

쑥의 *Clostridium perfringens* 생육 저해 물질의 최적 추출조건

권동진* · 박중현 · 권민¹ · 유진영 · 구영조

한국식품개발연구원 생물공학연구부, ¹농촌진흥청 고령지 농업시험장

초록 : 쑥으로부터 *Clostridium perfringens*의 생육 저해 물질의 추출 조건을 조사하였다. 쑥의 유용성분을 최대한 추출하기 위하여 *C. perfringens*에 대한 생육 억제 정도를 기준으로 추출용매 농도, 추출온도 및 추출시간을 조사한 결과 100% ethanol, 40°C, 4시간 추출한 것이 *C. perfringens*의 생육 저해에 효과가 가장 좋았다.(1997년 1월 6일 접수, 1997년 5월 17일 수리)

서론

인체의 장내에는 100조 100중에 달하는 장내 미생물이 장내균총을 구성하여 서로 공생 또는 길항관계를 유지하면서 섭취된 음식물과 소화관으로 분비되는 생체성분을 영양원으로 계속 증식하면서 배설되고 있다. 이들은 대장 내용물의 약 1/3을 차지하고 있으며 숙주인 인간의 건강유지, 질병 또는 노화 등에 큰 영향을 미치고 있는 것으로 알려져 있다.

이들 미생물은 성인의 경우 분변 g당 10^{11} cfu 수준으로 존재하는데 Bacteroidaceae, *Eubacterium*, Peptococcaceae, *Bifidobacterium* 등이 10^9 ~ 10^{11} 수준으로 가장 많고 *Lactobacillus*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Veillonella* 등은 10^5 ~ 10^8 정도로 존재한다.^{1,2)} *Clostridium*속 균들은 장내의 대표적인 유해균으로서 *C. perfringens*는 장염, *C. difficile*은 대장염, *C. botulinum*은 식품 및 장내 독소 생성균으로 잘 알려져 있으며 *C. paraputrificum*은 발암성 물질의 생성에 관여하는 steroid dehydrogenase의 활성을 보여 대장암의 발생과 깊은 관련이 있을 것으로 추정되고 있다.³⁾ 이들 중 대표적 유해균으로서 일반적으로 *C. perfringens*가 지목되고 있는데 이 균은 여러가지 독소성 효소, 즉 phospholipase와 collagenase를 생산하여 숙주의 세포막을 파괴하고 또한 장관 내벽 혈관의 투과성을 증가시키는 독소를 생성하여 장염, 설사 등에 깊이 관여하고 또한 발암성 전구물질로 사람의 노화에 깊이 관여하는 것으로 추정되고 있다.

그리고 각종 이화학적 요인 또는 정신적 스트레스는 장관의 분비와 운동성 그리고 혈액의 흐름에 영향을 미쳐 균총의 변화를 유발한다. 장내 균총의 변화를 주로 내·외적인 요인들이 많이 알려져 있다. 예를 들어 모유를 먹는 아이들은 분유로 양육된 아이들에 비해 bifidobacteria균이 우세하게 나타나는데 이는 모유 중의 glucosamine을 함유한 당류가 bifidobacteria의 생육을 촉진시킨다고 보고하고,⁴⁾ 당근 주스도 bifidobacteria의 증식성분을 갖고 있는데 그 유효성

분으로 pantethine이 보고되어 있으며⁵⁾ 설탕을 기질로 fructofuranosidase를 작용시키면 설탕에 과당이 1~3개 정도 결합한 fructooligo 당은 *C. perfringens*가 잘 이용하지 못하지만 bifidobacteria는 이를 이용하는 특성을 갖고 있어 기능성 감미료로 이용되고 있다고 보고⁶⁾되어 있다.

쑥 (*Artemisia* spp.)은 우리나라에 널리 분포하는 다년생 식물로 식품원으로서 뿐만 아니라 한방에서도 필수적인 약재이다. 그리고 구황식품으로 애용되고 있는 쑥은 지혈약으로 쓰이고 소화, 구충, 약취제거 등에 효과가 있으며 또한 위장병, 변비, 신경통, 배아픔, 천식, 부인병 및 위암 등에 효과가 있다고 한방에 기재되어 있다.⁷⁾

