

공학석사 학위논문

허브 추출물의 항균
특성에 관한 연구

지도교수 양 지 영

이 논문을  학위논문으로 제출함

2002년 2월

부경대학교 산업대학원

식품산업공학과

유 미 영

이 논문을 유미영의 공학석사
학위논문으로 인준함

2001년 12월 일

주 심 이학박사 장 동 석



위 원 농학박사 이 양 봉



위 원 농학박사 양 지 영



목 차

Abstract 1

서 론 3

재료 및 방법

1. 실험재료 7

2. 사용균주 및 배지 7

3. 실험방법 7

 3.1. 항균력 검사를 위한 시료 조제 7

 3.1.1. 증류수 추출 9

 3.1.2. 메탄올 추출 9

 3.2. 추출물 및 시판 허브의 항균력 검색 9

 3.3. 시판 허브의 최소저해 농도 10

 3.4. 항균성 물질의 안정성 측정 10

 3.4.1. 온도의 영향 10

 3.4.2. pH의 영향 10

 3.5. 미생물의 생육저해 곡선 측정 11

 3.6. GC 및 GC-MS를 이용한 시판 허브의 분석 및 동정 11

3.6.1. Solide phase microextraction 법	11
3.6.2 GC-MS 분석	11

결과 및 고찰

1. 추출물 및 시판 허브의 항균력	14
1.1. 추출물의 항균력	14
1.2. 시판 허브의 항균력	14
2. 시판 허브의 최소저해 농도	17
3. 항균성 물질의 안정성	17
3.1. 온도의 영향	17
3.2. pH의 영향	22
4. 미생물의 생육저해 곡선	22
5. GC 및 GC-MS를 이용한 시판 허브의 분석 및 동정	22

결론 및 요약	40
----------------------	----

참고문헌	42
-------------------	----

Antimicrobial Activities of Herb extracts

Mi-Young Yoo

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

In order to evaluate the antimicrobial function of natural herb extracts as antimicrobial agents for the preservation of foods, water and methanol extracts of herb were prepared and their antimicrobial activities were determined.

About 5g of dried herbs was extracted with water and 99.85% methanol for 72hrs using a shaker. The extract was concentrated by vacuum concentration system.

It was showed that a lavender made herbal extracts had a narrow spectrum for commercial ones

Optimal pH of a commercial rosemary extracts was pH 3 for *Can. albicans* ATCC 10231, pH 7 for *Bac. subtilis* ATCC 6633, and pH 5 for *E. coli* ATCC 25922. Optimal pH of a commercial lavender extracts was pH 5 for three strains.

Both of two commercial herbal extracts were stable between 40 and 121 °C but were unstable for acidic or alkaline areas.

It was affected in repression of microbial growth by 50 μ l of a commercial herbal extracts in 20ml liquid medium.

The head space volatiles compounds of the commercial herbal extracts were isolated, separated and identified by GC-MS.

The most abundant compounds were terpenes, alcohols, esters. And the fewer compounds were ketones, oxidized compounds acids.

서 론

여러 가지 식물로부터 추출한 독특한 향기성분은 식품의 향료로서 오래 전부터 사용되어져 왔다. 향신료 역사는 기원전 5,000년 전부터 시작되었으며, 특히 17세기에는 향신료의 확보를 목적으로 한 식민지주의 원양항해가 빈번해지기도 하였다. 식품향료로서 이용되는 천연향료는 1,500여종이 있으며 비교적 사용빈도가 높은 것은 200에서 300가지 정도로 대부분 식물계이며, 허브종류이다.

최근 사용과 재배가 늘어나고 대중화되기 시작한 천연 식품 향료인 허브는 푸른 풀을 의미하는 라틴어 “허바(herba)”에 어원을 두고 있으며, 고대국가 때부터 향과 약초라는 뜻으로 쓰였다. 기원전 4세기경의 그리스 학자인 테오프라스토스(Theophrastos)는 식물을 교목, 관목, 초본으로 나누면서 처음 허브라는 말을 사용했으며, 현대에 와서 “꽃과 종자, 줄기, 잎, 뿌리 등이 약, 요리, 향료, 살균, 살충 등에 사용되는 인간에게 유용한 모든 초본 식물“을 허브라고 정의했다. 중국에서는 기원전 5,000년경부터 허브를 사용하였으며, 이집트에서는 기원전 2,800년 전에, 바빌로니아에서는 기원전 2,000년경에 허브를 사용했다는 사실이 역사적 기록을 통해서 알려졌다. 이집트에서는 미이라를 만들 때 부패를 막고 초향(焦香)을 유지하기 위해 스파이스(spice)와 허브(herb)를 사용하였다고 한다

허브(herb)의 원산지는 주로 유럽, 지중해 연안, 서남아시아 등으로 기본적인 생육이 매우 강하여 어느 곳에서나 무리 없이 잘 자라지만 양지 바른 곳을 좋아하며 통풍과 보온성, 배수성이 양호하고 유기질이 많은 토양에서 잘 자란다. 허브의 종류로는 딜, 라벤더, 레몬그래스, 레몬밤, 레몬 버베나, 장미, 로즈마리, 마조람, 민트, 바질, 보리자, 세이보리, 세

이지, 제라늄, 스테비아, 야로우, 오레가노, 차빌, 차이브, 케모마일, 타임, 타라곤, 팬지, 펜넬, 페퍼민트 등을 들 수 있다. 이들 향신료의 사용 형태는 주로 액상인 essential oils로 주요성분으로는 terpene군(thymen, camphene, chamazulene)과 alcohol군(geraniol, linalol, farnesol, menthol) , aldehyde군(citral, cinnamids) ,ester군(bornyl acetate, linalyl acetate) ketone군(fenchone, camphor, carvome) 및 phenol군(carvacrol, arbutin, thyme) 그리고 coumarin(bergapten) 과 oxide군(cineole(eucalyptol)) 이 알려져 있으며 이중에서도 특정한 미생물에 대해 강력한 항균력을 나타내는 것이 몇 종 발견되어 있다. 그러나 정유성분 자체의 첨가는 대부분 특유의 강한 맛과 냄새, 짙은 색 등으로 인하여 식품첨가물로 실용화되기는 어려운 실정이나, 최근에 대한 향기 의학회에 의해 향기 치료를 통한 만성 불안장애 환자의 치료 등이 보고된 바 있고 아로마테라피를 이용한 공기 정화법을 이용하여 스트레스와 공기 청정 등 효과가 알려지는 등의 직접적인 첨가방법이 아닌 간접적인 방법으로도 효과가 있음이 알려졌다.

식품의 부패 및 변질을 방지할 목적으로 그 원인이 되는 미생물을 사멸시키거나 증식을 억제시키기 위하여 사용되고 있는 대부분의 보존료는 화학적 합성품으로 사용농도가 높을수록 효과적이거나 목적하는 기능 외에 바람직하지 못한 부작용을 나타내어 안전성 문제가 대두되고 있다. 특히 최근 소비자의 식품에 대한 건강 지향적 욕구에 따라 이에 대한 관심이 고조되고 있으며 화학적 합성보존료에 대한 기피현상이 강하게 일어나고 있다. 이러한 이유 때문에 인체에 무해한 천연물 대체 보존료의 개발이 절실하게 필요하게 되었다. 따라서 천연물에 존재하는 향균성물질을 식품보존에 이용하고자 하는 연구가 오래 전부터 수행되어 왔으며 현재에도 천연 향균성 물질의 검색과 식품에의 이용에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

특히, 허브는 방향성을 가진 식물로서 최근에 재배가 활발하게 되고 있으며, 잎과 줄기 및 꽃의 독특한 향기성분으로 인해 식품의 방향성분으로 첨가되기도 한다. 이러한 식물에서 추출한 향료는 천연물에서는 주로 식물의 꽃 또는 꽃봉오리(정향·자스민·라일락·은방울꽃·라벤더 등), 종자(겨자·아몬드·육두구 등), 과실(고추·후추·바닐라·화향·유자나무 등), 나무껍질(육계 등), 줄기 또는 뿌리(생강·심황 등), 잎(소엽·박하·월계수·파슬리·초피나무 등), 수지 등에서 얻을 수 있다. 이러한 방향식물은 고대 이집트, 바빌론시대에 인도·스리랑카 등지에서 후추·계피 등이 전해져 약과 향료로 사용되기 시작하였으며 계피·커민·육계 등은 미이라 제조시 방부제로 사용되었다고 알려져 있다. 방향식물의 일부 정유성분은 곰팡이나 세균 등 미생물에 대한 항균활성과 저장기간 동안 식품의 균감소를 조절하는 자연 살균제로서의 잠재적 사용가능성이 증명되어 향료로서만이 아니라, 식품의 저장 및 유통과정 중에 미생물의 증식에 의한 변질 부패를 방지할 목적으로 식품첨가물인 보존료로서도 사용되고 있다. 최근에는 허브의 아로마테라피를 이용한 공기정화 등의 방법이 스트레스와 피로를 풀며 살균과 피부미용에도 효과가 있다고 발표된 바 있다.

