

용매별 정향 추출물의 항균활성

이옥환¹ · 정승현² · 손종연^{1*}

¹국립 한경대학교 식품생물공학과 식품생물산업연구소
²오뚜기중앙연구소

Antimicrobial Activity of Clove Extract by Extraction Solvents

Ok-Hwan Lee¹, Seung-Hyeon Jung² and Jong-Youn Son^{1*}

¹Institute of Food Industry and Biotechnology Department of Food and
Hankyong National University, Gyeonggido 456-749, Korea
²Ottogi Research Center, Gyeonggido 431-070, Korea

Abstract

This study was investigated the antimicrobial activity of clove extracts according to extraction solvents. The extracts were tested for their antimicrobial activity against several food spoilage microorganisms including *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. The methanol extract showed stronger antimicrobial activities than water extract. However, petroleum ether extract did not show antimicrobial activity. The water extract of clove showed growth inhibition effect against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*, whereas no effect against *Bacillus subtilis*. The methanol extract of clove extracts showed more sensitive antimicrobial activity in Gram (+) bacteria than in Gram (-) bacteria. The antimicrobial activities were increased with increasing concentration of the clove extract.

Key words: clove, antimicrobial activity, extraction solvent

서 론

식품산업의 발달에 따라 식품 보존에 대한 필요성이 증대되어 다양한 합성 보존제가 이용되고 있으나 이러한 보존제들은 안전성의 문제로 인하여 소비자들은 점차 합성 보존제의 사용을 기피하는 경향을 보이고 있다(1-3). 따라서 인체에 무해한 천연식품 보존제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(4). 최근 천연물 성분연구에 대한 관심이 고조되어 자초, 황백, 유백피, 방기 등의 한약재 추출물에 대한 항균성 연구가 많이 보고되고 있다(4-6). 외국에선 음식에 향을 내기 위해 사용하였던 향신료의 항균작용에 관한 연구가 많이 이루어져왔는데, 이들 향신료들의 항균작용은 향신료로부터 추출한 정유성분에 기인하는 것으로 알려져 있다(7-9).

향신료의 일종인 정향(Clove)은 정향나무(*Eugenia caryophyllata* Thumb)의 꽃이 피기전의 꽃봉오리를 따서 말린 것으로 오래 전부터 유럽의 각국에서 각종 육류와 야채요리에 널리 이용되고 있으며, 우리나라에서도 본래의 향미강화, 나쁜 향미 억제 등의 목적으로 널리 이용되고 있다(10,11).

정향에 대한 연구로 Ueda 등(12)은 각종 향신료의 알코올 추출물이 Bacillaceae과의 세균에 대한 항균효과, Farag 등

(13,14)은 sage, rosemary, cumin, caraway, clove, thyme의 정유성분에 대한 항균효과, Chung 등(15)은 카레 향신료 정유성분의 항균효과, Park과 Choi 등(16)은 저온 저장중 clove가 *Listeria monocytogenes*와 *Salmonella typhimurium*의 생존에 미치는 영향, Lee 등(17)은 정향으로부터 추출한 항응고활성 획분의 기능적 특성, Park(18)의 Clove에 의한 *Escherichia coli* O157:H7의 증식과 생존억제 등의 연구가 이루어졌다. 이와 같이 향신료 그대로 또는 분말로 사용하거나, 물 추출물이나 증기로 추출한 정향유만을 대상으로 각각의 항균효과를 검토하고 있다. 따라서 본 연구는 극성이 각기 다른 용매(물, 메탄올 및 석유 에테르)를 이용하여 정향 추출물을 제조하였고 이들 추출물의 항균성을 paper disc agar diffusion법과 liquid culture에서 생육저해 효과를 비교, 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 정향은 탄자니아의 잔지바르 지방에서 생산된 것으로 (주)오뚜기로부터 제공받아 사용하였고 정향

*Corresponding author. E-mail: nawin98@chol.com
Phone: 82-31-670-5155, Fax: 82-31-677-0990

을 분쇄기(IKA M20, IKA, Germany)로 약 40~50 mesh로 조분쇄하여 일반분석 및 정향 추출물 제조에 사용하였다.

일반성분 분석

정향의 일반성분은 AOAC법(19)에 따라 수분은 105°C 상압가열건조법, 조단백질은 semi-microkjeldahl, 조지방은 soxhlet 추출법, 조회분은 550°C 직접 회화법에 따라 분석하였으며, 탄수화물의 함량은 수분, 조단백, 조지방 및 조회분의 각 분석치를 합한 값을 100%에서 뺀 값으로 나타내었다.

