

초피 추출물의 수율 및 항균활성

임 상 빈* · 좌 미 경** · 송 대 진* · 고 정 삼***

Yields and Antimicrobial Activities of Extracts from *Zanthoxylum piperitum*

Sang-bin Lim*, Mi-Kyung Jwa**, Dae-Jin Song* and Jeong-Sam, Koh***

ABSTRACT

Extraction yields of *Zanthoxylum piperitum* by organic solvents and supercritical carbon dioxide(SC-CO₂) with and without ethanol as a cosolvent, and antimicrobial activities of the extracts against *Bacillus cereus* were determined. Extraction yield by distilled water was the highest, 20%, while those by ethanol, ethyl ether and hexane were less than 3%. Extraction yield by SC-CO₂ with ethanol was 1.42 times greater than that by only SC-CO₂. Ethyl ether- and ethanol-extracts had potent antimicrobial activities against *B. cereus*. Extraction yield by SC-CO₂ with ethanol showed almost the same degree of microbial growth inhibition as that by only SC-CO₂.

Key words : *Zanthoxylum piperitum*, Supercritical fluid extraction, Antimicrobial activity

1. 서 론

천연물에 존재하는 항균성 물질을 이용하고자 하는 연구는 오래 전부터 수행되었고 현재도 이에 대한 연구는 활발하다⁽¹⁾. 특히 우리나라에서 많이 사용되는 향신료들은 여러균주에 대하여 항균작용이 알려져 있는데, 항균작용은 대부분

정유에 함유된 성분에 의하여 일어나며 가장 많이 알려진 것은 마늘⁽²⁾과 양파⁽³⁾이다.

초피나무는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 동북아시아에 자생하는 운향과 산초나무에 속하는 낙엽관목으로서 과피, 수피, 종자 등에 독특한 신미와 정유성분이 함유되어 있어 전통적으로 생약재, 향신료, 방향성 건위제, 소염, 이뇨, 정장제, 살충, 해독, 구충작용, 고미 정기 원료, 향료 등으로 널리 사용되어 왔다. 건조한 초피 과실에는 단백질이 10.1%, 에테르 침출물이 10.4%, 탄수화물이 37.2%, 정유가 3.2% 함유되어 있다. 정유의 주성분으로는 dipentene(50%) 외에

* 제주대학교 식품공학과
Dept. of Food Science and Technol., Cheju Nat'l Univ.
** 제주대학교 대학원
Graduate School, Cheju Nat'l Univ.
*** 제주대학교 농화학과
Dept. of Agricultural Chemistry, Cheju Nat'l Univ.

citronellal(8%), geraniol, phellandren 등이 있다. 초피의 신미(辛味)성분으로는 α, β -sanshool, sanshoamide 등이 있는데 특히 α -sanshool은 무색 대형 결정이며, 용점은 69℃이고, 공기 중에서는 불안정하므로 밀봉하여 0℃에서 보관해야 되며, 모기의 유충에 대해서 살충력이 있다. 또한 α -sanshool은 석유 에테르 중 양이온의 작용으로 β -sanshool로 이성화되는데, β 형은 모두 trans형으로 용점이 112℃의 침상결정이며 α 형보다 살충력이 약하다. 이외 유도체로는 octahydro- α -sanshool이 있다. 그 밖에 초피는 2~4%의 탄닌, 알카로이드, magnoflorine, xanthoxylin, hyperin을 함유하고 있다⁽⁴⁾.

