

참비름 추출물에서 항균성 물질의 분리 및 동정

오영숙 · 이신호*

영남대학교 생명공학연구소, ¹대구가톨릭대학교 식품산업학부

Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from *Amaranthus lividus*. Oh, Young Sook and Shin Ho Lee^{1*}. Institute of Biotechnology, Yeungnam University, 214-1, Dae-dong, Gyeongsan 712-749, Korea, ¹Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Hayang 712-702, Korea - Isolation and identification of pathogens from slaughter and meat processing plant were investigated. Antimicrobial activity of *Amaranthus lividus* against isolated pathogens such as *Aeromonas sobria*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* was investigated. Among the chloroform, ethyl acetate and butanol fraction of *amaranthus lividus* showed inhibitory effect against *Aeromonas sobria* CLFM1 and *Escherichia coli* CLFM2. Antimicrobial substance in chloroform fraction was isolated by silica gel adsorption column chromatography, sephadex LH-20 column chromatography and silica gel partition column chromatography. The antimicrobial compound of *amaranthus lividus* was identified as diethyl phtalate by HPLC, GC-MS, H-NMR and C-NMR.

Key words: Antimicrobial activity, *Amaranthus lividus*, diethyl phtalate

우리나라에서도 경제 성장과 더불어 곡류위주의 탄수화물 식품에서 육류, 유제품 등 단백질 식품으로 점차 식단의 형태가 변화되는 현실을 감안해 볼 때 이러한 병원성 세균에 대한 검사 방법의 확립과 대책이 절실히 검토되어야 할 것이다. 그리고 이러한 미생물의 증식을 억제하는 보존제로 인공 합성품이 상업적으로 사용되고 있으나 근래 소비자의 건강 지향적 육구의 증대와 안전성의 문제로 화학적 합성 보존제에 대한 기피현상이 강하게 일어나고 있다. 따라서 미생물의 증식을 억제하면서 안전성이 확보된 천연물 대체 보존료의 개발이 필요하게 되었고 현재 천연물에 존재하는 항균성 물질[1-9]을 식품 보존에 이용하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 동물성 식품으로는 난백 lysozyme[10, 11], 식물성 식품으로는 다양한 종류의 한약재와 식용식물의 추출물[12,13], 향신료의 이용[14,15]에 관한 보고가 활발하게 이루어지고 있다. 박[9]은 천연물을 이용하여 식중독 세균의 증식을 억제시킬 목적으로 여러 가지 조리에 널리 사용되고 있는 20종류의 향신료의 효과에 대해 보고하였으며, 녹차 추출물이 식중독 세균에 대한 항균성을 조사하여 식품에 보존제로서 이용할 수 있는 방안을 모색하기 위하여 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*에 대한 증식억제 작용[16]을 보고하였다. 그 외에도 쑥[17], 솔잎[18], 한약재[19,20], 민들레[21] 등의 다양한 식용식물이 각종 세균에 대하여 항균 활성이 있는 것으로 보고되고 있다. 양 등

[5]은 주위에서 흔히 구할 수 있는 자생식물 80종을 수집하여 methanol 추출물에 대한 용매 분획을 실시한 결과 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 그리고 *Vibrio parahaemolyticus*에 대해서 사철쭉, 지칭개, 보리배이, 꿀풀, 광대나물 등이 항균효과를 나타내었다고 보고하였다.

참비름은 비름과에 속하는 식물로 56속 900여종으로 주로 열대와 아열대에 분포하나 우리 나라에서도 3속 7종이 자생하는 것으로 알려져 있으며, 들과 밭에 자생하는 잡초로써 나물용으로 이용되는 비름도 여러 종류로 비름(*Amaranthus mangostanus*), 참비름(*A. lividus* L), 눈비름(*A. deflexus*), 털비름(*A. retroflexus* L)등이 있는데 주로 참비름을 이용하고 있다. 참비름은 1년생 잡초로서 밭, 공휴지 등지에 잘 자라며 종자로 번식한다. 참비름은 5월 중순~6월 초순 연한 잎과 줄기를 채취할 수 있으며 단백질의 함량이 매우 높고 필수아미노산 중에서도 특히 라이신을 많이 함유하고 있는 등 식품가치가 높으며 배앓이를 예방 또는 치료하는 효능과 뿌리는 호박의 뿌리와 함께 달여 먹으면 유산 시 출혈을 멎게 하는 효과가 있다고 알려져 있다.

본 연구는 유통과정 중에서 발생될 수 있는 식중독 병원성 세균으로 인한 식중독을 예방하기 위하여 병원성 미생물의 성장을 억제할 수 있는 생육 억제제를 선별하고 분리·동정하여 그 사용기법을 도출하여 위생적이고 안전한 식육제품의 생산방안을 모색하기 위하여 실시하였다.

*Corresponding author
Tel: 82-53-850-3217, Fax: 82-53-850-3217
E-mail: leesh@cu.ac.kr

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 참비름(*Amaranthus lividus*)은 1998년 4월 대구 시내백화점에서 구입하였고 수세, 건조 후 분쇄하여 사용하였다.