쑥 성분에 관한 연구로서 화학적인 성분들의 규명에 관한 연구에서 주요 성분으로 isocoumarin, coumarin, diterpenelactone, flavonoid 및 정유성분 등이 있다고 보고되어 있다.⁸⁾ 김⁹⁾은 *Artemisia*속의 향기성분에 대하여 보고하였고, 김¹⁰⁾과 김¹¹⁾은 쑥의 약리효과에 대하여, 이 등¹²⁾은 쑥 추출물의 항돌연변이원성 효과에 대하여 보고하고 있으며 장내 미생물에 대한 효과를 검토한 연구 등이 일부 보고¹³⁻¹⁵⁾되어 있다. 그러나 장내 미생물 중 유해균인 *C. perfringens*의 생육 억제효과가 있는 활성물질에 대한 특성을 규명한 연구는 별로 알려진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 장내 유해균인 *Clostridium perfringens* ATCC 13124의 생육을 억제하는 쑥 추출물을 얻기 위한 최적 추출 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 쑥은 전남 해남에서 채배된 쑥 (*Artemisia princeps*, Pan.)을 구입하여 건조 마쇄하였다.

사용균주

사용 균주는 한국식품개발연구원에 보관 중인 *Clos-*

찾는말 : 쑥 추출물, *Clostridium perfringens*

*연락처

tridium perfringens ATCC 13124이다. 균주의 보관배지는 EGLF 배지¹⁶⁾ (Difco)이며 5°C 이하의 냉장보관을 하였다.

혐기배양방법 및 장치

혐기 희석액, 혐기 배지 등의 혐기성균 배양을 위한 배지 환원은 gas pack을 이용한 CO₂ 가스 치환법을 사용하였고 Mitsuka 등의 방법¹⁷⁾ 및 Hungate의 방법¹⁸⁾을 참고하여 100% O₂-free CO₂ 가스로 치환된 혐기배양장치를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 이때 working culture 배지로 reinforced clostridial media (Difco)를 사용하였다.

쑥 추출물의 전처리

쑥을 ethanol로 추출하여 *C. perfringens*를 목표 미생물로 하여 분석하였다. 즉 건조 마쇄된 쑥 30 g에 100%, 80%, 60% ethanol 및 100% 증류수를 각각 800 ml 넣어 실온과 10°C에서 80°C까지 10°C 간격으로 8시간 추출하고 에탄올을 완전히 제거한 후 본 실험에 사용하였다.

*C. perfringens*의 최대 생육 저해효과를 위한 쑥 추출조건 결정

쑥 추출물 10 mg을 미리 활성화시킨 *C. perfringens*가 접종된 EG배지¹⁶⁾를 이용하여 agar diffusion method로 *C. perfringens*의 최대 생육 저해효과를 위한 쑥 추출물의 최적 추출조건인 용매농도, 추출온도 및 추출시간을 조사하였다.

결과 및 고찰

추출용매 농도별 쑥의 추출수율

쑥의 최적 추출을 위한 추출용매의 농도를 결정하기 위하여 쑥의 추출용매별 추출수율의 결과는 Fig. 1과 같다.

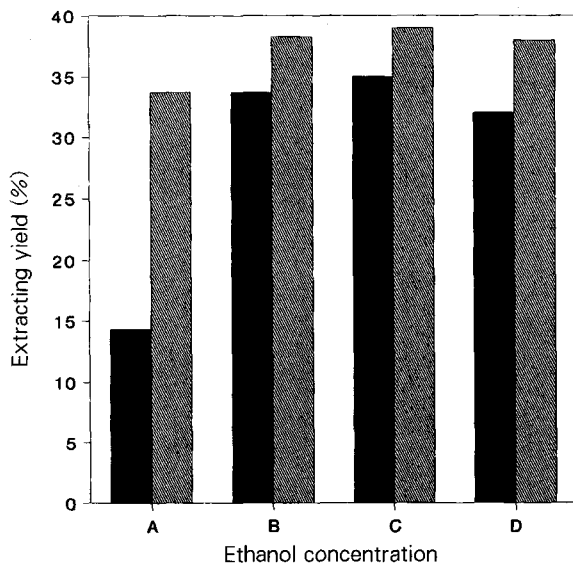


Fig. 1. Yield of wormwood extracted at various ethanol concentrations. ■—■, Wormwood extracted at room temperature; ▨—▨, Wormwood extracted at 80°C. A: 100% Ethanol; B: Ethanol : Water=8 : 2; C: Ethanol : Water=6 : 4; D: 100% Water.

