

만병초 추출물의 식중독 유발균에 대한 항균효과 및 항산화활성

최무영^{1*} · 임태진²

¹상지대학교 식품영양학과
²상지대학교 동물생명자원학부

Antimicrobial Effects against Food-Borne Pathogens and Antioxidant Activity of *Rhododendron brachycarpum* Extract

Moo-Young Choi^{1*} and Tae-Jin Rhim²

¹Dept. of Food and Nutrition and ²Dept. of Biotechnology in Division of Animal and Life Resources, Sangji University, Gangwon 220-702, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the antimicrobial effects against food-borne pathogens and antioxidant activity of *Rhododendron brachycarpum* ethanol-extract. The antimicrobial activity of the extract was determined using a paper disc-diffusion method, and the diameter of the clear zone was measured. The diameter of the clear zone in the presence of 10 mg of extract was maximal against *Bacillus cereus* among the three tested Gram-positive bacteria and against *Escherichia coli* O157:H7 among the five tested Gram-negative bacteria. Analysis of the minimum inhibitory concentration (MIC) showed that the extract exhibited a similar efficacy as that of sorbic acid, a well-known chemical preservative. The growth inhibitory effects of the extract at concentrations of 250, 500, 1,000, and 2,000 mg/L on food-borne pathogens were determined against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7. Growth of the microorganisms was not affected by the extract at concentrations up to 250 mg/L, but it was significantly ($p < 0.05$) inhibited by the extract at concentrations higher than 1,000 mg/L. The antioxidant effects of the extract were examined via measurement of DPPH radical scavenging activity, inhibition of reactive oxygen species (ROS) generation using fluorescent dichlorofluorescein (DCF) assay, and prevention of peroxy radical- and hydroxyl radical-induced supercoiled DNA breakage. The IC₅₀ of the extract for DPPH radical scavenging activity was about half that of α -tocopherol, which was used as a positive control. DCF fluorescence intensity decreased as the concentration of the extract increased, demonstrating that ROS generation was inhibited in a concentration-dependent manner. The ROS inhibitory effect of the extract was higher than that of ascorbic acid. The extract prevented supercoiled DNA strand breakage induced by peroxy radical and hydroxyl radical. Thus, the results of the present study demonstrate that the extract exhibits antimicrobial effects against food-borne pathogens as well as potent antioxidant capacity, suggesting that *R. brachycarpum* could be used as a natural antibacterial agent and effective antioxidant in food.

Key words: *Rhododendron brachycarpum*, antimicrobial activity, paper disc-diffusion, DPPH radical scavenging, ROS, supercoiled DNA breakage

서 론

최근 식생활의 간편화나 다양화와 더불어 단체급식이나 외식의 기회가 많아지며, 또한, 지구 온난화 현상 및 실내 온도 상승 등 환경변화로 인하여 국내·외 가공식품, 냉동 및 냉장식품과 즉석식품에서 다양한 유해 미생물에 의해 야기되는 식중독 사고는 증가하고 규모면에서도 집단화·대형화하고 있는 실정이다. 식품의 부패 및 변질은 주로 미생물 작용에 의해 일어나는데, 이를 방지하기 위해 식품보존제나 방부제 등 다양한 방법들을 사용하여 저장기간의 연장을 시

도하고 있다. 근래에는 소비자의 건강 지향적 요구가 증대되어 인공합성보존제의 기피현상이 사회전반에서 일어나고 있으며, 또 안정성이 문제시되는 인공합성보존제 대신에 천연소재로부터 얻은 천연성 성분, 즉 항균성 물질을 이용하여 식품저장 중 일어나는 식품의 변질을 방지하여 식품의 신선함과 안정성을 동시에 만족시키려는 노력이 수반되고 있다. 따라서 식용 및 약용으로 이용되고 있는 천연물을 이용하여 천연보존제 개발에 대한 많은 연구들이 활발히 진행되고 있다(1-6).

한편, 인체 내의 자유라디칼은 주로 노화와 질병의 원인으로

*Corresponding author. E-mail: mychoi@sangji.ac.kr
Phone: 82-33-730-0497, Fax: 82-33-738-7652

로 알려져 있는데, 이러한 산화적 손상으로부터 생체조직을 보호하기 위해서는 계속적인 항산화영양소나 항산화제의 섭취가 필요하다(7). 항산화제는 인체 내의 대사과정에서 발생하는 유해한 활성산소에 의한 지질의 과산화반응 등의 산화작용을 억제하여 세포막 및 적혈구 파괴를 방지하고, 발암물질의 생성을 억제하고, 세포의 노화를 억제하는 물질로써, 천연항산화제와 합성항산화제가 있다. BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene)와 같은 합성항산화제는 우수한 항산화능력을 있지만, 과량으로 섭취할 경우 암 유발 가능성 등의 안정성이 논란이 되고 있다. 따라서 천연물질로부터 안정성과 항산화력이 우수한 물질을 탐색하는 노력과 항산화제 개발을 위한 연구가 활발히 행해지고 있다(8,9).

만병초(*Rhododendron brachycarpum*)는 진달래과 식물로 별칭으로는 천상초, 딱갈나무, 풍엽 등 여러 이름으로 불리고 있다. 우리나라에는 태백산, 지리산 등 해발 700 m가 넘는 곳에서 자란다. 이 만병초는 민간에서는 위, 장의 경련에 의해 생기는 요배산통, 관절통, 월경불순, 신경통, 고혈압, 강장제, 이노제로 효과가 있다. 현재까지 만병초의 재배육종 및 수종의 생육환경에 대한 연구(10)와 flavonoid의 분리(11), 사람의 암 세포주 등에 대한 세포독성(12)에 대한 연구가 있으나, 생약학적 기능이나 생리활성 등에 대한 연구는 거의 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 천연보존제 및 항산화제 개발을 위한 연구의 일환으로 만병초를 이용하여 식중독 유발균에 대한 항균력 및 항산화 효과를 검증하여, 새로운 기능성식품이나 식품첨가물 소재로서의 개발가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 만병초는 강원도 태백의 만병초 재배농가에서 건조된 것을 구입하여 시료로 사용하였다.

