

차조기의 에탄올과 물 혼합 추출물의 항균활성

김미향¹ · 이난희² · 이명희³ · 권대준⁴ · 최응규^{5*}

¹상주대학교 식품영양학과, ²대구가톨릭대학교 식품영양학과, ³경북과학대학 바이오식품과,
⁴아시아대학교 한약자원학과, ⁵아시아대학교 한방식품영양학과

Antimicrobial Activity of Aqueous Ethanol Extracts of *Perilla frutescens* var. *acuta* Leaf

Mi-Hyang Kim¹, Nan-Hee Lee², Myung-Hee Lee³, Dae-Jun Kwon⁴, Ung-Kyu Choi^{5*}

¹Department of Food Science & Nutrition, Sangju National University

²Department of Food Science & Nutrition, Catholic University of Daegu

³Department of health & Fermentation Food, Kyongbuk Collage and science

⁴Department of Oriental Medicinal Resources, Asia University

⁵Department of Oriental Medicinal Food and Nutrition, Asia University

Abstract

This study was conducted to examine the antimicrobial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf fractions extracted with a mixture of ethanol and water. The Ca and Mg contents of the leaf were 595.75 mg% and 467.0 mg%, respectively, and they were the highest among all of the tested minerals. The extract yield increased with the content of water in the extraction solvent. Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* was found in the 50, 70 and 95% ethanol extracts. Of the various fractions extracted from the mixture of ethanol and water, the ethyl acetate fraction showed antibacterial activity against all microorganisms tested in this experiment, and the antibacterial activity of ethyl acetate fraction from the water extract was the strongest. The phenol and flavonoid content in the ethyl acetate fraction showed no correlation with the concentration of ethanol in the extract solvent; however, their contents were higher in the 30% ethanol and water extraction which the antimicrobial activity of the extract was the strongest.

Key Words : *Perilla frutescens* var. *acuta*, antimicrobial activity, polyphenol, flavonoids

1. 서 론

차조기는 우리나라 들판에서 흔히 볼 수 있었던 식물로 소엽, 자소 등으로 불리며 농가에서 재배되기도 했던 농작물이었으나 지금은 그 수요가 많지 않아 일부 농가에서만 재배되고 있다. 예로부터 한방에서는 약리 효과가 인정되어 한약재로서 기침, 가래, 인후염, 소화불량, 부스럼, 불면증, 마비증세, 당뇨병, 요통 등의 질병에 다양하게 처방하고 있으며, 민간에서는 생선이나 게를 먹고 식중독에 걸렸을 때 잎의 생즙을 마시거나 삶아서 먹기도 하였다. 또한 식용으로서 널리 이용되어 왔는데 향기가 좋아 차로 달여 마시기도 하였으며 식욕을 돋우는 채소로 쓰이거나 여름철에 오이, 양배추로 만든 반찬이나 김치, 동치미 등에 넣어 맛을 내는 데 이용되었다. 또 방부효과가 있어 된장, 간장 등을 담글 때 사용하는 등 식품으로 다양하게 사용되어 왔다. 그 외에도 고유의 아름다운 색상을 이용하여 천연의 염

색제로도 이용되어 왔으며(Kim 1997; Moon 1999), 근간에는 각종 향료, 향수 및 화장품 원료로도 이용되고 있다(Jeo 등 2005). 차조기는 우리나라보다 일본에서 매실 장아찌를 만들 때 착색제, 방부제로 더 활발히 활용되고 있다. 차조기 잎의 정유 성분으로는 perillaldehyde가 50% 이상으로 대부분을 차지하며 limonene, pinene, cyanidin-3-5-β-glucoside, isoegomaketone 등이 들어 있으며, 잎의 색은 anthocyanin과 carotenoid 색소에 의한 것으로 알려져 있다. 차조기에 관한 연구로 국내에서는 자소자의 아미노산 및 지방산(Kim 1998), 향산화물질(Kim 1997), 자소자를 첨가한 동치미(Hwang 2003; Hwang 2000), 자소자 추출물의 향산화 및 항균효과(Yamamoto 2002; Povilaityte 2000) 등이 보고되어 있다. 또 생리활성 연구로는 자소엽의 화장품(Choi 2003), 소엽의 향과 색소(Ishikura 1981; Choi 2004), 알레르기성 천식(Kang 등 2004), 알콜 대사에 관여하는

*Corresponding author : Ung-Kyu Choi, Department of Oriental Medicinal Food and Nutrition, Asia University, 240-3, yeochun-dong, gyeongsan, Gyeongbuk, 712-220 Korea Tel:82-53-819-8201 Fax:82-53-819-8135 E-mail:cuk8272@asiau.ac.kr

효소 활성화(Moon 1998), 피부 흑색종 암세포에 대한 항암작용(Swo & Han 1998), 구강 유상피암 세포에 대한 항암 효과(Choi 등 1997) 등이 보고되어 있다. 이들 연구는 자소자에 관한 연구가 다수이며 자소엽에 관한 연구도 주로 한방 약재로서 약리적인 효능에 관한 것이 대부분으로 식품 소재로서 접근하는 연구는 그다지 많지 않은 현실이다. 또한 차조기의 항균작용 및 항산화작용에 관한 연구가 몇몇 보고 되어 있으나 질환 관련 미생물에 대하여 보고되어 있는 정도에 그치고 있다(Lee & Seo 2005).

