

황금추출물의 항균특성

조성환[†] · 김영록

경상대학교 식품공학과

Antimicrobial Characteristics of *Scutellariae Radix* Extract

Sung-Hwan Cho[†] and Young-Rok Kim

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

Abstract

It was carried out for research and development of natural antimicrobial on *Scutellariae Radix* extract against food-borne infection bacteria. *Scutellariae Radix* extract showed remarkable antimicrobial activities against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Vibrio parahaemolyticus* when examined by disk method, it was very stable on the wide range of temperature and pH. The growth rates of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Vibrio parahaemolyticus* were decreased at the concentration of more than 500 ppm *Scutellariae Radix* extract, indicating that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Vibrio parahaemolyticus* to *Scutellariae Radix* extract were around 500 ppm. The morphological changes were observed by transmission electron microscope and scanning electron microscope and the microbial cells membrane was destroyed by *Scutellariae Radix* extract. It was identified that the membrane integrity of the sensitive cells was disrupted by exposure to *Scutellariae Radix* extract as the β -galactosidase test on experimental substrate ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galacto-pyranoside).

Key words: natural antimicrobial, *Scutellariae Radix* extract, disk method

서 론

소득향상과 함께 생활수준이 높아짐에 따라 보다 신선하며 합성 보존료가 함유되어 있지 않은 식품에 대한 소비자의 선호도 변화에 따라 최소 가공된 냉장식품의 유통이 증가되고 있으며 유통 중 미생물적 안전성을 확보하기 위한 수단으로 천연항균제의 연구개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1,2).

이러한 연구노력의 결과로 현재 천연항균제로는 자몽종자추출물(3,4)이 항균성과 안전성을 인정받아 식품첨가물로서 개발되어 그 사용이 허가되었고, 마늘(5)과 양파(6) 추출물들은 부패미생물들에 대해 생육저해효과를 보이며, 항균력이 뛰어나다는 보고가 있었다. 예로부터 질병의 치료제로 사용되었던 여러 가지 한약재들에 대해서도 항균, 항진균, 항산화 효과가 발표되고 있으며(7-9), 황백(10), 오미자(11), 대황 및 황련(12) 등은 광범한 항균성을 나타내고 있는 것으로 보고되고 있다. 이에, 한약재를 이용한 천연항균제 개발을 위하여 항균력이 있다(13)고 알려진 건조된 26종의 약용식물들을 대상으로 한 예비실험에서 건조물 대비 29.2%의 높은

수율과 더불어 공시균주에 대한 항균성시험에서 생육저해환의 크기 10 mm 이상의 우수한 항균력을 보인 황금(黃芩, *Scutellariae Radix*)을 대상으로 병원성 미생물들에 대한 항균력을 알아보기 위하여 최소저해농도를 측정하여 황금추출물의 항균효과를 확인하고자 하였으며, 항균성분의 열 및 pH 안정성을 검토하였다. 황금추출물이 미생물의 세포막에 미치는 영향을 알아보기 위해서 전자현미경을 이용하여 공시균주의 세포형태 변화를 관찰하고, 균체효소인 β -galactosidase 활성을 정량하여 공시균주들의 세포막 손상정도를 추정하고자 하였다.

재료 및 방법

황금추출물의 조제

건조시킨 황금을 분쇄한 다음, 황금과 증류수를 1:5의 비율로 넣고 100°C 항온수조에서 3시간 동안 추출하여 1차 여과포를 이용하여 여과한 후, 10분 동안 5,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 재차 여과시켜 얻은 액을 회전진공 증발기로 최초량의 약 1/10 부피로 농축한 후, 동결

[†]Corresponding author. E-mail: sunghcho@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5478. Fax: 82-55-751-6113

건조하여 황금추출물을 얻었다.