현재 식품에 사용되고 있는 화학 보존료는 안전성 문제로 인하여 천연물에 존재하는 항미생물성 물질을 식품 보존에 이용하고자 하는 연구가 수행되어지고 있는데 방향식물은 식품향료로서 식품의 저장기간과 민간요법에서 넓게 사용되어져 그 안전성이 확보되어져 왔으며 이들 물질의 대부분은 정유성분이다.

국내외적으로 연구되고 있는 천연 보존료의 개발에 관한 실험들은 주로 향신료와 한약재 등을 중심으로 진행되고 있으며, 형태에 따라서 수용성 향료, 유용성 향료, 유화성 향료의 액상형태와, 분말향료의 4가지로 나눌 수 있다. 첨가 방법에 있어서 액상으로 식품에 직접 첨가하

는 방법은 식품에 작용하는 중 산화 및 가수분해 또는 여러 가지 이미, 이취의 발생 등에 문제가 있으며, 저장기간이 연장되면 2차적인 화학반응이 일어날 수 있다는 점에서 안전하다고는 할 수 없다. 그러나 기체 상태인 증기상태에서는 겨자 및 고추냉이(와사비) 등의 항균력이 증가됨이 보고된 바 있다. 따라서, 식품에 직접 액상으로 혼입하지 않고 기체형태인 증기상태에서 간접적으로 작용하여 항균력을 나타냄으로서 보존료로서의 기능을 할 수 있는 정유성분의 형태변화가 필요하다고 본다.

따라서, 본 연구에서는 대표적인 식품향료이며, 아로마테라피에도 널리 이용되는 허브 종류인 오레가노(greek oregano), 라벤더(lavender) 그리고 패출리(patchouli), 로즈마리(rosemary), 유칼리투스(eucalyptus), 타임(thyme)등의 허브를 이용하여 보존료로서의 사용을 위해 항균활성의 특성에 대하여 보고하고자 한다.

재 료 및 방 법

1. 실험재료

본 연구에서는 대표적인 식품향료이며, 아로마테라피에도 널리 이용되는 허브 종류인 오레가노(greek oregano), 라벤더(lavender) 그리고 패츨리(patchouli), 로즈마리(rosemary), 유칼리투스(eucalyptus), 타임(thyme) 등의 방향식물을 L 백화점에서 2001년 4월에 구입하여 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 사용균주 및 배지

각 방향유의 항균활성은 식품의 변패나 병원성과 관계있는 대표적인 균주로서 그람 양성세균 1종, 그람 음성세균 1종 그리고 효모 1종을 사용하였으며(Table 1), 균 생육 배지로서 세균은 nutrient broth와 nutrient agar(Difco, U.S.A), 효모는 YM broth와 YM agar(Difco, U.S.A)를 각각 사용하였다.

3. 실험방법

3.1. 항균력 검사를 위한 시료 조제

건조 상태의 각 시료에서 방향성분을 추출하기 위한 방법으로 증류수 추출과 메탄올 추출의 방법을 사용하였다

Table 1. Microbial strains used in this study

Charactrices	Strains	
Gram positive	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 25922
Gram negative	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 6633
Yeast	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

3.1.1. 증류수 추출

각 시료의 정유성분을 추출하기 위하여 시료 5g을 50ml 증류수를 사용하여 shaker 에서 24시간씩 3회 반복 교반 추출하여 여과지(whattman No.2)로 여과한 후 진공농축 원심분리기(Spinvac, Hanil, Korea)로 농축하여 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다

3.1.2. 메탄올 추출

각 시료의 정유성분을 추출하기 위하여 시료 5g을 50ml 메탄올을 사용하여 shaker 에서 24시간씩 3회 반복 교반 추출하여 여과지(whattman No.2)로 여과한 후 진공농축 원심분리기(Spinvac, Hanil, Korea)로 농축하여 냉장 보관하면서 실험하였다

3.2. 추출물 및 시판허브의 항균력 검색

허브 추출물의 항균성 검색에 사용한 균주는 사면배지에 배양된 각 균주 1백급이를 취하여 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Bacillus subtilis* ATCC 6633는 20ml nutrient broth 배지에 접종하고 *Candida albicans* ATCC 10231는 20ml YM broth 배지에 접종하여 각 생육온도에서 24시간 배양하여 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각의 생육배지로 멸균된 기충용 배지를 petri dish에 15ml씩 분주하여 응고시키고, 중층용 배지를 각각 2.5ml씩을 시험관에 분주하여 멸균한 후, 각종 시험균액을 0.1% 첨가하여 잘 혼합한 후, 기충용 배지위에 고르게 퍼지도록 도포한 뒤 응고시켜 이중의 균집종 평판배지를 만들어 사용하였다. 시료의 항균력 검색은 한천배지확산법(disk plate method)으로 측정하였다. 즉 각각의 시료용액(10mg/100 μ l)을 멸균된 filter paper disc (Φ 8mm, Toyo co. Japan)에 20 μ l씩을 흡수시킨 후, 추출용매를 완전

히 휘산시키고 시험용 평판배지위에 놓아 밀착시키고 각 생육온도에서 *Bacillus subtilis* ATCC 6633와 *Escherichia coli* ATCC 25922는 24시간, 그리고 *Candida albicans* ATCC 10231는 48시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하였다.

3.3. 시판 허브의 최소저해 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)

시판 허브에 대한 최소 저해농도 측정은 한천배지 확산 평판법(agar diffusion method)으로 측정하였는데 멸균된 filter paper disc(Φ 8mm, Toyo co. Japan)에 rosemary(France)와 lavender(USA)를 2, 5, 10, 15, 20ul를 흡수시킨 다음 각 생육온도에서 *Bacillus subtilis* ATCC 6633와 *Escherichia coli* ATCC 25922는 24시간, 그리고 *Candida albicans* ATCC 10231는 48시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하여 최소저해농도로 결정하였다.

3.4. 항균성 물질의 안정성 측정

3.4.1. 온도의 영향

시판 허브 중 항균활성을 나타내는 물질의 열 안정성은 rosemary(France)와 lavender(USA) 10ul를 40, 60, 80, 100, 121℃에서 각각 20분 동안 열처리한 후 대조구와 같이 한천배지 확산법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다.

3.4.2. pH의 영향

pH의 안정성은 시판 허브 중 rosemary(France)와 lavender(USA)를

pH 1, 3, 5, 7, 11, 13으로 조정한 후 실온에서 1시간 방치한 다음, 다시 pH 5로 중화시켜 대조구와 같이 한천배지 확산법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다.

