

수박 과실썩음병 병원균(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)에 대한 식물유래 항균 활성물질 탐색*

노진택** · 최용화***

Search for Plant-originated Antibacterial Compounds Against Pathogen (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of Watermelon Bacterial Fruit Blotch

Noh, Jin-Taek · Choi, Yong-Hwa

133 Species of medicinal plants were used for the development of natural agrichemicals with anti-microbial activity against *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, a pathogen of bacterial fruit blotch in watermelon. The MeOH-extracts of these medicinal plants were examined for anti-microbial activity by bioassay. The MeOH-extract of *Citrus unshiu* Markovich had the strongest antibacterial activity against *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. To identify anti-microbial compounds from *Citrus unshiu* Markovich, solvent-fractionation was used. The fraction of hexane, which showing the highest value of anti-microbial activity, was analyzed by GC-MS. Each mass spectra, corresponding to each peak of chromatogram, was compared to mass database of Wiley library. As a result, d-Limonene, γ -terpinene, β -linalool, terpineol, palmitic acid, 9,12-octadecadienoic acid, Linolenic acid, and stigmaterol were identified. Among them, d-Limonene, γ -terpinene, β -linalool, and terpineol confirmed to be shown the anti-microbial activity by bioassay. Especially, d-Limonene and γ -terpinene found to have strong activity. In conclusion, we thought d-limonene and γ -terpinene from *Citrus unshiu* Markovich. *Latin*, had anti-microbial activity against *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and could be candidates for the control agents for the control of bacterial fruit blotch in watermelon.

Key words : *acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, bacterial fruit blotch, *citrus unshiu markovich*, *d-limonene*, γ -terpinene

* 이 논문은 2014학년도 경북대학교 학술연구비와 산업통상자원부 지역특화산업육성사업 기술개발 (과제번호 : A005900553)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

** 경북대학교 과학기술대학원 식물생명과학과

*** Corresponding author, 경북대학교 생태환경대학 생태환경시스템학부(ychoi@knu.ac.kr)

I. 서 론

박과 작물의 과실썩음병(Bacterial fruit blotch, BFB)은 1965년 미국 수박 재배지에서 처음 보고되었고(Sowel and Schaad, 1979), 1980년대와 1990년대 초반 미국에서 크게 번성해 피해를 주었으며(Hopkins et al., 1996; Latin and Rane, 1990; Somodi et al., 1991) 최근에는 오이나 호박 같은 박과 작물에 대한 피해도 늘어나고 있다는 보고가 있다(Isakeit et al., 1997; Langston et al., 1999; Martin et al., 1999). 일본 역시 1990대 말부터 피해가 늘어나고 있으며, 국내의 경우 수박에 발생한 과실썩음병은 1991년 전북 고창에서 처음 보고된 이후 간헐적으로 발생했고(Song et al., 1991), 2005년과 2006년, 2009년에 경남 하동지역의 수박포장과 육묘장에서 발생하여 피해를 주었으며, 최근 전남 광주와 나주지역에서 재배되는 멜론의 과실썩음병이 보고된 바 있다(Seo et al., 2006).

수박과 참외에서 주로 발생하는 과실썩음병은 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*에 의해 발생하며 과실에 발생이 많고, 육묘기부터 발생해 접목 후 확산된다(Hopkins et al., 1996; Hopkins and Schenck, 1971; Hpokins and Thompson, 2002; Lessl et al., 2007). 1차 전염은 병원성 세균이 종자나 포장에 남아있던 작물체의 잔유물(뿌리, 덩굴 등)에 잠복하다 다음해 발생 원인이 되는 경우이다(Lessl et al., 2007; Latin and Hpokins, 1995). 또한 접목할 때, 또는 관수할 때 주변의 건전한 묘에 전염이 되거나, 정식 후 적심 등의 재배관리 작업을 할 때 2차 전염의 우려가 있다. 30℃ 이상의 고온다습한 환경에서 발병이 증가한다(Latin and Hpokins, 1995; Rane and Latin, 1992).

수박과 참외에서 주로 발생하는 과실썩음병은 세균성 병으로 병 방제를 위해 동제나 항생제 계열의 농자재 활용이 가능하나 그 수가 적고 방제효과도 저조한 실정이다. 따라서 과실썩음병을 방제할 수 있는 환경친화적 방법이나 자재개발이 절실한 실정이다.

청피는 운향과의 귤나무(*Citrus unshiu* Markovich) 또는 동속 근연식물의 덜 익은 과피를 말하는데(Kubo et al., 1989), 과피의 정유 성분이 소화기 자극, 소화촉진, 항균작용 등을 하는 것으로 보고되었다(Matsuda et al., 1991; Kuroyanagi et al., 2008).

