

## 초피추출물의 항균특성

정순경 · 정재두 · 조성환<sup>†</sup>

경상대학교 식품공학과

### Antimicrobial Activities of *Chopi*(*Zanthoxylum piperitum* DC.) Extract

Sun-Kyung Chung, Jae-Doo Jung and Sung-Hwan Cho<sup>†</sup>

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

#### Abstract

In order to evaluate the antimicrobial function of natural herb extracts as antimicrobial agent or packaging material for the preservation of foods and greenhouse produce, the water extract of *chopi* (*Zanthoxylum piperitum* DC.) was prepared and its antimicrobial activity was determined. In the paper disk test its antimicrobial activity was increased in proportion to its concentration. The growth of microorganisms was completely inhibited above 500ppm of its concentration. It showed wide spectrum of thermal(40 to 180°C) and pH(4 to 10) stabilities. In the electronic microscopic observation(TEM and SEM) of microbial morphological change it showed to decrease the activation of physiological enzymes and to lose the function of cell membranes. Even in the activation test of  $\beta$ -galactosidase, it seemed to weaken the osmotic function of cell membranes remarkably in comparison with chloroform and its activation corresponded to 40~50% of toluene. *Zanthoxylum piperitum* DC. extract seemed to be an excellent antimicrobial for the inhibition of food-borne microorganisms as well as the preservation of greenhouse produces.

**Key words:** antimicrobial activity, greenhouse produce, *Zanthoxylum piperitum* DC.

#### 서 론

초피(*Zanthoxylum piperitum* DC.)는 한국, 일본 그리고 중국 등 동북아시아에 널리 자생하는 방향성 낙엽 관목으로서 산초나무(*Zanthoxylum*)에 속한다(1). 우리나라에서는 초피라 부르며 지방에 따라 제피(경상도), 쟈피(전라도)라 불리기도 하고 한방에서는 천초라고도 하며 가시가 없는 것은 민초피라고도 한다. 일본에서는 산소우(山椒), 중국에서는 화초(花椒)라고 부른다. 초피는 각종 신미, 정유성분 및 유지가 함유되어 있어 옛부터 향신료로 이용되어 왔고 또한 한방과 민간에서는 복통, 설사, 감기, 이뇨, 황달, 통경, 편두염, 중풍, 사독, 진통 등에 약재로 사용되어 왔다(2-6). 최근에는 많은 약성분이 검출되고 천연의약품, 천연향신료로 이용개발이 활발하게 진행되고 또한 천연보존제로도 이용되고 있다(7-11). 천연에 존재하는 보존제, 즉 항균 물질에 대한 연구는 각종 한약재의 추출물(12-15), 향

신료의 추출물(16-18) 등에서 활발한 연구가 진행되어 오고 있다. 따라서 본 연구에서는 천연식품보존제 및 천연항균제 개발을 위한 방안으로서 천연 향신료중 한 방과 민간 약재로 사용되어온 초피를 물로 추출하여 항균물질을 분리한 후 이를 이용하여 변폐미생물들에 대한 항균력을 확인하고, 항균활성성분이 미생물세포막 또는 세포벽의 유동성에 미치는 영향을 전자현미경을 이용하여 항균작용을 확인하고자 하였다. 또한 이를 기초로 하여 시설채소산물에 대하여 선도유지제로서의 이용가능성을 검토하는데 목적을 두었다.

#### 재료 및 방법

##### 초피

초피(*Zanthoxylum piperitum* DC.)는 한국산 초피를 건조상태로 1997년 6월 경남 함양군 한약재상에서 구입하여 씨를 제거한 후 사용하였다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

### 공시균주

항균활성의 검색을 위한 공시균주는 변패된 양파에서 분리·동정된 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas syringae* 그리고 *Corynebacterium xerosis*를 표준균주로 사용하였다.

