

GA 0572-05058

최 종
연구보고서

과채류의 유통기간 연장을 위한 국내산 생약재로부터
천연 선도 유지제 개발

Development of natural preservatives from Korean medicinal
herbs for shelf-life extension of fruits and vegetables

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “과채류의 유통기간 연장을 위한 국내산 생약재로부터 천연 선도 유지제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 10월 14 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 도 정 룡

세부연구책임자 : 김 병 삼

연 구 원 : 이 명 기

연 구 원 : 조 진 호

연 구 원 : 김 영 명

연 구 원 : 임 상 동

연 구 원 : 허 인 숙

연 구 원 : 백 수 연

요 약 문

I. 제 목

과채류의 유통기간 연장을 위한 국내산 생약재로부터 천연 선도 유지제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

국내에서 생산되는 식물자원으로부터 과일 채소류의 부패에 관여하는 곰팡이와 부패세균에 효과가 있는 항균성 물질을 분리하고, 이들 항균성 성분을 이용하여 과실 채소류 등의 신선 농산물의 저장 유통기간을 연장할 수 있는 기술을 개발하고자 함.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

농산물의 수확 이후 소비자의 식탁에까지 전달되는 전 저장, 유통과정에서 발생하는 품질저하를 억제할 수 있는 기술 개발은 생산자와 소비자를 위해 계속적으로 해결해야할 영원한 숙제이다.

신선농산물의 경우 수확 후 장단기 보관을 위한 주요 기술로서는 현재 산지예냉, 저온저장, MAP, CA저장 등의 기술이 사용되고 있으며 이들 기술은 모두 대상 농산물 및 주위환경에 대한 온도, 습도, 가스 환경, 부패미생물의 생육제어를 위해 컨트롤이 되고 있다.

특히 저온저장중의 선도유지를 위해서는 온도 및 습도관리와 함께 에칠렌가스 등 유해가스의 제거 및 곰팡이 등 부패미생물의 생육억제가 노화와 선도저하를 억제하기 위한 주요 기술로서 단독 또는 복합적으로 혼용되고 있다.

신선농산물의 경우 수분함량이 65~95%로 높고 수확당시 오염된 부패미생물($10^3 \sim 10^6$ cfu/fw)과 저장고내의 과습한 조건(70~99%)에서 증식한 부패미생물에 의해 부패와 함께 상품성이 감소하게 된다.

저장고내의 부패 억제를 위해서는 오존, 염소계 화합물, 자외선, 전자파, 훈증제, 산화티타늄 광촉매 등 여러 가지 기술이 채용되고 있다. 한편, 수확 후에도 농산물의

경우 호흡작용과 2차분해에 의한 에틸렌 가스, 아세트알데하이드, 유화가스등 휘발성 유기화합물(VOCs)등에 의한 노화와 품질저하는 지속되게 된다. 최근 저장고 내 탈취, 유해가스 분해를 위해서는 광촉매나 오존가스, 과망간산칼륨 등을 이용하여 행하고 있으나 시설비와 운영효율측면에서 제한성이 있어 농업현장에 적용되는 데는 제약이 따르고 있다.

신선농산물의 경우 0℃부근에 저장하게 되나 증산작용, 호흡작용과 함께 창고 내 증발기와의 온도차(ΔT)에 의해 탈습에 의한 감모손실이 크며 이를 억제하기 위해 초음파, 원심 식 가습 등 여러 가습 방법이 채용되고 있다. 그러나 현재 채용되고 있는 가습 방법은 수입자가 커서 농산물 표면에 결로를 유발시키게 되어 품목과 저장온도에 따른 제한성이 크다. 아울러 농산물 표면의 과습 현상은 2차적으로 곰팡이 등 농산물에 부착된 부패미생물의 생육을 촉진시켜 2차적인 품질저하를 가져온다.

한편 최근에 식품으로 사용이 허가된 천연 식물자원 중에는 부패 미생물의 생육 억제 및 살균효과가 있는 성분을 함유하고 있어, 이들 성분의 항균효과에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 지금 까지 보고 된 항균 활성 천연물은 매우 다양하며 항균 활성도 적용하는 식품에 따라 다르게 나타났으며, 이는 부패에 관련하는 미생물이 식품에 따라 매우 다양하기 때문으로 사료된다. 앞으로 개발할 무독성의 천연 보존료 이용기술과 온도 조절, 오존 살균 방안을 혼용하면 국내산 농산물의 감모율을 현저히 감소시킬 수 있으리라 기대된다.

한편 기존 천연 보존료는 일부 제한된 식품에 적용됨으로서 신선 농산물에 사용하기가 힘들었다. 따라서 신선 농산물의 유통기간을 연장할 수 있는 천연 보존료의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 천연 식물자원으로부터 보존 효과가 있는 천연 보존제를 제조하여 신선 농산물의 유통기간을 연장 할 수 있는 기술을 개발하고자 한다.

< 항균 효과를 나타내는 식물자원 >

식물자원	주요성분	비 고
황련	Berberin-C1	열에 안정, 알칼리성 조건에서 항균활성 증대
포공영	클로로포름 추출물	세균에 비해 효모에는 항균력 약함
오미자	succinic acid, malic acid, acetic acid	에탄올 추출물의 항균활성이 우수함 김치 보존 효과, 수삼 보존 효과
마늘, 황기, 황금, 백강잠, 냉이잎, 달래뿌리, 길경, 도라지		장류 보존 효과
동백꽃씨		빵 보존 효과
오배자, 적포도과 피	폴리페놀 희분	그람 음성, 양성 세균에 대한 항균효과
녹차	물 추출물, 에탄올 추출물	물 추출물 1.5%, 에탄올 추출물 1.0%에서 식중독 세균 사멸. 세포벽과 원형질막 손상에 의함
자소 잎	에탄올 추출물	식중독 세균과 부패 곰팡이에 대한 항균효과
산초, 초피잎	에탄올 추출물	에칠아세테이트, 클로르포름 희분이 항균효과가 매우 우수함.
국화	에탄올 추출물	전통 민속주에 대해 항균효과

나. 경제·산업적 측면

우리나라의 경우, 신선 농산물의 수확 후 손실률은 품목에 따라서 차이가 있으나 대체로 20~50%에 이르고 있는 것으로 보고 되고 있다. 특히 외국 농산물의 수입개방에 따라 품질경쟁력 측면에서 신선농산물까지 위협을 받고 있고 신선농산물의 수출에 있어서는 선도유지관리의 미흡으로 외국시장에서의 폐기 및 제값을 못 받는 사례가 많다. 신선 농산물의 품질관리는 수확 후부터 소비자에 들어가기까지의 전 단계에 대하여 온도, 습도, 가스 환경, 미생물의 생육제어 등이 종합적으로 이루어져야만 소정의 목적을 달성할 수가 있다. 따라서 향후 미생물의 생육억제 효과가 있는 천연 보존료의 개발 필요성은 계속 증대할 것으로 사료된다.

다. 사회문화적 측면

국민소득의 증가에 따른 소비자의 고품질농산물 선호, 외국농산물의 수입에 따른 소비자의 선택폭의 증가, 건강지향성에 따른 안전농산물의 수요 증가로 신선농산물에 대한 품질관리는 그 요구도가 커질 것이다. 특히 최근 수입농산물에 대한 농약 오염 문제와 함께 국내 생산농산물에 대해서도 농약문제가 자주 대두되는데 선도유지를 위해 저장고의 살균 시 농약류의 살충제 처리나 크레졸 등 부적합한 살균제의 처리로 유통에 문제를 안고 있다. 농산물 자체의 계절성 때문에 일정기간 저장되어야 할 필요성은 피할 수 없으며 우리나라의 경우는 수확 후 농약처리나 합성 보존료에 의한 선도유지는 소비자의 호응을 받기 어려우므로 천연 보존료에 의한 선도관리가 바람직한 것으로 사료되어지며 시장성이 클 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 천연 식물자원 유래의 향 곰팡이제 개발

- 가. 향 곰팡이 성분의 추출방법 개발
- 나. 향 곰팡이 성분의 분리 정제
- 다. 향 곰팡이 성분의 이화학적 특성 규명
- 라. 향 곰팡이 성분이 농산물의 부패에 미치는 효과 조사
- 마. 향 곰팡이 성분의 적용 방법 개발

2. 천연 식물자원 유래의 향 진균제 개발

- 가. 천연 향균 성분의 추출방법 개발
- 나. 천연 향균 성분의 분리 정제
- 다. 천연 향균 성분의 이화학적 특성 규명
- 라. 천연 향균 성분의 농산물의 부패에 미치는 효과 조사
- 마. 천연 향균 성분의 적용 방법 개발

3. 신선 농산물에 대한 저장 유통기간 연장 효과 조사

- 가. 과일류(감귤, 딸기, 사과 등)에 대한 유통기간 연장 효과
- 나. 채소류(부추, 상추, 애호박, 풋고추 등)에 대한 유통기간 연장 효과

다. 기타 농산물(마늘, 생강, 수삼 등)에 대한 유통기간 연장 효과

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발의 결과

가. 천연 식물자원을 이용하여 항 곰팡이 성분을 추출, 분리방법을 개발, 이화학적 특성을 규명으로 농산물 부패에 미치는 효과를 조사하여, 생약재의 천연 항 곰팡이 효과를 확인하였다.

나. 천연 식물자원을 이용하여 항 세균 성분을 추출, 분리방법을 개발, 이화학적 특성을 규명으로 농산물 부패에 미치는 효과를 조사하여, 생약재의 천연 항 세균 효과를 확인하였다.

다. 천연 생약재를 이용하여 보존성과 상품성을 가장 적정하게 유지하면서, 과일, 채소, 기타 농산물제품의 생리활성을 최소화하여 유통기간연장 효과를 위한 최적 조건을 본 연구를 통하여 확보하였다.

라. 본건 연구의 결과와 관련하여 식품과학회지에 “Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants”(FOOD SCI. BIOTECHNOL. Vol. 13, No. 5, 640-645 (2004)), “생약재의 항균, 항고혈압 및 활성”(KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 37, No. 2, 206-213 (2005)), “식품부패세균에 대한 가자(*Terminalia chebula* Retz.) 추출물의 항균활성”(KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 37, No. 3, 498-503 (2005)) 게재 3건과 식품영양과학회지에 “Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Ethanol Extracts of Medicinal (FOOD SCI. NUTR Vol. 10, 81-87 (2005)) 게재 1건을 하였다.

2. 활용에 대한 건의

가. 천연 식물자원을 더 연구하여 천연 식품 보존제를 개발해 식품의 보존성과 안전성을 높여 농산물의 저장 유통기간을 연장시킬 수 있을 뿐 아니라 향후 기회가 되면 합성 보존제를 대신하여 모든 식용제품에 사용될 수 있도록 추가 연구하고자 한다.

SUMMARY

I. TITLE

Development of natural preservatives from Korean medicinal herbs for shelf-life extension of fruits and vegetables.

II. OBJECT

Development of antimicrobials from Korean medicinal herbs for shelf-life extension of fruits and vegetables.

III. RESULT OF STUDY

1. The objective of this study was to determine the radical scavenging activity, total phenolic index, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration(MIC) of water extracts of 32 medicinal plant species that have been commonly used in medical herbs. The freeze dried weight per dried materials were showed above 30% for 4 extract: *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana*, *Cinnamomum cassia* and *Cornus officinalis*. Total phenolic index and radical scavenging activity of *T. chebula* extract presented a highest value (585.87 mg/g, 38.15%), followed by *S. officinalis* (429.21 mg/g, 29.33%), *P. thumbergiana*(377.31 mg/g) and *R. coreanus miquel*(316.23 mg/g, 26.77%). The extracts from *T. chebula*, *R. coreanus muquel*, *C. sappan*, *E. aromaticum*, *S. officinalis* and *C. japonica* possessed outstanding antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. MIC was determined on those extracts that showed high efficacy against the test organisms. The efficiency of MIC value of *T. chebula* extract against *B. subtilis*, *S. aurusa*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* was 7.8, 31.2, 15.6 and 7.8 ug/mL, respectively. In addition, the total phenolic content and radical scavenging activity very closely correlated for the set of all samples($p < 0.01$, $r = 0.85$). The correlation coefficient between total phenolic index

and antimicrobial activity was of 0.89(*E. coli*), 0.79(*B. subtilis*), 0.78 (*S. aureus*), 0.85 (*L. plantarum*), 0.85(*P. aeruginosa*) and 0.25(*S. typhimurium*) (all $p < 0.05$).

2. The objective of this study was to determine the radical scavenging activity, total phenolic content, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) of ethanol extracts of 32 medical plant species that have been commonly used in medicinal plants. Total phenolic index of *T. chebula* exhibited the highest value (498.01 mg/g), followed by *R. coreanus miquel* (400.33 mg/g), *Sanguisorba officinalis* (368.25 mg/g), *P. thumbergiana* (259.74 mg/g) and *Eugenia aromaticum* (229.38 mg/g). Radical scavenging activity for the DPPH radical was highest in *T. chebula* (40.91%, $p < 0.01$), followed by *C. sappan* (36.50%), *S. officinalis* (32.92%), *R. coreanus miquel* (26.54%) and *P. thumbergiana* (24.50%). The extracts from *T. chebula*, *R. coreanus muquel*, *C. sappan*, *E. aromaticum*, *S. officinalis* and *C. japonica* possessed outstanding antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. MIC was determined on those extracts that showed high efficacy against the test organisms. The most potent MIC values were seen for *T. chebula* extract against *P. aeruginosa*, *S. aurusa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *L. plantarum* and *S. Typhimurium* at 7.8, 7.8, 15.6, 7.8, 125 and 31.2 μ g/mL, respectively. Furthermore, the total phenolic content and radical scavenging activity were very closely correlated for all samples ($r=0.78$). The coefficient correlation between total phenolic index and antimicrobial activity was 0.91 (*E. coli*), 0.91 (*B. subtilis*), 0.79 (*P. aeruginosa*), 0.79 (*S. Typhimurium*) and 0.70 (*L. plantarum*).

3. Antibacterial, antifungal, anticancer and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of water and 70% ethanol extracts of 32 medicinal herbs species were investigated. *Terminalia chebula* extracts showed strong antibacterial activities. Ethanol extract of *Cinnamomum cassia* showed good antifungal activity. ACE inhibitory activities of *P. corylifolia* water extract and Fraction I of *P.*

corylifolia water extract was 65.2 and 81.8%, respectively.

Cytotoxicity of ethanol precipitate fraction obtained from water extract of *Eugenia caryophyllata* was highest.

4. This study was to investigate antibacterial activities of water and 70% ethanol extract from *Terminalia chebula* Retz. The fractions were prepared by step-wise fractionation of water and 70% ethanol extracts using acetone, hexane, chloroform and butanol. The butanol fraction showed the best antibacterial activities against the using strain. Water and 70% ethanol extract from *Terminalia chebula* Retz. had significantly high pyrogallol content among the 13 kinds of phenolic compound analysed by HPLC, and pyrogallol(standard) showed the highest activities against several food spoilage microorganism.

CONTENTS

I . Synopsis of the study	
1 . Object of study	17
2. Necessity and Scope of Study	17
1) Necessity of Study	17
2) Scope of Study	20
II. Statements of technical development in local and foreign country	
1. Situation and place of results for technical development in local and foreign country	22
1) In local	22
2) In foreign country	24
III. Performed research and results	
1. Performed method	26
1) Materials	26
2) Medicinal herb Extracts	26
3) Strains & medium	26
4) Antibacterial & antifungal activities	29
5) Antibacterial and antifungal effects of medicinal herb extracts on various concentration	30
6) Yields for time and temperature of medicinal herb extractions	30
7) Various enzyme used hydrolysis of medicinal herbs	31
8) Fractionation procedure for the water and ethanol extracts of <i>Terminalia chebula</i>	31
9) Total polyphenol compounds by colorimetry	31
10) Quantitative analysis of polyphenol by HPLC	31
(1) Pretreat of samples	31
(2) Chemicals	31
(3) Polyphenols contents using HPLC	32
11) Polyphenol Analyses	32

12) Experimentation of fruits and vegetables	34
(1) Recipe of fruits and vegetables	34
(2) Total cell and fungal count	35
2. Contents and results	36
1) Development of antibacterial from nature plants	36
(1) Medicinal herb Extract yields	36
(2) Antibacterial activity	38
i . Antibacterial effects of water extract of medicinal herbs	
on various concentration	42
ii. Antibacterial effects of 70% Ethanol extract of medicinal herbs	
on various concentration	47
(3) Antifungal activity	52
i . Antifungal effects of water and 70% Ethanol extract of medicinal	
herbs on various concentration	55
2) Development of antibacterial quality and recipe from nature plants	57
(1) Fractionation procedure for the water and ethanol extracts	
of <i>Terminalia chebula</i>	57
(2) Antibacterial effect of separated fraction from <i>Terminalia chebula</i> ..	58
(3) Antibacterial effect of butanol fraction	59
(4) Antibacterial effect of various polyphenols	60
(5) Antibacterial effect of phenolic compounds	61
(6) Total polyphenol compounds by colorimetry	63
(7) The correlation between total polyphenol compound and	
antimicrobial activity	65
(8) Quantitative analysis of polyphenol by HPLC	69
(9) Antibacterial and antifungal ingredients	76
i . Preliminary experiment of fruits and vegetables	76
ii. Change of total microbial count during storage	77
i) Apple	77
ii) Orange	78
iii) Tomato	80
iv) Leek	82
v) Green pepper	84
vi) Green pumpkin	86

3) Effect of storage term for fresh agricultural products	88
(1) Development of antimicrobials recipe process from fresh agricultural products	88
i . Condition establishment of nature preservative	88
ii. Storage experiment of fruits and vegetables	90
i) Change that fruits and vegetables treat medicinal herb extract during storage	90
(i) Orange	91
(ii) Fresh ginseng	93
(iii) Lettuce	95
(iv) Ginger	97
(v) Garlic	99
IV. Achievement and Contribution to the Related Fields	
1. Goal of study	102
2. Achievement	103
3. Contribution to the related fields	104
V. Utilization Plan of the Outcome	
1. Necessity of study addition	105
1) Technical	105
2) Economy and industry	106
2. Application of different study	107
VI. Acquisition of foreign scientific informations during this research	
1. Medicinal herbs for antibacterial activities	108
2. Food preservative	122
VII. References	149
※ Appendix	157

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	17
제 1 절	연구개발의 목적	17
제 2 절	연구개발의 필요성 및 범위 등을 기술	17
1.	연구개발의 필요성	17
2.	연구개발의 범위	20
제 2 장	국내외 기술개발 현황	22
제 1 절	국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술	22
1.	국내	22
2.	국외	24
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	26
제 1 절	연구개발 과제의 연구 수행 방법	26
1.	재료	26
2.	생약재의 추출	26
3.	사용균주 및 배지	26
4.	항균 및 항 곰팡이 활성 측정	29
5.	생약재 추출물의 농도별 항균 및 항 곰팡이 효과	30
6.	생약재의 추출 시간 및 온도에 따른 수율	30
7.	여러 가지 효소를 이용한 생약재의 가수분해	31
8.	<i>Terminalia chebula</i> 의 극성차에 따른 용매 분획	31
9.	비색법에 의한 총 폴리페놀 함량 조사	31
10.	HPLC에 의한 폴리페놀 정량실험	31
가.	시료 전 처리	31
나.	Chemicals	31
다.	HPLC에 의한 폴리페놀 함량 분석	32
11.	Polyphenol Analyses	32
12.	과채류의 저장 실험	34
가.	과채류의 시료 처리	34

나. 총균 및 총곰팡이 수 측정	35
제 2 절 연구개발 과제의 연구 수행 내용 및 결과	36
1. 천연 식물자원 유래의 항균제 개발	36
가. 생약재 추출 수율	36
나. 항균활성	38
1) 생약재 물 추출물의 농도별 항균 효과	42
2) 생약재 70% Ethanol 추출물의 농도별 항균 효과	47
다. 항 곰팡이 활성	52
1) 생약재 물 추출물과 70% Ethanol 추출물의 농도별 항균 효과	55
2. 천연 식물자원 유래의 항균제의 특성 규명 및 활용방안 개발	57
가. <i>Terminalia chebula</i> 의 극성차에 따른 용매 분획	57
나. <i>Terminalia chebula</i> 의 용매 분획물의 항균 활성	58
다. 부탄올 분획물의 항균 활성	59
라. 폴리페놀류의 항균 활성	60
마. Polyphenol의 항균 활성	61
바. 비색법에 의한 총 폴리페놀 함량 조사 결과	63
사. 폴리페놀 함량과 항균활성의 상관도 조사	65
아. HPLC에 의한 폴리페놀 성분의 정량 분석 결과	69
자. 항균 및 항 곰팡이 성분이 신선 농산물의 부패억제에 미치는 효과 검증	76
1) 과채류 예비 저장 실험	76
2) 저장기간에 따른 미생물수의 변화	77
가) 사과	77
나) 오렌지	78
다) 토마토	80
라) 부추	82
마) 고추	84
바) 호박	86
3. 신선 농산물에 대한 저장 유통기간 연장 효과조사	88
가. 신선 농산물에 대한 항균제의 처리 공정 개발	88
1) 천연선도유지제 조건 설정	88
2) 과채류의 저장 실험	90
가) 생약재추출물처리에 의한 과채류의 저장기간 동안의 변화	90
(1) 감귤	91
(2) 수삼	93

(3) 상추	95
(4) 생강	97
(5) 마늘	99
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	102
제 1 절 연도별 연구목표	102
제 2 절 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도	103
제 3 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술	104
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	105
제 1 절 추가연구의 필요성	105
1. 기술적 측면	105
2. 경제·산업적 측면	106
제 2 절 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술	107
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	108
제 1 절 항균성분을 가진 한약·생약	108
제 2 절 식품 보존제	122
제 7 장 참고문헌	149
※ 첨부자료	157

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 연구 목적

국내에서 생산되는 식물자원으로부터 과일 채소류의 부패에 관여하는 곰팡이와 부패세균에 효과가 있는 항균성 물질을 분리하고, 이들 항균성 성분을 이용하여 과일 채소류 등의 신선 농산물의 저장 유통기간을 연장할 수 있는 기술을 개발하고자 함.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위 등을 기술.

1. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

농산물의 수확 이후 소비자의 식탁에까지 전달되는 전 저장, 유통과정에서 발생하는 품질저하를 억제할 수 있는 기술 개발은 생산자와 소비자를 위해 계속적으로 해결해야할 영원한 숙제이다.

신선농산물의 경우 수확 후, 장·단기 보관을 위한 주요 기술로서는 현재 산지 예냉, 저온저장, MAP, CA저장 등의 기술이 사용되고 있으며 이들 기술은 모두 대상 농산물 및 주위환경에 대한 온도, 습도, 가스환경, 부패미생물의 생육제어를 위해 컨트롤이 되고 있다.

특히 저온저장중의 선도유지를 위해서는 온도 및 습도관리와 함께 에틸렌 가스 등 유해가스의 제거 및 곰팡이 등 부패미생물의 생육억제가 노화와 선도저하를 억제하기 위한 주요 기술로서 단독 또는 복합적으로 혼용되고 있다.

신선농산물의 경우 수분함량이 65~95%로 높고 수확당시 오염된 부패미생물($10^3 \sim 10^6$ cfu/fw)과 저장고내의 과습한 조건(70~99%)에서 증식한 부패미생물에 의해 부패와 함께 상품성이 감소하게 된다.

저장고내의 부패 억제를 위해서는 오존, 염소계 화합물, 자외선, 전자파, 훈증제, 산화티타늄 광촉매 등 여러 가지 기술이 채용되고 있다. 한편, 수확 후에도 농산물의 경우 호흡작용과 2차분해에 의한 에틸렌 가스, 아세트알데하이드, 유화가스등 휘발성

유기화합물(VOCs)등에 의한 노화와 품질저하는 지속되게 된다. 최근 저장고 내 탈취, 유해가스 분해를 위해서는 광촉매나 오존가스, 과망간산칼륨 등을 이용하여 행하고 있으나 시설비와 운영효율측면에서 제한성이 있어 농업현장에 적용되는 데는 제약이 따르고 있다.

신선농산물의 경우 0℃부근에 저장하게 되나 증산작용, 호흡작용과 함께 창고 내 증발기와의 온도차(ΔT)에 의해 탈습에 의한 감모 손실이 크며 이를 억제하기 위해 초음파, 원심식가습 등 여러 가습 방법이 채용되고 있다. 그러나 현재 채용되고 있는 가습 방법은 수입자가 커서 농산물 표면에 결로를 유발시키게 되어 품목과 저장온도에 따른 제한성이 크다. 아울러 농산물 표면의 과습 현상은 2차적으로 곰팡이 등 농산물에 부착된 부패미생물의 생육을 촉진시켜 2차적인 품질저하를 가져온다.

한편 최근에 식품으로 사용이 허가된 천연 식물자원 중에는 부패 미생물의 생육 억제 및 살균효과가 있는 성분을 함유하고 있어, 이들 성분의 항균효과에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 지금 까지 보고 된 항균 활성 천연물은 매우 다양하며 항균 활성도 적용하는 식품에 따라 다르게 나타났으며, 이는 부패에 관련하는 미생물이 식품에 따라 매우 다양하기 때문으로 사료된다. 앞으로 개발할 무독성의 천연 보존료 이용기술과 온도 조절, 오존 살균 방안을 혼용하면 국내산 농산물의 감모율을 현저히 감소시킬 수 있으리라 기대된다.

< 항균 효과를 나타내는 식물자원 >

식물자원	주요성분	비 고
황련	Berberin-C1	열에 안정, 알칼리성 조건에서 항균활성 증대
포공영	클로로포름 추출물	세균에 비해 효모에는 항균력 약함
오미자	succinic acid, malic acid, acetic acid	에탄올 추출물의 항균활성이 우수함 김치 보존 효과, 수삼 보존 효과
마늘, 황기, 황금, 백강잠, 냉이잎, 달래뿌리, 길경, 도라지		장류 보존 효과
동백꽃씨		빵 보존 효과
오배자, 적포도과피	폴리페놀 획분	그램 음성, 양성 세균에 대한 항균효과
녹차	물 추출물, 에탄올 추출물	물 추출물 1.5%, 에탄올 추출물 1.0%에서 식중독 세균 사멸. 세포벽과 원형질막 손상에 의함
자소 잎	에탄올 추출물	식중독 세균과 부패 곰팡이에 대한 항균효과
산초, 초피잎	에탄올 추출물	에칠아세테이트, 클로르포름 획분이 항균효과가 매우 우수함.
국화	에탄올 추출물	전통 민속주에 대해 항균효과

한편 기존 천연 보존료는 일부 제한된 식품에 적용됨으로서 신선 농산물에 사용하기가 힘들었다. 따라서 신선 농산물의 유통기간을 연장할 수 있는 천연 보존료의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 천연 식물자원으로부터 보존 효과가 있는 천연 보존제를 제조하여 신선 농산물의 유통기간을 연장 할 수 있는 기술을 개발하고자 한다.

2) 경제·산업적 측면

우리나라의 경우, 신선 농산물의 수확 후 손실률은 품목에 따라서 차이가 있으나 대체로 20~50%에 이르고 있는 것으로 보고 되고 있다. 특히 외국 농산물의 수입 개방에 따라 품질경쟁력 측면에서 신선농산물까지 위협을 받고 있고 신선농산물의 수출에 있어서는 선도유지관리의 미흡으로 외국시장에서의 폐기 및 제값을 못 받는 사례가 많다. 신선 농산물의 품질관리는 수확 후부터 소비자에 들어가기까지의 전 단계에 대하여 온도, 습도, 가스환경, 미생물의 생육제어 등이 종합적으로 이루어져야만 소정의 목적을 달성할 수가 있다. 따라서 향후 미생물의 생육억제 효과가 있는 천연 보존료의 개발 필요성은 계속 증대할 것으로 사료된다.

3) 사회문화적 측면

국민소득의 증가에 따른 소비자의 고품질농산물 선호, 외국농산물의 수입에 따른 소비자의 선택폭의 증가, 건강지향성에 따른 안전농산물의 수요 증가로 신선농산물에 대한 품질관리는 그 요구도가 커질 것이다. 특히 최근 수입농산물에 대한 농약 오염 문제와 함께 국내 생산농산물에 대해서도 농약문제가 자주 대두되는데 선도유지를 위해 저장고의 살균 시 농약류의 살충제 처리나 크레졸 등 부적합한 살균제의 처리로 유통에 문제를 안고 있다. 농산물 자체의 계절성 때문에 일정기간 저장되어야할 필요성은 피할 수 없으며 우리나라의 경우는 수확 후 농약처리나 합성 보존료에 의한 선도유지는 소비자의 호응을 받기 어려우므로 천연 보존료에 의한 선도관리가 바람직한 것으로 사료되어지며 시장성이 클 것으로 기대된다.

2. 연구개발의 범위

가. 천연 식물자원 유래의 향 곰팡이제 개발

- 1) 향 곰팡이 성분의 추출방법 개발
- 2) 향 곰팡이 성분의 분리 정제
- 3) 향 곰팡이 성분의 이화학적 특성 규명
- 4) 향 곰팡이 성분이 농산물의 부패에 미치는 효과 조사
- 5) 향 곰팡이 성분의 적용 방법 개발

나. 천연 식물자원 유래의 향 진균제 개발

- 1) 천연 항균 성분의 추출방법 개발
- 2) 천연 항균 성분의 분리 정제
- 3) 천연 항균 성분의 이화학적 특성 규명
- 4) 천연 항균 성분의 농산물의 부패에 미치는 효과 조사
- 5) 천연 항균 성분의 적용 방법 개발

다. 신선 농산물에 대한 저장 유통기간 연장 효과 조사

- 1) 과일류(감귤, 딸기, 사과 등)에 대한 유통기간 연장 효과
- 2) 채소류(부추, 상추, 애호박, 풋고추 등)에 대한 유통기간 연장 효과
- 3) 기타 농산물(마늘, 생강, 수삼 등)에 대한 유통기간 연장 효과

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

1. 국 내

국내에서 농산물을 신선한 상태로 저장 유통하기 위한 방안으로서 주로 온도 조절, 포장기법, 부패 미생물의 생육을 억제하는 방식이 주로 혼용되고 있다. 저장고 내 부패미생물 억제를 위해서는 훈증처리, 오존가스, 광촉매 등의 방법이 적용되고 있으나 만족스럽게 활용되지 못하고 있다. 최근 청과물의 표면 살균 처리 방안으로 오존을 처리하는 연구 보고가 있다. 부패미생물의 생육억제를 위해서 보존료가 사용되며, 과일 야채류의 저장을 위해서 Tetracycline류의 항생물질이 사용되어 왔다. 이와 같은 항생물질이 식품에 사용되었을 경우 인체에 이행되어 여러 가지 부정적인 영향을 줄 수 있어 제한이 많다. 따라서 식품보존에 사용될 물질로서 가능한 한 독성이 적고 사용 한계가 넓으며 인체에 이행되더라도 쉽게 분해가되며, 부작용이 적은 천연 보존제의 개발이 필요하다. 천연 보존료에 관한 연구로는 주로 가공식품에 관한 것으로서 우리가 평소에 상용하던 것들로부터 연구가 되어 왔다. 예를 들면, 김치 보존제, 장류 보존제, 수삼 보존제, 빵 보존제 그리고 주류 보존제 등이 있다. 그러나, 과일, 야채 등 신선 농산물의 보존제 개발에 관한 연구는 찾아보기 어렵다. 또한 마늘과 양파를 이용하여 항균작용을 조사한 것이 보고 되고 있고, 이 성분은 매운 맛 성분인 Allin에 기인된다 하였으며 이와 비슷한 functional group으로 sulfhydryl group을 가진 화합물을 찾으려 노력하여 왔다. 이와 같은 성분으로는 정향의 Eugenol, 백리향의 Thymol, 육계의 cinnaaldehyde가 알려져 있으며, 이 밖에 mustard oil, citronellal이 재료로서는 고추, 당근 즙과 씨, 박하, 수피, 편축, 초피, 회향유, 황금, 작약, 황백, 파, 시금치, 호박 등이 있다.

가. Development of Food Preservatives from Natural Resources.

A lactococcal strain was isolated from dairy source as a candidate for producing antimicrobial substances and deposited to KFCC. Lactococcal

isolate(KFCC 10790) was reclassified using API kit and morphology, and identified as *Lactococcus lactis* subsp. *latis*. Bacteriocin producing bacteria were isolated from groups of traditionally prepared Korean food such as winter kimchi, mul-kimchi, non-winter kimchi, Kakduki, Sikhae and farm milks. Culture conditions of *Lactococcus* sp. KFCC 10790, a bacteriocin producing strain, were studied for enhancing its production with regard to environmental and nutritional factors. Optimal composition of culture medium for bacteriocin production was determined. Antimicrobial activity of water or ethanol extracts from mountain edible herbs was investigated against food poisoning or foodborne disease organisms. Among them, ethanol extract of *Coptis chinensis* Franch showed the strongest antimicrobial activity. Also, silica gel column chromatography was used to isolate active antimicrobial compounds and eluted and concentrated by using benzene, dichromethane, ethylacetate, and ethanol-methanol-acetate-water(1:1:0.1:1) with step by step.

4. Development of Natural Food Preservatives from Agricultural Products.

This studies are intended to develop the new food preservatives from the natural product including medicinal plants, and agricultural wastes. This study was carried out to investigate characteristics during fermentation in radish kimchi and finally provided the ways of extending self-life. We have screened food preservatives from natural materials which have been known to nontoxic to our health, and searched antimicrobial activity in soy sauce to inhibit growth of harmful yeast that provide bad taste and flavor of soy sauce. Search and development of natural substances providing antimicrobial activity against causing fresh raw ginseng rotting were investigated.

2. 국 외

외국의 경우 CA 저장에 활성화되고 있고 부패미생물의 생육제어를 위해서는 수확 후 훈증처리, 자외선, 전자파, 광 축매, 염소 화합물 등이 활용되고 있고 유해가스나 노화억제를 위한 에틸렌가스를 제거하기 위해서는 상기에서 열거한 방법들이 혼용, 적용되고 있다. 최근들어서는 0℃이하에서의 습도조절방법, 빙온, 정온저장, 전자장, 광 축매, 오존, 그리고 저 에너지 저장시설 등 여러 가지 방법이 적용되고 있다. 그리고 외국에서는 수확 전에 인체에 독성이 없는 농약을 사용함으로써 부패를 억제하고 있다. 그러나 외국에서는 에틸렌가스 및 부패취의 제거, 곰팡이 등 유해미생물의 제어 목적에 천연 보존료를 활용한 사례는 찾아보기 힘들다.

가. Process for the production of ammonium dipropionate and its use in food preservatives

Process for the production of Propionic Acid, ammonium salt (2:1) and derived products, useful in the preservation of foods for human and animal consumption. The production of Propionic Acid, ammonium salt (2:1) is realized by means of a reaction of one mole of Ammonium Bicarbonate for every two moles of Propionic Acid, without use of solvent. Propionic Acid, ammonium salt (2:1) obtained this way, is formulated as a liquid or solid (on a carrier of high surface area).

나. Food preservative composition

This invention resides in a composition for treatment of meat, poultry, fruit and vegetables to maintain the color and to preserve same. The composition comprises as essential constituents between about 10 and 40% each of the following materials: (1) ascorbic acid and/or the sodium or potassium salts thereof; (2) citric acid and/or the sodium or potassium salts thereof; (3) sodium or potassium carbonate; and (4) sulfite, bisulfite or metabisulfite of sodium or potassium. These materials represent a synergistic combination which preserves the color and freshness of these products for a surprisingly long period of time.

다. Disposable, biodegradable air freshening device and food preservative

A disposable, biodegradable material for use as an air freshener in a closed container and/or for use in containers containing perishable food products which includes an elongated sheet having an upper face and a lower face which is composed of a cellulosic material present as a plurality of randomly intermeshed fibers. The elongated sheet contains a hygroscopic absorptive material attached thereto.

라. Food preservative compositions

Compositions and process are disclosed for treating freshly cut surfaces of edible plant parts by dipping the freshly cut parts in an aqueous solution containing edible ingredients which simultaneously protects the plant parts from degradation and coloration by oxidative, enzymatic, microbial and metal ion effects.

마. Food preservative compositions

Compositions and process are disclosed for treating freshly cut surfaces of edible plant parts by dipping the freshly cut parts in an aqueous solution containing edible ingredients which simultaneously protects the plant parts from degradation and coloration by oxidative, enzymatic, microbial and metal ion effects.

바. Food preservative and production thereof

Garlic essence is produced by extracting garlic with ethanol and deodorized with phytic acid, added either during or after the extracting step. The garlic essence exhibits outstanding antibacterial action when added to or sprayed onto foods. It is used alone or in combination with e-polylysine in the amount of 1-256 mg/ml.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 과제의 연구 수행 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 생약재는 190여종의 생약재에서 항균실험의 결과를 참고하여 선정하였다. 생약재의 구입은 금산약초시장에서 건조된 상태로 2003년 5월에 구입하여 사용하였다(Table 1.)

2. 생약재의 추출

본 실험에 사용한 생약재를 세절 및 분쇄하여 중량의 10배량의 증류수와 70% Ethanol를 가하여 환류냉각기가 장착된 추출기로 비등점에서 2시간 동안 추출하여 Whatman No 2 여과지로 여과한 후, 물 추출물은 Rotaty evaporator (Heidolph LABOROTA 4000, Germany)를 사용하여 감압 농축하였고, 70% Ethanol 추출물은 50℃에서 6시간동안 증탕하여 Ethanol을 완전히 제거한 후 동결건조하여 -4℃ 냉동고에 보관하면서, 실험 시 물 추출물은 증류수에 녹여 사용하였고, Ethanol추출물은 50% DMSO(M.I. Okeke 등 2001)에 녹여 실험에 사용하였다. 생약재의 추출수율은 Whatman No 2 여과지로 여과한 후, Refractometer (ATAGO, Digital Refractometer Japan)를 이용하여 Brix측정과 동결건조 후 중량을 달아 나타내었다.

3. 사용균주 및 배지

항균실험에 사용한 6가지 균주는 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Bacillus subtilis* ATCC 14593, *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522 균주로 BHI broth에 18hr~20hr 배양하여 BHI (brain heart infusion; Difco Laboratories) agar slant에 접종하여 24hr 배양한 후 냉장보관하면서 실험에 사용하였고, 이 외에 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 균주는 Tryptic soy배지에 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 균주는 MRS 배지에 배양한 후 실험에 사용하였다. 항곰팡이 실험에 사용한 5가지 균주는 *Aspergillus*

niger ATCC 62751, *Aspergillus oryzae* ATCC 16507, *Trichoderma reesei* ATCC 26921, *Penicillium rugulosum* IFO 4683 균주로 Potato dextrose broth (Difco Laboratories, detroit, USA)에 접종하여 72hr배양한 후 실험에 사용하였고, 이 외에 *Mucor miehei* KFRI 01011균주는 Malt extract broth배지에 배양한 후 실험에 사용하였다(Table 2).

Table 1. List of medicinal herbs used for antimicrobial experiments

Medicinal Herbs	Scientific name	Effective part
가시오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	Bark
가자	<i>Terminalia chebula</i>	Seeds
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Root
강황	<i>Curcuma longa</i>	Root
갈근	<i>Pueraria thumbergiana</i>	Root
맥문동	<i>Liriope plathyphylla</i>	Root
구기자	<i>Lycium chinense</i>	Seeds
계피	<i>Cinnamomum cassia</i>	Bark
당귀	<i>Angelica gigas</i>	Root
복분자	<i>Rubus coreanus miquel</i>	Fruit
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	Seeds
석곡	<i>Dendrobium nobile</i>	Body
소목	<i>Caesalpinia sappan</i>	Body
영지	<i>Shining Ganoderma</i>	Body
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	Seeds
오수유	<i>Evodia officinale</i>	Seeds
오약	<i>Lindera aggregata</i>	Root
육두구	<i>Myristica fragrans</i>	Root
애엽	<i>Artemisia asiatica</i>	Leaves
익지인	<i>Alpinia oxyphylla</i>	Root
작약	<i>Paeonia albiflora</i>	Root
정향	<i>Eugenia aromaticum</i>	Seeds
죽엽	<i>Phyllostachys nigra</i>	Leaves
진피	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	Fruit skin
지유	<i>Sanguisorba officinalis</i>	Root
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	Root
파고지	<i>Psoralea corylifolia</i>	Seeds
필발	<i>Piper longum</i>	Seeds
초두구	<i>Amomum globosum Loureiro</i>	Root
호장근	<i>polygonum aviculare</i>	Root
황련	<i>Coptis japonica</i>	Root
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	Root

Table 2. List of strains and media used for antimicrobial experiments

	Strains	Media
Bacteria	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682	BHI
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	BHI or Nutrient
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12692	BHI
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15522	BHI
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Tryptic soy
	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	MRS
Fungi	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 62751	Potato dextrose agar
	<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 16507	Potato dextrose agar
	<i>Mucor miehei</i> KFRI 01011	Malt extract agar
	<i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921	Potato dextrose agar
	<i>Penicillium rugulosum</i> IFO 4683	Potato dextrose agar

4. 항균 및 항곰팡이 활성 측정

항균 활성 검색에 사용한 균주는 slant 배지에 배양한 균주 1백금이를 각각 취하여 각각의 10ml 의 broth 배지에 접종하고, 37°C에서 18~24hr 배양하여 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각의 생육배지를 멸균하여 기층용 배지 (agar 1.5%)를 petridish에 분주하여 응고시키고, 각각의 균주를 1% 접종하여 잘 혼합한 증층용 배지(agar 0.75%)를 이에 분주하여 조제하였다. 평판배지에 올려 밀착 시킨 filter paper disc(Ø 8mm, Advantec, Toyo Roshi Co)에 생약재 10% 농도의 추출물을 20 μ l 접종하여, 37°C incubator에 36~48hr 동안 배양한 후 Paper disc agar diffusion법에 준하여 disc 주위의 clear zone 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다. 항 곰팡이 활성 검색에 사용한 균주는 각각의 broth배지에 72~84hr 배양한 균주를 2% 취하여 증층용 배지(agar 0.75%)에 잘 혼합한 후 미리 제조한 기층용 배지(agar 1.5%)에 분주하여 항 곰팡이 활성검색 배지를 조제하였다. 이에 항균활성 검색 방법과 같은 방법으로 평판배지에 밀착 시킨 filter

paper disc(\varnothing 8mm, Advantec, Toyo Roshi Co)에 생약재 10% 추출물을 $20\mu\text{l}$ 접종하여, 30°C incubator에 72~84hr 배양한 후 Paper disc agar diffusion법(Kim, M.S 2000)에 준하여 disc 주위의 clear zone 직경(mm)을 측정하여 항곰팡이 활성을 비교하였다.

5. 생약재 추출물의 농도별 항균 및 항곰팡이 효과

항균 및 항곰팡이 활성 실험에서 조제한 방법과 같은 방법으로 항균, 항곰팡이 활성 실험 배지를 조제한 후 예비 실험에서 선정된 생약재를 100mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml, 12.5mg/ml, 6.25mg/ml의 농도로 조제한 후 평판배지에 밀착시킨 filter paper disc(\varnothing 8mm, Advantec, Toyo Roshi Co)에 각각 $20\mu\text{l}$ 씩 접종하여, 항균활성은 37°C incubator에 36~48hr 동안 배양한 후 Paper disc agar diffusion법에 따라 disc 주위의 clear zone 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였고, 항곰팡이 활성은 30°C incubator에 72~84hr 배양한 후 Paper disc agar diffusion법(Kim, M.S 등 2000)에 준하여 항곰팡이 활성을 측정하였다.

6. 생약재의 추출 시간 및 온도에 따른 수율

생약재를 세절 및 분쇄하여 중량의 10배량의 증류수를 가하여 50, 60, 70, 80, 95°C 의 온도와 10, 30, 60, 90, 120분의 시간별로 추출하여 Whatman No 2 여과지로 여과한 후 Refractometer (ATAGO, Digital Refractometer Japan)를 이용하여 Brix수치측정 통해 최적의 수율을 나타내었다.

7. 여러 가지 효소를 이용한 생약재의 가수분해

항균과 항곰팡이 활성에 뛰어난 가자, 갈근, 계피, 복분자, 소목 및 지유의 6가지 생약재를 세절 및 분쇄하여 중량의 10배량의 증류수를 가한 후 1N HCl를 이용하여 각각 효소의 pH를 적정하고, 효소의 최적 온도로 조정된 Water bath에서 0, 30, 60, 120, 210분간 효소 반응 시켜 Refractometer (ATAGO, Digital Refractometer Japan)를 이용하여 Brix수치측정과 Spectrophotometer (Jasco

V-570. Japan)를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. *Terminalia chebula*의 극성차에 따른 용매 분획

*Terminalia chebula*의 water extract와 EtOH extract의 50 g을 각각 1 L의 증류수에 넣어 완전히 녹인 후 acetone, hexane, chloroform, butanol의 용매 극성차를 이용하여 순차적으로 분획하였다.

9. 비색법에 의한 총 폴리페놀 함량 조사

각 시료 추출물에 대하여 g당 총 폴리페놀 함량은 Singleton과 Rossi(1965)에 의한 Folin-Ciocalteu 방법으로 정량하였다. 30 ul의 샘플과 150 ul의 Folin-Ciocalteu reagent를 혼합하고 450 ul 20 wt.% sodium carbonate용액을 혼합하여 증류수를 이용하여 최종 3.0 ml로 맞추었다. 2시간 동안 실온에서 발색시킨 후 흡광도 750 nm에서 측정하였다. 총 폴리페놀의 표준곡선은 (+)-catechin을 이용하여 작성하였다. 시료의 총 폴리페놀함량은 (+)-catechin 검량선(mg GAE/100 g)을 이용하여 조사하였다.

10. HPLC에 의한 폴리페놀 정량실험

가. 시료 전 처리

모든 샘플은 추출물을 동결건조 후 분말을 최종 1mg/ml로 제조하여 sartorius Minisart-0.45 μ m membrane filter(Sartorius AG, Germany)로 여과한 후 냉장 저장(4 $^{\circ}$ C)하면서 분석하였다.

나. Chemicals

시험에 사용된 polyphenol 표준시약들은 13종으로 phloroglucinol, pyrogallol, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, catechin, vanillic acid, syringic acid, 4-methylcatechol, p-coumarilic acid, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid,

siniapic acid, 3,4-dimethoxybenzoic acid, p-anisic acid로 모두 sigma-aldrich(Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 모든 표준 시약들은 -1℃에서 보관하며 사용하였으며, HPLC용 에탄올에 녹여 사용하였다.

다. HPLC에 의한 폴리페놀 함량 분석

분석에 사용된 HPLC 분석장비는 IT regulator system이 장착된 JASCO system을 사용하였다. pump는 JASCO model PU-980 dual pump, detector는 model JASCO UV-975 UV/VIS detector를 사용하였고, column oven은 JASCO model CO-965, Intergreiter는 을 사용하였다(Tokyo, Japan).

분석 조건은 유속이 0.5 ml/min 이었으며, 흡광도는 UV 280 nm이었고, oven 온도는 40℃였다. 컬럼은 Guard column(10 ×4.0 mm i.d)이 장착된 Nova pack C18 UG120(150 ×4.6 mm i.d., 5 μ m, Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하였다.

사용된 A 용액은 7% Methanol이 함유된 50 mM sodium phosphate(pH 3.3-HCl) in water였으며, B 용액은 100% Methanol이었고, 유속은 0.5 ml/min이었고 분석에 사용된 Gradient는 다음과 같다. 초기에 A 용액이 초기에 100%에서 시작하여 40분에 25%가 되도록 linear program을 사용하였으며, 다시 45분에 0%, 50 min에 50%, 60분에 100%로 하였다. 이때 injection volume은 20 ul 였다.

11. Polyphenol Analyses.

Polyphenol 분석을 위해서 최적 분석 조건을 확립하기 위해 각 표준곡선이 겹치지 않게 retention time을 정하였으며, 각 시료의 분석은 각 standard curve의 calibration curve를 정한 후 이를 통해 시료의 면적을 환산해 정량 분석하였다. 각 표준품의 standard의 retention time은 table 3과 같고, 표준 곡선의 양상은 fig. 1과 같다.

Table 3. The retention time of polyphenol standards

Polyphenol standard	Retention time (min)
phloroglucinol	2.89
pyrogallol	3.75
protocatechuic acid	7.52
p-hydroxybenzoic acid	10.93
catechin	11.65
vanillic acid	13.35
syringic acid	15.03
4-methylcatechol	15.58
p-coumarilic acid	17.70
trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid	19.42
siniapic acid	19.82
3,4-dimethoxybenzoic acid	19.96
p-anisic acid.	23.46

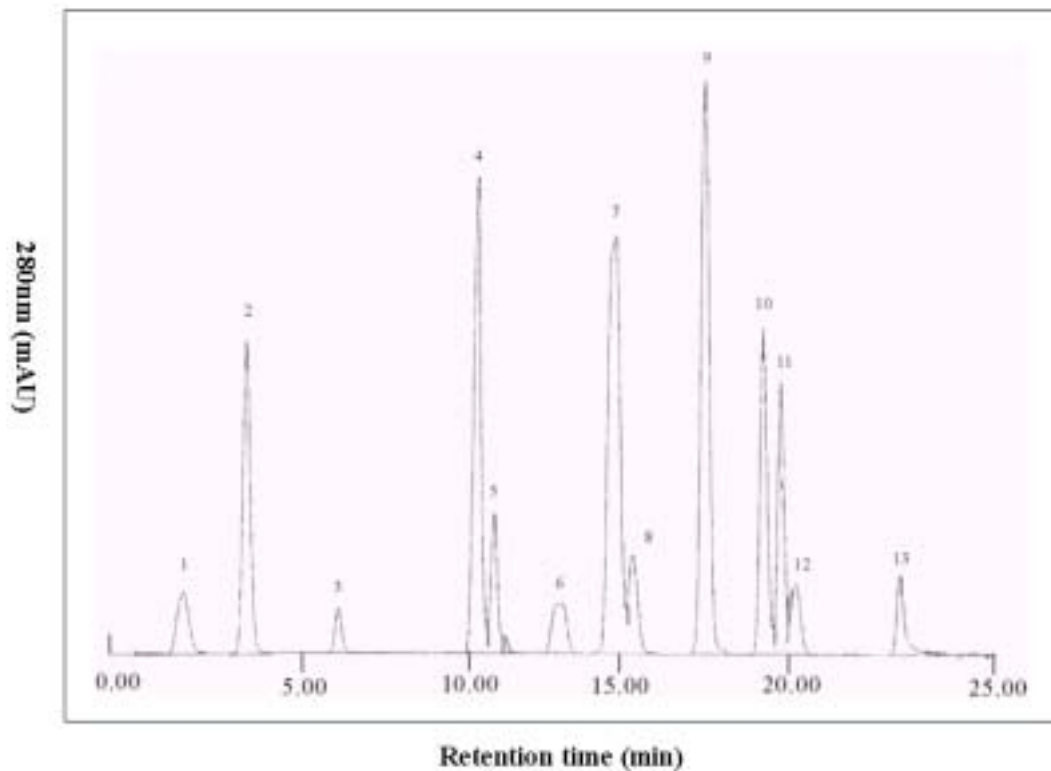


Fig 1. Typical HPLC profile for polyphenols.

Numbers show the following standard chemicals: 1, phloroglucinol; 2, pyrogallol; 3, protocatechuic acid; 4, p-hydroxybenzoic acid; 5, catechin; 6, vanillic acid; 7, syringic acid; 8, 4-methylcatechol; 9, p-coumarilic acid; 10, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid; 11, sinapiic acid; 12, 3,4-dimethoxybenzoic acid; 13, p-anisic acid.

12. 과채류의 저장 실험

가. 과채류의 시료 처리

과채류는 국내산으로 구입하여 실험에 사용하였다. 과채류에 생약재추출물을 분무

또는 침지하여 실험에 임하였다. 침지 또는 분무한 후, 선풍기를 이용하여 건조시켜 실험하였다.

나. 총 균 및 총 곰팡이 수 측정

과채류를 생약재추출물의 처리구와 주정 및 글리세린이 함유된 용액에 각각 용액에 잠기도록 침지하였다가 꺼내어 자연 건조 시킨 후, 각각의 과채류를 polyethylene 봉투에 넣어 $10\pm 1^{\circ}\text{C}$ 항온실에 저장하면서 일주일 간격으로 평판배양법을 이용하여 총 균수를 측정하였다.

총 균수 측정은 처리구별 과채류 시료 20g 취해서 멸균된 polyethylene 봉투에 넣은 후, 100ml의 멸균된 peptone수에 넣어 밀봉하였다. Bag mixer를 이용하여 15초간 혼합한 후 각각의 과채류 즙 1ml을 피펫으로 분취하여 평판배양법에 준하여 총 균수를 측정하였다. 또한 곰팡이수 측정은 상온에서 3일 배양 후 곰팡이균체의 수를 측정하였다.

제 2 절 연구개발 과제의 연구 수행 내용 및 결과

1. 천연 식물자원 유래의 향균제 개발

가. 생약재 추출 수율

본 실험에 사용한 생약재는 세절 및 분쇄하여 중량의 10배량의 증류수와 70% Ethanol를 가하여 환류냉각기가 장착된 추출기로 비등점에서 2시간 동안 추출하여 Whatman No 2 여과지로 여과한 후 Refractometer (ATAGO, Digital Refractometer Japan)를 이용하여 Brix수치 측정을 통해 추출수율을 알아보았으며, 또한 물 추출물은 Rotaty evaporator (Heidolph LABOROTA 4000, Germany)를 사용하여 감압 농축하고, 70% Ethanol 추출물은 50℃에서 6시간동안 중탕하여 Ethanol을 완전히 제거한 후 동결건조하여 추출수율을 나타내었다. 즉, 생약재의 물 추출물의 동결건조 중량(%)이 40~30%에 달하는 생약재는 가자, 갈근, 맥문동, 산수유가 있고, 30~20%에 달하는 생약재는 감초, 구기자, 당귀, 오미자, 천궁, 황기가 이에 속했으며, 중량(%)이 20~10%에 달하는 생약재는 복분자, 오수유, 애엽, 작약, 진피, 지유, 파고지, 황련이 이에 속했다. 마지막으로 10%이하의 추출 수율을 나타낸 생약재들은 가시오가피, 강황, 계피, 석곡, 소목, 영지, 오약, 육두구, 정향, 죽엽, 필발, 초두구, 호장근이 이에 속했다.

생약재의 70% Ethanol 추출물의 동결건조중량을 살펴보면, 동결건조 중량(%)이 40~30%에 달하는 생약재는 가자, 당귀, 산수유가 이에 속하였고, 30~20%에 달하는 생약재는 감초, 맥문동, 구기자, 오미자, 오수유, 천궁, 황기가 속하였으며, 동결건조 중량(%)이 20~10%에 달하는 생약재는 복분자, 육두구, 애엽, 작약, 정향, 지유, 파고지, 호장근, 황련이 이에 속했다. 또한 10% 이하의 수율을 나타내는 생약재는 가시오가피, 강황, 갈근, 계피, 석곡, 소목, 영지, 오약, 익지인, 죽엽, 필발, 초두구가 이에 속하였다(Table 4).

