J. Korean Soc. Food Nutr.
24(5), 695~701 (1995)

갓(*Brassica juncea*)의 항균물질의 분리 및 항균성

강 성 구
순천대학교 식품공학과

Isolation and Antimicrobial Activity of Antimicrobial Substance Obtained from Leaf Mustard (*Brassica juncea*)

Seong-Koo Kang
Dept. of Food Science and Technology, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

Abstract

The ethanol extract of leaf mustard (*Brassica juncea*) exhibiting high antimicrobial activities was fractionated in the order of hexane, chloroform, ethylacetate and butanol fractions to test antimicrobial activity. The highest antimicrobial activity for the bacteria tested was found in the ethylacetate fraction, but a lesser extent in the butanol fraction. In contrast to antimicrobial activity for the bacteria, both ethylacetate and butanol fractions showed weak antimicrobial activity for yeasts. Unknown compound A in the ethylacetate fraction which exhibited a strong antimicrobial activity was isolated by silica gel column chromatography and HPLC, and exhibited 9 times more antimicrobial activity than the ethylacetate fraction.

Key words : leaf mustard (*Brassica juncea*), antimicrobial substance, isolation, silica gel column chromatography, HPLC

서 론

갓 (leaf mustard, *Brassica juncea* Coss.)은 십자화과에 속하는 엽경채소류 중의 하나로 중국이 원산지이지만 현재는 한국과 일본 등에서 널리 재배되고 있으며 주로 잎과 줄기를 식용으로 하고 종자는 겨자를 만드는 두해살이 식물이다(1). 우리나라에서는 옛부터 김치재료, 조미료 및 향신료 등으로 이용되고 있는데, 김치재료로 사용할 경우 다른 재료를 사용한 김치에 비해서 발효 속도가 늦어 저장성이 좋을 뿐만 아니라 독특한 신미성분이 풍부하여 건강식품으로 널리 이용되고 있다(2). 갓의 조직이 절단 또는 상처를 받으면 조직 중에 존재하는 myrosinase가 다량 함유되어 있는 sinigrin에 작용하여 glucose, 함황성분과 그 관련 물질 등을 생성하게 되는데, 그 가운데 allylisothiocyanate (AIT)는 독특한 매운맛을 내는 주 성분으로 알려져 있다(3-5).

한편 한국산 재래종 갓(2)의 항균성에 관한 연구로는 강 등이 갓의 에탄올 추출물이 몇 종의 식품 부패미생물, 식중독 원인세균 및 발효식품 미생물에 대하여 항균활성 검색(6), 갓 에탄올 추출물의 항균성 물질이 미생물 증식에 미치는 영향과 전자현미경에 의한 세균의 형태 변화(7) 그리고 갓 에탄올 추출물을 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli* 두 균주의 배양액에 처리하여 균체의 지방산과 아미노산 조성 및 균체성분의 누출에 미치는 영향(8)을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 이미 보고된 연구 결과(6-8)에 이어 갓 에탄올 추출물을 용매계통 분획하여 각 용매분획별 항균활성과, 항균활성이 가장 강하게 나타난 에틸아세테이트 분획물 중의 주 항균성 물질을 순수분리 및 정제하여 항균성을 실험하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 항균성 물질의 추출용 재료는 전남 광양군 광양읍 세풍리에서 1992년 8월 12일에 파종하여 동년 11월 22일경 약 25cm 정도 성장한 한국산 갓 (leaf mustard, *Brassica juncea*)을 채취하여 옴건세절한 것을

사용하였다.

갓 에탄올추출 및 분획

음건 세절한 시료 1.0kg을 전보(6)와 같은 방법으로 추출하여 에탄올 추출물(고형물 155.8g)을 얻은 후 용매분획하였다(Fig. 1). 즉, 이와 같이 얻은 에탄올 추출물을 분획여두에서 헥산 : 메탄올 : 물(10 : 1 : 9 v/v/v) 1L씩 3회 추출, 농축하여 헥산추출 분획 39.4g을 얻었고, 계속해서 같은 방법으로 수층을 클로로포름, 에틸아세테이트 및 수포화부탄올로 용매분획한 다음 농축하여 각각 0.6, 2.2 및 12.5g 분획물을 얻었으며, 최종적으로 물 분획물 99.2g을 얻어 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

사용균주 및 배지

사용균주는 젖산균 4종을 포함한 그람 양성균 9종, 그람 음성균 3종 및 효모 3종을 사용하였으며(Table 1), 균 생육배지는 세균은 nutrient broth와 agar(Difco), 젖산균은 Lactobacillus MRS broth와 agar(Difco), 효모는 YM broth와 agar(Difco)를 각각 사용하였다.