초피나무에 관한 연구로는 권 등⁽⁵⁾의 산초류 생약의 성분검색, 김과 유⁽⁶⁾의 생약학적 연구, 한⁽⁷⁾의 과피와 종자의 성분연구, 윤과 김⁽⁸⁾의 종실의 유지와 단백질 조성, 김 등⁽⁹⁾의 방향성분, 정⁽¹⁰⁾의 신미 및 정유성분에 관한 보고등이 있다. 최근의 연구로 김과 박⁽¹¹⁾은 초피나무의 과피를 메탄올로 추출 후 다시 hexan, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물층으로 분획하였는데 특히 hexan 분획물이 aflatoxin B₁에 대하여 98% 이상을, MNNG에 대하여 64%의 돌연변이 억제 효과를 나타내었다. 또한 hexan과 클로르포름 분획물은 사람의 골육 암세포인 MG-63의 증식을 각각 98, 96%까지 억제시켰다. 김 등⁽¹²⁾은 초피나무 추출물의 물고기에 대한 독성력을 측정 한 결과 메탄올, 물 추출물, 건조분말, 클로르포름 추출물 순으로 독성력이 감소하였으며, 추출물을 분석한 결과 L-asarinin임을 확인하였다. 김 등⁽⁹⁾은 과피와 잎의 방향성분을 분석한 결과 과피의 주성분은 1,8-cineol(25.4%), limonene(11.9%), geranyl acetate(9.0%), myrcene(6.1%), geraniol(2.8%), citronellal(2.2%) 순이었고, 잎의 주성분은 citrionellal(23.1%), 1,8-cineol(18.3%), citronellol(6.0%), methyl cinnamate(4.0%) 순이었다. 정⁽¹⁰⁾은 초피나무의 신미, 정유성분을 분석한 결과 과피에는 미지의 신미성분 두가지와 함께 sanshool III(70.3%), sanshool I

(17.2%), sanshool IV(11.0%), sanshool V(0.8%)가 분리되었고, 수피에는 미지의 신미성분 네가지와 함께 sanshool III(53.9%), sanshool IV(10.9%), sanshool I(7.9%), sanshool V(3.3%)가 분리되었고, 과피의 신미성분 총 함유량은 수피의 12배 었다. 또한 과피와 수피 중의 정유성분 분석결과 과피에는 37.7%의 cineol과 limonene이 주된 정유성분을 이루었으며, 수피에서는 16.5%의 α -terpineol과 15.5%의 pinene이 대부분이었다.

한편 초임계유체에 의한 천연물의 추출은 최근 많은 관심의 대상이 되고 있다. 증류에 의한 분리에서는 너무 높은 비등점, 특히 천연물에서는 고온에 의한 유효성분의 분해 및 파괴 등이 문제가 되고, 용매추출법에서는 적절한 용매의 선택, 유기용매의 잔존, 용매의 제거 및 낮은 분리효과 등의 어려움이 있다. 이에 비하여 초임계유체 추출법은 증류법에 비하여 저온에서 조작할 수 있으므로 천연물과 같이 열에 민감한 물질에 유용하며, 용매추출법과 비교하여 불 때 초임계가스 용제는 확산계수가 높고 점도가 낮기 때문에 보다 빠른 추출과 상분리가 가능하다. 더우기 추출조 온도 또는 압력을 약간 변화시키므로써 용제 회수를 쉽게 행할 수 있으며 이에 필요로 하는 에너지도 용매추출에 비하여 훨씬 적다⁽¹³⁾.

따라서 본 연구는 생약재, 향신료로 예로부터 민간에서 사용되어온 초피를 대상으로 유기용매 및 초임계이산화탄소로 추출하여 각각의 추출수율을 측정하고, 이들 추출물의 항균효과를 검색하는데 그 목적이 있다.

II. 재료 및 방법

2.1 재 료

본 실험에 사용한 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*)는 1994년 7월경 제주도 교래리 야산에서 채취하여 그 잎을 건조시켜 마쇄한 후 추출용 시료로 사용하였다.

2.2 유기용매에 의한 추출

추출 용매로는 극성 차이가 비교적 큰 것들인 용매 즉, 증류수, 에탄올, 에틸에테르, 헥산을 사용하였다. 즉 500 mL 분액여두에 건조한 초피 5g과 용매를 각각 300 mL씩 넣고 진탕 추출시켜 얻은 액을 두겹의 가제로 여과한 후 Toyo No. 5A로 재차 여과하였다. 그 후 여과액을 40℃에서 회전 진공증발 농축기로 추출용매를 제거한 후 농축물들을 dimethylsulfoxide(DMSO)로 10 mL 정용한 후 검색용 시료로 사용하였다.

