

지유 에탄올 추출물의 식품 위해성 세균에 대한 항균 활성 및 *Salmonella* serotype Typhimurium TA100에 대한 항돌연변이 활성 효과

김세령·원지혜·김미라^{1†}

경북대학교 식품영양학과, ¹경북대학교 식품영양학과 · 장수생활과학연구소

Antimicrobial Activity against Food Hazardous Microorganisms and Antimutagenicity against
Salmonella serotype Typhimurium TA100 of an Ethanol Extract
from *Sanguisorba officinalis* L.

Se Ryoung Kim · Ji Hye Won and Meera Kim^{1†}

Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, South Korea

^{1†}Dept. of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University · Center for Beautiful Aging, Daegu 702-701,
South Korea

Abstract

This study was performed to analyze the antibacterial activity against food hazardous microorganisms and antimutagenic effects of *Sanguisorba officinalis* L. ethanol extracts on *Salmonella* Typhimurium TA100. The antibacterial activity was evaluated by paper disc diffusion assay, minimum inhibition concentration (MIC), and optical density of the culture with the ethanol extract for 24 hr. Antibacterial activity was tested with seven microorganisms including *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. The paper disc diffusion assay showed distinct clear inhibition zones around the discs treated with the extract for five microorganisms, except *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157:H7. MIC values were 0.625-2.5 mg/mL for these five strains that showed clear zones. The time-kill assay was consistent with the results from the paper disc diffusion assay and MIC test. Additionally, antimutagenicity of the extract was determined using the Ames test. The ethanol extract at 5 mg/plate inhibited 72.42% and 89.85% of mutagenicity induced by 4-nitroquinoline 1-oxide and sodium azide, respectively. These results demonstrate that the ethanol extract from *S. officinalis* L. has remarkable antibacterial activity and antimutagenicity.

Key words : *Sanguisorba officinalis* L., antibacterial activity, antimutagenicity

[†]Corresponding author: Meera Kim, Department of Food Science and Nutrition,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, South Korea.
Tel : +82-53-950-6233
Fax : +82-53-950-6229
E-mail : meerak@knu.ac.kr

1. 서론

식품에 사용되는 보존료는 항균효과를 가지고 있는 물질로 가공식품의 유통기한을 연장하기 위해 사용된다. 식품의 보존료로서 sodium benzoate, sodium nitrite, butyl ρ -hydroxybenzoate 등이 널리 사용되고 있으나 합성 보존료를 다량으로 섭취하거나, 체내에 축적될 경우 피부나 눈 점막을 자극하는 등 인체 부작용이 발생할 수 있다고 보고되면서 상대적으로 인체에 안전하다고 생각되는 천연 보존료에 대한 소비자들의 요구와 선호도가 증가하고 있다(Son DH 등 2001). 따라서 국내외적으로 천연 보존료에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 마늘이나 동충하초(Kim KJ 등 2005), 쑥 및 솔잎(Park CS 등 2002), 벌꿀(Chung DH와 Beak SH 2003), 녹차(Chung SH와 Yoon KH 2008), 된장(Yi SD 등 1999), 허브 추출물(Yoo MY 등 2005), 향신료식물(Lee DJ 등 2007) 등의 추출물의 천연 항균성에 대한 연구들이 보고되었다. 단삼(Mok JS 등 1994), 환삼덩굴(Park SW 등 1994), 뽕나무 및 고삼(Han JS와 Shin DH 1994) 등의 각종 한약재(Kim JG 등 2003, Son DH 등 2001)를 대상으로 한 천연 항균물질의 탐색도 수행되었는데 이는 한약재가 인체에 대한 안전성이 기본 전제가 되어 사용되어 왔고 함유된 여러 생리활성 물질들 중 항균효과를 가진 물질도 있을 것이라고 예상되기 때문이다. 실제 이 중 일부 한약재는 항균성 물질이 분리, 동정되었는데, 단삼에서 adietane-type diterpenoid 색소계인 cryptotanshinone, dihydrot anshinone I(Han WS 2004)와, 고삼에서 flavonone 화합물의 하나인 kushenol F가 동정되었다(Ahn EY 등 1998). 한편 건강에 대한 관심이 증가하면서 항암과 관련된 항돌연변이 활성화에 대한 관심도 증가하고 있다. 암화 과정의 초기 단계에서 세포의 돌연변이가 발생하기 때문에 돌연변이를 억제할 수 있는 능력을 가진 천연물 유래 항돌연변이 물질에 대한 연구들이 수행되고 있다(Jeon YH 등 2008b, Jeon YH 등 2008c, Jeon YH 등 2009, Kim SA 등 2005, Oh SI와 Lee MS 2007).

지유(*Sanguisorba officinalis* Linne, 地榆)는 장미과(*Rosaceae*)에 속한 여러 해살이 풀인 오이풀 및 같은 속 근연식물의 뿌리를 말린 것을 이르는데, 중국과 일본 및 우리나라 전역의 산과 들에 많이 분포하고 특히 산비탈의 습기가 적당한 곳에서 많이 자란다(An BJ 등 2004a). 지유는 약간 구부러진

