

## 지층이(*Sargassum thunbergii*) 에탄올 추출물의 항균활성

이소영<sup>1</sup> · 송유진<sup>1</sup> · 김꽃봉우리<sup>1</sup> · 윤소영<sup>1</sup> · 김서진<sup>1</sup> · 이소정<sup>1</sup> · 홍용기<sup>2</sup> · 임성미<sup>3</sup> · 안동현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 식품공학과/ 식품연구소

<sup>2</sup>부경대학교 생물공학과

<sup>3</sup>동명대학교 식품공학과

## Antimicrobial Activity of Ethanol Extract from *Sargassum thunbergii*

So-Young Lee<sup>1</sup>, Eu-Jin Song<sup>1</sup>, Koth-Bong-Woo-Ri Kim<sup>1</sup>, So-Young Yoon<sup>1</sup>, Seo-Jin Kim<sup>1</sup>,  
So-Jeong Lee<sup>1</sup>, Yong-Ki Hong<sup>2</sup>, Sung-Mee Lim<sup>3</sup>, and Dong-Hyun Ahn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science & Technology/ Institute of Food Science and

<sup>2</sup>Dept. of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food Science & Technology, Tongmyong University, Busan 608-735, Korea

### Abstract

Antimicrobial activity of *Sargassum thunbergii* was determined by paper disc assay and minimum concentration inhibitor (MIC) test. A water extract of *S. thunbergii* did not show the antimicrobial activity, but an ethanol extract of *S. thunbergii* (SHE) inhibited *Serratia liquefaciens*, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aerogenosa* and all of the tested gram-positive bacteria at 4 mg/mL. Especially, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes* were susceptible to SHE. As the results of MIC test, SHE inhibited the growth of *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* at concentration of 0.1~0.3%, and inhibited *C. perfringens* at 0.01%. In the thermal and pH stability test for SHE, antibacterial activities of SHE were maintained when the SHE was treated at 121°C for 15 minutes or under pH 2~8. SHE was partitioned in the order of n-hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol. As the results of the MIC test for each obtained fraction, no fraction exhibited higher antibacterial activity than that of the crude SHE. However, a mixture of chloroform, ethylacetate and ethanol fractions showed higher antibacterial activity than SHE.

Key words: algae, *Sargassum thunbergii*, antibacterial activity

### 서 론

식품의약품안전청 보고(2005)에 따르면 우리나라 식중독 발생은 2000년 104건 7,269명, 2001년 93건 6,406명, 2002년 78건 2,980명, 2003년 135건 7,909명, 2004년 165건 10,388명으로 2002년에 잠시 주춤하였으나 지속적인 증가추세를 보이고 있으며, 균주별로는 *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* 등이 문제가 되고 있다(1). 이러한 식품 부패 및 식중독 관련 미생물의 증식을 효과적으로 제어하여 식품을 안전하게 장기간 저장하기 위해 각종 합성 보존제나 일부 천연물질로부터 항균물질을 개발하여 사용하고 있으며, benzoic acid, sorbic acid 및 염소제 등 다양한 형태의 상업적 제품이 생산되어 이용되고 있다(2). 현재 우리나라 식품위생법에는 총 14종의 화학합성품이 보존료로 허가되어 그 사용기준이 설정되어 있는데(3), 이들 보존료를 허용량 이하로 섭취할 경우의 안전성은 입증되었지만 지속적

으로 섭취하거나 병용하여 사용한 식품을 장기간 섭취할 시에는 체내 축적으로 인한 만성독성, 발암성, 돌연변이 유발 등의 문제가 있다고 보고되고 있다(4). 또한 근래 소비자들의 건강육구 증대에 따라 안전성에 대한 재고가 사회적인 관심사로 대두되고 있어 합성보존료를 사용한 식품에 대한 소비자들의 기피현상이 두드러지고 있으며, 이 같은 추세에 따라 독성이 아주 낮거나 거의 없는 항미생물제 또는 식품 보존제 개발의 필요성이 대두되고 있다.

현재까지의 천연 항균제 개발에 관한 연구는 마늘, 양파, 백리향(5-7) 정향, 계피, 삼향자(8) 등의 향신료나 목단피(9), 단삼(10), 홍경천(11), 상백피(12) 등의 약용식물과 같은 육상식물을 위주로 이루어져 왔다. 그러나 최근에 이르러서는 육상의 동식물로부터 신소재를 개발하는 것이 한계에 이르게 되었고, 이와 더불어 해양 자원의 채집 기술, 양식 기술 및 분획 기술의 발달과 관련분야의 학문이 진보함에 따라 그 동안 미개척 분야인 해양생물 자원에도 눈을 돌리게 되었다. 그 중 해조류는 오랜 기간 식용으로 사용되어 오다 최근

