

초석잠의 잎 추출물의 항균 활성

류병호* · 박범규

경성대학교 식품공학과

Antimicrobial activity of the hexane extract of *Stachys sieboldii* MIQ leaf

Beung-Ho Ryu* and Bub-Gu Park

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungshung University, 608-736, Busan Korea

Abstract

The present study was carried out for research and development of natural antimicrobial from extract of *Stachys sieboldii* MIQ against food borne bacteria. The hexane extract of *Stachys sieboldii* MIQ at 250 μ g/mL per disc showed 15~20 mm inhibition zone against gram positive and gram negative bacteria. Minimum inhibitory concentration (MIC) of hexane extract was 250 μ g/mL against *Bacillus cereus*, 250~500 μ g/mL against *Listeria monocytogenes*, 500 μ g/mL against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Observation by transmission electron microscope, showed that disruption of the cell wall assumed to be due to the bactericidal activity. In addition, the membrane integrity of the sensitive cells was disrupted by exposure to *Stachys sieboldii* MIQ extract on the D- β -galactosidase activity as substrate of O-nitrophenol- β -D-galacto-pyranoside. The hexane extract of *Stachys sieboldii* MIQ was very stable on the pH and thermal stability.

Key words – *Stachys sieboldii*., antimicrobial activity, bacteria

서 론

생활수준이 향상되면서 식생활의 안전성에 대한 관심이 높아지고 있는 가운데 인공합성 보존료가 함유하지 않은 식품에 대한 소비자의 선호도가 증가함에 따라 식중독 미생물로부터 안전성을 확보하기 위하여 천연 항균제의 개발이 진행되고 있다.

우리나라에 자생하는 많은 종류의 식물은 항균, 항암 및

항산화 활성을 가진 생리활성 물질이 함유되어 있어 적은 함량으로도 고부가 가치를 올릴수 있는 특성이 있다. 식물에 들어있는 항균 물질은 volatile oil, alkaloid, flavonoid, terpenoids 및 quinone 등 이차대사 산물 또는 그 유도체로 밝혀져 있다[1,3,4,8].

식물에서 항균물질이 밝혀진 마늘의 allicin[12], 해당화에서 sesquiterpene[6], 녹차의 gallic acid[11,13] 등이 있으며 그 항균 범위도 다양하다.

예로부터 질병 치료제로 사용되었던 여러 가지 한약재 중에서도 활성이 높은 것으로 황금[2], 오미자[10], 몰약[7], 대황 및 황련[6,9] 등은 광범위한 항균 효과를 나타낸다고

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 061-620-4712, Fax : 051-622-4986
E-mail : bhryu@star.ac.kr

보고하였다. 이와같이 우리나라에서도 자생하는 식물에 대한 항균활성에 관한 연구가 많이 보고 되고 있으나 항균물질을 분리·정제 및 확인에 대한 연구가 미흡하여 실용화 연구가 요구되고 있다[10].

천연항균 물질은 세균과 진균류의 생육을 동시에 생육을 저해시킬 수 있는 광범위한 항균스펙트럼이 요구되고, 장기간 소량씩 투여해도 내성이 없고 부작용이 없는 안전한 물질이어야 한다.

초석잠은 1년생 풀로서 여름에는 잎이 무성하고, 겨울에는 뿌리가 누에모양을 하고 있어 동충하초와 모양이 비슷하고 약효도 우수하여 식물의 동충하초라고 불리기도 한다. 초석잠은 중국의 중앙편에 의하면 뇌경색, 기억력 증진, 노인성 치매와 장을 강화하는 장수채(長壽菜)로서 옛날부터 애용해 왔다. 일본에서도 정월 요리에 귀하게 쓰이기도 하고 여러 가지 성인병과 만성병 치료에 유용하게 쓰이기도 하였다. 초석잠의 성분중 탄수화물은 감자와 같은 전분이 아니라 올리고당으로 장속의 유익 세균의 생육을 도와 장의 기능을 촉진하기도 한다.

중국 중약대사전에 소개된 초석잠의 효능을 보면 맛이 달며 담백하고 독이 없어 풍을 쫓고 어혈, 적혈을 풀며 기를 내리게 하고 신체의 조화를 이루게 하여 무병장수에 기여한다고 기록되어 있다. 또 사지무력증, 마비증, 전신 골절통, 관절염, 신경통 등을 치유하고 초석잠 즙액으로 눈병을 낫게 하고 간을 좋게 하는 작용이 있어 황달을 낫게 한다. 모든 중독증상에 초석잠이 좋다고 하였고 자양강장에 효과가 있어 허약증이나 감기에 일상으로 진하게 달여 먹으면 기운을 찾게 되고 기침도 멎는다고 하였다.

