

몰약(*Commiphora molmol* Engl.)의 식중독 미생물 증식 억제 물질의 구조동정 및 식품적용

한지숙 · 신동화 · 백남인*

전북대학교 응용생물공학부(식품공학 전공, 농업과학기술연구소)

*경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터

Identification of Growth Inhibitory Substance on Food-borne Microorganisms from *Commiphora molmol* Engl. and Its Application to Food Products

Ji-Sook Han, Dong-Hwa Shin and Nam-In Baek*

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

*Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyunghee University

The ethanol extract and n-hexane fraction of *Commiphora molmol* Engl. showed minimum inhibitory concentration of 50 ppm and 25 ppm, respectively, on 5 strains of *Listeria monocytogenes* at 32°C. The purified substance, C3-3-2 fraction, was isolated by silica gel column and preparative thin layer chromatography from n-hexane fraction of *Commiphora molmol* Engl. The C3-3-2 fraction showed a strong bactericidal activity on 5 strains of *L. monocytogenes* at the concentration of 10 ppm in tryptic soy broth medium. At that concentration, the viable count was reduced 5-6 log cycle from initial cell number. The n-hexane fraction of *Commiphora molmol* Engl. showed strong growth inhibition at the concentration of 25 ppm on *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, at 50 ppm in broth on *Salmonella enteritidis*, and at 500 ppm on *Vibrio parahaemolyticus*. The purified antimicrobial substance, the C3-3-2 fraction, was identified as *m*-nonylphenol by on the basis of the ¹H-, ¹³C-NMR and EI/MS data. For the application test, the C3-3-2 fraction which was purely isolated from *Commiphora molmol* Engl. at 100 ppm were applied to minced Alaska pollack and ground beef at 32°C and 5°C. The antimicrobial substances did not reduce *L. monocytogenes* ATCC 19113 at 32°C, while they reduced *L. monocytogenes* ATCC 19113 in viable number at 5°C. However, the antimicrobial effect of C3-3-2 fraction in food system was lower than that of broth condition.

Key words : *Commiphora molmol* Engl. foodborne microorganisms, antimicrobial effect, *m*-nonylphenol

서 론

최근에 식물체에서 항 미생물 활성물질을 분리하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데 *Plectranthus hereroensis*의 뿌리로부터 분리한 diterpene류인 16-acetoxy-7 α ,12-dihydroxy-8,12-abietadiene-11,14-dione은 *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*에 대해서 항균효과가 있었고⁽¹⁾, *Agrimonia pilosa*에서 분리한 agrimol C, agrimol F, agrimol G, agrimophol은 *S. aureus*와 *Bacillus cereus*에 대해서 항균효과가 있었으

며⁽²⁾, *Myristica argentia*에서 분리된 diaryldimethylbutane lignan은 *Streptococcus mutans*에 대해서 항균활성을 나타낸다고 보고⁽³⁾되어 있다.

몰약(*Commiphora molmol* Engler)은 *Commiphora molmol* Engler(미루라) 및 동속식물에서 얻는 수지로서⁽⁴⁾ 성질은 따뜻하고 맛은 쓰고 매우며 독이 없고, 결(結)과 어혈을 헤치고 통증을 멈춘다. 타박상, 뼈와 힘줄이 상하거나 부러져서 어혈이 지고, 쇠붙이에 다친 곳, 여러 가지 막창과 치루를 낮게 한다. 또한 중독(腫毒)을 삭이고 갑자기 하혈하는 것을 멎게 하며 눈에 예장이 생기면서 어지럽고 아프고 그 돌레가 퍼지는 것을 낮게 한다^(5,6). 몰약은 안식향과 향이 비슷한데 그 덩어리의 크기가 고르지 않고 빛이 검으며 부드럽게 갈아 약에 넣어 쓰거나 또는 더운물에 타서 먹는다고 하며, 소나무진은 역균 및 소염작용이 있으며 습진, 약창 등 외용으로 사용한다. 이들 수지에는 myrcene, α -camphorene, z-gug-

Corresponding author : Dong-Hwa Shin, Faculty of Biotechnology(Food Science & Technology Major), Chonbuk National University, Dukjin-Dong, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
Tel: 82-63-270-2570
Fax: 82-63-270-2572
E-mail: dhshin@moak.chonbuk.ac.kr

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganisms tested	Media used	Temp. (°C)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	TSB & TSA ¹⁾	32
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112	TSB & TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	TSB & TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	TSB & TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	TSB & TSA	32
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	NB & NA ²⁾	30
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	NB & NA ²⁾	30
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 33844	TSB & TSA+ 3%NaCl	30
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43894	TSB & TSA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSB & TSA	37
<i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021	NB & NA ³⁾	37

¹⁾TSB & TSA: Tryptic soy broth & Tryptic soy agar (Difco)
²⁾NB & NA: Nutrient broth & Nutrient agar (Oxoid)
³⁾NB & NA: Nutrient broth & Nutrient agar (Difco)

gulsterol, guggulsterol I(C₂₇H₄₄O₄), mukulol(C₂₀H₃₄O), cembrene A 등의 essential oil 등이 포함되어 있다⁷⁾.

본 실험에서는 몰약의 각 분획별 항균효과를 조사하고, 항균효과가 가장 우수한 순수 분리물을 쇠고기와 명태육에 첨가하여 *Listeria monocytogenes*에 대한 증식억제효과를 측정함으로써, 식중독 미생물 증식 억제제로서 대체 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

몰약 에탄올 추출물에 대한 항균활성을 *L. monocytogenes* 5 균주를 대상으로 검색하였고, 항균 스펙트럼을 확인하기 위해 유해 식중독 미생물 6종을 대상으로 항균효과를 확인하였다. 이때 사용한 균주와 배지는 Table 1과 같다.

