

## 무화과 잎의 용매분획 및 항미생물 활성

강성국 · 정희종

전남대학교 농과대학 식품공학과

**초록 :** 무화과잎으로부터 천연 항미생물 물질의 개발을 검토할 목적으로 무화과잎을 메탄올로 추출하고 ethyl acetate와 buffer용액을 이용하여 용매분획하였고 각 분획에 대한 항미생물 활성을 측정하였으며 활성이 강한 분획에 대한 최소저해농도(MIC)와 최소치사농도(MLC)를 측정하였다. 무화과 잎중의 항미생물 활성은 산성 분획과 페놀성 분획에서 강하게 나타났으며 미생물의 종류에 관계없이 활성범위가 넓었다. 페놀성 분획이 산성 분획에 비하여 MIC와 MLC값이 상대적으로 낮았고 MIC값의 경우 두 분획이 공통적으로 세균보다는 진균류에 대하여 낮았으며 특히 저온세균인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 MIC와 MLC값이 대단히 낮음을 알 수 있었다(1995년 7월 10일 접수, 1995년 8월 3일 수리).

### 서 론

식품의 부패는 식품의 구성 성분이나 조건에 따라 다소 차이는 있지만 대부분 미생물학적 요인에 의해 일어나는데 미생물에 의한 식품의 부패는 식품의 위생적 측면에서 대단히 중요한 문제로서 미생물에 의한 식품의 품질저하 또는 부패 방지는 많은 식품과학자들의 중요한 연구대상이 되고 있다.<sup>1-3)</sup> 식품의 부패를 방지하기 위한 수단으로 식품산업체에서는 sorbic acid, benzoic acid 및 propionic acid와 같은 합성보존제를 사용하고 있으나 이들 합성보존제는 그 안전성에 대한 우려가 많고 소비자도 기피함에 따라 식품가공업계 자체에서도 인공 합성 보존제 사용을 가능한 줄이려는 추세이다. 미생물의 증식을 억제하는 보존제로는 인공합성품이 많이 알려져 있으나 천연물 중에도 항미생물 활성물질이 존재하는 것으로 알려져 있으며<sup>4-7)</sup> 최근에도 항미생물 물질의 탐색과 식품에의 이용에 관한 연구가 진행되고 있다.<sup>8,9)</sup> 식품의 원료 또는 부재료로 사용되는 것들 중에도 항미생물 물질이 존재한다고 많은 연구자<sup>10-12)</sup>들에 의해 보고된 바 있다.

무화과는 남부지방에서 많이 재배되고 있는 아열대성의 반교목성 낙엽성 과수로서 뽕나무과에 속하며 600여종 이상이 있고 유럽과 미국에서는 스미르나형(Smirna type)의 무화과 품종이 주품종으로서 건과로 많이 이용되고 있으나 우리나라에서는 보통형(Common type)에 속하는 봉래시(蓬萊柿)와 乘井도우핀(Dauphine)이 주생산 품종으로 주로 생식용으로 재배되고 있다. 우리나라의 경우 무화과 과실은 주로 생과로 이용되었으나 최근 잼이나 식초 등의 가공식품화가 진행되고 있고 무화과 유액은 치질과 무좀의 치료제 및 구충제<sup>13)</sup>로도 사용되어 그 약리효과가 인정되며 무화과 잎에도 유액이 존재하는데 이에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본

연구에서는 무화과잎을 용매추출하여 분획하고 각 분획에 대한 항미생물 활성을 측정함으로써 무화과 잎을 천연 항미생물 물질 개발원으로서의 이용 가능성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료

본 실험에 사용된 무화과(*Ficus carica* Linn.)잎은 전남 영암에서 재배하고 있는 보통계 품종(*Ficus carica* Linn. var. *hortensis* Shinn)인 승정도우핀(Masui Dauphine)의 잎을 1992년 8월에 채취하여 바로 실험에 사용하였다.

#### 메탄올추출물 조제 및 용매분획

신선한 무화과잎 15 kg을 분쇄하여 10배량의 메탄올을 가하여 중탕하면서 3회 반복하여 추출한 다음 여과하고 45°C에서 감압농축하여 메탄올추출물을 얻었고 다시 메탄올추출물은 Fig. 1에서와 같이 용매분획하였다.

