

Vibrio parahaemolyticus에 대한 산초 추출물의 항균활성

김정순 · 구경모 · 정용현 · 양재길 · 이강권[†]

삼성에버랜드(주) 식품연구소

Antimicrobial Activities of *Zanthoxylum schinifolium* Extract Against *Vibrio parahaemolyticus*

Jeong Soon Kim, Kyoung Mo Koo, Yong Hyun Jung, Jae Gil Yang and Gang Gweon Lee[†]

Food Research & Development Center, SAMSUNG Everland Inc., Gyeonggi-do 449-912, Korea

Abstract

This study was designed to investigate the possible utilization of *Zanthoxylum schinifolium* as a source of decontamination agents. The antimicrobial effect of *Zanthoxylum schinifolium* extract was investigated against *Vibrio parahaemolyticus* which is food-born disease organism. Ethanol extract of *Zanthoxylum schinifolium* was compared with water extract of *Zanthoxylum schinifolium* to test antimicrobial activities against *Vibrio parahaemolyticus* by disk method. Ethanol extract was more effective than water extract on the antimicrobial activities. It had remarkable antimicrobial activities against *Vibrio parahaemolyticus*. It was very stable on the wide range of temperature and pH. It turned out by GC-MS that estragole (4-allyl anisole) was a major antimicrobial component of *Zanthoxylum schinifolium* extract. These results indicated that *Zanthoxylum schinifolium* extract could protect against bacterial contamination and inhibit a growth of *Vibrio parahaemolyticus*.

Key words: antimicrobial activity, *Zanthoxylum schinifolium*, *Vibrio parahaemolyticus*, estragole, decontamination agent

서 론

최근 들어 식중독 발생 규모는 대형화되고 있으며 원인식품도 점차 다양해지고 있는 추세이다. 세계 각국에서 발생하고 있는 식중독의 대부분은 세균에 그 원인이 있으며, 따라서 식중독 세균에 대한 관심이 점차 높아지고 있다. 특히, 세균성 식중독의 원인균 중 *Salmonella spp.*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*에 의한 많은 발병 사례들이 보고되고 있다. 우리나라의 경우 1993~1997년까지 식중독 발생원인은 살모넬라균(46.5%) 장염비브리오(21%), 황색포도상구균(19.2%), 자연독(2.4%), 기타(11.9%)였으나 1998년도에는 전체 환자 4,577명 중 황색포도상구균 환자가 가장 많았고(31%), 발생건수로는 장염비브리오균에 의한 식중독이 28.6%로 가장 많았다(1). 이는 어깨류를 생식하는 식습관과 조리시 불완전한 살균 및 식재료의 교차오염이 원인으로 밝혀지고 있으며, 비슷한 식습관을 가진 일본에 있어서도 세균성 식중독 전체 발생건수의 거의 절반을 차지하고 있다(2).

한편, 이러한 식중독 세균에 대한 억제 및 사멸을 위한 방법 중의 하나로 종래에는 화학적 합성 phẩm을 많이 사용하여 왔으나, 소비자들의 소득향상과 함께 생활수준이 높아지고 건강

에 대한 관심이 고조되면서 합성 보존료가 함유되어 있지 않은 식품에 대한 소비자의 선호도가 높아짐에 따라 천연물에 존재하는 인체에 해가 없는 천연항균물질을 식품에 이용하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(3-5).

현재까지 상품화되어 있거나 항균성이 알려진 천연물질로는 주로 lysozyme, polylysine, protamine, conalbumin, avidin 등의 단백질과 acetic acid, benzoic acid, maleic acid, succinic acid 등의 유기산, 그리고 페틴분해물, 갈변반응 생성물질, 저금지방산 ester, 향신료 등이 있는데(3) 특히, 최근에는 이들 가운데 우리나라에서 많이 사용하는 향신료들의 상당수가 여러 군에 대해 항균효과가 있는 것으로 알려지고 있다(6). 향신료의 이러한 항균효과는 대부분 정유(精油)에 함유된 성분에 의한 것으로 알려지고 있는데 그 중 우리나라, 일본, 중국 등 동북아시아에 널리 자생하고 있는 운향과 (*Rutaceae*)의 산초(*Zanthoxylum*)는 옛날부터 동북아시아에서 가장 오랫동안 사용되어온 전통적인 향신료로 과실 및 껌질, 잎 등을 주로 이용하며, 이들 속에는 각종 신미성분, 정유성분 및 유지성분이 함유되어 있어 약용 및 제유용으로 널리 이용되어 왔다. 또한 산초는 구충제, 해독살충약, 감기약 등에 이르기까지 그 용도가 다양하다(7). 이에 본 연구는

