pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 4, pp. 382~390 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.4.382

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

황색포도상구균을 포함한 식중독 미생물들에 대한 홍삼의 항균효과

곽이성* · 정명균 · 장경화 · 한민우 · 유병일
한국인삼공사 R&D본부

Antimicrobial Effect of Red Ginseng Against Major Food Poisoning Microorganisms Including *Staphylococcus aureus*

Yi-Seong Kwak*, Myung-Gyun Jung, Kyoung-Hwa Jang, Min-Woo Han, Byeung-Il Yu
R&D Research Institute, Korea Ginseng Corporation, Daejeon, Korea

(Received May 19, 2020/Revised May 26, 2020/Accepted July 1, 2020)

ABSTRACT - This study was carried out to evaluate the antimicrobial effect of red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) against several foodborne pathogens including *Staphylococcus aureus, Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. The antimicrobial effect was determined by agar diffusion method using red ginseng extract, crude saponin and non-water-soluble fractions. Red ginseng extract showed antimicrobial effect against *S. aureus*, but not *C. albicans* or *A. niger*. The extract showed anti-bacterial activity at concentration above 30% against *S. aureus*, which cause both food poisoning and atophic dermatitis. Crude saponin showed antibacterial activity above 7.5% against the bacterium. However, the ginsenosides purified from crude saponin showed no antimicrobial activities at 100-200 μg/mL. To investigate the mode of growth inhibition, red ginseng extract and crude saponin were added to 0.85% NaCl solution containing *S. aureus* and then incubated at 35°C for 12 h. The results showed that viable cells were rapidly reduced in above 10% concentration of red ginseng extract and above 2% of crude saponin, respectively. However, the crude saponin and red ginseng extract did not inhibit the bacterial cells completely at those same concentrations. On the other hand, whereas all non-water-soluble fractions showed inhibition zones above 10 mm against *S. aureus*, they showed no inhibition effects against *E. coli*, *C. albicans* or *A. niger*. The methanol fraction-1 (MF-1) showed the highest antibacterial activity against *S. aureus*, and the MIC (minimal inhibitory concentration) was 0.625 mg/mL. These results suggest that red ginseng extract, crude saponin and non-water-soluble fractions show selective antibacterial activity against *S. aureus*, and non-water-soluble fractions might be used as natural antibacterial agents.

Key words : Red ginseng extract, Fraction, Antimicrobial activity, Food pathogen, *Staphylococcus aureus*

식품에서의 저장성 부여는 식품성분 및 영양소 파괴의 최소화를 고려할 때 열처리의 최소화가 바람직한데 이럴 경우 식품 부패성 검토 및 병원성 미생물의 살균이 매우 중요하다[1]. 최근에는 건강에 대한 관심집중으로 화학적 합성 보존료 대신에 천연 항균제 및 무보존료 제품이 증가하는 추세로 병원성 식중독균에 대한 관리가 무엇보다 중요하다. 현재에 이르기까지 미생물로부터 해양생물까지 항균성물질 및 항생물질이 개발되어 다량 소비되고 있으며, 식용 동·식물 및 생약으로부터 특정성분을 추출하여 미생물 증식억제 및 살균에 이용하고자 하는 연구가 지속되어 왔다[1]. 또한, 2,000년 이후 건강기능식품 및 일반식품에서 생약제제에 대한 관심증가로 식품공전이 개정되면서 많은 생약제제들이 사용이 가능하도록 허가되는 추세이다[2-4]. 생약자원 중 주로 많이 사용되고 있는 품목은 인삼, 당귀, 계피 등인데 이들 중 인삼은 그 우수한 효능과 안전성으로 인해 꾸준히 사용되고 있으며 미국 및 일본 등에서도 생약자원(herb) 중 그 사용량이 10위 안에 포함될 정도로 중요한 생약제제로 취급되고 있다[2]. 이러한 생약자원은 저장 및 취급 시 주의가 필요한데 만약 부패성 미생물이 오염되면 이들이 유해한 물질을 생성하여 안전성 문제를 야기할 수 도 있으므로 미생물학적 안

*Correspondence to: Yi-Seong Kwak, Korea Ginseng Corporation, 30, Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34128, Korea
Tel: +82-42-870-3071, Fax: +82-42-870-3142
E-mail: twostar@kgc.co.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

전성 확보는 매우 중요하다. 생약자원 중 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 그 약효가 예로부터 잘 알려져 왔으며, 최근에 홍삼은 면역증진, 피로해소, 혈행개선, 기억력개선, 항산화기능, 여성갱년기증상 개선 등 여러가지 기능성에 대해 식품의약품안전처에서 법적으로 고시된 바 있다[5]. 또한, 홍삼은 사포닌 이외에도 다당체, AFG(arginyl-fructosyl-glucose), 폴리페놀, 폴리아세틸렌, 말톨 등 다양한 화학성분을 함유하고 있다[6,7]. 한편, 예로부터 알려진 고려인삼의 효능 중에는 인삼을 섭취하면 위장을 튼튼히 하고 설사를 멈추게 하는 등 위장과 관련된 긍정적 효과가 알려져 왔다[8].

