

산수유 추출물의 항균 및 항산화성

서권일 · 이상원* · 양기호**

순천대학교 식품영양학과, *진주산업대학교 미생물공학과, **순천대학교 한약자원학과

Antimicrobial and Antioxidative Activities of *Corni Fructus* Extracts

Kwon-Il Seo, Sang-Won Lee*, and Ki-Ho Yang**

Department of Food and Nutrition, Suncheon National University

*Department of Microbiological Engineering, Chinju National University

**Department of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University

Abstract

Corni Fructus extracts were investigated for antimicrobial and antioxidative activities. In the methanol, ethanol, water extracts from *Corni Fructus*, antimicrobial activity of the water extract was stronger than the others. Antimicrobial activities were strong against microorganisms such as *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O-157, the activity against *Escherichia coli* O-157 was the strongest of all the microorganisms. The growth of all the microorganisms were completely inhibited to 48 hours in the 150 μ l per ml of culture media. The shape of *E. coli* O-157 treated with *Corni Fructus* water extract was expanded and its cellular surface was collapsed severely. When *Corni Fructus* water extract of 200 μ l was treated, hydrogen donating effect was more than 90%, and antioxidative activity using linoleic acid was similar to 0.1% BHT at the concentration of 50 μ l.

Key words : *Corni Fructus* extract, antimicrobial activity, antioxidative activity

서 론

산수유는 층층나무과에 속한 낙엽활목으로서 주로 약용수로 이용하기 위하여 전국에 식재하고 있으며, 중국으로부터 도입된 것으로 알려져 왔으나 최근 학자들의 조사에 따라 우리나라에서 자랐던 토종나무라고 밝히고 있다. 생약 산수유는 가을에 익은 산수유의 열매를 따서 씨를 뽑아내고 햇볕에 말린 것을 말하는데, 어느 한약방에 가보아도 산수유라고 적힌 약서랍이 있을 만큼 중요한 약제로서 옛부터 많이

사용되어 왔으며, 그 술도 많이 애용되어 왔다. 산수유는 그 맛은 시고 성질은 약간 따뜻하며, 간경, 신경에 좋고, 이뇨작용, 혈압강하작용, 단백질의 소화를 돕는작용, 항암작용, 항균작용 등이 있다고 동의학에는 말하고 있으며, 한때는 이 나무가 세 그루만 있어도 아들을 대학에 보낼 수 있다 하여 '대학나무'라는 별명이 붙을 만큼 수익이 좋았다고 한다(1). 특히 산수유는 전라남도 구례군에서 생산의 기후 및 토질이 적합하다 하여 대량으로 생산되고 있는데, 그 물량이 연간 200여톤으로 우리나라 생산량의 약 30%를 차지하고 있으며, 수출 및 내수를 통하여 그 생산액으로만도 25억원에 달하고 있다. 이에 따라 구례군은 산수유를 특품사업으로 지정 받아 산수유차 등을 개발

Correspond author ; Kwon-Il Seo, Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

하여 판매하고 있으며, 산수유주 및 음료 등을 개발하여 구례의 명품으로 육성하고자 노력하고 있다.

산수유에 대한 연구로는 이 등(2)이 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육분리의 특성에 대하여, 김 등(3)이 건조방법에 따른 구기자와 산수유의 영양성분에 관하여 보고하였으며, 박 등(4)은 산수유 종자의 항당뇨효과에 대하여, 정 등(5)은 산수유 종자의 독성과 렉틴 성분에 대하여 보고하였는데, 산수유에 대한 항균 및 항산화 등의 생물활성에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 산수유의 항균 및 항산화성의 기능적 특성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

재료

산수유는 전라남도 1998년도에 구례군에서 수확하여 씨를 제거하여 건조한 것을 실험에 사용하였다.

추출

메탄올, 에탄올 및 물과 같은 용매를 사용하여 산수유 5g당 100ml의 비율로 용매를 첨가하여 상온에서 24시간 교반추출하고, 또한 환류냉각기를 이용하여 메탄올과 에탄올은 80℃, 물은 100℃에서 2시간 추출하여 이를 산수유 g당 1ml가 되도록 농축한 후 생리활성을 측정하는 시료로 사용하였다.