[†]Corresponding author. E-mail: ganggweon.lee@samsung.com
Phone: 82-31-288-0795, Fax: 82-31-288-0811

예로부터 항신료로 사용되고 있는 산초의 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항균활성의 확인과 물리적인 특징 및 그 유효성분을 파악하고 식품에서의 적용 방안을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

산초 추출물의 제조

시료는 서울 경동시장에서 구입하였으며, 산초의 종자(씨)부분(S1)과 종자를 제외한 부분(S2; 과피, 잎, 가지)으로 분류하여 60°C에서 24시간 열풍건조시킨 후 사용하였다. S1과 S2를 각각 분쇄하여 균질화시킨 후 10 g씩을 취해 중류수 100 mL를 가하고 100°C로 감압 중류하여 중류액 S1A와 S2A를 얻었으며, 별도로 중류잔류물을 여과지(Whatman No. 2)에 통과시켜 잔사 추출액 S1B와 S2B를 얻어 시험용액으로 사용하였다. 또한, 위와 동일한 방법으로 S1과 S2를 각각 취하여 주정(95% ethanol, prethanol A) 100 mL를 가하고 65°C에서 감압 중류하여 중류액 S1C와 S2C를 얻었으며, 별도로 중류잔류물을 여과하여 잔사 추출액 S1D와 S2D를 얻어 이를 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1)(8).

산초 추출물의 항균성 시험

산초 추출물의 항균력 시험은 disk method(9)를 이용하였다. 항균력 시험을 위한 균주는 아주대학교병원 임상병리실에서 분양받아 본 연구소에 보관 중인 *Vibrio parahaemolyticus*를 10 mL LB broth에 접종하고 37°C에서 16시간 배양한 후 10,000배까지 단계별로 희석하고 0.1 mL를 취하여 LB agar 배지 상에 고르게 도말하였다. 각각의 도말된 LB agar 배지에 멸균된 10 mm Ø paper disk를 얹고 시험용액 S1A, S1B, S1C, S1D, S2A, S2B, S2C, S2D 및 주정을 각각 40 µL씩 paper disk에 떨어뜨려 전조시킨 후 37°C에서 24시간 배양하여 disk 주위에 형성된 생육저해환의 직경을 측정함으로써 항균력을 시험하였다. 이때 대조구로는 중류수 및 주정을 paper disk에 동일하게 접종하여 측정하였다. 또한 항균성 시험에서 가장 우수한 *Vibrio* 생육 저해능을 보인 시험

용액에 대하여 주정 및 중류수를 이용하여 1~1×10⁵배까지 단계별로 희석하고 이를 disk method를 이용하여 최저저해농도를 확인하였다.

산초 추출물의 온도 및 pH에 대한 안정성 시험

항균성 시험에서 가장 우수한 *Vibrio* 생육 저해능을 보인 시험용액을 이용하여 실험을 진행하였다. 시험용액을 멸균된 용기에 담아 40, 60, 80, 100°C에서 각각 30분간 열처리한 후 멸균된 10 mm Ø paper disk에 40 µL씩을 떨어뜨린 후 *Vibrio parahaemolyticus* 배양액 0.1 mL가 도말된 LB agar 배지에 얹어 생육저해환의 직경을 측정함으로서 온도에 대한 안정성 시험을 실시하였다(10). pH 안정성은 시험용액을 phosphoric acid, ammonium solution을 이용하여 pH 4, 6, 7, 8, 10으로 각각 처리한 후, 37°C에서 1시간 방치한 다음 다시 pH 7로 중화시켜 열 안정성 시험과 같은 방법으로 생육저해환의 직경을 측정하였다.

