

국화 꽃 휘발성 향기성분의 식중독균에 대한 항균 작용

장미란* · 서지은* · 이제혁* · 정미숙* · †김건희

*덕성여자대학교 식물자원연구소, 덕성여자대학교 식품영양학과

Antibacterial Action against Food-Borne Pathogens by the Volatile Flavor of Essential Oil from *Chrysanthemum morifolium* Flower

Miran Jang*, Jieun Seo*, Je-Hyuk Lee*, Mi-Sook Chung and †Gun Hee Kim

*Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Dept. of Food & Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract

The aim of this study was to investigate antibacterial activities of essential oil from *C. morifolium* against four Gram-positive bacteria and six Gram-negative bacteria. The antibacterial activity of the oils was determined by agar-well diffusion assay, minimum inhibitory concentration(MIC), and minimum bactericidal concentration(MBC). Essential oil of *C. morifolium* had a large inhibition zones especially against *Salmonella enterica*(21 mm) and *Bacillus cereus*(19 mm). Essential oil of *C. morifolium* generally showed higher antibacterial activity against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria. MIC of essential oil from *C. morifolium* was 5 µg/ml against ten food-borne pathogens. MBC values were determined to be from 5 to 20 µg/ml against eight bacteria except *Salmonella choleraesuis* and *Listeria monocytogenes*. Therefore, the essential oil of *C. morifolium* and its components have a potent antibacterial activity against food-borne pathogens, and is expected to be used as a novel food preservative.

Key words: *Chrysanthemum morifolium*, essential oil, agar-well diffusion assay, minimum inhibitory concentration(MIC), minimum bactericidal concentration(MBC).

서론

최근 국민소득의 증가와 더불어 식생활 수준의 향상으로 식품의 안전성 및 식품첨가물에 대한 소비자의 관심이 크게 증가하였지만, 외식 및 급식의 이용이 증가하면서 이들 식중독균에 의한 발병이 증가하고 있는 실정이다(KFDA 2009). 개발도상국뿐만 아니라 미국과 유럽 등에서도 *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* 은 달걀, 쇠고기, 가공육 등의 낙농제품에서 발견되고 있다(Greig & Rave 2009; Tauxe 2002). 또한 식중독은 식중독균주의 직접적인 감염에 따른 위해성 외에도 식중독균과 부패미생물들이 과일, 야채, 곡물과 그 가공 식품 내에 배출하는 위

험한 독성대사물질에 의해 질병을 유발하기도 한다. *Escherichia coli*, *Staphylococcus pyogenes*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Clostridium* sp. 등이 배출하는 enterotoxin은 구토와 설사를 유발하는 위장장애를 일으키는 원인균으로 밝혀지고 있다. 미량의 식중독균은 건강한 사람에게는 건강상의 문제를 야기하지 않지만, 면역체계가 약한 어린이, 노인, 환자 또는 임산부의 경우에 심각한 위험을 초래할 가능성이 있다. 그 예로서 *Listeria* sp.의 감염으로 인한 listeriosis는 높은 치사율을 보인다(Datta 2003).

화학적 합성 보존료는 식품 부패 미생물이나 병원성 미생물의 생장을 억제시키고, 식품의 저장성 향상을 위해 비교적 많은 식품에서 사용되고 있지만 지속적으로 사용할 경우 체

† Corresponding author: Gun-Hee Kim, Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, 419, Ssangmun-dong, Dobong-gu, Seoul 132-714, Korea. Tel: +82-2-901-8496, Fax: +82-2-901-8474, E-mail: ghkim@duksung.ac.kr

내에 축적되어 돌연변이나 심각한 질병 유발 등의 문제가 되고 있어 그 사용이 제한되고 있다(Lee & Lim 1998). 이에 최근에는 천연물에 존재하는 항균활성 물질이 가공식품의 저장, 유통기간을 증진시키는 목적으로 천연의 항균제제로 사용되고 있다.

정유 성분(essential oil)은 식물의 휘발성 이차 대사산물로서 향산화(Caldefied-Chezet 등 2004), 항염증, 항알레르기(Medeiros 등 2007), 항암활성(Syvestre 등 2006)을 가지고 있으며, 또한 위 점막(gastric mucosa)의 보호효과와 세포사멸(apoptosis)의 유도 등도 보고되고 있으며(Hiruma-Lima 등 2002), 수세기 동안 천연의 항균 복합제나 단일물질로서 이용되어 왔다. 식중독균과 식품 부패 미생물의 성장을 조절하는 목적으로 천연의 식품보존료로서 정유의 사용에 대한 연구 개발이 지속적으로 이뤄져 왔다(Misaghi & Basti 2007).