황금추출물의 항균성 시험

황금추출물의 항균력 시험은 disk method(14)를 이용하였다. 공시균주인 *Bacillus cereus* ATCC 21772(이하, *B. cereus*), *Escherichia coli* ATCC 25922(이하, *E. coli*), *Listeria monocytogenes* ATCC 19111(이하, *L. monocytogenes*)와 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802(이하, *V. parahaemolyticus*)를 10 mL Tryptic soy broth(이하, TSB)에 접종하고 35°C에서 24시간 배양한 후 면봉을 사용하여 tryptic soy agar(이하, TSA)위에 고루 도말시켰다. 0, 500, 1000, 5000 ppm의 농도가 되게 단계별로 희석시킨 황금추출물 용액에 침지·포화시킨 멸균된 6 mm paper disk를 TSA 평판에 놓고 35°C에서 24시간 배양시킨 다음 disk 주위의 clear zone의 직경을 측정하여 항균력을 시험하였다.

공시균주의 생육저해곡선

황금추출물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration)는 Turbidimetric Assay법(14)을 이용하여 실험하였다. 황금추출물을 TSB에 첨가하여 0, 500, 1000, 5000 ppm으로 조절한 시험용액에 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*와 *V. parahaemolyticus*의 배양액 0.1 mL를 취하여 첨가한 다음, 35°C에서 4, 8, 12, 24, 48시간 동안 배양하면서 각 시험균별로 1 mL를 취하여 spectrophotometer(DR-20, BAUSH & LOMB)를 이용하여 파장 620 nm에서 흡광도를 측정하였고, blank로써 황금추출물을 넣은 TSB를 사용하였다.

황금추출물의 열 및 pH 안정성 시험

열 안정성 시험을 위하여 *E. coli*를 시험균주로 하여 황금추출물의 농도를 1,000 ppm으로 조절한 다음, 처리온도 40, 60, 80, 100, 120, 180°C에서 30분 동안 열처리한 후, 처리온도별로 disk method(14)를 이용하여 실험하였으며, pH 안정성은 황금추출물을 1000 ppm 농도가 되게 조절한 다음, buffer 용액을 이용하여 pH를 4, 6, 7, 8, 10으로 각각 처리한 후, 35°C에서 1시간 방치한 다음 다시 pH 7로 중화시켜 열 안정성 시험과 같은 방법으로 생육저해환을 측정하였다.

황금추출물 처리에 의한 공시균주의 세포형태 변화

황금추출물의 처리로 인한 공시균주의 세포형태 변화를 알아보기 위해 전자현미경을 이용하여 처리전후의 세포구조를 Park 등(4)의 방법에 따라 조직표본을 제작하여 관찰하였다. 공시균주는 *E. coli*를 이용하였고, 투과전자현미경(TEM: transmission electron microscope)은 Hitachi H-600을 이용하였으며, 주사전자현미경(SEM: scanning electron microscope)은 DS-130C(ISI ABT)으로 관찰하였다.

β -galactosidase 활성 측정

세포막 손상정도를 추정하기 위하여 균체 효소인 β -galactosidase(β -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23, 이하, β -galactosidase)활성을 Park 등(4)의 방법에 따라 정량

하였다. 공시균주로는 *E. coli*를 이용하였으며, 세포를 파쇄하지 않고, toluene, chloroform과 황금추출물을 같은 농도로 처리하였고, 기질로써 ONPG(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, 4 mg/mL)를 첨가하여 반응을 시킨 후 흡광도를 420 nm에서 측정하였다. 증류수를 넣은 경우를 0으로 하고 toluene을 넣어준 경우를 100으로 하여 황금추출물이 세포막 손상정도를 추정하였다.

결과 및 고찰

황금추출물의 항균성 시험

공시균주인 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*와 *V. parahaemolyticus* 균주를 균일하게 도말한 TSA상에 농도를 0, 500, 1000, 5000 ppm으로 달리하여 용액에 침지한 paper disk를 일정한 간격으로 놓은 후 35°C에서 24시간 배양시킨 결과는 Fig. 1과 같다. 황금추출물 500 ppm 이상의 농도로 처리한 paper disk 주위 공시균주인 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*와 *V. parahaemolyticus* 모두에서 증식 억제로 인한 clear zone이 선명하게 관찰되어 황금추출물의 항균력을 알 수 있었다.

