



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

황칠나무(*Dendropanax*
morbiferus Lev.) 잎 에탄올
추출물의 항균 및 항산화활성

濟州大學校 大學院

食品工學科

李 守 敬

2017年 2月

황칠나무 (*Dendropanax*
morbiferus Lev.) 잎 에탄올
추출물의 항균 및 항산화활성

指導教授 朴 恩 珍

李 守 敬

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2017年 2月

金昭延의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 高 榮 煥 印

委 員 千 智 連 印

委 員 朴 恩 珍 印

濟州大學校 大學院

2017年 2月

Antimicrobial and antioxidant activities of
ethanol leaf extract of *Dendropanax*
morbiferus Lev.

Sugyeong Lee
(Supervised by professor Eun-Jin Park)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree
of Master of Engineering

2016. 12.

This thesis has been examined and approved.

Young-Hwan Ko, Thesis director, Prof of Food Science and Engineering

Ji-Yeon Chun, Prof of Food Science and Engineering

Eun-Jin Park, Prof of Food Science and Engineering

Dec. 2016

Department of Food Science and Engineering

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract	1
1. 서론	2
2. 재료 및 방법	
2.1. 황칠나무 잎 추출 및 보관	5
2.2. 사용균주 및 배양조건	5
2.3. 항균활성	8
2.4. 최소저해농도	8
2.5. 최소사멸농도	8
2.6. 생육저해 효과	9
2.7. 항산화 활성	9
2.8. 통계처리	10
3. 결과 및 고찰	
3.1. 항균활성	11
3.2. 최소저해농도와 최소사멸농도	13
3.3. 생육저해 효과	15
3.4. 항산화 효과	16
4. 결론	22
국문요약	25
참고문헌	26

Abstract

In this study the antimicrobial and antioxidant activities of the ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev. from Jeju Island were investigated. Of the fourteen strains of twelve species of microorganisms tested, the extract exhibited antimicrobial activity against seven gram-positive bacteria of six species, but not against five gram-negative bacteria and a yeast strain. The diameter of the growth-inhibition zone by disc diffusion method increased with the increase of the extract concentration and the strongest growth inhibition was observed against *Staphylococcus aureus* KCTC 1916 at 5 mg/ml. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract was between 2.5 mg/ml and 15 mg/ml, where the lowest concentration was against *Bacillus cereus* KACC 12672 and the highest concentration was against *Enterococcus faecalis* KCTC 3206. The minimum bactericidal concentration (MBC) values defined as being $\geq 99.9\%$ reduction in viable cells against the tested strains were higher than the MIC values. Time killing curves using the optimum MIC were drawn on seven strains for 48 hr. Although the growth of *B. cereus* KACC 12672 was detected after 12 hr's incubation, no significant growth was observed in the other strains during incubation for 48 hr. The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity of the ethanol leaf extract was similar to that of butylated hydroxyanisole (BHA). These results indicate that the leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev. can be utilized as a natural preservative and antioxidant.

1. 서론

식품관련 산업에서 가장 중요하게 고려해야 할 부분은 식품의 위생과 안전이다. 식품관련 산업의 규모가 커지고 활성화되는 만큼 식품위생 및 안전과 관련된 식중독 발생률도 꾸준히 증가하고 있다. 이를 뒷받침해주는 근거로 식품의약품안전처의 식중독 통계자료를 살펴보면 식중독 전체 발생건수는 2002년 78건(환자수 2,980건)에서 2015년 330건(환자수 5,947건)으로 약 4배 이상의 차이를 보이며 점차 증가하고 있다[KFDA, 2015]. 식품의약품안전처의 식중독 발생건수는 원인물질별로 크게 세균 및 바이러스, 자연독, 화학물질, 불명(원인물질을 알 수 없는 경우)등으로 분류되어있는데, 2015년도 전체 식중독 발생건수 중 불명인 경우 43.6%를 제외하고 세균성 식중독이 56.4%를 차지하였다. 원인미생물별 발생빈도를 살펴보면 Norovirus가 17.6%를 차지하였고 다음으로 병원성 *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus* 등이 있었다[KFDA, 2015].

식중독 발생률 증가의 원인 중 하나로 즉석섭취·편의식품류에 해당하는 즉석섭취식품, 신선편의식품의 소비증가를 뽑을 수 있다[Kim JB et al., 2011]. 즉석섭취식품은 더 이상의 가열과 조리과정 없이 구입 후 그대로 섭취 가능한 햄버거, 김밥과 같은 식품을 의미하고 신선편의식품은 농·임산물 본래의 특성을 파괴하지 않는 범위 내에서 신선한 상태로 다듬어 그대로 섭취할 수 있는 채소나 나물, 샐러드 등을 일컫는다[KFDA, 2016]. 이러한 제품들은 열처리와 같은 조리과정 없이 그대로 섭취할 수 있기 때문에 다른 식품에 비해 식중독균에 노출될 가능성이 있어 전 세계적으로 농산물과 관련된 식중독 발생률이 증가하는 원인 중 하나이다[Park HK. et al., 2005]. 이와 같이 세균성 식중독이 전체 식중독 발생건수 대비 높은 비율을 차지하는 만큼 식중독 예방을 위하여 미생물에 대한 오염 예방 및 제거 등 관리의 중요성이 커지고 있다. 이에 따른 움직임으로 식품의 저장 및 유통 과정에서 식품의 위생과 안전을 위협하는 오염의 원인이 되는 근본적인 발생인자를 제거하기 위해 보존제를 식품에 직접 또는 간접적으로 첨가하

거나 2차 오염 매개체인 기구와 용기 등의 표면에 살균제나 소독제를 사용하는 방법이 이용되고 있다. 그러나 식품에 직접 첨가하여 사용되는 화학적 합성첨가물은 장기간 또는 다량 노출 시 인체에 축적되어 부작용이 발생할 가능성이 높다. 따라서 화학적 합성첨가물의 법정 허용기준을 준수하여 사용하는 등의 노력과 더불어 그 효과가 동등하거나 더 우수한 살균 효과를 가진 항균 물질이 함유된 천연자원을 탐색하여 이들로부터 추출한 성분이 천연 보존료로 이용 가능성이 있는지 여부를 확인하는 노력이 지속적으로 이루어져야 한다[Park HK et al., 2005].

다양한 생리활성 물질 중 항균활성을 나타내는 천연물질에는 식물의 정유성분 (essential oil)과 색소, phenolic acid와 flavonoid 화합물 등의 phytochemicals, 유기산 등이 보고되었다[Jang JS et al., 2007]. 우리나라에서 현재까지 식용 또는 약용으로 이용되어 온 식물 중에서 초피[Chung SK et al., 1999]등의 향신재료와 허브[Yoo MY et al., 2005], 영경귀[Jang MR et al., 2014], 인진쑥[Chae GC et al., 2009], 감초[Kim SU et al., 2006]등 식물의 잎과 뿌리 추출물로부터 항균활성이 확인되었다. 또한 유산균에서 유래되는 박테리오신이 항균활성물질로 주목 받고 있는데 유산균은 발효식품의 맛과 발효산물의 특징을 결정할 뿐만 아니라 유기산 및 박테리오신 등의 항균활성물질을 생성하여 식품의 저장성에 기여하는 중요 요인이다. 박테리오신은 다양한 그람 양성균에서 생산 되는 항균활성 단백질 또는 peptide이기 때문에 박테리오신의 경우 식품산업에서 항생제 대체물질 및 천연 보존제로 이용할 수 있는 발전성을 지닌 물질로서 관심을 받고 있다 [Kim SY et al., 2011]. 이와 같이 다양한 자원으로부터 항균활성에 대한 탐색이 진행되고 있으며 더 나아가 제주지역의 자원탐색을 위해서 제주도의 지리적 특정도 함께 파악할 필요성이 보인다.

우리나라는 단위면적 대비 다양한 식물자원이 분포되어 있다[Kim JS et al., 2014]. 특히 제주도는 우리나라 전체 면적의 약 8.1%에 불과한 작은 섬이지만 지리적 위치, 해발고도 그리고 지형 등의 영향으로 아열대에서 아한대까지의 기후가 분포되어 있어 우리나라에 서식하고 있는 전체 식물종 중 약 41%가 서식하고 있는 것으로 알려져

있다[Son MC et al., 2012)]. 이렇듯 다양한 생물종이 서식하고 있는 제주도는 폭넓은 연구자원의 근원지가 되고 있다. 제주도 자생 식물을 대상으로 한 항균효과에 관한 연구에는 애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill)[Kim JY et al., 2007], 엉겅퀴(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)[Jang MR et al., 2014], 암대극(*Euphorbia jolkini* Boiss)[Kim JY et al., 2006], 등대풀(*Euphorbia helioscopia*)[Kim JY et al., 2007], 삼백초(*Saururus chinensis*)[Lee JH et al., 2013], 백년초(*Opuntia ficus indica*)[Seo YH et al., 2012], 구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*)[Kim JY et al., 2011] 추출물을 이용한 연구결과가 있다.

