

## 자몽종자 추출물(DF-100)이 *Penicillium islandicum* 생육 및 독소 성분 skyrin 생합성에 미치는 저해효과

조 성 환 · 서 일 원\* · 최 종 덕\*\* · 주 인 생

경상대학교 식품공학과, \*(주)아비콘 캐미, \*\*통영수산 전문대학 수산가공학과

**초록:** 곡류 등에 오염되어 황색 독소성분인 skyrin을 생합성하는 *Penicillium islandicum* 배지에 grapefruit 종자로부터 추출한 천연유기 복합물인 DF-100을 처리하여 곰팡이 생육 및 skyrin 생성을 저해하는 효과를 볼 수 있었다. DF-100 500ppm 농도로 *Penicillium islandicum*의 생육을 91% 저해하였고, 750ppm 농도에서 곰팡이 생육을 완전히 저해하였으며 500ppm 농도로 skyrin생성을 완전히 저해하였다.

skyrin 생합성경로를 고려할 때 DF-100은 낮은 농도에서 emodinanthrone으로부터 emodin을 거쳐 skyrin으로 전환되는 효소 반응계와 skyrinanthrone으로 진행되는 반응단계를 저해하는 것으로 밝혀 졌다(1990년 2월 19일 접수, 1990년 5월 25일 수리).

식량이나 사료로 이용되는 곡류에 곰팡이가 오염되면 변질에 따른 경제적 손실을 가져오는 동시에 독소 성분이 생성되면 국민보건 및 가축 위생상의 문제가 될 수 있다.

*Penicillium islandicum*은 쌀에 기생하여 독소물질인 황색색소 skyrin을 생성하여 황변미의 결과를 초래하는 균주이다.

황변미독은 일본에서 1940년대에 문제되었는데 1944년 Gilolo섬의 주둔 병력이 수입쌀에 의하여 중독 증세를 보였고, 그 원인은 오염된 *Penicillium islandicum*에 의한 것으로 밝혀졌다.

1954년 일본으로부터 수입한 쌀 중 많은 양이 곰팡이 오염을 이유로 식량으로의 사용 불가처분이 내려짐으로서 경제적 문제가 제기된 바있고, 1963년 일본에서 병아리 3,000여수가 폐사한 사건의 원인도 오염된 *Penicillium islandicum*의 독소성에 의한 것이었다.

우리나라에서는 1960년 일본으로 3만톤의 쌀을 수출할 때 황변미독을 생성하는 곰팡이가 오염되지 않았다는 보증을 요구하여 정부의 관심사가 된 적이 있다.

이와 같이 황변미 독소성분은 악성종양을 유발하고 RNA합성 및 glycogen분해를 촉진하는 등의 급성 독성 및 조직 병리학적인 결과를 초래한다<sup>1)</sup>.

한편 *Penicillium islandicum*에 의한 황변미 독소성분의 생합성 기작 규명을 위하여 acetate, emodin-

throne, emodin, chrysophanol 및 islandicum 등을 출발 물질로한 생합성 경로를 추적하여 acetate → polyketides → emodin → skyrin의 대사경로를 예상할 수 있었다<sup>2-5)</sup>.

본 연구자도 *Penicillium islandicum*에 의한 황변미 독소 성분 skyrin의 생합성 기작을 연구하여 그 생합성 경로가 emodinanthrone → emodin → skyrin의 과정을 거치는 경우와 emodinanthrone → skyrinanthrone → skyrin으로 진행되는 대사반응을 확인한 바 있다<sup>6)</sup>. 따라서 본 연구에서는 이러한 독소 성분의 저해효과를 기대하기 위하여 곰팡이의 세포벽 합성저해, 균체내 작용효소력 약화 및 RNA/DNA 유전정보 기작을 파괴함으로써 항균 및 항곰팡이력이 강한 것으로 알려진 Grapefruit 종자 추출물(이하 DF-100)<sup>7-9)</sup>을 이용하여 *Penicillium islandicum*의 생육 및 skyrin 생합성 기작을 저해하는 효과를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

