



Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf from Myanmar

Miran Jang[‡], SoHyeon You[‡], Gun-Hee Kim^{*}

Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

미얀마 자생 사차인치(*Plukenetia volubilis* L.) 잎의 항산화 및 항균 효과

장미란[‡] · 유소현[‡] · 김건희^{*}

덕성여자대학교 식물자원연구소

Abstract

The comparative study evaluated the antioxidant and antimicrobial activities of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf extracts from Mandalay and Yangon, Myanmar. The total polyphenol and flavonoid contents were higher in Sacha inchi extracts from Yangon (97.84 and 89.60 mg/g, respectively) than in those from Mandalay (71.27 and 60.81 mg/g, respectively). Both DPPH and ABTS radical scavenging activities and FRAP values were higher in Sacha inchi from Yangon, than Mandalay. A clear zone formed around all paper discs placed on a plate coated with pathogenic bacteria indicated antibacterial activity of Sacha inchi extracts. Time-kill curves showed that the growth of all tested strains was inhibited by incubation with Sacha inchi extracts for 24 h. The MIC₅₀ and MIC₁₀₀ were 6.25-2,000 and 125-5,000 µg/mL for eleven and eight tested strains. All measurement methods showed that the antibacterial activity was superior for Sacha inchi from Yangon compared with Mandalay. The more effective antioxidant and antimicrobial activities of Sacha inchi from Yangon were ascribed to the higher abundance of functional phenolics and flavonoids.

Key words : Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), polyphenol, antioxidant, antibacterial activity

서 론

최근 간편화 된 식생활과 외식산업이 발달됨에 따라, 식품의 소비 패턴이 변화하고 있으며 이에 따른 즉석 및 가공식품의 소비가 증가하고 있다(Choi 와 Rhim, 2011). 식품은 저장 및 유통과정을 거치면서 부패 및 변질이 일어나게 되는데(Kim 등, 2007), 주로 미생물의 작용에 의한 것으로, 식품 위해성 균들에 의해 오염된 음식물을 섭취할 경우 구토, 설사, 복통 등의 식중독 증세가 일어날 수 있다(Seo 등, 2016). *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

spp., *Echerichia coli*, *Bacillus cereus*는 물과 토양에 널리 분포되어 있어 채소류에서 주로 발견이 되며(Oh 등, 2016), *Vibrio* spp. 및 *Aeromonas* spp.는 여름철 어패류에서 발견이 되어 패혈증을 유발한다(Lee 등, 2012; Park 등, 2003). 식품 업계에서는 이러한 식중독균들의 증식을 억제하기 위하여 dehydroacetic acid, sorbic acid 및 benzoic acid와 같은 합성 보존료를 사용하고 있다. 그러나, 최근에는 그 안전성에 대한 우려가 제기되고 있어, 천연 식물 유래의 항균성 물질에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다(Jeong 등, 2006; Yoo 등, 2005).

*Corresponding author. E-mail : ghkim@duksung.ac.kr, Phone : +82-2-901-8496, Fax : +82-2-901-8661

[‡]These authors contributed equally to this work.

Received 01 June 2020; Revised 10 July 2020; Accepted 28 July 2020.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한편, 모든 생물은 에너지 대사를 위해 산소를 필요로 하며, 대사 과정 중에 부산물로 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 각종 질병의 주된 원인이라고 보고되었다(Kim 등, 2012a). 활성산소종의 산화적 대사산물로는 superoxide anion radical, hydroxy radical 및 과산화수소와 같은 자유라디칼(free radical)이 있으며, 이들은 생체막에 존재하는 지질의 과도한 산화과정을 통하여 생체막을 변질시켜 효소 불활성, 세포노화, 동맥경화, 당뇨병, 암 등의 각종 질병을 발생시킨다(Yoon 등, 2006). 따라서 질병예방을 위해서는 생체 내 자유라디칼의 생성을 억제하는 것이 중요한 과제로 요구된다.

폴리페놀 화합물은 식물이 함유하고 있는 2차 대사산물로 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones, resveratrols 등이 있으며, 그 종류가 8,000가지 이상이 되는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2012a). 폴리페놀에는 다수의 hydroxyl group을 포함하고 있어 금속 및 단백질과 같은 거대분자들과 결합하려는 성질을 통해 항산화, 항염증 및 다양한 질병을 억제하는 효과를 나타낸다(Kim 등, 2007). 플라보노이드 화합물은 식물에 함유되어 있는 대표적인 페놀성 물질 중의 하나로, 자연계에 널리 분포하고 있으며, 뛰어난 항산화, 항염증 및 항균효과를 가지고 있는 것으로 보고되었다(Coppo와 Marchese, 2014). 현재까지 폴리페놀 그리고 플라보노이드 화합물의 건강기능성 효과에 대해서 많은 보고가 있었으며, 최근에는 천연 식물의 항균 효과와 이들의 천연 항균제로서의 이용에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다(Cushnie와 Lamb 2011; Kim 등, 2012a).

사차인치(Sacha inchi; *Plukenetia volubilis* L.)는 스타빈(star bean), 잉카피넛(inca peanut) 및 오메가너트(Omeganut)로도 불리며, 대극과(Euphorbiaceae)의 덩굴식물로서 아마존이나 동남아시아의 열대우림에 자생한다. 사차인치는 별 모양의 녹색 열매가 맺히며, 과육 속에 식용이 가능한 갈색의 종자를 함유한다. 사차인치의 종자에는 단백질이 27%, 지방이 35-60%, 함유되어 있으며, 그 중에서도 ω -3와 ω -6 등의 불포화지방산이 다량 함유되어 있다고 보고되었다(Fanali 등, 2011). 또한, 잎에는 terpenoids, saponins 및 phenolic compounds 등을 함유하고 있어 항산화 및 암세포의 증식을 억제하는 효과가 있다고 보고되었다(Kumar 등, 2014). 최근에는 사차인치의 vitamin E 활성 및 동물 실험에서의 안전성이 확인되었으며, 그 효능을 소비자들에게도 인정받아 국내에서도 다양한 형태의 식품으로 가공되어 유통되고 있다(Lee, 2019).

