

Grapefruit 종자추출물이 *Enterobacter pyrinus*의 생리기능에 미치는 영향

이태호 · 정숙정 · 이상열* · 김재원 · 조성환**

경상대학교 미생물학과, *생화학과, **식품공학과

The Inhibitory Effect of Grapefruit Seed Extracts on the Physiological Function of *Enterobacter pyrinus*

Taeho Lee, Sook-Jung Jeong, Sang Yeol Lee*, Jae Won Kim and Sung-Hwan Cho**

Department of Microbiology, *Biochemistry,

**Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract

Grapefruit seed extracts(GFSE) have some unknown compounds which exhibit the antibiotic activities against microorganisms including bacteria and fungi. We have examined the effects of GFSE on the growth of *Enterobacter pyrinus* which was isolated from necrotic lesions of pear trees. During the cultivation, the growth of the bacteria was strongly inhibited at the low concentration(0.01%, w/w) of GFSE. Hydrophobic fraction extracted from GFSE by mixed solvents (chloroform : methanol : water, 1 : 2 : 0.8, v/v/v) had components which inhibited the growth of bacteria. There was, however, no inhibitory effect of GFSE on the activities of several enzymes including hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase and succinate dehydrogenase. O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG), the artificial substrate of β -galactosidase was hydrolyzed in the presence of GFSE, indicating that the membrane was perturbed by the GFSE. From the results it was suggested that the antibiotic activity of GFSE is due to the change of membrane permeability of cell. GFSE was fractionated by high performance liquid chromatography equipped with C_{18} reverse phase column. Among active fractions, three peaks were identified as 1-chloro-2-methyl-benzene (o-toluene), N,N-dimethyl-benzenemethanamine, 1-[2-(2-ethylethoxy)ethoxy]-4-(1,1,3,3-tetramethyl)-benzene, respectively, while the other three remained unidentified.

Key words: grapefruit seed extracts, antibiotic activity, *Enterobacter pyrinus*

서 론

최근, grapefruit종자추출물(grapefruit seed extract: 자몽종자추출물: 이하 GFSE라 칭함)에 대한 항균, 항진균 및 항산화 효과가 발표⁽¹⁻³⁾되면서 광범위한 분야에서 적용가능성을 검토해 오고 있다. 많은 연구결과를 통하여 GFSE는 광범위한 분야에서 탁월한 효과를 나타내고 있으나, 아직까지 GFSE의 활성물질이 무엇이며, 어떠한 기작에 의해 살균이 되는 지에 관한 기초연구는 거의 이루어져 있지 않다. 천연물에는 우리가 아직 확인하지 못한 여러 성분들이 존재하고, 또한 이미 알고는 있으나, 그 물질의 효용을 제대로 파악치 못하여, 산업화, 실용화가 되지 못하고 있다. GFSE도 예외는 아니어서 적어도 수십가지 이상의 여러 성분들이 복합적으로 이루어져 있으리라고 예상은 되지만, 미량 존재하는 여러

가지 성분들의 분리나 효능은 알려진바 없다. 본 연구에서는, GFSE의 항균제로서의 역할과 효능을 분자적인 수준에서 이해하려는 그 목표를 두었다. 따라서, GFSE를 조제하여 소수성 분획과 친수성 분획으로 분리하고 공시균주로서 *Enterobacter pyrinus*를 사용하여, GFSE처리가 미생물의 성장, 에너지대사 관련효소의 활성 및 세포막의 투과성에 미치는 영향을 조사하는 한편, GFSE의 항균성분을 분리·동정하였다.

재료 및 방법

GFSE의 조제

본 실험에 사용된 GFSE는 진보^(1,7)에 준하여 추출·조제하였다.

GFSE의 분획

GFSE를 Bligh-Dyer의 방법⁽⁹⁾에 따라 소수성 분획과 친수성 분획으로 분리하였다. GFSE를 chloroform : methanol : H₂O (1 : 2 : 0.8, v/v/v)의 혼합 용액에 잘 섞어

Corresponding author: Sung-Hwan Cho, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, 900 Kajwa-dong Chinju 660-701, Korea

용해하고 흔들어 방치한 후, chloroform과 물을 동량 가하여 chloroform : methanol : H₂O의 비율 (1 : 1 : 0.9)가 되도록 조절하여 chloroform 층과 methanol-H₂O 혼합액 층으로 나누었다. Chloroform층은 감압 농축하여 소량의 5% glycerol에 혼합하여 소수성 분획으로 삼았고, methanol-H₂O층은 같은 방법으로 농축하여 친수성 분획으로 사용하였다.

