

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

안용선 · 신동화 · 백남인* · 성낙선** · 우건조***

전북대학교 응용생물공학부(식품공학 전공), *경희대학교 농학과,
식품의약품안전청 생약규격과, *식품의약품안전청 식품미생물과

Isolation and Identification of Antimicrobial Active Substance from *Mallotus japonicus* Muell on *Listeria monocytogenes*

Yong-Seon Ahn, Dong-Hwa Shin, Nam-In Baek*,
Rack-Seon Seong** and Gun-Jo Woo***

Faculty of Biotechnology(Food Science & Technology), Chonbuk National University,

*Department of Agriculture, Kyung Hee University,

**Department of Herbdrug Standardization, Korea Food & Drug Administration,

***Division of Food Microbiology, Korea Food & Drug Administration

Ethanol extracts from *Mallotus japonicus* Muell exhibited strong antimicrobial activities by paper disc diffusion method on the five strains of *Listeria monocytogenes*(ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113, ATCC 19114 and ATCC 15313). Ethanol extract from *Mallotus japonicus* Muell was subsequently fractionated by n-hexane, chloroform, ethyl acetate and water. n-Hexane fraction of *Mallotus japonicus* Muell showed strong growth inhibition at concentrations as low as 20 ppm level in broth culture medium on the five strains of *L. monocytogenes* for 72 hr at 30°C. Single substance(M34-4-4) was isolated from n-hexane fraction of *Mallotus japonicus* Muell. M34-4-4 showed a bactericidal activity against *L. monocytogenes* at a concentration of 50 ppm level. The purified M34-4-4 was identified as linolenic acid by ¹H-NMR, DEPT-135 and ¹³C-NMR.

Key words : *Mallotus japonicus* Muell, antimicrobial activity, linolenic acid, *L. monocytogenes*

서 론

식물유래 항균 활성 물질 중 인류가 오래 전부터 사용해 온 향신료는 항균 작용이 우수한 것으로 알려져 왔는데, 정향(clove)의 정유성분인 eugenol과 삼향자(pimento) 추출물은 *Listeria monocytogenes*와 *Aeromonas hydrophila*의 증식을 저해했고⁽¹⁾, thymol, garlic, onion은 *Aspergillus*속의 증식 저해에 효과적이었다고 보고되었다⁽²⁻⁴⁾. Garlic, onion, oregano, thyme의 정유성분은 부패효모의 증식을 저해했으며⁽⁵⁾, 백리향(*Thymus vulgaris* L.)의 정유성분은 9종의 Gram 양성균 및 6종의 Gram 음성균에 대해서 우수한 항균 효과를 나타냈다⁽⁶⁾. Mango 주스 제조시 첨가된 생강(*Zingiber officinale*)과 육두구(*Myristica fragrans*) 추출액은 세균과 효모의 증식을 저해했으며⁽⁷⁾,

carvacrol은 250 ppm 수준에서 *Salmonella typhimurium*⁽⁸⁾과 *Vibrio vulnificus*⁽⁹⁾에 대해 항균 활성을 나타냈다.

그 밖에 식물 추출물을 대상으로 한 실험에서 coconut oil 과 milkfat 으로부터 합성된 monoacylglycerols은 *L. monocytogenes*에 대해 항균 활성을 나타냈으며⁽¹⁰⁾, 뚜껑별꽃(*Pimpinella anisum*)씨에서 분리된 anethole은 *E. coli*를 비롯한 13종의 미생물의 증식을 저해했고⁽¹¹⁾, 차 향기성분인 nerolidol은 *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*에 대해 25 ppm 수준에서 강한 항균 활성을 나타냈다^(12,13). 꿀풀과 식물인 차조기(*Perilla frutescens*)잎에서 분리한 perillaldehyde⁽¹⁴⁾는 125~1000 ppm수준에서 16종의 미생물에 대해서 항균 활성을 보였으며, 혐기성균인 *Clostridium perfringens*은 육계(*Cinnamomum cassia*)에서 분리된 cinnamaldehyde와 salicylaldehyde에 의해서 증식이 저해됐다⁽¹⁵⁾. 식물 추출물로부터 구조가 밝혀진 항균성 물질로는 옷나무과인 cashew 고무(*Anacardium occidentale*) 열매로부터 분리한 anacardic acids⁽¹⁶⁾, green peper(*Piper nigrum* L.)에서 분리한 3,4-dihydroxyphenyl ethanol glucoside와 3,4-dihydroxy-6-(N-ethylamino) benzamide⁽¹⁷⁾, orange의 비휘발성 성분으로부터 분리된 hexa-, hepta-flavones

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

등⁽¹⁸⁾이 보고됐으며, 최근에는 고추냉이 등 십자화과 식물의 휘발성 성분인 allyl isothiocyanate의 항균 활성도 보고되고 있다⁽¹⁹⁻²¹⁾.

