

지유 발효추출물의 항세균 및 항산화 활성

길기정^{1#}, 도은수¹, 장준복¹, 이승현², 유지현^{1*}

1 : 중부대학교 한방제약과학과, 2 : 중원대학교 교양학부

Antibacterial and Antioxidant activities of Bio-fermented Sanguisorbae Radix Extract

Ki-Jung Kil^{1*}, Eun-Soo Doh¹, Jun-Pok Chang¹, Seung-Hyun Lee², Ji-Hyun Yoo^{1#}

1 : Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University Geumsan 312-702, Korea

2 : Liberal Arts School, Jungwon University Goesan 367-805, Korea

ABSTRACT

Objectives : The objective of this research was to investigate the antibacterial and antioxidant activities of bio-fermented Sanguisorbae Radix extract.

Methods : The Sanguisorbae Radix extract was fermented by *Streptococcus thermophilus*, and their products was tested for antibacterial activity against pathogenic microorganisms namely, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* by paper disc diffusion method and the antioxidant activities of extract was evaluated by five different assays as electron donating ability(EDA), superoxide dismutase(SOD)-like activity, polyphenol, flavonoid contents and nitrite scavenging ability.

Results : The bio-fermented Sanguisorbae Radix extract was safe from heat. Antibacterial activity of fermented Sanguisorbae Radix extract appeared relatively highly against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* and didn't show any difference. EDA in comparison to Vitamin C showed over 90% activity at about the same time of Sanguisorbae Radix extract expressed highly. SOD activity showed 15% in fermentation before and after. The nitrite scavenging ability of Sanguisorbae Radix extract before and after fermentation showed higher numerical value over 70% in pH 2.5 than that of butylated hydroxytoluene(BHT). But SOD activity, EDA and nitrite scavenging ability were not different between the Sanguisorbae Radix extract before and after fermentation. Total polyphenol content expressed over about 20 mg/g, and that of the Sanguisorbae Radix extracts was increased than that of the fermented Sanguisorbae Radix extracts.

Conclusions : The results suggest the usefulness of developing functional materials using antioxidant active Sanguisorbae Radix extract was fermented by *Salmonella typhimurium* with high polyphenol contents and nitrite scavenging ability.

Key words : Fermentation, Sanguisorbae Radix, Antibacterial, Antioxidant

서론

지유(Sanguisorbae Radix, 地榆)는 장미과(Rosaceae)에 속한 여러 해 살이 풀인 오이풀 및 같은 속 근연식물의 뿌리를 말린 것을 이르는데, 우리나라와 중국 각지에 분포하고, 뿌리에 tannin, triterpenoid계 sanguisorbin A, B, E ziyu

-glycoside I, II 등과 sanguin H-1, H-2, H-3 등이 함유되어 있으며, 효능은 涼血止血, 解毒斂澀, 治便血, 痔出血, 血痢, 崩漏, 水火燙傷, 癰腫瘡毒 등이다¹⁾.

최근 활성산소를 제거하는 항산화 물질과 질병 치료 가능성이 있는 유용한 물질을 탐색하고 이를 개발하기 위한 연구

*Corresponding author : Ji-Hyun Yoo Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University Geumsan 312-702
· Tel : +82-41-750-6962 · E-mail : jhyoo@joongbu.ac.kr

#First author : Ki-Jung Kil, Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University Geumsan 312-702

· Tel : +82-41-750-6225 · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr

· Received : 25 June 2015 · Revised : 22 July 2015 · Accepted : 22 July 2015

가 활발히 이루어지면서 각종 과채류에 다량으로 존재하는 phenol화합물과 flavonoid류 등이 항산화, 항암, 항균 등의 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 보고되고 있는데²⁻⁴⁾, 한의학에서 주로 이용되던 약용식물에 대한 관심이 높아지고 있다^{3,5)}.

