

Schima wallichii sp. *liukiensis*로 부터 분리된 β -Sitosterol Glycoside 항균물질의 안정성 및 돌연변이원성

최명석* · 신 금 · 이동권¹ · 권오웅 · 손성호
임업연구원 임목육종부 생물공학과, ¹성균관대학교 약학대학

The Stability and Mutagenicity of β -Sitosterol Glycoside, Antimicrobial Compound from *Schima wallichii* sp. *liukiensis*

Choi Myung SUK*, Shin Keum, RHEE Dong KWON¹, Kwon Oh WOUNG, and Son Sung HO

Division of Biotechnology, Forestry Research Institute, Suwon 441-350, Korea; and

¹College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received August 31, 1999; accepted September 29, 1999)

Abstract—Stability of the β -sitosterol glycoside from *Schima wallichii* sp. *liukiensis* at various physical conditions were investigated, mutagenicity of the steroid saponin was determined by Ames test. When exposed in pH 3 to pH 8, the β -sitosterol glycoside was stable on antimicrobial activity against yeasts. The antimicrobial activity of the β -sitosterol glycoside also stable in high temperature, N₂, O₂ gas and light exposure, and metal ion. Ames test result revealed that β -sitosterol glycoside did not have any mutagenic activity. These results suggest that the β -sitosterol glycoside might be a promising candidate as a natural antimicrobial compound.

Keywords □ antimicrobial compounds, *Schima wallichii* sp. *liukiensis*, β -sitosterol glycoside, stability, mutagenicity

경제발달과 소비자들의 지적수준의 향상으로 식품이나 의약품 등의 안전성에 대한 관심이 날로 증대되고 있다. 특히 식품의 저염화, 저당화 추세로 말미암아 보존료의 첨가가 불가피한 실정이어서 인체에 안전한 보존제의 개발이 시급한 실정이다(Conner와 Beuchat, 1984). 식물은 오랫동안 식량, 의약품 원료 등으로 인류와 밀접한 관계로 이로부터 천연계 항균소재를 개발한다면 안전성과 기호도면에서 합성 항균제보다 효과적인 것이다. 식물로부터 항균소재가 개발되어 산업화된 예는 많지 않으나 자몽종자 추출물(조 등, 1992), 향신료 추출물(Shelef 등, 1980) 등이 현재 인기리에 시판되고 있다. 그러나 이런 천연계 항균소재는 항균력이 입증되었다 하더라도 온도, pH, 광 등 실제 적용에는 문제점이 많다.

항균성이 확인된 물질을 식품가공 또는 의약품 제조 등에 활용하기 위해서는 그들의 제조, 가공, 저장, 유통과정에서 활성을 유지할 수 있는 안정성을 지녀야 하며, 또한 모든 항균제들은 인체에 해를 미치지 않도록 안전성을 확보해야 한다. 그러나 우리나라에서 현재 외국으로부터 수입되는 식품첨가물은 외국에서 만들어진 안전성 자료와

FDA/WHO에서 행하여진 평가결과를 참고하여 법적인 규제를 가하고 있기 때문에 국내의 평가기준과 지침 등이 마련되어야 한다. 또한 국내에서 개발된 첨가물에 또한 안전성에 대한 검토가 제대로 실시되고 있지 않아 빠른 시일에 적합한 안전성 검토가 요구된다. 최 등(1999)은 인체에 무해한 항균소재 개발을 위한 연구의 일환으로 218종의 목본 식물로부터 효모 등에 강력한 항균활성을 가진 *Schima wallichii* sp. *liukiensis*라는 수종으로부터 steroid계 saponin을 분리하였다(Fig. 1). 이 수종은 수고 20 m 이상 자라는 차나무과(Theaceae) 상록활엽교목으로 일본 남부, 대만, 인도네시아 등지에서 자생하며 건축용재 등의 용도로만 이용되어 왔다. 이 수종 유래 항균 물질은 aglycon인 α -sitosterol에 D-glucose, D-galactose, L-rhamnose이 결합된 형태로 *Candida* 종에 대한 MIC 값이 40 μ g/ml로 천연보존제 용도로 시판중인 hinokitiol 등과 캔디다증 항생제인 nystatin에 비해 훨씬 강력하였다. 따라서 본 연구에서는 항균물질 β -sitosterol 배당체를 캔디다증 치료제와 같은 의약품, 식물병원균의 생육을 억제 또는 사멸시키는 생물농약, 식품, 사료, 농작물 등의 천연보존제 등 다양한 용도로 개발하기 위하여 pH, 열, 가스, 광, 금속이온 등에 대한 안

*To whom correspondence should be addressed.

