

博士學位論文

손바닥 선인장 열매 고분자 점질물을
분해하는 진균의 분리 및 동정



濟州大學校 大學院

食品工學科

許 允 姬

2008 年 2 月

손바닥 선인장 열매 고분자 점질물을
분해하는 진균의 분리 및 동정

指導教授 高 榮 煥

許 允 姬

이 論文을 工學 博士學位 論文으로 提出함

2008年 2月

許允姬의 工學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	姜 永 周	(印)
委 員	河 璉 桓	(印)
委 員	金 昭 美	(印)
委 員	玄 昌 久	(印)
委 員	高 榮 煥	(印)

濟州大學校 大學院

2008年 2月

Isolation and Identification of a Fungus
Degrading Mucilage Polymers from Fruit of
Opuntia ficus-indica var. Saboten

Yoon-Hee Huh

(Supervised by Professor Young Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Doctor of Engineering

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

FEBRUARY, 2008

목 차

List of Figures

List of Tables

Abbreviations

Abstract

I. 서 론	1
II. 연구사	6
1. 손바닥 선인장 열매 점질물	6
2. 손바닥 선인장 열매 색소	9
3. 손바닥 선인장의 효능	11
4. 진균이 생산하는 당분해 효소	13
5. 균주(진균) 동정	14
III. 재료 및 방법	16
1. 재료	16
1) 선인장 열매 점질물 분리	16
2) 균주 분리용 토양시료	16
3) Congo red 용액	17
4) 시판 선인장 열매 동결건조 분말	17
2. 선인장 열매 점질물의 이화학적 특성	18
1) 닌하이드린 시험	18
2) Molisch 시험	18
3) 페놀-황산법에 의한 총당 정량	19
3. 선인장 열매 점질물 분해 균주 및 효소 분리	20
1) 선인장 열매 점질물 분해 균주 분리	20
2) 분리 균주에서 분해효소 생산	22
4. 분리 균주 효소에 의한 선인장 열매 점질물의 분해 확인	23
1) 선인장 열매 점질물 효소 반응	23

2) Thin layer chromatography(TLC) 분석	24
3) High performance liquid chromatography(HPLC) 분석	24
4) Liquid gel permeation chromatography 분석	26
5. 분리 균주 효소 처리한 시판 선인장 열매 동결건조 분말의 항산화활성 변화	27
1) 시판 선인장 열매 동결건조 분말의 항산화 활성 시료	27
2) 총폴리페놀 함량 분석	28
3) 플라보노이드 함량 분석	29
4) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거활성	30
5) Hydroxyl 라디칼 소거 활성	31
6) Hydrogen peroxide 소거 활성	32
7) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 활성	33
6. 분리 균주 동정	34
1) 분리 균주의 형태학적 동정	34
2) Internal transcribed spacer(ITS)-5.8S rDNA sequencing	34
IV 결과 및 고찰	35
1. 선인장 열매 점질물의 이화학적 특성	35
2. 선인장 열매 점질물 분해 미생물 분리	37
3. 분리 균주 효소에 의한 선인장 열매 점질물의 분해 확인	39
1) Thin layer chromatography(TLC) 분석	39
2) High performance liquid chromatography(HPLC) 분석	41
3) Liquid gel permeation chromatography 분석	45
4. 분리 균주 효소 처리한 시판 선인장 열매 동결건조 분말의 항산화활성 변화	47
1) 총폴리페놀과 플라보노이드 함량	47
2) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거활성	49
3) Hydroxyl 라디칼 소거 활성	50
4) Hydrogen peroxide 소거 활성	52

5) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성	53
5. 분리 균주 BX의 동정	55
1) 분리 균주 Bx의 형태학적 동정	55
2) Internal transcribed spacer(ITS) 5.8S rDNA sequencing	58
V 요약	63
참고문헌	65



List of Figures

- Fig. 1. Proposed partial structure for *Opuntia ficus-indica* mucilage.
- Fig. 2. A map of the ribosomal DNA region containing ITS1, ITS2 and the 5.8S rDNA gene. Arrowes indicate the position of the primers used for PCR and sequence analysis.
- Fig. 3. Calibration curve of maltose.
- Fig. 4. HPLC chromatogram of high molecular weight dextran(MW 2.0×10^6).
- Fig. 5. HPLC chromatogram of low molecular weight dextran(MW 1.0×10^4).
- Fig. 6. Calibration curve of gallic acid.
- Fig. 7. Calibration curve of naringin.
- Fig. 8. Fungal isolate Bx on M9 agar medium containing mucilage as the sole carbon source and congo red.
- Fig. 9. Thin layer chromatogram of prickly pear mucilage and its degradation products.
- Fig. 10. HPLC chromatograms of the mucilage before or after fungal enzyme treatment.

Fig. 11. Liquid gel permeation chromatograms on Sephadex G-100 of the mucilage before or after fungal enzyme treatment.

Fig. 12. Phenol and flavonoid contents from fruit of *Opuntia ficus indica* var. saboten.

Fig. 13. Microscopic morphology of the fungal isolate Bx(x400).

Fig. 14. Dendogram of the ITS-5.8S rDNA region sequences of 11 *Pestalotiopsis* strains showing the phylogenetic relationship of the fungus Bx with reference taxa.

Fig. 15. The nucleotide sequences alignment of internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene from the fungal isolate Bx and *Pestalotiopsis aquatica* (Pa).

List of Tables

Table 1. Molecular weight, sugar and uronic acid composition of *Opuntia* mucilage

Table 2. Composition of M9 agar medium containing mucilage from prickly pears as the sole carbon source and congo red

Table 3. Composition of M9 broth medium containing mucilage from prickly pears as the sole carbon source

Table 4. Analysis condition by HPLC

Table 5. Chemical properties of prickly fruit mucilage

Table 6. DPPH radical scavenging activities of prickly fruit extract

Table 7. Hydroxyl radical scavenging activities of prickly fruit extract

Table 8. Hydrogen peroxide scavenging activities of prickly fruit extract

Table 9. The ACE inhibitory activities of prickly fruit extract

Table 10. Cultural characteristics of fungal isolate Bx on media

Abbreviations

ABTS : 2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)
ACE : Angiotensin Converting Enzyme
AV : Acid Value
BHA : Butylated Hydroxyanisol
CDA : Czapek-Dox Agar
CMCase : Carboxy Methyl Cellulase
COD : Chemical Oxygen Demand
DMSO : Dimethyl Sulfoxide
DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EDTA : Ethylenediaminetetra Acetic Acid
HDL Cholesterol : High Density Lipoprotein Cholesterol
HHL : Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
ITS : Internal Transcribed Spacer
KCCM : Korean Culture Center of Microorganisms
LDL Cholesterol : Low Density Lipoprotein Cholesterol
MEA : Malto Extract Agar
NCBI : National Center for Biotechnology Information
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDA : Potato Dextrose Agar
POV : Peroxide Value
PY-CMC : Peptone Yeast extract Carboxy Methyl Cellulose
qPCR : Quantification Polymerase Chain Reaction
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDA : Sauboraud Dextrose Agar

SOD : Superoxide Dismutase

TBA : Thiobarbituric Acid

TCA : Trichloroacetic Acid

TLC : Thin Layer Chromatography

YMA : Yeast extract Malt extract Agar



Abstract

The prickly fruit of *Opuntia ficus-indica* cultivated in JeJu Island is rich with high molecular weight mucilage, which has high viscosity and hinders its use in food industry. A fungus that produced the mucilage-degrading enzyme was isolated and identified in this study.

From prickly pears viscous mucilage was extracted and purified. Carbohydrates were detected in the mucilage preparations by the Molisch method and its total sugar concentration by the phenol-sulfuric acid method using maltose as a standard was 64.85 mg/mL in 0.5% aqueous solution. Ninhydrin-positive reaction was observed in 0.5% aqueous mucilage solution and our results showed that the mucilage preparations have amino acids or peptides.

Many strains of fungi isolated from soil were grown on M9 medium containing congo red using the mucilage as the sole carbon source and the fungus with the best decolorizing ability of congo red was selected. Its pure culture was obtained through repeated subculturing on M9 medium containing the mucilage as the sole carbon source and symbol Bx was assigned to the purified fungal strain. Crude enzyme was prepared from culture filtrate of the fungus Bx.

To confirm the fungal enzymatic degradation of the mucilage, analysis by TLC, HPLC and liquid gel permeation chromatography were carried out. The degradation products at R_f 0.19 was observed by TLC of solution after incubation of the mucilage with fungal crude enzyme. All mucilage solution, fungal enzyme preparation and solution after incubation

of the mucilage with heat-inactivated crude enzyme showed no degradation product. The spot at R_f 0.19 clearly showed that mucilage was degraded by the fungal enzyme. When the degradation products were tested for its coloring reaction with ninhydrin or phenol-sulfuric acid as a spray reagent, only phenol sulfuric acid made brown color development. This coloring reaction suggested the presence of carbohydrates without amino acids or peptides within degradation products of the mucilage.

Analysis by HPLC of the mucilage after incubation with fungal crude enzyme showed that high molecular weight fractions (molecular weight 2×10^6) shifted to low molecular weight fractions (less than molecular weight 1×10^4).

Analysis by gel permeation chromatography on Sephadex G-100 also showed molecular weight decreased of the mucilage resulting from incubation with fungal culture filtrate.

These results showed that high molecular weight mucilage fractions were degraded by the crude enzyme from the fungus Bx.

To test whether the crude enzyme from the fungus Bx influences on antioxidative activity of prickly pear, total polyphenol contents, flavonoid contents, DPPH radical scavenging activity, hydroxy radical scavenging activity, hydrogen peroxide scavenging activity, ACE inhibition activity were investigated. Both contents of polyphenol and flavonoid in prickly pear extract after incubation with fungal crude enzyme were higher than those without incubation with fungal crude enzyme. Both hydrogen peroxide scavenging activity and ACE inhibition activity of the extract increased through preincubation of prickly pear with the crude enzyme.

Fungus Bx on microscope ($\times 400$) was filamentous and had fusiform spore. The spores of fungus Bx were scattered or gregarious, with two

or more apical appendages and consisted of 2–several layers of brown. The ITS regions of 5.8S rDNA sequences from the isolate fungus Bx showed higher similarity than 99% to those of *Pestalotiopsis aquatica*. This could be the first report concerning the isolate and identification of a microorganism degrading high molecular weight mucilage from prickly fruit of *O. ficus-indica*.



I. 서 론

선인장은 건조한 기후에 적응력이 뛰어난 식물로 오랫동안 탄수화물과 비타민의 공급원으로 이용되어 왔으며, 식수난과 식량난을 겪고 있는 사막 여러 국가에서는 식품으로서의 가치를 인정받고 있어 재배가 권장되고 있다. *Opuntia*속 선인장은 대부분 야생에서 자라지만, 멕시코, 칠레, 아르헨티나, 미국에서는 상업적인 재배를 하고 있다(1). *Opuntia*속 선인장은 가지 있는 배(prickly pears) 또는 노팔(nopal) 등으로 불리는 *Platyopuntia*와 출라(cholla)라 불리는 *Cylindropuntia*의 두 그룹이 있으며, *O. compressa*, *O. arenaria*, *O. fragilis*, *O. ficus-indica*, *O. streptacantha*, *O. leucotracha* 등을 포함하는 300여종 이상의 품종이 있다(2).

손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)은 *Platyopuntia* 그룹에 속하며 일명 prickly pear라 하고, 다년생 식물로 멕시코가 원산지이며, 우리나라에는 약 200년 전에 들어와 제주도 월령마을과 마라도 남쪽 해변 산지에 자연 상태로 착생되어 제주도 지방 기념물 제 35호로 지정되어 있다. 현재는 월령지역을 중심으로 노지에서 재배되고 있으며, 열매는 서양배 모양으로 식용할 수 있고 다량의 점질물과 적색계 색소를 함유하고 있다(3,4). 손바닥 선인장(이하 선인장이라 칭함)은 제주도에선 밭작물 재배가 어려운 척박지에서도 잘 자라며 병충해에 의한 피해가 거의 없어 농약과 비료를 사용하지 않아 청정재배가 가능하며 수확기간이 길어 노동력이 분산되어 타작물과 경합이 적은 작물이다(5). 제주도에선 선인장을 경제적인 목적으로 재배한 것은 1991년도이며, 초기 고소득 작물로 인식되어 1998년에는 재배면적이 322.8 ha(생산량 1,884.5톤)까지 증가하였으나 1999년(생산량 2,325톤) 과잉생산으로 가격이 폭락함에 따라 농가자체 폐원으로 2000년에는 면적이 199.7 ha(생산량 2,995톤)로 급격히 감소하였다. 그러나 생산량은 선인장이 성목이 됨으로 인하여 2003년 생산량인 4,000톤(재배면적 199 ha)을 유지할 것으로 판단된다. 현재 선인장은 4,000톤이나 생산되고 있지만 선인장 열매 공급량에 비해 수요가 많지 않아 가격이 낮게 형성되고,

생산된 물량을 처리할 수 있는 대형판로를 개척하지 못해 생산농가들이 처리 난을 겪고 있다(5).

선인장 줄기 또는 열매를 갈아 마시면 변비치료, 이뇨효과, 장운동의 활성화 및 식욕증진의 효능이 있고, 선인장 줄기는 피부질환, 류마치스 및 화상치료에 효과가 있다는 것이 구전되어 오고 있다(6). 또한 본초강목(7)에 의하면 기관지천식, 해수기침, 폐질환, 위염, 변비, 장염, 신장염, 고혈압, 당뇨, 심장병, 신경통, 관절염 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 중약대사전(8)에는 신경성 통증을 치료하고 건위, 자양강장제, 해열진정제, 소염해독, 급성유선염, 이질을 치료하는데 이용하며, 피를 맑게하고 하혈을 치료하는 목적으로 이용되는 것으로 알려져 있다.

선인장 열매(prickly pear)는 14.5%의 고형분 함량을 가지고 있으며, 0.21%의 단백질(N×6.25), 0.12%의 지방, 0.02%의 조섬유, 0.44%의 회분, 0.19%의 pectin 그리고 미량의 비타민 A와 C 이외에도 여러 종류의 무기질 들을 포함하고 있다고 하였다(1). 총폐놀 함량은 씨의 경우 1.47%, 줄기 1.86-1.85%, 열매 3.4-4.9% 함유되어 있고, 선인장 씨의 주요 유리당은 sucrose로 전체 유리당의 83.2%를 차지하였으며, 줄기는 fructose, sucrose, glucose로 전체의 40.8%, 31.8%, 25.7%이고 점질 다당류의 구성분인 mannose는 180 mg%로 전체 유리당의 1.7%를 차지하였고 열매의 경우 주요 유리당은 sucrose, fructose, glucose로 각각 68.7, 18.0, 12.8%를 차지하였으며, 점질다당류의 구성분인 mannose는 약 208 mg%로 전체 유리당의 0.5%를 차지하였다고 보고 되었다(9,10). 선인장 주성분은 가용성 무질소물이고, 총무기질 함량은 선인장 줄기, 열매와 씨가 각각 9,400.8, 6,151.2와 1,096.8 mg%이고 주요 무기질은 Cu, P, Mg이며, 주요 유리아미노산이 열매에는 tyrosine, proline, arginine이, 줄기에는 glycine과 arginine이 그리고 종자에는 함황아미노산이 풍부하여 methionine과 cystine은 FAO/WHO 권장량의 2배를 함유하였고 glutamic acid와 arginine이 들어 있다고 보고 되었다(9,11).

*Opuntia*속 선인장 종자는 총지질의 87.0%가 중성지질이었고, 펄프유에서는 총지질의 52.9%가 당지질과 인지질이었고 종자와 펄프 중에는 linoleic acid, palmitic acid, oleic acid 순으로 지방산이 함유되어 있었고 linoleic acid 함량

은 70%이상으로 불포화지방산 함량이 높았다. 또 *Opuntia*속 선인장은 비타민 E와 sterol의 좋은 급원이 되며 β -sitosterol, campesterol이 주요 sterol이었고, α -tocopherol이 비타민 E 중의 80%를 차지한다고 보고 되었다(11,12).

*O. ficus-indica*의 점질물은 arbinose, rhamnose, galactose, xylose로 이루어져 약 55개의 당 잔기를 갖는 중성 다당류라고 하였고(13), 점질물이 L-arabinose, D-xylose, D-galactose, L-rhamnose, D-galacturonic acid를 각각 44.04, 22.13, 20.43, 7.02, 6.38(wt%) 함유하고 있는 중성 글루칸, 당단백질과 산성 다당류의 혼합물이고 주요당은 arabinose라고도 보고 되었다(14,15).

선인장 열매의 적색 색소는 betalaine으로 알려져 있는데, betalaine은 주로 적색 beet와 prickly pear의 꽃, 열매, 잎에 있는 세포의 액포에 존재하며, 천연 적색 색소인 betalaine은 적색의 betacyanine과 황색의 betaxanthine으로 분류된다. 적색 beet에 함유된 betacyanine의 75-95%를 차지하는 betanine의 적색은 pH 3.0과 pH 7.0사이에서 유지되고, 최대흡수 파장은 537-538 nm이며, pH 3이하에서는 보라색을 띠고, 최대 흡수파장이 단파장영역으로 이동된다고 보고 되었다(16).

*Opuntia*속 선인장 성분으로는 anhalinin, mescaline, indicaxathin, isobetatin, betatin, saponin, galactin 및 alkaloid 등이 보고 되었고(17), flavonoid계 성분으로는 isorhamnetin, quercetin, kaempferol 등이 보고 되었으며(18), 선인장 열매에서 2종의 dihydroflavonol 성분인 (+)-trans-dihydrokaempferol과 (+)-trans-dihydroquercetin이 보고 되었다(19). 선인장 꽃에는 isorhamnetin이 선인장과 식물에는 flavonol 3-O-glycosides(quercetin, kaempferol, isorhamnetin), dihydroflavonols, flavonones, flavanonols이 함유되어 있다고 보고 되었다(20-24). 또한 선인장에는 quercetin, kaempferol, isorhamnetin, ascorbic acid, carotenoid의 항산화물질이 존재하여 항산화 활성이 있음이 보고 되었다(25).

손바닥 선인장 부위별 생리기능 연구에 의하면 열매와 줄기 부위는 혈당강화제 및 케양치료효과가 있으며, 열매는 고지혈증에 효과적이고, 줄기 부위는 항알러지 효과, 항염증효과가 탁월한 것으로 알려져 있는데 이는 항염증제로 작용하

는 β -sitosterol이라는 물질이 함유되었기 때문으로 보고 되었다(26-31).

손바닥 선인장 가공에 대한 외국의 경우들을 살펴보면, 멕시코에서는 손바닥 선인장의 줄기인 nopalitos가 신선한 야채로 이용되고 또한 이를 이용하여 피클, 샐러드용 가공식품이 생산되며, 열매를 이용하여 colonch라는 알코올성 음료가 생산되고, 주스, 농축물, 잼, 젤리로 가공되고 있다. 미국에서는 15개의 가공업체에서 손바닥선인장 줄기를 길게 자른 것이나 깎두기 형태로 자른 것을 식초에 담그거나 다양한 샐러드를 만들어 팔고 있고, 이스라엘에서는 아이스크림으로 가공되고 있다(5). 남아메리카와 일본의 후쿠오카 지방에서는 선인장이 고유 특산품으로 자리를 잡고 있으며, 후쿠오카의 미야자키 현에 있는 선인장 농원에서는 10여종의 가공식품이 시판되고 있고 20여 가지 이상의 즉석식품(fast food)이 판매되고 있다(10).

이와 같이 외국에서는 다양한 선인장 가공품들이 생산되고 있으나 국내에서는 제주지역을 중심으로 선인장 청차, 열매 분말, 초콜릿, 비누와 같은 가공품에 한정되어 있어 제품의 다양성과 고급성이 요구되고 있다. 최근에 선인장 열매가 잼, 주스 및 초콜릿 등 식품가공소재로 활용방안이 연구되고 있으며, 알코올음료, 젯산발효음료 등 발효음료 제조를 위한 소재로 활용이 시도되고 있으나 본격적인 제품생산이나 판매가 다양하게 이루어지지 않고 있다. 따라서 유용한 색소성분과 점질물을 다량 함유하는 선인장 열매는 생리활성을 갖는 기능성 소재임에도 불구하고 식품소재로의 이용은 제한적이며, 특히 산업적 이용이 미비한 실정이다(32). 과일 생산되는 선인장의 소비를 위해서는 식품소재로서의 선인장이 이용에 용이해야 하며 다양한 이용방법 개발이 요구된다.

제주도에서 자생하는 선인장 열매는 구전해 오는 약리효과 뿐만 아니라 항산화 성분, 천연의 붉은 색소, 점질물 등의 기능성 성분을 가지고 있음에도 불구하고 점질물이 갖는 높은 점도 때문 식품 가공 산업에 있어서 제약이 되고 있다. 또한 선인장에 대한 성분, 항산화 활성, 생리활성 효과에 대한 연구들은 많이 이루어져 왔으나 점질물의 분해에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 그러므로 선인장 열매 점질물을 생분해하여 식품가공 적성을 높이고, 식품 가공소재로서의 이용성을 확대시키는데 본 연구의 목적을 두었다.