국화과(Compositae family)의 대표적 식물인 국화(*Chrysanthemum morifolium*)는 많은 나라에서 다년생 정원수로 재배되는 식물로서, 정원의 식수나 식재료로 이용되고 있으나, 그 생리활성에 대한 연구는 미미한 실정이다. 다만, 동종에 속하는 감국(*Chrysanthemum indicum*)은 면역계 질병, 고혈압 등의 질환의 개선에 대한 활성이 보고되었다(Cheng 등 2005; Shunying 등 2005). 국화 정유의 주요 휘발성 화합물로는 1,8-cineole, germacrene D, camphor, α -pinene, α -cadinol, camphene, pinocarvone, β -caryophyllene, 3-cyclohexen-1-ol, γ -curcumene 등이 보고된 바 있다(Jiang 등 2005; Wang 등 2008; Wang & Yang 2006).

본 연구에서는 최근 몇 년간 우리나라에서 자주 발생 한 식중독의 원인 균주를 대상으로(KFDA 2009) 국화꽃 정유성분의 항균활성에 대한 보고를 하고자 하며, 본 연구결과를 기초로 새로운 천연 식품 보존료의 탐색과 개발에 도움을 주고자 한다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 시약

실험에 사용된 국화(*Chrysanthemum morifolium*)는 꽃 부위를 경상남도 생약농업협동조합에서 2009년 9월에 구입 후 음건하여 실험 재료로 사용하였다. 국화 정유성분의 지표물질로서 camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha + \beta$ -thujone의 화합물과 항생제 대조군으로 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

국화 시료로부터 정유(essential oil)는 steam distillation method(Gomez & Witte 2001)를 사용하여 추출하였다. 음건한 국화

시료를 24시간 동안 Clevenger-type apparatus(Hanil Labtech Ltd., Incheon, Korea)를 사용하여 추출한 후, 다시 24시간 동안 anhydrous sodium sulfate 중에서 건조시켰다. Agilent 6890 gas chromatography/5973 mass selective detector(Agilent Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 성분분석을 실시하였고, camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha + \beta$ -thujone를 지표물질로 사용하여 본 연구를 진행하였다.

3. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 Gram 양성균 4종, Gram 음성균 6종과 각각의 배양 조건을 Table 1에 나타내었다. 각 균주는 35% glycerol medium을 사용하여 -70°C 에서 저장, 보관하였다. 실험 균액은 UV-spectrophotometer(SpectraMax M2, Molecular Decives, USA)를 이용하여 600 nm에서의 O.D. 값이 0.2~0.3 (대략 1×10^7 CFU/ml) 되게 농도를 일정하게 조정된 후 사용하였다. 배지는 균주의 특성에 맞게 제조하여 121°C , 1.5기압 하에서 15분간 멸균하였고, 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

4. 항균활성 측정(Agar Well Diffusion 분석법)

국화 정유성분의 항균활성은 agar-well diffusion 분석법을 사용하여 분석하였다(Owen & Palombo 2007). 각 식중독균의 배양액(O.D.₆₀₀=0.2~0.3) 100 μl 를 spreader로 Nutrient agar (NA, Difco, MI, USA) plate의 표면에 균질하게 도말한 후, 멸균된 cork-borer(5 mm diameter)를 사용하여 agar 표면에 well을 만들었다. 이 well에 국화 정유와 정유의 지표물질을 20 μl 을 각각 가한 후, agar내로 정유 또는 지표성분들이 확산되도록 30분간 상온에서 방치 후, 37°C 에서 12시간 동안 배양하였다.

Table 1. List of strains and cultivation condition used for antimicrobial experiment

Food-borne pathogens	Cultivation condition	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	KCTC ¹⁾ 2358	NB ³⁾ , 37°C
<i>Salmonella choleraesuis</i>	KCCM 11806	NB, 37°C
<i>Salmonella enterica</i>	KCTC 12400	NB, 37°C
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2009	NB, 37°C
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCCM 11965	NB with 3% NaCl, 37°C
<i>Vibrio vulnificus</i>	KCTC 2959	NB with 3% NaCl, 37°C
<i>Bacillus cereus</i>	KCCM ²⁾ 11204	NB, 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

¹⁾ Korean Collection for Type Cultures(Daejeon, Korea).

