

암대극(*Euphorbia jolkini* Boiss) 추출물의 항산화 및 항균활성

김지영 · 이정아 · 윤원종 · 오대주 · 정용환 · 이욱재 · 박수영*

(재)제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소

Antioxidative and Antimicrobial Activities of *Euphorbia jolkini* Extracts

Ji-Young Kim, Jung-A Lee, Weon-Jong Yoon, Dae-Ju Oh, Yong-Hwan Jung, Wook Jae Lee, and Soo-Yeong Park*

Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute

Abstract The antioxidative and antimicrobial activities of *Euphorbia jolkini* extracts were investigated. Total polyphenolic compounds extracted were approximately as follows: 162.08 mg/g from ethanol, 12.64 mg/g from *n*-hexane, 48.11 mg/g from dichloromethane, 544.08 mg/g from ethylacetate, 176.42 mg/g from butanol, and 30.00 mg/g from water. The ethylacetate fraction of this extraction showed the highest antioxidative activity (IC₅₀): DPPH radical scavenging capacity was measured at 8.38 µg/mL, xanthine oxidase inhibitory activity was 466.01 µg/mL, superoxide radical scavenging capacity was 11.39 µg/mL, and nitric oxide scavenging capacity was 332.11 µg/mL. Antimicrobial activities were determined by paper disc method and minimum inhibitory concentration of *E. jolkini* extracts against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* were also determined. These results suggest that the ethylacetate fraction of *E. jolkini* has strong antimicrobial activity against the all species of microorganisms as well as strong antioxidant activity.

Key words: *Euphorbia jolkini*, antioxidative activity, antimicrobial activity

서 론

최근 약용식물 및 생약 등으로부터 특정성분이나 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리활성물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 생리활성물질은 매우 적은 양으로 현저한 활성을 나타내는 고부가가치의 물질로서 현재 수많은 종류가 유용하게 이용되고 있으며, 또한 새로운 물질들이 연구 개발되고 있다. 특히 산업 문명이 고도로 발달함에 따라 인공합성품 중 일부가 안정성의 문제가 제기 되면서 규제가 점점 더 강화되고 있고, 소비자들의 안전과 건강에 대한 욕구증대에 따라 인공합성품의 사용을 제한하려는 추세에 있어 천연물의 이용 분야는 더욱 넓어지고 있다. 생리활성을 나타내는 물질 중 식품의 기능 강화를 위해 주로 활용되고 있는 것은 방향성 및 항산화활성 관련 물질과 식품의 부패와 변질을 유발하는 미생물에 대하여 항균활성을 나타내는 물질들이다(1).

활성산소(ROS, reactive oxygen species)는 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있으며(2,3), 식품에서도 산패와 독성물질 생성 등으로 유해한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(4). 현재 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 류마티즘, 항암 등의 질병과 관련된 활성산

소 및 자유라디칼의 역할에 대한 연구와 함께 천연 항산화제 개발에 대한 연구가 지속적인 관심의 대상이 되고 있다(5,6). 일반적으로 항산화제(antioxidant) 또는 산화방지제는 산화촉진제(pro-oxidant)와는 반대로 어떤 임의의 산화속도를 억제하여 주는 물질들이나 요인들로 알려져 있으며, 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연시킬 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하기도 한다(7). 천연물에 존재하는 항균성 물질을 항균소재로 이용하고자 하는 연구는 식품, 의약 및 생물공학산업 등에서 오래 전부터 활발하게 연구가 진행되고 있으나 대부분 항균성에 대한 연구가 식품(8-10)이나 한약재(11-15)로 이용되는 식물체에 국한되고 있고 주위에서 흔히 구할 수 있는 많은 자생식물에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다(16,17). 특히 식용으로 이용되어 온 생약류인 경우 항균효과뿐만 아니라 다양한 생리활성을 가지고 있어 이를 굳이 정제하거나 순수 분리하는 과정을 거치지 않고 식품에 직접 첨가가 가능할 것으로 사료되며, 그 경우 식품의 보존성 향상뿐만 아니라 인체에 유용한 다양한 생리활성을 동시에 섭취하는 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각되어진다.

암대극(*Euphorbia jolkini* Boiss)은 다년생 초본식물로 높이는 40-80 cm이고 줄기는 비대(肥大)하여 원주형이며 여러 대가 같이 나옴 전체에 털이 없다. 약명은 대극이고 속명은 갯바위대극이며 제주도 및 남부지방 해안의 암석지(岩石地)에 자생한다. 예로부터 한방에서 잎과 줄기를 사지동통과 타박상, 감기로 인한 해수의 진해제, 소화 불량에도 큰 효과가 있어 약대극(約大戟)이라는 약재로 쓰여 왔으며 또한 민간에서는 뿌리를 건선, 사독, 통경, 이뇨, 발한, 부종, 창종, 치통, 당뇨, 임질 등에 사용하는 것으로 알려진 유독성식물이다(18). 그러나, 암대극에 대한 약리 연구는 거의 보고된 바 없다.

