

산초 정유성분의 식중독균에 대한 항균 활성

장미란¹ · 서지은¹ · 이제혁¹ · 김진희^{1,2*}

¹덕성여자대학교 식물자원연구소, ²덕성여자대학교 식품영양학과

Antibacterial Activities of Essential Oil from *Zanthoxylum schinifolium* Against Food-Borne Pathogens

Miran Jang¹, Je-Hyuk Lee¹, Jieun Seo¹ and Gun Hee Kim^{1,2*}

¹Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University

²Department of Food & Nutrition, Duksung Women's University

Abstract

In this study, the antibacterial activities of essential oil from *Zanthoxylum schinifolium* against four Gram-positive bacteria and six Gram-negative bacteria were investigated. The antibacterial activity of the oils was determined using the agar-well diffusion assay, MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration). In particular, essential oil from *Z. schinifolium* showed higher antibacterial activity against Gram-positive bacteria than against Gram-negative bacteria. Essential oil from *Z. schinifolium* displayed large inhibition zones especially against *Bacillus cereus* (31 mm). At concentrations between 0 and 20 µg/mL the oils showed an antibacterial effect against both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) values against nine bacteria ranged from 1.25 to 5 µg/mL. The minimum bactericidal concentration (MBC) values against eight bacterial ranged from 2.5 to 20 µg/mL, except *Shigella sonnei*. Furthermore, our finding on the antibacterial activities of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* validated the use of this plant for medical purposes.

Key words: *Zanthoxylum schinifolium*, essential oil, agar-well diffusion assay, minimal inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC)

1. 서론

생활수준이 개선되면서 식품 위생과 안전 및 식품의 생체조절 기능에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있음에도 불구하고, 식중독균의 오염에 의한 중독 현상은 의약품분야 뿐만 아니라 식품의 저장 유통 등의 광범위한 영역에서 발생하여 경제적 손실을 야기하고 있다(Harris RC 1988, Rocourt J 등 2003). 식중독균에 의한 발병과 관련된 보고에 의하면, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* 등은 개발도상국뿐만 아니라 미국과 유럽 등에서도 달걀, 쇠고기, 가공류, 낙농제품에서 발견되고 있다(Tauxe RV 2002 과 Greig, JD와 Ravel A 2009). 식중독균에 대한 항균활성을 위한 식품 보존제는 대부분 화학적 합성 보존제에

의존하고 있어 인체 내 위해성에 대한 논란이 만연하고, 보다 안전한 식품첨가제에 대한 소비자의 요구가 증가하고 있다. 이에 천연 소재의 안전한 식품 보존제에 대한 개발과 연구에 관심이 모아지고 있다(Dillon VM과 Board RG 1994). 최근 여러 식물성 식품 소재들이 식품의 제조와 유통과정에서 식중독 세균과 곰팡이의 생장을 억제하여 가공식품의 저장 및 유통기간을 증진시키는 목적으로 천연의 항균제제로 사용되고 있다.

식중독균에 의한 직접적인 감염에 따른 위해성 이외에도, 식중독균과 부패미생물들이 과일, 채소, 곡물과 그 가공 식품 내에 배출하는 위험한 독성대사물질에 의해 공중보건이 위협받을 수 있다. *Escherichia coli*, *Staphylococcus pyogenes*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Clostridium* sp. 등이 배출하는 enterotoxin은 구토와 설사를 유발하는 위장 장애를 일으키는 원인 물질로 밝혀지고 있다. 이러한 소량의 식중독균은 건강한 사람에게 있어서 문제를 야기하지 않지만, 면역체계가 약화된 환자나 임산부의 경우는 심각한 건강상의 위험을 초래할 수 있으며, 그 예로

*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

서 *Listeria* sp의 감염에 의한 높은 치사율을 보이는 listeriosis를 들 수 있다(Datta AR 2003).

식물의 휘발성 이차 대사산물인 정유 성분(essential oil)은 항산화, 항염증, 항알러지, 항암활성을 가지고 있으며(Caldefied-Chezet F 2004, Syvestre M 2006, Medeiros R 2007), 정유성분에 의한 위 점막(gastric mucosa)의 보호 효과와 세포사멸(apoptosis)의 유도 등도 보고되고 있다(Hiruma-Lima CA 2002). 이러한 정유는 수세기 동안 천연의 항균 복합제나 단일물질로서 이용되어 오고 있고, 식중독균과 식품부패 미생물의 생장을 조절하는 목적으로 천연의 식품보존제로서 정유의 사용이 연구 개발되고 있다(Misaghi A와 Basti AA 2007).

