

오배자(*Schlechtendalia chinensis*)로부터 수박 과실썩음병 병원균(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)에 대한 항균 활성물질 탐색*

김현우** · 최용화***

Isolation of Antimicrobial Active Substances from Chinese Gall Nut (*Schlechtendalia chinensis*) against Watermelon Fruit Rot Pathogens (*Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*)

Kim, Hyun-Woo · Choi, Yong-Hwa

This study was conducted to develop environment-friendly agricultural products with anti-microbial activity against *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of bacterial fruit blotch in cucurbit. *Schlechtendalia chinensis* was extracted by MeOH and solvent fraction. The hexane fraction, which showed highest value of anti-microbial activity, was analyzed by GC-MS. Each mass spectra, corresponding to each peak of chromatogram, was compared to MS database of Wiley library. As a result, myristic acid, palmitic acid and 3-*n*-pentadecylphenol were identified as main compounds showing antimicrobial activity against *A. avenae* subsp. *citrulli*. Bioassay using commercial myristic acid, palmitic acid and 3-*n*-pentadecylphenol to test for the anti-microbial activity conformed the anti-microbial activity of potential active compounds, and myristic acid and 3-*n*-pentadecylphenol showed strong activity. In conclusion, myristic acid and 3-*n*-pentadecylphenol identified from *S. chinensis* were anti-microbial chemicals.

Key words : *acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, bacterial fruit blotch,
3-*n*-pentadecylphenol, *Schlechtendalia chinensis*, watermelon

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

** 경북대학교 대학원 생태환경시스템학과

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

I. 서 론

박과 작물의 과실썩음병(Bacterial fruit blotch, BFB)을 일으키는 병원세균은 *A. avenae* subsp. *citrulli*로 전 세계적으로 분포하고 있으며 주로 수박에 큰 피해를 주고 있다. *A. avenae* subsp. *citrulli*는 1965년 미국 수박 재배지에서 처음 보고 되었고(Sowel and Schaad, 1979), 1980년대와 1990년대 초반 미국 전역의 수박 재배지에서 대량으로 발생되어 크게 문제가 되었던 식물 병원세균으로서 1988년 수박을 비롯하여 박과작물의 과일생산을 위협하고 있다(Hopkin et al., 1996; Latin and Rane, 1990; Somodi et al., 1991; Wall et al., 1990). 또한 1997년 이스라엘에서는 미국에서 수입한 가지과(Solanaceous) 종자(Assouline et al., 1997)와 멜론에서 보고되었으며(Isakeit et al., 1997), 박과 작물인 오이 및 호박에도 보고되었다(Langston et al., 1999; Matin et al., 1999). 일본에서는 식물 방역법 시행 규칙에 근거하여 이 병이 일본에 침입하지 못하도록 주의를 기울였다. 그러나, 수박에서 이 병이 1998년, 2001년, 2009년에 아키타현, 야마카타현, 돗토리현, 나가노현, 도쿠시마현 등에서 발생하였다. 국내에서는 1990년대에 *Pseudomonas*에 의한 세균성 병이 작물에서 보고된 이후 1991년 전북 고창에서 처음 보고되었고(song et al., 1991), 다른 작물에서의 발생 보고는 없었으나 2005년과 2006년, 2009년에 경남 하동지역의 수박포장과 육묘장에서 발생하여 큰 피해를 주었다. 또 전남 광주와 나주지역에서 재배되는 멜론의 과실썩음병이 보고된 바 있으며(seo et al., 2006), 최근 2010년, 2011년, 2012년 영주시에서 이 병주가 발견되었으며 피해가 급속도로 확산되었다.