참비름 추출물의 항균성 검색

분쇄한 참비름 1 kg에 시료 10배 분량의 75% ethanol을 넣고 상온에서 24시간 동안 추출한 다음, 여과시켜 얻은 액을 회전진공 증발 농축기로 농축하였다. 에탄올 추출물의 항균성검사는 추출물 1%가 함유된 TSB(Tryptic soy broth)에 분리한 병원성 균을 접종하여 24시간 배양하였다. 추출물의 항균효과는 24시간 배양하면서 시간 경과에 따른 생균수의 변화를 측정하였다. 사용한 균주는 식육처리장 및 식육가공공장에서 분리·동정한 병원성 식중독균인 *Aeromonas sobria*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*를 사용하였다.

참비름 추출물의 분획

에탄올 추출물을 n-hexane을 가하여 분획한 후 여과 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 이와 같은 방법으로 chloroform, ethyl acetate, butanol로 순차적으로 분획 하였다.

참비름 추출물의 용매분획별 항균성 검색

분획 추출물의 항균성 검색은 억제능이 있는 추출물을 membrane filter(0.2 μ m)로 제균하여 각 추출물 1%를 TSB(trypic soy broth)에 24시간 배양한 배양액에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 추출물의 항균효과는 24시간 배양하면서 시간 경과에 따른 생균수의 변화를 측정하였다.

항균성 물질의 분리

참비름의 Chloroform fraction을 silica gel column chromatography(10 g, 70~230 mesh, column chromatography-용, Merck)로 MeOH 농도를 0, 5, 10, 15, 20, 50, 100%로 분획하여 얻은 fraction을 항균성이 높게 나타난 fraction만을 합쳐서 다시 sephadex LH-20(25~100 mesh, Phamacia)으로 분리하여 항균력이 가장 우수한 fraction을 Silica gel (25 g, 70~230 mesh, column chromatography-용, Merck사)에 16ml의 glycine buffer(0.2 M-glycine, 0.2 M HCl, pH 3)를 가하여 coating[23] 시키고 n-hexane으로 slurry를 만들어 column(2.9 \times 45 cm)에 충전 시킨 후, n-hexane-EtOAc 용매계로 EtOAc농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100%까지 증가하여 step-wise 용출 방법으로 용출하여 활성을 검정하였다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for analysis of antimicrobial compounds from *Amarantus lividus*.

Requester	Condition
Instrument	Varian
Column	μ -C ₁₈ bondpak
Mobile phase	Water
Wavelength	Water : Acetonitrile = 9 : 1
Injection volume	25°C

항균성 물질의 동정

HPLC - 참비름의 chloroform의 3번째 3rd fraction을 단일 분리하기 위하여 Table 1의 조건으로 HPLC를 실시하였다.

TLC - 시료를 MeOH에 녹여 TLC plate(Kieselgel 60, 20 \times 20 cm, Merck)에 bending 하였다. n-hexane-EtOAc(1 : 1, v/v) 용매계로 전개시키고 UV 254 nm를 이용하여 분리 양상에 따라 분취하여 EtOAc로 용출하였다.

GC-MS - Mass spectrum(MS)은 김 등[24]의 방법에 따라 GC/MS를 사용하였다. Column은 DB-1(30 m \times 0.25 mm)을 이용하였으며 column온도는 40°C에서 2분 유지시킨 후 10°C/min으로 승온하여 320°C, 1 min 조건으로 분석하였다. Injector 온도는 250°C였으며 electron energy는 70eV였다. Carrier gas는 He(1.0 ml/min)을 사용하였다.

NMR - Proton nuclear magnetic resonance spectrophotometer (¹H-NMR)spectrum은 Varian Gemini 2000(500 MHz) ¹H-NMR과 C-NMR로 측정하였다. 화학적 이동은 내부 표준물질로 d-DMSO를 사용하였다.

결과 및 고찰

참비름 추출물의 항균성

참비름 에탄올 추출물을 분리한 병원성미생물에 대한 증식억제 효과를 검색하기 위하여 24시간 동안 분리 미생물의 생균수 변화를 측정한 결과, *A. sobria* CLFM1와 *E. coli* CLFM2의 성장은 대조구에 비해 4 log cycle정도 억제하였으며 *E. coli* O157 CLFM3, *L. monocytogenes* CLFM4, *S. spp.*, *S. aureus* CLFM5의 성장은 3 log cycle 억제하였다. 일반적으로 gram 음성균 보다 gram 양성균에 대하여 정유성분이 민감하게 반응하여 항균력이 높다고[25, 26] 알려져 있으나 본 실험에서는 gram 음성균인 *E. coli*의 생육에도 추출물이 민감하게 반응하는 경향을 보여주었다. 그리고 김[27]의 연구에 의하면 산초의 메탄올 추출물이 gram 양성 균주 보다 gram 음성 균주인 *E. coli*에 더 민감하게 반응하였다.

