

오레가노, 육계, 편백 및 황금의 초임계 유체 추출물의 항균 활성

¹김우진 · ¹조준영 · ¹최창숙 · †¹윤기선 · ²이원규 · ²유연우

¹(주)케이엠에이치 생명공학연구소 ²아주대학교 분자과학기술학과

(접수 : 2007. 5. 31., 게재승인 : 2008. 4. 1.)

Antimicrobial Activity of Extracted by Supercritical Fluid from *Origanum vulgare*, *Cinnamomum cassia*, *Chamaecyparis obtusa* and *Scutellariae baicalensis*

Woo-jin Kim¹, Jun-young Cho¹, Chang-Suk Choi¹, Gee-Sun Yoon^{1†}, Won-Kyu Lee², and Yeon-Woo Ryu²

¹KMH co., institute of biotechnology, Suwon 442-749, Korea

²Department of molecular science and technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

(Received : 2007. 5. 31., Accepted : 2008. 4. 1.)

The variety of functional plants has an attention for new natural food preservation and natural antiseptic development. The extracts from functional plants with various methods (ethanol extraction, hot water extraction and supercritical fluid extraction) tested antimicrobial activity against 10 strains including the pathogenic and food poisoning bacteria, the yeast and fungi. The antimicrobial activities of supercritical fluid extracts were shown higher than ethanol extract and hot water extract when tested with disc-diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC). Antimicrobial activity of supercritical fluid extract was two times higher than ethanol extract in *Cinnaonumum cassia*. In addition, the supercritical fluid extractions of *Chamaecyparis obtuas* and the *C. cassia* showed the higher yield than *Origanum vulgare* and *Scutellariae baicalensis*. The supercritical fluid extract of *C. cassia* showed an antimicrobial activity against all strains tested. The supercritical fluid extract of *S. baicalensis* showed strong antimicrobial activity on *Listeria monocytogenes*. Supercritical fluid extraction of *O. vulgare* and *C. obtuas* showed strong antimicrobial activity on *Salmonella typhimurium*. In MIC test, *C. obtuas* was shown the best natural material for the preparation of natural antimicrobial agent by supercritical fluid extraction. In conclusion, these results suggest that supercritical fluid extraction technique was effective to obtain functional ingredient with higher antimicrobial activity in the development of new antimicrobial reagent from natural materials.

Key Words : antimicrobial, Supercritical fluid extraction, Disc-diffusion method, natural materials, minimum inhibitory concentration

서론

현재 시판되고 있는 여러 식품과 화장품등에는 미생물에 의한 부패와 변질을 방지할 목적으로 인공합성 보존료가 첨가되고 있다. 하지만 최근 웰빙 (well being) 열풍과 함께 건강 지향적인 욕구가 증대되고 있으며 화학적 합성 첨가물의 안전성에 대한 문제가 대두되어 합성 첨가물의 사용이 줄고 있는 추세이다(1). 이러한 합성 보존료에 대한 문제를 해결하기 위해

천연자원에 존재하는 항균성 물질을 탐색하고 이용하고자 하는 연구가 오래 전부터 수행되어 왔다(2). 일반적으로 천연물 그 자체 또는 이들의 추출물에 존재하는 천연 항균성 물질로는 단백질(3), 유기산(4), 지방산 (탄소수가 12~18개)(5), 향신료(6, 7), 생약제류(8) 등이 있으며, 그중 대표적인 것이 이미 식품의 맛과 향을 위해 오래전부터 사용되어 안정성이 확보된 향신료가 많이 연구되어져 왔다(9). 이들의 다양한 추출물들은 식품의 항균효과를 위한 첨가물로서 화학적 합성품의 대체제로 사용될 수 있으며, 식품분야 이외에 화장품 분야에서도 방부효과를 위해 합성 항균제를 사용하고 있어 이를 대체하기 위한 천연 항균물질의 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이러한 일련의 천연항균물질 연구 중에 본 연구와 관련이

† Corresponding Author : KMH co., institute of biotechnology, Suwon 442-749, Korea

