

Anti-bacterial Effect of *Oenothera lamarckiana* Aerial Part Extract

Ji Yeong Yang^{1,2,§,*}, Pyoengjae Lee^{3,§,**} and Sa-Hyun Kim^{4,†,**}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Yonsei University, Wonju 26493, Korea

²Crop Foundation Division, National Institute of Crop Science, Jeonju 54875, Korea

³School of Industrial Bio-pharmaceutical Science, Semyung University, Jecheon 27136, Korea

⁴Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon 27136, Korea

Ingestion of food contaminated with microorganism, if not always, could lead to severe health problem. Preservatives has been added to food to prevent food from being contaminated with microorganism. But, these have potential to threaten the health. Therefore, much effort has been taken to find the safe materials showing the anti-microbial activity. In this study, we investigated the anti-bacterial activity of *Oenothera lamarckiana* aerial part extract against eight bacteria strain. In paper disc assay, extract inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus*, *Bacillus cereus* and *Shigella dysenteriae* at 200 µg/disc, but not against *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhi and *S. enteritidis*. Minimum inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus*, *Bacillus cereus* and *Shigella dysenteriae* is 250, 250, 500 and 500 µg/mL, respectively. Compared with reported MIC of other plant resources, *O. lamarckiana* aerial part extract showed the relatively high anti-bacterial activity. *O. lamarckiana* aerial part could be suitable for the preservative development. But, it still remains to be studied to evaluate safety and so on.

Key Words: *Oenothera lamarckiana*, Anti-bacterial activity, *Staphylococcus aureus*, Minimum inhibitory concentration

식중독(food poisoning)은 식품을 매개로 하여 나타나는 질환으로 인체 유해 미생물 혹은 화학물질 등에 오염된 신선식품 혹은 육가공품을 섭취함으로써 나타난다. 미생물에 의한 식중독은 크게 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus* 등의 박테리아를 대표로 하는 장독소 기전을 통한 비염증성 설사를 동반하는 경우와 *Salmonella* 속 박테리아를 대표로 하는 장관 침습 혹은 세포독소 기전을 통한 염증성 설사를 동반하는 경우로 나눌 수 있다. 이런 미생물에 의한 식품오염을 막기 위해 신선식품 혹은 육가공품의 생산, 가공, 유통 등 소비자에 도달하기 하기 전 과정에 오염요인 관리하고 좀 더 정교한 미생물 탐색 기술

을 개발하고자 노력하고 있다(Lim and Kim, 2017; Choi et al., 2019). 동시에 식품을 장기간 안전하게 보존하고자 항균 효과를 가지는 식품 보존제를 사용하는데 천연자원의 항균 활성과 항균물질을 탐색하고 산업적으로 응용하는 방법에 대한 연구 또한 꾸준히 진행되어 오고 있다(Yang and Lee, 2013; Lee et al., 2015; Lee et al., 2017; Liu et al., 2017; Yu et al., 2019).

Oenothera 속의 달맞이꽃은 남·북 아메리카가 원산지인 우리나라에서는 전국적으로 자생하나 특히 남부해안과 제주도에서 주로 찾아볼 수 있다고 알려져 있다. *Oenothera* 속 달맞이꽃의 생리활성 효능과 관련하여 항산

Received: October 30, 2020 / Revised: December 11, 2020 / Accepted: December 12, 2020

* Graduate student, ** Professor.

§ These authors contributed equally.

† Corresponding author: Sa-Hyun Kim, Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon 27136, Korea.

Tel: +82-43-649-1624, Fax: +82-50-4411-9604, e-mail: science4us@semyung.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

Table 1. List of bacteria used for anti-bacterial effect of *O. lamarckiana*

Gram staining	Strain	Media	Temp.	
Positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Nutrient agar	37°C
	MRSA ¹⁾	ATCC 43300	Nutrient agar	37°C
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 13061	Nutrient agar	30°C
Negative	<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313	Nutrient agar	37°C
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Nutrient agar	37°C
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	Nutrient agar	37°C
	<i>Salmonella</i> Typhi	ATCC 19430	Nutrient agar	37°C
	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	Nutrient agar	37°C

