

물레나물(*Hypericum ascyron* L.)의 식중독 미생물 증식 억제 물질의 분리 및 식품적용

한지숙 · 이지영 · 백남인¹ · 박일웅² · 신동화*

전북대학교 응용생물공학부(농업과학기술연구소),

¹경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ²호원대학교 식품환경화학공학부

Isolation of Growth Inhibition Substance on Food borne Microorganisms from *Hypericum ascyron* L. and Application to Food Preservation

Ji-Sook Han, Ji-Young Lee, Nam-In Baek¹, Il-Woung Back² and Dong-Hwa Shin*

Faculty of Biotechnology (Food Science and Technology Major), Chonbuk National University

¹Graduate School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, Kyunghee University

²Division of Food, Environmental and Chemical Engineering, Howon University

The ethanol extract and n-hexane fraction from *Hypericum ascyron* L. showed strong growth inhibition at 25 ppm on 5 strains of *Listeria monocytogenes* for 72 hr at 32°C. The purified substance, H2-5-2 fraction, was isolated by silica gel column and preparative thin layer chromatography from n-hexane fraction of *Hypericum ascyron* L. The H2-5-2 fraction showed a strong bacteriostatic activity on 5 strains of *L. monocytogenes* at 10 ppm in tryptic soy broth, and the viable cell was reduced 1 log cycle compared to initial cell number. The n-hexane fraction of *Hypericum ascyron* L. showed strong growth inhibition at 25 ppm on *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, and at 50 ppm on *Vibrio parahaemolyticus* for 72 hr. The purified antimicrobial substance, the H2-5-2 fraction, was assumed as high unsaturated sterol by ¹H-NMR and ¹³C-NMR. On application test using minced Alaska pollack and ground beef, the n-hexane fraction of *Hypericum ascyron* L. at the level of 250 ppm was applied at 32°C and 5°C. At 32°C storage condition, the antimicrobial substances did not reduced *L. monocytogenes* ATCC 19113, meanwhile at 5°C storage condition, *L. monocytogenes* ATCC 19113 was reduced in viable number.

Key words: *Hypericum ascyron* L., food borne microorganisms, antimicrobial effect, high unsaturated sterol

서 론

물레나물(*Hypericum ascyron* L.)은 물레나물과의 다년초로 전초를 홍한련(紅旱蓮) 또는 대련교(大蓮翹)라고 쓴다. 이 밖에 대황심초(大黃心草), 방심초(房心草), 일지전(一枝箭), 대정혈(大精血) 등의 여러 이름이 있다. 우리나라 각지의 산기슭, 산골짜기 도랑가, 양지바르면서 습기가 비교적 많은 땅에서 자란다. 세계적으로는 중국(동북, 화북), 시베리아, 몽골, 일본 등에 분포되어 있다⁽¹⁾. 봄·초여름에 연한 잎과 줄기를 삶아 나물로 먹으며, 평간(平肝), 지혈(止血), 패독(敗毒), 소

종(消腫)의 효능이 있고 두통, 토혈(吐血), 타박상을 치료하며, hypericin이 많이 함유되어 있는데, 이 hypericin은 식물성 항생제로 상처, 궤양, 유선염, 뽕루지, 꺾는데, 축농증, 편도염, 중이염, 화상 등에 널리 쓸 수 있다. 물레나물은 항생제에 내성이 생긴 여러 가지 염증성 질병에 탁월한 치료효과가 있으나 사람이 이 식물을 많이 먹으면 피부염을 일으킬 염려가 있다⁽²⁾고 알려져 있으며, 서구에서는 우울증 환자 치료에 널리 이용된다⁽³⁾.

천연 항균제로는 식물추출물⁽⁴⁻⁶⁾, 특정 단백질 및 효소류⁽⁷⁾, 유기산류⁽⁸⁻¹⁰⁾, bacteriocin⁽¹¹⁻¹³⁾ 등을 들 수 있다. 특히 항균 효과가 뛰어난 약용식물 추출물은 천연항균제와 살균제로서 폭넓은 사용범위가 예상된다. 현재까지 항균성분을 함유한 천연 항균제에 관한 연구는 대부분의 실제 응용분야에 있어서 효과면에 치중한 연구로서 살균작용을 하는 유효성분 및 작용기작을 규명하기 위한 기초연구가 부족한 상태이다.

본 실험은 물레나물 에탄올 추출물의 항균활성 물질을

*Corresponding author : Dong-Hwa Shin, Faculty of Biotechnology(Food Science & Technology Major), Chonbuk National University, Dukjin-Dong, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
Tel: 82-63-270-2570
Fax: 82-63-270-2572
E-mail: dhshin@moak.chonbuk.ac.kr

column chromatography 및 preparative thin layer chromatography(PLC), thin layer chromatography(TLC)로 분리하고, 그 항균활성을 생균수로 측정하여 살균효과와 정균효과를 조사하여 항균활성이 확인된 순수분리 물질은 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR로 분석하여 그 구조의 구명을 시도하였다. 또한, *L. monocytogenes* 뿐만 아니라 *Bacillus cereus* 등 6종의 식중독균에 대해서도 물레나물의 항균 spectrum을 확인하여 물레나물이 광범위한 식중독 미생물 제어제임을 확인하였다. 또한, 쇠고기와 명태육에 첨가하여 그 저장온도를 달리하여 저장하면서 *L. monocytogenes*의 증식억제효과를 실험하였기에 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

물레나물 에탄올 추출물의 항균활성을 *L. monocytogenes* 5 균주를 대상으로 검색하였고, 항균 스펙트럼을 확인하기 위해 유해 식중독 미생물 6종을 대상으로 항균효과를 확인하였다. 이때 사용한 균주와 배지는 Table 1과 같다.

물레나물의 에탄올 추출 및 순차 용매 분획

실험에 사용한 물레나물(*Hypericum ascyron* L.)의 뿌리는 한국도로공사 전주수목원에서 수집, 수세, 건조한 후 분쇄기로 마쇄한 시료에 75% 에탄올을 5배(w/v) 정도 혼합하여 환류냉각관이 부착된 플라스크에 넣고 80°C 수욕상에서 3시간 가열, 추출 후 여과(Whatman No. 2)한 여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)로 농축하였다.

