

석류에서 항진균성 활성의 탐색

- 연구노트 -

이금영¹ · 박태희¹ · 이다인¹ · 박정로² · 최상기¹

¹순천대학교 생물학과
²순천대학교 식품영양학과

Detection of Antifungal Activities from Pomegranate

Geum Young Lee¹, Tae Hee Park¹, Da-In Lee¹, Jeong-Ro Park², and Sang Ki Choi¹

¹Department of Biology and ²Department of Food and Nutrition, Suncheon National University

ABSTRACT Antifungal activities of pomegranate were investigated. Seventy percent ethanol extracts of seeds, peels, and whole fruits of pomegranate showed similar antifungal activities against *Candida albicans* in liquid media, whereas extract of whole fruit showed relatively high antifungal activity in solid media. When 70% ethanol extracts were fractionated sequentially with chloroform and ethyl acetate, ethyl acetate fraction exhibited the highest anti-fungal activities against *C. albicans*. Ethyl acetate fractions of whole fruits and peel portions showed at least 36% and 25% growth against *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, and *Candida lusitanae* in liquid media, respectively. These results indicate that pomegranate contains antifungal compounds soluble with organic solvents.

Key words: pomegranate, antifungal activity, *Candida albicans*, growth inhibition

서 론

석류(*Punica granatum* LINNE, Pomegranate)는 석류과(Punicaceae)에 속하는 낙엽 활엽 교목의 열매로 이란을 중심으로 한 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지로 알려져 있다. 석류는 여성의 폐경 질환 완화와 유방암 및 전립선암 예방과 강력한 동맥경화성의 병반 분해에 유효하며, 천연에서 가장 강력한 항산화 활성 등과 연관되어 있고 그 기능성 성분은 의학, 치료, 수명 및 배란 등에서 개발 가능성이 널리 제시되어 왔다(1,2). 또한 고유한 기능성 화학성분들이 석류의 종자 껍질 등 부위별로 다른 함량을 가지고 있어 기능성 과일로 불리고 있다.

석류씨는 석류자(Granati Semen)라고 하며, 석류가지, 줄기, 뿌리 및 석류과실의 껍질은 석류피(Granati Cortex)라고 한다. 예로부터 한방에서 석류열매, 줄기껍질, 뿌리의 껍질을 건조하여 각종 기생충, 특히 촌충의 구제, 설사, 이질, 구내염, 장출혈에 효과가 있어 한약재로 이용돼 왔다. 최근 석류씨 중의 puniceic acid, estrogen, estradiol, β -sistosterol의 생리활성 및 섭취 효과가 보고되면서 석류씨에 대한 많은 연구들이 발표되고 있다(3). 석류나 콩과류에서 발견되는 phytoestrogen의 주성분은 isoflavones와 lignans 등의 페놀성 화합물이며(4), 이들 페놀성 화합물은

천연의 성호르몬과 공통성을 갖는 구조를 가지고 있어 암, 심장혈관질환, 골다공증 등의 만성질환에 대해서 예방 효과가 있다고 보고되고 있다(5). 식물계에 널리 분포되어 있는 이들 페놀성 물질은 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 항산화 효과 등의 다양한 생리활성 기능도 갖고 있다(6,7). 또한 석류씨 기름 중에 다량 함유되어 있는 puniceic acid와 같은 conjugated fatty acid는 항암작용물질로 알려져 있으며, 이외에도 면역증진, 항산화 작용, 체지방 감소 등에도 효과적인 것이 보고되면서 conjugated fatty acid를 다량 함유한 새로운 기능성 식품에 대한 지속적인 연구가 진행되고 있다(8).