에덕나무는 대극과(Euphorbiaceae)로서 개화기는 6월경이며, 우리나라 남부의 산기슭 및 산골짜기에 서식하는 낙엽 소고목이다⁽²²⁾. 이 식물의 잎 부위에는 rutin, isoprenoid 유도체⁽²³⁾ 및 geranin, mallotusinic acid, mallotinic acid 등⁽²⁴⁾이 함유되어 있고, 민간에서는 예로부터 위궤양이나 십이지장궤양을 치료하는데 사용되어 왔으며⁽²³⁾, 담석증에도 효능이 있다고 알려져 왔다⁽²⁴⁾.

본 실험에서는 에덕나무 잎으로부터 75% 에탄올 추출물을 얻고 이를 각 용매로 분획 한 다음 column chromatography를 통하여 *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성 물질을 분리하였다. 항균 활성이 확인된 순수 분리물질을 ¹H-NMR, DEPT-135 및 ¹³C-NMR로 분석하여 항균 활성 물질의 구조를 구명하였다.

재료 및 방법

재료

에덕나무(*Mallotus japonicus* Muell)은 식품의약품안전청 소록도 약용식물재배시험장에서 재배하고 있는 식물의 잎 부위를 수집하여 수세, 건조 및 분쇄하여 에탄올 추출용 시료로 사용하였다.

추출 및 용매 분획⁽²⁵⁾

분쇄기로 마쇄한 에덕나무 잎(2900 g)에 5배의 75% 에탄올을 혼합하여 환류냉각관이 부착된 플라스크에 넣고 80°C 수욕상에서 3시간 추출 후 얻은 에탄올 추출물에 hexan을 가하여 hexan 분획물을 얻었으며, 동일방법으로 클로로포름 및 에틸아세테이트를 순차로 가하여 클로로포름, 에틸아세테이트 및 물 분획물을 각각 얻었다. 각 분획물은 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)와 진공 건조기로 용매를 완전히 제거한 후 에탄올로 녹여 항균효과 실험에 사용하였다.

항균 활성 물질의 분리⁽²⁶⁾

에덕나무의 경우는 Fig. 1과 같이 hexan 분획물(20 g)을 silica gel(625 g, 70~230 mesh, Merck)이 hexan으로 현탁 충전된 column(5.5×46 cm)에서 step-wise 용출법으로(hexan : 에틸아세테이트 = 10 : 1 → 에틸아세테이트, v/v) 12개의 획분(M1~M12)을 분리하였다. 이 중 활성이 우수한 M34(0.50 g) 획분을 벤젠 : 에틸아세테이트(7 : 1, v/v) 용매계로 silica gel column chromatography(2.7×16 cm)하여 소 획분(M34-1~34-4)을 얻었다. 이 중 활성이 우수한 M34-4 획분을 hexan : 아세톤(10 : 0.5, v/v) 용매계로 silica gel column chromatography(2×10 cm)하여 소 획분(M34-4-1~34-4-4)을 얻었다. 이 중 M34-4-4 획분이 활성이 우수하여 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.,