에탄올 추출물을 농축하여 물층만 남긴 후 분별깔때기를 이용하여 약 4배의 헥산을 가하여 헥산 분획물을 2회 반복하여 얻고 동일한 방법으로 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차로 가하여 각각의 순차 용매 분획물을 얻었다. 각 분획물은 rotary vacuum evaporator와 진공건조기(New Power Engineering. Co., Korea)로 용매를 완전히 제거한 후 고형분 함량을 구하여 원하는 농도만큼 에탄올로 녹여 0.22 μm membrane filter(Millipore Co., USA)로 제균한 후 항균효과 실험에 사용하였다.

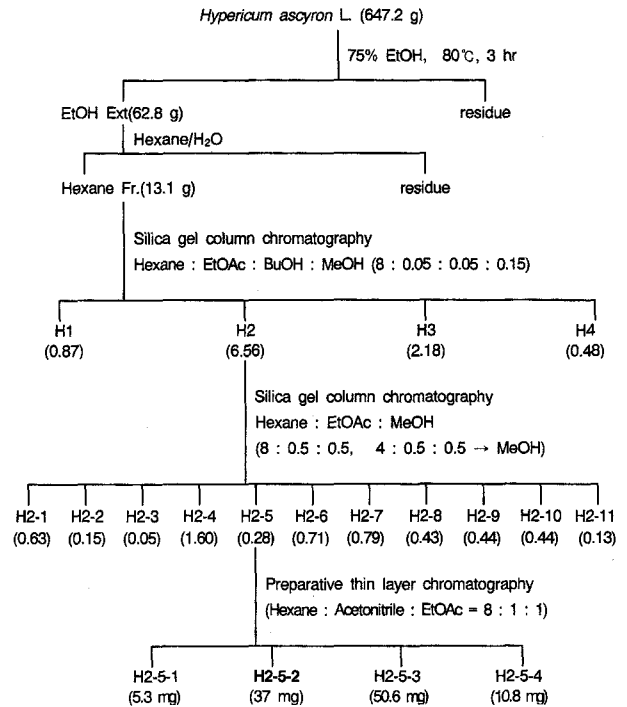


Fig. 1. Isolation flow diagram of the antimicrobial compound from *Hypericum ascyron* L.

물레나물 에탄올 추출물로부터 항균 활성물질의 분리

물레나물 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차 분획하여 항균효과를 실험한 결과 헥산 분획물의 항균효과가 우수하여 이로부터 Fig. 1과 같은 순서에 따라 항균 활성물질을 분리하였다.

즉 물레나물 헥산 분획물(13.1 g)을 silica gel(480 g)이 헥산 : 에틸아세테이트 : 부탄올 : 메탄올(8 : 0.05 : 0.05 : 0.15, v/v)에 현탁·충진된 column(5.5×40 cm)에 흡착시킨 후 메탄올 비율을 단계적으로 증가시키면서 용출하여 4개의 소획분(H1~H4)으로 분리하였다.

이중 H2 획분(6.56 g)의 항균활성과 수율이 우수하여 헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올(8 : 0.5 : 0.5, 4 : 0.5 : 0.5, v/v →

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganisms tested	Media used	Temp. (°C)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19111	TSB&TSA ¹⁾	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19112	TSB&TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19113	TSB&TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19114	TSB&TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC15313	TSB&TSA	32
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	NB&NA ²⁾	30
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	NB&NA ²⁾	30
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 33844	TSB&TSA+3%NaCl	30
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894	TSB&TSA	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	TSB&TSA	37
<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM 12021	NB&NA ³⁾	37

¹⁾TSB & TSA: Tryptic soy broth and Tryptic soy agar (Difco).

²⁾NB & NA: Nutrient broth and Nutrient agar (Oxoid).

³⁾NB & NA: Nutrient broth and Nutrient agar (Difco).

MeOH) 용매계로 silica gel column chromatography(170 g, 3.4×34 cm) 하여 총 11개의 소획분을 얻었으며, 11개의 소획분의 항균활성을 실험해 본 결과 이 중에서 H2-5 획분의 항균효과가 우수하였다.

H2-5 획분(0.28 g)을 다시 hexan : 아세트니트릴 : 에틸아세테이트(8:1:1, v/v)의 용매를 혼합하여 이 중 상층을 취해 3차 preparative thin layer chromatography 하여 4개의 소획분(H2-5-1~H2-5-4)으로 분리하였으며 그 중 항균효과가 우수한 H2-5-2(37 mg)의 화학구조를 동정하였다.

구조동정 조건

물레나물에서 분리된 단일물질의 소획분 H2-5-2은 ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δH)과 DEPT-135 및 ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δC)를 사용하여 구조를 동정하였다.

사용기기 및 재료

항균활성 검색용 기기로는 Bioscreen C(Labsystem, Helsinki, Finland)를 사용하였고, 항균물질의 분획에는 fraction collector(Foxy JR., Isco. Inc., USA), 순수물질 동정을 위하여 ¹H-NMR(400 MHz), DEPT-135 및 ¹³C-NMR(100 MHz)(JNM-LA400, JEOL, Japan)을 사용하였고, 식품적용 실험시 Stomacher(Interscience, France)를 사용하여 접종한 균주를 완전 혼합하였다. 순수분리용 컬럼의 충전제 및 TLC를 위한 Silica gel 60, TLC plate(Silica gel 60, F₂₅₄) 및 PTLC plate(Silica gel 60, F₂₅₄, 2 mm)는 Merck(Germany)사에서 구입하여 사용하였다.