식중독 세균 중 *Staphylococcus aureus*는 화농성 질환의 원인균일뿐만 아니라 식중독의 원인균이다. 우리나라의 경우, *S. aureus*는 *Salmonella, Vibrio* 등과 더불어 식중독 발생빈도가 높고, 식중독발병률은 2005년 이후로 약 13% 정도 차지하고 있으며[9] 지속적으로 식중독 환자가 발생하고 있는 실정이다[8,10]. 이 균은 일반적으로 사람이나 동물의 피부, 비강, 구강, 쓰레기, 하수, 분변 등 자연계에 널리 분포되어 있기 때문에 식품을 오염시킬 기회가 상대적으로 많으며 한번 오염되면 증식하여 독소를 생산하므로 가열 처리하여도 식중독이 예방되지 않는다. 한편 *S. aureus*는 식중독 유발균이면서 동시에 아토피의 원인세균 중의 하나로 알려져 있다. 황색포도상구균은 정상인의 피부에서는 2-25%에서 검출되는 반면 아토피 피부염이 있는 소아와 어른에 있어서는 78-100%의 높은 비율로 검출된다. 이 균주가 비정상적으로 증식하면 가려움증을 유발하고 여기에 긁어서 난 상처가 다시 세균에 감염이 되는 악순환을 반복하게 되므로 이 균주의 사멸은 아토피 피부염의 개선에 도움이 된다고도 보고되어 있다[11]. 그러나 근래 이 균주에 대한 항생제 내성균이 증가하여 병원 내 감염이 발생하는 등 균의 방제에 어려움이 있다고 알려져 있다. *S. aureus* 중에는 methicillin에 대하여 내성을 가지는 MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) 및 vancomycin에 대해서 내성을 가지는 VRSA (Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*) 등의 발생이 보고되어 사회적 문제가 되기도 하였다[8,10,12].

따라서 이러한 항생제에 대한 내성을 가지는 내성균이 존재하기 때문에 이를 방어하기 위해서는 항생제 이외 천연항균성 물질의 연구가 중요하다. 그러나 지금까지 생약제제 등 천연물로부터 이 균에 대한 항균성 연구는 미미하였고[2,3,13], 인삼사포닌을 포함한 인삼 및 홍삼성분과 미생물 생육과의 관련성 연구도 매우 미비한 수준이었다[7,14,15]. 본 실험에서는 식품부패성 미생물 평가 균주로 알려진 4종의 미생물에 대해 홍삼농축액, 홍삼사포닌, 홍삼 비수용 성분의 항균활성 연구를 추진함으로써 추후 홍삼제품의 미생물 증식억제 가능성을 모색하기 위한 기초자료를 확보하고자 하였다.

Materials and Methods

사용균주

항균력 시험용으로 사용한 미생물은 세균 2종, 효모 1종, 곰팡이 1종 등 4종의 균주로 KGC인삼공사 R&D본부(Daejeon, Korea)에 보관중인 *Escherichia coli* NCTC12923, *Staphylococcus aureus* NCTC10788, *Candida albicans* NCPF3179, *Aspergillus niger* NCPF2275를 사용하였다.

홍삼농축액, 조사포닌, 진세노사이드 및 홍삼 비수용성 분획

홍삼농축액은 상업적으로 판매되고 있는 홍삼농축액(240g, KGC, Daejeon, Korea)을 사용하였고, 조사포닌은 Kim 등[16]의 방법에 준하여 다이아이온 수지(Diaion HP-20, Mistubishi Kasei, Japan)로 분리하여 사용하였다. 진세노사이드(ginsenoside)는 홍삼으로부터 순수 분리하여 KGC 인삼공사 R&D본부(Daejeon, Korea)에 보관중인 RM급(Reference material, KGC, Daejeon, Korea) ginsenoside-Rb2, -Rc, -Rd, -Rf, -Rg_2, PD (protopanaxdiol saponin), PT (protopanaxtriol saponin)을 사용하였다[7]. 또한 홍삼으로부터 홍삼 비수용성 분획(non-water soluble fraction) 조제는 홍삼(5 kg)을 95% MeOH로 추출(5 volume, v/w)한 후 동량(1:1, v/v)의 methylene chloride(special grade, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)로 물층과 비수용성층을 분리한 후 물층은 제거하고 비수용성층은 각각 헥산(hexane)과 15% methanol을 가하여 헥산 및 15% MeOH 분획을 조제하였다. 얻어진 분획물은 항균성시험을 위해 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 최종농도가 10-200 mg/mL이 되도록 용해시킨 후 시험에 사용하였다.

진세노사이드(Ginsenoside)정량

조사포닌에 함유된 진세노사이드는 ultra-performance liquid chromatography (UPLC, Waters Acquity, PDA Detector, Milford, MA, USA)로 Table 1에 나타낸 조건에서 분석하였다. 진세노사이드의 정량은 각각의 진세노사이드 표준품으로 작성된 검량곡선의 peak 면적을 환산하여 표시하였다. UPLC분석을 위해 methanol에 용해된 조사포닌 10% 용액을 여과(pore size 0.45 μm) 한 후 Table 1에 나타낸 조건에 의해 정량분석 하였다[7].

항균력 시험

홍삼에서 분리한 홍삼성분의 항균성 여부를 검정하기 위해 감수성 시험용 paper disc (Φ 8 mm, thickness 0.7 mm, Toyo Roshi, Tokyo, Japan)를 활용한 agar diffusion 방법[1,9]에 의하여 활성을 검정하였다. 검정용 균액(최종농도 5×10^6 colony forming unit (CFU/mL)을 세균의 경우, trypticase soy agar (TSA, DIFCO Co., Sparks, MD, USA) 배지에,

Table 1. Analytical conditions of UPLC and HPLC-MS, respectively

UPLC condition	Contents		
Detector	PDA		
Column	Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm (2.1×100 mm)		
Mobile phase	A: Water in formic acid 0.1%		
	B: Acetonitrile in formic acid 0.1%		
Gradient	Minutes	A	B
	0	100	10
	3	80	20
	5	60	40
	10	50	50
	15	30	70
	17	20	80
	18	0	100
	18	0	100
	18.01	90	10
	20	90	10
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection volume	5.0 μL		
HPLC-MS Condition	Contents		
Company	Waters		
Mode	ESI +		
Cone volt	50 ev		
Source temp.	120 D		
Desolvation	450 D		
Cone gas flow	50 L/hr		
Desolvation flow	800 L/hr		

효모 및 곰팡이의 경우 PDA (potato dextrose agar, DIFCO Co., Sparks, MD, USA)에 각각 0.15 mL씩 도말 하였다. 목적하는 시료를 각각 30 μL씩 paper disc에 흡수시키고 건조하여 시료에 함유된 용매의 영향을 최소화한 후, paper disc를 올려놓고 세균은 35°C에서 1일 동안 배양하였고, 효모는 25°C에서 2일 동안, 곰팡이는 25°C에서 5일 동안 배양하였다. 항균활성은 paper disc 주위에 형성된 clear zone의 직경을 측정함으로써 생육 억제 정도를 조사하였다. 양성 대조군으로는 sodium benzoate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)를 각각 10, 20, 30% 사용하였다.

