

백작약 추출물이 식중독 유발 세균의 증식에 미치는 영향

배 지 현[†]

계명대학교 식품영양학과

Effect of Extracts from *Paeonia japonica* on the Growth of Food-borne Pathogens

Ji-Hyun Bae[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

Paeonia japonica has been widely used as a folk remedy for a long time. This study was performed to investigate antimicrobial substance of *P. japonica* extracted with petroleum ether, chloroform, ethylacetate, methanol or hot water. The antimicrobial activities of the *P. japonica* extracts were determined using a paper disc method and liquid culture. The methanol fraction at a concentration of 10 mg/mL showed the strongest antimicrobial activity against *Salmonella typhimurim* KCCM 11862. The ethylacetate fraction (5 mg/mL) showed the highest antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* KCCM 11593. In a study using liquid culture, the ethylacetate fraction from *P. japonica* showed the highest anti-microbial activity against *S. aureus* KCCM 11593 in a concentration range of 5~10 mg/mL. All fractions prepared from *P. japonica* inhibited the growth of *S. aureus* KCCM 11593 under our culture conditions.

Key words : *Paeonia japonica*, antimicrobial activity, food-borne pathogens.

서 론

평균 수명의 연장과 더불어 성인병 발생이 더욱 증가하고 있고, 생활 환경의 변화와 함께 건강에 대한 관심도 더욱 고조되고 있다. 세계적인 이상 기후 현상으로 인해 간단한 먹거리에서부터 각종 식량 자원의 공급 등이 불안정해지고 있고, 이로 인해 해외에서 값싼 식품 재료 등의 수입을 점차 증가시키고 있다. 축산물을 수입하는 경우, 이들의 유통 기한과 저장 등의 과정 중 콜레라, 이질 및 각종 식중독 유발 미생물 등의 오염이 일어날 확률이 높아지고 있는 실정이며, 기타 수입 식품의 범람으로 우리의 식탁이 여러 가지 위생학적인 위험성에 노출되어 있다. 한편, 이와 같은 식품 위생상 식품의 안전성을 확보하기 위해 최근에는 한방용 식물이나 나뭇잎, 종실, 과피, 뿌리 등에서 새로운 항균성 물질을 탐색하려는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다(Choi *et al* 2008, Park *et al* 2008, Kang SK 2005). 미생물에 의한 식품의 부패와 변질을 방지하고, 식중독 사고를 예방하기 위하여 여러 종류의 합성 보존료를 사용하고 있으나, 소비자들은 합성 첨가물의 안전성에 문제가 있다고 인식하고 있으며(Brewer *et al* 1994), 천연 항균성 물질을 검색하여 이를 식품에 안전하게

사용하기를 희망하고 있다 (Gould GW 1996). 천연물의 항균 작용에 관한 연구는 쑥(Kwon *et al* 1997), 솔잎(Koo *et al* 1997), 녹차(Senji *et al* 1989), 지치 등의 한약재(Park *et al* 1992a), 마늘(Kumar & Berwal 1998), 민들레(Kim *et al* 1998a), 정향(Park & Choi 1997, Park CS 1998) 등의 다양한 식용 식물이 각종 유해 세균에 대하여 항균 활성이 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 식용 식물은 항산화성(Kang *et al* 1998, Dapkevicius *et al* 1998)을 비롯한 건강 기능성 식품 소재로서의 부가가치를 가지고 있기 때문에 바람직한 천연 보존 재료로 인식되고 있으며(Jung & Jung 1992, Park *et al* 1998), 이들 식용 식물이나 그 추출물을 직접 식품에 이용한 연구로 쑥을 첨가한 빵과 떡의 저장성 향상(Kim *et al* 1998b) 등이 보고되고 있다. 본 연구에서는 이와 같은 천연물의 식품 보존 재료로의 개발 가능성을 염두에 두고 백작약 추출물이 각종 식중독 유발 세균의 증식에 미치는 항균 효과를 검증해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비 및 사용 균주