몰약의 에탄올 추출 및 순차 용매 분획⁸⁾

몰약(*Commiphora molmol* Engl.)은 서울 경동시장 한약방에서 건조상태로 구입하여 분쇄기로 마쇄하여 시료에 75% 에탄올을 5배 정도(w/v) 혼합하여 환류냉각관이 부착된 플라스크에 넣고, 80°C 수욕상에서 3시간 가열, 추출 후 여과(Whatman No. 2)한 액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)로 농축하였다.

에탄올 추출물을 농축하여 물층만 남긴 후 분별깔때기를 이용하여 약 4배의 헥산을 가하여 헥산 분획물을 2회 반복하여 얻고 동일한 방법으로 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차로 가하여 각각의 순차 용매 분획물을 얻었다. 각 분획물은 rotary vacuum evaporator와 vacuum drying oven(New Power Engineering Co., Korea)으로 용매를 완전히 제거한 후 고형분 함량을 구하여 원하는 농도만큼 에탄올로 녹여 0.2µm membrane filter로 제균한 후 항균효과 실험에 사용하였다.

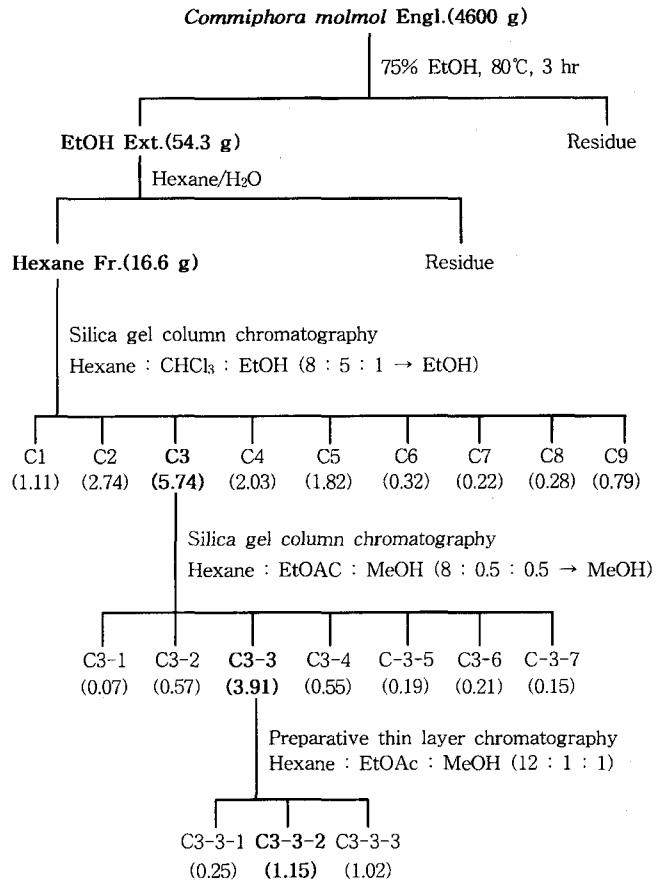


Fig. 1. Isolation flow diagram of the antimicrobial compound from *Commiphora molmol* Engl.

몰약 항균 활성물질의 분리⁸⁾

몰약 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차 분획하여 항균활성을 확인한 결과, 헥산 분획물의 항균효과가 다른 순차 용매 분획물에 비하여 월등히 높아 Fig. 1과 같은 순서에 따라 헥산 분획물의 항균 활성물질을 분리하여 각각의 수율을 확인하였다.

즉, 몰약 헥산 분획물(16.6 g)을 silica gel(540 g)을 헥산 : 클로로포름 : 에탄올 (8 : 5 : 1, v/v)에 현탁·충진시킨 column (5.5×45 cm)에 흡착시킨 후 에탄올 비율을 단계적으로 증가시키면서 용출하여 총 9개의 소획분으로 분리하여 C1~C9의 획분을 얻었다.

분리 후 얻은 획분 중에서 항균활성과 수율이 우수한 C3(5.74 g)획분을 다시 헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올(8 : 0.5 : 0.5, v/v→메탄올) 용매계로 silica gel column chromatography (170 g, 3.6×30.5 cm) 하여 총 7개의 소획분을 얻었다. 이 중에서 C3-3(3.91 g)의 획분이 항균효과와 수율이 우수하였으므로 이 획분을 다시 헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올(12 : 1 : 1, v/v) 용매계로 preparative thin layer chromatography(silica gel 60, 2 mm) 하여 3개의 소획분을 얻었다. 이 중에서 항균효과가 인정되면서 수율과 정제도가 우수한 C3-3-2(1.15 g)의 화학구조를 동정하였다.

C3-3-2(*m*-nonylphenol)의 구조동정

Colorless oil; EI/MS (*m/z*) 220, 205, 202, 191, 127, 93; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δH) 7.08 (1H, dd, *J*=7.5, 7.5 Hz, H-5), 6.72 (1H, d, *J*=7.5 Hz,), 6.65 (1H, d, *J*=7.5 Hz) (H-4, H-6), 6.63 (1H, s, H-2), 2.51 (2H, t, *J*=6.8 Hz, H-7), 1.55 (2H, m, H-8), 1.26 (2H×6, H-9, 10, 11, 12, 13, 14), 0.88 (3H, t, *J*=6.5 Hz). ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δC) 155.19 (s, C-1), 144.93 (s, C-3), 129.33, 120.96, 115.40, 112.57 (all d, C-2, 4, 5, 6). 35.80 (t, C-7), 31.88, 31.26, 29.54, 29.50 (×2), 29.32 (all t, C-8, 9, 10, 11, 12, 13), 22.65 (t, C-14), 14.06 (t, C-15).

