J. Fd Hyg. Safety 17(2), 71–78 (2002)

백련초 (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)의 *Salmonella*와 *Escherichia coli* O157:H7에 대한 항균효과

김소현[1] · 권남훈[1] · 김지연 · 임지연 · 배원기 · 김준만 · 노경민 · 허진 · 정우경 · 박건택 · 이종은* · 라정찬* · 박용호†

[1]공동기여저자, 서울대학교 수의과대학 및 농생명공학 사업단 미생물학교실, 경기도 수원시 권선구 서둔동 103, 441-744,

*RNL 생명과학, 경기도 수원시 권선구 서둔동 5-2, 441-100

Antimicrobial Activity of Natural Product Made by *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Against *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7

So Hyun Kim[1], Nam Hoon Kwon[1], J. Y. Kim, J. Y. Lim, W. K. Bae, J. M. Kim, K. M. Noh, J. Hur, W. K. Jung, K. T. Park, J. E. Lee*, J. C. Ra*, Yong Ho Park†

[1]*Equally contributed, Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seodoon-Dong 103, Kwonsun-Gu, Suwon, Gyunggi, KOREA, 441-744*

**RNL Life Science, Seodoon-Dong 5-2, Kwonsun-Gu, Suwon, Gyunggi, KOREA, 441-100*

ABSTRACT – With the incidence of antibiotic resistant bacteria there is increasing interest in natural products such as herb extract and probiotics to control antibiotic resistant bacteria. This study was focused on the determination of antimicrobial activity of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* against *Salmonella enetrica* serovar Enteritidis (*S. enteritidis*), *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) DT104 and *Escherichia coli* O157:H7. Though bactericidal effect of *O. ficus-indica* var. *saboten* was not observed, it had significant inhibitory activity against *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 on the Meuller Hinton agar containing its solution dissolved in deionized water. To investigate the antimicrobial activity *in vivo*, mice were challenged with *S. typhimurium* DT104 (3.7×10^8 cfu/mouse) after pre-feeding *O. ficus-indica* var. *saboten* solution. The fecal shedding of *S. typhimurium* DT104 was more dramatically decreased and not detectable in feces and intestines 3 days after challenge in mice fed with *O. ficus-indica* var. *saboten*. Antibody responses of the intestinal IgA were also significantly increased in mice fed with *O. ficus-indica* var. *saboten*. These findings suggest that *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* decreased the shedding of *S. typhimurium* DT104 *in vitro* and also in the gastrointestinal tract in mice. In addition, administration of the product might enhance the mucosal immune response against *S. typhimurium* DT104. In conclusion, *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* might be useful to control antibiotic resistant bacteria *in vivo* and *in vitro*.

Key words □ *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, *Escherichia coli* O157:H7, Antimicrobial activity

Salmonella, *Escherichia coli* O157:H7 등과 같은 주요 식중독균들을 비롯하여 여러 가지 유해균들을 control하기 위하여 항생제가 도처에 지속적으로 사용되어 왔으며, 이러한 항생제나 항균 물질 등의 오, 남용으로 인해 최근 항생제 내성균들이 등장하여 사회적으로 큰 문제가 되고 있다[24,26]. 이러한 문제 인식이 확산됨에 따라 항생제나 항균 물질의 사용을 자제하는 사회적 분위기가 조성되고 있으며, 이와 더불어 항생제를 대체할 수 있는 물질에 대한 연구 또한 활발하여 오래 전부터 민간요법으로 사용되어 오던 식물이나[2,6,8,28,34] 생균제인 probiotics[4,16,21,22] 등을 이용하여 항균 효과나 면역 증진 효과 등을 얻고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

백련초 (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)는 열대지역 유래의 다년초로서 그 열매 (prickly pear)와 줄기 (nopalitos)는 국내뿐만 아니라 외국에서도 오래 전부터 민간요법에 사

†Author to whom correspondence should be addressed.

용되고 있으며, 변비치료[1], 이뇨효과[13], 장 운동의 활성화[1], 염증 완화[30,31,32], 위궤양에 대한 항궤양 효과[12], 콜레스테롤 수치를 낮추어 고혈압을 예방하는 효과[6,13], 당뇨병 예방 효과[37] 등이 보고되고 있다. 남아메리카와 일본에서는 스낵, 우동, 아이스크림 등 다양한 백련초 가공 제품이 판매되고 있으며, 이탈리아의 경우에도 백련초에 대한 연구가 활발하다[1,12,13,17]. 그러나 국내에서는 제주지역을 중심으로 선인장 청차 등과 같은 가공식품만이 생산되고 있을 뿐 국내에서 생산되는 백련초에 대한 연구 및 이를 이용한 제품 생산 등은 아직 미흡하다 하겠다[1].

백련초의 주요 성분으로는 flavonoids, akaloids, polypeptides, β-sitosterol, saponin, anhalinin, isobetain, betain 등이 있음이 밝혀졌으며, flavonoids 중에는 isorhamnetin, quercetin, (+)-*trans*-dihydrokaemperol, (+)-*trans*-dihydroquercetin 등이 존재함이 확인되었다[1,31,32]. 이러한 성분들은 여러 연구에서 항균 효과가 있음이 밝혀져 백련초에 항염증 효과, 항궤양 효과 등과 같은 기능 외에 antimicrobial activity도 존재할 가능성을 제시하고 있다.