즉, 건조 마쇄한 쑥의 중량에 대한 추출한 건조 고형물의 수율인 추출수율은 실온의 경우 100% ethanol에서는 14.3%, 80% ethanol에서는 33.7%, 60% ethanol에서는 35.0%, 100% 증류수에서는 32.0%로 ethanol의 농도가 높을수록 추출수율은 낮았으며 60% ethanol에서 가장 높았다. 한편, 80°C 고온의 경우 추출수율은 100% ethanol에서는 33.7%, 80% ethanol에서는 38.3%, 60% ethanol에서는 39.0%, 100% 증류수에서는 38.0%로 실온의 경우와 같이 ethanol의 농도가 높을수록 추출수율은 낮아지고 있었다. 또한 실온보다는 80°C 고온에서 추출수율이 좋았고 ethanol 농도가 높을수록 추출수율이 낮았다.

쑥의 추출용매 농도별 *C. perfringens*에 대한 생육 저해효과

쑥의 최적 추출을 위한 추출용매의 농도를 결정하기 위해 쑥 추출물을 EG 한천배지에 혼합하여 37°C에서 agar diffusion method으로 *C. perfringens*의 생육 저해효과를 halo의 크기로 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. 즉, 실온에서 추출한 경우 100% ethanol로 추출한 것은 halo의 크기가 직경 15.0 mm으로 가장 크고, 80% ethanol로 추출한 것은 11.0 mm, 60% ethanol로 추출한 것은 12.0 mm, 100% 증류수는 9.0 mm로 가장 작았다. 한편 80°C 고온에서 추출한 경우 100%와 80% ethanol에서 추출한 것은 11.0 mm, 60% ethanol과 100% 증류수로 추출한 것은 9.0 mm로 *C. perfringens*에 대한 생육 저해효과는 ethanol의 농도가 높을수록 저해효과가 높은 것으로 나타났고 고온보다는 실온에서 저해효과가 높은 것으로 나타났다. 특히, 실온에서 100% ethanol로 추출한 것이 추출수율은 가장 낮았지만 *C. perfringens*에 대한 생육 저해효과가 가장 높아 ethanol 최적 추출농도를 100%으로 하였다.

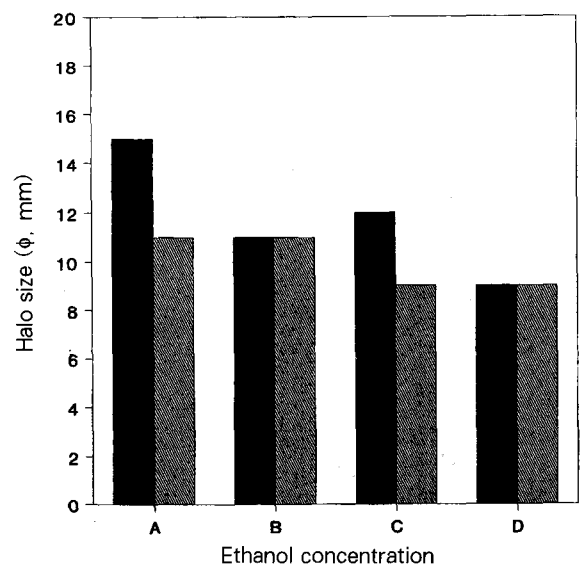


Fig. 2. Effect of wormwood extracted at various concentrations on *C. perfringens*. ■—■, Wormwood extracted at room temperature; ▨—▨, Wormwood extracted at 80°C. A: 100% Ethanol; B: 80% Ethanol; C: 60% Ethanol; D: 100% Water.

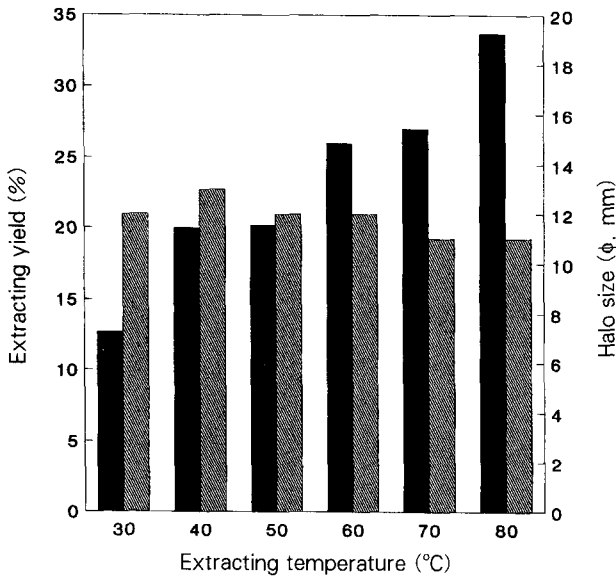


Fig. 3. Effects of wormwood extracted at various extracting temperature on *C. perfringens*. ■—■, Extracting yield of wormwood; ▨—▨, Halo size.

