

갈참나무 부위별 에탄올 추출물 및 분획물의 항균효과

윤재원¹ · 유미영¹ · 최재호¹ · 이명구² · 오덕환^{1†}

¹강원대학교 바이오산업공학부

²강원대학교 산림과학대학 제지공학과

Antimicrobial Effects of Ethanol-Extracted and Sub-Fractionated Materials from Different Parts of *Quercus aliena* Blume

Jae-Won Yoon¹, Mi-Young Yoo¹, Jae-Ho Choi¹, Myoung-Ku Lee² and Deog-Hwan Oh^{1†}

¹School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Dept. of Paper Science and Engineering, College of Forest Sciences,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

This study was to determine the inhibitory effect of ethanol extract of leaf, bark and xylem of *Quercus aliena* Blume and, consecutively, of organic solvent subfractions against food borne pathogens. The ethanol extracts of leaf, bark and xylem of *Quercus aliena* Blume were shown to have antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* were more resistant to ethanol extracts of the *Quercus aliena* Blume tissues compared with *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* O157:H7. The ethanol extract of *Quercus aliena* Blume leaf showed the strongest antimicrobial activity against food borne pathogens, followed by those of xylem and bark. The ethanol extract treatment (500~1,000 µg/mL) of *Quercus aliena* Blume leaf completely reduced the growth of *B. cereus* and *L. monocytogenes* within 24 hour whereas 2,000 µg/mL of ethanol extract was needed for complete growth inhibition of *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium*. Among organic solvent subfractions obtained from the ethanol extract of leaf, bark and xylem of *Quercus aliena* Blume, the ethyl acetate fraction showed the strongest antimicrobial activity, but no antimicrobial activity was observed in chloroform, hexane and water fractions.

Key words: antimicrobial activity, *Quercus aliena* Blume, food borne pathogens

서 론

수목의 추출성분은 예로부터 의약, 향료, 염료 및 공업원료 등 인류의 생활과 밀접한 관계를 가지고 발전해 왔다. 수목의 유효성분은 가지, 잎, 뿌리, 꽃 및 종자 등 특정한 부위에 소량으로 존재하며 물 또는 유기용매에 유출되는 성분으로 테르펜류, 페놀류, 알칼로이드류, 저분자 탄수화물, 무기염류 등으로 구분하고 있다(1,2). 최근에는 분석기술의 급속한 발달로 수목으로부터 새로운 약리성분과 효능이 발견되면서 이를 기초로 한 기능성 성분의 모색 및 효능검정에 관한 연구가 활발히 추진되고 있다(1-3).

생활수준의 향상과 가공식품의 수요가 날로 증가하면서 식품의 저장기간을 연장하고 상품성을 높이기 위하여 사용되는 각종 합성 보존제는 대부분 독성을 나타내고 있고, 인체에 해로운 영향을 끼칠 수 있다는 보고로 인해(4), 식품제조업자와 소비자 모두 이들의 사용을 꺼리고 있으므로 최근

에는 독성이 없고 안전한 천연물로부터 항균물질을 추출하여 식품에 이용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다(5,6). 지금까지 항균성 물질의 소재로서 우리나라에 자생하는 약용 또는 식용식물, 단백질 및 특정효소, 정유성분 등 다양한 원료로부터 연구가 진행되어 왔으나 산림자원으로부터 항균성소재를 연구한 논문은 많이 보고되어있지 않다(7-10).

참나무는 우리나라 전임목의 약 27%를 차지하고 있으며, 예로부터 종실을 식용으로 사용하여 왔다. 도토리에는 풍부한 전분과 맛을 내는 탄닌, 유지방과 쿠에르사이트린 등 여러 성분이 함유되어 있는데 식품으로는 물론 약용식물로도 아주 유용하여 장 및 혈관을 수축시키는 작용을 하며, 민간요법에서 잎과 껌질을 수령성 피멍이약, 설사, 탈항, 치질을 비롯하여 거담, 진통, 지혈 등에 사용해 왔다(11,12). 그 중 갈참나무는 Lee와 Shin(13)이 *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* 및 *Bacillus cereus*에 대하여 각각 항균력이 있음을 보고하였고, 에탄올