다양한 생리활성 기능 중 항산화제는 반응성이 높아 체내 유해물질과 반응하여 세포 내 주요물질들이 활성산소에 의한 연쇄반응을 막아주어 세포를 보호하는 역할을 한다. 인체는 활성산소를 제거하기 위한 생체방어시스템을 가지고 있으며, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), catalase(CAT), 환원형 glutathione(GSH), glutathione S-transferase(GST) 등에 의한 효소적 방어체계를 가지고 있는 식품을 통해 섭취 가능한 저분자 항산화제 혹은 free radical scavenger 역할을 하는 항산화물질은 Se, Cu, Mn 등의 무기질류⁶⁾, 아스코르브산과 비타민 E, tocopherol, gossypol, sesamol oryzanol 등⁷⁻⁹⁾, polyphenol, phenolic acid, flavonoids 등이 알려져 있다¹⁰⁻¹³⁾. 그 외에 tocopherol, vitamin C, carotenoid 등의 천연항산화제와 BHA와 BHT를 필두로 많은 합성 항산화제들이 개발 및 사용되고 있다^{14,15)}.

그러나, 사람과 동물이 가지는 항산화 체계는 체내에서 발생되는 산화적 손상을 완전히 예방 또는 복구하는데 충분하지 않기 때문에 식품이나 한약재를 통해 섭취되는 항산화 물질들은 체내 산화적 손상을 낮추어주는데 도움이 되는 것으로 보고되고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

또한, 전 세계적으로 합성 식품첨가물에 대한 안전성과 사용규정들이 다시 검토되면서 최근 천연 식품 첨가물에 대한 관심이 새롭게 대두되고 있다^{19,20)}. 식품의 원료, 가공, 저장 및 유통 중에 예상되는 부패성 및 병원성 미생물에 의한 오염과 균의 증식을 억제하기 위하여 nitrite, sorbic acid, sodium metabisulfite, 염소제 등 다양한 합성보존제가 장기간 사용되어 왔으나 합성 보존료는 체내 축적성 등 안전성에 관한 문제가 되고 있으며, 물질의 종류, 사용량에 따라 잔류독성, 돌연변이 유발 등 인체에 부정적 영향을 주기도 한다고 알려져 있다^{19,20)}. 따라서 식품부패 및 식중독 관련 미생물의 증식을 효과적으로 제어하여 식품을 안전하게 장기간 저장하기 위하여 일부 천연물질로부터 항균물질이 개발되어왔으며²¹⁾, 생약재와 식용식물, 향신료 등은 천연보존제를 개발하기 위한 좋은 소재로 많은 연구가 진행되고 있다^{22,23)}.

본 연구에서는 지금까지 지유에 관한 연구결과로는 높은 항암 활성²⁴⁾, 항바이러스 및 항균 활성도 보고된 바 있으며^{24,25)}, 흰쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서 지유추출물 투여는 간 보호²⁶⁾와 뇌세포 보호²⁷⁾ 효과를 나타내었고, 지유 추출물의 항산화 효과는 DPPH 소거활성 억제²⁸⁾, superoxide 소거활성 억제²⁹⁾ 등이 보고되어 있으나, 지유의 발효물에 대한 언급은 없다.

사회적 요구에 비추어 볼 때 한약재의 생리활성물질과 그 효과에 관하여 학문적으로 연구하고 이론적 배경을 바로 세울 필요성이 있다. 또한 지유에 관한 연구는 그 성분, 항균, 항암에 관한 보고가 있으나 아직 미미한 실정이므로 본 연구는 한약재 중 지유가 가지는 생리활성에 관해 연구함과 동시에 특히 지유의 추출물을 발효하였을 때 나타나는 항균 및 항산화 활성 연구하여 천연보존제 및 항산화 효과 등에 적용가능성을 검토해 보기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 지유(*Sanguisorba officinalis* L.)는 충남 금산 벨엘약업사에서 구입한 후 중부대학교 한방제약학과 과에서 감정하였고, 이용하기 전에 불순물을 제거하고 건조하여 분쇄 후에 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 냉장 보관한 후 추출용 시료로 사용하였다.

2) 사용 균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 그람양성균인 *Bacillus subtilis* KCCM11316, *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Staphylococcus aureus* KCCM 12256, 그람음성균인 *Salmonella typhimurium* KCCM 40253, *Vibrio parahaemolyticus* KCCM 11965, *Escherichia coli* KCCM 11835로 한국중균협회 한국미생물 보존센터에서 분양받아 사용하였으며, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium*는 Nutrient agar, *S. aureus*는 Trypticasesoy agar 및 *V. parahaemolyticus*는 3% NaCl이 첨가된 nutrient agar를 배양에 사용하였다.

