

운향으로부터 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균 활성 물질의 분리 및 구조동정

안용선 · 신동화 · 백남인*

전북대학교 응용생물공학부(식품공학 전공, 농업과학기술연구소),
*경희대학교 농학과

Isolation and Identification of Active Antimicrobial Substance against *Listeria monocytogenes* from *Ruta graveolens* Linne

Yong-Seon Ahn, Dong-Hwa Shin and Nam-In Baek*

Faculty of Biotechnology(Food Science & Technology Major), Chonbuk National University,
*Department of Agriculture, Kyung Hee University

Abstract

Ethanol extracts from *Ruta graveolens* Linne exhibited strong antimicrobial activities by disc diffusion method against 5 strains of *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113, ATCC 19114 and ATCC 15313). Ethanol extract from *Ruta graveolens* Linne was subsequently fractionated by n-hexane, chloroform, ethyl acetate and water. Chloroform fraction of *Ruta graveolens* Linne showed strong growth inhibition at concentrations as low as 40 ppm level in broth culture medium against 5 strains of *L. monocytogenes* for 72 hr at 30°C. Single substance(RTG1-1) was isolated by silica gel column chromatography from chloroform fraction of *Ruta graveolens* Linne. RTG1-1 showed a strong bactericidal activity against *L. monocytogenes* at a concentration of 20 ppm level. Purified RTG1-1 was identified as gravacridonechlorine by analyses of EI-Mass, ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

Key words : *Ruta graveolens* Linne, antimicrobial activity, gravacridonechlorine, *Listeria monocytogenes*

서 론

최근 국제적으로 식품의 수출입이 증가하는 추세에 따라 국내외 법에 따른 안전성에 대한 요구가 필수적인 사항이 되고 있으며 또한 식중독 발생의 예방도 더욱 중요한 사항이 되고 있다. 우리나라의 경우 식중독에 의한 환자 수는 1994년 1,746명에서 1998년 4,577명에 이르고 있으며, 그 중 *Salmonella*에 기인한 발병이 전체 식중독 발병의 40~50%를 차지한다. 또한 주요 원인 식품으로는 어패류 및 그 가공품이 11~37%를 차지하고 있으며, 집단 급식소에서 환자 발생이 크게 증가하고 있는 추세이다⁽¹⁾.

미국의 경우를 보면 1994년에는 6백만명이 식중독

에 감염되어, 그 중에서 9,000여명이 사망했다고 보고 되었으며⁽²⁾, 1995에는 *Campylobacter jejuni* 등 7종의 식중독 미생물에 의한 발병 환자 수는 330~1,230만명으로 그 중 3,900명 이상이 사망했고, *Listeria monocytogenes*에 의한 listeriosis 발병 환자 수도 928~1,767명에 이른다고 보고되었다⁽³⁾. 또한 *Salmonella*에 의한 salmonellosis의 경우 매년 69~384만명에 이르며⁽⁴⁾, *E. coli* O157:H7의 경우 매년 7,668~20,448명이 감염된 것으로 보고되고 있다⁽⁵⁾.

식중독균을 제어하기 위한 노력은 오래 전부터 계속되어 왔으며, 식품 가공산업에 HACCP(hazard analysis and critical control point)와 같은 위생관리 개념들이 도입되어 가고 있지만 세계적으로 식중독 발생보고는 계속 증가하고 있는 추세이다.

미생물의 정균 및 살균방법으로 살균제인 chlorinated water⁽⁶⁾, acidified sodium chlorite⁽⁷⁾, electrolyzed oxidizing water⁽⁸⁾, hydrogen peroxide⁽⁹⁾, chlorine dioxide⁽¹⁰⁾, diacetyl⁽¹¹⁾과 보존제인 sorbic acid⁽¹²⁾,

Corresponding author : Dong-Hwa Shin, Faculty of Biotechnology(Food Science & Technology Major), Chonbuk National University, Dukjin- Dong, Chonju, Chonbuk 560-756, Korea
Tel : 82-63-270-2570
Fax : 82-63-270-2572
E-mail : dhshin@moak.chonbuk.ac.kr

benzoic acid⁽¹³⁾, *Lactobacillus* 대사산물⁽¹⁴⁾, bacteriocin⁽¹⁵⁾, lysozyme⁽¹⁶⁾, 유기산⁽¹⁷⁾ 등 천연 혹은 합성 항균제 처리와 함께 감마선 처리⁽¹⁸⁾에 의한 식중독 미생물의 증식 저해 방법이 보고되어 왔다.

이와 같은 여러 방법 중 최근 합성 항균제에 대한 소비자들의 거부반응과 천연물 유래의 항균제를 선호하는 인식이 더욱 높아짐에 따라 식용 및 약용 식물로부터 항균^(19,22), 항산화^(23,24), 항 돌연변이성⁽²⁵⁾ 물질을 얻으려는 연구도 활발히 진행되어왔고 일부 상용화되기도 하였다.

이 연구에서는 천연물로부터 항균 활성 물질을 분리하고자 식용 혹은 약용 식물을 대상으로 검색 시험을 실시하였다. 예비 선별과정에서 선별된 운향은 산초과(Rutaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 개화기는 6-7월경이며, 원산지는 지중해 연안지역으로 우리나라에는 흔하지 않다. 뿌리에는 알칼로이드인 rutacridone, rutacridine 등이 알려져 있으며, 구풍, 통경, 정신병, 고혈압 및 뇌출혈 등에 사용되어 왔고⁽²⁶⁾, 특히 이 식물의 물 추출물은 낙태제로 유럽, 아시아, 남미 및 아프리카 등에서 사용되어 왔다⁽²⁷⁾.