박과 참외에서 주로 발생하는 과실썩음병을 일으키는 병원균은 *A. avenae* subsp. *citrulli*가 속한 *Acidovorax* 속 세균들은 *Pseudomonas* 속에 소속되어 있던 세균이었으나 1992년 Willems et al.에 의해 새롭게 분류된 속으로 병원성, 생화학적 특성, 16S rRNA 염기서열 분석 등에 의해 8종 3아종으로 분류되었다(Song et al., 2000). 과실썩음병은 과실에 발생이 많고, 육묘기부터 발생해 접목 후 확산된다(Hopkins et al., 1996; Hopkins and Schenck., 1971; Hopkins and Thompson, 2002; Lessl et al., 2007). 잎의 병변은 적갈색, 갈색 또는 자주색의 잎을 띄며, 주맥으로 퍼질 수 있다(Latin and Hopkins, 1995). 1차 전염은 병원성 세균이 종자나 재배포장에 남아있던 식물체의 잔유물(뿌리, 넝쿨, 잎 등)에 잠복하다 다음해의 발생 원인이 될 가능성이 있다(Lessl et al., 2007; Latin and Hpokins, 1995). 또한 2차 전염은 접목 또는 관수할 때 주변 건전한 묘에 전염되며 정식 후, 적심 등의 재배관리 작업에 의해 전염된다. 또한 30℃ 이상의 고온다습한 환경에서 발병이 증가하여 90-100%의 손실이 일어난다는 보고가 있다(Latin and Hpokins, 1995; Rane and Latin, 1992).

본 연구에서는 *A. avenae* subsp. *citrulli*에 항균활성을 갖는 친환경농자재를 개발할 목적으로 오배자로부터 항균활성을 탐색하였다. 오배자(*Schlechtendalia chinensis*)는 진딧물과(*Aphidae*)에 속하는 곤충에 의해 붉나무와 같은 율나무과(*Anacardiaceae*)에 형성된 충영으

로, 우리나라의 경우 붉나무(*Rhus javanica* L.)에 오배자면충이 기생하여 이루어진 경우가 많다. 전통 한약재로 사용되어 온 오배자는 최근의 일련의 연구에 의해 항산화, 항균, 정장 작용, 항암활성 등의 생리활성이 보고되고 있다(Jo et al., 2000). 오배자 추출물은 *Staphylococcus aureus* 병원균과 *Salmonella gallinarum* 병원균에 대해 높은 항균활성을 나타내었으며, 열에 대해서도 안정한 결과를 보였다는 보고(Choi et al., 2002)가 있으며, 병원성 녹농균인 *Pseudomonas aeruginosa*와 여드름 원인세균인 *Propionibacterium acnes*에 대해서도 항균활성은 나타내었다고 보고되었다(Cha et al., 2008).

본 연구는 오배자에 함유된 활성물질을 구명하여 추후 친환경 농자재 개발에 이용하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 수박 과실썩음병 병원균인 *A. avenae* subsp. *citrulli*는 전북대학교 농생물과(Prof. 주호영)에서 분양받아 경북대학교 과학기술대학원 식물자원학전공 천연물화학 연구실에 보관하면서 배양하여 사용하였고, 식물재료인 오배자는 경동시장 약제상에서 구매하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

용매분획과 silica gel column chromatography에 사용된 MeOH, hexane, CHCl₃, EtOAc, 그리고 BuOH 등은 덕산약품공업(주)회사의 extra pure grade의 용매가 사용되었다. 표준품 시약 myristic acid, palmitic acid은 Samchun 제품을, 3-*n*-pentadecylphenol은 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(*A. avenae* subsp. *citrulli*)은 incubator에서 30°C로 24시간 진탕 배양 후 사용하였다.

4. MeOH 용매추출

건조시킨 오배자의 시료를 blender를 이용하여 잘게 분쇄하여 99.5% methanol (MeOH)로 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.

5. 용매분획

건조시킨 오배자(12 kg)를 MeOH로 3회 반복 추출하여 농축 건조시켜 MeOH 추출물(372 g)을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수 500 ml에 현탁시킨 후 hexane, CHCl₃, EtOAc, BuOH을 500 ml씩 3회 순차적으로 용매분획하여, hexane fraction (6.6 g), CHCl₃ fraction (8.3 g), EtOAc fraction (314.5 g), BuOH fraction (13.6 g), aqueous fraction (29 g)을 얻었다.

