

오배자 발효추출물의 항세균활성

도은수^{1#}, 유지현^{2*}

1 : 중부대학교 한방제약과학과, 2 : (재)금산국제인삼약초연구소

Antibacterial activity of Bio-fermented Galla Rhios Extract

Eun Soo Doh^{1#}, Ji Hyun Yoo^{2*}

1 : Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University Geumsan 312-402, Korea

2 : International Ginseng and Herb Research Institute Geumsan 312-804, Korea

ABSTRACT

Objectives : This experimental study was performed in order to investigate the antibacterial effect of bio-fermented Galla Rhois extract.

Methods : The Galla Rhois extract was fermented by *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus delbrueckii*, and their products was tested for antibacterial activity against six pathogenic microorganisms namely, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by paper disc diffusion method.

Results : The Galla Rhois fermented extract by *Lactobacillus delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* showed more effective antibacterial activity than not fermented extract against *Bacillus subtilis* and *Vibrio parahaemolyticus*. Antibacterial activity of fermented extract using especially *Lactobacillus delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* was proved that it was good with even 2 percents concentration. Antibacterial activity of Galla Rhois extract within pH 3 to pH 7 had been safe regardless of pH but low over pH 9.

The growth of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Vibrio parahaemolyticus* had a tendency to decrease depend on the increasing concentration of the extract. EtOEt, EtOAc and n-BuOH fractions of the Galla Rhois extract had a high level of antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*, respectively. Surprisingly, EtOAc fractions of the Galla Rhois extract showed higher antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus* alone. And antibacterial activity against six pathogenic microorganisms had a tendency to increase depend on the increasing concentration of the fractions of the Galla Rhois extract.

Conclusions : Bio-fermented Galla Rhois extract, efficiently inhibited the growth of *Bacillus cereus* and *Vibrio parahaemolyticus*.

Key words : Galla Rhois, Fermentation, Extract, Antibacterial activity, Fraction

서론

최근 약용식물 및 생약 등으로부터 특정성분이나 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리활성물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 특히 건강에 관한 관심이 높아지면서 천연 기능성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁾. 생리활성물질은

매우 적은 양으로 현저한 활성을 나타내는 고부가가치의 물질로서 현재 수많은 종류가 유용하게 이용되고 있으며, 또한 새로운 물질들이 연구 개발되고 있다²⁾. 특히 산업문명이 고도로 발달됨에 따라 인공합성품 중 일부가 안전성의 문제가 제기되면서 규제가 점점 강화되고 있고, 소비자들의 안전과 건강에

*교신저자 : 유지현, 충남 금산군 금산읍 인삼광장로 25 (재)금산국제인삼약초연구소
· Tel : 041-750-1642 · FAX : 041-750-1629 · E-mail : yooua@ginherb.re.kr
#제1저자 : 도은수, 충남 금산군 추부면 대학로 201 중부대학교 한방제약과학과
· Tel : 041-750-6722 · FAX : 041-750-6174 · E-mail : esdoh@joongbu.ac.kr
· 접수 : 2014년 6월 18일 · 수정 : 2014년 7월 22일 · 채택 : 2014년 7월 22일

대한 육구증대에 따라 인공합성품의 사용을 제한하려는 추세에 있어 천연물의 이용분야는 더욱 넓어지고 있는데, 허브를 포함한 다양한 유용식물을 이용하여 전 세계적으로 식물자원에서 항암, 항알레르기, 항비만, 항산화 및 항균 등에 효과 있는 기능성 물질을 다량 함유하고 있는 자원을 선별하여 이들 유용한 물질들을 약, 식품첨가제 또는 화장품의 원료로 개발하려는 연구가 다양한 각도에서 진행되고 있다^{3,4)}.

최근 웰빙 바람을 타고 식생활에 있어서도 상당한 변화가 있으며, 가공식품의 소비는 현대 생활에서 피할 수 없는 측면이기는 하나, 기피하여야 할 대상으로 인식되고 있는 측면도 없지 않다. 일반적으로 인간이 장기간 식용으로 사용했던 천연물을 그대로 이용하거나 추출하여 보존제로 사용하는 경우, 미국에서는 이를 generally recognized as safe(GRAS) list로 분류하여 관리하고 있다. 따라서 천연항균물질의 개발과 이용은 인공합성 보존제의 사용으로 인한 부정적인 측면을 해소하고 소비자 기피현상을 유발하지 않으면서도 저장성 향상과 안전성을 확보할 수 있는 좋은 방안으로 보고되고 있다⁵⁾.

식중독 원인 미생물이나 부패 미생물을 제어하여 식품을 안전하게 장기간 저장하기 위한 수단으로 각종 합성보존제나 일부 천연물질로부터 항균물질을 개발하여 사용하고 있으나, 편의성과 비용 때문에 benzoic acid, nitrite, sorbic acid, sodium metabisulfite, 염소제 등 다양한 합성보존료가 장기간 사용되어 왔다. 그러나 합성 보존료는 지속적으로 사용할 경우 체내 축적성 등 안전성에 관한 문제가 대두되어 있고, 물질의 종류, 사용량에 따라 잔류독성, 만성독성, 발암성, 돌연변이 유발 등 인체에 부정적 영향을 주기도 하며⁶⁻¹¹⁾, 이 같은 추세에 따라 독성이 아주 낮거나 거의 없는 항미생물제 또는 식품보존제 개발의 필요성이 대두되고 있다¹²⁾.