사용균주 및 배지

항균시험용으로 사용된 균주는 *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 및 *Escherichia coli* O-157로서 한국 중균협회에서 분양받아 사용하였으며, 각종 미생물의 배양에 사용된 배지는 nutrient broth와 agar를 사용하였다.

항균력 측정

항균력 측정은 Farag의 방법(6)을 변형하였다. 즉, agar 1.5%가 함유되어 있는 생육배지를 petri dish의 밑면에 얇게 펴고, 그위에 다시 0.6%의 agar가 함유된 생육배지를 부어 2중의 평판배지를 만든 후 각 균주를 평판배지에 도말하였다. 직경 0.8cm 여지 disc에 산수유 추출물 일정량을 가한 다음 균주가 도말된 평판생육배지위에 올려놓고 36℃에서 24시간 배양하여 생성되는 생육저해환을 측정하여 항균력을 조사하였다.

미생물의 생육도 측정

미생물의 생육도 측정은 액체배지 회석법으로 하였다. 즉, 시험관에 10ml의 생육배지를 넣고 대수기 중기까지 배양된 균체 배양액 1%를 접종한 후 농축한 산수유 추출물의 함량을 배지 ml당 0, 30, 60, 90, 120 및 150 μ l가 되도록 첨가하고 균주의 최적 온도에서 배양하면서 경시적으로 미생물의 생육정도를 spectrophotometer를 사용하여 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

미생물의 형태변화 조사

산수유 추출물의 처리에 따른 식품 부패미생물의 형태변화를 조사하기 위하여 전자현미경으로 관찰하였다. 즉, 부패미생물을 배지에서 48시간 배양한 다음 배양균주 일부에 산수유 추출물을 첨가하여 3시간 방치한 다음 이를 원심분리하고 균체를 분리하여 0.05M phosphate buffer로 회석한 후 0.45 μ m membrane filter에 균체를 고정하였다. 이를 5% glutaldehyde 용액에 하룻밤 담구어 멸균수로 세척한 뒤 30~100%의 에탄올에 차례로 담구어 탈수하고, 이를 isocamylacetate에 약 30분간 담구어 건조시킨 후 전자현미경 촬영 시료를 조제하여 관찰하였다.

수소공여능 측정

시료에 대한 수소공여능은 α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazine(DPPH)의 환원성을 이용하여 516nm에서 UV/Vis-spectrophotometer로 측정하였다. 즉 각 추출물과 비교구로 사용한 BHT의 농도를 0.1%되게 조제한 시료 1ml와 4 \times 10⁻⁴M DPPH 용액 3ml를 5초 동안 vortex mixer로 혼합하여 증류수에 대한 흡광도를 측정하고, 대조구는 시료대신 에탄올 1ml를 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소비율로 나타내었다.

$$\text{수소공여능} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Linoleic acid에 대한 항산화력 측정

산수유 추출물의 항산화 효과를 linoleic acid에 대한 과산화물값(peroxide value, POV)을 측정하여 in vitro로 탐색하였다. 삼각플라스크에 linoleic acid 1 g, ethanol 10ml 및 소량의 산수유 추출물을 첨가한 후 0.2M 인산완충용액 25ml를 가하여 37℃에서 일정기간 저장한 다음 반응용액을 분액깔대기에 옮겨 chloroform 25ml를 가하여 2~3회 반복 추출하였다. Chloroform 추출액에 acetic acid 25ml과 포화 KI용액 1 ml를 가하여 암소에서 5분간 방치한 다음 증류수 50 ml를 가하여 1/100N Na₂S₂O₃용액으로 적정하였다.

결과 및 고찰

용매 및 추출 방법에 따른 산수유 추출물의 항균활성 용매 및 추출 방법에 따른 산수유 추출물의 항균 활성을 측정된 결과는 Fig. 1 및 Table 1과 같다.

