



연구노트

## Antimicrobial effect of black raspberry (*Rubus occidentalis*, *Bokbunja*) extract against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Ji Song Yu<sup>1</sup>, Na-Jeong Yu<sup>1</sup>, Sung Woog Gim<sup>2</sup>, Su Jung Lee<sup>2</sup>,  
 Gyoo Taik Kwon<sup>2</sup>, Hyun-Gyun Yuk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

<sup>2</sup>Berry & Biofood Research Institute, Gochang 56417, Korea

### 대장균과 황색포도상구균에 대한 복분자 추출물의 항균효과분석

유지송<sup>1</sup> · 유나정<sup>1</sup> · 김성웅<sup>2</sup> · 이수정<sup>2</sup> · 권규택<sup>2</sup> · 육현균<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국교통대학교 식품공학과, <sup>2</sup>(재)베리&바이오품연구소

#### Abstract

Black raspberry (*Rubus occidentalis*), which is known as *Bokbunja* in Korea, has traditionally known to possess various physiological functions such as anticarcinogenic and antioxidant effects. Although these functions have been well studied previously, little work has been done on its antimicrobial effect against foodborne pathogens. Thus, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of ethanolic and aqueous *Bokbunja* extracts against *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* cultures. The antimicrobial activity was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of each extract with each bacterial strain. The 10, 20 and 30% (w/v) EtOH extracts of the fruit pomace and an aqueous extract of the ripened fruit had lower MIC values (4-6 mg/100 µL) for both *E. coli* and *S. aureus* than the other extracts (8-12 mg/100 µL). Based on these results, these four extracts were further compared for their antimicrobial activities using time kill assay. Among the four extracts, the DW extract of ripened fruit decreased the populations of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* by 1.5 and 2.4 log CFU/mL for 24 h at 37°C, respectively, which were higher log reductions than those of the other three extracts. Thus, these results suggest that the DW extract of ripened *Bokbunja* fruit could be used as a natural preservative for the food products.

**Key words :** Black raspberry, foodborne pathogens, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC), time kill assay

#### 서 론

식중독균에 의한 식중독 사고는 꾸준히 증가하고 있다. 식품의약품안전처의 통계 자료 시스템에 따른 최근 몇 년간의 식중독 발생 현황을 살펴보면 2010년부터 2013년까지 식중독 환자 수는 꾸준히 감소하는 추세를 보였으나 2014

년 이후 식중독 환자 수 및 발생건수가 다시 증가하였다(1). 이러한 식중독 사고를 감소시키기 위한 방법의 일환으로 안전성에 문제가 없는 식물 유래 천연물질을 활용한 항균작용에 대한 연구와 개발이 이루어지고 있다(2,3). 천연에 존재하는 향균물질에는 효소, glucosinolate, lupulone, polyphenol, 동·식물의 단백질, 유기산, humulone, flavonoid 등이 현재 알려져 있다(4-6).

복분자(*Rubus occidentalis*)는 중국, 일본, 우리나라의 산지, 평지, 야산에서 재배가 가능한 장미과의 낙엽활엽 덩굴성 식물이며, 전통주 제조, 잼, 음료 등과 같은 식용, 약용, 약재 등 다양하게 이용되는 천연물질이다(7). 복분자에는 유리당, 유기산, anthocyanin, flavonoid, tannin, polyphenol

\*Corresponding author. E-mail : yukhg@ut.ac.kr  
 Phone : 82-43-820-5244, Fax : 82-43-820-5240  
 Received 25 February 2019; Revised 21 March 2019; Accepted 27 March 2019.  
 Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

등의 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있으며 항암활성, 항산화 및 항균효과 등에 대한 효능이 알려져 있다(8,9). 이와 같은 효능이 알려지면서 복분자의 항고혈압 활성(10), 항 돌연변이 활성과 암세포 성장 억제 효과(11), 대사증후군 개선효과(12), 여드름 원인균에 대한 항균 활성(13), 항균, 항산화 및 항 혈전 활성(14) 등이 꾸준히 보고되고 있다.