천연항균물질을 식품에 적용하기 위해서는 관능적인 측면에서 해결되어야 할 문제가 남아있는 것도 있고, 항균력이 약하거나 항균 스펙트럼이 좁아 아직까지 천연 항균제로 개발되어 상품화 된 제품은 극히 일부에 지나지 않고 있다¹³⁾.

이러한 연유로 인하여 현대에 이르러 천연물에 대한 소비자들의 욕구가 높아져 각 분야에 걸쳐 부작용이 적은 천연물의 이용이 증가하고 있으며, 특히 천연물을 이용한 항균성 물질의 개발 연구가 활성화되고 있으며, 연구 또한 많이 진행되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

오배자는 붉나무 *Rhus javanica* Linné 또는 그 밖의 동속식물(욱나무과 Anacardiaceae)의 잎에 오배자진딧물 *Melaphis chinensis* Bell(숨진딧물과 Eriosomatidae)의 刺傷에 의하여 생긴 벌레집이다. 이 약은 냄새가 없고 맛은 떼으며 수렴성이다¹⁷⁾. 오배자는 전국 각지에서 생산되며, 성분으로는 gallotannin(오배자 탄닌)을 70~80% 함유하며 지방, 수지 등을 함유하고 있고, 효능으로는 斂肝降火, 澀腸止瀉, 斂汗止血, 收濕斂瘡, 治肝虛久咳, 久痢, 久瀉, 自汗, 盜汗, 遺精, 便血, 衄血, 崩漏, 外傷出血, 癰腫瘡毒, 皮膚濕爛 등으로 알려져 있다¹⁸⁾.

지금까지 알려진 오배자에 관한 최근 연구로 천연항균물질을 통한 식품보존제 연구에서 오배자의 폴리페놀 추출물이 그람 음성 및 양성세균에 대해 우수한 항균효과가 있으며, 오배자의 에탄올 추출물 및 열수 추출물이 漁病세균에 우수한 항균력을 가진다고 보고¹⁹⁾ 외에 오배자 추출물의 효능에 관한 여러 연구가 보고되고 있으나 발효한 오배자 추출물의 관련된 연구는 거의 없다.

본 연구에서는 항균, 항암 및 생리활성 작용이 있다고 알려진 오배자 발효에 의한 항세균활성 조사하여 천연식품보존제로서의 활용 가능성과 그 이용가치를 검토하여 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 오배자(*Galla Rhois*)는 2008년 10월경에 경남 의령 소재의 자굴산 일대에서 채취한 후 중부대학교 한방제약과학과에서 감정하였고, 이용하기 전에 불순물을 제거하고 건조하여 분쇄 후에 4℃에서 냉장 보관한 후 추출용 시료로 사용하였다.

2) 사용 균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 Gram positive 균인 *Bacillus cereus* KCCM11204, *Bacillus subtilis* KCCM11316, *Staphylococcus aureus* KCCM12256, Gram negative 균인 *Vibrio parahaemolyticus* KCCM11965, *Escherichia coli* KCCM11835, *Salmonella typhimurium* KCCM40253로 한국중균협회 한국미생물보존센터에서 분양받아 사용하였으며, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*는 Nutrient agar, *V. parahaemolyticus*는 3% NaCl이 첨가된 nutrient agar를 사용하였다.

3. 방법

1) 오배자 추출물의 제조

오배자 분말과 H₂O의 희석비율을 1 : 10(W/V)으로 하여 120℃에서 30분간 끓인 다음 거즈로 1차 거른 후 여과지(Whatman No 2.)로 여과하였다. 이것을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축한 후 동결건조 하였다. 동결 건조한 분말은 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

2) 오배자 추출물의 발효

위에 제조된 오배자 추출물을 이용하여 다음과 같이 발효물을 제조하였다.

- (1) 조효소 조제 : α -Herbzyme 3 g에 증류수 100 mL를 가하고 50℃에서 2시간 침출 한 다음 거즈로 1차 거른 후 여과지로 여과시킨 여액을 조효소액으로 사용하였다.
- (2) 동결 건조한 오배자 분말 0.9 g에 조효소액 2.2 mL를 첨가하여 50℃에서 2시간 효소반응 시킨 후 95℃, 10분간 멸균하였다.
- (3) *Steptococcus thermophilus*, *Saccharomyces cersvisiae*, *Lactobacillus delbrueckii*를 각각 0.1 mL씩 접종하여 30℃ shaking incubator에서 4일간 배양한 후 60℃에서 20분간 열처리하였다.
- (4) 동결건조 시킨 다음 4±1℃에서 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