Table 4. Extract yield of medicinal herbs

Medicinal Herbs	Extract yield			
	Water extract		70% EtOH extract	
	동결건조중량 (%)	Brix	동결건조중량 (%)	Brix
가시오가피	5.42	1.1	5.30	1.5
가자	32.38	5.9	39.56	5.4
감초	23.82	2.9	21.56	2.4
강황	5.99	0.9	8.39	2.4
갈근	30.01	5.7	9.28	2.1
맥문동	42.67	5.3	28.80	3.2
구기자	25.99	4.2	27.00	2.6
계피	6.66	0.9	6.38	1.4
당귀	24.24	4.5	32.33	4.0
복분자	13.36	2.5	11.29	1.7
산수유	44.76	5.0	38.11	3.1
석곡	3.56	0.7	3.82	1.0
소목	2.60	0.3	5.60	0.6
영지	1.78	0.9	4.50	0.7
오미자	24.67	4.5	24.97	2.9
오수유	13.89	3.4	20.49	2.9
오약	5.18	0.9	4.61	1.4
육두구	6.38	1.0	12.23	1.8
애엽	12.83	2.8	12.79	1.5
익지인	11.51	1.6	9.51	1.7
작약	11.33	2.0	13.68	1.4
정향	9.30	1.6	16.57	4.4
죽엽	3.76	0.6	3.43	1.0
진피	13.88	4.7	34.04	3.7
지유	13.91	1.9	16.78	2.3
천궁	25.31	4.0	27.09	2.6
파고지	14.83	2.2	16.87	2.2
필발	5.73	1.6	5.67	1.1
초두구	5.75	0.8	9.85	1.7
호장근	6.96	1.7	18.68	3.1
황련	16.20	2.6	18.24	1.8
황기	24.04	2.8	22.08	2.1

나. 항균활성

금산 약초시장에서 구입한 32종의 생약재에 대해 Bacteria 6종의 항균활성을 탐색한 결과 Table 5, Table 6 와 같은 결과로 나타내었다. Table 5, Table 6 은 생약재의 물 추출물 과 70% ethanol 추출물에 대해서 6종의 Bacteria의 항균활성을 측정된 것으로서 생약재 물 추출물의 경우 가자 추출물은 *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*의 6가지 균종에 대해서 모두 높은 항균활성을 나타냈으며, 복분자 와 지유의 물 추출물에서는 *L. plantarum*의 균종을 제외한 5가지 균종에 대해 높은 항균 활성을 나타내었다. 또한 소목 과 황련의 추출물에서는 *E. coli*를 제외한 5가지 균종에서 항균활성을 나타내었으며, 정향 추출물에서는 *E. coli*균주에 대해서는 약한 항균활성을 나타내었고, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*의 4종의 균주에 대해서는 좋은 항균활성을 나타내었다. 이 외에 감초 추출물은 *P. aeruginosa*, 석곡 추출물은 *S. aureus*, *S. typhimurium*, 계피 추출물은 *S. typhimurium*, 산수유 추출물은 *B. subtilis*, *S. aureus*, 파고지는 *S. aureus*균종에 대해서 항균활성을 나타내었다.

Table 6 은 생약재 70% ethanol 추출물의 결과로서 대부분의 생약재에서 높은 항균 활성을 나타내었다. 특히 가자, 감초, 강황, 복분자, 석곡, 소목, 오미자, 작약, 정향, 지유, 파고지, 호장근, 황련 의 13가지 생약재 추출물에서 높은 항균활성을 나타내었다. 가자의 70% ethanol 추출물의 경우는 물 추출물의 결과에서 같이 6가지 균종에 대해 모두 높은 항균활성을 나타냈으며, 복분자, 작약, 정향, 지유의 70% ethanol 추출물은 *L. plantarum* 균을 제외한 5가지 균종에 대해 높은 항균 활성을 나타내었다.

소목의 70% ethanol 추출물의 경우에는 *E. coli* 균을 제외한 5가지 균종에서 높은 항균 활성을 보였으며, 이외에 생약재는 Table 6 에서처럼 강황, 석곡, 황련, 호장근의 70% ethanol 추출물은 4가지의 균주에 대해서 항균 활성을 나타내었다. 또한 파고지, 오미자의 70% ethanol 추출물은 3가지 균주에 대해서 항균활성을 나타냈으며, 천궁, 육두구, 오수유, 갈근, 계피, 가시오가피의 70% ethanol 추출물은 2가지 균주에 대해 항균 활성을 나타내었다. 이 외에도 맥문동, 오약 등의 생약재에서 낮은 항균활성을 찾아 볼 수 있었다.

20여종 한약재를 물과 에탄올을 이용하여 천연항균성 물질을 추출하여 항균력을 조

사하였는데 모든 시료의 에탄올추출물이 물 추출물보다 2~10배 항균력이 높았으며 (박 등 1992), 자초에서 항균성 물질을 추출 시 용매별, 온도별에 따른 추출조건과 항균력을 실험한 결과 에탄올 농도가 높을수록 그리고 가열하여 추출하는 것보다 상온에서 추출하면 항균력이 높다고 하였다. 이러한 실험결과는 이 등³⁶⁾, 정 등¹⁰¹⁾, 홍 등¹²¹⁾ 연구도 박 등³⁸⁾의 연구와 동일하다. 이에 본 실험에서는 물 과 70% Ethanol를 이용하여 비등점에서 추출한 추출물 가지고 항균 활성실험을 하였지만, clear zone에는 큰 차이가 없었으며 다만, 70% Ethanol 추출물의 많은 종류의 생약재에서 항균활성을 나타내었다 또한 균의 그람음성균과 그람양성균에 따라 생약재의 항균활성 차이를 보이고 있다. 즉, 대부분의 생약재에서는 그람 음성균 보다 그람 양성균에 대해 훨씬 뛰어난 항균 활성을 나타내는 것을 본 실험을 통해 알 수 있다.

Table 5. Antibacterial effects of water extracts from medicinal herbs

Medicinal Herbs	Microorganism Strains					
	E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.p
Control	- ²⁾	-	-	-	-	-
가시오가피	-	-	-	-	-	-
가자	20 ¹⁾	28	28	30	14	17
감초	-	+ ³⁾	12	+	-	-
강황	-	-	-	-	-	-
갈근	-	-	-	-	-	-
거심맥	-	+	-	-	+	-
구기자	-	+	+	-	+	+
계피	-	+	-	-	16	-
당귀	-	+	-	+	+	-
복분자	16	15	20	23	16	-
산수유	-	12	+	12	-	+
석곡	-	-	-	12	13	-
소목	-	15	15	20	28	13
영지	-	-	+	+	-	-
오미자	-	-	-	-	-	-
오수유	-	+	-	+	-	-
오약	-	-	-	-	-	-
육두구	-	+	-	+	-	-
애엽	-	-	-	+	-	-
익지인	-	-	-	+	-	-
작약	-	-	+	+	+	-
정향	+	12	18	20	15	-
죽엽	-	-	-	+	-	-
진피	-	+	-	-	-	-
지유	16	13	20	21	16	-
천궁	-	-	-	+	-	-
파고지	-	-	+	10	-	-
필발	-	-	-	-	-	-
초두구	-	-	-	-	-	-
호장근	-	-	-	-	-	-
황련	-	13	12	16	15	14
황기	+	-	-	-	+	-

E.C: *Escherichia coli* B.S: *Bacillus subtilis* P.A: *Pseudomonas aeruginosa*

S.A: *Staphylococcus aureus* S.T: *Salmonella typhimurium* L.P: *Lactobacillus plantarum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm) ²⁾ have no antibacterial activity.

³⁾ weak activity.

Table 6. Antibacterial effects of 70% ethanol extracts from domestic medicinal herbs

Medicinal Herbs	Scientific name	Microorganism Strains					
		E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.p
Control	70% ethanol	- ²⁾	-	-	-	-	-
가시오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	-	12	-	+ ³⁾	12	+
가자	<i>Terminalia chebula</i>	20 ¹⁾	25	25	32	16	17
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	-	17	16	15	+	+
강황	<i>Curcuma longa</i>	-	13	+	11	13	13
갈근	<i>Pueraria thumbergiana</i>	-	13	12	+	+	-
거심맥	<i>Liriope plathyphylla</i>	-	+	-	+	12	-
구기자	<i>Lycium chinense</i>	-	-	+	-	+	+
계피	<i>Cinnamomum cassia</i>	-	-	+	-	22	17
당귀	<i>Angelica gigas</i>	-	-	+	-	+	-
복분자	<i>Rubus coreanus miquel</i>	15	20	20	22	15	-
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	-	+	-	-	+	-
석곡	<i>Dendrobium nobile</i>	-	-	13	13	15	15
소목	<i>Caesalpinia sappan</i>	-	16	16	25	15	17
영지	<i>Shining Ganoderma</i>	-	-	-	-	+	-
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	+	-	12	12	12	-
오수유	<i>Evodia officinale</i>	-	13	19	-	+	-
오약	<i>Lindera aggregata</i>	-	-	12	-	-	-
육두구	<i>Myristica fragrans</i>	-	20	+	12	+	-
애엽	<i>Artemisia asiatica</i>	-	-	-	-	12	-
익지인	<i>Alpinia oxyphylla</i>	-	-	-	11	+	-
작약	<i>Paeonia albiflora</i>	13	15	14	16	16	-
정향	<i>Eugenia aromaticum</i>	14	20	17	21	13	-
죽엽	<i>Phyllostachys nigra</i>	-	-	-	+	+	-
진피	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	-	-	-	-	+	-
지유	<i>Sanguisorba officinalis</i>	16	20	22	22	17	-
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	-	11	+	11	+	-
파고지	<i>Psoralea corylifolia</i>	-	13	15	13	+	-
필발	<i>Piper longum</i>	-	-	+	+	+	-
초두구	<i>Amomum globosum Loureiro</i>	-	11	+	-	+	-
호장근	<i>polygonum aviculare</i>	-	16	15	15	17	-
황련	<i>Coptis japonica</i>	-	13	16	19	+	12
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	-	-	+	+	+	-

E.C: *Escherichia coli* B.S: *Bacillus subtilis* P.A: *Pseudomonas aeruginosa*

S.A: *Staphylococcus aureus* S.T: *Salmonella typhimurium* L.P: *Lactobacillus plantarum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm) ²⁾ have no antibacterial activity.

³⁾ weak activity.

1) 생약재 물 추출물의 농도별 항균 효과

Table 7 와 Table 8 은 Table 5 과 Table 6 의 결과를 바탕으로 선별한 생약재를 농도별로 항균 활성을 조사한 결과로서, Table 7 은 생약재의 물 추출물을 농도별로 제조하여 clear zone을 측정하였다. 즉, 가자 추출물의 경우에는 6가지 균종에서 모두 높은 항균활성을 나타냈으며, 낮은 농도의 생약재 추출물에서도 높은 항균활성을 나타내었다. 또한 복분자 와 지유의 생약재에서는 *Lactobacillus plantarum* 균을 제외한 5가지 균종에서 좋은 항균활성을 나타내었고, 소목 및 황련 추출물에서는 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*를 제외한 4균주에서 항균활성을 보였으며, 정향 추출물은 *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*를 제외한 4가지 균에서 높은 항균활성을 나타냈다.

Table 7. Antibacterial effects of water extract of medicinal herbs on various concentration

Medicinal Concentration		Microorganism Strains					
Herbs	(mg/ml)	E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.p
가자 (<i>Terminalia chebula</i>)	100	24 ¹⁾	25	26	28	23	16
	50	21	22	22	25	21	15
	25	20	21	19	20	18	14
	12.5	17	18	17	18	18	12
	6.25	15	16	14	15	15	10
	control	- ²⁾	-	-	-	-	-
복분자 (<i>Rubus coreanus miquel</i>)	100	18	21	23	21	20	-
	50	14	19	20	17	18	-
	25	13	17	17	13	14	-
	12.5	12	14	14	12	13	-
	6.25	11	10	13	11	13	-
	control	-	-	-	-	-	-
소목 (<i>Caesalpinia sappan</i>)	100	-	24	20	25	15	25
	50	-	18	15	20	13	19
	25	-	15	13	14	11	14
	12.5	-	13	12	12	-	10
	6.25	-	10	11	10	-	-
	control	-	-	-	-	-	-
지유 (<i>Sanguisorba officinalis</i>)	100	19	20	21	21	20	-
	50	18	17	19	19	20	-
	25	17	15	16	15	17	-
	12.5	15	13	13	13	17	-
	6.25	12	10	12	10	14	-
	control	-	-	-	-	-	-
정향 (<i>Eugenia aromaticum</i>)	100	18	-	21	22	21	-
	50	16	-	17	17	18	-
	25	16	-	16	14	15	-
	12.5	14	-	13	13	14	-
	6.25	12	-	13	12	13	-
	control	-	-	-	-	-	-
황련 (<i>Coptis japonica</i>)	100	-	15	15	18	-	13
	50	-	14	14	17	-	11
	25	-	12	14	14	-	-
	12.5	-	11	13	11	-	-
	6.25	-	-	12	-	-	-
	control	-	-	-	-	-	-

E.C: *Escherichia coli* B.S: *Bacillus subtilis* P.A: *Pseudomonas aeruginosa*
S.A: *Staphylococcus aureus* S.T: *Salmonella typhimurium* L.P: *Lactobacillus plantarum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm) ²⁾ have no antibacterial activity.

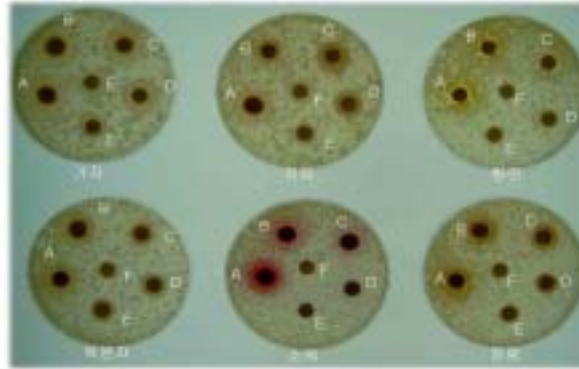


Fig 2. Antibacterial effects according to the concentration of water extracts of various medicinal herbs on *Bacillus subtilis* ATCC 14593.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

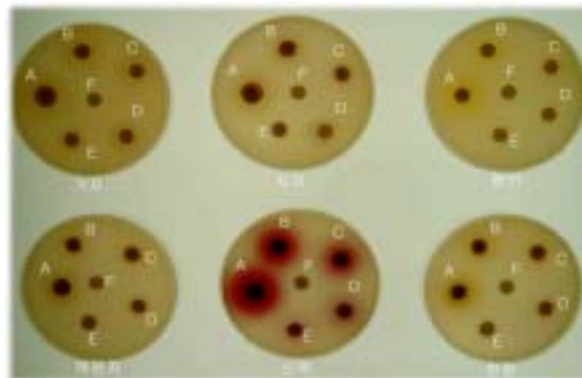


Fig 3. Antibacterial effects according to the concentration of water extracts of various medicinal herbs on *Escherichia coli* KCTC 1682.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

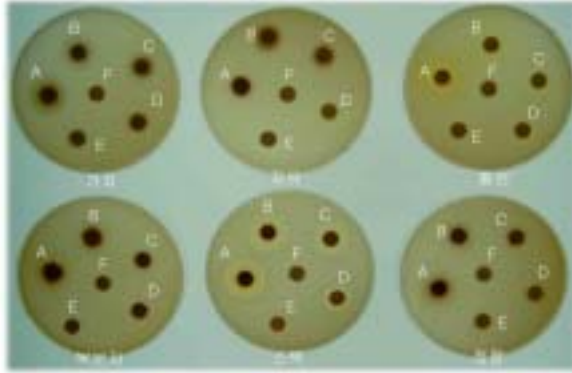


Fig 4. Antibacterial effects according to the concentration of water extracts of various medicinal herbs on *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

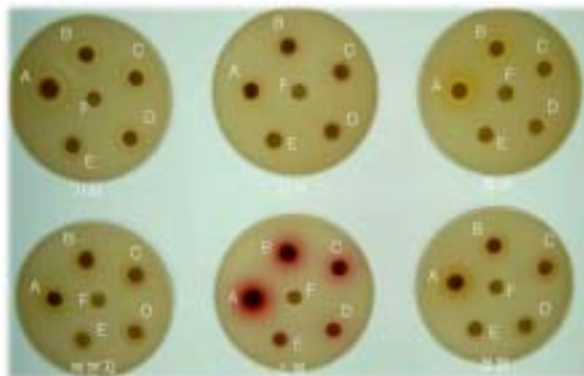


Fig 5. Antibacterial effects according to the concentration of water extracts of various medicinal herbs on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

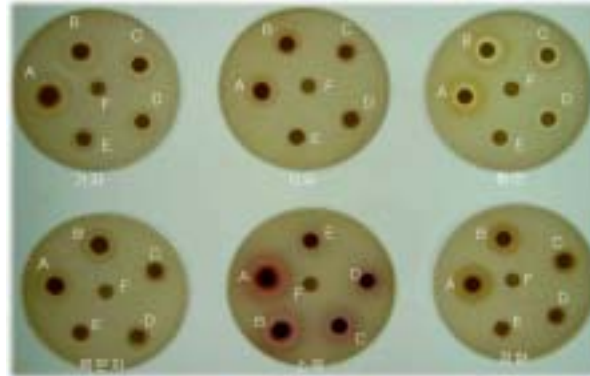


Fig 6. Antibacterial effects according to the concentration of water extracts of various medicinal herbs on *Staphylococcus aureus* ATCC 12692.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

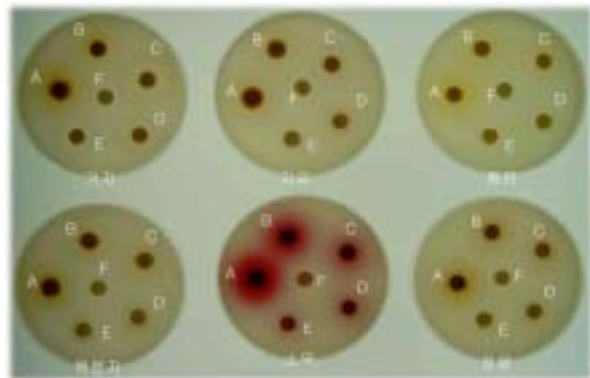


Fig 7. Antibacterial effects according to the concentration of water extracts of various medicinal herbs on *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

2) 생약재 70% Ethanol 추출물의 농도별 항균 효과

Table 8은 생약재의 70% Ethanol 추출물을 농도별로 제조하여 항균활성을 살펴본 실험결과이다. 70% ethanol추출물의 최저농도에서 나타나는 항균활성은 물 추출물에서 나타나는 활성보다 좋은 항균활성을 나타내었다. 즉, 가자와 복분자 및 황련의 70% ethanol추출물은 물 추출물의 항균활성이 약 2~4mm정도 크게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

소목과 지유 및 정향의 70% ethanol추출물은 물 추출물보다 좋은 항균활성을 나타내었다. 즉 소목의 70% ethanol추출물의 경우 물 추출물에서 활성을 보이지 않던 *Salmonella typhimurium* 균에 대해 항균 활성을 나타내었고, 지유의 70% ethanol추출물은 *Bacillus subtilis* 균에 대해 물 추출물보다 강력한 항균활성을 나타내었다. 또한 정향의 70% ethanol추출물도 물 추출물보다 강력한 항균활성을 나타내었는데 이는 생약재에서 천연 항균성물질 추출 시 추출용매를 물 과 Ethanol로 나누어 사용하였을 경우 Ethanol추출물이 물 추출물 보다 2~10배가량 항균력이 높다는 (박 등 1992)보고와 그 결과가 유사하였다.

Table 8. Antibacterial effects of 70% ethanol extract of medicinal herbs on various concentration

Herbs	Concentration (mg/ml)	Microorganism Strains					
		E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.p
가자 (<i>Terminalia chebula</i>)	100	23 ¹⁾	28	24	28	23	17
	50	18	25	19	23	20	15
	25	16	20	17	20	20	13
	12.5	15	18	15	16	18	10
	6.25	14	15	14	14	14	-
	control	- ²⁾	-	-	-	-	-
복분자 (<i>Rubus coreanus miquel</i>)	100	19	18	19	21	19	-
	50	13	15	19	19	15	-
	25	11	13	16	12	14	-
	12.5	11	11	14	10	14	-
	6.25	10	10	14	10	13	-
	control	-	-	-	-	-	-
소목 (<i>Caesalpinia sappan</i>)	100	-	17	20	22	-	23
	50	-	15	16	18	-	20
	25	-	14	13	13	-	18
	12.5	-	12	10	10	-	13
	6.25	-	10	-	-	-	10
	control	-	-	-	-	-	-
지유 (<i>Sanguisorba officinalis</i>)	100	20	12	18	19	20	-
	50	15	10	14	14	16	-
	25	13	-	11	13	15	-
	12.5	12	-	11	11	14	-
	6.25	10	-	10	10	11	-
	control	-	-	-	-	-	-
정향 (<i>Eugenia aromaticum</i>)	100	14	-	19	15	14	-
	50	13	-	15	13	10	-
	25	12	-	13	12	10	-
	12.5	12	-	14	10	-	-
	6.25	11	-	11	-	-	-
	control	-	-	-	-	-	-
황련 (<i>Coptis japonica</i>)	100	-	14	14	18	-	13
	50	-	12	13	15	-	11
	25	-	10	13	14	-	10
	12.5	-	-	11	14	-	-
	6.25	-	-	10	13	-	-
	control	-	-	-	-	-	-

E.C: *Escherichia coli* B.S: *Bacillus subtilis* P.A: *Pseudomonas aeruginosa*
S.A: *Staphylococcus aureus* S.T: *Salmonella typhimurium* L.P: *Lactobacillus plantarum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm) ²⁾ have no antibacterial activity.

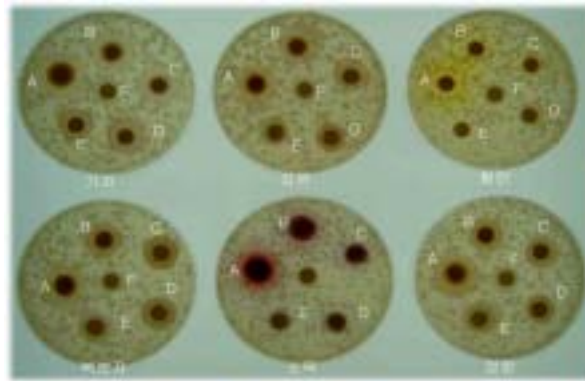


Fig 8. Antibacterial effects according to the concentration of 70% Ethanol extracts of various medicinal herbs on *Bacillus subtilis* ATCC 14593.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

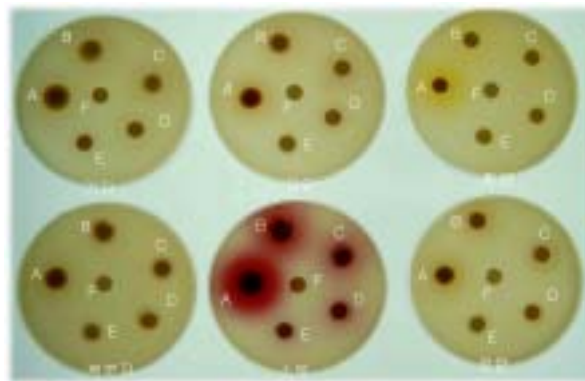


Fig 9. Antibacterial effects according to the concentration of 70% Ethanol extracts of various medicinal herbs on *Escherichia coli* KCTC 1682.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

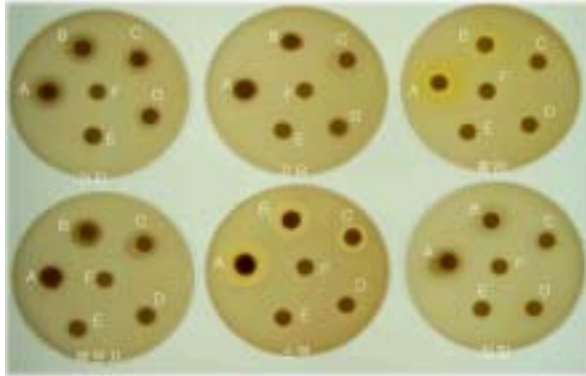


Fig 10. Antibacterial effects according to the concentration of 70% Ethanol extracts of various medicinal herbs on *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

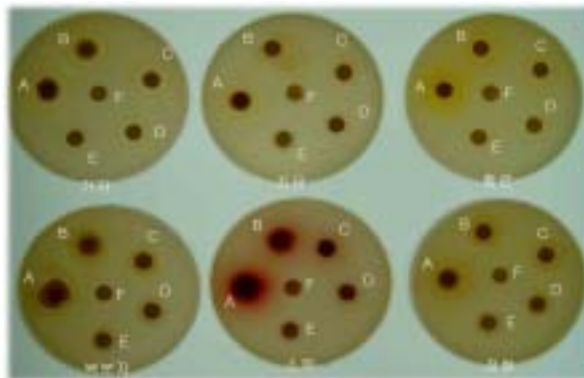


Fig 11. Antibacterial effects according to the concentration of 70% Ethanol extracts of various medicinal herbs on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

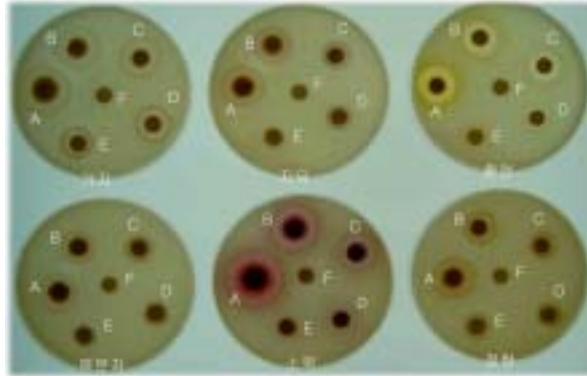


Fig 12. Antibacterial effects according to the concentration of 70% Ethanol extracts of various medicinal herbs on *Staphylococcus aureus* ATCC 12692.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

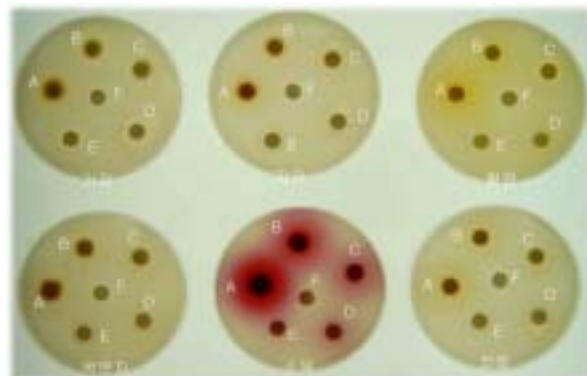


Fig 13. Antibacterial effects according to the concentration of 70% Ethanol extracts of various medicinal herbs on *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
 A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

다. 향 곰팡이 활성화

32종의 생약재에 대해 Fungi 5종의 향 곰팡이 활성을 탐색한 결과 Table 9, Table 10, Table 11 과 같은 결과로 나타내었다. Table 9, Table 10는 생약재의 물 추출물 과 70% ethanol 추출물에 대해 5종의 Fungi의 향 곰팡이 활성을 측정 한 것으로서 생약재 물 추출물의 경우 갈근 추출물 과 황련추출물에서 향 곰팡이 활성이 나타났는데 갈근 물 추출물은 *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Penicillium rugulosum*의 3가지 균종에 대해서 모두 높은 향 곰팡이 활성을 나타냈으며, 황련 물 추출물은 *Mucor miehei*의 균종에서만 높은 향 곰팡이 활성을 나타내었다.

Table 10은 생약재 70% ethanol 추출물의 결과로서 생약재의 물 추출물보다 좋은 향 곰팡이 활성을 나타내었다. 특히 계피의 70% ethanol 추출물에서는 *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Penicillium rugulosum*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*의 5가지 균종에서 모두 좋은 향 곰팡이 활성을 나타냈으며, 이외에도 감초의 70% ethanol추출물에서는 *Aspergillus niger*균주에 대해, 육두구와 호장근 및 황련의 70% ethanol추출물에서는 *Mucor miehei*균주에 대해 향 곰팡이 활성을 나타냈으며 또한 초두구의 70% ethanol추출물에서는 *Trichoderma reesei*균주에 대해 좋은 향 곰팡이 활성을 나타내었다.

Table 9. Antifungal effects of water extracts from domestic medicinal herbs

Medicinal Herbs	Scientific name	Microorganism Strains				
		A.n	A.o	M.m	P.r	T.r
Control	<i>Deionized water</i>	- ²⁾	-	-	-	-
가시오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	-	-	-	-	-
가자	<i>Terminalia chebula</i>	-	-	-	-	-
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	-	-	-	-	-
강황	<i>Curcuma longa</i>	-	-	-	-	-
갈근	<i>Pueraria thumbergiana</i>	39 ¹⁾	-	40	20	-
거심맥	<i>Liriope plathyphylla</i>	-	-	-	-	-
구기자	<i>Lycium chinense</i>	-	-	-	-	-
계피	<i>Cinnamomum cassia</i>	-	-	-	-	-
당귀	<i>Angelica gigas</i>	-	-	-	-	-
복분자	<i>Rubus coreanus miquel</i>	-	-	-	-	-
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	-	-	-	-	-
석곡	<i>Dendrobium nobile</i>	-	-	-	-	-
소목	<i>Caesalpinia sappan</i>	-	-	-	-	-
영지	<i>Shining Ganoderma</i>	-	-	-	-	-
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	-	-	-	-	-
오수유	<i>Evodia officinale</i>	-	-	-	-	-
오약	<i>Lindera aggregata</i>	-	-	-	-	-
육두구	<i>Myristica fragrans</i>	-	-	-	-	-
애엽	<i>Artemisia asiatica</i>	-	-	-	-	-
익지인	<i>Alpinia oxyphylla</i>	-	-	-	-	-
작약	<i>Paeonia albiflora</i>	-	-	-	-	-
정향	<i>Eugenia aromaticum</i>	-	-	-	-	-
죽엽	<i>Phyllostachys nigra</i>	-	-	-	-	-
진피	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	-	-	-	-	-
지유	<i>Sanguisorba officinalis</i>	-	-	-	-	-
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	-	-	-	-	-
파고지	<i>Psoralea corylifolia</i>	-	-	-	-	-
필발	<i>Piper longum</i>	-	-	-	-	-
초두구	<i>Amomum globosum Loureiro</i>	-	-	-	-	-
호장근	<i>polygonum aviculare</i>	-	-	-	-	-
황련	<i>Coptis japonica</i>	-	-	36	-	-
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	-	-	-	-	-

A.N: *Aspergillus niger* A.O: *Aspergillus oryzae* M.M: *Mucor miehei*

T.R: *Trichoderma reesei* P.R: *Penicillium rugullosum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm)

²⁾ have no antifungal activity.

Table 10. Antifungal effects of 70% ethanol extracts from domestic medicinal herbs

Medicinal Herbs	Scientific name	Microorganism Strains				
		A.n	A.o	M.m	P.r	T.r
control	70% ethanol	- ²⁾	-	-	-	-
가시오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	-	-	-	-	-
가자	<i>Terminalia chebula</i>	-	-	-	-	-
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	15	-	-	-	-
강황	<i>Curcuma longa</i>	-	-	-	-	-
갈근	<i>Pueraria thumbergiana</i>	-	-	-	-	-
거심맥	<i>Liriope plathyphylla</i>	-	-	-	-	-
구기자	<i>Lycium chinense</i>	-	-	-	-	-
계피	<i>Cinnamomum cassia</i>	24 ¹⁾	20	29	18	24
당귀	<i>Angelica gigas</i>	-	-	-	-	-
복분자	<i>Rubus coreanus miquel</i>	-	-	-	-	-
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	-	-	-	-	-
석곡	<i>Dendrobium nobile</i>	-	-	-	-	-
소목	<i>Caesalpinia sappan</i>	-	-	-	-	-
영지	<i>Shining Ganoderma</i>	-	-	-	-	-
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	-	-	-	-	-
오수유	<i>Evodia officinale</i>	-	-	-	-	-
오약	<i>Lindera aggregata</i>	-	-	-	-	-
육두구	<i>Myristica fragrans</i>	-	-	18	-	-
애엽	<i>Artemisia asiatica</i>	-	-	-	-	-
익지인	<i>Alpinia oxyphylla</i>	-	-	-	-	-
작약	<i>Paeonia albiflora</i>	-	-	-	-	-
정향	<i>Eugenia aromaticum</i>	-	-	-	-	-
죽엽	<i>Phyllostachys nigra</i>	-	-	-	-	-
진피	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	-	-	-	-	-
지유	<i>Sanguisorba officinalis</i>	-	-	-	-	-
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	-	-	-	-	-
파고지	<i>Psoralea corylifolia</i>	14	-	29	-	13
필발	<i>Piper longum</i>	-	-	-	-	-
초두구	<i>Amomum globosum Loureiro</i>	-	-	-	-	20
호장근	<i>polygonum aviculare</i>	-	-	18	-	-
황련	<i>Coptis japonica</i>	-	-	35	-	-
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	-	-	-	-	-

A.N: *Aspergillus niger* A.O: *Aspergillus oryzae* M.M: *Mucor miehei*

T.R: *Trichoderma reesei* P.R: *Penicillium rugullosum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm)

²⁾ have no antifungal activity.

1) 생약재 물 추출물 과 70% ethanol추출물의 농도별 항 곰팡이 효과

Table 10은 Table 8 과 Table 9의 결과를 바탕으로 선별한 생약재를 농도별로 항 곰팡이 활성을 조사한 결과로서, Table 10은 생약재의 물 추출물 과 70% Ethanol 추출물을 농도별로 제조하여 clear zone을 측정하였다.

갈근의 물 추출물의 경우에는 4가지 균종에서 모두 높은 항균활성을 나타냈으며 낮은 농도에서도 높은 항 곰팡이 활성을 나타내었다. 이 외에도 황련의 물 추출물에서 *Mucor miehei* 균주에서 좋은 항 곰팡이 활성을 나타내었다.

생약재의 70% Ethanol 추출물을 농도별로 제조하여 항 곰팡이 활성을 살펴 본 결과 70% ethanol추출물에서는 계피와 파고지, 초두구, 황련이 항 곰팡이 활성이 좋았으며, 특히 계피의 70% ethanol추출물에서는 5가지 균종에서 모두 뛰어난 항 곰팡이 활성이 나타났다.

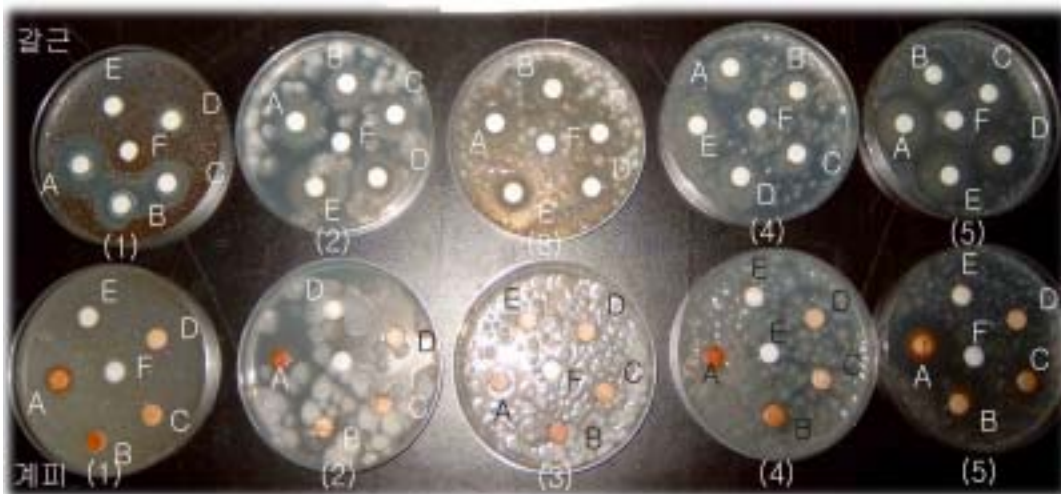


Fig 14. Antifungal effects according to the concentration of water and 70% Ethanol extracts of various medicinal herbs on fungus.

* A: 10% B: 5% C: 2.5% D: 1.25% E: 0.625% F: Control

* (1) *Aspergillus niger*. (2) *Aspergillus oryzae*. (3) *Penicillium rugulosum*.

* (4) *Trichoderma reesei*. (5) *Mucor miehei*.

Table 11. Antifungal effects of water and 70% ethanol extracts of medicinal herbs on various concentration

Extract condition	Medicinal Herbs	Concentration (mg/ml)	Microorganism Strains					
			A.n	A.o	M.m	T.r	P.r	
Water extract	갈근	100	27 ¹⁾	-	35	20	20	
		50	23	-	33	19	19	
		25	20	-	31	17	16	
		12.5	16	-	30	16	15	
		6.25	12	-	29	15	13	
		control	-	-	-	-	-	
	황련	100	-	-	21	-	-	
		50	-	-	14	-	-	
		25	-	-	12	-	-	
		12.5	-	-	9	-	-	
		6.25	-	-	-	-	-	
		control	-	-	-	-	-	
	70% Ethanol extract	계피	100	19	19	30	13	19
			50	13	17	15	-	12
25			-	13	-	-	-	
12.5			-	-	-	-	-	
6.25			-	-	-	-	-	
control			-	-	-	-	-	
파고지		100	14	-	20	13	-	
		50	12	-	18	-	-	
		25	12	-	16	-	-	
		12.5	11	-	15	-	-	
		6.25	10	-	14	-	-	
		control	-	-	-	-	-	
초두구		100	-	-	-	17	-	
		50	-	-	-	15	-	
	25	-	-	-	-	-		
	12.5	-	-	-	-	-		
	6.25	-	-	-	-	-		
	control	-	-	-	-	-		
황련	100	-	-	22	-	-		
	50	-	-	21	-	-		
	25	-	-	17	-	-		
	12.5	-	-	10	-	-		
	6.25	-	-	-	-	-		
	control	-	-	-	-	-		

A.N: *Aspergillus niger* A.O: *Aspergillus oryzae* M.M: *Mucor miehei*

T.R: *Trichoderma reesei* P.R: *Penicillium rugulosum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm)

²⁾ have no antifungal activity.

2. 천연 식물자원 유래의 항균제의 특성 규명 및 활용방안 개발

가. *Terminalia chebula*의 극성차에 따른 용매 분획

*Terminalia chebula*의 water extract와 EtOH extract의 50g을 각각 1L의 증류수에 넣어 완전히 녹인 후 acetone, hexane, chloroform, butanol의 용매 극성차를 이용하여 순차적으로 분획하였다(Fig. 15).

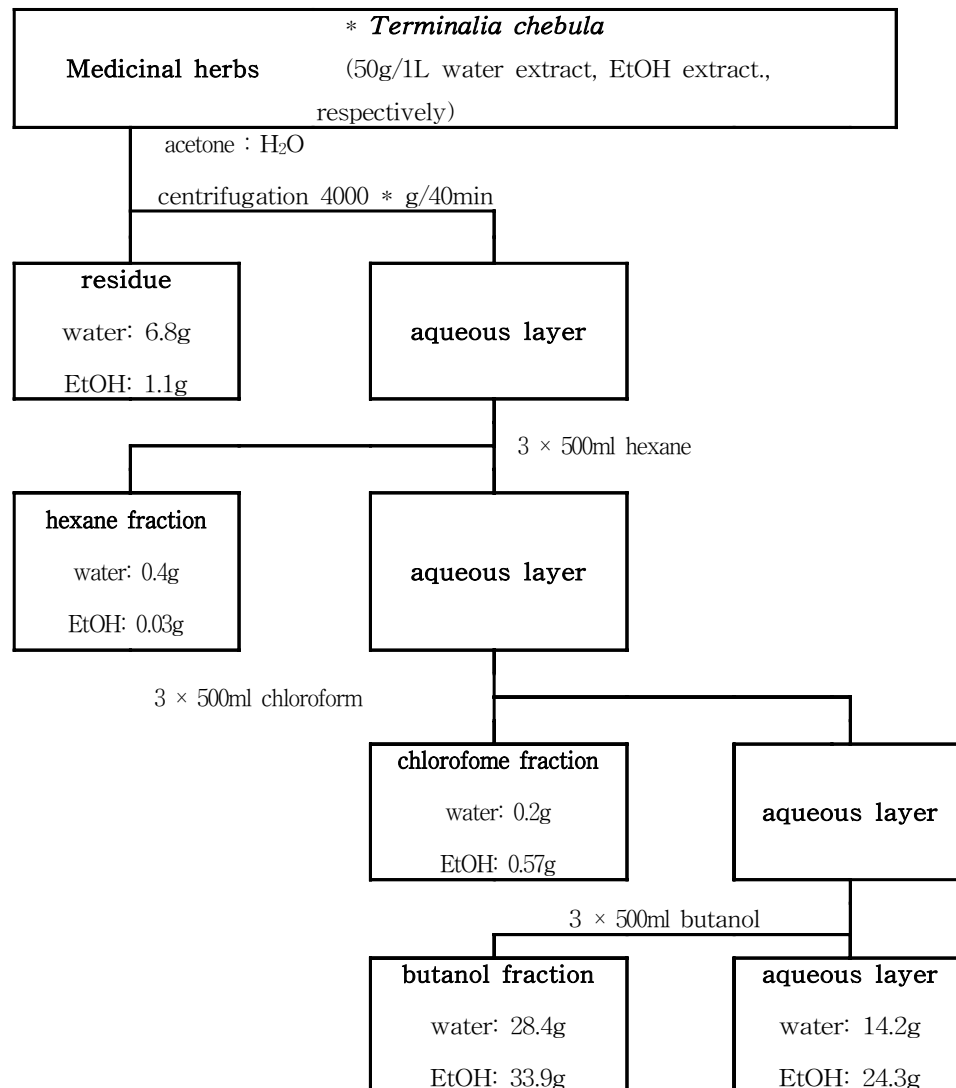


Fig 15. Fractionation procedure for the water and ethanol extract of *Terminalia chebula*.

나. *Terminalia chebula* 용매 분획물의 항균 활성

물과 70% ethanol을 이용하여 비등점에서 2시간 동안 추출한 가자 추출물을 여러 가지 용매의 극성차를 이용하여 분획하였다. 즉, 추출물 50g을 1L의 증류수에 녹인 후 acetone, hexane, chloroform, butanol의 용매를 순차적으로 분획하였다. 이와 같이 분획한 시료의 항균활성 검색은 다음과 같다. 항균 활성 검색에 사용한 균주는 37°C에서 18~24시간 전 배양하여 실험에 사용하였다. 항균활성 실험 평판 배지의 조제는 각각의 생육배지를 멸균하여 기층용 배지(agar 1.5%)와 균주를 접종하여 혼합한 중층용 배지(agar 0.75%)로 제조하였다. 평판배지에 올려 밀착 시킨 paper disc(Ø 8mm, Advantec, Toyo Roshi Co)에 300ug/ml의 농도로 제조한 추출물을 20 μ l 첨가하여, 37°C incubator에 36~48시간 동안 배양한 후 paper disc agar diffusion법에 따라 paper disc주위의 clear zone 직경(mm)을 측정하였다.

Table 12. Antibacterial effect of separated fraction from *Terminalia chebula*

Medicinal Herbs	Extract condition	Microorganism Strains						
		E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.m	
<i>(Terminalia chebula)</i>	가자 water extract	Water	- ²⁾	-	-	9 ¹⁾	15	-
		Acetone	-	10	11	10	12	10
		Hexane	-	-	12	-	15	10
		Butanol	25	21	26	15	28	23
		Chloroform	-	-	10	13	18	8
		Control	-	-	-	-	-	-
	70% ethanol extract	Water	15	9	14	16	16	11
		Acetone	9	-	8	-	9	-
		Hexane	14	20	17	11	16	15
		Butanol	23	20	23	25	26	24
		Chloroform	13	-	9	9	14	9
		Control	-	-	-	-	-	-

E.C: *Escherichia coli* B.S: *Bacillus subtilis* P.A: *Pseudomonas aeruginosa*
 S.A: *Staphylococcus aureus* S.T: *Salmonella typhimurium* L.P: *Lactobacillus plantarum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm). ²⁾ weak activity.

다. 부탄올 분획물의 항균활성

항균 활성 검색에 사용한 균주는 37°C에서 18~24시간 전 배양하여 실험에 사용하였다. 항균활성 실험 평판배지의 조제는 각각의 생육배지를 멸균하여 BHI배지 (agar 0.7%)에 균주를 접종하여 혼합하여 제조하였다. 평판배지에 올려 밀착 시킨 paper disc(Ø 8mm, Advantec, Toyo Roshi Co)에 5, 3, 1, 0.5, 0.1g/ml의 농도로 제조한 추출물과 GFSE용액을 30 μ l 첨가하였고 페니실린과 멸균수도30 μ l를 첨가한후 37°C incubator에 36~48시간 동안 배양한 후 paper disc agar diffusion법에 따라 paper disc주위의 clear zone 직경(mm)을 측정하였다.

Table 13. Antibacterial effect of butanol fraction

Samples	Concentration (mg/ml)	Microorganism Strains					
		S.a	E.c	B.s	S.t	L.m	
가자 (<i>Terminalia chebula</i>)	Water	0.5	15 ¹⁾	15	15	15	15
		0.3	14	14	14	13	14
	extract	0.1	13	10	9	11	12
	(부탄올획분)	0.05	9	9	- ²⁾	-	10
		0.01	9	-	-	-	9
	70% Ethanol	0.5	14	14	14	16	14
		0.3	13	14	13	14	13
	extract	0.1	10	12	12	12	10
	(부탄올획분)	0.05	9	9	9	9	9
		0.01	9	9	9	9	9
Control		0.5	18	15	19	11	11
		0.3	18	15	17	11	11
	GFSE ⁴⁾	0.1	13	11	12	-	-
		0.05	13	11	-	-	-
		0.01	-	11	-	-	-
	Penicillin ³⁾	10,000unit/ml	37	27	27	30	27
D.W ⁵⁾		-	-	-	-	-	

E.C: *Escherichia coli* B.S: *Bacillus subtilis* P.A: *Pseudomonas aeruginosa*
S.A: *Staphylococcus aureus* S.T: *Salmonella typhimurium* L.P: *Lactobacillus plantarum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm) ²⁾ have no antibacterial activity.

³⁾ Prepared with 10,000 uunit/ml(penicillin G sodium and 10,000 μ g/ml streptomucin sulfate in 0.85% saline.)

⁴⁾ grapefruit seed extract ⁵⁾ distilled water

다. 폴리페놀류의 항균 활성

항균 활성 검색에 사용한 균주는 37°C에서 18~24시간 전 배양하여 실험에 사용하였다. 항균활성 실험 평판배지의 조제는 각각의 생육배지를 멸균하여 BHI배지 (agar 0.7%)에 균주를 접종하여 혼합하여 제조하였다. 평판배지에 올려 밀착 시킨 paper disc(∅ 8mm, Advantec, Toyo Roshi Co)에 10,5,2.5,1mg/ml의 농도로 제조한 추출물을 30 μ l 첨가한후 37°C incubator에 36~48시간 동안 배양한 후 paper disc agar diffusion법에 따라 paper disc주위의 clear zone 직경(mm)을 측정하였다.

Table 14. Antibacterial effect of various polyphenols

Polyphenol	Concentration (mg/ml)	Microorganism Strains				
		S.a	E.c	B.s	S.t	L.m
Pyrogallol	10	28 ¹⁾	25	30	15	25
	5	22	20	23	12	22
	2.5	20	18	19	10	17
	1	-	-	-	-	-
	control	- ²⁾	-	-	-	-
Phlorogluchinol	10	9	-	9	10	10
	5	9	-	9	9	10
	2.5	-	-	9	9	9
	1	-	-	9	9	9
	control	-	-	-	-	-
Trans-4-hydroxy-3-me thoxucinamic	10	-	-	-	10	-
	5	-	-	-	10	-
	2.5	-	-	-	10	-
	1	-	-	-	9	-
	control	-	-	-	-	-
Sinapic acid	10	9	-	9	10	9
	5	9	-	9	10	9
	2.5	9	-	9	10	9
	1	-	-	9	10	-
	control	-	-	-	-	-
Vanilic acid	10	10	-	-	10	-
	5	10	-	-	10	-
	2.5	9	-	-	10	-
	1	-	-	-	9	-
	control	-	-	-	-	-

E.C: *Escherichia coli* B.S: *Bacillus subtilis* P.A: *Pseudomonas aeruginosa*

S.A: *Staphylococcus aureus* S.T: *Salmonella typhimurium* L.P: *Lactobacillus plantarum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm) ²⁾ have no antibacterial activity.

마. Polyphenol의 항균활성

Polyphenol standard에 대한 6종류 미생물의(*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*.)항균 활성을 실험하였다. 그 결과 1mg/ml 농도로 제조하여 30ul 첨가한 대부분의 polyphenol 에서 항균 활성을 나타내었다. 즉, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhimurium* 의 3균종에 대해서 항균효능을 나타낸 폴리페놀은 p-coumarilic acid, protocatechuic acid, pyrogallol 이었으며 식물 중에 많이 함유되어 있는 caffeic acid는 *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* 세 가지 균주에 대해 항균 활성을 나타내었으며, syringic acid는 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 세 가지 균주에 대한 항균 효능을 나타내었고, catechin와 p-hydroxybenzoic acid는 실험에 사용한 6종의 균주에 대해서 항균 활성이 없는 것으로 나타났다.

JP Rauha등(2000. 3)은 플라보노이드와 페놀화합물의 항균 활성 연구에서 9종의 균주에 대해 13종의 시료의 항균효과를 살펴본 결과 본 연구 결과 유사한 경향을 보고 하였다.

Table 15. Antibacterial effect of phenolic compounds

Samples	Microorganism Strains				
	E.c	B.s	S.a	S.t	L.m
p-coumarilic acid	- ²⁾	9 ¹⁾	10	9	-
protocatechuic acid	-	9	11	9	-
4-methylcatechol	-	-	11	-	-
phloroglucinol	-	10	-	9	-
siniapic acid	-	10	-	9	-
pyrogallol	-	10	11	9	-
caffeic acid	-	9	-	10	9
catechin	-	-	-	-	-
vanillic acid	-	9	12	-	-
syringic acid	-	11	9	-	9
trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid	-	9	9	-	-
p-hydroxybenzoic acid	-	-	-	-	-
3,4-dimethoxybenzoic acid	-	-	9	-	-
p-anisic acid	-	-	9	-	-

E.C: *Escherichia coli* B.S: *Bacillus subtilis* P.A: *Pseudomonas aeruginosa*

S.A: *Staphylococcus aureus* S.T: *Salmonella typhimurium* L.P: *Lactobacillus plantarum*

¹⁾ inhibition zone diameter(mm) ²⁾ have no antibacterial activity.

* sample amount is 300ug

바. 비색법에 의한 총 폴리페놀 함량 조사 결과.

32종의 생약재 추출물(에탄올 및 물)의 비색법에 의한 총 폴리페놀함량 분석결과는 table 16과 같다.

비색법에 의한 총 폴리페놀 함량의 경우 (+)-catechin함량으로 정량분석 하였다. 물 추출물의 경우 가자가 585.87 mg/g 으로 모든 시료중에서 통계학적으로 가장 높게 나타났다($p<0.01$). 또한 300 mg/g이상인 것으로는 가자를 비롯한 5종으로 지유, 갈근, 복분자 및 작약, 오수유으로 나타났으며, 이들의 값은 각각 429.21, 377.31 그리고 316.23~326.77CE mg/g 으로 나타났다($p<0.01$).

에탄올 추출물의 총 폴리페놀함량의 경우 물 추출물과 마찬가지로 가자의 함량이 498.01 mg/g 으로 32종의 생약재 중에서 유의적으로 가장 높게 나타났다($p<0.01$). 다음으로는 복분자로 368.25 mg/g 으로 300 mg/g이상의 함량을 보인 것은 가자와 복분자였다. 다음으로는 호장근, 저항 그리고 소목 및 육두구로 이들의 함량은 각각 259.74, 229.38, 147.36~156.02 mg/g으로 나타났다($p<0.01$).

따라서 300 mg/g이상인 것으로는 물 추출물이 5가지였으며, 에탄올 추출물은 2가지로 나타났다. 또한 폴리페놀성분의 경우 물 추출물이 에탄올 추출물 보다 높게 나타났다.

이상의 결과 비색법에 의한 총 폴리페놀 함량 분석 결과 가자가 물 및 에탄올 추출물에서 가장 높은 값을 나타내었다. 이는 가자가 총 폴리페놀 함량도 높으면서, 수율(%)함량도 높기 때문에 식품의 선도유지를 위한 소재로 적합하다고 생각된다.

Table 16. Estimated concentration of total polyphenols in oriental herbs extracts determined by Folin-Ciocalteu(FC) method using (+)-catechin as the standard(CS)(mg/g dry base).

Samples	water	ethanol
가시오피	84.79±5.96 ^j	66.60±4.81 ^k
가자	585.87±5.85 ^a	498.01±2.81 ^a
갈근	377.31±3.81 ^c	113.07±4.14 ^{hi}
감초	19.23±1.09 ^{no}	35.34±6.59 ^{mn}
강황	23.43±2.22 ^{mno}	117.86±3.03 ^h
거심맥	3.94±1.50 ^p	2.05±1.35 ^q
계피	156.00±5.65 ^g	115.61±6.21 ^h
구기자	22.54±3.47 ^{mno}	9.91±0.13 ^{pq}
당귀	17.55±3.47 ^{no}	17.90±2.97 ^{op}
복분자	316.23±19.48 ^d	400.33±13.68 ^b
산수유	44.41±0.84 ^{jk}	25.59±6.24 ^{no}
석곡	45.05±0.07 ^{jk}	104.85±6.86 ^l
소목	151.12±1.24 ^g	156.05±2.76 ^f
애엽	129.55±0.63 ^h	65.70±6.08 ^k
영지	33.32±2.38 ^{klm}	38.71±1.82 ^m
오미자	15.17±6.83 ^o	15.57±6.26 ^p
오수유	227.10±4.10 ^f	148.25±2.48 ^f
오약	85.54±6.30 ⁱ	129.68±0.45 ^g
육두구	19.44±0.80 ^{no}	147.36±3.74 ^f
익지인	28.26±2.46 ^{lmn}	33.68±4.69 ^{mn}
작약	326.77±4.57 ^d	79.65±0.49 ^j
정향	255.85±5.86 ^e	229.38±0.87 ^e
죽엽	86.90±4.38 ⁱ	69.68±0.45 ^k
지유	429.21±5.36 ^b	368.25±2.48 ^c
진피	39.01±1.40 ^{jkl}	48.29±2.42 ^l
천궁	18.33±2.37 ^{no}	18.35±2.33 ^{op}
초두구	151.92±4.36 ^g	137.95±2.90 ^g
파고지	35.76±5.99 ^{kl}	109.92±0.11 ^{hi}
필발	23.33±2.36 ^{mno}	28.14±2.63 ⁿ
호장근	147.07±4.14 ^g	259.74±0.37 ^d
황기	15.38±5.12 ^o	11.81±1.68 ^p
황련	48.29±2.42 ^j	32.77±3.16 ^{mn}

^{a-q}Mean±S.D was significantly different in the same column(p<0.01).

사. 폴리페놀 함량과 항균활성의 상관도 조사.