일반적으로 사차인치는 종자와 잎을 건조하여 차로 음용하는데, 사차인치에 대한 대부분의 연구는 종자의 영양성분 및 생리활성에 대한 것으로서 현재까지 잎 부분의 생리활성 연구는 매우 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 미안마

의 만달레이 및 양곤 지역에서 수확한 사차인치 잎의 총 폴리페놀과 플라보노이드 화합물 함량 분석 및 항산화활성을 확인하였으며, 대표적인 식중독균 12종에 대한 항균 활성을 조사하여 사차인치 잎을 기능성식품 및 식품 첨가물 소재로서의 활용성을 제고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 조제

사차인치(*Plukenetia volubilis* L.)는 미안마의 만달레이 및 양곤지역에서 2016년에 수확한 것으로 잎 부분을 수확 직후 음건하여 완전히 건조된 것을 실험에 사용하였다. 만달레이산 사차인치는 Post-Harvest Technology Training Centre(Naypyidaw, Myanmar)로부터 제공받았으며, 양곤산 사차인치는 미안마의 산업부 산하 연구소인 Pharmaceutical Research Department (Yangon, Myanmar)로부터 제공받은 것을 실험에 사용하였다. 추출물은 건조시료 30 g에 중량대비 15배의 70% 에탄올을 가하여 50°C에서 환류냉각하면서 4시간 추출하였으며, ADVANTEC paper(No.6, ADVANTEC Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 2회 여과한 후 감압 농축기(EYELA N-1000, Riakikiai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 사차인치 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 100 mg/mL 농도로 녹여 -20°C에 보관하여 실험 시, 증류수를 이용하여 적정농도로 희석하여 사용하였다.

총폴리페놀 함량 측정

총폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin과 Denis, 1912)을 이용하였다. 즉, 각 추출물 50 μ L에 Folin reagent 200 μ L을 가한 뒤, 실온에서 3분간 정치한 후 2% Na_2CO_3 150 μ L를 가하였으며, 실온에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 spectrophotometer(SpectraMax M2, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며, 작성된 표준검량선으로부터 총폴리페놀 함량을 산출하였다. 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 제시하였다.

총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드 함량은 Davis 방법(Jang 등, 2012)을 이용하여 측정하였고, 각각의 시료용액 0.1 mL에 diethylene glycol 1 mL와 1 N NaOH 0.1 mL를 혼합한 뒤 30°C에서 60분간 유지시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin(Sigma Chemical Co.)을 사용하였으며, 시료와 동일한 방법으로 분석하여 작성된 표준검량선으로부터

터 총플라보노이드 화합물의 함량을 산출하였다. 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 제시하였다.

DPPH 라디칼 소거활성 측정

각 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois 등(1958)의 방법을 약간 변형하여 평가하였다. 농도별 시료에 0.2 mM DPPH(Sigma Chemical Co.) 용액을 1:1 비율로 가하여 잘 혼합한 뒤, 암소에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 시료 대신 증류수를 첨가한 대조군과 비교하여 라디칼 제거활성을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 제시하였으며, 계산식은 다음과 같다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A: Absorbance of the blank

B: Absorbance of the sample

ABTS 양이온 소거활성 측정

ABTS 양이온 소거 활성은 ABTS 용액과 과황산칼륨(potassium persulfate)이 반응하여 생성된 ABTS 양이온이 항산화 물질과 반응하여 소거됨으로써 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용한 실험으로, 이의 흡광도를 측정하여 항산화 능력을 측정할 수 있다(Re 등, 1999). 7.4 mM ABTS 용액은 2.6 mM 과황산칼륨과 혼합하여 암소에서 약 24시간 반응시켰으며, 732 nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.03 이 되도록 phosphate buffer saline(pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 희석한 용액 950 μL 에 농도별로 희석한 시료 50 μL 를 첨가한 뒤, 실온에 10분간 방치한 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 시료 대신 증류수를 첨가한 대조군과 비교하여 라디칼의 제거활성으로 나타냈으며, 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\% \text{ ABTS} = (A - B) / A \times 100$$

A: Absorbance of the blank

B: Absorbance of the sample

FRAP 항산화능 측정

FRAP에 의한 항산화능은 Benzie과 Strain(1996)의 방법에 따라 측정하였다. Sodium acetate buffer(0.3 M, pH 3.6), 40 mM HCl로 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ, Sigma Chemical Co.), 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP reagent를 제조하였으며, 37°C로 가온하여 실험에 사용하였다(Benzie와 Strain, 1996). 추출물은 다양한 농도로 희석하여 사용하였다. 실험

은 시료액 0.05 mL에 혼합물 1.5 mL를 가한 후 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 593 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

사용 균주 및 배양

본 실험에 사용된 그램 양성균 4종, 그램 음성균 8종은 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)와 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양 받아 사용하였다. 각각의 배양 조건을 Table 1에 나타내었다. 실험 균액은 600 nm에서의 OD값이 0.2(대략 1×10^7 CFU/mL) 되게 농도를 일정하게 조정하여 사용하였다. 배지는 각 균주의 특성에 맞게 제조하였으며, 121°C, 1.5기압에서 15분간 멸균하여 실험에 사용하였다.