본 연구에서는 식품 소재로서 차조기의 보다 효과적인 이용과 추출물 제조를 위해 에탄올 농도를 95%, 70%, 50% 및 30%로 달리하여 얻어진 추출물과 물추출물의 식품 관련 미생물에 대한 항균 활성을 측정하고 이들 추출물의 분획물에 대한 항균 활성을 확인하였다.

11. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 차조기는 2005년 5월에 경북 칠곡에서 수확한 것을 여러 차례 흐르는 물에 세척하고 음건한 후 분쇄기(DA282-2, Daesung, Korea)로 분말화하여 4℃에서 냉장 보관하면서 사용하였다.

2. 추출물 및 분획물 조제

차조기의 에탄올 추출은 에탄올 농도를 0, 30, 50, 70 및 95%로 변화시켜 추출하였다. 즉 차조기 분말 100g에 각각의 물과 에탄올 혼합용액을 10배가 되게 가하여 실온의 진탕 항온기에서 24시간 추출한 후 감압여과 하였으며 이 과정을 3회 반복하여 모아진 여액을 합하여 감압 농축기(Rotary evaporator, EYELA N-1000, Japan)로 농축하였다. 이때 물 추출은 삼각 플라스크에 차조기 분말 100 g에 대하여 10배의 증류수를 가하고 냉각기를 연결하여 hot plate 상에서 5시간 동안 진탕하면서 가열 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 여과한 여액을 모두 합하여 여과지(Whatman No.2)로 감압여과하고 감압 농축기를 이용하여 농축한 것으로 하였다. 각각의 추출물은 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 순으로 다시 계통 분획하였다. 즉, 각 농도의 에탄올 추출물을 각각 감압농축기를 이용하여 용매를 휘발시킨 후 증류수를 가하여 분산시키고 분액여두를 이용하여 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 순으로 분획하고 그 나머지 잔사를 물 분획으로 하였다. 이때 추출물과 분획물은 모두 감압 농축하여 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

3. 실험균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC

6538와 *Bacillus subtilis* KCCM 11316 등 그람 양성균 2종과 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004, *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Salmonella typhimurium* KCTC 2515, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888, *Escherichia coli* O157(Human isolated in PSA)와 *Escherichia coli* ATCC 8739 등 그람 음성균 6종으로 총 8종을 냉장고에 보관하면서 계대 배양하여 사용하였다. 실험에 사용한 배지로는 nutrient broth (Difco, USA)와 nutrient agar (Difco, USA) 배지를 사용하였다.

4. 추출물의 항균활성

8종의 균주에 대한 항균 활성은 disc agar diffusion 법(Bauer; 1966, Piddok; 1990)과 액체 배양법(KFDA 2003)으로 측정하였다. Disc agar diffusion 법은 에탄올 추출물과 분획물을 각각의 추출용매와 분획 용매로 적정농도로 제조하여 각각 8 mm의 paper disc에 60 μ L를 흡수시키고 용매는 휘발시켜 준비하였으며, 대조구는 각 용매를 동일하게 올린 후 휘발시켰다. 계대 배양하여 활성화된 8종의 미생물 배양액을 nutrient agar 배지를 굳힌 plate에 100 μ L 접종하여 배지 전체에 분산시킨 후 준비된 paper disc를 올린 후 37℃ incubator에서 24시간 배양하였다. 이때 disc 주변에 생성된 저해환의 크기를 측정하여 나타내었다. 이때 disc에 흡수시킨 추출물과 분획물의 농도는 100 μ g으로 하였다 액체배양법은 추출물을 첨가한 액체배지에 균을 접종하고 24시간 배양 후 colony 계측으로 생균수를 측정하였다. 즉, 차조기 에탄올 추출물과 분획물은 각각 증류수와 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 농도를 조정하여 준비한 다음 계대 배양하여 활성화된 미생물 배양액에 500 ppm과 1,000 ppm 농도가 되게 추출물과 분획물을 첨가하고 37℃에서 24시간 동안 진탕배양하면서 3시간 간격으로 생균수를 측정하였다.

5. 총 phenol 및 flavonoid 함량 정량

총 phenol 함량은 Folin-Danis 법(Singleton 1965)으로 정량하였다. 시료 0.1 mL에 Folin reagent 0.1 mL와 2% Na₂CO₃ 2 mL를 가한 후 잘 혼합하고, 30분간 정지 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 chlorogenic acid 표준곡선으로 환산하였다. 총 플라보노이드 함량은 diethylene glycol 비색법(NFRI 1990)으로 측정 하였다. 시료 1 mL에 diethylene glycol 10 mL과 1N NaOH 1 mL를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준 곡선은 naringin을 기준으로 하였다.

6. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하여 평균치와 표준편차로 나

타내었으며, 유의성은 version 12의 SPSS(statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA) soft-ware package를 이용하여 Duncan's multiple test를 행하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 무기질 함량 및 추출물의 수율

실험에 사용된 차조기의 무기질을 분석한 결과 Ca (595.75 mg%)과 Mg (467.0 mg%) 함량이 가장 높았으며, Fe (99.58 mg%), Mn (10.01 mg%), Zn (5.21 mg%), Cu (1.80 mg%)의 순으로 나타났다 (data not shown).