*Corresponding author: Soo-Yeong Park, Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, 4-8 Ara-1, Jeju 690-121, Korea
Tel: 82-64-720-2322
Fax: 82-64-720-2301
E-mail: user111@jejuhidi.or.kr

Received August 2, 2006; accepted September 6, 2006

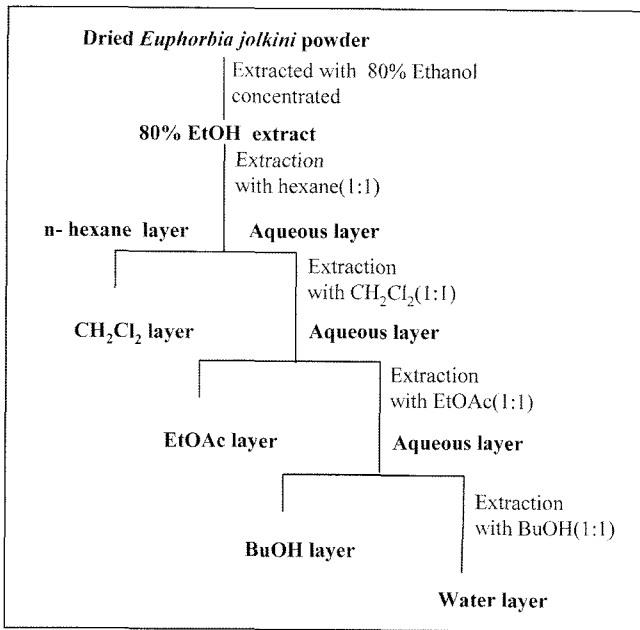


Fig. 1. Scheme of extraction and solvent fractionation of ethanol extract from *Euphorbia jolkini*.

본 연구에서는 기존 연구개발 되어진 항산화제 및 항균제 보다 효과적이고 안전하며 우수한 활성을 발현하는 기능성식품을 천연물로부터 개발하기 위한 연구의 일환으로 한국에 자생하며 한방약으로 사용되는 약용식물인 암대극을 극성에 따라 용매 추출하여 항산화능 및 항균활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 용매 계통 분획

제주도 해안가 일대에 자생하고 있는 암대극(*Euphorbia jolkini* Boiss) 전초를 2006년 4월에 채집하여 대한식물도감(19)을 참고하여 동정하였으며, 동정된 암대극을 증류수로 2-3회 수세한 뒤 물기를 제거한 후 7일간 음건·분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

추출은 80% ethanol(EtOH) 및 분획용 *n*-hexane, dichloromethane (CH_2Cl_2), ethylacetate(EtOAc) 그리고 butanol(BuOH)을 사용하였으며, Fig. 1에 나타난 바와 같이 순차적으로 용매 추출하였다. 즉 80% ethanol 추출물에 10배의 증류수와 *n*-hexane을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 *n*-hexane 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 dichloromethane, ethylacetate, butanol 그리고 water 층을 분획하여 각각의 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 3회 반복 실시하였다. 각 분획물은 해당 용매로 용해시켜 0.2 μm membrane filter (Advantec MFS Inc., USA)로 제균하여 4°C에 보관하면서 본 연구에 사용하였다.

총 폴리페놀 측정

총 폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis 방법(20)에 따라 측정하였다. 즉, 암대극 추출물 시료를 1 mg/mL로 녹인 다음 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 2 mL로 만든 후, 여기에 0.2 mL Folin-ciocalteu's phenol reagent(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분간 실온에 방치하였다. 그리고 2 M Na_2CO_3 용액 0.4 mL를 가하여 혼합하고 증류수를 첨가하여 4 mL로 만든 후, 실온에서 1시간 동안 방치하여 상등액을

725 nm에서 흡광도(Ultaspec 2100 pro, Amersham Biosciences, USA)를 측정하였고, 표준물질은 tannic acid (Sigma Chemical Co., USA)를 이용하였다. 표준곡선을 작성한 후 암대극 추출물 및 분획물 시료의 총 폴리페놀 함량은 g 중의 mg tannic acid로 나타내었다.

전자공여능(electron donating ability) 측정

전자공여능(electron donating ability) 측정은 Blosis 방법(21)에 의한 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) free radical 소거법을 변형하여 측정하였다. Methanol에 녹인 시료의 각각의 농도를 96 well plate에 0.1 mL씩 분주하고 0.4 mM DPPH(Sigma Chemical Co., USA)용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 ascorbic acid, butylated hydroxy anisole(BHA), trolox를 사용하였다. DPPH radical 소거활성은 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC_{50})로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

Xanthine oxidase 저해 활성 및 Superoxide 소거 활성 검색

Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도값에 의해 산출하였고, superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium(NBT) 환원방법에 의해 측정하였다(22). 반응액은 각 시료의 여러 농도와 0.5 mM xanthine와 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer(pH 7.5) 0.1 mL에서 준비하였고 50 mU/mL xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하여 반응 시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC_{50})로 표시하였다.

Nitric oxide 소거 활성 검색

자연적으로 nitric oxide를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 시료의 nitric oxide 소거 활성을 검색하였다(23,24). 10 mM SNP 용액 0.2 mL에 시료를 농도별로 첨가하고 25°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess시약 [2.5% (v/v) phosphoric acid, 1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine]을 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염(nitrite)의 양으로 nitric oxide 소거활성을 산출하였다. Nitric oxide 소거활성은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC_{50})로 표시하였다.

사용균주 및 배지

항균활성 검색은 식중독을 일으키는 Gram(+) 세균 4종과 Gram(-) 세균 5종으로 총 9종의 균주를 사용하였으며, 본 연구에 사용한 균주 종류와 배지 조성은 Table 1과 같다. 배지는 tryptic soybean agar(TSA), tryptic soybean broth(TSB), brain heart infusion(BHI)는 Difco(USA)사의 제품을 사용하였다.

