

The Antimicrobial Activity of Fermented Extracts from Korean *Dendropanax morbifera*

Jae-Yeul Lee^{1,2}, Tae-Hee Park¹, Se-Ho Park^{1,2}, Seun-Ah Yang³ and Kwang-Hwan Jhee^{1*}

¹Department of Applied Chemistry, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 39177, Korea

²Institute of Natural Science, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

³Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

Received October 11, 2018 / Revised November 19, 2018 / Accepted November 19, 2018

We investigated the fermentation conditions for extracts of leave/branches and sap from Korean *Dendropanax morbifera* (*D. morbifera*) using *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) ilchiwhangchil 1785 and *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020. Log growth phase cultured *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785 and *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020 were used for fermentation. The pH and growth of the microorganisms in broth were monitored during the fermentation period. The results revealed that the optimum fermentation conditions for 20 wt% of leave/branches extracts and 1 wt% of sap extract was 2 days incubation at 37°C. The minimum inhibitory concentration (MIC) method and a disk diffusion assay were used to evaluate the antimicrobial activity of the fermented extracts of the leave/branches and sap against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The antimicrobial activity increased in all three strains grown on the medium containing fermented extracts of the leave/branches and sap as compared with that of the strains grown on medium containing non fermented extracts. Furthermore, the antimicrobial activity increased in proportion to the contents of the fermented extracts. Our data suggest that fermented extracts of leave/branches and sap of *D. morbifera* have applications as natural bio functional materials, such as preservatives, cosmetic materials, and natural packaging materials.

Key words : Antimicrobial activity, *Dendropanax morbifera*, fermentation, *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785, *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020

서 론

식품의 안전과 보존성을 위해 항균 효과가 탁월한 천연보존제와 천연물의 탐색이 활발히 이루어지고 있으며, 실용화에 대한 연구가 진행되고 있다. 식중독은 부패된 음식을 섭취함으로써 발생하는 구토, 설사, 복통 등의 증세를 일으키는 임상 증후군을 일컫으며, 식중독 원인균 가운데 가장 많은 비중을 차지하는 것이 *Salmonella* 종이며, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Vibrio*, *Shigella* 속의 균주들도 식중독을 일으키는 것으로 알려져 있다. 식중독을 유발하는 세균은 주로 채소, 육류, 우유, 난류, 유제품 그리고 조리된 가공 식품을 오염시킬 수 있으며, 오염된 식품을 섭취하면 심각한 식중독을 유발시킨다[10].

천연물에 존재하는 항균활성 물질을 식품의 보존에 이용하고자 생약재 성분, 향신료와 그 정유 성분, 마늘, 파, 쪽 추출물에서 유래된 성분, 미생물이 생성하는 항균활성 물질 등을 중심으로 연구가 계속되어 왔다[5, 6, 13, 15]. 이러한 천연 항균활성 물질의 경우 대부분 그 활성이 낮고 추출된 물질은 식품의 맛과 색택에 많은 영향을 미치므로 아직까지 식품산업에 실용화되지 못하고 있는 실정이다.

제주도 자생식물 중 하나인 황칠나무(*Dendropanax morbiferus* Lev.)는 두릅나무과(araliaceae)에 속하는 아열대성 상록활엽교목으로 동남아시아 등에 약 30여 종이 분포하고 있다. 그 중 우리나라에 서식하는 황칠나무는 1속 1종의 특산 수종으로 온화한 기후의 남서해안 지역과 제주도에서만 자생하고 있다 [1, 8]. 현재까지 수행된 황칠나무에 관한 연구의 대부분은 잎 추출물을 대상으로 하였으며 펠라닌 생성 억제에 의한 미백 [18], 생체 방어체계 강화[16], 항산화 및 항노화[24], 항암[8] 그리고 항당뇨[25] 효과 등이 보고되었다. 이와 같이 다양한 생리 기능성에 대한 연구는 수행되고 있으나, 황칠나무의 기능성을 나타내는 천연물 중 항균활성 물질의 항균제로의 이용 가능성에 대한 연구는 미흡하다.

황칠나무 표피에 상처를 내면 노란 액체(진액)가 나오는데 이를 수액(樹液, sap)이라 한다. 황칠나무 수액의 경우 휘발성

*Corresponding author

Tel : +82-54-478-7837, Fax : +82-54-478-7859

E-mail : khjhee@kumoh.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성분이 다량 함유되어 있으며, 그 중 대부분 지용성 성분으로 알려져 있다. 하지만 현재까지 식품, 화장품 산업에서의 활용도가 전무하므로, 본 연구에서는 황칠나무 수액의 보존제로의 활용도를 확인하고자 한다.

