

제주도 자생식물 추출물의 유산균에 대한 생육과 항산화 활성 및 어류 병원성 미생물에 대한 항균활성

문영건 · 최광식 · 이경준 · 김기영 · 허문수*
제주대학교 해양과학대학 해양과학부

Lactic Acid Bacterias Growth, Antioxidant Activities and Antimicrobial Activity on Fish Pathogenic Bacteria by Native Plant Extracts, Jeju Island. Moon, Young Gun, Kwang-Sik Choi, Kyeong-Jun Lee, Ki-Young Kim, and Moon-Soo, Heo*. Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea – In this study was investigated the growth effect of native plant (*Microlepidia marginata*(panzer Christ., *Prunella vulgaris. aleutica* Fernald, *Perillafrutescens* var. *japonica* Hara., *Gleichenia japonica* Spreng) extracts on various lactic acid bacterias, electron donating ability, total cell count and hydroxyl radical scavenging activity. The total cell count of *Enterococcus faecium* KCCM 12118, *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32826, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11542, *Pediococcus pentosaceus* KCCM 40464 in the absence of native plant extracts (10%) at 37°C after 48hr were 2.2×10^9 cfu/ml, 2.1×10^9 cfu/ml, 2.3×10^9 cfu/ml, 2.2×10^9 cfu/ml. On the other hand, the total cell count of *E. faecium* KCCM 12118, *L. rhamnosus* KCCM 32826, *L. plantarum* KCCM 11542, *P. pentosaceus* KCCM 40464 in the presence of native plant extracts (10%) at 37°C after 48hr were 4.3×10^9 cfu/ml, 4.3×10^9 cfu/ml, 4.8×10^9 cfu/ml, 3.9×10^9 cfu/ml. The electron donating ability indicated to *E. faecium* KCCM 12118, *L. rhamnosus* KCCM 32826, *L. plantarum* KCCM 11542, *P. pentosaceus* KCCM 40464 added by 10% native plant extracts, respectively. when 10% native plant extracts were added lactic acid bacterias, the electron donating ability is the highest. Hydroxyl radical scavenging activity of *E. faecium* KCCM 12118, *L. rhamnosus* KCCM 32826, *L. plantarum* KCCM 11542, *P. pentosaceus* KCCM 40464 showed higher than that of control.

Key words: Lactic acid bacteria, native plant extracts, electron donating ability, hydroxyl radical scavenging activity

서 론

최근 들어 천연물을 중심으로 한 학문이 발전을 하면서 자생식물에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 육상 식물 자원을 활용하는 방법은 크게 두 가지로 나누어 생각해 볼 수 있다. 하나는, 식물이 함유하고 있는 탄수화물, 지방유, 셀룰로오스 등과 같은 양적으로 대량생산되는 1차 대사산물을 식품, 종이, 식량 등으로 이용하는 것과 다른 하나는 식물의 2차 대사산물을 활용하는 것이다. 이러한 2차 대사산물은 식물 중에 따라 함유량이 다르겠지만 1차 대사산물에 비하여 매우 적은 양만이 식물에 함유되어 있다. 특히 물질에 따라 특정 식물에만 국한되어 존재하는 것도 식물이 가지는 2차 대사산물의 특징이다. 이렇듯 자생식물이 가지고 있는 다양한 생리활성 효능을 나타내는 천연 물질에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 효능 중에서도 항균효능에 대한 연구는 식품, 의약품, 화장품, 양식업, 축산업 등 관련분야에서 적용이 되고 있는데 이는

생리활성 물질을 생산하는 공장이라고 불려질 만큼 다양한 물질을 생산해내고 특히 자기방어 기작과 관련한 대사 물질의 천연 항균에 잠재력이 있다는 연구에 기초하고 있다고 생각되어진다[1]. 식품분야에서 식물의 항균효능에 관한 연구는 인체 안전성의 문제점이 제기된 sorbate, benzoate, propionate 등과 같은 기존 화학합성 보존제를 대체할 수 있는 천연방부제, 천연보존제의 개발이 주로 진행되어오고 있다[2]. 그리고 식물의 2차 대사산물의 다양한 생리활성 효능 중에서 항산화 효과를 들 수가 있다. 생물은 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 이런 균형상태가 무너지면 산화촉진 방향으로 균형이 기울어져 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포손상이나 병리적 질환을 일으키게 된다[9, 10]. 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡을 하는 대부분의 생물에서 필수적으로 생성되는 부산물이다[13, 21, 22]. ROS에서 유래되는 산소 라디칼은 자유라디칼 중에서 가장 많은 부분을 차지하며, 비공유 전자를 갖고 있기 때문에 불안정하고 반응력이 높아 생체물질과 쉽게 반응하게 되고, 끊임없이

*Corresponding author
Tel: 064-754-3473, Fax: 064-756-3493
E-mail: msheo@cheju.ac.kr

체내 고분자를 공격하여 결국은 세포와 조직에 비가역적인 손상을 초래하거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하여 생체나 식품에 문제가 되고 있다[11, 16]. 이를 방지하기 위해 수많은 합성 또는 천연 항산화 물질이 개발되어 왔으나, 그 효과와 경제성 및 안전성 때문에 실제로 많이 사용되고 있는 것은 합성 항산화제인 BHA(Butylated Hydroxy Anisole), BHT(Butylated Hydroxy Toluene)이며, 천연 항산화제로는 tocopherol 정도이다. 그러나 합성 항산화제인 BHA, BHT를 실험동물에 고농도로 투여할 경우에는 간 비대증이 유발되거나 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 BHT는 여러 연구 결과를 통하여 실험동물의 간에서 microsomal enzyme activity를 증가 시킨다는 것이 알려지면서, 이들 폐놀계 합성항산화제의 안전성에 대하여 논란이 제기되어 현재에는 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다[4, 7, 11]. 따라서 천연으로부터 얻은 항산화제를 인공합성물에 대체하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 현재 천연물 중 가장 많이 사용되고 있는 것이 tocopherol이나 식물성 기름에 효과가 낮고 가격이 고가인 결점이 있다[5, 6, 19]. 따라서 인체에 무해하고 항산화력이 우수한 천연 항산화제에 관한 연구가 오래전부터 진행되어 왔으며, 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물 유래이다. 대부분의 식물들의 항산화능 물질들은 phenolic 및 flavonoid 계통의 화합물로 알려져 있으며, 특히 식물계내에는 대부분 phenolic 화합물로 보고되어져 있다[8]. 지구상 현화식물 250,000종중에 약 20% 정도가 각 지역의 민속약용식물로서 연구되어지고 있다[15]. 우리나라의 경우 약 4,500여종의 고등식물이 존재하고 있다고 추정되고 있으며[17], 제주도는 그 중 1870여종의 자생식물이 있다.