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[Jeong BS et al., 1995; Bernart MW et al., 1996]. 수피에 상처를 냈을 때 나오는 황색의 수지액을 바로 황칠이라 일컫는다[Moon MO et al., 1999]. 황칠나무는 목본(dendro), 전능약(panax)이라는 학명에서 오는 의미와 같이 만병통치나무라 예로부터 불려왔으며 황칠나무에 함유되어 있는 대표적인 성분으로는 세스퀴테르펜(sesquiterpene)에 속하는 β -selinene, capnellane-8-one, 페놀, 플라보노이드 화합물인 chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, rosmarinic acid가 있다고 보고되었다[Choi SK, 2003]. 현재까지 수행된 황칠나무에 관한 연구의 대부분은 잎 추출물을 대상으로 하였으며 멜라닌 생성 억제로 인한 미백[Lim KP et al., 1998], 생체방어체계 강화[Park BY et al., 2004], 항산화 및 항암[Hyun TK et al., 2013] 그리고 항당뇨[An NY et al., 2014] 효과 등을 나타내는 것으로 확인되었다. 이와 같이 다양한 생리 기능성 연구는 일부 수행되었으나 황칠나무의 생리활성 물질에 대한 항균활성을 확인하여 다양한 목적의 항균제로의 이용 가능성을 확인하는 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 제주도에 자생하고 있는 황칠나무의 잎 에탄올 추출물의 항산화 활성을 분석하고 식중독균뿐만 아니라 비듬균, 충치 원인균과 녹농균에 대한 항균 활성을 확인하여 황칠나무 잎 에탄올 추출물이 천연 항산화제와 천연 보존제 그리고 천연 항균제로 이용 가능한 소재인지 여부를 검토하는 기초자료로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 황칠나무 잎 추출 및 보관

본 실험에 사용된 황칠나무 잎은 2013년 7월에 제주도 서귀포시 지역에서 자생하는 황칠나무(*Dendropanax morbiferus* Lev.)로부터 채집하여 사용하였다. 채집한 황칠나무 잎은 그늘에서 자연 건조시켰으며, 잘 건조된 황칠나무 잎을 증류수로 2회 세척하고 분쇄한 후, 황칠나무 잎 무게 대비 10배의 70% 에탄올(Daejung, Seoul, Korea)을 가하고 60℃로 중탕 가열하여 2회 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No.1, Whatman, Maidstone, United Kingdom)로 감압여과하고, 그 여과액을 회전농축기(rotary evaporator N-1110S, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축하였다. 감압농축을 통하여 얻은 점조상의 추출물을 동결 건조기(FDU-1200, EYELA, Tokyo, Japan)로 건조하여 분말을 얻었다(수득률 29.2%). 분말상태인 황칠나무 잎 에탄올 추출물은 모두 -20℃에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

2.2. 사용균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 식중독, 비듬 그리고 충치의 원인이 되는 미생물로서 그 종류와 배양조건을 Table 1에 나타내었다. 미생물은 그람 양성균 6 종(species)과 그람 음성균 5종, 효모 1종으로 구성되어 있다. 충치 원인 세균과 비듬 원인 효모로 알려진 *Streptococcus mutans*와 *Malassezia furfur*, 녹농균인 *Pseudomonas aeruginosa* 그리고 그 외의 균주들은 식중독을 유발하는 것으로 알려진 것들이다. 실험에 사용된 균주는 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM, Seoul, Korea), 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Daejeon, Korea) 그리고 농촌진흥청 농업유전자원정보센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC, Jeonju, Korea)로부터 분양받았다. 분양 받은 균주는 3회 계대배양 후 40% glycerol 용액과 혼합하여 -18℃에서 보관하면서 실험에

사용하였다. 보관된 균주는 실험 직전 증식을 위한 액체배지에 접종하여 각각 최적 배양 조건에서 2회 계대배양 후 사용하였다.

Table 1. List of microorganisms and growth conditions used for antimicrobial activity test

Strains	Reference No.	Culture medium	Growth temperature
Gram-positive bacteria			
<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC ¹⁾ 3206	TSA ⁴⁾ / TSB ⁵⁾	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1621		
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	KCTC 1916		
<i>Listeria monocytogenes</i>	KCTC 3710		
<i>Listeria monocytogenes</i>	KCTC 13064		
<i>Bacillus cereus</i>	KACC ²⁾ 12672		
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 1022		
<i>Streptococcus mutans</i>	KACC 16833	TSA+0.30%YE / TSB+0.30%YE	
Gram-negative bacteria			
<i>Salmonella enterica</i>	KCTC 2057	TSA / TSB	37°C
<i>Enterobacter sakazakii</i>	KCTC 2949		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC 1750		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC 2729	TSA+0.10%NaCl / TSB+0.10%NaCl	
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2518	TSA / TSB	
Yeast			
<i>Malassezia furfur</i>	KCCM ³⁾ 12679	YMA ⁶⁾ +0.10% olive oli / YMB ⁷⁾ +0.10% olive oil	28°C

¹⁾Korea Collection for Type Cultures (Daejon, Korea)

²⁾Korean Agricultural Culture Collection (Jeonju, Korea)

³⁾Korea Culture Center of Microorganism (Seoul, Korea)

⁴⁾Trypticase Soy Agar (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)

⁵⁾Trypticase Soy Broth (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)

⁶⁾Yeast Malt Agar (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)

⁷⁾Yeast Malt Broth (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)

2.3. 항균활성

추출물은 멸균된 증류수를 이용하여 0.5, 1, 5, 10, 30 그리고 50 mg/mL 농도로 제조하였다. 농도별로 제조된 추출물은 멸균된 paper disc(diameter 6 mm, ADVANTEC, Toyo Roshi Co., Tokyo, Japan)에 20 μ L씩을 흡수시킨 후 무균상(clean bench) 안에서 건조하였다. 실험균주를 각각 최적 조건에서 배양한 후 그 생균수를 1×10^7 CFU/mL로 조정된 배양액을 1% agar가 첨가된 배지와 1 : 1 비율로 혼합시킨 후 1.5% 평판 한천배지에 중층(overlay method)하였다. 중층한 배양액이 응고되면 추출물을 흡수한 paper disc를 표면에 밀착시켜 각각 최적 생육 조건에서 배양하였다. 배양이 완료된 후 paper disc 주위에 생성된 생육 저해환(inhibition zone)의 직경(mm)을 측정하여 항균 활성을 비교하였다.

2.4. 최소저해농도

Disc diffusion method 실험에서 추출물의 항균 활성이 확인된 균주를 대상으로 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 조사하였다. 추출물을 0.5-50 mg/mL 농도로 희석하고 균주와 혼합하여 배양한 후 흡광도를 측정하여 각각 대상 균주의 생육을 저해하는 정확한 농도를 확인하고자 하였다. 각 농도의 추출물 100 μ L과 생균수를 1×10^7 CFU/mL로 조정된 실험균주 배양액 2 μ L를 96-well plate (iNtRON biotechnology, Seongnam, Korea)에 넣은 후 각각 균주에 적합한 배양 조건에서 배양하였다. 균주 배양액 대신 액체배지를 혼합한 시료를 대조군으로 하였다. 배양 후에는 UV-Vis spectrophotometer (SPECTRA PLUS 384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군과 비교하여 균주의 증식이 관찰되지 않는 추출물의 최소농도를 MIC로 결정하였다.

2.5. 최소사멸농도

Disc diffusion method와 MIC 실험을 통하여 추출물에 의한 생육 저해효과가 확인된 균주를 대상으로 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 조사하

였다. MBC는 액체배지에 MIC의 추출물과 실험균주를 넣고 배양한 후, 배양 시료 100 μ L를 취하여 십진 희석 후 평판배지에 도말하고 각각 최적조건에서 배양하여 생성되는 colony(집락)을 확인하였다. MIC에서 colony가 관찰되면 높은 농도로 재수행 하여 최종적으로 실험 균주를 99.9% 이상 사멸시키는 최소 농도를 MBC로 결정하였다.

