

작약추출물의 식품변패미생물에 대한 항균특성

박기덕¹ · 조성환^{1*}

¹경상대학교 식품공학과 · 농업생명과학연구원

Antimicrobial Characteristics of *Paeonia lactiflora* Pall. Extract Tested against Food-putrefactive Microorganisms

Ki-Duck Park¹ and Sung-Hwan Cho^{1*}

¹Department of Food Science & Technology and Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

Paeonia lactiflora Pall. was extracted with water and the *Paeonia lactiflora* Pall. extract (PLE) was tested for antimicrobial activities against *Corynebacterium xerosis*, *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas syringae*. PLE showed pronounced antimicrobial effects at concentrations at or above 50 µg/mL. The activities were stable at 100°C and over the pH range of 3-11. PLE may serve as a natural antimicrobial agent in food preservation. It is suggested that hydrophilic components in the extract synergistically perturb microbial membrane functions.

Key words : *Paeonia lactiflora* Pall. extract, antimicrobial effects, hydrophilic components

서 론

식품의 가공, 유통 및 저장에 있어서 미생물의 오염은 변질이나 부패를 일으켜 생산자와 유통업자들에게는 상품성이나 경제성을 상실하게 할뿐 아니라, 이를 소비하는 최종적인 소비자들에게 있어서는 식중독이나 전염병 등을 일으킬 수 있는 요인이 되기도 하므로, 식품업체에서는 미생물의 오염을 억제하고 위생적이고도 안전성 및 저장성을 확보할 수 있는 방법이나 시스템에 대한 개발을 위하여 부단하게 연구를 계속하여 왔다. 현재 미생물에 의한 식품의 안전성 확보와 식품의 변질이나 부패를 확보하기 위하여 사용이 허용된 합성보존료는 그 독성이 강하여 사용량과 사용 용도에 대하여 법적으로 규제되고 있고, 소득향상과 함께 생활수준이 높아짐에 따라 보다 신선하며 합성 보존료가 함유되어 있지 않은 식품에 대한 소비자의 선호도 변화에 따라 최소 가공된 냉장식품의 유통이 증가하고 있으며 유통 중 미생물적 안전성을 확보하기 위한 수단으로 천연항

균제의 연구개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 (1). 이러한 연구노력의 결과로 현재 천연항균제로는 식물 추출물인 자몽종자추출물(2-4)이 항균성과 안전성을 인정받아 식품첨가물로써 개발되어 그 사용이 허가되었고, 마늘(5)과 양파(6) 등과 같은 식물의 추출물질들도 항균력이 뛰어난 것으로 보고되었다. 그 밖에 여러가지 유기산류(7), lysozyme (8,9), lactoferrin (10)과 같은 단백질 성분들에 있어서도 항균력이 있었다는 연구 결과들이 보고되고 있다. 한편, 예로부터 질병의 치료제로 사용되었던 한약재에 대한 항균, 항진균, 항산화 효과가 발표(11-15)되고 있다. 특히, 작약추출물(*Paeonia lactiflora* Pall. extract : 이하 PLE라 칭함)은 항균작용, 항염, 항궤양작용 등의 약리기능성이 뛰어난 약용식물이며(16, 17), HPLC법에 의하여 작약뿌리중에 유용성분인 paeoniflroin이 2.56~3.57% 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다(18). 따라서, 본 연구에서는 작약추출물의 식품변패 미생물들에 대한 항균력을 확인하고, 작약추출물의 항균특성을 구명하여, 식품 원료 및 가공품에 적용하기 위한 기초적인 연구결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

*Corresponding author. E-mail : sunghcho@gnu.ac.kr,
Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 작약(*Paeonia lactiflora* Pall)은 경남 지역에서 생산, 재배되고 있는 것을 2009년 10월에 구입하여 추출용 시료로 하였다.

작약추출물(PLE)의 조제

먼저, 구입한 작약을 물로 세척한 다음, 60°C~70°C의 건조실에서 30~60분 동안 순환식 열풍건조기를 사용하여 건조시킨 작약을 5°C 저온실에서 분쇄기로 80~320 mesh 크기로 분쇄하여 추출시료로 사용하였다. 추출 시료에 5배량의 물을 첨가하고, 균질기(homogenizer)로 균질화하여 한약추출기(H-2000, Hanil Engineering Co., Korea)에서 3시간동안 가압·침출시킨 후, 여과하여 1차 추출하고, 다시 잔사에 5배량의 물을 가하여 상기와 동일한 방법으로 2차 추출한 후, 추출액을 합하여 여과지(Whatman No.2)로 여과하였다. 이 추출여액을 50°C~60°C water bath 상에서 감압·농축하고 5°C의 냉장고에서 하룻밤 방치한 후, 원심분리하여 침전된 불순물을 제거하고 상층의 작약추출물(*Paeonia lactiflora* Pall extract : PLE)을 실험재료로 사용하였다.

