생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
48(1) : 51 ~ 55 (2017)

독활 부정근의 항산화 및 항균활성

심수진 · 김나현*
국립산림과학원 산림약용자원연구소

Antioxidant and Antibacterial Activity of Adventitious Roots from *Aralia continentalis* Kitagawa

Su Jin Sim and Nahyun Kim*
Forest Medicinal Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Gyeongsangbuk-do 36040, Korea

Abstract – *Aralia continentalis* Kitagawa (Araliaceae), known as "Dokwhal" in Korea, has been widely used in traditional Korean medicine for analgesia, neuralgia, sweating, and rheumatism. The biological activity was estimated with methanol extracts of from cultivated roots and adventitious roots of *A. continentalis*. DPPH and ABTS activities showed the highest activity in methanol extract of adventitious roots at 175.6 and 279.7 μg/mL (RC_{50}), respectively. Antioxidant activity of methanol extract of the adventitious roots was higher than other samples. In the antibacterial activity assay (paper disc method), the methanol extract of adventitious roots showed activity against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *S. enterica*. This study demonstrated that adventitious roots of *A. continentalis*, which was produced for the first time in the roots of *A. continentalis*, can be used as a natural antioxidant and antibacterial agents.

Keywords – *Aralia continentalis*, Araliaceae, Adventitious roots, Antioxidant activity, Antibacterial activity

독활(*Aralia continentalis* Kitagawa)은 쌍떡잎식물 산형화목 두릅나무과의 다년생 초본으로 우리나라를 포함한 동아시아 지역의 산지에 널리 분포한다. 높이는 1.5 m까지 자라고, 꽃을 제외한 식물 전체에 짧은 털이 있으며, 잎은 달걀모양 또는 타원형으로 잎 밑은 둥글거나 심장모양이며 끝은 날카롭고 가는 톱니가 있다.[1] 약용부위인 뿌리는 진통, 부종, 해열, 치통, 관절염 등의 치료에 사용되어 온 생약재로 정유성분, 스테아린산, 수지, 살리실산과 테르펜산등의 성분을 포함하고 있으며 어린 잎과 줄기는 특유의 향이 있어 식용으로 이용되는 유용한 식물 자원이다.[2] 독활의 플라보노이드 성분과 항산화 활성[3,4]이 보고된바 있으며, 항균작용,[5,6] 간보호 효과,[7] 항염증작용,[8] 항혈전효과[9] 등에 대한 연구가 보고되었다.

식물조직배양 기술은 우수 개체의 대량 증식, 육종, 식물체 대량 생산 등을 위해 효과적으로 이용할 수 있는 기술이다. 특히 재배기간이 길고 뿌리를 약용 및 식품으로 이용하는 식물의 경우에 생물반응기 배양을 통한 부정근의 생산은 목적 물질을 단기간에 제한된 공간에서 적은 노동력으로 생산할 수 있는 방법으로 이용될 수 있다.[10-13]

본 연구에서는 재배근과 부정근의 생리활성 비교를 통해 독활 부정근에서 유용성분의 대량 생산을 위한 가능성을 확인하기 위하여 독활 부정근의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량과 DPPH free radical 소거활성, ABTS 양이온 소거활성을 통한 항산화 활성과 항균 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 연구에 사용된 독활은 2010년 8월 전남대학교 자연과학대학에서 채취하였으며, 기내배양 부정근 그리고 식물체 순화를 통해 일반 토양에서 5개월간 자란 뿌리를 시료로 사용하였다. 시료는 전남대학교 자연과학대학 황성진 교수에게 동정 받았으며, 표본(ACAR-1008)은 전남대학교 자연과학대학 표본실에 보관하고 있다.

시료추출 – 모든 시료는 24시간 음건한 후 1일 동안 동결건조하고 마쇄하였고, 분말화한 시료 10 g을 250 mL 삼각플라스크에 넣고 100% 메탄올 150 mL를 첨가하여 24 시간동안 110 rpm 속도로 진탕하여 추출하였으며 동일 과정

