

## 마두령 추출물의 항균특성

이인은 · 조성환<sup>†</sup>

경상대학교 식품공학과

### Antimicrobial Effect of *Aristolochia contorta* Bge. Extract on the Growth of Pathogenic and Putrefactive Microorganisms

In-Eun Lee and Sung-Hwan Cho<sup>†</sup>

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

#### Abstract

To investigate the function and effectiveness of natural antimicrobial agents extracted from medicinal herb, *Aristolochia contorta* Bge., their antimicrobial activities were tested against *Bacillus cereus*, *Corynebacterium xerosis*, *Pseudomonas syringae*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida albicans* and *Fusarium* sp. causing the decay of agricultural products and their processing foods. The aqueous extracts of *Aristolochia contorta* Bge., showed remarkable inhibitory effect on the growth of above-mentioned reference microorganisms when treated with more than 500 ppm. The antimicrobial activities of *Aristolochia contorta* Bge. extract were very stable in the wide spectrum of temperature (40°C~150°C) and pH 4~10.

**Key words:** natural antimicrobial agents, *Aristolochia contorta* Bge., inhibitory effect

#### 서 론

생활수준의 향상과 더불어 점점 더 편의성을 추구함에 따라 생활에 필요한 물품들도 포장된 상태로 구매하여 사용하는 추세이다. 농축수산 식품원료 및 그 가공식품 또한 이러한 유통과정에서 벗어날 수 없는 실정으로 상품의 상태에 따라서 심각한 영향을 받으며 심한 경우 상품이 아닌 폐품으로 오히려 처리하는 비용을 수반하기도 한다. 대부분의 농축수산 식품원료 및 그 가공식품은 유통기한이 대단히 짧으며 따라서 이러한 상품의 유통기한을 연장할 수 있는 방법을 다각도로 연구해 오고 있는 실정이다. 일부에서는 유기화학적 합성보존료를 사용하여 농축수산 식품원료 및 그 가공식품의 유통기한을 늘리고(1-4) 있으나, 합성보존료는 안전성의 문제로 인한 소비자 기피현상의 야기로(5) 인체에 무해하면서 변패를 억제하여 유통기한을 늘릴 수 있는 천연보존료의 개발 필요성이 점차 강해지고 있는 실정(6,7)이다. 이런 취지에서 개발과 더불어, 그 적용분야 및 사용방법을 검토하고 있는 천연 항균성 물질로 단백질(8), 유기산(9-11), 지방산(12), 향신료(13,14), 한약재의 추출성분(15,16)에 관한 연구가 수행되고 있으며, 항균력이 뛰어나고 안전성이 확인된 항균물질의 분리 및 응용에 관한 연구가 활발하

게 진행되고 있다. 본 연구에서는 천연식물체에서 항균성 물질을 추출하여 합성보존료에 대체할 수 있는 천연보존료의 개발을 위한 방안으로 예비실험에서 항균효과가 확인된 마두령(*Aristolochia contorta* Bge.)을 시료로 선정하여 식품의 부패와 식중독과 관계있는 미생물에 대한 항균력을 확인하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

마두령(馬兜鈴, *Aristolochia contorta* Bge.)은 쥐방울과에 속하는 식물체의 뿌리 및 과실을 9~10월에 과실이 녹색에서 황색으로 변할 때 채취하여 건조한 약재이다. 본 실험에서는 경남 산청군에서 채취한 약재를 약초시험장에서 건조상태로 구입하여 분쇄(20~30 mesh)한 다음, 추출용 시료로 하였다.

##### 마두령 추출물의 조제

마두령 건조약재와 증류수를 1:5(w/v)의 비율로 섞어 100°C water bath에서 3시간동안 추출한 후 여과(Toyo No. 2)하여, 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하였

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

다. 그 상등액을 수집하여 다시 2차 여과시켜 Rotary vacuum evaporator(Tokyo Rikakikai Co., Ltd)로 최초량의 1/10로 농축한 다음, 동결건조기로 건조하여 분말상태로 마두령 추출물을 조제하였다.

### 일반성분분석

마두령 추출액의 일반성분은 AOAC법(17)에 준하여 분석하였다. 즉, 수분함량은 상압가열건조법, 조지방함량은 Soxhlet 추출법, 조단백질 함량은 Auto-kjeldahl 법, 조섬유 함량은 Weende method, 환원당은 Fehling Lehman School법, 총당은 산기수분해법, 조회분은 전식 회화법으로 측정하였다.