3.5. 미생물의 생육저해 곡선 측정

Escherichia coli ATCC 25922과 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 50ml nutrient broth 생육배지에 1ml 접종하고, *Candida albicans* ATCC 10231는 50ml YM broth 생육배지에 1ml 접종한 후 시판 허브 중 rosemary(France)와 lavender(USA)를 각각 0, 5, 20, 50 μ l를 첨가하여 배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 580nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.6 GC 및 GC-MS를 이용한 시판 허브의 향기 분석 및 동정

3.6.1 Solide phase microextraction 법

시료를 밀봉한 채로 50°C에서 30분간 가열하면서, solid phase microextraction(SPME, Supelco 5-7300, USA) 장치를 이용하여 headspace 부분을 차지하고 있는 휘발성 성분을 fiber(100 μ m polydimethylsiloxane coating of manual red holder)에 흡착시켰다. 흡착이 끝난 후, GC(Hewlett Packard 5890, series II, USA)의 주입구에 SPME를 삽입하고, fiber를 내려서 5분간 탈착시켜 분리, 동정하였다.

3.6.2 GC-MS 분석

GC의 주입부에 주입된 총 휘발성 성분은 GC-MSD에 의해 분리·동정하였고 GC오븐(HP-5890 series II)과 MSD(QP-5050A)의 작동 조건은 Table 2, 3과 같다.

Table 2. Gas chromatography conditions for analysis of volatile compounds

Instrument	HP 5890 series II (USA)
Columns	Fused silica capillary column (SUPELCO, USA) (60m × 0.32mm × 1.00um)
Carrier	N ₂ , 0.5ml/min
Temp. program	Initial temp. : 50°C Rate : 3°C/min Final temp. : 200°C
Injection temp.	230°C
Detector temp.	250°C
Split ratio	Splitless

Table 3. GC/MS conditions for analysis of volatile compounds

Instrument	QP-5050A mass spectrometry (SHUMATZ, JAPAN)
Columns	Fused silica capillary column (SUPELCO, USA) (60m × 0.32mm × 1.00um)
Carrier	He, 0.5ml/min
Mass range	50~500 a.m.u
Temp. program	Initial temp. : 50°C
	Rate : 2°C/min
	Final temp. : 200°C
Injection temp.	230°C
Detector temp.	250°C
Split ratio	Splitless
Ionization V.	70eV

결 과 및 고 찰

1. 추출물 및 시판 허브의 항균력

1.1. 추출물의 항균력

허브의 항균력을 조사하기 위해 rosemary, lavender, thyme, greek oregano의 methanol 추출물과 증류수 추출물에 대한 항균효과를 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 그리고 *Candida albicans* ATCC 10231를 대상으로 측정된 결과는 Table 4과 같다.

Rosemary, thyme, greek oregano의 methanol 추출물은 *Bacillus subtilis* ATCC 6633에 항균력을 나타내었으며 lavender methanol 추출물은 *Escherichia coli* ATCC 25922에 항균력을 나타내었다. 그러나, 증류수 추출물들은 공시균주에 대하여 모두 항균력이 나타나지 않았다. 이는 증류수 추출에서는 항균성 성분들이 추출되지 않았기 때문으로 사료된다.

1.2. 시판 허브의 항균력

시중에 시판되고 있는 rosemary(USA),(France), lavender(USA),(UK), patchouli(USA) 그리고 encalyptus(USA)에 대한 항균효과를 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 및 *Candida albicans* ATCC 10231를 대상으로 측정된 결과는 Table 5과 같았다.

Rosemary 미국산과 프랑스산 그리고 encalyptus는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633에 항균력이 좋았으며, lavender 미국산은 *Escherichia coli* ATCC 25922에 항균력이 좋았으며 lavender 영국산은 *Candida albicans* ATCC 10231에 항균력이 좋았다. patchouli는 *Bacillus subtilis*

Table 4. Antimicrobial activities of water and methanol extracts of herbs

Herbs	Strains	Size of clear zone(mm)	
		MeOH	Water
Rosemary	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11.35	-
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-
Lavender	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10.6	-
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-
Thyme	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12.8	-
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-
Greek oregano	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12.9	-
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-

Table 5. Antimicrobial activities of commercial herbs extracts

Herbs	Strains	Size of clear zone (mm)
Rosemary(USA)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14.65
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20.6
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	15.3
Rosemary(France)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	17.45
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25.1
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	14
Lavender(USA)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	28.4
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	19.4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	23
Lavender(UK)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20.2
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20.3
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	24.55
Patchouli(USA)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15.25
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-
Eucalyptus(USA)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15.9
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20.6
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13.65

ATCC 6633에만 항균력이 나타났다.

2. 시판 허브의 최소저해 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 항균력 검색에서 항균력이 좋은 rosemary(France)와 lavender(USA)를 filter paper disc(Toyo, 8mm, Japan)에 2, 5, 10, 15, 20ul를 흡수시킨 다음 *Bacillus subtilis*와 *Escherichia coli* 그리고 *Candida albicans*을 대상으로 최소저해 농도를 측정한 결과는 Table 6 그리고 Fig. 1, 2, 3 과 같다.

Rosemary와 lavender의 *Bacillus subtilis*와 *Escherichia coli*에 대한 MIC는 5ul/mg으로 항균력이 아주 우수한 것으로 나타났으며 rosemary의 *Candida albicans*에 대한 MIC는 10ul/mg으로 lavender의 5ul/mg보다 항균력이 낮은 것으로 나타났다.

淺野(1992)에 의하면 식품보존료인 파라옥시 안식향산 에틸의 경우 *Bacillus subtilis*에 대한 MIC는 1000ppm이라고 보고하였는데 시판 rosemary와 lavender는 이 보다 100배 정도 항균력이 좋은 것으로 나타났다. 또한 *Bacillus subtilis*에 대한 천연 항균제의 MIC를 검토해 보면, 겨자 가수분해물(서 등, 1996)은 70ul/ml, 잣 에탄올 추출물(강 등, 1994)은 10,000ug/ml으로 나타나 시판 rosemary와 lavender가 이러한 천연 항균제보다는 15~1,000배 정도 항균력이 우수한 것으로 나타났다.

*Escherichia coli*의 경우 시판 rosemary와 lavender의 MIC는 5ul/ml로 나타났는데, 정 등(1999)은 초피추출물에 대한 MIC는 1000ppm이라고 보고한 바 있어, 시판 rosemary와 lavender는 이 보다 100배 정도 높은 항균력을 나타내었다.

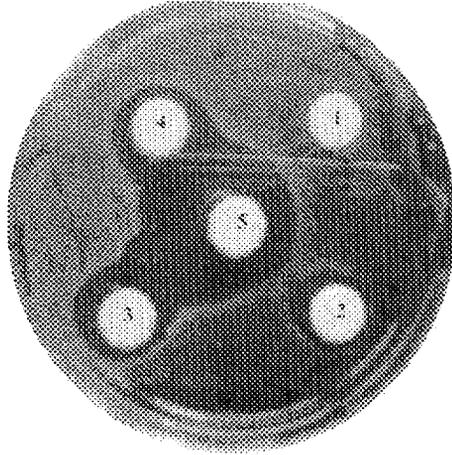
3. 항균성 물질의 안정성

3.1. 온도의 영향

Table 6. Minimum inhibitory concentrations(MIC) of rosemary and lavender extracts

Strains	MIC(ul/ml)	
	Rosemary	Lavender
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	5	5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5	5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10	5

A



B

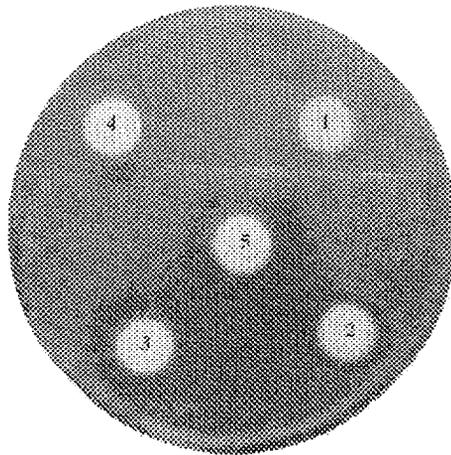
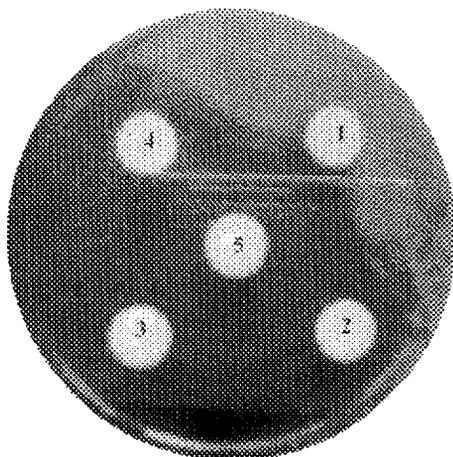