따라서 본 연구는 토양으로부터 손바닥 선인장 열매 점질물을 분해하는 곰팡

이를 분리하여 동정 하였고, 점질물 분해 확인을 위하여 TLC, HPLC, liquid gel permeation chromatography 분석을 하였으며, 현재 식품가공소재로 사용되는 손바닥 선인장 열매 동결건조 분말에 효소를 처리하여 항산화 활성의 변화를 확인하였다. 분리된 곰팡이의 동정은 형태학적 동정과 internal transcribed spacer(ITS) 5.8S rDNA sequencing 분석을 하였다.



II. 연구사

1. 손바닥 선인장 열매 점질물

선인장 점질물은 arabinose, galactose, galacturonic acid, rhamnose, xylose 등의 단당류 30,000개로 이루어져 있는 식이 섬유소의 일종으로 복합 다당류이다(14, 33-36). 점질물 구성당은 추출방법에 따라 달라서 galactose, rhamnose, arabinose, xylose로 이루어져 있거나(37), galactose, rhamnose, arabinose, uronic acid로 구성되어 있다고 보고 되었다.(38,39). 또한 점질물은 arabinose 24.6-42.0%, galactose 21.0-40.1%, galacturonic acid 8.0-12.7%, rhamnose 7.0-13.1%, xylose 22.0-22.2%로 구성되어 있다고 보고 되었다(40,41). 껍질 벗긴 선인장 점질물의 조성은 L-arabinose, D-galactose, D-xylose, 19.4%의 uronic acid로 이루어져 있고(42) 선인장 열매 점질물의 GLC분석결과 23.4%의 galacturonic acid와 arabinose, rhamnose, xylose, galactose가 각각 1.0:1.7:2.5:4.1로 함유되어 있다고 하였고(43), 열매 껍질에서 분리한 점질물에는 galacturonic acid(64%)의 함량이 많았다고 보고 되었다(44).

점질물의 분자량은 Cárdenas 등(45)은 3×10^6 , Trachtenberg와 Mayer(40)는 4.3×10^6 , Trachtenberg와 Mayer(35)는 1.56×10^6 이었고, Medina-Torres 등(15)에 의해 분리된 점질물은 2.3×10^4 으로 보고하여, 추출 분리 방법에 따라 분자량에 차이를 나타내었다(Table 1).

Table 1. Molecular weight, sugar and uronic acid composition of *Opuntia* mucilage

Author	MW	Galactose	Rhamnose	Arabinose	Xylose	Uronic acid	Galactose /Arbinose
Paulsen and Lund(14)		+	+	+	+	+	2.3/3
McGarvie and Parolis (33)		+		+	+		1.5/3
McGarvie and Parolis (34)		+	+	+	+	+	
Trachtenberg and Mayer(35)	1.56×10 ⁶						
Saag et al.(36)		+	+	+	+	+	3.5/3
Goycoolea et al.(37)		+	+	+	+		2/3
Sáenz and Sepúlveda (38)		+	+	+		+	
Sáenz et al.(39)		+	+	+		+	
Trachtenberg and Mayer(40)	4.3×10 ⁶	+	+	+	+	+	4.9/3
Nobel et al. (41)		+	+	+	+	+	
Majdoub et al. (42)		+		+	+	+	3/1
Mastuhiro et al.(43)		+	+	+	+	+	
Cárdonas et al.(45)	3×10 ⁶						

선인장 점질물은 분지가 많은 다당류 구조로 α-D-galacturonic acid가 β-L-rhamnose에 1→2결합된 골격에 치환체로서 L-arabinose와 D-xylose를 대신하는 galactose 소당류의 C-4에 1→4결합으로 분지구조를 가지고 있다고 보고 되었다(Fig. 1)(33). 그리고 선인장 표면에는 잔기로서 α-1→5-L-arabinan과 β-1→4-galactan을 가지는 α-D-galacturonic acid에 1→4 결합한 α-L-rhamnose의 골격구조를 갖는 펙틴성 다당류가 있음이 보고 되었다(46). 선인장 열매 종자 알칼리 추출물에서는 hemicellulose의 다당류가 2종의 xylan으

로 분리되었는데, 하나는 fucosylglucuronoxylan으로 xylopyranosyl기의 O-2와 O-3에 α -결합된 4-O-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid와 fucopyranosyl기가 결합된 직쇄상의 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl기로 이루어져 있고, 다른 하나는 물에 불용성인 xylan으로 직쇄상의 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl기로 이루어져 있다고 보고 되었다(46). Xylan은 D-xylose와 4-O-methyl- α -D-GlcA의 비가 11:1에서 65:1로 다양한데 수용성인 것은 xylose함량이 적고, 물에 불용성인 것은 xylose함량이 18-65%로 많다고 보고 되었다(47).

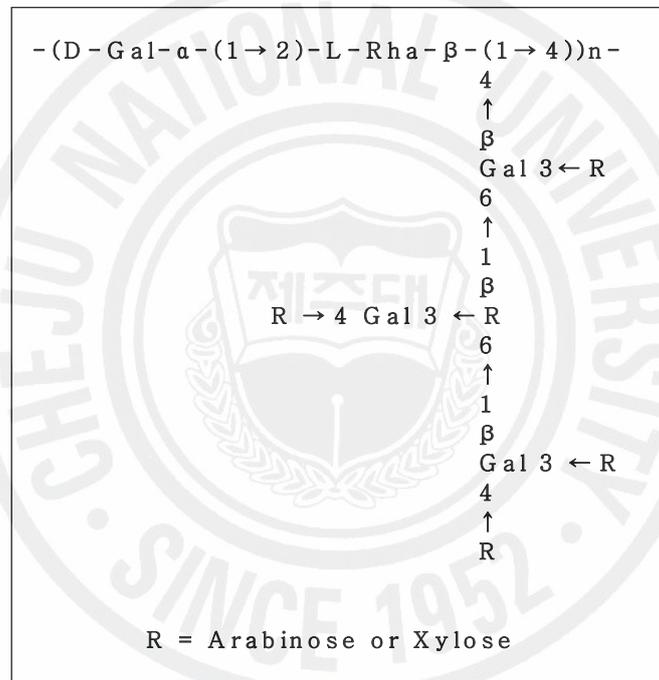


Fig. 1. Proposed partial structure for the *Opuntia ficus-indica* mucilage.

다당류는 식품의 기능성을 증진시켜 주므로 식품산업에 많이 이용되어왔다. 점질물은 일부 식이 섬유를 함유하는 다당류이며 이런 이유로 식품 산업뿐만 아니라 다른 산업에서도 첨가물로서 좋은 전망을 가지고 있다(48). 선인장 열매에서 분리된 점질물 추출액은 열에 안정하며, 산성조건(pH 4)에서 적색색소의 안정성 및 물성을 유지하는 다당류를 함유하고 있다고 하였다(49). 선인장 점질물은 식

품산업에서 거품을 안정화시키고, 유화액을 안정화시키며, 결정을 조절하는데 사용되고, 현탁액 안정제, 식용필름으로 이용된다고 보고 되었다(50).

선인장 점질물의 겔 형성능은 pH와 Ca^{2+} 에 따라 달라져 Ca^{2+} 가 존재하면 겔이 단단해지고, Ca^{2+} 가 없으면 겔이 헐거워진다고 보고 되었다(51). *k*-carageenan/mucilage gum(손바닥 선인장)의 80/20 혼합물은 겔 강도가 높아지고, 점질물 농도가 증가할수록 변형률(strain)과 응력(stress)은 증가하고, 파단 변형률(rupture strain)은 감소하여 점질물의 농도에 따라 레올로지 특성이 달라진다고 하였다(52,53). 점질물 수용액은 비뉴턴 유체의 흐름을 갖고, pH가 산성에서 알칼리성으로 변할수록 점도가 증가하였고, 전단 응력(shear stress)이 일정할 때 점질물 농도가 증가할수록 응력은 감소하였다. 3%이하의 낮은 점질물 농도에서는 묽은 용액과 같았으나 농도가 증가함에 따라 약한 gel 용액과 같았고 polyisobutylene과 같은 점탄성을 나타내었다고 하였다(54).

선인장 점질물은 또한 멕시코나 칠레에서 물 정화제와 석회 접착제로 사용되고 있는데, 특히 물을 정화하는데 있어 aluminum sulfate와 비슷한 양상을 나타내며, COD(Chemical Oxygen Demand)를 감소시키고, Fe, Al, Mn과 같은 금속과 물에서 나는 이취를 감소시킨다고 보고 되었다(55).

2. 손바닥 선인장 열매 색소

선인장 열매 적색 색소는 천연의 것으로 식품 조리에 많이 응용이 되어지고 있다. 그러나 식품산업에서는 색소안정성이 낮아 변색이 잘 되는 단점으로 인하여 그 이용성이 적다고 할 수 있다.

손바닥 선인장 열매 색소인 betalaine은 flavan-3,4-diol이 anthocyanidin으로 전환되지 않고 적색의 betacyanine과 황색의 betaxanthine으로 생성되고, 수용성의 질소를 함유하는 색소로서 빛과 산소의 존재하의 알칼리 용액에서는 아주 불안정하며, 용액상태에서 이 색소는 pH에 따라 양이온 또는 음이온으로 존재한다(56). Betacyanine은 75-95%의 betanine과 그의 유도체인 isobetanine, phyllocactine, isophyllocactine으로 구성되어 있고(57), betanine은 pH, 온도,

산소, 빛, 수분활성도 등의 영향을 받는다.

Betanine은 열에 약하여 betalamic acid와 cyclodopa 5-o-glucoside로 분해되며 저온에서 빛에 노출되면 안정성이 크게 저하되나 높은 온도에서는 열분해로 인하여 빛의 노출은 중요하게 작용하지 않는다. 열안정성은 pH 5-6에서 가장 좋았고, 산소의 영향을 받아 산소 존재 하에서는 열안정성이 크게 감소한다고 보고 되었다(58). Betanine은 수분활성도를 1.0에서 0.37로 낮추었을 때 75℃에서 안정성이 증가하여 반감기가 4배로 증가하며 수분활성도가 감소함에 따라 안정성이 증가하였고(59), 수분활성도(a_w)가 0.5이하에서는 betanine의 안정성이 증가된다고 보고 되었다(60). 산소가 있는 조건에서 betanine은 pH 4-5에서 색소 안정성이 가장 높았으나, 산소가 없는 상태에서는 pH 3-7 모든 영역에서 안정성을 나타낸다고 보고 되었다(61). 그리고 선인장 열매 적색 색소는 pH 4.2에서 가장 안정하였고, 알칼리로 갈수록 쉽게 변색되었으며, 70℃까지 열처리에서 색소 안정성 및 물성이 유지된다고 보고 되었다(49). Betacyanine은 536-538 nm에서 최대 흡광도를 나타내었고 90℃에서 열처리 시간이 경과될수록 최대흡수파장이 자외선 영역으로 이동하였으며, 열처리시 온도증가에 따라 반감기가 감소하여 열안정성이 감소하였으나, propyl gallate, L-cysteine, ascorbic acid 첨가시 농도가 증가함에 따라 항산화효과가 증가한다고 보고 되었다(3). 선인장 열매 색소는 50℃이하에서는 색소 안정성이 있었으나 70℃ 이상에서는 안정성이 저하되었고, Fe, Ca, Sn 이온을 각각 100 ppm 첨가하여 pH 5로 조정하고 4주간 저장성 실험을 한 결과 Ca과 Sn은 아무런 변화가 없었지만 Fe이온은 색소 안정성을 저하시켰다. 그리고 선인장 색소에 100 ppm, 500 ppm의 phosphoric acid, citric acid, ascorbic acid를 첨가하여 4주간 저장성 시험을 한 결과 citric acid와 ascorbic acid 첨가군에서는 색소의 변화가 없었으나 phosphoric acid는 100 ppm에서 3주 후에 색소 안정성을 크게 저하시켰다고 보고 되었다(62). 페놀이나 sulfur기를 함유하지 않는 항산화제는 betanine 색소 안정성에 영향을 미치지 않았으며, ascorbic acid와 isoascorbic acid는 betanine의 산화 안정성에 효과적이거나, ascorbic acid나 isoascorbic acid의 차이는 거의 없었다. 또한 citric acid와 ascorbic acid를 혼합 사용하였을 때에도 ascorbic acid의 단독 사용하였을 때와 비교하여 산화 안정성에 차이가 없었다고 보고 되었다(63).

유기산 중 lactic acid(100 ppm), acetic acid(5.9%)는 betanine 안정성에 효과가 없었고, 금속이온 중 Cu^{2+} 가 Fe^{3+} 보다 betanine 분해를 가속화시켰으나, citric acid(10,000 ppm)와 EDTA(10,000 ppm)는 반감기를 1.5배 증가시켜 betanine안정성에 효과가 있다고 보고 되었다(64).

3. 손바닥 선인장의 효능

손바닥 선인장 추출물은 *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* O-157 균주들에 대하여 항균활성을 보였고, 수소공여능을 나타내었으며, linoleic acid에 대한 항산화활성을 나타내었다고 보고 되었다(65). 선인장 열매 아세톤 추출물과 클로로포름 추출물이 *E. coli*, *Staphylococcus aureus*에 대해 항균효과를 나타내었고(66), 에탄올, 메탄올 추출물이 항산화 활성과 항균활성이 우수하며, 항균활성은 그람양성균에 효과적이고 용매 분획물 중에는 ethyl acetate 분획이 효과가 가장 크다고 보고 되었다(25). 손바닥 선인장 산 가수분해 추출분획물이 항균효과가 뛰어나 기존의 보존제인 sodium benzoate보다 항균효과가 높아 천연보존제로서의 이용가능성이 보고되었고(67), 또 손바닥 선인장 발효물은 양식넙치에서 항균 효과를 나타낸다고 보고 되었다(68). 천년초 선인장(*Opuntia humifusa*)의 ethyl acetate 추출물은 병원성 식중독 미생물인 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*에 동량의 benzoic acid보다 월등한 항균효과를 나타내었다고 보고 되었고(69), 선인장(*Opuntia streptacantha*)은 DNA virus와 RNA virus인 herpes simplex(단순포진) virus, equine herpes(말포진) virus, pseudorabies(가성 광견병) virus, influenza virus, HIV의 DNA 또는 RNA의 복제를 저해한다고 보고 되었다(70).

손바닥 선인장은 갈슘과 총폴리페놀, 플라보노이드, 비타민 C, 식이섬유 함량이 높아, LDL 콜레스테롤은 낮추고, HDL 콜레스테롤은 증가시켰으며, 알코올성 고지혈증에 효과가 있었고, 급성, 아급성 중추신경계에 독성이 없으며, 진통과 소

염에 효과를 나타낸다고 하였다(71,72).

천년초 ethyl acetate 추출물의 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical 소거 활성은 BHA(butylated hydroxyanisole) , α -tocopherol 보다 우수하였으며, AV(acid value), POV(peroxide value) 측정에서는 BHA보다 못하였으나 α -tocopherol과 유사하였고 TBA(thiobarbituric acid)가 측정에서는 α -tocopherol보다 우수한 항산화 활성을 나타내었다(73). 손바닥 선인장을 4℃에서 9일 동안 저장하였을 때 ascorbic acid, polyphenol의 함량과 항산화 활성에는 변화가 없었고, 저장 중 산도, pH의 변화는 있었으나 미생물군의 변화나 관능적 품질(appearance, taste, aroma, firmness)은 거의 변화가 없었다(74).

손바닥선인장과 콜레스테롤이 첨가된 식이에서 혈액내의 콜레스테롤과 중성지방이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, 또 선인장은 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia)에 효과가 있어 총콜레스테롤과 LDL콜레스테롤은 낮추어주고, 중성지방과 HDL콜레스테롤 함량에는 변화가 없다고 하였다(75). 선인장 열매로부터 분리된 pectin 성분은 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과가 있었고(76), 선인장 열매 및 줄기 가수분해 캡슐은 당뇨 및 고지질증에 대해 고농도에서 상당한 효과를 나타내었다(77). 흰쥐에 대한 손바닥 선인장 고지방식이 집단은 고지방식이 대조군에 비해 복부지방, 혈중 중성지방이 유의적으로 감소하였고, HDL-콜레스테롤농도가 증가하여 항동맥경화 효과가 있었으며, 구연산 합성효소의 활성이 증가하여 유산소 운동 능력을 향상시킬 것을 시사하였다(78). 흰쥐 식이에 손바닥 선인장 종자유를 첨가한 결과 체중 증가나 소화에는 아무런 영향이 없었으나 LDL 콜레스테롤과 혈중 당농도는 감소시켰다(79). 또한 손바닥 선인장 종자 분말을 식이 보조제로 사용한 결과 혈중 지방과 혈중 당농도를 조절하여 죽상동맥경화와 당뇨에 효과가 있음을 시사하였다(80).

손바닥선인장 줄기의 메탄올 추출물은 유리라디칼 소거활성, tyrosinase 저해 활성, 항알러지 활성이 우수하며, 친피부 효과가 있어 화장품 첨가제로서의 이용 가능성이 보고 되었다(81). 쥐의 위 조직에 대한 병리조직학적 검사에서 선인장을 섭취한 쥐에 비하여 섭취하지 않은 쥐가 궤양발생이 매우 심하였으며, 이외에 위궤양의 지표로 사용한 pH, 위점액량, 전혈점도, 조직병리학적 소견을 종합한 결과 선인장은 항궤양 효과가 있었다고 보고 되었다(82). 선인장의 항알러지 작

용에 대한 동물실험에서는 복강 투여의 경우에만 효과를 나타내었고, 기관지 평활근 이완작용에 효과가 있었으며, 위점막 보호 작용이 있다고 보고 되었다(83). 선인장 추출물은 대식세포(macrophage)에서 종양괴사인자를 유도하여 항암 및 항염증 작용이 있으며(84), 방사선 조사 시 조혈계 보호기능 및 회복기능을 나타내었고, 간세포(stem cell)인 소장 음세포에서 세포자연사(apoptosis)에 의한 세포를 감소시켜 방사선 방호에 효과가 있다고 하였다(85). 선인장은 소염작용과 진통작용이 있으나, 중추신경계나 말초신경계에 대한 영향은 없는 것으로 보고 되었다(86). 또한 손바닥 선인장 중의 항산화 물질인 quercetin, (+)-dihydroquercetin, quercetin 3-methyl ether는 모두 신경 세포를 보호하는 작용이 있으며, 특히 quercetin 3-methyl ether가 그 효과가 큰 것으로 보고 되었다(87,88).

그리고 항산화 성분들 이외에도 기능성이 있을 것으로 추정되는 성분으로 선인장에서는 mescaline(3,4,5-trimethoxyphenethylamine), citric acid methylesters(dimethylester, trimethyl citrate, 1,3-dimethyl citrate, 1-monomethyl citrate), 천연초에서는 taxifolin이 보고 되었다(2).

4. 진균이 생산하는 당 분해 효소

과실의 세포벽은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴, 당단백질로 구성되어 있고 세포벽분해효소인 polygalacturonase, pectinmethylesterase, cellulase, β -galactosidase의 작용에 의해 저분자화되거나 유리된다(89-93). 추출한 감 과실세포벽에 polygalacturonase와 β -galactosidase 처리시 유리당류의 변화에서 polygalacturonase 처리균이 저분자화가 많이 이루어졌다고 보고되었다(94). 전국에서 수집된 35개의 누룩에서 전분당화력, glucoamylase활성, 액화력, xylanase활성이 있는 16개의 곰팡이 균주를 분리하였고(95), 누룩곰팡이 중 액화, 당화, 생전분 분해능이 높은 균주는 *Aspergillus oryzae*, *Asp. penicilloides*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus oryzae*로 동정되었다고 하였다(96). 옥수수 생전분 당화효소 생산 곰팡이를 토양에서 분리하여 동정한 결과 *Asp. niger*로

동정되었고(97), 섬유질이 많이 포함된 부식토, 퇴비, 썩은나무 및 토양으로 부터 cellulase를 생산하는 *Aspergillus*속, *Penicillium*속, *Trichoderma*속 곰팡이를 분리하였다고 보고 되었다(98). *Penicillium wortmanni*와 *Chaetomium trilaterale*는 β -xylosidase 생산하였고(99,100), *Aspergillus awamori*와 *Asp. niger*에서 glucoamylase 생산하였으며(97), *Penicillium minioluteum*은 dexrranase를 생산한다고 보고 되었다(101). 그리고 한우와 재래산양의 반추위에 존재하는 *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*속 곰팡이는 cellulase와 xylanase를 생산한다고 보고 되었다(102).

5) 균주(진균) 동정

진균은 콜로니와 포자의 색, 크기, 모양과 같은 형태적 특징으로 동정되었으나, 이것은 시간이 소모가 많고, 배지 성분의 차이가 콜로니의 모양, 색, 크기 등에 영향을 주기 때문에 정확성이 감소하여 동정에 어려움이 있다(103,104). 따라서 진균 동정에 빠르고 정확한 방법이 발달하여 quantification polymerase chain reaction(qPCR), restriction fragment length polymorphism(RFLP)분석, random amplified polymorphic DNA(RAPD)분석이 진균의 동정과 정량에 이용되었다(105-107). 최근에는 internal transcribed spacer(ITS1, ITS2)와 rDNA sequencing으로 진균을 동정하고 있는데(108) 분류학에서 DNA sequence 분석은 screen out에 유용한 coding(5.8S)과 non-coding(ITS1과 ITS2) region은 특별한 marker로서 종을 동정한다(109-111). 진균의 리보솜 유전자는 일렬로 배열되어 있고 리보솜 DNA의 internal transcribed spacer(ITS) region은 ITS1 spacer, 5.8S rRNA gene, ITS2 spacer로 구성되며(Fig. 2), ITS 영역은 진균의 종들 사이에서 많은 차이를 나타내어 분류학적 유연관계를 결정하는데 유용한 것으로 입증되었다(112, 113).