6. Bioassay

A. avenae subsp. *citrulli* 균주를 배양배지에 접종하고 incubator에 30°C에서 12시간 배양하여 배양액을 생물검정에 사용하였다. 배양액 9,900 µl를 test tube에 넣은 후 10,000 ppm 시료 100 µl를 test tube에 첨가하여 생물검정 농도를 100 ppm으로 조정하였다. 30°C에서 24시간 shaking 배양하여 30분간 정치 후 600 nm UV/VIS Spectrophotometer에서 optical density (OD)값을 측정하였다.

7. Hexane fraction 분획의 정제

활성이 우수한 hexane 분획물의 활성물질을 탐색하기 위하여 Silica gel (Merck 7734, 500 g)을 glass column(50 mm × 860 mm)에 충전한 후 Hexane fraction (6.6 g)을 n-hexane에 용해시켜 column chromatography에 loading 하였다. n-hexane-chloroform(CHCl₃)의 용매계로 순차 용출(step-wise)시켜 얻은 127개의 활성분획을 silica gel TLC plate에 얇은 유리관을 이용해 spotting하고 hexane-chloroform (8:2)를 전개용매로 전개하였다. UV spectrum을 통해 TLC plate 상에서 UV 흡수 또는 발색 spot이 생기거나, 염색제 H₂SO₄을 분무하여 태웠을 때 발

색 spot 발생유무를 조사하였다. 이에 따라 총 6개의 그룹으로 활성분획으로 나누어 500 ml 라운드 플라스크에 옮기고 회전감압 농축기로 농축 건조시켰다. hexane fraction으로부터 각각 OBJ-H-S1 (760 mg), OBJ-H-S2 (80 mg), OBJ-H-S3 (230 mg), OBJ-H-S4 (410 mg), OBJ-H-S5 (240 mg), OBJ-H-S6 (4,270 mg) 6개의 subfraction을 얻었다.

8. Silica gel column chromatography에 의한 분획의 생물검정

Hexane 분획을 silica gel chromatography로 분리 정제하여 얻은 6개의 subfractions을 대상으로 수박 과실썩음병원균에 대한 항균활성을 검정하였다. 각각의 subfraction 시료 1 mg 당 1 ml의 MeOH를 첨가하여 1,000 ppm의 검정시료를 만들었다.

수박 과실썩음병원균을 대상으로 모든 처리는 각각의 test tube에 12시간 30°C로 진탕배양한 배양액 9,900 μ l씩 넣고, 각각의 검정시료를 100 μ l씩 접종하였다. 처리 후 30°C에서 24시간 shaking 배양한 다음 30분간 상온에서 정지 후 600 nm UV/VIS Spectrophotometer에서 optical density (OD)값을 측정하였으며, 한 개의 용기를 한 반복으로 5 반복으로 수행하였다.

9. Silica gel column chromatography 분획의 항균 활성물질 탐색

Silica gel column chromatography 분획의 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 μ l를 주입하였다. Oven의 온도는 80°C, 170°C, 310°C로 Rate 10 (°C/min), Hold time은 각각 2 min이다. GC-MS에서 얻어진 spectrum들은 Wiley library Data base와 비교하였고 이를 통해 silica gel column chromatography로 얻는 활성 subfraction에 함유된 물질들을 구명하였다.

III. 결과 및 고찰

수박 과실썩음병원균에 대한 오배자의 MeOH 추출물 용매분획에 대한 항균활성을 감정한 결과, hexane fraction에서 가장 강한 항균활성을 보였으며 다음으로 CHCl₃ fraction에서 강한 활성을 보였으나, EtOAc fraction, BuOH fraction, Aqueous fraction에서는 활성이 보이지 않았다(Fig. 1).

