

Antimicrobial Activities of Omija Extracts Against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*

Youngah Yoo¹, Heejin Ham^{2*}, Insil Yu¹, Donghyiun Yook¹ and Sujin Kim¹

¹Seoul Metropolitan Government Institute of Public Health and Environment, Seoul, Korea

²Anyang University, College of Liberal Arts, Anyang, Korea

Corresponding

Heejin Ham

Anyang University, College of Liberal Arts,
Anyang 14028, Korea

Phone : +82–31–463–1353

Fax : +82–31–463–1386

E-mail : hhj3814@anyang.ac.kr

Received : March 06, 2018

Revised : March 20, 2018

Accepted : March 21, 2018

Omija berry (*Schisandra fructus*) is a traditional Korean fruit, which contains lots of medicinal ingredients. In order to analyze whether Omija contains antibacterial components, we extracted Omija using five different methods including water precipitation, ethanol precipitation, hot water extract, methanol-ultrasonication, and water-ultrasonication, and examined their antimicrobial activities against *Escherichia coli* (*E. coli*), and *Bacillus cereus* (*B. cereus*). Most of Omija extracts did not inhibit bacteria growth in the paper disc diffusion assay except hot water extract for 60 minutes. Hot water extract for 60 minutes made clear inhibition zone around the disc at all the concentrations (x1, x1/10, x1/100) in both *E. coli* and *B. cereus*. However, hot water extracts for 90 minutes and 120 minutes showed antimicrobial activities only at x1 stock solution, which indicates that 60 minutes extraction at hot water is the best method to obtain Omija extract with the best antimicrobial activities in disc diffusion assay. In turbidimetric assay, water extract in soak, hot water extract, and methanol extract in ultrasonicator inhibited growth of both *E. coli* and *B. cereus*. Ethanol extract in soak and water extract in ultrasonicator had no effect on bacterial growth in both *E. coli* and *B. cereus*. In this study, we found that Omija extracts showed antimicrobial activities against *E. coli* and *B. cereus*. Therefore, water soluble materials of Omija can be used as a drink supplement and developed as an antibacterial cleanser.

Key Words: *Schisandra fructus*, Omija, Antibacterial activities, *E. coli*, *B. cereus*

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Copyright © 2018 Journal of Bacteriology and Virology

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

INTRODUCTION

천연물 중에는 많은 종류의 항균활성과 항암활성 및 항 돌연변이 활성을 가진 생리활성물질이 존재하는데, 이는 매우 적은 양으로도 고부가가치를 얻을 수 있는 물질로서 오래 전부터 이에 대한 연구가 이루어져 이미 수많은 종류가 인류에게 유용하게 활용되고 있다 (1). 다섯 가지 맛이 난다고 해서 이름이 붙여진 오미자(*Schisandra fructus*) 역시 예로부터 기침, 가래, 허약체질 등에 좋다고 하여 열매를 물에 담가 붉은 물을 우려낸 뒤 화채 국물로 쓰이거나 차로 끓여 마시는데 사용되고 있고, 한방재료로도 널리 이용되고 있다. 또한 한방에서 중추억제 작용 및 혈압강하, 알코올에 대한 해독작용 및 면역조절작용 등이 있는 것으로 알려진 약재로서 다양한 생리적 기능성이 보고되고 있다. 오미자는 미생물에 대한 항균활성 효과가 있는 유기산이 풍부한 열매로 오미자 추출물의 미생물에 대한 항균활성에 관한 연구가 매우 광범위하게 진행되어 왔으며, 신맛, 단맛 등이 어우러진 독특한 풍미를 나타내어 오미자의 식품 부패성 세균에 대한 항균활성에 관한 다양한 연구가 수행되고 있다. 선행 연구에서는 오미자의 에탄올 추출물이 *Clostridium perfringens*의 생육을

강하게 억제하고, 물이나 에탄올 추출물은 *Escherichia coli* (*E. coli*)의 생육을 강하게 억제함을 보고하였다 (2). 또한 오미자의 물 추출물의 첨가 농도가 증가할수록 *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis의 증식에 대한 억제력이 증가하였으며, 오미자와 매실 추출물은 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균활성을 나타내었다 (3). 오미자 에탄올 추출물은 *Listeria monocytogenes*의 성장에 대해서도 뚜렷한 항균활성을 나타내는 등 다양한 세균에 대한 오미자 추출물의 항균력이 확인되고 있다 (4). 이러한 연구 결과들에 근거하여 천연 항균제로서 오미자 추출물을 식품산업에 응용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (3).