살균력 및 생균수 측정

*S. aureus*에 대한 홍삼농축액 및 조사포닌의 살균효과를 조사하기 위해 홍삼농축액은 0~100 mg/mL, 조사포닌은 0~200 mg/mL가 되도록 농도를 조정한 후, 배지의 영향을 최소화하기 위해 0.85% 생리식염수(9 mL)가 함유된 시험관에 첨가하였다. 이 후, *S. aureus*를 1×10^2 CFU/mL가 되도록 접종하고 35°C에서 12시간 정치 배양한 후, 생균수를 측정하였다. 이때, *S. aureus*는 35°C에서 1일 동안 배양한 후, 미리 활성화시킨 균주를 사용하였다. 또한 생균수는 pour plate method[8]에 의해 측정하였다. 사용배지는 세균의 경우, 영양배지(nutrient agar, DIFCO Co., USA)를 사용하였으며, 25°C에서 48시간 동안 배양한 후 나타나는 colony수를 측정하였다.

최소억제농도 측정

최소억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)는 항균력시험에 사용한 paper disc를 이용한 고체배지법으로 측정하였다[1,17]. 즉, 홍삼분획은 비수용성으로 DMSO에 용해된 상태로 물에 녹지 않으므로 액체배지가 아닌 고체배지를 사용하였다. MIC를 측정하기 위해 TSA를 미리 분주하여 굳힌 평판배지에 35°C, 24시간 동안 TSB (trypticase soy broth, DIFCO Co., Sparks, MD, USA) 액체배지에서 활성화시킨 *S. aureus* 균주(5×10^6 CFU/mL)를 각각 0.15 mL씩 도말하였다. 검정용 시료는 희석하여, 0.0625, 0.625, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 mg/mL로 만든 후, 항균력시험용 paper disc에 30 μL씩 점적한 후 TSA에 올려놓고 35°C에서 24시간 동안 배양한 다음 MIC를 측정하였다. MIC는 paper disc의 clear zone이 최초로 확인된 최저 농도로 결정하였다.

홍삼 비수용성 분획의 특성분석

홍삼 비수용성 분획의 항균활성을 조사를 위해 상기 진세노사이드 분석결과에서 주요한 peak에 대해서 High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS, Waters, MA, USA)로 물질의 질량을 추정하였다(Table 1). 분석에 사용한 용매는 HPLC급으로 Merk (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

Results and Discussion

조사포닌의 ginsenoside 함량

본 실험에 사용한 조사포닌의 진세노사이드 함량은 항균력시험에 사용한 개별 진세노사이드와의 차이를 검토하고 시료의 규격을 확보하기 위해 UPLC로 측정하였다. 조사포닌은 ginsenoside-Rg_1, -Rc, -Rf, -Rh_1, -Rg_2(s), -Rb_1, -Rc, -Rb_2, -Rd, -Rg_3(s), -Rg_3(r) 등 11종을 포함하고 있었으며 그 합은 181.4 mg/g (18.1%, dry base)이었고, 이중 ginsenoside-Rb_1 및 -Rg_3 함량이 각각 37.03 mg/g, 59.06 mg/g으로 가장 높았다. Ginsenoside-Rb_1, -Rb_2, -Rc, -Rd 및 -Rg_3는 PD계 사포닌으로서 여기에 속하는 사포닌은 일반적으로 대사억제 및 진정작용이 있다고 알려져 있

Table 2. The contents of ginsenosides of crude saponin from red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) (Unit: mg/g, dry base)

Ginsenosdes	Contents
-Rg_1	3.40±0.05
-Re	5.32±0.11
-Rf	9.00±0.11
-Rh_1	12.90±0.12
-Rg_2(s)	15.94±0.17
-Rb_1	37.03±0.57
-Rc	15.89±0.10
-Rb_2	13.85±0.30
-Rd	8.99±0.06
-Rg_3(s)	45.03±0.45
-Rg_3(r)	14.03±0.15
Total Sum	181.38±2.01

The values were means¡¾S.D. by three experiments.

으며, ginsenoside-Re, -Rf, -Rg_1, -Rh_1, -Rg_2 등이 포함되는 PT계 사포닌은 반대로 대사증진, 활성화 기능을 가진다고 보고된 바 있다[18]. 미생물 생육억제 효과에서도 PD계 및 PT계 사포닌의 효과에 대해서 세세한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 실험에 사용한 조사포닌은 전체 181.4 mg/g 중 PD계 사포닌 합은 134.8 mg/g으로 PT계 사포닌의 합 46.6 mg/g 보다 약 3배 정도 많은 것으로 분석되었다(Table 2).