이러한 배경에서 본 연구에서는 국내에서 오래 전부터 민간 요법으로 사용되어 오던 백련초를 이용하여 그 항균능 등을 평가하고자 하였다.

실험방법

공시재제

본 연구에 사용된 재제는 주성분이 백련초 (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)로서 북제주군 한림읍에서 재배한 것이며, 북제주군 농업기술센터에서 줄기와 열매를 수세 및 탈수과정을 거쳐 동결 및 건조한 분말을 시료로 사용하였다.

본 공시재제는 증류수에 잘 용해되므로 *in vitro*에서의 항균력 시험에는 공시재제 2 g을 10 ml의 증류수에 녹이고 0.45 μm syringe filter (Sartorius, Germany)로 여과한 것을 사용하였으며, 마우스 접종 실험에는 제조사 (RNL, Korea)가 제시한 사람의 섭취량인 6 g/60 kg에 따라 공시재제 4 mg을 10 ml의 증류수에 녹이고 마우스 (평균 체중: 20 g) 각 개체당 0.5 ml씩 투여하였다.

공시균주 및 균주의 배양

*In vitro*에서의 항균력 시험에는 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (이후 *S. enteritidis*로 표기) ATCC 13076과 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides, 그리고 tetracycline 등 5가지 항생제에 대해 내성 (ACSSuT type)을 보이는 *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 (이후 *S. typhimurium* DT104로 표기, 미국 Washington State University에서 분양) 및 vero cytotoxin (VT) I과 II를 모두 분비하는 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894를 사용하였다. 균주들은 blood agar (KOMED, Korea)에서 배양하여 오염여부를 확인한 뒤 Tryptic Soy Broth (TSB; Difco BRL, USA)에 접종, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

마우스 접종 실험에는 *S. typhimurium* DT104를 TSB (Difco BRL)에 접종하여 37°C shaking incubator에서 24시간 배양한 후, 2,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 이후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 PBS에 재부유하여 균수를 3.7×10^9 cfu/ml로 맞추어 마우스 개체당 stainless steel tube (Zonde, 18G)를 이용하여 0.1 ml씩 경구로 접종하였다.

*In vitro*에서의 항균력 시험

한천 배지를 이용한 항균력 시험을 위해 *O. ficus-indica* var. *saboten*을 증류수에 녹인 후 filtering한 용액의 최종 농도가 1, 2, 3, 4 및 5% (v/v)가 되도록 Mueller Hinton agar (MHA; Difco BRL)와 혼합한 뒤 10 ml씩 peri-dish (녹십자, Korea)에 부어 굳혔다. 굳은 배지에 각 균을 inoculum replicator로 3.0×10^4 cfu가 되도록 접종하였다. 그 뒤 37°C에서 36시간 동안 배양하여 minimum inhibitory concentration (MIC), 즉 균의 성장이 관찰되지 않은 최소 농도를 측정하였다[6,21,22].

Broth를 이용한 항균력 시험을 위해 Mueller Hinton broth (MHB; Difco BRL)에 *O. ficus-indica* var. *saboten* 용액의 최종 농도가 1, 2, 3, 4 및 5%가 되도록 혼합하여 최종 10 ml씩 시험관에 분주하였다. 그리고 *O. ficus-indica* var. *saboten* 여과액과 배지의 혼합액이 담긴 시험관에 각 유해균을 1.0×10^6 cfu/ml가 되도록 접종하였다. 그 뒤 37°C에서 36시간 동안 배양하여 MIC를 측정하였다. 배양결과 균이 성장하지 않은 농도의 배양액들은 다시 blood agar (KOMED)에 접종, 37°C에서 18-20시간 동안 배양하여 minimum bactericidal concentration (MBC)을 측정하였다[21,22,39].

실험동물

3주령의 Specific Pathogen Free (SPF) ICR 마우스 암, 수 각각 22마리를 본 실험에 사용하였으며, SPF 마우스임을 확인하기 위하여 분변에 대한 미생물학적 검사를 실시하여 특정 병원체가 없는 것을 확인한 후 실험을 실시하였다. 마우스는 암, 수 각각 Negative Control군은 4마리, 3개의 실험군은 각각 6마리씩 (Negative Control군 총 8마리, 3개의 실험군 각각 총 12마리) 임의로 선택하여 케이지에 분리하

였으며, 1주일 간의 적응기간을 둔 후 실험을 실시하였다. SPF 상태를 유지하기 위해 음수, 사료, 깔짚 등은 모두 고압멸균 후 사용하였으며, 온도 22°C, 습도 50%, 12시간 간격으로 조명이 조절되고, 환기도 자동으로 조절되는 실험동물 사육장치 (MJ-721CS, Myung-Jin, Korea)에서 사육하였다.