\*Corresponding author. E-mail: dhahn@pknu.ac.kr  
Phone: 82-51-629-5831, Fax: 82-51-629-5824

고지혈증 예방(13), 항암(14), 면역조절작용(15), 항바이러스(16), 항염증(17), 항산화(18), 항혈액응고(19), 항균작용(20) 등의 다양한 생리활성을 갖는 물질들을 함유하고 있는 것으로 알려져 새로운 생리활성물질의 보고로 주목받고 있다. 이러한 생리활성물질 중 현재까지 알려진 항균물질로는 홍조류인 빨간검둥이과(Rhodomelaceae) 해조류로부터 분리, 동정된 bromophenol(21), *Dictyota dichotoma*로부터 분리된 diterpene류인 dolabellane 유도체(22), *Fucus vesiculosus*로부터 추출한 phloroglycin(23) 및 *Dictyopteris zonarioides*에서 추출한 hydroquinone 유도체(24) 등이 있다. 그러나 이러한 연구는 주로 일본과 미국을 중심으로 1950년대 이후부터 1990년대까지 이루어진 것이 대부분이며, 해조류를 식용으로 많이 이용하고 있는 국내에서는 근래 참보라우무(25), 톳(26) 및 다시마(27)에 대한 연구가 진행되었을 뿐, 국내 자생 해조류로부터 항균물질을 개발하기 위한 연구는 미미한 실정이다.

한편 지충이는 우리나라 남해안에 널리 자생하고 있는 갈조류로 구충제, 식용, 사료용으로 사용되어 왔으며, 최근에는 항산화작용(18,28) 및 항암작용(29) 등의 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 우리나라 전 해안에서 널리 자생하고 있는 지충이를 에탄올로 추출한 후 항균활성을 조사하여, 천연보존료로의 사용 가능성에 대해 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

부산 기장에서 채취한 지충이를 수도수로 깨끗이 씻어내어 이물질을 제거한 후 실온에서 건조하고 분쇄한 후 -70°C에서 동결저장하며 사용하였다.

### 배지 및 시약

Nutrient broth(NB)는 Accumedia사의 제품을 사용하였고 Brain heart infusion(BHI), Reinforce cystein medium

(RCM), Lactobacilli MRS broth, Potato dextrose broth (PDA), Yeast potato dextrose(YPD) 및 Muller hinton broth(MHB)는 Difco사의 제품을 사용하였다. Silica gel column chromatography에 사용한 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 에탄올, 메탄올은 Junsei 사의 제품을 사용하였다.

### 시험균주

실험에 사용한 균주와 각 균주의 배양 배지는 Table 1과 같다. 사면배지에 배양되어 있는 균주의 단일 집락을 취한 후 액체 배양하여 활성화시켜 사용하였다. *C. perfringens*와 *Lactobacillus plantarum*은 액체배지에 접종한 후 Gas pak (BBL) 및 anaerobic indicator와 함께 jar에 넣어 혐기성 상태를 유지하며 37°C에서 24시간 동안 배양하여 사용하였고 이를 제외한 나머지 세균은 NB에 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 사용하였다. 효모는 YPD 배지에 접종하여 28°C 배양기에서 48시간 배양하였으며, 곰팡이는 PDB(potato dextros broth)에 접종한 후 25°C에서 3~5일간 배양하여 실험에 사용하였다.

### 추출

건조 분쇄된 시료에 물 또는 에탄올을 10배량 가하여 실온에서 24시간 교반하며 추출하였다. 추출 후 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)를 이용하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 취하였다. 이 과정을 3번 반복하여 얻은 상층액을 모아 여과지(Advantec 5A, Toyo, Japan)로 여과한 후 Rotary evaporator(RE 200, Yamato Co., Japan)로 감압 농축하였다. 이 농축액을 37°C에서 건조시킨 후 -20°C에서 보관하며 일정농도로 희석하여 공시하였다.

### Paper disc assay

높이가 4~5 mm인 MHA 평판 배지에 농도가 약  $10^5 \sim 10^6$  CFU 가량 되도록 균액을 분주한 후 도말 삼으로 도말하였다. 여기에 지름이 6 mm인 paper disc를 고정시키고 일정 농도로 희석한 해조류 추출물을 20  $\mu$ L 흡수시켰다. 이를 실온에서 약 1시간가량 확산시킨 후 37°C incubator에서 24시

Table 1. Lists of strain and media used for experiments

Category	Strain	Media
Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> KFCC 35421	Nutrient broth
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Nutrient broth
	<i>Clostridium perfringens</i> KCTC 5014	Nutrient broth
	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 1048	MRS broth
	<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	Brain heart infusion
	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	Brain heart infusion
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1636	Nutrient broth
	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	Nutrient broth
	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	Nutrient broth
	<i>Serratia liquefaciens</i> KCTC 2925	Nutrient broth
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Nutrient broth	
Yeasts	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7905	Yeast peptone dextrose
Molds	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 6906	Potato dextrose broth
	<i>Penicillium expansum</i> KCTC 6436	Potato dextrose broth

간 배양하였다. 이때 혐기성 균주는 gas pak(BBL) 및 anaerobic indicator와 함께 혐기성 jar에 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 배양하였고, 효모는 확산 후 28°C incubator에서 48시간 배양하였으며 곰팡이는 실온에서 3~5일간 배양하였다. 배양 후 형성된 clear zone의 크기로 항균력을 판단하였다.

