

## 산수유의 용매분획별 항균활성

김용두<sup>†</sup> · 김황곤 · 김경제

순천대학교 식품공학과

### Antimicrobial Activity of Solvent Fraction from *Cornus officianalis*

Yong Doo Kim<sup>†</sup>, Hwang-Kon Kim and Kyung Je Kim

Dept. of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

#### Abstract

To develop natural food preservatives, ethanol and water extracts were prepared from the cornus (*Cornus officianalis*) and antimicrobial activities were examined against 10 microorganisms which were food borne pathogens and/or food poisoning microorganisms, food-related bacteria and yeasts. Ethanol extract exhibited antimicrobial activity for the microorganisms tested, except lactic acid bacteria and yeast. Especially, minimum inhibitory concentrations (MIC) of the ethanol extracts were determined as 0.25 mg/mL against bacteria and 2 mg/mL against target lactic bacteria and yeasts. Antimicrobial activity of the ethanol extracts were not destroyed by the heating at 121°C for 15 min and not affected by pH. The ethanol extract of cornus exhibiting high antimicrobial activities were fractionated in the other of diethylether and butanol fractions to test antimicrobial activity. The antimicrobial activity adjust bacteria test was highest in the ethanol fraction.

**Key words:** *Cornus officianalis*, extract, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentrations (MIC), isolation

#### 서 론

식품의 미생물에 의한 부패와 변질을 방지할 목적으로 일부 식품에 인공합성 보존료를 첨가하고 있으나 최근 식품에 대한 건강 지향적인 욕구에 따라 화학적 합성 첨가물의 안전성이 문제시되어 합성 첨가물을 기피하는 현상이 강하게 일어나고 있다. 이러한 취지에서 인체에 무해하면서 변패를 억제하고 유통기한을 늘릴 수 있는 천연 보존료의 개발 필요성이 점차 강해지고 있는 실정이다(1,2). 식물 추출물이 항균활성을 갖고 있다는 것은 오래 전부터 알려져 왔고 그 대표적인 것이 향신료들이다(3). Ueda 등(4)은 각종 향신료들의 항미생물작용에 관하여 山下(5)는 향신료를 이용한 천연계 보존제를 보고하였고 최근들어 식물성 한약재 및 약용식물에서도 항균작용을 나타낸다는 연구들이 보고되고 있다. Ahn 등은 감초(6)와 고삼(7)에서 항균효과가 있다고 보고하였고, Lee와 Cho(8)는 마두령 추출물에서 Chung 등(9)은 오미자의 추출물에서 Kim 등(10)은 민들레 추출물에서 항균활성을 보고하였다.

지금까지 산수유에 관한 연구자료는 가공에 관한 연구와 한방 재료에 관한 연구가 있을 뿐이며 응용적인 면에서는 아직 미흡한 편이다. 따라서 본 연구에서는 천연 보존료 개발의 일환으로 산수유 열매의 추출물과 분획물을 몇 종의 병원균

과 식중독균, 식품과 관련이 있는 10개 균주에 대한 항균활성 검색과 항균성이 강한 에탄올 추출물의 최소화해농도, 추출물에 함유된 항균활성 물질의 열과 pH 안정성을 조사하여 산수유의 항균활성 물질을 식품 보존료의 이용 가능성 검정을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 실험에 사용한 산수유는 전남 구례군 산동면(2002년도 산)에서 수확한 것을 과육과 씨로 분리하고 -20°C 냉장고에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

##### 사용균주 및 시약

시험에 사용한 균주는 그람양성균 3종, 그람음성균 3종, 젖산균 2종 및 효모 2종 등 총 10종을 선정하여 사용하였다.

균 생육매지로 세균은 Nutrient broth와 agar(Difco), 젖산균은 Lactobacillus MRS broth와 agar(Difco), 효모는 YM broth와 agar(Difco)를 각각 사용하였다.

