

병원성 식중독 미생물에 대한 천년초 선인장 추출물의 항균 활성

이경석 · 김민규 · 이기영[†]

호서대학교 식품생물공학과

Antimicrobial Effect of the Extracts of Cactus *Chounnyouncho* (*Opuntia humifusa*) against Food Borne Pathogens

Kyung-Seok Lee, Min-Gue Kim and Ki-Young Lee[†]

Dept. of Food and Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea

Abstract

The 70% ethanol extract from cactus *Chounnyouncho* (*Opuntia humifusa*) was fractionated subsequently by hexan, chloroform, ethyl acetate, buthanol and water. The ethyl acetate fraction exhibited strong antimicrobial activities by paper disk diffusion method on the five strains of food born bacteria *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas fluorescens*. It has a heat resistance to show inhibitory effect after heat treatment at 110°C for 1 hr. The ethyl acetate fraction showed almost perfect growth inhibition at over 700 ppm on the tested strains.

Key words: cactus *Chounnyouncho*, *Opuntia humifusa*, antimicrobial activity, food borne pathogens

서 론

현대 세계에서는 과학기술의 발전과 산업화에 의해 다양하고 간편한 가공식품들이 대량 생산, 소비되고 있으며, 질적 수준도 점차 높아지고 있는 추세이다. 또한 세계화에 따른 국가간의 무역교류는 해외로부터 값싼 식품재료를 대량 수입할 수 있게 되어 이에 따른 유통 및 보관기간 중의 식품의 변질과 부패가 문제되고 있다(1-3). 이는 주로 미생물의 작용에 의해서 나타나게 되며, 식중독과 부패세균의 증식을 억제할 목적으로 많은 종류의 합성 보존료 사용이 불가피한 형편이다. 그러나 이러한 보존료들은 안전성의 문제를 야기하고 이로 인하여 소비자들은 점차 합성 보존제의 사용을 기피하는 경향을 보이고 있다(4,5). 따라서 인체에 무해한 천연식품 보존제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(6). 지금까지 연구된 천연항균성 물질로는 동물, 식물, 단백질 및 효소류, 유기산류 및 bacteriocin 등이 알려져 왔다(7). 그 중에서 식물 추출물이 항균성을 가지고 있다는 것은 오래 전부터 알려져 왔으며, 마늘, 갖 등과 같은 향신료들과 솔잎, 쑥, 황련, 자몽 등 다양한 식용식물 및 한약재들의 항균성이 활발하게 보고되고 있다(8,9).

지구상에는 4,000여종의 선인장이 있는데 그 중 열매가 달린 선인장은 손바닥 선인장으로 불리며 예로부터 식용이나 식품 대용으로 사용되어 왔다. 이들 손바닥 선인장 즙을 마시면 변비치료, 이뇨효과, 장운동의 활성화 및 식욕증진 효능이

있고, 선인장은 피부질환, 류마티스 및 화상치료에 사용되어 왔다. 본초강목(10)에 의하면 선인장은 기관지, 천식, 기침, 폐질환, 위염, 변비, 장염, 신장염, 고혈압, 당뇨, 심장병, 신경통, 관절염 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.

한편, 렙트를 대상으로 한 면역계 세포의 활성화에 대한 연구(11), *E. coli* 등 식중독 미생물 6종에 대한 항균 효과와 항산화 효과(12) 등이 발표된 바 있다.

하지만 한국 토종의 손바닥 선인장인 천년초 선인장에 대한 생리활성 효과는 아직 보고된 바 없다. 천년초 선인장은 사람의 키 정도로도 잘 자라는 백년초 선인장에 비해 크기가 30~40 cm 정도로 상대적으로 작다. 또한 영하에서는 생존이 불가능한 제주도산 백년초와는 달리 영하 20°C의 혹한에서도 수분을 절반 이하로 감소시켜 얼어 죽지 않고 겨울을 나 수십 년을 살 수 있는 다년생이다. 따라서 본 연구는 천년초 선인장의 항균활성을 확인하기 위하여 용매 추출과 분획을 행하였고 이를 이용해 식품 부패 미생물 6종에 대한 항균효과, 생육저해효과, 열 안정성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 천년초 선인장은 충남 아산 김복현씨 농가의 것으로 3월에 수확하여 동결 건조한 천년초 선인장을 마쇄하여 사용하였고 추출 및 분획용 시약은 1급을, 배지는

[†]Corresponding author. E-mail: kylee@office.hoseo.ac.kr
Phone: 82-41-540-5641. Fax: 82-41-532-5640

nutrient broth, YM broth, agar(Difco, USA)를 사용하였다.