¹⁾ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

화, 항염증, 항암 등이 보고된 바 있어 산업적으로 이용 가치가 높다고 평가되고 있으며 특히 달맞이꽃의 씨의 생리활성 연구는 매우 활발한 편이다(Yoon et al., 2009; Almora-Pinedo et al., 2017; Timosuzuk et al., 2018; Pajak et al., 2019). *Oenothera* 속 달맞이꽃의 항균 작용과 관련하여 애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata*) 전초 80% 에탄올 추출물과 분획물이 항균효과를 보였으며(Kim et al., 2007) 달맞이꽃(*Oenothera biennis*) 70% 에탄올 추출물의 경우 *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhi*에 대해서는 성장억제 효과를 보이지 않았으나 *Bacillus cereus*에 대해서는 성장억제를 보였다(Kim and Lee, 2016). 긴잎달맞이꽃(*Oenothera odorata*) 뿌리 75% 메탄올 추출물과 분획물 대상으로 항균효과 실험했을 때는 클로로포름 분획물이 *Streptococcus* 속에 대해 상대적으로 높은 항균력 보였다(Shin et al., 1994). 하지만 *Oenothera* 속 달맞이꽃 중 큰달맞이꽃(*Oenothera lamarckiana*)이 식품 부패 및 식중독 관련 균에 대한 성장억제 효과가 보고된 바 없다. 본 연구는 큰달맞이꽃 지상부 추출물을 대상으로 항균효과가 있는지 실험하여 식품과 관련하여 효용이 있는지 기초적인 자료를 제시하고자 한다.

큰달맞이꽃(*Oenothera lamarckiana*)의 지상부 추출물은 한국식품추출물은행에서 구매하여 사용하였다. 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 분주하여 -20도에서 보관하였다. 실험에 사용한 bacteria에 대한 정보는 Table 1과 같다. 실험 균주는 보통한천배지(Becton-Dickinson, New Jergy, USA)에 계대 배양하여 사용하였다. 30°C 혹은 37°C에서 18시간 배양한 세균의 집락을 취하여 멸균 생리식염수로 옮겨 각각의 균수를 McFarland 탁도 0.5 (1.5×10^8 /mL)에 맞추어 세균 부유액을 준비하였다. Muller-Hinton 평판배지(Becton-Dickinson) 표면에 멸균된 면봉을 이용하여 세균 부유액을 3회 반복하여 도말하였다. DMSO에

Table 2. Clear zone (mm) of treatment with *O. lamarckiana* against bacteria

Gram staining	Strain	Concentration (µg/disc)	
		20	200
Positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	- ¹⁾	12
	MRSA ²⁾	-	12
	<i>Bacillus cereus</i>	-	8
Negative	<i>Shigella dysenteriae</i>	-	15
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-
	<i>Salmonella</i> Typhi	-	-
	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-

¹⁾ No clear zone

²⁾ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

녹인 20 mg/mL과 동일 용매로 희석한 2 mg/mL 10 µL를 paper disc (6 mm)에 처리한 후 건조하여 용매를 제거하였다. 대조군으로 DMSO 10 µL를 paper disc에 처리하여 건조한 것을 사용하였다. Paper disc를 박테리아를 도말한 평판배지 위에 올려놓고 밀착시켰다. 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 disc 주변에 생성된 생육억제환(clear zone)의 지름을 측정하였다. 배양된 세균의 집락을 취하여 각각의 균수를 최종 1×10^5 /mL가 되도록 Muller-Hinton 액체배지(Becton-Dickinson, MA, USA)에 세균 부유액을 준비하였다. 큰달맞이꽃 추출물은 최소 농도 0.13 mg/mL에서 최대 농도 2 mg/mL의 범위 내에서 Muller-Hinton 액체배지에 단계 희석하였다. 대조군과 각 실험군에 동일한 최종 용매의 양(%)이 되도록 DMSO를 첨가하였다. 농도별 추출물과 세균 부유액을 96 well plate에 각각 100 µL씩 분주한 후 18시간 배양하였다. 최소억제농도(MIC)는 600 nm에서