항균력 측정

암대극의 항균력을 검색하기 위해 본 연구에서는 paper disc method(15)을 사용하였다. 즉, 각 균주 1 백금이를 취하여 10 mL의 broth에 접종하고 최적온도에서 18시간 동안 배양하였다. 배양한 세균을 Spectrophotometer(Ultaspec 2100 pro, Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 650 nm에서 optical density(O.D)

Table 1. List of microorganisms and media used for antimicrobial experiment

	Strains	Media	Temp. (°C)
Gram positive	<i>Bacillus cereus</i> (ACTC 9634)	TSA/TSB	30
	<i>Listeria monocytogenes</i> (ACTC 19115)	BHI	37
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ACTC 25923)	TSA/TSB	37
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ACTC 12228)	TSA/TSB	37
Gram negative	<i>Escherichia coli</i> (ACTC 25922)	TSA/TSB	37
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ACTC 27853)	TSA/TSB	37
	<i>Salmonella enteritidis</i> (KCCM 12021)	TSA/TSB	37
	<i>Salmonella typhimurium</i> (ACTC 14028)	TSA/TSB	37
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ACTC 33844)	TSA/TSB+3%NaCl	30

값을 0.4(10⁶ CFU/mL)로 흡광도를 조절하고 pour-plate method에 따라 배지가 분주된 배양 접시에 균일하게 섞은 후 실온에서 굳혔다. 이 배지 위에 멸균된 paper disc를 시료 수에 맞게 올리고 밀착시킨 후 각각의 시료를 1000 ppm으로 흡수 시켰다. 대조구는 80% ethanol을 실험군과 동일한 방법으로 점적하였다. 최적온도에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 생육저해환(clear zone, mm)의 크기를 측정하여 항균활성을 비교 분석하였다.

미생물의 생육 곡선 측정

B. cereus, *L. monocytogenes* 그리고 *E. coli* 의 생육저해 곡선 측정은 각 추출물 시료를 액체배지에 100, 250, 500 및 1000 ppm 농도로 처리하여 O.D 값이 0.4가 될 때까지 키운 세균 배양액 0.1 mL를 신선한 배지 10 mL에 접종하여 shaking incubator (120 rpm)를 이용하여 최적온도에서 배양하면서 미생물 생육저해는 microplate reader(Bio-TEK Instrumenis Inc., USA)를 통해 650 nm에서 12시간 간격으로 72시간 동안 측정하였다.

미생물의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

각 균주의 최소저해농도(MIC)은 broth microdilution 방법(25)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉 well plate에 각 추출물 시료를 0, 100, 250, 500 및 1000 ppm 농도로 처리하여, 여기에 O.D 값이 0.4가 될 때까지 키운 세균 배양액을 100배 희석하여 접종시켜 24시간 배양한 후, 세균 배양액의 증식 정도를 microplate reader(Bio-TEK Instrumenis Inc., USA)로 650 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

추출수율 및 총 폴리페놀 함량

암대극 건조분말(253 g)을 80% ethanol로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 조추출물 66.63 g을 얻었다. 그리고 ethanol 추출물 중 15 g을 증류수 1 L에 현탁시킨 후에 *n*-hexane(1 L × 3), dichloromethane(1 L × 3), ethylacetate(1 L × 3) 그리고 butanol(1 L × 3) 등으로 순차적으로 분획하여 *n*-hexane 층에서 2.1570 g, dichloromethane 층에서 0.3867 g, ethylacetate 층에서 3.0012 g 및 butanol 층에서 3.2352 g 그리고 잔사인 water 층에서 4.0783 g의 분획물을 얻었다.

대극과(*Euphorbiaceae*) 식물은 열대 및 아열대 지방에 널리 분포하는 식물로서 300여 속(屬), 7,500여 종(種)이 존재하는데, 그 중에는 약용식물로서 중요한 것들이 많이 존재하며 또한 tannin의 자원으로도 중요한 식물군으로 알려져 있다(26). 암대극(*E. jolkini*)과 동일 속 식물인 대극(*E. pekinensis*)에는 flavonol glyco-

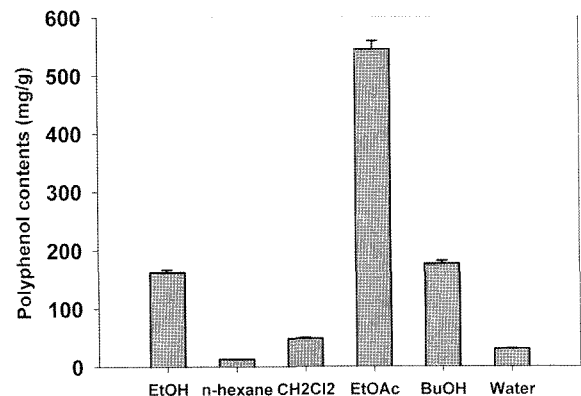


Fig. 2. Concentration of total polyphenolic compounds in the ethanol extract and its various fractions from *Euphorbia jolkini*.

side의 galloyl 유도체들이 가수분해성 tannin과 붉은대극(*E. ebracteolata*)인 경우에는 flavonol glycoside의 galloyl 유도체들과 iso-queretin, kaempferol, quercetin, astragalin, afzelin, rutin 등과 같은 페놀성 화합물이 다수 포함되어 있다는 보고(27,28)가 있어 여기서는 tannic acid 표준곡선을 이용하여 암대극 시료의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 80% ethanol 추출물에서의 총 폴리페놀 함량은 162.08 mg/g ± 0.445, *n*-hexane 분획물에서 12.64 mg/g ± 0.049, dichloromethane 분획물에서 48.1 mg/g ± 0.143, ethylacetate 분획물에서 544.08 mg/g ± 1.452, butanol 분획물에서 176.42 mg/g ± 0.483, 그리고 water분획물에서 30.00 mg/g ± 0.095로 나타났으며 그 중 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타낸 것은 ethylacetate 분획물로 조추출물에 비해 3.4배 가량 증가하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과로 유추해 보면 암대극 또한 다른 대극속 식물과 마찬가지로 페놀성 화합물을 다수 함유하고 있음을 의미한다.

