

수목추출물의 생리활성에 관한 연구(II)^{*1}

-느티나무 심재의 항균 및 항산화물질-

이 성 숙^{*2} · 최 돈 하^{*2} · 이 학 주^{*2} · 강 하 영^{*2}

Studies on Biological Activity of Wood Extractives(II)^{*1}

- Antimicrobial and antioxidative compound isolated

from heartwood of *Zelkova serrata* -

Sung-Suk Lee^{*2} · Don-Ha Choi^{*2} · Hak-Ju Lee^{*2} · Ha-Young Kang^{*2}

ABSTRACT

Antimicrobial and antioxidative activities on heartwood extractives from *Zelkova serrata* were investigated to develop a natural fungicide or preservative. The ethanol extract from *Z. serrata* was fractionated in the order of petroleum ether, diethylether and ethylacetate to determine antimicrobial activity. The highest antimicrobial activity against the tested microorganisms was found in the petroleum ether soluble fraction. An active antimicrobial compound was isolated from petroleum ether soluble fraction, and identified as 7-hydroxy-3-methoxycadalene by ¹H-, ¹³C-NMR and EI-MS spectrometry. This compound showed higher antifungal activity, but lower antibacterial activity than hinokitiol(β -thujaplicin), strong antimicrobial compound isolated from *Thujopsis dolabrata*. Antioxidative activity was also higher than α -tocopherol and similar to BHT(butylated hydroxytoluene), one of the strongest synthetic antioxidant. As a result, it was concluded that 7-hydroxy-3-methoxycadalene isolated from *Z. serrata* had strong antifungal and antioxidative activities.

Keywords : *zelkova serrata*, antimicrobial activity, antioxidative activity, 7-hydroxy-3-methoxycadalene, hinokitiol, butylated hydroxytoluene

- 요약 -

천연살균제나 식품보존제 개발을 위한 항균 및 항산화물질 검색을 목적으로, 느티나무 심재 에탄올 추출물을 용매 분획하여 얻은 석유에테르분획, 디에틸에테르분획, 에틸아세테이트분획 중 항균활성이 가장 우수한 석유에테르분획으로부터 활성물질을 분리하였다. 이 물질의 화학구조는 EI-MS, ¹H- 및 ¹³C-NMR로 분석한 결과, 나프탈렌 구조를 기본 골격으로 하는 7-hydroxy-3-methoxycadalene으로 동정되었다. 그리고, 이 물질의 항진균활성은 배지점적법을 이용하여 hinokitiol과 비교·검정한 결과, 활성이 hinokitiol보다 우수한 것으로 나타났다. 그러나, 탁도측정법을 이용한 항산화 활성은 그람양성균의 경우 hinokitiol의 80%로 나타나, 세균보다 진균에 대한 항균활성이 우수한 것으로 판명되었다.

^{*1} 접수 2000년 2월 20일, Received Feb. 20, 2000

본 연구는 임업연구원 임업연구사업의 일환으로 수행되었음.

^{*2} 임업연구원 Korea Forest Research Institute, Seoul 130-012, Korea

또한, 항산화활성을 과산화물가 및 프리라디칼 소거능을 측정하여 천연항산화제인 α -tocopherol 및 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT)과 비교·검정한 결과, α -tocopherol보다 우수하였으며, BHT와 동등한 것으로 나타났다. 이상의 결과, 느티나무 심재로부터 분리된 7-hydroxy-3-methoxycadalene은 항균 및 항산화 활성이 우수한 물질로 판명되었다.

1. 서 론

식품속에 함유되어 있는 지방산 (특히 다가 불포화 지방산)은 프리라디칼에 의한 연쇄반응으로 산화되어 과산화물을 생성하기가 쉽다. 이 과산화물은 다시 휘발성 카보닐 화합물 중합체 또는 활성산소라디칼과 같은 여러 가지 화합물로 변하여 식품에서 산패와 변패를 가져 오게 된다(河智, 1995). 식품 중에 생성된 과산화물과 산화분해물은 식품의 영양가치 저하는 물론 섭취시 독성의 발현등 문제가 되고 있다. 이러한 식품의 산화를 효과적으로 억제하기 위하여 저온저장, 빛의 차단, 탈산소제의 사용이라는 물리적인 수단과 함께 항산화제의 첨가라고 하는 화학적 수단을 이용하고 있다. 식품용 항산화제로서는 α -tocopherol (비타민 E), ascorbic acid(비타민 C) 이외의 합성항산화제인 butylated hydroxyanisole(BHA)과 butylated hydroxytoluene(BHT)등이 사용되어 왔지만, 최근 이러한 합성항산화제의 안전성이 문제가 되어(Branen, 1975, Choe·Yang, 1982) α -tocopherol과 같은 천연 항산화제의 사용이 날로 증가하고 있다. 이러한 측면에서 최근에는 향신료(심기환 등, 1995; 河智, 1995), 식품재료(강성구, 1995; 律田, 1995; Rice-Evans 등, 1995), 생약재(김근영 등, 1997; 김현구 등, 1995; 신동화 등, 1997; 심경희 등, 1995) 및 녹차등의 茶類(여생규 등, 1995a; 1995b)로부터 항균 및 항산화물질을 탐색하고 분리하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나, 수목의 경우에는 대만 편백으로부터 분리된 항균활성물질인 hinokitiol (β -thujaplicin)에 대한 연구(岡部 등, 1994; Sakai 등, 1994)와 Eucalyptus(加藤 등, 1995)와 밤나무果皮(吉田 등, 1995)의 항산화물질에 대한 연구 등이 있을 뿐, 초분류에 비해 상대적으로 연구가 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구는 수목 추출물로부터 항균 및 항산화물질을 검색할 목적으로 국내산 수목 추출물의 항균 및 항산화활성을 검정한 결과(이성숙 등, 1999),