3) 항세균 활성 측정

항세균 활성을 측정하기 위해 slant에 배양된 각 균주 1 백금이를 취해 100 mL broth배지에 접종하여, 24시간 동안 활성화 시킨 후 사용하였다. 직경 9 cm인 petri dish에 20 mL의 배지를 분주한 평판배지 위에 각 균주의 활성화 된 배양액 0.1 mL를 처리한 다음 삼각 유리막대로 배지 위에 골고루 퍼지도록 도말하였다. 동결 건조시킨 다음 보관된 시료의 분말을 살균수로 희석하여 1%, 2%, 5% 및 10% 농도로 조제한 후 pore size 0.45µm인 membrane filter를 통과 시킨 다음 멸균된 paper disc에 흡수시켰다. 이것을 균주가 도말된 plate 표면에 올려놓은 후 *V. parahaemolyticus*, *E. coli*, *S. aureus*는 37°C, 그리고 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* 는 30°C incubator에서 48시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)을 측정하여 항세균활성을 조사하였다.

4) 추출물의 분획별 항세균 활성 측정

동결 건조시킨 분말 20g을 H₂O 400 mL와 현탁시킨 후 n-hexane, Ethyl Ether (EtOEt), Ethyl Acetate(EtOAc), n-butanol(n-BuOH) 및 H₂O로 극성이 낮은 용매에서 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하였다(Fig. 1). 분리된 분획물을 모아 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였고, 동결건조 후 paper disc법으로 항세균활성을 조사하였다.

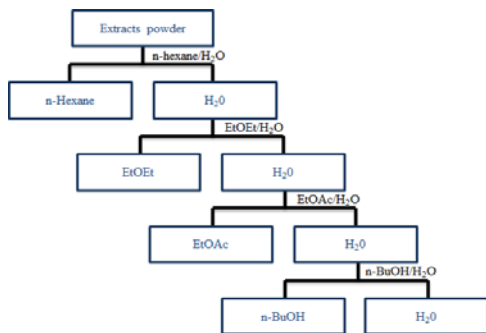


Fig. 1. Scheme of extraction and solvent fractionation of ethanol extract of *Galla Rhois*

4. 통계처리

통계처리는 DMRT(Duncan's Multiple Range Test)를 하였으며, P<0.05 경우 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1. 오배자 발효물의 항세균 활성

오배자 추출물을 *S. thermophilus*(FST), *L. delbrueckii*(FLD), *S. cerevisiae*(FSC) 등 3종의 발효균주를 이용한 발효물을 10%의 농도로 조제한 후 그람양성 세균인 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, 그람음성 세균인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus* 등 6종의 식품부패균 및 식중독균에 대한 항세균 활성을 조사하였다. 그 결과, FLD와 FSC에 의한 발효물은 *B. subtilis*에 대해서는 항세균활성이 높았으나,

나머지 식품부패균 및 식중독균에 대한 항세균활성은 비발효물과 차이가 거의 나타나지 않았다. FST에 의한 발효물을 제외하고 *B. cereus*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus* 대한 항세균활성은 비발효물과 차이는 없었고, 생육저해환의 직경이 14.0~19.0 mm로 항세균활성이 큰 것으로 관찰되었다. 반면에 FST에 의한 발효물은 비발효물 보다 *E. coli*에 대한 항세균활성이 높게 조사되었으며, FLD와 FSC에 의한 발효물은 비발효물과 비슷하거나 낮게 나타났다. *S. typhimurium*에 대한 항세균활성은 발효전후에 차이가 없었다(Table 1). 결과적으로 오배자 발효물의 항세균활성은 발효균주의 종류나 대상 식품부패균 및 식중독균의 종류에 따라 각기 상이한 것으로 조사되었는데, FLD와 FSC에 의한 발효물의 경우 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus* 등 4종의 식품부패균 및 식중독균에 대해서는 비발효물 보다 높거나 같은 항세균활성을 관찰할 수 있었으나, FST에 의한 발효물은 비발효물보다 약간 낮은 항세균활성을 나타냈다. 반면에 *E. coli*에 대한 항세균활성은 FST에 의한 발효물이 비발효물 보다 높게 나타났으며, *S. typhimurium*에 대한 항세균활성은 발효 전후 모두 매우 낮거나 거의 없는 것으로 관찰되었다.

Table 1. Antibacterial activity of fermented *Galla Rhois* extract against six kinds of bacteria

| Treatment | Inhibition zone(mm) | | | | | |
|------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | BC ²⁾ | BS | SA | EC | ST | VP |
| NF ¹⁾ | 18,0 ^{a3)} | 12,5 ^b | 18,3 ^a | 10,0 ^b | 9,0 ^a | 16,8 ^a |
| FST | 15,3 ^b | 10,8 ^c | 13,0 ^b | 11,3 ^a | 8,0 ^a | 14,0 ^b |
| FLD | 16,2 ^{ab} | 15,0 ^a | 15,5 ^{ab} | 9,0 ^{bc} | 9,0 ^a | 19,0 ^b |
| FSC | 15,5 ^{ab} | 15,0 ^a | 18,3 ^a | 8,0 ^c | 9,0 ^a | 17,3 ^a |

