

## 미나리발효액이 장내 유해세균 및 유익균의 *In Vitro* 생육 및 호소활성에 미치는 영향

이경애<sup>1</sup> · 김무성<sup>2</sup> · 조홍범<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>용인대 자연과학연구소, <sup>2</sup>(주)마크로케어 연구소, <sup>3</sup>서경대 생물공학과

미나리(*Oenanthe stolonifera*) 발효액이 장내 병원성 미생물과 유익균의 생육, 그리고 장내 세균 호소에 미치는 영향을 *in vitro*에서 조사하였다. 고상 배지(Agar plate)에서의 clear zone 형성에 의한 생육저해를 측정할 결과, *Vibrio*, *Salmonella* 등의 유해 미생물에 대해서 강한 생육저해 효과를 보였으며 *Bifidobacterium longum*에 대해서는 생육저해 효과가 크지 않았다. 액체배지에서의 최소저해농도(MIC) 측정에서도 고상 배지에서의와 같은 경향을 보여 상대적으로 *B. longum*에 대한 생육저해가 가장 적었다. 발효기간에 따른 영향을 보면 발효기간이 길수록 적은 양으로도 유해한 균들의 생육을 잘 저해할 수 있는 것으로 나타났다. 장내 세균 효소인  $\beta$ -glucuronidase와 tryptophanase의 활성에 대해 미나리 발효액은 발효하지 않은 액에 비해 저해효과가 컸으며 발효기간이 길수록 저해효과도 증가하였다. 이상의 실험 결과로서 미나리 발효액은 유해세균에 대한 생육저해능이 크고 상대적으로 유익균인 *B. longum*에 대한 저해는 적어, 음용 시 정장 효과가 있을 것으로 추정된다.

**Key words** □  $\beta$ -glucuronidase, fermentation, intestinal bacteria, *Oenanthe stolonifera*, tryptophanase

인간의 장내에는 수백 여 종의 세균이 대장 내용물 g당 100조 정도의 숫자로 서식하고 있으며 일정한 균형을 유지하는 복잡한 생태계가 구성되어 있다(5). 이들 균총은 외부에서 유입된 음식물이나 스트레스, 호르몬 분비 등 인체의 상태에 따라 변화될 수 있으며, 이들이 생성하는 호소, 대사산물이 여러 가지 물질의 인체 내 대사에 관여하고, 영양분이나 약물의 흡수, 독성물질의 생성, 노화현상 등에 영향을 미치고 있다(8, 11, 17). 따라서 장내에 유익한 세균을 강화시키거나 조화된 균총을 유지하는 것은 매우 중요하며, 이를 위해 유산균을 복용하거나 식이섬유의 섭취, 정장 작용이 있는 기능 성분의 개발 등 다양한 노력이 이루어지고 있다(1, 3, 5, 9).

미나리(*Oenanthe stolonifera* DC)는 산형과의 다년생 초본으로서 한방에서는 수근(水芹)이라 하여 해열, 이뇨, 황달, 고혈압의 치료에 이용하거나 각종 해독 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 미나리 추출물에 높은 항돌연변이 효과가 있음이 보고되었으며(10), MNNG에 의해서 유도된 위암세포의 성장을 억제한다는 사실(14)과 동물실험에서 진통효과가 인정된다는 보고(13) 등이 있어 약품으로서의 개발 가능성도 고려되고 있다. 한편 채소와 녹즙의 경우 저장성이 문제되기 때문에 장기 저장과 효능을 강화할 목적으로 발효시킨 가공품이 많이 사용되고 있으며, 미나리의 경우도 발효에 의한 기능성 증가 및 보존성 강화가 시도되고 있으나 발효에 따른 여러 가지 기능 변화에 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 미나리 발효에 의한 기능성 연구의 일환으로 장내 세균에 대한 효과를 *in vitro*에서 확인하여 보고한다.

미나리는 경기도 양평군에서 재배되는 20~30 cm 길이의 돌미나리를 사용하였다. 발효전 미나리의 추출은 생엽을 균질기로 마쇄한 후 동일 중량의 물로 추출하여 여과지(Whatman No. 2)로 여과하였으며, 미나리의 발효는 생엽을 2~3 cm 크기로 절단 분쇄한 다음 동일 중량의 물에 생엽대비 10% (w/w)의 설탕을 첨가한 후 밀봉하여 18°C를 유지하면서 1개월, 6개월, 18개월, 36개월에 각각 채취 후 여과하여 사용하였다.