본 연구에서는 우리나라 식품의약품안전청에 식품원료로 사용 가능한 식물로 분류되어 있는 식물을 포함, 주변에서 흔히 자생하는 야생 잡초류의 식물 중에서도 제주도에 가장 흔하게 관찰 할 수 있는 돌잔고사리, 꿀풀, 들깨, 풀고사리를 채취하여 각 부위별로 열수 추출물을 제조하여 추출물의 probiotic bacteria에 생육에 미치는 영향과 추출물 첨가에 따라 분비하는 2차 대사산물에 항산화 효과 및 어류질병 미생물에 대한 항균 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용시료

본 실험의 공시 재료로 사용된 식물은 Table 1과 같이 제주도 서부지역과 동부지역의 목초지 및 농지 주변 길가에서 흔히 자라는 식물을 위주로 2005년 8월부터 10월에 채집하였으며, 식물분류는 한국식물도감[18]과 한국의 자원식물 I [14] 그리고 제주식물도감 인터넷 사이트(<http://www.nfc.co.kr>)를 참고 하였다.

사용균주

본 연구에 사용된 균주는 한국중균협회(KCCM, Korean Culture Center of Microorganism)에서 *Enterococcus faecium* KCCM 12118, *Lactobacillus rhamnosus* KCCM 32826, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11542, *Pediococcus pentosaceus* KCCM 40464를 분양받아 MRS agar(Difco, USA)에서 stab culture 하여 4°C에서 보관하면서 3주마다 계 대하여 실험에 사용하였다.

시료 추출방법

생체로 채집된 식물은 물을 이용하여 흡과 같은 이물질은 제거한 후 비람이 통하는 음지에서 3일 이상 건조하여 수분을 충분히 제거하였다. 음건된 식물체는 각 부위별로 자른 다음 mixer를 이용하여 미세하게 마쇄하여 실험에 사용하였다.

중류수 400 ml 당 10 g의 식물시료를 혼합하여 100°C 수 욕상에서 약 30분간 증탕한 다음 Whatman No.2 여과지를 사용하여 1차 여과과정을 거친 후 pore size 0.45 µm syringe용 멸균 필터를 사용하여 무균적으로 식물 열수 추출액을 조제 하여 갈색 병에 보관하면서 유산균 생육 및 항균 항산화 효과 측정에 사용하였으며, 추출된 시료 보관은 4°C에서 보관 하면서 사용하였다.

Lactic acid bacteria 생육조건

MRS broth(Difco, USA)에서 *L. plantarum*은 3.0×10^8 cfu/ml, *L. rhamnosus*, *E. faecium* 그리고 *P. pentosaceus*는 2.9×10^8 cfu/ml 농도로 접종하여 37°C에서 48시간 정치배양 하면서 배양시간에 따른 생균수를 측정하기 위해 12시간 별로 흡광도 및 pH 측정하였다. pH 측정은 pH meter (SevenMulti, Swiss)를 이용하여 조사하였고, 생균수는 MRS broth에서 배

Table 1. List of native plants tested in this work.

Family	Scientific name	Korean name	Part used by
Dennstaedtiaceae	<i>Microlepia marginata</i> (panzer) Christ.	돌잔고사리	Leaf
Labiatae	<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>aleutica</i> Fernald	꿀풀	Leaf
Labiatae	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i> Hara.	들깨	Leaf, Fruit
Gleicheniaceae	<i>Gleichenia japonica</i> Spreng	풀고사리	Leaf

양하는 동안 12시간마다 UV/VIS spectrophotometer (Hanson OPRON-3000, Korea)를 사용하여 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 생육을 조사하였다.

자생식물 추출물 첨가에 따른 lactic acid bacteria 생육 조건

본 연구에서 사용된 4종의 균주를 MRS broth에 5%씩 접종하고 난 후 각각의 자생식물 열수 추출물을 배양액에 0%, 5%, 10%, 15%, 20%씩 첨가하여 37°C에서 48시간 정치배양하면서 생육시간에 따른 각각의 lactic acid bacteria에 생균수를 조사하기 위하여 배양기간 동안 12시간 마다 배양액의 pH 및 glucose 함량을 1% 높은 BCP plate count agar (Eiken chemical, Japan)를 사용하여 생성된 colony를 계측하여 생균수 변화를 측정하였다.

또한 각 농도별로 12시간마다 배양액을 취하여 4000 ×g로 원심 분리하여 상등액만을 모아 항균 실험 및 항산화능 실험에 사용하였다.

항균실험 균주

본 실험에 사용된 균주는 어류 질병 미생물로서 한국유전은행인 KCTC(Korean Collection For Type Culture)에서 그람음성균 12종과 그람양성균 1종을 분양받아 실험에 사용하였다.

