

갓 (*Brassica juncea*) 의 에탄올추출물이 미생물 생육에 미치는 영향

강성구[†] · 성낙계* · 김용두 · 이재근 · 송보현 · 김영환 · 박석규**

순천대학교 식품공학과

*경상대학교 식품공학과

**순천대학교 식품영양학과

Effects of Ethanol Extract of Leaf Mustard (*Brassica juncea*) on the Growth of Microorganisms

Seong-Koo Kang[†], Nack-Kie Sung*, Yong-Doo Kim, Jae-Keun Lee, Bo-Hyeon Song,
Young-Whan Kim and Seok-Kyu Park**

Dept. of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

To develop natural food preservatives, ethanol extract was prepared from the leaf mustard (*Brassica juncea* Coss.) and antimicrobial activities were examined against 12 microorganisms which were food borne pathogens and/or food poisoning microorganisms and food-related bacteria and yeasts. The most active antimicrobial concentration of the ethanol extract for most Gram positive microorganisms, Gram negative microorganisms, and lactic bacteria and yeasts was found to be 10, 20 and 40mg/ml, respectively, when tested by a dose response manner. Growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were completely inhibited 4 hours after the addition of more than 20mg/ml of ethanol extract to the logarithmic phase. Scanning electron micrographs of *E. coli* and *Staph. aureus* treated with ethanol extract exhibited morphological changes, including the irregularly contracted cell surface of *E. coli* and expanded ellipsoidal shape of the *Staph. aureus*.

Key words : leaf mustard, natural antimicrobial substance, minimum growth inhibition

서 론

식품의 저장기술은 외부로부터 미생물의 침입을 방지하고, 침입한 미생물의 생육을 어떤 방법으로 저지할 것이며, 또한 식품성분의 상호작용이나 식품조각 중에 내재하는 효소에 의한 생화학적 반응을 피할 것인가가 가장 중요한 과제이다¹⁾. 이런 목적으로 화학합성품의 살균제나 보존료가 일반적으로 많이 사용되어 왔는데^{2,3)}, 최근 식생활에 있어서 안정성 문제 등으로 합성첨가물의 기피현상이 강하게 일어나 천연물에 의한 식품저장의 수단으로 일상생활에서 많이 섭취해온 식품 재료로부터 천연 항균성 물질의 검색과 식품의

이용에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다⁴⁻¹³⁾.

자연계에는 항균작용을 나타내는 물질이 많이 알려져 있고, 동·식물 또는 미생물에 있어서도 여러 가지 형태로 자기 방어수단으로서 항균 기능을 갖추고 있다. 항균 작용을 나타내는 천연물이 식품보존료로서 이용되기 위해서는 반드시 안전성이 확보되어야 하는데¹⁴⁾, 식품의 경우에는 인간이 계속해서 섭취해 왔던 동·식물의 조직으로부터 항균성분을 추출해서 이용하는 것이 바람직하다고 본다¹⁵⁾. 따라서 본 연구자들은 옛부터 김치재료, 조미료 및 향신료 등으로 식품에 사용되고 있는 한국산 재래종 갓¹⁶⁾이 이미 발표한 연구결과¹⁷⁾에서 에탄올로 추출한 성분이 항균효과가 높았으므로, 본 연구에서는 몇 종의 식품 부패미생물, 식중독 원인세균 및 발효식품 미생물에 대하여 갓 에탄올

[†]To whom all correspondence should be addressed

추출물의 항균성 물질이 미생물 증식에 미치는 영향과 전자현미경에 의한 세균의 형태변화를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 항균성 물질의 추출용 재료는 전보¹⁷⁾에서와 같은 한국산 재래종 갓 (*leaf mustard, Brassica juncea*)을 사용하였다.

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 그람 양성균 3종, 그람 음성균 3종, 젖산균 3종 및 효모 3종을 사용하였으며 (Table 1), 균 생육에 사용된 배지는 전보¹⁷⁾에서와 같다.