이에 본 연구에서는 오미자를 여러 가지 방법으로 추출하고, 그 추출물의 항균력을 확인하여 항균력이 높은 오미자의 효과적인 추출방법을 확인함으로써 각종 원료 및 가공 식의약품에 적용하기 위한 기초적인 연구 결과를 제공하고자 한다.

MATERIALS AND METHODS

시험재료

2017년 6월 서울약령시에서 오미자를 구입하여 시험시료로 사용하였다.

시험균주

실험에 사용한 표준 균주는 *B. cereus* ATCC 11778, Culti-Loops (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 *E. coli* ATCC 8739, Quanti-Cult Plus (Thermo Fisher Scientific)를 사용하였다.

오미자 추출물 제조

물로 세척한 오미자를 체에 걸러 물기를 제거한 후 자연 건조하고, 분쇄기(DA338; Daesung, Seoul, Korea)로 80~320 mesh 크기가 되도록 분쇄하여 추출 시료로 사용하였다.

에탄올 침지추출

추출 시료 100 g을 에탄올(ethanol absolute, class 1B, A9951; Thermo Fisher Scientific) 900 ml와 함께 삼각 플라스크에 넣고 24시간 rotating shaker (SR-2DW; TAITEC, Saitama, Japan)로 회전 진탕하여 추출하였다. 이 추출물을 110 mm 5A filter paper (Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 회전증발농축기(rotary evaporator, SB-1300; Shanghai Zyla Co., Shanghai, China)로 잔량이 100 ml가 되도록 감압 진공 농축한 후 50 ml 원심분리기용 용기에 나누어 보관하며 에탄올 침지추출 원액으로 사용하였다.

증류수 침지추출

추출 시료 100 g을 증류수 900 ml와 함께 비이커에 넣고 24시간 방치 후 우려내어 추출하였다. 이 추출물을 여과하여 증류수 침지추출 원액으로 사용하였다.

열수 추출

추출 시료와 100 g과 증류수 900 ml를 약탕기(DWP-5000M; Daewoong Bioelectronics, Goesan, Korea)를 이용하여 100°C에서 60분, 90분, 120분 동안 가열하여 추출한 후 여과하여 각각 60분 열수추출 원액, 90분 열수추출 원액, 그리고 120분 열수추출 원액으로 사용하였다.

메탄올 초음파 추출

추출 시료 100 g을 메탄올(methanol, 6011-2B; Kanto Chemical, Tokyo, Japan) 900 ml와 함께 비이커에 넣고 초음파 분쇄기(Bransonic

CPX8800H-E; Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA)에서 60분 동안 초음파로 추출하여 여과한 후 메탄올 초음파 추출 원액으로 사용하였다.

증류수 초음파 추출

추출 시료 100 g을 증류수 900 ml와 함께 비이커에 넣고 초음파 분쇄기에서 60분 동안 초음파로 추출하여 여과한 후 증류수 초음파 추출 원액으로 사용하였다.

오미자 추출액의 항균력 측정

항균력 시험은 여러 농도의 추출액으로 포화시킨 blank paper disc (CT 0998B; Oxoid, Hampshire, UK)를 평판우무배지에 접촉시켜 공시 균주의 증식도를 비교하여 생육 저해 정도를 측정하는 paper disc diffusion method를 이용하여 다음과 같이 실시하였다 (5). *B. cereus* ATCC 11778이나 *E. coli* ATCC 8739 표준 균주를 tryptic soy broth (Oxoid)에서 37°C에서 24시간 배양한 후, McFarland 탁도가 0.5가 되도록 희석한 다음 Mueller Hinton agar (Oxoid) 표면에 멸균 면봉으로 도말하였다. 각 추출물 시료원액($\times 1$ 배) 20 μ l를 10 μ l씩 2회에 나누어 blank paper disc에 묻힌 다음 표준 균주가 도말된 Mueller Hinton 평판배지에 올려놓았다. 각 추출 원액을 10배($\times 1/10$ 배)와 100배($\times 1/100$ 배) 희석한 후 희석액 20 μ l를 10 μ l씩 2회에 나누어 blank paper disc에 묻힌 다음 표준 균주가 도말된 Mueller Hinton 평판배지에 올려놓았다. 평판배지를 24시간 배양한 후 결과 판독을 실시하는데, 추출원액 및 희석액이 묻은 disc 주변의 생육저지환(inhibition zone)의 직경(mm)을 측정하여 비교 분석하였다.