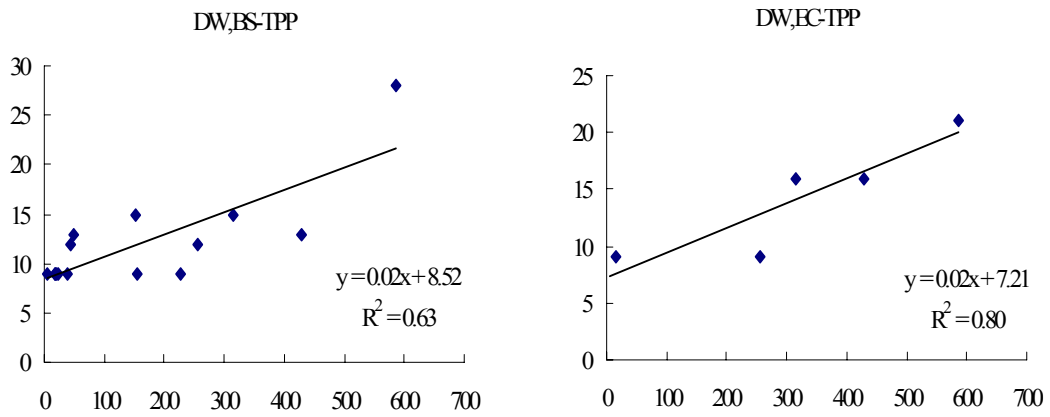


Fig 16.1. The correlation between antibacterial and total polyphenol compound in the water extracts. DW = water extracts; EC = *E. coli*, BS = *B. subtilis*; TPP = Total polyphenol compound.

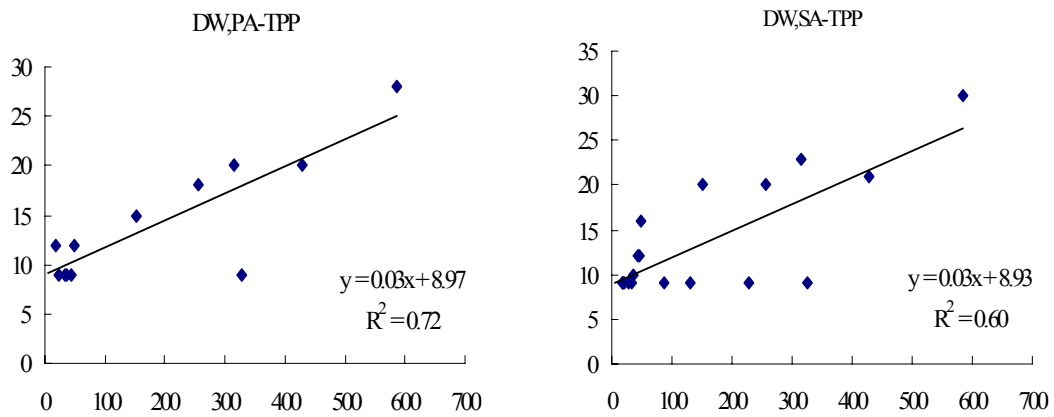


Fig 16.2. The correlation between antibacterial and total polyphenol compound in the water extracts. DW = water extracts; PA = *S. aeruginosa*; SA = *St. aureus*; TPP = Total polyphenol compound.

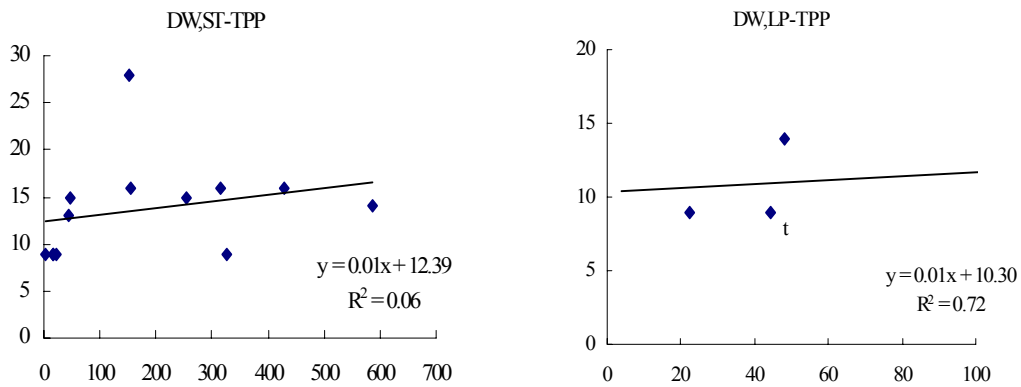


Fig 16.3. The correlation between antibacterial and total polyphenol compound in the water extracts. DW = water extracts; ST = *S. typhimurium*; LP = *L. plantarum*; TPP = Total polyphenol compound.

그림 16.1, 16.2, 16.3은 물 추출물에서 항균능과 총 폴리페놀간의 상관도를 나타낸 그림이다. 그림 4.3의 *S. typhimurium*과 총 폴리페놀과의 상관도를 제외하고는 전체적으로 상관도가 높게 나타났다. 즉, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*과 총 폴리페놀 성분과 상관계수(r)가 각각 0.89, 0.79, 0.85, 0.78, 0.85로 나타나 유의적으로 높은 수치를 나타내었다($p < 0.01$). 또한 이들의 결정계수(r^2)값이 각각 0.80, 0.63, 0.72, 0.60, 0.06 그리고 0.72로 *S. typhimurium*을 제외하고는 비교적 높은 결정계수를 나타내었다. 즉 물 추출물에 있어 *S. typhimurium*을 제외하고는 총 폴리페놀함량이 높을수록 항균력이 높은걸 알 수 있었다.

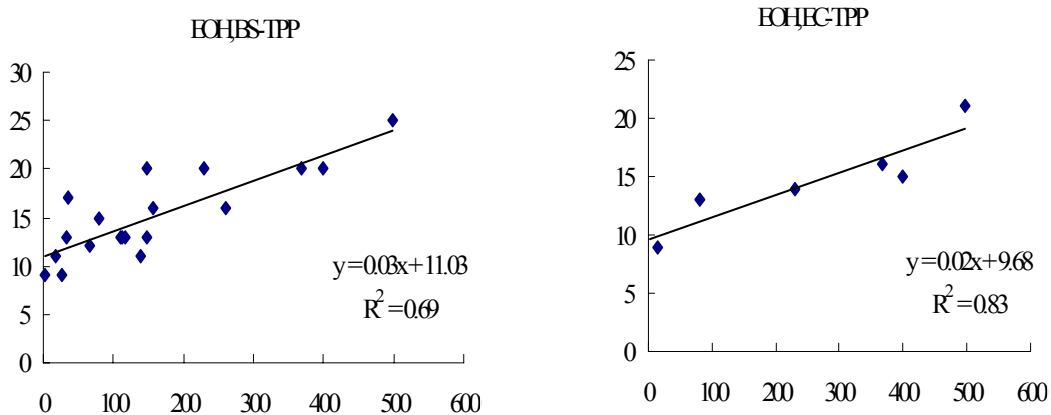


Fig 17.1. The correlation between antibacterial and total polyphenol compound in the ethanol extracts. EOH = Ethanol extracts; EC = *E. coli*, BS = *B. subtilis*; TPP = Total polyphenol compound.

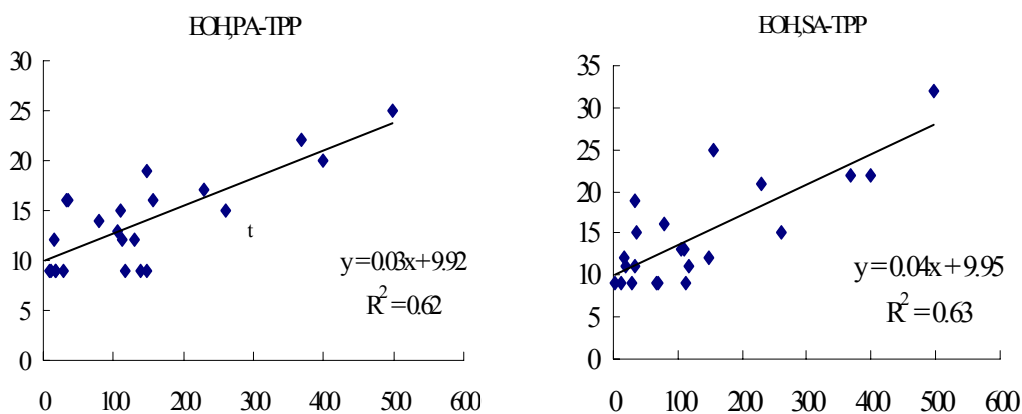


Fig 17.2. The correlation between antibacterial and total polyphenol compound in the ethanol extracts. EOH = Ethanol extracts; PA = *S. aeruginosa*; SA = *St. aureus*; TPP = Total polyphenol compound.

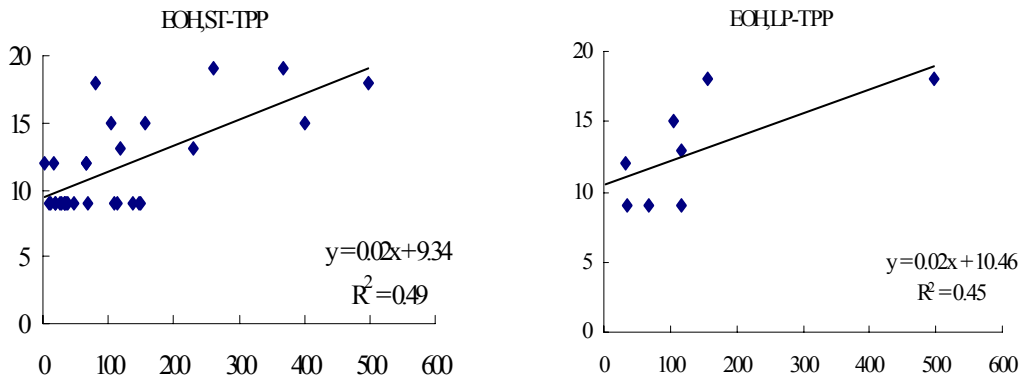


Fig 17.3. The correlation between antibacterial and total polyphenol compound in the ethanol extracts. EOH = Ethanol extracts; ST = *S. typhimurium*; LP = *L. plantarum*; TPP = Total polyphenol compound.

Fig. 17.1, 17.2, 17.3은 에탄올 추출물에서 항균능과 총 폴리페놀간의 상관도를 나타낸 그림이다. 전체적으로 항균능과 총 폴리페놀과의 상관도가 높게 나타났다. 즉 상관계수의 경우 *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*과 총 폴리페놀 성분과 상관계수(r)가 각각 0.91, 0.91, 0.79, 0.79, 0.70으로 나타나 유의적으로 높은 수치를 나타내었다($p < 0.01$). 또한 이들의 결정계수(r^2)의 경우 각각 0.83, 0.69, 0.62, 0.63, 0.49, 0.45로 *S. typhimurium*, 및 *L. plantarum*의 결정계수를 제외하고는 비교적 높은 값을 나타내었다.

이상의 결과 물 추출물 및 에탄올 추출물의 항균 효능과 총 폴리페놀과는 밀접한 관계가 있다고 판단된다.

아. HPLC에 의한 폴리페놀 성분의 정량 분석 결과

본 실험의 예비 실험 결과 32종의 생약재 중에서 수율, 항균 활성능, 항 곰팡이 활성능, 총 폴리페놀 함량 분석을 통해 식품첨가제 및 항 미생물 재제로 가장 경제적이면서 효율성이 높을 것으로 판단되는 4종의 생약재(가자, 복분자, 계피, 갈근)를 대상으로 HPLC를 이용한 폴리페놀 성분을 동정하기로 하였다. 선택된 생약재는 용매에 녹여 분석한 이후 시료 100g 당 mg의 폴리페놀함량으로 나타내었다. Fig. 18 및 19은 가자의 에탄올 추출물 및 물 추출물의 HPLC 결과 profile을 나타낸 것이고, Fig. 20, 21은 계피, Fig. 22, 23은 복분자, Fig. 24, 25은 감초의 결과 profile을 나타낸 것이다.

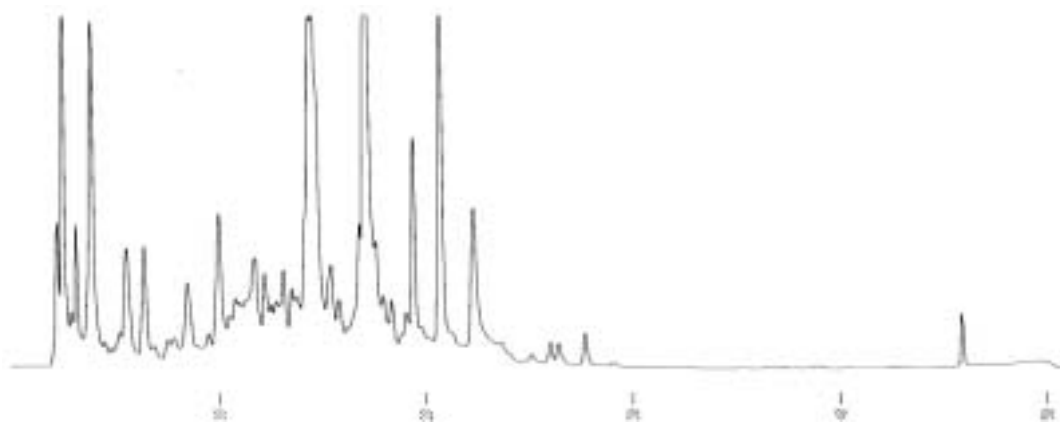


Fig 18. The HPLC profile of *Terminalia chebula* of water extracts.

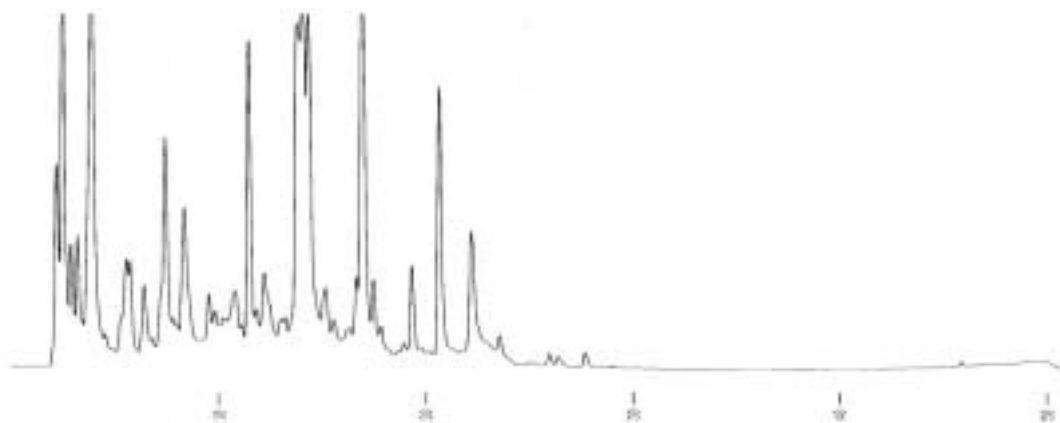


Fig 19. The HPLC profile of *Terminalia chebula* of ethanol extracts.

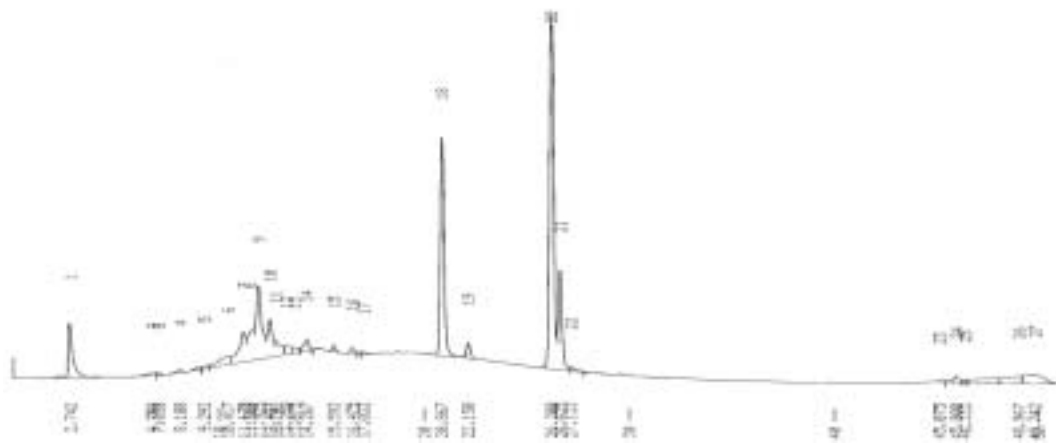


Fig. 20. The HPLC profile of *Cinnamomum cassia* of ethanol extracts.



Fig. 21. The HPLC profile of *Cinnamomum cassia* of water extracts.

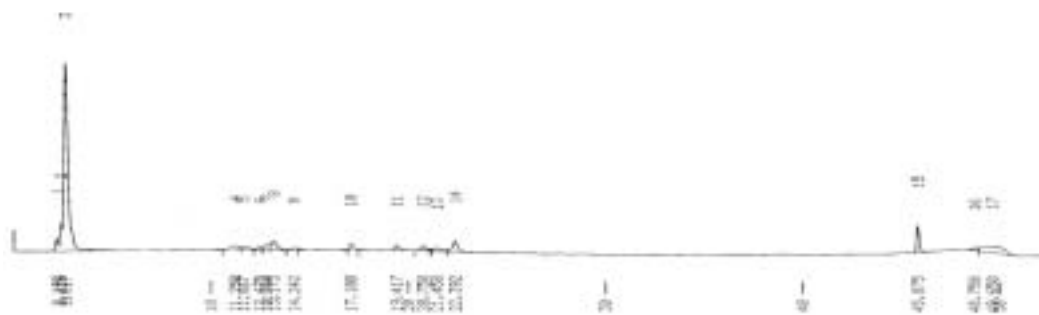


Fig. 22. Fig. The HPLC profile of *Rubus coreanus miquel* of ethanol extracts.



Fig. 23. The HPLC profile of *Rubus coreanus miquel* of water extracts.



Fig. 24. The HPLC profile of *Pueraria thumbergiana* of ethanol extracts.

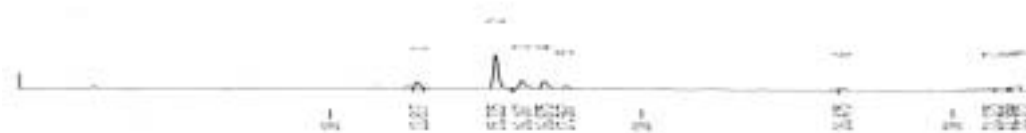


Fig. 25. The HPLC profile of *Pueraria thumbergiana* of water extracts.

Table 17. Polyphenols contents of oriental herbs extracts using HPLC(mg/100g dry base).

plant foodstuffs (scientific name)	polyphenols	polyphenol content(mg%/dry base)	
		Water extract	Ethanol extract
<i>Terminalia chebula</i>	phloroglucinol	5270±16	2149±89
	pyrogallol	36735±136	28971±1370
	protocatechole	6667±176	1600±14
	hydroxy benzoic acid	547±35	885±22
	catechin	2011±47	5814±100
	vanillic acid	7478±30	3076±35
	syringic acid	908±104	826±36
	4-methylcatechole	1028±37	754±65
	p-comarilic acid	429±26	891±83
	T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamon	14509±193	24340±834
	siniapic acid	3782±133	2896±52
	Dimethyl benzoic	210±21	26±7
p-anisic acid	844±87	328±2	
<i>Cinnamonum cassia</i>	protocatechole	126±7	241±13
	hydroxy benzoic acid	138±19	790±14
	catechine	116±22	2229±206
	vanillic acid	122±28	1478±128
	syringic acid	121±30	285±21
	4-methylcatechole	131±36	1017±23
	p-comarilic acid	130±26	388±17
	T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamon	171±57	136±6
	siniapic acid	142±13	165±7
	Dimethyl benzoic	120±28	363±81
p-anisic acid	100±1	156±6	
<i>Rubus coreanus</i>	phloroglucinol	8668±470	137±10
<i>miquel</i>	pyrogallol	10533±1218	150±7
	protocatechole	3803±110	156±15
	hydroxy benzoic acid	1180±28	165±7
	catechine	3432±137	2249±214
	p-comarilic acid	464±8	2719±115
	T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamon	3779±30	7025±35
<i>Pueraria</i>	phloroglucinol	5293±151	2121±27
<i>thumbergiana</i>	protocatechole	3246±77	187±5
	hydroxy benzoic acid	1574±37	139±27
	vanillic acid	2899±16	160±14
	4-methylcatechole	4883±103	160±42
	p-comarilic acid	456±6	2361±56

위의 Table 17은 물 추출물 및 에탄올 추출물에 대해 표준물질 13 종을 이용한 HPLC 분석결과를 나타낸 표이다. 표준품으로는 phloroglucinol, pyrogallol, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, catechin, vanillic acid, syringic acid, 4-methylcatechol, p-coumarilic acid, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, sinapic acid, 3,4-dimethoxybenzoic acid, p-anisic acid을 사용하였다.

HPLC 분석결과 총 peak 면적 중에서 13개의 표준품으로 정량할 수 있는 비율은 가자의 물 및 에탄올 추출물이 각각 27.5%, 27.5% 정도였으며, 계피의 경우, 물 추출물 및 에탄올 추출물이 각각 7%, 10%였으며, 복분자의 경우엔 각각 25%, 7%, 그리고 갈근의 경우 각각 15%, 15% 정도로 나타났다.

가자의 물 추출물의 경우 검출 대상 중에서 전체 peak 중에서 9%를 차지하는 pyrogallol이 36,735 mg%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamon이 14,509 mg%였으며, 다음으로 vanillic acid가 7,428 mg%였으며, protoatechole이 6667 mg%였으며, phloroglucinol이 5,270 mg%로 나타났다. 가자의 에탄올 추출물의 경우 pyrogallol이 가장 높은 28,971 mg%였으며, 다음으로 T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamon이 24,340 mg%였으며, 다음으로 catechin이 5,814mg%였다.

계피의 물 추출물의 경우 T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamon이 가장 높은 함량인 171 mg%였으며, 다음으로 sinapic acid가 142 mg%로 나타났다. 또한 계피의 에탄올 추출물의 경우 catechin이 가장 높은 2,229 mg%로 가장 높게 나타났으며, vanillic acid가 다음으로 1,478 mg%였으며, 다음으로 4-methylcatechole로 1,017 mg%였다.

복분자의 물 추출물의 경우 phloroglucinol이 가장 높은 8,668 mg%였으며, pyrogallol이 10,533 mg%였다. 또한 에탄올 추출물의 경우 p-coumarilic acid가 2,719 mg%였다.

갈근의 물 추출물의 경우 phloroglucinol이 5,293 mg%였으며, 4-methylcatechole이 4,883 mg%로 나타났다. 또한 에탄올 추출물의 경우 phloroglucinol이 2,121 mg%였으며, p-coumarilic acid가 2,361 mg%로 나타났다.

이상의 HPLC를 이용한 폴리페놀성분의 정량 결과 폴리페놀의 peak 면적이 가자에서 가장 많이 나왔다. 가자의 주요성분 7개 중에서 본 실험에서는 3 종류의 주요 peak를 detection 할 수 있었으며, 이 중 pyrogallol이 주요 peak 였다.

향후 본 연구는 가자의 주요 폴리페놀 성분에 대한 고찰이 필요하며, 이들 물질들의 적절한 동정 방법 및 분획 방법을 통한 구조 동정 및 분리된 특정 폴리페놀 성분에 대한

물리 화학적 및 생리학적 특성에 대한 연구가 필요하다.

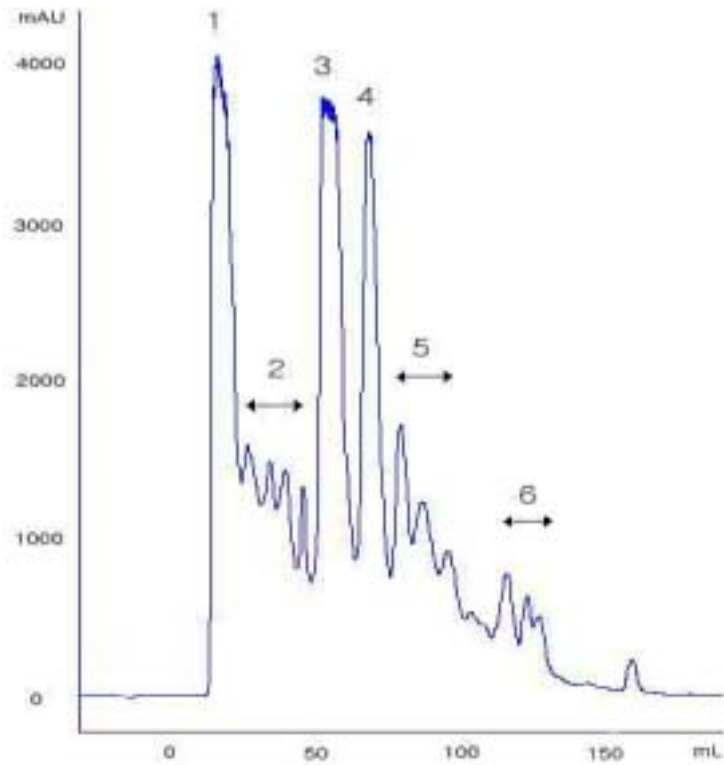


Fig. 26. Vydac 218 컬럼에 의한 가자 부탄을 획분의 chromatogram.

*Terminalia chebula*의 water 추출물을 증류수에 넣어 완전히 녹인 후 acetone, hexane, chloroform, butanol의 용매 극성차를 이용하여 순차적으로 분획하였다. 위와 같이 분획한 결과 butanol획분의 회수율은 56.8%에 달했으며, 항균효과 또한 다른 용매를 이용하여 분획한 분획물에 비해 좋은 항균활성을 나타내었다. 이 결과를 바탕으로 가자의 butanol 획분을 아래와 같이 분석하였다.

분석에 사용된 HPLC 분석장비는 AKTA explorer 100 system을 사용하였다. 분석에 사용된 용매와 조건은 다음과 같이 분석하였다. A 용액은 7% Methanol이 함유된 50

mM sodium phosphate(pH 3.3-HCl) in water였으며, B 용액은 100% Methanol이었다. 조건은 유속이 2ml/min 이었으며, 흡광도는 UV 280 nm이었고, oven 온도는 40°C 이었다. 이때 사용한 컬럼은 Vydac 218(protein and peptide C18 .USA)을 이용하였으며, injection volume은 500-300 ul 이었다.

자. 항균 및 항 곰팡이 성분이 신선 농산물의 부패억제에 미치는 효과 검증

1) 과채류 예비 저장 실험

갈근과 가자 물 추출물을 열풍 건조시켜 시료를 제조하였다. 이렇게 제조한 갈근과 가자 시료를 각각 5% 용액으로 만들어 혼합한 후, 스프레이를 이용하여 방울토마토, 귤, 애호박에 분무하였다. 이러한 과정을 3회 정도 반복하여 잘 건조시킨 후, 과채를 지퍼백에 일정한 양을 담아 넣고, 37°C incubator에서 3일간 배양하여 총 균수를 측정하였다. 총 균수 측정은 과채류의 처리구와 비처리구를 일정한 양 수거하여 hand blender마쇄한 후 측정하였다. 즉, 100ml의 peptone수와 함께 일정한 양의 과채류를 넣고 마쇄한 후, 1ml 취해 평판배양법에 준하여 측정하였다.

그 결과 갈근과 가자의 5%의 용액의 처리구가 처리하지 않은 과채류에 비해 생육억제 효과로 적은수의 생균수를 나타내었다(Table. 18). 위의 결과를 바탕으로 10°C의 항온실내에서 호박, 고추, 토마토, 부추, 사과, 감귤의 야채와 과일이 부패되는 과정을 총균수 측정으로 실험하였다.

Table 18. Total microbial count of fruits and vegetables during storage at 37°C

Sample	Condition	CFU / ml			
		10^5	10^4	10^3	10^2
토마토	무처리	582 ¹⁾	756	3378	3032
	처리	99	103	783	902
귤	무처리	40	551	86	96
	처리	0	0	0	0
애호박	무처리	129	95	1110	1036
	처리	36	43	337	388

¹⁾colony unit

2) 저장기간에 따른 미생물수의 변화

가) 사과

갈근과 가자 및 복분자의 추출물을 각각 5%, 2.5%농도의 용액과 0.1% 알긴산 나트륨 용액이 함유된 처리 용액을 사과에 처리하여 10℃의 항온실에서의 저장기간 중 미생물 변화는 다음과 같다.

저장 3주가 지나면서 사과에 생약재추출물만을 처리한 처리구에서 외관상으로 검붉은 점을 나타내는 것을 확인할 수 있었고, 0.1% 알긴산나트륨과 대조구에서의 사과들은 외관상 깨끗한 표면을 확인할 수 있었다. 그러나 저장과정중의 총 균수에서는 생약재추출물을 처리한 사과에서 총 균수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 0.1% 알긴산나트륨과 대조구에서는 총 균수가 조금씩 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 27). 곰팡이수는 처리구별로 큰 차이는 보이지는 않았으나 생약재추출물과 0.1% 알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 생약재추출물을 처리한 사과에서 낮게 나타났(Fig. 28).

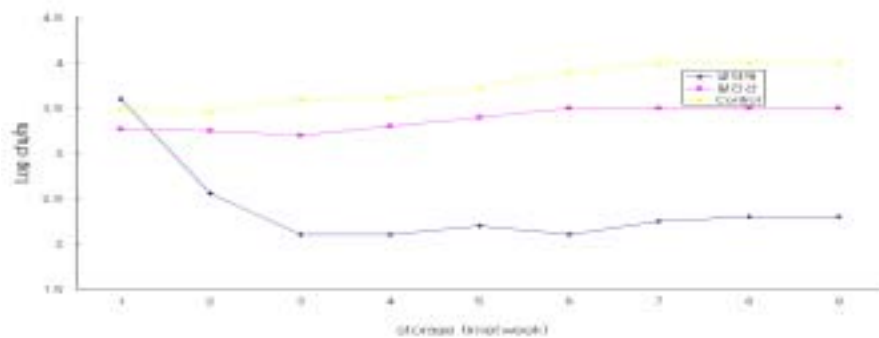


Fig. 27. Total microbial count of apple during storage at 10°C.

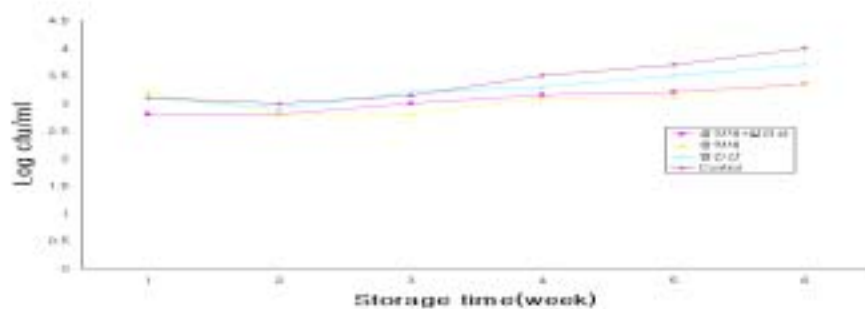


Fig. 28. Total fungal count of apple during storage at 10°C.

나) 오렌지

갈근과 가자 및 복분자의 추출물을 각각 5%, 2.5%농도의 용액과 0.1% 알긴산 나트륨 용액이 함유된 처리 용액을 오렌지에 처리하여 10℃의 항온실에서의 저장기간 중 미생물 변화는 다음과 같다.

오렌지의 외관은 생약재추출물처리를 한 경우 1-2주간 다른 처리구와 비슷했으나, 저장 3주째부터 생약재추출물 처리를 한 오렌지에서 검은색 점을 확인할 수 있었다. 이에 반해 0.1% 알긴산나트륨과 대조구에서는 외관상으로는 검은색 점을 나타나지 않았다. 그러나 총 균수의 경우 생약재추출물 처리를 한 오렌지에서는 총 균수가 현저히 감소함을 확인할 수 있었고, 0.1% 알긴산나트륨과 대조구에서는 총 균수가 조금씩 증가하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 29). 오렌지의 곰팡이 개체수는 저장기간 1주까지는 발견되지 않았으나 저장기간이 지남에 따라 꾸준히 증가하였고, 저장 3주에 달해서는 생약재추출물과 0.1% 알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 생약재추출물을 처리한 오렌지에서의 곰팡이 개체수가 다른 처리구에서 보다 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 30).

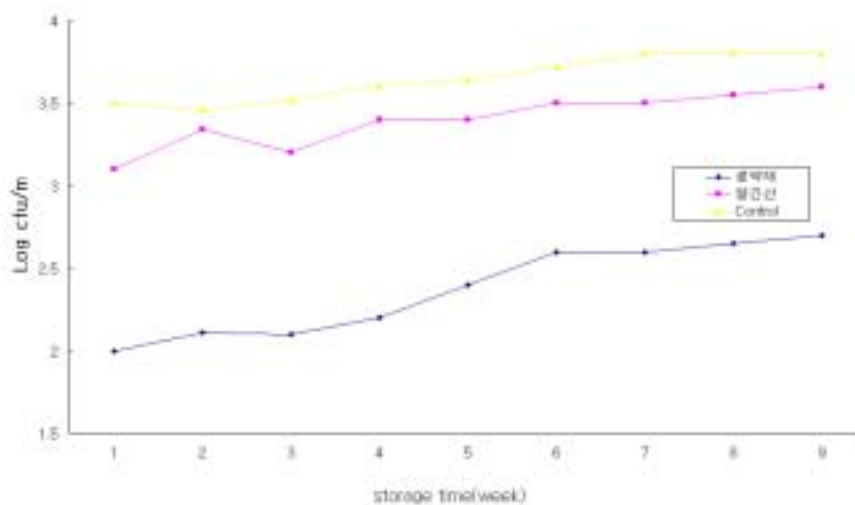


Fig. 29. Total microbial count of orange during storage at 10°C.

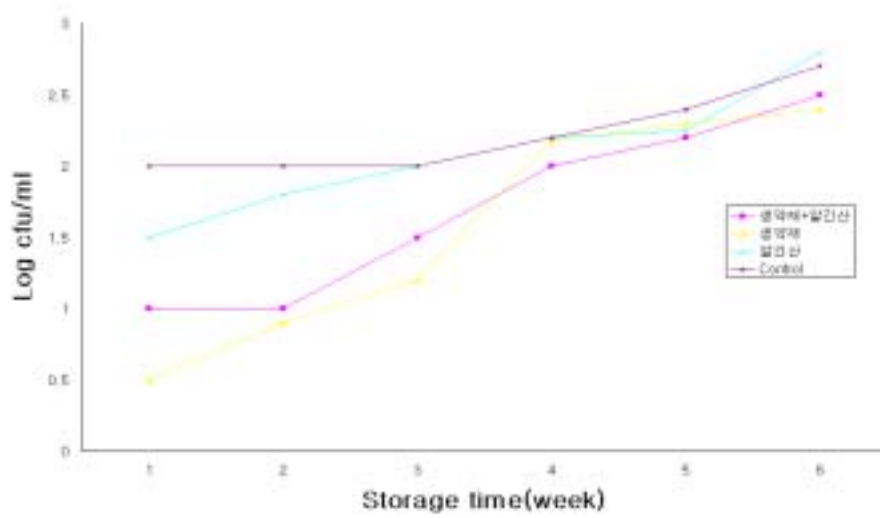


Fig. 30. Total fungal count of orange during storage at 10°C.

다) 토마토

갈근과 가자 및 복분자의 추출물을 각각 5%, 2.5%농도의 용액과 0.1% 알긴산 나트륨 용액이 함유된 처리 용액을 토마토에 처리하여 10℃의 항온실에서의 저장기간 중 미생물 변화는 다음과 같다.

토마토는 외관상 각각의 처리구별로의 차이는 보이지 않았으며, 다른 과채류보다 그 부패속도가 매우 빨라 저장 4주째는 저장해 두었던 모든 토마토가 썩어 있음을 확인할 수 있었다. 이에 반해 총 균수에서는 생약재추출물을 처리한 경우 저장 1주 때와 6주 때의 균수 차이가 크지 않았고, 다른 처리구에서는 지속적으로 증가함을 확인 하였다(Fig. 31). 저장기간 중의 곰팡이 개체수는 1-2주 동안 많은 수가 확인되었고, 저장 3주째부터의 곰팡이 개체수는 조금씩 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 생약재추출물과 0.1% 알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 생약재추출물을 처리한 처리구가 다른 처리를 한 토마토에서보다 적은 곰팡이 수가 나타났다. (Fig. 32).

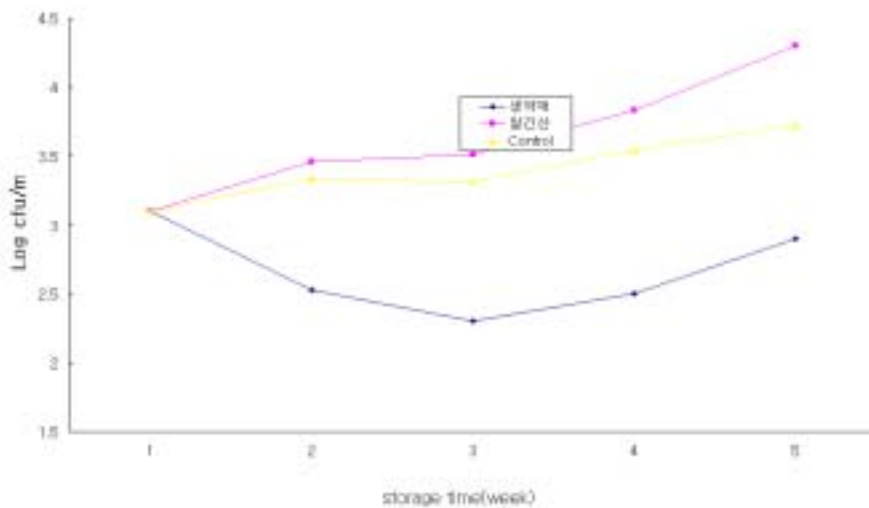


Fig. 31. Total microbial count of tomato during storage at 10°C.

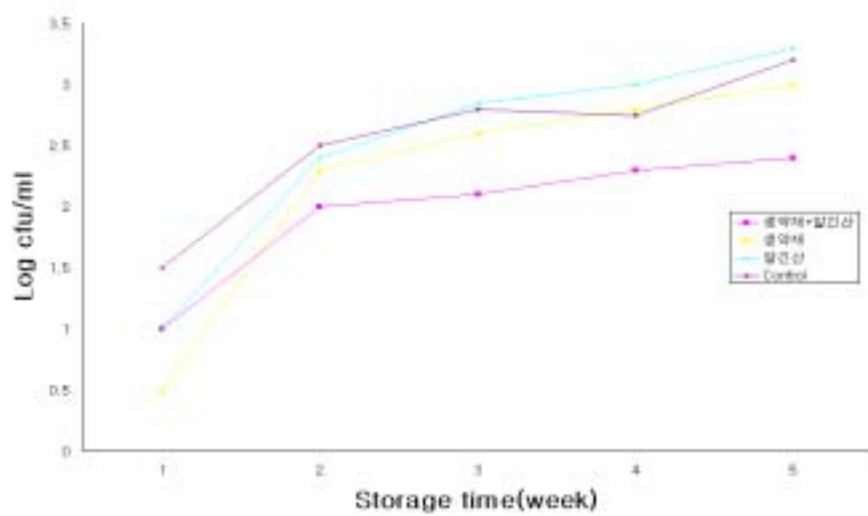


Fig. 32. Total fungal count of tomato during storage at 10°C.

라) 부추

갈근과 가자 및 복분자의 추출물을 각각 5%, 2.5%농도의 용액과 0.1% 알긴산 나트륨 용액이 함유된 처리 용액을 부추에 처리하여 10℃의 항온실에서의 저장기간 중 미생물 변화는 다음과 같다.

저장을 시작한 초기에는 모든 부추의 외관이 좋았으나 저장 4주차가 되면서 대조구를 제외한 모든 부추의 외관이 썩어보였으며, 저장 6주차 때에는 모든 부추가 다 썩어 보였다. 그러나 균수에 있어서는 처리구가 대조구에 비해 낮은 균수를 나타내었다. 즉, 저장 1주째에는 알긴산 처리를 한 부추의 균수가 많지 않았으나, 저장 기간이 늘어남에 따라 균의 수가 많이 증가하였다. 이에 반해 생약재추출물을 처리한 부추에서는 처음에 많이 수의 미생물이 확인되었으나, 저장 기간이 지남에 따라 그 증가율이 낮게 나타났다 (Fig. 33).

곰팡이의 개체수는 각각의 처리구에서 나타나지 않았으나 저장 기간이 증가함에 따라 비슷한 경향으로 증가 하였고, 생약재추출물과 0.1% 알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 생약재추출물을 처리한 처리구에서 곰팡이의 생육이 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 34).

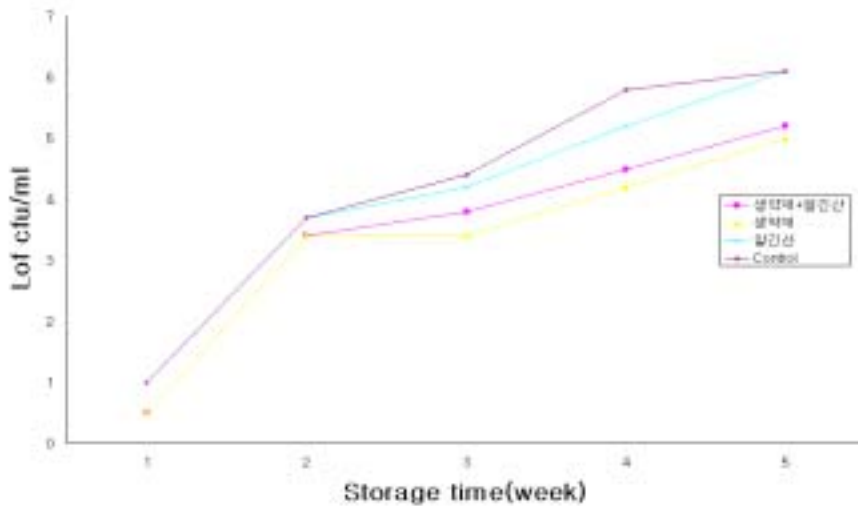


Fig. 33. Total microbial count of leek during storage at 10°C.

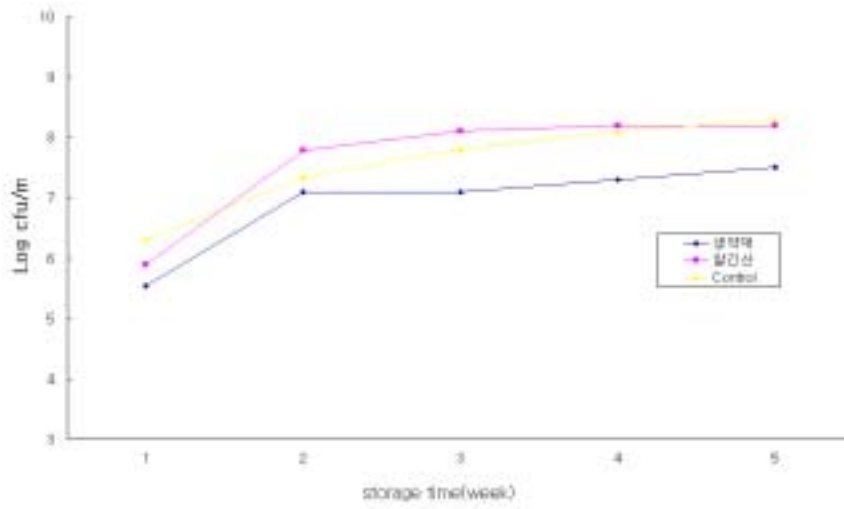


Fig. 34. Total fungal count of leek during storage at 10°C.

마) 고추

갈근과 가자 및 복분자의 추출물을 각각 5%, 2.5%농도의 용액과 0.1% 알긴산 나트륨 용액이 함유된 처리 용액을 고추에 처리하여 10℃의 항온실에서의 저장기간 중 미생물 변화는 다음과 같다.

저장기간 중의 고추 외관은 저장 4주째부터 생약재추출물과 0.1% 알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 생약재추출물을 처리한 처리구에서 검은색을 나타내었으며, 고추의 질이 물렁해졌다. 0.1% 알긴산나트륨 처리와 대조구에서는 외관상 큰 차이가 없다가 저장 6주째가 되면서 모든 처리구가 물렁해졌다. 또한 고추의 꼭지 부분에서 곰팡이가 출현하였다.

고추의 총 균수는 생약재추출물의 처리구가 저장 2주까지 균수가 감소하였고, 그 이후부터 조금씩 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 0.1% 알긴산나트륨의 처리구와 대조구에서는 저장 기간이 지남에 따라 균수가 조금씩 증가함을 알 수 있었다(Fig. 35). 곰팡이의 개체수는 생약재추출물과 0.1% 알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 0.1% 알긴산나트륨 처리를 한 처리구에서의 곰팡이 개체수는 저장1주차까지는 나타나지 않다가 점차 증가하였고, 생약재추출물의 처리와 대조구에서는 저장 기간이 지남에 따라 조금씩 증가하였다. (Fig. 36).

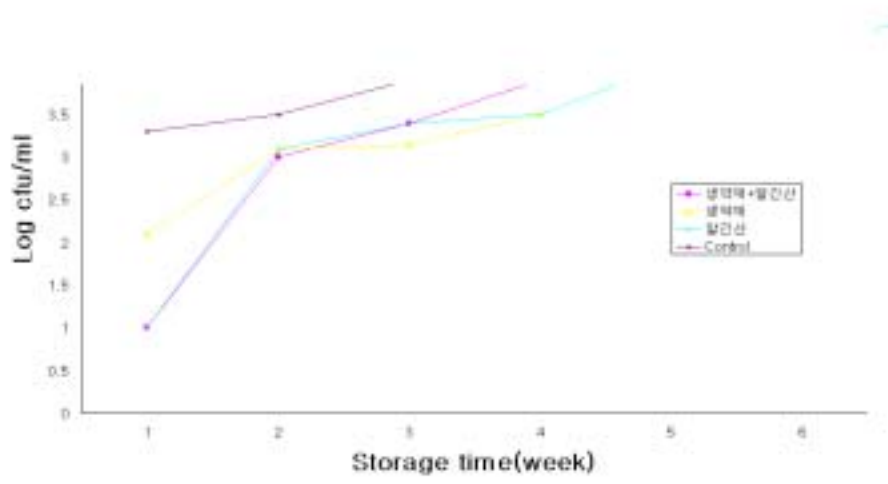


Fig. 35. Total microbial count of green pepper during storage at 10℃.

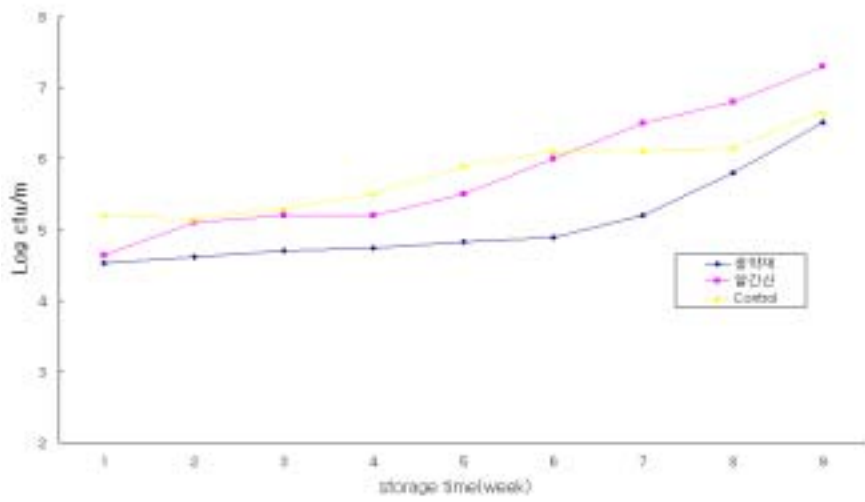


Fig. 36. Total fungal count of green pepper during storage at 10°C.

바) 호박

갈근과 가자 및 복분자의 추출물을 각각 5%, 2.5%농도의 용액과 0.1% 알긴산 나트륨 용액이 함유된 처리 용액을 호박에 처리하여 10℃의 항온실에서의 저장기간 중 미생물 변화는 다음과 같다.

호박은 생약재추출물과 0.1% 알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 생약재추출물을 처리한 처리구에서 좋은 외관을 보였고, 생약재추출물을 처리한 호박은 저장 6주차까지도 보기 좋았으며, 0.1% 알긴산나트륨 처리와 대조구에서는 저장 4주째에 모두 썩음을 확인할 수 있었다. 또한 저장 7주째에는 모든 처리구의 호박이 외관상 모두 썩어 있음을 확인할 수 있었다.

저장 중 호박의 총 균수는 생약재추출물을 처리한 호박에서 2주까지 현저히 감소하다가 저장 5주째에 들어서 균의 변화가 없었다. 저장 6주째에 들어서서 총 균수가 약간 증가하였고, 0.1% 알긴산나트륨과 대조구는 저장 기간의 처음과 큰 차이 없이 조금씩 증가 하였다(Fig. 37).

곰팡이 개체수는 0.1% 알긴산나트륨처리를 한 호박에서 저장 1주차 때까지 없다가 저장 2주차 에서 갑자기 증가하였고, 생약재추출물과 0.1% 알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 생약재추출물을 처리한 호박에서 곰팡이수가 적었다. 또한 0.1% 알긴산나트륨과 대조구에서는 큰 차이 없이 지속적으로 증가 하였다(Fig. 38).

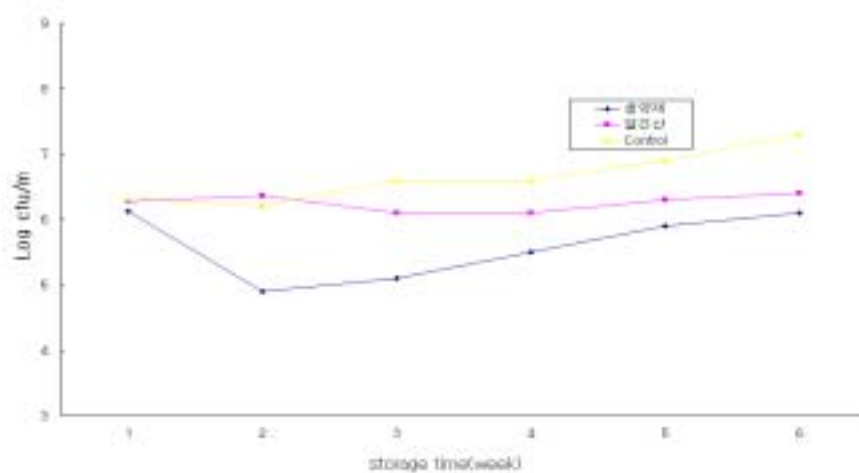


Fig. 37. Total microbial count of green pumpkin during storage at 10℃.

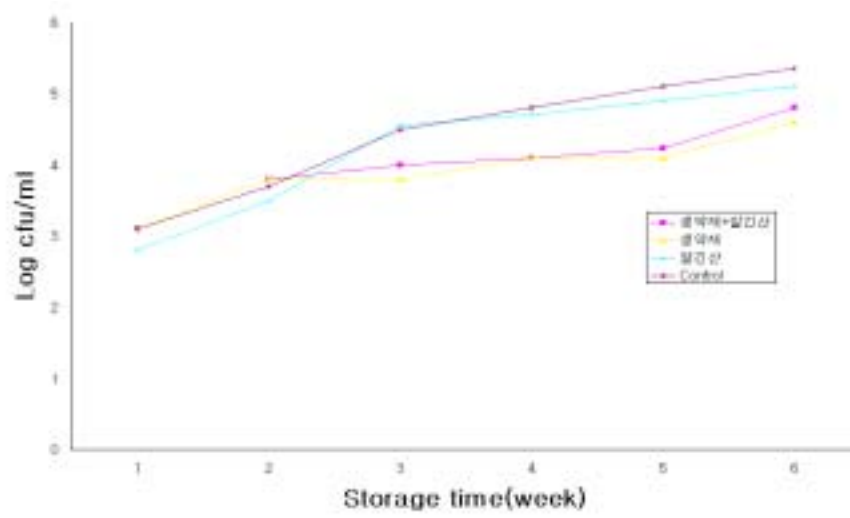


Fig. 38. Total fungal count of green pumpkin during storage at 10°C.

3. 신선 농산물에 대한 저장 유통기간 연장 효과 조사

가. 신선 농산물에 대한 항균제의 처리 공정 개발

1) 천연선도유지제 조건 설정

주 건우에프피에서 구입한 갈근(*Pueraria thumbergiana*), 계피(*Cinnamomum cassia*), 가자(*Terminalia chebula*) 그리고 복분자(*Rubus coreanus miquel*) 물 추출물을 시료로 사용하였으며 각각의 시료를 1%씩 혼합하여 천연선도유지제를 제조하였다. 이는 가자 물 추출물의 MIC 항균실험 결과를 바탕으로 성능과 경제적인 면을 고려하여 최소농도 결과인 1.25%를 가만하여 1%로 정하였다(Fig. 39). 천연선도유지제 제조 시 용매는 증류수와 글리세린 그리고 주정을 사용하였다. 0% 대조구와 10~60%까지 농도별 글리세린과 주정 용액에 붉은색소를 첨가·제조하여 일정크기의 무를 5분간 침지시킨 후 10분간 방치하여 완전 건조시켰다. 글리세린과 주정 용액의 흡수 정도는 무의 변색으로 판정하였다. Spectrophotometer(Minolta CM-2002, Japan)로 색도(L*a*b color space)를 측정하여 용매의 농도에 따른 변색 정도를 측정하였다. 그 결과 글리세린과 주정의 농도는 40%가 가장 효과적 이었다(Fig 40, 41). 과채류는 감귤, 수삼, 상추, 생강 그리고 마늘을 선택하였다.

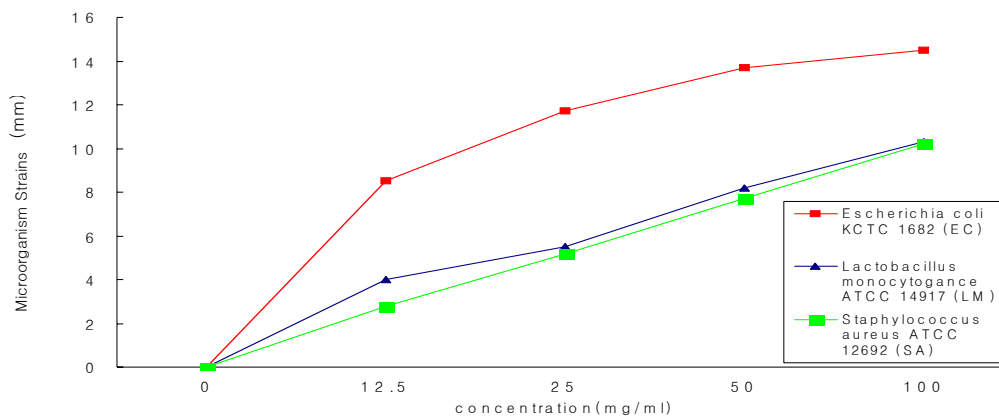


Fig. 39. Antibacterial effects of Water Extracts from *Terminalia chebula* on various concentration.

