

## 목초액의 항균 및 DPPH 라디칼 소거 활성에 관한 연구

이 경 민 · <sup>1</sup>정 귀 택 · <sup>2,3†</sup> 박 돈 회  
전남대학교 물질·생물화학공학과, <sup>1</sup>공업기술연구소, <sup>2</sup>생명과학기술학부, <sup>3</sup>생물공학연구소  
(접수 : 2004. 9. 4., 게재승인 : 2004. 10. 23.)

## Study of Antimicrobial and DPPH Radical Scavenger Activity of Wood Vinegar

Kyoung-Min Lee, Gwi-Taek Jeong<sup>1</sup>, and Don-Hee Park<sup>2,3†</sup>

Department of Material Chemical & Biochemical Engineering,

<sup>1</sup>Engineering Research Institute, <sup>2</sup>School of Biological Sciences and Technology,

<sup>3</sup>Biotechnology Research Institute, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2004. 9. 4., Accepted : 2004. 10. 23.)

The antimicrobial and antioxidative activities were investigated to confirm the utility of wood vinegar. Antimicrobial activity was performed by paper disc method and liquid culture. The growth inhibition was observed in all microbial species at a dose of as low as 25  $\mu$ L of wood vinegar by paper disc method. Also, in liquid culture, *S. cerevisiae* and *P. aeruginosa* were more inhibited the growth than others in the concentration of 2% (v/v). For measuring of antioxidative activity, wood vinegar was fractionated with acidic, phenolic, basic and neutral fraction; and their antioxidant activities were measured by the radical scavenging effect on DPPH radical. In four fractions, phenolic fraction showed high antioxidative activity.

**Key Words** : Antimicrobial activity, antioxidative activity, phenolic fraction, wood vinegar

### 서 론

모든 생물체들은 생체 내에서 에너지 생산을 위한 산소 이용과정에서 활성산소가 생성된다. 이들 활성산소는 생체 내 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) 등과 같은 효소기작에 의해 대부분 소멸이 되지만 과량의 활성산소나 지속적인 활성산소 생성으로 항산화 방어제와의 균형이 깨지게 되면 각종 질환을 일으키게 된다. 유해산소로 알려져 있는 활성산소는 가장 안정한 형태인 삼중항산소 ( $^3O_2$ )가 환원되면서 super oxide radical ( $O_2\cdot$ ), 과산화수소 ( $H_2O_2$ ), hydroxy radical ( $\cdot OH$ ), 지질 peroxide (ROOH)이나 여기에서 생기는 free radical ( $ROO\cdot$ ,  $RO\cdot$ ) 등의 과산화지질로서 이러한 활성산소의 과산화지질이 정상적으로 소거되지 않을 때 free radical로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에서 생기게 된다(1). 이러한 산화적 스트레스는 생체막의 필수 구성성분인 불포화지방산의 탄소사

슬을 공격하여 microsome, mitochondria, lysosome의 막을 손상시키고, 과산화물은 DNA와 RNA에 작용하여 생화학적 변화를 초래하여 각종 질병 및 노화촉진의 원인이 된다(2). 활성산소의 독성을 억제하기 위한 항산화성 물질로는 ascorbic acid, tocopherol, carotenoid, flavonoid, glutathione 등의 천연 항산화제와 butylated hydroxy anisol (BHA) 및 butylated hydroxy toluene (BHT) 등 합성 항산화제가 있다. 천연항산화제는 비교적 항산화력이 낮고, 합성항산화제의 경우 생체효소나 지방에 대한 변이원성 및 독성으로 인해 인체에 암을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다(3, 4). 따라서, 천연자원에서 쉽게 얻을 수 있고 인체에 무해하면서 높은 항산화력을 갖는 물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 또한, 현대 생활양식의 변화로 장기간 식품 보존의 필요성이 커지고 있으며, 이에 인체에 무해한 천연 항균·보존제의 개발이 요구되고 있다. 식품의 부패와 변질은 오염된 미생물의 유형과 양뿐만 아니라, 화학적 구성성분에 영향을 받으며, 이를 방지하기 위한 각종 보존제의 사용이 증가하고 있다. 천연물에 존재하는 생리활성을 나타내는 물질 중 식품의 부패와 변질을 유발하는 미생물에 대하여 항균 활성을 나타내는 물질은 alkaloid, terpenoid, phenol 및 정유 성분과 같은 이차 대사산물이거나 그 유도체들로 알려져 있다(5). 이러한 생리활성 물질은 단백질과 결합하여