유산균은 미국 식약청에서 안정성을 인정한 Generally Recognized As Safe (GRAS)로 향압, 항산화, 항균, 면역력개선, 항알레르기 등에 뛰어난 효능을 가진 것으로 알려져 있으며[3, 12, 19, 20, 22], 식품이나 채소, 전통약용식물에 적용함으로써 항균작용이 강화되는 등의 긍정적인 효과를 보인다[11]. 이는 발효를 통하여 특정 기능성 성분이 체내에 흡수되기 좋은 형태로 전환되거나 그 양이 증가되는 효과를 가진다는 것을 의미한다. 특히, 황칠나무 잎·가지 및 수액 추출물의 경우 발효에 대한 연구가 매우 부족하여 발효물의 항균 활성 효과에 대한 과학적인 고찰이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 유산균 발효 조건을 검토하고, 추출물의 발효물이 식중독에 관련된 *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 균들에 대한 항균활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

Peptone, dibasic potassium phosphate, sodium acetate, glucose는 Daejung Scientific (Seoul, Korea)에서, prethanol은 Duksan Scientific (Seoul, Korea)에서, nutrient broth (NB) medium, beef extract, yeast extract는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

황칠나무 잎·가지 추출물 제조

황칠나무(*Dendropanax moribifera*, *D. moribifera*) 잎·가지 및 수액은 (주)HSP라이프(Seoul, Korea)에서 제공받았다. 자연 건조된 황칠나무 잎·가지를 세절하여 1 kg을 칭량하고 멸균된 증류수 1 l를 혼합하여 80°C에서 6시간 동안 추출하였으며, 부직포로 여과한 후 고속 추출 농축기를 이용하여 농축시킨 뒤 동결건조기로 건조하여 분말 형태로 회수하였다. 회수한 추출물은 -20°C에서 보관하여 사용하였다. 동결건조 후 분말 형태의 황칠나무 잎·가지 추출물과 수액은 용해성 향상을 위해 초기에 59%의 prethanol을 사용하여 용해시켰다. 그리고 유산균 발효조건 검토실험과 항균 실험에서는 prethanol에 대한 독성을 최소화하기 위해 MRS배지에 1%로 첨가하여 prethanol의 최종 농도가 0.59%가 되도록 배지에 희석하여 사용하였다. Rozès et al의 연구 결과에 따르면 3%의 에탄올을 *L. plantarum*에 처리한 경우, 5×10^8 CFU/ml의 균수를 나타냈으며, 이는 에탄올이 첨가되지 않은 균(*L. plantarum*)과 비교하였을 때 의미 있는 차이를 나타내지 않는 범위이다[23].

Lactobacillus 균주 생장 곡선 측정

본 연구에 사용한 미생물은 *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785 (*L. plantarum* ilchiwhangchil 1785, KACC 92131P)와 *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020 (*L. plantarum* ilchiwhangchil 2020, KACC 92132P)이며, 국립농업과학원(Korean Agricultural Culture Collection, KACC, Wanju, Korea)에서 기탁 받아 사용하였다. *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020의 배양은 200 ml의 MRS medium (pH 7.0)에 미리 18시간 배양된 2 ml의 균체를 접종하여 37°C로 유지된 진탕 배양기(Shaking incubator, SH-802F, LABOTECH, Korea)에서 배양하였다. 유산균의 생장 곡선은 분광광도계(UV-visible spectrophotometer, Agilent 8453, Agilent Technologies, USA)를 사용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효물 제조

황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효물의 제조 공정은 Fig. 1에 나타내었다. MRS 배지를 shaking flask에 넣고 고압 멸균기(Autoclave, AC-02, JEIOTECH, Korea)를 사용하여 멸균하였다. MRS 배지에 황칠나무 잎 추출물 함량을 0, 10, 20, 30, 40 wt% 비율로 제조하고 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785와 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020의 균수는 7×10^8 CFU/ml로 동일하게 접종하여 발효시켰다. 황칠나무 수액시료는 59% prethanol 1 ml에 수액 0.5, 1.0, 2.0 g을 40°C에 5분간 vortexing하여 녹인 후 사용하였다. 용해된 황칠나무 수액을 MRS 배지에 100배 희석하여, 최종 함량이 0, 0.5, 1.0, 2.0 wt%가 되도록 사용하였다. *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785, *L. plantarum*