항균력 시험균주

본 실험에서 PLE의 항균력 검색을 위해 사용한 균주들은 일반적으로 곡류가공식품, 낙농가공식품, 육가공식품, 수산가공식품 및 기타 발효식품의 변질에 관여하는 부패미생물들로서 한국중균협회에서 분양받아 실험에 사용하였다 (Table 1.). 곰팡이 및 효모는 potato dextrose agar, 세균은 brain heart infusion agar, tryptic soy agar 등의 사면배지에 계대배양하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

Table 1. Microorganisms and media used for the primary screening of antimicrobial substances extracted from *Paeonia lactiflora* Pall.

Bacteria	Fungi & Yeasts
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 23073	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 9654	<i>Corynebacterium xerosis</i> ATCC 7094

작약추출물의 항균력 검사

항균력 시험은 여러 농도의 PLE로 포화시킨 paper disk를 brain heart infusion agar plate상에 접촉시켜 공시균주의 증식도를 비교하여 생육저해정도를 측정하는 paper disk 확산법(19)을 이용하였다. 즉 tryptic soy agar의 사면에 배양된 공시균주 1백금이를 취하여 10 mL tryptic soy broth에 접종

하고 30°C에서 24시간 배양한 후, 일정농도로 희석한 후 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 5~8mm brain heart infusion agar 배지 표면에 접촉하고 도말봉으로 균일하게 도포한 다음, 멸균된 6mm filter paper disk (Whatman No.2)를 무처리구인 대조구를 별도로, phosphate buffer로 희석시킨 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL 농도의 작약추출물 용액에서 침지 포화시킨 멸균된 6mm filter paper disk (Whatman No.2)를 brain heart infusion agar배지위에 올려놓고, 30°C에서 48시간동안 배양한 후, disk 주위의 생육저해의 직경을 측정하여 항균성을 비교하였다.

PLE중 항균물질의 열 및 pH에 대한 안정성 조사

항균활성물질의 열안정성을 측정하기 위하여, PLE를 100°C의 일정한 온도에서 5분에서 45분까지 열처리한 후, 시료용액으로 사용하였다. 살균 냉각한 potato dextrose agar 또는 tryptic soy agar 표면에 50 µg/mL 농도의 시험용액에 침지한 disk를 올려놓고, paper disk 확산법(19)으로 대조구와 같이 *Listeria monocytogenes*의 생육저해환을 측정 비교하였다. 또한 pH 안정성은 염산이나 수산화나트륨으로 PLE의 pH를 3에서 11까지 조정하고 20 µL씩을 채취하여, 배지위에 일정간격으로 위치한 paper disk에 접촉한 후, 37°C에서 24시간 배양한 다음, 열안정성과 동일한 방법으로 생육저해환을 측정·비교하였다.

PLE에 의한 미생물 생육저해 농도 측정

미생물 생육저해농도 측정은 Turbidimetric Assay방법(20)에 의하여 측정하였다. 즉, PLE를 membrane filter(0.2 µm)로 제균시키고, tryptic soy broth에 여러 가지 농도로 첨가한 후, 사면배지에서 각 공시균주 1백금이를 취하여 10 mL TSB에 접종, 30°C에서 24시간동안 전 배양시키고, 이 배양액 0.1 mL를 취해 상기와 동일한 배양조건으로 계대 배양한 배양액 0.1 mL를 여러 농도의 PLE가 함유된 plate count agar상에 평판도말하고 30°C에서 3일간 배양하여 생존균수를 대조구와 비교·측정하여 미생물의 생육저해정도를 배양시간별로 조사하였다.

