

조릿대 Ethanol 추출물 및 분획물의 항균 효과

장미란 · 이다움 · 김건희[†]
덕성여자대학교 식물자원연구소

Antibacterial Activity of Ethanol Extract and Fraction of *Sasa borealis*

Miran Jang, Dauh Lee and Gun-Hee Kim[†]

Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University

Abstract

This study investigated the antibacterial activities of extracts and fractions of *Sasa borealis* against eight bacteria (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens* and *Vibrio vulnificus*) by broth dilution assay. Using survival curves, the kinetics of bacterial inactivation upon exposure to the extracts and fractions were followed for 24 h. In this same manner, MIC (minimum inhibitory concentration) values were determined by broth microdilution assay and then confirmed to be the extract concentrations that inhibited bacterial growth. *Sasa borealis* extracts showed antibacterial activities against all tested bacteria. In particular, all tested fractions of *Sasa borealis* had stronger activities than 70% ethanol extract. MIC of *Sasa borealis* extract was determined to be 5 mg/mL against *Salmonella choleraesuis*. All fractions of *Sasa borealis* extract had extremely strong antibacterial activities. MIC of fractions were determined to be 0.03~2.5 mg/mL. These results suggest that the extracts and fractions of *Sasa borealis* effectively inhibited bacterial growth and thus are useful as natural antibacterial agents.

Key words: *Sasa borealis*, antibacterial activity, survival curves, minimum inhibitory concentration(MIC)

1. 서론

지속적인 경제 성장과 더불어 식문화는 풍요롭게 개선되었으며 식품산업은 꾸준히 발전하고 있다. 이에, 가공식품에 첨가되는 보존료의 종류와 합성 보존료가 인체에 미치는 영향력에 대한 소비자들의 관심이 증가함과 동시에 식품의 저장·유통 과정에서 안전성을 보장하기 위해 첨가되는 합성 보존료들의 잠재적 위험성은 소비자들의 불안감을 증가시키고 있어 천연 소재의 안전한 식품 보존료에 대한 연구에 소비자들의 관심이 집중되고 있다(Dillon VM 1994). 특히 최근 천연 식물 소재들은 실제로 천연 항균제제로서 식품산업에 적용되어 세균이나 곰팡이 등의 미생물을 억제하여 가공식품의 저장 및 유통기간을 증진시키고 있다(Jang M 등 2010). 천연물의 항균성 물질에 대한 연구는 식품, 의약 및 생물공학산업 등에서 오래 전부터 진행되고 있으나, 대부분 한약재로 이용되는 식물

소재에 국한되어 주위에서 흔히 구할 수 있는 많은 자생 식물에 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다(Hahn 2005).

조릿대는 화본과 식물로서 우리나라, 일본, 중국, 러시아 등에 자생하며 항비만 및 항당뇨 활성(Kim E 등 2007), 항산화 활성(Ko M 2008, Lee M과 Moon G 2003), 항암 활성(Park S 2003)을 가지고 있다고 보고되었다. 특히 일본에 자생하는 조릿대의 잎은 전통적으로 항균제제로서 이용되고 있다(Hasegawa 등 2008).

우리나라에 자생하는 조릿대의 항균 활성에 관한 연구로는 Baek J 등(2002)이 국내산 대나무 5종의 줄기와 잎을 추출하여 항균력을 비교·분석하였으나 조릿대에 대하여는 뚜렷한 항균력이 검증되지 않았으며, Ko M (2008)의 연구에서는 paper disc 법으로 조릿대의 부위별 water 및 ethanol 추출물에 한하여 항균력을 검증하였다. 또한 Chung DK와 Yu R (1995)의 연구에서 조릿대를 methanol, acetate, ethyl ether 및 ethyl acetate의 유기 용매에 추출하여 김치 발효 미생물에 대한 조릿대의 항균 활성에 대해 보고하였다. 다양한 연구를 통해 대나무종의 항균 활성은 입증되었으나, 조릿대의 항균작용에 대한 구체적인 연구가 부족한 실정이다. 본 연구에서는 더 나아가 용매별

[†]Corresponding author: Gun-Hee Kim, Department of Food and Nutrition, Duksung Women's University
Tel: 02-901-8496
Fax: 02-901-8474
E-mail: ghkim@duksung.ac.kr

분획을 하여 병원성 미생물에 대한 좀 더 심층적인 조릿대의 항균력을 검증하고자 하며, 본 연구결과를 토대로 조릿대의 천연식품보존료로서의 이용 가능성을 검토하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 시약

