

*S. mutans*에 대한 대나무 숯의 항균력에 관한 연구

최미숙 · 안권숙

초당대학교 치위생학과

Antibacterial effect of bamboo charcoal on *Streptococcus mutans*

Mi-Suk Choi · Kwon-Suk Ahn

Department of Dental Hygiene, Chodang University

Received : 6 November, 2013
Revised : 13 January, 2014
Accepted : 21 January, 2014

Corresponding Author

Kwon-Suk Ahn

Department of Dental Hygiene, Chodang University, 380, Muanro, Muaneup Muangun, Jeollanamdo 534-701, Korea,
Tel : +82-61-450-1284
+82-10-4693-5174
Fax : +82-61-450-1711
E-mail : ksahn@cdu.ac.kr

ABSTRACT

Objectives : The purpose of the present study was to investigate the effect of bamboo charcoal on *Streptococcus mutans* which is one of the most important causative agents of dental caries.

Methods : *S. mutans* was incubated with or without bamboo charcoal and then changes were observed in its cell viability and antibacterial effect. Oral epithelial cells viability (human gingival fibroblast, HGF) was performed using MIT assay. Antibacterial effect was analyzed using a dilution plating method and agar diffusion method.

Results : Oral epithelial cells, human gingival fibroblast (HGF) showed a tendency to increase in bamboo charcoal treatment solution concentrations (0.5, 1, 2, 3, 5, 10%). The bamboo charcoal had an antibacterial effect on *S. mutans*. Antibacterial effect of bamboo charcoal for the bacterium was 58%. Charcoal concentration of 2% and 5% in the inhibition zone showed a minimal growth, but the concentration of 10% bamboo charcoal in inhibition zone revealed a conspicuous antibacterial activity.

Conclusions : Overall results suggested that the bamboo charcoal proved to be bactericidal effect on *S. mutans*.

Key Words : antibacterial effect, bamboo charcoal, *Streptococcus mutans*

색인 : 대나무 숯, *Streptococcus mutans*, 항균력

서론

치아우식증은 인류와 함께 오랫동안 함께 해온 구강질환의 하나로 설탕이 감미료로 사용됨에 따라 그 발병률이 증가하게 되었으며, 구강병 중에서 가장 발생률이 높은 범발성 질환으로 우리나라 사람들이 치아를 상실하는 주원인 중의 하나이다^{1,2)}.

2011년도 국민건강통계에서 구강질환의 경우 영구치우식 유병률은 2007년 38.3%에서 32.1%로 지속적인 감소추세이나³⁾, 미국 23.7%에 비해 여전히 높은 수준이라고 보고하였다⁴⁾.

치아우식증은 치면세균막내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환으로서 치면세균막내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)가 주된 원인균으로 알려져 있다⁵⁾.

*S. mutans*는 치면에 부착, 증식 및 산 생성과정을 거쳐 치아우식을 유발한다⁶⁾. *S. mutans*는 균체의 또는 균체 표층에 치아우식의 유발효소인 glucosyltransferase(GTase)라는 효소를 분비하고 이 GTase가 음식물 중 자당(sucrose)을 분해하여 치면에 불용성 glucan을 형성한다. Glucan은 또한 구강내 다른 미생물들과 치면에 부착하여 치면세균막을 생성한다^{7,8)}.

Copyright©2014 by Journal of Korean Society of Dental Hygiene

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in medium, provided the original work is properly cited.

▶ 본 논문은 2011년도 산학연공동기술개발사업 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부임

여기에 치아우식 유발균과 혐기성 세균이 증식하면서 생성시킨 산에 의해 치아가 탈회되어 치아우식증이 유발된다^{9,11)}.

그러므로 치아우식증 예방 및 감소를 위해 구강내 *S. mutans*의 성장 억제 및 치면세균막의 형성이 저지되어야 한다. 치면세균막 형성을 억제하기 위해 chlorohexidine, triclosan, cetylpyridinium chloride(CPC) 등의 합성 물질이 사용되었으나, 지속적인 사용시 인체 및 환경 안정성과 관련하여 문제가 있으므로^{12,13)} 항균력이 우수하면서도 인체 및 환경 독성이 낮은 천연물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

*S. mutans*에 대해 항균작용이 있는 천연물질로는 황금¹⁴⁾과 백두옹 추출물¹⁵⁾, 후박¹⁶⁾, 일황련¹⁷⁾, 고삼¹⁸⁾, 오미자 추출물¹⁹⁾, 지의류 추출물²⁰⁾ 등이 있는 것으로 보고되었다.