사용균주 및 배지

만병초 추출물의 항균실험에 사용한 식중독 유발균주는 그람양성 3균주(*Bacillus cereus* KCTC 1012, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928 및 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569)와 그람음성 5균주(*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Salmonella* Choleraesuis ATCC 2931, *Escherichia coli* KCTC 2441 및 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895) 총 8균주를 사용하였다. 균의 생육배지로는 모든 균주에 대하여 tryptic soy broth(TSB, BD, Sparks, MD, USA)를 사용하여 30°C incubator에서 18~24시간 배양하였다. 항균성 실험에 사용한 고체배지는 tryptic soy agar(TSA, BD)이었다.

항균성물질의 추출

건조된 만병초 164.8 g을 마쇄하여 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 round flask에 넣어 95% 에탄올(Daejung Chemical & Metals Co., Gyeonggi-do, Korea)을 첨가하여 혼합한 후 heating mantle(EI05, Minsung Scientific Co., Seoul, Korea)로 80°C에서 4시간 강열 환류 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 추출액을 여과지(Whatman No. 1)로 여과하여 불순물을 제거하였다. 여과된 용액은 감압농축기(Eyela N-1 NW, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 45°C에서 감압, 농축하였다. 이 농축물을 동결건조기(Eyela FUD-1200, Rikakikai Co.)로 동결 건조시킨 후 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 이때 추출물의 회수량은 26.76 g이었다.

만병초 추출물의 항균활성 측정

항균효과 실험을 하기 위하여 paper disc-diffusion method (13)를 사용하였다. 각 시험균주는 사면배지에서 배양된 것을 1 백금이를 취하여 10 mL의 TSB배지에 접종한 후 30°C shaking incubator에서 24시간 배양하였다. 배양한 각 균주 100 µL를 petri dish에 넣고 여기에 멸균된 TSA배지 10 mL를 분주하여 고루 섞은 후에 완전히 굳힌 다음 멸균된 8-mm paper disc(Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)를 배지표면에 얹고 밀착시킨 후 추출물(2.5, 5.0, 10.0 mg)을 DMSO로 녹인 후 흡수시켜 건조시킨 다음 30°C incubator에서 24시간 배양하여 paper disc 주위의 저해환(mm)의 크기를 측정하여 항균력을 비교하였다. 대조군은 DMSO를 사용하여 동일한 방법으로 점적하였다.

최소저해농도 측정

최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 Choi 등(14)의 방법에 따라 측정하였다. 추출물의 함량이 50 mg/L 간격으로 들어있는 TSA 고체배지에 사면배지에서 배양된 각 균주 1 백금이를 취해 접종하여 30°C에서 24시간까지 배양한 후 육안으로 관찰하여 미생물이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

미생물의 생육곡선 측정

만병초 추출물을 DMSO로 녹인 후 TSB배지에 250, 500, 1,000, 2,000 mg/L 농도별로 첨가하였다. 각 시험 균주는 사면배지에서 배양된 것을 1 백금이를 취하여 10 mL의 TSB배지에 접종한 후 30°C shaking incubator에서 24시간 배양하였다. 배양한 배양액을 각 100 µL씩 접종하고(10^6 cells/mL) 30°C에서 72시간 배양하면서 spectrophotometer(Beckman DU650, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 6시간마다 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 추출물을 넣은 broth를 blank로 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거활성 측정

DPPH free radical 소거활성은 Malterud 등(15)의 방법에

따라 측정하였다. DPPH 용액(45 µg/mL)을 추출물과 혼합한 다음 515 nm에서 흡광도의 감소를 30초 간격으로 5분간 측정하였다. Free radical 소거활성은 pyrogallol용액(125 µg/mL)의 흡광도 감소를 100%로 기준하여 표기하였다. 또한, 양성대조군으로 α-tocopherol을 사용하여 DPPH 소거활성을 비교 조사하였다.

Reactive oxygen species(ROS) 측정

2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)로부터 sodium hydroxide 처리에 의해 생성된 DCFH는 ROS에 의해 dichlorofluorescein(DCF)으로 산화된다. Cell-free system에서 1 µM H₂O₂와 10 µM FeSO₄로 ROS를 유발시켰다. 추출물과 혼합한 다음 DCF 형성에 따른 형광도 변화는 LeBel 등(16)의 방법에 따라 microplate spectrofluorometer (Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 excitation 파장 488 nm와 emission 파장 525 nm에서 2분 간격으로 10분간 측정하였다. 형광도 감소는 추출물 내 항산화물질에 의한 ROS 생성 억제를 나타낸다. 또한, 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하여 ROS 생성 억제 효과를 비교 조사하였다.

Supercoiled DNA strand 절단

Peroxyl radical에 의한 DNA strand 절단은 Hu 등(17)의 방법에 따라 측정하였다. Supercoiled pBR322 DNA 0.2 µg에 추출물을 넣고 5 mM 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH)와 함께 37°C에서 2시간 배양하였다. 양성 대조군으로 Trolox를 사용하였다.

Hydroxyl radical에 의한 DNA strand 절단은 Hiramoto 등(18)의 방법에 따라 측정하였다. Supercoiled pBR322 DNA 0.2 µg에 추출물을 넣고 0.1 mM H₂O₂와 0.1 mM FeSO₄와 함께 37°C에서 1시간 배양하였다. 양성 대조군으로 sesamol을 사용하였다.