사용기기 및 재료

항균활성 검색용 기기로는 Bioscreen C(Labsystem, Helsinki, Finland)를 사용하였고, 항균물질의 분획을 위하여 fraction collector(Foxy JR., Isco. Inc., USA), 순수물질 동정을 위하여 ¹H-NMR(400 MHz), DEPT-135 및 ¹³C-NMR(100 MHz)(JNM-LA400, JEOL, Japan)을 사용하였고, 식품적용 실험시 Stomacher(Interscience, France)를 사용하여 접종된 균주를 완전 혼합하였다. 순수분리용 컬럼의 충전제 및 thin layer chromatography(TLC)는 silica gel 60, TLC plate(silica gel 60, F₂₅₄), PTLC plate(silica gel 60, F₂₅₄, 2 mm)를 Merck (Germany)사에서 구입하여 사용하였다.

물약 에탄올 추출물, 순차 용매 분획물 및 소획분의 농도 별 항균효과⁽⁶⁾

*L. monocytogenes*를 배양한 사면배지에서 1백금이를 취해 10 mL 액체배지에 접종하여 32°C에서 24시간 배양시킨 후 이 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배지에 접종하여 32°C에서 24시간 배양하여 균체 배양액을 만들었다. 에탄올로 추출한 항균성 시료는 75% 에탄올로 완전히 용해시키거나 필요에 따라 희석한 후 membrane filter(0.2 μm)로 제균하여 액체배지 9.8 mL에 첨가량이 1000 ppm이 되게 항균활성이 확인된 각 추출물 시료를 첨가(0.1 mL) 하였다. 이 배지에 균체 배양액 0.1 mL를 접종한 후 32°C에서 72시간 동안 배양하면서 12시간 간격으로 600 nm에서 Bioscreen C를 이용하여 optical density(O.D.)를 측정하여 증식억제 효과를 실험하였다. 이때 에탄올로 추출한 시료를 용해시키는데 사용한 에탄올량(0.075 mL) 만큼을 대조구에 첨가하여 에탄올 자체의 항균력이 감안 되도록 하였다. 물약 에탄올 추출물을 hexan, chloroform, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차 분획하여 분획물을 얻었다. 이 순차 분획물 역시 같은 방법으로 *L. monocytogenes*에 대한 각 순차 분획물별 minimum inhibitory concentration(MIC)을 조사하였다. 또한 항균효과가 인정된 순차 용매 분획물의 *V. parahaemolyticus*의 5 종의 식중독 미생물에 대한 항균 스펙트럼과 항균 유효 단일물질을 분리하기 위해서 column chromatography와 PTLC 하여 얻어진 각각의 소획분의 항균활성도 역시 Bioscreen C를 이용하여 MIC를 조사하였다.

단일물질의 살균효과⁽⁸⁾

*L. monocytogenes*를 배양한 사면배지에서 1백금이씩 취해

10 mL 액체배지에 접종, 32°C에서 24시간 배양하여 균수를 10⁸⁻⁹ CFU/mL로 맞춘 후 이 균체 배양액 0.1 mL를 정제된 물질이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 32°C에서 72 시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 표준평판한천 배양법에 의해 생균수를 계수하였다. 같은 방법으로 균체 배양액 0.1 mL와 각 처리구에 추출물 용해에 사용된 양과 동일한 에탄올(0.075 mL)을 가한 배지를 대조구로 하였다.

식품 적용실험

명태육과 쇠고기를 warring blender로 갈아서 20 g씩 삼각플라스크에 분취하여 121°C에서 15분간 고압 증기멸균하고 여기에 각각 물약 단일물질(C3-3-2) 100 ppm을 에탄올에 용해시켜 첨가하였다. 여기에 액체배지 중 *L. monocytogenes* ATCC 19113 균수를 10⁷ CFU/mL 정도로 조정된 배양액 0.1 mL씩을 각각 명태육과 쇠고기에 첨가하여 잘 혼합한 후 5°C와 32°C에서 저장하면서 일정시간 간격으로 표준평판한천 배양법에 의해 생균수를 계수하였다. 같은 방법으로 균체 배양액 0.1 mL와 항균물질 용해에 사용한 에탄올량(0.075 mL)을 첨가한 것을 대조구로 하였다.

통계처리

식품적용 실험 결과는 SAS(Statistic Analytical System, USA) 프로그램⁽⁹⁾을 이용한 Duncan의 다중검증을 통하여 유의성을 조사하였다.

결과 및 고찰

물약 에탄올 추출물 및 순차 용매 분획물의 항균효과

물약 에탄올 추출물과 순차 용매 분획물에 대하여 항균활성을 비교한 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서 보면 물약 에탄올 추출물은 *L. monocytogenes* 5 균주 모두에 대해 50 ppm 첨가시 72시간 동안 균증식을 억제하였으며, 25 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* ATCC 15313에 대하여 24시간까지, *L. monocytogenes* ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113에 대하여 12시간까지 균증식 억제를 보이다가 그 이후 균증식이 나타났다. 또한 *L. monocytogenes* ATCC 19114는 25 ppm 첨가시 균증식 억제 현상을 관찰할 수 없었다. 물약을 순차 용매 분획하여 각 분획물을 25, 50, 100, 500 ppm씩 첨가해 보았을 때 *L. monocytogenes* 5 균주 모두 hexan 분획물에서 최소 증식저해농도는 25 ppm이었다.

물약 에탄올 추출물의 chloroform, 에틸아세테이트, 부탄

Table 2. Minimum inhibitory concentration of ethanol extract and solvent fractions of *Commiphora molmol* Engl.