##### 산수유의 용매별 추출물

산수유 과육과 씨의 물추출물은 시료 1 kg에 증류수 3 L를 첨가하여 마쇄한 다음 상온에서 24시간 동안 교반, 침출시켜

<sup>†</sup>Corresponding author. E mail: kyd4218@suncheon.ac.kr  
Phone: 82 61 750 3256, Fax: 82 61 750 3208

1차 추출하고, 다시 증류수 3 L를 가하여 동일한 방법으로 2차 추출한 후, 추출액 모두를 여과하였다. 이 여액을 회전감압농축기로 50°C 수욕상에서 농축하여 얻은 점조성의 추출물을 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 에탄올과 에칠아세테이트, 디에칠에테르 추출물 역시 물 추출물과 같은 방법으로 추출하여 농축한 후, 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 에탄올 추출물의 용매분획

산수유 1 kg을 상기 방법으로 에탄올 추출물 256.0 g을 얻은 후 용매분획하였다. 즉, 에탄올 추출물을 분획여두에서 핵산:에탄올:물(10:1:9 v/v) 1 L씩 3회 추출, 농축하여 핵산 추출 분획물 36.0 g을 얻었고, 계속해서 같은 방법으로 수층을 에테르 및 에칠아세테이트로 용매분획한 다음 농축하여 각각 28.0 g, 84.0 g을 분획물을 얻었으며, 최종적으로 물 분획물 108.0 g을 얻어 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 항균력 측정

항균성 시험용 평판배지는 각각의 생육배지로 멸균된 기층용 배지를 petri dish에 15 mL씩 분주하여 응고시키고, 중층용 배지를 각각 5 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한 후, 45°C 수욕상에서 보관하면서 각종 시험균액(멸균식염수로 균현탁액을 만들어 균 농도를 660 nm에서 흡광도가 0.3이 되게 한 균 현탁액) 0.1 mL를 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 기층용 배지 위에 분주한 뒤 고르게 응고시켜 이층의 균 접종 평판배지를 만들어 사용하였다. 추출된 항균성 물질의 항균력 검색은 한천배지 확산법(11,12)으로 측정하였다. 추출물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정은 한천배지 희석법으로 측정하였는데, 추출물의 고형물 함량을 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/mL이 되도록 조절한 고체배지를 petri dish에 부어 고르게 펴서 응고시킨 후 전배양된 시험균액을 0.1 mL씩 접종한 다음 30°C에서 20시간 배양하여 균주 증식이 되지 않은 농도로 결정하였다(13-16).

#### 항균성 물질의 열 및 pH 안정성 측정

산수유 추출물 중 항균활성을 나타내는 물질의 열 안정성은 산수유의 에탄올 추출물을 50~100°C까지 10°C 간격으로 각각 1시간 동안, 121°C에서 15분 동안 열처리한 후 대조구와 같이 한천배지 확산법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다. 또한 pH 안정성은 산수유의 에탄올 추출물을 염산과 수산화나트륨으로 pH 3~11까지 조절하고 상온에서 1시간 방치한 후, 다시 각 균주의 최적 pH로 중화시켜서 열 안정성과 동일한 방법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다.

### 결과 및 고찰

#### 산수유 추출물의 항균력 검색

추출 용매에 따른 항균활성 물질의 추출능을 확인하기 위하여 산수유의 과육과 씨로부터 에탄올, 물, 에칠아세테이트, 디에칠에테르 추출물의 항균활성 검색 결과는 Table 1과 같