실험에 사용한 균주는 식품의 부패나 변패에 관여하는 미생물로 Table 1과 같으며 Gram positive 2종, Gram negative 3종, yeast 1종을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 사용하였다.

추출 및 분획

마쇄한 천년초 선인장을 시료 10배량의 70% ethanol로 환류냉각관을 부착시킨 플라스크에 넣고 80°C에서 3시간씩 2회 추출 후 여과지(Whatman No.2, Maidstone, England)로 여과하여 rotary vacuum evaporator로 농축하고 동결 건조하여 추출물을 얻었다. 이 추출물을 hexan, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 등의 용매로 순차 분획 후 농축하고 동결 건조하여 분획물을 얻었다(Fig. 1).

Paper disk법에 의한 항균활성 측정

천년초 선인장 추출물의 분획용매별 항균활성 검사는 Paper disk agar diffusion법(13)을 응용하였다. 각 시험균주를 해당 액체배지에 20시간 전배양하여 이 배양액 0.1 mL씩을 petri dish에 접종한 후 미생물의 종류에 따라 적정 한천배지

10 mL를 pouring하여 배지를 조성하였다. 여기에 동결 건조한 분획물을 methanol에 녹인 후 고형분 시료 함량이 4 mg이 되게끔 흡착시킨 멸균 paper disk(8 mm, Advantec, Toyo Roshi Co., Japan)를 접착시키고 30°C에서 24시간 동안 배양 후 형성된 저해 부위의 크기(mm)를 측정하였다. 대조군으로 benzoic acid를 동일한 방법으로 측정하였다. 용매에 의한 항균활성이 일어날 수 있어 methanol만으로 공시험을 한 결과 항균효과는 일어나지 않았다.

열 안정성

Paper disk diffusion 결과 가장 우수한 항균활성을 보여준 ethyl acetate 분획물을 사용하여 열에 대한 안정성을 알아보기 위해 이를 각각의 온도와 시간별로 열처리한 후 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*에 대한 항균효과를 Paper disk법에 의하여 측정하였다.

Liquid culture에서 생육저해 효과 측정

우수한 활성을 보인 ethyl acetate 분획물을 사용하여 Liquid culture에서 생육저해 효과를 측정하였다. 추출물 시료의 농도(w/v)가 각각 0 ppm, 100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 700 ppm이 되도록 조절한 배지에 배양액을 각각 0.05 mL씩 접종한 후 30°C에서 12시간 배양하면서 2시간 간격으로 균의 생육정도를 측정하였다. 균의 생육정도는 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시간에 따른 흡광도의 변화로 균의 생육정도를 나타내었다.

결과 및 고찰

추출수율

천년초 선인장의 항균효과를 검토하기 위하여 동결건조 마쇄한 천년초 선인장을 70% ethanol로 추출하여 일부를 110°C에서 건조시킨 후 고형분 함량을 계산한 결과 추출 수율은 12.2%였다. 이 추출물을 각 용매별로 분획한 분획물을 동일한 방법으로 계산한 수율은 Table 2와 같다. 70% ethanol 추출물의 용매별로 분획한 분획물의 추출 수율을 보면 물 분획이 64.6%로 가장 높았으며 butanol 27.8%, hexan 5.4%, ethyl acetate 1.4%, chloroform 0.9% 순이었다.

Paper disk법에 의한 항균활성

병원성 식중독 미생물에 대한 천년초 선인장 분획물의 Pa-

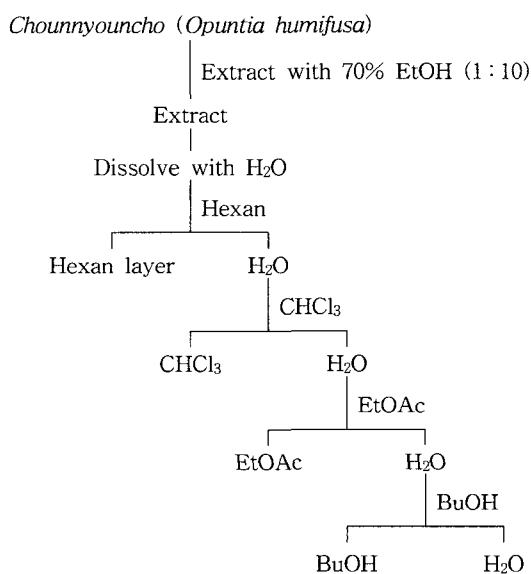


Fig. 1. Fractionation of antibacterial extracts from cactus *Chounnyouncho (Opuntia humifusa)*.

