

연잎 추출물의 항균 효과

이경석 · 오창석 · 이기영[†]

호서대학교 식품생물공학과

Antimicrobial Effect of the Fractions Extracted from a Lotus (*Nelumbo nucifera*) Leaf

Kyung-Seok Lee, Chang-Seok Oh and Ki-Young Lee[†]

Dept. of Food & Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Abstract

In this study the antimicrobial activity of the extract from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*) was evaluated in comparison with benzoic acid. The 70% ethanol extract was fractionated subsequently by hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water, and the antimicrobial activity of each dried fraction was tested by paper disk diffusion method. The ethyl acetate fraction exhibited strong antimicrobial activity on the five strains of food born bacteria e.g. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas fluorescens*. The antimicrobial activity of the fraction was stronger than benzoic acid and showed no appreciable difference between on Gm⁺ and Gm⁻ bacteria. Heat treatment of the fraction at 110°C for 1 hr did not change the degree of inhibitory effect. The ethyl acetate fraction showed almost perfect growth inhibition on the tested strains at over 800 ppm.

Key words: lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf, antimicrobial activity, food born pathogens

서 론

현대 세계는 과학기술의 발전과 산업화에 의해 다양하고 간편한 가공식품들이 대량 생산, 소비되고 있으며, 질적 수준도 점차 높아지고 있는 추세이다. 또한 세계화에 따른 국가간의 빈번한 무역교류는 해외로부터 값싼 식품재료를 대량 수입할 수 있게 되어 유통 및 보관기간 중의 식품의 변질과 부패가 문제되고 있다(1-3). 이는 주로 미생물의 작용에 의해서 나타나며, 식중독과 부패균의 증식을 억제할 목적으로 다양한 종류의 보존료 사용이 불가피한 형편이다. 그러나 이러한 보존료들은 인체의 건강과 안전성의 문제를 야기해 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 물질은 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 향신료와 솔잎, 쑥, 황련, 자몽 등 다양한 식용식물 및 한약재의 항균성이 활발하게 보고되고 있다(8,9).

연은 수생식물 중 부엽식물에 속하는 쌍떡잎식물로서 아

시아 남부, 북호주가 원산지이다. 주로 연못에서 자라고 논밭에서 재배되기도 하는데(10,11), 이러한 연잎은 예로부터 출혈성 위궤양이나 위염, 치질, 출혈, 설사, 야뇨증에 효과가 있으며 각종 독성 물질에 대한 중화작용을 하는 것으로 알려져져 민간치료제로 사용하여 왔다. 하지만 연잎에 대한 생리활성이나 성분분석에 관한 연구보고는 거의 전무하고 다만 연근에 대한 항산화효과(12,13), 연근전분의 특성(14), 연꽃 씨의 항산화효과(15) 등 일 이외의 부분에서 일부 연구되어 있을 뿐이다.

본 연구는 민간에서 약재로 사용되는 연잎을 용매 추출하여 기존 항균제와 비교 실험을 통해 항균력을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

연잎은 충남 인취사에서 자연 건조한 것을 공급받아 분쇄해 사용하였다. 추출 및 분획에 사용한 시약은 1급을, 나머지 시약은 특급을 사용하였으며 배지는 nutrient broth(Difco)를 사용하였다.

실험에 사용한 균주는 식품의 부패나 변패에 관여하는 미

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

Table 1. List of microbial strains used for antimicrobial test

Strain		ATCC NO.
Grampositive Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	25923
Gramnegative Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	23736
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	10708
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	21541

생물로 Table 1과 같으며 Gram positive 2종, Gram negative 3종을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 사용하였다.

용매 추출

검색용 생리활성 물질은 건조 시료 150 g당 10배의 70% ethanol을 첨가한 후 환류냉각관을 부착한 80°C의 heating mantle에서 3시간 추출시켜 여과(Whatman No.2)하여 얻었다. 이렇게 2, 3차 추출액을 얻어 모두 혼합한 후 rotatory vacuum evaporator로 용매를 증발시킨 용액을 상압 가열 건조시켜 고형물 함량을 산출하였다(16).