### 초피추출물의 조제

초피추출물의 조제는 원심분리 순환식 무압력 한약 추출기에 초피와 증류수를 1 : 5의 비율로 넣고 100°C에서 3시간 동안 추출하여 1차 여과포를 이용하여 여과한 후, 여과액을 10분 동안 5,000rpm에서 원심분리하여 상정액을 수집하여 2차 여과시켜 얻은 액을 회전진공증발기로 최초량의 약 1/10로 농축하고 동결건조기로 건조하여 조제하였다.

### 항균력 시험

초피추출물의 항균력 검색용 균주를 Brain heart infusion broth(Difco, USA)에 각각 접종하여 35°C에서 18시간 배양한 배양액을 공시균주로 하였다. 초피추출물의 최소저해 농도 항균력 시험은 paper disc method (19)에 의해 측정하였다. 즉, 배양된 공시균액 1ml를 petri dish에 가하고 멸균된 배지 약 15ml를 부어 혼합하고 굳힌 다음 그 위에 다시 10ml를 증침하여 응고시킨 후, 그 위에 paper disc를 놓고 초피추출물을 0~1,000ppm 범위내의 농도별로 조제된 액을 10 $\mu$ l 흡수시켜 35°C에서 48시간 배양한 후 균이 증식하지 못한 clear zone의 직경을 대조구와 비교하여 항균력을 시험하였다.

### 열 및 pH 안정성 조사

초피추출물의 열안정성을 측정하기 위하여 추출물을 40, 60, 80, 100, 120, 180°C에서 각각 30분 동안 열처리한 후 처리온도별로 초피추출물의 농도가 1,000ppm이 되도록 살균증류수로 조제한 다음, 항균력 시험 방법과 동일하게 비교·측정하였다. 또한, pH안정성은 pH를 4, 6, 7, 8, 10으로 조정한 후 37°C에서 1시간 방치한 다음, 다시 pH 7로 중화시켜 열안정성 시험과 같은 방법으로 생육저해환을 비교·검토하여 pH안정성을 측정하였다.

### 미생물 생육저해 곡선 측정

초피추출물의 항균력 시험에서 항균력이 입증된 초피추출물을 membrane filter(0.2 $\mu$ m)로 제균시키고, Tryptic soy broth(TSB, Difco, USA)에 접종한 후,

30°C에서 24시간 동안 배양시키고, 이 배양액 0.1ml를 취해 다시 10ml TSB에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 배양액 0.1ml를 여러 농도(100, 500, 1000, 2500, 5000ppm)의 초피추출물이 함유된 TSB에 접종한 후 배양하였다. 초피추출물의 첨가농도별 항균효과는 배양미생물의 생육정도를 620nm에서 흡광도를 측정하고 초피추출물을 넣지 않은 TSB를 blank로 하여 비교·검토하였다.

### 항균력에 의한 미생물세포의 전자현미경 형태변화 조사

초피추출물의 처리로 인한 공시균주의 세포형태 및 기능성 변화를 알아보기 위해 전자현미경을 이용하여 처리전·후의 세포구조를 관찰하였다. 초피추출물 1,000ppm의 농도로 처리한 것과, 처리하지 않은 대조구 균체세포의 전자현미경촬영사진을 비교·검토하여 미생물 세포형태 및 세포기능의 변화를 측정하였다(20). 투과전자현미경(TEM: Transmission electron microscope)과 주사전자현미경(SEM: Scanning electron microscope)의 조직표본 제작은 전보(15)에 준하여 수행하였다.