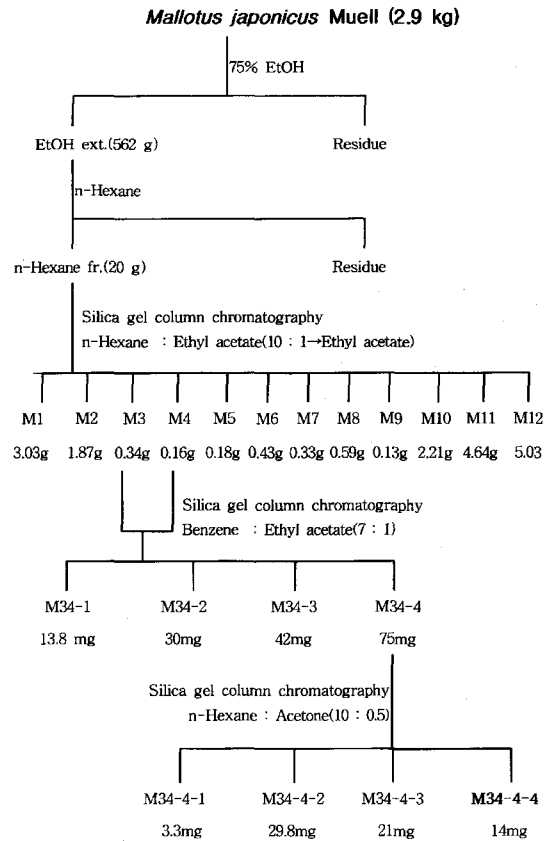


Fig. 1. Isolation flow diagram of the antimicrobial compound from *Mallotus japonicus* Muell

USA), Bioscreen C(Labsystem, Oy, Helsinki, Finland), Collection fractor(Foxy JR., Isco. Inc., USA), EI/MS(JEOL JMS-AX505WA), ¹H-NMR(400 MHz) 및 ¹³C-NMR(100 MHz)는 JEOL JNM-LA400을 사용하였다.

시약 및 기타 재료

Duksan Pure Chemical사 제품으로 hexan(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)을 사용하였으며, 아세토니트릴(99.9%, v/v)은 Fisher Scientific사(USA) 제품을 사용하였다. 기타 실험 재료로는 Merck사(Germany) 제품인 Silica gel 60과 TLC plate(silica gel 60 F254)를 구입하여 사용하였다.

사용 균주 및 배지

에덕나무 추출물의 항균활성 시험은 *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113, ATCC 19114 및 ATCC 15313)를 대상으로 하였으며, 시험균주는 tryptic soy broth와 agar 배지(Difco, USA)에 접종하여 30°C에서 배양하였다.

항균 활성 측정^(26,27)

사면 배지에 배양된 각 시험 균주를 1백금이씩 취해 10 mL 액체 배지(tryptic soy broth)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한

tryptic soy agar plate에 떨어뜨린 후 균일하게 도포하였다. 각 시험균이 접종된 plate 위에 에덕나무 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 희석하여 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)^(28,29)의 각 well에 0.3 mL씩 분주한 다음 30°C, 600 nm 조건하에서 72시간 동안 2시간 간격으로 혼탁도를 측정하여 증식 저해 효과를 비교하였으며, 이 때 첨가되는 에탄올 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 처리농도와 동일하게 에탄올만을 첨가한 대조구를 설정하여 증식정도를 비교하였다.

살균 효과 측정⁽²⁵⁻²⁷⁾

각 균주 배양액 0.1 mL를 정제된 물질이 일정 농도로 첨가된 액체 배지에 접종하여 30°C에서 72시간 동안 배양하면

서 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.

활성물질의 분리, 동정

순수 분리된 물질의 구조동정을 위하여 ¹H-NMR(400 MHz), DEPT-135 및 ¹³C-NMR(100 MHz) (ZEOL JNM-LA400, Japan)을 사용하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물 및 용매 분획물의 항균 효과

에덕나무 75% 에탄올 추출물을 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 물층으로 순차 분획 후, 에탄올 추출물 및 각각의 분획물에 대하여 항균 활성을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 에덕나무 에탄올 추출물 및 용매 분획물을 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm 및 20 ppm 수준의 농도로 액체 배지(tryptic soy broth)에 첨가 후 *L. monocytogenes* 5 균주를 접종하여 72시간 동안 혼탁도의 변화를 살펴본 결과, 에탄올 추출물 및 핵산 분획물을 제외한 다른 분획물들은 200 ppm 농도에서 항균 활성이 나타나지 않았으며, 에탄올 추출물의 경우 200 ppm 농도에서 5균주는 모두 증식이 저해되어 최소 저해 농도(MIC)는 200 ppm이었다. 이는 뽕나무(MIC 500 ppm)⁽³⁰⁾

Table 1. Antimicrobial effect of the ethanol extract and solvent fraction obtained from *Mallotus japonicus* Muell on *L. monocytogenes*