차조기의 에탄올 농도를 달리한 추출물의 수율과 각각의 추출물을 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol의 순으로 단계별로 분획하여 얻어진 분획물의 수율은 <Table 1>에 나타내었다. 물 추출물의 수율은 20.8%로 가장 많았고 에탄올 추출에서는 30%>50%>70%>95% 순으로 에탄올 농도가 높아질수록 전체 수율은 낮아졌다. 95% 에탄올 추출물은 전체 수율이 9.32%로 이중 32.4%가 hexane층으로 분리되는 성분으로 가장 많았으며, ethyl acetate 층이 0.47%로 가장 적었다. 70% 에탄올 추출에서는 전체 수율은 16.5%로 급격히 증가하였는데 이는 hexane층은 2.57%로 95% 에탄올 추출시보다 감소한 반면 chloroform층, ethyl acetate 층, butanol 층 및 물 분획은 모두 2배 이상 증가한 때문으로 나타났다. 50% 에탄올 추출물에서도 물층의 수율이 가장 높아 9.5%로 전체 수율의 50.4%를 차지하였고, 70% 에탄올 추출에 비하여 hexane층, chloroform층과 butanol층은 오히려 감소하고 ethyl acetate층은 증가하였다. 이러한 현상은 30%와 물 추출에서도 유사한 경향을 보였다. 분획물의 수율을 살펴보면 hexane층은 95%와 70% 에탄올에 가장 잘 추출되어 3.02%와 2.57%로 가장 높고, 50% 이하의 에탄올 농도에서는 그 양이 0.76~0.17%로 매우 적었다. Chloroform층은 70% 에탄올 추출한 것이 2.72%로 가장 많았으며, ethyl acetate 층은 물 추출물에서 가장 많아서 에탄올 혼합율이 낮아질수록 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. butanol층은 70% 에탄올 추출한 것이 2.72%로 가장 높았다.

결과적으로 차조기의 에탄올 농도를 달리한 추출에서는 물 혼합율이 증가할수록 추출물의 전체 수율은 증가하였고, 물 추출한 것이 가장 높은 수율을 보였다. 이는 단계적 분획에서 남는 물층의 수율 증가가 가장 주요한 원인인 것으로 판단된다. 분획물의 수율은 hexane층은 95% 에탄올 추출물에, chloroform과 butanol 층 분획은 70% 에탄올 추출물에, ethyl acetate 분획은 물 추출물에 가장 잘 용출되어 나오는 것으로 판단되며, 특히 ethyl acetate 분획

<Table 1> Yield of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf extract and fraction (%)

Cont. of EtOH (%)	Extract and fraction					
	EE ¹⁾	HF	CF	EF	BF	WF
95	9.320	3.017 (32.4) ²⁾	1.466 (15.7)	0.474 (5.1)	1.165 (12.5)	1.336 (14.3)
70	16.500	2.570 (15.6)	2.721 (16.5)	0.594 (3.6)	2.718 (16.5)	4.598 (27.9)
50	18.881	0.759 (4.0)	1.958 (10.4)	0.798 (4.2)	2.078 (11.0)	9.510 (50.4)
30	19.365	0.445 (2.3)	1.201 (6.2)	0.871 (4.5)	1.820 (9.4)	11.232 (58.0)
0 ³⁾	20.782	0.166 (0.8)	1.100 (5.3)	0.998 (4.8)	1.870 (9.0)	12.968 (62.4)

¹⁾ EE: ethanol extract, HF: hexane fraction, CF: chloroform fraction, BF: butanol fraction, WF: water fraction

²⁾ The numbers in parenthesis are the ratio of extract and fraction for total yield

³⁾ 0%: using boiling water only for 5hr

은 에탄올 혼합율이 낮을수록 수율이 많아지며 에탄올 추출에서 보다는 물 추출에서 수율이 높은 것으로 나타났다.

2. 추출물의 항균 활성

농도를 달리한 에탄올 추출물과 이들을 계통 분획한 분획물의 8종의 미생물에 대한 항균력을 저해환의 크기로 살펴본 결과는 <Table 2>와 같다. 차조기의 95% 에탄올 추출물은 *S. aureus*, *B. subtilis* 및 *P. aeruginosa*에 대하여, 70%와 50% 에탄올 추출물은 *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에 대하여 각각 항균력을 나타내었다. 이때 에탄올 혼합율이 높을수록 항균력이 높게 나타나서 *P. aeruginosa*의 경우 95% 추출물의 저해환이 17.2 mm로 가장 크고 물 혼합율이 높아질수록 항균력은 낮아졌다. 30% 에탄올추출물과 물추출물(0%)에서는 실험 대상 미생물 모두에 clear zone을 나타나지 않았다. 에탄올 혼합율을 달리한 에탄올 추출물과 물 추출물의 분획물의 저해환 형성 여부를 살펴본 결과 hexane 분획물은 *S. aureus*와 *P. aeruginosa* 2종에 대하여 에탄올 혼합 추출물의 hexane 층에서 항균력을 보였으며 70% 에탄올 추출물의 hexane층에서는 *P. aeruginosa*에 대하여 15.2 mm로 가장 강한 넓게 형성되었다. Chloroform 분획물은 농도별 에탄올 추출물 모두와 물 추출의 chloroform 층에서 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대해서 항균력을 나타내었다. 이때 에탄올 혼합율이 낮을수록 저해환의 크기도 점차적으로 크게 나타났는데 95% 에탄올 추출물의 chloroform층이 11.5 mm의 저해환을 보인 반면 물추출물의 chloroform층이 18.6 mm로 항균력이 가장 컸다. Ethyl acetate 분획물은 실험 대상으로 한 8종의 균종에 대하여 모든 추출물에서 강한 항균력을 보였는데 특히 *S. aureus*, *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에 대한 항균력이

