

오배자와 포도 껍질 추출물의 항균 활성에 관한 연구

이만중 · 김관필 · 김성호* · 정낙현** · 임무현*

롯데그룹 중앙연구소, *대구대학교 식품공학과, **카톨릭 상지전문대학

Antimicrobial Activity of Extract from Gall-nut and Red-grape Husk

Man-Chong Lee, Goan-Pil Kim, Seong-Ho Kim*, Nack-Hyun Choung** and Moo-Hyun Yim*

Lotte Group R&D Center, Seoul, 150-104, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Tae-Gu University, Kyungsan, 713-714, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Catholic Sang-Ji Junior College, Andong, 760-070, Korea

Abstract

The antimicrobial and GTase(Glucosyltransferase) inhibition activity were investigated for solvent fractions of Gall-nut, variety of fork drugs and Red-grape husk water extracts. Among them, Gall-nut and Red-grape husk water extracts were selected for the powerful antimicrobial and GTase inhibition activity. The methanol fractions of Gall-nut and Red-grape husk were showed very powerful antimicrobial activity on both *B. subtilis* and *E. coli*. The MIC(Minimum Inhibitory Concentration) of gall-nut methanol fraction were 1.0mg/ml for *B. subtilis* and 3.0mg/ml for *E. coli*. Red-grape husk were 2.0mg/ml for *B. subtilis* and 3.0mg/ml for *E. coli*. The methanol fractions of Gall-nut and Red-grape husk were showed very powerful GTase inhibition activity. The concentrations of these fractions for 80% inhibition of GTase activity were $1.0^8 \times 10^{-3}$ mg/ml and $1.0^8 \times 10^{-2}$ mg/ml, respectively. The principal compound for the antimicrobial and GTase inhibition activity in these extracts seems to be polyphenol derivatives.

Key words : antimicrobial activity, GTase inhibition activity, Gall-nut, Red-grape husk

서론

최근 수년 동안에 걸쳐서 천연 첨가물에 대한 관심이 증가되고 있는데 화학적으로 제조된 합성보존료¹⁾를 첨가하여 만들어진 식품들에 대한 안정성 문제와 이들 식품의 장기 섭취로 인한 건강상의 문제가 그 주된 요인이다. 따라서 보다 안정성이 높고 보존성이 높은 보존제의 개발이 시급한 과제가 되고 있다. 식품 보존 방법으로는 미생물 증식을 억제시킬 필요성에 따라 가열살균, gas 치환과 같은 물리적인 방법과 pH, 수분 활성의 조절, 보존제 첨가 등의 화학적인 방법으로 크게 구분할 수 있다. 보존제로서는 합성 방부제로 sodium benzoate와 potassium sorbate²⁾ 등이 대표적이며 천연 보존제로서는 alcohol류³⁾ 외에도 곰팡이에 대하여 효과가 있는 것으로 알려져 있는 초산, 저급지방산(C₄~C₁₂) 등과 그밖에 glycine 등도 대표적으로 사용되어 왔다^{3,4)}.

최근 들어 천연 보존제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 野坂⁵⁾은 난백중에 함유되어 있는 lysozyme은 Gram 양성세균에 강한 항균작용을 나타낸다고 보고하였으며, 또한 pectin 분해물, 감초 추출물⁶⁾, 차 추출물⁷⁾, spice류의 추출물⁸⁾의 phenol 화합물이 각종 세균과 효모의 생육을 억제할 뿐만 아니라 충치 형성에 관여하고 있는 GTase(Glucosyl Tranferase) 효소에 대해서도 억제 작용을 갖고 있다고 보고하였다. 식물체에 존재하는 phenol 화합물에 대한 연구로는 Mamoru 등⁹⁾은 catechin류가 세균 및 효모에 대한 생육억제 효과, 효소에 대한 활성저해 효과 이외에도 비타민 E의 상승 효과에 대하여 보고하였으며, 이 등¹⁰⁾은 인삼 추출물중의 catechin이 고혈압에 유효하다고 하였다. 山崎¹¹⁾는 flavonoid 계통이 미생물의 생육 억제와 효소류의 활성저해 효과가 뛰어나다고 하였다.

