

젖소 유방염 치료를 위한 천연물 유래의 제제 탐색

제해신* · 김희경**

(*장흥군농업기술센터 농촌지도사 · **전남대학교 생물공학연구소 연구원)

Study on the natural products for the treatment of mastitis of milk cow

Hae-Shin Je* · Hee-Kyung Kim**

*Changhung Agricultural Development and Technology Center, 276, Wondo-Ri, Changhung-Eup, Changhung-Kun, Chonnam, Korea.

**Institute of Biological Engineering, Chonnam National Univ., Kwang-Ju 300, Korea.

적 요

Ethyl acetate를 이용한 인동초(忍冬草) 추출물에서 항미생물 활성이 인정된 활성물질을 solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, HPLC 등의 기법으로 활성본체를 정제, 분리하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 기기 분석을 통해 항미생물 활성에 미치는 최종 성분분석을 시도하였다. 인동초의 Ethyl acetate 추출물은 표준 및 현장 분리 *Staphylococcus aureus* 균종에 대해 항미생물 활성을 보였다. 인동초의 항미생물 효과에 미치는 항균성을 나타내는 물질로는 Benzoic acid가 동정되었으며, 아울러 항미생물 활성을 갖는 미량성분으로 Cinnamic acid가 동정되었다. 추출 용매중 항균성에 미치는 물질을 분리하는데는 Ethyl acetate가 가장 효과적이었으며, Methanol과 ether는 그 효과를 인정할 수 없었다. 항균성에 관련된 물질로 확인된 Benzoic acid는 생체중량 g당 0.773mg, Cinnamic acid는 생체중량 g당 7.01g 수준이었다. 특히 benzoic acid 함유량이 타 식물체의 함유량(0.001~11.2g/g)에 비하여 매우 높은 함량을 갖고 있음이 인정되었으며, 이러한 사실에서 인동초 및 인동초 추출물은 천연의 항균성물질로 이용 가능성이 강력히 시사되었다.

1. 서론

젖소의 유방염을 유발하는 원인 균은 지금까지 약 100여종이 알려져 있으며, 감염 경로에 따라 전염성균, 환경유래균, 기타 등 3가지로 분리되고 있으며, 이 중에서 전염성 세균의 경우가 가장 중요하다고 알려져 있으며, 대표적인 것은 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 무유성 연쇄상구균(*Streptococcus agalactiae*)과 마이코플라스마 보오비시(*Mycoplasma bovis*) 및 코리네박테리아(*Corynebacteria*) 등이 있다.

이중 황색 포도상구균은 유선 조직에 감염이 되면

체세포 수가 높아지는 만성 잠재성 유방염으로 발현하며 고름 등의 응괴물이 형성된다(농림부 국립수의과학검역원, 1996).

이 균은 또한 인·수 공통 병원체이며, 이 균이 일으키는 질병에 대한 역학 조사가 국내외에서 광범위하게 이루어지고 있다. 최근 연구에 의하면 젖소 유방염을 유발하는 전염성 및 환경성 유래의 원인균을 비교하면 표 1과 같다.

지속적인 국가 경제 성장에 따른 국민소득의 증가는 식생활 수준의 양적, 질적 향상과 관련하여 우유 및 유제품의 소비가 급격히 증가하는 등 축산 식품의 소비량에도 커다란 변화를 가져오고 있다. 우리나라

표 1. 전염성 및 환경성 유래의 유방염 원인균 비교

구 분	전염성 원인균	환경성 원인균
황색 포도상구균 균 종 코리네박테리아	응집 효소 음성 포도상구균 무유성 연쇄상구균 Coliform 유방염	환경성 연쇄상구균
보균자	감염된 분방	젖소, 젖소의 주변
감염매개체	착유과정, 착유자, 손, 착유기, 유두세척 수건	침낭, 분변, 토양
감염시기	착유과정(비유기)	비유기 또는 분만 전 후
계절	계절에 상관없음	여름철 다발
감염기간	30일 이상(만성)	30일 이하(60 - 70%)
발병형태	준임상형 > 임상형	임상형 > 준임상형

라 우유 수급 현황을 보면 1인당 우유 소비량이 1962년 0.1kg, 1970년 1.6kg, 1980년 11kg, 1990년 53kg으로 엄청난 증가폭을 나타내고 있다. 이처럼 높은 우유 소비량의 증가로 식품 중에 차지하는 우유의 비율이나 역할이 중요해 짐에 따라 위생적으로 안전하고, 보다 품질 좋은 우유를 원하는 소비자들의 욕구가 증대되었다.

원유의 질(質)은 유지방, 단백질 등 영양 성분뿐만 아니라 우유내 총세균수, 체세포수 같은 젖소 유방의 건강 상태와 관련된 요소들에 의해서도 결정된다. 유방염에 감염된 젖소의 우유에는 세균이 존재할 뿐 아니라 체세포수 증가 등 유성분에도 극적인 변화가 초래되므로서 유질(乳質)이 현저히 저하된다. 따라서 영양적인 면에서나 위생적인 면에서도 유질을 향상시키기 위해서는 젖소에서 가장 문제시되는 질병중의 하나인 유방염을 예방하고 치료하는 것이 필수적이다. 젖소의 유방염은 자연계에 널리 분포되어 있는 여러 가지 미생물 감염에 의하여 유선 조직에 염증이 생긴 것으로서 산유량 감소 및 유질 저하는 물론이고 건강우(健康牛)에 대한 감염원으로 작용하므로서 유방염을 전파시키는 역할을 하며, 심한 경우에는 젖소로서의 기능 상실 및 폐사에 이르는 등 막대한 경제적 손실을 초래한다 할 수 있다. 이외에도 젖소 도태, 치료 경비, 판매가치 감소, 노동력 경비 증가,

대체우(代替牛) 경비 등 유방염으로 인한 경제적 손실은 낙농에서 연간 순이익을 결정하는 요인 중 유량이 37%, 유방염이 14%, 산자수와 수명이 5~9%라는 것을 고려했을 때, 낙농의 성공 여부가 유방염 방제 여부에 직접적으로 관련이 있음을 의미한다고 볼 수 있다.

유방염을 일으키는 원인체의 다양함으로 인하여 지난 수십년 동안 유방염 예방과 치료를 위해 항생 물질이 널리 사용되어 왔다. 그러나 항생제의 연용(連用)으로 인하여 내성균주가 증가하게 되어 치료율이 감소되고, 항생제가 인체에 잔류되면 나쁜 영향을 초래한다는 보고가 있는 후 이를 해결하기 위하여 휴약기간을 설정하여 항생제 사용시에는 최소 72시간 이내의 우유는 버리지 않으면 안되었다. 그리하여 최근에는 유방염 등 질병 방제를 위하여 항생제를 탈피하여 생리학적 및 면역학적 요법에 의한 숙주의 질병에 대한 저항성을 높이는 면역증강제 개발이 시도되고 있다.

인동초는 <동의보감>, <본초강목>등 주요 한방서(書)에서 항암 및 항세균 효과가 있는 것으로 알려지고 있으며, 인동초의 잎에는 엽분 배출시키는 루테오닌, 줄기는 탄닌, 알칼로이드, 꽃에는 사포닌 성분이 들어 있는 것으로 알려지고 있으며, 또한 한의학 서인 <동의보감>에서는 종기, 종창, 부스럼에 효과 있는

것으로 알려지고 있다. 이외에 호흡기 질환과 매독 등의 세균 등에도 효과가 있다고 일컬어지고 있다.

이와 같은 인식을 근거로 하여 본 연구자들은 비위생적인 사양 관리 및 여러 가지 요인에 의한 젖소의 유방염을 효율적으로 예방하기 위해 최근에 면역세포를 활성화시키고, 항(抗)세균 효과가 있는 것으로 알려진 인동초를 이용하여 첫번째 과정으로 실험실에서 매우 높은 항균 효과를 보인 인동초의 항미생물 활성물질 추출물을 선정한 후, 이 물질에 대한 생화학적 물질분석을 하고, 인동초 추출물에 대한 항균성을 측정하여 활성물질의 구조를 확인한 후 항균 활성물질을 정량하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 인동초 유기 용매 추출물의 항미생물 활성물질 추출

가. 재료의 준비

본 연구에 적용하기 위한 인동초는 전라남도 장흥군 지역에 자생하는 재료를 채취하여 이를 물로 깨끗이 세척한 후 뿌리, 줄기 및 잎으로 분리하여 상온(常溫)에 방치하여 잔존하는 표면의 잔여 수분을 제거한 다음, 냉암소(冷暗所)에서 건조한 후 실험 재료로 사용하였다.

또한 본 연구에 따른 실험은 전남대학교의 생물공학연구소(응용가축개발부)에서 수행하였다.

나. 용매추출법에 의한 항균 활성 성분의 조제

인동초의 분리 재료를 용매별로 추출하기 위하여 시료를 분쇄기(blender)로 균일하게 분쇄한 후 각기 다른 용매 추출장치의 분리 필터에 100g씩을 넣은 후, 40°C~50°C의 범위에서 500ml 용매 충전 플라스크에 250ml 에칠아세트(Ethyl acetate), 메탄올(MeOH), 혹은 에테르 등을 넣은 다음, 추출장치를 12시간씩 3회 반복하여 추출하였다. 다시 추출 여과지를 이용하여 여과하고 이를 냉각순환장치(Cooling aspirator)가 부착된 농축 감압 장치를 사용하여 45°C에서 농축 건조하여 추출물을 얻었다.

다. 천연제제 추출물의 유기용매 분획

1) 에칠아세트(Ethyl acetate)를 사용하여 용매 분획

에칠아세트(Ethyl acetate)를 사용하여 용매 분획하기 위하여 다음과 같은 방법을 실시하였다. 먼저 에칠 아세트와 0.2M 글리신 완충용액(glycine-HCl Buffer(pH 2.5))을 이용하여 수상(Buffer층)과 유기상(Ethyl acetate층)으로 분리하고 수상을 1.0M 수산화나트륨(NaOH)으로 pH 12.0으로 조절한 후 에칠아세트(Ethyl acetate)로 분배하여 염기성 분획을 얻었다.