1) NF: Not fermented, FST: Fermented with *Streptococcus thermophilus*, FLD: Fermented with *Lactobacillus delbrueckii*, FSC: Fermented with *Saccharomyces cerevisiae*
 2) BC : *B. cereus*, BS : *B. subtilis*, SA : *S. aureus*, EC : *E. coli*, ST : *S. typhimurium*, VP : *V. parahaemolyticus*
 3) The same letters indicate Duncan's multiple range grouping which do not differ significantly at 5% level. Values were average of three replications, Dilution degree was 10 fold. A size of paper disc was included into an inhibition zone

2. 오배자 발효물의 농도별 항세균활성

FST, FLD 및 FSC 등 3종의 균주에 의한 오배자 발효물을 1%, 2%, 5% 및 10% 농도로 조제한 후 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* 및 *V. parahaemolyticus* 등 6종의 식품부패균 및 식중독균에 대한 항세균활성을 조사하였다.

오배자 발효물의 항세균활성은 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었고, FLD 및 FSC에 의한 발효물은 2% 농도까지 *B. subtilis*에 대한 항세균활성은 비발효물 보다 증가하였고, 또한 1% 농도까지 *V. parahaemolyticus*에 대한 항세균활성은 비발효물보다 증가하는 것으로 조사되었다. FST에 의한 발효물은 10% 농도에서만 *E. coli*에 대한 항세균활성은 비발효물 보다 높게 조사되었으나, 그 이하 농도에서는 항세균활성의 차이가 없었다. 반면에 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhimurium* 및 *V. parahaemolyticus*에 대한 항세균활성은 비발효물보다 오히려 감소하거나 발효물의 농도

와 관계없이 비슷하게 나타났다(Table 2). 오배자 발효물의 희석농도에 따라 항세균활성이 다르게 나타났을 뿐만 아니라 발효균주의 종류나 식품부패균 및 식중독균의 종류에 따라서도 항세균활성에 차이가 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Antibacterial activity of fermented *Galla Rhois* extract with various concentration against six kinds of bacteria

| Treatment | Concn. (%) | Inhibition zone(mm) | | | | | |
|------------------|------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | BC ²⁾ | BS | SA | EC | ST | VP |
| NF ¹⁾ | 10 | 18.0 ^{a3)} | 12.5 ^a | 18.3 ^a | 10.0 ^a | 9.0 ^a | 16.7 ^a |
| | 5 | 15.0 ^b | 10.0 ^b | 14.0 ^b | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 13.0 ^b |
| | 2 | 13.0 ^c | 9.0 ^c | 13.0 ^{bc} | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 10.5 ^c |
| | 1 | 11.0 ^d | 9.0 ^c | 11.7 ^c | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 8.0 ^d |
| FST | 10 | 15.5 ^a | 10.7 ^a | 13.0 ^a | 11.2 ^a | 8.0 ^a | 14.0 ^a |
| | 5 | 12.5 ^b | 10.0 ^a | 11.5 ^b | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 10.2 ^b |
| | 2 | 11.0 ^c | 8.0 ^b | 10.3 ^c | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 9.0 ^{bc} |
| | 1 | 10.0 ^c | 8.0 ^b | 9.0 ^d | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 8.0 ^c |
| FLD | 10 | 16.2 ^a | 15.0 ^a | 15.5 ^a | 9.0 ^a | 9.0 ^a | 19.0 ^a |
| | 5 | 13.5 ^b | 12.0 ^b | 13.7 ^{ab} | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 16.0 ^b |
| | 2 | 11.0 ^c | 9.0 ^c | 12.0 ^{bc} | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 14.0 ^b |
| | 1 | 9.0 ^d | 8.0 ^c | 11.0 ^c | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 9.0 ^c |
| FSC | 10 | 15.5 ^a | 15.0 ^a | 18.2 ^a | 8.0 ^a | 9.0 ^a | 17.2 ^a |
| | 5 | 13.0 ^b | 13.0 ^b | 12.2 ^b | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 16.2 ^b |
| | 2 | 12.0 ^c | 9.0 ^c | 12.0 ^b | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 12.0 ^c |
| | 1 | 9.0 ^d | 8.0 ^c | 9.0 ^c | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 9.0 ^d |

¹⁾ NF: Not fermented, FST: Fermented with *Streptococcus thermophilus*, FLD: Fermented with *Lactobacillus delbrueckii*, FSC: Fermented with *Saccharomyces cerevisiae*
²⁾ BC : *B. cereus*, BS : *B. subtilis*, SA : *S. aureus*, EC : *E. coli*, ST : *S. typhimurium*, VP : *V. parahaemolyticus*
³⁾ The same letters indicate Duncan's multiple range grouping which do not differ significantly at 5% level. Values were average of three replications. Dilution degree was 10 fold. A size of paper disc was included into an inhibition zone.