Phenol 화합물의 충치예방 효과에 대한 연구도 최근 많이 수행되고 있는데 이것은 충치를 발생시키는 세균

인 *Streptococcus mutans*가 GTase를 생산하는데 이 효소가 sucrose로부터 glucose의 polymer인 glucan을 형성하여 충치를 발생시킨다고 알려져 있다¹²⁾. GTase 활성저해제로는 ribocitrin, acarbose 등과 nojirimycin의 유도체인 1-desoxynojirimycin과 N-methylsyojirimycin 등이 미생물로부터 발견되어 충치의 주원인인 glucan류를 분해하는 연구도 수행되었는데 (1→6)결합 glucan을 분해하는 dextranase가 있고 (1→3)결합 glucan을 분해하는 mutanase 등이 개발되어졌다⁸⁾. 또한 Namba 등¹³⁾은 많은 종류의 생약 중에서 검색한 수종의 polyphenol 성분 중에서 flavonol 및 불소성분이 GTase 활성저해와 더불어 glass평활면에 *S. mutans*의 부착을 억제한다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 오배자 등의 민간 생약물질과 폐기되고 있는 포도껍질들의 물추출물을 용매분획한 후, 이 분획물이 가지는 항균활성과 충치 형성에 관여하는 GTase 저해활성능에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

적포도, 백포도, 거봉 과피와 오배자 등의 민간 생약제는 시중에서 구입하였고 시판 항균제인 sodium benzoate, potassium sorbate는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 추출 및 용매 분획

각각의 추출재료에 과량의 물로 48시간 동안 추출하여 원심분리한 후 침전물을 제거한 다음 상등액을 감압 농축하여 동결건조한 후 추출물 1g을 증류수 10ml에 용해하여 membrane filter (0.45 μ m)로 여과하여 glass column상에서 분획하였다. 이 때 용출액으로는 benzene, benzene:chloroform(1:1), chloroform:methanol(1:1), methanol 등 비극성 용매로부터 극성 용매로 순차적으로 치환하면서 용출시킨 후 감압 농축 건조하여 항균력 및 GTase활성 실험에 사용하였다.

3. 사용균주

실험에 사용한 균주는 세균 4종(*Streptococcus mutans* ATCC 880223, *Staphylococcus aureus* ATCC 10537, *Escherichia coli* C 600, *Bacillus subtilis* MI 13), 효모 1종(*Saccharomyces cerevisiae* IFO 0251), 곰팡이 3종(*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Monascus anka* IFO 4478) 등 8종의 균주를 사용하였다.

4. 배 지

*Streptococcus mutans*는 Brain heart infusion(Difco)배지를, 그외의 세균은 LB배지, 효모와 곰팡이는 PDA(Difco Co.)배지를 사용하였다.

5. 균주의 배양

보관중인 균체는 액체배지 5ml에 접종한 후, 세균은 37 $^{\circ}$ C에서 24시간, 효모는 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였고, 곰팡이는 agar plate에서 30 $^{\circ}$ C, 3~7일간 배양한 후 포자 현탁액을 조제하여 사용하였다.

6. 항균력 측정

항균력 측정은 paper disc 방법으로 측정하였다. 먼저 0.5% 한천을 함유한 한천배지를 50 $^{\circ}$ C 정도로 냉각시킨 다음 균 배양액과 포자 현탁액을 혼합한 후 미리 조제된 1.5% 한천이 함유되어 있는 한천배지에 도말하였다. 여기에 각각의 용매 추출물 60mg/ml용액을 paper disc에 30 μ l를 확산시킨 후 최적온도에서 24시간 배양하여 형성된 생육 저해환의 크기로 항균력의 정도를 측정하였다.

7. GTase 조효소의 조제¹³⁾

Streptococcus mutans B-13을 BHI 배지에서 20시간 배양한 후 원심분리하여 얻어진 상등액에 cold ethanol 2/3 volume을 가하여 얻어진 침전물을 5mM triethylamine 30ml에 용해한 후 24시간 동안 투석을 하였다. 투석 후 원심분리하여 불용성 침전물을 제거한 후 이 조효소액을 GTase 활성 저해 실험에 사용하였다.