2.6. 생육저해 효과

추출물에 의한 미생물의 생육저해효과는 time killing curve assay 방법으로 조사하였다. 생육 억제 작용이 관찰된 균주들을 대상으로 최소저해농도(MIC)에서 24-48시간 배양하면서, 3시간 간격으로 UV-Vis spectrophotometer (Molecular Devices)를 사용하여 탁도(600nm에서의 흡광도)를 측정하였다. 96-well plate (iNtRON biotechnology)에 추출물 100 μ L, 2배 농축된 액체배지 100 μ L 그리고 생균수를 1×10^7 CFU/mL로 조정된 배양액 2 μ L을 혼합한 후 각각 최적 배양조건에서 배양하였다. 생육저해효과는 균주들 각각의 배양 시간에 따른 생육곡선으로 나타내었다.

2.7. 항산화 활성

추출물에 의한 라디칼 소거능을 확인할 수 있는 비교적 안정한 물질인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 반응 후 변색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 추출물은 50% 에탄올과 0.1, 0.5, 1 그리고 5 mg/mL 농도가 되도록 혼합하였고, DPPH도 50% 에탄올에 용해시켜 2.0 mM DPPH를 제조하였다. 빛이 차단된 갈색 시험관에 각 농도의 추출물 0.1 mL와 2 mM DPPH 0.9 mL를 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후, UV-Vis spectrometer (Molecular Devices)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 BHA (butylated hydroxyanisole, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 추출물과 표준물질의 라디칼 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도를 IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) 값으로 나타내었다.

DPPH free radical scavenging capacity(%)=[(A-B)] / A x 100

A: absorbance of the control, B: absorbance of the sample

2.8. 통계처리

모든 실험을 3회 이상의 독립적인 실험을 수행하여 결과를 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각각의 실험결과는 SPSS 통계분석 프로그램(SPSS 18.0K for windows, SPSS Inc., AM, USA)의 분산분석(Analysis of Variance)을 수행하고 Duncan's multiple range test에 의해 평균값에 대한 유의차($p < 0.05$)를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항균활성

황칠나무 잎 에탄올 추출물을 50, 30, 10, 5, 1, 0.5 mg/mL의 농도로 제조 후 식중독, 비듬 그리고 충치의 원인이 되는 미생물에 대한 항균활성 측정 결과를 Table 2에 나타내었다. 실험을 수행한 총 12종 14개의 균주 중 그람 양성균 5종 7개인 *E. faecalis* KCTC 3206, *S. aureus* KCTC 1621, *S. aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916, *L. monocytogenes* KCTC 3710, *L. monocytogenes* KCTC 13064, *B. cereus* KACC 12672, *S. mutans* KACC 16833에서만 생육 저해환(inhibition zone)을 관찰할 수 있었고, 생육 저해환(inhibition zone)의 크기는 추출물의 농도가 증가할수록 유의적으로 커짐을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 황칠나무 잎 에탄올 추출물에 대한 민감도는 시험 미생물에 따라 다르게 나타났으며, 가장 낮은 농도인 5 mg/mL에서 *S. aureus* KCTC 1916가 유일한 생육 저해환(6.7 mm)을 보여 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 이어 시험농도 10 mg/mL에서는 *S. aureus* KCTC 1621와 *B. cereus* KACC 12672가 각각 8.7과 7 mm의 생육 저해환을 나타내었으며, *S. aureus* KCTC 1916는 7 mm로 *S. aureus*의 경우 같은 종(species)에서도 황칠나무 잎 에탄올 추출물에 대한 민감도에 차이가 있음을 확인하였다. 특히 *S. mutans* KACC 16833은 시험농도 중 50 mg/mL에서만 11 mm의 생육 저해환을 나타내었으며, *E. faecalis* KCTC 3206와 *L. monocytogenes* KCTC 3710는 모두 30과 50 mg/mL에서만 각각 생육 저해환이 관찰되었고 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다($p > 0.05$). 또 하나의 *Listeria* 속(genus)인 *L. monocytogenes* KCTC 13064 역시 30과 50 mg/mL에서 생육 저해환이 확인되었으며 농도의 증가에 따라 그 크기도 유의적으로 커졌다($p < 0.05$). 낮은 농도인 1, 0.5 mg/mL에서는 모든 균주에서 생육 저해환이 관찰되지 않았다. 탁도 측정을 통한 항균 활성 농도 확인은 좀 더 세밀한 농도 측정이 가능하다는 장점이 있으나 탁도에 영향을 미치는 색을 띄는 추출물이나 배지 조성이 영향을 주는 경우 및 사균(dead cell)이 존재할 때는 그 영향을 받을 수 있다는 단점이 있다. 그러나 disc agar diffusion 방법을 통한 항균 활성 측정은 탁도에 영향을 미치는 인자들이 배제된 방법이므로 섬세한

농도 결정은 어렵지만 오히려 비교적 정확한 항균 활성 농도를 확인할 수 있다는 장점이 있다.

현재까지 황칠나무 에탄올 추출물의 항균 활성에 대한 연구가 보고되어 있지 않기 때문에 제주의 다양한 자생 식물의 추출물에 대한 항균 활성효과를 비교해보고자 하였다. 제주 해안가 모래땅에서 흔히 볼 수 있는 애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill)의 에탄올 추출물에서도 그람 양성균인 *S. aureus*, *L. monocytogens* 그리고 *B. cereus*에 대해 농도에 비례한 생육 저해환(inhibition zone)을 확인하여 본 실험결과와 비슷한 양상을 보였다. 그러나 본 연구에서는 항균활성을 확인하지 못한 그람 음성균인 *E. coli*, *S. enteritidis* 그리고 *S. typhimurium*에 대해서도 생육 저해환이 관찰되어 애기달맞이꽃 추출물의 항균 스펙트럼(spectrum)이 황칠나무 잎 에탄올 추출물보다 넓다는 것을 알 수 있었다[Taniguchi S et al., 2002, Kim JY et al., 2007]. 제주도 습지에서 자생하는 다년생 초본인 삼백초(*Saururus chinesis*) 추출물 역시 본 실험과 유사한 결과를 보였다. 그람 음성균주 *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대해서는 생육 저해환이 나타나지 않은 반면에 메탄올과 헥산 분획물에서 그람 양성균인 *B. subtilis*와 *S. aureus*에 대한 생육 저해환이 확인되었다[Lee JH et al., 2013]. 제주도 해안가에서 자생하는 대극과 식물인 등대풀(*Euphorbia helioscopia*)의 에탄올 추출물은 그람 양성균인 *B. subtilis*와 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 높은 항균활성을 나타내었다[Kim JY et al 2007]. 최근 제주에서 재배가 증가하고 있는 백년초(*Opuntia ficus-indica*) 물 추출물 역시 그람 음성균인 *E. coli*와 그람 양성균인 *L. monocytogens*에 대한 항균활성이 확인되었다[Seo YH et al 2012]. 제주도 하천을 따라 분포하고 있는 구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidata*) 잎 에탄올 추출물 또한 그람 양성균인 *B. subtilis*와 그람 음성균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*의 생육저해 효과가 있음을 확인하였다[Kim JY et al 2011]. 이들 추출물의 disc diffusion method 수행 결과를 종합적으로 살펴보면 전체적으로 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 저해환 관찰 농도보다 비교적 낮은 농도에서 저해환을 관찰하였고, 그람 양성균뿐만 아니라 본 연구에서 항균활성이 관찰되지 않은 그람 음성균에 대한 생육저해 효과를 확인하였다. 본 연구에서도 *S. enterica*, *E. sakazakii*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *V. parahaemolyticus* 그리고 *S. sonnei* 등의 그람 음성균과 효모인 *Malassezia furfur*를 대상으로 항균활성 실험을 수행하였으나 추출물 50% 희석액에서도 저해환을 확인할 수 없었다. 그러나 이러한 추출물에 따른

