

630.24
L 293 6

최 증
연구보고서

GOVP 12009313

우리나라 고유 식용 생물자원으로부터 향균,
항암, 항종양 및 항산화 물질의 분리 및 이용

Screening and application of antimicrobials,
anticancers, antitumors and antioxidants from
native biomaterials

전북대학교

농림부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우리나라 고유 식용 생물차원으로부터 향균, 향암, 항종양 및 항산화 물질의 분리 및 이용”과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 10 . 31 .

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 신 동 화

연 구 원 : 백 남 인 외 7명

협동연구기관명 : 이화여자대학교

협동연구책임자 : 우 건 조

협동연구기관명 : 원광대학교

협동연구책임자 : 박 중 균

요 약 문

I. 제 목

우리나라 고유 식용 생물자원으로부터 향균, 향암, 향종양 및 항산화 물질의 분리 및 이용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 국제무역기구(WTO) 체제의 출범으로 우리 농산물도 무한 경쟁시대에 돌입하여 세계시장에서 치열한 경쟁을 해야 하는 매우 절박한 상황에 처하게 되었으며, 농산물의 수입으로 인해 경쟁력이 약한 농촌의 경제가 위기에 처하게 되었다. 따라서 우리의 농업도 이와 같은 개방화와 국제경쟁상황에서 능동적으로 대처할 수 있는 부가가치가 높은 농산물을 다양하게 개발하고 상품화할 필요가 요구되는 실정이다. 또한 국제기술질서는 점차적으로 유용물질 특히 생리활성 기능을 갖는 향균, 향종양, 향암, 항산화물질 등의 탐색 방법이나 연속생산 시스템 공정 등에 대하여 철저하게 그 know-how를 보호해 가고 있는 실정이다.

식물과 동물의 일부 성분은 미생물의 생장을 억제 혹은 유지의 산화를 지연시켜 식품의 부패 방지 역할을 하거나 품질보존을 위한 보존제나 유지 산패 억제를 위한 항산화제들은 대부분이 인공합성품으로 잠재적 독성 때문에 그 사용량이 규제되고 사용 대상 식품이 법적으로 제한되고 있다. 또한 소비자들도 인공 합성 첨가물에

대한 심한 기피증 때문에 식품 가공 업체에서도 인공합성 보존제나 항산화제의 사용을 자제하고 있으며 이를 대체하기 위한 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

난백 lysozyme은 대부분의 그람 양성 박테리아와 일부 그람 음성 박테리아의 세포벽을 가수분해할 뿐만 아니라 고온에서도 매우 안정한 효소이므로 식품 가공 및 저장용 천연 식품보존제로서의 이용 가치가 높다. 이러한 항균 효소인 lysozyme을 선택적으로 분리하여 공업적으로 대량 생산하는 공정을 개발하는 것이 매우 중요한 과제이다. 현재 일반적으로 유통되고 있는 상업용 난백 lysozyme은 3번의 결정화 단계를 거쳐 동결 건조시켜 제품화되고 있는데, 기존의 결정화와 냉동건조 방법 대신 한외여과 막을 사용함으로써 13종의 난백 단백질로부터 lysozyme을 single-step으로 분리할 수 있는 최적 막 분리 조건을 설정하는 것이 천연 항균효소 생산에 매우 중요한 일이다.

생명체의 유전인자는 항상 자외선이나 방사선 등에 의해 상해받고 이러한 상해가 절제회복 등의 기작에 의해 복구되지 않으면 암과 돌연변이 유발의 치명적인 결과가 나타난다. 한편, 유발된 암세포는 항암제나 이의 보조제에 의해 세포고사되어 더 이상 증진되지 않을 수 있음이 알려져 왔다. 따라서 이러한 DNA 회복과정이나 암세포의 고사를 항진할 수 있는 물질들은 암의 예방적 측면에서 유효하고 정확한 대응물질로서 작용할 것이다. 본 연구에서는 한국산 천연 물질을 대상으로 하여 이러한 효능을 분석하고자 하였다

이러한 신물질의 탐색이나 그 생산 기술 및 공정의 개발은 본 연구에서 그 대상으로 하고자 하는 우리나라 고유의 천연생물자원인 농림산물의 부가가치를 높일 뿐만 아니라 농촌 및 산촌의 소득증대와 직결된다는 점에서 연구개발의 필요성이 높다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 식용가능 동식물의 대상 선발
 - 식용 동식물 및 한약재의 추출물을 대상으로 항균, 항산화성을 비교 실험 대상 선정
 - 난류의 구성 성분 및 대사 산물에 대한 특성 시험
 - 동식물의 구성 성분 및 대사 산물에 대한 특성 시험
 - 동식물 추출물에 의한 항암 및 항종양 효과의 배양 세포계 수준의 대비 시험

- 유효 물질의 분리 및 정제 방법의 정립
 - 선정 대상물질의 최적 분리 방법 시험
 - 유효 물질의 적용 가능한 정제방법 정립
 - 대상 동식물의 조건별 유효 물질 함량측정
 - 분리, 정제법과 항암, 항균, 항산화 등의 생체기능분석법간의 연관성 정립

- 유효물질의 구조 규명 및 효과 측정
 - 활성 물질의 동정 및 분자구조 결정
 - 활성 물질의 분자 수식
 - 수식된 새로운 물질의 효과측정
 - 새로운 물질의 생체기능성 변화와 강화 조건 탐색

○ 식품 및 생체 적용시험

- 항균성 물질의 적용가능 대상 식품 및 저장기간 연장 확인
- 항산화성 물질의 산화 억제효과 및 유지 식품에 적용
- 동물 및 배양 세포계 실험을 통한 항암 및 항종양 효과 확인
- 유용천연물질 및 유용유전자의 대량발현, 정제 및 안전성평가

IV. 연구개발 결과

“우리나라 고유 식용 생물자원으로부터 항균, 항암, 항종양 및 항산화 물질의 분리 및 이용”에 대한 연구는 3개의 세부과제로 이루어 졌으며 각 세부과제별 연구결과를 구분하여 요약하였다.

● 제1세부 연구과제

식용식물자원으로부터 항균성, 항산화성 물질의 분리, 동정 및 식품에 이용

1. 항산화성 물질의 분리 및 효과측정

소목(*Caesalpinia sappan*, L) 등 60여종의 현재까지 실험되지 않은 식용 혹은 한 약재를 대상으로 항산화 효과를 든지, 팜유 및 콩기름에 대하여 실험한 결과 소목, 강진향 등 한약재로부터 얻은 추출물의 항산화 효과가 기존 인공합성 항산화제에 비하여 우수함을 확인하였다. 항산화 효과가 우수한 소목의 원인 물질을 추적하여 brazilin과 protosappanin A임을 확인하였으며 이들 순수물질에 의한 항산화 효과의 우수함이 입증되었고 식용유지의 산화 안정성에도 뚜렷한 효과가 있음이 증명되었다.

강진향 용매 분획물 중 CHCl_3 분획물이 든지와 팜유에 모두 높은 활성을 나타내

었고, ascorbic acid는 상승효과를 나타내었다. 강진향 CHCl_3 분획물(500 ppm)은 돈지와 팜유의 저장시험에서(60℃) BHT(200 ppm)와 항산화 효과가 유사하였고, BHA(200 ppm)와 δ -tocopherol(200 ppm) 보다 활성이 높았다.

건칠(*Rhus vernieifula* STOKES) 등 10여종의 식용식물 및 한약재로부터 75% ethanol 추출물을 얻어 Rancimat, oven test, DPPH 방법 등을 동원하여 항산화 활성 대상을 탐색완료하였다. 항산화성 물질 중 유효물질의 구조를 동정한 결과 건칠의 경우 gallic acid, butin, butein, sulfuretin 등으로 확인되었다. 분리된 원인 물질들의 항산화 효과는 기존 상업적으로 이용되는 BHA 및 tocopherol 등 항산화제 보다 우수하여 천연 항산화제로 이용 가능성이 높았다. 실제 이들 항산화제를 식품에 적용할 때 열안정성, 산화지연성 등 상업적 목적에도 부응하여 산업적 가치도 인정되었다.

옥두구 75% ethanol 추출물에서 돈지의 AI는 4.2 팜유에는 AI 1.44로 효과가 있었고 chloroform 층에서 항산화 효과가 높았다.

옻나무 추출물 중 항산화 물질의 특성 및 구조결정에 대해 실험하였다. 옻나무 수피 75% ethanol 추출물은 팜유와 돈지에 대하여 항산화 효과가 우수하여 이 물질을 분획하여 항산화 효과를 비교한 결과 chloroform 층에서 가장 효과가 좋았다. Chloroform 층을 다시 phenol성 물질분리 방법에 따라 분리한 결과 이 물질(RCF)은 기존의 BHT와 BHA에 비하여 돈지에서 5배, 팜유에서 2배 정도 항산화 효과가 좋았다. 순수 분리된 획분의 화학구조를 MASS, Spectrometer 및 NMR로 동정한 결과 RCF-11-1 : gallic acid, RCF-11-2 : 3', 4', 7-trihydroxy-flavenone (butin), RCF-11-3 : 2', 4', 3, 4 tetrahydroxychalcon(butein), RCF- 13-1 : 3', 4', 6 trihydroxyaurone(sulfuretin)으로 확인되었다.

Lecithin으로 liposome 상을 만들고 여기에 각 획분 200 ppm 첨가하여 lipid peroxide inhibition(%)을 측정한 결과 RCF-11-3이 가장 높은 산패지연 효과를 보였으나 δ -tocopherol보다는 낮았다.

2. 항균성 물질의 분리 및 효과 측정

감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 등 70여종의 식용 혹은 한약재를 대상으로 항균성을 비교 측정하였으며 이들 중 효과가 뚜렷한 상백피, 감초, 고삼, 관중 등을 선발 완료하였다. 식중독 미생물인 *Listeria monocytogenes* 5균주와 *Staphylococcus aureus*, 식품 변질균인 *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*에 대하여 선별적으로 상당한 항균성을 보이는 대상을 확인하였다. 항균성 원인 물질을 확인한 결과 상백피 추출물은 Kuwanon G, 감초 추출물의 경우 liquiritigenin으로 확인되었으며 이들의 효과는 기존 항균제에 비하여 탁월하였다.

육두구를 포함한 70여종의 식용 혹은 한약재로부터 *Listeria* 등 식중독 미생물과 *Bacillus* 등 부패미생물 증식 억제 효과가 있는 육두구, 고삼, 섬바디, 어수리 등을 선발하였다. 고삼 chloroform 층의 경우 *Listeria*, *Bacillus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* 등에 탁월한 효과가 있고 원인 물질은 Kushenol F로 동정되었다. 고삼에서 분리된 Kushenol F는 30 ppm수준에서도 Gram(+) 및 Gram(-)균 증식 억제 효과가 탁월하여 기존 항균제보다도 우수하다. 육두구의 경우 ethanol층과 n-hexane 분획층에서 모두 *Listeria monocytogenes* 등 5균종의 증식억제 효과를 보였고 이의 원인 물질은 분리 동정하고 있다. 섬바디는 울릉도 자생 식물로 약초나 사료로 사용되며 에탄올 추출물에서 식중독 및 부패 미생물에 10 ppm 수준에서도 탁월한 증식억제 및 살균효과가 있어 이의 원인 물질을 동정하고 있다.

식용 혹은 한약재로 사용하는 식물 90여종으로부터 75% ethanol 추출물을 얻고 이들 추출물의 항균 활성을 검색하였다. 어수리 75% ethanol 추출물을 용매 분획한 결과 hexane층과 chloroform층 분획물에서 강한 항균활성을 보였고 30 ppm 수준에서도 72시간까지 확실한 증식억제 현상을 보였다.

섬바디의 항균활성과 물질동정에 대해 실험하였다. A8 소획분을 다시 silica gel column chromatography하여 순수물질인 SBD-1 및 SBD-2를 얻어 구조동정을 한 결과 SBD-1은 지방산의 복합체였고, SBD-2는 (9z)-heptadeca-1,9-dien-

4,6-diyne-3,8-diol(falcarindiol)로 동정되었다. SBD-2를 monoglyceride와 혼합하여 사용할 때 *Listeria*에 대한 항균효과는 크게 증가하였다.

운향나무의 항균활성을 실험하였다. 운향나무 뿌리의 75% ethanol 추출물은 40 ppm의 낮은 농도에서도 *Listeria monocytogenes* 5균주에 대하여 72시간까지 증식억제 현상을 보였으며, minimum bactericidal concentration(MBC)도 40 ppm이었다. Chloroform층을 silica gel chromatography하여 얻은 순수물질을 구조 동정한 결과 gravacridonediol로 확인되었다.

감초와 섬바디 분획물을 식품에 적용하여 실험한 결과, 액체배지에서 *Listeria monocytogenes*에 대하여 증식억제 효과를 나타낸 항균활성 분획을 각각 가열 살균한 소고기에 첨가하여 상온에서 저장 실험한 결과 저장 4일째 대조구와 처리구의 균이 거의 같은 수준으로 검출됨으로서 항균 효과를 확인할 수 없었다. 저장 온도가 5℃이고 초기 접종 균수가 $ca. 10^7$ CFU/g일 때 낮은 온도로 인하여 상온보다는 균수 증가폭이 적었으나 저장 8일째까지 대조구와 처리구의 차이가 관찰되지 않았다.

● 제2세부 연구과제

막분리 공정을 이용한 food grade 천연 항균효소제의 연속생산 시스템 개발

PM30 막을 이용한 난백 lysozyme의 막 분리 최적 조건은 시료 농도 0.25%, 온도 35℃, 막 횡단 압력 30 psi, 교반속도 300 rpm이었다. 막 분리 초기 12분까지는 YM30 막의 flux가 더 높았으나, 정상상태에서의 flux는 PM30 막이 더 높았다. PM30 막의 분리 여액내 단백질 농도와 lysozyme 농도는 YM30 막에 비해 낮았으나, 비활성도는 2배 이상 높았다. 5회 막 분리한 PM30 막은 새 PM30 막에 비하여 flux가 약 30% 감소하였으나 시간 경과에 따른 flux 감소 경향은 거의 동일하였으며,

막 분리 35분 경과 후 정상상태에 이르러 초기 flux의 약 70%를 유지하였다.

막 분리 여액내 lysozyme 농도와 비활성도는 각각 110 units/mL, 2,821 units/mg protein이었으므로, PM30 막을 이용한 한외여과 공정은 천연 항균 효소제인 lysozyme을 분리하는데 매우 효과적인 방법이었다. 예비여과와 한외여과 단계를 거치면서 lysozyme 이외의 비효소성 단백질은 PM30 막에 의해 99% 이상이 제거되어 PFS에 비해 PMS의 비활성도가 최저 18배에서 최고 31배 까지 증가하였다. 여러 농도 중 비활성도와 purification factor가 가장 높은 0.25% 난백 용액을 최적 농도로 결정하였다.

난백 용액 (0.25%, w/v)의 겔 크로마토그래피 결과 비효소 획분은 대부분 ovalbumin으로 판명되었으며, 전기영동 결과 PMS내에는 고순도의 lysozyme이 존재하였다. 분자량이 큰 단백질들이 0.9 μm 의 두께로 한외여과 막 표면에 침착되었으나, SEM 관찰 결과 이들 침착 단백질의 대부분은 0.1 N NaOH로 세척시 제거되는 것으로 나타났다. 따라서, polysulfone계의 PM30 막을 사용한 한외여과 공정이 고순도의 lysozyme만을 선택적으로 분리하는데 매우 효과적이었다.

PM30 증공사 막을 사용하여 lysozyme 분리 공정을 scale-up하였을 때, 최적 막 분리 조건은 pump 속도 3, 시료온도 20 $^{\circ}\text{C}$, 막 압력 16 psi였다. 막 분리 초기에는 급격한 flux 감소가 나타났으나 5분 경과 후에는 18 LMH의 flux를 유지하였다.

한계분자량이 다른 PN01E 막과 PN03C 막을 사용하여 막 분리가 되었을 때 pump speed와 막 압력에 따라 두 막의 flux 증가 경향이 다르게 나타났으며, 최적 조건 하에서 막 분리가 되었을 때 PN03C의 flux가 더 높았다. 그러나, 한계 분자량이 같은 PM30 막의 flux가 PN03C보다 더 높을 뿐 아니라 시간에 따른 flux 감소 효과도 훨씬 적었으므로 polysulfone 재질의 증공사막이 천연 항균 효소인 lysozyme을 대량으로 분리하는데 가장 적합한 막으로 판단되었다.

● 제3세부 연구과제

천연물로부터 항암·항종양 물질의 분리와 세포 및 생체적용시험

다양한 천연물들을 검색한 후 선정된 물질들 중 상백피 추출물과 인삼 추출물은 자외선 또는 알킬화제를 처리한 배양세포의 세포막의 건전성과 세포생존률을 농도에 따라 10-40% 가량 증진시켜 세포독성으로부터의 감소 효과를 보였다. 유전독성 변화능 실험 중 DNA 합성을, 비주기성 DNA 합성, DNA사 절단 등에서도 이들 추출물은 20 - 40% 가량의 통계적으로 유의미한 감소를 나타내었고, 특히 인삼 추출물의 경우 회복과정 중 절제단계를 유의미하게 증가시키는 것으로 해석되었다. 대사활성계의 존재는 천연물의 유전독성 감소효과를 약 5-10% 가량 증가시키며 그 최적 시간대는 12 시간으로 관찰되었다.

In vitro foci형성에 의한 암세포화의 빈도와 그 범위를 측정한 결과, 이러한 암화과정에 인삼 추출물과 상백피 추출물은 유의미한 저해효과를 보여 이들 물질이 유전독성의 감소를 통해 실제 발암과정에도 감소효과를 나타냄을 관찰할 수 있었고, 대사활성계의 존재는 부제시보다 약 5 - 27%의 발암감소효과를 보였다. 또한, Balb/c mouse에 자외선형의 상해에 의한 피부암, 위암, 간암 빈도에 대해 분석한 결과 이들 추출물은 통계적으로 유의미한 감소 효과를 보였다. 발생된 암에 대한 bleomycin의 치료적 처리에 대한 천연물의 효과를 분석한 결과, 천연물들의 후처리는 DNA사 절단은 증가시키나, 비주기성 DNA합성이나 DNA 합성율은 별로 변화시키지 않았고, nucleosome-sized DNA ladder의 형성을 증가시킴을 알 수 있었다. 이는 이들 추출물이 세포고사능의 촉진 역할을 수행함을 시사하고, 세포고사 강화능 검색 결과 윗나무와 인삼 추출물의 분리성분들에 이러한 효능이 강함을 관찰하였다.

인삼의 경우, western blot 분석에 의해 MMS에 의한 DNA 상해에 대해서 p53 단백질의 수준이 정상배지로의 교환때 보다는 PD 와 PT 사포닌에서 증가했음이 관찰되었고, p21 단백질 수준도 역시 증가함이 관찰되었다. 이러한 결과와 부합되게 세

포주기 관련 단백질들인 cyclin E, cyclin D1, CDK2, 그리고 PCNA의 단백질 수준은 감소한 결과를 얻을 수 있었다. 반면, DNA 회복과 관련된 GADD45에 대한 western blot 결과는 PD 사포닌 처리 후 시간 경과에 따라 증가를, 그러나 PD 사포닌 처리 후의 시간 경과에 따라서는 감소라는 선별적 효과를 보였다.

옫나무로부터 분리된 RCF-11이 SNP에 의한 세포사에 영향 주는지를 MTT assay를 통해 검색한 결과, SNP에 의한 세포의 손상 후 RCF-11을 가했을 땐 예상되는 수치보다 RCF-11의 농도가 낮을 때는 높게 나타나고, RCF-11의 농도가 높을 때는 예상되는 값보다 오히려 낮게 나타났다. SNP와 RCF-11을 12시간 동안 동시 처리할 경우 세포 활성은 상승되었고, RCF를 선처리하고 SNP 처리시에도 상승효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 세포 형태적 분석과 FACS 분석에서도 관찰되었다. DNA 합성을 분석 결과, RCF-11은 비정상적인 DNA synthesis rate을 감소시키는데 영향을 미치는 것으로 추정되었다. RCF-11의 이러한 효과는 RCF의 항산화적 효과에 의해 SNP의 작용을 경감시키거나 또는 SNP에 의해 손상된 세포의 DNA 회복 활성을 높이는 것으로 생각된다.

또한 이들 분리 성분들을 꿀, 자당, 녹두즙 등을 포함하는 다양한 조합으로 세포 및 동물에 투여하고 위의 기능성 및 안전성 실험을 수행한 결과들도 모두 긍정적이었으며 따라서 기능성 및 안전성에서 전혀 손상받지 않음을 확신할 수 있었다.

결론적으로, 이들 분리성분들의 안전성 시험의 결과, 전체적으로 안전성면에서는 매우 고농도가 아니면 문제가 없는 것으로 확인되었다. 따라서 이들 분리 성분과 그 이전 단계의 혼합물들은 식용 또는 약용 수준의 농도에서 충분한 기능성과 안전성을 나타내었다.

본 과제 의 추출물 및 분리 성분들은 식품화하기에 충분한 생물학적 기반이 본 연구에 의해 규명되었으며, 이들이 항암기능을 갖는 식품으로 다양하게 가공할 수 있음을 기능성과 안전성 면에서 체계화하였다. 본 연구 결과에 따라 본 연구자는 인삼 성분이 함유된 기능성 음료의 개발을 전북 소재의 건보 식품과 적극적으로 추

진하고 있다.

V. 연구개발 결과의 활용계획

1. 활용방안

- 천연자원 유래 항암, 항산화 물질들은 건강음료 등의 기능성 음료에, 항산화, 항균 물질들은 다양한 종류와 다양한 유통 단계의 가공식품에 활용
- 신물질 사용에 따른 제반 식품 특성(저장학적 특성, 관능적 특성, 기능적 특성 등)의 변화 및 예상되는 문제점 해결에 중점을 두어 21세기 노령화 시대에 대비하고 요구되는 기술의 확보
- 노령식, 환자식 등 medical foods에 적용, 제품화하고 아울러 기존 식품에 이들 새로운 기능성 소재를 강화함으로써 건강 추구형, 생지향형 가공식품의 수요 확대 창출
- 기능성식품의 조제 기술은 본 과제에서 대상으로 하는 다양한 약용식물을 이용한 유사 제품 개발에 응용
- 개발된 관련 막분리 공정기술을 다른 식품소재 생산공정에 응용

2. 학술지 및 관련 홍보매체에 게재

- 한국식품과학회지 등 식품관련학회에 학술논문으로 투고하여 18편 게재 완료
- 각종 학술발표회에 적극 참여하여 20편 발표 완료
- 기타 협회, 연구소, 업체 등의 발간지에 연구결과 게재

여 백

Summary

I. Title of Research

Screening and application of antimicrobials, anticancers, antitumors and antioxidants from native biomaterials

II. The Objective and Importance of Research

In recent years, the form of World Trade Organization(WHO) has led to an urgent condition to domestic agricultural economy, as we have got to compete fiercely with foreign products for the weakened competitive edge in agricultural field by the imported agricultural products.

Therefore, it is necessary to develop and commercialize the high value-added agricultural products to cope with an open trade policy and a foreign competition. Moreover, it is the fact that in the grim reality of international society the know-how about an investigation procedure of useful substances, especially antimicrobials, anticancers, antitumors and antioxidants with physiological active agent is thoroughly kept a secret.

Consequently we are badly in need of the investigation of these new substances and the development of manufacturing technique and process in

order to strengthen the competitiveness of our native biomaterials from farm and forest products on international markets and increase wealth in agricultural community and mountain village.

III. The contents and category of research

o Selection of edible animals and plants

- Selection of the control group to examine antimicrobial and antioxidative activity from edible animals and plants and medicinal plants.
- Experiment on effect of components and metabolic products of eggs.
- Experiment on effect of components and metabolic products of animals and plants.
- Experiment at the level of culture cell on effect of anticancers and antitumors of extracts from animals and plants.

o The establishment of methods to isolate and refine active substances

- Experiment on the optimum isolation method of selected substances.
- Establishment of applicable methods to refine active substances.
- Content measurement of active substances according to conditions
- Establishment of isolation refining method and correlation between

the organic functional analysis for antimicrobials, anticancers, antitumors and antioxidants

o Experiment on identification of active substance and its effect

- Identification of active substances.
- Isolation of active substances.
- Experiment on effect of new substances.
- Research on the change of functionality of new substances and reinforcing condition.

o Application experiment on food and culture cell

- Identification of antimicrobial substances and application on food for shelf life extension.
- Experiment on effect of antioxidative substance and its food application.
- Identification of anticancer and antitumor effect through animal and culture cell experiments.
- Mass revelation of natural substances and genes, refining and safety evaluation.

IV. Results of research

The research on "Screening and application of antimicrobials, anticancers, antitumors and antioxidants from native biomaterials" consists of 3 details research units and is summarized in terms of unit.

● The 1st research subject

Screening and application of antimicrobials and antioxidants from native biomaterials.

1. Screening and effect measurement of antioxidative substances

The antioxidative activities of more than 60 edible or medicinal plants that have not been experimented before (e.g. *Caesalpinia sappan*. L) were examined and extracts from medicinal plants such as *Caesalpinia sappan*. L, *Dalbergia odorifera* T.CHEN showed more effective antioxidative activity than commercial antioxidants. The antioxidative active compounds of *Caesalpinia sappan*. L were isolated and identified as brazilin and protosappanin A, which were a very effective antioxidative compounds as natural substances and revealed high antioxidative activity on edible oil.

Chloroform fraction of *Dalbergia odorifera* T.CHEN extract showed strong antioxidative activity on lard and palm oil, and synergistic effect with ascorbic acid. In accelerated storage test on lard and palm oil at 60°C, chloroform fraction (500 ppm) of *Dalbergia odorifera* T.CHEN extracts showed

similar antioxidative activity to BHT(200 ppm) and stronger activity than BHA(200 ppm) and δ -tocopherol(200 ppm).

Antioxidative activity of 75% ethanol extracts from more than 10 edible or medicinal plants such as *Rhus verniciflua* stokes etc. was examined by Rancimat, oventest, and DPPH method. The antioxidative active compounds of *Rhus verniciflua* STOKES, *Caesalpinia sappan*. L and *Dalbergia odorifera* T.CHEN were isolated and identified as gallic acid, brazilin and mucronulatol, respectively. The compounds showed more effective antioxidative activity than commercial antioxidants such as BHA and tocopherol, and was judged to show the possibility of a new natural antioxidant. These antioxidants exhibited thermal stability and retardation of oxidation in food application experiment, satisfying the commercial purpose.

75% ethanol extracts from *Myristica fragrans* Houttuyn were examined on lard and palm oil and its AI was 4.2 and 1.44, respectively. Its chloroform fraction exhibited the strong antioxidant activity.

The identification of antioxidative components from *Rhus verniciflua* STOKES was carried out. 75% ethanol extracts of *Rhus verniciflua* STOKES Bark were examined on lard and palm oil, and showed comparatively strong antioxidative activity, chloroform fraction exhibited the strongest antioxidant activity. The free phenolic acid fraction of chloroform extract showed that the RCF was 5 times on lard and twice on palm oil as effective as commercial antioxidants such as BHT and BHA. The following chemical structure was identified through MASS, spectrometer and NMR.

RCF-11-1 : gallic acid

RCF-11-2 : 3',4',7-trihydroxyflavenone(butin)

RCF-11-3 : 2',4',3,4-tetrahydrochalcone(butein)

RCF-13-1 : 3',4',6-trihydroxyauron(sulfuretin)

Liposome system was made with lecithin, each fraction 200 ppm was added to it, and lipid peroxide inhibition(%) was measured. In consequence, RCF-11-3 showed the stronge antioxidative activity but lower activity than δ -tocopherol.

2. Isolation and effect measurement of antimicrobial active substance

Antioxidative activities of over 70 edible or medicinal plants such as *Glycyrrhiza uralensis* Fisch were examined and screening of *Morus alba* Linne, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, *Sophora flavescens* Ait and *Dryopteris crassirhizama* Nakai with strong effect was completed. Antimicrobial effect of tested plant extract on food poisoning bacteria (5 strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and food spoilage bacteria (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*) has been proved to be quite strong. Antimicrobial compounds of extracts of *Morus alba* Linne and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch was identified as Kuwanon G and liquiritigenin respectively and they showed far more effective antimicrobial activity than commercial antimicrobial agents.

Myristica fragrans Houttuyn, *Sophora flavescens* Ait, *Dystaenia takesimana* kitagawa, and *Heracleum mollendorffii* Hance were selected from 70 species of edible medicinal plants, and they had growth inhibition effect on food poisoning bacteria *Listeria*. Chloroform fraction of *Sophora flavescens*

Ait. exhibited strong growth inhibition on *Listeria monocytogenes*, *Bacillus*, *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. Its antimicrobial compound was identified as Kushenol F. Kuschnol F. from *Sophora flavescens* Ait showed strong growth inhibition on Gram(+) and Gram(-) bacteria at 30 ppm and showed far more effective antimicrobial activity than commercial antimicrobial agents. Ethanol fraction and n-hexane fraction of *Myristica fragrans* Houttuyn showed growth inhibition on 5 strains of *Listeria monocytogenes* and its compounds are being identified. Ethanol extract of *Dysoxylum tatesimana* Kitagawa (Uluru Island native plant) exhibited strong growth inhibition and bactericidal effect on food poisoning bacteria and spoilage bacteria at 10 ppm and its compounds are being identified.

75% ethanol extract from more than 90 species of edible or medicinal plants was screened antimicrobial activity. Fractionation of 75% ethanol extracts from *Heracleum mollendorffii* Hance showed that hexane and chloroform fraction had strong antimicrobial activity and exhibited growth inhibition for 72 hours even 30 ppm level.

Identification of antimicrobial active substance from *Dysoxylum tatesimana* Kitagawa was examined. After silica gel column chromatography, SBD-1 and SBD-2 were separated from A8 fraction. SBD-1 was identified as complex of fatty acid and SBD-2 was identified as (9z)-heptadeca-1,9-dien-4,6-dien-3,8-diol (falcariindiol). Addition SBD-2 to monoglyceride led to remarkable improvement of antimicrobial activity on *Listeria*.

Antimicrobial activity of *Ruta graveolens* Linne was measured. 75% ethanol extracts of *Ruta graveolens* Linne root exhibited growth inhibition on 5 strains of *Listeria monocytogenes* for 72 hr even at low concentration 40 ppm

and minimum bactericidal concentration was 40 ppm. Pure substance from chloroform fraction by silica gel column chromatography was identified as gravacidonediol.

Food application experiment of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch and *Dystaenia takesimana* kitagawa fractionate were carried out. Antimicrobial active fraction with growth inhibition effect on *Listeria monocytogenes* in liquid medium was added to cooked beef and it was stored at the normal temperature. In consequence, we found no effect of antimicrobial activity when plant extracts were applied to cooked beef. Because they had almost same bacteria numbers in control as well as in treatment.

● The 2nd research subject

Development of continuous membrane separation process of antimicrobial enzyme which can be used as natural food grade preservatives

Hen egg white lysozyme (HEWL) is very valuable as a natural preservative in food processing due to its selective bactericidal activity. HEWL which traditionally isolated by crystallization or freeze drying was simply separated from 13 different hen egg white (HEW) proteins by a single-step ultrafiltration.

Freeze dried HEW (0.25%, w/v) dissolved in a citrate-phosphate buffer (pH 4.6) was ultrafiltered with a PM30 membrane under various operating

conditions, by changing concentration, temperature, transmembrane pressure (ΔP_T), and stirring speed. Optimum separation conditions were decided when maximal flux was obtained. Under the optimum separation conditions, the effect of membrane material and fouling on flux as time passed as well as lysozyme concentration, protein concentration, specific activity (SA) in the permeate were measured. To determine the optimum separation concentration among the different hen egg white protein (HEWP) concentrations (0.25, 0.5, 1.0%, w/v), protein concentrations, lysozyme concentrations, specific activities (SA), and purification factors of prefiltered solution (PFS) and ultrafiltered solution (PMS) were determined and compared. The purity of lysozyme separated at each step was analyzed and confirmed by gel chromatography and electrophoresis. The fouling deposits on membrane were observed by SEM. The optimum separation conditions of the scale-up process were to be determined based on the predetermined optimum conditions in bench-top scale. Using hollow fiber membrane made of polysulfone, the effects of feed flow rate, inlet pressure, and feed temperature on flux were measured. Under the optimum separation conditions, the change of flux as time was observed.

The flux was measured by changing feed flow rate and inlet pressure when PN01E and PN03C membrane, which has different membrane material and pore size with PM30 membrane, were used. Best separation conditions of HEWL with PM30 membrane were sample concentration 0.25%, temperature 35°C, ΔP_T 30 psi, and stirring speed 300 rpm. During the first 12 min, the flux of YM30 was higher, but at the steady-state it was lower than that of PM30. The SA of the PM30 permeate was over 2 times higher in spite of the lysozyme and protein

concentration being lower than that of YM30 permeate. The flux of 5 times used PM30 decreased 30% compared to a new PM30, but both had the same tendency in flux decrease when time passed. Both of them reached a steady-state after 35 min and remained at 70% of the initial flux. In the PM30 permeate, the lysozyme concentration and SA were 110 units/mL and 2,821 units/mg protein, respectively. Therefore, PM30 membrane separation was very effective for separation of antimicrobial lysozyme. The non-enzymatic proteins were removed over 99% by ultrafiltration(UF). The increased feed concentration did not contribute to the increase of SA. SA of PMS was 18 to 31 times higher than that of PFS. The optimum feed concentration was decided as 0.25% based on SA and purification factor. The non-enzymatic region of gel chromatogram was proved to be ovalbumin. The thickness of deposit on the UF membrane was approximately 0.9 μm and removed by cleaning with 0.1 N NaOH. In scale-up separation process with PM30 hollow fiber membrane, the optimum separation conditions were pump speed 3, feed temperature 20°C, inlet pressure 16 psi. Although the severe decline in flux was observed in the initial filtration stage, the flux was maintained 18 LMH after 5 minutes.

The increase in flux with PN01E and PN03C membrane showed different pattern as inlet pressure and pump speed increased. PN03C showed higher flux than PN01E under the optimum conditions. Since the flux of PM30 membrane was higher and the flux decline was much lower than PN03C, polysulfone hollow fiber membrane was the best in separation of natural antimicrobial lysozyme in large-scale process.

● The 3rd research subject

Isolation of anti-tumor materials from Korean natural products and analyzes of their cellular and in vivo activities

From the selected materials, the mulberry and ginseng aqueous extracts increased to about 10-40% of the cell membrane integrity and cell survival decrease induced by genotoxic treatment. Repair assays including DNA synthesis rate, UDS, DNA strand break also indicated that these extracts increased the repair activities induced by genotoxic treatments. The presence of metabolic activation system potentiated these activities.

In vitro foci formation assay showed that these materials significantly decreased the frequencies of cancer cell induction. In vivo experiments using Balb/c mouse system also indicated their preventive effects on the formation of skin, lung, and liver cancers. The bleomycin-induced apoptosis of cancer cell was potentiated by these materials as judged by nucleosome-sized DNA ladder formation. Components of *Rhus verniciflua* and ginseng extracts were selected after screening of apoptosis-enhancing activities.

In the case of ginseng, western blot analyses indicated that PD and PT saponin increased the expression of p53 and p21 after genotoxic treatment. In harmony with these results the expression of cell cycle-related proteins such as cyclin E, cyclin D1, CDK2, and PCNA was decreased. However, the expression of GADD45 was increased by PD saponin and decreased by PT saponin.

RCF-11, the mixture of purified components from *Rhus verniciflua*, showed a increasing effect of cell survival induced by SNP when analyzed by MTT

assays. The effects were similar either when cotreated, post-treated, or pre-treated. When the RCF concentration was high, however, the effects were reversed. These results were also observed by cell morphology analysis and FACS analyses. Abnormal DNA synthesis induced by SNP was suppressed by RCF.

Various combination of these components with food-additives such as honey, fructose, etc. also showed the above bioactive effects and safeties were conserved during all processes. Thus these extracts and components showed sufficient bioactivities and safeties in concentrations applicable for food or drug applications.

V. Application plan of research results

1. Application plan

- o Application natural anticancers and antioxidants to functional beverage such as health beverage and antioxidants and antimicrobials to various kinds of processed food.

- o Careful attention must be paid to various food properties change in storage, senses, and functionality etc. and its problem solution caused by new substances use. Moreover, new techniques should be prepared for old age society and it should be developed.

- o It is necessary to research on method for application of medical

foods such as old age food and patient food and production on a commercial scale and development of functional ingredients-enriched foods. Then, there will be in great demand for healthful and life-oriented processed food.

- o Research on application a manufacturing process of functional foods to products development of various medicinal plants, the subject of this study, is necessary.
- o Application a membrane separation manufacturing process to the other foods is necessary.

2. Make public through technical journals and mass media

- o Contribute to well-known scientific journal in domestic and abroad.(18 papers)
- o Presentation on conferences or meetings.(20 proceeding)
- o Submit to various company bulletins.

Contents

Presentation note	1
Abstract(in Korean)	2
Summary(in English)	13
Contents(in English)	26
Contents(in Korean)	28
Isolation, identification and food application of antimicrobial and antioxidative substances from edible plant materials	31
Contents	33
Chapter 1. Introduction	35
Chapter 2. The contents and category of research	39
Chapter 3. Results of study	45
Chapter 4. Achievement of study and contribution	202
Chapter 5. Application plan of research results	206
Chapter 6. Reference	207
Development of continuous membrane separation process of antimicrobial enzyme which can be used as natural food grade preservatives	243
Contents	245
Chapter 1. Introduction	247
Chapter 2. The contents and category of research	250

Chapter 3. Results of study	260
Chapter 4. Achievement of study and contribution	312
Chapter 5. Application plan of research results	314
Chapter 6. Reference	315

Isolation of anti-tumor materials from Korean natural products and analyzes of their cellular and in vivo activities

Contents	323
Chapter 1. Introduction	325
Chapter 2. The contents and category of research	330
Chapter 3. Results of study	334
Chapter 4. Achievement of study and contribution	370
Chapter 5. Application plan of research results	373
Chapter 6. Reference	374

목 차

제 출 문	1
요 약	2
영문요약	13
영문목차	26
목 차	28

식용식물자원으로부터 항균성, 항산화성 물질의 분리, 동정 및 식품에

이용	31
목 차	33
제 1 장 서 론	35
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	39
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	45
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	202
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	206
제 6 장 참고문헌	207

탁분리 공정을 이용한 food grade 천연 항균효소제의 연속생산 시스템

개발	243
목 차	245
제 1 장 서 론	247
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	250

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	260
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	312
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	314
제 6 장 참고문헌	315
천연물로부터 항암·항종양 물질의 분리와 세포 및 생체적용시험	321
목 차	323
제 1 장 서 론	325
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	330
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	334
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	370
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	373
제 6 장 참고문헌	374

여 백

식용식물자원으로부터 향균성, 향산화성 물질의
분리, 동정 및 식품에 이용

연구 기관 : 전북대학교

연구책임자 : 신 동 화

연구 원 :	백 남 인	최 응
	김 문 속	안 용 선
	김 인 원	안 은 영
	오 진 아	추 근 식

여 백

식용식물자원으로부터 항균성, 항산화성 물질의 분리, 동정 및 식품에 이용

제 1 장 서 론	35
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	39
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	45
제 1 절 국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균특성	45
제 2 절 상백피 추출물중 <i>Listeria monocytogenes</i> 증식억제 물질의 분리 및 효과	59
제 3 절 고삼으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정	69
제 4 절 감초로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정	83
제 5 절 관중(<i>Dryopteris crassirhizoma Nakai</i>)의 에탄올 추출물 및 용매 분획물이 <i>Listeria monocytogenes</i> 의 증식 억제에 미치는 영향	97
제 6 절 한약재로부터 선발된 옷나무 수피 추출물로부터 항산화 활성물질의 분리	113
제 7 절 섬바디로부터 <i>L. monocytogenes</i> 의 성장억제 물질의 분리 및 구조동정	132

제 8 절	섬바디로부터 분리된 Falcarindiol과 유화제와의 혼합에 따른 <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 항균 상승효과	145
제 9 절	Bulk와 emulsion system에서 유지에 대한 항산화제와 유화제의 항산화효과	163
제 10 절	웃나무 에탄올 추출물로부터 항산화활성 물질의 구조동정	179
제 11 절	가열 살균된 소고기에 접종된 <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 감초(<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch)에틸아세테이트 분획물과 섬바디(<i>Dystaenia takesimana</i> kitigawa)활성 분리물의 항균효과	195
제 4 장	연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	202
제 1 절	연구개발 목표 달성도	202
제 2 절	대외기여도	203
제 5 장	연구개발 결과의 활용계획	206
제 6 장	참고문헌	207

제 1 장 서 론

최근 국제무역기구(WTO) 체제의 출범으로 우리 농산물도 무한 경쟁시대에 돌입하여 세계시장에서 치열한 경쟁을 해야 하는 매우 절박한 상황에 처하게 되었으며, 농산물의 수입으로 인해 경쟁력이 약한 농촌의 경제가 위기에 처하게 되었다. 따라서 우리의 농업도 이와 같은 개방화와 국제경쟁상황에서 능동적으로 대처할 수 있는 부가가치가 높은 농산물을 다양하게 개발하고 상품화할 필요가 요구되는 실정이다. 또한 국제 기술 질서는 점차적으로 유용물질 특히 생리활성 기능을 갖는 항균, 항산화 물질 등의 탐색 방법이나 연속생산 시스템 공정 등에 대하여 철저하게 그 know-how를 보호해 가고 있는 실정이다. 이러한 신물질의 탐색이나 그 생산 기술 및 공정의 개발은 본 연구에서 그 대상으로 하고자 하는 우리나라 고유의 천연 생물자원인 농림산물의 부가가치를 높일 뿐만 아니라 농촌 및 산촌의 소득증대와 직결된다는 점에서 연구개발의 필요성이 높다.

특정 식물과 동물의 일부 성분은 미생물의 생장을 억제 혹은 유지의 산화를 지연시켜 식품의 부패 방지 역할을 하지만 품질보존을 위한 보존제나 유지 산패 억제를 위한 항산화제들은 대부분이 인공합성품으로 잠재적 독성 때문에 그 사용량이 규제되고 사용 대상 식품이 법적으로 제한되고 있다. 또한 소비자들도 인공 합성 첨가물에 대한 심한 기피증 때문에 식품 가공 업체에서도 인공합성 보존제나 항산화제의 사용을 자제하고 있으며 이를 대체하기 위한 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

우리나라의 경우도 식품 위생법에 허용된 보존제는 13개(보건복지부, 1995)품목으로 사용 대상 식품과 사용량이 규제되어 있고 모두가 인공 합성품이며 미국이나 일본도 비슷한 상황(종합식품연구원, 1987)이다. 따라서 안전성의 문제가 없으며 항균성이 있는 물질의 개발이 관련 연구자들에게 관심의 초점이 되고 있는

데, 특히 많은 연구자들이 식용 동·식물 자원에서 특정 성분을 추출, 이를 미생물 증식 억제 혹은 살균에 이용하고자 하는 시도가 이루어지고 있다.

치료에 쓰인 가장 오래된 향신료는 마늘과 양파로서 히포크라테스는 폐렴 및 상처 치료에 사용(Beuchat, 1989)하였고 일부 지역에서는 이질, 콜레라 등에 아직도 이용(Wills, 1956)하고 있다. 마늘의 항균성 물질은 allicin으로 알려졌으며 이 물질이 -SH group 효소의 저해 인자로 작용한다는 것이 밝혀졌으며, 대부분의 식품으로부터 오는 위해 미생물을 성장 저해(Al-Delainy, 1970)시킨다. 김치에서는 호기성균의 증식은 저지하나 젖산균에는 영향을 주지 못하였다(조남철, 1988). 정향의 항균성 물질은 eugenol이며 아니스의 열매와 회향품은 anethole로 알려져 있으며 *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* 그리고 *Escherichia coli* 등에 살균효과가 있었다. 육계의 정유성분은 cinnamic aldehyde로서 aflatoxin 생성 저지 효과가 있었고 백리향의 정유성분인 thymol도 같은 효과(Buchanan, 1981)가 있었다. 김치 발효시 겨자유를 첨가하면 젖산균을 저지하여 적숙기에 이르는 시간이 지연(홍완수, 1989)되었고, 카레에 사용되는 14종의 향신료중 정향 등 5종이 강한 항균력을 나타냈고, 그람 음성균보다는 그람 양성균에 생육 억제 효과가 좋으나 젖산균에는 그렇지 않았다(정창기, 1990).

생약제에 의한 항균성 연구로는 인삼의 경우 젖산균에 대하여 저농도에서는 생육 촉진 효과가 있으나 고농도에서는 저해 현상(양재원, 1979)을 보였고, 초피나무 추출물(조병헌, 1965) 및 회향유 등(이규룡, 1968)은 항진균 작용이 밝혀졌다. 생약제로 쓰이는 황백은 상당히 광범위한 항균성을 보여 효모, 황국균(박수용, 1979)과 납두균, 사과나무 부란병균(*Valsa ceratosperma*) (홍무기, 1988) 그리고 식품의 부패 관여균에 우수한 효과(신동화, 1991)를 보였다. 약용식물로 알려진 28종의 식물로부터 잠녹병을 일으키는 *Pythium ultimum*에 대한 항균성을 본 결과(Bae, 1987) 목단, 자리공, 대황 등 9개가 효과가 있었다(백수봉, 1990). 뽕나무

는 *Listeria monocytogenes* 의 증식을 억제하는데 탁월한 효과가 있음이 밝혀지고 있다(신c, 1994).

식품산업에서 사용하고 있는 항산화제는 인공합성 항산화제와 천연 항산화제로 구분되고 있는데 그 효과와 경제성(Harman, 1982)때문에 인공합성 항산화제를 많이 사용하고 있으며 천연 항산화제로는 tocopherol이 가장 많이 쓰여지고 있다. 가장 폭 넓게 사용되고 있는 BHA, BHT와 같은 인공합성 항산화제는 발암성 문제가 대두 되어(Ito, 1983) 소비자들의 기피현상이 상당히 표면화 되면서 인공합성 항산화제를 천연물로 대체키 위한 연구가 많이 이루어지고 있다(Kasuga, 1988; 최웅, 1992). 또한 현재 가장 많이 사용되고 있는 tocopherol은 식물성 유지에 효과가 낮은 등(Haumann, 1990) 제한적이고 가격이 비싼(Coal, 1974) 단점이 있다.

이와같은 상황에서 인공합성 항산화제에 버금가는 효과와 함께 안정성이 확보된 천연 항산화제를 발굴하려는 시도의 일환으로 많은 식용식물로 부터 얻은 정유 혹은 용매 추출물을 대상으로 폭 넓은 연구가 이루어지고 있다.

천연 항산화제로 일찍부터 연구된 대상은 향신료들로서 caraway, sage, cumin, rose mary, thyme, clove 등에서 항산화 효과를 확인 (Faraga a, 1989)한 바 있으며 면실유에서는 thyme과 clove의 추출물이 산화억제 효과를 보이며(Faraga b, 1989) 인삼의 추출물에도 항산화성 물질이 존재함을 확인하였다(이근계, 1982). 식물성 유지가 많이 함유된 종실인 참깨의 박에는 sesamol, sesaminol, sesamol 등이 있고 이들이 항산화 효과가 있음이 알려지고 있으며(福田, 1990) 고추 과피 추출물은 마가린의 산화 억제에 효과가 있으며(유주현, 1981) 잣과 겨자의 methanol 추출물도 유지의 산화 억제 작용이 있다 (한용몽, 1987).

한편 한약재로 사용하고 있는 붉나무의 ethanol 추출물은 상당한 항산화 효과를 보였고(장영상, 1992) tocopherol과 같이 사용했을때 강한 synergistic effect를 보이며 라면 등 튀김 식품에서도 효과가 있었다.

녹차와 목단피에는 epigallocatechin 및 epigallocatechin gallate가 존재, 항

산화성을 보이며(부용출, 1993), 땅콩껍질(Yen, 1993) 및 완두콩(Tsuda, 1993) 등에도 항산화성 물질이 존재하며 일부 tocopherol과 synergistic effect를 보이고 있다.

이와같은 천연 항산화 물질을 실제 식품에 적용하여 효과가 인정된 경우도 있는데 메기처리물에 rosemary 추출물을 첨가한 경우 효과가 있었고(Eun, 1993) 붉나무 추출물도 라면 및 감자 튀김에서 산화 안정 효과가 있었다(신동화b, 1992).

이상에서 본바와 같이 세계적으로 천연 항산화제 개발을 위한 수많은 연구가 이루어지고 있으나 아직까지 tocopherol이 가장 넓게 사용되고 있으며 극히 일부 rosemary 추출물이 상업적으로 이용되고 있을 뿐인데 이는 개발된 항산화제가 인공 합성 항산화제에 버금가는 효과와 경제성이 확보되지 못한 것이 가장 큰 이유이다.

따라서 앞으로는 실험 대상에서 효과가 확인된 경우 관련 물질의 확인 그리고 구조 변화에 따른 효과의 비교, 나아가서 식품에 적용으로 저장성 향상 및 경제성 확보 등 과학적 검증과 함께 실용화 연구에 치중해야 한다.

제 2 장 연구개발의 내용 및 범위

● 항산화성 물질의 분리 및 효과측정

1. 추출대상의 선정

가. 시험 대상 식물

기존연구에서 수행했거나 아직 실험되지 않은 식용식물 혹은 한약재에서 항산화성이 예상되는 대상을 선발하고 1차 시험으로 추출 수율 높고 항산화성이 비교적 높은 식물을 선발하여 용매별 추출물이 항상 및 항산화 효과를 비교, 검토하고 synergist 효과도 확인한다.

나. 새로운 식물 검색

식용은 아니나 독성이 없는 것으로 알려진 식물을 대상으로 한다.

2. 유효성분의 추출 및 분리

가. 사용 용매

식품으로 사용하는데 비교적 문제가 없는 75% ethanol을 1차 선별시 사용하여 추출하고 여기서 효과가 있는 대상에 대하여 methanol과 hexane으로 추출, 추출 수율과 항산화효과를 측정한다. 대상 식물의 부위는 잎, 줄기, 뿌리 및 열매로 구분하여 시험한다

나. 추출방법

대상 식물을 음건한 후 마쇄된 분말 혹은 절편을 직접 용매에 넣어서 3~6시간 진탕 추출하고 여과, 농축하여 조 추출물을 얻는다. 유지가 많은 경우 hexane으로

유지를 제거한다.

다. 유효성분의 분리

우선 용매별로 분리하되 chlorlform, ethyl acetate, butanol, ethanol 및 물층으로 분획하고 이들의 항산화 효과를 비교한 다음 silica gel column chromatography에 의해서 몇가지 용매를 사용, 분획한다. 분획분에 대하여 항산화 및 항균 효과를 측정하고 효과가 있는 분획물을 TLC로 다시 전개, 순수물질의 spot을 확인 후 이를 결정화한다

라. 유효 성분 확인

활성 물질이 단일 물질일 경우 결정화된 물질을 GC-MS, NMR 및 IR을 이용, 구조 확인을 시도한다.

3. 항산화력의 비교

가. Rancimat에 의한 비교

우선 팜유 및 돈지를 실험 대상유지로 선정하여 식물의 조 추출물 100~200 ppm 식 첨가하여 항산화 효과가 있는 것에 대하여 돈지, 유지, 팜유 및 대두유에 대하여 첨가 수준별로 항산화 효과를 비교한다. 이때 항산화효과의 기준을 antioxidant index(AI) -무첨가 유지의 induction time으로 식물 추출물 첨가 유지의 induction time을 나눈값 - 1.5이상으로 하고 조 추출물의 가용성 고형분의 양을 계산하여 첨가량 수준을 정한다.

나. 유지에 첨가시험

예비 선발전 추출물을 돈지, 유지, 팜유 및 대두유에 100~600 ppm을 첨가하여

60℃에 저장하면서 POV, TBA, AV를 측정하여 각 기름의 안정성을 비교한다.

다. 가열 안정성 시험

가온 시험에서 효과가 있는 추출물을 유지에 항산화 해당 유지에 항산화 효과가 있는 수준으로 첨가하여 160~180℃로 가열 후 60℃ 저장하면서 POV, TBA, AV를 비교 항산화 물질의 열 안정성을 비교한다.

라. Synergist 효과 측정

선정된 항산화 추출물질에 유화제, 금속붕쇄 및 다른 항산화 효과가 있는 물질을 혼합하여 그 항산화 효과를 Rancimat 방법으로 비교한다. 대표적인 synergist로 ascorbic acid, palmitic acid, tocopherol, lecithin을 대상으로 하되 식물 추출물간의 상승효과도 비교한다.

● 항균성 물질의 분리 및 효과 측정

1. 항균성 시험

가. 사용 균주

*L. monocytogenes*를 대상으로 하되 ATCC등 실험 균주 분양 기관에서 속, 종이 확인된 균주를 구입하도록 한다. 균주는 4-5종을 시험하고 균종에 따른 특성을 비교한다.

나. 항균성 예비시험

Disk method로 각 추출물의 항균성을 예비 검색한다. 즉, 추출물을 seitz filter로 무균여과후, 건물량을 확인하고, 이들 filter paper disk (φ 7mm)에 적신

후 대상균주가 접종된 평판에 차례로 표면에 밀착 시킨 후, 35℃에서 배양한다. 24 - 48 시간 aerobic 상태에서 배양후, dist주위에 나타난 clear zone의 직경이 15mm 이하인 것은 제외하고 그 이상인 것을 1차 검색에서 선발한다.

다. Minimum inhibitory concentration (MIC)의 측정

1차 검색에서 선발된 무균 추출물을 100-2,000 ppm씩 대상균주가 접종된 broth에 첨가한 후 배양하고, 추출물이 첨가된 broth를 control로 하여 OD를 측정, 균증식의 정도를 비교한다. Broth에 접종하는 대상균주는 1차 증식한 균체를 사용하여 일정 균체량이 접종되도록 한다. 균의 증식이 완전히 저지 되는 농도를 MIC로 정한다.

라. 추출물의 분획 및 항균성시험

추출물 중 유효 성분의 분리를 시도하기 위하여 용매를 이용, 추출물 성분을 분획한다. 용매는 Chloroform, ethyl acetate, butanol, water를 사용, 순서대로 분획한다. 각 분획물은 진공 농축하여 농축물을 얻고 이의 건물량을 측정, 수율을 확인한다. 분획 농축물로서 항균성 예비실험 및 MIC측정 시험을 실시, 유효성분 분획구를 확인한다.

마. 균체의 검정

증식 저해 혹은 살균효과가 있는 추출물이 선정되는 경우 선발된 추출물을 첨가한 broth 중 균체를 수집, 균체의 모양을 현미경과 전자현미경으로 관찰하여 증식 저해 혹은 살균의 원인을 추적하도록 한다. 또한 생존여부도 함께 관찰한다.

바. 식품에 적용시험

모델 식품을 조제하여 완전 살균 후 선발된 식물 추출물을 첨가하고 L.

*monocytogenes*을 접종하여 5℃에 저장하면서 *L. monocytogenes*의 증식 여부를 검증한다. 증식은 35℃에서 하고 증식배지는 tryptone soy broth를 이용, 매1일 간격으로 시료를 채취, 검사한다. 검사 항목은 균의 존재 여부와 증식 정도로 한다.

사. 제품의 관능검사

식품 적용 시험 결과가 긍정적인 효과를 나타낼 때, 효과 있는 추출물을 첨가한 경우 모델 식품의 향, 맛 및 풍미 특성을 관능검사를 통하여 실시한다. 추출물을 포함하지 않는 처리구를 표준구로 하고, 첨가구를 비교하고 이를 통계처리하여 유의성을 검정한다.

2. 활성물질의 분자구조 결정

가. 물리, 화학적 특성으로부터 활성물질의 계통 구명

물리적 특성 (용점, 비점 극성, 산도)으로부터 어떤 계통에 속하는 화합물인가를 추정한 TLC 상의 UV 흡수 특성, 발색시약에 대한 정색 특성 등으로부터 어떤 계통에 속하는 화합물인가를 추정한다.

나. 기기 분석에 의한 화학구조 구명

IR 및 Mass spectrophotometer에 의하여 관능기 및 분자량과 부분구조를 해석하고 NMR에 의해서 화학구조를 결정한다. Porarimeter로 입체구조를 추정하고 CD로 구조 결정한다.

다. 화학반응을 이용한 화학구조 확인

아세틸화, 메틸화, 에스터화 반응을 이용한 관능기 특성을 구명하고 산, 알칼리 가수분해, 메탄올라이시스, 효소 가수분해 반응을 이용한 부분구조를 확인한다. 아올러 수화, 수소화, 탈수, 산화 반응을 이용한 미세구조를 확인한다.

3. 활성물질의 분자수식

가. 생물학적, 화학적 분자수식을 이용한 활성 증강 유도체의 제조

효소반응 또는 화학반응을 이용하여 활성물질의 효능이 증강된 유도체를 제조한다.

나. 생물화학적

효소반응 또는 화학반응을 이용하여 활성물질의 부작용이 감소한 유도체를 제조한다.

다. 생물학적, 화학적 분자수식을 이용한 대량생산 방법 개발

용이하게 입수할 수 있는 전구물질로부터 효소 및 화학적 전이반응을 이용하여 활성물질의 대량 제조법을 확립한다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균특성

서 론

식품의 저장 기간을 연장하면서 안전성을 확보하기 위한 여러 가지 시도의 하나로 천연보존제를 이용하려는 연구가 많은 동식물을 대상으로 수행되었다. 지금까지 많은 연구가 수행된 대상은 양파, 생강, 마늘과 같은 향신료의 정유성분⁽¹⁻⁵⁾과 함께 녹차, 커피 등의 다류⁽⁶⁻⁸⁾와 cashew apple⁽⁹⁾의 향기성분 등으로 우수한 항균 효과가 있음이 보고되었고 미생물, 특히 젖산균이 생산하는 bacteriocin⁽¹⁰⁻¹⁴⁾이나 갑각류인 게, 새우등에 함유한 키틴질로부터 추출한 chitosans^(15,16)도 항균작용이 있다고 보고되었다. 생약재와 향신료를 대상으로 한 실험에서 *Streptococcus mutans*의 증식억제효과⁽¹⁷⁾가 인정되었고 고삼의 에테르추출물⁽¹⁸⁾, 소목의 75% 에탄올 추출물에서도 항균성 물질의 존재가 확인⁽¹⁹⁾된바 있다. Gram양성균에 대하여 황백과, 뽕나무추출물⁽²⁰⁻²²⁾은 증식억제효과가 뚜렷하였으며 간장의 방부효과를 위해서 황백 추출물을 첨가⁽²³⁾하는 등 천연물을 이용한 식품보존에 관한 실험들이 다방면으로 시도되고 있다. 그밖에도 냉동, 냉장식품에서 문제⁽²⁴⁾가 되는 *Listeria monocytogenes*의 증식억제를 위한 연구로써 식용식물의 정유성분⁽²⁵⁻²⁷⁾에 의한 항균성이 확인되고 있는 바 본 실험에서는 식중독균 중 저온에서 증식이 가능한 *Listeria monocytogenes* 균주와 식품의 부패에 관여하는 부패미생물을 대상으로 국내에서 재배되는 약용식물의 추출물에서 항균성효과를 검색하였기로 이에 보고한다.

재료 및 방법

재료

한약재는 최신방약합편⁽²⁸⁾, 임상본초학⁽²⁹⁾ 등의 한의서를 조사하여 주로 화농성 질환 치료에 사용한 한약재를 대상으로 하였고 그 식물명은 Table 1과 같다.

Table 1. List of medicinal herbs used for antimicrobial experiment

Korean name	Botanical name (abbreviation)	Part used
가 자 옥	<i>Terminalia chebula</i> Retz (Tc)	Fruit
갈 화	<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth (Pt)	Flower
감 수	<i>Euphorbia sieboldianus</i> Hara (Es)	Whole
강 황	<i>Crcuma longa</i> L. (Cl)	Root
건 강	<i>Zingiber officinale</i> Rosc (Zo)	Root
계 내 금	<i>Gallus gallus domesticus</i> Brisson (Gd)	Bark
고 본	<i>Angelica tenuissima</i> Nakai (At)	Root
골 채 보	<i>Davallia mariesii</i> Moore (Dm)	Root
괴 화	<i>Sophora japonica</i> L. (Sj)	Flower
구 척	<i>Cibotium barmetz</i> (L) J.Sm (Cb)	Root
구 판	<i>Geoclemys reevessi</i> Gray (Gr)	Root
귀 전 오	<i>Euonymus alatus</i> (Thunb)Sieb (Ea)	Stem
귤 피	<i>Citrus unshiu</i> Marc (Cu)	Bark
금 앵 자	<i>Rosa laevaigate</i> Michx (Rl)	Fruit
기 구 자	<i>Lycium chinense</i> Miller (Lc)	Root
남 성	<i>Arisaema japonicum</i> Bl (Aj)	Root

Table 1. Continued

Korean name	Botanical name (abbreviation)	Part used
백미	<i>Cynanchum atratum</i> Bunge (Ca)	Whole
백굴채	<i>Chelidonium majus</i> var. <i>asiaticum</i> (Hara)Ohwi (Cm)	Whole
백단향	<i>Santalum album</i> (Sa)	Root
백모근	<i>Imperata cylindrica</i> var. <i>kaengii</i> (Retz) Durand et. Schinz (Ic)	Root
백복영	<i>Poria cocos</i> Wolf (Pc)	Root
별갑	<i>Amyda sinensis</i> Wiegmann (As)	Whole
봉출	<i>Curcuma zedoaria</i> (Berg)Rosc (Cz)	Root
사간	<i>Belamcanda chinensis</i> (L) DC (Bc)	Root
삼칠근	<i>Panax notoginseng</i> L. (Pn)	Root
서각	<i>Rhinoceros unicornis</i> L. (Ru)	Bark
석곡	<i>Dendrobium moniiforme</i> (L) Sw (Dmi)	Whole
석창포	<i>Acorus graminens</i> Soland (Ag)	Root
세신	<i>Asiasarum sieboldii</i> Miq. var. <i>seoulense</i> Maeka (Asm)	Stem & Leaves
소목	<i>Caesalpinia sappan</i> L. (Cs)	Wood
애엽	<i>Artemisiae lavandulaefolia</i> Dc (Al)	Whole
양강	<i>Alpinia officinarum</i> Itance (Ao)	Root
연교	<i>Forsythia koreana</i> Nakai (Fk)	Bark
왕불유행	<i>Melandryum firmum</i> Rohrb (Mf)	Whole
우방자	<i>Arctium lappa</i> L. (Al)	Seed
옥두구	<i>Myristica fragrans</i> Houtt (Mfh)	Fruit
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i> L. (Ls)	Whole
인진	<i>Artemisiae capillaris</i> Thunb (Ac)	Whole
자초	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> S. et Z (Le)	Whole
조구등	<i>Uncaria rhychophylla</i> (Miq) Jacks (Ut)	Stem & Leaves
진교	<i>Gentiana macrophylla</i> Pall (Gm)	Root
천오	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx (Acd)	Root
천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i> Merr (Acm)	Root
천산갑	<i>Manis pentadactyla</i> L. (Mp)	Root
청상자	<i>Celosia cristata</i> L. (Cc)	Seed
초두구	<i>Alpinia katsumadai</i> Hayata (Ak)	Fruit
파극	<i>Morinda officinalis</i> How (Mo)	Root
편축	<i>Polygonum aviculare</i> L. (Pa)	Whole
필발	<i>Piper longum</i> L. (Pl)	Fruit

Table 1. Continued

Korean name	Botanical name (abbreviation)	Part used
한련초	<i>Elipta prostrate</i> L. (Ep)	Whole
향유	<i>Lscholtzia patrini</i> Garck (Lp)	Whole
호초	<i>Piper nigrum</i> L. (Pnl)	Fruit
호황련	<i>Picrprrhiza kurrooa</i> Royle ex Benth (Pk)	Root
황정	<i>Polygonatum sibirium</i> Redout (Ps)	Root
희철	<i>Siegesbeckia orientalis</i> L. var. (So)	Whole

추출방법

분쇄기로 곱게 마쇄한 시료에 5배 정도의 75% ethanol을 혼합하여 환류냉각관을 부착시킨 플라스크에 넣고 85℃ 수욕조상에서 3시간 가열, 추출후 여과하여 rotary vaccum evaporator에서 에탄올을 증발시켜 농축물을 얻었고 각 농축물중 함유된 soluble solid 함량은 농축물 1 mL를 취하여 105℃에서 건조후 증발 잔사량으로 하였다. 이때 별도로 추출수율은 계산하지 않았다.

사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 psychrotrophs로 육류제품에서 식중독을 일으킬 수 있는 균주와 부패 관여 미생물을 대상으로 하였고 각 균주별 사용배지는 Table 2와 같다.

추출물의 항균성 검색

Slant에 배양된 각 균주를 1백금이씩 취해 10 mL의 해당배지에 접종하여 30℃에서 24시간동안 배양하여 활성화된 액 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 plate에 주입한 후 구부러진 유리막대로 균일하게 도포하고, 멸균된 0.65 mm filter paper disc (Whatman NO. 2)를 각 추출물에 침지하여 흡수

Table 2. List of strains and media used for antimicrobial experiment

No	Microorganism	Media used
1	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	
2	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	
3	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112	
4	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	
5	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	Tryptic Soy Broth & Agar(Difco)
6	<i>Bacillus cereus</i> YUFE 2004	
7	<i>Staphylococcus aureus</i> KFCC 11764	
8	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 1645	
9	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 2344	
10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFCC 12031	Lactobacilli MRS Broth & Agar(Difco)

시킨 후 건조하였고 이 disc를 균이 접종된 plate 표면위에 붙여 놓고 30℃, 24~48시간 동안 배양한후 disc 주위의 clear zone의 직경(mm)을 비교^(30,31)하였다. 시험한 각 disc는 건조하여 흡착된 건물량을 확인하였다.

추출물의 저해농도 측정

농축물을 membrane filter (0.2 μm, pore size)로 제균시키고, 액체배지에 각 추출물의 고형분을 기준으로 각 농도별(ppm)로 첨가한 후 여기에 활성화된 배양액 0.1 mL를 접종하여 30℃에서 3일간 배양하면서 12시간 마다 spectrophotometer (Cecil se 292, England)로 620 nm에서 흡광도를 비교하여 미생물 증식 정도를 비교하였다⁽³²⁾.

추출물의 분획

75% 에탄올로 추출하여 얻은 조 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차 분획⁽³³⁾한 후 각각 농축하여, 각 용매의 분획물을 얻고 최종적으로 물층을 얻어 농축한 후 각 농축물에 대한 증식저해효과를 측정하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물의 항균성 검색

한약재 56종의 에탄올 추출물을 대상으로 항균성을 비교한 결과 Table 3과 같이 실험한 10종의 균주에 대하여 각기 다른 항균 특성을 보이고 있다. Clear zone diameter가 15mm 이상으로 뚜렷한 항균성이 확인된 대상은 가자육, 금앵자, 소목, 옥두구이고 굴피, 연교, 우방자, 진교, 호황련, 희침등은 몇균주에 대하여 항균효과를 보이고 있다. 식물 추출물의 항균성은 일반적으로 물보다 에탄올 추출물에서 증식억제 효과가 높은 반면^(20,34) 항중양성 실험⁽³⁵⁾을 보면 에탄올보다 물추출물에서 효과가 있다고 보고되었다. 본 실험에서 보면 소목의 에탄올 추출물은 각 균주에 대하여 광범위하게 뚜렷한 증식억제 효과를 보이고 있다.

Table 3. Antimicrobial effect of each medicinal herbs ethanol extracts on various microbial strains

Botanical name ¹⁾	Microorganism ²⁾										SS ³⁾
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Tc	16 ³⁾	15	13	15	16	19	18	19	16	15	1.3
Pt	- ⁴⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	13	1.3
Eo	-	-	-	-	-	12	-	-	-	15	0.8
Cl	-	-	-	-	13	-	10	-	-	-	0.9
Zo	-	-	-	14	-	10	-	-	-	9	0.6
Gd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0.5
At	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	1.3
Dm	14	13	14	12	13	-	14	11	-	16	1.7
Sj	-	-	-	-	-	10	-	-	-	10	-
Cb	-	-	12	6	-	-	-	-	-	-	2.3
Gr	-	-	-	10	-	-	-	10	-	11	0.2
Ea	10	-	-	-	-	11	-	-	-	-	0.6

Table 3. Continued

Botanical name ¹⁾	Microorganism ²⁾										SS ³⁾
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Cu	-	-	-	-	15	16	-	-	-	-	1.6
Rl	17	16	16	10	19	18	17	14	18	14	1.7
Lc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	1.9
Aj	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	1.1
Ca	11	-	-	-	-	-	-	-	-	13	0.8
Cm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0.4
Sa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
Ic	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	1.3
Pc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3
As	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	1.0
Cz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0.7
Bc	-	10	-	12	-	12	11	-	-	10	1.1
Pn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1
Ru	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0.6
Dmi	-	-	9	-	-	-	-	-	-	12	0.5
Ag	12	10	12	-	-	-	10	-	-	-	1.2
Asm	-	-	10	12	12	13	-	-	10	-	1.3
Cs	26	27	28	39	22	24	30	14	15	27	0.1
Al	12	-	-	-	-	-	-	-	-	11	1.0
Ao	-	11	-	-	11	13	-	-	-	-	0.9
Fk	17	11	13	15	14	-	16	-	-	11	0.8
Mf	-	-	-	-	-	-	-	11	10	-	1.8
All	10	-	-	-	-	19	-	17	-	-	1.0
Mfl	16	17	18	21	13	17	18	15	16	16	0.9
Ls	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8
Ac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0.5
Le	10	-	-	-	-	-	-	11	-	12	1.1
Ur	-	12	-	-	-	-	-	-	-	11	0.5
Gm	14	16	12	18	15	14	15	-	-	16	1.6
Acd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.2
Acm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0
Mp	-	-	-	-	10	-	-	-	-	10	0.3
Cc	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	1.1

Table 3. Continued

Botanical name ¹⁾	Microorganism ²⁾										SS ³⁾
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Ak	14	-	12	-	12	13	12	-	-	15	1.0
Mo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	1.2
Pa	10	13	10	14	10	-	-	-	-	13	0.7
Pl	-	-	-	-	12	-	-	-	-	10	1.1
Ep	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3
Lp	11	-	-	-	-	16	-	-	-	12	0.7
Pnl	-	-	-	-	-	-	16	-	-	10	1.1
Pk	14	14	10	13	-	16	19	14	-	-	1.3
Ps	14	12	14	14	12	16	12	14	14	12	1.7
So	18	-	-	14	13	-	9	-	-	12	0.3

¹⁾See Table 1

²⁾See Table 2

³⁾mg of soluble solid content of extract/disc

⁴⁾Clear zone diameter (mm)

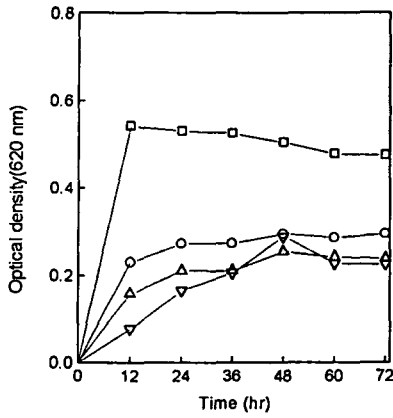
⁵⁾No inhibition

추출물의 첨가농도별 항균효과

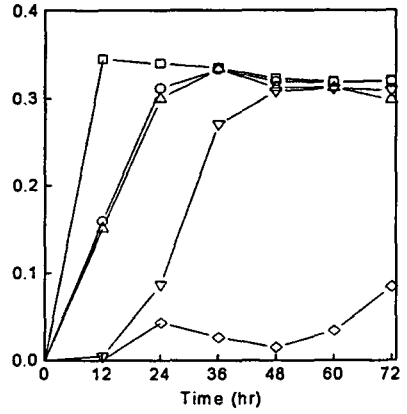
항균성이 가장 우수했던 가자육, 소목 에탄올 추출물(Table 3)을 10종의 균주에 대해 각각 농도별로 첨가하여 항균효과가 매우 높은 균주만을 선별하여 비교한 결과는 Fig. 1과 Fig. 2 와 같다.

Fig. 1을 보면 가자육 에탄올 추출물은 *L. monocytogenes* ATCC 19114, *B. cereus* YUFE 2004, *S. aureus* KFCC 11764 그리고 *P. fluorescens* KCTC 1645에 대해서 첨가농도에 따라 항균작용이 달라지는 것을 알 수 있으며, *L. monocytogenes* ATCC 19114에 대해서는 가자육 추출물의 첨가농도에 따라 항균효과도 상승하여 100~2,000 ppm까지 모두 증식억제효과가 있었다. *B. cereus* YUFE 2004는 대조군에 비교하여 볼 때 100~1,000 ppm은 배양 36시간까지 그리고 2,000 ppm은 72시간까지 거의 증식이 억제되는 상당한 항균효과를 보이고 있다. 또한 *S. aureus* KFCC 11764는 가자육 추출물 500~1,000 ppm첨가시 생육증식이 지연되는 것을 볼 수 있고

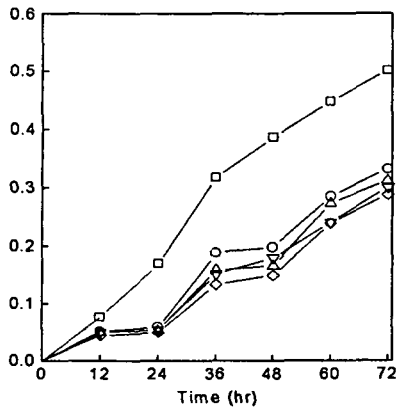
L. monocytogenes ATCC 19114



B. cereus YUFE 2004



S. aureus KFCC 11764



P1. fluorescens KCTC 1645

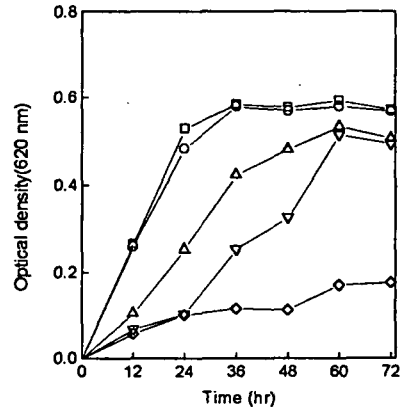
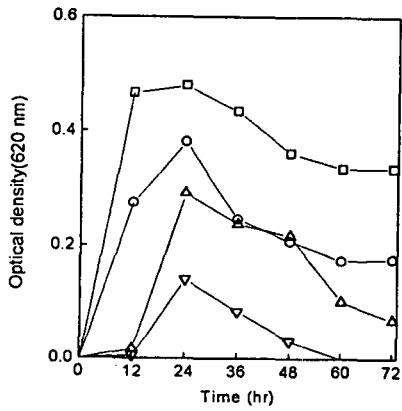


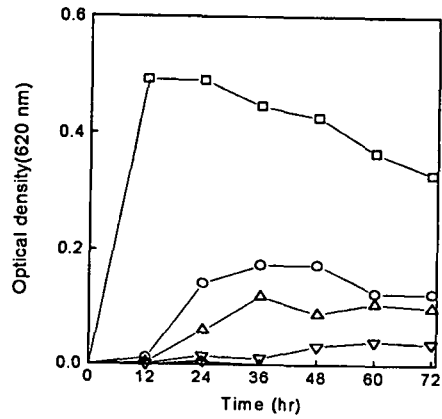
Fig. 1. Antimicrobial effect of 75% ethanol extract *Terminalia chebula* Rets on several strains.

□ control ○ 100 ppm △ 500 ppm ▽ 1000 ppm ◇ 2000 ppm

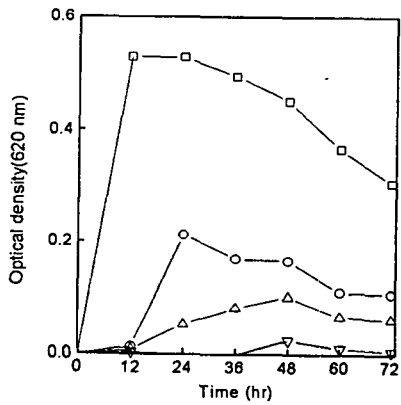
L. monocytogenes ATCC 15313



L. monocytogenes ATCC 19111



L. monocytogenes ATCC 19112



L. monocytogenes ATCC 19113

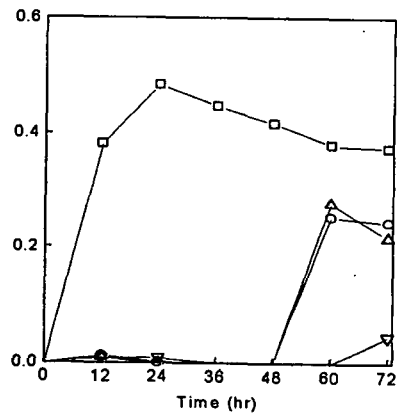
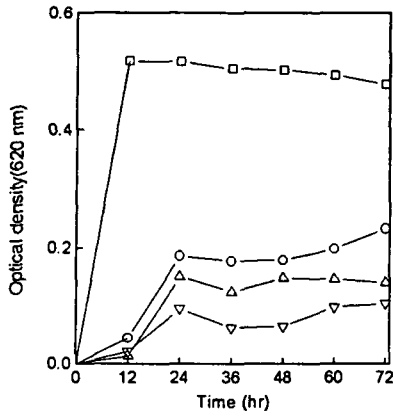


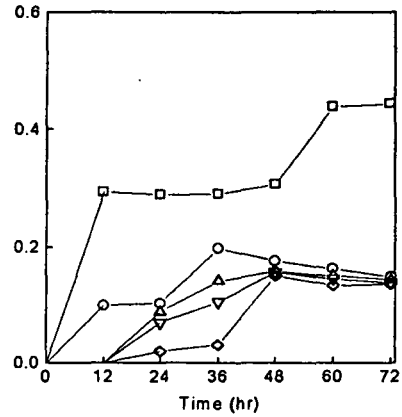
Fig. 2. Antimicrobial effect of 75% ethanol extract *Caesalpinia sappan* L. on several strains.

□ control ○ 10 ppm △ 20 ppm ▽ 50 ppm ◇ 100 ppm

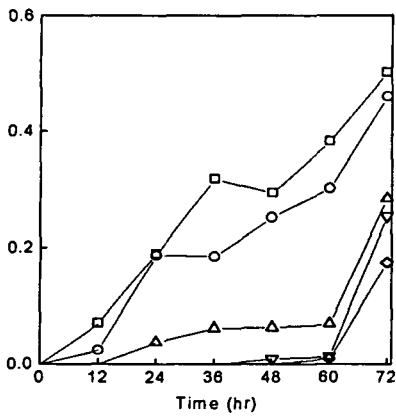
L. monocytogenes ATCC 19114



B. cereus YUFE 2004



S. aureus KFCC 11764



P. fluorescens KCTC 1645

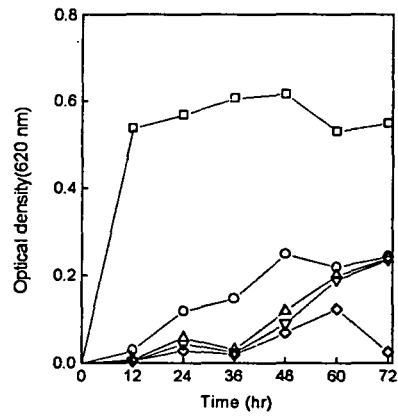


Fig. 3. Antimicrobial effect of 75% ethanol extract *Caesalpinia sappan* L. on several strains (continued).

□ control ○ 10 ppm △ 20 ppm ▽ 50 ppm ◇ 100 ppm

2,000 ppm을 첨가한 실험구는 뛰어난 항균효과를 보여 배양 3일동안 증식이 완전히 억제되었다. *P. fluorescens* KCTC 1645는 100~2,000 ppm까지 거의 비슷한 저해효과를 보며 추출물의 첨가농도에 크게 영향을 받지 않고 항균효과를 나타냄을 알 수 있었다.

항균성 검색(Table 3)에서 각 균주에 대해 가장 효과가 좋았던 소목 추출물에 대한 첨가농도별 항균성을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2의 결과는 Table 3에서 clear zone diameter 가 대부분의 균주에 대해 20~39 mm로 다른 실험대상 추출 보다 탁월한 항균효과를 보이는 것과 일치하는 것을 볼 수 있다. 실험균주중 *L. monocytogenes* ATCC 15313은 배양 24시간이후로 증식이 감소되는 추세며 100 ppm에서는 거의 증식이 정지되는 양상을 보이고 *L. monocytogenes* ATCC 19111과 *L. monocytogenes* ATCC 19112에서도 비슷한 경향으로 10 ppm 첨가량에서도 확실한 증식억제효과를 보였다.

또한 *L. monocytogenes* ATCC 19113에서는 가장 뛰어난 항균활성을 나타내어 배양 36시간까지 첨가농도에 관계없이 생육이 정지된 상태를 보이다가 10~20 ppm은 배양 48시간이 되어서야 비로소 증식하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 *L. monocytogenes* ATCC 19114, *B. cereus* YUFE 2004, *S. aureus* KFCC 11764는 대조구에 비해서 모든 실험구에서 우수한 증식억제효과를 보이고 있으며 *P. fluorescens* KCTC 1645에서는 50~100 ppm 첨가시 배양 48시간까지는 증식이 정지된 상태였다. 소목의 추출액에서 항균작용⁽³⁶⁾이 있고 황색포도상구균과 typhus균에 대한 상당한 항균효과⁽³⁷⁾가 있다는 보고로 보아 앞으로 폭 넓은 연구를 통하여 원 인 물질과 항균 기작을 밝힐 필요가 있다고 판단된다.

추출물의 분획별 항균성 검색

항균성물질 분리의 초기단계로써 극성이 다른 용매인 클로로포름, 에틸아세테이

트, 부탄을 순으로 순차 분획하여 항균성을 검색한 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서 보면 각 균주에 대해 가자옥 분획물들은 균일하게 항균효과를 보였고 금앵자, 소목은 에틸아세테이트 분획물에서 뚜렷한 항균효과를 보였으며 옥두구의 클로로포름 분획물이 몇 균주에 대해 항균효과가 있었다. 일반적으로 분획시 특정 용매에서 효과가 상승⁽³⁸⁾하는 경향과 비슷한 양상을 보이고 있으며 이는 항균 원인물질의 물리적 특성 때문으로 판단된다.

Table 4. Growth inhibition of different solvent fractions on various microbial stains

Plant	Solvent	Microorganism ¹⁾										SS ²⁾
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Terminalia</i>	CHCl ₃	20 ³⁾	18	30	19	15	15	15	18	15	16	0.3
<i>chebula</i>	EtoAC	25	25	32	25	23	24	25	26	18	24	1.8
(가자옥)	BuOH	20	20	25	20	22	25	24	25	15	26	0.3
	Water	20	20	20	15	20	15	13	25	18	16	0.6
<i>Rosa</i>	CHCl ₃	11	10	13	10	10	12	13	12	11	10	0.2
<i>laevaigate</i>	EtoAC	20	18	22	16	18	17	20	15	17	13	0.5
(금앵자)	BuOH	12	13	13	15	15	12	17	10	15	15	1.1
	Water	10	14	12	15	15	15	11	10	10	12	1.2
<i>sappan</i>	CHCl ₃	10	20	18	9	12	18	22	- ⁴⁾	-	-	0.3
(소목)	EtoAC	33	35	38	37	35	37	30	25	35	24	0.7
	BuOH	12	18	15	15	25	16	23	-	10	-	0.2
	Water	10	10	10	9	10	8	10	-	-	-	0.3
<i>Myristica</i>	CHCl ₃	-	20	20	-	20	10	20	22	-	13	0.6
<i>fragrans</i>	EtoAC	-	12	15	-	-	15	-	-	12	10	0.6
(옥두구)	BuOH	12	11	13	-	-	10	-	11	12	12	0.7
	Water	-	12	10	-	10	15	-	12	-	11	0.2

¹⁾See Table 2

²⁾mg of soluble solid content of extract/disc

³⁾Clear zone diameter (mm)

⁴⁾No inhibition

요 약

국내에서 생산되는 한약재 56종을 75% 에탄올로 추출하여 10종의 균주, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, 19111, 19112, 19113, 19114, *Bacillus cereus* YUFE 2004, *Staphylococcus aureus* KFCC 11764, *P. fluorescens* 1645, 2344 and *Leuconostoc mesenteroides* KFCC 12031에 대하여 항균성을 비교한 결과 굴피, 연교, 우방자, 진교, 호황련, 희침등은 몇 균주에 대하여 항균 효과를 보이는 반면 가자육, 금앵자, 소목 그리고 옥두구는 각 균주에 대해 뚜렷한 증식억제효과를 보였다. 그중 소목 조추출물을 10 ppm 첨가수준에서 모든 시험 균주에 대해 뚜렷한 증식 억제 효과를 나타냈고 가자육은 *L. monocytogenes* ATCC 19114, *B. cereus* YUFE 2004, *S. aureus* KFCC 111764 그리고 *P. fluorescens* KCTC 1645에 대해 농도에 비례하여 상당한 항균효과를 보였다. 또한 뚜렷한 항균효과가 있는 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 분획하여 검색한 결과 대부분의 균주가 가자육, 금앵자, 소목 추출물은 에틸아세테이트 분획물에서 옥두구는 클로로포름 분획물에서 더 높은 항균성을 보였다.