에탄올추출물

갓 에탄올추출물은 습진 세절한 시료 1.0kg을 에탄올 6L로 24시간 동안 상온에서 교반침출시킨 후 1차 추출하고, 다시 에탄올 6L를 가하여 동일한 방식으로 2차 추출한 후 추출액 모두를 여과 (Whatman No. 2)하였다. 추출여액을 evaporator로 50°C 수욕상에서 약 100ml로 감압 농축한 후 증류수 1L를 가한 다음 잘 혼합하여 5°C의 냉장고에서 24시간 방치한 다음, 3500rpm으로 원심분리하여 침전된 수지성분을 2회 반복하여 제거하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 evaporator로 감압 농축하여 최종적으로 에탄올추출물 (고형물 155.8g)을 얻은 다음, 에탄올을 가하여 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

Soluble solid 함량 측정

Soluble solid 함량은 감압농축된 추출물 1ml를 취하여 105°C에서 건조 후 증발잔사의 무게를 측정하여

첨가량(mg)으로 나타내었다¹⁸⁾.

추출물의 항균력 측정

에탄올추출물의 농도별 항균효과는 액체배지 희석법을 이용하여 측정하였다. 갓 에탄올추출물이 세균 및 효모증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 갓 에탄올추출물의 고형분 함량을 각각 2.5, 5, 10, 20, 40mg/ml 농도가 되도록 조절하여 균증식을 측정하였다. 즉, 멸균된 배지 8.5ml에 균 희석액 0.5ml와 추출물의 최종 농도가 적당하게 20배 농축된 검액 0.5ml를 가하고 멸균수로 10ml가 되도록한 다음, 30°C에서 배양하면서 경시적으로 미생물의 생육정도를 spectrophotometer (東京光電, Mode 1)를 사용하여 흡광도 (660nm)를 측정하였다. Blank는 추출물을 넣은 배지를 사용하였으며, 균 집종액은 3회 계대배양한 시험균을 생리식염수에 현탁하여 흡광도가 0.3이 되도록 조정한 배양액을 사용하였다¹⁸⁾.

미생물의 형태 관찰

30°C에서 대수기 중기까지 배양한 균체액 5ml에 갓 추출액을 소정의 농도가 되도록 가하고 30°C에서 1시간 진탕배양한 후 배양액을 원심분리 (10,000×g, 10분, 4°C)하여 제거시키고 균체를 집종한 다음 주사식 전자현미경 (SEM, JEOL T330A)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

에탄올추출물의 농도별 항균활성

항균력 측정에 사용된 12균주에 대해서 전보¹⁷⁾에서 항균력이 우수하였던 에탄올추출물을 2.5~40mg/ml 까지 농도별로 첨가한 배지에서 균증식을 조사한 결과, 그람 양성균은 Fig. 1, 그람 음성균은 Fig. 2, 젖산균은 Fig. 3, 효모는 Fig. 4에 나타난 바와 같다.

그람 양성균의 경우 *B. subtilis*와 *B. cereus*는 10mg/ml에서 배양 24시간 까지 균증식이 억제되다가 그 이후 서서히 증가를 하였으며 20mg/ml에서는 완전히 억제되었다. *S. aureus*는 저농도에서 오히려 균증식이 촉진되었으며 20mg/ml에서 배양 24시간 까지 억제되다가 서서히 증가를 하였고, 40mg/ml에서 완전히 억제되었다.

그람 음성균인 *S. typhimurium*, *E. coli* 및 *P. fluorescens*는 5mg/ml 이하의 추출물을 함유한 배지에서는 균증식이 약간 증가함을 보였으나, 10mg/ml에서는 다소 억제되었으며 20mg/ml 이상에서는 거의 증식을 하지

Table 1. List of strains used for this experiment

Gram positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 27348
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13301
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 15489
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 11250
Lactic acid bacteria	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014
	<i>Lactobacillus brevis</i>	IFO 13110
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	IFO 12060
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IFO 1950
	<i>Saccharomyces coreanus</i>	IFO 1833
	<i>Hansenula anomala</i>	KCCM 11473