Table 1. List of microbial strains used for antimicrobial test

	Strain	ATCC NO.	Media
Gram positive bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	NB ¹⁾
	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	25923	NB
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i>	23736	NB
	<i>Salmonella typhimurium</i>	10708	NB
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	21541	NB
Yeast	<i>Candida abicans</i>	18804	YM ²⁾

¹⁾Nutrient Broth-Difco. USA. ²⁾Yeast Mold Broth-Difco. USA.

Table 2. Fraction yield from 70% ethanol extract of cactus *Chounnyouncho* (*Opuntia humifusa*) by various solvents

Solvent	Hexan	Chloroform	Ethyl acetate	Buthanol	Water
Fraction yield (%)	5.4	0.9	1.4	27.8	64.6

per disk diffusion에 의한 항균 효과를 비교한 결과는 Table 3과 같다. Clear zone을 측정된 결과를 보면 천연초 선인장 추출물의 ethyl acetate분획물이 타 분획물보다 전체적으로 월등히 우수한 항균 효과를 보여 주었다. Ethyl acetate 분획물은 동량의 benzoic acid보다 월등히 우수한 효과를 보여 주었고 2배의 benzoic acid보다도 우수한 항균효과를 보여 주었다. 그람 양성세균과 음성 세균간 항균활성의 차이는 거의 보이지 않고 비슷한 항균 효과를 보여주었다. 실험 결과에 나타나진 않았지만 *Candida albicans*의 경우 paper disk에 고형분의 흡수량을 10 mg으로 높일 경우 비슷한 정도의 항균효과를 나타내어 yeast에 대해서도 항균효과를 나타낼 수 있었지만 bacteria에 비해서는 그 효과가 약했음을 볼 수 있었다.

열 안정성 평가

항균 효과가 뛰어난 ethyl acetate 분획물을 서로 다른 조건으로 열처리한 후 그람 양성 세균인 *B. subtilis*와 그람 음성 세균인 *E. coli*에 대한 항균효과를 Paper disk diffusion에 의하여 검토한 결과는 Table 4, Fig. 2와 같다. 가장 강한 열처리 조건인 110°C, 1 hr에서도 천연초 선인장 추출물의 항균력의 변화는 거의 일어나지 않아 열에 안정함을 알 수 있었다.

Liquid culture에서 생육저해 효과

Ethyl acetate 분획물의 생육 저해 효과를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 그람 양성세균 및 음성세균 모든 균주의 liquid culture에 대하여 ethyl acetate 분획물의 농도가 700 ppm일 경우 생장이 완전히 억제되었고 500 ppm에서 균주의 성장 정도가 절반가량 억제됨을 볼 수 있었다. 그람 양성 세균과 음성 세균 간에 큰 차이는 볼 수 없었다. 다만 *Pseudomonas fluorescens*의 경우 농도에 따른 가시적인 생육 저해효과는 볼 수 있었지만 700 ppm의 농도에서도 완전히 생육을 억제

Table 4. Thermal stabilities of the EtOAc fractions of cactus *Chounnyouncho* (*Opuntia humifusa*) for antibacterial activity

	Inhibition zone ¹⁾ (mm)		
	100°C, 1 hr	110°C, 0.5 hr	110°C, 1 hr
<i>B. subtilis</i>	18	18	18
<i>E. coli</i>	19	18	19

¹⁾4 mg of fraction extract was absorbed into paper disk (Φ8 mm) and the diameter (mm) of clear zone was measured.

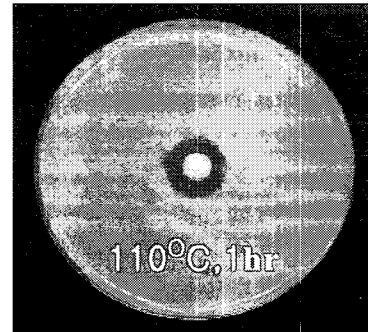


Fig. 2. Thermal stabilities of EtOAc fraction of cactus *Chounnyouncho* (*Opuntia humifusa*).