항균활성 측정

어류 질병 미생물에 대한 항균활성 측정은 Murry [20] 등의 방법을 응용하여 측정하였다. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *E. faecium* 그리고 *P. pentosaceus*가 접종되어진 배양액에 각 자생식물 열수 추출액을 10% 첨가하여 48시간 동안 배양한 배양액을 5000 ×g로 원심 분리하여 상등액만을 모아 항균 활성 측정 시료로 이용하였다. 먼저 전 배양된 공시균을 Muller Hinton broth (Difco, USA)에 12시간 정도 배양하여 배양액의 탁도를 MacFarland turbidity No. 0.5가 되도록 조절한 후 멸균된 면봉을 사용하여 Muller Hinton agar (Difco, USA)에 회전하면서 배지 전면에 균액을 골고루 도말하였다. 항균측정용 시료액은 8 mm paper disc (ADVANTEC, Japan)에 50 μl를 흡수 건조시켜 배지위에 부착시켜서 각 공시균의 최적온도에서 24시간 배양 후 생성된 억제환(직경 mm)을 측정하여 항균 효과를 확인하였다.

DPPH radical 소거활성 측정

전자공여능은 4.0×10⁻⁴ M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 2ml와 자생식물 열수 추출물을 농도별로 첨가하여 48시간 배양시킨 probiotic bacteria 배양액을 1 ml씩 혼합한 후, UV/VIS spectrophotometer(Hanson OPRON-3000, Korea)로 518 nm에서 흡광도를 측정하였다[3]. 대조구로는 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxytoluene)와 BHT(butylated

hydroxytoluene)를 0.05% (w/v)의 농도로 제조한 후 제조된 DPPH용액 2 ml와 대조구액 1 ml를 혼합한 것과 자생식물 열수 추출물을 농도별로 첨가하여 배양시킨 lactic acid bacteria 배양액을 시험구와 같은 농도로 희석액을 제조한 후 제조된 DPPH용액 2ml와 대조구액 1 ml씩을 혼합한 후 30분간 상온에서 반응시킨 후 흡광도를 측정 하였다.

전자 공여능(Electron donating ability, EDA(%))은 자생식물 열수 추출물을 농도별로 첨가하여 배양시킨 lactic acid bacteria 배양액과 control의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1 - \text{자생식물 열수 추출물을 농도별로 첨가하여 배양시킨 lactic acid bacteria 배양액 흡광도} / \text{control의 흡광도}) \times 100$$

Hydroxyl radical 소거활성 측정

농도별로 희석된 자생식물 열수 추출물을 농도별로 첨가하여 48시간 배양시킨 lactic acid bacteria 배양액의 hydroxyl radical(OH) 소거활성능을 조사하기 위해 2-deoxyribose oxidation method 방법[12]을 변형하여 측정하였다.

시험관에 10 mM FeSO₄/EDTA 용액 0.2 ml, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 ml, 농축액 0.2 ml와 0.1 mM phosphate buffer (pH 7.4) 1 ml, 10 mM H₂O₂ 0.2 ml를 가하고 37°C에서 4시간 동안 반응 시킨 후, 2.8% TCA (trichloroacetic acid)용액 1ml를 가하여 반응을 중지 시켰다. 그 후, 1.0% TBA (thiobarbituric acid)용액 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각시켜 532 nm 에서 흡광도를 측정하였으며 시료에 대한 기준시료는 DPPH액을 가지고 측정하였다. OH 소거활성은 HSA (hydroxyl radical scavenging ability)로 표기 하였으며 다음과 같은 식으로 계산 하였다.

$$HSA(\%) = [1 - ((\text{absorbance of sample at 532 nm}) / (\text{absorbance of control at 532 nm}))] \times 100$$

결과 및 고찰

Lactic acid bacteria의 생육

Lactic acid bacteria의 생육조건 알아보기 위해 MRS broth에서 72시간 동안 배양 하면서 균수의 변화 및 pH 변화를 측정한 결과 *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* 배양액 흡광도가 48시간 배양하였을 때 가장 높은 흡광도 값을 나타내고 있으며 48시간 이후에는 흡광도 값이 감소하였다. 48시간 배양액을 glucose 함량을 1% 높은 BCP plate count agar(Eiken chemical, Japan)에 100 μl를 도말하여 colony를 계측한 결과 *L. plantarum*은 2.3×10⁹ cfu/ml, *L. rhamnosus*는 2.1×10⁹ cfu/ml 그리고 *E. faecium*, *P. pentosaceus*는 2.2×10⁹ cfu/ml로 나타났다. 또한 배양 48시간

에 각 배양액의 pH는 초기 6.5~6.7에서 pH 3.9로 변화 되었다. 결과적으로 각 균주에 따른 증식과 pH 변화가 크지 않았다.

자생식물 추출물 첨가에 따른 lactic acid bacteria의 생육 제주도 야생에서 채집한 자생식물 돌잔고사리 잎, 꿀풀 잎,

들깨 잎, 들깨 열매, 풀고사리 잎을 100°C 수용상에서 추출한 추출액을 배지에 0%, 5%, 10%, 15%, 20%씩 첨가하여 72시간동안 배양하면서 *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과를 Table 2, 3, 4, 5, 6에 나타내었다.

Table 2. Result of pH and viable cell count of selected strained in MRS broth added with *Microlepis marginata* (panzer) Christ. leaf extract.

Concentration(%)	Culture for 48 hours	<i>L.plantarum</i>	<i>L.rhamnosus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	Final pH	3.86	3.9	3.9	3.87
	Viable cell(cfu/ml)	3.1×10^9	2.9×10^9	2.1×10^9	2.9×10^9
5	Final pH	3.86	3.86	3.86	3.85
	Viable cell(cfu/ml)	3.2×10^9	3.3×10^9	3.3×10^9	3.3×10^9
10	Final pH	3.87	3.84	3.84	3.83
	Viable cell(cfu/ml)	3.7×10^9	3.9×10^9	4.1×10^9	3.6×10^9
15	Final pH	3.86	3.86	3.86	3.84
	Viable cell(cfu/ml)	3.3×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9
20	Final pH	3.82	3.85	3.85	3.84
	Viable cell(cfu/ml)	2.9×10^9	2.9×10^9	2.9×10^9	2.9×10^9

Table 3. Result of pH and viable cell count of selected lactic acid bacteria in MRS broth added with *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald leaf extract.