70% ethanol추출물의 분획

70% ethanol추출물을 극성을 달리한 용매별로 분획하여 분획물을 얻었다(Fig. 1). 농축한 추출물을 water에 희석한 후 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 순으로 각각 분액어두에서 3회 반복 추출한 다음 rotatory vacuum evaporator로 ethanol을 증발시킨 용액을 동결 건조시켜 고형물 함량을 산출하였다(16).

총 페놀함량

연잎 추출물 및 용매별 분획물의 총 페놀함량은 AOAC법(17)에 의하여 측정하였다. 즉, 연잎 추출물 및 용매별 분획물 1 mL를 취하여 2%(w/v) Na₂CO₃ 용액 1 mL를 가하여

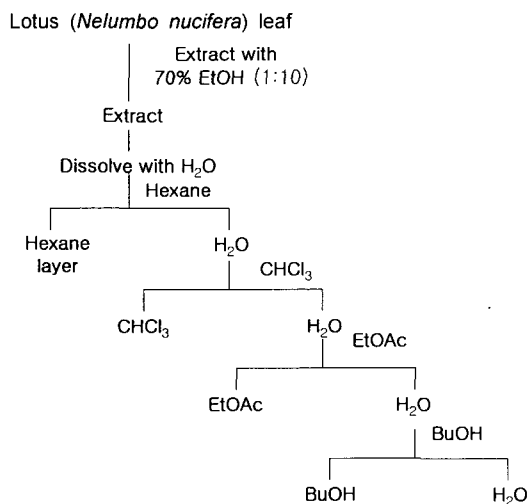


Fig. 1. Fractionation of antimicrobial extracts from a lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf.

3분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 가하여 반응시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 tannic acid로 환산하여 나타내었다.

Paper disk법에 의한 항균활성 측정

연잎 추출물의 항균활성 검색은 Paper disk agar diffusion법(18)을 응용하였다. 각 시험균주를 액체배지에 20시간 전배양하여 이 배양액 0.1 mL씩을 한천배지에 도말하여 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 접촉시키고 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 평가

Paper disk diffusion 결과 가장 우수한 항균활성을 보여준 ethyl acetate 분획물을 사용하여 열에 대한 안정성을 알아보기 위해 이를 각각의 온도와 시간별로 열처리한 후 항균효과를 paper disk법에 의하여 측정하였다(19).

Liquid culture에서 생육저해 효과 측정

우수한 항균활성을 보인 ethyl acetate 분획물을 사용하여 liquid culture에서 생육저해 효과를 측정하였다. 추출물 시료의 농도(w/v)가 각각 0 ppm, 100 ppm, 500 ppm, 800 ppm, 1,000 ppm이 되도록 조절된 배지에 배양액을 각각 0.05 mL씩 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하면서 2시간 간격으로 균의 생육정도를 측정하였다. 균의 생육정도는 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시간에 따른 흡광도의 변화로 균의 생육정도를 나타내었다(19).

통계처리

본 연구의 결과는 평균으로 나타내었고, 각 실험군 간의 비교분석은 SAS system을 이용하여 ANOVA 분석 후 $\alpha = 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 사용하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

70% 에탄올 추출수율 및 용매별 분획물의 수율

연잎의 항산화효과를 검토하기 위해 자연 건조하여 마쇄한 시료를 70% ethanol로 추출하였다. 이것의 일부를 110°C에서 건조시킨 후 고형분 함량을 추출수율로 계산한 결과 추출수율은 8.16%로 측정되었다. 이를 용매별로 분획한 후 70% 에탄올 추출물에 대한 추출수율을 측정된 결과는 Table

Table 2. Fraction yield from 70% ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf by various solvents (%)

Solvent	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water
Fraction yield	9.84	13.37	17.5	36.12	23.17

Table 3. Total phenol contents of fraction from 70% ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf by various solvents (mg/mL)

Solvents	Total phenolic content
Hexane	0.278 ^{c1)}
Chloroform	0.295 ^c
Ethyl acetate	0.761 ^a
Butanol	0.592 ^b
Water	0.088 ^d

¹⁾Means with different superscripts differ (p<0.05).

2와 같다.