대구광역시 소재 한약방에서 구입한 백작약을 이물질을 제거하고 깨끗이 씻어 말린 뒤 추출관에 넣고 methanol(J. T. Baker USA)을 첨가하여 상온에서 추출물을 조제하였다. 또한 백작약을 증류수에 넣고 100℃에서 30분간 끓인 후 여과

[†] Corresponding author : Ji-Hyun Bae, Tel : +82-53-580-5875, E-mail : jhb@kmu.ac.kr

시켜 열수 추출물을 모았다. 불순물을 제거하기 위하여 Whatman No. 2 여과지로 여과하고, 감압 농축기(EYELA TYPE N-N SERIES, Japan)로 65°C에서 감압, 농축시키고 동결 건조한 후 -18°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 균주는 Table 1에서와 같이 Gram(+)세균 2종과 Gram(-)세균 6종을 한국 미생물 분양센터에서 분양받아 Trypic Soy Agar(Difco, USA)와 Trypic Soy Broth(Difco, USA)를 사용하여 37°C에서 계대 배양하였다.

2. 백작약 추출물의 용매 계통 분획

백작약의 메탄올 추출물을 petroleum ether, chloroform, ethylacetate 및 methanol 등의 4가지 유기 용매를 사용하여 Fig. 1과 같이 계통 분획하였다.

백작약의 methanol 추출물을 약 2배의 증류수에 재 용해시키고 분액 깔대기를 이용해, 1/3배의 부피 비율로 petroleum ether를 첨가한 후 3분간 shaking하고 30분간 정치하여 두 층을 분리되게 한 후 petroleum ether 분획층을 받아 모았다. 나머지 수용성 분획물에 chloroform, ethylacetate 및 methanol을 순차적으로 첨가하여 각각의 분획물을 얻었다. 이상의 방법으로 준비된 백작약의 petroleum ether, chloroform, ethylacetate 및 methanol추출물은 65°C에 감압 농축하고 desicator에 보관하면서 사용하였다.

3. 백작약의 항균력 측정

백작약의 항균성 물질을 검색하기 위해 본 실험에서는 paper disc 방법을 사용하였다(Hughey & Johnson 1987). TSB 배지에 접종한 세균을 600 nm에서 O.D.값 0.25까지 성장시킨 후 TSA 배지가 분주된 배양 접시에 균일하게 섞은 후 실온에서 균히고 멸균된 paper disc를 올려 밀착시켰다. 각 용매별 백

작약 추출물 20 μ L를 paper disc에 천천히 흡수시켜 배지에 스며들게 하고, 37°C에서 24시간 배양한 다음 disc 주변에 생성되는 clear zone의 직경(mm)을 측정하였다. 또한 액체 배지에 접종한 세균을 흡광도(600 nm)가 1.0이 되도록 현탁하고, 여기에 membrane filter(0.45 μ m)로 제균한 각 추출물을 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도로 각각 첨가하였다. 37°C의 호기성 조건에서 18시간 동안 배양한 다음 600 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 성장 억제 효과를 조사하였다.

결과 및 고찰

1. Disc Agar Diffusion 법에 의한 백작약 추출물의 항균 활성

백작약의 각종 유기용매 추출물 및 수용성 분획물을 각종 식중독 유발 세균에 적용시켜 항균 실험해 본 바, 백작약의 petroleum ether, chloroform, ethylacetate, methanol 추출물 및 열수 추출물 항균 활성은 disc에 점적한 백작약의 각종 추출물의 농도가 증가할수록 항균 활성이 크게 나타났다. 즉, 농도가 증가할수록 항균 활성을 나타내는 inhibition zone의 크기가 증가하여 ethylacetate 추출물의 경우 *Staphylococcus aureus*에 대해 10 mg/mL 농도에서 31 mm로 가장 큰 활성도를 나타내었다(Table 2). 본 연구에 사용한 모든 균주에 대해 항균 효과가 나타남을 알 수 있었고, 특히 Gram(-)균 중에서는 *Salmonella typhimurium*에 대한 항균력이 가장 높게 나타났으며,

Table 1. Microorganisms used for testing antimicrobial activity of *Paeonia japonica*

