J. Fd Hyg. Safety 10(1), 23-28(1995)

단삼 추출물의 항균특성

목종수 · 김영목 · 김신희 · 장동석
부산수산대학교 식품공학과

Antimicrobial Property of the Ethanol Extract from *Salvia miltiorrhiza*

Jong-Soo Mok, Young-Mog Kim, Shin-Hee Kim and Dong-Suck Chang
Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT—The effect of the ethanol extract from salviae miltiorrhizae radix (*Salvia miltiorrhiza*) on the microbial growth and the stability of the extracted antimicrobial material were investigated. The ethanol extract had strong growth inhibition activity (MIC, 3.13~50.0 μg/ml) against Gram-positive bacteria such as *B. subtilis, L. monocytogenes* and *S. aureus*. Among Gram-positive bacteria tested, *B. subtilis* was the most susceptible to the extracted substance. While the antimicrobial activity of the ethanol extract was weak (MIC, 400~800 μg/ml) to *E. coli* and yeasts (*C. albicans, Sacch. diastaticus*). The ethanol extract had bactericidal action at higher concentration than MIC against *B. subtilis*, while the extract had only bacteriostatic action against *S. aureus*. The extracted antimicrobial substance was stable in the pH range of 4.0 to 10.0, heat treatment at 121℃ for 15 min, and freezing and thawing

Key words □ *Salvia miltiorrhiza*, Antimicrobial activity, Bactericidal action

단삼(丹蔘, *Salvia miltiorrhiza*)은 꿀풀과의 다년생 약용식물로 뿌리가 붉기 때문에 단삼이라고 하며, 그 길이는 40~80 cm이다.[1] 원산지는 중국으로 봄이나 가을에 채취한 뿌리를 건조시킨 후 약재로 사용하고 있으며, 우리나라에서 경북 가야, 강원도 설악산에서 자생하는 것으로 알려져 있는데 그 이용도는 한방에 국한되어 왔다.

단삼은 간보호작용 및 불규칙한 생리, 혈관염, 월경과다, 불면증, 혈액순환장애, 협심증, 염증 등의 치료에 효과적인 것으로 알려져 있으며,[2,3] 성분으로는 tanshinone I, II, cyptotanshinone, tanshindiol, methyltanshinone, hydroxytanshinone, isotanshinones 등이 보고되었다.[3-7] 그리고 이들 tanshinone계 색소성분은 *Staphylococcus aureus*[8]와 *Mycobacterium* 속[9]에 대하여 항균작용이 있다고 보고된 바 있으나, 기타 식중독 세균이나 부패 미생물에 대한 폭넓은 항균작용 및 식품보존효과에 관한 보고 예는 거의 없는 실정이다. 또한 Gao 등[9]에 의하면 단삼 추출물은 실험용 쥐나 토끼에 경구투여하여 실험한 결과 독성을 나타내지 않았다고 보고하였고, 전보[10]에서 단삼 추출물은 그람 음성균보다도 그람 양성균에 대하여 특히 강한 항균효과를 나타내어 그람 양성균이 문제시되는 식품에 천연보존료로 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

따라서 본 연구에서는 단삼 추출물을 천연보존료로써 이용하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 식중독 세균이나 부패 미생물의 증식에 미치는 영향을 검토하였고, 추출된 항균성 물질에 대하여 가열처리, 저장온도나 기간 및 pH 변화에 따른 안정성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

단삼(丹蔘, *Salvia miltiorrhiza*)은 부산시 소재의 한약 건재상에서 구입하여 20~30 mesh의 분말로

분쇄하여 실험재료로 사용하였다.

사용균주 및 배지

항균력 시험용으로 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Escherichia coli* ATCC 1129, *Candida albicans* IPL 76 및 *Saccharomyces diastaticus* NCYC 361을 사용하였다.

항균력 측정용 배지는 Difco社 제품을 사용하였는데, 세균은 Mueller Hinton broth, 효모는 YM broth, 생균수 측정용으로는 standard plate count agar를 사용하였다.

