J. Fd Hyg. Safety 15(1), 36–40 (2000)

일부 식품부패성 미생물에 대한 관중의 항균활성

곽이성† · 김미주 · 안대진 · 이종철
한국인삼연초연구원

Antimicrobial Activity of *Dryopteris rhizoma* against Some Food Spoilage Microorganisms

Yi-Seong Kwak†, Mi-Ju Kim, Dae-Jin Ahn and Jong-Chul Lee
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Shinseong-dong, Youseong Ku, Taejeon 305-345, Korea

ABSTRACT – This study was carried out to know the active fraction of Dryopteris rhizoma on antimicrobial activity against some food spoilage microorganisms. Also, antimicrobial activities were investigated for the aqueous and ethanolic extracts of four herbs such as *Terminaliae fructus*, *Eugeniae flos*, *Salviae miltiorrhizae radix* and *Dryopteris rhizoma*. Antimicrobial activities of three herbs except for Terminaliae fructus showed higher activities in 75% ethanolic extracts than in aquoeus extract. Ethanolic extract of Dryopteris rhizoma showed the highest antimicrobial activity among extracts of four herbs. Antimicrobial activity intensities of solvent fractions of Dryopteris rhizoma extracted by 75% ethanol were order to $CHCl_3$ fraction>EtOAc fraction >BuOH fraction>H_2O fraction. The $CHCl_3$, EtOAc and BuOH fractions also inhibited growth of food spoilage microorganisms as the concentration increased, respectively. In case of EtOAc fraction, 1000 ppm of fraction almost inhibited completely the growth of microorganisms tested.

Key words □ *Dryopteris rhizoma*, Antimicrobial activity, Food spoilage microorganism.

항균활성에 대한 연구는 미생물, 지의류 및 고등식물을 소재로 하여 많이 이루어져 왔다.[1,2,3] 특히 생약재의 항균활성 연구는 생약재에 의한 항균성 여부[4] 및 함량별 항균력,[5] 식품의 부패관여균에 대한 항균효과,[3] 사과나무 부란병균[6] 등의 식물병원균에 대한 항균효과가 보고된 바 있다.

식품에서의 저장성 부여는 열처리, 건조, 냉동, 냉장, 각종 절임 등의 살균 또는 정균방법 등이 있으며 각각 신선도, 맛, 냄새, 장기저장면에서 장·단점이 있다. 이들 중 열처리는 영양소 파괴 및 경제성을 고려할 때 열처리를 최소화하는 것이 바람직한데 이 방법으로는 결국 부패성 미생물의 충분한 사멸은 기대하기 어렵기 때문에 이에 대한 미생물학적 저지수단으로 화학적 합성물을 사용하고 있으나 대부분의 화학적 합성물은 그 안전성이 문제되고 있다. 또한 최근에는 소비자의 건강지향적 욕구가 증대됨에 따라 식품기업에서도 인공합성 첨가물 대신에 생약으로부터 특정성분을 추출하여 이를 미생물의 증식억제 및 살균에 이용하려는 시도가 이루어지고 있으나 실용화된 사례는 그리 많지않다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

따라서 본 연구는 천연 식품보존제의 개발에 이용할 목적으로 일부 식품 부패성 미생물에 대해 강한 항균활성을 보인 관중에 대한 용매 추출분획물 별로 식품 부패성 미생물들에 대한 항균활성을 조사하였다. 더불어 식품부패성 세균 *Bacillus subtilis*에 항균활성이 강했던 가자, 관중, 단삼, 정향의 물추출물과 ethanol 추출물을 이용하여 일부 식품부패성 미생물을 대상으로 항균활성을 조사하여 얻어진 결과를 보고 하는 바이다.

재료 및 방법

미생물 균주

실험에 사용한 미생물은 주로 식품의 부패성에 관여하는 균주로 한국인삼연초연구원(대전)에 보관중인 *Escherichia coli* AB1157, *Bacillus subtilis* IAM1069, *Staphylococcus aureus* ATTC 65389, *Pseudomonas fluorescence* ATCC21541을 사용하였다.