일반적으로 페놀성 물질은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며, 이런 종류의 화합물은 항산화 효과 및 항균효과 등 여러 생리활성 기능도 갖고 있는 것으로 알려져 있다(29-31).

암대극 추출물에 의한 항산화활성

한방약으로 사용되어 왔던 약용식물인 암대극을 본 연구에서는 ethanol 및 극성에 따라 용매분획 추출하여 항산화능에 대한 생리활성을 검증하였다. 각각의 추출물에 대한 항산화활성 결과

Table 2. Comparison of antioxidant potential by the ethanol extract and its various fractions from *Euphorbia jolkini*

Treatment	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾			
	DPPH radical scavenging activity	Xanthine oxidase inhibitory activity	Superoxide radical scavenging activity	Nitric oxide radical scavenging activity
80% EtOH	22.22 ± 1.37	>1000	26.11 ± 1.41	413.26 ± 2.36
<i>n</i> -hexane	266.83 ± 2.43	>1000	>1000	>1000
CH ₂ Cl ₂	71.93 ± 1.85	>1000	117.48 ± 2.07	625.71 ± 2.56
EtOAc	8.38 ± 0.92	466.01 ± 2.67	11.39 ± 1.06	332.11 ± 1.55
BuOH	12.90 ± 1.11	>1000	19.701 ± 1.29	496.33 ± 2.22
Water	53.47 ± 1.72	>1000	93.73 ± 1.97	>1000
BHA ²⁾	22.70 ± 0.61	NA ³⁾	NA	-
Ascorbic acid	3.90 ± 3.22	-	-	-
Trolox	8.62 ± 2.20	288.60 ± 4.4	189.9 ± 2.03	>1000
Allopurinol	NA	3.12 ± 0.17	22.65 ± 0.35	-

¹⁾IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments. ²⁾Butylated hydroxy anisole. ³⁾NA: not available method.

Table 3. Antimicrobial activities of each solvent fraction from *Euphorbia jolkini* against gram positive bacteria

Strains	Fraction conc. (ppm)	Clear zone on plate (mm) ¹⁾					
		80% EtOH	hexane	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	BuOH	Water
<i>B. cereus</i>	100	11	- ²⁾	-	13	11	-
	250	15	-	-	18	15	10
	500	15	-	-	20	16	11
	1000	18	-	11	22	18	12
<i>L. monocytogenes</i>	100	10	-	-	12	11	-
	250	11	-	-	13	12	10
	500	12	-	-	15	13	11
	1000	15	-	11	18	15	12
<i>S. aureus</i>	100	11	-	-	12	12	-
	250	15	-	-	18	16	10
	500	15	-	-	19	17	11
	1000	19	-	11	20	18	13
<i>S. epidermidis</i>	100	11	-	-	13	12	-
	250	16	-	-	17	13	10
	500	17	-	9	18	14	11
	1000	20	-	11	20	18	13

¹⁾Diameter. ²⁾No inhibitory zone was formed.

는 Table 2에 나타내었다. 전자공여능 측정에 사용된 DPPH의 free radical 소거활성은 ethylacetate와 butanol 분획물에서 다른 용매 분획물에 비해 대단히 높은 radical 소거활성을 나타냈으며, xanthine oxidase 저해활성은 ethylacetate 분획물에서, superoxide radical 소거활성과 nitric oxide 소거활성은 ethylacetate와 butanol 분획물에서가 높게 나타났다. 전반적으로 가장 우수한 항산화활성을 보인 추출물은 ethylacetate 분획물로 각각의 DPPH의 free radical 소거활성, xanthine oxidase 저해활성, superoxide 소거활성 및 nitric oxide 소거활성의 IC₅₀ 값은 8.38 µg/mL, 466.01 µg/mL, 11.39 µg/mL, 332.11 µg/mL 이었다. 총 폴리페놀 함량이 가장 높게 나타난 ethylacetate 분획물에서 전자공여능이 가장 높게 나타난 것으로 보아 페놀성 화합물과 전자공여능과는 서로 밀접한 관계가 있음을 확인 할 수 있었고, 특히 ethylacetate 분획물은 대조군으로 사용된 합성 항산화제인 BHA(22.70 µg/mL)나 trolox(8.62 µg/mL)보다 전자공여능이 높게 나타났다. 그리고 xanthine/xanthine oxidase system에 의한 superoxide 소거활성 또한 대조군으로 사

용된 allopurinol(22.65 µg/mL) 보다 높게 나타난 것은 그 의미가 크다 하겠다. 그러나, Fig. 2와 Table 2의 결과에서 보듯이 ethylacetate 분획물에서의 총 폴리페놀 함량이 다른 분획물에 비해 월등히 높음에도 불구하고 항산화활성에는 총 폴리페놀함량 차이 만큼 크나큰 차이를 보이지 않았다. 그 원인으로서는 암대극에 함유되어 있는 성분들이 radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 모두 억제하는 것이 아니라 활성산소의 종류나 radical source에 따라 또한 산화반응 기작에 따라 반응성이 다르게 작용되기 때문이라 여겨지며, 이를 극복하기 위해선 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화물질 연구가 보다 더 세밀히 이루어져야 될 것으로 여겨진다.

