

새뱅이(*Caridina denticulata denticulata*) 추출물의 항균효과

박희연[†] · 이창국 · 박원기* · 이응호**

국립수산진흥원 남해수산연구소

*동신대학교 식품영양학과

**부경대학교 식품공학과

Antimicrobial Effect of *Caridina denticulata denticulata*

Hi-Yun Park[†], Chang-Kook Lee, Won-Ki Park* and Eung-Ho Lee**

South Sea Fisheries Research Institute, NFRDA, Yosu 550-120, Korea

*Dept. of Food and Nutrition Dongsin University, Najoo 520-714, Korea

**Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

After extracting *Caridina denticulata denticulata*, the raw material of salt-fermented *Toha*, with the use of water, ether, acetone and methanol in order, we had the antimicrobial activity test for nine strains of bacteria which are harmful to the human body and food. It is as follows; solvent extract yield of the powder of vacuum freeze dried *Caridina denticulata denticulata* was 52% of water fraction, 7.4% of ether fraction, 1.0% of acetone fraction and 0.8% of methanol fraction. The result of solvent extract antimicrobial search of *Caridina denticulata denticulata* said that with the sample of 20µg/disk, ether fraction resulted in clear one of 8~12mm, acetone fraction 8~12mm, methanol fraction 7~9mm and water fraction didn't have antimicrobial effect. The minimal inhibitory concentration of solvent extract of *Caridina denticulata denticulata* per area was that ether fraction was 250~500µg/ml, acetone fraction 125~500µg/ml and methanol fraction 250~500µg/ml. The minimal bactericidal concentration of solvent extract per area of *Caridina denticulata denticulata* showed that ether fraction was 2,500~10,000µg/ml, acetone fraction 1,250~10,000µg/ml and methanol fraction 5,000~10,000µg/ml.

Key words: antimicrobial effect, *Caridina denticulata denticulata*

서 론

사람의 대장에는 100여종 이상의 세균이 서식하고 있으며 이것들은 사람의 건강 유지, 질병 및 노화 등에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(1). 이들 세균은 유해성 세균의 증식을 억제하고 비타민과 각종 유기산을 합성하여 면역체계를 자극함으로써 감염에 대한 저항력을 증가(2,3)시키는 유익한 작용을 하는 세균이 존재하는 반면에 부패성 물질과 독소 등을 생산하여 질병을 유발하거나 면역력을 감소시키거나 노화의 원인(4)이 되는 유해성 세균도 존재하고 있다. 따라서 우리가 섭취하는 식품의 항균성은 인체 건강과 밀접한 관련이 있다고 볼 수 있으며 식품의 항균성을 구명하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

지금까지 보고된 천연 항균성 물질로는 계란에 함유된 conalbumin, avidin, lysozyme(5-7), 우유에 존재하는 lactoferrin(6,7)과 같은 단백질, succinic acid, malic acid, tartaric acid, benzoic acid와 같은 천연물에 함유된 유기산(8-11), 동식물의 조직에 소량으로 존재하는 탄소수 12~18개의 중쇄지방산(medium-chain fatty acids)(12,13), 마늘과 양파의 정유성분(14,15), glycine, cystine, tryptophan과 같은 아미노산 등(16)이 있으며 수산물을 대상으로 한 보고로는 Lee 등(17)이 해면동물에 존재하는 항균성 물질로 benzoic acid, okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1(DTX-1)을 동정하였고, 조(18)는 게 껍질로부터 제조한 분자량 10,000~40,000인 chitosan이 50ppm 첨가로 Gram 음성균에 대하여 균의 증식을 억제시킬 수 있었다고 보고하였으며, 해조류에 함유된 항균

[†]To whom all correspondence should be addressed

성 물질로는 지방산, 합황화합물, phloroglucinol, tannin, bromophenol, terpenoid 등(19,20)이 보고되어 있다. 그러나 아직까지 새뱅이의 항균효과에 관한 보고는 없다. 새뱅이(토하, *Caridina denticulata denticulata*)는 수질이 청정한 하천, 호수 등에 서식하는 새뱅이과의 민물새우로서 고래로부터 우리나라에서는 토하젓(Salt-Fermented Toha)으로 가공하여 섭취해 오고 있다. 또한 동의보감(21)에 의하면 새우가 종기를 치료하는 효능이 있는 것으로 기술되어 있으며 우리나라 전통 민간요법에서도 구강질환 치료에 이용하는 등 약용으로도 사용되어 왔다.

