

가공조건에 따른 marta rosemary의 항균성

최혜련 · 손선영 · 최언호*
서울여자대학교 식품과학부

Antimicrobial Activities of Marta Rosemary under Different Processing Conditions

Hye-Ryun Choi, Sun-Young Son, and Eon-Ho Choi*

Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul, Korea

Antimicrobial activities of ethanol extracts of marta rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) against *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium* were investigated under conditions similar to processing of general food materials to develop natural food preservatives. The strongest antimicrobial activities were shown against the tested organisms at pH 7. In *B. subtilis*, the herbal extract extended the lag phase at low concentrations, and reduced the specific growth rate during logarithmic phase at high concentrations. In *S. typhimurium* the herbal extract reduced the specific growth rate even at lower concentrations. These trends were obtained at low pHs of culture solution. Antimicrobial substances of herbs were efficiently extracted with low polar solvents. The thermal stability of antimicrobial substances decreased with heating time at 100°C. *S. typhimurium* was more sensitive to herbal extracts at 100 and 121°C than *B. subtilis*.

Key words: herbs, antimicrobial activities, herbal extracts, natural preservatives, marta rosemary

서 론

식품은 수많은 유해 세균이나 곰팡이 등의 미생물에 노출되어 있다. 이들 유해 미생물을 억제하기 위한 수단으로 지금까지 dehydroacetic acid, sorbic acid, benzoic acid와 이들의 염, p-oxy-benzoic acid ester 등의 식품보존료가 사용되어 왔다. 그러나 화학약품의 약해와 이에 대한 소비자들의 기피현상으로 종전의 합성항균제를 천연항균제로 대체하려는 관심이 높아짐에 따라 허브의 항균성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1-12).

국내외 허브의 항균성에 관한 연구는 sage, rosemary, allspice, clove, oregano, thyme, cumin, nutmeg, 고추냉이, 방아 등에 관한 것으로(2-12) 국내의 경우는 구황식물과 약용식물에 치중되었다. 본 연구실에서 53종의 자생 및 서양허브의 항균성을 6종의 부패 및 식중독 세균에 대하여 조사한 결과는 자생종으로 삼백초(*Saururus chinensis*), 서양종으로 curry plant(*Helichrysum angustifolium*)와 marta rosemary(*Rosemarinus officinalis* L.)가 우수한 항균활성을 보인 것으로 나타났다(13). Marta rosemary는 꿀꿀과의 다년생 초본으로 혈액순환 촉진과 강장작용이 있고 향미가 우수하여 요리의 소스와 차로 사용되고 있고 음료 개발용으로 사용가능할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 음료용 천연항균제의 개발에 필요한 기본 자료를 얻기 위하여 marta rosemary의 항균성을 추출용매, 허브 농도, pH, 가열온도 등 가공조건을 달리하여 조사 비교하였다.

재료 및 방법

허브와 성분추출

Marta rosemary(*Rosemarinus officinalis* L.)를 허브다섯메(서울시 장지동)로부터 화분상태로 구입하여 7월 초순부터 10월 하순 사이에 잎을 채취하였다. 허브 잎 2g을 세절하여 20배량의 증류수나 95% ethanol, 1-butanol, hexane 등에 침지하여 30°C, 150 rpm의 진탕항온기에서 1시간 추출 후, 소형 mixer(Hanil Co., Korea)로 1분간 분쇄하고 Whatman No. 4(USA)로 여과하였다. 한편, 농축이 필요한 경우 증류수와 1-butanol은 60°C에서, ethanol과 hexane 추출액은 50°C에서 rotary vacuum evaporator(RE 200, Yamato, Japan)로 감압농축하여 95% ethanol로 회수하고 Whatman No. 4로 여과하였다. 각 여과액을 10 mL로 정용하여 4°C에 보관하였다.