항균력 측정용 시료 검액 조제

시료 검액의 조제는 전보[10]에서 최적 추출조건으로 선정된 조건하에서 추출하여 조제하였다. 즉, 분쇄한 원료 단삼 일정량에 무수에탄올을 10배량 가하여 상온에서 2시간 진탕추출한 다음 멸균된 여과지(Toyo, No. 5A)로 여과하여 얻은 여액을 무수에탄올로 최초 첨가량이 되도록 첨가하여 검액으로 사용하였다.

추출용액중의 가용성 고형성분함량

가용성 고형분함량은 항균력 측정용 시료 검액을 일정량 취하여 105℃에서 항량점이 될 때까지 건조 후 증발잔사의 무게를 측정하여 m*l* 당 μg으로 나타내었다.

균 최저증식억제농도 측정

균 최저증식억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)는 Vitor Lorian의 방법[11]에 따라 액체배지 희석법으로 측정하였다. 첨가량의 농도범위는 최초농도 0.78 μg/m*l*으로부터 누진법으로 가산하여 최종농도 800 μg/m*l*까지 설정하여 액체배지에 첨가하였다. 그리고 시료가 첨가된 액체배지에 각 시험균을 10^5/m*l* 정도 접종하여 최적증식온도에서 48시간 배양 후 흡광도(660 nm)를 측정하여 균의 증식이 나타나지 않은 농도로 결정하였다.

미생물 증식에 미치는 영향

단삼 추출물이 강한 항균력을 나타낸 그람 양성균에 대하여 MIC 이상 첨가시에는 균의 증식에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해서 *B. subtilis*와 *S. aureus*에 대해 각각 MIC의 약 3배, 10배의 농도까지 Mueller Hinton broth에 첨가하였다. 그리고 시료가 첨가된 액체배지에 각 시험균을 10^4/m*l* 정도 접종하여 최적증식온도에서 배양하면서 시간경과에 따른 생균수 변화를 조사하였다.

추출된 항균성 물질의 안정성

추출된 항균성 물질의 pH, 가열 및 저장에 대한 안정성을 측정하기 위하여 pH 4.0에서 pH 10.0에 이르기까지 1.0 간격으로 조절한 후 상온에서 6시간 동안 방치한 것을 시료로 사용하였으며, 8.4 μg/m*l* 농도가 되도록 첨가한 50 m*l* Mueller Hinton broth에 *B. subtilis*를 10^4/m*l* 정도 접종하여 35℃에서 3시간 배양 후의 생균수를 측정하여 최초 추출액(pH 5.8)의 항균활성을 100으로 하였을 때 각 pH 별로 조절한 시료의 잔존 항균활성을 백분율로 나타내었다. 또한 열안정성은 단삼추출물 10 m*l*를 thermal death time tube에 넣고 100℃ water bath에서 10분, 20분, 30분 및 60분, 그리고 autoclave에서 121℃, 15분 동안 열처리한 다음 pH 안정성과 동일한 방법으로 생균수를 측정하여 가열 전의 항균활성을 100으로 하였을 때 가열 후의 잔존 항균활성을 백분율로 나타내었다. 그리고 저장에 대한 안정성은 단삼 추출물을 cap tube에 10 m*l* 씩 넣고 −18℃, 4℃, 20℃ 및 37℃에서 30일까지 저장하면서 pH 안정성과 동일한 방법으로 생균수를 측정하여 저장 전의 항균활성을 100으로 하였을 때 저장 후의 잔존 항균활성을 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