Fig. 1. Antimicrobial activities of rosemary and lavender extracts against *E.coli* ATCC 25922

A: rosemary B: lavender

1 :2ul 2: 5ul 3: 10ul 4: 15ul 5: 20ul

A



B

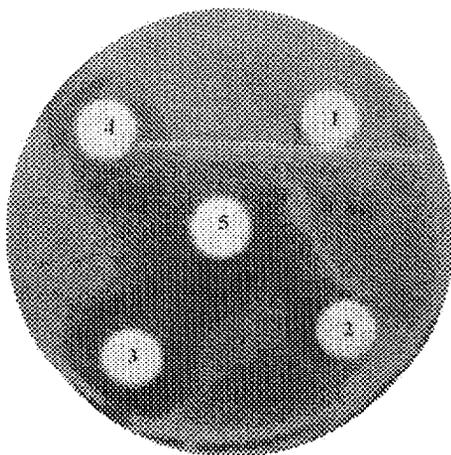
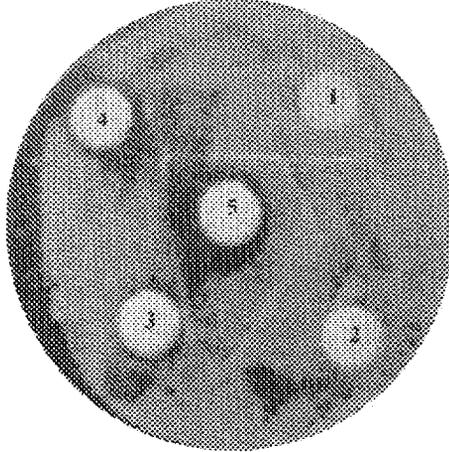


Fig. 2. Antimicrobial activities of rosemary and lavender extracts against *Bac.subtilis* ATCC 6633

A: rosemary B: lavender

1 :2ul 2: 5ul 3: 10ul 4: 15ul 5: 20ul

A



B

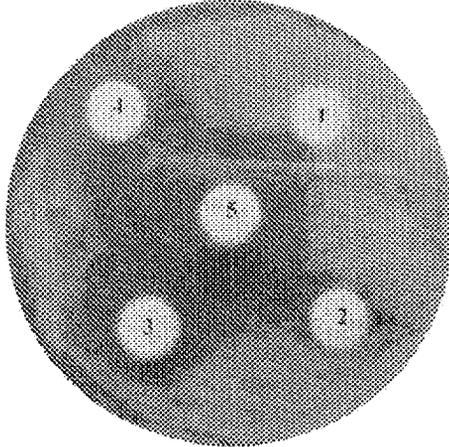


Fig. 3. Antimicrobial activities of rosemary and lavender extracts against *Can. albicans* ATCC 10231

A: rosemary B: lavender

1 :2ul 2: 5ul 3: 10ul 4: 15ul 5: 20ul

시판 rosemary와 lavender의 가열온도에 대한 안정성을 살펴본 결과는 Fig. 4, 5와 같았다.

시판 rosemary와 lavender는 40, 60, 80, 100, 121℃에서 각각 20분간 열처리한 시료의 경우 열처리 하지않은 대조구의 항균력에 비해 항균력이 감소하지 않은 결과로 보아 좋은 열 안정성을 나타내었다.

3.2. pH의 영향

시판 rosemary와 lavender의 pH에 대한 안정성을 측정한 결과는 Fig. 6, 7와 같았다.

시판 rosemary와 lavender를 pH 1, 3, 5, 7, 11, 13으로 조정한 후 실온에서 1시간 방치한 후, pH5로 중화시켜 항균력을 살펴본 결과 약산성 또는 중성에서 활성이 높았으며 산성 이나 알카리성으로 처리시 활성이 실패되는 현상을 나타내었다.

4. 미생물의 생육저해 곡선

항균력 시험에서 항균력이 입증된 시판 rosemary와 lavender의 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 그리고 *Candida albicans* ATCC 10231에 대한 생육억제효과를 확인하기 위하여 측정한 생육저해 곡선은 Fig. 8, 9, 10, 11, 12, 13과 같다.

액체배지 20ml에 대해 50ul 허브시료를 첨가한 경우 피검균의 생육을 크게 저해하는 결과를 나타내었다.

5. GC 및 GC-MS를 이용한 시판 허브의 분석 및 동정

최적 조건하에서 SPME를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 14와 Table 7, 8, 9에 나타내었다.

허브의 향 중 가장 많은 휘발성 성분(volatile compound)이 분리되어

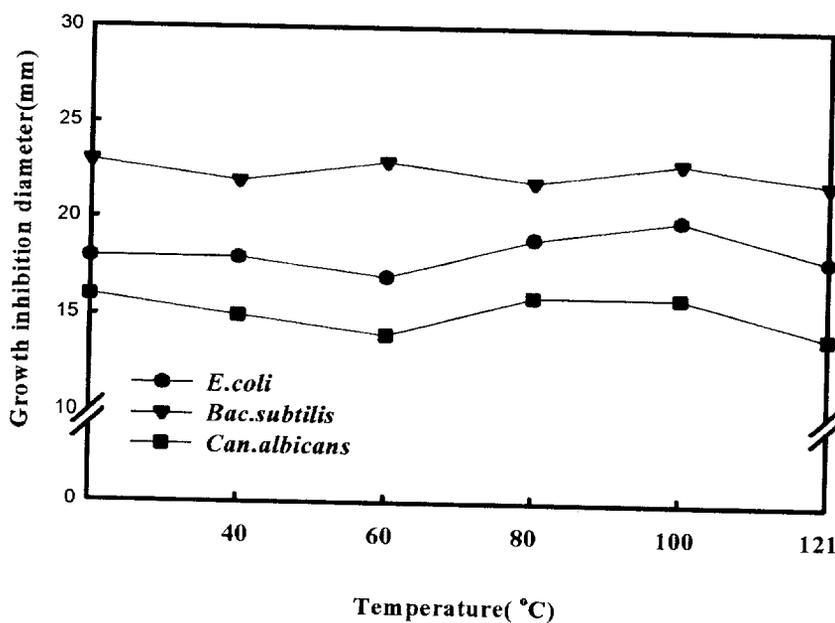


Fig 4. Effect of heat treatment on the growth inhibitory activity of lavender extract for *E.coli* ATCC 25922, *Bac. subtilis* ATCC 6633 and *Can. albicans* ATCC 10231

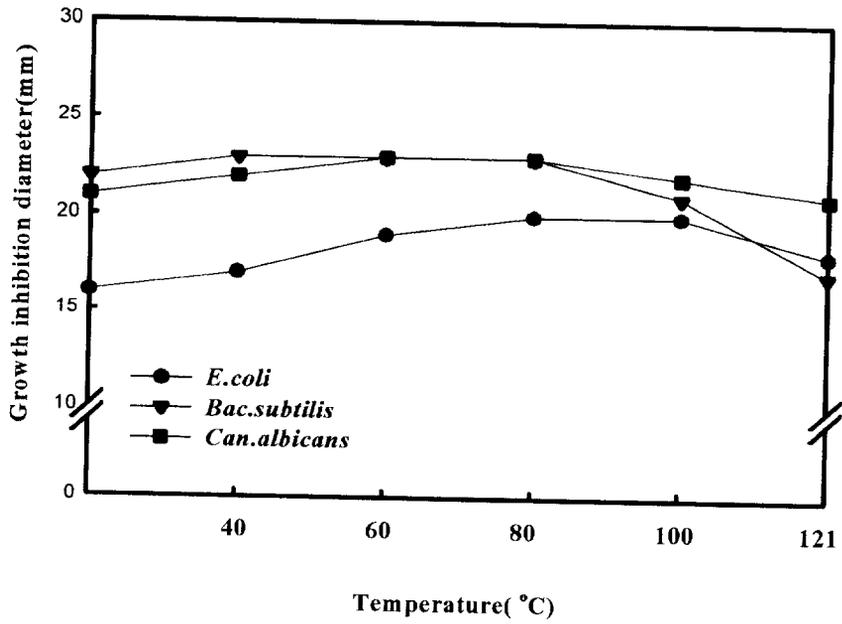


Fig 5. Effect of heat treatment on the growth inhibitory activity of rosemary extract for *E.coli* ATCC 25922, *Bac. subtilis* ATCC 6633 and *Can. albicans* ATCC 10231

