

실유카(*Yucca smalliana* Fern.)에서 신규
생물활성(항균) 물질의 개발 연구
Development of New Bioactive (Antimicrobial)
Natural Products from *Yucca smalliana* Fern.

연구기관

전남대학교 농업생명과학대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “실유카(*Yucca smalliana* Fern.)에서 신규 생물활성(항균) 물질의 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 일

주관연구기관명 : 전남대학교농업생명과학대학

총괄연구책임자 : 박 노 동

연 구 원 : 김 영 철

연 구 원 : 김 옥 란

연 구 원 : 지 명 심

연 구 원 : 조 경 현

연 구 보 조 원 : 주 완 택

요 약 문

I. 제 목

실유카(*Yucca smalliana* Fern.)에서 신규 생물활성(항균) 물질의 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1980년대 후반 물질특허제도가 도입되면서(신약, 신농약을 포함한) 신규물질개발을 목표로 한 신물질 탐색연구가 주목을 받게 되었고 그 결과 많은 연구가 산학연 각계에서 활발히 진행되어왔다. 특히 종래의 유기화학자들에 의하여 주도되었던 유기합성에 의한 신물질 창출연구가, 이제는 생물학자들에 의해 생물로부터의 신물질 창출로 전환되고 있는데, 이는 미생물, 식물, 조류 등 생물종의 다양성, 그 기능의 다양성, 및 대사산물의 다양성에 기인하며, 천연물과학의 발전에 힘입어 실제로 유니크한 화학구조의 기능성 물질들이 높은 확률로 창출되고 있다. 이렇게 창출된 신기능성 생리활성물질들은 직접적으로 신약개발 및 기타 산업에 응용되어 거대한 생물산업시장을 주도하고 있다(1).

신물질 탐색을 위한 접근 방법으로는 귀납적 방법과 연역적 방법으로 나눌 수 있을 것이다. 전자는 종래의 random screening을 기초로 한 탐색법으로 논리적이지 못한 것 같으면서도 주의깊은 통찰력을 통해 *in vivo*에 가까운 풍부한 정보를 캐낼 수 있는 장점이 있다. 후자는 지식의 축적에 따라 수용체, 유전자의 구조 등에 근거한 논리적 탐색법(target-oriented or mechanism-oriented screening)으로 혁신적인 신규활성물질을 탄생시킬 수 있는 매력적인 방법이라 할 수 있다.

본인 등은 신규활성물질을 개발하고자 소위 random screening 방법으로 주변에서 흔히 철쭉, 후박, 실유카, 선인장, 불두화, 개망초, 꽃기린,

개발톱, 공작선인장, 형개, 소엽, 택란, 지구자, 녹차, 유자, 방아잎 등의 식물체, 종실, 또는 꽃을 시료로 천연성분을 추출하여 항산화활성, 항미생물활성, 항혈전활성 등을 실험하여 왔다. 이중 방아잎에서 강한 항산화활성 성분 로즈마린산을 분리 동정한 바 있으며 또한 실유카에서 어느 식물체에서 보다 특별히 강한 항미생물활성을 확인하였다. 이에 본 연구는, 실유카로부터 항진균성분을 분리, 정제, 동정하고, 나아가 이의 기타의 다양한 생리활성까지 조사하여 새로운 농업용 또는 의료용 항균제 또는 생리활성 물질을 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 1차 년도 : 식물체의 확보, 추출 및 정제
항미생물활성 및 기타 생물활성 검색
- 2차 년도 : 활성 성분의 구조 분석
신규활성물질의 유도체화, 생물전환 및 활성 비교
- 3차 년도 : 신규활성물질의 유도체화 및 생물전환
신규 활성물질의 다양한 응용성 검토

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 실유카로부터 생물활성(항균)물질을 탐색하기 위하여 실유카를 부위별, 시기별로 채취하고 80% 메탄올로 추출하였다. 결과 실유카꽃과 잎 추출물은 0.1% 농도에서 높은 항산화활성과 식물병원성 곰팡이인 *Rizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*에 대한 높은 항균활성을 나타냈고 특히 *R. solani*, *P. capsici*에 대해서는 모두 약 50%의 생장억제활성을 나타냈지만 뿌리 추출물은 0.1% 농도에서 약 10%의 생장억제활성을 보여 항균성이 잎 추

출물에 비해 현저히 낮았다. 실유카 잎의시기별 메탄올 추출물은 8월말에 채취한 시료를 제외하고 전년에 거쳐서 유사한 항진균활성을 나타냈으며, 잎추출물을 hexane, ethylacetate, butanol, water 순으로 분획한 결과 butanol과 water 분획에서 높은 항진균활성을 나타냈다.

오이모잘록병과 고추역병균인 *R. solani*와 *P. capsici*을 대상으로 실유카추출물의 생물농약으로서의 가능성을 실험하였다. 오이에서는 병원균만 처리한 구에서는 47주중 35주 식물체가 고사되었으나, 실유카추출물을 처리한 구에서는 2주만이 약간의 생장저해를 나타냈으며, 고추에서는 병원균만 처리한 구에서는 앞에 암갈색의 병반이 생기면서 뿌리 부근에서도 부패하면서 흑갈색으로 변화했으나 실유카추출물을 처리한 구에서는 정상적인 생장이 유지되었다.

항진균활성물질의 구조를 구명하기 위해 항진균활성이 강한 용매분획을 silica gel column chromatography, ODS column chromatography를 실시하여 4종의 물질이 분리되었다. 항진균활성 물질은 IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT 등으로 분석한 결과 kaempferol-3-O-rhamnosyl-glucoside (화합물 1), 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranosyl 5-spirostan-3β,5,27-triol (화합물 2), tigogenin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-galactopyranoside (화합물 3)와 tigogenin의 aglycon을 가진 steroidal saponin으로 추정되는 화합물 (화합물 4)로 확인되었다. 이 4종의 물질들은 모두 실유카에서 처음으로 확인된 물질들이며, 특히 화합물 2, 3, 4는 지금까지 보고된바 없는 새로운 화합물로 확인되었다. 또한 화합물 3과 4의 MIC는 *R. solani*에 1 ppm 이하였으며, *F. oxysporum*에 대해서 화합물 3은 25 ppm, 화합물 4는 50 ppm이었다. 화합물 2의 MIC 값은 *F. oxysporum*에 대해 250 ppm이었다.

이상의 결과로부터 실유카추출물은 새로운 천연물농약으로서의 가능성을 제시하고, 새로운 항진균활성 물질이 규명됨에 따라 항진균제의 개발 및 친환경농업자재로서 일익을 담당하는데 기여할 것으로 기대된다.

SUMMARY

(영문 요약문)

Intensive use of synthetic chemicals for control of pathogenic fungi has become one of environmental concerns due to their potentials for environmental contamination. Thus, alternative method in controlling pathogenic fungi using natural products has triggered scientific actions to find bioactive compounds from plant materials. This study described the isolation and characterization of new bioactive compounds from *Yucca smalliana* for control of pathogenicfungi. Leaves and roots of *Y. smalliana* were extracted using 80% MeOH followed by chromatographic column clean up for the isolation of bioactive compounds and used for antifungal activity. Antifungal activity assays were carried out by measuring fungal growth inhibition by the extracts from *Y. smalliana*. Mass spectrometric, FT-IR and NMR analyses were performed for the characterization of chemical structure of the isolated antifungal compounds. Antifungal activity assays using the extracts obtained seasonally from *Y. smalliana* were performed to investigate an optimum season for the harvest of *Y. smalliana*. Methanolic extracts of *Y. smalliana* showed antifungal activity against *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Phytophthora capsici* at a concentration of 0.1%, resulting particularly in 50% growth inhibition of *R. solani* and *P. capsici*. Significantly higher antifungal activity was observed in the leave extracts as compared to the root extracts, suggesting leaves of *Y. smalliana* as a potential sink for antifungal compounds. No significant defference in antifungal activities was observed in the extracts obtained seasonally from *Y. smalliana*. The leave extracts of *Y. smalliana* decreased

damping-off cucumber seedlings caused by *R. solani* and blight pepper caused by *P. capsici*, and powdery mildew of tomato, suggesting that the extracts of *Y. smailiana* are applicable for biological control of those plant diseases. Based on instrumental analyses by mass spectrometer, FT-IR and NMR, the antifungal compounds isolated from *Y. smailiana* were confirmed to be kaempferol-3-*O*-rhamnosylglucoside (compound 1), 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galantopyranosyl 5-spirostan-3 β , 5,27-triol (compound 2), tigogenin 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopyranoside (compound 3) and steroidal saponin with aglycon of tigogenin (compound 4). These compounds are newly identified antifungal substances from *Y. smailiana*. The compound, particularly 2, 3 and 4, are suggested to be new antifungal substances that have not been reported. The minimum inhibition concentration (MIC) values are 1 ppm for compound 3 and 4 against *R. solani*, 25 ppm for compound 3 against *F. oxysporum*, 50ppm for compound 4 against *F. oxysporum*, and 250 ppm for compound 2 against *F. oxysporum*. Taken together from these observations, the antimicrobial substances isolated from *Y. smailiana* were suggested to have a potential as natural materials for the control of pathogenic fungi.

CONTENTS

| | |
|--|-----------|
| SUMMARY | 1 |
| Chapter 1. Comprehensive description of research | 9 |
| Section 1. Research significance | 9 |
| Section 2. Research purpose and Scope | 16 |
| Chapter 2. The bioactivity of yucca (<i>Yucca smalliana</i> | |
| Fern.) extract | 17 |
| Section 1. Introduction | 17 |
| Section 2. Materials and method | 19 |
| Section 3. Results and discussion | 23 |
| Section 4. Abstract | 41 |
| Chapter 3. Isolation and identification of antimicrobial | |
| compounds from butanol fraction of yucca | |
| extract | 43 |
| Section 1. Introduction | 43 |
| Section 2. Materials and method | 47 |
| Section 3. Results and discussion | 50 |
| Section 4. Abstract | 92 |
| Chapter 4. Evaluation of the first purpose and | |
| services in this field | 94 |
| Chapter 5. Applying plan | 95 |
| Chapter 6. Information of related study | 96 |
| Chapter 7. References | 98 |

목 차

| | |
|---|----|
| 요 약 문 | 1 |
| 제 1 장 서 론 | 9 |
| 제1절 연구개발의 필요성 | 9 |
| 제2절 연구개발의 목적과 범위 | 16 |
| 제2장 실유카(<i>Yucca smailliana</i> Fern.) 추출물의 생물활성 | 17 |
| 제1절 서설 | 17 |
| 제2절 재료 및 방법 | 19 |
| 제3절 결과 및 고찰 | 23 |
| 제4절 적요 | 41 |
| 제3장 실유카 메탄올 추출물의 부탄올 분획에서 항균활성물질의 분리 및 구조해석 | 43 |
| 제1절 서설 | 43 |
| 제2절 재료 및 방법 | 47 |
| 제3절 결과 및 고찰 | 50 |
| 제4절 적요 | 92 |
| 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 94 |
| 제5장 연구개발결과의 활용계획 | 95 |
| 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 96 |
| 제7장 참고문헌 | 98 |

제1장 서론

제1절 연구개발의 필요성

20세기 급격한 세계인구 증가로 인하여 지구상의 전 인류는 식량확보라는 어려운 문제에 직면하게 되었고, 이를 해결하기 위한 방법으로 병충해, 잡초 방제기술 개발, 품종개량, 토양비옥도 증진 등을 이용하여 꾸준히 증산을 이루어 왔다. 그 중에서도 화학 합성농약을 이용한 병충해 및 잡초 방제는 농업생산 증대에 없어서는 안 될 중요한 요소로 인식되어 왔으며, 국내외 사용량은 계속 증가되고 있다. 그러나 지속적인 화학농약 사용과 과용, 오염 독성, 환경오염 및 자연생태계에 미치는 악영향, 인축에 대한 독성과 약제 저항성 병균, 해충의 발생으로 인한 방제효과 감소 등 여러 가지 문제점이 계속 제기되고 있다. 이러한 화학 농약사용의 문제점을 줄이기 위하여 생물학적 방제법이 대안으로 제안되면서 환경친화적인 생물농약개발이 활발해지고 있다. 생물농약은 농작물의 병해 또는 해충 및 잡초를 방제하기 위하여 자연 환경에서 채집 분리된 병원균, 기주 저항성 미생물, 천연식물 및 천적을 제품화한 것이다. 생물농약은 본래 자연계에 존재하고 있던 생물들을 농약으로 활용하기 때문에 환경조화형이고 생태계에 미치는 영향이 전혀 없다. 그러나 독성에 대한 안정성도 높으며, 병해충 및 잡초에 대한 방제를 실시할 때에 한정적인 특이성을 나타내기 때문에 방제 표적 이외에는 전혀 피해를 주지 않는다. 이러한 생물제제로서는 (1) 미생물(세균, 방선균, 진균, 바이러스, 원생동물 등), (2) 효소 (*Saccharomyces*, *Aspergillus* 등이 생산하는 효소), (3) 항생물질(방선균, 사상균, 세균 등이 생산하는 물질), (4) 페로몬(성교란용, 유살용 등), (5) 천적(포식성, 기생성 등), (6) 식물성물질(넝, 로테논, 콰시아, 라이아니아, 해조액 등), (7)동물성물질 (동물성유지 등), (8) 유전자 (*Bacillus thuringiensis* gene, EPSP synthase gene 등 저항성 유전자)

등 8개 종류가 있다.

생물농약의 개발 역사를 보면(Table 1), 고전적인 생물학적 제어는 1888년도에 시작되었는데 캘리포니아에서 솜방석깍지진디(cottony cushion scale)라는 감귤 해충을 퇴치하기 위해 호주산 베달리아딱정벌레(Vedalia beetle)를 수입방사하여 방제에 성공하였다. 이후, 영국에서는 1920년대 토마토 온실가루이 (*Trialeurodes vaporariorum*)를 온실가루이 쯤벌(*Encarsia Formosa*)을 수입하여 방제하였고, 1927년 미국에서는 감자 더듬이병 방제용으로 방선균을 이용하여 병원균 생장억제 효과를 얻었다. 영국에서는 1960년대에는 *European spruce sawfly*(잎벌류)를 virus로, 나방류는 *Bacillus thuringiensis*를 이용하여 방제에 성공하였고, 1991년도에는 식물저항성 유도미생물을 미생물 종자처리제로 개발하여 유도저항성을 유발시켜 식물 병의 발생을 억제하는 수준에 도달하였다. 일본에서 1962년에 담배 허리마름병에 *Trichoderma* 생균 제제의 제품화를 시초로 많은 제품이 미국에서 개발되었으며 대부분의 실용화 제품이 육묘 중 발생하는 묘잘록병 방제용으로 개발되었다(Table 2) (최용철 등, 1997).

지금까지의 미생물농약을 보면 대부분 미생물 자체를 이용하거나, 미생물이 생산하는 생리활성물질을 이용한 생물농약이다. 병해 방제용 생물농약 중 가장 획기적인 성공 제품으로는 각종 작물 특히 다년생 목본류의 뿌리에 발생되고 있는 뿌리혹 세균병(Crown gall)에 길항미생물인 *Agrobacterium radiacter* strain 84 및 K1026균주를 이용한 Galltrol, Dygall, Nogall, Bakuterozu 제품이 있다. 이 생물농약의 방제기작으로는 *A. radiobacter*세균이 생산하는 아그로신(Agrocin)이라는 항균성 물질이 병원균의 세포벽 합성을 저해하는 것으로 밝혀져 있다. 미생물이 생산하는 대사 활성물질이 생물농약으로 이용되고 있는 것은 1958년 도열병 방제용 항생물질로 알려져 있는Blasticidin S를 선두로 Kasugamycin, Polyoxin, Validamycin 등이 있다.

Table 1. A chronology of biological control

| Time | Event |
|--|--|
| <u><i>Pre-scientific era</i> (pre - 1880)</u> | |
| 'Ancient' Chin | Releases of ants for control of citrus pests |
| 'Medieval' Arabi | Transportation of ant colonies from mountains to date grov |
| <u><i>Classical era</i> (1880 DDT (1939))</u> | |
| 1988 | First major classical biological control success: importation of vedalia beetle to Californi |
| 1919 | The term 'biological control' coined by H.S. Smi |
| 1920s | Commercial production of <i>Encarsia</i> for greenhouse control of whitef |
| 1932 | Prickly pear brought under control in Australi |
| <u><i>Chemical era</i> (DDT(1939) - '<i>Silent Spring</i>' (Carson, 1962))</u> | |
| 1940s | Commercial production of <i>Encarsia</i> for greenhouse control of whitefly ceases as a result of pesticide availability |
| 1940s | Decline in number of classical biological control introductions |
| 1950s | Extensive commercial production of Bt product |
| <u><i>Integrated era</i> ('<i>Silent Spring</i>' present)</u> | |
| 1963 | 'Observations of the effect of flowers on parasitic hymenoptera' published |
| 1967 | FAO formalises the concept of integrated control of pests |
| 1970s | Extensive commercial production of Bt product |
| 1971 | First deliberate introduction of a pathogen for weed contr |
| 1980s | Devine and Collego mycoherbicide products markete |
| late 1980 | Worldwide sales of Bt estimated to exceed US\$ 50 million |
| 1992 | BIOCAT database includes 4,769 introductions of insect natural enemies with 421 pest species controlle |
| 1996 | Publication of 'Code of Conduct for Importation and Release of Exotic Biological Control Agents' |
| 1996 | Cumulative total of 1,150 deliberate releases of 365 invertebrate and fungal species onto 133 weed species in 75 countries |

(Gurr and Wratten, 2000)

Table. 2. Commercially available microbial pesticides for the control of diseases, insects and weeds

| Microorganism | Microbial Agen | Target | Commercial Nam | Country | |
|--|--|---|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| Bacteria | <i>Agrobacterium radiobacter</i> strain 84 | Crown gall | Galltro Bakuterozu Dygall | USA Japan Cana | |
| | <i>A. radiobacter</i> K102 | Crown gall | Nogall | Austra | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | Seedling root diseases Infection seedborn | Quantum 4000 Gus 2000 | USA USA | |
| | <i>B. thuringiensis kurstak</i> | Lepidopter | Dipel, Thuricide | USA | |
| | <i>B. t. aizawai</i> | Lepidoptera wax mo | Certan | USA | |
| | <i>B. t. K. strain EG 2348</i> | Gypsy moth | Condor | USA | |
| | <i>B. t. san diego</i> | Colorado potato beetle | M-one | USA | |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> | Seedling root | Blue circl | USA | |
| | <i>P. fluorescens</i> EG-105 | Damping-of | Daggaer G | USA | |
| | <i>Streptomyces griseovirides</i> | Damping-of | Mycost | USA | |
| | <i>Cercospora rodmanii</i> | Water hyacinth | ABG-50 | USA | |
| | Fungi | <i>Gliocladium virens</i> GL-21 | Damping-of | WRC-GL-21 WRC-AP-1 | USA |
| | | <i>Pythium ligandam</i> | Sugar beet disease | Polygandro | Czechoslovakia |
| | | <i>Trichoderma harzianum</i> rifai strain KRL-A | Damping-of | F-Stop | USA |
| <i>T. harzianum/polysporum</i> | | Wood-decaying fung | Binab TM T | USA | |
| <i>T. lignorum</i> | | Southern blight Sore shin (Tobacco) | Trichoderma (spore) | Japan | |
| <i>T. viridae</i> | | Verticillium in mushroom plum silver leaf disea | BINAB TSEPPIC BINA | France UK | |
| <i>Arthobotrys irregularis</i> | | Root-knot nematodes | Royal 350 | France | |
| <i>Metharhizium anisopliae</i> | | Spittle bug | Metaquino | Brazil | |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | | Nematode eggs Root-knot nematodes | Biocon | Phillippine | |
| <i>Collectotrichum agloosporioides</i> | | Cuscuta spp. | Lubao No.1 | China | |
| <i>Phytophthora palmivora</i> | | Strangler vine (<i>Morrenia adorata</i>) | DeVine | USA | |
| Virus | | <i>Neodiprion</i> NPV | Pine sawfly | Virox | UK |
| | | <i>Cydia pomonella</i> GV | Frosted chafer | Carpocapsin | France Germany |
| | | <i>Orgyia pseudotsugata</i> NPV | Douglas-firtussock moth | Biocontrol-1 Virtuss | USA Canada |

(최용철 등, 1997)

식물성 농약은 초기 로마 시대부터 20세기 중반까지 pyrethrum, rotenone, nicotine, sabadilla, quassin 등이 서유럽에서 해충기피와 독성 물질을 함유하고 있어 살충제로 널리 사용되었다. 그러나 DDT와 같은 유기염소계 농약이 합성 개발되어 1945년 농업 해충방제용으로 이용되면서 유기합성 농약의 전성기가 도래되었다. 그러나 유기 염소계 농약의 긴 잔류특성, 독성, 생물축적, 악성종양유발 등 위해성이 입증되고 1962년 Rachel Carson이 'Silent spring'이라는 저서에서 환경생태계를 파괴시키는 농약 독성의 심각성을 경고한 이후 농작물 및 식품의 안정성에 대한 사회적 관심이 대두되었다. 이에 따라 포유동물에 대한 저독성 및 뛰어난 선택성의 특성을 지닌 식물성 농약연구가 다시 거론되기 시작하여 옛날부터 사용되어 온 식물성 살충제의 개발이 활발하게 진행되고 있다.

