

용매의 분획에 따른 겨자 물추출물의 항균성

서권일, 김홍출*, 심기환**

동국전문대학 전통발효식품과, *진주산업대학교 미생물공학과,

**경상대학교 식품공학과

Antimicrobial Activities in the Water Extract of Mustard Seed Fractionated by Solvents

Kwon-il Seo, Hong-Chul Kim*, Ki-Hwan Shim**

Department of Traditional Fermented Food, Tongkuk Junior College,

**Department of Microbiological Engineering, Chinju National University,*

***Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University*

Abstract

The water extract of mustard seed was fractionated by solvents with an increase of polarity, and antimicrobial activities of each extracts were examined, and volatile compounds of each extract were identified by GC-MS. When the water extract was fractionated with solvents, the antimicrobial activities were high in the order of chloroform, ethylacetate, hexane, butanol and aqueous layer. In chloroform fraction, 16 volatile compounds, including 2 isothiocyanates such as 3-isothiocyanato-1-propene and 4-isothiocyanato-1-butene, 1 nitrile and 4 acids were identified, their contents were higher than other fractions. Twelve, 10, 4 and 7 volatile compounds were identified in ethylacetate, hexane, butanol and water fractions, respectively. The volatile compounds were considerably less in the fractions of butanol and water than others.

Key words: mustard seed, antimicrobial activity, volatile compound

서론

겨자를 비롯한 향신료 및 그 정유성분이 정균 혹은 살균작용을 갖고 있다는 것은 오래전부터 알려져 왔으나, 본격적으로 조사된 것은 20세기에 들어와서이며, 그 후 많은 연구자들이 향신료 정유성분의 항균성에 대하여 연구하였다. 겨자에 관하여는 홍 등[1]이 김치 발효시 겨자유를 첨가하면 젖산균의 성장을 억제하여 적숙기에 이르는 시간이

지연된다고 보고하였고, 강 등[2]은 겨자의 잎인 갖의 항균성에 대하여 보고하였으며, Kojima 등[3]은 GC-MS를 이용하여 겨자에서 allyl, 3-butenyl 및 β -phenylethyl isothiocyanate 등의 휘발성분을 동정하였다. 그러나 겨자의 항균성에 대한 연구는 아직 미약하여 겨자의 항균력 유무와 항균물질로 알려진 isothiocyanate류의 분석에 불과하며, 더우기 우리 나라에서 생산된 겨자의 항균성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구자들은 우리 나라의 전남 여천군 돌산지방에서 다량 생산되고 있는 겨자의 항균

Corresponding author : Kwon-il Seo, Department of Traditional Fermented Food, Tongkuk Junior College, Chilkok 718-850, Korea

효과 증진방법과 항균성 물질 등을 동정하였고 [4,5], 겨자 물추출물의 첨가에 따른 식품 보존 효과에 대한 결과들을 보고한 바 있으며[6-8], 본 연구에서는 기존의 결과를 기초로하여 겨자 물추출물의 항균성과 휘발성 화합물과의 상관성을 조사하기 위하여 겨자 물추출물을 용매의 극성 증가순으로 계통 분획하여 그 분획물의 항균성을 측정하고 휘발성 화합물을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

겨자(*Brassica juncea*)는 전남 여천군 돌산지방에서 1994년 5월에 수확한 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

사용균주 및 배지

항균시험용으로 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13301), *Streptococcus mutans* (ATCC 27607), *Streptococcus faecalis* (IFO 3971)와 같은 그람 양성균 4종, *Escherichia coli* (ATCC 15489), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 11250), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Vibrio cholerae non 01 J-3* (동대대학교 미생물학과 분양)과 같은 그람 음성균 4종, *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), *Lactobacillus brevis* (IFO 13110), *Leuconostoc mesenteroides* (IFO 12060)와 같은 젖산균 3종, *Saccharomyces cerevisiae* (IFO 1950), *Saccharomyces coreanus* (IFO 1833)와 같은 효모 2종, *Aspergillus oryzae* (ATCC 22787), *Fusarium solani* (IFO 8506)와 같은 곰팡이 2종을 사용하였다. 각종 미생물의 배양에 사용된 배지 중 세균은 nutrient broth와 agar, *Vibrio*는 3% NaCl이 첨가된 TS(trypic soy) broth와 agar, 젖산균은 lactobacilli MRS broth와 agar, 효모와 곰팡이는 PD(potato dextrose) broth와 agar를 각각 사용하였으며, 생균수 측정배지는 PCA(plate counter agar)를 사용하였다.