본 연구는 청피로부터 수박 과실썩음병에 항균활성을 보이는 천연물질을 분리하고 항균활성을 검정하여 친환경 자재로서의 개발 가능성을 모색하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 수박 과실썩음병 병원균인 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*는 전북대학

교 농생물과(Prof. 주호영)에서 분양받아 사용하였고, 균주표본은 경북대학교 과학기술대학원 식물자원학전공 천연물화학연구실에 보관 중이다. 식물재료는 약용식물 133종을 경동시장 및 약령시장 약재상에서 구매하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

용매분획에 사용된 MeOH, hexane, CHCl₃, EtOAc, 그리고 BuOH 등은 덕산약품공업(주) 회사의 extra pure grade의 용매가 사용되었다. 표준품 시약 d-limonene, γ -terpinene은 Fluka 제품을, β -linalool은 Aldrich 제품을, terpineol은 Sigma-Aldrich 제품을 사용하였다. Bioassay에 사용된 beef extract, yeast extract, peptone은 Bacto 제품, NaCl은 Samchun 제품, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ 등은 Duksan 제품을 사용하였다. UV/VIS Spectrophotometer는 Shimadzu 회사의 UV mini 1240을, Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)는 Agilent의 7890A기종을 사용하였고 Column은 HP-5MS capillary를 사용하였으며 Detector는 Agilent 5975C, Library는 Wiley (W9N08.L)를 사용하였다.

3. 실험 병원균의 배양조건

수박 과실썩음병원균의 배양 배지는 Beef extract (1 g), Yeast extract (2 g), Peptone (5 g), NaCl (5 g), KH₂PO₄ (0.45 g), Na₂HPO₄ (2.39 g), D.W. (1 L), pH (6.8) 조건으로 조성하고 120 °C로 15분간 가열하여 조제하였다. 병원균(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)은 incubator에서 30°C로 24시간 진탕 배양 후 사용하였다.

4. MeOH 용매추출

건조시킨 약용식물 133종의 시료를 blender를 이용하여 각각 잘게 분쇄하여 99.5% MeOH로 실온에서 24시간 침지하여 추출하였다. MeOH 침지와 추출 과정을 3회 반복하였다. 여과지(Toyo Rosh Kaisha Ltd, 300 mm × 100 circles, No 2, Japan)를 사용하여 고형물을 걸러내고 MeOH 추출물을 40°C에서 rotary evaporator로 감압농축 건조시켰다. 건조시킨 MeOH 추출물 일정량을 10,000 ppm의 농도로 MeOH에 녹여 bioassay를 하였다.

5. MeOH 추출 및 용매분획

건조시킨 청피 600 g을 1 L MeOH로 3회 반복 추출하여 농축 건조시켜 MeOH 추출물 (31.48 g)을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수 500 ml에 현탁시킨 후 hexane, CHCl₃, EtOAc,

BuOH을 500 ml씩 3회 순차적으로 용매분획하여, hexane fraction (3.43 g), CHCl₃ fraction (2.70 g), EtOAc fraction (3.27 g), BuOH fraction (5.15 g), aqueous fraction (16.93 g)을 얻었다.

6. Bioassay

먼저 *A. avenae* subsp. *citrulli* 균주를 배양배지에 접종하고 incubator에 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양세균 10 ml를 test tube에 넣은 후 50 ul의 시료를 tube에 첨가하여 30°C에서 24시간 shaking 배양하여 30분간 정치 후 600 nm UV/VIS Spectrophotometer에서 optical density (OD) 값을 측정하였다. 약용식물 133종의 MeOH 추출물과 청피 분획에 대한 생물검정은 1반복 실험결과이고 청피 Hexane fraction에서 검출된 화합물들에 대한 생물검정은 3반복 실험으로 결과를 도출하였다.

7. Hexane fraction의 항균 활성물질 분석

Hexane fraction의 주요 성분을 분석하기 위하여 GC-MS를 사용하였다. Flow rate는 0.9 ml/min (He)이고 측정 시 시료는 HPLC용 hexane에 희석하여 auto sampler를 사용하여 1 ul를 주입하였다. Oven의 온도는 60°C, 170°C, 220°C, 310°C로 Rate 10 (°C/min), Hold time은 각각 2 min이다. GC-MS에서 얻어진 spectrum들은 Wiley library Data base와 비교하였고 이를 통해 청피의 MeOH 추출물에 함유된 물질들을 구명하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

약용식물 133종의 MeOH 추출물에 대한 수박 과실썩음병원균에 대한 항균활성을 조사한 결과, 청피(*Citrus unshiu* Markovich)의 MeOH 추출물이 수박 과실썩음병에 대한 항균활성을 나타냈다. 청피로부터 항균 활성물질을 구명하기 위하여 청피의 MeOH 추출물을 용매분획하여 용매분획별 항균활성을 감정한 결과, hexane fraction에서 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 1).