방추형으로 길이는 10~20 cm이고 지름이 5~20 mm이며, 차가운 성질을 갖고 있다. 또한 신맛과 쓴맛, 짠맛을 내나 무향, 무독이다(임종필 2003). 일화자(日華子)가 편찬한 '이화자제가본초'(日華子諸家本草)에 의하면 지유는 토혈(吐血), 코피, 장풍(腸風), 월경부지, 혈붕, 출산전후의 여러 혈질(血疾) 및 수사(水瀉)의 치료에 쓰인다고 되어있다. 또한 중국 송나라 때 구종석(寇宗奭)이 편찬한 의서인 '본초연의'(本草衍義)에 의하면 하초(下焦)로 들어가 열혈리(熱血痢)가 있는 경우에 쓰이며, 중국 명나라 때 가구여(賈九如)가 저술한 본초학서인 '약품화의'(藥品化義)에 의하면 여러 종류의 열독옹(熱毒癰)을 해소하는데 쓰였다고 기록되어 있다(한국생약학교수협의회 2002, 한국한의학 본초학 편찬위원회 2004). 한방에서는 주로 양혈지혈(涼血止血)의 효과와 해독렴창(解毒斂瘡)의 효과가 있어 지혈과 상처부위의 치료에 사용되어 왔다(서부일 2004).

그 동안 수행된 지유의 생리활성 연구로는 한국산 지유의 항산화 효과 및 천연소재로서의 활용방안(An BJ 등 2004a), 지유의 항암 및 항균효과(An BJ 등 2004b) 등이 있으며 성분 분석에 대한 연구로는 지유의 riterpene glycoside 분석(Mikaki Y 등 2001)과 ziyuglycoside 함량 분석(Kim HK 등 2002)이 보고된 바 있다. 그 밖에 지유로부터 분리한 다당류의 분석과 항응고 작용(Kim YS 등 1993), 지유의 항불안 활성(Lee SY &와 Chung SH 1994), 한국산 지유로부터 glucosyltransferase 및 tyrosinase inhibitor분리(An BJ 등 2003), HepG2 2.2.15 세포주를 이용한 B형 간염바이러스 증식 억제효과(Kim TG 등 1999), 흰쥐의 급성위염 및 소화성 궤양에 미치는 영향(Lee JJ 등 2005) 등에 대한 연구가 보고되고 있다. 그러나 지유의 항균 및 항돌연변이 활성화 등의 생리활성 분석에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 주요 식품위해성 세균에 대한 지유 에탄올 추출물의 항균활성 및 항돌연변이 활성을 측정하여 새로운 기능성 식품소재의 기초자료를 얻고자 하였으며, 이를 위해 paper disc diffusion assay와 최소저해농도, 생육억제도 측정을 통한 항균 활성을 측정하였고 Ames test를 이용하여 돌연변이 균주인 *Salmonella* Typhimurium TA100에 직접돌연변이원을 처리하였을 때 지유 추출물의 항돌연변이 활성을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

1) 실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 지유는 2010년 대구 약전골목 내의 약재상에서 구입하여 사용하였고, 실험에 사용된 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 sodium azide, 4-NQO, *p*-hydroxybenzoic acid는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 고체배지는 nutrient agar(Acumedica, USA)를 이용하였고, 액체배지는 nutrient broth(Acumedica, USA)와 tryptic soy broth(Acumedica, USA)를 사용하였다.

2) 사용 균주 및 배지

항균실험에 사용된 균주는 그람 음성균인 *Escherichia coli* (KTCT 1682)와 *Escherichia coli* O157:H7(ATCC 43894), *Pseudomonas aeruginosa*(KTCT 1750), *Salmonella* Typhimurium (KTCT 2515) 및 그람 양성균인 *Listeria monocytogenes*(KTCT 3569)와 *Bacillus cereus*(KTCT 1012), *Staphylococcus aureus* (KTCT 1916)를 사용하였다. *P. aeruginosa*는 기회성 감염균 이기는 하나 육류 및 유제품의 오염과 관련된 연구에서 이를 포함시켜 실험하는 경우가 많으므로(Kim TY 등 2010, Lee KT 등 2007, Park YO와 Kim HS 2010) 본 연구에서도 이 균주를 포함하여 실험하였다. 균주는 한국생물자원센터에서 분양받아 계대배양하여 사용하였다. *Salmonella* Typhimurium TA100(KTCT 2054)은 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 배양하여 활성화시킨 후 유전형질을 확인하고 항돌연변이 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 지유 에탄올 추출물 제조

지유 에탄올 추출물은 Jeon 등(2008a)의 방법을 이용하여 추출하였다. 시료 100 g을 파쇄하고 70% 에탄올 추출물이 총 2 L가 되도록 가하여 항온수조(25℃)에서 12시간 추출하였다. 이를 여과지(Advantec, Toyo No.2)를 통해 여과하는 과정을 2회 반복하였다. 여과액은 회전감압농축기(EYELA, Rikakiki, Co., Japan)로 농축한 후, 동결건조하여 항균 및 항

돌연변이 활성 측정실험에 사용하였다.

2) 항균 활성 분석

(1) Paper disc diffusion assay

Tryptic soy broth(TSB)를 이용해 균을 37℃에서 12시간 배양하여 활성화시켜 배양액의 균수가 1×10^8 /mL이 되도록 희석한 뒤, 100 μ L를 취해 nutrient agar(NA)로 만든 평판배지에 도말하고 4℃에서 2시간 동안 방치하였다. 고착된 균 위에 멸균된 paper disc(Advantec 6 mm, Japan)를 올리고 syringe filter(0.2 μ m pore size, Advantec, Japan)를 이용하여 제균한 시료를 농도별로 20 μ L씩 각 paper disc에 분주하였다. 이를 37℃의 incubator에서 24시간 배양한 후, paper disc 주위에 생성된 clear zone의 크기를 측정하여 항균활성을 측정하였다. 대조균으로 동일한 농도의 *p*-hydroxybenzoic acid를 사용하여 실험하였다.