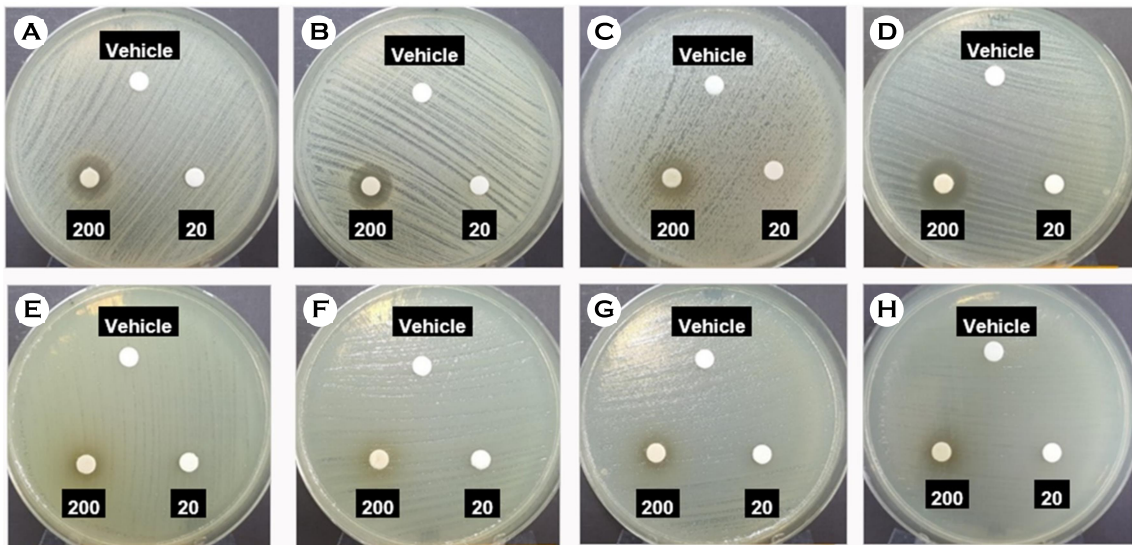


Fig. 1. Anti-bacterial effect of *O. lamarckiana* against *S. aureus* (A), MRSA (B) and *B. cereus* (C) and *S. dysenteriae* (D), *E. coli* (E), *E. coli* 0157 (F), *S. Typhi* (G), *S. enteritidis* (H). Vehicle: Disc which was added with DMSO, 200: 200 µg/disc, 20: 20 µg/disc.