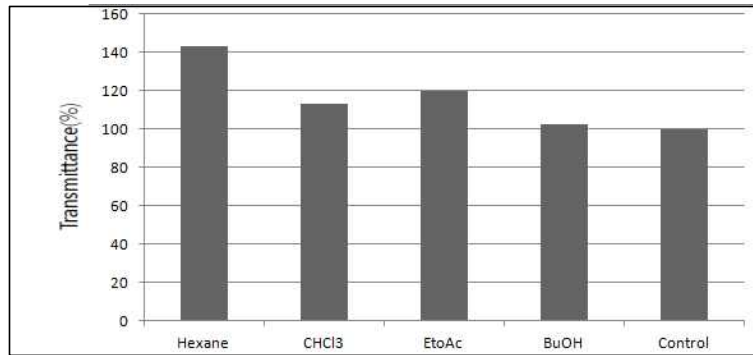


Fig. 1. Antibacterial activities of solvent fractions of *Citrus unshiu* Markovich extract against *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* measured by investigating the transmittance of cultural media with UV/VIS spectrophotometer.

수박 과실썩음병에 대한 항균활성이 강하게 나타난 hexane fraction을 GC-MS로 분석한 결과 GC chromatogram은 Fig. 2와 같았다.

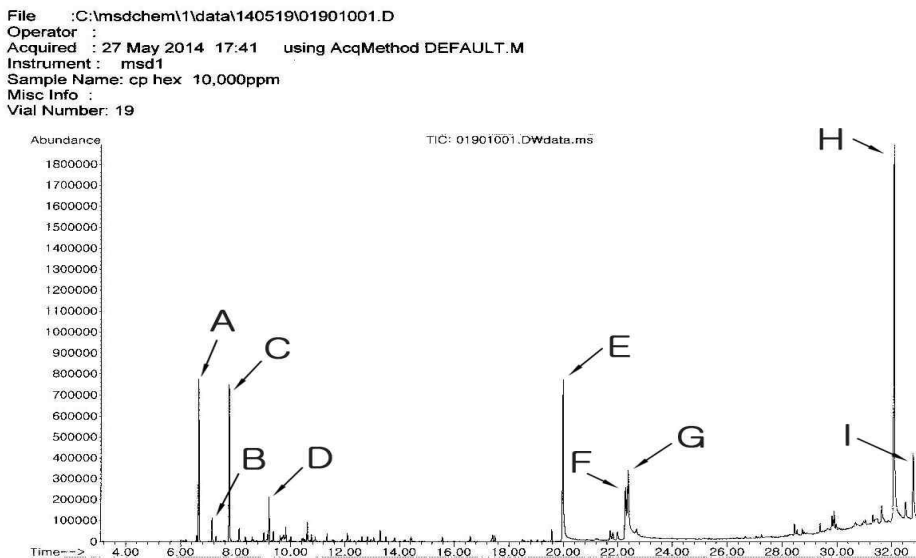


Fig. 2. GC chromatogram data of hexane fraction.

각각의 peak가 어떤 물질인지 구명하고자 Wiley library DB와 각각의 MS spectra를 비교하는 방식으로 profiling하여 구조를 확인하였다.

GC chromatogram에서 6.651 min에 나타난 peak (A)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 d-limonene으로 판명되었다(Fig. 3).

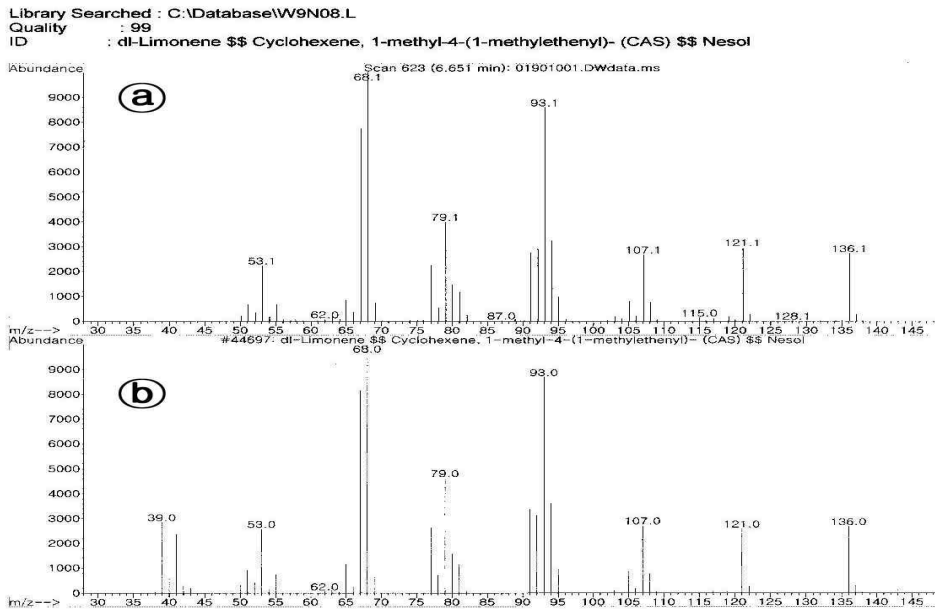


Fig. 3. Mass spectra of A (Ⓐ) in Fig. 2 and d-limonene (Ⓑ) in Wiley library.