균주의 보관 및 배양¹⁰⁾

배나무의 갈색 점무늬병(brown leaf spot disease)의 병반에서 분리한 *Enterobacter pyrinus*는 경상대학교 미생물학과에 소장중인 균주를 분양받아 nutrient agar에 계대 배양하여 보관하였고, nutrient media에 배양하였다.

효소원의 제조

*Enterobacter pyrinus*를 영양 배지에서 20시간 배양하고 원심분리하여 세포만을 수집하였다. 세포를 10 mM EDTA를 포함한 10 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충 용액에 현탁시키고, 초음파 파쇄기로 파쇄한 후 3000×g에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 모으고 이를 효소원으로 사용하였다.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase(D-glucose-6-phosphate: NADP⁺ 1-oxidoreductase; G6PDH, EC 1.1.1.49)의 활성 측정

Glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성은 이 등의 방법¹¹⁾에 따라 측정하였다. 효소 반응액(전체 부피 1 ml)의 조성(최종 농도)은 30 mM tris-HCl(pH 9.0), 6 mM MgCl₂, 0.24 mM NADP⁺, 1 mM glucose-6-phosphate와 여러가지 농도의 GFSE와 효소원이었다. 효소 반응은 기질인 glucose-6-phosphate를 가하여 시작하였고, 시간에 따라 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성을 결정하였다.

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

Hexokinase의 효소 활성은 효소 반응액에 glucose를 기질로 하여 정제된 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 첨가하여 주고 생성된 D-glucose-6-phosphate를 coupling assay 방법¹²⁾으로 정량하여 결정하였다. 효소 반응액(전체 부피 1 ml)의 조성(최종 농도)은 40 mM tris-HCl(pH 7.6), 222 mM Glucose, 8 mM MgCl₂, 0.91 mM NADP⁺, 0.64 mM ATP, 1 unit의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 여러가지 농도의 GFSE와 효소원이었다. 효소 활성은 glucose를 가하여 시작하였고 340 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하여 결정하였다.

Malate dehydrogenase(L-malate: NAD⁺ oxidoreductase; MDH, EC 1.1.1.37)의 활성 측정¹³⁾

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

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

Succinate dehydrogenase의 활성은 주등의 방법¹³⁾에 따라 측정하였다. 반응액(전체 부피 1 ml)의 조성(최종 농도)은 50 mM phosphate buffer(pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04 mM DIPCIP, 20 mM sodium succinate, 여러가지 농도의 GFSE와 효소원이었다. 환원된 DIPCIP의 양은 620 nm에서 측정하여 효소의 활성을 추적하였다.

β-Galactosidase(β-D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23)의 정량¹⁴⁾

GFSE가 세포막에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 세포를 파쇄하지 않고 toluene과 GFSE 존재시에 *E. pyrinus*의 β-galactosidase가 정량되는가의 여부를 살펴보았다. *E. pyrinus*가 β-galactosidase를 가지고 있음은 IPTG와 X-gal을 함유한 배지에서 확인하였다. *E. pyrinus*를 영양배지에 접종한 뒤 30°C에서 12시간 배양한 후 M9 medium으로 옮겨 주고 600 nm에서의 흡광도가 0.5-0.7이 되도록 배양한 다음, 0°C에 방치하여 성장을 억제하였다. 배양액 1.5 ml에 같은 부피의 Z 완충용액(조성: 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0), 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM β-mercaptoethanol)을 가하고, 최종 농도가 3%가 되도록 각각 증류수, toluene, SDS, chloroform을 처리하고, 10초간 세게 흔들어 주었다. Toluene 제거를 위해 37°C에서 40분간 방치하고 28°C로 옮겨 5분간 더 방치한 후, 0.6 ml의 ONPG(o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, 4 mg/ml)를 가하여 주었고 28°C에서 18시간 동안 방치하였다. 1 M Na₂CO₃ 1.5 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후, 원심 분리하고 상등액의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다. 증류수를 넣은 경우를 0으로 하고 toluene을 넣어준 경우를 100으로 하여 GFSE가 세포막에 미치는 영향을 비교하였다.