시험균주의 생육저해곡선

시험균주인 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*와 *V. parahaemolyticus*에 대한 황금추출물의 최소저해농도를 알

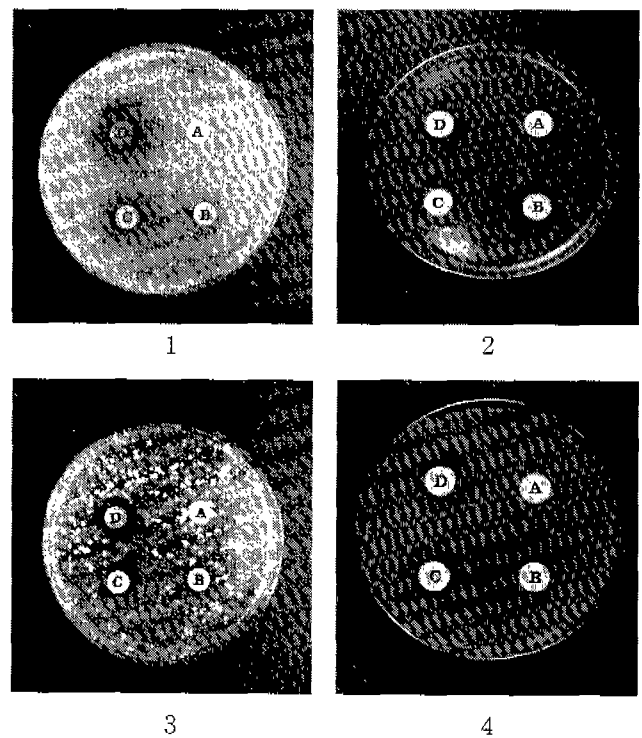


Fig. 1. Inhibitory effect of *Scutellariae Radix* extract on the growth of bacteria. 1: *B. cereus*, 2: *L. monocytogenes*, 3: *E. coli*, 4: *V. parahaemolyticus*. A: 0 ppm (control), B: 500 ppm, C: 1,000 ppm, D: 5,000 ppm.

아보기 위하여 spectrophotometer를 이용하여 파장 620 nm에서 흡광도를 측정한 결과들은 Fig. 2~5와 같다. 공시균주인 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*와 *V. parahaemolyticus* 모두 황금추출물의 농도 500 ppm 이상에서는 생육이 억제되는 것을 볼 수 있었고, 특히, *E. coli*에 있어서는 5,000 ppm에서 생육이 완전히 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 한편, *B. cereus*, *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*에 있어서는 Fig. 2, 3, 5에서 보듯이 12시간이 지나면서 다소 흡광도가 증가하였는데, 이는 시험관 아랫부분의 침전물에 의한 것으로써, 공시균주들의 생육에 의한 것이라기보다는 TSB에 접종된 균주들의 대사산물과 사멸된 균의 균피에 의한 것으로 추정되었다.

황금추출물의 열 및 pH 안정성

황금추출물의 열 안정성을 측정하기 위하여 황금추출물(1000 ppm)을 40, 60, 80, 100, 120, 180°C에서 30분 동안 열처리한 후, disk method법을 사용하여 생육 저해환을 측정한 결과는 Fig. 6과 같으며, 시험균주인 *E. coli*의 생육 저해환의 지름은 모든 가열처리구에서 처리 온도와 관계없이 15 mm 정도이었다.