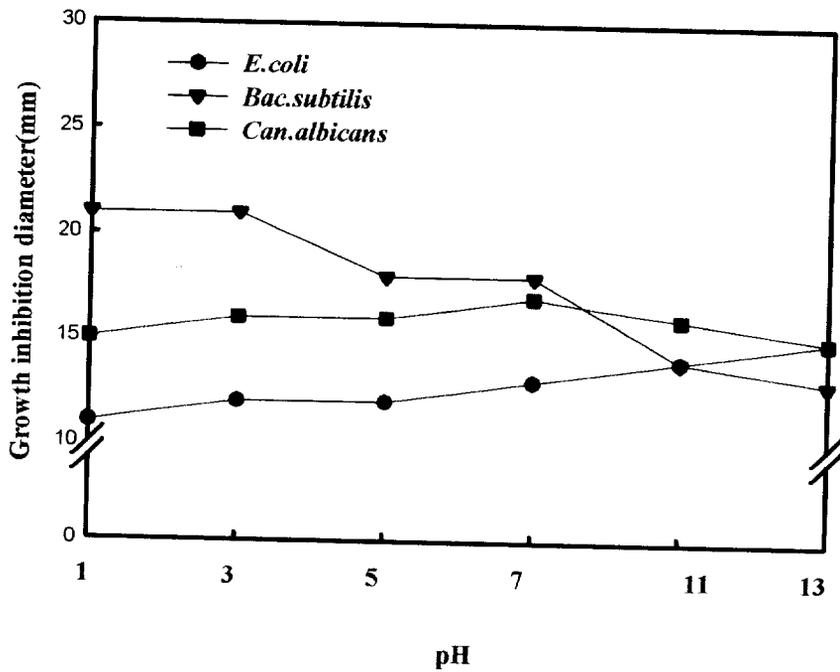


Fig 6. Effect of pH treatment on the growth inhibitory activity of rosemary extract for *E.coli* ATCC 25922, *Bac. subtilis* ATCC 6633 and *Can. albicans* ATCC 10231

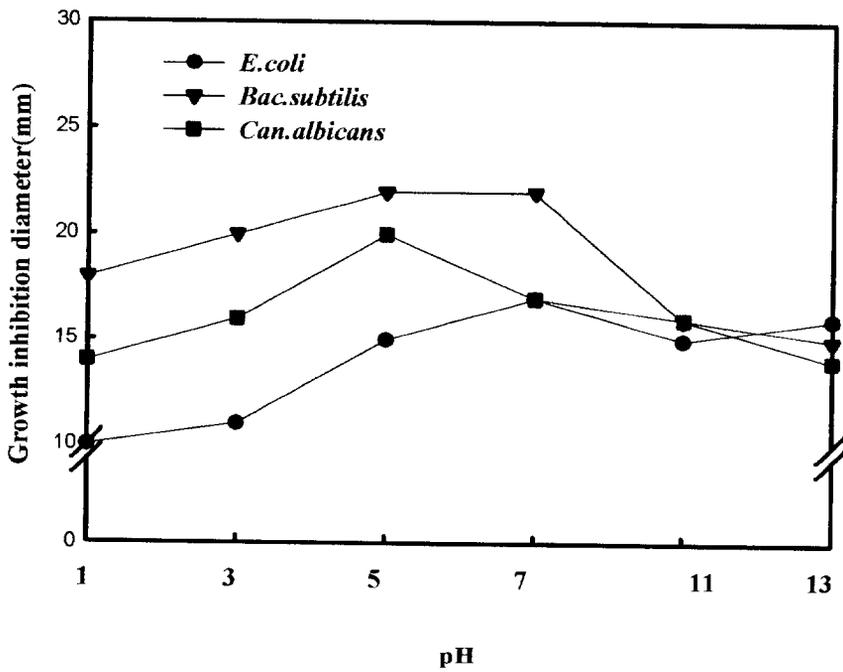


Fig 7. Effect of pH treatment on the growth inhibitory activity of lavender extract for *E.coli* ATCC 25922, *Bac. subtilis* ATCC 6633 and *Can. albicans* ATCC 10231

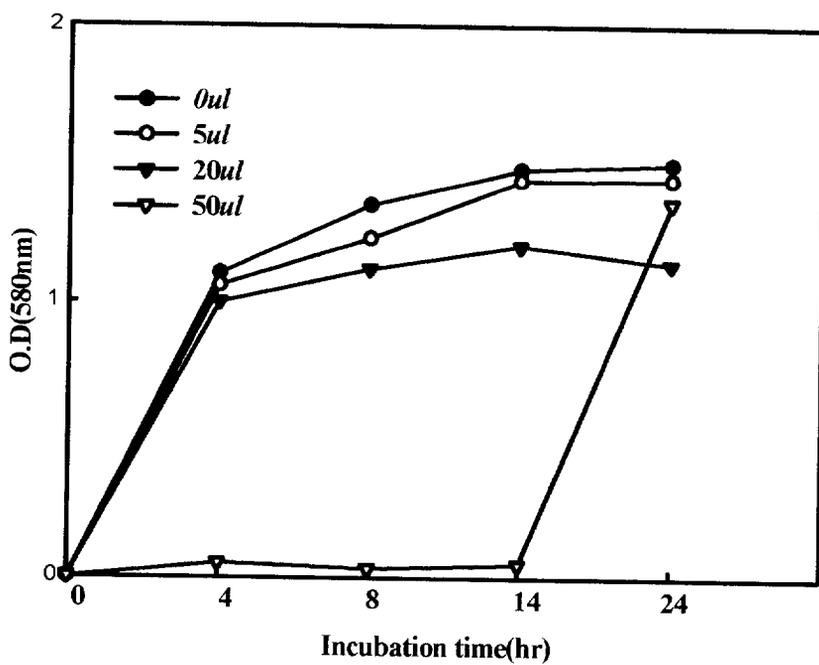


Fig. 8. Growth curve in medium containing rosemary extracts for *E.coli* ATCC 25922

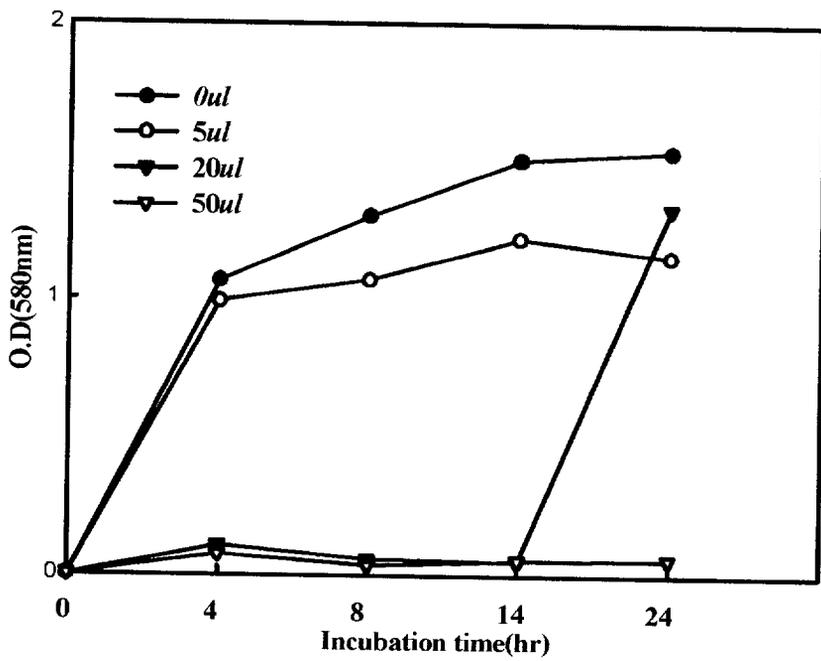


Fig. 9. Growth curve in medium containing lavender extracts for *E.coli* ATCC 25922