### 재료 및 방법

#### DF-100의 조제<sup>7)</sup>

브라질산 자몽을 구입하여 그 과육부를 제거하고 분리한 종자들을 수거하여 물로 세척한 다음, 적외선 장치들이 장치되어 있는 60~70°C의 건조실에서 30~60분 동안 drum-drying을 행하여 건조시킨 자몽의

종자를 5°C 이하의 온도가 유지되는 저온실에서 특정한 milling system으로 80~320mesh 크기로 분쇄하여 건조 분말중자 80%와 추출용매 glycerin 20%의 중량비율로 혼합한 후, 수일간 연속 추출하고 층분리시켜 자몽종자 추출물(Grapefruit seed extract)을 수집하였다. 이와같이 추출조제한 종자 추출물 300 g에 propylene glycol 300 g과 lactic acid 60 g을 교반 용조에 넣고 혼합 교반하여 균질한 용액을 만든 다음, 다시 300 g씩의 propylene glycol 및 자몽 추출물을 교반 용조에 첨가하고 교반, 균질화하는 과정을 3번 더 반복한 후, 균질한 용액이 얻어질 때까지 조성분 혼합물을 50~80rpm의 느린속도로 10분 동안 계속하여 교반한다.

이때 얻어지는 종자 추출물은 자외선이 조사되는 무균실에서 특정온도, 압력, 시간등의 조건하에서 품질관리 방법에 의한 검사를 실시하여 일정한 규격의 제품이 되도록 하여 실험용 시료로 사용하였다.

**균주 배양 및 skyrin의 분리**

전보<sup>6)</sup>에서 분리, 동정하여 malt extract agar slant media에 보관중인 *Penicillium islandicum* NRRL 1175를 skyrin 생합성 균주로 이용하였다. 즉, 곰팡이 균주의 포자가 잘 형성될 때까지 25°C에서 7일 동안 사면 배지상에서 배양하고 형성된 포자를 멸균한 0.01% Tween 80 용액으로 세척해 내어 그 포자현탁액 0.5 ml를 40 μmol의 tritium labeled sodium acetate(1.0×10<sup>6</sup> dpm/μ mol)를 함유한 Czapek-Dox media 200ml에 분주하고 30°C의 암실에서 계속해서 10일간 배양하였다.

이때, 곰팡이의 생육 및 skyrin합성에 미치는 DF-100의 영향을 조사하기 위하여 배양 flask별로 0 (control구), 100, 250, 500, 750, 1,000ppm의 DF-100이 함유되어 있도록 하였다.

배양이 완료된 균체는 증류수로 3번 세척하고 3일간 풍건한 후, Gatenbeck의 방법<sup>4-6)</sup>에 의하여 silica column chromatography를 행하고 skyrin band를 acetone으로 용출하여 TLC plate에 spotting하고 chloroform-methanol-formic acid(2%) (10 : 1 : 1)용액으로 전개시키고 Packard 7220 radioactivity scanner에 걸어 radioactive skyrin band를 확인하였다.

**Skyrin 생합성 과정의 중간대사 산물의 조제<sup>6)</sup>**

1) [<sup>3</sup>H]-emodin의 조제

유리 시험관에 포장되어 있는 [<sup>3</sup>H]-emodin

(Sigma Chemical Co. 제품, 195mci/25mℓ ethanol)의 꼭지를 file로 절단하여 수기에 옮기고 계속 소량의 ethanol로 세척하여 모은 것을 rotary evaporator를 사용하여 증발, 건조하고 실온에서 포화될 때까지 chloroform으로 용해 시킨후, 감압, 증발하여 결정체를 생성시켜 ice box에서 냉각하고 glass filter를 사용하여 여과해서 [<sup>3</sup>H]-emodin을 추가 획득하였다.