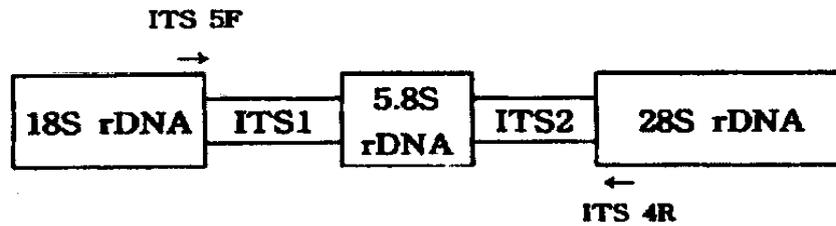


Fig. 2. A map of the ribosomal DNA region containing ITS1, ITS2 and the 5.8S rDNA gene. Arrows indicate the position of the primers used for PCR and sequence analysis.

ITS1 영역을 증폭시키기 위한 프라이머(primer)는 5.8S rRNA 유전자를 표적으로 하는 58A2R(CTGCGTTCTTCATCGAT-reverse)과 NSI1(GATTGAATG-GCTTAGTGAGG-forward) 이용하고, ITS2 영역을 증폭시키기 위한 프라이머는 5.8S rRNA 유전자를 표적으로 하는 58A2F(ATCGATGAAGAACGCAG-forward)와 28S rRNA 유전자를 표적으로 하는 NLB4(CGATTCTCACCTC-TATGAC-reverse)를 이용한다(114,115).

*Aspergillus*와 *Penicillium* 곰팡이는 ITS1이 ITS2보다 sequence 변화가 커서 동정에 ITS1 sequence 분석을 한다고 보고 되었다(116). 치즈에서 *Penicillium roqueforti*와 *Geotrichum candidum*을 분리 동정하는데 ITS1-5.8S-ITS2 영역 DNA sequence 분석으로 동정하였다고 보고 되었고(117), *Lactarius deliciosus* 동정에 ITS rDNA sequence 분석을 하였다고 보고 되었으며(118). 자낭균과 담자균의 분석은 5.8S rDNA sequence 분석이 적합하다고 보고 되었다(119). *Pestalotiopsis*속, *Trichoderma*속, *Cordyceps*속 균주 동정에 ITS rDNA sequence 분석을 하였다는 보고도 있다(120-124).

III 재료 및 방법

1. 재료

1) 선인장 열매 점질물 분리

선인장 열매를 구입하여 열매에 붙어있는 잔가시를 제거하고 세척하여 물기를 없앤 후 유압착즙기(이건과학, 한국)로 착즙하고, 착즙액을 90℃에서 15분간 가열처리 하였다. 가열 처리한 착즙액에 3배 부피의 95% 에탄올을 가하여 4℃에서 3시간이상 방치하여 점질물을 침전시키고 선인장 색소와 기타 성분은 에탄올에 용출시켰다. 이것을 원심분리(7,000 Xg, 4℃, 25분) 한 후 침전물을 회수하여 여기에 소량의 증류수를 가하여 용해시킨 후 불용성 성분을 제거하기 위하여 No.2 여과지(Advantec)로 여과하였다. 다시 2배의 95% 에탄올을 가하여 침전시키고, 원심분리, 증류수 용해, 여과의 전 과정을 3회 반복하여 선인장 열매 적색 색소, 알코올에 용출되는 성분, 물에 불용성인 성분들이 제거된 수용성 점질물을 얻었다. 이것을 진공동결건조기(Ilshin freeze dryer TFD5505, Ilshin Lab Co., Korea)로 건조시킨 후 분말을 밀봉하여 -20℃ 냉동실에 보관하면서 시료로 사용하였다.

2) 균주 분리용 토양시료

선인장 열매 점질물을 분해하는 미생물을 분리하기 위한 토양 시료는 제주시 한림읍 금릉리 지역 선인장 자생지에서 선인장 뿌리 부근의 흙을 지표면에서 3-8cm 깊이에서 수집하였다. 토양은 30℃ 건조기(Dry Oven, Hanbaek Scientific co., Korea)에서 2시간 건조시켜 균주 분리용 토양시료로 하였다.

3) Congo red 용액

선인장 열매 점질물을 분해하는 미생물을 분리하기 위하여 분리 배지에 확인 시약으로 다당류 사슬을 갖거나 섬유소 분해 미생물을 분리하는데 사용하는 congo red를 첨가하였다. Congo red 용액은 NaCl 2 g을 증류수 20 mL에 용해시킨 A액과 congo red 0.5 g을 99.9% 에탄올 80 mL에 용해시킨 B액을 섞어 여과(syringe filter, 0.45 μ m)하여 실온에 보관하면서 사용하였다. Congo red 용액은 선인장 열매 점질물 분해 미생물 분리용 배지 중에 0.01%가 되도록 첨가하였다(125,126).

4) 시판 선인장 열매 동결건조 분말

식품 소재로 이용되고 있는 시판 선인장 열매 동결건조 분말에 점질물 분해 균주 세포외 효소를 반응시킨 후 항산화 활성과 angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 활성의 변화를 확인하기 위하여 시판되고 있는 선인장 열매 동결건조 분말(선인장 마을, 제주, 한국)을 구입하여 사용하였다.

2. 선인장 열매 점질물의 이화학적 특성

1) 닐하이드린 시험

선인장 열매 점질물의 성분을 확인하기 위하여 닐하이드린 시험(127,128)을 하였다. 0.5% 시료 용액 1 mL에 1% 암모니아수를 가하여 pH를 중성으로 조정하고 1% 닐하이드린 시약을 5방울 가하여 끓어오를 때까지 가열한 후 색의 변화를 관찰하여 자색 또는 보라색을 나타내면 닐하이드린 양성반응으로 하였다.

2) Molisch 시험

선인장 열매 점질물이 당화합물인지 확인하기 위하여 Molisch 시험(127,128)을 하였다. 0.5% 시료용액 0.5 mL에 5% α -naphthol의 95% 에탄올 용액 2방울을 가하여 혼합한 다음 진한 황산 1 mL를 시험관 벽으로 천천히 주입하면 두 액의 접촉면에 자색 고리가 나타난다. 이것을 혼합하여 액 전체가 적색 또는 자색으로 변하면 Molisch 반응 양성으로 하였다.

3) 페놀-황산법에 의한 총당 정량

분리한 선인장 열매 점질물에 함유되어 있는 당함량을 알아보기 위하여 0.5% 점질물 수용액 1 mL에 5% 페놀 1 mL를 가하여 잘 혼합하고, 진한 황산 5 mL를 가하여 가능한 한 강하게 발열시킨 후 잘 혼합하여 실온에 20-30분간 방치하였다가 470 nm에서 흡광도(Shimadzu UV-1700, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다. 총당 함량은 maltose를 표준용액으로 하여 25, 50, 75, 100 µg/mL 농도에서 검량선(Fig. 3)을 작성하였다(128).

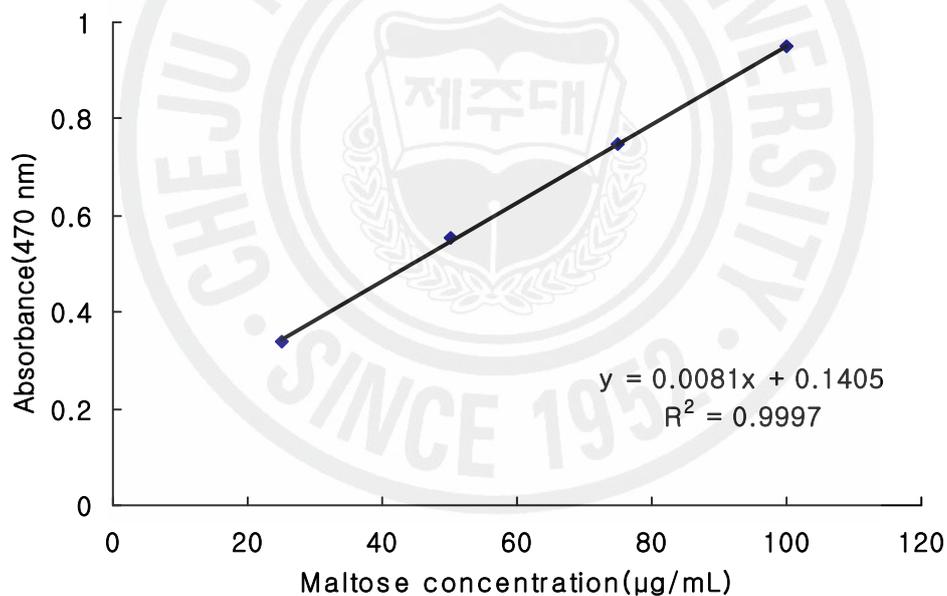


Fig 3. Calibration curve of maltose.

3. 선인장 열매 점질물 분해 균주 및 효소 분리

1) 선인장 열매 점질물 분해 균주 분리

선인장 열매 점질물을 분해하는 균주를 분리하기 위한 분리용 배지는 유일한 탄소원으로 분리한 선인장 열매 점질물을 첨가한 M9(129)배지를 사용하였고, 그 조성은 Table 2와 같다. 또한 배양된 균주들이 점질물 등의 다당류를 분해하는 지를 확인하기 위하여 congo red 염색 시약을 배지 중에 0.01%가 되도록 첨가하였다.

손바닥 선인장 자생지(제주도 제주시 한림읍 궁릉리)에서 채취하여 건조시킨 토양시료를 M9배지에 접종하여 28℃ 항온배양기(Hanbaek Scientific co., Korea)에서 3일간 배양하였다. 배양하는 3일동안 M9배지에서 성장한 많은 균주들 중 congo red 염색 시약의 붉은 색이 황색 등으로 변색되는 균주 3종을 선별하여 새로운 배지에 이식을 시켰다. 이 3종의 균주들 중 분리용 M9배지에서 성장이 좋고 배지 중의 congo red 염색 시약을 가장 많이 변색 시킨 균주 1종을 선별하였다. 선별된 균주는 새로운 배지에 여러 번 계대 배양시켜 순수 분리하였다.

Table 2. Composition of M9 agar medium containing mucilage from prickly pears as the sole carbon source and congo red

Component	Contents
Sterile 10X salt*	100 mL
<u>0.5% prickly pears mucilage solution</u>	<u>100 mL</u>
0.01M CaCl ₂	10.0 mL
0.1M MgSO ₄	10.0 mL
Agar	15 g
H ₂ O	780 mL
<u>Congo red</u>	<u>0.01%</u>
All ingredients are mixed after autoclaving and filtering.	
	Na ₂ HPO ₄ 70 g
	KH ₂ PO ₄ 30 g
10X salt*	NaCl 5 g
	NH ₄ Cl 10 g
	H ₂ O 1000 mL
Adjust pH to 5	

2) 분리 균주에서 분해효소 생산

분리된 진균을 배양하여 선인장 열매 점질물을 분해하는 효소를 생산하기 위하여 탄소원으로 선인장 열매 점질물을 첨가한 M9 broth 배지를 이용하였으며 그 조성은 Table 3과 같다. 순수 분리한 진균을 M9 broth 배지에 접종하여 28℃ 진탕배양기(HB-201SLI, Hanbaek Scientific co., Korea)에서 200 rpm의 속도로 진탕하면서 4일간 배양하였다. 곰팡이 균체가 충분히 자라면 배양액을 원심분리(7,000 Xg, 20 min)하여 균체를 제거하고 상층액을 진공동결건조(Ilshin freeze dryer TFD5505, Ilshin Lab Co., Korea)시킨 후 밀봉하여 -20℃ 냉동고에서 보관하면서 세포의 조효소로 사용하였다.

Table 3. Composition of M9 broth medium containing mucilage from prickly pears as the sole carbon source

Component	Contents	
Sterile 10X salt*	100 mL	
0.5% prickly pears mucilage solution	100 mL	
0.01M CaCl ₂	10.0 mL	
0.1M MgSO ₄	10.0 mL	
H ₂ O	780 mL	
All ingredients are mixed after autoclaving and filtering.		
	Na ₂ HPO ₄	70 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
10X salt*	NaCl	5 g
	NH ₄ Cl	10 g
	H ₂ O	1000 mL
Adjust pH to 5		

4. 분리 균주 효소에 의한 선인장 열매 점질물의 분해 확인

1) 선인장 열매 점질물 효소 반응

토양에서 분리한 균주 세포의 조효소에 의해 선인장 열매 점질물이 분해되는지 확인하기 위한 분석용 시료로 0.1% 선인장 열매 점질물 수용액(이하 OMS라 함)과 분리 균주를 선인장 열매 점질물을 탄소원으로 하는 배지에 배양시켜 균체를 제거한 후 동결건조 시킨 세포의 조효소 0.2% 수용액(이하 OES라 함)을 조제하였다. 0.1% 선인장 열매 점질물 수용액 2 mL와 분리 균주를 선인장 열매 점질물을 탄소원으로 하는 배지에 배양시켜 균체를 제거한 후 동결건조 시킨 세포의 조효소 0.2% 수용액 1 mL를 섞어 30 °C 수욕조에서 3시간 반응을 시킨 것을 효소반응액(이하 OMES라 함)으로 하였다. 대조구는 분리 균주를 선인장 열매 점질물을 탄소원으로 하는 배지에 배양시켜 균체를 제거한 후 동결건조 시킨 세포의 0.2% 조효소액을 100 °C에서 30분간 끓여 불활성화 시킨 후, 0.1% 점질물 수용액 2 mL와 불활성화 시킨 0.2% 세포의 조효소액 1 mL를 섞어 동일하게 반응시킨 반응액(이하 OESH라 함)으로 하였다. 또 다른 대조구로는 0.1% 점질물 수용액 2 mL에 분리 균주를 선인장 열매 점질물을 탄소원으로 하는 배지에 배양시켜 균체를 제거한 후 동결건조 시킨 세포의 0.2% 조효소액 1 mL를 넣자마자 바로 분석시료로 한 것(이하 OMESC라 함)을 사용 하였다.

2) Thin layer chromatography(TLC) 분석

선인장 열매 점질물이 분리된 미생물에 의해 분해되는지 확인하기 위해 silica gel 60F₂₅₄(Merck, Darmstadt, Germany) TLC 분석을 하였다. OMS, OES, OMES와 대조구로서 OESH를 여과(syringe filter, 0.45 µm)하여 silica gel 60F₂₅₄ TLC 판위에 30 µL씩 점적하였다. 전개용매는 butanol: metanol: water 를 4: 1: 1(v/v/v) 비율로 혼합하여 사용하였고(130), 전개방식은 상승전개를 하였다. 발색제로는 당과 아미노산 또는 펩타이드를 갖는 화합물인지 알아보기 위해 5% 황산, 페놀-황산, 닌하이드린을 사용하였다(131).

3) High performance liquid chromatography(HPLC) 분석

선인장 열매 점질물이 분리된 진균 세포의 조효소에 의해 어느 정도 분해되는지 여부를 확인하기 위해 HPLC 분석을 하였다. OMS, OMES와 대조구로 OESH, OMESC를 여과(syringe filter, 0.45 µm)하여 시료를 각 20 µL씩 HPLC에 주입하여 분석 하였다. HPLC(Waters 2690, Waters Co., USA) 분석은 검출기는 RI(Waters 2414, Waters Co., USA)를 사용하였고, RI 검출기의 온도는 35°C였으며 분석조건은 Table 4와 같다. 분석에 사용한 BIOSEP-SEC-S4000 컬럼(Phenomenex, USA)은 분자량의 크기에 따라 분리되는 것으로 고분자량의 물질이 먼저 검출되고 저 분자량의 물질은 뒤에 검출되므로, 이러한 분자량의 차이를 이용한 머무름 시간을 서로 비교하여 점질물의 분해를 확인하였다. 시료의 분자량을 확인하기 위한 표준물질로 분자량 2.0×10^6 , 1.0×10^4 의 dextran(D5376, D9260, SIGMA-Aldrich Chemical Co., USA)을 각 0.1% 수용액으로 제조하여 여과(syringe filter, 0.45 µm)한 후 같은 조건으로 분석하였다. Fig. 4는 dextran (2.0×10^6)의 HPLC 결과이고 머무름 시간 5.805분에서 검출되었다. Fig. 5는 dextran(1.0×10^4)의 HPLC 분석 결과이고 머무름 시간이 10.45분에서 검출되었다. HPLC 분석 후 검출된 물질의 분자량은 이 표준물질과 머무름 시간을 비교하여 산출하였다.

Table 4. Analysis condition by HPLC

Column	BIOSEP-SEC-S4000
Mobile Phase	H ₂ O
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	RI

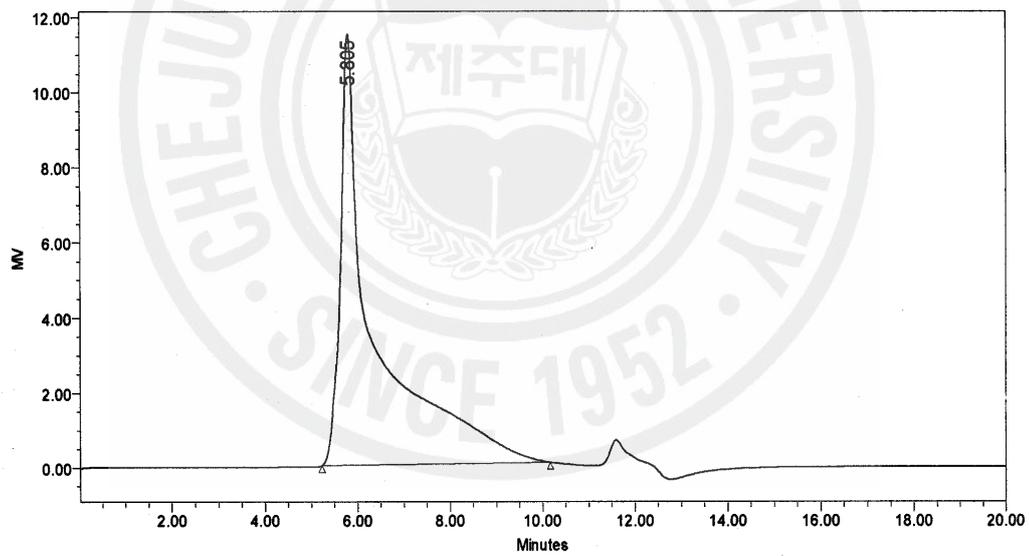


Fig. 4. HPLC chromatogram of high molecular weight dextran(MW 2.0×10^6).

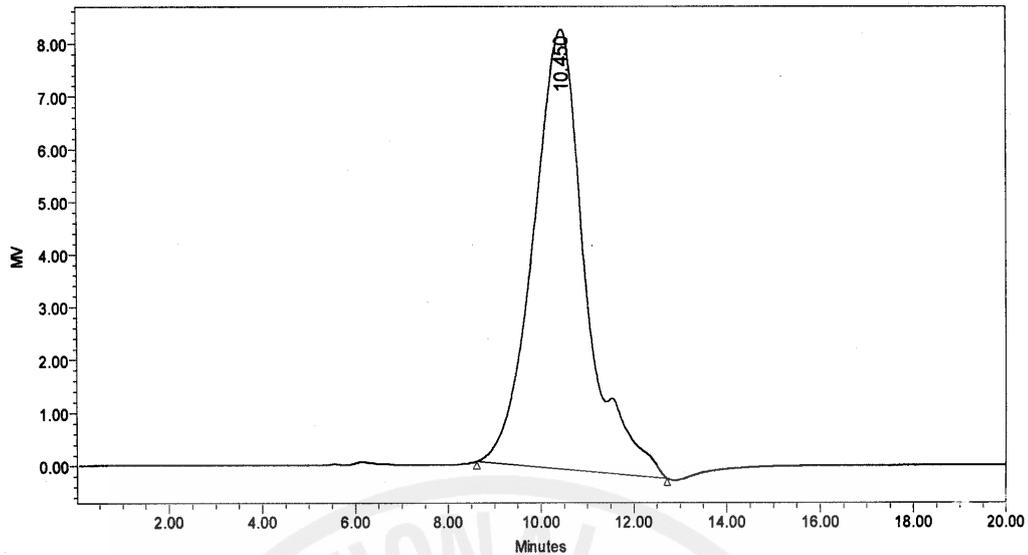


Fig. 5. HPLC chromatogram of low molecular weight dextran(MW 1.0×10^4).

4) Liquid gel permeation chromatography 분석

선인장 열매 점질물이 분리된 진균 세포외 조효소 효소에 의하여 분해되는지를 분석하기 위하여 liquid gel permeation chromatography 분석을 하였다. OMS와 OMES를 각각 5 mL씩 Sephadex G-100이 채워진 컬럼(2.8×35 cm)에 주입한 후 pH 5인 0.1 M acetate buffer(with 0.02% sodium azid)를 이동상으로 하여 0.1 mL/min 유속으로 용출시키면서 3.0 mL씩 분획하였다. 분획한 시료 1 mL에 5% 페놀 용액을 1 mL 가하여 잘 혼합하고, 진한 황산 5 mL를 가하여 가능한 한 강하게 발열시킨 후 잘 혼합하여 실온에 20-30분간 방치하였다가 470 nm의 분광광도계(Shimazu UV-1700, Shimazu Co., Japan)에서 흡광도를 측정하였다.