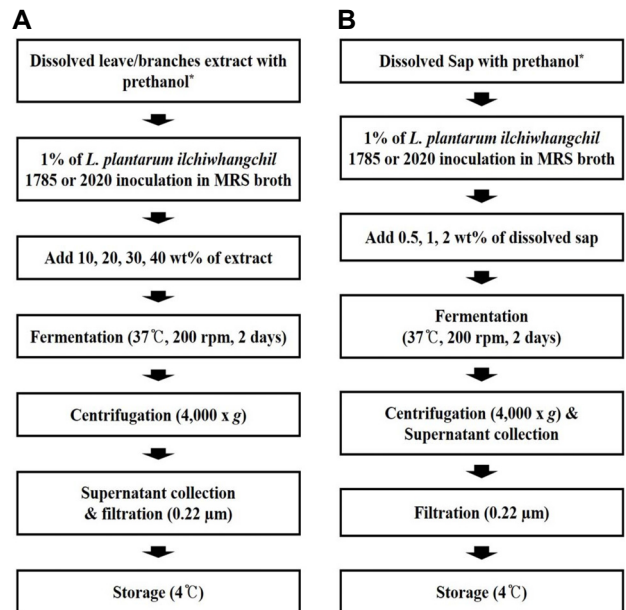


Fig. 1. Fermentation process of *Dendropanax moribifera* (A) leave/branches extracts, (B) sap. * represent 59% edible ethanol.

ilchiwhangchil 2020의 균수는 7×10^8 CFU/ml로 동일하게 접종하여 발효시켰다. 5일 동안 shaking incubator (200 rpm, 37 °C)에서 배양하고 원심분리 후 상층액을 filtering (0.22 μ m pore size, Advantec, Toyo Roshi Kaisha. Ltd., Japan) 하여 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효물을 확보하였다.

황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효 조건 검토

L. plantarum ilchiwhangchil 1785와 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020을 분광광도계의 O.D_{660nm} 값이 0.3일 때, 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액을 함유한 MRS 배지 100 ml에 33 μ l 접종하여 배양하였다(3,000x dilution). 배양 시간별 pH를 측정하기 위해 배양된 균액 200 μ l를 채취하여 pH를 측정하였다(Model 410A⁺, Thermo orion, Korea). 생균수 측정은 shaking flask method를 사용하였다. 분광광도계의 O.D_{660nm} 값이 0.3인 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785 또는 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020을 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액을 함유한 MRS medium에 1×10^5 CFU/ml가 되도록 희석 접종하여 shaking incubator에서 배양하였다. 24시간 간격으로 MRS 고체 agar medium에 10^6 배 희석하여 100 μ l의 균액을 spreading 하였다. Incubator (SH-701, LABOTECH, Korea)에서 37°C, 18시간 배양 후, 생성된 코로니 수를 측정하였다.

황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효물의 항균력 측정

E. coli (KCTC 1039)와 *S. aureus* (KCTC 3881)는 미생물자원센터(KCTC)에서, *P. aeruginosa* (KCCM 11266)는 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였으며, 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효물에 대한 항균활성은 disc diffusion method를 이용하여 생육저지환(inhibition zone)의 크기를 측정하였다. NB agar 배지에 각 균을 도말(1×10^5 CFU/ml) 한 후, 멸균된 paper disc (6 mm, GM Healthcare, UK)를 배지 위에 위치시키고 각 시료를 10 μ l (무게비 1, 2, 3 mg)를 paper disc에 흡수시켰다. 이후, incubator에서 37°C, 24시간 배양하고 디스크 주위의 생육저지환 생성 유무를 확인하였다. Chloramphenicol (10 μ g)은 항세균 활성의 positive control로 사용하였다.

항균력의 정량적인 평가를 위해 minimum inhibitory concentration (MIC)법으로 최소억제농도를 측정하였다. 96 well plate에 각 균을 5×10^5 CFU/well로 180 μ l 접종하고 각 well에 시료를 20 μ l씩 처리하여 32, 64, 128, 256, 512, 1,024, 2,048, 4,096 및 8,192 μ g/ml의 최종농도로 37°C에서 24시간 배양 후 O.D_{660nm}를 측정하여 최소억제농도를 판독하였다.

통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과에 모든 값은 3회 이상의 반복실험의 측정값의 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 실험 결과 값에

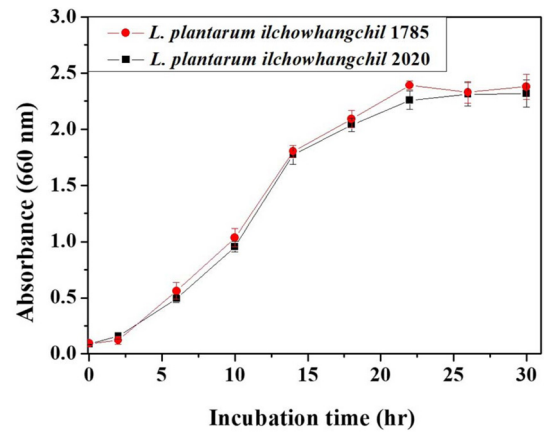


Fig. 2. Growth curves of *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785 and *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020.

대한 통계적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였으며, *p*값이 0.05 이하이면 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

***Lactobacillus* 균주 성장 곡선 측정**

L. plantarum ilchiwhangchil 1785와 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020의 성장 곡선을 작성하였다(Fig. 2). *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785와 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020은 5시간까지는 lag phase, 5~18시간은 log phase, 20시간 이후에는 정지기를 유지하였다. 따라서 황칠나무 잎·가지 추출물과 수액의 발효 모두, 18시간 배양한 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020 균을 사용하였다.