물레나물 에탄올 추출물, 순차 용매 분획물, 소획분의 농도별 항균효과

*L. monocytogenes*를 배양한 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL 액체배지에 접종하여 32°C에서 24시간 배양시킨 후 이 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배지에 접종하여 32°C에서 24시간 배양하여 균체 배양액을 만들었다. 에탄올로 추출한 항균성 시료는 75% 에탄올로 첨가량이 1,000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 25 ppm이 되게 에탄올로 완전히 용해, 희석한 후 membrane filter(0.2 μm)로 제균하고 액체배지 9.8 mL에 각 ppm별로 0.1 mL 씩 첨가하였다. 이 각각의 배지에 균체 배양액 0.1 mL를 접종한 후 32°C에서 72시간 동안 배양하면서 12시간 간격으로 600 nm에서 Bioscreen C를 이용하여 optical density(O.D.)를 측정하여 증식억제 효과를 실험하였다. 이때 에탄올로 추출한 시료를 용해시키는데 사용한 에탄올량(0.075 mL) 만큼을 대조구에 첨가하여 에탄올 자체의 항균력이 감소 되도록 하였다. 물레나물 에탄올 추출물을 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차 분획하여 분획물을 얻었다. 이 순차 분획물 역시 같은 방법으로 *L. monocytogenes*에 대한 각 순차 분획물별 최소증식저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 조사하였다. 또한 항균효과가 인정된 순차 용매 분획물의 *V. parahaemolyticus* 등 6 종의 식중독 미생물에 대한 항균 스펙트럼과 항균 유효 단일물질을 분리하기 위해서 column chromatography와 PTLC 하여 얻어진 각각의 소획분의 항균활성도 역시 Bioscreen C를 이용하여 MIC를 조사하였다.

단일물질의 살균효과

*L. monocytogenes*가 배양된 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL 액체배지에 접종, 32°C에서 24시간 배양하여 균수를 10⁸⁻⁹ CFU/mL로 조정 한 후 이 균체 배양액 0.1 mL를 순수분리된 단일물질이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 32°C에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 표준평판천 배양법에 의해 생균수를 계수하였다. 같은 방법으로 균체 배양액 0.1 mL와 각 처리구에 추출물 용해에 사용된 양과 동일한 에탄올(0.075 mL)을 가한 배지를 대조구로 하였다.

식품 적용실험

명태육과 쇠고기를 waring blender(Waring, USA)로 갈아서 20 g씩 삼각플라스크에 분취하여 121°C에서 15분간 고압 증기멸균하고 여기에 물레나물 hexan 분획물 250 ppm을 에탄올에 용해시켜 각각 첨가하였다. 여기에 액체배지 중 *L. monocytogenes* ATCC 19113 균수를 10⁷ CFU/mL 정도로 조정 한 배양액 0.1 mL씩을 각각 명태육과 쇠고기에 첨가하여 잘 혼합한 후 5°C와 32°C에서 저장하였다. 일정시간 간격으로 명태육과 쇠고기 각각의 삼각플라스크의 검체를 0.1% peptone water 100 mL로 stomacher bag에 무균적으로 옮겨 담은 후 골고루 섞어준 후 희석하여 표준평판천 배양법에 의해 생균수를 계수하였다. 같은 방법으로 균체 배양액 0.1 mL와 항균물질 용해에 사용한 에탄올량(0.075 mL)을 첨가한 것을 대조구로 하였다.

결과 및 고찰

물레나물 에탄올 추출물 및 순차 용매 분획물의 항균효과

물레나물 에탄올 추출물과 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올의 순차 용매 분획물을 25, 50, 100 ppm씩 tryptic soy broth에 첨가하여 *L. monocytogenes*에 대한 항균효과를 실험한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 보면 에탄올 추출물은 실험 최저 농도인 25 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* 5 균주에 대하여 모두 72시간 동안 균증식을 억제하였으며, 이는 에덕나무 에탄올 추출물(100 ppm)⁽¹⁴⁾, 감초 에탄올 추출물(500 ppm)⁽¹⁵⁾ 및 뽕나무 추출물(500 ppm)⁽¹⁶⁾보다 뛰어난 항균효과를 보이고 있다.

각 순차 용매 분획물의 항균활성을 살펴보면 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 층보다 hexan층에서 균중에 따른 감수성의 차이를 보이지 않고 실험 최소증식저해농도가 25 ppm으로 에탄올층과 그 항균활성의 농도가 같았다.

물레나물 hexan 분획물의 1차 column chromatography 후 얻은 소획분들의 항균효과

물레나물 순차 용매 분획물 중 항균효과가 물레나물 에탄올 추출물(실험 MIC: 25 ppm)과 거의 비슷한 hexan 분획물의 항균활성 물질을 분리하기 위해 1차 column chromatography 용 전개용매로 hexan : 에틸아세테이트 : 부탄올 : 메탄올(8 : 0.05 : 0.05 : 0.15)의 용매계로 용출시키다가 벤젠 : 에틸아세테이트 : 클로로포름(5 : 1 : 1 → 메탄올)으로 물질을 분리한 후 총 4개의 소획분으로 분리하여 이들에 대한 항균효과를 비교한 결과는 Table 3과 같다.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of ethanol extract and solvent fractions of *Hypericum ascyron* L.

<i>Listeria monocytogenes</i>	Minimum inhibitory concentration (M, ppm)				
	EtOH extract	n-Hexane fraction	CHCl ₃ fraction	EtOAc fraction	BuOH fraction
ATCC 19111	25	25	100<M<500	500<	500<
ATCC 19112	25	25	100<M<500	500<	500<
ATCC 19113	25	25	100	500<	500<
ATCC 19114	25	25	100<M<500	500<	500<
ATCC 15313	25\	25	100	500<	500<

Table 3. Minimum inhibitory concentration (ppm) of the 1st column chromatography fractions obtained from *Hypericum ascyron* L. on *Listeria monocytogenes*

Fraction No.	Yield (g)	<i>L. monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
H1	0.87	<10	<10	<10	<10	<10
H2	6.56	<10	<10	<10	<10	<10
H3	2.18	25<	25<	25<	25<	25<
H4	0.48	25<	25<	25<	25<	25<