Paper disc법

항균 활성은 paper disc법을 사용하여 분석하였다(Kim 등, 2006). 각 균의 배양액($\text{OD}_{600}=0.2-0.3$) 100 μL 를 agar plate의 표면에 균일하게 도말한 후, paper disc(7 mm diameter)를 올려놓은 후, 각 추출물 60 μL 를 disc에 흡수시킨 후, agar plate에 올려놓았다. Disc를 올려놓은 agar plate는 37°C에서 16시

Table 1. List of strains and cultivation condition used for anti-microbial experiment

Pathogens	Cultivation condition
Gram (+)	
<i>Bacillus cereus</i> KCCM ¹⁾ 11204	NB ³⁾ , 36°C
<i>Bacillus subtilis</i> KCCM 11316	NB, 36°C
<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	NB, 36°C
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 12214	NB, 36°C
Gram (-)	
<i>Aeromonas hydrophila</i> KCTC ²⁾ 2358	NB, 36°C
<i>Escherichia coli</i> KCCM 12119	NB, 36°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1636	NB, 36°C
<i>Salmonella choleraesuis</i> KCCM 11806	NB, 36°C
<i>Serratia marcescens</i> KCTC 2216	NB, 36°C
<i>Shigella sonnei</i> KCTC 2009	NB, 36°C
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCM ²⁾ 11965	NB with 3% NaCl, 36°C
<i>Vibrio vulnificus</i> KCTC 2959	NB with 3% NaCl, 36°C

¹⁾Korean Culture Center of Microorganisms (Seoul, Korea).

²⁾Korean Collection for Type Cultures (Daejeon, Korea).

³⁾Nutrient Broth.

간 동안 배양하였으며, disc 주위의 clear zone 직경(mm)을 측정하여 항균 활성을 확인하였다.

생육저해효과 측정

사차인치 추출물의 식중독균에 대한 생장 저해효과를 측정하기 위하여 broth-dilution 방법을 이용하여 실험하였다 (Jang 등, 2014). 12종의 균주를 nutrient broth 배지에 넣고 OD₆₀₀=0.2-0.3으로 조절한 뒤 실험에 사영하였다. 96-well plate에 nutrient broth 120 µL, 균액 50 µL 그리고 농도별 사차인치 추출물을 50 µL를 첨가하여 36.5 °C에서 배양하면서 4시간의 간격을 두고 24시간 동안 흡광도 값을 측정하였다.

최소저해농도 측정

사차인치 추출물의 식중독균 및 식품부패균의 생장 최소저해 농도(MIC) 측정을 위해서 Jang 등(2014)의 방법을 적절하게 수정하여 사용하였다. OD₆₀₀=0.2-0.3으로 조절한 균액 50 µL을 nutrient broth 120 µL에 넣어준 후 0-5,000 µg/mL 농도의 사차인치 추출물을 50 µL를 첨가하여 36.5°C에서 24시간 동안 배양 후 흡광도 값을 측정하였다. 이 때, 미생물의 생육을 50%와 100%로 저해하는 농도를 각각 MIC₅₀과 MIC₁₀₀으로 정의하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균값과 표준편차로 나타내었으며, SPSS(ver. 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 ANOVA를 실시하였으며, 각 군의 평균값의 유의성은 Duncan's multiple range test로 사후 검정을 수행하였다(p<0.05).

결과 및 고찰

총페놀 및 총플라보노이드 함량

미얀마 두 지역의 자생 사차인치 추출물의 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 만달레이 및 양곤산 사차인치 추출물의 총페놀성 화합물 함량은 71.27±1.21 및 97.84±2.25 mg/g으로 양곤산 사차인치가 만달레이산 사차인치보다 더 높은 페놀성 화합물 함량을 함유하고 있는 것으로 확인되었다.

식물 속에 함유되어 있는 다양한 생리활성 물질 중 페놀 화합물은 식물이 가장 많이 함유하고 있는 2차 대사산물로서, 자유라디칼을 수용할 수 있는 phenolic hydroxyl기를 여러 개 가지고 있어 단백질과 같은 거대분자들과 쉽게 결합하며, 항산화, 항암, 항균 작용 등의 다양한 생리활성을 나타내는데 주된 작용을 하는 것으로 보고되었다(Boo 등, 2009;

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid contents

	Sacha inchi-M ¹⁾	Sacha inchi-Y ²⁾
TPC	71.27±1.21 ³⁾ mg/g GAE	97.84±2.25 mg/g QUE
TFC	60.81±3.34 mg/g QUE	89.60±1.41 mg/g QUE

¹⁾Sacha inchi from Mandalay.

²⁾Sacha inchi from Yangon.

³⁾Each value is expressed as mean±SD (n=3).

Jeon 등, 2008).

사차인치 추출물의 총플라보노이드 화합물 함량은 각각 60.81±3.31 및 89.60±1.41 mg/g으로 양곤산 사차인치가 만달레이산 사차인치보다 더 높은 플라보노이드 화합물을 함유하고 있는 것으로 확인되었다.

플라보노이드 화합물은 식물에 의해 합성된 폴리페놀의 대부분을 차지하는 물질로서, 효과적으로 자유라디칼 제거 및 항산화 효과를 나타내는 주요 물질이다(Coppo와 Marchese, 2014). Lee와 Min(2007)은 물, 에탄올 및 메탄올로 추출한 5가지 약용식물의 폴리페놀 화합물 함량과 플라보노이드 화합물 함량의 관계를 확인하였으며, 모든 용매에서 폴리페놀 화합물 함량이 높을수록 플라보노이드 화합물의 함량도 비례하여 높게 나타남을 확인하였다. Jang 등(2012)은 식물이 자생하는 지리, 채집시기 및 기후조건에 따라 함유하고 있는 페놀성 물질 함량 및 조성의 차이가 있다고 보고하였다. 만달레이는 연간 700-1,000 mm의 강수가 내리는 건조지역인 반면, 양곤은 연 강수량이 2,200-28,000 mm로 높은 강수량을 나타내어 수자원의 공급이 유리하며, 영양이 풍부한 층적토가 널리 분포되어 있다고 알려져 있다(Aung, 2011; Li 등, 2018). 본 연구에서 두 지역의 사차인치가 함유하는 페놀 및 플라보노이드 화합물의 차이는 식물이 자생하는 지역의 기후 및 지리적인 차이에 영향을 받았을 것으로 판단된다.

