

## 마두령 추출물의 항균작용특성

이인은 · 조성환<sup>†</sup>

경상대학교 식품공학과

## The Mode of Antimicrobial Mechanism of *Aristolochia contorta* Bge. Extract

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

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

### Abstract

To develop natural antimicrobial agents for keeping qualities of agricultural products and their processing foods, the antimicrobial actions of *Aristolochia contorta* Bge. extract, which showed remarkable antimicrobial effects against microorganisms causing their decay, were investigated. Direct visualization of microbial cells by using both transmission electron microscope and scanning electron microscope showed that microbial cell membrane was destroyed by treating with the dilute extract solution. This change of cellular membrane permeability could be identified in the experiment that O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), the artificial substrate of  $\beta$ -galactosidase, was hydrolyzed in the presence of the extract, indicating that the membrane was perturbed. Consequently, the functionality of *Aristolochia contorta* Bge. extract as antimicrobial agents for keeping qualities of agricultural products and their processing foods may be recommended.

**Key words:** natural antimicrobial agents, transmission electron microscope, scanning electron microscope,  $\beta$ -galactosidase activity

### 서 론

본 연구에서는 전보(1)의 실험결과, 항균력이 탁월하고 열 및 pH 안정성이 우수한 천연항균소재로 확인된 마두령 추출물의 농축산물 식품원료 및 그 가공품에 대한 항균소재로서의 이용가능성을 검토하고자 하였다. 먼저, 마두령 추출물이 미생물에 대한 항균작용의 방식을 검토하고 미생물의 세포형태 및 기능성에 미치는 변화를 조사하기 위해 전자현미경을 이용하여 처리전후의 세포구조를 관찰하였다. 아울러, 미생물의 세포막에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포를 파쇄하지 않고 toluene, chloroform과 호장추출물 및 정향추출물처리시에 균체배양물에서  $\beta$ -galactosidase가 정량되는가의 여부를 측정하여 세포막 기능을 검토하였다. 이를 기초로 해서, 천연에서 추출된 항균물질이 농축산 식품원료 및 그 가공식품의 선도유지를 위한 항균소재로서의 이용가능성을 검토하고자 실험을 실시하였다.

### 재료 및 방법

$\beta$ -galactosidase activity( $\beta$ -galactoside galactohydrolase EC3.2.1.23.)의 정량

마두령 추출물이 미생물 세포막에 미치는 영향을 알아

보기 위해 Miller의 방법(2,3)에 준하여, 세포를 파쇄하지 않았을 때의 toluene, chloroform, 마두령 추출물의 존재 시에 그 활성이 확인된 *Escherichia coli* 및 *Pseudomonas syringae*의  $\beta$ -galactosidase activity를 측정하여 세포막의 기능성을 비교·검토하였다. 먼저 IPTG(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside)와 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) 함유매지를 통해  $\beta$ -galactosidase를 가지고 있는 것으로 확인된 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas syringae*를 M9 medium(2)에서  $2\sim5\times 10^8$  cell/mL(O.D.<sub>600</sub>: 0.2~0.7)까지 배양하였다 이 배양액 0.5 mL에 동량의 Z-buffer(2)를 가하고 10초간 잘 흔들어 toluene, chloroform, 마두령 추출물, 증류수를 1,000 ppm의 농도로 처리한 다음 다시 10초간 흔들어 주었다. toluene의 제거를 위해 37°C에서 40분간 방치하고, 28°C에서 5분간 더 방치하였다. 모든 실험구에 ONPG(o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, 4 mg/mL) 0.2 mL를 가하여 yellow color가 발현되면 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 mL를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 원심분리하였다. 상등액을 420 nm, 550 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도로 환산한 후, toluene을 100, 증류수를 0으로 하여 마두령 추출물의 세포막에 미치는 영향을 비교하였다.