강했으며 에탄올 농도가 낮을수록 저해환도 점차적으로 커지는 경향을 보였다. 또 2종의 *Salmonella* sp. 와 3종의 *E. coli* 에 대하여도 항균력을 보였는데 에탄올 농도가 높은 추출물의 ethyl acetate층에서는 항균력이 약하였으나 30% 에탄올과 물추출물의 ethyl acetate층에서는 14 mm이상의 비교적 큰 저해환을 보였다. 이러한 결과로 볼

때 항균력이 있는 ethyl acetate 가용성 물질은 수용성 성분일 것으로 추측된다. 비교적 강한 극성의 butanol 분획물은 *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에 대하여 모든 농도의 에탄올 추출물과 물 추출의 butanol층에서 항균력을 보였는데 95% 에탄올 추출물과 물 추출물의 butanol층이 14.5~18.3 mm로 가장 큰 저해환을 나타내었다. *S.*

<Table 2> Antimicrobial activity against various microorganisms of fractions from the extract by the aqueous ethanol from *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf. Diameter of clear zone (mm)

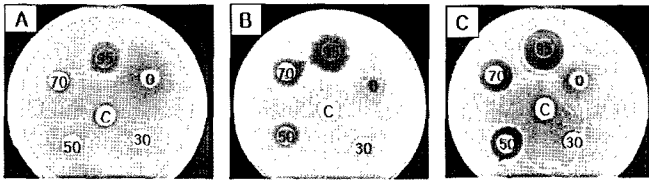
Microorganism	Con. of EtOH(%)	Fraction					
		EE ¹⁾	HF	CF	EF	BF	WF
<i>Staphylococcus aureus</i>	95	11.5±0.1 ²⁾	10.0±0.1	trace	11.5±0.3	10.3±0.4	-
	70	trace	11.5±0.4	8.8±0.3	11.0±0.4	-	-
	50	3)	9.0±0.5	10.5±0.2	13.0±0.6	-	-
	30	-	trace	12.0±0.7	15.6±0.3	-	-
	0 ⁴⁾	-	-	13.8±0.2	16.4±0.6	9.0±0.4	-
<i>Bacillus subtilis</i>	95	15.0±0.4	-	-	18.6±0.4	15.8±0.4	-
	70	12.5±0.4	-	-	19.0±0.4	10.0±0.8	-
	50	11.0±0.4	-	-	21.2±0.4	9.0±0.6	-
	30	-	-	-	21.0±1.0	11.5±0.4	-
	0	-	-	-	20.3±0.6	14.5±1.0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95	17.2±0.8	13.1±0.2	11.5±1.2	21.6±0.2	18.3±1.0	21.5±0.3
	70	14.5±0.4	15.2±0.4	15.3±0.4	19.5±0.4	14.2±0.4	16.0±1.0
	50	13.2±0.2	11.4±0.4	16.1±0.5	19.5±0.4	10.5±0.6	10.0±0.6
	30	trace	10.2±0.5	16.4±0.2	22.0±0.2	12.8±0.4	-
	0 ¹⁾	-2)	-	18.6±0.6	23.5±0.3	16.5±0.3	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	95	-	-	-	-	9.1±0.2	-
	70	-	7.0±0.6	-	9.2±0.4	-	-
	50	-	-	-	13.0±0.3	-	-
	30	-	-	trace	16.2±0.4	-	-
	0	-	-	trace	17.3±0.6	10.5±0.4	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	95	-	-	-	-	trace	-
	70	-	-	-	trace	-	-
	50	-	-	8.5±0.4	8.8±0.3	-	-
	30	-	-	8.8±0.2	12.5±0.4	-	-
	0	-	-	-	14.0±0.4	9.5±0.4	-
<i>E. coli</i> O157 (Human isolated in PSA)	95	-	-	-	-	12.0±0.3	-
	70	-	-	-	10.5±0.2	-	-
	50	-	-	trace	10.4±0.4	-	-
	30	-	-	9.1±0.6	13.2±0.4	-	-
	0	-	-	13.0±0.3	15.2±0.8	12.1±0.4	-
<i>E. coli</i> O157:H7	95	-	-	-	trace	9.0±0.2	-
	70	-	-	-	trace	-	-
	50	-	-	-	12.0±0.1	-	-
	30	-	-	trace	16.1±0.4	-	-
	0	-	-	9.3±0.5	16.3±0.2	9.0±0.2	-
<i>E. coli</i>	95	-	-	-	-	trace	-
	70	-	-	-	trace	-	-
	50	-	-	trace	11.2±0.4	-	-
	30	-	-	9.0±0.4	14.1±0.3	-	-
	0	-	-	10.1±0.2	14.2±0.5	trace	-

¹⁾ EE: ethanol extract, HF:hexane fraction, CF: chloroform fraction, BF: butanol fraction, WF: water fraction

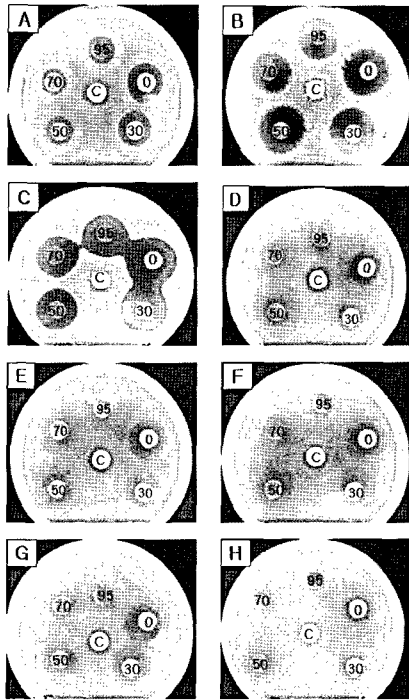
²⁾ Values are means±standard deviation of triplicate determinations.