유기상은 0.2M 인산 완충용액($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ Buffer), (pH 7.5)으로 분배하여 수상(水狀)과 유기상(有機狀)으로 분획하였다. 수상은 1.0M 염산(HCl)을 이용, pH 3.0으로 조절하고 에칠아세트(ethyl acetate)로 분배하여 산성 분획(分獲)을 얻었다.

그리고 유기상은 0.2M 수산화나트륨(NaOH)-염화칼륨(KCl)완충액(pH 13)으로 분배하여 수상과 유기상으로 분획하여 유기상인 중성 회분을 얻었다. 수상은 다시 1.0M 염산(HCl)로 pH 6.0으로 조절하고 에칠아세트(ethyl acetate)로 분배하여 주요 성분인 유기상 회분을 얻었으며, 이상과 같은 각각의 분획을 최종 정제를 위한 재료로 사용하였다.

2) 메탄올(MeOH) 및 에테르(eter)에 의한 인동초에서의 용매 추출

메탄올(이하, 추출물-3)과 에테르용매(추출물-4)에 의한 추출물은 분쇄된 시료 400g을 분쇄기(Osterizer, Co., Matic 12, USA)로 재 분쇄한 후 추출용매인 메탄올(Metanol)과 에테르(Eter)를 혼합하여 균질기(NISSEIA M-7 homogenizer)를 이용하여 균질화시킨 다음 약 10배량의 메탄올(Methnol)과 에테르로 12시간 동안 3회 반복하여 추출하였다. 다시 추출물은 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 여과하고 냉각순환장치(EYELA COOL ACE Ca-111)를 장착한 감압 농축장치(EYELA TYPE N-N)를 사용하여 45°C에서 감압 농축하여 메탄올 및 에테르 추출물을 만들었다.

3) 메탄올(MeOH) 및 에테르 추출물의 유기용매 분획

메탄올 및 에테르에 의한 인동초에서의 용매 추출물은 유기 용매로 에칠아세트를 사용하여 용매 분획하였으며, 전반적인 분획은 전술한 에칠아세트의 분획 방법과 동일하게 실시하였다.

4) 실리카겔 흡착 컬럼 크로마토 그래피에 의한 정제

추출물-1과 추출물-2는 실리카겔(Silicagel, 180g, 70-230mesh, colum chromatography용, Merck사)을 구입하여 시료의 10배에 해당되게 우선 에칠아세트로 혼합하고 3.2 x 48cm로 제조된 컬럼에 기포가 생기지 않도록 충전하고, 메탄올 - 에칠아세트(EtOAc) 혼합용매를 0%, 2, 4, 6 및 100%로 점차 증가시키면서 용출시킨 인동초 추출물을 용출 분획하여 이를 원료로 황색 포도상구균에 대하여 항균 활성을 검정하기 위한 재료로 사용하였다.

5) Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피에 의한 추출물의 정제

인동초에서 용매별로 추출한 시료인 4종류의 추출물은 Sephadex LH-20 column 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 즉, Pharmacia사의 25-100mesh크기의 Sephadex LH-20 레진을 구입하여 이를 MeOH : CHCl₃(4:1, v/v)혼합용액에서 24시간을 방치한 후, 3.3 x 10cm의 컬럼에 1,000ml 되도록 레진을 충전하였다. 그리고, 동일한 용매를 사용하여 인동초 추출액을 최종 분획하여 이를 원료로 항균 활성을 검정하기 위한 재료로 정제하였다.

6) 용출 용액의 재결정

획득된 각각의 결정시료는 헥산(n-Hexane)을 소량 넣은 후, 가온 수조에서 서서히 가온시키면서 용해시킨 후, 역시 서서히 냉각시키면서 재결정화(백색침상 결정, 이하 추출물-1) 하여 이를 여과하여 획득한 후 이를 건조하여 분말상의 최종 검정시료로 하였다. 그러나, 침전되지 않은 상층액(이하 추출물-2)으로 하였으며, 메탄올과 에테르에 의해 용출되는 경우를 각

각 추출물-3과 추출물-4로 명명하였다. 여기에서 얻어진 최종 시료를 황색 포도상구균에 대한 항균 활성을 검정하기 위한 재료로 사용하였다.

7) 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의한 분리 및 정제

재결정 과정에서 침상결정을 제외한 여액에서의 항균활성성분을 분리하고자 상기의 1% AcOH-MeOH 용액계를 이용하여 C₁₈ column(Delta-PAK C₁₈)의 HPLC를 실시하였다.

전반적인 액체 크로마토그래피(HPLC)조건으로는 박 등의 방법에 준하여 실험을 실시하였다⁽⁵¹⁾. 방법을 간략히 정리하면, Sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 필터(GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2 μ m)로 여과한 후 Delta-Pak C₁₈ 컬럼(1.9 x 30cm)에 이동상으로는 1% Acetic acid : MeOH(40:60)으로 용출 분획하였다.

2. 인동초 추출물에 대한 항균성 측정

가. 병원균주의 선발

최종 선발된 4종류의 추출물을 대상으로 하여 항균성을 나타내는 최소 저지농도를 확인하기 위하여, 황색 포도상구균에 의하여 유방염을 나타내는 우유를 무작위적으로 소에서 채취하여 이를 농림부 국립수의과학검역원 세균과에 의뢰하여 황색 포도상구균을 동정 분리하여 이를 본 연구에서 현장균(現場菌)으로 사용하였고, 표준 균주로는 한국 미생물 보존협회에서 황색 포도상구균 NCTC 6571균을 구입하여 역시 표준균(標準菌)으로 사용하였다.

나. 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 배양

황색 포도상구균의 균주들은 영양 육즙배지(Difco)에 접종하여 37°C, 150rpm에서 18시간 동안 진탕 배양하였다. 균 배양액을 원심 분리(500xg, 4min)하여 황색 포도상구균을 순수하게 분리한 다음 인산 완충액(0.1M, pH 7.0)으로 희석하되 필요할 경우 이 원심 과정을 수회 반복, 세균 수를 조정하여 실험에 사용하였다.

다. 인동초 추출물 용액 조제

인동초(1Kg, 수분 함량 48.4%)를 실온에서 건조하여 마쇄(磨碎)한 후 이를 에칠아세트, 메탄올 및 에테르로 추출하여 얻은 각 추출물을 생체 중량 1g에 상당하는 양으로 항미생물 활성을 검정하였다. 즉, 제조된 4종류의 인동초 분리체에 대하여 용매별 추출물의 농도별 항균성 범위를 설정하기 위하여 재료인 추출물 용액은 다음과 같이 제조하여 실험에 사용하였다.

우선 선발된 4종류의 인동초 분리체 각각을 인산 완충 용액에 5%(w/v)용액 함량이 되도록 용해하였고 이를 희석하여 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.0004% 및 0.00001% 인동초 분리체 용액으로 조제하여 항균성을 나타내는 물성의 인동초 분리체를 선발하고 또한 항균성을 나타내는 최소 저지 농도를 검정하기 위한 시료로 사용하였다.

라. 흡광도(Optical Density)측정에 의한 항균 억제 효과 검정

인동초 분리체의 황색 포도상구균에 대한 증식 억압 능력을 측정하기 위해, 영양 육즙 배지(Difco)를 만들어 pH를 6.0으로 조정후 250ml 삼각 플라스크에 이 배지액을 분주한 다음, 고압 멸균시켰다. 그리고 추출물-1~4에 대하여 각각 실온에서 건조하여 마쇄한 후 얻은 각 추출물을 건조 중량 0.1g에 상당하는 양으로 인산 완충 용액에 용해하여 1% 용액(w/v)으로 제조하여, 이를 항미생물 활성을 검정하였다

이 영양 육즙 배지에 농도별(0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%)로 희석한 인동초 분리체 용액을 첨가하고, 앞서 준비한 황색 포도상구균 배양액을 1 ml씩 분주한 후, 37°C에서 진탕 배양시키면서 1시간 부터 1시간 간격으로 12시간까지 흡광도치(optical

density值)를 흡광 광도계(Spectronic 20, Bauch & Lomb, 독일)를 이용(660nm)하여 측정하였다.

마. 인동초 추출물의 농도별 항균성 조사

인동초 분리체의 첨가 농도별 항균성을 알아보기 위하여 250ml 플라스크내 영양 육즙 배지를 만들어 황색 포도상구균을 접종하여 37°C에 배양시켰다. 그리고, 추출물- 1~4에 대하여 각각 실온에서 건조하여 마쇄한 후 얻은 각 추출물을 건조 중량 0.1g에 상당하는 양으로 인산 완충 용액에 용해하여 1% 용액(w/v)으로 제조하여, 이를 항미생물 활성을 검정하였다. 이들 배양액은 2×10^7 CFU/ml로 조정후 다음, 인동초 분리체를 농도별(0.5%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%)로 희석하여 첨가한 5개 처리군과 인동초 분리체를 첨가하지 않은 대조군을 두었다.

인동초 분리체를 첨가한 후 1분, 2분, 3분 4분 및 5분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 12시간에 각 처리군별로 10μl씩 채취하여 990μl의 인산 완충액을 넣은 캡 시험관에 잘 섞은 다음 이중 50μl를 혈액 한천 배지에 도말하여 하루 동안 배양시켜 나타난 집락수(集落數)를 세어서 계산하였다.

3. 활성 물질의 구조 확인

정제된 추출물의 구조 확인은 질량 분석기(MS), ¹H-핵자기공명, ¹³C-핵자기공명 등의 기기 분석을 통하여 실시하였다.

가. 질량(Mass)분석

활성 물질을 직접 주입 장치(Direct injection port, DIP)가 장치된 질량 분석기(Mass spectrometer, JMX-AX 505 WA, Jeol, Japan)를 이용하여 질량(MS)분석

표 2. 질량 (MS)의 분석 조건

장	치	Jeol JMS-AX 505 WA mass spectrometer
이온방 온도		200°C
질량주사범위		m/z 50~500
이온화 전압		70 eV

을 실시하였다. 그 분석 조건은 표 2와 같다.

III. 결과 및 고찰

나. ¹H-핵자기공명(NMR)과 ¹³C-핵자기공명(NMR) 분석

인동초 추출물의 물성 분석을 위하여는 FT-NMR spectroscopy(Unity Plus-300, 300MHz, Varian, USA) 기기를 사용하여 분석하였고, 용매는 염화카드뮴(CdCl₂)을 사용하였다.