*Corresponding author. E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6457, Fax: 82-33-250-6457

추출물도 물 추출물과 유사한 항균활성을 나타낸다고 보고 하였고, Yun 등(14)은 병원성 식중독 미생물에 대한 참나무류 6종(갈참나무, 굴참나무, 떡갈나무, 졸참나무, 신갈나무, 상수리나무)의 에탄올 추출물에 대한 항균력을 검색한 결과 잎, 수피, 목질부 모두 항균력을 나타내었으며, 그중에서도 참나무 6종 모두 잎이 다른 부위에 비하여 항균력이 높았으며 6종의 참나무중 갈참나무 에탄올 추출물이 가장 항균력이 높다고 보고하였다. 따라서 본 연구는 여러 종류의 병원성 식중독 미생물에 대하여 갈참나무의 부위별 에탄올 추출물과 분획물에 대한 생육저해효과를 규명하여 천연항균소재로서의 응용가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 시료는 2001년 9월 강원대학교 연습림에서 자생하는 생장이 양호한 갈참나무의 잎, 수피, 목질부를 채취하여 공시재료로 사용하였다.

시료의 추출

시료는 잎, 수피, 목질부로 선별 정선한 후, 먼지 등을 제거하기 위하여 깨끗한 물로 수세, 음건 후 전식분쇄기(Samsung Electrics, CR-581W, Korea)로 분쇄하여 150 mesh (Standard testing sieve, ITOH Co., Japan)에 통과된 분말을 추출용 시료로 사용하였다. 갈참나무 잎, 수피, 목질부의 추출은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 flask 내에 500 g의 분말시료를 넣고 60°C 온도에 시료중량의 10배에 해당하는 에탄올을 30, 70, 90%를 가하고 3, 6, 12시간동안 2회 반복 추출한 후, 감압여과 장치로 여과하였다. 여액을 rotary vacuum evaporator(Eyela N-N-series, Japan)를 사용하여 농축하고, 이를 동결건조한 후 밀봉하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

추출물의 유기용매별 분획

에탄올 추출물은 극성이 다른 용매를 이용하여 단계적으로 분획하였다. 에탄올 추출물과 혼산, 물을 1:10:9의 비율로 혼합하여 추출 분획한 후 rotatory vacuum evaporator (Eyela N-N-Series, Japan)로 농축하여 혼산 분획물을 얻었다. 수증 분획은 분획여두에서 다시 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 분획하여 이로부터 각각 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수증 분획물을 얻은 후 농축하고, 이를 동결건조 하여 건조 후 증발잔사의 양을 시료 건물량에 대한 백분율로 나타내어 추출수율을 계산하였다.

추출물의 항균활성 및 생육저해

본 실험에 사용된 균주는 ATCC와 조지아대학 식품공학과에서 분양을 받았으며 그람양성균인 *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

와 그람음성균인 *Escherichia coli* k-12 IFO 3301, *Escherichia coli* O157:H7 933, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 등 총 8균주를 대상으로 paper disk method를 이용하여 항균력을 조사하였다. 즉, tryptic soy agar 배지를 121°C에서 15분간 살균한 다음 50°C까지 냉각하여 무균적으로 petri dish에 15 mL씩 분주하여 응고시킨 후, 전배양한 각종 시험균 배양액 0.1 mL를 평판배지에 주입하여 균일하게 도포하였다. 갈참나무의 부위별 에탄올 추출물에 대해서 멸균된 paper disk에 놓도록 시험용 평판배지 표면에 올려놓은 후 35°C incubator에서 24~48시간동안 배양하여 disk 주변의 clear zone(mm)을 측정하여 항균력을 검색하였다. 한편, 위해미생물에 대한 각 부위별 에탄올 추출물의 생육저해효과를 알아보기 위하여 멸균된 TSB 배지에 *B. cereus* ATCC 9634, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *E. coli* O157:H7 933, *S. Typhimurium* ATCC 14028 등 총 4균주를 사용하여 시험균의 초기농도를 1×10^5 CFU/mL가 되도록 접종한 후 각 추출물을 2,000 µg/mL가 되게 첨가한 뒤, Bioscreen C(Labsystems, FP-1100-C, Finland)로 35°C에서 24시간 배양하면서 균의 생육을 600 nm에서 optical density(O.D) 값으로 측정하였다.