#### Minimum inhibitory concentration(MIC) test

멸균 후 완전히 굳지 않은 MHA 배지에 100 mg/mL로 희석한 해조류 추출물을 원하는 최종농도에 맞춰 첨가하고 시험 균주의 농도가 약  $10^5 \sim 10^6$  CFU 가량 되도록 접종한 후 혼합하였다. 이를 평판에 분주하여 실온에서 균하고 37°C incubator에서 24시간 배양하였다. 이때 혐기성균은 gas pak(BBL) 및 anaerobic indicator와 함께 혐기성 jar에 넣은 후 배양하였으며, 효모는 28°C incubator에서 28시간, 곰팡이는 실온에서 3~5일간 배양하였다. 배양 후 현미경 상에서 균의 성장이 관찰되지 않은 평판의 농도를 최소저해농도(MIC)로 하였다.

#### 열 안정성

적당한 농도로 희석한 시료를 60°C에서 10분, 30분, 60분, 80°C 및 100°C에서 10분, 20분, 121°C에서 15분간 열처리한 후 급냉하였다. 이를 4°C에서 보관하며 paper disc 법으로 항균활성의 변화를 측정하였다.

#### pH 안정성

적당한 농도로 희석한 시료의 pH를 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl을 이용하여 pH 2, 4, 6, 8, 10으로 조절한 후 상온에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간 처리 된 시료는 본래의 pH로 중화시킨 후 paper disc 법으로 항균활성의 변화를 측정하였다.

#### Silica gel column chromatography

지층이 에탄올 추출물의 항균물질을 확인하기 위하여 silica gel column chromatography를 이용하여 용매별 분획물을 얻었다(Fig. 1). 활성화된 silica gel(230~400 mesh, Merck Co., Germany)에 헥산을 가하여 slurry로 만들고 glass column(50×65 mm, 120 mL)에 충전한 후 이를 3배의 헥산으로 세척하였다. 지층이 에탄올 추출물을 column에 300 mg loading 한 후 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 에탄올 및 메탄올을 충전된 silica gel 부피의 3배량씩 가하며 극성을 높이면서 순차 분획하였다. 분리된 분획물은 감압 농축하여 37°C에서 완전히 건조시킨 후 ethanol 또는 DMSO에 희석하여 항균력을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### Paper disc assay

Paper disc법을 통하여 항균력을 측정된 결과(Table 2),

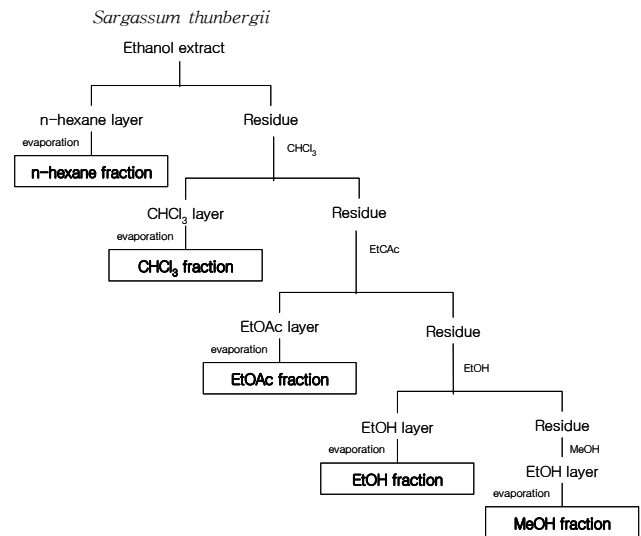


Fig. 1. The procedure to obtain the solvent fraction from ethanol extract of *Sargassum thunbergii*.

Table 2. Antimicrobial activity of ethanol extracts from *Sargassum thunbergii* (Concentration: mg/mL)

	Water extract		Ethanol extract	
	4	0.4	4	0.4
<i>B. subtilis</i>	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	+	-
<i>C. perfringens</i>	-	-	+++	++
<i>L. monocytogens</i>	-	-	+	-
<i>L. plantarum</i>	-	-	+	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>S. liquefaciens</i>	-	-	+	-
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	+	-
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-
<i>P. expansum</i>	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+	-

Growth inhibition size: -, not detected; +, smaller than 1.5 mm; ++, 1.5~3 mm; +++, 3~5 mm; +++++, larger than 5 mm.

