

측백나무 열매 추출물의 항균활성

염태현 · 임흥빈[†]

충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과

Antimicrobial Activities of Organic Extracts from Fruit of *Thuja orientalis* L.

Tae Hyun Youm and Heung Bin Lim[†]

Department of Industrial plant Science, Colleague of Agriculture, life & Environment Science,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea.

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the antimicrobial activities of organic extracts obtained from the fruit of *Thuja orientalis* L. The native fruits in Korea were collected and extracted by 80% ethanol, and the extract was sequentially fractionated with n-hexane, chloroform, ethylacetate, and butanol. The fraction yields of n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and water of ethanol extract were 10.15%, 10.05%, 1.45%, 45.35% and 27.55%, respectively. n-Hexane-soluble fraction showed the highest antibacterial activity against gram positive bacteria, while the chloroform, ethylacetate, butanol and aqueous fractions did not show any antibacterial activity. Minimum inhibitory concentration (MICs) on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Sateptococcus pneumoniae*, n-hexane-soluble fraction were 100 µg, 500 µg and 50 µg/disc, respectively. The antibacterial activity was not destroyed by heating at 80, 100, 120 °C for 30 min and was not affected by pH. In the inhibitory test against the *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Sateptococcus pneumoniae*, n-hexane-soluble fraction showed potent growth inhibition at the concentration of 0.1 and 0.5 µg/mL for 12~24 hours and n-hexane-soluble fraction did not show any mutagenic activity.

Key Words : *Thuja orientalis* L, Extract, Antimicrobial Activity, Minimum Inhibitory Concentration(MIC), Mutagenic Activity

서 언

최근 생활수준의 향상과 함께 천연물에 대한 관심이 높아지면서 천연물에서 새로운 기능성 물질을 찾으려는 연구와 식품 산업이 발달함에 따라 유통 및 저장 과정에서 발생하기 쉬운 부패나 변질의 원인이 되는 미생물의 증식을 억제하기 위한 연구 (Park *et al.*, 2006)가 활발하게 진행되고 있다. 식품의 부패와 변질을 방지할 목적으로 일부 식품에 여러 가지 인공 합성 보존료가 첨가되고 있으나 식품 첨가물의 안전성이 강하게 대두되면서 소비자가 합성 첨가물이 들어있는 식품을 기피하는 현상이 나타나고 있다 (Lee *et al.*, 2001). 따라서 유용 식물을 비롯한 생약 및 한약 등으로부터 인체에 무해하면서 변패를 억제하고 유통기한을 늘릴 수 있는 천연 보존료의 개발 필요성이 증대되고 있다 (Ahn, *et al.*, 2000).

최근 들어 식물성 한약재 및 약용식물에서도 항균작용을 나타낸다는 연구들이 보고되고 있으며 (Choi *et al.*, 2002), 국내 자생식물 (Han *et al.*, 2006) 및 약용식물 (Paik *et al.*,

1998)에서 항균활성을 찾으려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이와 같은 자생식물과 약재로 사용하는 식물의 항균활성에 대한 연구로는 무화과 (Jeong *et al.*, 2005), 고수 (Kim *et al.*, 2001), 삼백초 (Koh, 2004) 등의 연구가 보고되었다.

측백나무 (*Thuja orientalis* Linn)는 측백나무 (Cupressaceae) 과에 속하는 상록 침엽 교목으로 민간 및 한방에서 토혈 (吐血), 비출혈 (鼻出血), 고혈압 (高血壓) 등의 치료제로 사용되어 왔으며, sabinic acid, juniferic acid, hinokitiol, quercetin, saponin 성분 (Kim *et al.*, 1998) 및 thujene, pinene 등의 정유성분과 flavonoid 등이 있는 것으로 보고되었다 (Sung *et al.*, 1998).

측백나무 잎의 hinokitiol 성분이 그람 양성균에 강력한 살균 활성을 보인다는 연구가 보고 되고 있으며 (Kang *et al.*, 2000), 서양측백나무 잎 정유성분의 항균활성에 관한 연구가 보고되고 있다 (Seo *et al.*, 2003). 최근에는 측백엽 메탄올 추출물이 신경보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 (Yoon *et al.*, 2008).

측백나무 열매인 백자인 (柏子仁)에 관한 연구로는 측백열매 과피의 물추출액이 토끼의 혈액성분변화에 미치는 영향에

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-261-2521 (E-mail) heunbin@chungbuk.ac.kr

Received 2010 July 29 / 1st Revised 2010 October 5 / 2nd Revised 2010 October 9 / Accepted 2010 October 13

관한 연구 (Nam *et al.*, 1987)와 tyrosinase 저해제의 분리 및 정제 (Lee *et al.*, 2000), 측백열매 추출물의 발모 효능 (Kim *et al.*, 2004) 등의 다양한 기능이 보고되고 있다. 그러나 측백나무의 항균활성에 관한 연구는 거의 없으며, 열매에 관한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 천연 보존료 개발의 일환으로 측백나무 열매를 과육과 종자로 분리하여 과육을 80% 에탄올로 추출한 후, 분획별 용매 추출물을 조제하여 병원균과 식중독균, 식품과 관련이 있는 6개의 균주에 대한 항균활성을 검색하고 항균성이 강한 추출용매에서의 최소저해농도, 추출물의 열 및 pH에 대한 안정성과 돌연변이유발성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 측백나무 열매는 경북 달성군 도동에서 9월에 채취하여 증류수로 2~3회 수세하고 깨끗이 손질하여 종자를 제거한 과육을 2주 동안 음건한 뒤 건조된 시료를 분쇄기로 분쇄하여 분말로 조제한 다음 4°C에서 냉장보관 후 추출용 시료로 사용하였다.