항균력 측정

추출물질의 항균력 검색은 한천배지 확산법(disc plate method)으로 측정하였다. 즉, 갓 에탄올 추출물의 분획물을 0.45μm membrane filter(Millipore Co., U.S.A.)로 여과하여 제균하고, 멸균된 filter paper disc(Toyo seisakusho, 8mm)에 일정량씩 흡수시킨 후, 추출용매를 완전히 날려 보낸 다음, 전보(6,7)에서 사용한 시험용 평판배지 표면에 놓아 밀착시키고 냉장고(4°C)에서 1시간 동안 방치한 후, 30°C incubator에서 24~48시간 동안 배양한 다음 disc 주변의 clear zone 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다(9,10). 비항균 저해활성(specific inhibitory activity)은 전체 clear zone에서 disc

Table 1. List of microorganisms used to determine the antimicrobial activity of *Brassica juncea*

Gram positive bacteria	*Bacillus cereus*	ATCC	27348
	Bacillus subtilis	ATCC	9372
	Bacillus natto	IFO	3009
	Streptococcus faecalis	IFO	3971
	Staphylococcus aureus	ATCC	13301
	(Lactic acid bacteria)		
	Lactobacillus plantarum	ATCC	8014
	Lactobacillus brevis	IFO	13110
	Leuconostoc mesenteroides	IFO	12060
	Pediococcus cerevisiae	ATCC	8081
Gram negative bacteria	*Escherichia coli*	ATCC	15489
	Salmonella typhimurium	ATCC	14028
	Pseudomonas fluorescens	ATCC	11250
Yeast	*Saccharomyces cerevisiae*	IFO	1950
	Saccharomyces coreanus	IFO	1833
	Hansenula anomala	KCCM	11473

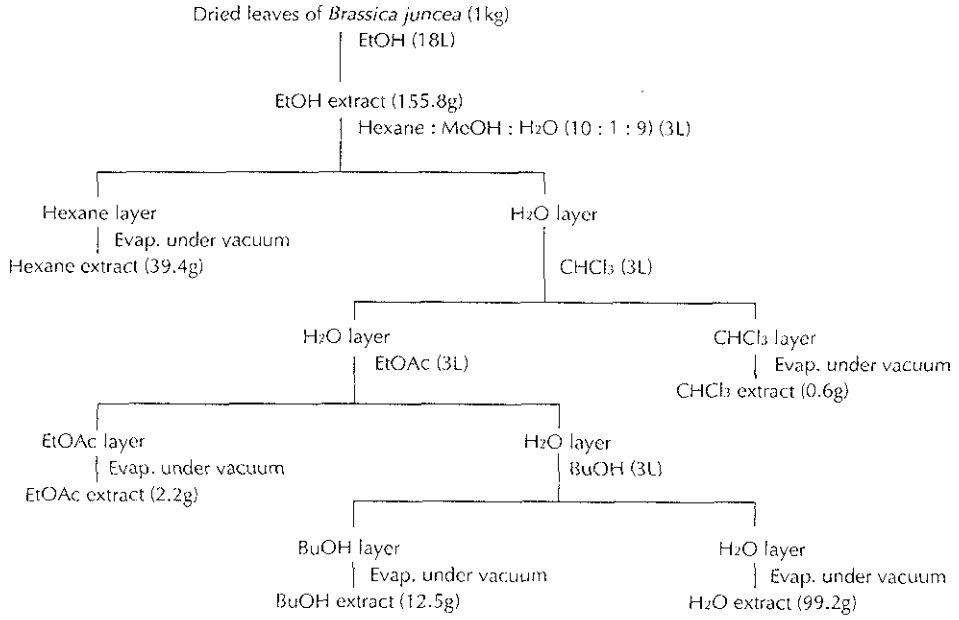

Fig. 1. Fractionation of the ethanol extract from *Brassica juncea*.