### 최적추출조건 구명

마두령 추출물의 최적추출조건을 알아보기 위해 순환식 연속추출기를 이용하여 시료와 증류수를 1:5의 비율로 섞어 50~125°C의 추출온도에서 1~5시간동안 추출하여 추출액을 얻었다. 얻어진 추출액은 원심분리하여 상등액을 수집한 후, 분말상태로 조제·평량하여 최적추출조건을 설정하였다.

### 항균력 측정

마두령 추출물의 추출용매별 항균력의 차이를 알아보기 위해 마두령과 서로 다른 6가지 용매(butanol, chloroform, ethanol, ethyl acetate, hexane, water)와 1:5(w/v)의 비율로 섞은 후, 100°C의 water bath에서 3시간동안 추출하여 5,000 rpm에서 10분동안 원심분리한 다음 그 상등액을 일정부피가 되도록 정용하여 paper disc method(18)로 항균력의 차이를 알아 보았다. 즉, 멸균된 BHIA(Brain Heart Infusion Agar)배지 25 mL를 petri dish에 가하여 응고시킨후, 시험균액 1 mL을 균일하게 도말하였다. 그 위에 멸균한 paper disc(Advantec, TOYO 8 mm)를 놓고 마두령 추출물을 0, 250, 500, 1000 ppm 농도로 주입하여 세균의 경우 37°C에서 24시간 배양하고, 곰팡이 및 효모의 경우는 30°C에서 48시간 배양하여 disc주위에 inhibition zone(mm)의 직경을 측정하여 항균정도를 비교하였다.

### 마두령 추출물의 열 및 pH 안정성 측정

마두령 추출물의 열 안정성을 측정하기 위해 40, 60, 80, 100, 120, 150°C의 온도가 유지되는 건조기내에서 30분간 열처리한 후 처리온도별로 마두령 추출물의 농도가 1000 ppm이 되도록 첨가한 다음 항균력 측정방법과 동일하게 측정하였다. pH 안정성은 pH 4, 6, 7, 8, 10으로 조정한 후 37°C에서 1시간동안 방치한 다음 pH 7로 중화시켜 열안정성과 동일한 방법으로 측정, 비교하였다.

### 미생물 생육저해농도곡선 측정

마두령 추출물의 미생물 생육저해농도는 Turbidimetric Assay(19)에 의하여 측정하였다. 즉, 10 mL의 TSB(Tryptic soy broth)배지에 대수기 증기까지 배양된 균체 배양액 1%를 접종한 후, membrane filter(0.2 µm)로 제균시킨 마두령 추출물을 0, 100, 250, 500 ppm 농도로 첨가하여 35°C에서 24시간 배양하면서 4시간 간격으로 미생물의 생육정도를 spectrophotometer(DR-20, BAUSH & LOMB)를 사용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 마두령 약재의 일반성분

마두령 약재의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 마두령을 국내에서 재배, 유통되고 있는 한약재의 일반성분과 비교시 마두령은 조지방 12.0%, 조섬유 24.3%의 비교적 높은 함유율을 보여주고 있으며, 회분의 함량이 한약재(20)로서 규격에 맞고 적합한 것으로 나타났다.

#### 추출용매의 종류에 따른 마두령 추출물의 항균력 측정

마두령 약재를 6가지 서로 다른 용매로 추출하여 항균성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 즉, BHIA plate상에 배양한 *Bacillus cereus*와 *Escherichia coli*에 대한 용매별 마두령 추출물의 항균효과는 에탄올과 물추출물에서 확인할 수 있었으며, 특히 항균성물질은 물에 잘 용해되어 본 실험에서는 물추출물을 항균성재료로 사용하였다.

Table 1. The chemical composition of *Aristolochia contorta* Bge.