실험재료 및 추출 · 분획

시료(가자, 관중, 단삼, 정향)는 대전시내의 한약방에서 구

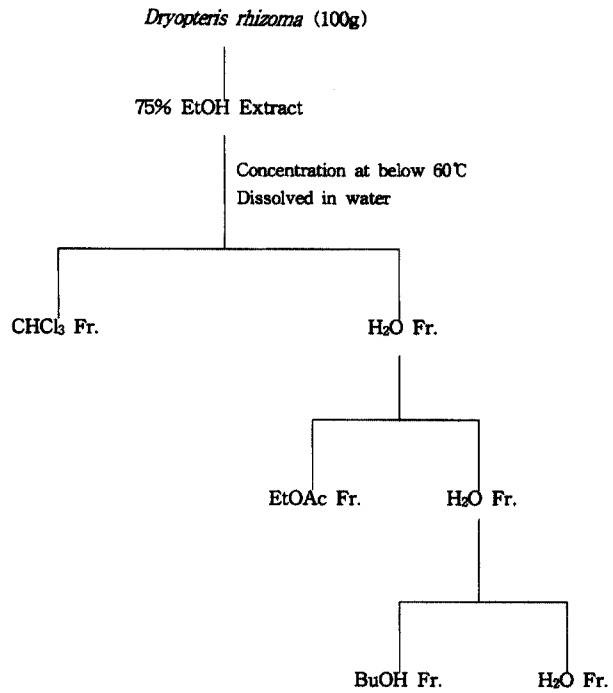

Fig. 1. Schematic representation of solvent fractionation of *Dryopteris rhizoma*.

입한 것이었으며, 이를 분쇄하여 환류냉각관을 부착시킨 플라스크에 5 배의 물 또는 75% ethanol를 가하여 85 ℃의 water bath에서 3시간씩 2회 반복하여 추출한 후 여과(Whatman No.1)하여 60℃이하에서 감압·농축하여 추출물을 얻었다.

관중추출물의 분획제조는 위와 같은 방법으로 얻은 ethanol 추출물을 일정량의 증류수로 현탁시킨 후 Zaika,[7] Chung 등[8]의 방법을 변형하여 Fig.1에서 보는 바와 같이 순차적으로 EtOAc, BuOH 및 H_2O 분획물을 각각 얻었다. 물과 ethanol 추출물에 대한 soluble solid 함량조사는 Park and Kim의 방법[6]에 준하여 추출물 1 ml를 취하여 105℃에서 3시간 건조후 증발잔사의 양으로 하였고, 관중의 용매 추출분획물에 대한 soluble solid 조사는 각 추출분획물을 60℃ 이하에서 감압·농축한 다음 일정량의 dimethyl sulfoxide (sigma, DMSO)에 용해시킨 후 soluble solid 함량(%)을 계산하였다.

항균활성 검색

생약재 추출물의 항균활성은 paper disc 방법[16]에 의해 검색하였다. 즉, 사면 배양된 각 균주 1 백금이를 취해 10 ml의 trypticase soy broth(TSB; Difco. USA)에 접종하여 37℃에서 12시간 배양하여 활성화시킨 배양액 0.1 ml을 pour plate 방법[9]에 의해 45℃로 식힌 nutrient agar(NA; Difco. USA) 배지와 함께 접종하였다. 배양액이 접종된 agar plate는 clean bench안에서 충분히 건조시킨 후 멸균된 paper disc (Advantec, TOYO ϕ8 mm)을 올려놓고 시료 추출물을 50 µl 흡수시킨 후 37℃에서 48시간 배양하여 disc 주위의 clear zone의 직경(mm: disc 자체의 직경포함)으로 항균활성의 정도를 비교하였다. 대조군으로 인공합성 보존료인 안식향산나트륨(sodium benzoate: 친화약품, 서울)을 사용하여 생약재 추출물의 항균활성 측정농도와 유사(0.10–0.20 mg/µl)한 농도인 0.2 mg/µl으로 조절한 후 항균활성을 조사하였다.

미생물의 성장억제 농도측정은 항균활성 검색용 균주와 같은 방법으로 배양·활성화시켜 그 배양액 0.1 ml을 추출물분획이 첨가된 TSB 배지에 접종하여 37℃에서 경시적으로 배양하면서 항균효과를 측정하였다. 추출 분획물의 농도별 항균효과는 spectrophotometer를 사용하여 620 nm에서 흡광도를 측정[6,10]하여 추출 분획물만을 넣은 blank와 실험구간의 차이로 결정하였다.