Fraction	Concentration (ppm)	<i>Listeria monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
Control ¹⁾	+ ²⁾	+	+	+	+	
	200	- ³⁾	-	-	-	-
	100	+	+	-	+	+
	50	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+
n-Hexane	200	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-
	200	+	+	+	+	+
Chloroform	100	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+
Ethyl acetate	50	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
Water	20	+	+	+	+	+

¹⁾Containing 0.75% ethanol in tryptic soy broth

²⁾Growth during 72 hr incubation at 30°C

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

Table 2. Antimicrobial effect of fraction M1~M12 obtained after column chromatography of n-hexane fraction on *L. monocytogenes* for 72 hr at 30°C

Fraction	Yield(g)	MIC ²⁾ (ppm)	
		ATCC 19111	ATCC 19114
M1	3.03	- ¹⁾	-
M2	1.87	50	50
M3	0.34	20	20
M4	0.16	50	50
M5	0.18	-	-
M6	0.43	-	-
M7	0.33	-	-
M8	0.59	-	-
M9	0.13	-	-
M10	2.21	-	-
M11	4.64	-	-
M12	5.03	-	-

¹⁾No inhibitory effect
²⁾Minimum inhibitory concentration

및 관중(MIC 500 ppm)⁽³¹⁾ 에탄올 추출물보다 항균 활성이 우수했으며 고삼(100<MIC<500)⁽²⁶⁾ 에탄올 추출물과는 유사한 항균활성을 나타낸 반면, 감초(50<MIC<100)⁽²⁵⁾ 및 섬바디(MIC<50)⁽²⁷⁾에탄올 추출물보다는 항균력이 다소 떨어지는 경향이였다. 핵산 분획물의 경우 20 ppm 수준의 농도에서도 72 시간 동안 *L. monocytogenes* 5 균주 모두가 증식하지 못했으며, 이는 섬바디 핵산 분획물(MIC 30 ppm)⁽²⁷⁾, 고삼 클로로포름 분획물(MIC 50 ppm)⁽²⁶⁾의 *L. monocytogenes*에 대한 항균 효과와 유사한 결과를 나타냈으며, 관중 클로로포름 분획물(MIC>100 ppm)⁽³¹⁾ 및 감초 에틸아세테이트 분획물(50<MIC<100 ppm)⁽²⁵⁾의 항균 효과 보다 우수한 것으로 나타났다.

핵산 분획물의 정제와 얻어진 획분들의 항균 효과

에덕나무 용매 분획물 중 핵산 분획물이 항균 효과가 우수하여 분리 대상으로 선정하였으며, 또한 균주별 감수성에 큰 차이가 없기 때문에 2 균주만 선정하여(ATCC 19111, 19114) 시험 균주로 사용하였다.

항균 활성이 우수한 핵산 분획물을 silica gel column chromatography를 실시한 결과 12개의 획분을 얻었으며 각 획분(M1~M12)별 항균 활성을 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 분리된 획분 중 M2 및 M4 획분은 최소 저해 농도가 50 ppm 수준 이하였고, M3는 20 ppm 수준 이하로 나타났다. 그 이외의 획분 M1, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11 및 M12 획분은 50 ppm 수준의 농도에서 대조구와 같은 수준으로 균이 증식하여 증식 저해 효과가 없었다. 이는 고삼 클로로포름 분획물의 1차 column 분획물의 최소 저해 농도(20 ppm)⁽²⁶⁾ 및 섬바디 핵산 분획물의 1차 column 분획물의 최소저해 농도(30 ppm)⁽²⁷⁾와 유사한 결과였다.

활성 소 획분 M34의 살균 효과

에덕나무 핵산 분획물로부터 분리된 12개의 획분 중 M2와 M4 획분은 최소 저해 농도가 50 ppm이며, M3 획분은 20

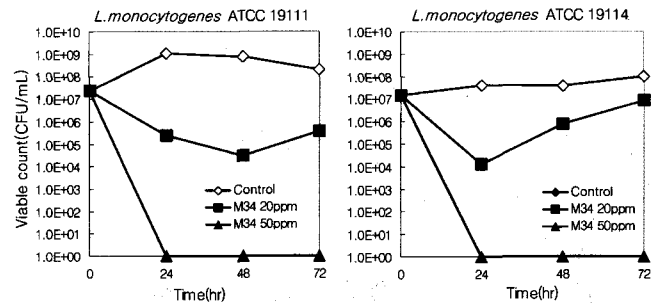


Fig. 2. Bactericidal effect of M34 isolated from n-hexane fraction of *Mallotus japonicus* Muell on *L. monocytogenes* for 72 hr at 30°C