Gram(+) bacteria
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11593
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCCM 35494
Gram(-) bacteria
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 11862
<i>Salmonella paratyphimurium</i> KCCM 41577
<i>Shigella dysenteriae</i> KCCM 11936
<i>Shigella flexneri</i> KCCM 40414
<i>Shigella sonnei</i> KCCM 40949
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCCM 11321

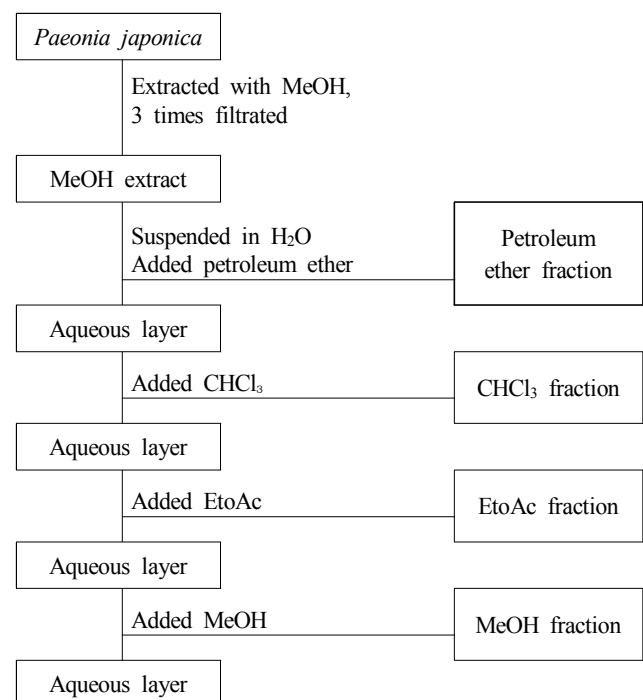


Fig. 1. Fractionation procedure of *Paeonia japonica*.

Gram(+)균에서는 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균력이 높게 나타났다. 각종 추출 분획물별 항균 효과는 백작약의 methanol 추출물이 10 mg/mL 농도에서 *Salmonella typhimurium*에 대해 가장 높은 활성을 보였고, ethylacetate, chloroform, petroleum ether 순으로 항균 활성을 드러내었다(Table 3). Hhwang JS(2001)의 연구에 의하면 백작약의 methanol 추출물은 1,500

$\mu\text{g/mL}$ 농도에서 *S. aureus* 및 *E. coli* 균에 대해 성장 억제 효과를 보인다고 하였으며, 본 연구에서도 백작약의 methanol 추출물은 2.5 mg/mL, 5 mg/mL에서도 모든 균종에 대해 항균 활성을 보였다. *Staphylococcus aureus*에 대한 백작약의 항균력은 ethylacetate 추출물에서 가장 높은 효과를 나타내, 백작약의 ethylacetate 추출물의 경우 5 mg/mL 농도에서도 30 mm의 clear zone이 생겨 큰 활성을 나타내었다(Fig. 2). 한편, 백작약의 열수 추출물은 유기용매 추출물보다 항균력이 크게 나타나지 않았고, 10 mg/mL 농도에서만 약간의 항균 활성이 나타났다. 일반적으로 식물의 petroleum ether 추출층에는 지방, 왁스, 정유성분 및 소량의 배당체가 용출되는 것으로 알려져 있고, ethylacetate 추출물층에는 phenol류 terpenoid 및 flavonoid 등의 성분이 용출되는 것으로 알려져 있는데, flavonoid계 중 ponciretin, irisolidone, cabreuvin 등의 성분은 *Helicobacter pylori*에 대한 항균 효과가 우수하다고 보고(Bae et al 1999)된 바 있어 본 실험에 사용한 백작약의 methanol과 ethylacetate 추출물에도 이와 유사한 항균 성분들이 함유되어 있으리라 사료된다. 그러나 백작약의 경우, 특정 분획 추출물에서만 항균 활성이 나타나는 것은 아닌 것으로 보아, 백작약의 항균성 물질은 특정 용매에서만 용출되는 것이 아니라 극성의 차이가 다른 용매에서도 용출되는, 한 가지가 아닌 여러 가지 성분이 복합된 것으로 보여진다. 한편, Kim et al(1996)은 대나무잎(*Sasa coreana* Nakai)의 petroleum ether 추출물이 *Staphylococcus aureus*에 대한 강한 항균 활성이 있다고 보고한 바 있고, Bae et al(2005)은 겨우살이(*Viscum album* var. *coloraum*)의 methanol 추출물이 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*에 대해 높은 항균 효과를 나타낸다고 하였다. 본 연구에 사용한 백작약의 경우, 백작약의 유기 용매 추출물은 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 효과가 나타났으나,