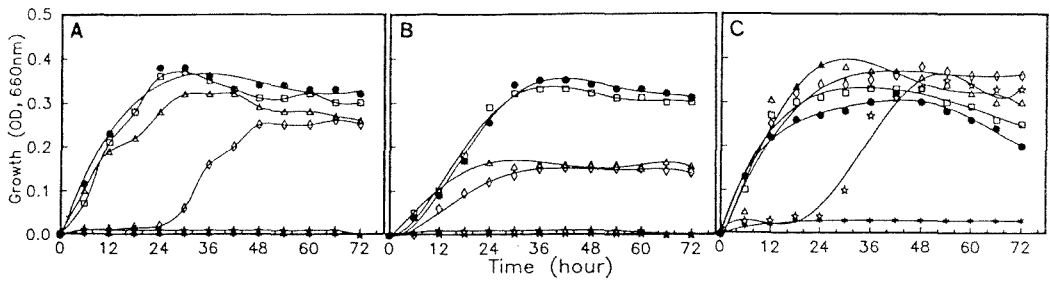


Fig. 1. Effect of growth inhibition by ethanol extract of leaf mustard on Gram positive bacteria.

A : *Bacillus subtilis*, B : *Bacillus cereus*, C : *Staphylococcus aureus*

Control (●), 2.5mg/ml (□), 5mg/ml (△), 10mg/ml (◇), 20mg/ml (☆), 40mg/ml (*)

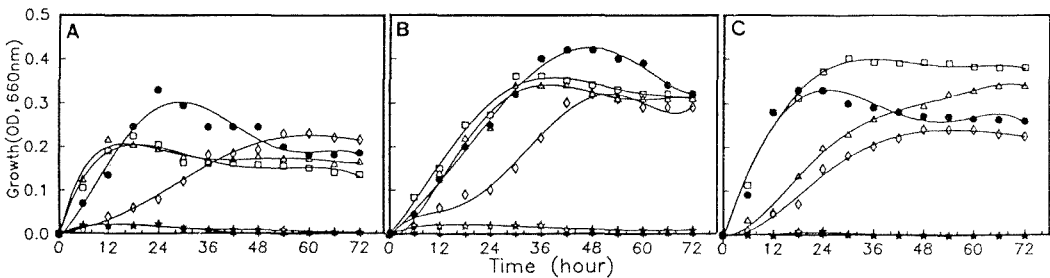


Fig. 2. Effect of growth inhibition by ethanol extract of leaf mustard on Gram negative bacteria.

A : *Salmonella typhimurium*, B : *Escherichia coli*, C : *Pseudomonas fluorescens*

Symbols shown in Fig. 1.

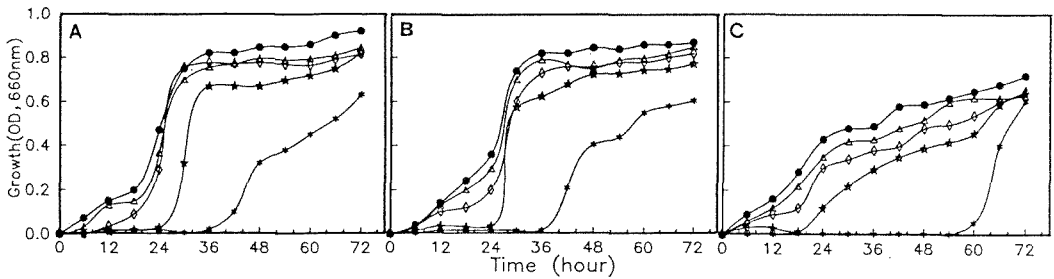


Fig. 3. Effect of growth inhibition by ethanol extract of leaf mustard on lactic acid bacteria.

A : *Lactobacillus plantarum*, B : *Lactobacillus brevis*, C : *Leuconostoc mesenteroides*

Symbols shown in Fig. 1.

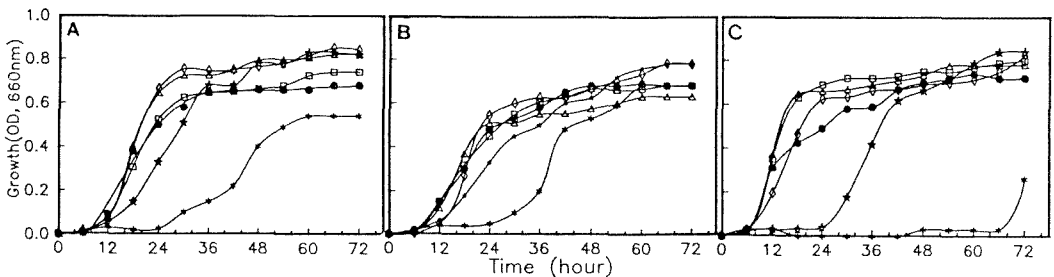


Fig. 4. Effect of growth inhibition by ethanol extract of leaf mustard on yeasts.