본 연구는 석류 추출물의 항진균 활성을 *Candida* sp. 진균을 대상으로 검증하였다. *Candida* spp.는 구강 칸디다증, 질 칸디다증, 기타 기회감염 등 많은 표재성 및 전신성 감염증을 일으키는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 식물성 천연물들의 항산화 효과, 항진균성 등은 추출방법, 추출조건 등에 따라 유효물질의 함량 및 함유 패턴이 다르고, 생리활성도 다르게 나타나기 때문에 석류의 효율적인 이용을 위해서는 석류 추출물의 형태에 따른 체계적인 유효성분의 검증이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* 등 단세포성 곰팡이의 성장을 저해하는 항진균 물질을 탐색하고 새로운 천연 항생물질을 찾기 위해 석류의 과피, 씨, 전체를 추출하여 항진균 활성을 측정하여 석류의 과피와 씨의 효율적인 활용 방안을 검토하고자 한다.

Received 5 November 2014; Accepted 18 December 2014

Corresponding author: Sang Ki Choi, Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea
E-mail: sangkic@sunchon.ac.kr, Phone: +82-61-750-3619

재료 및 방법

석류의 항진균 물질의 추출

고흥에서 생산된 석류를 전체, 과피, 씨로 나누어 통풍이 잘 되는 곳에서 건조한 후 막자사발로 분쇄하여 분말 형태로 만들었다. 다양한 에탄올 농도에서 석류 분말을 추출한 예비 실험 결과 70% 에탄올 농도에서 효과적으로 항진균 활성이 측정되었으며, 분말 10 g과 70% EtOH 100 mL를 혼합한 후 30°C shaking incubator에서 24시간 진탕한 다음 원심 분리 하여 상층액을 추출물 시료로 사용했다.

석류 추출액의 유기용매에서의 농축

석류 추출액을 chloroform, ethyl acetate 용매 순으로 추출하였다. 석류 추출액 90 mL와 유기용매 90 mL를 1:1 비율로 혼합한 후에 유기용매층과 물층으로 분리된 층 중에서 유기용매층을 감압건조 시킨 후 남은 건조한 추출물을 70% EtOH로 녹여서 실험에 시료로 사용했다. 남은 물층에 다음 순서인 유기용매를 1:1로 혼합한 후 위와 같은 방법으로 건조한 후 추출물을 10 mL씩 제조하였다.

Disc diffusion 방법

석류추출물의 항진균 활성 여부를 알아보기 위해 Kim 등(9)의 disc diffusion 실험에 따라 수행하였다. 미리 배양한 *C. albicans*의 배양액(OD₆₀₀ 0.01)을 YpD 고체배지(500 mL 기준: yeast extract 5 g, peptone 10 g, dextrose 10 g, agar 8 g)에 100 µL 분주한 후 멸균된 면봉을 이용하여 도말하였다. 그 위에 석류 추출물을 지름 6 mm 크기로 만든 paper disc(Whatman, Maidstone, Kent, UK)에 100 µL씩 분주하여 충분히 말린 후 올려놓고, 30°C incubator에서 24시간 배양하여 투명한 크기를 비교 관찰하였다.

Test tube 및 96 well plate의 액체배양에서의 항진균 활성 측정

액체배양에서의 항진균 활성은 Kim 등(9)의 방법을 변형하여 측정하였다. Test tube에 RPMI 1640(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 배지 6 mL, 석류의 과피, 전체, 씨의 추출물 원액 360 µL를 넣고, *C. albicans* 배양액(OD₆₀₀ 0.01) 300 µL를 혼합한 후 30°C shaking incubator에서 24시간 배양하여 6시간마다 ELISA reader(Dynex, Chantilly, VA, USA)를 이용하여 600 nm에서 성장 정도를 측정하였다.