또한 박 등(22)은 새뱅이 중에 chitin이 평균 $9.6 \pm 0.2\%$ 함유되어 있고 여기에서 제조된 chitosan은 chitin 중량의 $72.5 \pm 3.6\%$ 라고 보고하고 있으며, 일반적으로 새우류에 glycine이 다량 함유되어 있으므로 이들에 의한 항균효과가 기대된다.

따라서 본 연구는 토하젓의 식품 기능성을 구명하기 위하여 새뱅이를 각종 용매로 추출 분획한 다음 인체 및 식품에 유해작용을 하는 세균을 대상으로 항균성 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료처리

본 실험에 사용한 새뱅이는 전남 곡성군 소재 양식장에서 8월에 채집한 것으로 증류수에 수회 수세한 후

진공동결건조기(Labconco Models77530)에서 건조한 다음 고체분쇄기(GFM-351B)를 이용하여 20mesh로 분쇄한 것을 -20°C 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

항균성물질의 추출

새뱅이의 항균성물질 추출은 5°C 의 저온실에서 Fig. 1과 같이 실시하였다.

즉 진공동결건조한 시료 100g을 증류수 2,000ml로 24시간 동안 교반 추출한 후 원심분리($7,000 \times g$, 4°C , 15min)하여 추출액을 진공동결건조시킨 것을 물 추출구로 하고, 잔사를 에테르, 아세톤, 메탄올 순서로 추출한 다음 회전식 증발농축기(Heidolph 2000)로 농축시킨 것을, 일반적으로 항균력에 영향을 미치지 않는 것으로 알려진(23,24) dimethyl-sulfoxide를 이용 100배로 희석하여 각각의 추출구로 하였으며, 5°C 냉장고에 보관하면서 항균성시험 시료로 사용하였다.

추출수율의 측정

용매별 추출수율의 측정은 추출에 사용한 진공동결 건조 시료 중량에 대한 추출물의 soluble solid 중량을 백분율로 나타내었다.

항균성시험

시험에 사용한 균주는 Table 1과 같으며 한국과학

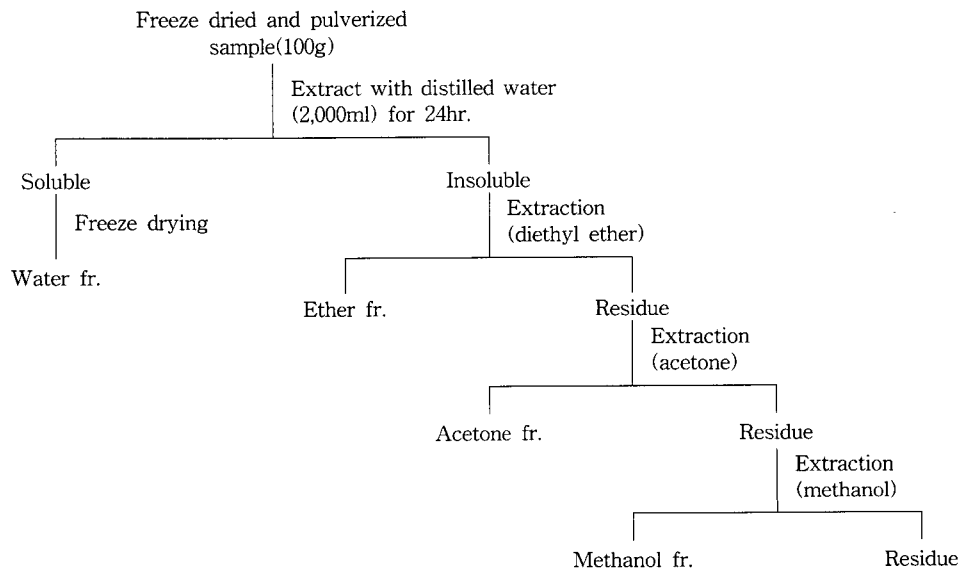


Fig. 1. A procedure for extraction of antimicrobial compounds from *Caridina denticulata denticulata*.