4. 항균 활성 물질의 정량

인동초 추출물 유래의 항균 활성 물질의 정량분석을 위하여, 표준 시료를 1% AcOH:MeOH(40:60, v/v) 용매계와 μ Bondapak C₁₈ 컬럼을 이용한 진술한 방법의 고압 액체크로마토그래피(HPLC)를 실시하여 작성된 검량선(檢量線)에 의하여 활성 물질의 함유량을 측정하였다.

1. 현장 감염 균 분리

소의 유방염 감염 증상을 보인 우유에서 채취한 균을 분리 동정한 균은 황색 포도상구균으로 확인되었다.

2. 인동초 추출물에 대한 항균성 측정

가. 흡광도(Optical Density) 측정에 의한 항균 억제효과 검정

그림 1과 그림 2에서 나타낸 바와 같이 인동초 추출물 중 Ethyl acetate 추출물인 추출물 1과 2에서 항균 활성이 집중되어 있었으며 이들 물질은 특히 황색 포도상구균에 대하여 좋은 항균 활성을 나타냈다.

이 실험에 사용한 황색 포도상구균주들의 항균성

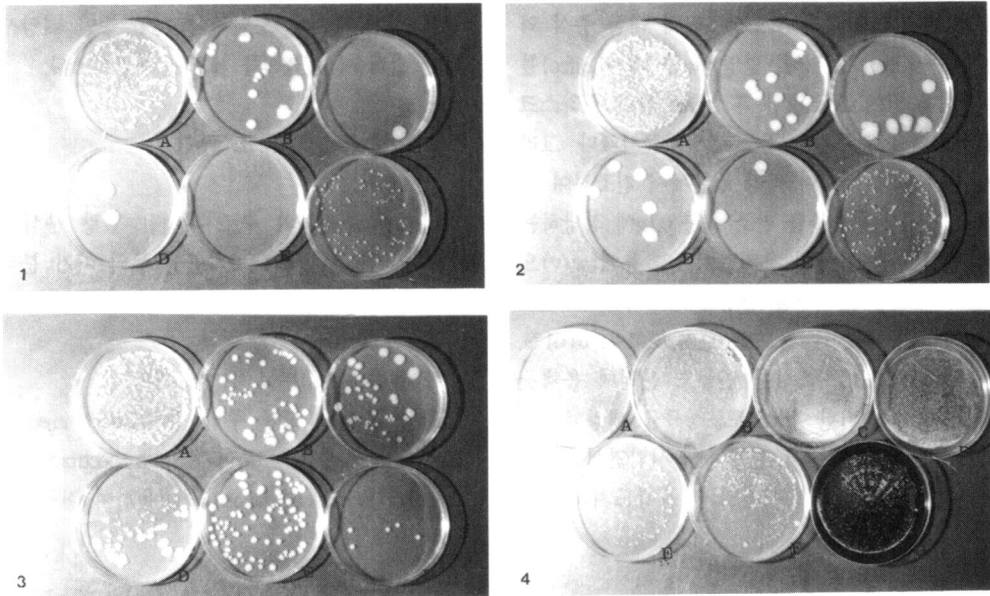


그림 1. 표준(1, 2) 및 현장분리(3, 4)의 황색포도상구균에 대한 인동초 추출물(1, 2: 추출물-1, 3: 추출물-2, 4: 추출물-3)을 농도별로 달리 투여한 경우에서 3시간 경과시의 항균효과 검정(A: 무처리군, B: 0.5%투여군, C: 0.1%투여군, D: 0.01%투여군, E: 0.005%투여군, F: 0.001%투여군, G: 0.0001%투여군)

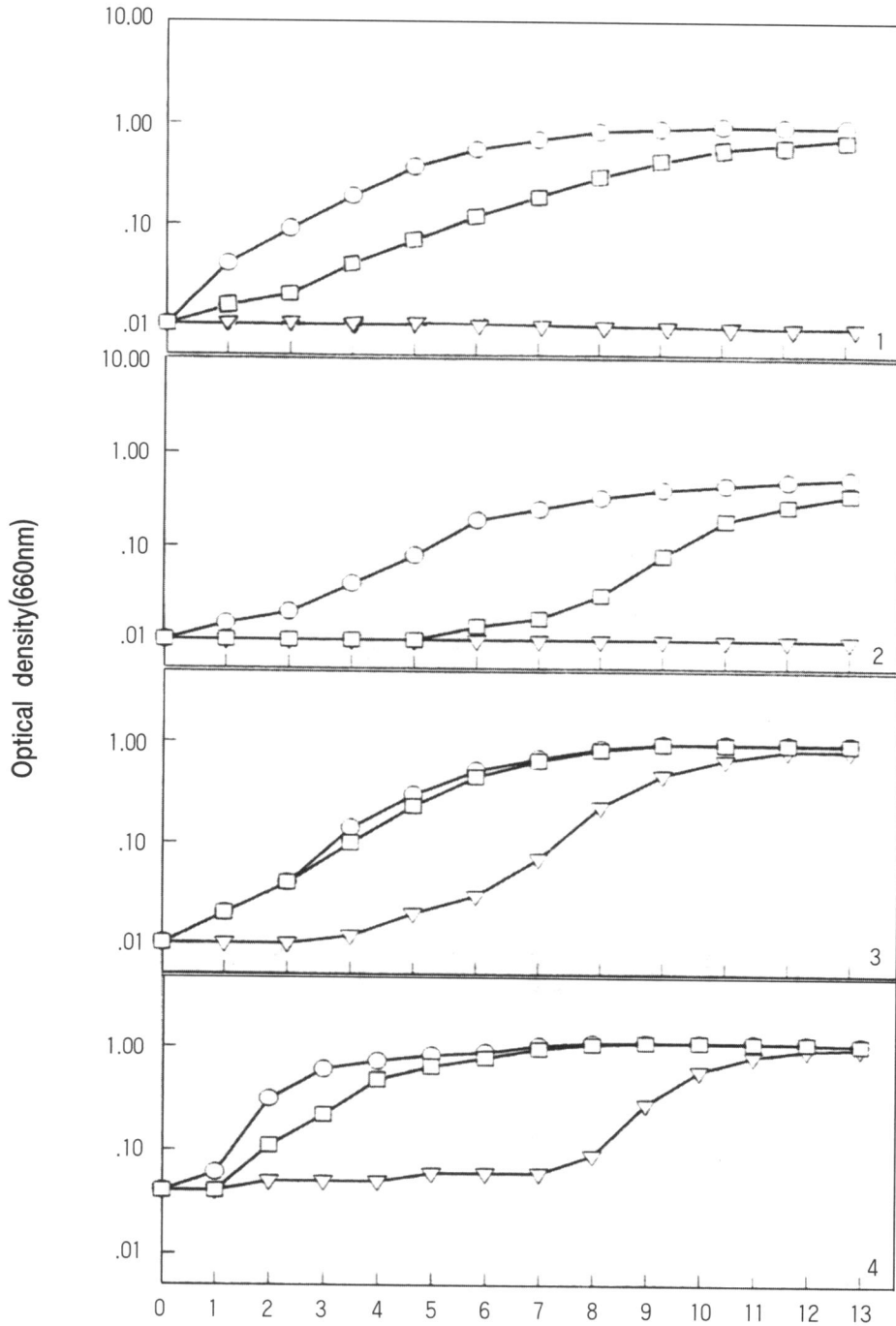


그림 2. 인동초 추출물의 종류별(1:추출물-1, 2:추출물-2, 3:추출물-3, 4 : 추출물-4) 및 농도별로 처리 한 후 시간 경과별 황색 포도상구균에 대한 성장 억제효과 판정.
○ : 무투여군, △ : 0.02%이상 투여군, □ : 0.001%이하 투여군

