

활나물 부위별 추출물의 유지에 대한 항산화 효과 및 항균성에 관한 연구

우나리아¹ · 김태수¹ · 박춘근² · 성하정³ · 고상범³ · 강명화^{1*}

¹호서대학교 식품영양학과

²농촌진흥청 작물과학원

³한국화학시험연구원 안전성평가본부

Antioxidative and Antimicrobial Activities of Extracts from Different Parts of *Crotalaria sessiflora* L.

NaRiYah Woo¹, TaeSoo Kim¹, Chun Geon Park², Ha Jeong Seong³,
Sang Beam Ko³ and Myung Hwa Kang^{1*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²National Institute of Crop Science, Rural Development Agriculture, Suwon 441-707, Korea

³Safety Assessment Center, Korea Testing and Research Institute for Chemical Industry, Gyeonggi 415-871, Korea

Abstract

The antioxidative and antimicrobial properties of the solvent extracts of 3 parts (leaf, stem, root) of *Crotalaria sessiflora* L. were investigated, in order to find out new natural food additives. The antioxidative activities of the extracts were determined by peroxide value (POV) and the conjugated diene value (CDV) of corn oil stored for 30 days at $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Each part of the extracts were added as 0.02, 0.05% and then compared with BHT. The antioxidative activities were as follows in decreasing order: BHT > LeafEX > StemEX > RootEX > control. The induction period showed that the part of the *Crotalaria sessiflora* L. group added with solvent extract showed a longer induction period compared with the control group. The part of *Crotalaria sessiflora* L. solvent extract were shown to have antimicrobial effects on the microorganism such as *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas flourescens* and *Escherichia coli*. Especially the effect on the *Pseudomonas flourescens* was remarkable.

Key words: *Crotalaria sessiflora* L., solvent extract, antioxidative activity, antimicrobial activity

서 론

현대인들의 식생활 양상은 다양한 가공식품을 선택하고 인스턴트 식품을 선호하는 경향으로 이들 식품의 장기간 섭취 시 안전성 문제가 제기되고 있다(1,2). 최근 다수의 연구결과 과일과 야채 섭취 시 각종 질병을 예방하거나 치유할 수 있는 천연항산화제가 다량 함유되어 있어 이들 섭취는 생체 내 산화적 손상에 의해 발생하는 각종 성인병으로부터 생체를 방어할 수 있다는 인식이 확산되고 있어 천연식품을 섭취하려는 시도 또한 증가추세이다. 식품에 첨가되는 각종 첨가물은 합성첨가물과 천연에서 추출한 성분을 사용하는데 식품의 가공과정에서는 천연 첨가물보다 BHT(butylated hydroxytoluene)나 BHA(butylated hydroxyanisole)와 같은 합성 첨가물의 사용이 많은 실정이다(3). 최근 항산화력이 뛰어난 BHT나 BHA 및 TBHQ와 같은 합성항산화제가 각종

가공식품에 첨가되고 있으나 이들의 변이성, 발암성 및 세포 내 독성이 지적되면서 부작용이 적으면서 안전성에 문제가 없는 천연 항산화제를 개발하려는 시도가 요구되었다(4).

항산화제는 주로 식용유지, 지방질 식품, 상온에서 장기간 저장되는 비스킷류, 과자류, 스낵가공품, 튀김 가공품 등에 첨가되고 있다(5). 항산화제에 대한 연구는 천연 추출물에서 개발하려는 연구가(6) 다수를 이루며, Kim 등(7)은 뽕잎의 용매별 분획 추출물이 식용대두유에 대하여 산패 억제능의 우수하였음을 보고하였고, Kim 등(8)은 보리 부산물에서 추출한 폴리페놀화합물에 대한 항산화능을 측정하였다. 또한 Ahn과 Cho(9)는 탈지 들깨박에서 추출한 페놀물질이 대두유에 대한 항산화 활성이 높음을 보고하여 유지 산패를 억제하는 물질을 대한 개발 연구가 이루어지고 있다. Lee 등(10)의 연구에 의하면 패모, 어성초, 쇠비름의 에탄올 추출물이 돈지에 대한 산화억제능이 우수하다고 보고하였고 Lim 등

