

부추의 항미생물 활성물질

김선재 · 박근형
전남대학교 식품공학과

Antimicrobial Substances in Leek (*Allium tuberosum*)

Seon-Jae Kim and Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

Abstract

The antimicrobial activity of leek (*Allium tuberosum*) was investigated against 17 strains of microorganisms. Methanol extracts of leek showed the growth inhibition effects on the wide range of microorganisms including gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeasts. The extracts were analysed by using solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, TLC, silica gel partition chromatography and HPLC techniques. Six components whose molecular weights range from 200 to 400 were confirmed to have the antimicrobial activity.

Key words: antimicrobial activity, antimicrobial substances, *Allium tuberosum*

서 론

김치의 천연 보존제로서의 이용가능성을 검토하고자 김치발효에 관여하는 미생물^(1,2)인 *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*과 *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 식물성 김치발효 추출물의 항미생물 활성을 조사한 결과 그 중 부추 methanol 추출물이 김치의 중기 숙성균^(3,4)인 *Ped. cerevisiae*와 김치의 숙성중 산 생성능이 강한 *L. plantarum*⁽⁵⁾의 증식 억제능이 높아 김치산패 억제제로 부추 추출물의 이용 가능성을 보고한 바⁽⁶⁾ 있으며, 김치에 부추 추출물의 첨가에 의해 산패 지연효과가 인정되어 보고한 바⁽⁷⁾ 있다.

부추(*Allium tuberosum*)^(8,9)는 우리나라 산야에서 자생하며 식물분류학상 *Allium*속에 속하며 실부추(*A. anisopodium*), 한라부추(*A. cyanem*), 한라세모부추(*A. cyanem* var. *deltoides*), 세모부추(*A. deltoidefistulosum*), 두메부추(*A. senescens*), 좀부추(*A. senescens* var. *minor*), 돌부추(*A. splendens*), 산부추(*A. thunbergii*), 참산부추(*A. sacculiferum*) 등이 있다. 개화시기는 5월부터 11월까지이며 독특한 맛과 향기가 있어서 이른 봄에 인경

과 근엽을 나물로서 애용해 왔을 뿐만 아니라 한방에서는 보혈, 청혈, 구충, 이뇨, 건위, 건뇌, 강심, 진통, 해독제 등의 약재⁽¹⁰⁾ 그리고 중풍, 코출혈, 치질, 당뇨, 치루, 타박상에도 이용⁽¹¹⁾되고 있다.

본 연구에서는 부추에 존재하는 항미생물 활성물질에 관한 정보를 얻고자 Gram양성 세균, Gram음성 세균, 효모 그리고 곰팡이를 포함한 다양한 미생물을 대상으로 항미생물 활성의 검색 및 부추에 존재하는 항미생물 활성물질의 탐색을 시도하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 부추(*Allium tuberosum*)는 10월 경에 생산농가에서 구입하여 실험재료로 사용하였다.

항미생물 활성 검색용 추출물의 조제

항미생물 활성을 검색하기 위해서 부추를 과량의 MeOH과 함께 homogenizer (NISSEI AM-7)로 마쇄하면서 추출하고 G₃ glass filter로 여과하여 얻어진 여액을 aspirator (EYELA COOL ACE CA-111)가 장치된 진공농축기(EYELA TYPE N-N)로 감압농축한 후 신선 부추 0.3 g, 1.0 g에 상당하는 추출물을 취하

Corresponding author: Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 300 Yongbong-Dong, Kwangju 500-757, Korea

였다.

검정 미생물

향미생물 활성을 검색하기 위해서 Gram 양성 세균 8주(*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*), Gram 음성 세균 4주(*Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*), 효모 3주(*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis*) 그리고 곰팡이 2주(*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*)의 총 17주를 사용하였다.

배지

부추 추출물의 향미생물 활성을 측정하기 위해서 사용된 배지는 세균의 경우 젖산균에 대해서는 *Lactobacilli* MRS 배지(Difco)⁽¹²⁾를, 그밖의 세균에 대해서는 nutrient 배지(Difco)⁽¹³⁾, 효모는 YM배지(Difco)⁽¹⁴⁾ 그리고 곰팡이는 potato dextrose agar배지(Difco)⁽¹⁵⁾를 사용하였다.

향미생물 활성 측정

부추 추출물의 향미생물 활성을 측정하기 위해 각각의 사용배지를 이용하여 세균은 37°C에서 24시간 동안, 효모는 30°C에서 24시간 그리고 곰팡이는 30°C에서 48시간 동안 3회 반복하여 전배양을 행한 후 실험균주로 하였다.