본 연구를 통해 암대극은 산소 유리기의 자유기를 소거할 수 있는 우수한 생리활성물질을 다수 함유하고 있음을 확인 할 수 있었으며 또한 총 폴리페놀 함량이 가장 높은 ethylacetate 분획물에서 항산화효과가 가장 높게 나타남으로써 암대극에서의 항산화능을 나타내는 주된 물질은 페놀성 화합물임을 간접적으로

Table 4. Antimicrobial activities of each solvent fraction from *Euphorbia jolkini* against gram negative bacteria

Strains	Clear zone on plate (mm) ¹⁾						
	Fraction conc. (ppm)	80% EtOH	hexane	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	BuOH	Water
<i>E. coli</i>	100	11	- ²⁾	-	14	11	-
	250	14	-	-	17	13	10
	500	14	-	-	18	15	12
	1000	18	-	11	20	18	13
<i>P. aeruginosa</i>	100	11	-	-	14	11	-
	250	14	-	-	18	15	11
	500	15	-	9	20	16	12
	1000	18	-	11	22	18	14
<i>S. enteritidis</i>	100	11	-	-	12	11	-
	250	14	-	-	17	15	11
	500	16	-	10	18	16	12
	1000	18	-	11	21	18	13
<i>S. typhimurium</i>	100	11	-	-	14	11	-
	250	14	-	-	17	16	10
	500	14	-	-	18	17	11
	1000	16	-	11	20	18	12
<i>V. parahaemolyticus</i>	100	11	-	-	13	12	-
	250	15	-	-	18	15	10
	500	17	-	9	20	16	11
	1000	19	-	11	22	18	13

¹⁾Diameter. ²⁾No inhibity zone was formed.

Table 5. Minimum inhibitory concentration of the each solvent fraction from *Euphorbia jolkini* against bacteria

Strains	MIC (ppm)					
	80% EtOH	n-hexane	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	BuOH	Water
<i>B. cereus</i>	100 < M < 0	- ¹⁾	1000 < M < 500	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100
<i>L. monocytogenes</i>	100 < M < 0	-	1000 < M < 500	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100
<i>S. aureus</i>	100 < M < 0	-	1000 < M < 500	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100
<i>S. epidermidis</i>	100 < M < 0	-	500 < M < 250	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100
<i>E. coli</i>	100 < M < 0	-	1000 < M < 500	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100
<i>P. aeruginosa</i>	100 < M < 0	-	500 < M < 250	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100
<i>S. enteritidis</i>	100 < M < 0	-	1000 < M < 500	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100
<i>S. typhimurium</i>	100 < M < 0	-	1000 < M < 500	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100
<i>V. arahaemolyticus</i>	100 < M < 0	-	1000 < M < 500	100 < M < 0	100 < M < 0	250 < M < 100

¹⁾No inhibity zone was formed.

확인 할 수 있었다. 특히 분획 레벨에서의 활성이 대조구 성분 못지않게 우수하게 나타난 것은 앞으로 암대극을 이용한 천연항산화제로서 개발가능성이 높다고 사료된다.

암대극 추출물의 항균력

암대극 추출물을 paper disc method로 식품 유해 미생물을 적용시켜 항균활성을 측정하였다. Gram(+) 세균에서는 Table 3에서 보듯이 80% ethanol 추출물, ethylacetate, butanol 및 water 분획물에서 처리농도가 증가할수록 항균활성을 나타내는 inhibition zone 크기도 비례적으로 증가하였으며, 특히 ethylacetate 분획물인 경우 *S. aureus*에서 1000 ppm 농도에 20 mm, *B. cereus*에서 22 mm의 clear zone이 나타나 다른 분획물보다 강한 항균력을 나타냈다. Gram(-) 세균에 대한 항균활성 검색 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 80% ethanol 추출물, ethylacetate, butanol 및

water 분획물에서 모든 균주에 대해 비교적 강한 항균활성을 나타냈는데, 특히 ethylacetate 분획물은 *P. aeruginosa*와 *V. parahaemolyticus* 균주에서 1000 ppm으로 처리시 22 mm로 가장 우수한 clear zone을 나타내었다. 그러나, n-hexane 분획물은 모든 균주에 대해 항균활성을 보이지 않았으며 dichloromethane 분획물에서는 1000 ppm 농도에서 다소 낮은 항균활성을 나타내었다.

암대극 추출물의 MIC 측정

암대극 추출물이 paper disc method에 의해 우수한 항균활성을 갖고 있음을 확인 된 바, 이에 식품 유해 미생물에서의 생육을 저해시키는 최소저해농도(minimum inhibitory concentration)를 측정 비교해 보았다. Table 5에서 보듯이 본 실험에 사용된 모든 균주를 대상으로 80% ethanol 추출물, ethylacetate 그리고 butanol 분획물은 100 ppm 농도에서부터 높은 생육 저해 효과를 나타냈