본 실험에서는 운향뿌리로부터 75% 에탄올 추출물을 얻고 이를 각 용매로 분획한 다음 column chromatography를 통하여 *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성 물질을 분리하고 EI-Mass, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 통하여 구조를 동정함으로써 항균제로서 이용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

운향(*Ruta graveolens* Linne)은 식품의약품안전청 육천 약용식물재배시험장 및 효성카톨릭 대학교에서 재배하고 있는 식물의 뿌리부위를 수집하여 수세, 건조 및 분쇄하여 에탄올 추출용 시료로 사용하였다.

추출 및 용매 분획⁽²⁸⁾

분쇄기로 마쇄한 운향 뿌리(800 g)에 5배량의 75% 에탄올을 혼합하여 환류냉각관이 부착된 플라스크에 넣고 80°C 수욕상에서 3 시간 추출 후 얻은 에탄올 추출물에 n-헥산을 가하여 n-헥산 분획물을 얻었으며, 동일한 방법으로 클로로포름 및 에틸아세테이트를 순차로 가하여 클로로포름, 에틸아세테이트 및 물 분획물을 각각 얻었다. 각 분획물은 진공 농축기(Eyela N-N series, Tokyo Rikakikai Co., LTD., Tokyo, Japan)와 진공 건조기(VO-3030, New Power Eng. Co.,

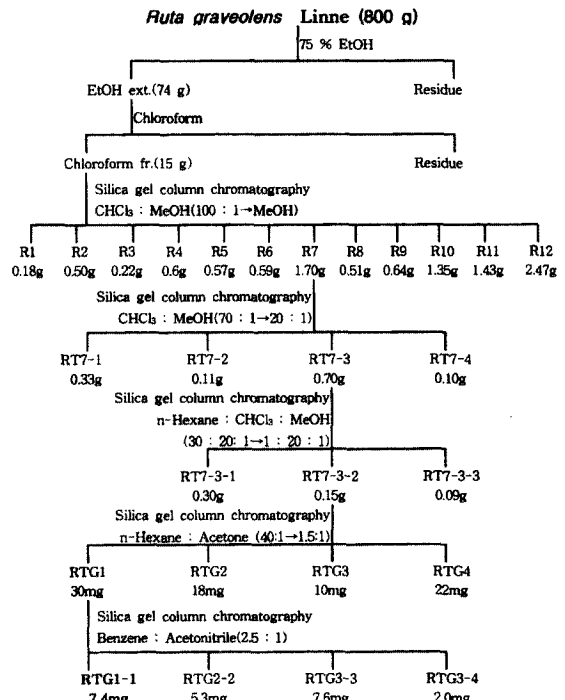


Fig. 1. Flow diagram for the isolation of the antimicrobial compounds from *Ruta graveolens* Linne.

Inchon, Korea)로 용매를 완전히 제거한 후 에탄올로 녹여 항균효과 실험에 사용하였다.

항균 활성 물질의 분리⁽²⁹⁾

운향나무 뿌리 에탄올 추출물을 순차 분획하고 각각의 분획물에 대하여 항균 활성을 확인하였고 항균 활성과 얻어진 획분의 수율에 따라 Fig. 1과 같이 활성 물질을 분리하였다. 운향 클로로포름 분획물(15 g)을 클로로포름으로 현탁, 충전된 silica gel(475 g, 70~230 mesh, Merck) column(5.5×38 cm)에서 극성을 단계적으로 증가시키는(클로로포름→메탄올) step-wise 용출법으로 12개의 획분(R1~R12)을 분리하였다. 획분 R7 (1.70 g)을 다시 클로로포름 : 메탄올(70 : 1, 20 : 1, v/v) 용매계로 silica gel column chromatography(3.5×10 cm)하여 소 획분(RT7-1~7-4)을 얻었고, 활성이 우수한 RT7-3 획분을 n-헥산 : 클로로포름 : 메탄올(30 : 20 : 1, 1 : 10 : 1, v/v) 용매계로 silica gel column chromatography(2.0×15 cm)하여 소 획분(RT7-3-1~7-3-3)을 얻었다. 활성이 우수한 소 획분 RT7-3-2(0.15 g)를 n-헥산 : 아세톤(1.5 : 1, v/v) 용매 시스템으로 silica gel column chromatography(2.0×10 cm)하여 분리된 획분(RTG1~RTG4)중 RTG1 획분을 벤젠 : 아세토니트릴(2.5 : 1,

Rf=0.3, v/v)에서 RTG1-1을 분리하여 구조를 동정하였다.

분취 할 때 용리물들은 TLC상에서 전개시킨 후 UV (254 nm, 365 nm)의 흡수 양상과 20% 황산 발색 후 나타나는 점적의 모양에 따라 분취하였다.

분석기기

분석용 기기로는 Spectroline(ENF-260C, Spetronics Co., USA), Bioscreen C(Labsystem, Oy, Helsinki, Finland), Collection fractor(Foxy JR., Isco. Inc., USA), EI/MS(JEOL JMS-AX505WA, Japan), ¹H-NMR(400 MHz) 및 ¹³C-NMR(100 MHz, JEOL JNM-LA400, Japan)을 사용하였다.

시약 및 기타 재료

n-헥산(99.5% v/v), 벤젠(99.5%, v/v), 클로로포름(99.5%, v/v), 아세톤(95.0%, v/v), 에틸아세테이트(99.5%, v/v) 및 메탄올(99.5%, v/v)은 Duksan Pure Chemical사(Korea) 제품을 사용하였으며, 아세토니트릴(99.9%, v/v)은 Fisher Scientific사(USA) 제품을 사용하였다. 기타 Silica gel 60과 TLC plate(silica gel 60 F₂₅₄)는 Merck사(Germany) 제품을 구입하여 사용하였다.