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

전자현미경에 의한 미생물의 세포형태 및 기능성 변화 측정

마두령 추출물로부터 분리한 항균활성성분이 미생물의 세포형태 및 기능성에 미치는 영향을 알아보기 위해 마두령 추출물을 1000 ppm 농도의 처리구와 처리하지 않은 대조구의 전자현미경촬영사진을 비교, 검토하였다. 즉, 투과전자현미경(TEM: transmission electron microscope)의 조직표면 제작은 균체를 원심분리하여 집균한 후, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.2)로 완충시킨 후, 2.5% glutaraldehyde용액으로 4°C에서 2~4시간 전고정하고, 1% osmium tetroxide(OsO<sub>4</sub>)로 30분 간격으로 한 번씩 흔들면서 2시간동안 후 고정하였다. 고정이 끝난 재료는 0.1 M phosphate buffer로 진탕수세한 다음 50% ethanol로 실온에서 15분 간격으로 탈수하여 epon 812에 포매하였다. 포매된 조직은 0.5 μm semithin section과 70 nm의 ultrathin section을 하였으며, ultrathin section은 copper grid(200 mesh)에 올려놓고 uranyl acetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다(4-6). 아울러, 주사전자현미경(SEM: scanning electron microscope) 촬영시료는 TEM과 동일한 방법으로 고정 및 탈수과정을 거친 후, 탈수된 조직은 critical point dryer로 건조시킨 다음, ion sputter를 이용하여 gold ion particle을 20 nm 두께로 피막을 입힌 후 주사전자현미경으로 관찰하였다(6,7).

결과 및 고찰

마두령 추출물이 미생물 세포막의 기능에 미치는 영향

마두령 추출물을 미생물 세포에 처리했을 때 세포막에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험으로 먼저 균주의 β-galactosidase 함유여부는 IPTG와 X-gal을 배지에 가하여 배양하였을 때 파란색 colony의 발현으로 알 수 있으며 실험균주 중 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas syringae*가 β-galactosidase를 함유하고 있음을 확인하였다(Fig. 1). 따라서, β-galactosidase활성변화가 확인된 두 균주를 toluene, chloroform, 증류수, 마두령 추출물에 처리하여 세포막의 기능성 변화를 비교·분석한 결과는 Fig. 2 및 Fig 3과 같다. 즉, 세포막기능을 완전히 파괴하는 toluene(2.3)을 100으로 하고 증류수를 0으로 하였을 때, 마두령 추출물은 *Escherichia coli*에는 32%, *Pseudomonas syringae*에는 50%의 세포막 기능파괴효과를 보였다

전자현미경을 이용한 미생물의 세포형태 및 세포막의 기능성 변화

마두령 추출물 처리에 의한 미생물의 세포형태 변화를 알아보기 위해 마두령 추출물 1000 ppm으로 처리한

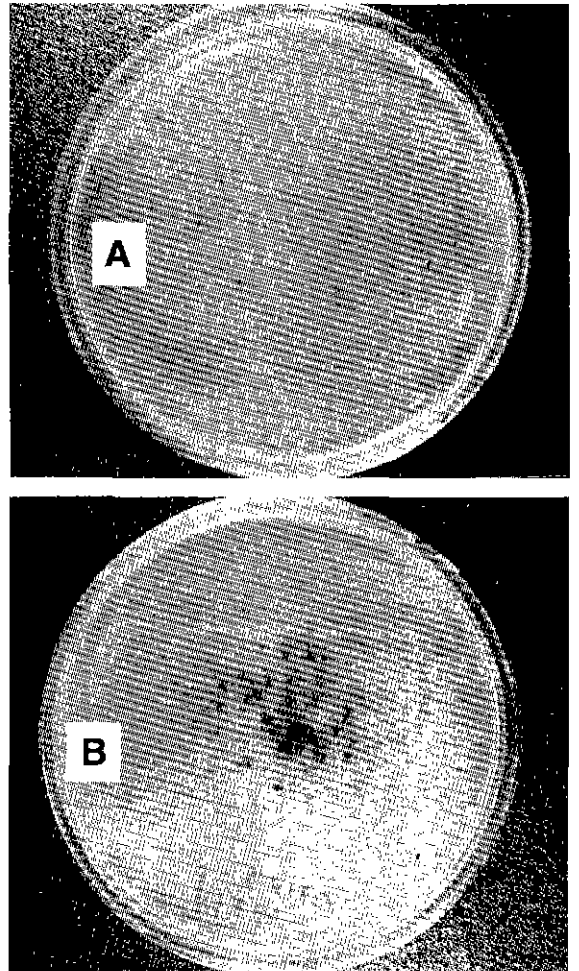


Fig. 1. Confirmation of testing microorganisms showing β-galactosidase activity. A: *Escherichia coli*, B: *Pseudomonas syringae*.