향미생물 활성의 측정은 45°C로 조절된 멸균배지 10 ml에 전배양액 0.1 ml를 옮겨 잘 혼합시킨 후 지름이 9.0 cm인 petri dish에 넣고 굳혔다. 여기에 부추 추출물이 함유되어있는 건조된 paper disc를 올려 놓고 0.85% 식염수(75 µl)로 확산시켜 세균은 37°C에서 16시간, 효모는 30°C에서 16시간 그리고 곰팡이는 30°C에서 48시간 배양하여 paper disc 주위의 저해환의 크기(mm)로 활성의 정도를 측정하였다.

추출 및 용매분획

신선한 부추 9 kg을 과량의 MeOH과 함께 homogenizer로 마쇄하면서 추출하고 G₃ glass filter로 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 MeOH을 제거한 다음 EtOAc와 buffer용액(0.2 M Na₂HPO₄·NaH₂PO₄, pH 7.5)으로 buffer층과 중성구(EtOAc-soluble neutral fr.)로 분배하였다. 중성구를 *n*-hexane과 80% MeOH로 분배하여 얻어진 *n*-hexane구와 80% MeOH구에 대해

*L. plantarum*과 *Staphy. aureus*를 대상으로 향미생물 활성을 검정하였다.

Silica gel adsorption chromatography

Silica gel (70 g, 70-230 mesh, column chromatography-용, Merck사)을 CHCl₃으로 slurry를 만들어 column (2.9×25.5 cm)에 충전시킨 후, CHCl₃-MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50% (농도별로 325 ml씩)까지 단계적으로 증가시킨 step-wise 용출방법으로 용출분획⁽¹⁶⁾하여 향미생물 활성을 검정하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography

Sephadex LH-20 (25-100 mesh, Pharmacia사)을 MeOH-CHCl₃ (4:1 v/v) 용매계로 하여 column (bed volume 250 ml)에 충전하고 동 용매계로 용출분획⁽¹⁷⁾하고 향미생물 활성을 검정하였다.

Thin layer chromatography (TLC)

시료를 MeOH-CHCl₃ (1:1, v/v) 용매계로 plate (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, 1.0 mm, Merck사)에 banding한 후, CHCl₃-EtOH (10:1, v/v)용매계로 15 cm 전개시킨 후, UV 및 육안에 의해 확인된 분리양상에 따라 절취하고, MeOH-CHCl₃ (1:1, v/v)용매계로 용출하고 각각의 획분에 대해 향미생물 활성을 검정하였다.

Silica gel partition chromatography

Silica gel (70-230 mesh, column chromatography-용, Merck사)에 소량의 물을 가하여 coating시키고 *n*-hexane으로 slurry를 만들어 column (gel 14 g, 1.5×22.0 cm; gel 10 g, 1.5×15 cm; gel 5 g, 1.3×13.5 cm)에 충전시킨 후, *n*-hexane-EtOAc 용매계로 EtOAc농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50% (gel 14 g, 농도별로 140 ml 씩; gel 10 g, 농도별로 100 ml 씩, gel 5 g, 농도별로 50 ml)까지 step-wise 용출방법으로 용출분획하여 향미생물 활성을 검정하였다.

HPLC

시료를 Sep-pak (C₁₈ type과 silica type)으로 전처리하고 filter (GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2 µm)로 여과한 후, Radial-Pak C₁₈ column (0.8×10.0 cm, 60% MeOH)과 CLC-ODS column (0.46×25 cm, 50% MeOH)은 분당 각각 1.0 ml와 0.5 ml로 용출분획하여 향미생물 활성을 검정하였다.

결과 및 고찰

부추 추출물의 항미생물 활성

부추 추출물의 항미생물 활성을 검색하기 위해서 Gram양성의 세균과 Gram음성의 세균, 효모 그리고 곰팡이에 대해 신선 부추 0.3 g, 1.0 g에 상당하는 MeOH추출물로 항미생물 활성을 경시적으로 측정하고 관찰한 결과를 Table 1에 나타냈다. 부추 0.3 g 상당의 추출물에서는 *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *Ped. cerevisiae* 그리고 *Staphy. aureus*에 대해 미생물 증식억제능을 보였다. 부추 1.0 g 상당의 추출물은 *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*를 제외한 8종의 세균과 *Saccharomyces fragillis*를 제외한 2종의 효모에 대해 항미생물 활성을 보였으나 곰팡이에서는 항미생물 활성이 나타나지 않았다. 부추의 1.0 g 상당 추출물에 활성을 보이는 10종의 미생물은 6일이상 미생물 증식억제능이 지속되었다. 특히 화농성질환 병원균이며 식중독 원인균인 *Staphy. aureus*, 식품의 발효에 관여하는 *Sacch. cerevisiae* 그리고 식중독 미생물인 *Salmonella typhimurium*에 대해 높은 미생물 증식 억제능을 나타