7.132 min에 나타난 peak (B)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 γ -terpinene으로 판명되었다(Fig. 4).

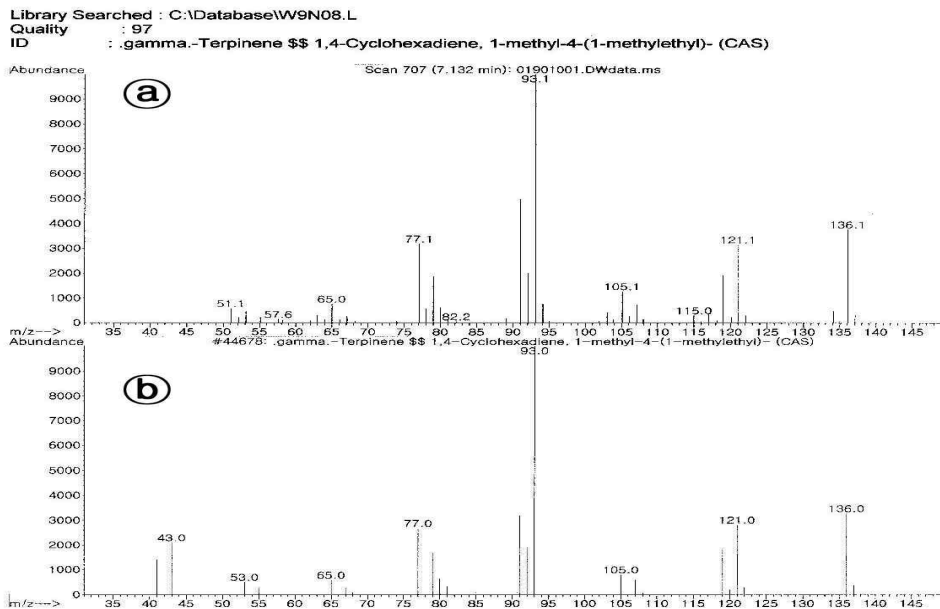


Fig. 4. Mass spectra of B (Ⓐ) in Fig. 2 and γ -terpinene (Ⓑ) in Wiley library.

7.750 min에 나타난 peak (C)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 β -linalool로 판명되었다(Fig. 5).

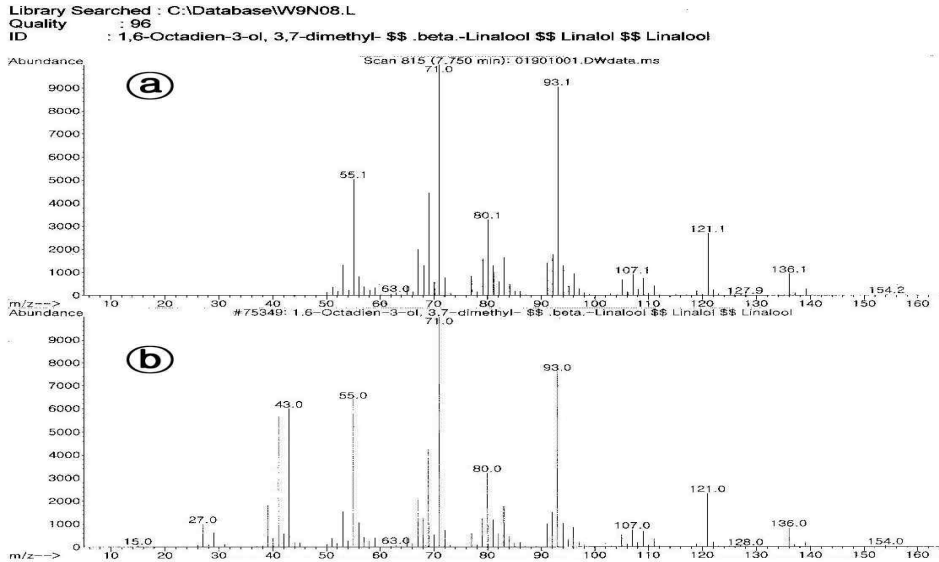


Fig. 5. Mass spectra of C (a) in Fig. 2 and β -linalool (b) in Wiley library.

9.215 min에 나타난 peak (D)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 terpineol로 판명되었다(Fig. 6).