사용 균주 및 배지

사용된 균주는 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, 19112, 19113, 19114, 15313 등 5균주이며, 배지는 tryptic soy broth 및 agar(Difco)를 사용하여 30°C에서 배양하였다.

항균 활성 측정⁽³⁰⁾

사면 배지에 배양된 각 시험 균주를 1 백금이씩 취해 10 mL 액체 배지(tryptic soy broth)에 접종하여 30°C에서 24 시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 tryptic soy agar plate에 떨어뜨린 후 균일하게 도포하였다. 각 시험균이 접종된 plate 위에 운향 에탄올 추출물 및 용매 분획물을 흡수시킨 filter paper(disc diameter 6.0 mm, Whatman No. 2)를 놓고 30°C에서 24~48시간 배양 후 disc 주위에 나타난 증식 저해환 직경(mm)의 크기에 따라 항균 활성을 비교하였다.

또한 액체 배지에서 항균력 측정을 위해 모든 시료를 75% 에탄올에 용해시켜 항균활성 물질의 농도를 10% 혹은 1% 농도로 조정된 다음 membrane filter(0.2 μm, Millipore Co., Bedford, USA)로 제균하였다. 제균된 시료를 멸균된 액체 배지에 10배씩 단계별로 희석

하여 일정농도로 첨가한 다음 균주 배양액 0.1 mL를 접종하였다. 이때 초기 균수는 10⁷~10⁸ CFU/mL 수준이었으며, 최종 에탄올 농도는 0.75% 이하가 되게 하였다. 각 접종액을 미생물 성장 분석기(Bioscreen C)^(31,32)의 각 well에 0.3 mL씩 분주한 다음 30°C, 600 nm 조건하에서 72시간 동안 2시간 간격으로 혼탁도를 측정하여 증식 저해 효과를 비교하였다. 이 때 첨가되는 에탄올 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 처리농도와 동일하게 에탄올만을 첨가한 대조구를 설정하여 증식정도를 비교하였다.

실균 효과 측정⁽²⁸⁻³⁰⁾

각 균주 배양액 0.1 mL를 정제된 물질이 일정농도로 첨가된 액체 배지에 접종하여 30°C에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 표준 평판 한천 배양법에 의해 생균수를 계수하고 같은 방법으로 균주 배양액 0.1 mL의 생균수를 계수하여 초기 접종 균수를 구했다. 처리구와 동일 농도로 에탄올만 가한 것을 대조구로 하였다.

분리물의 동정

순수 분리된 물질의 구조동정을 위하여 Electron Impact/Mass(ZEOL JMS-AX505WA, Jpan), ¹H-NMR(400 MHz), ¹³C-NMR(100 MHz) (ZEOL JNM-LA400, Japan)을 사용하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물 및 이의 용매 분획물의 항균 효과

운향 75% 에탄올 추출물을 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 물층으로 순차 분획한 후, 에탄올 추출물 및 각각의 분획물에 대하여 항균 활성을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 각 균주에 대한 증식 저해환의 크기는 에탄올 추출물의 경우 17~20 mm 수준이었으며, 용매 분획물의 경우 클로로포름 분획물이 18~22 mm 수준으로 다른 분획물에 비해서 항균 활성이 우수한 것으로 나타났다. 이는 뽕나무 클로로포름 분획물(15~25 mm)⁽³³⁾ 및 금앵자 에틸아세테이트 분획물(16~22 mm)⁽²⁰⁾과 비슷한 수준의 항균 활성이었다. 또한 각 분획물을 1,000 ppm, 500 ppm 및 250 ppm 수준의 농도로 첨가한 액체 배지(tryptic soy broth)에 *L. monocytogenes* 5 균주를 접종하여 30°C에서 72시간 동안 배양하여 혼탁도의 변화를 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 클로로포름 분획물은 250 ppm 수준의 농도에서 5 균주 모두 72시간 동안 증식을 저해했으며, n-헥

Table 1. Antimicrobial effect of the ethanol extract and its solvent fraction obtained from *Ruta graveolens* Linne against *L. monocytogenes*

Fraction	SS ¹⁾	Clear zone (mm)				
		<i>Listeria monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
Ethanol	0.1	17 ²⁾	20	20	18	17
n-Hexane	0.1	12	13	15	11	10
Chloroform	0.1	18	21	22	18	19
Ethyl acetate	0.1	10	11	14	10	10
Water	0.1	- ³⁾	-	-	-	-

¹⁾mg of soluble solid content of extract/disc.

²⁾Clear zone diameter(disc diameter 6.0 mm) on tryptic soy agar for 24 hr at 30°C.

³⁾No inhibitory effect.

Table 2. Antimicrobial effect of the solvent fraction obtained from *Ruta graveolens* Linne against *L. monocytogenes*

Fraction	Concentration (ppm)	<i>Listeria monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
Control ¹⁾		+ ²⁾	+	+	+	+
n-Hexane	1,000	- ³⁾	-	-	+	+
	500	+	-	-	+	+
	250	+	+	-	+	+
Chloroform	1,000	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-
Ethyl acetate	1,000	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-
	250	+	+	-	+	-
Water	1,000	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+
	250	+	+	+	+	+

¹⁾Containing 0.75% ethanol in tryptic soy broth.

²⁾Growth during incubation for 72 hr at 30°C.

³⁾No growth during incubation for 72 hr at 30°C.

산 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 250 ppm 수준에서 일부 균이 증식했으며 물층의 경우 1,000 ppm 수준 이하의 농도에서 모든 균이 증식하여 항균 활성이 나타나지 않았다.