결과 및 고찰

추출물의 항균활성 검색

가자, 관중, 단삼, 정향의 물 및 ethanol 추출물별로 부패미생물에 대한항균활성을 검색한 결과는 Table 1과 같다. 가자의 물추출물과 ethanol 추출물과, 단삼, 관중의 ethanol 추출물은 *S. aureus*에 대하여 각각 항균활성 효과가 있었으나 정향의 물 및 ethanol 추출물은 모두 그 효과가 전혀 없었다. *E. coli*에 대하여 관중, 단삼, 정향의 ethanol 추출물은 강한 항균활성을 나타내었으나 물추출물에서는 항균활성이 전혀 없었으며, 가자의 ethanol 추출물도 그 활성이 없었다. *B. subtilis*에 대하여 가자의 물추출물 및 단삼, 관중의 ethanol 추출물이 강한 항균효과를 나타내었고, *P. fluorescence*에 대하여는 가자의 ethanol 추출물만이 항균효과를 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 보면 물추출물의 경우는 가자가 *S. aureus*과 *B. subtilis*에 활성이 있었던 것을 제외하고는 관중, 단삼, 정향은 항균활성이 전혀 없었다. 그러나 ethanol추출물의 경우는 단삼과 정향이 *P. fluorescence*을 제외한 3 균주 모두에 대해 강한 항균활성을 보였다. 이러한 결과는 유백피의 약효연구[7] 및 항진균실험[11]에서 물추출물에 비해 알콜추출물이 항균력이 강하였다는 결과와도 유사한 경향이었다. 또한 관중의 ethanol 추출물은 *P. fluorescence*를 제외한 3 균주 모두에 대한 clear zone이 14.1–18.3 mm이었고, 가자의 ethanol 추출물은 *P. fluorescence*에 대한 clear zone이 31.6 mm이었다.

이들의 clean zone의 크기는 본 실험에서 처리한 생약재

Table 1. Antimicrobial activities of aqueous and ethanolic extracts of *Terminaliae fructus*, *Eugeniae flos*, *Salviae miltiorrhizae radix* and *Dryopteris rhizoma* (Unit : inhibition zone diameter with disc, mm)

Herbs (extracts)	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Bacillus subtilis*	*Pseudomonas fluorescence*	Soluble solid1)
Terminaliae fructus (H_2O ext.)	8.9	-	11.5	-	0.12
Terminaliae fructus (EtOH ext.)	10.5	-	-	31.6	0.15
Eugeniae flos (H_2O ext.)	-	-	-	-	0.14
Eugeniae flos (EtOH ext.)	-	8.2	8.5	-	0.10
Salviae miltiorrhizae radix (H_2O ext.)	-	-	-	-	0.13
Salviae miltiorrhizae radix (EtOH ext.)	9.9	11.6	10.1	-	0.12
Dryopteris rhizoma (H_2O ext.)	-	-	-	-	0.14
Dryopteris rhizoma (EtOH ext.)	18.3	14.3	14.1	-	0.13
Na-benzoate[2)]	12.0	10.8	11.0	10.9	0.20

Antimicrobial activity was investigated after incubation at 37°C for 2 days on nutrient agar medium.
[1)]Soluble solid means mg of soluble solid content of extract per disc.
[2)]Na-benzoate was used as 0.2 mg/μl.

추출물의 농도 (0.10–0.20 mg/μl)와 유사한 0.2 mg/μl으로 인공합성보존료인 안식향산나트륨 (sodium benzoate)을 사용하였을 경우 clear zone의 크기가 10.8–13.5 mm으로 생약재 처리군에 비해 작은 것으로 나타났다. 따라서 관중과 가자의 ethanol 추출물은 식품 보존재로 이용할 가치가 매우 높을 것으로 생각되어진다.

식중독은 여러 가지 원인에 의해서 발생 할 수 있으나 세균성 식중독이 대부분을 차지하고 있다. 원인균으로는 *Staphylococcus*, *Salmonella*속 세균에 의한 식중독이 대부분이며 그 밖에 *Clostridium*, *Escherichia*, *Shigella*, *Vibrio*, *Bacillus*속 등도 식중독의 원인균으로 알려져 있다.[12] Choi[13]는 향부자의 경우 식중독에 효과가 있는 이유는 향부자가 *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*속 등에 항균효과가 있기 때문이라고 하였는데 본 실험에서 도 관중이 식중독 원인균인 *S. aureus*, *E. coli* 등에 대하여 강한 항균효과를 보여 이러한 생약재 이용으로 추후 이러한 미생물이 발생시키는 식중독의 병리기전을 조절할 수도 있을 것으로 생각된다.