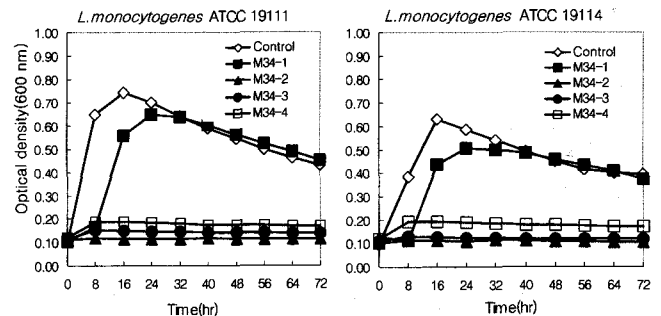


Fig. 3. Growth inhibition of fraction M34-1~M34-4 (50 ppm) obtained after column chromatography of M34 fraction on *L. monocytogenes* for 72 hr at 30°C

ppm으로 항균 활성이 우수하였다. 이 중 항균 활성이 가장 좋은 M3 획분과 TLC에서 M3 획분과 거의 유사한 R_f값을 나타낸 M4 획분을 혼합한 M34 획분을 선정하여 항균 물질 분리에 사용하였다. M34 획분의 최소 저해 농도는 20~50 ppm 수준으로 5 종류의 유기산⁽³²⁾보다 항균 효과가 좋음을 확인하였으나 액체 배양법에서 혼탁도를 측정하는 방법의 증식 양상을 관찰할 수 있으나 정확한 항균 정도를 확인할 수 없어, 이를 보완하기 위해 생균수를 계수하면서 살균 효과를 관찰하였다.

초기 접종 균수는 10⁷ CFU/mL 수준이었으며 24 시간 배양한 후 전체적인 균수 변화를 살펴보면(Fig. 2) 대조구는 접종 초기 균수에 비해 10¹~10² CFU/mL 증가하거나(ATCC 19111) 초기 균수와 차이가 거의 없는(ATCC 19114) 반면, 처리구는 20 ppm 수준의 경우 ATCC 19111은 10⁵~10⁶ CFU/mL, ATCC 19114는 10⁴~10⁵ CFU/mL로 대조구에 비해 10³(ATCC 19114)~10⁴(ATCC 19111) CFU/mL 정도 감소하였으며, 50 ppm 수준의 경우 생균수는 검출되지 않았다. 이후 72시간에서 대조구는 두 균주 모두 10⁸ CFU/mL 수준으로 초기 균수에 10¹ CFU/mL 증가한 반면, 처리구는 20 ppm 수준의 경우 10⁶(ATCC 19111)~10⁷(ATCC 19114) CFU/mL 수준으로 대조구에 비해 10¹(ATCC 19114)~10²(ATCC 19111) CFU/mL 정도 감소하였다. 반면 50 ppm 수준의 경우는 24 시간 배양했을 때와 마찬가지로 생균수는 검출되지 않았다. 이는 상백피 클로로포름 분획물의 2차 column 분리물인 F-5'획분(100 ppm)⁽³³⁾보다 살균 효과가 우수하게 나타났다. 이들 결과로 볼 때 M34 획분은 *L. monocytogenes*에 대하여 20 ppm 혹은 50 ppm 수준의 농도에서 살균 효과가 있음을 확인하였다.

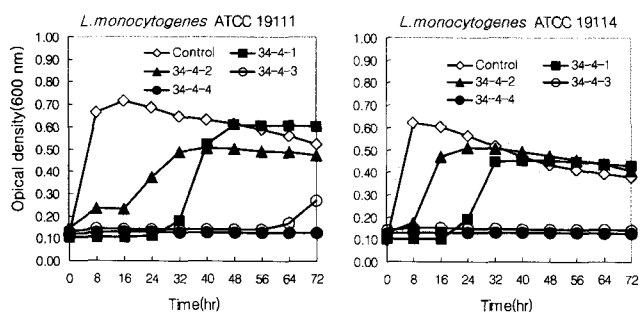


Fig. 4. Growth inhibition of fraction M34-4-1~M34-4-4(50 ppm) obtained after column chromatography of M34-4 fraction on *L. monocytogenes* for 72 hr at 30°C