대나무는 뿌리에서부터 잎까지 약용으로 활용도가 높아 예로부터 민간요법으로 널리 사용되었으며, 동의보감과 본초강목 및 신농본초경에서도 중풍과 고혈압의 치료에 탁월한 효과가 있다고 기록되어 있다^{21,22)}. 그리고 대나무 숲은 미세한 다공성 구조로 되어 있어 흡착력이 강하고 음이온을 발생시킬 뿐만 아니라 칼슘, 칼륨 등의 미네랄을 제공하여^{23,24)} 예로부터 의약품, 산업제품 및 생활용품 등 폭 넓게 쓰이고 있으며, 최근에는 지사, 해독, 항균 등의 약리효과가 밝혀진 바 있다²⁵⁻²⁷⁾.

따라서 본 연구는 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*에 대한 대나무 숲의 항균력을 관찰하여 치과임상분야에서 활용할 기초자료를 제공하고자 한다.

연구방법

1. 실험균주의 배양 및 실험재료

실험에 사용한 균주로 *Streptococcus mutans* KCTC 3065를 한국생명공학연구원으로부터 분양 받아 사용하였고, 배지는 BHI(Brain Heart Infusion, Difco., U.S.A) Broth에 *S. mutans* 균을 접종하고 (37±1)°C에서 24시간 진탕 배양한 균액을 1~5 × 10⁵ 개/mL가 되도록 희석하여 접종균액으로 사용하였으며, 고체배지로 Brain Heart Infusion agar을 사용하여 37°C에서 24시간 배양하였다.

항균실험에 사용된 대나무 숲은 대나무숲 분말을 열수 추출하여 사용하였고, 시험시료 및 대조시료는 자외선(UV Lamp) 등을 이용하여 청정화시킨 후 시험에 사용하였으며 증화용액을 대조수단으로 이용하였다.

2. 대나무 숲 분말의 세포 독성 실험

대나무 숲 분말이 구강상피세포인 Human Gingival

Fibroblast (HGF)에 독성을 미치는지 알아보기 위하여 MTT3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, sigma, U.S.A 분석법으로 세포 독성 평가를 시행하였다. 세포 배양 조건은 37°C의 5% CO₂ incubator(Forma Scientific Co., U.S.A)에서 배양하고 배양액을 DMEM에 EGF, FBS 10%, hydrocortisone(5 µg/ml), 항생제 등을 넣어 사용하였다.

대나무 숲 분말 함유 용액을 96well microplate에 넣고 1일간 CO₂ 배양기에서 배양한 후 MTT용액 10 µl를 모든 well에 넣고 다시 6시간 배양하였다. 살아 있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 생성된 formazan 0.04N HCL-isopropanol 용액 100 µl로 잘 녹여서 EZ Read 400 Microplate Reader(biochrom, England)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대나무 숲 용액을 처리한 well의 흡광도 값을 대조군 세포가 들어있는 흡광도 값으로 나눈 다음 백분율로 나타내었다.

3. 대나무 숲의 항균력 실험

3.1. 희석평판배양법에 의한 항균력 실험

중화 용액에 0.2 g/mL의 비율로 시료를 넣고 접종균액을 접종하여 120rpm, (37±1)°C의 조건에서 24시간 진탕 배양하였다. 따로 동일한 방법으로 시료를 넣지 않은 중화용액에 균액을 접종하여 대조로 하였다. 배양 후 시험시료 및 대조시료로부터 균액을 채취하여 생리식염수를 이용해 희석하고, BHI agar 배지를 사용하여 (37±1)°C에서 24시간 배양해 세균수를 측정 하였다. 생균수 계산은 (식1)에 따라 측정하였고 항균감소율은 (식2)에 따라 결정하였다.

결과 계산

1) 생균수 계산

$$N = C \times D, \dots\dots\dots(식1)$$

N : 생균수,

C : 집락수,

D : 희석배수

2) 살균감소율 계산

$$\text{감소율}(\%) = [(M_b - M_c) / M_b] \times 100, \dots\dots\dots(식2)$$

M_b : 24시간 배양 후 대조시료의 균수

M_c : 24시간 배양 후 시험시료의 균수

3) 시험성립조건 : 균의 증식값이 31.6배 이상이어야 한다.

$$\text{균의 증식값} : F = M_b / M_a, \dots\dots\dots(식3)$$

M_b : 24시간 배양 후 대조시료의 균수

M_a : 대조시료의 초기 균수

3.2. 디스크확산법에 의한 항균력 실험

농도별(0%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%)로 추출한 대나무 숯 용액을 paper disc(Advantec, Japan)을 사용하여 대나무 숯 용액의 항균 효과를 측정하였다. *S. mutans*가 배양된 BHI broth 1ml를 petri-dish에 골고루 떨어뜨린 후 BHI agar와 혼합 후 균은 상태의 고체배지 상(주입평판배양)에 대조군과 농도별 대나무 숯 용액(0%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%) 및 천연무기항균제인 50% G-sol을 첨가하여 건조된 paper disc를 일정 간격으로 올린 후 37°C의 incubator에서 24시간 배양한 후 Inhibition zone의 유무를 확인하였다.