Table 2. Antimicrobial activities of the methanol extract and its solvent fractions of *Paeonia japonica* against foodborne pathogens

Strains	Fraction conc. (mg/mL)	Clear zone on plate(mm)				
		M	P	C	E	W
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.5	—	—	—	—	—
	5	14	15	19	30	11
	10	15	16	20	31	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.5	—	—	—	—	—
	5	11	12	15	18	10
	10	12	13	18	19	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5	10	10	10	12	—
	5	12	11	11	13	11
	10	12	12	12	14	12
<i>Salmonella typhimurium</i>	2.5	12	10	10	12	—
	5	12	10	11	14	—
	10	18	12	13	16	10
<i>Salmonella paratyphimurium</i>	2.5	—	—	—	9	—
	5	9	9	9	11	—
	10	10	11	12	13	9
<i>Shigella sonnei</i>	2.5	—	—	10	10	—
	5	12	9	11	11	—
	10	13	10	12	13	9
<i>Shigella dysenteriae</i>	2.5	—	—	9	12	—
	5	9	10	11	13	—
	10	11	11	12	13	9
<i>Shigella flexneri</i>	2.5	—	—	—	11	—
	5	9	11	12	12	9
	10	10	12	14	13	10

M : Methanol fraction P : Petroleum ether fraction.
C : Chloroform fraction E : Ethylacetate fraction.
W : Hot water extract — : No inhibitory zone was formed.

Table 3. Antimicrobial activities of the methanol extract and its solvent fractions of *Paeonia japonica* against *Salmonella typhimurium*

	Concentration(mg/mL)			
	0	2.5	5	10
<i>Portulaca oleracea</i>				
	Inhibition zone diameter(mm)*			
Petroleum ether fraction	—	10	10	12
Chloroform fraction	—	10	11	13
Ethylacetate fraction	—	12	14	16
Methanol fraction	—	12	12	18
Hot water extract	—	—	—	10

* Disk diameter(8.0 mm) was included.

— No inhibitory zone was formed.

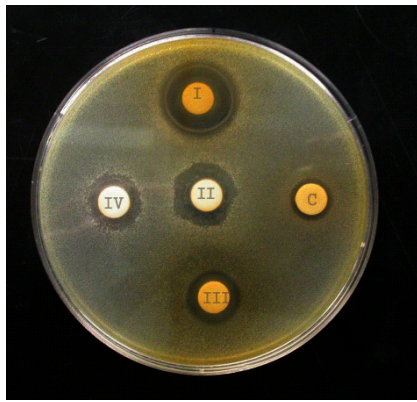


Fig. 2. Antimicrobial activities of the methanol extract and its solvent fractions of *Paeonia japonica* against *Staphylococcus aureus* at the concentration of 5 mg/mL.

C : Control (70% ethanol)
I : Ethylacetate fraction
II : Chloroform fraction
III : Petroleum ether fraction
IV : Methanol fraction

백작약의 증류수 추출물은 낮은 농도에서는 항균성이 별로 나타나지 않았고, 이는 여러 가지 원인이 있겠지만, 추출 과정에서의 고온 처리로 인해 항균성 물질이 다소 소실되었거나 실험 과정에서 수용성 항균 물질이 agar plate내로 확산되지 않았기 때문으로 보여진다.