관중의 ethanol 추출물에서 항균활성 물질을 분리할 목적으로 $CHCl_3$, EtOAc, BuOH 및 H_2O로 분획하여 그 항균활성을 검색한 결과는 Table 2와 같다. 물분획물이 *B. subtilis*에 대하여 항균활성이 없었던 것을 제외하고는 모든 분획물이 *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*에 대하여 항균효과가 있었다. 분획물별로는 실험대상 미생물 모두에 대하여 $CHCl_3$ 분획물이 가장 높은 항균성을 보였고 그 다음으로 EtOAc 분획물이었으며 BuOH 분획물도 비교적 강한 항균력을 나타내었다. 또한 물분획물도 미약하지만 *S. aureus* 및 *E. coli*에 항균활성을 나타내었다. 이러한 결과는 관중에 함유된 항균활성물질은 특정용매에만 용해되지 않고 여러 용매에 용해되는 것으로 생각되며 이는 Briozzo 등[14] 및 Chen 등[15]이 12 가지 식품부패성 미생물을 대상으로 생약재의 분획별 항균활성을 조사한 결과 여러 용매분획물에서 항균활성이 검색되었다는 보고와 유사한 결과이었다. 그리고 관중의 $CHCl_3$ 및 EtOA 분획물에서 항균활성이 강하였던 것은 관중에 함유된 항균활성물질이 이들 분획에 많이 용해되어 있는 것으로 생각되어지며, 또한 용매 분획물별로 각 균주에 대한 항균활성이 다른 것은 항균활성물질이 단일물질이 아닐 수 있다는 것을 시사한다고 할 수 있다. 분획물별 항균활성에 관하여 Zaika[7] 는 유백피의 BuOH 분획물이 *B. subtilis*에 강한 항균활성을 나타내는 것은 BuOH 분획물에 항균성을 나타내는 물질이 추출되어 함유하고 있기 때문이라고 보고한 바 있다.

Table 2. Antimicrobial activities of various fractions of *Dryopteris rhizoma* extract
(Unit: inhibition zone diameter with disc, mm)

Fractions	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Bacillus sublilis*	Soluble solid1)
Chloroform Fr.	19.5	16.7	15.7	1.6
Ethylacetate Fr.	15.9	14.5	12.0	1.5
Butanol Fr.	11.1	9.7	9.6	1.7
Water Fr.	9.0	8.2	0	1.4

Antimicrobial activity was investigated after incubation at 37°C for 2 days on nutrient agar medium.
[1)]Soluble solid means mg of soluble solid content of extract per disc.

분획농도별 미생물 성장 억제 효과

관중 추출물로부터 용매 분획한 각 분획물에 대해 농도별 미생물 성장억제 효과를 조사한 결과(Fig. 2, 3, 4), $CHCl_3$

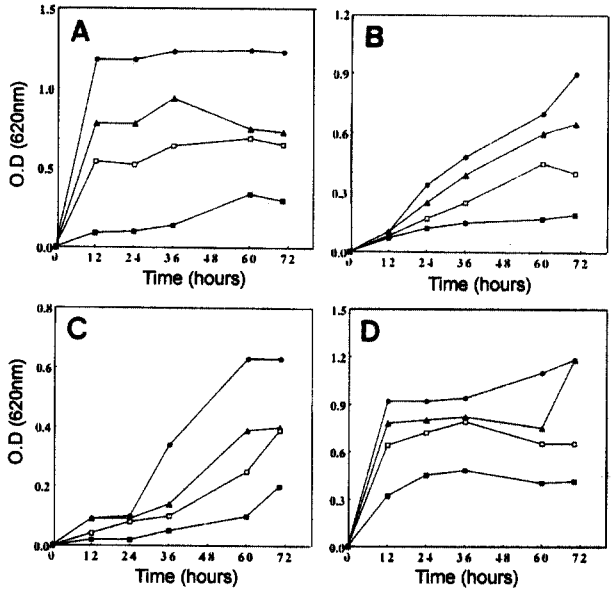

Fig. 2. Effect of chloroform fraction of *Dryopteris rhizoma* on growth inhibition of food sopilage microorganisms. Abbreviations : A; *Staphylococcus aureus*, B; *Bacillus substilis*, C; *Pseudomonas fluorescence*, D; *Escherichia coli*, —●—; control, —▲—; 100 ppm, —□—; 500 ppm, —■—; 1000 ppm.