*교신저자(E-mail) : knh1125@korea.kr
(Tel) : +82-54-630-5637

을 3회 반복하였다. 추출물은 여과지(Whatman NO. 2, England)를 이용하여 여과한 후 회전 감압 농축기를 이용하여 농축하여 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정 – 총 폴리페놀 함량은 Sharma[14] 등의 Folin-Denis법을 변형하여 측정하였다. 감압 농축한 시료를 메탄올로 용해한 후 증류수를 첨가하여 1 mg/mL 농도의 시료 추출물을 만들었다. 시료 추출물 100 μL에 0.2 N의 Folin-ciocalteu reagent 500 μL를 가하고 5분 후 2% sodium carbonate 400 μL을 첨가하였다. 상온의 암소에서 2시간 동안 반응시킨 후 UV spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 총 페놀함량은 gallic acid를 사용 표준 곡선을 작성하여 mg gallic acid equivalent/g extract(mg GAE/g extract)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량 측정 – 플라보노이드의 함량은 Moreno 등[15]의 방법에 의해 측정하였다. 플라보노이드 함량은 quercetin을 사용하여 표준곡선을 작성하여 mg quercetin equivalent/g extracts(mg QE/g extract)로 나타내었다.

DPPH Free Radical 소거활성 측정 – DPPH free radical은 Sharma[14]의 방법에 따라 측정하였다. 시료 추출물의 DPPH free radical 소거능이 50%가 되는 값의 농도(RC_{50})를 계산하여 나타내었다. 대조구는 항산화제인 ascorbic acid을 사용하였다.

ABTS 항산화 활성 – ABTS free radical을 이용한 항산화 측정은 Re 등[16]의 방법을 참고하여 측정하였다. 시료 추출물의 농도별 ABTS free radical 소거능이 50%가 되는 값의 농도(RC_{50})를 계산하여 나타내었다. 대조구는 항산화제인 ascorbic acid을 사용하였다.

항균 활성 – 항균활성을 확인하기 위해 그람양성균은 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*를 사용하였고, 그람음성균은 *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*를 사용하였다. 실험에 사용된 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)와 American Type Culture Collection (ATCC)에서 각각 분양 받았으며 사용균은 Table I과 같다.

디스크 확산법 – 항균 활성을 측정하기 위해 디스크 확산법을 실시하였다. 각각의 균주를 Tryptic soy broth(TSB, Difco, USA) 또는 Brain heart infusion broth(BHI, Difco, USA) 5 mL에 200 rpm으로 8시간 배양한 후 사용하였으며, 배지에 배양한 균액을 혼합하여 균체수를 약 10^6으로 조정한 다음 멸균한 면봉을 이용하여 Mullerr Hinton Agar 배지에 균일하게 도말하였다. 멸균된 직경 6 mm의 paper disc(ADVANTEC, Japan)에 농도가 조절된 독활의 메탄올 추출물 15 μL를 가하고 clean bench 내에서 완전히 건조시킨 후 균이 도말된 배지위에 paper disc의 평평한 면이 밑으로 가게 하여 차례로 올려놓았다. 이 때 사용된 추출물의 농도는 메탄올을 이용하여 용해하였으며, 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62.5 mg/mL의 농도별로 희석하였다. 디스크 확산법 실험을 위해 도말된 균주 중 *B. subtillus*는 30°C에서 배양하였으며, 이를 제외한 균주는 37°C에서 배양하여 24시간 내에 생성된 clear zone의 직경을 측정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 – 부정근 및 재배근의 총 폴리페놀 함량과 플라보이드 함량을 조사한 결과는 Table II에 나타냈다. 총 페놀 화합물은 부정근 메탄올 추출물이 102.2 mg GAE/g으로 재배근의 25.1 mg GAE/g에 비해 월등하게 높은 함량을 나타내었다. 또한 플라보노이드 함량에서도 부정근이 11.9 mg QE/g, 재배근이 7.8 mg QE/g으로 총 페놀함량과 마찬가지로 부정근에서 더 높게 나타났다. 이 같은 결과의 원인은 생리활성물질 생산에 영향을 주는 배지 내의 화학적 환경요인 및 배양체 내의 물리적 환경요인이 크게 영향을 받았을 것으로 생각된다.[17] 페놀성 화합물은 식물에서 발견되는 물질의 일종으로 일반적으로 항균, 항산화 효과 등의 생리 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.[18,19] 이에 따라 페놀 화합물의 함량측정은 항산화 활성을 실험하기 위한 일차적 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