GFSE로부터 항균 성분의 분리

GFSE에서 항균 성분을 HPLC로 분리하였다. C₁₈ reverse phase column에 GFSE를 주입한 후 처음 10분간 1 ml/min의 속도로 증류수를 흘려 보내 세척한 후 acetonitrile의 농도를 서서히 높혀 주면서(0-100%, 40 min) 용출하였다. 각 fraction을 모아 성장 억제 효과를 조사하였다. 항균 활성이 큰 분획을 UV-spectroscopy와 GC-Mass로 분석하였다.

결과 및 고찰

GFSE가 *Enterobacter pyrinus*의 성장에 미치는 영향

GFSE가 bacteria와 진균류에 대한 항균 작용이 있음은 실험적으로 검토되어 왔다. GFSE의 항균 작용이 특히 주목을 받고 있는 이유는 우선 자연에서 유래된 살균제이므로 무자극성, 무독성, 천연 항균제로서 개발될 가능성이 크며 이미 알려진 몇몇 천연 항균제보다도 탁월한 항균력을 보이기 때문이다. 본 연구에서는 이러한 사실을 기초로 GFSE가 *Enterobacter pyrinus*의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험의 공시균주인 *E. pyrinus*는 1991년 최초로 Chung 등⁽¹⁰⁾이 배나무의 갈색 점무늬병의 병반에서 분리 보고한 균주이다. 배나무의 갈색 점무늬병은 병원균이 아직 밝혀져 있지 않으며, 농가에 피해가 큰 식물병이다. 따라서 *E. pyrinus*가 주원인균일 가능성이 높으며 현재 그에 대한 연구가 진행중이다. 이 *E. pyrinus*를 영양 배지에서 배양하였을 때 Fig. 1에서 보듯이 20시간 배양하면 정지기에 이르렀다. 같은 조건하에서 GFSE가 최종 0.001% 이하의 농도에서는 *E. pyrinus*의 성장에 큰 영향을 주지 못하였다. GFSE 농도 0.01%를

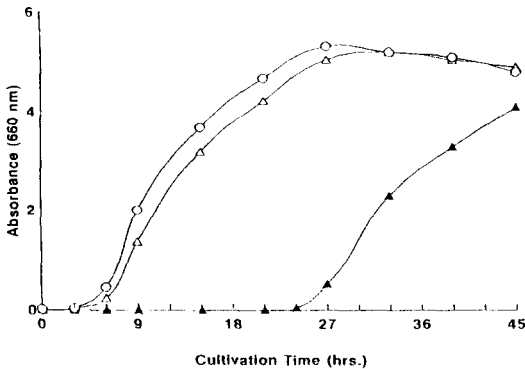


Fig. 1. The effect of grapefruit seed extracts(GFSE) on the growth of *Enterobacter pyrinus*. The cells were cultivated in the nutrient broth(○) containing 0.001% (△) and 0.01%(▲) of GFSE, respectively.

포함한 배지에서는 *E. pyrinus*가 배양 22시간 후까지 전혀 성장하지 못하다가 27시간 후 부터 성장하기 시작하였고, 0.1% 이상의 농도에서는 전혀 성장이 관측되지 않았다. 이러한 결과는 전보⁽⁷⁾에 보고된 바와 일치하며 GFSE에는 항균 성분이 함유되어 있을 뿐 아니라, *Salmonella choleraesuis* 등의 균주에도 효과가 있음을 볼 때 응용 범위가 매우 크다는 것을 알 수 있었다. GFSE는 grapefruit의 종자를 용매로 추출한 물질이므로 과연 어떠한 성분에 의해서 항균 작용이 일어나는가에 대해 아직 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 항균 성분을 알아내기 위한 일차적 작업으로 GFSE를 크게 소수성 분획과 친수성 분획의 두 분획으로 나누었다. 두 분획에 대하여 같은 방법으로 *E. pyrinus*를 배양하였더니 Fig. 2에서와 같이 소수성 분획 0.01%를 함유한 배지에서 GFSE 총추출물에서 관찰한 바와 같은 성장 억제 현상을 관찰 할 수 있었으며, 이와는 달리 같은 농도에서 친수성 분획은 큰 영향을 주지 못하였다. 이 결과로, GFSE에 포함된 항균성분은 친수성 보다는 소수성이 강하다는 것을 알 수 있었다.