배양이 끝난 다음, gel loading buffer를 첨가하고, 0.01% GelRed nucleic acid stain(Biotium, Hayward, CA, USA)이 포함된 0.8% agarose에서 전기영동을 실시하였다. 자외선 하에서 사진을 촬영한 후, DNA band의 density는 Image J 1.44 program(NIH, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 측정하였으며, 만병초 추출물의 supercoiled DNA strand 절단 억제효과는 supercoiled DNA band의 retention%를 측정함으로써 조사하였다. Retention%는 $[1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{native}})] \times 100$ 의 공식으로 계산하였으며, A_{sample}은 radical과 추출물 처리 시의 supercoiled DNA strand의 양을 나타내며, A_{native}는 radical과 추출물 무처리 시의 supercoiled DNA strand의 양을 나타낸다.

통계처리

본 실험의 통계분석은 PASW statistics 18.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석 하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 실험결과에 대한

Table 1. Effect of *R. brachycarpum* ethanol extract on growth inhibiting activities against microorganisms¹⁾

Microorganisms	Clear zone diameter (mm) ²⁾		
	2.5 mg	5.0 mg	10.0 mg
<i>B. cereus</i>	11.17±0.29 ^a	12.17±0.29 ^b	13.17±0.29 ^c
<i>Staphy. aureus</i>	9.33±0.29 ^a	10.33±0.29 ^b	11.33±0.29 ^c
<i>L. monocytogenes</i>	10.00±0.00 ^a	11.33±0.29 ^b	12.33±0.29 ^c
<i>Sal. Typhimurium</i>	11.50±0.00 ^a	12.17±0.29 ^b	13.67±0.29 ^c
<i>Y. enterocolitica</i>	9.33±0.29 ^a	10.33±0.29 ^b	11.33±0.29 ^c
<i>Sal. Choleraesuis</i>	11.33±0.29 ^a	12.33±0.29 ^b	13.33±0.29 ^c
<i>E. coli</i>	9.33±0.29 ^a	10.17±0.29 ^b	11.17±0.29 ^c
<i>E. coli</i> O157:H7	10.33±0.58 ^a	11.83±0.29 ^b	14.67±0.29 ^c

¹⁾Antimicrobial activity was indicated as diameter of clear zone surrounding paper disc absorbing 2.5, 5.0 or 10.0 mg of soluble solid of *R. brachycarpum* ethanol extract on TSA plate inoculated with test microorganisms.

²⁾The data are expressed as means±SD of triplicate determinations.

^{a-c}Values with different superscripts within the same row are significantly different at p<0.05.

유의성 검정은 분산분석을 한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

만병초 에탄올 추출물의 항균성 검색

Paper disc 방법으로 만병초의 에탄올 추출물을 시험균주에 적용시켜 항균활성을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 각 균주에 대한 항균활성은 disc에 점적한 만병초 추출물의 농도가 증가함에 따라 항균활성이 높게 나타났다(p<0.05). 그람양성균인 *B. cereus*, *Staphy. aureus*와 *L. monocytogenes*에 대해 10 mg/disc에서 저해환의 직경이 각각 13.17±0.29 mm, 11.33±0.29 mm와 12.33±0.29 mm로 나타났고, 그람음성균인 *Sal. Typhimurium*, *Sal. Choleraesuis* 및 *E. coli* O157:H7에서는 각각 13.67±0.29 mm, 13.33±0.29 mm 및 14.67±0.29 mm로 나타나, 그람양성균과 그람음성균에서 광범위한 생육 저해 효과가 나타났다. Choi와 Rhim(19)은 개머루덩굴 추출물의 그람양성균인 *Staphy. aureus*, *L. monocytogenes*와 그람음성균인 *Sal. Typhimurium*, *Sal. Choleraesuis* 및 *E. coli* O157:H7에 대한 항균력을 보고하였고, Lee 등(20)은 매실 착즙액의 농도에 따라 그람양성균과 그람음성균에 대한 항균력 차이가 관찰되었다고 보고한 바 있다. 이와 유사하게 본 실험에서도 만병초 에탄올 추출물의 농도에 따라 항균력의 차이는 다소 있었지만, 식중독 유발균에 대해 강한 항균력을 나타내었다.

최소저해농도(MIC) 측정

만병초 추출물의 MIC를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 사용한 대부분의 그람양성균과 그람음성균에 대한 MIC는 900~1,000 mg/L로 나타났다. 현재 합성보존료로 많이 사용하고 있는 sorbic acid의 시험균주에 대한 MIC도 1,000~1,200 mg/L로 나타나, 만병초 추출물의 항균활성이 sorbic

Table 2. Minimum inhibitory extracts concentration (MIC) of ethanol extract of *R. brachycarpum* against microorganisms

Microorganisms	MIC (mg/L)	
	Extract	Sorbic acid
<i>B. cereus</i>	1,100	1,200
<i>Staphy. aureus</i>	900	1,000
<i>L. monocytogenes</i>	1,000	1,000
<i>Sal. Typhimurium</i>	1,000	1,100
<i>Y. enterocolitica</i>	1,000	1,000
<i>Sal. Choleraesuis</i>	900	1,000
<i>E. coli</i>	1,000	1,200
<i>E. coli</i> O157:H7	1,000	1,000

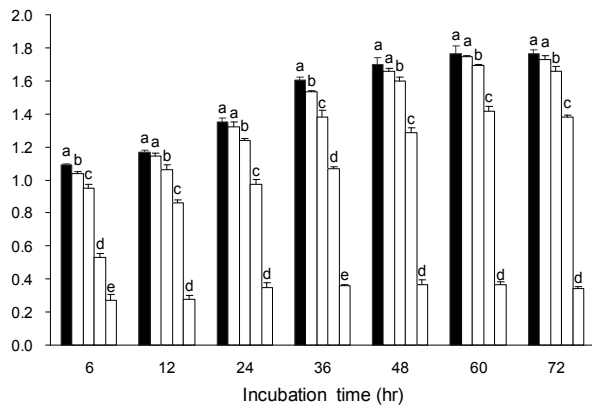


Fig. 1. Effects of ethanol extracts of *R. brachycarpum* on the growth of *L. monocytogenes*. Each bar represents the means \pm SD of quadruplicate determinations. ■: control, □: 250 mg/L, ▨: 500 mg/L, ▩: 1,000 mg/L, ▭: 2,000 mg/L. ^{a-e}Values with different letters within same group are significantly different at $p < 0.05$.

acid와 유사한 것으로 나타났다.