† Corresponding Author : School of Biological Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1841, Fax : +82-62-530-1849

E-mail : dhpark@chonnam.ac.kr

미생물 세포의 성장 저해를 유발시킴으로써 항균효과를 나타내고 있으며, 항알레르기, 항종양, 항암, 충치방지, 항암효과가 제안되고 있다(6).

목초액은 목재를 500~700℃에서 탄화시킬 때 발생하는 연기와 수증기를 포집하여 냉각·응축시켜 다시 30일에서 길게는 1년 이상 상온에서 숙성·정제시키면 3개 층으로 분리하여 얻을 수 있으며(7), 이 중 중간층이 주로 이용된다. 목초액은 항균, 보존성 향상, 항산화 효과, 가공식품의 향취개선 등의 목적으로 식품첨가제로 이용되어져 왔고, 농업용으로 토양살균 및 축산분뇨의 탈취, 작물의 해충기피, 퇴비 발효촉진, 식물생장, 뿌리생육 촉진의 목적으로 이용되고 있다. 목초액의 주요 성분은 보통 물이 80~90%를 차지하고 나머지가 유기물인데, 유기물중에서는 산류, 페놀류가 주 성분을 이루고 카르보닐 화합물, 중성 및 염기성 성분을 함유하고 있다(8, 9). 하지만 목초액의 성분별 유용성은 잘 알려져 있지 않은 상태이다. 본 연구는 목초액의 항균 활성 및 항산화 활성을 측정하여 그 유용성을 밝히고자 하였다.

**재료 및 방법**

**재료 및 균주**

실험에 사용한 목초액은 경남사천소재 "지리산참숯마을"에서 공급받아 여과지(Whatman, No.1, England)로 여과하여 암소냉장(4℃) 보관하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* 2K 0201, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Rhalella aquatilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio vulnificus* M06-2410, *Candida bombicola* ATCC 11858을 사용하였다. 항균성 측정에는 Muller Histon II 배지(Merck, USA)를 사용하였다.

**항균 활성**

항균 활성 검정은 각각의 실험균주 200 μL (6 × 10<sup>7</sup> CFU/mL)가 도말된 Muller Histon II 고체배지에 멸균된 직경 8 mm의 paper disc (Toyo Roshi Kaisa, Ltd, Japan)를 고체배지위에 3~5개를 올려놓고 미리 준비된 농도의 목초액을 25 μL씩 점적한 후, 34℃에서 24시간 배양 후 생성된 생육저지환의 크기를 측정하여 항균 활성을 검정하였다(10).

목초액 첨가 농도에 따른 항균성 측정은 각각의 실험균주가 접종된 액체배지에 목초액 0~10% (v/v) 그리고 대조구로 증류수를 동량 첨가하여 120 rpm, 34℃에서 24시간 동안 배양하면서 각 균주에 따른 성장저해를 측정하였다. 목초액에 의한 성장저해는 배양액의 흡광도를 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 측정된 값으로 나타내었다(10).