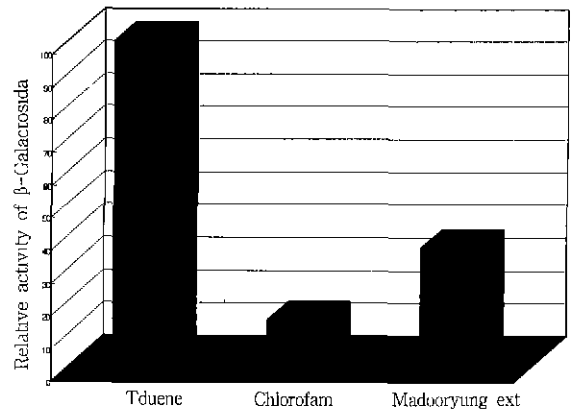


Fig. 2. The effect of *Aristolochia contorta* Bge. extract on the membrane perturbation of *Escherichia coli*. The cells were treated with the reagents including toluene, chloroform, and *Aristolochia contorta* Bge extract



Fig. 3. The effect of *Aristolochia contorta* Bge. extract on the membrane perturbation of *Pseudomonas syringae*.

The cells were treated with the reagents including toluene, chloroform and *Aristolochia contorta* Bge. extract.

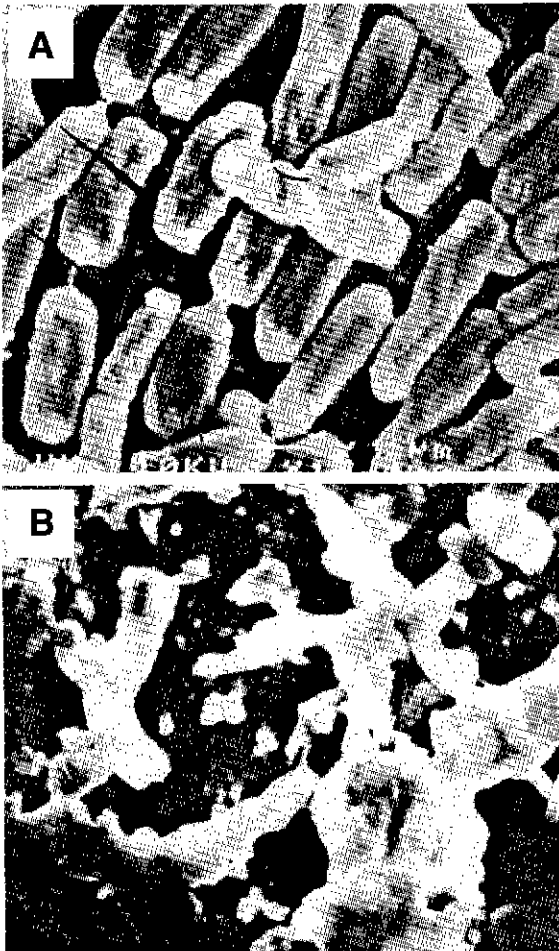


Fig. 4. Scanning electron micrographs of *Pseudomonas syringae* cells not-treated (A) and cells treated with *Aristolochia contorta* Bge. extract (B). (Magnification:  $\times 10,000$ )

것과 처리하지 않은 대조구를 전자현미경으로 촬영한 결과 Fig. 4~Fig. 6과 같다. SEM의 결과인 Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조구에 비해 처리구에서는 세포막기능의 손상을 초래해 균체가 심하게 팽윤되어 단세포의 형태를 찾아볼 수 없을 정도로 심한 형태학적 변화를 보였다. TEM의 경우, Fig. 5 및 Fig. 6에서 보듯이 미생물 세포막의 손상으로 세포내 물질의 외부 유출로 균체 생육이 억제되어 속이 빈 사멸균체가 증대함을 보여 이것으로 마두령추출물의 세포막 기능 파괴효과를 확인할 수 있었다.