2) [<sup>3</sup>H]-emodinanthrone 및 [<sup>3</sup>H]-skyrinanthrone의 조제

이상에서 조제한 [<sup>3</sup>H]-emodin에 CH<sub>3</sub>COOH 및 50% HI를 가한 후 가열하고 감압, 증발하여 [<sup>3</sup>H]-emodinanthrone 결정체를 얻고 이것을 N, N-dimethylformide에 용해시켜 탈기한 후, N<sub>2</sub> gas로 충전하여 조제한 [<sup>3</sup>H]-emodin과 같이 4°C 냉장고에 보관하여 본 실험 기질 물질로 하였다.

[<sup>3</sup>H]-skyrinanthrone도 같은 방법으로 전보<sup>6)</sup>에서 추출 조제한 [<sup>3</sup>H]-skyrin을 정제하고 acetic acid 및 HI를 반응시켜 실험기질 물질로 하였다.

**DF-100의 skyrin 생합성 저해 효과 실험**

DF-100을 각각 500ppm의 농도로 함유하고 있는 Czapek-Dox 액체 배지 200ml에 앞에서 조제한 [<sup>3</sup>H]-labeled sodium acetate, emodinanthrone, emodin 및 skyrinanthrone을 각각 20 μmol(1.0×10<sup>6</sup> dpm/μ mol), 1.3 μmol(1.6×10<sup>5</sup> dpm/μ mol), 1.25 μmol(2.0×10<sup>5</sup> dpm/μ mol) 및 0.44 μmol (4.8×10<sup>5</sup> dpm/μ mol)씩 첨가하고 포자 현탁액 0.5ml를 접종한 후, 30°C의 암실에서 10일간 진탕, 배양하였다. 배양액을 여과해서 균체를 수거하고 증류수로 세척한 다음, 50°C에서 3~4일간 건조시킨 균체를 Soxhlet 장치에서 petroleum ether로 2시간 추출하고 모든 색소가 거의 완전하게 용출될 때까지 acetone으로 계속 추출하여 끓는 water bath에서 증발, 농축 시킨후, silica column chromatography를 행하여 분리되는 대사 생성물을 표준 화합물과 함께 TLC plate 상에 spotting하여 chloroform-methanol-2% formic acid(10 : 1 : 1)의 혼합액을 전개 용매로 전개시켰다. 건조한 TLC plate를 Packard 7220 radioactivity scanner에 걸어 radioactivity를 가진 대사 생성물질의 방사능 곡선을 그려 각 spot를 분리하여 표준화합물과 대조, 확인한 후, 각 부위에 해당하는 TLC plate의 silica gel을 긁어내어

scintillation vial에 넣고 20ml의 scintillation cocktail (Aldrich Chemical Co., U.S.A 제품)을 첨가하여 세계 진탕하고 Beckman scintillation counter(Model LS233)로 각 용액의 radioactivity(cpm)을 측정하였다. 이와 같이 산출한 측정치를 다음 공식에 대입하여 첨가된 emodin(or emodinanthrone)의 total cpm에 대한 skyrin 부분의 회분비를 구하고 대조구(DF-100이 첨가되지 않은 기질 반응계)와 비교, 검토함으로써 DF-100 성분의 skyrin 합성저해 정도를 조사하였다.

$$\text{cpm skyrin} = \frac{\text{Area of skyrin}}{\text{Area of emodin(or emodinanthrone)}} \times \text{cpm } [^3\text{H}] \text{ emodin standard (or } [^3\text{H}] \text{ emodinanthrone)}$$

$$\% \text{ skyrin} = \frac{\text{cpm of skyrin region}}{\text{Total cpm added}} \times 100$$

#### 균체량 측정

배양균주를 일정기간 배양한후 미리 평량된 여과지 Whatman No.1로 배양액을 여과하여 균체를 회수하였다. 여과지와 균체는 80°C에서 48시간 건조하여 균체중량을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### DF-100의 물리, 화학적 특성

일정한 연속 추출과정과 장치에 의하여 추출, 조제된 DF-100의 성상 및 물리화학적 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Physical and chemical properties of grapefruit seed extract (DF-100)