2. 방법

1) 추출물의 제조

지유 분말과 용매(MeOH)의 희석비율을 1:10(W/V)으로 하여 실온에서 48시간 동안 침지한 후 거즈로 1차 거른 후 여과지(Whatman No 2.)로 여과하였다. 이것을 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ 수욕상에서 감압농축한 후 동결건조 하였다. 동결 건조한 분말은 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

2) 발효물 제조

위에 제조된 지유 분말을 이용하여 다음과 같이 발효를 제조하였다.

(1) 조효소 조제 : α -Herbzyme 3g에 증류수 100 mL를 가하고 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 2시간 침출 한 다음 거즈로 1차 거른 후 여과지로 여과시킨 여액을 조효소액으로 사용하였다.

(2) 추출물 발효 : 동결 건조한 지유 분말 0.9 g에 조효소액 2.2 mL를 첨가하여 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 2시간 효소반응 시킨 후 $95 \pm 1^\circ\text{C}$, 10분간 멸균하였다. *Streptococcus thermophilus*를 100 μL 씩 접종하여 30°C shaking incubator에서 4일간 배양한 후 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 20분간 열처리하였다.

(3) 동결건조 시킨 다음 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

3) 항세균활성 측정

항세균효과를 평가하기 위해 slant에 배양된 각 균주 1 백 균이를 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 100 μL 를 처리한 다음 삼각 유리막대로 배지 위에 골고루 퍼지도록 도말하였다. 동결 건조시킨 다음 보관된 시료의 분말

을 살균수로 희석하여 1%, 2%, 5% 및 10% 농도로 조제한 후 0.45 μm인 membrane filter를 통과 시킨 다음 멸균된 paper disc에 흡수시켰다. 이것을 균주가 도말된 plate 표면에 올려 놓은 후 *V. parahaemolyticus*, *E. coli*, *S. aureus*는 37 ± 1°C, 그리고 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* 는 30 ± 1°C, 48시간 배양시켜 paper disc 주위에 생성된 clear zone(mm)의 직경을 측정하였다.

4) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법³⁰⁾을 응용하여 측정하였다. 시료 1 mg을 95% 에탄올 1 mL에 용해시키고 Folin-Ciocalteu 1 mL를 첨가하여 27°C 수욕 조에서 혼합하였다. 5분 정도 경과 후 10% Na₂CO₃ 용액 1 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 동안 반응 후 분광광도계(UV/VIS spectrophotometer, Shimadzu Co., Japan)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준물질 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

5) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성능 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund 와 Marklund의 방법³¹⁾에 따라 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하였다. 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxy methyl] amino-methane + 10 mM EDTA) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 실온에 10분간 방치 후, 1N HCl 1 mL로 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 분광광도계 420 nm에서 흡광도를 측정하여 시료첨가 및 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

6) 전자공여능(Electron donating activity, EDA) 측정

전자공여능은 Blois의 방법³²⁾에 따라 각 추출물의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)에 대한 전자공여 효과로써 각 시료의 환원력을 측정하였다. 에탄올에 용해한 100 μM의 DPPH 용액 900 μL와 시료 용액 100 μL를 혼합하여 잘 교반한 후 암소에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

7) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Nieva 등³³⁾의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 100 μL를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 μM potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

8) 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Kato 등³⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다. 1 mM의 NaNO₂ 용액 1 mL에 시료 추출물을 첨가하고 0.1 N HCl(pH 1.2)과 0.1 M 구연산완충액으로 pH 2.5 및 4.2로 조정 한 후 반응액을 10 mL로 하였다. 이 용액을 37 ± 1°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 1 mL씩 취하여 2% acetic

acid 5 mL와 Griess 시약 0.5 mL를 첨가하여 혼합 후 실온에서 15분간 방치시켰다. 반응시킨 시료를 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 0.1 mL 가하여 동일하게 행하였다. 아질산염 소거작용은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율(%)로 나타내었다.

3. 통계처리

통계처리는 Student's *t*-test과 DMRT(Duncan's Multiple Range Test)에 의해 *p* < 0.05 수준에서 유의성 검정을 하였다.

결 과

1. 항세균활성

*S. thermophilus*를 이용하여 발효한 후 그람양성 세균인 *B. cereus*(BC), *B. subtilis*(BS), *S. aureus*(SA), 그람음성 세균인 *E. coli*(EC), *S. typhimurium*(ST), *V. parahaemolyticus* (VP) 등 6종의 식품부패균 및 식중독균에 대한 항세균 활성을 조사하였다. 그 결과 BS, EC, ST 및 VP에 대해서는 비발효물과 발효물의 항세균활성이 차이가 없었으나, BC, SA에 대한 항세균활성은 비발효물이 발효물보다 조금 더 있었으나, 전반적으로 지유 추출물의 항세균활성은 그리 높지는 않았다(Table 1).