공시균주와 배지

Listeria monocytogenes 40307, *Salmonella typhimurium* 11863, *Bacillus subtilis* 11316, *Escherichia coli* 11234, *Vibrio parahaemolyticus* 11965, *Staphylococcus aureus* 11335을 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양받아 공시균주로 사용하였다. 배지로 *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*는 Nutrient(Difco,

*Corresponding author: Eon-Ho Choi, Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-744, Korea
Tel: 82-2-970-5634
Fax: 82-2-970-5639
E-mail: ehchoi@swu.ac.kr

USA)가, *L. monocytogenes*와 *S. aureus*는 BHI(brain heart infusion, Difco, USA)가, *V. parahaemolyticus*는 천일염(NaCl)을 3% 함유한 Nutrient(Difco Co.)가 사용되었다. 각 균주는 37°C의 해당 배지에서 16시간씩 2회 계대배양되어 사용되었다.

항균성 조사 조건

균주의 종류: 6종의 공시균주에 대한 허브의 항균활성을 paper disc법으로 비교하였다.

허브의 농도: 보관중인 허브의 ethanol 추출액을 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 4, 8 mL씩 취하여 미리 멸균한 액체배지(pH 7, 100 mL)에 넣고 공시균주를 접종하여 농도에 따른 항균활성을 생육곡선법(growth curve method)으로 구하였다.

배지의 pH: 허브 추출액을 pH를 4, 5, 6, 7로 조정된 액체 배지(0.1-4 mL/100 mL)에 첨가하고 pH에 따른 항균활성을 생육곡선법으로 구하였다.

추출용매: 증류수, ethanol, 1-butanol, hexane으로 추출농축하여 95% ethanol 용액에서 보관중인 허브액으로 용매에 따른 항균활성을 paper disc법으로 비교하였다.

열처리: 허브 추출액을 100°C에서 0, 1, 5, 10, 20분, 121°C에서 15분간 가열한 후에 액체배지(pH 7, 100 mL)에 첨가하였다. 열처리된 허브 추출액의 첨가량은 *B. subtilis*의 경우 marta rosemary 0.5%, curry plant 0.1%, 삼백초 2.0%로 하고, *S. typhimurium* 경우는 허브 종류에 관계없이 4%로 조정하였다. 허브의 항균활성을 생육곡선법으로 구하였다.

항균활성 측정

Paper disc 법: 15 mL씩 분주된 평판배지(90 mm ϕ)에 공시균주 배양액 80 μ L를 도말하였다. 냉장 보관 중인 허브 ethanol 추출액을 증류수로 2배 희석하여 10 μ L를 filter paper disc(6.0 mm ϕ , Whatman No. 1)에 흡수, 건조시킨 후 disc를 공시균주가 도말된 평판배지 표면에 올려 놓고 37°C에서 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경을 측정하여 항균활성을 비교하였다. 추출용매인 알코올의 영향을 조사하기 위하여 95, 70, 45, 20% ethanol을 대조구로 실험하였다.

생육곡선(growth curve) 법: 2일 계대배양한 공시균주 현탁액을 약 10^6 CFU/mL($OD_{660}=0.01$) 농도로 접종하고 여기에 조건이 설정된 허브 추출액을 가하여 37°C의 150 rpm 진탕항온기에서 0, 3, 6, 12, 18, 24시간 배양하면서 배양액의 흡광도를 660 nm에서 측정하고 생육곡선의 대수기로부터 비증식속도

(specific growth rate)를 구하였다.

결과 및 고찰

추출용매에 따른 항균성

극성이 다른 증류수, ethanol, 1-butanol, hexane으로 marta rosemary를 추출하여 6종의 공시균주에 대한 항균성을 paper disc 법으로 조사한 결과는 Table 1과 같다. 이들의 유전항수는 각각 78.5, 24.3, 17.8, 1.9이다. 용매별 추출농축액은 95% ethanol로 희수하고 증류수로 2배를 희석하여 추출용매와 희수용매로 인한 항균작용을 배제하였다.