A : *Saccharomyces cerevisiae*, B : *Saccharomyces coreanus*, C : *Hasenula anomala*

Symbols shown in Fig. 1.

못하였다.

젖산균 증식은 추출물의 첨가구별로 차이는 있지만 배양시간이 경과됨에 따라 점차 증가하였으며, 40mg/ml에서 *L. plantarum*과 *L. brevis*는 배양 36시간, *L. mesenteroides*는 54시간 까지 억제되었다.

효모 증식은 3균주 모두 20mg/ml 이하의 저농도에서는 오히려 촉진되었으며, 40mg/ml에서 *S. cerevisiae*와 *S. coreanus*는 배양 24시간 까지 억제되다가 그 이후부터는 급격히 증가하여 대조구 보다 오히려 균증식이 증가되었으며, *H. anomala*는 배양 3일 까지 억제되었다. 에탄올추출물 첨가가 낮은 저농도에서 효모 증식이 대조구에 비해서 증가한 이유는 추출물 중의 일부 성분을 영양원으로 이용한 것으로 생각되나 정확한 원인은 앞으로 보다 구체적인 실험을 해야할 것으로 생각된다.

대수증식기에 미치는 영향

대수증식기에 에탄올추출물이 균생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 30°C에서 8시간 배양하여 대수증식기에 도달한 *E. coli*와 *S. aureus*의 두 균주에 에탄올추출물을 membrane filter (0.45µm)로 여과, 제균하여 농도별로 첨가, 진탕배양하면서 흡광도로 균체 증식량을 조사한 결과는 Fig. 5, 6과 같이 나타났다.

그람 음성균인 *E. coli*균주는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 저농도의 에탄올추출물을 함유한 배지에서는 별 영향을 받지 않았으나 10mg/ml의 농도에서부터 균체의 성장속도가 지연되었으며, 20g/ml 이상의 첨가구에서는 약 2시간 후부터 균의 생육이 서서히 억제되기 시작

하여 약 4시간 후에는 완전히 억제되었고 8시간 이후에는 초기의 균체량 보다 더 낮게 나타났다. 한편 그람 양성균인 *S. aureus*균주도 Fig. 6에서 보는 바와 같이 *E. coli*의 결과와 비슷하게 나타났는데, 첨가농도가 증가할수록 균체의 성장 속도가 지연됨을 볼 수 있었으며 20mg/ml 이상의 농도 부터 균체 증식이 현저하게 감소되었다. 이와 같이 두 균주에서 모두 일정농도 이상에서 균체량의 감소현상은 에탄올추출물의 항균성 물질에 의하여 생육저해현상을 받고 있음을 암시하였다.

미생물의 형태변화

갯 에탄올추출물에 의한 미생물의 형태변화를 조사하기 위하여 *E. coli*와 *S. aureus* 두 균주에 대하여 갯 에탄올추출물로 처리한 것과 처리하지 않은 대조구를 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8과 같다.

그람 음성균인 *E. coli*의 경우 Fig. 7에서 보는 바와 같이 갯 에탄올추출물 (40mg/ml) 처리구 (B)는 대조구 (A)의 전형적인 대장균의 형태에 비해서 균체표면이 불규칙적으로 수축된 현상을 보였고, 이와 같은 현상은 그람 양성균인 *S. aureus*(Fig. 8)에서도 대조구 (B)에 비해서 처리구 (A)는 균체가 팽윤되고 타원형으로 변형되어 두 균주 모두 표층구조가 손상을 받고 있음을 보여 주고 있으며 심한 형태학적인 변화가 있음이 관찰되었다.