운향과(Rutaceae family)에 속하는 산초(*Zanthoxylum schinifolium*)는 한국, 일본, 중국 등지에서 식품 향신료로서 사용될 뿐만 아니라 감기, 복통, 설사, 황달 등의 전통적인 대체의약품으로도 사용되어 왔다(Choi YJ 1992, Ko Y와 Han H 1996). 산초열매의 메탄올 추출물은 quercetin과 hyperoside의 함량이 높고, DPPH 소거활성을 보이는 등 항산화활성이 보고되고 있으며(Mun SI 등 1994), 클로로포름 분획은 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균활성을 갖는 것으로 조사되었다(Kim S와 Han Y 1997). 산초 휘발성 향기성분인 정유의 주요 화합물로는 geranyl acetate, β -phellandrene, D-limonene, citronellal, geraniol, p-sopropyl-2-cyclohexenone, phellandral 등이 보고되고 있다(Lee J 1998, Lee M과 Chung M 2000, Choi S 등 2008a). 또한 생리활성 기능으로는 간암세포의 세포사멸을 유도하고, 항염증활성 등(Paik S 등 2005, Lee J 등 2009)이 보고되었다. 특히 Choi S 등(2008b)은 산초 정유의 식중독균에 대한 항균활성도 일부 보고하였는데, 본 연구에서는 최근 몇 년간 우리나라에서 자주 발생한 식중독 원인 균주(KFDA 2009)를 중심으로 더욱 다양한 식품부패의 원인 균주들로 범위를 확장하고, 항균력을 검증하는 분석법을 더욱 다양하게 이용하여 산초 정유성분의 항균활성을 보고하였다. 본 연구결과를 기초로 천연 식품 보존제의 탐색과 개발에 도움을 주고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 시약

실험에 사용된 산초(*Z. schinifolium*)는 열매 부위를 경상남도 생약 농업 협동조합에서 2009년 9월에 구입 후 음건하여 실험 재료로 사용하였다. 산초 정유성분의 지표물질로서(Lee J 등 2009, Lee M와 Chung M 2000) citronellal, geranyl acetate, limonene과 항생제 대조균으로 ampicillin, streptomycin을 Sigma-Aldrich Inc.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 모든

용매들은 특급으로 Wako Pure Chemical Industries(Japan)으로부터 구입하였다.

2. 정유의 추출과 분리

산초 열매로부터의 정유(essential oil)는 steam distillation method(Gomez NE와 Witte L 2001)를 사용하여 추출하였다. 음건한 산초열매를 24시간 동안 Clevenger-type apparatus(Hanil Labtech Ltd., Incheon, Korea)를 사용하여 추출한 후, 다시 24시간 동안 sodium sulfate anhydrous 중에서 건조시켰다. Agilent 6890 gas chromatography/5973 mass selective detector(Agilent Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 성분분석을 실시한 결과 확인된 성분들 중에서 다량 함유되어 있으면서 항균성이 보고된 geranyl acetate, citronellel, limonene를 지표물질로 사용하였다(Lee J 등 2009, Lee M과 Chung M 2000).

3. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 식중독 균주는 gram 양성균 4종(*Bacillus cereus* KCCM 11204, *Bacillus subtilis* KCCM 11316, *Listeria monocytogenes* KCCM 40307, *Staphylococcus aureus* KCCM 12214), gram 음성균 6종(*Aeromonas hydrophila* KCTC 2358, *Salmonella choleraesuis* KCCM 11806, *Salmonella enterica* KCTC 12400, *Shigella sonnei* KCTC 2009, *Vibrio parahaemolyticus* KCCM 11965, *Vibrio vulnificus* KCTC 2959)을 사용하였고, 각 균주는 Korean Culture Center of Microorganisms(KCCM; Seoul, Korea)과 Korean Collection for Type Cultures(KCTC, Daejeon, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 각 균주는 35% glycerol medium을 사용하여 -70°C에서 저장, 보관하였다. *Vibrio* sp. 균주를 제외한 항균활성 실험에 사용된 모든 균주는 보관 균액 1 mL을 9 mL의 Nutrient Broth(NB, Difco, MI, USA)에, *Vibrio* sp. 균주는 3% NaCl을 첨가한 NB배지에 각각 접종하여 37°C에서 2회 계대배양하였고, UV-spectrophotometer(SpectraMax M2, Molecular Decives, USA)를 이용하여 O.D.=0.2~0.3(대략 10^7 CFU/mL) 농도로 일정하게 조정된 후 실험 균액으로 사용하였다. 배지는 균주의 특성에 맞게 제조하여 121°C, 1.5 기압 하에서 15분간 멸균하였고, 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

4. 항균활성 측정(Agar well diffusion assay)