식중독 유발균 성장에 미치는 영향

최근 빈번하게 발생하는 식중독 유발균 중에서 그람양성균인 *Staphy. aureus*와 *L. monocytogenes*, 그람음성균인 *Sal. Typhimurium*와 *E. coli* O157:H7 총 4균주를 선정하여, 각 균주에 대한 성장에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, *L. monocytogenes*의 배양에서 만병초 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 OD₆₆₀값은 배양시간에 따라 증가하여 배양 60시간에서는 1.766 \pm 0.043로 가장 높게 나타났다($p < 0.05$). 그러나 만병초 추출물의 농도가 250과 500 mg/L인 경우, 72시간 배양 후 OD₆₆₀값은 각각 1.730 \pm 0.020, 1.656 \pm 0.034로 나타나 성장억제효과가 관찰되지 않았으나, 2,000 mg/L에서는 OD₆₆₀값이 0.339 \pm 0.017로 나타나 만병초 추출물이 *L. monocytogenes*의 성장을 80.1% 억제시켰다 ($p < 0.05$). Jeong 등(21)은 국내산 무화과 완숙과 추출물 25 mg/mL 이상의 농도에서부터 *L. monocytogenes*의 성장이 억제되었다고 보고한 바 있어, 본 실험에서 사용한 만병초 추출물이 무화과 완숙과 추출물에 비해 *L. monocytogenes*에 대한 증식억제 효과가 뛰어난을 알 수 있었다.

만병초 에탄올추출물의 *Staphy. aureus*에 대한 생육저해 정도를 동일한 방법으로 72시간 동안 살펴본 바 Fig. 2와

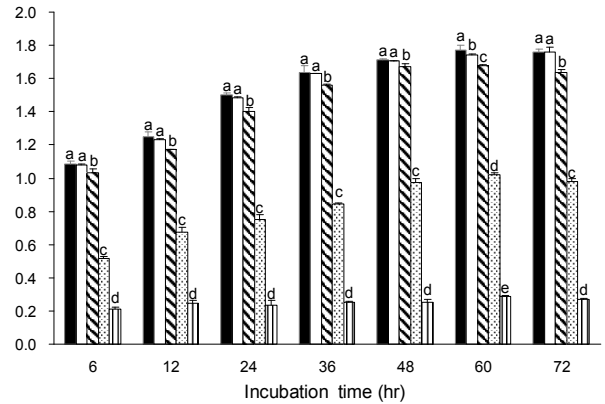


Fig. 2. Effects of ethanol extracts of *R. brachycarpum* on the growth of *Staphy. aureus*. Each bar represents the means \pm SD of quadruplicate determinations. ■: control, □: 250 mg/L, ▨: 500 mg/L, ▩: 1,000 mg/L, ▭: 2,000 mg/L. ^{a-e}Values with different letters within same group are significantly different at $p < 0.05$.

같다. 만병초 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 경우, 배양 후 6시간부터 급속한 균의 증식을 보여 72시간에는 OD₆₆₀값이 최대인 1.772 \pm 0.013으로 나타나, 추출물의 첨가 농도가 높을수록 성장이 억제되었다($p < 0.05$). 2,000 mg/L 첨가군에서는 배양 12시간에 OD₆₆₀값은 0.245 \pm 0.022로 나타났지만 배양 72시간에도 OD₆₆₀값은 0.268 \pm 0.006으로 나타나, 대조군과 비교하면 84.8%의 성장억제효과를 나타내었다. 따라서 만병초 추출물의 농도가 높을수록 *Staphy. aureus*의 성장을 효율적으로 억제시킬 수 있는 것으로 판단되었다. Chung (22)은 손바닥 선인장 에탄올추출물 농도가 3.0 mg/mL 이상에서 *Staphy. aureus*에 대한 증식을 지연시켰다고 보고한 바, 본 실험에서 사용한 만병초 추출물이 손바닥 선인장 추출물에 비해 *Staphy. aureus*에 대한 증식억제 효과가 뛰어난을 알 수 있었다.

만병초 추출물이 그람음성균인 *Sal. Typhimurium* 생육저해에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 만병초

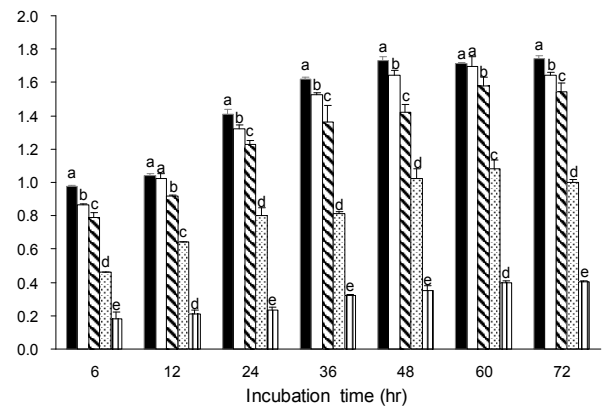


Fig. 3. Effects of ethanol extracts of *R. brachycarpum* on the growth of *Sal. Typhimurium*. Each bar represents the means \pm SD of quadruplicate determinations. ■: control, □: 250 mg/L, ▨: 500 mg/L, ▩: 1,000 mg/L, ▭: 2,000 mg/L. ^{a-e}Values with different letters within same group are significantly different at $p < 0.05$.