참비름 추출물의 분획별 항균성

참비름 ethanol추출물에서 항균성 물질을 분리하기 위하여 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 순으로 분획하여 항균성을 검색한 결과를(Fig. 1~6)에 나타내었다. 참

비름의 chloroform 분획 추출물은 실험 균주 6종에 대하여 성장을 억제하며 사멸시키는 경향을 나타내어 항균성이 매우 높은 것으로 나타났고, 특히 *E. coli* CLFM2의 경우 (Fig. 2) chloroform 분획 첨가구의 경우 배양 24시간 이후 완전히 사멸하는 경향을 나타내었다. *E. coli* O157 CLFM3의 경우 (Fig. 3) chloroform 분획은 *E. coli* CLFM2와 유사한 경향을 나타내었으나 butanol 분획은 항균활성을 나타내지 않았다. *L. monocytogenes* CLFM4의 경우 (Fig. 4) chloroform 분획 첨가구의 경우 배양초기부터 생균수가 감소하기 시작하여 배양 24시간 이후 검출되지 않는 것으로 보아 사멸되는 경향을 나타내었고 *Salmonella* spp.의 경우 (Fig. 5)는 대조구에 비해 배양 24시간 중 약 5 log cycle 억제하는 경향을 나타내어 항균활성을 보였으며 *S. aureus*

CLFM5 (Fig. 6)의 경우는 배양 12시간까지 배양초기 생균수 10^4 /ml를 유지하였으나 그 후 급격히 감소하여 배양 24시간 이후 사멸하는 경향을 나타내어 뚜렷한 항균활성을 나타내었다. 따라서 참비름 추출물의 항균효과를 보면 추출 용매별로 살펴보면 chloroform 분획에서 항균 활성이 가장 낮았다. 이 등[27]은 천연항균물질 검색에 대한 1차 실험결과를 토대로 하여 항균성이 확인된 식물 추출물에 대해 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 및 물로써 순차 추출하여 항균성을 재시험한 결과, 일반적으로 물 추출물보다는 비극성이 높은 butanol과 chloroform으로 추출된 획분에서 얻어진 물질이 높은 항균력을 보인다고 하였다. 조 등[28]은 또한 수산가공 폐기물 및 미 이용 해조류의 항균성 물질 검색

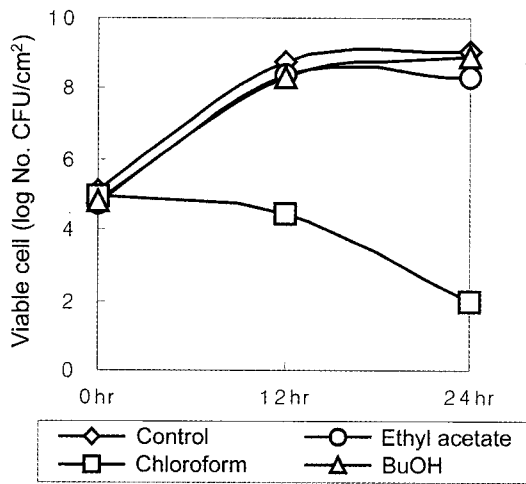


Fig. 1. Antimicrobial effect of *Amaranthus lividus* extracts on the growth of *Aeromonas sobria* CLFM1 isolated from meat processing plant at 37°C.

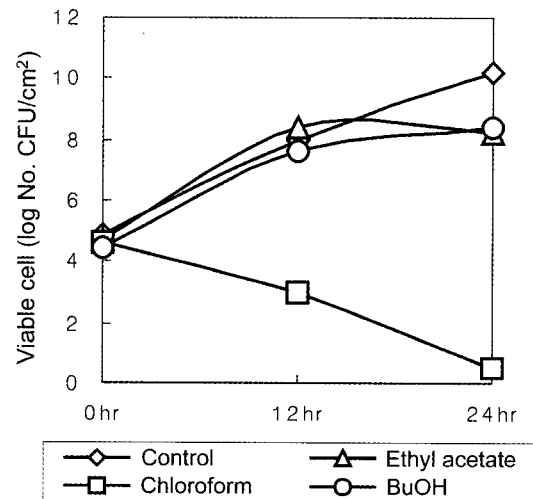


Fig. 3. Antimicrobial effect of *Amaranthus lividus* extracts on the growth of *Escherichia coli* O157 CLFM3 isolated from meat processing plant at 37°C.

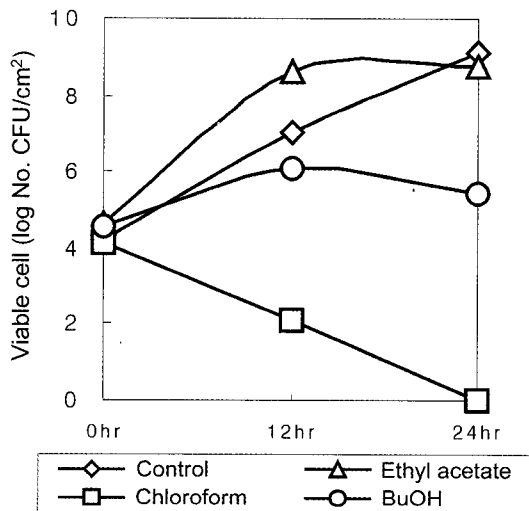


Fig. 2. Antimicrobial effect of *Amaranthus lividus* extracts on the growth of *Escherichia coli* CLFM2 isolated from meat processing plant at 37°C.