<i>Listeria monocytogenes</i>	Minimum inhibitory concentration (ppm)				
	EtOH extract	Hexane fraction	CHCl ₃ fraction	EtOAc fraction	BuOH fraction
ATCC 19111	50	25	500<	500<	500<
ATCC 19112	50	25	500<	500<	500<
ATCC 19113	50	25	500<	500<	500<
ATCC 19114	50	25	500<	500<	500<
ATCC 15313	50	25	500<	500<	500<

Table 3. Minimum inhibitory concentration(ppm) of the 1st column chromatography fractions obtained from *Commiphora molmol* Engl. on *Listeria monocytogenes*

Fraction No.	<i>L. monocytogenes</i>				
	ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
C1	<25	25<	25<	25<	25<
C2	<10	<10	<10	<10	<10
C3	<10	<10	<10	<10	<10
C4	<10	<10	<10	<10	<10
C5	<10	<10	<10	<10	<10
C6	25<	25<	25<	25<	25<
C7	25<	25<	25<	25<	25<
C8	25<	25<	25<	25<	25<
C9	25<	25<	25<	25<	25<

을 순차 용매 분획물에서는 *L. monocytogenes* 5 균주 모두 500 ppm 이하 첨가에서는 항균효과를 전혀 관찰할 수 없었는데 이는 몰약의 항균 활성물질은 극성(極性)이 비교적 낮은 물질임을 의미하고 있다.

몰약 핵산 분획물의 1차 column chromatography 후 얻은 소획분들의 항균효과

순차 용매 분획물 중 항균효과가 뛰어난 몰약 핵산 분획물의 항균물질을 분리하기 위해 R_f 0.2~0.25 사이의 분리능을 나타내는 용매를 TLC로 검색한 결과, 핵산 : 클로로포름 : 에탄올(8 : 5 : 1)→에탄올의 조합에서 에탄올의 비율을 단계적으로 증가시키면서 용출, 분리시켜 항균활성을 실험한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보면 분리된 9개의 소획분을 tryptic soy broth에 각각 10과 25 ppm씩 첨가하여 항균활성을 관찰해 본 결과 *L. monocytogenes* 5균주 모두 C2~C5의 4개의 소획분에서 실험 최저농도인 10 ppm을 첨가할 때도 72시간 동안 균증식이 억제되었음을 관찰할 수 있었다. 이 결과로 보아 유효물질이 정제됨에 따라 항균활성이 향상됨으로써 항균활성 물질이 단일물질일 가능성이 높다고 판단되었다.

획분 4개의 수율을 실험한 결과 C3 획분의 수율이 가장 높았고 다시 TLC로 전개하여 황산으로 발색시켜 본 결과 C3 획분에서 뚜렷한 형광물질이 관찰되었다. 이 C3 획분을 2차 column chromatography용 시료로 선정하여 유효물질 분리 실험을 계속하였다.

몰약 분획물의 2차 column chromatography 후 얻은 소획분들의 항균효과

분리용 시료로 선정된 몰약 핵산 분획물에서 분리한 C3 획분을 다시 핵산 : 에틸아세테이트 : 메탄올(8 : 0.5 : 0.5)의 용매계로 메탄올의 양을 순차적으로 늘려서 용출시켜 7개의 소획분으로 분리하였고, 그 항균효과를 관찰한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서 보면 각 획분을 10과 25 ppm씩 첨가하였을 때 C3-3 획분의 최소 증식저해 농도는 10 ppm으로 다른 획분에 비해 그 항균효과가 뚜렷하였다.

Table 4. Minimum inhibitory concentration(ppm) of the 2nd column chromatography fractions and the preparative thin layer chromatography fractions of C3-3 fraction obtained from *Commiphora molmol* Engl. on *Listeria monocytogenes*

Fraction No.	<i>L. monocytogenes</i>				
	ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
C3-1	25<	25<	25<	25<	25<
C3-2	25	25	25	25	25
C3-3	10	10	10	10	10
C3-3-1	10<	10<	10<	10<	10<
C3-3-2	10	10	10	10	10
C3-3-3	10<	10<	10<	10<	10<
C3-4	25<	25<	25<	25<	25<
C3-5	25<	25<	25<	25<	25<
C3-6	25<	25<	25<	25<	25<
C3-7	25<	25<	25<	25<	25<

C3-3 획분을 TLC로 전개하여 UV에서 확인한 결과 장파(365 nm)에서 R_f 0.2~0.55 사이에 넓게 존재하는 보라색의 뚜렷한 형광물질을 관찰할 수 있었으므로 C3-3 획분을 3차 분리용 시료로 선정하였다.

몰약 분획물의 3차 preparative thin layer chromatography(PTLC) 후 얻은 소획분들의 항균효과

몰약 핵산 분획물 중 2차 column chromatography에서 얻은 C3-3 획분을 핵산 : 에틸아세테이트 : 메탄올(12 : 1 : 1)의 용매계로 다시 PTLC한 결과 3개의 단일 소획분을 모을 수 있었고, 이 3개의 소획분을 10과 25 ppm 첨가하여 그 균증식 양상을 관찰한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서 보면 C3-3-2 획분의 최소 증식저해 농도는 10 ppm으로 다른 획분보다 그 증식 저해효과가 높았으며, C3-3-2 획분을 다시 핵산 : 에틸아세테이트 : 메탄올(12 : 1 : 1)의 용매계로 TLC 전개하여 UV상에서 관찰하였을 때 장파(365 nm)에서 R_f 0.50의 보라색의 뚜렷한 단일 형광물질을 관찰할 수 있었고, 단파(254 nm)에서 R_f 0.44의 형광물질을 관찰할 수 있었으나 황산 발색시 R_f 0.50에서만 단일 band를 관찰할 수 있었다. 이와 같이 정제도가 높아짐에 따라 항균활성이 높아지는 것은 항균 원인물질이 순수 단일 물질임을 나타내고 있으므로 이 단일물질의 구조를 동정하였다.