96 well plate에서 항진균 활성을 측정하기 위해서 석류의 과피, 전체, 씨의 유기용매 추출물 3 µL, RPMI 혼합배지 100 µL, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Candida lusitanae*, *C. glabrata* 배양액(OD₆₀₀ 0.01) 10 µL를 96 well plate에 분주한 후 30°C incubator에서 24시간 배양하면서 12시간마다 ELISA reader를 이용하여 600 nm에서 성장 정도를 측정하였다. 추출물에 의한 진균성장 저해실험은 3번 실험한

결과를 토대로 평균표준편차를 산출하였다. 진균성장저해율(%)은 시료가 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 일정시간 성장한 배양액의 흡광도를 측정 후 다음과 같은 식에 따라 계산하여 얻었다; $[(\Delta\text{시료처리군의 흡광도} - \Delta\text{대조군의 흡광도}) / \Delta\text{대조군의 흡광도}] \times 100$.

결과 및 고찰

석류의 씨 및 껍질 추출물의 항진균 활성

전라남도 고흥에서 많이 생산되는 석류의 과피와 씨의 효율적인 활용방안을 모색하고자 이들 추출물에 단세포성 곰팡이의 성장을 저해하는 항진균 물질이 함유하는지를 탐색하였다. 석류를 과피, 씨, 전체로 분리하여 에탄올로 추출하여 항균활성을 조사하였을 때 석류 씨, 전체 및 과피의 추출물에 항진균 활성을 관찰하였으나 부위별로 활성의 큰 차이를 관찰하지 못하였다(Fig. 1).

Disc diffusion 방법에 의한 석류 추출액의 항진균 활성

석류 추출물의 항진균 물질의 활성을 알아보기 위해 disc diffusion 방법을 이용하였다. 미리 배양한 *C. albicans*의 배양액(OD₆₀₀ 0.01)을 도말한 YpD 고체배지에 석류의 씨 및 과피 추출물을 제조하여 300 µL씩 분주하여 지름 6 mm 크기의 paper disc를 올려놓고 30°C incubator에서 24시간 배양하여 투명한 크기를 관찰했을 때 석류 전체에서는 크지만 뚜렷하지 않은 clearing zone이 관찰되었다(Fig. 2). 과피에서는 뿌연게 확산되는 물질 때문에 clearing zone의 경계는 확실하지 않지만 균 성장이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 씨에서는 아주 미미한 크기의 clearing zone이 관찰되었다.

석류 추출물의 유기용매 분획물에 따른 항진균 활성

석류 과피의 80% 메탄올 추출물이 *Candida utilis*의 성장을 저해한다는 보고(10)는 있으나 유기용매 추출에 따른 활성의 분석은 없다. 석류 추출물이 Fig. 2에서 보이듯이 항진

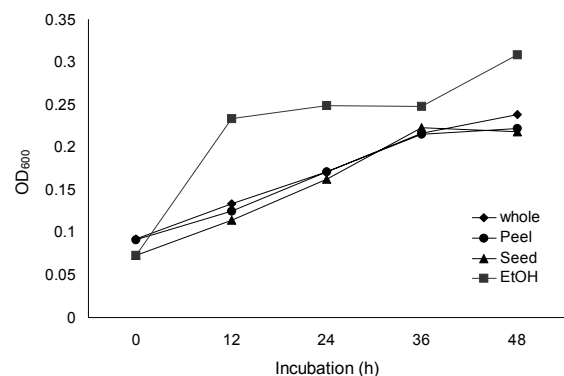


Fig. 1. Antifungal activities of ethanol extracts of various portions of pomegranate. Each organic solvent extracts was added to media inoculated with *Candida albicans* and incubated for 48 hours at 30°C.

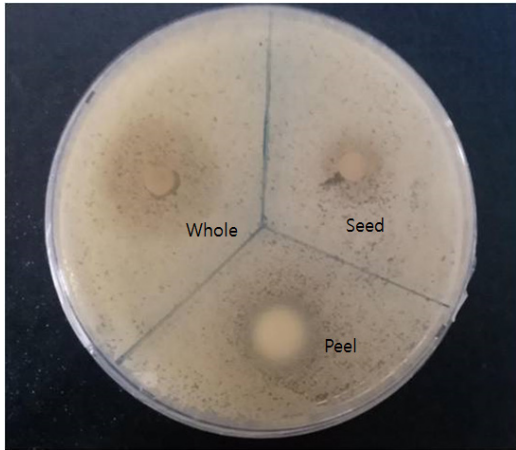


Fig. 2. Growth inhibition of *Candida albicans* by ethanol extracts of various portions of pomegranate.