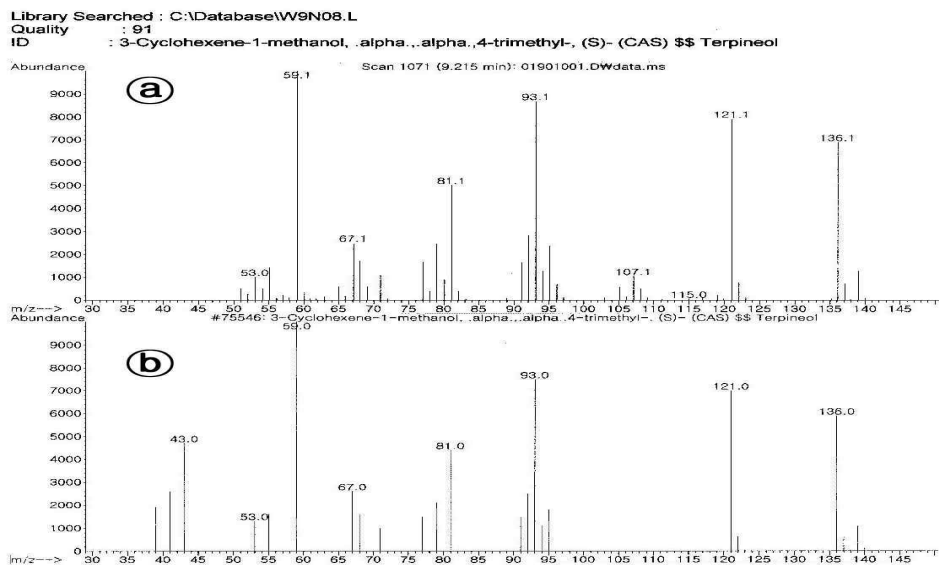


Fig. 6. Mass spectra of D (a) in Fig. 2 and terpineol (b) in Wiley library.

19.978 min에 나타난 peak (E)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 palmitic acid로 판명되었다(Fig. 7).

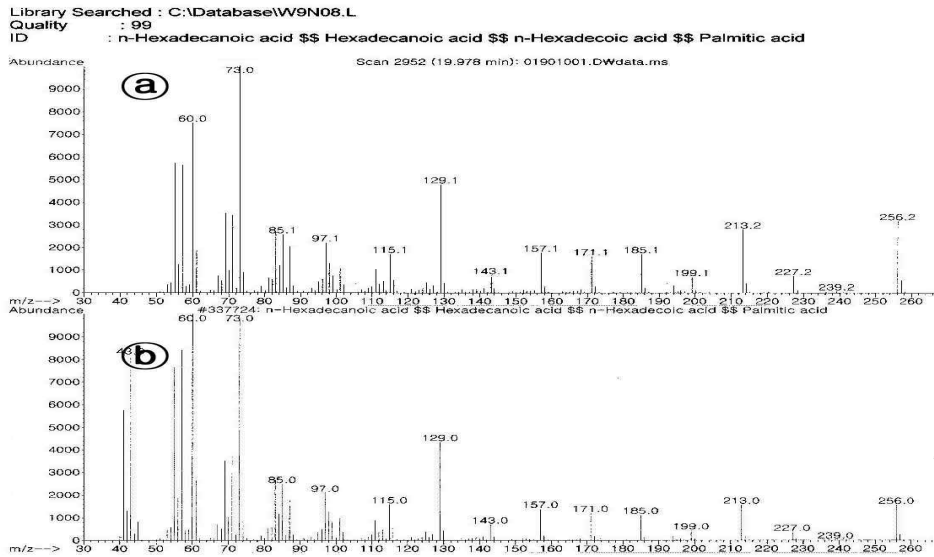


Fig. 7. Mass spectra of E (a) in Fig. 2 and palmitic acid (b) in Wiley library.

22.278 min에 나타난 peak (F)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 9,12-octadecadienoic acid로 판명되었다(Fig. 8).

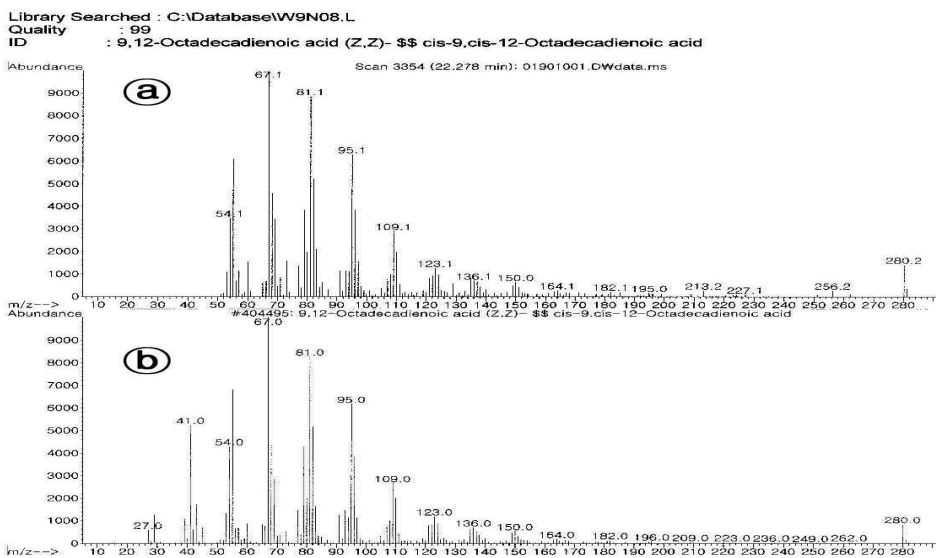


Fig. 8. Mass spectra of F (a) in Fig. 2 and 9,12-octadecadienoic acid (b) in Wiley library.