2.3 초임계이산화탄소에 의한 추출

초임계유체 추출장치(Autoclave Engineers, #08U-06-60-FS)는 최대 압력이 340 bar까지 사용 가능한 연속 유통형으로 Fig. 1과 같다. 먼저 추출조(EV)에 건조된 초피 20g을 주입한 후, check valve(CV)를 거쳐 탄산가스(TK)가 공급되어 고압 피스톤펌프(HPP1)에 의해 가압된다. 이 때 탄산가스 주입부의 공동화 현상을 방지하기 위하여 -20℃냉각조(HE)를 설치하여 이산화탄소의 기화를 방지한다. 가압된 이산화탄소는 역압조절기(BPR)에 의하여 241 bar로 조절되며 추출조로 이송된다. 이 추출조의 내용적은 300 mL이고, 온도는 비례형 온도조절기에 의하여 40℃로 조절되며, 열전도쌍온도계에 의하여 측정된다. 이와 같이 하여 일정 압력과 온도에서 정상상태로 유지된 후, 추출조 출구로 나가는 고압의 혼합물은 가온된 metering valve(MV)를 통하여 분리조(S)에서 대기압으로 감압, 팽창되면서 탄산가스와 추출물로 분리된다. 이 때 통과되는 탄산가스의 유량은 rotameter(R)에 의해 측정되고, 적산부피는 totalizer(FT)에 의해 측정되어진 후 대기 중으로 방출된다. 이와 같은 방법으로 40℃에서 3시간 동안 추출한 후 추출조를 격리시키고, 보조 용매 펌프(HPP2)를 사용하여 추출조 후반부 라인과 분리조를 150 mL의 에탄올로 세척하여 회수된 추출물을 Toyo No. 5A 여지로 여과한 후,

여액을 40℃에서 회전 진공증발 농축기로 농축하여 에탄올을 제거하였으며, 농축물을 DMSO에 용해시켜 10 mL로 정용한 후 검색용 시료로 사용하였다.

추출용매로는 탄산가스와 보조용매로서 에탄올을 사용하였으며, 이 때의 유속은 각각 1.5 L/min과 0.49 mL/min 였다.

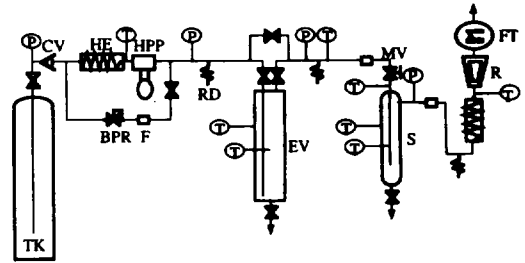


Fig. 1 Schematic diagram of supercritical fluid extraction system (BPR: back pressure regulator, CV: check valve, EV: extraction vessel, F: filter, FT: flow totalizer, HE: heat exchanger, HPP: high pressure pump, MV: metering valve, P: pressure gauge, R: rotameter, RD: rupture disk, S: separator, T: temperature indicator, TK: carbon dioxide tank)

2.4 추출수율과 용해도

추출물 중의 고형분 추출수율은 추출물 2mL를 각각 2회씩 취하여 105℃에서 건조 후 증발잔사의 양을 시료 건물량에 대한 무게 백분율로 나타내었다. 용해도는 추출물 중의 고형분에 대한 용매의 무게비로 나타내었다.

2.5 항균활성 측정

추출물에 의한 미생물의 생육저해 여부를 확인하기 위해 *Bacillus cereus*을 공시균주로, nutrient agar(Difco, USA)를 균주 배양용 배지로 사용하였다. 피검색시료는 사용전에 멸균된 0.45 μm의 syringe filter로 여과시켰다.

항균성 유무는 filter disk법에 의하여 측정하였다. 이 방법은 비교적 단순하면서도 다수의 시료를 단시간에 일차적으로 검색하는데 유용하다. stock culture로부터 균주를 백금이로 1회 취하여 5 mL의 액체배지에 접종하여 24시간 동안 진탕배양기에서 배양한 배양액 100 µm를 고체배지상에 삼각 유리봉으로 균일하게 도말시킨 후, 멸균된 원판형 여지(6.5mm, Schleicher & Schuell # 740-E)를 한천배지 표면 위에 올려놓고 각 추출물을 20 µL씩 가한 후 24시간 동안, 37°C에서 배양한 후 disk 주위에 형성된 생육저지대(clear zone)의 직경(mm)을 측정하여 항균성의 유무와 강도를 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

3.1 유기용매에 의한 초피의 추출수율 및 용해도

극성이 다른 용매가 초피의 추출수율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 용매별로 초피의 추출수율 및 용해도를 측정된 결과는 Table 1과 같다.