균 최저증식억제농도

단삼 추출물의 각종 미생물에 대한 MIC를 측정한 결과는 Table 1과 같이 나타났다. 이때, 증식용 배지에 첨가되는 항균력 측정용 시료 검액은 고형분함량으로 환산해서 첨가하였으며, 첨가된 시료 검액의 가용성 고형분함량은 0.133%였다. 식품부패세균으로 알려진 그람양성 간균인 *B. subtilis*에 대하여 MIC는 3.13 μg/m*l*으로 가장 강한 항균효과를 보였다. 淺野[12]에 의하면 식품보존료인 파라옥시 안식향산 에틸의 경우, *B. subtilis*에 대한 MIC는 1,000 ppm이라고 보고하여 단삼 추출물보다 300배 정도 약한 항균효과를 보였다. 또한 *B. subtilis*에 대한 천연 추출물의 MIC를 검토해 보면, 안[13]의 쑥잎을 증기로 추출한 추출액을 에테르로 재추출한 쑥의 정유는 25 μg/m*l*, 이 등[14]의 황금의 물추출물은 10,000 μg/m*l*, 강 등[15]의 갓의 에탄올 추

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC)[1] of *Salvia miltiorrhiza* extract against microorganisms by broth dilution method.

Strains	MIC (μg/ml)
Bacteria	
B. subtilis	3.13
S. aureus	6.25
L. monocytogenes	50
E. coli	800
Yeasts	
C. albicans	800
Sacch. diastaticus	400

[1]MIC means no growth after 2 days culture at optimum condition.

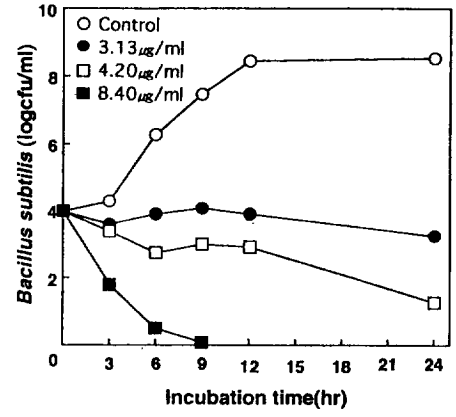

Fig. 1. Comparision of inhibitory effect on the growth of *Bacillus subtilis* in Mueller Hinton broth (at 35℃) by the concentration of extract of *Salvia miltiorrhiza*.

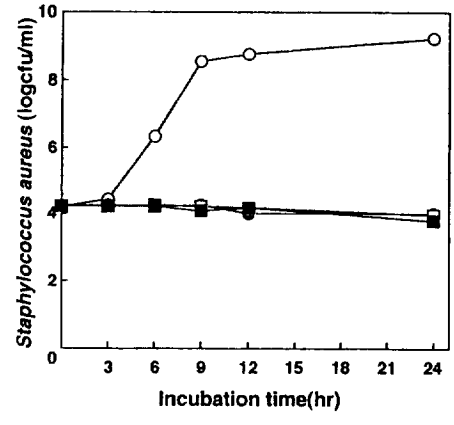

Fig. 2. Comparision of inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* in Mueller Hinton broth (at 35℃) by the concentration of extract of *Salvia miltiorrhiza*.

○: Control, ●: 6.25 μg/ml, □: 40 μg/ml, ■: 80 μg/ml

출물은 10,000 μg/ml이라고 보고하여 단삼 추출물은 이들 천연 추출물보다 훨씬 강한 항균효과를 나타내었다.

식중독 세균으로 알려진 그람양성 구균인 *S. aureus*에 대하여 단삼 추출물의 MIC는 6.25 μg/ml인데 반하여 淺野[12]는 식품보존료인 파라옥시 안식향산 에스테르류의 MIC는 125~4,000 ppm이라고 보고하여, 단삼 추출물은 파라옥시 안식향산 에스테류 보다는 20~600배 정도 항균력이 강한 것으로 나타났다. 또한, 이와 박[14]의 황금의 물추출물의 MIC는 1,000 μg/ml, 강 등[15]의 갓의 에탄올 추출물은 20,000 μg/ml, 박 등[16]의 자초의 에탄올 추출물은 1,000 μg/ml이라고 보고하여 단삼 추출물은 이들 천연 추출물보다 100배 이상 우수한 항균력을 보였다.