(2) 최소저해농도(minimum inhibition concentration, MIC) 측정

Demirci F 등(2008)의 방법에 따라 micro-well dilution법으로 각 미생물에 대한 지유 에탄올 추출물의 최소저해농도를 측정하였다. TSB에 배양한 미생물 배양액의 균수가 1×10^8 /mL이 되도록 희석한 뒤, 96 well의 각 well에 희석된 배양액을 각각 100 μ L씩 분주하였다. 미생물 배양액이 들어있는 well에 시료의 최종 농도가 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312.5 ppm이 되도록 two-fold dilution을 이용해 만든 시료를 넣어 최종 부피가 200 μ L가 되도록 하였다. 분주를 완료한 96 well은 37℃에서 24시간 배양한 뒤, ELISA reader(Tecan, Switzerland)를 이용해 620 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였고, 균의 생장이 관찰되지 않은 최소 농도를 최소저해농도로 결정하였다.

(3) 생육억제도 측정

지유 에탄올 추출물이 미생물의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 spectrophotometer(DU 800, Beckman, USA)를 이용하여 24시간 동안 균의 생육변화를 관찰하였다. 멸균한 삼각플라스크에 nutrient broth와 시료를 넣어 총 부피가 50 mL가 되도록 하고, 최종 농도는 1000 ppm과 3000 ppm이

되도록 하였다. nutrient broth을 이용해 37℃에서 12시간 배양하여 활성화시킨 미생물 배양액을 각 플라스크에 100 μ L 씩 첨가하여 37℃에서 진탕배양하며 4시간마다 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 항돌연변이 활성 측정

Salmonella Typhimurium TA100(KTCT 2054) 균주를 이용하여 Ames test(Maron & Ames 1983)를 실시하였다. 균주는 정기적으로 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이와 R-factor의 유전형질을 확인하였다. 돌연변이 유발물질은 세포내 DNA 정보 발현에 직접적인 이상을 일으켜 돌연변이를 유발시키는 직접돌연변이 물질인 sodium azide와 4-NQO를 사용하였다. 시료 농도는 mutagenicity test를 실시하여 실험균주에 대한 돌연변이를 야기하지 않는 농도를 실험에 적용하였다. 시료와 돌연변이 물질은 모두 DMSO에 용해하고 syringe filter(0.2 μ m pore size, Advantec, Japan)를 이용하여 제균한 후 실험에 사용하였다. 멸균한 cap tube에 시료 50 μ L, 직접돌연변이원 50 μ L, 배양된 균 100 μ L를 첨가한 다음 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)를 첨가하여 최종부피를 700 μ L가 되도록 하였다. 항온수조에서 30분 동안 배양한 후 각각의 cap tube에 0.5 mM histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 mL씩 넣고 약 2초간 vortex한 후 minimal glucose agar plate에 증충하였다. 증충된 plate는 암실에서 1시간 동안 굳힌 후, 37℃에서 48시간 동안 배양하여 복귀돌연변이의 colony의 수를 측정하였다. 이 때 항돌연변이 활성은 아래의 식에 의해 산출되었다.

$$\text{항돌연변이 활성(\%)} = \frac{(M-S_1)}{(M-S_0)} \times 100$$

M : 돌연변이원 함유 복귀 돌연변이

S₁ : 시료 함유 복귀 돌연변이

S₀ : 자연 복귀 돌연변이

4) 통계 분석

본 연구에서 얻어진 실험결과는 SPSS ver.18을 이용하여 통계처리하였으며, 각 실험군별 유의성은 일원분산분석과 Duncan의 다중범위분석을 실시하여 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 지유 추출물의 항균 활성 분석

(1) Paper disc diffusion assay

지유 에탄올 추출물의 항균력을 확인하기 위해 몇 가지 식품위해성 세균에 대해 disc diffusion법으로 실시한 실험의 결과는 Table 1과 같다. 지유 에탄올 추출물을 1.5 mg/disc에서 4.0 mg/disc까지 처리하였을 때, 실험에 이용한 7가지 균 중에서 *E. coli*와 *E. coli* O157:H7을 제외한 나머지 5개의 균에서는 뚜렷한 clear zone을 확인할 수 있었다. 이 clear zone의 크기는 항미생물제의 농도 및 용해도, 확산 상수 및 전반적인 효능에 비례하는 것으로 보고되고 있는데(Madigan MT & Martinko JM 2006, Chu SM 2007), 본 실험에서도 항균활성을 보인 균들은 지유 에탄올 추출물의 농도가 높으면 clear zone의 크기가 증가하였다. 특히 *P. aeruginosa*에 대해서는 4.0 mg/disc 농도에서 18.48 mm의 inhibition zone이 나타나 매우 강한 항균활성을 보여주었고, *L. monocytogenes*와 *S. Typhimurium*에 대해서도 17 mm 이상의 높은 항균활성을 나타내었다. 지유의 항균력에 대한 선행연구를 보면 Ahn DJ 등(2000)은 지유가 피부질환을 일으키는 백선균인 *Trichophyton mentagrophytes*에 대해 항균력을 가지고 있다고 보고하였고, Kang SY(2005)은 지유 에탄올 추출물이 어류병원성 그람 음성균인 *Edwardsiella tarda*와 *Vibrio anguillarum*에 대해서 항균력을 나타내었다고 했으며, Seon HJ 등(1999)은 지유 essential oil이 수삼부패 원인균을 억제하는 효과를 나타내었다고 보고하였다. 또한 Cha 등(2008)은 지유 에탄올 추출물이 *P. aeruginosa*, *S. aureus*와 *Propionibacterium acnes*에 대해 항균력을 나타낸다고 하여 본 실험 결과에서 나타난 결과와 일치하였다. 따라서 이러한 선행연구 결과를 볼 때 지유는 여러 미생물에 대한 항균성을 가지고 있으며 특히 *P. aeruginosa*에 대한 큰 항균력을 가지고 있는 것이 확인되었다.