70% ethanol 추출물의 용매별 분획물의 추출수율을 보면 butanol 분획이 36.12%로 가장 높았으며 water, ethyl acetate, chloroform, hexane 순이었다. 대체적으로 용매의 극성이 높아질수록 추출수율이 높은 것을 볼 수 있는데 이는 천년초(19), 거봉(20), 영경귀(21) 등의 용매별 분획물의 수율 또한 용매의 극성이 높을수록 분획물의 수율이 높은 것과 일치하는 결과를 보여주고 있다.

총 페놀 함량

홍경천(22), 꾸지뽕나무(23), 감초(24), 고삼(25) 등 식물에서 항균물질을 분리 동정한 결과 대부분 페놀계 물질들로 나타나 연잎 추출물의 페놀 성분과 항균력의 관계를 확인하기 위해 총 페놀 함량을 측정하였다. 연잎 70% ethanol 추출물의 총 페놀 함량은 0.362 mg/mL였고 이를 용매별로 분획한 추출수율을 측정한 결과 총 페놀 함량은 Table 3과 같다. Ethyl acetate 분획물이 0.761 mg/mL로 총 페놀 함량이 가장 높았으며 butanol, chloroform, hexane, water 순이었다.

Paper disk법에 의한 항균활성

병원성 식중독 미생물에 대한 연잎 분획물의 paper disk 법에 의한 항균 효과를 비교한 결과는 Table 4와 같다. Clear zone을 측정한 결과를 보면 총 페놀 함량이 높은 butanol, ethyl acetate 분획물의 항균력이 강하게 나타났으며 특히 ethyl acetate 분획물이 타 분획물보다 월등히 우수한 항균 효과를 보여 주었다. 이는 분획물의 항균력이 총 페놀 함량과 일치하는 결과를 보여주어 연잎의 페놀성 물질과 항균력 간의 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

Ethyl acetate 분획물은 동량의 benzoic acid보다도 월등히 우수한 효과를 보여 주었으며 Gram 양성세균과 음성세균 간 항균활성의 차이는 거의 보이지 않고 비슷한 항균 효과를 보여주었다.

Table 4. Antimicrobial activity of different solvent fraction from 70% ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf and benzoic acid

	Inhibition zone ¹⁾ (mm)					Benzoic acid
	Fractions of solvent					
	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water	
<i>B. subtilis</i>	-	-	15 ^{a2)}	12 ^b	-	11 ^b
<i>S. aureus</i>	-	-	13 ^a	10 ^b	-	10 ^b
<i>E. coli</i>	-	-	15 ^a	10 ^b	-	11 ^b
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	14 ^a	12 ^b	-	12 ^b
<i>P. fluorescens</i>	-	-	15 ^a	10 ^b	-	12 ^b

¹⁾4 mg of fraction extract was absorbed into paper disk (φ 8 mm) and the diameter (mm) of clear zone was measured.

²⁾Means in the same row with different superscripts differ (p<0.05).

Table 5. Thermal stabilities of the EtOAc fraction of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf for antimicrobial activity

	Inhibition zone ¹⁾ (mm)		
	100°C, 1 hr	110°C, 0.5 hr	110°C, 1 hr
<i>B. subtilis</i>	15	14	15
<i>S. aureus</i>	13	14	14
<i>E. coli</i>	14	15	15
<i>S. Typhimurium</i>	14	14	14
<i>P. fluorescens</i>	15	14	15

¹⁾4 mg of fraction extract was absorbed into paper disk (φ 8 mm) and the diameter (mm) of clear zone was measured.

열 안정성 평가

항균 효과가 뛰어난 ethyl acetate 분획물을 서로 다른 조건으로 열처리한 후 항균 효과를 paper disk diffusion에 의하여 검토한 결과는 Table 5와 같다. 가장 강한 열처리 조건인 110°C, 1 hr에서도 연잎 추출물의 항균력의 변화는 거의 일어나지 않아 열에 안정함을 알 수 있었다. Baek 등(26)은 대나무줄기 추출물을, Kong과 Oh(27)는 신갈나무 잎 추출물을 121°C에서 15분 열처리한 후 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogens* 등 2종의 균에 대한 항균효과를 측정할 결과 열에 안정하다고 보고하였다. 따라서 식물성 항균 물질들은 열안정성이 높은 것으로 여겨지며 식품보존제로 사용할 경우 취급이 용이할 것으로 생각된다.