Listeria 속 중에서 인간에게 병원성을 나타낸다고 알려진 *L. monocytogenes*에 대한 단삼 추출물의 MIC는 50 μg/ml으로 같은 양성균인 *B. subtilis*와 *S. aureus*에 비하여 다소 약한 항균효과를 나타내었다.

위와 같이 그람 양성균에 대해서는 강한 항균효과를 나타낸 반면, 그람 음성균 및 효모에 대해서는 약한 항균효과를 나타내었다. 즉, 그람 음성균인 *E. coli* 대한 단삼 추출물의 MIC는 800 μg/ml이였으며, 효모인 *Sacch. diastaticus*와 *C. albicans*에 대한 MIC는 각각 400, 800 μg/ml였다. 이에 반하여 박 등[16]은 자초의 에탄올 추출물의 MIC는 *E. coli*에 대하여 1,500 μg/ml 이상, *Sacch. diastaticus*에 대해서는 1,000 μg/ml이라고 보고하였으며, 강 등[15]의 갓의 에탄올 추출물의 *E. coli*에 대한 MIC는 20,000 μg/ml이라고 보고하여 단삼 추출물은 자초나 갓의 에탄올 추출물보다 우수한 항균효과를 보였다.

이상과 같이 단삼 추출물은 그람 양성균에 대해서는 매우 우수한 항균력을 나타내었으나, 그람 음성균 및 효모에 대해서는 항균력이 약하였다. 이것은 그람 양성균의 세포벽은 peptidoglycan이 표면에 노출되어 항균성 물질에 공격을 받기 쉽지만 그람 음성균의

경우에는 lipopolysaccharide를 주성분으로 하는 외막이 peptidoglycan을 보호하고 있기 때문이다.[17] 또한, 단삼 추출물은 그람 양성균에 대하여 매우 강한 항균효과를 가지므로 식품에 첨가하면 그람 양성균에 대한 세균성 식중독이나 식품의 부패를 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

미생물 증식에 미치는 영향

단삼 추출물이 강한 항균력을 나타낸 그람 양성균인 *B. subtilis*와 *S. aureus*에 대하여 MIC 이상 첨가시 균의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 즉, *B. subtilis*에 대하여 MIC인 3.13 μg/ml 첨가시에는 균의 증식을 억제하였으며, 4.2 μg/ml 농도 첨가로는 배양 6시간째 균수가 1/10 정도 감소하여 24시간까지 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며, 8.4 μg/ml 첨가했을 시에는 급격히 감소하여 배양 9시간만에 초기균수의 1/100을 감소시켰다. 반면, *S. aureus*에 대해서는 MIC(6.25 μg/ml) 10배 이상의 농도인 80 μg/ml 첨가로도 정균작용만 나타내었다.

반면, 박[18]의 상백피의 에탄올 추출물은 *B. subtilis*에 대하여 16 μg/ml 이상 첨가시, *S. aureus*에 대해서는 12.8 μg/ml 이상 첨가시에 살균효과를 보여 *B. subtilis*에만 살균효과를 보인 단삼 추출물과는 다른 경향을 보였다.

이와 같이 단삼에서 추출된 항균성 물질은 같은 그람 양성균인데도 균종에 따라 크게 차이를 보였다. 즉, *B, subtilis*에 대하여는 4.2 μg/ml 이상 첨가시에 살균효과를 내는 반면, *S. aureus*에 대하여는 이의 약 20배의 농도가 되도록 가해도 살균효과를 나타내지 않은 것은 앞으로 그 작용기구를 밝혀야 할 흥미있는 과제라 생각된다.

추출된 항균성 물질의 안정성

pH－pH에 대한 항균성 물질의 안정성을 알아보기 위하여 단삼 추출물을 pH 4.0에서 pH 10.0까지 각 단계별로 조정하여 항균력을 조사한 결과는 Table 2와 같이 조사된 각 pH의 영역의 잔존 항균활성은 98～100%로 나타나 추출된 이 항균성 물질은 pH에 대하여 매우 안정하다는 것을 알 수 있었다. 강 등[15]의 갓의 에탄올 추출물 및 신 등[19]의 방기의 물추출물도 pH 1.0에서 pH 13.0까지 조사된 전범위에서 안정한 것으로 보고된 바 있어 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 보였다.

