농약과학회지 제11권 제2호 (2007)
The Korean Journal of Pesticide Science
Vol. 11, No. 2. pp.82~86

연구보문/개발

포도나무 (*Vitis vinifero* L.) 지상부로부터 분리한 항진균성 활성물질의 특성규명

임태헌 · 권순열[1] · 최용화[2]*
(주) 삼호유비 농생명과학연구소, [1]상주대학교 지역혁신센터, [2]상주대학교 식물자원학과
(2007년 5월 15일 접수, 2007년 6월 8일 수리)

Characterization of an Antifungal Substance Isolated from Aerial Parts of *Vitis vinifero* L.

Tae Heon Lim, Kwon Soon Youl [1] and Yong-Hwa Choi[2*] (*Research Institute of Agri-Bio Science, SamHoUB Co, Sangju 742-130, Korea, [1]Regional Innovation Center, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea, [2]Dept. of Plant Resources, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea*)

Abstract : Methanol extract obtained from aerial parts of *Vitis vinifero* L. was successively fractionated with *n*-hexane, ethylacetate, *n*-butanol, and water. From ethylacetate fraction, an active compound was isolated through silica gel column chromatography and recrystallization, and was identified as Lup-20(29)-ene-3,28-diol on the basis of EI-MS data. The compound, at 100 mg mL^{-1} , inhibited the mycelial growth of *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum acutatum* by 52.1% and 40.8%, respectively.

Key words : Betulin, *Phytophthora infestans*, antifungal activity, *Phytophthora capsici, Colletotrichum acutatum*

서 론

고추는 국내 재배되는 채소면적의 20%이상을 차지하는 주요 경제작물 중 하나이다. 고추 재배에 있어 발생하는 주요 병은 *Phytophthora capsici*와 *Colletotrichum* spp.에 의한 역병과 탄저병을 들 수 있다. 역병에 의한 생산 손실정도는 연 평균 5%정도로 추정되고 있으며 이의 방제는 주로 유기합성 농약에 의존하고 있다(Jee 등, 2000).

유기합성 농약은 현대 농업에 있어 농산품의 품질 유지와 적정 수확량 확보에 필수적인 투입 요인이나 환경오염, 저항성 출현에 의한 약효 저하 현상, 인축 독성 등의 지속적이고 광범위한 사용으로 인한 문제를 초래해 왔다(Ames, 1979; Lim 등, 1998; Staub와 Sozzi, 1984).

이러한 유기합성 농약의 문제점을 해결하기 위하여 저항성 품종 개발, 경종적 방제, 생물적 방제 및 천연물 농약 개발 등에 관한 연구가 지속되고 있다(Baker 등, 1983; Becker, 1993; Lange 등, 1993; Porter와 Fox, 1993; Rim 등, 2000). 특히 농약 개발에 있어서 곰팡이, 세균, 방선균 및 식물 유래의 천연 생리활성 물질은 자체뿐만 아니라 선도물질로서 이용 가치가 높다(Lee 등 1998; Porter와 Fox, 1993; Ryu 등 2001).

본 연구에서는 포도재배 과정에서 발생하는 부산물인 하계전정 가지와 잎으로부터 항진균성 활성물질을 구명하기 위하여 지상부를 methanol(MeOH)로 추출하여 용매분획과 chromatography로 분리, 정제하여 활성화합물을 얻었다.

이 화합물에 대하여 MS 분석 기법을 이용하여 화학적 구조를 결정하였고 고추역병, 탄저병 및 잔디라이족토니아 마름병균의 균사생육 억제효과를 검토하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용된 포도나무 (품종 : 캠벨) 잎과 어린가지는 2006년 7월과 8월 사이 경북 상주시 모서와 모동면 일원의 과원으로부터 채집하였으며 -40°C 초저온 냉동고에 보관하며 실험에 사용하였다.

* 연락저자 : Tel: +82-54-530-5201 , Fax: +82-53-530-5201,
E-mail: yhchoi@sangju.ac.kr

기기분석

GC는 Agilent 6890N을 사용하였으며, EI/MS는 agilent 5973N mass selective detector를 사용하였다. Agilent AMDIS software의 NIST library 자료와 비교하여 동정하였다.

Column은 DB-5MS(5% phenyl 95% dimethyl arylene siloxane 30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm)를 사용하였고, Inlet 온도는 330°C, oven 온도는 120°C에서 5분간 머무른 후, 10°C min^{-1}으로 280°C 후 10분간 머무른 후, 10°C min^{-1}으로 300°C 후 10분간 진행하였으며, 유량은 0.9 mL min^{-1}(He 99.99995%)이고, MSD transfer line heater는 280°C 10분간 후, 10°C min^{-1}으로 300°C로 하였다.