Table 1. Antimicrobial activities of Corni Fructus solvent extracts

Microorganisms	(Unit : mm)					
	Shaking			Reflux		
	MeOH	EtOH	Water	MeOH	EtOH	Water
<i>Streptococcus mutans</i>	23	20	24	23	19	25
<i>Bacillus subtilis</i>	25	22	24	26	22	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	19	23	23	20	25
<i>Salmonella typhimurium</i>	26	23	27	25	22	26
<i>Escherichia coli</i>	26	24	28	25	22	26
<i>Escherichia coli O-157</i>	29	23	31	31	25	31

Each disc contain 50 μ l extracts equivalent to 50mg Corni Fructus.



Fig. 1. Antimicrobial activities of various solvent extracts from Corni Fructus against *Salmonella typhimurium*.
1. Methanol extracts. 2. Ethanol extracts. 3. Water extracts.

산수유 추출물 50 μ l(산수유 50mg에 해당)에 대하여 항균활성을 측정된 결과 용매별 항균활성은 물추출물이 가장 강하였고, 다음으로 메탄올과 에탄올 순이었다. 추출방법에 따라서는 교반 및 환류방법이 크게 차이를 나타내지 않았다. 시험균주에 대한 산수유 물추출물의 clear zone은 교반추출시 *S. mutans*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli* 및 *E. coli O-157*에 대하여 각각 24, 24, 23, 27, 28 및 31mm이었고, 환류추출시는 25, 26, 25, 26, 26 및 31mm로 대체로 모든 시험

균주에 대하여 항균활성 강하게 나타났는데, 특히 이 중에서 산수유 물추출물은 *E. coli O-157*에 대하여 가장 강한 항균활성을 나타내었고, *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대하여도 다른 시험균주보다는 높은 경향이였다.

산수유 물추출물의 농도가 미생물 증식에 미치는 영향 상기의 결과에 근거하여 산수유 물추출물이 미생물의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 환류추출에 의한 산수유 물추출물의 농도를 미생물이 첨가된 배지 ml당 0, 30, 60, 90, 120 및 150 μ l 농도로 첨가하여 미생물의 생육도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

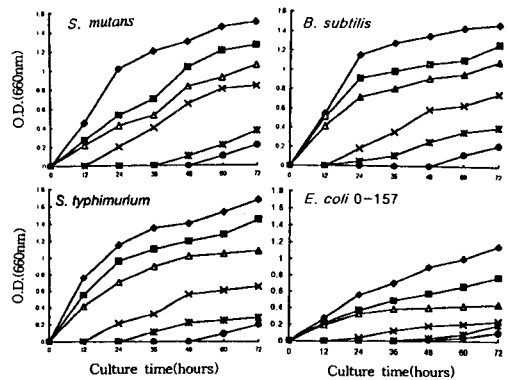


Fig. 2. Inhibitory effects of water acetate from Corni Fructus against microorganisms.
● : 0 μ l, □ : 30 μ l, ▲ : 60 μ l, × : 90 μ l, * : 120 μ l, ○ : 150 μ l.

*S. mutans*의 경우 산수유 물추출물을 배지 ml당 30 μ l로 첨가하였을 때 균의 증식이 억제되었으며 90 μ l 첨가시는 대조구에 비하여 50% 이상 균의 성장이 억제되었으며, 150 μ l 첨가시는 48시간 균의 성장이 완전히 억제되었다. *B. subtilis*의 경우도 *S. mutans*와 비슷한 경향으로 나타났으며, *S. typhimurium*의 경우는 120 μ l 첨가시 24시간까지 균의 성장이 완전 억제되었고, 150 μ l 첨가시는 48시간까지 균의 성장이 완전 억제되었으며, *E. coli O-157*의 경우도 *S. typhimurium*과 비슷하였으나, 이는 다른 시험균주에 비하여 저농도의 산수유 물추출물에서도 균의 성장을 크게 저해하였다.

산수유 물추출물에 의한 미생물의 형태 변화

산수유 물추출물에 의한 미생물의 형태 변화를 조사하기 위하여 *E. coli O-157*에 대하여 산수유 물추출물을 배지 ml당 200 μ l로 처리한 것과 처리하지 않은 대조구를 전자현미경 촬영시료를 조제하여 관찰한 결과는 Fig. 3과 같이 대조구에 비하여 산수유 물추

출물을 처리하였을 때 균체가 팽윤되고, 표층구조가 허물어지는 심한 형태학적 변화를 나타내었다.