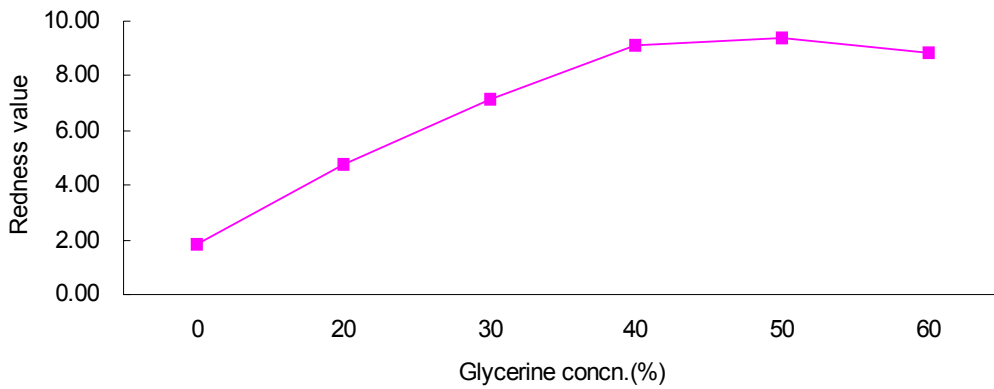


Fig. 40. Redness of radish on the glycerin concentrations

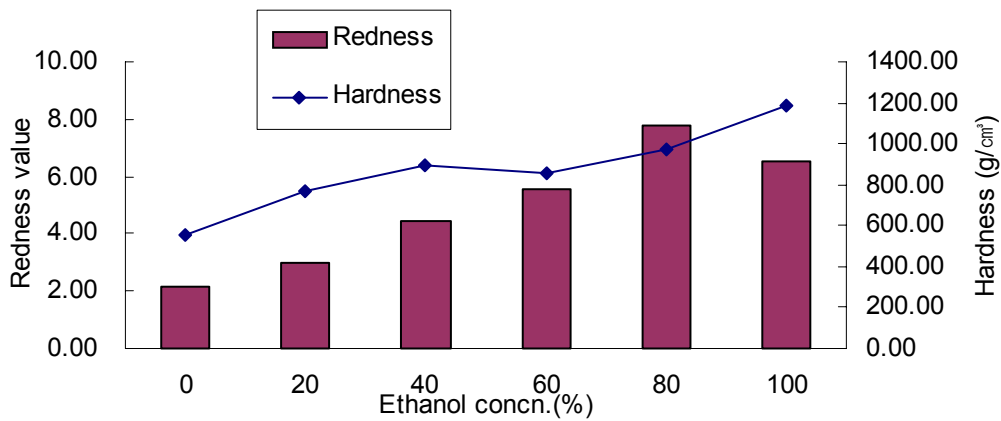


Fig. 41. Redness and hardness of radish on the ethanol concentrations

2) 과채류의 저장 실험

실험에 사용한 시료는 갈근(*Pueraria thumbergiana*), 계피(*Cinnamomum cassia*), 가자(*Terminalia chebula*) 그리고 복분자(*Rubus coreanus miquel*) 물 추출물을 첨가하여 제조하였다. 즉, 가자와 갈근 및 계피를 각각 1%씩 혼합하고, 복분자와 갈근 및 계피도 각각 1% 씩 혼합·제조하여 시료를 두개의 처리구로 만들어 사용하였다. 이에 40% 주정과 40% 글리세린 용액을 만들어서 생약재추출물과 주정 및 글리세린이 각각 함유된 처리 용액을 제조하였다. 대조구로 생약재추출물을 넣지 않은 증류수와 주정 및 글리세린이 각각 사용하였다. 여기서 글리세린 함유 용액은 시료의 표면을 감싸는 성질 때문에 감귤에만 사용하였고 수삼, 생강, 마늘 및 상추에는 주정 함유 용액을 처리구로 각각 사용하였다.

과채류는 국내산으로 구입하여 실험에 사용하였다. 즉, 감귤, 수삼, 상추, 생강 및 마늘을 생약재추출물의 처리구와 주정 및 글리세린이 함유된 용액에 각각 용액에 잠기도록 침지하였다가 꺼내어 자연 건조 시킨 후, 각각의 과채류를 polyethylene 봉투에 넣어 10±1℃ 항온실에 저장하면서 일주일 간격으로 평판배양법을 이용하여 총 균수를 측정하였다.

총 균수 측정은 6가지 처리구별 과채류 시료 20g 취해서 멸균된 polyethylene 봉투에 넣은 후, 100ml의 멸균된 peptone수에 넣어 밀봉하였다. Bag mixer를 이용하여 15초간 혼합한 후 각각의 과채류 즙 1ml을 피펫으로 분취하여 평판배양법에 준하여 총 균수를 측정하였다.

가) 생약재추출물처리에 의한 과채류의 저장기간 동안의 변화

생약재추출물의 수용액 침지처리에 의한 선도유지 효과를 알아보기 위해 과채류로 감귤, 수삼, 상추, 생강 및 마늘을 가자, 복분자, 갈근과 계피의 물 추출물을 수용액 침지 처리 하여 10℃ 항온실에서 보관하여 총 균수 측정과 관능적 평가를 한 결과는 다음과 같다.

(1) 감귤

감귤의 총 균수 측정결과와 관능적 평가내용은 Table 19 와 같다. 대조구와 생약재 추출물 처리구에 있어서 모든 저장기간은 5주로 외관은 4주까지 모두 좋았으며 감귤의 향도 좋았으나 5주에서 대조구인 증류수와 글리세린에서 다른 처리구에 비해 나빴으며, 조직감은 저장기간의 경과에 따라 단단함이 조금씩 물러지는 것을 볼 수 있었다.

총 균수의 경우 대조구인 증류수와 글리세린에서는 균이 0주에서 1주일 이 지난 후 균이 급격히 늘어나 조금씩 증가하고 있었으나 증류수에 가자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구에서는 0주에서 1주일 이 지난 후 균수가 2.73에서 2.11로 줄어들었으며 증류수에 복분자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구에서는 0주에서 1주일 이 지난 후 균수가 증가했다가 1주에서 2주로 지나며 균수가 4.39에서 3.58로 감소한 것을 알 수 있는데 이는 다른 과채류의 같은 처리구에서 볼 수 없는 현상으로 동일한 방법으로 시료를 처리했지만 시료에 따른 처음부터 가지고 있는 균의 차이에 따른 결과라고 판단해 본다. 생약재추출물 처리를 하지 않은 증류수와 글리세린은 총 균수가 조금씩 증가 다른 처리구보다 균수가 생약재추출물 처리를 한 감귤에서의 총 균수보다 높은 것을 확인할 수 있었고, 증류수에 가자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구에서 총 균수가 감소하며 동안 가장 낮은 총 균수를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 43).

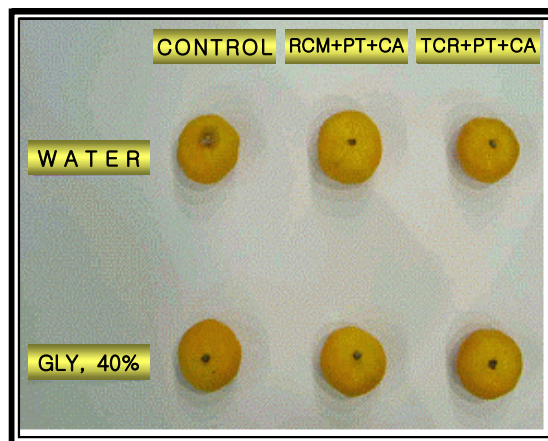


Fig. 42. Appearance of orange during storage at 10°C

Table 19. Total microbial count and acceptability of orange during storage at 10°C.

(Unit : log CFU/g)

sample ¹⁾		storage time (weeks)					
		0	1	2	3	4	5
1	Total microbial count	1.00	4.78	4.81	5.12	6.23	6.60
	Acceptability	+	+	+	+	+	-
2	Total microbial count	1.00	5.36	5.65	6.26	6.30	6.40
	Acceptability	+	+	+	+	+	-
3	Total microbial count	1.30	4.39	3.58	4.64	5.59	5.70
	Acceptability	+	+	+	+	+	+
4	Total microbial count	1.30	4.65	4.69	5.07	5.45	5.60
	Acceptability	+	+	+	+	+	+
5	Total microbial count	2.73	2.11	2.41	3.15	5.15	5.38
	Acceptability	+	+	+	+	+	+
6	Total microbial count	1.00	3.43	3.3	5.03	5.77	5.85
	Acceptability	+	+	+	+	+	+

¹⁾ sample ; 1 : control(destilled water), 2 : glycerine or ethanol 40% , 3 : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 4: glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water 5 : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 6 : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

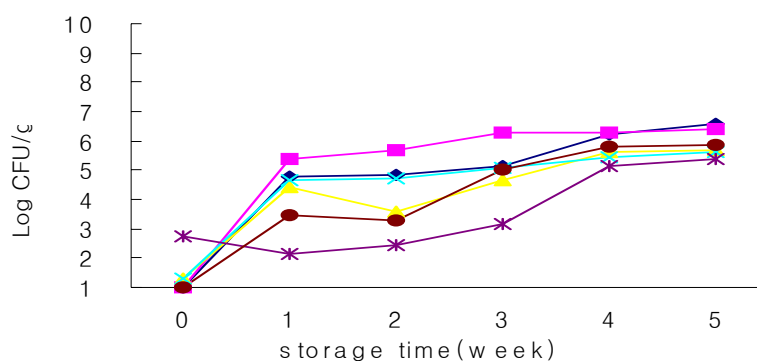


Fig. 43. Total microbial count of orange during storage at 10°C

♥ : control(destilled water), ■ : glycerine or ethanol 40%, ▲ : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, × : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water, * : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, ● : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

(2) 수삼

수삼의 총 균수 측정결과와 관능적 평가내용은 Table 20 과 같다. 대조구와 생약재 추출물 처리구에 있어서 모든 저장기간은 5주로 외관은 수삼의 머리와 뿌리 부분을 중심으로 보아 2주까지 모두 좋았으며 대조구와 복분자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구는 3주까지도 좋았다. 가자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구는 가자를 넣음으로 용액의 색이 진해서 인지 전체적으로 수삼의 색이 진한 갈색을 띄었다. 수삼 향은 3주까지 좋았다. 조직감은 2주까지 뽀뽀함이 살아있었으나 저장기간의 경과에 따라 물러지는 것을 볼 수 있었다. 식용은 2~3주 사이까지 가능하다.

총 균수의 경우 대조구인 주정과 증류수에 복분자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구에서 균이 0주에서 3주까지 균이 각각 7.31에서 6.49, 6.97에서 6.71로 조금씩 감소하는 것을 볼 수 있었으나 다른 처리구에서는 0주에서 1주 사이 균수가 늘었다가 2주 줄어들었으며 다시 3주부터 계속 증가해나갔다. 이 역시 동일한 방법으로 시료를 처리했지만 시료가 처음부터 가지고 있던 균의 차이에 따른 결과라고 판단해 본다. 수삼은 대조구인 주정과 복분자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구에서 총 균수가 감소하며 저장효과 좋았다(Fig. 45).

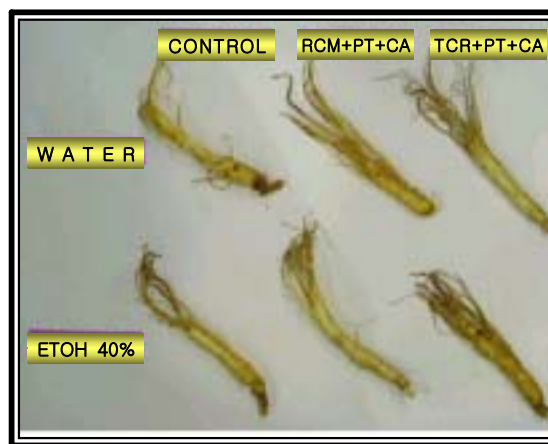


Fig. 44. Appearance of fresh ginseng during storage at 10°C

Table 20. Total microbial count and acceptability of fresh ginseng during storage at 10°C. (Unit : log CFU/g)

sample ¹⁾		storage time (weeks)					
		0	1	2	3	4	5
1	Total microbial count	6.35	7.57	7.09	7.14	9.04	9.18
	Acceptability	+	+	+	+	-	-
2	Total microbial count	7.31	6.80	6.47	6.49	8.30	8.32
	Acceptability	+	+	+	+	-	-
3	Total microbial count	6.97	6.88	6.78	6.71	8.20	8.30
	Acceptability	+	+	+	+	-	-
4	Total microbial count	5.58	7.24	7.00	7.27	8.26	8.81
	Acceptability	+	+	+	+	-	-
5	Total microbial count	6.23	7.83	7.41	7.95	8.78	8.95
	Acceptability	+	+	+	-	-	-
6	Total microbial count	5.81	7.82	7.10	7.83	8.58	9.20
	Acceptability	+	+	+	-	-	-

¹⁾ sample ; 1 : control(destilled water), 2 : glycerine or ethanol 40% , 3 : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 4: glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water 5 : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 6 : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

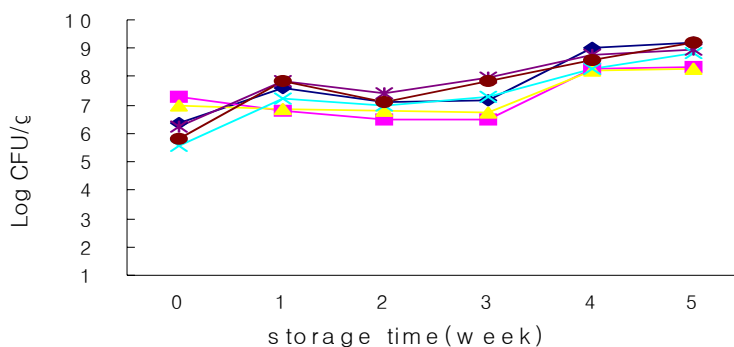


Fig. 45. Total microbial count of fresh ginseng during storage at 10°C

♥ : control(destilled water), ■ : glycerine or ethanol 40%, ▲ : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, × : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water, * : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, ● : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

(3) 상추

상추의 총 균수 측정결과와 관능적 평가내용은 Table 21과 같다. 대조구와 생약재추출물 처리구에 있어서 모든 저장기간은 5주로 외관, 향 및 조직감 모두 1주까지는 싱싱하고 좋았으나 2주부터 절반이상이 짓물렀고 3주부터는 모든 처리구가 썩은 내와 짓물러 시료를 분취하기도 어려웠다. 식용 가능한 저장기간은 1주가 적당하다.

총 균수의 경우 0-1주 사이에 주정만이 균이 6.08에서 7.08로 감소하는 것으로 나타났으며 대조구인 증류수와 생약재추출물 처리구 모두에서 균이 증가하는 것으로 나타났다.(Fig. 46).

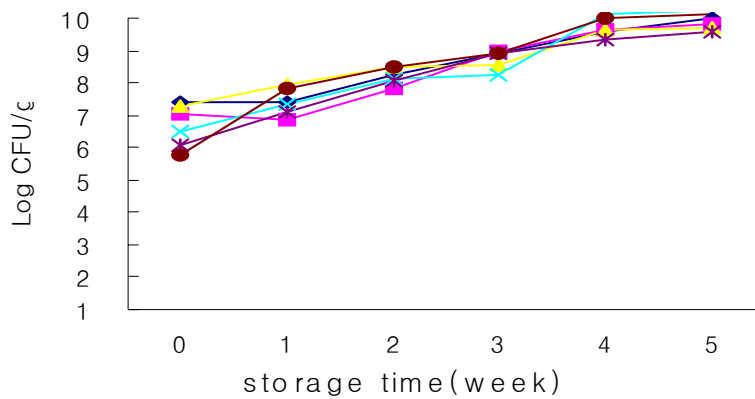


Fig. 46. Total microbial count of lettuce during storage at 10°C

♥ : control(distilled water), ■ : glycerine or ethanol 40%, ▲ : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, × : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water, * : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, ● : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

Table 21. Total microbial count and acceptability of lettuce during storage at 10°C.

(Unit : log CFU/g)

sample ¹⁾		storage time (weeks)					
		0	1	2	3	4	5
1	Total microbial count	7.39	7.38	8.26	8.92	9.59	9.98
	Acceptability	+	+	-	-	-	-
2	Total microbial count	7.05	6.84	7.84	8.97	9.63	9.84
	Acceptability	+	+	+	-	-	-
3	Total microbial count	7.31	7.93	8.50	8.55	9.66	9.67
	Acceptability	+	+	-	-	-	-
4	Total microbial count	6.50	7.33	8.10	8.26	10.10	10.20
	Acceptability	+	+	-	-	-	-
5	Total microbial count	6.08	7.08	8.05	8.94	9.33	9.58
	Acceptability	+	+	-	-	-	-
6	Total microbial count	5.76	7.85	8.49	8.90	10.00	10.10
	Acceptability	+	+	-	-	-	-

¹⁾ sample ; 1 : control(destilled water), 2 : glycerine or ethanol 40% , 3 : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 4: glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water 5 : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 6 : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

(4) 생강

생강의 총 균수 측정결과와 관능적 평가내용은 Table 22와 같다. 대조구와 생약재추출물 처리구에 있어서 모든 저장기간은 5주로 외관, 향 및 조직감 모두 1주까지 단단하고 생강 향도 좋았으나 2주부터 대조구인 증류수와 주정, 주정에 복분자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구에서 곰팡이가 생기며 짓무르기 시작했고 3주부터는 썩은내와 짓물러 시료를 자르면 진액이 흘렀다. 생강의 식용 가능한 저장기간은 2주까지가 적당하다.

총 균수의 경우 0~1주 사이에 증류수에 복분자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구에서 균이 7.52에서 6.77로 감소하는 것으로 나타났다. 그 밖의 대조구와 생약재추출물 처리구는 균이 증가하는 것으로 나타났으며 3주후 균은 눈에 띄게 증가하지 않았다.(Fig. 48).

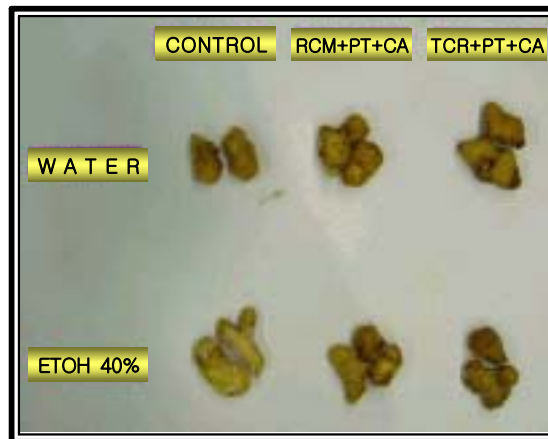


Fig. 47. Appearance of ginger during storage at 10°C

Table 22. Total microbial count and acceptability of ginger during storage at 10°C.

(Unit : log CFU/g)

sample ¹⁾		storage time (weeks)					
		0	1	2	3	4	5
1	Total microbial count	7.85	7.62	8.40	8.62	8.81	9.13
	Acceptability	+	+	-	-	-	-
2	Total microbial count	7.23	7.24	8.14	8.15	8.28	8.64
	Acceptability	+	+	-	-	-	-
3	Total microbial count	7.52	6.77	7.06	7.94	8.40	8.71
	Acceptability	+	+	+	-	-	-
4	Total microbial count	6.96	7.27	8.35	8.56	8.91	9.00
	Acceptability	+	+	-	-	-	-
5	Total microbial count	6.59	6.81	7.36	8.15	8.91	9.11
	Acceptability	+	+	+	-	-	-
6	Total microbial count	6.52	6.83	7.73	8.54	8.62	9.09
	Acceptability	+	+	+	-	-	-

¹⁾ sample ; 1 : control(destilled water), 2 : glycerine or ethanol 40% , 3 : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 4: glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water 5 : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 6 : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

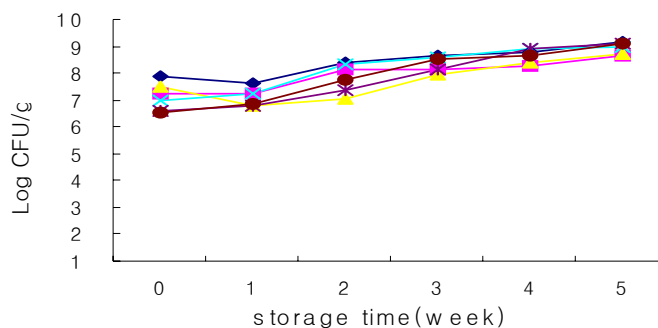


Fig. 48. Total microbial count of ginger during storage at 10°C

♥ : control(destilled water), ■ : glycerine or ethanol 40%, ▲ : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, × : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water, * : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, ● : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

(5) 마늘

마늘의 총 균수 측정결과와 관능적 평가내용은 Table 23 과 같다. 대조구와 생약재 추출물 처리구에 있어서 모든 저장기간은 6주로 외관은 겉을 보아 4주까지 모두 좋았으며 부분적으로 가자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구에서 가자로 인해 용액의 색이 진해져 부분적으로 마늘의 겉에 갈색을 띄었다. 마늘 향 역시 4주까지 좋았다. 조직감은 대부분이 단단했다. 식용은 3~4주 사이까지 가능하다.

총 균수의 경우 증류수에 생약재추출물을 넣은 처리구에서 균이 감소하는 현상을 보였다. 0~1주 사이 증류수에 복분자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구와 가자, 갈근, 계피 물 추출물을 넣은 처리구의 균이 각각 6.52에 5.77로, 6.78에서 6.00으로 감소하는 것을 볼 수 있었으며 다른 처리구에서는 큰 변화 없이 일정한 균수가 증가하는 것을 볼 수 있다.(Fig. 50).

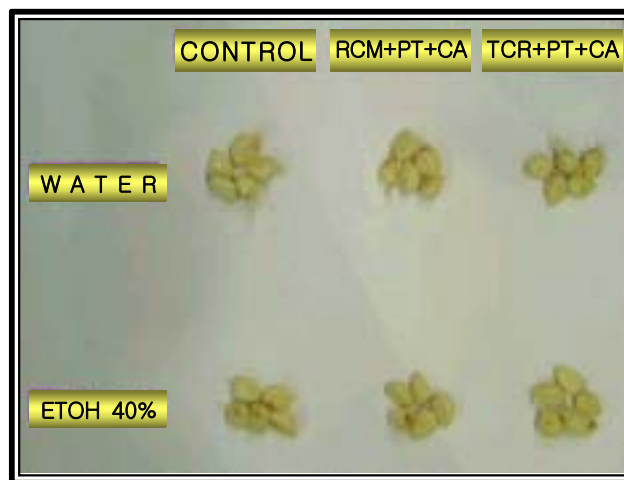


Fig. 49. Appearance of garlic during storage at 10°C

Table 23. Total microbial count and acceptability of garlic during storage at 10°C.

(Unit : log CFU/g)

sample ¹⁾		storage time (weeks)						
		0	1	2	3	4	5	6
1	Total microbial count	7.58	7.78	7.89	7.56	7.60	8.82	8.30
	Acceptability	+	+	+	+	-	-	-
2	Total microbial count	6.30	6.29	7.37	7.48	7.76	8.64	8.67
	Acceptability	+	+	+	+	-	-	-
3	Total microbial count	5.87	6.05	7.22	6.85	7.48	7.70	7.74
	Acceptability	+	+	+	+	+	-	-
4	Total microbial count	6.52	5.77	5.95	5.90	7.34	8.34	8.36
	Acceptability	+	+	+	+	+	-	-
5	Total microbial count	6.92	7.02	6.78	6.85	7.00	7.60	7.61
	Acceptability	+	+	+	+	+	-	-
6	Total microbial count	6.78	6.00	6.09	6.83	7.95	7.95	7.97
	Acceptability	+	+	+	+	-	-	-

¹⁾ sample ; 1 : control(destilled water), 2 : glycerine or ethanol 40% , 3 : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 4: glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water 5 : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, 6 : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

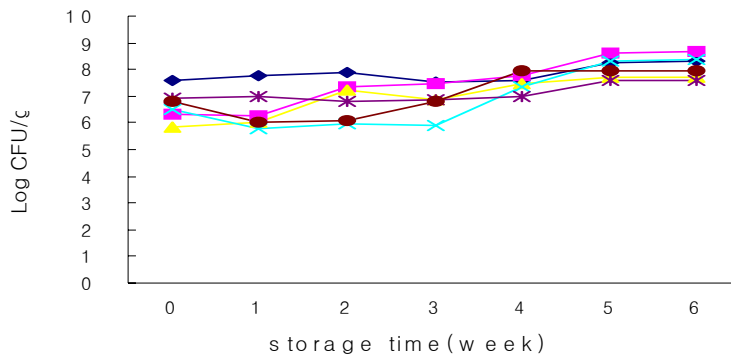


Fig. 50. Total microbial count of galic during storage at 10°C

♥ : control(distilled water), ■ : glycerine or ethanol 40%, ▲ : distilled water added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, × : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Rubus coreanus miquel*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water, * : distilled water added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts, ● : glycerine or ethanol 40% solution added with 1% of *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana* & *Cinnamomum cassia* Water Extracts

생약재추출물은 식품부패세균에 대해 polyphenol성분들이 다량 함유하고 있어 미생물의 항균작용에 유의성을 보이며 이는 총 균수를 감소시켜 과채류의 품질 특성을 유지에 도움이 될 것으로 생각된다. 특히 가자 추출물은 저장성 연장에 효과가 우수하며 그보다 다소 미약하나 복분자 역시 식품의 저장성 연장에 효과가 우수하다고 보고하고 있다. 이처럼 생약재추출물은 식품의 저장성 연장에 우수한 천연 식품보존료임을 확인할 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표

I. 1차년도 연구목표

천연 식물자원 유래의 향균제 개발

향 곰팡이 성분의 추출방법 개발, 향 곰팡이 성분의 분리 정제, 향 곰팡이 성분의 이화학적 특성 규명, 향 곰팡이 성분이 농산물의 부패에 미치는 효과 조사, 향 곰팡이 성분의 적용 방법 개발 등의 연구를 하고자 한다.

2. 2차년도 연구목표

천연 식물자원 유래의 향균제의 특성 규명 및 활용방안 개발

천연 향균 성분의 추출방법 개발, 천연 향균 성분의 분리 정제, 천연 향균 성분의 이화학적 특성 규명, 천연 향균 성분의 농산물의 부패에 미치는 효과 조사, 천연 향균 성분의 적용 방법 개발 등의 연구를 하고자 한다.

3. 3차년도 연구목표

신선 농산물에 대한 저장 유통기간 연장 효과 조사

과일류(감귤, 딸기, 사과 등)에 대한 유통기간 연장 효과, 채소류(부추, 상추, 애호박, 풋고추 등)에 대한 유통기간 연장 효과, 기타 농산물(마늘, 생강, 수삼 등)에 대한 유통기간 연장 효과 등의 연구를 하고자 한다.

제 2 절 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	평 가 착 안 사 항	달 성 도
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> · 향 곰팡이 성분의 추출·분리 방법 개발 · 향 곰팡이 성분의 이화학적 특성 규명 · 향 곰팡이 성분이 농산물의 부패에 미치는 효과 조사 · 향 곰팡이 성분의 적용 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · 생약재의 물 추출물과 70% ethanol 추출물을 사용하여 5종의 곰팡이에 대한 향 곰팡이 활성을 탐색 · 향 곰팡이 효능이 우수한 생약재를 농도별로 향 곰팡이 활성을 실험
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> · 천연 향 세균 성분의 추출·분리 방법 개발 · 천연 향 세균 성분의 이화학적 특성 규명 · 천연 향 세균 성분의 농산물 부패에 미치는 효과조사 · 천연 향 세균 성분의 적용 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · 생약재의 물 추출물과 70% ethanol 추출물을 제조하여 6종의 세균에 대해 항균활성을 탐색 · 항균활성이 우수한 생약재를 선별하고 농도별 활성을 실험 · HPLC를 이용한 폴리페놀성분 분석(페놀성분과 항균활성과의 상관도)
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> · 과일류(감귤, 딸기, 사과 등)에 대한 유통기간 연장효과 · 채소류(부추, 상추, 애호박, 풋고추 등)에 대한 유통기간 연장 효과 · 기타 농산물(수삼, 마늘, 생강 등)에 대한 유통기간연장 효과 	<ul style="list-style-type: none"> · 과일 및 채소류의 부패에 관여하는 곰팡이와 부패세균에 효과가 있는 항균성 물질을 이용하여 과실 및 채소류 등 신선 농산물의 저장 유통기간을 연장할 수 있는 기술을 개발

제 3 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술

천연 식물자원 유래의 천연 보존료의 사용은 일부 식품에 적용해왔으나 이를 이용한 신선 농산물의 저장 유통 기술은 국내뿐 아니라 외국에서도 활용 사례를 접하기 힘들다.

천연선도유지를 위해 신선 농산물로 과일류에는 감귤, 딸기, 사과를, 채소류에는 부추, 상추, 애호박, 풋고추, 기타 농산물로 마늘, 생강, 수삼을 선택하여 천연 보존료인 생약재 가자, 복분자, 갈근, 계피를 가해 10℃에 저장하여 총 균수를 살펴본 결과 저장유통 기간을 연장 시킬 수 있었다.

이는 부패세균에 대한 생약재의 항균, 항 곰팡이 실험을 통하여 항균, 항 곰팡이 활성에 관여하는 폴리페놀 성분을 위의 생약재들이 함유함을 밝혀 항균제로서 가치를 입증함에 따른 것이다.

이번 연구에서 수행하고자하는 천연 보존료를 이용한 신선 농산물의 저장 유통 기술은 신선도를 제고시키는 새로운 선진 기술로서 농산물 저장유통 분야에 활용도가 , 증가할 것으로 보이며 특히 부패하기 쉬운 신선과실, 채소류 유통에 큰 기여를 할 것으로 보인다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

1. 기술적 측면

기존 천연 보존료는 일부 제한된 식품에는 적용되나 신선 농산물에 사용하기가 어렵다. 신선 농산물의 유통기간을 연장시킬 수 있는 천연 보존료의 개발이 필요함에 따라서 본 연구에서는 천연 식물자원으로부터 보존 효과가 있는 천연 보존제를 제조하여 신선 농산물의 유통기간을 연장 할 수 있는 기술을 개발하였다.

○ 연구 결과 및 결과별 활용가능 영역

1) 국내외 관련 학회 논문 게재

- Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants. *FOOD SCI. BIOTECHNOL.* Vol. 13, No. 5, 640-645 (2004)
- 생약재의 항균, 항고혈압 및 활성. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* Vol. 37, No. 2, 206-213 (2005)
- 식품부패세균에 대한 가자(*Terminalia chebula* Retz.) 추출물의 항균활성 *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* Vol. 37, No. 3, 498-503 (2005)
- Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Ethanol Extracts of Medicinal *FOOD SCI. NUTR* Vol. 10, 81-87 (2005)

2) 국내외 관련 학회 학술발표

- 생약재 추출물의 수율 및 항고혈압 활성, 한국식품저장유통학회, 대전국립중앙과학관 (2003. 10. 31)
- 생약재의 식품부패 세균에 대한 항균활성, 한국식품저장유통학회, 대전국립중앙과학관 (2003. 10. 31)
- 생약재의 식품부패 곰팡이에 대한 항균활성, 한국식품저장유통학회, 대전국립

중앙과학관 (2003. 10. 31)

- 생약재 추출물의 항균 활성 및 Polyphenols 함량분석, 한국식품과학회, 강원도 용평리조트 (2004. 6. 23)
- 식품부패세균에 대한 가자(*Terminalia chebula* Retz.)추출물의 항균활성, 한국식품과학회, 서울 COEX 컨벤션 센터 (2005. 6. 17)
- HPCL를 이용한 한약재 물 추출물 중 폴리페놀성분의 정량, 한국식품영양과학회, 강원도 용평리조트 (2005. 10. 21.)
- 생약재추출물에 의한 과채류의 저장 중 항균효과, 한국식품유통학회, 경북대학교 (2005. 10. 28)

2. 경제 · 산업적 측면

우리나라의 신선 농산물의 수확 후 손실률은 품목에 따라서 차이가 있으나 대체로 20~50%에 이르고 있는 것으로 보고 되고 있어, 신선 농산물의 품질관리는 수확 후부터 소비자에 들어가기까지의 전 단계에 대하여 온도, 습도, 가스 환경, 미생물의 생육 제어 등이 종합적으로 이루어져야만 소정의 목적을 달성할 수가 있다. 따라서 미생물의 생육억제 효과가 있는 천연 보존료의 개발 필요성을 가지게 되어 천연 식물자원인 생약재를 원료로 한 연구결과를 경제적인 측면에서 살펴보기위하여 이들 생약재에 증류수와 70% Ethanol을 가한 물 추출물과 70% Ethanol 추출물의 수율을 각각 측정한 결과, 수율이 40~30%에는 달하는 생약재로 물 추출물에는 가자, 갈근, 산수유, 맥문동이 있고, 70% Ethanol 추출물에는 가장, 당귀, 산수유가 속하며, 30~20%에 달하는 생약재로 물 추출물에는 감초, 구기자, 당귀, 오미자, 천궁, 황기가 있고, 70% Ethanol 추출물에는 감초, 맥문동, 구기자, 미자, 오수유, 천궁, 황기가 있다.

또한, 항균, 항 곰팡이 활성에 관여하는 물질인 폴리페놀 성분의 함량이 높은 물 추출물로는 가자, 지유, 갈근, 복분자, 작약 및 오수유가 있으며, 에탄올 추출물로는 가자, 복분자, 호장근, 저항, 소목 및 육두구가 있다.

이 중 가자의 경우 물 추출물, 에탄올 추출물 모두 총 폴리페놀 함량이 가장 높은 값을 나타냈을 뿐만 아니라 수율(%)함량도 높기 때문에 식품의 선도유지를 위한 소재로 가장 적합하다고 생각되어진다.

이러한 신선 농산물의 유통기간 연장을 위한 천연 보존료의 연구로 신선 농산물의 부패 감도 손실을 기존 20~50%에서 5% 이하로 줄일 수 있어 신선 농산물의 연간

총생산량 12조 2,431억원의 30%정도 감모 억제 효과를 가져온다고 추산하면 연간 약 4조 431억원의 경제적 손실을 억제할 수 있다.

또한 기존 살균제, 훈증제의 대체 효과가 있으며, 고품질 신선 농산물의 안정적인 공급으로 수입농산물에 대한 경쟁력을 제고 할 수 있다.

향후 유효성분 함량이 높은 원료생산의 연구는 계속적으로 이루어져야 한다고 사료된다.

제 2 절 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

항균 효능이 있는 생약재로 지금까지 보고 된 자료로 항 곰팡이 효능과 항 세균 효능을 중심으로 정밀 검토하여 오미자, 녹차, 가자육, 오배자, 당귀, 계자, 인삼 등의 생약재가 항균 효능이 있는 것으로 보고 이를 원료로 선정하였고, 본 연구에서는 부패에 주로 관여하는 곰팡이 및 부패 세균에 대한 기본 메커니즘 구명하여, 천연 보존제로 개발, 생산을 참여기업과 공동 추진함으로써 연구개발 결과가 바로 실용화될 수 있도록 하였다.

이 결과는 타 연구에 있어서 신선 농산물뿐만 아니라 합성보존료를 대신할 가공품의 보존료로의 활용방안으로 연구와 대중화를 위한 연구에도 응용되어 질 수 있길 바란다.

기업화 추진에 있어 한국식품연구원이 천연 식물자원 이용 분야의 중소기업인 주식회사 코메츠와 함께 수행한 것으로서 참여기업이 그 동안 관련분야에서 축적해온 기술을 주관연구기관인 한국식품연구원이 농산물 저장·유통 분야의 첨단 신기술로 개발하는 체계로 추진되어진 것으로 연구기술의 사용은 주식회사 코메츠에 우선권이 주어진다.

그러나 본 연구의 결과를 참여기업인 코메츠에서 활용하지 않기로 최종결정이 내려진 경우, 관련 업체에 홍보하여 연구 결과를 산업화 할 수 있게 된다.

또한 생산농민단체(농협, 영농조합법인 등), 공공판매시설(물류센터, 도매시장), 농산물 수출 단체 등을 통해 전수하면서 단계적으로 농업전반에 확대 보급할 수 있도록 활용할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절. 항균성분을 가진 한약·생약

1. ANTIBACTERIAL AGENT CONTAINING 'OUREN'

(PURPOSE) To prevent infectious diseases, etc. by using an antibacterial agent consisting of OUREN (rhizome of *Coptis Japonica*) which has hitherto been cultured and utilized as a crude drug. (CONSTITUTION) This antibacterial agent containing concentrated liquid or dried extract of OUREN is produced by cutting OUREN into small pieces, immersing in water for a proper time, extracting on a water bath, filtering the extract, concentrating the separated extract liquid and drying the concentrate by a constant-temperature dryer to obtain a dried extract. The antibacterial agent containing OUREN is impregnated in a substrate to obtain an antibacterial paper, antibacterial cloth, antibacterial sheet or antibacterial nonwoven fabric.

2. ANTIBACTERIAL COMPOSITION

(PURPOSE) To obtain an antibacterial composition showing excellently preventing effects on deterioration of pimples and treating effects on inflammations, containing baicalein phosphate as an active ingredient. (CONSTITUTION) Baicalein phosphate, flavonoid of *Scutellaria baicalensis*, crude drug, is dissolved in any of various aqueous solutions by a conventional procedure and then prepared into a necessary dosage form to give the aimed substance. The aimed substance can be prepared into solution, cream, ointment, powder or spray. The substance is preferably blended with a buffer solution at pH approximately 5.0 in order to show the antibacterial action of phosphate at its maximum and the composition is preferably adjusted to pH 5.0W6.5. The aimed substance shows selectively antibacterial action on *Propionibacterium*, pimple causing bacterium. 0.2W8μg baicalein phosphate is applied based on 1cm² skin.

3. Antiviral and antimicrobial herbal complex

A pharmacologically effective composition of herbs is provided which is antiviral, antibacterial, and symptom relieving for colds, flu, sinus infections, stomach infections, blocked ears due to infection, bronchitis, genital herpes, and herpes simplex. The composition does not contain any undesirable stimulants or other ingredients, such as caffeine and chlorohydrate. The preferred composition includes Isatis leaf and root, as well as other anti-microbial herbal agents, along with herbs for aches, pains, sore throat, and to reduce fever.

4. Polymers containing antimicrobial agents and methods for making and using same

Polymeric compositions containing antimicrobial agents and methods for making and using same are provided. The antimicrobial agents include phytochemicals and phytonutrients such as naturally occurring extracts from plants and herbs and other chemical disinfectants safe for use on food-contact surfaces. Chemical releasers can be added to the compositions for causing the release of the antimicrobial agents. The chemical releasers include citric acid extract. A blend of antimicrobial agents can be included in the composition for destroying and inhibiting the growth of a wide variety of different microorganisms including bacteria, viruses, and fungi.

5. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*

Of 17 spices and herbs tested at 1% (wt/vol) in Mueller-Hinton (MH) agar, only cloves, thyme, oregano, allspice, basil, rosemary, and marjoram showed antimicrobial effects on *Shigella*. The MICs of thyme, oregano, basil, and rosemary (as determined by the agar dilution method) ranged from 0.5 to 1% (wt/vol) depending on the *Shigella* strain used. With the use of various combinations of temperatures (12, 22, and 37 °C), pHs (5.0, 5.5, and 6.0), and NaCl concentrations (1, 2, 3, and 4%, wt/vol) and the inclusion or exclusion of thyme or basil at 1%

(wt/vol) in an MH agar model system, it was established that basil or thyme can contribute to combination processing as a growth-inhibitory factor for *Shigella* spp. In the presence of basil and thyme, *Shigella flexneri* did not develop CFU during the 7-day incubation period for, respectively, 14 and 16 of the 18 tested combinations, while growth was noted in the corresponding temperature-pH-NaCl concentration combinations without basil or thyme. A growth-inhibitory effect on *Shigella sonnei* was also noted. The results of an orientation study involving the addition of basil and thyme to spaghetti sauce prior to autoclaving and *S. sonnei* inoculation indicated that basil and thyme contributed to the reduction of *S. sonnei* after 16 days at 12 °C but not at 4 °C.

6. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*.

The potential of spices and herbs to inhibit *Shigella sonnei* and *S. flexneri* was investigated. Of 17 spices and herbs tested at 1% w/v in Mueller-Hinton (MH) agar, only cloves, thyme, oregano, allspice, basil, rosemary and marjoram showed antimicrobial effects against *Shigella*. The min. inhibitory concn. of thyme, oregano, basil and rosemary (as determined by the agar dilution method) ranged from 0.5 to 1% w/v depending on the *Shigella* strain used. With the use of various combinations of temp. (12, 22 and 37(degree)C), pH (5.0, 5.5 and 6.0) and NaCl concn. (1, 2, 3 and 4% w/v), and the inclusion or exclusion of thyme or basil at 1% w/v in the MH agar model system, it was established that basil or thyme can contribute to combination processing as a growth-inhibitory factor for *Shigella* spp. In the presence of basil and thyme, *S. flexneri* did not develop cfu during the 7-day incubation period for, respectively, 14 and 16 of the 18 tested combinations, while growth was noted in the corresponding temp./pH/NaCl concn. combinations without basil or thyme. A growth-inhibitory effect on *S. sonnei* was also noted. Results of an orientation study involving the addition of basil and thyme to spaghetti sauce, prior to autoclaving and *S. sonnei* inoculation, indicated that basil and thyme contributed to the reduction of *S. sonnei* after 16

days at 12(°)C but not at 4(°)C.

7. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols.

Hydrosols can be obtained from herbs and spices by subjecting ground samples to hydrodistillation for 1 h. In this study, hydrosols of 16 spices (black thyme, sumac, sea fennel, summer savory, sage, rosemary, pickling herbs, oregano, mint, laurel, fennel, dill, dalmagia sage, cumin, basil, anise) were obtained and their antibacterial activity was determined. Hydrosols were added to 5 mm-diam. filter paper discs at a concn. of 50 µl/disc, which were then incubated at 25(°)C for 18-24 h with a range of bacteria, including *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis* var. *niger*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* and *Yersinia enterocolitica*. Hydrosols of oregano and summer savory demonstrated activity against all bacterial species tested, whereas anise, cumin, oregano, summer savory and black thyme were effective against some species. The other spice hydrosols did not demonstrate any antibacterial activity.

8. Antimicrobial characteristics of *Scutellariae radix* extract.

Inhibition of food-borne pathogens by a *Scutellaria radix* extract was investigated. The *S. radix* extract showed marked antimicrobial activity against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Vibrio parahaemolyticus* and was effective over a wide range of temp. and pH. Growth rates of all pathogens studied decreased in the presence of >500 ppm *S. radix* extract, indicating that the min. inhibitory concn. was approx. 500 ppm. Morphological changes to the pathogens were observed by TEM and SEM, including destruction of bacterial cell membranes. The membrane perturbation effect of *S. radix* extract on *E. coli* cells was confirmed using the beta-galactosidase test.

9. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol.

In Turkey, *Micromeria* spp. are used in the preparation of herbal teas due to their pleasant aroma and medicinal properties. Water-distilled essential oils from herbal parts of *M. cristata* (Hampe) Griseb. subsp. *phrygia* P.H. Davis (Endemic) (Lamiaceae) collected from 3 different localities were analysed by GC-MS. The predominant component of all 3 oils was borneol (27-39%). Other major components of the essential oils were camphor (9-15%), caryophyllene oxide (4-6%) and trans-verbenol (4-6%). Enantiomeric distributions of borneol and camphor in the oils were determined on a fused silica Lipodex-E capillary column using a multidimensional GC-MS system. The 3 essential oils and both enantiomers of borneol were evaluated for their antimicrobial activity and were found to inhibit both Gram-negative and Gram-positive pathogens.

10. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species.

Essential oils obtained from the aerial parts of *Origanum scabrum* and *Origanum microphyllum*, both endemic species in Greece, were analysed by means of GC and GC-MS. 48 constituents were identified, representing 98.59 and 98.66% of the oils, respectively. Carvacrol, terpinen-4-ol, linalool, sabinene, alpha-terpinene, and gamma-terpinene were the major components detected. Both essential oils exhibited an interesting antimicrobial profile after they were tested against 6 Gram-negative or Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*) and 3 pathogenic fungi (*Candida albicans*, *C. tropicalis* and *Torulopsis glabrata*).

11. Antimicrobial activities of *Quercus* spp. leaf ethanol extract against foodborne disease microorganism.

Ethanol extracts of 18 different traditional medicinal herbs were tested for

antimicrobial activity against various foodborne pathogens. Among them, ethanol extracts of *Quercus mongolica* demonstrated the strongest antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, followed by *Q. aliena* and *Q. dentata*. *Quercus* plants were then extracted with ethanol, methanol and water and their antimicrobial activities were investigated further. Ethanol, methanol and water extracts of *Q. mongolica* (2000 mug/disc) produced inhibition zones measuring 16–21, 13–19 and 14–20 mm, respectively against Gram-positive bacteria; corresponding values against Gram-negative bacteria were 13–17, 12–17 and 13–16 mm; little antimicrobial activity was observed against fungi (*Rhizopus javanicus* IFO 5441) and yeast (*Candida utilis* IFO 0589). Minimal inhibitory concn. of *Q. mongolica* ethanol extracts were 250 mug/ml against *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*, 125 mug/ml against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and 62.5–125 mug/ml against 9 different strains of *Listeria monocytogenes*.

12. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and corni fructus.

Extracts were prepared from Chinese chive (*Allium tuberosum*), cinnamon (*Cinnamomum cassia*), and corni fructus (fruit of *Cornus officinalis*, used in traditional Chinese medicine) and used to evaluate their antimicrobial activity against common foodborne microorganisms, alone and in combination. The mixed extract, consisting of 3 extracts in equal vol., showed an entire antimicrobial spectrum and had excellent stability to heat, pH and storage. The mixed extract exhibited better inhibition of growth of *Escherichia coli* than potassium sorbate at 2–5 mg/ml. The mixed extract inhibited growth of *Pichia membranaefaciens* at levels as low as 2 mg/ml. When the mixed extract was used in foods, the expected antimicrobial effect in orange juice, pork and milk was observed. After gel filtration chromatography, each extract was partially purified into fractions, and 1 fraction in each extract showed enhanced antimicrobial activity. Overall, the mixed extract had promising potential for incorporation into various food products

for which a natural antimicrobial additive is desired.

13. Antimicrobial activity of the essential oil of the herbs of *Agastache rugosa* and its composition.

Antimicrobial activity of essential oil obtained by steam distillation from *Agastache rugosa* was investigated and volatile components of the oil were identified by GC-MS. The essential oil inhibited growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Parathi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*, with clear zone diam. ranging from 16 mm for *S. Parathi* to 30 mm for *S. aureus*. Volatile compounds identified were isomenthone, menthone, dihydrocarvone, anethole, vanillin, eugenol, methyleugenol, beta-caryophyllene and beta-caryophyllene oxide. It is suggested that components with phenylpropanoid-type structures contribute to the antimicrobial activity of the oil and that the oil may have potential use as a food preservative.

14. The mode of antimicrobial mechanism of *Aristolochia contorta* Bge. extract.

Antimicrobial activity of extracts of the medicinal herb *Aristolochia contorta* Bge. was investigated using *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* and *Candida albicans*. Direct visualization of microbial cells by TEM and SEM demonstrated that microbial cell membranes were destroyed by treatment with a dilute solution of *A. contorta* Bge extract. The herbal extract hydrolysed O-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside, an artificial substrate of beta-galactosidase (beta-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) and it was found that beta-galactosidase activity correlated with membrane perturbation in *E. coli* and *P. syringae*. It is concluded that extracts of *A. contorta* may have potential use as antimicrobial agents in foods.

15. Antimicrobial effect of *Aristolochia contorta* Bge. extract on the growth of pathogenic and putrefactive microorganisms.

Extracts of the medicinal herb *Aristolochia contorta* Bge. were tested for their ability to inhibit several food spoilage microorganisms. Aqueous, butanol, chloroform, ethanol, ethyl acetate and hexane herb extracts were tested against *Bacillus cereus*, *Corynebacterium xerosis*, *Pseudomonas syringae*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida albicans* and *Fusarium* spp. Aqueous extracts of *A. contorta* Bge. at concn. ≥ 500 ppm demonstrated significant inhibitory effects on growth of the above microorganisms, with growth inhibition zones ranging from 12–16 mm diam. Antimicrobial activities of the herbal extracts were stable at 40–150 (degree)C and pH 4–10.

16. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7,

Listeria monocytogenes, and *Salmonella Typhimurium* associated with beef.

Effectiveness of a commercially available, GRAS, herb extract dispersed in sodium citrate (Protecta One) or NaCl (Protecta Two) against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated onto beef was investigated in 3 experiments. Results of the 1st experiment showed that all 3 bacteria inoculated onto beef and subjected to surface spray treatments with 2.5% solutions of Protecta One or Protecta Two were not affected by immediate application (day 0) of the herbal extracts. However, after 7 days of storage at 4(degree)C, *E. coli* O157:H7 was reduced by $>1.3 \log_{10}$ cfu/cm² by Protecta Two, *L. monocytogenes* was reduced by 1.8 and 1.9 \log_{10} cfu/cm² by Protecta One and Protecta Two, respectively, and *Salmonella Typhimurium* was not reduced ($>0.3 \log_{10}$ cfu/cm²) by either extract by day 7. In the 2nd experiment, 2.5% Protecta Two (w/v or w/w) added to inoculated lean and adipose beef trim, processed and packaged as ground beef chubs (80% lean, 20% adipose), did not reduce pathogen populations ($>0.5 \log_{10}$ cfu/cm²) up to 14 days at 4(degree)C. In the 3rd experiment, surface spray treatments of beef with 2.5% lactic acid or 2.5% solutions of Protecta One or Protecta Two, vacuum packaged and stored up to 35 days at 4(degree)C reduced *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* slightly. Results suggest that the

use of herb extracts may afford some reductions of pathogens on beef surfaces. However, antimicrobial activity may be diminished in ground beef by adipose components.

17. The effect of mixed medicinal herb extracts with antimicrobial activity on the shelf-life of kimchi.

Effects of mixtures of medicinal herbs such as *Curcuma longa*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Schizandra chinensis* on shelf life of kimchies were evaluated. Kimchies containing herbs were higher in pH than control kimchies (no additives) during fermentation (25 days; 10(°)C); levels of titratable acidity, viable cell counts of lactic acid bacteria and total bacteria changed more slowly than in control samples. Kimchi shelf life was improved by addition of 1% extracts in binary mixtures (1:1); sensory properties of experimental kimchies were similar to those of control kimchies after fermentation (10 days), although sourness of some kimchi/herb mixtures developed more slowly than in control (>15 days fermentation). As extract concn. increased, sensory quality of kimchi was reduced. From En summ.

18. Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms.

Various medicinal herbs, widely employed in folk medicine, were evaluated for antimicrobial activity of ethanolic extracts against foodborne pathogens. Extracts of *Coptis chinensis* Franch exhibited highest antimicrobial activity, which was not destroyed by heating at 100(°)C for 60 min or 121(°)C for 30 min. Min. inhibitory concn. of this extract were reduced as pH increased. Inhibition by partially purified extracts of *C. chinensis* against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* was examined. Growth of these pathogens occurred in the presence of 100 mug extract/ml, was inhibited by 500 mug/ml, and was totally inactivated at 1000 mug/ml.

19. The effect of mixed medicinal herb extracts with antimicrobial activity on the shelf-life of kimchi.

Effects of mixtures of medicinal herbs such as *Curcuma longa*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Schizandra chinensis* on shelf life of kimchies were evaluated. Kimchies containing herbs were higher in pH than control kimchies (no additives) during fermentation (25 days; 10(°C)); levels of titratable acidity, viable cell counts of lactic acid bacteria and total bacteria changed more slowly than in control samples. Kimchi shelf life was improved by addition of 1% extracts in binary mixtures (1:1); sensory properties of experimental kimchies were similar to those of control kimchies after fermentation (10 days), although sourness of some kimchi/herb mixtures developed more slowly than in control (>15 days fermentation). As extract concn. increased, sensory quality of kimchi was reduced. From En summ.

20. Screening of antimicrobial activity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from plants in Korea.

Methanol extracts from 133 plants species growing in Korea were screened for antimicrobial activity against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7. The plants were selected from 3 plant groups: traditional medicinal herbs; edible plants; and flowers. Among the medicinal herbs, extracts of *Prunus mume* S. et Z. (Ume) had the highest antimicrobial activity. Extracts from most vegetables and plants did not show any antimicrobial activity, with the exception of the leaves of *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgo*) and the seeds of *Prunus salicina* L. (*Japanese plum*). From En summ.

21. 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate and its homologues as food-originated compounds with antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Antibacterial plants, including spices and medical herbs, are habitually used as foodstuffs and as wrapping materials to protect food from putrefaction. In this

study, antibacterial compounds were screened, identified and isolated from a number of plant foods. Cruciferae plants, banana and coriander each showed antibacterial activity. Highest activity was found in the stems of wasabi. An ethereal extract from wasabi stems had potent antibacterial activity; this active compound was isolated from the extract and identified as 6-methylsulphinylnhexyl isothiocyanate. Homologues of 6-methylsulphinylnhexyl isothiocyanate were also active against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. From En summ.

22. Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-borne bacteria.

Fifty-six types of medicinal herbs, extracted by 75% ethanol, were evaluated for their antimicrobial activity against the following food-borne bacteria: *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, 19111, 19112, 19113 and 19114; *Bacillus cereus* YUFE 2004; *Staphylococcus aureus* KFCC 11764; *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1645 and 2344; and *Leuconostoc mesenteroides* KFCC 12031. Ethanol extracts of *Terminalia chebula* Rets, *Rosa laevigata* Michx, *Caesalpinia sappan* L and *Myristica fragrans* Houtt (nutmeg, mace) showed inhibitory effects on the growth of most of the strains tested. In particular, the extract of *T. chebula* Rets showed significant ability to inhibit growth of bacteria in proportion to quantity of extract applied (100-2000 p.p.m.), while 100 p.p.m. of *C. sappan* L extract prevented growth of several bacterial strains. In addition ethyl acetate reactions of *T. chebula* Rets, *R. laevigata* Michx, and *C. sappan* L, together with the chloroform fraction of *M. fragrans* Houtt, showed increased inhibitory activity on the growth of most of the strains tested. From En summ. & graphs.

23. Antibacterial activity of spice extracts against food-related bacteria.

Identification of spices and herbs that possess antibacterial activity with a view to control of microorganisms in food was attempted. Alcoholic extracts of 17 spices and 5 herbs were prepared, and examined for growth inhibition of several kinds of food-related bacteria in culture media. *Bacillus stearothermophilus*, which

produces heat-resistant spores, was highly sensitive to most of the spices tested; both germination of spores and outgrowth of vegetative cells of this organism were inhibited by most of the spices. Minimal inhibitory concn. (MIC) were 0.005% for paprika, 0.01% for anise and 0.02% for mace, both on agar and in liquid media. Inhibition of this organism by effective spices was influenced by pH and NaCl concn. of the basal medium. When pH and NaCl were 6.0 and 1.5%, respectively, MIC decreased to 10-20%. No synergistic effect of spice and sodium lactate was observed, except for mace. At 0.05%, nutmeg, sage and white pepper completely inhibited *B. stearothermophilus* growth. Garlic showed no antibacterial effect, and turmeric also had less effect than other spices. In general, antibacterial activity of herbs was comparatively low. Against *B. coagulans*, sage and rosemary inhibited growth, and MIC were 0.05 and 0.2%, respectively. Both *Escherichia coli* and *Salmonella* were not inhibited by 0.2% concn. of any of the spices and herbs tested. Sage showed inhibitory effects against *B. subtilis*, *B. cereus* and *Staphylococcus aureus*. It is concluded that the results suggest control of thermophilic bacteria, especially *B. stearothermophilus*, in canned foods is possible by some spices. From En summ.