항산화 활성

사차인치 추출물의 농도별 DPPH 라디칼 소거 활성은 Fig. 1A와 같다. 만달레이 그리고 양곤산 사차인치 추출물은 모두 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 두 지역의 DPPH 라디칼 소거 활성을 비교한 결과, 만달레이산 사차인치는 30.87-46.68%였으며, 양곤산 사차인치는 44.83-59.87%로, 양곤산 사차인치가 만달레이산 사차인치보다 유의적으로 높은 활성을 보였다. 특히, 가장 낮은 농도인 125 µg/mL의 농도의 양곤산 사차인치는 고농도인 500 µg/mL 농도의 만달레이산 사차인치와 유사한 라디칼 소거 활성을 나타내어 양곤산 사차인치에서 더 높은 항산화 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

항산화 작용은 식품 또는 생체막에 존재하는 지질 산화 연

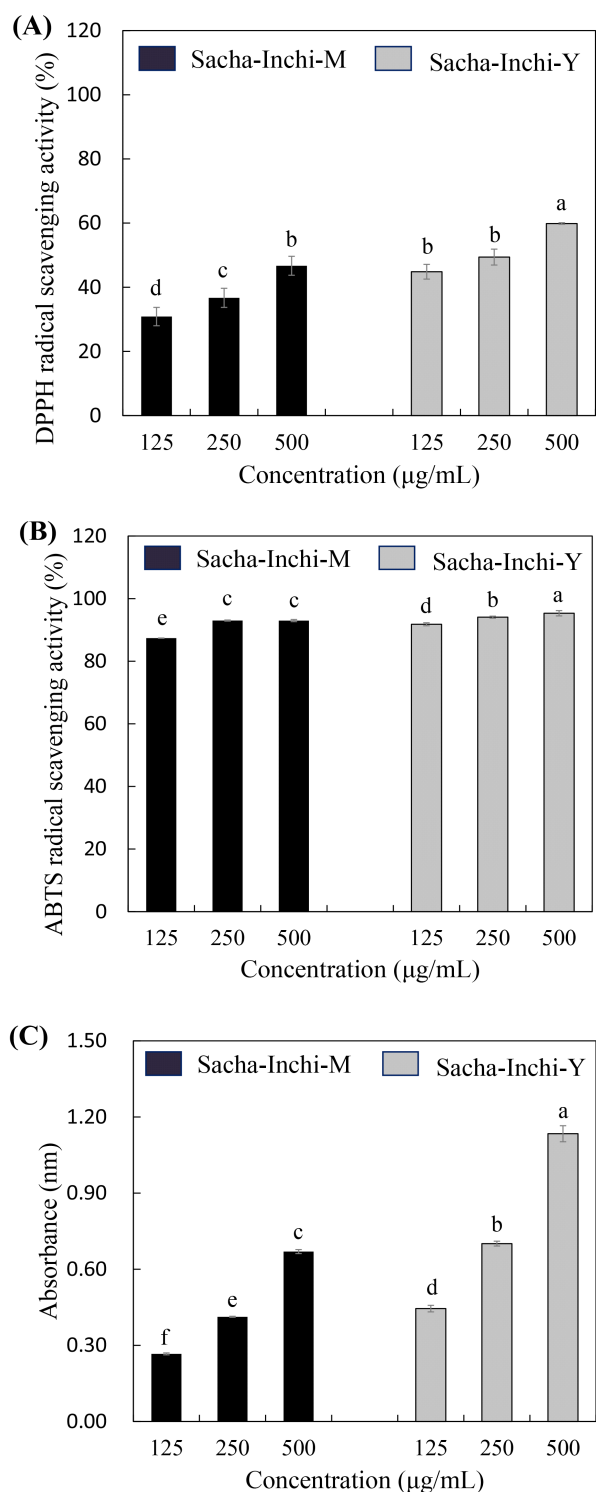


Fig. 1. Antioxidant activities of Sacha inchi extract from Mandalay and Yangon.

A, DPPH radical scavenging activity; B, ABTS radical scavenging activity; C, ferric reducing antioxidant power. Results represent mean±SD of three replicates. Different superscript letters in the same column show differences ($p < 0.05$) M, Mandalay; Y, Yangon.

쇄반응에 관여하는 활성 라디칼에 전자 및 수소 원자를 공여하여 안정된 형태의 라디칼로 전환하는 작용을 말한다. 이 전자 공여 작용은 활성 라디칼과의 전자 공여 작용을 통하여 식품의 지질 산화 억제 및 인체 내 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용을 한다(Min과 Lee, 2007). 본 연구에서는 DPPH 라디칼 소거법을 이용하여 사차인치 추출물의 항산화 활성을 평가하였다. DPPH는 짙은 자색을 띠는 유리 라디칼로서, 항산화제 또는 아민류 등에 의하여 환원되어 자색의 강도가 감소하는 성질을 이용한 방법이다. DPPH 라디칼 소거 활성법은 측정 방법이 간단하면서도 대량으로 측정이 가능하여 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용된다(Jeon 등, 2008). Nascimento 등(2013)은 브라질 자생 사차인치 잎 용매 별 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인하였으며, 실험결과 250 µg/mL 농도에서 사차인치 물 추출물과 에탄올 추출물은 모두 50% 이상의 높은 소거활성을 보였는데, 이는 식물의 재배 환경으로 인하여 식물의 항산화 효과의 차이를 보인 것으로 사료된다(Nascimento 등, 2013). Boo 등(2009)은 폴리페놀 함량과 전자 공여능이 양의 상관 관계를 가지고 있다고 보고하였으며, Lee 등(2015)의 사차인치 동속 식물(대극속; *Euphorbia* L.)인 비단풀 (*Euphorbia humifusa*)의 추출 용매 별 항산화 효능을 확인한 연구에서는 각 추출물의 폴리페놀 함량에 따라 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하는 경향을 보여 본 연구결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