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 생육저해 곡선

산초 추출물의 최소저해농도는 Turbidimetric Assay법(11)을 이용하여 실험하였다. LB broth에서 16시간 배양한 *Vibrio parahaemolyticus* 배양액을 100 mL LB broth에 0.1% 접종한 후, 시험용액을 0%, 0.5%, 5%의 농도로 각각 첨가한 다음, 37°C에서 배양하면서 시간대별 균체량 변화를 Spectrophotometer(UV-1601 Shimazu, Kyoto Japan)를 이용하여 620 nm에서 측정한 흡광도를 통해서 조사하였다.

항균활성물질의 분리, 동정

시험용액의 항균성분은 GC-MS(Agilent 6890/Agilent 5973N, USA)을 이용하여 분석하였다. Column은 HP-1(Crosslinked Methyl Siloxane: 25 m × 0.32 mm i.d. × 0.17 µm film thickness)을 사용하였으며, column 온도는 70°C(2 min)에서 150°C(5°C/min), 주입구 온도는 230°C로 설정하였다. Carrier gas는 helium, flow rate은 1.5 mL/min, injection volume은 1.0 µL(Split ration = 30 : 1)이며, ionization voltage는 70 eV로 하였다. 항균물질의 동정은 GC-MS에 의해서 얻은 total ion chromatogram에서 분리된 peak의 mass spectrum과 Wiley NBS를 사용한 library search system을 이용하여 동정하였으며, 표준물질(Aldrich Chemical Co., USA)을 구입하여 mass spectrum을 확인하였다. 항균물질에 대한 활성은 LB broth 배지에서 배양시킨 *Vibrio parahaemolyticus*를 LB agar 배지에 도말하고 동정된 표준품을 농도별로 재조하여 paper disk method로 분석하였다.

결과 및 고찰

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 산초 추출물의 항균 활성

10 mL LB broth에서 16시간 배양한 *Vibrio parahaemolyticus* 균주를 10,000배까지 0.85% 생리식염수를 이용하여 단계별로 희석한 후 각각 0.1 mL씩을 균일하게 LB agar 배

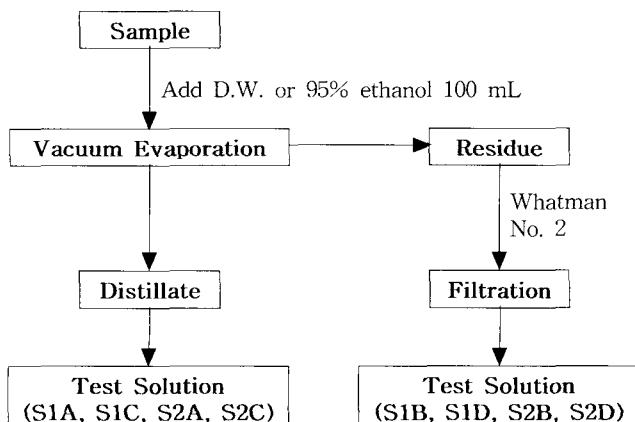


Fig. 1. Flow diagram of test solution preparation.

지에 접종하였다. 이 도말된 배지상에 10 mm Ø paper disk를 일정한 간격으로 놓고 시험용액 S1A, S1B, S1C, S1D, S2A, S2B, S2C, S2D 및 주정을 각각 40 µL씩 떨어뜨린 후 37°C에서 배양시킨 결과, 시험용액 S1C와 S1D는 2.45×10^9 CFU/mL까지 *Vibrio parahaemolyticus* 종식억제로 인한 생육저해율이 선명하게 관찰되었으며, 특히 시험용액 S2C와 S2D는 2.45×10^{11} CFU/mL의 균수까지도 뚜렷한 생육저해율을 형성하여 *Vibrio parahaemolyticus*에 대해 탁월한 항균효과를 나타내었다(Table 1). 실험결과 종류수로 추출한 시험용액 S1A, S1B, S2A, S2B 및 주정에서는 항균효과가 나타나지 않았으며, 주정으로 추출한 시험용액의 경우 S1C, S1D, S2C, S2D 모두에서 항균효과가 나타났으며, 종자를 제외한 부분으로 제조한 추출성분(S2C, S2D)이 종자부분으로 제조한 추출성분보다 항균효과가 높았다(Fig. 2). 따라서 산초에 존재하는 항균활성 물질은 종류수보다 주정과 같은 알코올계 유기용매에 의해서 잘 추출되거나, 주정에서만 항균활성을 보이고 종류수에서는 불활성되는 것으로 사료된다.