Marta rosemary의 항균성은 유전항수가 클수록 높게 나타나서 hexane의 경우 *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus* 균주에 대하여 직경 11 mm 이상의 넓은 clear zone을 보여 marta rosemary의 항균성분이 ethanol이나 butanol보다 hexane에서 더 잘 용출되는 것으로 나타났다.

Michelle 등(14)은 솔잎의 물 추출액과 ethanol과 ether 추출물의 항균성 비교에서 ethanol 추출물이 ether보다 2.5-8배 높은 항균 활성을 보였다고 보고하였다. 일반적으로 식용 및 약용 허브의 추출에는 ethanol이 많이 사용되었다(1,15-17).

허브 농도에 따른 항균성

허브의 첨가농도를 20배량의 ethanol로 추출한 여액의 미생물 배양액에 대한 %(v/v)로 표시하였을 때 *B. subtilis*와 *S. typhimurium*에 대한 marta rosemary의 농도별 항균성은 Fig. 1과 같이 *B. subtilis*의 경우 1% 이상의 접종 시에는 균의 생육이 전혀 나타나지 않았다. 0.25% 첨가 시 3시간까지 유도기(lag phase)가 연장되고, 0.5% 첨가시에도 균의 유도기가 연장되어, 6시간 후부터 서서히 자라기 시작하여 대조구와 비슷한 생육곡선을 보였다. *B. subtilis*는 포자형성균이기 때문인지 대조구에서 12시간 이후 흡광도가 점점 감소되는 현상이 관찰되었다. *S. typhimurium*은 허브의 첨가 농도가 높아질수록 균의 성장이 저해되고, 비증식속도(specific growth rate, $\mu = OD/hr$)도 대조구가 $\mu = 0.071$ 에서 2% 첨가구 $\mu = 0.064$, 4% $\mu = 0.027$ 순으로 점점 낮아졌으며, 8% 농도에서 균의 생육이 거의 나타나지 않았다. 특히하게도 0.5%의 허브 첨가구는 12시간까지는 대조구와 비슷한 성장을 보이다가 12시간 이후에는 균의 생육을 촉진하는 것으로 관찰되었다.

전체적으로, *B. subtilis*는 *S. typhimurium*보다 허브에 민감하였다. *B. subtilis*에 대하여 허브의 저농도에서는 유도기 지연형, 고농도에서는 유도기 지연 및 비증식속도 억제형이며, *S. typhimurium*에 대해서는 농도에 관계없이 비증식속도 억제형으로 관찰되었다. Park(5)은 4개 종류의 향신료(allspice, clove, oregano, thyme)를 액체배지에 0-2% 첨가하여 여러 식중독 세균에

Table 1. Antimicrobial activity of marta rosemary extracts with different solvents measured by a paper disc method

(unit: mm)

| Microorganisms | Solvents | | | |
|--------------------------------|----------|---------|-----------|--------|
| | Water | Ethanol | 1-Butanol | Hexane |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 6.0 | 8.6 | 8.3 | 11.3 |
| <i>Escherichia coli</i> | 6.0 | 7.7 | 8.6 | 6.0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 6.0 | 8.6 | 7.7 | 6.5 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 6.2 | 9.8 | 8.7 | 11.5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6.0 | 7.6 | 8.0 | 6.0 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 6.0 | 8.8 | 11.1 | 13.2 |