생육저해효과 차이는 실험에 사용한 paper disc의 크기와 두께 그리고 추출물의 paper disc에의 흡수력 차이 등에 따라 결과가 다르게 나타날 수 있기 때문에 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)의 측정을 통한 비교가 필요할 것으로 판단된다. 식물과 해조류 등의 추출물의 항균 활성을 확인한 연구 결과들을 살펴보면 전체적으로 그람 음성균보다 그람 양성균에 대한 항균 스펙트럼이 넓다는 것을 알 수 있다[Yoon SY et al 2010]. 이는 그람 음성균의 세포벽이 그람 양성균보다 얇지만 구조가 더 복잡하며, 외막으로 둘러싸여 있어서 외부로부터의 물질 흡수를 방해하는 것이 이유로 판단된다. 그러나 그람 음성균 일부에 대해서도 항균 활성을 보이는 것은 세균 분류 상 그람 음성균과 양성균으로 구분하고는 있지만, 각각의 세포 구조에 차이가 있으므로 이에 따른 각 strain 간의 특성 차이 때문인 것으로 판단된다. 또한 위에서 열거한 애기 달맞이꽃과 삼백초, 대풍, 백년초 그리고 구실잣밤나무 잎 추출물의 항균 활성은 주로 플라보노이드 성분에 기인하는 것으로 확인되었다. 현재까지 보고된 바에 따르면 황칠나무에는 정유물질에 속하는 쌍환성 세스퀴테르펜(sesquiterpene), 알코올 그리고 에테르 등의 성분이 함유되어 있어서 이들 성분 중에서 일부가 항균 활성에 역할을 할 것으로 예상되지만[Ahn JC et al 2002], 황칠나무 추출물의 항균 활성 성분에 대해서는 앞으로 그 물질 확인 및 분리 등의 심도 있는 연구가 추가로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

3.2. 최소저해농도와 최소사멸농도

Disc diffusion method에서 추출물에 의한 생육 저해가 확인된 7가지 그람 양성균주에 대하여 항균 활성을 나타내는 최저농도를 세밀하게 측정하기 위하여 흡광도 측정을 통한 최소저해농도(MIC)를 확인하였으며, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 실험을 실시한 균주 중 *B. cereus* KACC 12672가 가장 낮은 농도인 2.5 mg/mL에서 생육이 저해되었으며, *S. aureus* KCTC 1916은 3 mg/mL, *S. aureus* KCTC 1621은 4 mg/mL, *S. mutans* KACC 16833는 5 mg/mL, *L. monocytogenes* KCTC 13064는 7.5 mg/mL, *L. monocytogenes* KCTC 3710는 10 mg/mL의 MIC를 확인하였다. 또한 *E. faecalis* KCTC 3206의 MIC는 15 mg/mL로 실험 대상 균주 중 가장 높은 수치의 MIC를 나타내었다. 앞서 disc diffusion method에서 확인한 바와 같이, 같은 종(species)내에서도 strain 간의 MIC 차이가 있음을 알 수 있었다. 제주 자생식물 추출물의 항균활성을 확인한

결과를 살펴보면, MIC가 대체적으로 가장 낮게 확인된 *S. aureus*에 대한 MIC는 애기달맞이꽃 추출물 10 µg/mL, 구실잣밤나무 잎 추출물 0.5 mg/mL 그리고 삼백초 추출물 2.5 mg/mL 등으로 확인되었다. 또한 *L. monocytogenes*의 경우에는 구실잣밤나무 잎과 애기달맞이꽃 추출물의 MIC가 각각 1과 50 mg/mL로 나타나 같은 실험 균주에 대해서도 식물 추출물 종류에 따라 MIC에 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 사용된 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 미생물에 대한 MIC를 동일 대상균주별로 비교하여 살펴보면, *S. aureus*는 3-4 mg/mL, *L. monocytogenes*는 7.5-10mg/mL으로 확인되어 위에 언급한 추출물과 농도를 단순 비교하였을 때 중간 정도 되는 항균 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

Disc diffusion method를 이용하여 측정된 항균 활성 최저 농도와 MIC를 비교하면, 대부분 1/2-1/4정도 MIC가 낮게 나타났고, *S. mutans* KACC 16833는 MIC 수치가 1/10 정도 낮게 측정되었다. 이와 같이 결과가 나타난 이유 중 하나는 두 실험방법의 차이 때문이라고 추측된다. Disc diffusion method인 경우, 고체배지를 사용하여 항균 활성을 측정하기 때문에 대상 추출물이 고체배지로의 확산이 어렵거나 확산속도가 현저히 떨어진다면 추출물과 미생물이 접촉하는 표면적이 넓은 액체배지를 이용한 MIC 실험결과보다 그 민감도가 감소할 것이다. 또한 MIC는 흡광도를 이용하여 측정하는 시험법이므로 황색의 황칠나무 잎 에탄올 추출물처럼 흡광도에 영향을 미치는 색소를 가지는 시료의 경우에 추출물의 색이 탁도에 영향을 미쳐서 MIC 결정에 영향을 미칠 것으로 판단된다. 하지만 이와 같은 경우에 흡광도 측정의 대조균을 추출물을 첨가한 배지로 사용하기 때문에 오차를 감소시킬 수 있다고 생각된다. 따라서 disc diffusion method와 MIC 수행으로 농도의 범위를 축소시킨 이후에 배양을 통하여 시료의 생균수를 직접 측정하는 최소사멸농도(MBC) 측정이 추가로 수행되었다. 생균수 측정을 통하여 각 실험균주를 99.9% 이상 사멸하는 MBC를 확인한 결과(Table 3), 모든 대상 균주에서 MBC는 MIC보다 높은 것으로 확인되었다. MIC가 10 mg/mL 미만인 균주들은 비슷한 양상의 MBC를 보였으나, 10 mg/mL 이상인 균주들은 MIC와 MBC 양상이 다르게 나타났다. 실험 균주 *B. cereus* KACC 12672는 MBC(MIC)는 5(2.5) mg/mL, 다음으로 *S. aureus* KCTC 1621과 KCTC 1916이 각각 6(3)과 8(4) mg/mL 그리고 *S. mutans* KACC 16833이 10(5) mg/mL으로 확인되었다. 그러나 *E. faecalis* KCTC 3206, *L. monocytogenes* KCTC 3710과 KCTC 13064는 각각 30(15),

40(10) 그리고 40(7.5) mg/mL의 MBC(MIC) 값을 나타내어 MBC와 MIC 간의 농도 증감에 대한 상관관계를 확인할 수 없었다. 뿐만 아니라 같은 종(species)인 *S. aureus* KCTC 1621과 KCTC 1916 그리고 *L. monocytogenes* KCTC 3710과 KCTC 13064는 각각 다른 MBC와 MIC 농도를 나타내어, disc diffusion method 결과와 더불어 같은 종(species)이라도 각각의 strain에 따라 항균물질에 대한 민감성에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 일반적으로 MIC가 미생물의 생육을 저해하는 항균물질의 최소 농도를 의미하지만, 이 농도가 반드시 미생물을 멸균시키는 않는다. 액체배지 배양 후 흡광도 상에서는 미생물 증식을 확인할 수 없지만 이를 고체배지에 도말했을 때는 집락(colony)를 확인할 수 있는 농도라는 것이다. 따라서 이러한 액체배양액을 고체배지에 도말했을 때도 colony가 확인되지 않은 농도를 MBC로 결정하고, 이 농도에서는 미생물이 99.9% 이상 사멸됨을 의미한다. 일반적으로 특정 병원균에 대한 항균물질 투여 시, MIC보다 수 배 높은 농도를 사용한다[Archer GL & Polk RE 2008]. 그러나 MIC나 MBC 실험은 특정 시간에서만 미생물 증식을 확인하기 때문에 어느 시점부터 미생물 생육이 억제되는지 또는 활성화되는지 등의 전체적인 경향에 관한 분석이 어렵다. 따라서 실제 미생물 증식에 필요한 시간 동안 혹은 그 이상의 시간 동안 일정 시간대 별로 흡광도를 측정하여 시간에 따른 항균물질에 대한 미생물의 반응 양상을 확인하는 생육저해효과(time killing curve assay)를 분석하는 실험이 수행되어야 한다.

황칠나무의 주성분으로 폴리아세틸렌(polyacetylene)계 화합물이 알려져 있는데 이 성분은 식물이 외상에 의한 자극 시 분비되는 항균성 물질인 것으로 알려져 있고[Lim GP et al., 1997] 이 뿐만 아니라 황칠나무에는 폴리페놀(polyphenol)의 중합체인 수용성 타닌(tannin)이 함유되어 있는데, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*에 대한 타닌(tannin)의 항균력은 이미 보고되었다[Merkel et al., 2008]. 황칠나무의 항균력은 이와 같은 물질에서 기인됨을 예상 할 수 있다.