항균성 물질의 추출 및 분획

겨자 물추출물은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테

이트, 부탄올 및 물을 용매의 극성 증가 순으로 순차적인 계통분획을 실시하였다. 즉, 겨자 100g을 40mesh로 분쇄하여 물 1ℓ를 첨가하고 37℃에서 24시간 방치하여 항균성을 최대로 한 후[5], 종이 여과지(Whatman No. 2)로 거른 겨자 물추출물을 60℃의 온도에서 100ml까지 농축하였다. 여기에 헥산 1ℓ를 첨가하여 잘 섞은 후 분획 깔때기를 이용하여 물층과 헥산층으로 구분하였다. 여기서 얻어진 물층에 클로로포름 1ℓ를 첨가하여 다시 물층과 클로로포름층으로 구분하고, 앞의 방법과 동일하게 에틸아세테이트층, 부탄올층 및 최종 물층을 얻어 각각 10ml씩 동일한 양으로 농축하였다.

항균력 측정

항균력 측정은 Farag 등의 방법[9]을 변형하여 실험하였다. 즉, agar 1.5%가 함유되어 있는 생육 배지를 petri dish의 밑면에 얇게 펴고, 그위에 다시 0.6%의 agar가 함유된 생육배지를 부어 2종의 평판배지를 만들었다. 만들어진 평판배지에 각 균주를 도말한 다음, 직경 0.8cm 여지 disc에 겨자 물추출물 일정량을 가한 다음 균주가 도말된 평판 생육배지위에 올려놓고 각 균주의 최적온도에서 최적시간 배양하여 생성되는 생육저해환을 측정하여 항균력을 검토하였다.

휘발성 화합물 동정

겨자 물추출물을 용매의 극성증가순 즉, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 최종 물층 순으로 분획한 후 이들을 농축하여 GC-MS (Shimadzu GC-MS QS 1000)에 주입하여 얻은 chromatogram을 GC-MS에 내장된 data base 및 Wiley/NBS 138 library와 비교하여 동정하였으며, 그 분석조건은 다음과 같다. 칼럼은 HP-INNO wax 모세관 칼럼(25m)을, injector 및 detector 온도는 250℃로 하였고, 칼럼 오븐 온도는 70~230℃까지 분당 2℃씩 승온시킨 후 최종온도에서 20분간 지속되도록 프로그램하였다. 운반기체는 헬륨을 사용하였으며, split ratio는 100:1로 하였다. Mass spectrometer의 ion source 온도는 200℃로 하고 EI mode에 ion energy는 70eV였다.

Table 1. Antimicrobial activities of the fractions from mustard seed water extract

Strains	Fraction (unit: mm)				
	Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol	Water
Gram(+) bacteria					
<i>Bacillus subtilis</i>	12	23	19	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	18	14	9	9
<i>Streptococcus mutans</i>	9	16	12	9	8
<i>Streptococcus faecalis</i>	9	17	12	10	9
Gram(-) bacteria					
<i>Escherichia coli</i>	10	19	15	10	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	18	12	10	9
<i>Salmonella typhimurium</i>	9	20	11	9	9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	14	24	18	13	10
<i>Vibrio cholera non 01 J-3</i>	13	18	12	12	10
Lactic acid bacteria					
<i>Lactobacillus plantarum</i>	8	13	10	-	-
<i>Lactoabacillus brevis</i>	8	14	12	-	-
<i>Leuconostoc mensenteroides</i>	8	14	11	-	-
Yeast					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	18	11	-	-
<i>Saccharomyces coreanus</i>	9	17	10	-	-
Mold					
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	13	10	-	-
<i>Fusarium solani</i>	9	14	11	9	-

결과 및 고찰

용매의 계통분획에 따른 겨자 물추출물의 항균성

겨자 물추출물 중 용매의 극성 증가 순에 따른 항균성과 항균물질의 분리정도를 알기 위하여 겨자 물추출물을 용매의 극성 증가순으로 계통분획을 하여 얻은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물의 분획물들의 항균성을 측정한 결과는 Fig. 1과 Table 1에서 보는 바와 같다.