제 2 절 상백피 추출물중 *Listeria monocytogenes*

증식억제 물질의 분리 및 효과

서 론

우리나라에 분포하는 뽕나무과 식물은 6속 11종이 있으며 뽕나무속은 산상 (*Morus bombycis* Koidzumi), 몽고 뽕나무(*M. monglica* C. K. Schen), 들 뽕나무 (*M. tiliaefolia* Makino) 및 백상(*M. alba* Linne)등 4종이 있으며 그외 가새 뽕나무 변종과 함께 중국에서 전래된 노상(*M. lhou* Ser. Koidzumi)이 있으며 재배되고 있는 것은 산상, 백상, 노상으로 알려지고 있다⁽¹⁾. 상백피에는 Kuwanon E등 대단히 많은 물질이 함유되어 있으며⁽²⁾ 이들 중에는 숨이차고 기침이나는 것을 막는 약리적 활성⁽³⁾과 함께 폭넓은 항균활성을 갖는 물질이 함유되어 있다고⁽⁴⁾ 알려지고 있다. 특히 상백피에 함유된 물질이 식중독균⁽⁵⁾으로 알려진 *Listeria monocytogenes*의 증식억제 효과⁽⁶⁾가 알려지면서 원인물질^(7,8)과 항균관련 물질⁽⁹⁾을 밝히려는 연구가 진행되었다. 특히 상백피에서는 새로운 물질들이 확인되면서, Kuwanon 관련구조를 갖는 화합물들이 밝혀지고 있는데 이들에 대한 약리적 효과도 규명되고 있다^(9,10).

*Listeria monocytogenes*의 증식억제 효과가 있는 백상피 추출물의 원인물질은 Kuwanon G로 추정⁽⁷⁾되는데 이 물질은 flavone 골격을 가졌고 많은 이성체들이 있다⁽¹¹⁾. 이 물질에 의한 *Listeria monocytogenes*의 증식억제 효과에 대한 연구는 아직까지 보고되지 않아 이에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단되어 관련 균주별, 분리 물질의 첨가 농도별 증식억제 및 살균효과를 관찰하였기에 이에 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

균주는 국립보건원에서 분양받은 *Listeria monocytogenes* 5종 (ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113, ATCC 19114 및 ATCC 15313)을 사용하였고 tryptic soy agar 에 접종, 30℃에서 48시간 배양시킨 후 4℃에서 보관하면서 매 1개월마다 계대배양하여 사용하였다. 항균활성 효과 실험용 배지는 tryptic soy agar, tryptic soy broth (Difco)를 사용하였다.

순수 물질의 정제⁽¹²⁾

뽕나무 (*Morus alba* Linne) 껍질을 전주시 소재 건재상에서 구입하여 시료중량 5배의 75% ethanol을 가해 78℃에서 3시간 추출한 후 이 추출물을 chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol 순으로 순차분획하였다. 각 분획물중 항균효과와 수율이 높은 chloroform 분획층을 대상으로하여 처음 *n*-butanol:chloroform (1:9, 2:8, 3:7), 다음 수포화 butanol, 마지막으로 methanol:water (5:5) 의 용매로 silica gel (70~230 mesh, Merk) column(4×100 cm) 으로 순차용리하였다. 1차 silica gel column chromatography후 얻어진 항균효과가 가장 높은 용리물에 대해 methanol:acetic acid:chloroform = 1:0.5:6 의 용매조건으로 2차 column (silica gel 60, 70~230 mesh, Merk, 3.3×41 cm) chromatography를 실시하였다. 분리 후 얻어진 각 용리물은 항균효과 실험 후 항균효과가 가장높은 획분(fraction 5')에 대해 HPLC (Spectrapsics SP 8800, C₁₈column)를 통하여 93%(peak area)정제도를 확인한 후 bactericidal 효과 실험용 시료로 사용하였다. 순수물질 획분(fraction 5')은 butanol:2M-NH₄OH = 10:1 의 용매조건으로 preparative layer chromatography (silica gel 60-F254)로 정제한 후 TLC (silica gel 60-F254)로 단일 점적임을 확인하였다.

항균효과검색 - Disc diffusion method⁽¹³⁾

사면배지에 배양된 각 시험균주를 1백금이씩 취해 10 mL tryptic soy broth 에 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 tryptic soy agar plate 에 떨어뜨린 후 균일하게 도포하였다. 각 시험균이 접종된 plate 위에 분획물을 흡수시킨 6.5 mm filter paper (Whatman No.2)를 놓고 30℃에서 24시간 배양 후 disc 주위에 나타난 clear zone 의 직경(mm)으로 항균성을 비교하였다⁽¹⁴⁾.

Bactericidal 효과 측정

각 균주가 배양된 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL broth에 접종, 30℃에서 24시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 분리된 순수물질(F-5')을 100 ppm 및 300 ppm 수준으로 첨가한 broth에 접종하여 30℃에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 생균수를 계수하고 같은 방법으로 균주배양액 0.1 mL의 생균수(control)를 계수하였다. 이때 F-5'가 물에 녹지 않아 7 mg을 75% ethanol 0.7 mL에 녹인 후 100 ppm 경우 0.1 mL를 broth 9.9 mL에 주입하고 300 ppm 경우 0.3 mL를 broth 9.7 mL에 주입하였다. 이때 첨가된 ethanol양에 대한 균증식 억제 양상을 관찰하여 영향이 없음을 확인하였다.

전자현미경 관찰

Bactericidal 효과가 가장 높았던 *L. monocytogenes* ATCC 15313 균주 배양액을 F-5'가 100 ppm 및 300 ppm 수준으로 첨가된 배지에 접종하여 30℃에서 12시간 배양한 후 균을 분리하여 이를 전자현미경 (SEM, Hitachi S-4100, Japan)으로 균의 상태를 관찰하였다.

결과 및 고찰

분획물의 항균성

에탄올(75%)을 용매로 하여 뽕나무 껍질에서 얻은 조추출물을 다시 극성이 다른 용매로 순차 분획하여 항균효과가 우수하였던 chloroform층을 silica gel column으로 1차 분리하여 얻어진 분획물에 대하여 항균성을 비교해본 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Antimicrobial activities after silicalgel partition column chromatograph of chloroform fraction from ethanol extract of *Morus alba* Linne bark

Fraction No. (elution volume)	<i>L. monocytogenes</i>				
	ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
F-1 ¹⁾ (100)	- ⁷⁾	-	-	-	-
F-2 ¹⁾ (100)	-	-	-	-	-
F-3 ¹⁾ (360)	-	-	10.0	12.0	13.0
F-4 ¹⁾ (240)	-	-	7.0	10.5	10.0
F-5 ²⁾ (670)	10.5 ⁸⁾	14.0	9.0	9.0	10.0
F-6 ³⁾ (100)	12.5	14.0	9.0	12.0	10.0
F-7 ⁴⁾ (1800)	14.0	10.0	10.0	14.0	12.0
F-8 ⁵⁾ (800)	-	7.5	-	-	-
F-9 ⁶⁾ (500)	-	-	-	-	-
F-10 ⁶⁾ (500)	-	-	-	-	-

¹⁾ *n*-BuOH:CHCl₃=1:9.

²⁾ *n*-BuOH:CHCl₃=1:9, 3:7.

³⁾ *n*-BuOH:CHCl₃=5:5.

⁴⁾ *n*-BuOH:CHCl₃=5:5, saturated BuOH.

⁵⁾ Saturated BuOH.

⁶⁾ MeOH.

⁷⁾ No inhibition.

⁸⁾ Clear zone diameter (mm).

Table 1에서 보면 Fraction 5 (F-5), F-6, 그리고 F-7에서 모든 실험군에 대하여 높은 항균성을 보이고 있으며 특히 F-7 분획물이 다른 분획구보다 높은 항균성을 보이고 있다. 천연물에서 항균성은 유효물질의 특성에 따라 용매에 용출 정도가 다른 바^(4,8,14) 실험에 사용한 상백피 추출물의 경우 유효물질이 용출되는 용매의 구성은 butanol:chloroform = 5:5의 용매비율에서 가장 효과가 좋았고 한 구획에 집중되어 있는 것을 감안한다면 특정 물질이 관여하고 있다는 가능성을 보였다. Table 1에서 효과가 높았던 F-7을 다시 용매조건을 달리하여 silica gel column으로 분리하여 각 획분에 대한 항균활성을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Antimicrobial activities after silicalgel partition column chromatograph of F-7 from Table 1

Fraction No. (elution volume)	<i>L. monocytogenes</i>				
	ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
F-1 ⁹⁾ (144)	12.0 ¹¹⁾	-	-	-	-
F-2 ⁹⁾ (54)	- ¹²⁾	-	-	-	-
F-3 ⁹⁾ (108)	11.5	-	-	-	12.5
F-4 ⁹⁾ (72)	17.0	-	14.0	-	16.0
F-5 ⁹⁾ (198)	16.5	11.0	13.0	14.5	17.8
F-6 ⁹⁾ (162)	14.5	-	-	11.5	10.0
F-7 ¹⁰⁾ (130)	-	-	-	-	12.5

⁹⁾MeOH:HOAc:CHCl₃=1:0.5:6.

¹⁰⁾MeOH.

^{11),12)}See Table 1.

Table 2에서 보면 F-5'은 실험 대상 5균주에서는 균주에 따라서 감수성은 약간씩 다르나 높은 항균활성을 보이고 있으며 다른 분획에 비하여 효과가 높은 경향으로 보아 이 획분에 항균활성 물질이 존재함을 알 수 있었다. 이획분을 PTLC로 다시 정제한 후 TLC로 단일 물질 여부를 조사한 결과 이 획분에는 순수물질 형태로 존재

하는 것을 단일 점적으로 확인하였고 이 결과는 Fig. 1과 같다.

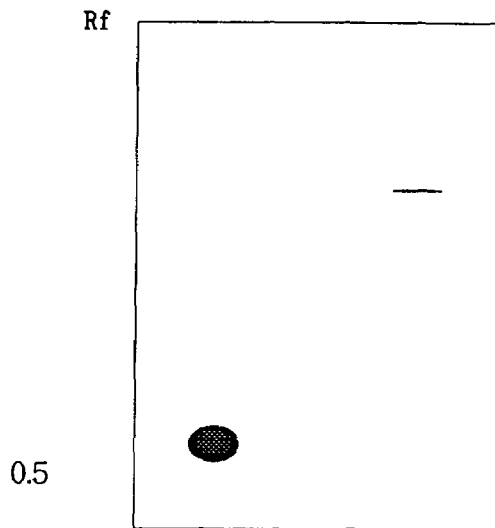


Fig. 1. Thin layer chromatogram of Kuwanon G.

(BuOH:2M-NH₄OH=10:1, Rf=0.58).

분획물의 농도별 항균효과

F-5' 획분을 농도별로 tryptic soy broth에 첨가한 후 *Listeria monocytogenes* 5균주를 각각 접종하여 증식양상을 관찰한 결과는 Fig. 2~6와 같다. Fig. 2~6에서 보는 바와 같이 F-5' 분획물은 100 ppm 농도로 첨가 하였을 때 뚜렷한 살균효과를 보이고 있으며 첨가량이 증가함에 따라 살균효과는 더욱 향상됨을 보여주고 있다.

각종 식물 추출물에 의한 *Listeria monocytogenes*를 포함한 식중독 미생물과 부패 미생물의 증식억제 효과는 많이 알려 졌는데 Tin men chu와 Sin mao heung⁽¹⁵⁾의

경우 *Listeria monocytogenes* Scott A와 함께 식중독을 억제하는 기능이 있으며 그 첨가수준은 대략 5,000 ppm 이었고 *Bacillus cereus* 등에 대한 황백 등 몇가지 식물추출물의 항균효과 수준은 500~2,000 ppm⁽¹⁶⁾, grape fruit종과 추출물은 *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae*의 증식저해는 100 ppm⁽¹⁷⁾ 에서 항균활성을 보이고 있으며 들산갯의 추출물은 *Bacillus subtilis* 등 몇가지 균종에 대하여 400~600 ppm 농도에서 증식 지연효과가 인정되었고 그 원인 물질은 allylisothiocyanate⁽¹⁸⁾로 확인하였다. 또한 쑥씨중 항균활성 물질은 terpinen-4-ol로 알려졌으며 항균활성 수준은 1000~1500 ppm 이었다⁽¹⁹⁾.

이들 결과와 F-5' 획분의 *Listeria monocytogenes*의 증식저해 농도수준을 비교하면 상당히 낮은 경향을 보이고 있어 증식저해 혹은 살균제로서의 활성이 높은 것을 확인 할 수 있었다. 상백피 추출물의 항균성에 대한 연구에서 원인물질을 추정된 결과⁽⁸⁾가 있어 본 실험에서 분리된 물질의 구조확인이 필요 할 것으로 본다.

살균작용에 대한 세포의 형태변화

상백피 추출물에서 분리된 F-5' 획분을 첨가하여 tryptic soy broth에서 *Listeria monocytogenes*를 증식시켰을 경우 비첨가구(control)에서는 미생물의 증식이 급격히 일어났으나 (Fig. 2~Fig. 6) 첨가구의 경우 오히려 미생물의 감소현상이 일어나는 것을 알 수 있으며 이를 통하여 F-5' 획분이 *Listeria monocytogenes*의 살균에 관여한다는 것을 알 수 있었다. 살균에 관여하는 기작을 확인코자 F-5' 획분을 300 ppm 농도를 첨가하여 증식시킨 균체의 표면을 관찰한 결과는 Fig. 7과 같다. Fig. 7 에서 보면 비처리구(Fig. 7-A)의 균체 표면은 매끄러우나 처리구 (Fig. 7-B)의 균체 표면은 손

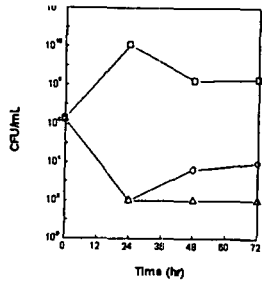


Fig. 2. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19111.

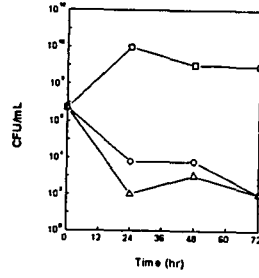


Fig. 3. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19112.

—□— control —○— 100 ppm —△— 300 ppm

—□— control —○— 100 ppm —△— 300 ppm

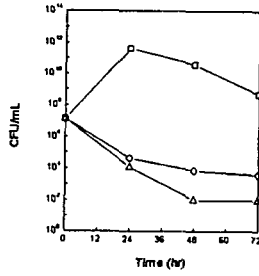


Fig. 5. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19114.

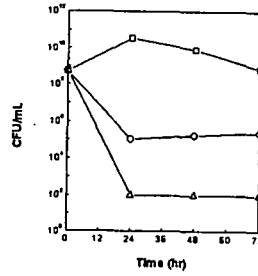


Fig. 4. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19113.

—□— control —○— 100 ppm —△— 300 ppm

—□— control —○— 100 ppm —△— 300 ppm

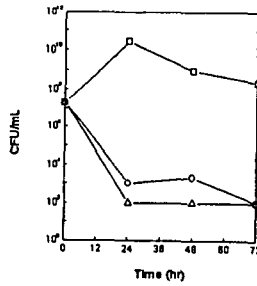


Fig. 6. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 15313.

—□— control —○— 100 ppm —△— 300 ppm

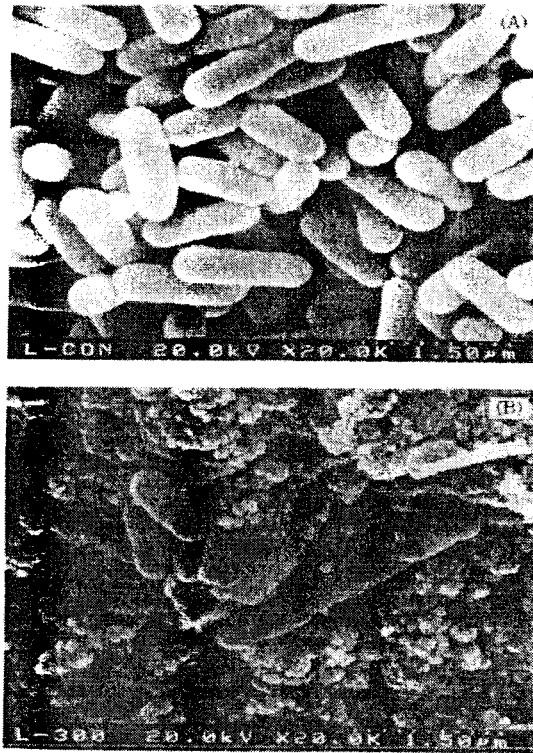


Fig. 7. Scanning electron micrographs($\times 20,000$) of *L. monocytogenes* ATCC 15313.

A: control, B: treated with 300 ppm of F-5' for 12 hours at 30°C.

상되었거나 형태가 이상을 일으킨 모습을 볼 수 있다. 이는 F-5'물질이 *Listeria monocytogenes* 균체에 이상을 일으키고 있음을 보여주고 있으며 grape fruit종자 추출물의 경우 *Salmonella choleraesuis* 등 미생물의 세포막이 파괴되어 내용물이 유출되는 현상⁽¹⁷⁾과 유사한 경향으로 추정된다.

요 약

상백피를 75% 에탄올로 추출하여 얻은 조 추출물을 다시 용매별로 순차 분획 후 *Listeria monocytogenes* 5균주에 대하여 증식저해 효과를 비교한 후 항균활성 물질을 확인하였다. 활성이 있는 획분을 1차 및 2차 column chromatography를 통하여 활성 물질을 순수 분리하여 활성 물질 획분(F-5')을 얻었고 이 획분을 tryptic soy broth에 100 및 300 ppm을 첨가하여 *Listeria monocytogenes*를 증식시킨 결과 배양 시간에 따라 뚜렷한 균수의 감소가 관찰되어 높은 살균효과가 인정되었으며 처리된 균체의 세포벽의 비정상적인 형태가 전자현미경을 통하여 관찰되었다.

제 3 절 고삼으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정

서 론

천연에 존재하는 항균제에는 우유와 난백에 들어있는 lactoferin, lysozyme 등의 효소제, 과일에 많이 들어있는 유기산류, 저급지방산 ester들⁽¹⁾, 향신료의 정유 성분^(2,3), 갑각류의 키틴질로부터 추출한 chitosan⁽⁴⁾, 미생물에서 생산되는 bacteriocin^(5~7) 등이 제시되고 있으며 이밖에도 오랜 기간 질병치료제나 식품의 재료로 이용되어 오면서 무해성이 간접적으로 입증된 생약재 및 식용식물 추출물로부터 항균 활성물질 탐색^(8~12)과 활성 본체의 구명^(13~19)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

천연 항균제의 보고인 식용식물은 기본 대사에 관여하는 당, 지방산, 아미노산 같은 1차 대사산물과 1차 대사의 중간산물로부터 합성되는 2차 대사산물을 함유하고 있는데 후자의 경우 특정 식물에만 분포되어 있으며 혈압강하⁽²⁰⁾, 항산화^(21,22), 항암효과⁽²³⁾ 등 다양한 생리활성을 나타내며 특히 항균 활성물질의 경우 essential oil, flavonoid, tannin을 비롯하여 대부분이 terpenoid계와 phenol성 화합물로 알려져 있다^(24,25).

고삼(*Sophora flavescens* Ait.)은 콩과에 속한 다년생 본초로 성질은 차고 무독하며 강한 쓴맛을 지니고⁽²⁶⁾ 항부정맥증에 효능⁽²⁷⁾이 있다고 알려져 있으며 한약재로 이용 되어왔다. 최근에는 건조한 고삼 뿌리의 75% 에탄올 추출물이 *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, 19112, 19113, 19114 및 15313)에 대하여 디스크 확산법에서 뚜렷한 항균 효과를 보이다가 액체배양법에서는 그 효과가 감소하였다는 보

고가⁽²⁸⁾ 있어 이를 재 실험한 결과 항균 효과가 상승하는 현상을 확인하여 이로부터 항균 활성 물질을 분리하고 구조를 구명하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재 료

고삼(*Sophora flavescens* Ait.)은 건조된 제품을 전주시 소재 건재상에서 구입한 후 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

추출 및 용매분획

고삼 800 g에 75% 에탄올 3 L를 가해 78 °C 수욕상에서 3 시간 추출한 후 농축하여 얻은 에탄올 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매별 분획물을 얻었다. 추출물과 각 분획물은 진공 농축기와 진공 건조기로 용매를 제거한 후 에탄올에 용해시킨 후 항균활성 실험에 사용하였다.

Silica gel column chromatography

고삼 에탄올 추출물을 순차 분획하여 항균활성을 확인한 결과 클로로포름 분획물이 항균효과와 수율이 높아 이로부터 활성물질을 분리하였다. 클로로포름 분획물(21g)을 silica gel (500 g, 70~230 mesh, Merck)이 헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올 (20 : 3 : 1, v/v)로 현탁 충전된 column (5.5 × 46 cm)에서 에틸아세테이트와 메탄올의 비율을 단계적으로 증가시키는 (헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올 = 20 : 3 : 1 ---> 메탄올, v/v) step-wise 용출법으로 분리하여 15개 (S-1~S-15)의 획분을 얻었고 이중에서 활성과 수율이 우수한 S-10-6으로부터 항균 활성 물질을 분리하였다. 획분 S-10 (3 g)은 다시 헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올 (8 : 5 : 1, 6

: 5 : 1, v/v)용매계로 silica gel column chromatography (150 g, 3.3 × 31 cm) 하여 총 9개의 소획분 (S-10-1~S-10-9)을 얻었으며 이 중에서 항균 효과가 인정되면서 수율과 정제도가 우수한 S-10-6의 구조를 동정하였다. 이때 용리물들은 TLC 상에서 전개시킨 후 UV (254 nm, 365 nm)의 흡수 양상과 황산 (15~20%) 발색시 나타나는 점적의 모양에 따라 분취하였다.

분석 기기

IR은 Perkin Elmer 599B를 사용하였고 ¹H-NMR은 ZEOL JNM-LA400 (400 MHz)을, ¹³C-NMR은 ZEOL JNM-LA400(100 MHz)을 사용하고 CDCl₃ : CD₃OD = 5 : 1을 용매로 하였다.

사용 미생물 및 배지

항균 활성 시험에 사용한 미생물과 배지는 Table 1과 같다.

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganism tested	Media used	Incubation temperature (°C)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Tryptic soy broth & agar (Difco)	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	Tryptic soy broth	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	& nutrient agar	35
<i>Staphylococcus aureus</i> KFCC 11764	(Difco)	35

항균 활성 측정

시험 균주가 접종된 사면배지에서 1백금이를 취해 10 mL 액체배지에 접종, 30 ℃에서 24 시간 배양시킨 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배지에 접종하여 30 ℃에서 24 시간 배양시켰다. 이 균주 배양액 0.1 mL를 에탄올로 용해 후 membrane filter (0.2 μm)로 제균시킨 각 시료를 일정농도(ppm)로 첨가한 액체배지에 접종한 후 30 ℃에서 72 시간 (또는 48 시간)동안 배양하면서 24 시간 (또는 12 시간) 간격으로 620 nm에서 혼탁 정도로 증식억제 효과를 비교하였다. 이때 첨가되는 용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 처리농도와 동일하게 에탄올만을 첨가한 대조구를 설정하였다.

살균 효과 측정

각 균주가 배양된 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL 액체배지에 접종, 30 ℃에서 24 시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 정제된 물질이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 30 ℃에서 72 시간 동안 배양하면서 24 시간 간격으로 표준평판한천 배양법에 의해 생균수를 계수하고 같은 방법으로 균주배양액 0.1 mL의 생균수를 계수하여 초기 접종균수를 구했다. 처리구와 동일 농도로 에탄올 만을 가한 것을 대조구로 하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물과 용매 분획물의 항균 효과

고삼 75% 에탄올 추출물을 50, 100, 500 및 1,000 ppm 수준으로 배지에 첨가한 후 *L. monocytogenes*를 배양시킨 결과 (Table 2) 실험 균주에 대한 최소 증식억제 농도가 50~500 ppm 이었고 용매 분획물의 경우 클로로포름

Table 2. Minimum inhibitory concentration of ethanol extract and solvent fraction of *Sophora flavescens* Ait. on *Listeria monocytogenes*

<i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i>	Minimum inhibitory concentration (ppm)			
	EtOH extract	CHCl ₃ fraction	EtOAc fraction	BuOH fraction
ATCC 19111	50<MIC' ¹⁾ <100	MIC<50	100<MIC	100<MIC
ATCC 19112	100<MIC<500	MIC<50	100<MIC	100<MIC
ATCC 19113	100<MIC<500	MIC<50	100<MIC	100<MIC
ATCC 19114	100<MIC<500	MIC<50	100<MIC	100<MIC
ATCC 15313	MIC<50	MIC<50	100<MIC	100<MIC

¹⁾ Minimum inhibitory concentration(ppm)

분획물만이 50 ppm 농도에서 균의 증식을 완전히 억제하였다. 동일한 실험 균주에 대하여 고삼 에탄올 추출물 및 클로로포름 분획물이 2,000 ppm 농도에서 약간의 증식억제 효과만을 나타내었다는 보고⁽²⁸⁾와 달리 본 실험에서는 보다 낮은 농도에서 항균 효과가 뚜렷이 나타났는데 이는 실험 방법의 차이로 인한 결과로 추정해 볼 수 있다. 즉 액체배양법에서 항균 활성 측정시 한⁽²⁸⁾ 등의 방법과는 달리 시료를 에탄올로 완전히 용해시킨 후 제균 함으로써 막에 의한 유효성분의 손실을 최소화 함으로서 항균 효과가 상승하였다고 생각하는 바이며 이는 액체배양법에서 중요하게 고려되어야 할 사항으로 여겨진다.

활성 물질의 정제와 얻어진 획분들의 항균 효과

뚜렷한 항균 효과를 보인 고삼 클로로포름 분획물에서 활성 물질을 분리하기 위하여 silica gel column으로 분리하여 얻은 획분들을 20 및 50 ppm 수준으로 배지에 첨가한 후 *L. monocytogenes* ATCC 19114를 배양시킨 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Minimum inhibitory concentration and yield of fraction obtained after silica gel column chromatography of chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract on *L. monocytogenes* ATCC 19114

Fraction	Elution solvent (hexane : EtOAc : MeOH)	MIC (ppm)	Yield ²⁾ (%)
S-1	20 : 3 : 1	50<MIC ¹⁾	0.073
S-2	20 : 3 : 1	50<MIC	0.016
S-3	15 : 3 : 1	50<MIC	0.118
S-4	15 : 3 : 1	50<MIC	0.215
S-5	15 : 3 : 1	MIC<20	0.020
S-6	12 : 3 : 1	MIC<20	0.042
S-7	12 : 3 : 1	MIC<20	0.131
S-8	10 : 3 : 1	MIC<20	0.056
S-9	10 : 3 : 1	MIC<20	0.122
S-10	10 : 3 : 1	MIC<20	0.428
	9 : 3 : 1		
S-11	8 : 3 : 1	50<MIC	0.225
S-12	6 : 3 : 1	50<MIC	0.055
S-13	6 : 3 : 1	50<MIC	0.031
S-14	6 : 3 : 1	50<MIC	0.123
S-15	4 : 3 : 1, MeOH	50<MIC	0.048

¹⁾ See footnote on Table 2

²⁾ Fraction weight(g)/dried plant(g)×100

용매조건이 15 : 3 : 1 ~ 9 : 3 : 1인 범위에서 용출된 S-5, S-6, S-7, S-8, S-9 및 S-10 획분들은 20 ppm 농도에서 균의 증식을 완전히 억제하였고 나머지 획분들이 첨가된 배지는 적용 농도에서 일정 시간 동안만 항균 효과를 보이거나 배양 초기부터 대조구와 같은 증식양상을 나타내므로서 실험 균주에 대한 최소 증식억제 농도가 50 ppm 이상임을 알 수 있었다. 활성 획분 중에서 S-10이 수율 및 정제도가

우수하여 이를 다시 silica gel column으로 분리하고 얻어진 소획분들을 10 및 30 ppm 수준으로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* ATCC 19114를 배양시켰다. 그 결과 Table 4에 나타낸 바와 같이 소획분 S-10-6과 S-10-7이 실험 균주에 대해 뚜렷한 항균 효과를 나타냈으며 이때 S-10-7의 효과가 좀 더 우수하였다. 그러나 소획분 S-10-6이 건조 약제에 대한 수율과 정제도(Fig. 1)가 우수하게 나타나므로써 이의 구조를 동정하였다.

Table 4. Minimum inhibitory concentration and yield of fraction obtained after silica gel column chromatography of G-10 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract on *L. monocytogenes* ATCC 19114

Fraction	Elution solvent (Hexane : EtOAc : BuOH)	MIC (ppm)	Yield ²⁾ (%)
S-10-1	8 : 5 : 1	30<MIC ¹⁾	0.007
S-10-2	8 : 5 : 1	30<MIC	0.013
S-10-3	8 : 5 : 1	30<MIC	0.006
S-10-4	8 : 5 : 1	30<MIC	0.018
S-10-5	8 : 5 : 1	30<MIC	0.090
S-10-6	8 : 5 : 1 6 : 5 : 1	10<MIC<30	0.058
S-10-7	6 : 5 : 1	MIC<10	0.026
S-10-8	6 : 5 : 1	30<MIC	0.009
S-10-9	6 : 5 : 1	30<MIC	0.026

¹⁾ See footnote on Table 2

²⁾ See footnote on Table 3

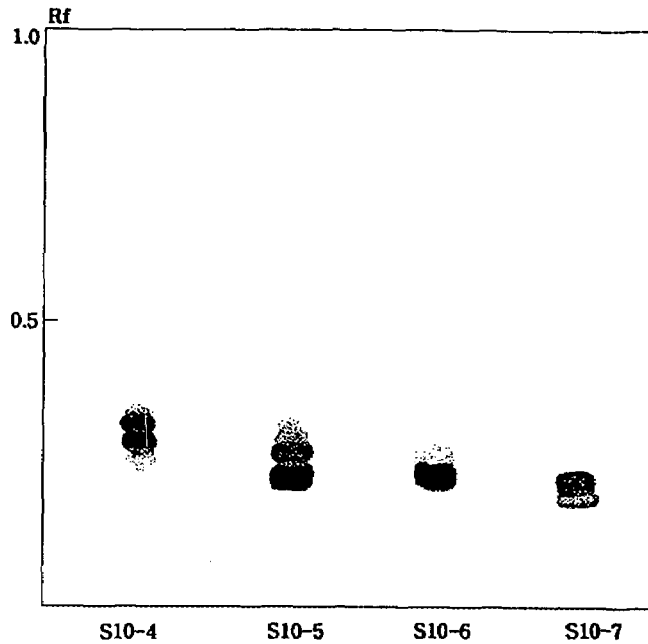
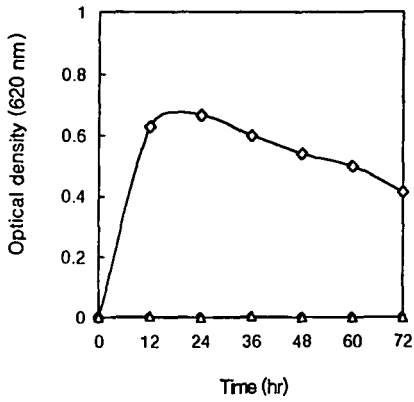


Fig. 1. Thin layer chromatogram of fraction of S-10 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* AIT. ethanol extract (Hexane : EtOAc : MeOH = 6 : 5 : 1).

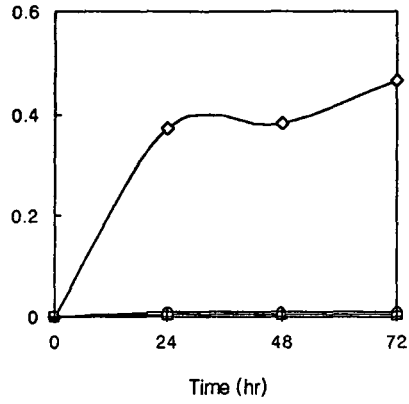
활성 소획분 S-10-6의 항균 효과

활성 소획분 S-10-6을 10~100 ppm 수준으로 배지에 첨가한 후 실험 균주를 배양시킨 결과는 Fig. 2와 같다. *L. monocytogenes* ATCC 19111, *B. subtilis* ATCC 14593 및 *S. aureus* KFCC 11764의 경우 S-10-6이 10 ppm 첨가되었을 경우에도 배양 시간 내내 혼탁도가 전혀 증가하지 않으므로 뚜렷한 증식억제 효과가 관찰되었으며 *L. monocytogenes* ATCC 19112, ATCC 19113 및 ATCC 15313의 배양시에도 동일한 항균 효과가 나타났다. 그러나 *E. coli* ATCC 25922 경우 활성 소획분이 100 ppm 첨가되어도 대조구와 마찬가지로 균이 증식하므로써 항균 효과가 전혀 나타나지 않았다.

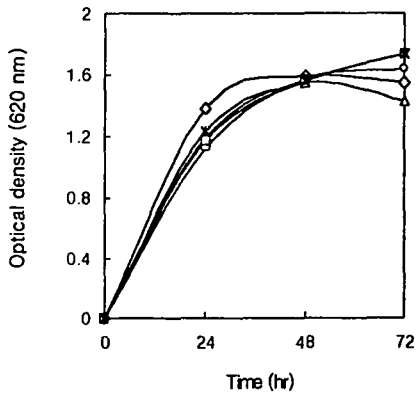
L. monocytogenes ATCC 19111



B. subtilis ATCC 14593



E. coli ATCC 25922



S. aureus KFCC 11764

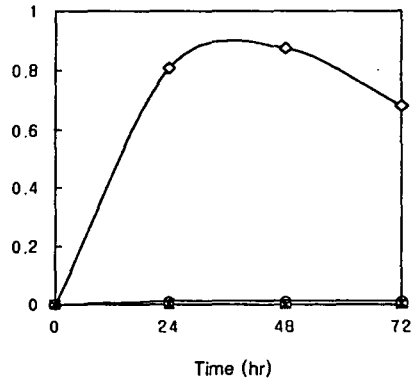


Fig. 2. Growth inhibition by G-4-4 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract on several strains of bacteria.

◇-◇ : control, ○-○ : 10 ppm, △-△ : 30 ppm, □-□ : 50 ppm, ++ : 100 ppm

소획분 S-10-6의 *L. monocytogenes*에 대한 항균 효과는 합성 보존제⁽²⁸⁾와 감초 분리물인 소획분 G-4-4의 효과⁽²⁹⁾보다도 우수하였으며 *S. aureus*에 대해서는 Corilagin 등의 tannin 류⁽³⁰⁾를 비롯하여 phloroglucinol 유도체⁽¹³⁾ 등의 최소 증식억제 농도 범위가 50~300 ppm인 것을 감안한다면 고삼에서 분리된 활성 소획분 S-10-6은 보존제로서의 이용 가치가 충분히 있다고 생각되며 활성 본체의 구명과 더불어 균체에 미치는 구체적인 항균기작에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

활성 소획분 S-10-6의 살균 효과

고삼으로부터 분리된 활성 소획분 S-10-6은 10 ppm 수준에서도 *L. monocytogenes* 대하여 뚜렷한 증식억제 효과를 나타냈었기에 항균 정도를 확인하기 위하여 30 및 50 ppm 수준으로 배지에 첨가한 후 균을 배양시키면서 균수의 변화를 관찰하였다. 24 시간 배양 후 대조구는 초기 균수에 비하여 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL 만큼 균수가 증가한 반면 처리구는 실험균주 모두 균수가 감소어 S-10-6의 살균효과가 인정되었다(Fig. 3).

L. monocytogenes ATCC 19111은 30 ppm 첨가구에서 24 시간 배양후 10^3 CFU/mL 정도 균수가 감소하다가 이후에는 균수가 증가하여 72 시간 배양시 초기 접종수준으로 균수가 증가하였고, 50 ppm 첨가구에서는 배양 도중 계속하여 균수가 감소, 72 시간 후에는 초기에 비해 10^6 CFU/mL 정도 균수가 감소하므로써 동일 농도에서 감초 분리물⁽²⁹⁾보다 효과가 우수하였다. ATCC 19112는 24 시간 배양 후 30 ppm 농도에서 10^3 CFU/mL, 50 ppm 농도에서 10^4 CFU/mL 정도 균수가 감소하여 감초 분리물에서의 균수 감소 정도⁽²⁹⁾ 보다는 우수하였으나 초기 접종수준에 차이(10^1)가 있어 두 물질간의 효과 차이는 단언할 수 없었다. ATCC 19113은 30 ppm 농도에서 24 시간 배양 후 균수가 약간의 감소 추세를 보이다가 이후에는 현저하게 감소하였고, 50 ppm 농도에서는 24 시간 배양 후 10^5 CFU/mL 정도 균수가 감소하고 배양 도중 균수의 변화가 거의 없었으며 72 시간 배양 후에는 처리 농도간의 균수의 차이가

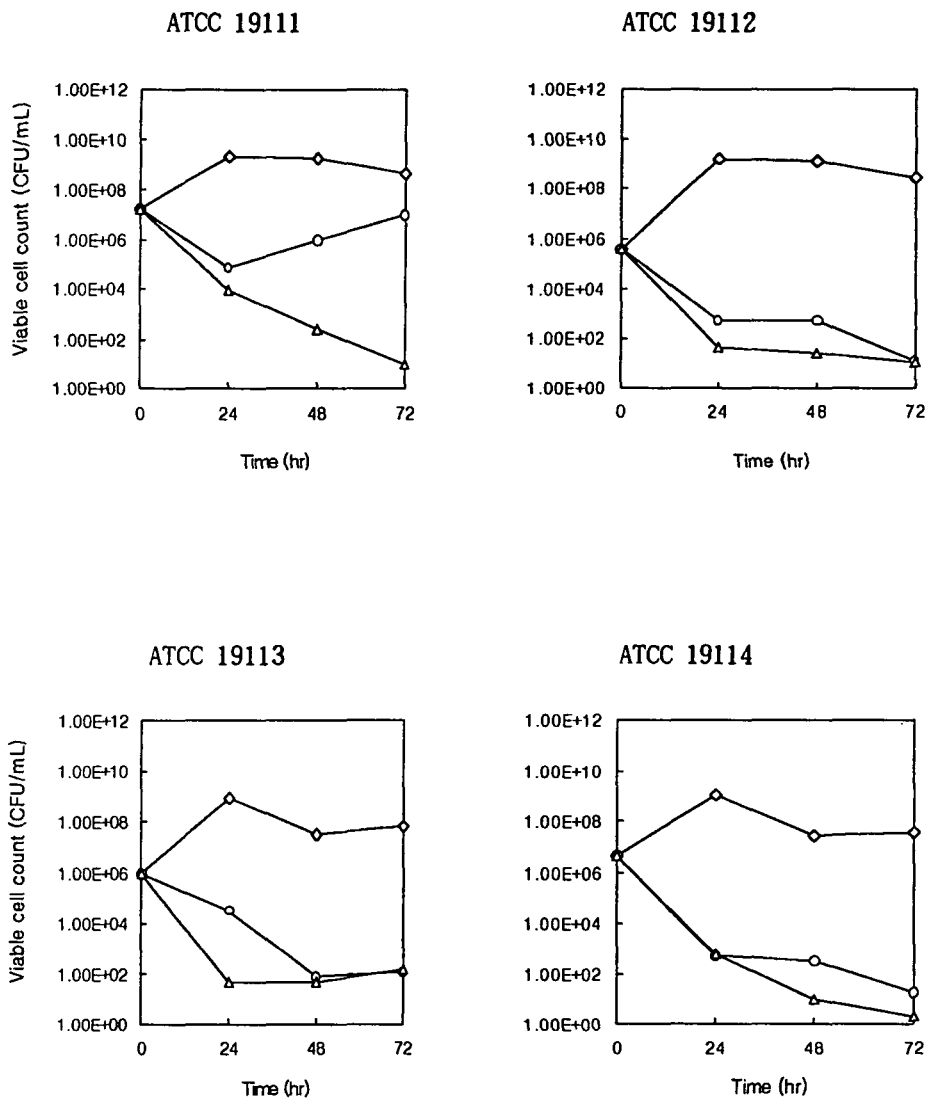


Fig. 3. Bactericidal effect of G-4-4 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract on *L. monocytogenes*.

◇-◇ : control ○-○ : 30 ppm △-△ : 50 ppm

거의 없었다. ATCC 19114는 30 ppm 첨가구에서 24 시간 배양 후 10^4 CFU/mL 정도 균수가 감소하였고 72 시간까지 약간의 감소 경향을 나타내었고 50 ppm 첨가구에서는 24 시간 배양 후 10^4 CFU/mL 정도 균수가 감소하였고 이후 72 시간 배양까지 다시 10^2 CFU/mL 정도 균수가 감소하므로서 완전살균의 가능성이 시사되었으며 동일 농도의 감초 분리물⁽²⁹⁾ 보다 효과가 우수하였다.

이상의 결과를 종합해보면, 50 ppm 농도에서 감초 분리물의 경우 *L. monocytogenes* ATCC 19112에 대한 살균효과가 가장 강하였으며 배양 도중 균에 따라 균수가 증가하거나(ATCC 19113, 19114 및 15313) 뚜렷한 균수의 변화가 나타나지 않았던(ATCC 19111)⁽²⁹⁾ 반면에 고삼 분리물인 S-10-6은 *L. monocytogenes* ATCC 19114에 대한 살균효과가 가장 우수하였으며 배양중 모든 실험균주의 수가 감소하는 경향으로 S-10-6의 살균효과가 더 높음을 확인할 수 있었다.

활성 소획분의 구조 동정

고삼으로부터 분리된 S-10-6은 담황색의 분말로 황산 발색시 진한 주황색을 나타내었다. MS spectrum에서 분자이온(M^+) peak로 분자량이 424인 화합물임을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 4)에서 7.22(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6'), 6.33(1H, dd, $J=8.5, 2.4$ Hz, H-5'), 6.27(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3') signal로부터 benzene환의 존재를 알 수 있고, 6.0(1H, s, H-8'), 5.50(1H, dd, $J=11.1, 5.0$ Hz, H-2)로부터 flavanone 골격의 2번 탄소의 proton의 존재를 추적하였고 4.90(1H, t, $J=6.7$ Hz, H-7'')로부터 이웃에 쇠상 사슬의 methylene을 갖는 이중결합 proton의 존재를 확인하였다. 또한 geminal coupling을 하는 exo-methylene의 존재를 4.50(1H, d, $J=21.1$ Hz, H-4a''), 4.49(1H, d, $J=21.1$ Hz, H-4b'') signal로 확인할 수 있었으며 3개의 singlet methyl signal이 1.56(3H, s), 1.51(3H, s), 1.40(3H, s) (H-5'', 9'', 10'')에서 관측되었다. 이상의 결과로부터 고삼 분리물 S-10-6은 A환이 3치환, B환이 2치환된 flavanone 골격에 불포화 결합을 갖는 isoprenoid 측쇄가

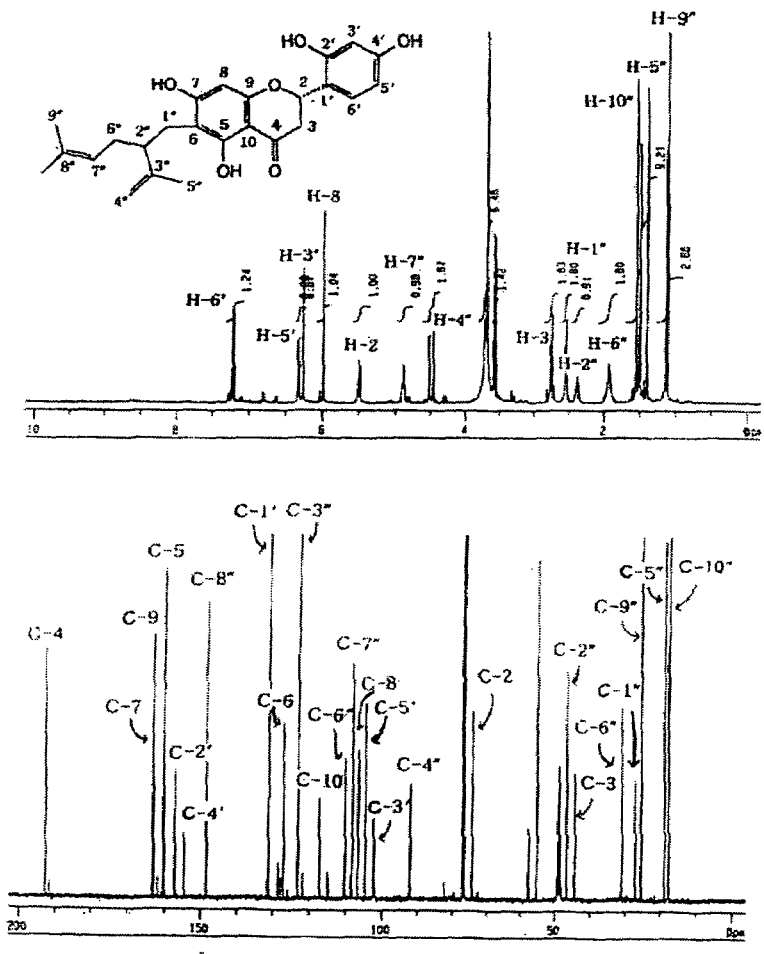


Fig. 4. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum of S-10-6 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract (CDCl₃ : CD₃OD = 5 : 1).

결합된 화합물임을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 5)을 살펴보면 총 25개의 탄소 signal이 관측되었는데 192.78 ppm에서 ketone, 154~163 ppm에서 산소가 결합된 benzene 탄소, 117~148 ppm에서 이중결합 탄소, 102~110 ppm에서 olefinic methine, 31~92 ppm에서 exomethylene의 존재를 확인할 수 있었고, 74.33 ppm에서 산소가 결합한 methine, 17, 18, 25 ppm에서 3개의 methyl signal을, 27~46 ppm에서 4개의 methylene 과 methyl 탄소의 존재를 확인하였다. 이상의 결과로보아 고삼에서 분리된 항균 활성물질인 S-10-6은 flavanone 골격의 B환의 2,4 탄소와 A환의 5,7 탄소에 hydroxy기가 결합되어 있고 6번 탄소에 측쇄결합을 갖고 있음을 확인하였고 Wu등⁽³¹⁾과 Shirataki등⁽³²⁾의 결과를 비롯하여 관련문헌⁽²⁴⁾과 비교 검토한 결과 kushenol F로 동정하였다.

요 약

고삼 75% 에탄올 추출물과 클로로포름 분획물을 첨가하여 몇가지 식중독 미생물의 증식억제 양상과 분리된 유효 물질의 구조를 확인하였다. 이 분획물의 항균 효과를 시험한 결과 *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, 19112, 19113, 19114 및 15313)에 대한 최소 증식억제 농도가 각각 50~500 ppm과 50 ppm 이하로 확인되었다. 항균 활성을 보인 클로로포름 분획물을 silica gel column chromatography로 연속 2회 정제하여 얻은 황색 분말의 항균 활성 소획분 S-10-6은 *L. monocytogenes* 5 균주, *Bacillus subtilis* 및 *Staphylococcus aureus* 에 대해서는 10 ppm 농도에서 뚜렷한 증식억제 효과를 보였으며 특히 *L. monocytogenes* 5 균주에 대해서는 30~50 ppm 수준에서 살균 효과가 인정되었으나 *E. coli* 경우 100 ppm 농도에서도 증식억제 효과가 없었다. 항균 활성을 보인 소획분 (S-10-6)을 IR, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 로 구조를 동정한 결과 flavanone 화합물의 하나인 kushenol F로 확인되었다.

제 4 절 감초로부터 항균활성 물질의 분리 및

구조 동정

서 론

식품의 원료, 가공, 저장·유통 중에 발생하는 부패성 및 병원성 미생물에 의한 오염과 균의 증식정도는 국민의 건강은 물론 식품의 보존기간과 부패유형에 중요한 인자로 작용하며 이로 인한 식품의 변질을 막기 위해서 가열처리, 냉장·냉동, 보존제 첨가, 방사선 조사 등 균의 증식을 제어하거나 살균하기 위한 다양한 방법들이 이용되고 있다⁽¹⁾. 제시된 방법 중에서 경제성과 안전성을 고려하여 가장 널리 쓰이는 가열 살균법은 열에 의해 제품의 질이 저하되는 단점이 있으며, 열처리를 최소화하여 신선함을 유지할 수 있는 냉장·냉동법은 저장 비용이 많이 들며, 원료에 이미 균이 오염되었거나 유통 과정 중 온도의 관리가 허술할 경우 식중독이 발생할 수 있는 가능성이 매우 높다^(2,3). 또한 일부 식품에 인공 합성 보존제를 첨가하고 있으나 독성이 있어 사용량에 제한이 있고 경우에 따라 잔류독성, 돌연변이 유발로 인하여 문제가 제기되고 있어⁽⁴⁾ 그 사용범위가 점차 줄어들고 있다. 이러한 상황들을 극복하기 위한 방법의 하나로 천연 소재로부터 얻은 항균제를 식품에 첨가하여 보존제로 이용함으로써 가열 살균 시 열처리량을 감소시킬 수 있고, 냉장식품을 비롯한 다수의 식품에 적용하여 신선함과 안전성을 동시에 만족시킬 수 있을 것이다.

감초(*Glycyrrhiza uralensis* FISCH)는 콩과에 속한 다년생 본초로서 단맛 성분인 glycyrrhizin을 6~14% 함유하고 있어 맛이 달고 독이 없으며 따뜻한 기운을 가지고 있어 한약의 구성 재료로 많이 쓰이며 기관지염이나 결핵 치료에 효능이 있다

고 알려져 있다^(5,6). 특히 감초의 75% 에탄올 추출물이 *L. monocytogenes*에 대하여 뚜렷한 항균 효과를 보이므로서⁽⁷⁾ 본 실험에서는 용매 분획, column chromatography를 통하여 항균 물질을 분리하고 기기분석을 통해 구조를 동정함으로써 항균제로서 이용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

감초(*Glycyrrhiza uralensis* FISCH)는 건조된 제품을 전주시 소재 건재상에서 구입한 후 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

추출 및 용매분획

감초 310 g에 75% 에탄올 1.6 L를 가해 78 ℃ 수욕상에서 3 시간 추출한 후 여과, 농축하여 에탄올 추출물을 얻고 이를 다시 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 분획하여 각각의 용매 분획물을 얻었다. 추출물과 각 분획물은 진공 농축기와 진공 건조기로 용매를 완전히 제거한 후 에탄올을 가해 용해시킨 후 항균 활성 실험에 사용하였다.

Silica gel column chromatography^(8,9)

감초 에탄올 추출물을 순차 분획하여 항균 활성을 확인한 결과 에틸아세테이트 분획물이 항균 효과와 수율이 높아 순차 분획을 하지 않고 에탄올 추출물에 에틸아세테이트를 직접 가해 에틸아세테이트 분획물을 얻고 이로부터 활성 물질을 분리하였다. 에틸아세테이트 분획물(20g)을 silica gel (700 g, 70~230 mesh, Merck)이 클로로포름 : 메탄올 (30 : 1)로 현탁, 충전된 column (5.5×57 cm)에서 메탄올 비

을을 단계적으로 증가시키는 (30 : 1-->2 : 1, v/v) step-wise 용출법으로 분리하여 13개의 획분 (G-1~G-13)을 얻었고 이 중에서 활성과 수율이 우수한 G-4와 G-11로부터 항균 활성물질을 분리하였다.

획분 G-4(1g)는 다시 헥산 : 에틸아세테이트 : 부탄올 (12 : 3 : 0.5, 10 : 3 : 0.5, v/v)용매계로 silica gel column chromatography (55 g, 2.5×35 cm)하여 소획분 (G-4-1~G-4-7)을 얻었고 이 중에서 항균 효과가 있으며 정제도와 수율이 높은 G-4-4의 구조를 동정하였다. 획분 G-11(2g)은 다시 클로로포름 : 메탄올 : 물 (15 : 3 : 1, 10 : 3 : 1, v/v) 용매계로 silica gel column chromatography (160g, 5×20 cm)하여 8개의 소획분을 얻었다. 분취할 때 용리물들은 TLC 상에서 전개시킨 후 UV (254 nm, 365 nm)의 흡수 양상과 황산(15~20%) 발색시 나타나는 점적의 모양에 따라 분취하였다.

분석 기기

IR은 Perkin Elmer 599B를 사용하였고 ¹H-NMR은 ZEOL JNM-LA400 (400 MHz)을, ¹³C-NMR은 ZEOL JNM-LA400(100 MHz)을 사용하고 CD₃OD를 용매로 하였다.

사용 미생물 및 배지

항균 활성 시험에 사용한 미생물과 배지는 Table 1과 같다.

항균 활성 측정^(7,10)

시험 균주가 접종된 사면배지에서 1백금이를 취해 10 mL 액체배지에 접종하여 30 °C에서 24 시간 배양 시킨 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배지에 접종하여 30 °C에서 24 시간 배양시켰다. 이 균주 배양액 0.1 mL를 에탄올로 완전히 용해시킨 후 membrane filter (0.2 μm)로 제균시킨 각 시료를 일정농도(ppm)로 첨가한 액체 배지에 접종한 후 30 °C에서 72 시간 (또는 48 시간)동안 배양하면서 24 시간 (또

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganism tested	Media used	Incubation temperature (°C)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Tryptic soy broth & agar (Difco)	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Tryptic soy broth & nutrient agar (Difco)	35
<i>Staphylococcus aureus</i> KFCC 11764		35

는 12 시간) 간격으로 620 nm에서 혼탁 정도로 증식억제 효과를 비교하였다. 이때 첨가되는 용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 처리농도와 동일하게 에탄올 만을 첨가한 대조구를 설정하였다.

살균 효과 측정

각 균주가 배양된 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL 액체배지에 접종, 30 °C에서 24 시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 정제된 물질이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 30 °C에서 72 시간 동안 배양하면서 24 시간 간격으로 표준평판한천 배양법에 의해 생균수를 계수하고 같은 방법으로 균주배양액 0.1 mL의 생균수를 계수하여 초기 접종균수를 구했다. 처리구와 동일 농도로 에탄올만을 가한 것을 대조구로 하였다.

결과 및 고찰

용매 분획물의 항균 효과

감초 75% 에탄올 추출물이 한⁽⁷⁾ 등에 의한 실험결과와 같은 수준에서 (50<MIC<100) 항균활성을 나타내어 이를 유기 용매로 순차 분획한 후 각각의 분획물을 50, 100 및 300 ppm 수준으로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5 균주를 배양시켰다. 그 결과 Table 2에 나타낸 바와 같이 클로로포름 분획물은 50~300 ppm 수준에서, 에틸아세티이트 분획물은 50~100 ppm 수준에서 증식억제 효과를 보였으나 부탄올 분획물은 300 ppm 수준에서도 증식억제 효과가 전혀 나타나지 않았다. 클로로포름과 에틸아세티이트 분획물의 *L. monocytogenes* 5균주에 대한 최소 증식억제 농도 (minimum inhibitory concentration : ppm)는 유사한 수준이었으나 에틸아세티이트 분획물의 수율이 높아 이로부터 활성 물질을 분리하였다.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of ethanol extract and solvent fraction of *Glycyrrhiza uralensis* FISCH

<i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i>	MIC(ppm)				Yield ²⁾ (%)	
	EtOH extract	CHCl ₃ fraction	EtOAc fraction	BuOH fraction	CHCl ₃ fraction	EtOAc fraction
ATCC 19111	50<MIC<100	M<50	M<50	300<M		
ATCC 19112	50<MIC<100	M<50	M<50	300<M		
ATCC 19113	50<MIC<100	50<MIC<100	M<50	300<M	5.72	6.56
ATCC 19114	50<MIC<100	100<MIC<300	50<MIC<100	300<M		
ATCC 15313	50<MIC<100	M<50	50<MIC<100	300<M		

¹⁾ Minimum inhibitory concentration(ppm)

²⁾ Fraction weight(g)/dried plant(g)×100

활성 물질의 정제와 얻어진 획분들의 항균 효과

감초 에틸아세테이트 분획물을 silica gel column chromatography하여 얻은 획분을 *L. monocytogenes* ATCC 19111에 대하여 항균 활성을 확인한 결과(Table 3) 획분 G-4, G-5, G-6, G-8 및 G-11이 강한 활성을 보였는데 이중에서 G-4와 G-11이 건조 약재에 대한 수율과 정제 정도가 우수하여 두 획분에서 활성 물질을 분리하고자 다시 silica gel column chromatography를 실시하였다. Table 4에서 나타낸 바와 같이 획분 G-4에서 얻은 소획분중 G-4-4가 회수량이 0.34 g으로 건조 약재에 대한 수율이 가장 높고 TLC 상에서 거의 단일 점적(Fig. 1)을 나타내므로서 여러 식중독균에 대한 항균 활성을 비교하고 구조를 동정하였다. 또한 클로로포름과 메탄올의 비가 6 : 1과 4 : 1인 범위에서 용출되어 G-4에 비해 극성이 매우 높은 활성 분획인 G-11에서 얻은 소획분들은 *L. monocytogenes* ATCC 19111에 대해서 50 ppm 농도에서도 증식억제 효과가 전혀 나타나지 않으므로 G-11의 항균 효과는 단일 물질보다는 여러 물질의 복합 작용에 의한 것임을 추정할 수 있었다(결과생략).

활성 소획분 G-4-4의 항균 효과

에틸아세테이트 분획물에서 분리된 활성 소획분 G-4-4를 10~100 ppm 수준으로 첨가하여 몇가지 식중독균을 배양시킨 결과는 Fig. 2와 같다. *L. monocytogenes* ATCC 19111 및 19113은 G-4-4가 10 ppm 첨가되었을 때 24 시간 내지 36 시간 증식이 완전 억제되다가 이후에는 급격히 증식 되는 것을 관찰할 수 있었으며 50 ppm 첨가구는 배양시간 내내 혼탁도가 증가하지 않으므로 뚜렷한 증식 억제효과가 나타났다. 이와 같은 항균 효과는 *L. monocytogenes* ATCC 19112, ATCC 19114 및 ATCC 15313의 배양 중에도 관찰되므로서 활성 획분 G-4-4의 *L. monocytogenes*에 대한 최소 증식억제 농도는 10~50 ppm 수준임을 알 수 있었다. 한편 *S. aureus* KFCC 11764는 G-4-4가 30 ppm 첨가되었을 경우 24 시간까지는 증식억제 효과를 보이다가 이후에는 대조구와 마찬가지로 균이 증식하였고 50 및 100 ppm 첨가되었을 때 균중

Table 3. Growth inhibition at 50 ppm of the fraction obtained after column chromatography of ethyl acetate fraction of *Glycyrrhiza uralensis* FISCH ethanol extract on *L. monocytogenes* ATCC 19111

Fraction	Elution solvent (CHCl ₃ : MeOH)	Antimicrobial activity	Yield ¹⁾ (%)
G-1	30 : 1	- ²⁾	0.05
G-2	30 : 1	+ ³⁾	0.05
G-3	30 : 1 15 : 1	++ ⁴⁾	0.45
G-4	15 : 1 10 : 1	+++ ⁵⁾	0.35
G-5	10 : 1	+++	0.18
G-6	10 : 1	+++	0.09
G-7	10 : 1 8 : 1	+	0.07
G-8	8 : 1	+++	0.11
G-9	8 : 1	+	0.02
G-10	8 : 1 6 : 1	+	0.08
G-11	6 : 1 4 : 1	+++	0.79
G-12	4 : 1 3 : 1	-	0.34
G-13	3 : 1 2 : 1	-	0.61

1) See footnote on Table 2

2) - : no inhibition

3) + : weak inhibition

4) ++ : strong inhibition

5) +++ : very strong inhibition

Table 4. Growth inhibition at 50 ppm of the fraction obtained after column chromatography of G-4 isolated from ethyl acetate fraction of *Glycyrrhiza uralensis* FISCH ethanol extract on *L. monocytogenes* ATCC 19111

Fraction	Elution solvent (Hexane : EtOAc : BuOH)	Antimicrobial activity	Yield ¹⁾ (%)
G-4-1	15 : 3 : 0.5	+++ ²⁾	0.04
G-4-2	15 : 3 : 0.5	+++	0.03
G-4-3	15 : 3 : 0.5	+++	0.05
G-4-4	10 : 3 : 0.5	+++	0.11
G-4-5	10 : 3 : 0.5	+++	0.02
G-4-6	10 : 3 : 0.5	+++	0.04
G-4-7	10 : 3 : 0.5, MeOH	- ³⁾	0.14

1) See footnote on Table 2

2), 3) See footnote on Table 3

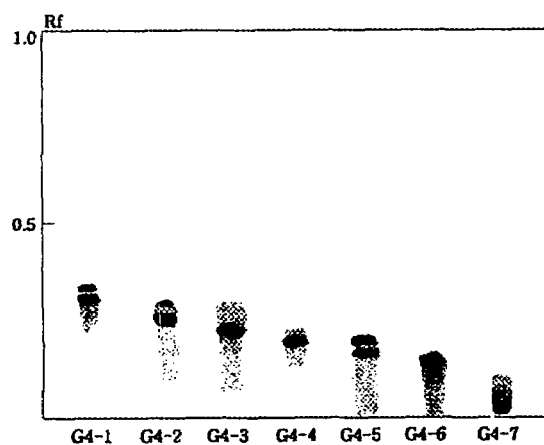
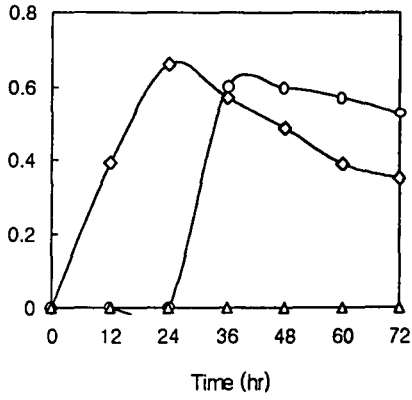
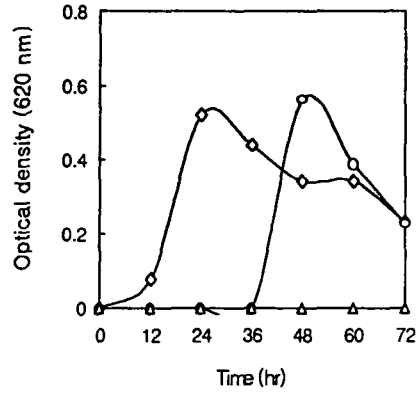


Fig. 1. Thin layer chromatogram of fraction of G-4 isolated from ethyl acetate fraction of *Glycyrrhiza uralensis* FISCH ethanol extract (Hexane : EtOAc : BuOH= 8 : 3 : 0.5).

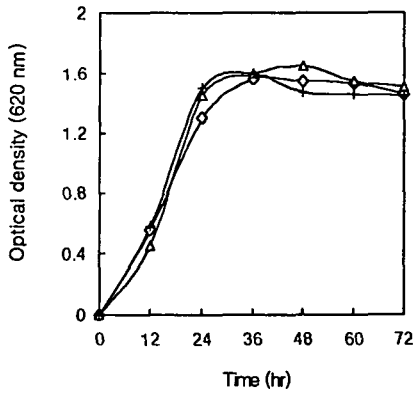
L. monocytogenes ATCC 19111



L. monocytogenes ATCC 19113



E. coli ATCC 25922



S. aureus KFCC 11764

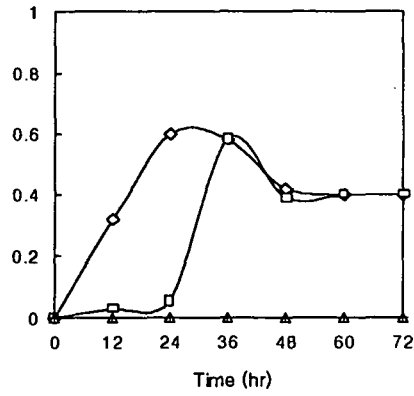


Fig. 2. Growth inhibition by G-4-4 isolated from ethyl acetate fraction of *Glycyrrhiza uralensis* FISCH ethanol extract on several strains of bacteria.

◇-◇ : control, ○-○ : 10 ppm, □-□ : 30 ppm, △-△ : 50 ppm, +-+ : 100 ppm

식이 완전히 억제되었으며, *E. coli* ATCC 25922의 경우 G-4-4가 100 ppm 첨가되었을 때도 대조구와 마찬가지로 균이 증식하므로 항균 효과가 전혀 나타나지 않았다.

합성 보존제인 sodium benzoate와 potassium sorbate의 *L. monocytogenes*에 대한 최소 증식억제 농도가 500 ppm 이상이며⁽¹¹⁾, 국화과 *Artemisia* 속 식물에서 분리한 flavone 화합물⁽¹²⁾, 꿀풀과 식물 뿌리에서 분리한 horminone⁽¹³⁾ 및 *Arnica* 속 꽃에서 분리한 4종의 sesquiterpenoid 등⁽¹⁴⁾의 *S. aureus*와 *E. coli*에 대한 최소 증식억제 농도가 100~800 ppm 이상으로 나타난 결과와 비교하여 볼 때 감초에서 분리된 항균 활성획분 G-4-4는 천연항균제로서 이용할 수 있는 충분한 가치가 있다고 생각되는 바이다.

활성 소획분 G-4-4의 살균 효과

*L. monocytogenes*의 증식억제를 위한 활성 소획분 G-4-4의 최소농도가 $10 < MIC < 50$ 로 기존의 합성보존제보다 효과가 좋음을 확인하였으나 액체배양법에서 혼탁도의 측정은 균의 증식양상은 관찰할 수 있으나 정확한 항균정도를 확인할 수 없으므로 이를 보완하기 위하여 각 실험 군주가 접종된 배지에 감초 분리물 G-4-4를 50 및 100 ppm 첨가하여 72 시간 동안 배양하면서 24 시간 간격으로 생균수를 계수하면서 살균 효과를 관찰하였다. 초기 접종 균수에 따른, 군중에 따른 차이점은 있으나 전체적인 균수의 변화를 살펴보면(Fig. 3), 배양 24 시간 후 초기 접종 균수와 비교하여 볼 때 대조구는 균수가 $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL 증가한 반면에 처리구는 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL 정도 균수가 감소하였다. 이후 배양시간 동안에는 대조구는 10^2 CFU/mL 정도 균수가 감소하였고 처리구는 군에 따라 균수가 감소(ATCC 19112), 증가하거나(ATCC 19113 및 19114) 뚜렷한 균수의 변화가 나타나지 않았다(ATCC 19111).

이상의 결과로 보아 G-4-4는 50 및 100 ppm 농도에서 *L. monocytogenes*에 대한 살균작용이 인정되며, 특히 100 ppm 첨가구에서 ATCC 19112경우 초기 균수가 4×10^6 CFU/mL이고 최종 균수가 1.7×10^2 CFU/mL으로 균수가 10^4 CFU/mL 감소하여 살

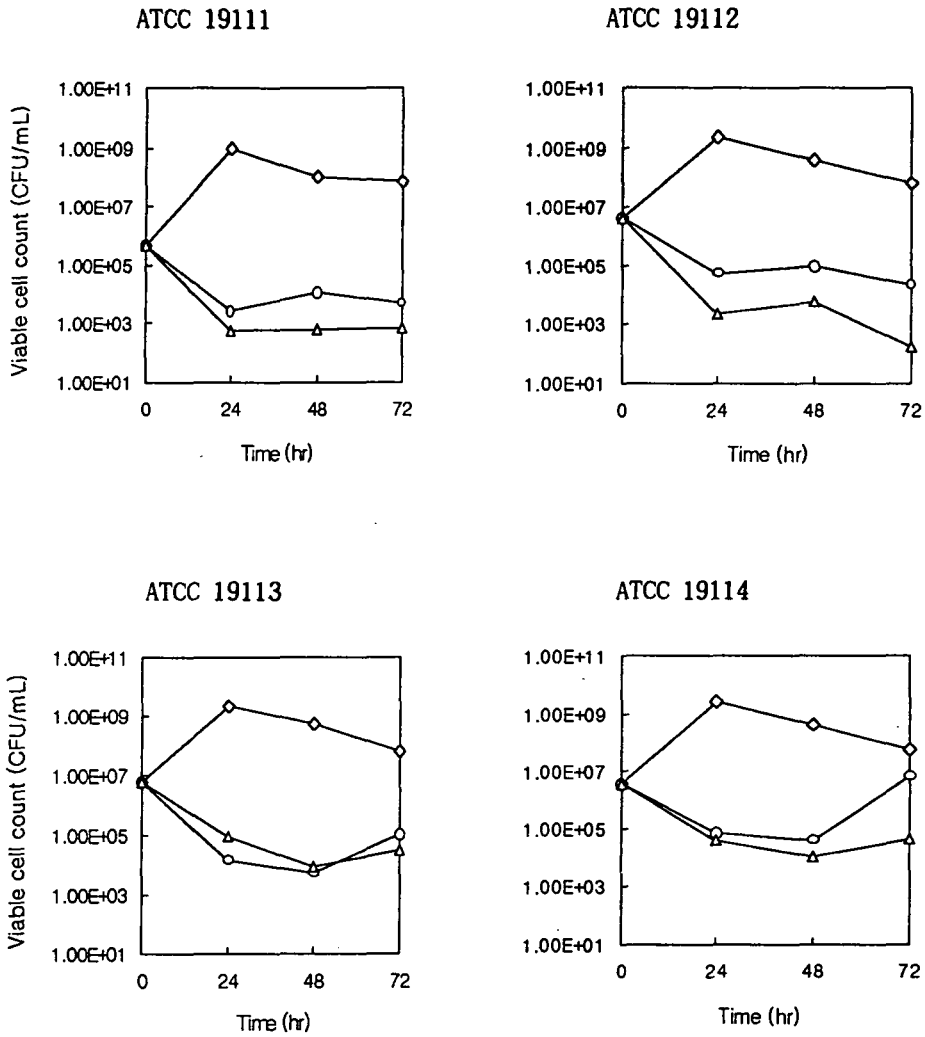


Fig. 3. Bactericidal effect of G-4-4 isolated from ethyl acetate fraction of *Glycyrrhiza uralensis* FISCH ethanol extract on *L. monocytogenes*.

◇-◇ : control, ○-○ : 50 ppm, △-△ : 100 ppm

균효과가 가장 뚜렷한 반면에 초기 접종 수준(5.7×10^6 CFU/mL, 3.5×10^6 CFU/mL)이 유사한 ATCC 19113 및 19114는 배양 후 균수가 초기에 비하여 10^2 CFU/mL 감소함으로써 효과가 낮음을 알 수 있었다. 또한 소획분 G-4-4를 50 ppm 첨가하여 ATCC 19114를 배양시켰을 때 균수가 약간의 감소를 보이다가 증가하여 최종 균수가 초기 접종 균수까지 증가하는 것을 볼 수 있는데 이와같이 적용 농도에서 균의 수가 감소하다가 증가하는 실험균주에 대해서는 살균효과 및 증식억제 효과를 유지하기 위해서 보다 높은 농도의 항균성 물질이 필요할 것으로 본다.

활성 소획분의 구조 동정⁽¹⁵⁾

감초로부터 분리된 G-4-4는 황색분말로 TLC 상에서 황산 발색시 어두운 주황색을 나타내었다. IR spectrum(Fig. 4)에서 3433cm^{-1} 의 broad한 흡수 band로부터 OH기를, 1748cm^{-1} 에서 C=O 결합을, 1569, 1418, 1386cm^{-1} 에서 공역이중결합들의 존재를 확인하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (Fig. 5)을 살펴보면 7.69(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), 6.43(1H, d, $J=8.8$, 2.2 Hz, H-6), 6.31(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8) signal로부터 1,2,4 치환 benzene환의 존재를, 7.20(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-2'), 7.20(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6')의 두 개의 수소의 coupling을 관측하여 para치환 benzene 구조를 확인하였고, 5.25(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-2)에서 산소가 결합된 methine proton signal을 확인하였고 2.94(1H, d, $J=17.0$, 13.4 Hz, Ha-3), 2.65(1H, d, $J=17.0$, 3.0 Hz, Hb-3)에서 geminal coupling을 이루고 있는 methylene proton의 존재를 확인하였다. 이상의 결과로부터 A환의 7번, B환의 4번 탄소에 치환기를 갖는 flavanone 화합물임을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 5)로부터 192 ppm에서 ketone, 150~170 ppm에서 산소가 결합된 benzene 탄소, 100~130 ppm에서 9개의 이중결합 탄소 signal 관측, 79.47 ppm에서 산소가 결합된 methine, 43.68 ppm에서 methylene 탄소의 존재를 확인할 수 있었다.

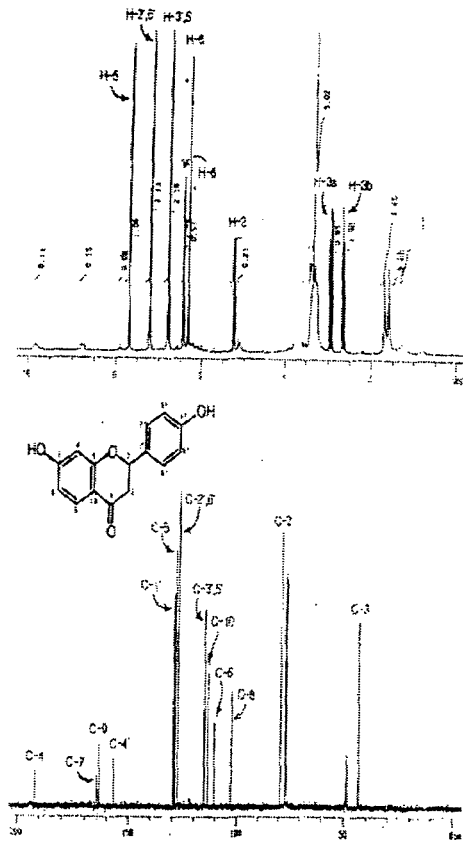


Fig. 5. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of G-4-4 isolated from ethyl acetate fraction of *Glycyrrhiza uralensis* FISCH ethanol extract (CD_3OD).

이상의 IR, MS, NMR의 해석결과를 바탕으로 전통 동양약물 데이터베이스⁽¹⁶⁾와 Tsutomu등⁽¹⁷⁾의 결과와 비교 검토하여본 결과 화합물 G-4-4는 감초중에 함유된 flavanone 화합물의 일종인 liquiritigenin으로 동정되었다.

요 약

감초 (*Glycyrrhiza uralensis* FISCH) 75% 에탄올 추출물이 *L. monocytogenes* 5 균주에 대하여 뚜렷한 항균 활성이 인정되어 용매 분획한 후 활성이 높은 에틸아세테이트 분획물을 얻었고 이를 silica gel column chromatography로 연속으로 2회 정제하여 황색 분말의 항균 활성 소획분을 분리하였다. 활성 소획분은 *L. monocytogenes*에 대해서는 10~50 ppm 수준에서 증식억제 효과를 보였고 50 및 100 ppm 농도에서는 살균 효과가 인정되었으며 *S. aureus*에 대해서는 30~50 ppm 수준에서 증식억제 효과를 보였으며 *E. coli*에 대해서는 100 ppm 농도에서도 증식억제 효과가 전혀 나타나지 않았다. IR, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 로 기기분석하여 활성 획분의 구조를 분석한 결과 감초에 함유된 flavanone 화합물의 하나인 liquiritigenin으로 동정되었다.

제 5 절 관중(*Dryopteris crassirhizoma Nakai*)의

에탄올 추출물 및 용매 분획물이 *Listeria*

*monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향

서 론

식품의 원료, 가공, 저장·유통 중에 발생하는 부패성 및 병원성 미생물에 의한 오염과 균의 증식정도는 국민의 건강은 물론 식품의 보존기간과 부패유형에 중요한 인자로 작용하며 이로 인한 식품의 변질을 막기 위해서 일부 식품에 차아염소산나트륨, 소르빈산 등 합성 보존제의 첨가를 허용하고 있으나 잔류독성, 돌연변이 유발로 인하여 문제가 제기되고 있어(조동, 1995) 천연물로부터 항균 물질을 얻고자 하는 다양한 연구가 이루어지고 있다. 천연에 존재하는 항균제에는 우유와 난백에 들어있는 lactoferin, lysozyme 등의 효소제, 과일에 많이 들어있는 유기산류, 저급지방산 ester들(Larry and David, 1989), 향신료의 정유성분(Bruno *et al*, 1996; Afroditi *et al*, 1996), 갑각류의 키틴질로부터 추출한 chitosan(Simpson *et al*, 1997), 미생물에서 생산되는 bacteriocin(Jung, 1997; Li, 1995; Nobuji, 1988)등이 제시되고 있다. 이밖에도 오랜 기간 질병 치료제나 식품의 재료로 이용되어 오면서 무해성이 간접적으로 입증된 생약재 및 식용식물 추출물로부터 항균 활성물질 탐색에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 최근에 수행된 연구결과에 의하면 양배추즙액이 효모, 젖산균 및 그밖의 병원성 세균에 대하여 폭넓은 항균활성을 나타내며(한과 경, 1995), 부추의 메탄올 추출물이 G⁺, G⁻세균 및 효모에 대하여 항균 효과가 있으며(김과 박, 1996), 가자육, 금앵자, 옥두구 등 다수의 약재들이 *Listeria monocytogenes*를 비롯한 식중독 미생물에 대해(신동, 1997), 녹차 추출물

이 *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* 등에 대해(농등, 1996), 들산갓 물추출물의 경우 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*에 대해 증식억제 효과를 나타낸다고(박등, 1995)보고 되었다. 본 실험에서는 *Listeria monocytogenes* 5균주에 대한 항균성이 미확인된 약재들의 75% 에탄올 추출물의 항균성을 검색한 후 그 효과가 가장 우수한 관중 뿌리의 에탄올 추출물과 분획물의 농도별 항균 효과를 확인하였다. 관중(김등, 1997)은 여러해 살이 풀로서 성미(性味)는 쓰고 서늘하며 뿌리는 삐뚤하게 자라며 굵은 덩어리 모양이고 단단하며 잎자루의 흔적 및 수염뿌리가 많이 있고 수색 또는 짙은 갈색의 큰 비늘이 뽁뽁하게 있다. 뿌리의 약리 효과는 구충작용, 항바이러스 작용, 항균작용, 자궁에 대한 작용, 토혈, 코피, 암치질로 인한 변혈, 적리, 대하증에 대한 치료효과 등 다양한 생리 활성을 나타내며 독을 함유하여 임산부, 소아, 소화기관 궤양 환자에게는 좋지 않으나 일반적으로는 위장에서 흡수되지 않아 오랫동안 한약재로 이용 되어 왔다.

재료 및 방법

1. 실험재료

가. 추출용 약재

임상본초학(신, 1986)을 참고하여 선발된 미검색 식용식물과 생약재 49종을 건조된 상태의 것을 구입하여 분쇄한 후 에탄올 추출용 시료로 사용하였고 사용부위는 표 1과 같다.

Table 1. List of plants used for antimicrobial experiment.

Korean name	Botanical name(abbreviation)	Part used
가시오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i> Seem(As)	stem
갈대	<i>Phragmites communis</i> Trin(Pc)	root
감국	<i>Chrysanthemum</i> Ramat(Cr)	flower
감송향	<i>Nardostachys chinensis</i> Batal(Nc)	root
감인	<i>Euryale ferox</i> Salisb(Ef)	seed
강진향	<i>Dalbergia odorifera</i> T. Chen. (Do)	stem
건지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboch(Rg)	root
건칠일속	<i>Rhus verniciflua</i> Stokes(Rv)	stem
계백부자	<i>Aconitum Koreanum</i> R. Raym(Ak)	root
고련근피	<i>Meliat toosendan</i> Sieb. et Zucc(Mt)	root
고본	<i>Angelica tenuissim</i> Nakai(At)	root
고원지	<i>Polygala tatarinowi</i> Regel(Pt)	root
고정향	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb(Ec)	flower
고행인	<i>Prunus armeniaca</i> var. (Pa)	seed
골담초	<i>Caragana sinica</i> Rehd(Cs)	seed
구기자근피	<i>Lycium chinense</i> Miller(Lc)	root
구맥	<i>Dianthus sinensis</i> L. (Ds)	whole
구자	<i>Allium tuberosum</i> Rottler(AtR)	seed
구절창포	<i>Acorus graminens</i> Soland(Ag)	root
궁궁	<i>Cnidium officinale</i> Makino(Co)	root
규자	<i>Malva verticillata</i> L. (Mv)	seed
과투인	<i>Trichosanthes kirilowill</i> Max(Tk)	seed
곽향	<i>Teucrium japonicum</i> Hott(Tj)	whole
관동화	<i>Tussiligo farfara</i> L. (Tf)	flower
관중	<i>Dryopteris crassirhizama</i> Nakai(Dc)	root
광도인	<i>Prunus persica</i> L. (Pp)	seed
권백	<i>Selaginella tamariscina</i> Spring(St)	whole
그늘현삼	<i>Scaro phularia buergeriana</i> Miq(Sp)	root
금권초	<i>Glechomo hederacea</i> var. <i>longituba</i> Nakai(Gh)	whole

Table 1. Continued

Korean name	Botanical name(abbreviation)	Part used
금모주척	<i>Citotium barometz</i> J.Sm(Cb)	root
꽃향유	<i>Elsholtzia splendens</i> Nakai(Es)	flower
달개비	<i>Commelina communis</i> L.(Cc)	whole
대추	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill var. <i>inermis</i> Rehd(Zj)	fruit
동진피	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hnce(Fr)	bark
백두옹	<i>Pulsatilla koreana</i> Nakai(Pk)	root
부평초	<i>Spirodela polyrrhiza</i> L. Sch leid(Sp)	whole
산약	<i>Dioscorea japonica</i> Thunb.(Dj)	root
상굴피	<i>Citrus unshiu</i> Marcor(Cu)	bark
석곡	<i>Dendrobium moniliforme</i> L. Sw(Dm)	whole
자완	<i>Aster tataricus</i> L.(AtL)	root
지검송마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom(Ch)	fruit
천마	<i>Gastrodia elata</i> Bl.(Ge)	root
천황연	<i>Coptis japonica</i> Mikino(Cj)	root
초과루근	<i>Amomum tsao-ko</i> Crevost et Lem.(AtC)	fruit
초피나무	<i>Zanthoxylum schinifolium</i> Sieb et zucc(Zs)	fruit
택사	<i>Alisma orientale</i> Juzep.(Ao)	stem
통황기	<i>Astragalus membranaceus</i> (Am)	root
흑측	<i>Pharbitis nil</i> L. Choisy(Pm)	seed

나. 균주 및 배지

Listeria monocytogenes 5종을 대상으로 미검색된 생약재의 항균활성을 검색하였는데 이때 사용한 균주와 배지는 표 2와 같다.

Table 2. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganism tested	Media used	Temperature(℃)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112	Tryptic soy broth	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	& agar	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	(Difco)	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313		

2. 실험방법

가. 에탄올 추출 및 용매 분획

분쇄기로 마쇄한 약재에 5배(W/V)의 75% 에탄올을 혼합하여 환류냉각관이 부착된 플라스크에 넣고 78 ℃ 수욕상에서 3 시간 가열, 추출 후 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator에서 농축하였다. 이 농축물에 약 4 배의 클로로포름을 가하여 클로로포름 분획물을 얻고(2회 반복) 동일방법으로 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차로 가하여 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물을 각각 얻었다. 각 분획물은 진공 농축기와 진공 건조기로 용매를 완전히 제거한 후 물을 가해 초음파로 분산시켜 항균성 검색실험에, 에탄올로 녹여 농도별 항균 효과 실험에 사용하였다.