항균 및 항산화활성이 우수한 것으로 나타난 느티나무로부터 활성물질을 분리하고 구조를 동정하였기에 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

경기도 포천시 소흘면 직동리 중부 임업시험장 시험림 제10임반에 자생하고 있는 수령 63년생(흉고직경 : 17cm)의 느티나무(*Zelkova serrata*)를 채취하여 공시목으로 사용하였다.

2.2 공시균

항균활성검정용 공시균은 진균류로서 목재부후균인 *Rhizopus stolonifer*, *Glucocladium virens*, *Tyromyces palustris*, *Trametes versicolor*, 수목병원균인 *Phomopsis albobestita*, *Endothia nitschkeii*, *Melanconis juglandis* 그리고 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를, 세균으로서 그람양성균인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* 및 그람음성균인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*를 사용하였다.

2.3 항균활성검정

2.3.1 항진균활성

항진균활성검정방법으로는 배지점적법(森 등, 1994)을 이용하였다. 즉, potato dextrose agar배지에 소정의 농도가 되도록 화합물을 혼합하여 만든 평판배지에 미리 배양해둔 각 공시균의 균사선단부를 직경 8mm의 cork borer로 떼어내어 접종하였다. 배양온도 27℃에서 소정기간 배양한 후 자란 균사환의 직경을 측정하여 균사생장억제율(hyphal growth inhibition ratio)로 항균활성을 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{균사생장억제율(\%)} = \left[\frac{(Gc) - (Gt)}{(Gc)} \right] \times 100 \dots [1]$$

Gc : 무첨가 배지상의 균사 직경
Gt : 첨가 배지상의 균사 직경

2.3.2 항세균활성

항세균활성은 한천배지확산법과 탁도측정법(池川 등, 1984)에 의하여 검정하였다. 한천배지확산법은 우선 agar 1.5%가 함유되어 있는 배지를 petri dish에 분주하여 하층배지를 만들고, 그 위에 각 세균을 접종한 0.6%의 agar 배지를 부어 2중의 평판배지를 만들었다. 이렇게 제조된 평판배지에 소정 농도의 화합물을 마운트한 페이퍼디스크(직경 : 8mm)를 올려놓고 37°C에서 20시간 배양한 후 디스크 주변에 형성되는 생육저지환(clear zone)의 직경을 측정하여 항세균활성을 검토하였다.

탁도측정법은 세균의 경우 크기가 균일한 집단으로 세포수가 증가하면 탁도도 증가하는 것을 이용한 방법으로, 소정 농도의 화합물을 첨가한 potato dextrose broth배지에 세균을 접종하여 37°C, 24시간 진탕배양한 후 세포수 증가를 610 nm의 흡광도로 측정하여 다음과 같이 세균생육억제율로 나타내었다.

$$\text{세균생육억제율(\%)} = \left[\frac{(\text{무처리구의 흡광도}) - (\text{처리구의 흡광도})}{(\text{무처리구의 흡광도})} \right] \times 100 \dots [2]$$

2.4 항산화활성검정

2.4.1 과산화물가 측정

A.O.C.S. Cd 8-53(1989)에 따라 60% linoleic acid를 기질로 사용하여 과산화물가(peroxide value : POV)를 측정하여 항산화활성의 지표로 삼았다. 과산화물가측정은 100 ml 비이커에 linoleic acid를 30 g씩 분취하여 40°C의 항온기에 저장하고 24시간 간격으로 측정하였다. 측정방법은 마개달린 삼각플라스크에 일정 시간별 측정용시료 2 g을 정확히 취해 넣고, 클로로포름-빙초산혼합액(2 : 3, v/v) 35 ml를 가하여 조용히 흔들어 용해한다. 이어서 청정한 질소가스를 투입하여 삼각플라스크내의 공기를 충분히 치환하고, 질소가스를 흘려보내면서 포화 KI용액 1 ml를 정확히 가한 후 질소가스를 잠그고, 즉시 마개를 하여 잘 흔들어 혼합한 후 상온·암소에서 5분간 정치한다. 5분 후 이산화탄소를 배제시킨 증류수 75 ml를