2. 사용균주 및 시약

추출에 사용한 ethanol 및 분획용 n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol은 MERK (German)사와 Junsei (Japan)사의 일급 시약을 사용하였으며, Paper disc와 membrane filter는 Advantec (USA)사의 제품을 사용하였다. 시험에 사용된 균주는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 등 그람양성균 3종, *E. coli*, *Salmonella* 등 그람음성균 2종, 그리고 *Saccharomyces cerevisiae* 효모 1종 등 총 6종을 선정하여 충북대학교 특용식물학과에서 보관중이거나 한국중균협회에서 분양받아 실험에 사용하였다. 균 생육배지로 nutrient broth는 Difco제품 (USA)을 agar는 Sigma (USA), potato dextrose broth는 Difco제품(USA)과 agar는 Sigma (USA)를 각각 사용하였다.

3. 시료의 전처리

건조된 측백나무 열매 과육 200 g을 잘게 파쇄하여 미세분말로 만든 후 5배의 80%에탄올 1 L를 가하고 3일간 침지하여 추출하였다. 추출액을 필터(Adventec, No. 6)로 여과하여 고형물을 분리하고, 감압농축기를 이용하여 50°C에서 농축한 뒤 에탄올 추출물을 얻었다.

4. 용매의 극성을 이용한 분획 추출물 제조

측백나무 열매 80% 에탄올 추출물 20 g을 증류수에 현탁한 뒤 극성을 달리하여 분획, 추출하였다. 즉, 에탄올 추출물을

20배의 증류수 400 mL에 현탁 시킨 다음 n-hexane을 1:1 비율로 가하고 잘 혼합한 후 1~2시간을 방치하여 수층과 추출용매의 두 층으로 나뉘도록 하였다. 추출 용매를 분리하고 여과(8 mm, Adventech, USA)한 다음 감압농축기를 이용하여 n-hexane 추출물 층을 얻었다. 남은 수층을 계속해서 같은 방법으로 chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 물로 극성이 낮은 용매에서 높은 용매 순서로 용매 분획하여 분획별 추출물 층을 얻었다. 모든 과정은 3회 반복 실시하여 n-hexane분획물은 2.03 g, chloroform분획물은 2.01 g, ethylacetate분획물은 0.3 g, n-butanol분획물은 9.07 g 그리고 물 분획물은 5.5 g을 얻었다. 추출된 n-hexane, chloroform, ethylacetate와 butanol 분획물은 에탄올에 재용해하고 수용성 추출물은 증류수에 재용해하여 0.45 µm membrane filter로 제균하고 4°C에 보관하면서 항균활성을 조사하는데 사용하였다.

5. 분획별 추출물의 항균활성 측정

본 실험에서는 측백나무열매의 에탄올추출물과 각 분획물의 항균활성을 확인하기 위하여 여러 농도의 추출물을 포화시킨 paper disk (8 mm)를 한천배지상에 접촉시켜 균주의 생육저해 정도를 측정하는 한천배지 확산법 (agar diffusion method)을 이용하였다 (Hwang *et al.*, 2003).

균주는 그람 양성균으로 식품을 변질시키는 *Bacillus subtilis*와 식중독을 일으키는 *Staphylococcus aureus*, 폐렴의 주요 원인균인 *Streptococcus pneumoniae*, 그람 음성균으로 오염의 지표가 되는 *E. coli*, 사람이나 동물에 티푸스성 질환을 일으키고 식중독의 원인균이 되는 *Salmonella* 그리고 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였다. 세균은 nutrient broth & agar, yeast 는 potato dextrose agar를 사용하였다.

항균성 검색용 평판배지는 각각의 생육배지로 기증층 배지를 petri dish 에 15 mL씩 분주하여 응고시킨 뒤, 중층용배지 5 mL을 45°C 수욕상에 보관하면서 각종 시험 균액을 600 nm에서 흡광도가 0.3이 되도록 한 다음, 균 현탁액 0.1 mL를 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 기증용 배지위에 분주하여 이중의 평판배지를 만들어 사용하였다. 각 용매별 추출물의 농도를 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/disc로 하여 멸균된 paper disc (직경 8 mm, Adventech)에 50 µL씩 흡수시킨 후, 추출용매를 완전히 증발시키고 시험균액이 도말된 plate에 올려놓은 뒤 37°C에서 24~48시간 배양하여 paper disc 주위에 생성된 저해환 (inhibition zone)의 직경(mm)을 측정하였다