본 연구는 이와 같이 많은 효능에도 불구하고 아직까지 항균활성이나 생리활성 물질에 대한 연구가 진행되지 않은 초석잠으로부터 항균활성에 대하여 실험하였다.

재료 및 실험방법

재료

경남 밀양시 산외면 다원에서 직접 채배하여 사용하였다.

초석잠의 일반성분 및 Ethanol 추출물 조제

초석잠을 환류 냉각관을 부착한 flask내에 500g을 넣고

시료 중량의 10배량의 75% 에탄올을 가하여 60℃의 수욕상에서 12시간동안 2회 반복 추출하여 감압여과장치로 여과한 후, 여액을 감압 농축하고 이를 동결건조하여 4℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

초석잠 유기용매별 추출물의 분획

75% 에탄올 추출물을 다시 극성이 다른 용매를 사용하여 순차적으로 분획하였다. 에탄올 추출물과 헥산, 물을 1:10:10의 비율로 혼합하여 추출 분획한 후 진공 농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 다시 순차적으로 추출하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층 분획물을 얻은 후 농축하고 이를 동결건조 후 증발잔사의 양을 시료 건물량에 대한 백분율로 나타내어 수율을 계산하였다.

사용균주 및 분획물의 항균력 검색

항균시험에 사용된 균주 및 배지는 Table 1과 같으며 항균실험은 paper disc method를 이용하였다. 즉, 멸균된 tryptic soy agar(TSA, Difco)배지를 petri dish에 15mL 씩 분주하여 응고시키고, 별도로 tryptic soy broth(TSB, Difco)에서 35℃에서 24시간 전배양한 각종 시험균액을 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 중층용 배지를 5mL씩 기층용 배지 위에 분주하여 2종의 평판배지를 만들었다. 각 추출물을 멸균된 paper disc에 일정량씩 흡수시킨 후, TSA배지에 올려놓은 후, 35℃에서 24~48시간 배양하여 disc 주변의

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

Microorganisms	Media used
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	TSB & TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	TSB & TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	TSB & TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	TSB & TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43256	TSB & TSA
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	NB & NA
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33844	NB & NA
<i>Esherichia coli</i> BHR-12	TSB & TSA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSB & TSA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NB & NA

TSB & TSA : Tryptic soy broth/agar (Difco)

NB & NA : Nutrient broth/agar (Difco)

clear zone(mm)을 측정하였다.

분획물의 생육저해 효과

시료를 dimethylsulfoxide(DMSO)로 녹인 후 제균하고 농도별로 별균한 TSB 또는 nutrient broth(NB, Difco)에 첨가하여 혼합하였다. 각 시험균의 초기농도를 일정량 조절하여 접종하고 여기에 분획물을 일정 농도씩 각각 첨가하여 35°C에서 일정시간 배양하면서 각 시험균별로 1mL를 취하여 Spectrophotometer (DR-20, BASUSH & LOMB 국명)로 이용하여 흡광도 620nm를 측정하여 균의 생육을 나타내었다.

최소저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 한천 배지 확산 평판법(平板法)으로 측정하였다. 항균물질을 농도별로 각각 조절한 TSA 혹은 NB를 사래에 넣어 응고 시킨 후 미리 활성화 시킨 각 실험균의 배양액을 접종한 다음 35°C에서 24~48시간동안 배양하여 증식이 관찰되지 않은 농도로 결정하였다[5].

시료처리에 의한 전자 현미경의 관찰

항균활성 물질을 처리한 피검 대상세균의 세포의 변화를 관찰하기 위하여 투과 전자현미경(TEM, Transmission electron microscope, HitachiH-600, Japan)으로 측정하였다. 즉, 배양하여 동결한 미생물 세포의 절취한 부위를 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2) 고정액에서 2시간 전 고정하고, 완충액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)으로 10분씩 3회 세척한 후, 1% OsO₄ (25°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)에서 2시간동안 고정하였다. 고정이 끝난 시료는 동일 완충용액으로 수회 세척한 후 ethanol 농도 상승순으로 탈수하였으며, propylene oxide로 치환하여 Epon-812로 포매한 다음, 60°C oven에서 36시간 중합반응시켰다. 포매된 조직은 ultramicrotome (ULTRACUTE, Leica 국명)으로 초박절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 TEM으로 관찰하였다.

