

신갈나무로부터 유래된 추출물의 *Botrytis cinerea* 균주에 대한 항균활성*¹

여 희 동*² · 이 형 철*² · 임 부 국*³ · 김 희 규*⁴ · 최 명 석*² · 양 재 경*^{2†}

Antifungal Activity of the *Quercus Mongolica* Extracts Against *Botrytis cinerea**¹

Hee Dong Yeo*² · Hyung Chul Lee*² · Bu Kug Lim*³ · Hee Kyu Kim*⁴ ·
Myung Suk Choi*² · Jae-Kyung Yang*^{2†}

요 약

목질자원으로부터 *Botrytis*속 곰팡이병에 대하여 항균활성을 나타내는 추출물을 탐색하고자 본 연구는 시도되었다. 신갈나무를 고압 전처리하고 이로부터 열수, 메탄올, 에탄올을 이용하여 목질 추출물을 획득하였다. *Botrytis*속 곰팡이 3종은 20°C와 25°C의 생장온도에서 최적 생장을 하였으며 pH 5.0과 7.0에서 가장 양호한 균사 생장을 나타냈다. 열수 추출물이 *Botrytis*속에 대하여 가장 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다. 열수추출물로부터 항균물질을 분리하기 위하여 *n*-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid (12 : 17 : 8 : 0.2, v/v/v/v)를 용제로 하는 silica-gel column chromatography와 TLC를 사용하였으며, 3종 추출물들은 HPLC 분석을 통하여 화합물을 확인하였으며 UV Spectrophotometer를 이용하여 열수 추출물로부터 6개의 fraction group을 분리 하였다. 6개의 fraction group의 항균활성 test결과, fraction group I 과 II는 *Botrytis cinerea*에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타냈다. Fraction group의 HPLC 분석결과, 3개의 유효물질을 확인하였으며 이 3가지 물질이 항균활성에 영향을 미친다고 추측된다.

*¹ 접수 2007년 8월 7일, 채택 2007년 10월 25일

*² 경상대학교 환경산림과학부, 농업생명과학연구원 Division of Environmental Forest Science and Institute of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

*³ (주)유림하이텍 Yulim Hightech. co, Daegu 711-855, Korea

*⁴ 경상대학교 응용생물환경학전공, Department of Applied Biology & Environmental Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

† 주저자(corresponding author) : 양재경(e-mail: jkyang@gnu.ac.kr)

ABSTRACT

The aim of this study was to attempt the efficacy of antifungal activity of the wood extracts against *Botrytis* grey mold. Wood chip derived from *Quercus mongolica* was obtain from steam explosion process and extracted by hot water and methanol and ethanol. The conidial germination was maximum growth with the application temperature for 20 and 25°C. In pH test, we observed the maximum growth in pH 5.0 and 7.0. Antifungal activity was the best in the hot water extractives against *Botrytis cinerea*. The separation of the antifungal substances was performed using a silica-gel column (*n*-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.2, v/v/v/v), TLC and UV-Spectrophotometer, and isolated 6 fraction group. The result of antifungal activity in 6 fraction group, fraction group I and fraction group II were the highest antifungal activity against grey mold with the present study. Three peaks in fraction group I and II were detected by HPLC and this compounds were suppose to effective of antifungal activity.

Keywords: antifungal activity, wood extracts, *Quercus mongolica*, *Botrytis cinerea*

1. 서 론

최근 천연물인 수목추출성분의 생리활성 및 항균 효과에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 수목유래의 추출성분은 항곰팡이, 항균, 살충 등의 각종 약리작용이 있으며, 매우 광범위하게 응용될 수 있다 (Kim *et al.*, 1999). 수목 유래 생리활성 물질은 높은 항균활성을 가진다고 보고되었으며 (Min, 1998; Park *et al.*, 2005), 수목추출물이 합성약제, 살충제 등에 비교하면 항균효과가 낮은 것이 사실이지만, 독성과 내성균 출현 등에 비교하면 높은 안정성을 나타낸다고 알려져 있다 (Park *et al.*, 2001; Yigal *et al.*, 1996).

수목으로부터 항균효과의 보고로는 산벚나무로부터 항균활성을 가지는 유효물질의 분리 (Lee *et al.*, 2003), 느티나무의 심재 추출물 및 떡갈나무의 목질부, 수피, 잎 부위에서 추출되는 유효 추출물들의 약리 및 생리 활성 작용들의 항균활성이 보고된 바 있다 (Kim *et al.*, 2000). 이들 수목추출물은 일부 산업화되어 제품들이 출시되고 있으며, 이들 제품의 대부분은 소비자의 선택적 만족을 충족시키고 있다.

한편 국민건강 생활에 관심이 많아지면서 친환경

적 농산물 생산이 농업의 주된 관심사로 부각되고 있다. 이에 따라 화학비료 및 화학 살균제의 사용을 제한하는 친환경 농업이 다각도로 연구 개발되고 있지만, 그 적용 범위가 매우 제한적인 문제점을 가지고 있다. 특히 농산물 재배 시 발생하는 곰팡이성 질병은 농약으로도 그 질병을 통제하기 어려운 문제점이 있다. 따라서 농가에서는 곰팡이성 질병방제를 위해 미생물제제 및 화학 농약을 과다하게 사용하여 농산물의 품질 저하를 초래하는 경향이 있다.

농작물의 시설재배 시 곰팡이 관련 병해는 현재 심각한 수준에 있으며 (Beever and Pakers, 1993), 특히 잿빛곰팡이병은 보트리티스 (*Botrytis* spp.) 속 곰팡이에 의해 발생하는 병해로 거의 모든 채소와 작물에 발생되며, 특히 잎을 생채로 이용하는 시설 하우스에 있어서는 경제적 손실을 초래하는 매우 중요한 병이다. 잿빛곰팡이병은 불완전균에 속하는 곰팡이로서, 공기 중에 쉽게 분산되는 다량의 분생포자를 형성하는데 병든 조직의 표면에 작고 검은 균핵을 형성하여 불량한 환경에서도 오랫동안 생존할 수 있다. 병원균은 2~30°C 사이에서 성장하지만 10°C 이하의 저온에서도 활동이 왕성하므로 저온(0~10°C)에서 저장 중인 식물체에도 많은 피해를 입힌다. 병원균의 최적 성장과 포자형성 및 방출 그리

고 발아와 감염온도는 18~23°C 정도이며, 이때 식물체 표면에 수분이 필수적으로 요구된다. 채소와 작물에서 잿빛곰팡이는 주로 상처부위나 노화된 세포의 각피에 침입한다. 과채류의 경우는 개화 후 꽃부분에서 발병하여 열매로 번지므로 과실의 피해에 의한 직접적인 수량감소를 초래하고 있으며, 오이, 호박, 토마토, 고추, 가지, 상치, 시금치, 딸기, 파, 양파, 부추 등에 피해를 주며 이외에 튜립, 카네이션, 국화, 장미, 제라늄 등의 화훼에도 발생하여 적지 않은 피해를 가져오고 있다(Rosslenbroich and Stuebler, 2000).