22.381 min에 나타난 peak (G)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 linolenic acid로 판명되었다(Fig. 9).

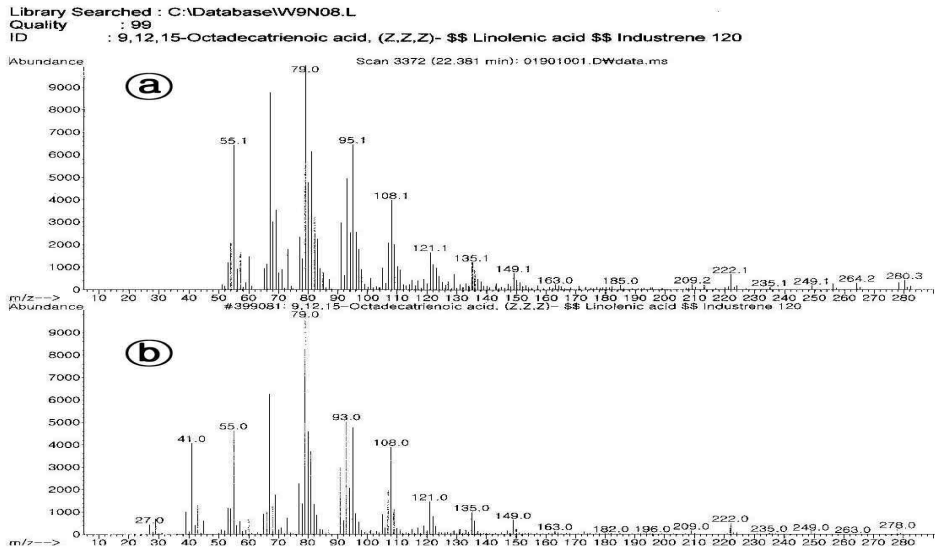


Fig. 9. Mass spectra of G (a) in Fig. 2 and linolenic acid (b) in Wiley library.

32.789 min에 나타난 peak (I)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 stigmasterol로 판명되었다(Fig. 10).

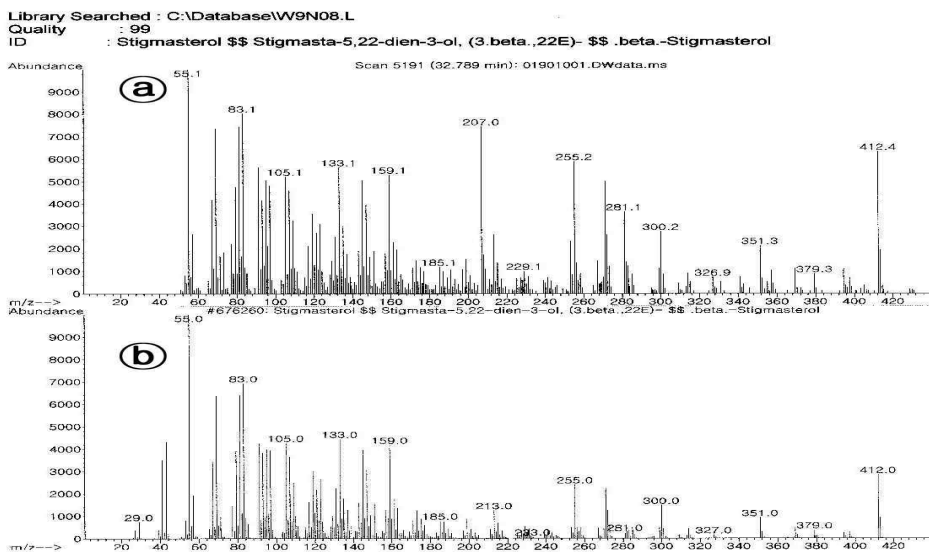


Fig. 10. Mass spectra of I (a) in Fig. 2 and stigmasterol (b) in Wiley library.

각각 추정된 화합물의 화학구조는 Fig. 11과 같다.