²⁾ Korean Culture Center of Microorganisms(Seoul, Korea).

³⁾ Nutrient Broth.

모든 실험은 3회 실시하였으며, agar well 주위로 미생물의 성장이 저해되는 clear zone의 크기(mm)를 caliper로 측정하여 항균력의 크기를 계산하였다(Fazeli 등 2007). 또한 정유시료를 제조한 dimethyl sulphoxide(DMSO; St. Louis, MO, USA)를 음성 대조군으로 사용하였고, 항생제인 ampicillin, streptomycin을 양성 대조군으로 사용하였다.

5. 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)의 분석

국화 정유의 각 식중독 균주에 대한 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 분석은 broth-dilution method를 사용하여 수행되었다(Mann & Markham 1998; NCLLS 1999; Yu 등 2004). 국화 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, 국화 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 성장(turbidity)이 검출되지 않는 최소 농도를 MIC로 설정하였다.

최소사멸농도(minimum bactericidal concentrations, 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(99.9%) 시키는 최소 농도로 MBC를 설정하였다(Choi 등 2008; Ji 등 2008). 모든 실험은 3개의 독립적인 실험을 수행하여 결

과를 종합하였다.

6. 통계처리

모든 실험은 3회 독립적으로 수행하였으며, 각각의 평균과 표준편차를 구하여 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 국화 정유성분의 항균활성(Agar-well Diffusion 분석법)

항균활성을 측정할 때 일반적으로 agar diffusion 법을 사용한다. Agar diffusion 법에는 paper disk 법과 agar well 법이 있는데, 항균활성을 지니는 물질이 agar 속으로 확산되어 그로 인한 항균활성을 inhibition zone의 크기로 결정하는 방법이다. 국화 정유에 대한 식중독균의 항균활성에 대한 조사를 위하여 기본실험으로 paper disk 법과 agar well 법을 사용하여 그 항균력의 크기를 비교한 결과, agar well 법이 국화 정유의 항균활성의 측정에 적합한 것으로 조사되어, agar well 법에 의한 항균활성을 측정하였다. 대상물질의 항균활성뿐만 아니라 agar 내로 확산이 어렵다든가 확산의 속도가 다르면, 대상물질의 agar well diffusion 법으로 측정된 항균활성의 정도가 달라지기 때문에 추가적으로 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)를 이용하여 항균활성을 확인하였다.

국내산 국화 정유와 지표물질 camphor, chrysanthemyl alcohol, α-pinene, γ-terpinene, α+β-thujone과 항생제 대조군인 ampicillin, streptomycin의 Gram 양성 식중독균 4종과 Gram 음성 식중독균 6종을 대상으로 한 항균활성을 Table 2에 나타내었

Table 2. Agar diffusion susceptibility of various microorganisms to essential oil from *C. morifolium*

Food-borne pathogens	Inhibition zone of plate(mm) ¹⁾							
	Essential oil			Components			Antibiotics	
	<i>C. morifolium</i>	Camphor	Chrysanthemyl alcohol	α-Pinene	γ-Terpinene	α+β-Thujone	Ampicillin	Streptomycin
<i>A. hydrophila</i>	16.3±1.2	11.0±1.0	11.5±0.6	23.0±0.6	-	18.5±0.5	21.5±0.0	9.5±1.0
<i>S. choleraesuis</i>	- ²⁾	-	-	20.5±3.0	-	13.5±1.5	19.0±0.5	9.5±1.0
<i>S. enterica</i>	21.0±3.6	16.5±2.1	28.5±1.5	21.0±2.0	-	27.5±2.1	19.0±0.5	11.5±1.0
<i>S. sonnei</i>	10.0±1.0	-	12.5±0.5	29.0±1.5	-	18.0±0.5	13.5±0.5	8.5±0.5
<i>V. parahaemolyticus</i>	15.0±2.0	9.0±0.5	14.0±0.6	26.5±1.5	-	20.0±1.5	22.5±1.0	12.5±1.0
<i>V. vulnificus</i>	14.0±1.7	-	11.0±1.5	25.5±1.5	-	21.0±0.5	21.5±0.5	12.5±0.0
<i>B. cereus</i>	19.0±2.0	15.2±1.2	12.5±1.0	31.0±1.5	8.7±0.6	29.0±2.0	17.0±1.2	10.5±1.0
<i>B. subtilis</i>	17.3±1.2	13.0±1.0	10.0±1.0	26.5±1.6	7.3±2.1	27.5±0.6	13.5±0.5	11.0±0.5
<i>L. monocytogenes</i>	13.3±1.5	9.0±0.5	9.3±0.6	29.0±1.2	11.0±1.7	16.5±1.5	17.0±1.0	9.0±1.0
<i>S. aureus</i>	13.7±1.2	9.5±0.5	10.0±0.5	33.5±1.2	-	20.5±0.5	20.0±1.5	10.0±0.5

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.

