

식품 부패미생물에 대한 천연 항균성물질의 농도별 및 분획별 항균 특성

이병완 · 신동화
전북대학교 식품공학과

Antimicrobial Effect of Some Plant Extracts and Their Fractionates for Food Spoilage Microorganisms

Byung-Wan Lee and Dong-Hwa Shin

Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

Abstract

Ethanol extracts of amur cork, elm root, plantain and dandelion which are edible and can be mass produced at farm were examined their inhibitory activity against food spoilage microorganisms at their concentrations and the extracts were fractionated by some solvents with checking effective fractionate. Above 500~2000 ppm of the extracts inhibited completely the test microorganisms with a few exception. One thousand ppm of amur cork extract inhibited *B. cereus* completely. *L. mesenteroides* by 500 ppm of amur cork and 2000 ppm of elm root and plantain showed a pretty good inhibition. The extracts which showed good inhibition to the test microorganisms were fractionated with chroloform, ethylacetate, butanol and water in order and the fractionates of butanol and chroloform showed comparatively higher inhibition than others generally. Inhibition rate of each fractionate were as follows; *B. cereus* was inhibited completely at 500 ppm of chroloform fraction, and 1000 ppm of ethyl acetate and butanol and *L. mesenteroides* was 500 ppm of butanol fraction. *P. fluorescens* was inhibited partly by 500 ppm of butanol and ethyl acetate fraction.

Key words : natural antimicrobial, food spoilage microorganisms

서 론

천연물에 존재하는 항균성물질을 식품의 보존에 이용하고자 하는 연구는 오래 전부터 수행되었고⁽¹⁾, 현재도 이에 대한 연구^(2,3)는 활발하며, 주로 향신료와 그 정유 성분⁽⁴⁻⁶⁾, 미생물이 생성하는 항균물질⁽⁷⁻⁹⁾에 대해 이루어지고 있다. 우리나라 생약재의 항균성은 오래 전부터 알려져 왔으며^(10,11) 대부분 인체에 발생하는 기생성 진균류의 억제에 관한 연구⁽¹²⁻¹⁴⁾가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 천연 항균성물질은 항균효과가 인공합성 보존료에 비교될 정도가 되지 못하기 때문에 아직까지 실용적으로 식품산업에 이용되는 경우는 별로 없는 실정이다. 근래 인공합성 보존제의 안전성이 계속 문제가 되는 한편, 천연물에 대한 소비자의 요구가 높아지기 때문에 앞으로 천연물로부터 항균성물질의 개발은 천연 식품보존제의 개발이라는 의미에서 그 의의가 있다고 본다.

따라서 본 연구에서는 약용식물학 등^(15,16)에서 방부 또는 살균효과가 있어 예로부터 민간에서 식품에 사용

되어 그 안전성이 확인된 식물이나 생약재에 대해 항균성을 예비검색하여 우수한 효과가 인정되는 식물 추출물을 대상으로 이들을 각 용매별로 분획, 몇 종의 식품 부패미생물에 대하여 항균성을 실험하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 항균성 시험대상 식물은 생약재^(15,16) 혹은 우리가 오랫동안 식용해왔던 식물 및 그 부산물로서 1차 시험에서 선정된 것으로 그 식물명은 Table 1과 같다. 이들 시료를 건조하거나 생것을 그대로 미세하게 마쇄한 후 추출용 시료로 사용하였다.

추출방법 및 Soluble solid 함량 측정

대상 시료의 추출은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 후라스크에 시료 5배 정도의 물 또는 75% 에탄올을 혼합하여 95℃와 85℃의 수욕상에서 3시간 동안 가열 후 여과하여 rotatory vacuum evaporator로 에탄올을 증발시켰고^(17,18), soluble solid 함량은 증발된 추출물 1 ml를 취하여 105℃에서 건조 후 증발잔사의 양으로 하였다.

Corresponding author : Dong-Hwa Shin, Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Dukjin-Dong, Chonju, Chonbuk 560-756, Korea

Table 1. List of plants used for antimicrobial experiment

Plant	Botanical source	Plant part
Amur cork	<i>Phellodendron amurense</i>	Bark
Dandelion	<i>Taraxacum platyarpum</i>	Leaves
Elm	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	Root
Oak	<i>Quercus aliena</i>	Leaves
Plantain	<i>Plantago asiatica</i>	Root & Leaves
Rigida	<i>Pinus rigida</i>	Leaves

사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 곡류식품, 야채류, 냉장 육류식품 및 발효식품의 변질에 관계있는 것으로 증식 및 보존에 사용한 배지는 Table 2와 같다.