조 등(7)은 *E. coli* 및 *S. aureus* 등에 grapefruit seed extract(GFSE)용액을 처리한 후 전자현미경으로 관찰한 결과 대조구와 비교하여 GFSE용액을 처리한 균체에서 세포막 기능이 파괴되어 세포내용물이 균체 외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되는 현상을 나타내었다고 보고하였고, 서 등(8)은 대장균에 겨자 물추출물을 처리하였을 때 균체표면이 수축되고 표층구조가 심하게 허물어졌다고 보고하였는데, 본 결과의 이와같은 현상들은 상기의 연구보고와 비교하여 볼 때 산수유 물추출물에 의한 미생물의 세포벽 및 세포막의 기능이 파괴되어 용균이나 균체성분의 노출로 인한 결과라고 생각된다.



Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Escherichia coli* O-157 treated with *Corni Fractus* water extract. A:Control. B:treated with water extract(200 μ l/ml).

산수유 물추출물의 수소공여능

유리라디칼은 노화, 발암, 동맥경화 및 식품의 산화에 관련이 있다고 보고되고 있는데(9), 산수유의 이에 대한 소거능을 조사하기 위하여 용매 및 추출 방법에 따른 산수유 물추출물의 수소공여능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 용매에 따른 수소공여능은 물추출물이 메탄올 및 에탄올 추출물보다 효과가 더 좋았으며, 교반 및 환류 방법에 따른 수소공여능은 항균활성과 마찬가지로 거의 비슷한 효과를 나타내었다. 또한 교반 방법에 의한 물추출물 100 μ l(산수유 100mg에 해당) 첨가시는 53.1%의 수소공여능을 나타낸 0.1%의 BHT보다 높은 67.9%의 효과를 나타내었고, 200 μ l 첨가시는 91.4%의 수소공여능을 나타낸 0.1%의 BHT보다 높은 91.7%의 효과를 나타내었으며,

환류 방법에 의한 물추출물도 100 μ l 첨가시는 68.7%의 효과를 나타내었고, 200 μ l 첨가시는 92.3%의 높은 효과를 나타내었다.

김 등(10)은 국내의 생약 추출물에 대한 수소공여능 조사에서 목단과 황금 추출물 200ppm의 농도 0.2 ml와 4×10^{-4} DPPH 0.8ml를 반응시킨 결과 약 80% 이상의 수소공여능을 가진다고 보고하였는데, 본 실험결과는 이보다 높은 효과를 나타내었다.

Table 2. Hydrogen donating activities of Corni Fructus solvent extracts (Unit : %)

Con. (μ l)	Control	Shaking			Reflux		
	0.1% BHT	MeOH	EtOH	Water	MeOH	EtOH	Water
100	53.1	67.9	40.2	67.9	66.1	59.2	68.7
200	91.4	80.4	67.4	91.7	84.5	63.9	92.3

산수유 물추출물의 linoleic acid에 대한 항산화 효과

산수유의 항산화 효과를 조사하기 위하여 linoleic acid에 대하여 0.1% BHT와 산수유 물추출물을 0, 10, 30 및 50 μ l 산수유를 첨가한 후 50 $^{\circ}$ C에서 7일간 저장하면서 과산화물가를 측정하였는데, 산수유 물추출물을 첨가하지 않은 대조구는 저장 1, 3, 5 및 7일 후에 과산화물가가 60, 117, 140 및 187meq/kg이었는데, 0.1% BHT 10 μ l 첨가시는 9, 23, 30 및 36meq/kg이었고, 산수유 물추출물을 첨가한 시험구에는 10 μ l 첨가시 11, 33, 36 및 42meq/kg, 30 μ l 첨가시는 8, 22, 27 및 30meq/kg, 50 μ l 첨가시는 6, 20, 22 및 25meq/kg로 나타났다(Fig. 4).