3. 오배자 발효물의 pH변화에 따른 항세균활성

오배자 추출물에 함유된 항세균활성 물질의 pH 안정성을 측정된 결과, 오배자 발효물과 비발효물 모두 pH에 대해 영향을 받는 것으로 조사되었다. 오배자 비발효물의 경우 *B. cereus*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus*는 pH 7이하에서 비교적 높은 항세균활성이 관찰되었으나 pH가 높아질수록 항세균활성이 나타나지 않았으며, *E. coli*와 *S. typhimurium*는 pH와 관계없이 항세균활성이 없는 것으로 조사되었다. FST에 의한 발효물의 경우에는 *E. coli*에서만 pH 3에서 항세균활성이 나타났고 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus*에 대해서는 pH 7 이하에서는 항세균활성이 나타난 반면, 그 이상에서는 항세균활성이 없는 것으로 조사되었다(Table 3).

Table 3. Antibacterial activity with pH of fermented *Galla Rhois* extract against six kinds of bacteria

| Treatment | pH | Inhibition zone(mm) | | | | | |
|------------------|----|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | | BC ²⁾ | BS | SA | EC | ST | VP |
| NF ¹⁾ | 3 | 16.0 ^{a3)} | 12.7 ^a | 15.0 ^a | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 18.0 ^a |
| | 5 | 13.5 ^b | 9.0 ^b | 14.2 ^a | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 17.0 ^{ab} |
| | 7 | 13.5 ^b | 9.0 ^b | 12.7 ^b | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 16.0 ^b |
| | 9 | 9.0 ^c | 8.0 ^b | 9.0 ^c | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 10.0 ^{cd} |
| | 11 | 9.0 ^c | 8.0 ^b | 9.0 ^c | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 8.0 ^d |
| FST | 3 | 15.2 ^a | 11.0 ^a | 14.5 ^a | 13.0 ^a | 16.0 ^a | 16.0 ^a |
| | 5 | 13.5 ^b | 11.0 ^a | 13.5 ^{ab} | 9.0 ^b | 15.5 ^a | 13.0 ^b |
| | 7 | 12.5 ^b | 11.0 ^a | 12.5 ^b | 9.0 ^b | 15.2 ^a | 12.0 ^{bc} |
| | 9 | 9.0 ^c | 9.0 ^b | 9.0 ^c | 8.0 ^b | 8.0 ^b | 8.0 ^d |
| | 11 | 9.0 ^c | 8.0 ^b | 9.0 ^c | 8.0 ^b | 8.0 ^b | 8.0 ^d |

¹⁾ NF: Not Fermented, FST: Fermented with *S. thermophilus*
²⁾ BC : *B. cereus*, BS : *B. subtilis*, SA : *S. aureus*, EC : *E. coli*, ST : *S. typhimurium*, VP : *V. parahaemolyticus*
³⁾ The same letters indicate Duncan's multiple range grouping which do not differ significantly at 5% level. Values were average of three replications. A size of paper disc was included into an inhibition zone. Dilution degree was 10 fold.

4. 오배자 추출 분획물의 항세균활성

오배자 추출물을 극성이 다른 유기용매인 n-hexane, EtOEt, EtOAc, n-BuOH 및 물로 순차적으로 분획하여 항세균활성을 조사하였다. *B. cereus*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus*에 대한 항세균활성은 H₂O층을 제외한 용매층에서 높은 것으로 조사되었으며, 특히 *V. parahaemolyticus*에 대한 항세균활성은 EtOAc층의 분획물에서 가장 높게 나타났다. *B. subtilis*에 대한 항세균활성은 EtOEt, EtOAc 및 n-BuOH 층의 분획물에서 높게 나타났으며 특히 EtOAc층의 분획물에서 가장 높게 나타났다. *B. subtilis*에 대한 항세균활성은 n-hexane과 H₂O층을 제외한 EtOEt, EtOAc 및 n-BuOH층의 분획물에서 높게 나타났으며 그 중 EtOAc층 분획물의 항세균활성이 가장 높은 것으로 조사되었다. *S. typhimurium*에 대한 항세균활성은 EtOAc층의 분획물에서만 높게 나타났고 나머지 분획물에서는 활성을 나타내지 않았으며, *E. coli*에 대해서는 n-BuOH층 분획물에서 약간의 항세균활성이 있었을 뿐이고 나머지 분획물의 항세균활성은 없었다(Table 4).

Table 4. Antibacterial activity with fractions of *Galla Rhois* extract against six kinds of bacteria

| Solvents | Inhibition zone(mm) | | | | | |
|------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | BC ¹⁾ | BS | SA | EC | ST | VP |
| n-hexane | 14.0 ^{b2)} | 9.0 ^c | 13.2 ^b | 8.0 ^c | 8.0 ^b | 13.7 ^c |
| EtOEt | 19.5 ^a | 15.8 ^b | 16.3 ^a | 8.0 ^c | 9.0 ^b | 19.5 ^b |
| EtOAc | 20.7 ^a | 18.7 ^a | 16.7 ^a | 9.0 ^b | 14.0 ^a | 23.2 ^a |
| n-BuOH | 19.0 ^a | 14.7 ^b | 14.7 ^{ab} | 10.7 ^a | 8.0 ^b | 19.5 ^b |
| H ₂ O | 8.0 ^c | 8.0 ^c | 8.0 ^c | 8.0 ^c | 8.0 ^b | 9.0 ^d |

¹⁾ BC : *B. cereus*, BS : *B. subtilis*, SA : *S. aureus*, EC : *E. coli*, ST : *S. typhimurium*, VP : *V. parahaemolyticus*
²⁾ The same letters indicate Duncan's multiple range grouping which do not differ significantly at 5% level. A size of paper disc was included into an inhibition zone. Values were average of three replications. Dilution degree was 10 fold.