산초 정유성분의 항균활성은 agar-well diffusion assay를 사용하여 분석하였다(Owen RJ와 Palombo EA 2007). 각 식중독균의 배양액(O.D.₆₀₀=0.2~0.3) 100 μ L을 멸균된 spreader로 Nutrient agar(NA, Difco, MI, USA) plate의 표면에 균질하게 도말한 후, 멸균된 cork-borer(5 mm dia-

meter)를 사용하여 agar표면에 well을 만들었다. 이 well에 산초 정유와 지표물질을 10 µL을 각각 가하고, agar내로 정유 또는 지표성분들이 확산되도록 30분간 상온에서 방치 후, 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 모든 실험은 3회 실시하였으며, agar well 주위로 미생물의 생장이 저해되는 clear zone의 크기(mm)를 caliper로 측정하여 항균력의 크기를 계산하였다(Fazeli MR 등 2007). 또한 정유시료의 희석에 사용된 dimethyl sulphoxide (DMSO) (St. Louis, MO, USA)를 음성 대조군으로 사용하였고, 항생제인 ampicillin과 streptomycin을 양성 대조군으로 사용하였다.

5. 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)의 분석

산초 정유의 각 식중독 균주에 대한 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 분석은 broth-dilution method를 사용하여 수행되었다(Mann CM과 Markham JL 1998, NCLLS 1999, Yu JQ 등 2004). 산초 정유, 지표물질, 항생물질을 DMSO로 희석하여 0~20 µg/mL 농도로 희석하였다. 각각의 균주는 농도를 O.D.₆₀₀=0.2로 조절한 후 본 실험에 사용하였다. 96-well plate(Falcon, USA)에 NB 100 µL, 산초 정유, 지표물질, 항생물질의 조제액 50 µL, 균 희석액 50 µL를 순차적으로 첨가한 뒤 4시간 마다 UV-spectrophotometer를 이용해 흡광도 값을 측정하면서 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 균의 생육 곡선 상에서 균의 생장(turbidity)이 검출되지 않는 최소 농도를 MIC로 설정하였다.

최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)는 MIC의 결정을 위한 각 시간대 별 배양 시료 50 µL를 취해 NA plate에 도말하여, 48시간 동안 37°C에서 배양한 후, 생성되는 colony 수를 관찰하였을 때 식중독균을 완전하게 사멸(99%)시키는 최소 농도로 MBC를 설정하였다(Choi S 2008b, Ji LL 등 2008). 모든 실험은 3개의 독립적인 실험을 수행하여 결과를 종합하였다.

6. 통계처리

각각의 실험은 모두 3회 반복 실시하였으며, 그 평균과 표준편차를 나타내었다. 모든 통계처리는 SPSS ver. 17.0 statistical analysis software(SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용하여 95%(p<0.05)에서 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 산초 정유성분의 항균활성(Agar-well diffusion assay)

일반적으로 항균활성을 측정하는 방법으로 agar diffusion 법을 사용한다. Agar diffusion 법에는 paper disk 법과 agar well 법이 있다. 그 기본원리는 항균활성을 지니는 물질

이 agar속으로 확산되어 그로 인한 항균활성을 inhibition zone의 크기로 결정하는 방법이지만, disk 확산법을 이용하였을 경우는 disk에 투여한 대상물질이 쉽게 휘발되거나, disk내로 응축되어 agar내로 확산되기 어려워, 대상물질의 항균력의 정확한 측정이 어려운 단점이 있다. 이에 산초 정유에 대한 식중독균의 항균활성 조사를 위하여 disk법과 agar well법을 사용하여 그 항균력의 크기를 비교한 결과, agar well법이 산초 정유의 항균활성의 측정에 더욱 적합한 것으로 판단되어 agar well법에 의한 항균활성을 조사하였다.

국내산 산초 정유와 그 지표물질인 geranyl acetate, citronellal, limonene과 항생제 대조군인 ampicillin과 streptomycin의 gram 양성 식중독균 4종과 gram 음성 식중독균 6종을 대상으로 한 항균활성을 Table 1에 나타내었다. *Bacillus cereus*에 대하여 산초 정유의 inhibition zone은 31 mm로 실험 균주들 중에 가장 큰 항균활성을 보였고 이는 대조군인 항생제 ampicillin과 streptomycin보다도 더 강하게 작용했다. 또한 지표물질인 geranyl acetate (26 mm)와 limonene(19 mm), citronellal(18.5 mm) 또한 다른 균주들에 비해 더 큰 항균활성을 나타냈다. *Bacillus subtilis*에 대하여는 inhibition zone이 16.5 mm으로 다른 gram 양성균에 비해서 비교적 작은 항균활성을 보였으나 역시 항생제 대조군인 ampicillin(14.5 mm), streptomycin(11.5 mm)보다는 큰 활성을 보였다. 지표물질인 limonene와 citronellal, geranyl acetate은 각각 14.5 mm, 10.5 mm, 9 mm의 활성을 나타냈다. Kim J 등(2000)은 산초 열매의 butanol 추출물이 *Bacillus subtilis*(14 mm)와 *Bacillus cereus*(13 mm)에 대해 강력한 항균활성을 갖는 것으로 보고하였는데, 산초 추출물이 다른 균주보다 *Bacillus sp*에 대하여 강력한 항균 효과를 나타내는 것으로 inhibition zone의 크기에는 차이가 있으나 본 연구의 결과와 유사한 결과를 보인다.