ABTS 라디칼 소거 활성을 나타낸 결과는 Fig. 1B와 같다. ABTS 라디칼 소거 활성은 두 추출물 모두 농도 의존적으로 증가하였으며, 125-500 µg/mL의 농도에서 양곤산 사차인치 추출물의 라디칼 소거 활성은 91.82-95.33%, 87.38-92.98%의 활성을 보인 만달레이산 사차인치 추출물보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거 활성법은 ABTS 양이온이 potassium persulfate와 반응하여 형성된 청록색의 용액이 항산화 물질과 반응하여 탈색되는 원리를 이용하여 측정하는 방법이다(You와 Kim, 2018). Kim 등(2018)은 황색 나무 딸기의 페놀 화합물 함량에 따른 항산화 활성 연구에서 DPPH 라디칼 소거 활성과 ABTS 라디칼 소거활성이 유사한 경향을 보였으며, 이는 플라보노이드를 비롯한 페놀성 화합물이 자유 라디칼을 소거하는데 더 효과적으로 작용하기 때문이라고 보고하였다. 한편, 두 추출물 모두 가장 낮은 농도인 125 µg/mL에서 80% 이상의 높은 라디칼 소거 활성을 보여 DPPH 실험결과에 비하여 다소 높은 활성을 보였는데, 이러한 결과는 극성과 비극성 시료의 항산화 활성에 대해 민감하게 반응하는 ABTS 시약의 특성 때문인 것으로 사료된다(Shin과 Lee, 2011).

FRAP법을 이용하여 두 지역의 사차인치 추출물의 항산화 활성을 측정된 결과는 Fig. 1C와 같다. 두 추출물 모두 농도 의존적으로 FRAP 값이 증가하였으며, 125-500 µg/mL 농도에서 FRAP 값은 양곤산 사차인치 추출물이 0.44-1.13으로, 0.27-0.67의 FRAP 값을 보인 만달레이산 사차인치 추출물보다 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($p < 0.05$).

FRAP 방법은 철이온의 환원력을 측정하는 방법으로, 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되어 푸른색을 내며, 발색이 진할수록 높은 환원력을 나타낸다 (Jang 등, 2012; Ku 등, 2009). Kim 등(2012b)의 황 함유 채소들의 항산화 활성을 분석한 연구에서, 채소들이 함유하고 있는 폴리페놀 화합물 함량이 DPPH 라디칼 소거활성 및 FRAP 값과 비슷한 경향을 나타내었으며, Ku 등(2009)은 페놀성 물질에 따른 항산화 활성연구에서 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량과 DPPH, ABTS 및 FRAP의 항산화 활성이 양의 상관관계가 있다고 보고하였다. 본 실험에서 양곤산 사차인치가 만달레이산 사차인치보다 높은 환원력을 나타낸 것은 추출물이 함유하고 있는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물 때문인 것으로 사료된다.

항균 활성

Paper disc 방법을 통한 사차인치 추출물의 식중독 균에 대한 항균활성을 확인한 결과는 Table 3과 같다. 두 사차인치 추출물을 500 µg/mL의 농도로 paper disc에 흡수시킨 뒤 24 시간 후에 paper disc 주변에 생성된 clear zone의 직경을 측정하여 항균활성 정도를 나타냈다. 그 결과, 양곤산 사차인치의 항균활성이 만달레이산 사차인치에 비하여 크게 측정되었다. 또한, 두 추출물 모두 그램 음성균에 대한 항균 활성이 그램 양성균에 비하여 크게 측정되었다. 특히 양곤산 사차인치 추출물은 *A. hydrophila*에 대하여 13 mm 이상의 큰 clear zone이 형성되어 큰 항균활성을 나타냈고, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*에 대하여 10-13 mm 크기의 clear zone을 형성하였다. Paper disc법으로 항균력을 측정하는 경우, 실험에 사용하는 paper disc의 크기, 두께 그리고 추출물이 disc에 흡수되는 추출물의 성질에 따라 결과의 차이가 있을 수 있다(Lee 등, 2015). 따라서 이후 연구에서는 균이 잘 생육하는 액체 배지에 추출물을 접종하여 미생물 생육 저해 곡선을 그리고 최소 저해 농도(MIC)를 결정하여 사차인치 추출물의 항균활성을 평가하였다.

사차인치 추출물의 생육 저해 효과는 사차인치 추출물을 접종 후 탁도를 흡광도로 측정하여 OD값을 기록한 후 생육 곡선을 그렸고 Fig. 2에 나타냈다. 사차인치 추출물 250과 500 µg/mL의 농도에서 24시간 동안 균 생육 억제 정도를 확

Table 3. Antimicrobial activity of ethanol extracts of Sacha inchi extract from Mandalay and Yangon

Pathogens	Sacha inchi-M ¹⁾	Sacha inchi-Y ²⁾
Gram (+) bacteria		
<i>Bacillus cereus</i>	+ ³⁾	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+
Gram (-) bacteria		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+++
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
<i>Salmonella choleaeusis</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	++	++
<i>Shigella sonnei</i>	+	++
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+	++
<i>Vibrio vulnificus</i>	+	+

¹⁾Sacha inchi from Mandalay.