3.3. 생육저해 효과

황칠나무 잎 에탄올 추출물에 의하여 증식 억제가 확인된 MIC를 첨가한 액체배지에서 대상 미생물 배양을 시작한 직후부터 이후 총 48시간 동안 3-12시간 간격으로 그 흡광도를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 추출물을 첨가하지 않은 미생물은 배양

3시간 이후 급격하게 증식하는 대수기에 접어들었음을 알 수 있었다. 그러나 *E. faecalis* KCTC 3206, *S. aureus* KCTC 1916, *L. monocytogenes* KCTC 3710과 13064 그리고 *S. mutans* KACC 16933은 전체 배양시간 동안 흡광도를 통한 증식은 확인할 수 없었다. 반면 *S. aureus* KCTC 1921은 3시간 이후 그리고 *B. cereus* KACC 12672는 12시간 이후 흡광도를 통한 미약한 증식을 확인할 수 있었다. 따라서 흡광도 측정을 통한 MIC를 확인하고자 하는 경우나 특정 시간에 배양을 통한 MBC를 확인하고자 할 때는 한 시점이 아닌 2-3개의 여러 시점을 정해서 그 결과를 측정하는 것이 실험결과에서 오차를 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

3.4. 항산화 효과

항산화 활성을 나타내는 기작은 이들 물질이 인체에서 노화와 세포손상에 의한 질병의 원인이 되는 자유 라디칼(free radical)를 소거하는 것이다. 시험물질로는 비교적 안정한 라디칼인 DPPH를 이용하여 이를 소거하는 정도를 수치로 계산하여 물질의 항산화 활성을 나타낸다. 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 추출물과 합성 항산화제인 BHA의 DPPH 라디칼 소거활성을 분석하고 그 결과를 Table 4에 제시하였다. 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 5, 1, 0.5 그리고 0.1 mg/mL에서 각각 89.8%, 76.4%, 44.7% 그리고 19.1%로 측정되었으며, 농도 감소에 따라 그 활성도 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 추출물의 항산화 활성 정도를 비교하기 위하여 사용한 BHA는 추출물과 같은 농도인 5, 1, 0.5 그리고 0.1 mg/mL에서 각각 92.6, 92.5, 90 그리고 49%로 확인되었으며, 0.1%에서만 활성에 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$). 추출물과 BHA의 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능 수치만 살펴보면 비슷한 활성을 나타내지만, 추출물의 수득률(29.2%)만 단순히 고려하면 황칠나무 잎은 측정된 값의 1/3 정도의 활성을 보이는 것으로 판단할 수 있다. 본 연구에서는 에탄올 추출물을 분석하였지만, 물과 에탄올 추출물의 항산화활성을 비교한 연구 결과에서 추출 용매에 따른 유의적인 차이는 확인할 수 없었다[Cho YJ, 2014]. 구실잣밤나무 추출물은 사용한 용매 종류에 따라 DPPH 소거능에 차이가 있었으며, 물이 가장 높고, 에탄올과 에틸아세테이트 등을 사용했을 때는 BHA와 비슷한 수치의 항산화활성을 나타내었다[Kim JY et al., 2011]. 따라서 추후에는 황칠나무 잎의 생리활성을 확인하기

위하여 에탄올뿐만 아니라 순차적 용매 분획물에 대한 연구도 수행되어야 할 것으로 판단된다.

결과로 제시하지는 않았지만 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 활용범위를 넓히고자 추출물이 첨가된 배지에 젖산균(*Leuconostoc mesenteroides* KACC 17862, *Weissella koreensis* KACC 11853 그리고 *Lactobacillus plantarum* KACC 11451)을 접종하여 발효과정을 거친 후 획득한 발효액의 항균활성을 분석하였다. 그 결과 황칠나무 잎 에탄올 추출물에 의한 증식억제가 관찰되지 않았던 그람 양성인 *P. aeruginosa*와 그람 음성인 *V. parahaemolyticus*가 발효된 황칠나무 잎 에탄올 추출물에 의해서는 그 증식이 억제됨을 확인하였다. 추출물을 제외하고 젖산균만을 이용한 발효액에서는 항균활성이 나타나지 않았기 때문에 이는 발효에 의해 추출물이 다른 물질로 분해 또는 합성되어 항균활성을 나타내는 것으로 추측된다. 따라서 추출물뿐만 아니라 황칠나무 잎을 직접 발효시킨 후 이에 대한 다양한 생리활성을 분석하는 연구가 추가로 수행되어야 할 것으로 판단된다. 최근 들어 황칠나무 잎 분말을 빵과 국수 등에 첨가하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 이에 따라 본 연구 결과는 추후 개발되는 황칠나무관련 추출물의 첨가 식품에 대한 생리활성 기능을 제시해줄 수 있는 기초자료가 될 것으로 기대한다.

Table 2. Inhibition of various pathogenic bacterial growth by ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev.

Strians	Diameter of growth-inhibition zone on plate (mm)					
	50 mg/mL ¹⁾	30 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	7.0 ± 0.0 ^{d2)}	6.8 ± 0.3 ^d	- ³⁾	-	-	-
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	11.3 ± 0.6 ^a	10.0 ± 0.0 ^c	8.7 ± 0.0 ^b	-	-	-
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC 1916	11.0 ± 1.0 ^a	10.0 ± 0.0 ^c	7.0 ± 0.0 ^d	6.8 ± 0.0 ^d	-	-
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 3710	7.0 ± 0.0 ^d	7.0 ± 0.0 ^d	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 13064	9.7 ± 0.6 ^c	8.7 ± 1.2 ^b	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> KACC 12672	10.0 ± 0.0 ^c	8.3 ± 0.6 ^b	7.0 ± 0.0 ^d	-	-	-
<i>S. mutans</i> KACC 16833	11.0 ± 0.0 ^a	-	-	-	-	-

¹⁾Extract concentration.

²⁾All values are means ± standard deviation of three replicates. Different superscript letters in the same column and concentration (mg/mL) show differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

³⁾No inhibition

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev. against various pathogenic bacteria.

Strains	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>E. faecalis</i> KCTC 3206	15.0 ± 0.0 ^e	30.0 ± 0.0
<i>S. aureus</i> KCTC 1621	3.0 ± 0.0 ^d	6.0 ± 0.0
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC 1916	4.0 ± 0.0 ^d	8.0 ± 0.0
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 3710	10.0 ± 0.0 ^c	40.0 ± 0.0
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 13064	7.5 ± 0.0 ^c	40.0 ± 0.0
<i>B. cereus</i> KACC 12672	2.5 ± 0.0 ^b	5.0 ± 0.0
<i>S. mutans</i> KACC 16833	5.0 ± 0.0 ^a	10.0 ± 0.0

All values are means ± standard deviation of three replicates. Different superscript letters in the same column and concentration (mg/mL) show differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 4. DPPH radical scavenging activity of ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev.

Concentrations (mg/mL)	BHA ¹⁾	<i>Dendropanax morbiferus</i> Lev. extracts.
5.0	92.6 ± 0.1 ^a	89.8 ± 0.0 ^a
1.0	92.5 ± 0.1 ^a	76.4 ± 2.9 ^b
0.5	90.0 ± 0.2 ^a	44.7 ± 0.7 ^d
0.1	49.0 ± 0.2 ^c	19.1 ± 3.6 ^e
IC ₅₀ ²⁾	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.1

All values are means ± standard deviation of three replicates. Different superscript letters in the same column and concentration (mg/mL) show differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

¹⁾Butylated hydroxyanisole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

²⁾The half maximal inhibitory concentration of radicals.