Tel : +82-31-212-4730, Fax : +82-031-214-0983

E-mail : ksyun@kmholdings.com

있는 대표적인 사례를 살펴보면, 육계 (*Cinnamomum cassia*)는 계피나무를 한방에서 일컫는 말로써, 혈압강하제, 진경작용제로 이용되어 왔고, diterpenoid가 갖는 항알러지 효과가 알려져 있다. Park 등(10)은 계피나무에서 기존에 알려져 있던 diterpenoid 물질 이외의 flavonoid 중의 새로운 항알러지 물질이 함유되어 있음을 밝혀내기도 하였다. 또한, 오레가노 (*Origanum vulgare* L.)는 발한성, 구풍제, 살균제, 강장제로써의 치료상의 작용을 하는 것으로 알려져 많은 나라에서 사용되어져 왔고(11), 오레가노의 항균활성은 여러 논문들을 통해 보고되어 있다(12-14). Souza 등(15)은 오레가노의 정유가 *Candida* 및 *Pichia* 속과 같은 부패성 효모에도 높은 항균활성을 나타내는 것으로 보고하였으며, 오레가노 정유의 항균활성은 carvacrol, γ -terpinene, α -terpinene, thymol, *p*-cimene, γ -terpineol, sabinene, myrcene, caryophyllene, germancrene, spathulenol과 같은 페놀화합물에 의한 것으로 생각되어지고 있다(16, 17). 측백나무과 (Cupressaceae)에 속하는 편백은 원래 일본이 원산지로서 우리나라에는 20세기 초에 들어와 주로 중부 이남에서 자생하고 있다. 측백나무과 (Cupressaceae)의 심재(心材)부분에는 hinokitol (β -thujaplicin)이라는 항균활성 물질이 존재하는 것으로 알려져 있으며(18), *Chlamydia trachomatis*에 대한 활성 억제 작용이 보고되어 있다(19). 또한, 편백나무 잎의 정유성분이 *Streptococcus* 속에 대한 높은 증식 억제 작용이 있는 것으로 나타나 편백의 항균성이 증명되어 있다(20). 황금 (*Scutellaria baicalensis Labiatae*)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로서 동아시아 대륙이 원산지이고, 우리나라, 중국, 시베리아 등지에 주로 분포한다. 황금에는 항균성분으로 baicalin, baicalein, wogonin 등이 함유되어 있고, 이 중에서도 baicalin 성분이 주된 항균물질인 것으로 보고되어 있다(21). 황금의 항균작용이 있는 것으로 밝혀지면서 농수산 식품의 원료 및 가공품의 변패 미생물에 대한 천연 항균소재로 이용된 연구와 황금추출물을 함유한 항균성 포장 필름을 이용한 딸기와 오이의 저장 효과들이 연구되고 있다(22). Bae 등(23)은 황금 추출물의 ethyl acetate 분획물이 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus dysenteriae*에 높은 항균활성을 나타내는 것을 밝혀냈고, 황금의 물추출물을 이용 항균력을 검사한 결과 500 ppm 이상의 농도에서 생육이 억제되었고, 투과형전자현미경을 통해 공시균주들의 세포막 파괴를 확인할 수 있었다(24).

항균활성을 갖고 있는 천연물에서 생리활성 물질을 추출하는 전통적인 방법으로 구성 성분의 휘발도를 이용하는 증류법과 특정 용매에 대한 구성물의 용해도 차이를 이용하는 용매추출법 등이 있다. 그러나 증류법은 너무 높은 비등점으로 인해 고온에 의한 천연물의 유효성분의 분해 및 파괴 등의 문제가 되고 있으며, 용매 추출법은 또한 적정 용매의 선택, 추출 후 유기용매 제거의 어려움, 낮은 분리효과 등의 문제점을 갖고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 본 연구에서는 초임계유체 추출법을 이용하였다. 초임계유체 추출법은 증류법에 비해 저온에서 조작할 수 있어 천연물과 같은 열에 약한 물질의 추출에 유용하며, 용매를 사용하는 기존의 추출법과 비교해 보면 초임계 유체는 확산계수가 높고 점도가 낮기 때문에 빠른 추출과 상분리가 가능하다. 또한 온도 또는 압력을 변화하여 용매 회수를 쉽게 할 수 있다는 장점이

있다(25). 초임계유체에 의한 천연물의 추출은 용매 추출법에 의한 것보다 항균활성이 더 높다는 최근 연구결과들이 발표되고 있다. 그러한 예로써, Vagi 등(26)이 오레가노 (*Origanum majorana* L.)의 초임계 추출물이 *Eshcherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*에 대한 항균활성이 에탄올 추출물에 비해 높고, 특히 *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium*과 같은 곰팡이에는 초임계 추출물이 에탄올 추출물에 비해 4배 이상의 항균력을 가지는 것으로 보고하였다.

따라서, 본 연구에서는 식물자체만으로도 다양한 생리작용 및 항균활성을 나타내는 허브류에서 높은 항균활성을 갖고면서도 보다 인체에 무해한 항균물질을 추출해 내는 방법의 일환으로 초임계 유체 추출법을 선택하여 항균성이 있는 것으로 알려진 오레가노, 황금, 편백, 육계로부터 초임계 추출물을 추출한 후 이들의 항균활성을 일반 유기용매 및 열수 추출물과 비교 검토하였다

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 재료로 터키산 오레가노 (*O. vulgare* L.) 분말, 한국산 편백 (*C. obtusa* Endlicher) 목부, 베트남산 육계 (*C. cassia* Blume), 중국산 황금 (*S. baicalensis Labiatae*)을 구입하여 사용하였다.