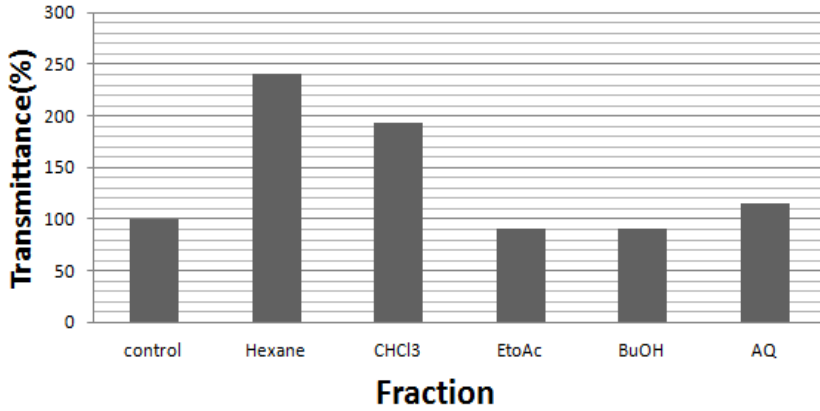


Fig. 1. Antibacterial activities of solvent fractions of *S. chinensis* extract against *A. avenae* subsp. *citrulli*.

따라서 활성이 가장 강하게 나타난 hexane fraction을 silica gel column chromatography로 분리 정제 하였다. 분획을 300 ml씩 받아서 127개의 분획을 얻은 후, 얻은 fractions를 TLC에 loading하여 TLC밴드 형태에 따라서 6개의 fraction으로 grouping 하여 subfractions를 각각 OBJ-H-S1, OBJ-H-S2, OBJ-H-S3, OBJ-H-S4, OBJ-H-S5, OBJ-H-S6라 하였다.

6개의 subfraction의 수박 과실썩음병원균에 대한 항균활성을 조사한 결과, OBJ-H-S6에서 가장 높은 억제율을 보였고, OBJ-H-S2에서 그 다음으로 높은 억제율을 나타내었다(Fig. 2).

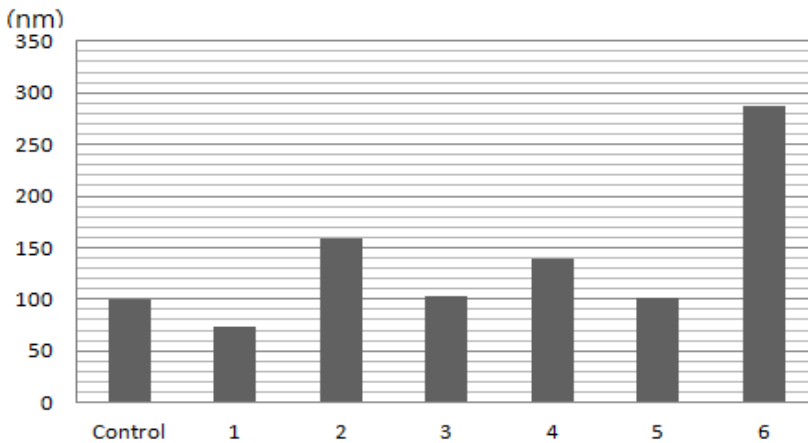


Fig. 2. Antibacterial activities of 6 subfractions against *A. avenae* subsp. *citrulli*.

수박 과실썩음병(BFB)에 대한 항균활성이 높게 나타난 OBJ-H-S2와 OBJ-H-S6을 GC-MS로 분석한 결과 GC chromatogram은 Fig. 3 및 Fig. 4와 같았다.