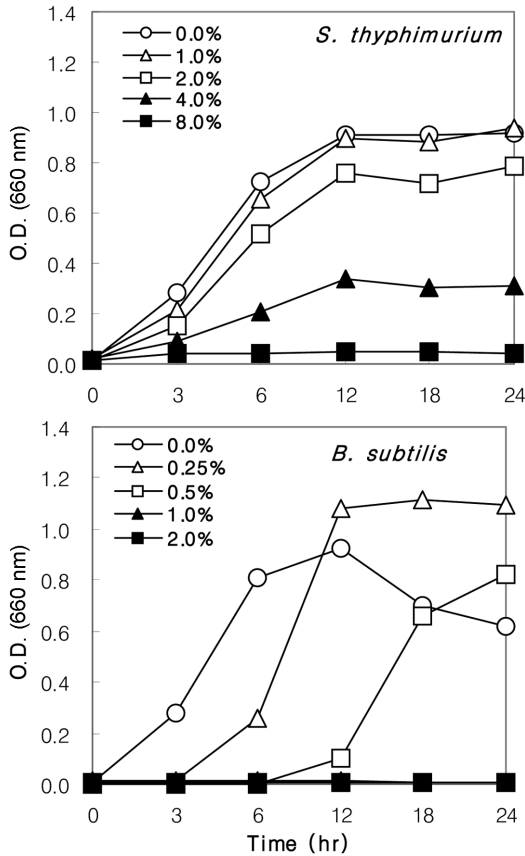


Fig. 1. Effect of concentration of marta rosemary extracts on growth inhibition of *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium* in nutrient broth at 37°C.

대한 항균활성을 배양액의 생균수 변화로 조사한 바, 향신료의 농도가 증가할수록 식중독 세균의 증식이 억제되었다고 하였으며 이는 위의 실험결과와 일치하였다. 초피 추출물은 농도에 비례하여 항균력을 보이며 500 ppm 이상에서 미생물의 생육을 완전히 억제하고, SEM 관찰결과 초피의 항균물질이 생리활성 효소기능을 약화시켜 세포벽 또는 세포막을 파손하고, 삼투기능의 상실로 미생물의 생리가 중단되고 억제되는 것이라고 밝혔다(18). 마두령 추출물의 항균 특성을 조사한 바 그람양성, 음성균, 효모, 곰팡이 등에서 농도에 비례하는 항균력의 증가가 보였다고 하였다(19).

배지의 pH에 따른 항균성

*B. subtilis*와 *S. typhimurium*의 pH에 따른 항균활성이 Fig. 2에 제시되었다. 0.5%로 처리한 marta rosemary의 pH에 따른 항균성을 조사한 바, pH가 낮아질수록 허브 무처리구에서 유도기는 같으나 비증식속도가 약 0.01씩 낮아지는 균의 성장 저해 현상이 보였다. 허브 처리시 pH 7에서는 *B. subtilis*는 유도기가 허브 무처리구의 3시간보다 지연된 6시간으로 증가하였고, pH 6에서는 18시간으로 유도기가 증가하였으며, 비증식속도는 pH 7의 허브 무처리구와 비슷하였다. pH 5에서는 균의 생육이 완전히 억제되었다. *S. typhimurium*의 허브 무처리구에서는 pH 6과 pH 7은 같은 유형의 생육곡선을 보이고 pH 5에서만 균의 유도기가 약간 길어지고 비증식속도가 pH 6과 7에서보다 0.015 정도 증가하였다. 허브 처리 시, pH가 산성으로 갈수록 균의 생육저해가 커지며, pH 5에서는 허브의 영향으로 균의 성장이