²⁾Sacha inchi from Yangon.

³⁾+, moderate inhibition (7-10 mm); ++, moderately high inhibition (10-13 mm); +++, high inhibition (≥13 mm).

인한 결과, 농도 의존적으로 모든 시험 균주의 생육이 저해됨을 확인하였다. 또한, paper disc 연구결과와 유사하게 전반적으로 양곤산 사차인치의 생육 저해 활성이 만달레이산 사차인치보다 강한 것으로 확인되었다. 다만, 시험법에 따라 활성이 강하게 나타나는 대상의 균주가 다르게 나타났는데, 이는 배지의 성상에 따라 사차인치 추출물의 확산정도가 다르기 때문으로 판단된다.

탁도를 측정된 값으로 생육곡선을 그렸을 때 24시간 동안 50% 증식이 억제되는 최소 농도를 MIC₅₀으로, 100% 증식이 억제되는 최소 농도를 MIC₁₀₀결정하였다(Table 4). 그 결과, *Pseudomonas aeruginosa*를 제외한 11종의 시험 균주에 대하여 6.25-2,000 µg/mL의 MIC₅₀이 확인되었다. 또한, MIC₁₀₀은 8종의 시험 균주에 대하여 MIC₅₀보다 상대적으로 높은 농도인 125-5,000 µg/mL에서 확인되었다.

만달레이산 그리고 양곤산 사차인치의 항균활성을 비교한 결과, 양곤산 사차인치 추출물이 그램 음성균의 대부분의 균에서 만달레이산 사차인치 추출물보다 유의적으로 더 높은 항균활성을 보였다.

식물체에 함유된 페놀성 물질은 산화반응을 지연시키고 동시에 항균성을 갖게 된다(Kim 등, 2005). Kim 등(2005)은

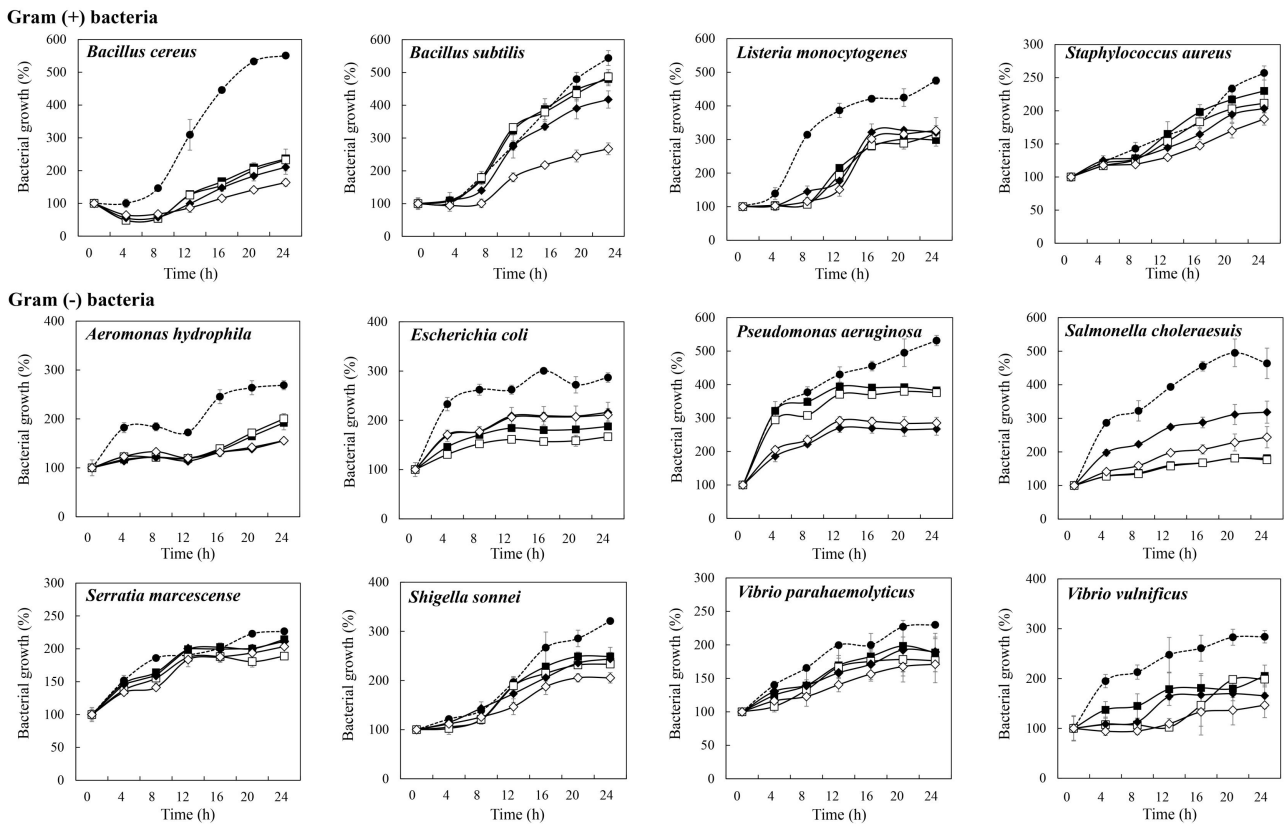


Fig. 2. The growth of tested ten bacteria and time-kill curves on exposure to Sacha inchi extract from Mandalay and Yangon.

Only bacteria (●), Sacha inchi-M at 250 µg/mL (■), Sacha inchi-M at 500 µg/mL (□), Sacha inchi-Y at 250 µg/mL (◆), and Sacha inchi-Y at 500 µg/mL (◇).