연구결과

1. 대나무 숯 분말의 세포 독성 실험

대나무 숯 용액이 구강상피세포인 Human Gingival Fibroblast의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대나무 숯 용액을 0.5, 1, 2, 3, 5, 10% 농도로 첨가하여 세포 성장에 미치는 영향을 측정하였다. 구강상피세포인 Human Gingival Fibroblast는 대나무 숯 용액 처리 시 농도에 따라 세포 증가 경향을 보였다. 대나무 숯은 구강상피세포인 Human Gingival Fibroblast의 성장에 있어 대조군에 비해 대부분의 농도에서 세포 성장에 큰 차이가 없었다(Fig. 1).

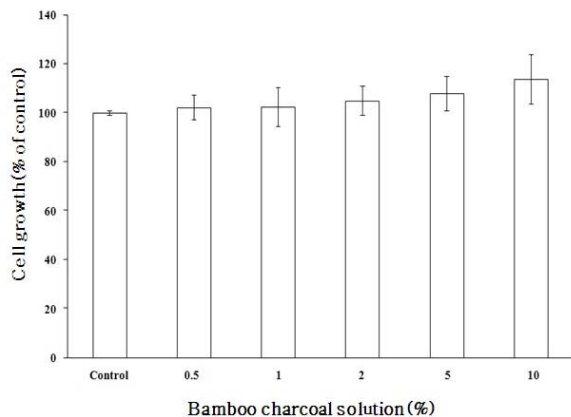


Fig. 1. Effect of bamboo charcoal on the viability of HGF

2. 희석평판배양법에 의한 항균력 실험

*S. mutans*에 대한 결과는 초기 접종균수 3.3×10^3 cfu/mL에서 24시간 후 대조시료는 3.4×10^5 cfu/mL로 나타났고, 시험시료는 1.4×10^5 cfu/mL로 나타났다(Table 1). 실험에 사용된 시료인 대나무 숯 분말에 대하여 항균력 실험을 한 결과 총치 원인균으로 알려진 *S. mutans*에 대하여 58.8%의 항균력을

나타내었다. 본 시험은 (식3)의 시험성립조건을 만족시키는 것으로 나타났다(Fig. 2).

Table 1. Variable cell count of *S. mutans* in bamboo charcoal solution Unit:CFU/mL

Variables	Intact	After 24hr	Percentage
Control	3.3×10^3	3.4×10^5	58.8%
Bamboo charcoal	3.3×10^3	1.4×10^5	

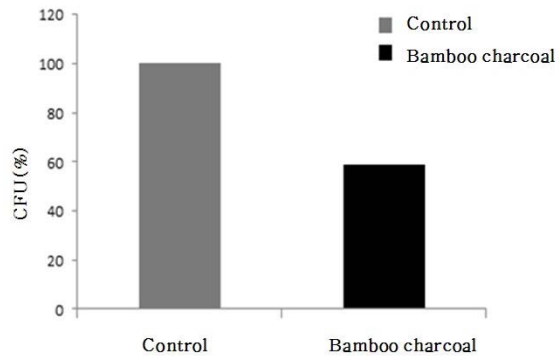


Fig. 2. Variable cell count of *S. mutans* in bamboo charcoal solution

3. 디스크확산법에 의한 항균력 실험

Inhibition zone을 관찰한 결과, 24시간 후 10% 농도의 대나무 숯 용액에서 형성되었으며, 2%와 5%에서는 미미하게 형성되었고, 0.5%와 1%에서는 거의 형성되지 않았다(Table 2, Fig. 3).