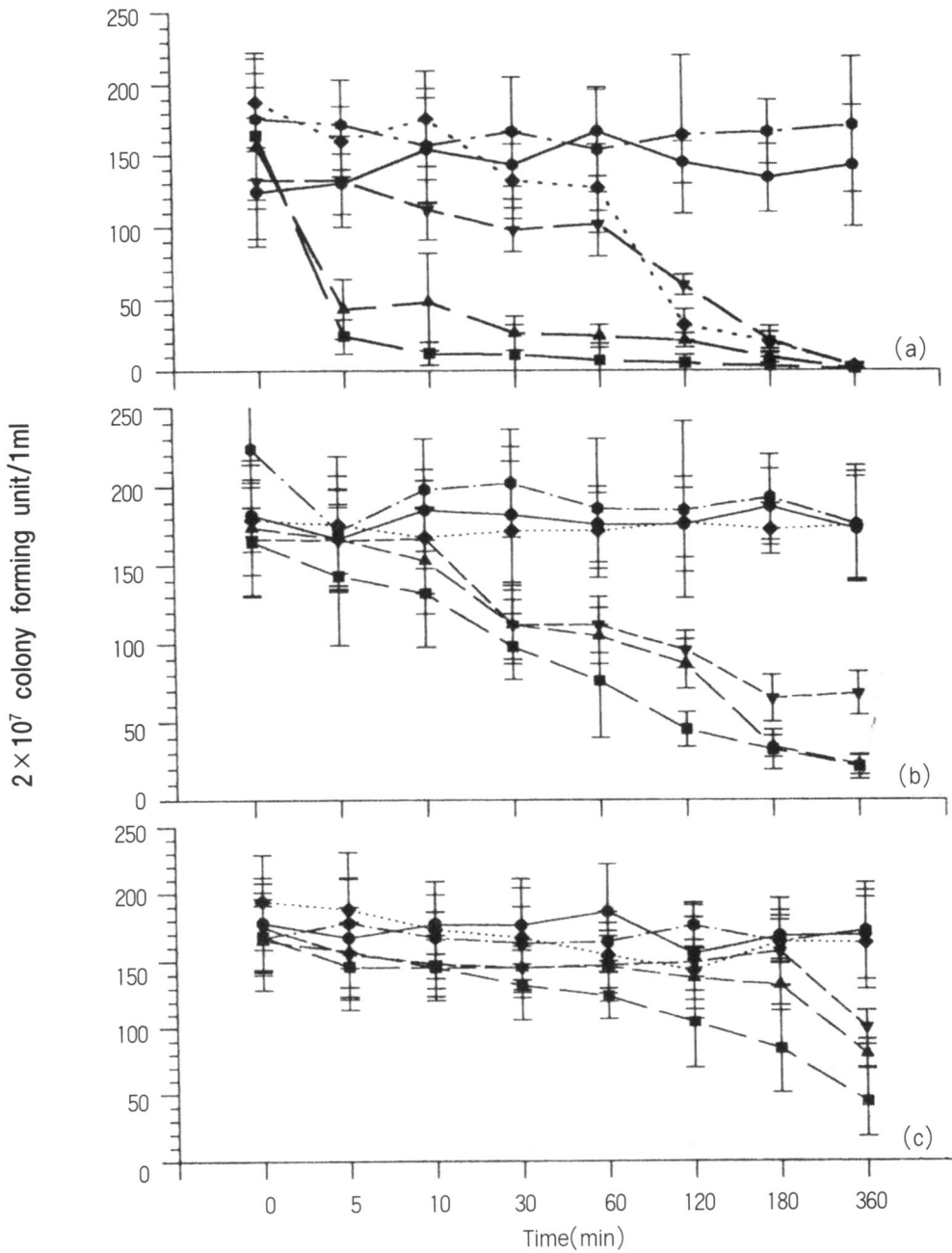


그림 3. 현장분리 황색포도상구균에 인동초 추출물 (a : 추출물 1, b : 추출물 2, c : 추출물 3, 4)을 종류 별 및 농도별로 처리한 후 시간 경과별 사멸효과 판정.
 ● : 무투여군 ■ : 0.1%투여군 ▲ : 0.01%투여군 ▼ : 0.001%투여군,
 ◆ : 0.0001%투여군, ● : 0.00001%투여군

은 대조군에 비하여 0.001% 이상의 인동초 추출물을 첨가한 후 1~12시간 동안에 뚜렷한 차이를 나타내어 매우 우수한 항균효과를 보였다(그림 2, 3, $P<0.01$). 그러나, 메탄올과 에테르를 용매로 하여 추출한 인동초 추출물의 경우인 추출물-3과 4의 경우에는 유의(有意)한 항균성을 인정할 수 없었다.

나. 인동초 추출물의 항균성 조사

4 종류의 인동초 추출물별로 처리한 후 황색포도상구균의 사멸(死滅) 효과를 각기 추출물과 농도 및 시간 경과에 따라 어떤 효과가 있는지를 관찰하였다. 그러나, 추출물 3과 4의 항균성을 흡광도치로 측정된 결과에서 유의성(有意性)있는 항균 효과가 나타나지 않아 추출물 3과 4중 3만을 대상으로 최종 추출물 1, 2와 3으로 3종류만을 선발하여 항균성을 검정하였다(그림 2, 3).

먼저 3 종류의 인동초 추출물을 첨가하기 전(1기준)에 비교하여, 0.001~0.5% 농도군(濃度群)으로 첨가하여 실험군(實驗群)에서 황색 포도상구균에 사멸 효과를 알아보았다.

그림 1과 2는 여러 농도조건에 따른 인동초 추출물의 사멸(死滅) 효과를 보여준다.

추출물-1을 0.5% 첨가시 10분 이내에 황색 포도상구균들의 생존 개체율은 약 0.32로 나타났고, 60분후는 약 0.07, 3시간 후에는 전체가 사멸되어 최초 추출물-1의 투여 전에 비하여 유의하게 감소하였다($P<0.01$).

또한, 추출물-1 0.3% 처리군은 60분 경과시는 약 0.24, 3시간 경과후는 역시 0.5%와 거의 같은 사멸효과를 나타내었다. 그리고, 0.1%~0.01% 처리군(群)에서는 60분 경과시 약 0.55 및 0.95로 시간의 경과에 따라 지속적으로 감소하여 3시간 후에는 최초 투여시에 비하여 약 0.02까지 감소하였다($P<0.01$).

그러나, 0.001% 추출물-1 처리군에서의 사멸 효과는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다($P<0.01$). 그림 2의 2와 3 처리군에서는 추출물을 첨가하기 전(1기준)에 비교하여 사멸 효과를 나타낸 것이다. 0.5% 처리군에서 10분 경과시는 추출물-2는 0.83, 추출물-3은 0.82로, 60분 경과시에는 각각 0.59와 0.64로 황색

포도상구균의 개체수는 감소하였다.

0.3% 처리군에서는 60분 경과시 추출물-2 처리군은 0.55, 추출물-3 처리군에서는 0.82로 추출물-1 처리시에 사멸효과보다 약 1/2~1/4수준을 나타냈다($P<0.01$). 최종 3시간 경과시는 추출물-2는 0.1, 추출물-3에서는 0.42로 역시 추출물-1의 전체가 사멸된 것과 비교시 사멸효과는 유의하게 낮은 수준이었다($P<0.01$).

황색포도상구균의 개체 생존율이 0.1%가 처리된 추출물-2, 3에서는 최종 3시간 경과시는 추출물-1이 0.015인 것에 비교하면, 추출물-2는 0.47, 추출물-3은 0.7로 역시 유의하게 낮은 수준이었다.

추출물-1의 경우는 0.001%가 첨가시, 추출물-2와 추출물-3의 경우 0.01% 이하의 첨가 농도에서는 황색 포도상구균의 사멸효과는 없는 것으로 나타났다($P<0.05$). 따라서 추출물-1, 추출물-2 및 추출물-3 순(順)으로 항균 효과가 높았으며, 그 사멸 효과에 따른 첨가농도에 따른 결과도 추출물-1의 경우는 0.01%이상, 추출물-2에서는 0.1%이상, 그리고, 추출물-3의 경우는 0.3% 이상이 첨가된 경우, 3시간 이내에 유의한 수준의 사멸 효과를 나타내었다($P<0.01$).

3. 성분의 정제와 얻어진 분획의 활성화

가. 용매분획에 의한 정제

인동초 1kg에서 얻어진 에칠아세트(EtOAc) 추출물(24.34g)을 용매분획하여 수용액획분, 중성획분(12.56g), 산성획분(1.984g)을 얻었다. 이들 분획에 대하여 항미생물 활성을 검정한 결과(그림 2, 3 및 4), 대부분의 활성이 산성 획분에서 인정되었다.

나. n-헥산-에칠아세트(n-Hexane-EtOAc)혼합 용매의 분획에 의한 정제

활성이 인정된 산성 획분을 n-헥산-에칠아세트(n-Hexane EtOAc) 혼합용매로 분획하고 역시 표준 및 현장 황색포도상구균을 대상으로 항미생물 활성을 검정하였다. 15~42.5% EtOAc 혼합 용매에 의해 용출된 획분에서 활성이 집중되었다.

다. 실리카겔 흡착 칼럼 크로마토그래피(Silica gel adsorption column chromatography)에 의한 정제 활성이 인정된 15~42.5% 에칠아세트(EtOAc) 용출획분을 메탄올-에칠아세트(MeOH-EtOAc)계의 실리카겔 흡착 칼럼 크로마토그래피로 분획하고 표준 및 현장 황색 포도상구균 두 종류를 대상으로 항미생물 활성을 검정하였다. 그 결과 그림 4~8에 나타난 바와 같이 100% 에칠아세트(EtOAc) 용출획분계의 실리카겔 흡착 칼럼 크로마토그래피로 분획하고 표준 및 현장분리 황색 포도상구균의 항균 활성을 검정하였다. 두 균주 모두 100~90% 에칠아세트(EtOAc) 용출획분에서 활성이 인정되었다.

라. Sephadex LH-20 컬럼 크로마토 그래피(column chromatography)에 의한 정제 실리카겔 흡착 칼럼 크로마토그래피의 활성획분을 메탄올-아세트 나이트릴(MeOH - CHCl₃) 4:1 용매계

의 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)에 의해 분획하고, 표준 및 현장 황색 포도상구균을 대상으로 항균 활성을 검정하였다. 그 결과 충전용적(bed volume)에 대한 용출용적(elution volume)의 비(V_e/V_t)가 0.88~1.00의 용출획분에서 두 균주 모두 활성이 인정되었으며, 이 활성획분을 농축한 결과 활성 물질을 결정상으로 얻었다.

결정상으로 얻어진 물질의 순도를 확인하기 위하여 1% 아세트알콜-메탄올(AcOH-MeOH) 용매계(40:60, v/v)로 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석을 시도한 결과, 이 물질은 보존시간(Retention time(t_R))15.3분에 95% 이상의 함량을 보인 주 피크(main peak)가 존재하였으나 보다 극성이 낮은 물질 유래의 피크(peak) 또한 존재하였다. 따라서 결정 상으로 얻어진 이 물질은 단일 물질이 아니라 극성이 다른 미량의 물질을 포함하고 있음을 알 수 있었으며, 더욱 정제할 필요가 있어 n-헥산(n-Hexane)을 이용한 재결정을 시도

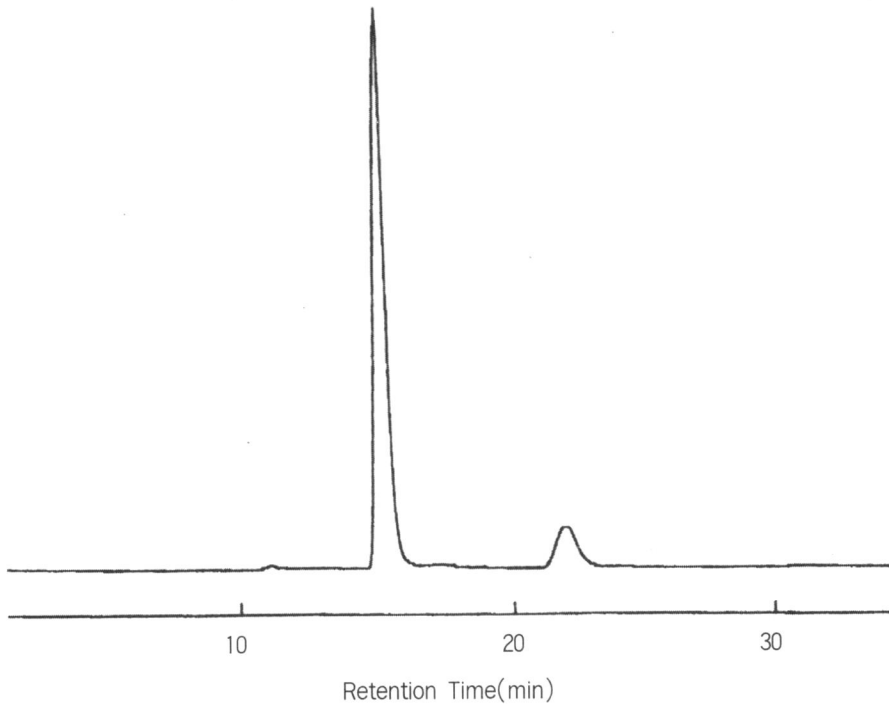


그림 4. C18컬럼을 이용한 HPLC분석에 의한 인동초 추출물의 크로마토그램

하였다.