Table 1. List of bacteria submitted for antimicrobial activity test

Gram positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 1021
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 1012
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1621
<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	KCTC 1039
<i>Enterobacter aerogenes</i>	KCTC 2190
<i>Proteus vulgaris</i>	KCTC 2433
<i>Salmonella typhimurium</i>	KCTC 1925
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC 2471

기술연구원 유전자은행에서 분양받아 사용하였고, 배지는 Müller Hinton broth 및 Müller Hinton Agar(Difco Co.)를 사용하였으며, *Vibrio parahaemolyticus* 균주의 경우는 3% NaCl을 첨가하였다.

항균성의 검색은 Bauer 등(25)의 disk diffusion method를 이용하여 실시하였다. 즉 멸균된 petridish에 Müller Hinton agar를 두께가 4~5mm 되도록 분주하여 응고시킨 다음 표준탁도판 (Macforland No. 5)과 탁도가 동일하도록 조정된 액체배양균액을 멸균된 면봉으로 petridish에 균일하게 도말하였다. 다음에 paper disk(Ø 6mm, Advantec Toyo, Japan)를 평판배지위에 올려놓고 100배 희석한 시료액을 마이크로실린저로 20µl씩 3개의 paper disk에 주입하여 37°C에서 18시간 배양한 후 3개의 paper disk 생육저지된 직경을 측정하여 평균치를 시험치로 하였다.

또한 추출물에 대한 항균력의 측정에는 broth dilution method(26)를 약간 수정하여 실시하였다. 즉 Müller Hinton broth 0.5ml에 새뻥이 시료액 1ml를 가한 후 2배 단계로 계속 희석한 시험관에 표준탁도판(Macforland No. 5)으로 탁도를 조정하여 100배로 희석한 공시균 배양액 0.5ml를 각각 분주하고 37°C에서 18시간 배양한 다음 표준탁도판과 흡광도(660nm)를 비교하여 세균의 증식이 저지되는 최소 시료량을 최저발육억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)로 정하였으며, 균이 사멸되었다고 판단되는 시험관의 내용물을 백금이로 Müller Hinton agar plate에 도말하여 37°C에서 18시간 배양한 다음 균이 존재하지 않는 시험구의 최소 시료량을 최저 살균농도(Minimal Bactericidal Concentration, MBC)로 하였다.

결과 및 고찰

용매추출 구간별 수율

진공동결건조한 새뻥이 분말시료를 각 용매별로 순

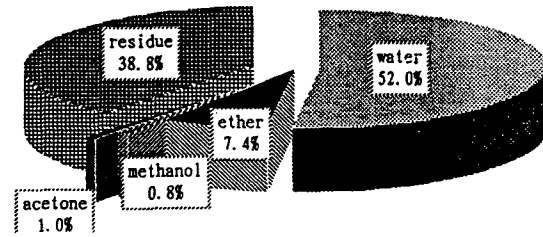


Fig. 2. Extraction yield of dried *Caridina denticulata* by solvent.

차적으로 추출하여 획득한 추출구간별 수율은 Fig. 2와 같다.

즉 용매추출 구간별 수율을 살펴보면 물추출구가 52.0%로 가장 높게 나타났으며, 에테르추출구 7.4%, 아세톤추출구 1.0%, 메탄올추출구 0.8%의 수율을 보였다.

이는 조 등(23)이 별불가사리, 오징어먹집, 성계접질, 우렁쉥이접질, 구멍쇠미역, 산말, 모자반, 참빗풀을 대상으로 각용매별로 순차적으로 추출하여 보고한 평균수율인 물추출구 20%, 에테르추출구 1.4%, 메탄올추출구 1.1%와 비교하여 보면 아세톤추출구와 메탄올추출구는 비슷한 경향을 보였으나 물추출구와 에테르추출구는 새뻥이가 높은 수율을 보였다.