추출물의 항균성 검색

각 추출물의 항균성 검색은 slant에 배양된 각 균주 1백금이 취해 10 ml broth에 접종하여 30°C, 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 액 0.1 ml를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 4~5 mm인 plate에 주입한 후 구부린 유리막대로 균일하게 펼치고, 멸균된 0.65 mm filter paper disc(Whatman No.2)에 각 추출물을 흡수시켜 plate 표면 위에 놓아 30°C, 24~48시간 동안 배양 후 disc 주위의 clear zone의 직경(mm)으로서 비교^(5,7,19,20)하였다.

추출물의 분획

75% 에탄올로 추출하여 얻은 추출물을 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 부탄올로 계속 분획^(21,22)하여 각각 농축, 각 용매의 분획물을 얻고 최종적으로 물층을 얻었다.

추출물의 저해능도의 측정

각 추출물을 membrane filter(0.2 µm)로 제균시키고, broth에 각 추출물의 soluble solid를 ppm 단위로 첨가한 후 각 대상균주의 slant에서 배양된 균주 1백금을 취해 10 ml broth에 접종, 30°C, 24시간 동안 배양시켜 이 배양액 0.1 ml를 취해 다시 10 ml broth에 접종하여 30°C, 24시간 동안 배양한 배양액 0.1 ml를 각 추출물이 함유된 broth에 접종하여 배양하였다. 추출물의 농도별 항균성

효과는 미생물의 생육정도를 spectrophotometer(Milton Roy Spectronic 21D)를 사용하여 620 nm에서 흡광도를 측정^(4,23)하였고, 추출물을 넣은 broth를 blank로 사용하였다.

결과 및 고찰**에탄올 추출물의 농도별 항균효과 측정**

1차 실험에서 상당한 항균성 인정된 황백, 느릅뿌리, 질경이, 민들레의 75% 에탄올 추출물에 대한 농도별 항균변화는 Fig. 1~4와 같았다. *B. cereus*에 대한 농도별 항균효과 측정에서 황백의 추출물은 Fig. 1에 나타난 것과 같이 1000 ppm에서 증식 저지효과를 나타내 2000 ppm에서는 완전한 증식 저지효과를 나타냈으며, 느릅뿌리의 추출물은 500 ppm에서 증식을 저지하여 2000 ppm에서 상당한 증식 저지효과를 보였다.

*L. plantarum*에 대해 느릅뿌리의 추출물은 Fig. 2에 나타난 것과 같이 2000 ppm에서 약간의 증식 저지효과를 나타냈지만, 황백 추출물은 1000 ppm에서 완전한 증식 저지효과를 나타냈다. *L. mesenteroides*에 황백의 추출물은 Fig. 3에 나타난 것과 같이 500 ppm에서 완전한 증식 저지효과를 보였으며 *P. fluorescens*에는 황백, 느릅뿌리, 질경이 등의 추출물이 Fig. 4에 나타난 것과 같이 2000 ppm에서 상당한 증식 저지효과를 보였다.

쑥씨의 정유성분⁽⁴⁾인 terpinen-4-ol은 *B. subtilis*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*에 1000 ppm에서 증식이 완전히 억제된다는 것으로 보아 본 실험에서 사용한 추출물을 정제, 분리할 경우 상당한 효과가 기대된다. 또한 이상의 결과에서 황백, 느릅뿌리, 질경이 등의 추출물이 균주에 따라 높은 항균성을 보여 이들 상호간의 combination에 의한 항균효과는 상당히 흥미있는 결과를 기대할 수 있을 것으로 본다.