발효 추출액의 가용성 고형분(soluble solid)은 굴절당도계(Hand refractometer, model N1, range : 0~35%, Atago, Japan)를 사용하여 상온에서 3회 측정된 후 Brix로 나타내었으며, 탁도(turbidity)는 spectrophotometer (V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 650 nm에서 측정하여 흡광도로 나타내었다.

본 실험에 사용한 균주는 장내 유해균으로서 *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 27969), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Salmonella enteritidis* (KCCM 12021), *Escherichia coli* (ATCC 43894), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12800), *Helicobacter pylori* (KCCM 41351), *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) 등의 8종을, 유익균으로서 *Bifidobacterium longum* (ATCC 15708), *Lactobacillus bulgaricus* (ATCC 11842) 2종을 사용하였다. 균주는 EG agar 배지에서 냉장 보관하면서 reinforced clostridial media (RCM, Difco)에서 활성화시킨 후 사용하였다.

균 생육에 미치는 영향은 고상(agar) 및 액체 배양 방법으로 조사하였다. 고상 배양은 EG agar 배지(Eiken, Tokyo)에 시험균

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-2-940-7187, Fax: 82-2-912-7932  
E-mail: hbcho@skuniv.ac.kr

**Table 1.** Turbidity, solid content and pH change of dropwort extracts of different fermentation period

Fermentation period (month)	Turbidity (OD)	Solid content (Brix)	pH
0 <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>	NT	4.58
1	0.25±0.003	14.6±0.05	3.44
6	0.59±0.031	29.2±0.30	3.36
18	0.87±0.009	30.0±0.01	3.22
36	0.56±0.0004	30.12±0.12	3.35

Leaves of dropwort were fermented with same weight of water containing 10% (w/w) of sugar.

<sup>a</sup>Leaves of dropwort were ground and extracted with water.

<sup>b</sup>NT, Not tested

주를  $10^{6-7}$  cells/ml 정도로 plating한 후 직경 5 mm의 paper disc를 놓고 0.2  $\mu$ m로 제균한 추출액을 희석하여 10  $\mu$ l loading 하였다. 혐기성 배양은 anaerobic jar (BBL Co.)와 vacuum desiccator를 이용하였으며, 37°C에서 48시간 배양한 후 생육 저해환(clear zone)의 크기를 조사하였다. 액체 배양은 EG broth에 0.2  $\mu$ m로 제균, 희석한 추출액을 첨가하고 각각의 균을 37°C, 24-48시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 MIC를 결정하였다.

대조균의 배양 48시간 후 균수를 hemocytometer로 측정한 결과는, *V. parahaemolyticus*  $2.5 \times 10^7$  cells/ml, *L. monocytogenes*  $1.7 \times 10^7$  cells/ml, *S. enteritidis*  $2.5 \times 10^7$  cells/ml, *E. coli*  $1.5 \times 10^8$  cells/ml, *S. aureus*  $1.5 \times 10^8$  cells/ml, *H. pylori*  $3.0 \times 10^6$  cells/ml, *C. jejuni*  $5.5 \times 10^6$  cells/ml, *C. perfringens*  $2.7 \times 10^7$  cells/ml, *B. longum*  $1.8 \times 10^8$  cells/ml, *L. bulgaricus*  $9.5 \times 10^7$  cells/ml이었다.

$\beta$ -Glucuronidase 활성 측정(6)은 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 0.38 ml, 10 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide 0.02 ml 및 효소액 0.1 ml을 37°C에서 15분간 반응시킨 후 0.5 N NaOH 용액 0.5 ml을 가하고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 p-nitrophenol의 양을 정량하였다. Tryptophanase의 활성 측정(4)은 0.2 ml의 complete reagent [0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 22.5 ml, pyridoxal phosphate 2.75 mg, EDTA 19.6 mg, BSA 10 mg, 증류수 87.5 ml], 0.02 M tryptophan 0.2 ml, 효소액 0.1 ml을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 color reagent (95% ethanol 94.8 ml, 36 N sulfuric acid 5.2 ml, dimethylaminobenzaldehyde 1.47 g) 2 ml을 가하고 550 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 indole의 양을 정량하였다. 실험 결과의 통계처리는 SPSS (SPSS Inc. USA) 통계 프로그램을 사용하여 분석하였으며 그 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 유의성은 Duncan's new multiple range test를 이용하여 검정하였다.