Table 1. Antimicrobial activity of the solvent extracts of *Cornus officianalis*

| Strains                 | Clear zone on plate (mm) <sup>1)</sup> (1.0 mg/disc) |                 |                |    |                        |                        |                  |
|-------------------------|--|-----------------|----------------|----|------------------------|------------------------|------------------|
|                         | Ethanol extracts                                     |                 | Water extracts |    | Ethyl acetate extracts | Diethyl ether extracts |                  |
|                         | F <sup>2)</sup>                                      | S <sup>3)</sup> | F              | S  | F                      | S                      |                  |
| <i>B. cereus</i>        | 25   | 16              | 24             | 14 | 21                     | 14                     | 10 <sup>4)</sup> |
| <i>B. subtilis</i>      | 24   | 15              | 24             | 14 | 20                     | 12                     | 10               |
| <i>S. aureus</i>        | 26   | 15              | 25             | 14 | 21                     | 13                     | 11               |
| <i>E. coli</i>          | 25   | 15              | 25             | 16 | 21                     | 14                     | 13               |
| <i>S. typhimurium</i>   | 23   | 14              | 24             | 15 | 20                     | 11                     | 10               |
| <i>P. fluorescens</i>   | 24   | 15              | 24             | 15 | 21                     | 12                     | 11               |
| <i>L. plantarum</i>     |  |                 |                |    |                        |                        |                  |
| <i>L. mesenteroides</i> |  |                 |                |    |                        |                        |                  |
| <i>S. cerevisiae</i>    |  |                 |                |    |                        |                        |                  |
| <i>H. anomala</i>       |  |                 |                |    |                        |                        |                  |

<sup>1)</sup>In diameter (mm).

<sup>2)</sup>F: Flesh of *Cornus officianalis*.

<sup>3)</sup>S: Seed of *Cornus officianalis*.

<sup>4)</sup>: no clear zone.

다. 산수유의 에탄올 추출물과 물 추출물에서는 사용된 총 10균주 중 젖산균과 효모를 제외한 대부분의 세균들에 대해 산수유 과육, 씨 모두에서 항균활성을 보였으나 과육에서 더 강한 항균활성을 보였으며, 전반적으로 그람양성균이 그람 음성균보다 감수성이 더 크게 나타났다. 그러나 극성이 낮은 용매 추출물일수록 항균활성은 약해지므로 산수유의 주 항균성 물질은 극성이 낮은 디에칠에테르보다는 에탄올이나 물에 잘 녹는 물질로 추정된다. 이와 같은 결과는 Lee와 Shim (17)의 식품 부패 미생물을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색, Hong 등(18)의 유백피의 연구, Park 등(19)의 한약재 추출물의 항균효과 검색에서 그람음성균보다 그람양성균에서 항균활성이 더 크게 나타난다는 결과와도 비슷하게 나타났으며, 산수유 항균성 물질 추출에는 에탄올이 더 적절한 용매로 생각된다. 산수유의 과육과 씨에서 추출된 항균활성 물질이 대장균, 살모넬라에도 항균활성이 나타나므로, 부패 및 식중독균의 생육 억제에 효과가 있을 것으로 생각된다.

#### 산수유 에탄올 추출물 분획의 항균활성

산수유의 과육과 씨 에탄올 추출물 중에 항균성 물질을 용매계통 분획하여 얻은 핵산, 디에칠에테르, 에칠아세테이트 및 물 분획물의 항균 활성을 disc plate method에 의한 생육 저지환을 측정하여 각 균주에 대한 억제 효과를 검색한 결과는 Table 2와 같다. 세균의 경우 그람양성균과 그람음성균 모두 물과 에칠아세테이트 분획물에서 생육억제효과가 크게 나타났는데, 특히 과육의 에칠아세테이트 분획물에서 *S. aureus* 균주에서 억제환의 크기가 22 mm로 가장 높게 나타났다. 또한 그람양성균과 그람음성균에서 모두에서 항균활성이 나타났다. 이상의 결과로 산수유 과육과 씨의 용매별 분획물은 과육이 씨보다 훨씬 강한 항균활성을 나타냈고, 극성 용매인 물 분획물이 비극성인 디에칠에테르에 비해서 강한