추출 및 분획

음지실온에서 건조시킨 건엽과 어린가지 1.5 kg을 99.6% methanol (MeOH) 10 L로 3회 반복 추출하여 MeOH 추출물 98.03 g를 얻었다. MeOH 추출물을 증류수(1,000 mL)에 현탁시켜 *n*-hexane(1,000 mL), ethyl acetate(EtOAc, 1,000 mL), *n*-butanol(BuOH, 1,000 mL)을 사용하여 각각 3회씩 순차적으로 용매 분획하였다.

항진균 활성물질의 분리

Column chromatography의 분획을 고추 역병과 탄저병균에 대하여 *in vitro*에서 균사의 생육억제 활성실험을 실시하여 활성물질의 분리·정제를 위한 지표로 삼았다. MeOH 추출물을 용매 분획하여 고추 역병과 탄저병균의 균사생육 억제효과를 분석한 결과, EtOAc fraction(fr.)에서 강한 활성을 나타내었다. EtOAc fr. (19.39 g)을 silica gel(Merck 7734, 800 g) column의 상단에 주입한 후 Hexane-MeOH의 용매계(27%, 45% MeOH in Hexane)로 순차용출(step-wise) 시켜 10개의 분획 (F1~F10)을 얻었다. 이중 F3~F4에서 고추 역병 및 탄저병균의 균사억제 활성을 보였다. F3~F4를 MeOH로 녹여 상온방치로 재결정 하여 순수 화합물 Compound 1(182 mg)을 얻었다(그림 1).

in vitro 균사생장 억제 실험

검정 배지는 감자한천배지를 이용하였으며 배지 내 최종 검정농도는 100 μg mL^{-1}로 조절하여 측정하였다.

최종 분리된 물질의 항진균 활성은 배지 내 최종농도가 0.01, 0.1, 1, 5, 50 및 100 μg mL^{-1}조절한 검정용 배지를 이용하였다. 각각의 병원균은 동일배지에서 5일간 전배양하여 이용하였으며, 균총의 가장자리로부터 직경 5 mm의 agar 절편을 취하여 검정 배지의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 고추 역병균과 잔디라이족토니아마름병균 25°C와 탄저병균 27°C에서 5일간 배양 후 대조구 대비 균총의 길이를 측정하여 균사생육 억제효과를 검정하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 포도재배 과정에서 발생하는 잎과 어린가지로부터 생리활성 물질을 분리하여 활용 방안을

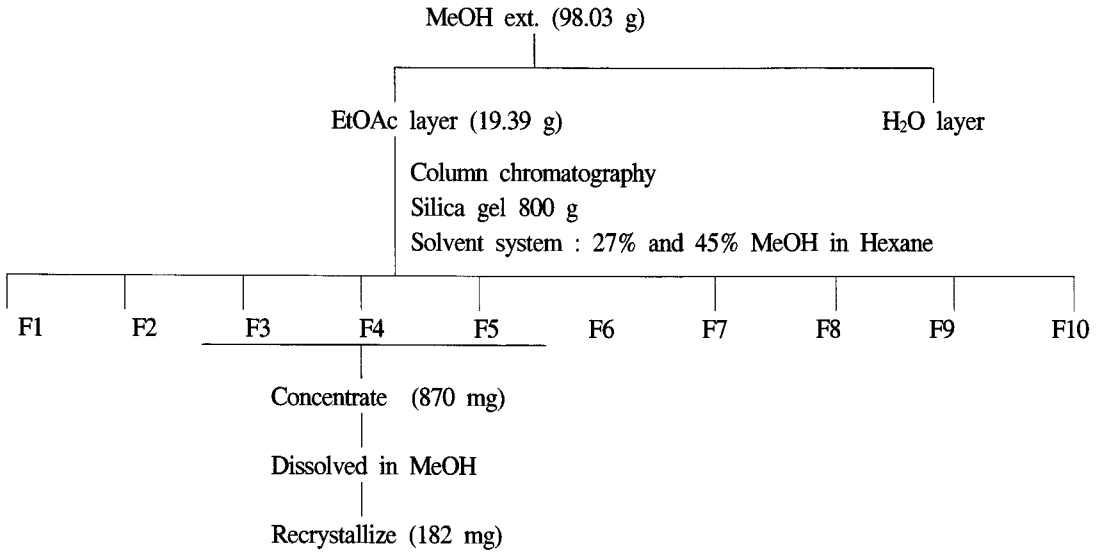

Fig. 1. Schematic procedure for isolation and purification of compound 1 from aerial parts of *Vitis vinifero* L. (CV. Cambell).