직경(8mm)을 뺀 값에 대한 disc에 loading한 고형물량(mg)을 나눈 값으로 나타내었다.

항균물질의 분리

Silica gel column chromatography

에탄올 추출물을 용매계통 분획하여 얻은 각 분획물들의 항균활성을 측정 비교한 후, 활성이 가장 강한 에틸아세테이트 분획물로 부터 유효성분을 검색할 목적으로 silica gel (ϕ3cm×35cm, 70~270 mesh, Merck) column chromatography를 행하고 다시 여러 개의 subfraction으로 나눈 후 각 subfraction에 대하여 항균활성을 비교하면서 항균성 물질을 순수 분리하였다(Fig. 2). 즉, 유리 column (ϕ3cm×50cm)에 시료의 약 10배의 활성화된 silica gel (70~270 mesh, Merck)을 클로로포름으로 slurry로 만들어 충진한 후, 시료를 $CHCl_3$-MeOH 용매계로 메탄올 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100%까지 단계적으로 증가시키면서 용출하였다. 유속은 1.0 ml/min로 하였고 fraction collector를 사용하여 분획당 10ml씩 분취하였다. 이와 같이 얻은 각 분획물들을 감압농축하고 paper disc 방법에 따라 항균성을 측정하여 활성이 나타나는 분획을 확인하여 항균활성 분획물을 얻었다.

Thin layer chromatography

Silica gel column chromatography를 행하여 항균활성이 크게 나타난 분획물들을 TLC로 분리하여 항균성 물질을 검색하였다. 즉 항균성이 확인된 분획물을 capillary tube로 TLC 상에 점적한 후, 전개용매에 의해 포화상태가 형성된 전개조에서 전개시켰다. 이때 전개용매는 $CHCl_3$-MeOH 용매 system (9 : 1, 8 : 2, 7 : 3, v/v)을 사용하였고, TLC plate는 254nm, 375nm의 UV 하에서 관찰하였다.

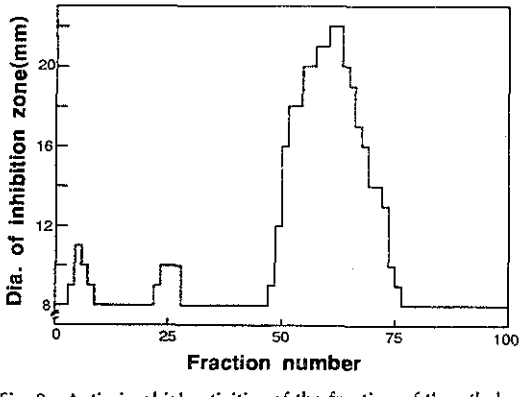

Fig. 2. Antimicrobial activities of the fraction of the ethylacetate extract fractionated by the silica gel column chromatography against *Staphylococcus aureus* ATCC 13301.

HPLC

Silica gel column chromatography와 TLC에서 항균성이 확인된 subfraction을 모아서 감압농축하고, 이 농축액을 다시 HPLC (Waters Co., M224)를 사용하여 항균활성 물질을 최종 순수분리하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 우선 1차적으로 항균활성이 확인된 분획을 Radial Pak C_{18} (8mm×10cm, Waters) column을 사용하여 순수분리를 행하였다. 이 때 사용된 용매는 70% 메탄올, 유속은 분당 2.0ml, 시료 주입량은 30μl, 그리고 분획구간은 2분 간격으로 16분 동안 8개의 분획물을 분취하였다. 이와 같이 하여 얻은 8개의 분획물을 50°C 수욕상에서 감압농축하여 적당한 농도로 희석한 후 paper disc 방법(10)으로 각각 항균활성을 확인한 다음, 2차적으로 항균활성이 확인된 분획물을 μ-BondaPak C_{18} (8 mm×30cm, Waters) column, 용매 50% 메탄올(v/v), 유속 1.5ml/min, 검출기 UV (214nm)의 분석조건으로 분리하였다. 분리된 peak를 각각 분취하여 감압농축한 후, 항균활성을 확인하여 최종적으로 항균활성 물질을 단일 물질로 순수분리하였다.