추출물의 분획별 항균성 검색

생약재 및 식물에 항균성물질이 상당히 존재가 생각되는 황백, 덧잎, 느릅뿌리, 갈참나무, 질경이, 리기다 등의 75% 에탄올 추출물에서 항균성물질을 분리 할 목적으로 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 그 항균성을 검색하였고, 그 결과는 Table 3과 같다. 이들 식물의 항균성물질은 특정 용매에만 용해되지 않고 일부 다른 용매에도 용해되고 있는데, 모든 실험

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

Strain	Media
<i>Bacillus cereus</i> YUFE 2004	Nutrient agar(Difco) & tryptone soya broth(Oxoid)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Nutrient agar(Difco) & tryptone soya broth(Oxoid)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lactobacillus MRS broth & agar(Merck)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFCC 35471	Lactobacillus MRS broth & agar(Merck)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 1645	Nutrient agar(Difco) & tryptone soya broth(Oxoid)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 0304	Malt agar & malt broth(Difco)

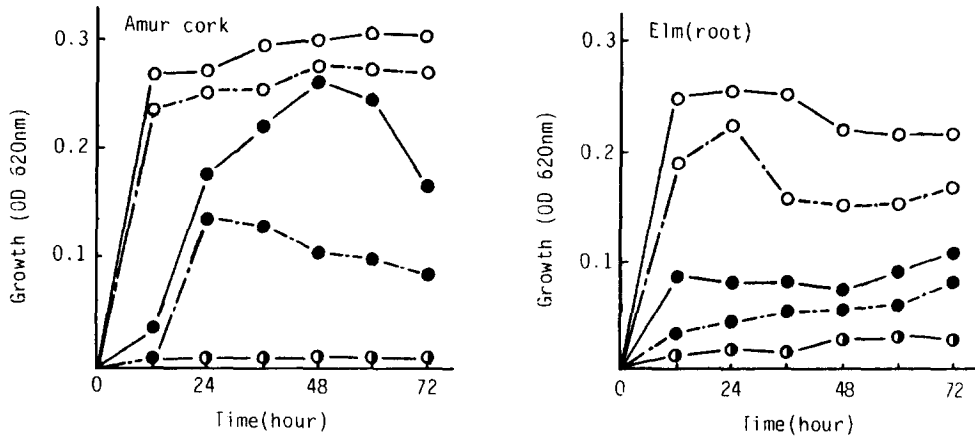


Fig. 1. Growth inhibition by ethanol extract of each plant on *Bacillus cereus*

○—○ : control, ○---○ : 100, ●—● : 500, ●---● : 1000, ○—● : 2000 ppm

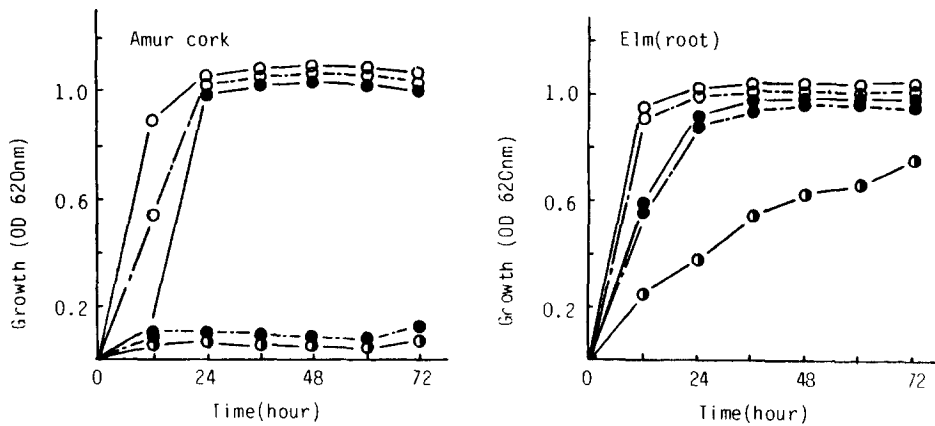


Fig. 2. Growth inhibition by ethanol extract of each plant on *Lactobacillus plantarum*