가해 심하게 흔들어 혼합한 후, 1% 전분용액을 지시약으로 넣고 0.01N Na₂S₂O₃용액으로 적정하여, 전분에 의한 착색이 소실될 때를 종점으로 하여 다음과 같이 과산화물가(POV)를 산출하였다.

$$\text{과산화물가} = \left[\frac{A \times F}{B} \right] \times 10 \dots [3]$$

A : 0.01N Na₂S₂O₃용액 사용량(ml)
F : 0.01N Na₂S₂O₃용액의 factor
B : 시료채취량(g)

과산화물가가 80 meq/kg oil에 도달하는 시간을 유도기간(induction period)으로 하여 시료별 항산화 정도를 비교하고, 다음과 같이 항산화지수(antioxidative index: A.I.)로 나타내었다.

$$\text{항산화지수} = \frac{\text{추출물첨가구유도기간}}{\text{대조구유도기간}} \dots [4]$$

2.4.2 프리라디칼 소거능(Free radical scavenging activity) 측정

안정한 프리라디칼을 생성하는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrodrazyl)는 산화에 의하여 생성되는 hydroperoxide(ROOH)가 유리시 발생하는 라디칼(RO·, ·OH)을 DPPH 라디칼이 포착함에 따라 DPPH라디칼 본래의 흑자색을 잃게된다. 이러한 점을 이용하여 Bloie(1958)는 DPPH의 퇴색 정도를 흡광도로 측정하여 항산화활성을 검토하였다. 측정방법은 Yoshida 등(1989)의 방법을 변형하여 시험관에 소정 농도의 시료를 포함한 메탄올용액 4 ml 및 0.5 mM의 DPPH·메탄올용액 1 ml를 가하여 총 5 ml가 되도록 하고, vortex mixer로 잘 섞어서 30분간 상온에서 반응시킨 다음, 반응액을 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 프리라디칼 소거능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도를 사용하여 다음과 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{프리라디칼소거능(\%)} = \left[\frac{(\text{무첨가구의 흡광도}) - (\text{첨가구의 흡광도})}{(\text{무첨가구의 흡광도})} \right] \times 100 \dots [5]$$

2.5 활성물질의 분리·동정

느티나무 심재목분을 에탄올에 3일간 침적한 후 연속하여 3회 추출하여 얻어진 에탄올 추출물을 감압농축하였다. 얻어진 조추출물은 순차연속 추출법에 따라 석유에테르, 디에틸에테르, 에틸아세테이트 가용부

로 나누어 항균활성을 검정한 결과, 항균활성이 우수한 석유에테르 가용부를 silica gel column chromatography(column : 6×25 cm, 용출용매 : *n*-hexane-ethyl acetate = 100 : 0, 19 : 1, 9 : 1, 4 : 1, 0 : 100, v/v)로 50 ml씩 용출시켜 65개의 분취물을 얻었다. 그리고, 각 분취물을 TLC(plate : silica gel 60 F₂₅₄, 전개용매 : *n*-hexane-ethyl acetate = 5 : 1, v/v)로 분리, 254 nm 및 375 nm의 UV하에서 확인하여 12개 분획(분획 I ~ XII)으로 나누었다. 이 중 항균활성검정 결과, 활성이 우수한 분획 V로부터 순수물질 분리를 위한 재결정을 시도하였다. 즉, 분획 V를 소량의 acetone에 녹인 후 극소량의 H₂O첨가 후 다량의 *n*-hexane을 넣고 -20°C에 방치하여 생성된 결정을 진공여과하여 막대형의 백색분말을 얻었다.

재결정된 분리물질은 EI-MS(JEOL JMS-AX505WA)로 분자량을 측정하였으며, 구조동정을 위해 ¹H- 및 ¹³C-NMR(JEOL LA400)을 측정하였다.

EI-MS m/z : 244(M⁺), 230, 229(base ion), 214, 184, 119, 88, 86, 84, 58.

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) δ: 1.44(6H, d, H-12, 13), 2.44(3H, s, H-14), 2.54(3H, s, H-15), 3.88(1H, m, H-11), 3.88(3H, s, OMe), 4.91(1H, b, OH), 7.03(1H, s, arom H-8), 7.18(1H, s, arom H-2), 7.91(1H, s, arom H-5).