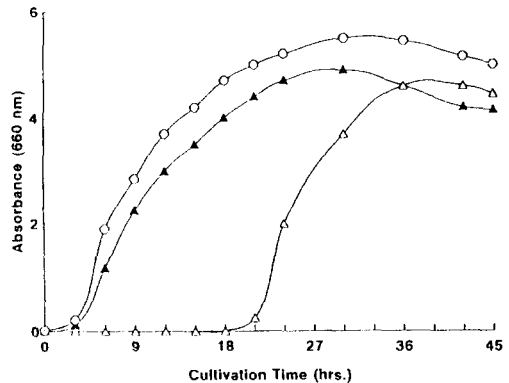


Fig. 2. The effect of grapefruit seed extracts(GFSE) fractions on the growth of *Enterobacter pyrinus*. The cells were cultivated in the nutrient broth(○) containing 0.01% of hydrophobic fraction(△) and hydrophilic fraction(▲) of GFSE, respectively.

Table 1. The effect of GFSE fractions on various metabolic enzymes

	Conc. (%)	G-6-p DH		SDH		MDH		HK	
		Relative activity	Sp. act. (U/mg)	Relative activity	Sp. act. (U/mg)	Relative activity	Sp. act. (U/mg)	Relative activity	Sp. act. (U/mg)
None		100	0.242	100	0.021	100	0.086	100	0.101
Total extracts	0.001	98	0.237	94	0.019	98	0.085	104	0.105
	0.01	95	0.229	90	0.018	106	0.091	100	0.101
Hydrophobic fraction	0.001	106	0.256	97	0.019	99	0.085	109	0.110
	0.01	108	0.261	87	0.017	97	0.083	100	0.101
Hydrophilic fraction	0.001	91	0.221	96	0.019	103	0.089	91	0.092
	0.01	90	0.217	90	0.018	98	0.084	90	0.091

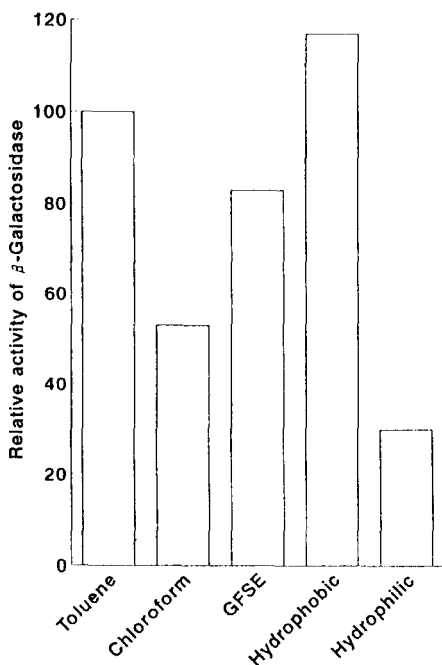


Fig. 3. The effect of GFSE on the membrane perturbation of *Enterobacter pyrinus*. The cells were treated with the reagents including toluene, chloroform, GFSE(0.01%), hydrophobic(0.01%) and hydrophilic(0.01%) fractions of GFSE in the media containing ONPG as substrate for β -galactosidase.

GFSE가 *Enterobacter pyrinus*의 효소 활성에 미치는 영향

GFSE의 미생물에 대한 항균 작용의 방식을 알아 보 고자, 여러가지 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 특히 에너지 대사와 관련된 효소들에 대한 영향을 살펴보기 위하여 여러가지 대사경로에서 주요한 역할을 하는 효소인, hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase와 succinate dehydrogenase를 선택하고 이들 효소에 대한 GFSE의 총추출물, 소수성 및 친수성 분획의 영향을 살펴보았다. 이 중 hexokinase의 활성은 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 이용하여 coupling assay method를 사용하므로, 먼저 glucose 6-phosphate dehydrogenase에 대한 GFSE의 효과를 살펴보았다. Table 1에서 보듯이, GFSE의 총추출물, 소수성 및 친수성 분획은 조사한 효소의 활성에 큰 영향을 주지 못하였다. GFSE가 세포내로 침투하는 가의 여부와는 상관 없이 효소의 활성을 억제하지 못하는 것으로 미루어 보아 세포내 대사를 억제하지는 않을 것으로 사료된다.