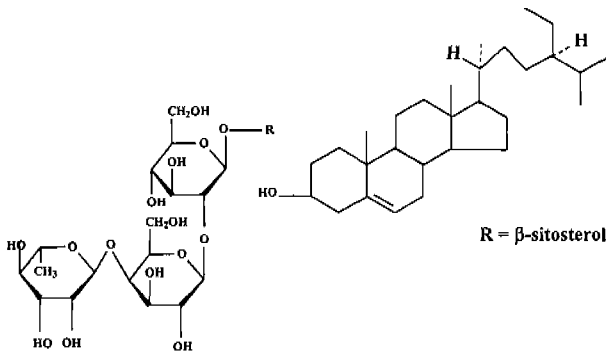


Fig. 1. Structure of antimicrobial compound, β -sitosterol glycoside derived from *Schima wallichii* sp. *liukuensis*.

정성 및 *Salmonella typhimurium* TA100을 이용한 돌연변이원성을 *in vitro*수준에서 검토하였다.

실험방법

실험재료, 기기, 시약

본 실험에 사용한 *Schima wallichii* sp. *liukuensis*의 줄기와 잎은 충남 태안군 소재 천리포 수목원에서 채취하였다. 박층크로마토그래피는 pre-coated TLC plate silica gel 60F₂₅₄(Merck, Art. 5554)와 preparative 액체크로마토그래피는 Waters Delta 4000 system을, 그 외 유기용매는 Sigma사의 특급시약을, 미생물 배양용 yeast peptone dextrose(YPD) 배지는 Merck사의 특급시약을 사용하였다.

항균물질의 추출 및 분리

Schima wallichii sp. *liukuensis* 항균물질 β -sitosterol 배당체의 추출 및 정제는 최 등(1999)의 방법으로 행하였다. 시료 1.3 kg을 70%(v/v) ethanol용액에서 추출한 후 *n*-hexane과 chloroform, ethyl acetate로 수세하고, 물층 분획을 *n*-buthanol과 partitioning하여 마지막으로 *n*-buthanol 분획을 얻었다. *buthanol* 분획물을 silica gel 60(particle size 0.040~0.063 mm)이 packing된 column(3.6×40 cm)에 *buthanol*:glacial acetic acid: water(5:1:4)의 혼합용매로 용출하여 항균 활성 분획을 얻은 후, preparative HPLC로 백색의 순수 물질을 얻었다.

항균물질 β -sitosterol 배당체의 활성 측정을 위해 사용된 균주는 항균력이 가장 높았던 *Candida* 종(*Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*)를 KIST 생명공학연구소 유전자원센터로부터 분양 받아 사용하였다. 사용된 배지는 YPD 배지를 사용하였으며, 사용한 모든 시약은 특급을 사용하였다. 항균 활성 검정은 Zaika(1988)의 방법을 응용한 한천배지 확산법(disc-agar plate diffusion method)으로 측정하였으며, 모든 실험은 3번 반복 이상 행하고 결과는 평균하여 나타내었다.

안정성검사

β -sitosterol 배당체의 pH, 열, 가스, 광, 금속이온 등에 대한 안정성을 검토하기 위해 각 조건별로 반응시킨 후 항균활성의 변화를 측정하였다. pH 변화에 대한 경우는 pH 별 용매를 만들어 동량의 시료를 가하여 25°C에서 4시간 방치한 후 항균활성을 측정하였다. 광선에 대한 영향은 시료용액을 25°C의 암소와 백열등(110 V, 30 w)조건하에서, 가스에 의한 영향은 N₂ gas로 공기를 치환한 후 밀봉한 경우와 100 ml culture flask에 30 ml의 시료용액을 넣고 N₂ gas처리를 하지 않는 상태에서 진탕시킨 후 항균활성을 측정하였다. 온도에 대한 영향은 4, 25, 40, 70, 100°C에서, 금속 이온에 대한 영향은 1.0×10⁻²M 농도의 각종 이온 용액(NaCl, KCl, CaCl₂, FeCl₃, MgCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, CuCl₂)을 각각 1.0%가 되도록 첨가하였다. 이상의 안전성 측정을 위한 반응조건은 특별한 언급이 없는 한 25°C 암소조건에서 모두 10일간씩 보관하면서 24시간 간격으로 항균활성 변화를 측정하였다.