항균 활성이 우수하게 나타난 클로로포름 분획물의 최소 저해 농도(MIC)를 측정된 결과(Table 3), 5 균주 모두 40 ppm 수준의 농도에서 72 시간 동안 증식하지 못했으며, 30 ppm 수준의 농도에서는 *L. monocytogenes* ATCC 19113을 제외하고는 모두 증식하여 최소 저해 농도는 30~40 ppm 수준으로 나타났다. 이는 섬바디 n-헥산 분획물(MIC 30 ppm)⁽³⁰⁾, 고삼 클로로포름 분획물(MIC 50 ppm)⁽²⁹⁾의 *L. monocytogenes*에 대한 항균 효과와 유사한 결과이며, 관중 클로로포름 분획물(MIC>100 ppm)⁽³⁴⁾ 및 감초 에틸아세테이트 분획물(50<MIC<100 ppm)⁽²⁸⁾의 항균 효과보다 우수하였다.

클로로포름 분획물의 정제와 얻어진 획분들의 항균 효과

운향 분획물의 경우 클로로포름 분획물의 항균 효과가 우수하여 분리 대상으로 선정하였으며, 또한 균주별 감수성에 큰 차이가 없기 때문에 상대적으로 증식 저해환이 작게 나타난 2 균주(*L. monocytogenes* ATCC 19111, 19114)를 선정하여 시험 균주로 사용하였다.

항균 활성이 우수한 클로로포름 분획물을 silica gel column chromatography를 실시한 결과, 12개의 획분을 얻었다. 각 획분별 최소 저해 농도를 살펴보면(Table 4), R2 및 R3 획분은 최소 저해 농도가 10 ppm 수준 이하였으며, R4 획분은 40 ppm, R6 획분은 50 ppm, R7획분은 20 ppm, R8 획분은 50 ppm 수준 이하로 나타났다. 이는 고삼 클로로포름 분획물의 1차 column

Table 3. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the chloroform fraction obtained from *Ruta graveolens* Linne against *L. monocytogenes*

Fraction	Concentration (ppm)	<i>Listeria monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
Chloroform	250	- ¹⁾	-	-	-	-
	125	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
	30	+ ²⁾	+	-	+	+
	20	+	+	+	+	+

¹⁾No growth during incubation for 72 hr at 30°C.

²⁾Growth during incubation for 72 hr at 30°C.

Table 4. Antimicrobial effect of fraction R1~R12 obtained after column chromatography of chloroform fraction against *L. monocytogenes* for 72 hr at 30°C

Fraction	Yield(g)	<i>Listeria monocytogenes</i>			
		ATCC 19111		ATCC 19114	
		Clear zone (0.02 mg/disc)	MIC ³⁾ (ppm)	Clear zone (0.02 mg/disc)	MIC (ppm)
R1	0.18	- ¹⁾	-	-	-
R2	0.50	18 ²⁾	<10	20	<10
R3	0.22	17	<10	16	<10
R4	0.61	10	40	12	40
R5	0.57	-	-	-	-
R6	0.59	15	50	16	50
R7	1.70	16	20	18	20
R8	0.51	15	<50	15	<50
R9	0.64	-	-	-	-
R10	1.35	-	-	-	-
R11	1.43	-	-	-	-
R12	2.47	-	-	-	-

¹⁾No inhibitory effect.

²⁾Clear zone diameter(disc diameter 6.0 mm) on tryptic soy agar for 24 hr at 30°C.

³⁾Minimum inhibitory concentration(MIC).

분획물 중 6개의 항균 활성 화분의 최소 저해 농도(20 ppm)⁽²⁹⁾와 유사한 결과였다. R1, R5, R9, R10, R11 및 R12 화분은 50 ppm 수준의 농도에서 대조구와 같은 수준으로 균이 증식하여 증식 저해 효과가 없었다. 또한 증식 저해환의 크기는 각 화분에 따라 10~18 mm(ATCC 19111) 및 12~20 mm(ATCC 19114)로 다양하게 나타났으며, 이는 상백피 클로로포름 분획물의 1차 column 분획물의 증식 저해환(9~14 mm)⁽³⁵⁾보다 우수한 항균 활성이었다. 운향 클로로포름 1차 column 분리물이 여러 화분에 걸쳐 활성이 나타난 것으로 보아 운향 클로로포름 분획물에는 다수의 항균 활성 물질이 존재하는 것으로 여겨지며, 또한 50 ppm 수준 이하의 농도에서 활성이 있으므로 강력한 살균 작용을 가진 물질로 추정되었다.

활성 소획분 R7의 살균 효과

운향 클로로포름 분획물로부터 분리된 12개의 화분 중 수율과 항균 활성이 우수한 R7 화분을 선정하여 항균 물질 분리에 사용하였다. R7 화분의 최소 저해 농도는 20 ppm 수준으로 5 종류의 유기산⁽³⁶⁾보다 항균 효과가 좋음을 확인하였다.

액체 배양법에서 혼탁도를 측정하는 방법은 균의 증식 양상을 관찰할 수 있으나 정확한 항균 정도를 확인할 수 없어, 이를 보완하기 위해 생균수를 계수하여 살균 효과를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

초기 접종 균수는 10⁶(ATCC 19114)~10⁷(ATCC 19111) CFU/mL이었으며 24시간에서의 균수 변화를 살펴보면, 대조구는 두 균주 모두 접종 초기 균수에 비해 10⁸ CFU/mL 수준으로 증가한 반면, 20 ppm 수준의 경우는 두 균주 모두 10¹~10² CFU/mL 정도 감소하였고, 50 ppm 수준의 경우는 두 균주 모두 10³ CFU/mL 정도 감소하였다. 72시간에서 대조구는 접종 초기