최근 효모와 유산균의 혼합발효에 의해 기능성 이외에도 발효산물의 풍미 개선, 이취 감소, 색상 변화 등 관능적 특성을 향상시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(7). 미나리의 경우도 일반적인 식물 발효물과 같이 대부분 효모와 유산균 계통에 균주에 의한 발효로서, 이때 발효 시간별 탁도와 대부분이 당성분인 고형분의 함량(당도), pH 등을 측정한 결과 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 탁도의 경우는 18개월까지 시간에 따라 증가하다가 36

개월에는 줄어드는 현상을 보였고, 당도의 경우는 초기 6개월까지 급증하다가 이후는 큰 차이를 나타내지 않아 당의 용출이나 고분자당의 분해는 이 때 정점에 온 것으로 판단되었다. pH의 변화는 미발효액과 발효액간에 차이가 컸으나 1개월 이후 시간 변화에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았다.

미나리 발효액이 병원성 미생물과 유산균 등의 생육에 미치는 영향을 agar plate에서 측정한 결과는 Table 2와 같이 유해세균 중에는 *L. monocytogenes*와 *C. perfringens*에 대한 저해효과가 상대적으로 작았으나 대부분 유해세균의 경우에는 저해율이 큰 것으로 나타났으며, 유익균의 경우는 *L. bulgaricus*가 저해를 많이 받았으나 *B. longum*은 비교적 저해율이 크지 않았다. 액체배지에서 MIC를 측정한 결과 고체배지에서의 저해효과와 반드시 일치하지는 않았지만 전체적으로는 유사한 경향을 나타내어 (Table 3), 유해 세균의 경우는 MIC값이 비교적 적은 반면 *B. longum*의 경우는 MIC값이 훨씬 컸다. 유해균에 대한 저해효과의 경우 미나리의 발효 기간이 길수록 추출물은 적은 양으로도 유해한 균들의 생육을 저해할 수 있는 것으로 나타났으며, *B.*

**Table 2.** Effects of extract of fermented dropwort on the growth of intestinal harmful or useful bacteria in agar plate (cm)

Strains	Fermentation period (month)				
	0	1	6	18	36
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.60	1.57	1.67	1.67	1.66
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.54	1.06	1.06	1.34	1.06
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.82	1.24	1.64	1.33	1.50
<i>E. coli</i> 0157	ND <sup>a</sup>	1.21	1.35	1.26	1.21
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.45	1.44	1.44	1.36	1.62
<i>Helicobacter pylori</i> 08	0.78	1.44	1.44	1.26	1.26
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.70	1.40	1.28	1.36	1.38
<i>Clostridium perfringens</i>	ND	1.10	0.93	1.07	1.10
<i>Bifidobacterium longum</i>	ND	0.90	1.00	0.96	1.00
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	0.85	2.24	2.10	2.50	2.10

Ten microliter of extracts of fermented dropwort were used for inhibition test. Each bacterium was cultivated on EG agar plate. Size (cm) of clear zone was measured as inhibition of cell growth.

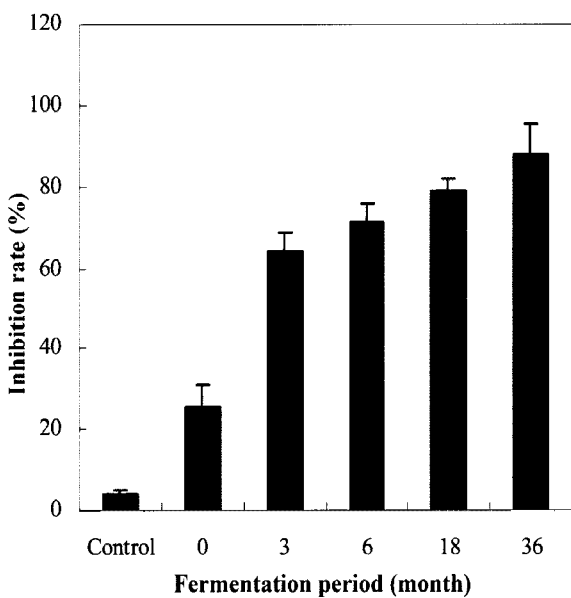
<sup>a</sup>ND, Not detected (clear zone below 0.40 cm)

**Table 3.** MIC of extract of fermented dropwort on the growth of intestinal harmful or useful bacteria in liquid cultivation (μl/ml)