8. GTase 활성 저해능의 측정

GTase의 활성은 Namba 등¹³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 반응 혼합물(GTase 0.02ml, 기질완충액 0.8ml, 시료 0.18ml)을 30 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응시켜 glucan과 반응 혼합물을 분리하고 증류수 3ml를 가하여 가용성 glucan을 제거한 후 균질화하여 550nm에서 흡광도를 측정하여 glucan 합성 저해능을 측정하였다. 대조 실험은 시료용액 대신 증류수를 가하여 반응시킨 후 형성된 glucan의 양을 100%로 하였으며 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : 대조군에서 합성된 부착성 불용성 glucan의 양
B : 시료 첨가시 합성된 부착성 불용성 glucan의 양

Table 1. The screening of antimicrobial and GTase inhibition activity

Crude drug	Strains	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>M. anka</i>	GTase inhibition
Gall-nut		+ / -	+++	+++	+	+ / -	-	-	-	+++
Burweed		+	+ / -	-	-	-	-	-	-	-
Acorn		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chestnut husk		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Walnut		++		+ / -	+	-	-	-	-	++
Undern		++	+	+ / -	+	-	-	-	-	+
Mugwort		+	+	+ / -	+ / -	-	-	-	-	++
Green tea		+	+	+	-	-	-	-	-	-
Red grape husk		-	+	+	+	-	-	-	-	+++
White grape husk		-	+	+	+ / -	-	-	-	-	+
Goe-Bong husk		-	+ / -	+ / -	+ / -	-	-	-	-	+
Pine needle		-	-	+ / -	+ / -	-	-	-	-	-
Cocoa bean		-	+ / -	+ / -	-	-	-	-	-	-
Cocoa bean husk		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glume-hull		-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Very strong, ++ : Medium, + : Weak, - : None

9. 생육도의 측정

Column chromatography 방법에 의해 분획된 각각의 항균성 물질의 생육저해도를 측정하기 위해 경시적으로 배양액의 일정량을 취해 분광광도계를 이용하여 660nm에서 생육도를 측정하였으며 대조실험으로서는 시료를 첨가하지 않은 배양액을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 추출물의 항균성 및 GTase 활성 저해능의 측정

시료를 물로 추출하여 얻은 추출물의 항균활성과 GTase 활성을 검색한 결과를 Table 1에 나타내었다. 항균성에 있어서는 오배자, 적포도 과피의 추출물 등에서 Gram 양성, 음성 세균에 대해 항균성을 나타내었으며, 그중에서도 오배자와 적포도 과피의 물 추출물이 가장 항균력이 높게 나타났다. 이러한 결과는 적포도중에 항균력 물질이 존재한다는 野坂¹⁾의 보고와 일치하였으며, 오배자 또한 이미 위염 등에 오래전부터 사용되어졌다는 내용⁹⁾과도 일치한다. GTase 활성 저해능 또한 오배자와 적포도 과피의 물 추출물이 가장 높게 나타났다.

2. 오배자와 적포도 과피 methanol 추출물의 생육저해 측정

분획과정에서 얻어진 오배자 및 적포도 과피 추출물에 의한 미생물의 생육저해도를 검토하기 위해 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*에 대한 생육저해도를 측정된 결과는 Fig. 1~4와 같다. 오배자 및 적포도 과피 추출물을 0.1, 0.5, 1.0% 첨가하여 경시적으로 배양액

을 채취하여 660nm에서 혼탁도를 측정함으로써 생육저해능력을 검정한 결과 오배자 추출물에 있어서 대조구와 비교시 배양 16시간째 0.5% 농도에서 *E. coli*는 22%, *B. subtilis*는 50% 정도의 생육저해도를 나타내었고, 적포도 과피 추출물의 경우는 배양 16시간째 0.5% 농도에서 *E. coli*는 13%, *B. subtilis*는 20% 정도의 생육저해도를 나타내었다. 이들 결과를 살펴보면 오배자 추출물이 적포도 과피 추출물에 비해서 항균력이 약간 우수한 것으로 나타났으며, 특히 Gram 양성 세균에 대해서는 모두 우수한 항균력을 나타내었다.

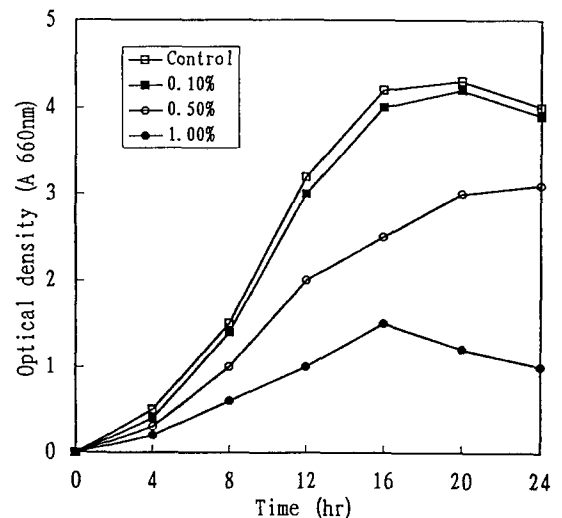


Fig. 1. Effect of Gall-nut extract on growth of *B. subtilis* at various concentrations.