시료의 제조 및 수율측정

분쇄된 정향분말 20 g을 정확히 칭량하여 추출용기에 옮겨 10배(w/v)의 물, 메탄올 및 석유 에테르를 각각 첨가한 후 환류냉각장치를 이용하여 4시간동안 추출하였다. 추출물은 여과지(Whatman No. 2, Maidstone, England)로 여과하여 40°C 이하에서 감압농축한 후 동결건조하여 냉동실(-20°C)에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출 수율의 측정은 추출에 사용한 시료의 건물에 대한 추출물의 총 고형분 함량의 백분율로 하였다.

총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 Folin-Dennis법(19)에 의하여 분석하였다. 즉, 증류수 7 mL에 DMSO에 녹인 시료 1 mL를 넣은 후 Folin-Dennis 시약을 0.5 mL를 첨가하였다. 정확히 3분 후에 sodium carbonate anhydrous 포화용액 1 mL와 증류수 0.5 mL를 넣은 후 UV/Visible spectrophotometer(Beckman, DU-65, USA)로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액과 비교하여 총페놀 함량을 구하였다. 표준용액으로는 tannic acid(Sigma Co., St. Louis, USA)를 사용하였다.

사용균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 식품의 부패나 변질에 관여하는 미생물로 Gram positive bacteria, Gram negative bacteria 등으로 실험에 사용된 균주 및 배지는 Table 1과 같다.

Paper disc법에 의한 항균활성 측정

추출용매별 정향추출물의 항균활성 검색은 paper disc agar diffusion법(20)을 응용하였다. 각 시험균주를 해당 액체 배지에 18~24시간 전배양하여 이 배양액을 0.1 mL씩을 petri-dish에 접종한 후 미생물의 종류에 따라 적정 한천배지 10 mL를 pouring하여 배지를 조성하였다. 여기에 시료 20 µL가

흡착된 멸균 paper disc(φ 8 mm, Advantec, Toyo Roshi Co. Japan)를 접촉시키고 37°C에서 12~24시간 동안 배양 후 형성된 저해 부위의 크기(mm)를 측정하였다.

Liquid culture에서 생육저해 효과 측정

본 실험에서 사용한 균주 중 Gram positive bacteria 2종류(*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*)와 Gram negative bacteria(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) 2종류를 선택하여 정향의 물, 메탄올 및 석유 에테르 추출물의 농도(w/v)가 각각 0.1%, 0.15%, 0.2% 및 0.25%가 되도록 조절된 TSB 배지에 배양액을 각각 0.1 mL씩 접종한 후 37°C에서 72시간까지 배양하면서 12~24시간 간격으로 균의 생육정도를 측정하였다. 균의 생육정도는 UV/Visible spectrophotometer(Beckman, DU-65, USA)를 이용하여 640 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시간에 따른 흡광도의 변화로 균의 생육 정도를 나타내었으며 모든 실험은 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

일반성분 및 용매별 추출수율

정향의 수분함량은 13.1%, 조단백질 5.6%, 조지방 18.8%, 조회분 5.6%, 탄수화물은 57.0%이었다. 추출수율은 물, 메탄올 및 석유 에테르에서 각각 35.1%, 27.5%, 5.1%로, 물 추출물에서 가장 높은 추출수율을 보였고 메탄올 및 석유에테르 추출물에 비해 약 1.3배 및 6.9배 높았다.

Paper disc법에 의한 항균활성

추출용매별 정향추출물의 항균력을 측정한 결과(Table 2), 물 추출물의 경우 *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* 및 *P. aeruginosa*에 대해서 항균력을 나타내었고 추출물의 농도(0.05~5%)가 증가함에 따라 항균효과도 증가하였다. 반면, *B. subtilis*에 대한 항균효과는 추출물의 농도가 높은 조건에서도 보이지 않았다. 이는 Jung 등(21)이 보고한 카레분과 향신료 추출물들의 항균연변이 효과에서 정향 물 추출물에서 어느 정도의 효과를 보인다는 결과와도 비슷한 경향이였다.