결과 및 고찰

갈참나무 부위별 에탄올 추출물의 생육저해효과

Fig. 1은 갈참나무로부터 부위별 에탄올 추출물에 대한 *B. cereus*의 생육저해 결과를 나타내었다. 갈참나무 잎 에탄올 추출물은 500 µg/mL 농도까지는 24시간동안 생육을 완전히 저해하였으나 250 µg/mL에서는 18시간 이후부터 서서히 생육하기 시작하였다. 반면에, 수피 에탄올 추출물은 1,000 µg/mL에서는 *B. cereus*의 생육이 완전히 저해되었으나 500 µg/mL 이하에서는 8시간 이후부터 빠르게 생육하였으며, 목질부 에탄올 추출물은 2,000 µg/mL에서만 생육이 완전히 저해되었다. Fig. 2는 갈참나무로부터 부위별 에탄올 추출물에 대한 *L. monocytogenes*의 생육저해 결과를 나타내었다. *L. monocytogenes*에 갈참나무 부위별 에탄올 추출물의 생육저해는 *B. cereus*에 비하여 현저하게 감소하였다. 갈참나무 잎 에탄올 추출물은 1,000 µg/mL 농도까지는 24시간동안 생육을 완전히 저해하였으나 500 µg/mL 이하에서는 8시간 이후부터 서서히 생육하기 시작하였으며 수피와 목질부 추출물은 모든 농도에서 8~10시간 이후부터 생육하기 시작하였다. 한편, 그람음성균인 *E. coli* O157:H7과 *S. Typhimurium*은 그람양성균에 비하여 갈참나무 부위별 에탄올 추출물에 저항성이 강한 것으로 나타났다. Fig. 3은 갈참나무 부위별 에탄올 추출물에 대한 *E. coli* O157:H7의 생육저해 결과를 나타내었다. 갈참나무 잎 에탄올 추출물은 2,000 µg/mL 농도까지는 24시간동안 생육을 완전히 저해하였으나 500 µg/mL 이하에서는 6시간 이후부터 생육하기 시작하였으며 수

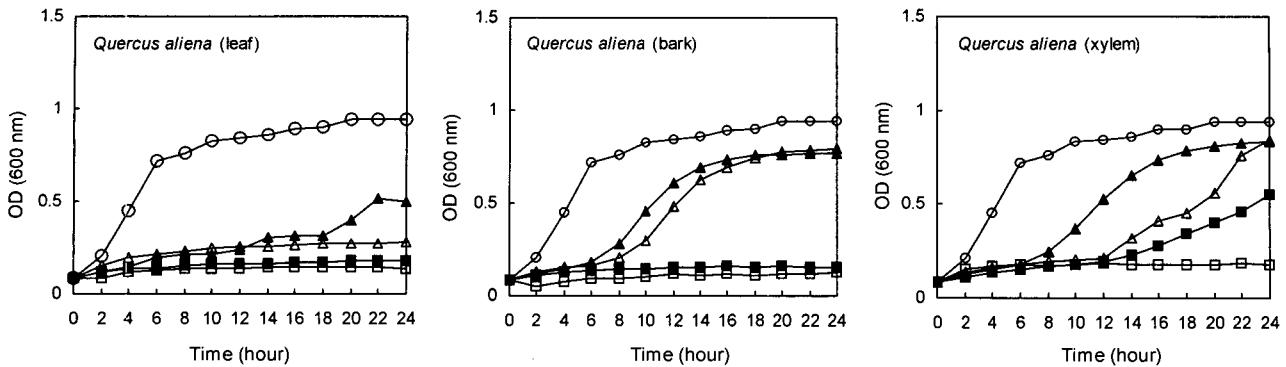


Fig. 1. Inhibitory effect of the ethanol extract of *Quercus aliena* Blume on the growth of *Bacillus cereus*.
—○— control, —▲— 250 µg/mL, —△— 500 µg/mL, —■— 1,000 µg/mL, —□— 2,000 µg/mL.