본 실험에서는 2010년 1월에 전라남도 화순에서 자생하고 있는 조릿대(*Sasa borealis*)를 채집하여 부위별(뿌리, 줄기, 잎)로 나누어 세척한 후 음건하여 실험 재료로 사용하였다. 실험에 사용된 모든 용매들은 특급으로 Sigma-Aldrich Inc.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2. 조릿대 추출물의 제조 및 용매별 분획

뿌리, 줄기, 잎을 1:1:1(w/w/w)의 비율로 섞은 조릿대 50 g에 70% 에탄올 1 L을 가하여 상온에서 48시간 동안 침지추출 하였다. 불순물을 제거하기 위해 Whatman 여과지(No.1)로 여과한 다음 회전농축기에서 감압 농축하여 건조시킨 후 시료로 사용하였다. 앞의 추출공정에 의해 얻어진 조릿대 추출물로부터 분획물을 얻기 위하여 서로 다른 극성의 용매(water, butanol, ethyl acetate, chloroform, n-hexane)를 첨가하여 단계적으로 분획하였다(Fig. 1). 조릿대 추출물을 증류수에 완전히 용해시킨 후 분획여두에 넣고 n-hexane 500 mL을 첨가하여 water층과 n-hexane층을 분리하였고, 동일한 과정을 통해 chloroform, ethyl acetate 및 butanol을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었고 최종 남은 용액은 water 분획물로 사용하였다. 얻어진 각각의 분획물을 감압여과 장치로 여과하여 농축한 후 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다.

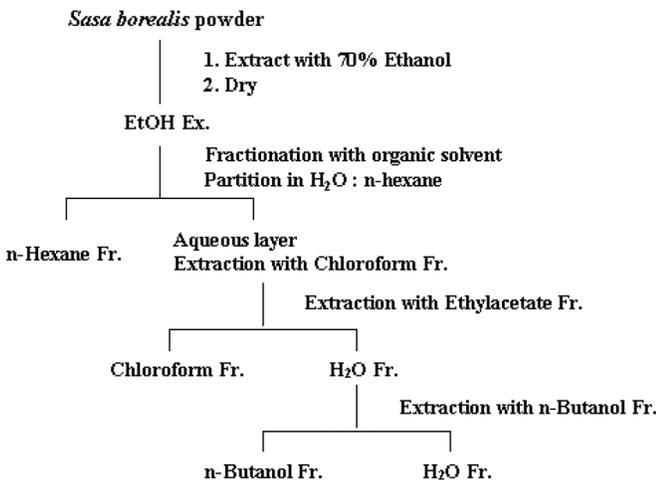


Fig. 1. Scheme for preparation of *S. borealis* Makino extract and its fractionation.

Table 1. List of strains and cultivation condition used for anti-microbial experiment

Food-borne pathogens	Reference	Cultivation condition
Gram positive bacteria		
<i>Bacillus cereus</i>	KCCM ¹⁾ 11204	NB ³⁾ , 37°C
<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 11316	NB, 37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	KCCM 40307	NB, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM 12214	NB, 37°C
Gram negative bacteria		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC ²⁾ 1636	NB, 37°C
<i>Salmonella choleraesuis</i>	KCCM 11806	NB, 37°C
<i>Serratia marcescens</i>	KCTC 2009	NB, 37°C
<i>Vibrio vulnificus</i>	KCTC 2959	NB with 3% NaCl, 37°C

¹⁾ Korean Culture Center of Microorganisms(Seoul, Korea)

²⁾ Korean Collection for Type Cultures(Daejeon, Korea)

³⁾ Nutrient Broth

3. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 Gram 양성균 4종, Gram 음성균 4종과 각각의 배양 조건을 Table 1에 나타내었다. 각 균주는 35% glycerol medium을 사용하여 -70°C에서 저장, 보관하였다. 실험 균액은 UV-spectrophotometer(SpectraMax M2, Molecular Devices, USA)를 이용하여 O.D.₆₀₀=0.2~0.3(대략 1×10⁷ CFU/mL) 농도로 일정하게 조정된 후 사용하였다. 배지는 균주의 특성에 맞게 제조하여 121°C, 1.5기압 하에서 15분간 멸균하였고, 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

4. 생육 저해 효과(Survival curve analysis)와 최소저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)의 분석