메탄올 추출물의 경우 모든 균에서 항균력을 나타냈으며, 특히 *S. aureus*에서 가장 강한 항균효과를 보였다. 그러나

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

	Strain	Media
Gram positive bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	BHI ¹⁾ & BHIA ²⁾
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12692	BHI & BHIA
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682	BHI & BHIA
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 144028	TSB ³⁾ & TSBA ⁴⁾
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15522	MRS ⁵⁾ & MRSA ⁶⁾

¹⁾Brain heart infusion (Difco). ²⁾Brain heart infusion agar (Difco).

³⁾Tryptic soy broth (Difco). ⁴⁾Tryptic soy broth agar (Difco).

⁵⁾Lactobacilli MRS broth (Difco). ⁶⁾Lactobacilli MRS broth agar (Difco).

Table 2. Antimicrobial activities of clove extracts according to extraction solvents

Microorganisms tested	Conc. (% , w/v)	Water	Methanol	Petroleum ether
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682	5	14 mm	16.5 mm	-
	3	13 mm	13.5 mm	-
	1	11 mm	13 mm	-
	0.5	10 mm	11 mm	-
	0.1	-	-	-
	0.05	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	5	-	16.5 mm	-
	3	-	15 mm	-
	1	-	11 mm	-
	0.5	-	10 mm	-
	0.1	-	-	-
	0.05	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12692	5	15 mm	17 mm	-
	3	13.5 mm	15 mm	-
	1	11 mm	11.5 mm	-
	0.5	10 mm	11 mm	-
	0.1	-	-	-
	0.05	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 144028	5	13.5 mm	16 mm	-
	3	11.5 mm	13.5 mm	-
	1	10 mm	12 mm	-
	0.5	9 mm	10 mm	-
	0.1	-	-	-
	0.05	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15522	5	13.5 mm	16 mm	-
	3	12 mm	13 mm	-
	1	11 mm	12 mm	-
	0.5	10 mm	11 mm	-
	0.1	-	-	-
	0.05	-	-	-

석유 에테르 추출물의 경우, 첨가된 추출물의 농도나 측정균의 종류에 관계없이 항균효과를 보이지 않았다.

이상의 결과에서 메탄올 추출물은 물 추출물이나 석유에테르 추출물보다 항균력이 우수하였다. 이는 용매별 정향 추출물의 총 페놀함량과 비교해 볼 때, 물, 메탄올 및 석유에테르 추출물의 총 페놀함량은 각각 28.4, 32.3 및 9.2%로 메탄올 추출물에서 가장 많은 함량을 보였으며 물 추출물에 비해 약 1.1배, 석유에테르 추출물에 비해 약 3.5배의 총 페놀함량을 보였다. 즉, 총 페놀함량이 높은 메탄올 추출물에서 가장 강한 항균효과를 보였고, 상대적으로 총 페놀함량이 적은 석유에테르 추출물에서는 항균효과를 보이지 않아 정향에 함유되어 있는 폴리페놀성 물질과 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 정향의 대표적인 생리활성 물질로는 eugenol, chavicol, β -caryophyllene, kaempferol, quercetin의 7번 위치가 methyl화 된 rhamnetin 등의 flavonoid류와 eugeniin, 1-desgalloyleugeniin 등의 tannin류, 일부 수용성 페놀성 물질들이 있는데 이들은 주로 물이나 메탄올과 같은 극성에 가까운 유기용매에 쉽게 용출되며 석유에테르와 같은 비극성 용매에는 용출되지 않는 것으로 알려져 왔다(16). 즉, 메탄올이나 물 추출물이 석유에테르 추출물에 비해 강한 항균효과를 보인 것은 메탄올 추출물에는 eugenol성분들이 추출되었

고 물 추출물에는 수용성 페놀성분들이 추출되어 강한 항균력을 보인 것으로 사료된다.

Liquid culture에서 생육저해 효과 측정

정향 물 추출물의 생육저해 효과를 측정된 결과(Fig. 1), *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*에 대해 강한 항균력을 보였으며, *B. subtilis*에 대해서는 항균효과를 보이지 않았다. Paper disc법에 의한 항균효과의 결과와도 비슷한 경향으로서 물추출물에 의한 생육저해 효과는 *E. coli*, *S. typhimurium*에서 가장 강하게 나타났다. 한편, *S. aureus*의 0.5%, 0.25% 농도에서는 강한 항균력을 보인 반면, 0.1%, 0.15% 농도에서 오히려 대조군보다 더 생육이 촉진되었는데 이는 낮은 농도에서는 오히려 추출물의 성분이 균의 생육을 활발하게 하게 하는 것으로 생각된다. 이는 Baek 등(22)의 왕대 줄기 추출물의 시간 경과에 따라 생육 저해 효과를 연구한 결과와도 같은 경향을 보였다.

