

애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill) 추출물의 항균활성

김지영 · 이정아 · 박수영[†]

(재)제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소

Antibacterial Activities of *Oenothera laciniata* Extracts

Ji-Young Kim, Jung-A Lee and Soo-Yeong Park[†]

Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, Jeju 690-121, Korea

Abstract

The solvent extracts of *Oenothera laciniata*, which were extracted by using several solvents with different polarities, were prepared for utility as a natural preservative. The *O. laciniata* extract by 80% ethanol was sequentially fractionated with *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate, and butanol. The antibacterial activities and cell growth inhibition were investigated on each strain with the different concentrations of *O. laciniata* extracts. Antibacterial activities were shown in ethanol, ethylacetate, and butanol fraction of *O. laciniata*. However *n*-hexane, dichloromethane and water fraction showed weak antibacterial activity against the tested microorganisms. Among the five fractions, ethylacetate fraction showed the highest antibacterial activities against microorganisms tested, such as *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. The polyphenolic compounds widely occurring in the traditional medicine plants have been reported to possess high antibacterial activity. The polyphenolic compounds from ethanol, *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol, and water fraction were 63.96 mg/g, 8.49 mg/g, 28.11 mg/g, 172.64 mg/g, 114.56 mg/g, and 34.91 mg/g, respectively. There are some relationships between antibacterial activity and polyphenol content in natural plant. The ethylacetate fraction could be suitable for the development of a food preservative.

Key words: *Oenothera laciniata*, antibacterial activity, polyphenolic compounds, natural preservatives

서 론

식품은 저장·유통과정 중 미생물의 오염에 의하여 부패나 변질을 일으킬 수 있으므로 식품보존제를 첨가하여 저장성을 높이고 있다. 식품보존제로는 인공합성품이 많이 사용되고 있으나 천연물 중에서도 상당한 항균성 물질이 존재하여 이의 검색과 식품의 이용에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1-3). 여러 종류의 보존제들 가운데 가장 바람직한 것은 인체에 무해하면서 영양이 될 수 있고 각종의 생리활성을 가지고 있는 물질이어야 할 것이다. 천연항균물질에는 전통적으로 사용해 온 소금, 식초 등 일반식품소재 외에도 동물, 식물, 미생물 등에서 유래한 것들이 많이 있다(4). 현재 상품화되어 있거나 항균성이 알려진 천연물질로는 주로 lysozyme, polylysine, protamine, conalbumin, avidin, 유기산, polyphenol 물질 등이 있다(5-11). 그리고 갈변반응 생성물질, 저급지방산 ester, 향신료 등이 있는데 특히, 최근에는 이들 가운데 우리나라에서 많이 사용하는 향신료들의 상당수가 여러 균에 대해 항균효과가 있는 것으로 알려지고 있다

(12-15).

천연물에 존재하는 항균성 물질을 항균소재로 이용하고자 하는 연구는 식품, 의약 및 생물공학산업 등에서 활발하게 연구가 진행되고 있으나, 대부분 항균성에 대한 연구가 식품이나 한약재로 이용되는 식물체에 국한되고 있고 주위에서 흔히 구할 수 있는 많은 자생식물에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다(2,16-21).

달맞이꽃은 바늘꽃과에 속하며 남아메리카나 북아메리카가 원산지이며 귀화식물로 전국 각지에 야생한다. 우리나라에 야생하는 동속식물로는 4종이 알려져 있다(22). 달맞이꽃은 아메리카 인디안들이 그 추출액을 피부의 염증 또는 발진에 바르거나 해소 기침에 민간약으로 사용했던 약초로 뿌리와 전초를 감기, 해열, 인후염, 신장염, 고혈압에 사용했다는 보고가 있다(23,24).

애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill)은 제주도 해안 모래밭에서는 흔히 찾아볼 수 있으며 날로 퍼져 나가고 있다. 줄기의 높이 20~60 cm로 털이 없거나 또는 약간 긴 털이 있고, 땅 위에 가로누웠으며 끝이 위를 향하고 있다. 꽃은

[†]Corresponding author. E mail: user111@jejuhidi.or.kr
Phone: 82 64 720 2322, Fax: 82 64 720 2301

6~7월에 총상화로서 피며, 꽃은 잎 겨드랑이에 달리고, 꽃이 필 때는 뒤로 뒤집힌다. 열매는 길이 1.8~2.5 cm이고 위쪽이 굵으며 털이 있다(25,26). 달맞이꽃 종속의 식물에는 ellagitannin dimer인 oenotherin 성분을 가지고 있는데, 이 성분은 항암 및 항균의 활성을 갖는다고 보고되어져 있다(27-30).