Table 4. Minimum inhibitory concentration (ppm) of the 2nd column chromatography fractions obtained from *Hypericum ascyron* L. on *Listeria monocytogenes*

Fraction No.	Yield (g)	<i>L. monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
H2-1	0.63	10<	10<	10<	10<	10<
H2-2	0.15	10<	10<	10<	10<	10<
H2-3	0.05	10<	10<	10<	10<	10<
H2-4	1.60	10<	10<	10<	10<	10<
H2-5	0.28	10	10	10	10	10
H2-6	0.71	10	10	10	10	10
H2-7	0.79	10<	10<	10<	10<	10<
H2-8	0.43	10<	10<	10<	10<	10<
H2-9	0.44	10<	10<	10<	10<	10<
H2-10	0.44	10<	10<	10<	10<	10<
H2-11	0.13	10<	10<	10<	10<	10<

Table 3에서 보면 소획분 4개를 분리한 후 10 및 25 ppm 씩 첨가하여 액체배양 하면서 Bioscreen C로 O.D.를 측정 한 결과 H1 획분(0.87 g)과 H2 획분(6.56 g)은 10 ppm 첨가시 72시간 동안 균증식을 완전히 억제하는 항균효과를 나타내 었다. 따라서 항균효과도 우수하며 수율도 높은 H₂ 획분을 2차 분리용 시료로 선정하였다.

물레나물 분획물의 2차 column chromatography 후 얻은 소획분들의 항균효과

항균효과와 수율이 높았던 물레나물 hexan 분획물의 H2 획 분을 column을 이용하여 hexan : 에틸아세테이트 : 메탄올(8 : 0.5 : 0.5, 4 : 0.5 : 0.5 → 메탄올)의 용매계로 용출시켜서 총 11 개의 소획분으로 분리하였다.

각각의 소획분들을 10 ppm씩 배지에 첨가하여 Bioscreen C로 O.D.를 측정한 결과는 Table 4와 같았다. Table 4에서 보면 H2-5와 H2-6 획분을 제외한 다른 소획분들은 10 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* 균종에 따라 증식을 억제하는 시간 은 달랐고, 72시간 동안 균증식을 완전히 억제하지는 못하였

다. 그러나 H2-5(0.28 g)와 H2-6 획분(0.71 g)은 10 ppm 첨가 시 72시간 동안 균증식을 완전히 억제하였다.

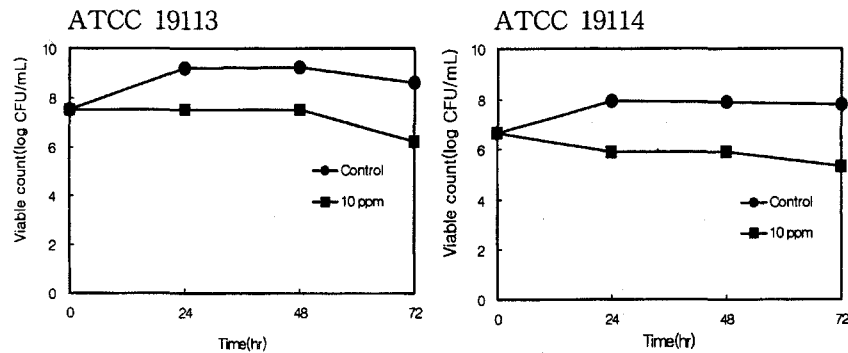
이들 소획분 중 수율이 높은 H2-6 획분을 TLC로 전개시 킨 후 UV와 황산 발색하여 관찰해 본 결과 여러 개의 band 를 관찰할 수 있었으나 뚜렷한 고농도의 물질이 없었다. 따 라서 H2-5 획분을 hexan : 에틸아세테이트 : 메탄올(8 : 0.5 : 0.5) 의 용매로 TLC하여 전개시킨 후 UV 장파(365 nm)로 관찰 해 본 결과 R_f 0.13~0.5에서 하늘색의 뚜렷한 형광물질을 관 찰할 수 있었으므로 H2-5 획분을 3차 분리용 시료로 선정하 였다.

물레나물 분획물의 3차 preparative thin layer chroma-tography 후 얻은 소획분들의 항균효과

물레나물 hexan 분획물의 2차 column chromatography에서 얻은 H2-5 획분을 다시 hexan : 아세토니트릴 : 에틸아세테이트 (8 : 1 : 1)의 용매계로 preparative thin layer chromatography로 전개하여 3차 분리하여 UV로 관찰한 결과 4개의 뚜렷한 획 분을 분취할 수 있었다.

Table 5. Minimum inhibitory concentration (ppm) of the preparative thin layer chromatography fractions obtained from *Hypericum ascyron* L. on *Listeria monocytogenes*

Fraction No.	Yield (mg)	<i>L. monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
H2-5-1	5.3	10<	10<	10<	10<	10<
H2-5-2	37.0	10	10	10	10	10
H2-5-3	50.6	10<	10<	10<	10<	10<
H2-5-4	10.8	10<	10<	10<	10<	10<

**Fig. 2. Bactericidal effect of purified H2-5-2 fraction isolated from *Hypericum ascyron* L. on *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 and 19114 for 72 h at 32°C.**

이 4개의 획분을 10 ppm씩 첨가하여 항균활성을 관찰한 결과는 Table 5와 같았고, H2-5-2 획분만이 10 ppm 첨가시 72시간까지 균증식을 완전히 억제하는 것으로 나타났다.

H2-5-2 획분을 다시 핵산 : 아세토니트릴 : 에틸아세테이트 (8 : 1.5 : 1.5)의 용매계로 TLC하여 UV(254 nm)로 관찰한 결과 R_f 0.43에서 하늘색의 형광물질을 관찰할 수 있었고, 황산 발색시 자주색의 단일 점적임을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 H2-5-2 획분을 물레나물의 순수분리된 항균활성 물질로 판단하여 그 구조를 동정하였다.