지층이 에탄올 추출물은 4 mg/mL 농도에서 실험에 사용된 모든 그람 양성균에 대해 항균효과를 보였는데, 특히 *B. subtilis*와 *C. perfringens*는 0.4 mg/mL 농도에서도 항균력을 보였다. 그람 음성균에 대해서는 *S. liquefaciens*, *S. Typhimurium* 및 *P. aeruginosa*에 대해 항균효과를 보였으며, *A. niger* 및 *P. expansum*에는 항진균 효과가 없었으나 *S. cerevisiae*에 대해서는 4 mg/mL 농도에서 항균활성을 보였다. 이러한 결과는 지층이 80% methanol 추출물이 2.5 mg/disc 농도에서 어류병원성세균인 *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대해 항균활성을 가진다는 보고(30)와 유사한 결과이나 지층이 100% methanol 추출물에서 *S. aureus*와 *Candida albicans*에 대한 항균력이 관찰되지 않았다는 Lee 등의 보고(31)와는 다른 결과를 보였다. 이처럼 동일해조류에 대한 항균활성의 결과가 다른 이유는 해조류의 항균활성

이 해조류의 채집 시기 및 장소 등과도 관계가 있으며(32), 시험 균주마다 감수성에 차이가 있기 때문으로 생각된다. 한편 지층이 물 추출물에서는 어떠한 균주에 대한 항균활성도 관찰되지 않았는데, 이러한 결과는 Murakami 등이 행한 일본산 해조류에 대한 항균성 물질 검색 실험 결과(33), 물 추출물에서는 항균활성이 없었다는 것과 유사한 경향을 나타내었으며, 녹조류인 *Cymopolia barbata*를 물, 에탄올, 에틸에테르 및 석유에테르로 추출하여 항균활성을 측정 한 결과(34), 물 추출물을 제외한 나머지 용매에서만 항균활성이 나타났다는 결과와도 일치하였다. 이는 해조류에서 추출되는 물질 중 항균활성에 관여하는 hydroquinone(24), crinitol(35), phlorotannin(20) 및 bromophenol(21)과 같은 물질이 물보다는 유기용매에 잘 용출되기 때문으로 생각된다.

Minimum inhibitory concentration(MIC)

지층이 에탄올 조추출물에 대한 MIC test를 실시한 결과 (Table 3), 그람 음성균과 *S. cerevisiae*에 대한 MIC 값은 0.8 및 0.4%로 약한 항균활성을 보였다. 그러나 그람 양성 균주 중 *C. perfringens*와 *L. monocytogenes*에 대해서는 각각 0.01 및 0.1% 농도에서 생육을 억제하여 효과가 높은 것으로 나타났다. 본 실험의 *L. monocytogenes*에 대한 지층이 에탄올 추출물의 MIC는 Lim 등(25)이 연구한 참보라색우무 methanol 추출물의 MIC인 0.125%에 비해 낮은 값이며, 현재 식품첨가물로 사용되고 있는 합성 보존제인 sodium propionate의 MIC(0.15~1.1%)(36)와 potassium sorbate 및 sodium benzoate의 MIC(0.52~0.98%)(37)보다 낮은 값으로, 이러한 결과를 고려하면 지층이 에탄올 추출물은 천연보존제로서 이용 가능할 것으로 생각된다.

한편, 본 연구 결과에 따르면 지층이 에탄올 추출물은 그

람 음성균에 비해 그람 양성균에 더 효과적임을 알 수 있다. *Sargassum*속 해조류의 항균물질에 대한 연구결과를 보면, *Sargassum tortile*로부터 분리된 acyclic diterpene alcohol 계열물질인 crinitol이 그람 음성균에 비해 그람 양성균에 효과적이라는 결과가 보고된 바 있으며(35), *Sargassum furcatum*(32) 및 *Sargassum filipendula*(38) 메탄올 추출물이 그람 음성균에 비해 그람 양성균에 더 효과적이라는 연구가 보고되어 본 연구와 유사한 경향을 보였다. 이러한 결과들은 그람 양성균이 그람 음성균에 비해 항균물질에 대한 감수성이 높다는 보고(39)와 일치하는 것으로, 이는 그람 음성균에는 외부 유입 물질에 대해 선택적인 투과 장벽의 역할을 하는 세포외막이 존재하기 때문이라고 알려져 있다(40).