항균성 검색

새뻥이를 물, 에테르, 아세톤, 메탄올을 용매로 하여 순차적으로 추출하여 disk diffusion method로 항균성을 검색한 결과는 Table 2와 같다.

즉 용매 추출구간별 생육저지원의 크기는 시료 20µg/disk에 대하여 에테르추출구와 아세톤추출구가 8~12mm로 비교적 높은 항균효과를 나타내었고, 메탄올추출구는 7~9mm로 미약한 항균효과를 보였으며, 물추출구는 항균성을 나타내지 않았다. 따라서 새뻥이에 존재하는 항균성 물질의 추출에는 비극성 용매인 에테르 및 아세톤이 물 및 메탄올에 비하여 효과적인 것으로 나타났다. 또한 항균성이 단일용매추출구에 집중되지 않고 극성의 정도가 다른 여러 종류의 용매 추출구에서 분산하여 나타난 것은 새뻥이에 존재하는 항균성 물질이 단일물질이 아니기 때문이라고 사료된다.

Lee 등(17)은 4종의 한국산 해면에 대한 항균성물질의 검색에서 CH_2Cl_2 , BuOH 등을 이용하여 분획한 유기용매추출구가 물추출구보다 높은 항균효과를 보였다고 보고하였으며, 이와 신(27)은 식물에서 추출한 천연 항균성 물질을 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물을 이용하여 순차적으로 분획한 다음 식품 부패미생물에 대하여 항균성 시험을 실시한 결과 비극성 용매

Table 2. Microbial growth inhibition by solvent fractions(20µg/disk) from dried *Caridina denticulata denticulata*

Strains	Clear zone on plate(mm)			
	Water	Ether	Acetone	Methanol
Gram positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i>	ND	12	11	8
<i>Bacillus cereus</i>	ND	12	12	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	9	11	7
<i>Streptococcus mutans</i>	ND	11	11	7
Gram negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i>	ND	11	10	8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ND	9	9	9
<i>Proteus vulgaris</i>	ND	11	11	7
<i>Salmonella typhimurium</i>	ND	8	8	7
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ND	12	12	8

ND: not detected

Table 3. Minimal inhibitory concentration of several fraction prepared from dried *Caridina denticulata denticulata*

Strains	Minimal inhibitory concentration(µg/ml)		
	Ether	Acetone	Methanol
Gram positive bacteria			
<i>Bacillus subtilis</i>	25 ^o	250	500
<i>Bacillus cereus</i>	250	250	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	250	250
<i>Streptococcus mutans</i>	500	125	500
Gram negative bacteria			
<i>Escherichia coli</i>	250	125	500
<i>Enterobacter aerogenes</i>	500	250	500
<i>Proteus vulgaris</i>	250	250	1,000
<i>Salmonella typhimurium</i>	500	500	1,000
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	250	250	250

ND: not detected

Table 4. Minimal bactericidal concentration of several fraction prepared from dried *Caridina denticulata denticulata*

Strains	Minimal bactericidal concentration(µg/ml)		
	Ether	Acetone	Methanol
Gram positive bacteria			
<i>Bacillus subtilis</i>	2,500	1,250	5,000
<i>Bacillus cereus</i>	2,500	1,250	5,000
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,000	5,000	10,000
<i>Streptococcus mutans</i>	2,500	1,250	10,000
Gram negative bacteria			
<i>Escherichia coli</i>	10,000	10,000	10,000
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10,000	10,000	10,000
<i>Proteus vulgaris</i>	10,000	10,000	5,000
<i>Salmonella typhimurium</i>	10,000	10,000	10,000
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10,000	5,000	5,000

ND: not detected

인 부탄올과 클로로포름 희분에서 항균성이 높게 나타났다고 보고하였다.