단일물질로 추정된 H2-5-2 획분의 살균효과

단일 물질로 추정된 물레나물 핵산 분획물의 3차 chromatography에서 얻은 H2-5-2 소획분의 살균효과를 알아보기 위해 균종간의 성장 차이가 뚜렷한 *L. monocytogenes* ATCC 19113와 ATCC 19114를 대상으로 tryptic soy broth에 H2-5-2 획분을 10 ppm씩 첨가하여 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 표준천배양법에 의해 생균수를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19113 만을 접종한 대조구는 24시간 증식시켰을 때 초기 접종균수 3.3×10^7 CFU/mL보다 2 log cycle정도 증가한 1.6×10^9 CFU/mL를 나타냈으며, 48시간까지 그 수를 유지하다가 72시간 경과 후 4.0×10^8 CFU/mL 수준으로 감소하였으나, 물레나물 H2-5-2 획분을 10 ppm 첨가한 처리구는 초기 접종균수 3.3×10^7 CFU/mL를 48시간 까지 유지하다가 72시간 경과 후 1.5×10^6 CFU/mL로 초기 접종균수보다 1 log cycle정도 감소하였다.

또한 Fig. 2에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19114 만을 접종한 대조구는 초기 접종균수 4.5×10^6 CFU/mL에서 24시간 증식 시켰을 때 1.5 log cycle정도 증식한 7.9×10^7

CFU/mL로 72시간까지 그 균수가 비슷하였다. 물레나물 H2-5-2 획분을 10 ppm 첨가한 처리구는 48시간까지 7.9×10^5 CFU/mL의 균수를 유지하다가 72시간에는 2.2×10^5 CFU/mL로 초기 접종균수보다 1 log cycle 감소한 것을 관찰할 수 있었다.

이들 결과를 종합하면 물레나물 핵산 분획물의 H2-5-2 획분은 10 ppm 첨가시 일부 살균효과가 인정되었다. 물레나물 에탄올 및 핵산 분획물의 MIC는 각각 25 ppm이었고, 물질을 정제, 분리해 감에 따라 그 MIC는 10 ppm으로 항균효과는 핵산 분획물에 비해 상승하였지만 1, 2, 3차 chromatography 후 얻어진 물질들의 항균효과는 상승하지 않았다(Table 3~5).

이 결과를 보면 물레나물에 존재하는 항균활성 물질은 단일물질 이라기보다는 몇 가지 물질이 관여하는 것으로 보이며 따라서 물레나물 추출물을 식품에 보존제로 이용할 때는 순수분리 하는 것보다 조 추출물 형태의 에탄올추출과 핵산 분획추출을 그대로 사용하는 것이 효과가 더 클 것으로 보이며, 다른 식물의 조 추출물에 비해 우수한 항균성을 가진 식물로 판단된다.

이 결과를 기존의 연구들과 비교해 보면 황련 에탄올 추출물은 *L. monocytogenes* Scott A에 대하여 MIC가 90 µg/mL 이었으나, 순차 용매 분획물의 MIC가 1000 µg/mL로 항균효과가 감소하였다는 오 등⁽¹⁷⁾의 결과와 비슷한 경우라 할 수 있다. 또한 양 등⁽¹⁸⁾은 황련(주성분 : 베르베린)을 단독으로 사용하였을 때 보다 황련을 감초와 혼합하였을 때 몇 종의 그람양성균과 그람음성균에 대한 항균력이 더 강해졌다고 보고하고 있다.

이 같은 결과는 천연물에서 항균활성 물질을 분리 할 때 일반적으로 나타나는 현상으로 정제도가 높아질수록 항균활

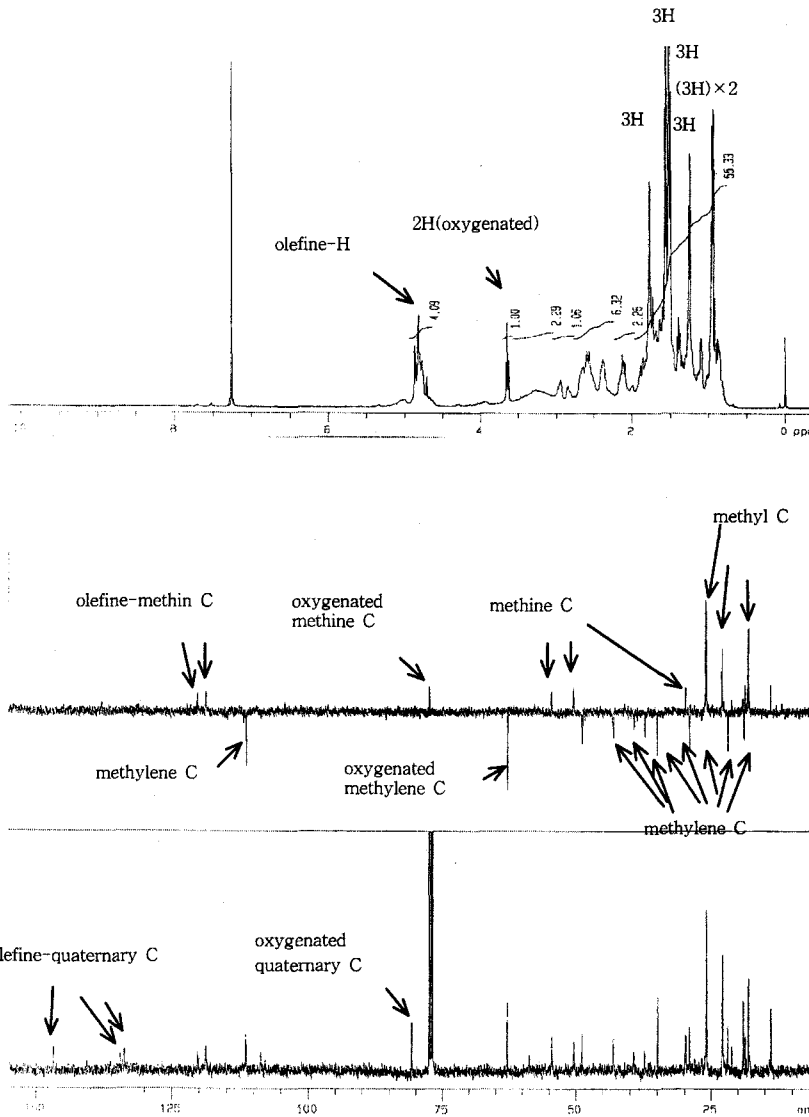


Fig. 3. ¹H-NMR, DEPT-135 & ¹³C-NMR spectra of H2-5-2 isolated from n-hexane fraction of *Hypericum ascyron* L. (400 & 100 MHz, CDCl₃).