Chemical components	Weight fraction (%)
Moisture	7.2
Crude protein	6.4
Crude lipid	12.0
Reducing sugar	3.7
Total sugar	27.8
Crude fiber	24.3
Ash	4.5

Table 2. Antibacterial activity of the various extracts from *Aristolochia contorta* Bge. against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*

Solvents	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Butanol	- <sup>1)</sup>	-
Chloroform	-	-
Ethanol	13 mm	10 mm
Ethyl acetate	-	-
Hexane	-	-
Water	16 mm	15 mm

<sup>1)</sup>No inhibition

마두령 추출물의 최적추출 조건

마두령약재의 추출조건을 구명하기 위한 실험에서 가열온도를 100°C로 고정하고 1~5시간동안 추출하여 얻어진 추출수율은 Table 3과 같다. 즉, 추출시간이 1시간일 경우에는 8%로 추출시간이 길어질수록 추출수율은 증가하나, 3시간일 경우에 추출수율은 13.6%, 4시간일 경우에는 14.0%, 5시간일 때에는 14.2%로 3시간 이후에는 추출수율의 증가량이 현저히 감소하였다. 한편, 마두령 추출물의 추출시간을 3시간으로 고정하고, 50~125°C의 온도에서 추출수율을 측정 한 결과는 Table 4와 같다. 즉, 50°C에서의 추출수율은 4.8%, 75°C에서는 7.6%, 90°C에서는 10.8%, 100°C에서는 13.6%, 125°C에서는 14.0%로 추출수율은 온도가 높아질수록 증가하나 100°C에서 최고수율에 접근하여 그 이상의 온도에서는 증가폭이 감소하는 경향을 보였다. 따라서 상기결과를 토대로 경제적인 면을 고려해 볼 때 최적추출조건은 100°C에서 3시간 정도가 적당한 것으로 생각되었다.

마두령 추출물의 항균력

각종 시험균주에 대한 마두령 물추출물의 항균력을 측정 한 결과는 Table 5와 같다. 즉, 마두령 물추출물은 광범위한 범위의 미생물군(Gram양성균, Gram음성균, 곰팡이, 효모)에 대한 항균력을 보이며 최소농도 250 ppm에서 뚜렷한 항균력을 나타내었다. 또한, 모든 대상균주에 대하여 농도가 증가함에 따라 생육저해환 직경이 커지며 항균력이 증가하고 있음을 알 수 있었다

열 및 pH 안정성

마두령 추출물이 나타내는 항균활성의 pH변화에 대한 안정성을 조사하기 위해 마두령 추출물을 다양한 범위의 pH(pH 4, 6, 7, 8, 10)로 조절 한 후, 시험균주의 생육억제활성을 측정 한 결과, Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 동일한 크기의 생육저해환으로 항균활성이 유지되었다. 또한, 마두령 추출물의 열안정성에 대하여 넓은 범위의 온도(40, 60, 80, 100, 120, 150°C)로 열처리하여 *Enterobacter aerogenes*에 대한 항균력을 측정 한 결과, Fig. 1과 같이 각 처리온도별 시료에서 동일한 생육저해환을 보여 마두령 추출물의 항균성분이 열에 안정함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 볼 때 마두령 추출물은 pH 및 열에 대하여 안정한 것으로 보여진다.

미생물 생육저해농도곡선

마두령 추출물의 미생물에 대한 생육억제효과를 확인하기 위해 마두령추출물을 0~500 ppm농도로 시험균주에 첨가하여 농도별 미생물 생육상태를 37°C에서 24시간 동안 측정 한 결과는 Fig. 2~Fig. 4와 같다. 즉, Gram(+)

Table 3. The extraction yields (%) of *Aristolochia contorta* Bge. extracted with water as time elapsed at 100°C

Extraction time (hrs)	Extraction yield (%)
1	8.0
2	12.8
3	13.6
4	14.0
5	14.2

Table 4 The extraction yields (%) of *Aristolochia contorta* Bge. extracted with water for 3 hours at various temperatures

Extraction temperature (°C)	Extraction yield (%)
50	4.8
75	7.6
90	10.8
100	13.6
125 <sup>1)</sup>	14.0

<sup>1)</sup>autoclaved

Table 5. Comparison of the growth inhibition zone (mm) caused by the aqueous extract of *Aristolochia contorta* Bge.