5. 분리 균주 효소 처리한 시판 선인장 열매 분말의 항산화활성 변화

분리한 균주가 생산하는 세포외 조효소가 시판되고 있는 선인장 열매 동결건조 분말에 사용되었을 때 선인장의 항산화활성 변화를 확인하기 위하여 총폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거활성, hydroxyl 라디칼 소거활성, hydrogen peroxide 소거활성, ACE 저해활성을 측정하였다.

1) 시판 선인장 열매 동결건조 분말의 항산화 활성 시료

시판되고 있는 선인장 열매 동결건조 분말에 분리된 균주에서 생산된 세포외 조효소를 첨가하였을 경우 항산화 활성의 변화를 알아보기 위하여, 시판 선인장 열매 동결건조 분말 10 g을 500 mL 증류수에 넣고 완전히 용해시킨 후 100 °C에서 2시간 끓여 열수 추출하여 No. 2 여과지로 여과하였다(이하 OFS라 함). 또한 시판 선인장 열매 동결건조 분말 10 g에 분리 균주에서 생산된 세포외 조효소 2 g과 증류수 500 mL를 넣고 완전히 용해시킨 후 30°C 수욕조에서 3시간 반응시키고, 100°C에서 2시간 끓여 열수추출한 다음 No. 2 여과지로 여과하였다(이하 OFES라 함). 이들 OFS와 OFES를 항산화 활성 및 ACE 저해 활성 분석 시료로 사용하였다.

2) 총폴리페놀 함량 분석

시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 균주에서 생산된 세포의 조효소 처리 전·후의 총폴리페놀 함량의 변화를 알아보기 위한 총폴리페놀 함량 분석은 Graham(132)의 방법에 따라 실험하였다. 시료 100 μL 에 증류수 3 mL를 넣고 0.016 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mL와 0.1 N HCl에 녹인 0.01 M FeCl_3 1 mL를 가하여 잘 섞어준 후 실온에서 15분간 방치하였다. Stabilizer(H_2O : 1% gum arabic: 85% phosphoric acid= 3:1:1, v/v/v)를 5 mL가하고 잘 섞어준 다음 700 nm에서 흡광도(UV mini 1240, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다. 표준시약으로는 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성하고(Fig. 6) 총폴리페놀 함량을 산출하였다.

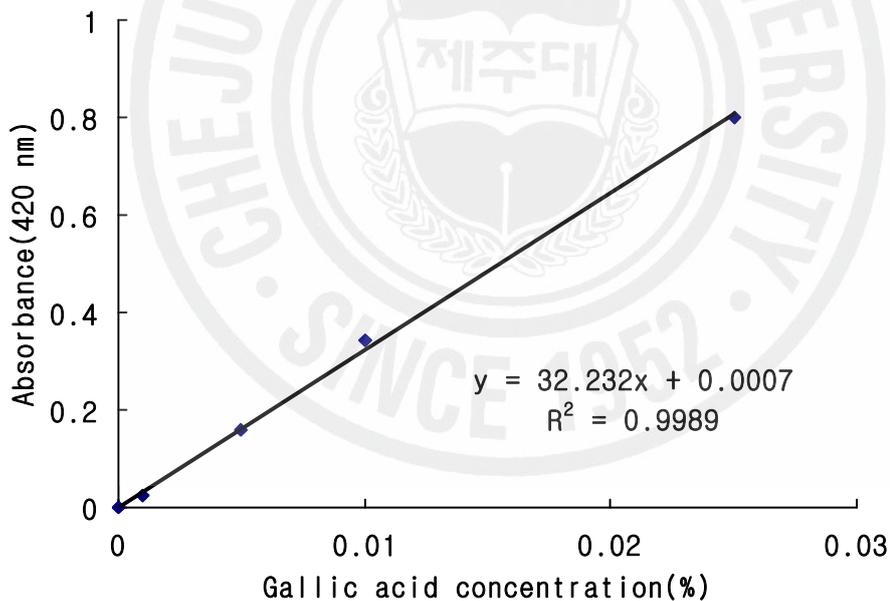


Fig. 6. Calibration curve of gallic acid.

3) 플라보노이드 함량 분석

시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 균주에서 생산된 세포외 조효소 처리 전·후의 플라보노이드 함량의 변화를 알아보기 위한 플라보노이드 함량 분석은 Kim(133)의 방법에 따라 실험하였다. Diethylene glycol 3 mL와 1 N NaOH 300 μ L, 시료 300 μ L를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도(UV mini 1240, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다. 표준시약으로 naringin을 사용하여 검량선을 작성하고(Fig. 7) 플라보노이드 함량을 비교 정량하였다.

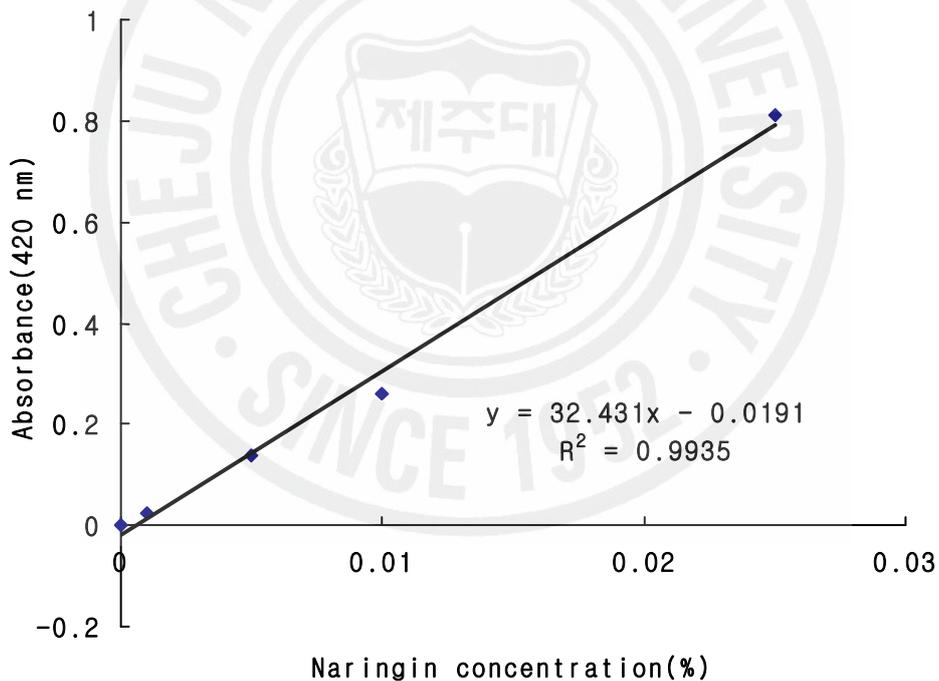


Fig. 7. Calibration curve of naringin.

4) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거활성

시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 균주에서 생산된 세포외 조효소 처리 전·후의 DPPH 라디칼 소거활성은 Blis(134)의 방법에 따라 2 mg의 DPPH를 15 mL의 에탄올에 녹여 만든 DPPH 용액 1.2 mL에 DMSO(dimethyl sulfoxide) 0.5 mL와 에탄올 3 mL를 혼합한 용액을 UV/Vis 분광광도계(UV mini 1240, Shimadzu Co., Japan)에서 517 nm에서의 대조군 흡광도가 0.94-0.97이 되도록 적당량의 에탄올을 첨가하여 조정하였다. 이 DPPH 용액 450 μ L에 시료용액 50 μ L를 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다가 517 nm에서의 흡광도(UV mini 1240, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = (\text{Abc} - \text{Abs})/\text{Abc} \times 100$$

Abc : Absorbance of control at 517 nm

Abs : Absorbance of sample at 517 nm

5) Hydroxyl 라디칼 소거 활성

시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 균주에서 생산된 세포외 조효소 처리 전·후의 hydroxyl기 소거 활성은 Chung 등(135)의 방법에 따라 10 mM FeSO₄·7H₂O 200 μL, 10 mM EDTA(ethylenediaminetetra acetic acid) 200 μL, 10 mM 2-deoxyribose 200 μL로 이루어진 fenton reaction mixture를 인산 완충 용액(pH 7.4) 1.2 mL와 함께 혼합하고 여기에 추출물 200 μL를 가하여 섞은 후 10 mM H₂O₂ 200 μL를 첨가하여 37℃에서 4시간 반응시켰다. 그리고 2.8% TCA(trichloroacetic acid) 1 mL, 1% TBA(thiobabituric acid) 1 mL를 첨가하여 10분 동안 끓이고, 이 혼합물을 상온에서 식힌 후 532 nm에서 흡광도(UV mini 1240, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다.

$$-\text{OH scavenging activity}(\%) = (1 - (\text{Abs} - \text{Abo})/(\text{Abc} - \text{Abo})) \times 100$$

Abo : Absorbance without treatment at 532 nm

Abc : Absorbance of treated control at 532 nm

Abs : Absorbance of treated sample at 532 nm

6) Hydrogen peroxide 소거 활성

시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 균주에서 생산된 세포외 조효소 처리 전·후의 hydrogen peroxide 소거 활성 변화는 Muller(136)의 방법에 따라 시료 100 μ L, 10 mM hydrogen peroxide 100 μ L를 0.1 M 인산 완충용액(pH 5.0) 500 μ L와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 즉시 제조한 1.25 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)) 150 μ L와 peroxidase(1 U/mL) 150 μ L를 넣어 섞은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜 405 nm에서의 흡광도(UV mini 1240, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다.

$$\text{Hydrogen peroxide scavenging activity(\%)} = (\text{Abc} - \text{Abs})/\text{Abc} \times 100$$

Abc : Absorbance of control at 405 nm

Abs : Absorbance of sample at 405 nm

7) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성

시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 균주에서 생산된 세포외 조효소 처리 전·후의 ACE 저해 활성의 변화는 Cushman과 Cheung(137)의 방법에 따라 시료 50 μL 에 HHL(hippuryl-L-histidyl-L-leucine) 100 μL , ACE 100 μL 를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰고, blank는 반응 후 1 N HCl 250 μL 를 넣고 반응을 정지시켰다. Ethyl acetate 1.5 mL를 넣고 5분간 교반시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하고, 상층액 500 μL 를 취하여 120 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 건조한 후 1.5 mL 증류수를 넣고 1시간 이상 용해시킨 다음 228 nm에서 흡광도(UV mini 1240, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다.

$$\text{ACE inhibitory activity(\%)} = (1 - (\text{As} - \text{Asb})/(\text{Ac} - \text{Acb})) \times 100$$

Ac : Absorbance of control at 228 nm

Acb : Absorbance of control blank at 228 nm

As : Absorbance of sample at 228 nm

Asb : Absorbance of sample blank at 228 nm

6 분리 균주 동정

1) 분리 균주의 형태학적 동정

Malto extract agar, Czapek-Dox agar, potato dextrose agar, YM agar, Sabouraud dextrose agar 배지에 균주를 접종하여 포자색과 성장정도 등의 생육상태를 관찰 하였다. 분리 배양된 곰팡이는 슬라이드 글라스 위에 검체를 고정시키고 lactophenol을 1-2방울 가하여 광학 현미경(Olympus CK2-TR3; Image-Pro Plus, Olympus Co., Japan)의 400배 배율에서 포자모양, 균사모양, 격벽유무 등을 관찰하였다(138).

2) Internal transcribed spacer(ITS) 5.8S rDNA sequencing

토양에서 분리한 선인장 열매 점질물 분해하는 진균 Bx를 동정하기 위하여 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms; KCCM)에 의뢰 하였다. 분리된 진균 Bx는 Internal transcribed spacer(ITS) 5.8S rDNA sequencing을 하여 National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank(U.S. National Library of Medicine, Bethesda, Maryland)에 있는 균주들과의 유사성을 검정하여 동정되었다.

IV 결과 및 고찰

1. 선인장 열매 점질물의 이화학적 특성

선인장 열매 점질물의 이화학적 특성의 결과는 Table 5와 같다. 점질물에 아미노산이나 펩타이드를 함유하는지 여부를 확인하기 위한 닌하이드린 시험결과 보라색을 나타내어 분리된 선인장 열매 점질물에는 아미노산이나 펩타이드를 함유하고 있음을 알 수 있었다.

Molisch 시험결과 자주색을 나타내어 분리된 선인장 열매 점질물은 당화합물이며, 페놀-황산법에 의한 총당 정량에 의하면 0.5% 점질물 수용액 중의 총당량은 maltose 기준으로 64.85 mg/mL이었다. 따라서 분리한 선인장 열매 점질물은 아미노산이나 펩타이드를 함유한 다당류임을 확인하였다.

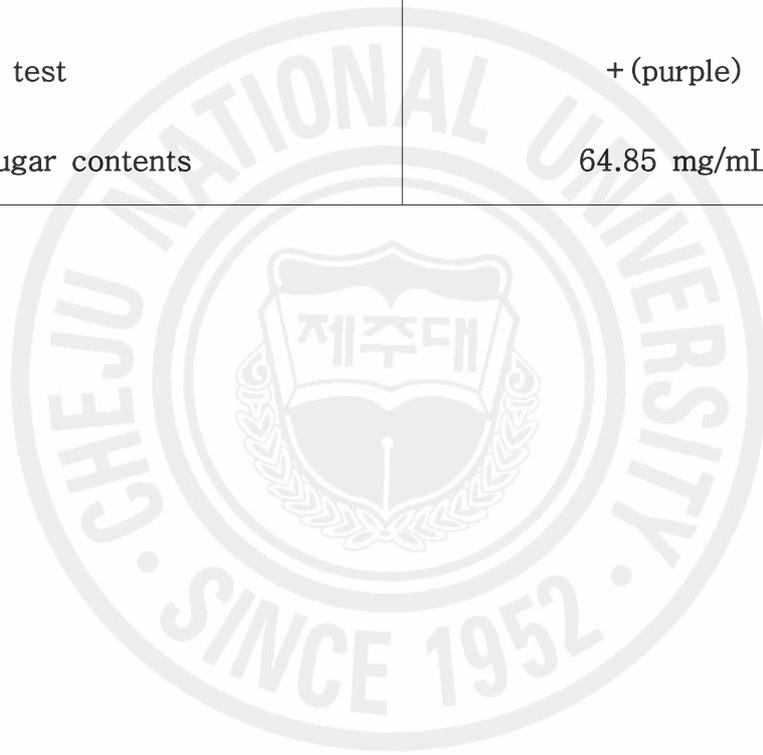
이 결과는 알코올 추출한 칠레산 손바닥 선인장 열매 점질물은 단백질을 포함하지 않고 93.48%의 당함량을 갖는 펙틴성 당류를 함유하는 다당류 복합체라는 보고(139), 선인장 점질물이 중성 다당류, 당단백질과 산성다당류(L-arabinose, D-galactose, L-rhamnose, D-xylose, D-galacturonic acid로 구성)의 혼합물이라는 보고(140)와 일치하였는데, 선인장 산지, 선인장 점질물의 추출방법과 정제 정도에 따라 혼합물을 구성하는 단위 물질이 달라지는 것으로 생각된다.

손바닥 선인장은 49.7%의 cellulose와 50.3%의 arabinan으로 구성된 96% 다당류로 가느다랗고 비어있는 섬유질이 평평하게 배열된 구조를 가지고 있다(141). 선인장과 유사한 알로에(Aloe) 다당류는 glucomannan, uronic acid, galactose, arabinose, rhamnose로 구성된 펙틴성 다당류, acethylmannan 등으로 보고되고 있다(142,143). Acethylmannan은 탄수화물 67%를 함유하고 있으며 mannose 60%, 소량의 glucose와 galactose로 이루어져 있고 acethyl기는 23%를 함유하고, 1,4-glycoside 결합을 가지고 있다고 보고 되었다(144). 그리고 알로에 점질물의 응집활성을 갖는 물질은 mannose와 glucose가 26:1의 몰비로 구성된 β -(1,4)결합의 다당체라고 보고 되었다(145).

용설란은 fructan 류(93.4%), 유리 disaccharide(2.0%), 유리 glucose(0.8%), 유리 fructose(3.8%)가 함유되어 있고, fructan은 다수의 가지구조를 갖는 fructan(fructose 분자 사이에 $\beta(2-1)$ 결합)과 neo-fructan(fructose 분자 사이에 $\beta(2-6)$ 결합)의 혼합물로 구성되어 있다고 보고 되었다(146).

Table 5. Chemical properties of prickly fruit mucilage

Ninhydrin test	+ (violet)
Molisch test	+ (purple)
Total sugar contents	64.85 mg/mL



2. 선인장 열매 점질물 분해 미생물의 분리

선인장 열매 점질물을 분해하는 미생물을 분리하기 위하여 유일한 탄소원으로 선인장 열매 점질물을 첨가한 M9 agar배지에 점질물의 분해를 확인하기 위한 congo red 염색시약을 0.01%되게 첨가한 다음 토양시료를 접종하여 배양하였다. Congo red 염색시약은 고분자 글루칸에는 결합하지만 5개 이하의 인접한 당과 결합된 D-glucospyranosyl unit를 함유하는 올리고당에는 결합하지 않는다(147). Congo red 염색법은 extracellular type cellulolytic activity를 갖는 균주를 검출하는데 활용할 수 있어, 다당류를 분해하는 균주를 검출하는데 직접적이고 단순한 방법으로 활용된다(148). 유일한 탄소원으로 선인장 열매 점질물을 첨가한 M9 agar 배지에서 배양된 균주들 중 congo red 염색 시약과 결합되지 않아 clear zone을 많이 형성한 균주 3종을 분리하였다. 이들 균주를 다시 동일한 배지 중에 배양하여 congo red 염색시약을 가장 많이 변색시킨 균주 1종을 분리한 다음 계대배양하여 순수한 균주를 얻었고, Bx라고 명명하였다(Fig. 8). 분리된 균주 Bx는 균주주위에서 clear zone을 형성하는 일반적인 경우와는 달리 생육초기 균주 colony에 접해 있는 붉은 색소가 남아 있었으나 시간이 지남에 따라 황색으로 바뀌어 clear zone을 형성하였다. 따라서 분리된 진균 Bx 세포외 효소가 점질물 다당류를 5개 이하의 당이 결합된 올리고당으로 분해하여 congo red 염색 시약과 결합하지 않는 것으로 생각된다.

세포벽 밖으로 분비 가능한 섬유소 분해효소를 생산하는 세균을 분리하는데 congo red 염색 시약을 변색시키는 균주는 cellulolytic activity가 있는 것으로 보고 되었고(147), PY-CMC(peptone yeast extract carboxy methyl cellulose) 배지에서 congo red 염색시 노랗게 변색된 균주들을 CMCase(carboxy methyl cellulase), β -glucosidase, xylanase 활성이 높은 것으로 보고 되었다(125). 진균이 분비하는 cellulase는 endoglucanase, cellobiohydrolase, β -glucosidase 이고 이 효소들은 cellulose와 cellobiose의 분해와 관련이 있었고, 진균의 종에 따라 congo red 붉은 색이 옅은 자주빛을 띠는 연한 회색 또는 연한 파란색으로 변화하였는데, 이것은 pH의 영향으로 pH 3.0에서 파란색, pH 5.2에서 붉은색을 나타내어 congo red가 pH 지시약으로 이용될 수 있다고 보고 되었다

(148,149).



Fig. 8. Fungal isolate Bx on M9 agar medium containing mucilage as the sole carbon source and congo red.

3. 분리 균주 효소에 의한 선인장 열매 점질물의 분해 확인

1) Thin layer chromatography(TLC) 분석

분리된 진균 Bx에 의해 선인장 열매 점질물의 효소적 분해가 이루어지는지 확인하기 위하여 TLC 분석결과를 Fig. 9에 나타내었다. 발색제로 5% 황산, 페놀-황산, 닐하이드린을 사용하여 발색시킨 결과 5% 황산, 페놀-황산에서는 R_f 0.19에서 발색점이 형성되었으나, 닐하이드린에서는 발색이 관찰되지 않았다. 따라서 아미노산 또는 펩타이드를 갖는 당화합물인 점질물이 진균 Bx 세포의 조효소에 의하여 분해되었고, 분해된 물질은 아미노산이나 펩타이드를 갖지 않는 당화합물로 확인되었다. 또한 TLC상에서 효소에 의한 분해 생성물의 이동거리가 짧아 고분자량의 점질물이 아주 작은 단위로 분해되지 않는 것으로 생각된다.