Table 1. Antibacterial activity of fermented Sanguisorbae Radix extract with various concentration against six kinds of bacteria

Treatment	Concn. (%)	Inhibition zone(mm)					
		BC ²⁾	BS	SA	EC	ST	VP
NF ¹⁾	10	14.0 ^{3b)}	9.0 ^a	11.5 ^a	8.0 ^a	9.0 ^a	9.8 ^a
	5	11.0 ^b	9.0 ^a	10.0 ^b	8.0 ^a	9.0 ^a	9.0 ^b
	2	9.0 ^c	8.0 ^a	9.0 ^c	8.0 ^a	8.0 ^a	8.0 ^c
FST	1	9.0 ^c	8.0 ^a	8.0 ^d	8.0 ^a	8.0 ^a	8.0 ^c
	10	10.0 ^a	8.0 ^a	10.0 ^a	8.0 ^a	8.0 ^a	9.0 ^a
	5	8.0 ^b	8.0 ^a	9.0 ^{ab}	8.0 ^a	8.0 ^a	8.0 ^a
	2	8.0 ^b	8.0 ^a	8.0 ^b	8.0 ^a	8.0 ^a	8.0 ^a
1	8.0 ^b	8.0 ^a	8.0 ^b	8.0 ^a	8.0 ^a	8.0 ^a	

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. Dilution degree was 10 fold, A size of paper disc was included into an inhibition zone. Values were average of three replications

2. 열처리에 따른 항세균활성

지유 발효물의 열 안정성을 조사하기 위해 80°C, 100°C 및 120°C에서 각각 30분간 열처리한 후 생육저해능을 측정한다. 결과 BC에 대해서는 비발효물의 항세균활성은 열처리 의한 차이가 없었으나, 발효물에서는 온도가 높아질수록 항세균활성이 약간 감소하였지만, 유의한 차이는 없었다. SA에 대해서는 비발효물의 경우 온도가 높아질수록 항세균 활성이 증가하였으나, 발효물에서는 항세균 활성의 차이가 없었다. VP에 대해서는 발효물보다는 비발효물의 항세균 활성이 높았으나, EC와 ST에 대한 비발효물 및 발효물에서 항세균활성이 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 2. Antibacterial activity with heating treatment of Sanguisorbae Radix extract against six kinds of bacteria

Treatment	Temp. (°C)	Inhibition zone(mm)					
		BC ²⁾	BS	SA	EC	ST	VP
NF ¹⁾	80	12,5 ^{a3)}	9,0 ^a	9,0 ^b	8,0 ^a	8,0 ^a	11,0 ^a
	100	12,5 ^a	9,5 ^a	10,5 ^a	8,0 ^a	8,0 ^a	10,0 ^a
	120	12,5 ^a	9,8 ^a	11,5 ^a	8,0 ^a	8,0 ^a	10,0 ^a
FST	80	11,0 ^a	8,0 ^b	10,0 ^b	8,0 ^b	8,0 ^b	9,0 ^b
	100	10,8 ^a	8,0 ^b	10,0 ^b	8,0 ^b	8,0 ^b	9,0 ^b
	120	10,0 ^a	8,0 ^b	9,5 ^b	8,0 ^b	8,0 ^b	9,0 ^b

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. Dilution degree was 10 fold. A size of paper disc was included into an inhibition zone. Values were average of three replications

3. 총 플라보노이드 및 폴리페놀 함량

*S. thermophilus*를 이용한 지유 발효물의 총 플라보노이드 및 폴리페놀 함량을 조사한 결과 발효에 관계없이 65 mg/g 이상의 플라보노이드 함량이 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 발효물이 비발효물 보다 플라보노이드 함량이 유의성 있게 감소하였고, 총 폴리페놀 함량은 발효물(약 22 mg/g)이 비발효물(약 19 mg/g)보다 총 폴리페놀 함량이 유의성 있게 증가하였다(Table 3).