6. 최소저해농도 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 측정

최소저해농도는 항균력 시험을 통하여 항균활성을 보였던 3종의 그람 양성균주 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*에 대하여 조사하였다. MIC 측정은

Choi (2006) 등의 한천배지 확산법을 이용하였다. 시료를 에탄올로 용해시켜 membrane filter (0.45 μm)로 여과하여 제균한 다음, 최종농도가 10, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 가 되도록 8 mm paper disk에 흡수시킨 후, 용매를 휘발시키고 nutrient broth agar에 배양된 균주의 단일 colony를 백금으로 취하여 10 mL nutrient broth에 접종하고 37°C에서 24시간 배양 후, 1 mL를 취하여 10 mL에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하여 활성화 시킨 균주를 600 nm에서 흡광도가 0.3이 되도록 희석하여 100 μL 씩 도말된 plate상에 올려놓고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 disk 주위의 clear zone의 직경 (mm)을 측정하여 미생물이 증식되지 않는 최저농도를 MIC로 결정하였다.

7. 생육저해활성 (Growth inhibition)

항균활성을 나타낸 n-hexane 분획물이 미생물 생육에 미치는 영향을 액체배지 희석법(broth dilution method)을 이용하여 측정하였다. 즉, 추출물을 에탄올에 용해시킨 다음 membrane filter (0.45 μm)로 제균시키고, 멸균된 10 mL nutrient broth 배지에 37°C에서 24시간 배양하여 활성화시킨 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 그람양성균 3종의 균주를 600 nm에서 흡광도가 0.3이 되도록 희석하여 0.1 mL씩 접종하고 추출물의 농도를 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되도록 조절하여 농도별로 가한 다음 균주의 성장 최적온도에서 48시간 동안 배양시키면서 6시간마다 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 추출물을 첨가하지 않고 시험균액 0.1 mL만을 접종한 액체배지와 양성대조구로 ampicillin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가한 배지를 사용하였다. 흡광도 측정 시 nutrient broth를 blank로 사용하였다.

8. 열 및 pH 안정성 검색

측백나무열매 추출물의 열 안정성을 조사하기 위하여 agar diffusion method를 이용하였다. 즉, 추출물을 에탄올에 녹여 membrane filter (0.45 μm)로 제균한 후 80°C, 100°C, 120°C에서 각각 30분 동안 열처리하였다. 5.0 mg/disc의 농도로 8 mm paper disk에 흡수시킨 후, 용매를 휘발시키고 전배양된 균주를 600 nm에서 흡광도가 0.3이 되도록 희석하여 100 μL 씩 도말된 plate상에 올려놓고 37°C에서 48시간 동안 배양한 다음 disk 주위의 clear zone의 직경 (mm)을 측정하였다. 또한 추출물을 에탄올에 녹여 membrane filter (0.45 μm)로 제균한 후 buffer 용액으로 pH를 각각 3, 7, 11로 조정된 후 실온에서 1시간 동안 방치한 다음, 중화시켜서 열 안정성과 동일한 방법으로 생육저해활성을 측정하여 비교하였다.

9. 돌연변이 유발성 조사

측백나무열매 추출물에 대한 돌연변이 유발성 조사는 Ames

Table 1. Yields (%) of various solvent layers fractionated from 80% ethanol extracts of the fruit.

Fraction	Yields (g)	Yields (%)*
n-Hexane	2.03	10.15
Chloroform	2.01	10.05
Ethylacetate	0.30	1.45
n-butanol	9.07	45.35
Water	5.50	27.55

*Yield = solid extract or fraction (g)/raw material (dry weight) \times 100

test (Mortelmans and Zeiger, 2000)로 측정하였다. *Salmonella typhimurium*의 변이주인 TA 98 균주를 실험에 사용하였으며, 균주의 형질확인인 histidin 요구성, rfa 돌연변이의 유지 여부, uvr B 돌연변이, R-factor, sponraneous revertant 시험 등을 정기적으로 실시하였고, 균 배양액 1 mL에 DMSO 90 μL 를 가하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다. S-9 mixture와 cofactor-1은 각각 Molecular Toxicol Inc (USA)와 WAKO Pure Chem Inc (Japan) 제품을 사용하였다.

돌연변이 유발성 검정은 고압증기 멸균한 top agar 100 mL에 histidin/biotin solution 10 mL를 가하여 잘 혼합한 후, 2 mL씩 멸균된 grass cap tube에 취하고 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 추출물 100 μL 에 미리 배양시켜 600 nm에서 흡광도가 0.3이 되도록 희석한 TA 98 균액 100 μL 을 가한 다음 S-9 mixture 0.5 mL를 가하고 즉시 vortex mixer로 2~3초간 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 minimal glucose agar plate에 부어 골고루 퍼지게 하여 굳힌 다음, petri dish를 뒤집어 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 생성된 plate당 복귀돌연변이 colony 수를 측정하였다. 복귀돌연변이 집락 수가 현저히 증가하였을 때 양성으로 판정하였으며, 복귀돌연변이 집락 수가 음성대조군에 비해 현저히 감소하였을 때 항균성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 분획별 추출물의 수율