*Listeria monocytogenes*는 열과 산성 환경에 안정하고, 낮은 온도에서도 생육이 가능하여 육가공을 비롯하여 냉장, 냉동식품의 소비가 급증하면서 새로운 식중독세균으로 인식되고 있으며(Datta AR 2003), 특히 치사율이 높은 식중독균으로 알려져 있다(Kim HJ 2005). *Listeria monocytogenes*에 대해서는 산초 정유성분과 limonene, geranyl acetate, citronellal의 활성이 각각 19 mm, 21.5 mm, 12 mm, 8 mm으로 나타났고, 대조군인 항생제 ampicillin(18 mm)과 streptomycin(8 mm)보다 더 큰 활성을 보였다. 또한 우리나라의 대표적인 식중독균인 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 산초 정유가 20 mm, 지표물질인 limonene과 citronellal, geranyl acetate가 각각 30 mm, 12 mm, 9 mm로 나타냈다. Limonene은 *Staphylococcus aureus*에 대하여 정유성분과 다른 지표물질에 비해 강력한 항균활성을 갖는 것이 확인되었다.

산초 정유는 gram 양성균에 대해서는 항생제보다 더 큰 항균활성을 나타내었으나, gram 음성균에 대해서는 상대적으로 약한 항균력을 보였다(AI-Reza SM 등 2010). 다만 *Aeromonas hydrophila*에 대해서는 항생제인 ampicillin(20 mm), streptomycin(10 mm)보다 비교적 큰 22 mm의 inhibition zone을 나타내었다. 나머지 gram 음성균에 대한 산초 정유 항균활성의 세기는 *Salmonella enterica*(13.5 mm) > *Vibrio parahaemolyticus*(12.5 mm) > *Vibrio vulnificus*(12 mm) > *Salmonella choleraesuis*(11 mm) > *Shigella sonnei*(11 mm)의 순서로 감소되는 양상을 보였다. Kim JS 등(2004)은 산초의 잎, 가지, 과피의 열수 추출물과 ethanol 추출물이 *Vibrio parahaemolyticus*에 대하여 18 mm 이상의 inhibition zone을 보여 강력한 항균력을 나타낸다고 보고하였다. Gram 음성균에 대한 항균활성은 비교적 미약하였다. 지표물질인 citronellal과 limonene, geranyl acetate도 미약한 항균활성을 나타내었고, 특히, geranyl acetate는 *Aeromonas hydrophila*(7.5 mm)를 제외한 다른 gram 음성균에 대해서 agar plate 상에서는 항균활성을 나타내지 않았으며, limonene은 *Aeromonas hydrophila*(8.5 mm), *Shigella sonnei*(7.5 mm)를 제외한 다른 gram 음성균에 대해서는 inhibition zone을 나타내지 않았다. 또한 citronellal은 *Salmonella choleraesuis*에 대해서는 활성을 나타내지 않았다. Table 1의 항균 결과를 보면, agar plate 위에서의 산초 정유성분의 항균활성은 각각의 지표물질의 항균활성보다 더욱 강력하게 나타났는데 이는 정유에 포함되어 있는 많은 성분들이 복합적으로 작

용하여 항균활성의 증진을 가져온 것으로 생각된다. Choi S 등(2008b)은 agar diffusion 방법에서 geranyl acetate가 모든 균주에 대하여 inhibition zone을 형성하지 않는다고 보고하였으나, 본 연구에서는 Gram 양성균에 대해서는 inhibition zone을 형성하였으며, Gram 음성균에 대해서만 항균활성이 나타나지 않았다. 이는 diffusion 방법에 있어 paper disc 법과 agar well 법의 방법의 차이에서 기인되는 것이라고 판단된다.