Microorganisms	µg of the added extract per disc		
	250	500	1000
Gram(-) bacteria			
<i>Bacillus cereus</i>	11	13	16
<i>Corynebacterium xerosis</i>	12	14	17
<i>Listeria monocytogenes</i>	9	13	16
<i>Staphylococcus epidermis</i>	9	11	15
Gram(-) bacteria			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9	12	16
<i>Escherichia coli</i>	9	11	15
<i>Pseudomonas syringae</i>	10	11	15
Yeast			
<i>Candida albicans</i>	9	10	13
Mold			
<i>Fusarium</i> sp	8	10	12

균인 *Bacillus cereus*의 경우, 마두령 추출물을 첨가하지 않은 대조구에서는 배양 8시간 이후부터 급격한 균의 성장을 나타내고 있으나, 100 ppm의 마두령 추출물을 첨가한 배지에서는 대조구의 50% 저해효과를 보이고 500 ppm의 농도에서는 90% 이상의 저해효과를 보였으며, *Corynebacterium xerosis*의 경우도 유사한 생육저해농도 곡선을 나타내었다(Fig. 2). Gram(-)균인 *Enterobacter aerogenes*의 또한, 대조구에서는 배양 12시간까지 대수기를 형성하고, 그 후 최대 균밀도를 보이는 정상기를 거치는 반면, 마두령추출물의 농도가 100 ppm이상 첨가된 시험구에서는 배양후 12시간까지 생육이 완전 저해되었고, 배양 24시간 경과시 500 ppm의 농도에서 낮은 생육곡선을 보였으며, *Pseudomonas syringae*의 경우에도 마두령 추출물을 첨가한 시험구 모두 배양 4시간까지 생육이 억제되었고, 그 후 250~500 ppm의 농도 처리구에

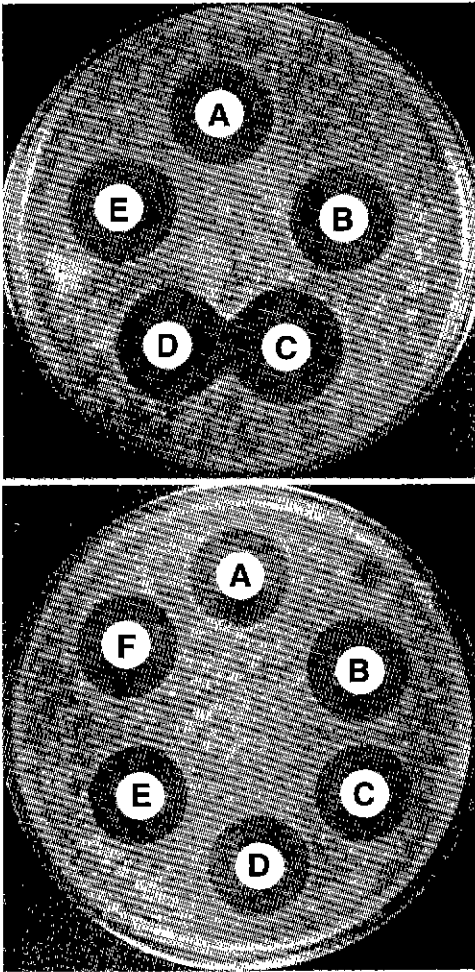


Fig. 1. pH (top) and thermal (bottom) stability of *Aristolochia contorta* Bge. extract for the growth inhibition of *Enterobacter aerogenes*.  
 (Top) A: pH 4, B: pH 6, C: pH 7, D: pH 8, E: pH 10  
 (Bottom) A: 40°C, B: 60°C, C: 80°C, D: 100°C, E: 120°C, F: 150°C.

서는 낮은 생육곡선을 보이거나, 500 ppm의 농도에서 균의 성장이 완전히 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이와같은 마두령 추출물의 생육저해효과는 *Candida albicans* 및 *Fusarium* sp.와 같은 효모와 곰팡이의 경우 (Fig. 4)에도 적용됨을 알 수 있었다. 일반적으로, 비교적 낮은 농도의 마두령 추출물로 처리한 공시균주의 생육이 크게 억제됨을 관찰할 수 있었으며, 세균류에서 효모나 곰팡이보다 더 큰 생육저해 효과를 확인할 수 있었다.