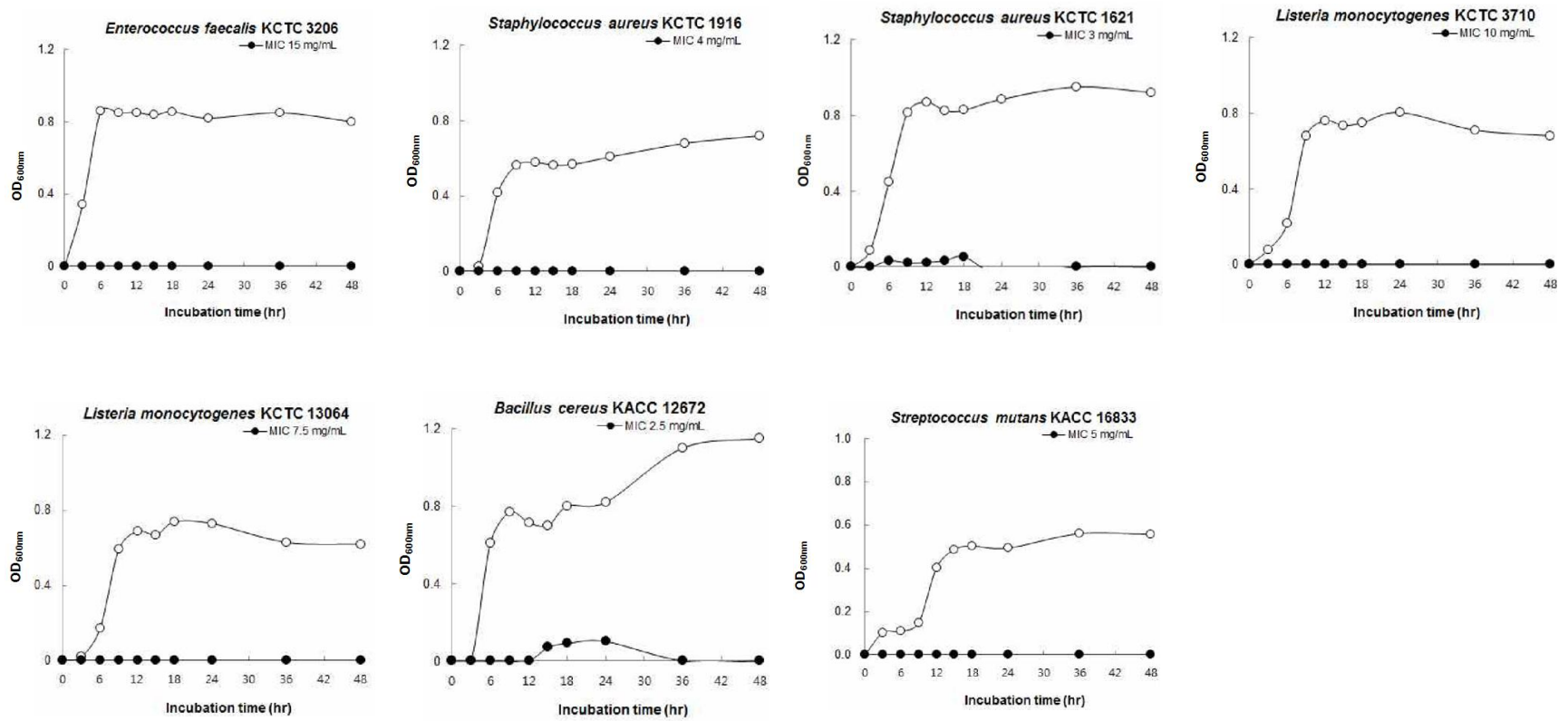


Fig. 1. Growth curves of bacteria treated with ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev. OD, optical density.

4. 결 론

본 연구에서는 제주도에 자생하고 있는 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 다양한 유해균에 대한 항균 활성 및 항산화 활성을 확인하고자 하였다. 항균활성 측면에서는 실험에 사용된 총 12종 14개 균주 중 그람 양성인 7개 균주에서만 생육 저해 효과를 확인할 수 있었다.

생육 저해환의 크기는 추출물의 농도 증가에 비례하여 유의적으로 커졌으며, *S. aureus* KCTC 1916만이 가장 낮은 농도인 5 mg/mL에서 생육이 저해되어 민감도가 높았다. 흡광도를 측정하여 확인한 MIC 항균활성 실험에서는 가장 낮은 농도인 2.5 mg/mL에서 *B. cereus* KACC 12672의 생육이 저해됨을 확인하였고, *E. faecalis* KCTC 3206은 가장 높은 농도인 15 mg/mL에서 생육이 저해됨을 알 수 있었다. 생균수 측정을 통하여 실험 균주 99.9% 이상을 사멸하는 MBC를 확인한 결과, 모든 대상 균주에서 MBC가 MIC보다 높은 것으로 확인되었다. 추출물에 의하여 증식 억제가 확인된 MIC를 첨가한 액체배지에서 대상 미생물을 배양한 후 총 24-72시간 동안 3시간 간격으로 그 흡광도를 측정된 결과, *B. cereus* KACC 12672에서만 12시간 이후 흡광도를 통한 미약한 증식을 확인할 수 있었다.

그람 양성균은 세포벽의 약 80-90%가 펩티도글리칸(peptidoglycan)으로, 여러 층의 펩티도글리칸(peptidoglycan)층이 두껍게 감싸고 있는 형태이다. 반면 그람 음성균은 펩티도글리칸(peptidoglycan)이 약 10-20%만을 차지하고 있고 매우 얇게 한층으로 이루어져 있으나 이를 대신하여 그람 음성균의 세포 외벽에는 인지질, 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide), 리포프로테인(lipoprotein)등으로 구성된 외막이 감싸고 있는 형태로 이루어져있다. 이러한 세포벽 구조의 차이에서 기인되는 그람 염색의 차이는 세균을 분류하는 가장 기본적인 기준이자 이러한 구분은 나아가 살균제, 소독제 또는 더 나아가 항생물질제제, 백신 및 정균약품 개발에 있어서 중요한 지표로 이용되어진다 [Kim HJ et al., 2007].

황칠나무 잎 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 5, 1, 0.5 그리고 0.1 mg/mL에서 각각 89.8, 76.4, 44.7 그리고 19.1%로 측정되었으며, 농도 감소에 따라 그 활성도 유의적으로 감소하였다. 이는 추출물과 같은 농도의 BHA를 대조군으로 사용하였을 때와 비슷한

수치이다.

이러한 황칠나무 잎 추출물의 항균 활성 및 항산화 활성은 황칠나무의 주성분인 폴리아세틸렌(polyacetylene)계 화합물 및 황칠나무에 함유된 폴리페놀(polyphenol)의 중합체인 수용성 타닌(tannin)에서 기인된 것으로 보인다.

결과로 제시하지는 않았지만 황칠나무 잎 에탄올 추출물에 젓산균 3종(*Leuconostoc mesenteroides* KACC 17862, *Weisella koreensis* KACC 11853, *Lactobacillus plantarum* KACC 11451)을 각각 접종한 모든 발효액에서 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2729 2종에 대해 항균 활성을 확인 할 수 있었다. 따라서 황칠나무 에탄올 잎 추출물과 황칠나무 잎 에탄올 추출물을 젓산균에 의해 발효시킨 발효액을 잘 이용하면 좀 더 광범위하게 실제 제품에 적용이 가능할 것으로 예상된다.

과학기술이 발달하면서 많은 합성물질들이 다양하게 개발되어 실생활에 적용되고 있지만 합성물질에 대한 안전성 등의 문제로 소비자들은 천연물질을 선호하고 있다. 미생물이 생산하는 항균물질의 대부분은 미생물 대사산물 중의 하나로 단백질 또는 peptide성 물질이어서 인간 또는 동물의 소화효소에 의해 분해되는 천연물질이기 때문에 식품에서 천연 항균제, 살균제 등으로 식품에서 안전하게 적용이 가능하다. 여기에 세계가 인정한 세계자연유산, 청정 이미지를 가지고 있는 제주도는 천연자원을 개발하여 실제 제품에 적용하여 판매하기까지 많은 장점을 지닌 지역이다.

현재까지 제주 자생식물을 대상으로 한 항균 활성 및 항산화 활성에 관한 연구가 이루어지고 있고 앞으로도 진행 중일 것이다. 제주도 자생 식물을 대상으로 한 항균효과에 관한 연구에는 애기달맞이꽃(*Oenothera laciniata* Hill)[Kim JY et al., 2007], 엉겅퀴(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)[Jang MR et al., 2014], 암대극(*Euphorbia jolkini* Boiss)[Kim JY et al., 2006], 등대풀(*Euphorbia helioscopia*)[Kim JY et al., 2007], 삼백초(*Saururus chinensis*)[Lee JH et al., 2013], 백년초(*Opuntia ficus indica*)[Seo YH et al., 2012], 구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*)[Kim JY et al., 2011] 추출물을 이용한 연구결과가 있다. 앞으로도 제주도만이 가지고 있는 지리적 위치, 해발고도 및 지형 등의 특징적 요인들을 좀 더 부각시켜 다양하게 연구할 필요가 있다. 앞으로도 현재까지의 연구결과를 바탕으로 제주 자생식물의 특징적인 요소들을 가미하여 지속적으로 다양한 천연자원의 생리활성 물질을 연구하여 항균제, 보존제

뿐만 아니라 천연소재의 이용 가능성에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 본 연구에서 확인된 항균 활성과 항산화 활성 결과로부터 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 천연 보존제 및 천연 항산화제로의 이용 가능성을 확인하였으며 이는 추후 황칠나무 잎을 이용한 식품 제조를 위해서 기초자료가 될 것으로 기대한다.