홍삼농축액 및 조사포닌의 항균활성

홍삼농축액의 *E. coli* 및 *S. aureus*에 대한 항균활성을 시험한 결과, Gram 음성 세균인 *E. coli*에 대해서는 생육억제 효과가 관찰되지 않았으나, Gram 양성 세균인 *S. aureus*에 대해서는 300 mg/mL에서 항균효과가 관찰되었다(Table 3). 조사포닌의 경우도 홍삼농축액과 유사한 결과를 나타내어 홍삼농축액의 1/4 농도인 75 mg/mL에서 *S. aureus*에 대한 항균활성을 나타내었다(Table 3). *S. aureus*는 황색포도상구균, 황색포도알균 또는 화농균으로 지칭되는 식중독 유발세균으로서 100°C로 30분 가열해도 파괴되지 않는 독소를 생성하므로 일단 오염되어 증식하면 가열 처리하여도 식중독을 예방하기 어렵다[19]. 이 균은 식중독 유발균이면서 동시에 아토피성 피부염의 주요 원인균으로도 알려져 있다[20]. 아토피 피부염의 원인은 유전적 요인과 환경적 요인으로 나뉘어지는데 환경적 요인으로는 allergy, 음식, 스트레스, 미생물 등이 주요한 원인요소로 알려져 있다[12]. 이 균은 피부의 가려움증을 유발하며 긁으면 다시 상처에 세균이 감염되는 악순환을 반복하여 증상을 악화시킨다. 그러나 이 균의 제어하기 위해 아토피 환자들이 사용하고 있는 스테로이드제제는 부신 피질의 일종으로 강한 항염증 효과가 있어 피부염치료제, 호르몬제, 소염제, 진통제나 근육강장제 등으로 사용되고 있지만 장기간 복용시에는 간 손상, 심장 이상 등 부작용의 가능성이 보고되고 있다[9]. 또한 이 균주는 methicillin에 대하여 내성을 가지는 MRSA 및 vancomycine에 대해서 내성을 가지는 VRSA 등이 보고되어[8,10,12] 항생제 내성이 없는 천연항균제의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 이러한 측면에서 홍삼으로부터 천연 항균성 발현물질의 확인은 그 의의가 있다고 생각된다.

홍삼은 수삼을 일정시간 95°C로 증기 가열 후 건조하여 제조되고, 홍삼농축액은 홍삼을 80°C 이상의 온도에서 추출 (14~16시간) 및 농축하여 제조하므로[6,16], 홍삼농축액에서 항균활성이 관찰된 물질은 열 안정성이 매우 높은 물질로 추정된다. 홍삼농축액 및 조사포닌의 생육저해능력이 살균작용에 의한 것인지 정균작용에 의한 것인지 작용양상을 조사하기위해 살균성유무를 시험한 결과를 Table 4에 나타내었다. 홍삼농축액은 첨가농도가 증가할수록 생균수가 감소하여 10% 첨가구에서는 사멸율 91.5%로 급격한 균수 감소 현상을 관찰하였으나 균주는 완전히 사멸하지 않았다. 조사포닌의 경우도 첨가농도가 증가할수록 생균수가 감소하여 2% 첨가구에서 급격한 균수감소 (성장저해율 97.2%)를 나타내어 유사한 저해양상을 나타내었다. 일반적으로 sodium benzoate 같은 식품보존료는 살균제로 보지않고 정균제로 보고 있다. 이는 살균제(bacteriocidal action)는 미생물의 생육을 완전히 억제시켜 사멸시키는 작용을 말하지만 정균작용(bacteriostatic action)은 완전한 사멸상태에 이르지는 못하지만 균의 생육을 억제시켜 균수를 감소시키는 작용을 하기 때문이다. 정균작용에는 일부 생육가능한 균이 존재한다는 의미이다. 따라서 홍삼농축액 및 조사포닌에 의한 *S. aureus*의 생육저해효과는 살균작용이 아닌 정균작용으로 추정된다. 이러한 결과는 Kwak 등[15]의 홍삼사포닌의 대장균군(*Enterobacter* sp.)에 대한 생육저해 보고에서 조사포닌의 생육저해효과는 살균보다는 정균작용일 것이라는 사실과도 일치한다.

일반적으로 미생물에 대한 항균작용은 세포벽 합성저해, 단백질 합성저해, 핵산합성 저해, 세포막 기능손상 등 여러가지 작용기전이 알려져 있으며, 홍삼에는 polyphenol, polyacetylene, maltol, saponin 등 다양한 항산화 물질이 존재한다[5]. Park 등[21]도 미생물에 대한 생육저해 작용은 인삼에 함유된 사포닌이 세포막의 sterol과 결합하여 세포막의 손상을 통해 항균작용을 나타내는 것으로 추정한 바 있다. 사포닌은 양수성 물질(amphilic substance)로서 세포막 투과가 용이하므로 본 실험의 *S. aureus*에 대한 조사포닌의 항균효과도 세균의 세포막에 침투하여 세포막의 sterol과 결합 및 기질 투과성을 억제함으로써 항균효과를 나타내는 세포막의 기능손상 기전의 하나로 추정해 볼 수 있다. 그러나 이러한 작용기전을 명백히 규명하기 위해서는

Table 3. Anti-microbial activities of red ginseng extract, crude saponin, ginsenoside and non-water soluble fraction from Korean red ginseng against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*

Samples	Concentrations	Inhibition zone (mm)			
	mg/mL (final%)	*E. coli*	*S. aureus*	*C. albicans*	*A.niger*
Red ginseng extract	500 mg/mL(50%)	0	12	0	0
	300 mg/mL(30%)	0	9	0	0
	100 mg/mL(10%)	0	0	0	0
Crude saponin	300 mg/mL(30%)	10	15	0	0
	150 mg/mL(15%)	0	12	0	0
	75 mg/mL(7.5%)	0	10	0	0
PT saponin	200 μg/mL(0.02%)	0	0	0	0
PD saponin	200 μg/mL(0.02%)	0	0	0	0
Ginsenosie-Rb2	100 μg/mL(0.01%)	0	0	0	0
Ginsenoside-Rc	100 μg/mL(0.01%)	0	0	0	0
Ginsenoside-Rd	100 μg/mL(0.01%)	0	0	0	0
Ginsenoside-Rf	100 μg/mL(0.01%)	0	0	0	0
Ginsenoside-Rg2	100 μg/mL(0.01%)	0	0	0	0
HF-1	100 mg/mL(10%)	0	12	0	0
HF-2	50 mg/mL(5%)	0	18	0	0
HF-3	200 mg/mL(20%)	0	15	0	0
HF-4	100 mg/mL(10%)	0	19	0	0
HF-5	50 mg/mL(5%)	0	17	0	0
HF-6	25 mg/mL(2.5%)	0	17	0	0
HF-7	50 mg/mL(5%)	0	17	0	0
MF-1	50 mg/mL(5%)	0	29	0	0
MF-2	200 mg/mL(20%)	0	20	0	0
MF-3	100 mg/mL(10%)	0	20	0	0
MF-4	25 mg/mL(2.5%)	0	10	0	0
MF-5	10 mg/mL(1%)	0	10	0	0
Sodium benzoate	300 mg/mL(30%)	37	40	12	12
	20 mg/mL(20%)	35	39	11	11
	10 mg/mL(10%)	29	30	9	10