식품안전성을 확보하기 위해 원료식품에 대한 열처리, 가공식품의 저온저장 또는 가공단계에서의 화학적 식품보존제 첨가 등 다양한 제어기술을 통해 식품 내에 존재하는 식중독균을 제어하려는 노력들이 있었다. 그러나 고온이나 저온을 이용한 제어기술은 식품이 가지고 있는 고유한 물리적, 화학적 혹은 영양적인 요소들을 변형 혹은 파괴할 수 있으며, 화학적 식품보존제의 경우 식중독균이 불완전하게 제어가 되는 경우가 보고되어 왔다(15). 특히 화학적 식품보존제의 경우 잠재적인 독성과 부작용 때문에 소비자의 불안감이 증가하고 있는 실정이다(16). 이러한 이유로, 식품에 대한 미생물학적 안전성을 높이기 위한 천연 보존제 개발에 상당한 노력을 기울이고 있다.

유기용매를 이용한 식물 추출물들은 일반적으로 유효효과가 없거나 독성을 나타내지 않아 천연항균제로서 최근에 많이 연구되고 있다(17). 특히 이러한 식물 추출물들은 여러 식중독 원인균에 대해서도 탁월한 항균 효과가 있는 것으로 밝혀져 향후 천연 식품보존제로서의 가능성이 높다 할 수 있겠다. 하지만, 식중독을 유발하는 원인균을 상대로 한 복분자박이나 과실의 항균 효과 연구는 현재까지 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 식품 유래 세균인 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7와 *Staphylococcus aureus*에 대한 여러 가지 복분자 추출물의 항균효과에 대해 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양

본 연구에 사용된 미생물은 *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157:H7 (ATCC C7927)와 *S. aureus* (ATCC 33592)였으며, 균주들은 American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)로부터 구매하였다. 각 균은 접종하기 전에 멸균된 Tryptic soy broth (TSB; Becton, Dickinson and Company(BD) Bacto™, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 37°C 배양기에서 24시간 동안 2번 연속 계대 배양하여 실험에 이용하였다.

### 추출물 제조

복분자박, 복분자 미숙과, 복분자 완숙과 추출물은 (재)베리&바이오토포연구소(전라북도 고창군)로부터 제공 받았다. 추출 방법은 복분자 열수 추출물 (DW)은 복분자박,

미숙과, 완숙과 시료 각각 100 g을 1 L 증류수에 녹인 후 환류냉각장치가 부착된 히팅 맨틀을 이용하여 100°C에서 2시간 동안 2회 추출하였다. 복분자 에탄올 추출물은 복분자박, 미숙과, 완숙과 시료 각각 100 g을 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 100% 에탄올을 1 L에 넣은 후 환류냉각장치가 부착된 히팅 맨틀을 이용하여 80°C에서 2시간 동안 2회 추출하였다. 이렇게 추출된 추출액은 감압농축기를 이용하여 당도가 5 °Brix 되도록 농축한 후 각각 동결 건조 하였다. 건조된 각 복분자 추출물을 4% Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, Co., ST. Louis, MO, USA)에 녹여 11종의 복분자 추출물 추출액을(Table 1)을 제조하였다.

Table 1. List of various *Bokbunja* extracts

<i>Bokbunja</i>	Extracts
Pomace	DW
	10% EtOH
	20% EtOH
	30% EtOH
	100% EtOH
Unripened	DW
	30% EtOH
	50% EtOH
	70% EtOH
Ripened	DW
	50% EtOH