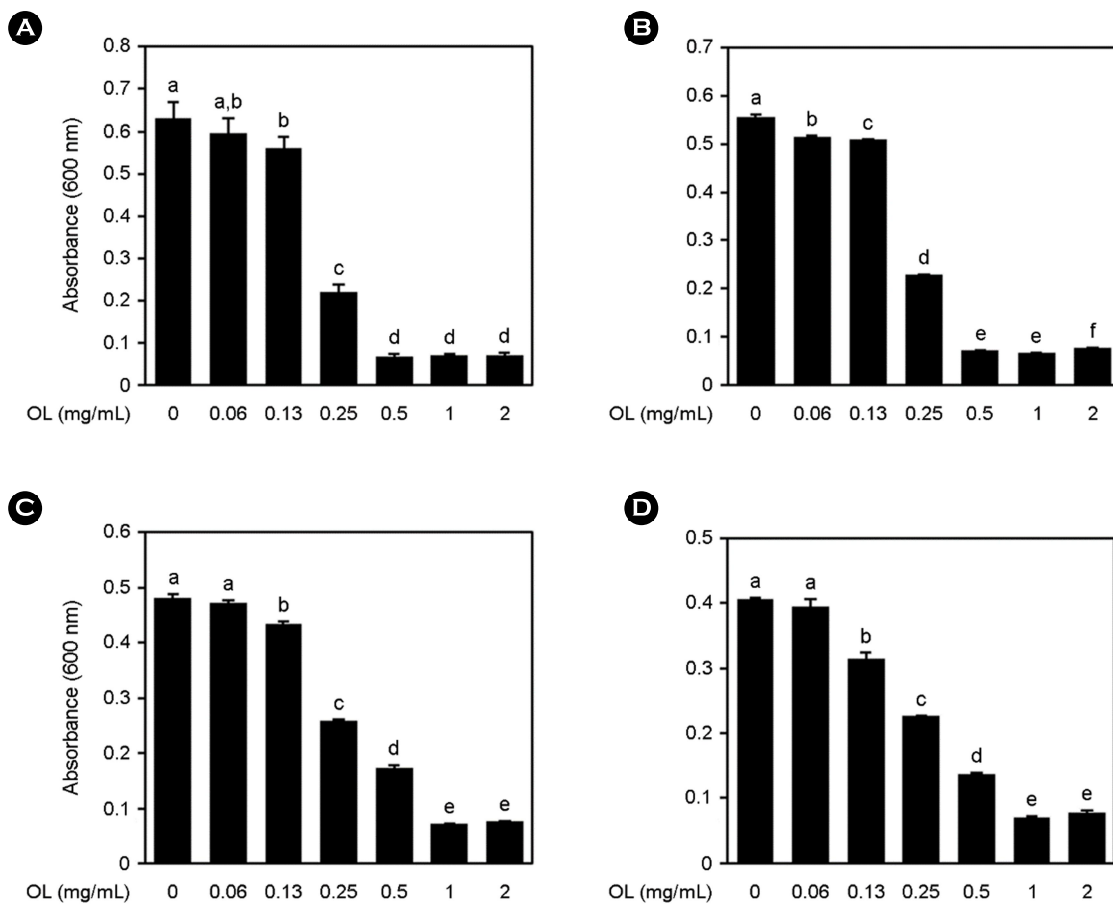


Fig. 2. Determination of the MIC of *O. lamarckiana* extract against *S. aureus* (A), MRSA (B) and *B. cereus* (C) and *S. dysenteriae* (D) by broth dilution test. A final optical density of the bacterial suspension was measured at 600 nm wavelength by spectrophotometry. DATA are presented as mean \pm SD of three independent experiments. Means with different letters indicate the statistical difference ($P < 0.05$).

흡광도를 측정하여 균 증식의 억제가 일어나는 최소 농도로 결정하였다. 큰달맞이꽃 추출물을 0.06, 0.13, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL 농도가 되도록 Mueller Hinton 액체배지에 희석한 후 2×10^5 /mL로 희석된 세균을 각각 100 μ L씩 96 well plate에 접종하였다. 37°C의 배양기에서 배양하면서 배양 직후부터 18시간 후까지 매 2시간마다 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 순수한 액체배지에 세균을 접종한 후 실험군과 동일한 방법으로 배양하면서 측정하였다. 측정값은 독립적으로 이루어진 3회의 실험에서 얻은 값을 mean \pm SD로 나타내었다. 시료들 간의 통계분석은 GraphPad Prism 6을 이용하여 일원분산분석과 turkey's multiple comparisons로 이뤄졌다($P < 0.05$).

Paper disc assay에서 *O. biennis* 전초 건조물의 70% 에탄올 추출물이 *B. cereus*에 대해서는 항균효과를 보였으나 *S. aureus*, *E. coli* 및 *S. Typhimurium*에 대해서는 항균효과를 보이지 않은 것으로 보고된 바 있으며(Kim and Lee, 2016) *O. laciniata* 전초의 80% 에탄올 추출물 및 분획물의 경우에틸아세테이트 분획물이 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S.*

aureus, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. Typhimurium*에 대해 가장 강력한 항균력을 보였다(Kim et al., 2007). 본 연구에서 *O. lamarckiana* 지상부의 메탄올 추출물은 20 μ g/disc에서 실험 대상이 된 박테리아에 대해 clear zone을 보이지 않았지만 200 μ g/disc에서 *S. aureus*, MRSA, *B. cereus*와 *S. dysenteriae*에 대해 각각 12, 12, 8, 15 mm의 clear zone을 보였다(Table 2, Fig. 1). *Oenothera* 속 달맞이꽃의 종, 부위, 추출 용매 등의 조건에 따라 항균의 양상이 다르게 나타날 수 있음을 보여준다. 좀 더 종합적으로 종별, 부위별, 추출방법별로 비교하여 실험이 이뤄져야 할 것으로 생각한다.

O. lamarckiana 지상부의 메탄올 추출물은 *S. aureus*와 MRSA에 대해 125 μ g/mL에서는 성장억제가 뚜렷하지 않았으나 250 μ g/mL에서는 대조군 대비하여 50% 이상 성장을 억제하여 MIC는 250 μ g/mL로 생각되며 *S. aureus*와 MRSA간의 큰 차이는 보이지 않았다(Fig. 2 and 3). *B. cereus*와 *S. dysenteriae*에 대해서는 농도의존적으로 성장을 억제하는 양상을 보였다(Fig. 2 and 3). *S. aureus*에 대해