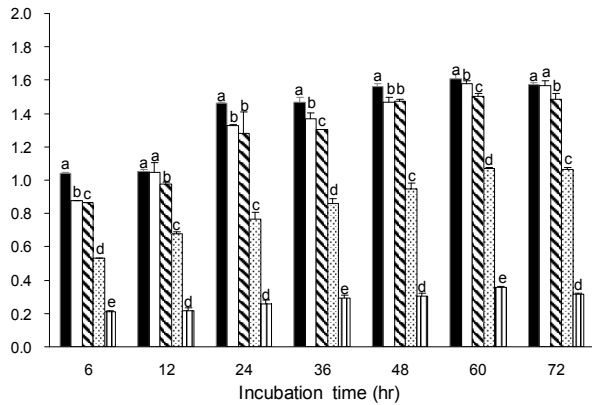


Fig. 4. Effects of ethanol extracts of *R. brachycarpum* on the growth of *E. coli* O157:H7. Each bar represents the means \pm SD of quadruplicate determinations. ■: control, □: 250 mg/L, ▨: 500 mg/L, ▤: 1,000 mg/L, ▥: 2,000 mg/L. ^{a-e}Values with different letters within same group are significantly different at $p < 0.05$.

추출물이 포함되어 있지 않는 대조군에서는 배양 후 12시간에 OD₆₀₀값이 1.039 \pm 0.012, 72시간에는 1.740 \pm 0.020로 나타나, 배양시간이 경과함에 따라 균의 증식이 증가하였다 ($p < 0.05$). 만병초 추출물의 농도가 높을수록 OD₆₀₀값이 감소하여, 1000 mg/L 농도 첨가 시 배양 후 72시간에는 대조군과 비교하여 약 42%의 성장 저해효과를 나타냈다. 특히, 2,000 mg/L 농도를 첨가하였을 경우, 배양 후 72시간에도 OD₆₀₀값이 0.404 \pm 0.007로 나타나 대조군에 비해 균의 증식이 약 77% 억제되었다 ($p < 0.05$). Bae(23)는 백화사철초의 메탄올 추출물 4,000 ppm 첨가가 *Sal. Typhimurium*의 증식을 완만하게 억제시켰다고 보고하였으며, 본 실험에서도 만병초 추출물이 *Sal. Typhimurium*에 대한 강한 증식억제효과를 나타내었다.

만병초 추출물이 식중독균의 생육저해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *E. coli* O157:H7을 이용하여 성장곡선을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 모든 배양시간에서 만병초 추출물 500 mg/L 농도까지 OD₆₀₀값은 대조군에 비해 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 만병초 추출물 2,000 mg/L 첨가군에서 배양 72시간의 OD₆₀₀값은 0.316 \pm 0.007로 나타나, 대조군에 비해 균의 증식이 약 80% 억제되었다 ($p < 0.05$). Park(24)은 향신료로 이용되고 있는 오레가노 0.5% 이상 농도에서 *E. coli* O157:H7의 성장이 감소한다고 보고한 바 있고, Yang 등(25)은 우수한 항균활성을 지닌 백운풀이 *E. coli* O157:H7에 대해서는 항균효과를 나타내지 않았다고 보고한 바 있다. 그러나 본 연구에서는 만병초 추출물이 *E. coli* O157:H7균의 성장을 효율적으로 억제시켰다. 따라서 본 연구에서는 특정 식중독균을 대상으로 만병초 추출물의 항균활성을 조사하였으나, 추후 보다 광범위한 식중독 유발 세균에 대한 항균성 검색이 필요하리라 사료된다.

DPPH radical 소거활성

만병초 추출물의 농도별 DPPH radical 소거활성은 Fig. 5에 나타나 있다. Pyrogallol의 억제율을 100%로 기준하였

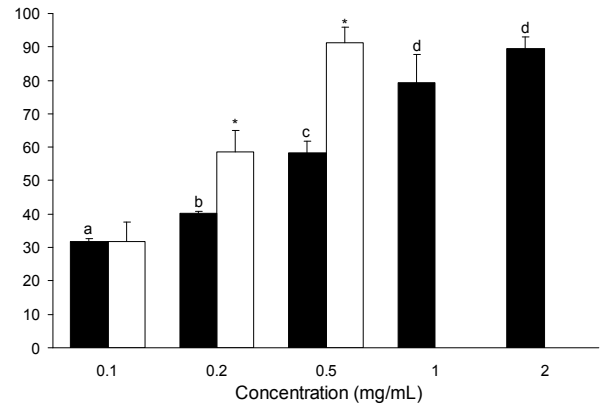


Fig. 5. DPPH free radical scavenging activities of *R. brachycarpum* extracts. Data results were expressed as % radical scavenging activity relative to 100% radical scavenging activity of pyrogallol solution as a reference. Each bar represents the mean \pm SD of quadruplicate determinations. ■: extract, □: α -tocopherol (positive control). ^{a-d}Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. * $p < 0.05$ when compared with the extract within same group.