균 활성이 약하게 나타났으므로 활성을 좀 더 명확하게 보기 위해서, 또한 항진균 물질의 특성을 추정하기 위해 이들 추출물을 chloroform, ethyl acetate 용매 순으로 추출하였다. Disc diffusion 방법을 이용하여 각 추출물에 따른 고체 배지에서의 *Candida* spp.의 항진균 활성도를 측정한 결과 2가지 시료 모두 ethyl acetate 추출물에서 높은 활성도를 보였다(Fig. 3, Table 1). Chloroform 추출물에서는 약한 활성도를 보이는 것으로 보아 추출에 사용되는 용매에 따라 다르다는 것을 알 수 있었다. 또한 추출하고 남은 수층에서는 항진균 활성을 거의 볼 수 없었는데 아마도 석류의 항진균 활성물질의 대부분이 불용성이거나 물에 대한 용해도가 낮기 때문이라고 추정된다. 석류의 과피와 전체 추출물은 고체 배지에서의 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* 등 단세포

Table 1. Growth inhibition of *Candida* spp. on plate media by organic solvent extracts of pomegranate

Strain	Antifungal activities (cm)			
	Chloroform (whole)	Ethyl acetate (whole)	Chloroform (peel)	Ethyl acetate (peel)
<i>Candida albicans</i>	0.9±0.05	2.0±0.10	0.9±0.08	2.0±0.10
<i>Candida tropicalis</i>	0.9±0.10	1.3±0.07	0.9±0.05	1.2±0.05
<i>Candida lusitaniae</i>	0.9±0.07	1.5±0.05	0.9±0.10	1.7±0.10
<i>Candida glabrata</i>	1.0±0.03	1.9±0.08	1.3±0.10	2.1±0.15

Data are expressed as mean±SD (n=3).

포성 곰팡이를 이용한 disc diffusion 방법의 활성검사에서도 비슷한 항진균 활성을 나타냈다(Fig. 3, Table 1).

유기용매 추출물에 대한 균 성장 저해율

유기용매 추출물을 이용한 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* 등 4가지 단세포성 곰팡이 균주에 대해서 RPMI 액체배지에서 항진균 실험한 결과 석류부위별 추출물에서 균 성장저해율이 비교적 높게 나왔다. 석류 전체의 ethyl acetate 추출물은 *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*의 균 성장을 다른 균에 비해 52% 이상 감소시켰으며, 과피의 ethyl acetate 추출물이 석류 전체보다 항진균 활성이 약간 낮은 25% 이상을 보였으나 과피의 chloroform 추출물은 *C. albicans*의 경우 71%의 높은 저해율을 보였다(Fig. 4, Table 2). 이 결과로 4종의 곰팡이를 저해하는 석류 내의 항진균 활성물질이 지용성일 것으로 추정된다. 반면에 석류 과피의 아세톤 추출물은 벼 도열병 곰팡이인 *Magnaporthe grisea*의 성장을 억제하는 것으로 보고(11)되었는데, 본 연구에서 발견된 지용성 석류 추출물이 사상성 곰팡이에도 성장 억제 활성을 보이는지는 좀 더 연구되어야 할 것이다.