본 연구에서는 제주도에 자생하는 자원식물로서 보존 활용가치가 높으며 민간요법에서 경험적으로 얻은 약리효과를 토대로 애기달맞이꽃을 이용하여 극성에 따라 용매별로 추출하고, 식품유해 미생물에 대한 항균활성을 검토하여 천연항균제로서의 사용가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

제주도 해안가 일대에 자생하고 있는 애기달맞이꽃 (*Oenothera laciniata* Hill)을 2006년 4월 말경에 채집하여 한국의 야생식물도감(25)과 한국귀화식물원색도감(26)을 참고하여 동정하였으며, 동정된 애기달맞이꽃 전초를 증류수로 2~3회 수세한 뒤 물기를 제거한 후 7일간 음건한 후 마쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

사용균주 및 시약

본 실험에 사용한 균주는 Table 1에 나타낸 바와 같이 그람양성균 3종과 그람음성균 3종으로 총 6종을 선정하여 사용하였다. 배지는 Tryptic soybean agar(TSA), Tryptic soybean broth(TSB), Brain heart infusion(BHI)은 Difco(USA)사의 제품을, 추출용매 및 시약은 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

용매의 극성을 이용한 순차분획

애기달맞이꽃의 항균 효과를 알아보기 위한 추출물 및 분획물의 제조는 80% 에탄올(EtOH) 및 분획용 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(CH₂Cl₂), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH)을 사용하여 용매의 극성을 이용한 순차적 추출법을 사용하였다. 즉 분말 건조된 시료에 80% 에탄올로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 동결건조기로 완전 건조시켰다. 상기의 과정을 3회 반복 추출하여 에탄올 추출물을 얻은 뒤, 건조된 에탄올 추출물에 10배량의 증류수와 동량의 헥산을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여

헥산 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 3회 반복 실시하였다. 각 시료 분획물은 해당 용매로 용해시켜 0.2 μm membrane filter(Advantec MFS Inc., USA)로 계균하여 4°C에 보관하면서 본 연구에 사용하였다.

항균력 측정

추출된 항균성 물질의 항균력 검색은 paper disc 방법(31)을 사용하였다. 각 균주는 10 mL의 액체배지에 접종하고 37°C에서 18시간씩 3회 계대 배양하여 항균활성 시험균주로 사용하였으며, 항균성 시험용 평판배지 조제는 각각의 시험균 농도를 650 nm에서 optical density(O.D) 값 0.4(10⁶ CFU/mL)가 되게 한 후 pour-plate 방법에 따라 배지가 분주된 배양 접시에 균일하게 섞은 후 실온에서 응고시켜 균접종 평판배지를 만들어 사용하였다. 각각의 시료를 100, 250, 500, 1000, 2000 μg/mL로 희석하여 멸균된 paper disc(Toyoseiskusho, 8 mm)를 시료 수에 맞게 25 μL씩 천천히 흡수시킨 후, 추출용매를 완전히 증발시키고 시험용 평판배지 표면에 놓아 밀착시키고 37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 생육저해환(clear zone, mm)의 크기를 측정하여 항균활성을 비교 분석하였다.

미생물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

최소저해농도(MIC)는 broth microdilution 방법(32)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 각각의 균 농도를 650 nm에서 O.D 값 0.4(10⁶ CFU/mL)가 되게 한 후 well plate에 분주하고, 각 시료를 0, 5, 10, 12.5, 25, 50 μg/mL 농도로 10 μL씩 처리하여 24시간 배양하였다. 세균 배양액의 증식 정도를 microplate reader(Bio-TEK Instrumenis Inc., USA)를 통해 650 nm에서 측정하였다.

미생물의 생육저해율 측정

미생물의 생육저해율의 측정은 배지 10 mL에 각각의 균 농도를 650 nm에서 O.D 값 0.4(10⁶ CFU/mL)가 되게 한 후, 각각의 시료를 1,000 μg/mL 농도로 처리하였다. 배양 후 microplate reader(Bio-TEK Instrumenis Inc., USA)를 통해 650 nm에서 측정하여 다음 식으로 생육저해율(%)을 확인하였다. 생육저해율은 균의 정지기인 24시간에서 그 값을 측정하였다.