단일물질로 추정된 C3-3-2 획분의 살균효과

몰약 추출물 중 단일 항균활성 성분으로 추정된 C3-3-2 획분을 배지에 10 ppm 첨가시 균증식이 되지 않는 항균효과는 Bioscreen C에서 확인할 수 있었고(data 생략), 이러한 항균 효과가 정균작용인지, 살균작용인지를 알아보기 위해 동일농도로 배양액에 첨가하여 생균수를 시험한 결과는 Fig. 2와 같다.

L. monocytogenes ATCC 19113은 24시간 경과시 초기 접종 균수(1.34×10^7 CFU/mL)보다 3 log cycle 정도 감소한 1.37×10^4 CFU/mL 수준으로 크게 감소하는 현상을 보였고, 72시간 경과시 1.55×10^2 CFU/mL으로 계속 균수가 감소하는 현상을 보였다.

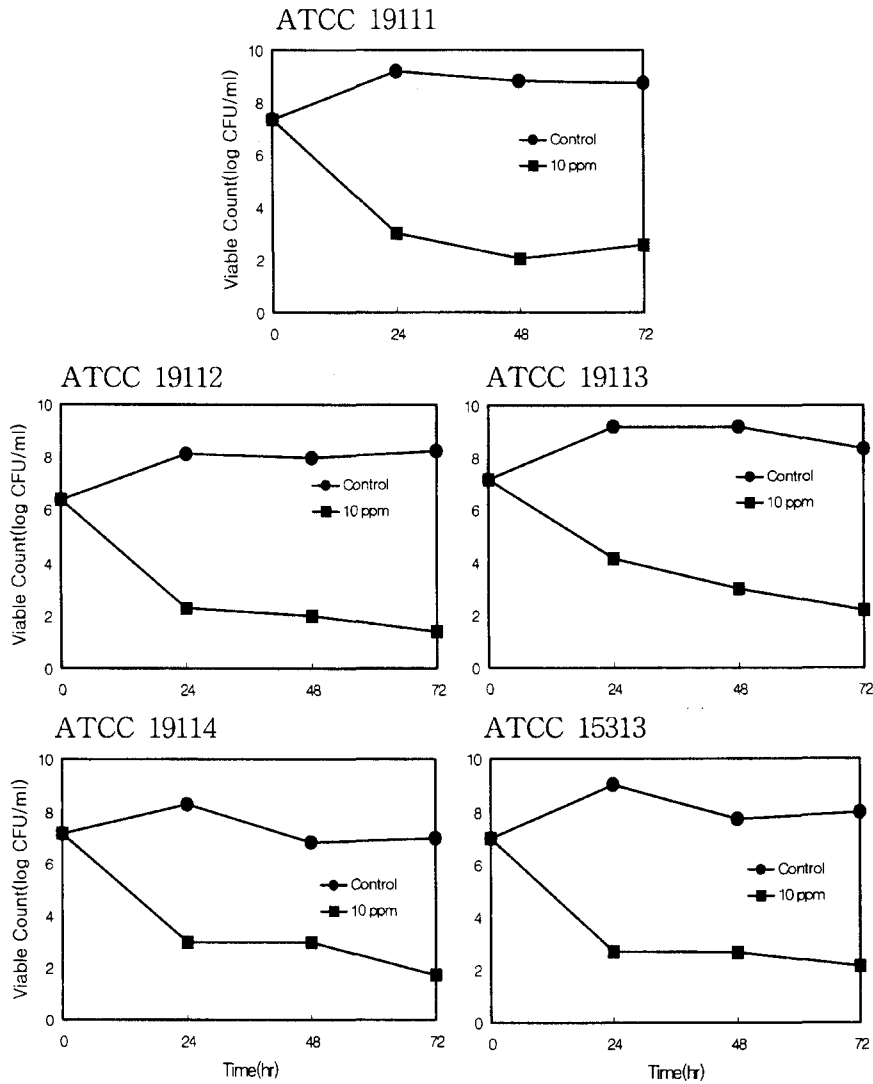


Fig. 2. Bactericidal effect of purified C3-3-2 fraction isolated from *Commiphora molmol* Engl. on *Listeria monocytogenes* for 72 hr at 32°C

L. monocytogenes ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19114 및 ATCC 15313은 24시간 경과시 초기 접종 균수보다 4 log cycle 정도 감소하여 각각 1.00×10^3 CFU/mL, 2.00×10^2 CFU/mL, 1.00×10^3 CFU/mL, 5.20×10^2 CFU/mL의 균수를 관찰할 수 있었고, 72시간에는 각각 3.50×10^2 CFU/mL, 2.50×10^1 CFU/mL, 5.30×10^1 CFU/mL, 1.40×10^2 CFU/mL의 수준으로 계속 균수가 감소하는 현상을 보여 C3-3-2획분은 정균효과 보다는 우수한 살균효과가 인정되었다.

이러한 살균효과는 고삼으로부터 분리한 Kushenol F와 감초로부터 분리한 liquiritigenin⁽⁶⁾보다도 강한 살균효과를 나타냄을 확인하였다.