제시하고자 MeOH 추출물을 대상으로 항진균 활성검정을 실시하였다. 포도나무 잎과 어린가지를 포함한 지상부의 MeOH 추출물을 증류수 1,000 mL에 현탁시켜 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 용매로 용매 분획하여 각 분획을 대상으로 *in vitro* test에 의한 고추역병과 탄저병균의 균사생육 억제효과를 조사하였다. 그 결과 EtOAc 분획에서 강한 활성을 나타냈다. *in vitro* 균사생장 억제 실험의 결과를 지표로 하여 EtOAc 분획으로부터 시리카겔 크로마토그래피와 MeOH 재결정 과정으로 활성물질로 compound **1**을 분리·정제하였다(그림. 1).

Compound **1**은 침상결정으로 EI-MS 분석결과, 주요

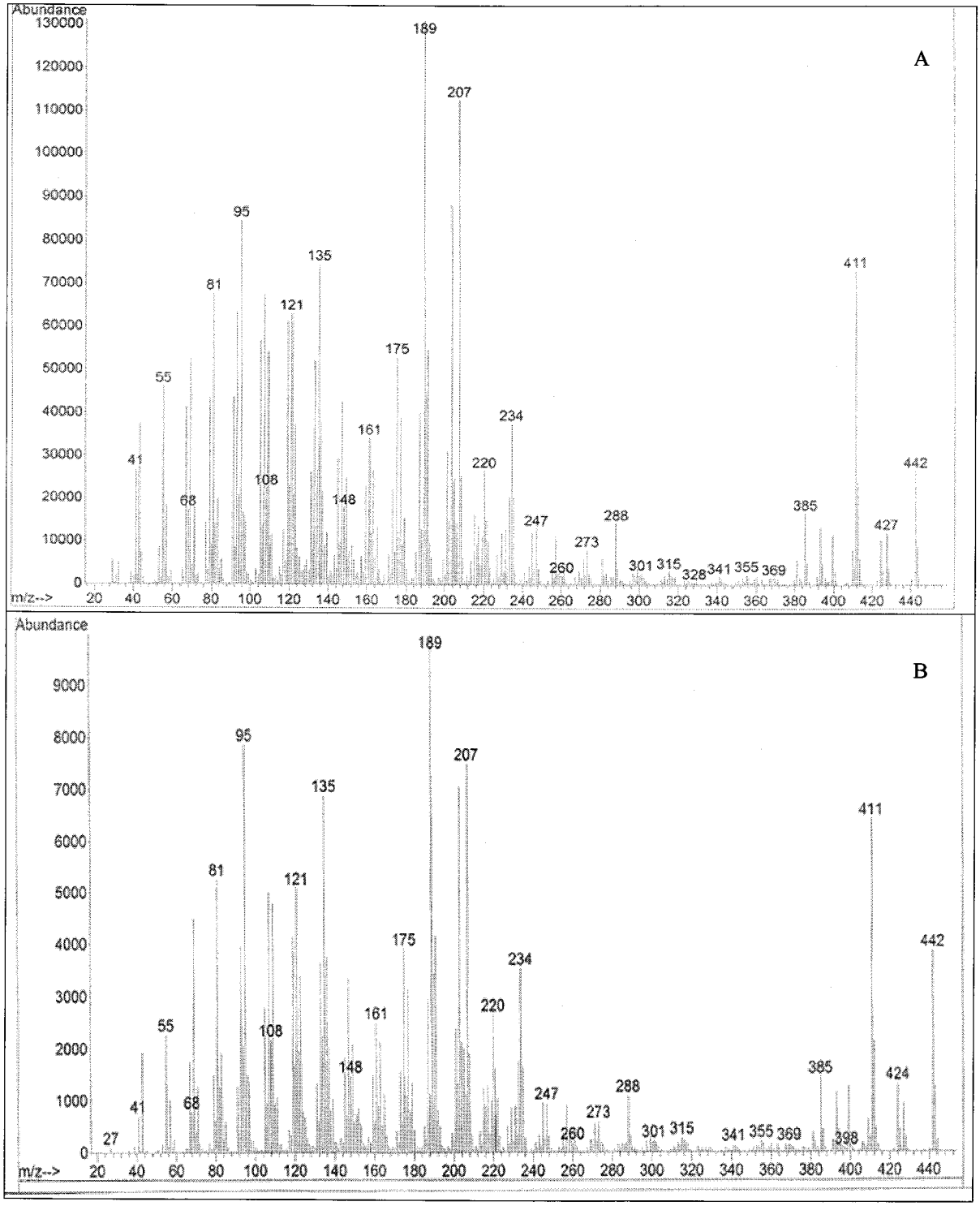

Fig. 2. Electron impact mass spectra of compound 1 isolated from aerial parts of *Vitis vinifero* (A) and of betulin in a NIST library (B).