β-galactosidase 활성 측정

세포막 손상정도를 추정하기 위하여 균체 효소인 β-galactosidase(β-D-galactosidase galactohydrolase ; EC3.2.1.23, 이하, β-galactosidase)활성을 정량하였다. 공시균주로는 *E.*

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

열 및 pH 안정성 시험

열 안정성 시험을 위하여 *E. coli* 및 *L. monocytogenes*의 농도를 500 µg/mL으로 조절한 다음, 처리온도 40, 60, 80, 100, 120, 180°C에서 30분 동안 열처리한 후, 처리온도별로 paper disc법을 이용하여 실험하였다. pH 안정성은 분획물을 500 µg/mL 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 생육 저해 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

초석잠 및 에탄올 추출물의 유기용매 분획별 수율

초석잠 에탄올 추출물의 활성성분에 대한 특성을 검토하기 위하여 극성이 다른 유기용매인 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 순차적으로 추출하여 분획하였다(Fig. 1). 유기용매별 수율은 Table 2에서 보는바와 같이 물로써 추출한 경우 수율이 26.42%로 가장 높았으며, 헥산은 9.46%로 물층 다음이었고 에틸아세테이트, 부탄올의 수율은 각각 5% 정도 였다. 반면에 클로로포름 추출물의 수율은 4.53%로 가장 낮았다.

Table 2. The fraction yield of solvent fractions extracted from ethanol extracts of *Stachys sieboldii*

	Yield (% , w/w)
Hexane	9.46
Chloroform	4.53
Ethylacetate	5.74
Butanol	5.33
Water	26.42
Total	51.48

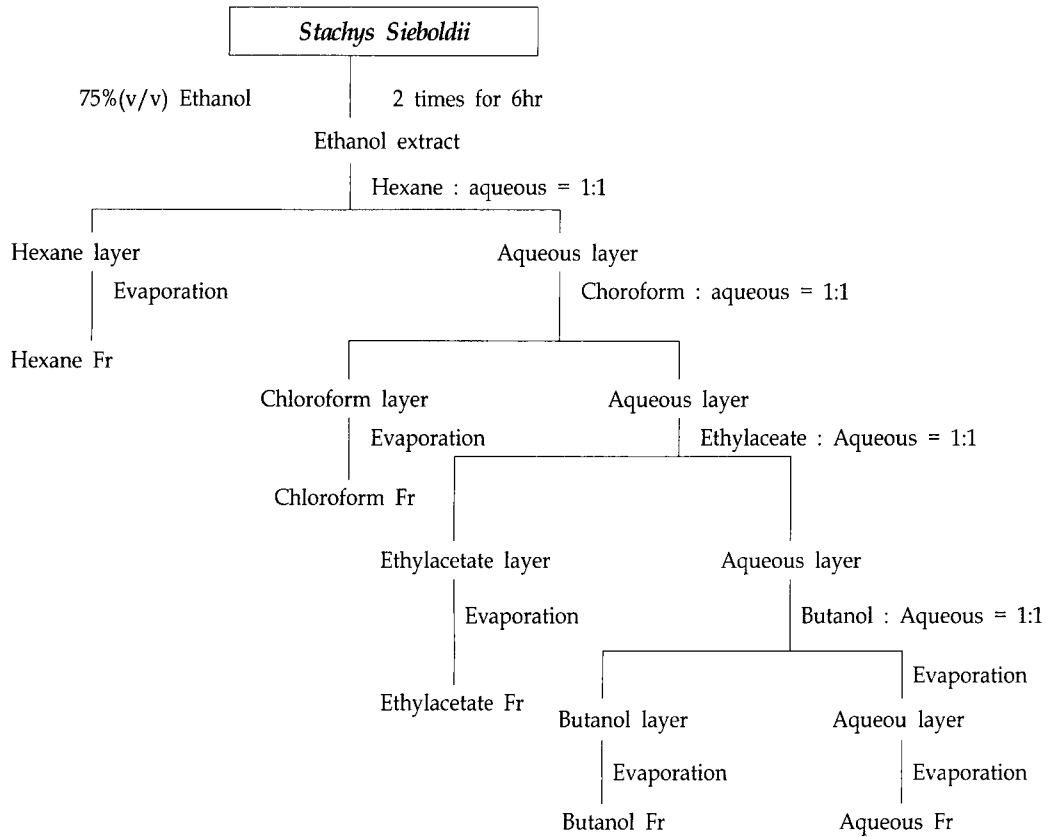


Fig 1. Isolation flow diagram of the antimicrobial compound of various organic solvent obtained from *Stachys sieboldii*.