국내외적으로 잿빛곰팡이의 방제를 위하여 여러 가지 살균제가 제시되고 있지만 대부분의 방제제가 benzimidazole, dichloran, iprodion, captan 등이며, 잿빛곰팡이균주는 이들 살균제에 대하여 약제 저항성을 나타낸다고 보고되고 있다(Talma *et al.*, 1989; Faretra and Pollastro, 1993; Koo *et al.*, 2006).

따라서 이런 살균제들의 독성에 대한 위험이 일반인의 관심이 되고 있으며 특히 과채류는 생식하기 때문에 더욱 문제가 되어, 농약을 사용하지 않거나, 최소한으로 사용한 친환경농산물에 대한 소비자들의 요구가 점차 커지고 있다. 또한 부가적으로 무분별한 농약사용의 증가로 인해 병원균의 약제 저항성 발생으로 약효를 상실하게 되고 그 사용에 제한이 따르게 되어 대안으로 생물적방제가 관심이 되고 있다.

미생물에 의한 생물적방제는 *Trichoderma*를 이용한 잿빛곰팡이에 대한 방제효과가 Nelson 등(1988)에 의하여 확인되어 성공가능성이 언급되어졌지만 아직까지 실용화 되지 못하고 있는 실정이다(Daulagala *et al.*, 2003). 또한 강한 살균력을 가지는 과산화수소를 농약대체약제로 사용될 수 있다고 보고되었지만 과산화수소를 작물에 적용하여 높은 가능성을 확인하였다는 사례는 거의 없었다(Byun and Choi, 2003).

한편 참나무류의 추출물에 대한 연구로는 Lee 등(1991)이 졸참나무와 갈참나무의 잎 추출물에서 높은 항균활성을 확인하였으며, 이때 flavonoid 및 lignan 등이 항균활성에 깊이 관여되어 있다고 보고

하였다. 참나무류 심재추출물의 주성분은 ellagitanins으로 알려져 있고 이 화합물은 약리학에 있어서 항바이러스 활성을 높이는 물질로 보고되었다(Zhentian *et al.*, 1999).

본 연구는 합성 살균제의 대안으로서 독성이 거의 없으면서 환경에 노출 시 잘 분해되는 환경 친화적인 천연 살균제 개발에 있어 작물 피해를 초래하는 화학약품에 의한 곰팡이 살균제가 아닌 목질자원으로부터 유래된 천연물의 잿빛곰팡이에 대한 항균활성 확인 및 항균제로서의 원료 가능성을 확인하고자 시도되었다. 신갈나무 침을 물리 화학적 전처리법을 적용하고 이로부터 항균력을 가지는 천연화합물을 효과적으로 분리정제하고, 잿빛곰팡이의 생육억제 효과를 확인하여 무한한 목질계 biomass 자원의 고부가 가치화 및 사용범위 확대의 가능성을 확인하고자 본 연구는 시도되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시균주

공시균주는 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에서 분양받은 *Botrytis cinerea* (KCTC 6973)와 2006년 4월부터 2006년 6월 사이에 경남 진주시 소재 고추농가 2곳으로부터 잿빛곰팡이가 감염된 고추를 수집한 다음 이로부터 병원균을 분리하였다. 병원균의 분리는 병든 잎을 온도 25°C, 상대습도 70%의 항온항습실에서 3일간 습실 처리한 후 Potato dextrose agar (PDA, Difco) 배지에 두어 병반에서 자란 곰팡이의 균사 선단을 새로운 배지에 이식하여 25°C의 배양기에서 5일간 암 배양하였다. 농가에서 채취한 *Botrytis* spp.를 각각 *Botrytis cinerea* 'Kumsan'과 *Botrytis cinerea* 'Munsan'이라고 표기하였으며 잿빛곰팡이가 형성된 고추의 품종은 녹각이었다.

Botrytis cinerea (KCTC 6973) 및 *Botrytis* spp. 2균주는 Potato dextrose agar (PDA, Difco), Potato sucrose agar (PSA, Difco) 배지에 접종하여 25°C 배양기 내에서 지속적으로 계대배양하여 실험에 사

용하였으며 곰팡이균의 보존은 25°C에서 4~7일간 배양된 *Botrytis* spp. 3종을 미네랄 오일로 채워진 각각의 튜브에 10 mm pellet으로 투입하여 -75°C에서 냉동 보관하였으며 보존균주를 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

2.2. 성장최적 환경조건

3종 곰팡이 균주의 성장최적 환경조건을 탐색하기 위하여 배지의 pH를 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 사용하여 각각 pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0으로 조절한 PDA 배지에 접종 후 20, 25, 30°C에서 7일간 배양한 후 균사의 평균생장 직경을 측정하였다.

2.3. 목질원료의 전처리

항균활성을 나타내는 추출물을 조제하기 위하여 전처리 된 신갈나무(*Quercus mongolica*) 칩을 사용하였으며, 전처리방법은 목재 칩을 고온(200 ± 5 °C), 고압 (20~40 kg/cm²) 포화수증기 하에서 10분간 처리한 다음, 대기 중에 순간적으로 방출함으로써 팽창과 마찰력에 의하여 목재 조직을 파쇄, 해섬을 하였다. 이를 실온에서 5일간 건조시킨 다음 전처리 목질원료로 사용하였다.

2.4. 목질추출물의 분리

항균활성을 나타내는 물질을 분리하기 위하여 전처리 목질원료로부터 열수, 메탄올, 에탄올 추출물을 분리하였다. 열수추출은 반응용기에 전처리 목질원료 20 g (건건중량기준)과 증류수 500 ml를 첨가하여 충분히 교반한 다음, 121°C에서 30분 반응시킨 후 G3 glass filter (Pyrex, Japan)로 여과하여 추출액을 획득하였다. 추출액은 50°C의 rotavapor (Sibata, Japan)에서 일정 수준까지 건조시킨 다음, freeze dryer (Ilshin, Korea)를 이용하여 동결건조 후, 열수 추출물 분말을 획득하였다. 메탄올 및 에탄올 추출물은 반응용기에 전처리 목질원료 20 g (건건중량기준)과 메탄올(또는 에탄올) 500 ml를 첨가

하여 실온에서 24시간 교반한 다음, G3 glass filter로 여과하여 추출액을 획득하였다. 추출액은 열수 추출물과 동일한 방법으로 추출물 분말을 획득하였다.