열 및 pH 안정성

대부분의 가공식품들은 기호성과 저장성을 향상시키거나, 제품 고유의 특성을 살리기 위해 열처리 또는 pH 처리과정을 거치게 되므로 이들 식품에 첨가되는 보존료는 열 및 pH에 안정하여야 한다. 이에 지층이 에탄올 추출물의 열 및 pH 안정성을 측정하였다. 열 안정성 실험 결과(Table 4), 지층이 에탄올 추출물은 121°C에서 15분간 열처리하여도 항균활성에 변화가 없어 이들 추출물 유래의 항균물질은 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다. 이러한 결과를 볼 때, 지층이 에탄올 추출물은 가공과정에서 열처리를 동반하는 대부분의 식품에 보존제로 사용하기 용이할 것으로 사료된다. 특히, *C. perfringens*와 같이 retort 및 통조림 제품에서 변패나 식중독을 일으킬 수 있는 균주에 대해서도 열처리 시 항균활성에 변화가 없는 것으로 나타나 통조림이나 retort 제품의 상업적 멸균 시 이용할 수 있을 것으로 기대된다. pH 안정성 test 결과(Table 5), 지층이 에탄올 추출물은 pH를 2~8의

Table 3. Minimum inhibitory concentration of ethanol extracts from *Sargassum thunbergii* (Unit: %)

	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Sargassum thunbergii</i>	0.3	0.3	0.01	0.1	0.8<	0.8<	0.8<	0.4

Table 4. Effect of heat treatment on antimicrobial activity of ethanol extract from *Sargassum thunbergii* (concentration: 4 mg/mL)

		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. plantarum</i>
Untreated		+	+	++++	+	+
60°C	10 min	+	+	++++	+	+
	30 min	+	+	++++	+	+
	60 min	+	+	++++	+	+
80°C	10 min	+	+	++++	+	+
	20 min	+	+	++++	+	+
100°C	10 min	+	+	++++	+	+
	20 min	+	+	++++	+	+
121°C	15 min	+	+	++++	+	+

Growth inhibition size of clearzone: -, not detected; +, smaller than 1.5 mm; ++, 1.5~3 mm; +++, 3~5 mm; +++++, larger than 5 mm.

Table 5. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of ethanol extract from *Sargassum thunbergii*

(concentration: 4 mg/mL)

pH	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. plantarum</i>
Untreated	+	+	++++	+	+
2	+	+	++++	+	+
4	+	+	++++	+	+
6	+	+	++++	+	+
8	+	+	++++	+	+
10	+	-	+++	-	-

Growth inhibition size of clearzone : -, not detected : +, smaller than 1.5 mm : ++, 1.5~3 mm : +++, 3~5 mm: +++++, larger than 5 mm.

범위에서는 항균활성이 유지되었으나, pH 10의 알칼리 조건에서는 *S. aureus*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* 및 *L. plantarum*에 대한 항균활성이 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 일반적인 식품의 pH가 약산성 또는 중성임을 고려할 때, pH 10의 알칼리 조건에서 항균력이 다소 떨어지는 것은 천연식품보존제로 사용하는데 큰 문제가 되지 않을 것으로 사료된다. 또한 산성 및 중성조건에서는 항균활성이 그대로 유지됨으로 주스나 탄산음료 및 침채류와 같이 pH가 낮고, 제품의 품질을 위해 열처리를 하기 힘든 식품에 있어 적용하기 용이할 것으로 생각된다.

#### Silica gel column chromatography 분획물의 항균활성

지층이 ethanol 추출물의 항균 유효 성분을 분리하기 위해 silica gel column chromatography를 실시하였다. 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 에탄올 및 메탄올을 용출용매로 하여 극성을 높여가며 각 용매별 분획을 분취한 결과, 헥산에는 지층이 에탄올 추출물이 용출되어 나오지 않았으나, 클로로포름에서 4.6%, 에틸아세테이트에서 19%, 에탄올에서 40%, 메탄올에서 9%의 수율로 분획물을 얻을 수 있었다 (Table 6). 각 분획물을 DMSO 및 에탄올을 이용하여 녹인 후 항균활성을 MIC로 측정할 결과, *C. perfringens*에 대해서는 모든 분획물이 지층이 조 에탄올 추출물과 동일한 수준의 항균효과를 나타내었으나, *B. subtilis*, *S. aureus* 및 *L. monocytogenes*에 대해서는 어떠한 분획물에서도 지층이 조 에탄올 추출물 이상의 항균활성이 나타나지 않았다 (Table