마우스 접종 실험 방법

실험은 Negative Control군, ST군, RNL+ST군, RNL+ST+RNL군으로 총 4군으로 나누어 실시하였다. Negative Control군은 실험기간 동안 PBS만을 투여하였고, ST군은 7일 동안 PBS를 투여한 후 *S. tyhpimurium* DT104으로 공격 접종하였다. RNL+ST군과 RNL+ST+RNL군은 *O. ficus-indica* var. *saboten*을 증류수에 녹인 용액을 각 개체당 0.5 ml (0.2 mg)씩 stainless steel tube (Zonde, 18G)를 이용하여 7일동안 경구투여 후 *S. typhimurium* DT104를 공격 접종하였으며, RNL+ST+RNL군은 공격 접종 후에도 3일 동안 추가로 *O. ficus-indica* var. *saboten* 용액을 투여하였다.

마우스 분변 및 장에서 *S. enterica* serovar Typhimurium DT104의 검출

분변으로 배출되는 *S. typhimurium* DT104의 양상을 분석하기 위하여 공격 접종 후 3일 동안 각 군의 마우스로부터 분변을 수집하였다. 마우스의 분변을 0.85% 생리식염수에 십진 희석하고, Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD, Difco BRL)를 사용하여 37°C에서 24시간 배양한 후 균수를 측정하고 분변 중의 *S. typhimurium* DT104의 숫자를 cfu/g으로 환산하였다[40].

장에서 *S. typhimurium* DT104를 검출하기 위하여 공격 접종 1일과 3일 후 마우스를 부검하여 장의 일부를 Rappaport and Vassiliadis (RVS) broth (Merck, Germany)에 넣고 42°C에서 18시간 동안 증균시킨 후 XLD agar (Difco BRL)에 접종하여 장에서 *S. typhimurium* DT104가 분리되는지 확인하였다[40].

항체 (Immunoglobulin)의 측정

경구로 섭취된 항원 (antigen)에 대한 일차적인 방어를 담당하는 장에서 분비되는 IgA를 측정하기 위하여 각 군별로 마우스의 분변을 모으고 그 양을 0.5 g으로 일정하게 조정하여 PBS에 잘 섞은 후 2,500 rpm으로 15분간 원심분리하여 그 상층액으로부터 *S. typhimurium* DT104에 대한 IgA를 측정하였다. 또한 systemic immune response를 측정하기 위하여 마우스의 혈청을 분리하여 혈청 내의 *S. typhimurium* DT104에 대한 IgG를 측정하였다.

IgA와 IgG 측정을 위한 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)용 항원으로 사용하기 위하여 *S. typhimurium* DT104를 TSB (Difco BRL)에 37°C에서 24시간 배양한 후, 2,500 rpm에서 30분간 원심분리하고, PBS에 세척한 후 3% formalin으로 1시간 동안 처리하였다. 이후 2,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 회수하고, PBS에 세척하여 formalin 성분을 제거하고 PBS에 재부유하여 균수를 2×10^6 cfu/ml이 되도록 하였다. 이후 96 well flat-bottomed micro-plate (Nunc, USA)에 100 μl씩 분주하여 37°C에서 1시간, 4°C에서 overnight으로 coating하고, 2% bovine serum albumin (BSA, fraction V; Sigma Chemical Co., USA)으로 37°C에서 1시간 동안 blocking하였다.

IgA 측정을 위해서는 분변 상층액 100 μl를 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBST [PBS + 0.05% Tween 20 (Sigma)]로 5회 세척한 후 2차 항체로 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgA (Zymed, USA)를 1:4000으로 PBS에 희석하여 37°C에서 1시간 반응시켰다.

IgG 측정을 위해서는 혈청 100 μl를 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBST로 5회 세척한 후 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Zymed)를 1:4000으로 PBS에 희석하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이후 O-phenylene diamine (OPD; Sigma)로 발색시켜 ELISA reader (IDEXX)를 이용하여 490 nm에서 optical density (OD)를 측정하였다[20,23,36].

통계 처리

Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, USA)를 이용하여 Student's *t*-test와 analysis of variance as appropriate (ANOVA)를 이용하여 자료를 분석, 통계처리 하였다.

결 과

*In vitro*에서의 항균력 시험

한천배지를 이용한 항균력 시험 결과 *O. ficus-indica* var. *saboten*을 증류수에 녹인 후 filtering한 용액을 3% 이상 첨가시 *S. enteritidis*, *S. typhimurium* DT104 및 *E. coli* O157:H7에 대하여 억제능을 나타내었다 (Table 1). Minimum inhibitory concentration (MIC)은 균의 성장을 억제시킨 *O. ficus-indica* var. *saboten* 용액의 농도를 말하며 *S. enteritidis*, *S. tyrphimurium* DT104, *E. coli* O157:H7 모두 MIC는 3% (v/v), 즉 6 mg/ml 이었다.