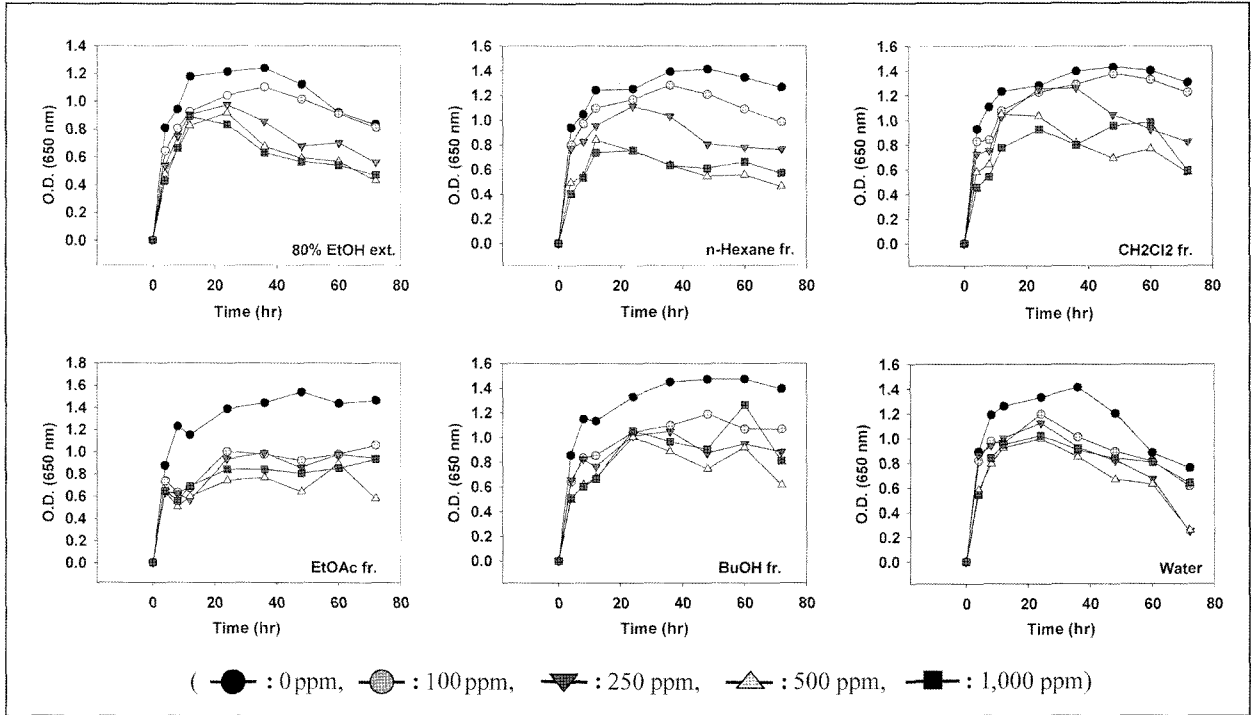


Fig. 3. Growth curves of *Bacillus cereus* in the media adding the ethanol extract and its various fractions from *Euphorbia jolkini*.

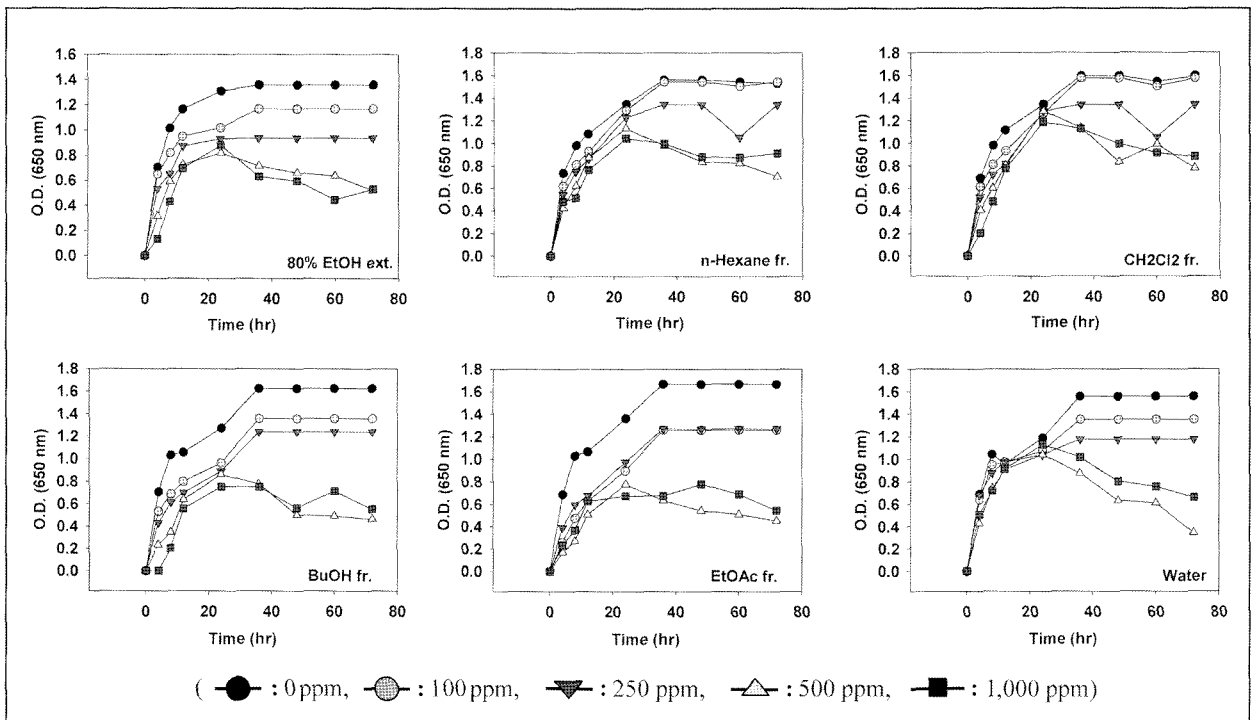


Fig. 4. Growth curves of *Listeria monocytogenes* in the media adding the ethanol extract and its various fractions from *Euphorbia jolkini*.

으며, water 분획물은 250 ppm, dichloromethane 분획물은 500 ppm 농도에서부터 최소 생육 저해효과를 나타냈다. 반면 n-hexane 분획물은 고농도에서도 생육저해효과를 보이지 않았다.