시키지는 못했다. *Candida albicans*는 농도에 따라 생육저해 효과가 나타나긴 했지만 그 폭이 여타 세균들에 비해 미미하여 700 ppm의 농도에서도 생육의 저해효과가 뚜렷하게 나타나지는 않았다. 이는 Paper disk법에 의한 항균활성을 측정했을 때 *Candida albicans*에 대한 항균효과가 나머지 세균에 비해 2배의 농도에서야 세균과 비슷한 항균효과를 보여준 것과 함께 미루어 천연초 손바닥 선인장의 추출물은 yeast보다는 bacteria에 보다 효과적인 항균효과를 나타낼 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 천연초 손바닥 선인장 유기용매 추출물의 항균성을 비교, 검토하고자 하였다. 70% ethanol로 추출하여 hexan, chloroform, ethyl acetate, buthanol, water로 순차 분획하여 ascorbic acid, benzoic acid와 항균효과를 비교하여 보았다. *Escherichia coli* 등 Gram positive bacteria 2종,

Table 3. Comparison of antimicrobial activity of the ethyl acetate fractions obtained from the extract of cactus *Chounnyouncho* (*Opuntia humifusa*) with ascorbic acid and benzoic acid

	Inhibition zone ¹⁾ (mm)						
	Fractions of solvent					Benzoic acid (4 mg)	Benzoic acid (8 mg)
	Hexan	CHCl ₃	EtOAc	BuOH	H ₂ O		
<i>B. subtilis</i>	-	-	18	13	10	10	12
<i>S. aureus</i>	-	-	20	12	9	10	12
<i>E. coli</i>	-	-	20	13	9	-	14
<i>S. typhimurium</i>	-	-	18	12	9	-	14
<i>P. fluorescens</i>	-	-	17	11	-	-	13
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾4 mg of fraction extract was absorbed into paper disk (Φ8 mm) and the diameter (mm) of clear zone was measured.