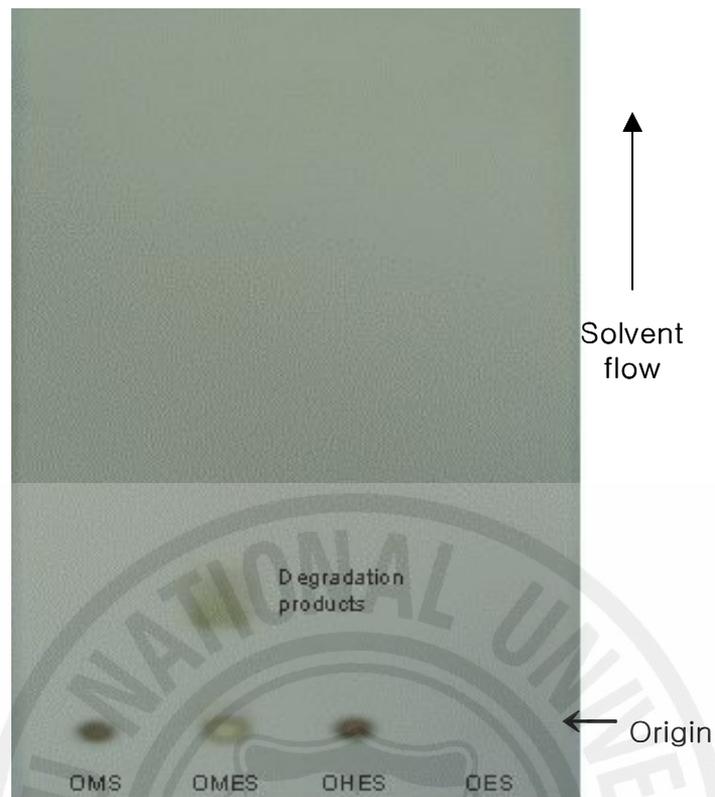


Fig. 9. Thin layer chromatogram of prickly pear mucilage and its degradation products.

OMS: untreated mucilage, OMES: mucilage after incubation with fungal crude enzyme, OHES: mucilage after incubation with heat treated fungal crude enzyme, OES: fungal crude enzyme

2) High performance liquid chromatography(HPLC) 분석

선인장 열매 점질물이 진균 Bx 세포의 조효소에 의해 분해되는지 확인하기 위해 OMS, OMES, OMESC, OHES의 HPLC 분석 결과는 Fig. 10에 나타내었다. OMS에서는 머무름 시간이 5.7분과 11.9분에서 peak가 나타났고, OMES에서도 5.3분과 11.3분에서 peak가 관찰되었으나 머무름시간 5분대의 peak는 감소하고 11분대의 peak가 증가하여 5분대의 고분자량의 물질이 11분대의 저분자량의 물질로 분해 되었음을 알 수 있었다. 대조군인 OMESC와 OHEC는 머무름 시간 5.5분, 11.3분과, 5.5분, 11.3분, 11.6분에서 peak가 나타났고 적분 면적도 비슷하여 비슷한 양상을 나타내었으며, 5분대의 고분자량 물질은 분해 되지 않았음을 나타내었다. 표준물질로 dextran을 같은 조건으로 분석한 결과 머무름 시간 5.3분의 물질은 2×10^6 의 고분자량을 나타내었고, 11.3분의 물질은 1×10^4 이하의 저분자량 물질을 나타내었다. 따라서 분리된 진균 Bx 세포의 조효소에 의해 2×10^6 의 고분자량의 선인장 열매 점질물이 1×10^4 이하의 저분자량 물질로 분해 되었음을 알 수 있었다.

손바닥 선인장 열매의 수용성 성분에서 고분자량($MW 1.3 \times 10^6 \text{ gmol}^{-1}$)과 저분자량($MW 3.9 \times 10^3 \text{ gmol}^{-1}$)의 2가지 성분 중 고분자량의 물질은 단백질을 함유하지 않은 순수한 다당류이고, 고분자량 성분은 galacturonic acid, glucuronic acid, glucose, xylose, galactose, rhamnose, arabinose로 구성된 20%의 당함량을 갖는 pectin계 물질이고, 저분자량의 성분은 단백질로 보고 되었다(43). 이는 본 실험에서 분리한 선인장 열매 점질물(수용성)이 2×10^6 의 분자량을 갖는 고분자 물질이라는 것에는 일치하지만, 닐하이드린 양성, Molisch 양성 반응을 나타내어 아미노산나 펩타이드를 갖는 다당류라는 결과와는 차이가 있었다.

손바닥 선인장에서 추출된 2.3×10^4 의 분자량을 갖는 다당류는 arabinose, rhamnose, xylose, galactose, galacturonic acid의 잔기를 가지며, gel을 형성하지는 못하지만 Ca 이온 첨가시 polyisobutylene과 같은 탄성을 갖는 특성이 있다고 보고 되었다(37). 알로에 점질물 mannose와 glucose의 β -(1,4)결합 다당체의 분자량은 1.0×10^6 으로 보고 되었고(148), 알로에 베라에서 분리한 acetylmannan은 mannose, glucose, galactose, acetyl기를 함유하고 1,4

glycoside 결합을 하고 분자량은 1.0×10^4 으로 보고 되었다(147). 알로에의 다당 성분인 glucomannan은 pH 변화, 고온 및 미생물 오염에 의해 쉽게 분해되므로, 이 다당류는 알로에 베라 겔의 불량한 조제여부의 판단지표가 된다고 하였다 (147). 따라서 점질물을 분리하는 방법에 따라 구성 성분과 분자량이 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

용설란은 가열에 의해 fructan은 총당의 80%이상에서 5%로 감소되면서 효모가 이용하기 쉬운 fructose로 분해되어 함량이 12%에서 80%로 증가되고, glucose, disaccharide로 소량 분해 된다고 하였다(149).



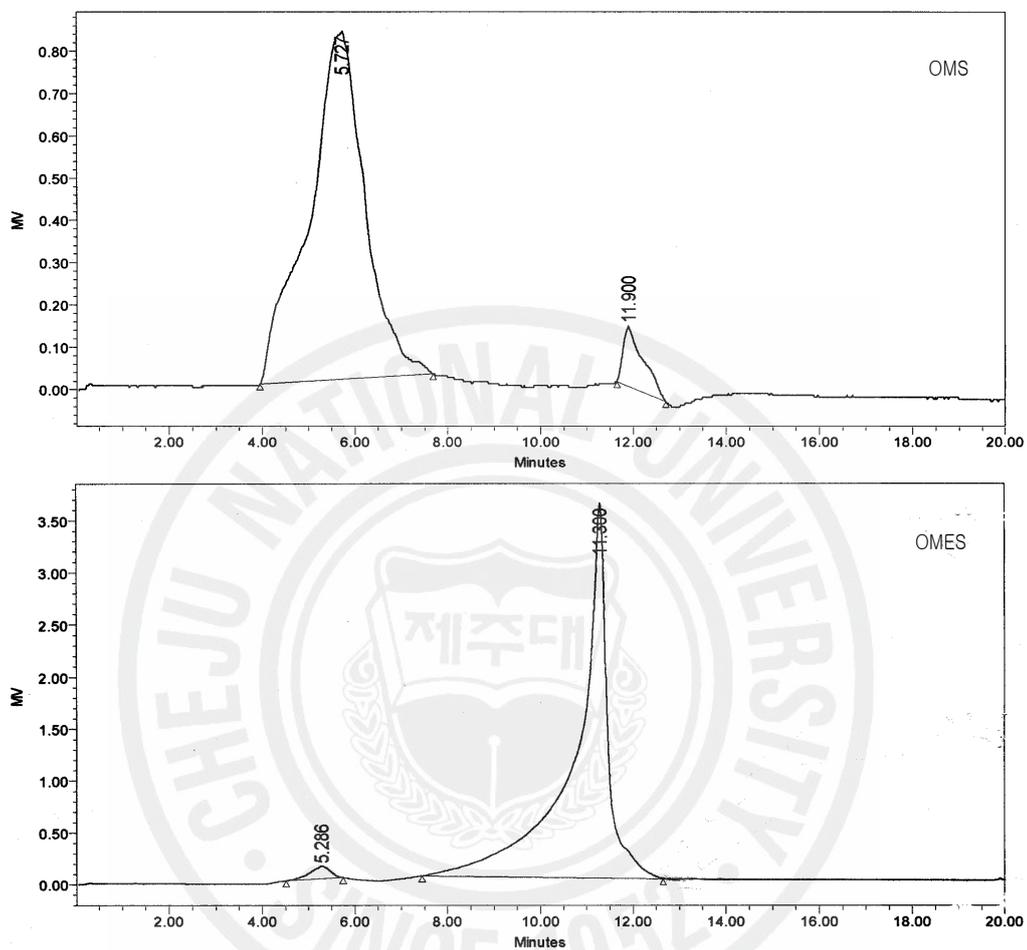


Fig. 10. HPLC chromatograms of the mucilage before and after fungal enzyme treatment.

OMS: untreated mucilage, OMES: mucilage after incubation with fungal crude enzyme, OMESC: mucilage right after mixing with fungal crude enzyme, OHES: mucilage after incubation with heat-treated fungal crude enzyme

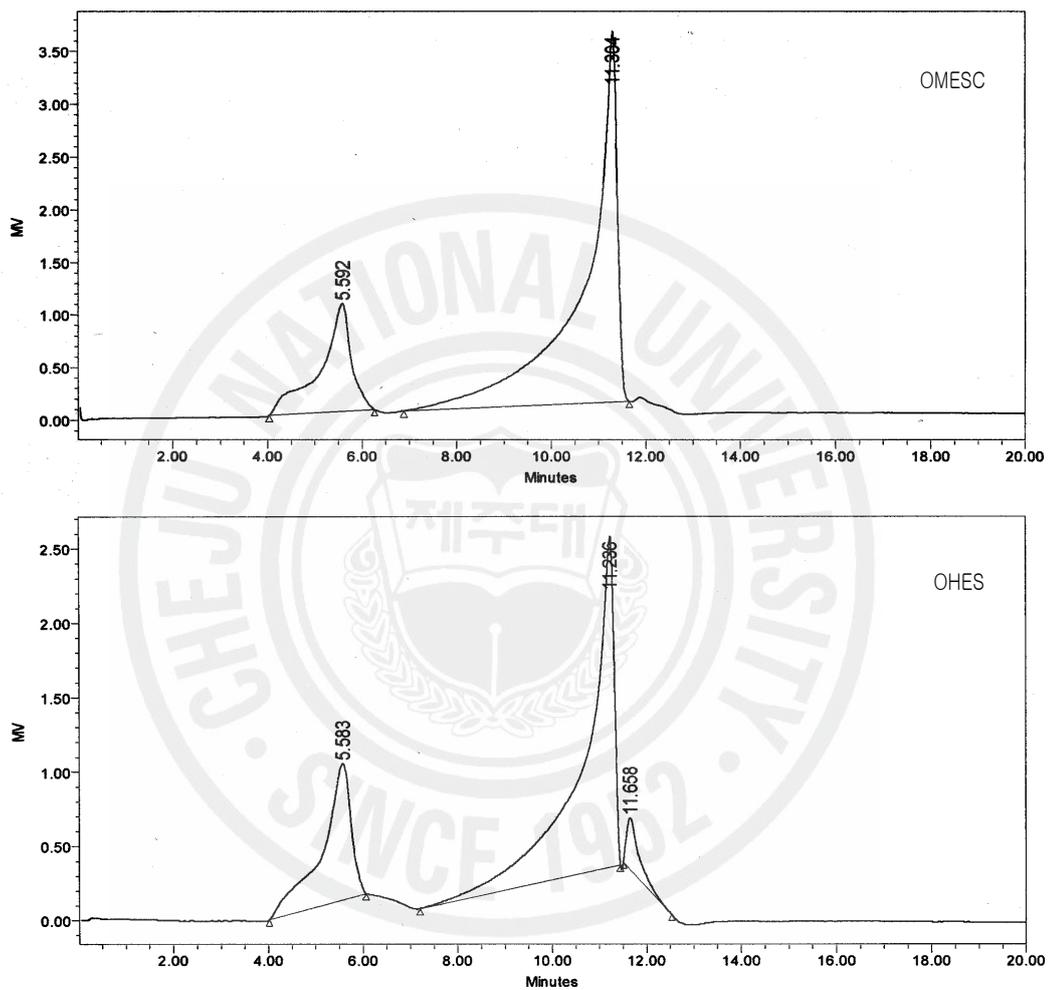


Fig. 10. Continued.

3) Liquid gel permeation chromatography 분석

분리 균주 Bx 세포의 조효소에 의해 선인장 열매 점질물이 분해되는지 확인하기 위하여 Sephadex G-100을 채운 컬럼에서 liquid gel permeation chromatography 분석하고 3 mL씩 분획한 다음 페놀-황산법으로 470 nm에서 흡광도를 측정하여 당을 검출한 결과는 Fig. 11과 같다. Liquid gel permeation chromatography는 분자크기에 따라 분리되어 단백질과 탄수화물과 같이 큰 분자를 분리하는데 널리 이용된다. 정지상은 작은 동공을 가지고 있어 작은 분자는 침투할 수 있으나 큰 분자는 침투할 수가 없으므로 작은 분자에 허용되는 부피는 큰 분자에 허용되는 부피보다 크다. 그래서 큰 분자는 이동상이 부피와 같은 용매 부피로 용출되어, 겔의 속과 밖에 존재하여 용리하는데 많은 용매가 필요한 작은 분자보다 먼저 컬럼으로부터 용출된다(150). OMS에서는 8-11번 분획물에서 고분자량의 당이 검출되었고, OMES에서는 28-34번 분획물에서 저분자량의 당이 검출되었다. 이것으로 부터 분리 진균 Bx가 생산하는 세포의 조효소는 선인장 열매 고분자 점질물을 저분자의 물질로 분해시키는 것으로 확인되었다.

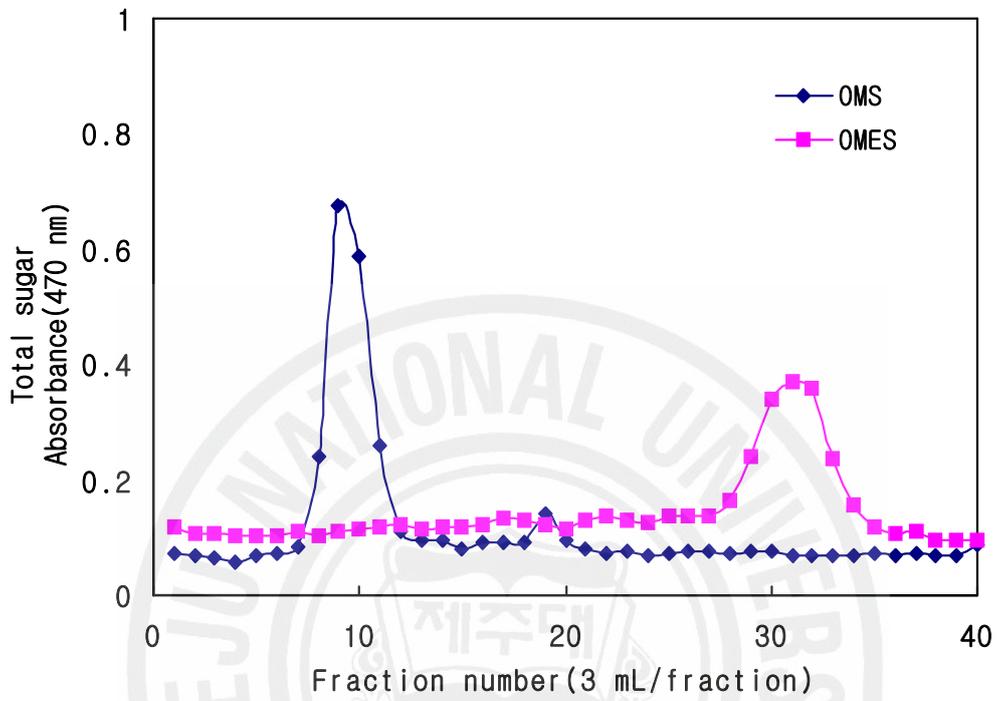


Fig. 11. Liquid gel permeation chromatograms on Sephadex G-100 of the mucilage before and after fungal enzyme treatment.

OMS: untreated mucilage, OMES: mucilage after incubation with fungal crude enzyme

4. 분리 균주 효소 처리한 시판 선인장 열매 동결건조 분말의 항산화활성 변화

1) 총폴리페놀과 플라보노이드 함량

폴리페놀성 화합물들은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로써 다양한 구조와 분자량을 갖는다. 이들은 phenolic hydroxyl(OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대분자들과 쉽게 결합하며, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(151). 시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 진균이 생산하는 세포외 효소 처리 전·후의 총폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 Fig. 12에 나타내었다. 총폴리페놀 함량은 OFS가 15.30 mg/L였고, OFES는 21.09 mg/L를 나타내었다. OFES가 OFS보다 총폴리페놀 함량이 약38% 증가하였는데, 이것은 점질물과 같이 결합되어 있던 폴리페놀이 점질물의 분해에 의하여 추출이 잘 된 것으로 생각된다.

알로에의 총폴리페놀성 화합물은 품종에 따라 껍질에서는 베라센스(370.21 mg/100 g), 아보레센스(290.54 mg/100 g), 베라(287.94 mg/100 g)순으로 함유되어 있고, 겔 부위에서는 아보레센스(21.76 mg/100 g), 베라센스(19.22 mg/100 g), 베라(12.89 mg/100 g)순으로 함유되어 있다고 보고 되었다(149).

OFS의 플라보노이드 함량은 30.56 mg/L였고, OFES는 46.28 mg/L로 OFS에 비해 약 51% 그 함량이 증가하였다. Flavonoid는 담황색 내지는 노란색을 띠고 있는 색소화합물로서 이들은 자연에서는 유리상태로 존재하나 대개의 경우 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당류와 결합하여 배당체(glycoside)의 형태로 존재한다고 하였다(152). 손바닥 선인장 메탄올 추출물은 플라보노이드를 $69.5 \pm 3.8 \mu\text{g/g}$ 함유하고 있고, 플라보노이드 성분은 각각 kaempferol($2.2 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$), quercetin($43.2 \pm 2.5 \mu\text{g/g}$), isorhamnetin($24.1 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$)이었다고 보고 되었다(25). 선인장 열매 80% 메탄올 추출물에서는 총폴리페놀과 플라보노이드 함량이 각각 4.976, 1.590 mg/g이었고 추출조건과 방법에 따라 함량의 차이가 있었다고 보고 되었다(9). 따라서 OFES가 OFS보다 플라보노이드 함량이 많은 것은 점질물이 분해되면서 점질물과 배당체 형태로 붙어있던 플라보노이드가 추출이 용이하게 되어 수율이 높아진 것으로 생각된다. 플라보노이드의 항산화력은

catechin, epicatechin, gallic acid gallate와 같은 flavanol(flavan-3-ols)이 가장 강하고 그 다음이 flavanol, flavone, flavanone의 순서로 효과를 나타낸다고 보고 되었다(153).

국내 시판되는 홍차, 인삼차, 녹차, 한차의 폴리페놀함량은 각각 101.51, 28.30, 94.90, 95.81 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었고, 플라보노이드 함량은 16.75, 3.29, 6.72, 6.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었으며(154), 한방 아로마 식물인 파인애플 세이지(*Salvia officinalis*), 로만 케모마일(*Matricaria recutita*), 물싸리(*Potentilla fruticosa*)의 폴리페놀 함량은 각각 22.6, 7.5, 37.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이고, 플라보노이드 함량은 각각 3.5, 7.1, 6.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 보고 되었다(155).

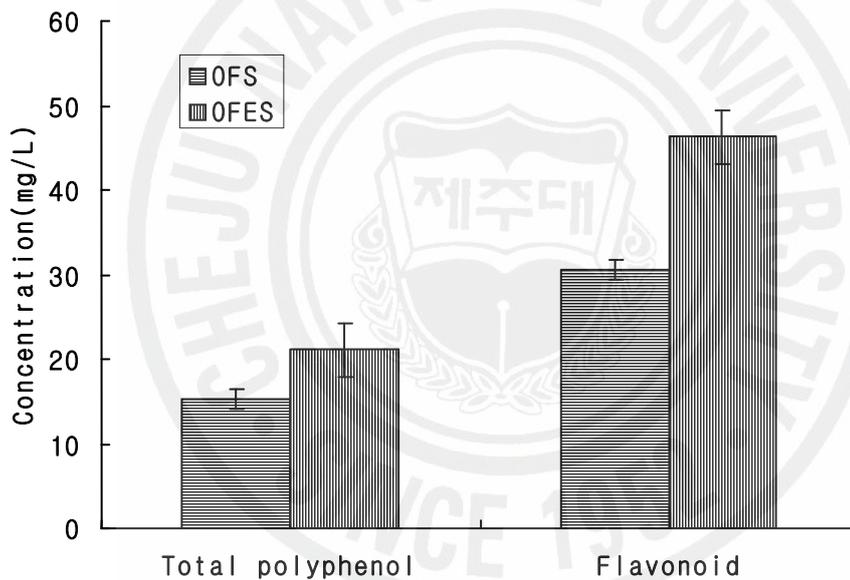


Fig. 12. Polyphenol and flavonoid contents from fruit of *Opuntia ficus indica* var. saboten.