Table 3. Total flavonoid content of Sanguisorbae Radix extract

Treatment	Con c. (mg/mL)	Contents (mg/g)	
		Flavonoids	Total phenol
NF ¹⁾	1	74.2 ± 0.5	19.2 ± 0.3
FST	1	65.8 ± 0.3 ^{**2)}	22.4 ± 0.4 ^{**}

¹⁾ NF : Not Fermented, FST : Fermented with *S. thermophilus*
²⁾ The values are expressed as the mean ± SD of three replications. Statistically significant value compared with control(NF) data by T-test ^{**} $p < 0,01$

4. 전자공여능 활성

*S. thermophilus*를 이용한 지유 발효물의 전자공여능을 측정된 결과, 대표적인 항산화제인 vitamin C의 전자공여능과 비교할 때 발효 전 후 모두 90% 이상의 활성을 보여 항산화능이 높은 것으로 나타났으며, 발효 전후의 전자공여능의 변화는 비슷하였다(Fig. 1).

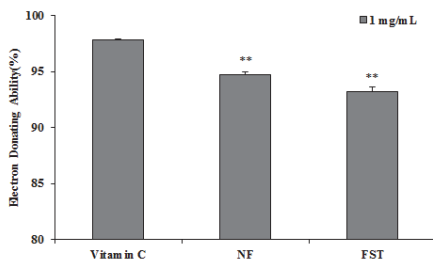


Fig. 1. Electron donating ability of Sanguisorbae Radix extract. NF; Not Fermented, FST; Fermented with *S. thermophilus*. The values are expressed as the mean ± SD of three replications. Statistically significant value compared with control (Vitamin C) data by T-test ^{**} $p < 0,01$

5. SOD유사활성

*S. thermophilus*를 이용한 지유 발효물의 SOD 유사활성을 측정된 결과 비발효 및 발효물 모두 약 15% 정도의 유사활성능을 나타내었으며, 비발효물과 발효물 유사활성능의 차이는 없었다(Fig. 2).

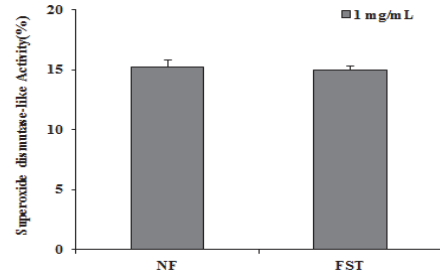


Fig. 2. Superoxide dismutase-like activity of Sanguisorbae Radix extract. NF; Not Fermented, FST; Fermented with *S. thermophilus*. The values are expressed as the mean ± SD of three replications

6. 아질산염 소거능 활성

지유 발효물의 항산화 효과를 조사하기 위하여 항산화 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있는 합성산화제인 BHT와 비교하여 아질산염 소거능을 조사한 결과, pH 2,5에서 비발효물과 발효물에서 아질산염 소거능은 70% 이상으로 대조구인 BHT보다 월등히 높았다. pH 4,2에서도 비발효물 및 발효물에서 BHT보다 아질산염 소거능이 유의성 있게 높게 나타났으나, pH 2,5는 낮았다(Fig. 3). 그러나 발효의 유무에 따른 아질산염 소거능의 차이는 거의 나타나지 않았다.

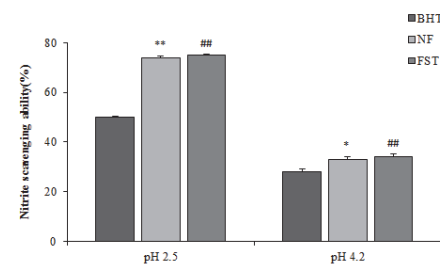


Fig. 3. Nitrite scavenging ability of Sanguisorbae Radix extract. NF; Not Fermented, FST; Fermented with *S. thermophilus*. The values are expressed as the mean ± SD of three replications. Statistically significant value compared with control (BHT) data by T-test ^{*} $p < 0,05$ and, ^{**} and ^{##} $p < 0,01$

고찰

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 식품에 대한 일반인들의 인식이나 선호도 또한 현저하게 달라지고 있는데 이러한 현상은 우리나라의 전통 발효 음식에 대한 관심으로 자연스럽게 이어져서 식품업계는 발효 산업을 하나의 성장 동력으로서 육성하고 있으며, 발효음식 관련 미생물 시장 또한 매년 대단히 빠르게 성장하고 있다³⁵⁾. 외국의 경우 유제품을 이용한 치즈, 우유, 효모를 이용한 맥주 등이 있지만, 채소나 한약자원을 이용한 발효식품은 흔치가 않다. 우리나라는 채소류, 곡