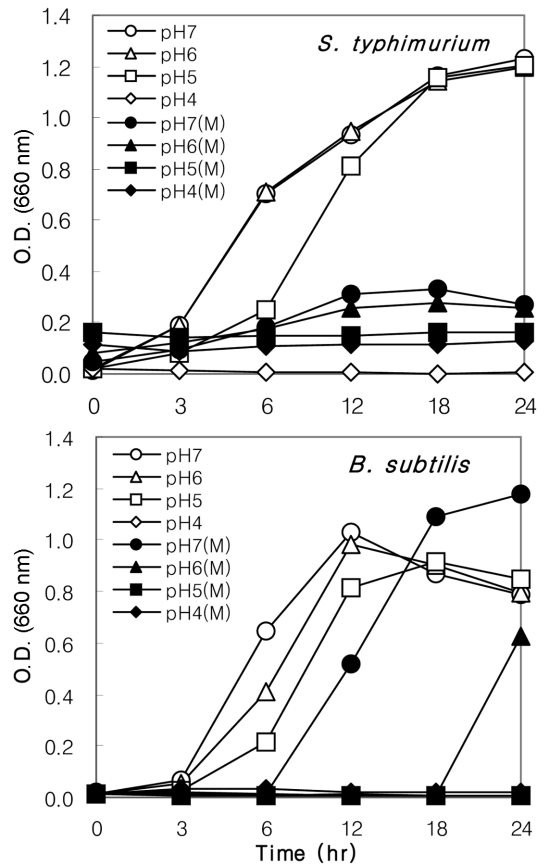


Fig. 2. Effect of pH on antimicrobial activity of marta rosemary extracts against *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium* in nutrient broth at 37°C.

완전히 억제되었다. *B. subtilis*가 *S. typhimurium* 보다 생육저해가 더 민감하고 pH 4에서는 두 균주 모두 완전히 저해되었다. 전체적으로 중성 pH에서 균의 성장 뿐만이 아니라 허브의 효과도 최대로 나타나고, pH가 낮아질수록 균의 성장은 억제되었다. 도꼬마리 추출물(20)의 경우 산 처리 시 50% 이상 실효를 보였고 알카리 처리 시에는 완전히 실효되었으며, 솔잎 추출물(21)도 알카리 처리에 의해 항균활성이 감소되었다. 마두령 추출물은 pH(4-10) 범위에 관계없이 동일한 항균력을 가진다고 밝혔다(21). 본 실험에서는 식품 첨가 시의 효과를 고려하였기 때문에 알카리성 보다는 산도를 높이는 쪽으로 실험을 진행하였다.

항균물질의 열안정성

Marta rosemary의 ethanol 추출액을 미리 100°C에서 0, 5, 10, 20분간 열처리하여 *B. subtilis*와 *S. typhimurium*의 생육저해 효과를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.

*B. subtilis*에 대하여 6시간의 유도기 지연을 보이던 marta rosemary는 열처리 시 대조구(control)와 유사한 비증식속도를 보이며 대조구와 같이 유도기는 3시간으로 줄었고, *S. typhimurium*에 대해서도 실온 허브 처리구의 비증식속도가 0.040인데 반해 열처리 허브와 대조구는 약 0.072로 비슷하게 높은 비증식속도를 보였다. Marta rosemary의 *B. subtilis*와 *S. typhimurium*에 대한 열안정성은 가열시간에 따라 감소하고 항균성분은 100°C에서 5분 이상 가열 시 파괴되어 열에 불안정한 것으로 나타났다.

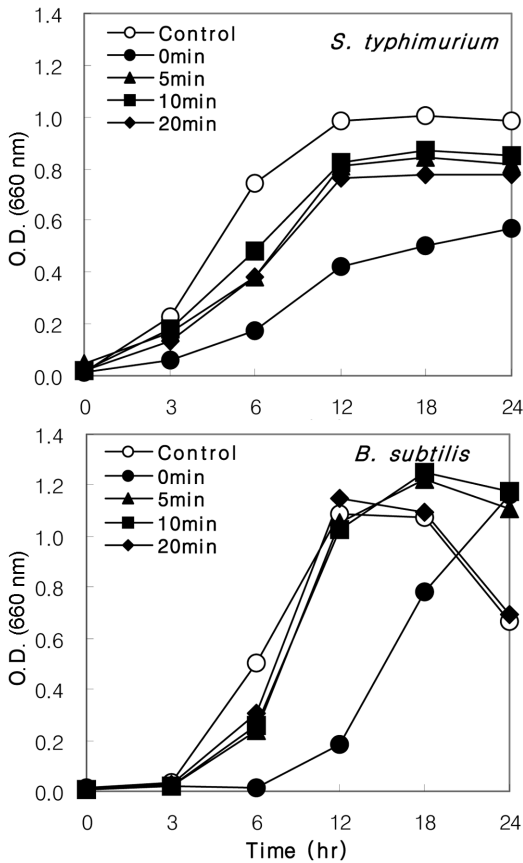


Fig. 3. Effect of thermal treatment to marta rosemary extracts at 100 on growth inhibition of *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium* in nutrient broth at 37°C.