위에서 얻어진 결과를 토대로 항균활성이 가장 뛰어난 시험용액 S2C에 대하여 최소저해농도를 측정하기 위해 종류수와 주정으로 희석하여 항균활성을 측정한 결과, 주정을 사용하여 희석한 경우 1×10^5 배까지의 희석배수에서도 항균활성을 나타내는 반면 종류수를 사용하여 희석한 경우 1×10^3 배의 희석배수까지만 항균활성을 나타내었다(Table 2). 이러한 결과로 산초에 존재하는 항균활성 물질들은 종류수보다 주정과 같은 알코올계 유기용매의 존재 시 항균활성의 상승효과가 있는 것으로 사료된다.

산초 추출물의 온도 및 pH에 대한 안정성

시험용액 S2C의 온도에 대한 안정성을 측정하기 위하여 40, 60, 80, 100°C에서 30분 동안 열처리한 후, disk method법을 사용하여 생육저해율을 측정한 결과 시험균주인 *Vibrio*

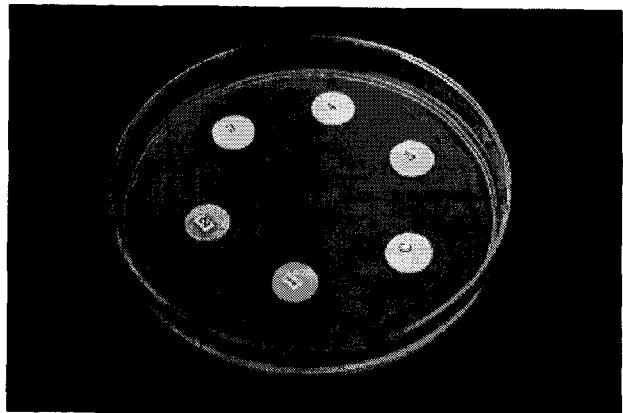


Fig. 2. Antimicrobial activities of *Zanthoxylum schinifolium* extract against *Vibrio parahaemolyticus* at 2.45×10^{11} CFU/mL.

C: 95% ethanol, 1: S2D, 2: S2A, 3: S2C, 4: S1D, 5: S1C.

Table 2. Antimicrobial activities of S2C against *Vibrio parahaemolyticus* by dilution times and solvents

Dilution times	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2.45×10^{11} CFU/mL)	
	Dilution with water	Dilution with 95% ethanol
1×10^1	++++ ¹⁾	+++
1×10^2	++	++
1×10^3	+	++
1×10^4	-	++
1×10^5	-	++

¹⁾Antimicrobial activity (10 mm Ø paper disk method, clear zone diameter): ++++ > 18 mm, 18 mm ≥ +++ > 15 mm, 15 mm ≥ ++ > 12 mm, 12 mm ≥ + > 10 mm, - ≤ 10 mm.

*parahaemolyticus*의 생육 저해율의 지름은 모든 가열처리구에서 처리 온도와 관계없이 18 mm 정도로 열을 가하지 않았을 때와 동일하게 항균력이 유지됨을 알 수 있었다. 또한 pH 안정성의 경우 시험용액 S2C를 1×10^4 배 희석하여 pH 4,

Table 1. Antimicrobial activities of *Zanthoxylum schinifolium* extract against *Vibrio parahaemolyticus* by various extraction methods

Test sol	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (CFU/mL)				
	2.45×10^{11}	2.45×10^{10}	2.45×10^9	2.45×10^8	2.45×10^7
Control	- ¹⁾	-	-	-	-
S1A ²⁾	-	-	-	-	-
S1B	-	-	-	-	-
S1C	-	-	++	++	++
S1D	-	+	++	++	++
S2A	-	-	-	-	-
S2B	-	-	-	-	-
S2C	++++	++++	++++	++++	++++
S2D	+	++	++	++	++

¹⁾Antimicrobial activity (10 mm Ø paper disk method, clear zone diameter): ++++ > 18 mm, 18 mm ≥ +++ > 15 mm, 15 mm ≥ ++ > 12 mm, 12 mm ≥ + > 10 mm, - ≤ 10 mm.