초임계 유체 추출

초임계 유체 추출은 (주) 유텍스의 초임계 추출 장치 (SFE 5L, Natex, Austria)를 이용하였다. 분쇄된 오레가노, 편백, 육계, 황금 시료를 각각 추출조에 1.3~2 kg을 넣어 반응기의 온도 65°C, 압력 450 bar, S/F ratio (supercritical fluid kg/Feed kg) 25~35까지의 조건으로 추출하였다. 또한 보조 용매 에탄올 (99.5%) 500~750 ml 을 이용하여 회수된 추출물을 40°C에서 회전진공증발농축기 (EYELA, N-series, Japan)로 농축한 후 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시켜 사용하였다.

유기용매 추출

분쇄한 각각의 시료 100 g을 1 l 에탄올 (99.5%)에 침시켜 추출하였다. 에탄올 추출액을 filter paper (Whatman NO. 4, USA)로 감압여과하고, 여과된 용액은 40°C에서 회전진공농축기로 감압 농축한 후 DMSO에 용해시켜 사용하였다.

열수 추출

각각의 시료 100 g에 증류수 2 l을 넣어 100°C의 수욕상에서 3시간 동안 가열하여 추출하였다. 열수 추출액을 filter paper로 감압여과 하고, 여과액은 40°C에서 회전진공농축기로 감압 농축하여 수율을 계산하였으며, 추출물은 멸균수에 용해시켜 사용하였다.

추출수율

추출방법별 추출수율은 추출전의 시료 건조물의 중량에 대비 각 추출방법에 의해 생성된 추출용액을 회전진공농축기로 감압 농축하여 나온 추출물 무게에 대한 백분율로 나타내었다.

$$\text{추출수율}(\%, \text{wt}/\text{wt}) = \frac{\text{추출물건조무게}}{\text{시료건조무게}} \times 100$$

사용 균주 및 배지

항균활성 실험에 사용한 세균은 그람양성균인 *Bacillus subtilis* KCCM 11315, *Bacillus cereus* KCCM 40935, *Staphylococcus aureus* KCCM 11764, *Listeria monocytogenes* KCCM 40307와 그람음성균인 *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Salmonella typhimurium* KCCM 11863, *Vibrio parahaemolyticus* KCCM 11965을 사용하였으며, 곰팡이는 *Aspergillus niger* KCCM 11241를 한국미생물보존센터 (KCCM)로부터 분양받아 공시균주로 사용하였고, 그람음성균인 *E. coli*, 효모 *Candida albicans*는 아주대학교 생명과학과 분자생물학실험실에서 분양받아 공시균주로 사용하였다.

시험균주의 생육배지로 세균은 Nutrient broth와 agar, Luria-Bertania broth와 agar, Tryptic Soy broth와 agar를 각각 사용하였으며, 효모는 YM broth와 agar를, 곰팡이는 Potato Dextrose broth와 agar를 각각 사용하여, 각 균주는 해당배지에서 적정온도로 incubator에서 24시간 계대 배양하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. Reference microorganisms tested and their growth conditions

| Strains | Media | Temp(°C) |
|---|-------------------------------|----------|
| Gram Positive Bacteria | | |
| <i>Bacillus subtilis</i> KCCM 11315 | Nutrient agar/broth | 30 |
| <i>Bacillus cereus</i> KCCM 40935 | Nutrient agar/broth | 30 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11764 | Nutrient agar/broth | 37 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307 | Tryptic Soy agar/broth | 37 |
| Gram Negative Bacteria | | |
| <i>Escherichia coli</i> | Luria-Bertani agar/broth | 37 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021 | Nutrient agar/broth | 37 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 11863 | Nutrient agar | 37 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCM 11965 | Nutrient agar/broth (3% NaCl) | 37 |
| Yeast | | |
| <i>Candida albicans</i> | YM agar/broth | 30 |
| Fungi | | |
| <i>Aspergillus niger</i> KCCM 11241 | Potato Dextrose agar/broth | 25 |

항균활성 실험

항균활성 측정을 위해 본 실험에서는 Disc-diffusion method를 사용하였다(27). 즉, 각 추출물들을 membrane filter (0.2 μm, pore size)로 제균 시킨 다음 공시균주 100 μl가 균일하게 도말된 배지 위에 paper disc (Φ 8mm)를 올려놓고 각 추출물을 1 mg/disc씩 흡수시켜 24시간동안 incubator에서 배양한 후 disc 주위에 형성된 생육저지대 (clear zone)의 직경 (mm)을 측정하여 항균성의 유무와 강도를 비교하였다. 용해용매인 DMSO 및 H₂O의 영향을 조사하기 위해 DMSO 및 H₂O를 대조구로 실험하였다.