¹³C-NMR(100MHz, CDCl₃) δ: 16.90(C-15), 19.75(C-14), 21.61(C-12, 13), 26.51(C-11), 57.02(OMe), 106.73(C-8), 116.36(C-2), 125.55(C-4), 125.75(C-5), 127.25(C-6), 128.23(C-1), 128.86(C-9), 131.62(C-10), 150.56(C-3), 150.57(C-7).

3. 결과 및 고찰

3.1 활성물질의 분리

느티나무로부터 항균물질을 분리할 목적으로, 심재 에탄올 추출물을 용매별로 분획하여 얻은 석유에테르, 디에틸에테르, 에틸아세테이트 가용부 및 잔사에 대한 항균활성을 검정하였다. 그 결과, 진균에 대한 항균활성은 석유에테르가용부에서 가장 우수한 것으로 나타났으며, 그 다음이 디에틸에테르 가용부이고, 에틸아세테이트가용부 및 잔사는 전혀 항균활성이 없는 것으로 나타났다(Table 1).

또한, 세균의 경우에는 디에틸에테르 가용부에서 가장 우수한 생육억제효과를 나타내었으며, 공시세균 중 대장균인 *E. coli*의 생육저지환 직경이 16 mm로 나타나 이에 대한 항균활성이 가장 뛰어난 것으로 나타났다(Table 2). 석유에테르 가용부의 경우에는 그람양성균인 *S. aureus*과 *B. subtilis*에 대한 생육저지환 직경이 각각 14 mm, 11 mm로 나타나 생육억제효과가 인정되었으며, 에틸아세테이트 가용부의 경우에는 사용한 모든 세균에 대해 생육저지환을 형성하지 않아 생육억제효과가 없는 것으로 밝혀졌다(Table 2). 이상의 결과, 느티나무 용매분획 중 석유에테르 가용부가 가장 우수한 항균활성을 보임으로써, 이 분획으로부터 항균활성물질의 분리를 시도하였다.

즉, 석유에테르 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 12개의 그룹으로 나누고 균에 대한 항균활성을 생육저지환으로 측정하였다. 그 결과, 분획 II와 III은 진균에 대한 항균활성은 약하

Table 1. Antifungal activities of petroleum ether -, diethylether - and ethylacetate-soluble fractions obtained from heartwood extractives of *Z. serrata*

Fraction	Hyphal growth inhibition ratio(%)						
	<i>R. stolonifer</i>	<i>G. virens</i>	<i>T. palustris</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P. albobestita</i>	<i>E. nitschkeii</i>	<i>M. juglandis</i>
Petroleum ether ¹⁾	73.5	84.3	81.9	27.7	45.8	74.7	85.5
Diethylether	34.9	57.8	12.0	6.0	45.8	69.9	76.0
Ethylacetate	- ²⁾	-	-	-	-	-	-
Residue	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾ 1,000 mg/ℓ of each fractions was added.

²⁾ No inhibition was detected.

나 세균에 대한 활성은 강하게 나타났으며, 분획 IV, V 및 VI의 경우에는 진균, 세균에 대해 공히 강한 항균활성을 나타내었다(Table 3). 특히, 분획 V는 *T. versicolor*를 제외한 모든 공시균에 대하여 생육저지

환을 나타내어 가장 활성이 우수한 것으로 나타났으며, 분획 X, XI 및 XII는 진균에 대한 활성은 약하나 세균에 대한 활성은 우수한 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서는 이들 12개의 분획 중 가장 항

Table 2. Antibacterial activities of petroleum ether -, diethylether - and ethylacetate-soluble fractions obtained from heartwood extractives of *Z. serrata*

Fraction	Diameter of clear zone (mm)					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Petroleum ether ¹⁾	14	11	- ²⁾	-	-	-
Diethylether	14	11	9	16	12	13
Ethylacetate	-	-	-	-	-	-
Residue	-	-	-	-	-	-

¹⁾ 1 mg/disc of each fractions was applied.

²⁾ No clear zone was formed.

Table 3. Antimicrobial activities of fractions fractionated by silica gel column chromatography on petroleum ether-soluble fraction

Fraction No.	Diameter of clear zone (mm)									
	<i>G. virens</i>	<i>T. palustris</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P. albobestita</i>	<i>E. nitschkeii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
I ¹⁾	- ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	++	+	-	+	+	+	+++	+++	++	+
III	+	+	-	+	-	+	++	+++	++	-
IV	++	+	-	+	+++	+	+++	+++	+	-
V	+++	+	-	++	+++	+	++	++	+	+
VI	+++	++	-	++	++	+	++	++	+	+
VII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
XI	+	-	-	-	-	-	++	+	+	-
XII	+	-	-	-	-	-	++	+++	++	+

¹⁾ 1 mg/disc of each fractions was applied.