### 최소생육저해농도 측정(Minimum inhibitory concentration, MIC)

복분자 추출물의 항균 활성 정도를 평가하기 위해 미생물의 생육을 억제하는 각 복분자 추출물의 최소농도를 측정하였다. 11종의 건조된 복분자 추출물 500 mg을 1 mL의 4% DMSO에 녹여 추출액을 제조하고, 다시 추출액을 4% DMSO를 사용하여 2-24 mg/100 µL로 희석하였다. TSB에서 37°C로 24시간 배양한 *E. coli*와 *S. aureus* 배양액(10<sup>9</sup> CFU/mL)을 TSB를 이용하여 약 10<sup>6</sup> CFU/mL까지 희석한 후 그 배양액 100 µL를 96-well plate에 접종하였다. 접종한 96-well plate에 상기에 희석된 복분자 추출물 4-48 µL를 각 well에 첨가한 후 96-well plate를 24시간 37°C에서 배양하였다. 이때 복분자 추출물을 첨가하지 않은 100 µL의 4% DMSO용액에 배양액만 첨가한 대조군도 같이 배양하였다. 배양 후 각 well에서 100 µL를 취하여 멸균 희석액(3M, science applied to life™, Saint Paul, MN, USA)을 이용하여 적절히 10배수 단계희석법으로 희석하여 Tryptic soy agar (TSA; BD)에 도말한 후 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양한 TSA에서 생육한 집락수를 계수하여 희석배수로 곱한 후 시료 1 mL에 존재하는 각 세균의 집락 수

(CFU/mL)를 계산하였다. 복분자 추출액이 첨가된 well에 존재하는 세균 집락수를 복분자 추출액이 첨가되지 않은 대조군에 존재하는 세균 집락수와 비교하여 MIC를 계산하였다. 본 연구에서의 MIC는 24시간 37°C에서 세균의 생육을 억제 하는 최소한의 복분자 추출물의 농도로 정의하였다.

### Time kill assay

MIC 측정결과에 따라 비교적 낮은 MIC를 갖는 복분자 추출물을 선택하여 Time kill assay 방법을 이용하여 항균활성을 비교하였다. 본 실험에서는 MIC방법에 사용된 비병원성 *E. coli*를 사용하지 않고 병원성인 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*를 이용하였다. 각 균을 TSB상에서 37°C에서 24시간 배양한 후 멸균 TSB를 이용하여 약  $10^6$  CFU/mL까지 희석하였다. MIC 농도로 희석된 배양액 880  $\mu$ L와 선택된 복분자 추출물 120  $\mu$ L를 멸균된 eppendorf tube에서 혼합시켰다. 혼합액을 약 25°C에서 보관하며 일정 시간별로 100  $\mu$ L를 취한 후 멸균희석수로 희석하여 TSA에 도말하여 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양한 TSA에서 생육한 집락수를 계수하여 희석배수로 곱하여 세균의 집락수를 계산하였다.

### 통계처리

각각의 실험은 모두 3회 반복 실시하였으며, 그 평균과 표준편차로 나타내었다. 본 연구의 통계처리는 IBM SPSS(version 21, Armonk, NY, USA) 프로그램을 이용하였고, 신뢰수준 95%( $p < 0.05$ )에서 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 최소생육저해농도 측정(MIC)

본 연구에서는 초기 균수가 약  $6.8 \log$  CFU/mL였기 때문에 복분자 추출물이 첨가된 well에서 균수가 그와 비슷하거나 이하가 되는 복분자 추출물의 최소 농도를 MIC로 결정하였다. 먼저, 복분자 추출물이 첨가되지 않은 대조군의 경우, 24시간 후에 약  $10^9$  CFU/mL까지 *E. coli*와 *S. aureus*의 균수가 증가한 것을 확인하였다 (data not shown). 따라서 복분자 추출물이 첨가된 well에서 균수가 초기균수와 비슷하거나 혹은 낮아진다면 그 추출물의 항균효과가 있음을 나타낸다. 총 11종류 복분자 추출물의 MIC는 Table 2와 같이 4-16 mg/100  $\mu$ L으로 다양하게 나타났고, 이 중 복분자 박 10%, 20%, 30% 에탄올 추출물, 복분자 완숙과 DW 추출물은 MIC 약 4-6 mg/100  $\mu$ L로 다른 추출물에 비해 상대적으로 높은 항균효과를 갖고 있음을 확인하였다.