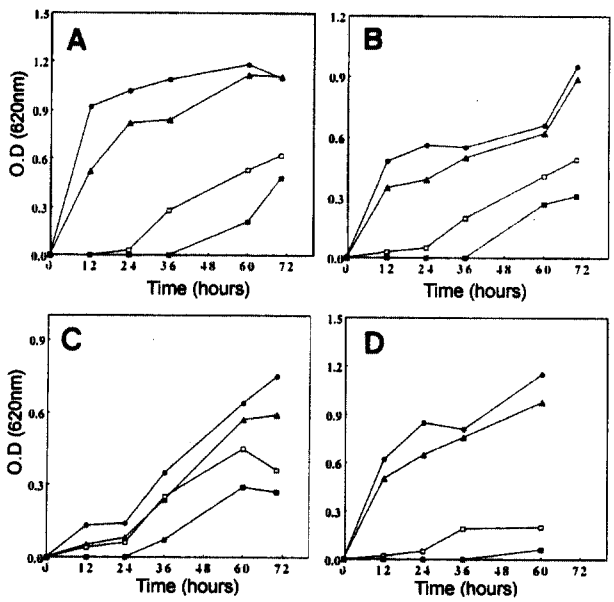

Fig. 3. Effect of ethylacetate fraction of *Dryopteris rhizoma* on growth inhibiton of food sopilage microorganisms. Abbreviations : A; *Staphylococcus aureus*, B; *Bacillus substilis*, C; *Pseudomonas fluorescence*, D; *Escherichia coli*, —●—; control, —▲—; 100 ppm, —□—; 500 ppm, —■—; 1000 ppm..

분획물의 항균활성은 Fig. 2에서보는 바와 같이 *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. fluorescence*, *E. coli*에 대해서 모두 농도 의존적으로 성장 억제효과를 나타내었다. *S. aureus*의 경우 (Fig. 2-A). 분획물을 첨가하지 않은 대조군에서는 12 시간 배양시 이미 O.D가 1.18로 균체가 정상기에 도달하였지만 $CHCl_3$ 분획물은 농도를 100, 500 ppm으로 증가시키고 70 시간 배양후에도 균체성장은 O.D가 0.30으로 낮은 수준을 유지하는 것으로 나타났다. *B. subtilis* (Fig. 2-B), *P. fluorcscence* (Fig. 2-C) 및 *E. coli* (Fig. 2-D)의 경우도 대조군에 비해 CHCl3 분획물을 첨가하면 농도 의존적으로 성장이 억제되었다. 다른 미생물의 경우도 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 $CHCl_3$ 분획을 1000 ppm 첨가하여도 모든 미생물은 사멸하지 않고 그 성장이 인정되어 미생물 성장 억제 기작은 살균작용보다는 정균작용(bacteriostatic)일 것으로 추측된다. EtOAc 분획물의 항균효과 (Fig. 3)도 분획물의 농도 의존적으로 미생물의 성장이 억제되었으며 1000 ppm 첨가의 경우 실험한 세균에 대해 성장억제 효과가 뚜렷하였다. *E. coli* (Fig. 3-D)의 경우 1000 ppm을 첨가하면 균의 성장이 거의 정지되어 가장 뚜렷한 성장억제효과를 나타내었다. BuOH 분획물에서는 $CHCl_3$ 및 EtOAc 분획물에 비해 성장 억제 효과가 약간 떨어지는 것으로 관찰되었는데(Fig. 4), 이러한 결과는 이미 위에서 언급한 관증

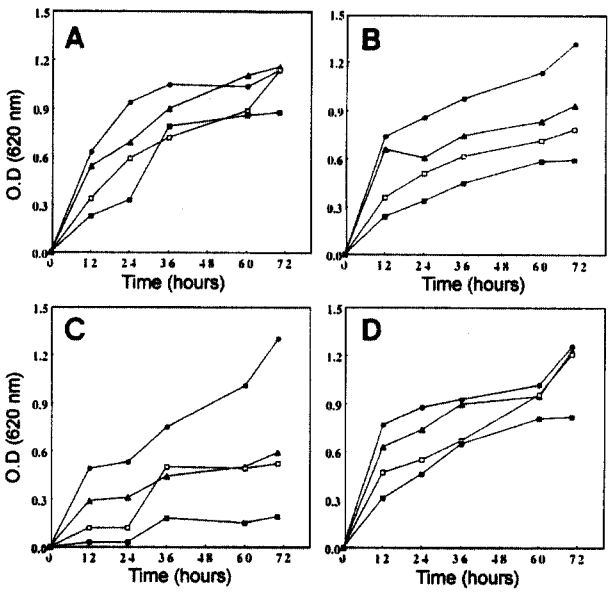

Fig. 4. Effect of butanol fractions of *Dryopteris rhizoma* on growth inhibition of food sopilage microorganisms. Abbreviations : A; *Staphylococcus aureus*, B; *Bacillus substilis*, C; *Pseudomonas fluorescence*, D; *Escherichia coli*, —●—; control, —▲—; 100 ppm, —□—; 500 ppm, —■—; 1000 ppm.