결과 및 고찰

갓 에탄올 추출물 분획의 항균활성

갓 에탄올 추출물 중의 항균성 물질을 분리할 목적으로 용매계통 분획하여 얻은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올(수포화) 및 물 분획물의 항균활성을 disc plate method에 의한 생육저지환을 측정하여 각 균주에 대한 억제 효과를 검색한 결과는 Table 2와 같다.

세균의 경우에는 젖산균을 제외한 그람 양성균과 그람 음성균 모두 에틸아세테이트와 부탄올 분획물에서 현저한 생육억제 효과가 나타났으며, 클로로포름과 물 분획물에서도 앞의 두가지 분획물 보다는 낮지만 대부분의 균주에 대하여 항균활성을 보였다. 헥산 분획물에서는 *S. aureus*, *S. typhimurium* 및 *P. fluorescens*가 다른 균주와는 달리 약간의 항균효과를 보였다. 특히 *S. aureus*와 *P. fluorescens*는 에틸아세테이트 분획물에서 생육저지환이 비활성도로 비교하여 볼 때 11.4와 7.9로 가장 항균활성이 높게 나타났다.

한편 젖산균은 에틸아세테이트와 부탄올의 두 분획물에서 약하게 항균성을 보였을 뿐 다른 분획물에서는

Table 2. Antimicrobial activities of fractions from ethanol extract of leaf mustard against several microorganisms

Strains	Clear zone on plate (mm)[1]				
	n-Hexane extract (3.9mg/disc)	Chloroform extract (1.2mg/disc)	Ethylacetate extract (0.88mg/disc)	Butanol extract (5.0mg/disc)	Water extract (6.6mg/disc)
B. cereus	-[2]	12 (3.3)[3]	12 (4.5)	15 (1.4)	9 (8.2)
B. subtilis	-	11 (2.5)	12 (4.5)	12 (0.8)	9 (0.2)
B. natto	-	10 (1.7)	11 (3.4)	14 (1.2)	10 (0.3)
S. faecalis	-	-	12 (4.5)	14 (1.2)	-
S. aureus	11 (0.8)	15 (5.8)	18 (11.4)	19 (2.2)	9 (0.2)
L. plantarum	-	-	9 (1.1)	9 (0.2)	-
L. brevis	-	-	9 (1.1)	9 (0.2)	-
L. mesenteroides	-	-	9 (1.1)	9 (0.2)	-
P. cerevisiae	-	-	9 (1.1)	9 (0.2)	-
E. coli	-	-	14 (2.3)	15 (1.0)	9 (0.2)
S. typhimurium	10 (0.5)	13 (4.2)	14 (6.8)	17 (1.8)	13 (0.8)
P. fluorescens	2 (1.0)	12 (3.3)	15 (7.9)	16 (1.6)	10 (0.3)
S. cerevisiae	-	-	9 (1.1)	9 (0.2)	10 (0.3)
S. coreanus	-	-	10 (2.3)	10 (0.4)	9 (0.2)
H. anomala	-	-	9 (1.1)	9 (0.2)	9 (0.2)

[1]Diameter
[2]No inhibitory zone was formed
[3]Specific inhibitory activity=(clear zone - 8mm)/amount (mg)

항균효과가 거의 없었다.

효모의 경우는 세균에서와는 달리 헥산과 클로로포름 분획물에서 거의 항균성을 보이지 않았으며 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물 등에서 9~10mm 정도로 항균활성이 약하게 나타났다.

홍 등(11)은 유백피의 메탄올 추출물 중 부탄올 분획물에서 그람 양성균인 *S. aureus, S. faecalis, P. aeruginosa* 및 *Bacillus sp.*에 대하여 발육억제 효과가 나타났으며 그람 음성균인 *E. coli*, 진균인 *Candida albicans*에 대해서는 발육저지효과가 관찰되지 않았다고 보고하였는데, 갓 추출물에서는 그람 음성균인 *E. coli, S. typhimurium* 및 *P. fluorescens* 등에서도 항균효과를 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 갓 에탄올 추출물 중의 항균성 물질은 특정용매에만 용해되지 않고 일부 다른 용매에도 용해되는 성분으로서 한가지 성분이라기 보다는 여러 가지 성분이 서로 복합적으로 작용을 하고 있는 것을 알 수 있으며, 갓 에탄올 추출물의 항균활성 물질이 에틸아세테이트와 부탄올의 두 분획물로 많이 이행되었음을 알 수 있었다.