성이 낮아지는 경우에 해당되는 것으로 보인다.

몰레나물 항균활성 물질(H2-5-2)의 구조 동정

¹³C-NMR 및 DEPT-135에서 보면(Fig. 3) 133.5, 134.3, 146.6 ppm에서 olefine-quaternary carbon 3개, 118.6 ppm과 120.2 ppm에서 olefine-methine carbon 2개, 111.4 ppm에서 methylene carbon 1개가 관찰되어 3쌍의 이중결합이 보여진다. 또한 80.7 ppm에서 oxygenated quaternary carbon이 1개가 관찰되며, 77.2 ppm에서 sterol 3번 탄소로 추정되는 oxygenated methine carbon이 관찰되었고, 62.7 ppm에서 oxygenated methylene carbon의 signal이 관찰되었다. 또한 고자장 영역에서 methylene carbon이 18.9, 21.8, 28.9, 34.8, 37.2, 39.2, 42.9, 48.7 ppm에서 7~8개가 보여지며, 18.0, 22.7, 22.8, 25.7, 25.8 ppm에서 methyl carbon이 5개, 21.0, 29.6, 29.7, 50.2, 54.4 ppm에서 methin carbon이 5개가 보여진다.

¹H-NMR에서 보면 0.94, 0.95 ppm에서 doublet의 methyl proton signal 2개가, 1.25, 1.50, 1.53, 1.78 ppm에서 singlet

의 methyl proton signal 4개가 보여지며, 3.66 ppm에서 oxygenated methylene proton signal을, 4.82 ppm에서 oxygenated methine 및 olefine-proton signal을 관찰할 수 있었다.

이와 같이 몰레나물 hexan 분획물로부터 분리된 H2-5-2의 구조는 carbon 수가 27~29개이며, 3번 탄소에 oxygenated methine carbon이 관찰되어지며, 5 및 6번 탄소에 이중결합이 있으며, 그 외에 2개의 이중결합이 더 존재하는 불포화도가 높은 sterol로 추정할 수 있었다.

몰레나물의 항균 스펙트럼

몰레나물 hexan 분획물을 *V. parahaemolyticus* 등 6종의 식중독 미생물을 대상으로 항균 스펙트럼을 실험한 결과는 Fig. 4와 같다.

몰레나물 hexan 분획물을 각각 25, 50, 100, 500 ppm 첨가 하였을 때 *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*는 실험 최저 농도인 25 ppm에서도 72시간까지 완전 증식 억제 효과를 나타내었으며, *V. parahaemolyticus*에 대해서는 50 ppm 이

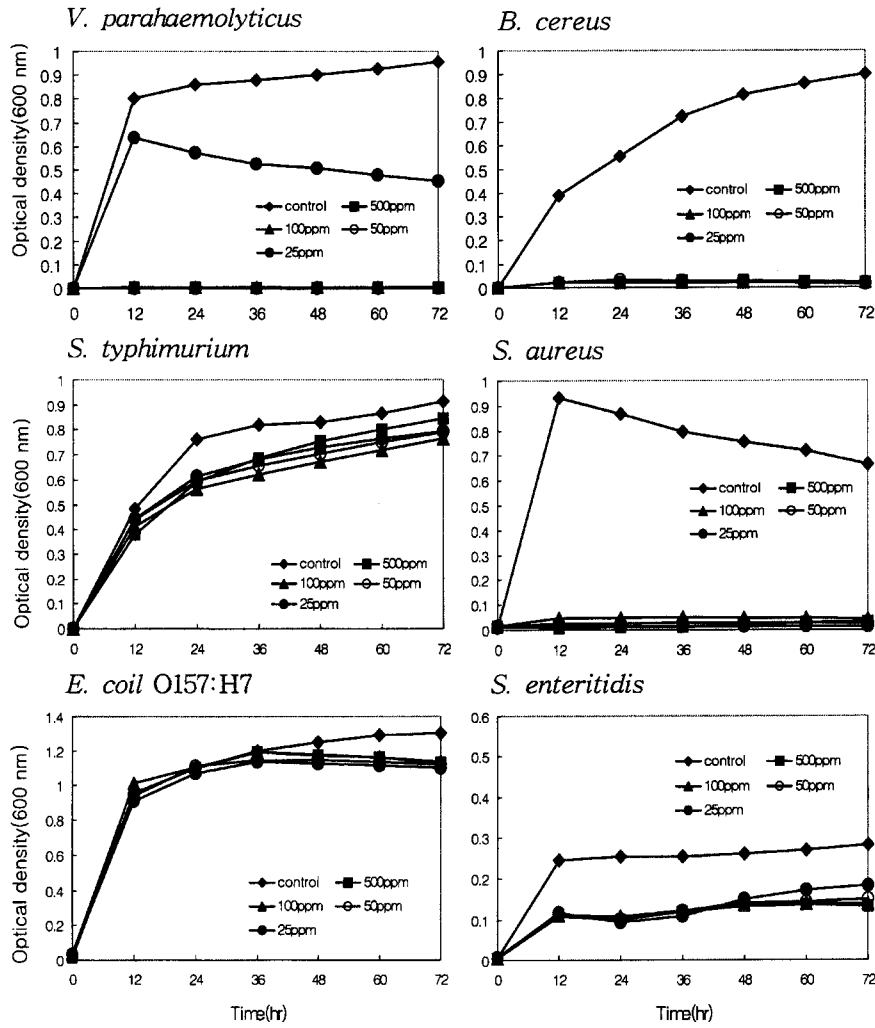


Fig. 4. Growth inhibition by n-hexane fraction of *Hypericum ascyron* L. on several food borne microorganisms for 72 h.