2. 액체배양법에 의한 백작약 추출물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성

액체배양법으로 백작약의 각종 유기용매 추출물 및 열수 추출물을 Gram(+)균인 *Staphylococcus aureus*에 적용시켜 실험해 본 바 Fig. 3과 같은 결과를 얻을 수 있었다. *Staphylococcus aureus*에 대한 백작약의 petroleum ether, chloroform, ethylacetate, methanol 추출물 및 열수 추출물의 항균 활성은 *Staphylococcus aureus*를 배양한 액체배지에 각종 추출물의 첨가 농도를 증가시킬수록 항균 활성이 크게 나타남을 알 수 있었다. 즉, 농도가 증가할수록 *Staphylococcus aureus*의 성장을 저해하였고, 이 효과는 37°C에서 18시간 배양할 때까지 유지되었다. 백작약의 ethylacetate 추출물이 5~10 mg/mL 농도에서 가장 저해 효과가 높게 나타났으며, chloroform 추출물은 10 mg/mL 농도에서 우수한 항균 효과를 나타내었다. 한편, 백작약에 함유되어 있는 성분으로는 lignan류(phillygenin, pinoselinol, arctigenin, matairesinol), lignan glucoside류(phillyrin, pinoselinol- β -D-glucoside, arctin, matairesinoside), flavonoid(rutin) 및 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoyl glycoside류 (forsythiaside, acetoside, suspensaside 및 β -hydroxyacetoside)등이 있는데, 이 성분들 중 forsythoside B, C 및

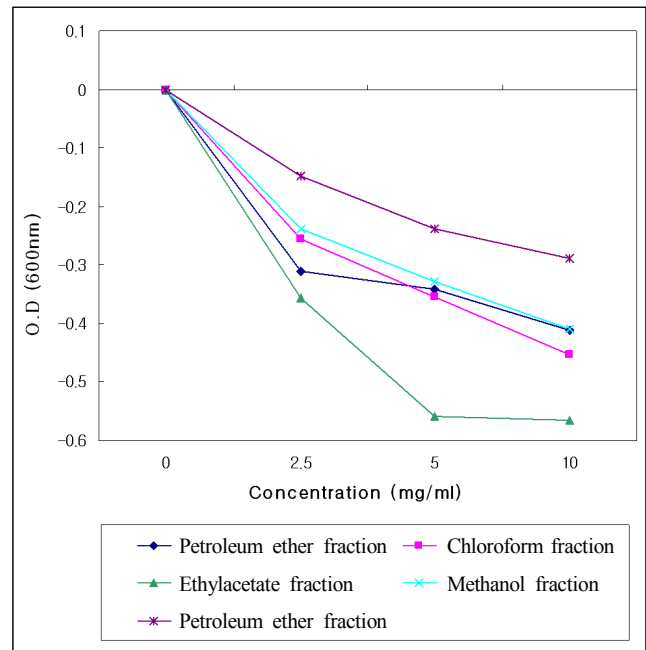


Fig. 3. Dose-dependent decreases of cell growth OD (600 nm) by treatment of the methanol extract and its solvent fractions of *Paeonia japonica* against *Staphylococcus aureus*.

D와 suspensaside 등이 항균 작용이 있다고 보고된 바 있다 (Yeo *et al* 1995, Park *et al* 1992b).

요 약

본 연구에서는 과거부터 민간이나 한방에서 널리 사용되어져 온 백작약의 식중독 유발 세균에 대한 항균 활성을 조사해 보고자 하였다. 백작약을 petroleum ether, chloroform, ethylacetate 및 methanol의 4가지 유기용매 및 열수에 추출하고, Gram(+)세균인 *Staphylococcus aureus* 및 *Staphylococcus epidermidis*와 Gram(-)세균인 *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* 및 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 성장 억제 실험을 해 본 바, 백작약의 methanol 추출물이 10 mg/mL 농도에서 *Salmonella typhimurium*에 대해 가장 높은 항균력을 나타내었다. *Staphylococcus aureus*에 대한 항균력은 백작약의 ethylacetate 추출물이 5 mg/mL에서 가장 큰 항균 효과를 보였으며, 액체 배지에 배양한 경우 5~10 mg/mL 농도에서 18시간까지 성장 억제 효과가 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌습니다.