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

M34 획분으로부터 분리된 2차 및 3차 column 분리물을 50 ppm 수준의 농도로 액체 배지(tryptic soy broth)에 첨가한 다음 72시간 동안 증식 저해 효과를 비교한 결과는 Fig. 3~4와 같다. 2차 column 분리물 중(M34-1~M34-4) M34-2, M34-3 및 M34-4 획분은 *L. monocytogenes* ATCC 19111와 19114의 증식을 저해했으며(Fig. 3), 이 중 수율이 우수한 M34-4 획분을 선정하여 3차 column chromatography에 사용하였다. 또한 3차 column 분리물에서는(M34-4-1~M34-4-4) M34-4-4 획분의 경우 두 균주 모두에 대해 항균 활성이 우수했으며(Fig. 4) M34-4-3 획분의 경우 ATCC 19114에 대해서는 항균 활성이 우수했으나, ATCC 19111에 대해서는 56시간 이후 혼탁도가 증가하면서 항균 활성이 감소하는 것으로 나타났다.

단일 획분 M34-4-4의 증식 저해 효과

M34-4-4 획분은 TLC상에서 단일 물질로 추정되었으며, *L. monocytogenes* ATCC 19111과 ATCC 19114 균주에 대한 증식 저해 효과를 살펴본 결과는 Fig. 5와 같다. 초기 균수는 10^6 (ATCC 19114)~ 10^7 (ATCC 19111) CFU/mL로 접종하여 24시간 배양하였을 때 대조구는 10^7 ~ 10^8 CFU/mL(ATCC 19111) 및 10^9 CFU/mL(ATCC 19114)로 증가하였으나, M34-4-4 획분은 20 ppm 수준에서 24시간 동

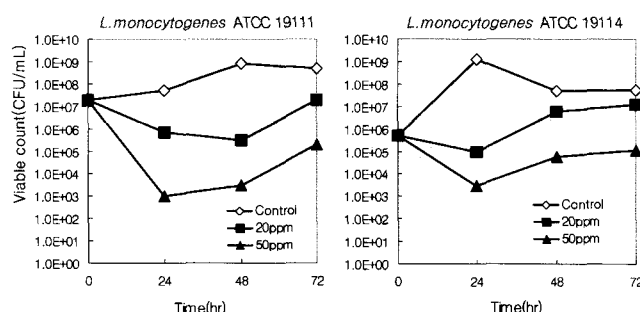


Fig. 5. Inhibitory effect of M34-4-4 fraction isolated from M34-4 fraction on *L. monocytogenes* for 72 hr at 30°C

안 10^5 (ATCC 19114)~ 10^6 (ATCC 19111) CFU/mL로 대조구에 비해 10^2 (ATCC 19111)~ 10^4 (ATCC 19114) CFU/mL 정도 감소했으며 그 이후에 균수가 증가하여 72시간에서는 두 균주 모두 대조구에 비해 10^1 CFU/mL 정도의 차이를 보이며 초기 접종 균수와 거의 동일한 수준까지 증가하였다. 이는 hexan 분획물의 1차 분리물이었던 M34 획분과 유사한 항균력을 보였으며, 50 ppm 수준 농도의 경우 접종 후 24시간에서 두 균주 모두 10^3 CFU/mL 수준으로 감소했으나 이후 서서히 증가하여 72시간에서는 두 균주 모두 10^5 ~ 10^6 CFU/mL 수준으로 나타나 대조구에 비해 ATCC 19111은 10^3 ~ 10^4 CFU/mL, ATCC 19114는 10^2 ~ 10^3 CFU/mL 정도 감소하였다.

이러한 결과로 볼 때 M34-4-4 획분은 *L. monocytogenes* 실험 균주에 대해 50 ppm 수준 이상의 농도에서 증식 저해 작용을 하는 것으로 추정 할 수 있다. 또한 M34-4-4 획분은 50 ppm의 농도에서 M34 획분에 비해 항균 활성이 감소되었는데, 섬바디 추출물의 경우 단일 물질로 분리 될수록 항균 활성이 떨어진다는 보고⁽²⁷⁾와 유사한 결과였다.