2.5. 목질추출물의 항균활성

열수, 메탄올, 에탄올 추출물은 121°C에서 30분간 멸균된 PDA배지를 50~60°C까지 식힌 후, 125, 250, 500 및 1,000 ppm 농도로 PDA배지에 첨가하였다. 조제된 PDA 배지에 계대 배양된 *Botrytis* spp. 곰팡이 3종으로부터 직경 10 mm의 pellet을 채취하여 접종하고 25°C 배양기에서 5일간 배양한 다음 균총의 직경(mm)을 측정하고 항균활성을 다음의 (식 1)에 의거하여 계산하였다 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않은 PDA배지를 사용하였다.

항균활성(%)

$$= 1 - \left[\frac{\text{처리구의 균총직경(mm)}}{\text{대조구의 균총직경(mm)}} \right] \times 100 \quad (\text{식 1})$$

2.6. Column Chromatography를 이용한 물질분리

2.6.1. 물질분리를 위한 최적용매 결정

항균활성을 나타내는 물질을 분리하기 위하여 추출물 분말 0.1 g을 증류수 1 ml에 녹인 후 초음파 처리하여 충분히 용해한 다음, silica gel 60 plates (Merck, Germany)를 2.5 × 3.5 cm cutting하여 적정한 비율로 혼합시킨 developing solution (*n*-hexane : chloroform : ethyl acetate)으로 2분 동안 전개시켜 mobile phases를 확인하였고 mobile phases와 TLC plate에 나타난 fraction의 R_f 값의 범위를 측정하였다. 또한 *n*-hexane : chloroform : ethyl acetate의 각각의 비율에 따른 mobile phases 중 물질의 분리가 가장 우수하다고 판단되는 developing solution을 선택하여 그 solution에 formic acid를 일정비율로 첨가하여 mobile phases를 다시 확인하고, TLC plate에 나타난 fraction의 R_f 값의 범위를 측정하였다.

2.6.2. Silica-gel column chromatography에 의한 물질 분획

추출물 분말 용액과 silica gel을 혼합한 후 감압 농축시켜 열수추출물이 silica gel에 잘 흡착되게 하였고, silica gel (particle size 0.063~0.2 mm, Merck, Germany)과 developing solution이 채워진 유리 column (2.3 × 40 cm)에 1 g을 적용시켰다. Fraction은 test tube에 각각 10 ml씩 수집하였으며, fraction의 분획은 4반복을 1 set로 하였고, 1 set의 시료는 추출물 1 g이 투입되도록 하였다.

2.6.3. 분획된 fraction의 group별 분리 및 수율 측정

수집된 fraction은 TLC와 UV spectrophotometer (U-3000, Hitachi, Japan)를 사용하여 물질을 확인하고 각각의 fraction group으로 구분하였다. TLC는 silica-gel column chromatography에 의한 열수 추출물 fraction (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 and 90, fraction number)의 fraction group의 분리를 위하여 사용되었다. TLC에 의해 Rf 값의 범위를 측정하고 UV spectrophotometer는 280 nm, 325 nm에서 흡광도를 측정하였으며 또한 fraction group에 있어서 각각의 UV흡광도가 최대인 fraction은 TLC plate를 사용하여 재확인하였다. UV spectrophotometer를 이용한 흡광도 값과 TLC plate를 이용한 각각의 fraction의 Rf 값을 서로 비교하여 동일한 물질이라고 판단되는 fraction을 모아서 동일 fraction group으로 하였다. Fraction group의 수율은 분획된 각각의 fraction을 동일 group으로 한 다음, 감압 농축하여 증류수를 일정량 투입하여 용해시킨 다음 동결 건조하여 최초 column chromatography에 투입된 전건 추출물의 중량을 기준으로 수율을 계산하였다.

2.7. Fraction group의 항균활성

Fraction group 분말을 1,000 ppm 농도로 PDA배지에 혼합한 후 계대배양된 *Botrytis* spp. 균주 3종으로부터 10 mm의 균사 pellet을 분리하여 접종한

다음 25°C에서 배양하였다. 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않은 배지를 사용하였고, 항균활성은 앞의 식 1에 의거하여 계산하였으며, 균사생장량은 공시 균주 3종의 5반복 평균값을 사용하였다.

2.8. HPLC 분석

HPLC 분석은 Kang 등(2005)의 방법에 의거하여 실시하였다. 열수, 메탄올, 에탄올 추출물 및 fraction group은 메탄올로 용해하여, memberin filter (0.2 μm, Germany)로 여과하였다. 여과액 20 μl를 TSK gel ODS-80Ts column (4.6 mm × 25 cm, 5 μm, Tosoh)이 장착된 HPLC system (Gilson, France)에 loading시켰다. UV는 280 nm에서 검출하였고, mobile phases는 H₂O : CH₃CN : H₃PO₄ (600 : 400 : 5)의 혼합 solvent를 사용하였으며, injection 후 solvent는 0.6 ml/min의 비율로 loading 하였다.

2.9. 통계분석

통계분석을 위하여 각 계통 5반복 값의 표준편차를 나타내었으며, 각 실험구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여 p < 0.05 수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *Botrytis cinerea*의 최적생장 환경

*Botrytis cinerea*의 3종 균주를 PDA배지에 접종한 다음 생장온도를 각기 달리하여 균사생장 직경을 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 생장온도 20°C와 25°C에서의 균사생장 직경은 3종 모두 5% 수준에서 유의성이 나타나지 않았으며 30°C에서는 균사생장이 저조하였다. 본 연구결과 균사생장 최적온도는 20°C와 25°C로 판단되었다(Fig. 1).

pH 변화에 따른 3종 균주의 균사생장 직경을 측

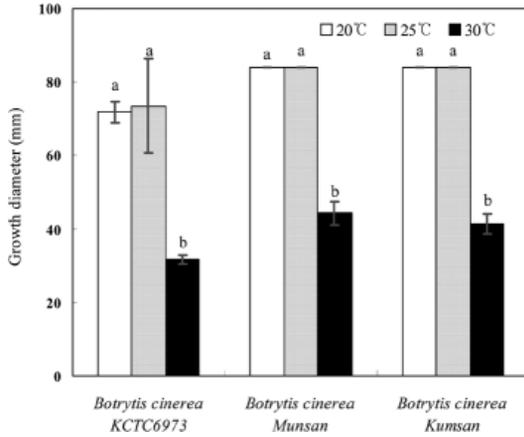


Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Botrytis* spp. on PDA medium.