### $\beta$ -Galactosidase activity의 측정

초피추출물이 미생물의 세포막에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포를 파쇄하지 않고 toluene, chloroform과 초피추출물 존재시에 균체의  $\beta$ -galactosidase가 정량되는가의 여부를 살펴보았다(21). 사용균주가  $\beta$ -galactosidase를 가지고 있음은 IPTG와 X-gal을 함유한 배지에서 확인하였다. 공시균주인 *Escherichia coli* 및 *Pseudomonas syringae*를 영양배지에 접종한 뒤, 37°C에서 24시간 배양한 후, M9 medium으로 옮겨 주고 600nm에서 흡광도가 0.2~0.7이 되도록 배양한 다음, 0°C에서 방치하여 성장을 억제하였다. 배양액 0.5ml에 같은 부피의 완충액을 가하고 10초간 잘 흔들어 toluene, 증류수, 초피추출물, chloroform을 같은 농도로 처리하고, 다시 10초간 세게 흔들어 주었다. Toluene 제거를 위해 37°C에서 40분간 방치하고, 28°C에서 5분간 더 방치하고 ONPG(o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, 4mg/ml)를 0.2ml 첨가후 잘 흔들어 주고 약 20시간 동안 28°C에서 반응하였다. 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5ml를 가하여 반응을 정지시킨 후, 원심분리하고 상등액의 흡광도를 420nm에서 측정하였다. 증류수를 넣은 경우를 0으로 하고 toluene을 넣어준 경우를 100으로 하여 초피추출물이 세포막에 미치는 영향을 비교하였다.

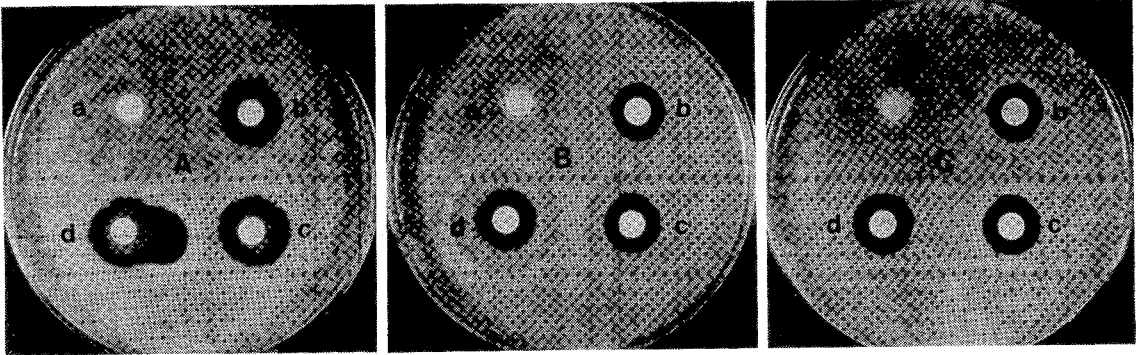


Fig. 1. Inhibitory effect of *Zanthoxylum piperitum* DC. extract on the growth of microorganisms.

A: *Escherichia coli*, B: *Bacillus cereus*, C: *Pseudomonas syringae*  
 a: 0ppm(control), b: 200ppm, c: 500ppm, d: 1000ppm

결과 및 고찰

초피추출물의 항균력 검사

초피에서 추출한 항균물질의 항균력 검사 결과는 Fig. 1에서 보여주고 있다. 공시균주에 대한 초피추출물의 항균활성에서 *Escherichia coli*는 1,000ppm의 농도에서 확실한 clear zone을 형성하였고, *Bacillus cereus*는 200ppm 이상에서 농도에 비례하여 clear zone을 나타내었다. 그리고 *Pseudomonas syringae*에 대해서는 500ppm 이상에서 clear zone을 보여주고 있다. 따라서 물로 추출한 초피추출물이 위의 공시균주들에 대하여 농도에 비례하여 항균력이 증가하는 것을 알 수 있었다.

미생물 생육저해 곡선특정

초피추출물의 항균력 시험에서 항균력이 입증된 초피추출물의 시설채소변패미생물에 대한 생육억제효과를 확인하기 위하여 측정된 생육저해 농도곡선은 Fig. 2와 같다. 사용한 공시균주, 즉 *Bacillus cereus*, *Pseudomonas syringae* 그리고 *Corynebacterium xerosis* 각각에 대하여 초피추출물 500ppm 이상에서 생육이 완전히 억제되는 것으로 나타났다.

열 및 pH 안정성의 검사

초피추출물의 열안정성 및 pH안정성을 검토한 결과는 Fig. 3과 Fig. 4에서 보여주고 있다. Fig. 3에서 나타난 것처럼 넓은 영역의 열처리 온도(40~180°C)에서 뛰어난 항균활성을 나타내고 있고 또한 Fig. 4에서와 같은 pH 범위(pH 4~10)에서도 항균력을 보임으로써 초피에서 추출한 항균물질은 열과 pH에 대하여 안정한 것으로 나타났다.

