

국내산 주요허브 열수 추출물의 항산화, 항균활성 및 세포독성

강다래* · 심관섭* · 최호성* · 나종삼**

Antioxidant, Antimicrobial Activities and Cytotoxicity of Hot Water Extracts of Major Herbs in Korea

Kang, Da-Rae · Shim, Kwan-Seob · Choe, Ho-Sung · Na, Chong-Sam

In this study, the DPPH free radical scavenging activity, antimicrobial effects, growth inhibition and cytotoxicity of herb extracts were determined to screen alternative antibiotics. Hot water extracts of 10 species herbs (*Origanum vulgare*, *Monarda didyma*, *Echinacea purpurea*, *Ocimum basilicum*, *Mentha piperita*, *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Stevia rebaudiana*, *Rosmarinus officinalis*, *Matricaria recutica*) were used. DPPH free radical scavenging activity of all herb extracts was ranged from 31.4-49.9%, and significantly great activities were found at *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* and *Matricaria recutica* ($P < 0.05$). Hot water extracts of *monarda didyma*, *origanum vulgare*, *thymus vulgaris* and *rosmarinus officinalis* showed greater antimicrobial activities compared to others. Additionally, those four extracts represented relatively low cytotoxicity compared to others. As a result, it was found that *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* which possessed great antioxidant and antimicrobial activity with less cytotoxicity. So these two herb extracts can be used as an alternative of antibiotics for organic farming.

Key words : antibiotics, antimicrobial activity, antioxidant, cytotoxicity, herbs

* 전북대학교 농업생명과학대학 동물생명공학과

** Corresponding author, 전북대학교 농업생명과학대학 동물생명공학과(csna@jbnu.ac.kr)

I. 서 론

항생제는 가축의 질병예방, 성장촉진과 사료 효율 등 생산성 증진에 긍정적인 영향을 미치나, 동물성 식품 내 항생제의 잔류와 인수공통전이 내성균 등의 부작용으로 인해 2011년부터 축산업에서의 항생제 사용이 전면 금지되었으며, 이로 인한 항생제 대체제의 연구가 많이 이루어지고 있다(Park et al., 2012; Shim et al., 2012).

식물성 천연 물질은 각종 유익한 성분을 함유하고 있으며 이를 이용하려는 목적으로 과일, 약용식물 및 채소에 함유된 기능성 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그중 허브는 항균과 항산화 작용(Park et al., 2012) 및 항알러지(Chea et al., 2010) 등의 기능으로 생리적 효용성이 인정된 천연 물질이며 기능성 사료 첨가제로의 활용 가능성이 대단히 높다. 최근 허브와 허브 부산물을 첨가한 사료가 한우(Kim et al., 2013; Lee et al., 2014), 젓소(Wanapat et al., 2008; Petersen et al., 2011), 양돈(Ji et al., 2011; Shim et al., 2012) 및 양계(Kang et al., 2007; Omar et al., 2016)에 이용되어 산란율, 면역력, 증체량 및 사료 효율 등과 같은 생산성 향상뿐만 아니라 항산화 활성 변화 등의 다양한 효과가 보고되고 있다.

허브와 허브 부산물을 이용하는 방법에는 단순첨가와 추출물로 이용하는 방법이 있다. 하지만, 허브나 허브 부산물을 단순 첨가하는 방법은 균일한 사료배합이 어렵고, 휘발성 유기용매로 추출하기 위해서는 설비 및 유기용매의 준비가 필요하다. 또한 유기용매로 추출을 하더라도 잔류 유기용매에 의한 독성 문제가 발생할 수 있다(Kang et al., 2015).