2. 최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration)

각 식중독 균주에 대한 산초 정유의 최소저해농도를 Table 2에 나타내었다. 산초 정유는 gram 양성균인 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 2.5 µg/mL에서, *Listeria monocytogenes*에 대해 5 µg/mL로 관찰되었다. 이러한 산초 정유의 최소저해농도는 그 주성분인 citronellal과 limonene, geranyl acetate의 경우, 시험에 사용된 모든 식중독 균주에 대해 1.25~2.5 µg/mL로 관찰되었고, 대조균인 항생제는 1.25 µg/mL에서 최소저해농도가 입증되었다. 산초 정유의 식중독균에 대한 최소저해농도는 agar well diffusion assay에서의 결과와는 달리 gram 양성균보다 gram 음성균에 대해서 더 강력한 항균 활성을 나타내었는데 이는 배지의 상태에 따른 확산정도가 다르기 때문이라고 판단되며, 지표물질이나 항생제의 항균력이 높게 나타난 것은 O.D.값으로 탁도를 측정하여 실험 결과를 도출함에 있어 지표물질이나 항생제가 무색

Table 1. Agar diffusion susceptibility of various microorganisms to essential oil from *Z. schinifolium*

Food-borne pathogens	Inhibition zone of plate (mm) ¹⁾					
	Essential oil	Components			Antibiotics	
	<i>Z. schinifolium</i>	Citronellal	Limonene	Geranyl acetate	Ampicillin	Streptomycin
Gram positive bacteria						
<i>Bacillus cereus</i>	^A 31.0±1.4 ^a	^C 18.5±2.1	^C 19.0±5.7	^B 26.0±1.4	^C 17.5±1.5	^D 9.0±1.0
<i>Bacillus subtilis</i>	^A 16.5±0.7 ^c	^{CD} 10.5±0.7	^B 14.5±3.5	^D 9.0±0.0	^B 14.5±0.5	^C 11.5±0.5
<i>Listeria monocytogenes</i>	^{AB} 19.0±1.4 ^{bc}	^D 8.0±1.4	^A 21.5±9.2	^C 12.0±0.0	^B 18.0±1.0	^D 8.0±1.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	^B 20.0±0.0 ^b	^C 12.0±0.0	^A 30.0±0.0	^D 9.0±0.0	^B 21.5±1.5	^D 9.5±0.5
Gram negative bacteria						
<i>Aeromonas hydrophila</i>	^A 22.0±0.0 ^b	^C 8.0±0.7	^C 8.5±0.7	^C D7.5±0.7	^A 20.0±0.0	^B 10.0±1.0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	^B 11.0±0.0 ^e	— ²⁾	—	—	^A 19.5±0.5	^C 9.0±1.0
<i>Salmonella enterica</i>	^B 13.5±0.7 ^d	^C 9.5±0.7	—	—	^A 19.5±0.5	^B 12.0±1.0
<i>Shigella sonnei</i>	^B 11.0±0.0 ^e	^D 7.0±0.0	^{CD} 7.5±0.7	—	^A 14.5±0.5	^C 8.5±0.5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	^B 12.5±0.7 ^d	^C 8.0±0.0	—	—	^A 23.0±1.0	^B 13.0±1.0
<i>Vibrio vulnificus</i>	^B 12.0±0.0 ^{de}	^C 7.5±0.7	—	—	^A 22.5±0.5	^B 13.0±0.0

¹⁾ Diameter (mm), ²⁾ Not showed antimicrobial activity.

Each value is expressed as mean value±standard deviation (n=3). Ampicillin and Streptomycin (12.5 µg/disc) were used as positive control. Capital letters A-E: within the same row, values denoted by different capital letters are significantly different at p<0.05. Small letters a-f: within the same column, values denoted by different capital letters are significantly different at p<0.05.

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oil of *Z. schinifolium*, its components against food-borne bacteria

Food-borne pathogens	Essential oil	Components			Antibiotics	
	<i>Z. schinifolium</i>	Citronellal	Geranyl acetate	Limonene	Ampicillin	Streptomycin
Gram positive bacteria						
<i>Bacillus cereus</i>	2.50	1.25	1.25	2.50	1.25	1.25
<i>Bacillus subtilis</i>	2.50	1.25	2.50	1.25	1.25	1.25
<i>Listeria monocytogenes</i>	5.00	2.50	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.50	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Gram negative bacteria						
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.25	1.25	1.25	2.50	1.25	1.25
<i>Salmonella choleraesuis</i>	2.50	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>Salmonella enterica</i>	2.50	2.50	2.50	1.25	1.25	1.25
<i>Shigella sonnei</i>	2.50	2.50	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>Vibrio vulnificus</i>	1.25	1.25	1.25	2.50	1.25	1.25

Minimum inhibitory concentration (MIC) as $\mu\text{g/mL}$ of essential oil, components and antibiotics.

인 것에 비해 고유의 색을 지닌 정유가 MIC를 결정하는 탁도에 영향을 미쳤기 때문이라 판단된다. 따라서 항균 효과는 하나의 assay이므로 결정하기에 무리가 있어, 탁도에 영향을 미치지 않는 MBC를 측정하여 산초 정유와 그 주성분들의 항균활성의 근거를 확인하였다.