을 때 만병초 추출물의 0.1 mg/mL 농도에서 DPPH radical 소거활성은 31.7 \pm 1.0%이었고, 추출물 농도가 증가할수록 소거활성도 증가하여 0.2, 0.5, 1 및 2 mg/mL 농도의 추출물은 각각 40.2 \pm 0.8, 58.2 \pm 3.7, 79.3 \pm 8.5 및 89.6 \pm 3.5%의 소거활성을 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 α -tocopherol의 0.1, 0.2 및 0.5 mg/mL에서 DPPH 소거활성은 각각 31.8 \pm 5.7, 58.6 \pm 6.4 및 91.3 \pm 4.7%로 나타나, 농도가 증가함에 따라 만병초 추출물의 소거활성이 α -tocopherol에 비해 낮았다 ($p < 0.05$). 추출물 농도와 DPPH radical 소거활성 간의 회귀분석 결과 50%의 radical 소거활성에 필요한 만병초 추출물의 농도(IC₅₀)는 0.43 mg/mL로 나타났다. α -Tocopherol의 DPPH IC₅₀이 0.2 mg/mL인 것과 비교해 볼 때, 만병초 추출물의 DPPH radical 소거활성이 α -tocopherol의 약 절반임을 알 수 있었다. Park 등(26)은 만병초 추출물의 50% 에탄올 분획의 DPPH 소거활성이 α -tocopherol의 약 40%라고 보고하여, 본 연구에서도 이와 유사한 결과가 관찰되었다. 그러나 만병초 추출물의 ethyl acetate 분획의 DPPH radical 소거활성은 α -tocopherol에 비해 월등히 높게 보고되었다(26).

ROS 생성 억제효과

만병초 추출물의 농도별 ROS 생성 억제에 미치는 효과는 Fig. 6에 나타나 있다. FeSO₄/H₂O₂에 의해 생성된 ROS에 의해 DCFH는 DCF로 산화되며, 이에 따라 DCF 형광도가 증가하게 된다. 따라서 추출물 내 항산화물질이 존재하는 경우, 추출물 첨가에 의해 항산화물질에 의한 ROS 생성이 억제되어 DCF 형광도가 감소하게 된다.

추출물 무첨가 시 DCFH의 산화에 의한 DCF 형광도는 410.3 \pm 7.6이었으며, 만병초 추출물의 0.1 mg/mL 농도에서 DCF 형광도는 357.1 \pm 3.6로 추출물 무첨가에 비해 낮게 ($p < 0.05$) 나타났다. 추출물 농도가 증가할수록 DCF 형광도

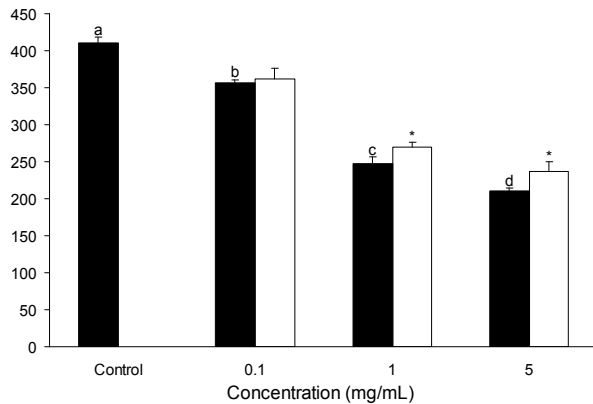


Fig. 6. The effect of *R. brachycarpum* extracts on inhibition of ROS generation. DCFH oxidation to DCF by $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ -induced ROS generation in the absence or presence of the extracts was measured for 10 min. Each bar represents the mean \pm SD of quadruplicate determinations. ■: extract, □: ascorbic acid (positive control). ^{a-d}Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. * $p < 0.05$ when compared with the extract within same group.

는 감소하여 1 및 5 mg/mL 농도의 추출물은 각각 247.9 ± 8.2 및 210.3 ± 4.0 으로 나타나, ROS 생성은 농도 의존적으로 억제되고 있음을 알 수 있었다. 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid의 DCF 형광도는 1 및 5 mg/mL 농도에서 각각 270.0 ± 5.8 및 237.2 ± 13.1 로, 만병초 추출물에 비해 높게 나타나($p < 0.05$), 만병초 추출물의 ROS 생성 억제효과가 ascorbic acid에 비해 우수한 것을 알 수 있었다.

Supercoiled DNA strand 절단 억제효과

DNA 전기영동을 이용하여 만병초추출물 농도별 peroxy

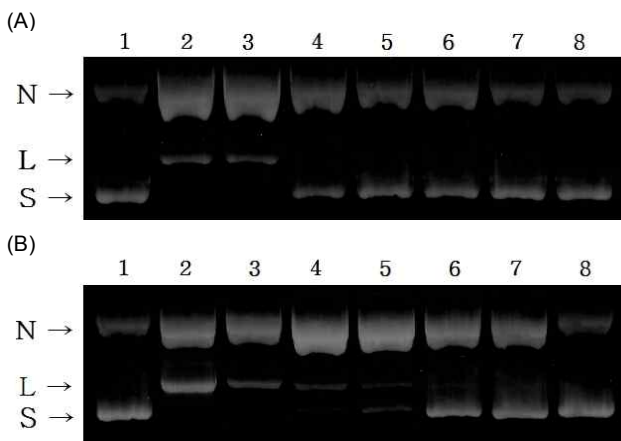


Fig. 7. Electrophoresis of pBR322 DNA treated with peroxy radical and hydroxyl radical in the presence of *R. brachycarpum* extracts. (A) peroxy radical was generated by 5 mM AAPH, (B) hydroxyl radical was generated by 0.1 mM H_2O_2 , 0.1 mM FeSO_4 . Lane 1, DNA alone; Lane 2, DNA + radical; Lane 3, DNA + radical + 0.002 mg/mL extracts; Lane 4, DNA + radical + 0.01 mg/mL extracts; Lane 5, DNA + radical + 0.02 mg/mL extracts; Lane 6, DNA + radical + 0.1 mg/mL extracts; Lane 7, DNA + radical + 0.2 mg/mL extracts; Lane 8, DNA + radical + 0.01 mg/mL Trolox (A) or 0.2 mg/mL sesamol (B). N, nicked DNA; L, linear DNA; S, supercoiled DNA.