다. *Bacillus cereus*에 대한 국화 정유의 inhibition zone은 19 mm로 Gram 양성균주 중에서는 가장 큰 항균 활성을 나타내었고, 이는 대조균인 항생제 ampicillin과 streptomycin보다도 더 강하게 작용했다. 지표물질인 camphor(15.2 mm), chrysanthemyl alcohol(12.5 mm), γ -terpinene(8.7 mm) 또한 다른 균주들에 비해 더 큰 활성을 나타냈고, 특히 α -pinene(31 mm)과 $\alpha + \beta$ -thujone(29 mm)은 매우 큰 활성을 나타내었다. *Bacillus subtilis*에 대하여는 inhibition zone이 17.3 mm로 다른 Gram 양성균에 비해서 비교적 강한 항균활성을 보였고, 역시 항생제 대조균인 ampicillin(13.5 mm), streptomycin(11 mm)보다 큰 활성을 보였다. 지표물질인 camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha + \beta$ -thujone은 각각 13 mm, 10 mm, 26.5 mm, 7.3 mm, 27.5 mm의 활성을 나타냈다. *Listeria monocytogenes*는 치사율이 높은 식중독균으로서 열과 산성물질에 안정하여 육가공품 및 냉장 냉동식품의 소비가 급증하면서 새로운 식중독세균으로 인식되고 있다(Kim 등 2005). *Listeria monocytogenes*에 대해서는 국화 정유성분과 지표물질인 camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha + \beta$ -thujone의 활성이 각각 13.3 mm, 9 mm, 9.3 mm, 29 mm, 11 mm, 16.5 mm로 나타났다. 또한 우리나라의 대표적인 식중독균인 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 국화 정유성분이 13.7 mm, 지표물질인 camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, $\alpha + \beta$ -thujone가 각각 9.5 mm, 10 mm, 33.5 mm, 20.5 mm로 나타났으며, γ -terpinene에 대해서는 inhibition zone을 형성하지 않았다. 국화 정유의 주요 조성분 중 α -pinene과 $\alpha + \beta$ -thujone은 특히 다른 성분들에 비해서 탁월한 항균활성을 나타내었는데, 휘발성 방향족 정유 성분인 thujone의 화학성분은 세균이나 바이러스 균에 저항력이 있어, 인체

내 항균 작용, 항암작용, 항염증작용, 항궤양작용, 항당뇨작용 등에 효능이 탁월한 것으로 많이 보고되어 왔다(Lee 등 2000, Hedi 등 2009).

국화 정유는 Gram 양성균에 대해서는 대부분 대조균인 항생제보다 더 큰 항균활성을 나타내었으나, Gram 음성균에 대해서는 상대적으로 약한 항균력을 보였다(AI-Reza 등 2010). 다만 *Salmonella enterica*에 대해서는 대조균인 항생제 ampicillin(19 mm), streptomycin(11.5 mm)보다 비교적 큰 21 mm의 inhibition zone을 나타내었다. 나머지 Gram 음성균에 대한 국화정유 항균활성의 세기는 *Aeromonas hydrophila*(16.3 mm) > *Vibrio parahaemolyticus*(15 mm) > *Vibrio vulnificus*(14 mm) > *Shigella sonnei*(10.0 mm)의 순서였고, *Salmonella choleraesuis*에 대해서는 inhibition zone이 관찰되지 않았다. 지표물질인 α -pinene, $\alpha + \beta$ -thujone은 Gram 음성균에서도 비교적 큰 활성을 나타내었으나 camphor, chrysanthemyl alcohol은 미약한 항균활성을 나타내었고, γ -terpinene은 항균활성을 나타내지 않았다. 다만 *Salmonella enterica*에 대해서는 다른 Gram 음성균보다 비교적 큰 활성을 나타내었는데, camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha + \beta$ -thujone에 각각 16.5 mm, 28.5 mm, 21 mm, 27.5 mm의 inhibition zone을 형성했다.