3. 최소사멸농도(MBC, minimum bactericidal concentration)

산초 정유와 그 주성분의 식중독 균주에 대한 최소사멸농도를 Table 3에 나타내었다. Gram 양성균인 *Bacillus cereus*와 *Bacillus subtilis*에 대한 산초 정유의 최소사멸농도는 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 이었고, *Listeria monocytogenes*와 *Staphy-*

*lococcus aureus*에 대해서는 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 최소사멸농도로 보였다. Gram 음성균은 gram 양성균에 비하여 산초 정유 성분에 대한 내성이 강하여 *Aeromonas hydrophila*와 *Vibrio parahaemolyticus*에 대해서는 $10 \mu\text{g/mL}$ 이상에서, *Salmonella choleraesuis*와 *Salmonella enterica*, *Vibrio vulnificus*에 대해서는 $20 \mu\text{g/mL}$ 이상에서 최소사멸농도가 조사되었다. 하지만 gram 음성균인 *Shigella sonnei*에 한해서는 다른 assay에서도 비교적 약한 항균력을 나타내었으며, MBC 시험 농도($0\sim 20 \mu\text{g/mL}$) 내에서 최소사멸농도가 관찰되지 않았다. 흥미롭게도 산초 정유성분은 여러 식중독균에 대해 다른 MBC를 보이는데, 이는 산초 정유가 각 식중독 균주마다 항식중독활성을 나타내는 다른

Table 3. Minimum bactericidal concentration (MBC) of essential oil of *Z. schinifolium*, its components against food-borne bacteria

Food-borne pathogens	Essential oil	Components			Antibiotics	
	<i>Z. schinifolium</i>	Citronellal	Geranyl acetate	Limonene	Ampicillin	Streptomycin
Gram positive bacteria						
<i>Bacillus cereus</i>	2.50	10.00	5.00	5.00	5.00	10.00
<i>Bacillus subtilis</i>	2.50	10.00	5.00	5.00	5.00	10.00
<i>Listeria monocytogenes</i>	10.00	10.00	10.00	10.00	5.00	10.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.00	— ¹⁾	5.00	20.00	2.50	10.00
Gram negative bacteria						
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10.00	—	—	5.00	2.50	10.00
<i>Salmonella choleraesuis</i>	20.00	—	—	20.00	5.00	5.00
<i>Salmonella enterica</i>	20.00	—	—	20.00	5.00	5.00
<i>Shigella sonnei</i>	-	—	—	20.00	5.00	10.00
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10.00	—	—	20.00	2.50	5.00
<i>Vibrio vulnificus</i>	20.00	—	—	10.00	2.50	5.00

Minimum bactericidal concentration (MBC) as $\mu\text{g/mL}$ of essential oil, components and antibiotics.

¹⁾ Not showed antimicrobial activity.

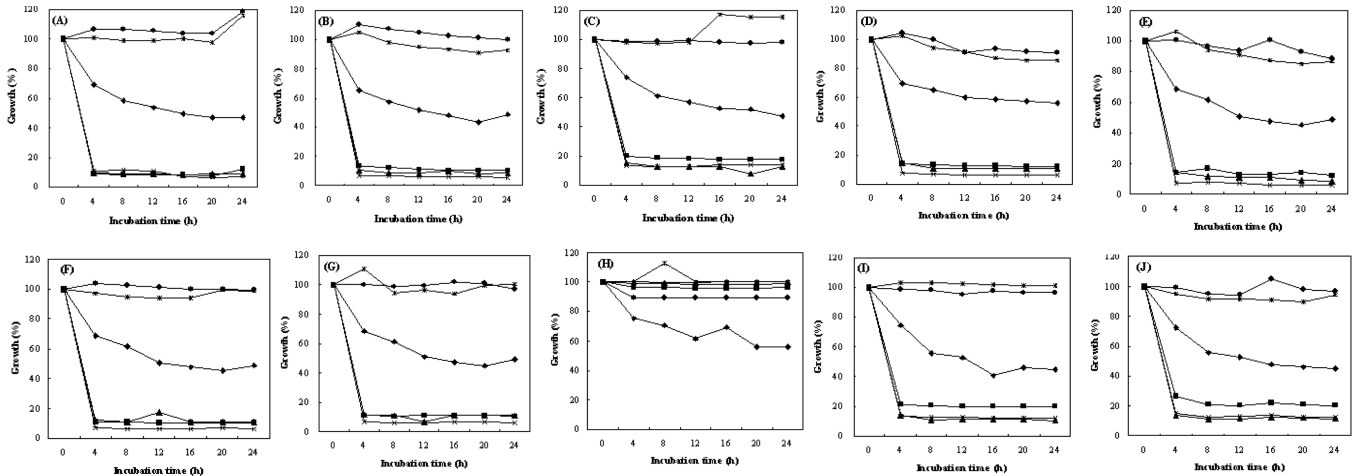


Fig. 1. Effect of the *Z. schinifolium* essential oil and components on the growth of bacteria; *B. cereus*(A), *B. subtilis*(B), *L. monocytogenes*(C), *S. aureus*(D), *A. hydrophila*(E), *S. choleraesuis*(F), *S. enterica*(G), *S. sonnei*(H), *V. parahaemolyticus*(I) and *V. vulnificus*(J). (◆; *Z. schinifolium*, ■; Citronellal, ▲; Geranyl acetate, ×; Limonene, *; Ampicillin and ●; Streptomycin)

조성성분이 존재한다는 것을 의미한다고 사료된다.