²⁾ - : No clear zone was formed, + : 9 mm ≤ Diameter of clear zone ≤ 11 mm,

++ : 12 mm ≤ Diameter of clear zone ≤ 14 mm, +++ : 15 mm ≤ Diameter of clear zone.

균활성이 우수한 분획 V로부터 항균활성물질들을 분리하였다.

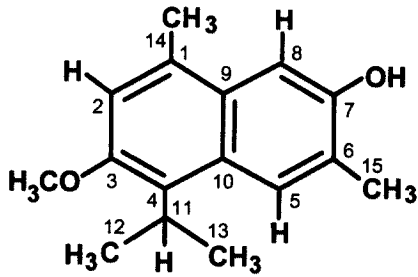


Fig. 1. Structure of 7-hydroxy-3-methoxycadalene.

3.2 활성물질의 구조 동정

분획 V로부터 분리, 재결정한 물질은 백색분말이었으며, EI-MS 스펙트럼으로 분석한 결과, 분자이온 피크는 m/z 244였으며 base ion 피크는 m/z 229에서 나타나 이 물질의 분자량은 244로 추정되었다.

그리고, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼으로 분석한 결과, aromatic ring의 isopropyl group은 δ 1.44(6H) doublet의 피크로 2개의 methyl기와 δ 3.88에서 1H의 signal로 나타났으며, aromatic ring 위의 methyl group은 δ 2.44의 singlet(3H)과 δ 2.54(3H)의 singlet의 signal로 나타났다. 또한, aromatic ring 위의 methoxyl group은 δ 3.88에서 singlet(3H)으로 나타

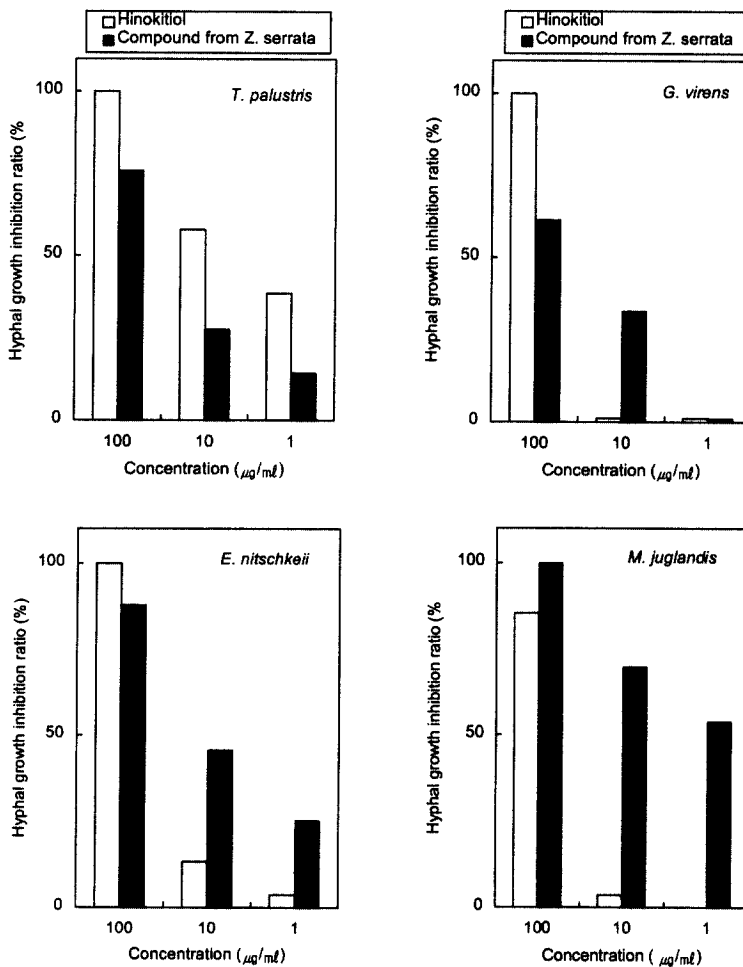


Fig. 2. Antifungal activities of hinokitiol and the compound isolated from *Z. serrata*.

나며 hydroxyl group은 δ 4.91의 broad한 signal로서 나타났다. 그리고, 3개의 aromatic proton은 δ 7.03, δ 7.18, δ 7.91의 피크에서 나타나 aromatic ring 중 3개의 수소는 치환되지 않았음을 알 수 있었다.