마. 재결정에 의한 정제

결정상으로 얻어진 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피 활성획분(7.807g)에 소량의 n-헥산(n-

Hexane)을 넣고 40°C 수조에서 서서히 가온시키면서 완전 용해시키고 냉각시켜 재결정하였다. 그 결과, 백색 침상 결정 5.82g을 얻었다. 또 이물질을 1% 아세트알콜-메탄올(AcOH-MeOH)계의 고압 액체크로마토그래피(HPLC)로 확인한 결과 단일피크(peak)로

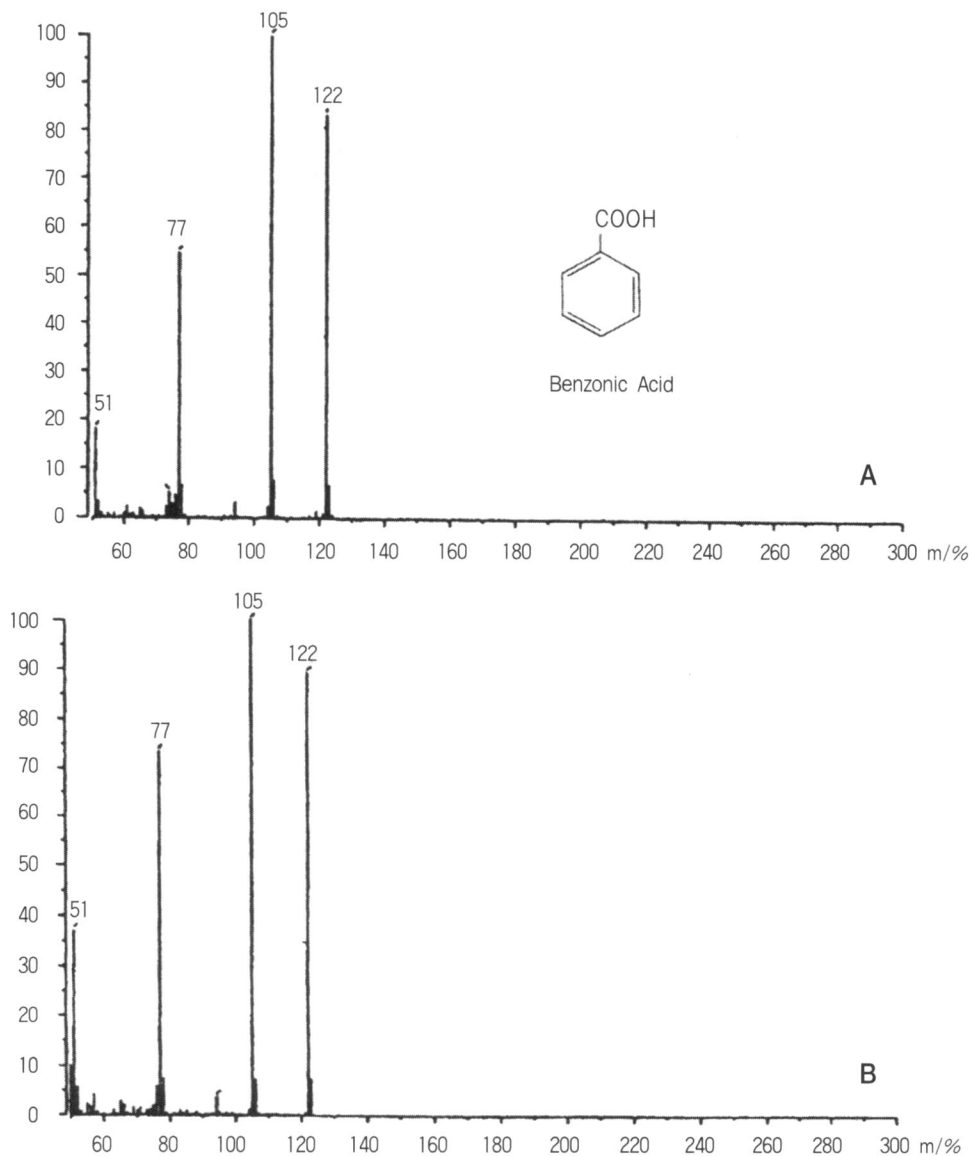


그림 5. 인동초 추출물-1을 분석한 질량분석 스펙트럼(B)과 표준물질로 사용한 벤조산(A)을 분석한 결과

나타나 재결정에 의해 얻어진 활성 물질은 단일 물질임을 확인할 수 있었다(그림 4).

바. 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의한 분리 및 정제
재결정 과정에서 침상 결정을 제외한 여액에서 부

(minor) 성분을 분리하고자 상기의 1% 아세트산 알콜-메탄올(AcOH-MeOH)용액계를 이용하여 C₁₈ column (Delte-PAK C₁₈)의 액체크로마토그래피(HPLC)를 실시 하였다.

그 결과 그림 4에 나타난 바와 같이 각각 보존시간 [Retention time(tR)] 15.3분과 21.4분에 피크(peak)를

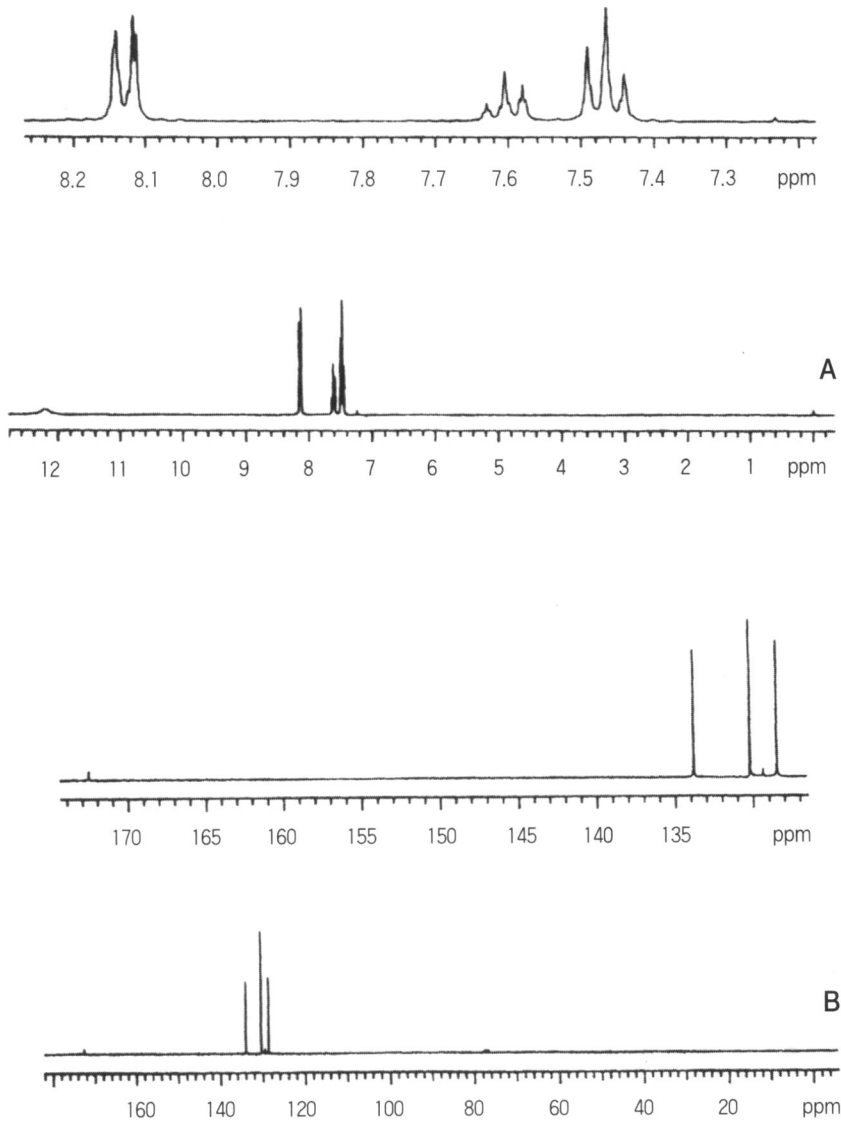


그림 6. 인동초 추출물-1을 분석한 FT- NMR분석 스펙트럼(A: 1H-NMR, B:13C-NMR)

나타내 완전한 분리가 이루어졌다. 이중 tR 15.3분의 물질은 추출물-1이며, tR 21.4분의 피크(Peak)를 분취하여 추출물-2라 명명하였다.

사. 활성물질의 구조 확인

1) 추출물-1의 구조 확인

추출물-1을 직접적인 탐침(direct probe) 방식의 전

자 충돌 질량(electron impact(EI) mass)분석을 한 결과 그림 5와 같이 분자 이온(molecular ion(M⁺)) m/z 122에 나타났으며 특징적인 조각 이온(fragment ion)이 m/z 105(M-17, base peak), 77(M-45), 51(M-71)에 나타났다. 이 파장(spectrum)으로 NIST 라이브러리(library) 검색을 실시한 결과 벤조산 (Benzoic acid)의 가능성(NIST entry No. 3420)이 시사되었다.