황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효 조건 검토

황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 함량이 증가할수록 유산균의 성장에 영향을 줄 수 있으므로, 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 적절한 함량 설정이 필요하다. 따라서 생균수와 pH의 변화를 발효기간 중에 시간 별로 측정하여 생균수가 가장 많은 배양시간을 확인하였다.

잎·가지는 0~40% 함량의 시료를 사용하였다. *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785와 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020의 배양 시간이 지남에 따라 산도가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A, Fig. 3B). 이는 *L. plantarum*의 발효대사산물인 lactic acid가 배지로 유입되기 때문으로 사료된다[4]. 발효 1일 차에 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020보다 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785에서 발효 초기에 산도가 증가되는 것을 알 수 있는데(Fig. 3A, Fig. 3B), 이는 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785의 당 분해능이 상대적으로 우수할 것으로 판단된다. 하지만, 2, 3, 4, 5일 발효 기간에서는 균에 관계없이 산도가 3.5 부근으로 나타났다.

또한, 황칠나무 잎·가지 추출물과 수액의 발효 조건을 확립하기 위해 발효 시간에 따른 생균수의 변화를 측정하였다. 그 결과, 황칠나무 잎·가지 추출물의 함량에 큰 관계없이 발효 기간이 2일이 경과하였을 때 균수가 가장 많은 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020이 황칠나무 잎·가지 추출물을 발효시킴을 유추할 수 있다(Fig. 3C,

Fig. 3D). 그리고 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785와 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020 간 황칠나무 수액의 발효 시간에 따른 생균수 측정 결과, 생균수가 가장 많은 2일간의 발효시간이 가장 적당하다고 사료된다(Fig. 3E, Fig. 3F).