(2) 최소저해농도

주요 식품위해성 세균에 대한 지유 에탄올 추출물의 최소저해농도 측정 결과를 Table 2에 나타내었다. *B. cereus*는 지유 에탄올 추출물 0.625 mg/mL의 농도에서 미생물의 증

Table 1. Diameter of clear zone for some food hazardous microorganisms by various concentrations of *Sanguisorba officinalis* L. ethanol extract in paper disc diffusion assay

Microorganisms	Concentration (mg/disc)					
	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
<i>Bacillus cereus</i>	11,50 ¹⁾	12,40	12,53	12,70	13,65	13,45
<i>Escherichia coli</i>	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	8,15	10,10	10,70	14,65	15,68	17,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13,15	15,28	16,15	17,18	17,50	18,48
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,15	11,78	12,08	12,40	12,90	13,40
<i>Salmonella</i> Typhimurium	11,40	12,90	14,30	14,45	16,95	17,54

¹⁾ Diameter of clear zone (mm)

Data were the mean of triplicate determinations.

²⁾ Not detected

식이 일어나지 않았으며, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*와 *S. Typhimurium*은 1,25 mg/mL에서 미생물의 증식이 관찰되지 않았다. *E. coli*와 *E. coli* O157:H7에 대한 최소저해농도 실험에서는 실험한 모든 농도에서 균의 증식이 관찰되어 paper disc diffusion assay의 결과와 동일한 양상을 나타내었다. 사용된 그람 음성균과 양성균에 대한 최소저해농도의 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 그람 양성균과 그람 음성균 모두에게 작용할 수 있음을 보여주었다. Kokoska L 등 (2002)은 *B. cereus*와 *P. aeruginosa*에 대한 러시아산 지유 에탄올 추출물의 최소저해농도가 각각 6,25 mg/mL와 250 mg/mL라고 보고하여, 본 연구에서 사용된 국산 지유 에탄올 추출물이 *B. cereus*(0,625 mg/mL)와 *P. aeruginosa*(1,25 mg/mL)에 대하여 더 낮은 농도에서 항균 활성을 나타낸 것으로 보여졌다. Chu SM(2007)은 항균 활성 측정 결과 최소저해농도와 clear zone의 크기가 '부의 상관관계'를 나타낸다고 보고하였는데 본 실험에서도 최소저해농도와 disc주위 clear zone의 크기를 비교해 볼 때, *S. aureus*의 최소저해농도가 2,5 mg/mL로 가장 높게 나타났으나 clear zone은 가장 작게 나타나 이와 일치하는 결과를 보여주었다. 또한 최소저해농도가 1,25 mg/mL인 *L. monocytogenes*와 *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*의 clear zone은 17~18 mm 정도로 이들이 유사한 항균활성을 가지고 있음을 보여주었다.

그러나 최소저해농도가 0,625 mg/mL으로 가장 낮게 나타

Table 2. Minimal inhibition concentration (MIC) of *Sanguisorba officinalis* L. ethanol extract for some food hazardous microorganisms

Microorganisms	MIC (mg/mL)
Gram (+)	
<i>Bacillus cereus</i>	0,625
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5
Gram (-)	
<i>Escherichia coli</i>	ND ¹⁾
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,25
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,25

¹⁾ Not detected

난 *B. cereus*는 clear zone이 13,45 mm로 나타나 상대적으로 낮은 clear zone 값을 보였다.

(3) 생육억제도

지유 에탄올 추출물의 항균 활성 측정을 위해 spectrophotometer로 24시간 동안 균 성장정도를 측정된 결과는 Figure 1과 같다. 이 실험의 결과는 앞서 실시한 두 가지의 실험 결과와 같이 *E. coli*와 *E. coli* O157:H7에서는 지유 에탄올 추출물의 농도와 상관없이 균 증식이 관찰되었고, 그 외 5가지의 균에 대해서는 생장이 억제되었다. 또한 각 최소저해농도보다 낮은 농도의 지유 에탄올 추출물을 처리한 경우에는 균 증식이 관찰되었으나 최소저해농도보다 높은 농도로 처리한 경우에는 균 증식이 억제되어 최소저해농도 실험결과와 일치된 결과를 확인할 수 있었다. 최소저해농도 실험에서 가장 낮은 값을 나타낸 *B. cereus*의 경우 생육억제도 실험에서도 1,000 ppm과 3,000 ppm의 농도에서 균의 증식이 나타나지 않았다. 또한 *S. Typhimurium*의 경우에도 최소저해농도보다 낮은 농도인 1,000 ppm의 지유 에탄올 추출물을 처리한 실험군은 대조군과 비슷한 양상으로 균 증식이 일어났으나 3,000 ppm에서는 균의 증식이 억제되어 최소저해농도 결과와 부합하는 항균 활성을 나타내었다. *L. monocytogenes*에서도 최소저해농도보다 높은 3,000 ppm에서는 균의 증식이 관찰되지 않았다.