Broth를 이용한 항균력 시험 결과 한천배지를 이용한 시험과는 달리 *O. ficus-indica* var. *saboten*의 최종 농도가

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of natural product made by *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*

Concentration[a] (v/v)	*S. typhimurium*[b]	*S. enteritidis*[c]	*E. coli* O157:H7[d]
1 %	+	+	+
2 %	+	+	+
3 %	-	-	-
4 %	-	-	-
5 %	-	-	-
MIC	3 %	3 %	3 %

+: Growth / -: No growth

a: The concentration of natural product made by *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* added in Mueller Hinton agar (total 10 ml) that dissolved in deionized water.

b: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 (Washington State University, USA), 3.0×10^7 cfu/ml

c: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, 3.0×10^7 cfu/ml

d: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 (Vero cytotoxin I+, II+), 3.0×10^7 cfu/ml

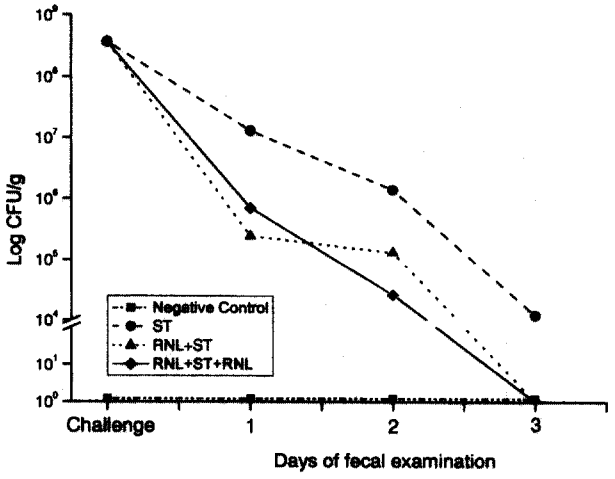

Fig. 1. Fecal shedding of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) DT104 (cfu/g) after challenge with *S. typhimurium* DT104
Negative Control: Phosphate buffered saline (PBS) treatment through the experimental period; ST: *S. typhimurium* DT104 challenge after PBS treatment for 7 days; RNL+ST: Administration of natural product made by *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* treatment for 7 days followed by *S. typhimurium* DT104 challenge; RNL+ST+RNL: Administration of the natural pro-duct for 7 days followed by *S. typhimurium* DT104 challenge and readministration of the natural product for 3 more days

1%에서 5%까지 모든 농도에서 균의 성장이 관찰되었으며, 본 실험에서는 minimum bactericidal concentration (MBC)은 5% (v/v), 즉 10 mg/ml 이상으로 정확한 농도는 측정할 수 없었다 (데이터 생략).

마우스 분변 및 장에서 *S. enterica* serovar Typhimurium DT104의 검출

S. typhimurium DT104를 공격 접종한 후 마우스 분변으로 *S. typhimurium* DT104의 수를 측정한 결과 *O. ficus-indica* var. *saboten*을 투여한 RNL+ST군과 RNL+ST+RNL군의 경우 *O. ficus-indica* var. *saboten* 투여 없이 *S. typhimurium* DT104만을 공격 접종한 ST군과 비교하여 그 배출이 급격히 감소함을 확인할 수 있었다. ST군에서도 *S. typhimurium* DT104의 배출이 감소하였으나 RNL+ST군과 RNL+ST+RNL군이 좀 더 빨리 감소하였으며, RNL+ST군과 RNL+ST+RNL군의 경우 3일 후에는 분변에서 *S. typhimurium* DT104의 배출이 검출되지 않은 반면 ST군에서는 3일에도 균이 계속 배출되었다. Negative Control군의 경우 실험 전 기간 동안 *S. typhimurium* DT104는 검출되지 않았다 (Fig. 1).

S. typhimurium DT104 공격 접종 1일 후에는 ST군, RNL+ST군, RNL+ST+RNL군의 마우스의 장에서 모두 *S.*

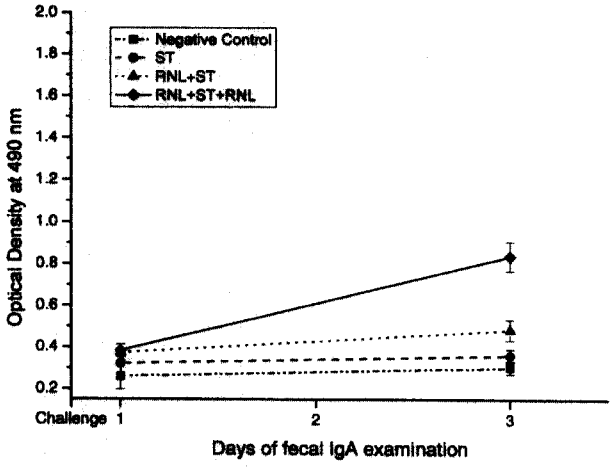

Fig. 2. Intestinal IgA against *Salmonella enterica* serovar Typhyimurium (*S. typhimurium*) DT104 after challenge with *S. typhimurium* DT104
Negative Control: Phosphate buffered saline (PBS) treatment through the experiment period; ST: *S. typhimurium* DT104 challenge after PBS treatment for 7 days; RNL+ST: Administration of natural product made by *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* treatment for 7 days followed by *S. typhimurium* DT104 challenge; RNL+ST+RNL: Administration of the natural product for 7 days followed by *S. typhimurium* DT104 challenge and readministration of the natural product for 3 more days