따라서 본 연구에서는 허브와 허브 부산물의 첨가에 대한 단점을 극복하기 위하여 열수 추출법을 이용하여 추출한 오레가노, 베르가못, 에키네시아, 바질, 페퍼민트, 레몬밤, 타임, 스테비아, 로즈마리 및 캐모마일 10종 허브 추출을 제작하였다. 그리고 각 추출물이 가지고 있는 DPPH free radical 소거능, 항균효과 및 세포독성효과 등을 분석하여 각 물질들이 가진 항생제 대체제로서의 가능성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 제조

본 실험에 사용된 10종의 허브인 오레가노(*Origanum vulgare*), 베르가못(*Monarda didyma*), 에키네시아(*Echinacea purpurea*), 바질(*Ocimum basilicum*), 페퍼민트(*Mentha piperita*), 레몬밤(*Melissa officinalis*), 타임(*Thymus vulgaris*), 스테비아(*Stevia rebaudiana*), 로즈마리(*Rosmarinus officinalis*), 캐모마일(*Matricaria recutita*)은 허브 특구로 선정된 남원시 운봉읍 일대의 농가에서 재배되어, 남원 허브식품 클러스터 사업단으로부터 수집 및 건조하여 분말 상태로 제

공받았다. 각 허브 100 g에 100°C 증류수 1 L를 삼각플라스크에 첨가 혼합하여 80°C의 shaking water bath에서 100 rpm으로 6시간 동안 열수추출 후, ice에 20 분 냉각시켰다. 허브 추출물은 4,000 rpm에 10분 4°C로 두 번에 걸쳐 원심분리 하였고 상층액은 다시 여과지 (Advantec, USA)로 여과 후 동결건조하여 분석 전까지 4°C에 보관하였다.

2. 항산화 활성

허브 추출물 10 종의 항산화 활성은 Chang 등(2010)의 방법에 준하여 2, 2-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 자유라디칼 소거능을 측정하였다. 동결 건조 된 허브 추출물을 증류수에 동일한 10 mg/mL의 농도로 용해 후 분석에 바로 이용하였다. 자유라디칼 소거능을 측정하기 위해 각 추출물, 멸균 증류수, 99.9% ethanol 및 4×10^{-4} M DPPH 순으로 0.1:0.4:1:1의 비율로 첨가 혼합 후 15 분간 실온에 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도(Multiskan Go, Thermo fisher, USA)를 사용하여 측정하였다. Free radical scavenging activity (%)는 아래의 계산식을 통하여 산출하였으며 모든 실험은 3 반복으로 실행하였다.

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \left[1 - \frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{blank}}} \right] \times 100$$

3. 허브 추출물의 항균활성 측정

허브 추출물에 대한 항균활성 측정을 위해 사용된 공시 균주들은 가축들에게 병원성을 나타내는 감염균으로 *Escherichia coli* K99 (ATCC 31616)와 *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)을 사용하였다. 균주들의 성장억제 효과를 측정하기 위하여 10종의 허브 추출물을 LB broth (Difco, USA)에 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL의 농도로 준비하였다. 허브 추출물을 농도별로 희석한 LB broth 1 ml당 200 colony (CFU/mL)씩 각 well (24 well flat bottom plates, BD Falcon)에 접종시켰으며 16시간 동안 37°C의 진탕 배양기에서 배양하였다. 16시간 후 세균의 증식이 관찰되었을 때 *E. coli* K99와 *S. typhimurium*에 대한 성장을 종료시켰다. 허브 추출물의 희석 정도에 따라 눈에 보이는 colony의 수를 세어 측정하였다.

4. 허브 추출물의 세포독성 측정

허브 추출물의 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 세포에 대한 독성효과는 시중에 판매되는 세포독성측정키트(Cytotox-Glo™, Promega, USA)를 이용하여 매뉴얼에 따라 측정하였다. 10종의 허브추출물은 RPMI 1640 배지에 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL의 농도로 25

cm³ 플라스크에서 MDCK 용합 단일 층과 함께 0, 12 및 24시간 배양시킨 뒤 500 µL씩 상층액을 분리하였다. 세포독성은 luminogenic AAF-Glo™ substrate가 dead-cell protease에 의해 분해되어 나타나는 luminescence (RLU) 신호를 측정하여 분석하였다.