24. Comparison of the pharmacological and antimicrobial action of commercial plant essential oils.

Pharmacological effects and antimicrobial activity of 52 commercial essential oils were investigated. Data on antibacterial activity, antifungal activity (% inhibition) and antioxidant activity of major essential oil components are tabulated for many of the essential oils, in particular, for chamomile oil (Roman, Moroccan and German), thyme oil (sweet and red) and marjoram (sweet, Spanish and French). Bioactivity of essential oils containing linalool and linalyl acetate, or 1,8-cineole are presented.

25. Antimicrobial activity of volatiles from edible herbs.

Antimicrobial activity of volatile compounds present in herbs was evaluated.

Combination effects of volatiles were also examined. Allyl isothiocyanate (AIT) from mustard and wasabi suppressed the growth of the 12 microorganisms (4 bacteria, 7 fungi and 1 yeast) tested. Salicylaldehyde also showed antimicrobial activity towards all the fungi and bacteria tested. The other extracted aldehyde compounds inhibited growth of fungi and *Bacillus subtilis*. Hydrocarbons inhibited the growth of *B. subtilis*. The volatile carvacrol was found to be a more effective suppressor of *Staphylococcus aureus* growth than AIT. Masking effects of plant volatiles on AIT odour were confirmed with sensory analysis. Citrus oils and vanilla flavour were found to be the most effective masking agents of AIT odour. Antimicrobial effects of AIT were not affected by mixing with other plant volatiles. From En summ.

26. Antimicrobial effect of spices on the growth of *Yersinia enterocolitica*.

Antimicrobial activity of 16 ground spices against *Yersinia enterocolitica* (10×10^5 cfu/ml) was tested by the addition of a dry spice sample (2.0-2.4% and 4.1-4.7%) to Trypticase Soya Broth and incubated at 25(°)C for 12 and 24 h. Ethanol extracts of spices were also tested for antimicrobial effects by agar diffusion (25(°)C/48 h) and serial dilutions (25(°)C/24 h). All spices showed antibacterial activity at concn. of 4.1-4.7% with inhibition most pronounced after 12 h. Cloves, rosemary and allspice had the greatest effect. Inhibition zones were only observed with cloves and allspice in the agar diffusion test. At 250 p.p.m. clove extract was sufficient to inhibit growth. Extracts of other spices at 1000 p.p.m. exerted only a slight inhibitory effect.

27. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils.

Essential oils of 3 *Origanum* herbs, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* Greek oregano, *Origanum dictamnus* Dittany of Crete and a commercially available *Origanum* oil, were analysed by GC-MS and showed a high content of carvacrol, thymol, gamma-terpinene and p-cymene representing 73.7, 92.8 and 87.78% of the total oil, respectively. The 3 essential oils exhibited high levels of antimicrobial

activity against 8 strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria including some food pathogens. Of the major components of the 3 oils, carvacrol and thymol exhibited highest levels of antimicrobial activity, while their biosynthetic precursors gamma-terpinene and p-cymene were inactive. The essential oil of *O. vulgare* subsp. *hirtum* was extremely bactericidal at 1/4000 dilution and even dilutions as high as 1/50 000 caused considerable decrease in bacterial growth rates. The same essential oil also exhibited high levels of cytotoxicity against 4 permanent animal cell lines including 2 derived from human cancers.

28. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes.

Studies were conducted to assess antimicrobial activity of terpenes which occur in essential oils of aromatic plants (including herbs and spices). Antibacterial activity of 1,8-cineole, linalool and eugenol from eucalyptus essential oils was tested against a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from food. Use of a 2*3 experimental design permitted minimization of the number of trials required and allowed quantification of interaction between the terpenes studied. 1,8-Cineole showed no significant antimicrobial activity; eugenol showed high antimicrobial activity, closely followed by linalool. Antagonistic interaction of effects of linalool and eugenol was observed.

29. Antimicrobial activity of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans*.

In an attempt to identify anticariogenic substances, activities of some medicinal herbs and spices against *Streptococcus mutans* were investigated. Essential oils from oregano, thyme, sage, fennel, nutmeg, rosemary, calamus and cassia cortex showed antibacterial activity against *S. mutans*. Oregano essential oil was most active. Min. inhibitory concn. of oregano essential oil was 0.05 ml/ml.

30. Natural antimicrobial systems.

The identification and assessment of natural antimicrobial systems as novel means of extending the safety and quality of food are described. Compounds examined include chitosan, olive extracts, herbs (basil and mastiche), spices, onions and garlic, and inhibitory substances produced by lactic acid bacteria. Ongoing evaluation will consider new sources of natural antimicrobials in terms of ease of extraction, purification and antimicrobial effectiveness, in combination with traditional preservation techniques.

제 2 절. 식품보존제

1. FOOD PRESERVATIVE AND METHOD FOR PRODUCING FOOD BY UTILIZING THE SAME

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a food preservative excellent in preserving effect and well-balanced in taste, and to provide a method for producing food using the same preservative. SOLUTION: This food preservative features formulating a mixture consisting of sodium gluconate or potassium gluconate and glycine with one or more kinds selected from the group consisting of an organic acid, a salt thereof, ethanol, a sucrose fatty acid ester, a thiamine ester, ε-polylysine, protamine, lysozyme, chitosan and polyphosphates.

2. FOOD PRESERVATIVE

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a food preservative which has high safety and has a high freshness-retaining effect and a browning-preventing effect for meats, fishes, fruits, lunches and so on, by including chitosan and the polar solvent extract of a plant belonging to the genus Eucalyptus. SOLUTION: This food preservative contains a polar solvent extract obtained by extracting the leaves of a plant belonging to the genus Eucalyptus, such as Eucalyptus grandis, with one or more kinds of solvents selected from the group consisting of lower

alcohols such as ethanol and glycols such as propylene glycol and chitosan having a viscosity of 5 to 100 cP (a viscosity in the case of 0.5% chitosan concentration). The food preservative preferably contains the polar solvent extract of the leaves of a plant belonging to the genus Eucalyptus and the chitosan in a total amount of 0.0001 to 10 wt.%, preferably 0.0001 to 1 wt.%, in an Eucalyptus extract/chitosan weight ratio of 1/10 to 10/1.

3. FOOD PRESERVATIVE

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a preservative which is used for fresh foods, can prevent the proliferation of bacteria over a long period of time, can hold the fresh appearances of the foods, can maintain the good flavors of the foods, and can improve the commercial values of the foods, by including a fumarate salt as an active ingredient.**SOLUTION:** This preservative for fresh foods contains a fumarate salt such as monosodium fumarate (in a concentration of preferably 0.1 to 2.0%, more preferably 0.2 to 1.0%) as an active ingredient. The fresh foods are preferably cut vegetables or the like. The preservative preferably further contains one or more compounds selected from sugar, sugar alcohols, polyhydric alcohols, calcium chloride, ascorbate salts, and sodium acetate, preferably one or more compounds selected from trehalose, sorbitol and glycerol. The fresh food is preferably treated with a solution (pH is preferably 3.97 to 4.05) containing the fumarate salt to preserve the food.

4. FOOD PRESERVATIVE

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a food preservative which has an effect for inhibiting the proliferation of bacteria, yeast and fungi and scarcely affects the flavors of foods. **SOLUTION:** This food preservative contains at least two kinds of fatty acid monoglycerol esters selected from fatty acid monoglycerol esters obtained by 8-12C fatty acids and glycerol, ε-polylysine or its salt, and glycine as active ingredients.

5. FOOD PRESERVATIVE

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a food preservative having antibacterial and antimycotic activities, applying moisture-absorption property also to a carrier for adsorbing a bactericidal agent and exhibiting high food preservation effect. **SOLUTION:** This food preservative is produced by forming the powder, fiber, staple fiber or filament of natural silk to a prescribed form with a porous synthetic resin. The powder, fiber, staple fiber or filament of natural silk is insoluble in water, has moisture absorbing and releasing property and crystallinity and thermal properties same as those of silk yarn, exhibits antibacterial and antimycotic properties and can keep the freshness of a food such as shrimp.

6. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative containing reuterin and an organic acid and/or its salt, capable of sufficiently improving food preservability even at reduced level of reuterin to be added to foods, and having a wide antimicrobial spectrum. **(CONSTITUTION)** This food preservative contains (A) an organic acid and/or its salt (e.g. acetic acid, lactic acid, adipic acid, their sodium or potassium salts, etc.) and (B) reuterin produced by *Lactobacillus reuteri*. Food deterioration due to yeast or moulds can be suppressed by merely adding reuterin at 0.01-0.2wt.% or so to foods.

7. FOOD PRESERVATIVE AND ITS PRODUCTION

(PURPOSE) To obtain a food preservative substantially comprising components derived from a natural substance optimum as a preservative to be added to a food by significantly suppressing sublimation and fragrance of natural hinokitiol and taking advantage of its antimicrobial/sterilizing effect and to provide a method for producing the food preservative. **(CONSTITUTION)** This food preservative comprises an inclusion substance as an active ingredient obtained by including natural hinokitiol, an extracted concentrate of pyrolignous acid and purified propolis in an including agent containing cyclodextrin. The food preservative is produced

by dissolving the natural hinokitiol, the extracted concentrate of pyrolignous acid and the purified propolis in an organic solvent, adding a cyclodextrin-containing including agent to the solution, subjecting to inclusion reaction at a low temperature to include the natural hinokitiol, the extracted concentrate of pyrolignous acid and the purified propolis in the including agent.

8. FOOD PRESERVATIVE

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a food preservative not giving feeling of flavor or sour taste of vinegar or acetic acid to tongue while improving preservability of foods by using vinegar or acetic acid. SOLUTION: Vinegar or acetic acid is mixed with one or more than two kinds of organic acids and/or organic acid salts selected from the group consisting of adipic acid, fumaric acid, gluconic acid, gluconodeltalactone, a citrate, a tartrate, a lactate and a malate to obtain the objective preservative. A mixing ratio of the organic acid and/or the organic acid salt to the vinegar or the acetic acid is preferably (0.05-10)/1 terms of acid concentration. Acid concentration of acetic acid in this food preservative is preferably 0.2-96wt.%.

9. FOOD PRESERVATIVE

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a food preservative capable of improving the preservability of a food, having high safety and free from the problem of the deterioration of the food quality. SOLUTION: This food preservative contains an extract of Hokotsushi (bean of *Psoralea corylifolia*), an organic acid and its salt, an antibacterial peptide and one or more components selected from proteins, sugars, sugar acids, polysaccharides composed of amino acids, its partial decomposition products, spices, vegetable components, alcohols and bacteriolysin.

10. BOBBIN FOR CONTINUOUSLY PACKAGED BODY OF FOOD PRESERVATIVE OF ETHANOL VAPOR GENERATION TYPE,

CONTINUOUS PACKAGED BODY US

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a bobbin for continuously packaged body of the food preservative of ethanol vapor generation type which is small in reduction of ethanol during preservation and capable of recycling of the bobbin itself. **SOLUTION:** In a bobbin 7 for the continuously packaged body of the food preservative of ethanol vapor generation type in which a flange 2 is formed on each end of a core cylinder 4 to wind a strip-shaped packaging body of the food preservative, the ethanol vapor transmissivity of a surface of the core cylinder 4 and an inner side surface of the flange 2 with which the food preservative of ethanol vapor generation type is brought into direct contact is below $10\text{g}/\text{m}^2\text{24hr.40}\text{\textcircled{C}}$.

11. NATURAL FOOD PRESERVATIVE

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a highly safe natural preservative aiming the improvement in the preservability of foods, drinks, etc., by extraction-treating the endodermis and exoderims of grains as raw materials with a solvent containing apolymerized phosphate. **SOLUTION:** This natural food additive is obtained by, preferably, grinding the endodermis and exodermis of grains, such as rice bran, wheat bran, rice chaff or buckwheat chaff, by using of a grinding machine as finely as possible and subsequently extraction-treating the ground product with a solution containing a polymerized phosphate preferably such as sodium etaphosphate preferably in a concentration of 3-4% preferably at $80\text{-}90\text{\textcircled{C}}$ for 30 min for 3-4 hr.

12. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To provide a food preservative having excellent preservability compared with the single use of protamine as a preservative by containing the protamine and a *Monascus anka* extract and/or *Tamarindus indica* L. tannin. (CONSTITUTION) When either one of the *Monascus anka* and the *Tamarindus indica* L. tannin is used together with the protamine, the weight ratio of the

protamine and the above-mentioned other component is 1:0.2-5. When both the *Monascus anka* extract and the *Tamarindus indica* L. tannin are used together with the protamine, the weight ratio of the *Monascus anka* extract and the *Tamarindus indica* L.tannin is 1:0.1-2:0.1-2. The food preservative is added to a food usually in an amount of 0.05-5% as the total amount of the protamine and the *Monascus anka* extract and/or the *Tamarindus indica* L. tannin amount. The food preservative exhibits an excellent preservation activity even for acidic foods having problems when the protamine alone is used.

13. BEAN CURD-BASED FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To provide a bean curd-based food preservative excellent in action of enhancing preservation quality of a bean curd-based food and preventing the quality from deteriorating by constructing the preservative from a specific compound selected from a polyphenol compound group as an active ingredient. (CONSTITUTION) One or plural compounds selected from a polyphenol compound group consisting of catechin, gallic acid, gallic acid gallate, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin and epigallocatechin gallate are used as an active ingredient to produce a bean curd-based food preservative. Bean curd, thick fried bean curd, fried bean curd, 'GANMODOKI' (fried bean curd mixed with bits of vegetables and pieces of seaweed called 'HIJIKI'), etc., are cited as specific examples of the bean curd-based food. Although the above-mentioned polyphenol compound group can be extracted from *Camellia sinensis*, the compound group can be also chemically synthesized. The polyphenol compound group has an excellent action of preventing thermostable sporangia causing putrefaction of the bean curd-based food from growing.

14. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To remarkably improve antibacterial power by combining hinokitiol with a specific fatty acid monoglyceride and using the combination as a food preservative. (CONSTITUTION) In the case of using hinokitiol as a food

preservative, hinokitiol is used in combination with a 6-12C fatty acid monoglyceride. Ethanol also has antibacterial power and has been used in the field of food. The antibacterial power of ethanol can be increased compared with the single use of ethanol by adding hinokitiol to ethanol. Addition of hinokitiol together with a 6-12C fatty acid monoglyceride to ethanol remarkably improves the antibacterial power compared with conventional combined preparation as well as the single use of ethanol. Furthermore, the present ethanol preparation is effective at a low concentration and low rate of application and an effective food preservation effect can be attained on the foods in general without causing the deterioration of the original taste and flavor of the food.

15. FOOD PRESERVATIVE FROM EXTRACT OF BAMBOO GRASSES

(PURPOSE) To inexpensively obtain a large amount of extract not containing chlorophyll from bamboo grasses by preparing an ethanol aqueous solution of an extracted solution of active component of cellulose of bamboo grasses hydrolyzed with an enzyme, concentrating and drying the aqueous solution under a specific condition. (CONSTITUTION) Cellulose of bamboo grasses is hydrolyzed with an enzyme to give an active ingredient, which is extracted with ethanol. Then the extracted solution is mixed with water to give 20-80vol.% ethanol aqueous solution and chlorophyll is reprecipitated and removed by filtration. The prepared aqueous solution containing the active ingredient is distilled at 40°C under 55mmHg by a distillation column in an atmosphere replaced with nitrogen or another inert gas while always feeding a small amount of atmosphere from the bottom of the distillation column and the active ingredient is concentrated to dryness to give a food preservative. The food preservative can be produced as a concentrated and dried material with an extremely low content of chlorophyll from a food preservative comprising bamboo grasses as a raw material which has been considered to have low utility because of high content of chlorophyll.

16. FOOD PRESERVATIVE AND METHOD FOR PRESERVING FOOD USING

THE SAME

(PURPOSE) To obtain a food preservative, containing a dried substance, etc., of adlay sprouts prepared by culturing adlay seeds in the dark as an active ingredient and capable of exhibiting powerful antimicrobial activity.

(CONSTITUTION) The objective preservative obtained by culturing adlay seeds in the dark and containing a dried substance, pressed juice or extract of the resultant adlay sprouts as an active ingredient. Furthermore, the aforementioned extract is preferably an ethanol extract solution or concentrate of the adlay sprouts.

17. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To provide a food preservative having adequate bacteriostaticity without affecting food quality, thus suitable for e.g. packed foods such as luncheons or prepared foods, containing, as active ingredients, a kojic acid (a derivative therefrom) and ethyl alcohol. (CONSTITUTION) The objective food preservative containing, as active ingredients, (A) a kojic acid of the formula (X is methylol, halogenated methyl, etc.; Y is hydroxyl, methoxyl, etc.; Z is H or methyl, etc.) or a derivative therefrom and (B) ethyl alcohol. This food preservative is pref. in the form of an aqueous solution 40-99wt.% in ethyl alcohol concentration and 0.-2wt.% in kojic acid (derivative) concentration. It is recommended that this preservative be used by spraying on foods, etc.

18. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain an inexpensive, convenient and strong food preservative from natural material. (CONSTITUTION) The objective food preservative contains an organic solvent extract of seed of *Psoralea corylifolia*. The organic solvent extract can be used in the form of aqueous solution, aqueous dispersion or powder. An inexpensive and strong food preservative can be produced because a large amount of an organic solvent extract having high antibacterial activity can be obtained from the seed of *Psoralea corylifolia*.

19. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative, containing an extract from *Aralia cordata* as an active ingredient, excellent in safety and useful for perishables such as meat without any toxicity such as carcinogenicity. (CONSTITUTION) The objective food preservative is obtained by extracting, e.g. *Aralia cordata* with an extracting solvent such as ethanol in an amount of 8-15 times based on the *Aralia cordata* and diluting the resultant extract [the active ingredient is (-)-pimar-8(14),15-dien-19-oic acid] with water to 8000-1200 times. Furthermore, the preservative is used in an amount of preferably 0.08-0.5wt.% based on a food.

20. FOOD PRESERVATIVE AND FOOD PRESERVATION USING THE SAME

(PURPOSE) To provide a food preservative excellent in both preservativity and safety, also causing no degradation of food flavor or taste because of being effective at a low level of its addition, containing, as active ingredient(s), a ferulic acid compound, organic acid (salt) and/or chitosan. (CONSTITUTION) The objective food preservative contains, as active ingredient(s), a ferulic acid compound, organic acid (pref. fumaric acid or acetic acid), its salt (pref. sodium or potassium salt) and/or chitosan. The amounts of these ingredients to be used are pref. 0.005-0.07wt.%, 0.05-0.5wt.%, and 0.001-0.05wt.% for the ferulic acid compound, organic acid (salt) and chitosan, respectively, based on a food. It is preferable that the chitosan, because of being sparingly soluble in a food, be used in an acidic solution after mixing with an organic acid.

21. FOOD PRESERVATIVE AND METHOD FOR PRESERVING FOOD

(PURPOSE) To obtain a food preservative for improving shelf stability of food with a small amount thereof, food preservation method, a disinfectant for an article for food having excellent disinfection effects and disinfection method. (CONSTITUTION) A food preservative comprises silica gel supporting a chemical having disinfection properties and/or bacteriostatic action such as ethanol. The food preservative is sprinkled on food or is made to coexist with a food to

preserve the food. An article for food comprises silica gel supporting a chemical e.g. ethanol having disinfection properties and/or bacteriostatic action, such as a disinfectant for a food producing material. The disinfectant is sprinkled on an article for food to sterilize the article for food.

22. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative capable of preventing germs or molds from developing in foods, food processing works, kitchens or cooking utensils and preserving the aforementioned foods in good quality for a long period. (CONSTITUTION) A food preservative is characterized as follows. Vitamin E, chitin, chitosan and its hydrolyzate or modified substance, chitosan oligosaccharides, pectin hydrolyzate, lysozyme, etc., are added to ethanol and an organic acid such as acetic acid, lactic acid, citric acid or malic acid is further added thereto.

23. FOOD PRESERVATIVE AND PRESERVATION OF FOOD USING THE SAME

(PURPOSE) To obtain a food preservative capable of removing acetaldehyde and safely preserving a food by using a deoxygenation agent and a specific substance available at a low cost, having high safety, free from disagreeable smell and exhibiting excellent activity to remove acetaldehyde by itself. (CONSTITUTION) The objective food preservative is composed of a deoxygenation agent and a compound of formula (n is 2-4; X is H or CH₃) such as 2-imidazolidone having 5-membered ring and 2-oxy-hexahydropyrimidine having 6-membered ring. The deoxygenation agent is e.g. iron powder and ascorbic acid.

24. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To provide a natural preservative separated from natural material, effective for suppressing the growth of various Gram-positive and Gram-negative

bacteria, capable of preserving various foods including perishable food and chilled food as well as heat-treated food and having high safety and versatility. (CONSTITUTION) The food preservative contains an extract of a marine alga which belongs to the genus *Carpophyllum*, family *Sargassum*.

25. FOOD PRESERVATIVE CHAMBER

(PURPOSE) To make the inside of a food preservative chamber sanitary and adjustable to have an appropriately moist condition by a method wherein a moisture adjusting material is covered with a porous membrane having a predetermined size of air hole in diameter and at least either of moisture adjusting material or porous membrane is impregnated with fungicidal agent. (CONSTITUTION) An opening part 15 of a moisture adjusting material case 6 is covered tightly with a porous membrane 7 having a predetermined size of air hole in diameter and at least either of the porous membrane 7 or a moisture adjusting material 5 is impregnated with fungicidal agent. The moisture adjusting material 5 is covered with the porous membrane 7, so that the porous membrane 7 is interposed between the moisture adjusting material 5 and an atmosphere in a storage case 1. In this way the porous membrane 7 between the moisture adjusting material case 6 and the storage case 1 is permeable to water but impermeable to foreign matter such as solids and dusts and, since the foreign matter is thus kept out of the moisture adjusting material case 6, the inside of this case 6 becomes extremely sanitary and safe.

26. FOOD PRESERVATIVE AND ITS PRODUCTION

(PURPOSE) To obtain a food preservative having excellent antimicrobial effects by addition or application to foods by deodorizing garlic and extracting essence of garlic. (CONSTITUTION) Garlic is immersed in a treating solution containing ethanol to give an extracted solution of garlic. In order to remove an offensive smell, the extracted solution of garlic is mixed with 0.4-0.6% phytic acid based on the amount of garlic to deodorize garlic. The deodorized extracted solution of

garlic is used alone or mixed with 1-100µg/ml ε-polylysine to give a food preservative.

27. PRODUCTION OF FOOD PRESERVATIVE CONTAINING ANTIMICROBIAL SUBSTANCE PRODUCED BY YEAST

(PURPOSE) To produce a safe food preservative by using a usual and readily growable microorganism such as a yeast, producing an antimicrobial substance having antimicrobial effects on various bacteria and paying attention to nonproduction of any substance toxic to the human body in those produced by usual yeast (CONSTITUTION) This method for producing a food preservative containing an antimicrobial substance produced by a yeast is to grow the yeast in a culture medium containing glucose, nutrients and inorganic salts required for growing the yeast until the stationary phase is attained, then remove the yeast, as necessary, supply the consumed glucose thereto, regrow the yeast until the stationary phase is attained, carry out the operations at least two or more times and thereby produce and accumulate an antimicrobial substance.

28. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative capable of prolonging a shelf life of a protein-based food without damaging texture of the food, comprising glycine, a condensed phosphate and an enzyme for a food as main components. (CONSTITUTION) This food preservative comprises (A) glycine, (B) a condensed phosphate (preferably a mixture of Na polyphosphate, Na pyrophosphate and Na metaphosphate in the ratio of 5:1:1 with respect to antimicrobial effect) and (C) an enzyme (preferably lysozyme or glucose oxidase) for a food as main components. Glycine of the component A can be wholly or partially replaced with alanine.

29. PRODUCTION OF FOOD PRESERVATIVE AND HIGHLY PRESERVABLE FOOD

(PURPOSE) To provide respective methods for producing a food preservative

with mangosteen rind extract as an active ingredient and for producing a highly preservable food. (CONSTITUTION) This food preservative contains, as an active ingredient, mangosteen rind extracts. The above-mentioned food comprises this food preservative and at least one kind of substance selected from glycine, sodium acetate, lysozyme, antibacterial substances extracted from licorice, lower fatty acid esters, glucono- δ -lactone, sugar esters, vitamin B1 esters, polyphosphates, protamine, polylysine, and ascorbic acid and salts thereof.

30. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative having strongly antimicrobial action and low toxicity by mixing protamine with betaine or glutathione. (CONSTITUTION) This food preservative is obtained by mixing (A) 1 pt.wt. of protamine with (B) 10-100 pts.wt. of betaine or 0.5-20 pts.wt. of glutathione. 0.01-2wt.% of the prepared food preservative is added to a food and 0.002-0.05wt.% calculated as the component A of the prepared food preservative is added.

31. FOOD PRESERVATIVE AND PRESERVATION OF FOOD USING THE SAME

(PURPOSE) To provide a food preservative having strong bactericidal activity and broad anti-bacterial spectrum, and scarcely giving undesirable taste to the food, containing 10C and 12C saturated fatty acid monoglycerides in a specific ratio.

32. FOOD PRESERVATIVES

(PURPOSE) To provide preservatives useful for foods, stable to light and oxidation, and free of ill-odor characteristic to conventional preservatives.

33. FOOD PRESERVATIVE FROM BAMBOO GRASS

(PURPOSE) To obtain the antibacterial fraction as an active constituent of a

food preservative from bamboo grass, by treating leaves or stems of the grass with an alkaline aqueous solution and then with an enzyme, and by extracting the solution with an inorganic solvent.(CONSTITUTION) Leaves or stems of bamboo grass are rinsed with water, cut finely, and treated with an alkaline aqueous solution to soften the cell membranes of the grass to some degree, and adjusted to the desired pH with an inorganic or organic acid, then treated with an enzyme, e.g. cellulase, pectinase, or protease, to destroy the cells. The aqueous phase or treated grass thus obtained by the inactivation of the enzyme, is extracted with a nonpolar or low polar organic solvent, e.g. ethyl acetate or hexane, to remove impurities, e.g. chlorophyll. The resulting antibacterial fraction is collected, and the obtained liquid, powder thereof, or supported on a carrier is used as a preservative for food.

34. FOOD PRESERVATIVE AND PRESERVING METHOD OF FOOD

(PURPOSE) A food preservative with low toxicity to life regardless of the concentration thereof, containing a chelate agent and ethanol.(CONSTITUTION) One or two or more chelate agents selected from the group consisting of hydroxy carboxylic acids, e.g. citric acid, tartaric acid, malic acid, lactic acid, or succinic acid or sodium salts thereof, polyphosphoric acids or sodium salts thereof, and natural phosphoric acid compounds, e.g. phytin or phytic acid, are mixed with ethanol. The resultant food preservative is used for preserving marine products and marine fish paste products, livestock meat and processed foods of the livestock meat, processed starch foods, processed soybean foods, processed egg foods, processed vegetable foods or fruits.

35. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) A food preservative that is obtained by adding an aluminum salt to albumin or the conalbumin fraction in albumin, thus showing high preservative effect on food products such as noodles, coatings of gyoza, shao-mai, fried soybean curd or bread.(CONSTITUTION) Albumin or the conalbumin fraction in albumin is

combined with an aluminum salt such as alum, aluminum sulfate or aluminum chloride by about 0.05W5wt% based on the dry weight of the albumin.

36. FOOD PRESERVATIVE AND ITS METHOD OF USE

(PURPOSE) To preserve a food, by using an alginic acid compound with ethanol together.(CONSTITUTION) An alginic acid compound, e.g. alginic acid, acidic sodium alginate, acidic calcium alginate, acid magnesium alginate or an acidic brown alga, is mixed with ethanol or both are separately at a time lag used in a marine product, marinefish paste product, livestock meat, processed livestock meat food, processed starchy food, processed soybean food, processed egg food, vegetables processed vegetables or fruits by the dipping, coating, spraying or kneading method. The concentration ofthe preservative is in the range of 0.1W5%.

37. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative with low toxicity to life and utilizable in a wide range, by using a food chelating agent, e.g. a hydroxycarboxylic acid or condensed phosphoric acid, and a nonionic surfactant at the same time.(CONSTITUTION) A food preservative consisting of one or two or more food chelating agents selected from the group consisting of citric acid, tartaric acid, malic acid, lactic acid, succinic acid, polyphosphoric acid, phytic acid or a sodium salt thereof, phytin, kojic acid and glutamic acid and a sucrose ester of a fatty acid having an HLB of 3W5 as active constituents. The resultant preservative is used as a preservative for marine products, or marine fish paste products, livestock meat and processedlivestock meat foods, processed starchy foods, processed foybean foods, processed egg foods, vegetables and processed vegetables, fruits, etc.

38. PREPARATION OF FOOD PRESERVATIVE AND PRESERVING METHOD OF FOOD

(PURPOSE) To preserve a food without exerting a bad influence upon the

taste, color, flavor, etc. of the food and injuring the human health, by using a mixture of betaine with glycine and an organic acid salt in a specific proportion as a food preservative. (CONSTITUTION) Betaine is mixed with 60W120wt%, based on the betaine, glycine and 70W160wt%, based on the betaine, organic acid salt, e.g. citric acid, tartaric acid or malic acid, to give a food preservative. In using the resultant food preservative, 3wt% or less, based on various foods, food preservative is added to the foods, sealed up and heated. In this case, the heating at 70W100°C without requiring pressurization permits the improvement in preserving days.

39. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) A food preservative, containing a lower fatty acid monoglyceride and a proteolytic enzyme, and having enhanced antimicrobial activity of the lower fatty acid monoglyceride and improved keeping quality of the food. (CONSTITUTION) A food preservative containing a 4W12C lower fatty acid monoglyceride, e.g. a monoester of caproic acid or a caprylic acid, with glycerol, and a proteolytic enzyme, e.g. papain or bromelain. The amount of the fatty acid monoglyceride is 0.02W0.2wt%, preferably 0.03W0.1wt%, based on the weight of the food. The proteolytic enzyme having potency $\geq 10,000$ units, preferably $\geq 100,000$ units, based on 1g proteolytic enzyme, in an amount of 0.001W1wt%, preferably 0.005W 0.5wt%, is added to the food.

40. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To provide a food preservative having especially remarkable effect to suppress the proliferation of *Bacillus subtilis* ATCC6633, and uninfluential to the taste and flavor of foods, by dissolving a slight amount of lysozyme in an aqueous ethanol solution. (CONSTITUTION) The preservative is composed of a 50W75% (w/v) aqueous solution of ethanol containing 300W500ppm of lysozyme, and is added and mixed homogeneously to a food in an amount of 3W4%.

41. PRODUCTION OF FOOD PRESERVATIVE USING BAMBOO GRASS

(PURPOSE) To obtain the titled food preservative, industrially useful, and capable of exhibiting powerful antiseptic and antioxidant properties, by incorporating an antimicrobial extract of bamboo grass with ethyl alcohol and an organic acid, etc. in a specific proportion. (CONSTITUTION) (A) An antimicrobial extract of a bamboo grass, e.g. *Sasa albo-marginata*, is incorporated with (B) ethyl alcohol and (C) one or more of organic acids, e.g. fumaric acid and phytic acid, and if necessary (D) water to give 20% or more, based on the dry weight of the component (A) and 3% or less, based on the total composition in weight ratio, component (C) and further 10W95vol% concentration of the component (B). Thus, the aimed food preservative is obtained.

42. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a general-purpose food preservative having bacteriostatic activity against various bacteria possible to contaminate a food, by using lysozyme, a lower fatty acid monoglyceride and other compound as active components. (CONSTITUTION) A lysozyme such as albumen lysozyme, etc. and the monoglyceride of a lower fatty acid such as caproic acid, caprylic acid, etc. are used as the active component of the agent, and the food is further compounded with phytic acid and/or sodium acetate.

43. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To provide a food preservative capable of suppressing the contamination of a food with microorganisms or the proliferation of the microorganisms at a low dose without lowering the taste and flavor of the food, by compounding ethanol, threonine, glycine and water at specific ratios. (CONSTITUTION) The objective food preservative is composed of ≥ 60 (W/W)% (preferably 70W75%) ethanol, 0.01W0.05% threonine, 0.01W0.09% glycine and the rest part of water. The preservative can be prepared by dissolving threonine and glycine in hot water, adding the threonine-glycine solution to a

95W96% ethanol, and diluting the mixture with a proper amount of water.

44. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative to emit ethanol effectively, by supporting ethanol on a porous adsorbent having a specific equilibrium water content and pore volume. (CONSTITUTION) A porous adsorbent such as silicon dioxide, active carbon, etc. having $\geq 28\text{wt}\%$ equilibrium water content (relative viscosity of environment is corresponding to water activity of a food to be preserved) at normal temperature and $\geq 0.6\text{ml}$ pore volume is used as a porous adsorbent. Ethanol or hydrous ethanol containing $\geq 80\text{vol}\%$ ethanol is supported on the carrier in $30\text{W}90\%$ pore volume.

45. FOOD PRESERVATIVE AND PRESERVATION OF FOOD USING SAME

(PURPOSE) To provide a food preservative composed of an adsorbent containing adsorbed ethanol, an easily oxidizable substance and a substance capable of eliminating acetaldehyde and effective to protect the food in a container from putrefaction and degradation and to prevent the transfer of acetaldehyde odor to the food. (CONSTITUTION) A mixture produced by mixing (A) an adsorbent containing adsorbed ethanol (e.g. powder of e.g. silicon dioxide, etc.), (B) an easily oxidizable substance (e.g. unsaturated fatty acid such as linoleic acid) and (C) a substance capable of eliminating acetaldehyde (preferably ammonium salt, etc.) is put into a container made of a substance permeable to as (ethanol vapor and oxygen) such as perforated polyethylene sheet to obtain the objective food preservative. The preservative is placed in a closed vessel together with a food to be preserved.

46. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain the titled food preservative exhibiting high preservative effect of food, keeping the softness of a food, and having high stability, by dissolving a monoglyceride in glycerol and ethanol. (CONSTITUTION) The

objective food preservative can be produced by mixing 5W50%, preferably 10W30% monoglyceride, 40W80%, preferably 50W70% glycerol and 10W50%, preferably 10W30% ethanol in the form of homogeneous solution. It is especially effective to a food causing gas expansion and emitting thinner odor, and is added to a food in an amount to give a monoglyceride concentration of ≥ 200 ppm, preferably ≥ 500 ppm.

47. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a versatile food preservative expected to have high safety when used in food, by using d-limonene or d-limonene and ethyl alcohol as main components.(CONSTITUTION) d-Limonene is added to a food in an amount of about ≥ 0.001 vol% preferably about ≥ 0.01 vol% based on the food or d-limonene is mixed with ethyl alcohol at a concentration of about ≥ 0.05 vol%, preferably about 0.5W2.0vol% and the mixture is added to a food at an alcohol concentration of about ≥ 1.0 vol%.

48. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) In preserving a food by using a substance to evolve ethanol vapor, to reduce extremely a smell caused by ethanol, by utilizing the substance to evolve vapor of ethanol and an ion exchanger as active ingredients for a food preservative.(CONSTITUTION) A food preservative comprising a substance to evolve vapor of ethanol and an ion exchanger as active ingredients. The substance to evolve vapor of ethanol designates a substance or a material to evolve gradually vapor of ethanol, such as a liquid comprising ethanol as a main component or a material obtained by supporting the liquid on silicic anhydride, zeolite, starch, etc., or by gelatinizing it with a gelatinizing agent such as gelatin, highly water absorbing resin, etc., A strongly basic or weakly basic ion exchanger is especially preferable as the ion exchanger. Its shape is preferably granular or powdery. When the above-mentioned preservative is used, the substance to evolve vapor of ethanol and the ion exchanger are separately placed in a container storing

a food, or a material wherein ethanol is supported on powder is blended with the ion exchanger, packaged in an ethanol vapor-permeable film and placed.

49. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) A natural product based food preservative, containing ϵ -polylysine (salt) as an active constituent and having high safety and high food preserving effect.(CONSTITUTION) A food preservative, obtained by cultivating a strain belonging to the genus, e.g. *Streptomyces albulus* subsp. *lysinopolymerus* No.346-D strain (FERM P-3834) and containing ϵ -polylysine or a salt thereof as an active constituent. The preservative in an amount of preferably 0.2W1.0wt% is normally added to a food.

50. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) A food preservative for KAMABOKO (boiled fish paste), sausage, cakes, etc., having extremely high antibacterial action by synergistic effects and a wide antibacterial spectrum, damaging no taste of food, obtained by combining a specific antibacterial substance such as glycine, etc., with protamine.

(CONSTITUTION) The aimed food preservative obtained by combining (A) one or more selected from a group of antibacterial substances consisting of glycine, sodium acetate, lysozyme, Licorice extracted antibacterial substance, lower fatty acid ester, sugarester, vitamin B1 ester and polymerized phosphate with (B) protamine.

51. FOOD PRESERVATIVE AND PRESERVATION OF FOOD USING SAID PRESERVATIVE

(PURPOSE) To eliminate an aldehyde evolved from a food using ethanol, etc., and protect the food against putrefaction and deterioration, by placing an adsorbent adsorbing ethanol, a readily oxidizable substance and aromatic aminosulfonic acid in a housing hermetically sealing a food so that ethanol vapor and oxygen may permeate.(CONSTITUTION) An adsorbent adsorbing ethanol, e.g., silicon dioxide,

readily oxidizable substance, e.g. oleic acid, and one or more of an aromatic aminosulfonic acid, e.g. sulfanilic acid, or an alkali metal salt or alkaline earth metal salt thereof are placed in a hermetically sealed housing containing a food in such a state that ethanol vapor and oxygen may permeate. The food, particularly using an alcohol is protected against putrefaction and deterioration. An oxidation accelerator, e.g. reduced iron, is preferably incorporated in the readily oxidizable substance.

52. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To enable the safe storage of a food, by decomposing a protein-containing solution with a protease, inoculating and proliferating heterofermentative lactic acid bacteria in the culture liquid obtained above and using the culture liquid and/or cell-separated liquid as the preservative. (CONSTITUTION) A solution containing a protein such as milk protein, vegetable seed protein, etc., is decomposed with a protease (e.g. papain). A strain of heterofermentative lactic acid bacteria (e.g. bacteria of *Leuconostoc* genus, *Bifidobacterium* genus, etc.) is inoculated and proliferated in a culture liquid containing the above decomposed liquid. The obtained culture liquid and/or a liquid produced by separating the bacterial cells from the culture liquid is used as a food preservative. A food (e.g. steamed bread, raw noodle, etc.) can be preserved safely by compounding or contacting the feed preservative to the food.

53. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative with hardly any smell of acetic acid without impairing flavor of a food, by adding chitosan to a food preservative solution consisting essentially of acetic acid, etc. (CONSTITUTION) The aimed food preservative obtained by adding chitosan to a food preservative solution consisting essentially of acetic acid or an alkali metal acetate. Furthermore, the amount of the chitosan added is preferably 4W5g based on 1l aqueous solution of the acetic acid, etc.

54. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To improve preservative or antiseptic effects of food, by subjecting Welsh onions, such as onion, or a blend thereof with ginger to extraction treatment, such as refluxing and heating, in the presence of water and adding chitosan in the form of an aqueous solution of powder to the resultant extract solution. (CONSTITUTION) One or more Welsh onions, such as onion, Welsh onion, Nanking shallot, scallion or Chinese chive, or a blend thereof with ginger is finely cut, dipped in water and heated for about 40W80min while being refluxed. After the heating while refluxing, the whole is filtered to remove solid residues and obtain an extract as a filtrate. An extract solution obtained by heating while refluxing or distilling is evaporated and concentrated until the ratio of the extract solution attains about 4W7pts.vol. extract solution based on 1pt.wt. dried raw material. Chitosan in the form of an aqueous solution or powder is subsequently added to the obtained extract solution. Thereby the resultant preserving solution has excellent preservative effects on food. The addition of the ginger has effects so that smell of the Welsh onions can also be eliminated.

55. FOOD PRESERVATIVE AND PACKAGED FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To provide a food preservative containing an aluminum compound having ethoxy group and effective in preventing the growth of mold on bread, etc. even after storage over a long period. (CONSTITUTION) The objective food preservative contains an aluminum compound having ethoxy group (preferably aluminum ethoxide). The preservative is preferably stored in a vessel made of a gas-permeable and water-impermeable film or sheet (e.g. fine porous spun-bond olefin polymer or olefin polymer sheet having fine open-cell structure).

56. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative having high antibacterial activity, harmless to human body and effective in prolonging preservation life of a food, by heat-treating a solution composed of chitosan powder, lactic acid or acetic acid

and calcium to form water-soluble powder. (CONSTITUTION) (A) Lactic acid and a lactate or acetic acid and an acetate, preferably a lactic acid solution produced by fermenting a solution composed of corn, potato, cow's milk and glucose is mixed with (B) a calcium component, e.g. calcium lactate or calcium acetate and (C) chitosan powder. The obtained solution is heat-treated e.g. with hot air to obtain water-soluble powder.

57. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To provide the title safe preservative having sufficient preservative power, free from impairing the eat feel and appearance of foods, containing as the active ingredient, a chitosan decomposition product of specific molecular weight. (CONSTITUTION) The objective preservative containing, as the active ingredient, a chitosan decomposition product (pref. acid decomposition product) with a molecular weight of 10,000W50,000. Said chitosan can be produced by deacetylation, using a conventional process such as alkali treatment, of chitin as the raw material which is a component of the skin skeletal tissue of the lower animals such as the Crustacea, lusecta or shellfish or the cell wall of fungi. The acid to be used in the acid decomposition is pref. acetic acid, lactic acid, citric acid, malic acid or hydrochloric acid.

58. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To reduce or eliminate smell of acetic acid emitted from a food preservative and simultaneously obtain the food preservative having improved preservation quality of a food, by adding c]hitosan to a food preservative consisting essentially of acetic acid or an alkali metal acetate. (CONSTITUTION) A food preservative obtained by adding preferably about 3W6g, preferably about 4W5 g chitosan to 1l solution of the food preservative consisting essentially of an active ingredient, such as trees and plants.vegetables.grains, or acetic acid and/or an alkali metal acetate is added to a processed food, such as uncooked noodles, pickles or 'MISO' (paste of fermented beans). The amount of the added food

preservative is normally within the range of about 0.5W3%.

59. ALCOHOLIC COMPOSITION AND FOOD PRESERVATIVE AND
STERILIZATION AGENT COMPOSED THEREOF

(PURPOSE) To provide the subject composition containing a lower fatty acid monoglyceride, protamine and ethanol, exhibiting bacterio-static action against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, lactobacilli, yeasts, etc., and useful as a food preservative or disinfectant. (CONSTITUTION) The objective composition contains a lower fatty acid monoglyceride (preferably a monoester of a 1-12C fatty acid and glycerol), a protamine (preferably strongly basic protein existing in the sperm of fish such as salmon, trout and herring in the form of nucleoprotamine) and ethanol. The composition is preferably further incorporated with lysozyme and acetic acid.

60. FOOD PRESERVATIVE AGENT AND PRODUCTION THEREOF

(PURPOSE) To obtain a food preservative causing no impairment of food taste and containing as effective component laminary oligosaccharide safe in respect to food hygiene by hydrolysis of a β -1,3 glucosylsaccharide compound with an enzyme or acid. (CONSTITUTION) A β -1,3 glucosylsaccharide compound collected from an extracted product or cultured product from cardran, pachyman, yeast cell wall, seaweed or fruit body of Basidiomycetes is hydrolyzed with either an enzyme such as β -1,3 glucanase or acid such as hydrochloric, sulfuric or oxalic acid to form laminary oligosaccharide 2-10 in polymerization degree. This oligosaccharide is, singly or in combination with an amino acid, added to a food-and-drink at an amount 0.1-10wt.% per weight of the food.

61. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative, having excellent bacteriostatic action on various bacteria and especially suitable as fries, by using a lysozyme, fatty acid monoglyceride and glycine in combination. (CONSTITUTION) A food

preservative obtained by blending one or two or more fatty acid monoglycerides selected from lauric acid monoglyceride, capric acid monoglyceride and caprylic acid monoglyceride with a lysozyme and glycine as active ingredients at 1:(0.5-2):(1-10) respective ratios of the lysozyme:fatty acid monoglycerides:glycine. The resultant food preservative in an amount within the range of 0.3-3.0% based on a food is added thereto.

62. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain food preservative exhibiting excellent antibacterial power by using of a small amount comprising ϵ -polylysine (salt) and protamine (salt). (CONSTITUTION) The aimed preservative is composed of ϵ -polylysine (salt) and protamine (salt) and mixed into food with a range of respective 0.005-1.0wt.%, preferably 0.01-0.5wt.%.

63. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To exhibit sure sterilizing preserving effect with a smaller using amount in contrast to conventional preservative or sterilizing agent by mixing a small amount of polygodial into chemical synthetic preservative such as potassium sorbate and preparing food preservative. (CONSTITUTION) Whole weed or leaf of polygonaceae such as Polygonum Blumei Meisn., Polygonum nodosum Pers. or Polygonum amphibium L. is dipped in non-polar or polar solvent and extracted, then crude extract is isolated and purified to obtain polygodial. Said polygodial is mixed with chemical synthetic preservative such as benzoic acid, sodium benzoate or potassium sorbate to prepare food preservative. Mixing ratio of polygodial is preferably 1-1/10,000pt.wt. to 1pt.wt. chemical synthetic preservative. Resultant food preservative exhibits are sterilizing preserving effect with a smaller using amount in contrast to conventional preservative and sterilizing agent.

64. FOOD PRESERVATIVE

(PURPOSE) To obtain a food preservative excellent in ethanol adsorptivity, its

sustained releasability and fluidity in ethanol adsorption and ensuring the adsorbent not to be latched to the sealed part when bagged by making ethanol adsorb on calcined mica. (CONSTITUTION) The objective food preservative to be used by being put into sealed food containers can be obtained by making ethanol adsorb on calcined mica (pref. ca.1.5-5.0ml/g in pore volume; virtually 5-100mesh in terms of mean granular size, pref. 500-3000 μ m more pref. 800-2500 μ m in granular size) prepared by calcination at 650-900 $^{\circ}$ C.

65. Food preservative

A food preservative composition comprising alum and citric acid and a method for using same. The composition retards deterioration of fruits, vegetables and meats, without substantially changing the flavor, appearance, odor or texture of the food.

66. DISCOLORATION PREVENTING FOOD PRESERVATIVE AND METHOD

A food preservation composition comprising a combination of safe chemicals is effective in low concentrations and imparts no off-color taste to the foods with which it is used, yet effectively prevents the discoloration of vegetables such as potatoes. Citric acid and cysteine, combined with the ratio of about 1 part cysteine to about 25 to 30 parts citric acid, may effectively prevent the blackening of potatoes when applied in solutions of about 0.5 to 0.7 percent by weight in water. A water solution of cysteine and citric acid in which the citric acid does not exceed 1 percent by weight, and the cysteine does not exceed 0.05 percent by weight of the solution, effectively prevents such blackening. Citric acid/cysteine compositions are rendered even more effective in the presence of very low concentrations of ascorbic acid; for example, about 0.1 percent to about 0.3 percent by weight in the water solution. The further addition of essentially trace amounts of ethylenediamine tetraacetic acid; for example, about 0.01 percent to about 0.05 percent by weight in the solution, will permit the reduction of the weight percentage of cysteine in the solution to about 0.01 percent, and will further

improve the efficacy of the composition.

67. FOOD PRESERVATIVE AND FOOD PRESERVATION

A food preservative containing lysozyme and alanine, another food preservative containing lysozyme, alanine, L-cystine and/or fumaric acid, and a method of preserving food by adding thereto the food preservative(s).

제 7 장 참고문헌

1. Abbas JA, El-Oqlah AA, Mahasneh AM. Herbal plants in the traditional medicine of Bahrain. *Economics Botany*, 46(2): 158 - 163(1992).
2. Adzet T, Vila R, Canigueral S. Chromatographic analysis of polyphenols of some Iberian Thymus. *Journal of Ethnopharmacology*. 24(2 - 3): 147 - 154(1988).
3. Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA. Isolation and Identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30(3): 680-687(1998).
4. Alzoreky NS, Nakahara K. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*. 80: 223 - 230(2003).
5. Ammar S, Michael H, Pirkko H, Kalevi P. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J. Ethnopharmacol.* 81: 327-336(2002)
6. Ayres HM, Payne DN, Furr JR, Russell AD. Use of Malthus-AT system to assess the efficacy of permeabilizing agents on the activity of antibacterial agents *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 422-426 (1998)
7. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.* 13: 235-244 (1998)
8. Bethan P, Philip F, Jim J, Joe D, Debra L, Isaac C, Karen S. Aqueous extract of herba *Scutellaria barbatae*, a chinese herb used for ovarian cancer, induces

apoptosis of ovarian cancer cell lines. *Gynecologic Oncology*. In press

9. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*. 28: 25-30(1995).

10. Branen AL, Go HC, Genske RP. Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetilactis* and *Luconostoc citrovorum*. *J. Food Sci.* 40: 446-453(1975)

11. Cai Q, Rahn RO, Zhang R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters*. 119: 99 - 107(1997).

12. Carmichael J, De Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-601 (1987)

13. Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka Y. Fructionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinarr, from *Lentinusedodessing*. *Cancer Res.* 30: 2276-2278 (1970)

14. Chung CK, Park OK, Yoo IJ, Park KM, Choi CU. Antimicrobial activity of essential oils of curry spices. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 716-719 (1990)

15. Conner DE, Beuchat LR. Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. *J. Food Sci.* 49: 429-437(1984)

16. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric asaay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*. 20:

1637-1648 (1971)

17. Do JR, Kang SN, Kim KJ, Jo JH, Lee SW. Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.* 13: 640-645 (2004)

18. Elena A Goun, Petrichenko VM, Solodnikov SU, Suhinina TV, Martin A Kline, Cunningham Glenn, Nguyen Chi, Howard Miles. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J. Ethnopharmacology.* 81: 337-342 (2002)

19. Frazier WA, Bartles JR. Discoidin I-membrane interactions I. Discoidin I binds to two types of receptor on fixed *Dictyostelium discoideum* cells. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Biomembranes.* 687: 121-128 (1982)

20. Golovinsky EV, Maneva LS, Angelov I I, Veljanova KD, Sniker DJ, Stankevich EK. Antibacterial and antitumor activity of some derivatives of reidosuccinic acid. *Neoplasma.* 23: 43-46 (1976)

21. Ha YL, Michael WP. Naturally occurring novel anticarcinogenes: Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid(CLA). *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20: 401-407 (1991)

22. Haraguchi H, Saito T, Okamura N, Yagi A. Inhibition of lipid peroxidation superoxide generation by diterpenoids from *rosmarinus* in leaf senescence. *Plant Med.* 61: 333 - 336(1995).

23. Hong ND, Rho YS, Kim NJ, Kim JS. A Study on Efficacy of Ulmi Cortex. *Korean J. Pharmacogn.* 21: 217-222 (1990)

24. Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green

- tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 63: 257–283 (1998)
25. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta.* 1147: 132–136 (1993)
26. Ito N, Fukushima S, Tamano S, Hiroe M, Hagiwara A. Dose response in butylated hydroxyanisole induction of forestomach carcinogenesis in F 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 77: 1261 - 1265(1986).
27. Kim HY, Lee YJ, Kim SH, Hong KH, Kwon YK, Lee JY, Ha SC, Cho HY, Chang IS, Lee CW, Kim KS. Studies on the development of natural preservatives from natural products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31(6): 1667–1678(1999).
28. Kim JS, Lee GD, Kwon JH, Yoon HS. Identification of phenolic antioxidative components in *Terminalia Chebula* Retz. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 36(4): 239–243(1993)
29. Kim MS, Lee DC, Hong, JE, Chang KS, Cho HY, Kwon YK, Kim HY. Antimicrobial effects of ethanol extracts from Korean and Indonesian plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 949–958 (2000)
30. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* 213 (1999)
31. Kitty B. The phytochemical renaissance. The status on known health benefits. *Food Proc, Nov.* 44 (1999)
32. Komali AS, Zheng Z, Shetty K. A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. *Process Biochemistry.* 35: 227 - 235(1999).

33. Kroon PA, Williamson G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J Sci Food Agri* 79: 355-361(1999).
34. Lee BW, Shin DH. Screening of Natural Antimicrobial Plant Extract on Food Spoilage Microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 200-204 (1991)
35. Lee KS, Kim SH, Sim KC, Park CS, Shin YS. Antimicrobial activity of *Terminalia chebula* retz. extract of against intestinal pathogens. *Korean J. Food Nutr.* 10: 559-563(1997)
36. Lee SH, Lim YS. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. *J. Korean Soc. Food Sic. Nutr.* 27: 239-243 (1998)
37. Mahasneh AM, Abbas JM, El-Oqlah AA. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain. *Phytotherapy Research.* 10: 251 - 253(1996).
38. Maruyama S, Miyoshi S, Tanaka H. Angiotensin I -converting enzyme inhibitors derived from *ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2763-2767 (1989)
39. Meng J, Zhao S, Doyle MP, Joseph SW. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. *J. Food Prot.* 61: 1511 - 1514(1998).
40. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 152: 239-245(1997)
41. Moller JKS, Madsen HL, Altonen T, Skibsted LH. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry.* 6: 215

- 219(1999).

42. Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Plotagus vulgarius* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 26(4): 2231-2240(1987)

43. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 6th ed. ASM, Washington, DC(1995).

44. Nepka C, Sivridis E, Antonoglou O, Kortsaris A, Georgellis A, Taitzoglou I, Hytoroglou P, Papadimitriou C, Zintzaras I, Kouretas D. Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. *Cancer Letters* 141: 57-62(1999)

45. Oguni I, Yamada M. Protection against cancer risk by green tea and antibacterial activity of tea catechin against *Helicobacter pylori*. Paper presented at 4th Int. Symposium on green tea, Seoul, Korea (1997)

46. Orrjala J, Erdelmeier CA, Wright AD, Rali T, Sticher O. Five new prenylated phydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Med.* 59: 546-551(1993)

47. Park UY, Chang DS, Cho HR. Antimicrobial effect of lithospermi radix (*Lithospermum erythrorhizon*) extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 97-100 (1992)

48. Park UY, Chang DS, Cho HR. Antimicrobial effect of medicinal herb. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 91-96 (1992)

49. Ravn H, Brimer I. Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantage major* subsp. *major*. *Phytochemistry*. 27(6):

3433-3441(1988)

50. Sabu MC, Ramadasan K. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethnopharmacology*. 81(2): 155-160(2002).

51. Saleem A, Husheem M, Härkönen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology*.81(3): 327-336(2002).

52. Salvi A, Brihlmann C, Migliavacca E, Carrupt PA, Hostettmann K, Testa B. Protection by antioxidants: developments of a convenient assay and structure-activity relationships of natural polyphenols. *Helv Chem Acta* 85: 867-881(2002).

53. Shahidi Bonjar GH. Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine *Fitoterapia*. 75(2): 231-235(2004).

54. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 32: 67-103(1992).

55. Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158(1965).