나. 추출물의 항균효과 검색(Disc diffusion method)

사면배지에 배양된 각 시험균주를 1백금이 썬 취해 10 mL tryptic soy broth 에 접종하여 30 ℃에서 24 시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 tryptic soy agar plate 에 떨어뜨린 후 균일하게 도포하였다. 각 시험균이 접종된 plate 위에 에탄올 추출물을 흡수시킨 6.5 mm filter paper (Whatman No.2)

를 놓고 30 ℃에서 24 시간 배양 후 disc 주위에 나타난 clear zone 의 직경(mm)의 크기에 따라 항균성을 비교하였다. 이때 추출물이 물에 완전히 용해되지 않을 경우에는 초음파로 분산시켜 실험하였다.

다. 추출물과 분획물의 농도별 항균 효과

시험 균주가 접종된 사면배지에서 1백금이를 취해 10 mL 액체배지에 접종하여 30 ℃에서 24 시간 배양 시킨 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배지에 접종하여 30 ℃에서 24 시간 배양시켰다. 이 균주 배양액 0.1 mL를 에탄올로 완전히 용해시킨 후 membrane filter(0.2 μm)로 제균시킨 각 시료를 일정농도(ppm)로 첨가한 액체배지에 접종한 후 30 ℃에서 72 시간(또는 48 시간)동안 배양하면서 12 시간 간격으로 620 nm에서 혼탁 정도로 증식억제 효과를 비교하였다. 이때 첨가되는 용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 처리농도와 동일하게 에탄올만을 첨가한 대조구를 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 추출물의 항균 효과

식용 혹은 한약재로 사용하는 49종의 약재로부터 얻은 에탄올 추출물을 disc method로 *L. monocytogenes* 5종에 대한 항균효과를 비교한 결과는 표 3과 같다.

Table 3. Antimicrobial effect of the ethanol extract from various plants on *Listeria monocytogenes*

Korean name	Botanical name ¹⁾	SS ²⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>					
			ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313	
가시오가피	As	1.5	11.7 ³⁾	- ⁴⁾	-	-	-	10.7
갈대	Pc	1.5	-	-	-	-	-	-
감국	Cr	2.0	-	-	-	-	-	-
감송향	Nc	1.5	-	-	16.7	9.3	-	-
감인	Ef	1.0	-	-	-	-	-	-
강진향	Do	1.0	-	-	-	-	-	-
건지황	Rg	2.0	-	-	-	-	-	-
건칠일숙	Rv	1.5	10.0	11.0	10.0	10.0	10.0	11.7
계백부자	Ak	2.2	8.5	-	-	-	-	7.7
고련근피	Mt	1.5	-	-	-	-	-	-
고본	At	1.8	-	-	-	-	-	-
고원지	Pt	2.3	-	-	-	-	-	-
고정향	Ec	2.2	16.2	15.8	15.3	16.3	16.3	15.0
고행인	Pa	1.5	9.0	7.0	8.0	8.5	8.5	8.5
골담초	Cs	1.1	-	-	-	-	-	-
구기자근피	Lc	2.2	-	-	-	-	-	-
구맥	Ds	1.2	-	-	-	-	-	-
구자	AtR	1.5	-	-	-	-	-	-
구절창포	Ag	1.5	14.0	11.0	12.0	-	-	11.5
궁궁	Co	2.2	8.3	8.0	7.5	-	-	7.3
규자	Mv	1.5	-	-	-	-	-	-
과루인	Tk	1.0	10	-	11	-	-	8
곽향	Tj	1.0	-	9.0	-	-	10.3	-
관동화	Tf	1.8	-	-	-	-	-	-
관중	Dc	2.4	15.3	14.7	12.5	20.5	20.5	13.3
광도인	Pp	2.5	-	-	-	-	-	-
권백	St	1.0	-	-	-	-	-	-

Table 3. Continued

Korean name	Botanical name ¹⁾	SS ²⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>				
			ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
그늘현삼	Sp	1.5	-	-	8.0	-	-
금권초	Gh	1.0	-	-	-	-	-
금모주척	Cb	1.5	9.7	-	10.3	9.0	-
꽃향유	Es	1.8	-	-	-	-	-
달개비	Cc	1.5	9.7	-	9.0	9.5	10.0
대추	Zj	1.5	-	-	-	-	-
동진피	Fr	1.9	-	-	-	-	-
백두옹	Pk	2.3	-	-	-	-	-
부평초	Sp	1.0	-	-	-	-	-
산약	Dj	1.5	-	-	-	-	-
상갈피	Cu	2.0	11.3	13.3	12.7	9.3	8.7
석곡	Dm	1.5	-	-	-	-	-
자원	AtL	2.5	-	-	-	-	-
지검승마	Ch	1.2	-	-	-	-	-
천마	Ge	2.0	-	-	-	-	-
천황연	Cj	1.8	14.7	10.0	19.0	14.0	13.3
초과투근	AtC	1.0	-	8.7	-	7.8	8.0
초피나무	Zs	1.5	16.7	-	16.0	-	15.0
택사	Ao	2.2	-	-	-	-	-
통황기	Am	1.5	-	-	-	-	-
흑축	Pn	1.5	-	-	-	-	-

1) See Table 1

2) mg of soluble solid content of extract/disc

3) Clear zone diameter(mm) on tryptic soy agar at 30°C

4) No inhibition

표 3에서 보는 바와 같이 실험대상 49종의 약재 중에서 일부 균에라도 항균효과가 있는 것은 18종이었고, 5균주 모두에 대하여 효과가 있는 것은 건칠일숙, 고정향, 고행인, 관중, 상갈피 및 천황연이었다. 이중에서 관중, 고정향, 천황연은 증식억제환(mm)이 15 mm 내외로 항균효과가 뚜렷했으며 감송향의 경우 *L. monocytogenes* ATCC 19113에 대하여, 초피나무의 경우 *L. monocytogenes* ATCC 19111, 19113 및 15313에 대하여 비교적 우수한 항균효과를 나타내었다.

2. 관중의 추출물과 분획물의 농도별 항균 효과

가. 에탄올 추출물의 항균효과

관중 뿌리의 에탄올 추출물을 50, 100, 500 및 1000 ppm 농도로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5균주를 배양시킨 결과는 그림 1~5와 같다. 각각을 대조구와 비교해 볼 때 추출물을 50 및 100 ppm 첨가하였을 경우 ATCC 19113과 ATCC 15313에 대해서는 24 시간까지 뚜렷한 증식억제 효과를 나타내었으나 타 균종에 대해서는 효과가 미비하였다. 500 ppm 이상 첨가시 실험균주 모두의 생육이 완전히 억제되었으며 증식억제 효과는 72시간 동안 지속되었고 균에 따른 감수성의 차이는 나타나지 않았다. 들산갓 물추출물(박등, 1995)의 경우 *S. typhimurium*에 대해 400~600 ppm 범위에서 뚜렷한 항균 효과를 나타내므로서 관중 뿌리의 에탄올 추출물과 유사한 항균 효과를 나타내었으나 황백과 느릅뿌리 에탄올 추출물(박등, 1994)은 *B. cereus*와 *L. plantarum*에 대해 1000~2000 ppm 범위에서 항균 효과가 확인되었으며, 방기 에탄올 추출물(신등, 1994)은 2000 ppm에서도 전혀 효과를 나타내지 않으므로서 관중 뿌리의 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

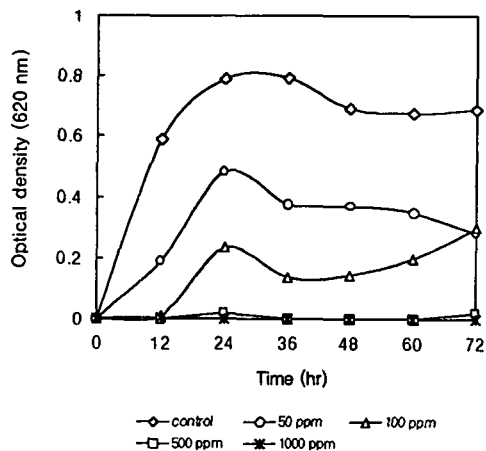


Fig. 1. Growth inhibition by ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 19111.

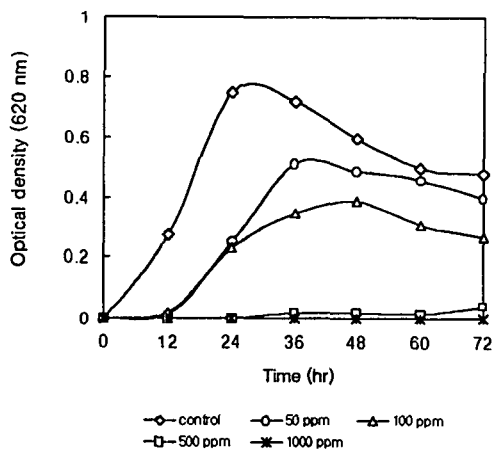


Fig. 2. Growth inhibition by ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 19112.

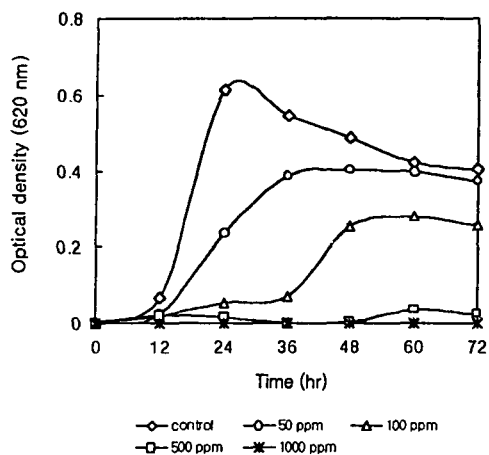


Fig. 3. Growth inhibition by ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 19113.

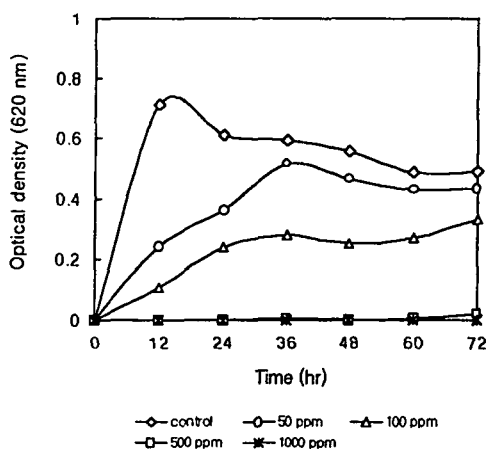


Fig. 4. Growth inhibition by ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 19114.

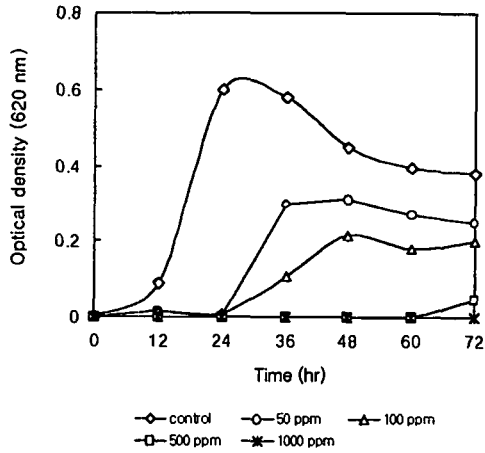


Fig. 5. Growth inhibition by ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 15313.

나. 용매 분획물의 항균효과

관중 에탄올 추출물이 500 ppm 수준에서 뚜렷한 증식억제 효과를 보여 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물은 농도를 낮춰 50 및 100 ppm 수준으로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes*를 배양시킨 결과는 그림 6~10와 같다.

모든 실험군에 대하여 클로로포름 분획물만이 뚜렷한 항균 효과를 나타내었으며 에틸아세테이트, 부탄올 분획물은 대조구와 같은 수준으로 균이 증식하여 증식하므로 항균 효과를 확인할 수 없었다. *L. monocytogenes* ATCC 19111과 19113의 증식 양상을 보면(그림 6, 8) 적용 농도에서 36 시간 동안 혼탁도의 변화가 미비하였으나 이후 배양시간에는 서서히 증가하였고, 분획물의 농도가 높을수록 균의 증식 정도도 미약한 것으로 보아 분획물을 100 ppm 이상의 농도로 첨가한다면 균증식을 완전히 억제할 수 있을 것으로 본다. *L. monocytogenes* ATCC 19111 및 ATCC 19114에

대해서는 12 시간까지는 균의 증식을 억제하였으나(그림 7, 9) 이후 효과가 감소되었고 앞의 두 균주보다 혼탁도가 높게 나타났다. ATCC 15313의 경우 50 ppm에서 24 시간까지 증식이 억제되었으나(그림 10) 이후 혼탁도가 증가하였으며 100 ppm에서는 72 시간 동안 균증식이 거의 일어나지 않았다. 환삼덩굴 메탄올 추출물을 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차 분획하였을 경우 항균성이 부탄올 분획물 > 에틸아세테이트 분획물 > 클로로포름 분획물 > 핵산 분획물 순으로 나타난 결과(박 등, 1994)와 비교하였을 때 관중 에탄올 추출물에 함유된 항균 활성 물질은 다른 용매에 분산되지 않고 클로로포름 분획물에만 포함되어 있거나 기타 용매에 분산되어 있어도 그 농도가 낮아 활성이 발현되지 못한 것으로 추정할 수 있었다. 또한 *L. monocytogenes*에 대해 관중 분획물과 유사한 농도범위에서(50~100 ppm) 항균 효과를 보인 감초 에틸아세테이트 분획물(안 등, 1998a) 및 고삼 클로로포름 분획물(안 등, 1998b) 과 100 ppm 농도에서도 약간의 증식억제 효과만을 보인 상백피 클로로포름 분획물(안 등, 1997)에서 분리된 항균 물질이 동일 균주에 대해 살균 효과(bactericidal effect)를 보인 결과를 비교해 볼때 관중 뿌리의 클로로포름 분획물로부터 항균 효과가 우수한 물질을 얻을 수 있는 가능성을 확인하였다.

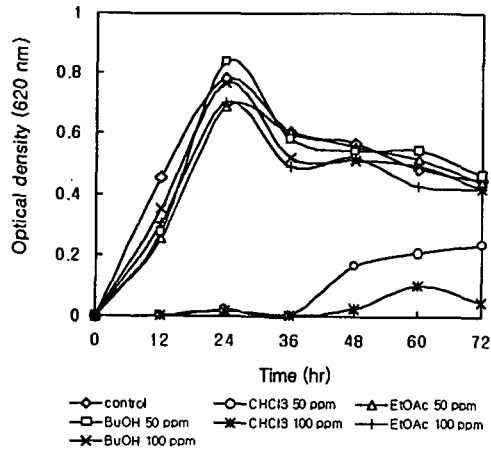


Fig. 6. Growth inhibition by each solvent fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 19111.

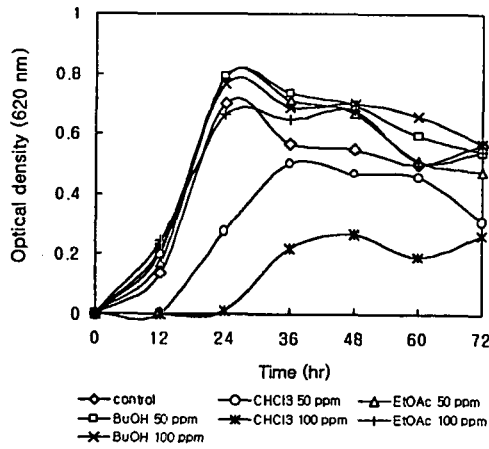


Fig. 7. Growth inhibition by each solvent fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 19112.

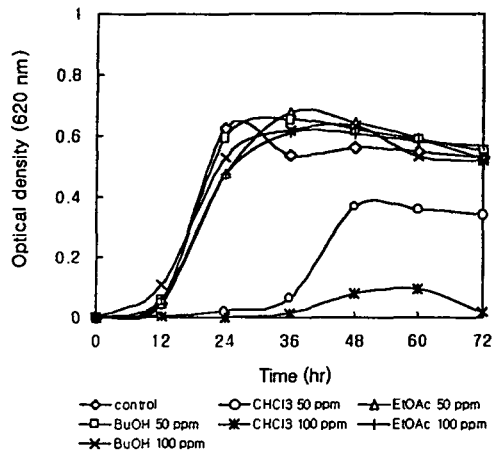


Fig. 8. Growth inhibition by each solvent fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 19113.

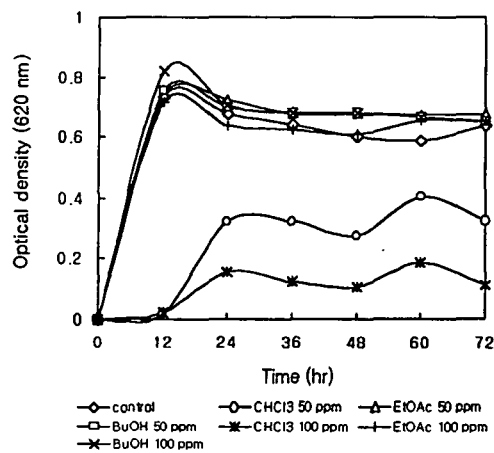


Fig. 9. Growth inhibition by each solvent fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 19114.

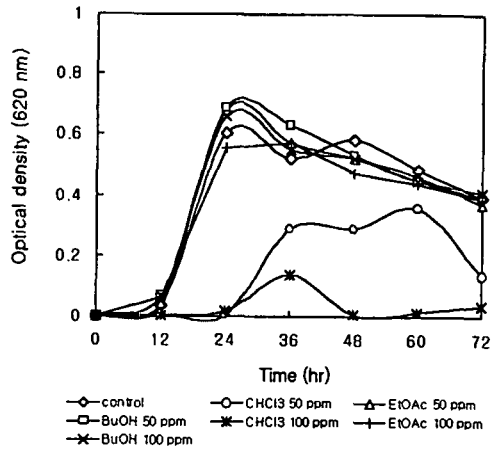


Fig. 10. Growth inhibition by each solvent fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *L. monocytogenes* ATCC 15313.

요 약

49종의 생약재 에탄올 추출물의 *L. monocytogenes*에 대한 항균성을 검색하여 건칠일속을 비롯한 몇가지 약재들의 항균성을 확인하였다. 특히 모든 실험 균주에 대해 뚜렷한 항균성을 보인 관중 뿌리는 주로 구충작용에 이용되어왔으며 이외에 항바이러스와 항균 작용, 코피나 변혈에 대한 치료효과가 알려져 있다. 에탄올 추출물의 경우 500 ppm에서 72시간 동안, 극성별 용매 추출 분획시 클로로포름층의 물질은 50~100 ppm에서 12~36시간 동안 실험한 *Listeria* 모든 균주의 증식을 완전히 억제하므로써 탁월한 항균 효과를 확인하였다. 이상의 실험 결과로부터 관중 뿌리는 오랫동안 질병의 치료제로 이용되어 오면서 그 무해성이 직·간접적으로 입증된 천연 항균제로서의 유용성이 있음을 확인할 수 있었고, 항균 물질의 분리 및 구조 확인을 위한 연구가 진행중이다.

제 6 절 한약재로부터 선발된 옷나무 수피 추출물로부터

항산화 활성물질의 분리

서 론

항산화제는 식품의 냄새, 풍미의 변화, 유지의 산패 그리고 변색을 방지, 지연, 억제하는 기능을 가진 화합물을 말하며 동, 식물체⁽¹⁻⁴⁾ 뿐만 아니라 곰팡이⁽⁵⁾ 내에도 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 가장 많이 이용되고 있는 합성 항산화제는 phenolic compound계로 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxytoluene(BHT) 그리고 tertiarybutyl hydroquinone (TBHQ)등이 알려져 있으며, 항산화활성은 우수한 반면 식품의 안전성 문제^(6,7)로 소비자의 기호에 부합되지 못하고 있는 실정이므로 천연물로 대체하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다⁽⁸⁻¹¹⁾. Phenol계 성분들은 항암작용⁽¹²⁾, 혈압강화작용, 피임작용, 간 보호작용, 진경작용 등 여러 작용⁽¹³⁾이 알려져 있다. 특히 향신료 및 생약성분중의 phenol계 성분들은 항산화작용을 가진 대표적인 물질로 보고^(14,15)되고 있으며, 항산화성의 정도는 식물의 종류 및 이들에 함유되어 있는 항산화 유효성분의 종류에 따라 다르며 추출방법에 따라 현저한 차이가 난다고 한다. Masahino Ogata 등⁽¹⁴⁾은 Magnolia cortex에서 phenolic compound와 관련된 magnolol, honokiol의 높은 항산화활성을 확인하였으며, 이런 성분들이 O₂⁻의 scavenger나 hydroxyl radical의 scavenge작용 때문이라고 보고하였다. 김 등⁽¹⁶⁾등은 오배자(*Rhus japonica* Linne) methanol추출물을 phenolic compound별로 분리하여 각 부분에서 수율도 높고 항산화 활성도 높은 gallic acid를 동정하였다.

옷나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 옷나무는 중국, 일본 등 동북아시아에서 많이 자라는 낙엽활엽소교목으로 이 수액을 옷 또는 건칠(*Rhus verniciflua* STOKES)

이라하여 한방에서는 구충, 복통, 통경, 변비 등에 그리고 닭과 함께 보신용으로 사용하고 있으며 일상생활에서는 도료 및 공업용으로 사용⁽¹⁷⁾하였다.

옷나무의 항산화활성 물질에 대한 연구는 옷나무의 에탄올 추출물을 쥐 뇌세포에 적용한 결과 가장 강한 항산화활성을 나타내었다는 연구결과⁽¹⁸⁾만 있을 뿐, 항산화활성 원인물질의 분리에 관한 보고는 거의 없는 상태이다. 이에 본 실험에서는 옷나무 75% ethanol 추출물의 항산화활성을 Rancimat을 이용하여 활성을 검색·비교하였으며, phenolic 성분을 중심으로 silica gel column chromatography를 실시하여 그 활성물질을 분리하였으며, 일반적으로 synergistic effect가 있다고 알려진 ascorbic acid, citric acid, δ -tocopherol을 동. 식물 유지에 적용, Rancimat을 이용하여 synergistic effect를 시험하였다.

재료 및 방법

재료

임상본초학⁽¹⁷⁾, 전통동양약물 데이터베이스⁽¹⁹⁾ 및 대한약전 외 한약 규격집⁽²⁰⁾등을 참고하여 검색한 후 안전성을 고려하여 식용 혹은 한약재로 사용하는 것을 실험 대상으로 하였다. 재료는 전주소재 한약방과 식품의약품 안전본부 육천 약용식물 재배시험장 등으로부터 제공받아 건조하여, 분쇄한 후 에탄올 추출용 시료로 사용하였다.

실험유지

항산화 실험에 사용한 유지는 항산화제가 첨가되지 않은 팜유와 돈지를 (주)농심에서, 대두유는 시판품(동방유량)을 구입, 냉동(-75℃) 보관하며 사용하였다.

시약

Ascorbic acid, δ -tocopherol, BHA(butylated hydroxyanisol), BHT (butylated hydroxytoluene) 및 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)는 Sigma사 제품, BF₃(Boron trifluoride methanol complex)는 BDH Laboratory supplies사 제품, TLC plate(silica gel 60 F₂₅₄, 두께 0.2 mm)와 silica gel 60(70~230 mesh)은 Merck사 제품을, 그리고 용매 및 기타 시약은 특급 또는 1급품을 사용하였다.

사용기기

Rancimat 679(METHROHM AG, CH-9100 Heris, Switzerland), GC-17A (Shimadzu, Japan), UV spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan), UV lamp(spectro line, Japan)

항산화 활성 물질의 추출

1,000 mL의 등근바닥 플라스크에 곱게 분쇄한 시료를 넣고 5배 정도의 75% 에탄올을 첨가하여 환류냉각관을 부착하였다. 이들을 수욕상(78±5℃)에서 3시간 가열, 추출 후 여과하고, 그 여액을 45℃에서 감압농축 하였다. 에탄올 추출물 중의 가용성 고형분 함량은 농축물 1 mL를 105℃에서 건조 하고, 증발 잔사의 양으로부터 계산하였다.

항산화 활성 측정

대상식물에서 추출한 에탄올 조 추출물을 든지, 팜유에 각각 2.5 g에 대해 1,000 ppm 수준으로 첨가하고 Rancimat을 이용하여, 임 등⁽¹¹⁾의 방법에 준하여 AI(Antioxidant index: 각 항산화제를 첨가한 실험구의 유도기간을 무첨가구의 유도기간으로 나눈 값)로 항산화력을 비교, 측정하였다.

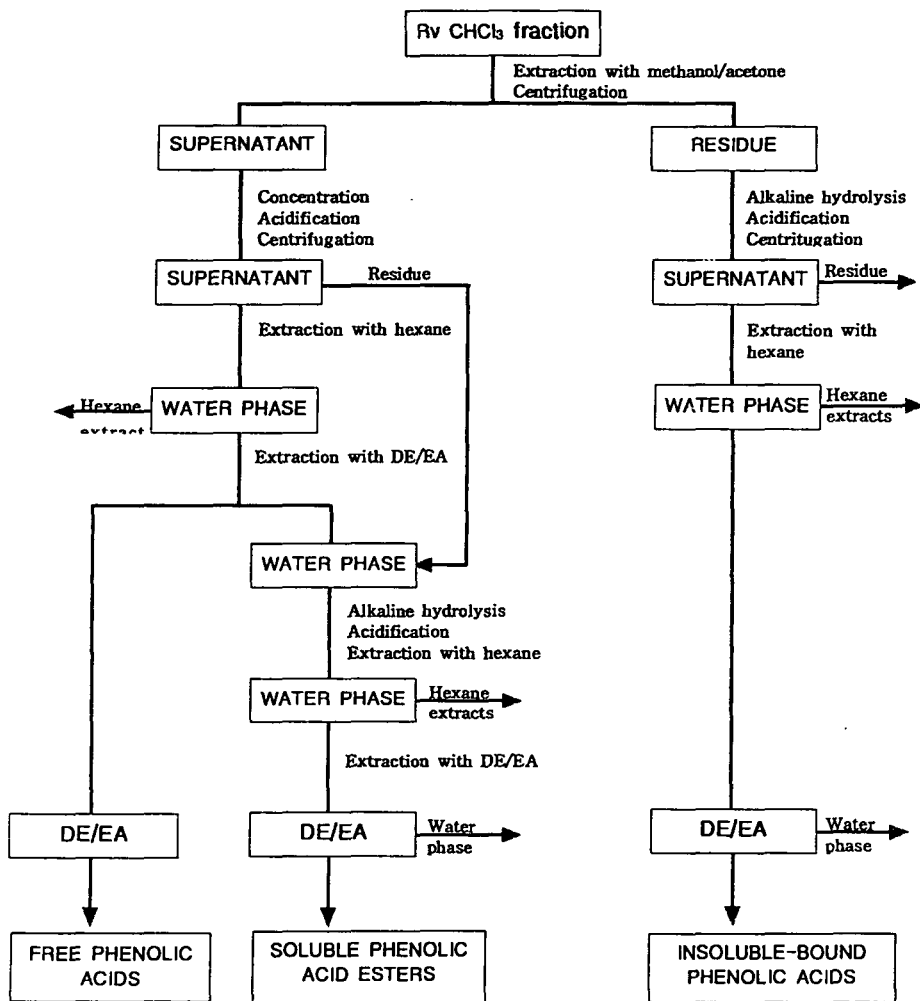
추출물의 분획

1) 용매에 의한 순차분획

임 등⁽¹¹⁾의 방법으로 분획하였다. 즉 용매의 극성 정도에 따라 4배량의 헥산을 가하고 소량의 증류수를 첨가, 진탕(20 min, 250 rpm)하여 헥산 분획물을 얻고(3회 반복), 물층을 다시 동일한 방법으로 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올을 순차로 가하여 클로로포름, 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물을 각각 얻었다. 각 분획물은 감압농축기(45℃)와 진공건조기(45℃)를 사용하여 용매를 완전히 제거한 후 메탄올에 녹여 항산화활성 실험에 사용하였다.

2) 페놀성화합물의 분리

활성이 높은 클로로포름 분획물을 페놀성화합물을 중심으로 Kozlouaka 등⁽²¹⁾과 Krygier 등⁽²²⁾의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 분리하였다. 즉 20 g의 옷나무 클로로포름 분획물을 같은 농도의 메탄올과 아세톤 동량의 400 mL로 3회 추출하여 여과하고 상징액을 200 mL로 농축하고 산 분해 후 상징액은 헥산 200 mL로 5회 추출하여 지질성분을 제거하였다. 물층은 디에틸에테르(DE)/에틸아세테이트(EA)(1 : 1)로 200 mL 6회 추출하여 DE/EA층을 무수황산나트륨으로 처리하여 잔여 수분을 제거하고 유리 페놀성산 성분으로 하여 시험재료로 하였다. 가용성 페놀성 에스터 성분은 산 분해 후 잔사에 4 N 수산화나트륨 200 mL 첨가하고 질소가스하 상온에서 4시간 가수분해 시킨 후 유리 페놀성산 성분과 같은 방법으로 분획하였다. 각 분획물은 용매추출물과 같은 방법으로 처리하여 활성을 시험하였다.



* DE/EA = diethyl ether/ethyl acetate (1 : 1, v/v)

Fig. 1. The schematic diagram of the separation of free phenolic acids, soluble phenolic acid esters and insoluble bound phenolic acids from *Rhus verniciflua* STOKES.

3) Silica gel column chromatography에 의한 분획

활성이 높은 유리 페놀성산 성분(6 g)을 column(3.6×80 cm)을 이용하여 gradient silica gel column chromatography(클로로포름/메탄올 = 40 : 1 → 클로로포름/메탄올/물 = 20 : 4 : 1, v/v/v) 실시하여 14개의 소분획을 얻었다. 분획물은 순차분획과 같은 방법으로 처리하여 항산화 활성 실험에 사용하였다. 그 중 활성이 강한 RCF-1, RCF-11과 RCF-13을 분리하였다(Fig. 2). RCF-11은 아세틸화하여 다시 RCF-11-1, RCF-11-2, RCF-11-3으로 분리하였고, RCF-13은 헥산/에틸아세테이트/메탄올(8 : 5 : 1, v/v/v)에서 RCF-13-1을 분리하였다.

Thin layer chromatography

Silica gel column chromatography하여 분리된 각 획분은 silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate(Merck)에 spotting한 후 column chromatography시 용출용매와 같은 용매 계로 전개하여 UV(254 nm, 365 nm) 흡수양상 및 20% 황산용액을 분무하여 발색시 나타나는 spot의 Rf값에 따라 column chromatography 용출물을 분취하여 항산화활성을 측정하였다.

Synergistic effect

웃나무에서 분리한 RCF-11에 일반적으로 synergistic effect가 있다고 알려진 ascorbic acid, citric acid, δ -tocopherol를 각각 200 ppm 수준으로 첨가하여 돈지, 팜유, 콩기름을 기질로 하여 Rancimat을 이용하여 synergistic effect활성을 시험하였다.

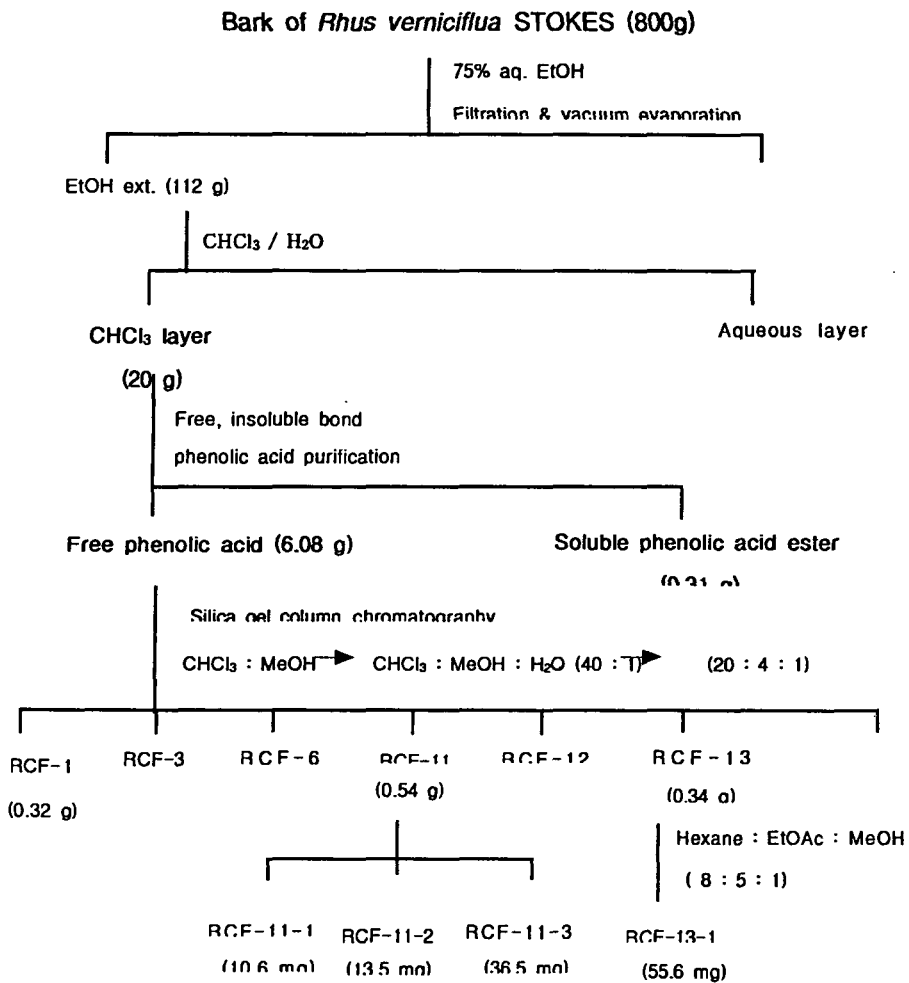


Fig. 2. Isolation of the antioxidative compounds from *Rhus verniciflua* STOKES.

결과 및 고찰

에탄올 추출물의 항산화활성 검색

각종 식물 추출물에 대한 항산화 효과를 antioxidative index(AI: 각 항산화제를 첨가한 실험구의 유도기간을 무첨가구의 유도기간으로 나눈 값)로 비교한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 보면 대부분의 한약재 추출물들이 모두 항산화 효과를 보여 각종 식물체는 양과 그 특성에 차이는 있겠으나 항산화성 물질들을 대부분 함유하고 있음을 알 수 있다.

돈지를 기질로 하였을 때 항산화 활성을 보인 에탄올 추출물의 AI를 살펴보면 건강 3.18, 건칠 5.18, 구맥 3.90, 금권초 3.89, 옥두구 4.20등이 다른 생약 추출물들보다 비교적 높은 항산화력을 나타내었으며, 팜유를 기질로 하였을 때 에탄올 추출물의 AI는 건강 1.50, 건칠 1.74, 구맥 1.51, 금권초 1.53, 옥두구 1.05를 나타내어 상당수의 추출물들이 식물성 유지 보다는 동물성 유지에 보다 항산화 효과가 있음을 알 수 있는데 이는 동물성 유지에는 존재하지 않는 tocopherol과 같은 항산화성 물질이 식물성 유지에는 소량이나마 식물체 자체에 존재⁽²³⁾하여 항산화 효과를 나타내기 때문이다. 또한 동물성 유지와 식물성 유지에서 항산화 효과는 약간의 차이를 보였다. 이와 같은 현상은 칩뿌리 추출물⁽²⁴⁾, 더덕 추출물⁽²⁵⁾, 소목, 강진향 추출물⁽²⁶⁾에서도 같은 결과를 보였으며, 이는 식물성 기름에는 천연으로 들어있는 항산화제의 영향과 유지 자체의 특성으로 알려지고 있다.

이들 실험한 대상 식물 추출물 중 건칠 즉 윗나무 수피 추출물의 경우 모든 추출물 중 가장 높은 항산화 효과를 나타내어서 윗나무에는 유지의 산화억제력이 뛰어난 물질이 존재하는 것으로 추정되었다.

따라서 본 연구에서는 동, 식물성 유지에 뛰어난 항산화 효과가 있는 것으로 확인된 윗나무를 대상으로 그 활성물질의 분리를 시도하였다.

Table 1. Antioxidative activity of the ethanol extracts from various medicinal plants on lard and palm oil

Korean name	Scientific name	Part used	AI ¹¹	
			Lard	Palm oil
가시오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i> Seem	stem	1.43	1.15
감국	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	flower	1.20	1.13
감송향	<i>Nardostachys chinensis</i> Batal	root	1.93	1.00
건강	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	root	3.18	1.50
건지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboch	root	1.05	1.09
건칠	<i>Rhus verniciflua</i> STOKES	stem	5.18	1.74
검인	<i>Euryale ferox</i> Salisbury	seed	1.18	1.22
계백부자	<i>Aconitum Koreanum</i> R. Raym	root	0.99	1.18
골담초	<i>Caragana sinica</i> Rehder	seed	1.34	1.18
구기자근피	<i>Lycium chinense</i> Miller	root	1.30	1.09
구맥	<i>Dianthus chinensis</i> L.	whole	3.90	1.53
구인	<i>Pericaeta communisma</i> Gete et Hatai	whole	1.05	1.24
구자	<i>Allium tuberosum</i> Rottler	seed	1.10	1.27
구절초	<i>Chrysanthemi Sibirici</i> Herba	whole	0.91	0.97
과루인	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Max	seed	0.91	1.27
광도인	<i>Prunus persica</i> L.	seed	1.51	1.07
권백	<i>Selaginella tamariscina</i> Spring	whole	1.23	1.23
규자	<i>Malva verticillata</i> L.	fruit	1.16	1.16
귤피	<i>Citrus unshiu</i> Marcorwicz	bark	1.05	1.29
그늘현삼	<i>Scaro phularia buergeriana</i> Miq	root	1.00	1.14
금권초	<i>Glechomo hederacea</i> var. <i>longituba</i> Nakai	whole	3.89	1.51
금모주척	<i>Citotium barometz</i> J.Sm	root	0.98	1.06
꽃향유	<i>Elsholtzia splendens</i> Nakai	whole	1.28	1.15
파리	<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>franchetii</i> Hort	fruit	1.37	1.15
남성	<i>Arisaema japonicum</i> BI	root	0.89	0.97
당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai	root	1.02	1.02

Table 1. Continued

Korean name	Scientific name	Part used	AI ¹⁾	
			Lard	Palm oil
대추	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>inermis</i> Rehder	fruit	0.99	1.21
동진피	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hnce	bark	1.04	1.19
만삼	<i>Codonopsis pilosula</i> NANNF.	root	1.09	1.21
맨드라미	<i>Celosia cristata</i> L.	flower	1.26	1.11
박하	<i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i>	leaves	1.07	1.01
방기	<i>Sinomenium acutum</i> Rehder, et Wils	root	0.82	0.92
사삼	<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i> Hara	root	1.19	1.13
상글피	<i>Citrus uvshiu</i> Marcorwicz	bark	1.05	1.29
선인장	<i>Lycium Chinense</i> Mill	stem	1.05	0.98
시호	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	root	1.13	1.11
오갈피	<i>Acanthopah Sessiliflorum</i> Seeman	bark	1.02	1.07
오매	<i>Prunus mume</i> Sieboid et Zucc	fruit	1.25	1.07
육이인	<i>Prunus humilis</i> Bunge	seed	1.02	0.99
육두구	<i>Myristica fragrans</i> Houttuyn	fruit	4.20	1.05
음양곽	<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	leaves	0.99	1.15
인동	<i>Lonicera japonica</i> Thunberg	stem	1.24	1.08
자완	<i>Aster tatarricus</i> L.	root	1.07	0.98
지검승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom	fruit	1.88	1.17
지우	<i>Poncirus trifoliata</i> Raf	leaves	1.04	1.14
지유근	<i>Sanguisorba officinalis</i> Linne	root	1.09	1.06
천마	<i>Gastrodia elata</i> Blume	root	1.11	1.13
천초	<i>Rubia akane</i> Nakai.	root	0.98	1.00
초용담	<i>Gentiana scabra</i> Bunge	flower	0.98	1.01
치자	<i>Gradenia jasminoides</i> Ellis	fruit	1.16	1.13
택사	<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk	leaves & stem	0.95	1.01
통길경	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle	root	1.18	1.22

Table 1. Continued

Korean name	Scientific name	Part used	AI ¹⁾	
			Lard	Palm oil
할미꽃	<i>Pulsatilla koreana</i> Nakai	root	1.11	1.10
황기	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	root	0.97	1.04
현초	<i>Geranium thunbergii</i> siebold et Zuccarini	stem	1.31	1.10

¹⁾: AI(antioxidant index) was expressed as induction period of oil containing various plant extracts/induction period of natural oil. Induction period of oil was determined by Rancimat method at 120°C. Each extract, 1,000 ppm, was added and aerated at 20 L (air)/1 hr.

옷나무 분획별 항산화 활성

팜유와 돈지에 대하여 항산화 효과가 우수한 옷나무 수피 에탄올 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 등의 용매로 순차 분획하여 각각 돈지와 팜유에 첨가하여 Rancimat method로 항산화 효과를 비교한 결과는 Table 2와 같다. 옷나무의 각 용매별 추출물의 항산화력은 두 유지에서 모두 클로로포름>에틸아세테이트>물>부탄올 순이었다. 클로로포름 분획물을 함량별로 첨가한 결과는 Table 2와 같은데 돈지에 대하여 200 ppm에서 AI가 5.09 및 600 ppm 에서 9.47로 무첨가구와 비교한다면 10배 이상 항산화 개선 효과가 있었다. 팜유에 대해서도 200 ppm에서 AI가 1.34 및 600 ppm 에서 1.99로 무첨가구와 비교해 보면 2배 정도 항산화 개선 효과가 있었다. 끈적끈적한 gum 성분이 함유된 클로로포름 농축물은 600 ppm 첨가시 돈지 및 팜유에서 각각 AI 9.47 및 1.99로 활성이 우수하였으며, 농도가 증가됨에 따라 그 유도기간도 비례적으로 증가하는 것을 확인하였다.

Table 2. Antioxidative activity of each fraction of 75% ethanol extract of *Rhus verniciflua* STOKES by concentration on oil

Fraction	Lard			Palm oil		
	200 ¹⁾	400	600	200	400	600
Crude extract	4.32 ²⁾	4.98	6.02	1.24	1.36	1.79
Chloroform	5.09	7.12	9.47	1.34	1.75	1.99
Ethyl acetate	1.90	2.01	2.12	1.13	1.30	1.42
Butanol	1.07	1.11	1.15	1.07	1.10	1.12
Water	1.15	1.50	1.92	1.12	1.15	1.19

¹⁾: Concentration added of each fraction. (ppm)

²⁾: Refer to the footnote of Table 1.

클로로포름 분획물을 페놀성화합물을 중심으로 용매 분획하여 유리 페놀성산, 가용성 페놀성산 에스터로 나누고 돈지, 팜유에 각각 농도를 달리하여 적용한 것과 일반적으로 많이 사용되고 있는 합성항산화제인 BHT 및 BHA와 항산화 활성 정도를 비교한 결과는 Table 3와 같다. Table 3에서 보면 600 ppm에서 유리 페놀성산 성분의 활성이 가용성 페놀성산 에스터보다 돈지에서는 약 3배, 팜유에서는 1.5배 정도 우수하였다. 유리 페놀성산 성분은 노란색을 띄었고, 600 ppm 첨가시 돈지, 팜유, 콩기름의 세 기질에서 각각 AI 8.65, 2.46, 1.97로 농도가 증가함에 따라 활성이 비례적으로 증가하였으며, 같은 농도에서의 BHT, BHA에 비해 돈지에서 각각 5배, 2.5배 정도 우수하였고, 팜유에서는 2배 정도로 유도기간이 연장되었다. 클로로포름 분획물을 페놀성 성분별로 용매분획 하였을 때 TLC, UV를 통해 확인한 결과 활성물질은 순도가 증가하면서 활성이 증가되고 분리가 용이하였다. 최 등⁽²⁷⁾은 겨자 추출물에서 가용성 페놀성산 에스터의 항산화 효과가 우수하고, 그 다음이 유리 페놀성산형이었다고 보고하였으며, 김 등⁽¹⁶⁾은 오배자 메탄

Table 3. Antioxidative effect of free phenolic acid and soluble phenolic acid ester of chloroform fraction of 75% ethanol extract of *Rhus verniciflua* STOKES on lard and palm oil

Fraction	Lard			Palm oil		
	200 ¹⁾	400	600	200	400	600
Free phenolic acid	4.29 ²⁾	6.14	8.65	1.62	2.02	2.46
Soluble phenolic acid ester	1.74	2.30	2.63	1.26	1.33	1.51
BHT	1.52	1.62	1.74	1.02	1.10	1.13
BHA	2.57	3.14	3.54	1.03	1.07	1.10

^{1,2)}: Refer to the footnote of Table 1.

을 추출물에서 불용성 페놀성산이 가장 항산화효과가 있었다는 보고와는 차이가 있었다. 이는 대상 식물에 따른 활성물질이 차이가 있다는 것을 알 수 있다.

활성이 증가된 분획물(RCF)을 silica gel column chromatography 하여 용매계 (클로로포름/메탄올 = 40 : 1 → 클로로포름/메탄올/물 = 20 : 4 : 1, v/v/v)를 이용, 14개의 획분으로 분리하였다. 진공건조 후 메탄올에 용해시킨 획분을 200 ppm 수준으로 돈지와 팜유에 첨가하여 Rancimat method로 획분별 항산화 효과를 비교한 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서 보면 클로로포름/메탄올 = 40 : 1(v/v)의 용매계에서 RCF-1을 분리하였고, 비교적 극성쪽의 클로로포름/메탄올/물 = 20 : 4 : 1(v/v/v) 용매계에서 활성이 우수한 RCF-11과 RCF-13을 분리하였다. RCF-1은 UV 365 nm에서 파란 형광을, 254 nm에서 갈색을 보였으며, 황산 발색시 갈색 반점을 나타내었다. RCF-11은 UV 365 nm, 254 nm에서 갈색을, 10% 황산발색시 붉은색을 나타내었다. RCF-13은 UV 365 nm에서 노란색, 254 nm에서 갈색을, 10% 황산용액으로 발색시 노란색을 나타내었다. UV spectrophotometer를 이용하여 scanning한 결

과, RCF-1은 342 nm, RCF-11은 380 nm에서 흡수밴드를 보였으며, RCF-13은 395 nm에서 흡수밴드를 보였다. 0.2 N 수산화나트륨용액 한 방울 첨가하여 spectrum의 shift를 본 결과는 Table 5에서 보이는 것과 같이 40 nm 정도 흡수밴드가 이동되었다. 단파장에서 흡수되고, shift되는 것으로 보아 옷나무의 항산화활성을 보이는 물질은 carbonyl기를 가지는 flavanone이나 flavone계 화합물로 추정⁽²⁸⁾할 수 있었다.

Table 4. Antioxidative activity of fraction RCF-1~RCF-14 obtained by column chromatography of free phenolic acid fraction of *Rhus verniciflua* STOKES on lard and palm oil

Fraction ²⁾ (200 ppm)	Antioxidative index ¹⁾	
	Lard	Palm oil
RCF-1	3.91	1.29
RCF-2	3.72	1.19
RCF-3	3.29	1.13
RCF-4	2.10	1.11
RCF-5	1.99	1.02
RCF-6	2.35	1.06
RCF-7	1.82	1.02
RCF-8	1.92	1.07
RCF-9	1.95	1.15
RCF-10	2.71	1.19
RCF-11	5.57	1.53
RCF-12	6.19	2.14
RCF-13	4.64	1.43
RCF-14	2.51	1.33

1): Refer to the footnote of table 1.

2): Elution condition of silica gel column chromatography(CHCl₃ : MeOH
→CHCl₃ : MeOH : H₂O = 40 : 1 → 20 : 4 : 1, v/v/v).

Table 5. UV-vis spectral data for fraction of free phenolic acid from *Rhus verniciflua* STOKES separated by silicagel column chromatography

Fraction	$\lambda_{max}, nm^{1)}$	$\Delta \lambda nm^{2)}$
RCF-1	342.50	40
RCF-11	380.00	45.5-55.5
RCF-13	395.00	45-55

1): Main peak, solvent : MeOH.

2): Spectrum shift, 2 N NaOH 1~2 drop.

Synergistic effect

항산화활성이 가장 높게 나타난 RCF-11에 기존에 항산화작용이 있다고 알려진 ascorbic acid, citric acid 및 δ -tocopherol 200 ppm을 첨가한 후 분획물의 농도를 달리해가며 돈지, 팜유, 콩기름에서 상승효과를 Rancimat에서 본 결과는 Fig 3, 4 및 5와 같다.

동일한 Rancimat 조건에서 돈지를 기질로 한 것을 보면, δ -tocopherol (400 ppm)만 첨가하였을 때 AI가 4.72인데 비해 RCF-11(200 ppm)과 δ -tocopherol(200 ppm)을 첨가하였을 때 AI가 8.18로 항산화효과가 2배 정도 상승되는 결과를 보였다. 팜유를 기질로 했을 때에도 마찬가지로 ascorbic acid(400 ppm)만 첨가하였을 때 AI가 2.02인데 비해 RCF-11(200 ppm)과 ascorbic acid (200 ppm)을 첨가하였을 때 AI가 3.09로 1.5배 정도 상승효과가 있었다. RCF-11 분획물의 첨가량이 증가함에 따라 AI도 비례적으로 증가하였으며, 돈지에서는 δ -tocopherol(200 ppm)과 RCF-11(600 ppm)의 AI가 14.28로 활성이 우수하였으며, 팜유와 콩기름에서는 ascorbic acid(200 ppm)와 RCF-11(600 ppm)의 AI가 각각 3.46 및 3.20으로 활성이 우수하였다. 이 결과는 임 등⁽¹¹⁾의 소목 추출물에서의 유지에 따라 항산화활성 상승정도의 차이가 있음을 보인 결과와 일치한다. 동물성 유지인 돈지가 식물성유지

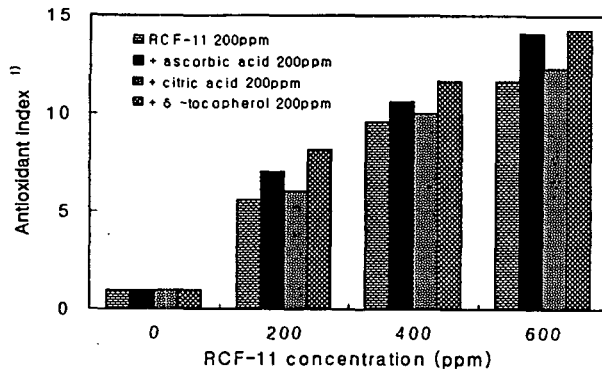


Fig. 3. Synergistic effect of several synergists on antioxidative activity of RCF-11 isolated from free phenolic acid fraction of CHCl_3 fraction obtained from *Rhus verniciflua* STOKES on lard.

¹⁾: Refer to the footnote of Table 1.

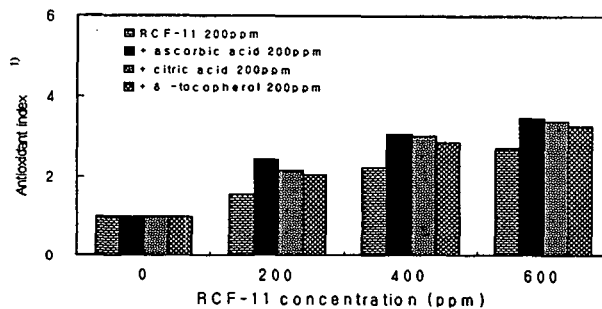


Fig. 4. Synergistic effect of several synergists on antioxidative activity of RCF-11 isolated from free phenolic acid fraction of CHCl_3 fraction obtained from *Rhus verniciflua* STOKES on palm oil.

¹⁾: Refer to the footnote of Table 1.

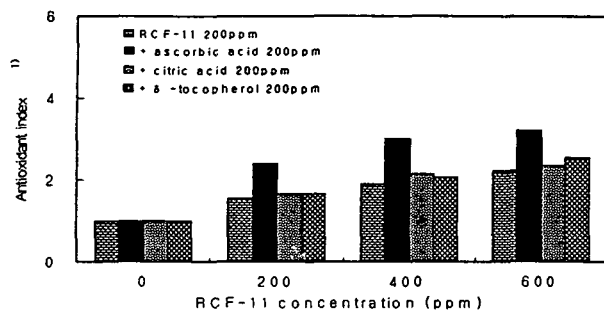


Fig. 5. Synergistic effect of several synergists on antioxidative activity of RCF-11 isolated from free phenolic acid fraction of CHCl_3 fraction obtained from *Rhus verniciflua* STOKES on soybean oil.

1): Refer to the footnote of Table 1.

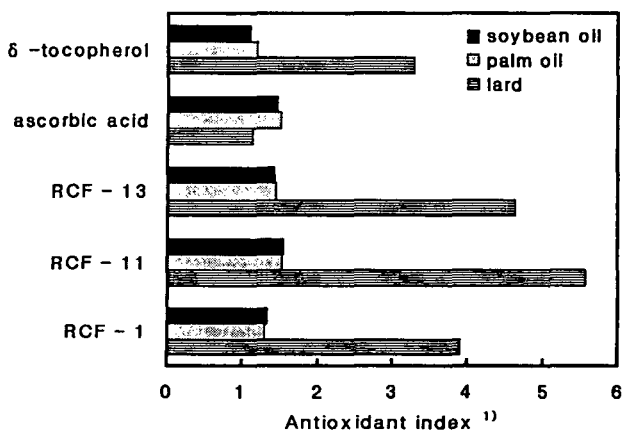


Fig. 6. Antioxidant activity of different fractions of free phenolic acid from *Rhus verniciflua* STOKES by silica gel TLC. Concentration of each sample was 200 ppm

1): Refer to the footnote Table 1.

인 팜유나 콩기름에 비해 높은 활성을 보이는 것은 식물성 유지에는 그 자체에 유지의 산패를 지연시키는 tocopherol이나 phospholipid같은 성분을 함유⁽²³⁾하고 있기 때문에 큰 지연효과를 보이지 않은 것으로 보인다. 또한 일반적인 현상인 동물성 유지와 식물성 유지에서 각 항산화제들의 활성이 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

일반적으로 많이 사용하고 있는 한약재 중 항산화효과가 있는 대상을 선별하였고 그 중 효과가 우수한 건칠을 대상으로 항산화물질을 분리, 효과를 측정하였다. 건칠(*Rhus verniciflua* STOKES)은 윗나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 윗나무(*Rhus verniciflua* STOKES)의 수액으로 한방에서는 구충, 복통, 통경, 변비의 목적으로 사용되어왔다. 윗나무 에탄올추출물은 돈지와 팜유를 기질로 Rancimat test에서 항산화효과가 인정되었으며, 용매의 극성을 각각 달리하여 분획하였을때 chloroform 층에서 항산화 활성이 가장 높았다. 이 분획물을 다시 phenolic compound를 중심으로 용매 분획한 후, 활성이 높은 free phenolic acid부분을 silica gel column chromatography하여 RCF-11 분획하였으며, 이 분획물을 돈지, 팜유 및 대두유에 각각 200 ppm 수준으로 첨가 하였을 때 AI(antioxidant index: 추출물을 넣은 유지의 유도기간을 기질유지의 유도기간으로 나눈 값)는 각각 5.57, 1.53 및 1.54를 나타내었다 이것은 같은 농도에서의 δ -tocopherol, BHT, BHA 보다 동물성유지인 돈지에서는 4배, 식물성유지인 팜유와 콩기름에서는 1.5배 정도 효과가 우수하였다. RCF-11에 항산화작용이 알려진 ascorbic acid, citric acid, δ -tocopherol 200 ppm을 첨가한 후 분획물의 농도를 달리해가며 동물성유지와 식물

성유지에 적용해보았다. 식물성유에서는 ascorbic acid를 첨가했을 때 단독으로 사용했을 때보다 AI가 1.5배 정도 상승효과가 있었으며, 동물성유에서는 δ -tocopherol를 첨가했을 때 단독으로 사용했을 때보다 AI가 2배 정도 상승하였다. Rancimat을 통해 항산화활성이 확인 된 옷나무 75% ethanol 추출물의 free phenolic acid 성분은 TLC, UV spectra를 통해 본 결과 flavanone이나 flavone계 화합물로 추정되며, 앞으로 그 원인물질에 대한 구조동정이 요구된다.

제 7 절 섬바디로부터 분리된 Falcarindiol과 유화제와의 혼합에 따른 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균 상승효과

서 론

식중독을 일으키는 병원균의 일종인 *Listeria monocytogenes*(Lm)는 저온에서도 증식 가능한 psychrotroph로서 증식범위가 2.5~44℃ 이고 적정 pH는 5.6~9.8이며 높은 염 농도에서도 생존가능하며⁽¹⁾ 낮은 온도에서 저장된 유가공 식품에서 증식할 수 있다⁽²⁾. 이 Lm은 자연에 널리 분포되어 있고 인체내에서 뇌막염, 뇌염, 패혈증, 결막염, 유산, 사산과 경우에 따라서는 정신병까지 유발할 수 있고 심하면 사망하게 된다. Lm에 의한 식중독의 증상은 건강한 성인에게는 잘 나타나지 않고 임산부, 태아, 신생아, 노인 그리고 면역적으로 약한 사람에게 주로 나타난다⁽³⁾. 적은 양으로도 식중독에 걸릴 수 있는 이 Lm의 식품중 검출에 대한 연구로 Silvia 등은 Brazil의 Rio de Janeiro에서 생산된 치즈에서 Lm의 출현을 보고⁽⁴⁾하여 경각심을 불러 일으켰고, Lm의 열 저항성을 관찰하였으며^(5,6), Kim 등은 유가공 식품에 쉽게 오염이 되므로 식품을 생산하는 동안 Lm을 임상적으로 조절하고자 사멸 온도와 시간을 연구⁽⁷⁾하였다. Lm에 대한 유기산들에 의한 증식 저해 정도를 관찰⁽⁸⁾하였으며, Nisin⁽⁹⁾, *Carnobacterium piscicola*와 *Enterococcus faecium*에 의해 생성된 bacteriocin^(10,11), 가자육, 금앵자, 옥두구 등의 에탄올 추출물⁽¹²⁾, 고삼⁽¹³⁾, 감초⁽¹⁴⁾, 상백피⁽¹⁵⁾, 단삼⁽¹⁶⁾등 식물 추출물에 의해 분리된 phenolic compound와 식물 정유 성분⁽¹⁷⁾, 금속이온과 sodium polyphosphate에 의해 Lm의 성장이 저해⁽¹⁸⁾되었다. Thayer 등은 Lm이 사멸하는 적절한 방사선 조사량과 온도를 연구⁽¹⁹⁾하였고,

Juven 등은 진공 포장된 ground beef에 젖산균을 증식시켜 L_m 을 2 log cycle 감소시켰다고 보고⁽²⁰⁾하였다. 한편 유화제에 의해 증식억제 현상을 구명한 연구들도 있는데 유화제는 천연식품을 비롯하여 가공식품 및 모방식품의 물리화학적 성질에 중요한 역할을 담당하는 식품첨가물의 일종으로 식품의 점성, 조직, 입안의 촉감 등에 영향을 미친다⁽²¹⁾. 유화제의 종류로는 글리세린 지방산 에스테르, 솔비탄 지방산 에스테르, 자당 지방산 에스테르 등이 있는데 이중 글리세린 지방산 에스테르 즉, monoglyceride는 천연유지 중에도 1%이하 함유되어 있고, 유지의 조리, 가공과정에서도 생성된다. 또한 유지를 섭취했을 때 약 2/3는 분해되고 monoglyceride로 흡수되어, 유지의 한 성분으로 생각하는 쪽이 좋고, 실제 서독에서는 식품첨가물이라 하지 않고 식품으로서 취급되고 있었던 적도 있다. 또한 미국에서도 GRAS로 분류되어 있으며 FAO/WHO의 ADI도 제한이 없다고 되어 있다⁽²²⁾. 또한 저급지방산에스테르(MC₆-MC₁₈)가 항균성이 있다고 보고되고있는데 특히 MC₁₀(monocapriate), MC₁₂(monolaurate), MC₁₄(monomyristate)가 곰팡이, 효모 및 세균에 대한 항균성이 우수하였다는 보고가 있다^(2,22,23).

본 실험에서는 항균 활성 물질과 유화제의 상승효과에 대한 보고가 미비하여, 항균성이 대단히 우수한, 섬바디로부터 본 실험의 연구자들이 분리한 polyacetylene계 물질인 falcarindiol⁽²⁴⁾과 항균성이 있는 유화제인 monoglyceride 중 monolaurate(MC₁₂)와 monomyristate(MC₁₄)와의 상승효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

재 료

Falcarindiol은 고창지역에서 자생하는 식용식물인 섬바디로부터 분리⁽²⁴⁾하였

고, 유화제는 Sigma 사의 monolaurate(MC₁₂), monomyristate(MC₁₄)을 사용^(2,23)하였다.

실험균주 및 배지

항균 활성 시험에 사용한 미생물과 배지는 Table 1과 같다.

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganism tested	Media used	Incubation (°C)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Tryptic soy broth & agar(Difco)	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313		

흔탁도 측정

미생물 증식에 따른 흔탁도 측정을 위해 Bioscreen C(Labsystem, Oy, Helsinki, Finland)를 이용^(25,26)하였다.

Monoglyceride의 증식억제 효과⁽²⁷⁾

Monoglyceride는 monolaurate(C₁₂), monomyristate(MC₁₄, Sigma사)를 무수 에탄올에 녹여^(2,23)(에탄올 농도는 1%) 일정농도를 만들어 사용하였다. 시험 균주가 접종된 사면배지에서 1백급이를 취해 10 mL 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양시킨 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양시켰다. 이 균주 배양액 0.1 mL를 monoglyceride를 일정농도(ppm)로 첨가한 액체배지에 접종한 후, Bioscreen C를 이용^(25,26)하여 30°C에서 72시간 동안 2시간 간격으로 600 nm에서 흔탁 정도를 측정하여 증식억제 효과를 비교하였다. 이때 첨가되는

용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 처리농도와 동일하게 에탄올만을 첨가한 대조구를 설정하여 증식정도를 비교하였다.

Falcarindiol과 Monoglyceride와의 synergistic effect

배지 10 mL에 falcarindiol과 monoglyceride와의 최소 저해 농도(MIC)와 그 이하의 일정농도를 첨가하여, monoglyceride의 증식억제 효과를 관찰하는 방법과 동일하게 실험하였다.

정제된 소분획의 살균효과⁽²⁷⁾

각 균주가 배양된 사면배지에서 1백금이씩 취해 액체배지 10 mL에 접종, 30℃에서 24시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 falcarindiol과 monoglyceride 혼합물이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 30℃에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 표준평판한천 배양법에 의해 생균수를 계수하고 같은 방법으로 균주배양액 0.1 mL의 생균수를 계수하여 초기 접종균수를 구했다. 처리구와 동일 농도로 에탄올만을 가한 것을 대조구로 하였다.

결과 및 고찰

Monoglyceride(MG)의 *L. monocytogenes*에 대한 증식억제 효과

낮은 농도에서도 우수한 항균효과를 나타내는 monolaurate(MC₁₂)와 monomyristate(MC₁₄)를 사용하여 세 가지 농도(50 ppm, 25 ppm, 10 ppm)로 액체배지에 첨가하여 균의 증식억제 효과를 비교해 본 결과는 Fig. 1~5과 같다.

실험한 *Listeria* 5균주 모두에 대하여 MC₁₂와 MC₁₄의 10 ppm 농도는 Lm의 증식을

저해시키지 못했으며, MC₁₂의 25 ppm 농도에서는 ATCC 19111, 19112, 19114, 15313에 대하여 성장억제를 시켰고(Fig. 1, 2, 4, 5), ATCC 19113은 증식 억제되다가 60시간 이후 성장하였다(Fig. 3). MC₁₄의 25 ppm 농도에서 ATCC 19111은 24시간 후에 증식했으며(Fig. 1), ATCC 19112, 19113은 36시간 이후부터 성장(Fig. 2, 3)하였고, ATCC 19114와 15313에 대하여는 72시간 배양하는 동안 성장을 억제시켰다(Fig. 4, 5). 이 결과는 Wang 등의 보고^(2,23)와 같은 경향을 보이고 있다.

계면활성제의 항균작용 기구에 대해서는 우선 계면활성제가 균의 표면에 흡착해 세포벽의 정상적인 작용을 방해한 후, 세포 내에 침투하여 효소를 불활성화시키고, 핵산이나 단백질을 변성시켜 세포성장을 저해시키고^(2,22), 이에 따라 항균제가 세포 표면에 흡착해, 세포 내부에 쉽게 침투하여 세포를 사멸시키는 것으로 추측하고 있는데, monoglyceride의 경우 세포질 내부까지 깊이 침투하는 것이 아니라 그 세포 표면에 나타나 세포막의 구조변화를 일으키고, 그 기능을 저해함으로써 세포를 사멸시킨다고 보고⁽²²⁾ 되고 있다.

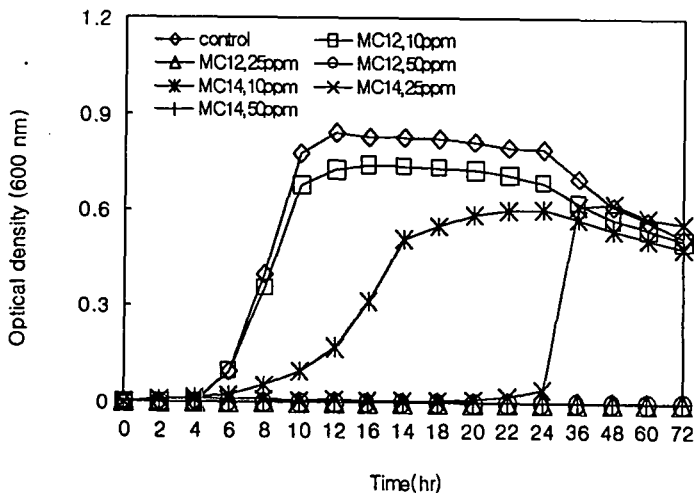


Fig.1. Growth inhibition by monolaurate(MC₁₂) and monomyristate (MC₁₄) on *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

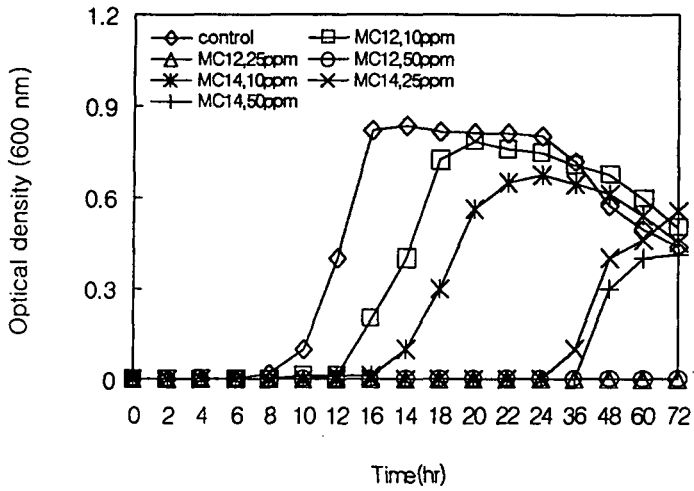


Fig.2. Growth inhibition by monolaurate(MC₁₂) and monomyristate (MC₁₄) on *Listeria monocytogenes* ATCC 19112.

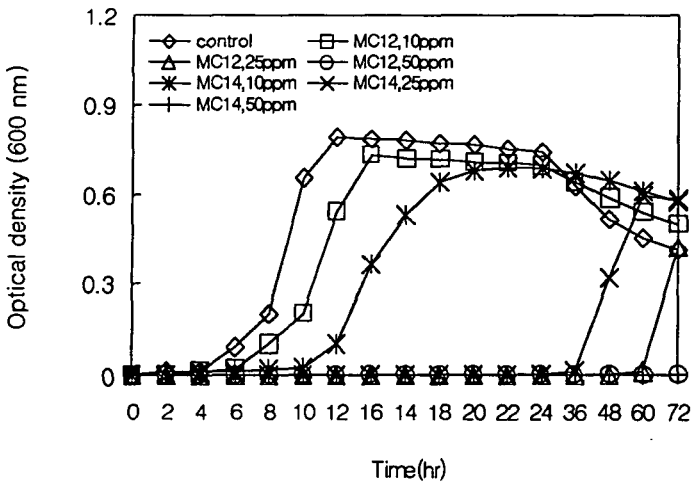


Fig.3. Growth inhibition by monolaurate(MC₁₂) and monomyristate (MC₁₄) on *Listeria monocytogenes* ATCC 19113.

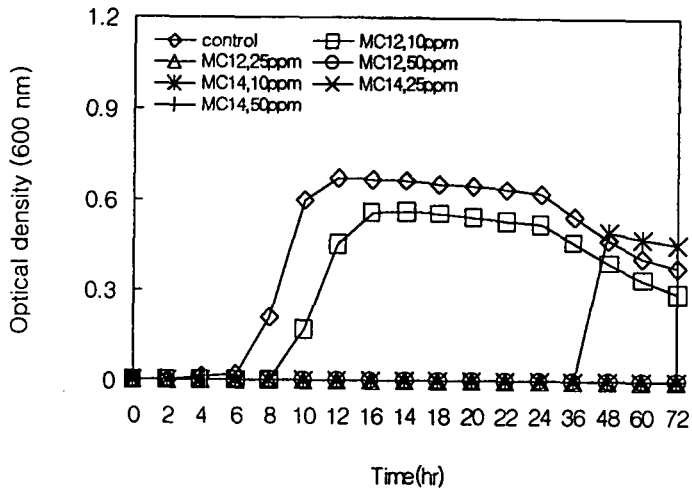


Fig. 4. Growth inhibition by monolaurate(MC₁₂) and monomyristate (MC₁₄) on *Listeria monocytogenes* ATCC 19114.

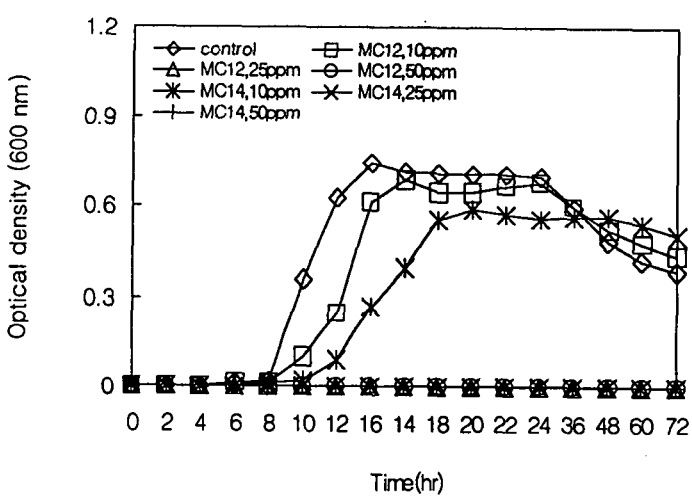


Fig. 5. Growth inhibition by monolaurate(MC₁₂) and monomyristate (MC₁₄) on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

Falcarindiol과 Monoglyceride의 혼합물의 혼탁도 비교

앞서 실험한 결과를 기초로 monolaurate(MC₁₂) 와 monomyristate(MC₁₄)의 MIC인 25 ppm과 *Listeria*의 성장을 억제시키지 못한 10 ppm, 그리고 섬바디로부터 분리된 falcarindiol⁽²⁴⁾의 10 ppm, 30 ppm을 각각 배지에 첨가하여 상승효과를 관찰한 결과는 Table 2, 3과 같다.

Falcarindiol 단독으로 사용하였을 때 증식억제 현상을 관찰할 수 없었던 농도 (10 ppm)⁽²⁴⁾에서 monoglyceride와 falcarindiol 두 물질을 혼합하였을 때, 실험한 모든 *Listeria monocytogenes* 5균주에 대하여 혼탁도가 보이지 않는 아주 탁월한 증식억제 효과를 나타냈다.

Falcarindiol과 Monoglyceride의 혼합물의 살균효과

액체배양법에서 혼탁도 측정은 균의 증식양상을 알 수 있으나 정확한 항균정도를

Table 2. Effect of the combined use of monolaurate(MC₁₂) and falcarindiol isolated from *Dystaenia takesimana* Kitagawa on the growth of *L. monocytogenes*.

MC ₁₂ (ppm)	Falcarindiol (ppm)	<i>L. monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
25	30	++ ¹⁾	++	++	++	++
	10	++	++	++	++	++
10	30	++	++	++	++	++
	10	++	++	++	++	++
Control		- ²⁾	-	-	-	-

¹⁾ ++ : O.D. (optical density) value is zero after 3 days.
(very strong inhibition)

²⁾ - : *L. monocytogenes* grow to >10⁷ CFU/g after 3 days.

Table 3. Effect of the combined use of monomyristate(MC₁₄) and falcarindiol isolated from *Dystaenia takesimana* Kitagawa on the growth of *L. monocytogenes*

MC ₁₄ (ppm)	Falcarindiol (ppm)	<i>L. monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
25	30	++ ¹⁾	++	++	++	++
	10	++	++	++	++	++
10	30	++	++	++	++	++
	10	++	++	++	++	++
Control		- ²⁾	-	-	-	-

1), 2) See the foot note of Table 2

확인할 수 없기 때문에 이를 보완하기 위해 섬바디로부터 분리된 falcarindiol⁽²⁴⁾을 30 ppm 및 10 ppm, monoglyceride를 25 ppm 및 10 ppm을 각각 혼합, 배지에 첨가하여 72시간동안 배양하면서 24시간 간격으로 생균수를 계수하면서 살균효과를 관찰한 결과는 Fig. 6~9와 같다.

초기 접종 균수는 10⁵~10⁶ CFU/mL이었으며 균종에 따라 차이는 있지만 24시간 배양한 후 전체적인 균수 변화를 살펴보면, 대조구는 10² CFU/mL 증가한 반면 falcarindiol 10 ppm과 monolaurate 25 ppm이 첨가된 처리구에서 ATCC 19111의 균수는 10¹ CFU/mL이었으며(Fig. 6), falcarindiol 10 ppm과 monolaurate 10 ppm이 첨가된 처리구에서는 ATCC 19114에 대하여 균수의 변화가 없는 정균현상이 나타났다(Fig. 7). 그 이외 처리구, 즉 falcarindiol을 30 ppm 및 10 ppm과 monolaurate의 10 ppm 및 25 ppm 첨가했을때는 colony가 전혀 나타나지 않았다. 48시간 배양 후에는 falcarindiol 30 ppm과 monolaurate 10 ppm이 첨가된 처리구에서 ATCC 19114에 대하여 10¹ CFU/mL의 균수가 관찰되었을 뿐 다른 처리구에서는 72시간 배

양하는 동안, 대조구는 2 log cycle 감소한 반면, *Listeria*의 colony를 발견할 수 없었다(Fig. 6, 7).

Fig. 8과 9를 보면 초기 접종 균수는 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL이었으며 ATCC 19111에 대하여 24시간 배양한 결과 falcarindiol 10 ppm과 monomyristate 25 ppm이 첨가된 처리구에서 10^2 CFU/mL의 균수가 관찰되었고(Fig. 8), 48시간 배양 후에는 falcarindiol 10 ppm과 monomyristate 10 ppm이 첨가된 처리구에서 1 log cycle 증가하였다. 그 이외의 처리구에서는 72시간 배양동안 colony를 발견할 수 없었다. *L. monocytogenes* ATCC 19114에 대하여는 72시간 배양 기간 동안 모든 처리구에서 *Listeria*의 colony가 발견되지 않았다(Fig. 9). 이 결과로 볼 때 falcarindiol과 monoglyceride의 혼합물은 *Listeria*를 사멸시키거나 정균 작용을 하여 단독으로 사용했을 때 보다 그 살균효과가 상승함을 확인하였다.

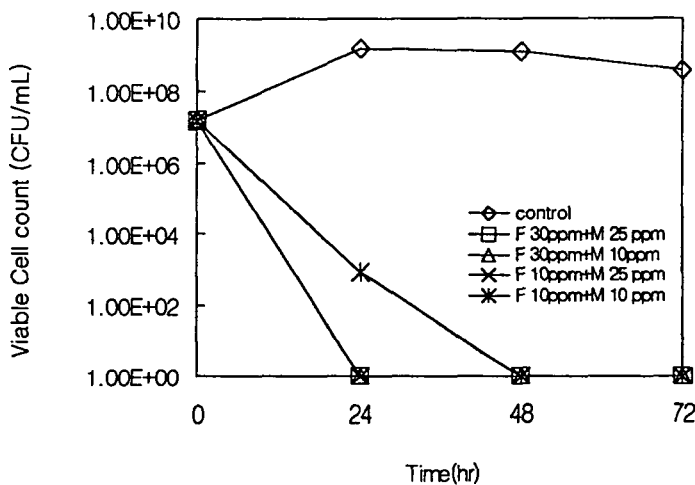


Fig. 6. Bactericidal effect of the combined use of monolaurate(M) and falcarindiol(F) isolated from *Dystaenia takesimana* Kitagawa on *L. monocytogenes* ATCC 19111.

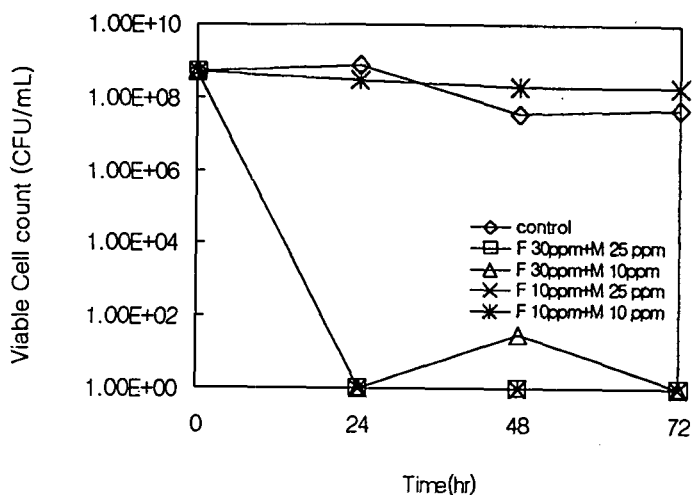


Fig. 7. Bactericidal effect of the combined use of monolaurate(M) and f alcarindiol(F) isolated from *Dystaenia takesimana* Kitagawa on *L. monocytogenes* ATCC 19114.

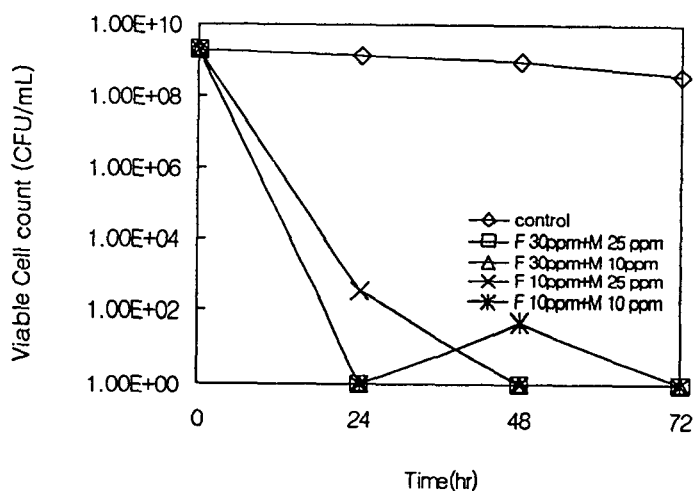


Fig. 8. Bactericidal effect of the combined use of monomyristate (M) and falcariindiol(F) isolated from *Dystaenia takesimana* Kitagawa on *L. monocytogenes* ATCC 19111.

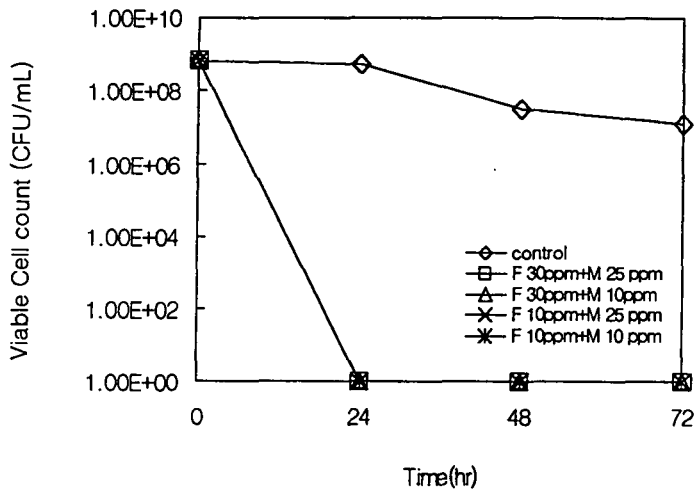


Fig. 9. Bactericidal effect of the combined use of monomyristate (M) and falcarindiol(F) isolated from *Dystaenia takesimana* Kitagawa on *L. monocytogenes* ATCC 19114.

균 증식을 억제하는 지방산은 물에 잘 녹는 것이거나, 세균 세포표면의 소수성 단백질, 혹은 지질에 영향을 미치는 소수성인 물질 일 것이며, chain이 짧은 지방산은 소수성을 감소시켜 용해도를 증가시킬⁽²³⁾ 수 있는데, 본 실험에서 Lm을 증식저해시킨 이유는 단독으로 사용한 falcarindiol이 monoglyceride에 의해 용해도가 증가하였기 때문이거나, 혹은 monoglyceride가 falcarindiol과 작용하여 세포의 생리 작용을 변화시켰기 때문일 거라 추측되었다. 이런 상승효과에 대한 항균기작에 대해서 보고된 자료가 없는 바, 더욱 깊이 있는 연구가 필요하다고 판단된다.

요 약

식용식물 섬바디에서 분리한 falcarindiol과 monoglyceride(MG)와의 상승효과를 실험하였다.

Falcarindiol 30 ppm 및 10 ppm과 MG 25 ppm, 10 ppm을 각각 배지에 첨가하여 Lm 5균주에 대한 혼탁도를 비교한 결과 4개의 처리구에서 시험된 모든 균에 대하여 혼탁도가 나타나지 않았다. 이 결과로 falcarindiol과 monoglyceride의 혼합물의 살균효과가 기대되어, tryptic soy broth에 혼탁도 비교시 사용한 동일 농도를 첨가한 후, Lm 2균주(ATCC 19111, ATCC 19114)를 배양시켜 24시간 간격으로 생균수를 확인한 결과 대조구는 초기 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL에서 72시간 배양결과 2 log cycle 증가하는 반면, 처리구는 72시간 배양결과 colony를 발견할 수 없었다. 이 결과를 볼 때 살균효과가 인정되었다.

이상의 결과로 섬바디로부터 분리된 falcarindiol과 monoglyceride와의 혼합물은 살균효과가 단독 사용시 보다 상승하였고, 합성 항균제보다 우수한 천연 항균제로서의 가능성이 있다고 평가된다.

제 8 절 섬바다로부터 *L. monocytogenes*의 생장억제

물질의 분리 및 동정

서 론

식품의 변질이나 부패는 일반적으로 물리화학적 변화와 미생물학적 변화로 크게 나눌 수 있으며 식품의 구성 성분이나 조건에 따라 조금의 차이는 있겠지만 물리화학적 변화보다는 미생물 작용에 의한 변질이 그 대부분을 차지하고 있다. 식품에서 부패성 및 병원성 미생물을 제거하기 위해 가열살균을 한다거나 냉동·냉장, 방사선처리, 그리고 화학 합성 보존제를 사용하여 미생물을 사멸 또는 증식억제를 시키고 있다. 이 방법 중 가장 많이 이용되고 있는 가열살균은 열 처리를 함으로 품질이 저하되고, 냉장·냉동의 경우 그 비용이 많이 들며 원료에 이미 균이 오염되어 있거나 유통과정중 온도의 관리가 허술할 경우 식중독이 발생할 수 있으며 보존제의 사용은 그 안전성의 논란 때문에 그 사용범위가 점차 줄어들고 있다. 이러한 문제점을 보완하기 위한 방법의 하나로 천연물을 이용하여 식품 저장기간 동안 신선함과 안전성을 지속시키려는 연구가 이루어지고 있다⁽¹⁾.