Song 등(18)은 감귤박 에탄올추출물과 열수추출물의 영양성분 및 항산화 활성에 대해 비교하였고, 추출용매에 따

른 전체 폴리페놀 함량은 차이가 없지만 열수추출물보다는 에탄올추출물의 항산화 활성이 더 높게 나타났으며, 이는 항산화능에 기여하는 폴리페놀 성분이 에탄올 추출물에 상대적으로 더 많이 포함되어있기 때문인 것으로 보고하였다. 또한 복분자 추출물의 항고혈압 활성에 대한 Lee 등(10)의 연구에서 사용된 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석 결과 열수추출물보다 에탄올추출물에서 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 더 높게 나타났다고 보고한 바 있다. 암대극 추출물의 항산화 및 항균활성 연구(19)에 따르면 총 폴리페놀 함량이 높게 나타난 추출물에서 가장 우수한 항균활성을 나타내며, 항균성에 관여하는 물질이 단일성분이라고 단정 짓기는 어려우나 항산화 결과와 마찬가지로 주된 항균활성 물질을 페놀성 화합물로 사료된다고 보고하였다. 따라서 복분자 에탄올 추출물에서 항균활성이 높게 나타난 것은 이 추출물에 더 높은 폴리페놀화합물이 존재하기 때문으로 사료된다. 이는 폴리페놀화합물이 미생물의 대사에 관여하는 여러 단백질과 결합하여 대사활동을 방해하기 때문일 것으로 여겨진다(20).

**Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of various *Bokbunja* extracts against *E. coli* and *S. aureus***

Extracts	Minimum inhibitory concentrations (MIC) (mg/100 $\mu$ L)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
Pomace	DW	6	6
	10% EtOH	6	4
	20% EtOH	4	4
	30% EtOH	4	4
Unripened	100% EtOH	14	16
	DW	12	8
	30% EtOH	10	10
	50% EtOH	10	8
Ripened	70% EtOH	6	6
	DW	4	6
	50% EtOH	6	4

### Time kill assay

MIC를 이용한 복분자 추출물의 항균활성 비교는 최소저해농도만 확인할 수 있을 뿐 균수의 감소를 정확하게 측정하기 불가능하므로, 본 연구에서는 Time kill assay를 이용하여 자세한 복분자 추출물의 항균활성을 비교하였다. 앞서 언급한 MIC 결과에서 복분자박 10%, 20%, 30% 에탄올 추출물, 복분자 완숙과 DW 추출물의 MIC값이 4-6 mg/100  $\mu$ L에서 항균효과를 나타내었으므로 이를 고려하여 위의 4 종류의 추출물에 대해서 Time kill assay를 진행하였다. Time kill assay에서는 실제로 이러한 추출물들이 식중독 원인균에도 효과가 있는지 검증하기 위해 비병원성 *E. coli*

대신 *E. coli* O157:H7을 대상으로 실험을 실시하였다. Fig. 1과 같이 복분자박 10% 에탄올 추출물은 *E. coli* O157:H7와 *S. aureus*에 대해 각각 0.7 log CFU/mL 감소하였으며, 복분자박 20% 에탄올 추출물은 *E. coli* O157:H7에 대해 1.0 log CFU/mL, *S. aureus*에 대해 1.4 log CFU/mL 감소하였다. 복분자박 30% 에탄올 추출물은 *E. coli* O157:H7에 대해 1.1 log CFU/mL, *S. aureus*에 대해 1.4 log CFU/mL 감소하였다. 복분자박 20%와 30% 에탄올 추출물은 *E. coli* O157:H7 보다 *S. aureus*에 더 효과가 있는 것으로 나타났다. *E. coli* O157:H7에 대해서는 4 종류의 복분자 추출물 중 완숙과 DW가 가장 효과적인 생육저해 효과를 나타냈으며 약 1.5 log CFU/mL 정도 감소시켰다. 마찬가지로, *S. aureus*에 대해서도 완숙과 DW가 24시간 동안 2.4 log CFU/mL 감소시키는 것으로 나타나 가장 효과적이었다.