초석잠 유기용매별 추출물의 항균검색

초석잠 에탄올 추출물의 미생물의 종류별 항균력을 조사한 결과 Table 3에 나타내었다. 초석잠 잎 에탄올 추출물은 1,000 µg/disc의 농도에서 *Bacillus cereus* ATCC 13720와 *Streptococcus aureus* ATCC 25923에 대해 19 mm의 생육억제대를 나타내었고, *Listeria monocytogenes*에 대해서는 균주별로 18~21 mm의 생육억제대를 나타내었다. 그리고 *Escherichia coli* BHR-12 및 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에 대하여 각각 15 mm, *Salmonella enteritidis* ATCC 14028의 경우 18mm의 생육억제대를 나타내어 초석잠 잎 에탄올 추출물은 그람 양성 및 음성균에 대해 항균활성이 있는 것으로 확인되었다.

초석잠 hexan 분획물의 항균성 검색

초석잠의 항균성 물질의 분리 초기 단계로써 에탄올 추출물로부터 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 층

Table 3. Antimicrobial activity of ethanol extract of *Stachys sieboldii* on microorganisms

Microorganisms ¹⁾	Clear zone(mm) ²⁾
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	20
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43256	21
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	21
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	18
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15114	20
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	18
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13720	19
<i>Esherichia coli</i> BHR-12	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15
<i>Vibro parahaemolyticus</i> ATCC 33844	15

¹⁾Final cells concentration for each bacterium was approximately 1.0×10^6 cells/mL.

²⁾One thousand µg of extract was absorbed into paper disc (φ 8mm) and the diameter of clear zone was measured.

으로 순차 분획한 후 각 분획물에 대하여 항균 활성을 측정한 결과는 Table 4에 나타내었다. 헥산 분획물에서 강한 항균활성을 나타내었으나 클로로포름 분획물에서는 약간의 항균력을 나타내었고 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물의 경우 모든 대상 실험군에서는 항균활성이 거의 나타나지 않았다.

헥산 분획물은 에탄올 추출물의 항균력 검사시 항균효과를 나와낸 있었던 모든 대상 균주에 대하여 항균력을 나타내었으며 비교적 그람 음성세균보다 그람 양성세균에 대하여 더 강한 항균 활성을 나타내었다. 그리고 모든 대상 균주들 중에서 비교적 항균력이 높게 나타난 *Listeria monocytogenes*는 균종별로 항균활성의 차이는 보였으나 생육 억제대(inhibition zone)가 14 mm 이상이 되는 균주는 ATCC 19111, 43256 및 15114으로 나타내었다. 그람 음성세균에 대한 항균 활성은 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 및 *Escherichia coli* BHR-12 균에 대하여 생육 억제대가 12 mm로 나타내어 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에 비해 다소 항균 활성이 약간 높은 것으로 나타내었다.

클로로포름 분획물의 경우, 그람 음성세균의 경우 헥산 분획물에 비하여 비교적 항균 활성이 떨어짐을 보여주고 있다. 그러나 헥산 분획물이 *Listeria monocytogenes*의 모든 균종별에 따른 항균 활성을 나타내었으나, 클로로포름 분획물에서는 *Listeria monocytogenes* 균주 중 3개의 균주에 대해서만 약간의 항균 활성을 나타내었다. 결론적으로 초석잠의 각종 유기용매 추출물이 초석잠 에탄올 추출물보다

상대적으로 항균활성이 낮게 나타난 것은 추출 분획 과정에서 항균 활성 성분이 헥산과 클로로포름 층으로 이동했기 때문으로 생각된다.

초석잠의 분획물의 최소 저해 농도 및 생육 저해 효과

초석잠의 용매 분획물에 대한 대상 세균의 최소 저해 농도와 농도에 따른 생육 억제 효과를 조사한 결과를 Table 5에서 보는 바와 같이 paper discs 방법을 사용한 결과와 일치 함을 알 수 있었다. 에탄올 추출물로부터 얻은 헥산 분획물에서는 *B. cereus* ATCC 13720 와 *L. monocytogenes* 균 중에서 ATCC 43256, ATCC 15113, ATCC 19111 균이 250 µg/mL 농도에서 생육 억제를 위한 최소 저해농도를 나타내고 있으나 *L. monocytogenes* 15313, 15313, 및 *S. aureus* ATCC 25923 및 *S. typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* BHR-12 및 *P. aeruginosa* ATCC 27853 균의 최소저해 농도는 500 µg/mL이었다. 클로로포름의 희분인 경우 *L. monocytogenes* ATCC 19111, 15313 및 *L. monocytogenes* ATCC 43256 균에서는 500 µg/mL의 농도로서 최소 저해 농도를 나타내었다. 그 외 에틸 아세테이트, 부탄올 분획물에서는 500 µg/mL 이하의 농도에서는 항균활성이 전혀 나타나지 않았다.