○—○ : control, ○---○ : 100, ●—● : 500, ●---● : 1000, ○—● : 2000 ppm

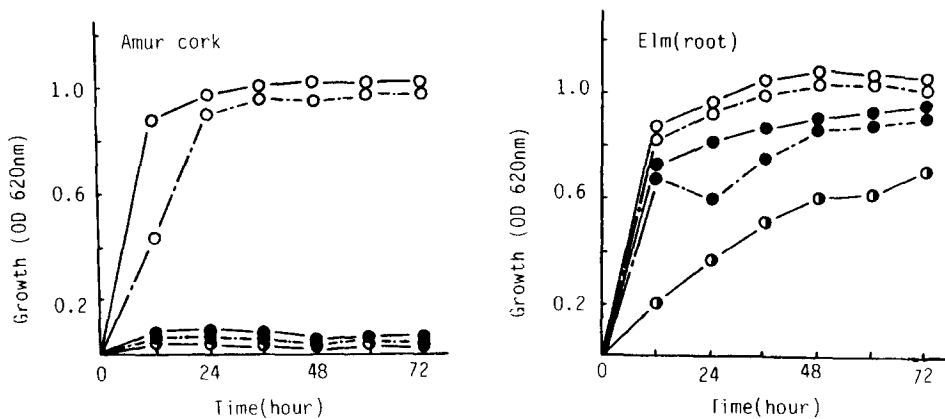


Fig. 3. Growth inhibition by ethanol extract of plant on *Leuconostoc mesenteroides*

○—○ : control, ○---○ : 100, ●—● : 500, ●---● : 1000, ○—● : 2000 ppm

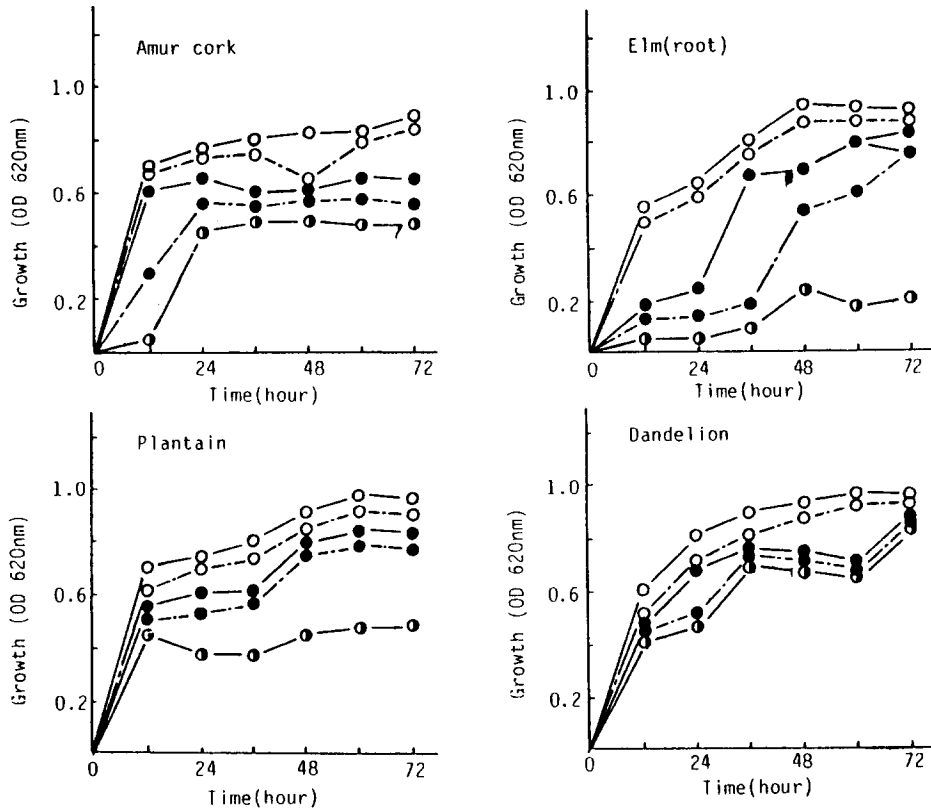


Fig. 4. Growth inhibition by ethanol extract of each plant on *Pseudomonas fluorescens*

○—○ : control, ○—● : 100, ●—● : 500, ●—● : 1000, ●—● : 2000 ppm

Table 3. Growth inhibition of different solvent fractions on several microorganisms