5. 통계분석

본 연구에서 얻어진 결과는 SAS program (SAS 9.1, USA)을 이용하여 분석되었고, 일반선형모형(GLM Procedure)으로 분산분석을 실시하였다. 또한 처리구의 평균 간 비교를 위해 Duncan (1955)의 다중검정법으로 비교하여 5% 유의 수준에서 검정하였다.

111

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 항산화 활성 비교

110종의 허브 추출물에 대해 10 mg/ml의 농도로 항산화활성 평가를 위한 DPPH를 이용한 자유라디칼 소거능의 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 10종의 허브 추출물은 31.4-49.9 %의 범위에서 평균 42.4 %의 자유라디칼 소거능을 나타냈다. 특히, 로즈마리, 오레가노와 캐모

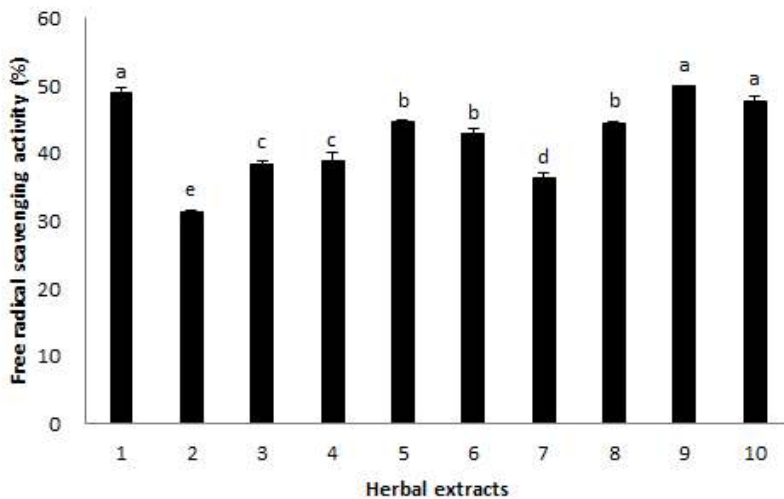


Fig. 1. Effects on DPPH radical scavenging activity hot water extract from herbs of 10 Species; 1, *Origanum vulgare*. 2, *Monarda didyma*. 3, *Echinacea purpurea*. 4, *Ocimum basilicum*. 5, *Mentha piperita*. 6, *Melissa officinalis*. 7, *Thymus vulgaris*. 8, *Stevia rebaudiana*. 9, *Rosmarinus officinalis*. 10, *Matricaria recutita*.^{a-c} Means with different superscripts are significantly different.

마일순으로 라디칼 소거능이 각각 49.9, 48.9, 47.7 %으로 활성이 유의적으로 높았으나 베르가못은 31.4%으로 활성이 가장 낮았다($P < 0.05$). Kim 등(2011)의 연구에서 열수추출물을 1 mg/ml의 농도로 전자공여능을 측정한 결과 타임, 로즈마리 오레가노 순으로 높았다고 하였다($P < 0.05$). 같은 방법을 이용한 열수추출물임에도 불구하고 본 연구에선 타임은 로즈마리와 오레가노보다 낮은 전자공여능을 나타냈는데 이러한 결과는 각 식물의 추출 부위와 시기, 추출용매의 종류, 추출성분의 함량 등에 따라 차이가 나는 것으로 보여진다(Choi et al., 2010). Chea 등(2010)은 로즈마리의 메탄올 추출물이 폴리페놀 함량과 전자공여능이 가장 우수한 항산화 물질로 보고하였으며, 이는 로즈마리가 항산화 및 항균활성이 높은 phenol 물질 중 rosmarinic acid를 많이 함유하고 있어(Yu et al., 2011) 가장 높은 전자공여능 활성 보여준 본 실험의 결과와 연관이 있을 것이라 생각된다. 본 연구에선 로즈마리, 오레가노와 케모마일의 열수추출물이 DPPH 전자공여능의 높은 활성을 나타내 가장 우수한 항산화 물질로 판단되었다.