시험 대상균주의 생육저해 범위

초석잠의 헥산 분획물이 최소 저해농도를 경시적으로 억제하는 범위를 Fig. 2에 나타내었다. 생육저해 스펙트럼

Table 4. Antimicrobial activities of different solvent fractions obtained from *Stachys sieboldii* on test microorganisms

Microorganisms	Solvents				
	Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol	Water
<i>B. cereus</i> ATCC 13720	14	9	ND	ND	ND
<i>S. cereus</i> ATCC 25923	14	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	14	10	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 43256	14	10	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15113	12	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15114	14	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	13	9	ND	ND	ND
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	12	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> BHR-12	12	ND	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	ND	ND	ND	ND

Not detected

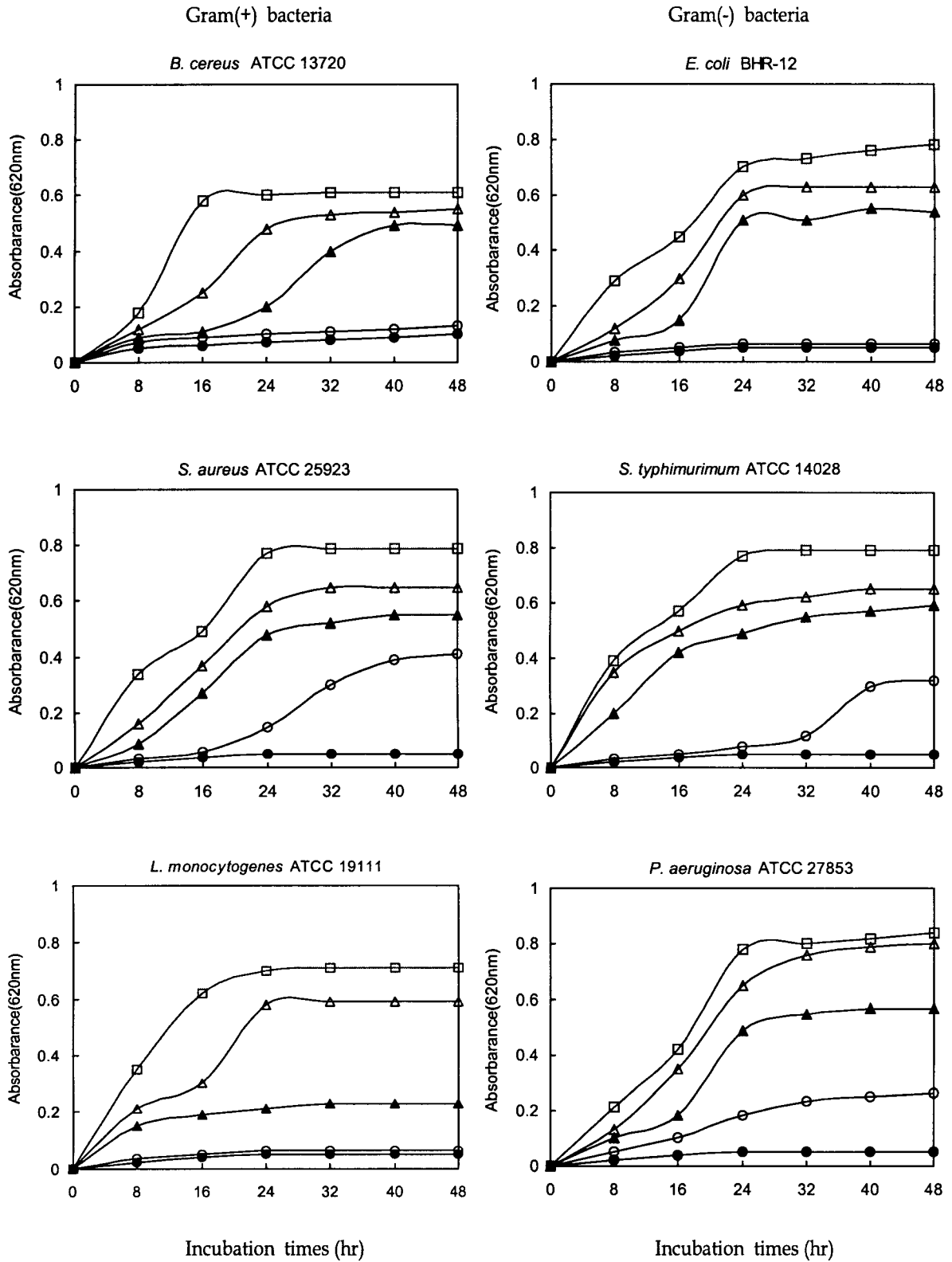


Fig 2. Growth inhibition effect of n-hexane fraction from on various pathogenic bacteria
 ●-●: 500µg/mL, ○-○: 250µg/mL, △-△: 150µg/mL, ▲-▲: 100µg/mL, ◆-◆: 50µg/mL, ■-■: Control