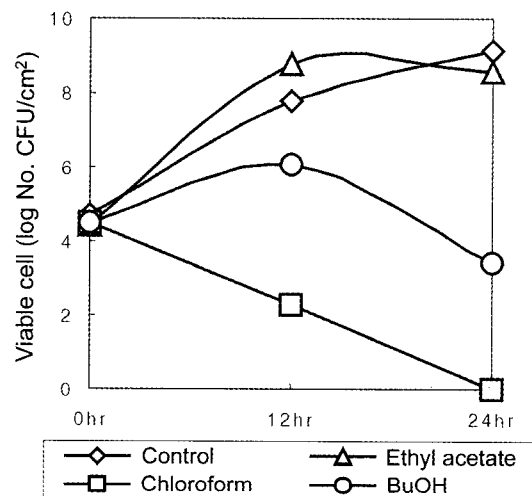


Fig. 4. Antimicrobial effect of *Amaranthus lividus* extracts on the growth of *Listeria monocytogenes* CLFM4 isolated from meat processing plant at 37°C.

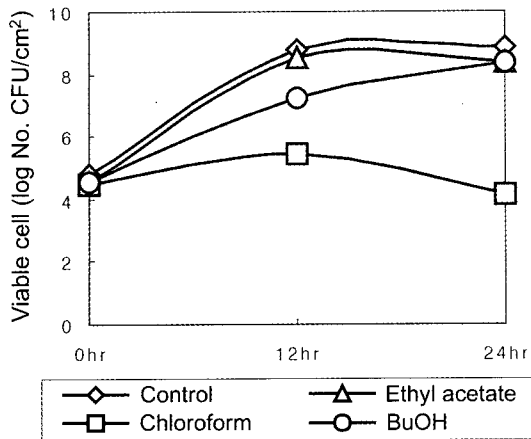


Fig. 5. Antimicrobial effect of *Amaranthus lividus* extracts on the growth of *Salmonella* spp. CLFM5 isolated from meat processing plant at 37°C.

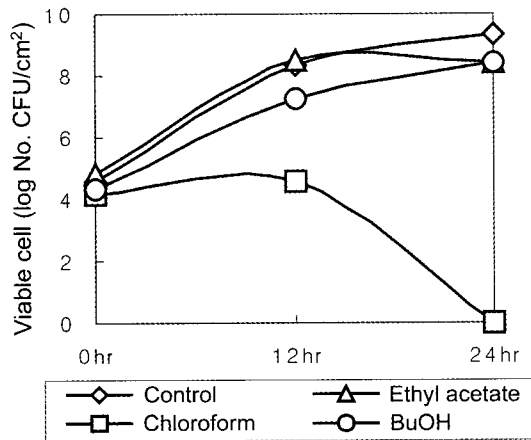


Fig. 6. Antimicrobial effect of *Amaranthus lividus* extracts on the growth of *Staphylococcus aureus* CLFM6 isolated from meat processing plant at 37°C.

에서 *S. aureus*에 대해 물 추출물에서는 불가사리와 우렁쉥이 껍질이 항균효과 있는 것으로 나타났으나 비극성 용매인 ether 추출구에서는 참빛풀, 불가사리, 우렁쉥이 껍질, 오징어 먹줄, 성게껍질, 구멍쇠 미역, 모자반등이 항균력이 높은 것으로 보고하고 있다. 또한 환삼 덩쿨 생리활성물질[29]의 연구에서는 분획별 항균효과를 비교한 결과 부탄올 분획이 *S. aureus*와 *S. cerevisiae*에 대한 항균효과가 우수하다고 보고한 바 있다. 또한 Kim 등은[30] 민들레 메탄올 추출물로부터 항균성을 측정된 결과 민들레 ethyl acetate 분획 추출물은 가장 낮은 농도인 500 µm/disc의 농도에서 *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*에 항균력을 나타내었다고 보고하였다. 참비름 추출물은 각 분획별로 항균성을 나타내는 것으로 보아 용매 분획 시 항균성 물질이 용해되어 있는 것으로 생각되어지며 여러 물질이 혼합되어 있는 것으로 사료된다.

Chloroform 분획물의 항균성

분리 미생물에 대해 가장 항균력이 있는 참비름 chloroform 추출물을 silica gel column chromatography를 실시한 결과 7개의 fraction을 얻었고 그에 대한 항균성은 Table 2와 같다. 7개 fraction을 사용하여 40 µl/disc가 되도록 paper disc에 첨가한 후 6종의 시험 균주를 대상으로 clear zone의 넓이를 측정하여 항균력을 검색하였다. *A. sobria* CLFM1의 경우 2번째 fraction에서 36 mm, 4번째 fraction에서 20 mm, 5번째 fraction에서 21 mm의 clear zone을 형성하였고, *E. coli* CLFM2의 경우는 2번째 와 5번째 fraction에서 21 mm의 clear zone을 형성하여 강한 항균력을 보였다. 이는 각각의 fraction이 *A. sobria* CLFM1의 성장을 억제하여 disc 주변에 균 성장을 억제하는 clear zone을 형성하였음을 알 수 있다. *L. monocytogenes* CLFM4와 *S. aureus* CLFM5 경우도 2번째 fraction에서 27 mm의 항균력을 나타내었다. 따라서 어떤 fraction 보다 강한 항균력을 보인 2번째, 4번째, 5번째, 6번째 fraction을 혼합하여 두 번째로 column chromatography를 실시하였고 그에 대한 항균성 실험을 실시한 결과는 Table 3과 같다. 2nd fraction의 4번째 fraction은 *A. sobria* CLFM1에 대해 23 mm의 clear zone을 형성하여 높은 항균력을 나타내었으며, *E. coli* CLFM2와 *L. monocytogenes* CLFM4에 대해서 2nd fraction에서 4번째 분획이 공히 19 mm의 clear zone을 형성하