염화 카드뮴(CdCl₂)을 용매로 사용하여 ¹H-핵자기

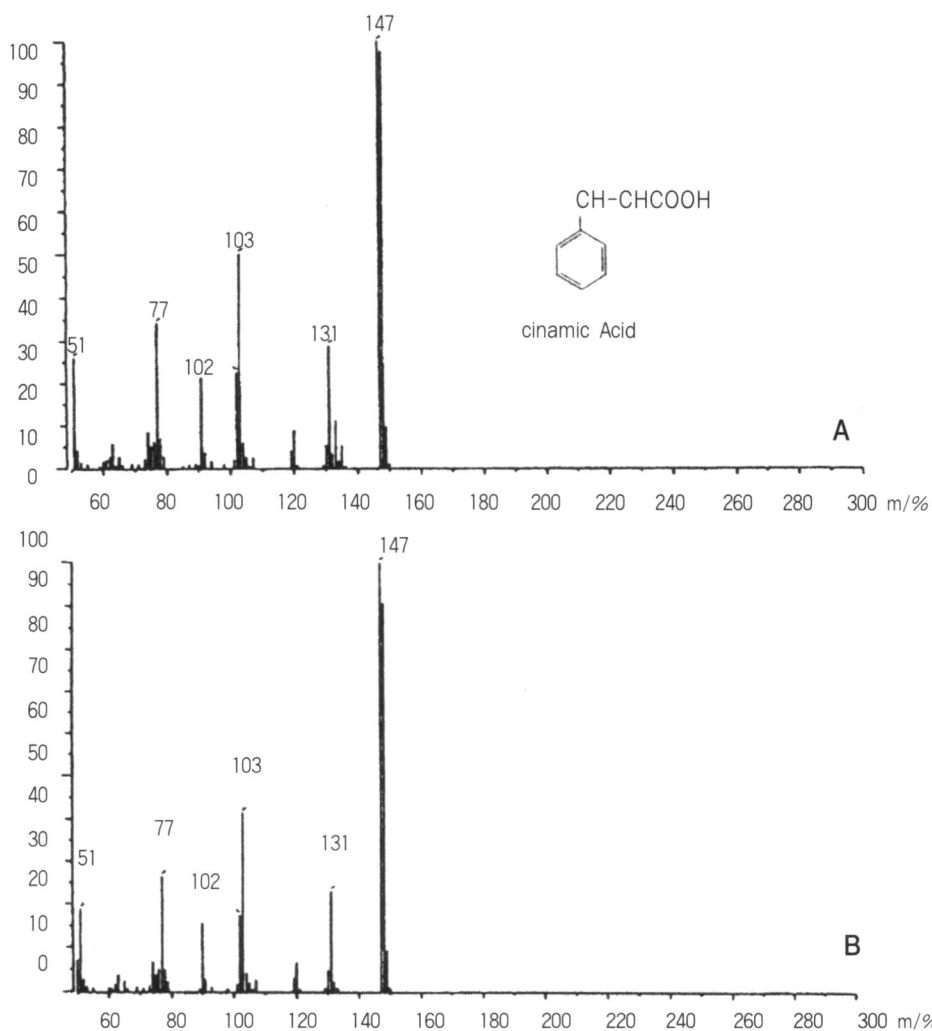


그림 7. 인동초 추출물- 2를 분석한 질량분석 스펙트럼(B)과 표준물질로 사용한 시나미산(A) 을 분석한 결과

공명(NMR)을 실시한 결과(그림 5) δ 128.46(C-3,5), 129.35(C-1), 130.21(C-2,6), 133.78(C-4), 172.47(C-1')의 위치에서 탄소(carbon)의 존재를 확인하였다.

그리고 이들 파장(spectra)은 알드리치 라이브러리 파장(Aldrich library spectra)의 벤조산[benzoic acid(2, 1063 B)]과 일치하였다.

이상의 질량 분석기(MS), ^1H -핵자기공명(NMR),

^{13}C -핵자기공명(NMR)의 분석에서 얻어진 질량 파장(mass spectrum)과 핵자기 공명파장(NMR spectra)은 추출물-1이 벤조산(benzoic acid)의 구조를 갖고 있는 것으로 나타내, 인동초로부터 향미생물 활성 물질로 분리된 추출물-1은 벤조산(benzoic acid)으로 동정되었다(그림 6).

벤조산(Benzoic acid)은 광택이 있는 작은 엽상(葉

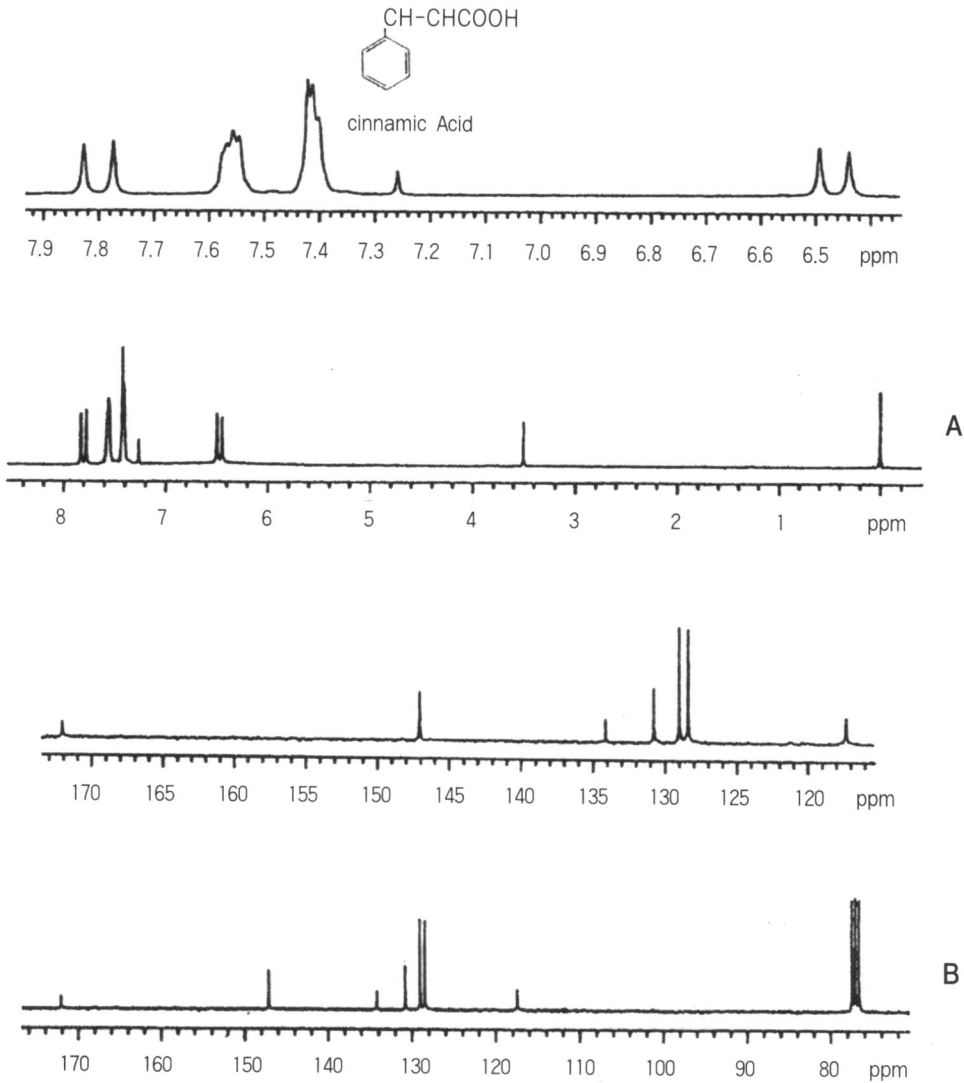


그림 8. 인동초 추출물-2을 분석한 FT-NMR분석 스펙트럼 (A : $^1\text{H-NMR}$, B : $^{13}\text{C-NMR}$)

狀) 또는 침상(針狀)의 결정으로 덩굴월귤(cranberries), 나무딸기(raspberries), 서양자두(plums), 육계(肉桂) 및 정향(丁香) 등에 천연적으로 존재하는 유기산이다. Salkowski에 의해 처음으로 항균활성이 있음이 보고되었으며 음료, 간장, 제빵 및 마아가린 등의 보존제로 사용되고 있다. 벤조산(Benzoic acid)의 항미생물 활성 기작은 확실히 밝혀지지 않았지만 Freese, Hunter와 Segel 등에 의하여 비헤리된 분자가 세포막 내부로 침투된 후 이온화되어 산패를 일으킴으로서 기질 수송과 산화적 인산화 반응을 저해하여 항미생물 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다.

2) 추출물-2의 구조 확인

추출물-2를 직접적인 탐침(direct probe) 방식의 전자 충돌 질량(electron impact(EI) mass)분석을 한 결과 그림 7과 같이 분자 이온(molecular ion(M⁺))이 m/z 147에 기본 피크(base peak)로 나타났으며, 특징적인 조각 이온(fragment ion)이 m/z 131(M-16), 103(M-44), 102(M-45) 77(M-70)에 나타났다. 이 파장(spectrum)으로 NIST 라이브러리(Library) 검색을 실시한 결과 *trans*-시나미산의 가능성(NIST entry No. 7861)이 시사되었다.

염화 카드뮴(CdCl₂)을 용매로 사용하여 ¹H-NMR을 실시한 결과(그림 8-A) δ 6.47(1H, d, J=16.1Hz, H-1')에서 양(proton)이 관찰되어 2개의 벤젠 고리 양자(benzene ring proton(δ 7.41, 7.56))와 2개의 올레핀 양자(olefinic proton(δ 6.47, 7.80))가 인정되었다. 또한 δ 6.47 및 7.80에서 관찰되는 올레핀 신호(olefinic signal)의 결합상수(coupling constant)가 16.1Hz인 사실에서 *trans*형임을 확인하였다.

한편 ¹³C-핵자기공명(NMR)을 실시한 결과(그림 8-B) δ117.34(C-1'), 128.37(C-2, 6), 128.98(C-3, 5), 130.74(C-4), 134.10(C-1), 147.05(C-1), 172.07(C-3)'의 위치에서 탄소(carbon)의 존재를 확인하였다. 그리고 이들 파장(spectra)은 알드리치 라이브러리 파장(Aldrich library spectra)의 시나미산(cinnamic acid(2, 1043 C)과 일치하였다. 시나미산(cinnamic acid)은 때죽나무, 코카(coca)의 잎, 육계나무의 정유 등에서 그 존재가 보고된 바 있다.