메탄올 추출물의 생육저해 효과를 조사한 결과(Fig. 2) *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *S. aureus*에서 모두 항균효과를 나타내었다. 특히 물 추출물에서 효과가 없었던 *B. subtilis*에서 비교적 강한 항균효과를 보였으며 생육저해 효과가 있어서 G(-)균인 *E. coli*, *S. typhimurium*보다 G(+)

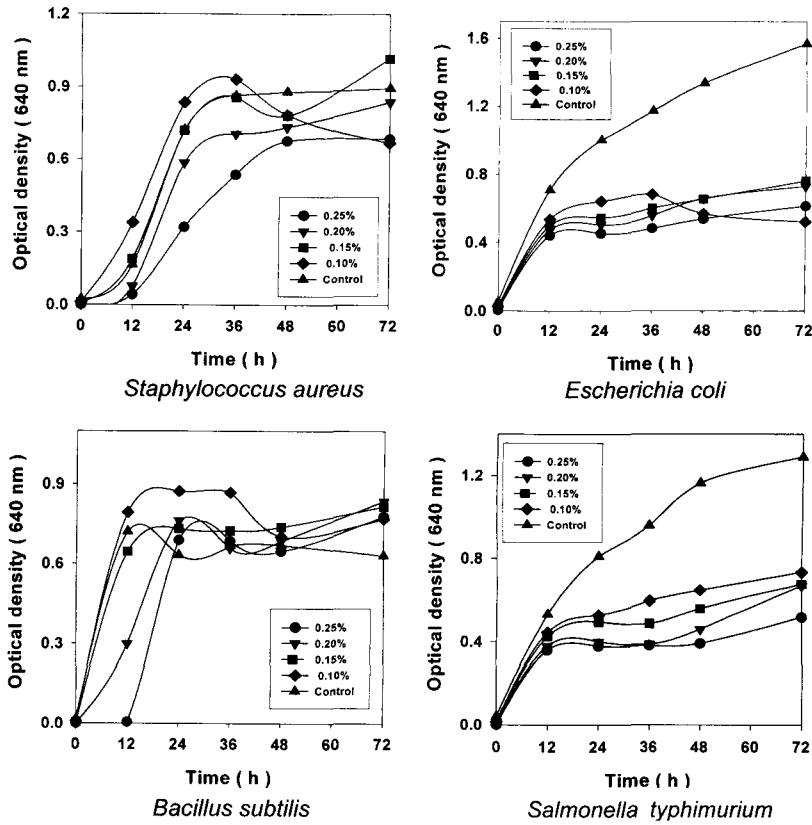


Fig. 1. Growth inhibition of water extract of clove.