³⁾ No inhibitory zone was formed

⁴⁾ 0% :extract using boiling water only for 5hr



<Figure 1> Antimicrobial activity of different concentration of ethanol extract of *perilla frutescens* var. *acuta* leaf for microorganisms. Concentration of extract and fraction was 500ppm. A: *Staphylococcus aureus* B: *Bacillus subtilis* C: *Pseudomonas aeruginosa*



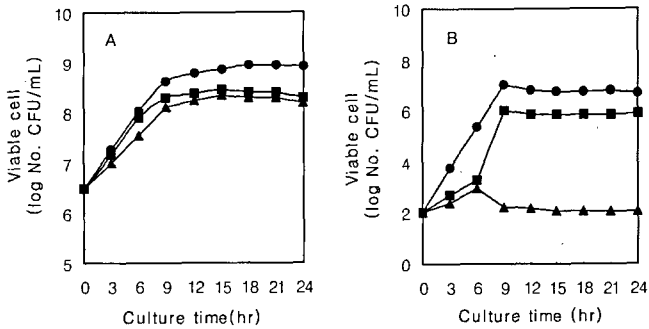
<Figure 2> Antimicrobial activity of ethyl acetate fraction derived from different concentration of ethanol extract of *perilla frutescens* var. *acuta* leaf. Concentration of extract and fraction was 500ppm. A: *Staphylococcus aureus*, B: *Bacillus subtilis*, C: *Pseudomonas aeruginosa*, D: *Salmonella enteritidis*, E: *Salmonella typhimurium*, F: *E. coli* O157(Human isolated in PSA), G: *E. coli* O157:H7, H: *E. coli*

*aureus*에 대해서도 95% 에탄올 추출물과 물 추출물의 butanol층에서 약한 항균력을 보였다. 물 분획물의 경우, *P. aeruginosa*에 대해서만 95%, 70% 및 50% 에탄올 추출물의 물분획이 항균활성을 보였으며 이 중 95% 에탄올 추출물의 물층은 저해환이 21.5 mm로 강한 높은 항균력을 나타내었다. 결과적으로 에탄올 추출물의 항균력이 낮은 것으로 보아 단순 에탄올 추출물이나 물추출물만으로 미생물에 대한 강한 항균활성을 기대하기는 어려우나 이들 분획물들이 강한 항균력을 나타내는 것으로 미루어 볼 때 이들 추출물에 존재하는 강한 항균활성 성분을 분리하여 이들을 이용할 경우 항균력의 상승효과를 얻을 수 있을 것

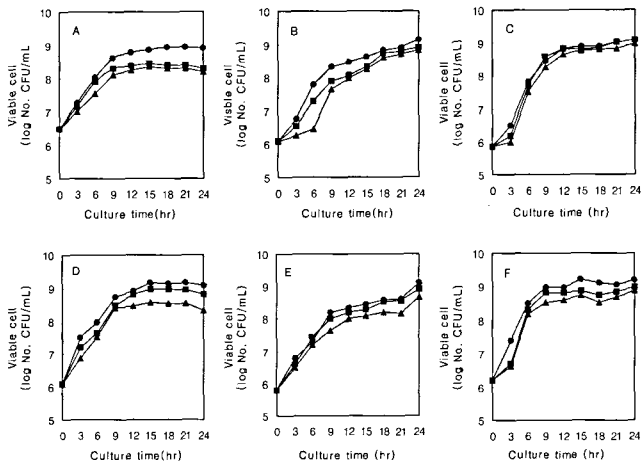
으로 판단된다.

<Figure 3>과 <Figure 4>는 저해환의 형성 유무로 확인된 8종의 미생물에 대한 항균활성 실험결과 모든 균에 대하여 항균력을 나타낸 ethyl acetate 분획물 중 가장 강한 항균 활성을 보인 물추출물의 ethyl acetate 층을 액체배지에 500 ppm과 1,000 ppm 농도가 되게 첨가하여 24시간 동안 배양하면서 생균수 변화를 관찰한 결과를 나타낸 것이다. <Figure 3>은 그람양성균 2종에 대한 생육곡선으로 *S. aureus*에 대하여 500 ppm 농도에서는 배양 6시간까지 대조구와 큰 차이를 보이지 않으나 그 이후 생육이 억제된 것으로 나타났고, 1,000 ppm에서는 배양 초기부터 억제되어 배양 24시간에는 대조구보다 생균수가 1 log cycle이 적었다. 비병원성 균이나 발효공업에서 잡균 오염의 원인이 되는 균으로 알려진 *B. subtilis*는 생육 초기부터 강한 억제를 보였는데 500 ppm 농도에서는 배양 6시간까지 강한 억제를 보이다가 그 이후 급격히 생균수가 증가하였다. 또 1,000 ppm 농도에서는 배양 3시간까지는 균수가 약간의 증가를 보이나 배양 6시간 이후에는 오히려 생균수가 줄어들어 초기 접종 균수와 비슷한 수준을 보이는 등의 강한 항균력을 보여 농도 의존적으로 강력한 생육 억제 능력을 가지는 것으로 나타났다. 결과적으로 물추출물의 ethyl acetate 가용성 성분에 그람양성균 2종의 성장을 강력하게 억제하는 물질이 존재하는 것으로 추정된다. 차조기 물 추출물로부터 얻은 ethyl acetate 분획물이 그람 음성균 6종의 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과는 <Figure 4>에 나타내었다. *P. aeruginosa*는 ethyl acetate 분획물 첨가시 *S. aureus*와 유사한 생육 곡선 양상으로 500 ppm과 1,000 ppm에서 농도 의존적으로 성장이 억제되는 것으로 나타났다. *Salmonella* 속 2종 모두 저해환의 형성 결과에서와 같이 생육억제를 보였으나 *S. enteritidis*는 1,000 ppm 농도에서 배양 초기에 강한 억제를 보이다가 이후 급격한 균수 증가를 보여 지속적인 생육저해 효과를 얻기 위해서는 이보다 높은 농도를 요구하는 것으로 보인다. *S. typhimurium*은 배양 3시간째에는 다소 억제 되는 듯하나 배양이 지속될수록 대조구와 큰 차이를 보이지 않고 미비하였다. *E. coli* O157 3종도 ethyl acetate 무첨가의 대조구보다 생육이 저해되는 것으로 나타났으며, 농도 의존적으로 500 ppm에서보다 1,000 ppm에서 생육 억제 효과는 더 높게 나타났다. 안 등(An et al.; 1997)은 돌산 갯 추출물이 *B. subtilis*에 대해 400~600 ppm 농도에서 증식을 억제한다고 보고한 바 있으며, 배 등(Bae et. al; 2005)은 금은화의 ethyl acetate 추출물이 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*에 대해 강한 항균력을 보였다고 하였다.