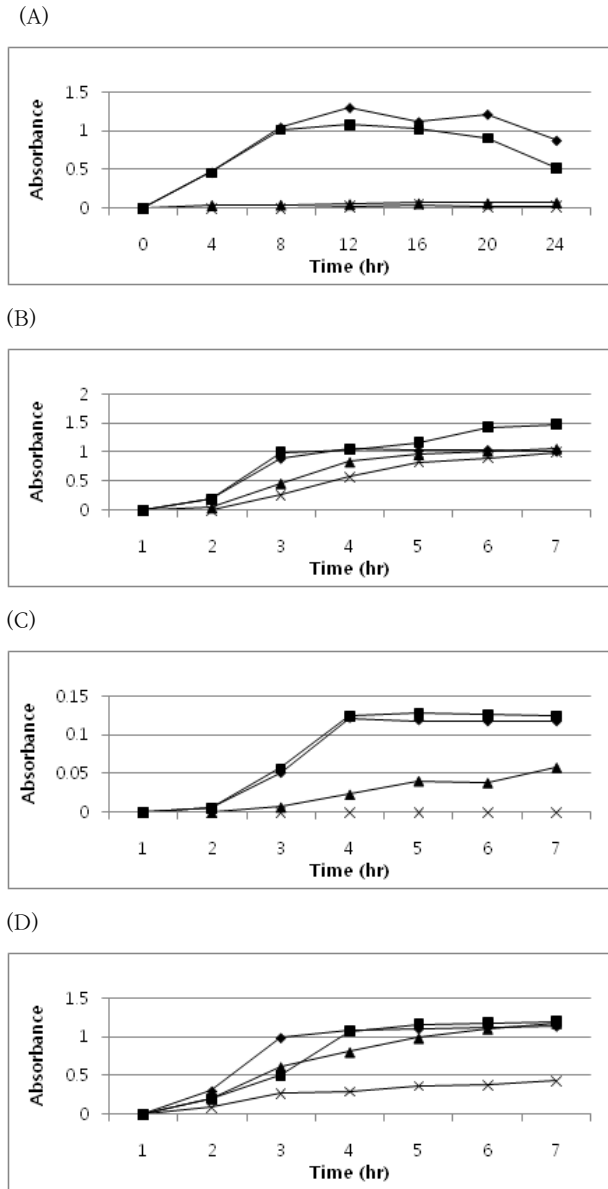


Figure 1. Growth curve of microorganisms in the medium containing *Sangisorba officinalis* L. ethanol extract

(A: *Bacillus cereus*, B: *Escherichia coli* O157:H7, C: *Listeria monocytogenes*, D: *Salmonella* Typhimurium, ◆: control, ■: 1% DMSO, ▲: 1000ppm, ×: 3000 ppm).

2) 항돌연변이 활성

지유 에탄올 추출물의 antimutagenicity를 측정하기 전 시료 자체의 돌연변이 유발성을 확인하기 위하여 mutagenicity

Table 3. The mutagenicity induced by the ethanol extract from *Sangisorba officinalis* L. and mutagens against *Salmonella* Typhimurium TA100

Treatment	Concentration	His+ (colony/plate)
Spontaneous revertants		156.0 ± 8.6 ^{1) b2)}
<i>Sangisorba officinalis</i> L.	0.5 mg/plate	139.0 ± 10.6 ^b
	1.0 mg/plate	125.7 ± 4.5 ^b
	5.0 mg/plate	141.7 ± 9.5 ^b
Sodium azide	1.5 μg/plate	1426.0 ± 204.6 ^a
4-Nitroquinoline-1-oxide	0.15 μg/plate	1372.7 ± 195.9 ^a

¹⁾ His⁺: mean ± SD of histidine positive revertant colonies on plates (n=3).

²⁾ The different superscript in the same column indicates significant difference among different samples by Duncan's multiple range test (p<0.05).

를 측정하였다. Mutagenicity test는 mutagen을 첨가하지 않고 antimutagenicity test와 동일한 실험방법으로 실시하였으며, 실험 결과 Table 3과 같이 지유 추출물 시료와 대조구의 revertants 사이에는 유의적인 차이가 나타나지 않아 본 연구에서 사용된 시료의 농도는 *Salmonella* Typhimurium TA100에 대한 mutagen으로서 작용하지 않는 것을 확인하였다. 또한 sodium azide(1.5 μg/plate)와 4-NQO(0.15 μg/plate)를 *S. Typhimurium* TA100에 처리하였을 때 자연복귀돌연변이 colony 수에 비해 복귀돌연변이의 colony 수가 유의적으로 증가한 것도 확인하여 이를 돌연변이원으로 사용하였다. 한편 지유에탄올 추출물의 *Salmonella* Typhimurium TA100에 대한 항균효과도 미리 확인할 필요가 있는데 *Salmonella* Typhimurium TA100은 histidine 요구주로서 일반적인 nutrient agar에서는 생육이 불가능하므로 앞서 실시된 항균 실험을 이용할 수 없으며 histidine이 첨가된 배지를 사용해야 한다. 따라서 histidine이 첨가된 배지에 균주인 *Salmonella* Typhimurium TA100과 시료인 지유 에탄올 추출물을 첨가하여 배양한 후 균수를 계수함으로써 균에 대한 시료의 항균력을 확인할 수 있으므로 mutagenicity test를 통해서 항균력도 확인하였다. 실험 결과 배양 후 생존한 *Salmonella* Typhimurium TA100 균수가 시료의 첨가에 의해 유의적으로

Table 4. The antimutagenic activity of the ethanol extract from *Sanguisorba officinalis* L. on the mutagenicity induced by sodium azide in *Salmonella* Typhimurium TA100

Treatment	Histidine+ ¹⁾ (colony/plate)	Inhibition (%)
Spontaneous revertants	198±2.08	
0	1278±9.71 ^(d2)	
<i>Sanguisorba officinalis</i> L. (mg/plate)	0.5	878±29.36 ^c
	1	788±12.66 ^b
	5	495±17.06 ^a

¹⁾ Data were the mean ± SD of triplicate determinations.