Results represent mean±SD of three replicates.

목초액의 용매별 분획물의 페놀 화합물 함량에 따른 항균효과를 확인하였으며, 가장 높은 페놀 화합물 함량을 보였던 에틸아세트산과 hexan 분획물에서 가장 우수한 항균 활성을 나타냈다. 또한, Song 등(1999)의 청미래덩굴 뿌리 분획추출물을 이용한 연구에서 식물 추출물이 높은 페놀함량을 가질수록 항균 활성이 높다고 보고하였다. 페놀성 물질 중에서도 플라보노이드는 우수한 항균 효과를 나타낸다고 알려져 있는데, 이들은 균들의 핵산 합성을 억제하거나 세포질 막의 기능 억제와 같은 다양한 매커니즘을 통하여 균 성장을 억제한다고 보고되었다(Coppo와 Marchese, 2014). 본 연구에서 만달레이산 사차인치 추출물에 비해서 높은 페놀 및 플라보노이드 화합물 함량을 보였던 양곤산 사차인치 추출물에서 더 높은 항균 활성을 보였으며, 이러한 결과는 사차인치 추출물이 함유하고 있는 페놀 및 플라보노이드 성분이 항균 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

Lee(2019)는 사차인치에 함유되어 있는 주요 성분을 분석하였으며, 항산화 활성과 관련있는 성분으로는 methyl ganoderate D 및 α -hydroxy tetracosanic acid가, 항균활성과 관

련있는 성분으로는 soyacerebroside I 과 momor-cerebroside I 이 확인되었다. 추후 사차인치의 항산화 및 항균효과의 작용 매커니즘을 규명하기 위하여 상기 물질들에 대한 분자생리학적 연구가 요구된다.

본 연구에서는 미얀마 만달레이와 양곤에서 채집된 사차인치의 항산화 활성 및 항균 활성을 측정하였다. 국외에서 수입되는 기능성 식재료가 점차 증가하는 만큼 이들에 대한 기초과학데이터가 필요한데, 최근 관심이 증가하는 사차인치의 항산화 활성 및 항균 활성의 연구결과가 향후 사차인치의 섭취 또는 활용에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 미얀마 자생 식물인 사차인치의 천연 항산화 화제 및 보존제로서의 이용 가능성을 확인하기 위하여 미얀마 두 지역(만달레이 및 양곤)에 자생하고 있는 사차인치 추출물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 화합물 함량을 측정하였으며, 그 함량에 따른 항산화 및 항균 활성을 분석하였다.

Table 4. The minimum inhibition concentration (MIC) of ethanol extracts of *Sacha inchi* extract from Mandalay and Yangon

Pathogens	Sacha inchi-M ¹⁾ (MIC ₅₀ /MIC ₁₀₀)	Sacha inchi-Y ²⁾ (MIC ₅₀ /MIC ₁₀₀)
Gram (+) bacteria		
<i>Bacillus cereus</i>	62.5/-	62.5/500
<i>Bacillus subtilis</i>	2000/-	500/-
<i>Listeria monocytogenes</i>	62.5/2,000	62.5/5,000
<i>Staphylococcus aureus</i>	-/-	1,000/-
Gram (-) bacteria		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	125/-	125/1,000
<i>Escherichia coli</i>	125/1,000	1,000/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-/-	62.5/-
<i>Salmonella choleaesuis</i>	62.5/125	62.5/-
<i>Serratia marcescens</i>	2,000/-	1,000/-
<i>Shigella sonnei</i>	62.5/125	500/-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	500/-	500/5,000
<i>Vibrio vulnificus</i>	62.5/-	62.5/1,000

¹⁾Sacha inchi from Mandalay.

²⁾Sacha inchi from Yangon.

-, no inhibition.

MIC₅₀, Concentration that inhibits the growth of bacteria by 50% for 24 h; MIC₁₀₀, Concentration that inhibits the growth of bacteria by 100% for 24 h.

실험결과, 양곤산 사차인치의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량이 각각 97.84 mg GAE/g 및 89.60 mg QUE/g로, 만달레이산 사차인치(71.27 mg GAE/g 및 60.81 mg QUE/g) 보다 높은 함량을 나타내었다. 항산화 활성을 확인한 결과, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 그리고 FRAP 환원능 모두 양곤산 사차인치가 만달레이산 사차인치보다 높은 활성을 나타내었다. 항균 활성 측정 결과, 두 지역의 사차인치 모두 식중독균 및 식품부패균주에 대하여 paper disc 주변에 clear zone을 형성하였으며, 생육곡선을 관찰한 결과 24시간 동안 사차인치 추출물에 의하여 시험 균주의 생육이 저해되는 것을 확인하였다. 또한, 11종의 시험균주에 대하여 6.25-2,000 µg/mL의 MIC₅₀이 확인되었고, 8종에 대하여 125-5,000 µg/mL의 MIC₁₀₀이 확인되었다. 한편, 모든 항균활성 측정법에서 전반적으로 양곤산 사차인치의 효과가 만달레이산 사차인치보다 뛰어난 것으로 나타났다. 항산화 및 항균활성에서 모두 양곤산 사차인치의 효과가 더 뛰어난 것은 함유된 기능성 페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량이 높기 때문인 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구에 사용된 시료를 제공하여 주신 미얀마 Post-Harvest Technology Training Centre와 미얀마 산업부의 Pharmaceutical Research Department에 감사드립니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Miran Jang <https://orcid.org/0000-0001-5934-982X>
SoHyeon You <https://orcid.org/0000-0001-9928-7379>
Gun-Hee Kim <https://orcid.org/0000-0001-8196-7149>