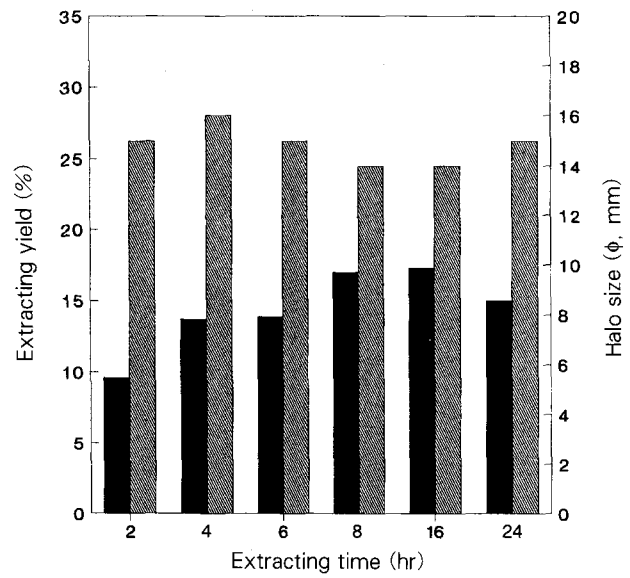


Fig. 4. Effects of wormwood extracted at various extracting time on *C. perfringens*. ■—■, Extracting yield of wormwood; ▨—▨, Halo size.

추출온도에 따른 *C. perfringens* 생육 저해효과

쑥 추출을 위한 추출온도를 결정하기 위하여 건조 마쇄한 쑥 30 g을 100% ethanol 800 ml을 넣어 30°C에서 80°C까지 10°C 간격으로 8시간 추출한 후 EG 한천배지를 이용하여 37°C에서 agar diffusion method으로 분석한 결과 Fig. 3과 같다. 즉, 추출수율의 경우 30°C에서 추출한 것은 12.7%, 40°C와 50°C에서는 20.0%, 60°C에서는 26.0%, 70°C에서는 27.0%, 80°C에서는 33.7%로 온도가 높을수록 쑥의 추출수율은 높았다. 한편, 각 추출온도에 따른 쑥 추출물의 *C. perfringens*의 생육 억제효과를 halo의 크기로 나타낸 결과 30°C에서 추출한 것은 직경 12.0 mm, 40°C에서는 13.0 mm, 50°C와 60°C에서는 12.0 mm, 70°C와 80°C에서는 11.0 mm로 40°C에서 추출한 것이 *C. perfringens* 생육 저해효과가 가장 높고 이후 차츰 낮아지고 있어 쑥 추출물의 최적 추출온도를 40°C로 하였다.

추출시간에 따른 *C. perfringens* 생육 저해효과

쑥 추출물의 추출시간을 결정하기 위하여 건조 마쇄한 쑥 30 g을 100% ethanol 800 ml에 넣어 40°C에서 시간별로 추출한 후 EG 한천배지를 이용하여 37°C에서 agar diffusion method으로 *C. perfringens* 생육 억제 효과를 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, 쑥의 추출수율은 2시간 추출하였을 때 9.6%, 4시간 추출하였을 때 13.7%, 6시간 추출하였을 때 13.9%, 8시간 추출하였을 때 17.0%, 16시간 추출하였을 때 17.3%, 24시간 추출하였을 때 15.0%으로 16시간 추출하는 것이 추출수율이 가장 좋았고 이후 감소하는 편이었다. 한편 쑥 추출물의 *C. perfringens*에 대한 생육억제를 halo의 크기로 나타낸 결과 2시간 추출한 것은 15.0 mm, 4시간 추출한 것은 16.0 mm, 6시간 추출한 것은 15.0 mm, 8시간과 16시간 추출한 것은 14.0 mm, 24시간 추출한 것은 15.0

mm으로 쑥 추출물의 *C. perfringens* 생육 억제 효과는 4시간 추출하였을 때 가장 효과적이었고 이후 감소하고 있었기 때문에 쑥의 최적 추출시간을 4시간으로 하였다.