돌연변이원성 조사

돌연변이원성 시험은 *Salmonella typhimurium* TA100 균주에 대해 Maron과 Ames(1983)의 방법을 약간 변형하여 행하였다. 변이원성의 판정에는 부가된 소량의 histidine에 의하여 세균의 집락이 존재하는지 확인하고 colony 수를 세었다. 변이원성 물질 대조군으로는 S-9 mix 없이 sodium azide를, S-9 mix 존재하에 2-aminofluorene을 사용하였다. 시험물질의 농도가 증가함에 따라 시험균주의 콜로니 수가 일정하게 증가하는지를 살펴보고, 전과정을 3번 반복하여 실시하였다. 시험물질의 농도는 1.6, 8, 40, 200, 1000, 5000 μ g으로 하였다.

실험결과

항균물질 β -sitosterol 배당체의 안정성

분리된 β -sitosterol 배당체의 pH 변화에 대한 항균력을 조사하기 위하여 pH를 3-10까지 조절한 후 MIC 농도인 40 μ g/ml로 첨가하여 24시간 후의 *Candida*의 생육 정도를 조사하였다. 그 결과 pH 3-8 사이에서는 항균활성의 변화가 없었고, 산에서 안정성이 매우 좋았으며, 중성 및 약알칼리 영역에서도 비교적 높은 항균력을 유지하였다. 가장 높은 항균력을 나타낸 처리구는 pH 6이었다(Fig. 2). 일반적으로 세균은 pH 6-7 부근에서 최적 생육 pH를 나타내는데, 대부분 항균소재들은 pH를 낮게 조절함으로써 세균의 생육을 억제할 수 있다(Fabian and Graham, 1953). 그래서 식품에 첨가되는 항균소재들은 대부분 산미제로 마요네즈, 소스류, 초밥 등에 첨가되는 식초가 그 대표적인 예이다. 이에 비해 β -sitosterol 배당체는 산과 알칼리에 비교적 넓은 pH 항균 spectrum을 보이는 것으로 나타나기

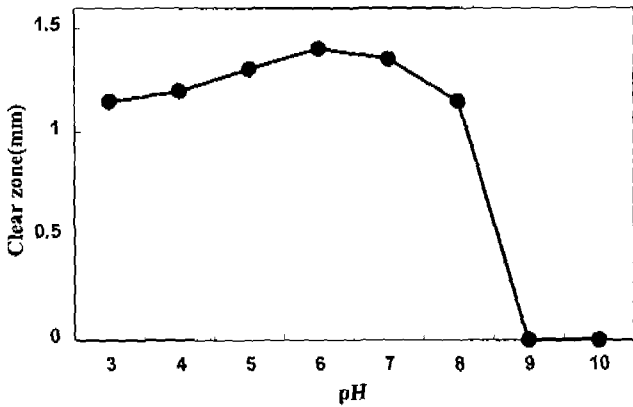


Fig. 2. Effects of pH on antimicrobial activity against yeast by β -sitosterol glycoside.

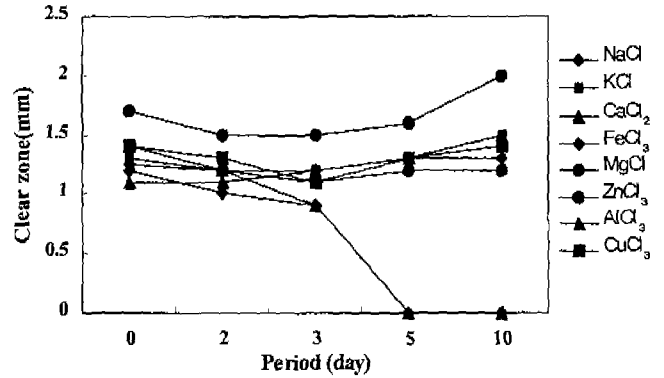


Fig. 4. Effects of various ions on antimicrobial activity against yeast by β -sitosterol glycoside.