이상의 실험결과를 통하여 마두령 추출물의 뚜렷한 항균작용이 확인되었으나, 활성물질의 분리와 동정 및 그 안정성을 검토함과 동시에, 수확한 농축산식품원료 및 가공식품의 선도유지 및 병해방지를 위한 처리효과실험 등을 지속하여 천연항균제 및 포장소재로 개발한다면 농축산 식품원료 및 가공식품을 우수한 품질로 유지시켜 경쟁력을 갖게 될 것이며, 또한 저렴한 비용으로 소비자에게 신선하게 공급시키는 것이 가능하게 될 것이다.

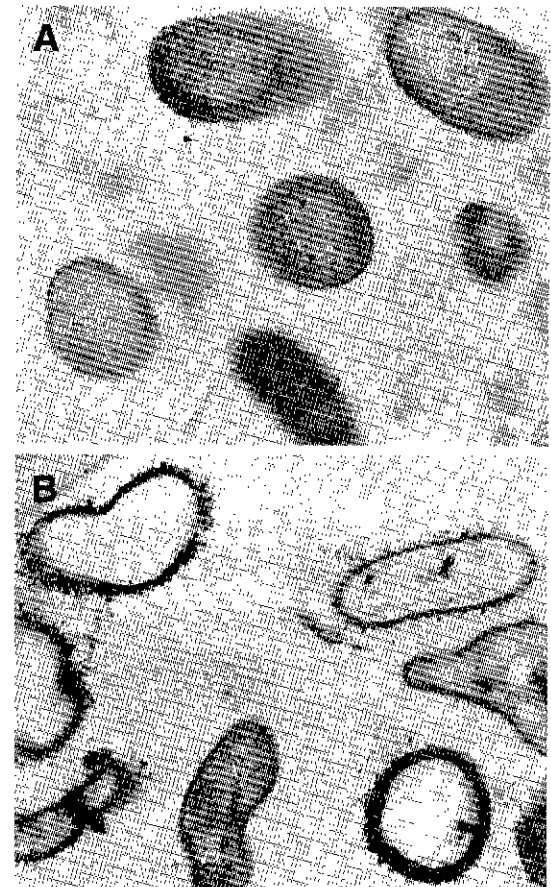


Fig. 5. Transmission electron micrographs of *Pseudomonas syringae* cells not-treated (A) and cells treated with *Aristolochia contorta* Bge. extract (B). (Magnification:  $\times 25,000$ )

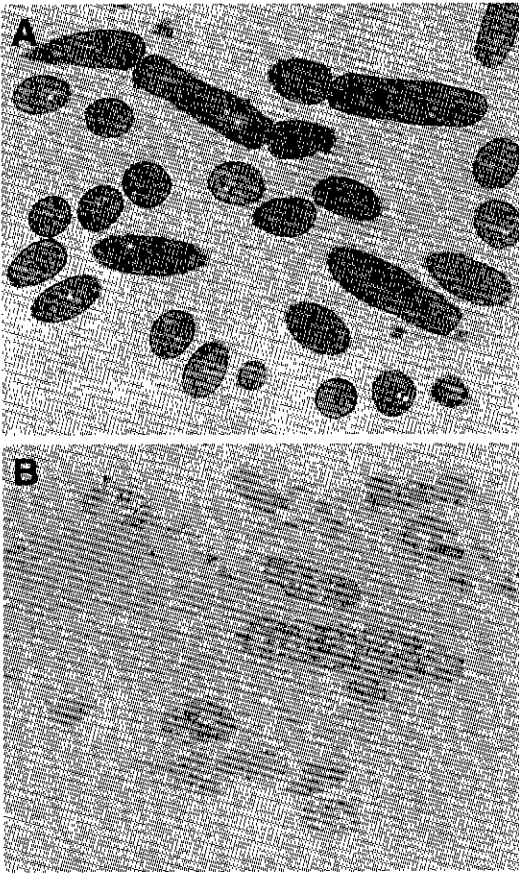


Fig. 6. Transmission electron micrographs of *Candida albicans* cells not-treated (A) and cells treated with *Aristolochia contorta* Bge. extract (B) (Magnification . ×25,000)