요 약

본 연구에서는 석류에서 단세포성 곰팡이의 성장을 저해하는 항진균 물질을 탐색하고 새로운 천연 항생물질을 찾기 위한 목적으로 석류를 과피, 씨, 전체로 각각 분리하고 추출하여 항진균 활성을 조사하였다. 고흥에서 생산된 석류를 전체, 과피, 씨로 나누어 70% EtOH로 추출한 후 *Candida*

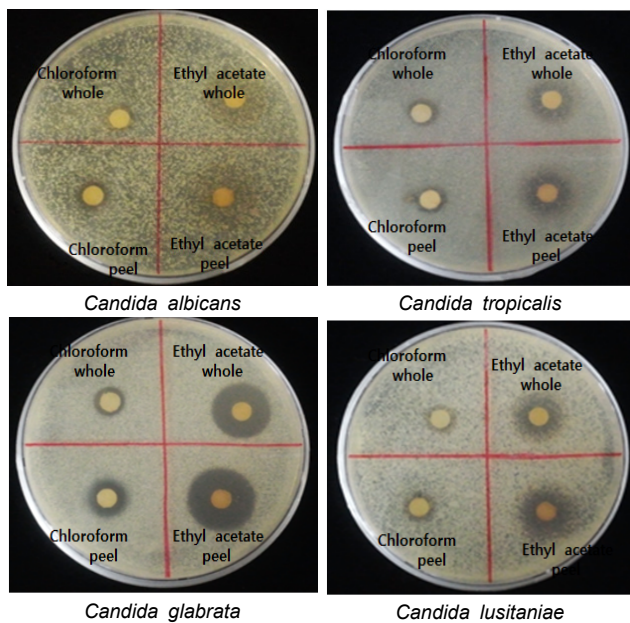


Fig. 3. Growth inhibition of *Candida* spp. by organic solvent extracts of pomegranate.

Table 2. Antifungal activities of organic solvent extracts of pomegranate in liquid media

Strain	Growth Inhibition (%)			
	Chloroform extract (whole)	Ethyl acetate extract (whole)	Chloroform extract (peel)	Ethyl acetate extract (peel)
<i>Candida albicans</i>	35±2.5	36±1.0	71±2.0	33±1.5
<i>Candida tropicalis</i>	11±0.5	52±2.0	43±1.0	36±1.5
<i>Candida lusitaniae</i>	30±1.5	59±2.0	13±0.5	25±1.0
<i>Candida glabrata</i>	38±1.5	48±1.0	36±1.0	35±2.0

Data are expressed as mean±SD (n=3).