Concentration(%)	Culture for 48 hours	<i>L.plantarum</i>	<i>L.rhamnosus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	Final pH	3.86	3.9	3.9	3.87
	Viable cell(cfu/ml)	3.1×10^9	2.9×10^9	2.1×10^9	2.9×10^9
5	Final pH	3.85	3.85	3.85	3.82
	Viable cell(cfu/ml)	3.5×10^9	3.4×10^9	3.5×10^9	3.4×10^9
10	Final pH	3.83	3.82	3.82	3.79
	Viable cell(cfu/ml)	4.8×10^9	4.3×10^9	4.3×10^9	3.8×10^9
15	Final pH	3.84	3.84	3.84	3.81
	Viable cell(cfu/ml)	3.3×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9
20	Final pH	3.85	3.84	3.84	3.81
	Viable cell(cfu/ml)	2.9×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9

Table 4. Result of pH and viable cell count of selected lactic acid bacteria in MRS broth added with *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara leaf extract.

Concentration(%)	Culture for 48 hours	<i>L.plantarum</i>	<i>L.rhamnosus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	Final pH	3.86	3.9	3.9	3.87
	Viable cell(cfu/ml)	3.1×10^9	2.9×10^9	2.1×10^9	2.9×10^9
5	Final pH	3.9	3.9	3.89	3.84
	Viable cell(cfu/ml)	3.1×10^9	3.1×10^9	3.2×10^9	3.1×10^9
10	Final pH	3.89	3.87	3.87	3.81
	Viable cell(cfu/ml)	3.6×10^9	3.7×10^9	3.9×10^9	3.7×10^9
15	Final pH	3.88	3.88	3.88	3.82
	Viable cell(cfu/ml)	3.2×10^9	3.3×10^9	3.5×10^9	3.3×10^9
20	Final pH	3.88	3.88	3.88	3.84
	Viable cell(cfu/ml)	3.1×10^9	2.8×10^9	2.8×10^9	2.8×10^9

Table 5. Result of pH and viable cell count of selected lactic acid bacteria in MRS broth added with *Perilla frutescens var. japonica* Hara fruit extract.

Concentration(%)	Culture for 48 hours	<i>L.plantarum</i>	<i>L.rhamnosus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	Final pH	3.86	3.9	3.9	3.87
	Viable cell(cfu/ml)	3.1×10^9	2.9×10^9	2.1×10^9	2.9×10^9
5	Final pH	3.88	3.87	3.87	3.87
	Viable cell(cfu/ml)	3.3×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9	3.1×10^9
10	Final pH	3.86	3.85	3.85	3.84
	Viable cell(cfu/ml)	3.8×10^9	3.8×10^9	3.7×10^9	3.8×10^9
15	Final pH	3.85	3.86	3.86	3.86
	Viable cell(cfu/ml)	3.6×10^9	3.6×10^9	3.4×10^9	3.6×10^9
20	Final pH	3.84	3.89	3.89	3.88
	Viable cell(cfu/ml)	2.9×10^9	2.9×10^9	2.9×10^9	2.9×10^9

Table 6. Result of pH and viable cell count of selected lactic acid bacteria in MRS broth added with *Gleichenia japonica* Spreng leaf extract.

Concentration(%)	Culture for 48 hours	<i>L.plantarum</i>	<i>L.rhamnosus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. pentosaceus</i>
0	Final pH	3.86	3.9	3.9	3.87
	Viable cell(cfu/ml)	3.1×10^9	2.9×10^9	2.1×10^9	2.9×10^9
5	Final pH	3.85	3.85	3.85	3.85
	Viable cell(cfu/ml)	3.2×10^9	3.1×10^9	3.3×10^9	3.1×10^9
10	Final pH	3.83	3.83	3.83	3.83
	Viable cell(cfu/ml)	3.7×10^9	4.0×10^9	4.0×10^9	3.9×10^9
15	Final pH	3.81	3.86	3.86	3.86
	Viable cell(cfu/ml)	3.1×10^9	3.5×10^9	3.5×10^9	3.5×10^9
20	Final pH	3.79	3.88	3.88	3.88
	Viable cell(cfu/ml)	2.8×10^9	2.8×10^9	2.9×10^9	2.8×10^9

결과에서도 나타났듯이 5가지의 자생식물 추출액은 10% 농도에서 4종의 lactic acid bacteria에 생육에 가장 높은 영향을 미치는 것을 알 수가 있었다. Table 2에서 돌잔고사리 잎 추출액 같은 경우는 10% 농도를 첨가 하였을 때 *E. faecium*에 가장 높은 영향을 나타내었으며, 다음으로 *L. rhamnosus*이다.

꿀풀 잎(Table 3) 추출액 같은 경우는 10% 농도를 첨가 하였을 경우 *L. plantarum* 생육에 가장 높은 영향을 미치는 것을 알 수가 있다. 들깨 잎(Table 4) 추출액 같은 경우는 10%농도에서 *E. faecium* 생육에 영향을 주는 것으로 나타났다. 들깨 열매(Table 5) 추출액은 10% 농도에서 4종 모두에게 유사한 영향을 미쳤다. 풀고사리 잎(Table 6) 추출액 같은 경우는 10% 농도를 첨가 하였을 경우 *E. faecium*, *L. rhamnosus* 생육에 가장 높은 영향을 주고 있다는 것을 알 수가 있었다.

이상의 결과로 보았을 때 lactic acid bacteria만을 배양 하였을 때나 자생식물 추출액을 농도별로 첨가하여 배양하였을 때 모두 48시간이 최적 배양시간임을 확인할 수가 있었다. 또한 MRS broth 배지에서 lactic acid bacteria만을 배양하였을

때 보다 자생식물 추출물을 첨가하여 배양하였을 때 균수가 증가하는 결과를 볼 수 있었으며 pH는 약간 낮아졌다.