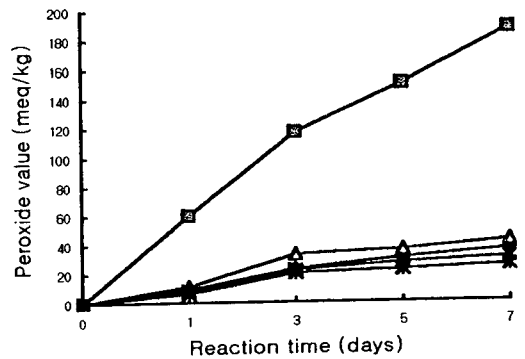


Fig. 4. Changes in the peroxide value with the addition of *Corni fractus* water extract during autoxidation of linoleic acid of 50 $^{\circ}$ C for 7 days. \blacklozenge : 50 μ l (0.1% BHT), \blacksquare : 30 μ l (D.W.), \blacktriangle : 10 μ l (Corni fractus), \blacktimes : 30 μ l (Corni fractus), \blackstar : 50 μ l (Corni fractus).

권 등(11)은 목단피 메탄올 추출물의 에칠아세테이트 분획의 linoleic acid에 대한 항산화 효과가 87.3% 이었고, 비교구인 BHT는 96.2%로 나타났다고 보고하였는데, 본 실험결과 산수유 물추출물을 10 μ l만 첨가하여도 0.1% BHT 50 μ l 첨가시와 거의 같은 항산화 효과를 나타내어 상당한 항산화효과가 있는 것으로 나타났다.

요 약

산수유 추출물에 대한 항균 및 항산화성에 대하여 조사하였다. 용매에 따른 산수유 추출물의 항균활성은 물추출물이 가장 강하였고, 다음으로 메탄올과 에탄올 순이었다. 산수유 물추출물은 *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 및 *Escherichia coli* O-157와 같은 시험균주에 대하여 강한 항균활성을 나타내었으며, 이 중에서 *Escherichia coli* O-157에 대하여 가장 강한 항균활성을 나타내었다. 산수유 물추출물을 각 시험균주에 농도별로 첨가한 후 경시적으로 균의 증식을 조사한 결과 30 μ l의 농도에서도 균의 증식을 억제하였으며, 150 μ l 첨가시는 48시간 이상 균의 성장이 완전히 억제되었다. 산수유 물추출물을 *Escherichia coli* O-157에 처리하였을 때 균체가 팽윤되고, 표층구조가 허물어지는 심한 형태학적 변화를 나타내었다. 산수유 물추출물 200 μ l 첨가시 90% 이상의 수소공여능을 나타내었으며, linoleic acid에 대한 항산화력의 조사에서도 10 μ l만 첨가하여도 0.1% BHT 50 μ l 첨가시와 같은 정도의 강한 효과를 나타내었다.

참고문헌

1. 장상문, 최정, 김종완, 박병윤, 박선동 (1996) 한약 자원식물학. 학문출판
2. 이영철, 김영언, 이부용, 김철진 (1992) 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육분리 특성. 한국식품과학회지, 24, 447~450.
3. 김미정 (1993) 건조방법에 따른 구기자과 산수유의 영양성분에 관한 비교 연구. 숙명여대 석사 학위논문.
4. 박영경, 황완균, 김일혁 (1995) 산수유 종자의 항당뇨 효과. 중앙대 약학논총, 9, 5~11.
5. 정시련, 전환희, 박소영, 장순자(1993) 산수유 종자의 독성과 락틴 성분. 한국생약학회지, 24, 177~182.
6. Farag, R.S. (1989) Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.* 52, 665.
7. 조성환, 이현철, 서일원, 김재욱, 장영상, 신재익 (1994) Grapefruit 종자추출물을 이용한 밀감의 저장효과. 한국식품과학회지, 1, 614~618.
8. 서권일, 강갑석, 심기환 (1997) 냉면육수의 보존중겨자의 첨가효과. 한국식품과학회지, 29, 51~56.
9. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, 90, 7915~7920.
10. 김석창 (1994) 황금에서 분리한 flavonoids와 그의 항산화성. 건국대학교 박사학위논문.
11. 권오근, 손진창, 김상철, 정신교, 박승우 (1998) 목단피 추출물의 항균 및 항산화 작용. 한국농산물저장유통학회, 5, 281~285.

(1999년 1월 12일 접수)