현재 미국에서 등록 판매되고 있는 식물성 살충제는 pyrethrum, rotenone, ryania, sabadilla, neem 등 5종이 있다. 이중 pyrethrum은 가장 오래된 해충방제제중의 하나로서 Kenya, Brazil과 Tanzania에서 대부분 재배되는 제충국꽃의 추출 농약으로서 특히 곤충에 대하여 독성이 강하여 운동신경을 마비시키지만, 온혈동물에는 독성이 없기에 모기, 바퀴, 딱정벌레, 해충 등의 여러 곤충의 살충제로 이용되고 있다. Rotenone은 콩과식물인 derris, lonchocarpus, tephrosia 등의 뿌리를 마쇄한 분상 살충제로 열대 원주민들이 살어제로 이용하였으며 북아메리카에서 상업적으로 판매되고 있는데 채소, 과수류의 진딧물, 응애, 나방류, 깍지벌레, 개미, 모기류 등에 접촉형 살충효과가 있으며, 작물약해는 없다. Ryania는 열대성 관목 *Ryania speciosa*의 줄기분말로서 최초의 천연살충물질이며 칼슘이온의 방출을 방해하는 근육독성 성분으로서 사과, 배 등의 유기촉진제로서 사과좀나방 방제, 감귤, 감자, 담배 등의 왕담배나방 방제에 효과적이다. Sabadilla는 곤충의 위독성을 일으키는 백합과 식물종자 추출 살충제로 채소, 과일 해충방제에 광범위하게 적용된다. Neem 살충제는 동남아시아, 아프리카, 아메리카, 호주, 남태평양 군도 등의 아열대 및 열대지방에 많이 서식하는 광엽상록수인 neem 나무열매에서 추출한 것으로 향

진균활성, 항박테리아활성, 항바이러스활성이 있으며 피부과와 치과 약품으로도 사용되고 있으며, 급성독성이 없는 유일한 식물성 살충제로서 암성이나 돌연변이성이 없다. 유효성분인 azadirachtin은 온실가루이, 총채벌레류, 나방류, 진딧물류, 응애류, 각지벌레류, 잎벌레류 등에 섭식방지, 기피효과가 강하고, 탈피를 저해함으로써 기형, 산란저해 등의 효과가 있으며, 정상 교미활동을 방해하여 번식을 억제시킨다.

국내의 개발현황을 보면은 1930년대에 사과면충을 사과면충좀벌을 이용하여 방제에 성공한 이후, 1976년도 제주도 감귤에 발생하는 루비각지벌레 방제용으로 루비붉은강충좀벌을 일본에서 도입하여 정착에 성공한 예가 있다. 국내에서의 생물농약의 연구와 개발은 외국에 비해 30-50년 뒤늦은 1980년대에 기초적 연구가 수행되어 1987년에 인삼뿌리썩음병을 방제하기 위하여 바이코나를 개발하였고, 1994년에는 고추역병방제용 AC-1을 개발하였으며, 2003년에는 토양미생물을 이용하여 오이의 흰가루병 방제용인 '탑시드'와 배추좀나방에 효과적인 '솔빛채'를 개발하였다(백수봉 등, 2001; <http://www.greenfarmer.com>). 한편, 미생물 생산 활성물질인 농업용 항생물질 연구 역시 외국에 비해 20-30년후에 추진되었으며 현재도 신물질탐색중에 있다. 특허청에 따르면 지난 2000년 이후 생물농약의 출원비율이 급속히 증가해 90년대 초반 전체 농약특허출원 중 8.9%였던 비중이 2000년대 들어서는 18%로 두 배 가량 높아졌다. 지난 2001~2002년 2년간 특허 출원된 생물농약은 106건에 달한다.

현재 생물농약의 대부분은 미생물농약으로서 천연물을 이용한 생물농약의 개발은 아직도 아주 미미한바 항균활성물질의 탐색단계에 불과하다. 국내에서의 항균활성에 관한 연구를 보면 소목(이성규, 2003), 당귀와 백지(유시용 등, 2001), 헛개나무(최윤정 등, 2003), 국화과 식물(천상욱 등 2003), 봉선화(강수철, 문영희, 1992), 의성개나리(노영수, 1975), 갓(신승원, 강찬아, 2001), 계피(방규호 등, 1997), 편축(김홍식, 조광현, 1980), 산철쭉(홍윤희 등, 2003), 산초나무(민경희, 1998), 황련(정일민, 백수봉, 1997), 잣나무(김종진 등, 2001), 참소리쟁이(조광현, 김홍식, 1980), 개똥썩

(김현철 등, 2001), 참쭈(이현옥 등, 1999), 회화나무(Park *et al.*, 2003), 비목나무(최용화 등, 2003), 굴피나무(최용화 등, 2003) 등이다. 이 외에도 다양한 생약과 국내자생식물의 메탄올 추출물의 항균활성에 관한 연구도 수행되었다(양민석 등, 1995; 장소영 등, 2003). 이들로부터 규명된 항진균 활성을 살펴보면 당귀와 백지에서는 coumarin 화합물, 헛개나무에서는 flavonoid 화합물, 회화나무에서는 isoflavonoid 화합물, 봉선화와 굴피나무에서는 naphthoquinonis 화합물, 계피, 갓, 참쭈, 개똥쭈에서는 정유성분, 산초나무에서는 alkaloid 화합물, 의성개나리과피에서는 triterpenoid 화합물들이었다.

1992년 리우 세계환경회의에서 농약사용량의 20%를 생물농약으로 대체하도록 결의함에 따라 각국은 정부차원에서 화학농약의 사용량을 제한하고 생물농약 개발을 촉진하는 정책을 추진하고 있다. 이처럼 화학농약의 사용을 줄이고 생물농약이 사용을 증대시키는 세계 농약산업의 추세와 함께 생물농약의 시장 규모도 매년 증가하고 있는데 현재는 세계 농약시장규모(350억불)의 3%에 불과하나 2010년에는 전체 450억불의 10%를 차지할 것으로 예측되며, 국내에서도 현재는 전체 농약시장의 1% 내외 수준이나 2010년에는 10%(1,220억원)로 증가할 것으로 전망되고 있다.

이러한 국내외적인 농업생산 환경변화에 맞춰 정부 차원에서 1997년도 12월에 환경농업육성법이 공포되었다. 그 후에 실천이 진행되고 있는데, 농림부는 2001년 친환경농업육성 5개년(2001~2005)계획 수립으로 친환경농업을 체계적으로 육성하기 위한 정책목표와 방향 설정하고 1999년 대비 2005년까지 화학비료, 농약 사용량 30% 감축하고 친환경농산물 생산량을 5%까지 확대하여 전체 농산물의 0.2%인 유기농산물 비중을 2005년까지 0.5%, 2010년까지 선진국 수준인 2.0%로 확대해 나갈 목적으로 하고 있다. 이처럼 화학농약의 사용을 줄이고 생물농약의 사용을 증대시키는 것은 세계 농약산업의 새로운 추세가 되고 있다. 따라서 과도한 유기합성농약의 환경오염과 생태계 파괴와 같은 단점을 보완 또는 대체하는 것이 날이 갈수록 점점 더 중요한 문제로 대두되고 있는 현실에서 생

물농약의 개발에 많은 투자와 관심이 모아진다.

제2절 연구개발의 목적과 범위

새로운 항균제의 개발은 기존 항균제의 화학수식을 통한 새로운 유도체 합성, 제제기술을 통한 독성감소와 약물 delivery 증진을 위한 신제형 제조, 천연물로부터의 새로운 항균물질의 탐색 등으로 요약할 수 있는데, 그 중에서 천연물을 대상으로 하는 항균제의 연구는 합성화합물에 비해 독성이나 부작용이 적거나 없는 천연물을 대상으로 한다는 점에서 꾸준히 진행되고 있다. 천연물유래 물질들은 항균제로 바로 이용되기도 하고 또한 새로운 물질이 개발에 선도물질로서 이용되기도 한다. 최근 화학합성 원료의 유해성 문제가 제기되면서 천연물을 원료 또는 첨가물로 포함하는 의약품이나 식품, 농약 등이 늘고 있다. 구체적으로 천연약물(Natural Medicines)/전통동양약물(Traditional Medicines)을 비롯하여 건강보조식품(Dietary Supplements), 기능성 식품(Nutraceuticals), 천연색소(Natural Dyes and Coloring Agents), 천연향료(Natural Fragrant), 기능성 화장품(Functional Cosmetics), 천연살충제-농약(Natural Insecticides-pesticides) 등이다.

우리는 천연자원으로부터 새로운 항균물질을 개발하고자 주위에서 흔히 볼 수 있는 식물의 메탄올 추출물을 이용하여 항균활성을 검토한 결과 유카추출물이 강한 항진균활성을 가지고 있는 것을 발견하였다. 특히 유카 추출물은 인체에 무해하므로 식품으로서 응용되기에 작물보호 및 자연생태계 유지, 인체무해라는 측면에서 보다 안전하고 부작용이 적은 생물농약으로서의 응용성 검토가 필요하다. 본 연구에서는 실유카에 함유된 항균활성물질을 분리하여 동정하고 그 활성을 평가함으로써 새로운 생물농약으로서 이용가능성을 제시하고자 하였다.

제2장 실유카 (*yucca smalliana* Fern.) 추출물의 생물활성

제1절 서설

병해충 및 잡초의 방제를 위하여 널리 사용되어온 유기합성농약은 지속적이고 광범위한 사용과 과다한 사용은 환경오염, 저항성 출현, 잔류독성, 생태계교란 (환경호르몬) 등의 문제를 일으키기 때문에 합성농약의 사용량을 가능한 제한하도록 유도하고 있다. 이러한 유기합성농약의 문제점을 극복하기 위한 방법으로 저항성 품종 개발, 경종적 방제, 생물적 방제, 천연물 농약 등이 이용되고 있다.

식물, 미생물, 및 동물에서 기원하는 생물농약은 화학농약에 비해 방제 효과가 늦게 나타나고 유해생물 종류에 따라 각각 다른 농약을 개발해야 되는 단점이 있음에도 불구하고 생태계 파괴 없이 특정 해충만을 골라서 방제할 수 있다. 또한 인체에 유해하지 않고 수확기에도 사용이 가능하기 때문에 소비자들의 호응은 물론 농민들의 선호도가 매우 높은 상태로서 농작물 재배면적이 감소함에 따라 전체 농약 사용량은 급격히 줄어들고 있음에도 불구하고 생물농약의 사용량은 점차 증가하고 있다.

1970년대에 독일로부터 시작된 친환경농업정책의 수행은 미국, 유럽으로 급속하게 확산되었는데 특히 북유럽에서는 유기농업의 면적과 유기농산물의 비중이 급속히 증가하였다. 독일은 농산물 과잉 생산의 대책으로 유기농업전환을 원칙으로 하는 조방화 농업을 본격 추진하고 있으며, 실천 농가에 장려금을 지급하고 있다. 영국은 유기농업 전환농가에 재정적 지원을 함으로써 유기농업을 권장하고 있고, 비료·농약·잉여 가축분뇨에 대한 환경세를 부과하여 환경 오염부담 경감을 유도하고, 환경세의 세수는 농업분야에 투자하고 있다. 특히, 최근 북유럽 지역에 유기농업이 크게 확산되고 있다. 유기농업 비중을 보면, 덴마크의 경우 1995년도에

전체 농지면적중 1.3%이던 유기농업 면적이 2000년도에는 7%로 확대 되었으며 유기농산물의 시장 점유율이 15~20%로 증가되었다. 스웨덴은 유기농업의 전환 목표를 10%로 설정하여 1996년에 전체 농업생산의 5%를 유기농업으로 전환하였다.

우리나라는 90년대 들어와서 친환경농업에 대한 국민들의 관심이 높아지면서 1996년에 “21세기를 향한 농림수산 환경정책”을 수립하여 정부 차원의 본격적인 친환경농업육성을 추진하였다. 또한 97년에는 환경육성법을 제정하고, 98년에는 친환경농업의 원년으로 선포하였으며, 99년에는 친환경농업직접지불제를 시행하였다. 따라서 모든 농업 정책이 환경친화적으로 변화하고 있으며 특히 식물의 병해충 방제 기술에 있어서는 더욱 환경친화적으로 보급되도록 추진되고 있다. 그러므로 농업생산 환경의 유지와 보전 및 안전한 농산물의 생산, 자연환경 및 생태계의 보존을 지향하는 농법이 급속히 확대되고 있는 추세에 맞춰 생물농약의 개발이 활발하게 이뤄져야만 한다.

식량증산과 안정성 농산물의 생산을 위한 생물농약의 개발을 위한 시도가 활발하게 이루어지고 있다. 현재 생물농약의 연구를 살펴보면 대부분 미생물제, 천적 그리로 페로몬이다. 현재 우리나라에서 시판되는 미생물살충제는 대부분 BT 제제이며 대부분 수입에 의존한다. 게다가 식물기원의 생물농약은 아직도 연구단계로서 우리나라에서는 생물농약으로 등록된 것은 없는 상황이다.

천연물에서의 생리활성물질의 연구는 주로 인간에게 유용한 화합물을 얻고자 하는데서 출발했으며 또한 아주 획기적인 결과를 얻었다. 양귀비로부터 얻은 진통제인 아편(morphine)이나 자근에서 얻은 색소인 shikonine, 푸른곰팡이에서 얻은 항생제 페니실린 등이 모두 천연물화학의 업적이다. 최근에는 천연물화학의 대상이 의약품 뿐만이 아니라 식품첨가물, 천연색소, 향료, 천연보조제, 비료, 농약, 건강보조식품, 기능성 향장품 등으로 그 분야가 넓어지게 되었다.

식물은 구조적으로 매우 다양한 항균활성 물질을 생산하는데, 이들은

phenolics과 phenolic acids, coumarin과 pyrones, flavonoids, isoflavonoids, steroids와 steroidal alkaloids 및 기타물질 등 6개 그룹으로 나눌 수 있다 (Mitra et al. 1984). 그중 사포닌의 항균활성에 관한 연구를 보면 용설란과, 백합과, 가지과, 마과, 갈매나무과 등 다양한 식물종에서 연구되었다 (Table 3).

국내에서의 연구를 보면은 유시용 등(2001년)은 당귀와 백지로부터 coumarin 계 물질들을 분리하였는데 메탄올 추출물들은 벼도열병에 96% 이상의 방제효과를 보였고, 당귀는 또한 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병 등에 대해 70% 이상의 방제 효과를 보였으며, 백지는 토마토 역병에 대해 85%의 높은 방제효과를 나타냈다. 천상욱 등(2003년)은 수종의 국화과 식물의 지상부 추출물로부터 살충 및 항균활성 연구를 수행하였는데 고들빼기, 떡쭈는 점박이응애에, 쭈부쟁이와 한련초는 도열병에, 가막살이와 더위지기는 벼 흰잎마름병에, 쭈부쟁이, 가막살이 및 한련초는 탄저병에 높은 항균활성을 보였다.

본 연구에서는 실유카의 식물병원균팡이에 대한 항균활성을 확인하고 생물농약으로서 가능성을 규명하고자 실시하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 식물체로부터 시료의 추출

본 실험에서 사용한 실유카(*Yucca smalliana* Fern.)는 2001년 6월부터 2002년 5월까지 전남대학교 대강당 부근에서 채취하였다. 채취한 식물은 꽃, 잎, 뿌리로 나눈 후 각각의 부위를 1 cm 정도로 잘게 절단하였다. 이들 시료를 80%(v/v) 메탄올(1:10)로 실온에서 2회 추출하였다. 추출물을 모아서 여과한 다음 회전감압농축기에서 메탄올을 완전히 제거하고 동결건조하여 시료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

본 실험에서 사용한 유기용매는 분석용 1급시약을 사용하였다. 항균활성 검색에서 사용한 배지는 PDB (Potato Dextrose Broth, Difco, USA), PDA (Potato Dextrose Agar, Merck, Germany), BHI (Brain Heart Infusion, Difco, USA) 등이다. 오이모잘록병 실험에 사용한 오이종자는 흥농종묘의 겨울살이청장오이를 사용하였으며, 고추역병 실험에서 사용한 고추는 흥농종묘 농광을 사용하였다. 항산화활성 측정에서 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)와 항혈전 활성 측정에서 사용된 heparin, APTT Reagent, Plasma 등은 sigma사로부터 구입하였다. 혈액응고측정기는 Fibrometer (Fibrosystem; BBL, Cockeysville, Maryland)를 사용하였다.

3. 항균활성의 검색

1) 병원성 진균

실유카의 부위별 향미생물 활성 검색을 위해 사용된 미생물은 식물병원성 곰팡이 *Fusarium oxysporum* (KACC 40053), *Rhizoctonia solani* (KACC 40101), *Botrytis cinerea* (KACC 40574), *Phytophthora capsici* (KACC 40483) 등을 사용하였다. 오이모잘록병에 대한 항균실험에 사용한 *Rhizoctonia solani*는 경상대학교 미생물연구실로부터 분양받았다.

2) 병원성 세균

균주 *Escherichia coli* O157:H7은 국립보건원에서 분양받았으며, *Salmonella typhimurium* LT2 strain ATCC 19585와 *Listeria monocytogenes* ATCC 10403은 전남대학교 의과대학 미생물학 실험실로부터 분양받았다.

3) 사용 배지

*P. capsici*는 20% V-8 한천 (20% 주스, 0.03% CaCO₃, 2% 한천)에 pH 6.0으로 맞춘 배지를 사용하였으며 나머지 식물 병원성 곰팡이는 PDA배지를 사용하였다. 세균의 경우는 BHI배지를 사용하였다. 오이 모잘록병 실험에서 *R. solani*는 PDB배지를 사용하였다.

4) 항진균 활성 측정

항미생물 활성의 검증은 배지에 추출성분을 일정 농도로 가하여 균 현 아가 배지 중앙에 균을 접종하여 그 성장 직경을 측정하였다. 배지 조제는 0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25% 실유카 추출물을 함유한 PDA배지를 멸균하는 방법과 멸균한 PDA배지에 0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25% 실유카 추출물을 첨가하는 두가지 방법을 사용하였다. 2001년 11월 2일에 채취한 실유카잎 추출물로 *F. oxysporum*, *P. capsici*, *R. solani*, *B. cinerea*에 대한 항균활성을 측정하였으며 *P. capsici*, *R. solani*의 균사에 대한 영향을 현미경하에서 관찰하였다.

5) 항세균 활성 측정

미생물에 대한 항균활성을 조사하기 위해서 각각 실유카 추출물을 0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25%를 함유한 각각의 배지에 균을 접종한 다음 30℃에서 배양하면서 균의 성장 속도를 spectrophotometer (Hitachi U-2001, Japan) 600 nm에서 관찰하였다. 항균활성은 대조구와 시험구의 성장률을 비교하여 저해률로 구하였다.

6) 실유카 추출물의 오이 모잘록병에 대한 항균활성

가. *R. solani* 접종물의 준비

250 ml 삼각플라스크에 50 ml의 PDB를 넣고 멸균한 다음 PDA에서 배양한 *R. solani*를 접종하였다. 이 접종물을 25℃에서 5일간 정치 배양하였다. 배양액 표면에 형성된 *R. solani* 균사를 멸균수에서 2분간 homogenized 한 다음 토양에 25 mg/kg를 접종하였다(Asaka and Shoda, 1996).

나. 병원균의 접종 및 항균활성

상토를 3회 연속 121℃에서 1시간 멸균시킨 상토에 2% NaClO에서 10분간 멸균시킨 오이종자를 포트당 4알씩 파종하였다. 파종 5일 후 *R. solani*를 접종하고 1% 유카추출물을 15 ml씩 처리하고 5일 후 오이의 생육상황을 관찰하였다.

7) 실유카 추출물의 고추역병균에 대한 항균활성

가. *P. capsici*의 배양 및 유주자회수

20% V-8 한천(20% 주스, 0.03% CaCO₃, 2% 한천)에 pH 6.0으로 맞춘 배지에서 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종하여 26°C에서 plate의 가장자리까지 배양한 후 유리 도말봉으로 기중 균사를 제거하여 형광등과의 거리가 15 cm되는 곳에서 다시 3일간 배양하여 포자낭을 형성시켰다. 여기에 멸균수 10 ml를 넣고 4°C에서 1시간 chilling시켜 유주자를 포자낭으로부터 방출시켜 유주자를 회수하였다 (Shim and Lee, 1994).

나. 병원균의 접종 및 항균활성

50일간 키운 고추에 *P. capsici* 10 ml (3×10^5 zoospores/ml)를 접종하고 동시에 한 포트당 1% 유카추출물 20 ml를 처리하고 생물방제력을 확인하였다.

4. 항산화활성의 검색

Sakata의 방법으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 소거능으로 나타냈다. 즉 DPPH (Sigma, USA)를 에탄올에 용해하여 제조한 용액 (0.15 mM) 0.9 ml와 시료용액 0.1 ml를 test tube에 넣고 vortex에서 혼합한 다음 실온에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다 (위 등, 2000). 천연항산화물질인 α -tocopherol을 표준물질로 비교하였으며, DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도인 SC50으로 나타냈다.

5. Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) 항응고 활성 측정

Plasma 100 μ l와 시료 25 μ l를 test tube에 넣어 37 °C에서 1 min동안 preincubation 시킨 후 APTT reagent 100 μ l를 넣고 3 min 동안 반응시켰다. 0.02 M CaCl₂ 100 μ l를 넣고 clotting time을 측정하였다.

6. 포장실험에서 토마토 흰가루병 억제 효과

병반면적은 일반 농약 효과점정 기준에 따라 육안관찰로 0에서 5까지 6단계의 지수로 구분(무발병은 0, 면적률로 5% 이하는 1, 20% 이하는 2, 40% 이하는 3, 60% 이하는 4, 그리고 60% 이상은 5)하여 수치화 하였다(조 등, 1998). 1%의 실유카 추출물과 시중에서 판매되고 있는 전착제 카바(blend of alkylaryl polyethoxylate and sodium salt of alkylsulfonated alkylate 60%) 0.05%를 혼합하여 처리하였다. 처리는 2회 분무 처리하였으며 분무기를 사용하여 물방울이 맺혀 일부는 흘러내릴 정도까지 충분량을 잎표면에 골고루 분무하였다. 대조구는 같은 방법으로 증류수와 전착제 카바만 각각 처리하여 물과 전착제에 의한 흰가루병의 발생률 변화를 비교하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 식물체로부터 시료의 추출

실유카(*Yucca smalliana* Fern.)를 채취하여 꽃, 줄기, 잎, 뿌리 부위별로 나눈 후 각각의 부위를 1 cm 정도로 잘게 절단하였다. 이들 시료를 80% 메탄올로 추출하였다. 추출물을 합친 후 여과 한 다음 회전감압농축하여 메탄올을 완전히 제거한 후 동결건조 시켰다. 시기별 채취한 시료의 메탄올 추출물 함량은 표 3과 같다. 식물생장이 왕성한 시기인 6월과 8월에 채취한 시료의 메탄올 추출물의 수율은 5.8%와 8.2%로서 낮고 나머지 시기에 채취한 시료는 모두 10%이상의 수율을 나타내, 여름을 제외한 나머지 계절에는 좋은 수율을 얻을 수 있었다.