요 약

농축산 식품원료 및 그 가공식품의 선도유지를 위한 천연항균소재를 개발하기 위하여, 항균력이 우수한 것으로 확인된 천연항균소재인 마두령 추출물의 항균작용을 검토하였다. 마두령 추출물이 미생물의 세포막에 미치는 영향을 알아보기 위한 β-galactosidase활성 변화에서는 증류수를 가해준 대조구에서의 값을 0으로 하고 toluene을 가해 준 시험구를 100으로 하였을 때, β-galactosidase활성이 확인된 *Escherichia coli* 및 *Pseudomonas syringae*를 이용한 실험에서 마두령 추출물처리구는 각각

32%, 50%의 활성이 검출되었다. Chloroform을 가해서 세포막을 손상하여 얻은 값이 10%정도인데 비하여, 마두령추출물은 chloroform보다 세포막을 더 손상시켰고, 세포막 파손이 심하게 일어나는 toluene처리구의 30~50%에 상응하는 세포막 기능을 파괴시켰다. 아울러, transmission electron microscope(TEM)와 scanning electron microscope(SEM)를 이용한 전자현미경적 관찰에서는 SEM의 결과, 변패균주인 *Pseudomonas syringae*의 세포형태가 빈화되고, 미생물의 생리가 중단되며, 생육이 억제되었다. TEM의 경우, 변패균주인 *Pseudomonas syringae* 및 *Candida albicans*의 균체세포는 세포막의 기능이 파괴되어 세포내용물이 균체 외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되었으며, 균체 내부물질이 유출된 사멸 균체수가 증대하였다. 따라서 마두령 추출물은 변패미생물의 생육을 억제할 것으로 기대된다. 본 실험결과를 토대로, 마두령 추출물은 농축산 식품원료 및 그 가공식품의 유통과정중, 선도유지를 위한 항균소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

문 헌

- 1 Lee, I.E. and Cho, S.H. : Antimicrobial effect of *Aristolochia contorta* Bge. extract on the growth of pathogenic and putrefactive microorganisms. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 1107-1111 (2000)
- 2 Miller, J.H. : Experiment 48. Assay of β-galactosidase. In *Experiments in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, N.Y., p.352-355 (1972)
- 3 Lee, T.H., Jeong, S.J., Lee, S.Y., Kim, J.W. and Cho, S.H. : The inhibitory effect of grapefruit seed extracts on the physiological function of *Enterobacter pyrinus*. *Korean J. Food Sci Technol.*, **27**, 985-990 (1995)
- 4 Pylottis, N.A., Withecross, M.J and Jacobsen, J.V. : Localization of gibberlic acid-induced acid phosphorylase activity in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells with the electron microscope. *Planta*, **147**, 134-142 (1979)
- 5 Cho, S.H., Lee, S.Y., Kim J.W., Ko, G.H and Soe, I.W. : Development and application of natural antimicrobial agent isolated from grapefruit seed extract. *J. Fd. Hyg Safety*, **10**, 33-39 (1995)
- 6 Cho, S.H., Kim, K.O., Chung, J.H. and Ryu, C.H. : Outbreaks and control of Listeriosis attributed to agricultural, marine and animal husbandry products. *J. Fd. Hyg Safety*, **9**, 191-198 (1994)
- 7 Bendayan, M. Protein-A-gold electron microscopic immunocytochemistry methods, applications and limitations. *J. Elect. Microsc. Tech.*, **1**, 243-270 (1984)

(2000년 9월 7일 접수)