측백나무열매 건조분말 시료로부터 추출한 80% 에탄올 및 각 용매분획별 수율은 Table 1에 나타내었다. 건조된 분말 200 g의 80% 에탄올 추출물은 65.15 g으로 전체 건조 중량의 32.6%의 높은 추출 수율을 나타내었다. 또한 에탄올 추출물 20 g으로부터 용매의 극성을 이용하여 순차적으로 분획한 n-hexane 층에서 2.03 g, chloroform 층에서 2.01 g, ethylacetate 층에서 0.3 g, n-butanol 층에서 9.07 g 그리고 수용성 층에서 5.5 g의 분획물을 얻었다. 에탄올 추출물에 대한 각 순차분획물중 ethylacetate 분획물 수율이 1.45%로 가장 낮았고, butanol 분획물이 45.35%로 가장 높은 수율을 나타내었다.

Table 2. Antibacterial activities of various solvent layer fractionated from 80% ethanol extracts (n = 5).

Solvent	Conc. (mg/disk)	Diameter of clear zone (mm)*					
		Strains					
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
80% Ethanol	0.5	-	-	-	-	-	-**
	1	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	8.6	-	9.0	-
	5	-	-	9.6	-	9.7	-
	10	-	-	11.0	9.3	11.0	-
n-Hexane	0.5	-	-	9.0	8.0	9.2	-
	1	-	-	9.8	8.2	9.7	-
	2.5	-	-	10.2	8.5	10.2	-
	5	-	-	10.5	8.7	10.5	-
	10	-	-	11.7	9.5	11.5	-
Chloro form	0.5	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
Ethyl acetate	0.5	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
n-Butanol	0.5	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
Water	0.5	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-

*Diameter of paper disc was 8 mm. **Not detected.

2. 각 분획 추출물의 항균활성

부패성 또는 병원성 세균 및 효모에 대한 실험결과는 Table 2에 나타나 있다. 80% 에탄올 추출물의 항균활성을 확인한 결과 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 등의 그람 양성균에서 항균활성이 나타났다. 순차적 분획물중 n-hexane 분획층에서 항균활성이 나타났으며 chloroform, ethylacetate, butanol 및 수용성 분획층에서는 그람 양성균과 음성균 및 효모에 대하여 모두 항균력을 나타내지 않았다. 그람 양성균에 대한 n-hexane 분획층의 항균활성은 분획물의 농도가 증가할수록 생육저해환의 크기가 증가하는 것으로 보아 이는 n-hexane 분획층의 항균활성이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 판단하였다.

측백나무열매 순차적 분획물의 한천배지 확산법을 이용한 항균활성은 n-hexane 분획층에서 그람 양성균에 대해서만 항균활성을 나타내었고, 그람 음성 및 효모에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. 이는 노루발풀 추출물의 n-hexane 분획물이 그람 양성균 *Bacillus subtilis*에 대하여 농도 의존적으로 활성을 나타내는 반면 그람 음성균 *E. coli*에서는 활성을 나타내지 않았다는 연구와 거의 비슷한 결과를 나타내었다 (Park *et al.*, 2006).

따라서 측백나무열매 80% 에탄올 추출물은 그람양성균에 항균활성을 나타내었으며, 이는 측백나무 잎 추출물이 100~150 ppm 이상의 농도에서 그람 양성, 음성, 곰팡이 및 효모 등의 광범위한 영역의 미생물에 대하여 항균활성을 보였다

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the n-hexane layer fractionated from 80% ethanol extracts.

Strains	Diameter of clear zone (mm)* at various concentration ($\mu\text{g}/\text{disc}$)						MIC ($\mu\text{g}/\text{disc}$)
	C	10	50	100	200	300	
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-**	8.0 \pm 0.0	8.2 \pm 0.1	8.2 \pm 0.1	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	8.0 \pm 0.1	8.1 \pm 0.1	8.2 \pm 0.1	8.2 \pm 0.1	50
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	8.1 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1	200

*Diameter of paper disc was 8 mm. **no clear zone

Table 4. Heat stability on the antibacterial activities of the n-hexane layer fractionated from 80% ethanol extracts (n = 3).

Strains	Diameter of clear zone (mm)*			
	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)			
	Control	80	100	120
<i>Bacillus subtilis</i>	10.1 \pm 0.1	10.1 \pm 0.2	10.2 \pm 0.1	10.1 \pm 0.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.1 \pm 0.1	8.2 \pm 0.1	8.2 \pm 0.1	8.1 \pm 0.2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11.2 \pm 0.2	11.8 \pm 0.2	11.2 \pm 0.3	11.2 \pm 0.1

*Diameter of paper disc was 8 mm.

Table 5. pH stability on the antibacterial activities of the n-hexane layer fractionated from 80% ethanol extracts (n = 3).

Strains	Diameter of clear zone (mm)*			
	pH			
	Control	3	7	11
<i>Bacillus subtilis</i>	10.0 \pm 0.1 [‡]	10.3 \pm 0.2	10.2 \pm 0.3	10.5 \pm 0.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.1 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1	8.3 \pm 0.2	8.2 \pm 0.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10.9 \pm 0.3	11.5 \pm 0.2	11.2 \pm 0.1	11.2 \pm 0.1

*Diameter of paper disc was 8 mm.