Solvent		Clear zone on plate (mm)						Soluble solid content (mg/disc)
		<i>B. subtilis</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. cereus</i>	
CHCl ₃	Amur cork	0	12	10	15	0	18	1.6
	Bamboo	0	11	12	0	12	0	1.0
	Elm(root)	12	12	12	0	7	0	1.3
	Oak	0	11	0	0	10	0	1.4
	Plantain	7	10	11	0	12	0	1.5
	Rigida	0	0	10	0	10	0	1.3
EtOAc	Amur cork	13	12	10	14	0	17	1.5
	Bamboo	0	12	12	0	12	0	1.2
	Elm(root)	0	10	10	0	0	0	0.9
	Oak	20	0	0	0	0	15	1.1
	Plantain	7	10	10	0	10	0	1.4
	Rigida	8	0	10	0	10	0	1.2
BuOH	Amur cork	27	27	14	20	13	20	1.7
	Bamboo	0	11	11	0	13	0	0.8
	Elm(root)	0	0	0	0	0	0	1.8
	Oak	9	0	0	0	0	0	1.5
	Plantain	0	10	11	0	8	0	1.4
	Rigida	0	0	9	0	9	0	1.3
Water	Amur cork	0	10	0	10	0	11	1.4
	Bamboo	0	11	13	0	11	0	1.4
	Elm(root)	0	10	0	0	0	0	1.7
	Oak	11	0	0	0	0	0	0.8
	Plantain	15	10	10	0	8	0	1.5
	Rigida	0	0	0	0	7	0	1.2

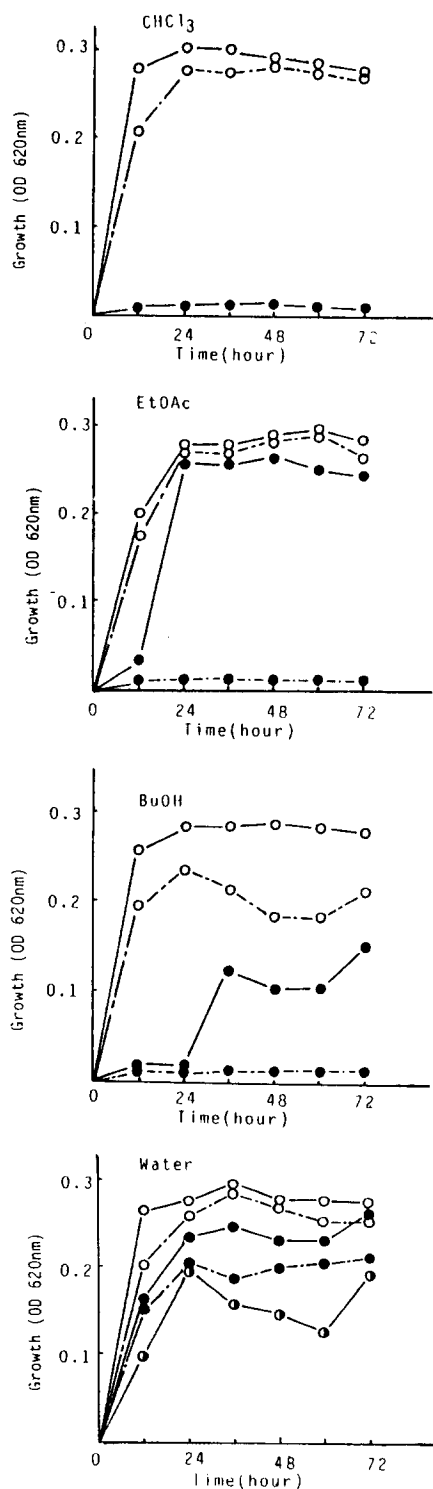


Fig. 5. Growth inhibition of each fraction of *Phellodendron amurense* on *Bacillus cereus*

○—○ : control, ○—○ : 100, ●—● : 500, ●—● : 1000, ●—● : 2000 ppm

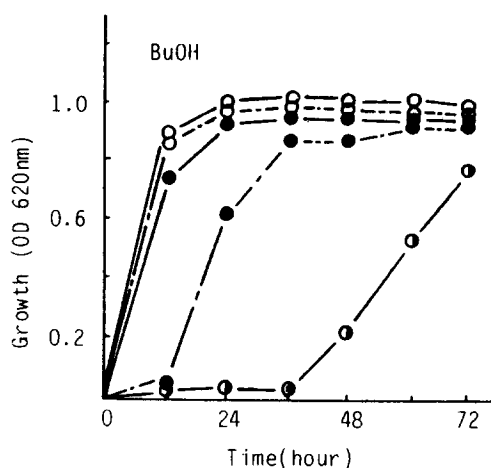


Fig. 6. Growth inhibition of each fraction of *Phellodendron amurense* on *Lactobacillus plantarum*