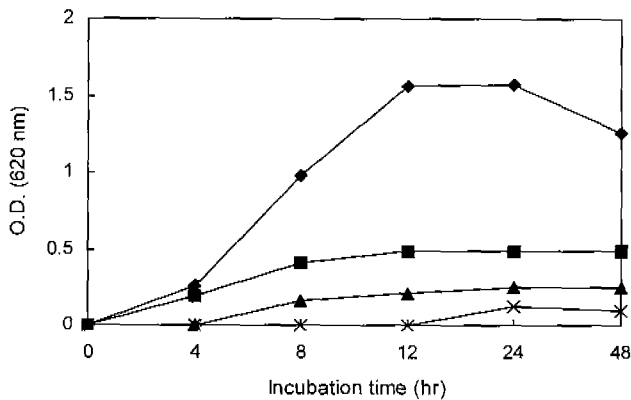


Fig. 2. Growth inhibition of *B. cereus* on the media containing *Scutellariae Radix* extract. ◆: 0 ppm (control), ■: 500 ppm, ▲: 1,000 ppm, ×: 5,000 ppm.

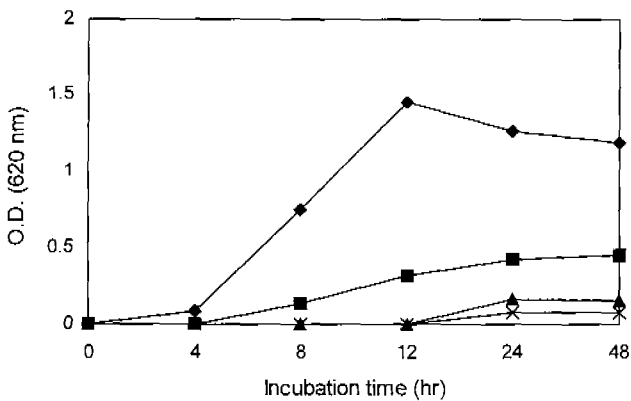


Fig. 3. Growth inhibition of *L. monocytogenes* on the media containing *Scutellariae Radix* extract. ◆: 0 ppm (control), ■: 500 ppm, ▲: 1,000 ppm, ×: 5,000 ppm.

또한 pH 안정성을 측정하기 위하여 황금추출물(1000 ppm)을 pH 4, 6, 7, 8, 10으로 처리한 후 37°C에서 1시간 방치한

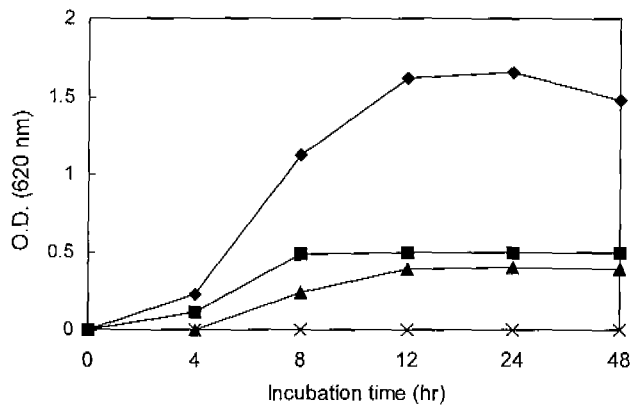


Fig. 4. Growth inhibition of *E. coli* on the media containing *Scutellariae Radix* extract. ◆: 0 ppm (control), ■: 500 ppm, ▲: 1,000 ppm, ×: 5,000 ppm.

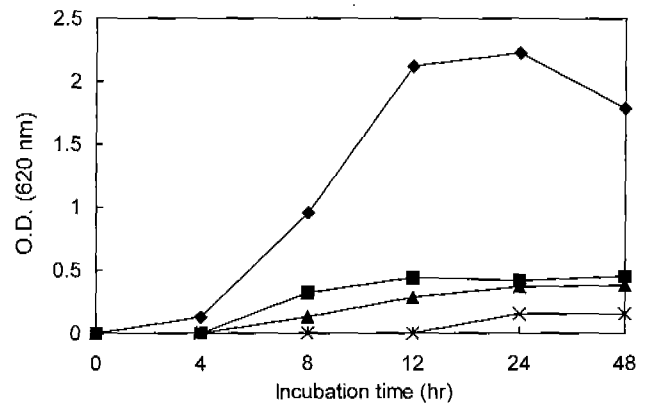


Fig. 5. Growth inhibition of *V. parahaemolyticus* on the media containing *Scutellariae Radix* extract. ◆: 0 ppm (control), ■: 500 ppm, ▲: 1,000 ppm, ×: 5,000 ppm.