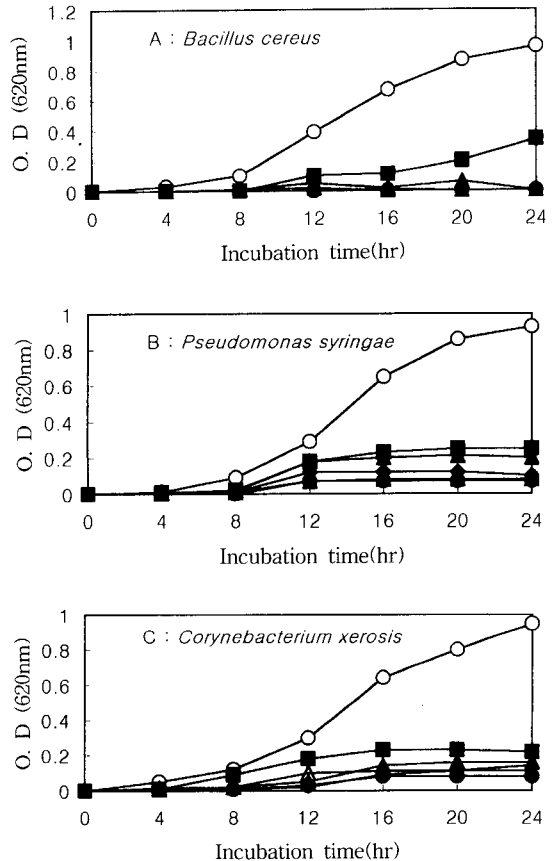


Fig. 2. Microbial growth curve in the medium containing *Zanthoxylum piperitum* DC. extract.

A: *Bacillus cereus*, B: *Pseudomonas syringae*, C: *Corynebacterium xerosis*  
 ○: control, ■: 100ppm, ▲: 500ppm, ◆: 1000ppm, ▽: 2500ppm, ●: 5000ppm

미생물세포의 전자현미경학적 형태변화 조사

초피추출물이 미생물세포생리특성에 미치는 영향

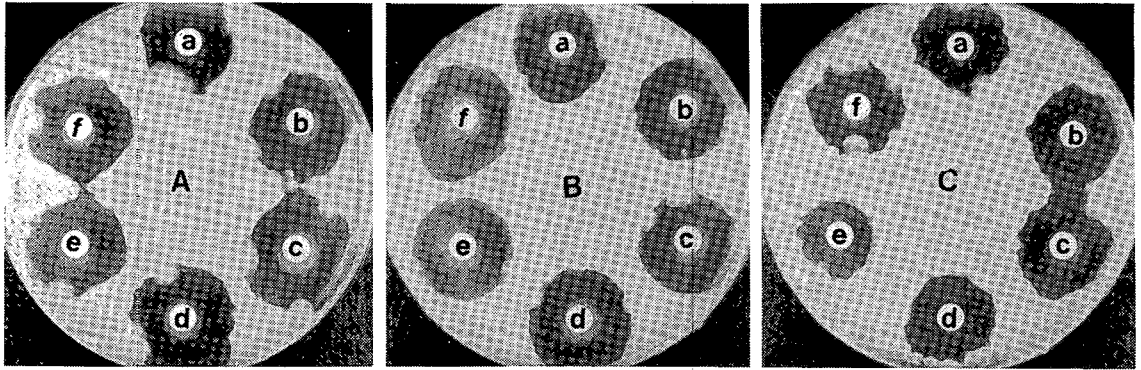


Fig. 3. Thermal stability of *Zanthoxylum piperitum* DC. extract for antibacterial activity.