PLE처리에 의한 미생물 세포의 전자현미경학적 형태변화 조사

항균력이 뛰어난 PLE의 처리로 인한 미생물의 세포형태 및 기능성 변화를 알아보기 위해 전자현미경촬영시료를 각각 조제하여 투과전자현미경 (TEM : Transmission electron microscope, Hitachi H-600)과 주사전자현미경 (SEM : Scanning electron microscope, DS-130C ISI ABT)을 이용하여, 각각 Bendayan 방법(21) 및 Pyliotis 방법(22)에 준하여 처리전후의 세포 구조를 관찰하였다.

β -galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase)의 활성측정

PLE처리가 미생물 세포막의 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포를 파쇄하지 않고, 비교시험구인 toluene과 PLE의 존재시에 *Collectotrichum fragariae*의 β -galactosidase가 정량되는가의 여부를 Miller의 방법(23)에 준하여 살펴 보았다. 즉, *Collectotrichum fragariae*가 β -galactosidase 효소 활성을 나타내는 정도는 isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)와 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- D-galactoside)을 함유한 배지에서 확인하였다(24). 이와같은 그 효소활성이 확인된 *Collectotrichum fragariae*를 영양배지에서 접종한 뒤 30°C에서 12시간 배양한 후 M9 medium으로 옮겨 주고 600 nm에서의 흡광도가 0.5~0.7이 되도록 배양한 다음, 0°C에 방치하여 성장을 억제하였다. 배양액 1.5 mL에 같은 부피의 완충용액 [100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 50 mM β -mercaptoethanol]을 가하고, 최종 농도가 3%가 되도록 각각 증류수, toluene, chloroform, PLE (50 μ g/mL)를 첨가하고, 10초간 세계 흔들어 주었다. Toluene 제거를 위해 37°C에서 40분간 방치하고 28°C로 옮겨 5분간 더 방치한 후, 0.6 mL ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, 4 mg/mL)를 가하여 주었고 28°C에서 18시간 동안 방치하였다. 1M Na₂CO₃ 1.5 mL를 가하여 반응을 정지시키고, 원심 분리하고 상등액의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다. 세포막기능의 파괴가 없는 증류수를 넣은 경우를 0으로 하고, 세포막기능이 상실되는 toluene을 넣어준 경우를 100으로 하여 PLE가 세포막에 미치는 영향을 비교하였다.

결과 및 고찰

PLE의 항균효과

PLE의 항균력을 측정하기 위하여 부패성 또는 병원성 공시세균 및 효모에 대한 PLE의 항균력 실험결과는 다음과 같다. 즉, 공시균주를 brain heart infusion agar plate상에 접종하여, 이들 균주에 대한 PLE의 항균성을 검토한 결과는 Fig. 1 과 같다. PLE 10-50 μ g/mL 농도에 침지 처리한 paper disk 주위 모두에 균의 증식이 억제되어 생육저해환을 형성하였고 특히 50 μ g/mL 농도에 침지 처리한 paper disk에서 가장 뚜렷하고 넓은 생육저해환이 관찰되었다. PLE는 Gram양성균, Gram음성균, 곰팡이 및 효모 등 광범위한 영역의 미생물에 대하여 뚜렷한 생육저해환을 보여 항균 및 항진균 작용이 우수한 식품보존료로 이용가능성을 확인해 주었다.

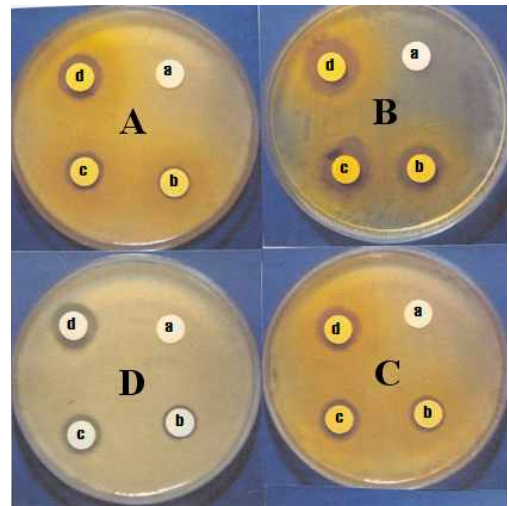


Fig. 1. Inhibitory effect of *Paeonia lactiflora* Pall. extract at different concentrations on the growth of microorganisms.