2. 최소저해농도(MIC, Minimum Inhibitory Concentration)

각 식중독 균주에 대한 국화 정유의 최소저해농도를 Table 3에 나타내었다. 국화 정유의 최소저해농도는 모든 균주에 대하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 관찰되었다. 이러한 국화 정유의 최소저해농도는 그 주성분인 camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha + \beta$ -thujone의 경우 시험에 사용된 모든 식중

Table 3. Minimum inhibitory concentration(MIC) of essential oil of *C. morifolium*, its components against food-borne bacteria

Food-borne pathogens	Essential oil			Components			Antibiotics	
	<i>C. morifolium</i>	Camphor	Chrysanthemyl alcohol	α -Pinene	γ -Terpinene	$\alpha + \beta$ -Thujone	Ampicillin	Streptomycin
<i>A. hydrophila</i>	5	5	10	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>S. choleraesuis</i>	5	10	5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>S. enterica</i>	5	5	5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>S. sonnei</i>	5	10	10	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>V. parahaemolyticus</i>	5	5	5	5	1.25	5	1.25	1.25
<i>V. vulnificus</i>	5	5	5	2.5	1.25	5	1.25	1.25
<i>B. cereus</i>	5	10	10	2.5	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>B. subtilis</i>	5	5	10	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>L. monocytogenes</i>	5	5	10	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>S. aureus</i>	5	10	10	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25

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

독 균주에 대해 1.5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 관찰되었고, 대조균인 항생제는 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최소저해농도를 보여 국화 정유의 성분이 식중독균의 최소저해농도에 영향을 미치는 것으로 생각된다. Agar well diffusion 분석법에서 확인된 것과 동일하게 α -pinene과 $\alpha + \beta$ -thujone은 식중독균의 성장을 강력히 저해하는 것으로 나타났다. 반면에 γ -terpinene은 agar well diffusion 분석법에서 미약한 항균력을 나타냈으나, MIC를 조사한 결과 식중독균의 성장을 강력히 저해하는 것으로 나타났다. 또한, 국화 정유의 식중독균에 대한 최소저해농도는 Gram 양성균과 Gram 음성균의 항균 활성 차이가 크게 나타나지 않았다. 이처럼 agar well diffusion 분석법과 MIC 결과의 차이로 시료물질의 항균활성뿐만 아니라 agar well diffusion에 있어 시료물질의 확산정도에 따라 항균활성의 차이가 생기기 때문이라고 판단되며, 지표물질이나 항생제의 항균력이 높게 나타난 것은 O.D.값으로 탁도를 측정하여 실험 결과를 도출함에 있어 지표물질이나 항생제가 무색인 것에 비해 고유의 색을 지닌 정유가 MIC를 결정하는 탁도에 영향을 미쳤기 때문이라 판단된다. 따라서 항균 효과는 하나의 분석법만으로 결정하기에 무리가 있어, 탁도에 영향을 미치지 않는 MBC를 측정하여 국화 정유와 그 주성분들의 항균활성의 근거를 확인하였다.

3. 최소사멸농도(MBC, Minimum Bactericidal Concentration)

국화 정유와 그 주성분의 식중독 균주에 대한 최소사멸농도를 Table 4에 나타내었다. Gram 양성균인 *Bacillus cereus*와 *Bacillus subtilis*에 대한 국화 정유의 최소사멸농도는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

이었고, *Staphylococcus aureus*에 대해서는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최소사멸농도로 보였다. *Listeria monocytogenes*에 대해서는 MBC 시험 농도(0~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 내에서 최소사멸농도가 관찰되지 않았다. Gram 음성균은 *Aeromonas hydrophila*와 *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*에 대해서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 최소사멸농도가 조사되었고, *Shigella sonnei*에 대해서는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 최소사멸농도가 조사되었다. 다만 *Salmonella choleraesuis*에 대해서는 시험 농도(0~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 내에서 최소사멸농도가 관찰되지 않았다. α -pinene과 $\alpha + \beta$ -thujone은 agar-well diffusion 분석법에서와 마찬가지로 MBC에서도 강한 항균력을 입증하였는데, *Salmonella* 균주를 제외한 모든 균주에 대해서 5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 최소사멸농도가 조사되었다. Camphor와 chrysanthemyl alcohol, γ -terpinene은 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 살균력이 나타나거나 대부분 시험 농도(0~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 내에서 최소사멸농도가 관찰되지 않았다.

