

식물성 항균소재 처리가 *Botrytis cinerea*의 생리기능에 미치는 저해효과

조성환[†] · 김철환¹ · 박우포²

경상대학교 식품공학과 및 농업생명과학연구원,
¹경상대학교 임산공학과, ²마산대학 식품과학부

Inhibitory Effect of Grapefruit Seed Extract Mixture on the Physiological Function of *Botrytis cinerea*

Sung-Hwan Cho[†], Chul-Hwan Kim¹ and Woo-Po Park²

Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

¹Department of Forest Products, Gyeongsang National University, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Division of Food Science, Masan College, Masan 630-729, Korea

Abstract

Botanical antimicrobial agent-grapefruit seed extract mixture (BAAG) have an unknown compounds which exhibit the antibiotic activities against microorganisms including bacteria and fungi. We have examined the effects of BAAG on the physiological function of *Botrytis cinerea* which was isolated from necrotic lesions of decayed fruits and vegetables such as cucumbers, grapes, tomatoes, and red peppers during storage. In the results of enzymatic activities related to the energetic metabolism there was no inhibitory effect of BAAG on the activities of several enzymes in vitro including glucose 6-phosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase, while there was inhibitory effect of BAAG on the activities of hexokinase and succinate dehydrogenase. O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG), the artificial substrate of β-galactosidase was hydrolyzed in the presence of BAAG, indicating that the membrane was perturbed by the BAAG. From the results we suggested that the antibiotic activity of BAAG is due to the change of membrane permeability of the cell. BAAG was fractionated and purified by silica gel and sephadex column chromatography. Among active fractions two peaks were identified as naringin and limonin when they were analyzed by NMR and Fast atomic bombardment.

Key words : botanical antimicrobial agent-grapefruit seed extract mixture, energetic metabolism, β-galactosidase, fast atomic bombardment

서론

수확한 과채류는 호흡작용, 증산작용 등의 생리작용이 활발해질 뿐만 아니라 곰팡이를 비롯한 식물병리 미생물의 오염 및 성장으로 부패가 일어난다. 또한 과채류의 품질을 결정하는 지표가 될 수 있는 정도가 저하되며, 수분, 비타민, 유기산, 당분, 색소함량 등이 떨어져서 가격을 제대로 받을 수가 없게 된다. 과채류의 소비와 생산량이 늘어가고 있는

상황에서 매년 수확기에 홍수 출하로 인하여 가격을 제대로 받지 못하고 있는 실정이다. 소비자들은 고품질의 과채류를 요구하므로 적절한 선도를 유지해야 높은 가격을 받을 수 있다. 영세 농가가 안고 있는 이러한 문제점을 조금이라도 해결하기 위해서는 상온에서도 어느 정도의 선도 유지 성능을 갖는 저장 및 유통용 포장 소재의 개발이 무엇보다 필요하다. 이러한 포장 소재는 수확후 과채류의 저장 및 유통기간 동안 변패 미생물의 발생을 억제하고, 호흡 작용을 통하여 방출하는 숙성 호르몬인 에틸렌가스 및 산소를 흡수 제거하며, 과채류의 수분 손실을 최소화할 수 있어야 한다. 따라서 수확한 과채류의 품질과 부가가치를 향상시키는 하나의 수단으로서 저장성 향상 및 선도 유지 방법의 개발이

[†]Corresponding author. E-mail : sunghcho@nongae.gsnu.ac.kr,
Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

요구된다. 과채류의 선도를 향상시키는 방안으로서는 안전성에서 우수한 천연 항균제를 이용하는 것이다. 또한, 과채류의 유통시에 포장은 필수적이므로 항균력이 뛰어난 천연 항균제를 함유한 포장재의 개발도 과채류의 선도 유지에 바람직한 방안의 하나가 될 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 항균력과 안전성이 뛰어난 자몽종자추출물(1-5)을 활용하여 식물성 천연항균제(Botanical antimicrobial agent-grapefruit seed extract mixture : 이하 BAAG라 칭함)를 조제하여 소수성 분획과 친수성 분획으로 분리하고, 공시균주로서 수확한 오이, 포도, 고추, 가지, 호박, 토마토 등의 과채류에 서식하여 상품가치를 잃게하는 잿빛곰팡이병 균주인 *Botrytis cinerea*를 사용하여, BAAG처리가 미생물의 성장, 에너지대사 관련효소의 활성 및 세포막의 투과성에 미치는 영향을 조사하여 BAAG의 항균작용을 검토하였다.