단일 획분의 M34-4-4의 구조 동정

예덕나무로부터 분리된 M34 분획물을 다시 분리하여 최종 단일 물질인 M34-4-4를 얻었다. M34-4-4는 linolenic acid로 TLC 상에서 전개시킨 후 20% 황산을 뿌리고 판을 가열했을 때 갈색을 나타냈으나, UV spectrum에서는 색이 발현되지 않았다.

M34-4-4의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. ¹H-NMR, DEPT-135 and ¹³C-NMR chemical shift of M34-4-4 isolated from n-hexane fraction of *Mallotus japonicus* Muell(400 and 100 MHz, CDCl₃)

Carbon No.	M34-4-4		
	DEPT-135	δ _c	δ _H
1		180.0	
2~8		20.5, 24.6	1.32~1.19(8H), m, -CH ₂ ×4
11	Methylene carbon(CH ₂)	25.5, 25.6	1.63(2H), dt-like, -CH ₂
14		27.1, 29.0	2.09~2.03(4H), m, -CH ₂ ×2
17		29.05, 29.1	2.35(2H), t, J=7.9 Hz, -CH ₂
		29.5, 34.0	2.81(4H), m, -CH ₂ ×2
9-10		127.1, 127.7	
12-13	Olefinic methine carbon(CH)	128.2, 128.3	5.40~5.30(6H), m, Olefinic-H×6
15-16		130.2, 131.9	
18	Methyl carbon(CH ₃)	14.7	0.98(3H), t, J=7.6 Hz

¹H-NMR에서는 olefinic-H의 특징적인 signal[δ 5.40~ δ 5.30(6H, m, Olefinic-H \times 6)]이 관측되었고, methylene[δ 1.32~ δ 1.19(8H, m, -CH₂ \times 4), δ 1.63(2H, dt-like, -CH₂), δ 2.09~ δ 2.03(4H, m, -CH₂ \times 2), δ 2.35(2H, t, J=7.9 Hz, -CH₂), δ 2.81(4H, m, -CH₂ \times 2)] 및 말단 methyl기[δ 0.98 (3H, t, J=7.6 Hz)]의 존재도 확인되었다. 또한, M34-4-4의 DEPT-135 및 ¹³C-NMR에서는 6개의 olefinic methine 탄소가 δ 127.1, δ 127.7, δ 128.2, δ 128.3, δ 130.2 및 δ 131.9 ppm에서 관측되어 3쌍의 2중 결합이 존재함이 밝혀졌고, δ 20.5, δ 24.6, δ 25.5, δ 25.6, δ 27.1, δ 29.0, δ 29.05, δ 29.1, δ 29.5 및 δ 34.0에서 10개의 methylene 탄소 signal이 관측되었다. 또한 δ 180에서 1개의 carbonyl 탄소 signal이 관측되었고, δ 14.7에서 말단 methyl기 탄소의 존재가 확인되었다. 따라서 M34-4-4는 세 쌍의 2중 결합과 1개의 carboxyl기를 갖는 탄소 18개를 가지는 (Z, Z, Z)-9, 12, 15-octadecatrienoic acid인 linolenic acid로 결정하였다.

요 약

항균 활성이 우수한 예덕나무의 75% 에탄올 추출물을 용매 분획 후 일정 수준의 농도로 액체 배지(tryptic soy broth)에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5 균주를 배양시킨 결과 핵산 분획물 20 ppm에서 72시간 동안 증식 저해 효과를 나타내었다. 항균 활성이 우수한 예덕나무 핵산 분획물을 silica gel column chromatography로 1회 분획하여 항균 활성이 우수한 핵분 M34를 얻었으며 M34 핵분은 50 ppm 수준의 농도에서 실험 균주 모두 증식을 저해했다. 핵분 M34를 2회 연속 분리하여 소 핵분 M34-4-4를 얻은 후 액체 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 2 균주를 접종한 후 72시간 배양한 결과 50 ppm 수준의 농도에서 증식 저해 효과가 나타났으며, M34-4-4를 구조 동정한 결과 linolenic acid로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 보건 의료 기술 연구 개발 사업(관리번호: HMP-99-F-06-0001, 식품 중 각종 위해 요인의 위해성 평가와 관리 방안 수립에 관한 연구)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