#### 무화과잎의 메탄올추출물 및 각 분획에 대한 항미생물 활성 측정

항미생물 활성 측정에는 Table 1의 균주와 배지를 사용하였고 세균은 37°C에서 24시간, 효모는 30°C에서 24시간, 곰팡이는 30°C에서 48시간 동안 3차례의 계대 배양을 통하여 활성화시킨 다음 접종 균주로 사용하였다. 항미생물 활성의 측정은 paper disc방법<sup>14)</sup>으로 측정하였는데 agar plate에 미리 배양한 접종액을 도말하고 시료 1g 상당량의 추출물을 적하하여 건조시킨 paper disc를 올려놓고 0.85% 식염수로 확산시켜 세균은 37°C에서 16시간, 효모는 30°C에서 16시간, 곰팡이는 30°C에서 48시간 배양한 후 paper disc 주위의 clear zone(mm)의 크기를 측정하여 항미생물 활성을 나타냈다.

찾는말 : Antimicrobial activity, minimum inhibition concentration, minimum lethal concentration, fig leaves

\*연락처

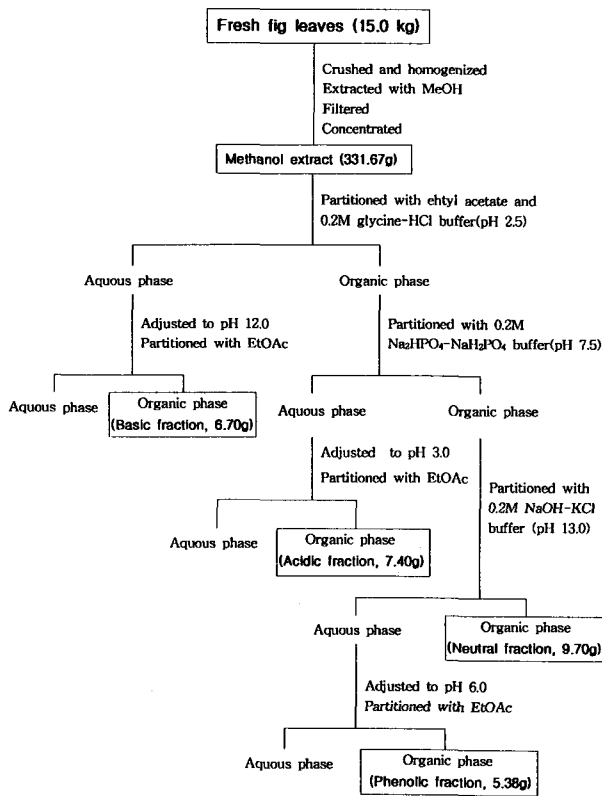


Fig. 1. Extraction and fractionation procedures of fig leaves.

Table 1. Microorganisms used for the determination of the antimicrobial activities, minimum inhibition concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC)

Microorganisms	Medium
Gram positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <sup>1)</sup>	Mueller Hinton
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100 <sup>2)</sup>	MRS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Mueller Hinton
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Mueller Hinton
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Mueller Hinton
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	Mueller Hinton
Yeasts	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Sabouraud Dextrose
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Sabouraud Dextrose
Mold	
<i>Aspergillus flavus</i> KCTC 1375	Sabouraud Dextrose

<sup>1)</sup>ATCC is an abbreviation for American Type Culture Collection.

<sup>2)</sup>KCTC is an abbreviation for Korean Collection for Type Culture.

#### 최소저해농도(MIC) 및 최소치사농도(MLC)의 측정

각 활성분획에 대한 MIC와 MLC측정<sup>15)</sup>에는 항미생물 활성 측정과 동일한 미생물과 배지를 사용하였다. 각 균주의 접종액을 균체산정에 적합한 농도로 멸균된 0.1% peptone수로 희석한 후 0.1 ml/를 취해 0.9 ml/ broth에 접종하고 여기에 무화과잎 추출물을 0.001~2.0 g 상당량/ml까지 농도별로 첨가하여 최적온도에서 일정시간 배양한 다음 pour plate방법으로 균수를 측정하였다.