본 연구는 경남 지리산일대에서 재배되고 있는 약용 식물인 마두령 식물체로부터 항균성물질을 추출, 조제하여 그 항균력을 검토하고 항균작용을 구명하였다. 먼저 간이적 대량생산실험을 통해 마두령으로부터 항균성물질을 추출하여 공장조건에서 얻을 수 있는 수율을 파악

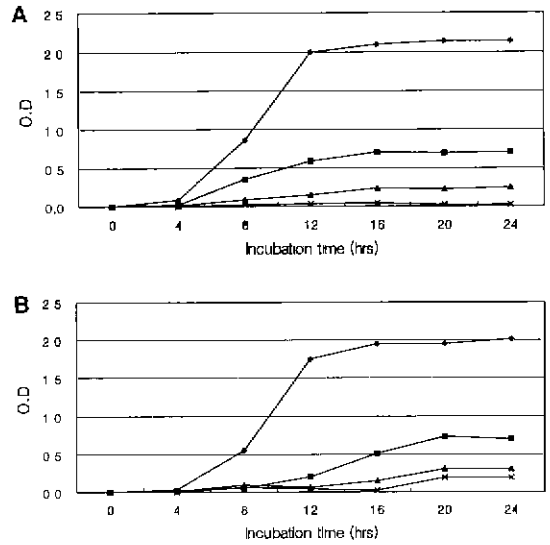


Fig. 2. Growth curves of *Bacillus cereus* and *Corynebacterium xerosis* in the medium containing *Aristolochia contorta* Bge. extract.  
 A: *Bacillus cereus*, B: *Corynebacterium xerosis*  
 ◆: Control, ■: 100 ppm, ▲: 250 ppm, ×: 500 ppm

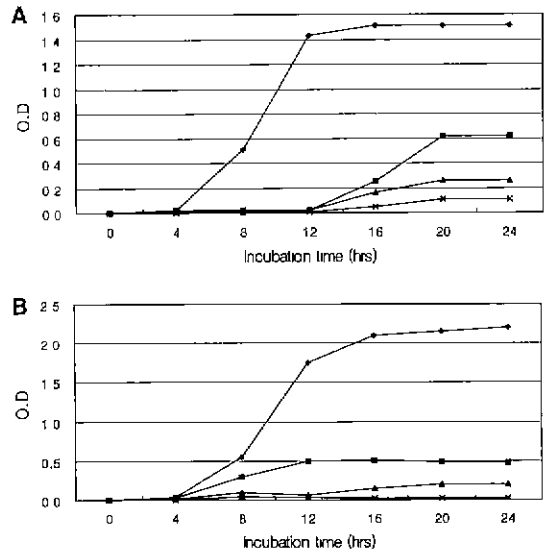


Fig. 3. Growth curves of *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas syringae* in the medium containing *Aristolochia contorta* Bge. extract.  
 A: *Enterobacter aerogenes*, B: *Pseudomonas syringae*  
 ◆: Control, ■: 100 ppm, ▲: 250 ppm, ×: 500 ppm.

하고, 그 경제성을 검토하기 위해 순환식 연속추출기를 이용한 추출실험을 실시하여 경제성을 고려한 상황에서 적정추출시간을 100°C에서 3시간으로 결정한 후 항균력 실험에 이용하였다. 실험에 사용된 변태미생물인 Gram (+), Gram (-) bacteria, yeast, mold 등 다양한 균주에 대하여 우수한 항균력을 보이며 농도에 비례하여 항균력

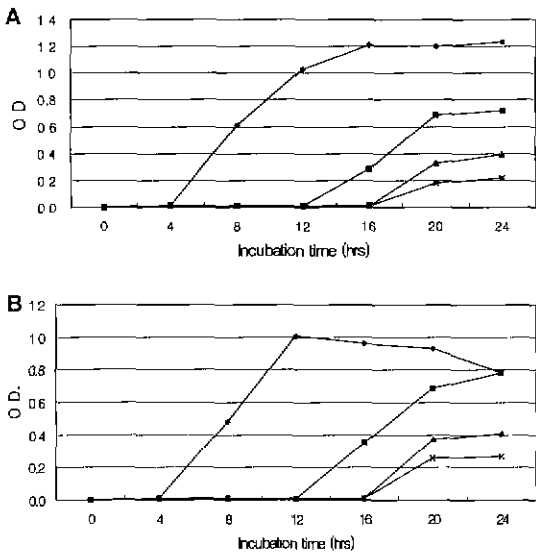


Fig. 4. Growth curves of *Candida albicans* and *Fusarium* sp. in the medium containing *Aristolochia contorta* Bge. extract.  
 A: *Candida albicans*, B: *Fusarium* sp.  
 ◆: Control. ■: 100 ppm, ▲: 250 ppm, ×: 500 ppm

이 증가하였고 이는 미생물의 생육저해농도곡선 측정으로 낮은 농도에서 미생물의 생육이 완전히 억제됨을 확인할 수 있었다 또한 가공적성시 문제가 될 수 있는 열과 pH에 대단히 안정함을 보여 마두령 추출물은 활용가능성이 높은 천연항균소재임을 확인할 수 있었다.