냈고 김치숙성에 관여하는 *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *Ped. cerevisiae* 그리고 사람의 피부에 존재하는 *Staphy. epidermidis*와 식품오염의 지표균인 *E. coli*에 대하여 미생물 증식 억제능을 보였다. 부추 추출물은 17종의 미생물을 대상으로 조사된 항미생물 활성 검정의 결과로 보아 곰팡이 이외의 미생물에 대해 광범위한 미생물 증식 억제능을 갖고 있는 것으로 생각되었다.

항미생물 활성물질의 정제

부추 9 kg을 MeOH로 추출하고 용매분획하여 얻어진 수용액구, *n*-hexane구, 80% MeOH구를 대상으로 부추 3.0 g에 상당하는 추출물로 항미생물 활성을 검정한 결과, 80% MeOH구에서 미생물 증식 억제능이 인정되었다. 용매분획의 결과로 보아 부추에 존재하는 항미생물 활성물질은 중성물질이며 대부분의 항미생물 활성물질이 80% MeOH구로 이행되어 어느정도 극성을 갖는 물질로 생각되었다.

활성획분인 80% MeOH획분(7.0 g)을 정제하고자 silica gel adsorption chromatography로 분획하고 *L. plantarum*을 검정 미생물로 하여 부추 50 g에 상당하

Table 1. Antimicrobial activities of methanol extracts of *Allium tuberosum* against various microorganisms

Microorganisms	Incubation Time (hour)															
	12		24		36		48		60		84		120		144	
	A ¹⁾	B ²⁾	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Gram positive bacteria																
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10 ³⁾	13	9	13	- ⁴⁾	13	-	13	-	13	-	9	-	9	-	9
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	10	12	-	11	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> KCTC 3104	13	19	13	18	13	18	12	18	12	15	10	14	10	13	10	12
<i>Leu. mesenteroides</i> KCTC 6633	16	21	15	20	15	20	14	15	14	15	12	15	12	13	9	10
<i>Ped. cerevisiae</i> KCTC 1628	14	18	14	18	14	17	13	17	13	16	13	14	12	14	10	12
<i>Staphy. aureus</i> ATCC 25923	15	26	15	26	14	25	13	25	13	24	13	19	13	16	10	13
<i>Staphy. epidermidis</i> ATCC 12228	12	25	12	25	11	25	10	24	10	19	9	16	-	15	-	13
<i>St. faecalis</i> ATCC 10541	9	10	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram negative bacteria																
<i>E. coli</i> ATCC 10536	10	16	10	16	10	16	10	15	-	14	-	13	-	13	-	12
<i>Proteus sp.</i> MB 838	12	15	10	14	10	14	10	12	9	11	-	9	-	-	-	-
<i>Pseud. aeruginosa</i> ATCC 9027	10	14	9	13	-	13	-	12	-	10	-	9	-	-	-	-
<i>Sal. typhimurium</i> ATCC 19430	15	23	14	23	13	22	12	20	12	18	10	17	-	16	-	15
Yeasts																
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	9	16	-	16	-	15	-	15	-	14	-	13	-	11	-	9
<i>Sacch. cerevisiae</i> ATCC 9763	15	27	14	27	14	26	14	26	13	25	12	24	9	23	-	18
<i>Sacch. fragillis</i> ATCC 8582	10	15	10	14	9	12	-	11	-	9	-	-	-	-	-	-
Molds																
<i>Asp. flavus</i> KCTC 1375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Asp. parasiticus</i> ATCC 6170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾A: Extract of 0.3 g fr wt eq. of *Allium tuberosum*

²⁾B: Extract of 1.0 g fr wt eq. of *Allium tuberosum*

³⁾Clear zone on plate (mm)

⁴⁾-: No inhibition

는 추출물로 항미생물 활성을 검정하였더니 CHCl_3 내의 MeOH 농도 5-10% 용출획분(400-700 ml)에 활성이 인정되어 활성획분 1.67 g이 얻어졌다.

이 활성획분(1.67 g)을 MeOH- CHCl_3 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration (bed volume 250 ml) 으로 분획하고 *L. plantarum*을 검정 미생물로 하여 부추 70 g에相当하는 추출물로 항미생물 활성을 검정하였다. bed volume에 대한 elution volume의 비(V_e/V_t)가 0.74-0.92의 용출범위(465 mg)에 활성이 인정되었다. Molecular sieve 효과를 갖는 LH-20 column의 용출양상⁽¹⁷⁾으로 보아 부추에 존재하는 항미생물 활성 물질은 분자량이 200-400 정도의 물질로 추정되었다.