HF-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7: hexane fraction-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7.
MF-1,-2,-3,-4,-5: 15% Methanol fraction-1,-2,-3,-4,-5.
Sodium benzoate: positive control.

세균의 세포막 전자현미경 사진 및 sterol 결합유무 등 자세한 추가 작용기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ginsenoside의 항균활성

조사포닌의 경우 Table 3에 나타낸바와같이 *E. coli*에 대해서는 동일한 농도에서 항균효과가 관찰되지 않았지만 고농도인 50%에서만 항균활성을 나타내었다. 따라서 사포닌의 생육 억제효과를 확인하기 위하여 ginsenoside를 사용하여 paper disc법으로 항균활성을 조사한 결과, ginsenoside는 항균활성 검정농도인 50-200 μg/mL에서 모두 항균효과가 관찰되지 않았다. 일반적으로 100-1,000 μg/mL에서 항균성을 검정하고 여기서 저해효과가 관찰되지 않으면 항균활성은 없다고 판단되므로[1], ginsenoside는 *S. aureus*에 대해서는 항균활성을 가지지 않는 것으로 사료된다. 그러나 홍삼농축액 및 조사포닌은 Table 4및 Table 5에 나타낸 바와 같이 비교적 고농도인 홍삼농축액 50% 및 조사포닌 7.5%의 농도에서 명백한 항균활성을 나타내었고 또한 홍삼농축액 10% 및 조사포닌 2%에서도 생육

Table 4. Effects of red ginseng extract on viable cell counts and the percent of growth inhibition of *Staphylococcus aureus* (Unit: CFU/mL)

Condition	Red ginseng extract (%)						
	0	0.10	0.25	0.50	1.00	2.50	10.00
12 h	4.7×10^2	4.6×10^2	4.3×10^2	4.3×10^2	4.0×10^2	3.7×10^2	4.0×10^1
Growth inhibition (%)	0	2.1	8.5	8.5	14.9	21.3	91.5

Table 5. Effects of crude saponin on viable cell counts and the percent of growth inhibition of *Staphylococcus aureus* (Unit: CFU/mL)

Condition	Crude saponin (%)					
	0	0.10	0.25	0.50	1.00	2.00
12 h	4.7×10^2	4.3×10^2	3.7×10^2	2.3×10^2	1.3×10^2	1.3×10^1
Growth inhibition(%)	0	8.5	21.3	51.1	72.3	97.2

저해 효과를 나타내었다. 추후 조사포닌의 작용기전에 대해서는 ginsenoside 이외 비사포닌 성분의 활성규명 등 다양한 연구가 필요하다. 본 실험에서 Gram 양성인 *S. aureus*에 대해서 강한 항균효과를 나타내었다. 이것은 항균성물질의 작용양상이 Gram 양성 및 음성세균의 세포막 형태에 따라 차이가 있을 것으로 추정된다. 즉, Gram 음성세균은 그람 염색이 되지 않는 세균으로서 세포막이 약 10 nm 정도로 비교적 얇은 대신에 peptidiglycan층과 outer membrane층의 이중막으로 되어 있다. 대신에 Gram 양성세균은 세포막이 약 15-80 nm 정도로 Gram 음성세균보다 두껍지만 세포막이 peptidoglycan 단일층으로 되어있어[20] 본 홍삼 항균성물질의 작용이 비교적 용이하기 때문에 항균효과를 강하게 나타내는 것으로 판단된다. 또한 Ha 등[22]도 매실추출물이 *Vibrio vulnificus*에 대해 항균효과를 보이는 것은 매실에 함유된 isoeugenol, nomilin, β-sitosterol 및 citric acid 등이 미생물의 에너지대사와 세포막의 기질투과성을 억제하여 항균활성을 나타낸다고 보고한 바 있다.

홍삼 비수용성 분획의 항균활성

홍삼 비수용성 분획은 원료홍삼으로부터 알코올추출(95% methanol) 및 methylene chloride로 비수용성 물질을 분리하여 헥산 및 15% methanol의 분획화에 의해 헥산 분획 7종, 15% methanol 분획 5종을 얻었다. 비수용성 분획에 대한 사포닌 유무를 조사하기 위하여 TLC로 분석한 결과 사포닌은 검출되지 않아서 비사포닌 성분으로 확인되었다 (data not shown). 대상 미생물 4종 Gram 음성 세균 *E. coli*, Gram 양성 세균 *S. aureus* 이었고 효모 *C. albicans*, 곰팡이 *A. niger*에 대해 paper disc를 이용한 항균활성을 측정한 결과, *S. aureus*에 대해서는 홍삼 비수용성 분획(12종) 모두 항균활성을 나타내었다. 반면에 *E. coli* 및 *C. albicans*, *A. niger*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다(Table 3). 홍삼 비수용성 분획 중에서는 15% methanol 분획(MF-1)이 가장 강한 항균효과를 나타내었다. 따라서 홍삼에서 조제된 비수용성 분획의 항균성물질이 균종에 따른 작용양상이 차이가 나는 것은 홍삼농축액 및 조사포닌과 마찬가지로 Gram 음성세균 및 Gram 양성세균의 세포막 구성성분의 차이로 인한 감수성이 차이 때문인 것으로 사료된다.