4. 생육저해효과

시험 용액 중 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 조제액을 24시간 동안 배양하면서 4시간 간격으로 국화 정유가 식중독 균의 성장에 미치는 영향을 검토한 결과, 모든 균주에 대해서 균의 성장을 저해하는 효과를 볼 수 있었다(Fig. 1). 국화 정유와 국화 정유의 주성분인 camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha + \beta$ -thujone은 모든 균주에 대하여 생육저해 효과를 나타내었다. 특히 국화 정유와 α -pinene과 $\alpha + \beta$ -thujone은 균의 성장을 탁월하게 저해하는 것으로 나타났다. Camphor와 γ -terpinene은 다른 지표물질에 비하여 균의 성장의 저해

Table 4. Minimum bactericidal concentration(MBC) of essential oil of *C. morifolium*, its components against food-borne bacteria

Food-borne pathogens	Essential oil			Components			Antibiotics	
	<i>C. morifolium</i>	Camphor	Chrysanthemyl alcohol	α -Pinene	γ -Terpinene	$\alpha + \beta$ -Thujone	Ampicillin	Streptomycin
<i>A. hydrophila</i>	5	20	20	5	-	5	2.5	10
<i>S. choleraesuis</i>	-	-	-	5	-	-	5	5
<i>S. enterica</i>	5	-	-	5	-	-	5	5
<i>S. sonnei</i>	20	-	20	5	-	10	5	10
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	-	20	5	-	5	2.5	5
<i>V. vulnificus</i>	10	-	-	5	-	5	2.5	5
<i>B. cereus</i>	10	20	-	2.5	-	5	5	10
<i>B. subtilis</i>	10	20	-	2.5	-	5	5	10
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	5	-	20	5	10
<i>S. aureus</i>	20	-	-	5	-	5	2.5	10

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

¹⁾ Not showed antimicrobial activity.