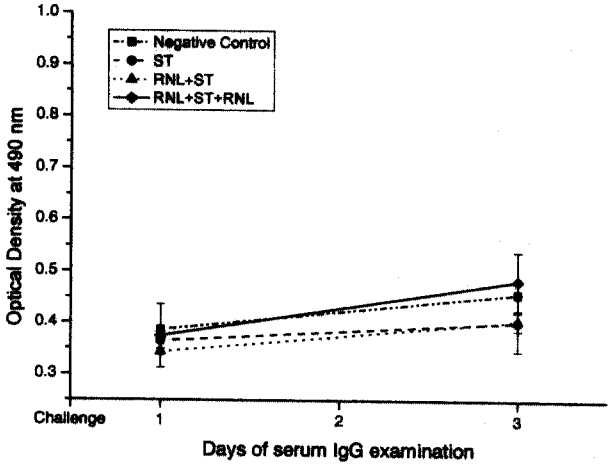

Fig. 3. Serum IgG against *Salmonella enterica* serovar Typhyimurium (*S. typhimurium*) DT104 after challenge with *S. typhyimurium* DT104

Negative Control: Phosphate buffered saline (PBS) treatment through the experiment; ST: *S. typhimurium* DT104 challenge after PBS treatment for 7 days; RNL+ST: Administration of natural product made by *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* treatment for 7 days followed by *S. typhimurium* DT104 challenge; RNL+ST+RNL: Administration of the natural product for 7 days followed by *S. typhimurium* DT104 challenge and readministration of the natural product for 3 more days

typhimurium DT104를 검출할 수 있었으나, 3일 후에는 ST군에서만 *S. typhimurium* DT104가 검출되었다. Negative Control군의 경우 *S. typhimurium* DT104는 검출되지 않았다.

항체 (Immunoglobulin)의 측정

마우스의 분변 내에 *S. typhimurium* DT104에 대한 IgA를 측정한 결과 RNL+ST군과 RNL+ST+RNL군에서는 공격 접종 1일 후부터 다른 군들과 비교하여 다소 높은 OD 값을 보임을 확인할 수 있었다. 또한 공격 접종 3일 후에도 두 군에서 역시 높은 OD 값을 보였으며, 특히 RNL+ST+RNL군에서 높은 IgA가 존재함을 확인할 수 있었다 ($p<0.05$) (Fig. 2).

마우스의 혈청 내에 *S. typhimurium* DT104에 대한 IgG를 측정한 결과 RNL+ST 및 RNL+ST+RNL군에서 Negative control군과 비교하여 비교적 높은 OD 값을 나타내었지만 유의성이 있는 차이를 보이지는 않았다 (Fig. 3).

고 찰

백련초 (*O. ficus-indica* var. *saboten*)의 항균능을 평가해 보기 위해 실시된 본 실험 결과 flavonoids 등 항균력이 인정된 성분으로 구성된 백련초 제제는 *S. enteritidis*, *S. typhimurium* DT104 및 *E. coli* O157:H7에 대한 억제능 (inhibitory activity)은 있으나 사멸능 (bactericidal activity)은 없는 것으로 판단되었다. *Salmonella* spp. 및 *E. coli* O157:H7에 대한 억제능이 한천배지에서는 관찰되었으나 broth에서는 나타나지 않았으므로 균의 농도나 균의 운동성, 공시제제 성분의 확산 등에 의해 영향을 받는 것으로 생각된다. *In vitro*에서 항균능 실험은 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Inc. (NCCLS) 방법을 응용하여 한천배지의 경우 3×10^4 cfu, broth의 경우 1×10^6 cfu의 균을 접종하였는데, 보다 높은 수의 균을 접종한 broth에서의 항균능이 한천배지에서 보다 낮게 나타난 것으로 생각된다. 또한 Gallusser의 결과와 같이 broth에서는 한천배지보다 균의 운동성 활발하여 broth에서의 항균능이 한천배지에서보다 낮게 나타난 것으로 사료된다[14].

또한 백련초 성분의 추출 방법도 항균력에 영향을 미칠 수 있었을 것으로 사료된다. 본 연구에는 동결, 건조된 백련초 열매 및 줄기의 분말이 사용되었는데 ethanol 또는 methanol extraction 등과 같은 방법으로 추출을 할 경우 보다 높은 항균력을 보일 것으로 예상된다. Okeke 등이 *Landolphia owerrience*를 ethanol, cold water 및 hot water를 이용하여 추출한 결과 각 방법에 따라 실험물질에 포함되어 있는 여러 가지 성분들의 농도가 달리 추출되었으며, 각 추출 방법에 따라 항균력을 나타내는 균의 종류도 달리 나타났다[27]. Okeke 등의 결과에 따르면 *L. owerrience*의 경우에는 ethanol extraction 방법으로 추출한 경우에 항균력이 가장 높은 것으로 확인되었다. 본 실험에서는 제재의 특성상 보다 높은 농도의 수용액을 얻기가 불가하였으므로 더 높은 농도에서의 항균력 시험은 수행하지 않았으며, 추후 ethanol 또는 methanol extraction 방법으로 추출한 백련초를 이용하여 항균능 실험을 실시하여 그 항균능의 차이를 비교하는 실험이 수행되어야 할 것이다.

마우스를 이용한 항균능 실험에서는 백련초 제제를 투여하지 않고 *S. typhimurium* DT104를 공격 접종한 ST군의 경우 실험기간 동안 계속 분변으로 *S. typhimurium* DT104가 배출되었으나 백련초 제제를 경구투여한 결과 *S. typhimurium* DT104 공격 접종 3일 후에는 분변으로부터 *S. typhimurium* DT104의 배출이 확인되지 않았으며, 장에서 또한 균을 분리할 수 없었다.