OFS: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit, OFES: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit after incubation with fungal crude enzyme

2) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거활성

항산화 물질은 유리기에 전자나 수소를 공여하여 복합체를 만든다. DPPH는 항산화물질로부터 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로 전자공여능으로부터 항산화 활성을 추정할 수 있다(134). DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 유리기로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는데 이것은 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다(151). 시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 진균 Bx가 생산하는 효소 처리 전·후의 DPPH 라디칼 소거활성의 결과는 Table 6에 나타내었다. OFS와 OFES 모두 50%이상으로 DPPH 라디칼 소거능 즉, 전자공여 작용이 높은 것으로 나타났지만, OFS의 라디칼 소거 활성은 $55.07 \pm 4.27\%$, OFES의 라디칼 소거활성은 $60.23 \pm 0.38\%$ 로 유의적인 차이는 없었다. 그러나 이 결과는 삼백초 추출물의 항산화활성 연구에서 전자공여능은 71.13%를 나타내었으며 전자공여능과 총폴리페놀 함량이 비례하는 경향을 나타냈다는 보고(156)와 일치하지 않았다.

플라보노이드에 대한 전자공여능을 조사한 결과 (+)-catechin이 가장 높은 전자공여능을 보였고 다음으로 rutin > quercetin > naringin=hesperidin 순이었다(157). 따라서 높은 전자공여능은 선인장 열매에 함유되어 있는 quercetin이 작용한 것으로 생각된다.

Table 6. DPPH radical scavenging activities of prickly fruit extract

Sample	Scavenging activity(%)
OFS	55.07 ± 4.27
OFES	60.23 ± 0.38

OFS: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit, OFES: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit after incubation with fungal crude enzyme

3) Hydroxyl 라디칼 소거 활성

유리기란 제일 바깥쪽 전자각에 짝지어지지 않은 전자를 포함하는 화학종으로 대체로 강한 반응성을 나타낸다. 이들은 탐식작용, prostaglandin 합성과 같은 생리적 과정에서 뿐만 아니라 많은 효소 촉매반응의 중간 물질로서 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 강한 반응성 때문에 인접한 세포성분들을 무차별 공격하여 손상을 일으킬 수 있다. 유리기 중에 생체 내에서 중요한 산소 라디칼은 superoxide(O_2^-), hydroxyl(OH \cdot), perhydroxyl($HO_2\cdot$), alkoxy($RO\cdot$), peroxy($ROO\cdot$)기 등이 있다. 그 외 반응성이 강한 산소종으로 과산화수소(H_2O_2)와 1중항산소(singlet oxygen)이 있는데 이는 불안정하다. 이들 산소들을 reactive oxygen species(ROS, 활성산소)라 하고, 그 중에서 hydroxyl 라디칼과 1중항산소(singlet oxygen)가 수용액 중에서 가장 강한 반응성을 나타내어 지질산화를 개시하고 DNA에 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있고, 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소(H_2O_2)가 Fe^{2+} 나 Cu^{2+} 이온의 존재하에서 생성되는 가장 독성이 강한 유리기이다(158-162).

시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 진균 Bx가 생산하는 효소 처리 전·후의 hydroxy 라디칼 소거 활성 결과는 Table 7과 같다. OFS와 OFES 모두 50% 이상으로 hydroxy 라디칼 소거 활성이 높았으나, OFS와 OFES 각각 $50.58 \pm 6.26\%$, $56.92 \pm 4.36\%$ 로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 김 등(163)은 식물 중에 존재하는 폴리페놀화합물들이 항산화 활성에 밀접한 관련이 있으며, 폴리페놀 함량과 hydroxy 라디칼 소거 활성 사이에는 양의 상관 관계가 있다고 하였는데 본 실험의 결과와 일치하지 않았다. 항산화 물질이 hydroxy 라디칼($\cdot OH$)에 대한 항산화력은 flavonol이 가장 크며 myricetin > quercetin > rhanetin > morin > diosmetin > naringenin > apigenin > catechin > robin > kaemferol > flavone과 같으며 이는 B-ring의 OH기 수와 위치가 항산화 활성에 영향을 준다는 것을 나타낸다고 하였다(164).

Table 7. Hydroxyl radical scavenging activities of prickly fruit extract

Sample	Scavenging activity(%)
OFS	50.58±6.26
OFES	56.92±4.36

OFS: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit, OFES: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit after incubation with fungal crude enzyme

4) Hydrogen peroxide 소거 활성

Hydrogen peroxide 소거 활성은 SOD(superoxide dismutase)에 의해 생성된 H_2O_2 를 peroxidase에 의해 물과 산소 분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시키는 능력을 측정하는 것이다. 시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 진균 Bx가 생산하는 효소 처리 전·후의 hydrogen peroxide 소거 활성은 Table 8에 나타내었다. Hydrogen peroxide 소거 활성은 OFS와 OFES 모두 50%이상으로 높게 나타났고, OFS의 $52.24 \pm 10.36\%$ 에 비하여 OFES는 $79.14 \pm 9.20\%$ 로 증가하였다. 이 결과는 hydrogen peroxide 소거 활성은 플라보노이드 함량과는 상관없이 없었으나 폴리페놀 함량에 비례하여 활성이 증가하는 양의 상관관계를 나타내어, 폴리페놀 함량과 밀접한 관련이 있다는 보고(151)와 잘 일치하였다. 따라서 OFS보다 OFES의 hydrogen peroxide 소거 활성이 증가한 것은 폴리페놀이 관여하여 OFES에서 점질물과 같이 결합되어 있던 폴리페놀이 점질물의 효소 분해에 의하여 추출량이 늘어났기 때문이라고 생각된다.

Table 8. Hydrogen peroxide scavenging activities of prickly fruit extract

Sample	Scavenging activity(%)
OFS	52.24 ± 10.36
OFES	79.14 ± 9.20

OFS: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit, OFES: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit after incubation with fungal crude enzyme

5) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성

고혈압이 발생하는 기작에서 renin-angiotensin system은 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. Angiotensin I converting enzyme(ACE)은 불활성형인 angiotensin I의 C 말단 His-Leu을 절단하여 angiotensin II를 생성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이고, 혈압을 감소시키는 물질인 bradykinin을 불활성화시키는 효소이다. Angiotensin II는 A-II 수용체와 결합하여 동맥과 소동맥을 수축시키고 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진시켜 결과적으로 혈압의 증가를 가져온다. 따라서 ACE 저해물질은 ACE 활성을 억제함으로써 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있다.(165-168).

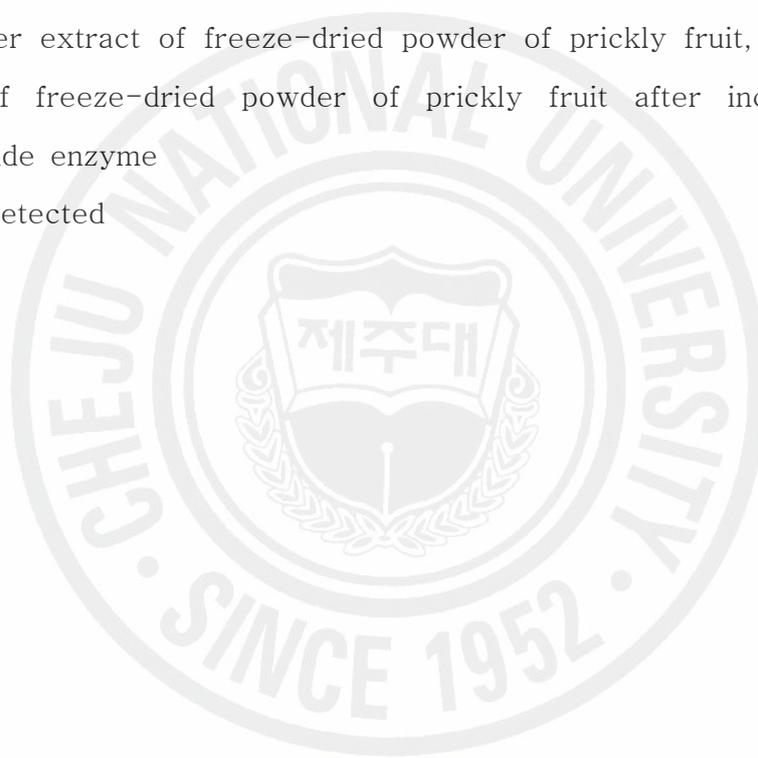
시판 선인장 열매 동결건조 분말에 분리 진균 Bx가 생산하는 효소 처리 전·후의 ACE 저해 활성의 결과는 Table 9에 나타내었다. OFS에서는 ACE 저해활성을 나타내지 않았으나, OFES는 $55.91 \pm 18.59\%$ 로 ACE 저해활성이 높게 나타났다. 이 결과는 폴리페놀 함량이 많아질수록 ACE 저해활성이 높아져 높은 상관관계를 나타냈다는 보고(169)와 잘 일치하였다. 그러나 OFS와 OFES 모두 폴리페놀을 함유하고 있음에도 불구하고 ACE 저해 활성이 OFES는 높는데 반하여 OFS에서는 나타나지 않았는데 그 이유는 무엇이며, ACE 저해활성이 있는 선인장 성분은 무엇인지, 그리고 분리된 진균이 생산하는 세포외 조효소 작용과 ACE 저해 활성 성분과의 관계에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 선인장과 유사한 알로에는 acethylmannan이 ACE 저해효과를 나타내어 IC_{50} 값은 0.58 mM이었으며 경쟁적(길항적) 저해형식을 나타내었다고 보고되었다(144).

Table 9. The ACE inhibitory activities of prickly fruit extract

Sample	Inhibitory activity(%)
OFS	ND
OFES	55.91±18.59

OFS: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit, OFES: water extract of freeze-dried powder of prickly fruit after incubation with fungal crude enzyme

ND: not detected



5. 분리 균주 Bx의 동정

1) 분리 균주 Bx의 형태학적 동정

분리된 균주의 배양적 특성을 알아보기 위하여 malto extract agar(MEA), Czapek-Dox agar(CDA), potato dextrose agar(PDA), YM agar(YMA), sauboraud dextrose agar(SDA) 배지에 균주를 접종하여 포자 색깔 등을 관찰하였다(Table 10). CDA와 SDA에서는 배양초기 갈색을 띄었고, MEA, PDA, YMA에서는 배양초기 노르스름한 빛을 띄었으나, 배양 후기에는 PDA에서의 열은 노란색을 제외하고는 나머지 배지에서 크림색을 나타내었다. 즉 배양초기보다 배양후기에는 포자 또는 균사의 색이 열어졌다. 그리고 5종의 모든 배지에서 생육상태는 양호하였다.

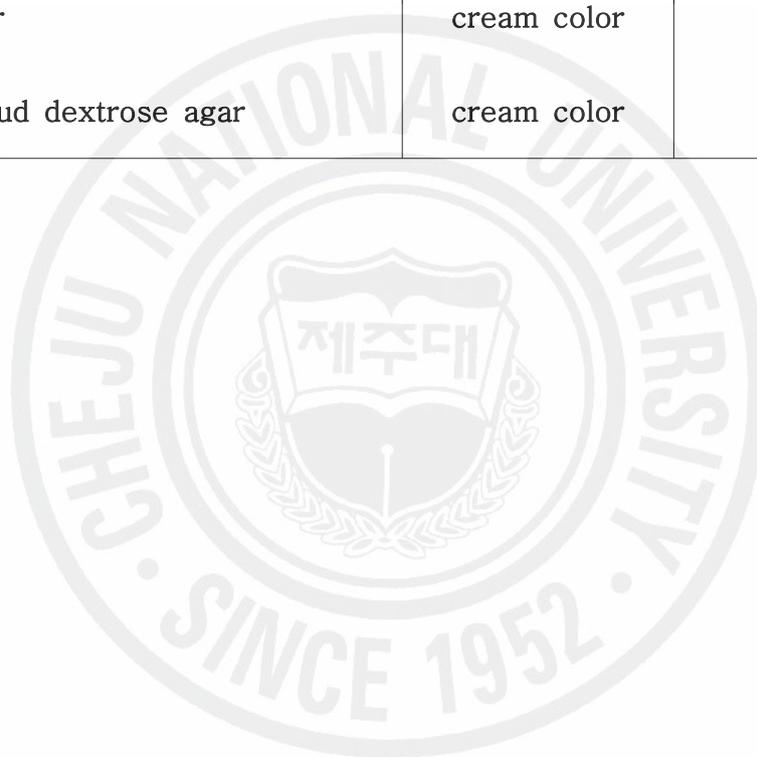
또한 400배 배율의 광학현미경하에서 진균의 형태, 포자모양, 분생자병 등을 관찰한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 곰팡이는 filamentous 형상을 하고 있으며, 포자는 방추형 또는 곤봉모양을 하고 있고, 두꺼운 세포벽으로 둘러싸여 있다. 2개의 갈색막에 의해 세 개의 구획으로 나뉘어져 있고 포자 앞쪽에 2-3개의 appendage가 있고 foot cell은 투명한 것으로 나타났다.

*Pestalotiopsis*속 균주들은 분생포자를 가지며, 포자의 모양은 원추형이고 2-3개의 열은 갈색 막으로 포자가 나뉘어져 있으며, 두꺼운 세포벽을 가지고 있고, foot cell은 투명질이며 포자의 앞쪽은 2개 이상의 appendage를 가지고 있다(122,170). 본 연구에서 분리 진균 Bx는 형태학적 특징으로 *Pestalotiopsis*속 균주로 추정되었다.

*Pestalotiopsis*속은 약 220개의 species(종)이 있으나 종사이에 형태적 특징이 많이 겹쳐지고, 지속적으로 새로운 균들이 발견되고 있다(123). *Pestalotiopsis* sp.는 형태적 특징 즉, 1) 분생포자의 median cell의 유형 2) apical appendage의 특성 3) 분생포자의 basal appendage의 존재 유무 4) 분생포자의 길이와 너비 등에 의해 분류하는데, 분류학적 유사성이 잘 구분되지 않고 애매모호하여 phylogenetic 분석에 의해 분류할 필요가 있다고 보고 된 바 있다(171).

Table 10. Cultural characteristics of fungal isolate Bx on media

Medium	Spore color	Growth
Malto extract agar	cream color	good
Czapek-Dox agar	cream color	good
Potato dextrose agar	pale yellow	good
YM agar	cream color	good
Sauboraud dextrose agar	cream color	good



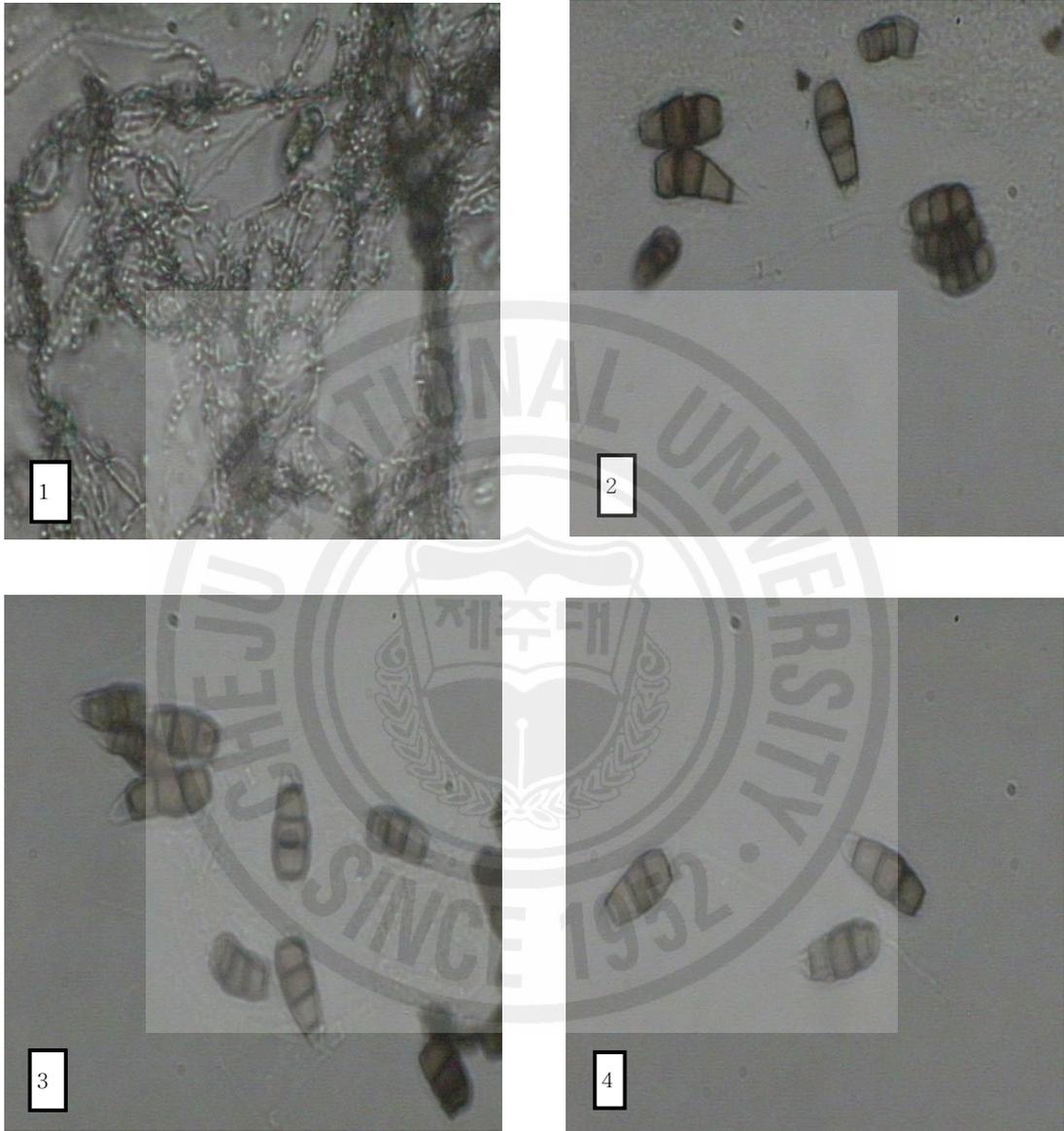


Fig. 13. Microscopic morphology of the fungal isolate Bx(x400).

1: Filamentous fungus, 2, 3 & 4: Foot cells and spores

2) Internal transcribed spacer(ITS) 5.8S rDNA sequencing

토양에서 분리한 선인장 열매 점질물 분해 균주 Bx를 동정하기 위하여 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms ; KCCM)에 의뢰하였다. 분리된 균주 Bx의 genomic DNA를 정제하여 polymerase chain reaction(PCR)에 의해 증폭시킨 후 5.8S rRNA gene sequence를 얻은 후 National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genebank(U.S. National Library of Medicine, Bethesda, Maryland)에 있는 균주들과의 nucleotide 유사성을 검정하여 동정되었다. DNA sequence의 유사성을 비교하여 균주를 동정하는 것은 자주 이용되는 방법이며, 특히 ITS-rDNA sequence를 이용한 동정은 진균의 phylogenetic 분석에 탁월하다(172-174). 5.8S rRNA gene은 163-165bp의 nucleotide sequence를 갖는 rRNA의 subunit 중의 하나로 보고 된 바 있다(175).

진균 Bx와 NCBI 균주들과의 phylogenetic 관계를 나타낸 vootstrap value를 표현한 dendogram을 Fig. 14에 나타내었다. 분리 진균 Bx와 NCBI Genebank의 균주들간의 ITS 5.8S rDNA sequence 유사성을 검정한 결과 99% 상동성으로 *Pestalotiopsis aquatica*로 동정되었다. 진균 Bx와 *Pestalotiopsis aquatica*의 ITS와 5.8S rRNA gene의 nucleotide sequence를 Fig. 15에 나타내었다. 진균 Bx는 총 482개의 nucleotide sequence들이 분석되었고, 15-156, 157-314, 315-477의 sequence들은 각각 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2를 나타내었다. 이들 sequence 중 129번째 염기만 다르게 분석되었으며, 226-239의 염기가 14bp 5.8S rRNA marker(5'-GAATTGCAGAATTC) 즉, EcoR I site를 가지고 있었다. David와 Leonard(176)는 곰팡이와 조류의 분류에 있어서 단일 EcoR I site의 존재는 곰팡이나 조류를 screen out하는데 편리한 방법이 된다고 보고 하였다.

분리 곰팡이 Bx는 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica* var. saboten) 열매 점질물을 분해하는 균주로 NCBI에 등록하여 accession No. EU190493을 부여 받았다.