추출물의 분획물별 항균성을 검색한 결과(Table 2)에서도 $CHCl_3$ 및 EtOAc 분획물이 높은 항균효과를 나타내었던 것

과 어느 정도 일치하는 것으로 나타났다. 그러나 분획물의 농도별 항균효과는 각각의 미생물에 따라 약간씩 상이한 것으로 관찰되었다. 이상의 결과를 종합해 보면 관중분획물의 각 미생물에 대한 항균활성은 서로 다르며, 항균에 관여하는 물질이 서로 다르다고 사료된다. 그러나 이에 관한 명백한 결과를 얻고 이를 식품 등에 응용하기 위해서는 항균성을 주로 나타내는 물질의 분리와 보다 자세한 분획 수준의 실험이 추후에 필요할 것으로 사료된다.

국문요약

관중의 추출분획물별과 *Bacillus subtilis*에 강한 항균활성을 보였던 가자, 정향, 단삼, 관중의 추출 용매별 (ethanol과 물)로 식품 부패성 미생물인 *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonase fluorescence* 에 대한 항균활성을 조사하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다. 1. 가자는 물추출물이, 정향, 단삼 및 관중은 ethanol 추출물이 각각 강한 항균활성을 나타내었으며, 그 중 관중의 ethanol 추출물이 가장 강한 활성을 보였고 그 활성정도는 인공합성보존류인 안식향산나트륨 (sodium benzoate)보다 실험한 모든 미생물에 대하여 강했다. 2. 관중의 ethanol 추출물의 각분획물에 대한 항균활성은 $CHCl_3$ 분획물>EtOAc 분획물>BuOH 분획물>물 분획물 순이었다. 3. 관중의 각분획물은 농도 의존적으로 미생물의 성장 억제효과가 있었으며, 그 억제효과에 대한 기작은 살균작용에 의한 것이라기 보다는 정균작용에 의한 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Brackett, R.E.: Effect of various acids on growth and survival *Yersinia enterocoltica. J. Food Prot.*, **50**, 598 (1987).
2. Tansey, M.R. and Appleton, J.A.: Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia*, **70**, 397 (1978).
3. Lee, B.W. and Shin, D.H.: Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganism *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 200 (1991).
4. 岡崎寬藏, 加勝廣, 苦田部武男.: 生藥の 抗菌性 (第2報). 藥學雜誌, **71**, 1 (1951).
5. 岡崎寬藏, 苦田部武男.: 生藥の 抗菌性 (第4報). 藥學雜誌, 藥學雜誌, **71**, 481 (1951).
6. Park, S.W. and Kim, C.J.: Studies on the food preservation by antimicrobial action of medicinal herbs. *J. Korean Agri. Chem.* Soc., **22**, 91 (1979).
7. Zaika, L.L.: Spices and herbs; Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety.* **9**, 97 (1988).
8. Chung, D.O. and Jung, J.H.: Studies on antimicrobial substances of Canoderma lucidumi. *J. Food Sci. Technol.*, **24**, 552 (1992).
9. Collins, C.H. and Patricia, M.L.: Microbiological Methods. Fifth edition, Butterworths, USA, p.89 (1984).
10. Laura, J.V. and Piddock, P.: Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Applied Bacteriol*, **68**, 307 (1990).
11. Yang, J.H. and Kim, Y.I.: Studies on the bioavailability of berberine preparations. J. *Korean Pharm. Sci.*, **22**, 55 (1992).
12. 문범수, 배국웅.: 최신식품위생학, 수학사, 서울, 한국, p.15 (1985)
13. Choi Young-Tae.: Antimicrobial activities on some natural herbs. *J. Korean Pharm. Sci.*, **17**(4), 302 (1986).
14. Briozzo, J., Nunez, L., Chirife, J., Herszage, L. and D'Aquino, M.: Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 69 (1989).
15. Chi-Pien Chen, Chun-Ching Lin and Tsuneo Namba.: Development of natural crude drug resources from Taiwan (VI), In vitro studies of the inhibitory effect on 12 microorganisms. *Shotakugaku Zasshi*, **41**(3), 215 (1987).
16. Bauer, A.W., Kibby, M.M., Sherris, J.C. and Tuck, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493 (1966).