fragment ions가 *m/z* 442 (M^+, 442%), 411 (20%), 234 (28%), 207 (86%), 115 (100%) 등에서 나타났다. 이들 fragmentation patten을 NIST library와 비교한 결과 Lup-20(29)-ene-3,28-diol (betulin)와 일치하였다(그림. 2). 따라서 포도나무에서 분리한 항진균성 활성물질인 Compound **1**의 구조는 betulin으로 결정하였다(그림. 3).

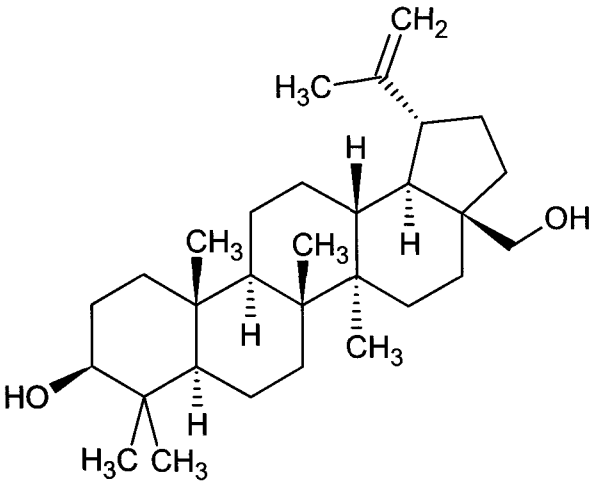

Fig. 3. Chemical structure of compound **1** isolated from aerial parts of *Vitis vinifero.*

Nall (2006)등은 *Eucela natalensis*의 뿌리 표피에서 분리한 다양한 triterpenoids 물질의 항진균 활성을 조사한 결과, betulin의 *Aapergillus niger* 및 *Cladosporium cladosporioides*에 대하여 100 μg mL^{-1}농도에서 40%내외의 균사 생육억제 효과가 있을 보고하였다. Betania (2003) 등은 *Coccoloba acrostichoides*로부터 분리한 betulin의 *Fusarium oxysporum*에 대한 항균활성을 보고하였다.

Lall(2006)등은 *Eucela natalensis*의 뿌리표면으로부터 분리한 betulin의 역병균(*Phytophthora* spp.)에 대한 항균활성이 없는 것으로 보고하였으나, 본 연구를 통하여 포도 잎에서 분리된 betulin의 경우 50 μg mL^{-1} 농도에서 36.4%정도의 억제효과를 보였다. Betulin과 동일계열 물질인 β-sitosterol의 항균활성이 분리원에 따라 다른 것으로 보고하였다(Kiprono 등, 2000; Tang 등, 2000). 본 연구를 조사된 betulin의 기존 보고와 다른 항균활성은 본 시험에 공시한 균주의 감수성과 생물 검정법의 차이로 생각된다. 또한 고추 탄저병에 대한 균사생육 억제효과는 동일농도에서 29%로 나타났다(그림 4). 그러나 동일농도에서 잔디 라이족토니아 마름병균의 균사생육 억제 효과는 나타나지 않았다(그림 4). Kiprono (2000) 등은 *Senecio lyratus*으로부

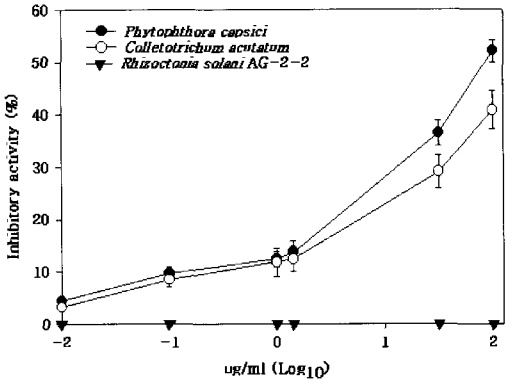

Fig. 4. Growth inhibitory activity compound **1** against *Phytophthora capsici, Colletotrichum acutatum,* and *Rhizoctonia solani* AG-2-2.