재료 및 방법

BAAG의 조제

본실험에 사용된 BAAG는 전보(6,7)에 준하여 추출·조제하였다. 즉, 자몽종자추출물은 브라질 Vale de Saofrancisco 지역산 자몽을 구입하여 과육부와 종자의 비율이 1 : 4 정도로 혼합되어 있는 자몽과실체를 60°C~70°C의 건조실에서 drum-drying을 행하여 건조시킨 후, milling system으로 80~120 mesh 크기로 분쇄하고 감압추출장치를 이용하여 glycerine을 추출용매로 연속 추출하고, 층분리시켜 자몽종자추출물(Grapefruit seed extract : GFSE)을 수집하였으며 이때 추출수율은 중량비율로 3.6% - 4.5%수준 이었다. 이와 같이 추출조제한 종자추출물에 lactic acid 5%, citric acid 5%이 되도록 혼합, 교반하고 균질화하는 과정을 반복한 다음, 50~80 rpm의 느린 속도로 일정시간 교반하여 얻어진 추출물을 식물성 천연항균제 자몽종자추출물제(Botanical antimicrobial agent-GFSE mixture: 이하 BAAG라 칭함)로 선택하여 항균력 실험원액으로 사용하였다. BAAG는 목적에 맞게 일정농도로 희석하여 실험용 시료로 이용하였다.

시험균주의 배양 및 효소원의 조제

과채류 저장중, 발생한 병반에서 분리한 *Botrytis cinerea*는 경상대학교 식품공학과에 소장중인 균주를 분양받아 brain heart infusion agar에 계대 배양하여 보관하였고, *Botrytis cinerea*를 brain heart infusion agar영양 배지에서 20시간 배양하고 원심분리하여 세포막을 수집하였다. 세포를 10 mM EDTA를 포함한 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충 용액에 현탁시키고, 초음파 파쇄기로 파쇄한 후 3,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 모으고 이를 효소원으로 사용하였다.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-glucose-6-phosphate: NADP-oxido reductase ; G6PDH, EC 1.1.1.49)의 활성 측정

Glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성은 이 등의 방법(9)에 따라 측정하였다. 즉, 효소 반응액 (전체 부피 1 mL)의 조성(최종 농도)은 30 mM Tris-HCl (pH 9.0), 6 mM MgCl₂, 0.24 mM NADP⁺, 1 mM glucose-6-phosphate와 여러 가지 농도의 BAAG와 효소원이었다. 효소 반응은 기질인 glucose- 6-phosphate를 가하여 시작하였고, 시간에 따라 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성을 결정하였다.

Hexokinase (ATP: D-hexose 6-phosphotransferase ; EC 2.7.1.1)의 활성 측정

Hexokinase의 효소 활성은 효소 반응액에 glucose를 기질로 하여 정제된 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 첨가하여 주고 생성된 D-glucose-6-phosphate를 coupling assay 방법(10)으로 정량하여 결정하였다. 효소 반응액(전체 부피 1 mL)의 조성(최종 농도)은 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 222 mM Glucose, 8 mM MgCl₂, 0.91 mM NADP⁺, 0.64 mM ATP, 1 unit의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 여러 가지 농도의 BAAG와 효소원이었다. 효소 활성은 glucose를 가하여 시작하였고 340 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하여 결정하였다.

Malate dehydrogenase (L-malate : NAD+ oxidoreductase ; MDH, EC1.1.1.37)의 활성 측정

Malate dehydrogenase의 효소 활성 측정은 malate를 기질로 하여 생성된 NADH에 의해 2,6-dichlorophenol indophenol (DICPIP)가 환원되는 양을 620 nm에서 흡광도의 변화를 측정(11)하여 추적하였다. 반응액(전체부피 1mL)의 조성(최종 농도)은 20 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43 mM NAD, 30 mM nicotinamide, 10 mM Na-malate, 0.86 mM KCN, 0.0034 mM DICPIP, 여러 가지 농도의 BAAG와 효소원이었다.

Succinate Dehydrogenase (succinate : oxidoreductase ; SDH, EC 1.3.99.1)의 활성 측정

Succinate dehydrogenase의 활성은 주 등의 방법(11)에 따라 측정하였다. 즉, 반응액 (전체 부피 1mL)의 조성(최종 농도)은 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04 mM DIPCIP, 20 mM sodium succinate, 여러 가지 농도의 BAAG와 효소원이었다. 환원된 DIPCIP의 양은 620 nm에서 측정하여 효소의 활성을 추적하였다.