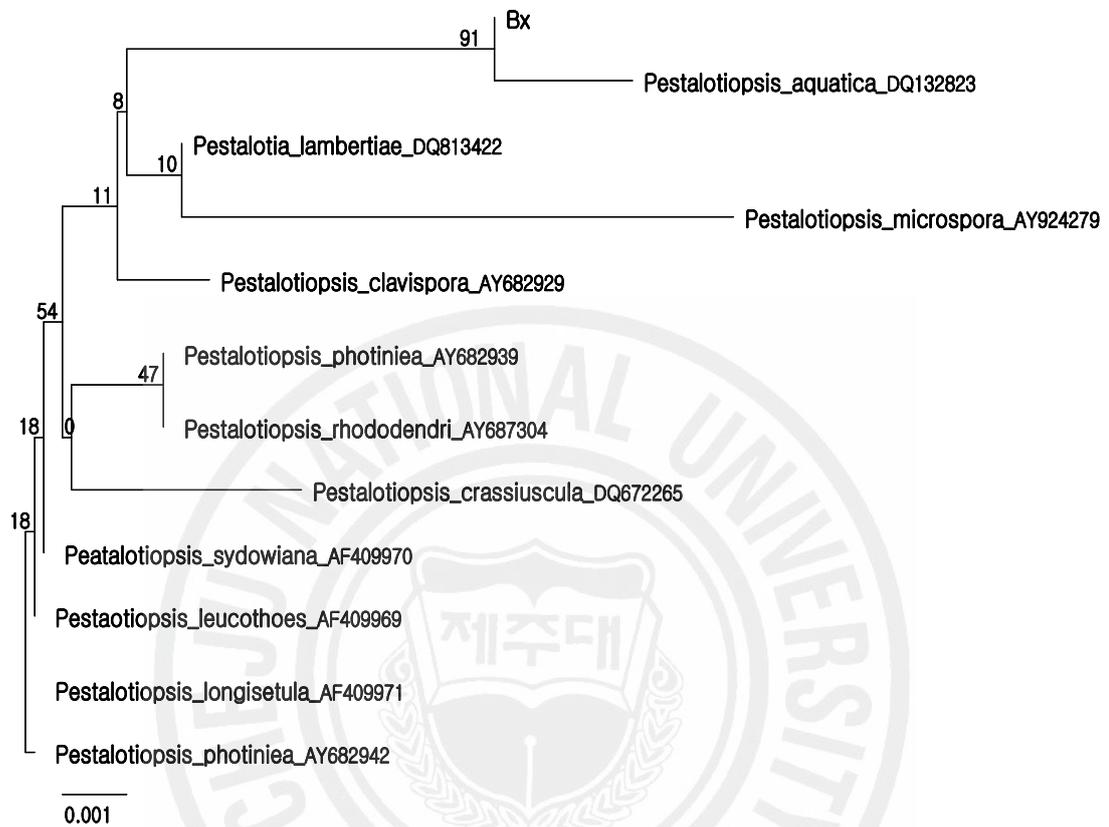


Fig. 14. Dendrogram of the ITS-5.8S rDNA region sequences of 11 *Pestalotiopsis* strains showing the phylogenetic relationship of the fungus Bx with reference taxa.

*P. aquatica*는 저장된 탄화수소 연료에서도 분리되었으나, 탄화수소를 대사에 이용할 수는 없으며(177), 중국 Naning 지역의 Podocarpaceae(나한송과)에서 분리되었고 *Pestalotiopsis* sp.는 숙주 식물에 특이성이 없다고 보고 되었다(124).

Pestalotiopsis sp.는 일반적으로 열대 다우림 식물에 기생하는 곰팡이로, 야자나무, 소나무, 비파나무, 구아바와 많은 관상식물과 같은 경제적으로 중요한 열대 식물의 잎과 줄기의 병원균으로 분리되었다(178). Strobel과 Daisy(179)는 *Pestalotiopsis* sp.가 antifungal agent인 ambuic acid, 인간 암세포주에 저항하는 cytotoxic agent인 torreyanic acid, phytotoxic pestalosite와 pestalopyrone, 항산화제인 isopestactin과 pestactin 등의 생리활성 물질을 생산하기 때문에 'microbial factory of bioactive secondary metabolites'라고 하였다.

*P. microspora*가 생산하는 2차 대사산물인 ambuic acid는 식물 병원성 곰팡이(*Fusarium solani*, *Fusarium cubense*, *Helminthosporium sativum*, *Diplodia natelensis*, *Cephalosporium gramineum*, *pythium ultimum*)에 대한 항진균 작용(antifungal activity)이 있는데, 이것은 *Pestalotiopsis* sp.와 숙주 식물 사이에는 병원성 보다는 공생관계가 더 크다고 하였다(178). *P. microspora*는 phytotoxin, pestalopyrone, hydroxypestalopyrone, pestalosite를 생산하는데 pestalosite는 숙주 식물내에 있는 다른 기생 곰팡이에 대해 항진균 작용(antifungal activity)이 있다고 보고 되었다(180). *Taxus wallachiana*(Himalayan yew) 기생 *P. microspora*와 *Wollemia nobilis* 기생 *P. guepinii*는 대사산물로 항암작용이 있는 diterpenoid인 taxol을 생산한다고 하였다(181-184). *P. microspora*는 Embden-Meyerhof 경로를 통하여 다당류(branched glucan)를 생합성하였고, 지질과 단백질로부터 당을 합성 할 수 있다고 보고 되었다(185).

Taxus brevifolia(pacific yew) 기생 곰팡이 *Pestalotiopsis* sp.(JCM 9685와 JCM 9686)의 대사산물로 5가지의 sesquiterpen(caryophyllene type of pestalotiopsin A, B, A와 humulane, drimane 유도체)와 2종의 C-methylated acetogenin((4S*, 5R*)-(6Z, 8E)-4,5-dihydroxy-6-hydroxymethyl-6,8-deca-diene, (4S*, 5R*)-(2Z, 6Z, 8E)-4,5-dihydroxy-6-hydroxymethyl-2,6,8

-decatriene)이 분리되었고, 이 대사산물 대부분이 식물독성이 있는 것으로 알려져 있으나 식물 질병 증상을 나타내지 않았다고 보고 되었다(186). *P. crassiuscula*는 스코틀랜드 소나무 수지 함량을 50% 감소시켰고, triglyceride, sterol, fatty acid를 효과적으로 분해하였으며, 펄프 독성은 제한적으로 감소시켰다. 그러나 나무 세포벽 성분인 lignin, cellulose, hemicellulose를 분해하지는 않는다고 보고 되었다(187).

*Tripterygium wilfordii*에서 분리한 *P. leucothēs*가 생산하는 BS, GS, YS라고 명명한 화합물은 immunomodulatory 효과가 있어 인간 면역관련 질병치료의 약제로서의 가능성이 있다고 보고 되었다(188).



V. 요약

제주도에서 경작되는 손바닥 선인장 열매는 많은 고분자량의 점질물을 함유하고 있고, 점질물의 높은 점도는 식품산업에 이용이 쉽지 않다. 따라서 토양으로부터 점질물을 분해시키는 진균을 분리하였고, 그 진균을 동정하였다.

손바닥 선인장 열매로부터 점질물을 추출, 정제 하였다. 점질물은 Molisch 시험결과 당화합물이었고, 0.5%의 점질물 수용액의 페놀-황산법에 의한 총당함량은 maltose 기준으로 64.85 mg/mL이었다. 점질물의 0.5% 수용액은 닐하이드린 반응에서 양성을 나타내어 아미노산이나 펩타이드를 함유하고 있음을 알 수 있었다.

토양시료에서 많은 균주들이 점질물을 유일한 탄소원으로 하고 congo red 염색 시약을 첨가한 M9배지에서 자랐고, 이들 중 congo red 염색 시약을 가장 많이 변색시킨 균주를 선별하였다. 이 균주를 점질물을 유일한 탄소원으로 첨가하고 congo red 염색시약을 첨가한 M9배지에서 계대배양하여 순수분리 하였고 Bx라고 명명 하였다. 진균 Bx 배양액으로부터 조효소를 분리하였다.

진균 효소에 의한 점질물의 분해를 확인하기 위하여 TLC, HPLC, liquid gel permeation chromatography 분석을 하였다.

TLC분석에서 선인장 열매 점질물과 분리 진균 조효소 반응액(OMES)에서는 R_f 0.19의 분해생성물이 관찰되었다. 그러나 선인장 열매 점질물 수용액(OMS), 분리 진균 조효소액(OES), 대조구인 가열하여 불화성화시킨 조효소와 선인장 열매 점질물 반응액(OHES) 모두에서는 분해 생성물이 관찰되지 않았다. R_f 0.19의 spot은 점질물이 진균 Bx 효소에 의해 분해됨을 나타내었다. 분해 생성물에 대하여 발색시약으로 닐하이드린과 페놀-황산을 사용하여 발색시킨 결과 페놀-황산만 발색을 나타내어 발색반응으로부터 분해생성물은 아미노산이나 펩타이드를

함유하지 않는 당화합물이라는 것을 확인하였다.

선인장 열매 점질물과 분리 진균 조효소 반응액(OMES)의 HPLC 분석 결과는 선인장 열매 점질물 수용액(OMS)의 머무름 시간 5.7분(MW 2×10^6)의 고분자량 물질이 머무름 시간 11.3분(MW 1×10^4)의 저분자량 물질로 이동하였음을 보여 주었다.

Shepadex G-100의 liquid gel permeation chromatography 분석에서 선인장 열매 점질물 수용액(OMS)는 8-11번 분획시료에서, 선인장 열매 점질물과 분리 진균 조효소 반응액(OMES)는 28-34번 분획시료에서 당이 검출되었다.

이 분석 결과들로부터 고분자량의 점질물이 진균 Bx의 효소에 의해 분해됨을 확인하였다.

진균 Bx의 효소가 항산화활성에 영향을 주는지 확인하기 위하여 총폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거활성, hydroxy 라디칼 소거활성, hydrogen peroxide 소거활성, ACE 저해활성을 확인한 결과 효소를 처리한 시료의 총폴리페놀함량과 플라보노이드 함량이 효소처리하지 않은 시료보다 많았고, hydrogen peroxide 소거활성, ACE 저해활성도 모두 높게 나타났다.

광학 현미경($\times 400$)하에서 진균 Bx는 실이 엉켜있는 모양을 하고 원추형의 포자를 가지고 있었다. Bx의 포자는 군집을 이루거나 흩어져 있고, 2개 이상의 apical appendage를 가지고 있고 포자내에 2개의 갈색막으로 나누어져 있었다. 진균 Bx의 ITS 5.8S rDNA sequencing 결과 99%의 상동성으로 *Pestalotiopsis aquatica*로 동정되었다.

본 연구는 손바닥 선인장 열매 점질물을 분해하는 미생물 분리 및 동정에 관한 최초의 연구 보고이다.

참고문헌

1. Swaya WN, Khatchadourian HA, Safi WM, Al-Muhammad HM. Chemical characterization of prickly pear pulp, *Opuntia ficus-indica*, and the manufacturing of prickly pear jam. J. Food Technol. 18: 183 (1983)
2. Lee YC. Food of *Opuntia ficus-indica* and direction of study in the future. In: The 1st Bukjeju-gun province industry of *Opuntia ficus-indica* forum: The situation and the direction of *Opuntia ficus-indica* from Bukjeju-gun. pp. 25-44(2004)
3. Kim IH, Kim MH, Kim HM, Kim YE. Effect of antioxidants on the thermostability of red pigment in prickly pear. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 1013-1016(1995)
4. Chung MS, Kim KH. Stability of betanine extracted from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Korean J. Soc. Food Sci. 12: 506-510(1996)
5. Han YN, Yoon ST, Lee YC, Choi JW. Development of functional foods using fruit and stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten and characterization of their physiologically active constituents. Ministry of Agriculture & Forestry pp. 28, 53-132(1999)
6. Lee HJ. *Hanguksigmuldogam hwahweryu I*. Mungyobu, Seoul, Korea p. 113(1964)
7. *Bonchogangmok* (Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs). p. 497 (1998)
8. *Jungyakdaesajeon*. Vol. 3. *Sanghaegwahakgisulchulpansa*. Sohakgwan p.1532(1985)
9. Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD. Composition of *Opuntia ficus-indica*. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 847-853(1997)

10. Korea Food Research Institute. Ingredient analysis and experiment for quality improvement of process food of *Opuntia ficus-indica* from Jeju Island. pp. 16-27(1997)
11. Ramadan MF, Mörsel JT. Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). Food Chem. 82: 339-345(2003)
12. Ennouri M, Evelyne B, Laurence M, Hamadi A. Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. Food Chem. 93: 431-437(2005)
13. Amin ES, Awad O, El-Sayed M. The mucilage of *Opuntia ficus-indica*. Carbohydr. Res. 15: 159-161(1970)
14. Paulsen BS, Lund SP. Water soluble polysaccharides of *Opuntia ficus indica*. In: Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*. (ed. Matsuhiro B, Lillo LE, Sáenz C, Urzúa CC, Zárate O.) Carbohydr. Polymers. 63: 263-267(2006)
15. Medina-Torres L, Brito-De La Fuente E, Torrestiana-Sanchez B, Katthain R. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). Food Hydrocolloids 14: 417-424(2000)
16. Jackman RL, Smith IL. Anthocyanins and betalains. In: Natural food colorants. 2nd ed., Blackie Academic and Professional, London, UK. p. 280 (1996)
17. Ghansah E, Kopsombut P, Maleque MA, Brossi A. Effects of mescaline and some of its analogs on choline allergic neuromuscular transmission. Neuropharmacology 32: 169-174(1993)
18. Burret F, Lebreton PH, Voirin B. Les aglycones flavoniques de Cactaceae: Distribution, signification. J. Nat. Prod. 45: 687-693(1982)
19. Jeong SJ, Jn KY, Kang TH, Ko EB, Kim YC. Flavonoids from the fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Kor. J. Pharmacogn. 30: 84-97(1999)

20. Arcoleo A, Ruccia M, Cusmando S. Flavonoid pigments from *Opuntia*. I. Isorhamnetin from flowers *Opuntia ficus-indica*. Annal. Chemica. (Rome) 51: 81(1961)
21. Meyer B, McLaughlin J. A note on the phytochemistry of *Opuntia* (Cactaceae). Cactus and Succulent J.(USA). 54: 226-228 (1982)
22. Miller JM, Bohm BA. Flavonol and dihydroflavonol glycosides of *Echinocereus triglochdatus* var. *gurneyi*. Phytochem. 21: 951-952(1982)
23. Richardson PM. Flavonols and C-glycosyl flavonoids of the Caryophyllales. Biochem. Syst. Ecol. 6: 283-286(1978)
24. Rosler H, Rosler U, Mabry T, Kagan J. The flavonoid pigments on *Opuntia lindheimeri*. Phytochem. 5: 189(1966)
25. Kuti JO. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. Food Chem. 85: 527-533(2004)
26. Lee EB, Hyun JE, Li DW, Moon YI. Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* stem on gastric damages in rats. Arch. Pharm. Res. 25: 67-70(2002)
27. Galati EM, Monforte MT, Tripodo MM, d' Aquino A, Mondello MR. Antiulcer activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) mill (Cactaceae): Ultrastructural study. J. Ethnopharmacol. 76: 1-9(2001)
28. Park EH, Hahng JH, Paek EA. Studies on the pharmacological actions of cactus: Identification of its anti-inflammatory effect. Arch. Pharm. Res. 21: 30-34(1998)
29. Lee NH, Yoon JS, Choi BH, Park KH. Screening of the radical scavenging effects, tyrosinase inhibition and anti-allergic activities using *Opuntia ficus-indica*. Kor. J. Pharmacogen. 31: 412-415 (2000)
30. Prasad K. Flaxseed: A source of hypocholesterolemic and antiarterogenic agents. Drug News Perspect. 13: 99-104(2000)
31. Fernandez ML, Lin EC, Trejo A, McNamara DJ. Prickly pear (*Opuntia*

- sp.) pectin alters hepatic cholesterol metabolism without affecting cholesterol absorption on guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr.* 124: 817-824(1994)
32. Son MJ, Whang K, Lee SB. Development of Jelly fortified with lactic acid fermented prickly pear extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 408-413(2005)
33. McGarvie D, Parolis PH. Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohyd. Res.* 88: 305-314(1981)
34. McGarvie D, Parolis H. The acid-labile peripheral chains of the mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohyd. Res.* 94: 57-65(1981)
35. Trachtenberg S, Mayer AM. Composition and properties of *Opuntia ficus indica* mucilage. *Phytochem.* 20: 2665-2668(1981)
36. Saag KML, Sanderson G, Moyna P, Ramos G. Cactaceae mucilage composition. *J. Sci. Food Agri.* 26: 993-1000(1975)
- 37 Goycoolea FM, Cárdenas A, Hernández G, Lizadi J, Alvarez G, Soto FJ, Valdéz M, Rinaudo M, Milas M, Hernández J. Polisacáridos aislados del mezquite y otras plantas del desierto. In: *Opuntia spp mucilage's: A functional component with industrial perspectives.* (Sáenz C, Sepúlveda E, Matsuhiro B. ed.) *J. Arid Environ.* 57: 275-290(2004)
38. Sáenz C, Sepúlveda E. Alternativas de industrialización de la tuna (*Opuntia ficus-indica*). In: *Opuntia spp mucilage's: A functional component with industrial perspectives.* (Sáenz C, Sepúlveda E, Matsuhiro B. ed.) *J. Arid Environ.* 57: 275-290(2004)
39. Sáenz C, Vásquez M, Trumper S, Fluxá, C. Extracción y composición química de mucilago de tuna (*Opuntia ficus-indica*). In: *Opuntia spp mucilage's: A functional component with industrial perspectives.* (Sáenz C, Sepúlveda E, Matsuhiro B. ed.) *J. Arid Environ.* 57: 275-290(2004)
40. Trachtenberg S, Mayer AM. Composition and properties of *Opuntia*

- ficus-indica* mucilage. Photochem. Photobiol. 20: 2665-2668(1981)
41. Nobel P, Cavelier J, Andrade JL. Mucilage in cacti: Its apoplasmic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. J. Exp. Bot. 43: 641-648(1992)
 42. Majdoub H, Roudesli S, Picton L, Le Cerf D, Muller G, Grisel M. Prickly pear nopals pectin's from *Opuntia ficus-indica* physico-chemical study in dilute and semi-dilute solutions. Carbohyd. Polym. 46: 69-79(2001)
 43. Matsuhira B, Lillo LE, Sáenz C, Urzúa CC, Zárate O. Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*. Carbohyd. Polym. 63: 263-267(2006)
 44. Forni E, Penci M, Polessello A. A preliminary characterisation of some pectin's from quince (*Cydonia oblonga* Mill) and prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) peel. Carbohyd. Polym. 23: 231-234(1994)
 45. Cárdenas A, Higuera-Ciapara I, Goycoolea F. Rheology and aggregation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) mucilage in solution. J. Professional Association for Cactus Development. 2: 152-159(1997)
 46. Habibi Y, Mahrouz M, Vignon MR. D-xylans from seed endosperm of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. Competes Rendus Chimie. 8: 1123-1128(2005)
 47. Habibi Y, Mahrouz M, Vignon MR. Isolation and structure of D-xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. Carbohyd. Res. 337: 1593-1598(2002)
 48. Whistler RL. Industrial gums, polysaccharides and their derivatives vol 1. Academic Press, New York, USA. pp. 1-19(1993)
 49. Lee SB, Whang K, Ha YD. Functional properties of mucilage and pigment extracted from *Opuntia ficus-indica*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 821-826(1998)
 50. Anon. A focus on gum. Food Technol. 3: 116-132(1991)

51. Trachtenberg S, Mayer AM. Biophysical properties of *Opuntia ficus indica* mucilage. *Phytochem.* 21: 2835(1982)
52. Medina-Torres L, Brito-De La Fuente E, Torrestiana-Sanchez B, Alonso S. Mechanical properties of gels formed by mixtures of mucilage gum (*Opuntia ficus-indica*) and carrageenans. *Carbohydr. Polym.* 52: 143-150(2003)
53. Medina-Torres L, Brito-De La Fuente E, Gómez-Aldapa CA, Aragon-Piña A, Toro-vazquez JF. Structural characteristics of gels formed by mixtures of carrageenan and mucilage gum from *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydr. Polym.* 63: 299-309(2006)
54. Medina-Torres L, Brito-De La Fuente E, Torrestiana-Sanchez B, Kathain R. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids* 14: 417-424(2000)
55. Sáenz C, Sepúlveda E, Matsuhira B. *Opuntia* spp mucilage's: A functional component with industrial perspectives. *J. Arid Environ.* 57: 275-290(2004)
56. Steglich W, Strack D. In a Brossi, Chemistry and pharmacology. In: The alkaloids. Vol 39. Academic Press, London, UK. pp. 1-62(1990)
57. Piattelli M, Imperato F. Betacyanins of the family cactaceae. In: Effect of antioxidants on the thermostability of red pigment in prickly pear. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 1013-1016(1995)
58. Huang AS, Von Elbe JH. Stability comparison of two betacyanine pigments-Amaranthine and Betanine. *J. Food Sci.* 51: 670-674(1986)
59. Pasch JH, Von Elbe JH. Betanine degradation as influenced by water activity. *J. Food Sci.* 40: 1145-1146(1975)
60. Saguy I, Goldman M, Bord A, Cohen E. Effect of Oxygen retained on beet powder on the stability of betanine and vulgaxanthine. *J. Food Sci.* 49: 99-101(1984)
61. Huang AS, Von Elbe JH. Effect of pH on the degradation and

- regeneration of betanine. J. Food Sci. 52: 1689-1693(1987)
62. Han GS, Huh YH, Ha JH, Ko YH. Stability of the pigment isolated from prickly pears, *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Cheju J. Life Sci. 3: 3-9(2004)
63. Attoe EL, Von Elbe JH. Oxygen involvement in betanine degradation: Effect of antioxidants. J. Food Sci. 50: 106-110(1985)
64. Pasch JH, Von Elbe JH. Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. J. Food Sci. 44: 72-74(1979)
65. Seo KL, Yang KH, Shin KH. Antimicrobial and antioxidative activities of *Opuntia ficus-indica* var. saboten extracts. Korean J. Postharvest Sci. 6: 355-359 (1999)
66. Kang GC, Jung DS, Han SB, Lee SJ. Extract and search of materials for physiological activity from *Opuntia ficus indica*. J. Basic Sciences 1: 35-40(1998)
67. Hong YN. Studies on the antibacterial characteristics of *Opuntia ficus-indica* extract and its potential applications. Master degree thesis, Busan Nat'l Univ. Busan, Korea (2003)
68. Heo SD, Park DS, Go GM, Kim MK, Son WG, Lee DS, Shin TK. Antibacterial effect of *Opuntia ficus-indica* fermentation in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Kor. J. Vet. Publ. Hlth. 27: 143-147(2003)
69. Lee KS, Kim MG, Lee KY. Antimicrobial effect of the extracts of cactus Chounnyouncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 1268-1272(2004)
70. Ahmad A, Davies J, Randall S, Skinner GRB. Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. Antiviral Res. 30: 75-85(1996)
71. Choi JW. The properties and the direction of study for *Opuntia ficus indica*. In: The 1st Bukjeju-gun province industry of *Opuntia ficus-*