오미자 추출액의 미생물 생육 저해농도 측정

오미자 추출액의 미생물에 대한 생육 저해농도 측정은 turbidimetric assay에 의하여 측정하였다 (2). 즉, 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 제균시킨 추출 원액($\times 1$ 배)과 10배($\times 1/10$ 배), 100배($\times 1/100$ 배) 희석액을 10 ml의 tryptic soy broth에 1 ml씩 첨가한 후 각 표준 균주를 McFarland 탁도가 0.5가 되는 농도로 접종하여 36°C에서 24시간 동안 배양시키고, 배양 결과를 육안으로 확인하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

오미자를 에탄올에 침지하여 우려낸 추출물의 *B. cereus*와 *E. coli*에 대한 항균력 시험을 disc diffusion method로 $\times 1$ 배, $\times 1/10$ 배, $\times 1/100$ 배 희석액에서 각각 실시한 결과, $\times 1$ 배에서 *E. coli*는 10 mm, *B. cereus*는 11 mm의 생육저지환을 형성하였다. 그러나 $\times 1/10$ 배와 $\times 1/100$ 배 희석액에서는 생육저지환이 형성되지 않았으며, turbidimetric assay를 $\times 1$ 배, $\times 1/10$ 배, $\times 1/100$ 배에서 각각 실시한 결과 모든 조건에서 균의 증식을 억제하지 못하여 항균력을 확인할 수 없었다(Table 1).

오미자를 증류수에 침지하여 얻은 증류수 침지추출액을 disc diffusion method로 *B. cereus*와 *E. coli*에 대하여 항균력 시험을 진행하였다. 증류수 침지추출액은 $\times 1$ 배, $\times 1/10$ 배, 그리고 $\times 1/100$ 배의 모든 조건에서 *B. cereus*와 *E. coli* 모두에 대하여 생육저지환을 형성하지 않았지만, turbidimetric assay에서는 $\times 1$ 배, $\times 1/10$ 배, $\times 1/100$ 배 모두에서 *B. cereus*와 *E. coli*의 증식을 억제하였다(Table 1).

오미자를 증류수에서 60분, 90분, 120분간 가열하여 열수 추출하고 *B. cereus*와 *E. coli*에 대한 항균력 시험을 disc diffusion method로 진행하였다. 시험 결과 60분 열수추출액은 $\times 1$ 배에서 *E. coli*에 대하여 12 mm, *B. cereus*에 대하여 19 mm의 생육저지환을 형성하였고, $\times 1/10$ 배에서는 *E. coli*와 *B. cereus* 모두 9 mm의 생육저지환을 형성하였다. $\times 1/100$ 배에서는 *E. coli*에 대해서만 8 mm의 생육저지환을 형성하였다. 90분 열수추출액의 경우 $\times 1$ 배에서 *E. coli*에 대하여 10 mm, *B. cereus*에 대하여 14 mm의 생육저지환을 형성하였으나, $\times 1/10$ 배와 $\times 1/100$ 배에서는 생육저지환을 형성하지 않았다. 120분 열수추출액의 경우에도 $\times 1$ 배에서만 *E. coli*에 대하여 10 mm, *B. cereus*에 대하여 14 mm의 생육저지환을 형성하였다(Table 1).

열수추출액을 가지고 turbidimetric assay를 $\times 1$ 배, $\times 1/10$ 배, $\times 1/100$ 배에서 실시한 결과 60분 열수추출액은 $\times 1$ 배, $\times 1/10$ 배, $\times 1/100$ 배의 모든 조건에서 *E. coli*와 *B. cereus*의 증식이 억제되었다. 90분 열수추출액은 $\times 1$ 배에서는 *E. coli*와 *B. cereus* 모두에서 균의 증식이 억제되었으나 $\times 1/10$ 배에서는 *E. coli*의 증식은 억제되었으나, *B. cereus*의 증식은 억제되지 않았다. 120분 열수추출액은 $\times 1$ 배, $\times 1/10$ 에서 *E. coli*와 *B. cereus* 모두 증식이 억제되었다(Table 1).