²⁾S1A: volatile water extract of *Zanthoxylum schinifolium* seeds, S1B: nonvolatile water extract of *Zanthoxylum schinifolium* seeds, S1C: volatile ethanol extract of *Zanthoxylum schinifolium* seeds, S1D: nonvolatile ethanol extract of *Zanthoxylum schinifolium* seeds, S2A: volatile water extract of *Zanthoxylum schinifolium* without seeds, S2B: nonvolatile water extract of *Zanthoxylum schinifolium* without seeds, S2C: volatile ethanol extract of *Zanthoxylum schinifolium* without seeds, S2D: nonvolatile ethanol extract of *Zanthoxylum schinifolium* without seeds.

6, 7, 8, 10으로 조정하여 37°C에서 1시간 방치한 후 pH 7로 중화시켜 생육저해환을 측정한 결과 모든 처리구에서 18 mm 정도로 pH에 관계없이 동일한 항균력을 유지하였다(Table 3). *Vibrio parahaemolyticus*의 생육 저해환의 지름은 모두가 18 mm 정도로 처리조건에 관계없이 동일한 크기의 생육저해환을 형성하였으며 이러한 결과로 볼 때 산초 추출물은 온도 및 pH에 대하여 안정한 것으로 판단된다.

산초 추출물의 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 생육저해

앞선 실험결과에서 얻어진 시험용액 S2C의 최소저해농도를 기준으로 배지에 주입시 물에 의해 희석되어지는 농도를 고려하여 각각 0, 0.5, 5%의 농도로 성장배지를 제조하였다. 이렇게 제조된 성장배지에 *Vibrio parahaemolyticus*를 접종하여 산초 추출물이 성장에 미치는 영향을 검토한 결과, 산초 추출물을 첨가하지 않은 경우 균수가 2시간 이후부터 급속히 증가하여 24시간 후 약 10 log CFU/mL까지 성장하였으며, 반면에 산초 추출물 0.5%, 5% 농도에서는 24시간 동안 생육이 완전히 억제되는 현상을 볼 수 있다(Fig. 3). 따라서 산초 추출물은 *Vibrio parahaemolyticus*의 생육을 억제한다는 것을 알 수 있었다. Chung 등(11)은 산초나무의 일종인 초피의 추출물이 *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas syringae* 등의 세균에 항균효과가 있다는 것을 확인하였으며, 이는 초피의 항균물질이 생리활성효소의 기능을 약화시키고, 세포벽 또는 세포막을 파괴하기 때문이라고 하였는데, 산초 추출물의 경우도 이와 같이 *Vibrio parahaemolyticus*의 효소 및 세포벽 또는 세포막에 작용하여 생육을 억제하는 것으로 사료된다.

Table 3. Antimicrobial activities of S2C treated with various temperature & pH against *Vibrio parahaemolyticus*

pH	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2.45×10^8 CFU/mL)	Temperature (°C)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2.45×10^8 CFU/mL)
4	++++ ¹⁾	40	++++
6	++++	60	++++
7	++++	80	++++
8	++++	100	++++
10	++++		

¹⁾Antimicrobial activity (10 mm Ø paper disk method, clear zone diameter): ++++ > 18 mm, 18 mm ≥ +++ > 15 mm, 15 mm ≥ ++ > 12 mm, 12 mm ≥ + > 10 mm, - ≤ 10 mm.

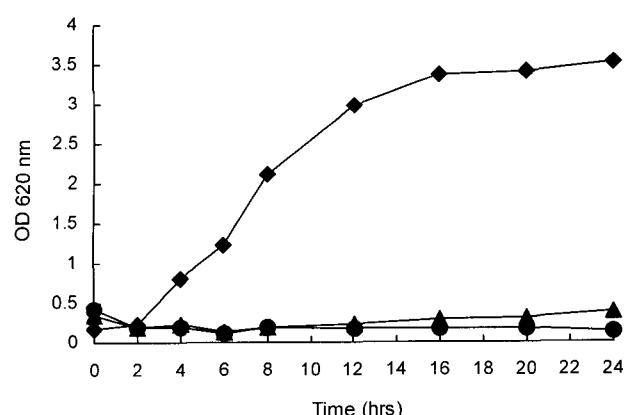


Fig. 3. Growth curves of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in LB broth media at various S2C concentration.
◆: Control, ▲: 0.5% S2C, ■: 1% S2C, ●: 5% S2C.