**Table 2. Antimicrobial activity of fractions from ethanol extracts of *Cornus officianalis* against target microorganisms**

| Strains                 | Clear zone on plate (mm) <sup>1)</sup> (1.0 mg/disc) |                 |                       |     |                       |     |               |     |
|-------------------------|--|-----------------|-----------------------|-----|-----------------------|-----|---------------|-----|
|                         | n Hexane extract                                     |                 | Diethyl ether extract |     | Ethyl acetate extract |     | Water extract |     |
|                         | F <sup>2)</sup>                                      | S <sup>3)</sup> | F                     | S   | F                     | S   | F             | S   |
| <i>B. cereus</i>        | 4)   |                 | 13                    |     | 21                    | 9   | 21            | 8.5 |
| <i>B. subtilis</i>      |  |                 | 12                    |     | 20                    | 8.5 | 20            | 9   |
| <i>S. aureus</i>        |  |                 | 15                    | 8.5 | 22                    | 9   | 20            | 9.5 |
| <i>E. coli</i>          |  |                 | 16                    |     | 21                    | 9   | 20            | 9   |
| <i>S. typhimurium</i>   |  |                 | 15                    |     | 20                    | 8.5 | 19            | 8.5 |
| <i>P. fluorescens</i>   |  |                 | 13                    |     | 21                    | 8.5 | 21            | 8.5 |
| <i>L. plantarum</i>     |  |                 |                       |     |                       |     |               |     |
| <i>L. mesenteroides</i> |  |                 |                       |     |                       |     |               |     |
| <i>S. cerevisiae</i>    |  |                 |                       |     |                       |     |               |     |
| <i>H. anomala</i>       |  |                 |                       |     |                       |     |               |     |

<sup>1)</sup>In diameter (mm).

<sup>2)</sup>F: Flesh of *Cornus officianalis*.

<sup>3)</sup>S: Seed of *Cornus officianalis*.

<sup>4)</sup>: no clear zone.

항균활성을 보였으므로, 산수유의 과육과 씨 에탄올 추출물에 함유된 항균성 물질은 극성이 강한 것으로 추정할 수 있다. 또한 균주별로는 그람양성과 그람음성에 둘다 항균활성이 나타났으며, 효모와 젖산균에서는 항균활성이 없었다.

**에탄올 추출물의 미생물에 대한 최소저해농도**

항균활성 검색에 사용된 10 균주에 대해서 항균활성이 우수하였던 산수유 과육의 에탄올 추출물의 최소저해농도를 조사하기 위하여 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL 농도별로 측정된 결과는 Table 3과 같다. 산수유의 과육과 씨 에탄올 추출물의 최소저해농도는 세균의 그람양성균과 그람음성균 모두 0.25 mg/mL로 큰 차이를 보이지 않았으며, 효모와 젖산균은 2 mg/mL로 세균에 비하여 높은 농도에서 생육이 저해됨을 보여 항균활성이 비교적 낮게 나타났다. 따라서 산수유의 과육과 씨 에탄올 추출물에 함유된 항균활성 물질은 세균의 경우 항균활성이 강하였으나, 효모와 젖산균의 경우 항균활성이 아주 약한 결과를 나타냈다.

**항균성 물질의 열 및 pH 안정성**

산수유 과육의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질의 열 안정성을 조사하기 위하여 추출물을 50~100°C까지 10°C 간격으로 1시간 동안, 121°C에서 15분간 열처리한 후 그람양성균인 *B. cereus*와 그람음성균인 *E. coli* 두 균주에 대한 생육저해환을 측정된 결과 100°C에서 1시간, 121°C에서 15분간 열처리한 뒤, 두 균주 모두 생육저해환의 크기가 대조구와 거의 비슷한 것으로 보아 산수유 과육의 에탄올 추출물 중의 항균활성 물질은 열에 매우 안정하였다. 또한 산수유 과육의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질의 pH 안정성을 조사하기 위하여 추출물을 pH 3~11까지 조절한 후 상온에서 1시간 방치한 다음, 다시 각각 균주의 최적 pH로 중화시켜서 동일한 방법으로 생육저해환을 측정

**Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the ethanol extracts from *Cornus officianalis* against target microorganisms**

| Strains                 | Portions        | Growth at various concentration (mg/mL) |     |      |                 |         | MIC (mg/mL) |
|-------------------------|-----------------|---|-----|------|-----------------|---------|-------------|
|                         |                 | C <sup>1)</sup>                         | 0.1 | 0.25 | 0.5             | 1.0 2.0 |             |
| <i>B. cereus</i>        | F <sup>2)</sup> | + <sup>4)</sup>                         | +   | +    | +               |         | 0.25        |
|                         | S <sup>3)</sup> | +                                       | +   | +    | ± <sup>6)</sup> |         | 1.0         |
| <i>B. subtilis</i>      | F               | +                                       | +   |      |                 |         | 0.25        |
|                         | S               | +                                       | +   |      | ±               |         | 1.0         |
| <i>S. aureus</i>        | F               | +                                       | ±   |      |                 |         | 0.25        |
|                         | S               | +                                       | +   | +    | ±               |         | 1.0         |
| <i>E. coli</i>          | F               | +                                       | +   |      |                 |         | 0.25        |
|                         | S               | +                                       | +   | +    | ±               |         | 1.0         |
| <i>S. typhimurium</i>   | F               | +                                       | +   |      |                 |         | 0.25        |
|                         | S               | +                                       | +   | +    | ±               |         | 1.0         |
| <i>P. fluorescens</i>   | F               | +                                       | +   |      |                 |         | 0.25        |
|                         | S               | +                                       | +   | +    | ±               |         | 1.0         |
| <i>L. plantarum</i>     | F               | +                                       | +   | +    | +               | +       | 2.0         |
|                         | S               | +                                       | +   | +    | +               | ±       | 2.0         |
| <i>L. mesenteroides</i> | F               | +                                       | +   | +    | +               | +       | 2.0         |
|                         | S               | +                                       | +   | +    | +               | ±       | 2.0         |
| <i>S. cerevisiae</i>    | F               | +                                       | +   | +    | +               | +       | 2.0         |
|                         | S               | +                                       | +   | +    | +               | ±       | 2.0         |
| <i>H. anomala</i>       | F               | +                                       | +   | +    | +               | +       | 2.0         |
|                         | S               | +                                       | +   | +    | +               | ±       | 2.0         |

<sup>1)</sup>C: control. <sup>2)</sup>F: flesh. <sup>3)</sup>S: seed.

<sup>4)</sup>+: growth. <sup>5)</sup>: no growth, <sup>6)</sup>±: uncertain in growth.

한 결과 산수유 과육의 에탄올 추출물을 pH 3~11까지에서 항균활성 검색 결과를 보면, 두 균주 모두 생육저해환의 크기가 대조구와 거의 비슷한 것으로 보아 산수유 과육의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질은 산, 알칼리 조건에서도 항균활성이 지속적으로 유지되는 것을 알 수 있었다.

**요 약**

다양한 기능성을 갖는 산수유를 대상으로 새로운 식품개발 및 천연 보존료 개발의 일환으로 물, 에탄올, 에칠아세테이트로 추출한 항균활성 물질을 몇종의 병원균과 식중독균 식품과 관련이 있는 세균, 젖산균 및 효모 등 10개 균주에 대하여 항균활성 검색을 하였으며, 항균력이 강한 산수유 에탄올 추출물을 용매 계통분획하여 각 분획별 항균활성을 조사하였다. 또한 에탄올 추출물의 최소저해농도, 추출물에 함유된 항균성물질의 열안정성 pH 등을 조사하였다. 산수유 과육과 씨 추출물의 항균활성은 에탄올 추출물과 물 추출물이 10균주 중 세균에 대하여 항균활성이 강하였으나, 젖산균 및 효모에 대해서는 항균활성이 나타나지 않았다. 산수유의 에탄올 추출물을 헥산, 디에칠에테르, 에칠아세테이트 및 물로 용매계통분획하여 얻은 각 분획물의 항균활성은 에칠아세테이트와 물층에서 강한 항균활성을 보였고 균주별로 일반세균은 항균활성이 나타났으며, 효모와 젖산균에서는 항균활