물약 항균활성 물질(C3-3-2)의 구조 동정

C3-3-2의 ¹H-NMR spectrum에서 관측된 δ6.65 (1H, d, J=7.5 Hz), δ6.72 (1H, d, J=7.5 Hz), δ7.08 (1H, dd, J=7.5 Hz) 및 δ6.63 (1H, s) signal 및 ¹³C-NMR spectrum에서 관측된 δ155.19 (s), δ144.93 (s), δ129.33 (d), δ120.96 (d), δ115.40 (d) 및 δ112.57 (d) signal로부터 meta-이치환 벤

젠환의 존재를 알 수 있었다. 또한 ¹H-NMR spectrum에 있어서 δ2.51에서 1개의 triplet methylene signal이 관측되었고, δ1.55에서 1개의 multiplet methylene signal이, δ1.28~1.35에서 다수의 methylene signal이, δ0.88에서 1개의 triplet methyl signal이 관측되어 aliphatic chain의 존재를 확인할 수 있었다. ¹³C-NMR의 2개의 olefine-quaternary signal의 chemical shift(δC: 155.19, 144.93)로부터 벤젠고리에 각각 산소와 탄소가 1개씩 연결되어 있는 것으로 판명되었다. 또한 8개의 methylene carbon(δC: 35.81, 31.87, 31.26, 29.54, 29.50, 29.50, 29.32, 22.65)과 1개의 methyl carbon(δC: 14.06) signal이 관측되어 n-nonyl기의 존재가 추정되었다. 이 사실은 EI/MS에서 M⁺ 이온 peak가 m/z 220에서 관측된 점으로부터도 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 보아 물약에서 분리된 항균물질인 C3-3-2는 phenol의 meta 위치에 n-nonyl기가 결합되어 있는 m-nonylphenol로 확인하였다.

물약의 항균 스펙트럼

물약의 다른 식중독균에 대한 항균 스펙트럼을 알아보기

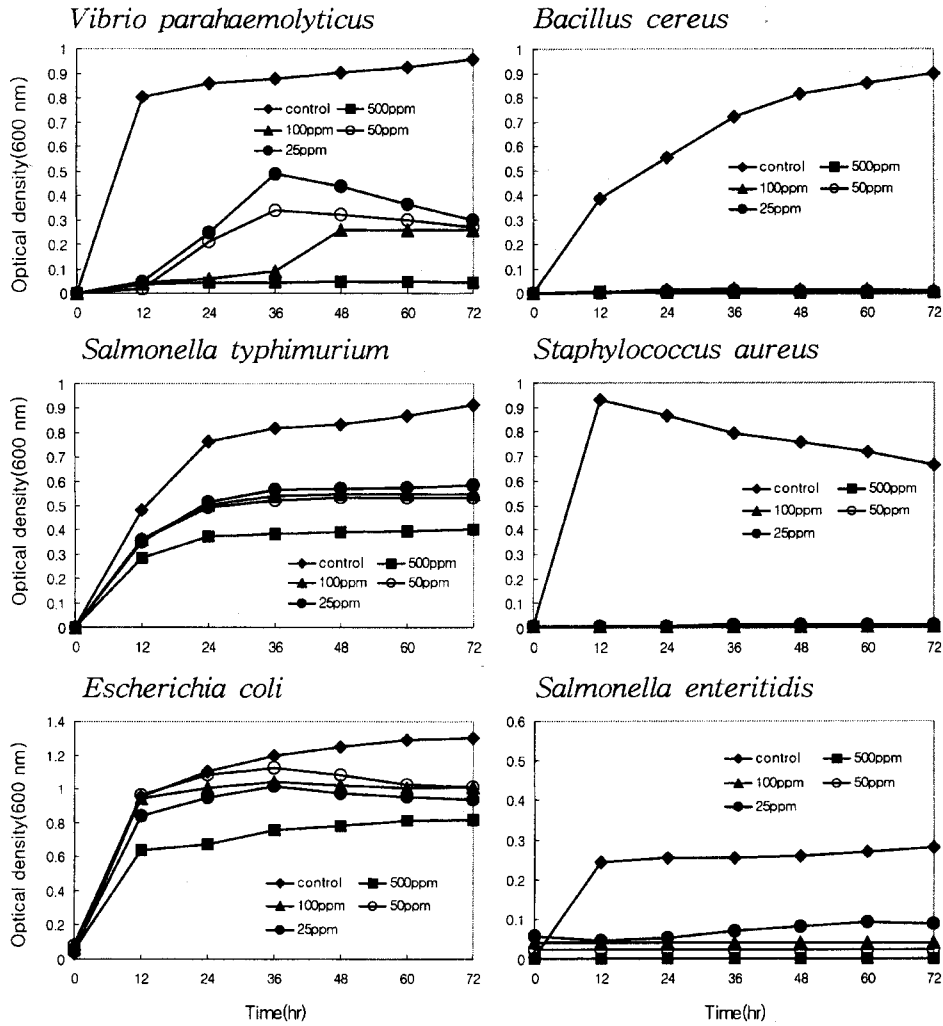


Fig. 3. Growth inhibition by n-hexane fraction of *Commiphora molmol* Engl. on several food-borne microorganisms for 72 hr

위해 몰약 헥산 분획물 25, 50, 100 및 500 ppm을 각각 배지에 각각 첨가하여 6종의 식중독균에 대한 항균효과를 실험한 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 보면 *B. cereus* 및 *S. aureus*에 대해서는 몰약 헥산 분획물을 25 ppm 이상 첨가시 72시간 동안 완전 증식억제 효과를 나타내었으며, *V. parahaemolyticus*에 대해서는 500 ppm 첨가시 72시간 동안 완전 증식억제 효과를 나타내었다.

*S. typhimurium*과 *E. coli*의 경우는 몰약 헥산 분획물을 첨가하지 않은 대조구에 비해서 몰약 헥산 분획물의 첨가농도가 높을수록 균증식은 다소 억제되었으나 균생장을 완전히 억제하지는 못하였다.

*S. enteritidis*에 대해서는 50 ppm 이상 첨가한 경우 균증식을 완전히 억제시킬 수 있었다. 이들 결과를 볼 때 몰약의 항균효과는 Gram(-)균을 포함한 균종에 따라 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다.

몰약의 항균효과는 영골 과즙의 아세톤 추출물이 *S. aureus*에 대해서 최소 증식저해 농도가 2500 ppm⁽¹⁰⁾이었고, 유백피 메탄올 추출물이 *B. cereus*에 대해서 300 ppm의 농도로 첨가하였을 때 완전증식 억제 효과가 있었다⁽¹¹⁾는 결과보다도 그 항균능력이 우수함을 확인하였다.