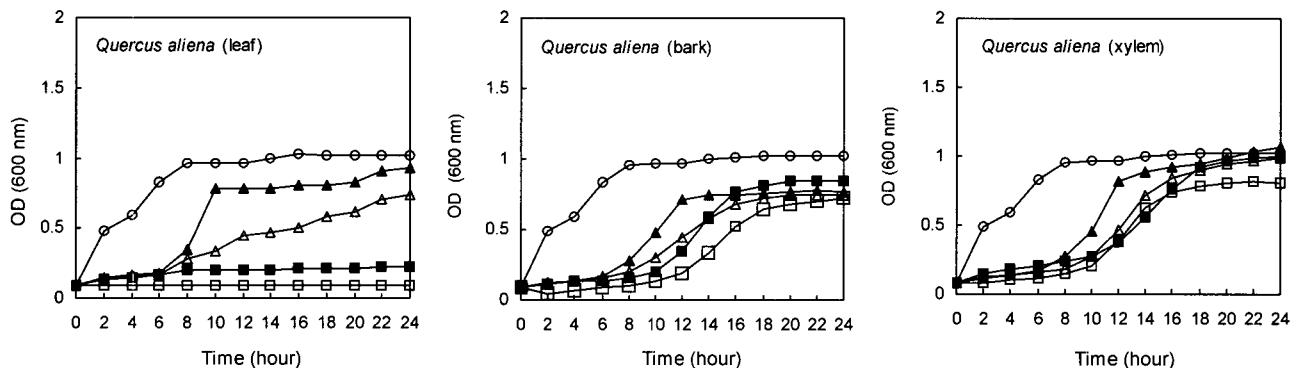


Fig. 2. Inhibitory effect of the ethanol extract of *Quercus aliena* Blume parts on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A.
—○— control, —▲— 250 µg/mL, —△— 500 µg/mL, —■— 1,000 µg/mL, —□— 2,000 µg/mL.

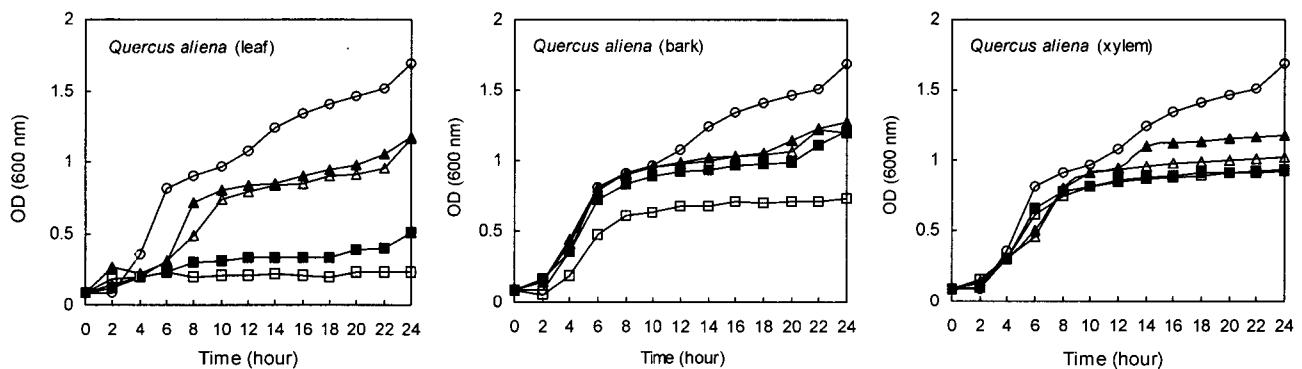


Fig. 3. Inhibitory effect of the ethanol extract of *Quercus aliena* Blume parts on the growth of *Escherichia coli* O157:H7.
—○— control, —▲— 250 µg/mL, —△— 500 µg/mL, —■— 1,000 µg/mL, —□— 2,000 µg/mL.