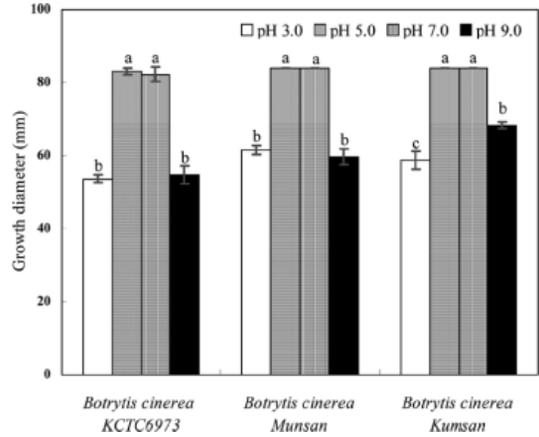


Fig. 2. Effect of pH on the mycelial growth of *Botrytis* spp. on PDA medium at 25°C.

정한 결과 pH 3.0의 배지에서 균사생장은 pH 5.0의 균사생장직경에 비해 약 65%의 성장을 나타냈으며 pH 5.0과 7.0 배지에서 가장 양호한 균사 성장을 나타냈다. 이때 pH 5.0과 7.0간의 균사 성장 차이에 있어서 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 2).

3.2. *Botrytis cinerea*에 대한 추출물의 항균활성

Table 1의 추출물 3종의 *Botrytis* spp.에 대한 항균활성을 나타냈다. Table 1에서 *Botrytis cinerea*에 대한 열수 추출물의 항균활성은 125 ppm에서 약 29%를 나타냈으며 추출물 농도의 증가에 따라서 항균활성은 약간 증가되는 경향을 나타냈지만, 500 ppm 이상의 추출물 농도에서는 유의성이 나타나지 않았다. 메탄올 추출물 500 ppm과 1,000 ppm은 약 33~34%의 항균활성을 나타냈지만, 추출물 농도에 따른 유의성은 인정되지 않았으며 250 ppm에서는 약 25%의 항균활성이 나타났다. 에탄올 추출물은 125 ppm에서 18%의 항균활성을 나타냈고 250 ppm에서 1,000 ppm까지 추출물 농도에 따른 유의성은 나타나지 않았다. *Botrytis cinerea*에 대한 항균활성은 열수 추출물이 메탄올, 에탄올 추출물보다 높게 나타났다.

Botrytis cinerea (Munsan)에 대한 열수 추출물의 항균활성은 125 ppm의 농도에서 약 13%의 항균활성을 나타내었으며, 1,000 ppm 수준에서 약 23%의 항균활성을 나타냈고, 500 ppm 이상에서는 추출물 농도에 따른 항균활성의 유의성은 나타나지 않았다. 메탄올 추출물에서는 125 ppm에서 13% 수준, 1,000 ppm에서는 22% 수준의 항균활성을 확인하였다. 에탄올 추출물은 열수 추출물과 메탄올 추출물보다 낮은 항균활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

Botrytis cinerea (Kumsan)에 대한 열수 추출물의 항균활성은 125 ppm에서 13% 수준, 1,000 ppm에서는 27% 수준의 항균활성을 나타냈으며 메탄올 추출물 또한 열수 추출물과 비슷한 수준의 항균활성을 나타냈다. 에탄올 추출물의 항균활성은 1,000 ppm의 농도에서 약 20% 정도의 항균활성이 나타났다. 또한 에탄올 추출물은 열수 추출물, 메탄올 추출물에 비해 낮은 항균활성을 나타냈다.

Botrytis cinerea (KCTC 6973), *Botrytis cinerea* (Munsan) 및 *Botrytis cinerea* (Kumsan)에 대하여 항균활성이 가장 높은 추출물은 열수 추출물이었으며, 그 다음으로 메탄올 추출물로 확인됐으며, 목질 자원에서부터 잣빛곰팡이의 항균원료 추출은 열수 추출법이 가장 유리하다고 판단되었다.

Fig. 3은 열수 추출물, 메탄올 추출물 및 에탄올

Table 1. Antifungal activity of wood extracts against *Botrytis cinerea*

	Antifungal activity, % ^{*1}		
	<i>B. cinerea</i> (KCTC6973)	<i>B. cinerea</i> (Munsan)	<i>B. cinerea</i> (Kumsan)
Hot water extract			
125 ppm	29.6 ± 6.9b ^{*2}	13.1 ± 2.3c	13.4 ± 2.0c
250 ppm	32.9 ± 3.3ab	16.9 ± 2.4b	20.4 ± 4.1b
500 ppm	35.6 ± 4.0a	19.4 ± 5.2ab	23.9 ± 3.7ab
1,000 ppm	37.6 ± 3.4a	23.9 ± 8.8a	27.4 ± 6.3a
Methanol extract			
125 ppm	25.5 ± 3.7b	13.3 ± 8.8c	13.5 ± 4.9c
250 ppm	25.1 ± 5.2b	14.6 ± 3.7b	19.4 ± 2.7b
500 ppm	33.8 ± 5.0a	19.4 ± 4.1ab	22.7 ± 2.9ab
1,000 ppm	34.5 ± 7.8a	22.8 ± 1.9a	25.2 ± 2.3a
Ethanol extract			
125 ppm	18.8 ± 2.8b	6.5 ± 6.9c	5.7 ± 7.0b
250 ppm	23.0 ± 14.8ab	11.2 ± 5.5b	8.7 ± 5.4b
500 ppm	27.0 ± 4.8ab	15.5 ± 5.1ab	15.7 ± 4.7a
1,000 ppm	28.5 ± 1.4a	20.6 ± 2.2a	20.8 ± 2.2a

^{*1} Antifungal activity represents percentage of growth inhibition over untreated control and each values represents mean ± standard deviation (n = 5).

^{*2} Mean followed by the same letter within the column are not significantly different at P < 0.05 according to Duncan's new multiple-range test.

추출물을 HPLC를 사용하여 분석한 결과이다. 열수 추출물에서는 5개 물질, 메탄올 추출물에서는 4개 물질 및 에탄올 추출물에서는 5개의 물질이 혼합되어 있다는 것을 확인하였고 retention time 4.4분에 나타나는 물질의 함량은 열수 추출물 및 메탄올 추출물이 에탄올 추출물보다 높게 나타났다. 열수 추출물에서는 retention time 5.0분에 나타나는 물질이 메탄올 추출물 및 에탄올 추출물에서는 발견되지 않은 것을 확인하였다.