A: *Escherichia coli*, B: *Bacillus cereus*, C: *Pseudomonas syringae*  
a: 40°C, b: 60°C, c: 80°C, d: 100°C, e: 120°C, f: 180°C

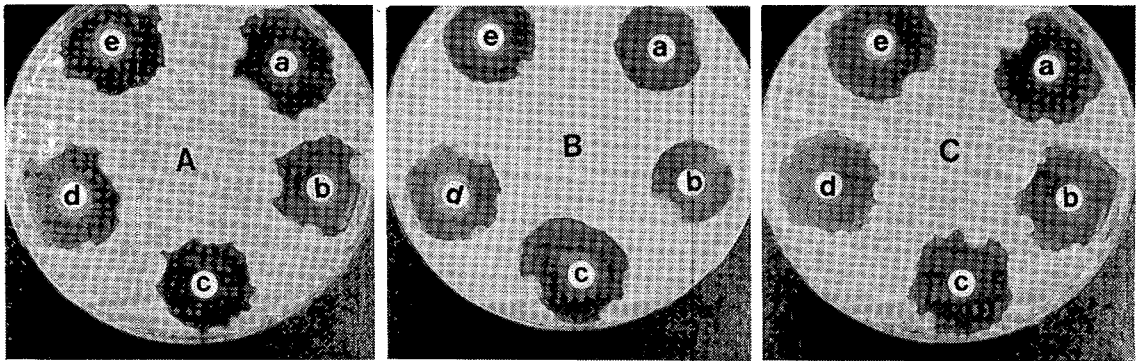


Fig. 4. pH stability of *Zanthoxylum piperitum* DC. extract for antibacterial activity.

A: *Escherichia coli*, B: *Bacillus cereus*, C: *Pseudomonas syringae*  
a: pH 4, b: pH 6, c: pH 7, d: pH 8, e: pH 10

을 조사하기 위하여 공시균주는 *Pseudomonas syringae* 를 사용하였다. 배양된 균주에 대하여 초피추출물의 농도를 1,000ppm으로 처리한 것을 처리하지 않은 대조구 균주와 함께 전자현미경 촬영시료로 조제하여 SEM과 TEM을 촬영한 결과는 Fig. 5 및 Fig. 6과 같다. SEM의 결과인 Fig. 5에서 보는 바와 같이 미생물의 생리활성효소의 기능이 약화되고 세포벽 또는 세포막이 파손되어 삼투기능이 상실됨으로 해서 미생물의 생리가 중단되고 생육이 억제되는 것을 볼 수 있다. 또한, TEM의 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 초피추출물의 항균물질에 의하여 균체세포는 세포내용물이 균체의 부로 유출되어 균체의 생육이 억제되며, 균체내부가 빈 ghost 형태의 균체수가 증대함을 알 수 있었다. 이것은 천연항균제가 미생물의 세포내 생리활성효소의 기능을 약화시키고, 세포막기능이 상실된다는 기존의 연구 보고(15,22)로 미루어 포자의 세포벽 및 세포막의 기능이 상실되어 포자내용물의 소실 등으로 인한 초피추출

물의 항균작용에 기인한 것으로 생각된다.

#### $\beta$ -Galactosidase activity의 측정

초피추출물을 미생물 세포에 처리하였을 때, 세포막에 영향을 주는가를 알아보기 위하여 초피추출물의 존재하에서 *Escherichia coli* 및 *Pseudomonas syringae*의  $\beta$ -galactosidase활성을 측정하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, 증류수를 가해준 대조구에서의 값은 0으로 하고 toluene을 가해 준 시험구를 100으로 하였을 때, *Escherichia coli*의 경우, 초피추출물처리구는 각각 40%, 43%, *Pseudomonas syringae*의 경우, 각각 50%, 43%의 활성이 검출되었다. Chloroform을 가해서 세포막을 손상하여 얻은 값이 10%정도였는데, 이를 토대로 보면, 초피추출물은 chloroform보다 세포막을 더 손상시키며, 세포막 파손이 심하게 일어나는 toluene 처리구의 40~50%에 상응하는 세포막 기능파괴가 초래된 것으로 예상할 수 있었다. 이 결과는 전자현미경 실험결