A: *Listeria monocytogenes* ATCC 23073 B: *Pseudomonas syringae* ATCC 9654
C: *Corynebacterium xerosis* ATCC 7094 D: *Candida albicans* ATCC 10231
a. Control b. 10 μ g/mL c. 25 μ g/mL d. 50 μ g/mL of PL

항균물질의 열 및 pH에 대한 안정성

PLE가 함유하는 항균물질의 열 및 pH에 대한 안정성을 측정한 결과는 Fig. 2 와 같다. 즉, 열안정성 실험결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 생육저해환의 지름이 열(100°C)에 노출된 시간에 관계없이 직경이 약 18mm정도로 일정하여 PLE 항균성분은 열에 대하여 상당히 안정한 물질임을 알 수 있었다. PLE 항균성분의 pH에 대한 안정성은 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 넓은 pH범위(pH 3~11)에서 동일한 크기의 생육저해환을 나타내어 pH 안정성을 보여 PLE의 항균활성물질이 넓은 pH범위에서 안정함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 요약하면 PLE의 항균성분은 열(100°C에서 45분처리)과 넓은 pH(pH 3~11)에서 유사한 크기의 뚜렷한 생육저해환을 보여 광범위한 영역의 식품원료 및 가공식품에 대해서 PLE처리로 뚜렷한 항균효과 및 저장효과를 기대할 수 있었다.

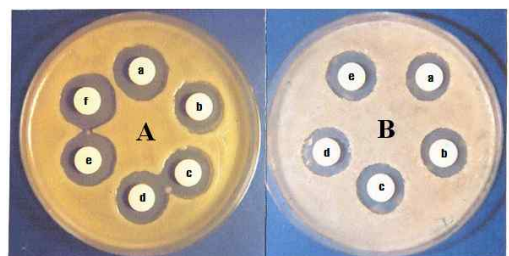


Fig. 2. Thermal (Top) and pH (Bottom) stability of *Paeonia lactiflora* Pall. extract on the growth inhibition of *Listeria monocytogenes*.

(Top) a. not heat-treated b. 5 min-treated c. 10 min-treated
d. 20 min-treated e. 30 min-treated f. 45 min-treated
(Bottom) a. pH 3.0 b. pH 5.0 c. pH 7.0 d. pH 9.0 e. pH 11.0

미생물에 대한 생육저해 곡선

Fig. 3에서 보는바와 같이 (A), (B), (C), (D) 모두 PLE에 대한 저해효과가 확인되었고, PLE의 농도가 높아질수록 미생물의 생육이 크게 억제됨을 알 수 있었다. 특히 50 µg/mL의 PLE농도에서는 균의 생육이 급격히 억제되어 균의 증식이 거의 중지되었음을 알 수 있었다. 따라서 실험한 균주 모두에 항균효과가 있음을 재확인 할 수 있었다.

것을 알 수 있었고, 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되었으며, 세포막의 삼투조절기능의 상실로 인하여 세포내용이 빈 ghost형태의 사멸균체수가 증가함을 알 수 있었다. 또한, Fig. 5에서 보는 바와 같이, SEM에 의한 시료 촬영결과에서도 PLE처리로 미생물 균체가 세포벽 또는 세포막 파괴로 인하여 세포형태의 변화가 뚜렷하게 관찰되었다.