항균활성 측정

어류 병원성 미생물인 그람 양성균 1종과 그람 음성균 12종에 대하여 항균활성을 측정 하였다(Table 7). 그 결과를 살펴보면 꿀풀 잎 추출물을 10% 첨가한 시료에서 모든 항균 실험 균주에 대하여 강한 항균 활성을 나타내고 있다. 그 다음으로 강한 항균활성을 나타낸 시료는 풀고사리 잎 과 돌잔고사리 잎 추출물을 첨가한 시료이며, 들깨 잎과 열매 추출물을 첨가한 시료에서는 다른 추출액을 첨가한 시료 보다 약한 활성을 나타내었다. 특히 꿀풀 잎 추출물을 첨가한 시료에서는 식중독 원인균으로 잘 알려진 *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*에 대하여 다른 시료보다 강한 항균활성을 나타내고 있었다.

DPPH radical 소거활성 측정

채집된 자생식물 열수 추출물을 첨가하여 48시간 배양한 lactic acid bacteria 배양액의 항산화능을 DPPH에 대한 전

자공여능(electron donating ability, EDA(%))으로 측정 하였다. 일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서도 DPPH radical 소

거 활성법은 비교적 간단하면서 여러 개의 샘플을 동시에 측정 할 수 있는 방법으로 흔히 이용되고 있다. DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 518 nm에서 강한 흡수

Table 7. Inhibition of bacterial growth by MRS broth added with 10% native plant extracts

Sample name	Fish pathogenic bacteria (clear zone on plate(mm))												
	Gram (-)												Gram(+)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PfL ^a -A	11.0	10.5	13.4	15.8	14.0	14.4	12.0	17.5	14.2	18.2	15.5	12.2	14.0
PfL-B	9.9	10.0	12.3	14.8	12.0	14.3	12.0	16.4	13.8	16.5	14.5	12.0	12.8
PfL-C	9.8	11.0	12.5	14.4	12.2	13.8	10.9	15.8	10.6	15.8	13.6	10.5	13.4
PfL-D	10.1	10.0	12.0	13.5	11.0	11.0	10.4	15.3	12.0	15.0	13.7	10.5	12.4
ML ^b -A	15.0	14.0	14.4	15.0	13.5	15.0	17.0	16.8	17.3	17.8	17.6	16.0	15.3
ML-B	13.4	12.6	13.6	14.0	11.0	13.0	14.0	15.3	16.3	16.0	16.3	14.0	14.0
ML-C	10.1	10.1	12.3	14.0	11.0	12.0	10.4	16.3	12.2	15.9	14.0	10.3	13.4
ML-D	12.0	14.2	13.7	14.2	13.0	14.3	15.0	16.0	15.4	15.9	15.0	14.7	14.0
PvL ^c -A	15.5	15.5	15.0	16.0	16.5	17.8	18.0	18.8	18.6	19.0	18.3	17.5	15.5
PvL-B	15.0	15.0	15.0	15.3	16.0	16.9	17.0	17.5	17.8	18.2	17.0	16.0	15.0
PvL-C	14.5	15.2	14.8	15.0	14.8	16.0	17.0	16.2	16.8	18.0	17.5	16.5	15.5
PvL-D	14.0	14.3	14.0	15.5	15.3	16.0	17.0	18.0	17.7	17.6	18.0	16.8	14.6
GL ^d -A	15.0	15.0	14.4	14.0	13.0	15.0	16.0	16.0	17.0	17.5	16.8	15.0	15.0
GL-B	14.5	15.0	15.0	15.0	14.0	16.0	17.0	17.0	17.6	17.0	17.0	16.0	14.8
GL-C	15.0	15.0	15.0	15.0	14.0	16.0	16.0	17.0	17.0	17.0	16.6	15.8	13.7
GL-D	15.0	15.0	14.0	15.0	14.0	16.0	16.5	16.4	17.3	16.8	16.8	16.0	14.8
PfF ^e -A	11.0	10.0	12.0	14.0	13.0	13.6	12.0	16.8	11.0	16.0	14.0	9.8	13.0
PfF-B	12.0	10.0	12.3	14.6	13.6	14.0	13.0	16.0	11.0	16.5	14.6	9.9	13.2
PfF-C	12.0	9.9	13.0	13.0	14.0	15.0	12.1	16.4	12.0	17.0	14.6	10.0	12.8
PfF-D	10.5	10.0	12.0	14.0	13.0	13.8	12.0	16.7	11.5	15.8	15.0	10.2	13.4

1; KCTC 2473 *V. fluviai*, 2; KCTC 2711 *V. anguillarum*, 3; KCTC 2715 *V. cholerae*, 4; KCTC 2717 *V. harvey*, 5; KCTC 2726 *V. salmonicida*, 6; KCTC 2728 *V. tubiashii*, 7; KCTC 2731 *V. furnissii*, 8; KCTC 2732 *V. pelagius*, 9; KCTC 2737 *V. mimicus*, 10; KCTC 12125 *V. rotiferianus*, 11; KCTC 2471 *V. parahaemolyticus*, 12; KCTC 12267 *Edwardsiella tarda*, 13; KCTC 1916 *Staphylococcus aureus*.

^aPfL; *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. Leaf, ^bML; *Microlepis marginata* (panzer) Christ. Leaf, ^cPvL; *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald. Leaf, ^dGL; *Gleichenia japonica* Spreng. Leaf, PfF; *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. Fruit.