최소저해농도 (minimum inhibitory concentration) 측정 각 균주의 최소저해농도 (MIC)는 다음과 같이 결정하였다(28). 최소억제농도 측정은 각 균을 액체배지 100 ml에

접종한 후 배양하여 각 균주가 대수증식기 중반기에 접어들 때 이를 각각의 새로운 배양배지 5 ml에 100 μl씩을 접종하였으며 각각의 희석된 추출물을 100 μl씩 첨가하여 최종 농도가 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ppm이 되도록 하였다. 24시간 incubator에서 배양한 후 미생물의 생육정도를 UV-VIS spectrophotometer (UV mini1240, Shimadzu)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세균의 생육억제 활성은 세균의 경우 크기가 균일한 집단으로 세포수가 증가함에 따라 탁도가 증가하는 것을 이용한 탁도 측정법과 동일한 방법으로 실시하였다. IC₅₀ (Fifty Percent Inhibitory Concentration)은 시료 무처리군의 흡광도에 대비하여 50%의 생육억제를 나타내는 시료의 농도를 IC₅₀으로 나타내었으며, 세균의 생육억제 활성은 탁도 측정법에서와 동일한 방법으로 실시하였다.

$$\text{세균생육 억제율}(\%) = \frac{\text{무처리구의 흡광도} - \text{처리구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}} \times 100$$

결과 및 고찰

추출 수율

추출공정에 따른 4가지 시료의 추출수율은 Table 2와 같이 0.5-28%로 시료별, 추출방법별에 따라 다양함을 알 수 있었다. 추출방법에 따라 추출수율을 비교한 결과 열수 추출의 경우에는 황금의 수율이 28%로 가장 높았고 초임계 추출의 경우 육계가 6.9%로 수율이 높게 나왔다.

Table 2. Yield of organic solvents, hot water and supercritical fluid extracts from plants

| | Extraction yield (%wt/wt) | | |
|---------------------------------|---------------------------|-----|-----|
| | SFE | SE | HWE |
| <i>Origanum vulgare</i> | 2.0 | 6.0 | 6.0 |
| <i>Chamaecyparis obtusa</i> | 4.7 | 2 | 1.8 |
| <i>Cinnamomum cassia</i> | 6.9 | 1 | 4.8 |
| <i>Scutellariae baicalensis</i> | 0.5 | 2.4 | 28 |

SFE : Supercritical Fluid extraction, SE : Solvent extraction, HWE : Hot Water extraction.

Extraction yield (%wt/wt) : (weigh of dry extract/weight of dry plant)×100.

Rodrigues 등(29)의 실험에서도 온도와 압력에 따라 초임계 추출수율이 달라지지만 오레가노 초임계 추출수율이 최대 1.32%로 수율이 낮게 나타났다. *E. vagi* 등(26)의 실험에서는 오레가노 (*O. vulgare*)와 같은 종인 *O. marjorana*에서 에탄올 추출수율은 9%, 초임계 추출수율은 3.8%로 초임계 추출수율이 낮게 나타났다. 오레가노의 경우 에탄올 추출수율이 초임계 추출수율에 비해 높은 것을 알 수 있다.

이경희 등(30)의 실험에서 육계를 70% 에탄올을 사용하여 추출한 경우도 수율이 3.4%로 낮은 추출수율을 나타낸다. 황금의 경우에는 Mei-chin Lin 등(31)의 실험에서 조건에 따라 초임계 추출수율이 달라지지만 대체적으로 유기용매 추출물보다 초임계 추출물의 수율이 낮게 나타났다. 즉, 편백과

육계의 초임계 추출의 경우 유기용매 및 열수 추출에 비해 수율이 더 높게 나왔지만 오레가노와 황금은 오히려 초임계 추출수율이 낮게 나타났다.

이 실험 결과 추출수율은 수종과 추출방법에 따라 추출수율이 다르다는 것을 알 수 있고, 같은 추출방법이라도 조건에 따라 추출수율이 달라진다는 것을 알 수 있다. 따라서 추출방법에 따른 추출수율을 높이는 방법에 따른 연구가 필요하다고 생각된다.

항균활성

추출방법에 따른 항균활성을 실험하기 위해 각 시료에 대한 초임계 추출, 유기용매 추출, 열수 추출을 실시하였다. 추출물의 disc-diffusion method에 의한 항균활성 측정 결과는 Table 3과 같다. 열수 추출물들의 경우 항균활성이 나타나지 않았고, 초임계 추출물들이 유기용매 추출물들보다 항균활성이 높게 나타났다.