Table 5. Minimal inhibitory concentrations(MIC) of different solvent fractions obtained from *Stachys sieboldii* on test microorganism

Microorganisms	Solvents fraction			
	Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol
<i>B. cereus</i> ATCC 13720	250	500	>500	>500
<i>S. cereus</i> ATCC 25923	500	>500	>500	>500
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	250	500	>500	>500
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 43256	250	500	>500	>500
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15113	500	>500	>500	>500
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15114	500	>500	>500	>500
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	250	>500	>500	>500
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	500	>500	>500	>500
<i>E. coli</i> BHR-12	500	>500	>500	>500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	>500	>500	>500

을 보면 핵산 분획물을 50, 100, 150, 250 및 500 µg/mL씩 각각 첨가하여 시간경과에 따른 생육 저해도를 보면 그람 양성균 중 500 µg/mL의 핵산 분획물을 첨가한 결과 *B. cereus* ATCC 13720의 경우 균을 접종한 다음 배양시간의 경과에 따른 억제효과를 보면 50, 100, 150 µg/mL 첨가시 8시간 경과 후 서서히 증식하다가 16시간 이후 부터는 증식억제 효과가 없었으나 250 µg/mL 첨가시에는 48시간 경과후까지 생육이 억제 되었으며 500 µg/mL 첨가시에는 48 시간 경과시까지 증식억제 효과가 있었다.

Staphylococcus aureus ATCC 25923의 경우 핵산 추출물을 50, 100 및 150 µg/mL 첨가시 배양 8 시간 경과시까지 증식억제 효과가 있었으나 배양시간이 길어질수록 증식억제 효과는 찾아 볼수 없었다. 그리고 핵산 추출물은 250 µg/mL 첨가시에는 배양 16시간 경과시까지 상당한 증식억제효과를 나타내었으나, 배양 40시간 경과시에는 다소 증식하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 핵산 추출물을 500µg/mL 첨가했을 경우 우수한 항균활성을 나타내었다.

또한 *L. monocytogenes* ATCC 19111의 경우에는 핵산 추출물을 50, 100 및 150 µg/mL씩 각각 첨가하였을때 배양 16시간 경과후부터 증식억제 효과가 없었으나 핵산추출물을 250 및 500 µg/mL 씩 각각 첨가하여 배양한 경우 48시간까지 생육이 완전히 억제됨을 알수 있었다. 그람 음성 세균의 경우 우선 *S. typhimurium* ATCC 14028 에 대한 핵산 추출물을 50, 100 및 150 µg/mL 씩 각각 첨가하여 첨가 농도별에 따른 증식 억제 효과는 매우 미약하였으나 핵산

추출물 250 µg/mL을 첨가하여 배양한 경우 배양 24시간 까지는 항균 억제효과를 나타내었으나 40시간 이후부터는 억제효과를 찾아볼 수 없었다.

E. coli BHR-12 의 경우에도 핵산 추출물을 50, 100 및 150 µg/mL 첨가하였을 때는 증식억제 효과가 없었으나 핵산 추출물 250, 500 µg/mL을 각각 첨가하여 실험한 결과 배양경과 48시간 까지는 거의 완전한 생육억제효과를 나타 냈었다. 또한 *P. aeruginosa* ATCC 27853의 경우는 핵산 추출물을 50, 100, 150 및 250 µg/mL 씩 각각 첨가하였을 때 항균활성이 없었으나, 핵산 추출물을 500 µg/mL 첨가한 경우 배양 48시간 경과시까지 항균억제 효과가 있었다. 이러한 결과는 초석잠 잎 핵산 추출물 500 µg/mL의 농도에서 강한 항균력을 가지고 있으므로 향후 상업적으로 새로운 천연 보존재료의 가능성을 나타내고 있다.