젯빛곰팡이에 대한 *Origanum*의 정유를 이용한 저해효과 연구(Mohamed *et al.*, 2003)에 의하면 1,000 ppm 농도의 수준에서 젯빛곰팡이에 대하여 높은 저해효과를 나타낸다고 보고된 바 있으며, Nikos 등(2007)은 정유 추출물이 젯빛곰팡이에 대하여 약 30%의 항균활성을 나타냈다고 보고하였고 이러한 결과는 본 연구결과의 항균활성과 거의 유사한 수준이었다. 또한 Gabriela 등(2005)은 살균제인

iprodon이 젯빛곰팡이에 대하여 500 ppm에서 23%의 저해효과를 나타냈다는 결과와 비교하였을 때 천연추출물 또한 젯빛곰팡이병 화학살균제와 거의 비슷한 수준의 효과를 나타낸다고 생각된다. 열수 추출물농도 1,000 ppm에서 *Botrytis cinerea* (KCTC 6973) 37%, *Botrytis cinerea* (Munsan) 23% 및 *Botrytis cinerea* (Kumsan) 27%의 항균활성 수준은 화학약품에 의한 방제효과보다는 낮은 수준이지만 화학약품의 사용량을 줄일 수 있는 천연물로서 활용이 기대된다.

3.3. 항균활성 물질의 분리

Botrytis cinerea 균주에 대하여 항균활성을 나타내는 열수 추출물의 유효 fraction을 분리하기 위한 용매, mobile phases 및 Rf값을 Fig. 4와 Table 2에 나타내었다. *n*-Hexane, chloroform 및 ethyl ace-

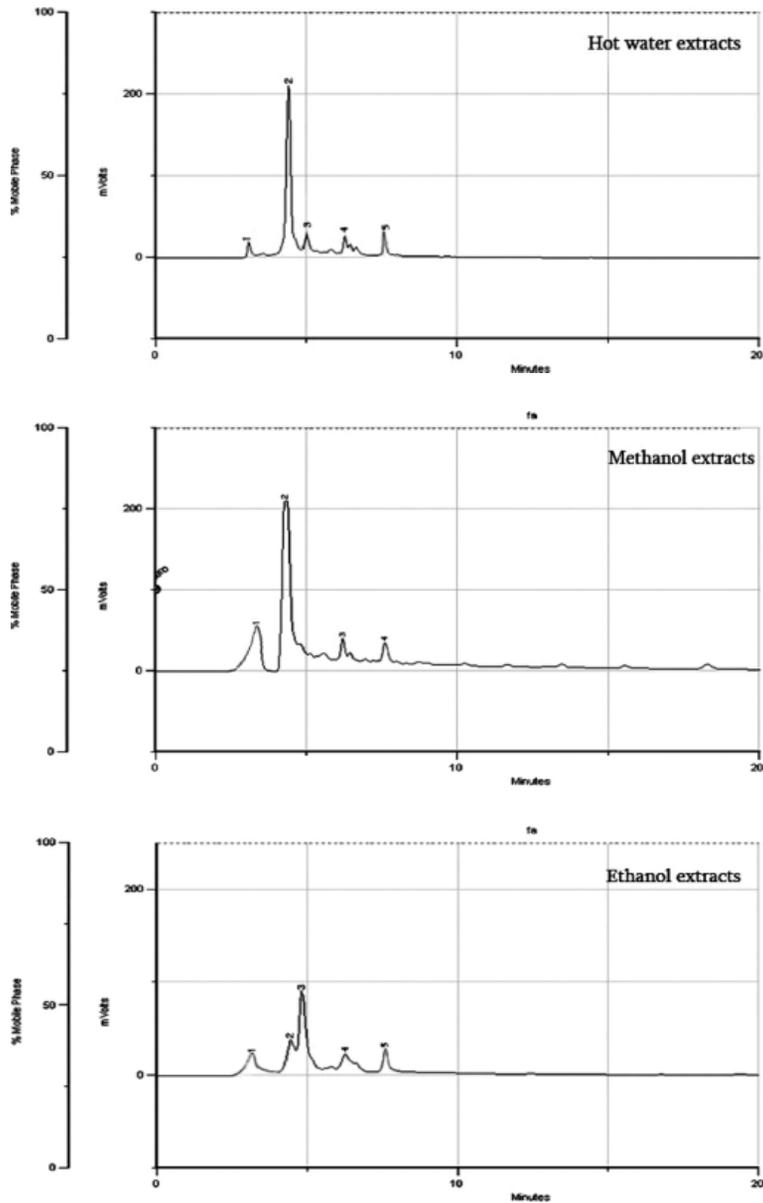


Fig. 3. HPLC chromatograms of hot water extracts, methanol extracts and ethanol extracts.

tate의 혼합비율을 달리하여 최초 8개의 mobile phases를 사용하였다. Fig. 4에서 *n*-hexane과 chloroform의 혼합비율이 ethyl acetate보다 높을수록 mobile phase는 아랫부분에 존재하였고 *n*-hexane과 chloroform의 혼합비율이 ethyl acetate보다

낮을수록 mobile phases가 위쪽에 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 이유는 *n*-hexane과 chloroform은 비극성 용매에 근접하고, ethyl acetate는 극성용매에 가깝고, TLC plate의 고정상에 해당하는 silica-gel은 비극성에 속하기 때문이라고 판단되었

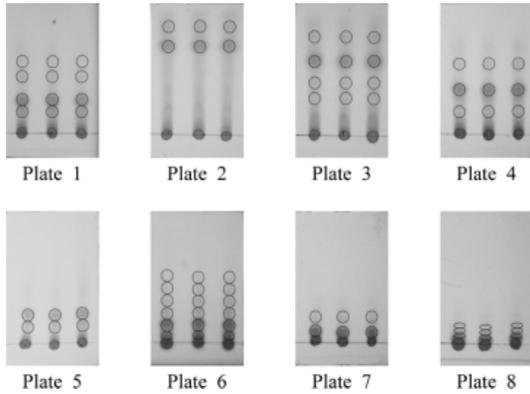


Fig. 4. TLC screening of mobile phases studied. The plate numbers correspond to those in Table 2.