Table 2. Antimicrobial activity of chloroform fractions extracted from *Amaranthus lividus* by passing through a silica gel adsorption column.

Pathogens	Clear zone on plate (mm)						
	1*	2	3	4	5	6	7
<i>A. sobria</i> CLFM1	33	36	18	20	21	24	19
<i>E. coli</i> CLFM2	18	21	18	20	21	24	19
<i>E. coli</i> O157 CLFM3	12	20	14	14	18	17	14
<i>L. monocytogenes</i> CLFM4	16	27	15	15	16	19	13
<i>Salmonella</i> spp. CLFM5	17	27	15	15	16	19	13
<i>S. aureus</i> CLFM6	16	21	14	21	17	17	15

*Chloroform fractions

Table 3. Antimicrobial activity of chloroform fractions extracted from *Amaranthus lividus* by passing through a sephadex LH-20 column.

Pathogens	Clear zone on plate (mm)			
	1*	2	3	4
<i>A. sobria</i> CLFM1	13	15	15	23
<i>E. coli</i> CLFM2	15	15	19	19
<i>E. coli</i> O157 CLFM3	-	16	12	15
<i>L. monocytogenes</i> CLFM4	-	17	16	19
<i>Salmonella</i> spp. CLFM5	-	14	16	15
<i>S. aureus</i> CLFM6	-	15	17	20

*Chloroform fractions

Table 4. Antimicrobial activity of chloroform fractions extracted from *Amaranthus lividus* by passing through a silica gel partition column.

Pathogens	Clear zone on plate (mm)							
	1*	2	3	4	5	6	7	8
<i>A. sobria</i> CLFM1	-	-	15	17	19	24	31	11
<i>E. coli</i> CLFM2	-	-	14	16	20	27	32	19
<i>E. coli</i> O157 CLFM3	-	-	14	20	19	24	29	11
<i>L. monocytogenes</i> CLFM4	-	-	15	15	19	24	31	15
<i>Salmonella</i> spp. CLFM5	-	-	15	15	19	27	33	18
<i>S. aureus</i> CLFM6	-	-	14	16	20	28	31	14

*Chloroform fractions

였다. 2nd fraction의 No. 1 fraction은 *S. aureus* CLFM5에 대해 clear zone을 형성하지 않았으나 No. 4 fraction에서 20 mm의 clear zone을 형성하였다. *E. coli* O157 CLFM3에 대해 No. 4 fraction에서 15 mm의 clear zone을 나타내었다. 따라서 sephadex LH-20 column chromatography에서 항균력이 가장 높은 4번째 활성획분에 대하여 silica gel partition column chromatography를 실시하여 8개의 fraction으로 분리하였다. 분리된 8개의 분획에 대한 항균효과의 결과를 Table 4에 나타내었다. *A. sobria* CLFM1에 대해 1, 2번째 fraction에서는 clear zone이 형성되지 않아 항균활성을 나타내지 않은 반면 n-hexane에 대한 ethyl acetate의 농도가 50~60%로 증가함에 따라 6번째와 7번째 fraction에서는 24 mm, 31 mm의 clear zone을 형성하여 뚜렷한 항균성을 나타내었다. 7번째 fraction은 *E. coli* O157 CLFM3(29 mm)을 제외한 5종의 실험 균주에 대하여 30 mm 이상의 clear zone을 보여 높은 항균 활성을 나타내었다. 이 결과에 의하면 n-hexane에 대한 EtOAc의 농도가 50~60%일 때 용출 활성 집중이 인정되었다. 김 등[30]은 민들레 ethyl acetate 추출물의 column fraction 결과 *B. subtilis*, *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 항균활성이 뛰어난 것을 볼 수 있었고 column 1차 분획물이나 2차, 3차 분획물이 clear zone을 형성하는데도 큰 차이가 없음을 시사하였고, 두릅수피의 항미생물 활성물질의 동정[31]에서 *S. aureus*와 *E. coli*를 대상으로 항미생물 활성을 검정한 결과 n-hexane에 대한 ethyl acetate의 농도가 40%~50%의 용출획분에서 활성을 나타내었다.

위의 결과로 미루어 볼 때 참비름 chloroform 추출물은 *Aeromonas sobria*, *E. coli*, *E. coli* O157, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*에 대하여 항균활성이 뛰어난 것을 볼 수 있었다.