성이 나타나지 않았다. 산수유 과육과 씨의 에탄올 추출물의 최소저해농도는 세균이 0.25 mg/mL이었고, 효모와 젖산균이 2 mg/mL이었다. 산수유의 과육 에탄올 추출물 농도의 영향은 *B. subtilis*는 0.25 mg/mL 이하의 농도에서는 균 증식이 증가되었으나 0.5 mg/mL 농도에서는 억제되었다. *E. coli*는 0.25 mg/mL 이하의 농도에서는 배양 16시간까지 균 증식이 억제되다가 그 이후 서서히 증가되었다. 산수유의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질은 121°C에서 15분간 가열한 후에도 그 활성이 유지된 것으로 보아 열에 안정하였으며, pH의 변화에도 항균활성의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다.

## 문 헌

1. 芝崎勲. 1983. 抗菌性天然添加物開發の現状と使用の上問題點. *New Food Industry* 25: 28-34.
2. Nanayama M. 1996. Antibacterial substances in food. *Jpn J Food Microbiol* 12: 209-213.
3. Fromtling RA, Bulmer GS. 1978. In vitro of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) on the growth and viability of *Cryptococcus neformans*. *Mycologia* 70: 397-401.
4. Ueda S, Yamashita H, Nakajima M, Kuwabara Y. 1982. Inhibition of microorganisms by spice extracts and flavouring compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 29: 111-116.
5. 山下一美. 1985. 香辛料 利用したう天然保存劑. *New Food Industry* 27: 35-41.
6. Ahn EY, Shin DH, Beak NI, Oh JA. 1998. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. *Korean J Food Sci Technol* 30: 680-687.
7. Ahn EY, Shin DH, Beak NI, Oh JA. 1998. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Sophora flavescens* Ait. *Korean J Food Sci Technol* 30: 672-679.
8. Lee IE, Cho SH. 2000. Antimicrobial effect of *Aristolochia contorta* Bge. extract on the growth of pathogenic and putrefactive microorganisms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1107-1111.
9. Chung KH, Lee SH, Lee YC, Kim JT. 2001. Antimicrobial activity of omija (*Schizandra chinensis*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 127-132.
10. Kim KH, Min KC, Lee SH, Han YS. 1999. Isolation and identification of antimicrobial compound from dandelion (*Taraxacum platycarpum* D.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 822-829.
11. Piddock LJV. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J Appl Bacteriol* 68: 307-318.
12. Bauer AW, Kibby MM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
13. 李在根, 龍口和惠, 提將和, 渡邊忠雄. 1985. グリシンと二, 三の藥劑の抗菌力併用效果. *日本食品衛生學雜誌* 26: 279-284.
14. MacLowry JD, Jaqua MJ. 1970. Detailed methodology and implementation semiautomated serial dilution microtechnique for antimicrobial susceptibility testing. *Appl Microbiol* 20: 46-53.
15. Pearson RD, Steigbigel RT, Davis HT, Chapman SW. 1980. Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 699-708.
16. Murray PR, Jorgensen JH. 1981. Quantitative susceptibility test methods in major United States medical centers. *Antimicrob Agents Chemother* 20: 66-70.
17. Lee BW, Shin DH. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Korean J Food Sci Technol* 23: 200-204.
18. Hong ND, Rho YS, Kim NJ, Kim JS. 1990. A study on efficacy of *Ulm cortex*. *J Korean Soc Pharm* 21: 217-222.
19. Park UY, Chang DS, Cho HR. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21: 91-96.

(2003년 5월 14일 접수; 2003년 7월 30일 채택)