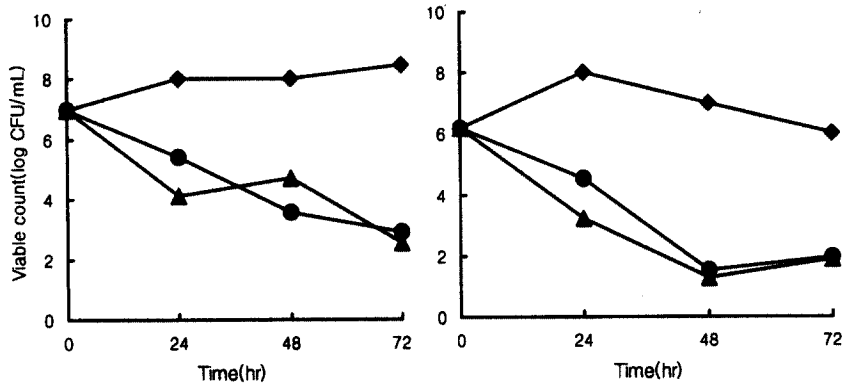


Fig. 2. Bactericidal effect of R7 fraction isolated from chloroform fraction of *Ruta graveolens* Linne against *L. monocytogenes* ATCC 19111(left) and ATCC 19114(right) for 72 hr at 30°C. -◆-; Control, -●-; 20 ppm, -▲-; 50 ppm.

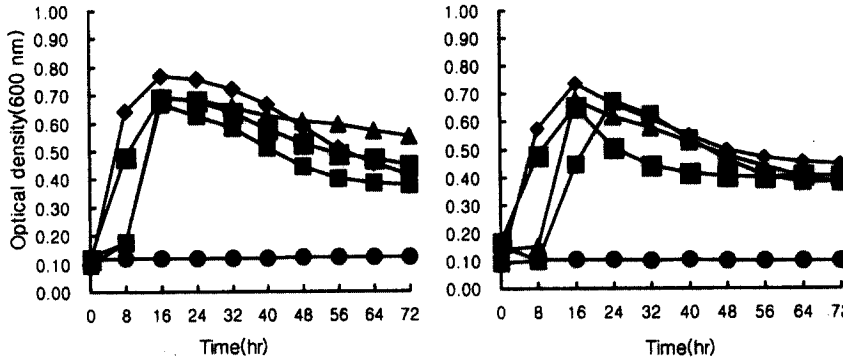


Fig. 3. Growth inhibition by fraction RT7-1~RT7-4(20 ppm) obtained after column chromatography of R7 fraction against *L. monocytogenes* ATCC 19111(left) and ATCC 19114(right) for 72 hr at 30°C. -◆-; Control, -■-; RT 7-1, -▲-; RT 7-2, -●-; RT 7-3, -▼-; RT 7-4.

균수에 비해 균수가 같거나(ATCC 19114) 10¹ CFU/mL 정도 증가(ATCC 19111)한 반면, 처리구는 20 ppm 및 50 ppm 수준의 농도 모두 초기 균수에 비해 10⁴ CFU/mL 정도 감소하였다. 이는 섬바다 n-핵산 분획물의 1차 column 분리물인 A8획분(30 ppm)⁽³⁰⁾과 유사한 살균효과이며, 상백피 클로로포름 분획물의 2차 column 분리물인 F-5'획분(100 ppm)⁽³⁵⁾보다도 우수한 살균 효과이다.

이상의 결과로부터 운향 추출물의 R7 획분은 *L. monocytogenes*에 대하여 20 ppm 혹은 50 ppm 수준의 농도에서 살균 효과가 있음을 알 수 있었다.

2차, 3차 및 4차 column chromatography 후 얻은 획분들의 증식 저해 효과

R7 획분으로부터 분리된 2차, 3차 및 4차 column 분리물을 20 ppm 수준의 농도로 액체 배지(tryptic soy

broth)에 첨가 한 다음 72시간 동안 증식 저해 효과를 비교한 결과는 Fig. 3~5와 같다. 2차 column 분리물(RT7-1~RT7-4) 중 RT7-3획분의 항균 활성이 우수하여 3차 column chromatography의 분리에 사용했으며, 나머지 획분은 대조구와 비슷한 혼탁도를 보였다(Fig. 3). 또한 3차 column 분리물(RT7-3-1~RT7-3-3)에서는 RT7-3-2와 RT7-3-3 획분의 항균 활성이 우수했으며(Fig. 4), 이 중 수율이 좋은 RT7-3-2 획분을 선정하여 4차 column chromatography에 사용하였다. 4차 column 분리물(RTG1~RTG4)의 경우 RTG1 및 RTG2 획분은 72 시간 동안 2 균주의 증식을 저해했으며, RTG 3획분은 ATCC 19111에 대해서는 항균 활성이 우수했으나 ATCC 19114에 대해서는 24시간 이후 혼탁도가 증가하여 항균 활성이 감소하였다(Fig. 5). RTG1 획분은 활성과 수율이 우수하여 단일 물질로 분리하는데 사용하였다.

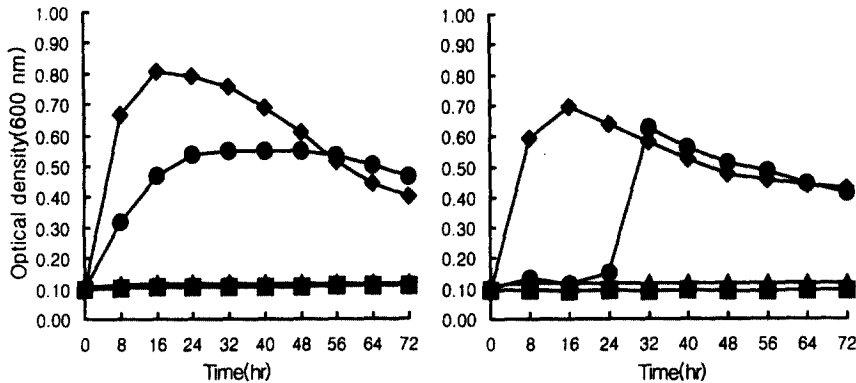


Fig. 4. Growth inhibition by fraction RT 7-3-1~RT 7-3-3(20 ppm) obtained after column chromatography of RT 7-3 fraction against *L. monocytogenes* ATCC 19111(left) and ATCC 19114(right) for 72 hr at 30°C. -◇-; Control, -■-; RT 7-3-1, -▲-; RT 7-3-2, -●-; RT 7-3-3.