β -galactosidase(β -D-galactoside galactohydrolase ; EC 3.2.1.23)의 정량

BAAG가 미생물의 세포막에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포를 파쇄하지 않고, toluene, chloroform과 BAAG 존

재시에 균체의 β -galactosidase가 정량되는가의 여부를 살펴 보았다(12). 사용균주가 β -galactosidase를 가지고 있음은 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside), X-gal(5-Bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)을 함유한 배지에서 확인하였다. 변패된 원예 산물에서 분리된 *E. coli* 및 *Pseudomonas syringae*를 영양배지에 접종한 뒤, 37°C에서 24시간 배양한 후, M9 medium으로 옮겨주고 600 nm에서 흡광도가 0.2~0.7이 되도록 배양한 다음, 0°C에서 방치하여 성장을 억제하였다. 배양액 0.5 mL에 같은 부피의 완충액을 가하고 10초간 잘 흔들어 toluene, 증류수, 황금추출물, chloroform을 같은 농도(500 μ g/mL)로 처리하고, 다시 10초간 세게 흔들어 주었다. Toluene 제거를 위해 37°C에서 40분간 방치하고, 28°C에서 5분간 더 방치하고 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG, 4 mg/mL)를 0.2 mL 첨가후 잘 흔들어 주고 약 20시간 동안 28°C에서 반응하였다. 1 M Na₂CO₃ 0.5 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후, 원심분리하고 상등액의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다. 증류수를 넣은 경우를 0으로 하고 toluene을 넣어준 경우를 100으로 하여 BAAG가 세포막에 미치는 영향을 비교하였다.

항균활성물질의 분리 및 동정

항균력이 탁월한 BAAG로부터 항균활성물질을 column chromatography를 이용하여 순수하게 분리하고, NMR 및 Fast atomic bombardment(FAB)측정기에 의하여 항균활성물질의 화학구조를 다음과 같이 분리·동정하였다. 즉, syrup상인 BAAG 100 g을 상온에서 메탄올 300 mL로 3회 추출하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이 추출물을 증류수 300 mL에 현탁한 후, ethyl ether 및 ethyl acetate로 각각 3회씩 분배·추출하여 ethyl ether 분획물과 ethyl acetate 분획물을 얻었다. Ethyl ether 분획물을 silica gel (70-230 mesh, Merck) column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate=99 : 1 \rightarrow 80 : 20, gradient)하여 3개의 소획분(FE1~FE3)을 얻었다. 분리된 분획중 항균력이 있는 소획분 FE1을 Sephadex LH 20을 사용한 column chromatography (CHCl₃/MeOH = 30 : 70)하여 Compound A를 분리하였다. ethyl acetate 분획물을 silica gel (70-230 mesh, Merck) column chromatography (CHCl₃/MeOH = 98 : 2 \rightarrow 70 : 30, gradient)하여 4개의 소분획(FA1-FA4)을 얻었다. 분리된 분획중 항균력이 있는 소분획 FA2를 sephadex LH 20을 사용한 column chromatography (CHCl₃/ MeOH = 10 : 90)하여 Compound B를 분리하였다. 분리된 compound A와 B의 구조분석을 위해 ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼을 실온에서 측정하였다. 기기로는 Bruker DRX500 (500 MHz)를 사용하였으며 TMS를 기준물질로 사용하였다. 한편, 기존의 저분해능 질량분석이 분자량 측정에 머무는 반면, 고분해능 질량분석은 최근 기술발달에 의해, 질량분석으로 화합물의 분자식 조성이 가능해짐에 따라 분자식을 확인할 수 있는 강

력한 방법으로 평가받는다. 따라서 본 연구에서는 다양한 이온화 방법을 이용하여 Compound A와 B의 질량분석을 시도한 결과, FAB(Fast Atomic Bombardment; 빠른-원자 포격) 방식을 이용하였을 때 어미이온의 피크를 얻을 수 있었고, 고분해능 방법으로 분석을 하여 NMR분석결과와의 상응성을 확인하여 활성물질을 동정하였다.