아. 활성물질의 항미생물 활성 측정

인동초의 항미생물 활성물질 탐색 과정에서 분리되고 동정된 벤조산 과 시나미산의 0.5mg과 1.0mg수준으로 표준 및 현장 황색 포도상구균에 대하여 항미생물 활성을 측정한 결과 그림 1, 2, 3과 같이 항균 활성을 나타내었다.

자. 활성물질의 함량

인동초에 함유된 항미생물 활성물질인 벤조산과 시나미산의 함량은 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 작성된 검량선을 이용하여 측정하였다. 그 결과 벤조산(benzoic acid)은 생체중량 g당 0.773mg, 시나미산(cinnamic acid)은 생체중량 g당 7.01g 수준이었다.

특히 인동초에는 벤조산(benzoic acid)이 생체 중량 g당 0.773mg이나 함유되어 있어 타식물체의 함유량이 0.01~11.2g/g인데 비하여 월등하게 많이 함유되어 있음이 확인되었다.

이러한 사실에서 인동초 및 인동초 추출물은 천연의 항미생물 활성을 갖는 기능성 소재로서 이용 가능성이 강력히 시사되었다.

IV. 결론

인동초의 에칠 아세트(EtOAc) 추출물의 항미생물 활성이 인정된 활성물질을 용매 분획(solvent fractionation), 실리카겔 흡착 크로마토그래피(silicagel adsorption chromatography), Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피(column chromatography), 액체 크로마토그래피(HPLC)등의 기법으로 활성본체를 정제, 분리하여 질량분석기(MS), ¹H-핵자기공명(NMR), ¹³C-핵자기 공명(NMR) 등의 기기 분석을 통해 항미생물 활성의 본체 규명을 시도하였다.

인동초의 에칠아세트(EtOAc) 추출물은 표준 및 현장 분리 황색 포도상구균의 두 종에 대해 항미생물 활성을 보였다.

인동초의 항미생물 주 활성 본체로 벤조산이 동정되었으며, 아울러 항미생물 활성을 갖는 미량 성분으로 시나미산도 동정되었다.

이러한 벤조산(Benzoic acid)과 시나미산(cinnamic acid)은 항미생물 활성이 알려진 물질이나 인동초에서 이 물질이 분리, 동정된 것은 처음으로 생각된다.

벤조산은 생체중량 g당 0.773mg, 시나미산은 생체중량 g당 7.01g 수준이었다. 특히 벤조산의 함유량이 타 식물체의 함유량(0.001~11.2 g/g)에 비하여 매우 높은 함량을 갖고 있음은 대단히 흥미로우며 이러한 사실에서 인동초 및 인동초 추출물은 천연의 항균성 물질로 이용 가능성이 시사된다고 하겠다.

참고문헌

1. 김창민, 이경복, 1990, "개느삼의 성분 및 생물활성에 관한 연구", 생약학회지, 21(2), p.137.
2. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호, 1990, "수산미이용자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색", 한국식품과학회지, 26(3), p.261.
3. 신동화, 1990, "천연 항균성 물질의 연구현황과 식품가공에의 이용", 식품과학과 산업, 23(4), p.68.
4. Board, R. G., 1969, "The microbiology of the hen's egg", Advance in applied microbiology, Vol. II, Academic Press, New York.
5. Oram, J. D. and Reiter, B., 1968, "Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron chelating agents", Biochem. Biophys. Acta, p.170, p.351.
6. Beuchat, L. R. and Golden, D. A., 1989, "Antimicrobials occurring naturally in foods", Food Technology, January, p.134.
7. Ashtin, D. H. and Busta, F. F., 1968, "Milk components inhibitory to *Bacillus stearothermophilus* by iron, calcium and magnesium", Appl. Microbiol., 16, p.628.
8. Hughey, V. L. and Johnson, E. A., 1987, "Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilages and food-borne diseases", Appl. Environ. Microbiol., 53, p.2165.
9. Best, B. H. and Lombord, S. H., 1990, "Influence of lysozyme on selected bacteria associated with gouda cheese", J. Food protect., p.53, p.306.
10. Kwano, K., Yoneya, T., Miyata, T., Yoshikawa, K., Tokunaga, F., Terada, Y. and Iwanaga, S., 1990, "Antimicrobial peptide, Tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*)", J. Biol. Chem., p.265, p.15365.
11. Loi, C. E., Weiss, J., Levy, O. and Elsbach, P., 1990, "Isolation of two isoforms of a novel proteins", J. Biol. Chem., p.265, p.15956.
12. Sakanaka, S., Kim, M., Toniguchi, M. and Yomamoto, T., 1989, "Antibacterial substance in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium", Agri. Biol. Chem., 53(9), p.2307.
13. Reiter, B. and Harnulv, G., 1984, "Lactoperoxidase antimicrobial system. Natural occurrence, biological functions and practical applications", J. Food Protect., p.47, p.724.
14. Bjoerck, L. and Claesson, O., 1980, "Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Escherchia coli*", Dairy Sci., p.63, p.919.
15. J. D. Dziezak., 1986, "Antimicrobial agents.-A means toward product stability", Food Technol., p.104.
16. Freese, E., Sheu, C. W. and Galliers, E., 1973, "Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives", Nature., p.241, p.321.
17. Fabian, F. W. and Graham, H. T., 1953, "Viability of thermophilic bacteria in the presence of varying concentrations of acids, sodium chloride and sugars", Food Technol., 7, p.212.
18. Thomson, J. E., Banwart, G. J., Sanders, D. H. and Mercuri, A. J., 1967, "Effect of chlorine, antibiotics, β -propiolactone, acids and washing on *Salmonella typhimurium* on eviscerated fryer chickens", Poultry Sci., p.46, p.146.
19. Fischer, J. R., Fletcher, D. L., Cox, N. A., and

- Bailey, J. S., 1985, "Microbiological properties of hard-cooked eggs in a citric acid-based preservative solution". J. Food Protect., p.48, p.252.
20. Notermans, S., Dufrenne, J. and Keybets, M. J. H., 1985, "Use of preservatives to delay toxin formation by *Clostridium botulinum* (type B, strain Okra) in vacuum-packed, cooked potatoes". J. Food Protect., p.48, p.851.
21. Cox, N. A., Mercuri, A. J., Juven, B. J., Thomson, J. E. and Chew, V., 1974, "Evaluation of succinic acid and heat to improve the microbiological quality of poultry meat". J. Food Sci., p.39, p.985.
22. El-Gazzar, F. E., Rusul, G. et al., 1987, "Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence as lactic acid and at different initial pH values". J. Food Protect., p.50, p.940.
23. Park, J.S., Kohmoto, K. and Nishimura, S., 1986, "Antifungal properties of some short chain fatty acids against phytopathogenic fungi". Korean J. Plant Pathol., p.2, p.89.
24. Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M. and Thompson, J. K., 1971, "Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. J. appl. Bact. 34(4), p.803.
25. Nadia, A. B., Harris, N. D. and Rill, R. L., 1987, "Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*". J. Food Sci., 52(2), p.411.
26. Branen, A. L., Go, H. C. et al., 1975, "Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus ciacetilacts* and *Leuconostoc citrovorum*. J. Food Sci.,
27. Conner, D. E. and Beuchat, L. R., 1984, "Effects of oils from plants on growth of food spoilage yeasts". J. Food Sci., p.49, p.429.
28. Al-Delaimy, K. S. and Ali, S. H., 1970, "Antibacterial action of vegetable extracts on the growth pathogenic bacteria". J. Sci. Food Agric., p.21, p.110.
29. Tansey, M. R., 1975, "Inhibition of fungal growth by garlic extract". Mycologia, p.67, p.409.
30. Karapinar, M. and Aktug, S. E., 1987, "Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and aneghole". Intl. J. Food Microbiol, p.4, p.161.
31. Chuyen, N. V., Tadao, K., Hiromochi, K and M Masao, F., 1982, "Antimicrobial activity of Kumazasa (*Sasa albo-merginata*". Agric Biol. Chem., 46(4), p.971.
32. 정창기, 박완규, 유익제, 박기문, 최춘언, 1990, "카레 향신료 정유성분의 항균성", 한국식품과학회지, 22(6), p.716.
33. Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M. and El-Baroty, G. S. A., 1989, "Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils". J. Food protec, 52(9), p.665.
34. Ismaiel, A. and Pierson, M. D., 1990, "Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B and 1623E by essential oil of spices". J. Food Sci., 55(6), p.1676.
35. 유영선, 박기문, 김영배, 1991, "생약제 및 향신료의 *Streptococcus mutans* 증식 억제 효과". 산업미생물학회지, 23(2), p.200.
36. 이병완, 신동화, 1991, "식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성물질의 검색". 한국식품과학회지, 23(2), p.200.
37. 박수용, 김찬주, 1979, "생약제에 의한 식품보전에 관한 연구". 한국농화학회지, 22(2), p.91.
38. 이창우, 김홍식, 1976, "밤꽃 추출물의 항사상균 작용". 대한피부과학회잡지, 14(2), p.91.
39. 남상해, 양민석, 1995, "산국 추출물의 항균력". 한국농화학회지, 38(2), p.269.
40. Hattori, M., Miyachi, K., Shu, Y. Z., Kakiuchi, N. and Namba, T., 1986, "Potent antibacterial