Table 1. Antimicrobial activities of *Schisandra fructus* berry extracts against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*

Extracting methods	Assay methods	x1		x1/10		x1/100	
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
Soaking extract in ethanol	Disc diffusion method	10 mm ¹⁾	11 mm	- ²⁾	-	-	-
	Tube turbidimetric assay	G ³⁾	G	G	G	G	G
Soaking extract in DW	Disc diffusion method	-	-	-	-	-	-
	Tube turbidimetric assay	NG ⁴⁾	NG	NG	NG	NG	NG
Hot water extract (100°C, 60 min)	Disc diffusion method	12 mm	19 mm	9 mm	9 mm	8 mm	-
	Tube turbidimetric assay	NG	NG	NG	NG	NG	NG
Hot water extract (100°C, 90 min)	Disc diffusion method	10 mm	14 mm	-	-	-	-
	Tube turbidimetric assay	NG	NG	NG	G	G	G
Hot water extract (100°C, 120 min)	Disc diffusion method	10 mm	14 mm	-	-	-	-
	Tube turbidimetric assay	NG	NG	NG	NG	G	G
Sonicating extract in methanol	Disc diffusion method	-	9 mm	-	-	-	-
	Tube turbidimetric assay	NG	NG	NG	NG	NG	NG
Sonicating extract in DW	Disc diffusion method	-	-	-	-	-	-
	Tube turbidimetric assay	NG	G	G	G	G	G

¹⁾Diameter (mm) of growth inhibition zone around disc, ²⁾no growth inhibition zone around disc, ³⁾growth, ⁴⁾no growth

오미자를 메탄올과 함께 초음파 추출하여 얻은 초음파추출액의 *B. cereus*와 *E. coli*에 대한 항균력을 disc diffusion method를 이용해 ×1배, ×1/10배, ×1/100배에서 각각 실시한 결과, *B. cereus*에 대해서만 ×1배 추출액에서 9 mm의 생육저지환이 형성되었다. Turbidimetric assay에서는 ×1배, ×1/10배, ×1/100배 모든 시험 조건에서 *B. cereus*와 *E. coli* 모두의 증식이 억제되었다(Table 1).

오미자를 증류수와 함께 초음파 추출하여 얻은 증류수 초음파추출액의 *B. cereus*와 *E. coli*에 대한 항균력을 disc diffusion method를 이용해 ×1배, ×1/10배, ×1/100배에서 각각 실시한 결과, 모든 시험 조건에서 *B. cereus*와 *E. coli* 모두에 대해 생육저지환이 형성되지 않았다. Turbidimetric assay의 경우에는 ×1배에서 *E. coli*의 증식은 억제되었지만, *B. cereus*의 증식은 억제되지 않았으며, ×1/10배와 ×1/100배에서는 *B. cereus*와 *E. coli* 모두 증식이 억제되지 않았다(Table 1).

본 실험에서는 여러 가지 추출방법을 통해 오미자를 추출하고, 유통 중인 한약재에 대한 미생물 오염도 모니터링 결과 검출빈도가 높은 *E. coli*와 *B. cereus*에 대한 오미자 추출물의 항균 효과에 대한 연구를 진행하였다. Disc diffusion method와 tube turbidimetric assay 방법을 이용한 항균 시험을 실시한 결과 tube turbidimetric assay에서 disc diffusion method보다 높은 항균력 결과를 얻었는데, 이는 고형배지 배양법을 이용한 disc diffusion method에 비해서 액상배지 배양법을 이용한 tube turbidimetric assay 방법이 더 많은 균의 배양이 가능하고 또한, 항균물질의 더 신속한 항균작용이 가능하기 때문인 것으로 보인다.

오미자 에탄올 추출물은 *E. coli*, *C. perfringenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. Typhimurium*, *B. cereus*, 그리고 *S. Enteritidis*에 대하여 항균 효과가 있음이 보고되었다 (2, 4, 6~9), 본 연구에서는 에탄올 침지 추출물의 경우 추출 원액(×1배)에서는 *E. coli*와 *B. cereus*에 대하여 각각 10 mm, 11 mm의 생육저지환이 형성되어 두 세균에 대한 항균력을 확인할 수 있었으나, turbidimetric assay를 포함한 다른 모든 조건에서는 항균력을 확인할 수 없었다. 또한 tube turbidimetric assay의 모든 조건에서 항균력이 관찰되지 않은 것으로 보아 에탄올 자체의 항균력이 아닌 오미자 에탄올 추출물의 항균력에 의해 각각의 저지환이 생성됐다고 볼 수 있다.