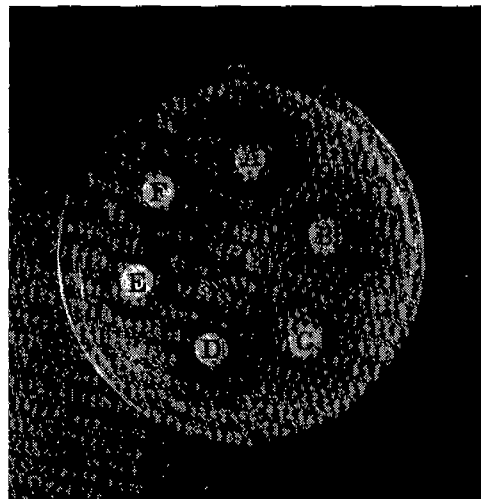


Fig. 6. Thermal stability of *Scutellariae radix* extract. *E. coli* was employed as a test organism. A: 40°C, B: 60°C, C: 80°C, D: 100°C, E: 120°C, F: 180°C.

후, pH 7로 중화시켜 생육 저해환을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. *E. coli*의 생육 저해환의 지름은 모두가 15 mm 정도로

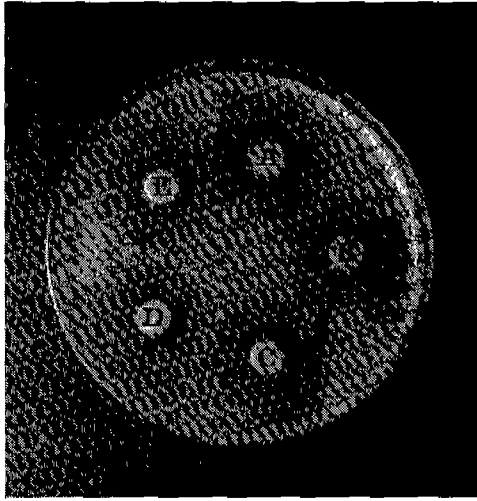


Fig. 7. pH stability of *Scutellariae radix* extracts. *E. coli* was employed as a test organism. A: pH 4, B: pH 6, C: pH 7, D: pH 8, E: pH 10.

서 처리하지 않은 대조구와 차이를 보이지 않았다.

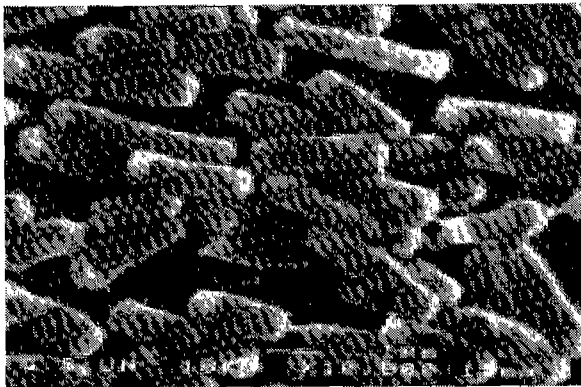
Fig. 6, 7의 결과들은 황금추출물이 열(40~180°C)이나 pH의 변화(pH 4~10)에 대하여 안정하다는 것을 보여준다. 이 같은 특성은 황금추출물을 여러 식품들에 첨가하여 가공하더라도 항균성분이 안정적으로 유지될 수 있음을 보여주는 것으로서, 식품첨가제로서 바람직한 가공특성으로 여겨진다.