항균성물질 분리

Silica gel column chromatography

항균활성이 강한 분획물로 부터 유효성분을 검색할 목적으로 에틸아세테이트 분획물 2.2g을 silica gel column chromatography를 행하여 분획을 얻어 *S. aureus*에 대한 항균력을 측정한 결과(Fig. 2), column을 통과시킨 99개의 분획 중에서 4번 부터 9번 까지 분획에서, 31번 부터 35번 까지의 분획에서 항균력이 약하게 나타났으며 48번 부터 75번 까지의 분획에서 강한 항균력이 확인되었다. 따라서 갓 에탄올 추출물의 주 항균성 물질은 에틸아세테이트 분획물에 다량 있는 것으로 확인되었다.

이와 같은 결과는 최 등(12)의 야생 식용식물의 약물대사 활성성분에 관한 연구에서 부추를 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 각각 처리하여 얻은 분획물에서 에틸아세테이트 분획물의 항균활성이 다른 분획물에 비해 월등히 높았다는 보고와 일치하는 경향을 나타내었다.

Thin layer chromatography

에틸아세테이트 분획물을 silica gel column chromatography를 행하여 항균활성이 크게 나타난 분획물들을 TLC하여 Fig. 3과 같은 chromatogram을 얻었다.

Rf 0.5에서 공통적인 물질군이 나타나고 있으나 Fig. 2에서 보는 바와 같이 분획 60번 부근에서 가장 항균활성이 강하게 나타내고 있으므로 Rf 0.6의 물질군이 주 항균성 물질로 생각하고 분획 54에서 64분획 까지를 합쳐 감압농축하여 이후의 HPLC용 시료로 사용하였다.

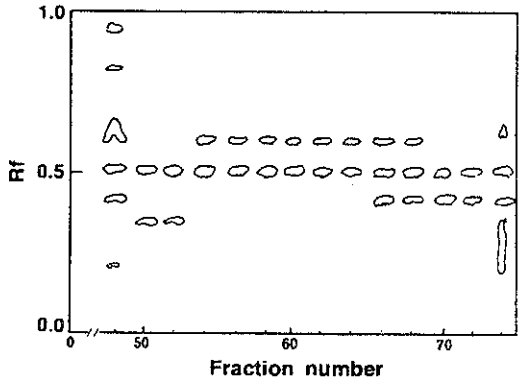

Fig. 3. Thin layer chromatogram of antimicrobial activity fractions (50~70 in number) of the ethylacetate extract separated by the silica gel column chromatography shown in Fig. 2.

Table 3. Antimicrobial activity of fractions of the ethylacetate extract separated by the HPLC

Fraction No.	Clear zone on plate (mm)[1]	
	E. coli	*S. aureus*
1	-[2]	-
2	-	-
3	14	16
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-

[1]Diameter
[2]No inhibitory zone was formed
Column, Radial Pak C_{18} (0.8cm × 10cm) ; Solvent, 70% MeOH ; Flow rate, 2.0ml/min
Each fraction was collected for 2min

HPLC

에틸아세테이트 분획물을 silica gel column chromatography와 TLC를 거쳐 항균활성이 확인된 농축 분획물을 다시 단일물질로 순수분리하기 위하여 HPLC를 행하였다. 1차적으로 Radial Pak C_{18} (8mm × 10cm) column을 통해 다시 분리하고 각 분획물의 항균활성을 paper disc method에 의해서 조사한 결과 (Table 3), HPLC를 실시하여 얻어진 8개 분획을 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 항균활성을 확인한 결과 3번 분획에서 가장 높게 나타났다.