오레가노, 편백, 육계 및 황금 추출물은 추출조건에 상관없이 모두 그람 양성균에 높은 항균활성을 보였으며, 그람 음성균에 대해서는 낮은 항균활성을 나타냈다. 이러한 결과는 배초향, 초피나무, 박하 등과같은 한국 자생 허브식물의

항균활성을 측정한 결과와도 일치하였다(32). 오레가노 (*O. vulgare*) 초임계 추출물은 17.5 mm, 편백 (*C. obtusa*) 초임계 추출물은 16.5mm로 다른 균들에 비해 *S. typhimurium*에 가장 큰 활성도를 나타냈지만, *S. enteritidis*와 *A. niger*에는 항균활성이 나타나지 않았다.

육계 (*C. cassia*) 초임계 추출물은 그람 양성균과 그람 음성균, 효모, 곰팡이 모두 항균활성을 나타냈으며 다른 추출물들에 비해 뛰어난 항균활성을 보였다. 특히 *S. typhimurium*에 대해 clear zone이 26 mm로 가장 큰 항균활성을 보였고, 그 다음으로 *L. monocytogenes* (23.7 mm)에 대해 높은 항균활성을 나타냈다. 육계 초임계 추출물에서만 항균활성을 보인 *S. enteritidis*는 15.5 mm, *A. niger*는 21 mm로 높은 clear zone을 형성하였다.

황금 (*S. baicalensis*) 초임계 추출물은 *L. monocytogenes* (23.7 mm)에 대해 가장 높은 항균활성을 나타냈으며, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *A. niger*에 대해서는 항균활성이 나타나지 않았다.

초임계 추출물의 최소저해농도

항균활성 검색에 사용된 10균주에 대해 4가지 시료에 의한

Table 3. Antimicrobial and antifungal activity of each extracts from plants

| Strains | Clear zone on plate (mm) ¹⁾ | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--|----|-----------------|------------------|----|-----|------------------|------|-----|-----------------------|----|-----|
| | <i>O. vulgare</i> | | | <i>C. obtusa</i> | | | <i>C. cassia</i> | | | <i>S. baicalensis</i> | | |
| | SFE | SE | HWE | SFE | SE | HWE | SFE | SE | HWE | SFE | SE | HWE |
| <i>B. subtilis</i> | 12 | 12 | - ²⁾ | 12 | 12 | - | 21 | 10 | - | 18 | 17 | - |
| Gram (+) <i>B. cereus</i> | 10 | 11 | - | 10 | 11 | - | 20 | 9 | - | 12 | 11 | - |
| <i>S. aureus</i> | 13 | 11 | - | 13 | 11 | - | 11 | 8.7 | - | 13 | 12 | - |
| <i>L. monocytogenes</i> | 12 | 10 | - | 12 | 10 | - | 23.7 | 12.2 | - | 23.7 | 12 | - |
| <i>E. coli</i> | 10 | 9 | - | 10 | 9 | - | 17 | - | - | 10 | 9 | - |
| Gram (-) <i>S. enteritidis</i> | - | - | - | - | - | - | 15.5 | - | - | - | - | - |
| <i>S. typhimurium</i> | 17.5 | - | - | 16.5 | - | - | 26 | - | - | - | - | - |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 10 | 10 | - | 10 | 10 | - | 22 | - | - | 10 | 10 | - |
| Yeast <i>C. albicans</i> | 10 | 9 | - | 9 | 8 | - | 21 | 9 | - | 14 | 11 | - |
| Fungi <i>A. niger</i> | - | - | - | - | - | - | 21 | - | - | - | - | - |

¹⁾Diameter, ²⁾No inhibitory zone was formed.

SFE : Supercritical Fluid extraction, SE : Solvent extraction, HWE : Hot Water extraction.