3. Ethyl acetate 분획의 폴리페놀과 플라보노이드의 함량
항균활성이 가장 높은 ethyl acetate 분획의 폴리페놀



<Figure 3> Changes in the number of viable cell on culture added with ethyl acetate fraction derived from water extract of *perilla frutescens* var. *acuta* leaf on gram positive bacteria for 24hrs at 37°C. A: *Staphylococcus aureus* B; *Bacillus subtilis*. Symbols ; -●- control, -■- 500 ppm, -▲-1,000 ppm

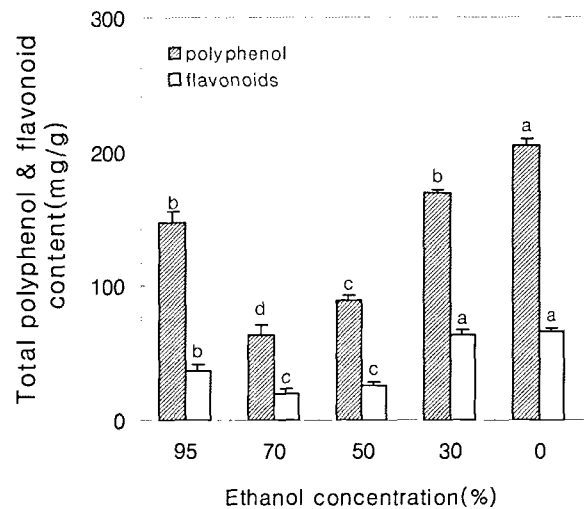


<Figure 4> The changes in the number of viable cell on culture added ethyl acetate fraction derived from water extract of *perilla frutescens* var. *acuta* leaf on gram negative bacteria for 24 hrs at 37°C . A: *Pseudomonas aeruginosa* B; *Salmonella enteritidis*, C: *Salmonella typhimurium* D: *E. coli* O157 (Human isolated in PSA) E: *E. coli* O157:H7, F: *E. coli* O157 Symbols ; -●- control, -■- 500ppm, -▲-1,000ppm

함량과 플라보노이드 함량을 조사한 결과는 <Figure 5>에 나타내었다. 페놀화합물은 식물체에 널리 분포되어 다양한 구조와 분자량을 가지며 phenol hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 등의 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며 항산화, 항균 활성 등의 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Clark 1981). 플라보노이드 또한 색소화합물로서 식물 중에는 대부분 당과 결합한 배당체 형태로 존재하며 항산화, 항균 및 항바이러스 작용, 면역증진 작용 등이 있는 것으로 보고되고 있다(Sohn 1988; Kawaguchi 1997). 추출용매에 따른 수율을 확인한 결과 에탄올 추출물보다는 물 추출물의 ethyl acetate 분획물의 polyphenol 함량이 204.4 mg/g 으로 가장 높게 나타났다. 에탄올 추출에서는 30% 에탄올 추출물의 ethyl

acetate 분획 폴리페놀 함량이 169.0 mg/g 으로 에탄올 추출물의 ethyl acetate 분획이 가장 높았으며, 95% 에탄올 추출물이 147.8 mg/g, 50% 에탄올 추출이 89.3 mg/g 으로 나타났고 70% 에탄올 추출물 ethyl acetate 층의 polyphenol 함량이 64.1 mg/g 으로 가장 낮았다. <Table 2>의 항균활성 결과와 비교해서 살펴보면 polyphenol 함량이 가장 높은 물추출물의 ethyl acetate 분획물이 실험 균주 8종에 대하여 저해환의 크기가 가장 크게 나타났다. 에탄올 추출 시에는 95% 에탄올 추출물의 ethyl acetate 분획의 폴리페놀 함량은 높으나 *Salmonella* 속 2종과 *E. coli* 3종에 대해서는 저해환을 나타내지 않았다. 추출용매의 에탄올 농도와 항균력이 폴리페놀 함량과 비례적인 상관관계를 갖는 것으로 나타나지는 않았으나 에탄올 추출 시 에도 에탄올 함량이 높고 물 혼합 비율이 적은 95%와 70% 에탄올 추출의 경우보다 50% 에탄올 농도에서 점차적으로 항균력이 증가하였다. 또 에탄올 함량이 낮고 상대적으로 물 혼합이 많은 30% 에탄올 추출물의 ethyl acetate 분획에서 항균력이 가장 높게 나타나는 것으로 볼 때 차조기의 항균 성분은 에탄올에 용출되는 폴리페놀 보다는 수용성 폴리페놀 성분이 더 강력한 항균력을 갖는 것으로 추측된다. 플라보노이드 함량은 폴리페놀 함량의 변화와 유사한 결과를 보였는데 30%에탄올 추출과 물추출의 ethyl acetate 분획이 가장 높은 것으로 나타났고 70%와 50% 에탄올 추출에서 오히려 함량이 줄어든 것으로 나타났다. 결과적으로 실험 대상 미생물에 비교적 강한 항균력을 보이는 30% 에탄올 추출물과 물 추출물의 ethyl acetate 분획물에 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다.