본 연구에서 사용된 *Rubus occidentalis*와 비슷한 복분자 딸기(*Rubus coreanus*)의 성숙 단계별 생리활성을 비교한 연구(21)에 따르면 복분자 딸기가 완숙되어 짐에 따라 상대적으로 미숙과와 중간숙과에 비하여 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 증가하여 완숙과가 가장 높은 총 폴리페놀 화합물 함량을 가진다고 보고되었으며 항산화 작용을 하는 비타민 E, 플라보노이드, 안토시아닌 함량 등이 미숙과와 비교했을 때 완숙과에서 더 높은 함량을 가진다고 보고된 바 있다. 천연물 속에 있는 총 폴리페놀, 플라보노이드는 항산화 작용뿐만 아니라 세균의 DNA gyrase와 같은 효소활성을 억제하고 증식을 차단하여 항균활성을 가진다(22). 따라서 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 미숙과보다 상대적으로 높은 완숙과에서 상대적으로 높은 항균활성을 나타내었다.

## 요 약

식품유래세균인 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 11종류의 복분자 추출물의 MIC를 측정한 결과 10%, 20%, 30% 에탄올 추출물과 완숙과 열수추출물이 비교적 낮은 MIC를 나타내었다. 가장 낮은 MIC를 나타낸 4종류 추출물의 항균활성을 Time kill assay를 통해 비교한 결과, 완숙과 열수추출물이 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 따라서 본 연구의 결과, 복분자 완숙과의 열수추출물이 식품보존을 위한 천연항균제 소재로 적용 가능성이 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 수출전략기술개발사업의 지원을 받아 이루어졌으며 이에 감사드립니다. (116072-03-3-HD060).

## References

1. Ministry of Food and Drug Safety (2018) Korea Food Code. Ministry of Food and Drug Safety, Osong, Korea
2. Oh D, Ham SS, Park BK, Ahn C, Yu JY (1998) Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. *Korean J Food Sci Technol*, 30, 957-963
3. Lee YS, Sohn HS, Rho JO (2011) The antibacterial effects

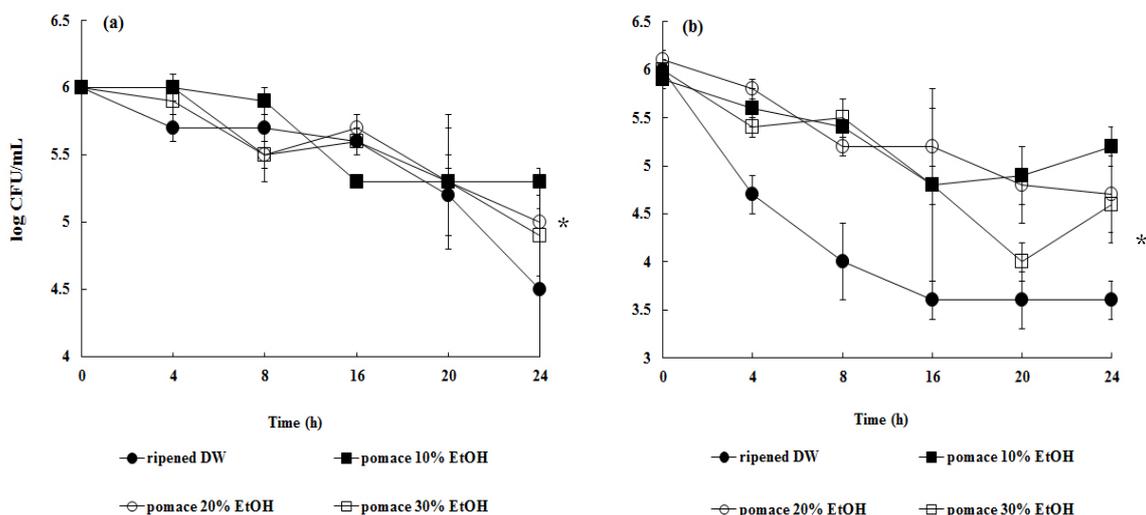


Fig. 1. Inhibitory effect of various *Bokbunja* extracts on the growth of *E. coli* O157:H7 (a) and *S. aureus* (b) for 24 h at 25°C.

Asterisk (\*) indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) among ripened DW, pomace 10% EtOH, pomace 20% EtOH and pomace 30% EtOH.