류, 수산물 등을 이용, 다양한 발효식품을 개발, 섭취해왔다. 이로써 식품의 저장 기간을 늘렸으며, 발효식품속의 미생물에 의해 소화하기 어려운 고분자 영양분을 저분자로 분해하여 소화, 흡수율을 높이고, 새로운 영양성분을 생성해 유용한 성분을 섭취할 수 있게 하였다. 유산균으로 발효시킨 식품들은 장내 정상 세균총의 유지, 부패세균에 의해서 발생된 독성물질 분해, 항암작용, 유당분해, 면역증강작용 및 혈중 콜레스테롤의 저하 등의 기능을 가지고 있으며, 최근 유산균을 이용한 혼합 발효를 통해 콩의 비린 냄새를 완화시키고, 영양적 가치를 높였으며, 두유를 유산균으로 발효함으로써 β -glucosidase, 황산화 활성을 증진시킨다는 보고가 있다³⁶⁾.

이에 본 연구는 지유 추출물을 *S. thermophilus*로 발효하여 병원성과 독소생산으로 피부의 염증 유발시키는 피부 생체 균이며 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. typhimurinum*에 대한 항세균활성을 확인하였다.

*S. thermophilus*를 이용한 지유 발효물의 항세균활성을 조사한 결과, 대상균에 따라 다른 결과를 나타내어 *B. cereus* 와 *S. aureus* 등 2종에서 항세균 활성이 비교적 높게 나타났으며 발효에 따른 항세균 활성의 유의적 차이는 없었고, 농도별로 비발효물에서는 5%, 발효물에서는 10% 농도에서 항세균활성이 인정되었다. 국내산 야생차는 발효가 많이 진행될수록 녹차에 비하여 항세균활성은 점점 감소하였다는 보고³⁷⁾와 일치하였다.

지유 추출물을 80℃, 100℃ 및 120℃에서 각각 30분간 열처리한 후 생육저해환을 측정한 결과, 열처리한 후 항세균 활성이 거의 변화가 없는 것으로 관찰되어 항세균활성을 나타내는 주요물질이 열에 안정한 것으로 생각된다.

식물에 존재하는 폴리페놀 화합물이나 플라보이드는 천연 항산화제로 작용하며, 폴리페놀 화합물은 hydroxy radical 및 superoxide radical 소거능과, 플라보노이드는 alkylperoxyl 라디칼 소거능과 연관이 있다³⁸⁾. 식물 중에 함유된 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 항산화 활성과 유의적인 상관관계가 있어 항산화 활성을 측정하는데 중요한 척도로 사용된다³⁹⁾.

*S. thermophilus*를 이용한 지유 발효물의 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량을 조사한 결과 총 플라보노이드 함량은 발효에 관계없이 65 mg/g 이상의 총 플라보노이드 함량이 있는 것을 관찰할 수 있었으나, 총 폴리페놀 함량에서는 비발효물 보다 발효물에서 약 22 mg/g 으로 총 폴리페놀 함량이 유의성 있게 증가하는 결과로 보아 발효처리에 의해 총 페놀성 성분이 고분자 화합물로부터 유리되어 추출이 용이해지고 구조적인 전환이 일어났을 것으로 판단된다. 특이한 것은 본 실험의 결과에서 플라보노이드보다 폴리페놀의 함량이 더 높게 관찰된 점이다. 이는 울금의 경우 Park 등⁴⁰⁾이 보고한 페놀화합물은 약 36.8 mg/g, 플라보노이드는 약 12.2 mg/g으로 높게 측정되는 것으로 보아 추출방법 또는 조건에 따라 함량차이가 크게 나는 것을 확인할 수 있어 본 실험결과와의 차이 이유인 것으로 판단된다. 또한 총 폴리페놀과 총 플라보노이드와의 상관관계가 없었으며, 추후 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

전자공여능을 조사한 결과, 대표적인 항산화제인 Vitamin C와 비교할 때 발효여부에 관계없이 90% 이상의 높은 활성

을 나타냈으며, Rhim⁴¹⁾은 지유의 에탄올 추출물에 대한 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 1 mg/mL 농도에서는 90% 이상의 높은 전자공여능을 나타낸다고 한 보고와 비교하여, 본 연구결과와 유사한 패턴의 결과를 확인 할 수 있었다.