- indica* forum: The situation and the direction of *Opuntia ficus-indica* from Bukjeju-gun pp. 47-72(2004)
72. Choi JW. Cholesterol inhibitory effect of *Opuntia ficus-indica*. In: Province forum professional committee of *Opuntia ficus-indica* from Bukjeju-gun Workshop pp. 23-52(2005)
73. Lee KS, Oh CS, Lee KY. Antioxidative effect of the fractions extracted from a cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). Korean J. Food Sci. Technol. 37: 474-478(2005)
74. Piga A, Del Caro A, Pinna I, Agabbio M. Changes in ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. Lebensm-Wiss U-Technol. 36: 257-262(2003)
75. Kwon DK, Song YJ. Effect of *Opuntia humifusa* supplementation on endurance exercise performance in rats fed a high-fat diet. Kor. J. Exercise Nutrition 9: 183-188(2005)
76. Fernandez ML, Trejo A, Mcnamara DJ. Pectin isolated from prickly pear (*Opuntia* sp.) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol fed guinea pigs. Lipids 25: 1283(1990)
77. Frati-Munari AC, de Leon C, Ariza-Andraca R, Banales-Ham MB, Lopez-Ledesma R, Lozoya X. Effect of a dehydrated extract of nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) on blood glucose. Arch. Intern. Med. 20: 211-216(1989)
78. Ennouri M, Fetoui H, Bourret E, Zeghal N, Attia H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 1. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. Bioresource Technol. 97: 1382-1386(2006)
79. Ennouri M, Fetoui H, Bourret E, Zeghal N, Guermazi F, Attia H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 2. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. Bioresource Technol. 97: 2136-2140(2005)

80. Kim DH. Decreasing effect on blood sugar of *Opuntia ficus-indica*. In: Province forum professional committee of *Opuntia ficus-indica* from Bukjeju-gun Workshop pp. 64-75(2005)
81. Lee NH, Yoon JS, Lee BH, Choi BW, Park KH. Screening of the radical scavenging effects, tyrosinase inhibition and anti-allergic activities using *Opuntia ficus-indica*. Kor. J. Pharmacogn. 31: 412-415(2000)
82. Lee HJ. Study on the antiulcer activity of *Opuntia dillenii* Haw. for stress gastric ulcer of rat. Master degree thesis, Seoul Nat'l Univ. Seoul, Korea (1997)
83. Hyun JE. Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* on respiratory system and gastric lesion in animals. Master degree thesis, Seoul Nat'l Univ. Seoul, Korea (2001)
84. Shin TK, Kim SJ, Moon CJ, Wie MB, Hyun BH. *Opuntia ficus-indica* ethanol extract ameliorates streptozocin-induced hyperglycemia in rats. Korean J. Erontol. 9: 78-83 (1999)
85. Shin TK, Kim SH. Radioprotective effect of prickly pear (*Opuntia ficus*) extract in irradiated Mice. J. Cheju. Life Sci. 1: 25-32(1998)
86. Choi J, Lee CK, Lee YC, Moon YI, Park HJ, Han YN. Screening on biological activities of the extracts from fruit and stem of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*). Kor. J. Pharmacogn. 32: 330-337(2001)
87. Dok-go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS, Cho J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quecetin, (+)-dihydroquecetin and quecetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. Brain Res. 965: 130-136 (2003)
88. Jin CB. Neuroprotective effects of antioxidative constituents isolated

- from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. In: Province forum professional committee of *Opuntia ficus-indica* from Bukjeju-gun Workshop pp. 54-62(2005)
89. Keegstra K, Talmadge KW, Bauer WD, Albersheim P. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnection of the macromolecular components. *Plant Physiol.* 51: 188-197(1973)
90. Pressey R, Hinton PM, Avants JK. Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. *J. Food Sci.* 36: 1070-1072(1971)
91. Poovaiah BW, Kukaya A. Polygalacturonase and cellulase enzymes in the normal rutgers and mutant rin tomato fruits and their relationship to the respiratory climacteric. *Plant Physiol.* 64: 534-537(1979)
92. Hultin HO, Levine AS. Pectinmethylesterase in the ripening banana. *J. Food Sci.* 30: 917-921(1965)
93. Lackey GD, Gross KC, Wallner SJ. Loss of tomato cell wall galactan may involve reduced rate of synthesis. *Plant Physiol.* 69: 122-124 (1982)
94. Shin SR, Kim MH, Kim JN, Won CY, Seo CH, Kim KS. Change on the components of free polysaccharide from cell wall of persimmon fruit by treatments of cell wall degrading enzyme. *Korean J. Postharvest Sci. Technol. Agri. Products* 2: 173-183(1995)
95. Kim JY, Koh JS. Screening of brewing yeast and saccharifying molds for foxtail millet-wine making. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 78-84(2004)
96. Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu TS. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolate from traditional Korean nuruk. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 456-464(1998)

97. Oh SH, O PS. Screening and identification of a potent fungus for producing raw corn meal saccharifying enzyme. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 547-552(1990)
98. Bae M, Kim BH, Lee KJ. Studies on the microbial utilization of Agricultural wastes. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 4: 105-110(1976)
99. Matsuo M, Fujie A, Win M, Yasui T. Four types of β -galactosidase from *Penicillium wortmanni* IFO 7237. Agric. Biol. Chem. 51: 2367-2379(1987)
100. Uziie M, Matsuo M, Yasui T. Purification and some properties of *Chaetomium trilaterale* β -xylosidase. Agric. Biol. Chem. 49: 1159-1166(1985)
101. Pakotonirainy MS, Heude E, Lavédrine B. Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book. J. Cultural Heritage 8: 126-133(2007)
102. Lee SS, Ha JK, Choi YJ, Han IK, Kim HD, Kim BJ. Studies on the isolation and identification of rumen fungi: Characterization of cellulolytic fungal enzymes and its industrial utilization. Kor. J. Nutr. Feed. 19: 419-432(1995)
103. Pedersen LH, Skouboe P, Boysen M, Soule J. Detection of *Penicillium* species in complex food sampling using the polymerase chain reaction. Inter. J. Food Microbiol. 35:169-177(1997)
104. Okuda T. Variation in colony characters of *Penicillium* strains resulting from minor variations in culture conditions. Mycologia 86: 259-262(1994)
105. Cruz-Perez P, Buttner MP, Stetzenbach LD. Specific detection of *Stachybotrys chartarum* in pure culture using quantitative polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 15: 129-138(2001)
106. Isik N, White L, Barnes R, Poynton CH, Mills KI. A simple PCR

- /RFLP analysis can differentiate between *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*. Mol. Biotechnol. 24: 229-232(2003)
107. Vesper SJ, Dearborn DG, Yike I, Sorenson WG, Haugland RA. Hemolysis, toxicity and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Stachybotrys chartmaum* strains. Appl. Environ, Microbiol. 65: 3175-3181(1999)
108. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31: 615-621(1993)
109. Hershkovitz MA, Zimmer EA. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. Nucleic Acids Res. 24: 2857-2867(1996)
110. Liston A, Robinson WA, Oliphant JM, Alvarez Buylla ER. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non-flowering plants. Sys. Bot. 21: 109-120(1996)
111. Liu JS, Schardl CL. A conserved sequence in internal transcribed spacer1 of plant nuclear rRNA genes. Plant Mol. Biol. 26: 775-778(1994)
112. Chen W, Hoy JW, Schneider RW. Species-specific polymorphism in scribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. Exp. Mycol. 16: 22-34(1992)
113. Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Mo. Bot Gard. 82: 247-277(1995)
114. Burke DJ, Martin KJ, Rygielwicz PT, Topa Ma. Ectomycorrhizal fungi identification in single and pooled root samples: Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and morphotyping compared. Soil Biol. Biochem. 37: 1683-1694(2005)

115. May LA, Smiley B, Schmidt MG. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can. J. Microbiol.* 47: 829-841(2001)
116. Gaskell CJ, Carter DA, Britton WJ, Tovey ER, Benyon FH, Lovborg U. Analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in common airborne allergenic fungi. *Electrophoresis.* 18: 1567-1569.
117. Flórez AB, Álvarez-Martín P, López-Díaz TM, Mayo B. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. *International Dairy J.* 17: 350-357 (2007)
118. Hortal S, Pera J, Galipienso L, Parladé J. Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* in the symbiotic and extraradical mycelium stages. *J. Biotechnol.* 126: 123-134(2006)
119. Zhang W, Wendel JF, Clark LG. Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from Bamboos. (Poaceae: Bambusoideae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 8: 205-217(1997)
120. Kim GY, Lee GJ, Ha MG, Lee TH, Lee JD. Intrageneric relationships of *Trichoderma* based on internal transcribed spacer and 5.8S rDNA nucleotide sequences. *Kor. Society Mycol.* 28: 11-16(2000)
121. Bae JS, Park NS, Jin BR, LHO, Park EJ, Tolgor B, Li Yu, Lee SM. Determination of the ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S rDNA sequences of *Cordyceps* species. *Int. J. Indust. Entomol.* 5: 85-91(2002)
122. Lee S, Crous PW, Wingfield MJ. Pestalotioid fungi from Restionaceae in the Cape floral kingdom. *Stud. Mycol.* 55: 175-181(2006)
123. Liu AR, Xu T, Guo LD. Molecular and morphological description of

- Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China. Fungal Divers. 24: 23-26(2007)
124. Wei JG, Xu T, Guo LD, Liu AR, Zhang Y, Pan XH. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. Fungal Divers. 24: 55-74(2007)
125. Jung YC. Production of cellulase from *Pseudomonas* sp. and expression of gene endo-1,4- β -glucanase. Available from: <http://kolas.chinju-c.ac.kr/nom026.html> Accessed May 24. 2004
126. Mascular clinical laboratory. Congo red stain protocol. Available from: <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/histol/congored.htm> Accessed Aug. 14. 1997
127. Korean biochemistry institute book edit committee. Biochemistry experiment. *Tamgudang*, Seoul, Korea pp. 147-148, 245-246(1989)
128. Ju HG, Method of Food Analysis, *Yurimmunhwasa*, Seoul, Korea p. 264(1993)
129. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. pp. 68-440(2001)
- 130 Kim CJ, Lee HG, Kim YH, Kim SG, Seo YB, Lee HS, Yoon BS. Search for Neomaterial. *Jayuakademi*, Seoul, Korea p. 399(1996)
131. Stahl E. Thin-layer Chromatography: A laboratory handbook. 2nd ed. Toppan Printing Co., New York, USA. pp. 889, 893, 900(1969)
132. Graham HD. Stabilization of the prussian blue color in the determination of polyphenols. J. Agric. Food Chem. 40:801-805(1992)
133. Kim MY. Isolation and identification of antioxidative flavonoid from garlic byproducts. Doctor degree thesis, Kyungpook Nat'l Univ. Korea(2000)
134. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free

- radical. *Nature* 181: 1199-1201(1958)
135. Chuhg SK, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical-scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 118-123(1997)
136. Muller H.E. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zbl Bakt. Mik. Hyg.* 259: 151-158(1995)
137. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1637-1648(1971)
138. Harrigan WF, McCance ME. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press, London, UK. pp. 106-108(1976)
139. Matsuhira B, Lillo LE, Sáenz, C, Urzúa C, Zárate O. Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus indica*. *Carbohydr. Polym.* 63: 263-267(2006)
140. Paulsen BS, Lund SP. Water soluble polysaccharides of *Opuntia ficus indica*. *Photochem. Photobiol.* 18: 569-571(1979)
141. Malainine ME, Dufresne A, Dupeyre D, Mahrouz M, Vuong R, Vignon MR. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*: Cellulose extraction and characterisation. *Carbohydr. Polym.* 51: 77-83(2003)
142. Femenia A, Sanchez ES, Simal S, Rossello C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydr. Polym.* 39: 109-117(1998)
143. Aspinall GO. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: The Biochemistry of plants. Vol. 3. carbohydrates: structure and function. Preiss J(ed.). Academic Press, New York, USA. pp. 473-500(1980)
144. Ryu IW, Shin YS. Inhibition effect of ACE (Angiotensin Converting Enzyme) and kinetics of aloe acethylmannan. *Korean J. Food Sci.*

- Technol. 29: 1269-1274(1997)
145. Lee SY, Min BJ, Kang TS. Flocculating activity of the mucilage extracted from *Aloe vera* Linne. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 13: 540-546(1998)
146. Waleckx E, Gschaedler A, Colonna-Ceccaldi B, Monsan P. Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber Var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. Food Chem. in press(2007)
147. Lee DS, Kim HK, Pack MY. Combination of colony formation and congo red reaction for detecting intra- and extra-cellular cellulolytic activities. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 12: 305-309(1984)
148. Yoon JH, Park JE, Suh DY, Hong SB, Ko SJ, Kim SH. Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulase in fungi. Microbiology 35: 21-24(2007)
149. Cha TY, Baek JH, Lee SY. Comparative study on chemical composition of Korean aloe of three species according to different portions. Food Eng. Progress 11: 175-184(2007)
150. Harris DC. Quantitative chemical analysis. *Jayukademi*, Seoul, Korea pp. 736-740(1994)
151. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activity of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 233-240(2005)
152. Kim GH, Choi MH. Antioxidant activity of flavonoids in plant origin food. Korean J. Postharvest 5: 121-135(1999)
153. Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang JH. Plant flavonoids, especially tea flavonols are powerful antioxidant using an *in vitro* oxidation model for heart disease. J. Agric. Food Chem. 43: 2800-2802(1995)
154. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. The antioxidant

- activities of the some commercial teas. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 723-727(2003)
155. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 85: 231-237(2004)
156. Kim SK, Ban SY, Kim JS, Chung SK. Change of antioxidant activity and antioxidant compounds in *Saururus chinensis* by extraction conditions. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 48: 89-92(2005)
157. Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrate scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 232-239(1996)
158. Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. Phytochem. 26: 2489(1987)
159. Kawagan S. Protocol for control of body functional material in food. Kakun Press center, Japan pp. 8-15(1996)
160. Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implication for the role of free radicals in drug action and toxicity. Biochem. Pharmacol. 31: 3335-3346(1982)
161. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food Chem. Toxcol. 32: 671-683(1994)
162. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H. In handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC press, USA. p 223(1989)
163. Kogukuchi N. Protocol for free radical experiment. Suiyoonsa, Japan. pp. 40-45(1999)
164. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhuy MR. Screening of the antioxidant activity of some medical plants. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 333-338(2004)
165. Noh H, Song KB. Isolation of an angiotensin converting enzyme

- inhibitor from *Oenanthe Javanica*. Agric. Chem. Biotechnol. 44: 98-99(2001)
166. Ma SJ. Inhibitory effect of onion seasoning on angiotensin converting enzyme. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 395-400(2000)
167. Vermeirssena V, Campb JV, Verstraetea W. Optimization and validation of an angiotensin converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. J. Biochem. Biophys. Methods. 51: 75-87(2002)
168. Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I converting enzyme. Lab Invest. 56: 345-348(1987)
169. Lee SE, Bang JK, Seong NS. Inhibitory activity on angiotensin converting enzyme and antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb: Cortex extract. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12: 79-84(2004)
170. Nag Raj TR. Coelomycetous anamorphs with appendage bearing conidia. Mycoogoe Publication, Waterloo, Canada (1993)
171. Xu T, Wei JG, Guo LD, Liu AR. Phylogenetic relationship of *Pestalotiopsis* species based on parsimony analysis of rDNA ITS sequences (abstract no PSI-23-0147). In: Abstracts: 8th International Mycological Congress. August 21-25, Cairns Convention Center, Queensland, Australia (2006)
172. Christine CG, Fátima MB, Joan K. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. Rev. Microbiol. 30: 1-10(1999)
173. Jobes DV, Thien LB. A Conserved Motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. Plant Mol. Biol. Rep. 15: 326-334(1997)
174. Cho ES, Kim HG, Cho YC. Sequence analysis of *Cochlodinium polykrikoides* isolated from Korean coastal waters using sequences of internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. J. Korean Soc.

- Oceanography 35: 158-160(2000) note
175. Hershkovitz MA, Lewis LA. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol. Biol. Evol.* 13: 1276-1295(1996)
 176. David AJ, Leonard BT. A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Plant Mol. Reporter* 15: 326-334(1997)
 177. Gaylarde CC, Bento FM, Kelley J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Rev. Microbiol.* 30: 1-10(1999)
 178. Li JY, Harper JK, Grant DM, Tombe BO, Bashyal B, Hess WM, Strobel GA. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochem.* 56: 463-468(2001)
 179. Strobel GA, Daisy B. Bioprotecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 67: 491-502(2003)
 180. Lee JC, Yang X, Schwartz M, Strobel G, Clardy J. The relationship between an endangered North American tree and an endophytic fungus. *Chem. Biol.* 2: 721-727(1995)
 181. Strobel GA, Yang XS, Sears J. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus walachiana*. *Microbiol.* 142: 435-440 (1996)
 182. Long DM, Smidansky ED, Archer AJ, Strobel GA. *In vivo* addition of telomeric repeats to foreign DNA generates extrachromosomal DNAs in the taxol-producing fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Fungal Genet. Biol.* 24: 335-344(1998)
 183. Strobel GA, Hess WM, Li JY. *Pestalotiopsis quepinii*, a taxol producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Aust. J. Biotech.* 45: 1073-1082(1997)
 184. Yuan JI, Jian-Nan BI, Bing YAN, Xu-Dong ZHU. Taxol-producing

- fungi: A new approach to industrial production of taxol. *Chin. J. Biotech.* 22: 1-6(2006)
185. Kai A, Karasawa H, Kikawa M, Hatanaka K, Matsuzaki K, Mimura T, Kaneko Y. Biosynthesis of ^{13}C -labeled branched polysaccharides by *Pestalotiopsis* from ^{13}C -labeled glucose and the mechanism of formation. *Carbohydr. Polym.* 35: 271-278(1998)
186. Pulici M, Sugawara F, Koshino H, Okada G, Esumi Y, Uzawa J, Yoshida S. Metabolites of *Pestalotiopsis* spp., endophytic fungi of *Taxus brevifolia*. *Phytochem.* 46: 313-319(1997)
187. Dorado J, Claassen W, Lenon G, Van Beek TA, Wijnberg JBPA, Sierra-Alvarez R. Degradation and detoxification of softwood extractives by sapstain fungi. *Bioresource Technol.* 71: 13-20 (2000)
188. Kumar DSS, Lau CS, Wan JMF, Yang D, Hyde KD. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothēs*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. *Life Sci.* 78: 147-156(2005)

감사의 글

부족함이 많은 저를 자식처럼 애정과 배려로 이끌어 주셨던 고영환 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 항상 자애로운 미소로 마음의 평안을 주셨던 송대진 교수님, 가끔 호통은 치시지만 기본과 원칙의 중요성을 가르쳐 주셨던 강영주 교수님, 열성적인 모습이 귀감이 되는 김수현 교수님, 항상 진심어린 조언으로 마음을 든든하게 해 주셨던 하진환 교수님, 학부 때부터 열정으로 지도하고 자신감을 갖게 해 주신 임상빈 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 논문을 다듬어 주신 김소미 교수님과 현창구 박사님께도 깊은 감사를 드립니다.

논문을 준비하는 동안 조언과 도움을 주었던 오유성, 김보경 선생님께 감사를 드리며, 항상 용기를 북돋워 주었던 실험실 선·후배님들에게도 감사를 드립니다. 자식이라는 공통분모를 가지고 많은 도움과 배려를 주는 친구 최승은과 이유미에게도 감사를 드립니다. 학창시절을 함께했던 제 마음의 재산인 희숙, 미경, 현숙, 은희, 희순 등 여러 친구들에게도 감사를 드립니다.

공부를 한다고 많은 배려와 사랑을 아끼지 않았던 시부모님과 큰형님 내외분께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 못한 딸자식 밖에서 제대로 앞가림 할 수 있도록 손자들 키워주시고 끈임 없는 사랑을 주시는 친정어머니께 깊은 감사를 드립니다. 또한 고인이 되셨지만 항상 마음의 기둥인 친정아버지께도 감사를 드립니다. 제가 바쁠 때면 아이들에게 엄마 대신이었던 동생 윤정, 항상 언니의 자랑인 동생 윤현, 어린 나이이지만 집안의 장남노릇을 톡톡히 하는 동생 윤성에게도 감사의 말을 전합니다.

제가 지치고 힘들어할 때마다 보듬어 주고 사랑해 준 남편 부윤섭과 나의 사랑스런 아이들 수민과 형원에게 감사의 마음과 사랑을 전하며 이 작은 결실을 드립니다.