56. Soliman KM, Badeaa RI. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*. 40(11): 1669 - 1675(2002).

57. Suzuki T, Ishikawa N, Meguro H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity in foods. *Nippon Nogeigaku Kaishi*. 57: 1143-1146 (1983)

58. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 56: 200-207(2002.).
59. Tomas-Barberan FA, Msonthi JD, Hostettann K. Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum intens*. *Phytochemistry*. 27(2): 753-760(1988)
60. Wurtzen G. Scientific evaluation of the safety factor for the acceptable daily intake (ADI). Case study: butylated hydroxyanisole (BHA). *Food Addit. Contam.* 10: 307 - 314(1993).
61. Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1038-1049 (1993)

Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants

Jeong-Ryong Do¹, Suk-Nam Kang^{2*}, Ki-Ju Kim¹, Jin-Ho, Jo¹ and Soo-Won Lee³

¹Korea Food Research, ²Agricultural Products Quality Authorization Center of Cheonan Yonam College, ³Graduate School of Food & Biotechnology, Sung Kyun Kwan University.

Abstract

The objective of this study was to determine the radical scavenging activity, total phenolic index, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration(MIC) of water extracts of 32 medicinal plant species that have been commonly used in medical herbs. The freeze dried weight per dried materials were showed above 30% for 4 extract: *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana*, *Cinnamomum cassia* and *Cornus officinalis*. Total phenolic index and radical scavenging activity of *T. chebula* extract presented a highest value (585.87 mg/g, 38.15%), followed by *S. officinalis* (429.21 mg/g, 29.33%), *P. thumbergiana*(377.31 mg/g) and *R. coreanus miquel*(316.23 mg/g, 26.77%). The extracts from *T. chebula*, *R. coreanus muquel*, *C. sappan*, *E. aromaticum*, *S. officinalis* and *C. japonica* possessed outstanding antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. MIC was determined on those extracts that showed high efficacy against the test organisms. The efficiency of MIC value of *T. chebula* extract against *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* was 7.8, 31.2, 15.6 and 7.8 ug/mL, respectively. In addition, the total phenolic content and radical scavenging activity very closely correlated for the set of all samples($p < 0.01$, $r = 0.85$). The correlation coefficient between total phenolic index and antimicrobial activity was of 0.89(*E. coli*), 0.79(*B. subtilis*), 0.78 (*S. aureus*), 0.85 (*L. plantarum*), 0.85(*P. aeruginosa*) and 0.25(*S. typhimurium*) (all $p < 0.05$).

Key words: Antimicrobial; antioxidant; phenolic; medicinal plants; water extracts

Introduction

The spoilage and poisoning of foods by microorganisms is a problem that has not yet been brought under adequate control despite the range of robust preservation techniques available. Several antimicrobials have been developed over the years to control these microorganisms. However, the development of antimicrobial resistance and the relatively narrow spectrum of the antimicrobials⁽¹⁾ have had limited success and the microbial contamination of food still poses an important public health and economic challenge. And, Due to the economical impacts of spoiled foods and the consumer's concerns over the safety of foods containing

synthetic chemicals, a lot of attention has been paid to naturally derived compounds or natural products⁽²⁻⁴⁾. Wild indigenous plants preservation is vital because such plants are fully adapted to local environments and conditions compared to any introduced species⁽⁵⁾. Natural alternatives are therefore needed to achieve sufficiently long shelf-life of foods and a high degree of safety with respect to foodborne pathogenic microorganisms. In nature, there are a large number of different types of antimicrobial compounds that play an important role in the natural defence of all kinds of living organisms. Recently, there has been considerable interest in extracts and essential oils from plants with antimicrobial activities for controlling pathogens and/or toxin producing microorganisms in foods^(6,7,8). Plant extracts have been known since antiquity to possess notable biological activity, including antioxidant, antibacterial and antifungal properties. Numerous kinds of metabolites have been isolated from various plants and their chemical structure has been elucidated^(9,10). This study is focused on phenolic compounds, constitute a large group of secondary plant metabolites that are ubiquitous among higher plants. They are phenolic compounds which generally occur as glycosylated derivatives. The aim of this study is to search for new antimicrobial and antioxidant agents. Therefore we characterize the extracts of 32 kinds of medicinal plant and yield contents, antioxidative, antimicrobial, minimum inhibitory concentration and total phenolic contents were measured.

Materials and methods

Extract yield.

32 kinds of dried medical plants were purchased from Kungdong market(Seoul, Korea) and were ground well individually by using grinder. The samples of medicinal plants were dried for 48 h to about 4% moisture (d.b.) in an air drier operating at 40°C. The samples were extracted with a distilled water(at 100°C) in a soxhlet apparatus for 6 hr. The extracts were filtered with filter paper(Whatman No 2). The extracts were concentrated with a evaporator after moderate dried of extracts were completely dried with freeze drier and were stored at -10°C until further use. The percentage of extract yield was noted.

Determination of total phenolic content using Folin-Ciocalteu method

The Folin-Ciocalteu method was performed as described by Singleton and Rossi Jr.⁽¹¹⁾. An aliquot of 30 ul of the diluted sample solution(10 mg/ml) was mixed with 150 ul of commercial Folin-Ciocalteu reagent and 450 ul of 20 wt.% sodium carbonate aqueous solution, the final volume was adjust to 3.0 ml with deionized water. The color generated was read after about 2 h at room temperature at 760 nm in 1 cm quartz cuvette using a UV-Vis spectrophotometer from Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 connected to a PC (software Wavescan). A calibration plot of absorbance versus phenolic concentration was made using (+)-catechin as standard. The phenolic content in samples was evaluated from the generated absorbance value and results were expressed as (+)-catechin equivalents (mg CE/g of extract powders). The equation of standard curve was followed:

$$\text{Total Phenolic Content} = 12.985 \times \text{O.D} + 0.0721$$

Radical-scavenging activity assay

The free radical scavenging activity of samples(10 mg/ml) was measured using the method of Brand-Williams et al⁽¹²⁾ with some modification. A 0.1 mM solution of DPPH

(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) in ethanol was prepared and to 2 ml of this solution was added 0.1 ml of an antioxidant solution in ethanol at different concentrations. After a 30 min incubation period at room temperature the absorbance was read against a blank at 517 nm.

Synthetic antioxidant reagent L-ascorbic acid was used in the construction of the standard curve. Estimation of radical-scavenging activity was carried out in triplicate. The results are mean values and expressed as percentage of L-ascorbic acid equivalents/10 mg of extract. The equation of standard curve was followed as:

$$\text{Radical-scavenging activity(L-ascorbic acid)} = 15.9457 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) + 0.6716$$

where A_{blank} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), and A_{sample} is the absorbance of the test compound.

Antimicrobial activities

The strains of microorganisms employed were the Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), *Bacillus subtilis* (ATCC 14593), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917), and the Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (KCTC 1682), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15522).

The dried plant extracts were dissolved in the 1% Dimethyl sulfoxide(DMSO) solvent to a final concentration of 100 mg/ml and sterilized through filtration by 0.45 um Millipore filters. Antimicrobial tests were then carried out by disc diffusion method⁽¹³⁾ using 100 ul of suspension containing 10^8 CFU/ml of bacteria spread on nutrient agar medium. The discs (8 mm in diameter) were impregnated with 20 ul of 100 mg/ml extracts (2 mg/disc) placed on the inoculated agar. Negative controls were prepared using the same solvents employed to dissolve the plant extracts. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 h for clinical bacterial strains. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition against the test organisms. Each assay in this experiment was repeated twice.

Minimum inhibitory concentration method

Minimum inhibitory concentration was determined by the micro dilution broth method. The sample extract(1 g) was dissolved in 100 ml of water containing 1% DMSO (10 mg/ml) and serially diluted with sterile nutrient broth medium to obtain the desired concentrations(0, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 ug/20 ul). Each plant extract dilution was inoculated with 20 ul of an individual microorganism present in its log phase. All inoculated dilutions were set at 37 °C for 24 h. The highest dilution of the plant extract that retained its inhibitory effect resulting in no growth (absence of turbidity) of a microorganism is recorded as the minimum inhibitory concentration value of the extract. A control experiment was run in parallel to study the impact of the solvent itself (without plant components) on growth of the nine test organisms. 1% DMSO was each diluted in a similar pattern with sterile nutrient broth, as indicated above, and inoculation by microorganisms followed by incubation were done similarly.

Statistical analysis

Data were analyzed using the SAS program. Duncan Multiple range test was performed to verify the significance. Pearson's correlation coefficients were also calculated between antimicrobial activities and phenolic content and radical-scavenging activity among 32 kinds of extracts.

Results and Discussion

Yield of extracts

The yield of lyophilized extracts of 32 medical plants were showed in Table 1. From the result, the yields of 4 out of 32 medical plant extracts were showed above 30% including *Terminalia chebula*, *Pueraria thumbergiana*, *Cinnamomum cassia* and *Cornus officinalis*. The extract of *C. officinalis* was showed a highest yield content(44.76%) among other sample($p < 0.01$), and those of *C. cassia*, *T. chebula* and *P. thumbergiana* showed 42.67, 32.38 and 30.01%, respectively.

Total phenolic content

Total phenolic content were measured for all the samples(Table 2). The total phenolic contents of plant extracts were analyzed by the Folin - Ciocalteu method and results were expressed as (+)-catechin equivalents (mg CE/g of extract powders). The extract of *T. chebula* present a highest TPI(585.87 CE mg/g) and followed *S. officinalis*, *P. thumbergiana* and *R. coreanus miquel*(429.21, 377.31 and 316.23 CE mg/g), respectively. Therefore, these extracts were used for further antioxidant and antimicrobial studies.

Radical-scavenging activity

The radical scavenging activity of medicinal plant was determined from the reduction in the optical absorbance at 517 nm due to scavenging of stable DPPH free radical. The results are expressed as percentage of L-ascorbic acid equivalents/10 mg of extract powder. The radical scavenging activity by the DPPH radical scavenging assay of the all extracts were shown in Table 2. *T. chebula* extract were highest RSA value(38.15%) among 32 extracts($p < 0.01$) and followed *C. sappan*, *S. officinalis*, *R. coreanus miquel*, and *P. thumbergiana* for the DPPH radical were 31.00%, 29.33%, 26.77% and 20.73%, respectively. The radical scavenging activities of antioxidants on the DPPH radical are thought to have been due to their hydrogen donation ability. The test samples had lots of phenolic hydroxyl groups in the structure(just like *T. chebula*, *C. sappan*, *S. officinalis*, *R. coreanus miquel*, and *P. thumbergiana*), and phenolic antioxidants have been recognized to function as electron or hydrogen donors⁽¹⁴⁾. Thus, the DPPH radical scavenging activity of these phenolic compounds may be mostly related to their phenolic hydroxyl group. From these results, the total phenolic content and radical scavenging activity are very closely correlated for the set of all samples($p < 0.01$, $r = 0.85$).

The key role of phenolic compounds as scavengers of free radicals is emphasized in several reports^(15,16). The presence of polyphenols, methoxylated flavonoids in particular, from medical plants was reported elsewhere⁽¹⁷⁾. Moreover, radical-scavenging activity is one of various mechanisms to contribute overall activity, thereby creating a synergistic effect.

Antimicrobial activities

The antimicrobial activities of 32 plant extracts against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus plantarum* at concentration of 0.2 mg/ml are shown in table 3. Of the plants screened for antibacterial activity, twenty-five were active, of these *T. chebula* had greatest activity; it had very strong activity(> sample of inhibition zone(i.z.) of 20 mm) against three of the six microorganisms *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. and had clear activity(i. z. of sample 10-15 mm.> i.z of control) against *E. coli* and had moderate activity(i.z. of sample 5-10 mm>.i.z. of control) against *S. typhimurium* and *L. plantarum*. And the extract of

Caesalpinia sappan had very strong activity against *S. typhimurium* and had clear activity against *S. aureus* and had moderate activity against *B. subtilis*, *L. plantarum* and *P. aeruginosa*. And the extract of *R. coreanus muquel* had strong activity (i.z. of sample 15-20 mm > i.z. of control) against *S. aureus* and had clear activity against *P. aeruginosa* and had moderate activity against *B. subtilis*, *S. typhimurium* and *E. coli*. Although the plants differ significantly in their activities against the tested microorganisms, most of the extracts showed antimicrobial activity against *B. cereus*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* then against *E. coli* and *L. plantarum*. From this study we can conclude that the extracts of *T. chebula* shown significant inhibitory activity against *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. It is generally considered that the inhibition of microbial activity by an antioxidant may be due to the free radical scavenging activity of phenolic compounds. Fig. 1 were showed the correlation between antimicrobial activity and the phenolic content of all samples in the water extracts. From this result, the coefficient correlation between phenolic contents and antimicrobial activity against *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *L. plantarum* were of 0.89, 0.79, 0.85, 0.78 and 0.85 ($p < 0.05$), respectively (Fig. 2).

Minimum inhibitory concentration(MIC)

This method was applied on 5 out of 32 plant extracts that showed an outstanding inhibitory effect against the microorganism with micro dilution broth method. These selected plant extracts were of *T. chebula*, *R. coreanus miquel*, *C. sappan*, *S. officinalis*, *E. aromaticum*, and *C. japonica*. The MIC value of each extracts against each of microorganisms are shown in Table 4. The MIC values of the extracts ranged between 7.8 and 1000 ug/ml. Results obtained by measurements of MIC, indicate that *B. subtilis* and *S. aureus* are the most sensitive microorganism tested, with the lowest MIC values (7.8 ug/ml) in the presence of water extracts from *T. chebula*. And the MIC value of *T. chebula* extract against *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* were respectively, 31.2, 7.8, 15.6 and 7.8 ug/ml, and followed that of *R. coreanus miquel* were 61.5, 61.5, 31.2 and 31.2 ug/ml, respectively. These differences could be due to the nature and level of the antimicrobial agents present in the extracts and their mode of action on the different test microorganisms. *T. chebula* extract showed the highest efficacy against 6 kinds of microorganisms at 20 ul per disk (Table 4). This activity against different test microorganisms suggests its promising efficacy as an antimicrobial agent. Actually showed that *T. chebula* had an activity against microorganisms cause by phenolic compound such as phloroglucinol, pyrogallol, protocathechuic acid, p-hydroxy benzoic acid and catechin et al^(18,19,20,21).

Table. 1. The used parts and yield contents of water extracts in the medicinal plants.

Medical herbs	Part	Yield %
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	Bark	5.42±0.45 ^k
<i>Alpinia oxyphylla</i>	Root	11.51±0.57 ^l
<i>Amomum globosum loureiro</i>	Root	5.75±0.32 ^k
<i>Angelica gigas</i>	Root	25.38±0.88 ^e
<i>Artemisia asiatica</i>	Leaves	12.83±0.81 ^h
<i>Astragalus membranaceus</i>	Root	24.34±0.75 ^e
<i>Caesalpinia sappan</i>	Body	2.60±0.86 ^{lm}
<i>Cinnamomum cassia</i>	Bark	42.67±0.18 ^b
<i>Cnidium officinale</i>	Root	25.42±0.62 ^e
<i>Coptis japonica</i>	Root	16.20±0.56 ^f
<i>Cornus officinalis</i>	Seeds	44.76±0.06 ^a
<i>Curcuma longa</i>	Root	5.99±0.66 ^k
<i>Dendrobium nobile</i>	Body	3.56±0.47 ^l
<i>Eugenia aromaticum</i>	Seeds	9.30±0.56 ^j
<i>Evodia officinale</i>	Seeds	13.89±0.57 ^{gh}
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	Fruit skin	13.88±0.34 ^{gh}
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Root	24.25±1.00 ^e
<i>Lindera aggregata</i>	Root	5.48±0.50 ^k
<i>Liriope plathyphylla</i>	Root	24.87±0.96 ^e
<i>Lycium chinense</i>	Seeds	6.66±0.48 ^k
<i>Myristica fragrans</i>	Root	6.38±0.28 ^k
<i>Paeonia albiflora</i>	Root	11.33±0.47 ⁱ
<i>Phyllostachys nigra</i>	Leaves	3.76±1.10 ^l
<i>Piper longum</i>	Seeds	5.73±0.57 ^k
<i>Polygonum aviculare</i>	Root	6.69±0.05 ^k
<i>Psoralea corylifolia</i>	Seeds	14.83±0.40 ^g
<i>Pueraria thumbergiana</i>	Root	30.01±0.82 ^d
<i>Rubus coreanus miquel</i>	Fruit	13.74±0.65 ^{gh}
<i>Sanguisorba officinalis</i>	Root	13.91±0.62 ^{gh}
<i>Schizandra chinensis</i>	Seeds	24.70±0.71 ^e
<i>Shining ganoderma</i>	Body	1.78±0.16 ^m
<i>Terminalia chebula</i>	Seeds	32.38±0.23 ^c

^{a~m}Mean±S.D were significantly different in the same column(p<0.01).

Table 2. The radical-scavenging activity and total phenolic contents of water extracts of medical plants.

Medical herbs	RSA % ¹	TPI mg CE/g ²
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	16.69±0.07 ^l	84.79±5.96 ⁱ
<i>Alpinia oxyphylla</i>	6.71±0.14 ^q	28.26±2.46 ^{lmn}
<i>Amomum globosum loureiro</i>	17.60±0.35 ^h	151.92±4.36 ^g
<i>Angelica gigas</i>	5.09±0.07 ^r	22.54±3.47 ^{mno}
<i>Artemisia asiatica</i>	19.82±0.21 ^f	129.55±0.63 ^h
<i>Astragalus membranaceus</i>	3.32±0.16 ^t	15.38±5.12 ^o
<i>Caesalpinia sappan</i>	31.00±1.44 ^b	547.37±3.71 ^g
<i>Cinnamomum cassia</i>	11.46±0.07 ^l	3.94±1.50 ^p
<i>Cnidium officinale</i>	4.50±0.28 ^s	18.33±2.37 ^{no}
<i>Coptis japonica</i>	9.82±0.14 ⁿ	48.29±2.42 ^j
<i>Cornus officinalis</i>	8.00±0.12 ^o	44.41±0.84 ^{jk}
<i>Curcuma longa</i>	6.67±0.35 ^q	23.43±2.22 ^{mno}
<i>Dendrobium nobile</i>	13.51±0.14 ⁱ	45.05±0.07 ^{jk}
<i>Eugenia aromaticum</i>	16.66±0.28 ⁱ	255.85±5.86 ^c
<i>Evodia officinale</i>	19.66±0.14 ^f	227.10±4.10 ^f
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	2.47±0.07 ^u	39.01±1.40 ^{kl}
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	10.67±0.03 ^m	19.23±1.09 ^{no}
<i>Lindera aggregata</i>	7.50±0.23 ^p	85.54±6.30 ⁱ
<i>Liriope plathyphylla</i>	6.59±0.33 ^q	17.55±3.47 ^{no}
<i>Lycium chinense</i>	13.65±0.14 ^j	156.00±5.65 ^g
<i>Myristica fragrans</i>	12.28±0.21 ^k	19.44±0.80 ^{no}
<i>Paeonia albiflora</i>	18.52±0.21 ^g	326.77±4.57 ^d
<i>Phyllostachys nigra</i>	4.74±0.16 ^{rs}	86.90±4.38 ⁱ
<i>Piper longum</i>	4.39±0.22 ^s	23.33±2.36 ^{mno}
<i>Polygonum aviculare</i>	18.53±0.14 ^g	147.07±4.14 ^g
<i>Psoralea corylifolia</i>	6.56±0.14 ^q	35.76±5.99 ^{kl}
<i>Pueraria thumbergiana</i>	20.73±0.28 ^e	377.31±3.81 ^c
<i>Rubus coreanus miquel</i>	26.77±0.07 ^d	316.23±19.48 ^d
<i>Sanguisorba officinalis</i>	29.33±0.14 ^c	429.21±5.36 ^b
<i>Schizandra chinensis</i>	3.37±0.06 ^t	15.17±6.83 ^o
<i>Shining ganoderma</i>	12.28±0.14 ^k	33.32±2.38 ^{klm}
<i>Terminalia chebula</i>	38.15±0.35 ^a	585.87±5.85 ^a

¹The radical-scavenging activity was determined with reference to the standard curve of L-ascorbic acid per g of extract powder.

²The total phenolic content was determined with reference to the standard curve of (+)-catechin mg per 10 mg of extract powder. .

^{a~q}Mean±S.D(n=3) were significantly different in the same column(p<0.01).

Table 3. Antimicrobial effects of water extracts from medicinal plants

Medical Herbs	Water extracts					
	gram positive			gram negative		
	BS	ST	LP	EC	PA	SA
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	a) -	-	-	-	-	-
<i>Alpinia oxyphylla</i>	-	-	-	-	-	~
<i>Amomum globosum loureiroi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Angelica gigas</i>	~	~	-	-	-	~
<i>Artemisia asiatica</i>	-	-	-	-	-	~
<i>Astragalus membranaceus</i>	-	~	-	~	-	-
<i>Caesalpinia sappan</i>	+	++++	+	-	+	++
<i>Cinnamomum cassia</i>	~	+	-	-	-	-
<i>Cnidium officinale</i>	-	-	-	-	-	~
<i>Coptis japonica</i>	+	+	+	-	~	+
<i>Cornus officinalis</i>	~	-	~	-	~	~
<i>Curcuma longa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Dendrobium nobile</i>	-	+	-	-	-	~
<i>Eugenia aromaticum</i>	~	+	-	~	++	++
<i>Evodia officinale</i>	~	-	-	-	-	~
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	~	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	b) ~	-	-	-	~	~
<i>Lindera aggregata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Liriope plathyphylla</i>	~	~	-	-	-	-
<i>Lycium chinense</i>	~	~	~	-	~	-
<i>Myristica fragrans</i>	~	-	-	-	-	~
<i>Paeonia albiflora</i>	-	~	-	-	~	~
<i>Phyllostachys nigra</i>	-	-	-	-	-	~
<i>Piper longum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Polygonum aviculare</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Psoralea corylifolia</i>	-	-	-	-	~	~
<i>Pueraria thumbergiana</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Rubus coreanus miquel</i>	+	+	-	+	d) ++	e) +++
<i>Sanguisorba officinalis</i>	+	+	-	+	++	++
<i>Schizandra chinensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Shining ganoderma</i>	-	-	-	-	~	~
<i>Terminalia chebula</i>	f) +++++	e) +	+	++	++++	++++

n=3

a) - : No antimicrobial activity.

b) ~ : Slight antimicrobial activity, inhibition zone(i.z) of sample 1-5 mm > i.z of control.

c) + : Moderate antimicrobial activity, i.z. of sample 5-10 mm > i.z. of control.

d) ++ : Clear antimicrobial activity, i.z. of sample 10-15 mm > i.z. of control.

e) +++: Strong antimicrobial activity, i.z. of sample 15-20 mm > i.z. of control.

f) +++++: Very strong antimicrobial activity, i.z. of sample > i.z. of 20 mm

EC = *Escherichia coli* KCTC 1682, BS = *Bacillus subtilis* ATCC 14593, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, ST = *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, LP = *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

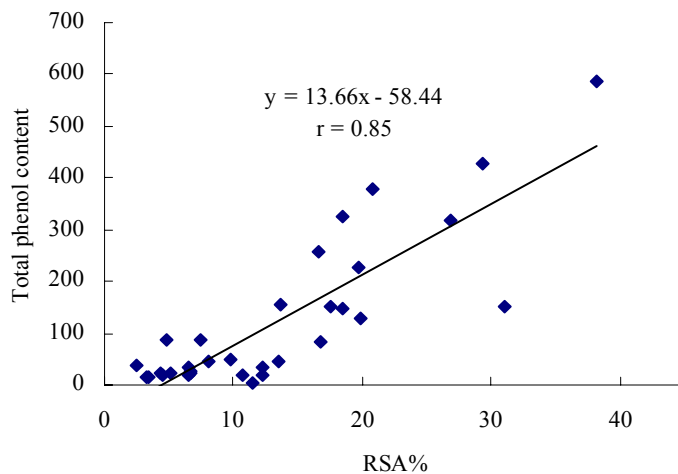


Fig. 1. The correlation between total phenolic content and radical-scavenging activity in the water extracts($p < 0.01$).

Table 4. Minimum inhibitory concentrations(MIC) obtained with micro dilution broth method.

Medical plants	Gram positive			Gram negative		
	BS	LP	ST	EC	PA	SA
<i>T. chebula</i>	7.8	125	31.2	31.2	15.6	7.8
<i>R. coreanus miquel</i>	62.5	-	31.2	62.5	31.2	31.2
<i>C. sappan</i>	250	31.2	-	-	62.5	31.2
<i>S. officinalis</i>	500	-	61.5	62.5	62.5	62.5
<i>E. aromaticum</i>	-	-	125	125	62.5	125
<i>C. japonica</i>	125	250	-	-	125	62.5

EC = *Escherichia coli* KCTC 1682, *BS* = *Bacillus subtilis* ATCC 14593, *PA* = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, *SA* = *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *ST* = *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *LP* = *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

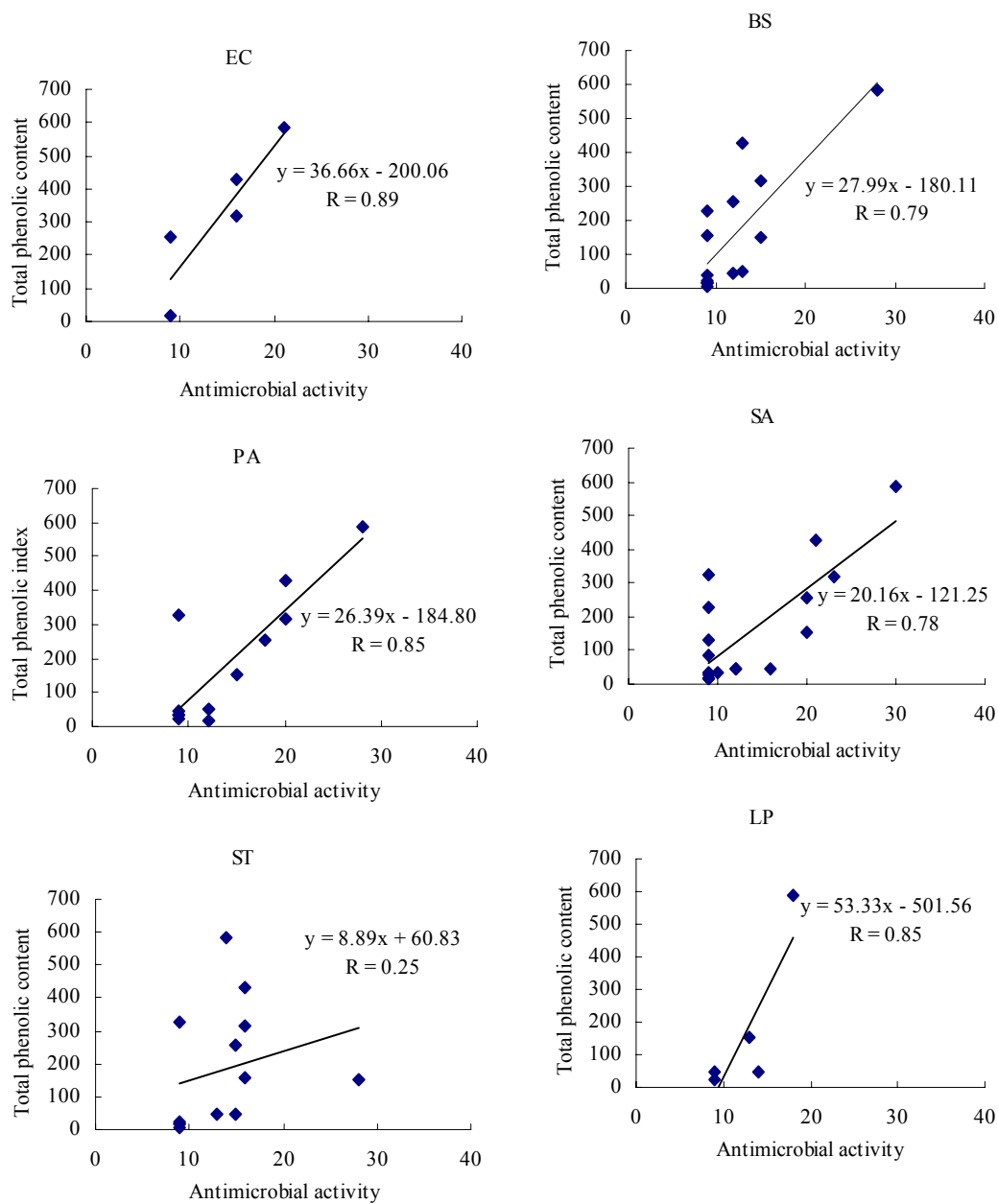


Fig. 2. The correlation between total phenolic content and Antimicrobial activity zone (*EC* = *Escherichia coli* KCTC 1682, *BS* = *Bacillus substillis* ATCC 14593, *PA* = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, *SA* = *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *ST* = *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *LP* = *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917) in the water extracts.

References

1. Meng J, Zhao S, Doyle MP, Joseph SW. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. *J. Food Prot.* 61: 1511 - 1514(1998).
2. Ito N, Fukushima S, Tamano S, Hiroe M, Hagiwara A. Dose response in butylated hydroxyanisole induction of forestomach carcinogenesis in F 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 77: 1261 - 1265(1986).
3. Wurtzen G. Scientific evaluation of the safety factor for the acceptable daily intake (ADI). Case study: butylated hydroxyanisole (BHA). *Food Addit. Contam.* 10: 307 - 314(1993).
4. Haraguchi H, Saito T, Okamura N, Yagi A. Inhibition of lipid peroxidation superoxide generation by diterpenoids from *rosmarinus* in leaf senescence. *Plant Med.* 61: 333 - 336(1995).
5. Abbas JA, El-Oqlah AA, Mahasneh AM. Herbal plants in the traditional medicine of Bahrain. *Economics Botany*, 46(2): 158 - 163(1992).
6. Alzoreky NS, Nakahara K. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology.* 80: 223 - 230(2003).
7. Soliman KM, Badeaa RI. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology.* 40(11): 1669 - 1675(2002).
8. Kim HY, Lee YJ, Kim SH, Hong KH, Kwon YK, Lee JY, Ha SC, Cho HY, Chang IS, Lee CW, Kim KS. Studies on the development of natural preservatives from natural products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31(6): 1667-1678(1999).
9. Mahasneh AM, Abbas JM, El-Oqlah AA. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain. *Phytotherapy Research.* 10: 251 - 253(1996).
10. Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA. Isolation and Identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30(3): 680-687(1998).
11. Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 16: 144-158(1965).
12. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie.* 28: 25-30(1995).
13. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 6th ed. ASM, Washington, DC(1995).
14. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 32: 67-103(1992).
15. Komali AS, Zheng Z, Shetty K. A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. *Process Biochemistry.* 35: 227 - 235(1999).
16. Moller JKS, Madsen HL, Altonen T, Skibsted LH. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry.* 6: 215 - 219(1999).
17. Adzet T, Vila R, Canigueral S. Chromatographic analysis of polyphenols of some Iberian

Thymus. Journal of Ethnopharmacology. 24(2 - 3): 147 - 154(1988).

첨부자료 2.

J. Food Sci. Nutr. Vol. 10, pp. 81~87 (2005)

Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Ethanol Extracts of Medicinal Plants

Jeong-Ryong Do¹, Ki-Ju Kim¹, Seung-Yong Park²,
Ok-Hwan Lee¹, Byeong-Sam Kim¹ and Suk-Nam Kang^{2*}

¹Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

²Cheonam Yonam College, Chungnam 330-820, Korea

Abstract

The objective of this study was to determine the radical scavenging activity, total phenolic content, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) of ethanol extracts of 32 medical plant species that have been commonly used in medicinal plants. Total phenolic index of *T. chebula* exhibited the highest value (498.01 mg/g), followed by *R. coreanus miquel* (400.33 mg/g), *Sanguisorba officinalis* (368.25 mg/g), *P. thumbergiana* (259.74 mg/g) and *Eugenia aromaticum* (229.38 mg/g). Radical scavenging activity for the DPPH radical was highest in *T. chebula* (40.91%, $p < 0.01$), followed by *C. sappan* (36.50%), *S. officinalis* (32.92%), *R. coreanus miquel* (26.54%) and *P. thumbergiana* (24.50%). The extracts from *T. chebula*, *R. coreanus muquel*, *C. sappan*, *E. aromaticum*, *S. officinalis* and *C. japonica* possessed outstanding antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. MIC was determined on those extracts that showed high efficacy against the test organisms. The most potent MIC values were seen for *T. chebula* extract against *P. aeruginosa*, *S. aurusa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *L. plantarum* and *S. Typhimurium* at 7.8, 7.8, 15.6, 7.8, 125 and 31.2 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Furthermore, the total phenolic content and radical scavenging activity were very closely correlated for all samples ($r=0.78$). The coefficient correlation between total phenolic index and antimicrobial activity was 0.91 (*E. coli*), 0.91 (*B. substillis*), 0.79 (*P. aeruginosa*), 0.79 (*S. Typhimurium*) and 0.70 (*L. plantarum*).

Key words: antimicrobial activity, antioxidant activity, phenolics, plant, extracts

Introduction

Spoilage and food-borne illnesses caused by microorganisms are problems that have not yet been brought under adequate control despite the range of robust preservation techniques available. Several antimicrobials have been developed over the years to control these microorganisms. However, the development of antimicrobial resistance and the relatively narrow

spectrum of the antimicrobials (1) have resulted in limited success and the microbial contamination of food still poses an important public health and economic challenge. Furthermore, due to the economic impacts of spoiled foods and the consumer's concerns over the safety of foods containing synthetic chemicals, a lot of attention has been paid to naturally derived compounds or natural products (2-4). The preservation of wild indigenous plants is vital because such plants are fully adapted to local environments and conditions compared to any introduced species (5), and natural alternatives are therefore needed to achieve sufficiently long shelf-life of foods and a high degree of safety with respect to foodborne pathogenic microorganisms. In nature there are a large number of different types of antimicrobial compounds that play an important role in the natural defense of all kinds of living organisms. Recently, there has been considerable interest in extracts and essential oils from plants with antimicrobial activities for controlling pathogens and/or toxin producing microorganisms in foods (6,7). Plant extracts have been known since antiquity to possess notable biological activity, including antioxidant, antibacterial and antifungal properties. Numerous kinds of metabolites have been isolated from various plants and their chemical structure has been elucidated (8)

This study focused on phenolic compounds. Phenolic compounds constitute a large group of secondary plant metabolites that are ubiquitous among higher plants. The main phenolic compound found in vegetables and plants extracts are derivatives of phenolic acid (9), that are hydroxycarboxylic acids with phenolic hydroxyl group occur in the forms of their esters, ethers or in their free forms. These compounds include some typical low molecular weight phenolic acids in foods as chlorogenic, caffeic and gallic acids. These compounds not only possess antioxidant, antiviral activities and stimulate the flowering of plants, but also affect activities of some enzymes (10,11). They are phenolic compounds which generally occur as glycosylated derivatives. The aim of this study was to search for new antimicrobial and antioxidant agents. Therefore we characterized the ethanol extracts of 32 kinds of medicinal plant and measured antioxidative and antimicrobial activities.

This study focused on phenolic compounds. Phenolic compounds constitute a large group of secondary plant metabolites that are ubiquitous among higher plants. The main phenolic compound found in vegetables and plants extracts are derivatives of phenolic acid (9), that are hydroxycarboxylic acids with phenolic hydroxyl group occur in the forms of their esters, ethers or in their free forms. These compounds include some typical low molecular weight phenolic acids in foods as chlorogenic, caffeic and gallic acids. These compounds not only possess antioxidant, antiviral activities and stimulate the flowering of plants, but also affect activities of some enzymes (10,11). They are phenolic compounds which generally occur as glycosylated derivatives. The aim of this study was to search for new antimicrobial and antioxidant agents. Therefore we characterized the ethanol extracts of 32 kinds of medicinal plant and measured antioxidative and antimicrobial activities.

Materials and methods

Determination of total phenolic content using Folin-Ciocalteu method

The Folin-Ciocalteu method was performed as described by Singleton and Rossi Jr (12). An aliquot of 30 μ L of the diluted sample solution (10 mg/mL) was mixed with 150 μ L of commercial Folin-Ciocalteu reagent and 450 μ L of 20% (w/v) sodium carbonate aqueous solution. The final volume was adjusted to 3.0 mL with deionized water. The color intensity generated was measured after about 2 h at room temperature at 760 nm using a UV-Vis

spectrophotometer from Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 connected to a PC using Wavescan software, Tokyo, Japan. A calibration plot of absorbance versus phenolic concentration was made using (+)-catechin as a standard. The polyphenol content in samples was evaluated from the generated absorbance value and results were expressed as (+)-catechin equivalents (mg CE/g of extract powders). The equation of the standard curve was:

$$\text{Total phenolic content} = 12.985 \times \text{O.D} + 0.0721$$

Radical-scavenging activity

The free radical scavenging activity of samples (10 mg/mL) was measured using the modified method of Brand-Williams et al. (13). Two milliliter of a 0.1 mM solution of DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) in ethanol was prepared, to which was added 0.1 mL of an antioxidant solution in ethanol at different concentrations. After a 30 min incubation period at room temperature the absorbance was read against a blank at 517 nm. Synthetic antioxidant reagent L-ascorbic acid was used in the construction of the standard curve. Estimation of the radical-scavenging activity was carried out in triplicate. The results are expressed as mean values as a percentage of L-ascorbic acid equivalents/10 mg of extract. The standard curve was:

$$\text{Radical-scavenging activity (L-ascorbic acid)} = 15.9457 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) + 0.6716$$

where A_{blank} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), and A_{sample} is the absorbance of the test compound.

Antimicrobial activity

The strains of microorganisms employed were the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), *Bacillus subtilis* (ATCC 14593), and *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917), and the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (KCTC 1682), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15522).

The dried plant extracts were dissolved in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) solvent to a final concentration of 100 mg/mL and sterilized through filtration by 0.45 μm Millipore filters. Antimicrobial tests were then carried out by the disc diffusion method (14) using a 100 μL of suspension containing 10^8 CFU/mL of bacteria spread on nutrient agar medium. The 8-mm diameter discs were impregnated with 20 μL of 10 mg/mL extracts (2 mg/disc) and placed on the inoculated agar. Negative controls were prepared using the same solvents employed to dissolve the plant extracts. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 h for clinical bacterial strains. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition against the test organisms. Each assay in this experiment was repeated twice.

Minimum inhibitory concentration (MIC) method

MIC was determined by the micro dilution broth method. The sample extract (1 g) was dissolved in 100 mL of water containing 1% DMSO (10 mg/mL) and serially diluted with sterile nutrient broth medium to obtain the desired concentrations (0, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 and 1,000 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$). Each plant extract dilution was inoculated with 20 μL of an individual microorganism.

present in its log phase. All inoculated dilutions were set at 37°C for 24 h. The highest dilution of the plant extract that retained its inhibitory effect resulting in no growth

(absence of turbidity) of a microorganism was recorded as the MIC value of the extract. A control experiment was performed in parallel to exam the effect of the solvent itself (without plant components) on the growth of the nine test organisms. DMSO (1%) was diluted in a similar pattern with sterile nutrient broth, as indicated above, and inoculation with microorganisms was performed in the same manner.

Statistical analysis

Data was analyzed using the SAS program. Duncan's Multiple range test was performed to verify the significance. Pearson's correlation coefficients were also calculated between the antimicrobial activities and phenolic content and radical-scavenging activity among the 32 kinds of extracts.

Results and Discussion

Yield of extract

The yields of lyophilized extracts from the 32 medicinal plants are shown in Table 1. From the results, the yield of the following 3 of 32 medicinal plant extracts were above 30%: *Terminalia chebula*, *Cornus officinalis* (39.2639.56%) and *Liriope plathyphylla* (32.56%) ($p < 0.01$). The extract of *C. cassia*, *A. gigas*, *C. officiale*, *S. chinensis* and *A. membranaceus* showed 28.76, 27.36, 27.19, 24.97 and 22.23%, respectively.

The total phenolic content

Total phenolic contents were measured for all the samples (Table 2). The total phenolic contents of plant extracts were analyzed by the Folin-Ciocalteu method and results were expressed as (+)-catechin equivalents (mg CE/g of extract powder). The extract of *T. chebula* showed the highest value (498.01 mg/g), followed by *R. coreanus miquel*, *Sanguisorba officinalis*, *P. thumbergiana* and *Eugenia aromaticum* with 400.33, 368.25, 259.74 and 229.38 CE mg/g, respectively.

Therefore, these extracts were used for further antioxidant and antimicrobial studies.

Radical-scavenging activity

The radical scavenging activity was determined by the reduction in the optical absorbance at 517 nm due to scavenging of stable DPPH free radical. The results were expressed as percentage of L-ascorbic acid equivalents/ 10 mg of extract powder. The radical scavenging activities according to the DPPH radical scavenging assay of all the extracts are shown in Table 2. *T. chebula* extract showed the highest value (40.91%) among 32 extracts ($p < 0.01$), followed by *C. sappan*, *S. officinalis*, *R. coreanus miquel*, and *P. thumbergiana* with the DPPH radical values of 36.50%, 32.92%, 26.54% and 24.50%, respectively. The radical scavenging activities of antioxidants against the DPPH radical are thought to have been due to their hydrogen donation ability. The test samples had numerous phenolic hydroxyl groups in the structure, and phenolic antioxidants have been recognized to function as electron or hydrogen donors (15). Thus, the DPPH radical scavenging activity of these phenolic compounds might be mostly related to their phenolic hydroxyl groups. From these results, the total phenolic content and radical scavenging activity were very closely correlated each other for all sets of samples ($p < 0.01$, $r = 0.78$). The key role of phenolic compounds as scavengers of free radicals is emphasized in several

reports (16,17). The presence of polyphenols, methoxylated flavonoids in particular, in medical plants was reported elsewhere (18). Moreover, radical-scavenging activity is one of various mechanisms to contribute antioxidant activity.

Antimicrobial activities

The antimicrobial activities of 32 plant extracts against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium and *Lactobacillus plantarum* at the concentration of 0.2 mg/mL are shown in Table 3. Of the plants screened for antibacterial activity, fifteen were active. Among them *T. chebula* had the greatest inhibitory activity. It had a very strong inhibitory activity against *S. aureus*, relatively strong inhibitory activities against *B. subtilis* and *P. aeruginosa*, and moderate inhibitory activities against *S. Typhimurium*, *L. plantarum* and *E. coli*. The extract of *C. sappan* had very strong inhibitory activity against *S. aureus*, relatively strong inhibitory activities against *L. plantarum*, and moderate inhibitory activities against *B. subtilis*, *S. Typhimurium* and *P. aeruginosa*. The extract of *R. coreanus muquel* had strong inhibitory activity against *S. aureus*, relative strong inhibitory activity against *P. aeruginosa*, moderate inhibitory activities against *B. subtilis*, *S. Typhimurium* and *E. coli*. The extract of *Sanguisorba officinalis* showed relative strong antimicrobial activity against *B. subtilis*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Although the plant extracts differed significantly in their activities against the tested microorganisms, most of the extracts showed antimicrobial activities against *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* and *L. plantarum*. From this study we can conclude that the extract of *T. chebula* showed significant inhibitory activity against *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. It is generally considered that the inhibition of microbial growth by an antioxidant may be due to the free radical scavenging activity of phenolic compounds (10–12). Fig. 1 were showed the correlation between antimicrobial activity and the phenolic content of all samples in the ethanol extracts. From result, as shown in Fig. 2, the coefficient of correlation between phenolic contents and antimicrobial activity against *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* and *L. plantarum*.

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Five out of 32 plant extracts showed an outstanding inhibitory effect against the microorganism with micro dilution broth method: These selected plant extracts were from *T. chebula*, *R. coreanus miquel*, *C. sappan*, *S. officinalis*, *E. aromaticum*, and *C. japonica*. The MIC value of each extract against each microorganism is shown in Table 4. The MIC values of the extracts ranged between 7.8 and 1,000 µg/mL. Results obtained by measurements indicated that the gram negative microorganisms of *P. aeruginosa* and *S. aureus* were the most sensitive microorganism tested, with the lowest MIC values (7.8 µg/mL) in the presence of ethanol extracts from *T. chebula*. The MIC value of *T. chebula* extract against *E. coli*, *B. subtilis*, *L. plantarum* and *S. Typhimurium* was 15.6, 7.8, 125 and 31.2 µg/mL, respectively. The value of *R. coreanus miquel* extract against *B. subtilis*, *S. Typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, was 15.6, 31.2, 62.5, 31.2 and 31.2 µg/mL, respectively. These differences could be due to the nature and level of the antimicrobial agents present in the extracts and their mode of action on the different test microorganisms. *T. chebula* extract showed the highest efficacy against 6 kinds of microorganisms at 20 µL per disk (Table 3). This growth inhibitory activity of the sample extract against different test microorganisms suggests its

potential as an antimicrobial agent. Actually, It was shown that the *T. chebula* activity against microorganisms was mediated by phenolic compounds such as phloroglucinol, pyrogallol, protocathechuic acid, p- hydroxy benzoic acid, catechins, vanillic acid and similar compounds (19-22).

Discussion and conclusions

Medicinal plants have been used by a large proportion of the Orient population. The reasons for this include the improvement of disease condition after herbal treatment, low harmful side effects and relatively low cost of the other forms of treatment. In the present study the results were encouraging as 25 out of 32 plants appeared to contain substances with antimicrobial activities. Several kinds of plant extracts with high phenolic content, anti-oxidant activity and consistent phenolic profile were identified and characterized. The high phenolic and antioxidant activities correlated well with antimicrobial activity against *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* and *L. plantarum*. In general, the extracts of *T. chebula* had highest the phenolic content, antioxidant activity and antimicrobial activity. The main phenolic compound found in vegetables and plants extracts containing phenolic acid as hydroxycarboxylic acids with phenolic hydroxyl group occur in the forms of their esters, ethers or in their free forms. These compounds include some typical low molecular weight phenolic acids as chlorogenic, caffeic and gallic acids. These compounds not only possess antioxidant and antiviral activities and stimulate the flowering of plants function, but also affect activities of some enzymes. They are phenolic compounds which generally occur as glycosylated derivatives. Further work is needed to identify the active principle from the various extracts and their phyto-pharmaceutical properties. It is possible that better therapeutic activities for many microbial diseases can be found in the bark, leaves and the other parts of hitherto neglected plants. These preliminary results appear to indicate that a number of plants have a high potential for antimicrobial activity.

Table 1. Parts used and yields of ethanol extracts in the medicinal plants

Medical herbs	Part used	Yield ¹⁾ (%)
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	Bark	5.41±0.30 ^{op2)}
<i>Alpinia oxyphylla</i>	Root	9.51±0.37 ^{mn}
<i>Amomum globosum loureiroi</i>	Root	9.85±0.23 ^m
<i>Angelica gigas</i>	Root	27.36±1.21 ^d
<i>Artemisia asiatica</i>	Leaves	12.79±0.25 ^{jk}
<i>Astragalus membranaceus</i>	Root	22.23±0.30 ^f
<i>Caesalpinia sappan</i>	Body	5.60±0.28 ^{op}
<i>Cnidium officinale</i>	Root	27.19±0.18 ^d
<i>Coptis japonica</i>	Root	18.24±0.34 ^h
<i>Cornus officinalis</i>	Seeds	39.26±0.90 ^a
<i>Curcuma longa</i>	Root	8.39±0.11 ⁿ
<i>Dendrobium nobile</i>	Body	3.52±0.34 ^q
<i>Eugenia aromaticum</i>	Seeds	16.57±0.42 ⁱ
<i>Evodia officinale</i>	Seeds	20.75±0.78 ^g
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	Fruit skin	10.04±0.06 ^m
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Root	21.56±0.49 ^{fg}
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Bark	28.76±0.91 ^c
<i>Lindera aggregata</i>	Root	4.49±0.39 ^{pq}
<i>Liriope plathyphylla</i>	Root	32.53±0.58 ^b
<i>Lycium chinense</i>	Seeds	6.38±0.14 ^o
<i>Myristica fragrans</i>	Root	12.43±0.42 ^k
<i>Paeonia albiflora</i>	Root	13.68±0.40 ^j
<i>Phyllostachys nigra</i>	Leaves	3.63±0.31 ^q
<i>Piper longum</i>	Seeds	5.61±0.37 ^{op}
<i>Polygonum aviculare</i>	Root	18.68±0.74 ^h
<i>Psoralea corylifolia</i>	Seeds	16.87±0.91 ⁱ
<i>Pueraria thumbergiana</i>	Root	9.48±0.48 ^{mn}
<i>Rubus coreanus miquel</i>	Fruit	11.29±0.19 ^l
<i>Sanguisorba officinalis</i>	Root	16.78±0.16 ⁱ
<i>Schizandra chinensis</i>	Seeds	24.97±1.14 ^e
<i>Shining ganoderma</i>	Body	4.53±0.47 ^{pq}
<i>Terminalia chebula</i>	Seeds	39.56±0.56 ^a

¹⁾lyophilized weight of sample extract/sample weight.

²⁾Values not sharing same superscript are significantly different in the same column from each other (p<0.01).

Table 2. Radical-scavenging activity and total phenolic contents of ethanol extracts of medicinal plants

Medical herbs	RSA ¹⁾ %	TPC ²⁾ mg CE/g
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	10.55±0.64 ^{no3)}	66.60±4.81 ^k
<i>Alpinia oxyphylla</i>	6.43±0.10 ^q	33.68±4.69 ^{mn}
<i>Amomum globosum loureiro</i>	16.88±0.18 ^{jk}	137.95±2.90 ^g
<i>Angelica gigas</i>	8.21±0.30 ^p	9.91±0.13 ^{pq}
<i>Artemisia asiatica</i>	17.95±0.08 ^{ij}	65.70±6.08 ^k
<i>Astragalus membranaceus</i>	1.94±0.23 st	11.81±1.68 ^p
<i>Caesalpinia sappan</i>	36.50±2.12 ^b	195.09±6.95 ^f
<i>Cinnamomum cassia</i>	2.35±0.08 ^s	2.05±1.35 ^q
<i>Cnidium officinale</i>	0.87±0.47 ^t	18.35±2.33 ^{op}
<i>Coptis japonica</i>	18.81±0.27 ^{hi}	32.77±3.16 ^{mn}
<i>Cornus officinalis</i>	6.25±0.35 ^q	25.59±6.24 ^{no}
<i>Curcuma longa</i>	20.61±0.56 ^g	117.86±3.03 ^h
<i>Dendrobium nobile</i>	19.66±0.49 ^{gh}	104.85±6.86 ^l
<i>Eugenia aromaticum</i>	18.16±0.48 ^{ij}	229.38±0.87 ^e
<i>Evodia officinale</i>	24.02±1.39 ^{ef}	148.25±2.48 ^f
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	20.58±0.59 ^g	48.29±2.42 ^l
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	17.60±0.57 ^{ij}	35.34±6.59 ^{mn}
<i>Lindera aggregata</i>	22.93±0.11 ^f	129.68±0.45 ^g
<i>Liriope plathyphylla</i>	11.58±0.59 ^{mn}	17.90±2.97 ^{op}
<i>Lycium chinense</i>	13.50±0.71 ^l	115.61±6.21 ^h
<i>Myristica fragrans</i>	15.81±0.27 ^k	147.36±3.74 ^f
<i>Paeonia albiflora</i>	3.70±0.71 ^r	79.65±0.49 ^j
<i>Phyllostachys nigra</i>	11.75±0.36 ^{mn}	69.68±0.45 ^k
<i>Piper longum</i>	0.98±0.31 ^t	28.14±2.63 ⁿ
<i>Polygonum aviculare</i>	24.50±0.71 ^e	259.74±0.37 ^d
<i>Psoralea corylifolia</i>	19.96±0.06 ^{gh}	109.92±0.11 ^{hi}
<i>Pueraria thumbergiana</i>	7.31±0.44 ^{pq}	113.07±4.14 ^{hi}
<i>Rubus coreanus miquel</i>	26.54±0.52 ^d	400.33±13.68 ^b
<i>Sanguisorba officinalis</i>	32.92±0.82 ^c	368.25±2.48 ^c
<i>Schizandra chinensis</i>	12.56±0.63 ^{lm}	15.57±6.26 ^p
<i>Shining ganoderma</i>	9.56±0.62 ^o	38.71±1.82 ^m
<i>Terminalia chebula</i>	40.91±1.54 ^a	498.01±2.81 ^a

¹⁾The radical-scavenging activity was determined from the standard curve of L-ascorbic acid per g of extract powder.

²⁾The total phenolic content was determined from the standard curve of (+)-catechin mg per 10 mg of extract powder.

³⁾Values not sharing same superscript are significantly different in the same column from each other (p<0.01).

Table 3. Antimicrobial effects of ethanol extracts from medicinal plants (n=3)

Medical herbs	Ethanol extracts					
	Gram positive			Gram negative		
	BS	ST	LP	EC	PA	SA
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	~ ¹⁾	~	~	- ²⁾	-	~
<i>Alpinia oxyphylla</i>	-	~	-	-	-	~
<i>Amomum globosum</i>	~	~	-	-	~	-
<i>Amomum loureiroi</i>	-	~	-	-	~	-
<i>Angelica gigas</i>	-	~	-	-	-	-
<i>Artemisia asiatica</i>	-	~	-	-	~	~
<i>Astragalus membranaceus</i>	+ ³⁾	+	++ ⁴⁾	-	+	+++
<i>Caesalpinia sappan</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum cassia</i>	~	~	-	-	~	~
<i>Cnidium officinale</i>	+	~	+	-	+	++
<i>Coptis japonica</i>	~	~	-	-	-	-
<i>Cornus officinalis</i>	+	+	+	-	~	~
<i>Curcuma longa</i>	-	+	+	-	+	+
<i>Dendrobium nobile</i>	++	+	-	+	+	++
<i>Eugenia aromaticum</i>	+	~	~	-	++	-
<i>Evodia officinale</i>	-	~	-	-	-	-
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	+	~	-	-	+	+
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	-	-	~	-	~	-
<i>Lindera aggregata</i>	~	~	-	-	-	~
<i>Liriope platyphylla</i>	-	~	-	-	~	-
<i>Lycium chinense</i>	++	~	-	-	~	~
<i>Myristica fragrans</i>	+	++	-	+	+	+
<i>Paeonia albiflora</i>	-	~	-	-	-	~
<i>Phyllostachys nigra</i>	-	~	-	-	~	~
<i>Piper longum</i>	+	++	-	-	+	+
<i>Polygonum aviculare</i>	+	~	-	-	+	+
<i>Psoralea corylifolia</i>	+	~	-	-	~	~
<i>Pueraria thumbergiana</i>	++	+	-	+	++	++
<i>Rubus coreanus miquel</i>	++	++	-	+	++	++
<i>Sanguisorba officinalis</i>	-	~	-	~	~	~
<i>Schizandra chinensis</i>	-	~	-	-	-	-
<i>Shining ganoderma</i>	+++ ⁵⁾	++	++	++	+++	++++ ⁶⁾
<i>Terminalia chebula</i>						

¹⁾Slight antimicrobial activity, inhibition zone (i.z) of sample 1~5 mm>i.z of control.

²⁾No antimicrobial activity.

³⁾Moderate antimicrobial activity, i.z. of sample 5~10 mm>i.z. of control.

⁴⁾Relatively strong antimicrobial activity, i.z. of sample 10~15 mm>i.z. of control.

⁵⁾Strong antimicrobial activity, i.z. of sample 15~20 mm>i.z. of control.

⁶⁾Very strong antimicrobial activity, i.z. of sample>i.z. of 20 mm.