Table 3. Retention percent of supercoiled DNA strand with *R. brachycarpum* extracts in peroxy radical- and hydroxyl radical-induced pBR322 plasmid DNA breakage

Extract (mg/mL)	Retention percent	
	Peroxy radical	Hydroxyl radical
0.01	54.7 ± 6.7^a	ND
0.02	75.1 ± 5.6^b	16.7 ± 3.3^a
0.1	77.0 ± 4.8^c	64.5 ± 6.9^b
0.2	92.4 ± 1.7^d	75.9 ± 4.0^c
Positive control ¹⁾	89.9 ± 4.6^d	94.7 ± 3.8^d

Supercoiled pBR322 DNA were treated with 5 mM AAPH (for peroxy radical generation) or 0.1 mM H_2O_2 , 0.1 mM FeSO_4 (for hydroxyl radical generation) in the presence of *R. brachycarpum* various extracts or positive control. The supercoiled and open circular forms of plasmid DNA were separated on a 0.8% agarose gel. Retention percent of supercoiled DNA band was calculated as described in Materials and Methods. The values are means \pm SD of triplicate determinations.

¹⁾0.01 mg/mL Trolox for peroxy radical- and 0.2 mg/mL sesamol for hydroxyl radical-induced supercoiled DNA strand breakage.

^{a-d}Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). ND, not determined.

radical 및 hydroxyl radical에 의해 유도된 DNA strand 절단에 미치는 효과는 Fig. 7과 Table 3에 나타나 있다. AAPH 처리에 의해 생성되는 peroxy radical 존재하에, pBR322 DNA의 supercoiled form은 nicked open circular form 및 linear form으로 전환되었다(Fig. 7A). Peroxy radical 존재하에 plasmid DNA를 만병초추출물과 함께 배양하였을 때, 추출물 농도가 증가함에 따라 nicked open circular form은 감소한 반면 supercoiled form은 증가하여, 0.2 mg/mL 농도의 추출물 첨가 시 DNA band pattern은 native(peroxy radical 무처리) plasmid DNA band pattern과 유사하게 관찰되었다(Lane 1 vs 7, Fig. 7A 및 Table 3). 또한, 만병초추출물(0.2 mg/mL)의 peroxy radical에 의한 DNA strand breaking 억제효과는 양성대조군으로 사용된 Trolox(0.01 mg/mL)와 차이가 없었다($p > 0.05$).

Fenton 시약인 H_2O_2 와 FeSO_4 처리에 의해 생성되는 hydroxyl radical 존재 하에, pBR322 DNA의 supercoiled form은 nicked open circular form 및 linear form으로 전환되었다(Fig. 7B). Hydroxyl radical 존재 하에 plasmid DNA를 만병초추출물과 함께 배양하였을 때, 추출물 농도가 증가함에 따라 nicked open circular form은 감소한 반면 supercoiled form은 증가하여, 만병초추출물은 농도 의존적으로 hydroxyl radical에 의해 유도된 single-strand 절단을 억제하였다. Peroxy radical에 대한 supercoiled DNA 절단 실험결과와는 달리, 0.01 mg/mL 농도까지의 추출물 첨가는 hydroxyl radical에 의한 supercoiled DNA strand 절단 억제에 영향을 미치지 않았다. 그러나 양파추출물은 0.01 mg/mL 농도에서 약 50%의 retention을 나타내, 만병초 추출물에 비해 hydroxyl radical에 대해 탁월한 supercoiled DNA strand 절단

억제효과가 보고된 바 있다(27). 0.2 mg/mL 농도의 만병초 추출물 첨가 시 hydroxyl radical에 대한 supercoiled DNA의 retention은 75.9%로 나타나 동일한 농도의 양성대조군인 sesamol에 의한 retention(94.7%)에 비해 낮았고($p < 0.05$), peroxy radical에 대한 추출물의 retention(92.4%)보다도 낮게 나타났다. 따라서 만병초 추출물이 hydroxyl radical에 비해 peroxy radical에 의해 유도된 supercoiled DNA 절단 억제효과가 높음을 알 수 있었다.

이상과 같이, 본 연구결과는 만병초 추출물이 식중독 유발균에 대하여 우수한 항균작용과 free radical에 의해 유도된 산화억제능을 나타내어 만병초가 효과적인 천연보존료 및 항산화제로서 이용될 수 있음을 시사하고 있다.

요 약

본 연구는 만병초 에탄올추출물의 식중독 유발균에 대한 항균효과 및 항산화 활성을 조사하였다. 추출물의 항균활성은 paper disc 방법으로 조사하였다. 추출물을 10 mg/disc 점적한 후 저해환의 크기를 측정된 결과, 그람양성 3균주 중에서 *Bacillus cereus*에 대해, 그리고 그람음성 5균주 중에서 *Escherichia coli* O157:H7에 대한 항균활성이 가장 좋았다. 최소 억제 농도(MIC)는 현재 합성보존료로 이용되고 있는 sorbic acid와 비슷하게 나타났다. 또한, 만병초 추출물이 식중독 유발균의 성장에 미치는 효과를 검정하기 위해 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium과 *Escherichia coli* O157:H7의 배양액에 250, 500, 1,000 및 2,000 mg/L 농도로 첨가하여 생육을 조사한 결과, 배양시간 별로 250 mg/L 농도까지는 대조군과 차이가 없었으나, 1,000 mg/L 이상의 농도에서는 균의 증식이 억제되었다. 만병초 추출물의 항산화 효능을 조사하기 위해 DPPH 라디칼 소거활성, ROS 생성 억제 및 supercoiled DNA strand 절단 억제효과를 측정하였다. Pyrogallol의 억제율을 100%로 기준하였을 때, DPPH 라디칼을 50% 억제시키는데 필요한 만병초 추출물의 농도는 양성대조군인 α -tocopherol의 약 절반으로 나타났다. 추출물의 농도가 증가할수록 DCF 형광도는 감소하여 ROS 생성이 농도 의존적으로 억제되고 있음을 알 수 있었다. 추출물의 ROS 생성 억제효과는 양성대조군인 아스코르빈산에 비해 높게 나타났다. 또한, 만병초 추출물은 peroxy radical 및 hydroxyl radical로 유발된 supercoiled DNA strand 절단을 억제시켰다. 따라서 본 연구결과는 만병초 추출물이 식중독 유발균에 대하여 우수한 항균작용과 항산화능을 나타내어 만병초가 효과적인 천연보존료 및 항산화제로서 이용될 수 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의해