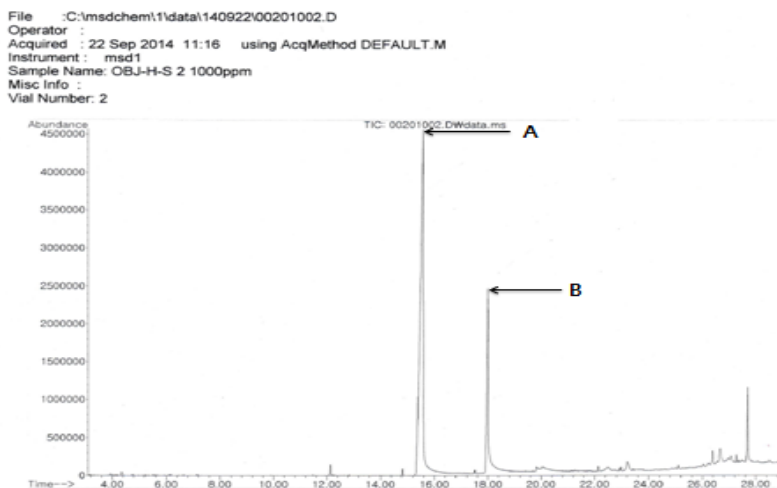


Fig. 3. GC Chromatogram data of OBJ-H-S2 fraction.

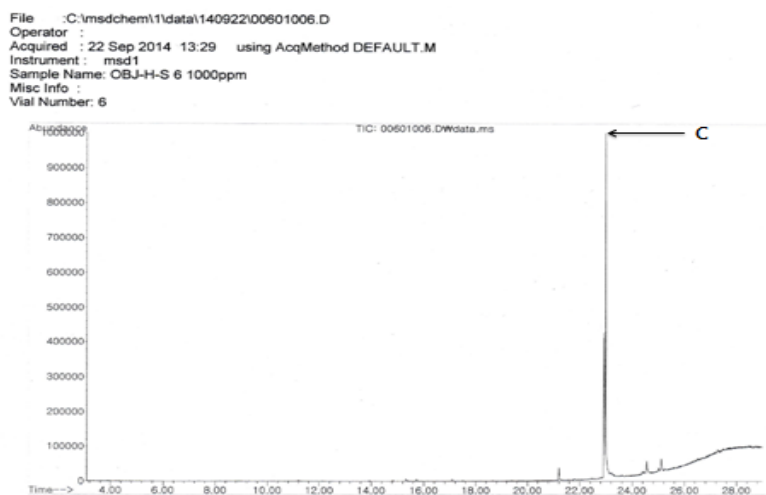


Fig. 4. GC Chromatogram data of OBJ-H-S6 fraction.

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

Subfraction OBJ-H-S2 subfraction의 GC Chromatogram에서 15.555min에 나타난 peak (A)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 myristic acid로 검출되었다 (Fig. 5).

Subfraction OBJ-H-S2의 GC Chromatogram에서 17.998 min에 나타난 peak (B)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 palmitic acid로 검출되었다(Fig. 6).