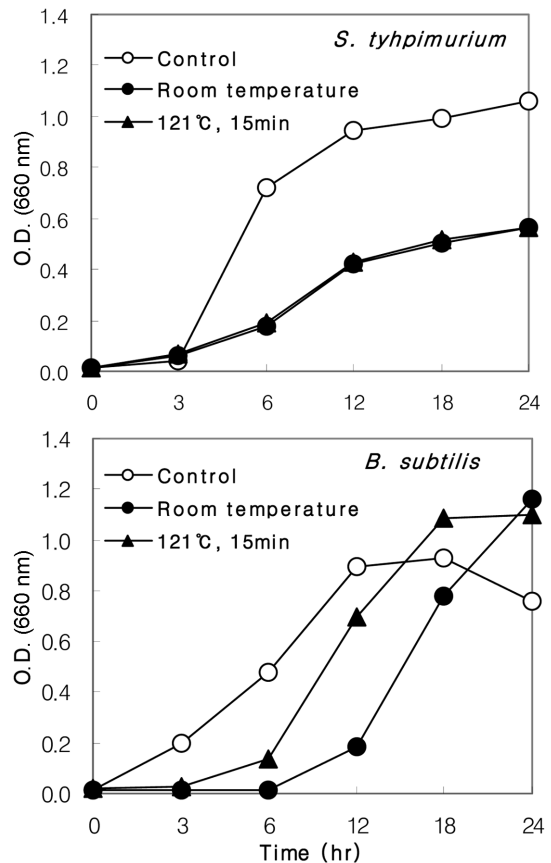


Fig. 4. Effect of thermal treatment to marta rosemary extracts on growth inhibition of *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium* in nutrient broth at 37°C.

허브 추출액을 일반 멸균조건인 121°C에서 15분간 열처리한 항균활성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 허브 성분의 열안정성은 대체로 불안정하며 100°C 실험의 결과처럼 *B. subtilis*에 대해서는 균의 유도기를 단축시키고 *S. typhimurium*에 대해서는 대수기의 비증식속도를 감소시켰다.

*B. subtilis*는 marta rosemary의 열처리 시 허브무처리구와 실온 허브처리구의 생육곡선 사이의 중간정도 저해를 보이며, 유도기가 실온 허브처리구의 6시간에서 3시간으로 짧아졌다. *S. typhimurium*(control $\mu = 0.091$)의 경우는 121°C에서 15분간 열처리한 허브처리구($\mu = 0.039$)의 생육곡선이 실온 허브처리구($\mu = 0.039$)와 거의 비슷한 곡선을 보여 marta rosemary의 항균성분의 열안정성은 높았다.

전체적으로 121°C에서 15분의 열처리는 *B. subtilis*보다 *S. typhimurium*에 대한 세 허브의 항균성분이 열에 더 안정하였다. Lee 등(19)의 유백피를 methanol로 추출하여 MIC 값과 열안정성을 조사한 결과에서 121°C에서 20분간 멸균 후에도 항세균 효과에는 별다른 영향이 없었다는 결과와 연관성이 있었다.