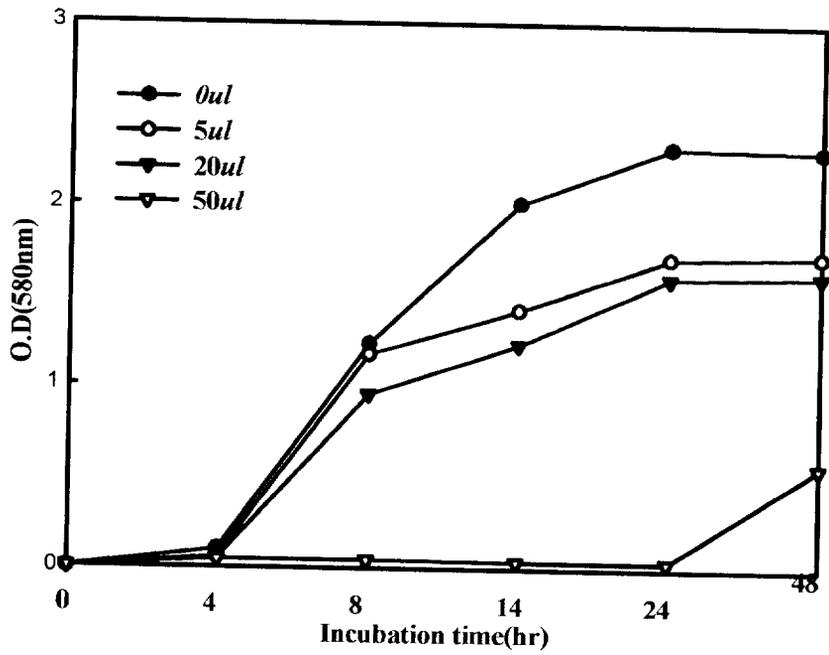


Fig. 10. Growth curve in medium containing rosemary extracts for *Bac. subtilis* ATCC 6633

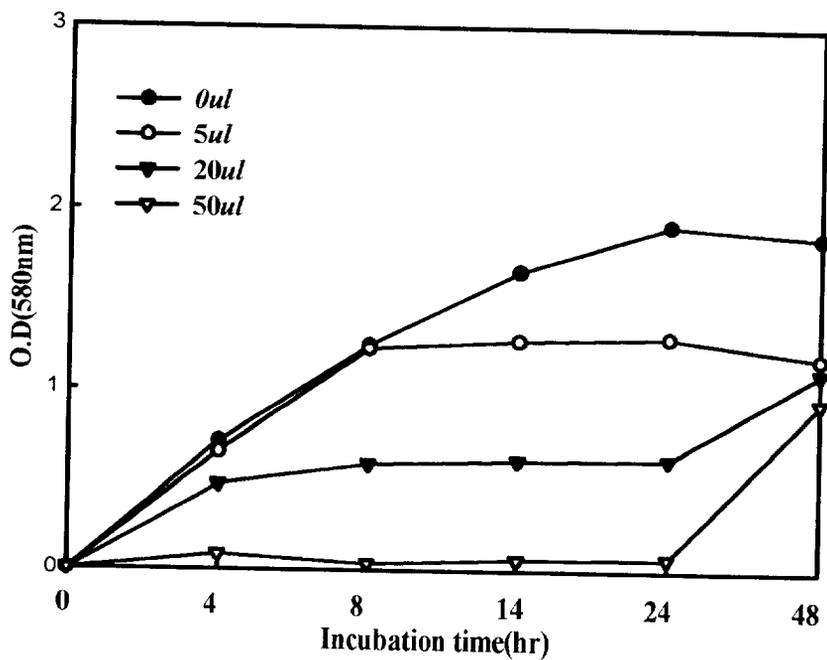


Fig. 11. Growth curve in medium containing lavender extracts for *Bac. subtilis* ATCC 6633

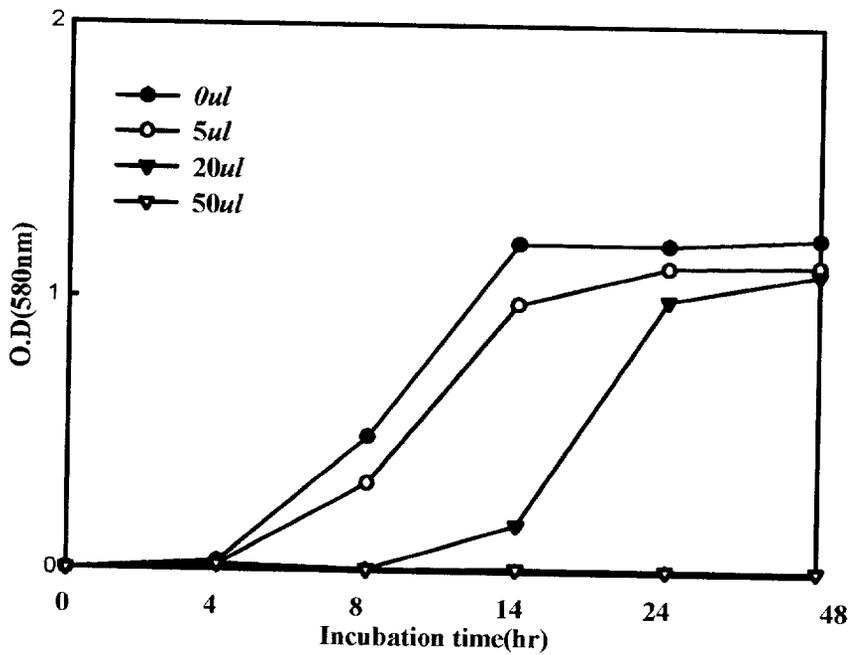


Fig. 12. Growth curve in medium containing rosemary extracts for *Can. albicans* ATCC 10231

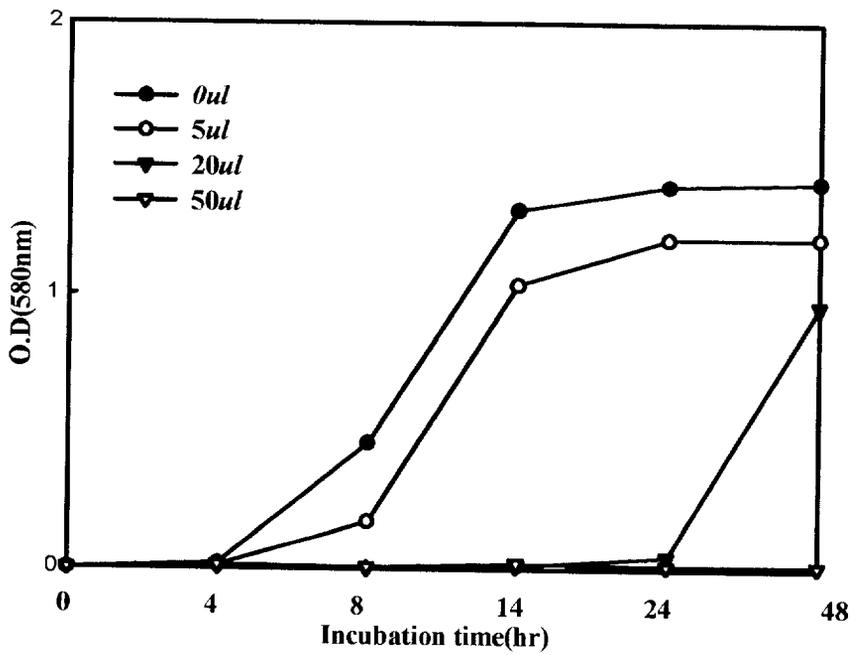


Fig. 13. Growth curve in medium containing rosemary extracts for *Can. albicans* ATCC 10231