^{13}C -NMR 스펙트럼의 피크를 분석한 결과, δ 106과 δ 150사이의 signal은 aromatic ring의 탄소를 나타내는 signal로 피크가 10개 나타나 이 화합물은 나프탈렌 구조를 기본 골격으로 하는 물질이라는 것이 밝혀졌다. 또한, aromatic ring 위의 methyl기의 피크는 δ 16.90과 δ 19.75에서 나타났다. 그리고 δ 21.61의 피크는 ^1H -NMR의 분석 결과로 미루어 볼 때 isopropyl기를 나타내는 signal로 동정되었다.

이상의 EI-MS와 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼 분석 결과, 활성물질은 7-hydroxy-3-methoxycadalene(Fig. 1)으로 동정되었다.

3.3 분리 물질의 항균 및 항산화 활성

3.3.1 분리 물질의 항균 활성

느티나무로부터 분리된 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 항균활성을 현재 천연물로부터 분리된 항균물질 중 활성이 가장 우수하며 실용화되고 있는 hinokitiol(β -thujaplicin)과 비교·검토하였다. 우선, 배지점적법으로 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 경우에는 목재부후균인 *G. virens*과 *T. palustris*에 대하여 hinokitiol이 보다 우수한 항균활성을 나타내었으나, 수목병원균인 *E. nitschkeii*, *M. juglandis*의 경우에는 분리물질이 hinokitiol보다 우수한 활성을 나타내

었다(Fig. 2). 특히, *M. juglandis*의 경우 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 결과, hinokitiol은 균사생장을 억제하지 못하는 것으로 나타난 반면, 분리물질의 균사생장억제율은 각각 70%와 54%인 것으로 나타났다(Fig. 2). 이상의 결과, 진균에 대한 항균활성은 분리물질이 hinokitiol보다 우수한 것으로 판단되었다.

또한, 분리물질의 세균에 대한 항균활성도 hinokitiol과 비교·검토하였다. 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 분리물질을 액체배지에 첨가하여 24시간 진탕배양한 후 세균생장억제율을 탁도측정법으로 조사하였다. 그 결과, 그람양성균인 *S. aureus*에 대한 활성은 분리물질이 hinokitiol의 80%로 나타나, hinokitiol에 비해 상대적으로 활성은 낮으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 92.9%의 생육억제율을 나타내는 등 우수한 항균력을 발휘하였다(Fig. 3). 그러나, 그람음성균인 *E. coli*에 대한 항균활성은 농도 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우 hinokitiol 97.2%, 분리물질 15.9%의 세균생장억제율을 나타내, 분리물질이 hinokitiol에 비해 상대적으로 항균활성도 낮고 항균력도 떨어지는 것으로 밝혀졌다(Fig. 3). 이상의 결과, 본 분리물질은 그람양성균에 대해서는 높은 항균력을 발휘하나 그람음성균에 대해서는 항균력이 떨어지는 것으로 나타났으며, 이는 그람음성균은 그람양성균과 달리 세포벽 외층에 단백질·인지질·리보다당으로 이루어진 세포외막(bacterial outer membrane)을 가지고 있어, 이 외막이 분리물질의 투과장벽이 되어 활성이 저하되는 것으로 사료된다(山田 등, 1983)

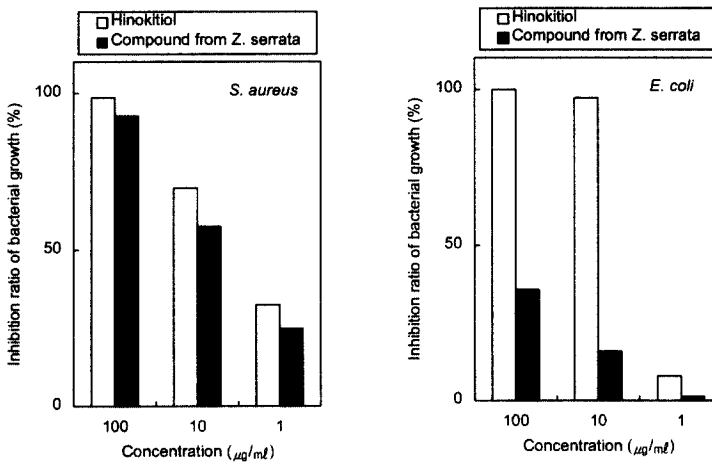


Fig. 3. Antibacterial activities of hinokitiol and the compound isolated from *Z. serrata*.

3.3.2 분리 물질의 항산화 활성

본 연구에서는 느티나무로부터 분리된 물질의 항산화활성을 천연항산화제인 α -tocopherol과 합성항산화제인 BHT와 비교·검토하였다. 즉, 불포화지방산인 linoleic acid를 기질로 하여 분리물질, α -tocopherol, BHT를 각각 200, 20, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 첨가하여 과산화물가를 측정, 항산화지수를 비교하였다. 그 결과, 농도 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우에는 BHT가 항산화지수 3.38로 가장 우수한 것으로 나타났으며, 분리물질이 2.70, α -tocopherol이 1.35로 나타나, 분리물질이 α -tocopherol에 비해 2배의 항산화력을 보였다(Fig. 4). 또한, 20, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 BHT, 분리물질, α -tocopherol의 순으로 항산화지수를 나타내었다(Fig. 4).