이와 같은 현상은 갯 에탄올추출물에 의해 미생물의 세포벽 및 세포막의 기능이 파괴되고 용균이나 균체성분의 누출을 증대시키는 원인이 될 것이라고 생각되어진다.

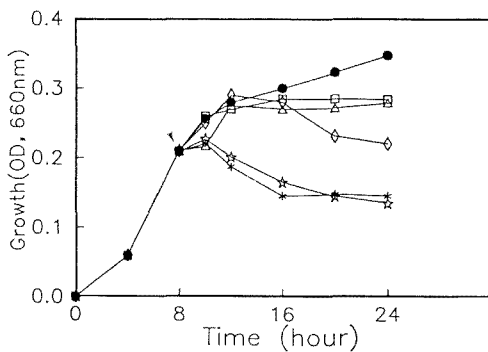


Fig. 5. Growth inhibition of *Escherichia coli* ATCC 15489 by the ethanol extract added to log-phase. Symbols shown in Fig. 1.

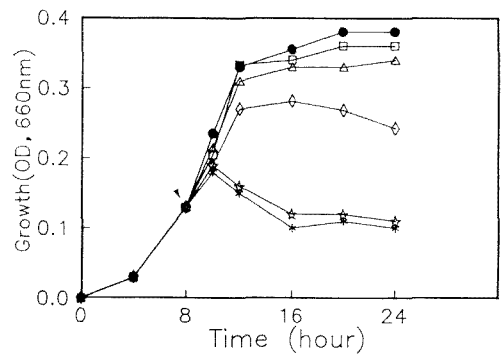


Fig. 6. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* ATCC 13301 by the ethanol extract added to log-phase. Symbols shown in Fig. 1.

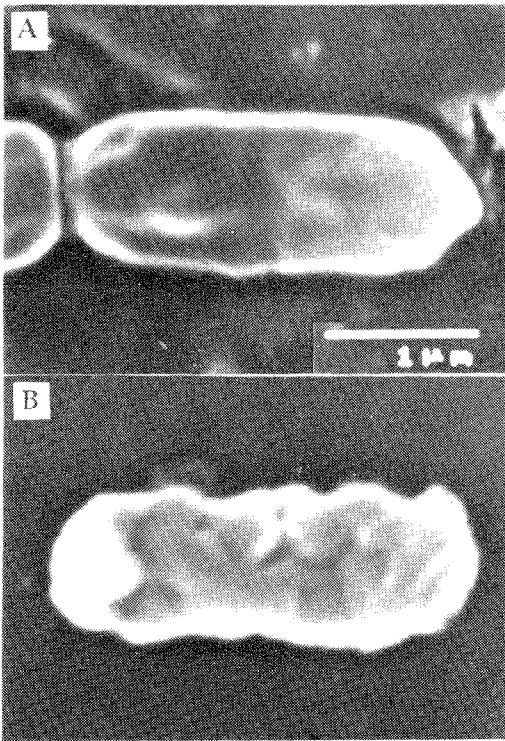


Fig. 7. Scanning electron micrographs of *Escherichia coli* ATCC 15489.

A : Control B : Treated with ethanol extract (40mg/ml)
(magnification : $\times 20,000$)

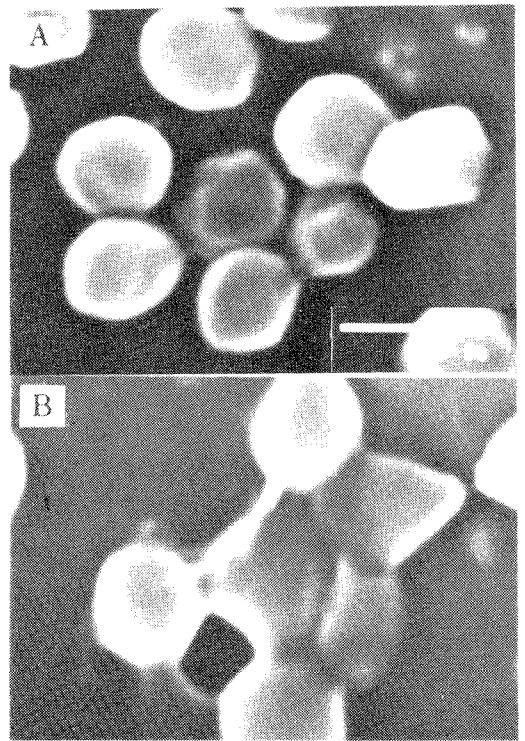


Fig. 8. Scanning electron micrographs of *Staphylococcus aureus* ATCC 13301.