2. 항균 활성 비교

허브 추출물 10종의 첨가 수준에 따라 *E. coli* K99와 *S. typhimurium*의 항균활성 효과를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 부패산균 및 오염지표균인 *E. coli* K99에 항균활성 효과가 있는 허브 추출물은 오레가노, 베르가못, 타임과 로즈마리로 4종이었다. 특히 베르가못은 다른 허브 추출물보다 *E. coli* K99에서 1.25 mg/mL의 낮은 농도에서 균의 성장억제 효과가 나타나 가장 높은 항균활성을 보였다. 가축에서 식중독의 원인균인 *S. typhimurium*에 항균활성 효과가 있는 허브 추출물은 오레가노, 베르가못, 페퍼민트, 타임, 스테비아와 로즈마리로 6종이었다. 나머지 허브 추출물인 에키네시아, 바질, 레몬밤과 케모마일 4종은 전 첨가 수준에서 *E. coli* K99와 *S. typhimurium*에서의 항균활성 효과가 관찰되지 않았다. Chung 등(2001)은 로즈마리를 열수추출 후 농축액으로 실험에 사용하여 항균활성을 측정한 결과 *E. coli*에서 로즈마리는 대조구인 0.65 mg benzoic acid와 같은 항균활성이 나타났으며 *S. typhimurium*에도 가장 높은 항균활성을 나타냈다. Hammer 등(1999)의 연구에서 *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대한 오레가노 essential oil은 0.25%와 0.12% 농도로 항균활성을 나타냈으며, 베르가못 essential oil은 각각 1.0%, >2.0% 농도로 항균활성 보였다. 이 연구들에 대한 결과는 열수추출물이 essential oil과 유사한 기능성 항균활성 물질의 추출이 가능하다고 보여진다. 따라서 본 연구에서 열수 추출한 허브 10종류의 항균활성을 측정한 결과 베르가못과 오레가노가 *E. coli* K99와 *S. typhimurium*에 대해 높은 항균활성을 가진다고 판단하였다.