Table 3. Seasonal and organ variation of methanol extract from *Yucca smalliana* Fern.

| Day | Fresh weight (g) | Methanol extract (g) | % Content |
|------------|------------------|----------------------|-----------|
| 2001.06.26 | 100 | 5.84 | 5.8 |
| 2001.08.26 | 100 | 8.2 | 8.2 |
| 2001.11.02 | 1300 | 139.5 | 10.7 |
| 2002.01.02 | 102 | 11.0 | 10.8 |
| 2002.03.02 | 103 | 15.5 | 15.0 |
| 2002.05.02 | 100 | 12.4 | 12.4 |
| flower | 1068 | 54.7 | 5.1 |
| root | 820 | 114.1 | 13.9 |

2. 항진균 활성 측정

11월 2일에 채취한 실유카잎 추출물로 *F. oxysporum*, *P. capsici*, *R. solani*, *B. cinerea* 에 대한 항균활성을 측정하였다 (Fig.1). 배지는 추출물을 PDA배지와 같이 멸균 한 것과 PDA배지만 멸균하고 추출물을 첨가한 후 배지를 만드는 두가지 방법을 사용하였다. 추출물을 멸균했을 때와 멸균하지 않았을 때의 항균력을 보면 0.25% 농도에서는 *F. oxysporum*을 제외한 나머지 균에 대해서 약 10%의 활성차이를 보였지만 0.1% 이하의 농도에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

실유카 부위별, 시기별 활성을 알아보기 위하여 0.1%농도에서 실험하였다(Fig.2). 뿌리 추출물은 *F. oxysporum*, *P. capsici*, *R. solani*, *B. cinerea* 에 대한 항균활성이 아주 낮거나 혹은 없는 반면 꽃과 잎 추출물은 *F. oxysporum*에 대해서는 각각 64%, 34%, *P. capsici* 에 대해서는 각각 66%, 62%, *R. solani* 에 대해서는 각각66%, 61%, *B. cinerea*에 대해서는 각각27%, 41%의 항균활성을 나타냈다.

시기별 항균활성은 *R. solani*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* 세 균을 이용하여 두가지 방법으로 측정하였다. 한가지는 메탄올 추출물을 0.1%로 활성을 측정하였으며, 다른 한가지는 식물체 1%에 상응한 메탄올 추출물로 활성을 측정하였다(Fig. 3). 메탄올 추출물 0.1%와 식물체 1%에 상응한 추출물로 활성을 측정했을 때 비슷한 항균효과를 나타냈다. 8월26일 시료는 *R. solani*에 대해서는 약 45%의 억제율을 나타냈지만 *B. cinerea*에 대해서는 약 7%로서 낮은 항균활성을 나타냈으며, *F. oxysporum*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. 다른 시기에 채취한 시료들은 세 균에 대하여 비슷한 항균활성을 나타냈다.

또한 실유카 추출물의 *P. capsici*, *R. solani*의 균사에 대한 영향을 400배 확대한 현미경하에서 관찰하였는데(Fig. 4) 실유카추출물은 두가지 균에 대해 모두 균사의 형태를 변형시키고 파괴하여 사멸시켰다.

11월 2일에 채취한 시료의 메탄올 추출물 200 g을 용매분획하여 hexane (12.3 g), ethyl acetate (18.6 g), butanol (100 g), 물 (43.9 g)획분

을 얻었다. 각 분획을 0.1% 농도에서 *F. oxysporum*, *R. solani*, *B. cinerea*에 대한 항균활성을 측정하였다(Fig. 5). 물층과 부탄올층에서 강한 항균활성을 나타냈는데 물층은 각각 60.0, 67.8, 84.6, 58.3%, 부탄올층은 각각 36.0, 46.0, 66.1, 58.3%의 억제효과를 나타낸 반면 에틸아세테트층은 각각 6.2, 6.2, 35.5, 6.0%로서 상대적으로 아주 낮은 항균활성을 나타냈다.

이상의 결과로부터 실유카 추출물은 키틴질이나 다당류로 된 세포벽을 가진 다양한 곰팡이에 대해 높은 활성을 가지고 있는바 생물농약으로서의 이용가능성을 제시하였다.

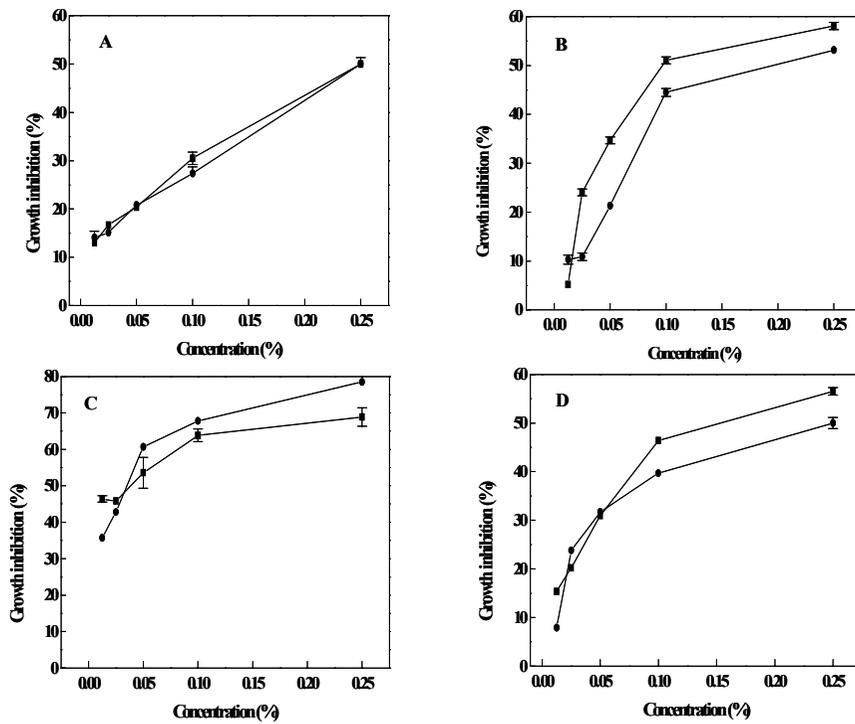


Fig.1. Effect of yucca extracts on the growth of plant pathogens

A. *F. oxysporum*

B. *P. capsici*

C. *R. solani*

D. *B. cinerea*

● The extracts was added to PDA and autoclaved

■ The extracts was added to autoclaved PDA

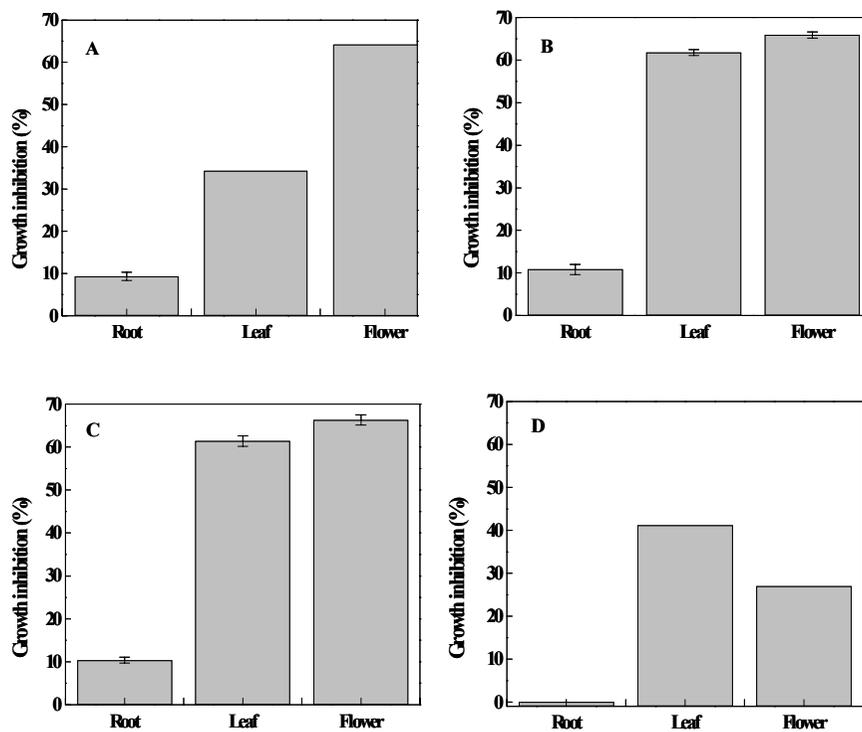


Fig. 2. Effect of yucca extracts on the growth of plant pathogens at a concentration of 0.1%

A. *F. oxysporum*

B. *P. capsici*

C. *R. solani*

D. *B. cinerea*

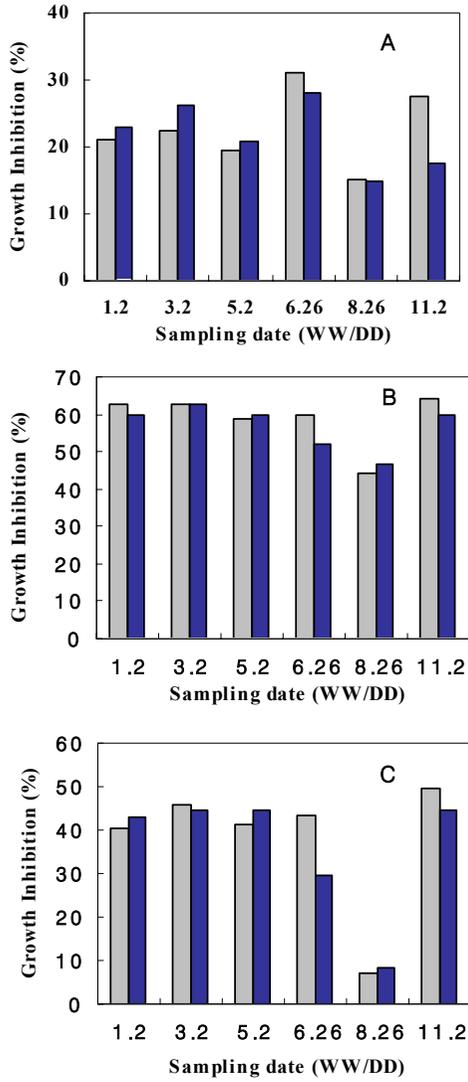


Fig. 3. Growth inhibition of plant pathogen by the extracts seasonally obtained from yucca

A. *F. oxysporum*

B. *R. solani*

C. *B. cinerea*

■ - 0.1% (MeOH extract)

■ - 1% (fresh yucca)

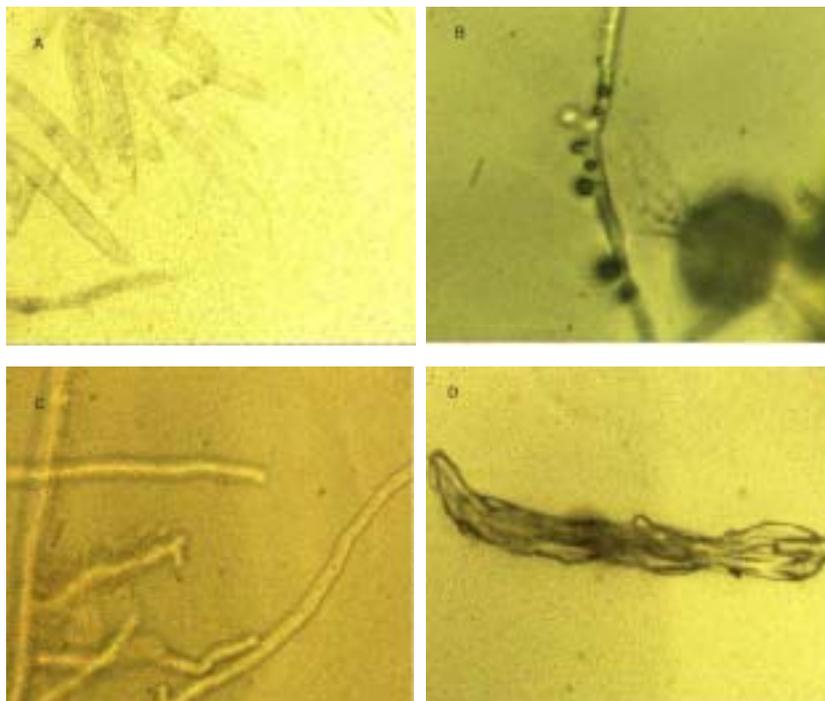


Fig. 4 Effect of yucca extracts on the morphology of *P.capsici* and *R. solani* hyphae at a concentration of 0.1%

A *P. capsici*

B *P. capsici* + yucca extracts

C *R. solani*

D *R. solani* + yucca extracts

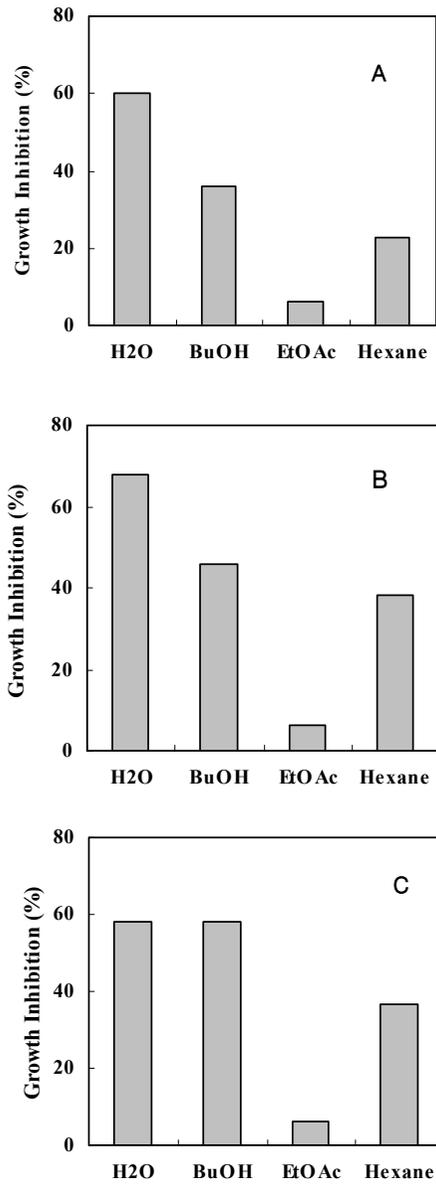


Fig. 5. Effect of solvent partitioning fractions of 80% MeOH extract from yucca on the growth of plant pathogens at a concentration of 0.1%

A. *F. oxysporum*

B. *R. solani*

C. *B. cinerea*

3. 항세균 활성 측정

식중독 원인균인 *Escherichia coli* O157, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성을 조사하기 위해 실유카 추출물을 0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25% 함유한 각각의 배지에 균을 접종한 다음 30℃에서 배양하면서 6시간, 12시간에 균의 성장정도를 spectrophotometer 600 nm에서 관찰하였다(Fig. 6). 서로 다른 농도에서 세가지 균의 생장은 대조구와 비슷한바 이 세가지 균에 대해서는 항균활성이 없는 것으로 판단되었다. 이것은 Tanaka 등이 보고한 결과와 비슷하였으며, Tanaka 등의 실험에서도 saponin 분획으로 Gram-positive와 Gram-negative 박테리아에 대한 항균활성을 측정하였을 때, 항박테리아 활성은 없거나 아주 낮았다 (Tanaka, 1996).

4. 오이 모잘록병에 대한 효과

오이 모잘록병의 방제효과를 알아보기 위하여 과중 5일 후의 pot에 오이 모잘록균(*R. solani*)을 접종함과 동시에 실유카메탄올추출물을 1%(W/V)로 조제하여 처리하였다. 3일 동안 생육시킨 후, 모잘록병방제 효과를 조사한 결과는 Fig. 7과 같다.

*R. solani*만을 처리한 구에서는 모잘록병에 의한 현상인 오이 식물체의 지체부가 갈변하고 잘록하게 썩으면서 쓰러지는 현상이 심하게 발생하여 47주 중 35주 식물체가 고사되고 있었으나, 유카추출물을 처리한 구(48주)에서는 모잘록병의 발생은 없었고 그 중에서 2주만이 약간의 성장저해를 나타내고 나머지는 정상적인 생육을 하였다. 또한 유카만을 처리한 것은 무처리구와 같이 아무런 현상을 나타내지 않았다. 이것으로 보아 유카 추출물은 오이 식물의 성장에는 영향을 미치지 않고 다만 *R. solani*의 성장을 억제하여 *R. solani*에 의한 오이모잘록병에 효과적인 천연물농약으로 사용 가능성이 기대된다.

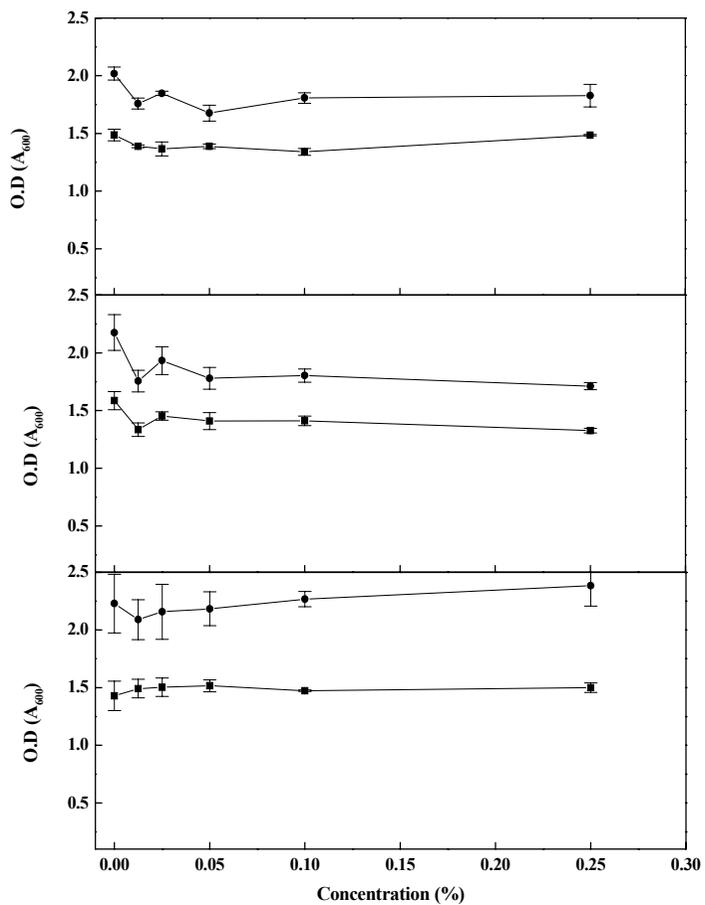


Fig. 6. Effect of yucca extracts on the growth of bacteria at variable concentrations.

A. *Escherichia coli* O157

B. *Salmonella typhimurium*

C. *Listeria monocytogenes*

■ - 6 hr

● - 12 hr



Fig. 7. Effects of Yucca extracts on the control of cucumber seedlings damping-off caused by *R. solani* before (A) and 3 day after treatment (B) of the extracts and the pathogen.

5. 고추역병균에 대한 효과

실유카 추출물의 고추역병균의 방제효과를 알아보기 위하여 3×10^5 개/ml 유주자 10 ml를 파종 60일 후의 pot에 고추역병균 (*P. capsici*)을 접종함과 동시에 1% 유카추출물 20 ml를 처리하였다. 10일 동안 생육시킨 후, 고추역병방제효과를 조사한 결과 *P. capsici*만을 처리한 것은 고추역병에 의한 현상으로 잎에 암갈색의 병반이 생기면서 잎이 누르스름해졌으며, 뿌리 부근에서도 부패하면서 흑갈색으로 변하였으나 *P. capsici*와 실유카추출물을 함께 처리한 것은 역병현상이 나타나지 않았고 또한 실유카추출물만 처리한 것에서는 무처리구와 같이 아무런 현상을 나타내지 않았다 (Fig. 8). 이것으로 보아 실유카추출물이 *P. capsici*에 의한 고추역병의 발병을 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다.

6. 토마토 흰가루병에 대한 억제 효과

토마토 흰가루병이 발생한 잎의 물 처리구는 처리 7일 후 병반면적지수 3.5에서 5.0을 보인 반면 전착제 카바만 처리구는 2.5 수준에 머물렀으며, 실유카와 카바를 같이 처리한 구에서는 0.8의 병반면적지수를 보였으며 (Fig. 9), 토마토의 성장에는 영향을 주지 않았다.



Fig. 8. Effects of yucca extracts on the control of pepper late blight caused by *P. capsici* 10 days after treatment of the extracts and the pathogen



Fig. 9. Effect of yucca extract on the development of powdery mildew of tomato. Tomato leaves were examined 7 days after foliar spray of yucca treatment.

6. 항산화 활성 측정

실유카 각 부위별 항산화활성을 DPPH법으로 측정한 결과 잎 추출물에서 항산화 활성이 제일 높고, 다음 꽃 추출물이었으며, 뿌리 추출물은 항산화활성이 없었다(Table 4).

항산화 활성이 제일 높은 잎 추출물은 hexane, ethylacetate, buthanol, water 등 유기용매로 분획한 다음 항산화 활성을 측정한 결과 0.1%에서 각 분획을 희석하여 항산화활성을 측정해본 결과 0.2%에서 각 분획은 80, 75, 77, 56%의 항산화활성을 나타냈다(Fig. 10).

이러한 실유카의 항산화활성은 실유카에 함유되어 있는 페놀화합물에 기인한 것으로 stibenenes, resveratrol, trans-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbens, yuccaols A-C 등이 존재가 이미 확인되었다(Olas et al., 2003; Piacente et al., 2002; Olezdek et al., 2001). 특히 resveratrol은 포도와 다양한 음식물의 phytoalexin에 존재하는 물질로서 항산화활성뿐만 아니라 항암 및 항염증 효과, 항알레르기 효과가 있다고 알려져 있다(Lee et al., 2003; 우 등, 2003; 장 등, 2001; Cheong et al., 1999). 따라서 실유카의 항산화 기능성 소재로서의 이용가능성이 기대된다.

7. 항혈전활성 측정

실유카 부위별 추출물을 1% 농도에서 항혈전 활성을 측정해본 결과 항혈전 활성이 확인되지 않았다.