5. 오배자 추출물 분획물의 농도별 항세균활성

오배자 추출물의 분획물 중 효과가 우수한 것으로 나타난 EtOEt, EtOAc 및 n-BuOH층 분획물의 배지 내 농도를 1%, 2%, 5% 및 10%로 조정하여 식품부패균 및 식중독균에 대한 분획물의 농도별 항세균활성을 측정 하였다(Table 5). 오배자 추출물 분획물은 *E. coli* 를 제외하고 나머지 식품부패균 및 식중독균에 대해서는 농도 의존적으로 항세균활성에 뚜렷하게 차이가 있는 것으로 조사되었다. EtOEt층의 분획물은 *B. cereus*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 2% 농도까지, *B. subtilis*에 대해서는 5% 농도까지 항세균활성이 있었고, EtOAc층 분획물은 *B. cereus* 및 *S. aureus*에 대해서는 1% 농도까지, *B. subtilis* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 5% 농도까지 그리고 *S. typhimurium*에 대해서는 10% 농도에서만 항세균활성이 있는 것으로 나타났다. n-BuOH층 분획물은 *B. cereus* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 2% 농도까지 그리고 *B. subtilis* 및 *S. aureus*에 대해서는 5% 농도까지 항세균활성이 있는 것으로 나타났다. 오배자 추출물 분획물과 식품부패균 및 식중독균의 종류에 따라서 나타나는 항세균활성은 차이가 있는 것으로 조사되었으며 그 중에서도 EtOAc층 분획물의 항세균활성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 5. Antibacterial activity with fraction concentration of Galla Rhois extract against six kind of bacteria

| Solvents | Concn. (%) | Inhibition zone(mm) | | | | | | |
|----------|------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|
| | | BC ¹⁾ | BS | SA | EC | ST | VP | |
| EtOEt | 10 | 19.5 ^{a2)} | 15.7 ^a | 16.3 ^a | 8.0 ^a | 9.0 ^a | 19.5 ^a | |
| | 5 | 15.0 ^b | 12.7 ^b | 13.5 ^b | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 16.7 ^b | |
| | 2 | 12.2 ^c | 9.0 ^c | 11.8 ^b | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 13.0 ^c | |
| | 1 | 9.0 ^d | 8.0 ^d | 9.5 ^c | 8.0 ^a | 8.0 ^a | 8.0 ^d | |
| EtOAc | 10 | 20.7 ^a | 18.7 ^a | 16.7 ^a | 9.0 ^a | 14.0 ^a | 23.2 ^a | |
| | 5 | 17.2 ^b | 14.2 ^b | 15.2 ^b | 8.0 ^a | 9.0 ^b | 19.5 ^b | |
| | 2 | 13.7 ^c | 9.0 ^c | 12.7 ^c | 8.0 ^a | 8.0 ^b | 8.0 ^c | |
| | 1 | 12.0 ^d | 8.0 ^d | 11.5 ^c | 8.0 ^a | 8.0 ^b | 8.0 ^c | |
| n-BuOH | 10 | 19.0 ^a | 14.7 ^a | 14.7 ^a | 10.7 ^a | 8.0 ^a | 19.5 ^a | |
| | 5 | 16.0 ^b | 12.0 ^b | 13.0 ^a | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 15.0 ^b | |
| | 2 | 13.2 ^c | 9.0 ^c | 10.2 ^b | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 12.7 ^c | |
| | 1 | 8.0 ^d | 8.0 ^d | 9.0 ^b | 8.0 ^b | 8.0 ^a | 9.0 ^d | |

¹⁾ BC : *B. cereus*, BS : *B. subtilis*, SA : *S. aureus*, EC : *E. coli*, ST : *S. typhimurium*, VP : *V. parahaemolyticus*

²⁾ The same letters indicate Duncan's multiple range grouping which do not differ significantly at 5% level. A size of paper disc was included into an inhibition zone. Values were average of three replications

고찰

본 연구는 오배자 추출물을 *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* 및 *S. cerevisiae*로 발효하여 병원성과 독소생산으로 피부의 염증 유발시키는 피부 생재균이며 식품부패 및 독소생성 식중독과 관련 있는 그람양성세균 *B. cereus*, *B. subtilis* 및 *S. aureus* 등 3종과 장염 및 식중독과 관련된 그람음성세균 *V. parahaemolyticus*, *E. coli* 및 *S. typhimurium*에 대한 항세균활성을 확인하였다.