EC=*Escherichia coli* KCTC 1682, BS=*Bacillus subtilis* ATCC 14593, PA=*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, SA= *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, ST=*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, LP=*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

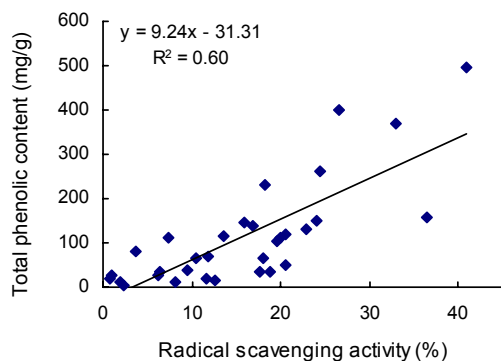


Fig. 1. The correlation between total phenolic content and radical-scavenging activity in the ethanol extracts of plants. were of 0.91, 0.91, 0.79, 0.79 and 0.70, respectively.

Table 4. Minimum inhibitory concentrations (MIC) obtained with micro dilution broth method

Microbial species	Gram positive			Gram negative		
	BS	LP	ST	EC	PA	SA
<i>T. chebula</i>	7.8	125	31.2	15.6	7.8	7.8
<i>R. coreanus miquel</i>	15.6	-	31.2	62.5	31.2	31.2
<i>C. sappan</i>	15.6	15.6	125	-	62.5	15.6
<i>S. officinalis</i>	62.5	-	61.5	62.5	62.5	62.5
<i>E. aromaticum</i>	-	-	61.5	62.5	62.5	31.2
<i>C. japonica</i>	125	250	-	-	125	62.5

BS=*Bacillus substillis* ATCC 14593, LP=*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, ST=*Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, EC=*Escherichia coli* KCTC 1682, PA=*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, SA=*Staphylococcus aureus* ATCC 12692.

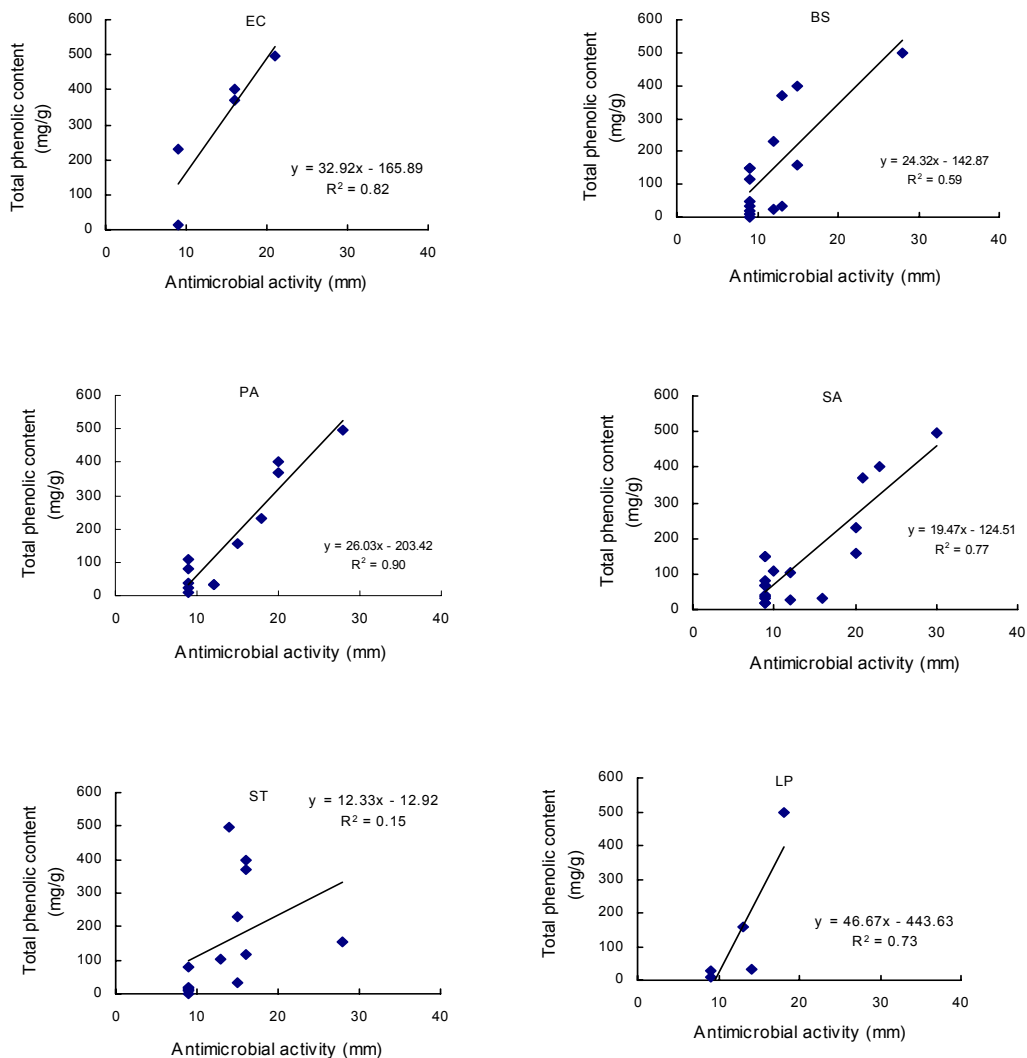


Fig. 2. The correlation between total phenolic content and antimicrobial activity zone in the water extracts.

EC=*Escherichia coli* KCTC 1682,

PA=*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522

ST=*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

BS=*Bacillus substillis* ATCC 14593

SA= *Staphylococcus aureus* ATCC 12692

LP=*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

References

1. Meng J, Zhao S, Doyle MP, Joseph SW. 1998. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. *J Food Prot* 61: 1511-1514.
2. Ito N, Fukushima S, Tamano S, Hiroe M, Hagiwara A. 1986. Dose response in butylated hydroxyanisole induction of forestomach carcinogenesis in F 344 rats. *J Natl Cancer Inst* 77: 1261-1265.
3. Wurtzen G. 1993. Scientific evaluation of the safety factor for the acceptable daily intake (ADI). Case study: butylated hydroxyanisole (BHA). *Food Addit Contam* 10: 307- 314.
4. Haraguchi H, Saito T, Okamura N, Yagi A. 1995. Inhibition of lipid peroxidation superoxide generation by diterpenoids from rosmarinus in leaf senescence. *Plant Med* 61: 333-336.
5. Abbas JA, El-Oqlah AA, Mahasneh AM. 1992. Herbal plants in the traditional medicine of Bahrain. *Economics Botany* 46: 158-163.
6. Alzoreky NS, Nakahara K. 2003. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol* 80: 223-230.
7. Soliman KM, Badeaa RI. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1669-1675.
8. Mahasneh AM, Abbas JM, El-Oqlah AA. 1996. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain. *Phytotherapy Research* 10: 251-253.
9. Kroon PA, Williamson G. 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J Sci Food Agri* 79: 355-361.
10. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 56: 200-207.
11. Salvi A, Brihlmann C, Migliavacca E, Carrupt PA, Hostettmann K, Testa B. 2002. Protection by antioxidants: developments of a convenient assay and structure-activity relationships of natural polyphenols. *Helv Chem Acta* 85: 867-881.
12. Singleton VL, Rossi JAJ. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American J Enology and Viticulture* 16: 144-158.
13. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30.
14. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. ASM, Washington, DC.
15. Shahidi F, Wanasundara PK. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutr* 32: 67-103.
16. Komali, AS, Zheng Z, Shetty K. 1999. A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. *Process Biochemistry* 35: 227- 235.
17. Moller JKS, Madsen HL, Altonen T, Skibsted LH. 1999. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry* 6: 215-219.
18. Adzet T, Vila R, Canigueral S. 1988. Chromatographic analysis of polyphenols of some Iberian Thymus. *J Ethnopharmacology* 24: 147-154.

첨부자료 3.

Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 37, No. 2, pp. 206~213 (2005)

생약재의 항균, 항고혈압 및 항암 활성

도정룡* · 김기주 · 조진호 · 김영명 · 김병삼 · 김현구 · 임상동 · 이수원¹
한국식품연구원, ¹성균관대학교 식품생명공학과

Antimicrobial, Antihypertensive and Anticancer Activities of Medicinal Herbs

Jeong-Ryong Do*, Ki-Ju Kim, Jin-Ho Jo, Young-Myoung Kim,
Byeong-Sam Kim, Hyun-Ku Kim, Sang-Dong Lim and Soo-Won Lee¹
Korea Food Research Institute
Department of Food and Biotechnology, ¹SungKyunKwan University

Antibacterial, antifungal, anticancer and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of water and 70% ethanol extracts of 32 medicinal herbs species were investigated. *Terminalia chebula* extracts showed strong antibacterial activities. Ethanol extract of *Cinnamomum cassia* showed good antifungal activity. ACE inhibitory activities of *P. corylifolia* water extract and Fraction I of *P. corylifolia* water extract was 65.2 and 81.8%, respectively.

Cytotoxicity of ethanol precipitate fraction obtained from water extract of *Eugenia caryophyllata* was highest.

Key words : medicinal herb, antibacterial, antifungal effect, antihypertensive, anticancer

서 문

중국 한방약물학 전문서인 신농본초경의 분류에 따르면 생약재는 다량 또는 장기간 복용해도 부작용이 없는 약재와 독성이 있어 주의해야 할 약재, 독성이 있어 장기간 복용이 어려운 약재로 분류하고 있다.

이러한 생약재는 독성의 유무와 약효의 차이는 있지만 활성성분의 작용에 의해 상호 의약품과 식품으로 이용 가능한 것으로 알려져 있다. 이러한 생약재의 활성성분은 각각의 생리활성에 따라 항균활성을 비롯하여 항 곰팡이, 항고혈압 및 항산화효과 등의 생리 활성이 보고 되고 있으며, 식물화학성분이 특정질병의 진행을 억제하거나 지연시킨다는 연구결과가 보고 되고 있다.

식품의 부패와 변질은 주로 미생물의 작용에 의해 일어나는데, 이를 방지하기 위해 각종 합성 보존제를 사용되고 있다. 또한 식품보존제로 사용하고 있는 합성보존제의 지속적인 사용이 여러 가지 부작용을 일으킬 수 있다는 문제가 제시되고 있다(3). 이러한 문제점을 해결하고 식품의 보존성을 확보하기 위해 천연자원으로부터 항균제 개발연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 따라 독성이 적고 항균력이 뛰어난 천연항균물질이 식품 부패의 원인인 미생물의 증식을 억제하여 식품의 저장기간과 신선도를 유지시켜줌으로 산업적인 이용이 증가하고 있는 추세이다.

생리활성 성분들은 대부분 2차 대사산물로서 어느 특정 생물에만 분포되어 있으며 식물체의 생합성과정 중 소량씩 생성되는데 flavonoid, terpenoid, steroid, alkaloid, quinone, tannin, indole, coumarin 및 plant sterol등이 그 대표적 성분들이다. 이 생리활성 성분들은 매우 적은 양으로도 고유의 생리활성을 나타내며, 분자량은 Mw. 2,000이하의 저분자 물질로부터 수만 이

상의 고분자 물질로 구분된다(24, 25). 이러한 생리활성 성분들 중 flavonoids와 catechin 등은 polyphenol류에 속하는 물질로서 여러 가지 생약재는 물론 과일과 곡류 등에서 볼 수 있으며, 특히 차(tea)에 많이 함유하고 있는 물질이다. 이 polyphenol물질은 항균작용(5)은 물론 항고혈압(6)과 항암활성(7)등의 생리 활성을 나타내는데, 이는 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가진 방향족 화합물로서 식물계에 다량으로 존재하며 높은 극성과 열, pH에 대해 민감하게 작용한다. Suzuki 등(8)은 한약을 포함한 117종의 ACE저해 활성을 탐색하여 대두식품과 차(tea), 과일, 메밀 등이 ACE저해 활성에 좋은 것을 확인하였다. 이들 ACE저해제들은 대부분이 열에 안정하며, 체내에 흡수가 용이한 비교적 저분자 물질로 그 저해능력은 혈압 강하제와 비교하였을 때 비교적 낮은 활성을 나타내지만 대량으로 항상 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대된다고 하였다. 이에 본 실험에서는 천연물에 존재하는 항균 및 항 곰팡이, 항고혈압, 항암 활성에 탁월한 효과를 나타내는 물질을 탐색하기 위해 32종의 생약재를 식품에 사용 가능한 용매인 물과 에탄올로 추출하여 항균, 항고혈압, 항암 활성을 탐색하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 32종의 생약재는 항균활성 실험 결과를(9) 참고하여 190여종의 생약재에서 선정하였으며, 실험재료로 사용한 생약재는 금산약초시장에서 건조된 상태로 구입하여 사용하였다(Table 1).

생약재 추출

본 실험에 사용한 32종의 생약재는 세절 및 분쇄한 후 중량의 10배량의 증류수와 70% 에탄올을 첨가하여 환류냉각기가 장착된 추출기로 비등점에서 2 시간 동안 추출하였다. 물 추출물은 Whatman No 2 여과지로 여과하여 농축기로(Heidolph 4000, Schwabach, Germany)농축한 후 동결 건조 하였고, 에탄올 추출물은 50℃에서 6 h 동안 중탕하여 에탄올을 완전히 제거한 후 동결 건조 하였다.

생약재의 추출수율은 Refractometer(ATAGO, Tokyo, Japan)수치로 나타내었으며, 동결 건조하여 -4℃ 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

사용균주 및 배지

항균 및 항 곰팡이 활성실험에 사용한 균주는 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Bacillus subtilis* ATCC 14593, *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 균주와 *Aspergillus niger* ATCC 62751, *Aspergillus oryzae* ATCC 16507, *Trichoderma reesei* ATCC 26921, *Penicillium rugulosum* IFO 4683, *Mucor miehei* KFRI 01011 균주로서 KFRI(한국식품개발연구원)에서 분양받아 사용하였다. 각각의 균주들은 BHI, Tryptic soy, Malt extract 및 Potato dextrose(Difco, Maryland, U.S.A.)의 각 배지에 전 배양하여 실험에 사용하였다.

항균 및 항 곰팡이 활성

항균 활성 검색에 사용한 균주는 37℃에서 18-24 시간 동안 전 배양하여 실험에 사용하였고, 항 곰팡이 활성검색에 사용한 균주는 30℃에서 72 시간 동안 전 배양하여 실험에 사용하였다. 항균 및 항 곰팡이 활성 실험 평판배지의 조제는 각각의 생육배지를 멸균하여 기층용 배지(agar 1.5%)를 제조하였고, 제조한 기층용 배지에 균주를 혼합한 중층용 배지(agar 0.75%)를 부어 균혀 제조하였다. 위의 평판배지에 paper disc(Ø 8mm, Advantec, Toyo Roshi Co, Tokyo, Japan)를 올려 밀착시킨 후 10% 농도의 생약재 추출물을 20 µL 첨가하여, 37℃와 30℃의 incubator에 18-24 시간, 48-72 시간 동안 각각 배양한 후 paper

disc agar diffusion법에 따라 항균 및 항 곰팡이 활성을 clear zone 직경(mm)으로 측정하였다.

ACE저해작용

ACE저해활성은 Cushman(10)의 방법을 응용하여 측정하였다. ACE저해 활성은 1% 시료 용액 50 μ L에 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 100 μ L 와 ACE 조효소액 50 μ L를 가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 5 min 동안 예비반응 시킨 후, HHL (hippuryl-histidyl-leucine) 50 μ L를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30 min 동안 반응시켰다. 이에 1 N HCl 250 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 가해 15 sec 동안 교반한 후, 원심분리(3000 rpm /5 min, 4 $^{\circ}$ C)하여 1 mL의 상등액을 얻었다. 상등액을 120 $^{\circ}$ C에서 30 min 동안 건조시켜 ethyl acetate를 완전히 제거한 후, 증류수 3 mL를 첨가하여 hippuric acid를 용해한 후 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ACE inhibition (\%)} = 1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡과도}}{\text{시료 무첨가구의 흡과도}} \times 100$$

Cytotoxicity

32종 생약재의 Cytotoxicity 측정은 Elena 와 Bethan (11, 12)의 실험 결과 및 한국생명공학연구원의 ‘암 질환용 식품의약 개발에 관한 연구’ 보고서 등을 바탕으로 정향, 작약, 지유, 호장근, 감초, 강황의 6가지 생약재를 선정하였다. 시료제조는 생약재추출물에 에탄올을 첨가하여 침전시켜 제조하였다.

세포배양

실험에 사용한 세포는 SNU-1(KCLB, 00001)과 HeLa(KCLB, 10002)로서 KCLB(한국세포주은행)로부터 분양 받아 사용하였다. 사용한 배지는 56 $^{\circ}$ C water bath에서 30 min 동안 inactivation 처리한 FBS 10%(v/v)와 항생제(1% penicillin-streptomycin) 1%(v/v), Sodium bicarbonate 0.2%(w/v), HEPES 0.475%(w/v), L-glutamine 0.03%(w/v)을 첨가하여 RPMI-1640배지(Sigma, ST. Louis, USA) 1 L를 제조하여 사용하였다. 세포배양은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 T-75 culture flask(BD Biosciences, Bedford, USA)에 배양하였다.

MTT assay

MTT assay는 인간에서 유래하는 2가지 종류의 암세포에 대한 cytotoxicity를 Carmichael(13)의 colorimetric MTT assay방법을 응용하여 측정하였다. 즉, SNU-1과 HeLa의 세포를 RPMI-1640(Sigma, ST. Louis, USA)배지에서 72시간 배양하여 SNU-1 세포는 1×10^4 cell/well이 되게 농도를 조정하고, HeLa세포는 1×10^3 cell/well로 각각 조정하여 실험하였다. 위 농도의 cell들을 96 well plate에 130 μ L씩 분주하고 1 mg/mL농도의 시료를 20 μ L 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양하였다. 이에 MTT용액 10 μ L를 첨가하여 SNU-1세포는 4시간동안 HeLa세포는 5시간동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 발색시킨 후 PBS buffer 50 μ L 와 20% SDS용액을 50 μ L씩 분주하여 20 h 동안 incubation시킨 후, dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용하여 세포를 완전히 풀어준 뒤 ELISA microplate reader(Emax, Molecular Devices, U.S.A)를 이용하여 540 nm에서 확인하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 1 - \frac{\text{실험구 well의 absorbance}}{\text{blank well의 absorbance}} \times 100$$

Gel filtration분획

시료를 6% 농도로 제조하여 0.2 μm 의 syringe filter로 여과한 후 Sephacryl S-300 (pharmacia, Uppsala, Sweden)컬럼에 loading하여 분획하였다. 용출용매로는 증류수를 사용하였으며, 용출속도는 1.8 mL/min 으로 분획하였다. 분획결과 Fig. 2. 와 같이 3개의 pick를 확인 할 수 있었으며, 이를 동결 건조하여 실험하였다.

결과 및 고찰

생약재 추출수율

생약재의 추출수율은 Table 1과 같다. 물 추출물의 경우 브릭스가 5.0 이상인 생약재는 가자, 갈근, 맥문동, 산수유 등으로 4종 이었고, 3.0-4.5에 달하는 생약재는 구기자, 당귀, 오미자, 오수유, 진피 등 5종으로 나타났으며, 2.0-3.0브릭스인 생약재는 감초, 복분자, 애엽, 작약, 파고지, 황련, 황기 등 7종으로 나타났고, 그 외의 생약재는 2.0 브릭스 미만의 적은 수율을 나타내었다. 70% 에탄올 추출물의 경우에는 가자, 정향, 당귀가 5.4, 4.4, 4.0 브릭스로 수율이 매우 높았으며, 그 다음으로 수율이 높은 생약재는 진피, 맥문동, 산수유, 호장근, 오미자, 오수유, 구기자, 천궁, 감초, 강황, 지유, 파고지, 황기, 갈근이 2.1-3.7브릭스로 70%에탄올 추출수율이 높았다. 그 외에는 2브릭스 미만으로 추출 수율이 매우 낮은 것으로 나타났다(Table 1).

본 실험의 결과에서 물과 70%에탄올에서 추출수율이 가장 높은 생약재는 가자로 나타났으며, 정향은 물 추출물에서는 수율이 낮았으나, 70%에탄올에서는 수율이 매우 높은 것으로 나타났다. 이는 정향 중에 정유성분이 풍부하기 때문인 것으로 사료된다.

생약재 추출물의 항균활성

32종의 생약재 추출물을 이용하여 6종의 미생물에 대한 항균활성을 검색하였다. 그 결과 가자 물 추출물과 에탄올 추출물이 gram 음성 균 과 gram 양성 균에 대해 높은 항균활성을 나타냈으며, 복분자와 지유 추출물은 *L. plantarum*을 제외한 5 균종에 대해 좋은 항균활성을 나타내었다. 이외에도 소목과 황련의 추출물이 *E. coli*를 제외한 *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*의 균에 대해 좋은 항균활성을 나타내었으며, 정향 추출물은 *E. coli*균종에 대해서는 약한 항균활성을 보인 반면 *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*의 균종에 대해서는 좋은 항균활성을 나타내었다. 대체적으로 생약재 물 추출물의 경우 *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*균주의 gram 음성 균에 대해 항균활성이 좋았고, *B. subtilis*, *S. aureus*균주의 gram 양성 균에 대해 좋은 항균활성을 나타내었다. 그에 반해 *E. coli*의 gram 음성 균과 gram 양성 균인 *L. plantarum* 균주에 대해서는 항균활성이 낮은 것으로 나타났다. 생약재 에탄올 추출물의 항균활성 결과는 물 추출물의 항균활성결과에 비해 월등히 좋은 활성을 나타내었다. 이는 20여종의 생약재를 물과 에탄올을 사용하여 추출하고 항균활성을 실험한 결과 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 2-10배 높은 항균활성을 나타낸 Park 등(19)의 연구결과와 일치한다. 특히 가자, 복분자, 정향, 지유, 소목, 강황, 황련 등의 13가지 생약재 추출물에서 높은 항균활성을 나타내었다. 가자 에탄올 추출물의 경우 물 추출물의 결과와 같이 *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*의 6가지 균주에 대해 좋은 항균활성을 나타냈으며, 복분자, 작약, 정향, 지유의 추출물은 *L. plantarum*을 제외한 5가지 균종에 대해 높은 항균 활성을 나타내었다. 또한 소목 추출물의 경우에는 *E. coli* 균주를 제외한 *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. plantarum* 균종에서 높은 항균활성을 보였으며, 이외에 강황, 파고지, 석곡, 오미자, 육두구, 호장근 추출물에서 비교적 좋은 항균활성을 나타내었다. 에탄올 추출물에서도 *E. coli*, *L. plantarum* 균주에 대해서는 좋지 않은 항균력을 보였으며, 물 추출물의 경우와 같이 에탄올 추출물도 gram 음성 균인 *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*균에 대해 좋은 항균활성을 나타냈으며, *B. subtilis*, *S.*

*aureus*의 gram 양성 균에서도 좋은 항균활성을 나타내었다. 또한 *E. coli* 균과 *L. plantarum* 균주에 대해서는 좋지 못한 항균활성을 나타내었다. 이는 항균력에 있어서 향신료나 생약재의 종류에 따라 다르며, 한 가지 생약재의 그 추출물도 일정 항균효과를 보이는 것이 아니라 미생물의 균종에 따라 그 민감도가 달라진다고 보고한 결과와 같다(14). Park 등(20)은 자초에서 항균성 물질을 추출시 용매별, 온도별에 따른 추출조건과 항균력을 실험한 결과 에탄올 농도가 높을수록 그리고 가열하여 추출하는 것보다 상온에서 추출하면 항균력이 높다고 하였다. 이러한 실험결과는 Lee 등(21)과 Chung(22), Hong(23)의 연구에서도 동일한 결과를 찾아볼 수 있었다. 본 연구에서는 생약재의 물 추출물에 비해 에탄올추출물에서 많은 종류가 항균활성을 나타내었지만, 가장 좋은 항균활성을 나타낸 가자의 경우 항균활성 실험결과 큰 차이는 없었다. 이는 추출공정에서 보다 쉽고 빠르게 추출할 수 있다는 장점을 갖고 있으며, 그 효율도 뛰어나 산업화 가능성이 있는 것으로 사료된다. 항균활성을 나타내는 성분으로는 폴리페놀이 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되고 있다(15).

생약재 물, 에탄올 추출물의 농도별 항균 효과

생약재를 농도별로 제조하여 5가지 균종에 대해 항 곰팡이 활성을 측정하였다. 32종 생약재의 추출물을 농도별로 제조하여 항 곰팡이 활성을 실험한 결과 황련 물 추출물을 250 μg 첨가하였을 때 *M. miehei* 균주에 대해서 9 mm의 clear zone을 나타내었다. 또한 계피 에탄올 추출물은 500 μg 이하의 첨가량에서는 활성이 나타나지 않았으며, 파고지 에탄올 추출물이 125 μg 의 가장 적은 양으로 항 곰팡이 활성을 나타내었다(Table 5).

생약재 추출물의 항 곰팡이 활성

농산물을 수확하여 저장 및 소비자에게 유통되는 기간동안 곰팡이에 의해 손실되는 양이 10%-30%이상의 손실율을 갖는다. 이는 경제적으로 큰 손실이 아닐 수 없다. 이에 본 연구에서는 32종의 생약재를 이용하여 항 곰팡이 활성을 탐색하였다.

물 추출물의 경우 황련 추출물에서는 *M. miehei* 균주에 대해 36 mm의 clear zone 수치를 나타내었다. 물 추출물과는 달리 에탄올 추출물에서는 비교적 다양한 생약재에서 항 곰팡이 활성이 나타났다. 특히 계피의 에탄올 추출물에서는 *A. niger*, *M. miehei*, *P. rugullosum*, *A. oryzae*, *T. reesei*의 5가지 균종에 대해서 각각 24 mm, 20 mm, 29 mm, 18 mm, 24 mm의 clear zone 수치의 항 곰팡이 활성을 나타내었다. 이 외에 파고지 추출물은 *A. niger*, *M. miehei*, *P. rugullosum* 균종에 대해 각각 14 mm, 29 mm, 13 mm의 clear zone을 나타냈으며, 감초 추출물에서는 *A. niger* 균주에 대해 항 곰팡이 활성을 나타내었고, 육두구, 호장근 및 황련 추출물에서는 *M. miehei* 균주에 대해 항 곰팡이 활성을 나타내었다. 또한 초두구 추출물에서는 *T. reesei* 균주에 대해 좋은 항 곰팡이 활성을 나타내었다(Table 4).

생약재 물, 에탄올 추출물의 농도별 항 곰팡이 효과

생약재를 농도별로 제조하여 5가지 균종에 대해 항 곰팡이 활성을 측정하였다. 32종 생약재의 추출물을 농도별로 제조하여 항 곰팡이 활성을 실험한 결과 황련 물 추출물을 250 μg 첨가하였을 때 *M. miehei* 균주에 대해서 9 mm의 clear zone을 나타내었다. 또한 계피 에탄올 추출물은 500 μg 이하의 첨가량에서는 활성이 나타나지 않았으며, 파고지 에탄올 추출물이 125 μg 의 가장 적은 양으로 항 곰팡이 활성을 나타내었다(Table 5).

물과 에탄올 추출물의 ACE저해효과

생약재의 생리활성물질 중 혈압상승에 관여하는 angiotensin converting enzyme (ACE)을 억제, 고혈압의 발생 기작인 renin-angiotensin system의 생화학적 기전을 조절하여 혈압강하에 중요한 역할을 하는 물질이 있다는 연구가 근래에 보고 되고 있다. 인체 내에서 ACE는 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I 으로부터 C-말단의 dipeptide(His-Leu)를 가수분

해시킴으로써 강력한 혈관수축작용을 나타내는 angiotensin II를 생성하고 혈압강화작용을 갖는 bradykinin을 분해하여 불활성화 함으로서 고혈압의 원인이 되고 있다. 이러한 ACE의 저해인 자로서는 저분자 peptide들과 그 유도체들, 차(tea)에 존재하는 catechin과 메밀의 rutin같은 polyphenol 성분들이 대표적으로 알려져 있다(16). 이에 본 실험에서는 32종의 생약재 물 추출물을 동결 건조한 시료를 10 mg/mL의 농도에서 ACE 저해작용 측정한 결과, 파고지가 항고혈압 활성이 가장 좋았고, 그 다음으로 소목과 죽엽이 높은 항고혈압 활성을 나타내었으며, 그 외에는 30%이하의 ACE저해율을 나타내었다. 다른 생약재와 비교해 볼 때 가장 항고혈압 활성이 높은 파고지를 선정하여 칼럼으로 분획하고 분획물의 ACE저해 활성을 분석하였다.

파고지(*Psoralea corylifolia*)분획물의 ACE저해 활성

선택한 파고지 생약재를 Sephacryl S-300 HR column으로 분획한 결과 3개의 fraction을 얻을 수 있었다. 이 3개의 분획물을 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/mL의 농도로 제조하여 ACE저해 활성을 실험한 결과 Fr 1의 5 mg/mL 농도에서 81.80%로 가장 좋은 ACE저해 활성을 보였으며, Fr 2에서 Fr 3.으로 갈수록 ACE저해 활성이 낮아졌다. 이는 파고지 물 추출물에서는 저분자물질 보다 고분자물질에서 ACE저해 활성이 높다는 것을 알 수 있었다. 또한 Fr 1의 IC₅₀을 조사한 결과 파고지 분획물 동결건조 중량이 3.5 ± 0.3 mg/mL 이었다(Fig. 3).

본초학에 의하면 파고지는 개암 풀 열매 또는 보골지(補骨脂)라고도 한다. 개암풀 열매는 가을에 익는데 맛은 맵고 쓰며 성질은 따뜻하며, 파고지는 신경과 비경, 심포경에 작용하며, 강심, 항암, 지혈, 항균 등의 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이렇듯 파고지는 오래전부터 한방에서 사용되어져온 약재로서 그 안전성이 입증되었고, 적당한 양의 섭취는 천연자원으로서 항고혈압 효능이 기대된다.

생약재의 Cytotoxicity

최근에는 부작용이 적으면서 유효한 항암제를 개발하기 위해 천연식물 자원으로부터 생리활성을 가진 물질 검색이 많이 이루어지고 있다. 즉 천연물을 이용한 미지의 약효성분을 검색, 발견함으로써 새로운 건강보조 대체 의약품으로 개발하려는 노력이 매우 활발히 전개되고 있다(17, 18).

이에 본 실험에서는 32종의 생약재를 대해 SNU-1 cells와 HeLa cells의 cytotoxicity를 MTT assay방법에 준하여 실시하였다. MTT assay방법은 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase에 의해 청색 formazan으로 변환되는 원리를 이용한 것이며, 살아있는 세포의 증식이나 독성검사에 활용하는 방법으로서 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma USA)시약을 PBS buffer에 5mg/ml의 농도로 제조하여 Carmichael 등(24)의 방법에 의해 색소의 강도를 ELISA reader로 측정하는 방법이다.

SNU-1 cells에 대한 cytotoxicity

작약, 지유, 호장근, 정향, 감초, 강황의 생약재를 water extracts, 70% ethanol extracts, ethanol precipitate, ethanol supernatant으로 제조 및 분획한 후, 4가지의 시료를 1 mg/mL의 농도로 제조하여 SNU-1 cells에 대해 cytotoxicity를 실시하였다. 그 결과 대체적으로 water extracts, ethanol precipitate에서 cytotoxicity활성이 좋게 나타났다. 또한 SNU-1 cells에 대해서 정향(*Eugenia aromaticum*)의 water extract가 1 mg/mL의 농도에서 43.58%로 좋은 세포독성을 나타내었고, 호장근(*Polygonum aviculare*)의 ethanol precipitate의 분획물에서는 44.53%의 세포독성을 나타내었다(Fig. 4).

HeLa cells에 대한 세포독성(cytotoxicity)

작약, 지유, 호장근, 정향, 감초, 강황의 생약재를 water extracts, 70% ethanol extracts, ethanol precipitate, ethanol supernatant으로 제조 및 분획한 후, 4가지의 시료를 1 mg/mL

의 농도로 제조하여 HeLa cells 에 대해 세포독성을 조사하였다. 그 결과, 대체적으로 water extracts, ethanol precipitate에서 cytotoxicity활성이 좋게 나타났다.

또한 HeLa cells에 대해서 정향의 ethanol precipitate분획물의 1 mg/mL 농도에서 69.60%의 좋은 세포독성을 나타내었고, 지유의 ethanol precipitate분획물의 1 mg/mL 농도에서도 55.03%의 세포독성을 나타냈었다. 또한 호장근의 water extract에서는 52.62%의 세포독성을 나타내었다(Fig. 5).

요약

본 연구에서는 32종 생약재로부터 70%에탄올과 물 추출물을 제조하고, 이들의 항균, 항곰팡이, 항암, 항고혈압활성을 조사하였다. 생약재의 추출물 제조는 32종의 생약재를 100℃에서 2시간동안 추출한 후 동결 건조하였다. 항균활성은 6종의 병원성 미생물을 사용하여 32종 생약재의 물 추출물과 70%에탄올추출물에 대해 조사하였다. 그중 가자의 물 추출물과 70%에탄올 추출물을 125 µg 첨가했을 때 14 mm이상의 항균 억제환을 나타내어 가장 좋은 항균활성을 보였다. 항곰팡이 활성은 5종의 곰팡이를 사용하여 32종 생약재의 물 추출물과 70%에탄올추출물에 대해 paper disc확산법으로 조사하였다. 그 결과 계피의 70% 에탄올추출물을 1000 µg 첨가했을 때 10 mm 이상의 항균 억제환을 보여 가장 좋은 항 곰팡이 활성을 나타내었다. 32종의 생약재 물 추출물과 70% 에탄올 추출물에 대한 ACE저해 활성을 조사하였다. 그 결과 파고지의 물 추출물이 10 mg/mL의 농도에서 65.2%의 억제율을 나타내었으며, 파고지의 물 추출물로부터 sephacryl S-300 컬럼으로 분획한 Fr I의 분획물이 5 mg/mL의 농도에서 81.1%의 억제율을 나타내었다. 생약재의 물 추출물과 70%에탄올 추출물의 세포독성을 조사하였다. 선정된 6종의 생약재중 정향의 에탄올 침전분획이 암세포에 대해 가장 우수한 세포독성을 나타내었다.

Table 1. Extract yields of medicinal herbs

(°Brix)

Scientific Name	Korean Name	Effective part	Water extract	EtOH extract
<i>Acanthopanax senticosus</i>	가시오가피	Bark	1.1	1.5
<i>Terminalia chebula</i>	가자	Seeds	5.9	5.4
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	감초	Root	2.9	2.4
<i>Curcuma longa</i>	강황	Root	0.9	2.4
<i>Pueraria thunbergiana</i>	갈근	Root	5.7	2.1
<i>Liriope plathyphylla</i>	맥문동	Root	5.3	3.2
<i>Lycium chinense</i>	구기자	Seeds	4.2	2.6
<i>Cinnamomum cassia</i>	계피	Bark	0.9	1.4
<i>Angelica sinensis</i>	당귀	Root	4.5	4.0
<i>Rubus coreanus</i> Miquel	복분자	Fruit	2.5	1.7
<i>Cornus officinalis</i>	산수유	Seeds	5.0	3.1
<i>Dendrobium nobile</i>	석곡	Body	0.7	1.0
<i>Caesalpinia sappan</i>	소목	Body	0.3	0.6
<i>Ganoderma lucidum</i>	영지	Body	0.9	0.7
<i>Schizandra chinensis</i>	오미자	Seeds	4.5	2.9
<i>Evodia officinalis</i>	오수유	Seeds	3.4	2.9
<i>Lindera strychnifolia</i>	오약	Root	0.9	1.4
<i>Myristica fragrans</i>	육두구	Root	1.0	1.8
<i>Artemisia asiatica</i>	애엽	Leaves	2.8	1.5
<i>Alpinia oxyphylla</i>	익지인	Root	1.6	1.7
<i>Paeonia albiflora</i>	작약	Root	2.0	1.4
<i>Eugenia caryophyllata</i>	정향	Seeds	1.6	4.4
<i>Phyllostachys nigra</i>	죽엽	Leaves	0.6	1.0
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	진피	Fruit skin	4.7	3.7
<i>Sanguisorba officinalis</i>	지유	Root	1.9	2.3
<i>Cnidium officinale</i>	천궁	Root	4.0	2.6
<i>Psoralea corylifolia</i>	파고지	Seeds	2.2	2.2
<i>Piper longum</i>	필발	Seeds	1.6	1.1
<i>Alpinia katsumadai</i>	초두구	Root	0.8	1.7
<i>Reynoutria japonica</i>	호장근	Root	1.7	3.1
<i>Coptis japonica</i>	황련	Root	2.6	1.8
<i>Astragalus membranaceus</i>	황기	Root	2.8	2.1

Table 2. Antimicrobial effects of water and ethanol extracts from medicinal herbs

Medicinal Herbs	Microorganism Strains											
	Water extract						Ethanol extract					
	E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.p	E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.p
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	12	-	9	12	9
<i>Terminalia chebula</i>	18 ¹⁾	26	26	28	12	15	18	23	23	28	14	15
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	-	9	12	9	-	-	-	17	16	15	9	9
<i>Curcuma longa</i>	-	-	-	-	-	-	-	13	9	11	13	13
<i>Pueraria thunbergiana</i>	-	-	-	-	-	-	-	13	12	9	9	-
<i>Liriope plathyphylla</i>	-	9	-	-	9	-	-	9	-	9	12	-
<i>Lycium chinense</i>	-	9	9	-	9	9	-	-	9	-	9	9
<i>Cinnamomum cassia</i>	-	9	-	-	16	-	-	-	9	-	22	17
<i>Angelica sinensis</i>	-	9	-	9	9	-	-	-	9	-	9	-
<i>Rubus coreanus</i> Miquel	16	15	20	23	16	-	15	20	20	22	15	-
<i>Cornus officinalis</i>	-	12	9	12	-	9	-	9	-	-	9	-
<i>Dendrobium nobile</i>	-	-	-	12	13	-	-	-	13	13	15	15
<i>Caesalpinia sappan</i>	-	15	15	20	28	13	-	16	16	25	15	17
<i>Ganoderma lucidum</i>	-	-	9	9	-	-	-	-	-	-	9	-
<i>Schizandra strychnifolia</i>	-	-	-	-	-	-	9	-	12	12	12	-
<i>Evodia officinalis</i>	-	9	-	9	-	-	-	13	19	-	9	-
<i>Lindera aggregata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-
<i>Myristica fragrans</i>	-	9	-	9	-	-	-	20	9	12	9	-
<i>Artemisia asiatica</i>	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	12	-
<i>Alpinia oxyphylla</i>	-	-	-	9	-	-	-	-	-	11	9	-
<i>Paeonia albiflora</i>	-	-	9	9	9	-	13	15	14	16	16	-
<i>Eugenia caryophyllata</i>	9	12	18	20	15	-	14	20	17	21	13	-
<i>Phyllostachys nigra</i>	-	-	-	9	-	-	-	-	-	9	9	-
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-
<i>Sanguisorba officinalis</i>	16	13	20	21	16	-	16	20	22	22	17	-
<i>Cnidium officinale</i>	-	-	-	9	-	-	-	11	9	11	9	-
<i>Psoralea corylifolia</i>	-	-	9	10	-	-	-	13	15	13	9	-
<i>Piper longum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	9	-
<i>Alpinia katsumadai</i>	-	-	-	-	-	-	-	11	9	-	9	-
<i>Reynoutria japonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	16	15	15	17	-
<i>Coptis japonica</i>	-	13	12	16	15	14	-	13	16	19	9	12
<i>Astragalus membranaceus</i>	9	-	-	-	9	-	-	-	9	9	9	-

E.C: *Escherichia coli*. B.S: *Bacillus subtilis*. P.S: *Pseudomonas aeruginosa*.

S.A: *Staphylococcus aureus*. S.T: *Salmonella typhimurium*. L.P: *Lactobacillus plantarum*. ¹⁾ inhibition zone diameter(mm). ²⁾ not detected

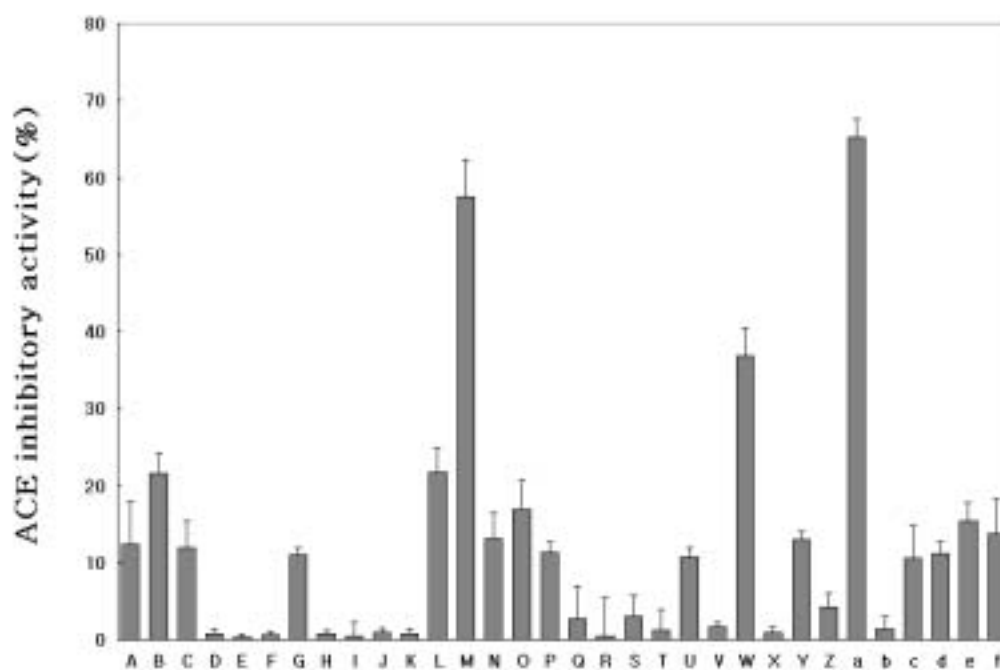
Table 3. Antifungal effects of water and ethanol extracts from medicinal herbs

Medicinal Herbs	Microorganism Strains									
	Water extract					Ethanol extract				
	A.n	A.o	M.m	P.r	T.r	A.n	A.o	M.m	P.r	T.r
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	- ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Terminalia chebula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-
<i>Curcuma longa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pueraria thunbergiana</i>	39 ¹⁾	-	40	20	19	-	-	-	-	-
<i>Liriope plathyphylla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lycium chinense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cinnamomum cassia</i>	-	-	-	-	-	24	20	29	18	24
<i>Angelica sinensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rubus coreanus</i> Miquel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cornus officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dendrobium nobile</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caesalpinia sappan</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizandra chinensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Evodia officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lindera strychnifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Myristica fragrans</i>	-	-	-	-	-	-	-	18	-	-
<i>Artemisia asiatica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alpinia oxyphylla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paeonia albiflora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eugenia caryophyllata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phyllostachys nigra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sanguisorba officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cnidium officinale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psoralea corylifolia</i>	-	-	-	-	-	14	-	29	-	13
<i>Piper longum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alpinia katsumadai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
<i>Reynoutria japonica</i>	-	-	-	-	-	-	-	18	-	-
<i>Coptis japonica</i>	-	-	36	-	-	-	-	35	-	-
<i>Astragalus membranaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A.n: *Aspergillus niger*. A.o: *Aspergillus oryzae*. M.m: *Mucor miehei*.

T.r: *Trichoderma reesei*. P.r: *Penicillium rugulosum*.

¹⁾ inhibition zone diameter(mm) ²⁾ not detected



Samples

Fig. 1. Angiotensin I converting enzyme(ACE) inhibitory effect of water extracts of medicinal herbs.

- A: *Acanthopanax sessiliflorum*. B: *Terminalia chebula*. C: *Glycyrrhiza glabra*.
D: *Curcuma longa*. E: *Pueraria thunbergiana*. F: *Liriope platyphylla*.
G: *Lycium chinense*. H: *Cinnamomum cassia*. I: *Angelica sinensis*.
J: *Rubus coreanus* Miquel. K: *Cornus officinalis*. L: *Dendrobium nobile*.
M: *Caesalpinia sappan*. N: *Ganoderma lucidum*. O: *Schizandra chinensis*.
P: *Evodia officinalis*. Q: *Lindera strychnifolia*. R: *Myristica fragrans*.
S: *Artemisia asiatica*. T: *Alpinia oxyphylla*. U: *Paeonia albiflora*.
V : *Eugenia caryophyllata*. W: *Phyllostachys nigra*. X: *Fraxinus rhynchophylla*.
Y: *Sanguisorba officinalis*. Z: *Cnidium officinale*.
a: *Psoralea corylifolia*. b: *Piper longum*. c: *Alpinia katsumadai*.
d: *Reynoutria japonica*. e: *Coptis japonica*. f: *Astragalus membranaceus*
* concentration 10 mg/mL

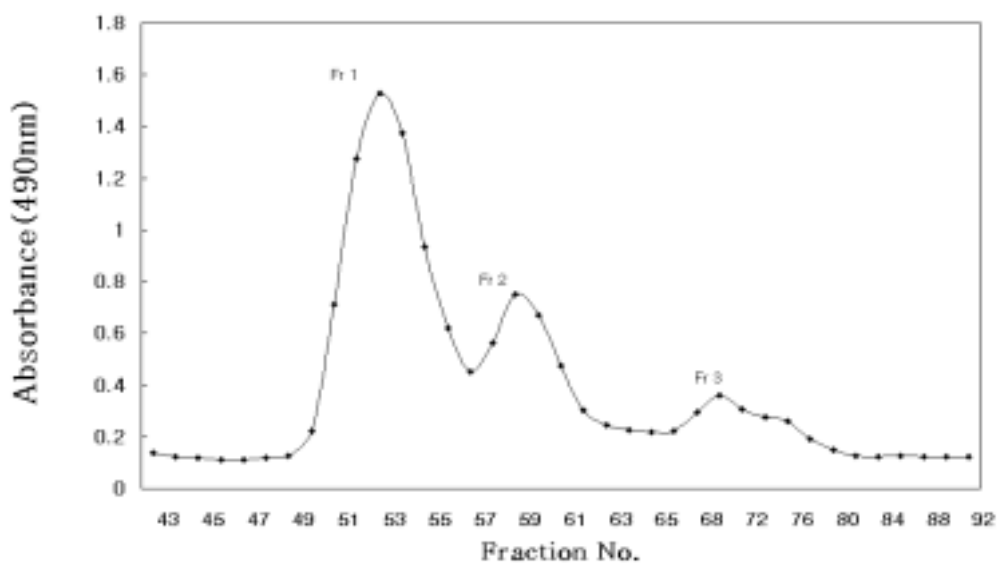


Fig. 2. Separation of water extract of the *Psoralea corylifolia* by Sephacryl S-300 HR.

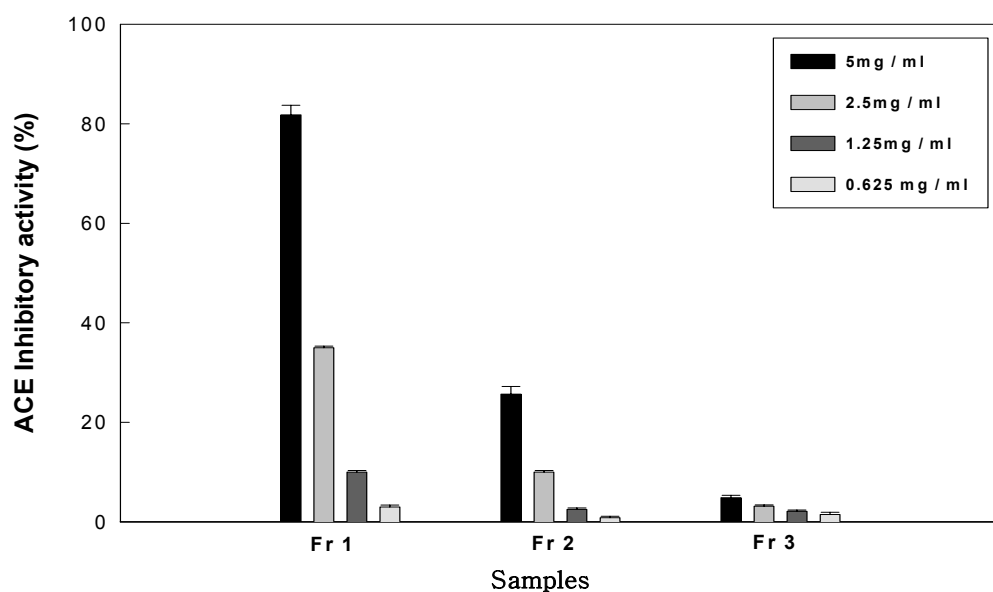


Fig. 3. Angiotensin- I -converting enzyme(ACE) inhibitory effect according to the concentration of *Psoralea corylifolia* fraction by sephacryl S-300 HR chromatography.

Fr. 1 : Fraction No. 49-56, Fr. 2 : Fraction No. 57-64, Fr. 3 : Fraction No. 65-82

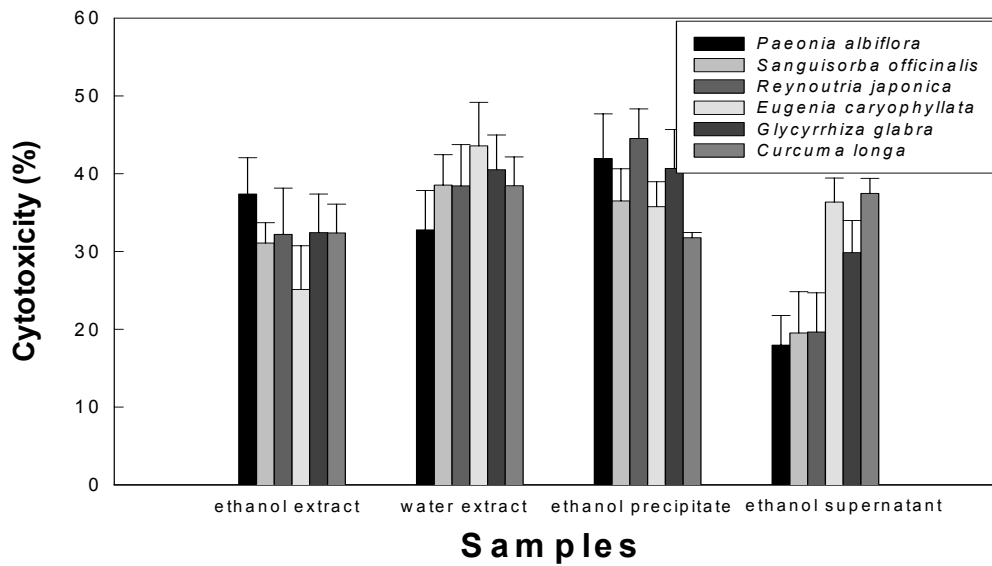


Fig. 4. Cytotoxicity of medicinal herbs water extracts, 70% ethanol extracts, ethanol precipitate, and ethanol supernatant fraction on SNU-1 cells
* concentration(1 mg/mL)

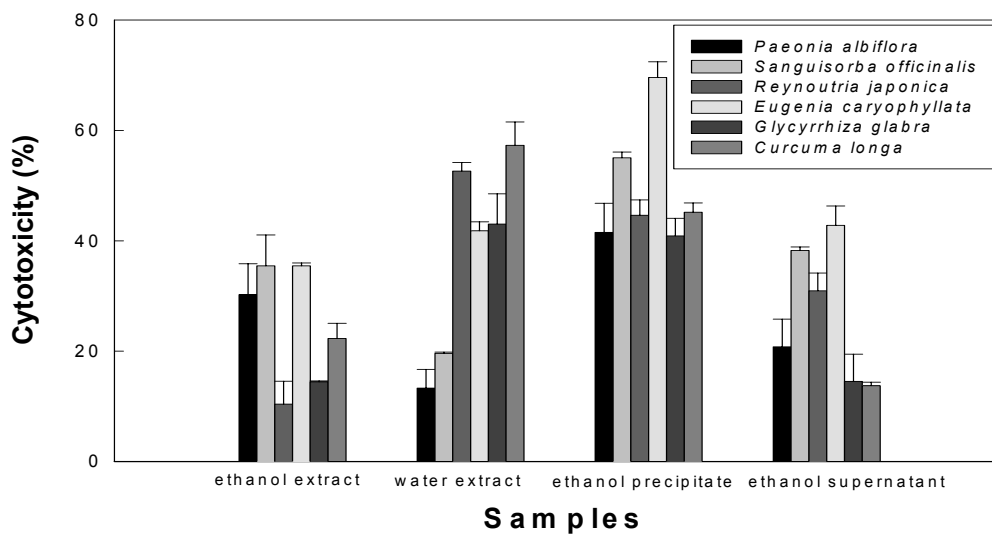


Fig. 5. Cytotoxicity of medicinal herbs water extracts, 70% ethanol extracts, ethanol precipitate fraction, and ethanol supernatant fraction on HeLa cells
* concentration(1mg/ml)

참고문헌

1. Kitty B. The phytochemical renaissance. The status on known health benefits. *Food Proc*, Nov. 44 (1999)
2. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* 213 (1999)
3. Lee SH, Lim YS. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. *J. Korean Soc. Food Sic. Nutr.* 27: 239-243 (1998)
4. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.* 13: 235-244 (1998)
5. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta.* 1147: 132-136 (1993)
6. Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 63: 257-283 (1998)
7. Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1038-1049 (1993)
8. Suzuki T, Ishikawa N, Meguro H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity in foods. *Nippon Nogeigaku Kaishi.* 57: 1143-1146 (1983)
9. Kim MS, Lee DC, Hong, JE, Chang KS, Cho HY, Kwon YK, Kim HY. Antimicrobial effects of ethanol extracts from Korean and Indonesian plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 949-958 (2000)
10. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology.* 20: 1637-1648 (1971)
11. Elena A Goun, Petrichenko VM, Solodnikov SU, Suhinina TV, Martin A Kline, Cunningham Glenn, Nguyen Chi, Howard Miles. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J. Ethnopharmacology.* 81: 337-342 (2002)
12. Bethan P, Philip F, Jim J, Joe D, Debra L, Isaac C, Karen S. Aqueous extract of herba *Scutellaria barbatae*, a chinese herb used for ovarian cancer, induces apoptosis of ovarian cancer cell lines. *Gynecologic Oncology.* In press
13. Carmichael J, De Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-601 (1987)
14. Frazier WA, Bartles JR. Discoidin I-membrane interactions I. Discoidin I binds to two types of receptor on fixed *Dictyostelium discoideum* cells. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Biomembranes.* 687: 121-128 (1982)
15. Do JR, Kang SN, Kim KJ, Jo JH, Lee SW. Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.* 13: 640-645 (2004)
16. Maruyama S, Miyoshi S, Tanaka H. Angiotensin I -converting enzyme inhibitors derived from ficus carica. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2763-2767 (1989)
17. Ha YL, Michael WP. Naturally occurring novel anticarcinogenes: Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid(CLA). *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20: 401-407 (1991)

첨부자료 4.

Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 37, No. 3, pp. 498~503 (2005)

식품부패세균에 대한 가자(*Terminalia chebula* Retz.) 추출물의 항균활성

김기주·도정룡^{1)*}·조진호¹⁾·김영명¹⁾·김병삼¹⁾·임상동¹⁾·강석남²⁾

전라북도생물산업진흥원, ¹한국식품연구원, ²천안연암대학

Antibacterial Activity of *Terminalia chebula* Retz. Extract Against Food Spoilage Microorganisms

Ki-Ju Kim, Jeong-Ryong Do^{*1}, Jin-Ho Jo¹, Young-Myoung Kim¹, Byeong-Sam Kim¹, Sang-Dong Lim¹, Suk-Nam Kang²

Jeonbuk Bioindustry Development Institute

¹*Korea Food Research Institute*, ²*Cheonam Yonam College*

This study was to investigate antibacterial activities of water and 70% ethanol extract from *Terminalia chebula* Retz. The fractions were prepared by step-wise fractionation of water and 70% ethanol extracts using acetone, hexane, chloroform and butanol. The butanol fraction showed the best antibacterial activities against the using strain. Water and 70% ethanol extract from *Terminalia chebula* Retz. had significantly high pyrogallol content among the 13 kinds of phenolic compound analysed by HPLC, and pyrogallol(standard) showed the highest activities against several food spoilage microorganism.

Key words : *Terminalia chebula* Retz, antibacterial effect, polyphenolic compound, HPLC

서론

근래의 식품은 빠르게 변화하는 생활방식에 따라 쉽게 먹을 수 있는 가공식품이 증가하고 있는 추세이다. 이러한 식품들은 가열 등의 물리적인 방법으로 식품의 저장성을 높이고 있는데, 이는 식품의 영양성분의 파괴 및 품질저하 등을 초래할 수 있다는 단점을 갖고 있다. 이에 우리나라는 14가지 합성보존료를 식품위생법에 따라 사용을 허가하고 있지만 합성보존료의 지속적인 사용이 인체에 부작용을 일으킬 수 있는 안전성문제가 제시되고 있다(1,2). 이러한 문제점을 해결하고 식품의 안전성과 보존성을 확보하기 위해 천연물질로부터 항균제 개발연구가 활발히 진행되고 있는데 Baratta 등(3)에 따르면 독성이 적고 항균활성이 뛰어난 천연항균물질이 식품 부패의 원인인 미생물의 증식을 억제하여 식품의 저장기간 및 신선도를 유지시킴으로 산업적 이용이 활발히 진행되고 있다고 한다. 이러한 미생물 증식억제 물질들은 생약제 등의 천연물에 존재하고 있는데 succinic, malic, tartaric, benzoic acid 등의 유기산류와 flavonoids, catechin류 등의 천연생리활성물질 등이 이에 속한다(4-8). 실험에 사용된 가자(*Terminalia chebula* Retz.)는 사군자과(Cambretaceae)에 속하는 가자나무의 성숙과실을 건조한 것으로 chebulic, chebulin 및 tannin이 주성분으로 그 중 tannin은 20-40%정도로 많은 양이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있으며, 항균활성에 뛰어난 생약재로 알려져 있다(9). 본 실험은 가자 물, 70% 에탄올추출물을 HPLC분석 및 분획하여 항균활성을 검증하였다.

재료 및 방법

실험재료 추출 및 분획

본 실험에 사용한 가자(*Terminalia chebula* Retz.)는 2003년 5월 건조된 상태로 금산약초시장(Geumsan, South Korea)에서 구입하여 사용하였다. 가자를 분쇄하여 10배량의 증류수와 70% 에탄올을 가하여 2시간 동안 환류추출, 여과하여(Whatman No 2), Evaporator(Heidolph 4000, Germany)로 감압 농축한 후, 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 가자 물 추출물과 에탄올추출물 50 g을 각각 1 L의 증류수에 넣어 녹인 후, acetone, hexane, chloroform, butanol의 극성도차를 이용하여 순차적으로 분획, 시료를 제조하였다(Fig. 1).

사용균주 및 배지

항균실험에 사용한 균주는 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, *Bacillus subtilis* ATCC 14593, *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111의 6가지 균주를 한국식품연구원(KFRI, Seongnam, South Korea)에서 분양받아 사용하였다. 사용한 배지는 BHI 와 Tryptic soy(Difco, Maryland, USA.)를 사용하였다.

항균활성 측정

항균 활성 실험에 사용한 균주는 slant 배지에서 배양한 균주 1 백급이를 취하여 각각의 10 mL의 broth 배지에 접종하고, 37°C의 incubator에서 18-24시간 동안 배양하여 사용하였다. 항균 활성 시험 평판배지의 조제는 각각의 생육배지를 멸균하여 기층용 배지(agar 1.5%)를 petridish에 응고시킨 후, 각 균주를 1% 접종하여 혼합한 중층용 배지(agar 0.75%)를 이에 분주하여 제조하였다. 가자 용매 분획물을 30 mg/mL농도로 제조하여, paper disc (Ø 8 mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)에 20 µL 첨가하고, 37°C incubator에 18-24시간 동안 배양한 후, 억제환(mm) 직경으로 항균활성을 측정하였다(10,11). polyphenol의 항균활성 실험은 phloroglucinol, pyrogallol, sinapiic acid, vanillic acid, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid를 10, 5, 2.5, 1 mg/mL의 농도로 제조하여 실험하였다. 가자 HPLC(ÅKTA) 분획물의 항균활성 실험은 액체배지 회색법으로 spectrophotometer(Jasco, Tokyo, Japan)를 사용하여 650nm에서 확인하였다.

HPLC 분석

가자 물, 70% 에탄올 추출물의 polyphenol 분석은 각 표준곡선의 calibration curve를 정한 후, 시료의 면적을 환산하여 정량 분석하였다. 가자 동결건조물을 1 mg/mL로 제조한 후, 0.45 µm membrane filter(Sartorius AG, Germany)로 여과하여 분석하였다. 분석에 사용된 polyphenol 표준시약들은 phloroglucinol, pyrogallol, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, catechin, vanillic acid, syringic acid, 4-methylcatechol, p-coumarilic acid, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, sinapiic acid, 3,4-dimethoxybenzoic acid 및 p-anisic acid(Sigma, Louis, USA)를 사용하였다. HPLC분석 장비는 Jasco system을 사용하였으며, 분석에 사용된 gradient는 A 용액이 초기에 100%에서 시작하여 40 min에 25%가 되도록 linear program을 사용하였으며, 45 min에 0%, 50 min에 50%, 60 min에 100%로 하였다. 이때 injection volume은 20 µL 이었다(Table 1).

HPLC(ÅKTA) 분획

가자 물 추출물의 butanol획분 분획은 ÅKTA explorer system(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 사용하였으며, column은 Vydac 218(Hesperia, USA)을 사용하였다. 분획 용매와 조건은 A 용액, 7% Methanol이 함유된 50 mM sodium phosphate(pH 3.3-HCl) in water였으며, B 용액은 100% Methanol을 사용하였으며, 유속은 2 mL/min, 온도는 40°C이었다. Gradient는 B 용액이 초기에 0%에서 시작하여 80 min에 75%가 되도록 linear program을 사용

하였으며, UV 280 nm에서 확인하였다. 이때 injection volume은 10%농도로 제조한 시료 500 μ L를 injection하였다.

결과 및 고찰

가자 추출물의 용매분획 및 수율

가자 열매를 blender로 마쇄한 후, 물 과 70% 에탄올을 사용하여 비등점에서 2 시간동안 추출한 결과, 32.38 g 과 39.56 g 을 얻었다. 물 50 g 과 70% 에탄올 추출물 60 g 을 acetone, hexane, chloroform, butanol 으로 극성 분획한 결과, 물 추출물의 경우 acetone 6.8 g, hexane 0.4 g, chloroform 0.2 g, butanol 28.4 g, 물 14.2 g 으로 butanol과 물 분획물이 대부분을 차지하였으며, 70% 에탄올 추출물의 경우 acetone 1.1 g, hexane 0.03 g, chloroform 0.57 g, butanol 33.9 g, 물 24.3 g 으로 물 추출물과 유사한 결과를 나타내었다 (Fig. 1). 이는 가자 70% methanol 추출물 30 g 을 가지고 n-hexane, chloroform, butanol 으로 극성 분획하여 n-hexane 0.32 g, chloroform 0.41 g, butanol 17.6 g, water 9.98 g의 결과와 유사한 결과를 나타내었다(12).

가자 용매 분획물의 항균 활성

가자 물 추출물 50 g 과 70% 에탄올추출물 60 g 을 1 L의 증류수에 녹인 후, acetone, hexane, chloroform, butanol의 용매를 순차적으로 분획하여 30 mg/mL의 농도로 제조한 뒤, 20 μ L 첨가하여, 36-48 시간 동안 6종의 미생물에 대해 항균활성을 실험하였다. 그 결과 butanol분획물이 가장 뛰어난 항균활성을 나타내었다. 즉, 물 추출물의 경우 *E. coli*(25 mm), *S. typhimurium*(28 mm), *P. aeruginosa*(26 mm), *B. subtilis*(21 mm), *S. aureus*(25 mm), *L. monocytogenes*(23 mm)의 항균활성을 나타내었으며, 70% ethanol추출물, *E. coli*(23 mm), *S. typhimurium*(26 mm), *P. aeruginosa*(23 mm), *B. subtilis*(20 mm), *S. aureus*(25 mm), *L. monocytogenes*(24 mm)로 물 추출물의 항균활성과 유사한 활성을 나타내었다(Table 2). 또한 butanol분획물을 농도별로 제조, 20 μ L 첨가하여, 항균활성을 살펴본 결과, 5,000 μ g/mL의 농도에서 대부분 15 mm 이상의 항균활성을 나타내었으며, 100 μ g/mL의 농도에서는 70% ethanol추출물의 butanol분획물이 6종의 미생물에 대해 9 mm 이상의 항균활성을 나타내었다(Table 3). Lee 등(9)의 연구 결과에 따르면, 가자 methanol추출물을 n-hexane, ethylether, ethyl acetate로 분획하여 항균활성 실험을 실시한 결과, 100-2,000 μ g/mL의 농도로 제조된 가자 methanol추출물이 *Bacteriodes fragilus*, *Salmonella typhimurimn*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium perfringens*의 균주의 생육을 억제시켰으며, 용매 분획물에 있어서는 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Eubacterium limosum*, *Bacteriodes fragilus*, *Salmonella typhimurimn*의 균주에 대해서 용매분획물간의 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 이러한 결과는 가자를 용매별로 분획하여 항균활성을 검토해본 결과, 항균 spectrum이 광범위한 것으로 나타났으며, 생약자원으로부터 *Clostridium perfringens*의 생육 억제를 검색한 결과, 물, acetone, ethyl acetate 및 butanol 추출물이 모두 항균활성을 나타내었다. 또한 식물체내에 존재하는 항균성 물질들은 대부분 단일 물질이 아니기 때문에 여러 종류의 유기용매에 의해서 추출된다고 보고하였으며, 본 연구에서도 유사한 연구결과를 나타내었다(13-15).

Polyphenol의 항균 활성

폴리페놀의 항균활성실험에 사용한 표준품은 phloroglucinol, pyrogallol, sinapiic acid, vanillic acid, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid로, 50% 에탄올을 사용하여 10, 5, 2.5, 1 mg/mL의 농도로 제조하여 항균활성 실험을 실시하였다. 그 결과, pyrogallol이 10 mg/mL의 농도에서 *S. typhimurium*의 균주를 제외한 5종의 균주에서 25 mm 이상의 억제환을 나타내어 다른 폴리페놀과 비해 상당히 좋은 활성을 나타내었다(Table 4). 가자를 methanol과

acetone으로 추출하여 MS와 NMR분석을 실시한 결과, caffeic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, phloroglucinol 및 pyrogallol이 확인되었으며, flavonoids와 catechin등의 polyphenol종류들이 항균작용에 탁월한 효과를 보고하고 있다(16). Do 등(17)에 따르면 총 페놀화합물과 5종의 미생물(*E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*)간의 항균활성에 대한 상관관계가 각각 0.89, 0.79, 0.85, 0.78 및 0.85($p < 0.05$)의 R값으로 페놀화합물과 항균활성간의 밀접한 상관관계가 있음을 보고하고 있다.

가자 물, 70% ethanol추출물의 HPLC 분석

실험에 사용한 polyphenol 표준시약들을 HPLC 분석한 결과, phloroglucinol(2.89), pyrogallol(3.75), protocatechuic acid(7.52), *p*-hydroxybenzoic acid(10.93), catechin(11.65), vanillic acid(13.35), syringic acid(15.03), 4-methylcatechol(15.58), *p*-coumarilic acid(17.70), trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid(19.42), sinapiic acid(19.82), 3,4-dimethoxybenzoic acid(19.96) 및 *p*-anisic acid(23.46)의 retention time을 나타내었다(Table 5). 가자 물 추출물과 에탄올추출물을 HPLC 분석한 결과, 총 peak 면적 중에서 13개의 polyphenol으로 정량할 수 있는 비율은 물 추출물이 27.53%, 70% 에탄올추출물이 27.47%를 나타내었으며, 그 주요성분으로는 phloroglucinol, pyrogallol, protocatechuic acid, catechin, vanillic acid, 4-methylcatechol, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid 및 sinapiic acid로 나타났다. 가자의 물 추출물의 경우 총 peak(27.53%)의 9%를 차지하는 pyrogallol이 36,735 mg%로 가장 높게 나타났고, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid(14,509 mg%), vanillic acid(7,428 mg%), protoatechole(6,667 mg%), phloroglucinol(5,270 mg%)으로 나타났으며, 가자 에탄올추출물의 총 peak(27.47%)에서 pyrogallol이 가장 높은 28,971 mg%였으며, T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamon(24,340 mg%), catechin(5,814mg%)으로 나타났다(Table 6). Nepka 등(18)의 연구에 따르면 가자 열매를 HPLC와 LC-MS로 분석한 결과 가자추출물의 주성분은 tannin 성분으로서 chebulinic acid가 butanol분획에서 확인되었음을 보고하였고, tannin이외에 6가지 종류의 polyphenol성분을 확인하였다. 또한 가자의 탈지 분말을 MS와 NMR분석을 실시한 결과, free phenolic acid에는 caffeic acid, vanillic acid 및 *p*-coumaric acid가 분석되었고, 불용성 phenolic acid에는 caffeic acid, phloroglucinol 및 pyrogallol이 확인되었다(19).

HPLC 분획물의 항균활성

가자 물 추출물의 butanol 분획물을 10%농도로 제조한 후, 500 μ L를 ÄKTA explorer system(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 주입 하여 Vydac 218(Hesperia, USA) column으로 분획하였다. 가자 butanol 분획의 chromatogram 양상은 3000 mAU이상의 peak를 포함하여 19개의 peak를 나타내었으며, 8번째 peak에서 Rt. 28.68 min, area값, 12,004.0310 mAU로 가장 높게 나타났다(Fig. 2). 이를 fraction 1(peak 1,2), fraction 2(peak 3,4,5,6,7), fraction 3(peak 8), fraction 4(peak 9), fraction 5(peak 10,11,12,13,14,15), fraction 6(peak 16,17,18,19)의 6개 구간으로 분취하여 10 mL로 농축한 뒤, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*를 대상으로 18시간 동안 액체배지 희석법으로 항균활성을 확인하였다. 그 결과, *L. monocytogenes* 균주는 6시간동안 배양했을 때 흡광도 값이 0.6-0.8 을 나타내었으며, 18시간에는 대조구를 제외한 모든 fraction에서 흡광도 0.6 의 근사한 값으로 생육이 억제되었으며, fraction간의 큰 차이는 보이지 않았다. *E. coli* 균주는 6시간동안 배양한 결과, 대조구를 제외한 fraction에서 0.2 이하의 흡광도 값을 나타내었으며, 18시간에서는 fraction 3 > 5 > 2 > 1 > 4 > 6 > control 순으로 생육억제를 나타내었다. 또한, *St. aureus*균주의 결과는 *E. coli* 균주와 유사한 양상을 보였으며, 18시간 배양결과 fraction 4 > 1 > 6 > 5 > 3 > 2 > control 순의 생육억제 양상을 나타내었다(Fig. 3,4,5). 이와 같은 결과는 각각의 peak에 함유되어 있는 polyphenol이 항균활성에 관여하여 각 병원성 미생물에 대한 항균활성이 나타나는 것으로 사료된다. Ammar (12)등의 연구 보고에 따르면, 가자 70% methanol 추출물을 n-hexane, chloroform, butanol을 이용하여 순차적으로 분획한 뒤, sephadex LH-20 column으

로 부분 정제한 결과, 최종의 물 획분에서 ellagic acid(120 mg)를 얻을 수 있었으며, butanol 분획에서 chebulinic acid(141 mg), 2,4-Chebuloyl- β -D-glucopyranose(85 mg)를 얻을 수 있음을 보고하고 있으며, 가자의 butanol 획분의 tannin성분은 chebulinic acid가 주된 성분과 다른 폴리페놀 성분들이 다량 함유되어 있다고 보고하고 있다(18). 또한 이러한 폴리페놀은 병원성 미생물의 항균작용과 유의성 있는 상관관계를 나타낸다(17).

요약

가자 물 추출물과 70% 에탄올 추출물을 acetone, hexane, chloroform, butanol의 용매로 순차 분획하였다. 용매 순차 분획물중 butanol분획물이 *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 균종에 대해 가장 좋은 항균활성과 추출수율을 나타내었다. 또한 polyphenol 표준물질 중 pyrogallol이 항균활성 실험결과 가장 좋은 활성을 나타내었다. 가자의 물 추출물과 에탄올 추출물을 13가지 표준품을 사용하여 HPLC 분석한 결과, pyrogallol의 수치가 가장 높게 나타났다.

Table 1. Operate condition of HPLC

Requester	Condition	
Instrument	pump	Jasco model PU-980
	detector	Jasco UV-975 UV/VIS
	column oven	Jasco model CO-965
Column	Nova pack C18 UG120 (Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)	
Guard column	10 ×4.0 mm i.d	
Flow rate	0.5 mL/min	
Mobile phase	A : 7% Methanol and 50 mM sodium phosphate(pH 3.3-HCl)	
	B : 100% methanol	

Table 2. Antibacterial effects of each fraction from the *Terminalia chebula* Retz. (Unit : mm)

Extract condition	Separate condition	Microorganism Strains					
		E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.m
water extract	Water	- ¹⁾	-	-	9	15	-
	Acetone	-	10	11	10	12	10
	Hexane	-	-	12	-	15	10
	Butanol	25	21	26	25	28	23
	Chloroform	-	-	10	13	18	-
	Control	-	-	-	-	-	-
70% ethanol extract	Water	15	9	14	16	16	11
	Acetone	9	-	-	-	9	-
	Hexane	14	20	17	11	16	15
	Butanol	23	20	23	25	26	24
	Chloroform	13	-	9	9	14	9
	Control	-	-	-	-	-	-

E.c: *Escherichia coli*. B.s: *Bacillus subtilis*. P.a: *Pseudomonas aeruginosa*.

S.a: *Staphylococcus aureus*. S.t: *Salmonella typhimurium*. L.m: *Listeria monocytogenes*.

¹⁾ not detected.

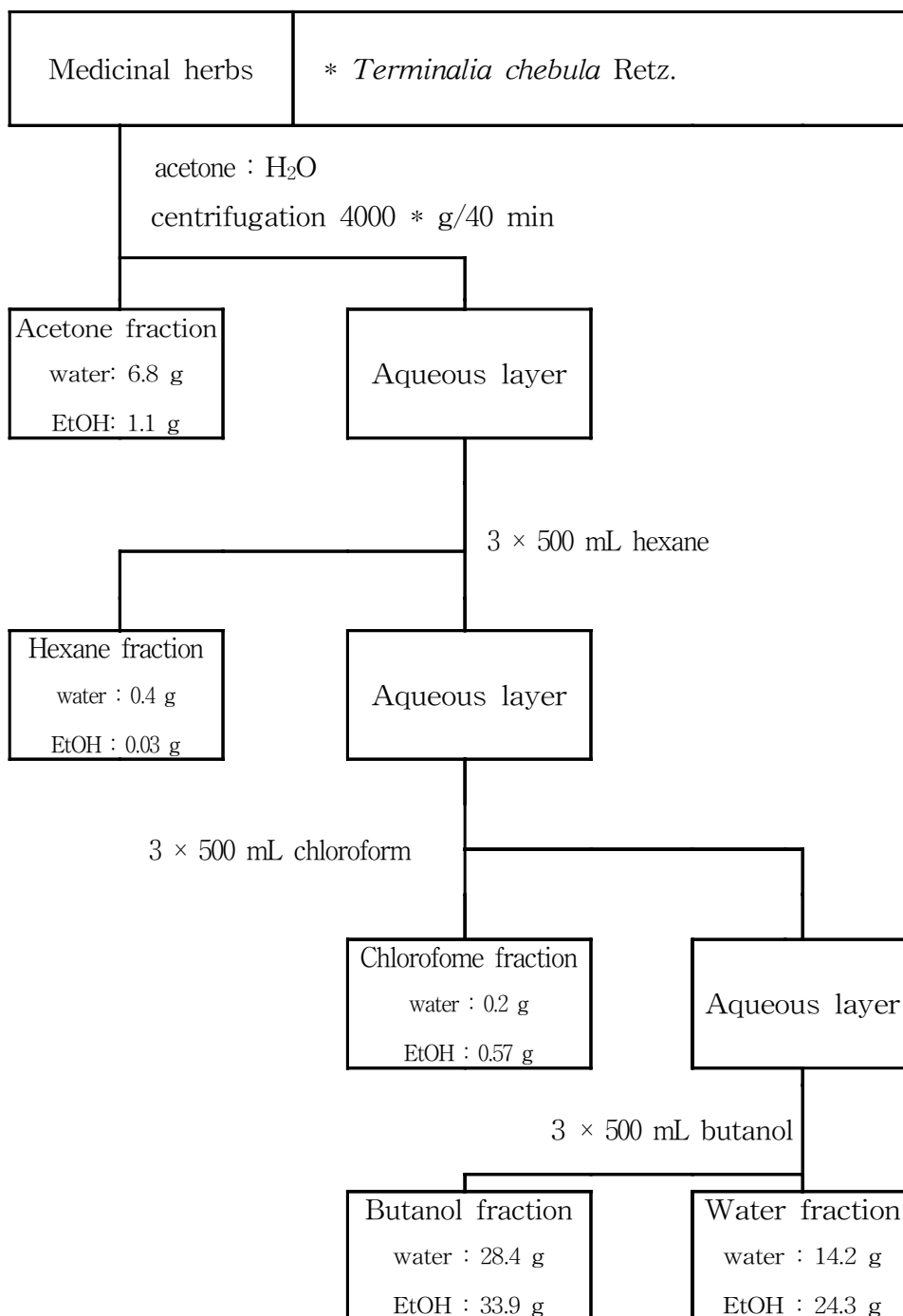


Fig. 1. The procedure for the solvent fraction of water and ethanol extract from the *Terminalia chebula* Retz.

Table 3. Antibacterial effects of butanol fraction from *Terminalia chebula* Retz. (Unit : mm)

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Microorganism Strains						
		E.c	B.s	P.a	S.a	S.t	L.m	
<i>Terminalia chebula</i>	water extract	5,000	15	15	16	15	15	15
		3,000	14	14	14	14	13	14
		1,000	10	9	13	13	11	12
		500	9	- ¹⁾	10	9	-	10
		100	-	-	9	9	-	9
	70% ethanol extract	5,000	14	14	14	14	16	14
		3,000	14	13	13	13	14	13
		1,000	12	12	10	10	12	10
		500	9	9	9	9	9	9
		100	9	9	9	9	9	9
Penicillin ²⁾	10,000unit/ml	27	27	41	67	30	27	

E.c: *Escherichia coli*, B.s: *Bacillus subtilis*, P.a: *Pseudomonas aeruginosa*, S.a: *Staphylococcus aureus*, S.t: *Salmonella typhimurium*, L.m: *Listeria monocytogenes*. ¹⁾ not detected. ²⁾ Prepared with 10,000 unit/ml penicillin G sodium and 10,000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate in 0.85% saline.

Table 4. Antibacterial effect of various standard polyphenol

(Unit : mm)

Samples	Concentration (mg/mL)	Microorganism Strains					
		E.c	B.s	P.a	S.a	L.m	S.t
Pyrogallol	10	25	30	30	28	25	15
	5	20	23	25	22	22	12
	2.5	18	19	18	20	17	10
	1	- ¹⁾	-	10	-	-	-
Phlorogluchinol	10	-	9	10	9	10	10
	5	-	9	9	9	10	9
	2.5	-	9	9	-	9	9
	1	-	9	-	-	9	9
Trans-4-hydroxy -3-methoxycinna mic acid	10	-	-	-	-	-	10
	5	-	-	-	-	-	10
	2.5	-	-	-	-	-	10
	1	-	-	-	-	-	9
Sinapic acid	10	-	9	9	9	9	10
	5	-	9	9	9	9	10
	2.5	-	9	-	9	9	10
	1	-	9	-	-	-	10
Vanilic acid	10	-	-	9	10	-	10
	5	-	-	9	10	-	10
	2.5	-	-	-	9	-	10
	1	-	-	-	-	-	9

E.c: *Escherichia coli*. B.s: *Bacillus subtilis*. P.a: *Pseudomonas aeruginosa*.S.a: *Staphylococcus aureus*. S.t: *Salmonella typhimurium*. L.m: *Listeria monocytogenes*.¹⁾ not detected.

Table 5. The retention time of polyphenol standards

No	Polyphenol standard	Retention time (min)
1	phloroglucinol	2.89
2	pyrogallol	3.75
3	protocatechuic acid	7.52
4	p-hydroxybenzoic acid	10.93
5	catechin	11.65
6	vanillic acid	13.35
7	syringic acid	15.03
8	4-methylcatechol	15.58
9	p-coumarilic acid	17.70
10	trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid	19.42
11	siniapic acid	19.82
12	3,4-dimethoxybenzoic acid	19.96
13	p-anisic acid.	23.46

Table 6. Polyphenols contents of *Terminalia chebula* Retz. extracts using HPLC
(unit : mg%)

Polyphenol	Polyphenol content	
	Water extract	Ethanol extract
phloroglucinol	5,270 ± 16	2,149 ± 89
pyrogallol	36,735 ± 13	28,971 ± 13
protocatechole	6,667 ± 17	1,600 ± 14
p-hydroxybenzoic acid	547 ± 35	885 ± 22
catechine	2,011 ± 47	5,814 ± 10
vanillic acid	7,478 ± 30	3,076 ± 35
syringic acid	908 ± 10	826 ± 36
4-methylcatechole	1,028 ± 37	754 ± 65
p-comarilic acid	429 ± 26	891 ± 83
trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid	14,509 ± 19	24,340 ± 83
siniapic acid	3,782 ± 13	2,896 ± 52
3,4-dimethoxybenzoic acid	210 ± 21	26 ± 70
p-anisic acid	844 ± 87	328 ± 20

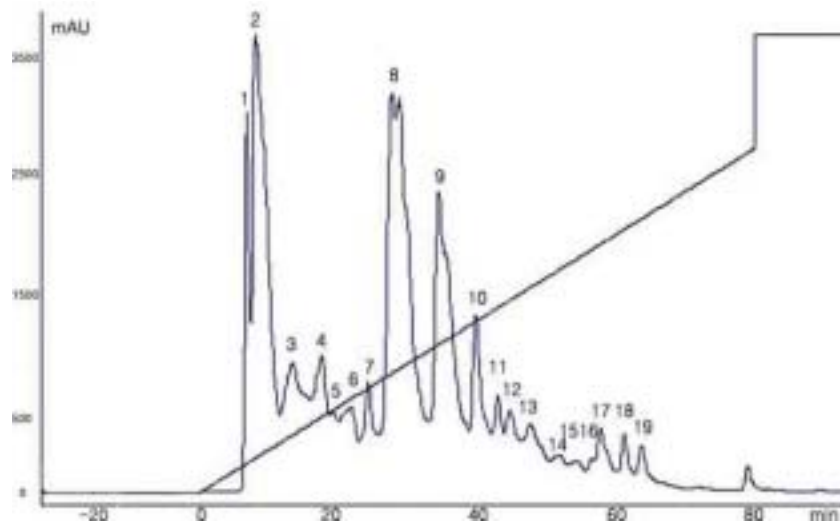


Fig. 2. HPLC(ÄKTA explorer system) chromatogram of butanol fraction from *Terminalia chebula* Retz. water extracts.

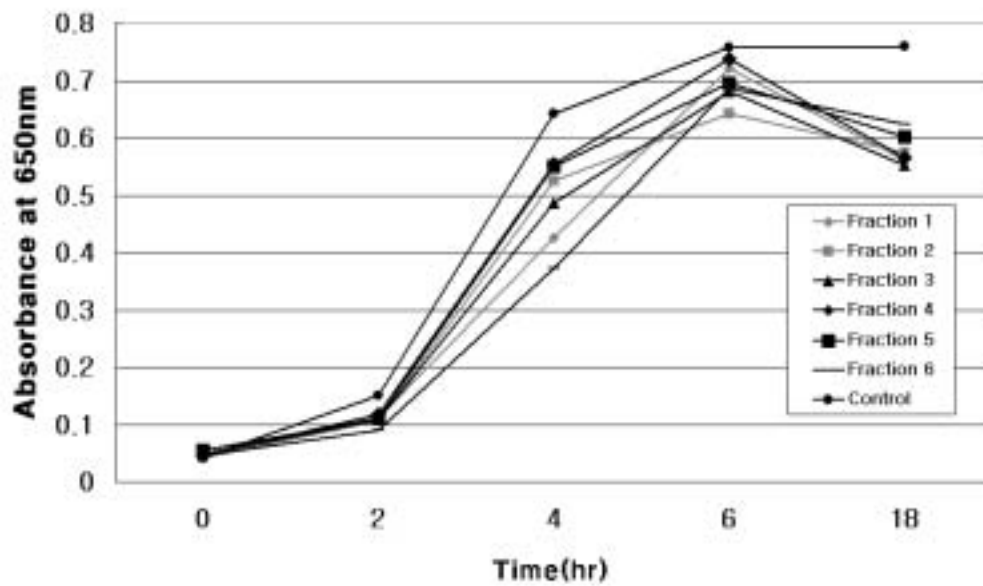


Fig. 3. Inhibition effect of HPLC(ÄKTA explorer system) separate of butanol fraction from *Terminalia chebula* Retz. water extract on growth of *Listeria monocytogenes*.

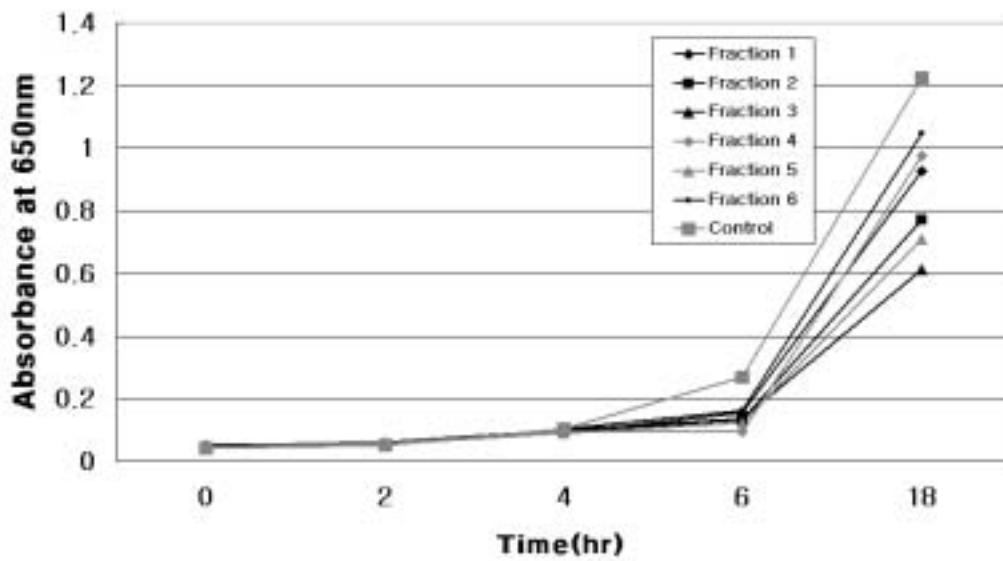


Fig. 4. Inhibition effect of HPLC(ÄKTA explorer system) separate of butanol fraction from *Terminalia chebula* Retz. water extract on growth of *Escherichia coli*.

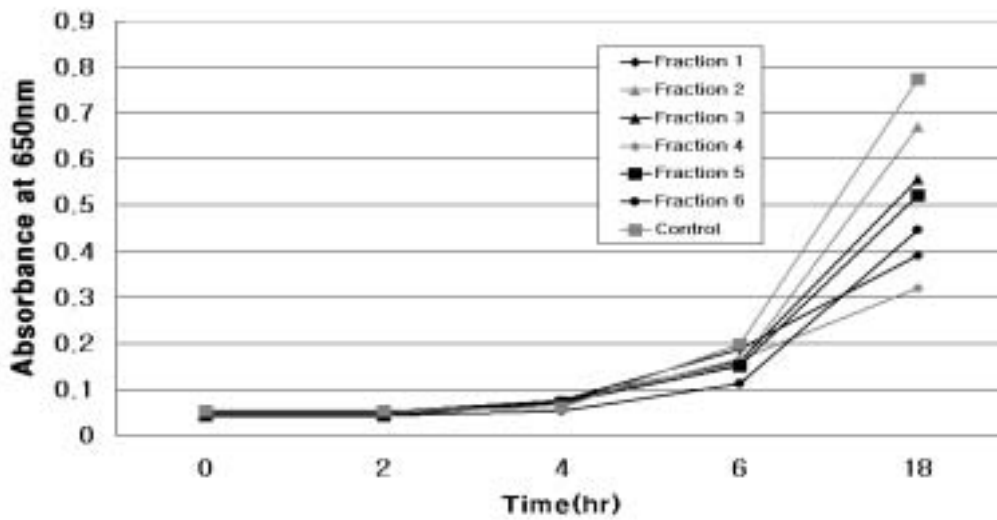


Fig. 5. Inhibition effect of HPLC(ÄKTA explorer system) separate of butanol fraction from *Terminalia chebula* Retz. water extract on growth of *Staphylococcus aureus*.

참고문헌

1. Lee SH, Lim YS. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. J. Korean Soc. Food Sic. Nutr. 27: 239-243(1998)
2. Kim MS, Lee DC, Hong JE, Chang KS, Cho HY, Kwon YK, Kim HY. Antimicrobial effects of ethanol extracts from Korean and Indonesian plants. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 949-958(2000)
3. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour. Fragr. J. 13: 235-244(1998)
4. Golovinsky EV, Maneva LS, Angelov I I, Veljanova KD, Sniker DJ, Stankevich, E.K. Antibacterial and antitumor activity of some derivatives of ureidosuccinic acid. Neoplasma. 23: 43-46(1976)
5. Orjala J, Erdelmeier CA, Wright AD, Rali T, Sticher O. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. Planta Med. 59: 546-551(1993)
6. Ayres HM, Payne DN, Furr JR, Russell AD. Use of Malthus-AT system to assess the efficacy of permeabilizing agents on the activity of antibacterial agents *Pseudomonas aeruginosa*. Lett. Appl. Microbiol. 26: 422-426(1998)
7. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiol. Res. 152: 239-245(1997)
8. Oguni I, Yamada M. Protection against cancer risk by green tea and antibacterial activity of tea catechin against *Helicobacter pylori*. Paper presented at 4th Int. Symposium on green tea, Seoul, Korea (1997)
9. Lee KS, Kim SH, Sim KC, Park CS, Shin YS. Antimicrobial activity of *Terminalia chebula* retz. extract of against intestinal pathogens. Korean J. Food Nutr. 10: 559-563(1997)
10. Conner DE, Beuchat LR. Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. J. Food Sci. 49: 429-437(1984)
11. Branen AL, Go HC, Genske RP. Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetiliactis* and *Luconostoc citrovorum*. J. Food Sci. 40: 446-453(1975)
12. Ammar S, Michael H, Pirkko H, Kalevi P. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. J. Ethnopharmacol. 81: 327-336(2002)
13. Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Plotgus vulgaris* and *Staphylococcus aures*. Phytochemistry. 26(4): 2231-2240(1987)
14. Ravn H, Brimer I. Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantage major* subsp. *major*. Phytochemistry. 27(6): 3433-3441(1988)
15. Tomas-Barberan FA, Msonthi JD, Hostettann K. Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum intens*. Phytochemistry. 27(2): 753-760(1988)
16. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim. Biophys. Acta. 1147: 132-136(1993)

첨부자료 5.

한국식품저장유통학회 발표(일시 2003년 10. 31, 장소 : 대전국립중앙과학회관)

생약재 추출물의 수율 및 항고혈압 활성

도정룡, 김기주
한국식품개발연구원

본 실험에 사용한 생약재는 금산 약초시장에서 2003년 6월에 구입하여 추출수율을 조사하였다. 그 결과, 생약재의 물 추출물의 동결건조 중량(%)이 30~40%에 달하는 생약재는 가자, 갈근, 맥문동, 산수유가 있고, 20~30%에 달하는 생약재는 감초, 구기자, 당귀, 오미자, 천궁, 황기가 이에 속했으며, 중량(%)이 10~20%에 달하는 생약재는 복분자, 오수유, 애엽, 작약, 진피, 지유, 파고지, 황련이 이에 속했다. 마지막으로 10%이하의 추출 수율을 나타낸 생약재들은 가시오가피, 강황, 계피, 석곡, 소목, 영지, 오약, 육두구, 정향, 죽엽, 필발, 초두구, 호장근이 이에 속했다. 생약재의 70% Ethanol 추출물의 동결건조중량을 살펴본 결과, 동결건조 중량(%)이 30~40%에 달하는 생약재는 가자, 당귀, 산수유가 이에 속하였고, 20~30%에 달하는 생약재는 감초, 맥문동, 구기자, 오미자, 오수유, 천궁, 황기가 속하였으며, 동결건조 중량(%)이 10~20%에 달하는 생약재는 복분자, 육두구, 애엽, 작약, 정향, 지유, 파고지, 호장근, 황련이 이에 속했다. 또한 10% 이하의 수율을 나타내는 생약재는 가시오가피, 강황, 갈근, 계피, 석곡, 소목, 영지, 오약, 익지인, 죽엽, 필발, 초두구가 이에 속하였다. 생약재의 추출 시간 및 온도에 따른 수율을 조사한 결과, 추출 시간이 경과함에 따라서 수율이 점차 증가하는 경향을 보였으며, 가자, 갈근, 황련, 복분자, 지유, 정향, 계피, 소목 순으로 높은 수율을 얻을 수 있었다. 생약재에 여러 가지 효소를 이용한 가수분해 결과, 대부분의 생약재에 대해 95℃에서 2시간동안 추출한 수율과 그다지 큰 차이는 보이지 않았지만 대부분의 생약재가 Termamyl 효소를 사용하여 가수분해 하였을 때 가장 높은 수율을 나타내었다. 또한 지유의 경우는 Viscozyme 효소를 처리하였을 경우 가장 좋은 수율을 나타내었다. 또한, 효소의 최적 온도로 조정된 Water bath에서 0, 30, 60, 120, 210분간 효소 반응시켜, 420nm에서 갈변도를 시간별로 측정해본 결과, Viscozyme 효소를 처리한 생약재에서 시간이 흐름에 따라 흡광도 수치의 변화가 크게 나타났다.

32종의 생약재 물 추출물의 항고혈압 활성을 측정된 결과, 파고지, 소목, 죽엽의 항고혈압 활성이 높은 것으로 나타났으며, 파고지의 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다. 70%에탄올 추출물의 경우에는 오미자, 오수유, 소목에서 항고혈압 활성이 높은 것으로 나타났으며, 오미자의 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다. 파고지 물 추출물을 칼럼(Sephacryl S-300, High Resolution)으로 분획하여 3개의 Peak를 얻었으며, 2번째 Peak의 항고혈압 활성이 매우 높은 것으로 나타났다.

첨부자료 6.

한국식품저장유통학회 발표(일시 2003년 10. 31, 장소 : 대전국립중앙과학회관)

생약재의 식품부패 세균에 대한 항균활성

도정룡, 김기주, 이명기, 김병삼, 임상동, 조진호, 김영명, 김용수⁽¹⁾
한국식품개발연구원, (주)코메츠⁽¹⁾

본 연구에서는 식품의 부패에 관여하는 미생물인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus plantarum*에 항균 활성을 나타내는 생약재의 효능을 살펴보았다.

금산 약초시장에서 구입한 생약재로부터 물 추출물과 70%에탄올 추출물을 제조하여 6종의 세균에 대해 항균활성을 탐색한 결과, 생약재 물 추출물의 경우에 가자 추출물은 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. plantarum*의 6가지 균종에 대해서 모두 높은 항균활성을 나타내었으며, 복분자 와 지유의 물추출물에서는 *L. plantarum*의 균종을 제외한 5가지 균종에 대해 높은 항균 활성을 나타내었다. 또한 소목과 황련의 추출물에서는 *E. coli*를 제외한 5가지 균종에서 항균활성을 나타내었으며, 정향 추출물에서는 *E. coli*균주에 대해서는 약한 항균활성을 나타내었으나, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhimurium*의 4종의 균주에 대해서는 우수한 항균활성을 나타내었다. 이 외에 감초 추출물은 *P. aeruginosa*, 석곡 추출물은 *S. aureus*, *S. typhimurium*, 계피 추출물은 *S. typhimurium*, 산수유 추출물은 *B. subtilis*, *S. aureus*, 파고지는 *S. aureus*균종에 대해서 항균활성을 나타내었다.

70% ethanol 추출물은 대부분의 생약재에서 높은 항균 활성을 나타내었다. 특히 가자, 감초, 강황, 복분자, 석곡, 소목, 오미자, 작약, 정향, 지유, 파고지, 호장근, 황련 의 13가지 생약재 추출물에서 높은 항균활성을 나타내었다. 가자의 70% ethanol 추출물의 경우는 물 추출물의 결과에서 같이 6가지 균종에 대해 모두 높은 항균활성을 나타냈으며, 복분자, 작약, 정향, 지유의 70% ethanol 추출물은 *L. plantarum* 균을 제외한 5가지 균종에 대해 높은 항균 활성을 나타내었다. 소목의 70% ethanol 추출물의 경우에는 *E. coli* 균을 제외한 5가지 균종에서 높은 항균 활성을 보였으며, 이외에 생약재는 강황, 석곡, 황련, 호장근의 70% ethanol 추출물은 4가지의 균주에 대해서 항균 활성을 나타내었다. 또한 파고지, 오미자의 70% ethanol 추출물은 3가지 균주에 대해서 항균활성을 나타냈으며, 천궁, 육두구, 오수유, 갈근, 계피, 가시오가피의 70% ethanol 추출물은 2가지 균주에 대해 항균 활성을 나타내었다. 항균활성이 우수한 생약재를 농도별로 활성을 조사한 결과, 물 추출물과 70% Ethanol 추출물 모두 낮은 농도에서도 우수한 항균활성을 나타내었다.

첨부자료 7.

한국식품저장유통학회 발표(일시 2003년 10. 31, 장소 : 대전국립중앙과학회관)

생약재의 식품부패 곰팡이에 대한 항균활성

도정룡, 김기주, 이명기, 김병삼, 조진호, 김영명, 김용수⁽¹⁾
한국식품개발연구원, (주)코메츠⁽¹⁾

본 연구에서는 생약재를 사용하여 부패에 관여하는 5종의 곰팡이(*Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Penicillium rugulosum*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*)에 대한 항곰팡이 활성을 탐색하였다. 생약재의 물 추출물과 70% ethanol 추출물을 사용하여 5종의 곰팡이에 대한 항곰팡이 활성을 측정된 결과, 물 추출물의 경우 갈근 추출물과 황련추출물에서 항곰팡이 활성이 우수한 것으로 나타났다. 갈근 물 추출물은 *A. niger*, *M. miehei*, *P. rugulosum*의 3가지 균종에 대해서 모두 높은 항곰팡이 활성을 나타냈으며, 황련 물 추출물은 *M. miehei*의 균종에 대해서 높은 항곰팡이 활성을 나타내었다. 70% ethanol 추출물의 항곰팡이 실험 결과, 물 추출물보다 좋은 항곰팡이 활성을 나타내었다. 특히, 계피의 70% ethanol 추출물에서는 *A. niger*, *M. miehei*, *P. rugulosum*, *A. oryzae*, *T. reesei*의 5가지 균종에서 모두 우수한 항곰팡이 활성을 나타냈으며, 이 외에도 감초의 70% ethanol추출물에서는 *A. niger*균주에 대해, 육두구와 호장근 및 황련의 70% ethanol추출물에서는 *M. miehei*균주에 대해 우수한 항곰팡이 활성을 나타냈으며, 또한 초두구의 70% ethanol추출물에서는 *T. reesei*균주에 대해 좋은 항곰팡이 활성을 나타내었다. 항곰팡이 효능이 우수한 생약재를 선별하고 이들 생약재로부터 추출한 다양한 획분을 사용하여 농도별로 항곰팡이 활성을 조사한 결과, 갈근의 물 추출물의 경우에는 4가지 균종에서 모두 높은 항균활성을 나타냈으며, 낮은 농도에서도 높은 항곰팡이 활성을 나타내었다. 이 외에도 황련의 물 추출물은 *M. miehei* 균주에서 우수한 항곰팡이 활성을 나타내었다.

생약재의 70% Ethanol 추출물을 농도별로 제조하여 항곰팡이 활성을 살펴 본 결과, 70% ethanol추출물에서는 계피와 파고지, 초두구, 황련이 항곰팡이 활성이 우수하였으며, 특히 계피의 70% ethanol추출물에서는 5가지 균종에서 모두 우수한 항곰팡이 활성이 나타났다.

첨부자료 8.

한국식품과학회 발표(일시 2004년 6. 23, 장소 : 강원도 용평리조트)

생약재 추출물의 항균활성 및 Polyphenols 함량분석
Antimicrobial Effects and Polyphenolic Compounds in
Oriental Herbs Extracts.

도정룡, 강석남, 김기주, 조진호, 김영명, 김병삼

본 연구는 32 종의 한방생약 추출물(물 및 에탄올)로부터 항균제의 개발을 위해 실시하였다. 항균실험의 경우, bacteria(*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurum*, *Lactobacillus plantarum*)의 경우 에탄올 추출물이 물 추출물 보다 항균효과가 높았으며, 가자, 복분자, 소목, 정향, 작약, 지유, 황련의 추출물이 항균효과가 높게 나타났다. 항 곰팡이 실험의 경우, 갈근(물 추출물)과 계피 및 파고지(에탄올 추출물)에서 높은 활성을 나타내었다. 또한 수소이온 라디칼 소거활성, 총 폴리페놀성분에 있어 가자의 활성이 가장 우수하였다. HPLC를 이용한 폴리페놀성분 분석 결과 phloroglucinol, pyrogallol, T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamoni가 주요성분이었다. 총 페놀 함량과 프리 라디칼 소거 능의 상관도(r)가 높게 나타났으며(물=0.9, 에탄올=0.8), 총 페놀성분과 항균활성과의 상관도도 높게 나타났다.

본 연구는 32 종의 한방생약 추출물(물 및 에탄올)로부터 항균제의 개발을 위해 실시하였다. 항균실험의 경우, bacteria(*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurum*, *Lactobacillus plantarum*)의 경우 에탄올 추출물이 물 추출물 보다 항균효과가 높았으며, 가자, 복분자, 소목, 정향, 작약, 지유, 황련의 추출물이 항균효과가 높게 나타났다. 항 곰팡이 실험의 경우, 갈근(물 추출물)과 계피 및 파고지(에탄올 추출물)에서 높은 활성을 나타내었다. 또한 수소이온 라디칼 소거활성, 총 폴리페놀성분에 있어 가자의 활성이 가장 우수하였다. HPLC를 이용한 폴리페놀성분 분석은 가장 효능이 좋은 가자, 복분자, 계피에 대해서 조사한 결과 phloroglucinol, pyrogallol, T-4-hydroxy-3-methoxy cinnamoni가 주요성분이었다. 총 페놀 함량과 프리 라디칼 소거 능의 상관도(r)가 높게 나타났으며(물 추출물=0.9, 에탄올 추출물=0.8), 총 페놀성분과 항균활성과의 상관도도 높게 나타났다.

첨부자료 9.

한국식품과학회 발표(일시 2005년 6. 17, 장소 : 서울 COEX)

식품부패세균에 대한 가자(*Terminalia chebula* Retz.)추출물의 항균활성

김기주* · 도정룡¹⁾ · 조진호¹⁾ · 김영명¹⁾ · 김병삼¹⁾ · 임상동¹⁾ · 강석남²⁾
전라북도생물산업진흥원, ¹한국식품연구원, ²천안연암대학

가자(*Terminalia chebula* Retz.)는 사군자과(Cambretaceae)에 속하는 가자나무의 성숙과실을 건조한 것으로 chebulic, chebulin 및 tannin이 주성분으로 그 중 tannin은 20-40%정도로 많은 양이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있으며, 항균활성에 뛰어난 생약재로 알려져 있다. 가자를 분쇄하여 비등점에서 2시간동안 물과 70% 에탄올을 이용하여 추출하였다. 이와 같은 추출물을 acetone, hexane, chloroform, butanol의 용매로 순차 분획하여 항균활성을 검토해 본 결과, butanol분획물이 *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*균종에 대해 가장 좋은 항균활성과 추출수율을 나타내었다. 또한 polyphenol 표준물질 중 pyrogallol이 항균활성 실험결과 가장 좋은 활성을 나타내었다. 가자의 물 추출물과 에탄올 추출물을 13가지 표준품을 사용하여 HPLC 분석한 결과, pyrogallol의 수치가 가장 높게 나타났다.

첨부자료 10.

한국식품영양과학회 발표(일시 2005년 10. 21, 장소 : 강원도 용평리조트)

HPLC를 이용한 한약재 물추출물 중 폴리페놀성분의 정량

¹도정룡, ²박덕천, ³이옥환, ³이부용, ⁴이무하, ⁵김기주, ⁶박승용, ⁶강석남*,
¹한국식품연구원, ²HIT(주), ³포천중문의대, ⁴서울대학교 농생명과학대학
동물자원학과, ⁵전라북도 생물산업진흥원, ⁶천안연암대학

향균 및 항산화능이 우수하다고 평가된 8종의 한약으로부터 열수추출하여 얻은 물추출물에 대하여 HPLC(JASCO, Japan)를 이용하여 폴리페놀 성분을 정량 분석하였다. 폴리페놀 표준물질은 총 22종이며, Nova pack C18UG120(150X 4.6mm i.d., Tokyo, Japan)칼럼을 사용, 7% MeOH (in 50mM sodium phosphate, pH 3.3)과 100% MeOH을 조합하여 시료 g 당 폴리페놀 성분을 정량 분석하였다. 그 결과, 황기의 경우, pyrogallol과 flavone이 각각 11.39mg/g, 10.12mg/g(각각 44.6%, 33.6%)으로 주요 성분으로 확인되었으며, 감초는 sinapic acid가 50.12mg/g(75%)로 주 성분이었다. 또한, 복분자는 pyrogallol과 syringic acid가 각각 144.42mg/g, 225mg/g(30.0%, 46.9%), 산수유는 pyrogallol, chlorogenic acid 및 syringic acid가 각각 77.37mg/g, 124.39mg/g 및 57.13mg/g (20%, 23% 및 24%), 진피는 pyrogallol, syringic acid, t-4-hydroxy-3-methoxy- cinnamic acid 및 p-anisic acid가 각각 7.2mg/g, 6.2mg/g, 11.2mg/g 및 11.9mg/g(13.8%, 11.9%, 21.4% 및 22.7%)로, 갈근은 syringic acid와 p-coumaric acid가 각각 23.9mg/g, 29.6mg/g(29.7%, 36.4%), 구기자, pyrogallol, 4-methyl catechol 및 syringic acid 가 10.5mg/g, 8.2mg/g 및 6.8mg/g (각각 35.1%, 27.4% 및 22.8%이며, 육계는 phloroglucinol, sinapic acid 및 morin이 각각 108mg/g, 45mg/g 및 33mg/g(각각 40.8%, 17.2% 및 12.6%)로 비교적 많은 함량을 보였다.

첨부자료 11.

한국식품저장유통학회 발표(일시 2005년 10. 28, 장소 : 대구 경북대학교)

생약재추출물에 의한 과채류의 저장 중 항균효과

도정룡*, 허인숙, 백수연, 조진호, 김영명, 김병삼, 임상동, 이명기
한국식품연구원

건강에 대한 소비자의 관심이 증가하면서 채소류에 대한 소비는 지속적으로 증가하고 있다. 소비수요가 증가함에 따라 식품의 가공·유통 및 저장 기술 개발의 필요성이 제기되고 있다. 식품의 가공·유통 및 저장에 있어서 미생물의 오염은 변질이나 부패를 일으켜 생산자와 유통업자들에게는 상품성을 감소시킬 뿐 아니라, 이를 소비하는 최종적인 소비자들에게 있어서는 식중독이나 전염병 등을 일으킬 수 있는 요인이 되기도 하므로, 식품업체에서는 미생물의 오염을 억제하고 위생적이고도 안전성 및 저장성을 확보할 수 있는 방법이나 시스템의 개발을 위하여 부단히 연구를 계속하여 왔다. 본 연구의 목적은 국내에서 생산되는 식물자원으로부터 과일 및 채소류의 부패에 관여하는 곰팡이와 부패세균에 효과가 있는 항균성 물질을 이용하여 과일 및 채소류 등 신선 농산물의 저장 유통기간을 연장할 수 있는 기술을 개발하였다. 즉, 32종 생약재를 6군종의 부패성 미생물을 대상으로 항균활성 실험 결과 가자, 복분자, 갈근과 계피가 가장 높은 활성을 나타내었으며 가자, 복분자, 갈근과 계피 추출물을 각각 혼합하여 과채류에 대한 선도유지제로서의 효과를 검토하기 위하여, 침지처리하여 일정저장기간별로 총균수를 측정하였다. 가자와 갈근은 각각 5% 용액으로, 복분자 추출물은 2.5%농도의 용액으로 제조하여 3가지 생약재가 첨가된 처리구를 제조하였고, 이에 0.1% 알긴산 나트륨 용액을 혼합하여 생약재 추출물과 알긴산 나트륨이 함유된 처리 용액을 제조하였다. 과채류는 농수산물 시장에서 국내산으로 구입하여 실험에 사용하였다. 즉, 사과, 오렌지, 토마토, 애호박, 부추, 풋고추를 생약재 추출물의 처리구와 알긴산 나트륨이 함유된 용액에 각각 침지하여 자연 건조 시킨 후, 각각의 과채류를 멸균된 polyethylene 봉투에 넣어 10℃ 항온실에 저장하면서 평판배양법에 준하여 총균수를 측정하였다. 또한 곰팡이수 측정은 상온에서 3일 배양 후 곰팡이균체의 수를 측정하였다. 그 결과 저장 1주 때는 대조구와 처리구의 총균수가 큰 차이를 보이지 않았으나 저장 2주부터는 대조구에 비해 처리구의 총균수가 현저히 낮은 경향을 나타내었다. 곰팡이 수는 처리구별로 큰 차이를 보이지는 않았으나 생약재추출물과 0.1%알긴산나트륨을 혼합하여 처리한 처리구와 생약재추출물을 처리한 처리구가 대조구에 비해 낮게 나타났다. 이는 과채류를 가자, 복분자, 갈근과 계피 추출물로 처리하는 동안에 과채류의 표면에 묻어있던 항균·항 곰팡이 성분이 저장 중에도 지속적으로 작용하였기 때문이라고 사려 된다.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.