²⁾ The different capital letters (a~d) indicate significant differences by Duncan's multiple range test (p<0.05).

감소하지 않았으므로 사용된 지유 에탄올 추출물이 *Salmonella* Typhimurium TA100에 대한 항균력을 가지고 있지 않음을 확인할 수 있었다.

Sodium azide로 유발된 돌연변이에 대한 지유 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성은 Table 4와 같다. 지유 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 돌연변이 억제 활성도 증가하는 것으로 나타났다. 항돌연변이 실험조건이 연구마다 차이가 있어 선행연구와의 절대적인 비교는 어려우나 본 연구에서 1 mg/plate의 농도에서 지유 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성이 45.83%인 것에 비해 Lee NJ 등(2001)에 의해 보고된 수영의 메탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물의 항돌연변이 활성은 각각 38.7%, 31.4%, 36.5%, 8.4%로 보고되어 지유 에탄올 추출물의 항균 활성이 더 높은 것으로 나타났다. 또한 sodium azide로 유발된 돌연변이에 대한 오미자(Jeon YH 등 2008a), 토사자(Jeon YH 등 2008b), 산수유(Jeon YH 등 2008c), 복분자(Jeon YH 등 2009) 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성이 0.5~5 mg/plate의 농도에서 각각 25.5%, 49.2%, 45.3%, 27.2%로 보고되어, 5 mg/plate에서 72.42%의 항돌연변이 활성을 나타낸 본 연구의 지유 에탄올 추출물이 더 높은 항돌연변이 활성을 나타내었다. 또한 Kim KJ 등(2005)에 의해 보고된 미역과 김의 에탄올 추출물은 4.5 mg/plate에서 각각 3.87%, 2.38%의 항돌연변이 활성을 나타내었으나 지유 에탄올 추출물은 이보다 낮은 농도인 0.5 mg/plate에서도 37%의 항돌연변이 활성을 나타내어

Table 5. The antimutagenic activity of the ethanol extract from *Sanguisorba officinalis* L. on the mutagenicity induced by 4-NQO in *Salmonella* Typhimurium TA100

Treatment	Histidine+ ¹⁾ (colony/plate)	Inhibition (%)
Spontaneous revertants	203±11.59	
0	1471±7.02 ^(d2)	
<i>Sanguisorba officinalis</i> L. (mg/plate)	0.5	479±3.51 ^c
	1	438±10.5 ^b
	5	332±8.08 ^a

¹⁾ Data were the mean ± SD of triplicate determinations.

²⁾ The different capital letters (a~d) indicate significant differences by Duncan's multiple range test (p<0.05).

sodium azide에 의한 돌연변이에 대해 높은 항돌연변이 활성을 보여주었다.

지유 에탄올 추출물의 4-NQO에 대한 돌연변이 억제 활성 측정 결과는 Table 5와 같다. 지유 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성은 sodium azide에 대한 돌연변이 억제 활성 결과와 같이 시료의 농도가 증가할수록 증가하였다. 지유 에탄올 추출물은 1 mg/plate 농도에서 81.54%의 항돌연변이 활성을 나타내었는데, Park SW 등(1995)에 의해 보고된 환삼덩굴의 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물의 활성은 같은 농도에서 각각 69.9%, 36.3%, 3.8%, 12.7%, 5.3%로 나타나 지유 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성이 이들에 비해 높게 나타났다. 또한 0.5 mg/plate의 농도에서 지유 에탄올 추출물은 78.31%의 항돌연변이 활성을 나타낸 반면, 가시오가피 뿌리, 줄기, 잎 추출물이 각각 2.6%, 1.5%, 2.7%의 항돌연변이 활성을 나타내었다고 보고되었고 (Park JS 등 2003), 산수유(Jeon YH 등 2008c), 오미자(Jeon YH 등 2008a) 에탄올 추출물은 0.5~5 mg/plate의 농도에서 모두 지유 에탄올 추출물보다 낮은 항돌연변이 활성을 나타내어 지유 에탄올 추출물이 높은 항돌연변이 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

따라서 두 종류의 직접돌연변이원에 대한 항돌연변이 활성 결과를 종합할 때 염기쌍 치환 돌연변이주인 *S. Typhimurium* TA100에 대한 지유 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성은 우수한 것으로 나타났다. 지유의 항돌연변이 성

분에 대해서는 아직 수행된 연구가 별로 없는데 지유에 약 2.5~4.0%정도 포함되어 있는 것으로 알려져 있는 triterpenoidal saponin이 돌연변이원성 억제에 좋은 효과를 가지고 나타낸 것으로 보고되었고(임종필 2003, Ryu BH 등 1986), 대두 saponin의 돌연변이 저해 효과가 L-ascorbic acid와 α -tocopherol보다 훨씬 높다고 보고된 바 있어(Jun HS 등 1999) 지유에 함유된 여러 saponin 물질이 항돌연변이 활성에 기여했을 것으로 예상되나 후속 연구로 생리활성을 가진 물질에 대한 분석이 이루어져야 할 것이다.