는 연구 결과 (Oh *et al.*, 2006)와 비교하여 볼 때, 측백나무 열매의 항균활성은 잎에 비해 그리 크지 않은 것으로 판단되며, 수확부위 및 시기에 따른 구지뽕나무 추출물이 부위에 따라 항균성이 다르게 나타난다는 보고 (Choi *et al.*, 2009)와 사철쑥의 종실에서 항균성이 나타난 반면 잎과 줄기에서는 항균성이 거의 없다는 보고 (Choi *et al.*, 2008)로 보아 측백나무도 잎과 열매가 부위별로 항균력이 다른 것으로 생각된다.

3. 최소저해농도

항균활성 검색에서 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 3종의 그람 양성균에 대해서 항균활성이 보였던 n-hexane 분획물의 최소저해농도를 조사하기 위하여 추출물을 에탄올에 용해시켜 10, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 의 농도별로 측정된 결과는 Table 3에 나타나 있다. 추출물의 그람 양성균에 대한 최소저해농도는 *Staphylococcus aureus*에서 50 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 로 가장 낮은 농도에서 생육저해환이 보였으며, *Bacillus subtilis*에서는 100 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 이었다. 그러나 *Streptococcus pneumoniae*에서는 200 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 생육이 저해됨을 보여 다른 2종의 균주보다 항균활성이 비교적 낮게 나타났다. 이 결

과로 n-hexane 분획물은 *Staphylococcus aureus*에서 낮은 농도에서 강한 항균력을 보이는 것으로 나타났다.

Park (1999) 등은 유백피 추출물을 용매분획한 후 항균성이 강하게 나타난 메탄올 추출물의 최소저해농도는 *Bacillus sereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*에 대하여 각각 0.3 mg/mL 이었으며, Beak (2002) 등은 대나무 줄기와 잎의 에탄올 추출물에서 항균활성이 뛰어난 왕대줄기 70% 에탄올 추출물의 MIC는 *Staphylococcus aureus*에 대해 10 $\mu\text{L}/\text{disc}$ 이상에서 *Streptococcus mutans*에 대해서는 20 $\mu\text{L}/\text{disc}$ 이상에서 항균력이 인정되었다고 보고 하였다. Kim (2001) 등은 고수 에탄올 추출물의 최소저해농도가 그람양성 세균인 *Bacillus sereus*, *Bacillus subtilis* 두 균주에서 0.25 mg/mL로 항균활성이 가장 높게 나타났다고 보고 하였다.

본 실험의 결과와 비교해 볼 때 측백나무열매의 n-hexane 분획물의 항균성은 왕대줄기 에탄올 추출물 보다는 낮으나 유백피와 고수 추출물에 비해서는 높은 항균력을 나타내었다.

4. 항균물질의 열 및 pH 안정성

Table 5는 측백나무열매의 열 안정성을 조사하기 위하여 n-

Table 6. Mutagenicity in the TA 98 strain induced by the n-hexane layer from 80% ethanol extracts (n = 3).

Sample	Reverse mutation/plate					
	Control	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL	2AA* (50 µg/mL)
n-hexane layer	43±8	43±2	43±6	35±5	26±5*	380±19

*2-aminoanthracene

hexane 분획물을 에탄올에 녹여 membrane filter (0.45 µm)로 제균한 다음 80°C, 100°C, 120°C에서 각각 30분 동안 열처리 하여 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*에 대한 열 안정성을 측정된 결과를 나타내고 있다. 80°C, 100°C, 120°C에서 30분 동안 열처리한 다음 추출물의 양성균주에 대한 항균력은 대조구와 거의 비슷하여 큰 변화가 없는 것으로 나타나, 추출물의 항균성분은 열에 대하여 상당히 안정한 물질인 것으로 판단되었다. 또한 추출물 성분의 pH 안정성은 Table 6에서 보는 바와 같이, 넓은 pH 범위 3, 7, 11에서 세 균주 모두 생육저해환의 크기가 대조구와 거의 비슷하게 나타나 넓은 pH 범위에서 안정함을 보여주었으며, 이는 측백나무 잎에 함유된 항균물질이 열 및 pH에 안정하다는 보고(Oh *et al.*, 2006)와 유사한 결과이며, Kim (2001) 등은 고수 에탄올 추출물을 60°C~100°C까지 10°C 간격으로 1시간 동안, 121°C에서 15분간 열처리 한 후 그림 양성균인 *Bacillus cereus*와 그람 음성균인 *E. coli* 두 균주에 대한 생육저해환을 측정하고 pH 안정성을 조사하기 위하여 추출물을 pH 1~13까지 조절한 후 동일한 방법으로 생육저해환을 측정된 결과 열 및 pH 변화에 안정하다고 보고하였으며, Koh (2004)는 삼백초 에탄올 추출물을 40°C~100°C까지 10°C 간격으로 1시간 동안, 120°C에서 15분간 열처리 한 후 *Bacillus cereus*와 *E. coli*의 생육저해환을 측정된 결과와 pH 3~11까지에서 두 균주의 생육저해환의 지름이 대조구와 비슷하게 나타나 삼백초 추출물에 함유된 항균활성이 열 및 강산과 강 알칼리 조건에서도 지속적으로 유지된다고 보고 하였다. 따라서 식물성 항균물질들은 열 및 pH 안정성이 높은 것으로 여겨지며 측백나무열매 추출물의 항균성물질도 열 및 산, 알칼리 조건에서도 안정한 것으로 보인다.