분리된 항균물질의 구조결정

참비름 chloroform 분획으로 부터 Silica gel partition column chromatography에서 분리된 활성물질의 순도를 확인하고자 MeOH 용매계를 이용하여 UV 254 nm(μ -

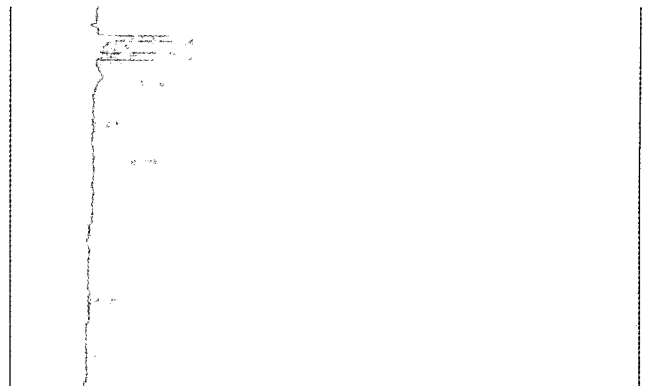


Fig. 7. HPLC spectrum of 3rd fraction (No. 7) from chloroform extracts of *Amaranthus lividus*.

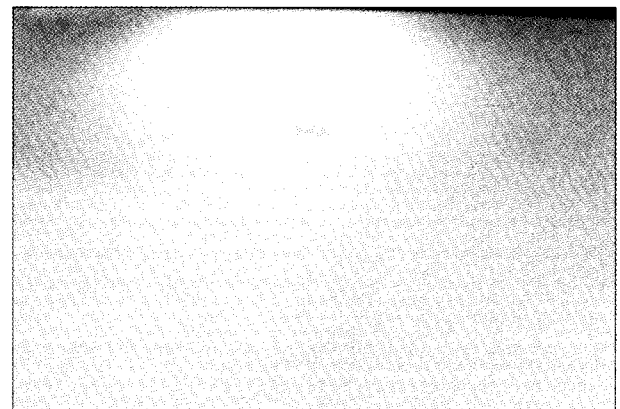


Fig. 8. TLC spectrum of 3rd fraction (No. 7) from chloroform extracts of *Amaranthus lividus*.

bondapak C₁₈)에서 HPLC로 Fig. 7와 같이 분리하였다. 분리된 peak를 n-hexan-EtOAc(1:1, v/v), 용매계로 TLC한 결과, R_f 13.1 위치(Fig. 8)에 단일 spot를 나타내어 순수물질임을 확인하였다. 분리된 활성물질을 GC-MS(m/z)를 분석한 결과는 Fig. 9에서 나타난 바와 같이 m/z 221에 base peak로 나타났으며 이 spectrum으로 NIST library 검색을 실시한 결과, C₁₂H₁₄O₄의 diethyl phthalate로 시사되었다. 따라서 d-DMSO 용매계를 사용하여 ¹H-NMR을 실시한 결과(Fig. 10) δ 1.33(3H), 4.32(2H), 7.29(H), 7.83(H)에서 proton이 관찰되었으며, 2개의 benzen ring proton(δ : 7.29, 7.83)과 2개의 hydroxyl기의 proton(δ : 1.33, 4.32)이 인정되었다. 또

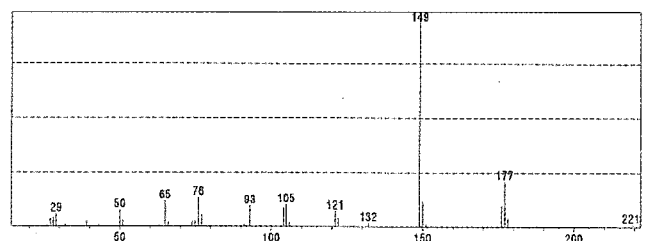


Fig. 9. GC-MS spectrum antimicrobial compound from *Amaranthus lividus*.

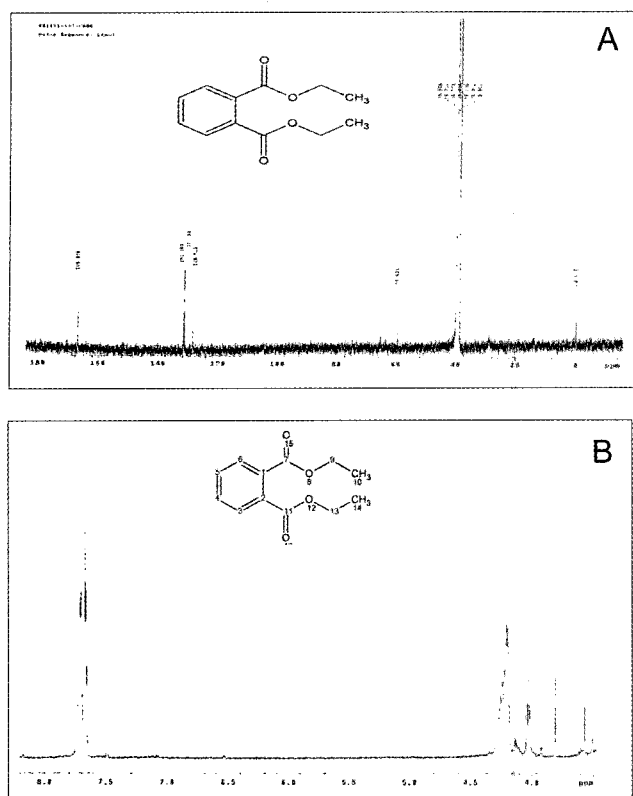


Fig. 10. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum antimicrobial compound from *Amaranthus lividus*. A: $^1\text{H-NMR}$ spectrum and B: $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum.