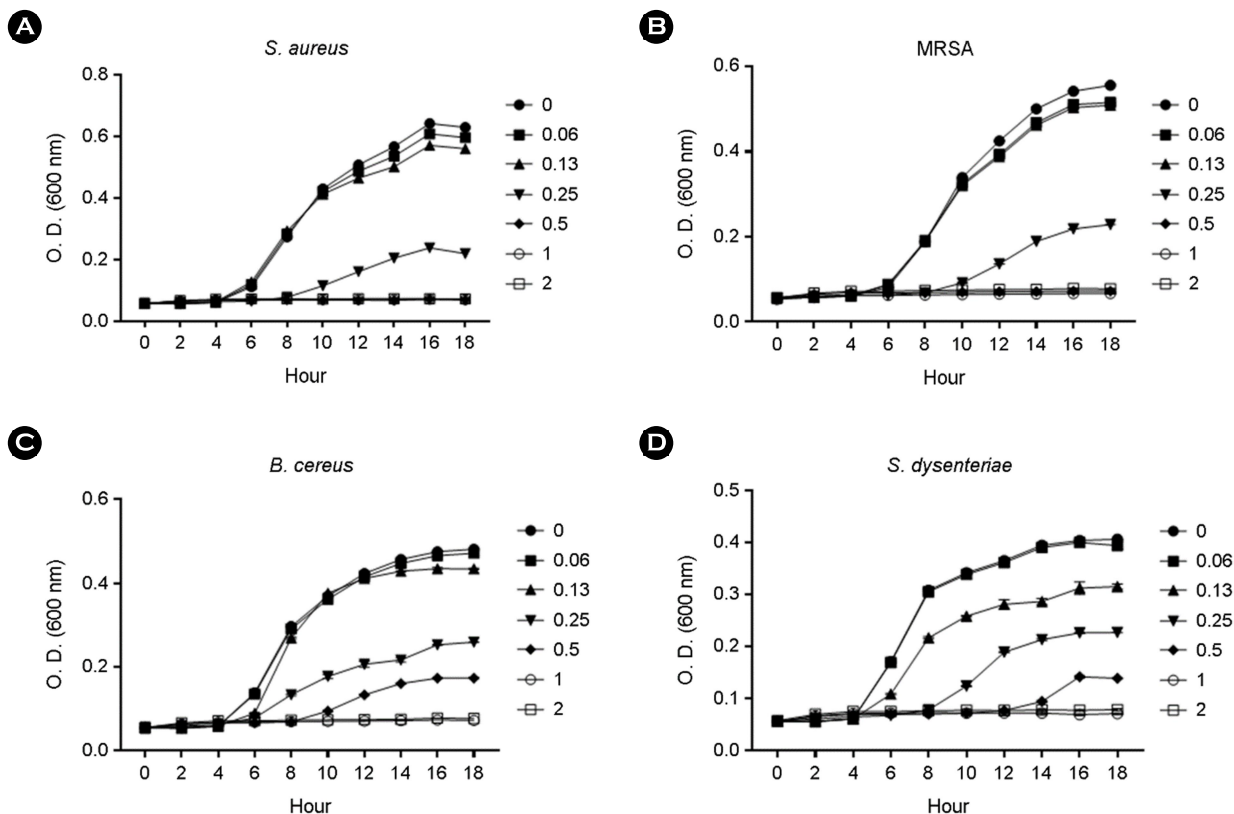


Fig. 3. Growth curves of *S. aureus* (A), MRSA (B), *B. cereus* (C) and *S. dysenteriae* (D). Cultred at different concentration of *O. lamarckiana*. Bacterial growth was analyzed at the indicated time points by measuring values of 600 nm wavelength by spectrophotometry.

생약재 추출물 중 우슬의 MIC는 156.25 µg/mL, 목단피와 향백은 625 µg/mL (Cai et al., 2002). 지유는 2.5 mg/mL (Park et al., 2001), 발효 강황은 0.5~1 mg/mL (Ra and Kim, 2016) 이어서 *O. lamarckiana* 지상부의 메탄올 추출물의 *S. aureus* 와 MRSA에 대한 항균력은 비교적 뛰어난 것으로 보인다. Kim et al. (2007)은 *O. laciniata* 전초 에틸아세테이드 분획물의 *S. aureus*에 대한 MIC가 10 µg/mL로 보고한 바 있어 *O. lamarckiana* 지상부 추출물의 분획물이 좀 더 강력한 항균효과를 보일 수도 있어 이에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

미생물에 오염된 식품의 섭취는 식중독과 같은 질병의 원인이 되기 때문에 식품의 장기 보관 및 유통을 위해 미생물의 성장을 억제하는 식품보존제의 개발은 국민들의 안전에 크게 기여할 수 있다. 본 실험에서 *Oenothera* 속 달맞이꽃 중 큰달맞이꽃(*Oenothera lamarckiana*)의 지상부 메탄올 추출물이 식품에 의한 감염질환과 관련 있는 박테리아 중 *S. aureus*, MRSA, *B. cereus*, *S. dysenteriae*에 대해 성장억제효과가 있음을 관찰하였다. 특히 *S. aureus*, MRSA에 대해서는 다른 식물의 총 추출물에 대해 상대적으로 강한 성장억제력을 보였다. 따라서 큰달맞이꽃 추출물에 항균력을 보이는 성분이 있을 것으로 생각된다. 이 실험은 큰달맞이꽃의 항균력에 관한 기초실험으로 향후 큰달맞이꽃에서 항균효과를 갖는 단일물질 탐색되어 식품의 보관 및 유통에 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Future Innovation Food Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119023-3).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