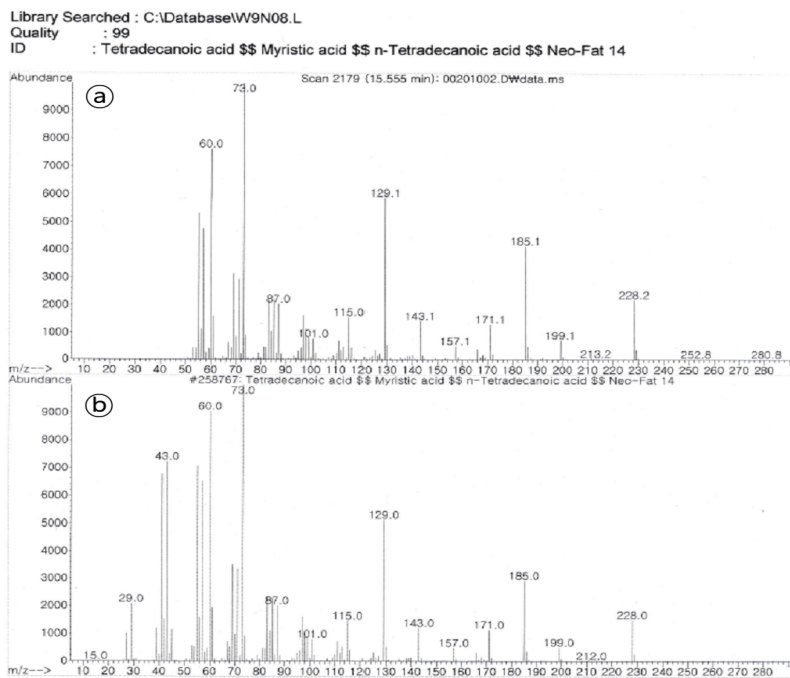


Fig. 5. Mass spectra of A peak (a) in Fig. 5 and myristic acid (b) in Wiley library.

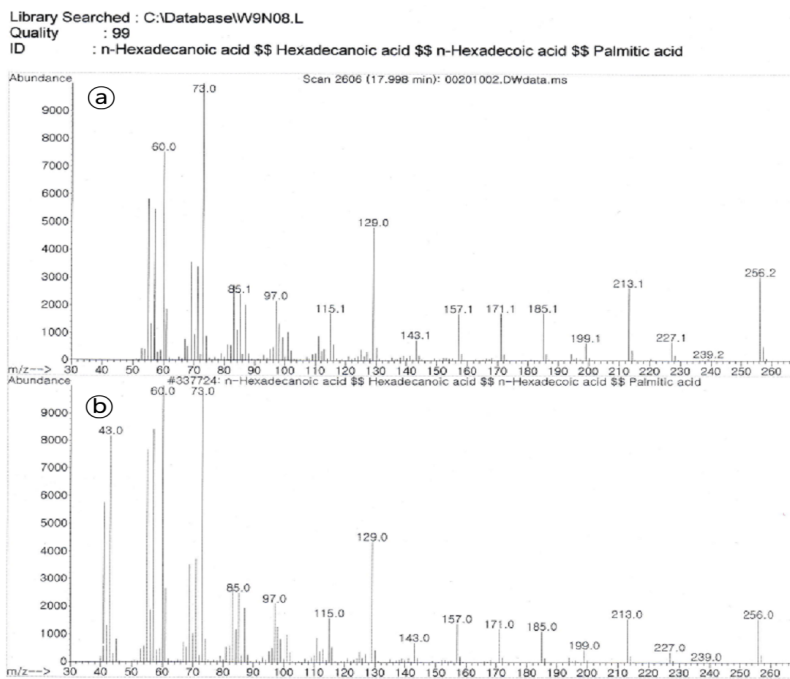


Fig. 6. Mass spectra of B peak (a) in Fig. 5 and palmitic acid (b) in Wiley library.

Subfraction OBJ-H-S6을 분석한 GC chromatogram에서 22.925 min에 나타난 peak (C)의 mass spectrum을 Wiley library DB의 spectrum과 비교분석한 결과 3-*n*-pentadecylphenol로 검출되었다(Fig. 7).