식품 적용실험

몰약 C3-3-2 획분 100 ppm을 각각 명태육과 쇠고기에 첨가하여 32°C, 72시간 저장하면서 24시간 간격으로 표준한천 배양법으로 *L. monocytogenes* ATCC 19113의 생균수를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 명태육에 *L. monocytogenes* ATCC 19113을 접종한 대조구의 초기 균수는 3.30×10⁵ CFU/mL이며, 24시간 경과 후 2.80×10⁸ CFU/mL으로 3 log cycle 정도 증가한 후 72시간까지 그 수준의 균수를(1.38×10⁸ CFU/mL) 유지하였다. 명태육에 몰약 단일물질 C3-3-2를 100 ppm을 첨가한 처리구는 24시간 경과 후 3.03×10⁸ CFU/mL으로 오히려 대조구보다 균수가 증가하는 경향을 보였으며 48시간, 72시간 경과 후 각각 1.92×10⁸ CFU/mL, 3.25×10⁸ CFU/mL으로 균증식 억제효과는 미미하였고, 72시간 경과 후는 대조구보다 처리구가 오히려 균수가 증가하였다.

몰약 C3-3-2 획분 100 ppm을 쇠고기에 첨가하여 32°C, 72시간 저장하면서 24시간 간격으로 표준한천배양법으로 생균수를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조구는 초기 접종 균수가 3.30×10⁵ CFU/mL이었고, 24, 48, 72시간에는 각각 4.56×10⁷ CFU/mL, 1.81×10⁸ CFU/mL, 5.17×10⁸ CFU/mL

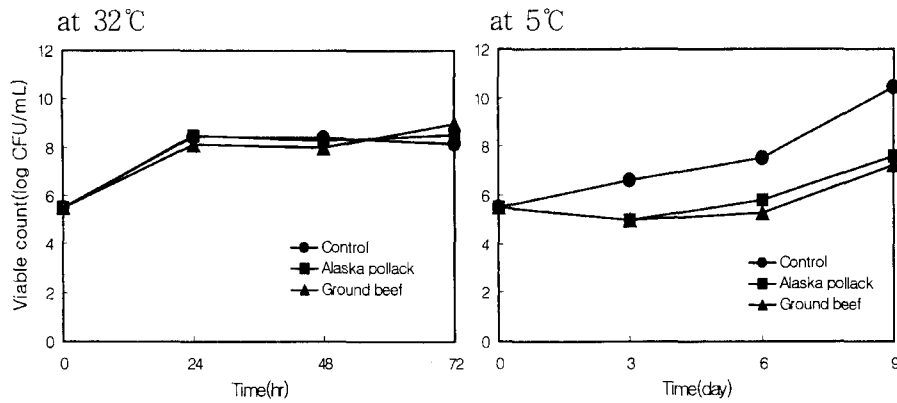


Fig. 4. Viable count of ground Alaska pollack and ground beef containing purified C3-3-2 fraction(100 ppm) isolated from *Commiphora molmol* Engl. on *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 for 72 hr

이었다. 쇠고기에 몰약 단일물질 C3-3-2를 100 ppm 첨가하였을 때 24, 48, 72시간에 균수는 1.23×10^8 CFU/mL, 1.01×10^8 CFU/mL, 9.40×10^8 CFU/mL으로 대조구와 비교하였을 때 균수에 차이가 없어 항균효과를 나타내지 않았다.

명태육과 쇠고기에 액체배지 실험에서 항균효과가 인정된 추출물을 첨가했을 때 32°C 저장온도에서는 이 항균물질이 충분한 항균효과를 나타내지 못하였다.

몰약 C3-3-2 획분 100 ppm을 명태육에 첨가하여 5°C에서 9일간 저장하면서 3일 간격으로 표준한천배양법으로 생균수를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19113만을 접종한 대조구의 초기 균수는 3.30×10^5 CFU/mL, 3일 경과 후 4.03×10^6 CFU/mL으로 약간 증가한 후 6일 경과 후 1 log cycle, 9일 경과 후 3 log cycle 정도가 증가한 반면에, 몰약에서 얻은 단일물질 C3-3-2를 100 ppm 첨가한 처리구의 균수를 살펴보면 3, 6, 9일째 각각 9.80×10^4 CFU/mL, 6.23×10^5 CFU/mL, 3.90×10^7 CFU/mL으로 대조구에 비하여 균수 증가속도가 낮았으며, 유의적인 차이가 있었다($P < 0.05$). 몰약 C3-3-2획분 100 ppm을 쇠고기에 첨가하여 그 항균효과를 알아본 결과는 Fig. 4와 같다. 몰약 C3-3-2 획분의 처리구는 24시간 경과 후에도 초기접종 균수와 비슷하였으며, 저장시간 별로 균수의 증가가 대조구에 비해서 적었으며, 통계적으로 검증한 결과 시간별로 대조구와 비교해서 유의적인 차이가 있었다($P < 0.05$).

이들 결과를 종합하면 몰약 C3-3-2 획분을 쇠고기나 명태육에 첨가하여 그 항균효과를 살펴보았을 때, 32°C 저장온도에서는 쇠고기나 명태육에 첨가된 몰약 C3-3-2 획분의 항균효과는 보이지 않았으나, 5°C 저장온도에서는 쇠고기나 명태육에 첨가된 몰약 C3-3-2 획분은 그 항균효과가 통계적 유의성이 있었고($P < 0.05$), 그 중에서도 쇠고기에 처리된 몰약 C3-3-2 획분의 항균효과가 보다 우수함을 알 수 있었다. 저장온도의 차이에 따른 항균효과의 차이는 *L. monocytogenes*의 증식이 32°C에서 더 빨라 균수가 많아짐에 따라 항균물질에 의한 항균효과가 적게 나타나기 때문인 것으로 추정된다.