조릿대 추출물 및 분획물의 각 병원성 균주에 대한 생육 저해 효과 및 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 조사하기 위하여 Jang M(2010) 등의 방법을 토대로 broth-dilution method를 사용하여 수행되었다. 조릿대 추출물과 분획물, 대조균인 항생제 tetracycline 및 식품보존료인 sorbic acid는 0.85% 생리식염수로 0~2.5 mg/mL 농도로 희석하였다. 각각의 균주는 농도를 O.D.₆₀₀=0.2~0.3로 조절한 후 본 실험에 사용하였으며, 96-well plate(Falcon, USA)에 nutrient broth 100 μL, 조릿대 추출물과 분획물 및 항생제와 식품보존료를 첨가하여 제조한 조제액 50 μL, 균 희석액 50 μL를 순차적으로 첨가한 뒤 4시간 마다 UV-spectrophotometer를 이용해 흡광도 값을 측정하면서 24시간 동안 37°C에서 배양한 후 균의 생육 곡선을 나타내었다. 균의 생육 곡선을 통해 조릿대의 추출물과 분획물이 균의 성장을 저해하는 정도를 확인하였으며, 생육 곡선 상에서 균의 성장(turbidity)이 검출되지 않는 최소 농도를 MIC로 설정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 추출물과 분획물의 수율

조릿대 50 g을 추출하여 70% ethanol 추출물 12 g(24%)를 얻었다. 70% ethanol 추출물로부터 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water 분획물의 수율은 각각 1.51 g(12.58%), 2.13 g(17.75%), 0.76 g(6.33%), 2.21 g(18.41%), 5.34 g(44.5%)으로 나타났다.

2. 생육저해효과(Time-killing assay)

시험 용액 중 1.25 mg/mL 농도의 조제액을 24시간 동안 배양하면서 4시간 간격으로 조릿대 추출물과 분획물이 식중독 균의 생장에 미치는 영향을 검토한 결과 모든 균주에 대해서 생장을 저해하는 효과를 볼 수 있었다(Fig. 2). 모든 균주는 16시간 이후에 생장률이 감소하였으며, 특히 모든 분획물은 저농도에서도 균의 생장을 탁월하게 저해하는 것으로 나타났다. 반면, 70% ethanol 추출물은