피와 목질부 추출물은 모든 농도에서 2시간 이후부터 빠르게 생육하였다. Fig. 4는 갈참나무 부위별 에탄올 추출물에 대한 *S. Typhimurium*의 생육저해 결과를 나타내었다. *S. Typhimurium*은 1,000 µg/mL 일 에탄올 추출물에서 14시간 까지는 생육이 저해되었으나 이후부터는 급격하게 생육하였으며 같은 농도에서 수피 및 목질부 에탄올 추출물에서는 4시간 이후부터 빠르게 생육하였다. 전보(14)에서 병원성 식중독 미생물에 대한 참나무류 6종의 부위별 항균력을 검색

한 결과 참나무류 부위별 에탄올 추출물의 항균력은 그람양성 세균과 음성 세균에 대해 높은 항균 활성을 나타내었으며, 수종별로는 갈참, 떡갈, 신갈나무 에탄올 추출물이 줄참, 상수리, 굴참나무 에탄올 추출물보다 더 강하였으며, 부위별로는 잎이 가장 높은 항균활성을 나타내었고 수피와 목질부는 유사한 항균력을 나타내었다고 보고하였다. 본 연구결과, 그람양성과 음성 4종에 대한 갈참나무 부위별 에탄올 추출물의 생육저해효과는 식중독 세균의 종류에 따라 약간의 차

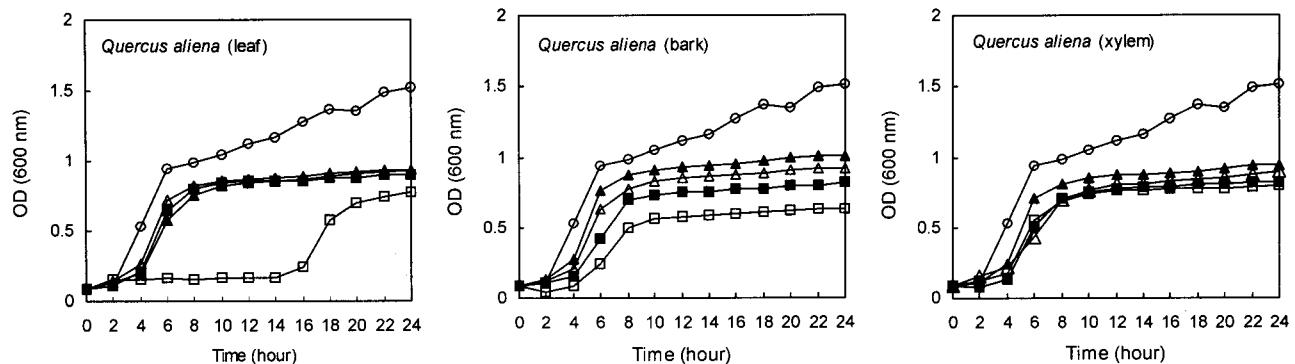


Fig. 4. Inhibitory effect of the ethanol extract of *Quercus aliena* Blume parts on the growth of *Salmonella* Typhimurium.
—○— control, —▲— 250 µg/mL, —△— 500 µg/mL, —■— 1,000 µg/mL, —□— 2,000 µg/mL.

이는 있었으나 *L. monocytogenes*와 *S. Typhimurium*은 *B. cereus*와 *E. coli* O157:H7에 비하여 더 강한 생육억제를 보였으며 갈참나무 부위 중 잎 에탄올 추출물이 가장 높은 항균력을 보였고, 수피와 목질부는 거의 유사하거나 수피 에탄올 추출물이 약간 강한 항균력을 나타내었다. 이러한 결과는 갈참나무 물 또는 에탄올 추출물이 *B. subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* 및 *B. cereus*에 대하여 각각 항균력이 있다는 Lee와 Shin(13)의 보고와 유사하였으며, Kim 등(15)의 덱갈나무 부위별 추출물의 항균활성이 잎, 수피, 목질부 순으로 높게 나타났다는 보고와도 비슷한 결과를 나타내었다.