Appearance	Liquid heavy viscous
Color(Gardner)	Lemmon yellow
Specific gravity(d. 25°C)	1.110
Density(1bs/gal)	9.37
pH(25°C)	2.5~3.0
Flash point(°F)	292
Viscosity(centistoke)	134.91
Surface tension average of five(5) readings(dynes/cm <sup>2</sup> )	40.0
Apparent interfacial tension (dynes/cm <sup>2</sup> )	5.0
True corrected interfacial tension(dynes/cm <sup>2</sup> )	4.5

즉, DF-100은 레몬빛 황색의 점도 높은 액체물질로서 약간 쓴맛이 나며 레몬향의 산성 pH용액으로

물, 알콜, 유기산 등에 잘 용해되고 580~585nm에서 최대 흡광도를 보였다.

#### 조제된 반응기질 물질의 특성

구입된 시약으로부터 [<sup>3</sup>H]-emodin결정체를 정제하고 주어진 산화반응식에 의하여 화학처리하여 41.5%의 수량에 해당하는 정제된 [<sup>3</sup>H]-emodinanthrone결정을 얻을 수 있었으며 같은 반응과정을 거쳐 [<sup>3</sup>H]-skyrin으로부터 40.2%의 수량에 해당하는 정제된 [<sup>3</sup>H]-skyrinanthrone을 얻을 수 있었다. 이렇게 정제하여 얻어진 [<sup>3</sup>H]-emodin은 alcohol에 용해되며 알칼리성 용액에 녹아 cherry-red 색깔을 띄우고 융점이 256~257°C 이며 그 IR spectrum은 표준품과 동일하였다.

한편 [<sup>3</sup>H]-emodinanthrone 및 [<sup>3</sup>H]-skyrinanthrone은 각각 N, N-dimethyl formamide에 녹아 황색 및 적황색을 띄우고 모두 염산을 가하면 암자색으로 변하고 융점은 각각 250~255°C 및 270~273°C로 표준품의 값과 일치하는 결정체였다.

#### DF-100의 skyrin 생합성 저해효과

DF-100의 *Penicillium islandicum*의 생육 및 skyrin 생성에 미치는 저해효과는 Table 2와 같다. 즉, DF-100은 500ppm 농도로 *Penicillium islandicum*의 생육을 91% 저해 하였으며 750ppm 농도로 곰팡이생육을 완전히 저해하였다. 또한, 250ppm 농도에서 skyrin의 생성이 83% 저해되었고 500ppm 농도에서는 skyrin의 생성이 완전히 저해되었다. 따라서, DF-100은 500~750 ppm 농도로 *Penicillium islandicum* 생육 및 독소성분 skyrin 생성을 효과적으로 저해함을 알 수 있다.

Table 3의 결과는 500ppm의 DF-100이 acetate, emodinanthrone, emodin 및 skyrinanthrone이 skyrin으로 주입되는데 미치는 영향을 보여 주고 있다. 자몽종자 추출물이 처리되지 않은 배양액 속에서의 [<sup>3</sup>H]-labeled acetate가 skyrin으로 주입되는 현상은 사용된 균주가 정상적인 skyrin 생합성 능력을 가지고 있음을 지적해 주고 있다.

DF-100은 [<sup>3</sup>H]-acetate, emodinanthrone 및 emodin의 skyrin으로의 전환반응을 완전히 저해하였으나 [<sup>3</sup>H]-skyrinanthrone의 skyrin으로의 전환기작에는 전혀 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 전보<sup>9)</sup>에서 *Penicillium islandicum*의 skyrin 생합성 경로는 acetate를 출발 물질로 하여 emodinanthrone을 거쳐 anthraquinone화합물인 emodin으로 산화된 후, dimeriza-

tion반응을 일으켜 skyrin으로 전환된다고 추론하였다.