Ueda 등(Ueda et al. 1982)은 향신료 추출물과 flavonoid



<Figure 5> The content of total polyphenol and flavonoids in ethyl acetate fraction derived from ethanol and water extract of *perilla frutescens* var. *acuta* leaf. Values with different superscripts within a indicate significant differences at p<0.05

화합물이 항균작용을 가지는 것으로 보고하고 있으며, Lee 등 (Lee et al. 2004)도 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량이 높은 butanol 층과 ethyl acetate 층에서 항균성이 높게 나타나는 것으로 보고한 바 있다.

IV. 요약

차조기의 30, 50, 70, 95% 에탄올 추출물과 물추출물의 식품 관련 미생물에 대한 항균 활성과 이들 추출물의 분획물에 대한 항균 활성을 살펴보았다. 본 실험에 사용한 차조기의 무기질은 Ca와 Mg 함량이 각각 595.75 mg%와 467.0 mg%으로 가장 많았다. 에탄올 혼합 추출물과 물추출물의 추출 수율은 에탄올 농도가 낮을수록 증가하여 95% 에탄올 추출물은 9.3%, 70% 추출물은 16.5%, 50% 추출물은 18.9%, 30% 추출물은 19.4%, 물추출물(0%)에서는 20.8%이었다. 추출용매의 에탄올 농도가 낮아질수록 hexane 층으로 용출되어 나오는 성분은 감소하고 ethyl acetate 층 분획성분은 점차 증가하는 것으로 나타났다. 에탄올 추출물과 물 추출물의 항균력은 95%, 70%와 50% 에탄올 추출물이 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 및 *Pseudomonas aeruginosa*에 대하여 clear zone을 나타내었다. 추출물을 단계별 계통 분획하여 얻은 분획물의 항균력 실험에서는 ethyl acetate 층이 실험 대상 미생물 모두에 대하여 항균 활성을 나타내었으며 에탄올 혼합율이 낮을수록 즉, 30% 에탄올과 물추출물의 ethyl acetate 분획물의 저해환이 가장 크게 나타났다. 물 추출물의 ethyl acetate 분획물을 첨가한 액체 배양에서 500 ppm의 농도에서는 *S. aureus*, *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에 대하여 대조구의 뚜렷한 증가와 대조적으로 낮은 생균수를 보였으며, 1,000 ppm의 농도에서는 실험 균주 모두에 대하여 배양 24시간 내내 생육이 저해되는 것으로 나타났다. 물 추출과 에탄올 추출의 농도와 항균 활성, 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량이 비례적인 상관관계에 있는 것으로 나타나지는 않으나 30% 에탄올 추출물과 물 추출물의 ethyl acetate 분획물이 폴리페놀 함량이 높고 항균력이 가장 강한 것으로 나타났다.

■ 참고문헌

Aritomi, M. Kumori, T. Kawasaki, T. 1985. Cyanogenic glycosides in leaves of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Phytochemistry*, 24(10): 2438-2439

Bauer AW, Kibby MM, Sherrin JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4): 493-496

Choi HS. 2004. Characteristic odor components of *Perilla frutescens* var. *acuta* kudo oil by aroma extract dilution analysis. *Food Science and Biotechnology*, 13(3): 279-284

Choi KE, Kwag JS, Kim YO, Baek SH and Han DS 1997 Development of anticancer agents from Korean medicinal plants(part 4). *Korean J. Toxicol.*, 13(4): 311-316

Do JR, Heo IS, Back SY, Yoon HS, Jo JH, Kim YM, Kim KJ, Kim SK. 2006 Antihypertensive, Antimicrobial and Antifungal Activities of Buckwheat Hydrolysate. *Korean Society. of food Sci. & Tech.*, 38(2): 268-272

Fujiwara, H. Tanaka, Y. Fukui, Y. Ashikaki, T. Yamaguchi M., Kusumi, T. 1998. Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant science*. 137(1): 87-94

Fujita, T. Nakayama, M. 1993. Monoterpene glucosides and other constituents from *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*, 34(6): 1545-1548

Ha MH, Park WP, Lee SC, Choi SG, Cho SH. 2006. Antimicrobial Characteristic of *Prunus mune* extract. *Korean Society of Food Preservation*, 13(2): 198-203

Hwang JH, Jang MS. 2001. Physicochemical properties of Dongchimi added with Jasoja (*Perillae semen*). *Korean Society of Food & Cookery Science*, 17(6): 555-564