요 약

쑥 추출물을 이용한 식품을 개발하기 위하여 건조 마쇄된 쑥을 추출조건을 다르게하여 쑥 추출물을 제조한 후 *C. perfringens*가 접종된 EG 한천배지에 agar diffusion method로 37°C에서 배양하면서 *C. perfringens*의 최대 생육 저해 효과를 나타내는 추출조건을 조사하였다. 그 결과 시료의 30배 이상의 100% ethanol을 넣고 40°C에서 4시간 추출한 것이 *C. perfringens*의 생육 저해효과 및 수율면에서 우수하여 쑥 추출물의 최적 추출조건은 100% ethanol, 40°C, 4시간이었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 연구비 지원에 의한 일부의 결과로서 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Hughes, D. B. and D. G. Hoover (1991) *Bifidobacteria*; Their Potential for Use in American Dairy Products. *Food Technol.* **45**, 74.
- Mitsuoka, T. 1989. *Intestinal Flora and Bio-homoeostasis*. Japan Scientific Soc. Press. Tokyo.
- Stark, P.L. and A. Lee (1982) *Clostridia* Isolated from the Feces of Infantis During the First Year of Life. *Pediat.* **199**, 362.
- Mark, P. and A. Bezkororainy (1988) Growth-enhancing

- Supplements for Various Specious of the Genus *Bifidobacterium*, *J. Dairy Sci.*, **71**, 3214.
5. Zbikowski, Z. and S. Zikjka (1986) Technology of Obtaining Humanized Infant Formula with Enhanced Bifidogenic Properties by Adding Carrot Juice, *Indian J. Dairy Sci.*, **39**, 60075.
 6. Hidaka, H., T. Eida, T. Takizawa, T. Tokunaga, and T. Tashira (1981) Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health, *Bifidobacteria Microflora*, **5**, 37.
 7. 허준 (1978) 한방동의보감, p.184, 민정사.
 8. 한덕용, 김인혜 (1973) *Artemisia* 정유물질에 관한 연구, 생약학회지 **4**, 71.
 9. 김지미 (1984) 쑥의 향기성분에 관한 연구, 부산대학교 석사학위논문
 10. 김기영 (1979) 쑥이 家兔의 易出腸管운동에 미치는 영향, 한양대학교 석사학위논문
 11. 김일혁 (1967) *Artemisia*속 정유물질의 항암작용에 관한 연구, 중앙대학교 논문집, **12**, 459.
 12. 이성, 권동진, 유진영, 정동호 (1995) 쑥 추출물의 항돌연변이 활성효과, 산업미생물학 회지 **24**, 105.
 13. 구영조, 유진영, 박종현 (1992) 국산 식품소재의 장내미생물에 대한 영향분석 및 이를 이용한 기능성 식품 개발 (1차년도), 한국식품개발연구원.
 14. 구영조, 유진영, 박종현, 권동진 (1993) 국산 식품소재의 장내미생물에 대한 영향분석 및 이를 이용한 기능성 식품 개발 (2차년도), 한국식품개발연구원.
 15. 정병선, 이병구, 심선택, 이정근 (1989) 쑥씨 중의 정유성분이 미생물의 생육에 미치는 영향, 한국식문화학회지 **4**, 417.
 16. Mitsuoka, T. (1980) *A Color Atlas of Anaerobic Bacteria*, p. 320, Shobunsha, Japan
 17. Mitsuoka, T. (1980) *A Color Atlas of Anaerobic Bacteria*, pp.15-26, Shobunsha, Japan
 18. Hungate, R.E.(1969) A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Methods in Microbiol.* **3B**, 117.

Optimal Extracting Condition of Growth-inhibitory Component of Wormwood (*Artemisia princeps*) against *Clostridium perfringens*

Dong-Jin Kwon*, Jong-Hyun Park, Min Kwon¹, Jin-Young Yoo and Young-Jo Koo (*Food Biotechnology Division, KFRI, Sungnam 463-420, Korea; ¹Alpine Agricultural Experiment Station, RDA, Pyongchang, 232-950, Korea*)

Abstract : To industrialize the foods using wormwood extract, the optimal extraction yield of growth-inhibitory component of wormwood (*Artemisia princeps*) against *Clostridium perfringens* *in vitro* was investigated at various conditions. The optimal extraction of wormwood was produced from the condition of 40°C, 4 hours and 100% ethanol (30 volume).

Key words : wormwood extract, *Clostridium perfringens*

*Corresponding author