GFSE가 *Enterobacter pyrinus*의 세포막에 미치는 영향

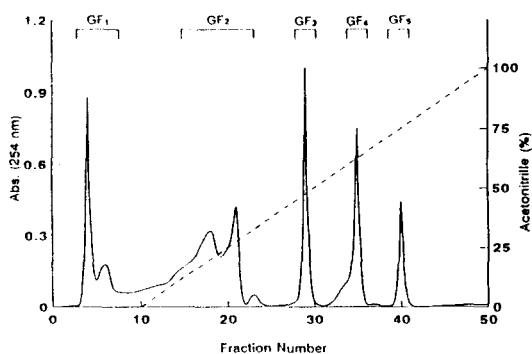


Fig. 4. The separation of active fraction from grapefruit seed extracts by C_{18} reverse phase HPLC. Active fractions were eluted by increasing the concentration of acetonitrile (0-100%), and monitored absorbance at 254 nm.

Table 2. The inhibitory effect of GFSE fractions on the growth of *Enterobacter pyrinus*

Fractions	Absorbance at 660 nm	Relative growth (%)
None	2.50	100
GFSE	0.03	1.2
Hydrophobic fraction	0.02	0.8
Hydrophilic fraction	2.03	81
GF ₁	2.50	100
GF ₂	2.53	101
GF ₃	2.45	98
GF ₄	0.02	0.8
GF ₅	1.25	50

The cells were cultivated in nutrient broth containing 0.01% of GFSE fractions. The aliquots after 12 hours cultivation were taken out for measuring the absorbance at 660 nm.

GFSE를 세포에 처리 하였을 때, 세포막에 영향을 주는가를 알아보기 위하여 GFSE의 존재하에서 *E. pyrinus*의 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. *E. pyrinus*가 β -galactosidase를 생성하는가를 알아보기 위하여 IPTG와 X-gal을 가하여 준 배지에서 배양하여 이를 확인하였다. 세포를 배양한 후, ONPG와 세포 혼합액에 증류수, toluene, sodium dodecyl sulfate(SDS), GFSE 총 추출물, 소수성 및 친수성 분획을 가하여 주었다. 측정하고자 하는 효소 β -galactosidase가 내에 존재하므로 GFSE가 세포막에 영향을 주지 않는다면, 증류수를 가하여 준 대조군에서 처럼 β -galactosidase의 활성을 측정할 수 없고, 이와는 반대로 세포막에 영향을 주어 세포막이 손상을 받아 β -galactosidase가 세포 밖으로 유출이 되면, toluene을 가하여 준 대조군에서 처럼 효소 활성이 검출될 것이다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, 증류수를 가해준 대조군에서의 값을 0으로 하고 toluene을 가하여 준 대조군을 100으로 하였을 때, GFSE의 총

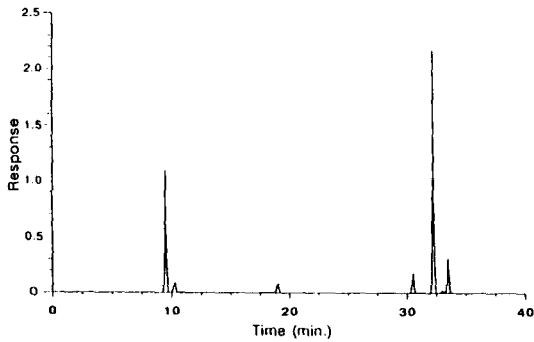


Fig. 5. Gas chromatogram of active fraction (GF4) isolated from grapefruit seed extracts.

추출물의 경우 80%의 활성이 검출되었다. Chloroform을 가하여 세포막을 손상하여 얻은 값이 55%였는데 이를 토대로 보면, GFSE의 총추출물은 chloroform보다 세포막을 더 손상시키는 것으로 판단 되었다. GFSE의 친수성 분획은 30%의 활성을 나타내는데 비하여, 소수성 분획은 toluene을 가하여 준 경우에서 보다 더 높은 값을 보여 120%의 활성이 관측되었다. 이 결과의 양상과 세포 성장 억제 효과(Fig. 1과 2)의 결과는 잘 일치하였으며, GFSE의 항균성분의 작용기작은 에너지 대사등에 영향을 주는 것이기 보다는 세포막에 손상을 주기 때문으로 생각되었다. 이와는 별도의 실험에서 전자현미경적 방법으로 관측하였을 때, 세포막이 손상을 받았다는 실험 결과^(4,6,7)와도 일치한다.