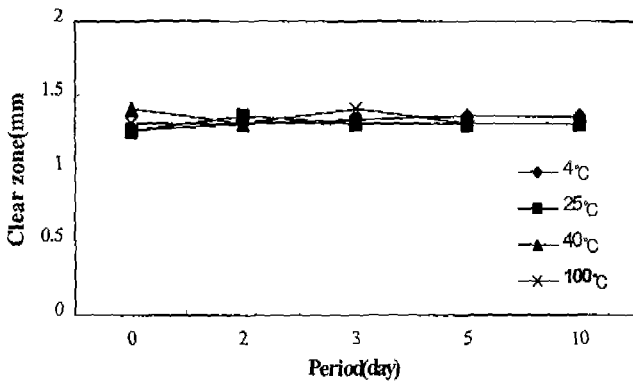


Fig. 3. Effects of temperature on antimicrobial activity against yeast by β -sitosterol glycoside.

존의 합성보존제와는 다른 기전을 갖고 있을 뿐만 아니라 본래 식품의 맛과 성상 등이 변화하지 않는다는 장점이 있어 이용도가 넓을 것으로 기대된다.

β -sitosterol 배당체를 MIC 농도로 하여 4, 25, 40, 70, 100°C에서 각각 1시간 동안 열처리한 후 *Candida*의 생육 정도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 그 결과 β -sitosterol 배당체는 온도에 관계없이 모든 처리군에서 항균 활성을 보여 β -sitosterol 배당체는 열에 매우 안정한 물질로 판명되었다. 최 등(1997)은 솔잎의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균물질이 고온에서 항균활성이 저하된다고 보고하였다. 식품을 부패시키는 미생물의 대부분은 최적생육온도가 20~30°C인 저온성 세균(psychrotrophes)과 35~40°C인 중온성 세균(mesophiles)이며, 최저 생육온도를 비교하면 저온성 세균은 -5~+5°C, 중온성 세균은 10~15°C으로 알려져 있다. 식품의 효과적인 보존을 위해서는 5°C 이하에서 행하는 것이 좋지만 유통과정이나 소비자의 편의성 때문에 5°C 이하의 보관이 힘들어서 보존제의 첨가가 거의 필수적이다(Scott, 1988). β -sitosterol 배당체는 온도에 매우 안정한 것으로 나타나 냉장 및 냉동용 식품, 또는 가열 멸균

식품 등 식품첨가물 등에 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

Fig. 4는 8종의 금속이온이 β -sitosterol 배당체의 항균활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. NaCl, KCl, CaCl₂, FeCl₃, MgCl₂, AlCl₃, CuCl₂ 이온에 대해서는 항균활성에 별다른 변화를 나타내지 않았으나, Zn 이온의 첨가 시에는 오히려 항균활성이 높아졌다. Fe 이온의 경우 3일 경과 후부터 활성이 급격히 떨어져 5일째부터는 활성을 잃었다. 또 Al 이온의 경우에도 Fe 이온의 경우와 마찬가지로 3일 경과 후부터 활성이 급격히 떨어져 5일째부터는 활성을 잃었다. Fe와 Al 이온의 경우 1일 경과 후부터 희뿌연 혼탁 현상이 나타났다. 이로 미루어 보아 β -sitosterol 배당체의 사용은 Fe와 Al 이온이 존재하지 않는 용기의 사용과 가공공정 중 이들이 제거된 식품에 이용하면 좋은 효과를 기대할 수 있을 것이다.

항균물질 β -sitosterol 배당체는 N₂ gas로 공기를 치환했을 경우나 공기중에 정지한 경우 모두 유사한 활성을 나타냈다(Fig. 5). 이로 미루어 β -sitosterol 배당체는 장기간 공기 중에 노출되는 식품 등에도 응용될 수 있을 것으로 보인다.

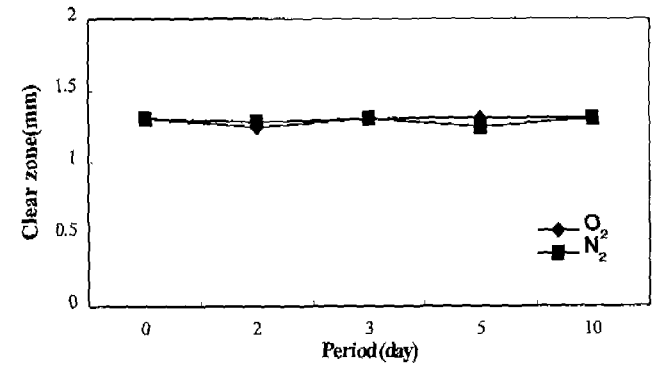


Fig. 5. Effects of gas on antimicrobial activity against yeast by β -sitosterol glycoside.