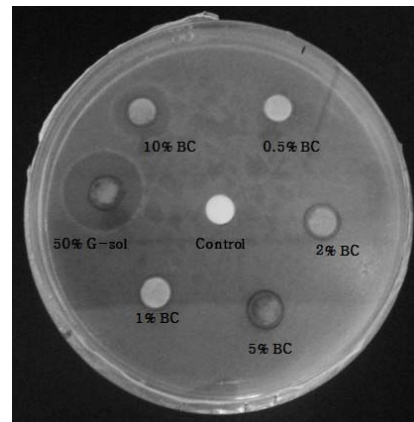


Fig. 3. Antibacterial activity of ratio bamboo charcoal against *S. mutans*

Table 2. Antibacterial activity of bamboo charcoal against *S. mutans* by paper disc method

Variables	Density (%)				
	0.5	1	2	5	10
Bamboo charcoal	-	±	+	++	+++

- unaffected, ± borderline of unaffected and mild inhibition,
+ mild inhibition, ++ moderate inhibition, +++ strong inhibition

총괄 및 고안

오늘날 항생제에 대한 내성을 가진 병원성 균의 증가로 천연물질에 대한 관심과 연구가 증가하고 있다. 특히 항균, 항산화, 항바이러스, 면역증강 효과가 있는 식물들에 대한 연구가 증가하고 있다.

이전 문헌에서 보고된 항균효과를 토대로 대나무 숯을 이용한 다양한 공산품들이 개발되고 있으며²⁵⁻²⁷⁾, 이는 구강위생용품으로의 활용방안을 모색함에 있어 바람직하리라 사료된다.

본 연구는 치아우식증의 주된 세균인 *S. mutans*에 대한 대나무 숯의 항균력을 검증하며, 구강내 적용시 구강상피세포에 대한 대나무 숯의 독성을 파악하여 대나무 숯을 이용한 구강위생용품의 개발 가능성을 모색하고자 실시하였다.

대나무 숯은 흡착력이 강하고 음이온을 발생시킬 뿐만 아니라 미네랄을 제공하며, 지사, 해독, 항균 등의 약리효과가 있다고 하였다²⁴⁻²⁸⁾.

실험 결과, 대나무 숯은 구강상피세포인 Human Gingival Fibroblast의 성장에 있어 대부분의 농도에서 세포 성장에 큰 차이가 없어 세포독성이 없는 것으로 나타났으며, 대나무 숯의 농도가 증가함에 따라 구강상피세포의 성장률도 증가하였다. 김 등²⁹⁾의 연구에서도 대나무 숯과 잎의 급여로 육계의 성장을 촉진하고 생존율을 증가시켰다고 하였다. 이는 대나무 숯이 지닌 건강 증진 효과 중 산화방지, 환원작용으로 사물을 오랫동안 유지하는 힘, 신선한 상태로 보존하는 힘, 복원력이 풍부해서 주위의 모든 사물을 활성화하고 인체의 건강을 유지하는 효능에 기반한 것으로 사료된다.

본 연구에서 대나무 숯 분말에 대하여 항균력 실험을 한 결과 총치 원인균으로 알려진 *S. mutans*에 대하여 58.8%의 항균력을 나타내었다. 본 시험은 '식3'의 시험성립조건을 만족시키는 것으로 나타났으며, Inhibition zone을 관찰한 결과, 24시간 후 10% 농도의 대나무 숯 용액에서 형성되었다. 김 등³⁰⁾의 연구에서 대장균의 일종인 *E. coli*로 숯의 비율이 증가됨에 따라 활성범위가 증가되었으며 대나무 숯의 비율이 20%, 30%에서 활성 반경이 거의 일치하여 숯의 최적 혼합

비율을 20%로 보고한 결과가 있다. 본 연구에서도 대나무 숯의 농도 증가로 Inhibition zone을 관찰할 수 있었으나 대나무 숯의 농도를 10%까지 희석하여 최적의 혼합 비율을 발견하지는 못하였다. 이는 추후 대나무 숯을 활용한 제품을 개발하는데 참고치가 될 거라 사료되며, 세균의 종류도 확대하여 비교 설명이 필요하리라 생각된다. 최³¹⁾의 연구에서도 대나무를 탄화시킬 때 나오는 연기로부터 채취되는 죽초액을 이용하여 *Bacillus cereus*, *Candida bombicola*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rahnella aquatilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio vulnificus*에 항균효과를 조사하였으며, 일정한 크기의 Inhibition zone이 형성됨으로써 미생물에 대한 항균 효과가 있음을 확인하였다.

구강내 치아우식증의 원인균은 *S. mutans*로 이는 다양한 생화학적, 혈청학적, 유전적으로 이질성을 갖는 세균이다. 이 세균에 대해 대나무 숯이 항균력이 있다는 것은 매우 높이 평가할 만한 결과이다.