갈참나무 잎 분획물의 수율 및 항균효과

갈참나무 부위 중 가장 강한 항균력을 나타낸 잎 에탄올 추출물로부터 항균활성 성분에 대한 특성을 검토하고자 극성이 다른 유기용매인 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄을 및 물 총으로 순차적으로 분획하여 추출하였으며, 그 수율은 Table 1과 같다. 물에 의한 추출수율이 45%로 가장 높았으며, 부탄율이 17%로 물총 다음으로 높았으며, 에틸아세테이트 4.6%, 클로로포름은 2.3%이었으며 헥산총에서는 전혀 추출되지 않았다. Kong 등(16)은 신갈나무 잎 에탄올 추출물의 경우 헥산 총에서 9.3%로 물총 다음으로

Table 1. The yields of solvent extraction fractions from ethanol extract of *Quercus aliena* Blume leaf

Solvents	Yield (%), w/w
Hexane	ND ¹⁾
Chloroform	2.3
Ethylacetate	4.6
Butanol	17.0
Water	45.0
Total	68.9

¹⁾Not detected.

가장 높은 수율을 나타내었고 에틸아세테이트 5.9%, 부탄을 5.2%순으로 나타났다고 보고하였으며 참나무 종류별로 수율의 차이가 상당히 있는 것으로 나타났다.

갈참나무 잎 에탄올 추출물로부터 극성이 다른 용매로 순차 분획한 분획물의 병원성 식중독균에 대한 항균활성을 검토한 결과를 Table 2에 나타내었다. 에틸아세테이트와 부탄을 분획총에서만 항균력이 나타났으며 클로로포름, 헥산, 물 분획총에서는 모든 대상 피검균에 대해 항균활성이 전혀 나타나지 않았다. 에틸아세테이트 분획총은 다른 분획물과 비교하여 가장 강한 항균력을 나타내었으며 대상균주 모두에 대하여 항균력을 나타내었고 그람음성균인 *S. Typhimurium*이나 *Y. enterocolitica* 같은 균주들보다 그람양성균인 *S. au-*

Table 2. Antimicrobial activities of solvent fractions extracted from ethanol extract of *Quercus aliena* Blume leaf on the foodborne pathogens
(Inhibition zone: mm¹⁾)

Microorganisms	Organic solvents					
	Control ²⁾	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Hexane	Water
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	20	ND ³⁾	12	12	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	19	ND	14	ND	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	19	ND	13	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	ND	20	11	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> K-12 IFO 3301	14	ND	15	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 933	14	ND	14	11	ND	ND
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	17	ND	11	12	ND	ND
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	14	ND	11	11	ND	ND

¹⁾Two thousand µg of ethanol extractives was absorbed into paper disc (Φ8 mm) and the diameter (mm) of clear zone was measured.

²⁾Ethanol extract of *Quercus aliena* Blume leaf.

³⁾Not detected.

reus, *B. cereus*, *L. monocytogenes*에 대하여 더 강한 항균력을 보였다. 갈참나무 잎 에탄올 추출물보다 에틸아세테이트 분획층이 대상 병원성 식중독 미생물에 대한 항균력이 떨어지는 것은 에탄올 추출물에는 여러 가지 성분들이 서로 상승 작용을 하여 항균력이 증가하였으나 항균물질의 분리 과정 속에서 정제된 물질들의 상호작용이 혼합물질보다 떨어지는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 신갈나무 잎 추출물에서 분획한 분획물의 경우에서도 비슷한 경향을 나타내었다(16).