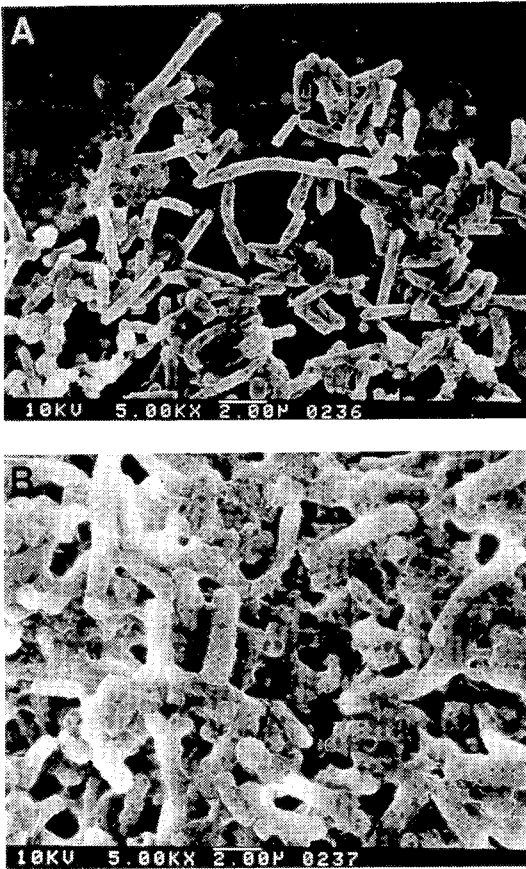


Fig. 5. Scanning electron micrographs of *Pseudomonas syringae* not-treated(A: control) and treated(B: 1000ppm) with *Zanthoxylum piperitum* DC. extract. (Magnification:  $\times 5,000$ )

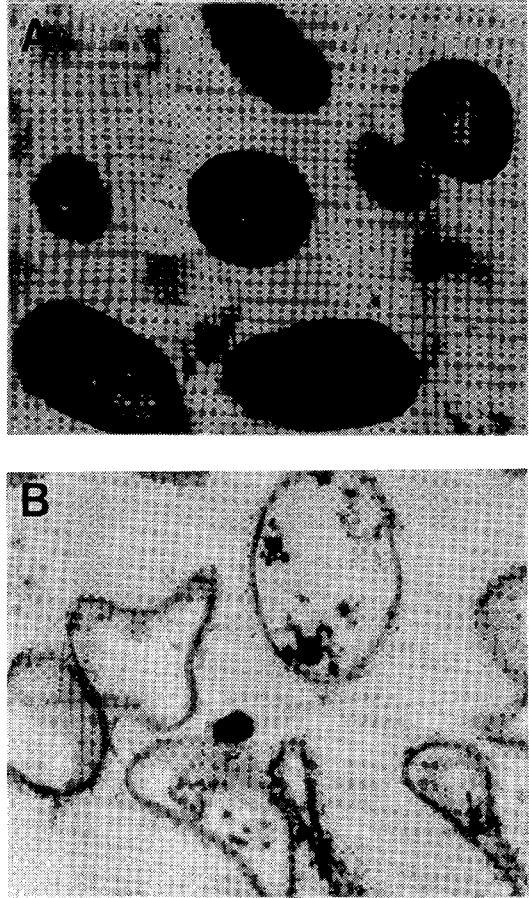


Fig. 6. Transmission electron micrographs of *Pseudomonas syringae* not-treated(A: control) and treated(B: 1,000ppm) with *Zanthoxylum piperitum* DC. extract. (Magnification:  $\times 25,000$ )

과(Fig. 5 및 Fig. 6)와 잘 일치하였으며, 이와 같은 항균기작에 연유하여 초피추출물처리는 각각 뛰어난 미생물 세포의 생육억제효과를 보여 줄 수 있는 것으로 판단되었다.