암대극 추출물의 미생물 증식에 미치는 영향

식품유해 미생물인 *B. cereus*, *L. monocytogenes* 그리고 *E. coli*

등 3종의 균주에 대해 미생물 증식과 관련하여 생육특성에 미치는 영향을 측정해 보았다. 그 결과, *B. cereus* 균주는 모든 추출물에 대해 처리 농도가 증가할수록 현저한 생육저해효과를 나타냈는데, 특히 ethylacetate 분획물인 경우 저농도에서도 균의 증식이 빠른 속도로 증가하다가 6시간 이후 급격히 성장이 저해됨으로써 효율적인 항균활성을 보여 주었다(Fig. 3). *L. monocytoge-*

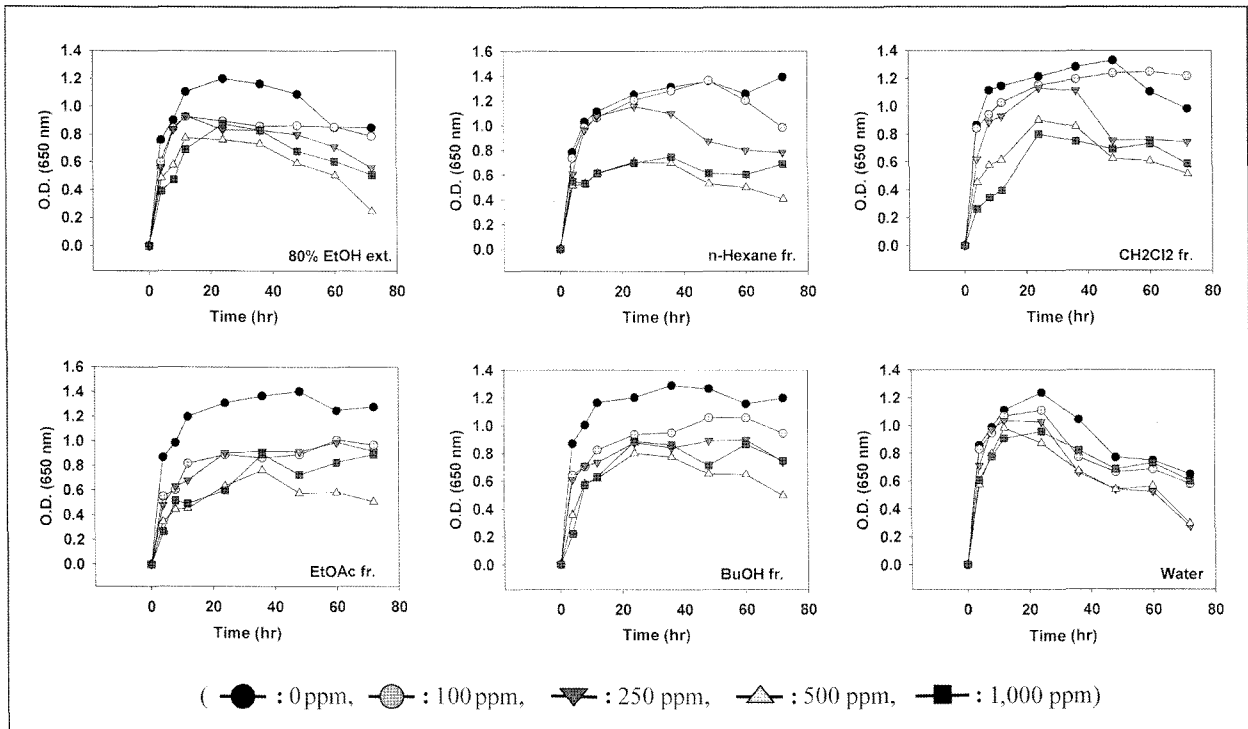


Fig. 5. Growth curves of *Escherichia coli* in the media adding the ethanol extract and its various fractions from *Euphorbia jolkini*.

nes 균주에서는 암대극 추출물 중 ethylacetate와 butanol 분획물에서 처리농도가 증가할수록 균의 증식이 감소되었으나, n-hexane과 dichloromethane 분획물에서는 500 ppm 이상의 고농도 처리시에도 그다지 현저한 차이를 볼 수 없었다(Fig. 4). 그러나 E. coli 균주에서는 ethylacetate 분획물에서뿐만 아니라 butanol 분획물에서도 현저한 생육저해 효과를 보여주므로써 전반적으로 B. cereus의 결과와 유사한 생육저해 효과를 나타냈다(Fig. 5).

암대극은 본 연구에 사용된 식품유해 미생물에 대해 폭넓게 항균력을 보여주었고, 그 중 총 폴리페놀함량이 높게 나타난 ethylacetate 분획물에서 가장 우수한 항균활성을 나타냄으로써 항균성에 관여하는 물질이 단일성분이라고 단정짓기는 어려우나 항산화 결과와 마찬가지로 주된 항균활성 물질은 페놀성 화합물로 사료되며, 이상의 결과를 종합해 볼 때 암대극은 천연항산화제뿐만 아니라 또한 천연 항균소재로서의 개발가능성도 높다고 사료된다.