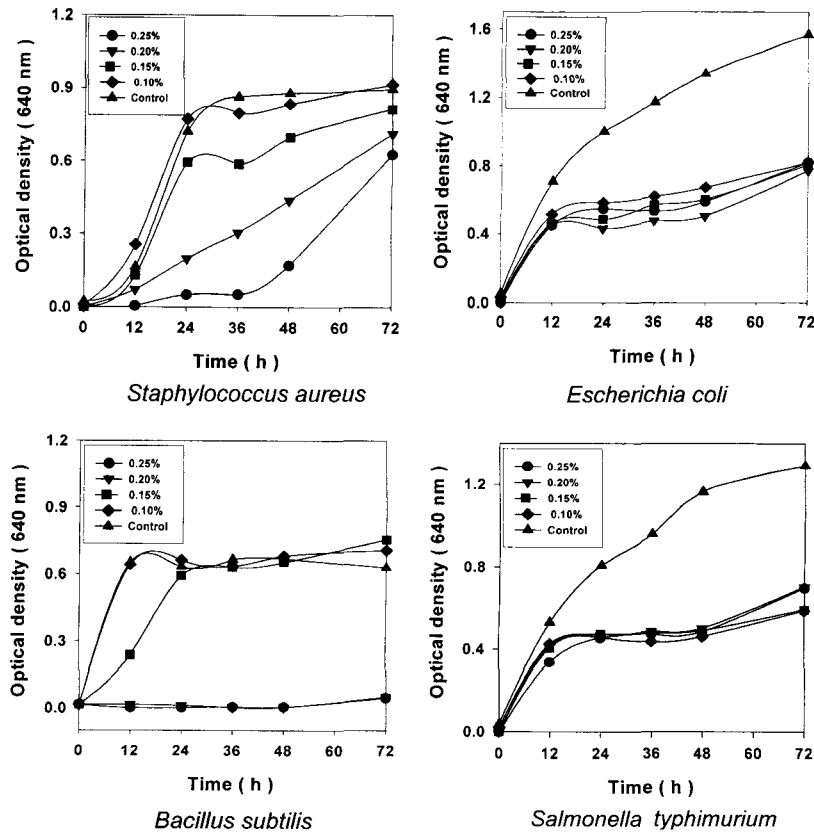


Fig. 2. Growth inhibition of methanol extract of clove.

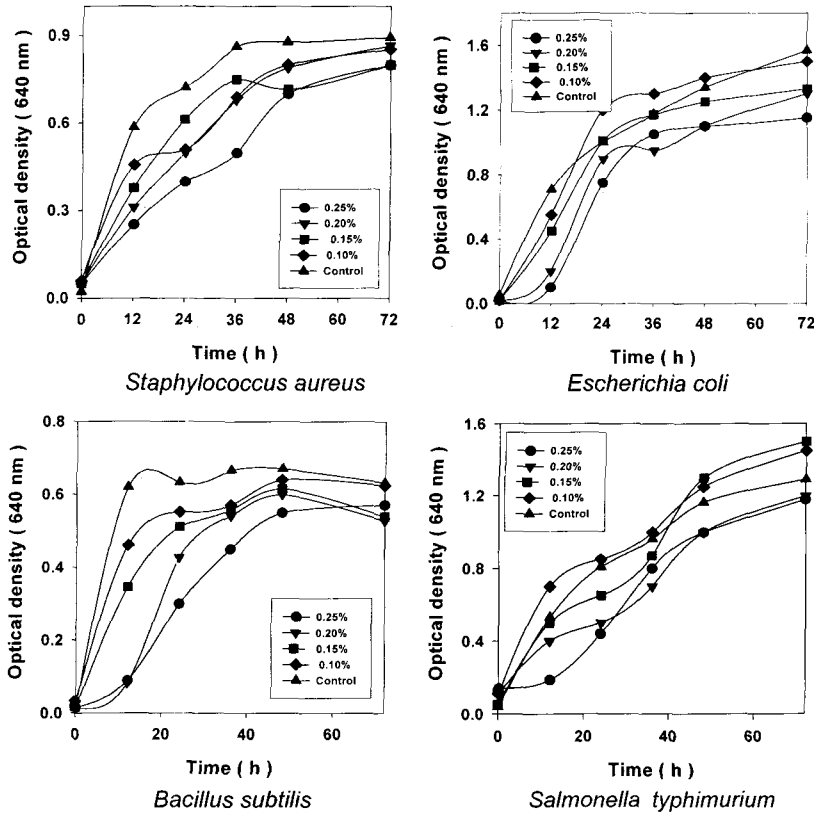


Fig. 3. Growth inhibition of petroleum ether extract of clove.

B. subtilis, *S. aureus*에 대한 생육저해 효과가 크게 나타났다. Farag 등(13)과 Chung 등(15)의 결과와 비교해 볼 때 G(-)보다 G(+)-균에 대하여 강한 항균성을 가진다는 보고와 같은 경향을 보였다.

석유 에테르 추출물의 경우, 모든 균에 대하여 생육저해 효과는 보이지 않았으며 paper disc법을 이용한 항균력에서와 같이 석유 에테르 추출물에 의한 생육저해 효과도 보이지 않았다(Fig. 3).

이상의 결과로 볼 때 추출물별 생육저해 효과는 메탄올>물>석유 에테르 순이었으며 paper disc법을 이용한 항균효과의 결과와도 같은 경향으로 추출물의 농도에 비례하여 항균력도 증가하였다.