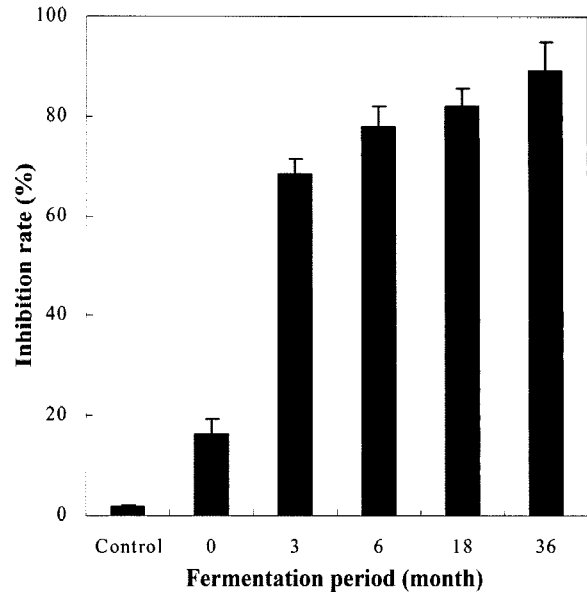
Strains	Fermentation period (month)				
	0	1	6	18	36
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	800	100	50	25	50
<i>Listeria monocytogenes</i>	400	100	50	50	50
<i>Salmonella enteritidis</i>	ND <sup>a</sup>	400	200	100	100
<i>E. coli</i> 0157	ND	200	200	100	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	800	100	50	25	25
<i>Helicobacter pylori</i> 08	NT <sup>b</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>Campylobacter jejuni</i>	400	50	50	50	25
<i>Clostridium perfringens</i>	ND	400	400	200	100
<i>Bifidobacterium longum</i>	ND	800	800	800	800
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	ND	200	200	100	100

Extracts of fermented dropwort were used for inhibition test. Each bacterium was cultivated in EG broth and optical density at 600 nm was measured before and after cultivation as inhibition of cell growth. <sup>a</sup>ND, Not detected (MIC over 800 μl/ml) <sup>b</sup>NT, Not tested.

*longum*의 경우는 발효 기간에 관계없이 큰 MIC 값을 나타내었다. 미나리는 항균기능을 가질 수 있는 다양한 flavonoid류 및 향 성분을 함유하며(2, 16), 발효 기간이 길수록 이러한 성분들이 식물 조직에서 발효액으로 용출되어 발효 기간에 따라 균 생육 저해도가 큰 것으로 추정되었다. 또 *B. longum*이 상대적으로 덜 저해된 결과는 본 실험에서 *B. longum*이 비교적 성장이 좋아 균



**Fig. 1.** Inhibitory effects of fermented dropwort extracts on β-glucuronidase activity Each value is expressed as Mean±SD in triplicate experiments.



**Fig. 2.** Inhibitory effects of fermented dropwort extracts on tryptophanase activity Each value is expressed as Mean±SD in triplicate experiments.

수가 많은 점도 있으나, 이보다는 녹차의 polyphenol류가 *C. perfringens* 등 유해 세균을 억제하는 반면 *Bifidobacterium* 속 균주의 성장을 촉진할 수 있다는 결과(12)와 같이 미나리 발효 중에 용출된 polyphenol 등 성분들의 작용성이 주요인일 것으로 사료되었다.

장내 세균이 생성하는 β-glucuronidase는 benzopyrene 등의 독성물질이 체내에서 glucuronide conjugate 형태의 무독성 물질로 변환되었을 때 이 결합을 끊어 발암의 원인이 될 수 있으며, β-glucuronidase의 생성은 *Clostridium* 속 균주에서 높으며 일부 다른 장내 세균에서도 생성되나 *Bifidobacterium* 속 균주는 생성하지 않는 것으로 알려져 있다(8, 15). 또 tryptophanase는 tryptophan을 분해하여 indole을 형성시킴으로써 대장암, 방광암 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(4). 미나리 발효액이 이들 효소에 대해 가지는 저해 효과를 *in vitro*에서 측정된 결과, Fig. 1 및 Fig. 2에 나타난 바와 같이 두 효소 각각에 대하여 미발효 추출액의 경우는 약한 저해효과를 보였으나 발효액의 경우는 그 효과가 상대적으로 컸으며 발효기간이 길어짐에 따라 저해 효과도 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 미나리의 구성 성분인 phenolic 화합물이 발효에 의해 phenolic 화합물의 용출이 증가하거나 배당체(glycoside) 형태에서 비당체(aglycon) 형태로 변환되면서 작용성이 증가하는 현상, 또는 미나리를 발효시키는 유산균 등의 미생물이 생성하는 물질 등에 의한 것으로 추정되며 향후 보다 상세한 분석이 요구된다 하겠다.

본 연구의 결과, 미나리 발효액은 장내 유해세균을 억제하는 효과가 있으며 상대적으로 *B. longum* 등 유익한 균에 대해서는 억제효과가 적어 미나리 발효액을 음용시 정상 효과가 있을 것으로 판단되며, β-glucuronidase와 tryptophanase 등 유해물질을

생성할 수 있는 효소작용을 저해하는 효과를 가져 장내 건강에 유익한 식품 소재가 될 것으로 기대된다.