결과 및 고찰

식물성 천연항균소재인 BAAG가 에너지 생성대사 관련 효소 활성에 미치는 영향

BAAG의 첨가배지상에서 미생물세포의 생육이 크게 억제된다는 실험결과를 토대로, 미생물에 대한 항균작용의 방식을 알아 보고자, *Botrytis cinerea*를 배양하여 분리한 여러 가지 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 특히 에너지 대사와 관련된 효소들에 대한 영향을 살펴보기 위하여 여러 가지 대사경로에서 주요한 역할을 하는 효소인, hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase와 succinate dehydrogenase에 대한 영향을 살펴 보았다. 이중 hexokinase의 활성은 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 이용하여 coupling assay method를 사용하므로, 먼저 glucose-6-phosphate dehydrogenase에 대한 BAAG의 효과를 살펴보았다. BAAG를 각각 효소반응시 농도를 달리하여 첨가한 후 효소 활성을 측정하였다. 대조구로는 이들 물질을 첨가하지 않고, 정상적인 효소활성을 나타내는 것을 사용하였으며 효소에 미치는 영향은 대조구에 대한 각 효소반응의 비율로 결정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이, 미생물 에너지대사 관련 효소 중, glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성은 BAAG의 최종농도가 0.01%와 0.1%에서 각각 약간의 효소활성이 억제되었으나, 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. succinate dehydrogenase 및 hexokinase 효소활성은 BAAG의 최종농도가 0.01%와 0.1%에서 각각 대조구에 비하여 93%와 88%, 92%와 83%로 나타나 약간의 효소활성 억제작용을 관찰할 수 있었다. malate dehydrogenase 효소활성의 경우, 추출물의 최종농도가 0.01%와 0.1%에서 각각 효소활성의 억제효과를 확인할 수 없었으며, 전반적으로 에너지 생성대사에 미치는 BAAG의 뚜렷한 효소활성 억제효과는 예상할 수 없었다. 이 결과로 BAAG가 일부 에너지 생성대사의 효소활성에 영향을 미치는 것으로 나타났으나, BAAG가 세포내로 침투하는가의 여부와는 상관없이 일부 효소의 활성을 부분적으로 억제하는 것으로 미루어 보아 세포내 대사를 억제하는 것을 확인하기 위해서는 추가적인 실험결과가 수반되어야 할 것으로 생각되었다.

Table 1. The relative activities of botanical antimicrobial agent-grapefruit seed extract mixture on various metabolic enzymes concerned with energy production. Enzymatic activities were represented as percentage assuming the control as 100.

| Treatment | Conc. (%) | Glucose-6-phosphate dehydrogenase | Succinate dehydrogenase | Malate dehydrogenase | Hexokinase |
|-----------|-----------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------|------------|
| CONTROL | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| BAAG | 0.01 | 95 | 93 | 98 | 92 |
| BAAG | 0.1 | 94 | 88 | 99 | 83 |

변패미생물의 세포막 기능에 미치는 BAAG의 처리효과

BAAG를 세포에 처리하였을 때, 세포막에 영향을 주는가를 알아보기 위하여 BAAG의 존재하에서 *Botrytis cinerea*의 세포내 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. *Botrytis cinerea*가 β -galactosidase를 생성하는가를 알아보기 위하여 IPTG와 X-gal을 가하여 준 배지에서 배양하여 과란색 colony가 발현으로 이 효소의 활성을 확인할 수 있었다. 이어서, 세포를 배양한 후, ONPG와 세포 혼합액에 증류수, toluene, chloroform, BAAG(0.05% 및 0.1%)를 가하여 주었다. 측정하고자 하는 효소 β -galactosidase가 배양세포내에 존재하므로 BAAG가 세포막에 영향을 주어 세포막이 손상을 받아 β -galactosidase가 세포 밖으로 유출이 되어, toluene을 가하여 준 대조군에서처럼 효소 활성이 검출되었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, 증류수를 가해준 대조군에서의 값을 0으로하고 toluene을 가하여 준 대조군을 100으로 하였을 때, BAAG 0.05%의 경우 62%, BAAG 0.1%의 경우 93%의 활성이 검출되었다. Chloroform을 가하여 세포막을 손상하여 얻은 값이 10%였는데 이를 토대로 보면, BAAG는 chloroform보다 세포막을 더 손상 시키는 것으로 판단 되었다. 이 결과의 양상과 세포 성장 억제 효과의 결과는 잘 일치하였으며, BAAG의 항균작용은 에너지 생성대사의 억제를 유발하는 효과라기보다는 미생물의 세포막 기능에 손상을 주는 인자에 기인하는 것으로 생각되었다.