요 약

본 연구에서는 추출용매(물, 메탄올, 석유 에테르)에 따른 정향추출물의 항균성을 비교, 검토하고자 하였다. 물 추출물의 경우 *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*에 대해서 항균효과를 나타내었으며 *B. subtilis*에서는 높은 농도에서도 항균력을 보이지 않았다. 메탄올 추출물의 경우 모든 균에서 항균성을 나타내었고, 특히 *S. aureus*에 대한 항균성이 매우 우수하였으며, 반면에 석유 에테르 추출물의 경우에는 항균효과를 나타내지 않았다. 액체배지에서 정향의 생육저해 효과는 물 추출물의 경우 *B. subtilis*를 제외

한 모든 균에서 항균력을 보였으며, 균종별로는 *S. aureus*보다 *E. coli*, *S. typhimurium*에서 더 강한 항균력을 보였다. 메탄올 추출물의 생육저해 효과를 조사한 결과 모든 균에서 강한 항균력을 보였고, G(-)균보다 G(+)-균에 대한 생육저해 효과가 크게 나타났다. 반면 석유 에테르 추출물은 모든 균에 대해서 추출물의 농도에 관계없이 생육저해 효과를 보이지 않았다. 따라서 정향 추출물의 항균력은 메탄올>물>석유에테르 추출물 순이었다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 오투기 장학재단의 연구비 지원으로 수행된 연구 결과로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Park SK, Park JC. 1994. Antimicrobial activity of extracts and coumaric acid isolated from *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 9: 506-511.
2. Kim YS, Kim MN, Kim JO, Lee JH. 1994. The effect of hot water-extract and flavor compounds of mugwort on microbial growth. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 994-1000.
3. Han JS, Shin DH. 1994. Antimicrobial effect of each solvent fraction of morus alba linne, *sopora flavescens* alton on *Listeria monocytogenes*. *Korean J Food Sci Technol* 26: 539-544.
4. Park UY, Chang DS, Cho HR. 1992. Antimicrobial effect

- of lithospermi radix (*Lithospermum erythrorhizon*) extract. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 97-100.
5. Park UY, Chang DS, Cho HR. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 91-96.
 6. Lee HY, Kim CK, Sung TK, Mun TK, Lim CJ. 1992. Antibacterial activity of *Ulmus pumila* l. extract. *Kor J Microbiol Biotechnol* 20: 1-5.
 7. Hitokoto H, Morzumi S, Wauke T, Sakai S, Kurata H. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 4: 818-826.
 8. Karapinar M, Aktug SE. 1987. Inhibition of food-borne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *Inter J Food Microbiol* 4: 161-167.
 9. Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y. 1981. Antifungal activity of components of essential oils. *Agric Biol Chem* 45: 945-955.
 10. Farrell KT. 1985. *Spices, condiments, and seasonings*. Van Nostrand Reinhold Co, New York. p 86-91.
 11. Park CS. 1998. Antibacterial activity of edible plant against pathogenic bacteria. *Korean J Postharvest Sci Technol* 5: 89-96.
 12. Ueda S, Yamashita H, Kuwabara Y. 1982. Inhibition of *Clostridium botulinum* and *Bacillus* sp. by spices and flavouring compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 29: 389-397.
 13. Farag RS, Daw SY, Heweid FM, El-Baroty GSA. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J Food Prot* 52: 665-672.
 14. Farag RS, Daw ZY, Abo-Raya SH. 1989. Influence of some essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J Food Sci* 54: 74-81.
 15. Chung CK, Park OK, Yoo IJ, Park KM, Choi CU. 1990. Antimicrobial activity of essential oils of curry spices. *Korean J Food Sci Technol* 22: 716-719.
 16. 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 Food Sci Technol* 13: 602-608.
 17. Lee JI, Lee HS, Jun WJ, Yu KW, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. 2000. Physiological characteristics of anti-coagulation fraction from *Eugenia caryophyllata*. *J Korean Soc Food Nutr* 29: 712-718.
 18. Park CS. 1998. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by clove. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 14: 9-15.
 19. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. USA.
 20. Kim MS, Lee DC, Hong JE, Chang KS, Cho HY, Kwon YK, Kim HY. 2000. Antimicrobial effects of ethanol extracts from Korean and Indonesian plants. *Korean J Food Sci Technol* 32: 949-958.
 21. Jung SH, Chung MS, Lee JS, Park KM. 2002. Antimutagenic effects of extracts of curry powder and its individual spice. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 352-357.
 22. Baek JW, Chung SH, Moon GS. 2002. Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. *Korean J Food Sci Technol* 6: 1073-1078.

(2003년 11월 20일 접수; 2004년 2월 26일 채택)