*Corresponding author. E-mail: mhkang@office.hoseo.ac.kr
Phone: 82-41-540-5973, Fax: 82-41-548-0670

(11)은 116종의 생약을 에탄올로 추출한 후 팜유와 돈지를 기질로 하여 항산화능을 비교 검색한 결과 건강, 강황, 방기 백작약, 석곡 등의 생약 추출물이 다른 생약 추출물보다 높은 항산화력을 나타내었다고 보고하였으며, Lee(12)는 황기 메탄올 추출물 중 국내산 5년근이 중국산에 비하여 대두유, 팜유, 라이드 등의 유지에 대하여 높은 항산화 효과를 보고하였다.

활나물(*Crotalaria sessiflora* L.)은 두과식물로 우리나라 산야에서 야생하고 있는 잡목으로 각종 종양, 암, 만성기관지염 등 각종 질환의 치료제나 해독제로 민간요법으로 널리 이용되어 왔다(13). 일년생 초본으로 20~70 cm의 크기로 전체에 긴 갈색 털이 나있으며 황무지나 잡초밭에서 자생하고 전국적으로 널리 분포되어 있다(14). 활나물은 다양한 생리활성 효과와 항암효과를 가진다고 보고하고 있다. 즉 생약명은 農吉利로 종양, 각종 암, 만성기관지염을 치료하거나 해독제로 이용되고 있으며, 특히 항암 효과가 있는 monocrotaline이라는 특정성분을 다량 함유하고 있다(15). Zhu 등(16)은 다양한 alkaloid 계통의 물질이 함유되어 있다고 보고하고 있다. 또한 Kang 등(17)은 활나물의 부위별 에탄올 추출물의 항산화 효과를 비교해 본 결과, 잎의 추출수율이 높았고 항산화 활성도 매우 높게 측정하였다.

본 연구에서는 자생하고 있는 활나물의 부위별로 용매 추출물을 조제하여 유지에 대한 항산화효과와 항균성을 측정하여 천연 첨가물로서의 사용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 활나물(*Crotalaria sessiflora* L.)은 2002년 수원 작물과학원 약용작물 시험포장에서 재배된 것을 수확하여 잎, 줄기, 뿌리부분으로 분류하여 세척한 후 그늘에서 자연 건조 후 시료로 사용하였다. 천연 항산화제로는 α -tocopherol과 BHT(Sigma Co, USA)를 대조군으로 사용하였다.

추출방법

활나물의 잎, 줄기, 뿌리를 메틸렌클로라이드:에탄올(3:1) 혼합용매로 상온에서 반복 추출하고 여과지에 거른 후 rotary evaporator(EYELA N-1000, Japan)를 이용하여 감압 농축하여 용매를 완전히 제거시킨 후 동결 건조기를 이용하여 건조 후 각 추출물의 수율을 계산하였다.

페놀성 화합물 정량

활나물 부위별 추출물의 페놀성 화합물은 Folin-Denis법(18) 일부를 변형하여 비색 정량하였다. 각 시료에 Na_2CO_3 를 가하고 2분간 실온에 방치하고 50%의 Folin-Denis시약을 가하고 혼합하여 30분 정치하여 750 nm에서 흡광도를 반복 측정하였다. 표준 곡선을 작성하기 위해 catechine 농도(0~1 mg/mL)를 달리하여 작성한 그래프의 계산식에 의해 계산

하였다.