Table 2. Antimicrobial activities in methanol extract of fig leaves

Microorganisms	Clear zone on plate <sup>1)</sup> (mm)
Gram positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <sup>2)</sup>	17
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100 <sup>3)</sup>	13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	19
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	13
Yeasts	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	21
Mold	
<i>Aspergillus flavus</i> KCTC 1375	18

<sup>1)</sup>Concentration of the extract was 1 g fresh weight equivalent per disc. <sup>2)</sup>ATCC is an abbreviation for American Type Culture Collection. <sup>3)</sup>KCTC is an abbreviation for Korean Collection for Type Culture.

이때 대조구는 시료추출물 대신에 사용 용매를 첨가하여 배양하였다. MIC 값은 대조구에 대해 colony forming unit(cfu)값이 약 10%감소했을 때의 농도로 하였으며, MLC값은 cfu값이 99.99% 이상 감소했을 때의 농도로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 메탄올추출물의 항미생물 활성

무화과잎 1g 상당량의 메탄올추출물에 대하여 항미생물 활성을 측정한 결과 Table 2에서와 같이 대부분의 측정 미생물에 대해 광범위한 활성을 나타냈다. 그람 양성 세균의 경우 *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*에 대해서 높은 활성을 나타냈으나 젖산균인 *Leuconostoc mesenteroides*에 대해서는 활성이 상대적으로 약한 것으로 나타났고 그람음성 세균의 경우 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해서 강한 활성을 나타냈으나 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에 대해서는 다른 시험균주에 비해서 낮은 활성을 나타냈다. 또한 *Candida albicans*와 *Saccharomyces cerevisiae*의 두 효모와 aflatoxin생성 곰팡이인 *Aspergillus flavus*에 대한 활성이 강한 것으로 보아 세균보다는 진균류에 대한 저해효과가 강하였다.

### 각 분획의 항미생물 활성

무화과 잎의 각 분획에 대한 항미생물 활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 가장 먼저 얻은 분획인 수상(염기성 분획)과 유기상에 대해 항미생물 활성을 측정한 결과 염기성 분획은 공시균주 모두에 대해 거의 활성이 나타나지 않았으나 유기상의 경우에는 메탄올추출물과 비슷한 정도의 활성을 보임으로써 무화과잎중의 항미생물 활성물질이 유기상을 구성하고 있는 산성, 중성

Table 3. Antimicrobial activities in each fraction of fig leaves

Microorganisms	Clear zone on plate (mm) <sup>1)</sup>			
	Basic	Acidic	neutral	Phenolic
Gram positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <sup>2)</sup>	— <sup>3)</sup>	14	—	17
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100 <sup>4)</sup>	—	13	—	14
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	—	15	—	20
Gram negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	—	15	—	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	—	19	—	18
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	—	12	—	15
Yeasts				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	—	21	—	19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	—	19	—	18
Mold				
<i>Aspergillus flavus</i> KCTC 1375	—	18	—	21

<sup>1)</sup>Concentration of each fraction was 1g fresh weight equivalent per disc. <sup>2)</sup>ATCC is an abbreviation for American Type Culture Collection. <sup>3)</sup>not detected. <sup>4)</sup>KCTC is an abbreviation for Korean Collection for Type Culture.

또는 페놀성 물질임을 알 수 있었다. 유기상을 다시 수상(산성 분획)과 유기상으로 분획하여 항미생물 활성을 측정된 결과 두 분획 모두 항미생물 활성을 나타냈는데 산성 분획의 경우 그람음성 세균이자 저온균인 *P. aeruginosa*에 대해 강한 활성을 보였고 효모와 곰팡이에 대한 활성도 강하게 나타났으며, 다시 유기상을 분획하여 얻은 수상과 유기상(중성 분획)에 대한 항미생물 활성을 측정된 결과 유기상중의 중성 분획은 모든 공시균주에 대해 거의 활성이 인정되지 않았으나 수상을 다시 용매분획하여 얻은 유기상(페놀성 분획)의 경우는 그람양성 세균중 *B. subtilis*와 *S. aureus*에 대하여, 그람음성 세균중 *P. aeruginosa*에 대하여 각각 높은 활성을 보였고 그밖의 세균에 대해서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다. 또한 효모 및 곰팡이에 대해서도 높은 활성을 갖고 있었다.