문 헌

- Hao, Y.Y., Brackett, R.E. and Doyle, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *J. Food Prot.* 61: 307-312 (1998)
- Buchanan, R.L. and Shepherd, A.J. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. *J. Food Sci.* 46: 976-980 (1981)
- Yin, M.C. and Cheng, W.S. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *J. Food Prot.* 61: (1998)
- Belmont, R.M. and Carvajal, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize plant essential oils and their components. *J. Food Prot.* 61: 616-619(1998)
- Conner, D.E. and Beuchat, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.* 49: 429-434 (1984)
- Marino, M., Bersani, C. and Comi, G. Antimicrobial activity of

the essence oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Prot.* 62: 1017-1023 (1999)

- Ejch, B.O., Souzey, J.A. and Akpomedaye, D.E. Microbial stability of mango(*Mangifera indica* L.) juice preserved by combined application of mild heat and extracts of two tropical spices. *J. Food Prot.* 61: 725-727 (1998)
- Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., Preston, J.F. and Wei, C.I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *J. Food Sci.* 60: 1364-1369 (1995)
- Kim, J., Marshall, M.R. and Wei, C.I. Antibacterial activity of some essence oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2841-2845 (1995)
- Wang, L.L., Yang, B.K., Parkin, K.L. and Johnson, E.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by monoacylglycerols synthesized from coconut oil and milkfat by lipase-catalyzed glycerolysis. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1000-1005 (1993)
- Kubo, I. and Himejima, M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2290-2292 (1991)
- Kubo, I. and Himejima, M. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* 41: 107-111 (1993)
- Kubo, I. and Himejima, M. Antimicrobial activity of green tea flavor compound and their combination effects. *J. Agric. Food Chem.* 40: 245-248 (1992)
- Kang, R., Helms, R., Stout, M.J., Jaber, H., Chen, Z. and Nakatsu, T. Antimicrobial activity of volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2328-2330 (1992)
- Lee, H.S. and Ahn, Y.J. Growth-inhibition effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46: 8-19 (1998)
- Himejima, M. and Kubo, I. Antimicrobial agents from the cashew *Anacardium occidentale*(Anacardiaceae) nut shell oil. *J. Agric. Food Chem.* 39: 418-421 (1991)
- Pradhan, K.J., Variyar, P.S. and Bandekar, J.R. Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper(*Piper nigrum* L.). *Lebensm. Wiss. Technol.* 32: 121-123(1999)
- Vargas, I., Sanz, I., Moya, P. and Prima-Yufer, E. Antimicrobial and antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed orange essence oil. *J. Food Prot.* 62: 929-932 (1999)
- Delaquis, P.J., Ward, S.M., Hollet, M.C.C. and Mazza, G. Microbiological, chemical and sensory properties of pre-cooked roast beef preserved with horseradish essence oil. *J. Food Sci.* 64: 519-524 (1999)
- Ward, S.M., Delaquis, P.J., Holley, R.A., Mazza, G. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roast beef by volatile horseradish distillates. *Food Res. Int.* 31: 19-26 (1998)
- Shofran, B.G., Purrington, S.Y., Breidt, F. and Fleming, H.P. Antimicrobial properties of sinigrin and its hydrolysis products. *J. Food Sci.* 63: 621-624 (1998)
- Korea Food & Drug Administration. An Illustrated Guide to Medicinal Plants in Okchon. pp.183, Woojin Pub. Co., Seoul, Korea (1997)
- Saijo, R., Nonaka, G.I. and Nishioka, I. Gallic acid esters of berberin and norberberin from *Mallotus japonicus*. *Phytochem.* 29: 267-270 (1990)
- Yook, C.S. Coloured Medicinal Plants of Korea, pp.576, Academy Book Co., Seoul, Korea (1990)
- 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. Technol.* 30: 680-687 (1998)
- 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. Technol.* 30: 672-679 (1998)
- 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. Technol. 31: 984-993 (1999)
28. 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)
29. 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 Appl. Microbiol. 22: 214-218 (1996)
30. 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. Technol. 26: 545-551 (1994)
31. 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)
32. 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. Technol. 29: 1236-1240 (1997)
33. Ahn, Y.S. and Shin, D.H. Antimicrobial effects of organic acids ethanol on several foodborne microorganisms. Kor. J. Food Sci. Technol. 31: 1315-1323 (1999)

(2001년 1월 11일 접수)