이와 같은 결과는 Table 3에서 emodinanthrone 및 emodin을 반응기질 물질로 skyrin으로 전환되는 비율이 50.1%, 64.2% 였다는 실험결과에 의해서 확인될 수 있다. 그러나 본 실험의 경우, skyrinanthrone으로부터 skyrin으로 전환되는 비율이 77.3%로 emodinanthrone 및 emodin의 그것보다 높게 나타났다. 따라서 이러한 결과로 미루어 볼 때 emodinanthrone

Table 2. Inhibitory effects of DF-100 on growth and skyrin production in Czapek-Dox broth containing tritium labeled sodium acetate by *Penicillium islandicum* NRRL 1175 after 10 days at 30°C

Treatment (ppm)	Mycelial weight		Skyrin	
	Weight (g)	Inhibition (%)	Radioactivity (10 <sup>4</sup> dpm)	Inhibition (%)
0	2.97	0	13.27	0
100	2.21	26	3.57	74
250	1.53	48	2.26	83
500	0.26	91	NR	100
750	0	100	NR	100
1,000	0	100	NR	100

NR : No radioactivity

Table 3. Incorporation of [<sup>3</sup>H]-labeled sodium acetate, emodinanthrone, emodin, and skyrinanthrone into skyrin by *Penicillium islandicum* treated with 500ppm DF-100

Precursor <sup>a)</sup>	Skyrin	
	Radioactivity (10 <sup>4</sup> dpm)	Incorporation efficiency <sup>b)</sup> (%)
Sodium acetate	7.25	0.36
Sodium acetate + DF-100	NR	-
Emodinanthrone	10.42	50.10
Emodinanthrone + DF-100	NR	-
Emodin	13.54	54.20
Emodin+DF-100	NR	-
Skyrinanthrone	16.33	77.30
Skyrinanthrone	16.48	78.00

a) Amount of [<sup>3</sup>H]-labeled precursors added :

Sodium acetate 20 μ mol (1.0 × 10<sup>6</sup> dpm/μ mol),  
Emodinanthrone 1.3 μ mol (1.6 × 10<sup>5</sup> dpm/μ mol),  
Emodin 1.25 μ mol (2.0 × 10<sup>5</sup> dpm/μ mol) and  
Skyrinanthrone 0.44 μ mol (4.8 × 10<sup>5</sup> dpm/μ mol)

b) NR : No radioactivity

c) Incorporation efficiency (%) =  $\frac{\text{Amount of incorporated skyrin}}{\text{Amount of } [^3\text{H}]\text{-labeled precursors added}} \times 100$

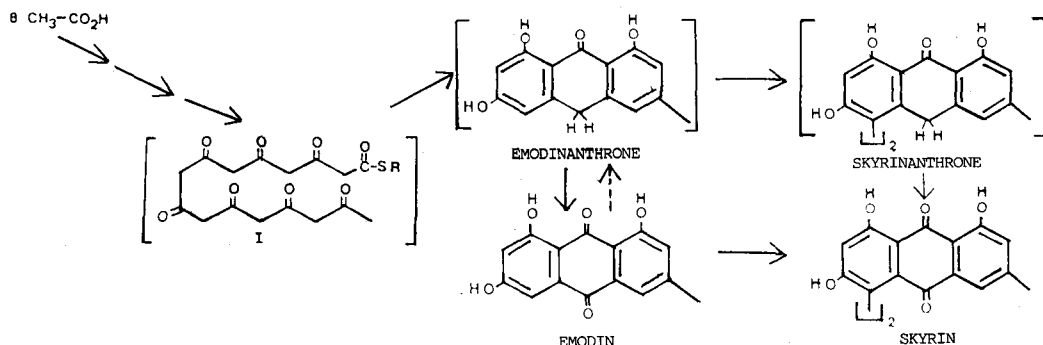


Fig. 1. Biosynthetic pathway of skyrin. Brackets indicate postulated intermediates.

이 산화되어 생성되는 emodin만이 skyrin을 생합성하는 유일한 경로의 중간대사 산물이 아니며 emodinanthrone이 산화되기 앞서 먼저 dimerization 반응을 일으켜 skyrinanthrone을 생합성하고 이것이 다시 산화되어 skyrin으로 전환되는 또 하나의 대사 경로를 예상할 수 있을 것이다.