한 d-DMSO 용매계로 C-NMR을 측정한 결과(Fig. 10) δ : 167.5에서 C=O의 carbon으로 인정되는 peak가 관찰되었으며 δ : 132.7, 131.1, 129.5에서 aromatic carbon을 확인하였고 61.5, 14,의 위치에서 CH_2 와 CH_3 를 확인하였다. 그리고 이들 spectra는 diethyl phthalate의 Aldrich library spectra와 일치하였다. 이상의 GC-MS, $^1\text{H-NMR}$, C-NMR의 분석에서 얻어진 spectra 또한 diethyl phthalate의 구조를 갖고 있는 것으로 나타내, 참비름에서 항균성 물질로 분리된 활성분체는 diethyl phthalate로 동정되었다.

요 약

참비름(*Amaranthus lividus*)의 에탄올 추출물이 6종의 분리 병원성 미생물에 대해 항 미생물 활성을 나타내었으며 silicagel column chromatography에서는 8개의 fraction중에서 7번째가 6개의 분리 미생물에 대해 clear zone을 형성하여 가장 높은 항균력을 나타내었고 특히 *A. sobria* CLFM1은 31mm, *S. spp.*는 33mm로 가장 큰 clear zone을 형성하였다. 활성물질의 순도를 확인하고자 methanol에 용해시킨 시료를 n-hexane : Ethyl acetate(1:1, v/v)용매계로 TLC를 전개시킨 결과 Rf 13.3의 위치에서 단일 spot를 나타내어 활성물질이 대단히 정제되어 있었으며, HPLC로 확인 결과

retention time 3.36에 single peak를 나타내 단일 물질임을 확인할 수 있었다. 분리된 활성물질을 GC-MS(m/z)로 분석한 결과 m/z 222에서 base peak로 나타났으며 이 spectrum으로 NIST library 검색을 실시 한 결과, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ 의 diethyl phthalate로 시사되었다. C-NMR과 $^1\text{H-NMR}$ 을 실시한 결과 참비름에서 분리한 물질은 구조식 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 인 diethyl phthalate로 동정되었다. 참비름(*Amaranthus lividus*)의 에탄올 추출물이 6종의 분리 병원성 미생물에 대해 항 미생물 활성을 나타내었으며 silicagel column chromatography에서는 8개의 fraction중에서 7번째가 6개의 분리 미생물에 대해 clear zone을 형성하여 가장 높은 항균력을 나타내었고 특히 *A. sobria* CLFM1은 31 mm, *S. spp.*는 33 mm로 가장 큰 clear zone을 형성하였다. 활성물질의 순도를 확인하고자 methanol에 용해시킨 시료를 n-hexane : Ethyl acetate(1:1, v/v)용매계로 TLC를 전개시킨 결과 Rf 13.3의 위치에서 단일 spot를 나타내어 활성물질이 대단히 정제되어 있었으며, HPLC로 확인 결과 retention time 3.36에 single peak를 나타내 단일 물질임을 확인할 수 있었다. 분리된 활성물질을 GC-MS(m/z)로 분석한 결과 m/z 222에서 base peak로 나타났으며 이 spectrum으로 NIST library 검색을 실시 한 결과, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ 의 diethyl phthalate로 시사되었다. C-NMR과 $^1\text{H-NMR}$ 을 실시한 결과 참비름에서 분리한 물질은 구조식 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 인 diethyl phthalate로 동정되었다.

REFERENCES

1. Kwak, Y. S., J. W. Yang, and K. S. Lee. 1993. Screening of herb drugs showing antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms. *J. Food Safety* **8**: 141-145.
2. Lee, B. W. and D. H. Shin. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Food Sci. Biotechnol.* **23**: 200-204.
3. Lee, B. W. and D. H. Shin. 1991. Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for food spoilage microorganisms. *Food Sci. Biotechnol.* **23**: 205-211.
4. Yeo, S. G., C. W. Ahn, I. S. Kim, Y. B. Park, Y. H. Park, and S. B. Kim. 1995. Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, oolong tea black tea. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**: 293-298.
5. Yang, M. S., Y. L. Ha, S. H. Nam, S. U. Choi, and D. S. Jang. 1995. Screening of domestic plants with antibacterial activity. *Agr. Chem. Biotechnol.* **38**: 584-589.
6. Lee, Y. C. and J. H. Yoon. 1993. Antioxidative effects of volatile oil and oleoresin extracted from rosemary, sage, clove and nutmeg. *Food Sci. Biotechnol.* **25**: 351-354.
7. Han, J. S., D. H. Shin, S. E. Yun, and M. S. Kim, 1994. Antimicrobial effects on listeria monocytogenes by some edible plant extracts. *Food Sci. Biotechnol.* **26**: 545-551.
8. Park, S. W., C. J. Woo, S. K. Chung, and K. T. Chung. 1994. Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fraction from *Humulus japonicus*. *Food Sci. Biotechnol.* **26**: 464-470.