항균활성이 확인된 3번 분획을 다시 최종적으로 순수분리를 하기 위하여 μ-Bonda Pak C_{18} (8mm × 30cm) column을 사용하여 분리한 결과 (Fig. 4), 12개의 물질이 분리 검출되었으며, 분리된 peak를 각각 분취하여 감압

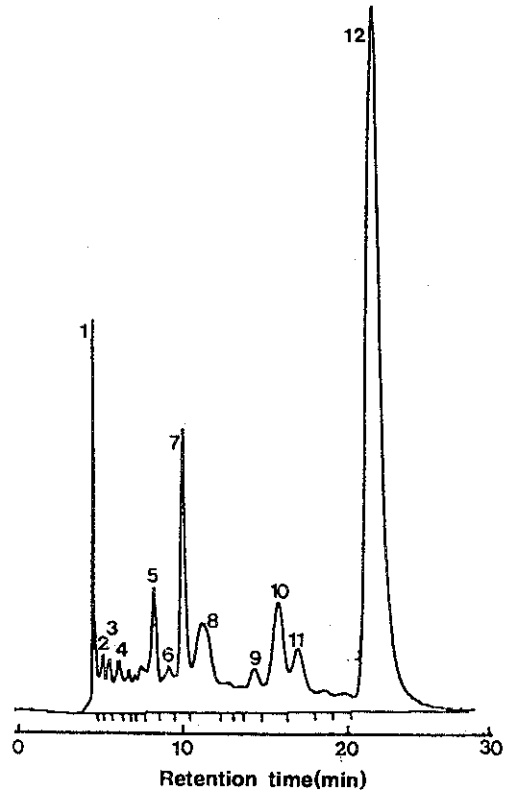

Fig. 4. HPLC chromatogram of Fraction No. 3 shown in Table 3 monitored by UV detector.
Column, μ-Bonda Pak C_{18} column (ϕ8mm × 30cm) ; Mobile phase, MeOH/H_2O (5/5) ; Flow rate, 1.2ml/min ; Detector, UV (214nm).

Table 4. Antimicrobial activity of each peak of HPLC fractions separated from the ethylacetate extract in Fig. 4

Peak No.	Clear zone on plate (mm)[1]	
	E. coli	*S. aureus*
1	-[2]	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-

[1]Diameter
[2]No inhibitory zone was formed
Column, μ-Bonda Pak C_{18} column (ϕ8mm × 30cm) ; Mobile phase, MeOH/H2O (5/5) ; Flow rate, 1.2ml/min, Detector, UV (214 nm)

농축한 후, 항균활성을 paper disc 방법에 의해서 조사한 결과는 Table 4와 같다.

즉, *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 12개의 물질의 항균활성을 조사한 결과, 12번 peak에서 항균활성이 두 균주에서 모두 나타났고, 이때 생육저지환은 18mm와 21mm로 각각 확인되었다. 따라서 12번 peak에서 항균활성이 확인되었으므로 이 peak를 대량으로 분취하여 감압농축한 결과, 최종적으로 순도 99% 이상의 단일 물질로 단정되는 미황색 결정 20mg의 화합물 A를 얻었으며, 이 화합물 A의 HPLC chromatogram은 Fig. 5와 같다.

그리고 갓 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물과 chromatography 등을 통하여 최종적으로 단일 물질로 분리된 미황색 결정 화합물 A와 항균활성을 비교하기 위해서 *S. aureus* 균주를 통해 항균활성을 확인한 결과(Fig. 6), 갓 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물(0.88mg/disc) 경우 균 생육저지환이 16mm, 화합물 A(0.1mg/disc)의 경우는 20mm로 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때 화합물 A가 갓 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물 보다 9배 정도 항균활성이 높아졌음을 확인하였다.

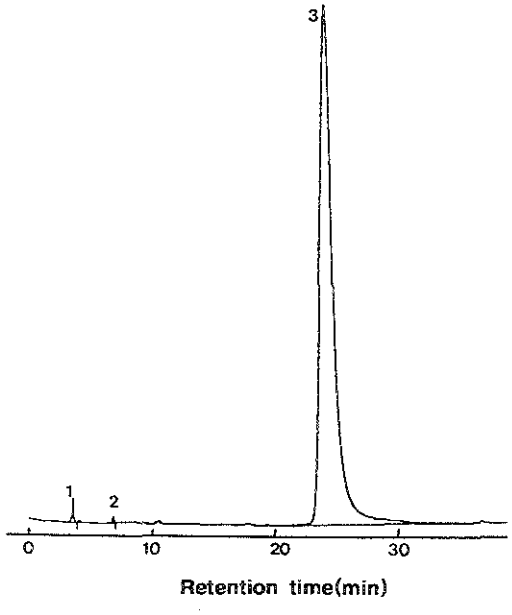

Fig. 5. **HPLC chromatogram of compound A.**
Column, μ-Bonda Pak C_{18} column (φ8mm×30cm); Mobile phase, MeOH/H_2O (5/5); Flow rate, 1.2ml/min; Detector, UV (214nm).