4. 생육저해효과(Time-killing assay)

시험 용액 중 2.5 µg/mL 농도의 조제액을 24시간 동안 배양하면서 4시간 간격으로 산초 정유가 식중독 균의 생장에 미치는 영향을 검토한 결과 모든 균주에 대해서 균의 생장을 저해하는 효과를 볼 수 있었다(Fig. 1). 산초 정유와 산초 정유의 주성분인 citronellal과 geranyl acetate, limonene은 모든 균주에 대하여 매우 강한 생육저해 효과를 갖는 반면 *Shigella sonnei*에 대해서는 다소 약한 저해 효과를 나타냈다. 또한 다른 균에서 보여 지는 것과 달리 정유가 그 지표물질보다 균의 생장을 더욱 억제하는 것으로 나타났다. 식중독균의 성장곡선의 형태는 배양한지 4시간째 균의 생장이 급격히 억제되다가 24시간 까지 꾸준히 억제시키는 경향을 보였다. 반면, 항생제 대조군인 ampicillin과 streptomycin은 4시간째까지는 균의 생장이 약간 증가하다가 이 후 균의 생장이 없거나 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 산초 정유와 그 주성분은 식품에 천연 보존제로서 첨가되었을 때 균의 생장을 강력하게 저해하고, 24시간 이상 항균력을 지속하여 식품의 저장성을 증가시킬 것으로 기대된다.

이수정 등(1997)은 산초 추출물을 미꾸라지 가공처리 과정에 첨가하여 실온에 저장한 결과 저장기간 중 첨가 농도에 비례하여 지질산화가 억제되었다고 보고하였다. 산초는 식중독 균에 대하여 직접적으로 항균작용을 나타낼 뿐만 아니라 식품에 적용되었을 때 식품의 저장성을 증대시킨다고 판단된다. 본 연구 결과를 보충하기 위하여 좀 더 광범위한 식중독 유발 세균에 대한 검증이 필요할 것으로 사료되며, 여러 식품의 형태에 적용이 되었을 때 식품의 저장기간 동안에 생물, 물리, 화학적으로

어떤 효과를 발휘하는지도 연구되어야 할 것이다. 또한 식물의 정유 추출물과 그 지표물질 각각의 생리활성에 대한보고는 많이 되어있으나 성분들이 복합적으로 작용하였을 때 미치는 항균력의 크기를 비교하는 연구는 부족한 실정이므로, 각각의 지표 정유 성분들이 복합적으로 식중독균에 처리하였을 때, 항균효과가 더욱 강력하게 나타나는지를 검증하기 위한 연구도 계속 되어야 할 것이다.

IV. 요약 및 결론

산초 정유의 식중독균에 대한 항균력을 검증하기 위해 산초 정유와 정유의 주성분인 citronellal와 limonene, geranyl acetate를 10종 균주에 대하여 agar-well diffusion assay와 MIC, MBC를 조사하였다. 실험 결과 gram 양성, 음성균 모두에 대해서 탁월한 항균 효과가 나타났다. Agar-well diffusion assay결과 산초 정유와 그 지표물질은 특히 gram 양성균에 대해서 강력한 활성을 보였다. MIC는 1.25 µg/mL에서 5 µg/mL 사이에서 균의 생장을 저해하는 효과가 나타났고, MBC는 2.5 µg/mL에서 20 µg/mL 사이에서 균이 완전히 사멸하는 살균력이 나타났다. 또한 액체 배양 중의 항균효과를 조사한 결과 산초 정유와 그 지표물질은 배양시간에 따라 항균 효과가 관찰되었다. 따라서 citronellal와 limonene, geranyl acetate를 조성분으로 함유한 산초 정유성분은 10종의 식중독균에 대해 항균활성을 나타내어, 천연 항균제로서 식품보존제로의 이용이 가능하리라 생각된다.

V. 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원과

2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국 연구재단의 대학 중점 연구소 지원 사업(2009-0094018)으로 일부 이루어진 것임.