최근에는 식용식물로부터 항 미생물 물질을 분리하고 구조를 밝히는 연구가 활발히 진행되고 있는데 두릅수피에서 3,4-dihydroxybenzoic acid를 분리⁽²⁾하였고, 옥두구 과피에서 분리된 malabaricon B와 malabaricon C는 *B. subtilis*, *Streptococcus duranse*를 1~4 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 증식을 억제⁽³⁾시켰으며, *Myristica argentea*에서 분리된 diaryldimethylbutane lignans이 *Streptococcus mutans*을 25 ppm에서 증식 억제시켰고⁽⁴⁾, *Angelica dahurica*뿌리에서 분리된 분리물⁽⁵⁾이 항균활성을 나타낸다고 보고하였다. 약용식물인 *Aspidosperma marcgravianum* Woodson에서

는 alkaloid계 물질⁽⁶⁾을 *Maclura pomifera*의 과실에서 isoflavones을 분리⁽⁷⁾하였다. 위의 보고와 같이 천연물로부터 물질을 분리하고 규명하는 일은 인간에게 해가 없는 천연물을 이용함으로써 건강 지향적 소비패턴에 부응할 수 있고, 식품의 안전성에 기여할 수 있을 것이다.

섬바디(*Dystaenia takesimana* Kitagawa)는 산형과로 울릉도에서 나는 다년초이며 키는 1.5~2 m, 윗부분에 가지를 치고, 4~5개의 마디가 있으며 꽃은 흰색이며 산형화로서 원 줄기 끝과 가지 끝에 달리며, 개화기는 7~9월, 결실기는 8~10월이다. 이 섬바디는 식용과 약용으로 과실과 뿌리 이용하여, 益精, 養精神의 효과가 있다⁽⁸⁾.

본 실험에서는 예비실험에서 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균 효과를 확인한 결과를 바탕으로 미생물 증식억제 효과가 있는 물질을 분리하고 그 화학구조를 규명하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재 료

섬바디(*Dystaenia takesimana* Kitagawa)는 전북 고창지역에서 자생하는 것을 직접 채취하여 수세, 건조(40℃, 72시간), 분쇄하여 에탄올 추출용 시료로 사용하였다.

추 출

분쇄기로 마쇄한 시료에 5배 정도의 75% 에탄올을 혼합하여 환류냉각관이 부착된 플라스크에 넣고 85℃ 수욕상에서 3시간 가열, 추출 후 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator에서 농축하였다⁽⁹⁾.

에탄올 추출물의 분획

에탄올 추출물에 증류수 : 헥산 (1:1)을 가하여 헥산 분획물을 얻고(3회 반복) 이 분획물을 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차로 가하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 각각 얻었다. 각 분획물은 진공 농축기와 진공 건조기로 용매를 완전히 제거한 후 에탄올로 녹여 0.2 μ Seiz filter로 제균한 다음 항균효과 실험에 사용하였다⁽⁹⁾.

항균 활성물질의 분리 및 동정

섬바디 에탄올 추출물을 용매별로 순차 분획하여 얻은 각각의 분획에 대하여 항균활성을 확인하였고 항균활성과 얻어진 획분의 수율에 따라 Fig. 1과 같이 활성물질을 분리하였다. 헥산 분획물(15 g)을 silica gel(250 g, 70~230 mesh, Merck)이 헥산 : 에틸아세테이트(60 : 1)로 현탁 충전된 column(3.5 \times 45 cm)에서 극성을 단계적으로 증가시키는(60 : 1--> MeOH, v/v) step-wise 용출법으로 분리하여 10개의 획분(A1~A10)을 얻었고 이 중에서 활성과 수율이 우수한 A8로부터 활성물질을 분리하였다^(10,11).

획분 A8(0.7 g)은 다시 헥산 : 클로로포름 : 에탄올(8 : 5 : 1, 6 : 5 : 1, v/v)용매계로 silica gel column chromatography(2.5 \times 35 cm)하여 소획분(A8-1~A8-6)을 얻었고 이 중에서 항균 효과가 있는 A8의 4, 5획분을 혼합하여 헥산 : 에틸아세테이트(4 : 1, 3 : 1, v/v) 용매계로 SBD-1 및 SBD-2를 분리하였고 이 분리물이 TLC(헥산:에틸아세테이트=3:1)로 단일 점적임을 확인하였다. 단리된 물질을 EI/MS를 통하여 분자량을 확인하고 NMR로 구조를 동정하였다.

분취할때 용리물들은 TLC 상에서 전개시킨 후 UV(254 nm, 365 nm)의 흡수 양상과 황산(15~20%) 발색시 나타나는 점적의 모양에 따라 분취하였다.

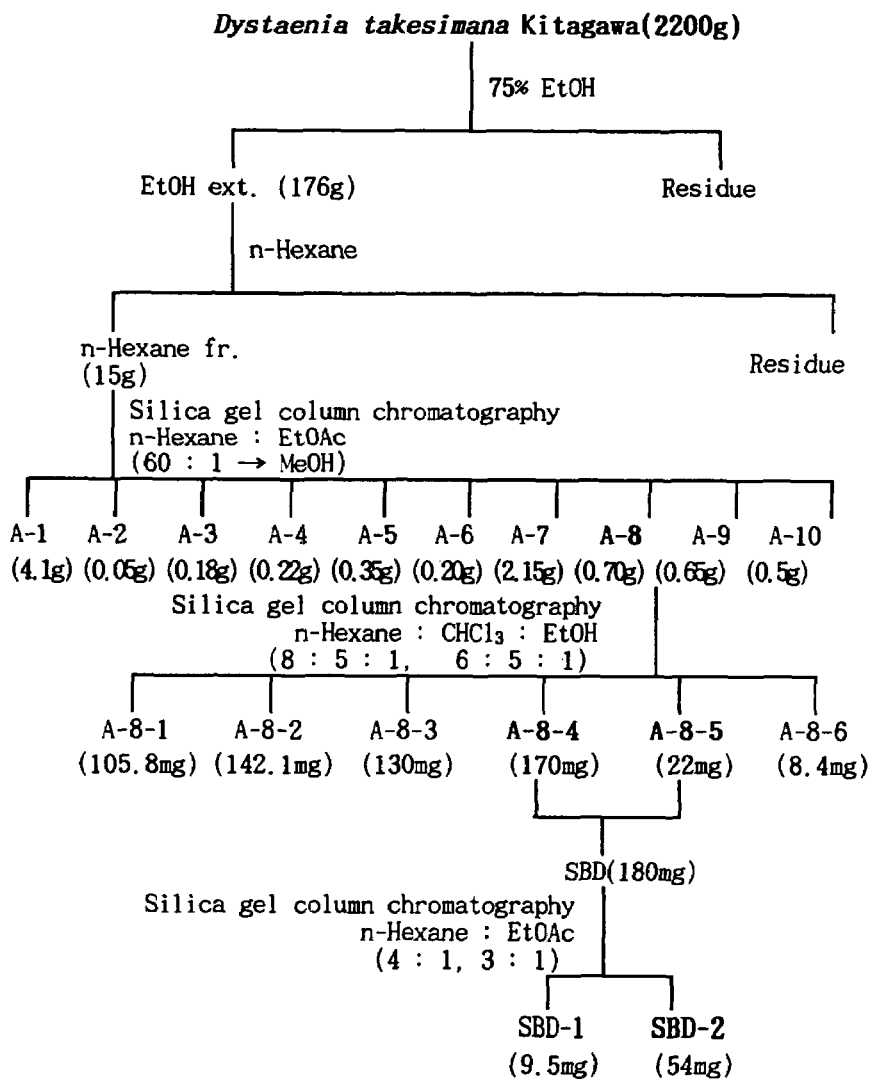


Fig. 1. Isolation flow diagram of the antimicrobial compound from *Dystaenia takesimana* Kitagawa.

분석 기기

혼탁도 측정을 위해서 UV spectrometer(Shimadzu UV-1201)와 Bioscreen C(Labsystem, Oy, Helsinki, Finland)를, 물질규명을 위하여 EI/MS(ZEOL JMS-AX505WA), ^1H - (400 MHz) 및 ^{13}C -NMR (100 MHz) (ZEOL JNM-LA400)을 사용하였다.

실험균주 및 배지

항균 활성 시험에 사용한 미생물과 배지는 Table 1과 같다.

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganisms tested	Media used	Incubation (°C)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Tryptic soy broth & agar(Difco)	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313		

에탄올 추출물 및 용매 분획물과 획분의 농도별 항균효과

시험 균주가 접종된 사면배지에서 1백금이를 취해 10 mL 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양시킨 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양시켰다. 이 균주 배양액 0.1 mL를 에탄올로 완전히 용해시킨 분획물을 일정농도(ppm)로 첨가한 액체배지에 접종한 후, 에탄올 추출물과 용매 분획물은 30°C에서 72시간 동안 배양하면서 12시간 간격으로 620 nm에서, 획분은 Bioscreen C를 이용^(12,13)하여 30°C에서 72시간 동안 2시간 간격으로 600 nm에서 혼탁 정도를 측정하여 증식억제 효과를 비교하였다. 이때 첨가되는 용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 처

리농도와 동일하게 에탄올만을 첨가한 대조구를 설정하여 증식정도를 비교하였다
(11-13)

정제된 소획분의 살균효과

각 균주가 배양된 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL 액체배지에 접종, 30℃에서 24시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 정제된 물질이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 30℃에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 표준평판한천 배양법에 의해 생균수를 계수하고 같은 방법으로 균주배양액 0.1 mL의 생균수를 계수하여 초기 접종균수를 구했다. 처리구와 동일 농도로 에탄올만을 가한 것을 대조구로 하였다⁽¹⁰⁾.

결과 및 고찰

에탄올 추출물과 용매 분획물의 항균효과

섬바디 에탄올 추출물을 50, 100, 500 및 1,000 ppm 농도(에탄올 농도는 1%)로 배지에 첨가하여 관찰한 결과 50 ppm의 낮은 농도에서 5균주 모두 72시간 동안 증식억제 효과가 지속되었고 균에 따른 감수성의 차이는 나타나지 않았다(Table 2). 에탄올 추출물에서 뚜렷한 증식억제 효과를 보여 용매분획하여 항균활성을 관찰하였다. 그 결과 모든 실험 균에 대하여 핵산과 클로로포름 분획물에서 뚜렷한 증식억제 효과를 나타내었으며 에틸아세테이트 분획물은 300 ppm 에서만 증식억제 현상이 일어났고, 부탄올이나 물 분획물에서는 대조구와 비슷하거나 더 높았다(Table 2). 이 현상은 5균주 모두에서 같은 경향을 나타내었고, 이것으로 보아 *Listeria*의 증식을 억제시키는 물질이 비극성이라는 사실을 확인할 수 있었다.

Table 2. Minimum inhibitory concentration(MIC) of ethanol extract and solvent fraction of *Dystaenia takesimana* Kitagawa

<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	MIC (ppm)					
	EtOH	n-Hexane	CHCl ₃	EtoAc	BuOH	H ₂ O
ATCC 19111	<50	<30	<30	300	¹⁾	-
ATCC 19112	<50	<30	<30	300	-	-
ATCC 19113	<50	<30	<30	300	-	-
ATCC 19114	<50	<30	<30	300	-	-
ATCC 15313	<50	<30	<30	300	-	-

1) - : not inhibitory at 300 ppm

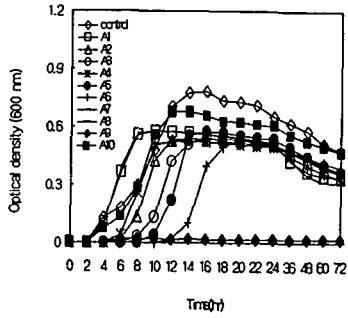
핵산 분획물의 1차 column chromatography 후 얻은 획분들의 항균효과

섬바디 분획물의 경우 위에서 관찰한 것 같이 핵산 분획물과 클로로포름 분획물의 효과가 비슷하여 사용한 약재에 대해서 수율(핵산 : 0.13%, 클로로포름 : 0.02%)이 높은 핵산 분획물을 분리 대상으로 선정 하였다.

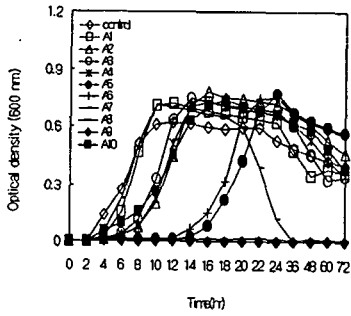
핵산 분획물로부터 항균활성 물질을 분리하기 위해 먼저 TLC상에서 분리능이 좋은 용매조건을 탐색 후 선택된 용매조건(핵산 : 에틸아세테이트)에서 silica gel column chromatography를 실시한 결과 분리된 10개의 획분을 얻었다. 각 획분(A1~A10)을 진공 건조 후 에탄올로 용해시킨 획분들을 30 ppm과 10 ppm 수준으로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5균주를 접종, 72시간 동안 배양시켰다. 그 결과는 Fig. 2~3과 같다.

분리된 획분 중 A8(Rf : 0.4)은 모든 균에 대하여 30 ppm, 10 ppm 두 농도를 첨가한 배지에서 72시간 동안 혼탁도의 변화가 없었으며, 획분 A9는 30 ppm 농도를 첨가한 배지에서 혼탁도의 변화가 없었지만 10 ppm이 첨가된 배지에서는 일정 시간 동안 증식억제 효과를 보이다가 약간의 균이 증식하는 것을 관찰할 수 있었다. 그 이외의 획분, 즉 A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, 및 A10은 두 농도에서 대조구와 같은 수준으로 균이 증식하여 증식억제 효과가 나타나지 않음을 알 수 있었다.

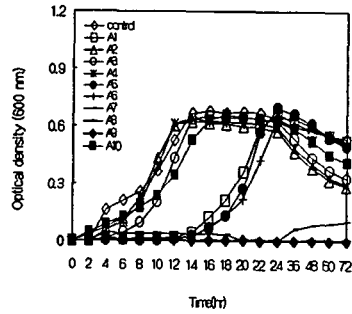
ATCC 19111



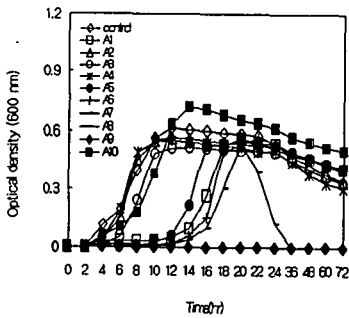
ATCC 19112



ATCC 19113



ATCC 19114



ATCC 15313

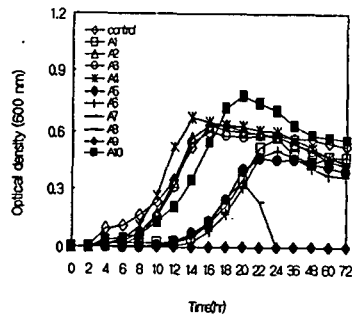
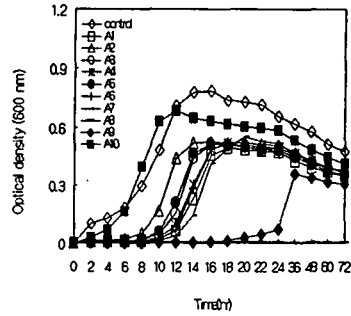
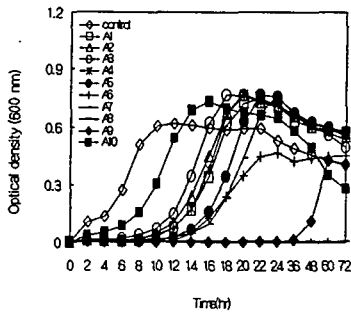


Fig. 2. Growth inhibition by fraction A1~A10 (30 ppm) obtained after chromatography of n-hexane fraction of *Dystaenia takesimana* Kitagawa on *L. monocytogenes*.

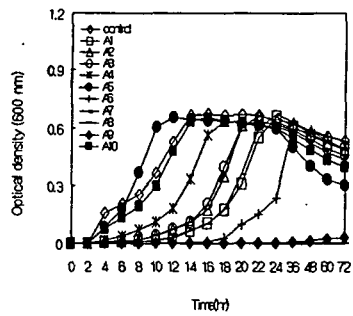
ATCC 19111



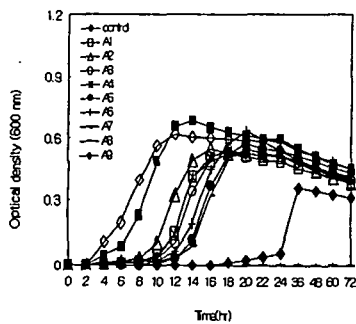
ATCC 19112



ATCC 19113



ATCC 19114



ATCC 15313

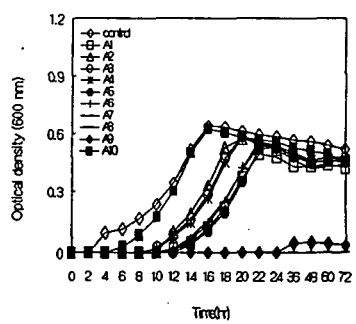


Fig. 3. Growth inhibition by fraction A1~A10 (10 ppm) obtained after chromatography of n-hexane fraction of *Dystaenia takesimana* Kitagawa on *L. monocytogenes*.

핵산 분획물의 1차 획분(A8)의 *L. monocytogenes*에 대한 살균효과

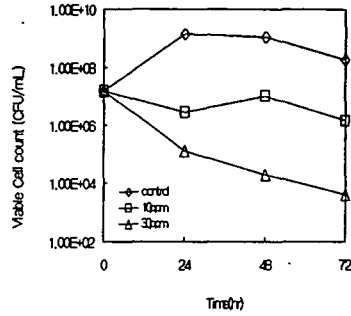
*L. monocytogenes*의 증식억제를 위한 섬바디 핵산 분획물로부터 분리된 A8의 최소증식억제 농도(ppm)가 MIC<10 ppm으로 sodium benzoate나 potassium sorbate 등의 화학합성 보존제보다 효과가 좋음을 확인⁽⁹⁾하였으나 액체 배양법에서 혼탁도의 측정은 균의 증식 양상은 관찰할 수 있으나 정확한 항균정도를 확인할 수 없어서 이를 보완하기 위해 각 균주가 접종된 배지에 섬바디 분리물 A8을 30 ppm 및 10 ppm씩 첨가하여 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 생균수를 계수 하면서 살균효과를 관찰하였다(Fig. 4). 초기 접종 균수는 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL이었으며 균종에 따라 차이는 있지만 24시간 배양한 후 전체적인 균수 변화를 살펴보면(Fig. 4) 대조구는 10^2 CFU/mL 증가한 반면 처리구는 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL정도 감소하였다. 이후 72시간 배양 시간 동안에는 대조구는 1 log cycle 감소하였고 처리구는 균에 따라 1 log cycle~3 log cycle 감소하거나 뚜렷한 변화가 나타나지 않았다. 이들 결과로 볼 때 섬바디 추출물의 A8 분획물은 *L. monocytogenes* 실험균주 모두에 대하여 배지 내 30 ppm 혹은 10 ppm 수준에서 증식저해 혹은 살균효과가 있음을 확인하였다.

핵산 분획물의 3차 획분(SBD-1, SBD-2)의 *L. monocytogenes*에 대한 증식억제 효과

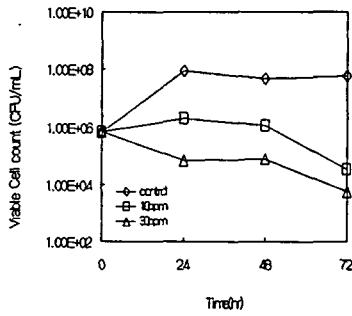
소획분으로 얻은 A8(Rf : 0.4)를 확인한 결과 순수물질은 아니므로 silica gel column으로 재 분리(핵산 : 클로로포름 : 에탄올)하였고, 재 분리해서 얻은 6개 획분중 4번째와 5번째 획분을 혼합하여 같은 column으로 3차 분리(핵산 : 에틸아세테이트)하여 단일물질로 확인된 SBD-1(Rf : 0.4)과 SBD-2(Rf : 0.23)를 얻었다.

핵산 분획물로부터 분리된 정제도가 우수한 SBD-1의 증식억제 효과를 비교한 결과, 모든 균에 대하여 SBD-1은 성장을 저해시키지 못하였는데, ATCC 19111의 경우 두 농도에서 대조구와 비슷한 경향을 보였고, ATCC 19112에 대하여는 24시간 이후 대조구 보다 혼탁도가 증가하였으며, ATCC 19113, 19114, 15313의 경우에는 성장을 더 촉진 시켰음을 알 수 있었다.

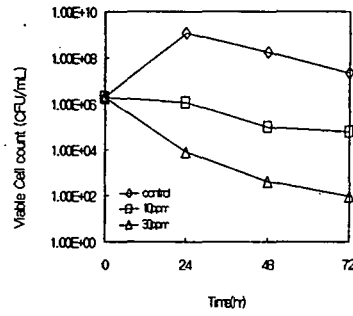
ATCC 19111



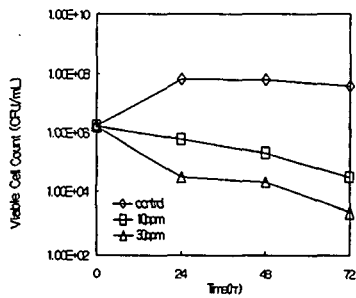
ATCC 19112



ATCC 19113



ATCC 19114



ATCC 15313

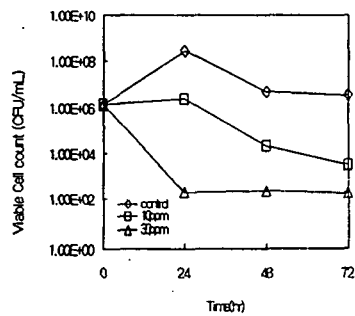


Fig. 4. Bactericidal effect of A8 isolated from n-hexane fraction of *Dystaenia takesimana* Kitagawa on *L. monocytogenes*.

핵산 분획물로부터 3차 분리하여 얻은 SBD-2의 증식억제 효과는 Fig. 5와 같다.

SBD-2는 30 ppm 농도에서 *L. monocytogenes* ATCC 19111에 대하여 유도기를 지연시켰으며, 이 보다 낮은 10 ppm 에서는 대조구와 비슷한 혼탁도를 보였다. ATCC 19112에 대하여는 30 ppm 농도에서는 균의 증식을 억제시켰고, 10 ppm에서는 유도기를 지연시켰다. ATCC 19113에 대해서는 30 ppm 농도에서 60시간 이후 혼탁도가 증가하였고 10 ppm 농도에서는 12시간 이후부터 대조구보다 혼탁도가 증가하였다. ATCC 19114에 대해서도 ATCC 19111과 같은 효과를 보였으며, ATCC 15313에 대해서는 30 ppm에서 72시간 동안 균을 증식시키지 못했고, 10 ppm에서는 24시간 이후 혼탁도가 증가하였다.

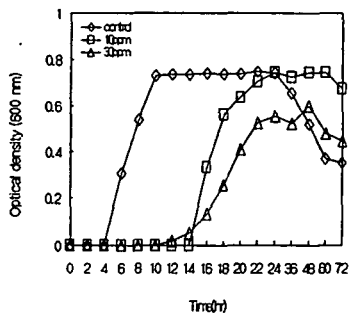
단일 물질로 분리된 SBD-1과 SBD-2는 두 물질로 추정된 A8보다 항균활성이 감소되었는데 이는 천연물에 존재하는 항균활성 물질이 단독으로 작용하는 것이 아니라 여러 물질에 의한 상승작용으로 그 효과를 나타낸다고 할 수 있겠다.

핵산 분획물(SBD-2)의 구조동정

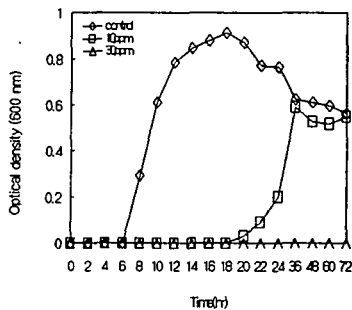
섬바디로부터 분리된 A8의 핵산 분획물을 다시 분리한 결과 SBD-2는 노란색 SBD-2의 $^1\text{H-NMR}$ 결과는 Fig. 6 및 Table 3과 같다. Vinyl기의 특징적인 signal[5.47(1H, ddd, $J=17.0, 1.0, 1.0$ Hz), 5.27(1H, ddd, $J=10.3, 1.0, 1.0$ Hz), 5.93(1H, ddd, $J=17.0, 10.2, 5.4$ Hz)] 및 그와 인접한 oxy-methine 수소의 signal[4.94(1H, ddd, $J=5.4, 1.0, 1.0$ Hz)]이 관측되었고, 다른 한쌍의 이중결합[5.53(1H, ddt, $J=11.0, 7.7, 1.2$ Hz), 5.61(1H, ddt, $J=11.0, 1.2, 6.6$ Hz)]과 이웃하고 있는 oxy-methine 수소의 signal[5.21(1H, br. d, $J=8.8$ Hz)과 methylene[2.10(2H, ddt, $J=7.2, 1.0, 6.6$ Hz)]의 존재가 확인되었으며 많은 methylene(1.20~1.38) 및 말단 methyl[0.88(3H, t, $J=6.8$ Hz)]의 존재도 확인되었다.

SBD-2의 $^{13}\text{C-NMR}$ 결과는 Fig. 6 및 Table 3과 같다. 4개의 4급탄소가 79.84, 68.67, 70.23, 78.28 ppm에서 관측되어 2쌍의 3중결합이 존재함이 밝혀졌고, vinyl기(117.25, 135.79 ppm)와 또 다른 하나의 2중결합에서 유래한 methine 탄소(127.64, 134.53 ppm)

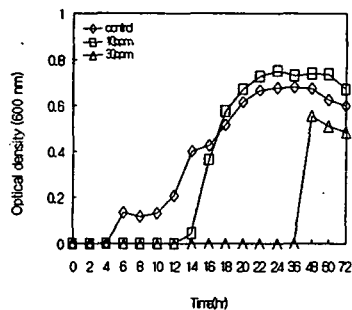
ATCC 19111



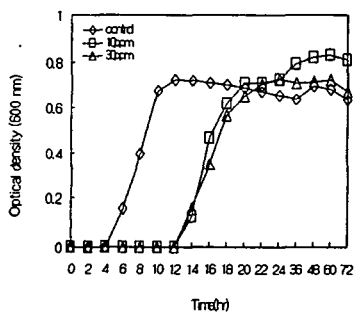
ATCC 19112



ATCC 19113



ATCC19114



ATCC 15313

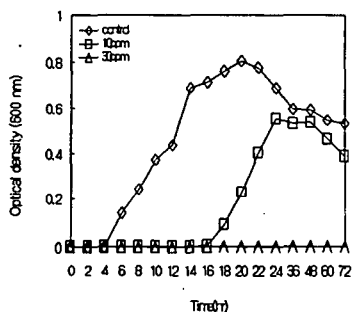


Fig. 5. Growth inhibition by SBD-2 isolated from n-hexane fraction of *Dystaenia takesimana* Kitagawa on *L. monocytogenes*.

oil인 화합물로 황산 발색시 검정색을 나타냈으며 이때 Rf치는 0.23이었다. signal이 관측되었다. 또한 2개의 oxy-methine 탄소(63.37, 58.48 ppm), 1개의 methyl(14.05 ppm) 및 6개의 methylene 탄소 signal(27.65, 29.24, 29.13, 29.03, 31.75, 22.59 ppm)이 관측되었다. 따라서 SBD-2는 두 쌍의 3중결합과 2개의 hydroxy기를 갖는 탄소수 17개의 폴리아세틸렌 화합물로 판명되었으며 Fig. 7과 같이 EI/MS로부터 결정된 분자량(M^+ : 260)과 ^{13}C -NMR의 chemical shift를 조사하고 기존 문헌^(14,15)의 NMR 결과를 비교함으로써 7그 구조를 (9z)-heptadeca-1,9-dien-4,6-diyne-3,8-diol인 falcarindiol로 결정하였다. 이 falcarindiol은 섬바디에서는 확인되지 않았으나 일반적으로 미나리과 식물의 뿌리 혹은 *Cladosporium fulvum*이 증식한 토마토 잎에서 발견되며 항진균 혹은 진통효과가 알려지고 있다⁽¹⁶⁾.

Table 3. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR chemical shift of SBD-2 isolated from n-hexane fraction of *Dystaenia takesimana* Kitagawa(400 and 100 MHz, CDCl_3)

NO.	SBD-2		SBD-2 diacetate	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
1	117.25	5.47, ddd, $J=17.0, 1.0, 1.0$ Hz	119.81	5.47, ddd, $J=17.2, 1.0, 1.0$ Hz
		5.27, ddd, $J=10.3, 1.0, 1.0$ Hz		5.34, ddd, $J=10.3, 1.0, 1.0$ Hz
2	135.79	5.93, ddd, $J=17.0, 10.2, 5.4$ Hz	136.53	5.84, ddd, $J=17.2, 10.3, 5.4$ Hz
3	63.37	4.94, ddd, $J=5.4, 1.0, 1.0$ Hz	64.37	5.90, ddd, $J=5.4, 1.0, 1.0$ Hz
4	79.84		76.68	
5	68.67		69.09	
6	70.23		70.72	
7	78.28		75.01	
8	58.48	5.21, br. d, $J=8.8$ Hz	60.01	6.13, br. d, $J=8.8$ Hz
9	127.64	5.53, ddt, $J=11.0, 7.7, 1.2$ Hz	123.59	5.53, ddt, $J=11.1, 7.7, 1.3$ Hz
10	134.53	5.61, ddt, $J=11.0, 1.2, 6.6$ Hz	131.82	5.67, ddt, $J=11.1, 1.4, 6.6$ Hz
11	27.65	2.10, ddt, $J=7.2, 1.0, 6.6$ Hz	27.87	2.14, ddt, $J=7.2, 1.2, 6.6$ Hz
12	29.13	1.38, br. t, $J=6.6$ Hz	29.12	1.38, br. t, $J=6.6$ Hz
	29.07		29.10	
13		1.32-1.20 (8H)		
		1.35-1.22 (8H)		
14				
15	31.75		31.79	
16	22.59		22.63	
17	14.05	0.88 (3H), t, $J=6.8$	14.11	0.88(3H), t, $J=6.8$ Hz
acetyl			169.46, 169.43	2.10 (3H), s
			20.92, 20.86	2.08 (3H), s

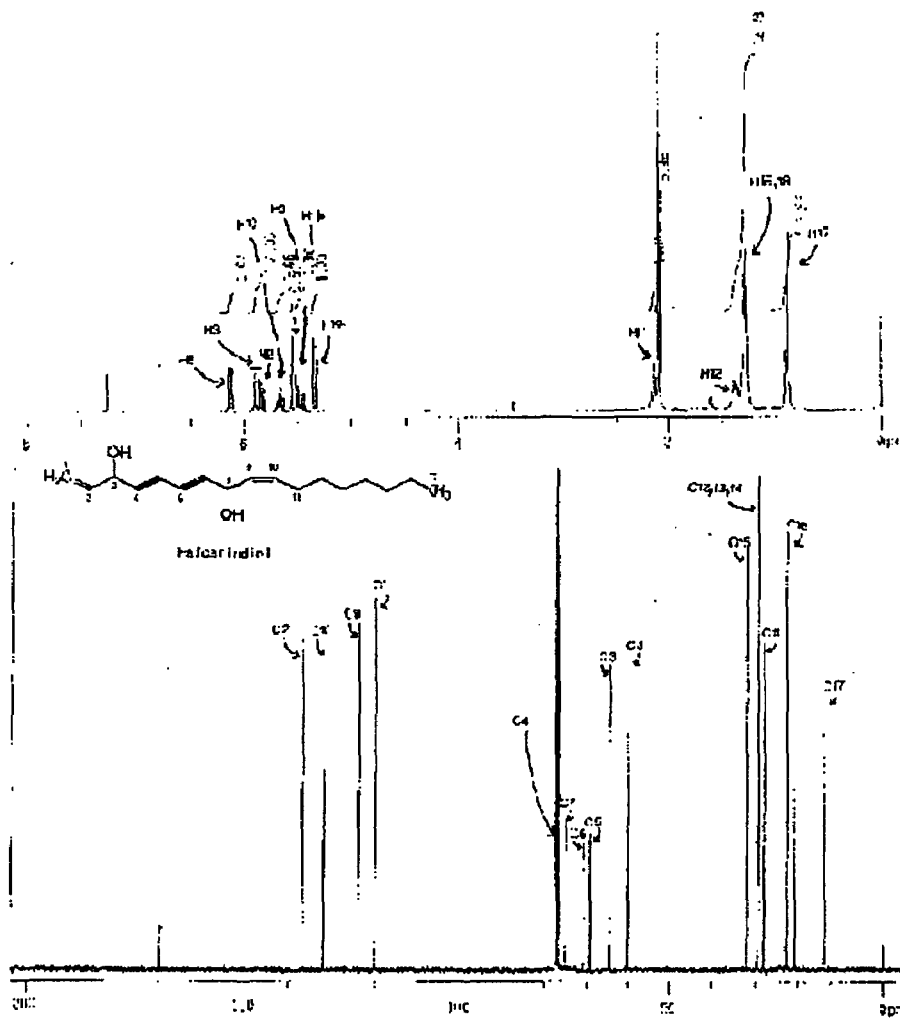


Fig. 6. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectrum of SBD-2 isolation from n-Hexane fraction of *Dystaenia takesimana* Kitagawa (in CDCl_3).

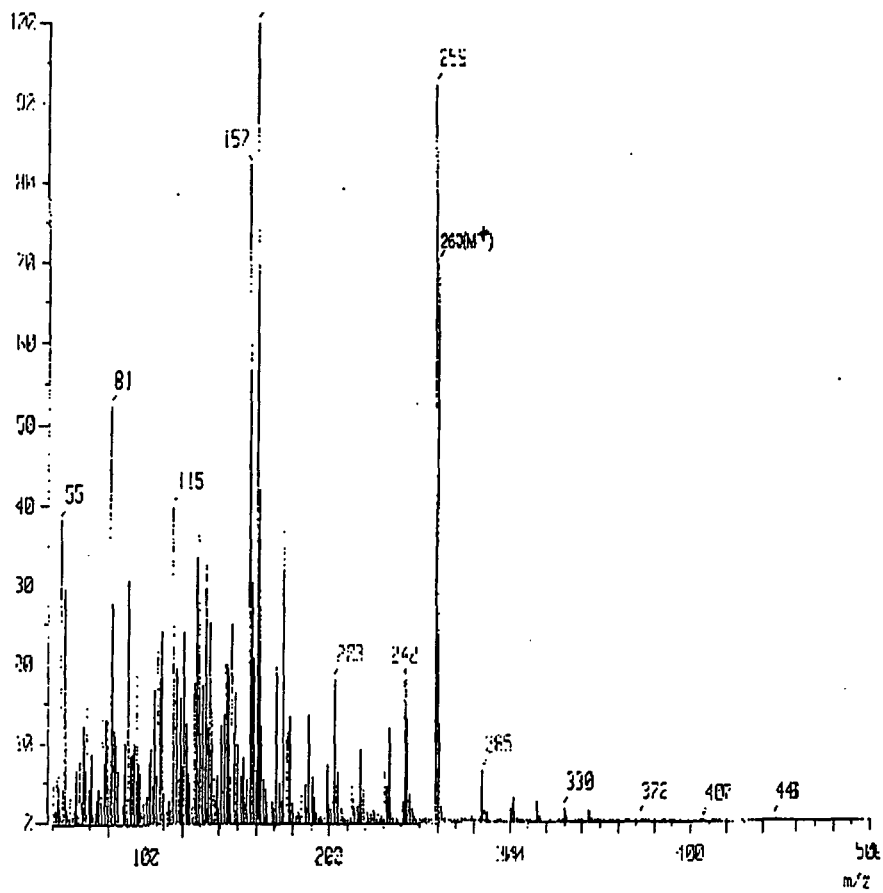


Fig. 7. EI/MS spectrum of SBD-2 isolation from n-Hexane fraction of *Dystaenia takesimana* Kitagawa.

요 약

섬바디 75% 에탄올 추출물과 핵산 분획물을 첨가하여 *Listeria monocytogenes*(Lm) ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113, ATCC 19114 및 ATCC 15313에 대한 증식억제 효과와 그 활성 물질의 구조를 확인하였다. 항균효과를 시험한 결과 에탄올 추출물은 50 ppm, 핵산 분획물의 경우에는 30 ppm에서 5종의 *Listeria* 균주를 모두 증식저해 시켰다. 항균활성이 우수한 섬바디 핵산 분획물을 silica gel column으로 1회 분획하여 획분 A8을 얻었고 이의 항균효과는 대단히 우수하여 10 ppm에서 실험균주 모두를 증식저해 시켰다. A8이 아주 우수한 항균효과를 나타내었기에 살균효과가 기대되었다. Tryptic soy broth에 섬바디 추출물에서 분리된 A8를 30 및 10 ppm씩 배지에 첨가한 후 Lm 5균주를 배양시켜 24시간 간격으로 생균수를 확인한 결과 대조구는 균수가 증가하는 반면 처리구는 균수가 감소함으로써 살균효과가 인정되었다. 그리고 이 획분 A8을 2회 연속 분리하여 단리된 소획분 SBD-1과 SBD-2를 얻었다. 이렇게 단일 물질로 분리된 SBD-1과 SBD-2의 항균효과는 column 분리후 얻은 획분(A8)보다 증식억제 효과가 감소하였는데 이는 섬바디에 존재하는 항균물질은 단독으로 작용하는 것이 아니라 그 안에 있는 여러 물질들의 혼합작용으로 그 효과가 나타난 것이라 추측되었다.

단일물질로 분리된 두 물질 중 수율이 높은 SBD-2를 구조 동정한 결과 폴리아세틸렌 화합물 (9z)-heptadeca-1,9-dien-4,6-dien-3,8-diol 인 falcarindiol로 확인되었다. 이 물질은 미나리과 식물 뿌리에 존재한다.

제 9 절 Bulk와 emulsion system에서 유지에 대한 항산화제와 유화제의 항산화효과

서 론

식용유지나 식품중의 지방질 성분은 다른 식품성분들에 비해 정제, 가공, 저장과정 중 변화가 매우 쉽게 일어나고 그 생성물들은 식품에서 나쁜 냄새, 맛, 영양적 손실과 독성을 발현⁽¹⁾시킨다. 식용유지에서의 산패는 불포화 식물성, 동물성 유지의 사용의 증가와 첨가물에 의한 영향 때문에 이를 원료로 사용하는 식품산업 분야에 있어서 유지의 산화억제는 중요한 과제이다. 지방산화에 대한 효과적인 조절방법으로 천연 항산화제의 손실을 최소화하거나 금속으로부터의 오염을 제거하거나 산화방지제를 첨가하여 산화를 최소화하려는 노력들이 이루어지고 있다⁽²⁻⁶⁾. 불포화지방산의 산화의 기본작용을 이해하기 위해 항산화작용⁽¹⁾과 지방산화분해생성물⁽⁷⁾에 대한 많은 연구가 이루어진 바 있다. 식품의 다양한 상(phase)에서 항산화제의 분해는 열역학적으로 상들의 친화에 따른다는 보고⁽⁸⁾가 있다. Frankel 등은 최근의 연구에서 불균일한 식품과 생물체에서의 항산화작용을 연구하기 위해 계면현상이 주요관심의 대상이라는 것을 발견⁽⁹⁻¹⁴⁾하였다. Bulk상에서 친수성 항산화제는 oil-air 계면에 위치해 있어서 oil상에 퍼져 있는 친유성 항산화제보다 산화로부터 유지상의 산화안정성면에서 더 효과적이며, 반대로 emulsion(oil-in water)상에서는 친유성인 항산화제가 oil-water 계면에 분배되어 있어 물상에 분배되어 있는 친수성 항산화제보다 유지의 산화방지에 더 효과적이라고 하였다. 또한 다른 상에 존재하는 항산화제의 분포는 상의 구성뿐만 아니라 항산화제의 상대적인 극성과 지질의 기질체계, 유화제, pH, 온도에 영향을 받는다⁽¹⁵⁾고 한다.

본 실험에서는 다른 상의 조건 아래 극성이 다른 항산화제를 첨가하고 HLB(hydrophilic lipophilic balance)에 따른 유화제를 처리하여 기질의 차이에 따른 항산화제와 유화제의 산화지연 정도를 시험하고 복잡한 식품에서의 유지의 산패에 대한 여러 첨가물 영향을 비교하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 유지는 시판(제일제당)되는 콩기름을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 친수성 항산화제로는 gallic acid를, 친유성 항산화제로는 δ -tocopherol(Sigma사 제품)을 사용하였고 유화제는 tween 20(YAKURI, Japan), lecithin(OAK ZONE, Japan), span 60(약리화학)을 사용하였다.

사용기기

산화안정성을 측정하기 위해 Rancimat 679(METHROHM AG, CH-9100 Heris, Switzerland)을 사용하였고 유지방구의 크기와 상의 변화를 측정하기 위해 Microscope(Dong won microscope, DW-BHN/THN, Korea), Surface tension meter(Fisher Model 20, U.S.A.)를 사용하였다.

Bulk 상과 Emulsion(oil-in-water) 상 제조

콩기름(2.5 g)에 tween 80(0.25 g), 3차 증류수를 25 mL 첨가하여 10°C에서 15분간 sonification시켜서 균질화⁽¹⁰⁾하였다. 이 때 micrometer로 측정한 유지방구의 크기는 0.5-1.5 μm 이었다. Bulk와 만들어진 emulsion상에 대해서 친수성 항산화제

로서 gallic acid, 소수성 항산화제로서 δ -tocopherol를 각각 200 ppm 첨가하였고 유화제로는 lecithin(HLB 3-4)⁽¹⁶⁾, tween 20(HLB 10-17), span 60(HLB 2-9)⁽¹⁷⁾를 각각 1,000 ppm 첨가하였다. 각 처리구들은 40 g 씩 250 mL 삼각플라스크에 취하여 알루미늄 호일로 빛을 차단하고 60℃에서 교반(200 rpm)하면서 분석 시료로 하였다.

Rancimat을 이용한 산화안정성시험

Bulk 상에 항산화제와 유화제를 적용한 각 처리구들의 산화안정성은 Rancimat을 이용하여 측정하였다. 즉 각 처리구 2.5 g을 취하여 120±0.1℃의 aluminum heating block 상에서 시간당 20 L의 공기를 주입하여 산화시켰다. 이 때 발생하는 휘발성 산화생성물을 70 mL의 증류수가 들어있는 absorption vessel에 이행시켜 double platinum foil electrode와 recorder에 의해 전기전도도 정도를 측정, 자동 기록된 chart에서 반응 개시의 전기전도도로 부터 전기전도도가 급격히 증가되는 시점까지의 시간을 유도기간(IP, induction period)으로 계산하여 각 처리구의 항산화 정도를 측정하였다.

Peroxide value(POV)측정

Bulk와 emulsion 상에 대하여 과산화물가를 측정⁽¹⁸⁾하였다. 시료유지 약 3 g을 삼각플라스크에 취하여 클로로포름 10 mL를 가하여 녹이고 초산 15 mL와 요오드화 칼륨 1 mL를 가한 다음 1분간 교반한 후 5분간 암소 방치하였다. 증류수를 가한 후 1% 전분용액을 지시약으로 하여 0.01 N Na₂S₂O₃로 적정하여 얻은 값으로 POV를 계산하였다.

Conjugated dienoic acid(CDA) 함량측정

Bulk와 emulsion 상에 대하여 CDA를 측정⁽¹⁹⁾하였다. Bulk상은 유지 1-2 방울을 삼각플라스크에 취한 후 20 mL의 iso-octane을 첨가하여 교반한 후 상온과 온도 평

형을 이루도록 하기 위하여 15분간 방치하였다. Emulsion상은 시료유지 100 mg을 취한 후 메탄올/헥산(1 : 1, v/v) 1 mL로 3회 추출하고 메탄올층을 2회 헥산으로 세척하여 헥산층을 모으고 농축하여 20 mL iso-octane으로 녹인 후 15분간 방치하고 234 nm에서 흡광도를 측정⁽¹⁰⁾ 하였다.

Emulsion상의 유지방구의 크기와 표면장력 변화 측정

Micrometer가 부착된 광학현미경을 이용하여 유지방구 크기의 변화를 측정하였고, ring 방법⁽²⁰⁾에 의하여 표면장력계를 이용하여 표면장력을 측정하였다. 이 때 고리의 직경은 5.623 cm이었다. 유지방구의 크기는 10개의 유지방구를 측정 평균치로 하였고, 표면장력은 3반복 실시하여 평균하였다. 즉 시료 약 20 mL를 측정용기에 담고 평형을 이룬 상태에서 5일 간격으로 3회 측정하였다. 각 처리구당 3반복하여 평균하였다.

통계처리

유지에 친수성, 소수성 항산화제와 HLB에 따른 유화제를 처리하여 유지의 산화 안정성 실험한 결과는 SAS로 Duncan's multiple range test⁽²¹⁾ 실시하여 처리간 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

Bulk상에서의 유지의 산화안정성

콩기름을 기질로 하여 친수성 항산화제로서 gallic acid와 소수성 항산화제로서 δ -tocopherol을 첨가하고, 각각에 대해 HLB에 따른 유화제를 첨가하여 60°C에서 12일 동

안 저장하면서 유지의 안정성을 실험한 결과는 Fig. 1, 2 및 3과 같다. Rancimat(12 0℃, 20 L(air)/1 hr)을 통한 유도기간의 변화는 Fig. 1과 같다. 즉 bulk상에서 12 일 경과시 gallic acid를 첨가한 처리구의 유도기간이 4.13인데 비해 δ -tocopherol를 첨가한 처리구의 유도기간은 1.18로 gallic acid를 첨가한 처리구가 3배 정도의 유지산패 지연 효과가 있었다. 또한 유화제의 처리에 따른 것을 비교해 보면 gallic acid를 첨가한 처리구에 lecithin을 처리한 것의 유도기간이 5.07, gallic acid와 tween 20이나 span 60을 처리한 것이 각각 2.23, 2.90으로 lecithin을 첨가한 것과 비교해 유지의 산화안정성이 낮아지고 있다. δ -tocopherol과 유화제를 함께 첨가한 것에서도 마찬가지로 lecithin 첨가구의 유도기간이 1.22, tween 20, span 60이 각각 0.7, 0.9로 gallic acid 첨가구와 같은 결과를 보였다.

과산화물가의 측정에서도 같은 경향을 보였는데 Fig. 2와 같이 gallic acid를 첨가한 것의 과산화물가는 12일 경과시 10.68 meq/kg oil, gallic acid를 첨가한 처리구에 lecithin을 처리한 것의 과산화물가는 9.83 meq/kg oil, gallic acid와 tween 20이나 span 60을 처리한 것이 각각 34.99 meq/kg oil, 10.67 meq/kg oil로 lecithin을 첨가한 것과 비교해 유지의 산화안정성이 낮아지고 있다. δ -tocopherol을 첨가한 것은 12일 경과시 128.50 meq/kg oil로 gallic acid처리구에 비교해 유지산패 지연이 낮았다. δ -tocopherol과 유화제를 함께 첨가한 것에서도 마찬가지로 lecithin 첨가구의 과산화물가가 66.89 meq/kg oil, tween 20, span 60이 각각 121.24 meq/kg oil, 109.01 meq/kg oil로 gallic acid 첨가구와 같은 결과를 보였다. 공액이중산함량은 Fig. 3에서 보는 것과 같이 gallic acid를 첨가한 것은 0.5%인데 비해 δ -tocopherol를 첨가한 것의 공액이중산함량은 1.42%로 Rancimat과 과산화물가를 통해 유지의 산화안정성을 측정한 결과와 마찬가지로 gallic acid 처리구가 δ -tocopherol를 처리한 것에 비해 유지산패 지연에 효과가 있었다.

Bulk상을 기질로 하였을 때 친수성 향산화제를 첨가한 것이 소수성 향산화제를

처리한 것보다 유지의 산패를 지연시켰다. 이것은 bulk상에 항산화제를 처리하였을 때 유지에 녹아서 유지의 산패를 막는 것보다 계면에서 공기와의 접촉을 차단하는 쪽의 친수성 항산화제를 처리하는 것이 유지의 산패를 더 효과적으로 지연하는 결과^(9,10)와 같은 경향이다. 유화제의 처리에 있어서는 HLB가가 낮은, 즉 소수성쪽의 유화제를 처리한 것이 유지의 산패를 지연시켰다. Bulk상에 유화제를 처리하였을 때는 소수성쪽의 유화제가 친수성쪽의 유화제보다 기질에 더 잘 녹지 않게 하여 유지의 산패를 지연시킨다고 볼 수 있다.

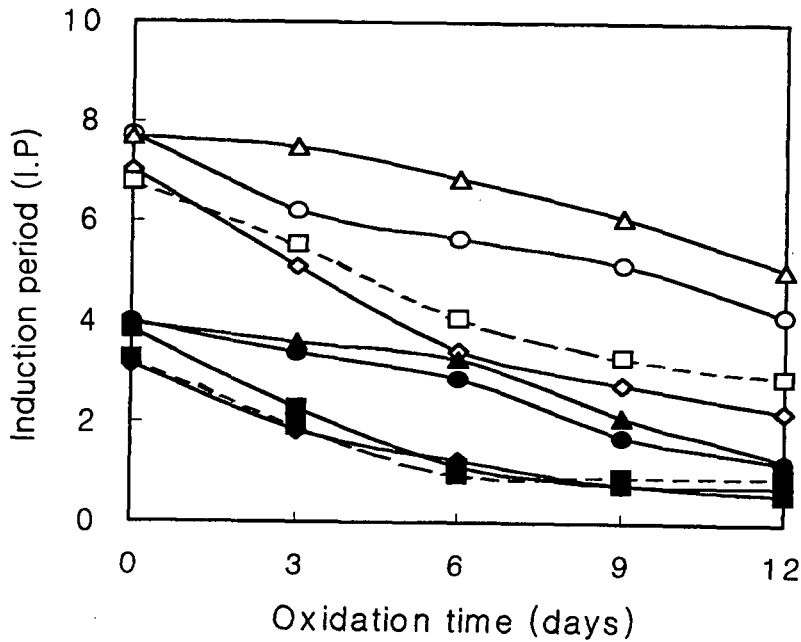


Fig. 1. Comparison of induction period of soybean oil(bulk) applied gallic acid(200 ppm), δ -tocopherol(200 ppm) and emulsifiers(1,000 ppm) at 60°C.

Induction period was determined by Rancimat method at 120°C, 20 L(air)/1 hr.

■-■: control(oil), ○-○: +gallic acid, Δ - Δ : +gallic acid+lecithin, \diamond - \diamond : +gallic acid+tween 20, \square ... \square : +gallic acid+span 60, ●-●: + δ -tocopherol, \blacktriangle - \blacktriangle : + δ -tocopherol+lecithin, \blacklozenge - \blacklozenge : + δ -tocopherol+tween 20, \blacksquare ... \blacksquare : + δ -tocopherol+span 60

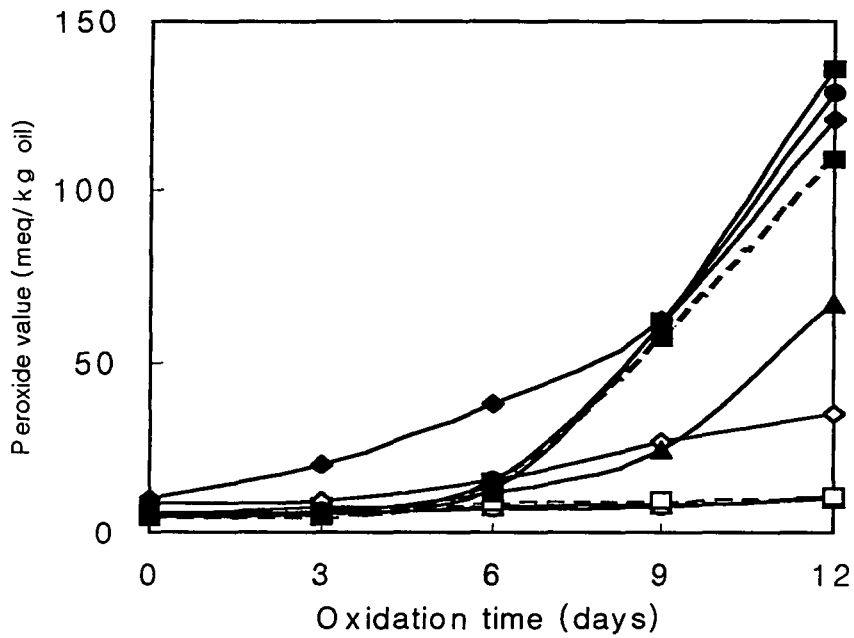


Fig. 2. Comparison of peroxide value of soybean oil(bulk) applied gallic acid(200 ppm), δ -tocopherol(200 ppm) and emulsifiers(1,000 ppm) at 60°C.

■-■: control(oil), ○-○: +gallic acid, Δ-Δ: +gallic acid+lecithin, ◇-◇: +gallic acid+tween 20, □-□: +gallic acid+span 60, ●-●: + δ -tocopherol, ▲-▲: + δ -tocopherol+lecithin, ◆-◆: + δ -tocopherol+tween 20, ■-■: + δ -tocopherol+span 60

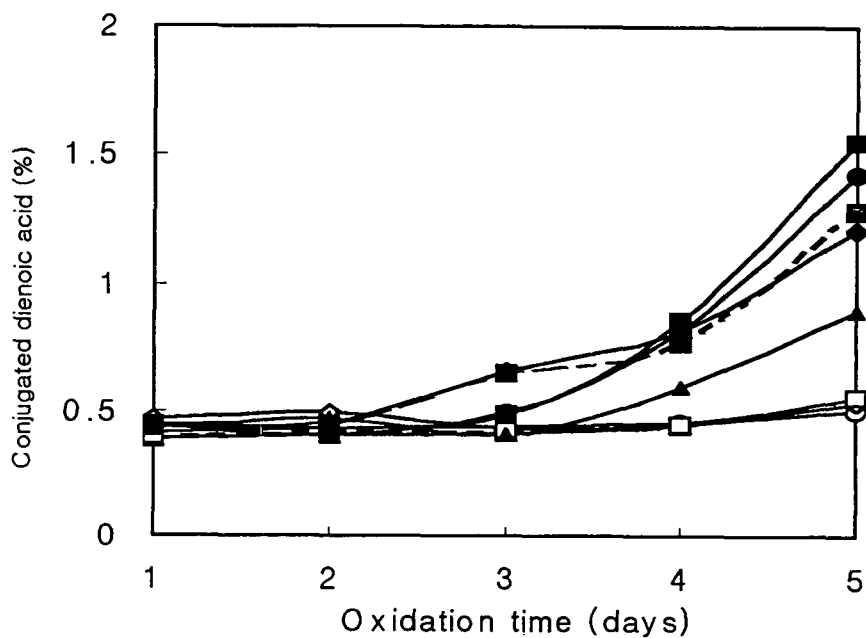


Fig. 3. Comparison of conjugated dienoic acid value of soybean oil(bulk) applied gallic acid(200 ppm), δ -tocopherol(200 ppm) and emulsifiers(1,000 ppm) at 60°C.

■-■: control(oil), ○-○: +gallic acid, Δ - Δ : +gallic acid+lecithin, \diamond - \diamond : +gallic acid+tween 20, \square ... \square : +gallic acid+span 60, ●-●: + δ -tocopherol, \blacktriangle - \blacktriangle : + δ -tocopherol+lecithin, \blacklozenge - \blacklozenge : + δ -tocopherol+tween 20, \blacksquare ... \blacksquare : + δ -tocopherol+span 60

Emulsion(oil-in-water)상에서의 저장시험

Emulsion(oil-in-water)상에 bulk상과 마찬가지로 친수성 항산화제와 소수성 항산화제를 첨가하고 각각 유화제를 첨가하여 유지의 산패 정도를 실험한 결과는 Fig. 4 및 Fig. 5와 같다. Fig. 4에서보면 emulsion상은 bulk상에 비해 큰 차이를 보이지는 않았으나 gallic acid를 첨가한 것의 과산화물가가 12일 경과시 33.88 meq/kg oil, δ -tocopherol를 첨가한 것이 57.68 meq/kg oil로 bulk상과 마찬가지로 친수성 항산화제를 첨가한 것이 유지의 산패를 지연시켰다. Frankel⁽⁹⁾등에 의하면 bulk상에서는 친수성 항산화제를 처리한 것이 emulsion상에서는 소수성 항산화제를 처리한 것이 유지산패지연에 더 효과적이라고 한 결과와는 차이를 보였다. 그 이유는 기질의 차이, 즉 정제하지 않은 콩기름을 이용하여 처리한 것에 의한 차이인 것 같다. 콩기름 자체에는 0.09-0.28%의 토코페놀이 함유되어 있고 Cillard에 의하면⁽²²⁾ α -tocopherol의 경우 5×10^{-3} mole/mol linoleic acid 농도 이상의 경우 산화촉진제로 작용하였으며 이런 산화촉진작용은 수용액 시스템에서 더 쉽게 나타난다고 보고하고 있다. 따라서 emulsion상에서의 이런 결과는 tocopherol에 의한 산화촉진작용이라고 볼 수 있다.

Bulk상에 항산화제와 유화제를 첨가하여 안정성을 시험한 결과를 통계처리한 결과는 Table 1과 같다. Bulk상에서는 친수성항산화제에 HLB가 낮은, 즉 소수성쪽의 유화제인 lecithin이나 span 60을 첨가한 것의 산화안정성이 HLB가 높은, tween 20을 첨가한 것에 비하여 산화안정성이($p < 0.01$) 우수하였다. Emulsion상은 bulk상에 비해 상이 불안하기 때문에 유의적인 결과는 얻기가 힘들었고 유화제를 첨가하지 않은 gallic acid만 첨가한 것이 가장 유지산패를 지연하였다(Fig. 5).

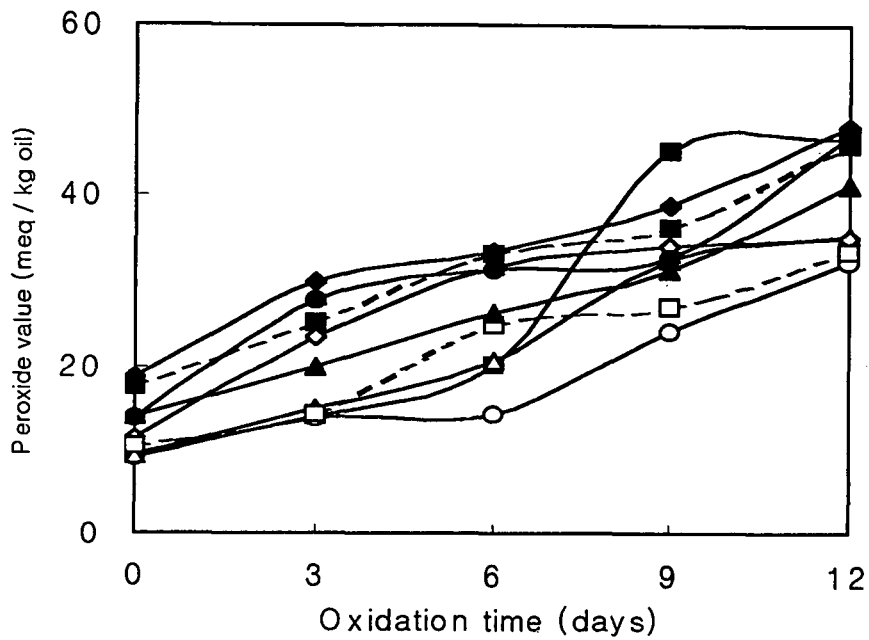


Fig. 4. Comparison of peroxide value of emulsion(oil-in-water)system applied gallic acid(200 ppm), δ -tocopherol(200 ppm) and emulsifiers (1,000 ppm) at 60°C.

■-■: control(emulsion), ○-○: +gallic acid, Δ-Δ: +gallic acid+lecithin, ◇-◇: +gallic acid+tween 20, □-□: +gallic acid+span 60, ●-●: + δ -tocopherol, ▲-▲: + δ -tocopherol+lecithin, ◆-◆: + δ -tocopherol+tween 20, ■-■: + δ -tocopherol+span 60

Table 1. Peroxide value and conjugated dienoic acid value in bulk oil system applied various antioxidants and emulsifiers

Sample	POV (meq/kg oil)	CDA (%)
Soybean oil	135.8±3.44 ^{al}	1.550±0.04 ^{az}
Oil + gallic acid	10.68±0.02 ^p	0.476±0.03 ^{oe}
Oil + gallic acid + lecithin	9.83±0.23 ^p	0.310±0.04 ^e
Oil + gallic acid + tween 20	14.99±0.02 ^c	0.495±0.01 ^a
Oil + gallic acid + span 60	10.67±0.46 ^p	0.500±0.02 ^o
Oil + δ -tocopherol	128.49±1.10 ^d	1.415±0.08 ^a
Oil + δ -tocopherol + lecithin	66.89±0.91 ^e	1.205±0.12 ^c
Oil + δ -tocopherol + tween 20	121.24±1.58 ⁱ	0.885±0.09 ^d
Oil + δ -tocopherol + span 60	109.01±0.28 ^g	1.175±0.03 ^b

¹⁾ Mean value with standard deviation of triplicates after 12 days storage at 60°C

Different letter in same column are significantly different at $p < 0.01$.

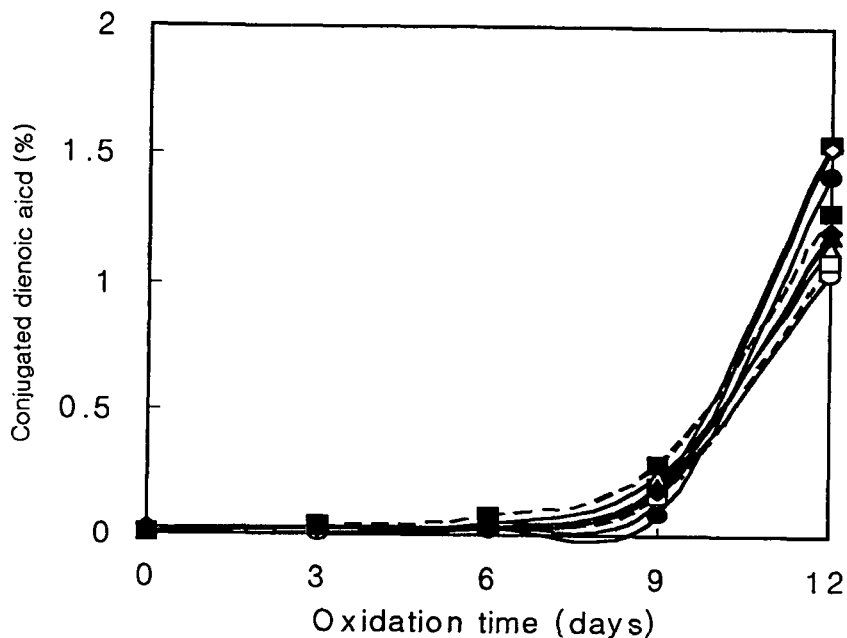


Fig. 5. Comparison of conjugated dienoic acid value of emulsion (oil-in-water) system in soybean oil applied gallic acid(200 ppm), δ -tocopherol(200 ppm) and emulsifiers(1,000 ppm) at 60°C.

■-■: control(emulsion), ○-○: +gallic acid, △-△: +gallic acid+lecithin, ◇-◇: +gallic acid+tween 20, □-□: +gallic acid+span 60, ●-●: + δ -tocopherol, ▲-▲: + δ -tocopherol+lecithin, ◆-◆: + δ -tocopherol+tween 20, ■-■: + δ -tocopherol+span 60

Emulsion상의 유지방구 크기와 표면장력

Emulsion(oil-in-water)상을 60°C shaking incubator(200 rpm)에 저장하면서 유지방구의 크기를 관찰한 형태의 결과는 Fig. 6과 같다. Emulsion상에서 유지방구의 크기는 평균직경(10개 측정) 1 μ m 정도였으나, 저장하면서 0.1 μ m ~ 0.5 μ m 정도로

작아졌다. 유화의 안정을 위해서는 분산입자의 입경을 작게하는 것이 효과가 있고, 직경이 1~5 μm 가 안정⁽²³⁾하다고 하는데, emulsion으로 제조된 상은 균질화되고 안정화된 상이라 볼 수 있다. Ling에 의하면⁽²⁴⁾ emulsion상에서는 물과 접촉되는 지방구들의 표면적은 매우 클 것이며, 가수분해가 일어나기 쉬운 여건에 놓여있기 때문에 다른 식용유지나 지방질식품에 비해서 특히 가수분해에 의한 산패가 중요시 된다고 하였다.

표면장력은 표면상의 단위길이에 작용하는 힘⁽²⁵⁾으로 한 액상의 고유성질 중의 하나이다. Emulsion상을 저장하면서 표면장력의 변화를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 즉 각 처리구들의 표면장력은 처리구들 간 차이는 있지만 저장하면서 증가하는 경향을 보였다. 유화제를 첨가한 것은 그 직경이 더 작아져서 표면적이 증가하여 공기와 접하는 면이 커짐으로 유지의 산화안정성이 유화제를 첨가하지 않은 것보다 더 떨어졌으며, 유화제의 종류에 따른 장력의 차이는 크지 않았다. 유화제를 첨가한 처리구들의 표면장력은 그 변화비가 약 1.2배로, 유화제를 첨가하지 않은 것의 비가 2.5배인 것에 비해 변화가 작았다. 이것으로 보면 유화제를 첨가한 처리구는 첨가하지 않은 것에 비해 물성의 변화의 속도가 낮다고 볼 수 있다. 즉 유화제를 첨가한 상은 안정하나 산화안정성 면에서는 불안정하다고 말할 수 있으며, 표면장력이 저장하면서 변한 것은 상 자체의 물성이 변화한 것으로 볼 수 있다. 유지방구의 크기는 첨가된 유화제의 양이나 종류, 교반속도에 의해 차이를 보이는 것으로 보다 안정한 emulsion상을 만들기 위해서는 적당한 유화제의 종류, 농도, 상을 만들기 위한 조건 설정을 할 필요가 있을 것이다.

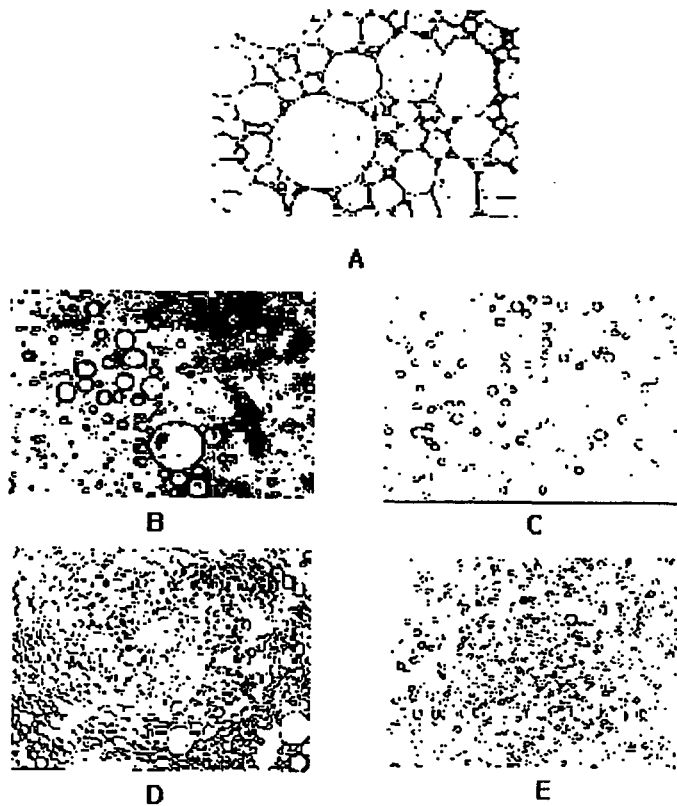


Fig. 6. Photograph ($\times 150$) of droplet in the O/W emulsion with antioxidant and emulsifier in soybean oil. (A) O/W system (B) O/W system with gallic acid (200 ppm) and tween 20 (1,000 ppm) at beginning (C) O/W system with gallic acid (200 ppm) and tween 20 (1,000 ppm) after 15 days (D) O/W system with δ -tocopherol (200 ppm) and tween 20 (1,000 ppm) at beginning (E) O/W system with δ -tocopherol (200 ppm) and tween 20 (1,000 ppm) after 15 days.

Table 2. Variation of surface tension in the emulsion(O/W) system applied various antioxidants and emulsifiers

Sample	Surface tension(dyne/cm)		
	0 day	5 day	10 day
O/w system	17.50±2.55 ¹⁾	40.19±5.54	46.71±0.21
+ gallic acid	17.79±2.03	44.49±3.07	48.19±1.06
+ gallic acid + lecithin	31.44±1.54	37.66±1.07	51.16±1.06
+ gallic acid + tween 20	45.52±2.32	45.38±3.04	53.38±2.82
+ gallic acid + span 60	35.29±2.05	44.49±1.29	49.97±1.20
+ δ-tocopherol	43.60±0.88	44.04±0.55	54.57±0.71
+ δ-tocopherol + lecithin	41.22±0.98	44.49±1.53	45.82±0.21
+ δ-tocopherol + tween 20	46.12±1.24	44.19±1.65	52.79±2.97
+ δ-tocopherol + span 60	48.64±1.50	44.49±1.55	46.26±0.57

¹⁾ Mean value with standard deviation of triplicates.

요 약

다른 유지상(bulk, oil-in-water)에 친수성 항산화제로서 gallic acid를, 소수성 항산화제로서 δ-tocopherol을 처리하고, HLB(hydrophilic lipophilic balance)에 따른 유화제를 처리하여 기질의 차이에 따른 항산화제와 유화제의 유지의 산화안정성 정도를 실험하였다. 유지는 정제하지 않은 콩기름을 사용하였고 bulk상에서 12일 경과시 gallic acid를 첨가한 처리구의 유도기간이 Rancimat method로 측정시 4.13인데 비해 δ-tocopherol을 첨가한 처리구의 유도기간은 1.18로 친수성 항산화제를 처리한 것이 3배 정도의 유지산화지연효과를 보였다. 또한 유화제의 처리에 있어서는 lecithin을 처리한 것의 유도기간이 5.07로 tween 20을 처리한 것이

2.23, span 60이 2.9인 것에 비해 산화안정성면에서 우수하였다. 이와 같은 결과는 과산화물가와 공액이중산함량에서도 같은 경향을 보였다. Emulsion상 (oil-in-water)에서도 bulk상과 같은 경향을 보였으며 이것은 emulsion상에 소수성 향산화제를 처리한 것이 유지 산화안정성면에서 더 효과적이라는 결과와는 차이가 있는데 기질의 차이, 즉 정제하지 않은 시판 콩기름을 사용한 것에 의한 차이인 것 같다. Emulsion상에서 유지방구의 크기는 저장하면서 모든 처리구에서 작아지는 경향을 보였으며, 이것은 유지방구의 크기가 작아지면서 표면적이 증가하고 따라서 공기와 접하는 면이 커지게 되므로 유지상은 안정해지나 산화는 더 촉진되므로 상의 안정과 산화안정성의 적절한 설정기준이 필요할 것으로 보인다.

제 10 절 옷나무 에탄올 추출물로부터 항산화활성 물질의 구조 동정

서 론

식품 첨가물로서의 산화방지제 개발을 위한 연구는 유지식품의 산패 억제 뿐만 아니라 최근 각종 질병 및 노화 등에 활성산소 및 과산화물이 직접적인 원인으로 작용한다는 사실이 밝혀지면서 이들 원인물질에 관여하는 항산화제를 질병 억제 및 치료제로서의 용도를 확인하려는 연구가 많이 이루어지고 있다. 지금까지 개발되어 사용되고 있는 항산화제로는 tert-butylhydroxy toluene (BHT), tertbutyl hydroxyanisol(BHA) 등과 같은 합성 항산화제, tocopherol류, carotenoid, flavonoid, tannin 등과 같은 일부 천연 항산화제가 이용되고 있거나, 이용될 가능성이 있는 실정이다. 그런데 이들 항산화제는 독성, 낮은 활성 및 용도의 한계성⁽¹⁾ 등의 여러 가지 문제점을 가지고 있어 사용에 제한을 받고 있다. 따라서 보다 안전⁽²⁾하면서도 강한 항산화활성을 가진 물질을 천연물⁽³⁻⁸⁾ 또는 미생물 대사산물⁽⁹⁾로부터 탐색하려는 연구가 현재 활발히 수행되고 있다. 또한 생약재 및 식용 식물로부터 항산화효과 뿐만 아니라 천연 항균성 물질⁽¹⁰⁾, 항암 물질⁽¹¹⁾을 개발하기 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.

본 실험에서는 예로부터 식용으로 이용되어 온 각종 식물과 질병치료의 목적으로 사용되어온 한약재를 에탄올로 추출하여 이들의 항산화 활성을 검색하였다. 예비 검색결과 항산화 활성이 비교적 우수한 것으로 확인된 옷나무 수피 추출물에 대하여 용매 분획, silica gel column chromatography, thin layer chromatography 등을 통하여 활성물질을 분리, 활성을 재확인하였고, 분리된 이들 물질에 대하여

Mass spectrometer 및 NMR 등의 각 자료를 해석하여 활성 원인물질의 구조를 동정하였다.

옷나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 옷나무(*Rhus verniciflua* STOKES)는 중국으로부터 도입된 낙엽활엽소교목으로 옷나무의 수액을 옷이라 하여 도료 및 공업용으로 사용하고 한방에서는 구충, 복통, 통경, 변비 등에 약재로 사용한다⁽¹²⁾. 옷나무의 화학성분은 수피의 물 추출물에서 fisetin, fustin이 알려져 있고, gum 추출물에서 분리한 urushiol은 독성을 갖는데 토끼의 혈압을 낮추고 사람의 피부에 patch-test에서 양성반응을 일으킨다고 알려져 있다⁽¹³⁾. 이와 같이 여러 가지 효능과 함께 민간에서도 널리 식용하고 있는 옷나무 추출물을 대상으로 항산화 활성을 갖는 물질을 분리, 동정하고 항산화 활성을 확인함으로써 새로운 항산화제로서 사용할 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 옷나무는 전주소재 한약방에서 건조된 것을 구입, 분쇄하여 실험재료로 사용하였다. 항산화 실험에 사용한 유지는 항산화제가 첨가되지 않은 팜유와 돈지를 (주)농심에서, 대두유는 시판품(동방유량)을 구입, 냉동(-75℃) 보관하며 사용하였다.

사용기기

Rancimat 679(METHROHM AG, CH-9100 Heris, Switzerland)를 이용하여 유지의 유도기간을 측정하였고, 순수 분리된 물질의 구조동정을 위하여 Electron

Impact/Mass (ZEOL JMS-AX505WA, Japan), $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) (ZEOL JNM-LA400, Japan)을 사용하였다.

항산화 활성 물질의 분리

항산화 활성 물질은 전보⁽¹⁴⁾와 같이 분리하였다. 즉 옷나무 RCF-11 분획물(190 mg)을 아세틸화⁽¹⁵⁾한 후, preparative thin layer chromatography한 후 세 개의 fraction으로 분리하였다. 분리한 아세틸화물은 메탄올(MeOH)에 녹이고 KOH 수용액을 가하여 실온에서 탈아세틸화하여 활성 검정에 사용하였다. RCF-13(80 mg)은 헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올 (8 : 4 : 1, v/v/v)로 silica gel column chromatography를 이용하여 분리하였다.

Rancimat을 이용한 유도기간 측정

각 분리물의 항산화 정도는 전보⁽¹⁴⁾와 같이 Rancimat을 사용하여 측정하였다.

1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)를 이용한 전자공여능 측정

DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA)⁽¹⁶⁾은 각 시료 0.2 mL에 10^{-4} M DPPH를 2.8 mL 가하고 10초간 진탕, 10분 방치 후 흡광도를 측정하였다. EDA는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 구하여 다음과 같이 백분율로 표시하였다.

$$\frac{(\text{Absorbance of no addition samples} - \text{Absorbance of addition samples})}{(\text{Absorbance of no addition samples})} \times 100$$

Liposome상에서의 thiobarbituric acid(TBA)값 측정

유지는 실제 식품에서 liposome 상으로 존재 할 수 있으므로 liposome 상에서의

항산화 효과는 상당한 의미가 있다. Lecithin(100 mg)에 클로로포름 2 mL를 가하여 녹인 후 감압 농축하고 10 mM potassium buffer(pH 7.4)를 10 mL 가하여 20분간 sonication(10℃)한 후 10 mM FeCl₃ 0.1 mL 첨가하여 liposome 상(0.5 ~1.5 μm)을 만들고 제조한 liposome상에 옷나무 분리물 RCF-11-1, RCF-11-2, RCF-11-3, RCF-13-1을 적용하였다^(17,18). 이 liposome에 각 분리물을 상에 대해 각각 2 ppm, 20 ppm 농도로 첨가하고, δ-tocopherol를 함께 첨가하여 상승효과도 시험하였다. Thiobarbituric acid (TBA)가는 37℃에서, 2시간 처리 후 측정하였다⁽¹⁹⁾. 즉, liposome 상을 screw cap tube에 2 mL를 취하고 BHT 0.01 mL, TBA 시약 2 mL, Trichloro acetic acid 0.2 mL 가하여 20분간 끓는 수욕상에서 반응시키고 냉수로 냉각한 다음 532 nm에서 흡광도를 측정하여 TBA가로 하였다.

$$\text{지질과산화 억제능(\%)} = \frac{(A_c - A_s)}{(A_c - A_B)} \times 100$$

A_c : 시료 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

A_s : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

A_B : 시료, FeCl₃를 첨가하지 않은 공시료의 흡광도

결과 및 고찰

옷나무 CHCl₃ 분획물로부터 분리한 RCF-11, RCF-13 획분의 항산화 효과

옷나무 에탄올 추출물로부터 용매 분획하여 항산화 활성이 가장 우수한 클로로포름 분획물을 페놀성화합물을 중심으로 분리하여 항산화 활성이 우수한 유리 페놀산성 성분을 분리하였으며, 이를 silica gel column chromatography 실시하여 항산화 활성이 우수한 RCF-11(190 mg)를 분리하였다. RCF-11을 아세틸화시켜서 다시

thin layer chromatography하여 노란색의 RCF-11-1(10.6 mg), RCF-11-2(36.5 mg) 및 RCF-11-3(13.5 mg)을 얻었다. RCF-13은 헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올 (8 : 4 : 1, v/v/v)에서 silica gel column chromatography 하여 노란색을 띄는 RCF-13-1(55.6 mg)을 얻었다. TLC를 통해 단일 spot로 확인 된 4개의 분리물은 Fig. 1과 같다. 각 분리물들에 대한 항산화활성을 전자공여능을 측정하여 비교한 결과는 Table 1과 같다. RCF-11로부터 분리한 RCF-11-1, RCF-11-2, RCF-11-3과 RCF-13으로부터 분리한 RCF-13-1을 각각 200 ppm 씩 DPPH 용액에 첨가한 후 전자공여능을 측정하여 항산화 활성을 비교한 결과 RCF-11-3이 74.1%로 가

Table 1. Electron donating ability(EDA) of subfractions(RCF-11-1 ~ RCF-11-3, RCF-13-1) isolated from CHCl₃ fraction of *Rhus verniciflua* STOKES

Fraction	EDA(%) ¹⁾
	200 ppm ²⁾
RCF-11-1	10.51
RCF-11-2	54.62
RCF-11-3	74.11
RCF-13-1	26.32
δ-tocopherol	75.48
BHT	45.19
BHA	73.47

¹⁾ Electron donating ability : (Abs. of no addition samples - Abs. of addition samples) / (Abs. of no addition samples) × 100

²⁾ Concentration of each fraction

Rf

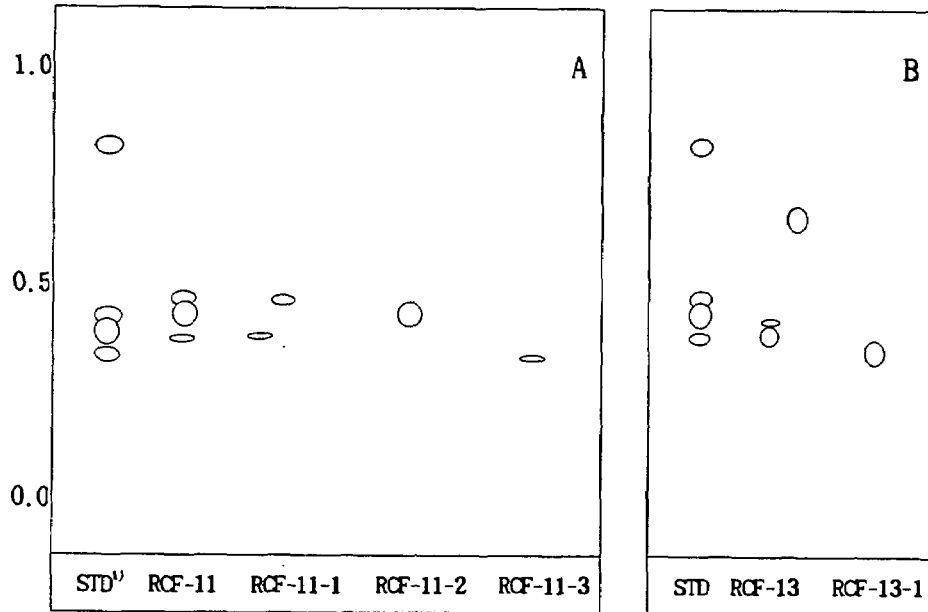


Fig. 1. Thin layer chromatogram of active compounds(RCF-11, RCF-13) isolated from CHCl_3 fraction of *Rhus verniciflua* STOKES.

¹⁾ Standard, Free phenolic acid fraction of *Rhus verniciflua* STOKES.

A: CHCl_3 : MeOH : H_2O (20 : 4 : 1, v/v/v)

B: Hexane : EtOAc : H_2O (8 : 4 : 1, v/v/v)

장 강한 활성을 나타내었고, RCF-11-2는 54.62%를 나타내어 같은 농도의 BHT(45.19%)보다는 높은 전자공여능을 보였으며, BHA(73.47%) δ -tocopherol(75.48%)과는 비슷한 전자공여능을 보였다. 이는 옷나무 분획물들에 전자를 공여하는 능력이 강한 물질이 존재한다는 것을 보여준다. DPPH를 이용하여 측정하는 방법은 간단하나 전자공여능만을 가지고 항산화활성을 측정하는 것은 변별력이 낮으므로 Rancimat을 사용하여 각 분획물들의 유도기간을 측정한 결과는 Fig.

2와 같다. 돈지에서 RCF-11(200 ppm) 획분의 AI(antioxidant index)는 5.57로 같은 농도에서 RCF-11-1, RCF-11-2 및 RCF-11-3 획분은 각각 1.17, 1.84, 2.68로 소분획으로 분리하기 전의 Antioxidant Index(AI)와 비교해보면 분리 후에 항산화 활성이 감소하였다. 이와 같은 결과는 식물성유인 팜유, 콩기름에서도 마찬가지이었다. 이는 세 물질이 함께 존재할 때 상승효과로 인하여 그 활성이 높다고 할 수 있다.

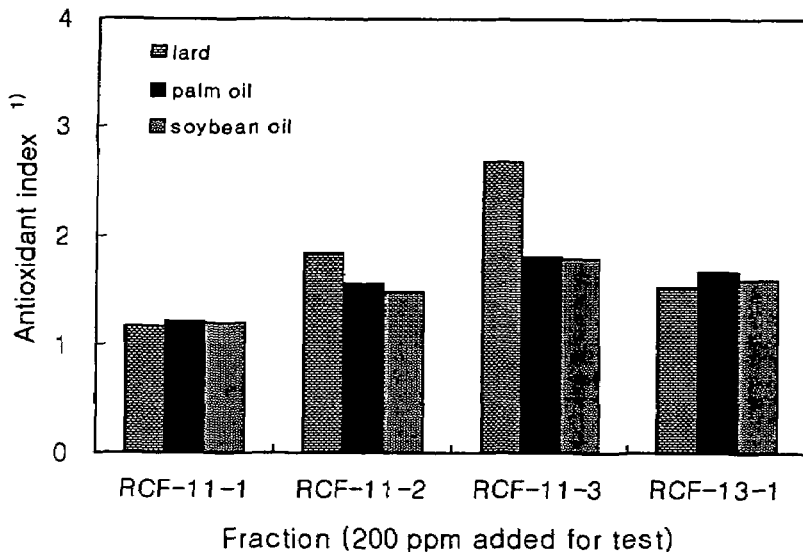


Fig. 2. Antioxidative activity of fraction RCF-11-1~RCF-11-3 and RCF-13-1 isolated from CHCl_3 fraction of *Rhus verniciflua* STOKES by Rancimat method.