국문 요약

제주지역에서 자생하는 황칠나무 잎 에탄올 추출물에 대한 항균 및 항산화 활성에 대해 알아보았다. 디스크 확산법(disc diffusion method)으로 측정된 황칠나무 잎 에탄올 추출물에 대한 민감도는 시험 미생물에 따라 다르게 나타났으며, 가장 낮은 농도인 5 mg/mL에서 *S. aureus* KCTC 1916가 유일한 생육 저해환(6.7 mm)을 보여 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 추출물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)실험에서는 균주 중 *B. cereus* KACC 12672가 가장 낮은 농도인 2.5 mg/mL에서 생육이 저해되었으며, *S. aureus* KCTC 1916은 3 mg/mL, *S. aureus* KCTC 1621은 4 mg/mL, *S. mutans* KACC 16833는 5 mg/mL, *L. monocytogenes* KCTC 13064는 7.5 mg/mL, *L. monocytogenes* KCTC 3710는 10 mg/mL의 MIC를 확인하였다. 또한 *E. faecalis* KCTC 3206의 MIC는 15 mg/mL로 실험 대상 균주 중 가장 높은 수치의 MIC를 나타내었다. 추출물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)실험 결과를 바탕으로 실시한 추출물의 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)실험에서는 실험 균주 *B. cereus* KACC 12672는 MBC(MIC)는 5(2.5) mg/mL, 다음으로 *S. aureus* KCTC 1621과 KCTC 1916이 각각 6(3)과 8(4) mg/mL 그리고 *S. mutans* KACC 16833이 10(5) mg/mL으로 확인되었다. 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 5, 1, 0.5 그리고 0.1 mg/mL에서 각각 89.8%, 76.4%, 44.7% 그리고 19.1%로 측정되었으며, 농도 감소에 따라 그 활성도 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 추출물의 항균활성 정도를 비교하기 위하여 사용한 BHA는 추출물과 같은 농도인 5, 1, 0.5 그리고 0.1 mg/mL에서 각각 92.6, 92.5, 90 그리고 49%로 확인되었으며, 0.1%에서만 활성에 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$). 이러한 연구 결과는 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 천연 보존제와 항산화제로서의 활용 가능성을 제시한다.

5. 참고문헌

- A. Jia, K. Koike, T. Ohmoto, M. Ni. Triterpenoid saponins from *Ardisia ctrnata*. *Thytochemistry* 37: 1389 (1994)
- Ahn JC, Kim MY, Kim OT, Kim KS, Kim SH, Kim SH, Hwang B. Selection of the high yield capacity of Hwangchil lacquer and identification of aromatic components in essential oil of *Dendropanax morbifera* Lev. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 126-131 (2002)
- Ai-Zindagi NA, Banaya AA, Barrett J. Molluscicidal activity of some Saudi Arabian euphorbiales against the snail *Biomphalaria pfeifferi*. *J Ethnopharmacol* 70: 119-125. (2000)
- An NY, Kim JE, Hwang DY, Ryu HK. Anti-diabetic effects of aqueous and ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Leveille in streptozotocin-induced diabetes model. *Korean J Nutr Health* 47: 394-402 (2014)
- Archer GL, Polk RE. Treatment and prophylaxis of bacterial infections. p 858 In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, eds. *Harrison's principles of internal medicine*, 17th ed. McGraw-Hill. New York, NY. USA (2008)
- Bernart MW, Cardellina JH, Balaschak MS, Alexander MR, Shoemaker RH, Boyd MR. Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *J Nat Prod* 59: 748-753 (1996)
- Chae GC, Auh QS, Chun YH, JP Hong. Antibacterial activity of *artemisa capillaris* THUNB on oral bacteria. *Korean J Oral Medicine* 24: 166-177 (2009)
- Cho YJ. Antioxidant, angiotensin converting enzyme and xanthin oxidase inhibitory activity of extracts from *Saururus chinensis* leaves by ultrafine grinding. *Korean J Food Preserv* 21: 75-81 (2014)
- Choi YJ. *Cultivation and Utilization of Wild Edible*. Osung Press, Seoul, Korea. p 337. (1987)

- Chung SK, Jung JD, Cho SH. Antimicrobial activities of *Chopi* (*Zanthoxylum piperitum* DC.) extract. Korean J Soc Food Sci Nitr 28: 371-377 (1999)
- Choi SK. Growth characteristics of *Dendropanax morbifera* LEV. in Wando area of Korea. Korean J Crop Sci. 48: 434 - 437. (2003)
- Fang J, Xia C, Cao Z, Zheng JZ, Reed E, Jiang BH. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/ AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. FASEB J 19: 3423. (2005)
- Hyun TK, Kim MO, Lee HK, Kim YJ, Kim EY, Kim JS. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Léveille. Food Chem 141: 1947-1955 (2013)
- Jang JS, Lee HJ, Oh BY, Lee JM, Go JM, Kim YH. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by organic acid. Korean J Env Hlth 33: 403-407 (2007)
- Jang MR, Park HJ, Hong EY, Kim GH. Comparison of the antibacterial activity of domestic *Cirsium japonicum*. Korean J Food Cook Sci 30: 278-283 (2014)
- Jeong BS, Jo JS, Pyo BS, Hwang B. Studies on the distribution of *Dendropanax morbifera* and component analysis of the golden lacquer. Korean J Biotechnol Bioeng 10: 393-400 (1995)
- Kim HJ, Yang JH, Woo SS, Kim SK, Yun CH, Kim KK, Han SH. Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of pro-inflammatory cytokines. J. Leukocyte Biol. 81: 983-989 (2007)
- Kim KY, Chung DO, Chung HJ. Chemical composition and antimicrobial activities of *Houttuynia cordata* thunb. Korean J food sci technol 29: 400-406 (1997)
- Kim JB, Kim JM, Cho SH, Oh HS, Choi NJ, Oh DH. Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food samples. J Food Sci 76: 25-29 (2011)
- Kim JS, Chung JM, Kim SY, Kim JH, Lee BY. Phytogeographic study on the Holocene hypsithermal relict plant populations in the Korean peninsula. Korean

- J Plant Taxonomy 44: 208-221 (2014)
- Kim JY, Lee JA, Park SY. Antibacterial activities of *Oenothera laciniata* extracts. Korean J Soc Food Sci Nutr 36: 255-261 (2007)
- Kim JY, Yoon WJ, Yim EY, Park SY, Kim YJ, Song GP. Antioxidative and Antimicrobial Activities of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* Extracts. Korean J Plant Res 24: 200-207 (2011)
- Kim JY, Lee JA, Yoon JA, Oh DY, Jang YH, Lee WJ, Park SY. Antioxidative and antimicrobial activities of *Euphorbia jolkini* extracts. Korean J Soc Food Sci Nutr 38: 699-706 (2006)
- Kim JY, Lee JA, Kim KN, Song GP, Park SY. Antioxidative and antimicrobial activities of *Euphorbia helioscopia* extracts. Korean J Soc Food Sci Nutr 36: 1106-1112 (2007)
- Kim JY, Yoon WJ, Yim EY, Park SY, Kim YJ, Song Gp. Antioxidative and antimicrobial activities of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* extracts. Korean J Plant Res 24: 200-207 (2011)
- Kim SJ, Kim GH. Identification for flavones in different parts of *Cirsium japonicum*. J Food Sci Nutr 8: 330-335. (2003)
- Kim SU, Shin JY, Park YM, Chung KM, Lee JH, Kweon DH. Investigation of antimicrobial activity and stability of ethanol extracts of Licorice Root(*Glycyrrhiza glabra*). Korean J Food Sci Technol 38: 241-248 (2006)
- Kim SY, Kim JD, Ji SS, Lee SK, Park KJ, Park MS. Biochemical and Molecular Identification of Antibacterial Lactic Acid Bacteria Isolated from *Kimchi*. Korean J Food Sci Technol 43: 446-452 (2011)
- Kim YS, Yoo IJ. Antimicrobial effect of natural and synthetic preservatives against *Escherichia coli* KFRI 174. Korean J Food Sci An 15: 127-131 (1995)
- Lee DW, Kim YJ, kim YS, Eom SY, Kim JH. Application as a Cosmeceutical Ingredient of Extract from *Euphorbia jolkini*. J Soc cosmet sci Korea. 33: 275-280 (2007)
- Lee JH, Choe YH, Park YJ, Zhang XW, Kim BS. Antimicrobial and antiviral activity