**항산화 활성**

**추출 및 분획**

여과한 목초액 시료를 500 mL 용량의 분액여두에 넣고 추출용매로 에테르를 동량 가해 추출한 후, 회전식중발기(N-1000, EYELA, Japan)를 사용하여 농축추출물을 얻었다. 얻어진 추출물은 Fig. 1과 같이 산성분획(acidic fraction), 페

놀성분획(phenolic fraction), 염기성분획(basic fraction) 및 중성분획(neutral fraction)으로 분획하였다. 산성분획은 추출물에 5% NaHCO<sub>3</sub>를 동량 가한 후 하층부를 분리하고, 여기에 10% HCl 수용액을 사용하여 산성 pH 2로 조절한 다음 에테르로 추출하여 산성분획을 얻었다. 추출 후 남은 층에 5% NaOH를 동량 가한 후 분리된 하층부에 10% HCl 수용액을 사용하여 산성 pH 2로 조절한 다음 에테르로 추출하여 페놀분획을 얻었다. 남은 상층부에 5% HCl을 동량 가한 후 분리된 하층부에 2M NaOH 수용액을 사용하여 pH 11로 조절한 다음 에테르로 추출 분리하였다. 남은 여액은 중성분획으로 사용하였다.

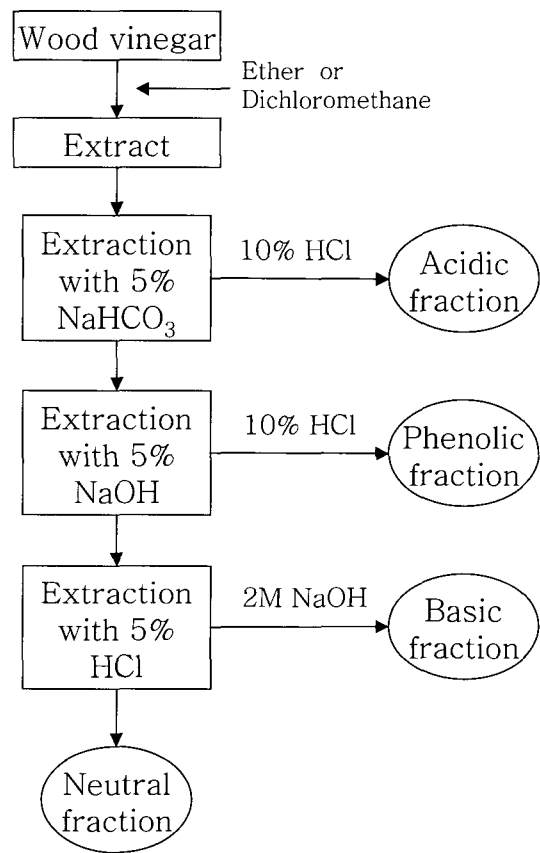


Figure 1. Schematic diagram of fractionation of wood vinegar.

**항산화 활성 측정**

각 추출 분획의 항산화 활성 측정은 hydrazyl에 불안정한 상태의 질소원자가 수소원자를 받아들이는 성질을 이용해 항산화물질과 반응하여 자체의 정색성을 소실하는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 특성을 이용한 방법으로 측정하였다. 각 시료를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 200 μg/mL, 100 μg/mL, 50 μg/mL, 25 μg/mL, 12.5 μg/mL의 농도로 제조하여 각각 100 μL를 취하여 여기에 500 μM의 DPPH 100 μL를 각각 넣어 37℃에서 30분간 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 동량의 DMSO를 첨가하여 반응 후 얻은 값으로 사용하였다. DPPH의 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 다음 식으로 계산하였다(3, 7).

$$EDA (\%) = \frac{B-A}{B} \times 100$$

- A : 517 nm에서 시료의 흡광도
- B : 517 nm에서 대조구의 흡광도

각 시료의 EDA (%)을 바탕으로 흡광도를 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 양 ED<sub>50</sub> (μg/μL)을 구하고, BHA, BHT, ascorbic acid와 비교하여 항산화 활성을 비교하였다.