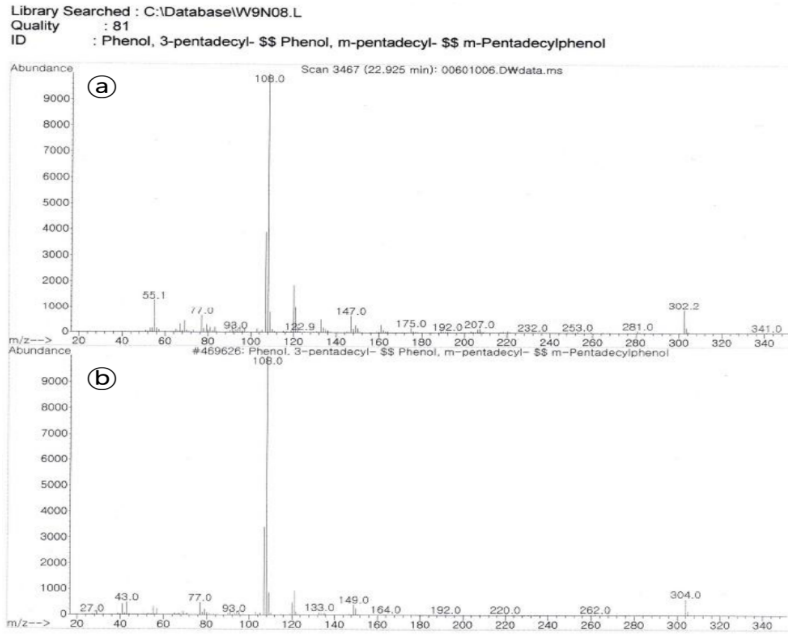


Fig. 7. Mass spectra of C peak (a) in Fig. 6 and 3-*n*-pentadecylphenol (b) in Wiley library.

따라서 subfraction OBJ-H-S2, OBJ-H-S6에서 주요 화합물의 화학구조는 Fig. 8과 같다.

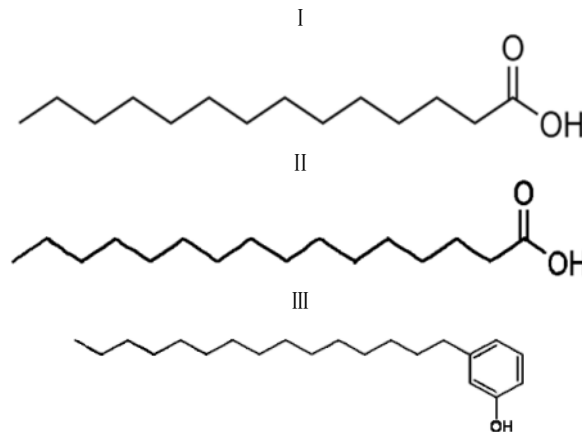


Fig. 8. Chemical structures detected from Hexane fraction of *S. chinensis* I. myristic acid, II. palmitic acid, III. 3-*n*-pentadecylphenol.

이들 검출된 화합물 myristic acid, palmitic acid, 3-*n*-pentadecylphenol의 항균활성을 검정하기 위하여 표준품 myristic acid, palmitic acid, 3-*n*-pentadecylphenol을 1,000 ppm으로 조제하여 동일한 방법으로 항균활성을 검정하였다. 생물검정 결과 myristic acid 화합물이 매우 강한 항균활성을 보였고 3-*n*-pentadecylphenol 화합물도 강한 활성을 보였으나 palmitic acid에서는 약한 활성을 보였다(Fig. 9). 따라서 본 연구에서 오배자로부터 분리한 myristic acid와 3-*n*-pentadecylphenol 화합물이 활성물질인 것으로 추정 되었으며, 항균력이 강한 오배자 추출물 또는 myristic acid와 3-*n*-pentadecylphenol 화합물을 주성분으로 하는 추출물을 수박 과실썩음병에 대한 친환경 방제용 자제로 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

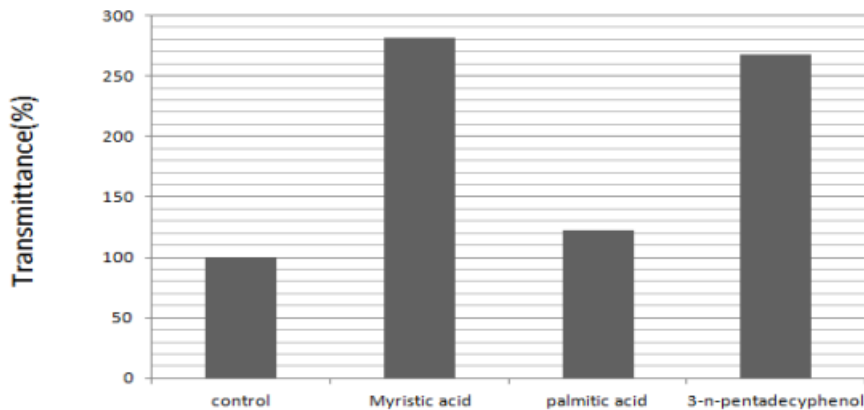


Fig. 9. Antibacterial activities of myristic acid, palmitic acid and 3-*n*-pentadecylphenol against *A. avenae* subsp. *citrulli*.