HPLC에 의한 항균성분의 분리

GFSE의 항균기작을 설명하기 위하여 GFSE에 함유된 항균성분이 무엇인지를 알아내고자 이의 분리를 시도하였다. GFSE의 소수성 분획에서 *E. pyrinus*의 성장 억제가 관측되었고, 소수성 분획이 세포막에 손상을 준다는 실험 결과로부터, 항균성분의 소수성 성질을 이용하기 위하여 C₁₈ reverse phase column chromatography를 행하였다. 분리하는 성분을 검출하기 위해서 UV detector를 사용하였고 254 nm에서 측정하였는데, 이는 GFSE가 UV region에서 흡광도를 나타내므로 임의로 선택하였다. Fig. 4에서 보듯이, acetonitrile의 농도를 서서히 올려 주면서 용출시켰을 때 적어도 8개 이상의 분획으로 분리가 일어났고, 특히 소수성 성질이 강할 것으로 추측되는 acetonitrile의 농도가 40% 이상에서 3개의 peak가 뚜렷이 분리됨을 관찰하였다. GFSE의 각 분획을 그림에 표시한 바와 같이 GF₁, GF₂, GF₃, GF₄, GF₅의 5분획으로 구별하여 회수하고 농축하였다. 각 분획이 *E. pyrinus*의 성장에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 이를 배지에 가하여 주고 배양한 결과를 Table 2에 나타내었다. GF₁, GF₂와 GF₃를 첨가한 배지에서는 세포의 성장이 대조군에서와 같이 관찰되었고,

이들 분획에는 항균 성분이 들어 있지 않음을 알 수 있었다. 항균 활성은 GF₄와 GF₅에서 관측되었으며, GF₅에서는 약 50%의 억제가 일어난 반면 GF₄에서는 99% 이상의 억제가 일어나 세포가 거의 성장하지 못하였다. 이와 같은 결과는 GFSE는 적어도 2가지 이상의 소수성을 갖는 항균 성분이 존재한다는 것을 나타내 주며, 특히 GF₄에 함유된 항균 성분이 세포성장 억제 효과가 탁월하다는 것을 알 수 있었다. 항균 성분의 정체를 좀더 구체적으로 알기 위하여 GF₄분획을 GC-Mass로 분석하였다. Fig. 5에서와 같이 GF₄ 분획에는 적어도 6가지 이상의 물질이 혼합되어 있음을 알 수 있었다. Gas chromatography로 분석한 결과, retention time이 9.4분, 10.0분, 18.8분, 30.6분, 31.5분, 32.1분, 33.4분, 33.7분에서 peak가 관찰되었고, 상대적 비는 각각 21%, 0.47%, 0.51%, 1.62%, 72%, 0.24%, 3.13%였다. 이들 각 peak에 대한 mass/charge의 비와 spectrum 양상으로 볼때, 9.4분에서의 peak는 1-chloro-2-methyl-benzene(o-toluene)의 양상과 일치하였다. 10.0분에 나타난 peak의 경우에는 N,N-dimethyl-benzenemethanamine의 양상과 일치하였으며, 30.6분의 peak는 1-[2-(2-ethylethoxy) ethoxy]-4-(1,1,3,3-tetramethyl)-benzene과 그 양상이 일치하였다. 이러한 물질들은 물질의 성질이나 양으로 보아 GF₄의 항균 성분으로 인정하기는 어려웠다. 그외의 peak는 mass/charge 비와 spectrum의 양상으로는 그 물질이 무엇인지 짐작하기 어려웠으며 더욱 정밀한 분석이 요구되었다. 상대적 비가 72%를 차지하는 31.5분의 peak는 GF₄의 대부분을 차지하는 물질로 항균 성분일 가능성이 높고, 또한 새로운 항균 물질로 기대된다. 이를 위하여 물질의 대량 분리 및 정밀한 구조분석에 관한 연구가 절실히 요구되며, 이와같은 지속적인 연구결과는 광범위 항균 제뿐만 아니라, 농수산품 및 그 가공식품의 보존료로서의 개발·활용에 중요한 자료가 될 것으로 전망된다.