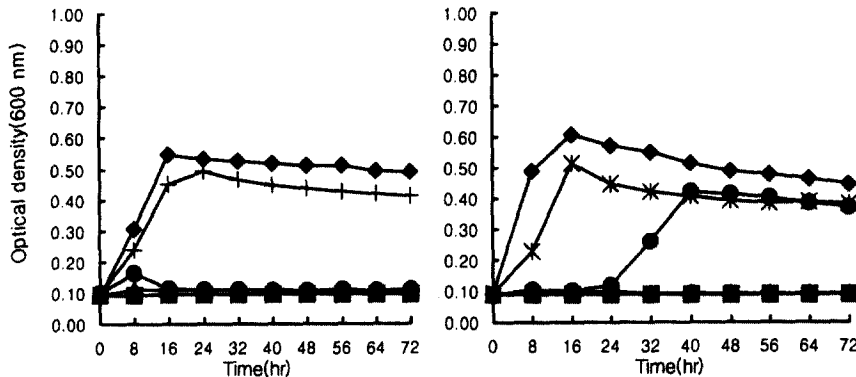


Fig. 5. Growth inhibition by fraction RTG1~RTG4(20 ppm) obtained after column chromatography of RT7-3-2 fraction against *L. monocytogenes* ATCC 19111(left) and ATCC 19114(right) for 72 hr at 30°C. -◇-; Control, -■-; RTG 1, -▲-; RTG 2, -●-; RTG 3, -+-; RTG 4.

단일획분 RTG1-1의 살균 효과

RTG1-1 획분은 20 ppm 수준에서 클로로포름 분획물의 1차 분리물이었던 R7획분 보다 항균력이 크게 증가되었는데 이는 천연물에 존재하는 항균 활성 물질이 단일 물질로 분리됨에 따라 살균 효과가 상승되었으며, 섬바디 추출물의 경우 단일 물질로 분리 될수록 항균 활성이 떨어진다는 보고와는 상반된 결과였다⁽³⁰⁾. Fig. 6에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19111 및 19114 두 균주 모두 접종 초기는 10⁷~10⁸ CFU/mL 수준이었으나 48 시간 이후에 전혀 검출되지 않아 모두 사멸한 것으로 나타났다. 이와 유사한 실험으로 감초에서 분리된 단일 획분(50 ppm)의 경우는 배양 후 72시간에서 생균수는 10³~10⁴ CFU/mL 수준으로 보고됐으며⁽²⁸⁾, 고삼에서 분리된 단일 획분(50 ppm)은 10¹ CFU/mL 수준으로 보고되었다⁽²⁹⁾. 이러한 결과로 볼 때 운향에서 분리된 단일 획분은 감초 및 고삼

에서 분리된 단일 획분보다 항균 활성이 우수함을 알 수 있었다.

단일 획분 RTG1-1의 구조 동정

RTG1-1의 ¹H-NMR 결과는 Table 6과 같다. RTG1-1은 ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) spectrum에서 다음과 같은 4개의 proton signal, 즉, δ7.19(ddd, J=8.0, 8.0, 1.0 Hz), δ7.49(dd, J=8.0, 1.0 Hz), δ7.66(ddd, J=8.0, 8.0, 1.0 Hz) 및 δ8.18(dd, J=8.0, 1.0 Hz)로부터 ortho-이치환 benzene의 존재가 확인되었으며, δ6.08(s) signal로부터 o치환 benzene의 존재가 추정되었다. 또한 secondary N-methyl 또는 methoxyl(δ3.92, ³H, s), oxygenated-methine[(δ4.85, dd, J=9.0, 7.8Hz), 입체적으로 고정되어 germinal coupling을 갖는 methylene [(δ3.62, dd, J=14.5, 9.0 Hz), (δ3.77, dd, J=14.5, 7.8 Hz)], hydroxy-methylene(δ3.55, d, J=10.8 Hz),

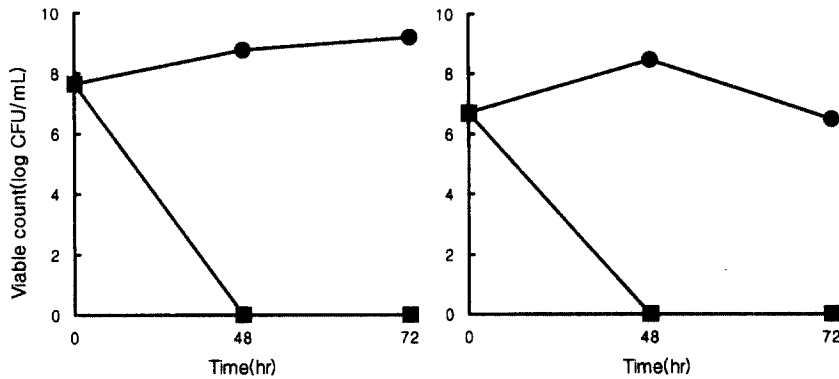


Fig. 6. Bactericidal effect of RTG1-1 fraction isolated from RTG1 fraction on *L. monocytogenes* ATCC 19111(left) and ATCC 19114(right) for 72 hr at 30°C. -●-; Control, -■-; 20 ppm.