홍삼 비수용성 분획 (MF-1) 최소억제농도(MIC)

최소억제농도(MIC)는 paper disc method[17]를 이용하여 측정한 결과, MF-1은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *S. aureus*에 대해 0.625 mg/mL 이상의 농도에서는 clear zone이 관찰되었지만 그 이하의 농도에서는 관찰되지 않아서 MIC는 0.625 mg/mL로 판단된다. 고려홍삼으로부터 분리된 비수용성 MF-1은 원료홍삼으로부터 최종산물의 수율은 0.005%(홍삼 5 kg → MF-1 0.25 g)이었다. 본 분획의 수율은 매우 낮기 때문에 추후 상업적 활용 가능성 등을 고려하면 좀더 많은 검토가 필요할 것으로 생각되지만, 본 실험은 홍삼으로부터 *S. aureus*에 대한 항균성물질을 최초로 확인하였다는 측면에서 그 의의가 있다. 기존 연구결과 인삼의 methanol 추출물 중 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성은 ethyl ether 및 ethyl acetate 분획에서 관찰되었으며 그 활성물질은 polyacetylene 계통으로 MIC는 0.05 mg/mL 이라고 보고된 바 있다[23]. 본 실험에서도 사포닌 이외의 비사포닌 성분이 균주 억제 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

MF-1 성분특성

분자량 특성을 조사하기 위해 UPLC 및 HPLC-MS로 분석한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 MF-1 분획은 2개의 주요한 peak (RT 8.11, RT 14.63)와 5에서 7개의 작은 minor peak로 구성되어 있었다. 주요한 2개의 peak를 질량분석기(HPLC-MS)로 분석한 결과 각각 분자량 179.55 및 187.55를 가지는 소분자량의 물질로 추정되었다. 인삼에는 항암효과를 나타내는 panaxynol, panxydol, panaxytriol 등과 같은 폴리아세틸렌화합물과 항산화활성을 나타내는 salicylic acid, cinnamic acid, vanilic acid, maltol, ferulic acid, caffeic acid, p-coumaric acid 같은 성분이 함유되어

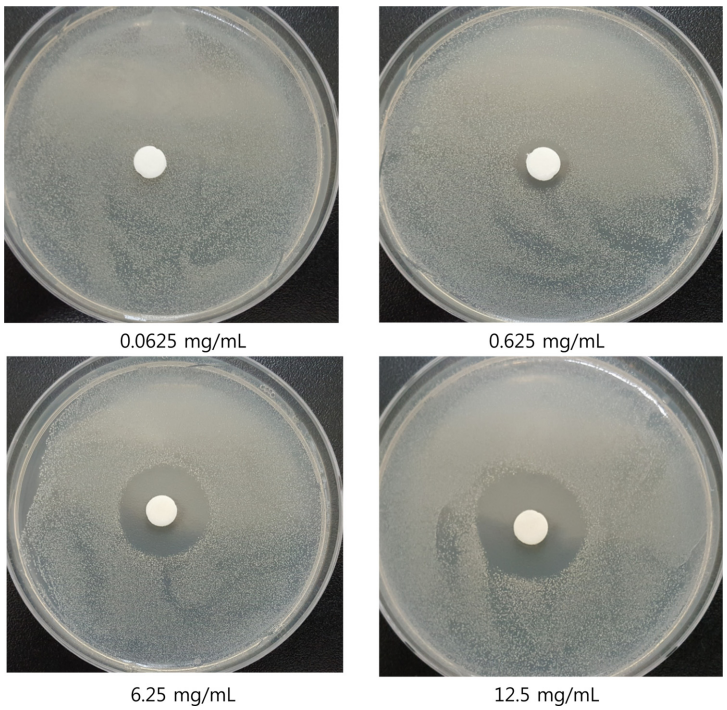

Fig. 1. Anti-bacterial activity photographies of MF-1 fraction from red ginseng for minimal inhibitory concentration against *Staphylococcus aureus*. The MF-1 fraction (15% methanol fraction) were loaded 30 μL per paper disc (8 mm).