Table 1. List of strains and media used for antibacterial experiments

	Strains	Media	Temp. (°C)
Gram positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i> (ACTC 9634)	TSA/TSB	30
	<i>Listeria monocytogenes</i> (ACTC 19115)	BHI	37
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ACTC 25293)	TSA/TSB	37
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> (ACTC 25922)	TSA/TSB	37
	<i>Salmonella</i> Enteritidis (KCCM 12021)	TSA/TSB	37
	<i>Salmonella</i> Typhimurium (ACTC 14028)	TSA/TSB	37

$$\% \text{ inhibitory effect} = \left(1 - \frac{\text{treatment} - \text{treatment blank}}{\text{control} - \text{control blank}} \right) \times 100$$

미생물의 생육 곡선 측정

애기달맞이꽃 에틸아세테이트 분획물을 well plate에 각각의 시료를 0, 100, 250, 500, 1000 µg/mL 농도로 첨가하였다. 여기에 각각의 균 농도를 650 nm에서 O.D 값 0.4(10⁶ CFU/mL)로 맞춘 세균 배양액을 10⁹배 희석하여 무균적으로 접종하고 37°C에서 24시간 배양하면서 4시간마다 세균 배양액의 증식 정도를 microplate reader(Bio-TEK Instrumenis Inc., USA)를 통해 650 nm에서 측정하였다.

총 폴리페놀 화합물의 함량

폴리페놀 화합물 함량은 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법(33)을 이용하여 측정하였다. 시료를 1 mg/mL로 녹인 다음 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 2 mL로 만든 후, 여기에 0.2 mL Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분간 실온에 방치하였다. 그리고 2 M sodium carbonate 용액 0.4 mL를 가하여 혼합하고 증류수를 첨가하여 4 mL로 만든 후, 실온에서 1시간 동안 방치하여 상등액을 725 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질은 tannic acid(Sigma Chemical Co., USA)를 이용하였다. 표준곡선을 작성한 후 시료의 총 폴리페놀 함량은 g/mg tannic acid로 나타내었다.

통계분석

실험결과는 SAS Program(statistical analysis system)을 이용하여 분석하였고, 평균치와 표준편차로 나타냈다. 그룹간의 유의적인 통계차를 분석하기 위하여 p<0.05의 유의수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물 및 순차분획물의 수율

애기달맞이꽃 전초 건조분말 시료(480 g)를 80% 에탄올로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 조추출물 80.58 g을 얻었다. 그리고 에탄올 추출물 중 20 g을 10배량의 증류수로 현탁시킨 후에 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 그리고 부탄올 등으로 순차적으로 분획하여 헥산 층에서 1.2915 g, 디클로로메탄 층에서 1.0343 g, 에틸아세테이트 층에서 1.1677 g 및 부탄올 층에서 5.4019 g 그리고 잔사인 물 층에서 8.8918 g의 분획물을 얻었다. 각 순차적 분획물의 수율은 Table 2에 나타내었으며, 추출에 사용한 애기달맞이꽃 에탄올 추출물의 수율은 약 16.79%이었다. 에탄올 추출물에 대한 각 순차분획물 중 디클로로메탄 분획물 수율이 5.17%로 가장 낮았고, 수용성 분획물이 44.46%로 가

Table 2. Yield of each fractions extracted from *O. lacinata*

Solvent	Yield (% , w/w) ¹⁾
EtOH extract	16.796
n Hexane fraction	6.460
CH ₂ Cl ₂ fraction	5.176
EtOAc fraction	5.836
BuOH fraction	27.016
Water fraction	44.460

¹⁾Yield={solid extract or fraction (g)/raw material (dry weight)}×100.

장 높은 수율을 보였다.

애기달맞이꽃 추출물과 분획물의 항균력

6종의 식품유해미생물에 대한 항균활성 결과는 Table 3에 나타내었다. 애기달맞이꽃 에탄올 추출물과 순차적 분획물의 항균활성은 전반적으로 disc에 점적한 추출물과 분획물의 농도가 증가할수록 항균활성이 크게 나타났다. 그람양성균인 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*에서는 에탄올 추출물, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수용성 분획물에서 처리농도가 증가할수록 항균활성을 나타내는 생육저해환 크기가 비례적으로 증가하였으며, 그람음성균인 *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*에 대한 항균활성은 에탄올 추출물, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물에서 높은 항균활성을 나타내었다.