Table 4. DPPH free radical scavenger activity (SC50) of the methanol extract from yucca organ

| Organ | Concentration (g/ml) |
|----------------------|----------------------|
| α -tocopherol | 9.4 |
| leaf | 492 |
| flower | 1347 |
| root | - |

제4절 적요

최근 합성 의약품이나 합성농약의 부작용과 독성에 대한 관심이 높아짐에 따라 천연물로부터 독성이나 부작용이 적거나 없는 보다 안전한 새로운 형태의 물질 개발을 위한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되어 천연물을 원료 또는 첨가물로 포함하는 의약품이나 식품 농약이 늘고 있다. 즉 천연약물, 건강보조식품, 기능성 식품, 천연색소, 천연향료, 기능성 화장품, 천연살충제-농약 등이다. 특히 20세기 식량증산을 위해 농약의 지속적인 사용과 과다사용은 환경오염, 잔류독성, 생태계교란 등의 우려가 있어 그 사용량을 제한하고 있기에 새로운 환경친화형 생리활성물질의 개발과 이용이 필요하다.

본 연구에서는 생리활성 특히 항진균활성을 가지고 있는 성분을 분리하고 구조를 동정함으로써 새로운 항진균물질을 개발하고 이용할 목적으로 주위에서 흔히 볼 수 있는 자원식물을 검토한 결과 실유카의 강력한 항진균활성을 발견하였다. 실유카의 뿌리, 줄기, 꽃의 methanol 추출물의 항진균활성을 측정해본 결과 실유카 줄기와 잎 추출물은 식물병원균인 *F. oxysporum*, *P. capsici*, *R. solani*, *B. cinerea*에 대해서는 모두 높은 활성을 나타냈으며 또 높은 항산화활성도 가지고 있었다. 특히 0.1% 농도에서 *R. solani*, *P. capsici*에 대해서는 잎과 꽃 추출물은 60% 이상의 높은 활성을 가지고 있는데 비해 뿌리 추출물은 약 10%의 낮은 활성을 나타냈다. DPPH법에 의한 항산화활성 측정에서 잎 추출물의 항산화활성이 가장 높았으며 뿌리추출물은 활성이 없었다. 실유카 잎 추출물을 hexane, ethyl acetate, butanol, water로 용매분획하여 항진균활성을 측정해본 결과 butanol과 water 분획은 모든 균에 대해 높은 활성을 나타냈다. 하지만 실유카 추출물의 항응고활성은 확인되지 않았다.

실유카 추출물의 생물농약으로서의 이용 가능성을 검토하기 위해 오이 모잘록병과 고추 역병에 대한 생물방제 활성을 알아보았다. 결과 1%의 실유카 잎 추출물은 식물의 생장에는 거의 영향을 주지 않고 병원균

인 *R. solani*, *P. capsici* 에 대해서는 높은 방제효과를 나타냈다. 또한 토마토 흰가루병에 대해서도 병반면적지수를 현저하게 감소시켜 흰가루병의 발생을 억제시켰다. 이상의 결과로부터 실유카추출물은 실용적인 환경보전형 방제제로 개발할 가능성이 매우 크다고 할 수 있다.

제3장 실유카 메탄올 추출물의 부탄올 분획에서 항균활성 물질의 분리 및 구조해석

제1절 서설

식물조직 내에 함유되어 있는 항균활성물질을 분리하여 이용하려는 노력은 의약품 개발에서 오래 전부터 시도되어 오다가 지금은 식품 첨가제, 생물농약 개발에서도 많이 시도되고 있다. 특히 근래에 들어 화학합성농약의 환경오염, 잔류독성, 생태계교란 등의 문제들이 제기되면서 그 사용량이 제한 또는 규제되면서 인체와 환경에 피해가 없거나 적은 천연물을 이용한 생물농약개발에 대한 관심이 높아지면서 이러한 식물조직내의 항균활성물질(preformed or induced antimicrobial compounds)을 분리하고 이용하려는 연구가 국내외적으로 많이 수행되고 있다(김종진 등, 2001; 유시용 등, 2001; Grayer and Harbone, 1994). 이러한 천연유래 물질들은 농약개발에서 큰 기여를 하는데 그 활성성분 자체뿐만 아니라 그 골격을 이용하여 새로운 농약을 개발하기 위한 선도물질로서 이용가치가 높다(Okada *et al*, 1980). 현재 식물유래항균활성 물질은 수백 내지 수천정도로 많은 물질들이 보고되고 있으나 아직까지 산업적으로 대체농약으로 사용되고 있는 것은 많지 않다.

식물 병원균의 생장과 점유를 억제하는 식물유래의 화합물은 phytoalexins 즉 'induced antifungal constituents'로서 병원균에 감염이 되었을 때 유도되는 물질과 'preformed antimicrobial compounds'로서 식물에 preformed 물질 두가지 형태가 있다. 이러한 항균활성물질들은 그 구조도 terpenoids, nitrogen- and/or sulphur-containing constituents, aliphatics, aromatics 등으로서 다양하다(Grayer and Harborne, 1994). 그 중 terpenoids에 속하는 saponins는 식물의 2차 대사산물로서 용설란과 (Mendes *et al.*, 2004), 마과(Hu and Yao, 2003), 백합과(Zhang *et al.*,

1999; Carotenuto *et al.*, 1999), 가지과(Zamilpa *et al.*, 2002), 갈매나무과(Li *et al.*, 1999) 등 다양한 식물에 존재하는데 대부분 preformed 물질이다. Saponins는 mevalonic acid가 isoprenoid pathway를 통해서 합성된 분자로서 항균활성 뿐만 아니라 거품 형성, 용혈 작용, 항혈전 작용, 항암활성 등 다양한 특성을 가지고 있어 의약품 개발, 호르몬 합성의 전구체, 보조약, 포말제, 감미료, 조미료, 화장품 등 목적으로 많이 연구되고 있다.

본 실험에서는 항진균활성을 갖는 천연농약을 개발 할 목적으로 국내 자생식물체를 식물병원균에 대한 항진균활성을 검토한 결과 유카와 실유카의 메탄올 추출물이 강한 항진균활성을 가지고 있는 것을 확인하였다.

유카는 외떡잎식물 백합목 용설란과의 상록관목으로서 북아메리카 원산이며 꽃이아름다워 정원이나 화분에 관상용으로 심는다. 북아메리카의 남부, 멕시코, 서인도제도 등에 약 30종이 있는데 유카(*Yucca gloriosa*), 수양유카(*Y. recurvifolia*), 실유카(*Y. smalliana*, *Y. filamentosa*라고도 함), 천수란(*Y. aloifolia*) 등이 있다. 유카는 상록 목질식물이지만 줄기가 거의 없는 것도 있다. 잎은 줄기 끝에 다수가 모여서 나거나, 뿌리에 나는데 선모양 또는 검모양이고, 육질이며 단단하고 끝이 가시로 되는 것, 가장자리에 톱니 또는 실모양의 섬유가 달려 있는 것이 있다. 실유카는 잎 가장자리에서 실이 갈라지기 때문에 실유카라고 하며 섬유를 채취하여 사용한다.

유카의 꽃, 열매, 씨앗, 줄기 추출물은 오래 전부터 치료 및 보건의 목적으로 이용해 왔으며, 미국 FDA에서는 향미제로 사용할 수 있도록 허가하였고(Oser, 1966), 최근에는 질병치료제나 사료첨가제로서도 이용되고 있다. 이처럼 유카는 1950년대에 포말성을 이용한 비누와 steroidal 호르몬의 원료로서 의약품 등에 응용되어 오다가, 1960년대에 이르러 축산 분야에 응용되기 시작하였다. 1970년대에 이르러서는 축산환경 및 가축의 성장을 개선시키는 등의 새로운 분야로 그 응용범위가 확대되었다(Chalermglin *et al.*, 2001; McAllister *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998; 전병수 등, 1996; Hussain and Cheeke, 1995; Wu *et*

al, 1994; 길지용 등, 1994).

유카추출물은 가축 사료 중에 적절히 첨가할 경우, 가축분에서 혐기성 발효를 촉진시키는 urease 작용을 억제하여 악취를 제거하는 역할을 하며(Nazeer et al, 2002; Killeen et al., 1998; Lowe and Kershaw, 1997; Yeo and Kim, 1997; 전병수 등, 1996) 반추동물의 제1위 발효조절 및 암모니아 농도저하(Chalermglin 등, 2001; Wang et al., 2000; Hristov et al., 1999; Wang et al., 1998; Wu et al, 1994; 길지용 등, 1994; Hussain and Cheeke, 1995; 가축의 성장촉진 및 사료효율 개선(Hussain et al., 1996; 전병수 등 1996, Yen and Pound, 1993), 젖소의 유생산성 향상(길지용 등, 1994), 양의 giardiasis의 억제(McAllister et al., 2001), 메추리의 혈액과 난황에서의 cholesterol 함량의 감소(Kaya et al., 2003) 등의 효과가 있어 국내에서도 많이 사용되고 있다.

유카추출물은 또한 강력한 항산화활성을 가지고 있는데 주로 phenolic 화합물에 기인한 것이다(Olas et al., 2003; Torres et al., 2003). 그중 3,4',5'-trihydroxystilbene(THS)은 강한 항산화작용을 가지고 있을 뿐만 아니라 대표적인 발암성 heterocyclic amine인 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b] indole(Trp-P-1)에 의한 SOS반응을 이용한 umu test에서 β -galactosidase의 유도를 억제하여 항돌연변이 활성이 확인된 우수한 변이원억제제로 제시되었다(Uenobe et al., 1997; Ashida and Shioyama, 1999). 또한 THS의 항돌연변이 활성은 THS를 단독으로 사용했을 때보다 사포닌과 병용했을 때, 즉 유카추출물을 직접 사용하였을 때 유카사포닌의 계면활성작용을 이용하여 유화분산되어 세포막을 쉽게 통과하기에 상승효과를 나타냈다(Ashida and Shioyama, 1999). Olas 등은 유카에서 phenolic 화합물의 혈소판에서의 산화스트레스에 대한 억제작용도 보고하였다. Yuccaols A와 C는 세포에서 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 수준을 증가시켰으며, trans-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene과 유카의 알코올추출물은 혈소판에서 지질의 과산화를 억제시켰다(Olas 2003).

유카추출물은 식품과 화장품 등에서의 응용도 검토되었다. *Yucca schidigera*의 steroidal saponins은 food-deteriorating yeast(*Candida albicans*), dermatophytic(피부사상균) yeasts(*Candida famata*, *Hansenula anomala* HUT 7083, *Pichia carsonii*), film-forming yeast(*Debaryomyces hansenii*, *Pichia nakazawae*, *Zygosaccharomyces rouxii*)등에 대해 잠재적 생장억제활성을 가지고 있는 것이 확인하였다(Miyahoshi *et al.* 2000). 또한 structure-antifungal activity 상호관계에서 무좀의 원인균인 *Trichophyton rubrum*에 대해 oleanane saponin은 28-COOH, 23-OH와 3-O-glycosyl group은 필수였다(Tanaka *et al.*, 1996). 또한 유카 추출물은 청국장에 첨가하였을 때 청국장 숙성 중 아미노태 질소 함량은 증가하는 대신, 암모니아태 질소는 감소하였고, 청국장에서의 citric acid, acetic acid, malic acid 등 유기산의 함량은 대조구에 비하여 높으며, 유카 추출물0.5 mg/g을 첨가시 무첨가구보다 유의적으로 맛과 향이 우수하였다고 보고되어 유카추출물의 산업적인 이용 가능성을 제시하였다(인재평, 2002). 이 외에도 유카 성분은 항암활성(Ali *et al.*, 1978), 항미생물활성(Sen *et al.*, 1998), 바이러스 복제 억제활성(Hayashi *et al.*, 1992), 항혈소판능(Olas *et al.*, 2002), 곤충 성장 조절활성(Torres *et al.*, 2003) 등을 가지고 있다.

이와 같은 유카의 생물활성은 saponins, phenolics(Oleszek *et al.*, 2001) 등 화합물에 기인된 것이다. 유카 saponin은 steroidal glycosides로서 sarsapogenin(Killeen *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1996; Kaneda *et al.*, 1987; Lemieux *et al.*, 1977; Sthos and Obrist, 1975; Dragalin and Kintia, 1975; Sthos *et al.*, 1975; Blunden and Hardman, 1969), smilagenin(Killeen *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 1991; Kaneda *et al.*, 1987; Blunden and Hardman, 1969), markogenin(Miyakoshi *et al.*, 2000; Kaneda *et al.*, 1987), samogenin(Miyakoshi *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1991; Kaneda *et al.*, 1987), gitogenin(Kaneda *et al.*, 1987; Blunden and Hardman, 1969), neogitogenin(Kaneda *et al.*, 1987; Blunden and

Hardman, 1969), tigogenin(Blunden and Hardman, 1969)에 당이 연결되어있다.

본 연구에서는 천연항균활성물질을 개발하고자 실유카에서 천연물질이 steroidal saponins를 분리하고 동정하여 자원식물로서의 새로운 응용방면의 잠재력을 제시할 수 있었다.

제2절 재료 및 방법

1. 시료 및 추출

전남대학교 대강당 부근에서 2001년 11월에 채취한 실유카 잎 1.8 kg을 1 cm 정도로 잘게 절단하고 80% 메탄올로 실온에서 15일간 침지시키고 2회 추출하였다. 추출물을 감압농축하여 메탄올을 완전히 제거하고 동결건조시켜 시료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

시료추출과 column chromatography용 용매는 분석용 1급시약을 사용하였으며, HPLC 용매는 Merck사의 HPLC용을 사용하였다. 컬럼크로마토그래피용 silica gel은 Merck사의 Silica gel(230~300 mesh, column chromatography용, Germany)을, octadecyl silane(ODS)는 YMC사의 ODS(70-230 mesh, Japan)를 사용하였으며, TLC plate는 Silica gel 60 F₂₅₄(Merck, Germany)을 사용하였다.

HPLC는 Hitachi D-2500 integrator(Japan), Hitachi L-7100 pump(Japan), Cedex 75 ELSD detector (France), Phenomenex ODS-18 컬럼(4.6 250mm, particle size-4um, USA)을 사용하였다.

질량측정에는 FAB-MS(electrospray ionization/mass spectrometry)을 이용하였는데 기기는 Jeol JMS-700 mass spectrometer(Japan)을 사용하였다.

Infrared(IR) 측정에는 KBr pellet을 이용하였으며 기기는 Nicolet 520P FT-IR spectrometry(Japan)을 사용하였다.

Nuclear magnetic resonance(NMR)은 화합물1과 4는 Bruker GPX 400 spectrometer(400 MHz, Germany)을, 2와 3은 Bruker Avance 500 spectrometer(500 MHz, Germany)을 이용하였고, 용매는 화합물 1은 DMSO를, 화합물 2, 3, 4는 pyridine-*d*5를 사용하였으며, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H Cosy, ¹³C-¹H Cosy, DEPT 등의 기법을 사용하였다. 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS, =0)을 사용하여 기준점으로 하였다.

3. 항균활성의 검색

1) 병원성 진균

식물 병원성 곰팡이는 *Fusarium oxysporum*(KACC 40053), *Rhizoctonia solani*(KACC 40101), *Botrytis cinerea*(KACC 40574), *Phytophthora capsici* (KACC 40483) 등을 사용하였다.

2) 사용 배지

*Phytophthora capsici*는 20% V-8 한천(20% 주스, 0.03% CaCO₃, 2% 한천)에 pH 6.0으로 맞춘 배지를 사용하였으며 나머지 식물 병원성 곰팡이는 PDA배지를 사용하였다.

3) 항진균 활성 측정

항진균활성은 한천배지 확산법(disk plate method)으로 측정하였다. 즉 각각의 시료용액을 멸균된 paper disc(Toyo, 8mm, Japan)에 흡수시킨 후 용매를 완전히 휘산시키고 시험용 평판배지에 놓아 밀착시켰다. 27°C에서 배양한 다음 disk주변의clear zone을 확인하였다.

4. 활성물질의 정제

1) Silica gel column chromatography에 의한 정제

메탄올로 추출한 시료 200 g을 hexane, ethylacetate(EtOAc), buthyl

alcol(BuOH), 증류수로 용매분획하였다. 그중 활성이 강한 BuOH층을 silica gel column chromatography를 수행하였다. Silica gel 1.5 kg(230~300 mesh, column chromatography용, Merck, Darmstadt, Germany)을 CHCl₃:MeOH 10:1로 slurry를 만들어 column(100×450 mm)에 충전시킨 후, 실유카 잎의 80% 메탄올 추출물의 부탄올 분획 200 g을 CHCl₃:MeOH 10:1, 5:1, 3:1, CHCl₃:MeOH :H₂O 10:3:1, 7:3:1, 6.5:3.5:1, 6:4:1, 6:5:1, 5:5:1로 용출분획하였다. 그중 항균활성이 강한 6:4:1 분획을 다시 한번 silica gel column chromatography(80×500 mm)를 행하였으며, 용매계통은 각각 CHCl₃:MeOH :H₂O 6.5:3.5:1, 6:4:1를 사용하였다.

2) ODS column chromatography에 의한 정제

Octadecylsilane(ODS) column chromatography는 ODS(70-230 mesh, YMC, Kyoto, Japan)를 column(34×480 mm)에 충전시킨 후, MeOH:H₂O 용매계로 분획하였는데, MeOH 농도를 20, 40, 60, 80, 100%로 단계적으로 증가시켜 용출분획하였다.

5. 분리한 화합물들의 생물전환 및 활성측정

분리한 화합물들은 *Streptococcus mutans* Ingbritt에서 분리한 fructosyl- transferase를 이용하여 생물전환 시켰다. 0.05 mM 인산완충용액(pH 6.8) 200 μ l에 5% 자당 500 μ l, 2 mg/ml 분리된 화합물 100 μ l, 효소 100 μ l를 37°C에서 12시간 반응시켰다. 물중탕에서 2분간 끓여서 반응을 정지시켰다. 생물전환 확인은 TLC를 이용하였으며 용매계통은 CH₃CN:H₂O=85:15를 사용하였으며 aniline-diphenylamine 시약으로 발색시켰다. 활성측정은 paper disc법을 이용하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 물질 1, 2, 3, 4의 분리

실유카잎 1.8 kg을 80% 메탄올로 추출하고 동결건조시켜 200 g의 추출물을 얻었다. 추출물은 극성에 따라서 hexane, EtOAc, BuOH, H₂O로 용매분획하였다. 각 용매분획에 대하여 한천배지 확산법을 이용하여 항균 활성을 측정한 결과 활성이 강한 BuOH 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 CHCl₃:MeOH:H₂O 용매계통으로 분획하였는데 CHCl₃:MeOH:H₂O 6:4:1(v/v/v)이 강한 분획을 각각 16.4 g 을 얻었다.

얻은 분획을 CHCl₃:MeOH:H₂O 65:35:10(v/v/v) 용매로 silica gel column chromatography를 수행하여 항균활성이 있는 분획을 얻었다(1.20 g, 2.11 g, 5.21 g). 이들 분획을 더욱 정제하기 위하여 ODS column chromatography를 실시하였으며 MeOH:H₂O 용매계에서 농도는 40, 60, 80, 100%로서 MeOH 농도를 점점 증가시켜서 chromatography 한 결과 화합물 1, 2, 3, 4를 얻었다(Fig. 11). 정제된 물질의 순도를 알아보기 위하여 각각 HPLC를 수행하였다. 용매계는 acetonitrile과 증류수를 사용하였으며, acetonitrile 15%에서 80%까지 40분동안 증가시켰으며, Evaporative light scattering detectors (ELSD)를 사용하였다.

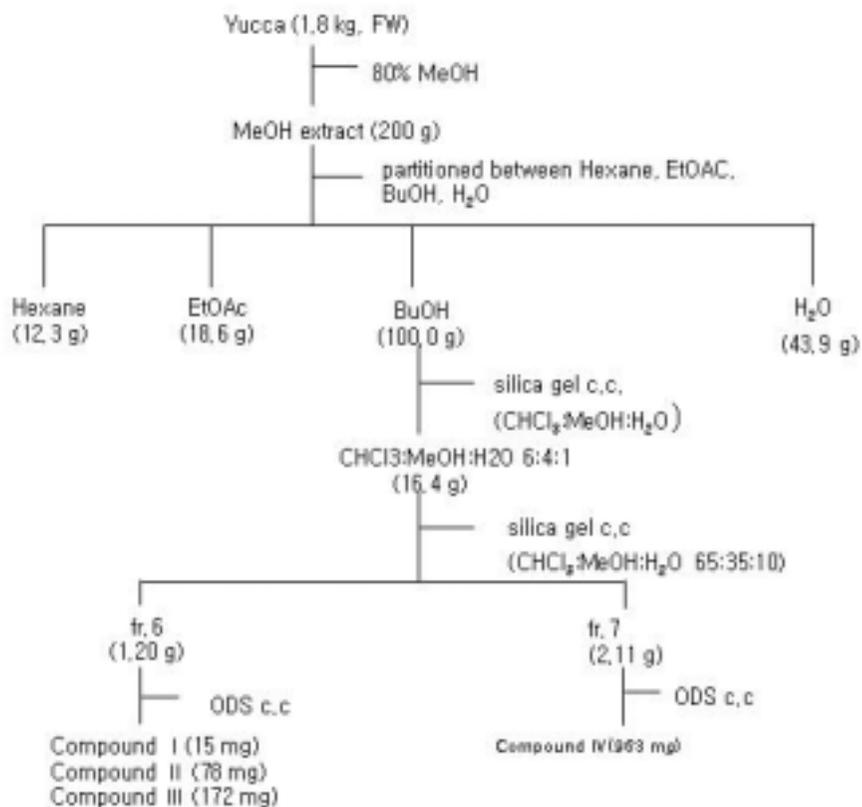


Fig. 11. Scheme for the isolation of antifungal compounds from *Y. smalliana* extracts

2. 화합물의 구조해석

1) 물질1의 구조해석

FAB-MS : 617[M+Na]⁺, 595[M+H]⁺

¹H NMR(400 MHz, DMSO) : δ 12.56(1H, s, 5-OH), 10.85(1H, s, 7-OH), 10.12(1H, s, 4'-OH), 7.98(2H, d, $J=8.8$ Hz, 2', 6'-H), 6.87(2H, d, $J=8.8$, 3', 5'-H), 6.41(1H, d, $J=1.9$, 8-H), 6.20(1H, d, $J=1.9$, 6-H), 0.98(3H, d, $J=6.2$, 6'''-H)

¹³C NMR(400 MHz, DMSO) : δ 177.4(C-4), 130.9(C-2', 6'), 115.1(C-3', 5'), 98.7(C-6), 93.7(C-8), 17.7(Rha-C-6)

순수 분리된 물질 1(Fig. 12)의 FAB-MS 분석결과 m/z 595에서 분자이온의 peak가 나타났으며, m/z 617[M+Na]⁺, 449[M-Rha]⁺, 287[M-Rha-Glc]⁺에서 ion fragment ion이 검출되었다(Fig. 14).