A; KCCM 11542 *L. plantarum*, B; KCCM 32826 *L. rhamnosus*, C; KCCM 12118 *E. faceium*, D; KCCM 40464 *P. pentosaceus*

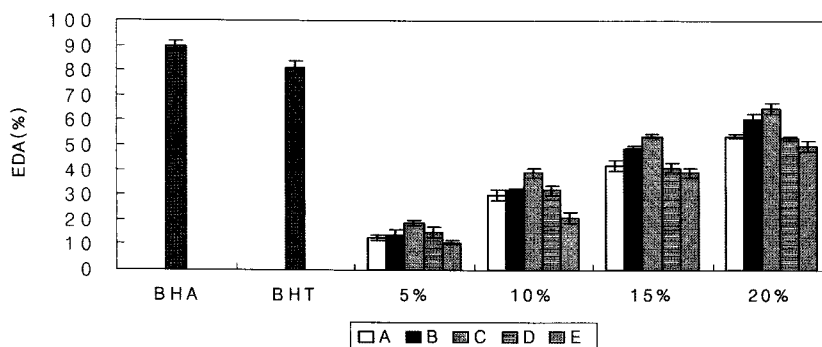


Fig. 1. Radical scavenging activity of the hot water extracts obtained native plants. The antioxidative activity was tested by DPPH method. BHA : Butylated hydroxyanisole, BHT : Butylated hydroxytoluene. A; *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. leaf, B; *Microlepis marginata* (panzer) Christ. leaf, C; *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald leaf, D; *Gleichenia japonica* Spreng leaf, E; *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. fruit.

band를 보이거나 phenolic 화합물과 같이 수소에 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다. 따라서 흡수 band도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔은 점점 없어지게 되고 흡광도도 감소하게 된다. 5종류의 자생식물 열수 추출물을 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 4종의 lactic acid bacteria 배양액에 전자공여능(EDA)을 측정하였다. 또한 자생식물 추출물 자체의 효과를 Fig. 1에 나타내어 추출물 자체의 효과인지 추출물에 의해서 lactic acid bacteria가 영향을 받아 효과를 나타내는지를 비교하였다. 자생식물 자체의 전자공여능을 측정한 결과에서는 20% 농도에서 꿀풀 잎 추출물이 가장 높은 활성(65%)을 나타내었고 돌잔고사리 잎(61%), 들깨 열매(54%), 풀고사리 잎(53%), 들깨 열매(50%) 순으로 활성을 나타내었다. 반면 자생식물 추출물을 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* 배양액에서는 자생식물 추출물 자체만을 측정한 결과보다 훨씬 높은 전자공여능을 나타내었다. 각 추출물을 5% 첨가하였을 때부터 높은 활성을 나타내기 시작하였으며 추출물을 10%를 첨가하였을 경우 가장 높은 전자공여능을 나타내었다. 그 중에서도 꿀풀 잎과 들깨 잎 추출물을 첨가하여 배양한

L. plantarum(Fig. 2), *L. rhamnosus*(Fig. 3) 배양액의 전자공여능을 합성 항산화제인 BHA와 BHT의 전자공여능과 비교하였을 때 BHA(90%)와는 유사하거나 조금 높은 활성을 BHT(81%)보다는 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다. 추출물을 첨가하여 배양한 *E. faecium*, *P. pentosaceus* 배양액에서도 *L. plantarum*, *L. rhamnosus* 배양액보다는 못하지만 식물 자체의 전자공여능 보다는 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과로 *L. plantarum*, *L. rhamnosus*에 꿀풀 잎과 들깨 잎 추출물을 첨가한 경우 다른 식물 추출물을 첨가한 경우보다 전자공여능이 높게 나타났으며 이는 식물 추출물이 lactic acid bacteria 발효에 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

Hydroxyl radical 소거활성 측정

Free radical이란 제일 바깥쪽 전자각에 짝지어지지 않은 전자(unpaired electron)를 포함하는 화학종으로 대체로 강한 반응성을 나타낸다. 이들은 탐식작용, prostaglandin 합성과 같은 생리적 과정에서 뿐만 아니라 많은 효소촉매반응의 중간물질로서 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 강한 반응성 때문에 인접한 세포성분들을 무차별 공격하여 손상을 일으킬 수 있다. Free radical 중에 생체 내에서 가장 빈번히 출현하고 따라서 중요하게 취급되는 것이 산소 radical이다. 주요 산소 radical로는 superoxide(O₂⁻), hydroxyl(OH[·]), perhydroxyl

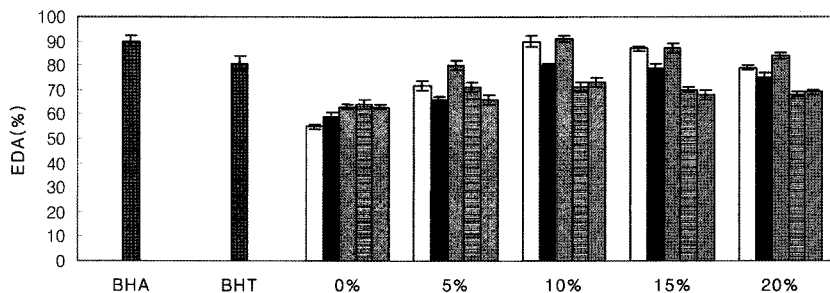


Fig. 2. Electron donating ability of *L. plantarum* in MRS broth added with native plant extracts. BHA: butylated hydroxyanisole, BHT: butylated hydroxytoluene. □: *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. leaf, ■: *Microlepis marginata* (panzer) Christ. leaf, ▨: *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald leaf, ▩: *Gleichenia japonica* Spreng leaf, ▪: *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. fruit.

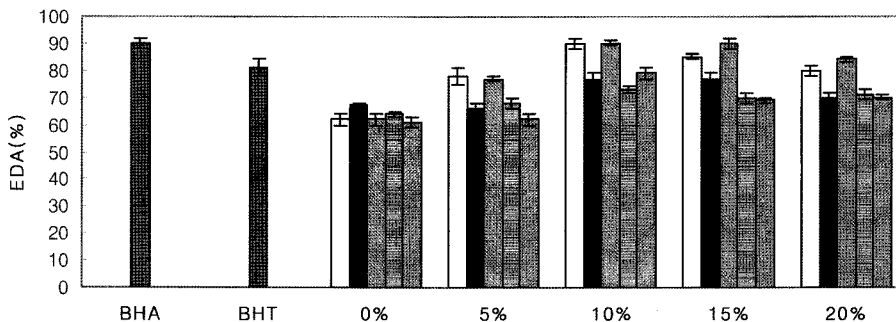


Fig. 3. Electron donating ability of *L. rhamnosus* in MRS broth added with native plant extracts. BHA: butylated hydroxyanisole, BHT: butylated hydroxytoluene. □: *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. leaf, ■: *Microlepis marginata* (panzer) Christ. leaf, ▨: *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald leaf, ▩: *Gleichenia japonica* Spreng leaf, ▪: *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. fruit.