IV. 요약

본 연구는 지유 에탄올 추출물의 항균 및 항돌연변이 활성을 측정하여 새로운 기능성 소재로서의 기초자료를 얻고자 실시하였다. *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*의 7가지 주요 식품위해성 세균에 대한 항균활성을 검증하기 위해 paper disc diffusion assay 및 최소저해농도를 측정하였으며 24시간 동안 균의 생육억제도를 측정하였다. Paper disc assay 결과 *E. coli*와 *E. coli* O157:H7을 제외한 5가지 균에 대한 지유 에탄올 추출물의 뚜렷한 clear zone이 확인되었다. Micro-well dilution법으로 확인한 최소저해농도의 범위는 *E. coli*와 *E. coli* O157:H7을 제외한 5가지 균에 대해서 0.625~2.5 mg/mL로 나타났으며 생육억제도 실험결과도 최소저해농도 결과와 일치하였다. *Salmonella* Typhimurium TA100을 이용한 Ames test 결과, 5 mg/plate의 농도에서 직접 돌연변이원인 sodium azide와 4-NQO에 대한 지유 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성이 각각 72.42와 89.85%로 나타나 지유 에탄올 추출물의 우수한 항돌연변이 활성을 확인하였다. 본 연구를 통해 지유 에탄올 추출물이 주요 식품위해성 세균들에 대한 우수한 항균성과 직접돌연변이원에 대한 높은 항돌연변이 활성을 나타내어 천연물 유래 생리활성 소재로 이용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

참고문헌

- 서부일. 2004. 알기 쉬운 본초학. 대구한의대학교출판부 pp 267
- 임종필. 2003. 본초생화학. 신일상사. 서울 pp 247
- 한국생약학교수협의회. 2002. 본초학. 아카데미서적. 서울 pp 488
- 한국한의과 본초학 편찬위원회. 2004. 본초학. 영림사. 서울 pp 437-438
- Ahn DJ, Kwak YS, Kim MJ, Lee JC, Shin CS Jeong KT. 2000. Screening of herbal plant extracts showing antimicrobial activity against some food spoilage and pathogenic microorganisms. Korean J Medicinal Crop Sci 8(2):109-116
- Ahn EY, Shin DH, Baek NI Oh JA. 1998. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Sophora flavescens* Ait. Korean J Food Sci Technol 30(3):672-679
- An BJ, Lee JT, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY Son JH. 2004a. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorbae officinalis* L. J Korean Soc Appl Biol Chem 47(2):244-250
- An BJ, Lee JT, Park JM, Kwak JH, Lee JY, Park CI, Son JH, Im HY. 2003. Isolation of novel glucosyltransferase and tyrosinase inhibitor from the roots of Korean *Sanguisorbae officinalis* L. Kor J Herbology 18(4):255-262
- An BJ, Lee SA, Son JH, Kwak JH, Park JM, Lee JY. 2004b. Cytotoxic and antibacterial activities of *Sanguisorbae officinalis* L. J Korean Soc Appl Biol Chem 47(1):141-145
- Cha JY, Ha SE, Sim SM, Park JK, Chung YO, Kim HJ, Park NB. 2008. Antimicrobial effects of ethanol extracts of Korean endemic herb plants. Korean J Life Sci 18(2):228-233
- Chu SM. 2007. Antioxidative and antimicrobial activities of medicinal plants collected from Nepal. M.A. Thesis. Dankook University. Korea pp 22-26
- Chung DH, Beak SH. 2003. Antibacterial activities of honeys on the *Staphylococcus aureus*. Korean J Food & Nutr 15(2):158-164
- Chung SH, Yoon KH. 2008. Antimicrobial activity of extracts and fractions of green tea used for coarse tea. J Korean Soc Food Sci Nutr 37(11):1382-1388
- Demirci F, Guven K, Demirci B, Dadandi MY, Baser KHC. 2008. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. Food Control 19(12):1159-1164
- Han JS, Shin DH. 1994. Antimicrobial effect of each solvent fraction of *Morus alba linne*, *Sophora flavescens* AITON on *Listeria*