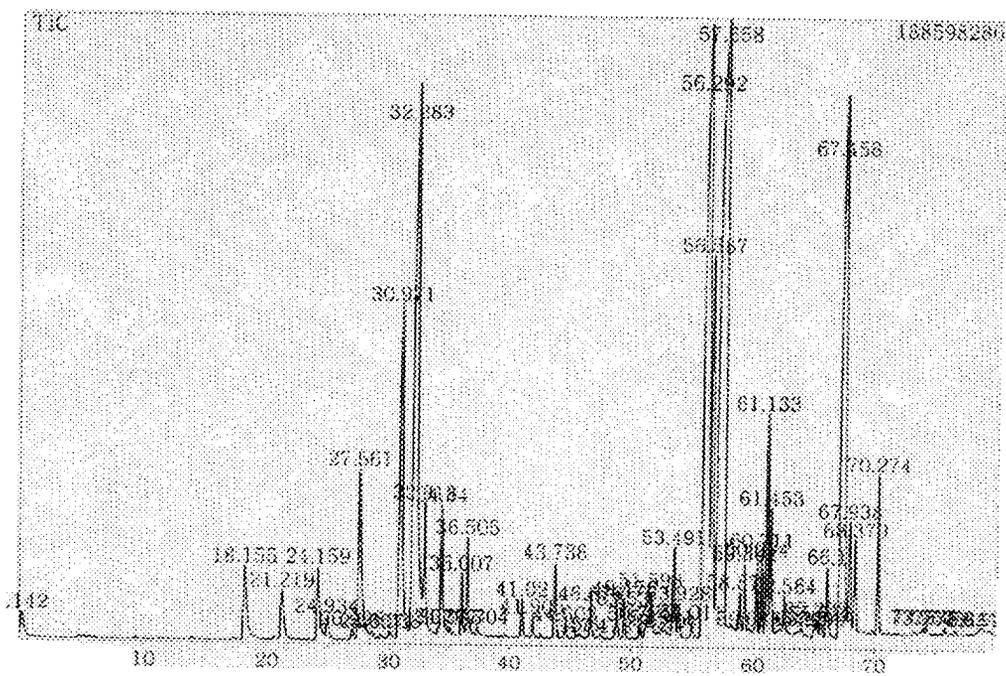


Table 7. Identification of volatile compounds in lavender by solid phase microextraction

Peak NO.	Compounds ¹⁾	R. T.	Peak Area ²⁾ ($\times 10^6$)
1	α -Pipene	20.8	2.7
2	Camphene	24.1	1.3
3	β -Pinene	27.3	2.4
4	Sabinene	28.1	0.9
5	<i>trans</i> -Ocimene	30.3	0.3
6	Myrcene	30.9	7.6
7	Linalyl acetate	32.0	0.3
8	3-Octanone	33.5	0.3
9	Limonene	34.4	12.6
10	1,8-Cineole	35.5	13.4
11	<i>trans</i> - β -Ocimene	36.5	4.0
12	Hexyl acetate	39.7	1.1
13	p-Cymene	40.2	4.7
14	<i>cis</i> -D-Dihydrocarveol	41.1	0.4
15	Hexyl butanoate	44.8	0.7
16	1-Octen-3-yl acetate	47.5	0.6
17	2-Methylcyclohexanol	52.7	0.6
18	<i>cis</i> -Linalool oxide	53.5	1.0
19	Lavandulol oxide	55.6	1.0
20	Plinol D	57.9	0.9
21	Batyl dimethyl ether	59.0	0.3
22	Linalool	59.9	19.4
23	β -Terpinyl acetate	61.0	19.4
24	d-Nerolidol	61.8	0.3
25	1-Terpinenol	63.8	0.4
26	Isopulegol	63.3	0.4
27	Geranyl propionate	64.3	1.4
28	Dihydrocarveol	64.7	0.7
29	Terpinen-4-ol	65.2	3.1
30	<i>trans</i> -Caryophyllene	65.5	1.5
31	Butyl Dimethyl ether	66.7	0.4

Peak NO.	Compounds ¹⁾	R. T.	Peak Area ²⁾ ($\times 10^6$)
32	Chimil ether	69.8	0.5
33	β -Terpineol	70.3	0.5
34	α -Terpineol	71.3	15.4
35	Isoborneol	72.0	2.3
36	Lavandulyl acetate	72.5	3.0
37	Geranyl acetate	74.4	7.0
38	Octadecanoic acid, methyl ester	78.9	10.3
39	Octadecanoic acid, ethyl ester	80.3	0.7

Table 8. Identification of volatile compounds in rosemary by solid phase microextraction

PeakNO.	Compounds ¹⁾	R. T.	Peak Area ²⁾ ($\times 10^6$)
1	2-Ethylhexanol	18.0	8.4
2	α -Pipene	21.1	0.8
3	γ -Terpinene	21.9	1.0
4	Camphene	25.2	0.2
5	Sabinene	28.0	6.2
6	β -Pinene	28.8	0.7
7	Myrcene	30.7	1.0
8	α -Phellandrene	31.0	0.1
9	Linalyl acetate	31.5	0.1
10	Limonene	34.3	1.8
11	1,8-Cineole	35.4	2.9
12	<i>trans</i> - β -Ocimene	37.5	18.3
13	γ -Terpinene	37.8	2.2
14	Hexyl acetate	39.7	0.6
15	<i>cis</i> -Decalindiol	51.7	0.5
16	<i>cis</i> -Linalool oxide	53.7	2.4
17	<i>trans</i> -Linalool oxide	55.2	0.4
18	Linalool	57.6	0.1
19	d-nerolidol	61.2	10.3
20	Methyl oleate	61.8	14.3
21	β -Terpinyl acetate	62.8	0.2
22	1-Terpinenol	64.0	0.1
23	Pinocarvone	64.3	0.5
24	β -Terpineol	69.5	0.4
25	α -Terpineol	70.7	1.3
26	Isoborneol	72.0	0.1
27	Batyl dimethyl ether	74.2	0.2

Table 9. Identification of volatile compounds in eucalyptus by solid phase microextraction

Peak NO.	Compounds ¹⁾	R. T.	Peak Area ²⁾ ($\times 10^6$)
1	2-Ethylhexanol	18.2	0.2
2	γ -Terpinene	20.9	16.1
3	Camphene	24.2	0.2
4	β -Pinene	27.4	5.7
5	Myrcene	31.0	3.0
6	α -Phellandrene	31.7	3.1
7	Terpinolene	33.0	0.3
8	Eucalyptol	35.7	18.6
9	1,8-Cineole	36.2	19.6
10	γ -Terpinene	38.1	11.0
11	p-Cymene	40.3	24.9
12	Terpinolene	41.1	2.4
13	1-Tetradecen-3-yne	44.8	0.6
14	<i>cis</i> -D-Dihydrocarveol	45.4	0.1
15	Isopulegol	47.2	0.2
16	Cyclopropane, trimethyl(2-methyl-1-propenylidene)	47.7	0.3
17	<i>cis</i> -Dihydrocarvone	49.4	0.3
18	1-Methyl-2-Isopropenylidenezene	53.4	1.3
19	Linalool oxide trans	55.6	0.4
20	Methyl oleate	60.4	1.8
21	Trans-2,5-Dimethoxymethylcyclohexane	63.6	0.2
22	Terpinen-4-ol	65.2	3.3
23	9,12-Octadecadienoic acid	66.1	0.2
24	Isopinocarveol	69.2	2.0
25	<i>cis</i> -Linalool oxide	69.7	0.7
26	Decenoic acid	70.7	0.4
27	α -Terpineol	71.3	6.2
28	Chimil ether	73.5	0.4
29	Butyl dimethyl ether	77.9	0.5

¹⁾ This stands for the compound identified tentatively by GC-MSD

²⁾ Unit is peak area count/ 10^6

진 것은 라벤다로 39개의 compound가 분리 동정되었다. 이 중 terpene류가 10종, alcohol류가 13종, ester류가 13종, ketone류가 1종, 그리고 산화 반응물(oxygen containic compound)이 2종 분리되었다. 허브의 향성분의 주요 성분이 되는 compound는 terpene류였으며 alcohol compound 중에서도 terpene류의 향을 가지는 알콜류가 나타났다.