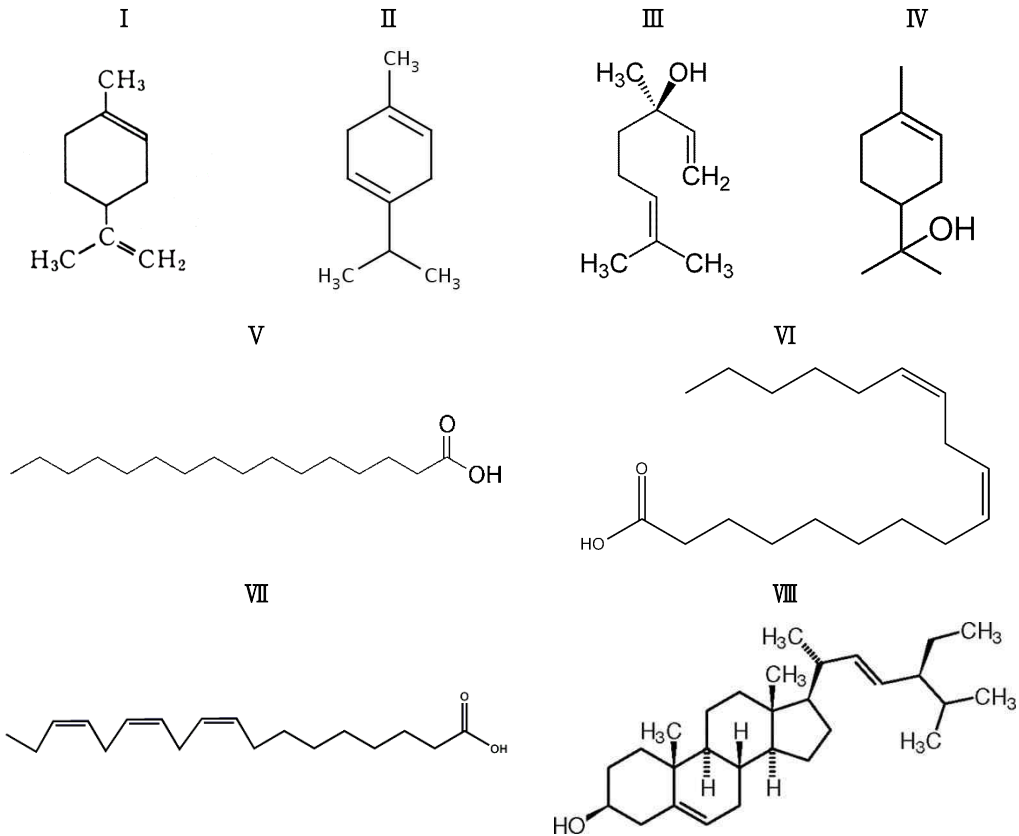


Fig. 11. Chemical structures of the compounds detected from hexane fraction of *Citrus unshiu* Markovich extract, I. d-limonene, II. γ -terpinene, III. β -linalool, IV. terpineol, V. palmitic acid, VI. 9,12-octadecadienoic acid, VII. linolenic acid, VIII. stigmasterol.

본 결과를 종합해 보면 6~10 min 사이에 나타난 peak들은 essential oil인 d-limonene, γ -terpinene, β -linalool, terpineol로 판명되었고, 19~23 min 사이에 나타난 peak는 palmitic acid, 9,12-octadecadienoic acid, linolenic acid 등 지방산으로 판명되었으며 32.789 min에서 steroid 화합물인 stigmasterol이 검출되었다. 그러나 32.086 min에서 나타난 peak (H)와 일치하는 화합물이 Wiley library database에서는 검출되지 않았다. 따라서 추후 이 화합물의 화학적 구명이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

이들 검출된 화합물 중 항균 활성물질로 추정되는 essential oil 성분인 d-limonene, γ -terpinene, β -linalool, terpineol의 항균활성을 검정하기 위하여 시판 표준품 d-limonene, γ -

terpinene, β -linalool, terpineol을 1,000 ppm으로 조제하여 동일한 방법으로 항균활성을 검정하였다. 생물검정 결과 d-limonene과 γ -terpinene에서 높은 항균활성을 보였다(Fig. 12). 따라서 본 연구에서 청피로부터 분리한 d-limonene과 γ -terpinene 화합물이 활성물질인 것으로 추정되었다. 항균력이 강한 청피 추출물 또는 d-limonene과 γ -terpinene을 주성분으로 하는 추출물을 수박 과실썩음병에 대한 친환경 방제용 자재로 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

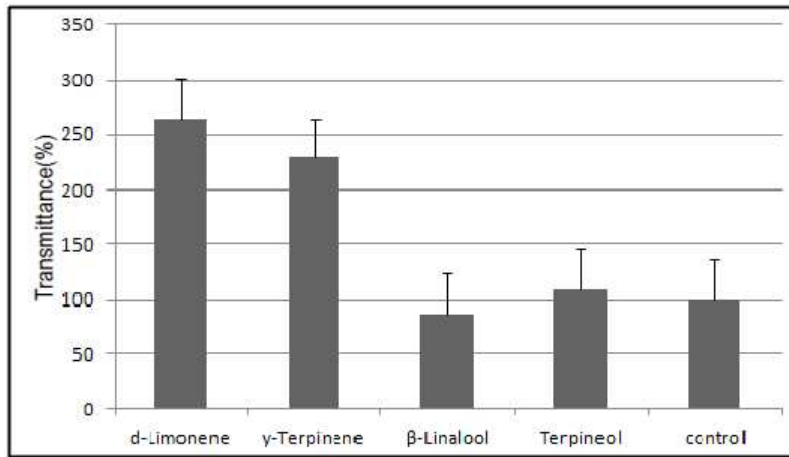


Fig. 12. Antibacterial activities of essential oils detected from hexane fraction of *Citrus unshiu* Markovich extract against *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* measured by investigating the transmittance of cultural media with UV/VIS spectrophotometer.