IV. 적 요

본 연구는 수박 과실썩음병의 원인균인 *A. avenae* subsp. *citrulli*에 대해 항균활성을 갖는 친환경 유기농자재를 개발할 목적으로 오배자(*S. chinensis*)를 대상으로 수행되었다. 오배자를 MeOH로 추출하여 용매분획을 하였고, 용매분획 중에서 가장 강한 활성을 나타낸 hexane fraction을 column chromatography로 분리하여 활성이 강한 분획들을 GC-MS로 분석하였다. GC chromatogram 상의 주요 peak에 해당하는 mass spectrum과 Wiley library를 비교하여 profiling한 결과, 지방산인 myristic acid, palmitic acid와 3-*n*-pentadecylphenol이 주요 물질로 검출되었다. 이들 검출 화합물의 항균활성을 검정하기 위하여 표준품을 사용하여 bioassay한 결과, myristic acid와 3-*n*-pentadecylphenol 화합물이 강한 활성을 보였다. 따라서 오배자로부터 분리한 myristic acid와 3-*n*-pentadecylphenol 화합물이 항균 활성물질인 것을 구명하였다.

[Submitted, April. 7, 2015; Revised, June. 11, 2015; Accepted, June. 11, 2015]

Reference

1. Assouline, I., H. Milshtein, M. Mizrahi, E. Levy, and I. S. Ben-Zeev. 1997. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Transmitted by Solanaceous seed. *Phytoparasitica*. 25: 2-3.
2. Cha, J. Y., S. E. Ha, S. M. Sim, J. K. Park, Y. O. Chung, H. J. Kim, and N. B. Park. 2008. Antimicrobial effects of ethanol extracts of Korea endemic herb plants. *J Life Sci*. 18: 228-233.
3. Choi, I., H. S. Chang, Y. M. Yun, and J. C. Um. 2002. Antimicrobial activity of medicinal herbs against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella gallinarum*. *Kor J Microbiol Biotechnol*. 30: 177-183.
4. 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.
5. Hopkins, D. L. and N. C. Schenck 1971 Bacterial leaf spot of watermelon caused by *Pseudomonas lachrymans*. *Phytopathol*. 62: 542-545.
6. Hopkins, D. L. and C. M. Thomson 2002 Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits. *HortSci*. 37: 924-926.
7. 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.
8. Jo, H. C., K. S. Han, and E. Y. An. 2000. Gall formation on different age, habitat, and parasite position in *Rhus javanica* L. *Kor J Med Crop Sci*. 8: 304-311.
9. Langston, D. B. Jr., R. D. Walcott, R. D. Gitaitis, and F. H. Sanders Jr. 1999 First report of a fruitrot pumpkin caused by *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis*. 83: 199.
10. Latin, R. X. and D. L. Hopkins 1995 Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis*. 79: 761-765.
11. Latin, R. X. and K. K. Rane 1990 Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Dis*. 74: 331.
12. 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.
13. 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.

14. Rane, K. K. and R. X. Latin 1992 Bacterial fruit blotch of watermelon-association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76: 509-512.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Song, W. Y., Kim, H. M., Kang, M. H. 2000. A new selective medium for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in rice seeds. *Plarhol. J.* 16: 236-241.
19. 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.
20. Wall, G. C., V. M. Santos, F. J. Cruz, D. A. Nelson, and I. Cabrera. 1990. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Mariana islands. *Plant Dis.* 74: 80.