황금추출물 처리에 의한 공시균주의 세포형태 변화

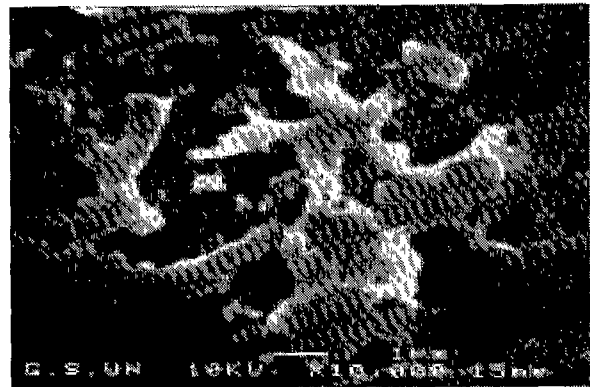
황금추출물의 처리로 인한 공시균주인 *E. coli* 세포들과 대조구 세포들을 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 8, 9와 같다. 주사전자현미경(SEM) 상에서는 황금추출물 처리구에 있어서 공시균주들의 세포막 파괴로 인해 세포형태가 변화된 것을 볼 수 있으며, 투과전자현미경(TEM) 상에서는 황금추출물 처리구에 있어서 공시균주들의 세포 내용물들이 용출되어진 것을 볼 수 있는 데, 이는 황금추출물 처리로 인한 세포막 기능의 파괴로 인한 것으로 추정되어진다.

β -galactosidase 활성 측정

황금추출물을 미생물 세포에 처리하였을 때, 세포막 손상 정도를 알아보기 위하여 황금추출물의 존재하에서 *E. coli*의

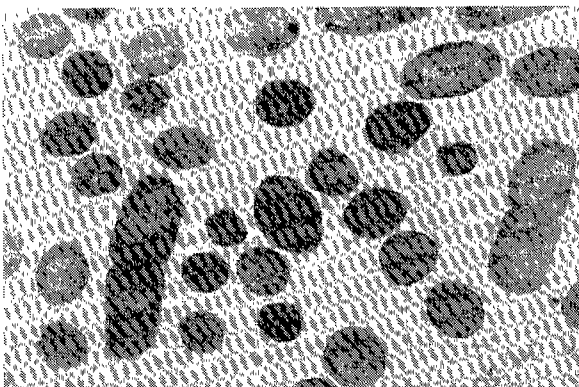


A



B

Fig. 8. Scanning electron micrographs of *E. coli*. Cells not-treated (A: control) and cells treated with *Scutellariae Radix* extract (B: 1000 ppm) (magnification: $\times 10,000$).



A



B

Fig. 9. Transmission electron micrographs of *E. coli*. Cells not-treated (A: control) and cells treated with *Scutellariae Radix* extracts (B: 1,000 ppm) (magnification: $\times 25,000$).

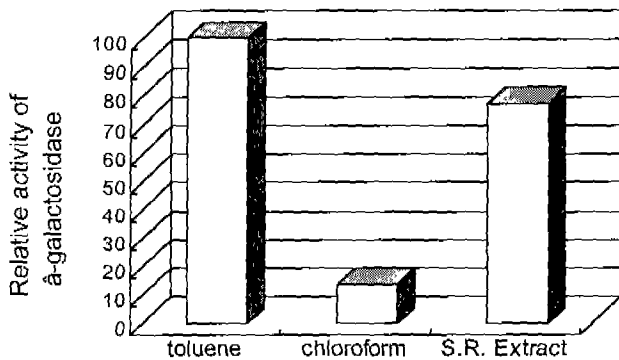


Fig. 10. The membrane perturbation effect of *Scutellariae Radix* extract on *E. coli* cells.

세포질에 존재하는 β-galactosidase 활성을 측정하였다. Fig. 10에서 보는 바와 같이, 증류수를 가해준 대조구에서의 값을 0으로 하고 toluene을 가해 준 시험구를 100으로 하였을 때, 황금추출물 처리구는 77.2%의 활성을 나타내었다. Chloroform을 처리하여 얻은 값이 10% 정도였는데, 이를 토대로 보면 황금추출물은 chloroform보다 세포막 손상효과가 더 강하며, toluene 처리구에 상응하는 세포막 기능파괴가 초래된 것으로 예상할 수 있었다. 이 결과는 전자현미경 실험결과와도 잘 일치하였으며, 이와 같은 항균작용에 의해 황금추출물이 항균작용을 가지는 것으로 추정되었다.