SOD 유사활성을 조사한 결과에서는 발효여부에 관계없이 약 15% 이상의 활성을 나타내었다. 전자공여능과 SOD 유사 활성 모두 발효에 의한 유의적 변화는 없었다.

아질산염 소거능을 조사한 결과 발효여부와 관계없이 pH 2.5 및 4.2에서 합성산화제인 대조구 (BHT) 보다 높았고, 비발효물 보다 발효물에서 근소한 차이로 아질산염 소거능이 약간 높았다. 또한 pH 4.2에서보다 pH 2.5에서는 70% 이상으로 훨씬 높게 나타났으므로 지유 추출물은 생체 내에서도 효과적인 것으로 예상되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 지유 추출물을 *S. thermophilus*을 이용하여 발효시킨 경우 항세균활성은 *B. cereus* 와 *S. aureus*에서 항균활성이 비교적 높게 나타났으나, 발효에 따른 항균활성의 크게 차이를 보이지 않은 결과로, 추후 다른 균주를 이용하여 발효에 대한 지속적인 연구가 더 필요한 것으로 판단된다. 또한 총 폴리페놀 함량과 아질산염 활성이 비발효물보다 발효물에서 항산화성이 높은 함량과 활성을 보여 따라서 천연 폴리페놀 항산화제를 많이 포함한 기능성 소재 및 아질산염 소거작용이 우수한 지유 발효물을 아질산염 및 아민이 함유되어 있는 식품과 함께 섭취 및 가공한다면 nitrosamine 의 생성을 효과적으로 억제함과 동시에 높은 산화방지 효과 및 이용가치가 높을 것으로 판단된다.

결론

천연식품보존제 및 항산화제 개발의 기초자료를 확보하고자 *S. thermophilus*를 이용한 지유 발효물에서 항균 및 항산화활성을 관찰한 바 다음과 같은 결과를 나타내었다.

1. 지유 발효물의 *B. cereus* 와 *S. aureus*에서 대해 항세균활성이 있는 것으로 나타났으나 발효유무에 따른 항세균활성에 유의한 차이는 없었다.
2. 지유 발효물의 총 폴리페놀 함량은 비발효물 보다 발효물에서 유의하게 증가하였고, 전자공여능과 SOD 유사 활성은 발효 전 후 비슷하였다. 또한 아질산염 소거능은 pH 4.5에서 보다 pH 2.5에서 높았고, pH 2.5에서는 지유 발효물은 대조구인 BHT보다 발효물에서 70% 이상 유의한 활성을 나타내었다.

이상의 결과에서, *S. thermophilus*에 의한 지유 발효물은 총 폴리페놀이 높았고 아질산염 소거능은 대조구인 BHT 보다 높아 항산화 작용이 있음을 확인하였다.