마우스 분변의 *S. typhimurium* DT104에 대한 IgA를 측정한 결과 백련초를 투여한 경우 높은 OD 값을 확인할 수 있었으며, 특히 백련초를 *S. typhimurium* DT104 공격 접종 이후에도 지속적으로 3일간 투여한 경우에 더욱 높은 항체가를 확인할 수 있었다. 분변의 IgA는 장으로 배출되는 IgA

를 간접적으로 대변하는 것[19]으로서 백련초를 경구투여하고 *S. typhimurium* DT104를 공격 접종한 경우 백련초가 장내에서 *S. typhimurium* DT104에 대한 항체 생성을 유도하는 것으로 사료된다. IgA는 식중독균을 비롯하여 대부분의 유해균들이 침입하는 부위인 mucous membrane surface에서 중요한 역할을 하는 항체로서[15] 백련초의 섭취를 통해 IgA 생성이 유도되어 이 또한 생체내에서 *S. typhimurium* DT104에 대한 항균력이 높게 나타난 원인의 하나로 생각된다. 마우스 혈청으로부터 *S. typhimurium* DT104에 대한 IgG를 측정한 결과 백련초 제제를 공격 접종 전, 후로 투여한 경우 다른 군들과 비교하여 비교적 높은 수준의 OD 값을 나타내었지만 유의성 있는 수준은 아니었다. 일반적으로 외부에서 침입 또는 주입한 항원에 대한 항체의 생성이 최고로 일어나는 시기는 10-17일이 경과된 후 이지만, 본 실험에서는 공격 접종 후 분변으로 배출되는 *S. typhimurium* DT104과 항체가를 함께 확인해보기 위해 공격접종 1일과 3일 후에 항체가를 측정하여 보았다. 단 한번의 공격 접종과 공격 접종 후 너무 빨리 그 값을 측정하였기 때문에 *S. typhimurium* DT104에 대한 IgA 및 IgG가 peak에 이르는 값을 측정할 수는 없었지만 RNL+ST군과 RNL+ST+RNL군의 경우 다른 군과 비교하여 이미 공격 접종 후 3일째에 비교적 높은 수준의 IgA와 IgG의 생성이 유도되었음을 확인할 수 있었다.

백련초에는 arabinogalactan과 galacturonic acid로 구성된 분자량이 큰 acid polysaccharide인 mucilage가 존재한다[13]. 이는 gastric mucosa로 여러 agent가 침입하는 것을 막아주는 등 인체의 여러 방어능과 협력하여 효율적인 방어가 이루어지도록 도와주는 역할을 하는데[13], 이러한 mucilage도 마우스의 *S. typhimurium* DT104에 대한 방어능에 작용을 했을 것으로 사료된다. 또한 백련초에는 saponin, ascorbic acid, alkaloids, flavonoids, β-sitosterol 및 polypeptide 등과 같은 성분들이 존재함이 확인되었으며, 본 성분들을 갖고 있는 다른 식물들의 항균력을 시험한 결과 본 성분들은 항균력을 갖거나 항균력이 존재하는 물질을 도와 보다 강력한 항균 작용을 갖도록 함이 밝혀졌다[31,32]. Saponin[3,28], 여러 alkaloids[2,35], flavonoids[7,9] 및 polypeptides[25,29] 등과 같은 성분들은 *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus* 등을 비롯한 여러 그람 음성 및 양성균에 대한 항균력을 보이며, ascorbic acid의 경우 세균들이 철을 이용하지 못하게 하는 deferoxamine 등과 같은 물질의 기능 향상 및 pulmonary defense mechanisms을 돕고[10,18,19,38], β-sitosterol 역시 항균력이 존재하는 물질을 도와 보다 강력한 항균력을 나타나도록 함이 밝혀졌다[6,33]. 따라서 생체실험에서 항균력이 뛰어나게 나타난 것은 백련초의 이러한 여러 인자들이 생체 내의 여러 방어능 등과 함께 작용하였기 때문으로 생각된다.

본 연구를 통해 민간요법으로 사용되던 백련초의 *S. enteritidis*, *S. typhimurium* DT104 및 *E. coli* O157:H7에 대한 항균력뿐만 아니라 그에 대한 강한 항체 생성능 유도 또한 확인할 수 있었으며, 또한 백련초 제제를 *S. typhimurium* DT104 공격 접종 전에만 투여한 군에 비하여 공격 접종 후에도 지속적으로 투여한 군에서 *Salmonella*에 대한 항균력 및 이에 대한 항체 생성능이 더 높았으므로 백련초를 지속적으로 섭취하는 것이 중요할 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 백련초 및 그 성분을 이용한 병원성 세균의 제거 및 면역 증진 효과 등과 같은 연구의 필요성을 확인할 수 있었으며, 백련초의 응용 가능성이 매우 높은 것으로 사료되었다.

감사의 말씀

본 실험은 Brain Korea 21 Project의 지원으로 실시되었으며, 지면을 통해 실험과정에 도움을 주신 서울대학교 수의과대학 실험동물학교실 박사과정 박종환 님께 감사의 뜻을 전합니다.