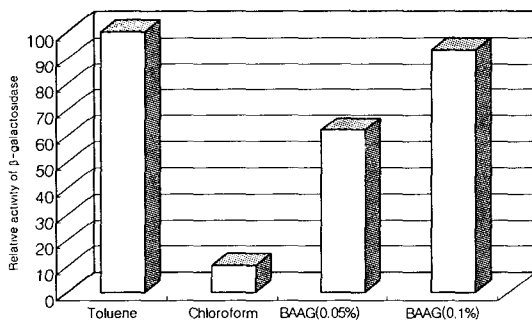


Fig. 1. The effect of BAAG on the membrane perturbation of *Botrytis cinerea*: The cells were treated with the reagents including toluene, chloroform, BAAG (0.05% or 0.1%) in the media containing ONPG as substrate for β -galactosidase.

항균활성물질의 구조동정

Fig. 2에서 보는 바와 같이 화합물 A의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼으로부터 모든 특성 공명선의 해석이 다음과 같이 가능하여 본 시료가 limonin임을 규명하였다. 먼저 limonin 분자의 4종류 메틸 수소 (CH_3) q, f, j 및 i는 1.12~1.24 ppm에서 각각 ^3H 면적의 단일선으로 얻어졌다. 5종류의 메틸렌 수소 (CH_2) 중 o 및 p는 각각 1.43 및 1.35 ppm에서 다중선으로 나타났다. 그리고 나머지 3종류 메틸렌 수소인 m, l 및 g은 각각 상대적으로 저자장인 4.82, 2.82 및 2.45 ppm에서 ^2H 면적으로 얻어졌다. 이처럼 저자기장에서 신호가 나타난 이유는 인접한 산소(카르보닐 및 에테르)에 의한 벗길효과(deshielding effect) 때문이다. 5종류의 메틴 수소(CH) 중에서 d, k 및 e는 각각 5.53, 4.28 및 3.15 ppm에서 ^1H 면적으로 얻어졌다. 그리고 나머지 두 메틴 수소인 h와 n은 각각 1.92 및 1.88 ppm에서 다중선으로 나타났다. 방향족 수소인 b, c 및 a는 각각 7.75, 7.65 및 6.51 ppm에서 ^1H 면적으로 나타났다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 화합물 A의 모든 탄소 공명선은 잘 해석되어져 $^1\text{H-NMR}$ 의 해석 결과와 동일하게 limonin으로 규명되었다. 즉, 4종류의 메틸탄소 9, 14, 15 및 26는 17.87~21.78 ppm에서 4개의 피크로 얻어졌다. 또한 3종류의 카르보닐 탄소 중 5와 18은 화학적 환경이 동일하여 177.53 ppm에서, 10은 170.06 ppm에서 각각 얻어졌다. 4종류의 방향족 탄소 1, 2, 3 및 25는 각각 144.11, 142.49, 121.73 및 110.98 ppm에서 얻어졌다. Sigma-Aldrich NMR DB로부터 얻은 limonin 표준물질의 ^1H - 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 Fig. 4와 같다. 이는 화합물 A에 대한 ^1H - (Fig. 2) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 3) 스펙트럼과 잘 일치하였다. 한편, Fig. 5에서 보는 바와 같이 화합물 B의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼으로부터 모든 특성 공명선의 해석이 다음과 같이 가능하여 본 시료가 Naringin임을 규명하였다. 먼저 Naringin 분자의 1종류의 메틸 수소(CH_3) k는 1.28 ppm에서 ^3H 면적의 삼중선으로 얻어졌다. 2종류의 메틸렌 수소(CH_2) a와 q는 각각 3.89, 3.60 ppm에서 나타났다. 9종류의 메틴 수소(CH) 중에서 b와 j는 각각 3.95, 3.81 ppm에서 나타났다. 그리고 h, d, g는 화학적 환경이 동일하여 3.70 ppm에서 다중선으로 나타났다. c, i, e는 각각 3.48, 3.41, 3.26 ppm에서 ^1H 면적의 다중선으로 나타났다. t, l, f는 상대적으로 저자장인 각각 5.49, 5.35, 5.18 ppm에서 ^1H 면적으로 나타났다. 3종류의 방향족 수소 n, r과 m, s 그리고 o, p는 각각 7.41, 6.90, 6.17 ppm에서 ^2H 면적의 다중선으로 나타났다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 화합물 B의 모든 탄소 공명선은 잘 해석되어져 $^1\text{H-NMR}$ 의 해석 결과와 동일하게 Naringin으로 규명되었다. 즉, 1종류의 카르보닐탄소가 197.95 ppm에서 얻어졌다. 그리고 l, 20, 5번 탄소가 각각 62.37, 43.35, 18.36 ppm에서 얻어졌다.