요 약

항균력이 있는 한약재를 중에서 추출수율과 항균력이 우수한 황금을 대상으로 식중독균에 대한 천연항균제의 적용 가능성을 검토하였다. 황금추출물의 항균작용을 알아보기 위하여 공시균주인 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*에 대하여 disk method에 의한 항균력 검사에서 생육억제로 인한 clear zone이 선명하게 관찰되어 황금추출물의 항균력을 알 수 있었고, 황금추출물의 열 및 pH 안정성을 검토한 결과 다양한 범위의 온도 및 pH에 대해서 매우 안정하다는 것을 확인하였으며, 공시균주들에 대한 유효저해농도를 측정한 결과 황금추출물의 농도 500 ppm 이상에서 생육이 억제되었다. 주사형전자현미경(SEM) 상에서는 처리구에서 공시균주들의 세포형태 변화를 볼 수 있었고, 투과형전자현미경(TEM) 상에서는 처리구에 있어서 공시균주들의 세포막 파괴로 인하여 세포내용물들이 용출된 것을 볼 수 있었다. 황금추출물 처리로 인한 세포막 손상정도를 확인하기 위하여 균체내 효소인 β-galactosidase 활성을 정량한 결과 chloroform보다 세포막을 더

손상시키는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 산학협동재단 학술연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Beuchat, L.R. and Golden, D.A.: Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, **43**, 134-142 (1989)
2. Dalgaard, P., Garcia Munoz, L. and Mejholm, O.: Specific inhibition of *Photobacterium phosphoreum* extends the shelf life of modified-atmosphere-packed cod fillets. *J. Food Prot.*, **61**, 1191-1194 (1998)
3. Cho, S.H., Chung, J.H. and Ryu, C.H.: Inhibitory effects of natural antimicrobial agent on postharvest decay in fruits and vegetables under natural low temperatures. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **23**, 315-321 (1994)
4. Park, W.W., Cho, S.W. and Lee, D.S.: Effect of grapefruit seed extract and ascorbic acid on the spoilage microorganism and keeping quality of soybean sprouts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1086-1093 (1998)
5. Sato, A., Terao, M., Kon, M. and Kobatake, M.: Antifungal activity garlic extract on yeast. *Jpn. J. Food Microbiol.*, **13**, 121-125 (1996)
6. Tansey, M.R. and Appleton, J.A.: Inhibition of antifungal growth by garlic extract. *Mycologia*, **70**, 397-401 (1978)
7. Oh, D.H., Ham, S.S., Park, B.K., Ahn, C. and Yu, J.Y.: Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 957-963 (1998)
8. Shin, D.W., Kim, M.S. and Han, J.S.: Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractions against food-borne bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 808-816 (1997)
9. Odachi, J., Ishii, E., Fukumoto, A. and Tanaka, M.: Antimicrobial activity of medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Seikatsu Eisei*, **37**, 15-19 (1993)
10. Park, W.Y., Chang, D.S. and Cho, H.R.: Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **21**, 91-97 (1992)
11. Lee, S.H. and Lim, Y.S.: Antimicrobial effect of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 239-243 (1998)
12. Chung, S.K., Lee, S.J., Chung, Y.J., Park, W.P., Lee, D.S. and Cho, S.H.: Antimicrobial effect of Korean medicinal herb extracts for preserving greenhouse fresh produce. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.*, **5**, 13-21 (1998)
13. Yook, C.S.: *Coloured medicinal plants of Korea*. Printed by academy, Seoul, p.14-595 (1989)
14. Davidson, P.M. and Parish, M.E.: Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, **43**, 148-155 (1989)

(2001년 7월 24일 접수)