요 약

마두령 추출물로부터 항균활성물질을 분리하여 천연항균제로서 이용하고자 식품의 부패 및 식중독과 관계는 미생물에 대한 항균력을 측정한 결과, Gram(+), Gram(-) bacteria, yeast, mold 등 다양한 균주에 대하여 우수한 항균력을 보이며 농도에 비례하여 항균력이 증가하였고, 최소농도 100 ppm에서 미생물 생육저해효과를 보였고, 500 ppm의 농도에서 생육이 완전히 억제되는 것을 볼 수 있었다 마두령 추출물의 열 및 pH 안정성 실험결과, 다양한 범위의 온도(40°C~150°C) 및 pH(1~10) 범위에 관계없이 동일한 항균력을 보여 열과 pH에서도 안정함을 알 수 있었다.

문 헌

1 Song, J.C. and Park, H.J. · *Food Additives*. Jisung Pub. Co, p.124-132 (1998)  
 2. No, J.K : Safety evaluation of food additives *Food Science and Industry*, 22, 47-57 (1989)

3. Bean, N.H., Griffin, P.M., Goulding, J.S. and Ivey, C.B : Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. *J. Food Prot.*, 53, 711-728 (1990)  
 4. Lee, D.W. and Shin, D.H. : Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23, 200-204 (1990)  
 5. 金井由美子, 篠原雅弘, 上尺佳乃, 山下晴美 : 天然系保存料-香辛料의 抗菌性을 利用した 保存料について. *New Food Industry*, 5, 22-31 (1983)  
 6. Nanayama, M. · Antibacterial substances in food. *Jpn J. Food Microbiol.*, 12, 209-213 (1996)  
 7. 芝崎勲. 抗菌性天然添加物開發の現狀と使用上問題點 *New Food Industry*, 25, 28-35 (1983)  
 8. Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi, K. : New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 647-650 (1991)  
 9. Bizri, J.N. and Wahem, I.A. · Citric acid and antimicrobials affect microbiological stability and quality of tomato juice. *J. Food Sci.*, 59, 130-133 (1994)  
 10. Nanayama, M. Antibacterial actions of citric acid in *Umebosi* (salted Japanese apricot) and *Bainiukekisu* (concentrate of Japanese apricot juice). *Jpn. J. Food Microbiol.*, 12, 211-217 (1996)  
 11. Yamamoto, Y., Hiashi, K. and Yoshi, H. · Inhibitory activity of acetic acid on yeast. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 31, 772-777 (1984)  
 12. Wang, L.L., Yong, B.K., Parkin, K.L. and Johnson, E.A. · Inhibition of *Listeria monocytogenes* by monoacylglycerols synthesized from coconut oil and milk fat by lipase-catalyzed glycerolysis *J. Agric. Food Chem.* 41, 1000-1002 (1993)  
 13. Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. and Elbroty, G.S.A. · Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils *J. Food Prot.*, 55, 665-667 (1989)  
 14. Sahika, E.A. and Mehmet, K. : Sensitivity of some common food poisoning bacteria to thyme, mint and bay leaves *Int. J. Food Microbiol.*, 3, 349-352 (1986)  
 15. Jang, D.S., Park, K.H., Lee, J.R., Ha, T.J., Park, Y.B., Nam, S.H. and Yang, M.S. · Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Hemistephtia lyrata*, *Chrysanthemum boreale*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 42, 176-179 (1999)  
 16. Park, S.W., Woo, C.J., Chung, S.K. and Chung, K.T. : Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fraction from *Humulus japonicus*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 464-470 (1994)  
 17. AOAC · *Official Methods of Analysis* 15th ed., Association of official analytical chemists, Washington, D.C. (1990)  
 18. Piddock, L.J.V. · Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 307-310 (1990)  
 19. Linton, A.H. · Theory antibiotic inhibition zone formation, disc sensitivity methods and MIC determinations. In *Antibiotics*, Academic Press, London and New York (1983)  
 20. Hwang, J.B., Yang, M.O. and Shin, H.K. · Survey for approximate composition and mineral content of medicinal herbs. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 671-679 (1997)