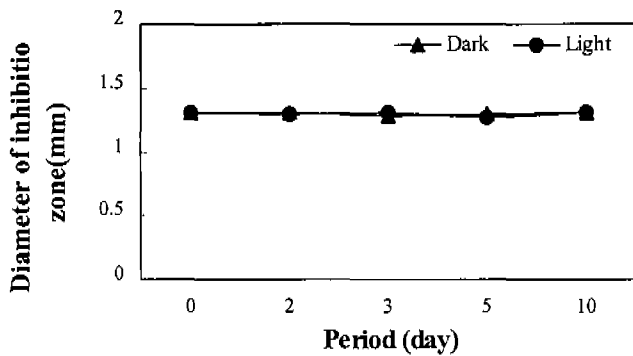


Fig. 6. Effects of light exposure on antimicrobial activity against yeast by β -sitosterol glycoside.

항균물질 β -sitosterol 배당체는 암소에서나 백열등 조사 시에도 항균활성 변화를 나타내지 않았다(Fig. 6). 이 결과는 식품첨가물로 이용되거나 각종 의약품 등에 처리되었을 때 유통과정 중에 일어나는 광노출에 따른 항균력 감소 등의 문제점을 극복할 수 있을 것이다.

합성보존제는 대부분 pH, 열, 가스, 광, 금속이온 등에 매우 안정적이다. 천연항균물질은 합성보존제와 같이 안정적인 효과를 얻기 어려운 것과 그 특유의 맛과 냄새 때문에 유효한 첨가량을 사용할 수 없는 것도 있다. 항균물질 β -sitosterol 배당체는 이상의 결과와 같이 물리적인 환경에 매우 안정한 것으로 나타났다. 온도, 광, pH, 금속이온 등 물리적인 환경요인은 본 제품생산과 유통과정에서 매우 중요하다. 살균을 위해 열처리를 하거나 각종 첨가물 등에 의한 pH 변화, 금속이온과의 반응 등은 제품의 성패를 좌우하는 중요한 인자이다. 적절한 첨가물의 선택 즉 성상을 변화시키지 않으면서 보존력을 증가시킬 수 있는 소재의 선택은 매우 중요하다. *Schima*로부터 분리된 항균물질 β -sitosterol 배당체는 이러한 물리적인 환경요인에 매우 안정한 특성을 보여 각종 항균소재로의 개발이 기대된다.

돌연변이원성 검정

식물 유래 유용성분은 돌연변이 유발을 억제한다고 알려져 있는데, 차나무, 채소 등에 존재하는 항돌연변이 물질로는 비타민 C, β -carotene, cysteine, polyphenols, peroxidase 등이 알려져 있다(Shinohara 등, 1988). 본 연구에서는 차나무과 수종인 *Schima wallichii* sp. *liukiensis* 항균물질 β -sitosterol에 대해 Maron 및 Ames의 방법으로 *Salmonella typhimurium* TA 100에 대한 돌연변이 유발 여부를 조사하였다. 그 결과 200 μ g/plate까지의 농도에서 revertant colony 수가 감소하여 변이원성은 인정되지 않았다(Table I). 이때 시험물질을 첨가하지 않은 대조군에서는 plate당 revertant의 평균 콜로니수는 20개였다. 농도가 증가할수록 revertant의 수가 감소한 것은 β -sitosterol이 *Salmonella typhimurium* TA 100에 대한 항균활성을 나타냈

Table I. Mutagenicity of β -sitosterol glycoside on *Salmonella typhimurium*

Concentration of β -sitosterol glycoside (μ g/plate)	Number of Revertants
5000	0
1000	3
200	5
40	8
8	6
1.6	11
0	20