¹H NMR spectrum에서는 Fig. 15에 나타난 바와 같이 ring A는 C5과 C7에 OH가 치환되었기에 meta coupling 하고 있는 proton인 H-6과 H-8의 chemical shift는 저자장 쪽으로 이동되어 각각 δ 6.02와 6.41 ppm에서 나타났다. 또한 ring B proton들의 meta coupling하고 있는 proton들과, A2B2 type의 ring B proton들의 존재를 나타내는 signal들[δ 7.98 (2H, d, $J=8.8$ Hz, 2', 6'-H), δ 6.87(2H, d, $J=8.8$, 3', 5'-H)]이 나타났다. Glucopyranose의 anomeric proton이 5.30에서 $J=7.4$ Hz의 doublet로 나타나므로 glucose는 3-OH와 β -glucoside 결합을 하고 있음을 알 수 있으며, rhamnopyranose의 H-1 signal은 δ 4.37, 6-H signal은 δ 0.97로서 glucopyranose와 rhamnopyranose의 결합이 6 \rightarrow 1결합을 하고 있음을 알 수 있다. 또한 δ 10이상에서 tri-OH에서 기인하는 signal(δ 12.56, 10.85, 10.12)이 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 ring C에 기인하는 signal인 δ 156.5(C-2), δ 133.2(C-3)이 관찰되었다(Table 5). 또한 anomeric carbon이 δ 104.0(Glc-1), δ 100.8(Rha-1)이 확인되었으며, δ 17.7에서 rhamnose의 C-6'''의 전형적인 signal이 관찰되었고, glucose의 C-6이 δ 66.9에서 관찰

되어 glucopyranose와 rhamnopyranose의 결합이 6→1결합을 하고 있음을 알 수 있다. 또한 98.7과 93.7에서 C-6과 C-8의 signal이 확인되었으며 그 차이도 5로서 flavonol화합물임을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 본 화합물의 구조는 보고된 문헌과 일치하여 kaempferol-3-O-rhamnosylglucoside(C₂₇H₃₀O₁₅)로 확인되었다(Fig. 13, Bergeron *et al.*, 1995). 이 화합물은 *Echinocereus triglochidiatus*(Miller and Bohm., 1982), *Bupleurum flavum* Forsk(Gevrenova *et al.*, 1997), *Typha angustifolia*(Chen *et al.*, 1990; Jia *et al.*, 1986), *Arctium miuns*(Saleh and Bohm., 1971), *Ageratum mexicanum*(Mionskowski and Gill, 1975), musa(Zeid, 1999), spinach(Kuti and Konuru, 2004) 등에서도 분리되었으며, antimicrobial(Bisignano *et al.*, 2000), antiprotozoal (Calzada *et al.*, 2001), antimalarial(Murakami *et al.*, 2001), antioxidant (Cichewicz and Nair, 2002), antiulcerogenic(Mpalantinos *et al.*, 1998), hypotensive(Mansoor *et al.*, 1993), diuretic activity(Mpalantinos *et al.*, 1998)이 확인되었다.

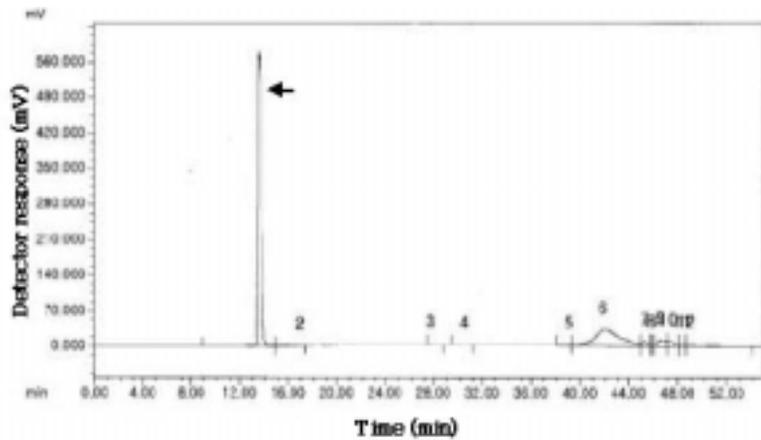


Fig. 12. HPLC chromatogram of compound 1

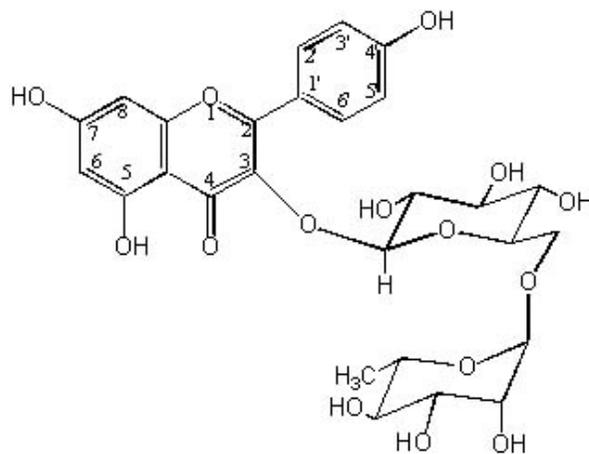


Fig. 13. Chemical structure of compound 1

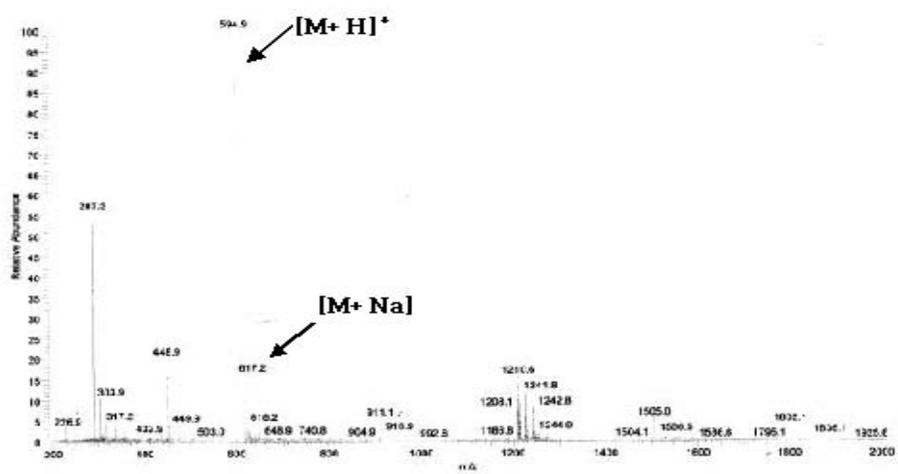


Fig. 14. FAB-MS spectrum of compound 1

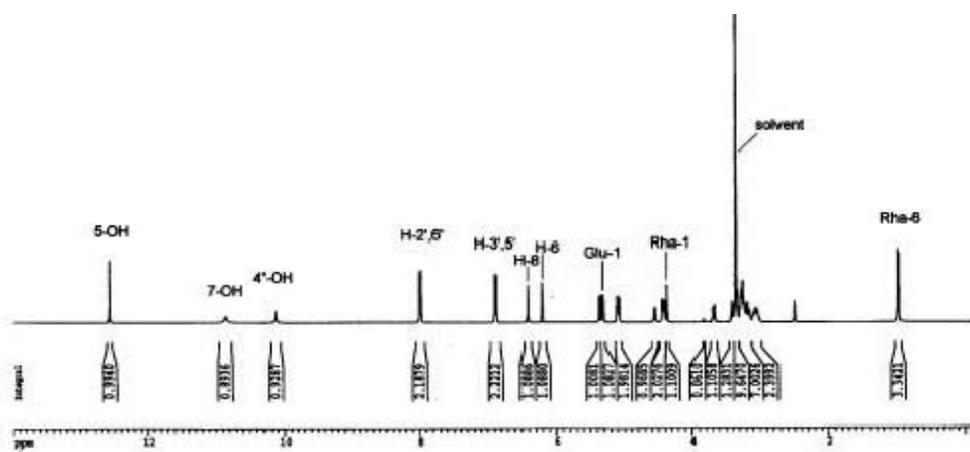


Fig. 15. ^1H NMR spectrum of compound 1

Table 5. ^{13}C NMR data for compound 1

| position | δ (ppm) |
|----------|----------------|
| 2 | 156.5 |
| 3 | 133.2 |
| 4 | 177.4 |
| 4a | 104.0 |
| 5 | 161.2 |
| 6 | 98.7 |
| 7 | 164.1 |
| 8 | 93.7 |
| 8a | 156.8 |
| 1' | 120.9 |
| 2' | 130.9 |
| 3' | 115.1 |
| 4' | 159.9 |
| 5' | 115.1 |
| 6' | 130.9 |
| Glc-1'' | 101.3 |
| 2'' | 74.2 |
| 3'' | 76.3 |
| 4'' | 70.6 |
| 5'' | 75.7 |
| 6'' | 66.9 |
| Rha-1''' | 100.8 |
| 2''' | 70.3 |
| 3''' | 69.9 |
| 4''' | 71.8 |
| 5''' | 68.2 |
| 6''' | 17.7 |

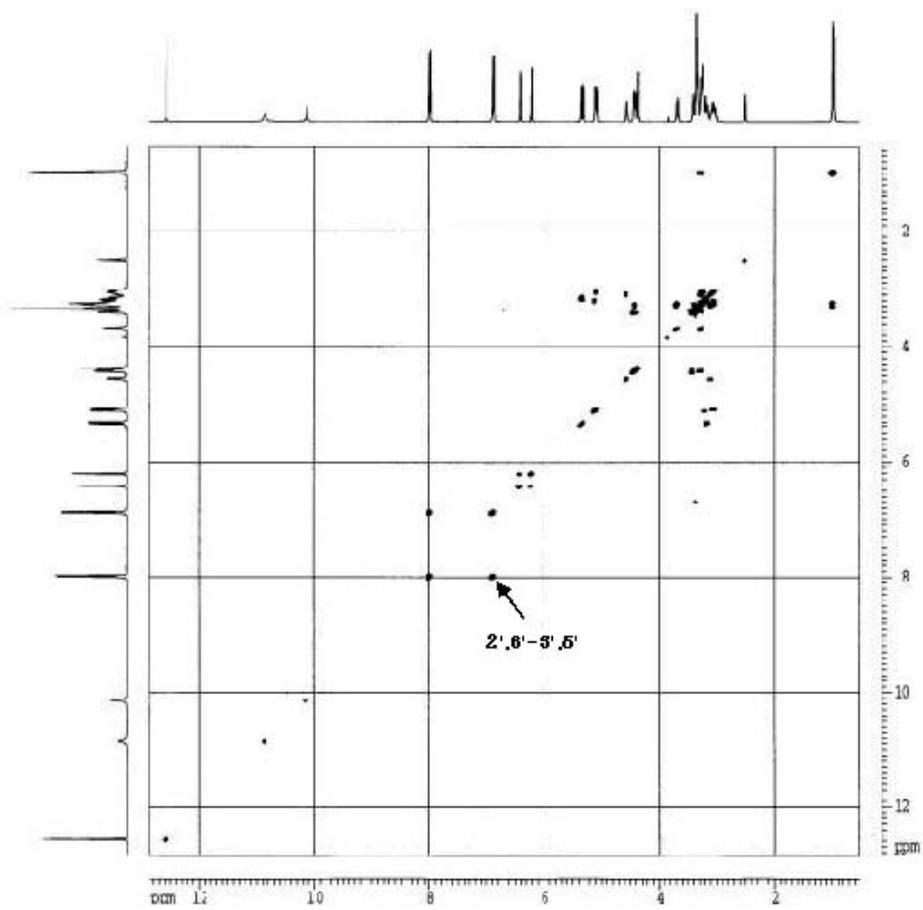


Fig. 16. Proton-proton COSY NMR spectrum of compound 1

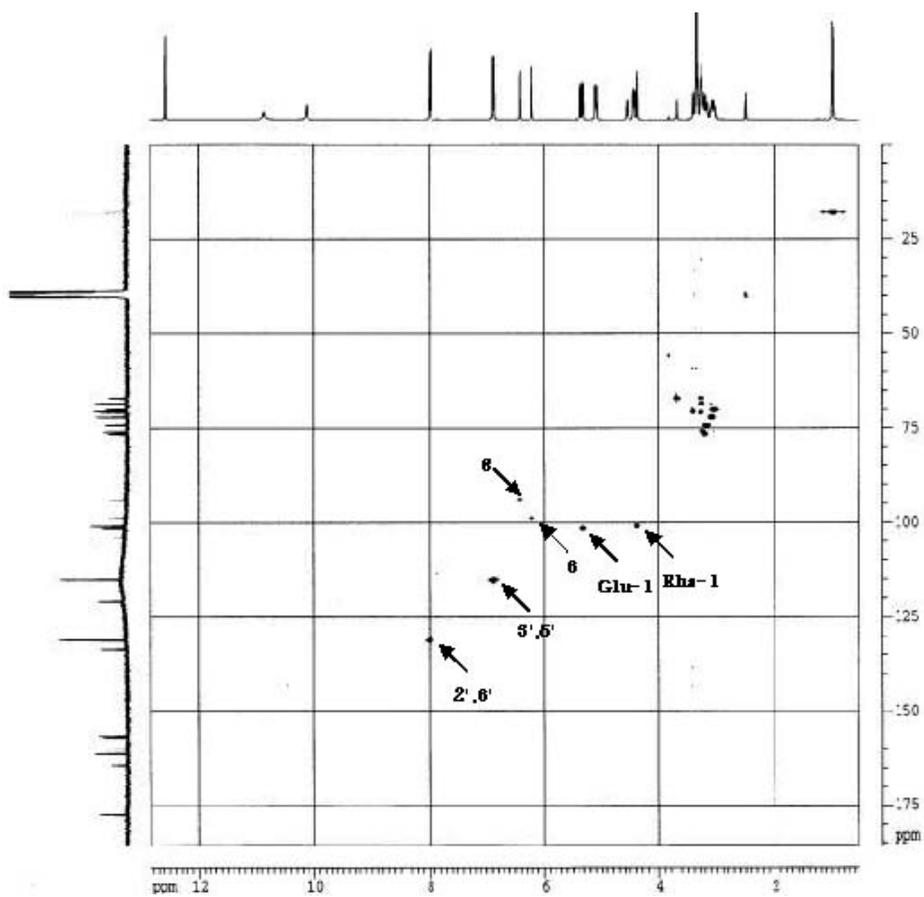


Fig. 17. Proton-carbon COSY NMR spectrum of compound 1

2) 물질 2의 구조 해석

FAB-MS : 773[M+H]⁺, 611[M-162+H]⁺, 449[M-162×2+H]⁺

FT-IR : V_{max}(KBr, cm⁻¹) : 3394(OH), 1023 cm⁻¹

¹H NMR(500 MHz, pyridine-*d*₅) : δ 0.73(3H, s, 18-CH₃), 0.96(3H, s, 19-CH₃), 1.13(3H, d, *J*=6.9 Hz), 1.09(3H, 27-CH₃), 4.92(1-H', d, *J*=7.7 Hz), 5.08 (1-H'', d, *J*=7.8Hz)

¹³C NMR(125 MHz, pyridine-*d*₅) : δ 13.0(C-19), 14.4(C-21), 16.0(C-18), 51.6(C-5), 63.5(C-27), 68.2(C-6), 77.3(C-3), 80.6(C-16), 101.6(Gal-1), 104.7(Glc-1), 109.1(C-22),

분리된 화합물 2(Fig. 18)의 FAB-MS 분석결과 *m/z* 773에서 분자이온의 peak가 나타났으며, *m/z* 611[M-Glc]⁺, 449[M-Glc-Gal]⁺ fragment ion이 검출되었다(Fig. 21).

IR spectroscopy 결과에 의하면 3394 cm⁻¹에서 OH, 1023 cm⁻¹에서 glycosidic C-O에 기인하는 흡수 band들을 확인 할 수 있다(Fig. 20).

¹H NMR spectrum (500 MHz, pyridine-*d*₅)은 Fig. 22에서 볼 수 있는 바와 같이 18-CH₃이 δ0.73, 19-CH₃이 δ0.96에서 각각singlet signal이 나타나고 있으며, 21-CH₃이 δ1.13(d, *J*=6.9 Hz)을 나타나고 있다. 두개의 anomeric proton들이 δ4.92(d, *J*=7.7 Hz), δ5.08(d, *J*=7.8Hz)에서 나타나 aglycon과 당 사이가 결합으로 연결되어 있음을 나타내고 있다.

¹³C NMR spectrum을 보면 δ101.6, 104.7에서 anomeric carbon의 signal이 확인되었다(Table 6). 또한19-C의 signal이 δ13에서 확인되어 5-αH 형 구조임을 알 수 있고, 3-C, 6-C, 27-C signal이 각각 δ77.3, 68.1, 63.5로 이웃하는 산소에 의해 저자장으로 shift되었으며, 당 부분에서 Gal-6이 δ69.5로서 7.5 ppm 저자장으로 shift되어 Gal-6에 glucopyranose가 결합되어 있음을 확인할 수 있다.

이상의 결과로부터 compound 2의 구조는 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-galantopyranosyl 5α-spirostan-3β,5,27-triol로 해석되었다(Fig. 19). 특히 지금까지 유카에서 분리된 화합

물들은 27-C에 OH group이 연결된 것은 확인되지 않았는바 이 화합물은 흥미로운 화합물로 생각되며 이 화합물에 대한 검색을 실시한 결과 새로운 화합물로 판명되었다.

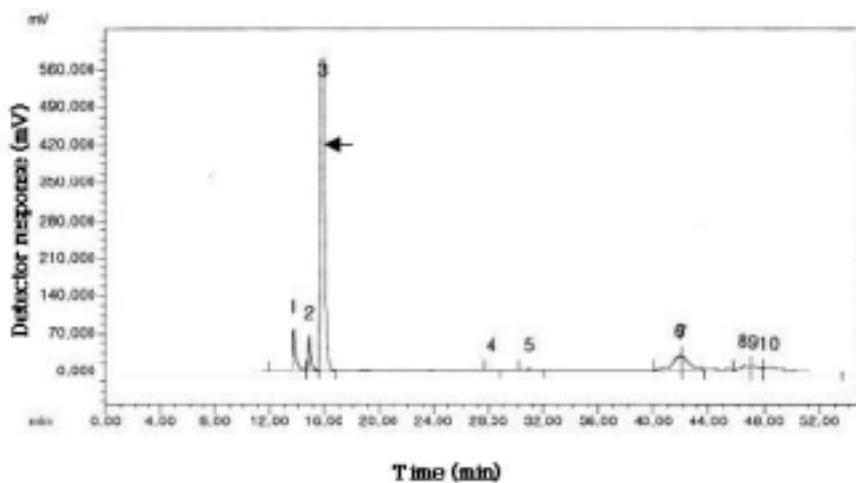
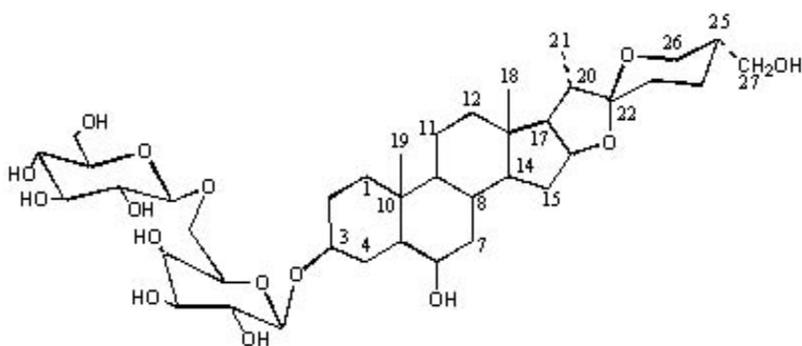


Fig. 18. HPLC chromatogram of compound 2



3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galantopyranosyl-
5 α -spirostan-3 β ,5,27-triol