요 약

최근 약용식물로부터 특정성분을 추출하여 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리활성 물질에 대한 관심이 증대되고 있는데, 생리활성을 나타내는 물질 중 식품의 기능 강화를 위해 주로 활용되고 있는 것은 항산화 및 항균활성에 관련된 물질들이다. 이러한 식품강화 물질을 발굴하고자 해안가에 자생하며 유독성 식물로 알려진 암대극(*E. jolkini*)의 전초를 대상으로 ethanol 추출 및 용매분획하여 총 폴리페놀 함량을 분석하고 그에 따른 항산화활성 및 식품 유해 미생물에 대한 항균활성을 비교 측정하였다. 그 결과 암대극(*E. jolkini*)은 다른 대극속 식물과 마찬가지로 페놀성 화합물을 다수 함유하고 있음을 확인할 수 있었으며, 총 폴리페놀 함량이 높게 나타난 ethylacetate 층에서 DPPH radical 소거활성, xanthine oxidase 저해활성, superoxide 소거활성 및 nitric oxide 소거활성의 IC₅₀ 값이 각각 8.38 µg/mL, 466.01 µg/

mL, 11.39 µg/mL, 332.11 µg/mL로 가장 우수한 항산화 활성을 보여 주었다. 항균활성은 paper disc method, 미생물 성장곡선 그리고 최대억제농도(MIC)를 측정 비교하였다. Paper disc method에서는 조추출물인 80% ethanol 및 ethylacetate와 butanol 분획물에서 농도가 증가할수록 항균력을 나타내는 inhibition zone 크기도 같이 증가하였으며, 특히 ethylacetate 분획물에서 가장 높은 항균력을 보여 주었다. 최대억제농도는 모든 균주에서 80% ethanol 추출물 및 ethylacetate와 butanol 분획물에서 100 ppm 농도로 처리시 최소 생육저해 효과를 보였으며, 또한 암대극 추출물이 식품유해 미생물인 B. cereus, L. monocytogenes, E. coli 등 3종의 균주를 대상으로 생육특성에 미치는 영향을 측정한 결과, ethylacetate 분획물이 가장 효율적인 항균활성을 보여 주었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-02-07) 지원으로 수행되었음.

문 헌

1. Tabance N, kirimer N, Demirci B, Demirci F, Baser KHC. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *Phrygia* and enantiomeric distribution of borneol. J. Agric. Food Chem. 49: 4300-4303 (2001)
2. Davies KJA. Free radicals and oxidative stress environment. pp. 1-31. In: Drugs and Food Additives. Rice-Evans C, Halliwell B, Lunt GC (eds). Portland Press, Portland (1995)
3. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens, oxygen radicals and degenerative diseases. Science 221: 1256-1264 (1983)
4. Harman D. Free radicals in Biology V. Academic Press. New York, USA. pp. 255-275 (1982)
5. Hatano T. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols.

- Natural Medicines 49: 357-363 (1995)
6. Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 162-166 (1995)
 7. Kim SM, Cho YS, Sung SK. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 626-632 (2001)
 8. Lee SH, Lim YS. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extracts on pathogenic microorganisms. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 239-243 (1998)
 9. Koh JH, Hwang MO, Moon SJ, Hwang SY, Son JY. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. *Korean J. Food Cookery Sci.* 21: 171-178 (2005)
 10. Jeon YO, Kim SI, Han YS, Kim KH. Screening of antimicrobial activity of the Plantain (*Plantago asiatica*) extracts. *Korean J. Soc. Food Sci.* 14: 498-502 (1998)
 11. Seo KL, Kim DY, Yang SI. Studies on the antimicrobial effect of wasabi extracts. *Korean J. Nutr.* 28: 1073-1077 (1995)
 12. Park UK, Chang DS, Cho HR. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 91-96 (1992)
 13. Shin DH, Kim MS, Han JS. Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-borne bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 808-816 (1997)
 14. Lee CY, Oh SW, Hong HD. Antismicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 700-709 (2002)
 15. Bae JH. Effect of *Artemisia capillaries* extracts on the growth of food-borne pathogens. *Korean J. Nutr.* 36: 147-153 (2003)
 16. Hahn YS. Antimicrobial effects of *Camellia japonica* L. leaves extracts on food-borne pathogenic microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 113-121 (2005)
 17. Yang MS, Ha YL, Nam SH, Choi SU, Jang DS. Screening of domestic plants with antibacterial activity. *J. Korean Soc. Appl. Bio. Chem.* 38: 584-589 (1995)
 18. Park SH, Kim JA, Hua XG, Lee CG, Choi JY. Isolation of 5 α -reductase Inhibitors from *Euphorbia jolkini*. *Korean J. Pharmacogn.* 36: 9-16 (2005)
 19. Lee TB. Illustrated Flora of Korea. Hyangmoon Publishing Co., Seoul, Korea. p. 512 (1999)
 20. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 58: 966-968 (1981)
 21. Blois MS. Antioxidant determination by the use a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200 (1958)
 22. Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC, Ko FN, Teng CM. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1392: 291-299 (1998)
 23. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-136 (1982)
 24. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 748-755 (1994)
 25. Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobial in liquid media. *Antibiotics in Laboratory Medicine.* Williams and Wikins, MD, USA. pp. 52-111 (1996)
 26. Kim JJ, Lee JS, Kim SY, Kim JA. Inhibitory effect of hydrolysable tannins isolated from the *Euphorbia helioscopia* on mushroom tyrosinase activity *in vitro*. *Yakhak Haeji* 45: 214-219 (2001)
 27. Ahn BT, Kang SS. Phenolic compounds from aerial parts of *Euphorbia pekinensis* (II). *Korean J. Pharmacogn.* 27: 142-145 (1996)
 28. Ahn BT, Lee BT, No JS, Lee GS. Phenolic compounds from *Euphorbia ebracteolata*. *Kor. J. Pharmacogn.* 27: 136-141 (1996)
 29. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Fd. Chem. Toxicol.* 32: 671- 683 (1994)
 30. Whang HJ, Han WS, Yoon KR. Quantitative analysis of total phenolic content in apple. *Anal. Sci. Technol.* 14: 377-383 (2001)
 31. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 1127-1132 (2000)