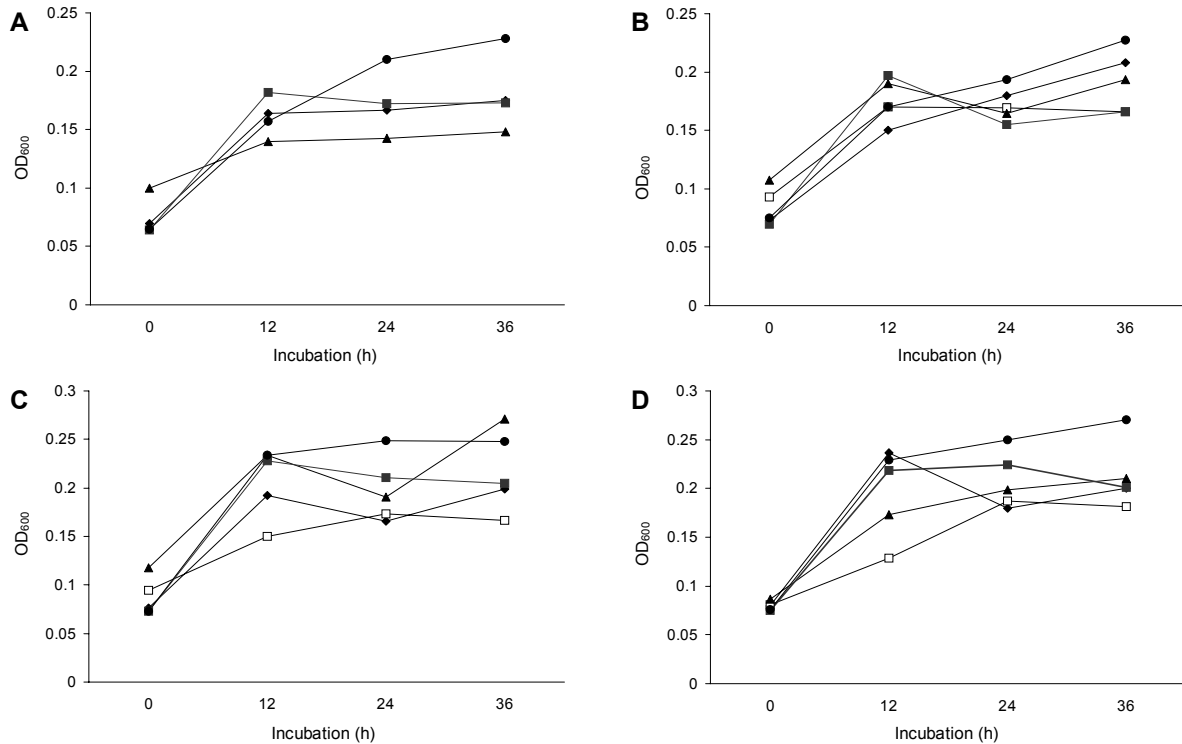


Fig. 4. Antifungal activities of organic solvent extracts of pomegranate. Each organic solvent extracts was added to media inoculated with *Candida albicans* (A), *Candida tropicalis* (B), *Candida glabrata* (C), and *Candida lusitaniae* (D) and incubated for 48 hours at 30°C. ◆, chloroform extract (whole); □, ethyl acetate (whole); ▲, chloroform (peel); ■, ethyl acetate (peel); ●, EtOH control.

*albicans*에 대한 항진균 활성을 측정된 결과, 항진균 활성이 액체배지에서 각각 비슷하게 나왔으며 고체배지에서는 석류 전체 추출물을 사용하였을 때 가장 잘 나타났다. 고체배지에서와 액체배지에서 공통적으로 석류 전체 및 과피 추출물의 chloroform, ethyl acetate 용매 추출물의 *C. albicans*의 항진균 활성도를 측정된 결과 ethyl acetate 추출물에서 모두 높은 활성도를 나타냈다. *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae*에 대한 항진균 활성은 석류 전체 및 석류 과피의 ethyl acetate 용매 추출물에서 각각 36%, 25% 이상의 저해율을 보였다. 이러한 결과는 석류 내 존재하는 항진균 활성 물질은 ethyl acetate에 잘 녹는 지용성 물질인 것으로 추정된다.

감사의 글

이 논문은 2014년 순천대학교 학술기반조성비로 연구되었음.

REFERENCES

- Song BH, AiTran HN, Bae SY. 2007. Pomegranate (*Punica granatum*) as resources of phytoestrogen and anticancer substances. *Korean J Microbiol Biotechnol* 35: 81-97.
- Shim SM, Choi SW, Bae SJ. 2001. Effects of *Punica granatum* L. fractions on quinone reductase induction and growth inhibition in several cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 80-85.
- Mori-Okamoto J, Otawara-Hamamoto Y, Yamato H, Yoshimura H. 2004. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol* 92: 93-101.
- Aviram M, Dornfeld L. 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 158: 195-198.
- Goldfien A, Monroe SE. 1997. *Basic & clinical endocrinology*. 5th ed. Greenspan FS, Strewler GJ, eds. Appleton Lange Company, London, UK. p 474-477.
- Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY, Son JY. 2005. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. *Kor J Food Cookery Sci* 21: 171-179.
- Takahama U. 1985. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: mechanism of antioxidative function. *Phytochemistry* 24: 1443-1446.
- Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol* 66: 11-17.
- Kim ES, Choi KS, Choi SK. 2012. Detection of endolichenic fungi producing antifungal compound. *Korean J Microbiol Biotechnol* 40: 23-29.
- Al-Zoreky NS. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int J Food Microbiol* 34: 244-248.
- Chee HY, Cho TE. 2005. Antifungal activity of plant and marine microalgae extracts against rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Korean J Mycology* 33: 86-88.