요 약

천연식품보존료의 개발을 목적으로 marta rosemary의 항균활성을 조건을 달리하여 조사하였다. 균주에 따른 에탄올 추출 marta rosemary의 항균성은 *S. typhimurium*과 *B. subtilis*에 대하여 높았다. 용매별 항균성은 극성이 작은 butanol과 hexane 추

출액에서 높았고, 수용액에서의 항균 활성은 pH 7에서 가장 높았다. 허브의 미생물의 생육억제 양상은 *B. subtilis*에 대하여 저농도에서는 유도기 지연형, 고농도에서는 유도기 지연 및 비증식속도 억제형이었으며 *S. typhimurium*은 농도에 관계없이 비증식속도 억제형으로 관찰되었다. 이와 같은 경향은 낮은 pH에서도 유사하게 나타났다. 항균물질의 100°C에서의 열안정성은 가열시간이 길수록 허브의 항균력이 저하되었고 121°C에서 15분간의 열처리로 인한 허브의 항균력은 *B. subtilis*보다 *S. typhimurium*에서 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 연구비(여자대학교 연구기반 확충사업: KISTEP 00-B-WB-08-A-02)지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Oh DH, Ham SS, Park BK, Ahn C, Yu JY. Antimicrobial activity of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. Korean. J. Food Sci. Technol. 30: 957-963 (1998)
- Shelf LA, Naglik OA, Bogen DW. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. J. Food Sci. 45: 1042-1044 (1980)
- Chung CK, Park OK, Yoo I, Park KM, Choi CU. Antimicrobial

- activity of essential oils of curry spices. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 716-719 (1990)
4. Seo KL, Kim DY, Yang SI. Studies on the antimicrobial effect of Wasabi extracts. Korean J. Nutr. 28: 1073-1077 (1995)
 5. Park CS. Effect of spices on the growth of pathogenic bacteria. J. Life Resour. Ind. 2: 9-18 (1997)
 6. Chen Q, Shi H, Ho CT. Effect of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. J. Am. Oil Chem. Soc. 69: 999-1002 (1992)
 7. Kramer RE. Antioxidants in clove. J. Am. Oil Chem. Soc. 62: 111-113 (1985)
 8. Vekari SA, Oreopoulou V, Tzia C, Thomopoulos CD. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 70: 483-487 (1993)
 9. Jhee OH, Yang CB. Antioxidant activity of extract from Bangah herbs. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 1157-1163 (1996)
 10. Chang SS, Biserka OM, Oliver ALH, Cheng LH. Natural antioxidants from rosemary and sage. J. Food Sci. 42: 1102-1106 (1977)
 11. Ahn CK, Lee YC, Yeom CA. Antioxidant and mixture effects of curry spices extracts obtained by solvent extraction. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 491-499 (2000)
 12. Cuvelier ME, Berset C, Richard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). J. Agric. Food Chem. 42: 665-669 (1994)
 13. Choi HR, Choi EH. Screening of antimicrobial and antioxidative herbs. J. Nat. Sci. Institute of Natural Science, Seoul Women's University 15: 123-131 (2003)
 14. Michelle MM, Schafer HW, Davidson PM, Zottola EA. Isolation and identification of antimicrobial furocoumarins from parsely. J. Food Prot. 60: 72-77 (1997)
 15. Park UY, Chang DS, Cho HR. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 91-96 (1992)
 16. Lee BW, Shin DH. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 200-204 (1991)
 17. Shin DH, Kim MS, Han JS. Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-borne bacteria. Korean J. Food. Sci. Technol. 29: 808-816 (1997)
 18. Chung SK, Jung JD, Cho SH. Antimicrobial activity of Chopi (*Zanthoxylum piperitum* DC.) extract. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 371-377 (1999)
 19. Lee IE, Cho SH. Antimicrobial effect of *Aristolochia contorta* Bge. extract on the growth of pathogenic and putrefactive microorganisms. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 1107-1111 (2000)
 20. Kim HS, Shin JO. Isolation and antimicrobial activity of *Xanthium strumarium* L. extract. Korean Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 183-188 (1997)
 21. Choi MY, Choi EJ, Lee E, Rhim TJ, Cha BC, Park HJ. Antimicrobial activity of pine needle (*pinus densiflora* Seib et Zucc.) extract. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 293-297 (1997)

(2004년 12월 8일 접수; 2005년 2월 16일 채택)