부정근의 DPPH Free Radical 소거활성 – DPPH free radical은 DPPH 분자 중에서 하나의 전자가 특정 위치에서

Table I. List of bacteria used for antibacterial activity

Type	Bacteria	Strain No.	Media	Temperature(°C)
Gram-positive	*Bacillus subtilis*	KCTC 1327	Nutrient agar	30
	Staphylococcus epidermidis	KCTC 1917	Nutrient agar	37
	Staphylococcus aureus	ATCC 25923	Tryptic soy agar	37
Gram-negative	*Salmonella enteritidis*	ATCC 13076	Tryptic soy agar	37
	Escherichia coli	ATCC 25922	Tryptic soy agar	37
	Salmonella enterica subsp. enterica	KCTC 1925	Nutrient agar	37

Table II. Total phenolic and flavonoid contents in methanol extracts of *A. continentalis*

Sample	Total phenolic content (mg GAE/g extract)†	Flavonoid content (mg QE/g extract)‡
Cultivated root	25.1 ± 0.60*	7.8 ± 0.08
Adventitious root	102.2 ± 4.10	11.9 ± 0.01

†GAE: gallic acid equivalent, ‡QE: quercetin equivalent.
*All values are mean ± standard deviation.

Table III. DPPH and ABTS radical scavenging activities of methanol extracts from *A. continentalis*

Sample	DPPH of RC_{50} μg/ml*	ABTS of RC_{50} μg/ml*
Cultivated root	818.7 ± 32.3	1239.5 ± 0.1
Adventitious root	175.6 ± 4.1	279.7 ± 2.2
Ascorbic acid	19.2 ± 0.2	35.3 ± 3.1

*All values are mean ± standard deviation

분리된 안정한 radical이다. 이러한 탈전자화(delocalization)는 517 nm에서 최대 흡광도를 갖는 진한 자주색을 나타내며 수소를 공여할 수 있는 항산화제가 DPPH radical과 반응할 때 radical을 갖지 않는 환원형의 노란색이 증가한다. 흡광도의 감소는 분광광도법으로 측정되며, DPPH free radical 환원 능력을 계산하기 위해 control과 비교된다.[20,21] 항산화 활성을 알아보기 위해 각 메탄올 추출물 시료의 DPPH free radical 소거능을 측정하여 RC_{50}을 구한 결과는 Table III에 나타내었다. 부정근 추출물에서 175.6 μg/mL으로 818.7 μg/mL을 나타낸 재배근에 비해 높은 활성을 나타내었다.

ABTS Free Radical 소거능 – ABTS를 이용한 항산화 분석법은 DPPH 분석법과 매우 유사한 방법으로 734 nm에서 최대 흡광도를 갖는 비교적 안정한 형태로 hydroxyl(-OH), peroxyl(ROO), alkoxyl(RO), inorganic radical과 반응할 수 있다. ABTS radical은 수산기, 시스테인, 글루타치온 등과 반응할 수 있어 생물학적 시스템의 다양한 구성요소에 대해 항산화력을 결정할 수 있어 친수성과 소수성의 다양한 성분의 항산화 활성 연구를 위해 널리 이용되고 있는 방법이다.[22] ABTS free radical 소거능을 통하여 독활의 시료별 항산화 활성을 재검증하였다(Table III). DPPH free radical 소거능과 유사하게 부정근의 RC_{50}은 279.7 μg/mL로 재배근의 1239.5 μg/mL 보다 높은 활성을 나타내었으며, 이 역시 페놀화합물의 함량과 상관관계가 있다고 사료된다. 본 실험에서 독활의 항산화 활성을 검증해 본 결과 조직배양을 이용하여 유도한 부정근이 재배근에 비하여 우수하다고 평가되었다. 추가적으로 시중에 판매되는 약재와 비교하여 실험을 수행할 필요성이 있으나 독활 부정근이 항산화제로 이용 가능하며, 기능성 식품 및 화장품 소재로 사용 가능할 것으로 사료된다.

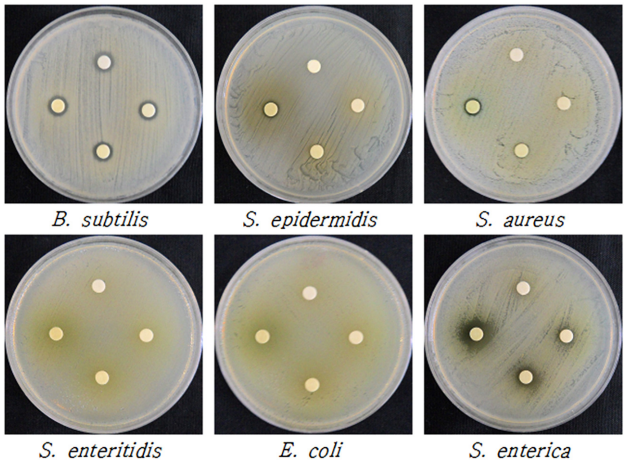

Fig. 1. Production of clear zone by methanol extracts of *A. continentalis* adventitious roots against bacteria.