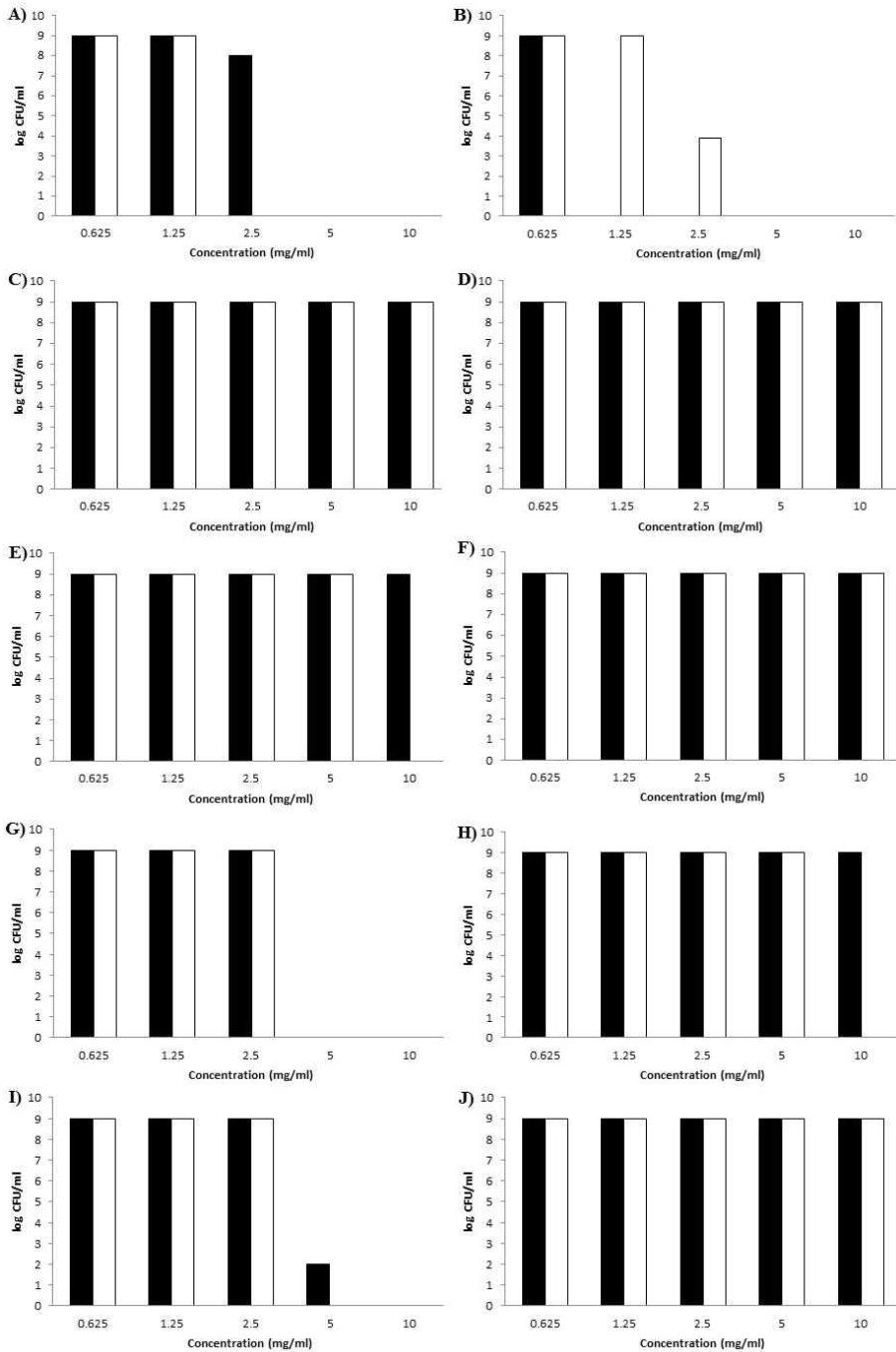
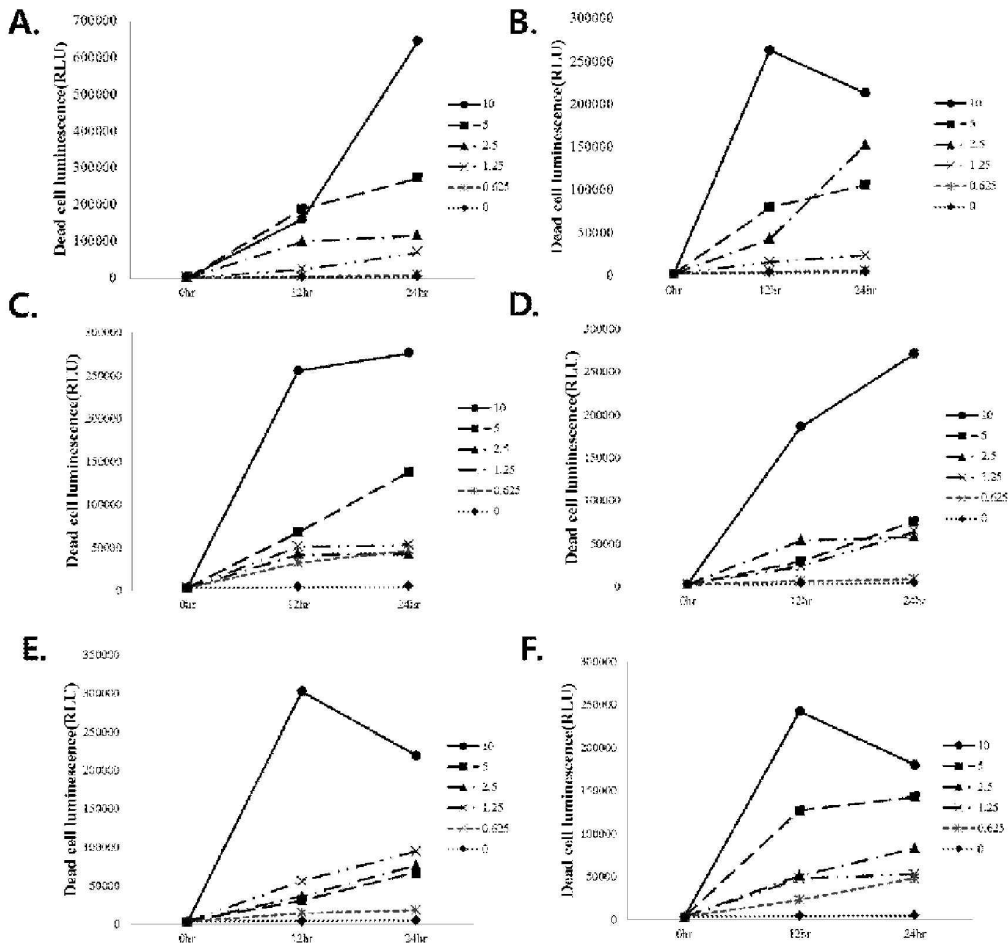