Liquid culture에서 생육저해 효과

Paper disk법에서 가장 우수한 항균활성을 보여준 ethyl acetate 분획물의 생육 저해 효과를 liquid culture에서 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. Gram 양성세균 및 음성세균 모든 균주들은 ethyl acetate 분획물의 농도가 100 ppm 이하에서는 균의 생육저해에 영향을 미치지 못하였으나 800 ppm 이상일 경우 생장이 완전히 억제되었고 500 ppm에서는 20시간가량 균주의 생장이 억제됨을 볼 수 있었다. Gram 양성세균과 음성세균 간에는 큰 차이를 볼 수 없었다. 건조시킨 연잎은 절에서 오랜 동안 차로 이용해와 안전성이 입증된

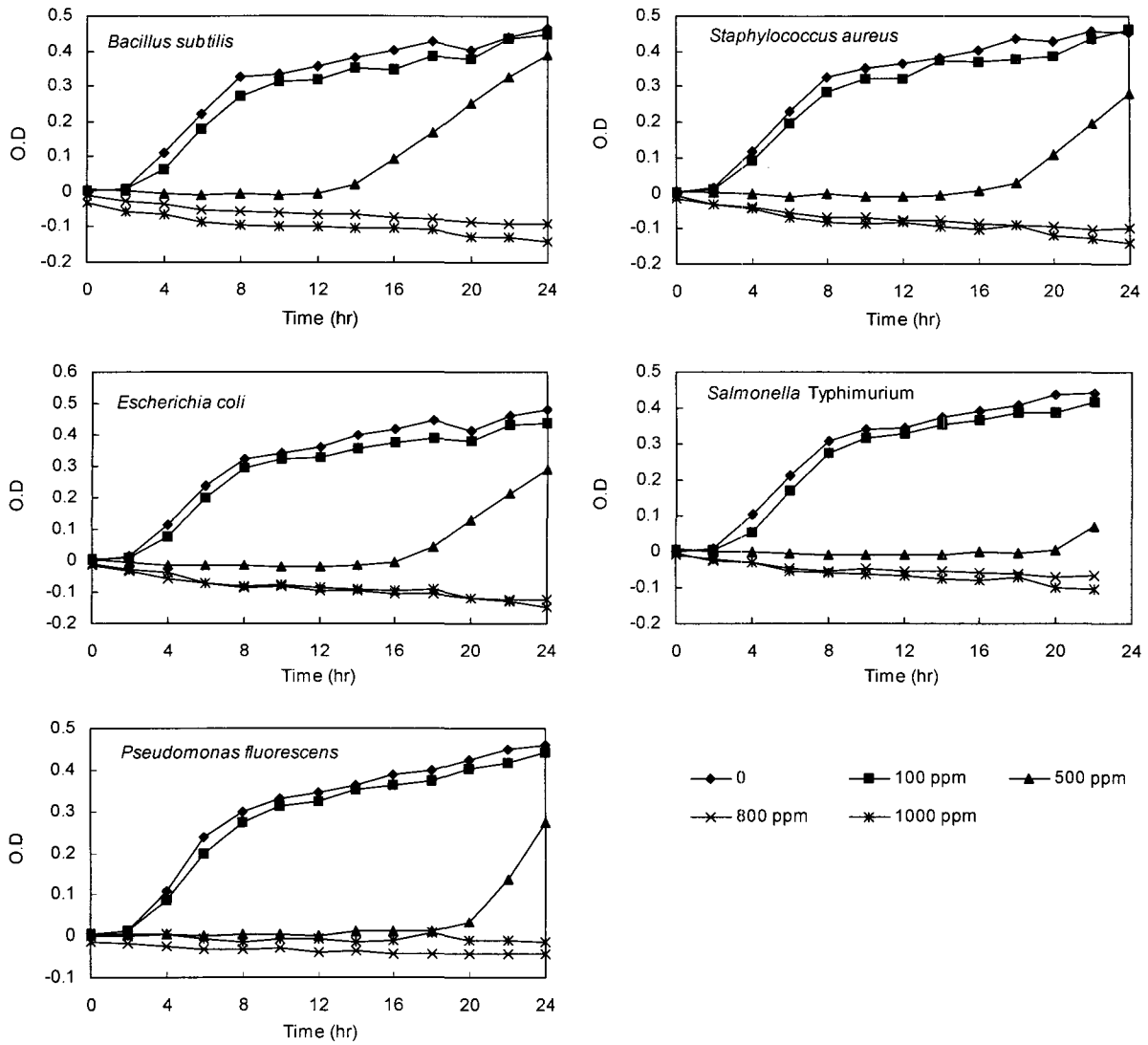


Fig. 2. Inhibitory effects of ethyl acetate fraction of lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf.

식재료이므로 연잎 추출물은 각종 식품의 보존료로 직접 이용이 가능하리라 생각된다.

요 약

본 연구에서는 연잎 추출분획물의 항균 활성을 benzoic acid와 비교, 검토하고자 하였다. 70% ethanol 추출물을 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water로 순차 분획하여 총 페놀함량을 비교한 결과 ethyl acetate 분획물이 가장 높은 함량을 보여주었다. 항균활성 또한 ethyl acetate 분획물에서 가장 우수한 활성을 보여주었으며 benzoic acid 보다 높은 활성을 나타냈다. Gram 양성균과 음성균간 항균력의 차이는 보이지 않았다. Liquid culture에서 생육저해 효과를 측정한 결과 추출물의 농도가 800 ppm이상일 경우 생장이 완전히 억제되었다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 충남농업테크노파크 기업농육성사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

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 Env 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.
 7. Beauchat LR, David AG. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *J Food Technol* 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. Borsch T, Barthlott W. 1994. Classification and distribution of the genus *Nelumbo adans* (*Nelumbonaccae*). *Beitr Biol Pflazen* 68: 421-450.
 11. Dahlgren R, Rasmussen FN. 1983. Monocotyledon evolution characters and phylogenetic estimation. *J Evol Biol* 16: 255-265.
 12. Jung HA, Kim JE, Chung HY, Choi JS. 2003. Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Arch Pharm Res* 26: 279-285.
 13. Hu M, Skibsted LH. 2002. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*). *Food Chemistry* 76: 327-333.