#### 산성 분획 및 페놀성 분획의 MIC 측정

항미생물 활성이 강하게 나타난 산성 분획과 페놀성 분획의 MIC를 측정된 결과는 Table 4에 나타났다. 산성 분획은 세균의 경우 *P. aeruginosa*에 대해서 시료 0.01g 상당량/ml의 MIC값으로 다른 공시세균에 비해 상대적으로 높은 활성을 나타냈으나, 그밖의 공시세균에 대해서는 시료 0.175~0.50g 상당량/ml의 농도로 MIC값이 상당히 높아 세균에 대한 억제능력이 약한 것으로 나타났다. 그러나 효모와 곰팡이에 대한 MIC값은 시료 0.01~0.05g 상당량/ml로 세균보다 훨씬 낮음을 알 수 있었다.

페놀성 분획은 그람양성 세균의 경우 MIC값이 시료 0.01~0.15g 상당량/ml수준으로 산성 분획보다 낮아 생육저해활성이 강하였으며, 그람음성 세균의 경우는 시료 0.005~0.25g 상당량/ml의 농도로 그람양성 세균에 비

Table 4. Minimum inhibition concentrations(MIC) and minimum lethal concentrations(MLC) in acidic and phenolic fractions of fig leaves

Microorganisms	Acidicfraction		Phenolicfraction	
	MIC <sup>1)</sup>	MLC <sup>2)</sup>	MIC	MLC
Gram positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.25	1.25	0.02	0.50
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	0.25	1.25	0.15	1.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.175	1.25	0.01	0.50
Gram negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	0.50	1.50	0.10	1.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0.01	0.25	0.005	0.10
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	0.50	1.25	0.25	1.50
Yeasts				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.03	0.50	0.025	0.50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	0.01	0.75	0.025	0.25
Mold				
<i>Aspergillus flavus</i> KCTC 1375	0.05	2.00	0.025	0.50

<sup>1)</sup>Minimum inhibition concentration (fresh sample weight equivalent (g/ml) was defined as the concentration at which cfu reduced by 10%. <sup>2)</sup>Minimum lethal concentration (fresh sample weight equivalent(g/ml) was defined as the concentration at which cfu reduced by 99.99%.

하여 낮은 MIC값을 보였다. 특히 효모와 곰팡이의 경우 MIC값은 시료 0.025g 상당량/ml 수준으로 세균에 비해 훨씬 높은 활성을 나타낸것은 산성 분획에서와 동일한 경향을 보였다.

#### 산성 분획과 페놀성 분획의 MLC 측정

MLC는 Table 4와 같이 산성 분획의 경우 그람양성 세균에서는 모두 시료 1.25g 상당량/ml로 높은 경향을 보였고 그람음성 세균에서는 *P. aeruginosa*에 대해 시료 0.25g 상당량/ml 수준으로 상당히 낮은 MLC값을 보였지만 *E. coli*의 경우는 시료 1.5g 상당량/ml로 훨씬 높은 MLC값을 나타냄으로써 공시균주에 따라 큰 차이가 있음이 밝혀졌다. 효모의 경우 *C. albicans*와 *S. cerevisiae*에 대한 MLC값은 각각 시료 0.50g 상당량/ml와 0.75g 상당량/ml 수준으로 치사활성이 높았고 곰팡이의 경우 *A. flavus*에 대해 시료 2.0g 상당량/ml으로 낮은 MIC값에도 불구하고 높은 MLC값을 보여 치사활성이 세균과 효모에 비하여 낮음을 알 수 있었다.

페놀성 분획은 그람양성 세균에 대한 MLC값이 시료 0.50~1.00g 상당량/ml 수준으로 산성 분획에 비하여 훨씬 강한 치사활성을 나타냈고 젖산생성세균인 *L. mesenteroides*에 대해서는 시료 1.00g 상당량/ml 수준으로 높은 MLC값을 나타냈으며, *S. aureus*와 같은 병원성 균주에 대해서는 시료 0.50g 상당량/ml으로 낮은 MLC값을 나타냈다. 그람음성 세균의 경우 *P. aeruginosa*에 대해서는 시료 0.10g 상당량/ml 수준으로 대단히 강한 치사활성을 나타냈으나 *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대해서는 시료 1.25g 상당량/ml 이상의 MLC값인 상대