5. 생육저해활성

항균활성을 보인 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 균주를 대상으로 n-hexane 분획물을 0, 100, 500, 1000 µg/mL의 농도로 액체배지에 첨가하여 48시간 동안 배양하면서 6시간 간격으로 균주의 성장곡선을 측정된 결과는 각각 Fig. 1, 2 및 3와 같다. *Bacillus subtilis*의 경우 추출물을 첨가하지 않은 대조구에서 18시간 이후부터 급격한 증가를 보여 빠른 성장을 나타내었으며, ampicillin 10 µg/mL을 첨가한 대조구는 36시간 동안 균의 증식이 억제되었

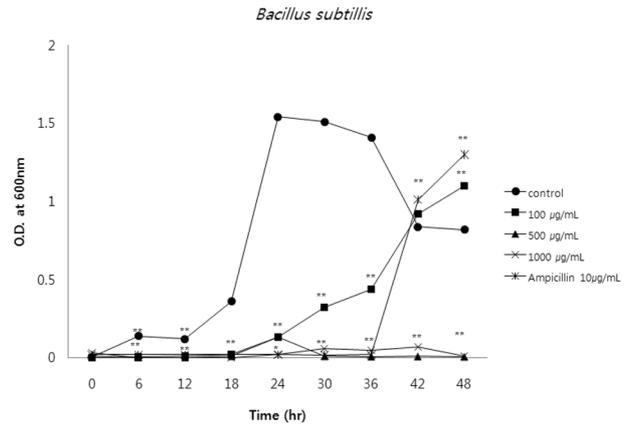


Fig. 1. Growth inhibition of *Bacillus subtilis* by n-hexane layer fractionated from 80% ethanol extracts. *P < 0.05 and **P < 0.001 (T-Test).

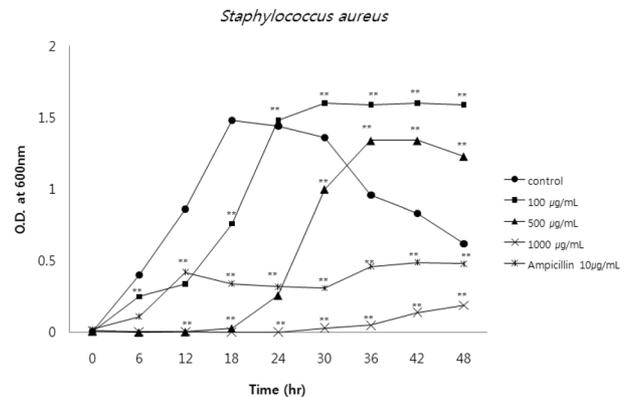


Fig. 2. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by n-hexane layer fractionated from 80% ethanol extracts. *P < 0.05 and **P < 0.001 (T-Test).

다. 추출물을 100 µg/mL 농도로 첨가한 균주는 18시간까지 균 증식이 현저하게 억제되다가 24시간 이후부터 균이 완만하게 증식되는 것을 확인할 수 있었다. 500 µg/mL 농도 이상에서는 48시간까지 균의 증식이 거의 일어나지 않아 균의 증식이 완전히 억제되는 것을 확인할 수 있었다. *Staphylococcus aureus*에서는 100 µg/mL 농도에서 12시간까지 대조구에 비해 월등히 낮은 흡광도를 나타내어 생육이 억제되었으나, 12시간 이후부터 균의 증식이 급격히 증가하였다. 500 µg/mL에서 18시

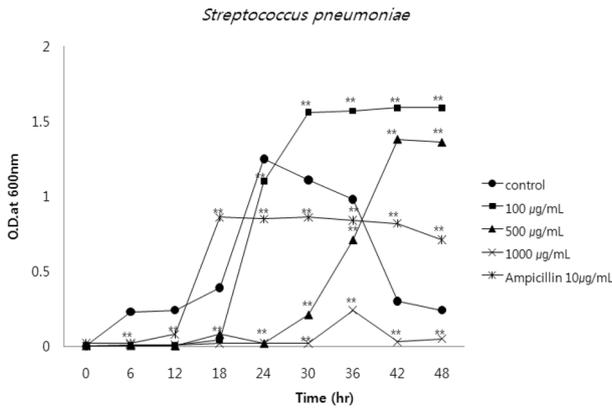


Fig. 3. Growth inhibition of *Streptococcus pneumoniae* by n-hexane layer fractionated from 80% ethanol extracts. *P < 0.05 and **P < 0.001 (T-Test).