활나물 부위별 추출물의 유지에 대한 항산화 효과 측정

각 추출물을 소량의 에탄올에 녹인 후 각각 0.02, 0.05% 농도로 옥수수유에 첨가하였다. 실험대조군으로는 추출물을 일체 첨가하지 않은 옥수수유를 사용했으며, 천연항산화제로 tocopherol과 합성항산화제로 BHT를 각각 0.02%씩 첨가하여 비교하였다. 각 시료들은 $60 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 저장하면서 과산화물가(peroxide value: POV)(19)와 공액이중산가(conjugated linoleic acid: CDV)(20)를 측정하여 산패도를 측정하였으며, 상대적 항산화 효과를 비교하기 위하여 Ahn(21)의 방법에 의하여 산출하였다. 즉 기질 옥수수유의 과산화물가가 100(meq/kg · oil)에 도달하는 기간을 유도기간(induction period: IP)으로 설정한 다음, 대조군의 유도기간에 대한 각 추출물이 첨가된 기질유지의 유도기간으로부터 다음과 같은 상대적 항산화 효과(relative antioxidant effectiveness: RAE)를 구하였다.

$$\text{RAE} = \frac{\text{IP of antioxidant added substrate}}{\text{IP of the control}} \times 100$$

항균활성 측정

실험에 사용한 균주는 *Bacillus subtilis*(ATCC 9372), *Staphylococcus aureus*(ATCC13301), *Listeria monocytogenes*(ATCC19112), *Salmonella* Enteritidis(ATCC13076), *Pseudomonas flourescens*(ATCC11250), *Escherichia coli*(ATCC15489)종을 각각 사용하였고 생육배지는 nutrient broth와 agar(Difco)를 사용하였다.

각 추출물의 항균력 검색은 한천배지확산법(disk plate method)로 측정하였다(22). 즉 각각의 시료를 추출용액인 에탄올을 사용하여 5% 농도로 조절한 후 0.45 μm membrane filter(Milipore Co., USA)로 여과 제균하고, 멸균된 paper disk(Toyoseisakusho, 8 mm, Japan)에 20 μL 씩 흡수시켰다. 추출용매인 에탄올을 완전히 휘발시킨 후 평판배지에 paper disk를 밀착시키고, 4°C냉장고에서 1시간 방치 후 30°C의 incubator에서 48시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하여 항균력을 비교하였다.

통계처리

본 연구의 결과는 SAS system를 이용하여 ANOVA 분석 후 $\alpha=0.05$ 에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

추출수율

활나물 부위별 추출수율은 Table 1과 같다. 활나물의 추출수율은 줄기 4.47%, 잎 3.95%, 뿌리 2.67%의 순으로 줄기 부분의 추출수율이 4.47%로 가장 높게 나타났다.

Table 1. Yield of *Crotalaria sessiflora* L. extracts

Sample of <i>Crotalaria sessiflora</i> L.	Yield (%)
Leaves	3.95
Stem	4.47
Root	2.67

활나물 부위별 총페놀 화합물

총 페놀성화합물 함량은 잎 2.98, 뿌리 2.34, 줄기 2.11 mg/mL로 잎 추출물에서 가장 높고 줄기 추출물에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 활나물 모든 부위별 추출물은 기존의 항산화제인 α -tocopherol보다는 페놀성 화합물 함량이 높았다(Fig. 1). 페놀화합물을 식물자원에 함유되어 있는 천연물질로써 다양한 구조와 생리활성이 다양하게 보고(23)되었고, Kang 등(17)의 연구에 의하면 활나물을 에탄올 용매로 추출한 경우 부위에 따른 페놀 함량은 0.71~0.99 mg/mL로 측정된 것과 비교하여 볼 때 용매에 따른 추출수율과 페놀함량이 다르게 측정되는 것으로 나타났다.