다. 극성은 극성과 친화력을 가지고 비극성은 비극성과 친화력을 가지므로 비극성에 속하는 *n*-hexane과 chloroform의 비율이 높을수록 고정상인 silica-gel과 친화성이 커지므로 이동하는 속도가 감소하여 물질이 아랫부분에 나타나게 되었다고 생각된다. Table 2에서 *n*-hexane : chloroform : ethyl acetate의 비율이 2 : 1 : 18, 10 : 12 : 10 그리고 16 : 22 : 4 (v/v/v)인 2, 5, 7번 용매에서는 2개의 fraction이 나타났고, 이때 *R_f*의 범위는 각각 0.68~0.84, 0.12~0.20, 0.08~0.20이었다. *n*-Hexane : chloroform : ethyl acetate의 비율이 8 : 7 : 12와 18 : 28 : 2 (v/v/v)인 4, 8번 용매는 3개의 fraction과 각각 0.16~0.56과 0.08~0.16 범위의 *R_f*값을 나

타냈다. 4개의 fraction이 나타난 용매 1번(*n*-hexane : chloroform : ethyl acetate = 1 : 1 : 1, v/v/v)과 3번 (*n*-hexane : chloroform : ethyl acetate = 4 : 3 : 16, v/v/v)은 각각 0.16~0.56과 0.28~0.76의 *R_f*값을 나타냈으며 가장 많은 fraction (6개)이 나타난 용매 6번(*n*-hexane : chloroform : ethyl acetate = 12 : 17 : 8, v/v/v)의 *R_f*값은 0.08~0.52로 가장 잘 분리되는 것으로 판단되었다.

6번 용매(*n*-hexane : chloroform : ethyl acetate = 12 : 17 : 8, v/v/v)에 formic acid를 적정비율로 첨가하여 그 mobile phases를 확인하였으며 첨가된 formic acid의 비율과 *R_f*값은 Table 3에 나타내었다.

Table 3에서 formic acid의 첨가비율이 0.2인 6-4번이 분리가 가장 잘되었고 formic acid 첨가 비율이 0.5, 0.4, 0.3, 0.1의 처리구에서는 *R_f*값의 큰 차이가 없었다.

결과적으로 열수 추출물의 물질분리는 developing solution인 *n*-hexane : chloroform : ethyl acetate의 비율이 12 : 17 : 8의 전개용매가 가장 우수하였고, 전개용매에 formic acid를 소량 첨가시킨 것(*n*-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.2, v/v/v/v)이 물질을 가장 잘 분리시키는 것으로 확인되었다.

열수추출물을 silica-gel column (2.3 cm × 40 cm)에 의해 분획된 각각의 fraction 10 ml를 TLC에 적용시켜 developing solution (*n*-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.2, v/v/v/v) mobile phases를 확인하였고 또한 UV

Table 2. The mobile phases studied

No.	Solvents	Fraction number	Range of <i>R_f</i> of compound
1	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate = 1 : 1 : 1 (v/v/v)	4	0.16~0.56
2	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate = 2 : 1 : 18 (v/v/v)	2	0.68~0.84
3	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate = 4 : 3 : 16 (v/v/v)	4	0.28~0.76
4	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate = 8 : 7 : 12 (v/v/v)	3	0.16~0.56
5	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate = 10 : 12 : 10 (v/v/v)	2	0.12~0.20
6	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate = 12 : 17 : 8 (v/v/v)	6	0.08~0.52
7	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate = 16 : 22 : 4 (v/v/v)	2	0.08~0.20
8	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate = 18 : 28 : 2 (v/v/v)	3	0.08~0.16

Table 3. The mobile phases studied of developing solvent by addition of formic acid

No.	Solvents	Fraction number	Range of R _f of compound
6-1	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.5 (v/v/v/v)	5	0.16~0.56
6-2	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.4 (v/v/v/v)	5	0.12~0.52
6-3	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.3 (v/v/v/v)	5	0.14~0.54
6-4	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.2 (v/v/v/v)	6	0.06~0.52
6-5	<i>n</i> -hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.1 (v/v/v/v)	5	0.14~0.52

spectrophotometer의 325 nm의 흡광도 값을 기준으로 하여 6개의 fraction group으로 분리하였다. Fig. 5와 Fig. 6에서 보는 바와 같이 fraction 1~10번까지는 물질이 존재하지 않다가 15번에서 세 개의 물질이 나타났다. 10~15번 사이에도 물질이 존재할 수 있을 것으로 추측되었으며 15~95번이 TLC plate상에서 물질이 분리되는 것을 확인할 수 있었지만 완벽한 물질분리는 이루어지지 않은 것으로 생각된다. 그러나 각 fraction의 UV 흡수특성을 고려하면 흡수강도는 다르게 나타났으며 이들 fraction은 6개의 fraction group으로 구분할 수 있었다(Fig. 6). Fraction group I-VI에 있어서 강한 UV 흡수는 fraction group II와 III에서 나타났으며 나머지 fraction group I, IV, V, VI는 약한 흡수를 나타냈다.

3.4. 분획된 Fraction Group의 항균활성과 HPLC분석

Table 4는 열수추출물 1 g으로부터 얻을 수 있는 6개의 fraction group의 수율을 나타낸 것이다. Fraction group V는 32 mg으로 가장 높은 수율을 나타내었으며 나머지 fraction group간의 수율은 5% 수준에서 유의성이 인정되지 않았다. Fraction group VI는 11 mg으로 두 번째로 높은 수율을 나타냈다.

Botrytis cinerea 균주에 대한 각각의 fraction group 항균활성을 Table 5에 나타내었다. Fraction

group II, III, IV가 *Botrytis cinerea* (KCTC 6973)에 대하여 약 50%의 항균활성을 나타내었다. *Botrytis cinerea* (Munsan), *Botrytis cinerea* (Kumsan)에 대하여 fraction group I은 각각 35, 42%로 다른 fraction group보다 높은 항균활성을 나타내었으며 fraction group II는 각각 33%와 36%의 항균활성을 나타냈다. Fraction group I과 II는 *Botrytis cinerea* 균주에 대하여 전체적으로 높은 항균활성을 나타내었다. 그러므로 본 결과에서는 잣빛곰팡이에 대하여 항균활성을 나타내는 물질이 fraction group I과 II에 다량으로 함유되어 있다고 판단되었다. 또한 각 균주에 항균활성을 나타내는 fraction group의 종류는 다를 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

Fig. 7은 *Botrytis cinerea*에 대하여 전체적으로 높은 항균활성을 나타낸 fraction group I, II를 HPLC를 사용하여 분석한 결과이다. Fraction group I에는 9개의 물질이 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, fraction group II에는 16개의 물질이 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. Fraction group I에서는 6번과 8번의 함량이 높았고, fraction group II에서는 5번 물질의 함량이 높았다. 특히 fraction group 그룹 I과 II에서 retention time 7.68분에 나타나는 물질 6번(fraction group I)과 물질 5번(fraction group II)은 거의 동일한 물질로 판단되며, 이 물질이 항균활성을 나타내는 주요 물질이라고 추측된다.