○—○ : control, ○—○ : 100, ●—● : 500, ●—● : 1000, ●—● : 2000 ppm

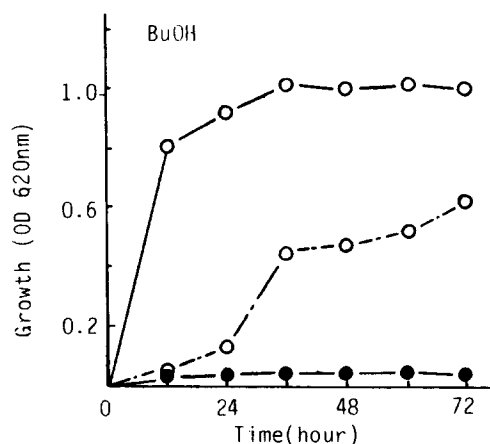


Fig. 7. Growth inhibition of each fraction of *Phellodendron amurense* on *Leuconostoc mesenteroides*

○—○ : control, ○—○ : 100, ●—● : 500, ●—● : 1000

대상 균에 대하여 황백의 부탄올 용해물질에서 가장 높은 항균성을 보였으며, *B. subtilis* 및 *L. plantarum*에는 물 용해분에서 높았고, 다른 균종은 모두 클로르포름에 용해분에서 높았다. 따라서 일반적으로 실험대상 식물에서는 부탄올 및 클로르포름에 용해되는 성분이 높은 항균성을 보였다.

홍 등⁽¹⁹⁾은 유백피의 부탄올 분획에서 *B. subtilis*에 강한 항균성이 있다고 보고하였는데, 본 실험에서 느릅뿌리의 클로르포름 분획물에서만 항균효과를 보이고 있다. 이와같이 분획 용매별로 각 균주에 대한 항균성이 다른 것은 항균성물질이 단일물질이 아니라는 것을 시사하는 것으로 사료된다.