Fig. 19. Chemical structure of compound 2

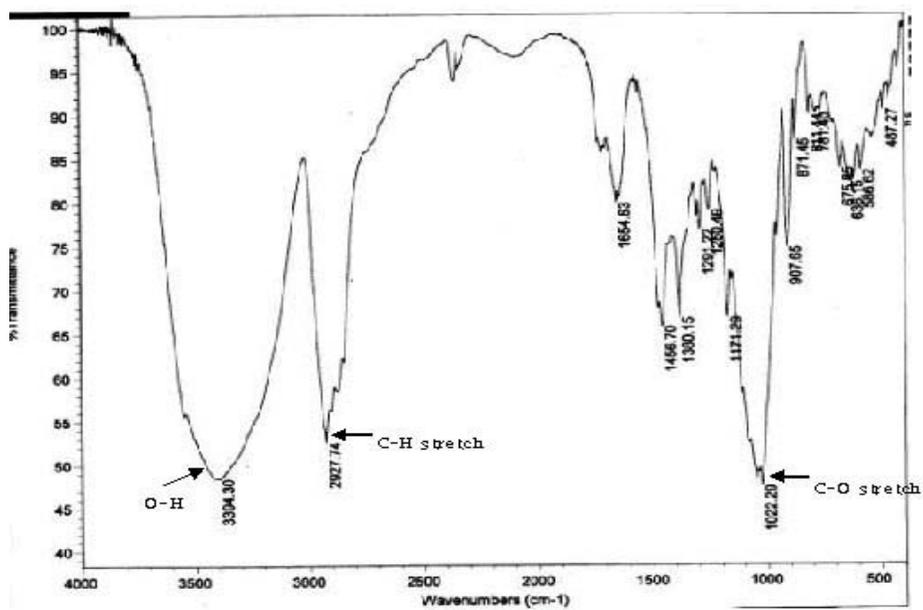


Fig. 20. FT-IR spectrum of compound 2

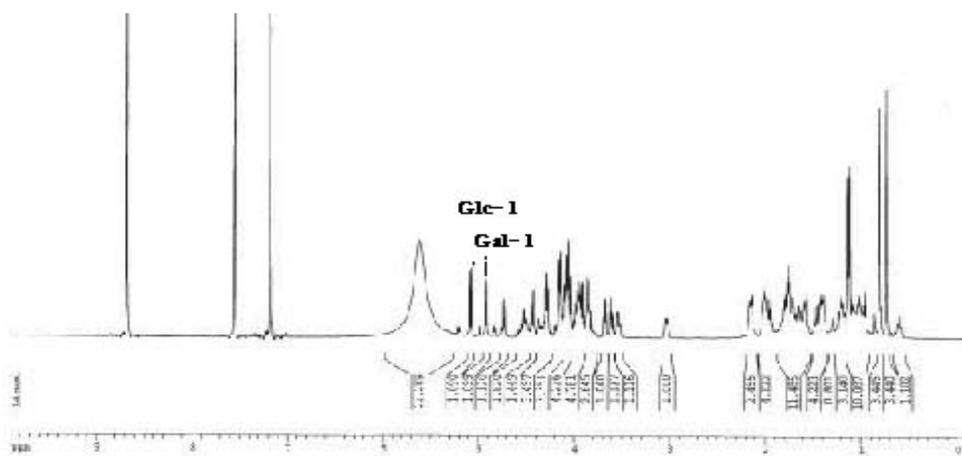


Fig. 22. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2

Table 6. ^{13}C NMR data of compound 2

| position | δ (ppm) | position | δ (ppm) |
|----------|----------------|----------|----------------|
| 1 | 37.2 | Gal-1 | 101.6 |
| 2 | 29.5 | 2 | 76.7 |
| 3 | 77.3 | 3 | 77.9 |
| 4 | 28.9 | 4 | 71.2 |
| 5 | 51.6 | 5 | 74.6 |
| 6 | 68.1 | 6 | 69.5 |
| 7 | 42.0 | Glc-1' | 104.7 |
| 8 | 33.8 | 2' | 77.9 |
| 9 | 53.5 | 3' | 74.7 |
| 10 | 36.1 | 4' | 71.2 |
| 11 | 20.7 | 5' | 77.8 |
| 12 | 39.5 | 6' | 61.7 |
| 13 | 40.3 | | |
| 14 | 55.7 | | |
| 15 | 31.6 | | |
| 16 | 80.6 | | |
| 17 | 62.5 | | |
| 18 | 16.0 | | |
| 19 | 13.0 | | |
| 20 | 41.6 | | |
| 21 | 14.4 | | |
| 22 | 109.1 | | |
| 23 | 31.1 | | |
| 24 | 23.5 | | |
| 25 | 38.6 | | |
| 26 | 63.9 | | |
| 27 | 63.5 | | |

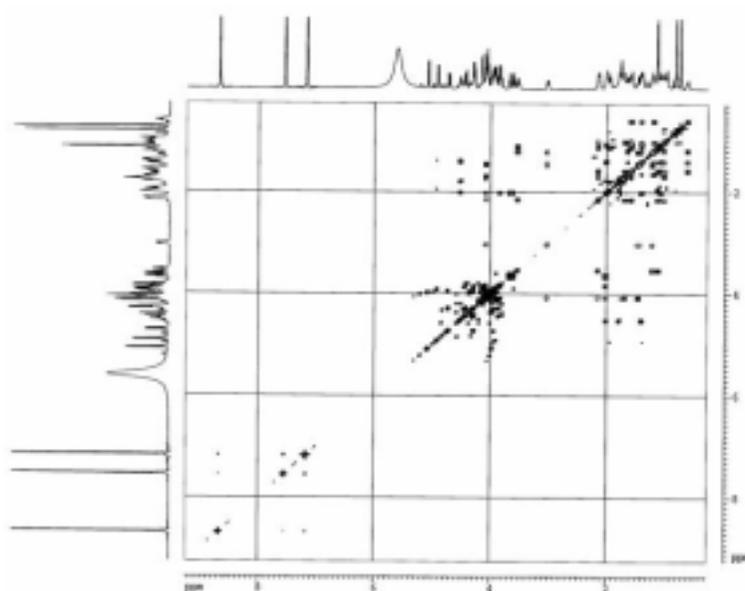


Fig. 23. Proton-proton COSY spectrum of compound 2

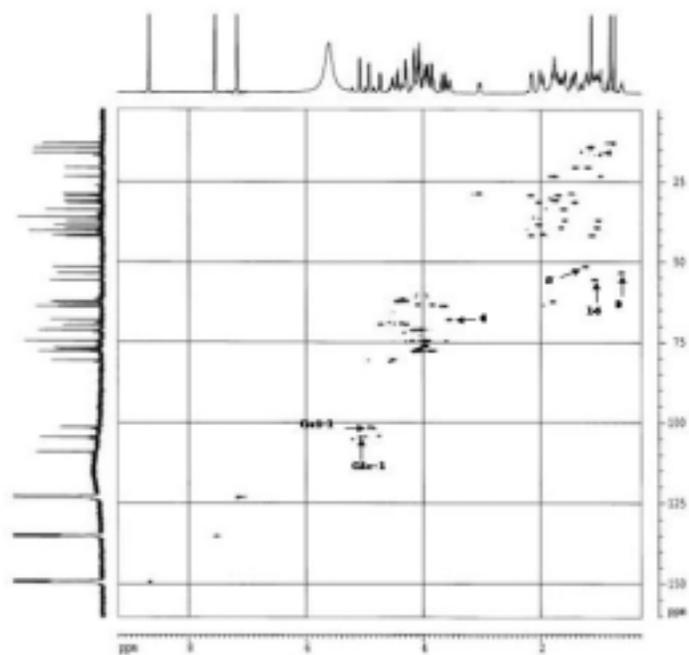


Fig. 24. Proton-carbon COSY spectrum of compound 2

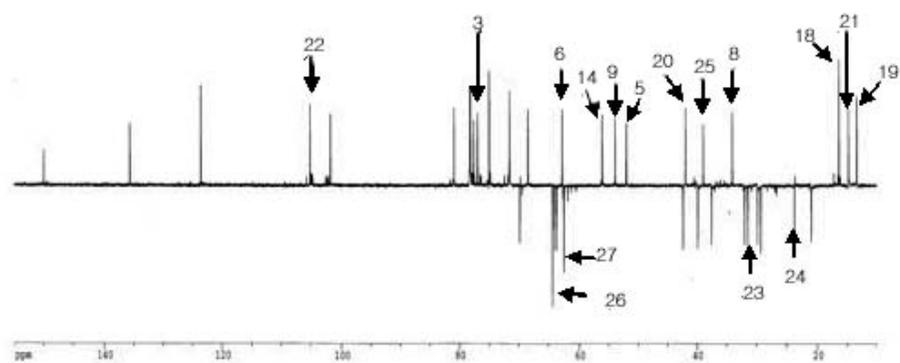


Fig. 25. DEPT spectrum of compound 2

3) 물질 3의 구조해석

FAB-MS : 1233[M+Na]⁺, 1087[M+Na-146]⁺, 417[M-164×4-146]⁺

FT-IR V_{max} (KBr, cm⁻¹) : 3423(OH), 1073, 981(A ring), 921(B ring), 898(C ring),

¹H-NMR: 5.53(d, J=7.6 Hz), 5.23(d, J=7.8 Hz), 5.08(d, J=7.6 Hz), 4.83 (d, J=7.4 Hz), 4.30(d, J=7.9 Hz)

¹³C-NMR: 111.7(C-19), 14.4(C-21), 16.8(C-27), 77.1(C-3), 80.6(C-16), 108.7(C-22), 104.4(Glc-1'), 104.2(Glc-1''), 103.7(Glc-1'''), 102.2(Rha-1), 101.9(Gal-1)

분리된 물질 3(Fig. 26)의 FAB-MS 결과 *m/z* 1233에서 [M+Na]⁺의 이온 peak가 나타나 분자량이 1211임을 알 수 있다. 또한 *m/z* 417에서 [M-162×4-146]⁺ fragment ion이 검출되어 aglycon에 hexose 4 mole과 methylpentose 1 mole이 연결되어 있음을 알 수 있다(Fig. 28).

IR spectroscopy 결과에 의하면 3423 cm⁻¹에서 OH, 1073 cm⁻¹에서 glycosidic C-O에 기인하는 흡수 band들을 확인 할 수 있다(Fig. 29). 또한 898 cm⁻¹에서의 흡광도가 921 cm⁻¹에서의 흡광도보다 크기에 25R steroidal saponin임을 알 수 있다.

¹H-NMR에서는 anomeric proton이 5.53(J=7.6 Hz), 5.23(J=7.8 Hz), 5.08(J=7.6 Hz), 4.83(J=7.4 Hz), 4.30(J=7.9 Hz)에서 확인되어 5개의 당이 연결되어있다는 것이 확인되었다(Fig. 30).

¹³C NMR spectrum을 보면 19-C의 signal이 111.7에서 확인되어 5-**α** H 형 구조임을 알 수 있으며, 111.7, 14.4, 16.0, 16.8에서 aglycon에 연결된 4개의 methyl group이 확인되었다(Table 7). 또한 104.4, 104.1, 103.7, 102.2, 101.9에서 anomeric carbon의 signal이 확인되었으며, 각각의 당의 결합을 보르면 Gal-4의 chemical shift는 79.7, Glc-2', 3'는 각각 80.9, 87.6, Glc-4'''은 78로 10ppm 이상 저자장 이동하여 당들 사이의 결합이 1→4, 1→3, 1→2으로 다양함을 나타냈다.

이상의 결과로부터 물질 3의 구조는 tigogenin 3-O-**α**-L-

rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-galactopyranoside로 해석되었다(Fig. 27). 또한 이 화합물에 대한 검색을 실시한 결과 새로운 화합물로 판명되었다.

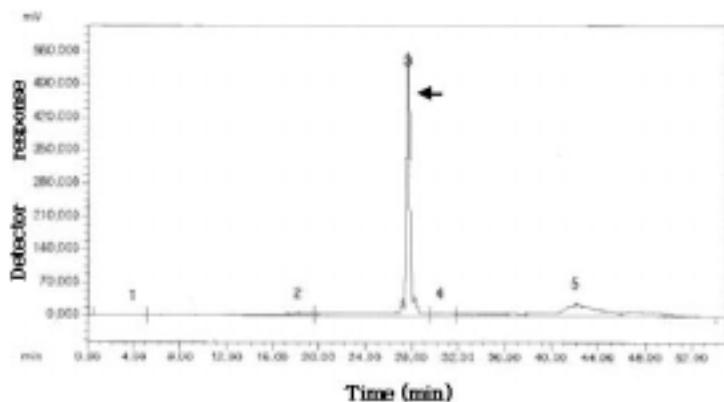
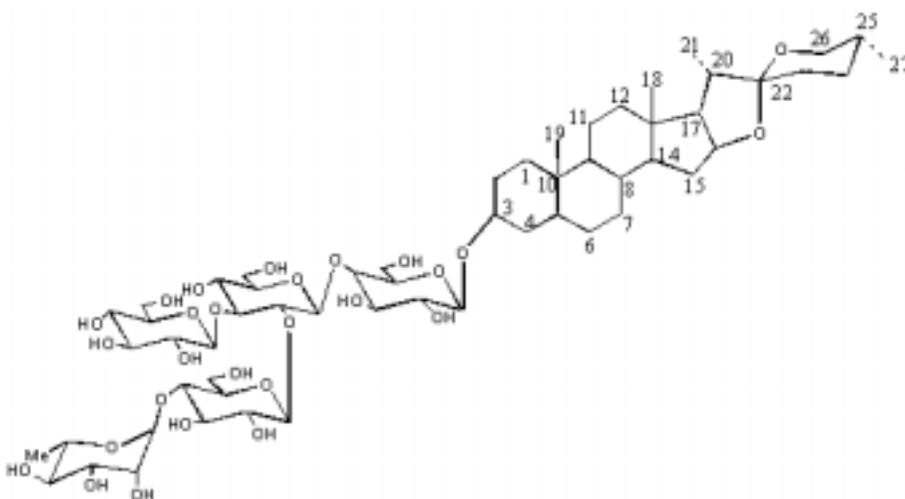


Fig. 26. HPLC chromatogram of compound 3



tigogenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-
 (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl- (1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-
 (1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopyranoside

Fig. 27. Chemical structure of compound 3

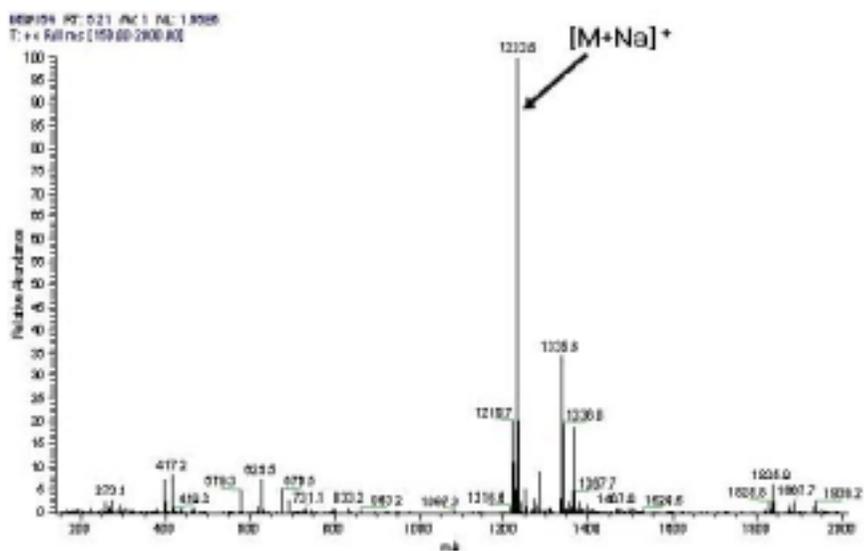


Fig. 28. FAB-MS spectrum of compound 3

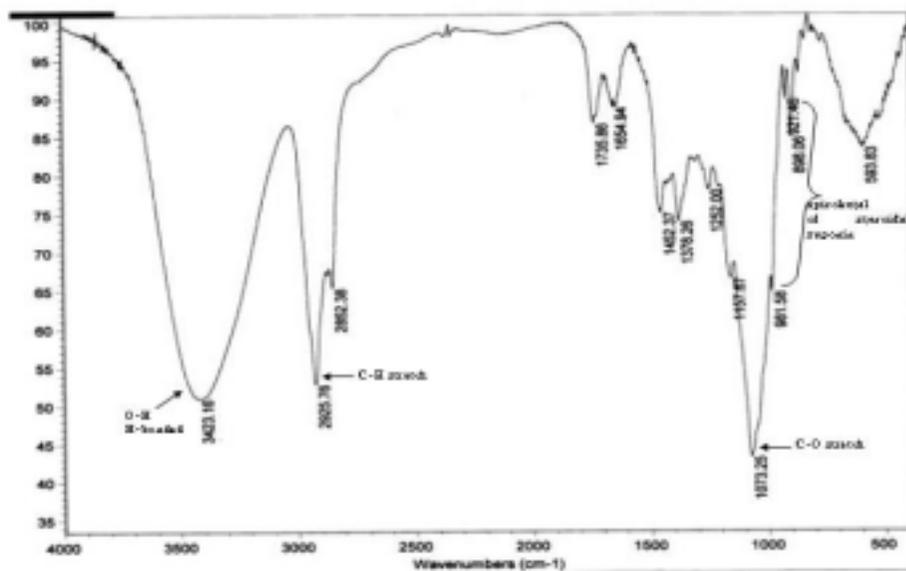


Fig. 29. FT-IR spectrum of compound 3

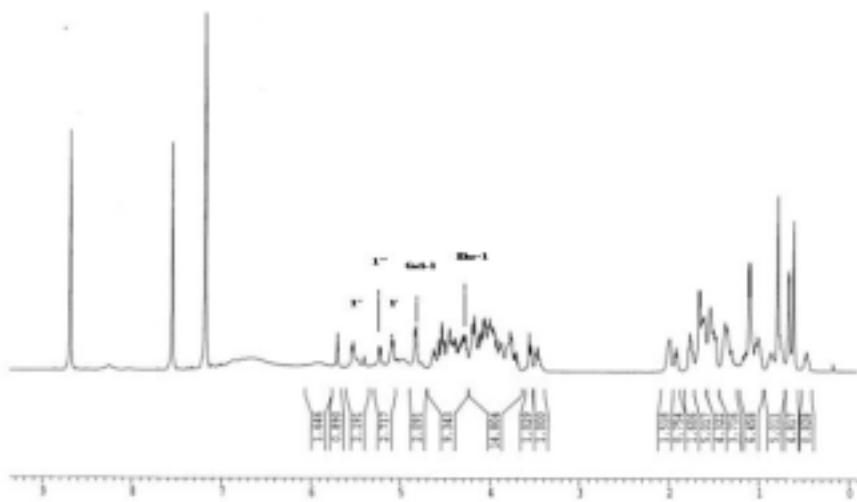


Fig. 30. ^1H NMR spectrum of compound 3

Table 7. ^{13}C NMR data of compound 3

| position | δ (ppm) | position | δ (ppm) |
|----------|----------------|----------|----------------|
| 1 | 44.1 | Gal-1 | 101.9 |
| 2 | 29.3 | 2 | 76.7 |
| 3 | 77.1 | 3 | 75.0 |
| 4 | 34.3 | 4 | 79.7 |
| 5 | 44.1 | 5 | 72.6 |
| 6 | 28.4 | 6 | 60.6 |
| 7 | 31.8 | Glc-1' | 104.4 |
| 8 | 34.7 | 2' | 80.9 |
| 9 | 53.9 | 3' | 87.6 |
| 10 | 35.3 | 4' | 70.1 |
| 11 | 20.7 | 5' | 76.9 |
| 12 | 39.6 | 6' | 62.4 |
| 13 | 40.2 | Glc-1'' | 104.2 |
| 14 | 55.9 | 2'' | 75.6 |
| 15 | 31.6 | 3'' | 77.4 |
| 16 | 80.6 | 4'' | 70.4 |
| 17 | 62.5 | 5'' | 78.1 |
| 18 | 16.0 | 6'' | 61.8 |
| 19 | 11.7 | Glc-1''' | 103.7 |
| 20 | 41.4 | 2''' | 74.8 |
| 21 | 14.4 | 3''' | 76.1 |
| 22 | 108.7 | 4''' | 78.0 |
| 23 | 28.7 | 5''' | 74.7 |
| 24 | 31.3 | 6''' | 60.0 |
| 25 | 30.0 | Rha-1 | 102.2 |
| 26 | 66.3 | 2 | 71.9 |
| 27 | 16.8 | 3 | 72.1 |
| | | 4 | 73.3 |
| | | 5 | 69.9 |
| | | 6 | 17.9 |

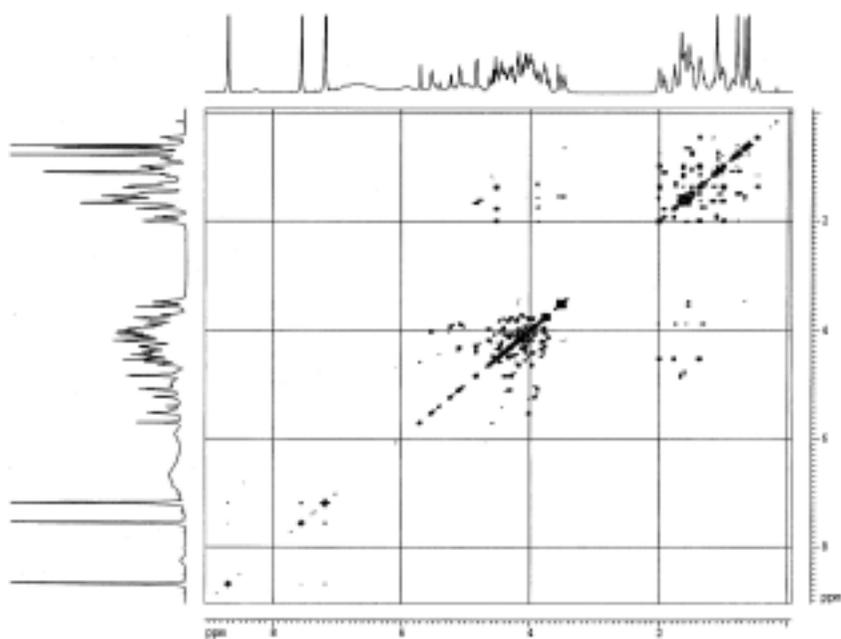


Fig. 31. Proton-proton COSY NMR spectrum of compound 3

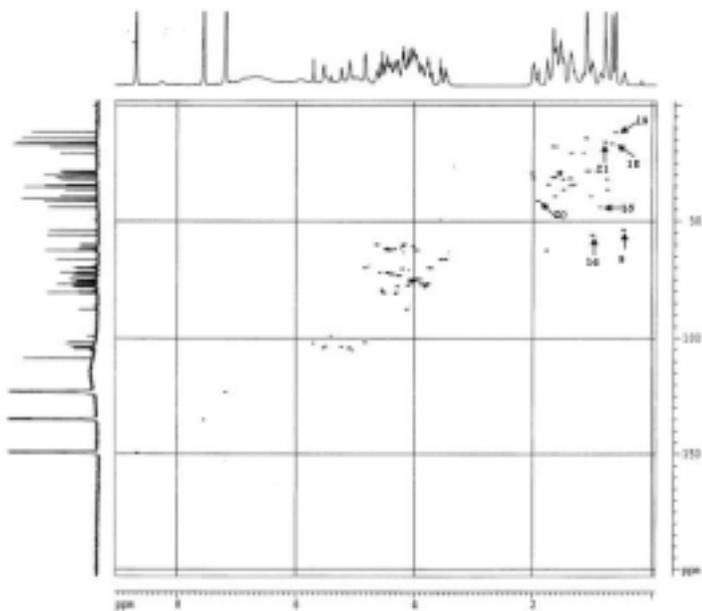


Fig. 32. Proton-carbon COSY NMR spectrum of compound 3

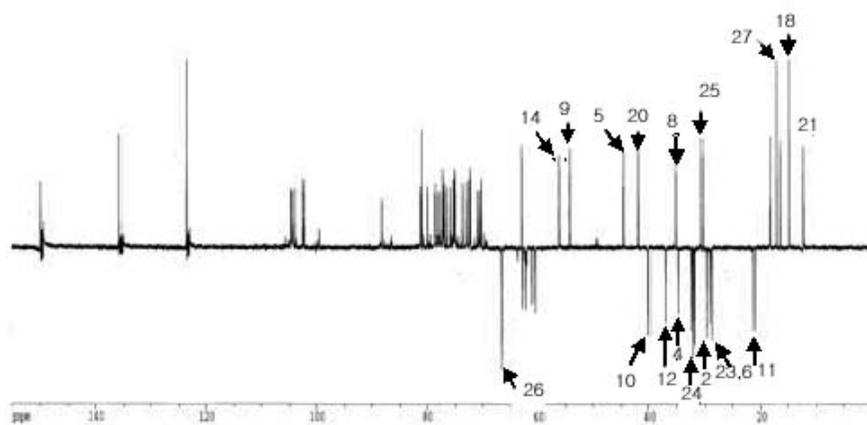


Fig. 33. DEPT spectrum of compound 3

4) 물질 4의 구조해석

FAB-MS : 1360, 1228, 417

FT-IR V_{\max} (KBr, cm^{-1}) : 3435(OH), 982(A ring), 922(B ring), 898(C ring)

$^1\text{H-NMR}$: δ 5.73(d, $J=7.0$ Hz), 5.49(d, $J=7.5$ Hz), 5.10(d, $J=7.2$ Hz), 5.03(d, $J=7.7$ Hz), 4.84(d, $J=7.0$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 12.2(C-19), 14.9(C-21), 16.5(C-18), 17.2(C-27), 77.3(C-3), 81.0(C-16), 109.1(C-22)

분리된 물질 4(Fig. 34)의 FAB-MS 결과 m/z 1360에서 분자이온 peak가 나타나 분자량이 m/z 1360으로, m/z 1228에서 이온 peak가 관찰되어 말단에 xylose 잔기가 있는 것으로, m/z 417에서 hexose 5 mole이 있는 것으로 추정된다(Fig. 36).