그러므로 단삼 추출물을 식품보존료로 사용시 중성

Table 2. Effect of pH on the growth inhibition of *B. subtilis* of *Salvia miltorrhiza* extract.

	pH						
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
Residual antibacterial activity (%)[1)]	98	99	100	100	100	100	98

[1)] Residual antibacterial activity was expressed as follow;

$$\frac{\text{Antibacterial activity of each pH}}{\text{Antibacterial activity of control (pH, 5.8)}} \times 100$$

All samples were treated at given pH for 6 hrs.

Table 3. Effect of heat treatment of *Salvia miltorrhiza* extract on the growth inhibition of *B. subtilis*.

Heating Temperature (℃)	Heating Time (min)			
	10	15	30	60
	Residual antibacterial activity (%)[1)]			
100	100	100	97	96
121		96		

[1)] Residual antibacterial activity was expressed as follow;

$$\frac{\text{Antibacterial activity after heating}}{\text{Antibacterial activity of control}} \times 100$$

Table 4. Effect of storage condition of *Salvia miltorrhiza* extract on the growth inhibition of *B. subtilis*.

Storage Temperature (℃)	Storage Time (day)		
	5	15	30
	Residual antibacterial activity (%)[1)]		
−18	100	100	100
4	100	98	100
20	100	98	99
37	99	99	99

[1)] Residual antibacterial activity was expressed as follow;

$$\frac{\text{Antibacterial activity after storage}}{\text{Initial antibacterial activity}} \times 100$$

식품을 비롯하여 산성 식품 뿐만 아니라 알카리성 식품에도 사용 가능할 것으로 사료된다.

가열 및 저장－가열에 대한 항균성 물질의 안정성을 조사하기 위하여 단삼 추출물을 100℃에서 10분, 15분, 30분 및 60분, 그리고 121℃에서 15분 각각 가열하여 항균력을 조사한 결과는 Table 3에 나타난

바와 같이 잔존 항균활성이 96~100%로 단삼으로부터 추출된 항균성 물질은 열에 대하여 매우 안정한 물질인 것으로 여겨진다. 강 등[15]의 갓의 에탄올 추출물, 박[18]의 상백피의 에탄올 추출물 및 신 등[19]의 방기의 물추출물도 121℃, 15분 가열에도 안정하다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

또한, 저장에 대한 항균성 물질의 안정성을 조사하기 위하여 단삼 추출물을 −18℃, 4℃, 20℃ 및 37℃에서 30일간 저장하면서 각 온도 구간별 잔존 항균활성을 조사한 결과는 Table 4에 나타낸 것과 같이 실험된 모든 온도대에서 저장일수 30일까지 잔존 항균활성 98~100%로 초기 항균활성과 거의 비슷한 경향을 나타내었다.

이상의 결과를 보아 단삼의 항균성 물질은 열에 매우 안정할 뿐 아니라 동결 및 상온에서 저장하여도 안정하므로 단삼 추출물을 가열식품이나 동결식품 등에 식품 보존료로 첨가할 수 있을 것으로 사료되며, 또한 보관시에는 상온에 보관하여도 무방할 것으로 생각되어진다.