### 참고 문헌

1. 이선화, 신현경. 1995. 쑥의 분획추출물이 주요 장내세균의 *in vivo* 생육에 미치는 영향. 한국영양학회지 28, 1065-1072.
2. 이종호, 박종철, 유영범. 1993. 미나리의 Steroid 및 Flavonoid. 생약학회지 24, 244-246.
3. 최성숙, 하남주. 1999. 식이에 따른 장내세균의 효소활성 및 장내세균총의 비교. 한국미생물학지 35, 128-132.
4. Chung, K.T., G.E. Fulk, and M.W. Slein. 1975. Tryptophanase of fecal flora as a possible factor in the etiology of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 1073-1078.
5. Cummings, J.H. and G.T. Macfarlane. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 443-459.
6. Fishman, W.H. 1974. Glucuronidase, p. 930-932. In H.U. Bergmeyer, 2nd ed., vol. 2. Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, N.Y., USA.
7. Kim, Y.C., E.Y. Jung, H.J. Kim, and S.M. Kang. 1999. Improvement of kimchi fermentation by using acid-tolerant mutant of *Leuconostoc mesenteroides* and aromatic yeast *Saccharomyces fermentati* as starters. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 22-31.
8. Kinoshita, N. and H.V. Gelboin. 1978. beta-Glucuronidase catalyzed hydrolysis of benzo(a)pyrene-3-glucuronide and binding to DNA. *Science* 199, 307-309.
9. Lee, H.C., A.M. Jenner, C.S. Low, and Y.K. Lee. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 157, 876-884.
10. Lee, K.I., K.Y. Park, and S.H. Rhee. 1992. Antimutagenic effect of green-yellow vegetables toward aflatoxin B1 and 4-nitroquinoline-1-oxide. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21, 143-148.
11. Mitsuoka, T. 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.* 50, 438-446.
12. Okubo, T., N. Ishihara, A. Oura, M. Serit, M. Kim, T. Yamamoto, and T. Mitsuoka. 1992. *In vivo* effects of tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 588-591.
13. Park, J.C., Y.B. Yu, J.H. Lee, and N.J. Kim. 1994. Studies on the chemical components and biological activator of edible plants in Korea (VI)-antiinflammatory and anlagenes effects of *Cedrela sinensis*, *Oenanthe javanica* and *Artemisia princeps var. orientalis*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23, 116-119.
14. Park, K.Y., K.I. Lee, and S.H. Rhee. 1992. Inhibitory effect of green-yellow vegetables on mutagenicity in Salmonella assay system and on growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21, 149-153.
15. Reddy, B.S., J.H. Weisburger, and E.L. Wynder. 1974. Fecal bacterial beta-glucuronidase: control by diet. *Science* 183, 416-417.
16. Seo, W.H. and H.H. Baek. 2005. Identification of characteristic aroma-active compounds from water dropwort (*Oenanthe javanica* DC.). *J. Agric. Food Chem.* 53, 6766-6770.
17. Thornton, J.R. 1981. High colonic pH promotes colorectal cancer. *Lancet* 16, 1081-1083.

(Received October 21, 2008/Accepted November 28, 2008)

**ABSTRACT : Effect of Extract of Fermented Dropwort on Intestinal Bacteria and Enzymes *In Vitro***  
**Kyung-Ae Lee<sup>1</sup>, Moo-Sung Kim<sup>2</sup>, and Hong-Bum Cho<sup>3\*</sup>** (<sup>1</sup>Institute of Natural Sciences, Yong In University, Yong In 449-714, Republic of Korea, <sup>2</sup>R&D Center, Macrocure Tech. Ltd., Ochang 363-883, Republic of Korea, <sup>3</sup>Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Republic of Korea)

Effect of extract of fermented dropwort (*Oenanthe stolonifera*) on growth of intestinal harmful/useful bacteria and enzyme activity were investigated *in vitro*. The extract showed strong inhibition on harmful microbes including *Vibrio* and *Salmonella*, but mild inhibition on *Bifidobacterium longum* in both agar plate and liquid cultivation. Minimum inhibitory concentration (MIC) value of *B. longum* was the highest among tested microbes. Inhibition effect of fermented extract on harmful microbes increased according to fermentation period. Extract of fermented dropwort showed inhibitory effects on activity of microbial  $\beta$ -glucuronidase and tryptophanase. The inhibitory effects were also proportional to fermentation period. As consequence, it is assumed that the uptake of fermented dropwort might be useful for human intestinal health.