생균수 감소가 발효과정 중에 황칠나무의 잎·가지 추출물 또는 황칠 수액에서 항균물질의 생성에 기인할 수도 있다. 한

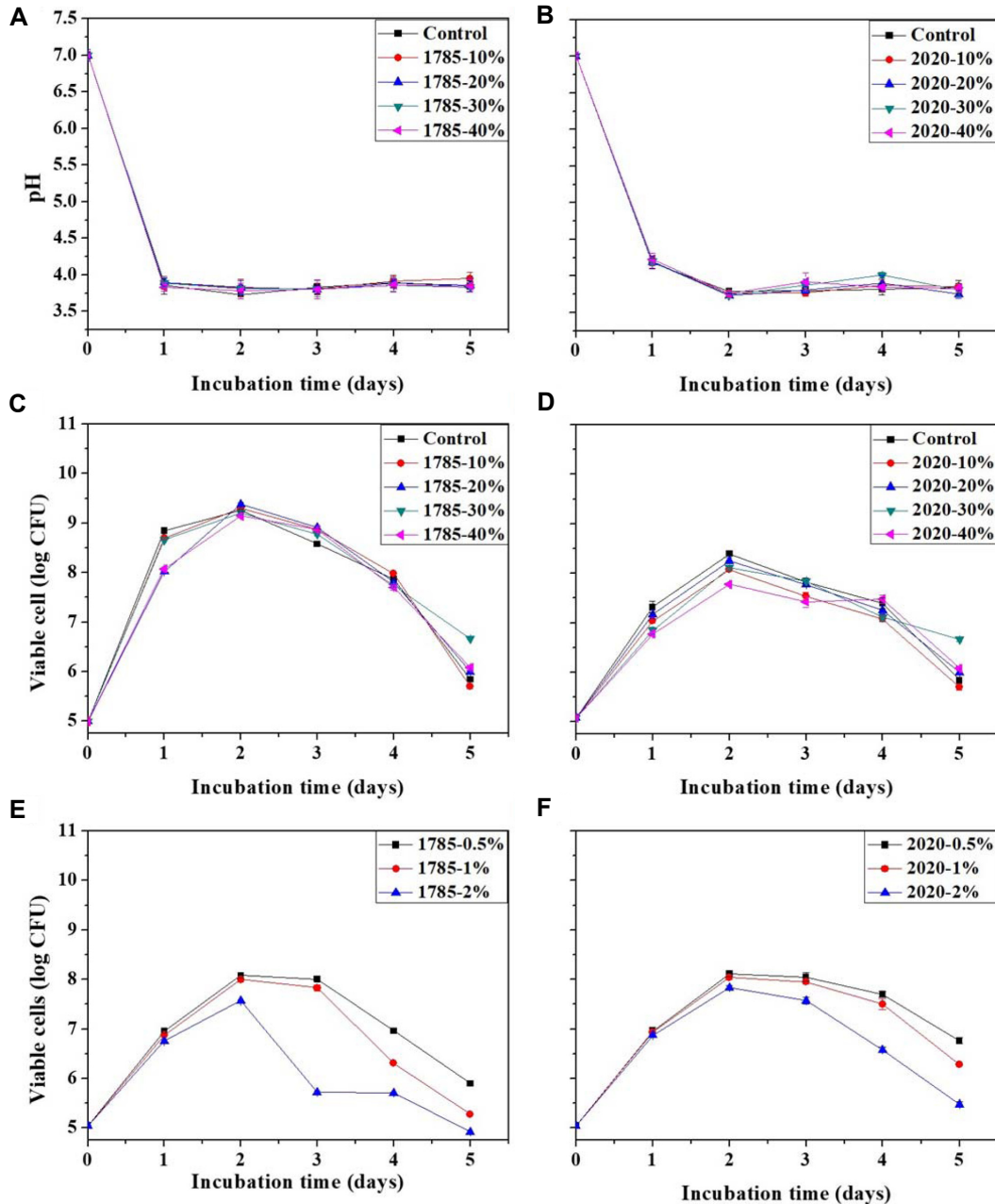


Fig. 3. The changes of pH and the viable cells during of fermentation process. (A) pH changes during fermentation of *Dendropanax morbifera* leave/branches extracts with *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785, and (B) *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020, (C) the number of viable cells changes during fermentation of *Dendropanax morbifera* leave/branches extracts with *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785, and (D) *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020, (E) the number of viable cells changes during fermentation of *Dendropanax morbifera* sap with *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785, and (F) *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020.

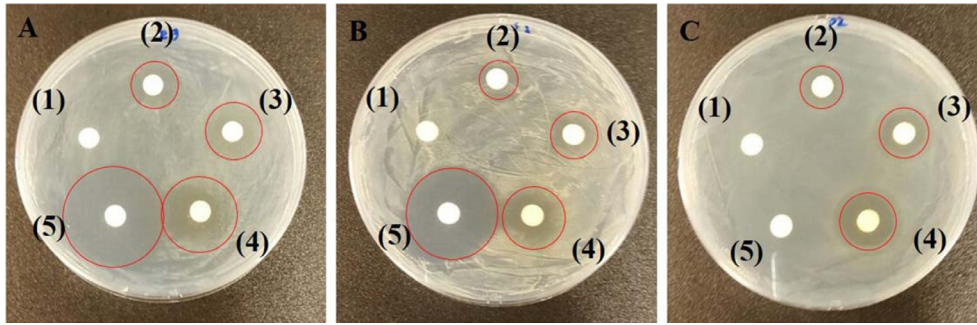


Fig. 4. Antimicrobial activities of fermented *Dendropanax morbifera* leave/branches extracts, using (A) *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785 (1785) against *Escherichia coli*, (B) *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785 (1785) against *Pseudomonas aeruginosa*, and (C) *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020 (2020) against *Staphylococcus aureus*. (1) control (distilled water), (2) 1 mg, (3) 2 mg, (4) 3 mg of *Dendropanax morbifera* extracts, respectively, (5) chloramphenicol (10 µg).

에로 테르펜에 속하는 화합물 중, sesquiterpene류의 β-cubebene은 황칠 수액의 주요성분으로 항균 효과가 있다는 보고가 있으므로[2], 황칠나무 수액의 β-cubebene에 의해 *L. plantarum* 균주가 더 이상 증식하지 못하고 사멸할 수도 있다. 본 실험을 통하여 황칠나무 잎·가지 발효물의 최적 발효 조건은 20 wt% 함량의 황칠나무 잎·가지 추출물, 1 wt% 황칠나무 수액을 이용, *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020의 생균수가 가장 많고, 산도가 높은 2일간 발효시킨 발효물을 이용하여 항균력 측정에 사용하였다.

황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효물의 항균력 측정

E. coli, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 균주에 대한 황칠나무 잎·가지 추출물의 발효물 및 수액 발효물의 항균 활성은 disk diffusion method를 수행하여 발효 전후 생육저지환의 크기를 비교, 분석하였다. 시료는 발효 전의 황칠나무 잎·가지 추출물, 발효 후의 황칠나무 잎·가지 추출물, 발효 후의 수액을 사용하였다.

*E. coli*에 대한 발효 전의 황칠나무 잎·가지 추출물은 생육저지환이 나타나지 않았으나, *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785를 사용한 발효 후의 황칠나무 잎·가지 추출물을 1, 2, 3 mg 처리한 균에서 12~20 mm의 생육저지환을 나타냈다(Fig. 4A).