LH-20 column 활성획분을 TLC를 행한 결과, 4개의 band로 분리되어 각각의 band를 분취하고 용출한 획분에 대해 *L. plantarum*을 검정 미생물로 하여 부추 200 g에相当하는 추출물로 항미생물 활성을 검정하였다. R_f 0.32-0.37 (활성 I로 명명), R_f 0.44-0.53 (활성 II) 그리고 R_f 0.62-0.69 (활성 III)에서 활성이 인정되어, 활성획분으로 194.9 mg, 137.6 mg 그리고 68.1 mg을 각각 얻었다. 각 활성의 크기는 III, II 그리고 I 순으로 나타났다.

TLC결과는 부추추출물의 항미생물 활성물질은 단일물질이 아니라 복수의 물질이 존재함을 보여 주었다. TLC에서 얻어진 활성획분에 대해 silica gel partition chromatography를 행하였다. 활성획분을 용출하고 *L. plantarum* 보다 감도가 좋은 *Staphy. aureus*를 검정 미생물로 하여 활성 I은 부추 120 g에相当하는 추출물로 항미생물 활성을 검정한 결과, *n*-hexane 내의 EtOAc의 농도가 20-40%의 용출범위 294-602 ml에서 활성이 인정되어 활성획분으로 84.1 mg을 얻었다. 활성 II는 부추 100 g에相当하는 추출물로 항미생물 활성을 검정한 결과, *n*-hexane 내의 EtOAc의 농도가 20-30%의 용출범위 200-340 ml에서 활성이 인정되어 활성획분으로 55.0 mg을 얻었다. 그리고 활성 III은 부추 60 g에相当하는 추출물로 항미생물 활성을 검정한 결과, *n*-hexane 내의 EtOAc의 농도가 10-20%의 용출범위 50-110 ml에서 활성이 인정되어 활성획분으로 33.3 mg을 얻어 상당한 정제효과를 얻을 수 있었다.

HPLC에 의한 항미생물 활성물질의 분리

이상의 정제과정에서 어느정도 정제가 이루어졌기에 HPLC 분석을 시도하였다. 활성획분 I, II, III에 대해 Radial-Pak C_{18} column을 사용한 reverse phase의 HPLC로 분획하였다. 활성 I은 부추 500 g에相当하는 추출물로 항미생물 활성을 검정한 결과, retention

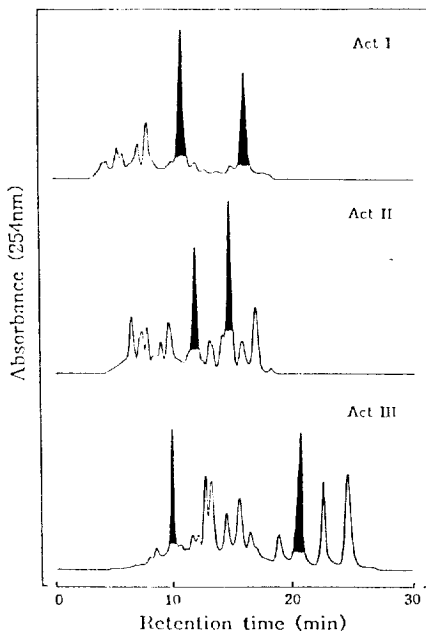


Fig. 1. HPLC chromatograms on CLC-ODS column of the active fractions from *Allium tuberosum* extract
■: active zone

time (t_R) 6.0-16.0분에서 활성이 인정되어 활성획분 44.6 mg을 얻었다. 활성 II는 부추 400 g에相当하는 추출물로 항미생물 활성을 검정한 결과, t_R 6.0-8.0분에서 활성이 인정되어 활성획분 23.5 mg을 얻었다. 그리고 활성 III은 부추 180 g에相当하는 추출물로 항미생물 활성을 검정한 결과, t_R 6.0-9.0분에서 활성이 인정되어 활성획분 5.0 mg을 얻었다.