문헌

- Bae EA, Han MJ, Kim DH (1999) *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Medica* 65: 442-443.
- Bae JH, No SH, Park HJ (2005) Antimicrobial effect of *Viscum album* var. *coloratum* extracts on food-borne pathogens. *J East Asian Soc Dietary Life* 15: 182-187.
- Brewer MS, Sprouls GK, Russon C (1994) Consumer attitudes toward food safety issues. *J Food Safety* 14: 69-76.
- Choi SI, Chang KM, Lee YS, Kim GH (2008) Antibacterial activity of essential oils from *Zanthoxylum piperitum* A. P.DC. and *Zanthoxylum schinifolium*. *Food Science and Biotechnology* 17: 195-198.
- Dapkevicius A, Venskutonis R, Beek T, Linssen JP (1998) Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agric* 77: 140-146.
- Gould GW (1996) Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Food Prot Suppl.*: 82-26.
- Hhwang JS (2001) The identification and the effects of antimicrobial compounds from *P. japonica* and *P. suffruticosa*, and their effects on processed foods *Ph D Dissertation* Sookmyung Womens University, Seoul, p. 5-128.
- Hughey VL, Johnson EA (1987) Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl Environ Microbiol* 53: 2165-2170.
- Jung DY, Jung JH (1992) Studies on antimicrobial substances of *Canoderma lucidum*. *Korean Journal of Food Sci* 24: 552-557.
- Park CS (1998) Effect of clove (*Eugenia caryophyllata* Thumb.) on the survival of *Escherichia coli*. *Korean J Cooking Sci* 14: 9-15.
- Park CS, Choi MA (1997) Effect of clove (*Eugenia caryophyllata* Thumb.) on the survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* during cold storage. *Korean J Cooking Sci* 13: 602-608.
- Park HS, Jun DY, Fang Z, Woo MH, Kim YH (2008) Antimicrobial activity of seeds of *Zanthoxylum piperitum* against oral pathogen *Streptococcus mutans*. *J Life Sci* 18: 167-174.
- Park NY, Lee KD, Jung YJ, Kim HG, Kwon JH (1998) Optimization for electron donating ability and organoleptic properties of ethanol extracts from *Chrysanthemum petals*. *Korean Journal of Food Sci* 30: 523-528.
- Park WY, Jang DS, Cho HR (1992a) Antimicrobial effect of *Lithospermi radix* (*Lithospermum erythrorhizon*) extract. *Korean J Food Science and Nutrition* 21: 97-100.
- Park YW, Jang DS, Jo HR (1992b) Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *Korean J Food Science and Nutrition* 21: 91-96.
- Kang SK (2005) Antimicrobial activities in the Korean traditional leaf mustard, *Brassica juncea* Coss. *Kor J Plant Res* 8: 92-102.
- Kang WS, Kim JH, Park YJ, Yoon KR (1998) Antioxidative property of turmeric (*Curcuma rhizoma*) ethanol extract. *Korean Journal of Food Sci* 30: 266-271.
- Kim DJ, Byun MW, Jang MS (1996) Physiological and antibacterial activity of bamboo (*Sasa coreana* Nakai) leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 135-142.
- Kim GH, Chun HJ, Han YS (1998a) Screening of antimicrobial activity of the Dandelion (*Taraxacum platycarpum*) extract. *Korean J Cooking Sci* 14: 114-118.
- Kim SY, Kim KJ, Jung HW, Han YS (1998b) Effect of mugwort on the extension of shelf-life of bread and rice cake. *Korean J Cooking Sci* 14: 106-113.
- Koo JH, Ha SJ, Park JH (1997) Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*. *Korean Journal of Food Sci* 29: 204-210.
- Kumar M, Berwal JS (1998) Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *J Appl Bacteriol* 84: 213-215.
- Kwon DJ, Park JH, Kwon M, Yoo JY, Goo YJ (1997) Optimal extracting condition of growth-inhibitory component of wormwood (*Artemisia princeps*) against *Clostridium perfringens*. *J Applied Biological Chemistry* 40: 267-270.
- Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric Biol Chem* 53: 2307-2310.
- Yeo SK, Ahn CW, Kim IS, Park YB, Park YH, Kim SB (1995) Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *Korean J Food Science and Nutrition* 24: 293-298.