L. plantarum ilchiwhangchil 2020으로 발효한 경우에도 동일한 결과를 나타내었다. 이 생육저지환의 크기는 발효물의 양에 비례하여 증가하였다. 그러나 수액의 발효물의 경우에는 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785에서는 생육저지환이 보이지 않았고, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020으로 발효한 경우, 9~12 mm의 생육저지환을 나타내었다. 1 mg 함량으로 처리한 경우는 생육저지환이 나타나지 않았고, 2, 3 mg 함량으로 처리한 균에서만 비례적으로 생육저지환이 증가하였다. 증류수를 사용한 음성대조군은 모든 시료에서 생육저지환이 나타나지 않았으며, 항세균 활성의 positive control으로 사용한 chloramphenicol의 경우 모든 시료에서 동일한 생육저지환이 나타났다(Table 1).

*S. aureus*에 대한 발효 전의 황칠나무 잎·가지 추출물 처리군(1, 2, 3 mg)에서의 생육저지환은 각각 7~10 mm로 나타났다. 발효 후의 황칠나무 잎·가지 추출물을 1, 2, 3 mg의 함량으로 처리한 균에서의 생육저지환은 11~16 mm로 나타나 발효 전의 추출물보다 항균활성이 발효에 의해 증가되었음을 알 수 있다(Fig. 4B). 이 생육저지환의 크기는 발효물의 양에 비례하여 증가하였다. 수액 발효물의 경우에는 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785로 발효한 경우, 3 mg의 함량에서만 9 mm의 생육저지환이 나타났고, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020을

Table 1. Inhibition zones of fermented *Dendropanax morbifera* leave/branches extracts, and sap using *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785 (1785) and *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020 (2020) against *Escherichia coli*

	Clear zone diameter (mm)				
	Dose (mg/disc)				Antibiotics
	¹ Control	1	2	3	
<i>D. morbifera</i> leave/branches extracts	² N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	32±2
Fermented leave/branches extracts by 1785	N.D.	15±0.5	17±1	20±0.5	32±1
Fermented leave/branches extracts by 2020	N.D.	12±0.5	17±1	20±1	32±1
Fermented sap by 1785	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	34±1
Fermented sap by 2020	N.D.	N.D.	9±0.5	12±0.5	32±1

¹Control : distilled water, ²N.D. : Not detected

Table 2. Inhibition zones of fermented *Dendropanax morbigera* leaf/branches extracts, and sap using *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785 (1785) and *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020 (2020) against *Staphylococcus aureus*

	Clear zone diameter (mm)				
	Dose (mg/disc)				
	¹ Control	1	2	3	Antibiotics
<i>D. morbigera</i> leaf/branches extracts	² N.D.	7±0.5	8±1	10±1	30±1
Fermented leaf/branches extracts by 1785	N.D.	11±0.5	13±1	16±2	27±1
Fermented leaf/branches extracts by 2020	N.D.	12±1	13±0.5	16±1	28±2
Fermented sap by 1785	N.D.	N.D.	N.D.	9±0.5	28±1
Fermented sap by 2020	N.D.	7±0.5	8±0.5	9±0.5	27±2

¹Control : distilled water, ²N.D. : Not detected

사용한 발효물의 함량에 비례하여 생육저지환이 나타났다. 증류수를 사용한 음성대조군은 모든 시료에서 생육저지환이 나타나지 않았으며, 항생균 활성의 positive control으로 사용한 chloramphenicol의 경우 모든 시료에서 동일한 생육저지환을 나타냈다. *S. aureus*에 대한 잎·가지 추출물의 발효물의 항균활성은 잎·가지 추출물의 발효물이 수액의 경우보다 우수함을 알 수 있다(Table 2).

*P. aeruginosa*에 대한 발효 전의 황칠나무 잎·가지 추출물에서는 생육저지환이 나타나지 않았다. 발효 후의 황칠나무 잎·가지 추출물을 1, 2, 3 mg의 함량으로 처리한 군에서는 8~16 mm의 생육저지환을 나타내었다(Fig. 4C). 이는 항균활성이 발효에 의해 증가되었음을 알 수 있다. 이 생육저지환의 크기

는 발효물의 양에 비례하여 증가하였다. 수액 발효물의 경우에는 두 가지 유산균에 의한 발효물 3 mg에서 각각 8, 9 mm의 생육저지환이 나타났다. 증류수를 사용한 음성대조군은 모든 시료에서 생육저지환이 나타나지 않았으며, *P. aeruginosa*에 대한 chloramphenicol의 생육저지환이 나타나지 않았다(Table 3). 그 이유는 다중약물 배출 시스템인 MexAB-OprM이 녹농균에서 발현되며, 이것은 chloramphenicol을 비롯한 fluoroquinolones, β-lactam, tetracycline, macrolides, novobiocin 등 다양한 항균제에 내재적 저항성을 보이기 때문이다[5, 21].