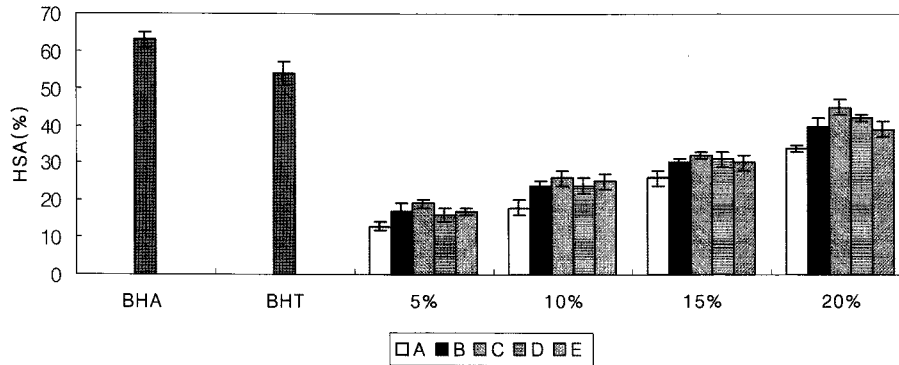


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of the hot water extracts obtained native plants. BHA : Butylated hydroxyanisole, BHT : Butylated hydroxytoluene. A; *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. leaf, B; *Microlepidia marginata* (panzer) Christ. leaf, C; *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald leaf, D; *Gleichenia japonica* Spreng leaf, E; *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. fruit.

(HO₂·), alkoxy(RO·), peroxy(ROO·) radical 등이 있다. 그 외 radical은 아니지만 반응성이 강한 산소종으로 과산화수소(H₂O₂)와 singlet oxygen이 있다. Singlet oxygen은 분자 산소와는 달이 외각의 전자 2개의 spin방향이 서로 반대로 되어 있어 불안정하다. 이상에서 열거한 여러 형태의 산소를 가리켜 흔히 reactive oxygen species(ROS, 활성 산소)라 부르는데 그 중에서도 hydroxyl radical과 singlet oxygen이 수용액 중에서 가장 강한 반응성을 나타내어 지질산화물을 개시하고 DNA에 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있고, 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소(H₂O₂)가 Fe²⁺나 Cu²⁺ 이온의 존재 하에서 생산되며 가장 독성이 강한 free radical이므로 이 라디칼을 소거하는 정도를 측정 하였다[12]. 합성 항산화제인 BHT (butylated hydroxytoluene)와 BHA(butylated hydroxyanisole)를 대조구로 사용하여 자생식물 열수 추출물의 농도별 첨가하여 48시간 배양한 Lactic acid bacteria 배양액에 대하여 hydroxyl radical scavenging activity(HSA) 측정하였다. 또한 자생식물 추출물 자체의 효과를 Fig. 4에 나타내어 추출물 자체의 효과인지 추출물에 의해서 lactic acid bacteria가 영향을 받아 효과를 나타내는지 비교하였다. 대조구로 사용

된 합성 항산화제인 BHA는 63%, BHT는 54%에 Hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다.

자생식물 열수 추출물을 농도별 첨가하여 48시간 배양한 lactic acid bacteria 배양액의 HSA 결과를 살펴보면 5% 추출물을 첨가하여 48시간 배양한 모든 lactic acid bacteria 배양액에서 BHT보다 높은 소거활성을 나타내기 시작하였으며, 자생식물 열수 추출물을 10% 첨가한 경우는 모든 lactic acid bacteria 배양액에서 BHA보다 높은 hydroxyl radical 소거 활성을 나타내었다.

E. faecium(Fig. 5) 같은 경우는 들잔 고사리 잎 추출액 10% 첨가하였을 때 다른 lactic acid bacteria에 비해 높은 HSA(68%)를 나타내었고, *L. rhamnosus*(Fig. 6)는 들깨 잎 추출액을 10% 첨가하였을 때 다른 lactic acid bacteria에 비해 높은 HSA(71%)를 나타내었다.

L. plantarum(67%~68%)과 *P. pentosaceus*(65%~68%)는 전체적으로 모든 추출액에서 유사한 HSA를 나타내었다. 이와 같은 결과로 lactic acid bacteria에 자생식물 추출물을 첨가하여 배양할 경우 자생식물 자체의 HSA보다 훨씬 높은 HSA를 나타내었다. 이는 식물 추출물이 lactic acid bacteria 발효에 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

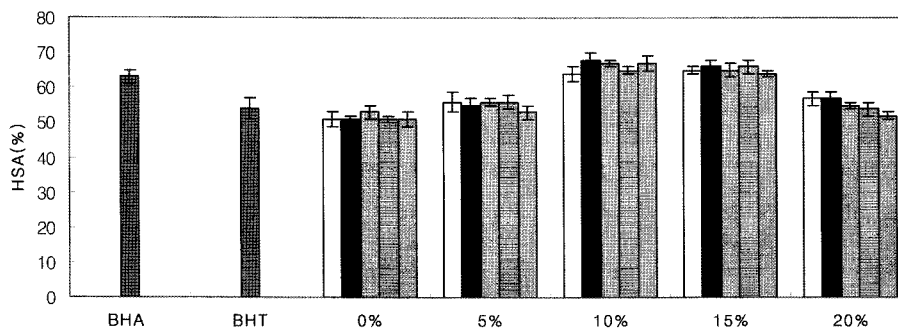


Fig. 5. Hydroxyl radical scavenging activity of *E. faecium* in MRS broth added with native plant extracts. BHA: butylated hydroxyanisole, BHT: butylated hydroxytoluene. □: *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. leaf, ■: *Microlepidia marginata* (panzer) Christ. leaf, ▨: *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald leaf, ▩: *Gleichenia japonica* Spreng leaf, ▪: *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. fruit.