Ester류는 다수이지만 주로 terpene류의 성질을 가지는 성분들이 주요하며 이외에는 미량의 성분들로 구성되어진다. 종래의 솔 향 등의 숲의 향(green aroma)의 향과 비교하여서도 α -pinen, β -pinene, limonene 등의 성분이 발견되어지고 있으며 이는 이후의 허브의 향에서도 동일하다. 라벤다 특유의 lavandalul의 경우 산화 반응물인 oxide의 형태로 존재하고 있었다.

로즈마리의 경우 다른 분석과는 별도로 tentative한 동정을 실시한 결과 27개의 compound를 가지는 것으로 보였다. 이 중 terpene류가 10종이며, alcohol류가 9종, ester가 5종, 산화반응물이 2종, ketone류가 1종 분리 동정되었다. 로즈마리의 경우 terpene류가 다른 허브의 향보다 그 수가 많이 분리되었으며 terpene이나 terpene성 ester류가 가장 많은 함량을 가지는 것으로 나타났다.

유칼립투스의 경우 29종의 휘발성 성분이 분리 동정되었는데 terpene류가 9종, alcohol류가 8종, ester류가 6종, 산화반응물이 2종, acid류가 2종, ketone류가 1종 분리되었다. p-Cymene과 γ -terpene 등의 terpene류가 보다 강하게 나타났으며 유칼립스 특유의 향을 구성하는 eucalyptol과 같은 alcohol류도 높은 함량을 나타내었다.

위의 세 가지 허브 물질들은 일반적인 숲의 향(green aroma)를 terpene이나 terpene성의 alcohol류에서 나타내고 있으며 산화 반응물에서는 동일하게 linalool의 cis-, trans-형의 산화 반응물을 가지고 있었다. Alcohol의 경우 terpenol의 형태를 높은 함량의 alcohol류에서 보이며, 1,8-cineol 성분을 공통적으로 보유하며, pinene이나 cymene, myrcene과 같은 terpene류를 일반적으로 함유하고 있어서, 허브 특유의 향의 유사한 조성을 확인할 수 있었다.

GC-FID의 결과에도 보이듯이 라벤다의 향이 가장 진하며, 많은 수의 휘발성 성분이 분리되었으며, 유칼립투스과 로즈마리의 경우 미량 성분은 유칼립투스가 많으나, 주요 향은 로즈마리가 더 높은 것을 보이고 있다.

결론 및 요약

1. 제조한 허브시료의 경우 좁은 항균 spectrum을 보여주었으나 시판 허브액의 경우 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231에 대해 patchouli를 제외하고 항균력을 나타내었다.
2. 시판 rosemary와 lavender의 MIC 결과 rosemary 모두에 대해 10ul로 나타났고 그 외는 5ul로 나타났다.
3. 항균력을 나타내는 최적 작용 pH는 시판 rosemary의 경우, *Candida albicans* ATCC 10231의 경우 pH 3에서 *Bacillus subtilis* ATCC 6633는 pH 7에서 나타났다. 시판 lavender의 경우는 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 모두 pH5에서 최적작용 pH를 나타내었다.
4. 시판 rosemary와 lavender의 열안정성 실험결과 40에서 121°C 범위에서 좋은 열안정성을 나타내었으며 pH 안정성 실험에서는 중성에서 안정성을 나타내었다.
5. 액체배양시 시판 rosemary와 lavender를 첨가하여 피검균의 생육억제 실험 행한 결과 액체배지 20ml에 대해 50ul 허브시료를 첨가한 경우 생육을 크게 저해한 결과를 나타내었다.
6. GC-MS 분석 결과 라벤다는 39개의 화합물, 로즈마리는 27개의 화

합물 그리고 유칼리투스는 29개의 휘발성 성분이 분리·동정되었으며 terpene류, alcohol류, ester류가 주로 분리·동정 되었으며 ketone류, 산화반응물 그리고 acid류가 수종 분리·동정 되었다.

참 고 문 헌

- Momose I., Sekizawa R., Hosokawa N., Inuma H., Matsui S., Nakamura H., Naganawa H., Hamada M., Takeuchi T. and Melleolides K.: New melleolides from *Armillariella mellea*. *Journal of Antibiotics*, 53(2), 137-143 (2000)
- Ladokhin A.S., Selsted M.E., White S.H. and White S.H.: CD spectra of indolicidin antimicrobial peptides suggest turns, not polyproline helix. *Biochemistry*, 38(38), 12313-12319 (1999)
- Bornemann S., Ramjee M.K., Balasubramanian S., Abell C., Coggins J.R., Lowe D.J. and Thorneley R.N.F.: *Escherichia coli* chorismate synthase catalyzes conversion O(6s)-6-fluoro-5-enolpyruvylshikimate-3-phospho-6-fluorochorismate implications for the enzyme mechanism and the antimicrobial action of (6s)-6-fluoroshikimate. *Journal of Biological Chemistry*, 270(39) (1995)
- Maa Y.F. and Hsu C.C.: Aggregation of recombinant human growth hormone induced by phenolic compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 140(2), (1996)
- Boger D.L., Castle S.L., Miyazaki S., Wu J.H., Beresis R.T. and Loiseleur O.: Vancomycin CD and DE macrocyclization and atropisomerism studies. *Journal of Organic Chemistry*, 64(1), 70-80

(1999)

Poeta M., Schell W.A., Dykstra C.C., Jones S.K., Tidwell R.R., Kumar A., Boykin D.W. and Perfect J.R.: *In vitro* antifungal activities of a series of dication-substituted carbazoles, furans, and benzimidazoles. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 42(10), 2503-2510 (1998)

Rao A.G.: Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachyplesin lacking disulfide bonds. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 361(1), 127-134 (1999)

Hall J.E., Kerrigan J.E., Ramachandran K., Bender B.C., Stanko J.P., Jones S.K., Patrick D.A. and Tidwell R.R.: Anti-pneumocytosis activities of aromatic diamidoxime produgs. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 42(3) (1998)

Mohamed H.A., Elgamal A.G.H. and Mekhael M.K.G.: Synthesis of some novel stryl, sulphonic ester and sulphonamide visnagin derivatives. *Afinidad*, 55(476), 275-278 (1998)

Rauha J.P., Susanna R. and Kalevi P.: Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International journal of food microbiology*, 56, 3-12 (2000)

Barnabas, C.G.G., Nagarajan S.: Antimicrobial activity of flavonoids of some medicinal plants. *Fitoterapia* 59(6), 508-510 (1998)

Heinonen I.M., Lehtonen P.J.: Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Agric. Food chem.* 46, 25-31 (1998)

강성구, 성낙계, 김용두, 신수철, 서재신, 최갑성, 박석규. 갓 추출물의 항균활성 검색. *한국식품영양과학회지* 23(6), 1008-1013(1994)

정순경, 정재두, 조성환. 초피추출물의 항균특성. *한국식품영양과학회지* 28(2), 371-377(1999)

서권일, 박석규, 박정로, 김홍출, 최진상, 심기환. 겨자 가수분해물의 항균성 변화. *한국식품영양과학회지* 25(1), 129-134(1996)

박옥연. 상백피 추출물의 항균성과 항균성 물질의 분리 정제. 부산수산대학교 공학박사 학위논문, 75-78(1995)