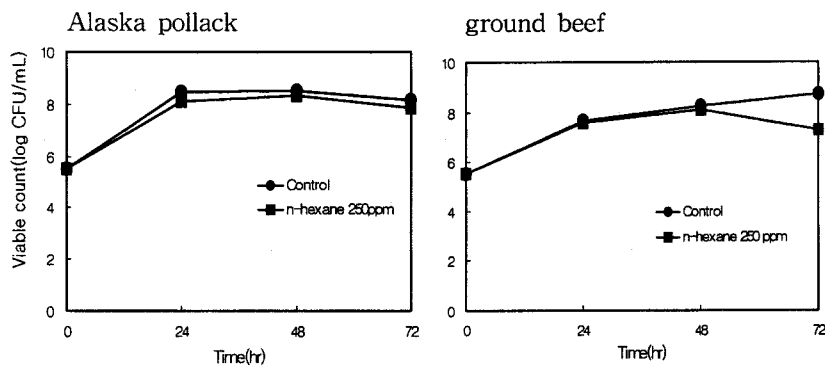


Fig. 5. Viable count of *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 in ground Alaska pollack and ground beef containing n-hexane fraction of *Hypericum ascyron* L. for 72 h at 32°C.

상 첨가시 72시간 동안 균증식이 억제 되었고, *Salmonella enteritidis*의 경우 대조구에 비하여 균증식이 억제 되었으나 농도별 균증식 억제 정도의 차이는 없었다. 그러나 *Salmonella typhimurium*과 *Escherichia coli*에 대해서는 균증식 억제 효과가 없었다.

이들 결과를 볼 때 물레나물 hexan 분획물은 *B. cereus*, *S.*

*aureus*에 대해서는 25 ppm, *V. parahaemolyticus*에 대해서는 50 ppm 이상 첨가시 효과적으로 균증식을 억제할 수 있는 강력한 항균활성을 가진 식물 추출물임을 확인할 수 있었다. 그러나 다른 실험군에 대하여는 항균효과가 없어 균증간 항균활성에 차이가 있음을 확인하였다.

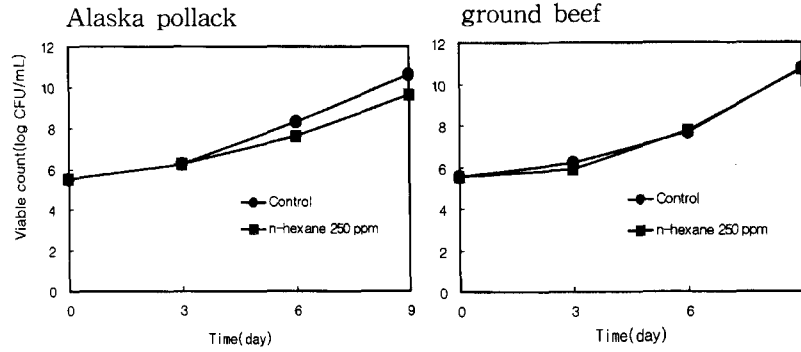


Fig. 6. Viable count of *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 in ground Alaska pollack and ground beef containing n-hexane fraction of *Hypericum ascyron* L. for 9 days at 5°C.

식품 적용실험

증식적온(32°C) 적용실험: 물레나물 hexan 분획물 250 ppm을 명태육에 첨가하여 32°C에서 72시간 저장하면서 24시간 간격으로 표준한천배양법으로 *L. monocytogenes* ATCC 19113의 생균수를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 명태육에 *L. monocytogenes* ATCC 19113을 접종한 대조구의 균수는 3.3×10^5 CFU/mL이며, 24시간 경과 후 2.8×10^8 CFU/mL으로 3 log cycle정도 증가한 후 72시간까지 그 수준의 균수(1.4×10^8 CFU/mL)를 유지하였다. 물레나물 hexan 분획물 250 ppm을 첨가한 처리구는 24시간 경과 후 그 균수가 1.3×10^8 CFU/mL이었고 대조구와 차이가 없었다. 또한 48시간, 72시간 경과 후 각각 그 균수가 2.1×10^8 CFU/mL, 7.2×10^7 CFU/mL으로 대조구보다 균수는 감소하였으나 항균활성은 미미하였다.

물레나물 hexan 분획물 250 ppm을 쇠고기에 첨가하여 32°C에서 72시간 저장하면서 24시간 간격으로 표준한천배양법으로 생균수를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 대조구는 초기 접종 균수가 3.3×10^5 CFU/mL이었고, 24, 48, 72시간에는 각각 4.6×10^7 CFU/mL, 1.8×10^8 CFU/mL, 5.2×10^8 CFU/mL이었다. 물레나물 hexan 분획물 250 ppm을 첨가한 처리구는 24, 48, 72시간에 각각 3.8×10^7 CFU/mL, 1.3×10^8 CFU/mL, 1.9×10^7 CFU/mL의 균수를 보였고 대조구와 비교해 보았을 때 항균효과가 없었다.

저온(5°C) 적용실험: 물레나물 hexan 분획물을 250 ppm을 명태육에 첨가하여 5°C에서 9일간 저장하면서 3일 간격으로 표준한천배양법으로 생균수를 측정된 결과는 Fig. 6과 같다.

Fig. 6에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19113만을 접종한 대조구의 초기 균수는 3.3×10^5 CFU/mL, 3일 경과 후 4.0×10^6 CFU/mL으로 1 log cycle 증가한 후 6일 경과 후 3 log cycle, 9일 경과 후 5 log cycle정도가 증가한 반면에, 물레나물 hexan 분획물을 250 ppm 첨가한 처리구는 3, 6, 9일째 각각 1.8×10^6 CFU/mL, 3.8×10^7 CFU/mL, 3.8×10^9 CFU/mL로 그 균수가 증가하였으나 대조구에 비하여 그 균수의 증가추세는 낮아져 저온에서는 물레나물 hexan 분획물이 증식억제 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

물레나물 hexan 분획물 250 ppm을 쇠고기에 첨가하여 그 항균효과를 알아본 결과는 Fig. 6과 같다. Fig. 6에서 보면

물레나물의 hexan 분획물을 쇠고기에 처리한 구는 시간별로 그 균수 증가가 대조구와 거의 비슷하였다.