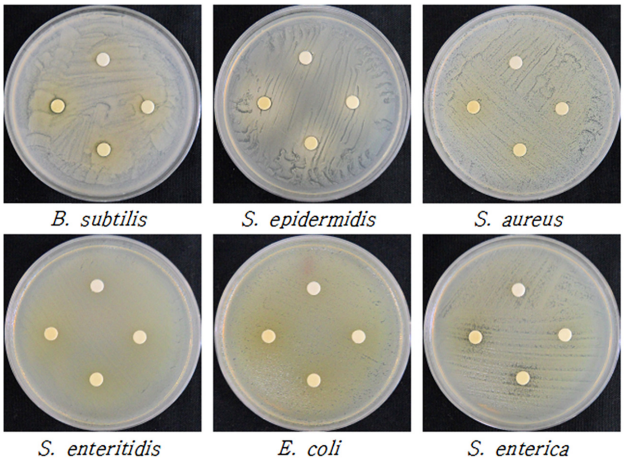

Fig. 2. Production of clear zone by methanol extracts of *A. continentalis* cultivated roots against bacteria.

항균활성 – 디스크 확산법을 이용하여 독활 부정근과 재배근 항균 활성을 측정 하였다. 그 결과 부정근에서는 그람 양성균인 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* 그리고 그람 음성균인 *S. enterica*에서 clear zone이 관찰되었다. *B. subtilis*의 경우 62.5~500 mg/mL의 농도에서 모두 9 mm의 환이 관찰되어 농도에 의존적이지 않은 결과를 보였다(Fig. 1). *S. enterica*의 경우 500 mg/mL의 농도에서 13 mm의 저해환이 관찰되어 시료 중에 가장 높은 활성을 나타내었다(Table IV, Fig. 1). 재배근 추출물의 항균력은 그람 양성균인 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*에서만 관찰 되었으며 500 mg/mL 농도에서 7~8 mm로 미미한 활성을 보였다(Table IV, Fig. 2).

Table IV. Antibacterial activity of *A. continentalis*

Sample	Bacteria	Concentration of extracts(mg/mL)			
		62.5	125	250	500
Adventitious root	*B. subtilis*	9[a]	9	9	9
	S. epidermidis	-[b]	-	-	7
	S. aureus	-	-	-	7
	S. enteritidis	-	-	-	-
	E. coli	-	-	-	-
	S. enterica	-	6.5	8.5	13
Cultivated root	*B. subtilis*	-	-	6.5[a]	7
	S. epidermidis	-[b]	-	-	6.5
	S. aureus	-	-	-	6.5
	S. enteritidis	-	-	-	-
	E. coli	-	-	-	-
	S. enterica	-	-	-	-

[a]Diameter of clear zone (mm), [b]Not detected

결 론

본 연구는 독활의 재배근과 조직배양 부정근을 이용하여 항산화활성과 항균활성을 조사하였다. 총 페놀 함량과 플라보노이드 함량을 조사한 결과 각각 부정근이 102.2 mg GAE/g과 11.9 mg QE/g으로 재배근 25.1 mg GAE/g과 7.8 mg QE/g에 비해 매우 높은 함량을 나타냈다. 또한 DPPH free radical 소거능과 ABTS free radical 소거능은 각각 부정근이 175.6과 279.7 μg/mL으로 재배근 818.7과 1,239.5 μg/mL에 비해 매우 높은 항산화활성을 나타냈다. 항균 활성은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus)*, 표피상구균(*S. epidermidis*), 고초균(*Bacillus subtilis*), 살모넬라균(*Salmonella enterica* subsp. *enterica*)에 대해 활성을 보였으며, 특히 부정근이 재배근에 비하여 우수한 항균활성을 나타냈다. 이상의 결과를 종합하여 부정근이 재배근에 비해 우수하다고 평가 되며, 항산화 및 항균 활성 측정을 통하여 천연 항산화제 및 항균제로 이용 가능성을 확인 하였다.