References

1. Compilation Committee of Korea Herbology. Herbology.

- Seoul : Younglimsa, 2007 : 434-5.
2. Pratt DE. Natural antioxidants from plant materials. In Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health (II). Huang MT, Hl ST, Lee CY, eds. Washington DC : Am Chem Soc, 1992 : 54-60.
 3. Hatano T. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species tannins and related polyphenols. *Nat Med*, 1995 ; 49 : 357-63.
 4. Shin DH. The Study course and movement of natural antioxidants. *Kor Food Sci Tech*, 1997 ; 30 : 14-8.
 5. Akaike T, Ijiri S, Sato J, Katsiki T, Maeda H. Determination of peroxy radical scavenging activity in food by using bactericidal action of alkyl peroxy radical. *J Agric Food Chem*, 1995 ; 43 : 1864-70.
 6. Namiki MO. Antioxidants and antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci*, 1990 ; 29 : 273-300.
 7. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983 ; 90 : 7915-22.
 8. Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant activity of rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in water emulsion. *J Agric Food Chem*, 1996 ; 44 : 131-5.
 9. Giese J. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technol*, 1996 ; 50 : 73-80.
 10. Rice-Evans CA, Miller HJ, Oaganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, 1996 ; 20 : 933-56.
 11. Azuma K, Nakayama M, Koshika M, Lpoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Ito H, Higashio H. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric Food Chem*, 1999 ; 47 : 3963-6.
 12. Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Oearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr*, 2000 ; 72 : 30-5.
 13. Wursch P. Influence of tannin-rich carob pod fiber on the cholesterol metabolism in the rat. *J Nutr*, 1979 ; 109 : 685-92.
 14. Yoon SO, Yoo SJ, Oh S. A Study on the phamacological and nutritional values of needles of *Pinus densiflora* S. *Res Bull Exp For*, 1997 ; 5 : 63-81.
 15. Simic MG. Mechanisms of inhibition of free radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, 1988 ; 202 : 386-99.
 16. Lin MY, Yen CL. Inhibition of lipid peroxidation by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum*. *J Agric Food Chem*, 1999 ; 47 : 3661-4.
 17. Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, Sawada H. Antioxidative effects of lactic and bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J Agric Food Chem*, 2003 ; 51 : 4456-60.
 18. Davidson PM, Post LS. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In Antimicrobials in foods. In Branen AL, Davidson PM(eds.). New York : Marcel Dekken Inc, 1983 : 371.
 19. Lewis RJ. There regulatory status their use by the food industry. In Food additives handbook. In Robert WD(ed.). New York : Nostrand Reinhold, 1989 : 3-27.
 20. 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 ; 39 : 799-804.
 21. Cherry JP. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. *food Technol*, 1999 ; 53 : 54-9.
 22. Nam SH, Kang MY. Screening of antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol*, 2000 ; 43 : 141-7.
 23. Ryu JH, Park YJ, Kim HS. Antibacterial Activity of Fermented Korean Medicine Against Multi-drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Korean Soc Biotechnol Bioengineering J*, 2011 ; 26 : 543-51.
 24. An BJ, Lee SA, Son JH, Kwak JH, Park JM, Lee JY. Cytotoxic and antibacterial activities of *Sanguisorbae officinalis* L. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2004 ; 47 : 141-5.
 25. Kim TG, Kang SY, Jung KK, Kang JH, Lee E, Han HM, Kim SH. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. *Phytother Res*, 2001 ; 15 : 718-20.
 26. Jeong CS, Suh IO, Hyun JE, Lee EB. Screening of hepatoprotective activity of medicinal plant extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Nat Prod Sci*, 2003 ; 9 : 87-90.
 27. Nguyen TT, Cho SO, Ban JY, Kim JY, Ju HS, Koh SB, Song KS, Seong YH. Neuroprotective effect of *Sanguisorbae radix* against oxidative stress-induced brain damage: *in vitro* and *in vivo*. *Biol Pharm Bull*, 2008 ; 31 : 2028-35.
 28. An RB, Tian YH, Oh H, Kim YC. *In vitro* free radical scavenging and hepatoprotective compound from *Sanguisorbae radix*. *Nat Prod Sci*, 2005 ; 11 : 119-22.
 29. An BJ, Lee JT, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Son JH. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorbae*

- officinalis L. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2004 ; 47 : 244-50.
30. Swain T, Hillis WE, Ortega M. Phenolic constituents of *Ptunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents, Sci Food Agric, 1959 ; 10 : 83-8.
 31. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem, 1974 ; 47 : 468-74.
 32. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 1958 ; 181 : 1199.
 33. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol, 2000 ; 71 : 109-14.
 34. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines. Agric Biol Chem, 1987 ; 51 : 1333-8.
 35. Technology Trends Survey Report, Environment/energy sector. The 4th technology of food fermentation, Korean Intellectual Property Office, 2001.
 36. Wang YC, Yu RC, Chou CC. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol, 2006 ; 23 : 128-35.
 37. 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.
 38. Jeon YH, Kim MH, Kim MR. Antioxidative and antimutagenic activity of ethanol extracts from *Cuscutae semen*. Korean J Food Cookery Sci, 2008 ; 24 : 46-51.
 39. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. Korean J Food Sci Technol, 2004 ; 36 : 333-8.
 40. Park J, Lee J, Jun W. Radical scavenging and anti-obesity effects of various extracts from turmeric (*Curcuma longa* L.). J Korean Soc Food Sci Nutr, 2013 ; 42 : 1908-14.
 41. Rhim TJ. *In vitro* Antioxidant Activity of *Sanguisorbæ Radix* Ethanol Extracts. Korean J Plant Resour, 2013 ; 26 : 149-58.