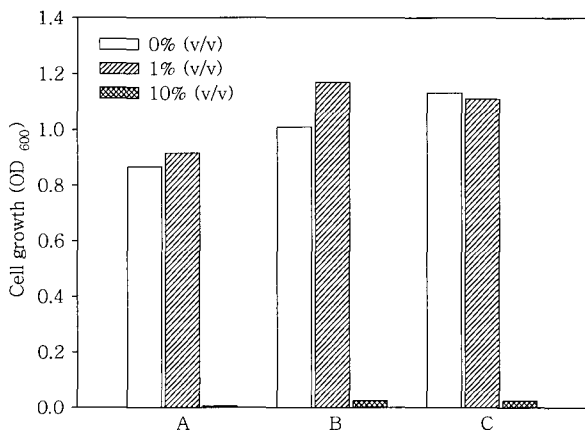
### 결과 및 고찰

#### 항균 활성 검증

25 μL 목초액을 식품부패균 및 식중독균 등을 대상으로 미리 제조한 항균 시험용 고체배지에 점적한 후 여러 균들에 대해 항균 활성을 조사한 결과 Table 1과 같이 모든 미생물에 대하여 항균 활성이 나타남을 확인할 수 있었다. *S. cerevisiae*와 *P. aeruginosa*와 같은 미생물에서 매우 큰 생육 저지환이 나타났으며, 특히 병원성 균 *S. aureus*와 *V. vulnificus*에서 생육저지환이 1.0~1.3 cm의 크기로 나타나 병원균에도 항균 활성이 있음을 확인하였다. 하지만, *E. coli*나 *B. cereus*, *C. bombicola*의 경우 다른 미생물에 비해 생육저지환의 크기가 크게 나타나지 않음을 확인할 수 있다.

**Table 1.** Antimicrobial activity of wood vinegar by paper disc diffusion method

Test strains	Clear zone (Unit : cm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1.00
<i>Bacillus cereus</i> 2K 0201	0.95
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.47
<i>Candida bombicola</i> ATCC 11858	0.90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1.53
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.33
<i>Vibrio vulnificus</i> M06-2410	1.23

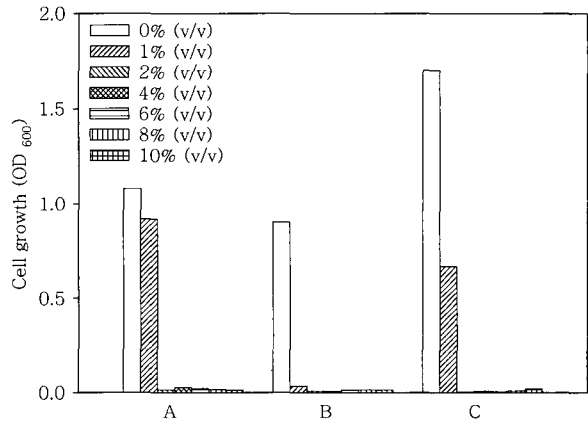


**Figure 2.** Effect of wood vinegar on antibacterial activity by liquid culture in 34°C for 24 hr. A : *V. vulnificus* B : *P. aeruginosa* C : *S. aureus*.