Almora-Pinedo Y, Arroyo-Acevedo J, Herrera-Calderon O, Chumpitaz-Cerrate V, Hanari-Quispe R, Tinco-Jayo A, Franco-Quino C, Figueroa-Salvador L. Preventive effect of *Oenothera rosea* on N-methyl-N-nitrosourea-(NMU) induced gastric cancer in rats. Clin Exp Gastroenterol. 2017. 10: 327-332.

Cai H, Choi SI, Lee YM, Heo TR. Antimicrobial Effects of Herbal Medicine Extracts on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. Korean J Biotechnol Bioeng. 2002. 17: 537-542.

Choi J, Lee SI, Rackerby B, Moppert I, McGorin R, Ha SD, Park SH. Potential Contamination Sources on Fresh Produce Associated with Food Safety. J Food Hyg Saf. 2019. 34: 1-12.

Kim JH, Lee SH. Antioxidative and antimicrobial activities of *Oenothera biennis* extracted by different methods. Korean J Food Preserv. 2016. 23: 233-238.

Kim JY, Lee JA, Pakr SY. Antibacterial Activities of *Oenothera laciniata* Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2007. 36: 255-261.

Lee JW, Yoon JH, Park JW. Effects of Grapefruit Seed Extract for Antibacterial Activity on the Coated Packaging. Food Eng Prog. 2015. 19: 104-110.

Lee SM, Kim SI, Kang MS, Lee CY, Hwang DY, Lee HS, Kim DS. Evaluation of Antimicrobial Activity of Steamed and Fermented *Asparagus cochinchinensis*. Food Eng Prog. 2017. 21: 143-149.

Lim MC, Kim YR. Sample Preparation and Nucleic Acid-Based Technologies for the Detection of Food Borne Pathogens. Food Eng Prog. 2017. 21: 191-200.

Liu Q, Meng X, Li Y, Zhao CN, Tang GY, Li HB. Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. In J Mol Sci. 2017. 18: E1263.

Pajak P, Socha R, Broniek J, Krolikowska K, Fortuna T. Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and fenugreek. Food Chem. 2019. 275: 69-76.

Park CG, Bang KH, Lee SE, Cha MS, Sung JS, Park HW, Seong NS. Antibacterial activity from medicinal plant extracts on the *Staphylococcus aureus*. Korean J Medicinal Crop Sci. 2001. 9: 251-258.

Ra HN, Kim HY. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Curcuma aromatica* Salisb. with and without Fermentation. Korean J Food Cook Sci. 2016. 32: 299-306.

Shin SJ, Kwon SK, Lee KH, Sung ND, Choi WY. Extraction and Characterization of Antibacterial Components from the Roots of Evening Primrose (*Oenothera odorata* Jacquin). J Agri Sci. 1994. 21: 54-59.

Timoszuk M, Bielawska K, Skrzydlewska E. Evening Primrose (*Oenothera biennis*) Biological Activity Dependent on Chemical Composition. Antioxidants (Basel). 2018. 7: 108.

Yang HR, Lee HS. Antibacterial Activities of Extracts Derived

from 13 Medicinal Plants against Food-Borne Bacteria. J Agri Life Sci. 2013. 44: 39-42.

Yoon WJ, Ham YM, Yoo BS, Moon JY, Koh J, Hyun CG. *Oenothera laciniata* inhibits lipopolysaccharide induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and proinflammatory cytokines in RAW264.7 macrophages. J Biosci Bioeng. 2009. 107: 429-438.

Yu JS, Yu NJ, Gim SW, Lee SJ, Kwon GT, Yuk HG. Antimicrobial effect of black raspberry (*Rubus occidentalis*, *Bokbunja*) ex-

tract against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Korean J Food Preserv. 2019. 26: 360-364.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2020.26.4.383>

Cite this article as: Yang JY, Lee P, Kim SH. Antibacterial Effect of *Oenothera lamarckiana* Aerial Part Extract. Biomedical Science Letters. 2020. 26: 383-388.