7). 천연물 유래 항균물질의 분리에 관한 현재까지의 연구에 따르면, 대부분의 경우 추출물의 정제 수준을 높일수록 항균력이 상승하는 것으로 보고되고 있으나(9-12,41), 일부 천연물의 경우에는 정제된 물질의 항균활성이 조 추출물일 때보다 떨어지는 경우도 있다고 보고되고 있다(42,43). 이는 추출물의 항균효과가 단일 성분에 의한 작용이 아니라 여러 성분의 상호작용에 의해 나타날 수 있음을 의미하는 것이다. 이에 본 실험에서는 지층이 추출물의 각 분획물을 2개 또는 3개씩 1:1(또는 1:1:1)의 비율로 혼합한 후 항균력을 측정하여 각 분획물간의 상호작용에 따른 항균활성의 변화를 측정하였다 (Table 8). 그 결과 10개의 혼합물 중 클로로포름 및 에탄올 분획 혼합물과 클로로포름, 에틸아세테이트 및 에탄올 분획 혼합물에서 조 추출물 이상의 항균활성이 나타났으나, 에틸아세테이트 및 에탄올 분획 혼합물에서는 조 추출물 이상의 항균활성이 나타나지 않았다. 이로 미루어 보아 지층이 추출물의 항균활성은 단일성분에 의한 작용이 아니라 클로로포름 분획물과 에탄올 분획물에 용출된 물질들 간의 상호작용에 의한 것으로 사료된다. 현재까지 보고된 지층이의 생리활성물질에 관한 연구를 살펴보면 fucoidan 등의 다당류(18, 29), chromene 계열(44), plastoquinones(28) 혹은 monogalactosyl diacylglycerol 계열(45)의 물질들이 보고된 바 있다. 이중 plastoquinones(16) 및 chromene 계열(46) 물질은 항균활성을 지니는 물질로서 이들 물질은 클로로포

Table 6. The yields of solvent extraction fractions from ethanol extract of *Sargassum thunbergii* (unit: %)

Solvents	Yield (%)
Chloroform	4.6
Ethylacetate	19
Ethanol	40
Methanol	9

Table 7. Minimum inhibitory concentration of serial solvent fraction of ethanol extract with *Sargassum thunbergii*

(unit: %)

	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. perfringens</i>
Chloroform	0.3<	0.3<	0.1<	0.01
Ethylacetate	0.3<	0.3<	0.1<	0.01
Ethanol	0.3<	0.3<	0.1<	0.01
Methanol	0.3<	0.3<	0.1<	0.01

Table 8. Minimum inhibitory concentration of serial solvent fraction mixtures obtained from ethanol extract of *Sargassum thunbergii* (unit: %)

	C <sup>1</sup> +EA <sup>2</sup>	C+E <sup>3</sup>	C+M <sup>4</sup>	EA+E	EA+M	E+M	C+EA+E	C+EA+M	C+E+M	EA+E+M
<i>C. perfringens</i>	0.01	0.005	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005	0.01	0.01	0.01<

<sup>1</sup>)Chloroform fraction. <sup>2</sup>)Ethylacetate fraction. <sup>3</sup>)Ethanol fraction. <sup>4</sup>)Methanol fraction.

름이나 에탄올 등의 용매에 잘 용출된다. 따라서 본 연구에서 분리한 지층이의 클로로포름 및 에탄올 분획물에도 이들 물질과 유사한 계열의 물질들이 함유되어 있을 것으로 예상된다.