애기달맞이꽃 에탄올 추출물과 순차분획물의 paper disc 방법에 의한 항균활성은 에틸아세테이트 분획물이 가장 높았고 부탄올 분획물, 에탄올 추출물, 수용성 분획물 순으로 나타났다. 그러나 헥산과 디클로로메탄 분획물은 모든 균주에서 항균활성이 나타나지 않았다. 이는 비극성 용매인 헥산 보다는 에탄올과 같은 극성용매에서 항균물질이 원활히 추출된다고 보고한 감초(34)나 영귤(35)에서의 결과와 유사하였다. 즉 애기달맞이꽃에서의 항균성물질을 추출하는 데는 극성용매가 효과적이었음을 알 수 있었다.

애기달맞이꽃 에틸아세테이트 분획물의 최소저해농도 측정(MIC)

순차적 분획물들 중에서 항균력이 가장 높게 나타난 애기달맞이꽃 에틸아세테이트 분획물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 액체배지희석법(broth dilution method)으로 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. 애기달맞이꽃 에틸아세테이트 분획물에 대한 최소저해농도는 *B. cereus*와 *S. aureus*에서 10 µg/mL로 가장 낮은 농도에서 생육이 저해되었으며, *E. coli*, *S. Typhimurium*에서는 12.5 µg/mL이며, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*에서는 50 µg/mL로 나타내었다. 최근 식물에서부터 항균력이 우수하다고 보고된 것 중 산수유나 정향 등과 비교해 볼 때 애기달맞이꽃 에틸아세테이트 분획물은 그보다 낮은 농도에서도 강한 항균력을 보였다(2,3). 또한 해안가 식물 중 항균효과가 우수하다고 알려진 암대극(36)과 비교해 보아도 암대

Table 3. Antibacterial activities of extracts and each solvent fraction from *O. laciniata* against bacteria

Strains	Fraction conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Size of clear zone (mm) ¹⁾					
		EtOH	<i>n</i> Hexane	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	BuOH	Water
<i>B. cereus</i>	100	2)			9	10	
	250	9			10	11	
	500	11			13	11	9
	1000	13			16	13	11
	2000	15			18	13	12
<i>L. monocytogenes</i>	100				11	9	
	250	9			12	11	
	500	11			12	12	9
	1000	12			13	12	10
	2000	15			14	13	10
<i>S. aureus</i>	100				11	10	
	250	9			12	12	
	500	11			13	13	9
	1000	13			15	14	11
	2000	15			18	14	12
<i>E. coli</i>	100				9	10	
	250	9			10	11	
	500	11			12	12	9
	1000	13			15	13	11
	2000	16			17	14	12
<i>S. Enteritidis</i>	100	8			11	9	
	250	9			12	11	
	500	11			13	12	9
	1000	12			15	14	11
	2000	15			15	17	13
<i>S. Typhimurium</i>	100				11	10	
	250	9			12	12	
	500	11			13	13	9
	1000	12			16	14	11
	2000	15			19	14	12

¹⁾Diameter (disc 8 mm). ²⁾Not detected.

Table 4. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the ethylacetate fraction from *O. laciniata* against several bacteria

Strains	Growth at various concentration ($\mu\text{g/mL}$)						MIC ($\mu\text{g/mL}$)
	0	5.0	10.0	12.5	25.0	50.0	
<i>B. cereus</i>	+ ¹⁾	+	2)				10.0
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	+		50.0
<i>S. aureus</i>	+	\pm ³⁾					10.0
<i>E. coli</i>	+	+	+				12.5
<i>S. Enteritidis</i>	+	+	+	+	+		50.0
<i>S. Typhimurium</i>	+	+	\pm				12.5

¹⁾growth. ²⁾no growth. ³⁾uncertain in growth.

극 에틸아세테이트 분획물이 여러 종의 식품유해미생물에 대해 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도의 생육저해효과를 보였으나, 본 연구의 애기달맞이꽃의 에틸아세테이트 분획물은 이보다 낮은 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 우수한 생육저해효과를 나타내었다.

미생물 생육저해율 및 생육곡선 측정

애기달맞이꽃 추출물 및 순차적 분획물들의 농도를 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 로 하여 액체배지에 첨가한 후 미생물에 대한 생육저해율을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 에탄올 추출물은 각각의 균주마다 약간의 차이는 보였지만 전반적으로 40% 정도의 생육저해효과를 나타내었고, 특히 *B. cereus*에 대하여 53%

로 가장 높은 저해율을 나타내었다. 순차적 분획물들 중에서는 에틸아세테이트 분획물이 60% 이상의 생육저해율을 나타내었으며, 그 다음으로는 부탄올 분획물에서 50% 이상의 생육저해율을 나타내었다. 추출물과 분획물에 대한 생육저해율은 $p < 0.05$ 수준으로 매우 유의적으로 나타났다.