¹⁾ AI(antioxidant index) was expressed as induction period of oil containing each fraction/induction period of natural oil. Induction period of oil was determined by Rancimat method at 120°C, 20 L (air)/ 1 hr

Liposome 상에서의 율나무 획분들의 항산화효과

Huang등⁽¹⁸⁾에 의하면 지질상의 물리적인 상태는 항산화제의 분산에 영향을 미치고 항산화제의 행동에 유의적으로 영향을 미치며, linoleic acid는 극성에 따른 항산화제와 농도에 영향을 받는 수용성 micelle 안에서 독특한 물리적 성질을 가지기 때문에 식품 항산화제를 측정하는데 적당한 기질이 아니라고 하였다. 따라서 불포화 triglyceride와 인지질이 지질식품계에서 항산화활성을 측정하는데 적당한 기질이라고 하였다. 이에 본 실험에서는 율나무 에탄올 추출물에서 분리한 소획분 RCF-11-1, RCF-11-2, RCF-11-3 그리고 RCF-13-1을 liposome상에 적용, thiobarbituric acid 함량을 측정하여 기질에 따른 율나무 분획물들의 항산화활성을 측정하고자 하였다. 인지

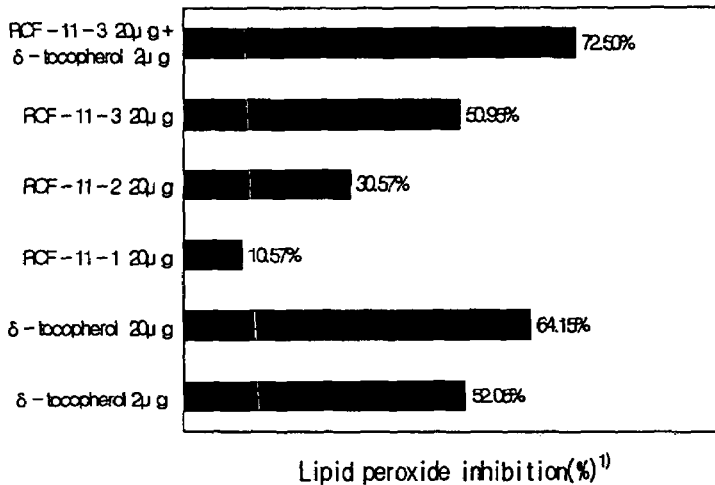


Fig. 3. Inhibition of lipid oxidation in the liposome system by fraction RCF-11-1~RCF-11-3 and RCF-13-1 isolated from CHCl₃ fraction of *Rhus verniciflua* STOKES.

¹⁾ (Abs. of no addition samples - Abs. of addition samples) / (Abs. of no addition samples - Abs. of no addition samples and FeCl₃) × 100.

질을 이용하여 제조된 liposome상에 분리물들을 적용하여 항산화활성을 측정하였으며, δ -tocopherol과의 상승효과를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. Liposome상에 대해 200 ppm의 분획물을 처리하여 lipid peroxide inhibition(%)를 측정한 결과 전자공여능이나 유도기간의 결과와 같이 옷나무 분획물 중 RCF-11-3이 유지의 산패 지연효과가 가장 높았다. 그러나 δ -tocopherol(20 ppm)보다는 낮은 산패 지연효과를 보였다.

옷나무 CHCl_3 분획물로부터 얻은 RCF-11-1 획분의 구조결정

옷나무 에탄올 추출물로 부터 분리된 RCF-11-1는 TLC 황산 발색시 연한갈색을 나타내고 장파장 자외선하에서 연두색 형광색을 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 4, 400 MHz, CDCl_3)로부터 3개의 OH기가 -OAc로 치환된 것 δ 2.31, 2.30, 2.30(3H, s)을 알 수 있었고 δ 4.37(2H, q, $J=7.20$ Hz)로부터 methyl기를 이웃한 oxymethylene을, δ 1.37(3H, t, $J=7.20$ Hz)로부터 말단 - CH_3 의 존재가 관찰되어 ethoxy기의 존재가 확인되었다. 또한 δ 7.80(1H, s)에서 benzene 탄소의 존재가 확인되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 4, 100 MHz, CDCl_3)에서 δ 122-143 ppm에서 benzene고리의 존재를 확인하고 164 ppm에서 carboxyl기의 signal을 관찰할 수 있었다. 또한 Fig. 5에서 보는바와 같이 EI-MS fragment pattern(m/z , 198, 170)으로 부터 gallic acid⁽²⁰⁾의 -H가 - CH_2CH_3 로 치환된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 메탄올로 옷나무를 추출한 후, 용매분획하고 TLC로 확인하였을 때 TLC상에서 동일한 spot이 관찰되지 않은 사실로부터, 에탄올로 추출시에 추출용매에 의해 에틸기가 carboxyl기에 도입되어 나타난 것으로 확인하였다. M/z , 153에서 -OH기의 peak를, m/z 125에서 -CO의 peak를 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 부터 옷나무에 존재하는 항산화활성 물질인 RCF-11-1은 gallic acid, 즉 3, 4, 5-trihydroxy benzoic acid 로 확인되었다.

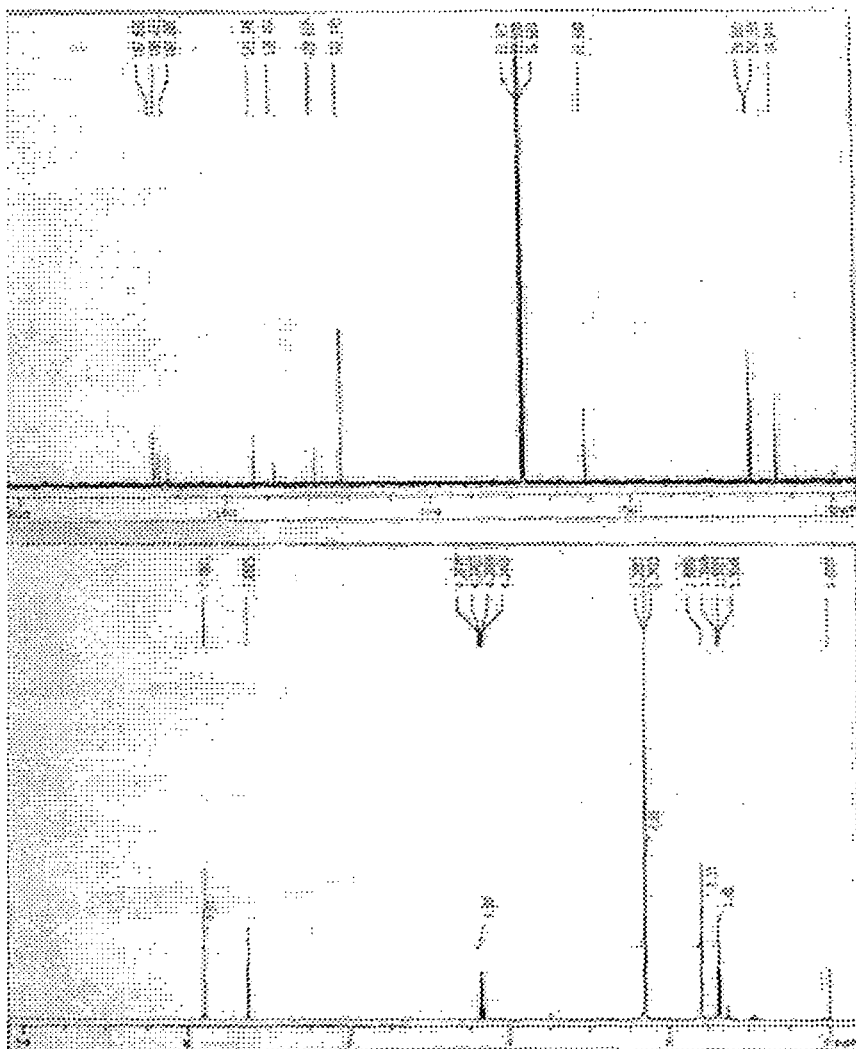


Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of RCF-11-1 isolated from CHCl_3 fraction of *Rhus verniciflua* STOKES.

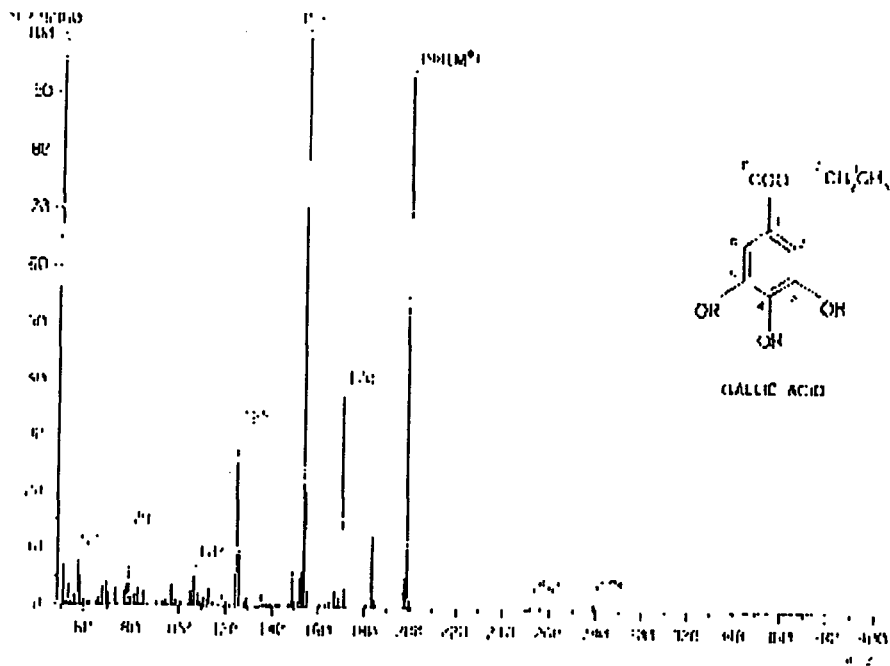


Fig. 5. EI/MS spectrum of RCF-11-1 isolated from CHCl_3 fraction of *Rhus verniciflua* STOKES.

옻나무 CHCl_3 분획물로부터 얻은 RCF-11-2 획분의 구조결정

옻나무로부터 분리된 RCF-11-2는 황산발색시 붉은색을 나타냈으며, 갈색형광을 보였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)에서 7.95(1H, d, $J=8.8$ Hz), 7.33(1H, d, $J=3.1$ Hz), 7.26(1H, d, $J=8.8$ Hz), 6.83(1H, d, $J=8.4$ Hz), 6.81(1H, dd, $J=2.1, 8.4$ Hz)에서 *m,p*-3치환 benzene 고리의 존재를 관찰할 수 있었고, 5.49(1H, dd, $J=3.1, 13.2$ Hz)에서 cyclohexane의 존재를 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)로부터 190.28 ppm에서 cyclohexanone의 peak를 관찰할 수 있었고 156.66 ppm,

142.36 ppm, 143.34 ppm에서 산소결합한 benzene 탄소의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 문헌⁽²¹⁾과 비교하여 3', 4', 7-trihydroxyflavanone(butin)으로 추정하였다.

오틀나무 CHCl₃ 분획물로부터 얻은 RCF-11-3 획분의 구조결정

오틀나무에서 분리한 RCF-11-3은 황산발색시 황색을 나타내었고 노란형광을 나타내었다. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃)에서 7.10(1H, d, J=16.1 Hz), 7.53(1H, d, J=16.1 Hz)로부터 trans 배치를 가진 α, β-불포화 케톤의 peak를 관찰할 수 있었으며, 7.01(1H, d, J=2.2 Hz), 7.53(1H, dd, J=2.2, 8.6 Hz), 7.72(1H, d, J=8.6 Hz), 7.42(1H, d, J=2.1 Hz), 7.24(1H, d, J=8.4 Hz), 7.45(1H, dd, J=2.1, 8.4 Hz)에서 m, p-3치환 benzene 구조가 2개 존재함을 알 수 있었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃)에서 190.02 ppm에서 -C=O의 존재를 관찰할 수 있었다. 또한 Fig. 6과 같이 EI-MS fragment pattern m/z, 269로부터 benzyl위치에서 tropylium ion의 peak를 관찰하였고 m/z, 71에서 -OCH₃의 peak를 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 문헌⁽²¹⁻²³⁾과 비교하여 2', 4', 3, 4-tetrahydroxychalcone(butein)으로 동정하였다.

오틀나무 CHCl₃ 분획물로부터 얻은 RCF-13-1 획분의 구조결정

오틀나무로부터 분리한 RCF-13-1은 황산발색시 황색을 띠는 붉은색을 나타내었으며, 장파장의 자외선하에서 노란형광을 나타내었다. Fig. 7의 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)에서 7.50(1H, d, J=8.3 Hz), 7.13(1H, dd, J=8.3, 2.0 Hz), 7.41(1H, d, J=2.0 Hz), 6.59(1H, d, J=8.3 Hz), 6.74(1H, d, J=8.3 Hz)로부터 benzene고리가 존재함을 확인하였으며, ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃)에서 184.49 ppm에서 ketone의 peak를 168.19 ppm, 149.36 ppm, 146.69 ppm, 147.68 ppm에서 산소와 결합한 benzene 탄소 signal을 관찰하였다. 또한 Fig. 8과 같이 EI-MS fragment pattern에서 m/z, 270, 253으로부터 -OH기의 peak, m/z, 242에서 -C₂H₄를 m/z, 213에서 -C₂H₅C=O를

m/z , 91에서 $C_7H_7^+$ peak를 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 문헌⁽²⁴⁾과 비교하여 3',4',6-trihydroxyaurone(sulfuretin)으로 동정하였다.

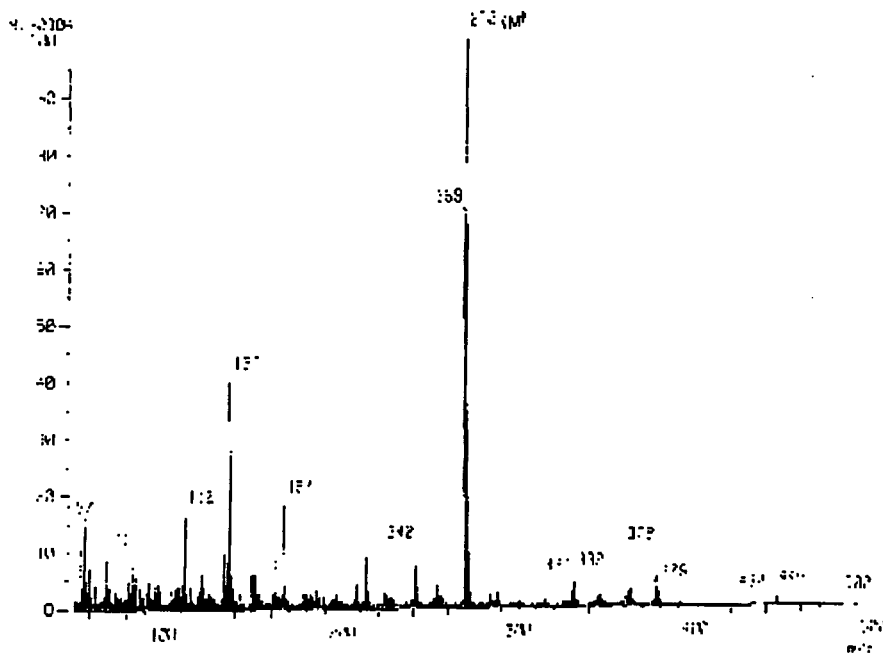


Fig. 6. EI/MS spectrum of RCF-11-3 isolated from $CHCl_3$ fraction of *Rhus verniciflua* STOKES.

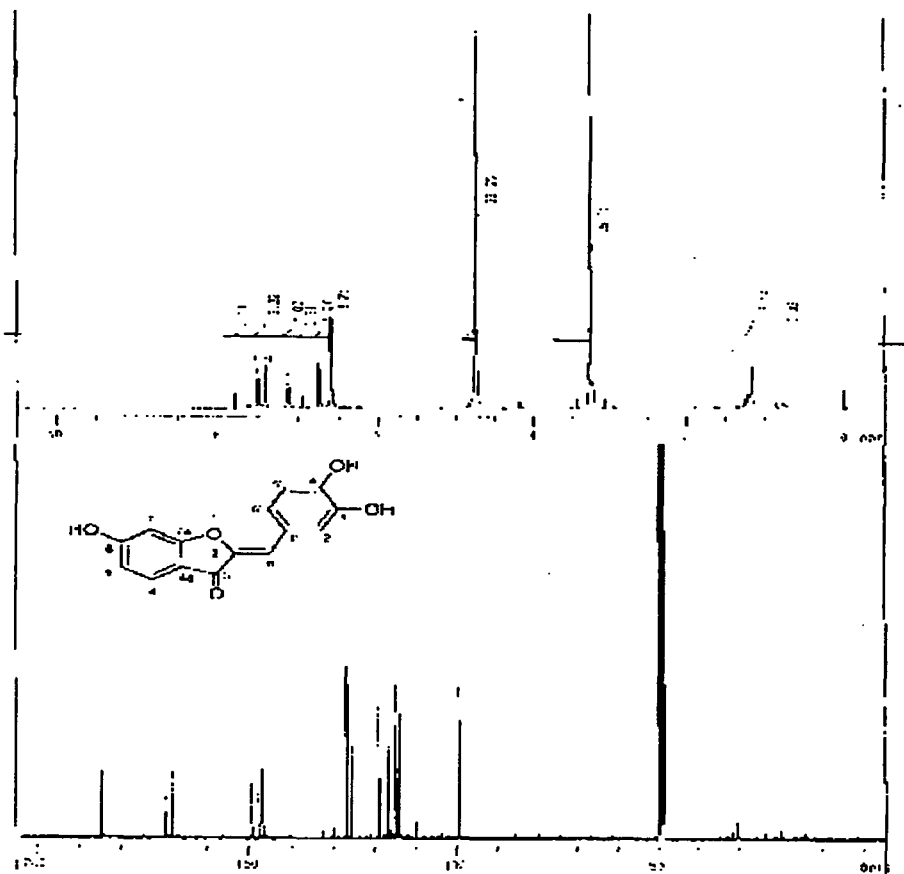


Fig. 7. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of RCF-13-1 isolated from CHCl₃ fraction of *Rhus verniciflua* STOKES. (400 and 100 MHz, CDCl₃)

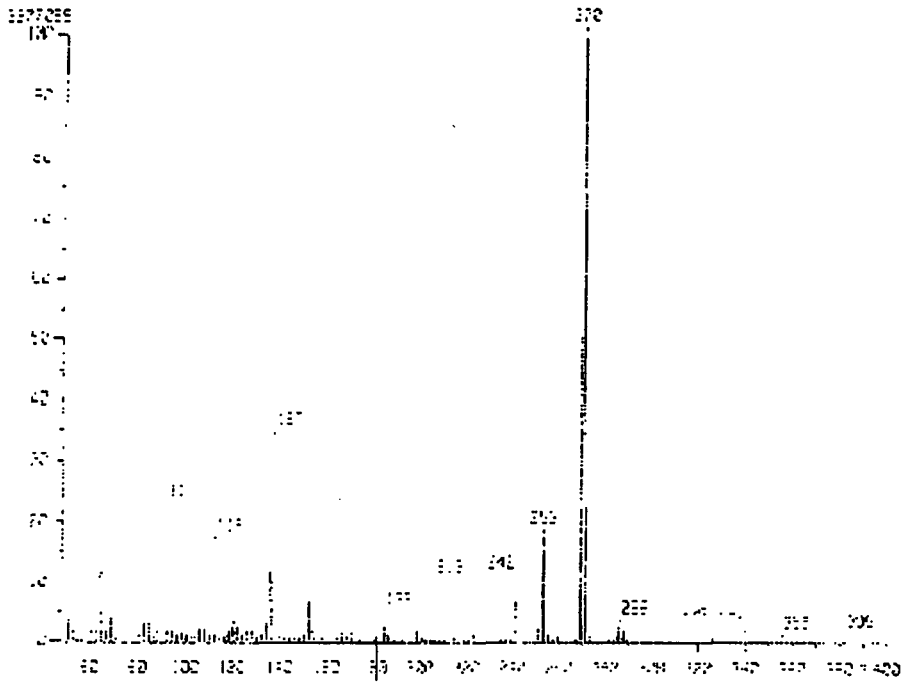


Fig. 8. EI/MS spectrum of RCF-13-1 isolated from CHCl_3 fraction of *Rhus verniciflua* STOKES.

요 약

견칠(*Rhus verniciflua* STOKES)은 옷나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 옷나무 (*Rhus verniciflua* STOKES)의 수액으로 한방에서는 구충, 복통, 통경, 변비의 목적으로 사용되어왔다. 옷나무 75% 에탄올 추출물의 클로로포름분획물을 phenolic 성분을 중심으로 분리하여 항산화활성이 우수한 free phenolic acid 성분(RCF)을

가지고 silica gel column chromatography 실시하여 RCF-11, RCF-13로 이름 붙이고, 분리된 획분은 Rancimat method에서 다른 획분보다 강한 항산화활성을 보였다. RCF-11은 다시 3개의 물질로 RCF-13은 1개의 물질로 분리되었다. 소분획으로 분리된 물질들은 전자공여능, Rancimat을 통한 유도기간의 측정과 liposome상에서의 TBA test를 통해 항산화활성을 측정하였다. RCF-13-1은 74.1%로 가장 강한 활성을 나타내었고, RCF-11-2는 54.62%를 나타내어 같은 농도의 BHT(45.19%) 보다는 높은 전자공여능을 보였으며, BHA(73.47%), δ -tocopherol(75.48%)과는 비슷한 전자공여능을 보였다. Rancimat test에서도 돈지를 기질로 하였을 때 RCF-11-1, RCF-11-2, RCF-11-3, RCF-13-1획분의 AI는 같은 농도에서 각각 1.17, 1.84, 2.68, 1.54로 RCF-11-3의 유도기간이 가장 길었다. Liposome상에 적용하였을 때도 RCF-11-3의 lipid peroxide inhibition(%)이 전자공여능과 유도기간의 결과와 같이 유지의 산패 지연효과가 가장 우수하였다. 이 물질들은 mass 및 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 통해 각각 gallic acid, butin, butein, sulfuretin으로 확인되었다.

제 11 절 가열 살균된 소고기에 접종된 *Listeria monocytogenes*에 대한 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 에틸아세테이트 분획물과 섬바디(*Dystaenia takesimana* kitagawa) 활성 분리물의 항균효과

서 론

천연소재로서 식용 식물로부터 분리된 항균 활성 물질을 이용하여 식품의 주요한 변질원 중의 하나인 부패 및 병원성 미생물의 오염을 방지함으로써 식품의 저장 기간동안 신선함과 안전성을 지속시키려는 노력이 이루어져 왔다. 9종의 식물 추출물을 *Listeria monocytogenes*와 *Aeromonas hydrophila*가 접종된 익힌 소고기에 첨가하였을 때 정향 추출물에서 얻은 eugenol과 pimento 잎 추출물이 뚜렷한 항균 효과를 나타내었고¹⁾, *Brettanomyces anomalus*와 같은 부패성 효모에 대해서 32종의 향신료의 정유를 적용하였을 때 garlic, oregano, tyme 등의 정유 성분의 효과가 매우 뚜렷하였다고 보고되었다²⁾. 한편 보존제 첨가와 열처리, 고압과 열처리³⁾, 저장온도 제어와 공기 조성의 변화⁴⁾와 같이 살균 방법을 병용하여 그 효과를 높이려는 연구가 이루어지고 있는데 nisin을 저온 포장된 lobster에 첨가하였을 때 단독 사용보다는 열처리를 병행했을 때 살균 효과가 상승함으로써 열에 의한 제품의 무게 감소율을 낮춰 공정에 필요한 비용 절감 효과를 유도하였고⁵⁾, saponin과 acetic acid를 순차적으로 처리함으로써 각각 사용하는 것보다 호기성 균수의 감소에 더 효과적이었고 보고되었다⁶⁾. *Listeria monocytogenes*는 낮은 온도에서도 환경 요인에 의해 유제품 및 육류에 오염되어 식중독을 일으키는 psychrotroph의 일종으로 실험 재료로 이용된 익힌 육류에 인위적으로 접종하였을 때 접종위치나 공

기조성(30% CO₂/70% N₂와 vacuum)에 의해 성장속도(μ) 유도기(lag phase)가 영향을 받지 않으며 7℃와 30℃ 각각의 온도에서 유도기만 차이를 보이는 것으로 보고되었다⁷⁾.

국내에서도 이미 항균제로서의 가능성이 널리 알려진 항신료⁸⁾를 비롯하여 병의 치료에 이용되어온 한약재^{9,10,11)} 등 각종 식물체의 다양한 부위가 균의 증식 양상에 영향을 미친다는 사실이 확인되었으나 실제 식품에 천연 항균제를 적용한 연구는 활발하지 않은 실정이다. 그리하여 본 연구에서는 tryptic soy broth에서 *Listeria monocytogenes*에 대하여 증식억제와 살균 효과를 나타낸 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 75%에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물¹²⁾과 섬바디(*Dystaenia takesimana* Kitagawa)에서 분리된 항균 활성 분획인 SBD¹³⁾를 가열 살균한 소고기에 첨가한 후 *Listeria monocytogenes*를 접종하여 저장하면서 균의 증식 양상을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

기름이 적은 부위인 소고기 앞다리살을 전주시 소재 소매상에서 구입하여 곱게 다진 후 15g씩 포장재(150×200 mm, nylon/15 μ m + LDPE/40 μ m)에 넣고 밀봉하여 열이 골고루 침투할 수 있도록 얇게 펴서 121℃에서 15분간 살균하였다.

실험균주

Listeria monocytogenes(ATCC 19111)을 tryptic soy broth(TSB)에 접종하여 30℃에서 24시간 배양 후 0.1 mL 취하여 다시 TSB에 접종하여 30℃에서 24시간 배양

한 액을 0.1 mL씩 시료에 접종하였다.

식물 추출물

감초 75% 에탄올 추출물에 에틸아세테이트를 가하여 추출, 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었고, 섬바디 분리물은 75% 에탄올 추출물을 용매 분획하여 얻은 헥산 분획물을 silica gel column으로 2회 연속 분리하여 얻었다. 각각의 분획물과 분리물은 진공 건조하여 에탄올로 녹인 후 제균하여 시료에 첨가하였다.

실험방법

포장하여 살균한 소고기에 감초 에틸아세테이트 분획물을 50, 500, 1,000 ppm 농도로, 섬바디 분리물(SBD)을 1,000 ppm 농도로 첨가하여 분획물이 골고루 퍼지도록 격렬하게 혼합한 후 일정시간 laminar flow chamber에 방치시켜 에탄올을 날린 후 *Listeria monocytogenes* 배양액을 초기 농도가 10^7 CFU/g와 10^4 CFU/g이 되게 접종하여 25℃에서 3(또는1)일과 4일간 저장하면서 균수를 확인하였고, 감초 분획물 첨가구의 일부는 5℃에서 8일간 저장하면서 4일 간격으로 균수를 확인하였다. 이때 대조구는 에탄올만을 첨가한 구로 설정하였다.

결과 및 고찰

감초 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 첨가하고 초기 균수가 ca. 10^7 CFU/g이 되게 접종한 시료를 25℃에서 저장한 결과 저장 1일 후 모든 실험구가 1 log cycle 균수가 증가하여 그 수가 저장 3일까지 유지되어 감초 에틸아세테이트 추출물의 항균 효과를 확인할 수 없었다(Table 1).

Table 1. Population of *Listeria monocytogenes* on beef with inoculum(ca. 10^7 CFU/g) and incubated at 25°C

Time (day)	Treatment concentration(ppm)			
	Ethanol	Ethylacetate fraction of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch		
	666.7	50	500	1000
0	1.28×10^7	1.28×10^7	1.28×10^7	1.28×10^7
1	8.10×10^6	6.93×10^6	1.07×10^7	1.23×10^7
3	9.46×10^6	7.80×10^6	1.64×10^7	1.76×10^7

Table 2. Population of *Listeria monocytogenes* on beef with inoculum(ca. 10^4 CFU/g) and incubated at 25°C

Time (day)	Treatment concentration(ppm)	
	Ethanol	Ethylacetate fraction of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch
	666.7	1,000
0	1.32×10^4	1.32×10^4
1	1.95×10^6	5.95×10^7
4	3.90×10^6	5.00×10^6

Table 2에서보면 초기 균수가 ca. 10^4 CFU/g 인 경우 모든 실험구가 저장 1일째 균수가 대조구의 경우 4 log cycle 증가하고 처리구의 3.5 log cycle 증가함으로써 약간의 차이를 보였으나 저장 4일째 대조구와 처리구의 균이 거의 같은 수준으로 검출됨으로서 초기 접종 균수에 따른 항균 효과의 차이를 확인할 수 없었다.

Table 3을 보면 초기 접종 균수가 ca. 10^7 CFU/g 이고 저장 온도가 5°C일 때 낮

은 온도로 인하여 상온보다는 균수 증가폭이 적었으나 저장 8일째 모든 실험구의 균수가 25℃에서 저장할 때와 같은 경향을 나타냄으로서 온도에 따른 항균력에는 차이를 보이지 않았다.

Table 3. Population of *Listeria monocytogenes* on beef with inoculum(ca. 10^7 CFU/g) and incubated at 5℃

Time (day)	Treatment concentration(ppm)			
	Ethanol	Ethylacetate fraction of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch		
	666.7	50	500	1000
0	1.28×10^7	1.28×10^7	1.28×10^7	1.28×10^7
4	1.42×10^8	7.53×10^7	2.56×10^7	3.09×10^7
8	3.56×10^8	5.45×10^8	3.30×10^8	8.25×10^8

Table 4와 5를 보면 섬바디의 항균 활성 분획(SBD)을 1,000 ppm 첨가하고 25℃에서 저장하였을 경우에 감초 에틸아세테이트 분획물 첨가구와 마찬가지로 초기 접종 균수가 ca. 10^7 CFU/g일 때 저장 1일 후 모든 실험구가 1 log cycle 균수가 증가하였고, 초기 균수가 ca. 10^4 CFU/g 일 때 저장 1일째 균수가 대조구의 경우 4 log cycle 증가하고 처리구의 3.5 log cycle 증가함으로서 초기 접종 균수에 상관 없이 모든 처리구의 균수가 대조구와 마찬가지로 증가함으로서 항균 효과를 관찰할 수 없었다.

Table 4. Population of *Listeria monocytogenes* on beef with inoculum(ca. 10^7 CFU/g) and incubated at 25°C

Time (day)	Treatment concentration(ppm)	
	Ethanol	SBD fraction of <i>Dystaenia takesimana</i> kitagawa
	666.7	1,000
0	1.10×10^7	1.10×10^7
1	4.05×10^6	4.0×10^6

Table 5. Population of *Listeria monocytogenes* on beef with inoculum(ca. 10^4 CFU/g) and incubated at 25°C

Time (day)	Treatment concentration(ppm)	
	Ethanol	SBD fraction of <i>Dystaenia takesimana</i> kitagawa
	666.7	1,000
0	1.32×10^4	1.32×10^4
1	1.95×10^5	7.25×10^7
4	3.90×10^6	2.10×10^8

액체배지에서의 뚜렷한 항균 효과와는 달리 고기에서의 실험 결과는 시료내에 완충작용을 하는 지방과 근육 단백질 등이 함유되어있고 물리적 성상이 다르기 때문에 식물 추출물의 항균력이 거의 나타나지 않은 것으로 추측하여 볼 수 있다. 이는 0.7% D-3-phenyllactic acid가 액체배지에서 *Listeria monocytogenes*에 대해서

살균 효과(bactericidal effect)를 나타낸 반면에 UHT whole milk에서 배양할 경우 균의 증식억제효과(bacteriostatic effect)만을 보여 같은 액체 상태의 기질이라도 성분에 따라 항균 효과가 다르게 나타난 결과¹⁴⁾와 유사한 경향을 나타내었다.

*Lactobacillus reuteri*의 혐기발효 산물인 reuterin의 경우 우유에서 농도를 달리하여 첨가하였을 때 *Escherichia coli* O157:H7의 수가 처리농도에 비례적으로 감소하였다는 보고¹⁵⁾와 broiler chicken skin에서 유기산의 농도가 높을수록 *Salmonella typhimurium*의 수가 감소하였다는 보고¹⁶⁾와 달리 본 실험에서는 첨가물의 농도와 균수 사이의 상관성을 확인할 수 없었다.

요 약

액체배지에서 *Listeria monocytogenes*에 대하여 증식억제 효과와 살균효과를 나타낸 감초 에틸아세테이트 분획물과 셉바디 헥산 분획물의 항균 활성분획(SBD)을 농도별로 가열 살균한 소고기에 첨가하고 초기 접종 균수를 달리하여 *Listeria monocytogenes*을 접종한 후 25℃와 5℃에서 저장하면서 균수의 변화를 관찰하였다. 저장 온도가 25℃이고 초기 균수가 ca. 10^7 CFU/g일 때 저장 1일 후 모든 실험구가 1 log cycle 균수가 증가하였고, 초기 균수가 ca. 10^4 CFU/g 인 경우 저장 1일째 대조구는 4 log cycle, 처리구는 3.5 log cycle 균수가 증가함으로써 약간의 차이를 보였으나 저장 4일째 대조구와 처리구의 균이 거의 같은 수준으로 검출되므로써 초기 접종 균수에 따른 항균 효과의 차이를 확인할 수 없었다. 저장 온도가 5℃이고 초기 접종 균수가 ca. 10^7 CFU/g일 때 낮은 온도로 인하여 상온보다는 균수 증가정도가 적었으나 저장 8일째까지 대조구와 처리구의 차이는 관찰되지 않았다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구개발 목표 달성도

1. 소목 등 230여 종의 식물을 대상으로 항균 및 항산화 효과의 검색을 완료하였다.
2. 대상식물에서 항균 및 항산화 활성 물질을 분리, 동정하는 최적 조건을 확립하였으며, 항균성 및 항산화성을 측정하는 방법을 확립하였다.
3. 대상식물에서 항균 및 항산화성이 높은 분획 또는 순수물질을 규명하였다. 순수물질을 규명한 결과 소목은 brazilin, 강진향은 protosapannin A, 건칠은 gallic acid, butin, butein, sulfuretin, 상백피는 kuwanon G, 감초는 liquiritigenin, 고삼은 kushenol F, 섬바디는 falcarindiol, 운향나무는 gravacridonediol이 항균 또는 항산화 활성이 가장 높은 물질로 확인되었다.
4. 분리된 항균성 물질을 유기산 등과 혼합 사용하여 synergistic effect를 확인하였다.
5. 분리된 항산화성 물질을 유화제 또는 다른 항산화제와 혼합 사용하여 synergistic effect를 확인하였다.
6. 분리된 항균성 물질을 멸균 소고기에 적용하여 항균효과를 확인하였다.
7. 항산화성 물질을 potato chip 등 식품에 적용하여 활성을 검증하였다.

제 2 절 대외기여도

1. 학술분야

가. 논문 발표(9건)

- 1) 신동화, 김문숙, 한지숙. 국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균특성. 한국식품과학회지, 29(4): 808-816 (1997)
- 2) 안은영, 한지숙, 신동화. 상백피 추출물중 *Listeria monocytogenes* 증식 억제 물질의 분리 및 효과. 한국식품과학회지, 29(6): 1236-1240 (1997)
- 3) 안은영, 신동화, 백남인, 오진아. 고삼으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정. 한국식품과학회지, 30(3): 672-679 (1998)
- 4) 안은영, 신동화, 백남인, 오진아. 감초로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정. 한국식품과학회지, 30(3): 680-687 (1998)
- 5) 안은영, 안은숙, 신동화. 관중(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)의 에탄올추출물 및 용매분획물이 *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 영향. 전북대학교 농대논문집, 29: 23-33 (1998)
- 6) 김인원, 신동화. 한약재로부터 선발된 율나무 수피 추출물로부터 항산화 활성물질의 분리. 한국식품과학회지, 31(3): 855-863 (1999)
- 7) 오진아, 신동화, 안용선. 섬바디로부터 분리된 Falcarindiol과 유허제와의 혼합에 따른 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균 상승효과. 한국식품과학회지, 31(3): 864-869 (1999)
- 8) 오진아, 신동화, 백남인. 섬바디로부터 *L. monocytogenes*에 대한 생장억제 물질의 분리 및 구조동정. 한국식품과학회지, 31(4): 984-993 (1999)
- 9) 김인원, 신동화, 장영상. Bulk와 Emulsion System에서 유지에 대한 항산화제와 유허제와의 항산화효과. 한국식품과학회지, 31(4): 1077-1083 (1999)

나. 심포지엄(12건)

- 1) 신동화, 백남인, 최웅, 김인원. 소목(*Caesalpinia sappan*, L)으로부터 항산화 활성물질의 분리. 한국식품과학회 춘계 학술발표회, Proceeding, p189 (1997)
- 2) 신동화, 백남인, 최웅, 김인원. 소목(*Caesalpinia sappan*, L) 분리물을 첨가한 유지의 저장 중 항산화효과. 한국식품과학회 추계 학술발표회, Proceeding, p176 (1997)
- 3) 신동화, 안은영, 오진아. 감초로부터 항균 활성물질의 분리 및 동정. International Symposium on Biotechnology Processes, Proceeding, p349 (1997)
- 4) 신동화, 김지혜, 오진아, 김인원, 안은숙. 휘발성 천연 항균물질에 대한 미생물 증식 억제. 한국산업미생물학회, 국제심포지엄 및 1998년 추계 학술발표회, Proceeding, p370 (1998)
- 5) 최웅, 신동화, 백남인, 김인원. Brazilin의 항산화효과와 Potato chip에 적용시험. 한국식품과학회 춘계 학술발표회, p4-11 (1998)
- 6) 신동화, 안용선. 식중독 미생물에 대한 에탄올, 유기산, 식물 추출물의 synergist 효과. 한국식품과학회 30주년 기념 심포지엄 및 학술발표회, Proceeding, p359 (1998)
- 7) 안용선, 신동화, 성낙선. 약용식물 에탄올 추출물에 대한 항균활성 검색. 1999년도 식품관련학회 춘계 연합 학술대회, Proceeding, p11-33s (1999)
- 8) 김인원, 신동화, 장영상. Isolation and identification of antioxidative components from ethanol extract of *Rhus verniciflua* STOKES and application to different oil system. 1999 IUFOST, Sydney, Proceeding, p22-30 (1999)
- 9) 오진아, 신동화. Isolation and identification of growth inhibition substance from edible plant on *L. monocytogenes* and synergistic effect with monoglyceride. 1999 IUFOST, Sydney, Proceeding, p22-32 (1999)

- 10) 신동화, 안용선, 성낙선, 백남인. 운향 에탄올 추출물의 항균활성 및 동정. 식품위생안전성학회 추계 학술대회, Proceeding, p-24 (1999)
- 11) 김용석, 신동화. 윗나무 추출물을 첨가한 potato chip의 산화안정성 비교. 한국식품과학회 추계 학술대회, Proceeding, p2-14 (1999)
- 12) 안용선, 신동화, 성낙선. 예덕나무 에탄올 추출물의 항균활성. 한국식품과학회 추계 학술대회, Proceeding, p7-15 (1999)

다. 총설 발표(2건)

- 1) 향산화제의 역할과 생리적기능(농촌생활과 과학, 1997)
- 2) 향산화제는 식품에서 어떤 역할을 하는가(소비자를 위한 식품의약품정보, 식품의약품안전청, p24-27 (1998.12))

라. 교육에 활용(1건)

- 1) 기능성 식품과 천연향산화제(농촌생활연구소, 1997.7.11)

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

천연자원 유래 항균 및 항산화 물질들은 다양한 종류와 유통 단계의 가공식품에 활용할 수 있다. 신물질 사용에 따른 제반 식품 특성(저장학적 특성, 관능적 특성, 기능적 특성 등)의 변화 및 예상되는 문제점 해결에 중점을 두어 21세기 노령화 시대에 대비하고 요구되는 기술을 확보한다. 또한 노령식, 환자식 등 medical foods에 적용, 제품화하고 아울러 기존 식품에 이들 새로운 기능성 소재를 강화함으로써 건강 추구형, 생지향형 가공식품의 수요 확대 창출하는데 활용한다. 기능성식품의 조제 기술은 본 과제에서 대상으로 하는 다양한 약용식물을 이용한 유사 제품 개발에 응용할 계획이다.

제 6 장 참 고 문 헌

서 론

- Al-Delaimy, K.S. and Ali, S.H. : Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, 21, 110 (1970)
- Bae, K.H. and Byun, J.H. : Screening of leaves of higher plants for antibacterial action. *Kor. J. Pharmacogn*, 18, 1 (1987)
- Beuchat, L.R. and Golden, D.A. : Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43, 134 (1989)
- Buchanan, R.L. and Shepherd, A.J. : Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. *J. Food Sci.*, 46, 976 (1981)
- Coal, M.M. : Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and their mode of action. *JAACS*, 51, 321 (1974)
- Eun, J.B., Hearnberger, J.O. and Kim, J.M. : Antioxidants, activators, and inhibitors affect-the enzymic lipid peroxidation system of catfish muscle microsomes. *J. of Food Sci.*, 58, 71 (1993)
- Harman, D. : The free-radical theory of aging. In Free radicals in biology, Pryor, N.A., Ed., Academic Press, Orlando, vol. 5, Ch.8 (1982)
- Haumann, B.F. : Antioxidants: Firms seeking products they can label as natural. *Inform*, 1, 1002 (1990)
- Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M. and Ogiso, T. : Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in F 344 rats. *J. Natl. Cancer*

- Inst.* 70, 343 (1983)
- Kasuga, A., Aoyagi, Y. and Sugahara, T. : Antioxidants activities of edible plants. *日本食品工業學會誌.* 35, 22 (1988)
- Tsuda, T., Osawa, T., Nakayama, T., Kawakishi, S. and Ohshina, K. : Antioxidant activity of pea bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extract. *JAOCS*, 70, 9 (1993)
- Wills, E.D. : Enzyme inhibition of allicin, the active principle of garlic. *Biochem. J.* 63, 514 (1956)
- Yen, G.C. and Duh, P., D. : Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *JAOCS*, 70, 383 (1993)
- 박수용, 김찬조 : 생약재에 의한 식품보존에 관한 연구. *한국농화학회지*, 22, 91 (1979)
- 백수봉, 오연선 : 토양 병원균 *Pythium ultimum* 방제를 위한 항균성 약용 보건사회부 : 식품첨가물 공전, 한국식품공업협회 (1995)
- 부용출, 전체옥 : 녹차와 목단피의 항산화 성분. *한국농화학회지*, 36, 326 (1993)
- 신동화, 이병완 : 식품 부패 미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색. *한국식품학회지*, 23, 200 (1991)
- 신동화, 이연재, 장영상, 강우석(b) : 붉나무 추출물과 몇가지 synergist를 첨가한 기름 튀김 식품의 저장 안정성 비교. *한국식품과학회지*, 24, 547 (1992)
- 양재원, 유태종 : 인삼 Extracts가 유산균의 생육에 미치는 영향. *고려인삼학회지*, 3, 268 (1979)
- 유주현, 조재민, 오두환, 변유량 : Margarine에 대한 고추 과피 추출물의 항산화성에 관한 연구. *산업미생물 학회지*, 9, 21 (1981)
- 이규룡 : Trimethylenetrianiiline, benzoin 및 회향유의 항진균 작용. 카톨릭대

- 학 의학부 논문집, 14, 379 (1968)
- 이근계 : 인삼 사포닌과 그 분획물이 유기산의 산화에 미치는 영향에 관한 연구, 상명여대 논문집, 10, 425 (1982)
- 장영상, 최용, 신동화, 신재익 : 향산화 효과가 있는 붉나무 추출물의 몇가지 synergist 효과. 한국식품과학회지, 24, 149 (1992)
- 정창기, 박완규, 유익제, 박기문, 최춘언 : 카레 향신료 정유성분의 항균성. 한국 식품과학회지, 22, 716 (1990)
- 조남철, 권덕영, 신말식, 홍운호, 임현숙(a) : 마늘의 농도가 김치 미생물에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 20, 231 (1988)
- 조병헌 : Trithioformaldehyde, Benzalaniline 및 초피나무 alcohol 추출물의 진균 작용. 카톨릭대학 의학부 논문집, 10, 65 (1965)
- 종합식품연구원 : 국내외 식품첨가물 현황, p.6, 종합식품연구원 (1987)
- 최용, 신동화, 장영상, 신재익 : 식용유지에 대한 붉나무 추출물의 향산화 효과. 한국식품과학회지, 24, 320 (1992)
- 한용봉, 김미라, 한병훈, 한용남 : 갓과 겨자의 향산화 활성성분에 관한 연구. 생화학회지, 18, 41 (1987)
- 홍무기, 정영호, 홍종욱 : 사과나무 부란병 방제용 식물성 살균제 개발. 농시논문집(작물 보호편), 30, 24 (1988)
- 홍완수, 윤선 : 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치 발효에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 21, 331 (1989)
- 福田靖子 : ゴマ種子の抗酸化成分に關する食品化學的研究. 日本食品工業學會., 37, 74 (1990)

제 1 절 국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균특성

1. Ismaiel, A and Pierson, M.D.: Inhibition of growth & Germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. *J. Food Sci.*, 55, 6 (1990)
2. Shelef, L.A., Naglik, O.A. and Bojen, D.W.: Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosenary and allspice. *J. Food Sci.*, 45, 1042 (1980)
3. Conner, D.E. and beuchat, L.R.: Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. *J. Food sci.*, 49, 429 (1990)
4. Al-Delaimy, K.S. and Ali, U.P.: Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric*, 21, 110 (1970)
5. Singh, H.B. and Singh, U.P.: Inhibition of growth and sclerotium formation in *Rhizoctonia solani* by garlic oil. *Mycologia.*, 72, 1022 (1980)
6. Muroi, H. and Kubo, I.: Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1102 (1993)
7. Kubo, I, Muroi, H. and Himejima, M.: Antibacterial Activity against *Streptococcus mutans* of Mate tea flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 107 (1990)
8. Matthews, P.D. and Haas, G.J.: Antimicrobial activity of some edible plants: Lotus (*Nelumbo nucifera*), coffee, and others. *J. Food Prot.*, 56, 66

(1993)

9. Muroi, H. Kubo, A and Kubo, I: Antimicrobial activity of cashew apple flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1106 (1993)
10. Pulusani, S.R., Rao, D.R. and Sunki, G.R.: Antimicrobial activity of lactic cultures: Partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, 44, 575 (1979)
11. Abdel-bar, N., Harris, N.D., and Rill, R.L.: Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food sci.*, 52, 411 (1987)
12. Spelhaug, S.R., and Harlander, S.K.: Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus Pentosaceus*. *J. Food Prot.*, 52, 856 (1989)
13. Okereke, A and Montville, T. J.: Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by Lactic acid bacteria. *J. Food prot.*, 54, 349 (1991)
14. Daeschel, M.A.: Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food technol.*, 43, 164 (1989)
15. Papineau, A.M., Hoover, D. G., Knorr, D., and Farkas, D.F.: Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.*, 5, 45 (1991)
16. Ralston, G.B., Tracey, M.V., Wrench, P.N.: The inhibition of fermentation in baker's yeast by chitosan. *Biochim. Biophys. Acta*, 93, 652 (1964)
17. 유영선, 박기문, 김영배: 생약재 및 향신료의 *Streptococcus mutans* 증식억제 효과. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 187 (1993)
18. Yamaki, M., Asogawa, T., Kashihara, M.: Screening for antimicrobial

- action of chinese crude drug and active principles of Hu zhang. *Shoyakugaku Zasshi.*, 42, 153 (1988) .
19. 한지숙, 신동화, 윤세억, 김문숙 : *Listeria monocytogenes*의 증식을 억제하는 식용가능한 식물추출물의 검색, *한국식품과학회지*, 26, 200 (1991)
 20. 박옥연, 장동석, 조학래 : 한약재의 추출물의 항균효과 검색. *한국식품과학회지*, 21, 91 (1992)
 21. 이병완, 신동화 : 식품부패미생물의 증식을 억제하는 천연항균성물질의 검색, *한국식품과학회지*, 23, 200 (1991)
 22. Chen, C.P., Lin, C.C. and Namba, T.: Development of natural crude drug resources from Taiwan(VII). *Shoyakugaku Zasshi.*, 41, 215 (1987)
 23. 박수용, 김찬조 : 생약재에 의한 식품보존에 관한 연구. *한국농화학회지*. 22, 2 (1979)
 24. James, S.J. and Evans, J.: Consumer bandling of chilled foods: Temperature Performance. *Rev. Int. Froid.*, 15, 299 (1992)
 25. Hefnawy, Y.A., Moustafa, S.I. and Marth, E.H.: Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. *J. Food Protec.*, 55, 344 (1992)
 26. Itokawa, H., Hirayama, F., and Tsuruoka, S.: Screening test for antitumor activity of crude Indonesia medicinal plants. *Shoyakugaku Zasshi.*, 44, 58 (1990)
 27. Chung, K.T., Thomasson, W.R. and Wu-puan, C.D.: Growth inhibition of selected foodborne bacteria, particularly *Listeria monocytogenes* by plant extracts. *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 498 (1990)
 28. 황도연 저, 김의건 편역 : 최신방약합편. 동양종합통신교육원장판 *J. Appl. Bacteriol* (1989)
 29. 신민교 : 원색 임상본초학. 남산당 (1986)

30. Gavidson, P.H. and Parish: Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, 43, 148 (1989)
31. Roberts, T.A.: Combinations of antimicrobials and processing methods. *Food Technol.*, 43, 156 (1989)
32. 임춘미, 경규향, 유양자 : BHA 및 BHT의 미생물 성장억제효과. 한국식품과학지. 19, 54 (1987)
33. 최재수, 박시향, 김일성 : 야생 식용식물의 약물대사 활성성분에 관한 연구. 생약학회지, 20, 117 (1989)
34. 안은숙, 김문숙, 신동화 : 식용식물로부터 얻은 추출물의 두부, 어묵, 막걸리 변질균에 대한 항균성 검색. 한국식품과학회지, 26, 200 (1991)
35. Itokawa, H., Hirayama, F., and Tsuruoka, S.: Screening test for antitumor activity of crude Indonesia medicinal plants. *Shoyakugaku Zasshi.*, 44, 58 (1990)
36. 堀田 滿 : 세계유용식물사전. 평범사 (1989)
37. 김의수 : 도해 향약(생약) 대사전 식물편. 영림사 (1986)
38. 강수철, 문영희 : 봉선화의 항균활성성분과 항균력에 관한 연구. 생약학회지, 23, 240 (1992)

제 2 절 상백피 추출물중 *Listeria monocytogenes* 증식억제 물질의 분리 및 효과

1. 김문협, 김락정, 김원경, 김윤식, 권대락, 최병희, 한계룡 : 잠사학개론, 학문사, p.28 (1972)
2. 전통 동양약물 데이터 베이스 : 서울대학교 천연물과학 연구소 (1996)
3. 허준 : 동의보감, 여강출판사, p.1766 (1994)
4. 한지숙, 신동화 : *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 뽕나무 및 고삼 에탄올 추출물의 분획별 효과. 한국식품과학회지, 26, 539 (1994)
5. Harrison, M.A., Huang, Y.W., Chao, C.H. and Shinemen, T.: Fate of *Listeria monocytogenes* on packed, refrigerated, and frozen seafood. *J. Food Prot.*, 54, 524 (1991)
6. 한지숙, 신동화, 윤세억, 김문숙 : *Listeria monocytogenes*의 증식을 억제하는 사용 가능한 식물추출물의 검색. 한국식품과학회지, 26, 545 (1994)
7. 신동화, 문성필, 한지숙, 안은영 : 상피추출물중 *Listeria monocytogenes* 증식 억제 물질의 분리. 한국식품과학회 제56차 학술 발표회 초록 (1996)
8. 박옥연, 김선희, 김지희, 김용반, 장동석 : 상백피 추출물로부터 항균성 물질의 분리정제. 한국식품위생·안전성학회지, 10, 225 (1995)
9. Nomura, T. and Fukai, T.: Constituents of the cultivated mulberry tree. VII. Isolation of three new isoprenoid-flavanones, Kuwanon D.E. and F from root bark of *Morus alba* L. *J. Med. Plant Res.*, 42, 79 (1981)
10. Nomura, T., Fukai, T., Matsumoto, J., Imashimizu, A., Terada, S. and Hama, M.: Constituents of the cultivated mulberry tree. X. Structure of Kuwanon I, a new natural diels-alder adduct from the root bark of *Morus*

- alba*. *J. Med. Plant Res.*, 46, 167 (1982)
11. Harborne, J. B. and Baxster, H.: *Phytochemical Dictionary*. Taylor & Francis, London, p.403 (1993)
 12. 우원식 : 천연물 화학연구법. 서울대학교출판부 (1989)
 13. Davidson, P.M, and Parish, M. E.: Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, 43, 148 (1989)
 14. 마승진, 고병섭, 박근형 : 두릅 수피에서 향미생물 활성을 갖는 3, 4-dihydroxybenzoic acid의 분리. *한국식품과학회지*, 27, 807 (1995)
 15. Chung, K.T., Thomasson, W.R., and Wu-Yuan, C.D.: Growth inhibition of selected food-borne bacteria, particularly *Listeria monocytogenes*, by plant extracts. *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 498 (1990)
 16. 이병완, 신동화 : 식품 부패 미생물에 대한 천연 항균성물질의 농도별 및 분획별 항균 특성. *한국식품과학회지*, 23, 205 (1991)
 17. 조성환, 이상열, 김재원, 고경력, 서일원 : Grapefruit 종자추출물로부터 광범위 항균제 개발 및 응용에 관한 연구 - Grapefruit종자 추출물의 항균제 검색. *한국식품위생·안전성학회지*, 10, 33 (1995)
 18. 박석규, 박정로, 이상원, 서권일, 강성구, 심기한 : 들산갓 전회리 추출물의 항균활성 및 열안정성. *한국영양식량학회지*, 24, 707 (1995)
 19. 정병선, 이병구, 심선택, 이정근 : 속씨 종의 정유성분이 미생물의 생육에 미치는 영향. *한국식문화학회지*, 4, 417 (1989)

제 3 절 고삼으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정

1. Beuchat, L. R. and Golden, D. A. : Antimicrobial occurring naturally in foods. *Food Tech.*, 43, 134 (1989)
2. Tirillini, B., Velasquez, E. R. and Pellegrion, R. : Chemical composition and antimicrobial of essential oil of *Pipper angustifolium*. *Planta Med.*, 62, 372 (1996)
3. Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. : Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils *J. Agri. Food Chem.*, 44, 1202 (1996)
4. Simpson, B. K., Gagne', N., Aschie, I. N. A. and Noroozi, E. : Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp. *Food Biotech.*, 11, 25 (1997)
5. Jung, D. S. : A natural antimicrobial substance: nisin. *Kor. J. Appl. Microbial. Biothechnol.*, 6, 24 (1993)
6. Li, J., Chen, G. and Webster, J. M. : Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J. Nat. Prod.*, 58, 1081 (1995)
7. Nakatani, N., Ikeda, K., Kikuzaki, H., Kido, M. and Yamaguchi, Y. : Diaryldimethylbutane lignans from *Mytistica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*. *Phytochem.*, 27, 3127 (1988)
8. Han, D. C. and Kyung, K. H. : Antimicrobial activity of autoclaved cabbage juice (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 74 (1995)
9. Kim, S. J. and Park, K. H. : Antimicrobial substances in leek(*Allium tuberosum*) (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 604 (1996)

10. Shin, D. H., Kim, M. S. and Han, J. S. : Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medical herbs and their fractionates against food-born bacteria(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 808 (1997)
11. Roh, H. J., Shin, Y. S., Lee, K. S. and Shin, M. K. : Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked rice putrefactive microorganism (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 66 (1996)
12. Park, S. K., Park, J. R., Lee, S. W., Seo, K. I., Kang, S. K. and Shim, K. H. : Antimicrobial activity and heat stability of water-pretreated extract of leaf mustard dolsan(*Brassica juncea*) (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25, 707 (1995)
13. Yamaki, M., Kashihara, M., Ishiguro, K. and Takagi, S. : Antimicrobial principle of Xian he cao. *Planta Med.*, 55, 169 (1990)
14. Batista, O., Duarate, A., Nascimanto, J. and Simoes, M. F. : Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *J. Natural Product*, 57, 858 (1994)
15. Kubo, I., Muroi, H. and Himejima, M. : Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. *J. Agri. Chem.*, 40, 245 (1992)
16. Hashidoko, Y., Tahara, S. and Mizutani, J. : Antimicrobial sesquiterpene from damaged *Rosa rugosa* leaves. *Phytochem.*, 28, 425 (1989)
17. Biyiti, L., Pesando, D. and Dao, S. P. : Antimicrobial activity of two flavones isolated from the Cameroonian plant *Erythrina sigmoidea*. *Planta Med.*, 54, 126 (1987)
18. Kuk, J. H., Ma, S. J. and Park, K. H. : Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*

- (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 204 (1997)
19. Ma, S. J., Ko, B. S. and Park, K. H. : Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from bark of *ralia elata* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 807 (1995)
 20. Harbone J. B. and Baxter H. : *Phytochemical Dictionary*, Taylor and Francis Ltd., p. 403 (1993)
 21. Yen, G. C., Wu, S. C and Duh, P. D. : Extraction identification of antioxidant components from the leaves of Mulberry. *J. Agri. Chem.*, 44, 1687 (1996)
 22. Asamarai, A. M., Addis, P. B., Epley, R. J. and Krick, T. P. : Wild rice hull antioxidant. *J. Agri. Chem.*, 44, 126 (1996)
 23. Park, J. D., Lee, Y. H., Baek, N. I., Kim, S. I. and Ahn, B. Z. : Isolation of antitumor agent from the heartwood of *Dabergia odorifera* (in Korean). *Kor. J. Pharmagon.*, 26, 323 (1995)
 24. Seoul National University Natural Products Research Institute : Traditional oriental medicines database. Seoul systems CO., LTD. (1996)
 25. 우원식 : 천연물화학연구법. 민음사, p. 45 (1989)
 26. 신민교 : 임상본초학. 남산당, p. 314 (1986)
 27. Kee, C. H. : *The pharmacology of chinese herbs*. CRC Press, Inc., p. 63 (1993)
 28. Han, J. S. : Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by plant extract. *M. S. Thesis*, Chonbuk National Univ., Seoul Korea, p. 37 (1995)
 29. Ahn, E. Y., Shin, D. H., Baek, N. I. and Oh, J. A : Isolation and Identification of Antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* (in process)

30. Burapadaja, S. and Bunchoo, A. : Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Med.*, 61, 365 (1995)
31. Wu, L. J., Miyase, T., Ueno, A., Kuroyanagi, M., Noro, T. and Fukushima, S. : Studies on the constituents of *Sophora flavescens* AIT. (in Japanese). *Yakukaku Zasshi*, 105, 736 (1985)
32. Shirataki, Y., Yokoe, I., Noguchi, M., Tomomori, T. and Komatsu, M. : Studies on the constituents of *Sophora* species XXII. Constituents of the root of *Sophora moorcroftiana* BENTH. ex BAKER. (1) *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2220 (1988)

제 4 절 감초로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정

1. Roberts, T. A. : Combinations of antimicrobial and processing methods. *Food Technol.*, 43, 156 (1989)
2. Shin, D. H. : Present status of natural antimicrobial compoundant their application (in Korean). *Food Science and Industry*, 23(4), 68 (1990)
3. Frack, J. F. : Control of *L. monocytogenes* in food processing environments. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 19, 491 (1990)
4. Cho, S. H., Lee, S. Y., Kim, J. W., Ko, G. H. and Seo, I. W. : Antimicrobial activities of grapefruit seed extract (in Korean). *J. Fd. Hyg. Safety*, 10, 33 (1995)
5. 신민교 : 임상본초학. 남산당, p. 175 (1986)
6. Kee, C. H. : The pharmacology of chinese herbs. CRC Press, Inc. p.275 (1993)
7. Shin, D. H., Han, J. S. and Kim, M. S. : Antimicrobial effect of ethanol extract of *Sonomenium acutum*(Thunb.) Rehd. et wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var. *Glandulifera* regel et zucc on *Listeria monocytogenes* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 627 (1995)
8. 우원식 : 천연물화학 연구법. 민음사, p. 22 (1989)
9. Roberts, R. M. 외 3인 원저, 김정균 외 5인 공역 : 유기화학실험. 청문각, p. 50 (1997)
10. Park, U.Y., Kim, S.H., Kim, J.H., Kim, Y.G. and Chang, D.S. : Purification of antimicrobial substance for the extract from the root bark of *morus alba* (in Korean). *J. Fd. Hyg. Safety*, 10, 225 (1995)

11. Han, J.S. : Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by plant extract.
M. S. Thesis, Chonbuk National Univ., Seoul, Korea p. 56 (1995)
12. Zheng, W. F., Tan, R. X., Yang, L. and Liu, Z. L. : Two flavones from
artemisia giraldii and their antimicrobial activity. *Planta Med.* 63, 160
(1996)
13. Batista, O., Duarate, A., Nascimanto, J. and Simoes, M. F. : Structure
and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus*
hereroensis. *J. Natural Product*, 57, 858 (1994)
14. Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., Chandhuri, S. K., Chez, Y. S. and Ogura,
T. : Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.*, 60,
218 (1994)
15. 일본분석학회 구주지부 편, 이용근 외 3인 공역 : 기기분석입문. 탐구당, p.
185 (1995)
16. Seoul National University Natural Products Research Institute :
Traditional oriental medicines database. Seoul systems CO., LTD. (1996)
17. Nakanishi, T., Inada, A., Kazuko, K. and Yoneda, K. : Flavonoid
glycosides of the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Phytochem.*, 24, 339
(1985)

제 5 절 관중(*Dryopteris crassirhizoma Nakai*)의 에탄올 추출물 및 용매 분획물이 *Listeria monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향

- Afroditi Sivropoulou, Eleni Papanikolaou, Constantina Nikolaou, Stella Kokkini, Thomas Lanaras, and Minas Arsenakis. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils *J. Agri Food Chem.* 44(5): 1202 (1996)
- 안은영, 한지숙, 신동화, 상백피 추출물중 *L. monocytogenes* 증식억제 물질의 분리 및 효과. 한국식품과학회지. 29(6): 1236 (1997)
- 안은영, 신동화, 백남인, 오진아. 감초로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조동정. 한국식품과학회지. 30(3): 680 (1998a)
- 안은영, 신동화, 백남인, 오진아. 고삼으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조동정. 한국식품과학회지. 30(3): 672 (1998b)
- Bruno Tirillini, Eliana Rojas Velasquez and Roberto Pellegrion. Chemical composition and antimicrobial of essential oil of *Pipper angustifolium*. *Planta Med.* 62: 372 (1996)
- B.K. Simpson, N. Gagne', I.N.A. Aschie and E. Noroozi. Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp. *Food Biotech.* 11(1): 25 (1997)
- Dong-Sun Jung. A natural antimicrobial substance: Nisin. *Kor. J. Appl. Microbial. Biothechnol.* (1997)
- 한덕철, 경규향. 가압살균한 양배추즙액의 미생물번식 저해작용. 한국식품과학회지. 27(1): 74 (1995)
- Jianxiong Li, Genhui Chen, John M. Webster. Antimicrobial metabolites from a

- bacterial symbiont. *J. Nat. Prod.* 58(7): 1081 (1995)
- 조성환, 이상열, 김재원, 고경혁, 서일원. Grapefruit 종자추출물의 항균력 검색. *식품위생·안전성학회지.* 10(1): 33 (1995)
- 김선재, 박근형. 부추의 항미생물 활성물질. *한국식품과학회지.* 28(3), 604 (1996)
- 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. *중약대사전.* 도서출판 정담. p457 (1997)
- Larry R. Beuchat and David A. Golden. Antimicrobial occurring naturally in foods. *Food Tech.* 43, 134 (1989)
- 이병완, 신동화. 식품 부패미생물에 대한 천연 항균성물질의 농도별 및 분획별 항균 특성. *한국식품과학회지.* 23(2): 205 (1991)
- 노현정, 신용서, 이갑상, 신미경. 쌀밥 부패미생물에 대한 녹차 물 추출물의 항균 활성. *한국식품과학회지.* 28(1): 66 (1996)
- Nobuji Nakatani, Kayo Ikeda, Hiroe Kikuzaki, Masaru Kido and Yuzo Yamaguchi. Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*. *Phytochem.* 27(10): 3127 (1988)
- 박승우, 우철주, 정신교, 정기택. 환삼덩굴의 용매 분획별 항균성 및 항산화성. *한국식품과학회지.* 26(4): 464 (1994)
- 박석규, 박정로, 이상원, 서권일, 강성구, 심기환. 들산갓 전처리 추출물의 항균활성 및 열안전성. *한국영양식량학회지.* 24(5): 707 (1995)
- 박석규, 박정로, 이상원, 서권일, 강성구, 심기환. 들산갓 전처리 추출물의 항균활성 및 열안정성. *한국영양식량학회지.* 25(5): 707 (1995)
- 신민교. *임상본초학.* 남산당 (1986)
- 신동화, 한지숙, 김문숙. 방기 및 감초의 에탄올 추출물이 *L. monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향. *한국식품과학회지.* 26(5), 627 (1994)
- 신동화, 김문숙, 한지숙. 국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검색과 농도별 및

분획별 향균특성. 한국식품과학회지. 29(5): 808 (1997)

제 6 절 한약재로부터 선발된 옷나무 수피 추출물로부터 항산화 활성물질의 분리

1. Takashi, M. and Takayuki, S.: Antioxidative Activities of Natural Compounds Found in Plants, *J. Agric. Food Chem*, 45, 1819-1822 (1997)
2. Fereidoon, S. and Ryszard, A.: Antioxidant Activity of Protein Hydrolyzates from Aquatic Species, *JAOCS*, 73, 1197-1199 (1996)
3. Kim, S.Y., Kim, J.H., Kim, S.K., Oh, M.J. and Jung, M.Y.: Antioxidant Activities of selected oriental Herb Extracts, *JAOCS*, 71, 633-640 (1994)
4. Yen, G.C., Chen, H.Y. and Peng, H.H.: Antioxidant and prooxidant Effect of Various Tea extracts, *J. Agric. Food Chem*, 45, 30-34 (1997)
5. Yen, G.C. and Lee, C.A: Antioxidant Activity of Extracts from Mold, *J. Food Protect.*, 59, 1327-1330 (1996)
6. Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M. and Ogiso, T.: Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in F 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, 343 (1983)
7. Branen, A.L.: Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS*, 52, 59 (1975)
8. Park J.H., Kang K.C., Baek, S.B., Lee Y.H. and Rhee, K.S.: Separation of Antioxidant Compounds from Edible Marine Algae, *Korean J. Food Sci. Technol*, 23, 256-261 (1991)
9. Choi, U., Shin, D.H., Chang, Y.S. and Shin, J.I.: Antioxidant Activity of Ethanol Extract from *Rhus javanica* Linné on Edible Oil, *Korean J. Food Sci. Technol*, 24, 320-325 (1992)

10. Cho, S.Y., You, B.J., Chang, M.H., Lee, S.J.: Screening for the Antioxidants in Unused Marine Resources by the Polarographic Method, *Korean J. Food Sci. Technol*, 26, 417-421 (1994)
11. Lim, D.K., Choi U. and Shin, D.H.: Antioxidative Activity of Some Solvent Extract from *Caesalpinia sappan* L., *Korean J. Food Sci. Technol*, 28, 77-82 (1996)
12. Schwarting, A.E.: "Dimeric Natural Compounds with Pharmacological Activity". In: *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity* (Eds. Wagner, H. and Wolff, P.), 197-211 (1977)
13. Woo, W.S.: Experimental method of phytochemistry(in Korean), Mineumsa, p.46 (1989)
14. Masahiro Ogata, Midori Hoshi, Kumiko Shimotohno, Shro Urano and Toyoshige Endo: Antioxidant Activity of Magnolol, Honokiol and related phenolic compounds, *JAOCS*, 74, 557-562 (1997)
15. Quinu, L.A. and Tang, H.H.: Antioxidant properties of phenolic compounds in *Macadamia Nuta*, *JAOCS*, 73, 1585-1588 (1996)
16. Kim, T.C., Lee, G.D. and Yoon, H.S.: Antioxidative Effectiveness of Methanol Extract in *Galla Rhois*, *Kor. J. Food Hygiene*, 7, 107-112 (1992)
17. Shin, M.K.: Coloured Limsangbonchohak(in Korean), Namsandang, p165-718 (1986)
18. Lim, K.T. and Shin, J.H.: Antioxidative Effects of Ethanol from *Rhus verniciflua* Stokes on Mouse Whole Brain Cells, *Korean J. Food Sci. Technol*, 29, 1248-1254 (1997)
19. Traditional oriental medicines database: Seoul National University,

- Natural Products Research Institute, Seoul system CO., LTD. (1996)
20. Ji, H.J. and Lee, S.I.: Standard of Chines medicine(Natural medicine)(in Korean), Korean Medical Index Co. p39-651(1989)
 21. Kozlouaka, H., Rotkiewice, D.A., Zadernousk, R. and Sosulski, F.W.: Phenolic acids in rapeseed and mustard. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, p.6 (1983)
 22. Krygia, K., Sosulski, F. and Hogge: Free, esterified and insoluble bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 330-334 (1982)
 23. Wiedermann, L.H., and Lee, Y.Z. : The nutrition and processing of edible oil: about soybean oil(in Korean). American soybean association, p.56 (1992)
 24. Oh, M.J., Lee, K.S., Son, H.Y. and Kim, S.Y.: Antioxidative components of pueraria root. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22, 793-798 (1990)
 25. Maeng, Y.S. and Baek, H.K.: Antioxidant activity of ethanol extracts from Dodok. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23, 311-315 (1991)
 26. Choi, U.: Development of new natural antioxidant from *Dalbergia odorifera* T.CHEN and *Caesalpinia sappan* L. and food application. A thesis for Ph. D. degree. Chonbuk National Univ., Korea, (1998)
 27. Choi, K.H., Yoon, H.S. and Kim, J.S.: Antioxidative effectiveness of methanol extract in mustard(in Korean). *Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.*, 7, 165-174 (1989)
 28. Woo, W.S.: Experimental method of phytochemistry(in Korean), Mineumsa, p.81 (1989)

제 7 절 섬바디로부터 분리된 Falcarindiol과 유화제와의 혼합
에 따른 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균 상승효과

1. Brackett, R. E. : Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technol.*, 42, 162-164 (1988)
2. Wang, L. L., Yang, B. K., Parkin, K. L. and Johnson, E. A. : Inhibition of *Listeria monocytogenes* by monoacylglycerols synthesized from coconut oil and milkfat by lipase-catalyzed glycerolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1000-1009 (1993)
3. Marth, E. H. : Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.*, 42, 165-168 (1988)
4. Silva, M. D., Hofer, E. and Tibana, A. : Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Prot.*, 61, 354-356 (1998)
5. Lou, Y. and Yousef, A. E. : Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptaion to environmental stresses. *J. Food Prot.*, 59, 465-471 (1996)
6. Schuman, J. D. and Sheldon, B. W. : Thermal resistance of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in liquid egg yolk and egg white. *J. Food Prot.*, 60, 634-638 (1997)
7. Kim, J. H., Schmidt, K. A., Phebus, R. K. and Jeon, I. J. : Time and temperature of stretching as critical control points for *Listeria monocytogenes* during production of mozzarella cheese. *J. Food Prot.*, 61, 116-118 (1998)

8. Restaino, L., Frampton, E. W., Bluestein, R. L., Hemphill, J. B. and Regutt, R. R. : Antimicrobial efficacy of new organic acid anionic surfactant against various bacterial strains. *J. Food Prot.*, 57, 496-501 (1994)
9. Dean, J. P. and Zottola, E. A. : Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 59, 476-480 (1996)
10. Buchanan, R. L. and Bagi, L. K. : Microbial competition : effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. *J. Food Prot.*, 60, 254-261 (1997)
11. Parente, E. and Hill, C. : Inhibition of *Listeria* in buffer, broth, and Milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *J. Food Prot.*, 55, 503-508 (1992)
12. Han, J. S. Shin, D. H. Yun S. E. and Kim, M. S. : Antimicrobial effect on *Listeria monocytogenes* by some edible plant extracts(in Korean). *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 26, 545-551 (1994)
13. Ahn, E. Y., Shin, D. H., Baek, N. I. and Oh, J. A. : Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Sophora flavescen* Ait(in Korea). *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 30, 672-679 (1998)
14. Ahn, E. Y., Shin, D. H., Baek, N. I. and Oh, J. A. : Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch(in Korean). *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 30, 672-679 (1998)
15. An, E. Y., Han, J. S. and Shin, D. H. : Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by pure compound isolated from extrat of *Morus alba* Linne bark(in Korean). *Kor. J. Food Sic. Technol.*, 29, 1236-1240 (1997)

16. Mok, J. S., Park, U. Y., Kim, Y. M. and Chang, D. S. : Effects of solvents and extracting condition on antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae* Radix(*Salvia miltiorrhiza*) extract(in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 1001-1007 (1994)
17. Aureli, P., Costantini, A. and Zolea, S. : Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 55, 344-348 (1992)
18. Zaika, L. L., Scullen, O. J. and Fanelli, J. S. : Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium polyphosphate as affected by polyvalent metal ions. *J. Food Sci.*, 62, 867-872 (1997)
19. Thayer, D. W., Boyd, G., Kim, A., Fox, J. B., JR. and Farrell, H.M., JR. : Fate of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage on raw or cooked turkey breast meat. *J. Food Prot.*, 61, 979-987 (1998)
20. Juven, B. J., Barefoot, S. F., Pierson, M. D., Mccaskill, L. H. and Smith, B. : Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* floracarn L-2. *J. Food Prot.*, 61, 551-556 (1998)
21. Song, J.C. and Yang, H.C. : *Food additives*, Semoon Co. p483-507 (1992)
22. Hidaka, D. : *Food emulsifier*(2nd ed.). Sooseowon, p230-239 (1996)
23. Wang, L. L. and Johnson, E. A. : Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 624-629 (1992)
24. Oh, J. A. : Isolation and identification of growth inhibition substance of *L. monocytogenes* from edible plant and synergistic effect with

- monoglyceride. *M. S. Thesis, Chonbuk National Univ., Chonju, Korea (1999)*
25. Minelli, E. B., Benini, A., Bassi, C., Abbas, H., Falconi, M., Locatelli, F., Marco, R. and Pederzoli, P. : Antimicrobial activity of human pancreatic juice and its interaction with antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2099-2105 (1996)
26. Hedin, G. and Hambraeus, A. : Screening tests for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 28, 681-694 (1991)
27. Ahn, E. Y. : Isolation and identification of antimicrobial active substance from edible plant extract. *M. S. Thesis, Chonbuk National Univ., Chonju, Korea (1998)*

제 8 절 섬바디로부터 *L. monocytogenes*의 생장억제 물질의 분리 및 동정

1. Shin, D.H. Present research status of natural antimicrobial components and their application to food processing. Food Science and Industry. 23: 68-77 (1990)
2. Ma, S. J., Ko, B. S. and Park, K. H. Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from bark of *Aralia elata*(in Korean). Kor. J. Food Sci. Technol. 27: 807-812 (1995)
3. Orabi, K. Y., Mossa, J. S. and Elferaly, F. S. Isolation and characterization of two antimicrobial agents from mace(*Myristica fragrans*). Journal of Natural Products. 54: 856-859 (1991)
4. Nakatani, N., Ikeda, K., Kikuzaki, H., Kido, M. and Yamaguchi, Y. Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*. Phytochemistry. 27: 3127-3129 (1988)
5. Kwon, Y. S., Kobayashi, A., Kajiyama, S. I., Kawazu, K., Kanzaki, H. and Kim, C. M. Antimicrobial constituents of *Angelica dahurica* root. Phytochemistry. 44: 887-889 (1997)
6. Verpoote, R., Ruigrok, L. M. and Svendsen, A. B. Medicinal Plants of Surinam. Planta medica. 46: 149-152 (1982)
7. Mahmoud, Z. F. Antimicrobial components from *Maclura pomifera* fruit. Planta medica. 42: 299-301 (1981)
8. Song, J.T., Jung, H.B., Kim, B. W., H.S. and Kim, K.Y. Korean Plant

Resources Research Institute, Jeail Publishing Co., Korea, p383
(1989)

9. Han, J. S. Growth inhibition of by plant extract. M. S. Thesis, Chonbuk National Univ., Chonju, Korea (1995)
10. Ahn, E. Y. Isolation and identification of antimicrobial active substance from edible plant extract. M. S. Thesis, Chonbuk National Univ., Chonju, Korea (1998)
11. Woo, W.S. Methodology of Natural Chemistry. Min Eum Sa, Korea, p22 (1989)
12. Minelli, E. B., Benini, A., Bassi, C., Abbas, H., Falconi, M., Locatelli, F., Marco, R. and Pederzoli, P. Antimicrobial activity of human pancreatic juice and its interaction with antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40: 2099-2105 (1996)
13. Hedin, G. and Hambræus, A. Screening tests for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 28: 681-694 (1991)
14. Kobayashi, M., Fujita, M. and Mitsuhashi, H. Studies on the constituents of umbelliferae plants. XV. constituents of *Cnidium officinale* : occurrence of pregnenolone, coniferylferulate and hydroxyphthalides. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 1427-1433 (1987)
15. Schulete, K. E. und Potter, B. Polyacetylene aus *Pituranthus tortuosus* (Desf.) Benth. U. Hook. *Arch. Pharm.* 310: 945-963 (1977)
16. Harborne, J.B. and Baxter, H. *Phytochemical Dictionary*. Taylor & Francis, London, England, p49 (1993)

제 9 절 Bulk와 emulsion system에서 유지에 대한 항산화제와 유폴제의 항산화효과

1. Okezie, I.A. Free radicals, Oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *JAOCS* 75: 199-212 (1998)
2. Yen, G.C., Wu, S.C. and Duh, P.D. Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of Mulberry. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1687-1690 (1996)
3. Giese, J.: Antioxidants tools for preventing lipid oxidation the action of oxidation. *Food Technology* 50: 73-81 (1996)
4. Camire, M.E. and Dougherty, M.P Added phenolic compounds enhance lipid stability in extruded corn. *J. Food Sci.* 63: 516-518 (1998)
5. Lee, B.J., Hendricks, D.G. and Cornforth, D.P. Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in a model beef system. *J. Food Sci.* 63: 394-398 (1998)
6. Li, S.J., Seymour, A.J. King, A.J. and Morrissey, M.T Color stability and lipid oxidation of rockfish as affected by antioxidant from shrimp shell waste. *J. Food Sci.* 63: 438-441 (1998)
7. Osawa, T. and Shibamoto, T. Analysis of free malonaldehyde formed in lipid peroxidation systems via a pyrimidine derivative. *JAOCS* 69: 466-468 (1992)
8. Frankel, E.N. Partition of selected antioxidants in corn oil-water model system. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1992-1994 (1997)
9. Frankel, E.N., Huang, S.W. and Aeschbach, R. Antioxidant activity of green teas in different lipid system. *JAOCS* 74: 1309-1315 (1997)

10. Frankel, E.N., Huang, S.W., Kanner, J. and German J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1054-1059 (1994)
11. Frankel, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry* 57: 51-55 (1996)
12. Hopia, A.I., Huang, S.W., Schwarz, K., German, B. and Frankel, E.N. Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2030-2036 (1996)
13. Yi, O.S., Meyer, A.S. and Frankel, E.N Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system. *JAACS* 74: 1301-1307 (1997)
14. Huang, S.W., Frankel, E.N., Schwarz, K. and German, J.B. Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2496-2502 (1996)
15. Huang, S.W., Hopia, A., Frankel, E.N., Schwarz, K. and German, J.B. Antioxidant activity α -tocopherol and trolox in different lipid substrates bulk oils vs oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 44: 444-452 (1996)
16. Griffin, W.C. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1: p.311 (1949)[in *Food Emulsities* (in Korean), Soo-Seo Won: p.90-91(1996)]
17. Davies, J.T. Surface activity. The 2nd International Congress. Butterworths, London 1: p.426 (1957)
18. Paguot, C. and Hautfenne, A. Standard method for the analysis of oils, fats and derivatives(7th revised). Blackwell Scientific Publication, London p.199 (1987)

19. A.O.C.S. Spectrophotometric determination of conjugated dienoic acid.
Official method Ti 1a-64 (1964)
20. Arthur, W.A. Physical chemistry of surfaces. 4th ed, Wiley-Interscience,
p.23-27 (1982)
21. SAS Institute, Inc. SAS Cary, NC U.S.A (1987)
22. Cillard, J., Cillard, P. and Cormier, M. Effect of experimental factors
on the prooxidant behavior of α -tocopherol. JAACS 57, 255 (1980)
23. Noh, J.S. and Park. E.K. Food Emulsifier (in Korean). Soo-Seo Won,
p.90-91 (1996)
24. Ling, E.R. Dairy Chemistry, 3rd ed., 1, Chapman and Hall, Ltd., London
(1963)
25. Atkins, P.W. Physical Chemistry, 6 edition, Oxford University Press.
Oxford, p.154 (1998)

제 10 절 옷나무 에탄올 추출물로부터 항산화활성 물질의 구조 동정

1. Hudson, B.J. F. Food Antioxidants. pp.253-307, Elsevier Applied Science, New York, USA, (1990)
2. Hahm, T.S., King, D.L. and Min, D.B. Food antioxidants. Foods and Biotech. 2: 1-18 (1993)
3. Choi, U., Shin, D.H., Chang, Y.S. and Shin, J.I. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect(in Korean). Korean J. Food Sci. Technol. 24: 142-148 (1992)
4. Chipault, J.P., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M. and Lundberg, W.O. The antioxidant properties of natural spices. Food Res. 17: p.46 (1952)
5. Miyake, T. and Shibamoto, T. Antioxidative activities of natural compounds found in plants. J. Agric. Food Chem. 45: 1819-1822 (1997)
6. Shahi, F. and Amarowicz, R. Antioxidant activity of protein hydrolyzates from aquatic species. J. Am. Oil Chem. Soc. 73: 1197-1199 (1996)
7. Kasuga, A., Aoyagi, Y. and Sugahara, T. Antioxidant activity of edible plant. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 35: p.828 (1988)
8. Kim, S.Y., Kim J.H., Kim, S.K., Oh M.J. and Jung M.Y. Antioxidant activities of selected oriental herb extracts. J. Am. Oil Chem. Soc. 71: 633-640 (1994)
9. Yen, G.C. and Lee, C.A. Antioxidant activity of extracts from mold. J. Food Protect. 59: 1327-1330 (1996)

10. Han, D.C. and Kyung, K.H. Antimicrobial activity of autoclaved cabbage juice(in Korean). Kor. J. Food Sci. Technol. 27: 74-79 (1995)
11. Paek, J.D., Lee, Y.H., Baek, N.I., Kim, S.I. and Ahn, B.Z. Isolation of antitumor agent from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. Kor. J. Pharmacol. 26: 323-326 (1995)
12. Shin, M.K. Limsangbonchohak. p.460-461. Nam-San Dang, Seoul, Korea (1986)
13. Chae, Y.B., Kim, W.J., Ji, O.P., Ahn, M.J. and No, Y.J. Comprehensive Korean useful plants resources. pp.52-55. Korean Research Institute of Chemical Technology. Seoul, Korea (1988)
14. Kim, I.W., Shin, D.H. and Choi, U. Isolation of antioxidative components from the bark of *Rhus verniciflua* STOKES screened from some Chinese medicinal plants(in Korean). Kor. J. Food Sci. Technol. 31: 855-863 (1999)
15. Kim, I.W. Isolation and identification of antioxidative components from ethanol of *Rhus verniciflua* STOKES and application to different to different oil system. M.S. thesis, Chonbuk National Univ. of Chonju, Chonbuk, Korea, (1999)
16. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181: 1199 (1958)
17. Yi, O.S., Meyer, A.S. and Frakel, E.N. Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system. J. Am. Oil Chem. Soc.74: 1301-1307 (1997)
18. Huang, S.W., Hopia, A., Schwarz, K., Frankel, E.N. and German, J.B. Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: Bulk oil vs oil-in-water emulsions. J. Agric. Food Chem. 44:

444-452 (1996)

19. Kosugi, H., Kojima, T. and Kikugawa, K. Characteristics of the thiobarbituric acid reactivity of oxidized fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 51-55 (1991)
20. Gupta, S.R., Rarindranath B. and Seshadri, T.R. The glucosides of *Butea monosperama*. *Phytochemistry*. 9: 2231-2235 (1970)
21. Adrian, P.N.B., Edward, V.B. and David, D.R. O-dibenzo- α -pyrones from *umtiza listerana*. *Phytochemistry*. 22: 2813-2817 (1983)
22. Almeida, M.E.L and Gottlieb, O.R. Iso-and n-flavonoids from *Dalbergia inundata*. *Phytochemistry*. 13: 751-752 (1974)
23. Yang, E.B., Zhang, K., Cheng, L.Y. and Mack, P. Butein, a specific protein tyrosine kinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 245:435-438 (1998)
24. Nicholls, K.W. and Bohm, B.A. Flavonoids and affinities of *Coreopsis bioelvh*. *Phytochemistry*. 18: 1076 (1979)

제 11 절 가열 살균된 소고기에 접종된 *Listeria monocytogenes*에 대한 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 에틸아세테이트 분획물과 섬바디(*Dystaenia takesimana* Kitagawa) 활성 분리물의 항균효과

1. Hao, Y.Y., Brackett, R.E. and Doyle, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extract. J. Food Prot. 61: 307-312 (1998)
2. Conner, D.E. and Beuchat, L.R. Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. J. Food Sci. 49: 429-434 (1984)
3. Linton, M., J. McClements, J.M. and Patterson, M.F. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice using a combination of high pressure and mild heat. J. Food Prot. 62: 277-279 (1999)
4. Juneja, V.K., Martin, S.T. and Sapers G.M. Control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed pre-peeled potatoes. J. Food Sci. 63: 911-914 (1998)
5. Ebo, B.A., Ablett, R.F. Harris, J. and Joss, D.B. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat. J. Food Prot. 62: 46-50 (1999)
6. Cutter, C.N. Combination spray washes of saponin with water or acetic acid to reduce aerobic and pathogenic bacteria on lean beef surfaces. J. Food Prot. 62: 280-283 (1998)
7. Beumer, R.R., te Giffel, M.C., de Boer, E. and Rombouts, F.M. Growth of

- Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. Food Microbiol. 13: 333-340 (1996)
8. Chung, C.K., Park, O.K., Yoo, I.J., Park, K.M. and Choi, C.U. Antimicrobial activity of essential oils of curry spices. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 716-719 (1990)
 9. Moon, K.D., Byun, J.A., Kim, S.J. and Han, D.S. Screening of natural preservatives to inhibit Kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 257-263 (1995)
 10. Shin, D.H., Kim, M.S. and Han, J.S. Antimicrobial effect of ethanol extract from some medical herbs and their fractionates against food born bacteria. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 808-816 (1997)
 11. Oh, D.H., Ham, S.S, Park, B.K., Ahn, C. and Yu, J.Y. Antimicrobial activities of natural medical herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 957-963 (1998)
 12. Ahn, E.Y., Shin, D.H., Baek, N.I. and Oh, J.A. Isolation and Identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 680-687 (1998)
 13. Oh, J.A, Shin, D.H. and Baek, N.I. Isolation and Identification of growth inhibition substance on *L. monocytogenes* from *Dystaenia takesimana* kitagawa. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 984-993 (1999)
 14. Dieuleveux, V. and Gueguen, M. Antimicrobial effect of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese. J. Food Prot. 62: 1281-1285 (1998)
 15. El-ziney, M.G., and Debevere, J.M. The effect of Reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in milk and cottage

- cheese. J. Food Prot. 61: 1275-1280 (1998)
16. Tamblyn, K.C. and Conner, D.E. Bactericidal activity of organic acids against *Salmonella typhimurium* attached to broiler chicken skin. J. Food Prot. 60: 629-633 (1997)

막분리 공정을 이용한 food grade 천연
항균효소제의 연속생산 시스템 개발

연구 기관 : 이화여자대학교

연구책임자 : 우 건 조

연 구 원 : 이 은 영

여 백

막분리 공정을 이용한 food grade 천연 항균효소제의 연속생산 시스템 개발

제 1 장	서 론	247
제 2 장	연구개발의 내용 및 범위	250
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	260
제 1 절	비연속 한외여과 시스템에서의 lysozyme 최적 분리 조건 설정	260
제 2 절	비연속 시스템에서의 막 침착 현상 및 분리된 lysozyme의 순도와 kinetic study	277
제 3 절	Scale-up시의 예비 여과 조건 및 연속적인 한외여과 시스템에서의 최적 막 분리 조건 확립	299
제 4 장	연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	312
제 1 절	연구개발 목표 달성도	312
제 2 절	대외기여도	312
제 5 장	연구개발 결과의 활용계획	314

제 6 장 참고문헌 315

제 1 장 서 론

Lysozyme은 코 점막, 눈물, 고무나무 유액 (plant latex), 난백 등에 존재하며, 이 중 난백은 lysozyme을 공업적으로 대량 생산할 수 있는 좋은 급원으로 알려져 있다. 난백 유래 lysozyme은 129개의 아미노산으로 된 단일 펩타이드 사슬로 구성되어 있으며 아미노산 64-80, 76-94, 6-127, 30-115의 네 부분에 이황화 결합 (S-S bond)을 형성하고 있다. 분자량과 pI가 각각 14,600, 10.7인 lysozyme은 대부분의 그람 양성 박테리아와 일부 그람 음성 박테리아의 세포벽을 가수분해할 뿐만 아니라 고온에서도 매우 안정한 효소이므로 천연 식품 보존제 및 의약품으로서의 활용도가 매우 높다. 난백은 13종의 단백질로 구성되어 있는데, lysozyme만을 선택적으로 분리하여 공업적으로 대량 생산하는 공정이 필요하며, 현재 일반적으로 유통되고 있는 상업용 난백 lysozyme은 3번의 결정화 단계를 거쳐 동결 건조시켜 제품화되고 있다. 최근에는 기존의 결정화 방법 이외에 다양한 크로마토그래피를 이용하거나 다공성의 키틴 막을 이용하여 lysozyme을 분리하기도 한다. Lysozyme과 같은 효소를 분리·정제할 때는 최종 물질의 순도, 활성 및 정제 비용 등이 가격 결정에 매우 중요한 요소이다. 복잡하고 다양한 화합물로부터 원하는 물질만을 순수 분리하기 위하여 사용되는 분리 공정 중 막 분리 공정 (membrane separation processes)은 생물 공학 분야에 빠르게 도입되고 있으며, 이미 몇몇 연구자에 의해 막을 이용하여 단백질이나 효소의 분리·정제에 적용하려는 시도가 있었다. '막'이란 '두 흐름 사이에서 한가지 혹은 그 이상의 물질이 이동하는 것을 제한하는 장벽'이다. 낮은 온도와 압력에서 액체 식품을 여과시키면 다공성의 막은 저분자 물질을 고분자 물질로부터 분리해내어 물과 함께 통과시킨다. 지금까지의 식품 공정에서는 분리와 정제에 상당히 많은 비용이 소요되었었는데, downstream processing 비용을 낮출 수 있는 새로운 기술로서 막에 관한 연구가 활발히 연구되고 있다.