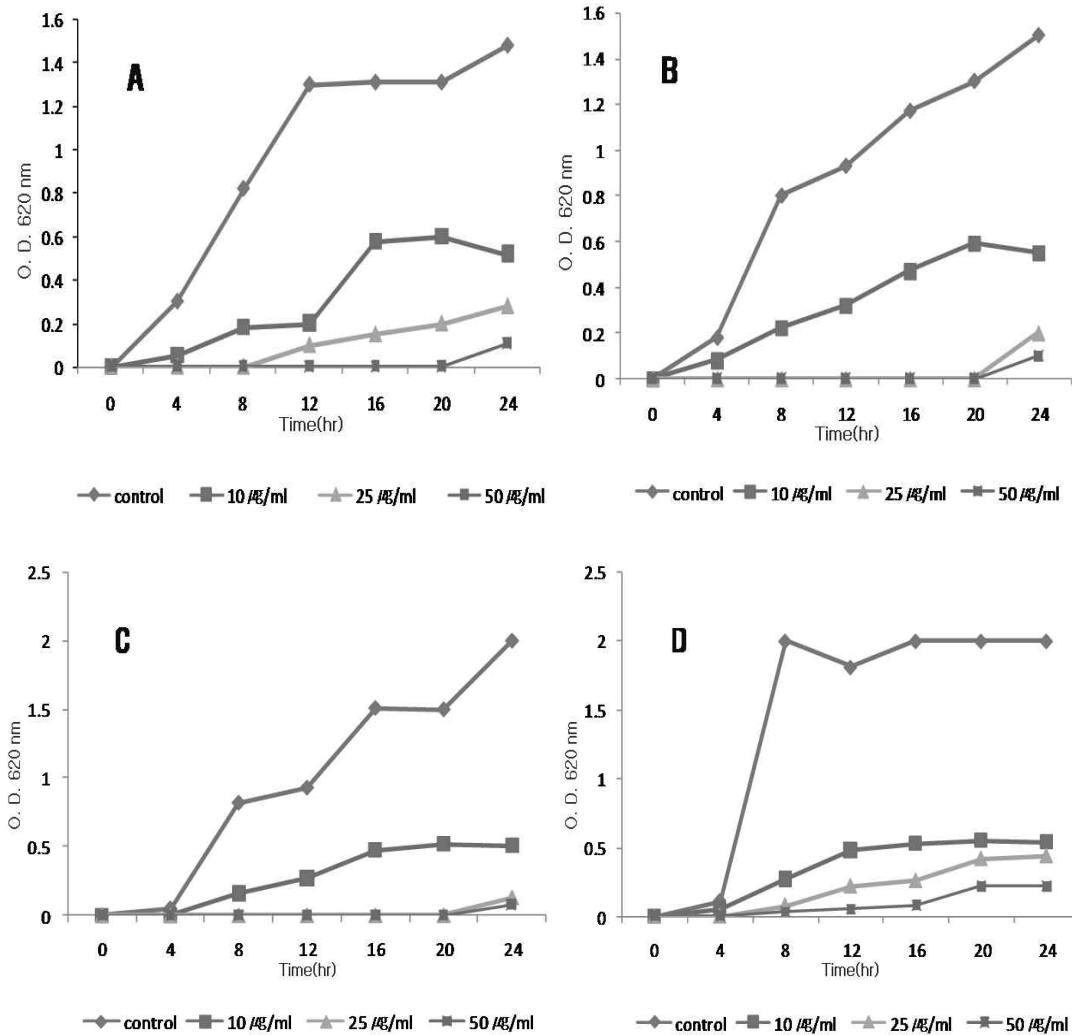


Fig. 3. Growth curves of *Corynebacterium xerosis* (A), *Candida albicans* (B), *Listeria monocytogenes* (C) and *Pseudomonas syringae* (D) in the medium containing *Paeonia lactiflora* Pall. extract at different concentration.

전자현미경을 이용한 PLE처리 전후의 미생물 세포조직 및 세포형태변화

100 µg/mL의 PLE용액으로 처리한 균체세포 및 포자를 처리하지 않은 대조구와 함께 전자현미경검정시료로 조제하여 TEM 및 SEM으로 촬영한 결과는 Fig. 4 및 Fig. 5와 같다. 즉, Fig. 4에서 보는 바와 같이, TEM에 의한 시료촬영결과, PLE용액에 처리한 미생물 균체세포 및 곰팡이 포자는 세포막의 기능이 파괴되어 세포막의 기능이 상실되는

이상의 결과에서 미생물 균체세포에 대한 PLE의 항균작용이 탁월함을 확인할 수 있었다. 따라서 부패성 및 병원성 균주의 오염 가능성이 있는 식품을 PLE로 예방 처리함으로써 변패성 미생물균주에 의한 농축수산 식품원료 및 그 가공식품의 변패현상을 억제할 수 있을 것으로 추정되었다.

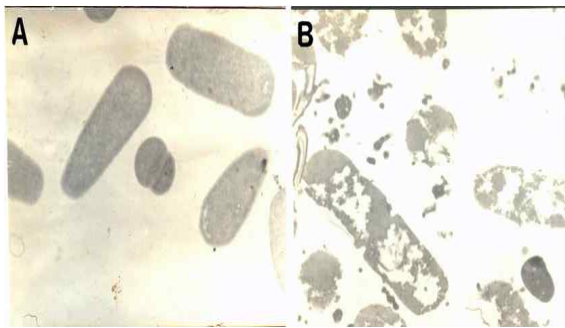


Fig. 4. Transmission electron micrographs of *Corynebacterium xerosis* vehicle-treated (A : Control) and treated (B : 100 µg/mL) with *Paeonia lactiflora* Pall. extract. (Magnification : x17,000)