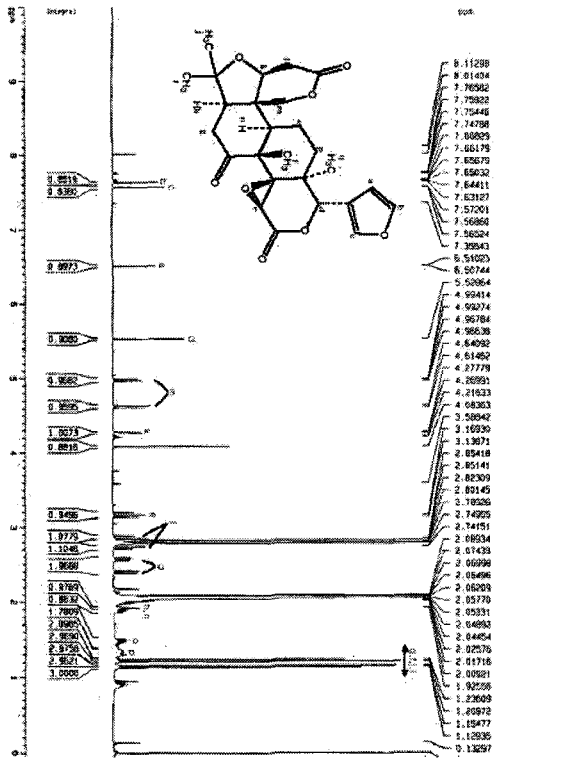


Fig. 2. 500 MHz ^1H -NMR spectrum of compound A in acetone- d_6 .

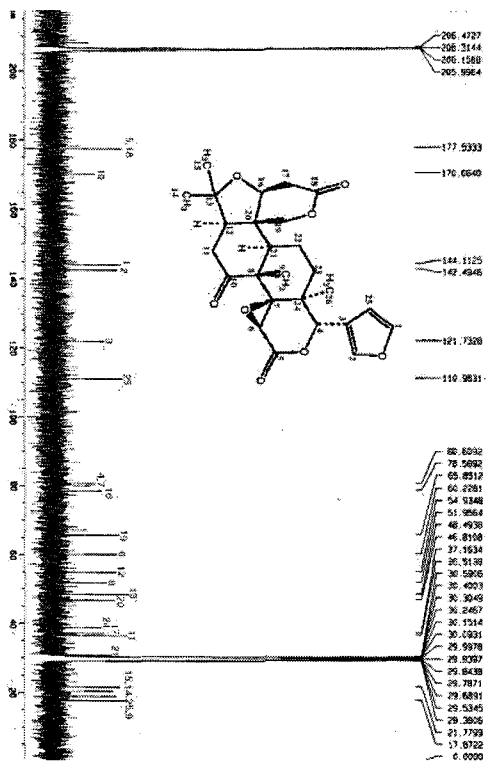


Fig. 3. 125 MHz ^{13}C -NMR spectrum of compound A in acetone- d_6 .

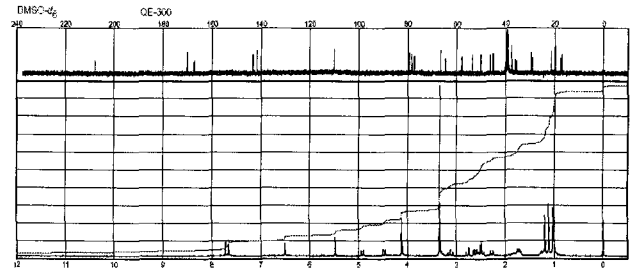


Fig. 4. ^1H - (bottom) and ^{13}C -NMR (top) spectra of limolin from Sigma-Aldrich DB.