활나물 부위별 추출물의 항산화 효과

활나물의 부위별 추출물의 항산화성을 검토하기 위하여

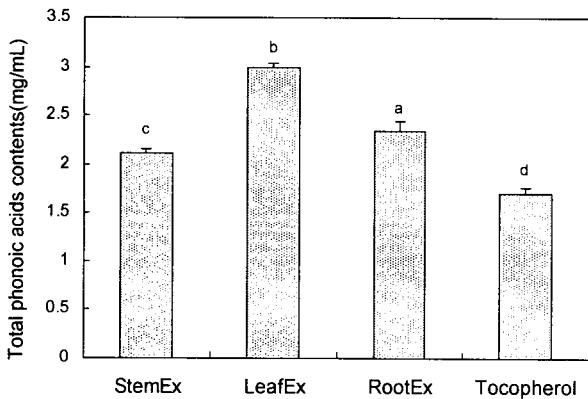


Fig. 1. Total phenolic acids contents of extracts from each part of *Crotalaria sessiflora* L.
a~d: different letters on the bars indicate significant difference at $\alpha=0.05$.

옥수수유에 추출물과 항산화제를 각 농도별로 첨가하여 60 \pm 2°C에 저장하면서 3일 간격으로 POV를 측정된 결과는 다음 Fig. 2와 같았다. 활나물의 잎, 줄기, 뿌리 추출물은 대조군에 비하여 저장기간 동안 높은 항산화성을 나타내었고, 0.05% 농도 추출물들이 항산화활성이 높게 나타났다. CDV를 측정된 결과도 저장기간에 따라 POV 경향과 비슷한 결과를 나타내었다. 또한 식물성 유지의 POV가 60~100 meq/kg \cdot oil, 동물성 지방의 경우 20~40 meq/kg fat에 도달하는데 소요되는 시간을 그 유지의 산화 유도기간으로 측정하고 있다(24). 따라서 POV가 100 meq/kg \cdot oil에 도달하는 시간을 유도기간으로 설정하여 활나물 추출물과 대조군간의 유도기간을 비교한 결과는 Table 2와 같다. 즉 합성항산화제 BHT는 25.0일인데 비하여 활나물 잎, 줄기 0.05% 추출물이 각각 23.1일과 22.1일로 유도기간이 대조군 19.4일에 비하여 연장되는 것을 알 수 있었다. 위의 결과를 통하여 활나물 추출물은 유지에 대한 항산화 효과가 있는 것으로 나타났고, 천연 추출물로서 가치가 있는 것으로 사료된다.

활나물 부위별 추출물의 항균활성 비교

활나물 추출물을 2% 농도로 희석하여 paper disc agar diffusion 법을 이용하여 항균성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 활나물 부위별 추출물의 항균성을 측정된 결과 활나물 잎 추출물이 모든 균종에서 강한 항균력을 나타냈고, 줄기

Table 2. Induction period (IP) and relative antioxidant effectiveness (RAE) of the corn oil containing various concentrations of *Crotalaria sessiflora* L. extracts

	IP (day)	RAE (%)
Control	19.4	100
BHT	25	129
LeafEX 0.02%	20.8	107
LeafEX 0.05%	23.1	119
StemEX 0.02%	20.5	105
StemEX 0.05%	22.1	114
RootEX 0.02%	18.9	97.2
RootEX 0.05%	20.5	106

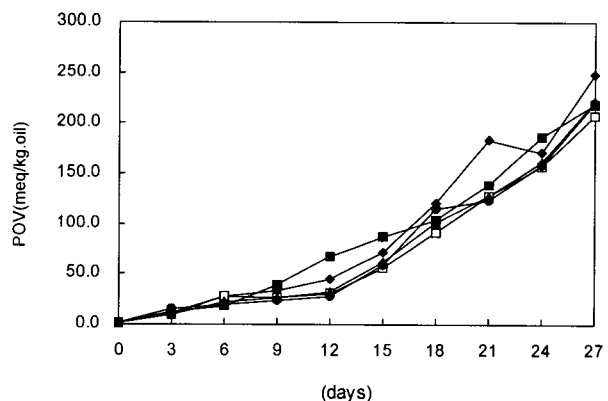
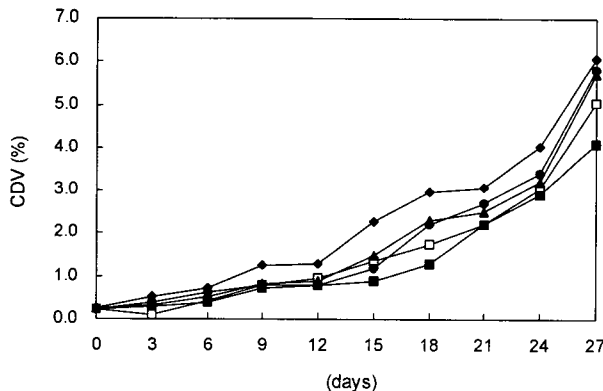