한외여과 (ultrafiltration, UF) 중 용질의 이동을 방해하는 농도 분극 현상, 흡착, 겔화, 물질의 침착 등에 의한 flux 저하 현상 때문에 식품 산업에서 UF 공정의 적용이 부분적으로 제한 받고 있으므로, 이러한 농도 분극 현상을 감소시키기 위한 최적 분리 조건을 찾아내는 것이 가장 중요한 과제이다. 이러한 농도 분극 현상은 다양한 방법으로 완화시킬 수 있는데, 막과 용액 내 분자들간 상호 작용이 침착 현상의 주요 요인이므로 막의 재질이나 분리 물질과의 상호 작용을 구명함으로써 flux 감소 요인을 효과적으로 제어할 수 있다. Ehsani 등은 막 분리시 이러한 flux 감소는 양전하를 띤 단백질과 음전하를 띤 막 사이의 결합에 의해 막에 단백질이 흡착되었기 때문이라고 하였으며, Kelly 등은 thiol기를 가진 단백질을 막 분리 할 경우 초기 flux 감소 현상이 다른 단백질에 비해 심화된다고 하였다. 같은 한계분자량을 가진 막을 사용하더라도 막 재질 또는 막 형태에 따라 분리되는 효소나 단백질의 종류와 양이 달라질 수 있으며, 막 주위의 미세 환경이 달라짐에 따라 단백질의 분리도가 상당한 영향을 받을 수 있다. 또한, 막 분리 공정을 scale-up 하였을 때, 분리 공정상의 운용 변수들이 달라지기 때문에 다시 최적 조건을 구해야 한다. 따라서, 한외여과 막을 이용하여 13종의 난백 단백질로부터 lysozyme을 선택적으로 분리하고자 한 본 실험에서는 비연속 시스템에서의 최적 분리 조건을 구하고, 일단 설정된 막 분리 최적 조건에 근거하여 농도를 달리한 난백 용액의 분리 단계별 단백질 농도, lysozyme 농도, 비활성도 및 purification factor를 측정함으로써 최적 분리 농도를 결정하고자 하였다. 분리된 lysozyme의 순도는 겔 크로마토그래피와 전기 영동으로 확인하고 난백 단백질의 막 침착 현상을 SEM으로 관찰하고자 하였다. 기존의 결정화 방법에 의해 분리된 sigma lysozyme과 한외여과 방법에 의해 분리된 lysozyme의 활성을 비교하였고 kinetic study를 통해 막분리된 lysozyme의 최적 pH, 최적 온도, 및 냉장 온도에서의 안정성 등을 측정하므로써 식품산업에 있어서 천연식품 보존제로서의 이용 가능성을 모색하고자 하였다. 기존의 sigma lysozyme에 비하여 막 분리한 lysozyme의 활성이 매우 우수하고 분리 공정도

간단하다고 판단되었으므로 비연속적 분리 공정을 scale-up하여 우수한 항균물질인 lysozyme을 대량으로 분리할 수 있는 최적 막과 최적 막 분리 조건을 결정하고자 하였다.

제 2 장 연구개발의 내용 및 범위

1. 비연속 한외여과 시스템에서의 lysozyme 최적 분리 조건 설정

가. 난백의 분리

송산 농장 (경기도 화성군 남양면)에서 생산되는 신선한 달걀을 실험 재료로 하여 아래와 같은 방법으로 달걀 난백에 존재하는 lysozyme이 함유된 난백 분말을 준비하였다. 달걀의 난황과 난백은 분할기(Sumika Co., Japan)를 이용하여 분리하였으며, 분리된 난백을 냉동 건조(진공도 10 μ Hg, 1-3단계 program temp: 20 $^{\circ}$ C, 4-16단계 program temp: 40 $^{\circ}$ C, Ilshin Eng. Co., Korea)시켜 난백 분말을 얻었다.

나. 난백으로부터 ovalbumin의 제거

Egg white에는 13종의 다양한 단백질들이 존재하며 이 13종의 단백질 중에서 비항균성 단백질인 ovalbumin이 약 54%를 차지하고 있다. 본 연구과제에서 분리 대상으로 하고 있는 항균효소제 lysozyme의 최종 yield와 specific activity를 높이기 위하여 1차적으로 난백 단백질 간의 pI 차를 이용하여 ovalbumin을 제거하였다. 냉동건조 시킨 난백분말을 citrate-phosphate buffer (pH 4.6)에 녹여 30분간 방치 시킨 후 응고·침전된 ovalbumin (pI=4.6)은 Whatman No. 4 filter paper를 이용하여 제거하였다.

다. 막 종류와 막 세척

Lysozyme 분리에 사용한 PM30 막은 한계분자량 30,000, 막 직경 62 mm, 막 표면적 28.7 cm², 물의 permeation flow rate 2.0~6.0 mL/cm²/min, 최대 허용 압력 55 psi인 polysulfone 재질이였다. YM30 막은 한계분자량 30,000인 cellulosic 형태

이었다. 한번 사용한 막은 0.1 N NaOH와 0.1% protease로 30분간 세척하였으며, 막 세척 후 증류수를 사용하여 원래의 flux 회복 여부를 판단하였다.

라. Lysozyme 분리 최적화 조건 확립

1) 한외여과 시스템

PM30 막을 장착한 Amicon cell에서 각 실험 조건에 따라 예비여과된 시료 (180 mL)의 flux 변화를 측정함으로써 최대 flux를 나타내는 최적 막 분리 조건을 구하였다.

가) 온도

Whatman filter paper (No. 4)로 여과하였을 때 여과 속도가 가장 빠른 0.75% 난백 용액을 시료로 하여 막 횡단 압력 (transmembrane pressure)과 막 분리 온도 (5℃, 20℃, 35℃, 43℃)에 따른 flux 변화를 측정하였다.

나) 농도와 막 횡단 압력

시료 농도를 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0% (w/v)로 달리하였을 경우, 막 횡단 압력에 따른 flux 변화를 비교함으로써 최적 막 분리 농도와 최적 막 횡단 압력을 결정하였다.

다) 교반속도

농도 차이가 10배인 0.1%와 1.0% 난백 용액을 시료로 하여 교반과 비교반시의 flux 차이를 비교하였으며, 교반속도에 따른 flux 변화를 측정하였다.

라) 염농도

용액의 염농도가 flux에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 최적 분리 조건하에서

염을 첨가하지 않은 것과 NaCl 농도가 각각 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM인 0.25% HEWP 용액의 flux 변화를 측정하였다. 각 염농도 시료의 막 분리 여액내 lysozyme 농도와 단백질 농도를 측정하였다.

마) 막 재질과 시간

최적 막 분리 조건하에서 막 재질 (PM30, YM30)과 세척 효과 (새 PM30, 5회 사용한 PM30)가 장기간 막 분리시 flux에 미치는 영향을 살펴보았다. 막 재질이 lysozyme 분리도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 YM30 막과 PM30 막을 통과한 여액의 lysozyme 농도와 단백질 농도를 측정하여 분리액내 효소의 비활성도 (specific activity, SA)를 비교하였다.

마. 단백질 분석

한외여과 시스템에서 얻어진 여액의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 방법을 이용하여 측정하였다. 단백질 표준 곡선은 Sigma protein assay kit (No. P5656, USA)를 이용하여 구하였다. 시료의 단백질 함량은 Spectrophotometer 301 (Milton Roy Co., USA)로 750 nm에서 단백질의 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

바. Lysozyme의 활성 측정

*Micrococcus luteus*를 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹여 0.3 mg/mL의 농도로 한 후 *M. luteus* 용액을 시험관에 각각 5.8 mL씩 넣고 시료를 0.2 mL씩 취하여 25°C, 450 nm에서 흡광도 감소를 관찰하였다. 초기 흡광도 감소 속도는 1분간 감소한 흡광도로 계산하였으며, 흡광도 감소는 0.02에서 0.04의 범주의 것을 택하였다. Lysozyme 1.0 unit은 pH 7.0, 25°C에서 1분간의 흡광도 감소 0.001로 정의하였다.

2. 비연속 시스템에서의 막 침착 현상 및 분리된 lysozyme의 순도와 kinetic study

가. 시료

신선한 달걀(송산 농장, 경기도 화성군 남양면)의 난백으로부터 lysozyme을 분리하기 위하여 난백을 냉동건조 (진공도 10 μ Hg, 1-3단계 프로그램 온도: 20 $^{\circ}$ C, 4-16단계 프로그램 온도: 40 $^{\circ}$ C, Ilshin Eng. Co., Korea)하여 냉동 보관(-20 $^{\circ}$ C)하였다. 냉동 건조한 난백 분말을 pH 4.6인 citrate- phosphate buffer에 0.25%(w/v) 농도로 녹인 후, Whatman filter paper (No.4)를 사용하여 예비여과 하였다. 예비여과된 여액을 한계 분자량 (molecular weight cut-off, MWCO) 30,000인 PM30 막 (Amicon Co., USA)으로 한외여과 하였다.

나. 겔 투과 크로마토그래피

Sepharose-6B(Pharmacia, Sweden)로 충전한 C26/100 컬럼(gel bed height =90.0 cm)에 0.25% 난백 용액의 각 분리 단계별 여액을 20 mL 씩 주입하여 280 nm에서 single path monitor UV-1(Pharmacia, Sweden)을 사용하여 흡광도를 측정하였다. 시료의 주입속도는 1.38 mL/min이었으며, 민감도는 1.0 A.U.이었다. 용출액은 pH 5.8 potassium phosphate buffer를 사용하였다.

다. 전기 영동

Bollag 등의 방법에 따라 LKB Midget electrophoresis Unit (Pharmacia, USA)을 이용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE, 5% stacking gel, 15% separating gel)를 행하였다. Standard로는 SDS molecular weight markers (MW 10,000~70,000, Sigma, USA)를 사용하였으며 각 시료 10 μ L

를 polyacrylamide 겔에 Hamilton syringe로 주입한 후 50 mA에서 전기 영동하였다. 전기 영동이 끝난 겔은 coomassie brilliant blue로 염색하였으며 탈염 후 건조시켰다.

라. Scanning Electron Microscope (SEM)

단백질에 의한 막 침착도와 막 세척 후 침착된 단백질의 제거 효과를 알아보기 위하여 막을 동결 건조시킨 후 S-4200 FE-scanning electron microscope(Hitachi, Japan)로 막의 표면 구조를 관찰하였다. PM30막, lysozyme 분리에 사용한 한외여과 막과 세척한 막을 탄소 테이프를 붙인 시료판(stub)에 고정시키고 $\epsilon 1030$ ion sputter(Hitachi, Japan)에서 도금한 후, 20,000, 60,000 배로 관찰하였다. 한외여과에 사용된 막은 0.1 N NaOH 용액으로 세척하였다.

마. 난백 lysozyme의 kinetics

1) Lysozyme 농도와 초기 속도

pH 7.0 potassium phosphate buffer에 녹인 0.3 mg/mL *M. luteus* 3.8 mL와 0.15M NaCl (2.2-X) mL를 시험관에 넣고 25°C에서 SL과 PMSL (X mL)을 각각 다른 시험관에 혼합한 후 즉시 흔들어서 450 nm에서 분광 광도계로 흡광도 감소를 측정하였다. 물의 흡광도를 0으로 하여 2분간 15초 간격으로 lysozyme의 흡광도 감소를 측정하고 1분 동안의 흡광도 감소를 초기 속도(initial velocity, V_0)로 하였다.

2) 기질의 농도와 초기 속도

Potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 0.3 mg/mL *M. luteus* (3.8-X) mL와 pH 7.0 potassium phosphate buffer X mL를 총량 3.8 mL 되도록 농도를 조절하여 각기 다른 시험관에 넣고 0.6 mg/mL *M. luteus* 3.8 mL를 별도로 준비하였다. SL의 V_0 를 측정하기 위하여 0.15 M NaCl 2.15 mL를 앞에서 준비한 각 시험관에 첨

가한 후 0.15 M NaCl에 녹인 0.25% SL 50 μ l(159.1 units/mL)를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C, 450 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. PMSL의 V_o 를 측정하기 위하여 각 시험관에 0.15 M NaCl 1.99 mL를 첨가하고 25 $^{\circ}$ C에서 PMSL 0.3 mL(15.7 units/mL)를 혼합한 후 흔들어서 450 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. V_o 의 측정은 위의 방법과 같았다.

3) V_{max} 와 K_m

일정 효소 농도에서 기질의 농도 증가에 대한 V_o 변화를 Lineweaver-Burk plot으로 나타내었다. 이 직선의 X 절편과 Y 절편으로부터 K_m 과 V_{max} 를 계산하였다.

4) pH와 초기 속도

pH가 5.0~7.8인 potassium phosphate buffer에 0.3 mg/mL *M. luteus*를 녹인 후 3.8 mL를 취해 각 시험관에 넣고 SL과 PMSL의 흡광도 감소를 기질 농도에 따른 V_o 측정과 같은 방법으로 행하였다.

5) 온도와 초기 속도

pH 7.0 potassium phosphate buffer에 녹인 0.3 mg/mL *M. luteus* 3.8 mL를 각 시험관에 취한 후 SL 최적 온도 측정 실험에서는 0.15 M NaCl 2.15 mL를, PMSL 최적 온도 측정 실험에는 0.15M NaCl 1.99 mL를 각 시험관에 첨가한 후 25 $^{\circ}$ C에서 80 $^{\circ}$ C범위로 온도를 조절하여 각 온도에서 효소를 첨가하지 않은 기질의 용액이 실험 온도에 도달할 때까지 증탕기에서 유지한 후 효소 활성이 3182 units/mL인 SL 50 μ l와 52.3 units/mL인 PMSL 0.3 mL를 각각 첨가하여 V_o 를 측정하였다.

6) 활성화 에너지 (E_a)와 최적 온도

25 $^{\circ}$ C부터 60 $^{\circ}$ C까지의 범위에서 1/T값에 대한 log V값의 기울기를 구하거나

Arrhenius 방정식을 사용하여 활성화 에너지 (activation energy, E_a)를 계산하였다. 25℃부터 65℃까지의 범위에서 $1/T$ 값에 대한 $\log V$ 값을 그래프에 나타내어 최적 온도를 구하였다.

바. 냉장온도에서 시간 경과와 lysozyme 안정성

PFS와 PMS를 냉장 (0~4℃) 보관한 후 6개월 동안 일정한 간격으로 PFS와 PMS내에 함유된 lysozyme의 활성을 측정하였다. Lysozyme의 활성은 pH 7.0 potassium phosphate buffer에 녹인 0.3 mg/mL M. luteus 5.8 mL를 시험관에 넣고 25℃, 450 nm에서 효소 첨가 후의 흡광도 감소를 2분간 15초 간격으로 측정한 후 1분 동안 감소한 흡광도에 1000을 곱해 얻어진 값을 1.0 unit으로 하였다.

3. Scale-up시의 예비 여과 조건 및 연속적인 한외여과 시스템에서의 최적 막 분리 조건 확립

가. 예비 여과 조건의 최적화

예비 여과 시스템 (Sam duck prefiltration system)에서 종류가 서로 다른 3종류의 예비여과막 (GF/A, GF/D, GF/F)을 사용하여 pump 속도 (1~100 rpm)에 따른 0.25% (w/v) 난백 용액의 flux를 측정하였다. GF/A, GF/D, GF/F (Whatman Co., USA)막은 세공의 크기가 각각 1.6 μm , 2.7 μm , 0.7 μm 이며, 고온에서도 안정한 borosilicate glass 재질로 제조되었다. 본 실험에 사용된 미세여과 막은 모두 고압살균이 가능하며 막의 면적은 158.3 cm^2 였다. 1차년도와 2차년도에서 예비여과시 pH 4.6으로 고정하여 실험하였던 것을 pH 3.9~6.6까지 다양하게 변화시켜 예비여과된 여액의 단백질 농도와 lysozyme 활성을 측정하므로써 최적 예비여과 pH를 결

정하였다. 세가지 종류가 다른 막 중 예비 여과시 flux가 비교적 높고, 예비 여과된 여액내 lysozyme의 활성이 비교적 높은 막을 최적 막으로 선정하여 시간에 따른 flux 변화를 측정하였다.

나. 한외여과 시스템

최적 한외여과 막을 선정하기 위하여 예비 여과를 거친 난백 용액을 3가지 종류가 다른 증공사 막을 이용하여 한외여과 하였다. 실험에 사용된 polysulfone 막 (hollow fiber membrane H1P30-43, Amicon, USA)은 한계분자량(molecular weight cut-off, MWCO) 30,000, 막 표면적 0.03 m^2 , 길이 20.3 cm, 물의 permeation rate $0.05\sim 0.15 \text{ L/min}$, 내부 지름 1.1 mm, 최대 허용 압력 25 psi인 polysulfone 재질의 막이었다. Polyacrlontile로 만들어진 PN01E (MWCO 10,000) 막과 PN03C (MWCO 30,000) 막은 세한 텍 (Korea)으로부터 구입하였으며, 두 막의 표면적은 1.332 m^2 이었다. Lysozyme 분리에 사용된 한외여과 시스템 (Fig. 1)은 속도를 조절할 수 있는 pump, 압력계, 온도 조절 기능을 함유한 magnetic stirrer로 구성되었다. Inlet 압력과 outlet 압력의 차이가 거의 없기 때문에 inlet 압력만을 구동력으로 간주하여 flux를 측정하였다. 모든 실험 후, 증류수로 20분, 0.1 N NaOH로 30 분, 다시 증류수로 20분간 막을 세척하였으며, 증류수의 flux를 측정하여 원래의 flux가 회복되었는지 알아보았다.

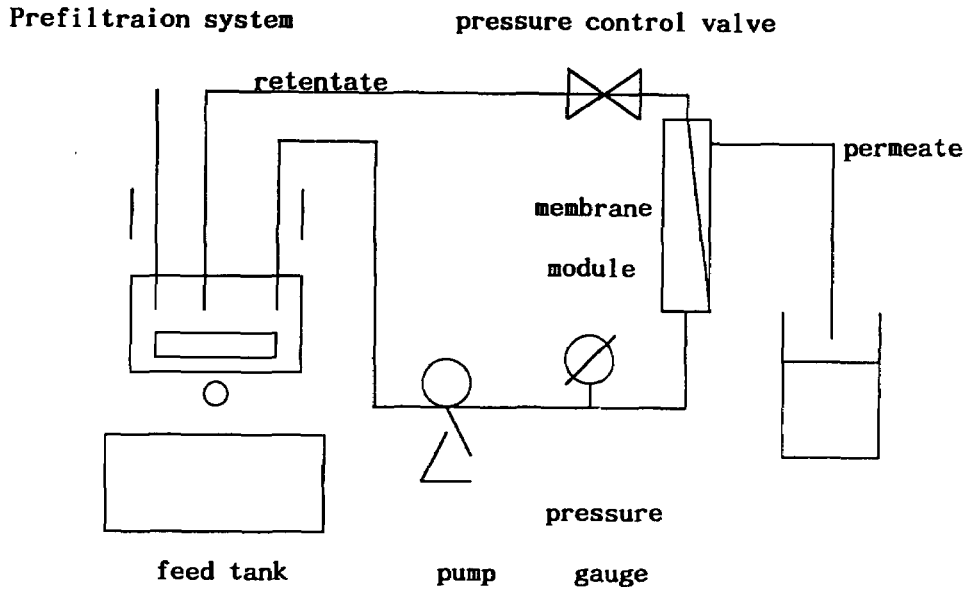


Fig. 1. Schematic flow diagram of the UF module.

다. Lysozyme 분리 최적 막 및 최적 한외여과 조건 확립

1) Pump Speed

1~100 rpm의 pump를 사용하여 한외여과 시스템에 시료를 주입하였을 때, 종류가 다른 세 막의 flux를 측정하였다.

2) 온도

PM30 막을 사용하여 시료의 온도를 0℃, 10℃ (냉장온도), 20℃ (상온)로 달리 하였을 때, 적용 압력에 따른 flux 변화를 측정하였다.

3) 막 재질과 막 분리 시간

서로 다른 3 종류의 막을 사용하여 각 막의 최적 조건하에서 막 분리 하였을 때, 막 재질과 시간에 따른 flux 변화를 측정하였다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 비연속 한외여과 시스템에서의 lysozyme 최적 분리 조건 설정

1. 온도 변화에 따른 막 분리도

43℃의 citrate-phosphate buffer와 예비여과한 5℃, 20℃, 35℃, 43℃의 0.75% HEWP 용액의 온도와 막 횡단 압력에 따른 flux 변화는 Fig. 2와 같다. 43℃ citrate-phosphate buffer는 막 횡단 압력이 10 psi부터 50 psi까지 10 psi씩 상승함에 따라 25.7, 43.3, 58.4, 76.2, 117.4 L/m²/hr (LMH)의 flux를 나타내어 막 횡단 압력에 비례적으로 flux가 증가하였으나 0.75% 난백 용액의 경우에는 온도에 따른 flux 차이가 컸으며 막 횡단 압력 20 psi이상에서 전반적으로 flux 증가율이 낮아졌다. 막 횡단 압력이 10 psi일 때 20℃, 35℃, 43℃ 시료들은 5℃ 시료에 비하여 3배 이상 flux가 높았으나 이들 시료간 flux 차이는 10% 미만으로 20℃ 이상에서는 온도에 따른 flux 차이가 적었다. 10 psi에 비해 막 횡단 압력이 20 psi일 때, 20℃ 용액의 flux는 약 20%, 35℃와 43℃용액의 flux는 약 40% 증가하여 35℃와 43℃ 용액의 flux 증가율이 20℃에 비해 약 2배 높았다. 냉장 온도인 5℃ 시료의 경우, 10 psi와 50 psi의 flux차이가 0.5 LMH 미만으로 막 횡단 압력이 증가하여도 flux가 거의 증가하지 않았다. 막 횡단 압력 40 psi 이상에서 더 이상 flux가 증가하지 않았던 35℃와 달리 43℃ 용액에서는 작은 폭으로나마 flux가 증가하였으나 35℃보다 온도가 8℃ 더 높은 것에 반해 flux 차이는 10% 미만으로 매우 적었다. 결과적으로, 막 횡단 압력과 온도가 증가할수록 0.75% HEWP 용액의 flux도 증가하였으나 막 횡단 압력 20 psi 이상에

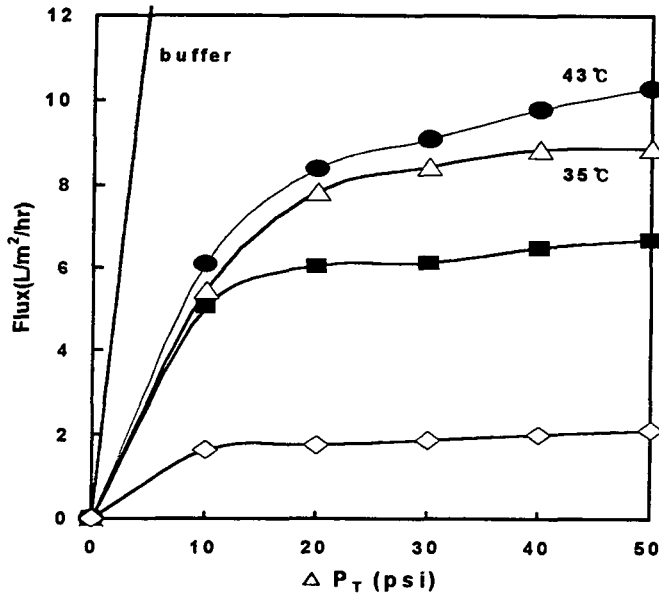


Fig. 2. Effect of temperature on permeate flow rate at various trans membrane pressures (ΔP_T) in an Amicon stirred cell with PM30 membrane. The sample was a 0.75% HEWP solution prefiltered with Whatman No. 4 filter paper in pH 4.6 citrate-phosphate buffer.

서는 압력보다 온도가 flux에 더 큰 영향을 미쳤다. 따라서, 본 실험 조건에서 막 분리 최적 온도는 35°C, 최적 막 횡단 압력은 20 psi였다.

한외여과 공정에서 구동력 (driving force)은 막 횡단 압력 (transmembrane pressure, ΔP_T)이므로, 막 횡단 압력이 증가함에 따라 flux가 증가한다. 그러나, 일정 막 횡단 압력이상에서 더 이상 flux가 증가하지 않는 것은 막 분리 공정이 진행됨에 따라 막 표면에 침착된 물질이 서서히 농축되어 용액의 점성이 증가하고, 높은 압력일수록 막 표면에서 농도분극 현상이 심화되어 막 표면에 단단한 겔층을

형성하기 때문이다. 이러한 결과는 flux가 막 횡단 압력과 용액의 점도, 막 투과도에 의하여 결정됨을 입증한 Hagen- Poiseuille의 법칙에 부합된다. Fig. 2에서 같은 막 횡단 압력일지라도 온도에 따라 flux 차이가 컸는데 이와 같은 현상은 flux가 막 횡단 압력보다는 용액의 점성에 의해 더 큰 영향을 받는다는 것을 의미한다. 막 횡단 압력이 증가하여도 5℃ 시료의 flux는 거의 증가하지 않았는데, 이는 낮은 온도에서 용액의 점성이 높아져 막 투과 속도가 감소하였기 때문이다. 20℃ 이상의 시료는 5℃ 시료에 비해 점도가 감소하였으므로 비교적 낮은 막 횡단 압력인 10 psi에서도 5℃ 시료보다 flux가 3배 높게 나타났다. 막 횡단 압력 20 psi 이상에서 20℃의 flux가 35℃나 43℃에 비해 낮은 것 또한 20℃ 용액의 점성이 이 두 용액(35℃, 43℃)보다 높았기 때문이다. 35℃와 43℃의 flux 차이는 10% 미만으로 온도 증가에 의한 flux 증가 효과가 크지 않았다. 35℃ 시료에 비해 43℃ 시료의 flux가 약간 높았지만 35℃를 최적 온도로 결정한 이유는 분리 온도가 높을수록 효소 활성이 감소할 가능성이 크기 때문이다. 따라서, 0.75% HEWP의 막 분리 최적 온도는 35℃였으며 이 온도에서 flux 증가율이 가장 높고 pumping에 소요되는 에너지가 최소인 막 횡단 압력은 20 psi인 것으로 나타났다.

2. 농도 변화에 따른 막분리도

농도를 달리한 35℃ HEWP 용액 (0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0%)의 flux를 측정한 결과 농도가 낮을수록, 막 횡단 압력이 높을수록 flux가 증가하였으며, 막 횡단 압력이 증가하여도 flux가 더 이상 증가하지 않는 지점이 시료 농도에 따라 달랐다 (Fig. 3). 최소 적용 압력인 10 psi에서 1.0%를 제외한 시료간 flux 차이가 0.2 LMH 미만이었으나, 최대 적용 압력인 50 psi에서는 0.1%를 기준으로 농도가 2.5배, 5배, 7.5배 10배로 증가함에 따라 flux가 33%, 46%, 57%, 59% 감소하였다. 0.1%는 50 psi까지 flux가 거의 직선에 가깝게 증가하는 반면, 0.25%와 0.5%는 30 psi, 0.75%와 1.0%는 20 psi에서 mass transfer controlled region과 pressure

controlled region으로 구분되어 농도에 따라 최적 막 횡단 압력이 달랐다. 단백질 용액 중 flux가 가장 높았던 것은 0.1% 시료였으나, 50 psi에서도 flux 증가율이 직선적일 만큼 용액의 농도가 매우 낮았다. 낮은 용액 농도는 공정 scale-up시 비용 손실의 가능성이 크므로, flux가 2번째로 높았던 0.25%를 최적 농도로 결정하였으며 이때의 최적 막 횡단 압력은 30 psi였다. 다양한 농도와 막 횡단 압력에서 농도가 낮을수록, 막 횡단 압력이 높을수록 flux가 증가하였는데 (Fig. 3), 이러한 현상은 낮은 농도일 때 막 표면에서 용질 침착율이 낮으며 한외여과 공정의 주요 구동력이 막 횡단 압력이기 때문이다. 0.1% 시료는 막의 최대 허용 압력에 가까운 50 psi까지 막 횡단 압력 증가에 따라 flux가 비례적으로 증가하는 pressure controlled region이었으므로 농도 분극 현상이 거의 발생하지 않았음을 알 수 있었다. 0.1%를 제외한 다른 농도에서는 막 횡단 압력 30 psi 이상(0.25%, 0.5%)과 20 psi 이상(0.75%, 1.0%)에서 각각 mass-transfer controlled region이 관찰되었는데, 이 구역에서 flux가 막 횡단 압력에 비례하지 않는 것은 막 표면에서 부분적인 물질 농축으로 인한 농도 분극 현상이 발생하여 구동력인 막 횡단 압력을 상쇄시켰기 때문이다. 10 psi에서보다 50 psi에서 농도별 flux 차이가 큰 것은 고 농도의 시료일수록 많은 단백질이 막 표면에서 침착을 일으키며 침착된 물질이 높은 압력하에서 막 표면에 겔층을 형성하기 때문에 물질의 막 통과가 저해되어 flux가 감소되었기 때문이다. 따라서, lysozyme 회수 효과를 고려하여 0.25%를 최적 농도로 결정하였으며, 이때 최적 막 횡단 압력은 pressure controlled region과 mass transfer controlled region이 구분되어지는 30 psi였다.

3. 교반에 따른 막 분리도

Fig. 4는 HEWP 0.1%와 1.0% 용액(35℃)을 magnetic stirrer를 이용하여 각각 교반(300 rpm)시키거나 교반 시키지 않았을 때 교반 유무가 flux에 미치는 영향을 보여주고 있다. 모든 적용 압력 하에서 비교적 낮은 농도의 0.1% 용액은 교반 여부와

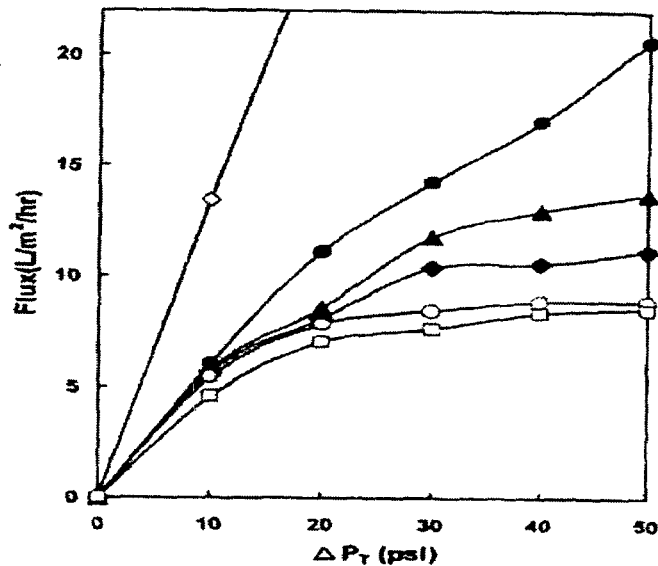


Fig. 3. Effect of sample concentration and transmembrane pressure on flux. Samples were 180 mL 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0% (w/v) HEWP solutions with a pH 4.6 citrate-phosphate buffer in an Amicon stirred cell equipped with PM 30 membrane. Separation temperature was 35°C. S in the Figure denotes stirring (300 rpm).

◇---◇: 35°C buffer, ●---●: 0.1%-S, ▲---▲: 0.25%-S, ◆---◆: 0.5%-S,
○---○: 0.75%-S, □---□: 1.0%-S.

관계없이 1.0%보다 flux가 높았다. 0.1% 교반 시료와 교반하지 않은 시료의 flux 차이는 10 psi에서 1.5 LMH이던 것이 50 psi에서는 8.6 LMH로 5.7배 증가한 반면, 1.0% 시료의 교반에 따른 flux 차이는 10 psi에서 3.9 LMH이던 것이 50 psi에서 6.1 LMH로 1.6배 증가한 것에 그쳤다. 막 횡단 압력이 증가함에 따라 교반 0.1% 용액의 flux는 거의 직선적으로 증가하였으나, 비교반 0.1%와 교반 1.0% 용액은 20 psi에서 flux가 현저히 감소하였다. 비교반 1.0% 용액에서는 적용 막 횡단 압력이

10 psi에서 50 psi로 증가하여도 flux가 1.0 LMH만이 증가하여, 압력의 증가에 flux가 거의 영향을 받지 않았다. 막 횡단 압력이 증가할수록 고 농도에서보다는 저 농도에서 교반 효과가 더 큰 것으로 나타났다. 모든 막 횡단 압력에서 교반 0.1%와 1.0% 시료가 비교반 시료에 비하여 flux가 상당히 높았으며, 높은 막 횡단 압력일수록 이들간 flux 차이가 컸다 (Fig. 4). 이러한 결과는 막 표면에서의 교반 효과로 인하여 부분적으로 농축된 2차 겔 층 (secondary gel layer)의 형성과 단백질 분자들의 침착이 억제되었기 때문이며, 특히 높은 적용 압력에서 이러한 효과가 컸음을 알 수 있었다. 비교반 0.1%와 교반 1.0% flux 차이가 거의 없는 것은 용액의 전체적인 농도 차이는 10 배이지만, 비교반 0.1% 용액내 형성된 2차 겔층의 농도가 교반 1.0%와 비슷한 농도이기 때문인 것으로 판단된다. 실험 결과로는 제시하지 않았지만 0.25% HEWP 용액에 교반속도를 달리하여 막 분리 하였을 때, 300 rpm 이상에서는 flux가 거의 증가하지 않았다. Kim 등은 0.1% BSA의 한외여과시 단백질의 응집에 영향을 미치는 요인을 전자현미경으로 조사한 결과, 교반속도가 400 rpm 일 때는 막 표면에 얇은 단백질 층이 형성되었으나 600 rpm의 교반속도에서는 단백질이 응고물을 형성하였으며, 이러한 단백질의 응고 현상은 교반 효과에 의한 높은 flux로 인해 막 표면에서 단백질이 빠르게 농축되었기 때문이라고 하였다. 단백질 응고 현상을 감소시키고 flux를 증가시키기 위해서는 적절한 교반속도의 선택이 중요하므로, 최적 교반속도를 300 rpm으로 결정하였다.

4. 염농도와 flux

염농도를 달리한 0.25% HEWP 용액을 최적 조건하에서 막 분리하였을 때 (Fig. 5), 50 mM의 염농도에서 flux가 가장 높았으며 용액내 염농도가 증가할수록 flux는 감소하였다. 50 mM과 100 mM의 염농도 시료는 염을 전혀 첨가하지 않은 시료에 비하여 flux가 높았으나, 이들간 flux 차이는 크지 않았다. 난백의 9.7~10.6%를 차지하는 13종의 난백 단백질은 대부분 구형 단백질로 구성되어 있다. 염의 종류와

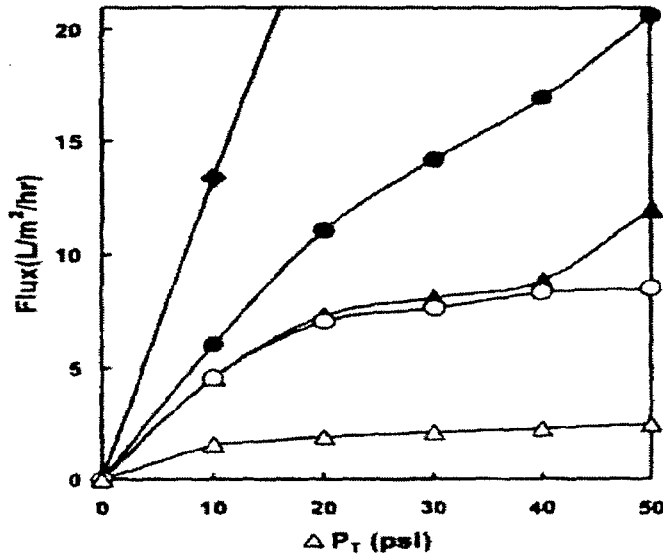


Fig. 4. Effect of stirring and transmembrane pressure on permeate flow rate. Samples were 0.1% and 1.0% HEWP solutions (180 mL). The effect of stirring on flux change was measured at 35°C with a condition of 300 rpm.
 ◆---◆: 35°C buffer, ●---●: 0.1%-S, ▲---▲: 0.1%, ○---○: 1.0%-S,
 △---△: 1.0%

농도에 따라 이들 단백질의 용해도가 달라지는데, 낮은 농도의 염은 단백질 표면의 전하를 중화시킴으로써 단백질의 구조를 안정화시키고 단백질의 수화도를 증가시킨다. 반면, 높은 염농도에서는 염이 물의 수소 결합을 약화시켜 물의 구조를 깨뜨리기 때문에 극성 분자인 단백질의 용해도가 감소하여 응집 현상이 발생한다. Fig. 5에서 염을 첨가하지 않은 0.25% HEWP 용액보다 50 mM과 100 mM 염농도 시료의 flux가 더 높은 것은 염이 난백 단백질의 구조를 안정시켜 용해도를 증가시켰기 때문이

며, 200 mM 이상의 염농도는 주변 물분자의 구조를 불안정하게 하여 단백질의 용해도를 오히려 감소시킴으로써 flux를 저해하는 것으로 사료된다. 염 첨가에 의한 단백질의 용해도 감소와 계속된 용액의 농축으로 인하여 막 표면에 침착된 단백질 층에는 등전점 (pI)이 알칼리 범위인 단백질들보다 pH 4.6 부근인 단백질들이 더 많이 침착되었을 것이다. 침착된 단백질 층에는 pI에서 단백질 구조가 압축되어 막과 단단히 결합한 단백질 (ovalbumin, ovoglobulin 등)과, 용액의 농축으로 단백질간 상호결합에 의하여 느슨하게 결합한 단백질(lysozyme)이 있다. 저농도의 염은 pI에서 단백질 분자의 net charge를 회복시켜 분자의 크기를 크게 만들므로 침착 층의

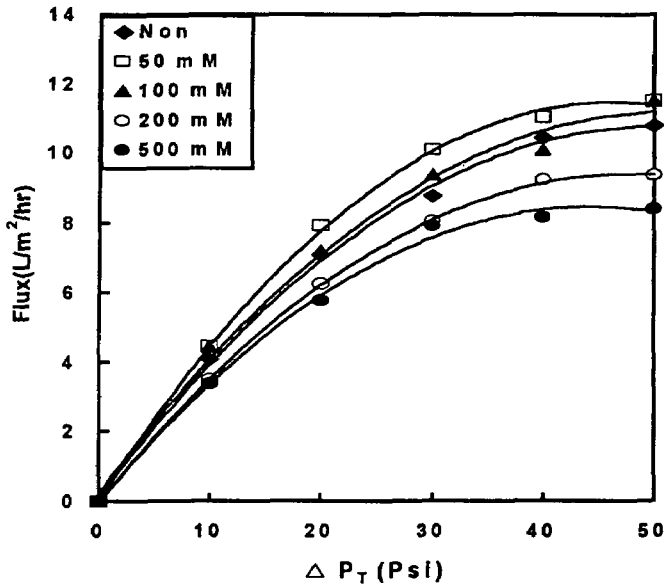


Fig. 5 Effect of salt concentration on permeability of a 0.25% (w/v) HEWP solution ultrafiltered with PM30 membrane. Salt concentration were 0, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM NaCl in 180 mL 0.25% HEWP. Experiment was performed at 35°C, 30 psi, and 300 rpm.

투과도를 향상시키지만, 염농도가 높을 때에는 침착된 단백질 분자들을 수축시키므로 투과도가 감소되는 것이라 사료된다. Fane 등은 0.1% BSA에 다양한 농도의 염 (NaCl)을 첨가하여 한외여과하였는데, BSA의 pI에서 염의 농도가 0.2 M 일 때 flux가 급격히 증가하였고 0.8 M 이상에서는 급격한 flux의 감소를 나타내어 flux를 증가, 혹은 감소시키는 염농도가 다르다고 하였다. 또한, pI에서는 염 첨가 시료의 flux가 더 높았으나 pI로부터 멀어질수록 염이 flux를 저하시킨다고 하였다. Cheryan 등은 염이 단백질의 구조 변형을 유발하여 단백질을 침전시키며, 막과 단백질 분자간에 salt bridge를 형성시킨다고 보고한 바 있다. 대부분의 난백 단백질의 pI가 pH 4~5이며 buffer의 pH를 ovalbumin (난백의 54%)의 pI (4.6)로 조정하였으므로, 염의 첨가가 예비여과 단계에서 제거하려했던 ovalbumin의 용해도를 높여 막 분리 여액으로 더 많이 여과되는 역효과가 있음을 Fane 등의 결과로부터 예측할 수 있었다. 또한, 항균력이 있는 lysozyme과 avidin은 pI가 각각 10.7과 9.5로 ovalbumin의 pI와 상당한 차이가 있으므로 염의 첨가가 오히려 막 분리 여액 내 이 두 단백질의 농도를 감소시킬 가능성이 있었다. 따라서, 0.25% HEWP 용액의 막 분리시 낮은 농도의 염은 약간의 flux 향상 효과를 유발하였으나, 선택적인 lysozyme 분리에는 바람직하지 않은 것으로 판단된다.

5. 염농도와 효소의 비활성도

0.25% HEWP 용액에 농도를 달리하여 NaCl을 첨가한 결과, 각 permeate내의 lysozyme 농도와 단백질 농도는 염을 첨가하지 않은 시료 (A)보다 높았으며, 특히 100 mM 염농도 permeate (C)의 lysozyme 농도와 단백질 농도는 (A)에 비하여 각각 2배, 3배 높았다 (Table 1). 그러나, 염 첨가에 의해 lysozyme의 비활성도는 오히려 감소하여 100 mM 이상의 염농도에서 비활성도는 (A)의 54~64% 수준이었다. 염농도가 50 mM (B)인 경우에도 여액내 lysozyme의 비활성도는 현저히 증가하지 않았으므로 순수한 lysozyme만을 분리하기 위해서는 염을 첨가하지 않는 것이 바람직하

였다. 결과적으로 lysozyme 분리를 위한 최적 시료는 염을 전혀 첨가하지 않은 0.25% HEWP이었다. 등전점 이하나 이상의 pH에서 단백질은 (+) 혹은 (-)의 net charge를 띄므로 단백질 분자간 정전기적 반발력과 단백질 주위의 극성 물분자와의 수소 결합에 의해 수화도가 증가한다. 대부분의 난백 단백질과 달리 lysozyme의 pI는 10.7로서, 산성 용액에서 용해도가 높으며 활성을 잘 유지한다. 시료의 염농도를 100 mM까지 증가시켰을 때 lysozyme의 농도가 2배

Table 1. Lysozyme concentration, protein concentration, and specific activity in PM30 permeate at various salt (NaCl) concentrations. Salt was added to 180 mL 0.25% (w/v) hen egg white protein solution

NaCl conc.	Enzyme conc. (units/mL)	Protein conc. (mg/mL)	Specific activity (units/mg protein)
(A) Non	110	0.039	2,821
(B) 50 mM	145	0.052	2,888
(C) 100 mM	210	0.116	1,810
(D) 200 mM	130	0.085	1,529
(E) 500 mM	130	0.076	1,711

가량 증가하는 것은 (Table 1) 염이 lysozyme의 용해도 증가와 구조 안정화에 기여하였기 때문이라 사료된다. 염의 농도가 0.05~0.1 M일 때 lysozyme의 활성이 증가하였으며, 고농도의 염분은 lysozyme의 활성을 저해하지만 저농도의 염분은 오히려 활성을 증가시켰다는 보고가 있다. Table 1에 의하면, 효소를 포함한 단백질의 농도는 (C)에서 가장 높았지만 효소의 순도를 의미하는 비활성도는 (A)의 65% 수준이

있으므로, 염농도가 증가함에 따라 lysozyme 이외의 단백질도 상당량 막을 통과하였음을 알 수 있었다. Fane 등은 염이 존재하지 않을 때 pI에서의 단백질 분자는 net charge가 0이므로 가장 치밀한 상태가 되어 침착된 단백질 층이 가장 낮은 투과도를 지니나, 염이 존재하면 (-)기의 결합에 의해 분자의 크기와 net charge가 모두 증가하여 용액의 막 투과도가 증가된다고 하였다. 200 mM 이상의 염농도에서 효소와 단백질 농도가 모두 감소하는 것은 전하의 차폐 (shielding)로 인하여 전하의 효과가 점차적으로 감소하여 투과도가 감소하였기 때문이다. 이러한 효과는 양이온보다 음이온이 더 크므로, Na⁺ 이온보다 Cl⁻ 이온이 단백질 구조에 많은 영향을 미치는 것으로 판단된다. 일정 농도의 염 첨가가 flux와 효소 농도, 단백질 농도 등을 향상시키지만, lysozyme의 비활성도는 오히려 감소시키므로 막 분리시 염을 첨가하지 않는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

6. 막 재질과 시간에 따른 flux 변화

최적 막 분리 조건하에서 PM30 막과 YM30 막의 시간에 따른 flux 변화를 살펴본다 (Fig. 6). 막 분리 초기에는 YM30 막의 flux가 더 높았으나 꾸준한 flux 감소로 인하여 막 분리 후 12분 경과시에는 PM30 막의 flux가 더 높았으며 이때 flux는 거의 정상상태에 이르렀다. 반면, YM30 막은 약 24분 경과 후 정상상태에 이르렀는데, 정상상태에서 PM30 막과 YM30 막의 flux는 막 분리 초기에 비하여 각각 33%, 58% 감소하였다. Table 2에 나타나 있듯이 막 분리 5분 경과 후 수거한 여액내 lysozyme 농도와 단백질 농도는 PM30 막보다 YM30 막의 경우 각각 1.8배, 3.8배 더 높았으나 효소의 비활성도는 절반 수준이었다. 따라서, 시간 경과에 따른 flux 감소율이 낮아 빨리 정상상태에 이르며, lysozyme의 비활성도 또한 높은 PM30 막을 사용하는 것이 YM30 막을 사용하는 경우보다 lysozyme 분리에 더 적합한 것으로 나타났다. 친수성인 YM (cellulosic type) 막은 단백질과의 흡착력이 매우 낮아 용질의 회수율이 높다. PM 막은 비이온성 중합체 (non-ionic polymer)로서, 이온이나

유기 용질은 흡착되지 않지만 steroids나 소수성 고분자 물질들이 막에 잘 흡착된다. 막 분리 초기에 YM30 막의 flux가 PM30 막보다 더 높은 것은 (Fig. 6) YM30 막의 높은 용질 회수율과 낮은 단백질 흡착성 때문이다. 시간이 경과함에 따라 두 막의 flux가 모두 감소한 것은 막 표면과 pore내에 단백질 분자가 침착되고 일부 단백질과 물이 여액으로 빠져나가면서 stirred cell 내부의 용액이 점점 농축되었기 때문이다. Cheryan 등은 막 분리 시간이 경과함에 따라 막에 흡착되는 유형 단백질의

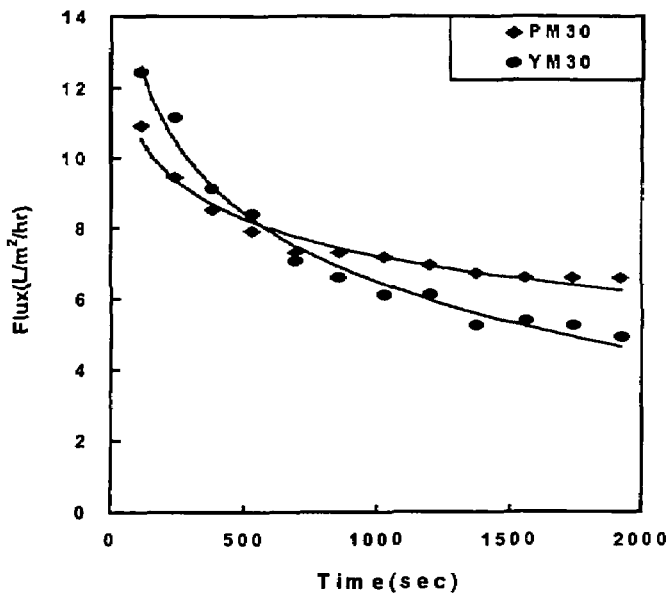


Fig. 6. Effect of separation time on flux of a 0.25% (w/v) HEWP solution in an Amicon stirred cell with PM30 and YM30 membrane. Both membranes were cleaned with distilled water for 1 hr. Experiment was performed at the optimum conditions (Temp.: 35°C, ΔP_T : 30 psi, stirring speed: 300 rpm, no salt added)

Table 2. Lysozyme concentration, protein concentration, and specific activity in permeate of 0.25% (w/v) hen egg white protein solution ultrafiltered with PM30 and YM30 membrane

Membrane type	Enzyme conc. (units/mL)	Protein conc. (mg/mL)	Specific activity (units/mg protein)
PM30	110	0.039	2,821
YM30	195	0.147	1,327

양이 증가하여 flux가 감소하였다고 보고하였으며, Ehsani 등은 효소의 한외여과시간이 경과함에 따라 flux가 급격히 감소하였으며 이러한 flux 감소는 양전하를 띤 단백질과 음전하를 띤 막 사이의 결합에 의해 막에 단백질이 흡착되기 때문이라고 하였다. Kelly 등은 단백질 용액의 flux 감소는 단백질 분자들이 막 표면에서 침착되기 때문이며 thiol기를 가진 단백질의 경우 초기 flux 감소 현상이 심화된다고 하였다. 13종의 난백 단백질 중 황을 함유한 단백질은 ovalbumin과 lysozyme이며, 특히 난백의 54%를 차지하는 ovalbumin은 lysozyme의 S-S기를 SH기로 환원시켜 활성을 잃게 할 수 있다. 더욱이 thiol기를 가지지 않는 단백질 분자들이 단순한 물리적 현상에 의해 큰 단백질 응고물을 형성하여 막에 침착되는 반면, 자유 thiol기를 함유한 단백질 분자는 SH-SS 상호 교환반응에 의해 다른 단백질과 화학적 결합을 하여 막 표면에서 침착이 잘 되므로, 예비여과 단계에서 ovalbumin의 제거가 막 분리시 높은 flux 유지에 있어서도 필수적임을 알 수 있었다. Fig. 6에서 막 분리 12분 경과 후부터는 PM30 막의 flux가 YM30 막보다 더 높았는데, 막 분리 초기에는 단백질의 막 흡착에 의해 flux가 감소하므로 단백질의 막 흡착력이 높은 PM30 막의 flux가 낮았으나, 일단 막 표면에 얇은 단백질 층이 형성된 후에는 단백질 흡

착력보다는 막 투과율에 의해 flux가 더 많은 영향을 받으므로 빨리 정상상태에 도달한 PM30 막의 flux가 더 높게 나타난 것으로 판단된다. 일반적으로 YM 막보다 PM 막이 더 빠른 flux를 나타내는데, 이러한 flux 차이는 막 재질이 달라 막 제조시 생성되는 pore의 크기가 달라지기 때문이다. 용매와 용질은 막 표면에 있는 pore 중 가장 큰 pore를 통해 이동하므로 “실질적인” pore 크기는 평균 pore 크기보다 크다. 따라서, 명목적인 한계 분자량 (nominal molecular weight cut-off)은 같지만 실질적인 pore 크기 차이로 인해 막 재질이 다른 YM30 막과 PM30 막의 flux가 다를 수 있으며, PM30 막의 실질적인 pore 크기가 YM30 막보다 더 커서 정상상태에서 더 빠른 flux를 나타내는 것이라 사료된다. Table 2에서 PM30 막의 높은 단백질 흡착력으로 인하여 YM30 막 여액내 lysozyme과 단백질 농도는 PM30 막보다 더 높았다. 그러나, PM30에 비교한 YM30 막 여액내의 효소 농도의 증가는 비효소성 단백질의 증가비율에 비하여 훨씬 떨어져 비활성도는 YM30 막이 오히려 더 낮게 나타났다. 따라서, 더 빠르게 정상상태에 이르러 높은 flux를 유지하며 비활성도도 높은 PM30 막이 lysozyme 분리시 더 적합한 재질의 막으로 판단되었다.

7. 막 침착에 의한 flux 변화

글리세린만을 제거한 새 PM30 막 (A)과 5회 이상 막 분리에 사용한 PM30 막 (B)으로 lysozyme을 분리하였을 때, 시간 경과에 따른 flux 변화는 Fig. 7과 같다. (A)와 (B) 모두 막 분리 12분 경과 후 정상상태의 flux에 이르렀으며, 이 때의 flux는 막 분리 초기에 비해 33% 감소한 수준이었다. (A)에 비해 (B)의 flux가 약 30% 감소하였으나, 분리 시간 경과에 따른 flux 감소 경향은 두 막이 거의 동일하였다. 막의 총 저항성(total resistance)은 막 분리시 농도 분극으로 인한 저항성 (polarized layer resistance, R_b)이 50% 이상을 차지하고, 막 세척으로 회복 가능한 가역적 저항성(reversible resistance, R_a)과 막 세척으로도 회복 불가능한 비가역적 저항성(irreversible resistance, ΔR_m)이 30~38% 정도를 차지한다.

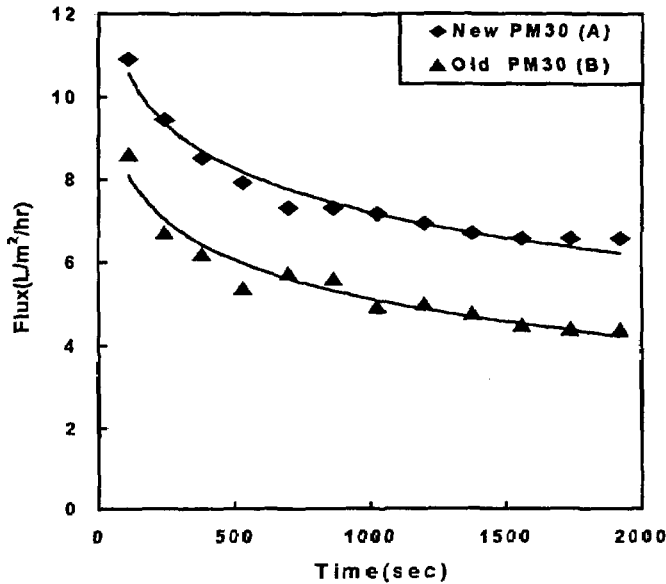


Fig. 7. Effect of membrane fouling on flux. (A) New-PM was cleaned with distilled water for 1 hr and never been used before, (B) Old-PM was first ultrafiltered, cleaned for 30 min with 0.1 N NaOH and then with 0.1% protease solution, and finally rinsed with distilled water. This procedure was repeated 5 times.

막 자체가 갖는 초기 저항성 (initial resistance, R_m)은 모든 막이 가지고 있으므로 거의 무시할 만하다. Fig. 7에서 모든 막 분리 조건과 막 재질이 동일한 (A), (B)의 flux 차이가 2 LMH로 일정하게 나타나는 것은 세척으로도 회복 불가능한 비가역적 저항성 때문이다. Fane 등은 flux의 감소는 흡착된 단백질이 서서히 막에 쌓이기 때문이며, 침착된 단백질 중 막과 단단하게 결합 (tightly-bound)된 것은 세척 후에도 flux를 회복하는데 문제가 된다고 하였다. Guell 등은 BSA, lysozyme,

ovalbumin을 각각 3시간 동안 미세여과하였을 때, BSA와 lysozyme은 polysulfone 막의 내부에만 침착되었지만 ovalbumin은 막 내부에 주로 침착된 후 막 외부와 막 표면에도 침착하였으며, polysulfone 막은 ovalbumin이 존재할 경우 가장 심한 침착현상을 일으켰다고 하였다. Pore를 막거나 pore를 좁게 하는 주된 원인은 단백질의 흡착과 막 내부에서 주로 발생하는 염의 침착 때문이다. Oppenheim 등은 double spin-labeled lysozyme (15,000 Da)을 PM10과 PM30 막으로 한외여과시킨 후 EPR (electron paramagnetic resonance) spectroscopy로 단백질 구조를 관찰한 결과, 막 표면의 단백질 구조보다 막 pore에 갇혀있거나 막을 막고 있는 단백질 구조가 더 압착된 형태라고 하였다. 따라서, 막 내부 pore에 침착된 일부 lysozyme과 ovalbumin이 존재하고 막 표면에 침착된 단백질들도 막과 단단히 결합하였거나 가해진 압력에 의해 압착됨으로써 막 세척시에 제거되지 않았기 때문에 (B)의 flux가 (A)에 비해 약 30% 감소한 것으로 사료된다. 시간이 경과함에 따라 (A), (B)의 flux 감소 경향이 동일하였는데, 이것은 막 재질과 막 운용 조건이 동일하여 두 막의 Rb나 Ra가 거의 같기 때문인 것으로 사료된다. 일반적으로 시간 경과에 따른 flux 감소 현상은 투입 용액의 물성 변화와 관련된 막 침착현상과 농도 분극 현상 (concentration polarization) 때문에 발생한다. 용매가 다공질의 한외여과 막을 통과할 때는 Hagen-Poiseuille 법칙을 따르므로 고형물이 농축되면 feed의 점도와 밀도가 상승하고 확산도가 감소하여 물보다 낮은 flux를 나타낸다. 막 표면에 용질의 농도가 국부적으로 증가하면 삼투압이 현저히 증가하여 구동력과 flux가 감소하는데, 분리 시간이 경과됨에 따라 flux가 급격히 감소하다 일정 수준에서 flux를 유지하는 것은 처음에는 물질이 막에 많이 흡착되었다가 점차 침착되는 양이 감소하여 여액으로 많이 빠져나가고 케이크가 형성될 때까지 이 과정이 진행되기 때문이다. Kim 등은 장기간 단백질을 한외여과할 경우 막 표면에서의 케이크 형성이 더 심화된다고 하였다. Fig. 7에서 (A), (B) 모두 막 분리 초기에 각각 10.9 LMH, 8.6 LMH의 높은 flux를 나타내던 것이 분리 시간이 경과함에 따라 flux가 점차 감소한

것은 본 실험에서 사용한 소수성 재질의 polysulfone 막과 다양한 종류의 난백 단백질 분자의 상호 결합으로 인하여 막 침착현상이 발생하였기 때문이며, 막 분리 12분 경과 후 7.3 LMH와 5.8 LMH를 유지하는 것은 막 표면에 형성된 농도 분극 층에 의한 용질의 역 이동과 구동력에 의한 물질 이동이 평형을 이루어 정상 상태에 이르렀기 때문이다.

제 2 절 비연속 시스템에서의 막 침착 현상 및 분리된 lysozyme의 순도와 kinetic study

1. 여과액의 단백질 농도

시료의 농도가 0.25%, 0.5, 1.0% (w/v)로 증가함에 따라 PFS의 단백질 농도는 2.4, 4.8, 10.8 $\mu\text{g/mL}$ 로 비례적으로 증가하였으며, 예비 여과 단계에서 각 농도별 단백질 제거율은 49.0~55.5%이었다 (Table 3). 한외여과 여액인 PMS의 단백질 함량은 0.038~0.14 $\mu\text{g/mL}$ 로 원시료 대비 99% 이상의 단백질이 막분리 단계에서 제거되었다. 모든 PFS 시료의 단백질 함량은 원시료의 절반 수준이었다. 이러한 단백질 함량 감소는 난백의 대부분을 차지하고 있던 ovalbumin(난백 단백질의 54%, $pI=4.6$), ovomucin (1.5%, $pI=4.5\sim 5.0$), ovomacroglobulin(0.5%, $pI=4.5\sim 4.7$) 등이 예비여과 단계에서 난백 용액의 pH를 4.6으로 유지시키면 이들 단백질들은 등전점인 pH 4.6에서 net charge가 0이 되어 용해도를 상실하면서 침전되었기 때문이다. 시료의 농도가 증가할수록 침전되는 단백질의 비율이 약간 감소하였는데 이러한 현상은 단백질의 양극성에 기인하는 것으로 판단된다. 실제로 예비여과한 시료의 pH를 측정된 결과, 0.25% PFS의 pH가 4.67인데 반해 농도가 증가할수록 pH도 증가하여 1.0% PFS의 경우는 pH가 4.81이었다. 일반적으로 단백질은 등전점에서 멀어질수록 정전기적 힘에 의해 구조적으로 안정해지며 용해도도 증가한다. 따라서, 단백질의 농도가 증가할수록 ovalbumin 등전점과의 차이가 커지므로 단백질 침전율이 감소하는 것으로 판단된다. 원시료 단백질의 99%가 한외여과 단계에서 제거되는 것은 (Table 3) 한외여과 공정에 의해 lysozyme 이외 대부분의 단백질들이 제거되었기 때문이다.

Table 3. Purification of lysozyme at various hen egg white protein concentrations

Sample conc. (w/v)	Separation Step	Volume of fraction (mL)	Protein		Lysozyme				
			Conc. (mg/mL)	Total amount (mg)	Conc. (units/mL)	Specific activity (Units/mg protein)	Total amount (Units)	Yield (%)	Purification factor (Fold)
0.25%	Origin	100.0	5.278 (100.0%) ¹⁾	527.8	484 (100.0%)	91.7	48390	100	1.00
	PFS ²⁾	94.0	2.354 (-55.5%)	221.3	360 (-25.6%)	152.9	33840	69.9	1.67
	PMS ³⁾	88.5	0.038 (-99.3%)	3.4	180 (-62.8%)	4,736.8	15930	32.9	51.66
0.50%	Origin	100.0	10.556 (100.0%)	1,055.6	968 (100.0%)	91.7	96,770	100	1.00
	PFS	88.8	4.762 (-54.9%)	422.9	950 (-1.9%)	199.5	84,360	87.2	2.18
	PMS	82.0	0.072 (-99.3%)	5.9	260 (-73.1%)	3,611.1	21,320	22.0	39.38
1.00%	Origin	100.0	21.110 (100.0%)	2,111.0	1936 (100.0%)	91.7	193,550	100	1.00
	PFS	92.5	10.762 (-49.0%)	995.5	1600 (-17.4%)	148.7	148,000	76.5	1.62
	PMS	84.0	0.140 (-99.3%)	11.8	430 (-78.0%)	3,071.4	36,120	18.7	33.49

¹⁾() means the % of the protein and the lysozyme which were removed at each separation step.

²⁾PFS means prefiltered solution in pH 4.6 citrate-phosphate buffer.

³⁾PMS means PM30 permeate solution.

2. Lysozyme 농도

Table 3에 제시되어 있듯이 PFS의 경우 시료의 농도가 0.25%의 2배, 4배로 증가함에 따라 PFS내 lysozyme 농도도 각각 2.6배, 4.4배로 증가하여 lysozyme 함량이 시료 농도에 대체로 비례하였다. PFS의 평균 lysozyme 농도는 각 농도별 원시료의 75% 이상이었으나, 막 분리한 PMS내 lysozyme 농도는 0.25% PMS를 제외하고는 원시료 lysozyme 농도의 30% 미만으로 감소하였다(Table 3). Table 1에 의하면 원시료 단백질의 50% 이상이 예비여과 단계에서 제거된 것과는 달리 PFS의 lysozyme 농도는 원시료의 75% 이상이었는데, 이와 같은 현상은 다른 난백 단백질들(pI=4.6)에 비해 등전점이 높은 lysozyme (pI=10.7)은 침전되지 않고 예비여과 단계에서 대부분 여액으로 빠져나왔기 때문이다. PMS lysozyme의 함량은 원시료의 30% 수준이었는데, 한의여과 단계를 거치면서 막 표면에 흡착되었거나 다른 난백 단백질과의 상호 작용으로 인하여 함께 침전되면서 소실된 것으로 판단된다.

3. 여과액의 비활성도와 purification factor

Lysozyme의 순도를 의미하는 비활성도 (specific activity)는 PMS (3,071~4,737 units/mg protein)가 원시료 (91.7 units/mg protein)나 PFS (148.7~199.5 units/mg protein)의 비활성도보다 매우 높았다. 비활성도가 높은 순서는 0.25% PMS > 0.50% PMS > 1.0% PMS 순이었다 (Table 3). 시료 농도를 달리한 PMS lysozyme의 purification factor는 33.49~51.66으로 PFS의 1.67~2.18에 비해 막 분리 단계를 거치면서 약 20~30 배 더 증가하였다 (Table 3). Purification factor는 시료의 농도와 일정한 상관관계가 없었으며, 세 가지 농도의 시료 중 0.25% PMS의 purification factor가 51.66으로 가장 높았다. 신선한 난백의 단백질 함량은 1.24%이며, 이 중 ovalbumin이 54%를 차지하는 것으로 알려져 있다. PMS lysozyme의 함량이 원시료나 PFS보다 낮음에도 불구하고 PMS lysozyme의 비활성도가 PFS lysozyme에 비해 18~31배까지 증가된 것은 예비여과와 막 분리 단계를 거치면서

PM30 막에 의해 분자량 30,000 이상의 비효소성 단백질의 대부분이 여액으로 빠져 나가지 못하고 lysozyme만이 선택적으로 분리·정제되었기 때문이다(Table 3). 흡착 크로마토그래피를 사용하여 분리한 난백 lysozyme의 비활성도와 purification factor는 각각 28,340 units/mg protein과 19.4로 나타났는데, 본 실험에서 분리한 lysozyme에 비하여 비활성도는 높고 purification factor는 낮았다. Moss 등은 양이온 교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피, reverse-phase FPLC의 3가지 방법을 연속적으로 사용하여 소의 관절과 코의 연골 조직으로부터 lysozyme을 분리하였는데, 3단계의 정제 과정을 거치면서 lysozyme의 purification factor는 각각 18, 112, 254로 상승하였으나, purification factor가 254배로 증가된 lysozyme의 비활성도가 1.419밖에 되지 않은 것으로 보아 lysozyme 이외의 다른 단백질들이 분리 여액내 상당량 존재함을 알 수 있었다. 반면에 본 실험에서 single-step으로 막 분리한 0.25% PMS lysozyme의 비활성도는 4,736.8 units/mg protein으로 매우 높게 나타났으므로, 막분리 공정이 Moss 등이 수행한 크로마토그래피 공정에 비해 lysozyme 분리에 더 효율적인 분리 방법임이 입증되었다. 세 가지 다른 농도의 시료 중 비활성도와 purification factor가 가장 높은 시료는 0.25% PMS 용액이었으므로 본 실험에 사용된 규모의 한외여과 시스템 최적 시료 농도는 0.25%로 판단되었다.

4. 겔 투과 크로마토그래피

Purification factor가 가장 높았던 0.25% (w/v) 난백 용액을 분리 단계별로 겔 크로마토그래피한 결과는 Fig. 8과 같다. Potassium phosphate buffer (pH 5.8)에 녹인 0.25% 시료 1은 두 번째 peak (1-b)가 등근 산 모양이었으나 pH 4.6인 citrate-phosphate buffer에 녹인 0.25% 시료(2, 3, 4)는 두 번째 peak의 가운데가 함몰되어 두 개의 peak가 중첩되는 형태로 나타났다 (Fig. 8.2-b, 3-b, 4-b). Lysozyme의 활성은 1, 2, 3, 4 네 시료의 두 번째 peak에서만 측정되었으며, 2, 3,

4의 경우는 두 번째 peak(b)의 두 봉우리 중 뒤쪽 봉우리 부분에서 lysozyme의 활성이 더 높게 나타났다. 크로마토그래피 결과 첫 번째의 비효소성 단백질 peak (a)가 한외 여과 단계에서 완전히 제거되었음을 알 수 있었다 (Fig. 8.4-b). Lysozyme은 13종의 난백 단백질 중 가장 분자량이 작으므로 크로마토그래피의 가장 뒷부분 peak에서 lysozyme 활성이 나타날 것으로 예측할 수 있었으며, 실제로 크로마토그래피 획분의 lysozyme 활성을 측정해 본 결과 1, 2, 3, 4 네 가지 시료의 두 번째 peak (Fig. 8.b)에서만 효소 활성이 측정되었다. Fig. 8에서 시료 2, 3, 4번

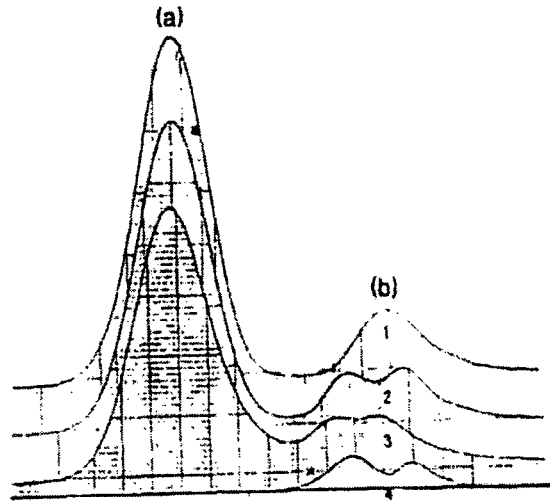


Fig. 8. Gel permeation chromatogram of 0.25% HEWP solution at each separation step. 1. Origin: 0.25% HEWP solution pH 5.8 potassium phosphate buffer, 2. Prefiltration permeate: 0.25% HEWP solution in pH 4.6 citrate-phosphate buffer, 3. Heating for 2 hr after prefiltration: 0.25% HEWP solution in pH 4.6 citrate-phosphate buffer, 4. PM30 membrane permeate: 0.25% HEWP solution in pH 4.6 citrate-phosphate buffer.

의 두 번째 peak 모양이 시료 1과 다른 이유는 lysozyme과 분자량이 비슷하고 등전 점이 4.6 부근인 단백질이 citrate-phosphate buffer에 의해 분리 단계 전에 침전되어 제거되었기 때문으로 사료된다. 시료 4에서는 시료 1, 2, 3과 달리 첫 번째 peak (a)가 크로마토그램 상에 전혀 나타나지 않았는데 이것은 PM30 막에 의해 고분자의 비효소 단백질이 완전히 제거되었음을 의미하며 본 실험에 사용된 막의 분리 효율이 상당히 높음을 알 수 있었다.

5. 전기 영동

난백 용액 (0.25%, w/v)을 전기 영동하였을 때, 난백의 대부분을 차지하는 단백질은 분자량 45,000인 ovalbumin이었다(Fig. 9, lane 2). 대부분의 ovalbumin은 PFS 단계에서 제거되었으며, 비록 일부 ovalbumin이 함께 여액으로 분리되었지만 PMS에는 정제도가 높은 lysozyme이 존재하였다. 겔 크로마토그래피 분석을 전기 영동한 Fig. 9의 lane 6과 7에 나타난 것처럼 크로마토그래피의 첫 번째 peak (Fig. 8.1-a, Fig. 8.2-a, Fig. 8.3-a)는 비효소 분석이었으며, 이들 대부분이 전기영동 결과 ovalbumin으로 판명되었다. 분리 단계별로 회수한 0.25% 난백 단백질을 전기 영동한 결과 ovalbumin을 제외한 다른 단백질은 농도가 매우 낮기 때문에 염색된 band의 수가 13개로 선명히 나타나지는 않았으나, ovalbumin은 분자량 45,000 부근에서 매우 굵고 선명한 band를 형성하였다 (Fig. 9, lane 2). 키틴을 흡착시킨 크로마토그래피를 이용하여 인간의 혈액, 모유, 염소 젖으로부터 lysozyme을 분리한 Weaver 등은 시료의 성질과 순도가 정제도에 많은 영향을 미친다고 하였으며, disc 겔 전기영동 결과 키틴 흡착 크로마토그래피에 의하여 원료에 관계없이 순수한 lysozyme을 분리하였다. FPLC로 분리한 lysozyme을 전기 영동하여 silver stain으로 염색한 Moss 등에 의하면, lysozyme이외의 다른 단백질 band가 많이 존재하였으며 분자량 14,100과 15,000 부근에서 lysozyme band가 관찰되었으므로 lysozyme의 isoform이 존재한다고 보고하였다. 예비 여과와 막 분리 과정을 거칠수록 분자량

45,000 부근의 단백질은 대폭 줄어들고 lysozyme의 band가 굵고 진해지는 것으로 보아 (Fig. 9, lane 3-4) PM30 막이 lysozyme을 선택적으로 분리하는데 매우 효과적인 분리 방법인 것으로 판단된다. PMS내에 ovalbumin으로 추측되는 다른 단백질이 일부 존재하였는데, 이는 한계 분자량 30,000의 막이라고 하더라도 실질적인 막 분리 단계에서는 분자량 30,000 이상의 단백질도 일부 통과되는 비교적 큰 세공을 부분적으로 갖고 있기 때문이다. Kim 등은 막의 실질적인 세공의 크기가 명목적인 세공의 크기보다 더 크다고 하였으며, Cheryan은 세공의 분포가 다양하기 때문에 명목적인 세공의 크기와 실질적인 세공의 크기가 반드시 일치하지는 않는다고 하였다. 크로마토그래피 첫 번째 peak 부분 (Fig. 8.a)이 비효소성 단백질이라는 것이 전기 영동 결과 확인되었으며, 활성 측정 결과 두 번째 peak에서만 효소 활성이 나타났듯이 전기 영동 결과에서도 상당히 순도 높은 lysozyme이 한외여과 후 여액에 존재한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 9, lane 4).

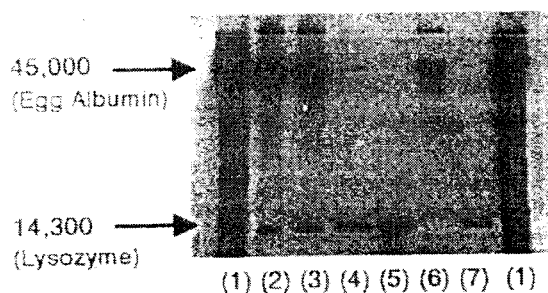


Fig. 9. SDS-PAGE of hen egg white lysozyme in each separation step.
 Lane 1: Standard proteins, Lane 2: 0.25%(w/v) hen egg white protein reconstituted with water, Lane 3: PFS, Lane 4: PMS, Lane 5: Sigma lysozyme, Lane 6: Chromatography fraction No. 40, Lane 7: Chromatography fraction No. 50

6. SEM

새 PM30 막의 표면에는 세공들이 균일하게 분포하고 있었으나(Fig. 10.A-1), 0.25% 난백 용액을 여과한 한외여과 막 (Fig. 10.B-1, B-2)에는 비교적 두꺼운 단백질 층이 막 표면을 덮고 있어 Fig. 4.A-1에서 관찰된 세공들을 발견할 수 없었다. PM30 막을 앞에서 관찰한 Fig. 10.B-2에서 막 표면에 침착된 단백질 층의 두께는 약 $0.9 \mu\text{m}$ 였으며, 이들 대부분이 0.1 N NaOH로 세척 후 제거되었다(Fig.10.C-1,

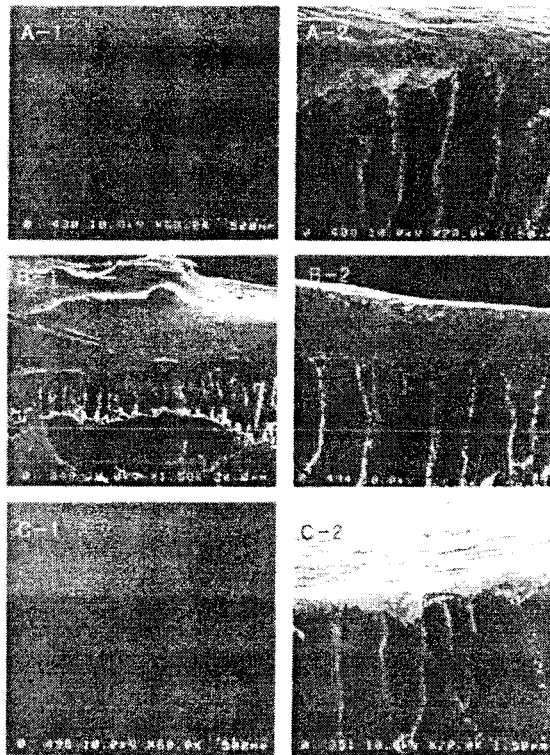


Fig. 10. Scanning electron micrographs of fouling deposits on the PM30 membrane. (A) New membrane (B) Filtered membrane (C) Cleaned membrane. (1) membrane surface (2) skin layer

Fig. 10.C-2). 일반적으로 막 분리시 flux의 저하를 유발하는 가장 주된 원인은 막 표면에 형성되는 단백질 층 (Fig. 10.B-1, B-2)을 꼽을 수 있다. Fane 등은 flux의 감소는 흡착된 단백질이 서서히 막 표면에 쌓이기 때문이며, 침착된 단백질 층 막과 단단하게 결합된 것은 세척 후에도 flux를 회복하는데 문제가된다고 하였다. Guell 등은 BSA, lysozyme, ovalbumin을 각각 3시간 동안 미세여과하였을 때, polysulfone 막에 침착 현상이 가장 심한 단백질은 ovalbumin인 것으로 보고한 바 있다. 따라서, 막 표면에 침착된 단백질 층의 주된 구성 물질은 난백의 대부분을 차지하는 ovalbumin이며, 이 침착층이 막 분리시 flux 저하를 유발하는 주된 물질임을 알 수 있었다. 본 실험에서 사용된 한외여과 막은 미세 여과 막보다 세공 크기가 작으므로 대부분의 ovalbumin이 막 표면에서 침착되었으며, 막 침착 물질이 0.1 N NaOH로 세척 후에는 거의 대부분 제거되었으므로 PM30 막이 lysozyme의 선택적 분리에 적합한 것으로 판단되었다.