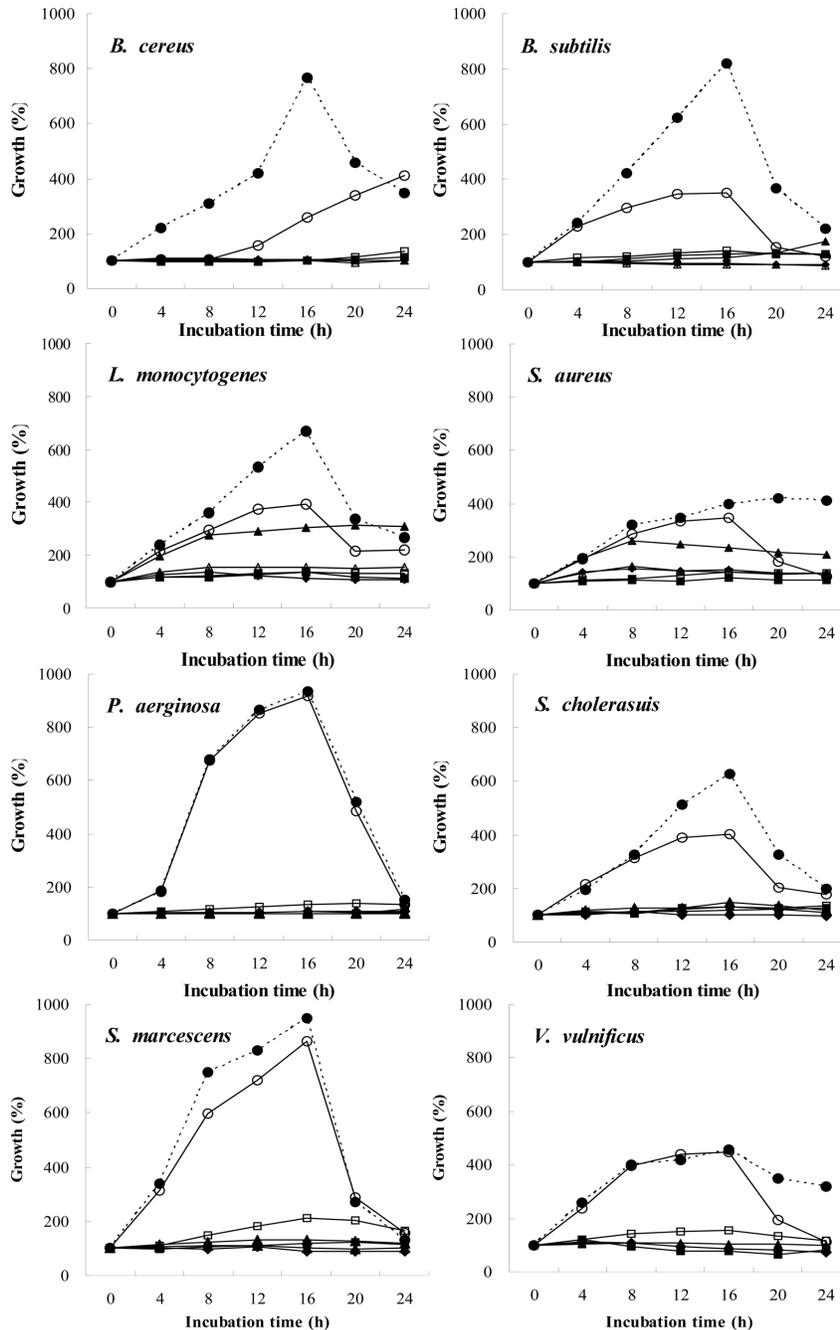


Fig. 2. Effect of the *S. borealis* extract and fractions on the growth of bacteria(---●---; bacteria, —○—; 70% ethanol extract, —■—; n-hexane and —□—; chloroform —▲—; ethyl acetate, —△—; butanol and —◆—; water).

분획물에 비하여 균의 생장의 저해가 비교적 미약하였다. Baek J 등(2002)의 연구에서 paper disc 방법을 이용하여 5종의 대나무를 1, 5% 농도에서 항균력을 검증한 결과 조릿대의 줄기 부위 5% 농도에서 *S. mutans*에 대해서만 큰 저해환(17.5 mm)이 나타났으며, 다른 대나무중에 비하여 조릿대의 항균력이 미약하다고 보고하였는데 본 연구 결과에서도 조릿대 분획물에 비하여 추출물의 항균력은 미약하게 관찰되었다. 이를 통해 조릿대는 추출물의 형태보다 분획물의 형태로 적용하였을 때 큰 항균력을 기대할 수 있다고 판단된다.

gram positive 균주들을 살펴보면, *B. cereus*와 *B. subtilis*는 추출물과 분획물 모두 균주의 성장을 저해하는 효과를 나타내었으며, 특히 모든 분획물이 두 균주의 성장을 탁월하게 저해하는 것으로 나타났다. Baek J 등(2002)의 연구에서 대나무 추출물이 *B. cereus*와 *B. subtilis*에 대하여 민감하게 작용한다고 보고하였으며, 이는 본 연구 결과와 유사하다. *L. monocytogenes*는 추출물과 모든 분획물이 균의 성장을 저해하였으나, 추출물과 ethyl acetate 분획물은 다른 분획물에 비해 미약한 항균력이 나타났다. 반면, *S. aureus*에 대해서는 추출물과 분획물의 항균력이 다른 gram positive 균주들에 비해 다소 미미하였으나, ethyl acetate 분획물을 제외한 분획물에서 강력한 항균력이 검증되었다. 동종의 조릿대로 항균실험을 검증한 Ko M(2008)의 연구에서 paper disc 방법을 통해 조사한 조릿대의 항균 활성은 *B. subtilis*에 대하여 큰 저해환(12.5 mm)을 형성하였지만 *S. aureus*와 *L. monocytogenes*에 대해서는 저해환을 나타내지 않았다고 보고하여 본 연구의 결과와 거의 일치한다.

gram negative 균주들에 대하여는 조릿대 추출물의 항균활성이 매우 미미하게 관찰되었다. 따라서 gram positive 균주들은 gram negative 균주들에 비하여 조릿대 추출물에 대해 민감한 것으로 판단된다. Baek J 등(2002)의 연구 결과에서도 이와 비슷한 경향을 보였다. *P. aeruginosa*에 대하여는 무침가균과 추출물 첨가균과의 생육 정도의 차

이가 거의 없으나 모든 분획물은 균의 성장을 강력하게 저해하는 것으로 나타났다. *S. choleraesuis*에 대해서는 추출물의 미약한 항균 활성이 관찰되었으며 모든 분획물은 강한 항균력이 나타났다. 또한, *S. marcescens*에 대하여 추출물의 항균력은 미약하게 관찰되었으나 모든 분획물에서 강력한 항균력이 나타났다. *V. vulnificus*에 대한 추출물의 항균력 또한 미약하게 관찰되었으며 분획물들은 탁월한 항균력이 검증되었다.