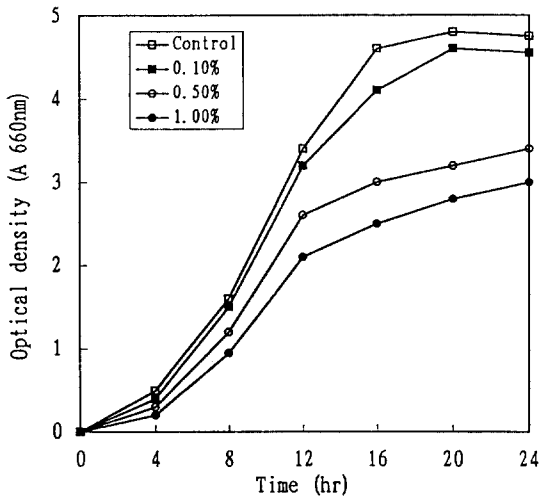


Fig. 2. Effect of Gall-nut extract on growth of *E. coli* at various concentrations.

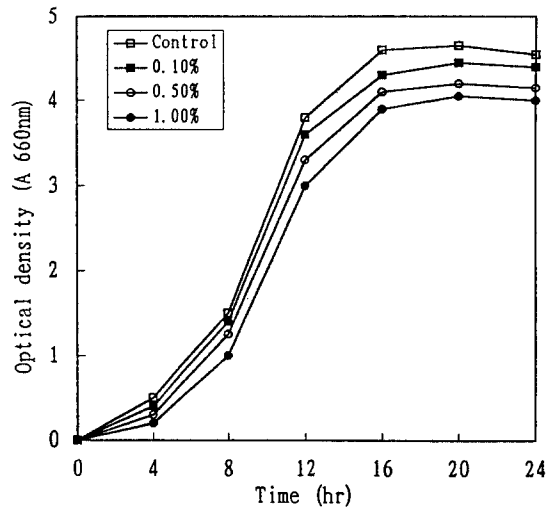


Fig. 4. Effect of Red-grape extract on growth of *E. coli* at various concentrations.

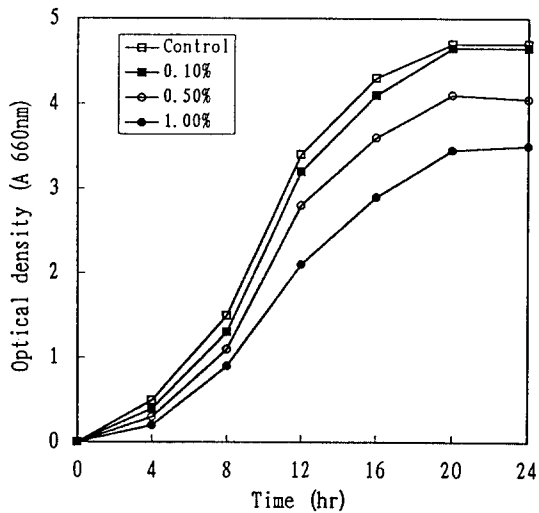


Fig. 3. Effect of Red-grape extract on growth *B. subtilis* at various concentrations.

3. 오배자와 적포도 과피의 methanol 분획물의 GTase 저해 측정

오배자 및 적포도 과피 추출물의 methanol 분획물에 대한 GTase 활성 저해 능력을 검정하기 위해 *A. terreus*로부터 생산되어 현재 gum 등에 사용되고 있는 mutastein과 methanol 분획물을 60mg/ml 농도로 조정 한 후 10배씩 희석해 가면서 GTase 활성 저해능력을 검토한 결과는 Table 2와 같다. 그 결과 오배자 추출

Table 2. Effect of GTase inhibition of methanol fraction in gall-nut and red-grape husk

Concentration (mg/ml)	Inhibition rate(%)		
	Gall-nut	Red-grape husk	Mutastein
1.08	99±3	99±3	99±3
1.08×10^{-1}	99±3	89±3	99±3
1.08×10^{-2}	88±3	79±3	86±3
1.08×10^{-3}	81±3	79±3	83±3

물은 1.08×10^{-3} 에서 80% 이상 저해하였고, 적포도 과피 추출물은 1.08×10^{-2} 에서 80% 정도를 저해하였으며 mutastein은 1.08×10^{-3} 에서 80% 이상 GTase 활성을 저해하였다. 한편 오배자 추출물과 적포도 과피 추출물의 저해율 차이는 methanol 추출물내의 polyphenol 함량 차이에 따른 것으로 두 가지 추출물의 polyphenol 함량을 정량해 본 결과 오배자 추출물이 polyphenol 함량이 다소 많은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 GTase 활성 저해에 미치는 물질이 polyphenol 류라는 연구 결과들과 일치하고 있다^{11, 14)}.