오배자 추출물을 *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* 및 *S. cerevisiae* 등 3종의 발효균을 이용하여 발효시킨 후 *B. cereus*, *B. subtilis* 및 *S. aureus* 등 그람양성세균과 *E. coli*, *S. typhimurium* 및 *V. parahaemolyticus* 등 그람음성세균에 대한 항세균활성을 조사한 결과, FLD와 FSC에 의한 오배자 발효물은 *B. subtilis*에 대해서는 비발효물보다 항세균활성이 높았으며, 특히 *V. parahaemolyticus*에 대해 항세균활성은 비발효물보다 농도 의존적으로 우수한 항세균활성을 확인할 수 있었다. 나머지 공시 식품부패균 및 식중독균에 대한 항세균활성은 발효물과 비발효물은 차이가 거의 나타나지 않거나 오히려 감소하였는데 이는 최 등²⁰⁾의 연구결과와 유사하였다. FLD와 FSC에 의한 발효물 *B. subtilis*에 대해서는 천연 항균제 혹은 식품보존료의 개발은 충분한 잠재력이 있는 것으로 판단된다. 또한 *V. parahaemolyticus*는 호염성 그람음성세균으로 날 것 또는 익히지 않은 해산물을 통해 인체에 섭취되거나, 장염비브리오균에 의해 오염된 해수에 상처 난 피부에 감염되고, 해산물에서 발생하는 식중독의 중요한 원인 중 하나로 알려져 있다²¹⁾. 따라서 오배자 *L. delbrueckii* 및 *S. cerevisiae*에 의한 발효물은 비브리오균 감염증 등의 식중독 발생을 감소시키거나 식품의 저장성 향상 등의 목적으로 활용 가능성이 있다고 사료된다.

*E. coli*와 *S. typhimurium* 등 2종의 세균에 대한 항세균활성은 오배자 발효물뿐만 아니라 비발효에서도 발효물의 농도에 관계없이 항세균활성이 나타나지 않았다. *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus* 등 4종에 대한 발효물의 항세균활성은 농도 의존적으로 처리 농도가 높을수록 높게 나타났다. pH에 따른 공시 식품부패균 및 식중독균에 대한 항세균활성은 추출물의 발효 유무나 공시균의 종류에 따라서 유의한 차이가 있었다. 전반적으로 pH가 낮은 곳에서 항세균활성이 높은 것으로 나타났는데, 이는 공시균의 대부분이 중성부근에서 잘 성장하며 pH가 낮아질수록 생장이 억제되었던 것과도 관련이 있을 것으로 사료되며, 또한 오배자의 주요 항균물질인 tannin 화합물이 pH의 변화에 불안정하기 때문이라고 한 보고²²⁾와도 관련된 것으로 사료된다. 오배자 추출물의 활성성분에 대한 특성을 검토하고자 극성이 다른 유기용매인 n-hexane, EtOEt, EtOAc, n-BuOH 및 물로 순차적으로 분획하여 항세균활성을 조사한 결과, EtOAc층이 다른 분획층에 비해 성장억제효과가 높게 나타났으며, 또한 배지 내 농도를 1%, 2%, 5% 및 10%로 조정하여 항세균활성을 측정한 결과 EtOAc 분획물에서는 모든 농도에서 항세균활성이 관찰하였다. 오배자의 ethyl acetate 분획물의 성분 중 tannins methylgallate와 gallic acid가 주된 항균물질이라 보고된 바 있는데²³⁾ 이러한 성분들이 항세균활성을 나타내는 주요물질로 사료된다. 따라서 발효균주의 종류나 식품부패균 및 식중독균의 종류에 따라 구성성분에 의한 활성 변화 연구가 추가적으로 필요한 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 오배자 추출물을 발효균주인 *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* 및 *S. cerevisiae*을 이용해 발효시킨 경우 일부 세균에 대해 우수한 항세균활성을 확인할 수 있었고, 이에 대한 지속적인 연구가 더 필요한 것으로 판단된다. 최근 합성보존료를 장기간 사용할 경우 체내 축적성 등 안전성에 관한 문제가 제기되면서 독성이 아주 낮거나 거의 없는 향미생물제 또는 식품보존제들을 대체 할 수

있는 천연식품보존제로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

결론

천연식품보존제 개발의 기초자료를 확보하고자 오배자 추출물을 *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* 및 *S. cerevisiae* 등을 이용한 발효물을 *B. cereus*, *B. subtilis* 및 *S. aureus* 등 그람양성세균과 *E. coli*, *S. typhimurium* 및 *V. parahaemolyticus* 등 그람음성세균에 대한 항세균활성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. *L. delbrueckii*와 *S. cerevisiae*에 의한 오배자 발효물은 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 비발효물 보다 농도 의존적으로 항세균활성이 우수하였으며, 특히 *B. cereus*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus* 등에 대해서는 배지 내 발효물의 농도가 2%인 경우에도 유의한 항세균활성이 있었다.
2. *S. thermophilus*에 의한 오배자 발효물은 *E. coli*를 제외하고 모든 공시균에 대하여 pH 3 ~ 7의 범위에서 항세균활성이 나타났다.
3. 오배자 추출물의 EtOEt, EtOAc 및 n-BuOH 분획층은 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus* 등에 높은 항세균활성을 나타냈고, 특히 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 농도 의존적으로 매우 높은 항세균활성이 나타났다.