황칠나무 잎·가지 추출물의 발효물 및 수액 발효물의 최소 저해농도(MIC)를 Table 4에 나타내었다. *E. coli*에 대한 발효 전의 황칠나무 잎·가지 추출물은 4,096 µg/ml의 MIC를 나타

Table 3. Inhibition zones of fermented *Dendropanax morbigera* leaf/branches extracts, and sap using *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785 (1785) and *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020 (2020) against *Pseudomonas aeruginosa*

	Clear zone diameter (mm)				
	Dose (mg/disc)				
	¹ Control	1	2	3	Antibiotics
<i>D. morbigera</i> leaf/branches extracts	² N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fermented leaf/branches extracts by 1785	N.D.	8 ± 0.5	13 ± 0.5	16 ± 0.5	N.D.
Fermented leaf/branches extracts by 2020	N.D.	8 ± 0.5	12 ± 1	16 ± 1	N.D.
Fermented sap by 1785	N.D.	N.D.	N.D.	9 ± 1	N.D.
Fermented sap by 2020	N.D.	N.D.	N.D.	8 ± 0.5	N.D.

¹Control : distilled water, ²N.D. : Not detected

Table 4. Minimum inhibitory concentration of fermented *Dendropanax morbigera* leaf/branches extracts, and sap using *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 1785 (1785) and *Lactobacillus plantarum* ilchiwhangchil 2020 (2020)

	MIC (µg/ml)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1785 only	8,196	8,196	8,196
2020 only	8,196	8,196	8,196
<i>D. morbigera</i> leaf/branches extracts	4,096	2,048	4,096
Fermented leaf/branches extracts by 1785	64	256	256
Fermented leaf/branches extracts by 2020	128	256	256
Fermented sap by 1785	4,096	4,096	2,048
Fermented sap by 2020	2,048	2,048	2,048

냈으며, 두 유산균을 사용한 발효 후의 황칠나무 잎·가지 추출물에서 각각 64, 128 µg/ml을 나타냈다. 그러나 두 유산균을 사용한 수액의 발효물의 경우에는 각각 4,096과 2,048 µg/ml의 MIC를 나타내었다. *S. aureus*에 대한 발효 전의 황칠나무 잎·가지 추출물은 2,048 µg/ml의 MIC를 나타냈으며, 두 유산균을 사용한 발효 후의 황칠나무 잎·가지 추출물에서 각각 256, 256 µg/ml을 나타냈다. 그러나 두 유산균을 사용한 수액의 발효물의 경우에는 각각 4,096과 2,048 µg/ml의 MIC를 나타내었다. *P. aeruginosa*의 경우, 발효 전의 황칠나무 잎·가지 추출물은 4,096 µg/ml의 MIC를 보였다. *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785를 사용한 발효 후의 황칠나무 잎·가지 추출물에서 256 µg/ml의 MIC값을 나타냈으며, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020을 사용한 경우에는 256 µg/ml을 나타냈다. 수액의 발효물의 경우에는 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785는 2,048 µg/ml, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020은 2,048 µg/ml의 MIC의 값을 보였다.

항균실험결과를 종합하면, 황칠나무의 잎·가지 추출물을 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785, *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020을 이용하여 발효시킴으로써 *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 균주들에 대하여 항균 활성이 증진되었다. 특히 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785의 황칠나무 잎·가지 발효물이 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020의 발효물보다 항균 활성이 우수함을 보였다. 이는 황칠나무 잎·가지 추출물의 주요 성분인 rutin이 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785의 L-rhamnose분해에 의해 cyanidine glycoside가 생성되어 항균 활성이 증대되었음을 유추할 수 있다[7, 14]. 황칠나무 수액 발효물의 경우, 황칠나무 잎·가지 추출물의 발효물보다 상대적으로 약한 항균력을 보였다. 본 연구 결과로 황칠나무 잎·가지 및 수액 추출 발효물의 천연보존제로의 활용이 가능 할 것으로 기대한다.

감사의 글

이 연구는 금오공과대학교 학술연구비로 지원되었음.