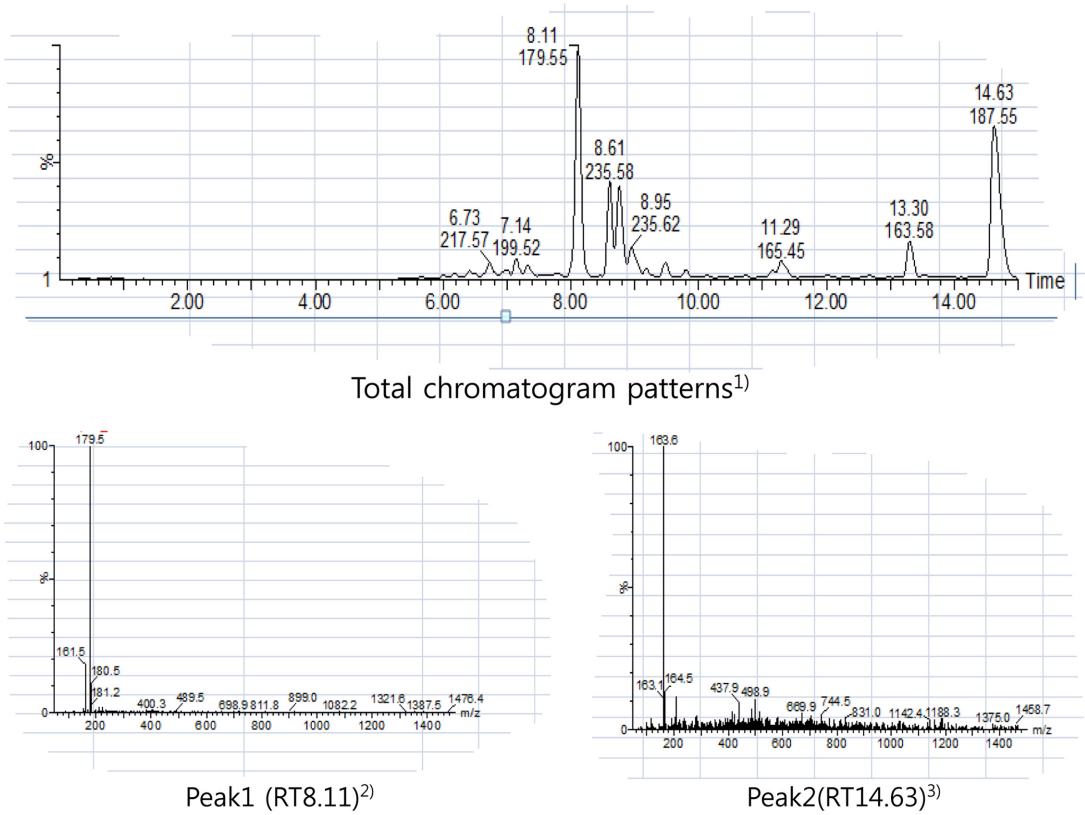

Fig. 2. Chromatograms patterns of MF-1 fraction from red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) by UPLC and HPLC-MS.
[1)]Total chromatogram patterns was objected by UPLC.
[2)]Peak1 (RT8.11) was estimated as molecular weight 179.55 by HPLC-MS.
[3)]Peak2 (RT14.63) was estimated as molecular weight 187.55 by HPLC-MS.

있으며 특히 이들 중 polyacetylene 성분은 식물병원균에 대해서 항진균작용을 한다는 사실이 보고된 바 있다[23]. 또한, 고려홍삼 분말 100 g 중에는 panaxydol, panaxynol, panaxytriol이 각각 25.0 mg, 29.7 mg, 32.0 mg 함유되어 있다고 보고되고 있다[24]. 그러나 이들의 분자량은 각각 244.37, 260.37, 278.38로 본 실험에서 분석된 분자량 179.55 및 187.55 와는 크게 상이하므로 다른 물질로 생각된다. 인삼에 함유된 항산화 성분인 vanilic acid, cinnamic acid, caffeic acid, syringic acid 등의 분자량이 168.15-198.17 정도인 것을 감안하면 오히려 polyacetylene 보다는 저분자량의 항산화물질과 유사한 것으로 추정된다. 그러나 추후 활성물질의 자세한 물질규명은 순수분리 및 정제한 성분을 가지고 수행하는 구조동정 연구를 통해서 지속적으로 밝혀야 할 것으로 사료된다.

국문요약

S. aureus, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger* 등 4종의 식중독균에 대해 agar diffusion법을 이용하여 홍삼(*Panax ginseng* C.A.Meyer)으로 부터 조제한 홍삼농축액, 조사포닌, 비수용성 분획에 대한 항균활성을 조사하였다. 그 결과, 홍삼농축액 및 비수용성분획은 *E. coli, C. albicans, A. niger*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았고 조사포닌도 고농도인 30%를 제외한 모든 농도에서 항균활성을 나타내지 않았다. *S. aureus*는 Gram positive 세균으로서 화농성 식중독의 원인균이면서 동시에 아토피성 피부염의 원인균으로 알려져 있는데, 홍삼농축액은 30% 농도에서 이 균에 대해 항균활성을 나타내었고 조사포닌도 7.5%에서 항균활성을 나타내었다. 홍삼으로부터 조제한 비수용성 분획도 10~200 mg/mL 농도로 실험한 결과 모든 분획에서 항균효과를 나타내었다. 조사포닌 및 홍삼농축액의 미생물 생육저해양상을 조사하기 위해 미리 *S. aureus*를 접종한 0.85% 생리식염수에 농축액 및 조사포닌을 농도별로 첨가하고 35°C, 12시간 배양한 후 생균수를 측정한 결과, 홍삼농축액은 10% 이상의 농도에서, 조사포닌은 2% 이상의 농도에서 각각 균의 생육을 억제하였다. 그러나 이러한 농도에서도 생균수는 완전히 사멸되지 않아서 홍삼농축액 및 조사포닌의 *S. aureus*에 대한 생육억제작용은 살균작용이 아닌 정균 작용으로 추정되었다. 사포닌의 항균활성 유무를 확인하기 위해 순수 분리된 ginsenoside 6종(PT saponin, PD saponin, ginsenoside-Rb_2,-Rc,-Rd,-Rf,-Rg_2)의 항균활성을 50~200 μg/mL의 농도에서 조사한 결과 모두 항균효과가 관찰되지 않아서 ginsenoside는 *S. aureus*에 대해서는 항균효과가 없는 것으로 사료된다. 한편 사포닌을 제외한 비사포닌 성분인 비수용성분획에 대해 상기의 4종 병원성미생물을 대상으로 항균활성을 조사한 결과 *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*에 대해서는 항균효과가 관찰되지 않았고 *S. aureus*에 대해서만 선택적인 항균활성을 나타내었다. 항균활성 발현 비수용성분획 중 15% methanol분획(MF-1)이 가장 높은 항균활성을 나타내어 이에 대한 최소생육저해농도를 조사한 결과 0.625 mg/mL 이었다. MF-1 분획을 질량분석기(HPLC-MS)로 조사한 결과 주요한 활성성분은 분자량 179.55 및 187.55를 가지는 물질로 추정되었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Byeung-Il Yu https://orcid.org/0000-0001-8708-294X
Yi-Seong Kwak https://orcid.org/0000-0002-0596-8622
Min-Woo Han https://orcid.org/0000-0002-0805-5343
Kyoung-Hwa Jang https://orcid.org/0000-0002-5414-8284
Myung-Gyun Jung https://orcid.org/0000-0001-6631-6364