IR spectroscopy 결과에 의하면 전형적인 steroidal saponin의 흡광도가 관찰되었는데 3435 cm^{-1} 에서 OH, 1074 cm^{-1} 에서 glycosidic C-O에 기인하는 흡수 band가 관찰되었다(Fig. 35). 982 cm^{-1} , 921 cm^{-1} , 898 cm^{-1} 에서 A, B, C ring에서 기인되는 특징적인 흡광도가 관찰되었으며 또한 898 cm^{-1} 에서의 흡광도가 922 cm^{-1} 에서의 흡광도보다 크므로 25R steroidal saponin임을 알 수 있다.

$^1\text{H NMR}$ spectrum에서 δ 5.73, 5.49, 5.10, 5.03, 4.84에서 anomeric proton으로 추정되는 다수의 signal이 확인되었다(Fig. 37).

$^{13}\text{C NMR}$ spectrum에서 19- CH_3 의 signal이 δ 12.2에서 확인되어 5- αH 형 구조가 확인되었으며, 3-H signal이 δ 77.3으로 이웃하는 산소에 의해 저자장으로 shift되었고, aglycon에 연결된 methyl group의 signal이 δ 12.2, 14.9, 16.5, 17.2에서 확인되었으며, δ 18.5에서 rhamnose의 methyl group이 확인되어 이 화합물에 rhamnose 잔기가 있는 것으로 추정된다(Table 8). 화합물 4의 aglycon의 구조는 문헌과 비교했을 때 tigogenin으로 추정된다(Kishor and Sati, 1990).

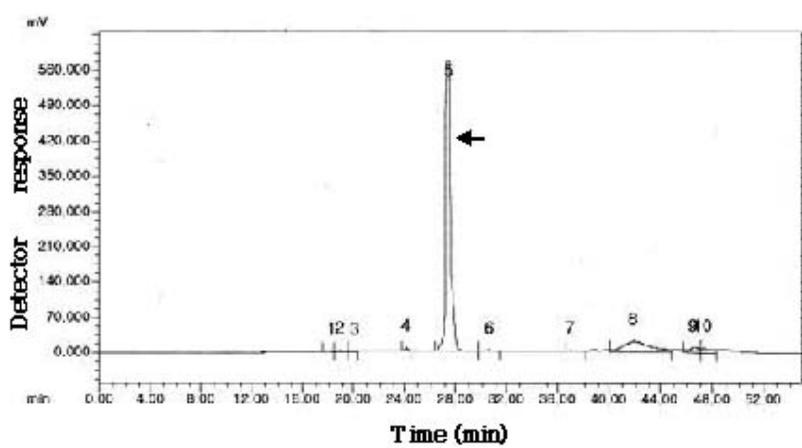


Fig. 34. HPLC chromatogram of compound 4

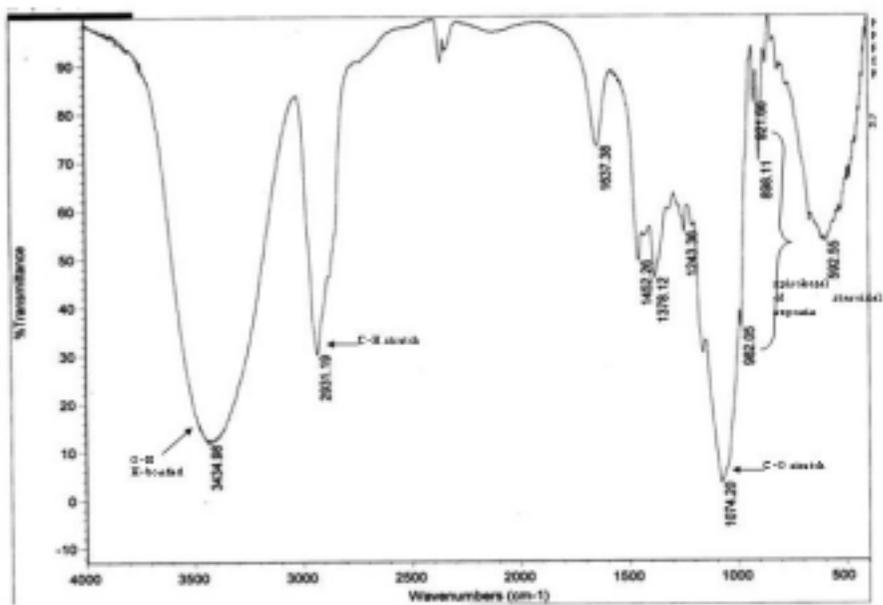


Fig. 35. FT-IR spectrum of compound 4

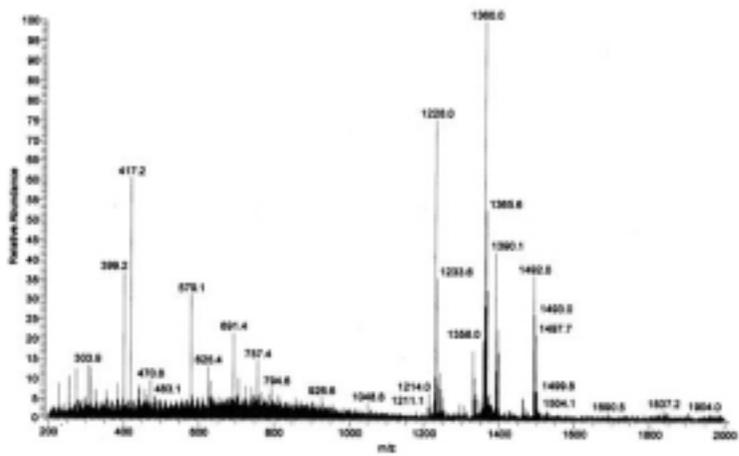


Fig. 36. FAB-MS spectrum of compound 4

Table 8. ^{13}C NMR data of compound 4

| position | δ (ppm) |
|----------|----------------|
| 1 | 37.0 |
| 2 | 29.8 |
| 3 | 77.3 |
| 4 | 34.7 |
| 5 | 44.5 |
| 6 | 28.8 |
| 7 | 32.3 |
| 8 | 35.1 |
| 9 | 54.3 |
| 10 | 35.7 |
| 11 | 21.2 |
| 12 | 40.0 |
| 13 | 40.6 |
| 14 | 56.3 |
| 15 | 32.0 |
| 16 | 81.0 |
| 17 | 62.9 |
| 18 | 16.5 |
| 19 | 12.2 |
| 20 | 41.9 |
| 21 | 14.9 |
| 22 | 109.1 |
| 23 | 31.7 |
| 24 | 29.2 |
| 25 | 30.5 |
| 26 | 66.7 |
| 27 | 17.2 |

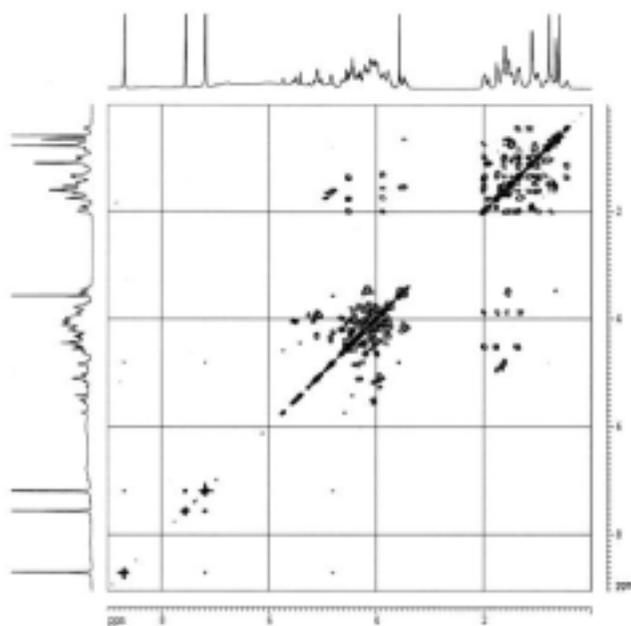


Fig. 39. Proton-proton COSY NMR spectrum of compound 4

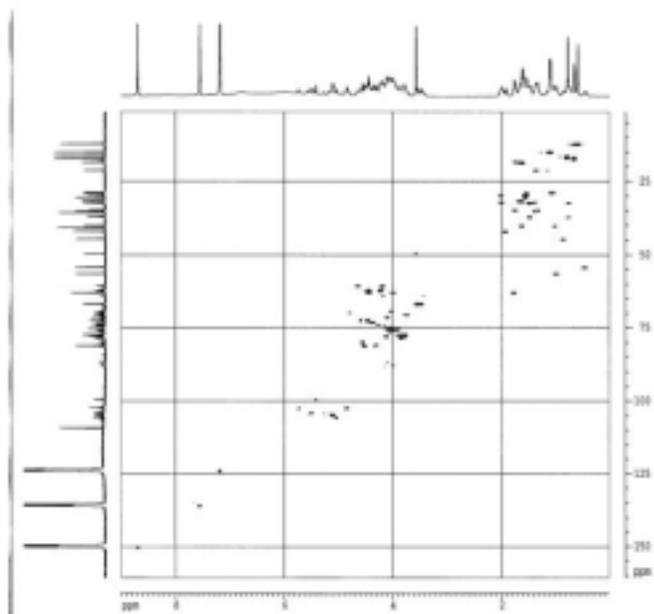


Fig. 40. Proton-carbon COSY NMR spectrum of compound 4

3. 분리된 물질의 항곰팡이 활성

분리된 물질의 항진균 활성을 측정하기 위하여 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*을 이용하여 실험한 결과 화합물 3, 4는 *Rhizoctonia solani*에 대하여 minimum inhibitory concentration(MIC) 1 ppm에서, *Fusarium oxysporum*에 대해서는 화합물 3은 MIC 25 ppm, 화합물 4는 MIC 50 ppm에서 발육억제효과가 있었다(Table 9). 화합물 2는 화합물 3,4에 비해 훨씬 낮은 항진균활성이 있었는바 250 ppm 이상에서 발육억제 효과가 관찰되었다. 이상의 결과로부터 실유카에서 분리한 화합물 3, 4는 특히 오이 모잘록병의 원인균인 *Rhizoctonia solani*에 대한 발육억제작용이 우수하며, 또한 *in vivo* 실험에서도 실유카 추출물의 오이 모잘록병 방제효과가 우수하기에 새로운 천연물 자원에서의 항진균제로서의 응용이 기대된다.

4. 화합물들의 생물전환 및 항진균활성

화합물2는 *Streptococcus mutans* Ingbritt에서 정제한 fructosyltransferase F3을 이용하고, 화합물 3과 4는 F3, F4를 이용하여 생물전환 시켰다. TLC에서 모든 화합물들이 두가지 효소에 의해 fructose가 전환이 되었음을 확인할 수 있었다(Fig 41). 하지만 항진균활성을 전환시키기 전과 비교했을 때 특별한 차이가 나지 않았다.

Table 9. Antifungal activity of compounds 2,3 and 4 isolated from *Yucca smalliana* Fern.

| compound | <i>R. solani</i> | <i>F. oxysporum</i> |
|----------|------------------|---------------------|
| 2 | 500< | 250 |
| 3 | ≤1 | 25 |
| 4 | ≤1 | 50 |

*The activities are expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) in ppm.

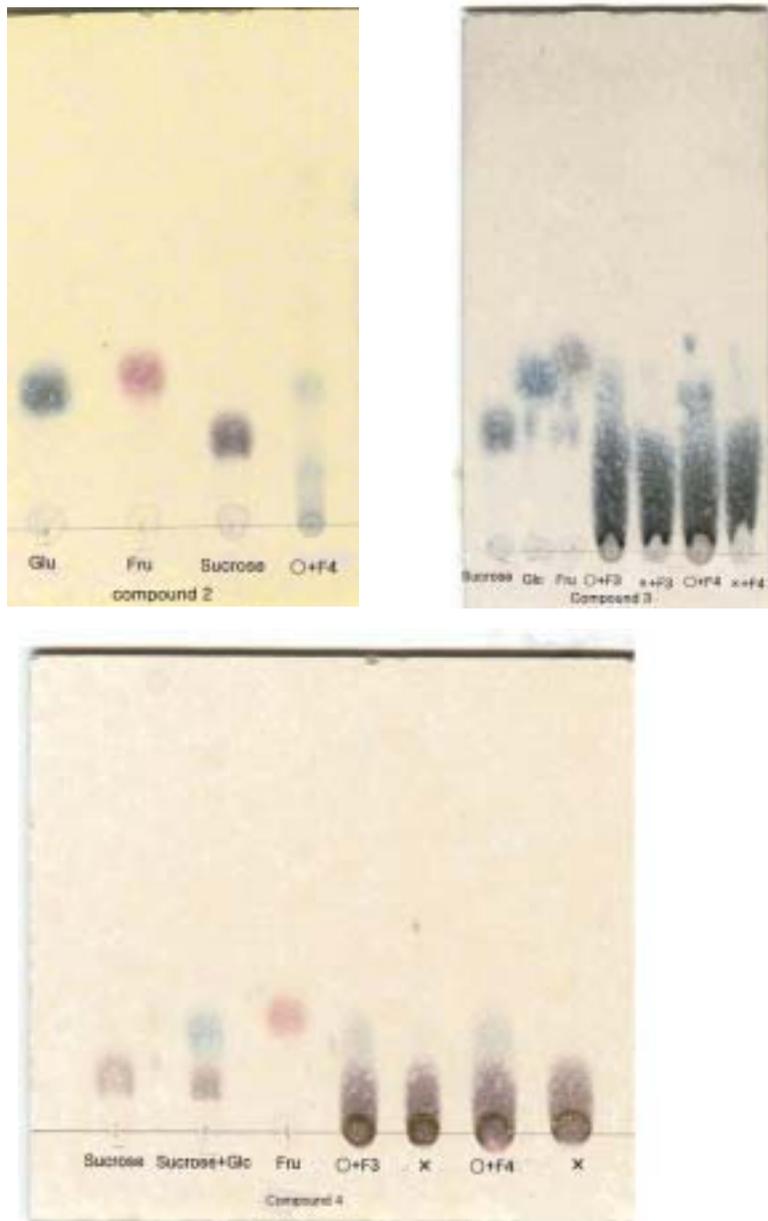


Fig. 41. TLC of compound 2, 3 and 4 after reaction with fructosyltransferase

제4절 적요

자생식물자원으로부터 천연물 농약을 개발하기 위하여 자생식물을 대상으로 항진균 활성검증을 실시한 결과 실유카 추출물의 강력한 항진균 활성이 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 실유카 유래의 항진균 활성물질을 규명하고자, 실유카 잎의 MeOH 추출물을 증류수에 현탁시켜 n-hexane, ethylacetate, n-butanol 용매로 용매분획하여 각 분획을 대상으로 항진균활성을 조사하였다. 그결과 butanol 분획에서 강한 항진균활성을 나타냈다.

실유카 잎 추출물의 butanol 분획을 silica gel chromatography, ODS chromatography를 수행하여 단일 성분으로 분리하고 IR, MS, NMR 등의 기기분석을 실시하여 구조를 확인하였다. 그 결과 앞에서 분리된 화합물은 kaempferol-3-O-rhamnosylglucoside (화합물 1), 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-galantopyranosyl 5-spirostan-3,5,27-triol (화합물 2), tigogenin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-galactopyranoside (화합물 3)와 tigogenin의 aglycon을 가진 steroidal saponin으로 추정되는 화합물 (화합물 4)로 확인되었다. 화합물 3과 4는 높은 항진균활성을 가지고 있는데 *R. solani*에 대해서는 MIC가 1 ppm이었고 *F. oxysporum*에 대해서는 각각 25 ppm과 50 ppm이었다. 화합물 2는 낮은 활성을 가지고 있었는데 *R. solani*에 대해서는 500 ppm에서도 활성이 없었으며 *F. oxysporum*에 대해서는 250 ppm에서 활성을 나타냈다.

이상의 연구결과, 실유카로부터 분리된 항진균물질인 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-galantopyranosyl 5-spirostan-3,5,27-triol, tigogenin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-galactopyranoside는 신규물질로 판명되었다. 특히 화합물 2는 비록 활성은 낮지만은 27-OH group은 지금까지 분리된 실유카 사포닌에서의 새로

운 특별한 구조로서 흥미로우며, 화합물 3은 5개의 당이 연결된 분자로서 다른 생리활성도 기대되며, 아직 구조가 완전히 밝혀지지 않은 화합물 4도 기대된다. 또한 실유카 추출물의 오이 모잘록병과 고추 역병에 대한 방제효과는 새로운 생물농약으로서의 응용도 기대된다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 과제는 1년차에서 식물체의 확보, 추출하여 항미생물활성 및 기타 생물활성 검색하고, 2년차에 활성 성분의 분리 정제 및 구조 분석이며, 3년차에 신규활성물질의 유도체화 및 생물전환, 신규 활성물질의 다양한 응용성 검토를 목표로 하였다.

실유카의 생리활성 특히 항진균활성은 본문에서 제시한 바와 같이 실험에 사용된 모든 병원성 진균에 대해 매우 강한 활성을 나타냈으며, 병원성 진균의 균사체를 파괴하여 변형을 일으키게 하였으나, 박테리아에 대해서는 활성이 없었다.

실유카 추출물의 포트실험에서는 *R. solani*에 의한 오이모잘록병과 *P. capsici*에 의한 고추역병균 실험에서 우수한 방제효과를 나타냈으며 토마토 흰가루병이 대량 발생한 포장에서도 흰가루병에 대해 높은 억제효과를 나타냈다.

항진균활성 물질을 분리하고 그 구조를 확인한 결과 saponin계열의 새로운 화합물인 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-galantopyranosyl 5-spirostan-β3,5,27-triol, tigogenin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-galactopyranoside이 동정되었다. 또한 화합물 4의 구조는 확실하게 밝혀지지는 않았지만 최소한 6개의 당을 함유한 tigogenin으로서 그 활성도 화합물 3과 비슷한바 흥미롭다.

이상의 결과로부터 실유카 추출물은 새로운 천연의 생물농약으로 활용할 수 있는 기초 자료를 마련하였으며, 생물농약으로서의 가능성을 충분히 보여주었다.

본 연구의 결과는 계획서상에 있는 연구내용은 충분히 수행되었다고 사료되며, 소기의 목적을 달성하였다고 사료된다. 특히 유카 추출물은 현재 식품에서 첨가제로서의 사용이 허용되고 있기에 친환경제제로서 새로운 생물농약으로 각광받을 것으로 기대된다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 확인된 실유카 추출물의 항곰팡이 활성은 현재 식품에서 식품첨가제로 응용되고 있는 유카 추출물의 새로운 분야에로의 응용에 기초자료를 제공하였으며 특히 오이모잘록병과 고추역병에 대한 방제효과는 생물농약으로서의 가능성을 제시하였다. 본 연구결과는 “실유카추출물의 항균활성 규명 및 생물농약으로의 응용”, “신규생물항진균제” 등 특허를 준비 중에 있으며 이후 학회지에도 투고할 예정이다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

유카의 생물활성에 관한 국내외에서의 연구는 대부분 유카추출물의 사료첨가제로서의 응용에 대한 연구로서 축산환경 개선과 가축의 성장 촉진에 관한 것이다(Chalermglin et al, 2001; McAllister et al, 2001; Wang et al, 2000; Wang et al, 1998; 전병수 등, 1996; Hussain and Cheeke, 1995; Wu et al, 1994; 길지용 등, 1994). 유카추출물은 가축 사료 중에 적절히 첨가할 경우, 가축분에서 혐기성 발효를 촉진시키는 urease 작용을 억제하여 악취를 제거하는 역할을 하며(Nazeer et al, 2002; Killeen et al., 1998; Lowe and Kershaw, 1997; Yeo and Kim, 1997; 전병수 등, 1996) 반추동물의 제1위 발효조절 및 암모니아 농도저하(Chalermglin 등, 2001; Wang et al., 2000; Hristov *et al.*, 1999; Wang et al., 1998; Wu *et al.*, 1994; 길지용 등, 1994; Hussain and Cheeke, 1995; 가축의 성장촉진 및 사료효율 개선(Hussain *et al.*, 1996; 전병수 등 1996, Yen and Pound, 1993), 젖소의 유생산성 향상(길지용 등, 1994), 양의 giardiasis의 억제(McAllister *et al.*, 2001), 메추리의 혈액과 난황에서의 cholesterol 함량의 감소(Kaya *et al.*, 2003) 등의 효과가 있다.