또한, 프리라디칼의 소거에 의한 항산화활성을 검토하기 위하여 DPPH를 이용하여 각각 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 α -tocopherol, BHT, 분리물질의 프리라디칼 소거능을 비교, 측정한 결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 α -tocopherol, BHT, 분리물질 모두 90%이상의 프리라디칼 소거능을 나타내었는데(Fig. 4), 이는 시료의 농도가 너무 높아 DPPH에 의한 라디칼 소거능의 차이가 나타나지 않는 것으로 생각되었다. 이와 같은 가능성을 확인하기 위해 DPPH법의 최적 농도를 조사한 결과, 시료의 농도를 10~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하였을 때 각 처리별 유의성이 명확히 나타나, 시료를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 조제하여 검정하였다. 그 결과, 분리물질의 소

거능이 45.8%, BHT가 33.2%, α -tocopherol이 43.9%로, 분리물질의 프리라디칼 소거능이 가장 우수한 것으로 나타났다(Fig. 4). 그러나, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우에는 분리물질, BHT, α -tocopherol 모두 10%이하의 낮은 프리라디칼 소거능을 나타내었다(Fig. 4). 이상의 결과, 분리물질의 항산화활성은 천연항산화제인 α -tocopherol보다 우수하며 합성항산화제인 BHT와 동등한 것으로 나타났다.

본 연구에서 분리된 7-hydroxy-3-methoxycadalene은 목재에 불포화 폴리에스테르계 도료를 도포할 때 도료의 경화장애를 일으키는 라디칼 중합저해 성분으로 알려진 물질로(Yokota 등, 1976), 이러한 물질의 라디칼 중합 저해 메카니즘은 유지의 자동산화기구를 제어하는 메카니즘과 유사하다. 즉, 프리라디칼은 공존 물질로부터 수소원자를 받아 안정되면 라디칼 연쇄 반응은 일어나지 않고 따라서 산화는 정지된다. 본 분리물질 역시 프리라디칼 소거능이 높은 것으로 보아 이러한 메카니즘에 의해 유지의 산화를 억제하는 것으로 추정되었다. 이와 같은 도료 경화장애를 일으키는 라디칼 중합 저해 성분은 느티나무 이외의 수목 추출 성분 중에도 많아(今村 등, 1983), 앞으로 이러한 성분의 항산화활성을 조사하여 항산화제로서의 이용가능성도 연구해 볼 필요가 있는 것으로 사료되었다.

Fig. 4. Antioxidative activities of α -tocopherol, butylated hydroxytoluene(BHT) and the compound isolated from *Z. serrata*.

4. 결 론

식품의 저장 기간을 연장하면서 안전성을 유지하기 위한 여러 가지 수단이 강구되어 왔는데, 이 중 그 원인이 되는 미생물을 사멸 또는 생육을 억제시키기 위한 보존제 및 산패방지제는 주로 합성품이 이용되어 왔다. 그러나, 합성품의 경우에는 발암성과 같은 유해성이 문제로 대두되고 있어 인체에 유해하지 않은 천연보존제 및 천연항산화제의 개발 필요성이 요청되고 있다. 지금까지 식품 속에 함유되어 있는 유지의 산패를 방지하기 위한 천연 항산화제는 식물, 조류 그리고 미생물로부터 분리되어 알려져 있지만 아직까지 이상적인 항산화제는 개발되고 있지 않다.

본 연구에서는 천연살균제나 식품보존제 개발을 위한 항균 및 항산화물질 검색을 목적으로, 느티나무 심재 에탄올 추출물을 용매분획하여 얻은 석유에테르 가용부로부터 활성물질을 분리하였으며, 이 물질의 화학구조는 기기분석 결과, 나프탈렌 구조를 기본골격으로 하는 7-hydroxy-3-methoxycadalen으로 동정되었다. 그리고, 이 물질의 항균활성을 기존의 천연물 유래의 항균물질 중 활성이 가장 우수한 것으로 알려진 hinokitiol과 비교 검증한 결과, 항진균활성은 hinokitiol보다 우수하였으며, 항세균활성은 hinokitiol보다 낮아 세균보다 진균에 대한 항균활성이 우수한 것으로 판명되었다. 또한, 항산화활성을 천연항산화제인 α -tocopherol 및 합성항산화제인 BHT와 비교·검정한 결과, α -tocopherol보다 우수하였으며, BHT와 동등하였다. 이상의 결과, 느티나무 심재로부터 분리된 7-hydroxy-3-methoxycadalen은 항균 및 항산화활성이 우수한 물질로 판명되었다.