4. 오배자와 적포도 과피의 methanol 분획물과 시판 항균제와 항균활성 비교

오배자 및 적포도 과피 추출물의 methanol 분획물과 현재 식품제조공정중에 사용되고 있는 sodium benzoate와 potassium sorbate 등과 비교한 결과는 Fig. 5~7과 같다. 각각 0.5%를 첨가하였을 때 *B. subtilis*에

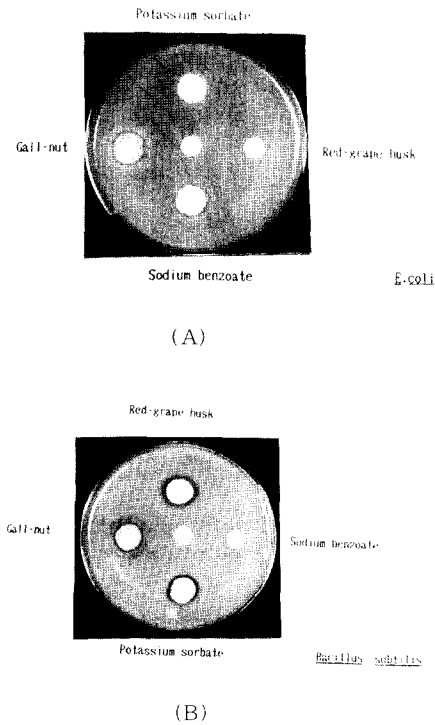


Fig. 5. Comparisons of Halo of Gall-nut and Red-grape methanol fraction with commercial antimicrobial agents.
(A) : *E. coli* (B) : *B. subtilis*

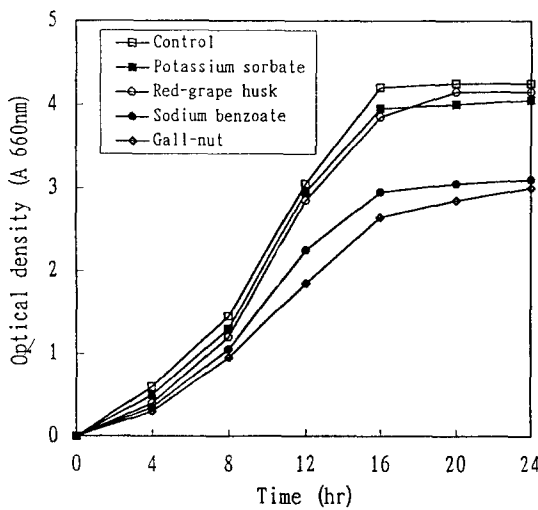


Fig. 6. Comparisons of antimicrobial activity in Gall-nut and Red-grape methanol fraction with commercial antimicrobial agents in *B. subtilis*.

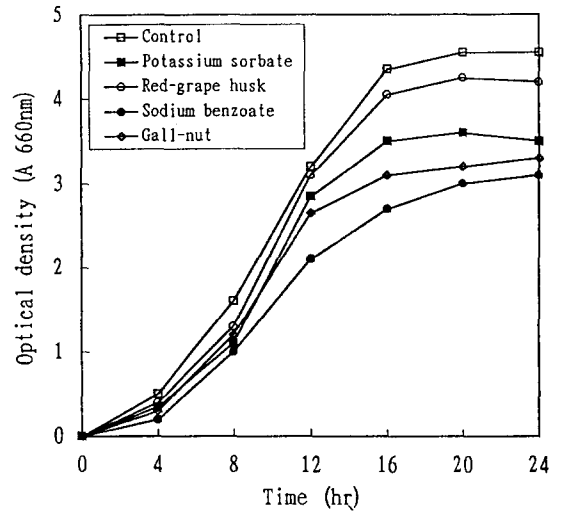


Fig. 7. Comparisons of antimicrobial activity in Gall-nut and Red-grape methanol fraction with commercial antimicrobial agents in *E. coli*.