Fig. 2. Effects on DPPH radical scavenging activity hot water extract from herbs of 10 Species; ■, *E. coli* K99. □, *S. typhimurium* S2. A, *Origanum vulgare*. B, *Monarda didyma*. C, *Echinacea purpurea*. D, *Ocimum basilicum*. E, *Mentha piperita*. F, *Melissa officinalis*. G, *Thymus vulgaris*. H, *Stevia rebaudiana*. I, *Rosmarinus officinalis*. J, *Matricaria rec.*

3. 세포독성 평가

10종류의 허브에서 각각 첨가 수준에 따라 0~24시간 동안 세포 독성을 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 대부분의 허브가 5~10 mg의 농도로 포함된 경우 비교적 높은 수준의 세포독성이 관찰된 반면 타임과 로즈마리의 경우는 10 mg 미만의 농도에서는 대조군과 비교하여 차이가 없는 낮은 수준의 세포독성이 관찰되어 안전성이 높은 것으로 관찰되었다. 베르가못과 오레가노가 포함된 경우도 2.5 mg 미만의 농도에서는 낮은 수준의 세포독성이 관찰되었다. 로즈마리는 다양한 암세포(NCI-H82, DU-145, K-562, Hep3D)에서 높은 세포독성이 있는 것으로 보고되고 있으며 타임과 오레가노는 HeLa cell엔 낮은 세포독성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Yesil-Celiktas et al., 2010; Berrington and Lall, 2012). 결과적으로 이러한 각각의 생리활성 효과는 각 허브 내 다른 생리 활성 물질이 세포의 종류에 따라 다르게 작용하는 것이라 판단하였다.