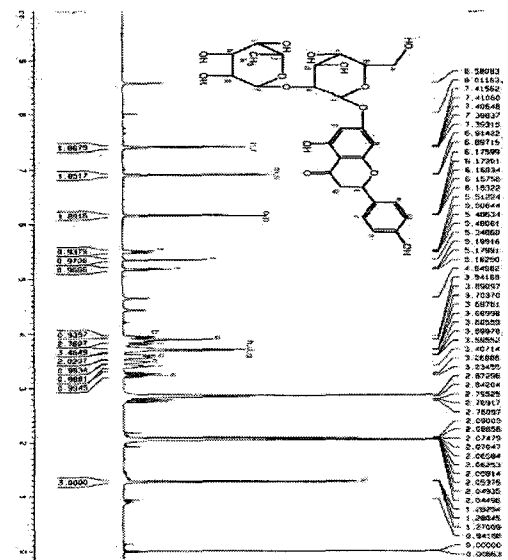


Fig. 5. 500 MHz ^1H -NMR spectrum of compound B in acetone- d_6 .

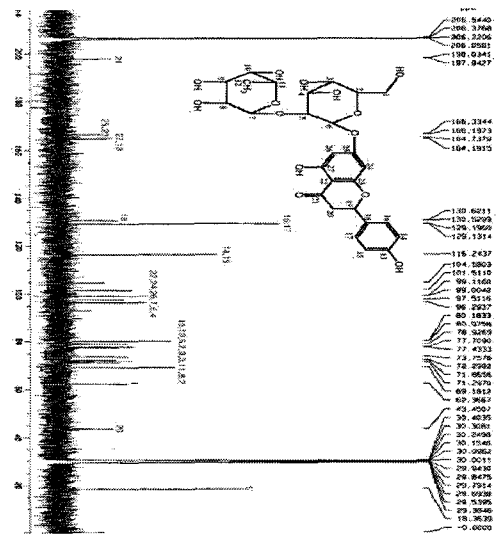


Fig. 6. 125 MHz ^{13}C -NMR spectrum of compound B in acetone- d_6 .

Compound A의 질량 분석 결과를 동위원소 패턴과 같이 Fig. 7에 나타내었다. 질량대-전하비(m/z) 471.2025에서 Limonin의 조성식인 C₂₆H₃₀O₈에 해당하는 M+H(C₂₆H₃₁O₈, 이론값: 471.2019, 실험오차: +1.2ppm) 피크가 관찰되었다. 동위원소 패턴 역시, 계산값과 실험값이 일치하였다. 따라서 Compound A는 Limonin으로 확인 되었다.

Compound B의 질량 분석 결과를 동위원소 패턴과 같이 Fig. 8에 나타내었다. 질량대-전하비(m/z) 581.1852에서 Naringin의 조성식인 C₂₇H₃₂O₁₄에 해당하는 M+H(C₂₇H₃₃O₁₄, 이론값: 581.1870, 실험오차: -3.1ppm) 피크가 관찰되었다. 화합물을 질량분석법으로 분석할 때, 어미 이온은 양전하를 가져야 검출이 가능하다. 이때 양전하를 가지는 방식으로 어미이온에서 전자를 한 개 떼어내는 방식(M+)과, 수소원자 한 개가 어미분자에 붙는 방식(M+H)이 있다. 동위원소 패턴을 확인한 결과, 계산값과 실험값이 일치함을 확인하였다. 따라서 시료 B는 Naringin으로 확인 되었다.

이상에서 보는 바와 같이, NMR 및 FAB의 분석결과, 분리된 화합물이 limonin과 naringin으로 공통적으로 확인, 동정되었다.

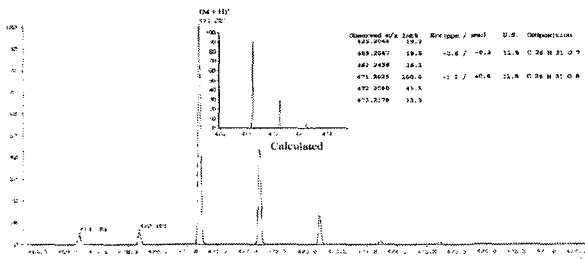


Fig. 7. Fast atomic bombardment spectrum of Compound A

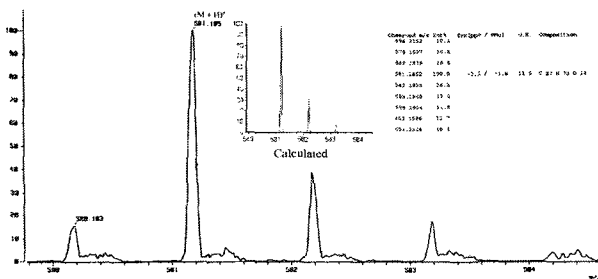


Fig. 8. Fast atomic bombardment spectrum of Compound B

요 약

BAAG의 첨가배지상에서 미생물세포의 생육이 크게 억제된다는 실험결과를 토대로, 미생물에 대한 항균작용의 방식을 알아 보고자, *Botrytis cinerea*를 배양하여 분리한 여러 가