유카추출물은 또한 강력한 항산화활성을 가지고 있는데 주로 phenolic 화합물에 기인한 것으로서 Olas(2003) 등은 혈소판의 산화스트레스에 대해 억제작용을 하며, 또한 지질의 과산화도 억제한다고 보고하였다. Uenobe(1997) 등과 Ashida(1999) 등은 유카 추출물이 우수한 변이원억제제라고 보고하였다.

유카추출물은 현재 식품에서 응용되고 있는데 Miyahoshi(2000) 등은 유카추출물의 주성분인 steroidal saponins이 food-deteriorating yeast, dermatophytic yeasts, film-forming yeast 등에 대한 잠재적 생장억제활성을 보고하였다. 국내에서는 인(2002) 등이 유카 추출물은 청국장에 첨가하였을 때 청국장 숙성 중 아미노태 질소 함량은 증가하는 대신, 암모

니아테 질소는 감소하였고, 청국장에서의 citric acid, acetic acid, malic acid 등 유기산의 함량은 대조구에 비하여 높으며, 맛과 향이 우수하였다고 보고하였다. 이 외에도 유카 성분은 항암활성(Ali *et al.*, 1978), 항미생물활성(Sen *et al.*, 1998), 바이러스 복제 억제활성(Hayashi *et al.*, 1992), 항혈소판능(Olas *et al.*, 2002), 곤충 성장 조절활성(Torres *et al.*, 2003) 등을 가지고 있다고 보고 되었다.

현재까지 유카추출물의 생물농약으로서의 잠재적인 활성에 관한 보고는 되어 있지 않다. 하지만 국내에서는 천연물을 이용한 생물농약에 대한 시도는 되어있지만은 아직까지 등록된 것은 없다. 유(2001) 등은 당귀와 백지의 메탄올 추출물을 이용하여 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병 등에 대한 방제효과를 검토하였으며, 천(2003) 등은 국화과 식물의 추출물의 살충 및 항균활성에 대해 검토하였다.

본 연구에서는 실유카 추출물이 오이모잘록병과 고추역병에 대한 강한 방제효과를 제시하였으며 또한 실유카 추출물의 주성분인 사포닌이라는 것이 확인되었는바 친환경 생물농약으로서의 가능성을 충분히 시사하고 있다.

제7장 참고 문헌

- Asaka O. and Shoda M.: Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4081-4085 (1996)
- Ali M.S., Sharma G.C., Asplund R.O., Nevins M.P. and Garb S.: Isolation of antitumor polysaccharide fractions from *Yucca glauca* Nutt.(Lilliaceae). *Growth.* 42, 213-223 (1978)
- Ashida T.: Cosmetics containing *Yucca extracts* and thFABr manufacture. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 09328410 (1997)
- Ashida T. and Shioyama M.: Mutagen inhibitors. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 115747 (1999)
- Baker B., David H. and Fesperman F.: Topical composition for the treatment of head lice and nits. U.S. US 6485734 B1 20021126 (2002)
- Bergeron C., Marston A., Hakizamungu E. and Hostettmann K.: Antifungal constituents of *Chenopodium procerum*. *Int. J. Pharmacog.* 33, 115-119 (1995)
- Bisignano G., Sanogo R., Marino A., Aquino R., D'Angelo V., German M.P., De Pasquale R., and Pizza C.: Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 105-108 (2000)
- Blunden G. and Hardman R.: Steroidal constituents of *Yucca glauca*. *Phytochem.* 8, 1523-1531 (1969)
- Calzada F., Cedillo-Rivera R. and Mata R.: Antiprotozoal activity of the constituents of *Conyza filaginoides*. *J. Nat. Prod.* 64, 671-673 (2001)
- Carotenuto A., Fattorusso E., Lanzotti V. and Magno S.: Spirostanol saponins of *Allium porrum* L. *Phytochem.* 51, 1077-1082 (1999)
- Chalermglin P., 홍승희, 최유지, 황일환, 이상석, 하종규: 유카 추출

- 물 첨가가 *In Vitro* 반추위 미생물 발효에 미치는 영향. 동물자원지, 43, 707-720 (2001)
- Chen Y., Fang S.D., Gu Y.L., Zhang C.Y. and Zhao J.: Active principles of the pollen of narrowleaf cattail (*Typha angustifolia*). *Zhongcaoyao*. 21, 50-53 (1990)
- Cheong H., Ryu S.Y. and Kim K.M.: Anti-allergic action of resveratrol and related hydroxystilbenes. *Planta Med.* 65, 19-21 (1999)
- Cichewicz R.H. and Nair M.G.: Isolation and characterization of stelladerol, a new antioxidant naphthalene glycoside and other antioxidant glycosides from edible daylily (*Hemerocallis*) flowers. *J. Agric. Food Chem.* 50, 87-91 (2002)
- Dragalin I.P. and Kintia P.K.: Steroidal saponins of *Yucca filamentosa*: Yuccoside C and protoyuccoside C. *Phytochem.* 14, 1817-1820 (1975)
- Gevrenova R., Dimitrova B. and Asenov I.: Flavonols from *Bupleurum flavum* Forsk family apiaceas. *Farmassiya* (Sofia). 44, 9-14 (1997)
- Grayer R.J. and Harbone J.B.: A survey of antifungal compounds from high plants. *Phytochem.* 37, 19-42 (1994).
- Gurr G. and Wratten S.: Biological control: Measures of success. Kluwer Academic Publishers (2000)
- Hayashi K., Nishino H., Niwayama S., Shiraki K. and Kiramatsu A.: *Yucca* leaf protFABn(YLP) stops the protFABn synthesis in HSV-infected cells and inhibits virus replication. *Antivir. Res.* 17, 323-333 (1992)
- Hristov A.N., McAllister T.A., Van Herk F.H., Cheng K.J., Newbold C.J. and Cheeke P.R.: Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in hFABfers. *J. Anim. Sci.* 77, 2554-2563 (1999)
- Hu K. and Yao X.: The cytotoxicity of methyl protoneogracillin (NSC-698793) and gracillin (NSC-698787), two steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human

- cancer cells *in vitro*. *Phytother. Res.* 17, 620-626 (2003)
- Hussain I. and Cheeke P.R.: Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on ruminant and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51, 231-242 (1995)
- Jia S.S., Liu Y.L., Ma C.M., Yang S.L., Zhou H.M., Zhao D.C., Liu D. and Li S.Y.: Flavonoid constituents of the pollen of *Typha angustifolia* L. (Puhugan). *Yaoxue Xuebao.* 21, 441-446 (1986)
- Kaneda N., Nakanishi H., and Staba E.J.: Steroidal constituents of *Yucca schidigera* plants and tissue cultures. *Phytochem.* 26, 1425-1429 (1987)
- Kaya S., Erdogan Z. and Erodogan S.: Effect of different dietary levels of *Yucca schidigera* powder on the performance, blood parameters and egg yolk cholesterol of laying quails. *J. Veter. Medic. Seri. A.* 50, 14-17 (2003)
- Killeen G.F., Connolly C.R., Walsh G.A., Duffy C.F., Headon D.R. and Power R.F.: The effects of dietary supplementation with *Yucca schidigera* extract or fractions thereof on nitrogen metabolism and gastrointestinal fermentation processes in the rat. *J. Sci. Food Agric.* 76, 91-99 (1998)
- Killeen G.F., Madigan C.A., Connolly C.R., Walsh G.A., Clark C., Hynes M.J., Timmins B.F., James P., Headon D.R., and Power R.F.: Antimicrobial saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their *in vitro* properties for their *in vivo* impact. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3178-3186 (1998)
- Kishor N. and Sati O.P.: A new molluscicidal spirostanol glycoside of *Yucca aloifolia*. *J. Nat. Prod.* 53, 1557-1559 (1990)
- Kuti J.O. and Konuru H.B.: Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidoscolus* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 52, 117-121 (2004)
- Lee J.C., Lee S.M., Kim J.H., Ahn S.M., Lee B.G. and Chang I.S.:

- Protective effect of resveratrol on the oxidative stress-induced inhibition of gap junctional intercellular communication in HaCaT Keratinocytes. *J. Appl. Pharmacol.* 11, 224-231 (2003)
- Lemieux R.U., Patcliffe R.M., Arreguin B., Vivar A.R. and Castillo M.J.: ¹³C-NMR characterizations of the sarsasapogenin disaccharides, the filiferins A and B: 2-O-(β-D-xylopyranosyl)- and 2-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranosides. *Carbohydr. Res.* 55, 113-120 (1977)
- Li X.C., FABSohly H.N., Nimrod A.C. and Clark A.M.: Antifungal jujubogenin saponins from *Colubrina retusa*. *J. Nat. Prod.* 62, 674-677 (1999)
- Lowe J.A. and Kershaw S.J.: The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. *Resear. in veter. sci.* 63, 61-66 (1997)
- Mansoor A., Hassan G.A., Khalid A. and Viqar Uddin A.: Effects of kaempferol-3-O-rutinoside on rat blood pressure. *Phytother. Res.* 7, 314-316 (1993)
- Mendes T.P., De MedFABros Silva G., Da Silva B.P., Parente J.P.: A new steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Nat. Prod. Res.* 18, 183-188 (2004)
- McAllister T.A., Annett C.B., Cockwill C.L., Olson M.E., Wang Y. and Cheke P.R.: Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. *Veter. Parasito.* 97, 85-99 (2001)
- Michael J.O.: Organic toothpaste containing saponin. U.S. US6485711 B1 20021126 (2002)
- Miller J.M. and Bohm B.A.: Flavonol and dihydroflavonol glycoside of *Echinocereus triglochidiatus* var. *gurneyi*. *Phytochem.* (Elsevier) 21, 951-952 (1982)

- Miltra S.R., Choudhuri A. and Adityachaudhury N.: Production of antifungal compounds by higher plants a review of recent researches. *Plant Physiol. Biochem.* 11, 53-57 (1984)
- Mionskowski H. and Gill S.: Flavonoids of the herb *Ageratum mexicanum* Sims. (Compositae). *Acta Polon. Pharmac.* 32, 633-639 (1975)
- Miyakoshi M., Tamura Y., Masuda H., Mizutani K., Tanaka O., Ikeda T., Ohtani K., Kasai R. and Yamasaki K.: Antiyeast steroidal saponins from *Yucca schidigera*(Mohave Yucca), a new anti-food-deteriorating agent. *J. Nat. Prod.* 63, 332-338 (2000)
- Miyakoshi M., Tamura Y., Masuda H., Mizutani K. and Tanaka O.: Saponin preservatives of yucca. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 200139812 (2001)
- Mpalantinos M.A., Soares de Moura R., Parente J.P. and Kuster R.M.: Biologically active flavonoids and kava pyrones from the Aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. *Phytother. Res.* 12, 442-444 (1998)
- Murakami N., Mostaqul H.M., Tamura S., Itagaki S., Horii T. and Kobayashi M.: New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae Dulcis* Folium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 2445-2447 (2001)
- Nakano K., Midzuta Y., Hara Y., Murakami K., Takaishi Y. and Tomimatsu T.: 12-Keto steroidal glycosides from the caudex of *Yucca gloriosa*. *Phytochem.* 30, 633-636 (1991)
- Nazeer M.S, Pasha T.N., Abbas S. and Ali Z.: Effect of yucca saponin on urease activity and development of ascites in broiler chickens. *Int. J. Pout. Sci.* 1, 174-178 (2002)
- Okada K., Kiyoka F., Nakanishi E., Hirano H., Ohno I. and Matsuo N.: Studies on chrysanthemic acid. Part XXIX. Synthesis of novel carboxylic acids and insecticidal activity of thFABr esters. *Agric. Biol. Chem.* 44, 2595-2599 (1980)

- Olas B., Wachowicz B., Stochmal A. and Oleszek W.: Inhibition of oxidative stress in blood platelets by different phenolics from *Yucca schidigera* Roezl. *Bark. Nutr.* 19, 633-639 (2003)
- Olas B., Wachowicz B., Stochmal A. and Oleszek W.: Anti-platelet effect of different phenolic compounds from *Yucca schidigera* Roezl. *Bark. Platelets.* 13, 167-173 (2002)
- Oleszek W., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizza C. and Cheeke P.: Resveratrol and other phenolics from bark of *Yucca schidigera* Roezl. *J. Agric. Food Chem.* 49, 747-752 (2001)
- Oleszek W., Sitek M., Stochmal A., Piacente S., Pizza C. and Cheeke P.: Steroidal saponins of *Yucca schidigera* Roezl. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4392-4396 (2001)
- Oser B.L.: An evaluation of yucca mohavensis as a source of food grade saponin. *Food Cosmet. Toxicol.* 4, 57-61 (1966)
- Park Y.K., Lee S.S., Lee H.J., Choi D.H.: Studies on biological activity of wood extractives(??)-Antifungal activity of isoflavonoids. *Mokchae Konghak.* 31, 70-76 (2003)
- Piacente S., Bifulco G., Pizza C., Stochmal A. and Oleszek W.: A novel phenolic spiro derivative, Yuccaone A, from *Yucca schidigera* bark. *Tetrahedr. Lett.* 43, 9133-9136 (2002)
- Saleh N.A.M. and Bohm B.A.: Flavonoids of *Arctium minus* (Compositae). *Experientia.* 27, 1494 (1971).
- Sen S., Makkar H.P.S., Muetzel S. and Beaker K.: Effect of Quillaja saponaria saponins and Yucca schidigera plant extract on growth of Escherichia coli. *Lett. App. Microbiol.* 27, 35-38 (2004)
- Stohs S.J. and Obrist J.J.: Saponins of *Yucca glauca* seed pods. *Phytochem.* 14, 239-241 (1975)
- Stohs S.J., Rosenberg H. and Billets S.: Sterols of *Yucca glauca* tissue

- cultures and seeds. *Planta medica*. 27, 257-261 (1975)
- Shim J.O., Lee M.W.: Growth rate and colony morphology of progenies of zoospores and oospores of *Phytophthora cactorum* causing phytophthora rots in apple trees. *Kor. J. Mycolo.* 22, 281-285 (1994)
- Shinozawa T. and Yamaguchi M.: Body-cooling aerosol compositions containing saponin. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 2003119109 (2003)
- Tanaka O., Tamura Y., Masuda H. and Mizutani K.: In Saponins used in food and agriculture. (Eds.) Waller and Yamasaki, Application of saponins in foods and cosmetics: Saponins of mohave yucca and *Sapindus mukurossi*. Plenum Press, New York. (1996)
- Tamura K., Masuda K., Yamamoto M., Murakami F., Mizutani K. and Tanaka O.: Microbicides useful in food, cosmetic and pharmaceutical industries. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 07149608 (1995)
- Torres P., Avila J.G., Vivar A.R., Garca A.M., Marn J.C., Aranda E. and Cspedes C.L.: Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochem.* 64, 463-473 (2003)
- Wang Y., McAllister T.A., Newbold C.J., Rode L.M., Cheeke P.R. and Cheng K.J.: Effect of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Techno.* 74, 143-153 (1998)
- Uenobe F., Nakamura S. and Miyazawa M.: Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutation Res.* 373, 197-200 (1997)
- Wallace R.J., Arthaud L. and Newbold C.J.: Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1762-1767 (1994)
- Wang Y., McAllister T.A., Newbold C.J., Rode L.M., Cheeke P.R., and Cheng K.J.: Effect of *Yucca schidigera* extract on fermentation and

- degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique(RUSITEC). *Anim. Food Sci. Technol.* 74, 143-453 (1998)
- Wang Y., McAllister T.A., Yanke L.J. and Cheeke P.R.: Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *J. Appl. Microbio.* 88, 887-896 (2000)
- Wu, Z., Sadik M., SIFABman F.T., Simas J.M., Pessaraki M. and Huber J.T.: Influence of yucca extract on ruminal metabolism in cows. *J. Anim. Sci.* 72, 1038-1042 (1994)
- Yamamoto S., Yamada Y., Arakawa H. and Kagasaki T.: Manufacture of wheat flour products containing yucca extracts and ethanol. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. JP 2000245415 (2000)
- Yen J.T. and Pond W.G.: Effect of carbadox, Copper, or *Yucca schidigera* extract on growth performance and visceral wFABght of young pigs. *J. Anim. Sci.* 71, 2140-2146 (1993)
- Yeo J.M. and Kim K.I.: Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 381-385 (1997)
- Zamilpa A., Tortoriello J., Navarro V., Delgado G. and Alvarez L.: Five new steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* Leaves and thFABr antimycotic activity. *J. Nat. Prod.* 65, 1815-1819 (2002)
- ZFABd, A.H.S.A.: Chemical and biological study of the leaves of some Musa species. *Egypt. J. Pharmaceut. Sci.* 39, 4-6 (1999)
- Zhang J., Zhang M., Sugahara K., Sagara Y., Meng Z., Xu S. and Kodama H.: Effect of steroidal saponins of *Anemarrhenaerhizoma* on superoxide generation in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 636-639 (1999)
- 강수철, 문영희: 봉선화의 항균활성성분과 항균력에 관한 연구. 생약학회지, 23, 240-247 (1992)

- 길지용, 조남기, 김범석, 이상낙, 맹원재: Yucca Extract의 添加가 飼料와 畜糞의 In vitro 酵素性狀 및 糞소의 乳生産性에 미치는 影響. 한국축산학회지, 36, 698-709 (1994)
- 김종진, 송홍근, 한창훈: 소나무속 수목의 부위별 추출물의 항균활성. 한국농화학회지, 44, 269-272 (2001)
- 김현철, 길봉섭, 이영행: 개똥쑥의 천연화학물질에 의한 항균효과와 성분확인. 한국생태학회지, 24, 137-140 (2001)
- 김홍식, 조광현: 편측 추출물의 항진균작용에 관한 연구. 한국균학회지, 8, 1-5 (1980)
- 노영수: 의성개나리 과피성분의 항진균작용에 관한 연구(I). 생약학회지, 6, 143-147 (1975)
- 민경희: 산초나무 추출물의 피부사상균에 대한 항균활성과 그 성분. 목재공학, 26, 78-85 (1998)
- 방규호, 이영하, 민병선: 계피로부터 항진균물질 AF-001의 분리·정제 및 특성. 한국균학회지, 25, 348-353 (1997)
- 백수봉, 구한모, 도은수, 천세철: 식물병해의 생물적 방제. 지구문화사 (2001)
- 신승원, 강찬아: 갯 정유의 조성 및 항진균작용에 관한 연구. 생약학회지, 32, 140-144 (2001)
- 양민석, 하영래, 남상해, 최상욱, 장대식: 국내 자생식물의 항균활성. 한국농화학회지, 38, 584-589 (1995)
- 우주형, 김영호, 백원기, 서성일, 서민호, 박종욱, 권택규: Resveratrol에 의한 암 전이 관련유전자 MMP-9의 발현 조절. 대한미생물학회, 33, 235-243 (2003)
- 위지향, 박근형: 땅콩껍질에서 항균 및 항산화 활성이 있는 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid의 동정. 한국생물학회지, 15, 464-468 (2000)
- 유시용, 김진철, 김영섭, 김홍태, 김성기, 최경자, 김진섭, 이선우, 허

- 정희, 조광연: 당귀와 백지로부터 분리한 Coumarin계 물질들의 식물 병원균에 대한 항균활성. 한국농약과학회지, 5, 26-35 (2001)
- 이성규: 가축질병 균주에 대한 소목의 항균활성. 한국미생물생물공학회지, 31, 242-249 (2003)
- 이현옥, 한규용, 한동민: 참썩 정유의 항세균 및 항진균 효과. 한국식품영양학회지, 12, 559-563 (1999)
- 인재평, 이시경, 안병권, 정일민, 장진혁: 유카(*yucca shidegera*) 추출물 첨가에 의한 청국장류의 풍미 개선에 관한 연구. 한국식품과학회지, 34, 57-64 (2002)
- 장귀현, 안병용, 권용주, 최동성: Trp P-1 변이원성에 대한 Resveratrol의 항돌연변이 효과. 한국식품영양학회지, 14, 329-332 (2001)
- 장소영, 유시용, 김성덕: 식물 추출물의 *Pityrosporum ovale* 및 *Candida albicans*에 대한 항진균 활성. 생약학회지, 34, 303-307 (2003)
- 전병수, 곽정훈, 유용희, 차장옥, 박홍석: 酵素, 生菌 및 유카제의添加가 돼지의 生長과 糞 惡臭 發生成分에 미치는 影響. 한국축산학회지, 38, 52-58 (1996)
- 조광현, 김홍식: 참소리쟁이 뿌리(*Rumex japonicus Houttuyn*, 羊蹄根) 추출물의 항진균작용에 관한 연구. 대한피부과학회지, 18, 383-389 (1980)
- 조일찬, 이성희, 차병진: 수용성 규소와 몇 가지 계면활성제의 오이 흰가루병 억제 효과. 한국환경농화학회지, 17, 306-311 (1998)
- 정일민, 백수봉: 황련 추출물로부터 항균활성물질의 분리 및 활성 검정. 분석과학, 10, 153-159 (1997)
- 천상옥, 김도익, 최용수: 수종의 국화과 식물의 지상부 추출물로부터 살충 및 항균활성 연구. 한국잡초학회지, 23, 81-91 (2003)
- 최운정, 이학주, 이성숙, 최돈하: 수목추출물의 생리활성에 관한 연구

- (X)-헛개나무 목부의 항균활성 물질. 목재공학, 31, 1-9 (2003)
- 최용철, 이정운, 김영구: 생물농약의 개발현황과 금후전망. 한국잡초학회지, 17, 112-123 (1997)
- 최용화, 권순열, 김진호, 백남인, 최경자, 조광연, 이병무: 비목나무 (*Lindera erythrocarpa*) 잎으로부터 항진균성 활성물질의 분리. 한국농화학회지, 46, 150-153 (2003)
- 최용화, 채상기, 김진호, 강상재, 백남인, 한재택: 굴피나무 (*Platycarya strobilacea*) 지상부로부터 항진균성 활성물질 분리. 한국농화학회지, 46, 268-270 (2003)
- 홍윤희, 송명중, 한재택, 장태오, 이윤형, 김성훈, 김승애, 박미현, 백남인: 산철쭉(*Phododendron yedoense* var. *poukhanense*) 꽃으로부터 Terpenoid의 분리·동정. 한국농화학회지, 46, 144-149 (2003)