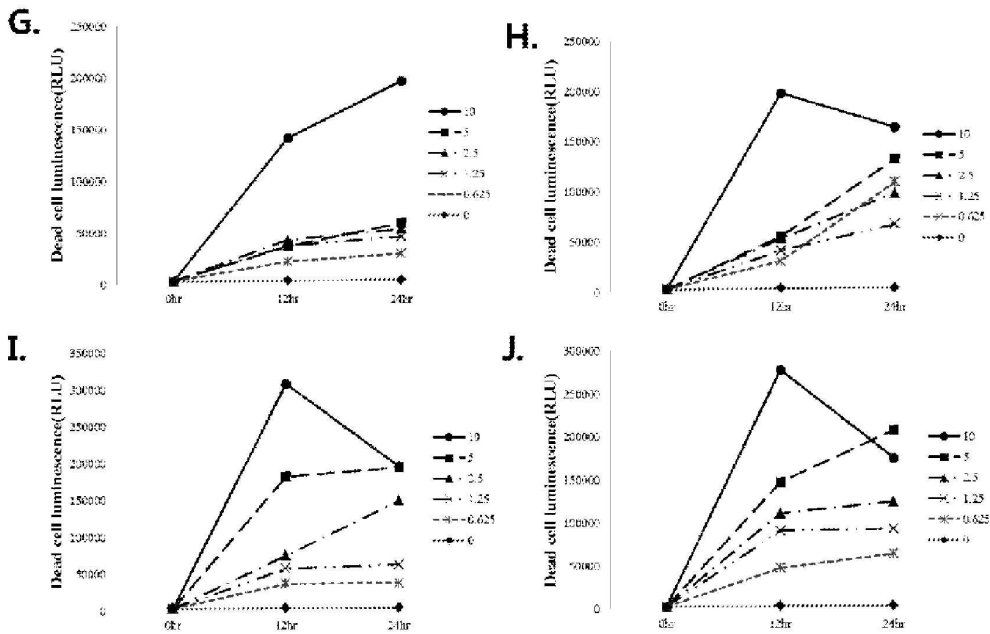


Fig. 3. Effects on cytotoxicity of microorganisms of hot water extract from herbs of 10 species; A, *Origanum vulgare*. B, *Monarda didyma*. C, *Echinacea purpurea*. D, *Ocimum basilicum*. E, *Mentha piperita*. F, *Melissa officinalis*. G, *Thymus vulgaris*. H, *Stevia rebaudiana*. I, *Rosmarinus officinalis*. J, *Matricaria recutita*.

IV. 적 요

본 연구는 10종 허브 추출물에 대한 DPPH 자유라디칼 소거능, 항균효과 및 세포독성에 미치는 영향을 조사함으로써 항생제 대체제로서 활용 가능성을 위한 기초 자료로 제시하고자 수행하였다. 10종의 허브 추출물의 DPPH 자유라디칼 소거능은 로즈마리, 오레가노 및 캐모마일이 각 49.9, 48.9, 47.7%으로 유의적으로 가장 높았다. 허브 추출물의 *E. coli* K99와 *S. typhimurium*에 대한 항균활성은 베르가못, 오레가노, 타임과 로즈마리가 두 균주에 공통적으로 활성이 높게 측정되었으며, 활성이 나타나는 농도에서의 세포독성이 비교적 낮아 안전한 것으로 관찰되었다. 본 연구 결과 유기 축산을 위한 가축 내 천연 항생제 대체제로 항균 및 항산화 활성이 높고, 세포독성이 낮게 나타난 오레가노와 로즈마리가 천연 물질로 활용 가능할 것으로 판단되며, 다양한 추출 조건으로 최적 추출 효율을 검토하여 추가적인 생리활성물질 검정과 해당 물질에 대한 연구가 필요하다.