Vibrio parahaemolyticus 균주에 대한 생육저해환은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층에서 각각 14, 24, 18, 13 및 10mm로써 클로로포름층이 가장 큰 항균력을 나타내었으며, 다음으로 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 및 물층의 순이었다. *Bacillus subtilis*에 대한 생육저해환은 12, 23, 19, 10 및 10mm로 *Vibrio parahaemolyticus*와 마찬가지로 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 및 물 순으로 생육저해환이 크게 나타났으며, 다른 균주들도 같은 경향으로 나타났으나, 젖산균과 효

모 및 *Aspergillus oryzae*에 대하여 부탄올과 물층에서는 항균성이 나타나지 않았다. 또한 *Bacillus subtilis*와 *Vibrio parahaemolyticus* 균주에 대한 생육저해환이 다른 균주보다 크게 나타나 항균력이 강함을 알 수 있었고, 젖산균과 곰팡이에서는 다른 균주에 비하여 항균력이 작게 나타났다.

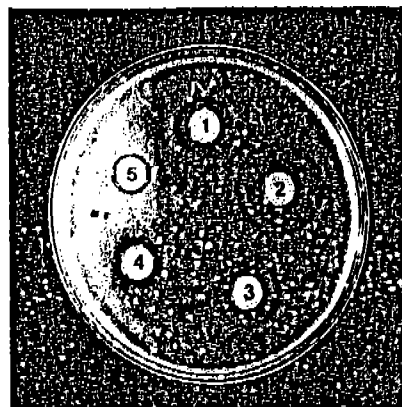


Fig. 1. Antimicrobial activities of the fractions from mustard seed water extract against *Vibrio parahaemolyticus*.

1: Hexane-soluble fraction, 2: Chloroform-soluble fraction, 3: Ethylacetate-soluble fraction, 4: Butanol-soluble fraction, 5: Water-soluble fraction

Table 2. Volatile compounds of the fractions from mustard seed water extract

Peak No	Volatile components	R.T	Fraction				
			Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol	Water
1	2-Methyl propenenitrile	6.477	+	+++			+
2	1,1-Dichloro cyclohexane	9.165					
3	Isocyanomethane	9.597					
4	3-Isothiocyanato-1-propene (Allyl isothiocyanate)	12.751	+++	+++	++		±
5	4-Isothiocyanato-1-butene (3-Butenyl isothiocyanate)	16.655		++	+	+	
7	Benzeneacetaldehyde	26.480				+	
8	2-Furancarboxaldehyde	27.626		±			±
9	Methyl-2-propenyl disulfide	32.087					
10	2-(Methylthio) ethanol	34.152					
11	Hexanoic acid	37.815					
12	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4- methyl-phenol	40.870					
13	Pentanoic acid	43.425					
14	Benzene propane nitrile	47.199					±
15	Octanoic acid	48.804					
16	1-Undecanol	51.697					
17	6-Methyl-1-heptene	54.010					
18	4-Hydroxy-3-methylacetophenone	55.075	+	±	+		
19	2-Isothiocyanatoethyl benzene (2-Phenylethyl isothiocyanate)	56.044	+				
20	1-Dodecanol	57.282		+			
21	Semicarbazone butyraldehyde	58.915	+	++	±	±	++
22	Unknown	66.138	+	+++	±		
23	Dioctyl ester hexanedioic acid	68.290	+		+	±	
24	2,6-Dimethyl-3-(methoxymethyl)-p- benzoquinone	71.704		++++	++++		
25	Trichloroecosyl silane	74.280	+	+++			±
26	Decanoic acid	76.825	+	+++	+		+
27	Dioctyl ester hexanoic acid	81.596	++	++++	+		
28	Hexadecanoic acid	85.579		+++	+		
29	Bicyclo[7.1.0] decane	87.384		±	±		
30	Tetrahydro-3-methyl-4-methylene- furan	98.423	±	++	+		
31	Glaudelsine	100.802		+	+		

The symbols(±, +, ++, +++ and +++) mean relative quantity of volatile compounds.