증류수 침지추출액에 대한 disc diffusion method 항균 시험에서는 모든 농도에서 *B. cereus*와 *E. coli*에 대한 항균력을 확인할 수 없었으

나, turbidimetric assay에서는 모든 농도의 증류수 침지추출액에서 *B. cereus*와 *E. coli*에 대한 생장이 억제되었다. 이러한 시험 결과는 Jo 등 (10)과 Ham 등 (5)이 *E. coli*에 대한 오미자 증류수 추출물의 항균 효과를 보고한 연구 결과와 일치하며, 오미자 증류수 추출액에 대한 항균력 검사 시험에서는 turbidimetric assay가 더 감수성이 높은 시험방법임을 알 수 있었다. 열수 추출물에 대한 항균시험 결과 90분이나 120분 추출액 보다는 60분 추출액이 두 균 모두에 대하여 더 높은 항균력을 나타내어 열수 추출의 경우 60분 추출이 오미자의 항균력을 높이는 방법임을 알 수 있었다. 또한 열수추출 시간이 길어질수록 오미자의 항균력이 감소하여 오미자를 물에 끓여 음용할 때는 가열시간이 길면 항균 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

대한민국 약품공전에서는 한약재의 성분추출을 위해 메탄올 추출법을 사용하는 것에 착안하여 오미자를 메탄올에서 초음파법으로 추출하고, 그 항균력을 시험한 결과 추출 원액에서 *B. cereus*에 대한 생육저지환을 확인할 수 있었고, turbidimetric assay에서는 $\times 1$ 배, $\times 1/10$ 배, $\times 1/100$ 배의 모든 농도에서 *B. cereus*와 *E. coli*의 생장을 억제함을 알 수 있었다. 오미자 메탄올 추출물의 항균 효과는 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhimurium* 등의 균에 대하여 확인되었으며 (3, 8, 11), 본 연구에서는 오미자를 메탄올에서 초음파 추출하는 경우 $\times 1/100$ 의 희석 농도에서도 높은 항균력이 있음을 확인하였다.

이러한 실험 결과들을 종합하여 볼 때, 오미자를 음용하고자 할 때에는, 에탄올, 메탄올, 증류수 중에서 증류수가 항균력이 높은 오미자 추출액을 만들기 위한 가장 좋은 추출 용매이며, 증류수 침지추출법과 열수추출법 중에서는 열수추출법이 증류수 침지 법에 비해 더 나은 항균 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

REFERENCES

- 1) Ji WD, Jeong MS, Chung HC, Choi UK, Jeong WH, Kwon DJ, et al. Growth inhibition of water extract of *Schizandra chinensis* bullion on the bacteria. J Fd Hyg Safety 2001;16:89-95.
- 2) Cho IS, Han YH, Lee GY, Park KY. Search for medicinal plants on improvable effect of intestinal microflora. Korean J Medicinal Crop Sci 2007;15:26-9.
- 3) Choi EJ, Jang SR, Kang OJ, Bang WS. Antibacterial activity of *Psoralea corylifora*, *Schizandra chinensis*, and *Spatholobus suberectus* extracts. Korean J Food Sci Technol 2013;45:495-500.
- 4) Lee SH, Lim YS. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract against *Listeria monocytogenes*. Kor J Appl Microbiol Biotechnol 1997;25:442-7.
- 5) Ham HJ, Yu IS, Lee JH, Kim SJ, Yu YA, Lee ES, et al. Investigation of pathogenic microbial contamination in medicinal herb products on the market. Korean J Medicinal Crop Sci 2017;25:108-14.
- 6) Chung KH, Lee SH, Lee YC, Kim JT. Antimicrobial activity of Omija (*Schizandra chinensis*) Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 2001;30:127-32.
- 7) Ji WD, Jeong MS, Chung HC, Choi UK, Jeong WH, Kwoen DJ, et al. Growth inhibition of water extract of *Schizandra chinensis* bullion on the bacteria. J Fd Hyg Safety 2001;16:89-95.
- 8) Nam SY, Lee JY, Ko JS, Kim JB, Jang HJ, Kim HR, et al. Changes in antioxidant and antimicrobial activities of *Schizandra chinensis* Baillon under different solvent extraction. J Korean Soc of Int Agric 2014;26:513-8.
- 9) Kim JH, Kang KO. Analysis of antioxidative effects and antimicrobial activity of Omija (*Schizandra chinensis* B.) extracts. J East Asian Soc Diet Life 2016;26:109-16.
- 10) Cho JY, Choi I, Hwang EK. Antimicrobial activity of extracts from medicinal herbs against *Escherichia coli*. Korean J Vet

Res 2003;43:625-31.

- 11) Ryu JY, Park YJ, Kim HS. Antimicrobial activity of fermented Korean medicine against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 2011;26:543-51.