실험에 사용된 모든 gram positive와 gram negative 균주에 대하여 추출물에 비해 분획물들이 강력한 항균력이 관찰되었는데, gram positive 균주에 대하여는 n-hexane, chloroform, butanol 및 water의 분획물이 ethyl acetate 분획물보다 민감하게 작용하는 것으로 나타났으며, gram negative 균주에 대하여는 n-hexane, ethyl acetate, butanol 및 water의 분획물이 chloroform 분획물보다 민감하게 작용하는 것으로 나타났다.

3. 최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration)

각 병원성 유해 균주에 대한 조릿대 추출물 및 분획물의 최소저해농도를 Table 2에 나타내었다. 추출물은 분획물에 비해 미약한 항균력을 나타내었으며, 최소저해농도는 *S. choleraesuis*에 대해서만 5 mg/mL로 나타났으며, 다른 균주에 대해서는 시험 농도 내에서 최소저해농도가 나타나지 않았다. 반면, n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water 분획물은 0.03~2.5 mg/mL로 최소저해농도가 관찰되었으며 본 연구에서 각각의 분획물은 항균력은 서로 다른 균주에 대하여 모두 다르게 나타났다. 특히 chloroform, butanol 및 water 분획물의 저농도에서 강력한 항균력이 관찰되었다. Chung DK와 Yu R(1995)의 연구에서는 ethyl acetate 추출물의 항균력이 강력하게 나타났으나, 이는 추출 방법과 접종 균주가 다르기 때문이라고 판단된다. Chloroform 분획물은 *B. cereus*와 *V. vulnificus*에 대하여 강한 항균력을 나타내었으며 MIC는 각각 0.03

Table 2. Minimum inhibitory concentrations(MIC) of extract and fractions of *S. borealis* against bacteria

Bacterial strains	70% ethanol		Fractions				Control	
	extract	n-Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water	Tetracycline	Sorbic acid
Gram positive bacteria								
<i>B. cereus</i>	- ¹⁾	1.25	0.03	1.25	1.25	1.25	0.03	0.03
<i>B. subtilis</i>	-	2.5	2.5	2.5	0.03	0.03	0.03	0.06
<i>L. monocytogenes</i>	-	2.5	2.5	2.5	0.06	1.25	0.03	0.03
<i>S. aureus</i>	-	1.25	1.25	5	2.5	2.5	0.03	0.03
Gram negative bacteria								
<i>P. aeruginosa</i>	-	2.5	2.5	1.25	1.25	1.25	0.03	0.03
<i>S. choleraesuis</i>	5	1.25	1.25	2.5	2.5	1.25	0.03	0.03
<i>S. marcescens</i>	-	1.25	1.25	2.5	1.25	0.03	0.03	0.03
<i>V. vulnificus</i>	-	1.25	0.06	1.25	1.25	0.03	0.03	0.03

Minimum inhibitory concentration(MIC) as mg/mL of 70% ethanol extract, fractions and control(tetracycline and sorbic acid).

¹⁾ Not showed antimicrobial activity.

mg/mL과 0.06 mg/mL으로 관찰되었다. Butanol의 최소저해농도는 *B. subtilis*와 *L. monocytogenes*에 대하여 0.03 mg/mL과 0.06 mg/mL으로 강력한 항균력이 관찰되었다. Water 분획물은 *S. marcescens*, *V. vulnificus* 및 *B. subtilis*에 대하여 0.03 mg/mL에서 최소저해농도가 관찰되어 다른 추출물 및 분획물에 비하여 비교적 강력하게 항균 작용을 하는 것으로 나타났다. Water층의 수율은 다른 분획층보다 많았으며, 일부 유기용매가 갖고있는 잠재적 위험요소가 없어 안전할 뿐만 아니라 본 연구에서 강력한 항균력이 검증되어 식품산업에 적용 시 경제적 또는 기능적 측면에서 가장 효과적인 것이라 판단된다.