강 등[2]은 들산갓의 에탄올 추출물을 용매의 극성증가순으로 계통분획한 결과 에틸아세테이트 및 부탄올 층에서 항균성이 높게 나타났는데, 본 실험 결과에서와의 차이점이 있는 것은 여러 가지 처리조건, 성분의 조성 및 주 항균 물질의 차이에서 비롯된 것으로 생각된다. 이 등[10]은 6종의 미생물에 대하여 겨자의 에탄올 및 물추출물의 항균력을 검색한 결과 에탄올 및 물추출물은 *Bacillus*

subtilis, *Leuconostoc mensenteroides* 및 *Pseudomonas fluorescens*에 대하여 항균활성을 나타내었으나, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Bacillus cereus*에서는 항균활성이 나타나지 않았다고 보고하였는데, 이 보고와 본 결과와 일치하지 않는 것은 추출방법 및 겨자 추출물의 첨가량 차이에 의한 것으로 생각된다. Farag 등[9]은 sage, rosemary, cumin, caraway, clove 및 thymine oil이

여러 가지 균들에 대하여 항균력을 나타낸다고 보고하였으며, 정 등[11]은 카레향신료의 정유성분이 각종 균주에 대하여 항균력을 나타내며, 그 중 clove와 oregano의 정유성분이 그람 양성균에 속하는 젖산균에 대하여 그람 음성균보다 더 높은 농도의 생육저해 농도를 요구하였다고 보고하였으며, 이는 본 결과와도 일치하였다.

각종 용매추출물의 휘발성 화합물의 동정

겨자의 항균물질은 대부분이 증류성분에 함유되어 있다는 보고[4]에 따라 용매의 극성증가순에 따른 계통분획에 의하여 얻어진 가수분해된 겨자 물추출물의 각종 용매 추출물의 항균성과 이들의 휘발성 화합물과의 상관관계를 조사하기 위하여 계통분획에 따른 겨자의 각종 용매 추출물을 분석한 결과는 Fig. 2, 3 및 Table 2와 같다.

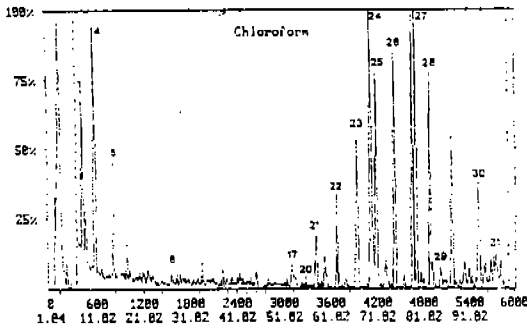


Fig. 2. Total ion chromatogram of chloroform-soluble fraction from mustard seed water extract.

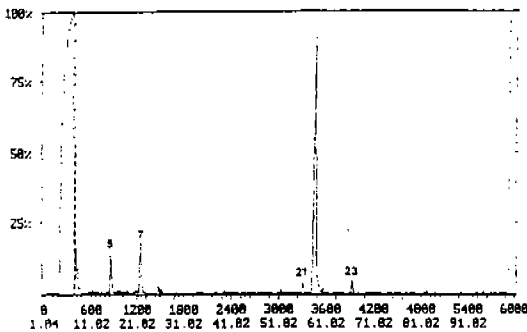


Fig. 3. Total ion chromatogram of butanol-soluble fraction from mustard seed water extract.

클로로포름층에서는 3-isothiocyanate-1-propene 및 4-isothiocyanato-1-butene과 같은 2종류의 isothiocyanate와 1종류의 nitrile, 4종류의 산류 및 2종류의 aldehyde류를 비롯한 16종의 휘발성 화합물이 동정되었고 그 함량도 다른 용매층보다 많았다. 에틸아세테이트층에서는 3-isothiocyanate-1-propene 및 4-isothiocyanato-1-butene를 비롯한 12종, 헥산층은 2종류의 isothiocyanate를 포함한 10종의 휘발성 화합물이 동정되었으며, 부탄올층과 물층은 4 및 7종류의 휘발성 화합물이 각각 동정되었으며, 그 함량도 다른 용매층보다 훨씬 적었다.