이들 결과를 종합해 보면 물레나물 hexan 분획물을 쇠고기나 명태육에 첨가하여 그 항균효과를 살펴보았을 때 32°C 저장온도에서는 쇠고기나 명태육에 첨가된 물레나물 hexan 분획물의 항균효과가 발휘되지 못하였고, 5°C 저장온도에서는 명태육에 첨가된 물레나물 hexan 분획물에서만 증식억제 효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 배양액 상태보다 식품적용시 항균활성이 감소되는 이유는 식품성분의 보호효과 때문이라는 결과⁽¹⁴⁾와 일치하였다.

요 약

물레나물 에탄올 추출물과 hexan 분획물은 *L. monocytogenes* 5균주에 대해 25 ppm에서 72시간까지 완전 균증식 억제 효과가 있었다. 물레나물 hexan 분획물의 항균활성 물질을 분리, 정제하여 얻은 H2-5-2 소회분의 경우 실험 MIC가 10 ppm으로 그 항균력을 생균수로 나타내었을 때 초기 접종 균수보다 0.5 log cycle정도 감소하여 그 살균효과를 알 수 있었다. 물레나물 hexan 분획물의 항균 스펙트럼을 살펴보면 *B. cereus*나 *S. aureus*에 대해서는 실험 최저 농도인 25 ppm에서도 72시간까지 완전 증식억제 효과를 나타내었으며, *V. parahaemolyticus*에 대해서는 50 ppm 첨가시 72시간 동안 균증식이 억제되었다. 물레나물의 항균활성 물질은 불포화도가 높은 sterol로 추정되었다. 쇠고기와 명태육 마쇄물에 물레나물 hexan 분획물을 첨가하여 32°C와 5°C에서 식품 적용 실험을 실시한 결과 32°C 저장온도에서는 쇠고기, 명태육에 첨가한 물레나물 hexan 분획물의 항균효과가 나타나지 않았고, 5°C 저장온도에서는 명태육에 첨가된 물레나물 hexan 분획물은 항균효과가 있었다. 그러나 물레나물 hexan 분획물의 항균효과는 배양액 상태보다 감소하였다.

감사의 글

이 논문은 보건의료기술 연구개발사업(관리번호: HMP-99-F-06-001, 식품중 각종 위해요인의 위해성 평가와 관리방안 수립에 관한 연구)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사하는 바입니다.

문 헌

1. Im, R.J. Encyclopedia of Chosun Medicinal Plant III. Hankuk-moonwhasa, Seoul (1997)
2. Bae, K.W. Korean Medicinal Herb. Kyohacksa, Seoul (1997)
3. Kim, T.J. Korean Wild Flower. Kyohaksa, Seoul (1998)
4. Himejima, M. and Kubo, I. Antimicrobial agents from the cashew *Anacardium occidentale*(Anacardiaceae) nut shell oil. J. Agric. Food Chem. 39: 418-421 (1991)
5. Vargas, I., Sanz, I., Moya, P. and Prima-Yufer, E. Antimicrobial and antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed orange essence oil. J. Food Prot. 62: 929-932 (1999)
6. Lee, H.S. and Ahn, Y.J. Growth-inhibition effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on human intestinal bacteria. J. Korean Agric. Chem. Soc. 46: 8-19 (1998)
7. Smith, J.L. and Marmer, B.S. Growth temperature and action of lysozyme on *Listeria monocytogenes*. J. Food Sci. 56: 1101-1103 (1991)
8. Delaquis, P.J., Sholberg, P.L. and Stanich, K. Disinfection of mung bean seed with gaseous acetic acid. J. Food Prot. 62: 953-957 (1999)
9. Dickson, J.S. Acetic acid action on beef tissue surfaces contaminated with *Salmonella typhimurium*. J. Food Sci. 57: 297-301 (1992)
10. Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, J. P. and Begin, A. Inhibition effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. J. Food Prot. 60: 246-253 (1997)
11. Janes, M.E., Nannapaneni, R. and Johnson, M.G. Identification and characterization of two bacteriocin-producing bacteria isolation from garlic and ginger root. J. Food Prot. 62: 899-904 (1999)
12. EL-Ziney, M.M. and Debevere, J.M. The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. J. Food Prot. 61: 1275-1280 (1998)
13. Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P. and Hill, C. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against food borne pathogens. J. Food Prot. 62: 1011-1016 (1999)
14. Ahn, Y.S. Isolation and identification of antimicrobial substance from *Ruta graveolens* Linne and *Mallotus japonicus* Muell on *Listeria monocytogenes*. MS thesis, Chonbuk National University, Chonju, Korea (2000)
15. Shin, D.H., Han, J.S. and Kim, M.S. Antimicrobial effect of ethanol extracts of *Sinomenium acutum*(Thunb.) Rehd. et Wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var. *Glandulifera* Regel et Zucc on *Listeria monocytogenes*. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 627-632 (1994)
16. Han, J.S. and Shin, D.H. Antimicrobial effect of each solvent fraction of *Morus alba* Linne, *Sophora Flavescens* Aiton on *Listeria monocytogenes*. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 539-544 (1994)
17. Oh, D.H., Ham, S.S., Park, B.G., Ahn, C. and Yu, J.Y. Antimicrobial activity of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 957-963 (1998)
18. Yang, J.H., Eun, J.S. and Lee, N.H. Studies on the bioavailability of berberine preparations(II): antibacterial activity and bioavailability of coprecipitate of *Coptidis rhizoma* and *Glycyrrhizae radix*. J. Korean. Pharm. Sci. 25: 185-190 (1995)

(2001년 11월 2일 접수)