References

1. Kwak, Y.S., Yang, J.W., Lee, K.S., Screening herb drugs showing antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms. *Kor. J. Food Hygiene,* **8**(3), 141-145 (1993).
2. Lee, S.Y., Use and perspective views of oriental herbs in food industry. *Food Ind. Nutr.,* **5**(3), 21-26 (2000).
3. Lee, J.M., Lee S.H., Kim H.M., Use of oriental herbs as medicinal food. *Food Ind. Nutr.,* **5**(1), 50-56 (2000).
4. Korea Food Industry Association, 2016. Korea Food Standard Codex, Kyungsungmunhwa Press, Seoul, Korea, pp. 325-330.
5. Korea Food Drug and Administration, 2012. Functional Food Codex. Seoul, Korea. pp. 50-53.
6. In, G., Ahn, N.G., Bae, B.S., Lee M.W., Park, H.W., Jang, K.H., Cho B.G., Han, C.K., Park, C.K., Kwak, Y.S., *In situ* analysis of chemical components induced by steaming between fresh ginseng, steamed ginseng and red ginseng. *J. Ginseng Res.,* **41**, 361-369 (2017).
7. Park, E.H., Jeong G.Y., Distribution of enterotoxin type in *staphylococcus aureus* isolates from stool samples. *Rep. Busan inst. Health & Environ*., **14**, 28-43 (2004).
8. Ministry of Health and Welfare, Prevalence and epidemiologic characteristics of antimicrobial resistant organisms in community: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among the elderly in long-term-care facilities. Final Report (2003).
9. Hyun, S.H., Kim, E.S., Lee, S.M., Kyung, J.S., Lee, S.M., Lee, J.W., Kim, M.R., Hong, J.T., Kim, Y.S., Comparative study on immune-enhancing effects of red ginseng fractions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **43**(11), 1665-1673 (2014).

10. Lee, J.Y., Wang, H.J., Shin, D.B., Cho, Y.S., Antibiotic resistance and bacterial film formation by *Staphylococcus aureus* strains isolated from various foods. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**(1), 96-104 (2013).
11. Kim, M.R., Woo, S.E., Shin, S.O., Hong, S.M., Yang, S.Y., A study on the distribution of *Staphylococcus aureus* in atophic dermatitis. *J. Soc. Cosmet. Sci., Korea*, **32**(2), 93-97 (2006).
12. Kim, A.N., Cho, J.I., Son, N.R., Choi, W.S., Yoon, S.H., Shu, S.H., Kwak, H.S., Joo, I.S., Development of a predictive model describing the growth of *Staphylococcus aureus* in pyeonyuk marketed. *J. Food Hyg. Saf*., **32**(3), 206-210 (2017).
13. Park, Y.O., Lim, H.S., Antimicrobial activity of Bamboo (*Sasa borealis*) leaves fraction extracts against food poisoning bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*., **39**(12), 1745-1752 (2010).
14. Lee, S.M, Bae B.S., Park, H.W., Ahn, N.G., Cho, B.G., Cho, Y.L., Kwak, Y.S., Characterization of Korean red ginseng (*Panax ginseng* C.A.Meyer): history, preparation method and chemical composition. *J. Ginseng Res*., **39**, 384-391 (2015).
15. Kwak, Y.S., Lee, J.T., Yeo, W.H., An identification of *Enterobacter* sp. isolated from contaminated ginseng and inhibition effect of ginseng saponin on its growth. *J. Food Hyg. Saf.,* **17**(1), 26-30 (2002).
16. Kim, S.K., Kwak, Y.S., Kim, S.W., Hwang, S.Y., Ko, Y.S., Yoo, C.M., Improved method for the preparation of crude ginseng saponin. *J. Ginseng Res.,* **22**(3), 155-160 (1998).
17. Beach, F.W., Davenport, R.R., Methods in Microbiology. Vol. **4**, Academic Press London and New York, pp. 153 (1971).
18. Nam, K.Y., 1996. The latest Korean ginseng (Component and Efficacy). The Korean ginseng research institute, Chunil Publishing Company, Daejeon, Korea, pp. 25-31.
19. Ko, M.S., Yang, J.B., Effect of heating temperature on antimicrobial activities of garlic juice. *Korean J. Food Preserv.*, **15**, 568-575 (2008).
20. Kang, Y.H., 2014. Life Science Dictionary, Yeocho Press, Seoul, Korea, pp.150.
21. Park, C.K., Kwak, Y.S., Hong, S.K, Lee, H.S., Hwang, M.S., Won, J.Y., Han, G.H., Inhibitor effect of ginseng saponin on the growth of *Citrobacter* sp, isolated from contaminated ginseng. *J. Ginseng Res.,* **32**(3), 270-274 (2008).
22. Ha, T.M., Jeon, D.Y., Im, H.C., Yoon, Y.H., Shin, M.Y., Yoon, K.B., Kim, J.B., Antimicrobial activity of Maesil (*Prunus mume*) extract against *Vibrio vulnificus*. *J. Food Hyg. Saf.,* **32**(2), 163-169 (2017).
23. Bae, E.A., Han, M.J., Baek, N.I., Kim, D.H., In vitro anti-helicobacter pylori activity of panaxatriol isolated from ginseng. *Arch. Pharm Res.,* **24**(4), 297-299 (2001).
24. Matsunaga, H., Kanano, M., Yamamoto, H., Fujito, H., Mori, M., Takata, K., Studies on the panaxytriol of *Panax ginseng* C.A. Meyer, isolation, determination and antitumor activity. *Chem. Pharm. Bull*., **37**(5), 1279-1281.