- of backryeoncho (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*) extracts as applied to kimchi fermentation with lactic acid bacteria and food poisoning bacteria. Korean J Hum Ecol, 20, 1213-1222
4. Jeon YH, Sun X, Kim M. (2012) Antimicrobial activity of the ethanol extract from *Rubus coreanum* against microorganisms related with foodborne illness. Korean J Food Cookery Sci, 28, 9-15
  5. Park MY, Yoon MK, Kwak JH (2014) Antimicrobial and antioxidant activities in different parts and cultivars of broccoli. Kor J Hor Sci Technol, 32, 408-414
  6. Lee BW, Shin DH (1991) Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. Korean J Food Sci Technol, 23, 200-204
  7. Jun HI, Kim YA, Kim YS (2014) Antioxidant activities of *Rubus coreanus Miquel* and *Morus alba L.* fruits. J Korean Soc Food Sci Nutr, 43, 381-388
  8. Lee MJ, Choi HR, Lee JH, Lee SJ, Kwon JW, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Park JH, Lee SC, Park PJ, Lee TB (2015) Co-treatment with fermented black raspberry and red ginseng extracts improves lipid metabolism and obesity in rats fed with a high-fat and high-cholesterol diet. Korean J Food Sci Technol, 47, 364-372
  9. Lee SJ, Lee MJ, Ko YJ, Choi HR, Jeong JT, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Jung HK, Park JH, Lee TB (2013) Effects of extracts of unripe black raspberry and red ginseng on cholesterol synthesis. Korean J Food Sci Technol, 45, 628-635
  10. Lee JH, Choi HR, Lee SJ, Lee MJ, Ko YJ, Kwon JW, Lee HK, Jeong JT, Lee TB (2014) Blood pressure modulating effects of black raspberry extracts *in vitro* and *in vivo*. Korean J Food Sci Technol, 46, 375-383
  11. Jeon YH, Choi SW, Kim MR (2009) Antimutagenic and cytotoxic activity of ethanol and water extracts from *Rubus coreanum*. Korean J Food Cookery Sci, 25, 379-386
  12. Kho MC, Lee YJ, Yoon JJ, Kang DG, Lee HS (2015) Beneficial effect of *Rubus Coreanus Miquel* in a rat model of high fructose diet-induced metabolic syndrome. J Physiol & Pathol Korean Med, 29, 11-17
  13. Lee KI, Kim SM, Kim SM, Pyo BS (2011) Comparison of fatty acids and antibacterial activity against pathogen of acne in different parts of ripened black raspberry (*Rubus coreanus Miquel*). J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 466-469
  14. Kim MS, Kang DK, Shin WC, Sohn HY (2015) Anti-microbial, anti-oxidant, and anti-thrombosis activities of the lees of Bokbunja wine (*Rubus coreanus Miquel*). J Life Sci, 25, 757-764
  15. Negi PS (2012) Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microbiol, 156, 7-17
  16. Gyawali R, Ibrahim SA (2014) Natural products as antimicrobial agents. Food Control, 46, 412-429
  17. Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int J Food Microbiol, 94, 223-253
  18. Song YW, Moon KS, Cho SM (2013) Antioxidant activity and nutrient content of ethanol and hot-water extracts of citrus unshiu pomace. J Korean Soc Food Sci Nutr, 42, 1345-1350
  19. Kim JY, Lee JA, Yoon WJ, Oh DJ, Jung YH, Lee WJ, Park SY (2006) Antioxidative and antimicrobial activities of Euphorbia jolkini extracts. Korean J Food Sci Technol, 38, 699-706
  20. Engels C, Knodler M, Zhao Y, Carles R, Ganzle M, Schieber A (2009) Antimicrobial activity of galloytannins isolated from mango (*Mangifera indica L.*) kernels. J Agric Food Chem, 57, 7712-7718
  21. Cha HS, Youn AR, Park PJ, Choi HR, Kim BS (2007) Comparison of physiological activities of *Rubus coreanus Miquel* during maturation. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36, 683-688
  22. Han KI, Kim M, Jo BK, Kim MJ, Kang MJ, Park KH, Koo Y, Kim B, Jung EG, Han MD (2015) Antimicrobial and antioxidative activities of the extracts from walnut (*Juglans regia L.*) green husk. J Life Sci, 25, 433-440