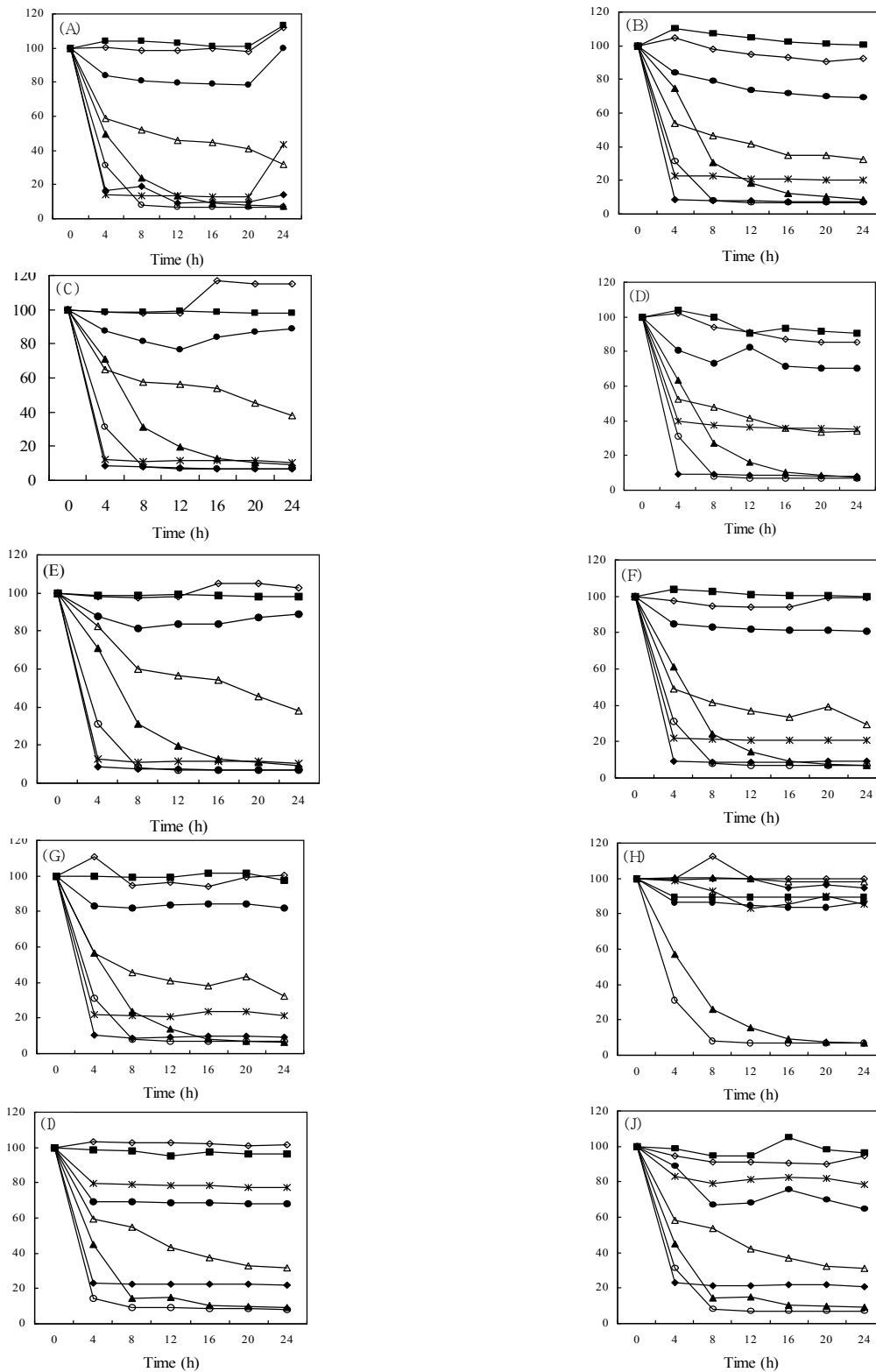


Fig. 1. Effect of the *Z. schinifolium* essential oil and components on the growth of bacteria. *B. cereus* (A), *B. subtilis* (B), *L. monocytogenes* (C), *S. aureus* (D), *A. hydrophila* (E), *S. choleraesuis* (F), *S. enterica* (G), *S. sonnei* (H), *V. parahaemolyticus* (I) and *V. vulnificus* (J). (*C. morifolium*; ▲, Camphor; ●, Chrysanthemyl alcohol; △, α -pinene; ○, γ -terpinene; ◆, $\alpha + \beta$ -thujone; *, Ampicillin; ◇, Streptomycin; ■).

가 비교적 미약하였다. *Shigella sonnei*에 대해서는 국화 정유와 α -pinene은 강력하게 균의 생장을 저해하였으나, 다른 성분들은 비교적 약한 저해 효과를 나타냈다. 모든 실험을 종합해 봤을 때, α -pinene과 $\alpha+\beta$ -thujone은 모든 균주에 대하여 다른 지표물질들에 비해서 탁월한 항균활성을 나타내었고, 이는 국화 정유성분의 항균활성에 가장 큰 영향을 미치는 물질이라고 판단된다. 식중독균의 성장곡선의 형태는 8시간까지 균의 생장이 급격히 감소되었다가 24시간까지 꾸준히 감소하는 경향을 보였다. 반면, 항생제 대조군인 ampicillin과 streptomycin은 4시간째까지는 균의 생장이 약간 증가하다가 이후 균의 생장이 없거나 감소되는 것으로 나타났다. 따라서 국화 정유와 그 주성분은 식품에 천연 보존료로서 첨가되었을 때 균의 생장을 강력하게 저해하고, 24시간 이상 항균력을 지속하여 식품의 저장성을 증가시킬 것으로 기대된다.

본 연구 결과를 보충하기 위하여 좀 더 광범위한 식중독 유발 세균에 대한 검증이 필요할 것으로 사료되며, 여러 가지 식품의 형태에 적용하여 식품의 저장기간 동안에 생물, 물리, 화학적으로 어떤 효과를 발휘하는지도 연구되어야 할 것이다.