References

- Bernart, M. W., Cardellina, J. H., Balaschak, M. S., Alexander, M. R., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. 1996. Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *J. Nat. Prod.* **59**, 748-753.
- Chung, I. M., Seo, S. H., Kang, E. Y., Park, S. D., Park, W. H. and Moon, H. I. 2009. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Dendropanax moribifera* against *Aedes aegypti* L. *Biochem. Syst. Ecol.* **37**, 470-473.
- Cross, M. L., Stevenson, L. M. and Gill, H. S. 2001. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int. Immunopharmacol.* **1**, 891-901.
- Fu, W. and Mathews, A. P. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng. J.* **3**, 163-170.
- Hong, W. S. and Yoon, S. 1989. The effects of low temperature heating and mustard oil on the Kimchi fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **21**, 331-337.
- Huhtanen, C. N. 1980. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. *J. Food Sci.* **43**, 195-196.
- Hyun, T. K., Kim, M. O., Lee, H., Kim, Y., Kim, E. and Kim, J. S. 2013. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax moribifera* Léveillé. *Food Chem.* **141**, 1947-1955.
- Im, K. J., Jang, S. B. and Yoo, D. Y. 2015. Anti-cancer effects of *Dendropanax moribifera* extract in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *J. Kor. Obstet. Gynecol.* **28**, 26-39.
- Jeong, B. S., Jo, J. S., Pyo, B. S. and Hwang, B. 1995. Studies on the distribution of *Dendropanax moribifera* and component analysis of the golden lacquer. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 393-400.
- Jung, H. J., Park, S. H., Seo, H. A., Kim, Y. J., Cho, J. I., Park, S. S., Song, D. S. and Kim, K. S. 2005. Differentiation of four major gram-negative foodborne pathogenic bacterial genera by using ERIC-PCR genomic fingerprinting. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 1005-1011.
- Kang, D. H. and Kim, H. S. 2011. Functionality analysis of Korean medicine fermented by *Lactobacillus* strains. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 259-265.
- Karovičová, J. and Kohajdová, Z. 2003. Lactic acid fermented vegetable juices. *Hortic. Sci.* **30**, 152-158.
- Koho, K. H. 1996. Antimicrobial effects of short-chain fatty acids against *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods Biotechnol.* **5**, 42-47.
- Kołodziejczyk, K., Sójka, M., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S. and Baron, A. 2013. Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Ind. Crop. Prod.* **51**, 279-288.
- Lee, B. W. and Shin, D. H. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**, 200-204.
- Lee, S. H., Lee, H. S., Park, Y. S., Hwang, B., Kim, J. H. and Lee, H. Y. 2002. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax moribifera* Lev. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **10**, 109-115.
- Li, X. Z., Livermore, D. M. and Nikaido, H. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1732-1741.
- Mo, J. H. and Oh, S. J. 2013. Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of the methanol extract and fractions from *Dendropanax moribifera* Lev. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **11**, 275-280.
- Olsen, A., Halm, M. and Jakobsen, M. 1995. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. *J. Appl.*

- Bacteriol.* **79**, 506-512.
20. Perdigón, G., Fuller, R. and Raya, R. 2001. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2**, 27-42.
 21. Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 255-264.
 22. Rafter, J. 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Brit. J. Nutr.* **88**, S89-S94.
 23. Rozès, N. and Peres, C. 1998. Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 108-111.
 24. Shin, D. C., Kim, G. C., Song, S. Y., Kim, H. J., Yang, J. C. and Kim, B. A. 2013. Antioxidant and antiaging activities of complex supercritical fluid extracts from *Dendropanax morbifera*, *Corni fructus* and *Lycii fructus*. *Kor. J. Herbol.* **28**, 95-100.
 25. Song, J. H., Kang, H. B., Kim, J. H., Kwak, S. M., Sung, G. J., Park, S. H., Jeong, J. H., Kim, H. H., Lee, J. M., Jun, W. J., Kim, Y. J. and Choi, K. C. 2018. Antiobesity and cholesterol-lowering effects of *Dendropanax morbifera* water extracts in mouse 3T3-L1 cells. *J. Med. Food* **21**, 793-800.

초록 : 국내 황칠나무 발효 추출물의 항균력 평가

이재열^{1,2} · 박태희¹ · 박세호^{1,2} · 양선아³ · 지광환^{1*}

(¹금오공과대학교 응용화학과, ²계명대학교 자연과학연구소, ³계명대학교 식품가공학과)

본 연구에서는 *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) ilchiwhangchil 1785와 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020을 이용하여 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효 조건을 검토하였다. 지수성장기의 *L. plantarum* ilchiwhangchil 1785와 *L. plantarum* ilchiwhangchil 2020 균주를 발효에 사용하였다. 발효 중에 발효액의 pH 변화와 생균수의 변화를 분석하였다. 그 결과, 적당한 발효 조건은 잎·가지 추출물 20 wt% 및 수액 1 wt%를 함유하고, 37°C에서 2일간 발효시키는 것이었다. 잎·가지, 수액 발효 추출물의 항균력은 최소저해농도법(MIC)과 disk diffusion 방법을 이용하여 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*), 포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*)을 대상으로 비교하였다. 비발효 추출물을 함유한 배지에서 배양한 것보다 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효액을 함유한 배지에서 배양한 세 가지 균주 모두에서 항균활성이 증가하였다. 또한, 황칠나무 발효 추출물의 함량에 비례하여 항균 활성이 증가하였다. 연구 결과는 황칠나무 잎·가지 추출물 및 수액의 발효물의 천연보존제, 화장품소재 및 천연물 포장소재 등 천연 생기능성 물질로의 응용가능성을 시사한다.