요 약

Grapefruit 종자추출물(GFSE)에는 박테리아와 곰팡이류들에 대하여 항균 효과를 갖는 성분이 있다고 알려져 있다. 배나무에 병반에서 분리한 *Enterobacter pyrinus*도 GFSE를 가하여 준 배지에서 생육이 억제되었다. 대조군이 stationary phase로 접어든 배양 20시간까지 GFSE의 최종 농도가 0.01%를 함유한 배지에서 *E. pyrinus*는 전혀 성장하지 못하였다. 항균 성분을 분리하기 위하여 GFSE를 용매추출하여 친수성 분획과 소수성 분획으로 나누었을 때 억제 효과는 소수성 분획에서 관찰되었다. GFSE가 에너지 대사에 관여하는 몇가지 효소에 미치는 영향을 조사하여 본 결과, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase와 succinate dehydrogenase 등에는 별다른 효과를 나타내지 않았다. 세포막에 미치는 영향을 알아보기 위하여 β -galactosidase의 인위적 기질인 ONPG의

분해 여부를 조사한 결과, GFSE는 세포막에 영향을 끼침을 관찰하였다. GFSE의 항균 성분을 분리 확인 하기 위해서 HPLC C_{18} reverse phase column chromatography를 하여 5개의 peak를 얻었으며, 이 중 1개의 분획에서 강한 항균 활성을 검출하였다. 이 분획을 GC-Mass로 사용하여 분석한 결과 1-chloro-2-methyl-benzene(o-chlorotoluene), N,N-dimethyl-benzenemethane-amine, 1-[2-(2-ethylethoxy)ethoxy]-4-(1,1,3,3-tetramethyl)-benzene 이외에 분획의 대부분을 차지하는 1개의 물질을 포함하여, 확인하지 못한 3개의 물질이 있음을 알았으며, GFSE의 항균활성을 보이는 성분은 새로운 물질일 가능성을 시사하였다.

감사의 말

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 깊은 감사를 드리고 아울러, 균주를 분양해 준 경상대학교 미생물학과 정영륜 교수에게도 감사드립니다.

문 헌

1. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 자몽종자추출물이 *Penicillium islandicum* 생육 및 독소성분 skyrin생합성에 미치는 저해효과. 한국농화학회지, 33, 169 (1990)
2. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 수산물에 대한 Grapefruit 종자추출물의 항균 및 항산화 효과. 한국수산학회지, 23, 289 (1990)
3. 최종덕, 서일원, 조성환 : Grapefruit 종자 추출물의 항균성에 관한 연구. 한국수산학회지, 23, 297 (1990)
4. 조성환, 서일원, 전상수, 라택균, 정수근, 강동훈 : 천연 항균성 물질을 이용한 *Vibrio vulnificus*의 살균 및 독소생성 억제효과. 한국식품위생학회지, 7, 99 (1992)
5. 김의연, 정나은, 재대엽, 이동철, 김재원, 조성환, 이상열 : 자몽 추출물로부터 분리된 항균성 chitinase의 특성. 한국식품병리학회지, 10, 277 (1994)
6. 조성환, 김기욱, 정진환, 류중호 : 농축수산물 식품원료 및 그 가공식품에 대한 *Listeria*균주의 오염실태조사와 Listeriosis 발생억제방법. 한국식품위생학회지, 9, 191 (1994)
7. 조성환, 이상열, 김재원, 고경혁, 서일원 : Grapefruit 종자추출물로부터 광범위 항균제 개발 및 응용에 관한 연구 -Grapefruit 종자추출물의 항균력 검색-. 한국식품위생학회지, 10, 33 (1995)
8. Harich, J.: DF-100. U.S. Patent 1,354,818 (1985), FDA No. R-0013982 (1982)
9. Kates, M.: Techniques of Lipidology in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology edited by Work, T.S. and Work, E., North-Holland Publishing company, Amsterdam, Oxford (1972)
10. Chung, Y.R., Benner, D.J., Steigerwalt, A.G., Kim, B.S., Kim, H.T. and Cho, K.Y.: *Enterobacter pyrinus* sp. nov., an organism Associated with Brown Leaf Spot Disease of Pear Trees. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 43, 157 (1993)
11. Lee, C.Y., Langley, C.H. and Burkhart, J.: Purification and molecular weight determination of glucose 6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme from mouse nad drosophila. *J. Anal. Biochem.*, 86, 697 (1978)
12. Bergmeyer, H.U.: Methods of enzymatic Analysis, 2nd English edition, Vol. 1, pp. 222-223, Verlag Chemie, Academic press, Inc. (1974)
13. Joo, C.N. and Han, J.H.: The effect of ginseng saponins on chicken's hepatic mitochondrial succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase. *Korean Biochem. J.*, 9, 43 (1976)
14. Miller, J.H.: Experiments in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972)

(1995년 8월 29일 접수)