GC-MS에 의한 항균활성물질의 동정

산초 추출물 S2C의 항균활성물질은 GC-MS를 이용하여

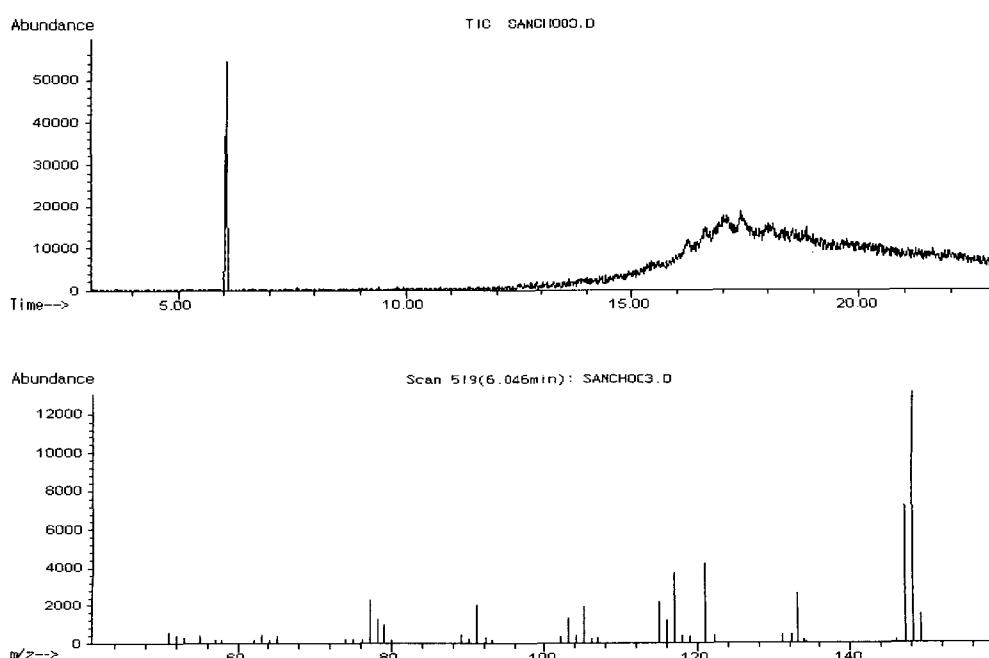


Fig. 4. Total ion chromatogram and mass spectrum of estragole isolated from *Zanthoxylum schinifolium* extract.

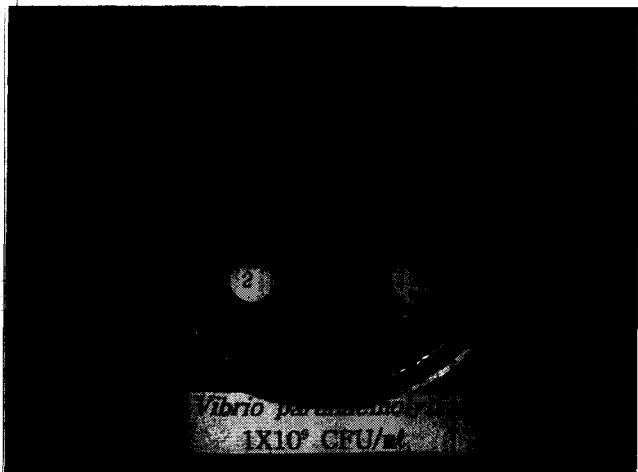


Fig. 5. Antimicrobial activities of estragole at various concentrations against *Vibrio parahaemolyticus*.

1: Control (95% ethanol), 2: Estragole 10 ppm, 3: Estragole 30 ppm, 4: Estragole 50 ppm.

분리, 동정하였다(Fig. 4). GC-MS로부터 분리된 peak의 mass spectrum 및 표준물질의 mass spectrum을 확인한 결과, 산초 추출물의 항균활성 성분은 estragole(4-allyl anisole)로 동정되었다. 산초에 있어서 estragole 성분은 꽃이 피고 열매가 맺히면서부터 생성되고 열매가 성숙할수록 더 많은 양이 잎으로 전이한다고 알려져 있다(12). Estragole은 *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *V. parahaemolyticus*의 증식을 크게 억제한다고 알려져 있다(13). 따라서 estragole이 산초추출물의 *Vibrio parahaemolyticus*에 대하여 강한 항균효과를 나타내는 주요 항균활성 성분으로 판단된다.