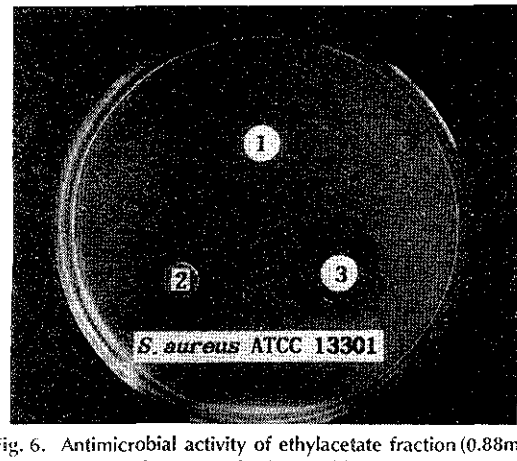

Fig. 6. **Antimicrobial activity of ethylacetate fraction (0.88mg/disc) and compound A (0.1mg/disc) against *S. aureus*.**
1. Ethanol alone
2. Ethylacetate fraction
3. Compound A

요 약

항균활성이 높게 나타난 갓 에탄올 추출물을 용매계통 분획하여 각 분획별 항균활성을 조사하고, 항균활성이 가장 강하게 나타난 에틸아세테이트 분획물 중의 주 항균활성 물질을 분리하였다. 갓 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 순으로 용매계통 분획하여 얻은 각 분획물의 항균활성은 세균의 경우 대부분 에틸아세테이트와 부탄올 분획물에서 나타났으며, 그 중 에틸아세테이트 분획물에서 강하게 나타남을 알 수 있었다. 효모의 경우는 세균과는 달리 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물에서 항균활성이 약하게 나타났다. 갓 에탄올 추출물 분획물 중 항균활성이 가장 높았던 에틸아세테이트 분획물을 silica gel column chromatography, HPLC 등을 이용해서 분리·정제하여 단일물질의 화합물A를 얻었으며, 이 물질의 항균력은 에틸아세테이트 분획물의 항균성 보다도 9배 이상 높게 나타났다.

문 헌

1. 石井林寧：最新園藝大辭典 第3券. 誠文堂新光社, 東京, p.1307 (1968)
2. 김순영, 김우정：천연향신료와 식용색소. 향문사, 서울, p.15 (1987)
3. 官 本 悌次郎：ワサビ.シナモンの抗菌性とその利用. 月刊 フードケミカル, 2, 30 (1988)
4. 官 本 悌次郎：香辛料の抗菌性と食品保藏への應用. 調理科學, **2-5**, 57 (1992)

5. 조영숙, 박석규 : 돌산 갓김치 숙성 중의 맛 성분 및 미생물군의 변화. 한국음식문화연구논총, **5**, 184 (1994)
6. 강성구, 성낙계, 김용두, 신수철, 서재신, 최갑성, 박석규 : 갓(*Brassica juncea*) 추출물의 항균활성 검색. 한국영양식량학회지, **23**, 1008 (1994)
7. 강성구, 성낙계, 김용두, 이재근, 송보현, 김영환, 박석규 : 갓(*Brassica juncea*)의 에탄올 추출물이 미생물 생육에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **23**, 1014 (1994)
8. 강성구, 김용두, 박석규 : 갓(*Brassica juncea*) 추출물이 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*의 균체 성분의 조성 및 누출에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, **24**, 208 (1995)
9. Piddock, L. J. V. : Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 307 (1990)
10. Bauer, A. W., Kibby, M. M., Sherris, J. C. and Turck, M. : Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493 (1966)
11. 홍남두, 노영수, 김남재, 김진식 : 유백피의 약효 연구. 생약학회지, **21**, 217 (1990.)
12. 최재수, 박시향, 김일성 : 야생 식용식물의 약물대사 활성성분에 관한 연구. 생약학회지, **20**, 117 (1989)

(1995년 6월 15일 접수)