이상과 같은 실험을 통하여 한국산 초피의 추출물에서 강한 항균력이 있다는 것을 확인하였으나 이 항균물질을 시설채소산물 기타 식품원료에 직접 또는 포장소재로 적용할 수 있기까지는 많은 기초연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다. 초피추출물의 항균활성물질 및 그 작용기작을 확립하기 위해서는 먼저 항균작용에 관여하는 초피추출물의 유효활성물질을 순수분리하여, 분자구조를 구명함과 동시에, 이들의 복합적인 작용기작을 조사하여 항균성분의 미생물 세포에 대한 작용부위 및 작용억제기작 등 초피추출물의 미생물억제작용에 대한 다각적인 실험이 더 많이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

### 요 약

천연에 존재하는 식물에서 항균성 물질을 추출하여 이 항균물질이 시설채소산물 기타 식품원료에 직접 또는 포장소재로써 적용가능성을 개발하기 위한 방안으로 한국산 초피(*Zanthoxylum piperitum* DC.)를 물로 추출하여 동결건조한 후 시설채소산물의 저장중 발생하는 변패미생물에 대한 항균력을 측정하였다. Paper disk법에 의한 농도별 항균력에서는 초피추출물이 농도에 비례하는 항균력을 나타내었다. 생육저해곡선의 측정에서는 500ppm 이상에서 미생물의 생육이 완전히 억제되는 것을 확인하였다. 열(40~180°C) 및 pH(4~10) 안전성에서는 넓은 온도범위에도 불구하고 항균력을 보였고 또한 pH범위에서도 우수한 항균력을 보였다. 전자현미경(SEM, TEM)에 의한 미생물 생태변화

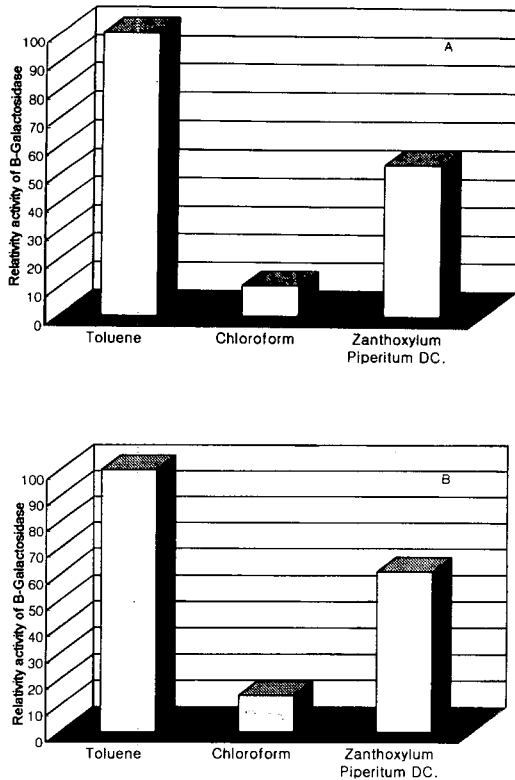


Fig. 7. The effect of *Zanthoxylum piperitum* DC. extract on the membrane perturbation of micro-organisms.

The cells were treated with reagents including toluene, chloroform, *Zanthoxylum piperitum* DC. extract.  
A: *Escherichia coli* B: *Pseudomonas syringae*

의 관찰에서도 초피의 항균물질이 생리활성효소 기능을 약화시켜 세포벽 또는 세포막을 파손하고, 삼투기능이 상실되어 미생물의 생리가 중단되고 억제되는 것을 확인하였다. 그리고  $\beta$ -galactosidase의 효소활성에 관해서는 초피추출물은 chloroform보다 세포막을 더 손상시키며, 세포막 파손이 심하게 일어나는 toluene 처리구의 40~50%에 상응하는 세포막 기능파괴가 초래된 것으로 예상할 수 있었다. 이 결과는 전자현미경 실험결과와 잘 일치하였으며, 이와 같은 항균기작에 연유하여 초피추출물처리하는 각각 뛰어난 미생물 세포의 생육억제효과를 보여 줄 수 있는 것으로 판단되었다. 따라서 항균력이 있는 초피추출물을 이용하여 시설채소 뿐만 아니라 각종 식품 저장 중에 발생하는 부패율을 억제할 수 있는 항균제로서 이용가능성이 있을 것으로 보여진다.