국문요약

단삼 추출물을 천연보존료로써 이용하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 식중독 세균이나 부패 미생물의 증식에 미치는 영향을 검토하였고, 추출된 항균성 물질에 대하여 가열처리, 저장온도나 기간 및 pH 변화에 따른 안정성을 조사한 결과는 다음과 같다. 단삼 추출물의 MIC는 그람 양성균에 대하여 3.13~50.0 μg/ml으로 우수한 항균효과를 나타내었고, 특히 *B. subtilis*에 대하여 MIC는 3.13 μg/ml로 가장 강한 항균활성을 보였다. 반면, 대장균 및 효모에 대해서는 400~800 μg/ml으로 그람 양성균에 비하여 약한 항균효과를 나타내었다. 단삼 추출물은 *B. subtilis*에 대해서는 MIC 이상 첨가시에는 사멸효과를 나타낸 반면, *S. aureus*에 대해서는 정균효과만 나타내었다. 추출된 항균성 물질은 pH 4.0~10.0, autoclave에서 121℃, 15분간 열처리해도 안정하였으며, 동결온도나 상온에서 30일간 저장하여도 항균활성은 거의 변화가 없었다.

참고문헌

1. 신민교, 정진섭: 도해향약(생약)대사전(상), 영림사, p. 160 (1990).
2. 은재순, 박이규, 염정렬, 최동성, 안문생: 단삼 엑기스의 간보호 작용. 한국생약학회지 **22**, 95 (1991).
3. Tang, W. and Eisenbrand, G.: Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag Berlin, p. 891 (1992).
4. Chen, M.K., Young, P.T., Ku, W.H., Chen, Z.X., Chen, H.T. and Yeh, H.C.: Studies on the active principles of Dan-Shen. 1. the structure of sodium tanshinone A sulfonate and methylene tanshinquinone. *Acta. Chim. Sin.* **36**, 199 (1978).
5. Luo, H.W., Wu, B.J., Wu, M.Y., Yong, Z.G., Masatake, N. and Yoshimasa, H.: Pigments from *Salvia miltiorrhiza. Phytochemistry* **24**, 815 (1985).
6. Okumura, Y., Kakisawa, H., Kato, M. and Hirata, Y.: Structure of tanshinone II. *Bull. Chem. Sco. Jpn.* **34**, 895 (1961).
7. Takenori, K., Takasahi, O., Teruo, H. and Hiroshi, K.: A diterpheoid phenalenone from *Salvia miltiorrhiza. Phytochemistry* **24**, 2118 (1985).
8. Luo, H.W., Zheng, J.R., Jiang, B.L. and Xu, L.F.: Relation between the RM value and biological activity of tanshinones. *J. Nanjing Coll. Pharm.* **13**, 42 (1982).
9. Gao, Y.G., Song, Y.M., Yang, Y.Y., Lie, W.F. and Tang, J.X.: Pharmacology of tanshinone. *Acta. Pharm. Shin.* **14**, 75 (1979).
10. 목종수, 박욱연, 김영목, 장동석: 용매와 추출조건에 따른 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 항균력. 한국영양식량학회지 **23**, 1001 (1994).
11. Vitor, L.: Antibiotics in laboratory medicine. Willams & Wilkins, USA, p. 53 (1991).
12. 淺野和男: 食品保存使覽. クリエイテイブジヤペン, 東京, p. 157 (1992).
13. 안병용: 쑥으로부터 추출한 정유의 항균효과. 한국식품

위생학회지 **7**, 157 (1992).
14. 이인란, 박홍순: 황금탕의 항균작용. 한국생약학회지 **18**, 249 (1987).
15. 강성구, 성낙계, 김용두, 신수철, 서재신, 최갑성, 박석규: 갓(*Brassica juncea*) 추출물의 항균활성 검색. 한국영양식량학회 **23**, 1008 (1994).
16. 박욱연, 장동석, 조학래: 자초(*Lithospermum erythrorhizon*) 추출물의 항균 특성. 한국영양식량학회지 **21**, 97 (1992).
17. Nakamura, S., A. Kato and K. Kobayashi: New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 647 (1991).
18. 박욱연: 상백피 추출물의 항균성과 항균성 물질의 분리정제. 부산수산대학교 박사학위논문, (1995).
19. 신옥호, 유시승, 이완규, 신현경: 방기(*Sinomenium acutum*)의 추출물의 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향. 한국산업미생물학회지 **20**, 491 (1992).