- of *Saururus chinensis* extract by n-Hexane. Korean J Vet Serv 36: 87-93 (2013)
- Lee JA, Kim JY, Yoon WJ, Oh DJ, Jung YH, Lee WJ, Park SY. Biological activities of *Oenothera laciniata* extracts(Onagraceae, Myrtales). Korean J Food Sci Technol 38: 810-815. (2006)
- Lee JE, Kim JS, Kim GS, Hong SY, Oh JG, Park SY, Cho GM, Oh SG, Lee GT, Kim GH. Understanding of microbial culture medium by Korean Food Standards Codex. pp. 4-7. bioscience.(2012)
- Lee SO, Han SM, Kim HM, Jeung SK, Choi JY, Kang IJ. Chemical components and antimicrobial effects of corni fructus. J Korean Soc Food Sci Nutr 35: 891-896 (2006)
- Lee YN 1998. Flora of Korea. 3th ed. Kyohak Publishing Co., Ltd., Seoul, Korea. p.72 (in Korean).
- Lee YS, Sohn HS, Rho JO. The antibacterial effects of *Backryeoncho*(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*) extracts as applied to *Kimchi* fermentation with lactic acid bacteria and food poisoning bacteria. Korean J Human Ecol 20: 1213-1222 (2011)
- Lim GP, Kim YS, Jung UY. Studies on the Development of Traditional Korean Golden Varnish(Hwangchil)(I) - Anatomical Characteristics and Chemical Composition of Wood and Exudates of Hwangchil-namu(*Dendropanax morbifera*)- Korean J Wood Sci and Technol 25: 24-28 (1997)
- Lim KP, Chung WY, Hong DH. Studies on the development of traditional Korea Golden Varnish (*Hwangchil*) (III) main component analysis of Korean Golden Varnishes traditionally refined from the exudates of *Hwangchil* namu (*Dendropanax morbifera* Lev.). Mokchae Konghak 26: 73-80 (1998)
- Moon MO, Ihm BS, Chung YC, Kang YJ, Kim CS, Kim MH. Taxonomic appraisal of *Dendropanax morbifera* Léveillé and *D. trifidus* (Thunb. ex Murray) Makino based on morphological characters. Korean J PI Taxon. 29: 231-248 (1999)

- Min, B. R., Pinchak, W. E. Merkel, R. Walker, S. Tomita, G. Anderson, R. C. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. *Academic J* 3: 066-073 (2008)
- Ministry of food and drug. 2015. Food poisoning statistics system. Available from: <http://www.mfds.go.kr/e-stat>. Accessed April 01, 2015
- Park BY, Min BS, Oh SR, Kim JH, Kim TJ, Kim DH, Bae KH, Lee HK. Isolation and anticomplement activity of compounds from *Dendropanax morbifera*. *Ethnopharmacol J* 90: 403-40 (2004)
- Park, HK., Park, BK, kang, KJ, Jeon, DH., Park, KH., Ha, SD. Evaluation of effectiveness of sanitizers and disinfectants used in domestic food processing plants. *Korea J Food Sci. Technol*, 37: 1042-1048 (2005).
- Park HK, Park BK, kang KJ, Jeon DH., Park, KH, Ha SD. Evaluation of effectiveness of sanitizers and disinfectants used in domestic food processing plants. *Korean J Food Sci Technol* 37: 1042-1048 (2005)
- Park SH. Colored Illustrations of Naturalized Plant of Korea. Ilchokak, Seoul. p 202. (1995)
- Seo YH, Han CH, Lee JM, Choi SM, Moon KD. Effects of *Opuntia ficus indica* extracts on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apples. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 41: 1009-1013 (2012)
- 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 Agric Sci* 21: 54-59. 30 (1994)
- Seo KI, Yang KH, Shim KH. Antimicrobial and anti-oxidative activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* extract. *Korean J Postharvest Sci Technol* 6: 355-359 (1999)
- Seo YH, Jang JH, Moon KD. Occurrence and characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from minimally processed vegetables and sprouts in Korea. *Food Sci Biotechnol*. 19: 313-319 (2010)

- Son MC, Gwon SC, Kim TH, Oh SH, Jung GJ, Choe GG. Korea geography : Jeju special self-governing province. National geographic information. Korea. pp.63-64 (2012)
- Taniguchi S, Imayoshi Y, Yabuuchi, Ito H, Hanano T, Yoshida T. A macrocyclic ellagitannin trimer, oenotherin T₁, from *Oenothera* species. *Phytochem.* 59: 191-195 (2002)
- T. Jia, K.Koike, T. Nikaido, T.Ohmoto, M. Ni. Triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* and their inhibitory activity on cANP phosphodiesterase, *Chem. Pharm. Bull.*, 42: 2309 (1994)
- Yoo MY, Jung YJ, Yang JY. Antimicrobial activity of Herb extracts. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 34: 1130-1135 (2005)
- Yoon SY, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Lee SJ, Lee CJ, Park NB, Jung JY, Kwak JH, Nam KW, Ahn. DH. Antimicrobial activity of the *Sargassum fulvellum* ethanol extract and the effect of temperature and pH on their activity. *Korean J Food Sci Technol* 42 :155-159 (2010)
- Zhang W, Guo YW. Chemical studies on the constituents of the chinese medicinal herb *Euphorbia helioscopia* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54: 1037-1039. (2006)
- Zhang W, Guo YW. Three new jatrophone-type diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*. *Planta Med Mar* 71: 283-286. (2005)

감사의 글

대학원 생활은 나에게 많은 경험의 기회를 주었습니다. 포기 하고 싶을 때도 많았지만 그때의 경험이 지금 나 자신을 한 단계 발전시켜 준 바탕이 되었습니다. 철없는 10대를 지나 앞으로 삶의 방향의 지침이 될 20대의 시간, 20대의 시간을 바탕으로 한 단계 성장해 가는 30대의 시작을 대학원 생활의 마무리와 함께 새롭게 시작하게 되어 기쁩니다. 혼자였으면 버거울 일 들을 교수님, 동기들, 친구들, 회사식구들이 있었기에 조금은 가벼운 마음으로 이어갈 수 있었습니다.

직장 생활과 병행하느라 대학원 생활에 온 정신을 집중 할 수 없었지만 넓은 마음으로 이해해 주신 박은진 교수님께 진심으로 감사드립니다. 자주 찾아뵙지는 못했지만 얼굴 볼 때마다 아낌없는 격려를 해주신 송대진 교수님, 김수현 교수님, 강영주 교수님, 하진환 교수님, 고영환 교수님, 임상빈 교수님, 김현정 교수님, 천지연 교수님께 감사드립니다. 실험에 집중 할 수 있도록 작은 것부터 하나하나 도와주었던 나이는 나보다 어리지만 언니같이 챙겨준 소연이에게도 고마운 마음을 전합니다. 그리고 대학교를 졸업하고 조교생활도을 하면서 오랫동안 학교생활을 해왔지만 어색 할 수밖에 없는 대학원 생활에 항상 웃음을 주었던 귀염둥이 재원이, 호진이, 미옥이, 정연이에게도 고마운 마음을 전합니다. 늦게 시작한 대학원 생활에 의지 할 수 있도록 용기를 주신 경민오빠, 해원오빠, 충우오빠, 지현언니에게 감사의 마음 전합니다.

대학원생활이 힘들지 않도록 직장생활에서도 힘들지 않도록 배려해 주신 김성호 박사님, 윤진석 부장님, 양정호 과장님, 김주희 과장님 외 회사식구들에게 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 언제나 내 편이 되어준 가족들과 친구들에게도 감사의 마음을 전합니다. 일일이 언급하지는 못했지만 항상 저를 아껴주고 힘이 되어준 모든 분들께 감사의 마음을 전합니다.

대학원 생활은 마무리 되었지만 이제 다시 또 다른 시작입니다. 지금 현재에 만족하지 않고 지속적으로 발전하여 어디선가 꼭 필요로 하는 사람이 되도록 노력하겠습니다.

진심으로 감사드립니다.