국문요약

항생제 및 항균 물질 등의 오, 남용으로 인하여 항생제 내성균들이 등장, 사회적으로 큰 문제가 되고 있으며, 최근에는 식물이나 probiotics 등과 같이 항생제를 대체할 수 있는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 본 연구에서는 국내에서 오래 전부터 민간 요법으로 사용되어 오던 백련초 (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)를 이용하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. enteritidis*), *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) DT104 및 *Escherichia coli* O157:H7에 대한 항균능을 평가하였다. 백련초의 수용액이 포함된 Meuller Hinton agar에 *Salmonella* spp. 및 *E. coli* O157:H7를 접종한 결과 이들 균에 대한 억제능 (inhibitory activity)을 확인할 수 있었다. 백련초 제제를 경구투여한 군에서 분변으로 배출되는 *S. typhimurium* DT104의 수가 급격히 감소하였고, 3일 후에는 더 이상 분변으로 균이 배출되지 않았으며, intestinal IgA가 유의적으로 증가함이 확인되었다. 본 연구를 통하여 백련초가 *in vitro*에서 *S. enteritis*, *S. typhimurium* DT104와 *E. coli* O157:H7대한 항균력을 나타낼 뿐만 아니라 마우스의 gastrointestinal tract에서 역시 *Salmonella*에 대한 항균력을 보임을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 백련초 및 그 성분을 이용한 병원성 세균의 제거 및 면역 증진 효과 등과 같은 연구의 필요성이 확인되었고, 그 응용 가능성도 매우 높을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 한용남, 윤상태, 이영철, 최종원: 손바닥 선인장의 열매와 줄기를 이용한 기능성 식품개발 및 생리활성물질 연구, *농림기획과제 최종 연구보고서*, 농림부 (1999).
2. Abo, K.A., Ogunleye, V.O. and Ashidi, J.S.: Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*, *Phytother. Res.*, **13**, 494-497 (1999).
3. Andersson, L., Bohlin, L., Iorizzi, M., Riccio, R., Minale, L. and Moreno-Lopez, W.: Biological activity of saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars, *Toxicon*, **27**, 179-188 (1989).
4. Brassart, D. and Schiffrin, E.J.: The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms, *Trends Food Sci. Technol.*, **8**, 321-326 (1997).
5. Camacho-Ibanez, R., Meckes-Lozoya, M. and Mellado-Campos, V.: The hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* studied in different animal experimental models, *J. Ethnopharmacol.*, **7**, 175-181 (1983).
6. Chattopadhyay, D., Maiti, K., Kundu, A.P., Chakraborty, M.S., Bhadra, R., Mandal, S. C. and Mandal, A.B.: Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands, *J. Ethnopharmacol.*, **77**, 49-55 (2001).
7. Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Casu, M., Pompei, R. and Bonsignore, L.: Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L, *Phytomedicine*, **8**, 302-305 (2001).
8. Cutter, C.N.: Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef, *J. Food Prot.*, **63**, 601-607 (2000).
9. Deng, Y., Lee, J.P., Tianasoa-Ramamonjy, M., Snyder, J.K., Des Etages, S.A., Kanada, D., Snyder, M.P. and Turner, C.J.: New antimicrobial flavanones from *Physena madagascariensis*, *J. Nat. Prod.*, **63**, 1082-1089 (2000).
10. Esposito, A.L.: Ascorbate modulates antibacterial mechanisms in experimental pneumococcal pneumonia, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **133**, 643-647 (1986).
11. Frati, A.C., Jimenez, E. and Raul Ariza, C.: Hypoglycemic effect of *Opuntia ficus indica* in non-insulin dependent diabetes mellitus patients, *Phytother. Res.*, **4**, 195-197 (1990).
12. Galati, E.M., Monforte, M.T., Tripodo, M.M., dAquino, A. and Mondello, M.R.: Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study, *J. Ethnopharmacol.*, **76**, 1-9 (2001).
13. Galati, E.M., Tripodo, M.M., Trovato, A., Miceli, N. and Monforte, M.T.: Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. waste matter Note I: diuretic activity, *J. Ethnopharmacol.*, **79**, 17-21 (2002).
14. Gallusser, A.: Comparative study, using 3 methods, of the sensitivity to metronidazole and ornidazole of anaerobic or related bacteria, *Ann. Microbiol.*, **134B**, 307-21 (1983).
15. Goldsby, R.A., Kindt, T.J. and Osborne, B.A.: Kuby Immunology (forth edition), W.H. Freeman and Company, New York (2000).
16. Guarner, F. and Schaafsma, G.J.: Probiotics, *Int. J. Food Microbiol.*, **39**, 237-238 (1998).
17. Gurrieri, S., Miceli, L., Lanza, C.M., Toomaselli, F. bonomo, R.P. and Rizzarelli, E.: Chemical characterization of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and perspectives for the storage of its juice, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5424-5431 (2000).
18. Hashem, F.A. and Saleh, M.M.: Antimicrobial components of some cruciferae plants (*Diplotaxis harra Forsk.* and *Erucaria*