조릿대 추출물과 분획물의 생육저해효과와 최소저해농도 분석을 통해 항균력을 조사한 결과 8종의 병원성 세균에 대한 항균활성이 입증되어, 천연 항균제 및 식품보존제로의 이용이 가능하리라 생각된다. 본 연구 결과를 보충하기 위하여 좀 더 광범위한 병원성 균주에 대한 검증이 필요하며, 식품 내에 첨가되었을 때의 식품과 조릿대 사이에서 일어나는 물리·화학적 반응에 대한 연구가 필요하다고 사료된다. 또한 식품 가공 과정에 조릿대를 경제적, 관능적, 실용적인 측면에서 효과적으로 적용할 수 있는 방안에 대하여 연구해야 할 것이다.

IV. 요약 및 결론

조릿대를 70% ethanol에 추출하여 12 g를 얻었으며, 70% ethanol 추출물로부터 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water 분획물의 수율은 각각 12.58%, 17.75%, 6.33%, 18.41%, 44.5%으로 나타났다. 적절한 액체배지에 24시간 동안 배양하면서 4시간 간격으로 조릿대 추출물과 분획물의 항균활성을 검토한 결과 모든 균주의 생장을 저해하는 효과를 볼 수 있었다. 특히 모든 분획물은 저농도에서도 균의 생장을 탁월하게 저해하는 것으로 나타났다. 반면, 70% ethanol 추출물은 분획물에 비하여 균의 생장의 저해가 비교적 미약하였다. 모든 균주는 16시간 이후에 생장률이 감소하였으며 특히 조릿대 분획물의 강력한 항균력은 24시간까지 지속되었다. MIC는 70% ethanol 추출물에서는 *S. choleaesus*에 대해서만 5 mg/mL으로 관찰되었으며, 다른 균주에 대해서는 관찰되지 않았다. 모든 분획물의 MIC는 0.03~2.5 mg/mL으로 저농도에서 관찰되었으며 균주의 생장을 탁월하게 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 조릿대 추출물 및 분획물은 실험에 사용된 8종의 병원성 유해 균주에 대하여 항균력이 입증되어,

천연 항균제제로서 식품보존제로서의 이용이 가능할 것으로 판단된다.

V. 감사의 글

본 연구는 농심그룹 울촌재단(이사장 신동익)의 지원과 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 것(2009-0094018)으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Baek J, Chung S, Moon G. 2002. Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culums and leaves. *Kor J food sci technol* 34:1073-1078
- Chng DK, Yu Rina. 1995. Antimicrobial activity of bamboo leaves extract on microorganism related to kimchi fermentation. *Kor J. food sci. technol* 27:1035-1038
- Dillon VM, Board RG. 1994. Future prospects for natural antimicrobial food preservation systems, In Dillon, V. M., Natural antimicrobial systems and food preservation. Wallingford, UK: CAB. pp 297-305
- Hahn YS. 2005. Antimicrobial effects of *Camellia Japonica* L. leaves extract on food-borne pathogenic microorganisms. *Korean J Food Sci Technol.* 37:113-121
- Hasegawa T, Tanaka A, Hosoda A, Takano F, Ohta T. 2008. Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*. *phytochem* 69:1419-1424
- Jang M, Lee J, Seo J, Kim GH. 2010. Antibacterial activities of essential oil from *Zanthoxylum schinifolium* against food-borne pathogens. *Kor. J. Food Cookery Sci.* 26:206-213
- Kim E, Jung E, Lim H, Heo Y. 2007. The effects of the *Sasa borealis* leaves extract on plasma adiponectin, resistin, C-reactive protein and homocysteine levels in high fat diet-induced obese C57/BL6J Mice. *Korean J. Pharm* 40:303-311
- Ko M. 2008. Chemical components in stalks and leaves of *Sasa borealis* Makino and antioxidative and antimicrobial activities of extracts. *Korean J. Food. Preserv* 15:125-132
- Lee M, Moon G. 2003. Antioxidative effects of Korean bamboo trees, *Wang-dae*, *Som-dea*, *Maegjong-juk*, *Jolit-dae* and *O-juk*. 2003. *Kor J Food Sci Technol* 35:1226-1232
- Park S. 2003. Cytotoxicity of *Sasamorpha purpurascens* extract against HL60 cells and L1210 cells with alterations of ROS scavenging enzymes activities.

2010년 10월 7일 접수; 2010년 12월 2일 심사(수정); 2010년 12월 2일 채택