Fig. 2. POV and CDV of corn oils containing with the *Crotalaria sessiflora* L. extracts.
—◆— Control, —□— BHT 0.02, —▲— Leaf 0.05, —●— Stem 0.05, —■— Root 0.05.

Table 3. Antibacterial activity of the extract of *Crotalaria sessiflora* L.

	Inhibition zone (mm)		
	LeafEX	StemEX	RootEX
Gram positive			
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	+++	+	+
Gram negative			
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+	++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+++	++	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+

-: no inhibition (-8 mm), +: slight inhibition (8~9 mm), ++: moderate inhibition (10~11 mm), +++: heavy inhibition (12 mm-).

추출물, 뿌리 추출물 순으로 항균활성을 나타내었다. 그람 양성균주의 잎 추출물은 12.2~12.4 mm의 활성저해환을 보였다. 특히 *Pseudomonas fluorescens*에 대해 잎 추출물은 14.5 mm, 줄기추출물은 12.5 mm의 강한 항균활성환을 나타내었다. Jung 등(25)은 오미자 종자의 용매추출물의 항균활성이 물 추출물보다 높게 측정되었고 *S. Enteritidis*균주에 처리한 결과 균체가 팽윤되고 표층구조가 허물어졌다고 보고한 바 있다. 활나물 부위별 추출물의 균체에 대한 항균반응을 실험한 결과, 항균활성이 높게 나타난 것은 활나물의 추출물에 의해 미생물 표층구조가 허물어져 균체성분이 유출되어 균생육이 억제된 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 활나물의 항산화제와 항균제로의 이용 가능성을 탐색하기 위한 기초연구로 수행되었다. 활나물의 용매 추출수율은 줄기, 잎, 뿌리 순이었으며 줄기추출수율이 4.47%로 가장 높았다. 총 페놀성화합물 함량은 잎, 뿌리, 줄기의 순이었으며, 잎 추출물이 2.98 mg/mL로 가장 높았으며, 줄기 추출물에서 가장 낮았다. 활나물 부위별 추출물의 유지에 대한 항산화성을 검토하기 위하여 옥수수유에 추출물과 항산화제를 각 농도별로 첨가하여 60±2°C에 저장하면서 3일간격으로 POV를 측정된 결과, 활나물의 잎, 줄기, 뿌리 추출물은 대조군에 비하여 저장기간 동안 높은 항산화성을 나타내었고, 0.05%의 추출물을 첨가한 군의 항산화 활성이 높았다. 또한 저장기간에 따른 CDV 측정 결과 POV와 유사한 경향이였다. 산화 유도기간은 잎, 줄기 0.05% 추출물이 대조군에 비해 연장되었다. 활나물 추출물의 항균성을 측정된 결과 잎 추출물이 모든 균종에서 강한 항균력을 나타내었고, 줄기, 뿌리 추출물 순으로 항균활성을 나타내었다. 특히 *Pseudomonas fluorescens*에 대해서는 강한 항균활성을 보였다. 따라서 활나물 추출물의 항산화효과와 항균성을 측정된 결과 모든 부위에서 강한 활성을 나타내어 천연 첨가물로의