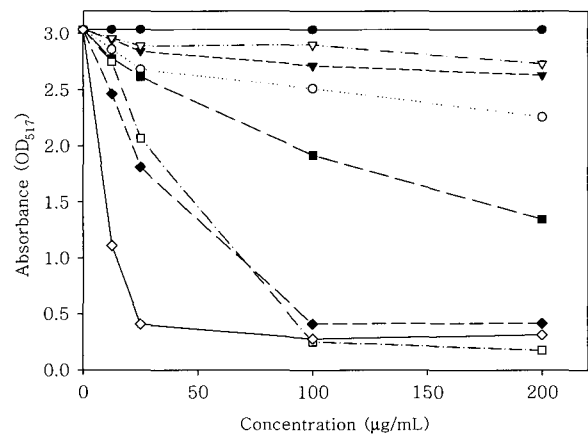
#### 목초액 농도에 따른 항균성 측정

각각의 균주에 일정농도의 목초액을 첨가하여 시간에 따라 성장 저해를 관찰하였는데, Fig. 2와 같이 *V. vulnificus*의 경우 10% (v/v)는 미생물 증식이 전혀 일어나지 못했으며, 1%의 경우 미생물 증식에 영향을 주지는 못했으며 목초액의 색도에 의해 대조구의 경우보다 흡광도 값이 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 전체적으로 10%의 경우 모든 미생물에서 완전 생육저해효과를 확인할 수 있었고, 1%의 경우 미생물에 따라 생육저해 효과가 전혀 없는 균과 부분적으로 나타나는 균으로 차이를 보였다.

목초액의 농도를 0~10% (v/v)까지 농도를 달리하여 농도에 따른 성장저해 정도를 약 24시간 배양 후 관찰해 본 결과, Fig. 3에서와 같이 대부분의 균에서 목초액 2% 이상의 경우에 완전저해를 나타내었다. 1%의 경우 균에 따라 저해 활성에 차이를 보이고 있지만, 증류수를 첨가했을 경우의 약 50%에 해당하는 미생물 저해가 나타났다.



**Figure 3.** Effect of wood vinegar on antibacterial activity concentration by liquid culture in 34°C for 24hr. A : *E. coli* B : *C. bombicola* C : *B. cereus*.



**Figure 4.** Absorbance change by DPPH radical scavenging activity of each fraction of wood vinegar (●- control, ○- acidic fraction, ▼- basic fraction, ▽- Neutral fraction, ■- phenolic fraction, □- ascorbic acid, ◆- BHA, ◇- BHT).

### 목초액의 추출 및 분획

목초액 시료를 에테르로 추출하여 얻은 추출물을 산성, 페놀성, 염기성, 중성 분획으로 분리하였다. 분획별로 페놀성 분획의 양이 가장 많았으며, 염기성 분획이 가장 적었다.

### 항산화 활성

농도에 따른 각 시료의 흡광도를 비교한 결과, Fig. 4에 나타난 것과 같이 ascorbic acid가 가장 낮은 값을 나타내었으며, BHT는 낮은 농도에서도 비교적 높은 라디칼 소거활성을 보였다. 하지만 목초액의 산성분획, 염기성분획, 중성분획은 비교적 흡광도의 변화가 없었다. 페놀성 분획의 흡광도 변화는 ascorbic acid나 BHA, BHT의 값에 미치지 못하는 수준이었지만, 목초액의 다른 분획에 비해 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서 흡광도 변화가 뚜렷했다.

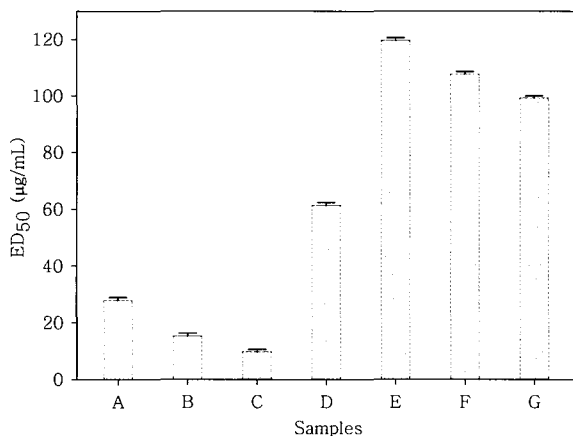


Figure 5. DPPH radical-scavenging activity of wood vinegar fraction (A: acidic fraction, B: basic fraction, C: neutral fraction, D: phenolic fraction, E: ascorbic acid, F: BHA, G: BHT).