간, 1000 µg/mL 농도에서는 36시간 동안 균의 증식이 억제되었다. Amicillin 첨가 대조구는 6시간까지 균의 증식이 억제되었으며 추출물을 첨가하지 않은 대조구에 비해 크게 증가되지 않았다. *Streptococcus pneumoniae*에서는 100 µg/mL 농도에서 18시간 동안 증식이 억제되다가 그 이후 급격한 증가를 보였으며, 500 µg/mL에서 24시간 동안 균의 증식이 억제되었고 1000 µg/mL에서는 48시간 동안 균의 증식이 완전히 억제되었다. Ampicillin을 첨가한 대조구는 12시간까지 균의 증식을 억제하였으며, 추출물을 첨가하지 않은 대조구에 비해 높은 성장저해활성을 나타내었다. 100 µg/mL와 500 µg/mL 농도에서 대조구에 비해 생육저해가 뛰어났지만 시간이 지남에 따라 오히려 대조군보다 생육이 더 활성화 되었다. 이러한 이유는 낮은 농도에서 추출물이 초기에는 생육이 저해되지만 시간이 경과함에 따라 생육 저해 효과는 사라지고 추출물의 기타 성분이 균의 생육을 활발하게 하는 것으로 생각된다. Baek (2002) 등의 연구 결과에서도 이와 비슷한 경향을 보였다. *Staphylococcus aureus*의 경우 3종의 그람 양성균 중 가장 낮은 항균력을 나타내었지만, Park (2001) 등의 수중 한약재 추출물 중 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성에 관한 연구 결과에서 강한 항균활성을 가지고 있다는 복분자 추출물 10 mg/mL에서 세균이 사멸되었다는 결과와 비교하여 볼 때 비교적 강한 항균활성을 가지고 있다고 생각된다.

Lee (2001) 등은 오미자 추출물 1%를 첨가한 TSB에 시험균주를 접종하여 12시간 배양 한 후 생균수를 측정 한 결과, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*에서 2.82, 4.79, 2.68의 log cycle 감소현상을 보여 성장억제효과가 뚜렷이 관찰되었다고 보고 하였으며, Kim (2007) 등은 차조기의 물 추출물의 ethyl acetate 분획물을 첨가한 액체배양에서 500 ppm 농도에서 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*에 대하여 대조구의 뚜렷한 증가와 대조적으로 낮은 생균수를 보였으며, 1000 ppm

의 농도에서는 실험균주 모두에 대하여 배양 24시간 내내 생육이 저해된다고 보고하였으며, Lee (2002) 등은 박하와 배초향 정유성분의 항균활성에서 박하 정유는 2 mg 이하의 저농도에서 9시간까지 세균의 증식을 억제시켰으며 5 mg 이상의 농도에서는 세균이 모두 사멸하였고, 배초향 정유는 2 mg 이하의 농도에서 12시간까지 세균증식이 억제되었고 5 mg 이상의 농도에서는 6시간 이후 세균이 사멸하였다고 보고하였다.

6. 돌연변이 유발성 검정

Salmonella typhimurium TA98 균주를 사용하여 측백나무 열매의 n-hexane 분획물의 돌연변이 유발성을 검정한 결과는 Table 6과 같다. 시료 대신 DMSO만을 첨가한 음성대조군의 plate 당 복귀돌연변이 콜로니 수는 43 ± 8이었으며, 대표적 발암물질인 2-aminoanthracene를 처리한 양성대조군의 plate 당 복귀돌연변이 콜로니 수는 380 ± 19이었다. 추출물을 plate당 100, 250, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 처리했을 때 모든 농도에서 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수가 음성 대조군과 비교하여 유의하게 증가되지 않았으며, 500 µg/mL 농도부터 복귀돌연변이 콜로니 수는 오히려 감소하였다. 이는 추출물의 항균활성 물질이 균의 증식을 억제하여 콜로니 수를 감소시키는 것으로 판단하였다.

따라서 측백나무열매의 n-hexane 분획물에 대한 돌연변이 유발성을 검정한 결과 추출물의 농도가 증가 할수록 오히려 plate당 복귀돌연변이 콜로니 수가 감소하였으며, 음성 대조군과 비교하여 증가되는 복귀돌연변이 콜로니 수는 관찰되지 않아 돌연변이 유발성은 나타나지 않았다.

본 실험결과로 볼 때 측백나무 열매 추출물은 독성이 없는 항균활성을 갖고 있는 것으로 생각되며 천연보존제로서 식품이나 식품첨가제로서 이용하기 위해서 생리활성이 있는 분획에 함유되어 있는 성분에 대한 충분한 연구가 이루어진다면 천연항균물질로서의 이용가능성을 충분히 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

LITERATURE CITED

Ahn DJ, Kwak YS, Kim MJ, Lee JC, Shin CS and Jeong KT. (2000). Screening of herbal plant extracts showing antimicrobial activity against some food spoilage and pathogenic microorganisms. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 8:109-116.

Beak JW, Chung SH and Moon GS. (2002). Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. Korean Journal of Food Science and Technology. 34:107 3-1078.