참고문헌

- Al-Reza SM, Rahman A, Lee J, Kang SC. 2010. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chem* 119: 981-986
- Caldefied-Chezet F, Zet M, Guerry J, Chalchat C, Fusillier M, Vasson. 2004. Anti-inflammatory effects of melaleuca alternifolia essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radic Res* 38(8): 805-811
- Choi YJ. 1992. Academy book. Seoul, Korea, pp. 137-143
- Choi S, Chang K, Lee Y, Kim G. 2008a. Antibacterial Activity of Essential Oils from *Zanthoxylum piperitum* A.P. DC. and *Zanthoxylum schinifolium*. *Food Sci Biotechnol* 17(1): 195-198
- Choi S, Hong E, Lee J, Lee Y, Kim G. 2008b. Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Ethanol Extract of *Allium victorialis* L. var. *platyphyllum*. *Food Sci Biotechnol* 17(2): 313-318
- Datta AR. 2003. *Listeria monocytogenes*, In Miliotis, M. D., Bier, J. W., international handbook of foodborne pathogens. New York: Marcel Dekker Inc. pp 105-121
- 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
- Fazeli MR, Amin G, Attari MMA, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* 18(6): 646-649
- G'omez NE, Witte L. 2001. A Simple Method to Extract Essential Oils from Tissue Samples by Using Microwave Radiation. *J Chem Ecol* 27(11):2351-2359
- Greig JD, Ravel A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *Int J Food Microbiol* 130(2):77-87
- Harris RC. 1988. Review of selected bacterial enterotoxins and their role in gastroenteritis. *Ann Clin Lab Sci* 18(2):102-108
- Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Bighetti EJB, Grassi-Kassisse D, Nunes DS, Souza-Brito ARM. 2002. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. *Phytomed* 9(6):523-529
- Ji LL, Luo YM, Yan GL. 2008. Studies on the antimicrobial activities of extracts from *Eupatorium lindleyanum* DC against food spoilage and food-borne pathogens. *Food Control* 19(10): 995-1001
- Kim HJ, Bae J, Lee I. 2005. Inhibitive effects of edible Mushrooms extracts on pathogenic bacteria and proliferation of cancer cells. *Korean J Food Preserv* 12(6):637-642
- Kim J, Cho Y, Seo K, Joo O, Shim K. 2000. Antimicrobial activities of *Zanthoxylum schinifolium* and *Zanthoxylum piperitum* Leaves. *Korean J Postharvest Sci Technol* 7(2): 195-200
- Kim JS, Koo KM, Jung YH, Yang JG, Lee GG. 2004. Antimicrobial activities of *Zanthoxylum schinifolium* extract against *Vibrio parahaemolyticus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(3):500-504
- Kim S, Han Y. 1997. Isolation and identification of antimicrobial compound from Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J Soc Food Sci* 13(1):56-63
- Ko Y, Han H. 1996. Chemical constituents of Korean Chopi (*Zanthoxylum piperitum*) and Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J Food Sci Technol* 28(1):19-27
- Lee M, Chung M. 2000. Analysis of volatile flavor components from *Zanthoxylum schinifolium* and Sensory evaluation as natural spice. *Korean J Soc Food Sci* 16(3):216-220
- Lee J, Chang K, Kim G. 2009. Composition and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* essential oil: suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, cytokines and cellular adhesion. *J Sci Food Agric* 89(10):1762-1769
- Lee J. 1998. Volatile Flavor Components of korean sancho fruit and tree (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J Food & Nutr* 11(5):493-498
- Mann CM, Markham JL. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol* 84(4):538-544
- Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianoski LF. 2007. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol* 151(5):618-627
- Misaghi A, Basti AA. 2007. Effects of *Zataria Multiflora* boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control* 18(9):1043-1049
- Mun S, Ryu H, Lee H, Park J. 1994. Further Screening for Antioxidant Activity of Vegetable Plants and Its Active Principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 23(3):466-471
- NCLLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard). 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9th International supplement. Wayne, PA, pp M100-S9
- Owen RJ, Palombo EA. 2007. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. *Food Control* 18(5):387-390
- Paik S, Koh K, Beak S, Paek S, Kim J. 2005. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased produc-

- tion of reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* 28(5): 802-807
- Rocourt J, Moy G, Vierk K, Schlundt J. 2003. Present state of foodborne disease in OECD countries, In anonymous. Geneva, Switzerland: Food Safety Department. World Health Organization, Geneva, Switzerland. pp 1-39
- Sylvestre MA, Pichette A, Longtin F, Nagau J, Legault 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharmacol* 103(1):99-102
- Tauxe RV. 2002. Emerging foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 78(1):31-41
- Yu JQ, Lei J, Yu H, Cai X, Zou G. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry* 65(7): 881-884
- 이수정, 류홍수, 문숙임. 1997. 산초처리 및 저장조건에 따른 건조미꾸라지육의 품질변화: 한국식품영양과학회, 정기총회 및 제 41차 춘계학술대회
-
- 2010년 3월 26일 접수; 2010년 4월 14일 심사(수정); 2010년 4월 14일 채택