사 사

본 연구는 2016년도 국립산림과학원 석·박사연구원십의 지원에 의해 이루진 것임.

인용문헌

1. Kim, T. J. (1996) Korean resources plants, 174-175, Seoul National University Press, Seoul, Korea.
2. Han, W. S. (2005) Isolation of the antimicrobial compounds from *Aralia cordata* Thunb extract. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **13**: 182-185.
3. Kim, J. S., Kang, S. S., Lee, M. W. and Kim, O. K. (1995) Isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia continentalis*. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**: 239-243.
4. Kim, J. S., Kang, S. S., Choi, J. S., Lee, M.W. and Lee, M. W. (1998) Antioxidant components from *Aralia continentalis*. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**: 13-17.
5. Jeong, J. J., YU, G. W., Kim, S. J, Choe, Y. U. and Baeg, G. Y. (2004) Plant regeneration from adventitious roots of *Rehmannia glutinosa* Liboschitz and bioreactor culture. *Plant Biotechnol.* **31**: 55-60.
6. Jeong, S. I., Han, W. S., Yun, Y. H. and Kim, K. J. (2006) Continentalic acid from *Aralia continentalis* shows activity against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother. Res.* **20**: 511-514.
7. Hwang, Y. P., Choi, J. H., Han, E. H., Kim, H. K., Kang, S. K., Chung, Y. C. and Jeong, H. G. (2008) Protective mechanisms of *Aralia continentalis* extract against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity: *in vivo* and *in vitro* studies. *Food chem. Toxicol.* **46**: 3512-3521.
8. Park, H. J., Hong, M. S., Lee, J. S., Leem, K. H., Kim, C. J., Kim, J. W. and Lim, S. (2005) Effects of *Aralia continentalis* on hyperalgesia with peripheral inflammation. *Phytother. Res.* **19**:511-513.
9. Yang, S. A., Im, N. K., Jhee, K. H. and Lee, I. S. (2008) Effects of *Aralia continentalis* Kitagawa on antiplatelet and antioxidative activities. *J. Life Sci.* **18**: 357-362.
10. Ahn, C. H., Bae, K. H., Yi, J. S. and Choi, Y. E. (2008) Induction and growth of adventitious roots and bioreactor culture in *Codonopsis lanceolata*. *Plant Biotechnol.* **35**: 155-161.
11. Ahn, J. K., Lee, W. Y. and Park, E. J. (2011) Effect of sal-

icylic acid on the root growth and the eleutheroside accumulation in the adventitious root culture of *Eleutherococcus senticosus*. *J. Korean For. Soc.* **100**: 178-183.
12. An, J. H., Son, K. H., Sohn, H. Y. and Kwon, S. T. (2005) In vitro culture of adventitious roots from *Dioscorea nipponica* Makino for the production of steroidal saponins. *Plant Biotechnol.* **32**: 217-223.
13. Bae, H. H., Cho, D. Y., Kim, S. G., Soh, W. Y. and Seong, R. S. (1994) Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on adventitious root formation from callus of *Bupleurum flacatum* L. and its histological observation. *J. Plant Biotechnol.* **21**: 41-46.
14. Sharma, O. P. and Bhat, T. K. (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* **113**: 1202-1205.
15. Moreno, M. I. N, Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 109-114.
16. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A, Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
17. Lee, E. J., Kim, M. K. and Paek, K. Y. (2010) Auxin and cytokinin affect biomass and bioactive compound production from adventitious roots of *Eleutherococcus koreanum*. J. Hort. Sci. Technol. **28**: 678-684.
18. Lee, S. O., Lee, H. J., Yu, M. H., Im, H. K. and Lee, I. S. (2004) Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**: 233-240.
19. Boo, H. O., Lee, H. H., Lee, J. W., Hwang, S. J. and Park, S. U. (2009) Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J. Med. Crop Sci.* **17**: 15-20.
20. Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenyl- picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci Technol.* **26**: 211-219.
21. Bondet, V, Brand-Williams W. and Berset, C. (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **30**: 609-615.
22. Miller, N. J. and Rice-Evans, C. A. (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Res.* **26**: 195-199.

(2017. 1. 2 접수; 2017. 2. 22 심사; 2017. 3. 14 게재확정)