Hwang JH, Jang MS. 2003. Free Sugar, Free Amino Acid, Non-Volatile Organic Acid and Volatile Compounds of Dongchimi added with Jasoja(*Perillae semen*). *Korean Society of Food & Cookery Science*, 19(1): 1-10

Ishikura, N.. 1981. Anthocyanins and flavones in leaves and seeds of *Perilla* plant. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(8): 1855-1860

Joe WA, Choi EY, Jeung SH, Kang BY, Son JH, An BJ, Lee CE, Choi KI, Son AR and Lee JT. 2005. Studies on the application for cosmetics natural materials of folium perillae. *Kor. J. Herbology*, 20(3): 1-7

Kang YS, Lee SC, Shin HD, Shin MK, Kim JH and Song HJ. 2004. Studies on the allergy asthma effect of Folium *Perillae*. *Korean Association of herbology*, 19(3): 25-34

Kawaguchi K., Mizuno T. Aida, K and Uchino K 1997 Hesperidine as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 102-104

KFDA. 2003. Code DH. Code Food, Korea Food and Drug Association. Seoul, Korea

Kim CK, Kim YJ, Kwon YJ. 1998. Amino Acid and Fatty Acid Compositions of *Perilla* semen. *Korean Soci. of Food Science and Nutrition*, 27(3): 381-385

Kim JG. 1997. Natural medicines dictionary. Namsandang. Seoul. p.172

Kim YJ, Kim CK and YJ Kwon. 1997. Isolation of Antioxidative Components of *Perilla* semen. *Korean Society. of food*

- Sci. & Tech, 29(1): 38-48
- Lee JJ, Kim SH, Chang BS, Lee JB, Huh CS, Kim TJ, BAEK YJ. 1999. The antimicrobials activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter Pylori*. Korean J. Food Sci. Technol. 31(4): 764-770
- Lee ES, Seo BI. 2005. Growth inhibition of *Perilla frutescens* var. *acuta* extract. Korean J. Herbology. 20(2): 83-89
- Lee OH, Lee HB, Son JY. 2004. Antimicrobial activities and nitrite-scavenging ability of olive leaf fractions. Korean J. Soc. Food Cookery Sci. 20(2): 204-210
- Moon GS. 1999. Medicinal herbs component and utilization. Ilwealsaegak, seoul. pp 517-518
- Moon HI, Zee OP and Shin KH. 1998. Effect of Perilla (*Perilla frutescens* Britton) Extract on Serum Ethanol Level and Hepatic Alcohol Dehydrogenase Activity. Korean Medical Crop Science, 6(2): 126-130
- NFRI. 1990. Manuals of Quality Characteristic Analysis for Food Quality Evaluation(2). National Food Reserch Institute, Tsukuba, Japan. p 61
- Oh DH, Hum SS, Park BK, Ahn C, Yu JY. 1998. Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganism. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 957-963
- Park HO, Kim CM, Woo GJ, Park SH, Lee DH, 2001. Chang EJ, Park KH. Monitoring and trends analysis of food poisoning outbreaks occurred in recent years in Korea. J. Food Hyg. safety, 16(2): 280-294
- Piddok, L. J. V. 1990. Techniques used for the determination of antibacterial resistance and sensitivity in bacteria. J. Appl. Bacteriol. 68(2): 307-318
- Povilaityte, V.; Venskutonis, P. R. 2000. Antioxidative activity of purple perilla (*Perilla frutescens* L.), Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.), and Roman chamomile (*Anthemis nobilis* L.) extracts in rapeseed oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77(9): 951-956
- Seo HH, Jeong SH and Kim DW. 2003. Research of natural dyeing development using plum - around match dyeing of plum and perilla plant-. Korea Soci. of craft, 6(2): 125-146
- Sohn J.S. and Kim M.K. 1988 Effects of hesperidin and naringin on antioxidative capacity in the rat. Korean Nutr. Soc. 31(3): 687-696
- Swo DH and Han DS. 1998. Antitumor Effects of the Chloroform Soluble Fraction of *Perilla frutescens* against Human Skin Melanoma Cells. Wonkwang univ. dental medical 1.8(2): 55-66
- Takeda, H. Tsuii, M, Matsumiya, T. Kubo, M. 2002. Identification of Rosmarinic Acid as a Novel Antidepressive Substance in the Leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (*Perillae Herba*). Japanese Journal of Neuropsychopharmacology-Tokyo-. 22(2): 15-22
- Ueda S., Yamashita H, Nakajima M and Kuwabara Y. Inhibition of microorganisms by spice extracts and flavoring compounds. Niiippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29(3): 389-392
- Yamamoto, H.; Ogawa, T. 2002. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 66(4): 921-924
- Yonekura-Sakakibara, K. Tanaka Y. Fukuchi-Mizutani, M. Fuiiwarra, H., Fukui, Y. Ashikari, T. Murakami Y. Yamaguchi, M. Kusumi, T. 2000. Molecular and Biochemical Characterization of a Novel Hydroxycinnamoyl-CoA:Anthocyanin 3-O-Glucoside-6"-O-Acyltransferase from *Perilla frutescens*. Plant & cell physiology. 41(4): 495-502
- Yoshida, K. Kameda, K. Kondot, T. 1993. Diglucuronoflavones from purple leaves of *Perilla ocimoides*. 33(4): 917-919
- Zheng, Z., pinkham, J. P. and Shetty, K. 1998: Identification of polymeric dye-tolerant oregano(*Oreganum vulgare*) clonal lines by quantifying total phenolics and peroxidase activity. J. Agric. Food Chem. 46: 4441-4446