개발 가능성이 시사되었다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 농림기술센터의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Jung IC, Park KS, Ha HC, Kim SH, Kwon YI, Lee JS. 1996. Antioxidative effects of fruit body and mycelial extracts of *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* 28: 464-469.
- Jang EH, Pyo YH, Ahn MS. 1997. Antioxidant effect of omija (*Schizandra chinensis Baillon*) extracts. *Kor J Soc Food Sci* 12: 372-376.
- Cho SY, You BJ, Chang MH, Lee SJ, Sung NJ, Lee EH. 1994. Screening for antimicrobial compounds in unused marine resources by the paper disk method. *Korean J Food Sci Technol* 26: 156-165.
- Lim KT, Shim JH. 1999. Antioxidative effects of ethanol extracts from *Rhus verniciflua* Stocks on mouse whole brain cells. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1248-1254.
- Cha BC, Lee SK, Lee HW, Lee E, Choi MY, Rhim TJ, Park HJ. 1997. Antioxidative effect of domestic plants. *Kor J Pharmacogn* 28: 15-20.
- Park CS, Kwon CJ, Choi MA, Park GS, Choi KH. 2002. Antioxidative and nitric activities of mugwort and pine needle extracts. *Korean J Food Preserv* 9: 248-252.
- Kim MW, Ahn MS, Lim YH. 2003. Antioxidative activities of mullberry leaves extracts on edible soybean oil. *Korean J Food Culture* 18: 1-8.
- Kim HM, Seog HM, Seo MS, Lee YT, Ahn MS. 2002. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J Food Sci Technol* 34: 889-893.
- Ahn MS, Cho HS. 1999. Antioxidative effect of phenolic acids in defatted perilla flour on soybean oil. *Korean J Food Cookery Sci* 15: 55-61.
- Lee YJ, Shin DH, Chang YS, Shin JI. 1993. Antioxidative effect of some edible plant solvent extracts with various synergists. *Korean J Food Sci Technol* 25: 683-689.
- Lim DK, Choi U, Shin DH. 1996. Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 28: 83-91.
- Lee CJ. 1999. A study on the antioixdative effects on the oils and identification of antioxidative substances from *Astragalus membranaceus Bunge* extracts. *PhD Dissertation*. Sungshin Women's University.
- Lee H, Lim JY. 1988. Antimutagenic activity of extract from anticancer drugs in Chinese medicine *Mutation Res* 204: 229-234.
- Shin MK, Song HJ, Kang YS, Ryu HS, Han DS, Kang KU, Baek SH. 1999. Development of anticancer agents from Korean medicinal plants. *Korean J Pharmacogn* 30: 130-136.
- Jang JH, Kim YJ, Jeon BS. 2001. Effect of presown cold stratification GA3, KNO3 and acetone treatment on germination of *Crotalaria sessiflora* L. *Korean J Medical Crop Sci* 9: 124-129.
- Zhu YC, Wu DC, Li JF. 1989. *Plants medicinals*. China boreali oriental, Harbin, China.

17. Kang MH, Choi CS, Kim ZS, Chung HK, Min KS, Park CG, Park HW. 2002. Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiflora* L. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1098-1114.
18. Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
19. AOCS. 1990. *Official and Tentative Methods cd 8-53*. 4th ed. American Oil Chemists Society, Illinois.
20. AOCS. 1990. *Official and Tentative Methods Ti-la-64*. 4th ed. American Oil Chemists Society, Illinois.
21. Ahn MS. 1984. Effects of reaction temperature, time and presence of organic acids or their salts on the antioxidant activity of caramelization mixture. *PhD Dissertation*. Korea University.
22. Piddock LJV. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J Appl Bacteriol* 68: 307-310.
23. Kim TK, Shin HD, Lee YH. 2003. Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J Food Sci Technol* 35: 266-272.
24. Reimenshneider RW. 1975. The antioxidative rancidity and antioxidants. In *Handbook Food and Agriculture*. Blank CF, ed. Reinhold Publishing Corp., New York, USA.
25. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The oxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* (omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.

(2005년 5월 26일 접수; 2005년 6월 30일 채택)