Table 1 Extraction yield and solubility of *Zanthoxylum piperitum* by organic solvents

Extraction solvent	Extraction yield %(wt/wt)	Solubility (mg/ml)
Hexane	0.86	0.063
Ethyl ether	1.23	0.090
Ethanol	2.78	0.210
Water	20.03	1.463

용매별 초피의 추출수율은 증류수인 경우 20%로서 초피에 함유되어 있는 고형물 중 1/5이 추출되고 있는 것으로 보아 초피 중에 수용성 성분이 다량 함유되어 있는 것으로 추정된다.

한편 에탄올, 에테르, 헥산을 추출용매로 사용하는 추출수율이 3% 이하로 매우 낮은 것으로 보아 추출수율 면에서는 증류수가 추출용매로서 적합한 것으로 나타났다. 용매에 대한 초피 중의 고형물의 용해도를 보면 1.4% 이하였는데 이는 시료량의 부족에 기인한다기 보다는 고형물의 용매에 대한 용해도 한계에 이르렀다고 볼 수 있다.

3.2 초임계이산화탄소에 의한 초피의 추출수율 및 용해도

초임계이산화탄소와 보조용매(동반제)로서 에탄올이 초피의 추출수율 및 용해도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 건조된 초피를 40°C/241 bar에서 3시간 동안 추출한 후 추출수율 및 용해도를 측정된 결과는 Table 2와 같다.

Table 2 Extraction yield and solubility of *Zanthoxylum piperitum* by supercritical carbon dioxide(SC-CO₂) with and without ethanol as a cosolvent

Extraction solvent	Extraction yield %(wt/wt)	Solubility (mg/g)
SC-CO ₂	0.867	0.147
SC-CO ₂ + Ethanol	1.232	0.209

추출용매로 초임계이산화탄소만을 사용했을 때 추출수율과 용해도는 각각 0.867%와 0.147 mg/g인 반면, 초임계이산화탄소에 동반제로서 에탄올을 가했을 때의 추출수율과 용해도는 1.232%와 0.209 mg/g으로 초임계이산화탄소만을 사용했을 때보다 추출수율과 용해도는 1.42 배 높았다. 이와 같이 에탄올과 같은 극성이 높은 유기용매를 사용했을 때 추출수율이 증가한다는 사실을 미루어 보아 초피에는 극성성분이 많이 함유되어 있는 것으로 추정된다.

한편 Brunner⁽¹⁴⁾는 제3의 물질인 보조용매를 초임계이산화탄소에 첨가하면 저휘발성 물질의

상대적 휘발도를 증가시킨다 하였다. 또한 Tavana 등⁽¹⁵⁾은 에탄올에 의해서 유기물질의 초임계이산화탄소에 대한 용해도가 digoxin(a cardiac glycoside)는 2.2배, cholesterol은 2.4배, stigmasterol은 3.9배씩 증가한다고 보고하였다. 이러한 사실로 보아 보조용매로서 에탄올은 초피 중의 저휘발성물질과 초임계이산화탄소 사이의 친화도를 증가시켜주므로써 고형물의 용매에 대한 용해도를 증가시켜주는 것으로 판단된다.

3.3 유기 용매에 의한 초피 추출물의 항균활성

초피를 극성이 다른 유기용매별로 추출하여 얻은 추출물들의 *B. cereus*에 대한 항균성을 검색한 결과는 Table 3과 같다. 헥산, 에테르, 에탄올, 물 추출물들은 *B. cereus*에 대하여 모두 항균성을 보였는데, 특히 에테르, 에탄올 추출물들이 보다 큰 항균성을 나타내는 것으로 보아 항균성 물질은 단일 물질이 아닌 것으로 추정된다.