Semi-preparative HPLC에 의해 정제된 활성 I, II, III에 대해 분석용 CLC-ODS column을 이용한 HPLC로 분리하여 얻어진 peak를 분취하여 항미생물 활성을 검정한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 활성 I은 부추 700 g에相当하는 추출물로 활성을 검정한 결과, t_R 11.79분의 peak (1.23 mg)와 t_R 16.19분의 peak (0.62 mg)에서 활성이 인정되었다. 활성 II는 부추 750 g에相当하는 추출물로 활성을 검정한 결과, t_R 12.48분의 peak (0.43 mg)와 t_R 15.50분의 peak (0.54 mg)에서 활성이 인정되었다. 그리고 활성 III은 부추 250 g에相当하는 추출물로 활성을 검정한 결과, t_R 9.86분의 peak (0.89 mg)와 t_R 21.23분의 peak (0.58 mg)에서 활성이 인정되었다.

이상의 결과로 보아 부추에 존재하는 항미생물 활성물질은 약간 극성을 띤 중성의 물질로 200-400정도의 분자량을 갖는 6종의 활성본체가 존재함을 확인할

수 있었으며, 이들 물질에 의해 항미생물 활성이 발현되고 있다고 생각된다. 부추에 존재하는 항미생물 활성물질의 함유량은 활성 I은 0.1-0.2 $\mu\text{g/g}$ fr wt, 활성 II는 0.07-0.09 $\mu\text{g/g}$ fr wt, 활성 III은 0.1-0.15 $\mu\text{g/g}$ fr wt의 수준이었다.

요 약

부추에 존재하는 항미생물 활성물질에 관한 정보를 얻고자 항미생물 활성의 검색 및 항미생물 활성물질의 탐색을 시도하였다. 부추 MeOH추출물의 항미생물 활성을 17종의 미생물을 대상으로 검색한 결과 Gram 양성균의 세균, Gram 음성균의 세균 그리고 효모에 대해서 광범위한 미생물 증식 억제능을 나타냈다.

부추를 MeOH로 추출, 용매분획하여 얻어진 활성을 silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, TLC, silica gel partition chromatography, HPLC 등의 방법으로 분석한 결과 부추에 존재하는 항미생물 활성물질은 약간의 극성을 띠는 중성물질로 200-400정도 분자량을 갖는 6종의 항미생물 활성물질의 존재가 확인되었다.

감사의 말

본연구는 농업신소재연구센터의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 연구센터와 과학재단 당국에 감사드립니다.

문 헌

1. 김호식, 전재근 : 김치발효중의 세균의 동적변화에 관한

- 연구. 한국에너지연구소, **6**, 112 (1966)
2. 최국지 : 김치에서 분리한 효모에 관한 연구. 한국미생물학회, **16**, 1 (1978)
3. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일 : 김치에서 분리한 젖산균의 미생물 생육저해. 한국농화학회지, **26**, 35 (1986)
4. 박연희, 조도현 : 김치에서 분리한 *Pediococcus*의 미생물 생육저해. 한국농화학회지, **9**, 207 (1986)
5. 민태익, 권태완 : 김치발효에 미치는 온도 및 식염농도의 영향. 한국식품과학회지, **16**, 443 (1984)
6. 김선재, 박근형 : 식물성 김치재료추출물의 항미생물 활성. 한국식품과학회지, **27**, 216 (1995)
7. 김선재, 박근형 : 부추추출물의 김치발효 지연 및 관련 미생물 증식억제. 한국식품과학회지, **27**, 813 (1995)
8. 이창복 : 대한식물도감. 향문사, p.204 (1982)
9. 유성오, 배종향 : 한국 야생부추의 개화분화. 한국원예학회지, **34**, 395 (1993)
10. 한국식품대보감 : 한국자연식물연구소. 제일출판사, p. 508 (1980)
11. 中藥大辭典 : 小學館. 上海科學技術出版社, p.838 (1985)
12. Zaika, L. and Kissinger, J.C.: Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *J. Food Sci.*, **46**, 1205 (1981)
13. Al-Delaimy, K.S. and Ali, S.H.: Antibacterial action of vegetable extracts on the growth pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 110 (1970)
14. Conner, D.E. and Beuchat, L.R.: Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. *J. Food Sci.*, **49**, 429 (1984)
15. Arum Sharma, G.M., Tewari, A.J., Shrikhande, S.R., Padwal, D. and Bandyopadhyay, C.: Inhibition of aflatoxin producing fungi by onion extracts. *J. Food Sci.*, **44**, 1545 (1979)
16. 박근형, 김선재, 현규환 : 결명자의 brassinosteroid 활성물질. 한국농화학회지 **36**, 99 (1993)
17. Park, K.H., Yokota, T., Sakurai, A. and Takahashi, N.: Occurrence of castasterone, brassinolide and methyl 4-chloro indole-3-acetate in immature *Vicia faba* seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3081 (1987)

(1996년 2월 12일 접수)