Table 4. Antimicrobial and antifungal activity of each extracts from plants

| Strains | <i>O. vulgare</i> | | | | <i>C. obtusa</i> | | | | <i>C. cassia</i> | | | | <i>S. baicalensis</i> | | | |
|--------------------------------|-------------------|------------------|------|------------------|------------------|------------------|--------|------------------|------------------|------------------|------|------------------|-----------------------|------------------|------|------------------|
| | SFE | | SE | | SFE | | SE | | SFE | | SE | | SFE | | SE | |
| | MIC | IC ₅₀ | MIC | IC ₅₀ | MIC | IC ₅₀ | MIC | IC ₅₀ | MIC | IC ₅₀ | MIC | IC ₅₀ | MIC | IC ₅₀ | MIC | IC ₅₀ |
| <i>B. subtilis</i> | 250 | 176.1 | >500 | 275.4 | 125 | 8.17 | 62.5 | ND | 250 | 96.1 | >500 | 208.8 | 250 | 45.4 | 500 | 96.6 |
| Gram (+) <i>B. cereus</i> | >500 | 371.9 | >500 | ND ¹⁾ | 125 | 31.56 | 62.5 | ND | 500 | 78.63 | >500 | ND | 500 | 50.67 | 500 | 154.5 |
| <i>S. aureus</i> | 250 | 119 | 500 | 178 | 125 | 39.9 | 62.5 | 6.4 | 250 | 144.7 | >500 | 756.8 | 250 | 153 | 500 | 330 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 500 | 290 | >500 | 564.2 | >500 | 244.8 | <31.25 | ND | 250 | 125.2 | >500 | 657 | >500 | 258.9 | >500 | ND |
| <i>E. coli</i> | >500 | 488.7 | >500 | 1851 | >500 | ND | >500 | ND | >500 | 386.7 | >500 | ND | >500 | 896.7 | >500 | ND |
| Gram (-) <i>S. enteritidis</i> | >500 | 831 | >500 | 840 | - ²⁾ | - | - | - | 500 | 315 | >500 | 828.7 | >500 | ND | >500 | ND |
| <i>S. typhimurium</i> | 500 | 232.1 | >500 | 760 | 500 | 320.3 | - | - | 250 | 130.5 | >500 | 670.2 | >500 | ND | >500 | ND |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 500 | 97.7 | 500 | 160.4 | 125 | 85.8 | 31.25 | ND | 250 | 55.8 | >500 | 688.5 | 500 | 45.5 | 500 | 123.8 |
| Yeast <i>C. albicans</i> | >500 | 271.9 | >500 | 857.6 | >500 | 442.8 | >500 | 1121.9 | >500 | 151.7 | >500 | 3584.9 | >500 | 156.9 | >500 | 288.5 |
| Fungi <i>A. niger</i> | >500 | 376.4 | >500 | 889 | >500 | 474.6 | - | - | 125 | 76.4 | - | - | >500 | 143.4 | >500 | 728.8 |

unit : µg/ml

¹⁾Not detection, ²⁾No inhibition

SFE : Supercritical Fluid extraction, SE : Solvent extraction.

열수 추출물은 disc-diffusion method에서 항균활성이 나타나지 않아 초임계 추출물 및 에탄올 추출물의 최소억제농도(MIC)만 실험하였으며 최소억제농도 및 IC₅₀값은 Table 4와 같다.

*B. subtilis*에 대해서는 초임계 추출물의 항균활성이 에탄올 추출물에 비해 높게 나타났다. 그 중, 편백 초임계 추출물의 MIC가 125 µg/ml, IC₅₀이 8.17 µg/ml로 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 황금 초임계 추출물의 MIC가 250 µg/ml, IC₅₀이 45.4 µg/ml로 높게 나타났다. *B. cereus*에 대한 항균활성은 편백의 초임계 추출물 (MIC: 125 µg/ml, IC₅₀: 31.56 µg/ml)이 가장 높았으며, 그 다음 황금 초임계 추출물 (MIC: 500 µg/ml, IC₅₀: 50.67 µg/ml) 순으로 나타났다. *S. aureus*는 *B. subtilis*의 경우와 마찬가지로 초임계 추출물의 항균활성이 높게 나타났고, 편백의 초임계 추출물 (MIC: 125 µg/ml, IC₅₀: 39.9 µg/ml)이 가장 높았으며, 그 다음 오레가노 초임계 추출물 (MIC: 250 µg/ml, IC₅₀: 119 µg/ml) 순으로 나타났다. 황금 초임계 추출물도 MIC가 250 µg/ml, IC₅₀이 153 µg/ml로 다른 초임계 추출물에 비해 낮지만 비교적 높은 항균활성을 나타냈다. *L. monocytogenes*에 대해서는 육계 초임계 추출물이 MIC가 250 µg/ml로 나타났고, IC₅₀이 125.2 µg/ml로 가장 큰 활성을 보였다.

4종의 그람 음성균의 MIC는 4종의 그람 양성균에 비해 MIC가 높게 나타남으로서 항균활성은 낮은 것으로 나타났다. *E. coli*에서는 육계 초임계 추출물의 MIC가 500 µg/ml 이상이지만, IC₅₀값이 386.7 µg/ml로 다른 추출방법에 비해 가장 높게 나타났고, *S. enteritidis*와 *S. typhimurium*도 *E. coli*와 마찬가지로 육계 초임계 추출물의 MIC가 각각 500, 250 µg/ml, IC₅₀값이 각각 315 µg/ml, 130.5 µg/ml로 가장 높게 나타났다. *V. parahaemolyticus*에 대해서는 모든 초임계 추출물들의 IC₅₀이 45.5-97.7 µg/ml로 높은 항균활성을 나타냈고, 이 중 황금 추출물이 45.5 µg/ml로 가장 높은 것으로 나타났다.