연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Jeong ET, Park MY, Lee JK, Chang DS. 1998. Antimicrobial activity and antimutagenesis of cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume) bark extract. *J Fd Hyg Safety* 13: 337-343.
- Choi OK, Noh YC, Hwang SY. 2000. Antimicrobial activity of grapefruit seed extracts and polylysine mixture against food-borne pathogens. *Korean J Dietary Culture* 15: 9-15.
- Lee OK, Lee HB, Son JY. 2004. Antimicrobial activities and nitrite-scavenging ability of olive leaf fractions. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 20: 204-210.
- Choi MY. 2010. Antibacterial activity of *Euphorbia humifusa* extracts on food-borne pathogenic bacteria. *Korean J Community Living Science* 21: 13-18.
- Choi MY, Rhim TJ. 2010. Antimicrobial effect of *Ampelopsis brevipedunculata* extracts on food spoilage or foodborne disease microorganisms. *Korean J Plant Res* 23: 430-435.
- Seo JK, Kang MJ, Shin JH, Lee SJ, Jeong HG, Sung NJ, Chung YC. 2010. Antibacterial and antioxidant activities of solvent extracts from different parts of Hagocho (*Prunella vulgaris*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1425-1432.
- Lee OH. 2004. Effects of supplementation of *Puerariae radix* ethanol extract on the antioxidative defense system in rats. *Korean J Nutr* 37: 872-880.
- Shim KB, Park CH, Lee BH, Shetty K. 1999. Selection of higher level of antioxidants producing rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones by inoculation of *Pseudomonas* sp. *Kor J Intl* 11: 325-330.
- Rhim TJ, Choi MY. 2010. The antioxidative effects of *Ampelopsis brevipedunculata* extracts. *Korean J Plant Res* 23: 445-450.
- Park JH, Kim JS, Jeong AY, Namba T. 1995. A pharmacognostical study on the 'Man Byung Cho'. *Kor J Phamacogn* 26: 168-174.
- Choi JS, Han SY, Park JC, Choi JH, Woo WS. 1986. Flavonoids from the leaves of *Rhododendron brachycarpum*. *Arch Pharm Res* 9: 233-236.
- Byun KS, Lee YW, Jin HJ, Lee MK, Lee HY, Lee KJ, Heo MY, Yu CY, Lee JH. 2005. Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves. *Korean J Medicinal Crop Sci* 13: 199-205.
- Board RG, Lovelock DW. 1975. *Some method for microbiological assay*. Academic press, New York, NY, USA. p 91.
- Choi MY, Choi EJ, Lee E, Rhim TJ, Cha BC, Park HJ. 1997. Antimicrobial activities of pine needle (*Pinus densiflora* Seib et Zucc.) extract. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 293-297.
- Malterud KE, Farbrot TL, Huse AE, Sund RB. 1993. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology* 47: 77-85.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5: 227-231.
- Hu C, Zhang Y, Kitts DD. 2000. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *Henonis* leaf extract in vitro. *J Agric Food Chem* 48: 3170-3176.
- Hiramoto K, Ojima N, Sako K, Kikugawa K. 1996. Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of

- hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biol Pharm Bull* 19: 558-563.
19. Choi MY, Rhim TJ. 2008. Antimicrobial effect of oregano (*Origanum majorana* L.) extract on foodborne pathogens. *Korean J Plant Res* 21: 347-351.
 20. Lee HA, Nam ES, Park SI. 2003. Antimicrobial activity of maesil (*Prunus mume*) juice against selected pathogenic microorganisms. *Korean J Food & Nutr* 16: 29-34.
 21. Jeong MR, Cha JD, Lee YE. 2005. Antibacterial activity of Korean fig (*Ficus carica* L.) against food poisoning bacteria. *Korean J Food Cookery Sci* 21: 84-93.
 22. Chung HJ. 2000. Antioxidative and antimicrobial activities of *Opuntia ficus indica* var. saboten. *Korean J Soc Food Sci* 16: 160-166.
 23. Bae JH. 2005. Antimicrobial effect of *Plagiorhegama dubium* extracts on food-borne pathogen. *Korean J Food & Nutr* 18: 81-87.
 24. Park CS. 1997. Effect of spices on the growth of pathogenic bacteria. *Korean J Soc Food Sci* 13: 330-337.
 25. Yang EJ, Han J, Lee IS. 1999. Antimicrobial activity of medicinal herbs extracts on cooling preservation foods. *Korean J Post Sci Technol* 6: 110-114.
 26. Park JC, Lim GN, Park SN. 2010. Antioxidant activity of *Rhododendron brachycarpum* D. Don extract and its skin hydration effect measure. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 36: 157-165.
 27. Rhim TJ, Lim SC. 2005. The hepatoprotective and antioxidative effects of onion (*Allium cepa*) extracts in rat hepatocyte primary culture. *Korean J Plant Res* 18: 470-478.

(2011년 5월 23일 접수; 2011년 9월 5일 채택)