초석잠의 핵산 획분 처리시 세포의 형태변화

초석잠의 핵산 분획물의 항균에 관여하는 기작을 확인 하고자 공시균주로 *L. monocytogenes*의 세포에 핵산 획분을 각각 500 µg/mL 농도로 첨가하여 32°C에서 12시간 증식시킨 균체의 표면을 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3. A에서 보는바와 같이 초석잠 핵산 획분을 처리하지 않은 정상적인 *L. monocytogenes* 세포를 관찰한 결과 균체의 표면이 본래의 형태를 볼 수 있고 세포내부의 내용물도 정상적으로 차있는 형태를 관찰 할 수 있었으나 핵산 획분을 처리한 세포를 전자현미경으로 관찰한 결과

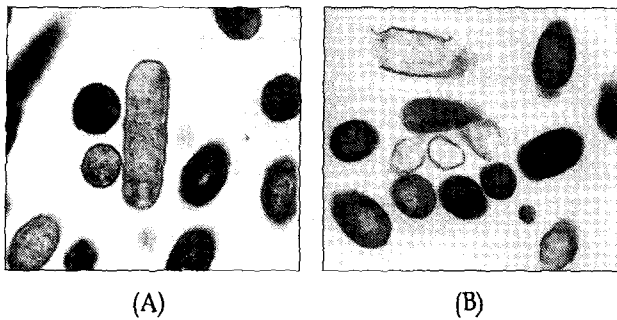


Fig. 3. Transmission electron micrograph of *Listeria monocytogenes* ATCC. (A), Normal cells control B, cells treated with hexane extracts obtained from *Stachys sieboldii*. Incubation with cells was 24h at 35°C.

Fig. 3. B에서 보는 바와 세포의 세포막 구조가 흐트러지면서 세포내 내용물이 유출된 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 초석잠 헥산 추출획분의 처리로 인한 세포막이 파괴되어 일어나는 현상으로 추정할 수 있다. 이는 상백피 추출물이 *L. monocytogenes* 및 황금 추출물이 *Salmonella choleraesuis* 등 미생물의 세포막을 파괴하여 미생물의 세포내 내용물이 유출되면서 항균효과를 나타낸다는 보고와 유사한 현상으로 볼 수 있다[2].

β -galactosidase 활성측정

초석잠 헥산 추출물을 미생물 세포에 처리하였을 때, 세포막 손상정도를 알아보기 위하여 초석잠 헥산 추출물의 존재하에서 *L. monocytogenes*의 세포질에 존재하는 β -galactosidase 활성을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와

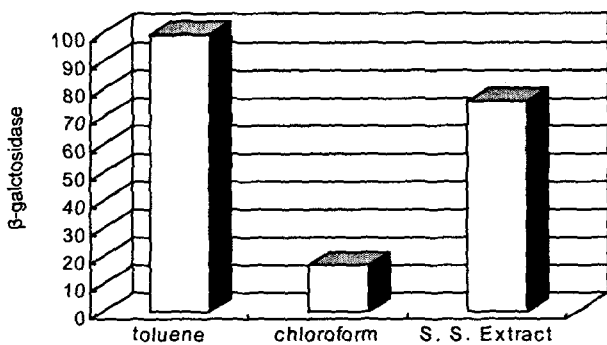


Fig 4. Membrane perturbation effect by extract *Stachys sieboldii* leaf on *L. monocytogenes* cells.

같이, 증류수를 가해준 대조구에서의 값을 0으로 하고 toluene을 가해 준 시험구를 100으로 하였을 때, 초석잠의 헥산 추출물 처리구는 68%의 활성을 나타내었다.

Chloroform을 처리하여 얻은 값이 12% 정도였는데, 이를 토대로 보면 초석잠 헥산 추출물은 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 초석잠 헥산 추출물이 항균작용을 가지는 것으로 추정되었다.

초석잠 헥산 분획물의 열 및 pH 안정성

초석잠 헥산 분획물에 대해서 열 안정성을 측정하기 위하여 분획물을 500 μ g/mL농도를 60, 80, 100, 120 및 180°C에서 30분간 열처리 한 후 paper disc 법으로 생육저해 여부를 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 시험균주인 *L. monocytogenes*의 생육저해를 검사한 결과 모든 처리구에서 온도와 관계없이 생육 저해환이 17~19 mm이었다. 한편 pH 안정성을 확인하기 위하여 초석잠 잎 분획물을 500 μ g/mL을 pH 4, 6, 7 및 8으로 처리한 후 1시간 방치한 후 pH 7로 중화한 다음 24시간 배양한 후 생육 저해환을 조사한 결과 생육 저해환이 17~19 mm정도이어서 분획물로서 처리하지 않는 대조구와 차이를 찾아 볼 수 없었다. 이러한 결과는 초석잠 분획물이 열이나 pH에 안정하므로 식품의 조리, 가공시 첨가하여도 항균성분이 그대로 유지 될 수 있을 것으로 생각되어 천연 식품 항균제로써 이용할 수 있을 것이다.