효모인 *C. albicans*와 곰팡이인 *A. niger*의 경우에는 육계와 황금의 초임계 추출물이 가장 높은 항균활성을 나타냈다. 육계 초임계 추출물은 *C. albicans*에 대해서 MIC와 IC₅₀값이 각각 >500 µg/ml, 151.7 µg/ml로, *A. niger*에 대해서는 MIC와 IC₅₀이 각각 125 µg/ml, 76.4 µg/ml로 나타났다. 또한, 황금의 초임계 추출물은 *C. albicans*에 대해 MIC와 IC₅₀이 >500 µg/ml, 156.9 µg/ml로, *A. niger*에 대해서는 MIC와 IC₅₀이 >500 µg/ml, 143.4 µg/ml로 나타났다.

실험결과 초임계 추출물이 유기용매 및 열수 추출물에 비해 항균효과가 높다는 것을 알 수 있었고, 4가지 시료 중 편백 목부와 육계가 높은 항균활성을 갖는 것으로 확인되었다. 또한 disc-diffusion method에서는 편백 목부 초임계 추출물이 육계 추출물보다 낮은 항균활성을 나타냈지만, 최소억제농도 실험에서는 육계 추출물보다 높은 항균활성을 나타냈다. 이것은 편백에 많이 함유되어 있는 휘발성 방향성분 (phytoncide) 즉, phenolics, terpenoid, alkaloid, phenylpropane, acetogenin, steroid 등의 화합물이 최소억제농도 실험보다 disc-diffusion method로 실험할 때 쉽게 휘발되어 없어지기 때문인 것으로 사료된다(33, 34).

또한, 4가지 시료에 대해 초임계 추출물이 물 및 유기용매 추출물에 비해 높은 항균활성을 나타냈다. 특히 오레가노, 황금의 항균활성은 편백과 시나몬에 비해 낮게 나타나

지만, 추출수율이 낮은 초임계 추출물의 항균활성이 물 및 에탄올 추출물에 비해 높은 것을 알 수 있다. 이 실험으로 추출수율과 수중에 상관없이 초임계 추출물의 항균활성이 다른 추출방법에 비해 항균활성이 높은 것을 알 수 있다. 따라서 편백을 비롯한 3종의 초임계 추출물 및 용매 추출물에 대해 차후 이러한 기능성 성분 분석에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

이와 같은 결과로 천연물을 이용한 항균제 개발에 있어 초임계 추출방법이 기존의 추출방법들에 비해 항균력이 높은 기능성 성분을 추출해 내는데 가장 효과적인 추출방법인 것으로 나타났다.

국문요약

다양한 기능성을 갖는 식물체를 대상으로 새로운 천연 식품 보존제 및 방부제 개발의 일환으로 다양한 방법으로 추출한 항균활성 물질을 몇 종의 병원성균과 식중독균, 효모, 곰팡이 등 10개 균주에 대하여 항균활성 검색을 하였다.

각 추출방법에 따른 추출 수율을 보면 편백과 육계 초임계 추출물의 수율이 가장 높았지만, 오레가노와 황금의 경우에는 초임계 추출물의 수율이 가장 낮았다. 그러나 항균활성 실험에서 disc-diffusion method 및 최소억제농도 (MIC) 실험 결과 유기용매 추출 및 열수 추출보다 초임계 추출의 경우가 항균활성이 모든 시료에서 높은 것으로 나타났다.

Disc-diffusion method에서 육계 초임계 추출물의 경우 에탄올 추출물보다 항균활성이 두 배정도 높게 나타났고, 10개 균주에 대해 모두 항균활성을 나타냈다. 황금 초임계 추출물은 *L. monocytogenes*에 강한 항균활성을 보였고, 오레가노와 편백의 초임계 추출물은 *S. typhimurium*에 강한 항균활성을 보였다. 최소억제농도 (MIC)에서는 편백 초임계 추출물이 다른 초임계 추출물에 비해 강한 항균활성을 보였으며, 그 다음으로 육계, 황금, 오레가노 초임계 추출물의 순으로 항균활성을 나타내었다. 따라서 천연물을 이용한 항균제 개발에 있어 초임계 추출방법이 항균력이 높은 기능성 성분을 추출해 내는데 가장 효과적인 추출방법인 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Nanayama, M. (1996), Antibacterial substances in food. *Jpn J. Food Microbiol* **12**, 209-213.
2. Beuchat, L. R. and D. A. Golden (1989), Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* **43**, 134-142.
3. Ashton, D. H. and F. F. Busta (1998), Milk components inhibitory to *Bacillus stearothermophilus* by iron, calcium and magnesium. *Appl. Microbiol.* **1**, 628-635.
4. Freese, E., C. W. Sheu, and S. E. Gallier (1973), Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* **241**, 321-325.
5. Neiman, C. (1985), Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganism. *Bacteriol. Rev.* **18**, 147-163.
6. Shelef, L. A., O. A. Naglik, and D. W. Bogen (1980), Sensitivity of some common food borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *J. Food Sei.* **45**, 1042-1044.