Table 3 Growth inhibition of *B. cereus* by organic solvent-extracts from *Zanthoxylum piperitum*

Extraction solvent	Clear zone on plate (mm)
Hexane	7.5
Ethyl ether	9.8
Ethanol	9.6
Water	9.1

3.4 초임계이산화탄소에 의한 초피 추출물의 항균활성

초피를 초임계이산화탄소와 보조용매로 에탄올을 사용하여 얻은 추출물의 *B. cereus*에 대한 항균활성을 검색한 결과는 Table 4와 같다. 초임계이산화탄소-에탄올 추출물에는 초임계이산화탄소만을 이용한 추출물보다 1.4배 이상의 고형물이 함유되어 있었음에도 불구하고 거의 동일한 항균성을 보이고 있는 것으로 보아 초임계

이산화탄소와 같은 비극성 용매에 용해되는 물질들이 항균성을 나타내는 것으로 추정된다.

Table 4 Growth inhibition of *B. cereus* by supercritical carbon dioxide(SC-CO₂) extracts from *Zanthoxylum piperitum*

Extraction solvent	Clear zone on plate(mm)
SC-CO ₂	8.2
SC-CO ₂ + Ethanol	8.5

IV. 요 약

초피를 유기용매 및 초임계이산화탄소와 보조용매로서 에탄올로 추출하여 각각의 추출수율을 측정하고, 이들 추출물들의 항균활성을 검색하였다. 유기용매별로 추출하여 각각의 추출수율을 측정한 결과, 증류수인 경우 20%로서 가장 높았고, 나머지 헥산, 에테르, 에탄올인 경우 3%이하로 매우 적었다. 또한 추출 용매로 초임계이산화탄소-에탄올을 병용했을 때 초피의 추출수율과 용해도는 초임계이산화탄소만을 사용했을 때보다 1.4배 이상 높았다. 용매별 추출물들의 항균성을 검색한 결과 모든 추출물들이 *B. cereus*에 대해 항균성을 나타내었는데, 특히 에탄올, 에테르 추출물들의 항균성이 더 큰 것으로 나타났다. 초임계이산화탄소-에탄올 추출물은 초임계이산화탄소만을 사용한 추출물과 거의 동일한 항균성을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Beuchat, L.R. and Golden, D.A., 1989, Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, Vol.43, p.134.
2. Tansey, M.R. and Appleton, J.A., 1978, Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia*, Vol.70, p.397.
3. Zaika, L. and Kissinger, J.C., 1981, Inhibitory and stimulatory effects of

- oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *J. Food Sci.*, Vol.46, p.1205.
4. 일본향료협회, 1989, 향료백과, 조창서림, pp.195-197.
 5. 권창호, 홍남두, 김창민, 1973, 산초류 생약의 성분검색, 생약학회지, 4권 4호, p.209.
 6. 김홍선, 유경수, 1970, 왕초피나무 과피의 생약학적 연구(1), 생약학회지, 1권, p.4.
 7. 한희자, 1988, 한국산 초피와 산초의 과피 및 종자의 성분에 관한 연구, 한양대 대학원 박사학위 논문.
 8. 윤한교, 김지문, 1976, 임산초피나무 종실의 유지 및 단백질 조성에 관한 연구, 충남대 농업기술연구보고, 3권 2호, p. 170.
 9. 김정환, 이경석, 오원택, 김경례, 1989, 초피의 과피와 잎의 방향성분, 한국식품과학회지, 21권, 4호, pp.562~568.
 10. 정현숙, 1984, 한국산 초피의 신미 및 정유 성분에 관한 연구, 전남대 대학원 석사 학위 논문.
 11. 김소희, 박건영, 1993, 초피추출물의 항돌연변이 및 MG-63 암세포 증식억제 효과, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 21, No. 6, pp.628~634.
 12. 김용두, 강성구, 오명록, 1993, 한국산 초피의 어독성분에 관한 연구, 한국영양식량학회지, 22권, 5호, pp.617~620.
 13. 임상빈, 김수현, 고영환, 오창경, 오명철, 고용구, 박제석, 1995, 초임계이산화탄소에 의한 톨과 알로에 추출물의 수율 및 항균활성, 한국식품과학회지, 27권, 1호, pp.68~73.
 14. Brunner, G., 1983, Selectivity of supercritical compounds and entrainers with respect to model substances, *Fluid Phase Equilibria* ., Vol. 10, p. 289.
 15. Tavana, A., Chang, J., Randolph, A.D. and Rodriguez, N., 1989, Scanning of cosolvents for supercritical fluids solubilization of organics, *AIChE J.*, Vol. 35, No. 4, p. 645.