9. Park, C. S. 1997. Effect of spices on the growth of pathogenic bacteria. *J. Life Resources - Industry* **2**: 9-18.
10. Pellegrini, A., U. Thomas, R. von Fellenberg, and P. Wild. 1992. Bacterial activity of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 180-187.
11. Pellegrini, A., U. Thomas, N. Bramaz, S. Klauser, D. Hunziker, and R. Fellenberg. 1997. Identification and isolation of bacterial domain in chicken egg white lysozyme. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 372-378.
12. Kang, S. K., N. K. Sung, Y. D. Kim, J. K. Lee, B. H. Song, Y. W. Kim, and S. K. Park, 1994. Screening of antimicrobial activity of leaf Mustard (*Brassica juncea*) extract. *J. Food Sci. Nutri.* **23**: 1008-1013.
13. Shin, K. H., K. I. Seo, S. G. Gang, S. J. Moon, and H. C. Kim. 1996. Antimicrobial substances of distilled components from mustard seed. *J. Kor. Soc. Food. Nutri.* **25**: 948-955.
14. Seo, K. I., S. K. Park, J. R. Park, H. C. Kim, J. S. Choi, and K. H. Shim. 1996. Changes in antimicrobial activity of hydrolyzate from mustard seed (*Brassica juncea*). *J. Kor. Food. Nutri.* **25**: 129-134.
15. Shelef, L. A., O. A. Naglik, and D. W. Bogen, 1980. Sensitivity of some common food borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. *J. Food Sci.* **45**: 1042-1045.
16. Shelef, L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety.* **6**: 29-4417.
17. Park, C. S. 1998. Antibacterial activity of green tea against pathogenic bacteria. *Kor. J. Postharv. Sci. Technol.* **5**: 286-291.
18. Kwon, D. J., J. H. Park, M. Kwon, J. Y. Yoo, and Y. J. Koo. 1997. Optimal extracting condition of growth-inhibitory component of wormwood (*Artemisia princeps*) against *Clostridium perfringens*. *Agr. Chem. Biotechnol.* **40**: 267-270.
19. Kuk, J. H., S. J. Ma, and K. H. Park. 1997. Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*. *Food Sci. Biotechnol.* **29**: 294-210.
20. Lee, S. H. and W. J. Choi. 1998. Effect of medicinal herbs' extracts on the growth of lactic acid bacteria isolated from kimchi and fermentation of kimchi. **30**: 624-629.
21. Park, U. Y., D. S. Chang, and H. R. Cho, 1992. Antimicrobial effect of *Lithospermi radix* (*Lithospermum erythrorhizon*) extract. *J. Food Sci. Nutri.* **21**: 97-100.
22. Kim, K. H., H. J. Chun, and Y. S. Han. 1998. Screening of antimicrobial activity of the dandelion (*Taraxacum platycarpum*) extract. *Kor. J. Food Cookery. Sci.* **14**: 11, 4-118.
23. Park, K. H., S. J. Kim, J. D. Park, L. S. Lee, and K. H. Hyun. 1993. Biochemistry · molecular biology : Brassinosteroid substances in immature *Oryza sativa* seeds. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.* **36**: 376-380.
24. Park, K. H., S. J. Kim, and K. H. Hyun. 1993. Brassinosteroid substances in immature *Cassia tora* seeds. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.* **36**: 99-104.
25. Park, K. H., A. Sakurai, and N. Takahashi. 1983. Gibberellin production in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant and Cell Physiol.* **24**: 1241-1246.
26. Lemos, T. L. G., F. J. A. Matos, J. W. Alencer, A. A. Craverio, A. M. Clark, and J. D. MacCheesney. 1990. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytother. Res.* **4**: 82-90.
27. Kim, S. I., H. J. Park, and Y. S. Han. 1996. Inhibitory effect of mugwort on the growth of food spoilage microorganisms and identification of antimicrobial compounds. *J. Food Sci. Nutri.* **1**: 59-63.
28. Kim, S. I and Y. S. Han. 1998. Isolation and identification of antimicrobial compound from sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **27**: 574-584.
29. Lee, Y. J., D. H. Shin, Y. S. Chang, and W. S. Kang. 1993. Antioxidative effect of us javanica linne extract by various solvents. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **25**: 677-682.
30. Cho, S. Y., B. J. You, M. H. Chang, and S. J. Lee. 1994. Screening for the antioxidants in unused marine resources by the polarographic method. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**: 261-265.
31. Keun, H. K. and C. M. Kyung. 1999. Isolation and identification of antimicrobials compound from Dandelion (*Taraxacum platycarpum* D.). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutri.* **28**: 822-829.
32. Ma, S. J., B. S. Ko, and K. H. Park. Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from Bark of *Aralia elata*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**: 807-812.

(Received Nov. 27, 2004/Accepted May 9, 2005)