## 요 약

Paper disc법을 통하여 항균력을 측정한 결과, 물 추출물에서는 항균효과가 나타나지 않았으나, 4 mg/mL 농도의 에탄올 추출물에서는 그람 음성균 중 *S. liquefaciens*, *S. Typhimurium* 및 *P. aerogenosa*에 대해 항균효과를 보였으며, 실험에 사용된 모든 그람 양성균에 대해 항균효과를 보였다. 특히, *B. subtilis*, *C. perfringens* 및 *L. monocytogenes*에 대해 높은 항균력을 보였다. 또한 *A. niger* 및 *P. expansum*에는 항진균 효과가 없었으나 *S. cerevisiae*에 대해서는 4 mg/mL 농도에서 항진균 활성을 보였다. 지층이 에탄올 조추출물에 대한 MIC test를 실시한 결과, 그람 음성균에 대한 MIC 값은 0.6~0.8%로 약한 항균활성을 보였으나, 그람 양성 균주 중 *C. perfringens*와 *L. monocytogenes*에 대해서는 0.01 및 0.1%에서 두 균주의 생육을 효과적으로 억제하였다. 열 및 pH 안정성 실험 결과, 지층이 에탄올 추출물은 121°C에서 15분간의 열처리와 pH 2~8 처리에도 항균활성에 변화가 없어 이들 추출물 유래의 항균물질은 열 및 pH 변화에 안정한 물질임을 알 수 있었다. 지층이 에탄올 추출물의 silica gel column chromatography 분획물을 2개 또는 3개씩 1:1(또는 1:1:1)의 비율로 혼합한 후 항균력을 측정할 결과, 클로로포름 및 에탄올 분획 혼합물과 클로로포름, 에틸아세테이트 및 에탄올 분획 혼합물에서 조 추출물 이상의 항균활성이 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오 21 사업의 해양바이오 프로세스연구단 연구비 지원(M-2007-05)에 의해 수행되었으며, 2008년도 Brain Busan 21사업에 의한 지원에 의해 게재된 논문으로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Korea food and drug administration. 2005. *Statistics of outbreak of food poisoning*. Ministry of health and welfare.
2. Cherry JP. 1999. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. *Food Technol* 53: 54-59.
3. Chang DS, Shin DH, Chung DH, Kim CM, Lee IS. 2002. *Food hygiene*. Jungmoongak, Seoul. p 244-246.
4. Ferrand C, Marc F, Fritsch P. 2000. Chemical and toxicological studies of products resulting from sorbic acid and methylamine interaction in food conditions. *Amino Acids* 18: 251-263.
5. Buchanan RL, Shepherd AJ. 1981. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. *J Food Sci* 46: 976-977.
6. Yin MC, Cheng WS. 1998. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *J Food Prot* 61: 123-125.
7. Montes-Belmont R, Carvajal M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oil and their components. *J Food Prot* 61: 616-619.
8. Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oil against six meat spoilage organisms. *Int J Food Microbiol* 37: 155-162.
9. Hwang JS, Han YS. 2003. Isolation and identification of antimicrobial compound from Mokdan bark (*Paeonia suffruticosa* ANDR). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1059-1065.
10. Choi HY, Han YS. 2003. Isolation and Identification of antimicrobial compound from dansam (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 22-28.
11. Sim CJ, Lee GH, Jung JH, Yi SD, Kim YH, Oh MJ. 2004. Isolation and identification of antimicrobial activity substances from *Rhodiola sachlinensis*. *Kor J Food Preserv* 11: 63-70.
12. Park UY, Kim SH, Kim JH, Kim YG, Chang DS. 1995. Purification of antimicrobial substance for the extract from the root bark of *Morus alba*. *J Fd Hyg Safety* 10: 225-230.
13. Awad NE, Selim MA, Saleh MM, Matloub AA. 2003. Seasonal variation of the lipoidal matters and hypolipidaemic activity of the red alga *Corallina officinalis* L. *Phytother Res* 17: 19-25.
14. Ryu BH, Kim DS, Cho K, Sin DB. 1989. Antitumor activity of seaweeds agame Sarcoma-180. *Kor J Food Sci Technol* 21: 595-600.
15. Liu JN, Yoshida Y, Wang MQ, Okai Y, Yamachita UB. 1997. B cell stimulating activity of seaweed extracts. *Int J Immunopharmac* 19: 135-142.
16. Iwashima M, Mori J, Ting X, Matsunaga T, Hayashi K, Shinoda D, Saito H, Sankawa U, Hayashi T. 2005. Antioxidant and antiviral activities of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum*, and a new chromene derivative converted from the plastoquinones. *Biol Pharm Bull* 28: 374-377.
17. Kim JY, Kim KH, Suh HS, Choi WC. 1997. Antiinflammatory effects of new chemical compounds, HS-1580 series (HS-1580, HS-1581, HS-1582). *J Life Sci* 16: 1181-1187.
18. Yang F, Wang Lin, Hu Qihui. 2005. Preparation of polysaccharide derived from *Sargassum thunbergii* and its antioxidant activity. *Food Sci* 26: 224-227.
19. Lee HJ, Kim JH, Lee CH, Kim JS, Kwak ST, Lee KB, Song KS, Choi BW, Lee BH. 1999. Inhibitory activities of seaweeds on prolyl endopeptidase, tyrosinase and coagulation. *Kor J Pharmacogn* 30: 231-237.
20. Kuda T, Kunii T, Goto H, Suzuki T, Yano T. 2007. Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia kurume* products harvested and processed in the Noto Peninsula, Japan. *Food Chem* 103: 900-905.
21. Choi JS, Park HJ, Jung HA, Chung HY, Jung JH, Choi WC. 2000. A cyclohexanonyl bromophenol from the red alga *Symphyclocladia latiuscula*. *J Nat Prod* 63: 1705-1706.
22. Amico G, Oriente G, Piatelli M, Tringali C, Fattorusso E, Mango S, Mayol L. 1980. Diterpenes based on the dola-bellane skeleton from *Dictyota dichotoma*. *Tetrahedron* 36: 1409-1414.
23. Glombitza KW, Rosener HU, Vilter H, Rauwald W. 1973. Antibiotics from algae. 8. Phloroglucinol from Phaeophyceae. *Planta Med* 24: 301-303.