요 약

국화 정유의 식중독균에 대한 항균력을 검증하기 위해 국화 정유와 그 주성분인 camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha+\beta$ -thujone를 10종 균주에 대하여 agar-well diffusion 분석법으로 생육 여부를 분석하였다. 실험 결과 국화 정유와 그 지표물질은 Gram 양성균과 음성균 모두에 대해서 탁월한 항균 효과가 나타났다. Agar-well diffusion 분석법 결과 국화 정유와 그 지표물질은 Gram 음성균보다 Gram 양성균에 대해서 강력한 활성을 나타내었다. 국화 정유의 minimum inhibitory concentration은 모든 균주에 대하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 균의 생장을 저해하는 효과가 나타났고, minimum bacteriocidal concentration은 *S. choleraesuis*와 *L. monocytogenes*에 대해서는 시험농도 내에서 사멸효과가 관찰되지 않았으나, 다른 균주에 대해서는 5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 살균력이 나타났다. 또한 액체 배양종의 항균효과를 조사한 결과, 국화 정유와 그 지표물질은 24시간 동안 꾸준히 항균력이 지속되었다. 따라서 camphor, chrysanthemyl alcohol, α -pinene, γ -terpinene, $\alpha+\beta$ -thujone를 조성분으로 함유한 국화 정유성분은 10종의 식중독균에 대한 항균활성이 입증되어, 천연 항균제재로서 식품보존료로서의 이용이 가능하리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원과 2009

년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국 연구재단 대학 중점 연구소 지원 사업(2009-0094018)으로 일부 이루어진 것으로, 이에 감사드립니다.

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* 38:805-811
- Cheng W, Li J, You T, Hu C. 2005. Anti-Inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linne. *J Ethnopharmacol* 101:334-337
- Choi S, Hong E, Lee J, Lee Y, Kim G. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of the ethanol extract of *Allium victorialis* L. var. *platyphyllum*. *Food Sci Biotechnol* 17: 313-318
- Chung BS, Lee BG, Shim ST, Lee CJ. 1989. Food culture society. *J Korean Meal Culture* 4:417
- 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
- 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* 18:646-649
- Gomez NE, Witte L. 2001. A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. *J Chem Ecol* 27:2351-2359
- Greig JD, Ravel A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *Int J Food Microbiol* 130:77-87
- Hedi M, Hafedh H, Ahmed A, Hanen N, Mohamed N. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chimie* 13:380-386
- 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:

523-529

- Hwang HC, Chu SH, Chao PD. 1991. Vasorelaxants from Chinese herbs emollient and scopolamine, process immunosuppressive properties. *Eu J Pharmacol* 198:211
- 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* 19:995-1001
- Jiang H, Li F, Zeng S. 2005. Capillary GC determination of β -elemene, camphor and borneol in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Yaowu Fenxi Zazhi* 25:508-511
- KFDA (Korea Food & Drug Administration). 2009. <http://fm.kfda.go.kr/>.
- 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* 12:637-642
- Lee CB. 1997. Korea Botanical Book. Jinmyung Publication Co., Seoul, pp.292
- Lee H, Lin JY. 1998. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat Res* 204:229
- Lee SK, Park JH, Kim YT. 2009. A study on the antioxidation and antimicrobial effect of Megmoonjong(*Liriope platyphylla* Wang et Tang) water extracts. *Korean J Food & Nutr* 22:279-285
- Lee SD, Park HH, Kim DW, Bang BB. 2000. Bioactive constituents and utilities of *Artemisia* sp. as medical herb and foodstuff. *Korean J Food & Nutr* 13:190-505
- Lee SH, Lim YS. 1998. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27:239-243
- Mann CM, Markham JL. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol* 84:538-544
- Medeiros R, Passos GF, Vitor CE, Koepp J, Mazzuco TL, Pianowski 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* 151:618-627
- Misaghi A, Basti AA. 2007. Effects of *Zataria multiflora* boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control* 18:1043-1049
- 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* 18:387-390
- Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Guolin Z. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J Ethnopharmacol* 96:151-158
- 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. *Ethnopharmacol* 103:99-102
- Tauxe RV. 2002. Emerging foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 78:31-41
- Wang Y, Guo Q, Yang X. 2008. Characterization of chemical components of essential oil from flowers of *Chrysanthemum morifolium* produced in Anhui province. *China J of Chinese Materia Medica* 33:2211-2213
- Wang Y, Yang X. 2006. GC-MS Analysis of essential oil of the flower of the *Chrysanthemum morifolium* by the different processing methods. *China J Chinese Materia Medica* 31:456-459
- Yu JQ, Lei J, Yu H, Cai X, Zou G. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochem* 65:881-884
- Zafrapolo MC, Blazquez MA. 1991. Antiinflammatory activity of sesquiterpene lactone from *Artemisia barrelieri* in rats. *Phytotherapy Research* 5:91

(2010년 3월 30일 접수; 2010년 5월 19일 채택)