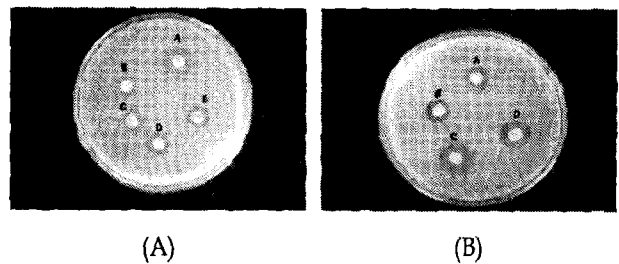


Fig. 5. Thermal (A) and pH(B) stability of hexane extract of *Stachys sieboldii* L. *Monocytogenes* was employed as test.

(A) L. temperatures; A: 60°C, B: 80°C, C: 100°C, D: 120°C, E: 180°C, (B) pH stability; A: pH 4, B: pH 6, C: pH 7, D: pH 8.

요 약

초석잠 핵산 추출물이 식중독균에 대한 천연 항균 활성 가능성을 검토하였다. 초석잠 핵산 추출물의 항균 작용을 알아보기 위하여 공시 균주인 *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* 및 *Listeria monocytogenes* 등에 대하여 disc법으로 실험한 결과 그람 음성 및 그람 양성균에 대하여 15~20 mm의 clear zone이 나타났다. 초석잠 핵산 추출물의 MIC는 *Bacillus cereus*에 대해 250 μ g/mL, *Listeria monocytogenes*에 대해 250~500 μ g/mL 그리고 *Staphylococcus aureus*와 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 각각 500 μ g/mL을 나타내었다. 초석잠 추출물을 처리한 전자현미경(TEM)상에서는 처리균주들의 세포막이 파괴되어 세포내용물이 용출된 것을 볼 수 있었다. 초석잠 추출물을 처리한 균주의 세포막 손상의 정도를 알아보기 위하여 균체내 효소인 β -galactosidase 활성을 측정된 결과 클로로포름보다 세포막을 더 손상시키는 것이 확인되었다. 그리고 초석잠 추출물의 pH 및 열 안정성을 실험한 결과 매우 안정하였다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 농림부 농림기술관리센터의 지원으로 수행되었으며 연구지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Beuchat, L. R. and D. A. Golden. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* **43**, 134-142.
2. Cho, S. H. and Y. R. Kim. 2001. Antimicrobials characteristics of *Scutellariae Radix Extract* **30**, 964-968.
3. Clark, A. M. and F. S. 1994. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. *J. Pharm. Sci.* **70**, 951-952.
4. Conner, D. E. L. R. and R. Beuchat. 1984. Effects of essential oils from plants growth of food spoilage yeast. *J. Food Sci.* **49**, 428-434.
5. Davidson, P. M. and M. E. Parish. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* **43**, 148-155.
6. Demizu, D., K. Kajiyama, K. Takahashi, Y. Hiraga, S. Yamamoto and T. Kinoshita. 1988. Antioxidant and antimicrobial constituents of Licorice. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 3474-3479.
7. Han, J. S., D. H. Sin and N. I. Beak. 2001. Identification of growth inhibitory substance on food borne microorganisms from *Commiphora molmol* and its application to food products, Korean, *J. Food Sci. Technol.* **33**, 401-408.
8. Larry, R. B. and A. G. David. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *J. Food Tech. Jan.* **8**, 134-142.
9. Lee, S. H. and Y. R. Kim. 1998. Antimicrobials effect of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 239-243.
10. Odachi, J., E., Ishii, A. Fukumoto and M. Tanaka, 1993. Antimicrobial activity of medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Seikatsu Eisei.* **37**, 15-19.
11. Park, C. S. and M. S. Cha. 2000. Comparison of antibacterial activities of green tea extracts and preservatives to the pathogenic bacteria, *Korean J. Food Nutr.* **13**, 36-44.
12. Robert, A. F. and G. S. Bulmer, 1988. In vitro effect of aqueous extract of gallic on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **70**, 397-405.
13. Roh, H. J., Y. S., Shin, K. S. Lee and M. K. Shin, 1996. Antimicrobial activities of water extract of green tea against cooked rice putrefactive microorganism. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 66-71.

(Received October 8, 2002; Accepted December 23, 2002)