항균력 측정

항균성 검색결과 항균성이 존재하는 에테르, 아세톤,

메탄올추출구를 대상으로 최저발육억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)와 최저살균농도(Minimal Bactericidal Concentration, MBC)를 측정 한 결과는 Table 3, 4와 같다.

즉 용매 추출구간별 MIC는 에테르 250~500µg/ml, 아

세톤 125~500 μ g/ml, 메탄올 250~500 μ g/ml였으며 MBC는 에테르 2,500~10,000 μ g/ml, 아세톤 1,250~10,000 μ g/ml, 메탄올 5,000~10,000 μ g/ml로 나타났다.

MIC의 경우 아세톤추출구가 *S. typhimurium*을 제외한 모든 시험 대상균주에 대하여 250 μ g/ml이하의 농도에서 세균의 발육을 저지할 수 있는 것으로 나타나, 용매 추출구간별로는 가장 우수한 항균효과를 보였으며, 균종별 항균력을 살펴보면 총치의 원인균인 *S. mutans*와 부패세균인 *E. coli*에 대한 MIC는 125 μ g/ml로서 비교적 저농도에서도 발육을 저지할 수 있으며, 식중독 세균인 *S. aureus*, 및 *V. parahaemolyticus*와 병원성 세균인 *E. aerogenes*에 대한 MIC는 250 μ g/ml이었다.

또한 항균력을 식품보존료인 benzoic acid(28)와 비교하면 benzoic acid의 경우 MIC는 *E. coli*에 대하여 500~1,000 μ g/ml(pH 5.2), *S. aureus*에 대하여 1,000 μ g/ml(pH 5.6)인데 비하여 아세톤추출구의 경우 MIC는 *E. coli*에 대하여 125 μ g/ml, *S. aureus*에 대하여 250 μ g/ml를 나타내어 benzoic acid 보다 새뱅이 추출물이 본 실험 조건에서 더 강한 항균력을 지니고 있는 것으로 나타났다.

MBC의 경우는 추출용매별로 큰 차이를 보이지 않았으나, 균종별로는 gram 양성균 1,250~5,000 μ g/ml, gram 음성균 5,000~10,000 μ g/ml로 나타나 gram 양성균의 MBC가 gram 음성균보다 다소 낮은 경향을 보였다. Nakamura 등(29)은 gram 양성균의 세포벽은 peptidoglycan이 표면에 노출되어 항균성 물질의 공격을 받기 쉽지만 gram 음성균의 경우에는 lipopolysaccharide를 주성분으로 하는 외막이 peptidoglycan을 보호하는 작용을 한다고 보고하였다.

요 약

토하것의 원료인 새뱅이를 물, 에테르, 아세톤, 메탄올을 이용하여 순차적으로 추출한 다음 인체 및 식품에 유해작용을 하는 9종의 세균을 대상으로 항균성 시험을 실시한 결과는 다음과 같다. 진공동결건조한 새뱅이 분말의 용매추출 구간별 수율은 물추출구 52.0%, 에테르추출구 7.4%, 아세톤추출구 1.0%, 메탄올추출구 0.8%였다. 새뱅이의 용매추출구간별 항균성 검색 결과 시료 20 μ g/disk에 대하여 에테르추출구 8~12mm, 아세톤추출구 8~12mm, 메탄올추출구 7~9mm였으며 물추출구는 항균성이 없었다. 새뱅이의 용매추출구간별 최저발육억제농도는 에테르추출구 250~500 μ g/ml, 아세톤추출구 125~500 μ g/ml, 메탄올추출구 250~500 μ g/ml였다. 새뱅이의 용매추출구간별 최저살균농도는 에테르

추출구 2,500~10,000 μ g/ml, 아세톤추출구 1,250~10,000 μ g/ml, 메탄올추출구 5,000~10,000 μ g/ml로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 농림수산부에서 수행한 1994년도 농림수산특정연구사업의 연구비로 수행한 결과의 일부이며 연구지원에 감사드립니다.