전자공여작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화 억제 및 활성라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용된다. Fig. 5에 나타난 것과 같이 같이 ED<sub>50</sub> 값을 비교한 결과, ascorbic acid가 119.7로 가장 높았으며, BHA와 BHT가 각각 107.7 및 99.3으로 높은 항산화력을 나타내었다. 목초액의 페놀성 분획은 ED<sub>50</sub>이 61.5를 보였으며, 이는 ascorbic acid나 BHA 등에 비해 낮은 값이지만, 목초액의 나머지 분획인 산성, 염기성, 중성분획보다는 높은 ED<sub>50</sub> 값을 나타내어 페놀성 분획에 항산화 활성을 띄는 물질이 다량 함유되어 있음을 나타내었다. 이러한 결과는 목초액의 페놀성 분획을 활용하여 천연항산화성이 요구되는 분야에 응용이 가능하리라 생각된다.

### 요 약

본 연구에서는 참나무 목초액에 대한 항균·항산화 활성에 대해 연구하였다. 참나무 목초액을 이용하여 식중독에 원인이 되는 *B. cereus*나 포도상구균, 폐혈증의 원인이 되는 *V. vulnificus*등과 같은 병원성 균과 일반 미생물에 대한 항균효과를 실험하였다. Paper disc법에 의한 항균검정에서는 거의 모

든 균에 대해 생육저지환이 나타났다. 또한 목초액의 농도에 따른 항균 활성은 균주에 따라 다르지만, 2% (v/v) 이상에서 뚜렷한 항균 활성을 나타내었다. 목초액을 산성, 페놀성, 염기성, 중성 분획으로 각각 나누어 DPPH를 이용한 라디칼 소거능 이용한 항산화 활성을 측정하여 ED<sub>50</sub> 값으로 비교한 결과, 대조군인 ascorbic acid가 가장 높았으며, BHA와 BHT도 높게 나타났다. 목초액의 분획에서는 페놀성 분획에서 항산화력이 가장 높게 나타났다. 그러나, 산성분획 및 염기성, 중성분획에서는 뚜렷한 항산화 활성은 나타나지 않았다.

### REFERENCES

1. Cha, B. C., H. W. Lee, and M. Y. Choi (1998), Antioxidative and antimicrobial effects of nut species, *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 28-34.
2. Shin, C. H. (2001), Studies on the antioxidative character in the ethyl acetate extractions of *Rumex crispus*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 592-602.
3. Jeong, S. J., J. H. Lee, N. H. Song, S. N. Seong, S. E. Lee, and N. I. Baeg (2004), Natural products, organic chemistry ; screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 135-140.
4. Lee, A. K. and H. Y. Chung (2004), Biological activities of a korean traditional prescription, *Nogyondaebotang*, *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.* **33**, 28-33.
5. Song, J. H., M. J. Kim, H. D. Kwon, and I. H. Park (2003), Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root, *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.* **32**, 1053-1058.
6. Choi, O. K., Y. C. Noh, and S. Y. Hwang (2000), Antimicrobial activity of grapefruit seed extracts and polylysine mixture against food-borne pathogens, *Korean J. Dietary Culture* **15**, 9-15.
7. Seo, K. I., K. J. Ha, Y. I. Bae, J. K. Jang, and K. H. Shim (2000), Antimicrobial activities of oak smoke flavoring, *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **7**, 337-341.
8. Lee, F. Z., S. H. Choi, and J. B. Eun (2002), The nitrite scavenging and electron ability of bamboo smoke distillates made by steel kiln and earth kiln, *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 719-724.
9. Kim, Y. H., S. K. Kim, K. S. Kim, and Y. H. Lee (2001), Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 262-268.
10. Park, D. H., G. T. Jeong, S. W. Yang, B. Hwang, H. G. Woo, J. H. Rhee, and Y. I. Joe (2001), On the study of useful secondary metabolites using plant hairy root cultures - effects of antimicrobial and disinfectant activity of allylisothiocyanate -, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 360-364.
11. Seo, G. W., J. Y. Cho, J. H. Kuk, J. H. Wee, J. H. Moon, S. H. Kim, and K. H. Park (2003), Identification of antioxidative substances in *Allium fistulosum* L. by GC-MS, *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 988-993.