Table 5. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ chemical shift of RTG1-1 isolated from chloroform fraction of *Ruta graveolens* Linne (400 and 100 MHz, CDCl_3)

Carbon No.	RTG1-1	
	δ_{C}	δ_{H}
1	36.7	3.62(1H), dd, $J=14.5, 9.0$ Hz 3.77(1H), dd, $J=14.5, 7.8$ Hz
2	83.5	4.85(1H), dd, $J=9.0, 7.8$ Hz
3		
4	91.2	6.08(1H), s
5	164.7	
6	179.6	
7	124.7	8.18(1H), dd, $J=8.0, 1.0$ Hz
8	120.9	7.19(1H), ddd, $J=8.0, 8.0, 1.0$ Hz
9	133.3	7.66(1H), ddd, $J=8.0, 8.0, 1.0$ Hz
10	114.0	7.49(1H), dd, $J=8.0, 1.0$ Hz
11	28.6(-N-CH ₃)	3.92(3H), s
12	142.9	
13	104.3	
14	119.4	
15	141.5	
16	100.9	
17	167.1	
18	60.7	
19	64.9	3.55(1H), d, $J=10.8$ Hz 3.70(1H), d, $J=10.8$ Hz
20	21.5	1.19(3H), s

(δ 3.70, d, $J=10.8$ Hz) 및 singlet methyl(δ 1.19) 유래의 signal 들이 관측되었다. 따라서 RTG1-1은 운향나무에서 다수 분리된 acridine 계열의 화합물로 판명되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)에서도 acridine 골격의 signal들이 관측되었으며, 그 외에 δ 179.6 signal로부터 C-6에 ketone기를 가진 acridone 화합물임이 판명되었고, δ 167.1, δ 164.7로부터 두 군데에 산소원자가 결

합한 것으로 밝혀졌다. 또한 δ 36.7(t), δ 83.5(d) signal로부터 dihydrofuran환의 존재가 추정되었다. 이상의 결과는 RTG1-1이 운향나무에서 분리된 바가 있는 gravacridonediol⁽³⁷⁾ 또는 gravacridonechlorine⁽³⁸⁾과 유사한 구조임을 보여준다. 하지만, 18번 4급탄소의 NMR spectrum에서의 chemical shift가 60.7 ppm으로 산소보다는 염소가 결합한 것을 나타내주고 있으며, EI-MS에서 M^+ 가 m/z 359에서 관측되어 분자량이 359로 결정된 점으로부터 이 화합물은 2-(1-Chloro-2-hydroxy-1-methylethyl)-1,11-dihydro-5-hydroxy-11-methylfuro[2,3-c]acridin-6(2H)-one인 gravacridonechlorine으로 동정되었다.

요 약

항균 활성이 우수한 운향 75% 에탄올 추출물을 각종 용매로 분획한 후 일정 수준의 농도로 액체 배지 (tryptic soy broth)에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5 균주를 배양시킨 결과 클로로포름 분획물 40 ppm 수준에서 72시간 동안 증식 억제 효과를 나타내었다. 항균 활성과 수율이 우수한 운향 클로로포름 분획물을 silica gel column chromatography로 1회 분획하여 항균 활성이 우수한 획분 R7을 얻었으며, R7 획분은 20 ppm 수준의 농도에서 5 균주 모두 증식을 억제했다. 획분 R7을 4회 연속 분리하여 단일 획분 RTG1-1을 얻었고, RTG1-1을 배지에 20 ppm 수준으로 첨가하여 72시간 배양하였을 때 생균이 검출되지 않아 강력한 살균 효과를 나타냈으며, RTG1-1의 구조를 동정 한 결과 gravacridonechlorine으로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 보건의료기술 연구개발사업(관리번호: HMP-99-F-06-0001, 식품중 각종 위해요인의 위해성 평가와 관리방안 수립에 관한 연구)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