24. Fenical W, Sims JJ. 1973. Zonarol and isozonarol, fungitoxic hydroquinones from the brown seaweed *Dictyopteris zonarioides*. *J Org Chem* 38: 2383-2386.
25. Lim CW, Lee JS, Cho YJ. 2000. Structure and some properties of the antimicrobial compounds in the red alga, *Symphysoladia latiscula*. *J Korean Fish Soc* 33: 280-287.
26. Kim SH, Lim SB, Ko YH, Oh MC, Park CS. 1994. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* by solvents and their antimicrobial effects. *Bull Korean Fish Soc* 27: 462-468.
27. Kim JH, Lee DS, Lim CW, Park HY, Park JH. 2002. Antibacterial activity of sea-mustard, *Laminaria japonica* extracts on the cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. *J Korean Fish Soc* 35: 191-195.
28. Seo Y, Lee HJ, Park KE, Kim YA, Ahn JW, Yoo JS, Lee BJ. 2004. Peroxynitrite-scavenging constituents from the brown alga *Sargassum thunbergii*. *Biosci Biotech Eng* 9: 212-216.
29. Zhuang C, Itoh H, Mizuno T. 1995. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*). *Biosci Biotech Biochem* 59: 563-567.
30. Kang SY, Oh MJ, Shin JA. 2005. Antimicrobial activity of korean marine algae against fish pathogenic bacteria. *J Fish Pathol* 18: 147-156.
31. Lee JH, Lee KH, Yoo HI, Zhou XL, Kim YS, Han GC, Nam KW. 2006. Antimicrobial activity of *Neorhodomela aculeata* extracts against human skin pathogens. *J Kor Fish Soc* 39: 292-296.
32. Val AG, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorroategui J, Suay I, Vicente F, Portillo M, Rio MJ, Reina GG, Pelaez F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary islands, Spain). *Int Microbiol* 4: 35-40.
33. Murakami M, Makabe K, Okada S, Yamaguchi K, Konosu S. 1988. Screening of biologically activity compounds in microalgae. *Nippon Suisan Cakki Shi* 54: 1035-1039.
34. Nadal NGM, Casillias CM, Rodriguez LV, Rodriguez JR, Vera LT. 1966. Antibiotic properties of marine algae-III. *Cymopolia barbara*. *Bot Marina* 9: 121-126.
35. Kubo I, Himejima M, Tsujimoto K, Muroi H, Ichikawa N. 1992. Antibacterial activity of crinitol and its potentiation. *J Nat Prod* 55: 780-785.
36. EI-Shenawy MA, Marth EH. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of sodium propionate. *J Food Microbiol* 8: 85-92.
37. Park CS, Cha MS. 2000. Comparison of antibacterial activity of green tea extracts and preservation to the pathogenic bacteria. *Korean J Food Nutr* 13: 36-44.
38. Morales JL, Cantillo-Ciau ZO, Sánchez-Molina I, Mena-Rejón GJ. 2006. Screening of antibacterial and antifungal activity of six marine macroalgae from coasts of Yucatan Peninsula. *Pharm Biol* 44: 632-635.
39. Magallanes C, Cordoba C, Orozco R. 2003. Antimicrobial activity of ethanolic extracts of marine algae from central coast of Peru. *Rev Peru Biol* 10: 125-132.
40. Nakamura S, Kato AM, Kobayashi K. 1991. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J Agric Food Chem* 39: 647-650.
41. Kim JH, Lee DS, Lim CW, Park HY, Park JH. 2002. Antibacterial activity of sea-mustard, *Laminaria japonica* extracts on the cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. *J Korean Fish Soc* 35: 191-195.
42. Yoon JW, Yoo MY, Choi JH, Lee MK, Oh DH. 2005. Antimicrobial effects of ethanol extracted and sub-fractionated materials from different parts of *Quercus aliena* Blume. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 910-914.
43. Kong MY, Kang TS, Lee MK, Park BK, Oh DH. 2001. Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fractions of *Quercus mongolica* leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 415-420.
44. Seo YW, Park KE, Nam TJ. 2007. Isolation of a new chromene from the brown alga *Sargassum thunbergii*. *Bull Korean Chem Soc* 28: 1831-1833.
45. Kim YH, Kim EH, Lee CH, Kim MH, Rho JR. 2007. Two new monogalactosyl diacylglycerols from brown alga *Sargassum thunbergii*. *Lipids* 42: 395-399.
46. Chimenti F, Bizzarri B, Bolasco A, Secci D, Chimenti P, Carradori S, Granese A, Rivanera D, Lilli D, Zicari A, Scaltrito MM, Sisto F. 2007. A novel class of selective anti-*Helicobacter pylori* agents 2-one-2H-chromene-3-carboxamide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 3065-3071.

(2009년 1월 13일 접수; 2009년 3월 4일 채택)