- monocytogenes*. Korean J Food Sci Technol 26(5):539-544
- Han WS. 2004. Isolation of antimicrobial compounds from *Salvia miltiorrhiza bunge*. Korean J Medicinal Crop Sci 12(3): 179-182
- Jeon YH, Choi SW, Kim MR. 2009. Antimutagenic and cytotoxic activity of ethanol and water extracts from *Rubus coreanus*. Korean J Food Cookery Sci 25(3): 379-386
- Jeon YH, Kil JH, Lim SM, Kim MH, Kim MR. 2008a. Analysis of antioxidative activity and antimutagenic effect of ethanol extract from *Schizandra chinensis* Baillon. J East Asian Soc Dietary Life 18(5): 746-752
- Jeon YH, Kim MH, Kim MR. 2008b. Antioxidative and antimutagenic activity of ethanol extracts from *Cuscutae semen*. Korean J Food Cookery Sci 24(1): 46-51
- Jeon YH, Kim MH, Kim MR. 2008c. Antioxidative, antimutagenic, and cytotoxic activities of ethanol extracts from *Cornus officinalis*. J Korean Soc Food Sci Nutr 37(1): 1-7
- Jun HS, Sung MK. 1999. Effect of soybean saponins in aflatoxin B₁-induced mutagenicity. Korean J Nutr 32(1): 110-117
- Kang SY. 2005. The antimicrobial compound of *Rhus verniciflua* barks against fish pathogenic gram-negative bacteria, *Edwardsiella tarca* and *Vibrio anguillarum*. J Fish Pathol 18(3): 227-237
- Kim HK, Kim YA, Hwang SW, Ko BS. 2002. Quantitative analysis of ziyuglycoside I from *Sanguisorbae radix*. Kor J Pharmacogn 33(2): 100-104
- Kim JG, Kang YM, Eum GS, Ko YM, Kim TY. 2003. Antioxidative activity and antimicrobial activity of extracts from medicinal plants(Akebia quinata Decaisn, Scirusfluviatilis A, Gray, Gardenia jasminoides for. grandiflora Makino). J Agric Life Sci 37(4): 69-75
- Kim KJ, Do JR, Kim HK. 2005. Antimicrobial, antihypertensive and anticancer activities of garlic extracts. Korean J Food Sci Technol 37(2): 228-232
- Kim SA, Kim J, Woo MK, Kwak CS, Lee MS. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. J Korean Soc Food Sci Nutr 34(4): 451-459
- Kim TG, Park MS, Han HM, Kang SY, Jung KK, Rhee HM, Kim SH. 1999. Inhibitory effects of *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* on hepatitis B virus replication in HepG2 2.2.15 Cells. Yakhak Hoeji 43(4): 458-463
- Kim TY, Jeon TW, Yeo SH, Kim SB, Kim JS, Kwak JS. 2010. Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of *Jubak* extracts. Korean J. Food & Nutr 23(3): 299-305
- Kim YS, Roh JE, Ann HS. 1993. Compositional analysis of polysaccharide from *Sanguisorba officinalis* and its anticoagulant activity. Kor J Pharmacogn 24(2): 124-130
- Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. 2002. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. J Ethnopharmacology. 82(1): 51-53
- Lee DJ, Bae RN, Kim HW, Chu SM, Park SY, Lee JS. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of herbs and spices. Korean J Intl Agric 19(1): 38-42
- Lee JJ, Choi HS, Lee JH, Jung CJ, Lee MY. 2005. The effects of ethylacetate fraction of *Sanguisorba officinalis* L. on experimentally-induced acute gastritis and peptic ulcers in rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 34(10): 1545-1552
- Lee KT, Lee YK, Lee JP, Lee JW, Son SK, Choi SH, Lee SB. 2007. Determination of the prevalence of pathogenic bacteria and the changes in microbiological growth pattern of cured and short-ripened raw ham during storage. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 27(1): 127-131
- Lee NJ, Lee KH, Lee DU, Park SS, Han YH, Ryu SY. 2001. Antimutagenic activity and cytotoxicity of the whole plant of *Rumex acetosa*. Kor J Pharmacogn 32(4): 338-343
- Lee SY, Chung SH. 1994. Anxiolytic activities of *Sanguisorbae radix*. Yakhak Hoeji 38(6): 733-741
- Madigan MT, Martinko JM 2006. Brock biology of microorganisms. 12th ed. seoul. Worldscience. pp 107-114
- Maron MI, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat. Res 113: 173-215
- Mikaki Y, Fukushima M, Yokosuka A, Sashida Y, Furuya S, Sakagami H. 2001. Triterpene glycoside from the roots *Sanguisorba officinalis*. Phytochemistry 57(5): 773-779
- Mok JS, Park UY, Kim YM, Chang DS. 1994. Effects of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae radix*(*Salvia miltiorrhiza*) extract. J Korean Soc Food Nutr 23(6): 1001-1007
- Oh SI, Lee MS. 2007. Antioxidative stress and antimutagenic effects of *Lentinus edodes* ethanol extracts. Korean J Food & Nutr 20(4): 341-348
- Park CS, Choi MA, Park GS, Choi KH. 2002. Antibacterial activities

- of *Cordyceps* spp., Mugwort and Pine needle extracts. Korean J Food Preserv 9(1): 102-108
- Park JS, Ahn BY, Koh HY, Choi DS. 2003. Inhibitory effect of methanol extract of *Eutherococcus senticosus* maxim on the direct mutagen mutagenicity. Korean J Biotechnol Bioeng 18(3): 217-221
- Park SW, Kim SH, Chung SK. 1995. Antimutagenic effects and isolation of flavonoids from *Humulus japonicus* extract. Korean J Food Sci Technol 27(6): 897-901
- Park SW, Woo CJ, Chung SK, Chung KT. 1994. Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fraction from *Humulus japonicus*. Korean J Food Sci Technol 26(4): 464-470
- Park YO, Kim HS. 2010. Antimicrobial activity of bamboo (*Sasa borealis*) leaves fraction extracts against food poisoning bacteria. J Korean Soc Food Sci Nutr 39(13): 1745-1752
- Ryu BH, Lee BH, Ha MS, Kim DS, Sin DB, Nam KD. 1986. Desmutagenic effect of legumes and plants crude saponins in *Salmonella typhimurium* TA 98. Korean J. Food Sci. Technol 18(5): 345-350
- Seon HJ, Joo IS, Sung CK. 1999. A study on suppression components of spoiling Ginseng. J Ginseng Res 23(2): 67-73
- Son DH, Lee SI, Chung YG. 2001. Antioxidative of medicinal plants on pathogenic bacteria. J Korean Soc. Hygienic Sciences 7(2): 103-108
- Yi SD, Yang JS, Jeong JH, Sung CK, Oh MJ. 1999. Antimicrobial activities of Soybean paste extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 28(6): 1230-1238
- Yoo MY, Jung YJ, Yang JY. 2005. Antimicrobial activity of herb extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 34(8): 1130-1135