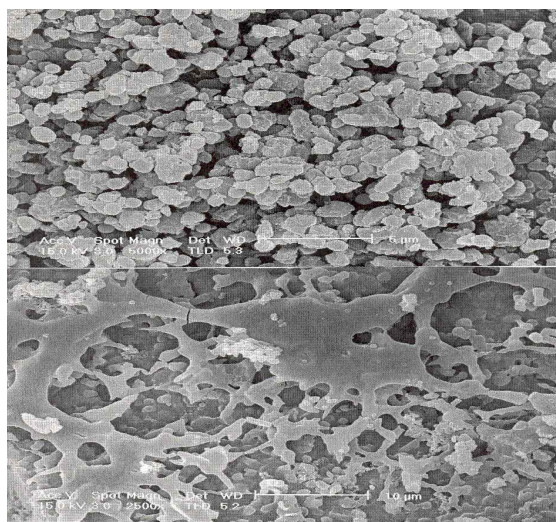


Fig. 5. Scanning electron micrographs of *Corynebacterium xerosis* vehicle-treated (A : Control) and treated (B : 100 µg/mL) with *Paeonia lactiflora* Pall. extract. (Magnification : x 17,000)

PLE 처리가 미생물 세포막의 기능에 미치는 영향

PLE을 미생물 세포에 처리하였을 때, 세포막에 영향을 주는 가를 알아보기 위하여 PLE 존재하에 *Corynebacterium xerosis*의 β -galactosidase 활성을 측정된 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이, 증류수를 가해준 대조구에서의 값을 '0'으로 하고 toluene을 가해 준 시험구를 '100'으로 하였을 때, PLE처리구는 81.8%의 활성이 검출되었다. Chloroform을 가해서 세포막을 손상하여 얻은 값이 9.8% 정도였는데, 이를 토대로 보면, PLE은 chloroform보다 세포막을 더 손상시키며, 세포막 파손이 심하게 일어나는 toluene처리구에 상응하는 세포막 기능과 파괴가 초래된 것으로 예상할 수 있었다. 이 결과는 전자현미경 실험결과와 잘 일치하였으며, 이와 같은 항균작용에 의해 작약추출물이 항균작용을 가지는 것으로 판단되었다. 그러나, 이와같은 항균기능을 극대화하기 위하여는 실제 식품 소재나 가공식품에 처리하기에 앞서, 작약추출물의 안전성에 대하여 과학적인 실험이 선행되어야 할 것이다.

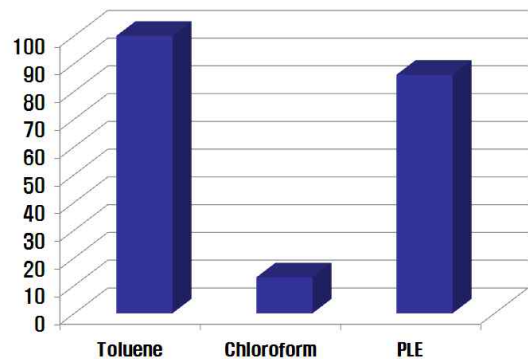


Fig. 6. The effect of *Paeonia lactiflora* Pall. extract on the membrane perturbation of *Corynebacterium xerosis*. The cells were treated with the reagents; toluene, chloroform and PLE in the media containing ONPG as a substrate for β -galactosidase.

요 약

한국산 작약(*Paeonia lactiflora* Pall.) 뿌리를 사용하여 작약추출물(PLE)을 조제 후, 변패미생물에 대한 작약추출물의 항균력을 측정하였다. Paper disk 확산법에 의한 농도별 항균력 검사에서는 작약추출물이 농도에 비례하는 항균력을 나타내었다. 생육저해곡선의 측정에서는 50 µg/mL 이상에서 미생물의 생육이 완전히 억제되는 것을 확인하였다. 열(100°C에서 45분처리) 및 pH(3~11)의 넓은 범위에도 항균력을 보여, 열 및 pH에 대한 작약추출물에 포함된 항균력의 우수한 안정성을 확인할 수 있었다. 전자현미경(SAM, TEM)에 의한 미생물생태변화의 관찰에서도 작약추출물의 항균물질이 세포벽 또는 세포막의 삼투기능을 상실시켜 미생물의 생리가 중단되고 억제되는 것을 확인하였다. 그리고 β -galactosidase의 효소활성측정결과 작약추출물은 미생물의 세포막 기능과 파괴를 심하게 초래하는 것으로 예상할 수 있었다.