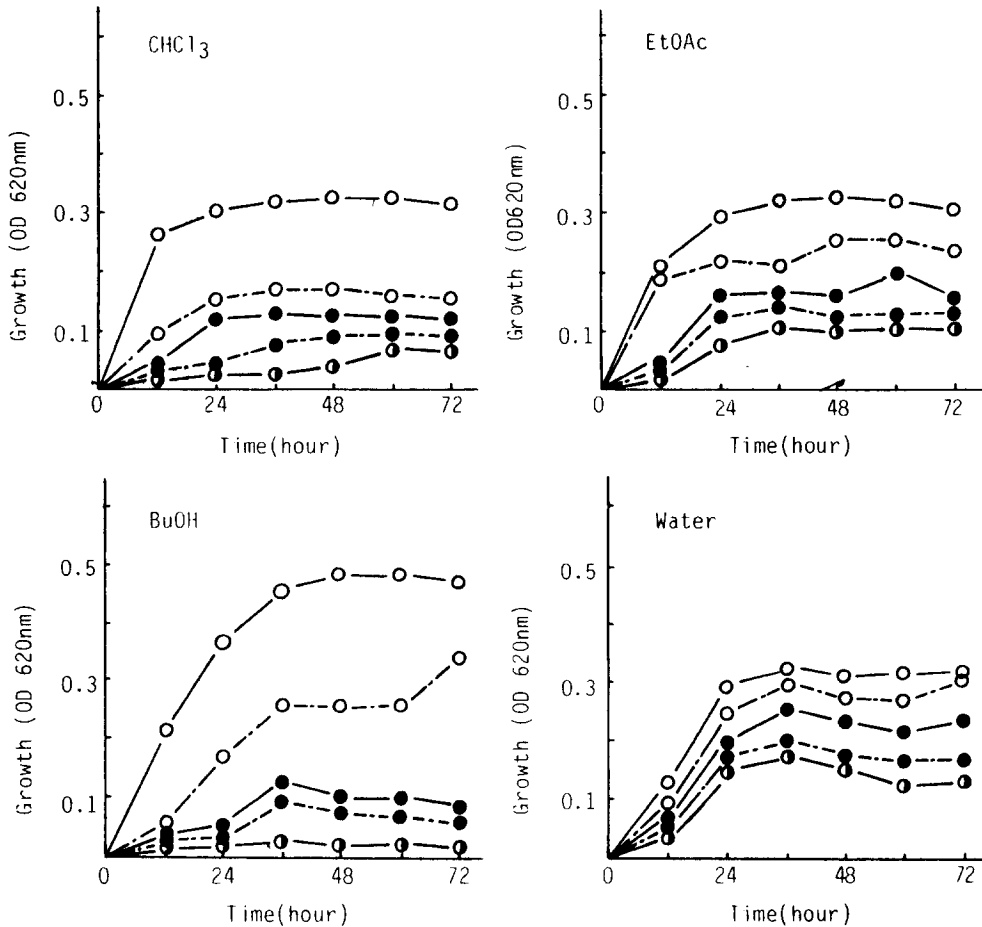


Fig. 8. Growth inhibition of each fraction of *Phellodendron amurense* on *Pseudomonas fluorescens*

○—○ : control, ○—○ : 100, ●—● : 500, ●—● : 1000, ○—○ : 2000 ppm

황백 분획물의 농도별 항균효과

Table 3의 분획별 항균성 검색에서 우수한 결과를 보인 황백에 대해 농도에 따라 항균효과를 측정하여 그 결과를 Fig. 5~8에 나타내었다. *B. cereus*에 대해 Fig. 5에 나타난 것과 같이 클로르포름 분획물은 500 ppm, 에틸 아세테이트 분획물과 부탄올 분획물은 1000 ppm에서 완전한 증식 저지효과를 나타냈다. *L. plantarum*에는 Fig. 6에 나타난 것과 같이 부탄올 분획물에서만 2000 ppm에서 36시간까지 저지효과를 보였고, *L. mesenteroides*에는 Fig. 7에 나타난 것과 같이 부탄올 분획물에서 100 ppm에서 효과를 나타냈고, 500 ppm에서는 완전한 증식 저지효과를 나타냈다. *P. fluorescens*에는 Fig. 8에 나타난 것과 같이 클로르포름 분획물은 100 ppm, 에틸 아세테이트와 부탄올 분획물은 500 ppm에서 저지효과를 보였고, 2000 ppm에서는 모든 분획물에서 상당한 저지효과를 나타냈다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 실험대상 미생물에 대하여

황백의 추출물은 폭넓게 항균성을 보이고 있으며, 항균성에 관여하는 물질은 단일물질이라고 생각하기는 어렵다고 여겨진다.

요 약

천연물에 존재하는 항균성물질을 정제, 분리할 목적으로 대량생산이 가능하며 식용하고 있는 식물로서 비교적 항균성이 높은 황백, 느릅뿌리, 질경이 및 민들레의 에탄올 추출물로 농도별 항균성을 시험하였고, 클로르포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 얻은 분획물의 항균성 검색과 항균성이 우수한 황백과 질경이 분획물은 농도별로 항균효과를 검토하였다. 황백, 느릅뿌리, 질경이 및 민들레의 에탄올 추출물로 농도별 항균성을 시험한 결과 균종에 따라 차이가 있지만 일반적으로 500~2000 ppm에서 완전 혹은 상당한 증식 저지현상을 보였다. *B. cereus*는 황백 1000 ppm, 느릅뿌리

500 ppm에서 증식 저지를 보였고, *L. plantarum*은 황백 1000 ppm, *L. mesenteroides*는 500 ppm에서 완전 저지되었으며 *P. fluorescens*는 황백, 느릅뿌리 및 질경이 추출물 2000 ppm에서 상당한 저지효과를 보였다. 항균성이 확인된 식물 추출물의 유효성분을 확인하기 위하여 클로르포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 및 물로써 계속 분획하여 농축물을 얻고 이에 대하여 항균성을 시험한 결과 일반적으로 부탄올과 클로르포름 분획에서 얻어진 물질이 높은 항균성을 보였다. 항균성이 가장 높은 황백을 분획하여 농도별로 각 대상균에 대하여 항균성을 비교한 결과 *B. cereus*는 클로르포름 분획물 500 ppm, 에틸 아세테이트 및 부탄올 분획물 1000 ppm에서 완전 증식저지를 보였고, *L. mesenteroides*는 부탄올 분획물 500 ppm에서 완전 증식저지를 보였으나, *P. fluorescens*는 부탄올과 에틸 아세테이트 분획물 500 ppm에서 저지효과를 나타냈다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 한국과학재단 연구비(일반)에 의하여 이루어진 결과의 일부로서 저자들은 이에 심심한 감사를 드립니다.