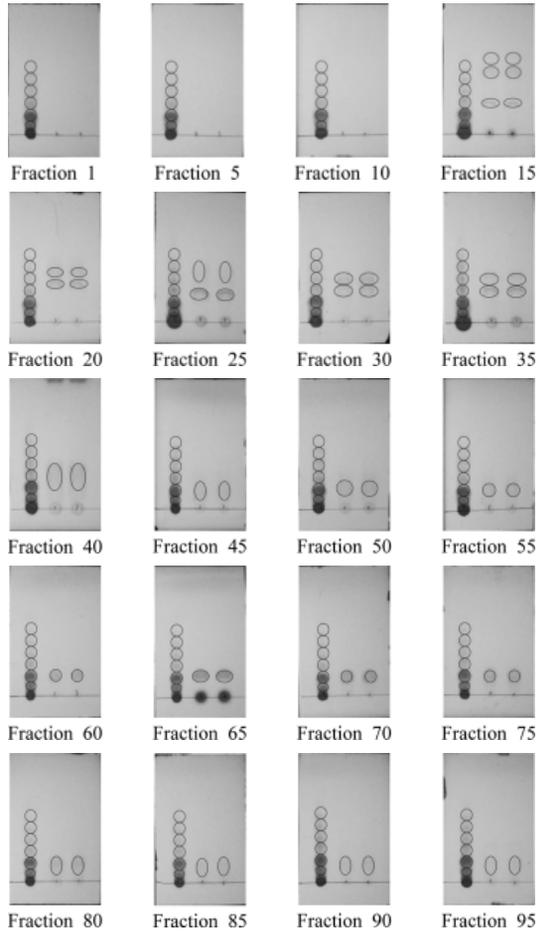


Fig. 5. Separation of compounds from hot water extracts by column chromatography (column: 2.3 × 40 cm, silica-gel 60: 45 g) and thin layer chromatography (TLC plate: silica-gel 60 F₂₅₄, 0.5 mm, MERCK). The elution solvents for column of the hot water extracts was used as 12 : 17 : 8 : 0.2 of used *n*-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid. The TLC was performed using mixture of *n*-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid (v/v/v/v) in 12 : 17 : 8 : 0.2.

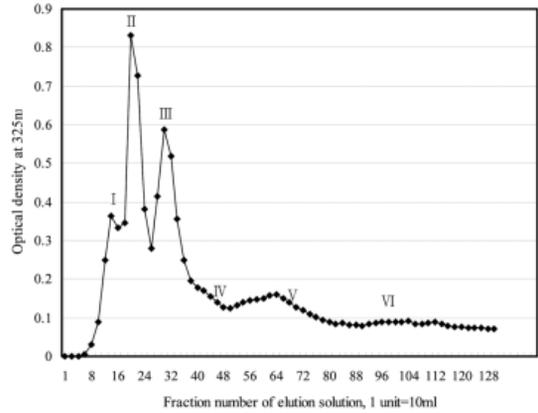


Fig. 6. The chromatography of a hot water extracts separated by silica gel column (2.3 × 40 cm, silica-gel 60: 45 g). Developing solution was *n*-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid (12 : 17 : 8 : 0.2, v/v/v/v).

Table 4. The yield of fraction group from 1 g of hot water extract by column chromatography

Fraction group	Yield, mg ^{*1}
I	8.03 ± 3.48b ^{*2}
II	10.40 ± 2.50b
III	9.73 ± 3.77b
IV	8.20 ± 1.15b
V	32.47 ± 10.02a
VI	11.70 ± 4.67b

^{*1} Yield was based on the 1 g of oven dried hot water extracts.

^{*2} Mean followed by the same letter within the column are not significantly different at P < 0.05 according to Duncan's new multiple-range test.

4. 결 론

본 연구는 목질자원으로부터 추출된 화합물의 *Botrytis cinerea*에 대한 항균활성 능력을 평가한 다음 곰팡이 방제제 원료로서의 사용가능성을 평가하고자 시도되었다. 공시한 잣빛곰팡이병 균주의 최적

Table 5. Antifungal activity of each fraction group (1000 ppm) against *Botrytis* spp. for 7 days

Fraction group	Antifungal activity, % ^{*1}		
	<i>B. cinerea</i> (KCTC 6973)	<i>B. cinerea</i> (Munsan)	<i>B. cinerea</i> (Kumsan)
I	3250 ± 429b ^{*2}	3538 ± 314a	4233 ± 052a
II	50.89 ± 0.75a	33.22 ± 1.59a	36.63 ± 1.54b
III	50.56 ± 0.94a	14.30 ± 0.68d	4.03 ± 1.94e
IV	51.60 ± 3.78a	19.78 ± 2.20c	11.85 ± 1.38d
V	26.50 ± 7.15bc	24.44 ± 3.15b	25.28 ± 1.51c
VI	21.56 ± 3.92c	21.58 ± 1.26bc	14.63 ± 2.62d

^{*1} Antifungal activity represents percentage of growth inhibition over untreated control and each values represents mean ± standard deviation (n = 5).

^{*2} Mean followed by the same letter within the column are not significantly different at P < 0.05 according to Duncan's new multiple-range test.

생장 온도는 20~25°C 범위로 나타났으며, pH 변화에 따른 3종 균주의 균사생장은 pH 5.0과 pH 7.0에서 가장 양호한 균사 성장을 나타냈다. 고압 전처리된 신갈나무로부터 획득된 추출물은 1000 ppm의 농도에서 *Botrytis cinerea* 곰팡이에 대하여 열수추출물은 약 30%, 메탄올 추출물은 약 25%, 에탄올 추출물은 약 23%의 항균활성을 나타냈으며 *Botrytis* spp.의 종류에 따라서 항균활성은 약간 차이가 있다. n-Hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid (12 : 17 : 8 : 0.2, v/v/v/v)를 사용한 silica-gel column chromatography와 TLC 및 UV Spectrophotometer를 이용했을 때 가장 높은 항균활성을 나타낸 열수추출물은 6개의 fraction group으로 분리할 수 있었으며, 그 중에서 fraction group I 과 II가 *Botrytis* spp.에 대하여 전체적으로 높은 항균활성을 나타내었다.