문 헌

1. 水谷武夫 : 老化生理と微生物のかかわり. *New Food Industry*, **29**, 83(1987)
2. Anand, S. K., Srinirasan, R. A. and Rao, L. K. : Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*. *Cultured Dairy Products J.*, **20**, 6(1985)
3. Hosono, A., Wardojo, R. and Otani, H. : Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agri. Biol. Chem.*, **54**, 1693(1990)
4. Homma, N. : *Bifidobacteria* as a residence factor in human beings. *Bifidobacteria Microflora*, **7**, 35(1988)
5. Board, R. G. : The microbiology of Hen's egg. In "Advances in applied microbiology" Perlman, D.(ed.), AP, New York, Vol. II (1969)
6. Orman, J. D. and Reiter, B. : Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron chelating agents. *Biochem. Biophys. Acta*, **170**, 351(1968)
7. Ashton, D. H. and Busta, F. F. : Milk components inhibitory to *Bacillus stearothermophilus* by iron, calcium, and magnesium. *Appl. Microbiol.*, **16**, 628(1968)
8. Freese, E., Sheu, C. W. and Gallier, S. E. : Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, **241**, 321(1973)
9. Fabian, F. W. and Graham, H. T. : Viability of thermophilic bacteria in the presence of varying concentrations of acids, sodium chloride and sugars. *Food Technol.*, **7**, 212(1953)
10. Yamato, Y., Hiashi, K. and Yoshi, H. : Inhibitory activity of acetic acid on yeast. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **31**, 772(1984)
11. Cox, N. A., Mercuri, A. J., Juven, B. J., Thomson, J. E. and Chew, V. : Evaluation of succinic acid and heat to improve the microbiological quality of poultry meat. *J. Food Sci.*, **39**, 985(1974)
12. Neiman, C. : Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganism. *Bacteriol. Rev.*, **18**, 147(1954)
13. Kcabra, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J. and Trauant, J. P. : Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 23(1972)
14. Tansey, M. R. and Appleton, J. A. : Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia*, **70**, 397(1978)
15. Zaika, L. and Kissinger, J. C. : Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and

- pediococcus cerevisiae*. *J. Food Sci.*, **46**, 1205(1981)
16. 芝奇勳 : 抗菌性天然添加物 開發の現狀と使用上の問題點. *New Food Industry*. **25**, 28(1983)
 17. Lee, J. S., Kim, I. S. and Moon, S. K. : Studied on the antibacterial, antifungal components in some Korean marine sponges. *Bull. Korean Fish. Soc.*, p.24(1991)
 18. 趙鶴來 : 底分子 Chitosan의 抗菌性 및 食品保存效果에 관한 研究. 釜山水産大學 工學博士學位論文(1989)
 19. 藏間一哉 : 海洋の生化學資源(日本水産學會 編). 恒星社厚生閣, 東京, p.80(1970)
 20. 起智雅光 : 海藻の生化學と利用(日本水産學會 編), 恒星社厚生閣, 東京, p.101(1983)
 21. 許俊 : 東醫寶鑑. 南山堂, p.707(1989)
 22. 박원기, 김희경, 김광윤, 범희승, 김지열 : 토하로부터 추출, 제조한 Chitin, Chitosan의 특성. *한국영양식량학회지*, **23**, 353(1994)
 23. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호 : 수산미이용자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색. *한국식품과학회지*, **26**, 261(1994)
 24. 김수현, 임상빈, 고영환, 오창경, 오명철, 박제석 : 추출 용매에 따른 톱 추출물의 수율 및 항균성 검정. *한국수산학회지*, **27**, 462(1994)
 25. Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Turck, M. : Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493(1966)
 26. 이진섭 : 진단병원미생물학. 고려의학, p.541(1989)
 27. 이병환, 신동화 : 식품 부패미생물에 대한 천연 항균성 물질의 농도별 및 분획별 항균 특성. *한국식품과학회지*, **23**, 205(1991)
 28. FAO/WHO : A review of the technological efficacy some antimicrobial agents. *WHO/Food Add.* **41**, 9(1970)
 29. Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi, K. : New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 647(1991)

(1996년 11월 6일 접수)