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 estragole의 항균효과 9 log CFU/mL 균수의 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 estragole 농도별 생육저해효과를 검색한 결과, 10 ppm에서는 약 12 mm정도의 생육저해환을 형성하였으며 30 ppm 이상의 농도에서는 18 mm정도로 뚜렷한 항균활성효과를 보임을 알 수가 있었다(Fig. 5). 따라서 estragole은 10 ppm의 낮은 농도에서도 *Vibrio parahaemolyticus*에 대하여 항균활성을 나타내며 이를 함유한 산초 추출물도 저농도에서 탁월한 생육저해효과를 나타내는 것으로 생각된다.

요 약

산초는 우리나라를 비롯한 일본, 중국 등지에 널리 분포하고 있으며 전통적으로 우리 정서에 친숙한 식미와 향기를 가지는 아시아권의 공통적인 향신료이다. 더불어 우리나라에서는 생선회와 어패류의 소비가 증가함에 따라 *Vibrio parahaemolyticus*에 의한 식중독발생 억제방안의 확립이 필요한 실정이다. 따라서 본 연구는 독성이 없는 새로운 천연 식품

보존제의 개발을 위하여 식품 및 향신료로서 적용 범위가 광범위한 산초를 대상으로 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 천연항균제의 적용 가능성을 검토하였다. 산초나무 추출물의 항균작용을 알아보기 위해서 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항균력 분석에서 종자를 제외한 성분으로 제조한 산초의 주정추출물이 효과가 가장 우수함을 확인하였으며, 이 추출물의 온도 및 pH에 대한 안정성을 검토한 결과 다양한 범위의 온도, pH에 대해서 매우 안정하다는 것을 알 수 있었다. 또한 GC-MS에 의한 산초 추출물의 분리, 동정 결과에서는 estragole이 항균활성을 나타내는 주성분임을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 우리나라에서 많이 사용되는 산초를 *Vibrio parahaemolyticus*에 의한 식중독을 줄일 수 있는 항균제로 적용할 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 식품첨가제 및 포장재, 식품포장 외부 충진 물질, 살균소독제 등의 다양한 형태로의 응용이 가능하리라 생각된다.

문 현

- 식품의약품안전청. 2002. 식중독 발생상황. 한국의 식중독 발생현황. 식중독 발생건수와 환자수.
- 工藤泰雄, 大橋誠. 1990. 腸炎ビブリオ 第III集. 近代出版, 東京. p 26-36.
- Park SK, Park JC. 1994. Antimicrobial activity of extracts and coumaric acid isolated from *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 9: 506-511.
- Choi SC, Jung JS. 1997. Studies on antimicrobial of *impatiens balsamina* extract (II). *J Korean Fiber Soc* 34: 393-399.
- Park CS. 1998. Antibacterial activity of edible plant against pathogenic bacteria. *Korean J Postharvest Sci Technol* 5: 89-96.
- Yang JY, Han JH, Kang HR, Hwang MK, Lee JW. 2001. Antimicrobial effect of mustard, cinnamon, Japanese pepper and horseradish. *J Fd Hyg Safety* 16: 37-40.
- Lee JW. 1998. Volatile flavor components of Korean sancho fruit and tree (*Zanthoxylum Schinfolium*). *Korean J Food & Nutr* 11: 493-498.
- Cho SH, Kim YR. 2001. Antimicrobial characteristics of *Scutellariae Radix* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 964-968.
- Davidson PM, Parish ME. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 43: 148-155.
- 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.
- Chung SK, Jung JD, Cho SH. 1999. Antimicrobial activities of *Chopi* (*Zanthoxylum piperitum* DC.) extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 371-377.
- 채영암. 2001. 전통 향료 유전자원 산초 및 초피의 화학형 분류. 농업생명과학연구 5: 23-26.
- Bahk JR, Park SH, Kim JO, Kim SW, Lee SY. 1997. The effect of estragole identified and extracts form *Agastache rugosa* O. Kuntze on the fungal growth and metabolism. *J Fd Hyg Safety* 12: 63-70.

(2003년 11월 17일 접수; 2004년 2월 24일 채택)