 14. Yang HC, Kim YH, Lee TK, Cha YS. 1985. Physicochemical properties of lotus root (*Nelumbo nucifera* G.) starch. *J Kor Agric Chem Soc* 28: 239-244.
 15. Yen GC, Duh PD, Su HJ. 2005. Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chemistry* 89: 379-385.
 16. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
 17. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. Cd 8-35.
 18. 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.
 19. Lee KS, Kim MG, Lee KY. 2004. Antimicrobial effect of the extracts of cactus Chounnyoucho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1268-1272.
 20. Park SJ, Oh DH. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts of black olypia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J Food Sci Technol* 35: 121-124.
 21. Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU, Yu CY. 2003. Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11: 53-61.
 22. Shim CJ, Lee GH, Yi SD, Kim YH, Oh MJ. 2004. Isolation and identification of antimicrobial active substances from *Rhodiola sachlinensis*. *Korean J Food Preservation* 11: 63-70.
 23. Lee BW, Kang NS, Park KH. 2004. Isolation of antibacterial prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 270-273.
 24. Ahn EY, Shin DW, Baek NI, Oh JA. 1998. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. *Korean J Food Sci Technol* 30: 680-687.
 25. Ahn EY, Shin DW, Baek NI, Oh JA. 1998. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Sophora flavescens* Ait. *Korean J Food Sci Technol* 30: 672-679.
 26. Baek JW, Chung SH, Moon GS. 2002. Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1073-1078.
 27. Kong YJ, Oh DW. 2001. Effect of ethanol extract of *Quercus mongolica* leaf as natural food preservative. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 243-249.

(2005년 11월 3일 접수; 2006년 2월 3일 채택)