요 약

본 연구는 여러종류의 병원성 식중독 미생물에 대하여 갈참나무의 부위별 에탄올 추출물과 분획물에 대한 생육저해 효과를 규명하여 천연항균소재로서의 응용가능성을 탐색하고자 하였다. 갈참나무 잎, 수피, 목질부의 에탄올 추출물은 모두 그람 음성균과 양성균에서 모두 항균활성을 나타내었다. 그람양성과 음성균 4종에 대한 갈참나무 부위별 에탄올 추출물의 생육저해효과는 식중독균 종류에 따라 약간의 차이는 있었으나 *L. monocytogenes*와 *S. Typhimurium*균이 *B. cereus*와 *E. coli* O157:H7균에 비하여 더 강한 생육억제를 보였으며 갈참나무 부위중 잎 에탄올 추출물이 가장 높은 항균력을 보였고, 수피와 목질부는 거의 유사하거나 수피 에탄올 추출물이 약간 강한 항균력을 나타내었다. 갈참나무 잎 에탄올 추출물은 *B. cereus*는 500 µg/mL, *L. monocytogenes* 및 *E. coli* O157:H7는 1,000 µg/mL 농도에서 24시간동안 생육을 완전히 저해하였으나 *S. Typhimurium*은 생육을 완전히 억제하는데 2,000 µg/mL 농도가 필요하였다. 한편, 갈참나무 잎 에탄올 추출물로부터 극성이 다른 용매로 순차 분획한 분획물의 병원성 식중독균에 대한 항균활성을 검토한 결과, 에틸아세테이트 분획층이 가장 강한 항균력을 나타내었으나, 클로포름, 헥산 및 물층에서는 전혀 항균력을 나타내지 않았다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 농림부에서 시행한 농림기술지원사

업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- Kang HY. 1994. The biochemical role of tree extractives. *Mokchae Konghak* 22: 5-11.
- Sasaya T, Kim YG, Moon CK. 1997. On the recent investigation of the wood extractives. *Res Bull Experiment Forests* (Gyeongsang Nat'l Univ) 7: 39-51.
- Kim YG. 1998. The bioactivities of the extractives from *Abies koreana* Wilsom. *PhD Dissertation*. Gyeongsang Nat'l Univ.
- 만세석, 황상요, 박경식. 1984. 식품첨가물. 개문사, 서울.
- Kim HY, Lee YJ, Kim SH, Hong KH, Kwon YK, Lee JY, Ha SC, Cho HY, Chang IS, Lee CW, Kim KS. 1999. Studies of the development of natural preservatives from natural products. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1667-1678.
- Chung DO, Jung JH. 1992. Studies on antimicrobial substances of *Canoderma lucidum*. *Korean J Food Sci Technol* 24: 552-557.
- Davidson PM, Post LS. 1983. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In *Antimicrobials in foods*. Branen AL, Davidson PM, eds. Marcel Dekker, Inc., New York. p 371-390.
- Maria BZ, Lamar SR, Jose SM, Minam LS, Amaldo RL. 1984. Volatile sulfides of the amazonian garlic bush. *J Agric Food Chem* 32: 1009-1010.
- Jamal NB, Ibrahim AW. 1994. Citric acid and antimicrobial affect microbiological stability and quality of tomato juice. *J Food Sci* 59: 130-134.
- Shin DH. 1990. Present status of natural antimicrobial compoundant their application. *Food Science and Industry* 23: 68-77.
- 김태욱. 1996. 한국의 수목. 교학사, 서울.
- 배영수. 1995. 참나무의 추출성분. 숲과 문화 연구회, 서울.
- Lee BW, Shin DH. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Korean J Food Sci Technol* 23: 200-204.
- Yun JW, Yoo MY, Park BK, Lee MK, Oh DH. 2004. Antimicrobial effect of ethanol extracts of *Quercus* spp. against foodborne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 463-468.
- Kim MY, Kim YG, Kim TH. 2000. Antimicrobial activity and antioxidative activity in the extractives of *Quercus dentata* Thunberg. *Mokchae Konghak* 28: 42-51.
- Kong YJ, Kang TS, Lee MK, Park BK, Oh DH. 2001. Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fractions of *Quercus mongolica* leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 415-420.

(2005년 4월 12일 접수; 2005년 6월 27일 채택)