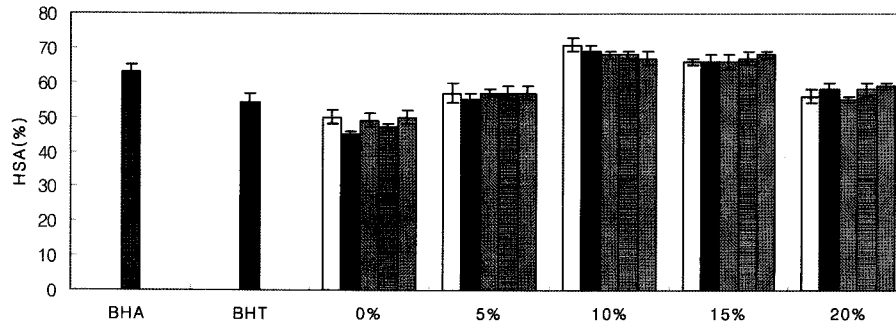


Fig. 6. Hydroxyl radical scavenging activity of *L. rhamnosus* in MRS broth added with natives plant extracts. BHA: butylated hydroxyanisole, BHT: butylated hydroxytoluene. □: *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. leaf, ■: *Microlepis marginata* (panzer) Christ. leaf, ▨: *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald leaf, ▩: *Gleichenia japonica* Spreng leaf, ▤: *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara. fruit.

요약

본 연구는 제주도 자생식물 4종(*Microlepis marginata* (panzer) Christ., *Prunella vulgaris* var. *aleutica* Fernald, *Perilla frutescens* var. *japonica* Hara., *Gleichenia japonica* Spreng)을 부위별로 나누어 각 부위를 열수 추출하여 각 추출액을 농도별로 첨가하여 *E. faecium* KCCM 12118, *L. rhamnosus* KCCM 32826, *L. plantarum* KCCM 11542, *P. pentosaceus* KCCM 40464 균종에 대한 생육조건 및 배양액을 가지고 어류 질병 미생물에 대한 항균활성 및 DPPH 라디칼 소거활성 및 Hydroxyl radical 소거활성을 조사하였다.

자생식물 추출액을 농도별로 첨가하여 4종의 lactic acid bacteria를 72시간 배양하면서 생육활성을 보았을 때 10%를 첨가하여 48시간 배양 하였을 때가 가장 좋은 생육 조건임을 알 수가 있었으며, 또한 lactic acid bacteria 생육시 자생식물 추출물 첨가가 lactic acid bacteria 증식에 효과가 있음을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성에서는 꿀풀 잎 추출물을 10% 첨가하여 배양하였을 때 합성 항산화제인 BHA(90%)와 BHT(81%)와 EDA를 비교하였을 때 BHA와 유사하거나 조금 높은 활성을 BHT보다는 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다. Hydroxyl radical 소거활성은 5% 자생식물 추출물을 첨가한 배양액에서부터 BHT보다 높은 소거활성을 나타내기 시작하여 10%를 첨가한 배양액에서는 BHA보다 높은 소거 활성을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 2006년 해양한국발전프로그램(KSGP) 연구개발사업에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Agrios, G N. 1998. In *Plants Pathology*. pp. 325-450. Academic Press. Inc., New York.
- An, B. J. 1999. The material of natural antibacterial agents for the food preservative. *Food Industry and Nutrition*. 4: 5-16.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26: 1199-1200.
- Brannen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy toluene and butylated hydroxy anisole. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52: 59-63.
- Cha, B. C., H. W. Lee, and M. Y. Choi. 1998. Antioxidative and Antimicrobial Effects of *Nut* Species. *Kor. J. Pharmacogn.* 29: 28-34.
- Cha, B. C., S. K. Lee, H. W. Lee, E. Lee, M. Y. Choi, T. J. Rhim, and H. J. Park. 1997. Antioxidative Effect of Domestic Plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 28: 15-20.
- Chan, K. M., E. A. Decker and W. J. Means. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J. Food. Sci.*, 58: 1-4.
- Choe, S. Y. and K. H. Yang. 1982. Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene(BHT) and butylated hydroxyanisole(BHA)(in Korean). *Kor. J. Food Sci, Technol.* 14: 283-288.
- Halliwell, B. and O. I. Aruoma. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. *FEMS Letters*, 281: 9-19.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1999. Free radical in biology and medicine. Third ed., Oxford University Press, New York.
- Ito, N., S. Fukushima, and A. Hasebawa. 1983. Carcinogenicity of BHA in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70: 343.
- Kawagan, S. 1996. Protocol for control of body functional material in food, pp8-15. *Kakuen press center*, Japan.
- Kim, S. J. 1994. Effect of natural antioxidants on reactive oxygen species. Ph.D. Thesis, Korea Advanced Institute of Science and Technology.
- Kim, T. J. 1996. Korean Resources Plants I., pp11-21. Seoul National University Press., Korea.
- Kumarasamy Y., P. J. Cox, M. Jaspars, L. Nahar. and S. D. Sarker. 2002. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 83: 73-77.

16. Lee, J. M. 1997. Protective effect of *Ganoderma lucidum* and *Panax ginseng*, C. A. Meyer on oxidative damage. M. S. Thesis, Seoul National University.
17. Lee, Y. C., S. W. Oh, and H. D. Hong. 2002. Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**: 700-709.
18. Lee, Y. N. 2002. *Flora of Korea*. 4th ed. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea.
19. Moon, J. O. and J. H. Park. 1997. Screening of the Hepato-protective Drugs for Folk Medicines. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**: 156-161.
20. Murray P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover. 1999, Manual of Clinical Microbiology, 7th. ed. ASM, Washington, DC.
21. Poli, G, E. Albano, and M. U. Dianzani. 1993. Free radical-From basic science to medicine. Molecular and Cell Biology Updates, Birkhauser Verlag.
22. Punchar, N. A. and F. J. Kelly. 1996. Free radicals-A Practical approach. Oxford University Press, New York.

(Received May 15, 2007/Accepted Aug. 27, 2007)