Choi OK, Kim YS, Cho GS and Sung CK. (2002). Screening for antimicrobial activity from Korean plants. Korean Journal of Food and Nutrition. 15:300-306.

Choi Il, Cho JY and Lim SC. (2006). Antimicrobial activity of

- medicinal herbs against *Staphylococcus aureus*. Korean Journal of Plant Resources. 19:491-496.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J, Choi DG and Park HM.** (2009). Antimicrobial activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to the parts harvested and time. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:335-340.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Ryu J, Kim DH and Eun JS.** (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of *Artemisia capillaris* Thunberg. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:112-117.
- Han SH, Woo NRY, Lee SD and Kang MH.** (2006). Antioxidative and antibacterial activities of endemic plants extracts in Korea. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 14:49-55.
- Hwang JS and Han YS.** (2003). Isolation and identification of antimicrobial compound from mokdan bark (*Paeonia suffruticosa* ANDR). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 32:1059-1065.
- Jeong MR, Cha JD and Lee YE.** (2005). Antibacterial Activity of Korean Fig (*Ficus carica* L.) against food poisoning bacteria. Korean Journal of Food and Cookery Science. 21: 84-93.
- Kang K.J and Kim JS.** (2000). Effects of hinokitiol extract of *Tunja orientalis* on Shelf-life of bread. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 29:624-628.
- Kim YD, Kang SK and Choi OJ.** (2001). Antimicrobial activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) extract. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 30:692-696.
- Kim HK, Kang EJ, Kang BJ, Park KJ and Ko BS.** (1998). Isolation of anti-herpes simplex Virus Type 1(HSV-1) component from *Thujae orientalis* semen. Korean Journal of Pharmacognosy. 29:277-282.
- Kim MH, Lee NH, Lee MH, Kwon DJ and Choi UK.** (2007). Antimicrobial activity of aqueous ethanol extracts of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf. Korean Journal of Society of Dietary Culture. 22:266-273.
- Kim YJ, Chung HC, Chung HT, Choi KY, Yun YG and Jang SI.** (2004). Hair growth promoting effect of *Thuja orientalis* ethanol extracts on hair loss-induced DBA1J mice. Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology. 18:1471-1475.
- Koh MS.** (2004). Antimicrobial activity of *Saururus chinensis* Baill extract. Korean Society of Food Science and Nutrition. 33:1098-1105.
- Lee JY, Min YK and Kim HY.** (2001). Isolation of antimicrobial substance from *Schizandra chinensis* Baillon and antimicrobial effect. Korean Journal of Food Science and Technology. 33:389-394.
- Lee JY and Choi SW.** (2000). Isolation and purification of tyrosinase inhibitors from the seeds of *Thuja orientalis* L. Korean Journal of Food Preservation. 7:409-413.
- Lee SE, Park CG, Cha MS, Kim JK, Seong NS, Bang KH and Bang JK.** (2002). Antimicrobial activity of essential oils from *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Malivaud and *Agastache rugosa* O. Kuntze on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 10: 206-211.
- Mortelmans K and Errol Z.** (2000). The ames salmonella/ microsome mutagenicity assay. Mutation Research. 455:29-60.
- Nam HK, Chung YT and Rho GH.** (1987). Studies of *Thuja orientalis*(4). Korean Society of Food Science and Nutrition. 18:371-374.
- Oh BT, Kim CH and Cho SH.** (2006). Antimicrobial characteristics of *Thuja orientalis* leaf extracts. Journal of Agriculture and Life sciences. 40:21-26.
- Park HG, Cha MR, Hwang JH, Kim JY, Park MS, Choi SU, Park HR and Hwang YI.** (2006). Antimicrobial activity of the extract from *Pyrola japonica* against *Bacillus subtilis*. Journal of Life Science. 16:989-993.
- Paik SB, Chung IM and Doh ES.** (1998). Screening of medicinal plants with antifungal activity on major seedborne disease. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 6:277-285.
- Park CG, Bang KH, Lee SE, Cha MS, Sung JS, Park HW and Seong NS.** (2001). Antibacterial activity from medicinal plant extracts on the *Staphylococcus aureus*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 9:251-258.
- Park JS, Shim CJ, Jung JH, Lee GH, Sung CK and Oh MJ.** (1999). Antimicrobial activity of *Ulmi cortex* extracts. Korean Society of Food Science and Nutrition. 28:1022-1028.
- Sung SH, Koo KA, Lim HK, Lee HS, Cho JH, Kim HS and Kim YC.** (1998). Diterpenes of *Biota orientalis* leaves. Korean Journal of Pharmacognosy. 29:347-352.
- Seo WT, Yang JK, Kang BK, Park WJ, Hong SC, Kang YM, Jung HY, Kim YD, Kang SM, Kim SW and Choi MS.** (2003). Extraction and biological activities of essential oil from *Thuja occidental* leaves. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 11:364-370.
- Yoon JS, Koo KA, Ma CJ, Sung SH and King YC.** (2008). Neuroprotective lignans from *Biota orientalis* leaves. Natural Product Sciences. 14:167-170.