7. Sahika, E. A. and K. Mehmet (1986), Sensitivity of some common food poisoning bacteria to thyme, mint and bay leaves. *Inter. J. Food Microbiol.* **3**, 349-354.
8. Lee, B. W., and D. H. Shin (1991), Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for food spoilage microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**, 200-204.
9. Fromtling, R. A., G. S. Bulmer (1978), *In vitro* of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) on the growth and viability of *Cryptococcus neformans*. *Mycologia* **70**, 397-401.
10. Park, K. H., D. S. Koh, and Y. H. Lim (2001), Anti-allergic compound isolated from *Cinnamomum cassia*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 40-42.
11. Sagdic, O., A. Kuscu, M. Ozkan, and S. Ozcelik (2002), Effect of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *E. coli* 0157:H7. *Food Microbiology* **19**, 473-480.
12. Baydar, H., O. Sagdic, G. Ozkan, and T. Karadogan (2004), Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* **15**, 169-172.
13. Chun, S. S., A. V. Vatter, Y. T. Lin, and K. Shetty (2004), Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process in Biochemistry* **40**, 809-816.
14. Nostro, A., A. R. Blanco, M. A. Cannatelli, V. Enea, and I. F. Morelli (2004), Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters* **230**, 191-195.
15. Souza, E. L., T. L. M. Stamford, E. O. Lima, and V. N. Trahano (2006), Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control, In Press, Corrected Proof* **21**.
16. Daferera, D. J., B. N. Ziogas, and M. G. Polissiou (2003), The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* **22**, 39-44.
17. Sahin, F., M. Gulluce, D. Daferera, A. Sokmen, M. Polissiou, and G. Agar (2004), Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* **15**, 549-557.
18. Erdtman, H. and J. Gripenberg. (1948), Antibiotic substances from the heart wood of *Thuja plicata* Don. *Naturem* **161**, 719.
19. Yamamoto, H., T. Yamazaki, K. Sat, S. Shiga, T. Hagiwara, K. Ouchi, and T. Kishimoto (2005), *In vitro* inhibitory effects of hinokitiol on proliferation of *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 2519-2521.
20. Lee, K. K. (1999), Antimicrobial activity of *Thuja orientalis* and *Chamaecyparis obtusa* essential oil. *J. Kor. Soc. Cosm.* **5**, 567-577.
21. Kim, Y. R., S. G. Choi, and S. H. Cho (2005), Analysis of antimicrobial substance isolated from *Scutellariae Radix* extract using LC-MS. *Korean J. Food Preserv.* **12**, 350-354.
22. Chung, S. K. and S. H. Cho (2002), Preservation of strawberry and cucumbers packaged by low density polyethylene film impregnated with antimicrobial agent, *Scutellariae baicalensis* extract. *Korean Journal of Food Preservation.* **9**, 271-276.
23. Bae, J. H., M. J. Lee, S. M. Lee (2005), Antimicrobial effect of *Cutellaria baicalensis* George extracts on food-borne pathogens. *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* **33**, 35-40.
24. Cho, S. H., and Y. R. Kim (2001), Antimicrobial characteristics of *Scutellariae radix* extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 964-968.
25. McHugh, M. A., and V. J. Krukonis (1986), Supercritical fluid extraction: principle and practice. *Butterworths, Boston, M. A.* **66**, 582-586.
26. Vagi, E., B. Simandi, A. Suhajda, and E. Hethelyi (2005), Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* **38**, 51-57.
27. Perez, C., M. Pauli, and P. Bazerque (1990), An antibiotic assay by agar well diffusion method. *Acta Biol. Med. Exp.* **15**, 113-115.
28. Zgoda, J. R. and J. R. Porter (2001), A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology* **39**, 221-225.
29. Rodrigues, M. R. A., L. C. Krause, E. B. Caramao, J. G. Dos Santos, C. Dariva, and J. V. De Oliveira (2004), Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from Sub- and Supercritical CO₂. *J. Agric. Food Chem* **52**, 3042-3047.
30. Lee, K. H. and E. M. Choi (2006), Stimulatory effects of extract prepared from the bark of *Cinnamomum cassia* blume on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytother. Res.* **20**, 952-960.
31. Lin, M. C., M. J. Tsai, and K. C. Wen (1999), Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae Radix*. *Jurnal of Chromatography A.* **830**, 387-398.
32. Lee, S. H., J. K. Kim, S. W. Kim, Y. W. Kim, Y. H. Choi, and J. H. Kwon (2005), Evaluation of functional properties of the traditional herbs in Korea. *Food Engineering Progress* **9**, 249-261.
33. Kang, H. Y., S. S. Lee, and I. G. Choi (1993), The Antifungal Activity of Coniferous Needle Oil. *J. Kor. For. En.* **13**, 71-77.
34. Whittaker, R. H., and P. P. Feeny (1971), Allelochemicals, chemical interactions between species. *Science* **171**, 757-770.