그러므로, DF-100은 skyrin 생합성 경로중, emodinanthrone → emodin → skyrin으로 진행되는 효소반응계를 저해하며, emodinanthrone → skyrinanthrone → skyrin으로 전환되는 경로에서는 emodinanthrone을 거쳐 skyrinanthrone으로 진행되는 과정중에 저해 단계가 존재함을 지적해 주고 있다.

이상의 결과를 토대로 낮은 농도의 DF-100은 skyrin 생합성 과정에서 특수한 효소반응 단계를 저해하며 skyrin 생합성 중간 대사산물을 축적함을 알 수 있다. 천연 식물 추출물에는 많은 곰팡이 생육 및 mycotoxin 생성을 저해하는 물질이 존재한다고 보고 되어 왔다<sup>10-12)</sup>.

DF-100에도 ascorbic acid, tocopherol, ascorbyl palmitate 등 곰팡이 생육에 영향을 미치는 주요 성분이

함유되어 있다<sup>7)</sup>. 물론, DF-100 각각의 곰팡이 생육 저해기작이 연구되어야 하겠지만, DF-100은 분명히 곰팡이 균주의 성장과 mycotoxin 생합성을 저해하는 물질로서 현재 사용중에 있는 식품 첨가물의 대체품으로서 가능할 수 있으며 다른 식품의 mycotoxin 오염을 방지하기 위한 적용가능성에 관하여는 더 많은 연구가 진행될 필요가 있다고 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Thomson, R.H. : In 'Chemistry and biochemistry of plant pigments', Quinones : Nature, Distribution, and Biosynthesis, Goodwih, T.W.(ed), p. 309, Academic Press, New York (1965)
2. Gatenbeck, S. : Acta Chemica Scandinavica, 12 : 1221 (1958)
3. Sankawa, U., Ebizuka, Y. and Shibata, S. : Tetrahedron Letters, 23 : 2125 (1973)
4. Bouhet, J.C., Choung, P.P.V., Toma, F., Kirszenbaum, M. and Fromageot, P. : J. Agric. Food Chem., 24 (5) : 964 (1976)
5. Ogiyara, Y., Kobayashi, N. and Shibata, S. : Tetrahedron letters, 15 : 1881 (1968)
6. 조성환, 존 에이 앤더슨 : 한국농화학회지, 27(3) : 151 (1984)
7. Harich, J.(Chemie Research & Manufacturing Co., Inc.) : DF-100, U.S. Patent 1,354,818 (1985), FDA No. R-0013982 (1982)
8. Lee, T.E : Efficacy report of DF-100. Conference of genetics & cell biology, University of Malaya, Kuala Lumpur (1987)
9. Aguiar, L.A.B. : IX. Latin American Microbiological Congress, Sao Paulo, Brazil (1983)
10. Codon, P. and Kuc, J. : Phytopathology, 50 : 267 (1960)
11. Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S., and Kurata, H. : Microbiology, 39 (4) : 818 (1980)
12. Bullerman, L.B. : Journal of Food Science, 39 : 1163 (1974)

#### Inhibitory effects of grapefruit seed extract(DF-100) on growth and toxin production of *Penicillium islandicum*

Sung-wan Cho, Il-Won Seo\*, Jong-Duck Choi\*\* and In-Saeng Joo (Dept of Food Technology, Gyeongsang National University, Chinju, \*ABCON CHEMIE Co., Ltd., Seoul, \*\* Dept of Food Technology, National Tongyong Fisheries Technical College, Choongmu)

**Abstract** : The anthraquinone mycotoxin, skyrin, is produced by *Penicillium islandicum*. DF-100 which was extracted from grapefruit seed extract and is a natural organic complex inhibited the biosynthesis of skyrin by *Penicillium islandicum*. This study was carried out to determine the potential of DF-100 to support *Penicillium islandicum* and skyrin production. DF-100 inhibited the growth of the fungus at 750ppm or less and caused complete inhibition of skyrin production at 500ppm or less. DF-100 appears to block the incorporation of emodinathrone into skyrin and an enzymatic step in the skyrin biosynthetic pathway which lies before skyrinanthrone.