적으로 낮은 치사활성을 나타냈다. 또한 효모의 경우 *C. ablicans*에 대해서는 시료 0.50 g 상당량/ml, 그리고 *S. cerevisiae*는 시료 0.25 g 상당량/ml 수준이었으며, 곰팡이에 대한 MLC값은 시료 0.5 g 상당량/ml 수준으로 산성 분획보다 높은 치사활성을 나타냈다. 이상과 같이 무화과잎 추출물중의 항미생물 활성을 갖는 물질은 산성분획 또는 페놀성분획에 함유되어 있는 것으로 확인되었으며 이들 물질들은 생육저해활성 뿐만 아니라 치사활성까지 갖고 있음을 알 수 있었다.

### 감사의 말

본 연구는 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 지방대육성 연구비 지원에 의하여 수행된 연구의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Zaika, L. L. and J. C. Kissinger (1981) Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *J. Food Sci.* **46**, 1205-1208.
2. Liewen, M. B. and E. H. Marth (1985) Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid. *J. Food Protect.* **48**, 364-368.
3. Farag, R. S., Z. Y. Daw, F. M. Hewedi and G. S. A. El-Baroty (1989) Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Protect.* **52**, 665-667.
4. Fleming, H. P., W. M. Walter and J. R. Etchells (1969) Isolation of a bacterial inhibition from green olives. *Appl. Microbiol.* **18**, 856-860.

5. 白田 昭, 高橋幸吉 (1979) クワ科木本植物の枝木部における抗菌性物質の生成と蓄積. *日植病報* **45**, 156-161.
6. Clark, A. M., T. M. Jurgens and C. D. Hufford (1990) Antimicrobial activity of Juglone. *Phytochemistry Research.* **4**, 11-14.
7. Beuchat, L. R. and D. A. Golden (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* **43**, 134-138.
8. Davidson, P. M. and L. S. Post (1983) Naturally occurring and miscellaneous Food Antimicrobials. In "Antimicrobials in Foods" ed. Branen, A. L. and P. M. Davidson. p. 371. Marcel Dekker Inc., New York.
9. Batt, C., M. Solberg, and M. Ceponis (1983) Effect of volatile components of carrot seed oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Sci.* **48**, 762-765.
10. Huhtanen, C. N (1980) Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. *J. Food Protect.* **43**, 195-198.
11. Marwan, A. G. and C. W. Nagel (1986) Microbial inhibitors in cranberries. *J. Food Sci.* **51**, 1009-1012.
12. FDA (1989) *Part 182, Substances generally recognized as safe.* 21 CFR Ch.1 (4-1 89 edition).
13. Freese, E., C. W. Sheu and E. Galliers (1973) Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* **241**, 321-325.
14. Beuchat, L. R. (1980) Comparison of anti-vibrio activities of potassium sorbate, sodium benzoate, and glycerol and sucrose esters of fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1178-1183.
15. Imai, K., I. Banno and T. Hjima (1970) Inhibition of bacterial growth by citrate. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**, 479-482.

### Solvent Fractionation of Fig Leaves and its Antimicrobial Activity

Seong Kuk Kang and Hee Jong Chung\* (Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

**Abstract:** Fig leaves were extracted with methanol and then fractionated with ethyl acetate and various buffers to get active fractions, and their antimicrobial activities in each fraction were determined. Acidic fraction and phenolic fraction of fig leaves showed strong antimicrobial activities, but the basic fraction and neutral fraction did not show any activities. The degree of antimicrobial activities in phenolic fraction against tested bacteria were higher than those in acidic fraction, but these against yeasts and mold were almost equivalent to those in acidic fraction. Especially, phenolic fraction showed the strongest activities against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Although there were some differences among microorganisms, minimum inhibition concentrations(MIC) in acidic and phenolic fractions against tested microorganisms were 0.05 to 0.1 g eq./ml and 0.01 to 0.25 g eq./ml, on the basis of fresh sample weight, respectively. Minimum lethal concentrations(MLC) in acidic and phenolic fractions were 0.25 to 2.00 g eq./ml and 0.05 to 1.50 g eq./ml, respectively. These supposed the antimicrobial activities in phenolic fraction were generally higher than those in acidic fraction and also phenolic fraction had lower MIC and MLC values than acidic fraction.

\*Corresponding author