서는 오배자 추출물이 가장 강한 항균활성을 나타내었고 *E. coli*에서는 sodium benzoate가 가장 강한 항균활성을 나타내었다.

5. 오배자와 적포도 과피의 methanol 분획물의 최소 저해 농도

항균활성이 우수한 methanol 분획물의 미생물에 대한 최소 저해 농도를 조사한 결과는 Table 3과 같다. Gall-nut와 Red-grape husk 모두 3mg/ml일 때 균의 증식을 억제하였으며 *B. subtilis*에 대한 Gall-nut와 Red-grape husk의 최소 저해 농도는 각각 1mg/ml, 2mg/ml였고 *E. coli*에 대한 Gall-nut와 Red-grape husk의 최소 저해 농도는 각각 3mg/ml였다.

Table 3. Minimum inhibitory concentration of gall-nut and Red-grape husk on *B. subtilis* and *E. coli*

Materials	Strains	Concentrations(per milliliter)				
		6mg	3mg	2mg	1mg	0.5mg
Gall-nut	<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	-
	<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-
Red-grape husk	<i>B. subtilis</i>	+	+	+	-	-
	<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-

요 약

오배자 등 민간생약제와 포도과피 추출물의 항균활성과 GTase 활성저해능에 대하여 조사하였다. 항균활성과 GTase 저해 활성능은 오배자와 적포도 과피의 물추출물이 가장 우수한 것으로 나타났다. 오배자와 적포도 과피 추출물의 methanol 분획물은 *B. subtilis*와 *E. coli* 균주에 대해서 강한 항균활성을 나타내었다. 오배자 추출물의 methanol 분획물은 *B. subtilis*와 *E. coli*에 대한 최소 저해 농도가 각각 1.0mg/ml과 3.0mg/ml이었고, 포도과피 추출물 추출물의 methanol 분획물은 각각 2.0mg/ml과 3.0mg/ml이었다. 오배자와 적포도 과피 추출물의 methanol 분획물의 GTase활성의 80% 저해율에 대한 농도는 각각 1.08×10^{-3} mg/ml과 1.08×10^{-2} mg/ml이었다. 두 추출물의 항균활성과 GTase활성 저해의 주요 화합물은 polyphenol 화합물 계통으로 추정된다.

참고문헌

1. 野坂 宜嘉 : 保存料, 日指向上劑 等の食品での表示へ 對して, *New Food industry*, 23, 17-23 (1990).
2. 食品添加物 公典 : 122. Potassium sorbate, 170. Sodium benzoate, 韓國食品工業協會, p165, p286 (1988).
3. 野乾 : Flavonoid系 天然 抗酸化劑に 對して, *New Food Industry*, 20(12) 38-43 (1988).
4. 原征産 : 茶 polyphenol類の機能性と食品への應用. *New Food industry*, 32, 33(1990).
5. 野坂 宜嘉 : 抗菌劑 市場 探索, 食品と開發, 25(2), 30-34 (1990).
6. 高柿 了士 : 甘草抽出物, センカノンの抗酸化性とその利用, *Food Chemical*, 2, 75-80 (1988).
7. Taiyo Kagaku Report : Sun Phenon(Natural Occurring Antidecay Agent), Taiyo Kagaku Co. Report (1989).
8. Shigeko Ueda, Harumi, Y. and Yoshihiro, K. : Inhibition of *Clostridium botulinum* and *Bacillus* sp. by spices and flavoring compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 129, 389-392 (1982).
9. Mamoru, K. and Yuichi, S. : 綠茶抽出物センカト-ル抗酸化性と應用, *Food Chemical*, 5, 54-60 (1990).
10. 李盛雨, 小机信行 : 인삼의 polyphenol 성분에 관한 연구, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 10, 245-249 (1978).
11. 山崎惠 : Flavonoid의抗酸化性, *Food Industriay*, 9, 20-22 (1977).
12. Hamada, S. and Slade, H. D. : Immunology and Cario geneticity of *S. mutans*, *Microbial. Rev.*, 44, 331-384 (1980).
13. Namba, T., Tsunozuka, M., Takehara, Y., Nunome, S., Takeda, K., Kakiuchi, Y. Z., Takagi, S. and Hattori, M. : Studies on dental caries prevention by tradition chines medicine screening of crude drug for antiprague action and effect of *Artemisia tacapillaris spikes* on adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface and synthesis of glucan by glucosyltransferase, *Shoyakugaku Zasshi*, 38, 253-263 (1984).

(1997년 5월 21일 접수)