따라서, 본 연구는 *L. delbrueckii* 및 *S. cerevisiae*을 이용해 오배자를 발효시킨 경우 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대해 우수한 항세균활성을 확인되었고, 아울러 향후 이를 이용한 천연식품보존제 등의 신소재 물질의 기초 자료로 충분한 활용성이 있다고 사료된다.

References

1. Joung YM, Park SJ, Lee KY, Lee JY, Suh JK, Hwang SY, Park KE, Kang MH. Antioxidative and antimicrobial activities of Liliun species extracts prepared from different aerial parts. *Korean J Food Sci Technol*. 2007 ; 39 : 452-7.
2. Tabance N, Kirimer N, Demirci B, Demirci F, Baser KHC. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata subsp. Phrygia* and enantiomeric distribution of borneol. *J Agric Food Chem*. 2001 ; 49 : 4300-3.
3. Kim HJ, Ahn MS, Kim GH, Kang MH. Antioxidant and antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* extracts prepared from different aerial part. *Korean J Food Sci Technol*. 2006 ; 38: 779-804.
4. Ali KA, Abdelhak M, George B, Panagiotis K. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic propolis. *Food. Chem*. 2005 ; 89 : 27-36.
5. Jung JH, Cho SH. Effect of steeping treatment in the natural antimicrobial agent solution on the quality control of processed tofu. *Korean J Food Preserv*. 2003 ; 10 : 41-6.
6. Cherry JP. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. *Food Technol*. 1999 ; 53 : 54-9.
7. Sibel R. Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Sibel R(ed). Cambridge, UK : Woodhead Publishing Ltd. 2003.
8. Davidson PM, Post LS. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In Branen AL, Davidson PM(eds). New York : Antimicrobials in foods, Marcel Dekker Inc. 1983 : 371.
9. Lewis RJ. Their regulatory status their use by the food industry. In Food additives Handbook, Robert WD(ed). New York : Nostrand Reinhold. 1989 : 3-27.
10. Chang DS, Shin DH, Chung DH, Kim CM, Lee IS. Food hygiene. Seoul : Jungmoongak. 2002 : 244-6.
11. Kim JY, Lee JA, Yoon WJ, Oh DJ, Jung YH, Lee WJ, Park SY. Antioxidative and antimicrobial activities of Euphorbia jolkini extracts. *Korean J Food Sci Technol*. 2006 ; 38 : 699-706.
12. Ferrand C, Marc F, Fritsch P. Chemical and toxicological studies of products resulting from sorbic acid and methylamine interaction in food conditions. *Amino Acids*. 2000 ; 18 : 251-63.
13. An BJ. The material of natural antibacterial agents for the food preservative. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 1999 ; 4 : 5-16.
14. Eun JS, Lim JP, Park YK, Choi DS, Ahn MS. Hepatoprotective activity of *Salviae miltiorrhizae Radix Extract*. *Kor J Pharmacogn*. 1991 ; 22 : 95-100.
15. Kim OH, Yang JS, Jung EJ. In vitro anticancer screening and evaluation of natural products in human tumor cell lines. Report; *Nati Inst Saf Res*. 1993 ; 6 : 201-7.
16. Mok JS, Kim YM, Kim SH, Chang DS. Antimicrobial property of the ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza*. *J Fd Hyg Safety*. 1995 ; 10 : 23-8.
17. Chi HJ, Lee SI, Ahn DK, Lee KS, Lee SY, Lee YJ. *Korean Herbal Pharmacopoeia (2th revision)*. Seoul : Korea medical index-sa. 1998 : 439-40.
18. Compilation Committee of Korea Herbology. *Korea herbology*. Seoul : Younglimsa. 2008 : 680-2.
19. Choi HS, Kim JS, Jang DS, Yu YB, Kim YC, Lee JS. Antibacterial activities of *Galla hois* extracts against fish pathogenic bacteria. *J Fish Pathol*. 2005 ; 18 : 239-45.

20. Choi OJ, Rhee HJ, Choi KH. Antimicrobial activity of korean wild tea extract according to the degree of fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2005 ; 34 : 148-57.
21. Lee JR, Park SJ, Jung DH, Park MK. Study on Antimicrobial activity and analysis of essential oil components of *Cinnamomum cassia* and *Prunellae Herba*. *J Environ Sci Int*, 2014 ; 23 : 157-64.
22. Choi I. Antimicrobial activity of *Rhus javanica* extracts against animal husbandry disease-related bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutri*, 2003 ; 32 : 1214-20.
23. Ahn YJ, Lee CO, Kweon JH, Ahn JW, Park JH. Growth-inhibitory effects of Galla Rhois-Derived tannins on intestinal bacteria. *J Appl Microbiol*, 1998 ; 84 : 439-43.