microcarpa Boiss.), *Phytother. Res.*, **13**, 329-332 (1999).
19. Hartzen, S.H., Frimodt-Moller, N. and Frolund Thomsen, V. The antibacterial activity of a siderophore. 1. In vitro activity of deferoxamine alone and in combination with ascorbic acid on *Staphylococcus aureus*, *APMIS*, **97**, 419-424 (1989).
20. Islam, D., Wretlind, G., Ryd, M., Lindberg, A.A. and Ghristensson, B.: Immunoglobulin subclass distribution and dynamics of *Shigella*-specific antibody responses in serum and stool samples in Shigellolsis, *Infect. Immun.*, **63**, 2054-2061 (1995).
21. Kwon, N.H., Kim, S.H., Bae, W.K., Kim, J.Y., Lim, J.Y., Noh, K.M., Kim, J.M., Ahn, J.S., Hur, J. and Park, Y.H.: Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against major food-borne pathogens, *J. Fd. Hyg. Safety*, **16**, 264-273 (2001).
22. Kwon, N.H., Kim, S.H., Bae, W.K., Kim, J.Y., Lim, J.Y., Noh, K.M., Kim, J.M., Ahn, J.S., Hur, J. and Park, Y.H.: Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against *Bacillus anthracis* sterne 34 F_2, *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.*, **25**, 277-287 (2001).
23. Kuttech, W.H., Kantele, A., Moldoveanu, Z., Crowley-Nowick, P.A., Mestecky, J.: Induction of specific immune responses in the genital tract of women after oral or rectal immunization and rectal boosting with *Salmonella typhi* Ty 21a vaccine. *J. Reprod. Immunol.*, **52**, 61-75 (2001).
24. Mah, M.W. and Memish, Z.A.: Antibiotic resistance. An impending crisis, *Saudi Med. J.*, **21**, 1125-1129 (2000).
25. Marcus, J.P., Green, J.L., Goulter, K.C. and Manners, J.M.: A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in Macadamia integrifolia kernels, *Plant J.*, **19**, 699-710 (1999).
26. Neu, H.C.: The crisis in antibiotic resistance, *Science*, **257**, 1064-73 (1992).
27. Okeke, M.I., Iroegbu, C.U., Eze, E.N., Okoli, A.S. and Esimone, C.O.: Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol.*, **78**, 119-127 (2001).
28. Otshudi, A.L., Foriers, A., Vercruysse, A., Van Zeebroeck, A. and Lauwers, S.: In vitro antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for the treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo (DRC), *Phytomedicine*, **7**, 167-172 (2000).
29. Park, C.J., Park, C.B., Hong, S.S., Lee, H.S., Lee, S.Y. and Kim, S.C.: Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherds purse, *Capsella bursa-pastoris*, *Plant Mol. Biol.*, **44**, 187-197 (2000).
30. Park, E.H., Kahng, J.H. and Paek, E.A.: Studies on the pharmacological action of cactus: identification of its anti-inflammatory effect, *Arch. Pharm. Res.*, **21**, 30-34 (1998).
31. Park, E.H. and Chun, M.J.: Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*, *Fitoterapia*, **72**, 165-167 (2001).
32. Park, E.H., Kahng, J.H., Lee, S.H. and Shin, K.H.: An anti-inflammatory principle from cactus, *Fitoterapia*, **72**, 288-290 (2001).
33. Peres, M.T., Delle Monache, F., Cruz, A.B., Pizzolatti, M.G. and Yunes, R.A.: Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana Baillon* (Euphorbiaceae), *J. Ethnopharmacol.*, **56**, 223-236 (1997).
34. Potera, C.: Tree extract curbs foodborne pathogens, ASM *News*, **67**, 605-606 (2001).
35. Scazzocchio, F., Cometa, M.F., Tomassini, L. and Palmery, M.: Antibacterial activity of *Hydrastis canadensis* extract and its major isolated alkaloids, *Planta. Med.*, **67**, 561-564 (2001).
36. Song, Q.H., Kobayashi, T., Xiu, L.M., Hong, T. and Cyong, J.C.: Effects of Astragali root and Hedysari root on the murine B and T cell differentiation, *J. Ethnopharmacol.*, **73**, 111-119 (2000).
37. Trejo-Gonzalez, A., Gabriel-Ortiz, G., Puebla-Perez, A.M., Huizar-Contreras, M.D., Munguia-Mazariegos, MdR., Mejia-Arreguin, S. and Calva, E.: A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fulginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **55**, 27-33 (1996).
38. van Asbeck, B.S., Marcelis, J.H., Marx, J.J., Struyvenberg, A. van Kats, J.H. and Verhoef, J.: Inhibition of bacterial multiplication by the iron chelator deferoxamine: potentiating effect of ascorbic acid, *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **2**, 426-431 (1983).
39. Wongkham, S., Laupattarakasaem, P., Pienthaweechai, K., Areejitranusorn, P., Wongkham, C. and Techanitiswad, T.: Antimicrobial activity of *Streblus asper* leaf extract, *Phytother. Res.*, **15**, 119-121 (2001).
40. Yang, S.J., Yoon, J.W., Seo, K.S., Koo, H.C., Kim, S.H., Bae, H.S., Baek, Y.J. and Park, Y.H.: Prophylactic effects of *Bifidobacterium longum* HY8001 against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 enteric infection and evaluation of vero cytotoxin neutralizing effects, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 419-425 (1999).