### 감사의 글

본 연구는 1997년도 한국과학재단의 연구비지원(과

제번호: 971-0604-025-2)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

### 문헌

1. Yu, T. J. : *Food processing and preservation*. Moonwoondang, p.215(1970)
2. Kim, J. M. : *Encyclopedia of food science*. Daekwang Co., p.18(1980)
3. The Society of Korean Biopharmacology : *Handbook of biopharmacology*. Nokjisa, p.213(1984)
4. Lee, S. I. : *Bonchohak*. Sooseowon, p.255(1981)
5. Kim, T. J. : *Korean source of plants II*. Seoul Nat'l Univ., Publishing Dept., p.266(1996)
6. Lee, S. U. : *History of foods in life before Korea dynasty*. Hyangmoonsa, Seoul, p.523(1978)
7. Moon, K. D., Byun, J. A., Kim, S. J. and Han, D. S. : Screening of natural preservatives to inhibit kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 257-263(1995)
8. Yoon, S. I., Park, K. D., Kim, Y. C., Im, Y. H. and Lee, C. : Preservation of kimchi by the addition of *Fagara mantchurica* extract and mustard oil. Patent publication B 3008(1990)
9. Yoon, S. I., Park, K. D., Kim, Y. C., Im, Y. H. and Lee, C. : Preservation of kimchi by the addition of *Fagara mantchurica* extract. Patent publication B 1003(1990)
10. Camargo, S. A., Gosmann, G. and Von Poser, G. L. : Antimicrobial activity of the volatile oil from fruits of *Zanthoxylum rhoifolium*. *Rev. Bras. Farm.(BRA)*, **72**, 29-30(1991)
11. Young, S. H. and Kwang, E. B. : Inhibitory effect of sancho(*Zanthoxylum piperitum* DC.) on the growth of food spoilage microorganisms and identification of antimicrobial compounds. *Advances in Food Sciences*, **18**, 7-12(1996)
12. Bae, K. H. and Byun, J. H. : Screening of leaves of higher plants for antibacterial action. *Kor. J. Pharmacogn.*, **18**, 1-5(1987)
13. Park, U. Y., Chang, D. S. and Cho, H. R. : Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 91-96(1992)
14. Schultz, T. P., Boldin, W. D., Fisher, T. H., Nicholas, D. D., McMurtrey, K. D. and Pobanz, K. : Structure Fungicidal properties of some 3- and 4-hydroxylated stilbenes and bibenzyl analogues. *Phytochemistry*, **31**, 3801-3805(1992)
15. Chung, S. K., Lee, S. J., Cung, Y. J., Park, W. P., Lee, D. S. and Cho, S. H. : Antimicrobial activities of Korean herb extracts for preserving greenhouse fresh produce. **5**, 13-21(1998)
16. Batles, W. and Bochman, G. : Model reactions on roast aroma formation. 1. Reaction of serine and threonine with sucrose under the conditions of coffee roasting and identification of new coffee aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 340-343(1987)
17. Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsura, H. and Nakagawa, S. : Antifungal activity

- of ajoene derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 615-621(1987)
18. Johnson, M. G. and Vaughn, R. H. : Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. *Appl. Microbiol.*, **17**, 903-907(1969)
  19. Piddock, L. J. V. : Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacterio.* **68**, 307-310(1990)
  20. Bendayan, M. : Protein-A-gold electron microscopic immunocytochemistry; methods, applications and limitations. *J. Elect. Microsc. Tech.*, **1**, 243(1984)
  21. Miller, J. : *Experiments in molecular biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp.352-355(1972)
  22. Miele, W. H. : Efficacy of grapefruit seed extract against *Salmonella typhi*, *Escherchia coli* and *Staphylococcus aureus*. Microbiological food analysis report reviewed and approved by Southern Testing and Research Laboratories, Inc. Wilson, NC, USA, pp.1-5 (1988)

(1998년 12월 10일 접수)