지 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 특히 에너지 대사와 관련된 효소들에 대한 영향을 살펴보기 위하여 여러가지 대사경로에서 주요한 역할을 하는 효소인, hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase와 succinate dehydrogenase에 대한 영향을 살펴 본 결과, BAAG가 glucose-6-phosphate dehydrogenase 및 malate dehydrogenase의 활성에는 별다른 효과를 나타내지 않았으나 succinate dehydrogenase 및 hexokinase 효소활성에서는 약간의 효소활성 억제작용을 관찰할 수 있었다. 또한, 세포막에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 β-galactosidase의 인위적 기질인 ONPG의 분해 여부를 조사한 결과, BAAG는 세포막의 기능에 영향을 끼침을 관찰하였다. BAAG의 항균 성분을 분리 확인 하기 위해서 silica gel column chromatography를 하여 ethyl ether분획물에서 3개, ethyl acetate분획물에서 4개의 peak를 얻었으며, 각 용매분획물에서 1개씩의 분획에서 강한 항균 활성을 검출하였다. 이 분획을 NMR 및 Fast atomic bombardment측정기에 의해서 분석한 결과, 화학구조를 limonin과 naringin으로 동정할 수 있었다. 이상의 연구결과로 미루어, 본 연구에서 그 기능과 작용을 구명한 천연항균 소재 BAAG는 수확한 과채류의 직접 처리제재 및 항균 포장 소재로 과채류의 선도유지를 목적으로 활용하여 그 효과를 기대할 수 있어, 과채류의 생산기반 보호와 농가소득에 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행된 연구결과와 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Harich, J. (1982) DF-100. U.S. Patent 1,354,818 FDA No.R-0013982
2. Cho, S.H., Seo, I.W., Choi, J.D. and Joo, I.S. (1990) Inhibitory effects of grapefruit seed extract on growth and toxin production of *Penicillium islandicum*. J. Korean Agric. Chem. Soc., 33, 169-173
3. Kim, W.Y., Cheong, N.E., Jae, D.Y., Lee, D.C., Kim, J.W., Cho, S.H. and Lee, S.Y. (1994) Characteriation of an antimicrobial chitinase purified from the grapefruit extract. Korean J. Plant Pathol., 10, 277-283
4. Cho, S.H., Kim, K.O., Chung, J.H. and Ryu, C.H. (1994) Outbreaks and control of listeriosis attributed to agricultural, marine and animal husbandry products. J. Fd. Hyg.

- Safety, 9, 191-198
5. Cho, S.H., Lee, S.Y., Kim, J.W., Ko, G.H. and Seo, I.W. (1995) Development and application of natural antimicrobial agent isolated from grapefruit seed extract-Antimicrobial activities of grapefruit seed extract J. Fd. Hyg. Safety, 10, 33-39
 6. Jung, J.H. and Cho, S.H. (2004) Preservative effect of garlic stalk or pork cooked in soy sauce by the addition of botanical antimicrobial agent-citrus and red ginseng mixture. Korean Journal of Food Preservation, 11, 1-6
 7. Jung, J.H. and Cho, S.H. (2004) Preservative effect of soybean spouts pre-soaked and cultivated in the solution of natural antimicrobial mixture. Korean Journal of Food Preservation, 11, 17-21
 8. Kates, M. (1972) Techniques of lipidology in laboratory techniques in biochemistry and molecular biology edited by Work, T.S. and Work, E., North-Holland Publishing company, Amsterdam, Oxford, London, p.85-124
 9. Lee, C.Y., Langley, C.H., and Burkhart, J. (1978) Purification and molecular weight determination of glucose 6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme from mouse nad drosophila. J. Anal. Biochem., 86, 697-706
 10. Bergmeyer, H.U. (1974) Methods of enzymatic analysis, 2nd English edition, Verlag Chemie, Academic press, Inc., Vol.1, p.222-223
 11. Joo, C.N. and Han, J.H. (1976) The effect of ginseng saponins on chicken's hepatic mitochondrial succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase. Korean Biochem. J., 9, 43-51
 12. Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., p.352-355,

(접수 2004년 8월 9일, 채택 2004년 9월 10일)