7. Lysozyme의 kinetics

가. Lysozyme 농도와 초기 속도 (V_0)

Sigma lysozyme(SL)과 최적 조건에서 분리한 0.25% PM30 permeate solution lysozyme(PMSL)의 농도 증가에 대한 초기 흡광도 감소 속도를 측정한 결과, SL과 PMSL의 농도가 증가할수록 초기 속도(initial velocity, V_0)도 비례적으로 증가하였다(Fig. 11). V_0 의 범위가 0.1~0.9 O.D./min 사이에서 SL의 농도는 60~380 units/mL인데 비하여 PMSL은 6~38 units/mL로 PMSL이 10배의 낮은 농도에서도 SL과 비슷한 V_0 를 나타내었다. 추세선 식은 두 lysozyme 모두 원점을 X절편으로 하는 1차 방정식으로 농도에 대한 V_0 가 first order reaction을 따랐으며 SL과 PMSL의 추세선 기울기 비가 1:10으로 PMSL의 활성이 상업적으로 사용되고 있는 Sigma사의 효소 활성보다 10배 더 높았다. Michaelis-Menten식에 따르면 단일 효소-기질 반응

(uni-uni reaction)에서 기질의 농도가 매우 높은 상황에서의 반응 속도는 효소-기질의 복합체 형성 농도에 비례하여 증가한다. 따라서, SL과 0.25% PMSL의 농도가 증가할수록 *M. luteus*의 분해속도가 first-order kinetics를 따르면서 비례적으로 증가하는 현상은 lysozyme 농도가 높아질수록 *M. luteus*와 lysozyme 복합체 형성이 증가하여 많은 *M. luteus*가 분해되었다는 것을 의미한다. 효소의 농도와 추세선 기울기를 비교해볼 때, PMSL의 효소 역가가 SL보다 10배 높아 기질의 분해 속도가 10배 빠른 것으로 나타났다. 즉, 본 과제에서 수행한 막분리에 의해 분리된 0.25% PMSL이 냉동건조와 결정화에 의해 정제되어 상업적으로 시판되는 SL보다 10배 가량 효소 활성이 높은 것으로 나타났다.

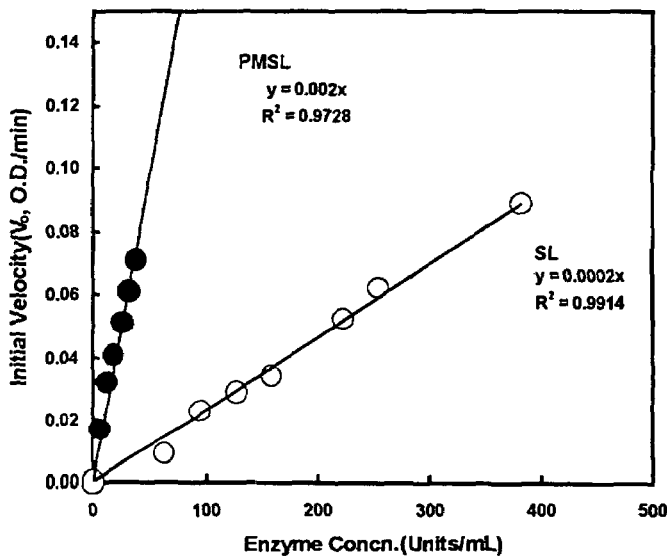


Fig. 11. Effect of SL and 0.25% PMSL concentration on the initial velocity of lysozyme. Substrate was 0.3 mg/mL *M. luteus*. The initial velocity was measured at 450 nm under the defined assay condition (pH 7.0, 25°C).

나. 기질의 농도와 초기 속도

Fig. 12에서 농도가 159.1 units/mL인 SL과 15.7 units/mL인 0.25% PMSL 모두 기질 농도 0~0.3 mg/mL까지는 V_0 가 급격히 증가하여 first-order kinetics를 따랐지만, 0.3~0.6 mg/mL 범위에서는 기질의 농도가 증가하여도 V_0 가 거의 증가하지 않아 정상상태를 나타내는 zero-order kinetics를 따랐다. 그래프로 추정된 SL과 PMSL의 대략적인 V_{max} 값은 각각 0.44, 0.48이었고, 이 때의 K_m 값은 각각 0.022와 0.024이었다. 기질 농도 0~0.3 mg/mL의 범위에서 기질 농도에 비례하여 두 lysozyme의 V_0 가 증가하는 것은 lysozyme의 농도에 비해 상대적으로 *M. luteus* 농

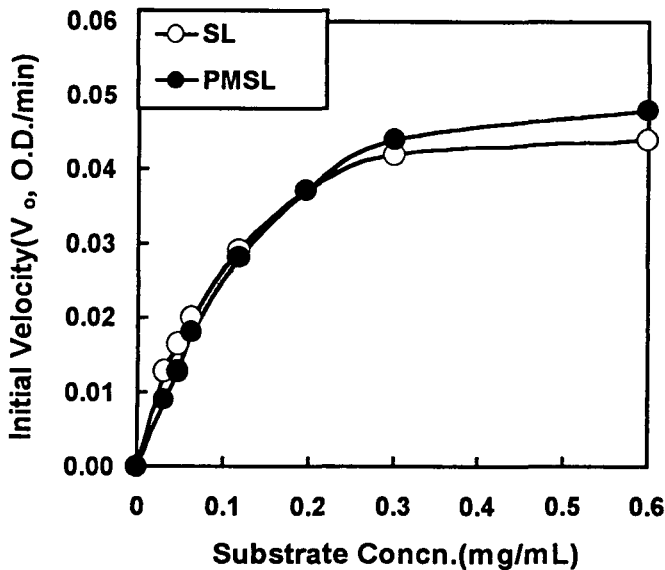


Fig. 12. Plot of initial velocity against substrate concentration for a lysozyme catalyzed reaction at constant lysozyme concentration. SL (0.25% Sigma lysozyme) concentration was 159.1 units/mL and PMSL (0.25% PM30 permeate lysozyme) was 15.7 units/mL.

도가 낮아 용액내에서 lysozyme-M. luteus 복합체를 형성하는데 시간이 많이 소요 되기 때문에 V_0 가 V_{max} 와 상당한 차이를 보이는 것이며 M. luteus의 농도를 증가시키면 그만큼 결합에 소요되는 시간이 줄어들므로 빨리 효소와 반응함으로써 반응속도가 기질 농도에 비례하여 증가하였기 때문이다. 기질 농도가 0.3~0.6 mg/mL 범위에서는 효소의 분해속도가 V_{max} 에 근접하므로 거의 모든 lysozyme이 M. luteus와 효소-기질 복합체를 형성하고 있는 것을 의미한다. M. luteus를 분해한 후 효소-기질 복합체에서 자유 효소의 형태로 전환된 lysozyme도 즉시 또 다른 M. luteus와 결합하므로 효소의 농도를 높여주지 않는 한 분해 속도가 더 이상 증가하지 않았다는 것을 알 수 있었다. 일정 효소 농도에서 기질 농도와 V_0 관계로 V_{max} 와 K_m 값을 계산할 수 있는데 SL과 PMSL의 V_{max} 값은 각각 0.44와 0.48, 이 때의 K_m 값은 각각 0.022와 0.024로 추정되어 SL 보다 10배나 낮은 농도의 PMSL이 비슷한 V_{max} 값과 K_m 값을 가지므로 막 분리 공정을 거쳐 분리한 0.25% PMSL의 기질 친화력이 현재 상업적으로 생산되어 시판되고 있는 SL보다 매우 높은 것으로 나타났다.

다. V_{max} 와 K_m

Lineweaver-Burk plot을 이용하여 $1/[S_0]$ 와 $1/[V_0]$ 와의 관계를 직선으로 나타내었을 때(Fig. 13), 직선의 Y 절편은 $1/V_{max}$, X 절편은 $-1/K_m$, 기울기는 V_{max}/K_m 을 의미하므로 SL의 직선 방정식 $Y = 1.9091X + 18.46$ 으로부터 구한 V_{max} , K_m , V_{max}/K_m 값은 각각 0.054, 0.103, 0.524이었으며, 0.25% PMSL의 직선 방정식 $Y = 3.0769X + 11.685$ 로부터 구한 V_{max} , K_m , V_{max}/K_m 값은 각각 0.086, 0.263, 0.327 이었다. V_{max} 와 K_m 값은 0.25% PMSL이 SL보다 컸으며 V_{max}/K_m 값은 SL이 PMSL보다 더 높음으로 나타났다. K_m 은 기질에 대한 생촉매(biocatalyst)와의 친화도를 나타낸다. 어떤 특정 생촉매의 경우 제한된 기질에 대한 친화도가 아주 높으면, 즉 낮은 K_m 값을 가지면 기질의 농도가 증가함에 따라 빨리 V_{max} 에 도달하나 K_m 값이 크면 천천히 V_{max} 값에 도달한다. Lineweaver-Burk plot을 이용하여 구한 K_m 과 V_{max} 를 비교해보

면, 최고 반응 속도는 SL의 0.054에 비해 0.25% PMSL이 0.086으로 더 높았으나 K_m 값은 SL이 두배 가량 높아 *M. luteus*에 대한 PMSL의 친화력은 SL의 50% 정도이었다. 그러나 PMSL에 비하여 10배나 높은 농도인 SL의 최대 반응 속도가 PMSL의 70% 정도에 해당하는 것은 PMSL의 효소 활성이 매우 높다는 것을 의미한다.

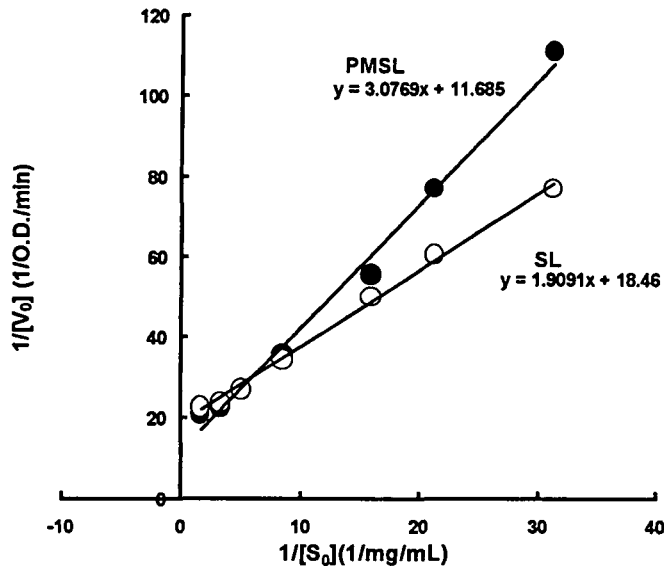


Fig. 13. The Lineweaver-Burk plot ($1/[V_0]$ versus $1/[S_0]$) for a single lysozyme catalyzed reaction at constant lysozyme concentration. V_{max} and K_m value for SL and PMSL were 0.054, 0.103 (SL) and 0.086, 0.263 (PMSL) respectively.

또한, 단순히 막 분리에 의해 고분자 단백질이 제거된 PMS내에 다른 단백질과 함께 lysozyme이 존재한다는 것을 고려한다면 3차례의 결정화 과정에 의해 순수하게 분리된 순도 높은 SL의 친화력이 PMSL 친화력의 2배를 넘지 않으므로 PMSL 활성이 낮은 농도에서도 매우 높다는 것을 알 수 있다.

라. pH와 초기 속도

25°C, 일정 기질 농도(0.3 mg/mL *M. luteus*), 일정 효소 농도(159.1 units/mL SL, 15.7 units/mL PMSL)에서 두 lysozyme 모두 pH 5.8일 때 분해 속도가 각각 0.059 O.D./min, 0.054 O.D./min으로 V_{max} 에 도달했으며, pH 5.8에서 떨어질수록 V_o 가 점차 감소하여 종 모양의 곡선을 나타내었다 (Fig. 14). 대체로 알칼리에서보다 pH 7.0 이하 산성 용액에서 높은 V_o 를 유지하였는데 최적 pH 5.8을 기준으로 pH 5.8 이하에서는 급경사를 이루는 반면 pH 5.8 이상에서는 완만한 경사를 이루며 서서히 V_o 가 감소하였다. SL과 PMSL 모두 pH 5.1과 pH 6.9 부근에서 V_{max} 절반 값에 해당하는 pK_a 와 pK_b 가 존재하여 pK_a 와 pK_b 는 각각 5.1과 6.9이었다. 효소의 촉매작용에 대한 pH의 영향은 효소와 기질의 이온화 때문이며 pH는 효소와 기질간의 결합 능력, 기질을 생성물로 직접 전환시키는 능력, 효소의 안정성 등에 영향을 준다. 기질이 이온화하지 않았을 때의 총 효소 (E)는 E⁻, E⁰, E⁺의 세 가지 형태로 기질과 결합하나 E⁰만이 기질을 생성물로 전환시킬 수 있다. pH는 효소 구조 안정성과 효소의 촉매작용에 관여하는데 효소의 활성자리 (active site)는 이온화된 그룹으로 구성되어있으며 적절한 이온 형태를 띄어야만 활성자리의 구조를 유지할 수 있다. 만약 효소의 활성이 특정 아미노산 side chain의 이온화 경향에 전적으로 좌우된다면 pH에 따라 효소 활성에 상당한 차이를 나타낼 것이며 활성 자리를 구성하는 두 그룹 아미노산의 pK_a 값이 pH profile을 결정한다. 극단적으로 낮은 pH와 높은 pH에서는 불활성이나 특정 범위에서 높은 활성을 띄는 경우 두 pK 값의 차이가 2 보다 클 때 최적 V_{max} 계산이 가능하나 두 pK 값의 차이가 2 보다 적을 때는 실제 V_{max} 값과 그래프 상의 V_{max} 값 차이가 크므로 최적 V_{max} 계산이 불가능하며 그래프는 종 모양 (bell-shaped type)을 나타낸다. 일단 pK 값을 알게되면 어떠한 그룹이 활성자리에 있는지 밝혀낼 수 있는데 Fig. 14에서 구한 pK_a 와 pK_b 값은 SL의 경우 5.2, 6.85이었고 PMSL의 경우는 각각 5.1과 7.0이었다. 즉, pK 값의 차이가 두 경우 모두 2를 넘지 못하므로 이 값은 실제 pK 값과 큰 차이가 있다. Lysozyme의

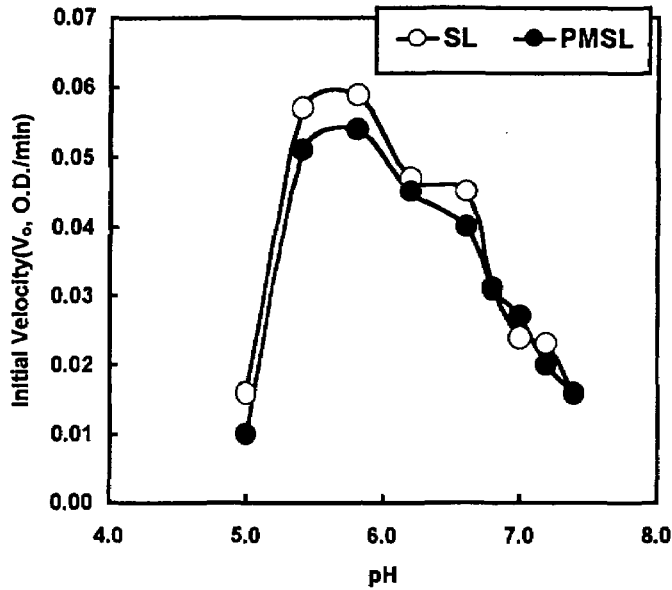


Fig. 14. Effect of pH on initial velocity of SL and PMSL. Bell-shaped curves are V_o versus pH plot at constant lysozyme concentration.

side chain 중 Phe-34, Asn-37, Asn-44, Gln-57, Asn-59, Trp-62, Trp-63, Asp-101, Ala-107, Trp-108, Arg-114가 기질과 결합 작용에 관여하여 효소와 기질을 결합시키며 Glu-35, Asp-52가 촉매 작용에 관여하여 박테리아 세포벽에 있는 D와 E사이 C_1 의 NAM과 C_4 의 NAG의 β -1,4 glycosidic link를 가수분해함으로써 세포벽을 분해한다. Lysozyme의 분해력과 관계 있는 주요 아미노산은 Glu-35, Asp-52인데 자유 lysozyme으로부터 구한 난백 lysozyme의 pK_a 값이 3.8과 6.7이었으므로 둘 중 낮은 pK_a 값인 3.8은 카르복시기가 관여함을 의미하는데 촉매 과정에 참여하는 Asp-52의 side chain으로 추측되며, 높은 값인 pK_b 6.7은 histidine이지만 histidine은 소수성 부분에 속해있는 Glu-35의 카르복시기에 주로 관여하므로 결과

적으로 pH 5에서 Glu-35의 수소를 함께 공유하는 것으로 판단된다. Fig. 9는 pH에 대한 효소의 V_o 변화를 나타낸 것으로 SL와 PMSL 모두 pH 5.8에서 V_{max} 에 도달한 것은 두 lysozyme 모두 pH 5.8의 조건에서 *M. luteus*와 결합하기 적절한 이온화 형태를 형성하여 기질을 잘 분해하기 때문이며 pH 5.8에서 멀어질수록 V_o 가 감소하는 것은 활성 자리에 있는 아미노산 side chain이 수소를 잃거나 얻음으로써 활성 자리에 구조적 변형이 발생하여 효소가 불활성화 되었기 때문이다.

마. 온도와 초기 속도

일정한 기질 농도와 효소 농도 하에서 온도에 따른 효소 반응 속도를 실험한 결과 상온인 25℃에서 SL, PMSL의 V_o 가 각각 0.024 O.D./min, 0.027 O.D./min이던 것이 온도가 상승함에 따라 V_o 도 증가하여 60℃에는 0.055 O.D./min, 0.063 O.D./min으로 V_{max} 에 이르렀다(Fig. 15). 그러나 60℃ 이상의 온도에서 V_o 가 급격히 감소하여 65℃에서는 V_o 가 SL, PMSL이 각각 0.022 O.D./min, 0.023 O.D./min로 25℃에서의 V_o 값과 별다른 차이가 없었다. 모든 온도에서 PMSL이 SL보다 V_o 가 더 높았으며 두 lysozyme의 최적 온도는 60℃였다. 온도가 증가할수록 반응 속도가 증가하는데 온도의 상승은 반응물의 운동 에너지(kinetic energy)를 증가시켜 반응물의 단위 시간당 생산적 운동(productive collision)을 유도한다. 효소 촉매 작용도 이와 비슷한데 효소는 복합 단백질 분자이므로 이들의 촉매 활성은 R-그룹의 특정 아미노산으로 구성되어 있으며 기질에 대한 결합부위와 촉매 부위를 형성하는 3차 구조에 의해 효소 활성이 좌우된다. 효소의 3차 구조는 결합력이 약한 많은 비 공유결합으로 되어있어 쉽게 변형되므로 너무 많은 에너지를 외부로부터 흡수하게 되면 3차 구조가 파괴되어 효소가 변성되므로 촉매 활성을 잃게된다. Fig. 15에서 보는 것과 같이 25℃~60℃ 범위에서 온도가 상승함에 따라 SL과 PMSL의 반응 속도가 함께 증가하였는데 이와 같은 현상은 효소와 기질간의 결합이 증가하여 촉매 반응이 활발히 일어났기 때문이다. 60℃이후 급격한 반응 속도 감소는 효소-기질간 결합 증가

에 따른 반응속도 증가가 온도 증가에 따른 효소의 변성 속도 증가와 상쇄된 결과이며 온도에 대한 속도 곡선은 최적 온도로 불려지는 60℃에서 최고의 초기 속도를 나타내었다. 65℃에서 효소 활성이 상온인 25℃와 비슷한 V_0 를 유지하였는데 Fig. 15에서 실험 결과는 제시되지 않았지만 80℃까지도 V_0 가 크게 감소하지 않았다. 일반적으로 저분자의 효소, 단일 펩타이드체인, S-S 결합 (cysteine residue)은 열에 매우 안정한 구조인데 lysozyme은 S-S 결합을 4개나 가지고 있는 저분자 효소이므로 비교적 고온에서도 어느 정도 효소 역할을 유지하는 것으로 사료된다.

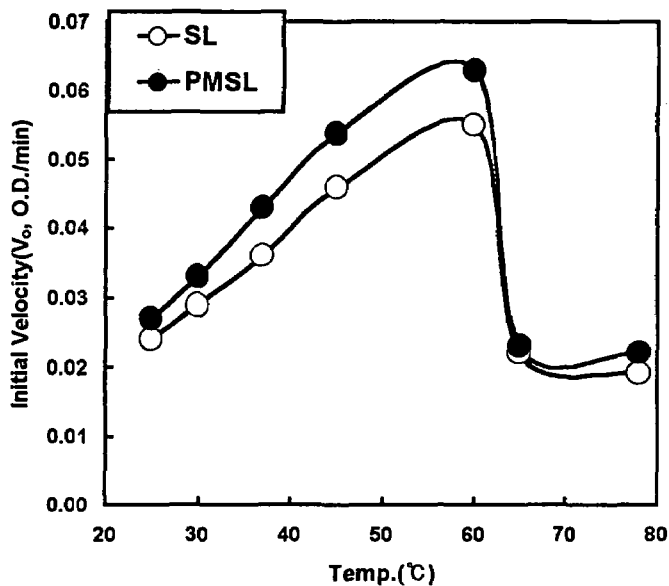


Fig. 15. Effect of temperature on initial velocity of SL and PMSL at constant lysozyme and substrate concentration. Initial velocity of SL and PMSL were measured between 25℃ and 78℃.

바. 활성화 에너지와 최적 온도

반응에 대한 활성화 에너지 (E_a)는 서로 다른 온도에서 $1/T$ 값에 대한 $\log V$ 값을 plot하거나 반응속도 상수를 측정함으로써 최적 온도와 E_a 를 구하였다. Fig. 16의 A는 25°C에서 60°C 사이의 V_0 를 $1/T$ 값에 대한 $\log V$ 값으로 나타낸 것이고 B는 25°C에서 65°C 사이의 V_0 를 $1/T$ 값에 대한 $\log V$ 값으로 나타낸 것이다. 그래프의 기울기로부터 구하는 방법과 수학적 계산에 의한 방법에 의하여 계산된 SL과 PMSL의 활성화 에너지를 Table 4에 나타내었다. Fig. 16.A는 $1/T$ 값 0.00314, 즉 45°C를 기준으로 오른쪽과 왼쪽 직선의 기울기가 달라 45°C가 전이 온도였으며 25°C부터 45°C 구간에서 SL과 PMSL의 활성화 에너지는 각각 6,075와 6,556 cal/mole이었고 45°C부터 60°C구간에서의 활성화 에너지는 각각 2,495, 2,152 cal/mole로 45°C 이전의 활성화 에너지가 약 3배 가량 높았다. 수학적 방법으로 계산한 활성화 에너지도 기울기를 이용하여 구한 값과 큰 차이가 없었다. 두 방법 중 어느 방법으로 활성화 에너지를 계산하였더라도 25°C부터 45°C 구간의 활성화 에너지는 SL이 더 낮았고, 45°C부터 60°C의 활성화 에너지는 PMSL이 더 낮았으나 두 lysozyme의 농도 차이가 10배인 것에 반하여 활성화 에너지의 차이는 거의 없었다. 25°C에서 65°C 까지 $1/T$ 값에 대한 $\log V$ 값을 나타낸 Fig. 16의 그림 B에서는 그림 A와 달리 65°C에서 급격히 $\log V$ 값이 감소하여 60°C가 SL과 PMSL의 최적 온도이었다. 비효소 반응보다 효소반응의 활성화 에너지가 상당히 낮으며 효소반응에 있어서는 활성화 에너지가 낮은 쪽의 반응 속도가 더 빠르다. 온도에 따라 K_m 값이 변하기 때문에 모든 온도에서 일정 기질의 농도가 효소와 반응한다고 할 수 없으며 대부분의 효소 촉매 반응에서는 온도가 변함에 따라 각각 다르게 영향받는 여러 가지 반응 상수에 의해 V_{max} 값이 달라지므로 Arrhenius plot을 통해 활성화 에너지를 계산하였다. Arrhenius plot 자체는 각각 다른 온도에서 속도 제한 단계가 있으면 직선적 관계를 보이지 않는다. 특정 온도에서 직선의 기울기가 변하면 이 지점이 한 단계에서 다른 단계로 바뀔 때 V_{max} 도 바뀌는 전이 온도 (transition temperature)이므로 서로 다른

온도에서 $1/T$ 값에 대한 $\log V$ 값을 나타낸 Fig. 16.A에서 전이 온도는 직선의 기울기가 바뀌는 45°C 이며 이 온도를 기준으로 45°C 이전의 V_{max} 값과 45°C 이후 60°C 까지의 V_{max} 가 다르다는 것을 알 수 있었다. SL과 PMSL의 활성화 에너지는 45°C 를 기준으로 달라져 45°C 이전과 이후의 활성화 에너지 차이가 약 3배에 이르는데 이것은 45°C 를 기점으로 기질이 용액내 증가된 온도의 영향을 받아 운동성이 증가하여 효소와 더 빈번하게 접촉함으로써 V_{max} 가 달라졌기 때문이며, 이전 온도에 비해 45°C 이후 활성화 에너지가 $1/3$ 이라는 것은 반응이 3배정도 더 빠르게 일어난다는 것을 의미한다. 따라서 25°C 부터 45°C 구간에서는 SL이, 45°C 부터 60°C 구간에서는 PMSL이 기질을 더 빨리 분해하여 반응 속도를 증가시키는 것으로 나타났다. 그러나

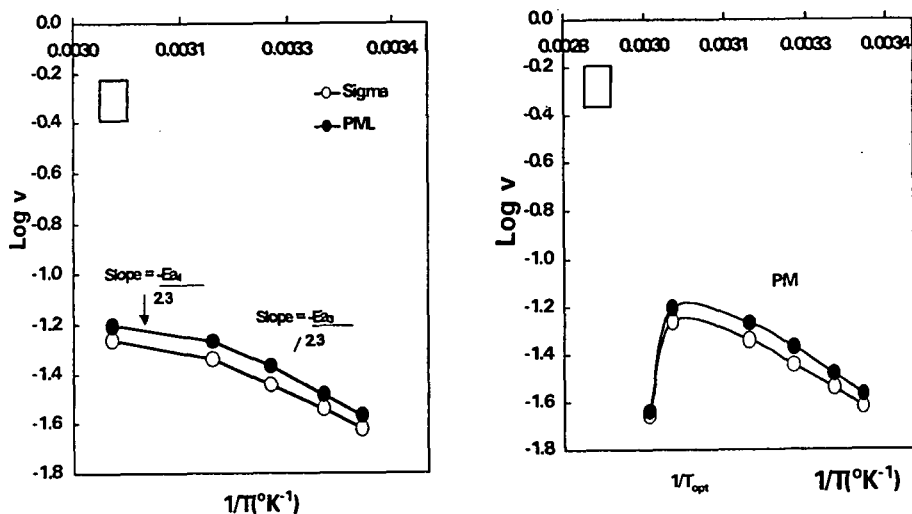


Fig.16. An Arrhenius plots of PML and SL. The activation energy, E_a , could be determined by measuring the reaction rate constant at different temperatures and plotting $\log k$ versus $1/T$. Slope of the straight line (Fig. 16. A) indicates E_a at certain temperature. Curve A : A definite change in slope between 25 and 60°C . Curve B : An activation change between 25 and 66°C .

SL과 PMSL의 농도 차이가 10배인 점을 고려한다면 PMSL이 낮은 농도에서도 더 쉽게 활성화 에너지를 감소시킨다는 것을 알 수 있었다. Fig. 16.B에서 60℃이후 SL과 PMSL 모두 log V가 상당히 감소하였는데 갑자기 낮은 log V 값으로 Arrhenius plot의 기울기가 감소한 현상은 단백질이 급격히 변성되었음을 의미한다. 60℃이후에서 SL과 PMSL이 변성되기 시작하여 반응 속도가 급격히 감소하였으므로 SL과 PMSL의 최적 온도는 60℃인 것으로 판단되었다.

Table 4. Activation energy value of SL and PMSL determined by graphical and mathematical methods.

Ea (cal/mole)	Graphical Method		Mathematical Method	
	Ea1	Ea2	Ea1	Ea2
(1) SL	6,075	2,495	5,886	2,550
(2) PMSL	6,556	2,152	6,261	2,190

8. 유효물질의 모델 식품에서 항균력 비교

0.25% 예비여과 용액 (PFS)과 0.25% 한외여과 용액 (PMS)을 6개월간 냉장보관하였을 때, 두 시료 모두 약 1달 경과 후 효소 역가가 가장 높았다 (Fig. 17). 효소 역가의 증가율은 PFS가 360 units/mL에서 750 units/mL로 100%, PMS가 180 units/mL에서 280 units/mL로 56%였다. PFS lysozyme의 경우, 1달을 고비로 효소 역가가 꾸준히 감소하여 약 6개월 후에는 최고 역가에 비해 약 36% 감소한 550 units/mL였으나 막 분리 직후보다는 53% 증가한 수치였다. 분리 후 약 2개월까지 PFS와 같은 경향을 보이던 PMS lysozyme은 그 이후 효소 역가가 다시 상승하여 6개월 경과시 275 units/mL로 최고 역가에 근접한 효소 활성을 나타내었다. 전반적으

로 PFS의 역가가 PMS에 비하여 2~3배 높은 것으로 나타났다. 최적 온도란 실험 시간과 상당히 관계가 있는데 실질적 의미의 최적 온도는 적어도 실험에 소요된 시간보다 장기간 효소가 일정한 활성을 유지하는 온도를 의미한다. 0.25% PFS와 PMS 모두 분리 직후보다 냉장 보존시 효소 역가가 증가한 것은 상온이나 35℃에 비해 낮은 온도 (0~5℃)에서는 효소의 소수성 결합이 약화되고 효소의 물리적 상태와 운동성이 낮아지므로 효소 구조가 더 안정해졌기 때문이다. 효소분리에 있어서 낮은 온도 유지가 필요한데 그 이유는 첫째, 효소의 안정성이 낮아 고온에서 효소 역가를 상실하기 쉬우며, 둘째, 자가 분해에 의해 세포적 파괴가 진행되어 효소가 분해되기 때문이다. 냉장 온도에서 60일 경과 후 PMSL 역가는 증가하는 반면 0.25% PFS

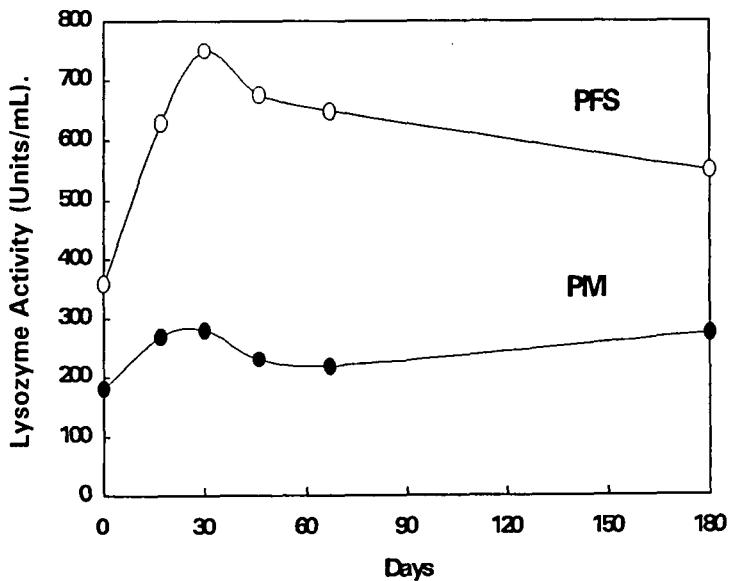


Fig. 17. The stability of PFL and PML stored at cool temperature (at 4℃) during six months. 0 day means the time right after membrane separation.

lysozyme의 역가가 감소하는 이유는 pH 4.6에서 미처 제거되지 못하였던 황 함유 아미노산인 ovalbumin이 lysozyme의 S-S 결합을 환원시켜 효소 활성을 감소시키기 때문인 것으로 사료된다.

제 3 절 Scale-up시의 예비 여과 조건 및 연속적인 한외여과 시스템에서의 최적 막 분리 조건 확립

1. 예비 여과 조건의 최적화

Gram(-)균의 세포벽을 선택적으로 분해하는 난백 유래 천연 항균 효소인 lysozyme을 한외여과하기 위한 전 단계로써 예비 여과 시스템 (Sam duck prefiltration system)에서의 분리 조건을 최적화하였다. 이전 실험에서 ovalbumin을 침전시키기 위한 pH 환경 설정을 4.6으로 고정하였으나, ovalbumin의 침전도가 예상보다 낮았으므로, 다양한 pH에서 단백질 침전율과 lysozyme 활성을 측정하였다 (Fig. 18). 다양한 pH를 가진 citrate-phosphate buffer에 0.25% (w/v) 난백 용액을 녹였을 때, 단백질의 농도는 pH 5.1에서 66.078 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 낮았으며 이 pH를 기점으로 pH가 낮아지거나 높아질수록 예비여과 여액내 단백질 농도는 점차 증가하였다. 반면, lysozyme의 활성은 pH 3.9에서 5.65까지 전혀 변화가 없었으며 pH 6.6 이상에서 점차 감소하였다. 따라서, 예비여과시 최적 pH는 lysozyme 활성에는 변함이 없으나 단백질 침전율은 기존의 pH 4.6보다 높은 pH 5.1로 조정하는 것이 바람직하였다. pH 5.1에 용해된 난백 용액을 3종류의 예비여과막 (GF/A, GF/D, GF/F)을 사용하여 예비여과 시스템에서 예비여과 하였을 때, pump 속도 (1~100 rpm)에 따른 0.25% (w/v) 난백 용액의 flux를 측정하였다. 증류수를 사용하여 pump 속도에 따른 세 막의 flux를 측정하였을 때는 세막의 flux 간 차이가 거의 없었으나(Fig. 19), 난백 용액을 예비여과한 Fig. 20에서는 GF/D가 낮은 flux에도 불구하고 여과능이 가장 좋았다. 세 막 중 GF/A 막의 flux가 가장 높았으나, 이 막의 flux는 증류수를 사용하여 측정한 flux와 거의 같아 pH 5.1에서 침전된 단백질 덩어리는 잘 분리하지 못하는 것으로 판단되었다. GF/D 막을 사용하였을 때, pump 속도가 3이상에서는 더 이상 flux가 증가하지 않았으므로 최적 pump speed는 퍼본 결과,

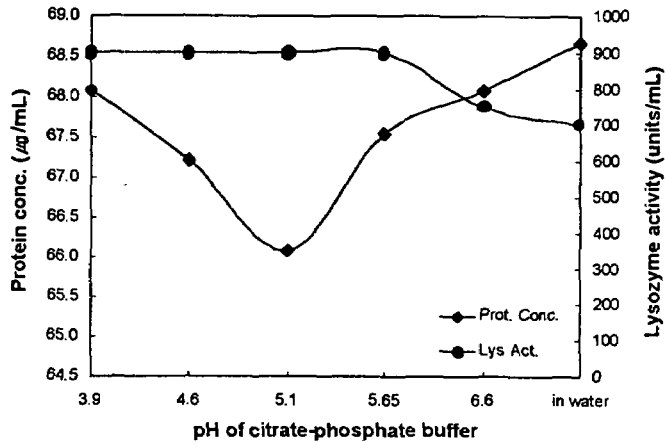


Fig. 18. Effect of buffer pH on protein concentration and lysozyme activity. Lyophilized hen egg white was diluted in various pH buffer solution of at pH 3.9~6.6, respectively.

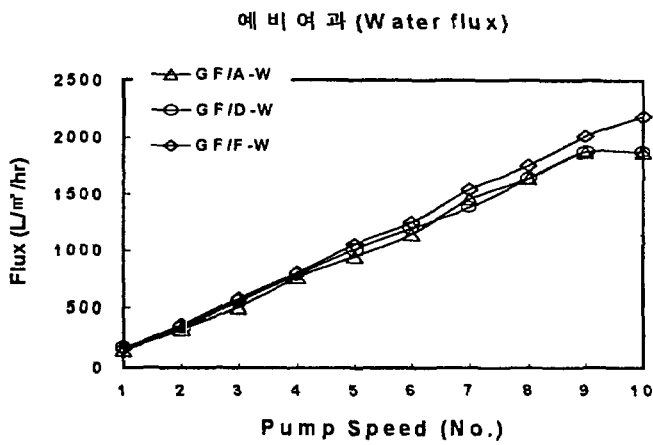


Fig. 19. Effect of filter type on water permeability.

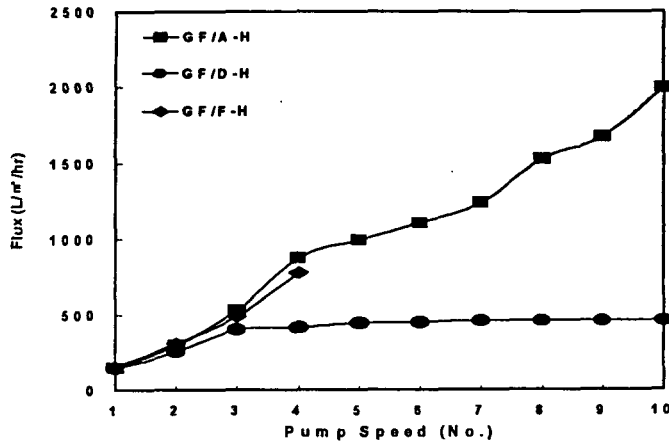


Fig. 20. Effect of filter type on 0.25% HEWP solution permeability. GF/F type caused severe forming over pump speed No.5. Separation process was stopped at No.4(GF/F). Each feed volume was 2.0 L.

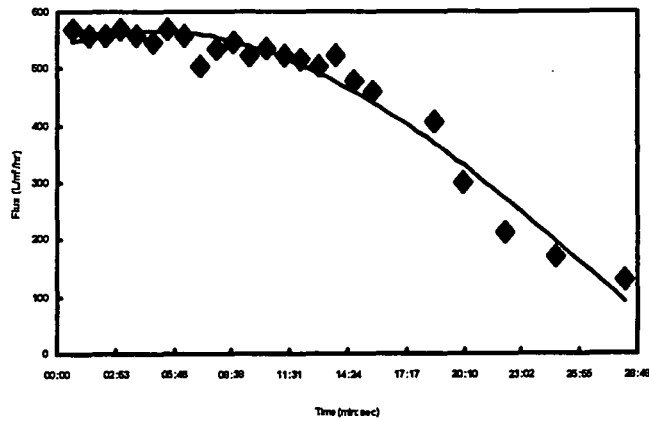


Fig. 21. Effect of separation time on flux of a 0.25%(w/v) HEWP solution in a Sam duck prefiltration system with GF/D glass fiber membrane. Experiment was performed at the optimum conditions(feed temperature: 10°C, Initial feed volume: 3 L)

3으로 결정하였다. 최적 예비 여과 조건에서 시간에 따른 GF/D의 flux 변화를 살
막 분리 후 약 14분 경과시 급격한 flux 감소가 관찰되었으나(Fig. 21), 14분까지
는 평균 542 liters/m²/hr의 높은 flux를 유지하였다.

2. Lysozyme 분리 최적 막 및 최적 한외여과 조건 확립

가. Pump speed

최적 조건하에서 예비여과된 0.25%(w/v) 난백 용액의 시료로 하여 연속식 한외
여과 시스템에서 pump speed에 따른 flux를 측정하였다. 먼저 회전 속도 (rpm)가
다른 두개의 pump drive를 사용하여 유속 증가에 따른 flux 변화를 측정하였다. 두
개의 pump drive 중 6-600 rpm의 pump는 PM30 막에 적용하였을 때, 빠른 유속으로
인하여 막의 한계 압력 이상으로 막 압력이 증가하였으므로 시료 적용시 막의 안전
성에 심각한 문제가 유발되었다. 따라서, 적정 pump로 1-100 rpm pump drive를 선
택하였다. 1-100 rpm의 유속을 달리하여 물의 flux를 측정한 결과 speed
controller number가 증가할수록 물의 recirculation rate도 직선적으로 증가하였
다. 예비 여과된 난백 용액을 다양한 유속(3.67 L/hr, 5.99 L/hr, 8.70 L/hr)하에
서 한외여과하였을 때, 막 압력에 따른 flux를 측정하였다(Fig. 22). 유속이 3.67
L/hr일 때 막 압력이 16 psi까지는 flux도 막 압력에 비례하여 증가하였으나, 16
psi 이상에서는 막 압력이 증가하여도 flux에 변화가 거의 없었다. 이러한 현상은
한외 여과 중 막 압력이 증가함에 따라 flux가 비례적으로 증가하는 pressure
controlled region과 막 압력 증가에 관계없이 flux가 증가하지 않는
mass-transfer controlled region이 모두 존재하기 때문인데, 16 psi 이상의 막 압
력 부분이 mass-transfer controlled region이므로 flux 증가가 거의 없었을 것이
라 사료된다. Pump의 유속이 5.99 L/hr와 8.70 L/hr일

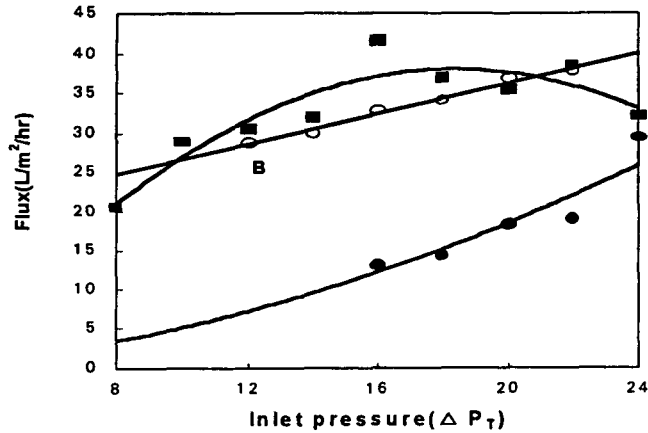


Fig. 22. Effect of inlet pressure and feed stream flow rate on permeate flux in PM30 hollow fiber membrane use. Feed stream flow rate was calculated as the average velocity within the hollow fiber tube in liters per hour(L/hr). Permeate flux was measured after steady state was obtained.

때는 16 psi 이상에서도 막 압력이 증가함에 따라 flux도 증가하는 경향을 나타내었다. 3.67 L/hr보다 높은 유속에서 막 압력이 낮을 때 permeate를 측정할 수 없었는데, 이러한 현상은 다음과 같은 원인에 기인하기 때문이라 사료된다. Permeate로 막을 빠져나가기 위해서는 용액이 막에 평행하게 흐르려는 힘보다(유속) 막에 수직으로 작용하는 힘이 커야 한다. 유속이 매우 빠른 상태에서는 permeate로 빠져나가기 위하여 막에 수직으로 작용하는 힘이 더 많이 필요하므로 PM30 막의 한계 압력인 25 psi 이하에서 유속이 빠를수록 permeate가 낮다고 사료되었다. 난백과 같이 점도가 큰 물질을 막 분리 할 때는 막 침착 현상을 감소시키는 것이 무엇보다 중요한 일이다. 대부분이 단백질로 이루어진 난백은 증공사 막에 침착하여 막 표면을 코팅하게 되는데 높은 막 압력에서는 막과 느슨하게 결합한 채로 코팅된 단백질이 압력으로 인하여 단단한 겔 층을 형성시킬 수 있다. 따라서, 유속과 막 압력이 증

가함에 따라 flux도 비례적으로 증가하는 것이 아니라 각 유속에 따라 최적 막 압력이 존재한다는 것이 실험 결과 관찰되었다. 본 실험에서의 0.25% (w/v) 난백 용액의 flux를 최대화하는 조건은 3.78 L/hr의 유속에서 막 횡단압력 16 psi로 판단되었다.

나. 온도

압력과 온도가 flux에 미치는 효과를 측정하기 위하여 막 횡단 압력을 점차적으로 상승시켜 5~10분간 안정화시킨 후 flux를 측정한 결과(Fig. 23), 모든 예비어과 시료의 flux는 온도와 막 압력이 상승함에 따라 증가하였다. 20℃ 시료의 경우 16 psi까지는 막 압력이 상승함에 따라 flux도 함께 증가하였으나 16 psi 이상에서는 막 압력이 증가하여도 flux는 거의 변함이 없는 steady-state 상태에 이르렀다. 반면, 10℃와 0℃ 시료는 막 압력이 증가함에 따라 flux가 지속적으로 증가하였으며 특히 0℃의 경우 16 psi 이하에서는 flux가 측정되지 않았으나 16 psi 이상에서는 거의 직선적인 flux 증가 경향을 나타내었다. 시료 온도가 증가함에 따라 flux가 증가하는 것은 용액의 온도가 높을수록 유체의 점성이 낮아져 유체가 막을 잘 통과하기 때문이다. 16 psi 이하에서 0℃ 시료의 flux가 측정되지 않은 것은 낮은 온도로 인하여 유체의 흐름이 비교적 느릴 뿐 아니라 분자의 운동성도 활발하지 못하므로, lysozyme을 포함한 물분자가 막을 잘 통과하지 못하기 때문이라 사료된다. 따라서, PM30 막을 사용하여 난백으로부터 lysozyme을 분리하고자 하였을 때 막 분리 최적 조건은 pump 속도 3, 시료온도 20℃, 막 압력 16 psi였다.

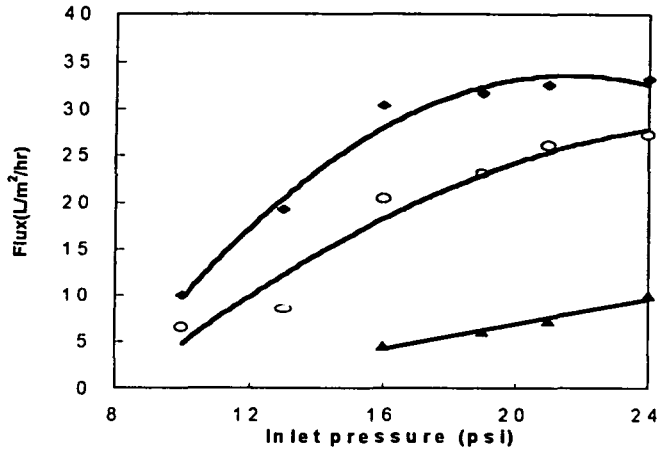


Fig. 23. Effect of inlet pressure and temperature on permeate flux in PM30 hollow fiber membrane use.

다. PM30 막의 시간에 따른 flux 변화

Bench-top scale에서 lysozyme의 분리도가 가장 높았던 polysulfone 재질의 증공사 막을 사용하여 최적 조건하에서 시간에 따른 flux 변화는 Fig. 24에 나타나있다. Plate-sheet 형태의 막에서와 마찬가지로 증공사 막을 사용하여 lysozyme을 분리한 경우에서도 막 분리 초기 약 5분까지는 약 10 LMH의 급격한 flux 감소가 나타났으나 5분 경과 후에는 안정화되어 약 18 LMH의 flux를 유지하였다. Fig. 23에서 시간에 따라 flux가 점차 감소하는 현상은 양전하를 띤 단백질과 음전하를 띤 막 사이의 결합에 의해 단백질이 서서히 막에 쌓이기 때문이며, 막 분리 5분 경과 후 약 18 LMH의 flux를 유지하는 것은 막 표면에 형성된 농도 분극 층에 의한 용질의 역이동과 구동력에 의한 물질 이동이 평형을 이루어 정상 상태에 이르렀기 때문이다. 막 형태가 재 사용한 막의 세척 효과에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 새 PM30 증공사 막과 5회 이상 사용한 PM30 증공사 막의 flux를 비교해보았다 (Fig. 24, Fig. 25). 5회 이상 여과에 사용된 PM30 막의 flux는 새 PM30 막에 비하여 1/5로

감소하였으며, 세척 후에도 원래의 flux를 회복하지 못하였다 (Fig. 25). 침착된 단백질 중 막과 단단하게 결합 (tightly-bound)된 것은 세척 후에도 flux를 회복하는데 문제가 되는데, Guell 등에 의하면 polysulfone 막은 여러 단백질 중 특히 ovalbumin이 존재할 경우 가장 심한 침착 현상을 일으켰다고 하였다. PM30 막을 lysozyme 분리에 사용하였을 경우 막 내부 pore에 plugging된 일부 lysozyme, ovalbumin 및 운송 중 가해

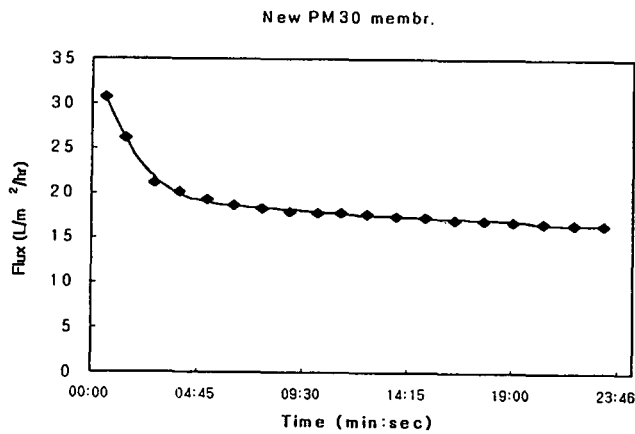


Fig. 24. Effect of separation time on flux of a 0.25% (w/v) HEWP solution with new PM30 hollow fiber membrane. New-PM was cleaned with distilled water for 1 hr and never been used before. Experiment was performed at the optimum conditions (inlet pressure: 15 psi, Initial volume: 1,200 mL, feed flow rate: 1.63 L/hr).

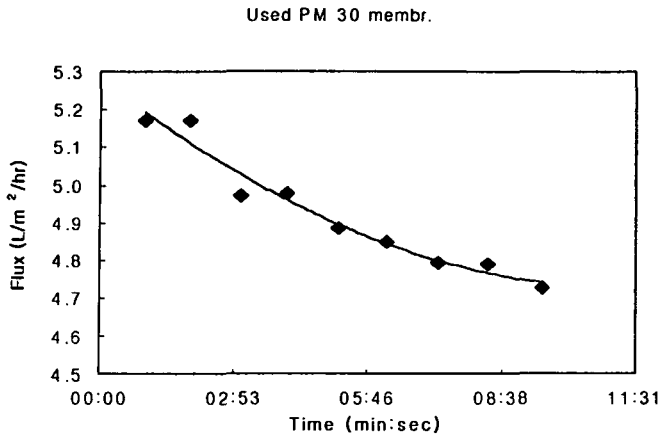


Fig. 25. Effect of separation time on flux of a 0.25% (w/v) HEWP solution with used PM30 hollow fiber membrane. PM membrane was first ultrafiltered, cleaned for 30 min with 0.1 N NaOH and then with 0.1% protease solution, and finally rinsed with distilled water. This procedure was repeated 5 times.

진 압력에 의해 막 표면에 침착된 단백질들이 막 세척시에 잘 제거되지 않아 막을 재사용하였을 때 flux의 감소를 유도하는 것으로 판단되었으며, plate-sheet 형태의 막을 사용하여 lysozyme을 분리하였던 이전 실험결과와 비교하여 볼 때(Fig. 7), 증공사 막 형태의 polysulfone 재질을 사용하였을 경우 plate-sheet 형태일 때 보다 세척에 의한 flux 회복이 매우 힘든 것으로 판단되었다.

라. 막 재질에 따른 운용 조건 변화

PM30 막과 막 재질 및 한계분자량이 다른 증공사 막을 사용하여 lysozyme을 분

리하고자 하였다. 한계분자량이 각각 13,000, 30,000인 PN01E 막과 PN03C 막을 사용하여 다양한 막 압력과 pump speed하에서 측정한 flux는 Fig. 26과 Fig. 27에 나타나있다. Pump speed가 2일 때 PN01E 막의 flux는 압력과 비례하여 증가하였으나, pump speed가 3으로 증가하였을 때는 압력이 증가함에 따라 flux가 비례적으로 증가하지는 않았다(Fig. 26). 이에 반해 PN03C 막의 flux는 pump speed 2나 3 모두에서 압력증가에 비례하지는 않았으며, 압력이 30 psi로 증가하였을 때는 오히려 이전 압력에서보다 flux가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 27). 막 재질이 같은 두 PN 막에서 막 압력 증가에 따라 flux 증가 경향이 이와 같이 다르게 나타나는 현상은 두 막의 한계 분자량이 다르기 때문인 것으로 사료된다. 일반적으로 막의 pore

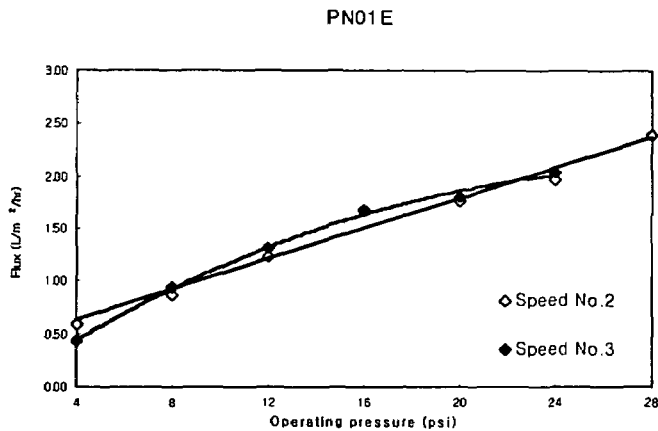


Fig. 26. Effect of inlet pressure and feed stream flow rate on permeate flux in PN01E hollow fiber membrane use. Permeate flux was measured after steady state was obtained.

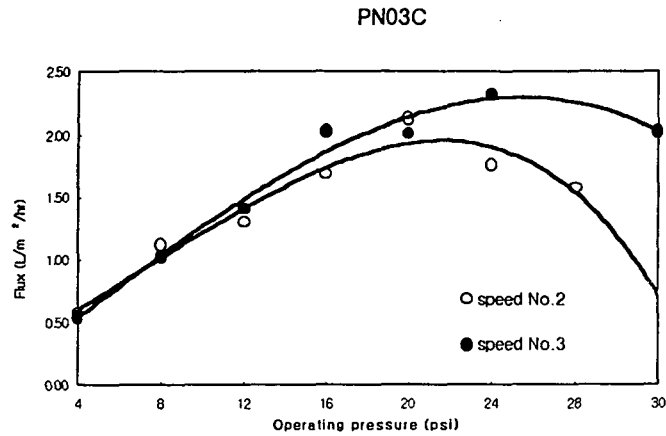


Fig. 27. Effect of inlet pressure and feed stream flow rate on permeate flux in PN03C hollow fiber membrane use. Permeate flux was measured after steady state was obtained.

크기는 정규분포를 이루고 있으며 용매와 용질은 막 표면에 있는 pore 중 가장 큰 pore를 통해 이동하므로 "실질적인" pore 크기는 평균 pore 크기보다 크다. 따라서, 명목적인 한계 분자량(nominal molecular weight cut-off)은 같지만 실질적인 pore 크기 차이로 인해 막 재질이 다른 막을 사용하였을 경우 flux에 차이가 있을 수 있으며 같은 재질을 사용한 막에서도 한계 분자량에 따라 flux가 달라질 수 있다. PN01E 막의 경우 한계분자량은 13,000이지만 실질적인 pore는 이보다 더 클 수 있으므로 본 실험에서 순수한 lysozyme을 분리하기 위하여 PN01E 막을 실험에 사용하였으며, 높은 막 압력하에서 한계 분자량이 더 큰 PN03C 막보다 PN01E 막의 flux가 오히려 더 높게 나타난 것은 분리하려는 시료의 단백질 분자량보다 PN01E 막 표면의 pore 크기가 대체로 작기 때문에 pore에 단백질이 plugging 되어 flux를 감소시키는 현상이 PN03C 막에 비해 현저히 적기 때문인 것으로 판단된다.

마. PN 막의 시간에 따른 flux 변화

PN01E 막과 PN03C 막을 pump speed 2, 막 압력 15 psi에서 장시간 동안 막 분리 하였을 때(Fig. 28), 두 막 모두 시간이 경과함에 따라 flux가 직선적으로 감소하였다. PN03C 막의 flux가 PN01E 막에 비해 약 0.2 LMH 가량 높았으며 PM30 막에서 관찰되었던 막 분리 초기의 급격한 flux 감소는 나타나지 않았다. 이는 단백질이 초기에 polysulfone 막과 상호작용하여 막 표면에 침착되는 속도가 PN 막에서보다 더 빠르기 때문으로 사료된다.

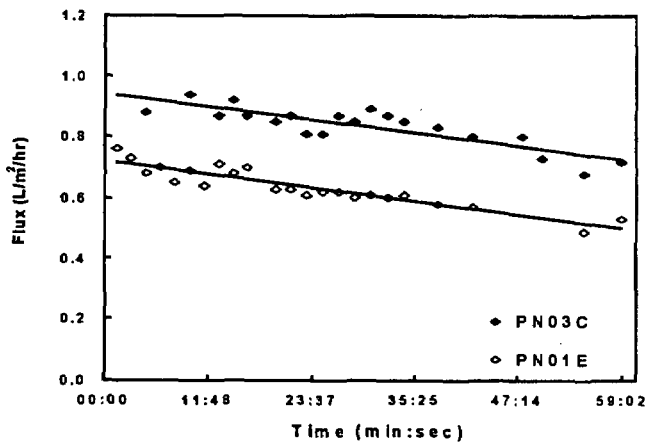


Fig. 28. Effect of separation time on flux of a 0.25% (w/v) HEWP solution with PN01E and PN03C hollow fiber membrane. Experiment was performed at the optimum conditions (inlet pressure : 15 psi, Initial volume: 1,200 mL, feed flow rate: 1.63 L/hr).

Polysulfone 막의 초기 막 침착 현상이 PN 막보다 더 심하게 발생하였으나, 일정

시간이 경과한 후에는 일정한 flux를 유지할 뿐 아니라 flux 자체도 PN 막보다 높게 나타났으므로 acrylnitril 재질의 PN 막에 비해 polysulfone 재질이 증공사막이 lysozyme 분리에 매우 효과적인 것으로 나타났다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구개발 목표 달성도

1. 난백 구성 단백질 분리를 위한 조건 확립하였다.
2. 식품 보존성 향상에 기여할 천연 항균제 lysozyme의 최적 막분리 조건 확립하였다.
3. 분리된 lysozyme의 순도 확인 및 비활성도 성공적으로 측정하였다.
4. 전자 현미경으로 막 침착 물질 성공적으로 관찰하였다.
5. Lysozyme의 kinetics study 완료하였다.
6. Scale-up 규모의 예비여과 조건을 확립하였다.
7. 증공사 막을 사용한 scale-up 규모에서의 lysozyme 최적 막 선택 및 막 분리 조건을 확립하였다.

제 2 절 대외기여도

1. 학술분야

가. 논문 발표

- 1) 이은영, 우건조: 천연 항균 효소제 난백 lysozyme의 한외여과 조건 최적화.
한국식품과학회지, 30, 397-406 (1998)
- 2) 이은영, 우건조: 한외여과 공정을 이용한 고순도 항균 lysozyme의 분리 및 막

침착 특성. 한국식품과학회지, 31, 458-464 (1999)

- 3) E.Y. Lee, and G.J. Woo: Kinetics of hen egg white lysozyme separated with ultrafiltration membrane. J. Food Sci. Technol. (투고예정)
- 4) E.Y. Lee, J. Park, and G.J. Woo: Ultrafiltration of antimicrobial lysozyme from hen egg white proteins using hollow fiber membranes. J. Food Sci. Technol. (투고예정)

나. 심포지엄

- 1) 이은영, 우건조. 난백 lysozyme의 한외 여과 조건 최적화. 한국식품과학회 추계 학술발표회 (1997)
- 2) 이은영, 우건조. 막 분리 공정과 크로마토그래피를 이용한 난백 유래 lysozyme의 분리. 한국식품과학회 추계 학술발표회 (1997)
- 3) 이은영, 우건조. 항균성 난백 lysozyme의 예비분리 조건 최적화. 한국식품과학회 및 한국식품영양과학회 춘계 공동학술발표회 (1998)
- 4) 이은영, 우건조. 고순도 항균성 난백 lysozyme의 고도분리 및 막 침착도 측정. 한국식품과학회 추계 학술발표회 (1998)
- 5) E.Y.Lee, G.J.Woo. Kinetics of hen egg white lysozyme separated with ultrafiltration membrane, IUFOST 10th Congress (Sidney, Australia, 1999년 10월)

2. 연구기술분야

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

본과제의 연구 결과 대량 생산되는 천연보존제인 항균효소제는 다양한 종류와 다양한 유통 단계의 가공식품에의 활용도가 높다.

제 6장 참고문헌

- Aimar, P., Meireles, M. and Sanchez, V.: A contribution to the translation of retention curves into pore size distributions for sieving membranes. *J. Membr. Sci.*, **54**, 321-338 (1990)
- Aimar, P., Taddei, C., Lafaille, J.P. and Sanchez, V.: Mass transfer limitations during ultrafiltration of cheese whey with inorganic membranes. *J. Membr. Sci.*, **38**, 203-221 (1988)
- Aimar, P.: Separation by membranes. In *Membranes in Bioprocessing: Theory and Applications*, Howell, J.A., Sanchez, V. and Field, R.W.(Ed.), Chapman and Hall, New York, p. 113-140 (1993)
- Amicon catalog* No. 388, p.8-53 (1995)
- Atlas, R.M.: Organization and structure of microorganisms. In *Principles of Microbiology*, 2nd, Wm. C. Brown, Publishers, USA, p.84-141 (1997)
- Biotol: Principles of enzymology for technological applications. Butterworth-Heinemann. (1993)
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D. and Edelstein, S.J.: Gel electrophoresis under denaturing conditions. In *Protein methods*, 2nd ed., Wiley-Liss, Inc., New York, p. 107-154 (1996)
- Cheryan, M. and Merin, U.: A study of the fouling phenomenon during ultrafiltration of cottage cheese whey. In *Ultrafiltration Membranes and Applications*, Cooper, A.R. (Ed.), Plenum Press, New York, Vol.13, p.619-629 (1980)
- Cheryan, M.: Fouling and cleaning. In *Ultrafiltration and microfiltration*

- Handbook*, Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, p 237-292 (1998)
- Cheryan, M.: Modelling of ultrafiltration processes. In *Ultrafiltration Handbook*, Technomic Publishing Co., PA, p. 73-125 (1986)
- Chiang, B.H., Su, C.K., Tsai, G.J. and Tsao, G.T.: Egg white lysozyme purification by ultrafiltration and affinity chromatography. *J. Food Sci.*, **58**, 303-306 (1993)
- Conrad, K.M., Mast, M.G. Ball, H.R. Froning, G. and Mac Neil, J.H.: Concentration of liquid egg white by vacuum evaporation and reverse osmosis. *J. Food Sci.*, **58**, 1017-1020 (1993)
- Damodaran, S.: Amino acids, peptides, and proteins. In *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O.R. (Ed.), Marcel Dekker, New York, p. 321-430 (1996)
- Ehsani N., Nyström, M., Ojamo H. and Siika-aho M.: Separation of enzymes produced by *Trichoderma reesei* with hydrophobic ultrafiltration membranes. *Process Biochem.*, **31**, 253-263 (1996)
- Fane, A.G., Fell, C.J.D. and Suki, A.: The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes. *J. Membr. Sci.*, **16**, 195-210 (1983)
- Fane, A.G., Fell, C.J.D. and Waters, A.G.: Ultrafiltration of protein solutions through partially permeable membranes-The effect of adsorption and solution environment. *J. Membr. Sci.*, **16**, 211-224 (1983)
- Ghiesmetti, G. and Trinchera, C.: Process for the production of lysozyme. *U.S. Patent 3,515,643* (1970)
- Guell, C. and Davis, R.H.: Membrane fouling during microfiltration of protein mixtures. *J. Membr. Sci.*, **119**, 269-284 (1996)
- Hanemaaijer, J.H., Robbertsen, T., van den Boomgaard and Gunnink, J.W.:

- Fouling of ultrafiltration membranes. The role of protein adsorption and salt precipitation. *J. Membr. Sci.*, **40**, 199-217 (1989)
- Hughey, V.L. and Johnson, E.A.: Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2165-2170 (1987)
- Ibrahim, H.R., Hatta, H., Fujiki, M., Kim, M. and Yamamoto, T.: Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1813-1817 (1994)
- Ibrahim, H.R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L.R., Kim, M., Yamamoto, T., Sugimoto, Y. and Aoki, T.: Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3799-3806 (1996)
- Kelly, S.T. and Zydney, A.L.: Protein fouling during microfiltration: Comparative behavior of different model proteins. *Biotech. Bioeng.*, **55**, 91-100 (1997)
- Kilara, A. and Harwalkar, V.R.: Denaturation. In *Food Proteins: Properties and Characterization*, Nakai, S. and Modler, H.W. (Ed.), VCH Publishers, Inc., New York, p.136-148 (1996)
- Kim, K.J., Chen, V. and Fane, A.G.: Some factors determining protein aggregation during ultrafiltration. *Biotech. Bioeng.*, **42**, 260-265 (1993)
- Kosikowski, F.V.: Membrane separations in food processing. In *Membrane Separations in Biotechnology*, McGregor, W.C. (Ed.), Marcel Dekker, New York, p.201-254 (1986)

- Lee, E.Y. and Woo, G.J.: Ultrafiltration and separation process optimization of hen egg white lysozyme as natural antimicrobial enzyme. *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **30**, 397-406 (1998)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- Moss, J.M., Damme, M.P.I., Murphy, W.H. Stanton, P.G., Thomas, P. and Preston, B.N.: Purification, characterization, and biosynthesis of bovine cartilage lysozyme isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**, 172-182 (1997)
- Nyström, M., Pihlajamäki, A. and Ehsani N.: Characterization of ultrafiltration membranes by simultaneous streaming potential and flux measurements. *J. Membr. Sci.*, **87**, 245-256 (1994)
- Oppenheim, S.F., Buettner, G.R. Dordick, J.S. and Rodgers, V.G.J.: Applying electron paramagnetic resonance spectroscopy to the study of fouling in protein ultrafiltration. *J. Membr. Sci.*, **96**, 289-297 (1994)
- Owen, R.O. and Chase, H.A.: Direct purification of lysozyme using continuous counter-current expanded bed adsorption. *J. Chromatography A*, **757**, 41-49 (1997)
- Proctor, V.A. and Cunningham, F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.*, **26**, 359-395 (1988)
- Ruckenstein, E. and Zeng, X.: Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation. *Biotech. Bioeng.*, **56**, 610-617 (1997)
- Stenesh, J.: Isolation, purification, and assay of egg white lysozyme. In *Experimental Biochemistry*, Allyn and Bacon, MA, p.135-147 (1984)

Stryer, L.: Exploring proteins. In *Biochemistry*, 3rd ed., W.H. Freeman and Company, New York, p. 43-70 (1988)

Weaver, G.L. and Kroger, M.: Deaminated chitin affinity chromatography: A method for the isolation, purification and concentration of lysozyme. *J. Food Sci.*, **42**, 1084-1087 (1977)

여 백

천연물로부터 항암·항종양 물질의 분리와

세포 및 생체적용시험

연구 기관 : 원광대학교

연구책임자 : 박 종 군

연 구 원 : 김 기 영

황 성 진

이 혜 속

김 명 은

여 백

천연물로부터 항암·항종양 물질의 분리와 세포 및 생체적용시험

제 1 장 서 론	325
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	330
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	334
제 1 절 항암·항종양 물질의 세포 및 유전독성에 대한 감소 효과	334
제 2 절 대사활성계 존재하의 천연물질의 세포 및 유전독성 감소효과	338
제 3 절 배양세포 암유발 모델에서의 천연물 및 대사활성계의 효과	342
제 4 절 실험동물계에서 항암·항종양 물질의 효과분석	343
제 5 절 유용산물 및 활성물질의 분리 및 정제	346
제 6 절 분리성분에 의한 항암효과 시험	347
제 7 절 활성물질의 안전성 평가	368
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	370
제 1 절 연구개발 목표 달성도	370
제 2 절 대외기여도	371

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획373

제 6 장 참고문헌374

제 1 장 서 론

생명체의 유전인자는 항상 자외선이나 방사선 등의 물리적 요인과 알킬화제나 benzo(a)pyrene 등의 화학적 요인에 의해 염기부가물(base adduct)이나 DNA 사의 절단, 교차결합 등의 형태로 상해받고 이러한 상해가 절제회복 등의 기작에 의해 복구되지 않으면 암 유발 및 돌연변이 유발의 치명적인 결과를 초래하게 된다는 사실이 정립되어 왔다.

DNA 상해요인들은 직접적으로 공격하거나 외부의 대사활성계, 예를 들면 간균질액의 postmitochondrial 또는 microsomal fraction(Ames, 1976)의 활성화를 거쳐 공격하게 된다. 간접적인 발암원인 다환방향족 탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)들은 대사활성화되어 공격적인 electrophile로 변환되어 단백질과 핵산등의 거대분자를 공격한다 (Koreeda *et al.*, 1987; Robertson *et al.*, 1987). 이러한 PAH중, benzo(a)pyrene (BP)는 포유류 세포에 존재하는 monooxygenase system과 epoxide hydrase 및 transferase에 의해 대사활성화되어 benzo(a)pyrene diolepide (BPDE)로 변환된다(Pelkonen and Nebert, 1982). BPDE의 대사물들중 anti-isomer (BPDE I)는 최종 반응 electrophile로서 높은 입체구조에 대한 선택성을 갖는다(Koreeda *et al.*, 1978, Robertson *et al.*, 1986).

직접적으로 작용하는 DNA 상해요인으로는 알킬화제를 대표적으로 들 수 있는데, 이들은 DNA를 포함하는 유기분자들의 친핵성 중심(nucleophilic center)에 대한 친화성을 갖는 친전자성(electrophilic) 화합물들이다. 일반적으로 염기들의 고리 질소원자들이 산소원자보다 더 친핵성으로, guanine의 N⁷과 adenine의 N³이 가장 반응성이 좋아 쉽게 알킬화되나, 암유발과 상관성이 높은 편인 guanine의 O⁶에 대한 알킬화는 빈번히 일어나지는 않는 것으로 알려져 있다. Methylating agent인 methylmethanesulfonate (MMS) 등에 의해서는 주로 DNA복제의 개시가 저해받음이

보고되어 왔다 (Cleaver *et al.*, 1983; Park and Park, 1988).

DNA 상해 또는 구조변형을 오류없이 제거하는 세포 기구중의 하나는 DNA 절제회복으로 이 과정에는 endonuclease와 exonuclease에 의한 DNA 상해를 포함하는 가닥의 절제(incision/excision), polymerase에 의한 patch 중합(incision/excision), 그리고 ligase에 의한 ligation과정이 포함된다(Friedberg, 1985).

절제단계와 동시에 또는 그 후에는 결과적으로 발생한 gap들을 DNA polymerase에 의해 채우는 중합과정이 일어난다. 포유동물세포에서는 DNA polymerase α , δ , 그리고 β 가 이 과정(incision/excision)에 포함되는 것으로 알려졌다. DNA polymerase α 와 δ 에 대한 저해제인 aphidicolin과, DNA polymerase β 에 대한 저해제인 dideoxythymidine triphosphate(ddTTP) 이나 dideoxythymidine(ddThR) 등을 사용하여 연구한 결과에 따르면 DNA polymerase α , δ , 그리고 β 는 DNA 상해의 양이나 유형에 따라 DNA 회복과정에 다르게 기능한다는 것이 알려져 왔다 (Miller and Chinault, 1982; Seki *et al.*, 1982; Dresler and Lieberman, 1983; Yamada *et al.*, 1985; Ishiguro *et al.*, 1987; Gorbacheva *et al.*, 1988). 이러한 DNA polymerase들은 사람의 섬유아세포에서 유도된 자외선회복합성과정에서 "cut and patch" 양식으로 참여한다는 것이 보고되어왔다 (Cleaver, 1984).

한편, 여러가지 전사후 변형기작 (posttranslational modification machinery), 예를 들면 phosphorylation, methylation, acetylation 그리고 poly(ADP-ribosylation)등이 histone이나 핵내효소들의 구조와 기능을 조절한다는 사실이 알려져왔다. 이러한 기작들중 poly(ADP-ribosylation)은 DNA 복제에 중요한 DNA topoisomerase I, DNA polymerase α 및 β 등과 구조적 핵단백질인 histone 및 nonhistone protein등에 NAD를 기질로 하여 ADP-ribose moiety를 부가중합하는 변형 기작으로, 그 결과 변형화된 단백질들은 그 활성및 3차구조에서 심한 변화를 보이게 된다 (Giri *et al.* 1978, Yoshihara *et al.* 1985).

따라서 진핵세포내의 poly(ADP-ribosylation)과정의 조절은 세포주기에 따른

DNA 복제, DNA recombination, RNA transcription 및 chromatin구조 등은 물론, DNA 절제회복, 분화, 그리고 암유발과정에도 밀접한 관련을 갖는 것으로 보고되어 오고있다 (Stone *et al.* 1977; Park *et al.* 1983; Cherney *et al.* 1987). 최근에는 poly (ADP-ribosylation)기작이 노화의 정도에 반비례하고 수명에 비례하는 형식으로 활성화됨을 보고하고 있으며, 여러가지 tumor promoting agent에 의해 활성화되고 이는 cAMP등의 2차 신호전달계를 통하여 그 유전자의 전사가 조절될 수 있음이 밝혀지고 있다 (Grube *et al.*, 1992).

유전독성(genotoxicity)은 대부분의 생명체의 유전인자인 DNA나 몇가지로 국한된 생명체의 유전인자인 RNA에 대한 구조 및 기능적인 변화에 의해 야기되는 돌연변이(mutagenesis), 기형유발(teratogenesis), 및 노화(aging)등의 세포생리적 장애를 일컫는데, 이러한 유전독성의 결과, 또는 동반되어 나타나는 현상이 세포독성(cytotoxicity)으로 세포수의 감소, 세포 구조물의 파괴, 세포막의 손상 등의 다양한 현상들을 포함한다.

따라서 이러한 DNA 상해 및 회복에 대한 분자론적 기구와 이에 관여하는 세포생리적 요인들의 정확한 해명은 지속적인 학문적 관심이 되어 왔으며 또한 이러한 지식의 체계는 암의 예방 및 치료 그리고 노화(aging)에 대한 고찰에 기여하여 왔다. 포유동물세포의 경우에는 실험계의 복잡성과 돌연변이주의 부족에 기인하여, 단세포류에서 용이하게 추구될 수 있는 기작과 유전자간의 통합설명의 모델이 잘 정립되어있지 않다. 그러나 상당한 부분의 DNA회복과정이 소수의 효소적 활성화와 chromatin구조에서의 차이를 제외한다면 단순계의 그것을 포함, 확장하는 형식으로 제시되어 왔다. 따라서 기본적인 DNA 절제회복(excision repair)과정이나 후복제회복(post-replication repair)등의 현상은 큰 맥락에서 하등세포계의 그것들과 유사하고 다만 다세포계의 특징인 세포간 신호전달 (signal transduction)과 변형가능(transformable)세포에 대한 방어기작으로서의 자해(suicidal) endonuclease계 등의 발달 및 여러 가지 외부 신호에 대한 반응의 차이가 연구의 주된 대상으로 부각

될 수 있을 것이다.

이러한 DNA회복과정에 항진을 촉발할 수 있는 물질들은 여러 가지 소망스럽지 않은 생물학적현상, 예를 들면 암, 돌연변이, 그리고 노화 등에 대해 보다 유효하고 정확한 대응기구로서 작용할 것이다. 이러한 긍정적 효과는 실제로 인삼 같은 천연 물질의 항암효과 등에 의해 증명되고 있다. 예를 들면 인삼의 saponin은 부신에서 catecholamine의 분비를 촉진하고, 지질의 과산화과정을 저해함으로써 항산화 활성을 지니며 이는 다시 radical의 형성을 저해함으로써 생체내에 유익한 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다 또한, 배양 포유류세포에 benzo(a)pyrene 등의 돌연변이원을 처리한 후 정상배양시간에 따라 회복되는 DNA 복제의 정도는 인삼 saponin을 후처리함으로써 가속화되는 결과들을 본 연구자들은 축적해오고 있다.

항암제로서 DNA 합성을 저해하는 mitomycin C(MMC)를 선택하여, 사람의 백혈구 암 세포인 MOLT-4 및 사람의 정상 임파구에 보익법의 분류를 고려한 9종의 한방약재들(양심탕, 보증익기탕, 사물탕, 팔미지황탕, 옥미지황탕, 사군자탕, 십전대보탕, 생맥산, 귀비탕)을 실험동물에 병용처리하고 그 효과를 관찰한 결과에 따르면, MOLT-4 세포에 9종의 한방약재만을 처리하였을 때는 전반적으로 암세포의 증식을 촉진시키는 것으로 보고되었고, 항암제 MMC와 한방약재를 동시에 처리하였을 경우 한방약재만 처리하였을 경우보다는 다소 미비하지만 증가시킴을, 그리고 십전대보탕의 경우는 단독처리시 암세포의 DNA합성능이 감소됨을 보고하고 있다. 이러한 항암효과는 영지와 상백피에서도 보고된 바 있다.

임상적으로 규명된 바에 따르면 인삼의 경우 전반적 허약체질과 모든 종류의 만성질환에, 황기의 경우에는 허약체질에 의한 발한, 만성설사 등에, 숙지황의 경우 고열, 갈증 등에 대한 효과를 보고하고 있다. 인삼의 경우를 보면 이러한 임상적 효과와 최근 연구되고 일부 발표되고 있는 인삼의 항암효과와의 사이에는 아무런 관련이 없는 것처럼 보인다. 그러나 천연물질의 특징인 복합요인중의 극소비중을 차지하는 성분중의 일부는 HPLC등의 분석에서 제외될지라도 이것이 활성성분

(active compound)으로서 세포의 생리, 유전학적 변화를 시작하게 하는 최초의 물질이 될 수 있는 것이고 이러한 현상중의 하나는 다단계 신호전달과정의 결과로서의 DNA상해회복의 조절, DNA상해를 회복할 시간을 벌게 해주는 세포주기의 정지, 그리고 많은 DNA 상해를 유지하여 암세포화 할 가능성이 많은 세포의 죽음을 위한 apoptosis과정 등의 중요한 기작이 될 수 있는 것이다. 그러나 이러한 소수의 정황적 증거와 그에 관련된 가설들 외에는 많은 천연물질에 의한 항암효과에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인삼, 황기, 숙지황, 당귀, 영지, 상백피 등을 포함하는 몇가지 천연 물질을 대상으로 하여 이들이 알킬화제에 의한 세포독성 및 유전독성의 감소과정에 어떠한 영향을 주는지를 배양세포계에서 일차적으로 검색하고, 이러한 결과가 실험동물 모델에서는 어떠한 항암효과로 나타나며, 항암제의 보조치료제로서 천연물질이 이용가능한지와, 이들 물질에 의한 암관련 유전자들의 발현을 규명하고, 유용 천연물질 및 유용 유전자산물의 분리, 정제 및 대량 생산의 기술을 확보하고자 하였다.

제 2 장 연구 개발의 내용 및 범위

1. 항암·항종양 물질의 추출 및 분리

가. 항암·항종양 물질의 검색

기존 연구에서 정황적 항암효과의 보고가 있거나, 항산화성이 있는 것으로 예상되어 제1 및 2세부과제에서 선발된 식용동식물 및 천연재 수용액 추출물들에 대해, 96 well plate에서 배양중인 암세포의 증식을 특이적으로 저해하는 것들을 선택한다. 양성 대조군으로는 bleomycin등의 항암제를, 음성 대조군으로는 최종농도의 용매를 포함한다.

나. 항암·항종양 물질의 분획

먼저 ethanol로 추출한 후, methanol, butanol, chloroform 및 ethyl acetate층으로 분획하고 이들의 항암·항종양효과를 비교한 후 각종 chromatography에 의해서 세분화한다. 추출 및 분리확인 과정은 제 1세부과제의 그것과 전반적으로 크게 다르지 않다.

2. 배양세포계에서 항암·항종양 물질의 효과분석

가. 항암·항종양 물질의 세포독성 감소효과분석

암유발원으로 알킬화제인 methylmethanesulfonate(MMS)를 선정하고, 그 자체의 세포독성을 알기 위하여 배양정상 및 암세포계에서 MMS를 적정 농도로 처리하고 나서 세포생존률과 세포막의 정상성을 조사한 후, 항암물질의 후처리가 이러한 결과에 어떠한 영향을 미치는지를 같은 방법으로 조사한다. 세포생존률은 돌연변이원과 항암물질 처리후 형성되는 colony의 수를 Giemsa staining하여 정상대조군에 대한 비율로 구한다. 세포막의 손상은 Trypan blue를 흡입하는 세포수의 전체에 대한 비

올로 구한다.

나. 항암·항종양 물질의 유전독성 감소효과분석

유전독성을 알기 위하여 배양 정상및 암세포계에서 암유발원을 적정농도로 처리 후 전체적인 회복합성의 지표인 非週期性 DNA합성(Unscheduled DNA synthesis), 회복합성 중 절개단계를 반영하는 DNA 단사절단을 조사하고 항암물질의 후처리가 이러한 결과들에 어떠한 영향을 미치는지를 같은 방법으로 조사한다.

비주기성-DNA 합성실험은 세포를 가득 차게 배양하고 혈청제한 조건에 방치한 후, 암유발원을 처리하고, 항암물질과 필요시 대사활성계를 포함하는 배지에서 배양하며 일정시간마다 30분간 ^3H -thymidine($5 \mu\text{Ci/ml}$)으로 표지하고 수거한 후 CPM을 LSC에 의해 측정한다.

DNA 단사절단을 위한 alkaline sucrose gradient sedimentation 분석은 ^3H -thymidine으로 선표지한 세포에 암유발원을 처리하고 항암물질을 함유한 배지 또는 정상배지에서 배양한 후, 미리 준비한 5-20%의 자당밀도구배의 상층부에 있는 용해용액(lysis solution)에 넣어 4 시간동안 실온에서 녹인다. 25000 rpm에서 4 시간동안 원심분리한 후 분획을 수거하여 GF/C filter에 여과, 건조하여 liquid scintillation counter로 방사능을 측정, DNA 크기의 분포를 구한다.

한편, 항암물질들의 효과를 DNA복제단계에 대해 조사하기 위해 알킬화제에 의해 감소된 DNA 합성률 (DNA synthesis rate)이 천연물질의 농도및 처리시간에 따라 어떤 변화를 보이는 지를 ^3H - thymidine의 삽입률에 의해 조사하고, 의미있는 변화가 보일경우 상기한 alkaline sucrose gradient sedimentation법에 의해 심층분석한다.

다. 배양세포계에서의 암유발모델 정립

접촉저해능이 있는 정상 세포주들을 대상으로 암유발원을 처리하여 형태적 변화

를 관찰하고, in vitro foci형성에 의한 암세포화의 빈도와 그 범위를 측정한다. 이러한 암화과정에 항암물질이 저해효과를 보이는 지를 계량적으로 분석한다.

라. 대사활성계하에서 항암·항종양 물질의 유전독성 감소효과분석

항암물질이 결국에는 간의 대사과정을 거쳐 효과를 나타낼 것이므로 대사활성계인 S-9 fraction이나 대사활성을 갖는 hepatocyte 등의 동시배양세포(coculture) 존재하에서 나타나는 DNA 회복과정에 대한 효과를 상기한 비주기성 DNA 합성, DNA 단사절단, 그리고 DNA 합성률의 관점에서 비교분석한다.

3. 실험동물계에서 항암·항종양 물질의 효과분석

가. 실험동물계에서의 암유발 및 이의 항암물질에 의한 감소효과분석

Balb/c mouse를 실험동물로 하고 DMBA를 발암원으로 하여 지속적인 피부도포에 의해 피부암을, 지속적인 음용에 의해 위와 간 등의 내부기관의 암을 유발한 후 유발된 암의 크기, 분포와 형태적 이상을 조직학적으로 검사한 후 유의미한 변화가 관찰된 표본에 대해 면역화학적방법으로 분석한다. 이러한 분석결과들에 항암물질의 처리 효과가 어떠한 영향을 미치는 지를 조사한다.