식품의 주요성분이 항균활성 물질의 항균력 감소에 미치는 영향을 실험한 안⁽¹²⁾의 연구결과에서 보면 3% 이상의 casein 및 soybean oil을 첨가한 배양액에서 항균 활성물질의

항균력은 이러한 단백질과 지방의 식품성분에 의해 저해를 받는다고 보고하고 있다. 또한 *L. monocytogenes*는 stainless steel 표면에서 biofilm을 형성하여 위생세제에 저항하는 능력이 있는데, 생성된 biofilm이 그 안에 존재하는 미생물이 위생세제나 항생물질 그리고 항체의 공격을 받지 않거나 적게 받게 하는 방패 역할을 하게되어 항균물질들의 효력을 크게 저하시키기 때문이다^(13,14). 본 실험에서도 식품성분에 의한 보호 효과 때문에 항균활성 물질이 충분한 항균효과를 나타내지 못한 것으로 추정된다.

요 약

몰약 에탄올 추출물은 50 ppm에서, 몰약 핵산 분획물의 경우 25 ppm 첨가 수준에서 *Listeria monocytogenes* 5 균주에 대해 72시간까지 완전 증식 억제 효과가 있었다. 몰약 핵산 분획물의 항균활성 물질을 분리, 정제하여 얻은 C3-3-2 소획분의 경우는 최소증식저해농도가 10 ppm이었다. 항균활성이 인정된 C3-3-2 소획분의 항균력을 생균수로 측정하였을 때 초기 접종 균수 보다 5-6 log cycle 정도 감소하는 것을 확인하여 C3-3-2 소획분에 강력한 살균효과가 있음이 입증되었다. 몰약 핵산 분획물은 *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*에 대해서 25 ppm, *Salmonella enteritidis*에 대해서는 50 ppm, *Vibrio parahaemolyticus*에 대해서는 500 ppm을 액체 배지에 첨가할 때 72시간 동안 완전 증식억제 효과를 나타내었다. 몰약의 항균활성 물질은 *m-nonylphenol*로 동정되었다. 액체배양법에서 Bioscreen C를 이용하여 optical density를 측정하여 그 항균활성을 확인하였고, 표준한천배양법으로 살균효과를 확인하였던 몰약 단일물질(C3-3-2) 100 ppm을 식품에 적용하였다. 쇠고기와 명태육 마쇄물에 몰약 항균활성 물질을 첨가하여 32°C와 5°C에서 저장실험을 실시한 결과, 32°C 저장온도에서는 쇠고기와 명태육에 첨가한 몰약 C3-3-2 획분의 항균효과는 나타내지 못함을 알 수 있었고, 5°C 저장온도에서는 쇠고기와 명태육에 첨가된 몰약 C3-3-2 획분은 항균효과가 있었다. 그 중에서도 쇠고기에 처리된 몰약 C3-3-2 획분의 항균효과가 더 우수하였다. 그러나 몰약 C3-3-2 획분의 항균효과가 배양액 상태보다 감소하였는데, 이 결과를 통하여 천연 항균활성 물질을 식품에 적용할 때 그 효

과가 감소하는 이유와 그 해결방법에 대한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

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

- Batista, O., Simoes, M.F., Duarte, A., Valdeira, M.L., Dela Torre, M.C. and Rodriguez, B. An antimicrobial abietane from the root of *Plectranthus hereroensis*. *Phytochemistry* 38: 167-169 (1995)
- Yamaki, M., Kashihara, M., Ishiguro, K. and Takagi, S. Antimicrobial principle of Xian he cao. *Planta Med.* 55: 169-170 (1989)
- Nakatani, N., Ikeda, K., Kikuzaki, H., Kido, M. and Yamaguchi, Y. Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica aregentia* and their antimicrobial action against *S. mutans*. *Phytochemistry* 27: 3127-3130 (1988)
- Huang, K. C. Nervous System. pp147. In: *The Pharmacology of Chinese Herbs*. CRC Press. Inc., Boca Raton, USA (1993)
- Seoul National University Natural Products Research Institute: *Traditional Oriental Medicines Database* (1996)
- Ghazanfar, S.A. Burseraceae. pp. 62-65. In: *Handbook of Arabian Medical Plants*. CRC Press. USA (1994)
- Im, R.J. *Encyclopedia of Chosun Medicinal Plant III*. pp184-186. Hankukmoonwhasa, Seoul, Korea (1997)
- Ahn, E.Y. Isolation and identification of antimicrobial active substance from edible plant extract. M.S. thesis, Chonbuk National University, Chonju, Korea (1998)
- SAS Institute, Inc. *SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Inc. Cary, NC, USA* (1996)
- Kim, Y.D., Kim, Y.J., Oh, S.W., Kang, Y.J. and Lee, Y.C. Antimicrobial activities of solvent extracts from citrus sudachi Juice and peel. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1613-1618 (1999)
- Park, J.S., Shim, C.J., Jung, J.H., Lee, G.H., Sung, C.K. and Oh, M.J. Antimicrobial activity of ulmi cortex extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 1022-1028 (1999)
- Ahn, Y.S. Isolation and identification of antimicrobial substance from *Ruta graveolens* Linne and *Mallois japonicus* Muell on *Listeria monocytogenes*. M.S. Thesis, Chonbuk National University, Chonju, Korea (2000)
- Wirtanen, G. and Mattila-Sandholm T. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to chlorine sanitizer. part II. *Lebensm. wiss. U.-Technol.* 25: 50-54 (1992)
- Payman, F. and Frank, J.F. Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *J. Food Prot.* 62: 761-765 (1999)

(2001년 1월 31일 접수)