참 고 문 헌

- 강성구. 1995. 갯(*Brassica juncea*)의 주 항균물질의 구조 분석. 한국영양식량학회지 24(5): 702~706.
- 김근영, 정동욱, 정희종. 1997. 어성초의 화학성분 및 항미생물활성. 한국식품과학회지 29(3): 400~406.
- 김현구, 김영언, 도정룡, 이영철, 이부용. 1995. 국내산 생약추출물의 항산화 효과 및 생리활성. 한국식품과학회지 27(1): 80~85.
- 신동화, 김문숙, 한지숙. 1997. 국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균특성. 한국식품과학회지 29(4): 808~816.
- 심경희, 양한석, 이태웅, 최재수. 1995. 배풍등의 화학성분 및 항산화 효과에 관한 연구. 1995. 생약학회지 26(2): 130~138.
- 심기환, 서권일, 강갑석, 문주석, 김홍출. 1995. 겨자 증류성분중의 항균성 물질. 한국영양식량학회지 24(6): 948~955.
- 여생규, 안철수, 이용우, 이태기, 박영호, 김선봉. 1995a. 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 항균효과. 한국영양식량학회지 24(2): 293~298.
- 여생규, 안철수, 이용우, 이태기, 박영호, 김선봉. 1995b. 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 항산화효과. 한국영양식량학회지 24(2): 299~304.
- 이성숙, 이학주, 강하영, 최돈하. 1999. 수목추출물의 생리활성에 관한 연구(I). -심재추출물의 항균 및 항산화활성-. 산림과학논문집 61: 82~89.
- 池川 信夫, 丸茂 晋吾, 星 元紀. 1984. 生理活性物質のバイオアッセイ. 講談社: 17~29.
- 今村 博之, 岡本 一, 後藤 輝男, 安江 保民, 横田 徳郎, 善本 知孝. 1983. 木材利用の化學. 共立出版株式會社: 161~174.
- 加藤 卓, 岡村 秀雄, 庭野 滿, 三村 精男. 1995. 配糖体の抗酸化劑等としての利用技術の開発. 樹木抽出成分利用技術研究成果集: 289~302.
- 森 滿範, 土居修一, 青山政和. 1994. 樹皮抽出物の抗菌活性. 日本木材學會北海 道支部講演集. 26: 41~44.
- 岡部敏弘, 齊藤幸司, 福井 徹, 飯沼和三. 1994. α -메チ실린 내성 황색 브ドウ球菌 (MRSA) に対する 히노키토올의 항균 활성. 木材學會誌 40(11): 1233~1238.
- 山田 常雄, 江上 不二夫, 小關 治男, 日高 敏隆, 前川 文夫, 八杉 龍一, 古谷 雅樹. 1983. 生物學辭典. 岩波書店. pp. 453.
- 吉田 稔, 後藤 知生, 大原 光晴, 村田 充良, 井戶田 薫, 加藤 紀子, 安藤 基治. 1995. 樹脂의 抗酸化劑等としての利用技術の開発. 樹木抽出成分利用技術研究成果集: 303~322.
- 河智 義弘. 1995. 香辛料의 抗酸化性. FFIジャーナル. 163: 44~55.
- 律田 孝範. 1995. 豆類に含まれる抗酸化成分とその利用. FFIジャーナル. 163: 30~38.

19. A.O.C.S. 1989. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 4th ed. Method Cd 8-53. Champaign. Illinois.
20. Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 181 : 1199~1200.
21. Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. J. Amer. Oil Chem. Soc. 52: 59~63
22. Choe, S. Y. and K. H. Yang. 1982. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole(BHA). Korean J. Food Sci. Technol. 14(3): 283~288.
23. Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley, J. B. Pridham. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Rad. Res. 22(4): 375~383.
24. Sakai, K., K. Kusaba, Y. Tsutsumi and T. Shiraiishi. 1994. Secondary metabolites in cell culture of woody plants III. Formation of β -thujaplicin in *Cupressus lusitanica* callus cultures treated with fungal elicitors. Mokuzaï Gakkaishi 40(1): 1~5.
25. Yokota, T., A. Noguchi and K. Nobashi. 1976. The inhibitory effects of extractives prepared from keyaki heartwood on the vinyl polymerizations. Mokuzaï Gakkaishi 22(11): 632~637.
26. Yoshida, T., K. Mori, T. Hatano, T. Okumura, I. Uehara, K. Komagoe, Y. Fujita and T. Okuda. 1989. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem. Pharm. Bull. 37(7) : 1919~1921.