- action of coumarin derivatives from Licorice Roots against *Streptococcus mutans*". *Shoyakugaku Zasshi*, 40(4), p.406.
41. Mitscher, L. A., Park, Y. H. and Clark, D., 1985, "Antimicrobial isoflavanoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. *trpica*". *J. Natural Products*, 43(2), p.259.
 42. Namba, T., Tsunozuka, M., Dissanayake, D. M., R. B. and Pilapitiya, V., 1985, "Screening of ayurvedic medicines for anti-plaque action". *Shoyakugaku Zasshi*, 39(2), p.146.
 43. Kakiuchi, N., Hattori, M., Nishizawa M., Yamagishi, T. Okuda, T. and Namba, T., 1986, "Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*". *Chem. Pharm. Bull.*, 34(2), p.720.
 44. 이인란, 박홍순, 1987, "황금탕의 항균작용". *생약학회지*, 18(4), p.249.
 45. 조병현, 1986, "Trichioformaldehyde, Benzalaniline 및 초피나무 alcohol 추출물의 항진균작용". *가톨릭대학의 학부논문집*, 10, p.65.
 46. 김홍식, 조광현, 1980, "편측 추출물의 항진균작용에 관한 연구". *한국근학회지*, 8(1), p.1.
 47. 이인란, 위승원, 한용남, 1989, "한국전통생약의 약리작용과 활성물질에 관한 연구(VI)". *생약학회지*, 20(2), p.110.
 48. 백수봉, 오연순, 1990, "토양병원균 *Pythium ultimum* 방제를 위한 항균성 약용식물의 탐색". *한국근학회지*, 18(2), p.102.
 49. 이택수, 박운정, 1976, "국균의 효소생산 및 생육에 미치는 고춧가루의 영향에 관한 연구". *한국농화학회지*, 19(4), p.227.
 50. 백수봉, 경석현, 도은수, 오연선, 박병근, 1994, "약용식물로부터 오이흰가루병에 대한 항균성 물질 탐색 및 동정". *한국환경농학회지*, 13(3), p.301.
 51. 박종성, 권진숙, 이규승, 1984, "쇠비름 즙액의 항균활성". *충남대학교 농업기술연구소보*, 11(2), p.190.
 52. 박승우, 우철주, 정신교, 정기택, 1994, "환삼덩굴의 용매분획별 항균성 및 항산화성". *한국식품과학회지*, 26(4), p.464.
 53. 정대균, 유리나, 1995, "김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력". *한국식품과학회지*, 27(6), p.1035.
 54. Nisiyama R. and Kozaki M., 1974, "Substances in Green Tea Inhibiting the Growth of Lactic Acid Bacteria". *Agr. Biol. Chem.*, p.48, p.83.
 55. 한지숙, 신동화, 1994, "*Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 뽕나무 및 고삼 에탄올 추출물의 분획별 효과". *한국식품과학회지*, 26(5), p.53.
 56. 조성환, 서일원, 최동덕, 주인생, 1990, "자몽종자 추출물이 *Penicillium islandicum* 생육 및 독소성분 skytin 생합성에 미치는 저해효과". *한국농화학회지*, 32(2), p.169.
 57. Yagi, A., Fukunaga, M., Okuzako, N., Mifuchi, I. and Kawamoto, F., 1989, "Antifungal substances from *Sophora flavescens*". *Shoyakugaku Zasshi*, 43(4), p.343.
 58. Sawada, T., Yamahara, J., Goto, K. and Yamamura, M., 1971, "Studies on the Evaluation of Crude Drugs by Bioassay. IV. Antibacterial Activities of the Components of *Coptidis Rhizoma*". *Shoyakugaku Zasshi*, 25(2), p.74.
 59. Kubo, M., Odani, T., Hotta, S., Arichi, S. and Namba, K., 1977, "Isolation of antibacterial compound from Honggi". *Shoyakugaku Zasshi*, 31(1), p.82.
 60. Kubo, M., Kimura, Y., Shin, H., Haneda, T., Tani, T. and Namba, K., 1981, "On the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.". *Shoyakugaku Zasshi*, 35(1), p.58.
 61. Yamaki, M., Asogawa, T., Kashihara, M., Ishiguro, K. and Takagi, S., 1998, "Screening for Antimicrobial of Chinese Crude Drugs, and Active Principles of *Hu Zhang*". *Shoyakugaku*

- Zasshi, 42(2), p.153.
62. Ohmoto, T. and Sung, Y. I., 1982, "Antimycotic substance in the crude drugs" II. Shoyakugaku, Zasshi, 36(4), p.307.
 63. Swaminathan, B. and Koehler, P. E., 1976, "Isolation of an inhibitor of *Aspergillus parasiticus* from white potatoes". J. Food Sci., 41, p.313.
 64. 정병선, 이병구, 심선택, 이정근, 1989, "쑥씨 중의 정유성분이 미생물의 생육에 미치는 영향". 한국식문화학회지, 4(4), p.417.
 65. 강신주, 이혜성, 1977, "식용 야채류의 항균작용에 관한 연구". 경북대학교 사범대학 교육연구집, 19, p.129.
 66. 한덕철, 경규항, 1995, "가압살균한 양배추즙액의 미생물번식 저해 작용". 한국식품과학회지, 27(1), p.74.
 67. Amin, M., Kurosaki, K. and Nishi, A., 1988, "Carrot phytoalexin alters the membrane permeability of *Candida albicans* and multilamellar liposomes". J. General Microbiology, 134, p.241.
 68. Uda, Y., Matsuoka, H., Kumagami, H., 1993, "Stability and antimicrobial property of 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate", the pungent principle in radish. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 40(10), p.742.
 69. 김선재, 박근형, 1995, "물성 김치재료 추출물의 향미생물 효과". 한국식품과학회지, 27(2), p.216.
 70. 최장경, 정옥화, 1984, "비름과 식물즙액에 의한 담배 모자이크 바이러스의 감염억제 효과". 한국식물보호학회지, p.23, p.137.
 71. Marwan, A. G. and Nagel, C. W., 1986, "Microbial inhibitors in cranberries". J. Food Sci., p.51, p.1009.
 72. 이창복, 1982, "대한식물도감". 향문사, p.63.
 73. 임경채, 1992, "조림학본론". 향문사, p.271.
 74. 신민교, 정보섭, 1990, "향약생약대사전", 영림사, p.104.
 75. 농촌영양개선연수원, 1991, "식품성분표". 농촌진흥청, p.194.
 76. 한철주, 1979, "소나무류 잎의 성분분석에 관한 연구". 전북대학교 농대논문집, 10, p.68.
 77. 이정숙, 1980, 송엽과 송화의 성장에 따른 영양성분의 변화에 관한 연구. 한양대학교 대학원 석사학위 청구논문, 한양대학교 대학원.
 78. 김일혁, 1991, "약품식물학 각론". 진명출판사, p.71.
 79. 강운한, 박용곤, 오상룡, 문광덕, 1995, "솔잎과 쑥 추출물의 기능성 검토". 한국식품과학회지, 27(6), p.978.
 80. 김종대, 윤태헌, 최 면, 임경자, 주진순, 이상영, 1991, "인동초 참가식이 흰쥐의 혈청 지방대사에 미치는 영향". 한국노화학회지, 1(1), p.66.
 81. 이민수, 1985, "송엽중의 항산화성 물질에 관한 연구". 한양대학교 대학원 석사학위 청구논문, 한양대학교 대학원.
 82. 부용출, 전체옥, 오지연, 1994, "솔잎으로부터 항산화 성분인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 분리". 한국농화학회지, 37(4), p.310.
 83. 황수진, 1995, "기능성음료 개발". 식품과 위생, 8, p.56.
 84. 문범수, 1993, "최신식품위생학". 수학사, p.63.
 85. Richard Novick, 1993, "*Staphylococcus, Bacillus* and other gram-positive bacteria", American Society for Microbiology, p.7.
 86. Paul S. and Diana S., 1987, "Dictionary of microbiology and molecular biology". 2nd, John Wiley & Sons, p.839.
 87. 하덕모, 1988, "최신식품미생물학". 신광출판사, p.62.
 88. 김찬초, 장지현, 1989, "신교식품미생물학". 수학사, p.62.
 89. 유태중, 이종태, 조석호, 1988, "식품위생학". 문운당, p.21.
 90. 강성국, 1994, "무화과 잎중의 향미생물 물질". 전남대학교 대학원 박사학위 청구논문, 전남대학교 대학원.
 91. Anita, C. W., Linda, M. S., James, D. O. and Morris, J. G., 1990, "Phenotypic evaluation of

- acapsular transposon mutans of *Vibrio vulnificus*. Infection and Immunity, 58(6), p.1769.
92. Susan, K. M. and James, D. O., 1992, "Effects of temperature abuse on survival of *Vibrio vulnificus* in oysters". Applied and Environmental Microbiology, 58(9), p.2771.
93. 신동화, 1994, "공장김치의 발효온도 및 포장방법별 성분과 미생물 변화". 김치의 과학, 한국식품과학회, p.82.
94. 임종락, 박현근, 한홍의, 1989, "김치에 서식하는 Gram 양성 세균의 분리 및 동정의 재평가". 산업미생물학회지, 27, p.404.
95. Zlika, L. L., 1988, "Spices and herbs. Their antimicrobial activity and it's determination". J. Food Safty, 9, p.97.
96. Harrigan, W. F. and Margaret E. M., 1976, "Laboratory methods in food and dairy". Microbiology, Academic Press, p.25.
97. 마승진, 고병섭, 박근형, 1995, "두릅수피에서 항미생물활성을 갖는 3, 4-dihydroxbenzoic acid의 분리". 한국식품과학회지, 27(5), p.807.
98. 박근형, 김선재, 박중대, 이란숙, 현규환, 1993, "벼종자의 brassinosteroid 활성물질". 한국농화학회지, 36(5), p.376.
100. 大岳望, 高橋信孝, 1978, "物質の單離と精製", 東京大學校出版會, p.17.
101. Susan B., Maryadele J. O., Ann, S. and Patricia, E. H., 1989, "The Merck Index". 11th, Merck & Co., p.1099.
102. Djerassi, C., Connolly, J. D. and Faulkner, D. J., 1987, "Dictionary of natural products". volume 3, Chapman & Hall chemical database, p.1557.
103. 細見, 直井, 岡田, 1988, "食品衛生生物物質マニュアル". 中國法出版, p.19.
104. 문범수, 1990, "식품첨가물". 수학사, p.87.
105. Hunter, D. R. and Segel, I. H., 1973, "Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*. Evidence of a proton change gradient as the driving force. J. Bacterial, p.13, p.1184.
106. Susan B., Maryadele J. O., Ann, S. and Patricia, E. H., 1989, "The Merck Index". 11th, Merck & Co., p.2299.
107. Davidson, P. M. and Herald, D. L., 1993, "Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids". J. Food Sci., p.48, p.1378.