문헌

1. Chang, D.S., Shin, D.H., Chung, D.H., Kim, C.M. and Lee, I.S. Food Sanitation. Chung Mun Kak, p48-52. Seoul, Korea (1999)
2. Gilmore, T.M., Mills, V. and Bruhn, J.C. A bridge to global food safety in the 21st century. Dairy, Food and Environ. Sanit. 18: 360-367 (1998)
3. Buzby, J.C. and Roberts T. Guillain-Barre syndrome increases foodborne disease costs. Food Rev. 20: 36-42 (1997)
4. Jordan Lin, C.T., Morales, R.A. and Ralston, K. Raw and undercooked eggs : A danger of salmonellosis. Food Rev. 20: 27-32 (1997)
5. Marks, S. and Roberts, T. *E. coli* O157 : H7 ranks as the fourth most costly foodborne disease. Food Rev. 16: 51-59 (1993)
6. Beuchat, L.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in bovine feces applied to lettuce and effectiveness of chlorinated water as disinfectant. J. Food Prot. 62: 845-849 (1999)
7. Castillo, A., Lucia, L.M., Kemp, G.K. and Acuff, G.R. Reduction of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella typhimurium* on beef carcass surfaces using acidified sodium chlorite. J. Food Prot. 62: 580-584 (1999)
8. Venkitanarayanan, K.S., Ezeike, G.O.I., Hung Y.C. and Doyle, M.P. Inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes* on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing water. J. Food Prot. 62: 857-860 (1999)
9. Sapers, G.M., Miller, R.L. and Mattrazzo, A.M. Effectiveness of sanitizing agents in inactivating *Escherichia coli* in golden delicious apples. J. Food Sci. 64: 734-737 (1999)
10. Taormina, P.J. and Beuchat, L.R. Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatments with various chemicals. J. Food Prot. 62: 850-856 (1999)
11. Kang, D.H. and Fung, D.Y.C. Effect of diacetyl controlling *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. J. Food Prot. 62: 975-979 (1999)
12. Larocco, K.A. and Martin, S.E. Effects of potassium sorbate alone and in combination with sodium chloride on the growth of *Salmonella typhimurium* 7136. J. Food Sci. 46: 568-570 (1981)
13. Yousef, A.E., EL-Shenawy, M.A. and Marth, E.H. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium as affected by benzoic acid and incubation temperature. J. Food Sci. 54: 650-652 (1989)
14. Juven, B.J., Barefoot, S.F., Pierson, M.D., Maccaskill, L.H. and Smith, B. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* Flora Carn L-2. J. Food Prot. 61: 551-556 (1998)
15. Schobitz, R., Zaror, T., Leon, O. and Costa, M. A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged meat. Food Microbiol. 16: 249-255 (1999)
16. Smith, J.L. and Marmer, B.S. Growth temperature and action of lysozyme on *Listeria monocytogenes*. J. Food Sci. 56: 1101-1103 (1991)
17. Stecchini, M.L., Luch, R.D., Bortolussi, G. and Del Torre, M. Evaluation of lactic acid and monolaurin to control *Listeria monocytogenes* on stracchino cheese. Food Microbiol. 13: 483-488 (1996)
18. Thayer, D.W., Boyd, G., Kim, A., Fox, J.B. and Farrell, H.M. Fate of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage on raw or cooked turkey breast meat. J. Food Prot. 61: 979-987 (1998)
19. Ahn, E.S., Kim, J.H. and Shin, D.H. Antimicrobial effects of allyl isothiocyanates on several microorganisms. Kor. J. Food Sci. Tech. 31: 206-211 (1999)
20. Shin, D.H., Kim, M.S. and Han, J.S. Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-born bacteria. Kor. J. Food Sci. Tech. 29: 808-816 (1997)
21. Lee, B.W. and Shin, D.H. Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for food spoilage microorganisms. Kor. J. Food Sci. Tech. 23: 205-211 (1997)
22. Han, J.S., Shin, D.H., Yun, S.E. and Kim, M.S. Antimicrobial effects on *Listeria monocytogenes* by some edible plant extracts. Kor. J. Food Sci. Tech. 26: 545-551 (1994)
23. Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S. and Osawa, T. Antioxidative polyphenols isolation from *Theobroma cacao*. J. Agric. Food Chem. 46: 454-457 (1998)
24. Duh, P.D. Antioxidative activity of burdock(*Arctium lappa* Linne): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 455-461 (1998)
25. Nakasugi, T. and Komai, K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja(*Baccharis trimera* Less). J. Agric. Food Chem. 46: 2560-2564 (1998)
26. Im, L.J. Medicinal Plants in Korea (In Korean), p.232. Hankuk Press, Seoul, Korea (1999)
27. Kong, Y.C., Lau, C.P., Wat, K.H., Ng, K.H., But, P.P.H., Cheng, K.F. and Waterman, P.G. Antifertility principle of *Ruta graveolens*. Planta Med. 55: 176-178 (1989)
28. Ahn, E.Y., Shin, D.H., Baek, N.I. and Oh, J.A. Isolation and identification of antimicrobial activity substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. Kor. J. Food Sci. Tech. 30: 680-687 (1998)

29. Ahn, E.Y., Shin, D.H., Baek, N.I. and Oh, J.A. Isolation and identification of antimicrobial activity substance from *Sophora flavescens* Ait. Kor. J. Food Sci. Tech. 30: 672-679 (1998)
30. Oh, J.A., Shin, D.H. and Baek, N.I. Isolation and identification of growth inhibition substance on *L. monocytogenes* from *Dystaenia takesimana* Kitagawa. Kor. J. Food Sci. Tech. 31: 984-993 (1999)
31. Manninen, M., Wirtanen, G., Ahvenainen and Mattila, T. Automated turbidometry in assessing the bacterial content of food products inoculated with pathogens. Lebensm. Wiss. Technol. 23: 20-24 (1990)
32. Laine, M.H., Karwoski, M.T., Raaska, L.B. and Mattila-Sandholm, T.M. Antimicrobial activity of *Pseudomonas* spp. against food poisoning bacteria and moulds. Letters Applied Microbiol. 22: 214-218 (1996)
33. Han, J.S. and Shin, D.H. Antimicrobial effect of each solvent fraction of *Morus alba* Linne, *Sophora flavescens* Aiton on *Listeria monocytogenes*. Kor. J. Food Sci. Tech. 26: 539-544 (1994)
34. Ahn, E.Y., Ahn, E.S. and Shin, D.H. Antimicrobial effect of ethanol extract and fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *Listeria monocytogenes*. Bulletin of Agricultural college, Chonbuk National Univ. 29: 23-33(1998)
35. Ahn, E.Y., Han, J.S. and Shin, D.H. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by pure compound isolated from extract of *Morus alba* Linne bark. Kor. J. Food Sci. Tech. 29: 1236-1240 (1997)
36. Ahn, Y.S. and Shin, D.H. Antimicrobial effects of organic acids ethanol on several foodborne microorganisms. Kor. J. Food Sci. Tech. 31: 1315-1323 (1999)
37. Paulini, H., Waibel, R., Kiefer, J. and Schimmer, O. Gravacridon-diolacetate, a new dihydrofuroacridone alkaloid from *Ruta graveolens*. Planta Med. 57: 82-83 (1991)
38. Reisch, J., Szendrei, K., Rozsa, Zs., Novak, I. and Minker, E. Chlorhaltige Acridon-Alkaloide aus *Ruta graveolens*. Phytochem. 11: 2359-2360 (1972)

(2000년 2월 3일 접수)