References

1. Berrington, D. and N. Lall. 2012. Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial carcinoma (HeLa) cell line. *Evid. Base. Compl. Alternat. Med.* 564927: 1-11.
2. Chang, W. K., S. B. Cho, D. W. Kim, S. S. Lee, and S. K. Kim. 2010. Cell growth and antioxidant activity on onion juice fermentation by using *Lactobacillus plantarum* as animal probiotics. *J. Life Sci.* 20(11): 1729-1737.
3. Chea, I. G., H. J. Kim, M. H. Yu, H. I. Kim, and I. S. Lee. 2010. Antioxidant and antibacterial activity of commercially available herbs in Korean markets. *Kor. J. Soc. Food Sci.* 39(10): 1411-1417.
4. Choi, I. Y., Y. J. Song, and W. H. Lee. 2010. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activities of some herbal extracts. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28(5): 870-876.
5. Chung, D. O., I. D. Park, and H. O. Jung. 2001. Evaluation of functional properties of onion, rosemary, and thyme extracts in onion kimchi. *Korean J. Food Cook. Sci.* 17(3): 218-223.
6. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 11(1): 1-42.
7. Hammer, K. A., C. F. Carson, and T. V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86(6): 985-990.
8. Ji, J. R., Y. M. Choi, D. Y. Song, H. S. Choe, C. S. Na, and K. S. Shim. 2011. Effect of feeding peppermint (*Mentha piperita* L.) powder on meat quality and fatty acid composition in finishing Korean native black pigs. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 31(2): 224-231.
9. Kang, B. K., K. B. W. R. Kim, N. K. Ahn, Y. U. Choi, M. J. Kim, S. W. Bark, W. M. Pak, B. R. Kim, J. H. Park, N. Y. Bae, and D. H. Ahn. 2015. Anti-inflammatory effect of onion (*Allium cepa*) peel hot water extract in vitro and in vivo. *Korean. Soc. Biotechnol. Bioeng.* 30(4): 148-154.
10. Kang, S. N., J. D. Kim, I. S. Kim, S. K. Jin, and M. H. Lee. 2007. Effect of replacing antibiotics by herb extracts and digestive enzymes containing vitamin E and oriental medicinal plants byproduct on blood serum cholesterol and meat qualities in the hog loin meat. *Korean J. Food. Sci. Ani. Resour.* 27(1): 87-94.
11. Kim, D. H., K. H. Kim, I. S. Nam, S. S. Lee, C. W. Choi, W. Y. Kim, E. G. Kwon, K. Y. Lee, M. J. Lee, and Y. K. Oh. 2013. Effect of indigenous herbs on growth, blood metabolites and carcass characteristics in the late fattening period of hanwoo steers. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 26(11): 1562.

12. Kim, I. S., M. R. Yang, O. H. Lee, and S. N. Kang. 2011. Antioxidant activities of hot water extract from various spices. *Int. J. Mol. Sci.* 12(6): 4120-4131.
13. Lee, A. L., H. R. Park, M. S. Kim, S. B. Cho, and N. J. Choi. 2014. A comparative study between microbial fermentation and non-fermentation on biological activities of medicinal plants, with emphasis on enteric methane reduction. *Korean J. Organic Agri.* 22(4): 801-813.
14. Omar, J. A., A. Hejazi, and R. Badran. 2016. Performance of broilers supplemented with natural herb extract. *Open J. Anim. Sci.* 6(1): 68-74.
15. Park, H. W., K. H. Jang, M. Hussain, and D. J. Lee. 2012. Evaluation of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging effect, cytotoxicity and tyrosinase inhibition activities in 4 species of herb plants. *J. Appl. Biol. Chem.* 55(4): 201-205.
16. Petersen, M. B., K. Søgaard, and S. K. Jensen. 2011. Herb feeding increases n-3 and n-6 fatty acids in cow milk. *Livest. Sci.* 141(1): 90-94.
17. Shim, K. S., C. S. Na, S. J. Oh, and N. J. Choi. 2012. Optimization of aqueous methanol extraction condition of total polyphenol from spent *Lycium chinense* miller to develop feed additives for pig. *Korean J. Organic agri.* 20(1): 91-99.
18. Wanapat, M., A. Cherdthong, P. Pakdee, and S. Wanapat. 2008. Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) powder supplementation. *J. Anim. Sci.* 86(12): 3497-3503.
19. Yesil-Celiktas, O., C. Sevimli, E. Bedir, and F. Vardar-Sukan. 2010. Inhibitory effects of rosemary extract, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Food. Hum. Nutr.* 65(2): 158-163.
20. Yu, M. H., I. G. Chae, Y. T. Jung, Y. S. Jeong, H. I. Kim, and I. S. Lee. 2011. Antioxidative and antimicrobial activities of methanol extract from *Rosmarinus officinalis* L. and their fractions. *J. Life Sci.* 21(3): 375-384.