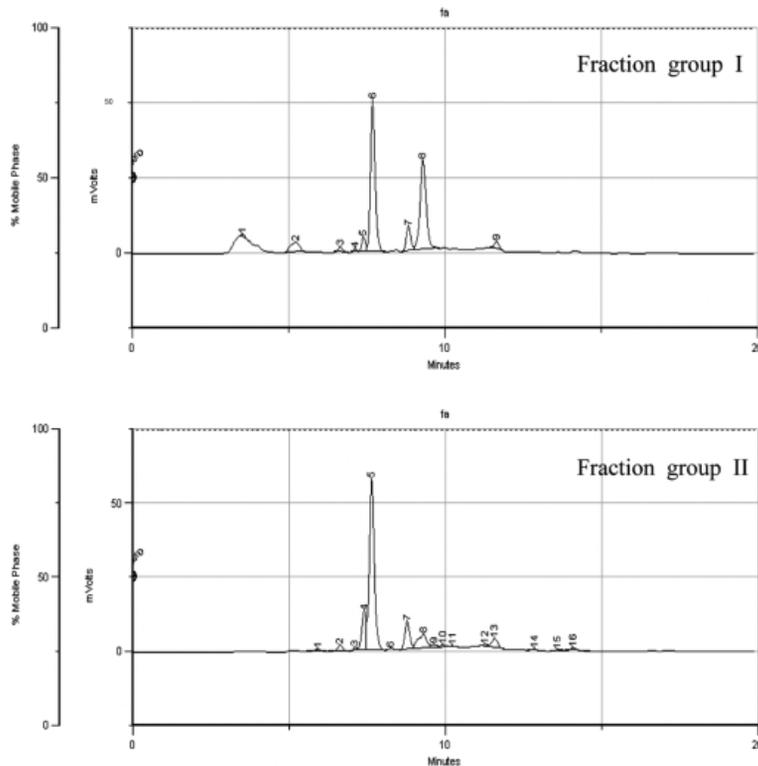


Fig. 7. HPLC chromatograms of fraction group I and II.

Fraction group I 과 II의 HPLC 분석한 결과, retention time 7.68분에 나타나는 물질이 항균활성을 나타내는 유효물질로 추측되었다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(과제관리번호: 505022-2, 2005)의 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Beever, R. E. and L. Parkes. 1993. Mating behaviour and genetics of fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in New Zealand. New Zealand J. Crop & Hort. Sci. 21: 303~310.
2. Byun, H. J. and S. J. Choi. 2003. Suppression of Post-harvest grey mold rot incidence in strawberry by field application of hydrogen peroxide. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44(6): 859~862.
3. Daulagala, E., G. W. Tsomlexoglou, L. A. Gooday, G. B. Seddon, and E. J. Allan. 2003. Molecular detection and b-glucuronidase expression of gus-marked *Bacillus subtilis* L-form bacteria in developing Chinese cabbage seedlings. Journal of Applied Microbiology. 95(2): 218~224.
4. Elad, Y., N. E. Malathrakist, and A. J. Dik. 1996. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. Crop Protection. 1(3): 229~240.
5. Faretra, F. and S. Pollastro. 1993. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* from nine countries. Plant Pathology. 42: 48~52.
6. Hmamouchi, M., C. Bouchraa, M. Achourib, and L. M. Idrissi Hassan. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. Fr. Journal of thnopharmacology. 89(1): 165~169.
7. Kang, J. S., O. H. Jhee, J. W. Hong, A. S. Om, M. H. Lee, W. S. Lee, L. M. Shaw, and J. W. Lee. 2005. Direct determination of verapamil in rat plasma by coupled column microbore-HPLC method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 37: 405~410.
8. Kim, J. Y., E. A. Bae, M. J. Han, and D. H. Kim. 1999. Inhibitory activity of *Bacillus licheniformis* AJ on the growth of diarrheal pathogens. J. Apple. Pharm. 7: 385~389.
9. Kim, M. Y., Y. G. Kim, T. H. Kim, J. S. Jo, and J. K. Yang. 2000. Antimicrobial activity and antioxidative activity in the extractives of *Quercus dentata* Thunberg. Mokchae Konghak. 28(3): 42~51.
10. Koo, H. M., S. j. An, and H. C. Shim. 2006. Effect of mepanipyrim on the resistant isolates of gray mold fungus, *Botrytis cinerea* to the fungicides of benzimidazole and dicarboximide. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 49(4): 259~265.
11. Lee, B. W. and D. H. Shin. 1991. Screening of Natural Antimicrobial Plant Extract on food Spoilage Microorganisms. Korea J. Food Sci. Technol. 23(2): 352~379.
12. Lee, H. J., S. S. Lee, and D. H. Choi. 2003. Studies on biological activity of wood extractives-Antimicrobial and antioxidative activities of extractive from the heart wood of *Prunus sargentii*. Kor. Mokchae Konghak. 31(4): 16~23.
13. Min, K. H. 1998. Antifungal activity of the extracts of *Zantboxylum schinfolium* sieb. et zucc. against dermatophytes. Mokchae Konghak. 26(4): 78~85.
14. Nelson, M. E. and M. L. Powelson. 1988. Biological control of gray mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. Plant Dis. 72: 727~729.
15. Nikos, G. T. and C. D. Economakis. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 8: 253~258.
16. Park, S. M., H. J. Jung, and S. H. Yeo. 2005. Antigungal activity of extract from *Xanthium strumarium* L. against plant pathogenous fungi. J. Life. Sci. 15: 692~695.
17. Park, Y. K., H. J. Lee, S. S. Lee, D. H. Choi, W. H. Yeo, and J. S. Oh. 2001. Studies on biological activity of wood extractives – Antifungal activity of isoflavonoids from *Sopbora japonica*. Mokchae Konghak. 29(4): 89~96.

18. Rosslenbroich, H. J. and S. Dietrich. 2000. *Botrytis cinerea*-history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*. 19(8-10): 557~561.
19. Sansone, G., I. Rezza, V. Calvente, D. Benuzzi, and M. I. Sanz de Tosetti. 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology*. 35: 245~251.
20. Talma, K., Y. Elad, and H. Yunis. 1989. Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*. 38(1): 86.
21. Zhentian, L., j. Jervis, and R. F. Helm. 1999. C-Glycosidic ellagitannins from white oak heartwood and callus tissues. *Phytochemistry*. 51: 751~756.