A : Control B : Treated with ethanol extract (40mg/ml)
(magnification : $\times 20,000$)

요 약

문 헌

갓 중의 항균성 물질을 검색할 목적으로 에탄올추출물이 미생물의 증식에 미치는 영향과 전자현미경에 의한 세균의 형태변화를 살펴보았다. 갓 에탄올추출물의 농도별 항균활성은 대부분의 그람 양성균에서는 10 mg/ml로 강하게 나타났으며, 그람 음성균의 경우는 20mg/ml에서 나타났다. 그리고 젖산균 및 효모에서는 40mg/ml로 세균에 비하여 항균력이 약하게 나타났다. 갓 에탄올추출물이 미생물의 대수증식에 미치는 영향은 *E. coli*와 *S. aureus* 두 균주 모두 20mg/ml 이상의 첨가시는 4시간 이후부터 균의 생육이 완전히 억제되었다. 갓 에탄올추출물로 처리한 *E. coli*와 *S. aureus* 두 균주를 전자현미경으로 관찰한 결과, 그람 음성균인 *E. coli*의 경우는 균체표면이 불규칙적으로 수축된 형상을 보였고, 그람 양성균인 *S. aureus*의 경우는 균체가 팽윤되고 타원형으로 변형되어 두 균주 모두 심한 형태학적인 변화가 있음이 관찰되었다.

1. 野崎一彦 : 天然物による食品の現状と効果. 月刊フードケミカル, 2, 45 (1986)
2. 芝崎勳 : 抗菌性天然添加物開發の現状と使用上の問題點. *New Food Industry*, 25, 28 (1983)
3. 노정구 : 식품첨가물의 안정성 평가. *식품과학과산업*, 22, 47 (1989)
4. Bullerman, L. B., Lieu, F. Y. and Seier, S. A. : Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.*, 42, 1107 (1977)
5. Sharma, A., Tewari, G. M., Shrikhande, A. J., Padwal-Desai, S. R. and Bendyopadhyay, C. : Inhibition of aflatoxin-producing fungi by onion extracts. *J. Food Sci.*, 44, 1545 (1978)
6. Laura, L. Z. and John, C. K. : Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *J. Food Sci.*, 46, 1205 (1981)
7. Conner, D. E. and Beuchat, L. R. : Effects of essential oils from plants on food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, 49, 429 (1984)
8. 강신주, 이혜성 : 식용 야채류의 항균작용에 관한 연구. 경북대학교 사범대학 교육연구집, 19, 129 (1977)

10. 太田靜行：抗菌抗酸化物質の檢索と應用. 月刊フードケミカル, **2**, 48(1990)
11. Kurita, N. and Koike, S. : Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oil components. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 159(1982)
12. 이홍용, 김치경, 성태경, 문택규, 임치주 : 유백피 추출물의 항세균 작용. 산업미생물학회지, **20**, 1(1992)
13. 이병완, 신동화 : 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색. 한국식품과학회지, **23**, 200(1991)
14. 野崎一彦：天然物による食品の現状效果. 月刊フードケミカル, **2**, 45(1986)
15. 成瀬治己, 莊司 禎：現状における抗菌性物質とその應用. 月刊フードケミカル, **4**, 53(1984)
16. 김춘영, 김우정 : 천연향신료와 식용색소. 향문사, p. 15(1987)
17. 강성구, 성낙계, 김용두, 신수철, 서재신, 최갑성, 박석규 : 갯 (*Brassica juncea*) 추출물의 항균활성 검색. 한국영양식량학회지, **23**, 1008(1994)
18. 李在根, 龍口和惠, 提將和, 渡邊忠雄 : グリシトニ, 三の藥劑の抗菌力併用效果. 日本食品衛生學雜誌, **26**, 279(1985)

(1994년 10월 4일 접수)