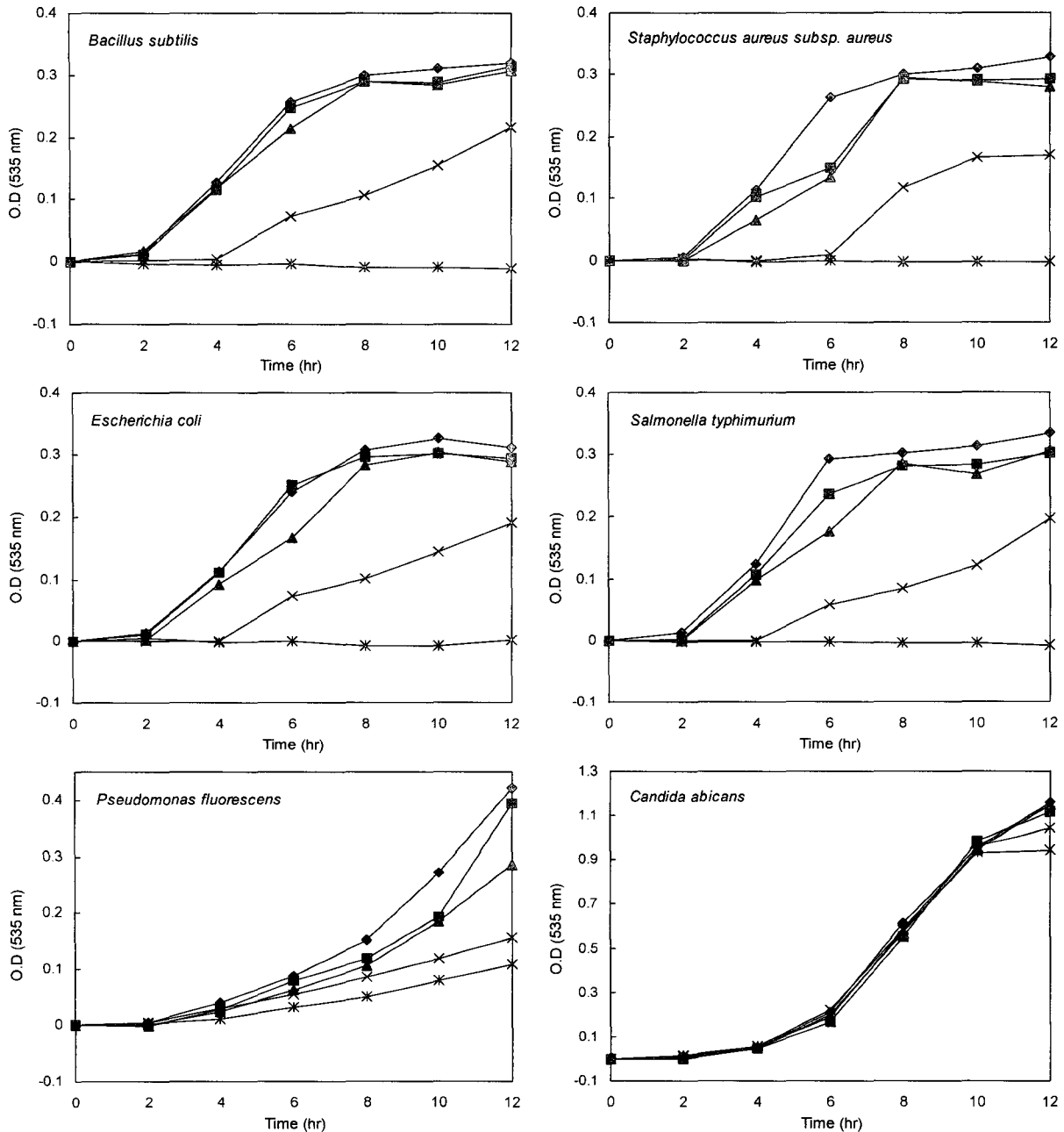


Fig. 3. Inhibitory effect of EtOAc fractions of cactus *Chounnyouncho* (*Opuntia humifusa*).
 ◆ 0 ppm, ■ 100 ppm, ▲ 300 ppm, × 500 ppm, * 700 ppm.

Gram negative bacteria 2종, yeast 1종 등 총 6개의 병원성 식중독 미생물에 대해 항균효과를 검토한 결과 ethyl acetate 분획물이 가장 우수한 항균효과를 나타내었고 이는 동량의 benzoic acid보다 월등히 우수하였다. Gram positive bacteria와 Gram negative bacteria에 대해 유의적 차이가 없는 비슷한 항균효과를 보여주었으나 bacteria에 비해 yeast에서 항균효과는 낮게 나타났다.

문헌

1. Todd ECD. 1989. Preliminary estimates of costs of food borne disease in the United States. *J Food Prot* 1: 595-601.
2. Scott VN. 1988. Safety considerations for new generation refrigerated foods. *Dairy Food Environ Sanitation* 1: 5-10.
3. Frank JF. 1990. Control of *L. monocytogenes* in food processing environments. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 491-493.
4. 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.
5. Kim YS, Kim MN, Kim JO, Lee JH. 1994. The effect of hot water-extract and flavor compounds of mugwort on microbial growth. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 994-1000.
6. Brane AL. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JA-OCS* 52: 59-63.

1. Todd ECD. 1989. Preliminary estimates of costs of food

7. Beuchat LR, David AG. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *J Food Technology* 43: 134-142.
8. Maria BZ, Lamar SR, Jose SM, Minam LS, Amaldo RL. 1984. Volatile sulfides of the amazonian garlic bush. *J Agric Food Chem* 32: 1009-1010.
9. Jamal NB, Ibrahim AW. 1994. Citric acid and antimicrobial affect microbiological stability and quality of tomato juice. *J Food Sci* 59: 130-134.
10. 이시진. 1994. 본초강목. 의성당, 서울.
11. Shin TK, Lee SJ, Kim SJ. 1998. Effects of *Opuntia ficus-indica* extract on the activation of immune cells with special reference to autoimmune disease models. *Korean J Vet Pathol* 2: 31-35.
12. Seo KL, Yang KH, Shim KH. 1999. Antimicrobial and anti-oxidative activities of *Opuntia ficus-indica* var. saboten extracts. *Korean J Postharvest Sci Technol* 6: 355-359.
13. Kim MS, Lee DC, Hong JE, Chang KS, Cho HY, Kwon YK, Kim HY. 2000. Antimicrobial effects of ethanol extracts from Korean and Indonesian plants. *Korean J Food Sci Technol* 32: 949-958.
14. Lee OH, Jeong SH, Son JY. 2004. Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 494-499.
15. Kim JS, Gu GM, Jeong YH, Yang JG, Lee GG. 2004. Anti-microbial activities of *Zanthoxylum schinifolium* extract against *Vibrio parahaemolyticus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 500-504.
16. Yun JW, Yu MY, Park BG, Lee MG, O DH. 2004. Antimicrobial effect of ethanol extracts of *Quercus spp.* against foodborne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 463-468.

(2004년 7월 6일 접수; 2004년 9월 7일 채택)