Reference

- Aung HH. Potential seismicity of Yangon region (Geological approach). *Adv Geosci*, 26, 139-151 (2011)
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70-76 (1996)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200 (1958)
- Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, Park SU. Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 17, 15-20 (2009)
- Choi MY, Rhim TJ. Antimicrobial effects against food-borne pathogens and antioxidant activity of *Rhododendron brachycarpum* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 1353-1360 (2011)
- Coppo E, Marchese A. Antibacterial activity of polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol*, 15, 380-390 (2014)
- Cushnie TT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*, 38, 99-107 (2011)
- Fanali C, Dugo L, Cacciola F, Beccaria M, Grasso S, Dacha M, Dugo P, Mondello L. Chemical characterization of *Sacha Inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *J Agric Food Chem*, 59, 13043-13049 (2011)
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic

- compounds as color reagents. *J Biol Chem*, 12, 239-243 (1912)
- Jang MR, Hong EY, Cheong JH, Kim GH. Antioxidative components and activity of domestic *Cirsium japonicum* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 739-744 (2012)
- Jang M, Park H, Hong E, Kim GH. Comparison of the antibacterial activity of domestic *Cirsium japonicum* collected from different regions. *Korean J Food Cook Sci*, 30, 278-283 (2014)
- Jeon YH, Kil JH, Lim SM, Kim MH, Kim MR. Analysis of antioxidative activity and antimutagenic effect of ethanol extract from *Schizandra chinensis* Baillon. *J East Asian Soc Diet Life*, 18, 746-752 (2008)
- Jeong GT, Lee KM, Park DH. Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. *Korean Chem Eng Res*, 44, 81-86 (2006)
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*, 44, 337-342 (2012a)
- Kim JS, Park SW, Ham YS, Jung SK, Lee SH, Chung SK. Antimicrobial activities and phenolic compounds of pyroligneous liquor. *Korean J Food Preserv*, 12, 470-475 (2005)
- Kim JY, Lee JA, Kim KN, Song GP, Park SY. Antioxidative and antimicrobial activities of *Euphorbia helioscopia* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 36, 1106-1112 (2007)
- Kim JY, Lee JA, Yoon WJ, Oh DJ, Jung YH, Lee WJ, Park SY. Antioxidative and antimicrobial activities of *Euphorbia jolkini* extracts. *Korean J Food Sci Technol*, 38, 699-706 (2006)
- Kim JS, Moon YS, Kwak EJ. Comparison of phenolic composition, content, and antioxidant activity in raspberries and blackberries. *Hortic Sci Technol*, 36, 115-127 (2018)
- Kim KH, Kim HJ, Byun MW, Yook HS. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from six vegetables containing different sulfur compounds. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 577-583 (2012b)
- Ku KM, Kim HS, Kim BS, Kang YH. Antioxidant activities and antioxidant constituents of pepper leaves from various cultivars and correlation between antioxidant activities and antioxidant constituents. *J Appl Biol Chem*, 52, 70-76 (2009)
- Kumar B, Smita K, Cumbal L, Debut A. Synthesis of silver nanoparticles using Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) leaf extracts. *Saudi J Biol Sci*, 21, 605-609 (2014)
- Lee MH. Study on the quality characteristics and functional analysis of pound cakes containing Sachainchi (*Plukenetia volubilis* L.) flour. *Culi Sci Hos Res*, 25, 28-40 (2019)
- Lee SW, You MJ, Lee HB, Shin GW. A case of *Aeromonas veronii* infection in Israeli carp (*Cyprinus carpio*): Phylogenetic analysis and antimicrobial resistance. *Korean J Vet Serv*, 35, 239-243 (2012)
- Lee SG, Lee SH, Park EJ. Antimicrobial and antioxidant activities of ethanol leaf extract of *Dendropanax morbiferus* Lev. *Korean J Food Cook Sci*, 31, 515-523 (2015)
- Li X, Siddique KHM. Future Smart Food. Rediscovering hidden treasures of neglected and underutilized species for zero hunger in Asia. FAO, Bangkok (2018)
- Min SH, Lee BR. Antioxidant activity of medicinal plant extracts cultivated in Jecheon. *J Korean Soc Food Cult*, 22, 336-341 (2007)
- Nascimento AKL, Melo-Silveira RF, Dantas-Santos N, Fernandes JM, Zucolotto SM, Rocha HAO, Scortecchi KC. Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae). *Evidence-based Complementary Altern Med*, 2013, 950272 (2013)
- Oh TY, Baek SY, Choi JH, Jeong MC, Koo OK, Kim SM, Kim HJ. Analysis of foodborne pathogens in *Brassica campestris* var. *narinosa* microgreen from harvesting and processing steps. *J Appl Biol Chem*, 59, 63-68 (2016)
- Park KN, Lee SH. Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of *Vibrio*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32, 185-190 (2003)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 26, 1231-1237 (1999)
- Seo GE, Kim SM, Pyo BS, Yang SA. Antioxidant activity and antimicrobial effect for foodborne pathogens from extract and fractions of *Sanguisorba officinalis* L. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 24, 303-308 (2016)
- Shin SL, Lee CH. Antioxidant activities of ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J Life Sci*, 21, 56-61 (2011)

- Song J, Kim H, Kim Y, Son B, Choi Y, Kang J. Antimicrobial activity of extract from *Smilax china*. J Agri Tech Dev Inst, 3, 163-168 (1999)
- Yoo MY, Jung YJ, Yang JY. Antimicrobial activity of herb extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr, 34, 1130-1135 (2005)
- Yoon KY, Lee SH, Shin SR. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Sarcodon aspratus*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 35, 967-972 (2006)
- You S, Kim GH. Phenolic compounds from antioxidant plant materials and their protective effect on PC12 cells. J Korean Soc Food Cult, 33, 86-94 (2018)