나. 배양세포계와 실험동물계에서의 암유발 및 이의 항암물질에 의한 감소효과의 비교 분석

여러가지 다양한 조건의 조합에서 수행한 실험의 결과들을 실험계의 상이점과 상관관계가 있는지를 통계화하고, 상관관계가 있다면 적절한 요인들로 종합 및 구분하여 작업가설화한 후 보충실험, 측정 및 분석에 의해 요인들을 구체적으로 규명해 간다. 분석대상은 대사계에 의한 항암효과의 변성 또는 유효화여부와, 배양세포계에서의 암유발모델이 실험동물 모델과 갖는 상이점과 공통점을 우선적인 문제로 한다.

4. 유발 암세포계에서 항암제 처리에 의한 세포및 유전독성에 대한 천연 물질의 증가효과분석

지금까지의 분석이 암유발과정에 대한 천연물의 방어효과를 중심으로 하였으나, 여기서는 발생한 암의 기존의 치료적 처리에 대한 천연물의 상승효과를 분석한다. 배양세포계와 실험동물계에서 발생한 암세포를 conditioned medium에서 적응유도하여 배양하고 항암제인 cis-platin이나 bleomycin을 처리시의 DNA 단사절단과 비주구성 DNA합성, DNA 합성률의 변화를 상기방법에 의해 수행하고 이들 약제에 대한 반응인 apoptosis의 징후인 nucleosome-sized DNA ladder로의 DNA분해를 agarose gel 전기영동으로 분석한다. 이러한 결과들에 추출된 천연물이 어떠한 상승효과를 보이는지를 분석하여 항암요법의 보조제로서의 천연물의 효과를 규명한다.

5. 물질대량정제, 생물학적 기능 및 안전성평가

가. 유용 산물 및 활성물질의 대량 정제

유용 산물과 활성물질을 원심분리 및 전기영동 등의 물리적인 분리방법과 ion exchange, gel filtration 및 affinity chromatography 등의 생화학적 분리방법에 의해 산물의 동정 및 정제의 도를 높이는 일반적인 과정을 거친다. 저분자량의 물질일 경우 paper electrophoresis나 TLC 등의 분리방법을 병행한다.

나. 순수분리된 활성물질의 생물학적 기능 및 안전성 평가

순수분리된 활성물질이 상기한 추출물수준의 항암적 효과를 유지하는지를 유사한 방법들에 의해 최종확인하고, 이를 식품첨가제 또는 다른 제제로 가공시 나타나는 기능성의 변화 및 식품약품으로서의 안전성을 표준적인 방법에 의해 규명한다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 항암·항종양 물질의 세포 및 유전독성에 대한 감소 효과

1. 항암·항종양 물질의 세포독성 감소효과분석

암유발원으로 알킬화제인 methylmethanesulfonate(MMS)나 자외선을 선정하고, 그 자체의 세포독성을 알기 위하여 배양정상 및 암세포계에서 암유발원을 처리하고 나서 세포생존률과 세포막의 정상성을 조사한 후, 항암물질의 후처리가 이러한 결과에 어떠한 영향을 미치는지를 같은 방법으로 조사하였다.

이 실험에서 상백피 추출물은 MMS를 처리한 NIH3T3 세포의 세포막의 건전성(integrity)과 세포생존률을 농도에 따라 10-40% 가량 증진시켜 세포독성으로부터의 감소 효과를 보였다. 돌연변이원을 자외선으로 하였을 경우에서도 MMS의 경우와 유사한 감소효과를 보였다. 한편, 인삼 추출물의 경우에서도 5-45% 가량의 세포독성 감소효과를 관찰하였다 (Table 1).

Table 1. MMS를 처리한 NIH3T3세포의 세포생존률에 대한 천연재 추출물 후처리에 의한 증진 효과(%)

추출물		MMS 농도(mM)					
		0	0.1	0.5	1	5	10
상백피	(10 ⁻⁶ X)	0	10.3	18.2	26.8	37.9	43.5
	(10 ⁻⁷ X)	0	6.5	10.8	17.9	22.7	29.6
인삼	(10 ⁻⁶ X)	0	5.2	12.5	21.7	35.4	45.3
	(10 ⁻⁷ X)	0	2.2	6.8	14.2	21.2	27.8

2. 항암·항종양 물질의 DNA 복제억제 감소효과분석

항암물질들의 효과를 DNA복제단계에 대해 조사하기 위해 발암원에 의해 감소된 DNA 합성률 (DNA synthesis rate)이 천연물질의 농도 및 처리시간에 따라 어떤 변화를 보이는지를 ^3H - thymidine의 삽입률에 의해 조사하였다.

정상세포인 NIH3T3 세포와 암세포인 A549 세포에 자외선을 조사한 후 상백피 추출물을 10^{-6} 농도로 0 - 20 시간동안 처리할 경우 두 가지 세포에서 모두 DNA 합성율의 증가를 보였는데 특히 자외선 조사후 12 시간 정도에서는 70%이상의 증가를 보였다(Table 2).

한편, 인삼 추출물은 10^{-5} 부터 10^{-7} 까지의 농도에서 자외선에 의한 DNA 합성율의 감소를 30-60%까지 완화하는 효과를 보였다(Table 2). 이 완화효과는 인삼의 자생지에 따라 약간씩 달랐는데 이 결과를 체계화하고 있는 중이다.

Table 2. 자외선(20 J/m^2)조사후 다양한 시간동안 정상배지로 배양한 NIH3T3 세포에서의 DNA 복제억제에 대한 추출물 후처리의 증진 효과(%)

추출물		자외선 처리 후 배양시간(h)				
		0	2	6	12	24
상백피	(10^{-6}X)	0	12.9	32.7	73.5	57.8
	(10^{-7}X)	0	8.3	23.6	57.4	42.1
인삼	(10^{-6}X)	0	9.4	27.5	61.3	52.3
	(10^{-7}X)	0	7.8	20.2	54.8	39.8

3. 항암·항종양 물질의 비주기성 DNA 합성에 대한 효과

유전독성을 알기 위하여 배양 정상 및 암세포계에서 암유발원을 적정농도로 처리후 전체적인 회복합성의 지표인 非週期性 DNA합성(unscheduled DNA synthesis)을 조사하고 천연물질의 후처리가 이러한 결과들에 어떠한 영향을 미치는지를 같은 방

법으로 조사하였다.

이 실험에서 상백피 추출물은 12-24 시간동안 처리할 경우 20 J/m^2 의 자외선에 의한 비주기성 DNA 합성을 40-50% 정도 증가시켰다. 인삼 추출물의 경우에서도 이 정도의 증가가 관찰되었다 (Table 3).

Table 3. 자외선 (20 J/m^2) 조사후 다양한 시간동안 정상배지로 배양한 NIH3T3 세포에서의 비주기성 DNA 합성에 대한 추출물 후처리의 증진 효과(%)

추출물	자외선 처리 후 배양시간(h)					
	0	2	6	12	24	
상백피	(10^{-6}X)	0	18.4	28.6	52.7	37.2
	(10^{-7}X)	0	10.7	22.5	38.3	29.4
인삼	(10^{-6}X)	0	20.6	36.1	49.5	36.8
	(10^{-7}X)	0	14.3	24.7	37.2	33.7

4. 항암·항종양 물질의 DNA사 절단에 대한 효과

위 결과들이 DNA회복과정 중 절단단계에서 발생하는지를 정확히 알기 위해 DNA 사 단사절단을 alkaline sucrose gradient sedimentation으로 분석하였다. 먼저 ^3H - thymidine으로 선표지한 세포에 암유발원을 처리하고 중합단계를 저해하는 조건에서 항암물질을 함유한 배지 또는 정상배지에서 다양한 시간동안 배양한 후 세포를 수거, 4 시간동안 실온에서 녹인 후, 25,000 rpm에서 4 시간동안 원심분리하고 각 분획의 방사능을 측정, DNA 크기의 분포를 구하고 이에 따라 절단빈도를 계산하였다. 이 분석의 결과, 상백피 추출물과 인삼추출물에서 자외선에 의한 DNA사의 절단을 평균 30%이상 가량 증가시키는 현상이 관찰되었다(Table 4).

Table 4. 자외선(20 J/m²)조사후 다양한 시간동안 정상배지로 배양한 NIH3T3 세포에서의 100 Mega Dalton당 DNA사 절단빈도에 대한 추출물 후처리의 증진 효과(%)

추출물	자외선 처리 후 배양시간(h)					
	0	2	6	12	24	
상백피	(10 ⁻⁵ X)	0	11.3	23.8	32.3	35.2
	(10 ⁻⁷ X)	0	10.7	18.4	26.7	28.6
인삼	(10 ⁻⁵ X)	0	14.3	20.4	34.5	36.3
	(10 ⁻⁷ X)	0	9.8	18.7	25.4	28.1

이상의 결과들로부터 이들 추출물은 DNA상해요인에 대한 세포독성, DNA 복제억제완화, DNA 회복 및 절단단계를 유의미하게 증가시켰는데, 이는 이들 추출물이 DNA 회복합성의 단계에 관여하는 효소 또는 인자들의 시간 경과적 발현의 유도를 통해서 성취되는 것으로 추측되며 이의 분자생물학적인 검증과정을 거치고 있는 중이다.

제 2 절 대사활성계 존재하의 천연물질의 세포및 유전독성 감소효과

1년차 연구결과 천연 항암물질들이 세포독성 및 유전독성으로부터의 회복과정에 현저한 긍정적 효과를 보임을 규명하였는데, 항암물질이 결국에는 간의 대사과정을 거쳐 효과를 나타낼 것이므로 2차년도에서는 대사활성계인 S-9 fraction이나 대사활성을 갖는 hepatocyte 등의 동시배양세포(coculture) 존재하에서의 효과를 비교 분석하였다.

1. 세포 독성 감소효과

암유발원으로 알킬화제인 methylmethanesulfonate(MMS)나 자외선을 처리하고 나서 세포생존률이 농도에 따라 감소되어 가는 과정에서 천연물질과 간추출물의 동시 후처리가 이러한 결과에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다.

이 실험에서 상백피 추출물은 MMS를 처리한 NIH3T3 세포의 세포생존률을 MMS의 농도에 따라 10-50% 가량 증진시켜 세포독성으로부터의 감소 효과를 보였다. 들연변이원을 자외선으로 하였을 경우에서도 MMS의 경우와 유사한 감소효과를 보였다. 한편, 인삼 추출물의 경우에서도 8-54% 가량의 세포독성 감소효과를 관찰하였

Table 5. 다양한 농도의 암유발원을 처리한 NIH3T3세포에서의 세포생존률 감소 과정에서 천연재 추출물과 S-9 mixture의 동시 후처리에 의한 저해효과(%)

추출물	들연변이원								
	MMS 농도 (mM)					자외선 (J/m ²)			
	0.1	0.5	1	5	10	5	10	20	30
상백피 (10 ⁻⁹ X)	10.8	19.1	29.2	42.6	48.7	18.1	23.5	38.8	50.6
인삼 (10 ⁻⁹ X)	8.7	16.3	26.4	43.7	47.6	19.4	27.6	41.5	54.3

다 (Table 5). 이러한 효과는 대사활성계가 없던 1차년도와 비교할 때 대사활성계의 존재가 천연물의 유전독성 감소효과를 약 5-10% 가량 증가시키는 것으로 해석된다.

2. DNA 복제억제 감소효과

항암물질들이 대사활성계와 같이 존재하는 최적시간대를 알기 위하여 암유발원 처리후 감소되었다 회복되는 DNA복제의 시간경과에 대해 분석하였다. 일차년도의 보고에서처럼, 자외선을 조사한 후 천연물질들을 10^{-6} 농도로 0 - 24 시간동안 처리할 경우 DNA 합성율의 증가를 보였고 이러한 완화효과는 대사활성계인 S-9 mixture나 간세포와의 공동배양에 의해 더욱 강화되었는데 그 최적 시간대는 12 시간으로 나타났다 (Table 6).

Table 6. NIH3T3세포에서 자외선(20 J/m²)조사후 추출물 후처리 시간경과에 따른 DNA 복제 억제로부터의 완화과정에서 S-9 mixture의 존재에 의한 증진 효과(%)

추출물	자외선 처리 후 배양시간(h)				
	0	2	6	12	24
상백피 (10 ⁻⁶ X)	5.2	8.6	18.5	14.1	7.5
인삼 (10 ⁻⁶ X)	7.2	10.3	22.7	16.9	9.6

3. 비주기성 DNA 합성의 증가효과

유전독성을 알기 위하여 배양 정상 및 암세포계에서 암유발원을 적정농도로 처리후 전체적인 회복합성의 지표인 非週期性 DNA합성(unscheduled DNA synthesis)을

조사하고 대사활성계 존재하에서 천연물질의 후처리가 이러한 결과들에 어떠한 영향을 미치는지를 같은 방법으로 조사하였다.

이 실험에서 대사활성계의 존재는 부재시보다 자외선에 의한 비주기성 DNA 합성을 6-23%가량 증가 시켰는데 그 최적시간은 위의 분석과 마찬가지로 12시간대로 밝혀졌다 (Table 7).

Table 7. NIH3T3세포에서 자외선(20 J/m²)조사후 추출물 후처리 시간경과에 따른 비주기성 DNA 합성에서 S-9 mixture의 존재에 의한 증진 효과(%)

추출물	자외선 처리 후 배양시간(h)						
	3	6	9	12	15	18	24
상백피 (10 ⁻⁶ X)	6.2	7.8	15.2	20.1	18.2	15.6	13.4
인삼 (10 ⁻⁶ X)	7.7	8.3	17.9	23.1	20.6	17.4	14.3

4. DNA사 절단의 증가효과

1년차 연구결과 천연 항암물질들이 DNA의 회복과정에 현저한 긍정적 효과를 보임을 규명하였는데 2년차에서는 이러한 효과들이 DNA회복과정 중 어떤 효소적 단계에서 발생하는지를 보다 정확히 알기 위해 DNA사 단사절단을 측정하는 alkaline sucrose gradient sedimentation 분석을 집중적으로 수행하였다.

1년차의 방법을 개량하여 DNA 상해후 회복의 중합단계를 저해하는 조건에 의해 DNA사 절단의 축적을 유도하였다. 분석결과 추출물 처리군은 정상배지 배양보다 다양한 시간동안의 절단의 축적이 상백피의 경우 평균 29% 가량, 그리고 인삼의 경우 평균 34% 정도 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 1차년도 유전독성 감소 효과들의 분자기구가 DNA회복 과정중 절제단계를 활성화함에 의해 절제회복의 전과

정이 상승되고 따라서 DNA 상해의 수를 감소시키며, 그 결과 세포생존률의 증가로 연결됨을 통합적으로 설명할 수 있었다.

한편 대사활성계가 8시간 존재할 경우 부재시보다 약 15%의 단사절단 빈도의 증가를 보였다 (Table 8의 괄호 안의 수치들). 이 결과는 대사활성화가 존재하는 시간이 증가함에 따라 유전독성의 감소를 더욱 현저히 나타내는 앞의 분석결과들과 같은 맥락으로 해석된다.

Table 8. 자외선(20 J/m²)조사후 다양한 시간동안 중합저해 배지로 배양한 NIH3T3세포에서 100 Mega Dalton당 DNA사 절단빈도에 대한 추출물 후처리의 증진 효과(%)와 대사 활성계 존재에 의한 상승효과 < * >.

추출물	자외선 처리 후 배양시간(h)			
	0	2	6	12
상백피 (10 ⁻⁶ X)	24.7 <5.4>	28.8 <7.8>	32.1 <9.4>	29.2 <14.8>
인삼 (10 ⁻⁶ X)	29.3 <6.1>	34.5 <8.2>	37.8 <10.6>	33.5 <16.4>

제 3 절 배양세포 암유발 모델에서의 천연물 및 대사활성계의 효과

접촉저해능이 있는 정상 세포주들을 대상으로 다양한 농도의 암유발원을 처리하여 3-4주 이상의 시간경과에 따른 세포의 형태적 변화를 관찰하고, *in vitro foci* 형성에 의한 암세포화의 빈도와 그 범위를 측정하였다.

이러한 암화과정에 인삼 추출물과 상백피 추출물은 유의미한 저해효과를 보여 이들 물질이 유전독성의 감소를 통해 실제 발암과정에도 감소효과를 나타냄을 관찰할 수 있었다(Table 9). 또한 이 과정에서 천연물 후처리시 대사활성계의 존재는 부재시보다 약 5 - 27%의 발암감소효과를 보여, 위의 세포및 유전독성에서 예측하였던 감소효과의 강화를 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 천연물의 후처리가 DNA사 절단과정을 중심으로 한 효소과정을 활성화하고 이 과정에서 대사활성계의 존재에 의한 산물(들)이 이를 더욱 효과적으로 작용하며, 이에 의해 유전및 세포독성을 감소시켜 암유발의 빈도를 유의미하게 감소시키는 것으로 해석된다.

Table 9. 다양한 농도의 MMS 또는 자외선을 처리한 NIH3T3세포의 *in vitro foci*형성과정동안 천연재 추출물 후처리에 의한 저해효과(%)

추출물	돌연변이원									
	MMS 농도 (mM)					자외선 (J/m ²)				
	0.1	0.5	1	5	10	5	10	20	30	
상백피	(10 ⁻⁶ X)	8.9	15.7	22.5	28.6	33.5	13.4	19.7	24.5	28.3
	(10 ⁻⁷ X)	5.8	9.3	15.2	20.3	24.7	9.5	13.6	18.2	23.1
인삼	(10 ⁻⁶ X)	9.4	14.8	24.1	31.2	35.1	15.3	21.2	26.9	29.4
	(10 ⁻⁷ X)	5.6	8.4	14.9	20.5	28.6	10.8	14.2	22.8	24.6

제 4 절 실험동물계에서 항암·항종양 물질의 효과분석

1. 암유발원의 지속 처리에 의해 유발된 각종 암에 대한 천연물질의 효과

Balb/c mouse에 자외선형의 상해를 유발하는 3-methylcholanthrene(MC)을 acetone에 녹여 2 μ M농도로 1주에 2번의 피부도포에 의해 피부암을, 지속적인 음용에 의해 위와 간 등의 내부기관의 암을 유발하며 항암물질의 동시 처리 효과가 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다. 14주 동안의 이러한 처리후 1mm이상의 유발된 암을 조직학적으로 분석하였다. 표본은 실험오차의 최소화에 충분히 이를만큼 여유있게 확보하여 각 실험군당 20마리 이상을 분석하였다.

이 분석결과 인삼 추출물의 경우 암의 발생률의 평균치를 28% 정도, 상백피 추출물의 경우 25%정도를 감소시켰다(Table 10).

Table 10. Balb/c mouse에 MC를 14 주동안 지속적으로 처리하여 유발된 암의 빈도에 대한 천연추출물 처리에 의한 저해효과(%)

추출물		자외선 처리 후 배양시간(h)		
		피부암	위암	간암
상백피	(10 ⁻³ X)	25.3	21.2	28.4
	(10 ⁻⁴ X)	15.7	13.4	17.8
인삼	(10 ⁻³ X)	28.1	22.8	31.9
	(10 ⁻⁴ X)	17.4	15.2	19.2

이 결과는 대사활성계가 존재하는 배양세포계 암유발모델에서의 분석결과와 거의 유사하였고, 따라서 실제 이들 추출물이 음용형태의 식품으로 개발될 수 있음을 강하게 시사하며, 현재 몇 가지 첨가물들의 상승효과에 대한 분석과 천연물의 전처

리나 후처리가 동시처리에 비해 어떠한 발암감소효과를 보이는지에 대한 분석도 병행하고 있다.

2. 배양세포계와 실험동물계에서의 암유발 및 이의 항암물질에 의한 감소효과의 비교 분석

여러가지 다양한 조건의 조합에서 수행한 실험의 결과들을 실험계의 상이점과 상관관계가 있는지를 통계화하고, 상관관계가 있다면 적절한 요인들로 종합 및 구분하여 작업가설화한 후 보충실험, 측정 및 분석에 의해 요인들을 구체적으로 규명해 가고자 하였다. 위에서 제시한 다양한 결과들로부터, 대사계에 의한 항암효과는 변성보다는 5-20% 정도의 유효화로 결론지어졌고, 배양세포계에서의 암유발모델은 실험동물 모델과 질적, 양적으로 거의 유사한 분석계임이 입증되었다.

3. 유발된 암세포계에서 항암제 처리에 의한 세포 및 유전독성에 대한 천연물질의 증가효과분석

지금까지의 분석이 암유발과정에 대한 천연물의 방어효과를 중심으로 하였으나, 여기서는 발생한 암의 기존의 치료적 처리에 대한 천연물의 상승효과를 분석하였다. 배양 세포계에서 발생한 암세포를 적응유도하여 배양하고 항암제인 bleomycin을 처리시의 DNA 단사절단과 비주기성 DNA합성, DNA 합성률의 변화를 상기방법에 의해 수행하고 이러한 결과들에 추출된 천연물이 어떠한 상승효과를 보이는지를 분석하였다. 그 결과 흥미롭게도 천연물들의 후처리는 DNA사 절단은 증가시키나, 비주기성 DNA합성이나 DNA 합성율은 별로 변화시키지 않았다(Table 11).

Table 11. Bleomycin(0.1 mM, 1hr)을 처리한 유발 암세포의 DNA 합성을, 비주기성 DNA합성, DNA사 절단에 대한 천연추출물 후처리에 의한 증가 (+) 또는 저해 (-)효과(%)

추출물	DNA 합성을	유전독성 분석		
		비주기성 DNA 합성을	DNA사 절단	
상백피	(10 ⁻³ X)	+10.3	+5.2	+25.6*
	(10 ⁻⁴ X)	+ 7.5	- 2.7	+18.2*
인삼	(10 ⁻³ X)	+11.7	+ 6.1	+32.9*
	(10 ⁻⁴ X)	+ 8.3	+ 2.9	+23.7*

이는 천연물들의 유전독성감소 효과가 정상세포에서만 보이거나 DNA사 절단을 유발하는 DNA 상해요인에는 다른 방식으로 작용함을 의미하는 것으로서, 전자의 경우에는 정상세포에서의 실험이, 후자의 경우에는 DNA 절단을 위주로 하는 전리방사선 조사에 의한 분석을 요구한다.

이러한 DNA사 절단은 최근의 관점에서 볼 때 DNA사의 회복절단과 apoptosis의 징후인 nucleosome-sized DNA ladder로의 DNA분해라는 두가지 설명이 가능하다. 따라서 본 연구자 등은 후자의 가능성에 대해 agarose gel 전기영동으로 DNA사 절단을 분석하여 보았는데 흥미롭게도 이들 추출물 후처리가 nucleosome-sized DNA ladder의 형성을 20-30%정도 증가 시킴을 알 수 있었다. 이 결과는 위의 결과들과 종합할 때, 추출된 천연물들이 적어도 DNA사 절단을 유발하는 상해요인에 노출된 암세포의 경우에는 세포고사로의 이행을 촉진하게 하는 신호를 발산한다는 의미로 해석되고 이를 앞으로 더욱 규명하여 항암요법의 보조제로서의 천연물의 효과를 분석하고자 한다.

제 5 절 유용산물 및 활성물질의 분리 및 정제

이상의 연구에서 항암물질들이 DNA의 회복과정에 현저한 긍정적 효과를 보임을 규명하였는데 이러한 효과를 유발하는 물질들의 정제를 통하여 순수분리 물질을 얻고, 이들 분리 성분에 의한 항암효과를 세포 및 유전독성, 세포고사능의 측면에서 분석한 후 식품첨가제로의 가공시 기능성의 변화 및 식품약품으로서의 안전성을 규명하고자 하였다.

먼저, 인삼의 경우 사포닌 화합물을 분리하기 위해 메탄을 추출한 엑기스화후 ether 추출, butanol 추출 및 silica gel column chromatography에 의한 다양한 ginsenoside들을 분리하였다. 이들 ginsenoside들과 prosapogenin, 그리고 sapogenin 성분들의 분리와 동정실험은 정립 분석방법에 따라 수행하였다. 이 분리 성분과정은 다양한 천연물 분석팀과 동정팀들의 자문과 검증의 기초하에서 3번 이상의 재현성이 확보될 때까지 반복하였다.

또한 본 연구팀은 협동연구로서의 장점을 극대화하기 위해 총괄책임자인 신 동화 교수의 지원하에 윗나무의 분리성분 혼합물에 대한 항암효과 시험도 병행하였다.

제 6 절 분리성분에 의한 항암효과 시험

1. 인삼 사포닌 성분이 NIH3T3 세포에 미치는 영향

인삼 사포닌은 그림 1 과 같이 dammarane형 triterpene인 aglycone (protopanaxadiol 및 protopanaxatriol)의 구조로 이루어졌다. 최근까지의 인삼 사포닌의 효능은 중추신경 진정작용, 단백질합성 촉진작용, 부신피질 호르몬분비 촉진작용, 인슐린 유사작용, 해독작용, 항염증, 동맥경화억제, 소염작용, 항암효과, 정상화작용, 피로회복 등 많은 효능들이 보고 되었으며 사포닌 종류별로 약리효능이 상이한 것으로 밝혀지고 있다.

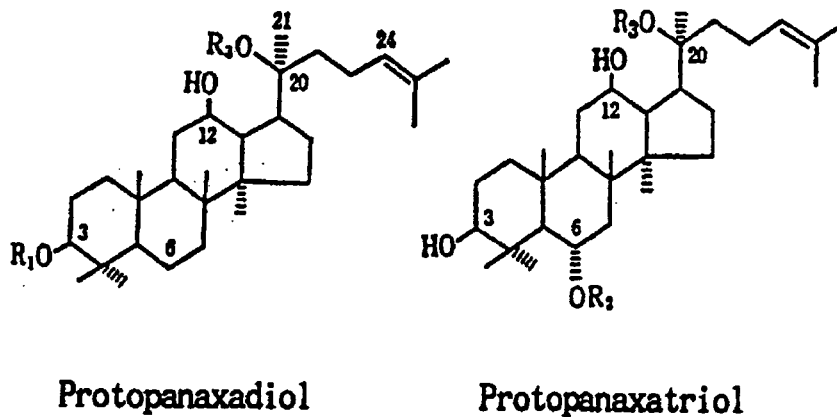


그림 1. 인삼사포닌의 구조

총사포닌과 PD, PT 성분들은 농도의존적으로 세포생존률을 감소시켰는데 이는 홍삼이 갖는 긍정적 효과 중 암세포나 노화세포의 세포고사를 촉진시킨다는 보고와 일치하였다. 이 saponin을 전처리함으로써 MMS에 의해 50%정도 감소되었던 DNA 합성율이 사포닌 농도증가에 따라 70%까지 회복됨을 알 수 있었다. 이 효과는 PD계에서도 중간농도의 경우 관찰되었으나 고농도에서는 그다지 효과적이지 않았다. 반면, PT계에서는 고농도에서도 이러한 회복효과가 현저하였다.

인삼사포닌이 NIH3T3 세포의 성장을 억제함을 MTT 분석법을 이용했다. Crude, PD, PT 사포닌을 다양한 농도로 세포에 처리한 후에 세포의 생존률이 감소됨을 결과적으로 관찰할 수 있었다. 하지만 PT사포닌이 crude 및 PD 사포닌이 약간 더 생존률이 감소됨을 알수있었다(그림 2).

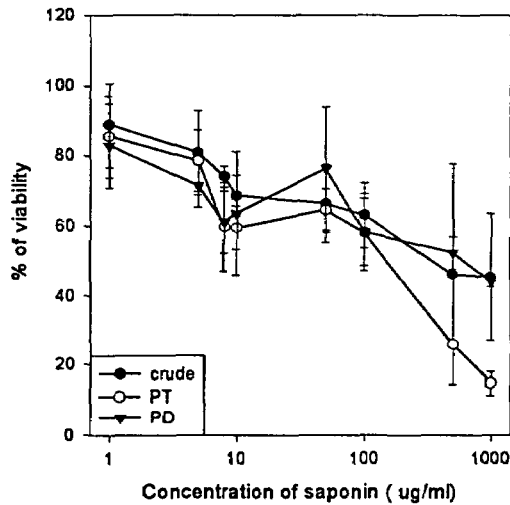


그림 2. 인삼사포닌 (crude, PD and PT 사포닌)에 의한 NIH3T3 세포의 성장 억제. NIH3T3 세포에 각각의 인삼사포닌을 1 에서 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 19 시간동안 배양하였다.

DNA 상해 물질인 methylmethane sulfonate (MMS)에 의한 NIH3T3 세포의 DNA합성 저해(그림 3) 후에 인삼 사포닌의 효과에 대해서 알아보기 위해서 인삼 사포닌 (crude, PD and PT 사포닌)의 다양한 농도로 처리한 후에 다음과 같은 결과를 얻었다. 여기서 MMS의 농도를 Ic_{50} 값인 1.5 mM, 1시간 동안 처리한 후에 다양한 농도의 인삼 사포닌을 2시간 동안 처리했다 (그림 4, 5 그리고 6). NIH3T3 세포에 MMS 1.5mM을 1시간 동안 처리했을 때 DNA 합성률은 40-50 % 정도이다. 이때 정상적인 성장배지(10% FBS 포함)로 교환을 해서 2 시간동안 배양했을 때 보다 crude 사포닌을 다양한 농도(20, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$)로 포함한 성장배지로 교환했을 때의 DNA 합성률이 10-20 % 정도 감소됨을 관찰하였다(그림 4).

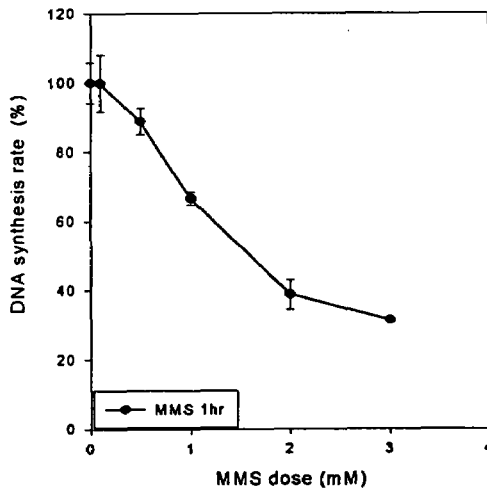


그림 3. Methylmethane sulfonate (MMS)에 의한 NIH3T3 세포의 DNA 합성률. NIH3T3 세포에 MMS 0.1 에서 3mM까지의 농도를 1시간동안 처리 하였다. ^{14}C -TdR (0.04 $\mu\text{Ci/ml}$)은 24시간동안 배양하고 ^3H -TdR (20 $\mu\text{Ci/ml}$)는 1시간동안 세포내로의 유입 시켰다.

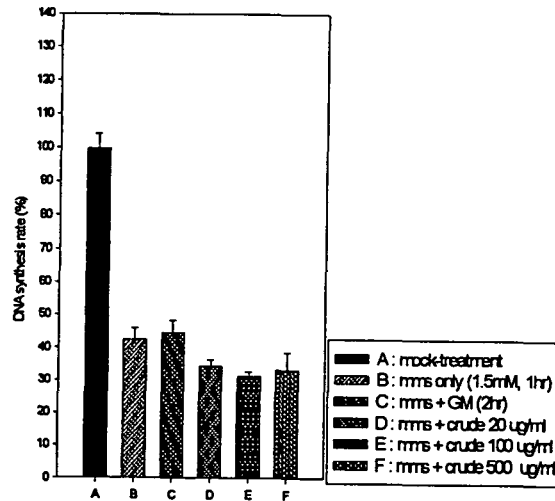


그림 4. MMS를 선처리한 NIH3T3 세포에서 DNA 합성률에 대한 crude사포닌의 효과. B - E lane은 MMS 1.5mM을 1시간동안 선처리한 것이고 A lane은 Control, 그리고 B 와 C lane은 각각 정상배지로 배양 (0시간과 2시간), D, E 그리고 F lane은 다양한 농도의 crude 사포닌(20, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$)을 포함한 성장배지로 배양했다(2시간).

반면에 PD 및 PT 사포닌의 경우는 정상배지로의 교환과 거의 같거나 또는 약간의 DNA 합성률이 감소함을 관찰하였다(그림 5 와 6).

이러한 결과는 NIH3T3 세포가 MMS에 의해서 발생한 DNA 상해에 대해서 정상적인 배양액 조건에서 보다 인삼사포닌 성분이 포함이 되면 DNA 합성률을 더욱 더 저해시키는 이유는 아마도 DNA 상해에 대해서 회복을 위한 기작을 준비하는 단계이거나 또는 세포고사(apoptosis)를 촉진시키는 영향을 인삼 사포닌이 가진다고 할 수 있다.

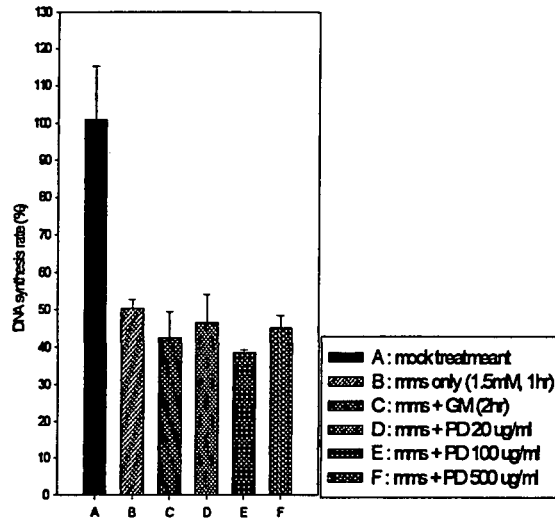


그림 5. MMS를 선처리한 NIH3T3 세포에서 DNA 합성률에 대한 PD 사포닌의 효과. B - E lane은 MMS 1.5mM을 1시간동안 선처리한 것이고 A lane은 Control, 그리고 B 와 C lane은 각각 정상배지로 배양 (0시간과 2시간), D, E 그리고 F lane은 다양한 농도의 PD사포닌(20, 100 및 500 μ g/ml)을 포함한 성장배지로 (2시간) 배양했다.

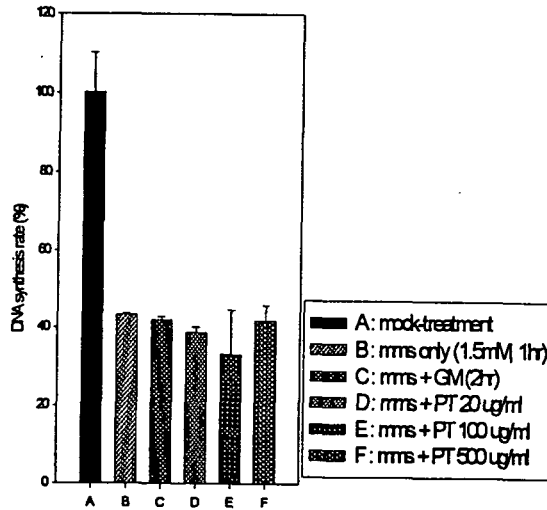


그림 6. MMS를 선처리한 NIH3T3 세포에서 DNA 합성률에 대한 PT사포닌의 효과. B - E lane은 MMS 1.5mM을 1시간동안 선처리한 것이고 A lane은 Control, 그리고 B 와 C lane은 각각 정상배지로 배양 (0시간과 2시간), 또한 D, E 그리고 F lane은 다양한 농도의 PT사포닌(20, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$)을 포함한 성장배지로 배양했다(2 시간).

Western 결과에 의해서도 역시 인삼사포닌이 MMS에 의한 DNA 상해에 대해서 세포고사를 촉진하는 결과를 얻을 수 있었다(그림 7, 8). MMS에 의한 DNA 상해에 대해서 p53 단백질의 수준이 정상배지로의 교환때 보다는 PD 와 PT 사포닌에서 증가했음이 관찰되어졌다(그림 7). 또한 p21 단백질 수준도 역시 인삼 사포닌이 포함되어졌을 때에 증가함이 관찰되어졌다. 하지만 PD 와 PT 사포닌에서의 p21의 증가에는 시간적으로 약간의 차이가 났다(그림 8). 결과적으로 p53 과 p21 단백질의 선택적인 증가는 NIH3T3 세포가 MMS에 의해서 발생한 DNA 상해에 대해서 세포고사의 촉진을 유발한다는 결과를 얻을 수 있었다.

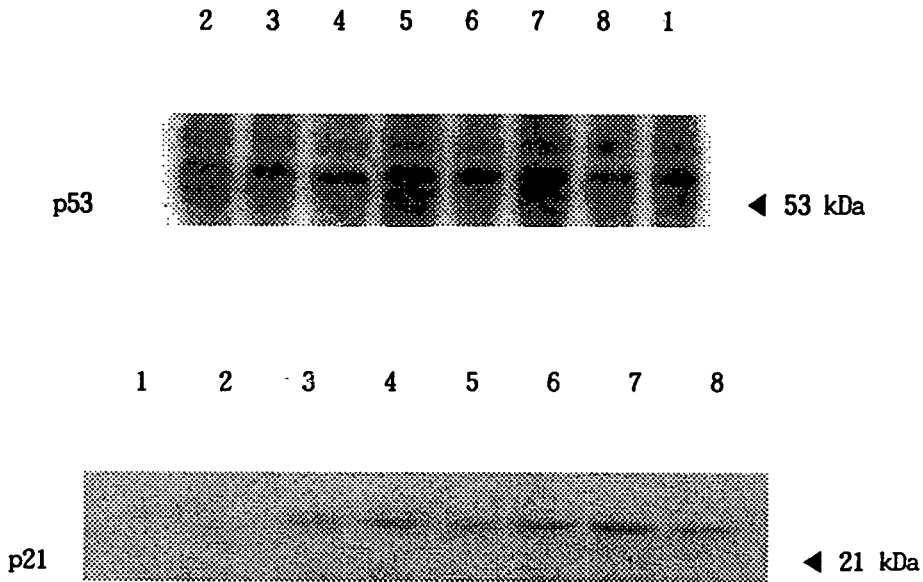


그림 7. MMS를 선처리한 NIH3T3 세포에서 p53, p21/WAF1/CIP1 단백질 수준에 대한 인삼 사포닌의 효과. lane 1 : Control, lane 2 : MMS only, lanes 3 과 4 : 각각 정상 배양액 2시간 과 4시간 배양, lane 5 와 6 : 각각 PD사포닌 100 μ g/ml을 2시간 과 4시간 배양, lanes 7 과 8 : 각각 PT사포닌 100 μ g/ml을 2시간 과 4시간 배양했다.

또한 p21은 세포주기 진행 과정에서 cyclin-dependent kinases(CDKs) / cyclin의 활성을 억제 시키는 억제자로 작용한다. 정상적인 세포주기 진행과정은 cyclin/CDKs complex의 활성이 pRb 단백질의 인산화를 시킴과 동시에 E2F 전사관련 단백질의 활성을 돕는다. 따라서 E2F는 DNA합성이나 dNTP 합성에 관련된 효소의 생성을 전사 단계에서 직접 작용을 한다.

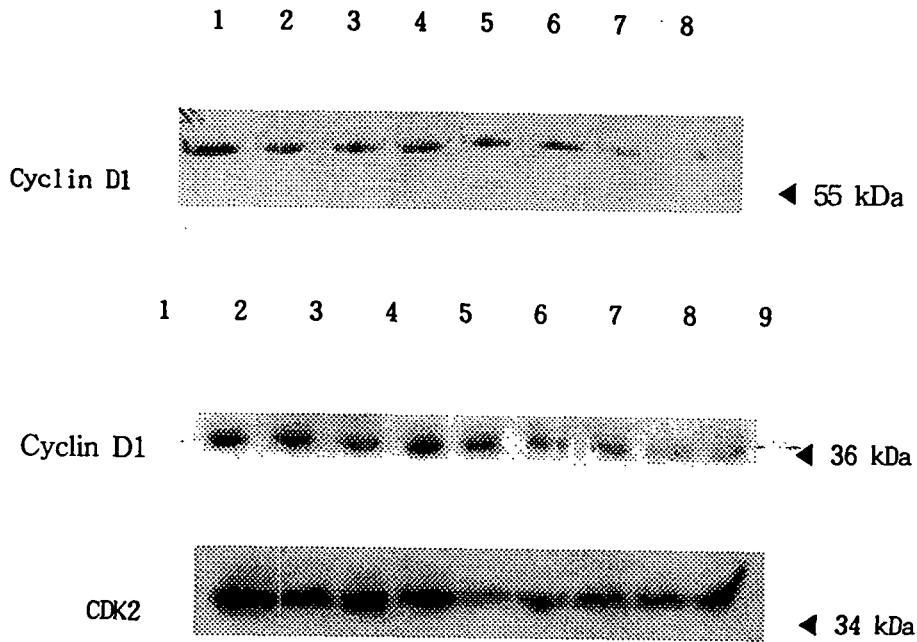


그림 8. MMS를 선처리한 NIH3T3 세포에서 Cyclin E, D1 및 CDK2 단백질 수준에 대한 인삼 사포닌의 효과. lane 1 : Control, lane 2 : MMS only, lanes 3 과 4 : 각각 정상 배양액 2시간 과 4시간 배양, lanes 5 와 6 : 각각 PD 사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 과 4시간 배양, lanes 7 과 8 : 각각 PT사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 과 4시간 배양 그리고 lane 9 : crude사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 배양했다.

NIH3T3 세포의 정상적인 G1에서 S 단계로의 들어갈때는 cyclin E/CDK2 복합체의 활성이 있어야 된다. 그리고 전반적인 S 단계에서는 Cyclin D1/CDK6 복합체가 활성을 가져야만 정상적인 세포주기가 이루어진다.

NIH3T3 세포가 MMS에 의해서 발생한 DNA상해에 대해서 정상적인 성장배양액의 교환보다 인삼사포닌이 포함된 배양액으로의 교환에서 p21의 단백질 수준에서 증가(그림 7)를 보인 반면에 cyclin E, cyclin D1, CDK2의 단백질 수준은 감소한 결과

를 얻을 수 있었다(그림 8), 그러나 각각의 인삼사포닌의 성분에 따라서 시간적 차이는 있었다. 결과적으로 MMS에 의해서 발생한 DNA상해에 대해서 p53과 p21의 증가에 관련해서 세포주기 진행과정에 관련된 단백질들의 감소를 볼 때 인삼사포닌 성분은 세포고사의 축진을 유도하는 것으로 해석된다. 또한 PCNA(proliferating cell nuclear antigen) 단백질은 DNA의 복제단계에 관련된 DNA 중합효소 δ 를 DNA주형에 고정시켜서 DNA 중합효소 δ 와 함께 DNA의 복제에 관련된다. 또한 PCNA 단백질은 cyclin/CDKs 복합체와 p21이 구조적으로 복합체를 형성하는 구조를 띄고 또한 PCNA도 이들 복합체에 결합을 할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

하지만 p21 과 PCNA의 직접적인 연관성은 아직 연구가 많이 되어있지 않다. 그럼에도 불구하고 PCNA의 단백질 수준을 위에서의 동일한 실험 조건으로 조사해본결과 cyclin E, cyclin D1, CDK2의 단백질 수준과 비슷하게 인삼 사포닌을 포함한 배양액 조건에서 감소됨을 관찰할 수 있었다(그림 9).

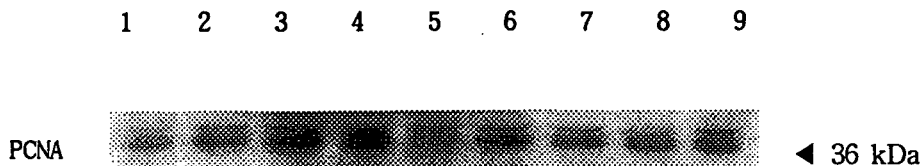


그림 9. MMS를 선처리한 NIH3T3 세포에서 PCNA 단백질 수준에 대한 인삼 사포닌의 효과. lane 1 : Control, lane 2 : MMS only, lanes 3 과 4 : 각각 정상 배양액 2시간 과 4시간 배양, lane 5 와 6 : 각각 PD 사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 과 4시간 배양, lanes 7 과 8 : 각각 PT 사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 과 4시간 배양 그리고 lane 9 : crude사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 배양했다.

GADD45(growth arrest on DNA damage) 유전자는 mammalian 세포들에서 DNA 상해 요인 물질이나 다른 성장 억제물에 의해서 유도 되어진다. GADD45는 DNA 상해에 대한 회복을 위한 기작과 p53 의존적인 세포고사에 연관이 된다. 인삼 사포닌 성분 중에서 형태상으로 NIH3T3 세포를 직접적인 죽음으로 유도하는 성분은 PT 사포닌이다. 그러나 PD 사포닌은 control 세포와 형태적으로 유사하였다. Western blot 결과를 보면 PD 사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 후에 시간이 지날수록 gadd45 단백질 수준은 증가를 했다, 그러나 PD 사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 후에 시간이 지날수록 gadd45 단백질 수준은 감소했다(그림 10). 이러한 결과로 인삼의 사포닌 성분에 대한 gadd45는 선택적으로 세포독성의 회복 과정에 기여하는 것으로 해석된다.

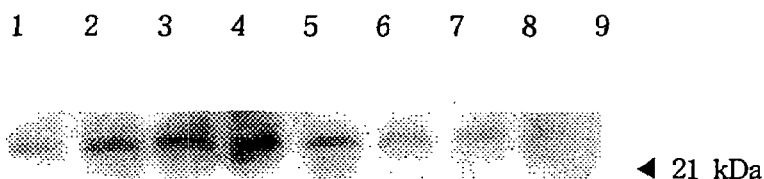


그림 10. NIH3T3 세포에서 GADD45 단백질 수준에 대한 인삼 사포닌의 효과.
lane 1 : Control, lane 2, 3, 4, 와 5 : PD 사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 다양한 시간동안 배양(1, 2, 4 와 6시간), lane 6, 7, 8, 과 9 : PT 사포닌 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 다양한 시간동안 배양했다(1, 2, 4 와 6시간).

2. 율나무로부터 분리된 RCF-11이 NIH3T3 세포에 미치는 영향

율나무의 수액을 율이라고 하여 도료 및 공업용으로 사용하고 한방에서는 구충, 복통, 통경, 변비 등에 사용한다. 율나무 수피 에탄올 추출물인 RCF-11은 팜유와 돈지 등의 식품에서 항산화성 효과를 조사해 본 결과 다른 한약재 추출물보다 항산화 개선 효과가 있는 것으로 확인되었다. 이에 gallic acid, butin, butein 등의

세가지 성분을 함유하고 있는 RCF-11을 NIH3T3 세포에 직접 처리하여 DNA 상해 반응에 어떤 영향을 주는지 알아보았다. 이를 알아보기 위해 유전 독성원으로는 NO donor를 가지고 있어 DNA 단사절단을 일으켜 세포사를 유발하는 돌연변이원인 SNP를 이용했다.

NIH3T3 세포에서 영향을 미치는 SNP의 농도와 시간을 결정을 위해서 MTT assay를 통해 cell viability를 측정해 보았다. SNP dose(0.1mM, 1mM, 2mM, 3mM, 10mM)별로 각각 30min, 1hr, 3hr동안 처리한 결과 (그림 1) SNP 1mM의 dose를 선정하여 실험에 임했다.

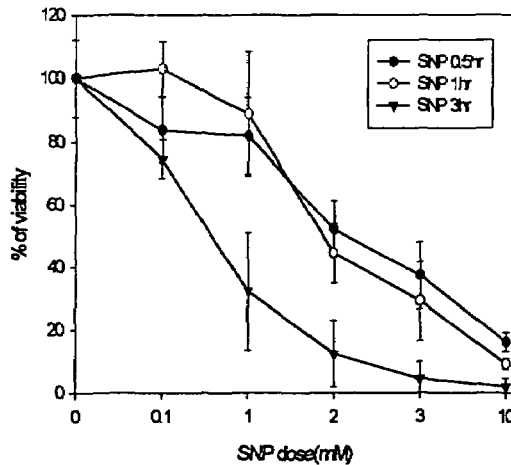


그림 1. NIH3T3 세포에 각각 SNP dose(0.1mM, 1mM, 2mM, 3mM, 10mM)별로 각각 30min, 1hr, 3hr동안 처리한 후 cell viability를 측정한 MTT assay.

SNP로 세포에 손상을 가한 후 정상의 배지에 배양했을 때 세포 주기에 영향을 미치는 정도를 알아보기 위해서 SNP 1mM을 6hr 처리 후 하여 정상의 배지에 각각 1hr, 3hr, 6hr, 12hr동안 배양했을 때 세포고사와 세포 주기 변화에 대한 flow cytometry(FACS) analysis를 그림 2에서 보여 주고 있다. SNP 1mM을 6시간 동안 처리를 했을 때는 세포 주기에 별다른 영향을 주지 못하나 세포가 손상된 후 정상의 배지에서 배양을 했을 때는 시간이 경과함에 따라 정상적인 세포 주기의 활성을 잃고 죽음에 이르게 됨을 알 수 있었다.

이러한 SNP의 세포내의 작용을 기초로 SNP와 RCF-11과의 상호 작용을 알아보고 RCF-11이 손상된 세포에 미치는 영향과 RCF-11이 세포 내 작용 후에 세포에 손상을 주었을 때 세포 내의 영향을 알아보고자 cell viability를 측정하였다.

그림 3에서는 먼저 SNP로 세포에 손상을 준 후 RCF-11이 세포에 미치는 효과를 살펴보기 위해 cell viability를 측정하여 예상되는 값과 비교하여 나타내었다. NIH3T3 세포에 1mM SNP를 1hr 전처리 후 정상의 배지와 RCF-11을 농도별로 6시간 동안 처리하였다. 그 결과 SNP에 의한 세포의 손상 후 RCF-11을 가했을 때 예상되는 수치보다 RCF-11의 농도가 낮을 때는 높게 나타나고, RCF-11의 농도가 높을 때는 예상되는 값보다 오히려 낮게 나타나고 있다. 여기에서 우리는 RCF-11이 손상된 세포내에서 세포의 활성을 높이는 데 영향을 주나 오히려 농도가 과했을 때는 세포의 활성을 낮추는 것으로 보고 다음 실험을 수행했다.

세포에 손상을 주는 SNP와 RCF-11을 동시에 처리했을 때 RCF-11이 SNP의 독성을 방해하는지를 알아보기 위해서 그림 4와 같은 실험을 수행했다. NIH3T3 세포에 SNP 1mM과 RCF-11을 dose별로 12시간 동안 동시 처리 후 효과를 알아 본 결과 독립적으로 작용했을 때 예상되는 세포의 활성보다 높게 나타남을 알 수가 있었다.

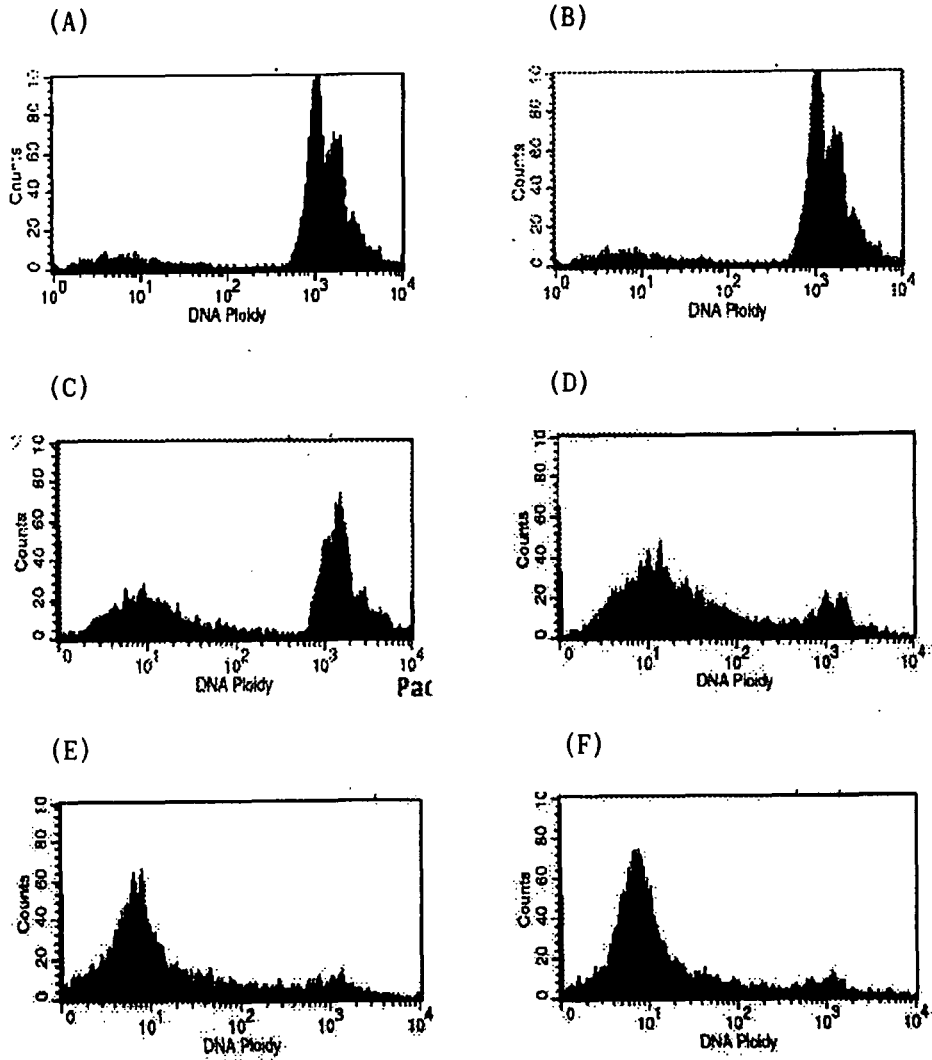


그림 2. SNP 1mM을 처리한 NIH3T3 세포의 flow cytometry analysis. (A) 정상 NIH3T3 세포, (B) SNP 1mM 6hr 처리, (C) SNP 1mM 6hr 처리 후 정상배지에 1hr동안 배양, (D) SNP 1mM 6hr 처리 후 정상배지에 3hr동안 배양, (E) SNP 1mM 6hr 처리 후 정상배지에 6hr동안 배양, (F) SNP 1mM 6hr 처리 후 정상배지에 12hr 동안 배양

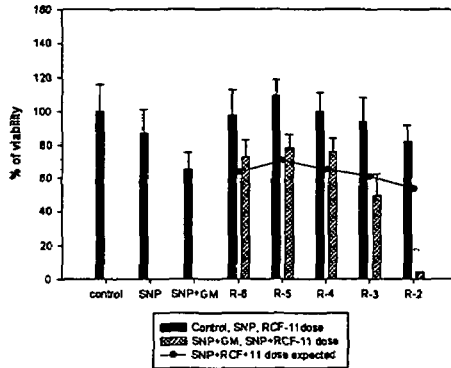


그림 3. NIH3T3 세포에 1mM SNP를 1hr 전처리 후 RCF-11 dose 6hr 배양 후 효과와 기대 효과. R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-5 : RCF-11 10^{-5} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-3 : RCF-11 10^{-3} , R-2 : RCF-11 10^{-2} .

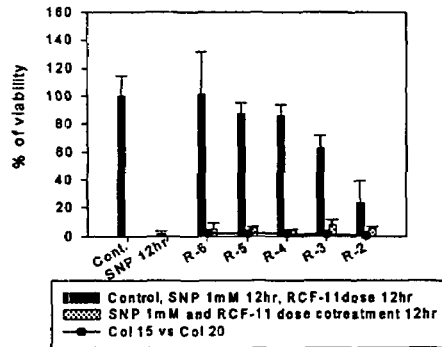


그림 4. NIH3T3 세포에 SNP 1mM과 RCF-11 dose별 동시처리 12hr 후 효과와 기대 효과. R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-5 : RCF-11 10^{-5} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-3 : RCF-11 10^{-3} , R-2 : RCF-11 10^{-2} .

이는 RCF-11이 SNP에 작용을 억제시키거나, SNP의 성분에 어떠한 변화를 줄 수 있다고 해석되었다.

RCF-11이 일정 시간 동안 세포에 영향을 준 후 세포에 손상을 주었을 때 세포의 활성을 알아보기 위해서 다음 실험을 수행했다. NIH3T3 세포에 RCF-11 dose별로 12시간동안 처리 후 SNP 1mM을 1시간동안 처리 하였을 때의 효과를 그림 5에서 보여주고 있다. 그림 4에서 보여 주는 바와 같이 RCF-11 처리 후 정상의 배지에서 나타나는 효과와 SNP의 효과가 중복해서 나타났을 때의 기대 효과보다 결과 값이 전반적으로 높게 나타남을 보여 준다. 그러나 낮은 농도에서보다는 높은 농도에서는 예상값과 별다른 차이를 보이지 않음을 보여준다. 이 결과로 세포에 RCF-11을 전처리한 후 세포에 손상을 가했을 때 세포에 가해지는 손상이 적음을 알 수가 있었다. 이는 RCF-11이 정상의 세포를 세포외에서 가해지는 자극으로부터 보호해 준다고 해석된다.

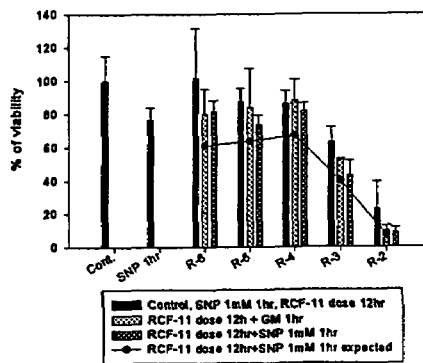


그림 5. NIH3T3 세포에 RCF-11 dose별 전처리 12hr 후 SNP 1mM 1hr 처리시 효과와 기대 효과. R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-5 : RCF-11 10^{-5} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-3 : RCF-11 10^{-3} , R-2 : RCF-11 10^{-2} .

그림 6에서의 실험은 세포에 단시간동안 자극 물질과 함께 RCF-11을 넣고 배양했을 때 나타나는 효과를 알아보기 위해 수행했다. NIH3T3 세포에 SNP 1mM과 RCF-11 dose별로 동시에 1시간동안 처리했을 때의 결과를 보여 주고 있다. SNP와 RCF-11이 단시간동안이 동시에 세포에 가해졌을 때는 낮은 농도에서는 별다른 영향을 미치지 않았으나 높은 농도를 가했을 때 세포의 활성을 약화시켰다. 이 결과 RCF-11은 단시간에는 세포나 세포손상 물질에 영향을 미치지 못하는 것으로 예상된다. 이 실험에서는 RCF-11을 1시간동안 처리했을 때의 실험 값은 보여지지 않았으나 세포에 별다른 영향을 주지 않아 실험 값을 보이지 않았다.

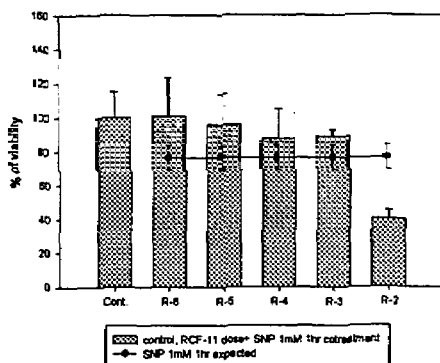
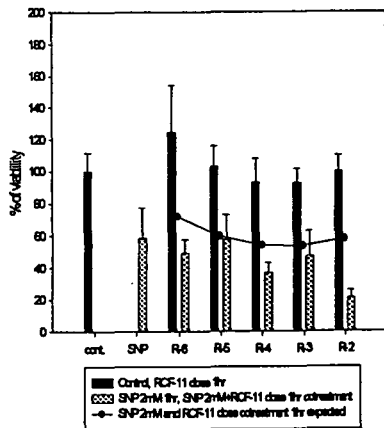


그림 6. NIH3T3 세포에 SNP 1mM과 RCF-11 dose별 동시처리 1hr 후 효과와 기대 효과. R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-5 : RCF-11 10^{-5} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-3 : RCF-11 10^{-3} , R-2 : RCF-11 10^{-2} .

세포의 손상을 단시간에 높게 주었을 때, RCF-11과 복합적으로 일어 나타나는 현상을 보기 위해 NIH3T3 세포에 SNP 2mM과 RCF-11 dose별 동시처리 1hr 후 효과를 보았다(그림 7의 (A)). 그림 7의 (A)에서 보여지는 것과 같이 단시간 높은 농도의

SNP에서는 기대되는 값보다 낮게 나타났고, 6시간동안 동시 처리한 그림 7의 (B)에서는 기대한 세포의 활성보다 높게 나타났다. 이런 결과 (A)와 (B)를 비교하여 보았을 때 RCF-11이 단시간 높은 농도의 세포의 손상을 줄일 수는 없지만 장시간(6시간)동안 동시 처리했을 때는 세포에 손상을 주는 물질을 방해하거나 물질에 변화를 초래하는 것으로 예상된다. 그림 8에서는 그림 7의 (B)에서 보다 긴 시간 처리했을 때 보이는 결과로 그림 7의 (B)와 비슷한 현상이었다.

(A)



(B)

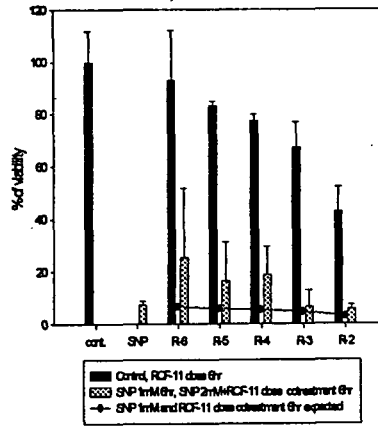


그림 7. (A) NIH3T3 세포에 SNP 2mM과 RCF-11 dose별 동시처리 1hr 후 효과와 기대 효과. R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-5 : RCF-11 10^{-5} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-3 : RCF-11 10^{-3} , R-2 : RCF-11 10^{-2} . (B) NIH3T3 세포에 SNP 1mM과 RCF-11 dose별 동시 처리 6hr 후 효과와 기대 효과. R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-5 : RCF-11 10^{-5} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-3 : RCF-11 10^{-3} , R-2 : RCF-11 10^{-2} .

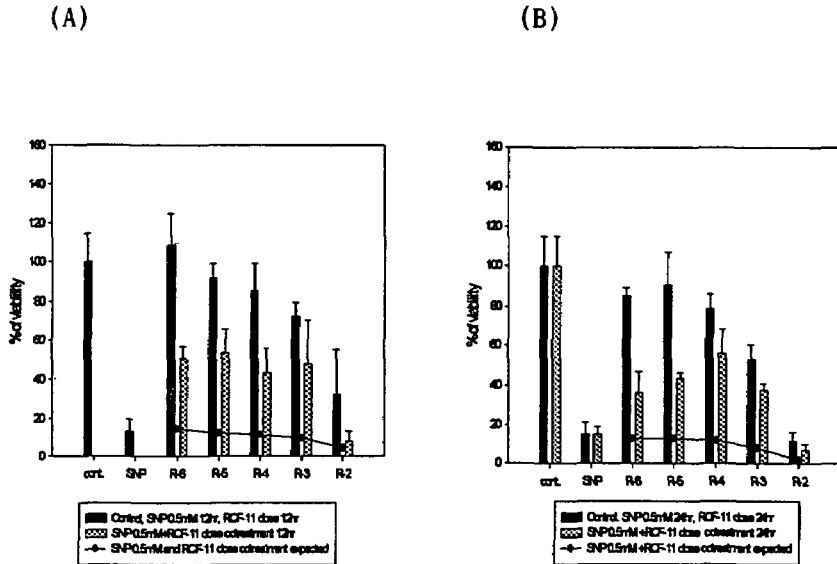
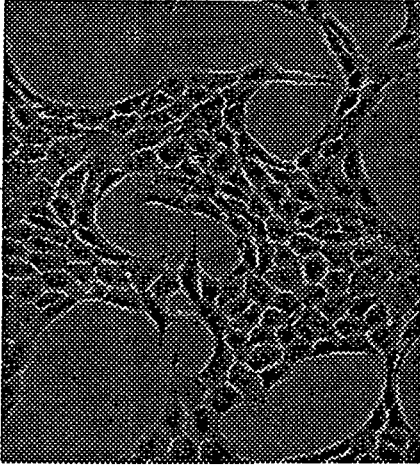


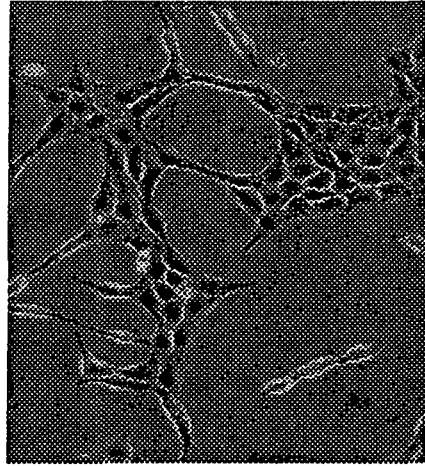
그림 8. (A) NIH3T3 세포에 SNP 0.5mM과 RCF-11 dose별 동시처리 12hr 후 효과와 기대 효과. R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-5 : RCF-11 10^{-5} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-3 : RCF-11 10^{-3} , R-2 : RCF-11 10^{-2} . (B) NIH3T3 세포에 SNP 0.5mM과 RCF-11 dose별 동시처리 24hr 후 효과와 기대 효과. R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-5 : RCF-11 10^{-5} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-3 : RCF-11 10^{-3} , R-2 : RCF-11 10^{-2} .

그림 9에서는 RCF-11의 세포학적인 형태 변화를 살펴보았다. (A)는 NIH3T3 세포의 정상, (B)는 NIH3T3 세포에 RCF-11 10^{-6} dose를 6시간 동안 처리하였을 때의 형태변화, (C)와(D)는 RCF-11 10^{-2} dose 6시간 처리하였을 때의 세포학적 변화를 관찰하였다. (A)에서는 별다른 변화가 관찰되지 않았으나 높은 농도인 (C)와 (D)에서는 세포의 크기가 작고 동그랗게 변함을 볼 수 있다. (C)와 (D)는 서로 다른 형태를 보이는 것으로 (C)의 과정을 거치기 전에 (D) 형태가 관찰되었다. 이 결과로 RCF-11은 세포의 형태적인 변화를 초래하면서 세포의 활성화에도 영향을 미치는 것으로 보여진다.

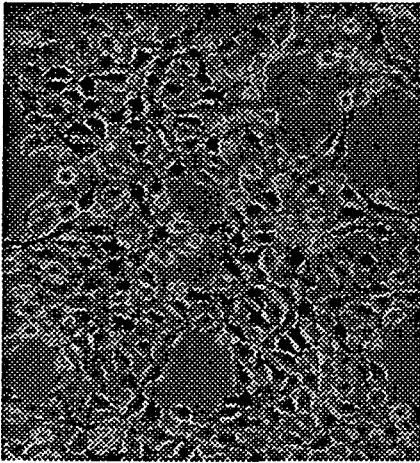
(A)



(B)



(C)



(D)

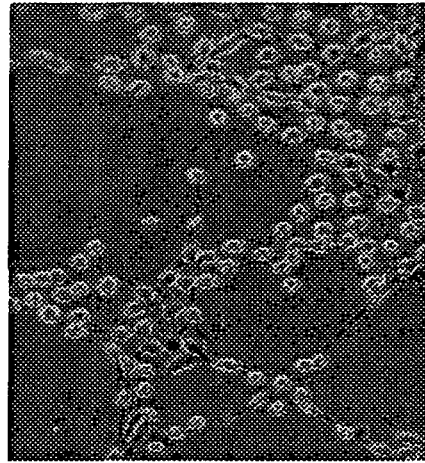


그림 9. NIH3T3 세포에 RCF-11 처리 후 세포 형태 변화. (A) NIH3T3 세포의 정상, (B) NIH3T3 세포에 RCF-11 10^{-6} 6hr 처리, (C) NIH3T3 세포에 RCF-11 10^{-2} 6hr 처리, (D) NIH3T3 세포에 RCF-11 10^{-2} 6hr 처리

그림 9와 그림 10에서는 RCF-11이나 SNP 혹은 SNP 처리 후 RCF-11을 처리하여 DNA synthesis rate 측정해 보았다. RCF-11을 단독으로 처리한 후의 DNA synthesis rate는 변화가 없었으나, SNP 처리 후 정상배지 배양에서 나타나는 비정상적인 DNA synthesis rate을 감소시키는 것으로 나타났다. 이런 결과, RCF-11은 비정상적인 DNA synthesis rate을 감소시키는데 영향을 미치는 것으로 추정된다. 지금까지의 결과로부터 RCF-11의 이러한 효과는 RCF의 항산화적 효과에 의해 SNP의 작용을 경감시키거나 또는 SNP에 의해 손상된 세포의 DNA 회복 활성을 높이는 것으로 생각된다.

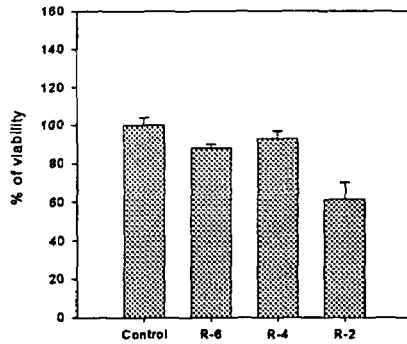


그림 10. NIH3T3 세포에 RCF-11 dose별 6hr 처리시의 DNA 합성률. control : 정상 NIH3T3, R-6 : RCF-11 10^{-6} , R-4 : RCF-11 10^{-4} , R-2 : RCF-11 10^{-2} .

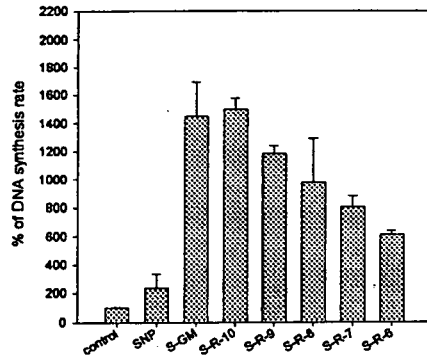


그림 11. NIH3T3 세포에 SNP 0.2mM 1hr 처리 후 RCF-11 6hr 후처리시의 DNA 합성률. control : 정상 NIH3T3, SNP : SNP 0.2mM 6hr, S-R-10 : SNP 0.2mM 1hr+RCF-11 10^{-10} 6hr, S-R-9 : SNP 0.2mM 1hr+RCF-11 10^{-9} 6hr, S-R-8 : SNP 0.2mM 1hr+RCF-11 10^{-8} 6hr, S-R-7 : SNP 0.2mM 1hr+RCF-11 10^{-7} 6hr, S-R-6 : SNP 0.2mM 1hr+RCF-11 10^{-6} 6hr

제 7 절 활성물질의 안전성 평가

이상의 실험결과들에서 관찰할 수 있듯이 고농도의 총사포닌과 PD, PT 성분들은 세포생존률을 감소시켰는데 이는 홍삼이 갖는 긍정적 효과중 암세포나 노화세포의 세포고사를 촉진시킨다는 보고와 일치하였다. 그러나 식용 또는 약용 수준의 보통 농도에서는 이 saponin을 전처리함으로써 MMS에 의해 50%정도 감소되었던 DNA 합성율이 사포닌 농도증가에 따라 70%까지 회복됨을 알 수 있다. 이 효과는 PD계에서도 중간농도의 경우 관찰되었으나 고농도에서는 그다지 효과적이지 않았다. 반면, PT계에서는 고농도에서도 이러한 회복효과가 현저하였다.

이상의 결과들과 동물 실험결과들은 사포닌 성분자체로는 DNA합성을 증진하여 건강한 세포의 생존률을 높이고, 지속적인 처리에 의해 유전독성의 감소를 도와주는 2가지의 매우 바람직한 효과가 있음을 의미하는 것이다. 이에 따라, 향후 더 미세성분, 특히 PT계열의 미세성분의 유전독성감소효과를 매우 긍정적으로 기대하며 이러한 방향으로의 실험을 전개중이다.

한편, 옷나무 추출물 분리성분 혼합체(RCF)에서도 MMS에 의한 유전독성을 감소시키는 효과가 있음이 MTT에 의한 세포활성, trypan blue uptake, DNA 합성율의 변화, 그리고 동물 실험에서 관찰되었다. 인삼의 경우와 마찬가지로 이러한 긍정적 효과는 중간농도에서 현저하였다.

또한 이들 분리 성분들을 꿀, 자당, 녹두즙 등을 포함하는 다양한 조합으로 세포 및 동물에 투여하고 위의 기능성 및 안전성 실험을 수행한 결과들도 모두 긍정적이었으며 따라서 기능성 및 안전성에서 전혀 손상 받지 않음을 확신할 수 있었다.

결론적으로, 이들 분리성분들의 안전성 시험의 결과, 전체적으로 안전성 면에서는 매우 고농도가 아니면 문제가 없는 것으로 확인되었다. 따라서 이들 분리 성분

과 그 이전 단계의 혼합물들은 식용 또는 약용 수준의 농도에서 충분한 기능성과 안전성을 나타내었다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구개발 목표 달성도

1. 추출물의 분획 및 항암 활성 검색을 성공적으로 완료하였다.
2. 배양세포계에서 세포독성 및 유전독성의 감소효과를 성공적으로 분석을 완료하였다.
3. 배양세포계에서의 암유발 모델을 성공적으로 정립하였다.
4. 대사활성계의 효과를 성공적으로 분석하였다.
5. 유발 암 세포의 세포 및 유전독성 변화 시험을 성공적으로 수행하였다.
6. 실험 동물계에서 암유발 및 유효물질에 의한 감소효과를 성공적으로 분석하였다.
7. 항암 효능의 유효성분 분리 및 정제를 완료하였다.
8. 분리성분에 의한 세포독성, 유전독성, 암유발의 감소효과를 성공적으로 분석하였다.
9. 세포고사능에 대한 증가 효과를 인삼 및 율 추출물 분리 성분에서 성공적으로 분석하였다.

제 2 절 대외기여도

1. 학술분야

가. 논문 발표

- 1) 김완주, 유병수, 전병훈, 이정섭, 박종근 : 홍삼 추출물에 의한 유전 독성 감소효과 (I). 대한화장품학회지 24(1), 74-86 (1998)
- 2) 차재영, 유병수, 김인호, 박종근 : 홍삼 추출물에 의한 유전독성 감소 효과 (II). 대한화장품학회지 24(1), 87-99 (1998)
- 3) 유수경, 김기영, 김강주, 박종근 : 감초산이 인체 치은 섬유모 세포에 미치는 영향. 대한치주학회지. 28(3), 453-463 (1998)
- 4) KIM, H.M., SHIN, H.Y., CHOO, Y.K. and PARK, J.K. : Inhibition of mast cell-dependent anaphylaxis by sodium salicylate. *Immunology* 96, 551-556 (1999)
- 5) HWANG, S.J. and PARK, J.K. : Ginseng saponin induces apoptosis and selectively elevates protein levels of p53 and p21 in MMS-treated NIH3T3 cells. *Cancer Research* (투고중)

나. 심포지엄

- 1) 황성진, 박종근. Ginseng saponin induces apoptosis and selectively elevates protein levels of p53 and p21 in MMS-treated NIH3T3 cells. 한국생물과학협회 추계 학술발표회 (1999)
- 2) 이혜숙, 황성진, 김완주, 박종근. Apoptosis of HL-60 cells treated with PARP inhibitor and base damaging agents. 한국생물과학협회 추계 학술발표회 (1999)

- 3) 조기정, 박종균. Screening of Korean herbs affecting cisplatin-induced apoptosis of cultured mammalian cells. .한국 생물과학협회 추계 학술발표회 (1999)

2. 연구 기술분야

본 연구 결과는 지금까지의 단순한 건강 보조 식품이 아닌 유전자 손상의 예방 기능을 갖는 특화된 기능성 식품으로 개발될 수 있을 것이다. 이에 따라 본 연구자는 인삼 성분이 함유된 기능성 음료의 개발을 위한 기술적 자문을 전북 진안 소재의 건보 식품과 적극적으로 수행하고 있고, 또한 향장업체인 소망(주)과도 화장품으로의 개발을 위한 기술 자문 등 협력 체제를 갖출 수 있게 되었다. 이러한 산학협력 과정에 의해 연구 개발 의지가 충만한 산업체들을 지원하여 그들의 기술력이 향상되는데 기여할 수 있었다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

본 과제에의 추출물 및 분리 성분들은 식품화하기에 충분한 생물학적 기반이 본 연구에 의해 규명되었으며, 이들이 항암기능을 갖는 식품으로 다양하게 가공할 수 있음을 기능성과 안전성 면에서 체계화하였다. 본 연구 결과에 따라 본 연구자는 인삼 성분이 함유된 기능성 음료의 개발을 전북 진안 소재의 건보 식품과 적극적으로 추진하고 있으며 그 제품들은 곧 출시될 예정이다. 제품의 출시와 더불어 본 연구의 성공적인 결과들은 특허를 출원하고 있으며, 그 중 학문적인 중요성을 지니는 결과들은 외국 학술지에 투고하는 작업을 진행중이다. 또한 향장업체와의 협력에 의해 유전자 보호기능 화장품으로의 제품 개발 또한 강력히 기대되는 시점이다.

제 6 장 참고문헌

- Al-Delaimy, K.S. and Ali, S.H. Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, 21, 110 (1970)
- Ames, B.N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204: 587-588 (1976)
- Baek NI, Kim DS, Lww YH, Park JD, Lee CB, Kim SI: Cytotoxicities of ginseng saponins and their degradation products against some cancer cell lines. *Arch Pharm Res* 18: 164-168 (1995)
- Baek, N.I., D. S. Kim, Y.H.Lee, J. D. Park, C. B. Lee, S. I. Kim, Cytotoxicities of ginseng saponins and their degradation products against some cancer cell lines, *Arch. Pharm. Res.* 18: 164-168(1995)
- Burton, G.W. : Antioxidant action of carotenoids. *J. of Nutrition*, 119: 109 (1989)
- Chen, Z. M. Nstio, T. Mashima, T. Tsuruo. Activation of actin-cleavable interleukin 1- β -converting enzyme (ICE) family protease CPP32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 56: 5224-5229 (1996)
- Cherney, B.W. O.W. McBride, D. Chen, H. Alkhatib, K. Bhatia, P. Hensley and M.E. Smulson cDNA sequence, protein structure, and chromosomal location of the human gene for poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8370-8374 (1987)
- Cleaver, J. E. Structure of repaired sites in human DNA synthesized in the presence of inhibitors of DNA polymerases alpha and beta in human

- fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 739: 301-311 (1983)
- Cleaver, J.E. Completion of excision repair patches in human cell preparations: identification of a probable mode of excision and resynthesis. *Carcinogenesis* 5: 325-330 (1984)
- Davidson, P.M. and Juneja, V.K. Antimicrobial agent. In *Food Additive*, A.L. Branen, P.L. Davidson, and S. Salminen (Ed.), p83. Marce Dekker Inc., New York. (1990)
- Dresler, S.L. and M.G. Frattini. DNA replication and UV-induced repair synthesis in human fibroblasts are much less sensitive than DNA polymerase α to inhibition by butylphenyl-deoxyguanosine triphosphate. *Nucleic acid Res.* 14: 7093-7102 (1986)
- Fujikawa-Yamamoto, K., T. Ota, S. Odashima, H. Abe, S. Arich, Different responses in the cell cycle of tumor cells to ginsenoside Rh2, *Cancer J.* 1: 349-352 (1987)
- Giri, C.P., M.H.P. West and M.P. Smulson. Nuclear protein modification and chromatin structure. I. Differential poly(adenosine diphosphate) ribosylation of chromosomal protein in nuclei versus isolated nucleosomes. *Biochemistry* 17: 3495-3500 (1978)
- Gorbacheva, L.B., G.V. Kukushkina, A.D. Durdeva and N.A. Ponomarenko. In vivo DNA damage and resistance to 1-methyl-1-nitrosourea and 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea in L1210 leukemia cells. *Neoplasma (BRATISL)* 35(1): 3-14 (1988)
- Harman, D. : The free-radical theory of aging. In *Free radicals in biology*, Pryor, N.A., Ed., Academic Press, Orlando, vol. 5 Chapter 8 (1982)
- Hickmann, J.A., Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer. Metastasis*

- Rev. 11: 121-139 (1992)
- Ishiguro, T., F. Otsuka, T. Ochi and M. Ohsawa. Involvement of DNA polymerases in the repair of DNA damage by benzo[a]pyrene in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 184: 57-63 (1987)
- Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M. and Ogiso, T. : Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in F 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 70: 343 (1983)
- Kaufmann, S.H. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drug: a cautionary note. *Cancer Res.* 49: 5870-5878 (1989)
- Kim, Y.H., K. H. Park, H. M. Rho, Transcriptional activation of the Cu, Zn-superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb2 extracted from a medical plant, *Panax ginseng*. *J. Biol. Chem.* 271: 24539-24543 (1996)
- Lee, K.Y., J. A. Park, E. Chung, Y. H. Lee, S. I. Kim, S. K. Lee. Ginsenoside -Rh2 blocks the cell cycle of SK-HEP1 cells at the G1/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27^{kip1}. *Cancer Lett.* 110: 193-200 (1996).
- Lee, Y.N., H. Y. Lee, H. Y. Chung, S. I. Kim, S. K. Lee, B. C. Park, L. w. Lim In vitro induction of differentiation by ginsenosides in F9 teratocarcinoma cells, *Eur. J. Cancer* 32: 1420-1428 (1996).
- Miller, M.R. and D.N. Chinault. The roles of DNA polymerase a, b, and g in DNA repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents. *J. Biol. Chem.* 257: 10204-10209 (1982).
- Nah, S.Y., H. J. Park, E. W. McCleskey, A trace component of ginseng that

- inhibits Ca²⁺ channels through apertusis toxin-sensitive G protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8739-8743 (1995).
- Ota, T., K. Fujikawa-Yamamoto, Z.-p. Zong, M. Yamaza, S. Odashima, I. Fujikawa, H. Abe, S. Arichi, Plant-glycoside modulation of cell surface related to control of differentiation in cultured B16 melanoma cells. Cancer Res. 47: 3863-3867 (1987).
- Ota, T., M. Maeda, S. Odashima, J. Ninomiya-Tsuji, M. Tatsuka. G1 phase -specific suppression of the Cdk2 activity by ginsenoside Rh2 in cultured murine cells. Life Sci. 60: PL39L44 (1997).
- Ota, T., M. Maeda, S. Odashima, Mechanism of action ginsenoside Rh2: uptake and metabolism of ginsenosides Rh2 by cultured B16 melanoma cells. J. Pharm. Aci. 80: 1141-1146 (1991).
- Park, J.K. and S.D. Park Effects of benzo(a)pyrene on DNA strand breaks and replication in the presence of metabolic activation system in mammalian cells. Kor. J. Genetics 10(4): 1-9 (1988).
- Park, J.K., W.J. Kim, Y.S. Park, H.S. Choi, J.I. Yu, D.M. Han and S.D. Park. Inhibition of topoisomerase I by NAD and enhancement of cytotoxicity of MMS by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in S.cerevisiae. Cellular and Mol. Biol. 37(7): 739-744 (1991c).
- Pelkonen, O. and D.N. Nebert. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. Pharmacol. Rev. 34: 189-222 (1982).
- Rao, L., E. White. Bcl-2 and ICE family of apoptosis regulators: making a connection. Curr. Opin. Gene Dev. 7: 52-58 (1997).
- Robertson, I.G.C., C. Guthenberg, B. Mannervik and B. Jernstrom. Differences in stereoselectivity and catalytic efficiency of three human glutathione

- transferases in the conjugation with 7,8-dihydroxy-9,10-oxy-7,8,9,10 tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 46: 2220-2224 (1986).
- Sakakibara, K., Shibata, Y., Hifashi, T., Sanada, S., and Shoji, J. *Chem. Pharm. Bull.* 23: 1999-1016 (1975).
- Seki, S., M. Ohashi, H. Ogura, and T. Oda. Possible involvement of DNA polymerases α and β in bleomycin-induced unscheduled DNA synthesis in permeable HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104: 1502-1508 (1982).
- Shibata, Y., Nozaki, T., Higashi, T., Sanada, S., and Shoji, J. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 2818-2824 (1976).
- Smets, L. A. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anti-cancer Drugs* 5: 3-9 (1994).
- Stone, P.R., W.B. Lorner III, W.R. Kidwell. Properties of the complex between histone H1 and poly (ADP-ribose) synthesized in HeLa cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 81: 9-19 (1977).
- Takahashi, A.W.C. Earnshaw. ICE-related proteases in apoptosis. *Curr. Opin. Gene Dev.* 6: 50-55 (1996).
- Toda, S., Kimura, M., and Ohnishi, M. *J. Ethnopharmacology* 30: 315-318 (1990).
- White, E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10: 1-5 (1996).
- Yamada, K., F. Hanaoka, and M. Yamada. Effects of aphidicolin and/or 2',3'-dideoxythymidine on DNA repair induced in HeLa cells by four types of DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* 260: 10412-10417 (1985).