문헌

1. Bass, G.K. : Methods of testing disinfectants. In *Disinfection, Sterilization* 2nd (ed.), Block, S.S., ed., Lea and Febiger, Philadelphia p.49(1977)
2. Beuchat, L.R. and Golden, D.A. : Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, **43**, 134(1989)
3. Davidson, P.M. and Post, L.S. : Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In *Antimicrobials in Foods*, Brannen, A.L. and Davidson, P.M., (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York p.371(1983)
4. 정병선, 이병구, 심선택, 이정근 : 쑥씨 중의 정유성분이 미생물의 생육에 미치는 영향. *한국식문화학회지*, **4**, 417(1989)
5. Conner, D.E. and Beuchat, L.R. : Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. *J. Food Sci.*, **49**, 429(1984)
6. Shelef, L.A., Naglik, O.A. and Bogen, D.W. : Sensitivity of some common food borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *J. Food Sci.*, **45**, 1042(1980)
7. Brannen, A.L., Go, H.C. and Genske, R.P. : Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetilactis* and *Luconostoc citrovorum*. *J. Food Sci.*, **40**, 446(1975)
8. Pulusani, S.R., Rao, D.R. and Sunki, G.R. : Antimicrobial activity of lactic cultures-Partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, **44**, 575(1979)
9. Abdel-Bar N., Harris, N.D. and Rill, R.L. : Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.*, **52**, 411(1987)
10. 岡崎實藏, 加藤, 苫田部武男 : 高等植物の抗菌性(第6報). 生薬類の抗菌性(第2報). *藥學雜誌*, **71**, 1(1950)
11. 岡崎實藏, 苫田部武男 : 生薬の抗菌性(第4報). *藥學雜誌*, **71**, 6(1950)
12. 김홍식, 조광현 : 편측 추출물의 항진균 작용에 관한 연구. *한국균학회지*, **8**, 1(1980)
13. 조병헌 : Trithioformaldehyde, benzalanilline 및 초파나무 alcohol 추출물의 항진균 작용. *카톨릭대학 의학부 논문집*, **10**, 65(1966)
14. 이규룡 : Trimethylenetrianiline, benzoin 및 회향유의 항진균 작용. *카톨릭대학 의학부 논문집*, **14**, 379(1968)
15. 황도연, 김의진 : 원방 최신방약합편. *동양종합통신교육원*, 1989
16. 강삼식, 윤혜숙, 장일무 : 천연물과학. *서울대학교 출판부*, 1988
17. 박수용, 김찬조 : 생약재에 의한 식품보존에 관한 연구(제1보). 몇 가지 생약재의 간장 방부효과. *한국농화학회지*, **22**, 91(1979)
18. 강신주, 이혜성 : 식용 야채류의 항진균작용에 관한 연구. *경북사범대학 교육연구집*, **19**, 129(1977)
19. 홍남두, 노영두, 김남재, 김진식 : 유백피의 약효연구. *생약학회지*, **21**, 217(1990)
20. 정호진, 김일혁 :小青龍湯의 미생물학적 연구. *생약학회지*, **14**, 119(1983)
21. 최재수, 박시향, 김일성 : 야생 식용식물의 약물대사 활성성분에 관한 연구. *생약학회지*, **20**, 117(1989)
22. 김창인, 이경복 : 개느삼의 성분 및 생물활성에 관한 연구. *생약학회지*, **21**, 137(1990)
23. 임춘미, 경규향, 유양자 : BHA 및 BHT의 미생물 성장 억제 효과. *한국식품과학회지*, **19**, 54(1987)

(1991년 1월 26일 접수)