기 때문일 것으로 사료된다. 따라서 정확한 유효농도를 정할 수는 없지만 변이원을 일으키지는 않는다고 할 수 있다. 한편, 최근 관심이 높은 자몽종자 추출물로 상품화된 DF-100의 경우 plate 당 40-60 μ 의 농도에서 유효성이 입증된 바 있으며, 최근 FDA로부터 승인을 받아 최근 식품첨가물 등으로 이용되고 있다(조 등, 1992). Ito 등(1987)은 aflatoxin B1에 의해 유발된 돌연변이에 대하여 녹차열탕추출물에 의한 돌연변이 억제효과를 검토한 결과, 녹차추출 건조분말을 180~400 mg/kg 씩 흰쥐에 투여했을 때 우수한 억제효과를 나타내었다고 하였으며, Inoue(1981) 및 Kada 등(1985)은 녹차에 함유된 bio-antimutagen 활성물질을 검색하기 위해 고초균(*Bacillus subtilis*)의 돌연변이주를 이용하는 rec-assay법에 의하면 EGCG(epigallocatechin gallate) 농도가 증가할수록 활성도 높아지는 것으로 나타나 녹차의 bio-antimutagen은 EGCG에 의한 것이라고 보고하였다. 향후 연구는 β -sitosterol 배당체의 정확한 유효농도를 정하기 위해 spore-rec assay나 chromotest 등 항균작용의 영향을 덜 받는 방법으로서의 연구가 필요할 것으로 보이며, 실험동물을 이용한 급성검사, 아급성, 만성 검사 등 일련의 안전성 검사도 행해져야 할 것이다.

결 론

차나무과 식물인 *Schima wallichii* sp. *liukiensis*로부터 분리된 항균 물질 β -sitosterol의 안정성과 안전성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. pH의 영향을 검토한 결과 pH 3-8 사이에서 높은 항균력을 나타내어 β -sitosterol은 비교적 넓은 항균 spectrum을 가지고 있음이 판명되었고, 온도, N₂ gas, 광노출 및 Fe와 Al 이온 등을 제외한 다른 금속 이온에도 항균활성의 안정성을 나타내었다.

2. *Salmonella typhimurium* TA 100에 대한 β -sitosterol 배당체의 돌연변이원성을 조사한 결과 β -sitosterol 배당체 200 μ g/plate까지의 농도에서는 revertant 수가 감소하였지만, 변이원성은 인정되지 않았다. 이상과 같이 β -sitosterol

배당체는 여러 물리적인 환경에 대한 안정성과 돌연변이원성 연구에서도 안전성이 입증되어 새로운 항균제로의 가능성을 제시해 주었다.

참고문헌

- Conner, D. E. and Beuchat, L. R. (1984). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.* **49**, 429-433.
- 강정미, 차인호, 이영근, 류홍수. (1997). 어성초 휘발성 정유성분의 동정과 분획물의 항특성 및 항균활성. II. Prep HPLC에 의한 분획물의 항특성과 항균활성. *한국식품영양학회지* **26**(2), 214-221.
- 조성환, 정덕화, 서일원, 이현수, 황보혜, 박우근. (1992). Grape fruit 종자 추출물을 이용한 *Aspergillus parasiticus*의 생육 및 aflatoxin 생성억제효과. *한국식품위생학회지* **7**, 15-21.
- Shelef, L. A., Naglik, O. A. and Bogen, D.W. (1980). Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *J. Food Science* **45**, 1042-1049.
- 최명석, 신 금, 권오웅, 윤승로, 정문영, 송기훈, 안진권, 이위영, 손성호. (1999). 목본 식물로부터 항균수종 탐색. *산림과학논문집*. 인쇄중.
- 최명석, 신 금, 백기현, 손성호. (1999). *Schima wallichii* sp. *liukuensis*의 항균 효과 및 분리 정제. *한국식품영양과학회지*. 투고중.
- Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs; Their antimicrobial activity and it's determination. *J. Food Safety* **9**, 97-105.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.* **113**, 173-179.
- 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**, 212-217.
- 최무영, 최은정, 이 은, 임태진, 차배천, 박희준. (1997). 솔잎추출물의 항균성 검색. *한국미생물학회지* **25**(3), 293-297.
- Scott, V. N. (1988). Factors to be considered in establishing good manufacturing practices for the production of refrigerated foods. *Daily Food Sanitation* **8**, 288-294.
- Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., Kong, Z. L. and Hosoda, H. (1988). Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1396-1405.
- 伊柱義明, 柱江喜美子. (1987). 第 46回日本ガン學會總會(東京).
- Inoue, T., Monta, K. and Kada, T. (1981). *Agric. Biol. Chem.* **45**, 345-351.
- Kada, T., Kaneko, K., Matsuzaki, S. and Matsuzaki, T. (1985). *Mutation Research* **150**, 127-132.