IV. 적 요

본 연구는 수박 과실썩음병의 원인균인 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 균에 대해서 항균활성을 갖는 친환경 유기농자재를 개발할 목적으로 약용식물 133종을 대상으로 진행되었다. 이들 133종 약용식물의 MeOH 추출물에 대한 bioassay를 통해 항균 활성을 검정한 결과 청피(*Citrus unshiu* Markovich) 추출물에서 강한 항균활성을 보였다. 청피(*Citrus unshiu* Markovich)로부터 항균활성물질을 구명하고자 용매분획을 하였고, 용매분획 중에서 hexane fraction이 가장 강한 활성을 나타내었다. Hexane fraction을 GC-MS로 분석하여 chromatogram 상의 각각의 peak에 해당하는 mass spectrum과 Wiley library를 비교하여 profiling 한 결과, essential oil인 d-limonene, γ -terpinene, β -linalool, terpineol과 지방산인 palmitic acid, 9,12-octadecadienoic acid, linolenic acid 그리고 steroid 화합물인 stigmasterol이 검출되었다. 이들 검출화합물 중에서 항균 활성물질로 추정되는 d-limonene, γ -terpinene, β -linalool,

terpineol의 항균 활성을 검정하기 위해 표준품을 사용하여 bioassay한 결과 두 화합물 d-limonene, γ -terpinene에서 높은 항균활성을 보였다. 따라서 본 연구를 통해 청피로부터 분리한 d-limonene과 γ -terpinene 화합물이 항균 활성물질인 것을 구명하였다. 항균력이 강한 청피 추출물 또는 d-limonene과 γ -terpinene을 주성분으로 하는 추출물을 수박 과실썩음병에 대한 친환경 방제용 자제로 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

[Submitted, December. 26, 2014 ; Revised, January. 13, 2015 ; Accepted, March. 16, 2015]

Reference

1. Hopkins, D. L., J. D. Cucuzza, and J. C. Watterson. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Dis.* 30: 529-532.
2. Hopkins, D. L. and N. C. Schenck. 1971. Bacterial leaf spot of watermelon caused by *Pseudomonas lachrymans*. *Phytopathol.* 62: 542-545.
3. Hopkins, D. L. and C. M. Thomson. 2002. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits. *HortSci.* 37: 924-926.
4. Isakeit, T, M. C. Black, L. W. Barnes, and J. B. Jones. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 81: 694.
5. Kubo, Z., M. Yano, and H. Matsuda. 1989. Pharmacological study on citrus fruits. I. Anti-allergic effect of fruit of *Citrus unshiu* Markovich. *Yakugaku Zasshi* 109: 835-842.
6. Kuroyanagi, M., H. Ishii, N. Kawahara, H. Sugimoto, H. Yamada, K. Okihara, and O. Shirota. 2008. Flavonoid glycosides and limonoids from Citrus molasses. *J. Nat. Med.* 62: 107-111.
7. Langston, D. B. Jr., R. D. Walcott, R. D. Gitaitis, and F. H. Sanders Jr. 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis.* 83: 199.
8. Latin, R. X. and D. L. Hopkins. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis.* 79: 761-765.
9. Latin, R. X. and K. K. Rane. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Dis.* 74: 331.
10. Lessl, J. T., A. Fessehaie, and R. R. Walcott. 2007. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and the relationship between blossom

- inoculum dosage and seed infestation. J. Phytopathol. 155: 114-121.
11. Martin, H. L., R. G. O'Brien, and D. V. Abbott. 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. Plant Dis. 83: 965.
 12. Matsuda, H., M. Yano, M. Kubo, M. Inuma, M. Oyama, and M. Mizuno. 1991. Pharmacological study on citrus fruit. II. Anti-allergic effect of fruit of *Citrus unshiu* Markovich. on flavonoid components. Yakugaku Zasshi 111: 193-198.
 13. Rane, K. K. and R. X. Latin. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon-association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76: 509-512.
 14. Seo, S. T., J. H. Park, J. S. Lee, K. S. Han, and S. R. Jung. 2006. Bacterial fruit blotch of melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Res. Plant Dis. 12: 185-188.
 15. Somodi, G. C., J. B. Jones, D. L. Hopkins, R. E. Stall, T. A. Kucharek, N. C. Hodge, and J. C. Watterson. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75: 1053-1056.
 16. Song, W. Y., H. M. Kim, I. Y. So, and Y. K. Kang. 1991. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*: The causal agent of bacterial fruit blotch rot on watermelon. Kor. J. Plant Pathol. 7: 177-182.
 17. Sowel, G. Jr. and N. Schaad. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: Seed transmission and resistance of plant introductions. Plant Dis. Rep. 63: 437-441.