터 분리한 betulin과 동일계열 물질인 β-sitosterol는 50 mg mL^{-1} 농도에서 *Fusarium molniliforme*의 포자 발아관 신장을 82% 억제함을 보고하였다. 앞으로 분리된 betulin의 역병과 탄저병균의 포자형성 및 발아 등의 다양한 생활사에 미치는 영향과 성체를 이용한 실험이 필요 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 상주대학교 학술연구지원금에 의해 연구되었음.

인용문헌

Ames, B. N (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204:587-593.

Baker, C. J., J. R. Stavely, C. A. Thomas, M. Sasser and J. S. MacFall (1983) Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. Phytopathology. 73:1148~1152.

Becker, J. O (1993) Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: Status and outlook. Pesticide Sci. 37:355~363.

Betania, B. C., A. B de Oliveira, J. D de Souza-Filho and F. C. Braga (2003) Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides.* Fitoterapia. 74:729~731.

Jee, H-J., W-D. Cho and C-H Kim (2000). Ecology of Phytophthora disease. pp.32~38. In Phytophthora

diseases in Korea (ed. RDA). Korea.

Kim, Y. I., S.-H. Lee and T. S. Cho (1996) Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z. Kor. J. Pharmacogn. 27(3):238~245.

Kiprono, P. C., F. Kaberia, J. M. Keriko, J. N. Karanja (2000) The in vivo antifungal and anti-bacterial activities of β-sitosterol from Senecio lyratus (Asterraceae). Zeitschrift fur Naturforsch 55:485~488.

Lall, N., O. Weiganand, A. A. Hussein, J. J. M. Meyer (2006) Antifungal activity of naphthoquinones and triterpenes isolated from the root bark of *Euclea natalensis*. South Africa Journal of Botany 72:579~583.

Lange, L., J. Breinhilt, F. W. Rasmussen, and R. I. Nielsen (1993) Microbial fungicides-The natural choice. Pesticide Sci. 39:155~160.

Lee, J. H., Y. S. Kwon and C. M. Kim (1998) Flavonoids from the stem bark of *Platycarya strobilacea*. *Kor. J. Pharmacogn.* 29(4):353~356.

Lim, T. H., T. H. Chang and B. J. Cha (1998). Incidence of benzimidazole- and dicarboximide-resistant isolates of Monilinia fructicola from overwintering mummies and peduncles on peach trees. Korean. J. Plant Pathol. 14:367~370.

Porter, N. and F. M. Fox (1993) Diversity of microbial products-discovery and application. Pesticide Sci. 39:161~168.

Rim, Y. S., Y. M. Park, M. S. Park, K. Y. Kim, M. J. Kim and Y. H. Choi (2000) Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. Korean J. Med. Crop Sci. 8(4):342~350.

Ryu, S. Y., J. C. Kim, Y. S. Kim, H. T. Kim, S. K. Kim, K. J. Choi, J. S. Kim, S.-W. Lee, J. H. Heo and K.Y. Cho (2001) Antifungal activities of coumarins isolated from *Angelica gigas* and *Angelica dahurica* against plant pathogenic fungi. *Kor. J. Pestc. Sci.* 5(3):26~35.

Staub, T. and D. Sozzi (1984) Fungicide resistance: A continuing challenge. Plant Dis. 68:1026~1031.

Tang, H. Q, J. Hu, L. Yang and R. X. Tan (2000) Terpenoids and flavinoids from Artemisia species. Planta Medica. 66:391~393.

포도나무 (*Vitis vinifero* L.) 지상부로부터 분리한 항진균성 활성물질의 특성규명

임태헌 · 권순열[1] · 최용화[2*]

(주) 삼호유비 농생명과학연구소, [1]상주대학교 지역혁신센터, [2]상주대학교 식물자원학과

요약 : 포도나무 잎의 메탄올 추출물을 *n*-hexane, ethylacetate, *n*-butanol, H_2O으로 순차적으로 용매분획 하였다. Ethylacetate 분획으로부터 silica gel chromatography와 재결정하여 활성물질을 분리·정제하였다. 이 화합물의 화학구조를 EI-MS의 조각 데이터를 근거로 분석한 결과 betulin으로 구조결정 되었다. 이 화합물이 고추 역병균(*Phytophthora capsici*), 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)에 대한 항균활성(in vitro)을 측정한 결과, 100 μg mL^{-1}에서 각각 52.1%, 40.8%의 균사생육 억제효과를 보였으나, 잔디 마름병(*Rhizoctonia solani*) 균의 균사생육 억제 효과는 나타나지 않았다.

색인어 : betulin, 포도나무, 항진균성 물질, 고추역병, 탄저병