또한 애기달맞이꽃 추출물 및 순차적 분획물들 중 가장 항균효과가 높게 나타난 에틸아세테이트 분획물을 본 실험에 사용된 6종의 균주 중 그람양성균인 *B. cereus*와 그람음성균인 *E. coli*를 대상으로 처리농도에 따른 생육곡선을 측정 비교하였다. 즉 각 균주에 에틸아세테이트 분획물을 농도

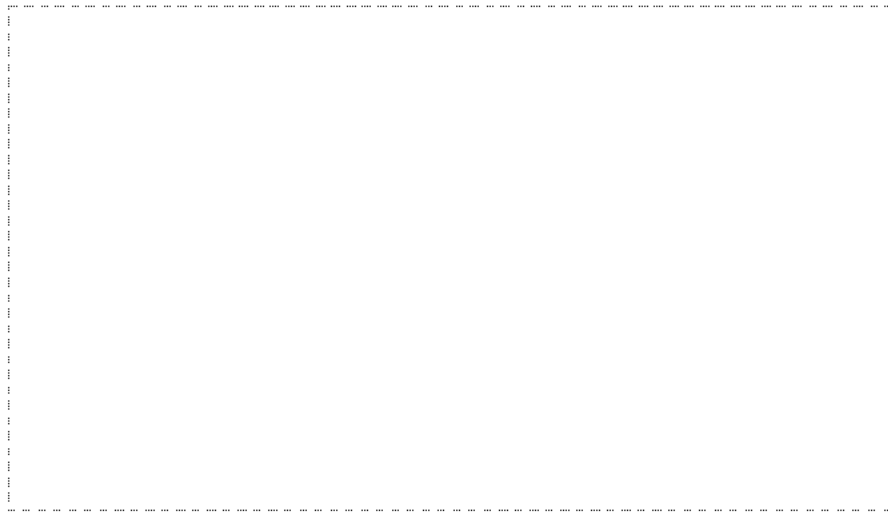


Fig. 1. Growth inhibitory rate of extracts and each solvent fraction from *O. laciniata* against several bacteria.
The data represent the mean±SD of three determinations (*p<0.05; **p<0.01).

별(0, 100, 250, 500, 1000 µg/mL)로 액체배지에 첨가하여 24시간 배양하면서 일정시간 간격으로 균주의 성장속도를 측정 비교하였다. 그 결과 Fig. 2 및 Fig. 3과 같은 성장곡선을 얻을 수 있었다. *B. cereus*의 경우, 애기달맞이꽃 에틸아세테이트 분획물을 첨가하지 않은 대조구 배지에서는 8시간 이후부터 급격한 증가를 보여 빠른 성장이 일어남을 관찰할 수 있었으나 에틸아세테이트 분획물을 첨가한 경우 8시간 이후부터 500 µg/mL와 1,000 µg/mL 농도에서 균의 증식이 완만하게 이루어져 24시간 동안 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). *E. coli*에서의 생육저해 정도를 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보듯이 배양 후 8시간부터 균의 증식속도가 급격히 증가함을 볼 수 있었지만, 농도가 증가할수록 균의 증식이 완만하게 이루어져 애기달맞이꽃 에틸아세테이트 분획물이 *E. coli*의 성장 또한 억제함을 확인할 수 있었다.

총 폴리페놀 화합물의 함량 분석

식물에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 phenolic hydroxyl 그룹 때문에 단백질 또는 효소단백질, 기타 거대분자들과 결합하는 성질, 항산화효과, 2가 금속이온과의 결합력을 가진다. 단백질과 결합하는 성질은 미생물 세포와 작용하여 성장저해를 유발시킴으로써 항균효과 등의 생리활성 기능을 가진다(10,29). 따라서 애기달맞이꽃의 에탄올 추출물 및 순차적 용매분획물의 총 폴리페놀 화합물의 함량을 Folin-Denis 방법으로 측정 비교하였다. 애기달맞이꽃 에탄올 추출물 및 순차적 용매분획물별 총 폴리페놀 함량은 에탄올 추출물에서 63.96 mg/g, 헥산에서 8.49 mg/g, 디클로로메탄에서 28.11 mg/g, 에틸아세테이트에서 172.64 mg/g, 부탄올에서 114.56 mg/g, 그리고 수용성 분획물에서 34.91 mg/g으로 에틸아세테이트 분획물>부탄올 분획물>에탄올 추출물>수용성 분획물>디클로로메탄 분획물>헥산 분획물 순