한편, Kanemaru 등[12]은 allyl isothiocyanate와 그 유도물질들이 항균효과를 갖는다고 보고하였고, Hejtmanekova 등[13]은 allyl isothiocyanate가 항곰팡이 효과를 갖는다고 보고하였으며, Drobnica [14]는 isothiocyanate류와 그 유사물질들이 항곰팡이 효과를 갖는다고 보고하였다. 이와같은 보고와 본 결과 및 앞의 계통분획에 따른 항균력 검색 결과를 검토하여 볼 때 GC에 의하여 검출된 휘발성분의 함량이 많은 클로로포름층에서 항균력이 높은 것은 이들 휘발성분의 항균성에서 기인된 것으로 생각된다.

요 약

겨자 물추출물의 항균성과 휘발성 화합물과의 상관성을 조사하기 위하여 겨자 물추출물을 용매의 극성 증가순으로 계통분획을 하여 얻은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층의 항균성을 측정하고, 휘발성 화합물을 분석하였다. 각종 시험균주에 대하여 겨자 물추출물의 각 분획별 항균력은 클로로포름층이 가장 크게 나타났으며, 다음으로 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 및 물층의 순이었다. 겨자 물추출물의 클로로포름층에서는 3-isothiocyanato-1-propene, 4-isothiocyanato-1-butene과 같은 2종류의 isothiocyanate, 1종류의 nitrile 및 4종류의 산류를 비롯한 16종의 휘발성 화합물이 동정되었으며, 그 함량도 다른 용매층보다 많았고, 에틸아세테이트와 헥산층에서는 각각 12 및 10종류가 동정되었으며, 부탄올층과 물층은 4 및 7종류의

휘발성 화합물이 각각 동정되었고, 그 함량도 다른 용매층보다 훨씬 적었다.

감사의 글

본 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모 과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다

참고 문헌

1. 홍원수, 윤헌 (1989) 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치 발효에 미치는 영향. 한국식품과학회지 21, 331.
2. 강성구, 성낙계, 김용두, 신수철, 서재신, 최갑성, 박석규 (1994) 갓(*Brassica juncea*)추출물의 항균활성 검색. 한국영양식량학회지 23, 1008.
3. Kojima, M., M. Uchida, and Y. Akahori (1973) Studies on volatile compounds of Wasabia japonica, Brassica juncea and Cochleria armoracia by gas chromatography-mass spectrometry. I. Determination of low mass volatile components. Yakugaku Zasshi. 93, 453.
4. 심기환, 서권일, 강갑석, 문주석, 김홍출: 겨자 증류성분층의 항균성 물질, 한국영양식량학회지, 24, 948(1995)
5. 서권일, 박석규, 박정로, 김홍출, 최진상, 심기환: 겨자 가수분해물의 항균성 변화. 한국영양식량학회지, 25, 129(1996)
6. 서권일, 정용진, 심기환 (1996) 김치 발효중 겨자의 첨가 효과. 한국농산물저장유통학회지 3, 33.
7. 서권일, 강갑석, 이용수, 정용진, 김용택, 심기환 (1996) 전어의 보존중 겨자의 처리 효과. 동아시아식생활학회지 6, 205.
8. 서권일, 강갑석, 심기환 (1997) 냉면 육수의 보존중 겨자의 첨가 효과. 한국식품과학회지 29, 51.
9. Farag, R.S.: Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. J. Food Prot. 52:665(1989)
10. 이병완, 신동화 (1991) 식품부패미생물의 증식을 억제하는 천연항균성 물질의 검색. 한국식품과학회지 23, 200.
11. 정창기, 박완규, 유익제, 박기문, 최춘언 (1990) 카레 향신료 정유성분의 항균성. 한국식품과학회지 2, 716.
12. Kanemaru, K., Takaya, T. and Miyamoto, T.: Separation and quantitation of allyl isothiocyanate in brown mustard and cinnamaldehyde in cinnamon by reverse-phase high performance liquid chromatography. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 37, 565(1990)
13. Hejtmankova, N., I. Leifertova and M. Lisa (1979) Study on the antifungal effect of allyl isothiocyanate. Acta Univ. Palackinae Olomucensis(Fac. Med.) 89, 9.
14. Drobnica, L. (1967) Antifungal activity of isothiocyanates and their analogues. Appl. Microbiol. 15, 701.

(1997년 9월 15일 접수)