참고문헌

1. Beuchat LR, Golden DA. (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol., 43, 134-142
2. Choi JD, Seo IW, Cho SH. (1990) Studies on the antimicrobial activity of grapefruit seed extract. Bull. Korean Fisheries Soc., 23, 297-302
3. Cho SH, Seo IW, Lee KH. (1993) Prevention from microbial post-harvest injury of fruits and vegetables by using grapefruit seed extract, a natural antimicrobial agent. J. Korean soc. Agric. Chem. Biotechnol., 36, 265-270

4. Cho SH, Chung JH, Ryu CH. (1994) Inhibitory effects of natural antimicrobial agent on postharvest decay in fruits and vegetables under natural low temperature. Food Nutrition Food Analysis Food Technology Korea Nutrition, 23, 315-321
5. Tansey MR, Appleton JA. (1978) Inhibition of Antifungal growth by galic Extract. Mycologia. 70, 397-401
6. Kim JH. (1997) Anti-bacterial action of onion(*Allium cepa* L.) extracts against oral pathogenic bacteria. J. Nippon Univ. Sch. Dent., 39, 136-141
7. Moustafa AE, Elmer HM. (1989) Inhibition or inactivation of *Listeria monocytogenes* by sodium benzoate together with some organic acids. J. Food Protect., 52, 771-776
8. Yang TS, Cunningham FE. (2003) Stability of egg white lysozyme in combination with other antimicrobial substance. J. Food Protect., 56, 153-156
9. Hughey VL, Jhonson EA. (1987) Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. Appl. Environ. Microbiol., 53, 2165-2170
10. Orman J.D. Reiter B. (1968) Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron chelating agents. Biochem. Biophys. Acta., 170, 351-354
11. Lee HS, Lee SG, Lee SE, Ma SY, Kim MK. (2000) Effect of growth-inhibitory substance from domestic medicinal plants against human lactic acid and harmful intestinal bacteria. Food Sci. Biotechnol., 9, 222-227
12. Oh DH, Ham SS, Park BK, Ahn C, Yu JY. (1998) Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 957-963
13. Shin DH, Kim MS, Han JS. (1997) Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-born bacteria. Korean J. Food Sci. Technol., 29, 808-816
14. Yang MS, Ha YL, Nam SH, Choi SU, Jang, DS. (1995) Screening of domestic plants with antibacterial activity. J. Korean soc. Agric. Chem. Biotechnol., 38, 584-589
15. Kwak YS, Yang JW, Lee KS. (1993) Screening of herb drugs showing antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms. Kor. J. Food. Hyg., 8, 141-145
16. Chang SM, Choi J, Kim JW, Park BY, Park SD. (1996) Korean medicinal herbs. Hak-Moon Publishing Co., Ltd. Seoul, Korea p.261-262.
17. Ahn DK. (1998) Illustrated book of Korean medicinal herbs. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Seoul, Korea p.665
18. Chang SM, Kim JW. (1987) Effect of soil fertility and the inorganic nutrients in the root on the paeoniflorin content in the root of *Paeonia albiflora* Pall., J. Agric. Sci. Taegu Univ., 1, 1-8
19. Piddock LJV. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. J. Appl. Bacteriol., 68, 307-310
20. Davidson PM, Parish ME. (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technol., 43, 148-155
21. Bendayan M. (1984) Protein-A-gold electron microscopic immunocytochemistry; methods, applications and limitations. J. Elect. Microsc. Technol., 1, 243-270
22. Pyliotis NA, Withecross MJ, Jacobsen JV. (1979) Localization of gibberlic acid-induced acid phosphorylase activity in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells with the electron microscope. Planta, 147, 134-142
23. Miller JH. (1972) Experiments in molecular biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. p.352-355
24. Ha MH, Park WP, Lee SC, Choi SG, Cho SH. (2006) Antimicrobial characteristic of *Prunus mume* extract. Korean J. Food Preserv., 13, 198-203

(접수 2010년 4월 20일, 수정 2010년 9월 13일 채택 2010년 9월 17일)