결론

본 연구는 치아우식증의 주된 세균인 *S. mutans*에 대한 대나무 숯의 항균력을 검증하며, 구강내 적용시 구강상피세포에 대한 대나무 숯의 독성을 파악하여 대나무 숯을 이용한 구강위생용품의 개발 가능성을 모색하고자 실시하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 구강상피세포인 Human Gingival Fibroblast는 대나무 숯 용액 처리 시 농도(0.5, 1, 2, 3, 5, 10%)에 따라 세포 증가 경향을 보였다. 대나무 숯은 구강상피세포인 Human Gingival Fibroblast의 성장에 있어 대조군에 비해 대부분의 농도에서 세포 성장에 큰 차이가 없어 세포독성이 없는 것으로 나타났다.
2. *S. mutans*에 대한 결과는 초기 접종균수 3.3×10^3 cfu/mL에서 24시간 후 대조시료는 3.4×10^5 cfu/mL로 나타났고, 시험시료는 1.4×10^5 cfu/mL로 나타났다. 실험에 사용된 시료인 대나무 숯 분말에 대하여 항균력 실험을 한 결과 치아우식증의 원인균으로 알려진 *S. mutans*에 대하여

58.8%의 항균력을 나타내었다.

3. 대나무 숲의 농도가 2%, 5%에서는 Inhibition zone이 미미하게 형성되었으나, 10% 농도의 대나무 숲 용액에서 Inhibition zone이 뚜렷하게 형성되어 항균력을 나타내었다.

이상의 결과, 대나무 숲은 구강상피세포인 Human Gingival Fibroblast에 독성이 없으며, 치아우식증의 주된 균인 *S. mutans*에 대한 항균효과가 있음을 확인하였다.

본 연구는 구강내 한 개의 균종에 대한 대나무 숲의 항균력에 대한 연구로, 향후 구강내 적용을 위한 구강위생용품 개발에 앞서 구강내 다양한 균종에 대한 대나무 숲의 항균효과에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

1. Jang GH, Ahn BY, Oh SH, Choi DS, Kwon YJ. Anticariogenic effects of *Coptis chinensis* Franch extract, J Korean Food Sci Technol 2000; 34: 1396-402.
2. Lee EK, Cho MS. A survey on awareness and behavior on preventive method of dental caries in middle school students, J Korean Soc Dent Hyg 2012; 12(4): 707-14.
3. Statistics Korea, Korea Health Statistics 2011: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V_2) [internet],[cited 2013 Sep 01]. Available from: <https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/index.do>.
4. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2011: With Special Feature on Socioeconomic Status and Health [internet],[cited 2013 Sep 01]. Available from: <http://www.cdc.gov/nchs/data/abus/abus>.
5. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay, Infect Immun 1975; 11(6): 1252-60.
6. Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention, J Dent Res 1984; 63(3): 407-11. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345840630031001>.
7. Hanada N, Takehara T. 1,3- α -D-glucan synthase from *Streptococcus mutans* AHT(serotype g) does not synthesise glucan without primer. Carbohydr Res 1987; 168(1): 120-4. [http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215\(87\)80013-7](http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(87)80013-7).
8. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, Microbiol Rev 1980; 44(2): 331-84.
9. Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral disease, Int Congr Ser 2005; 1284: 103-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ics.2005.06.071>.
10. Kozai K, Miyake Y, Kohda H, Kametaka S, Yamasaki K, Suginaka H, et al. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and ursolic acid, Caries Res 1987; 21(2): 104-8. <http://dx.doi.org/10.1159/000261010>.
11. Gibbons RJ, Houte JV. Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu Rev Microbiol 1975; 29: 19-44. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.29.100175.000315>.
12. Adolfsson Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden, Chemosphere 2002; 46(9-10): 1485-89. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00255-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00255-7).
13. Rule KL, Ebbett VR, Vikesland PJ. Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of triclosan, Environ Sci Technol 2005; 39(9): 3176-86. <http://dx.doi.org/10.1021/es048943+>.
14. Lee YH. Chemical properties and antibacterial activities of extracts of *Scutellaria Baicalensis*, Georg. J Kyungpook National Univ. of Taegu, 1974; 15(2): 212-6.
15. Chung SW, Chung JH, Lim SB, Kim CG, So EH. The antimicrobial effect of *Pulsatilla koreana* extracts to oral micro-organism, J Periodontal Implant Sci 2000; 30(3): 661.
16. Yoo BT, Rhee GJ, Lee MK, Ryu SH, Bae KH. Antibacterial action of a crude drug "Hoobak" against *Streptococcus mutans*. Dept. of Pharmacy, College of Sciences Chungnam National Univ. of Daejeon, 1981; 8: 207-12.
17. Kwak DJ, Kim JH, Kim MS. Volatile components of *Coptidis rhizoma* having growth inhibition activity on oral bacteria, J Korean Soc Hyg Sci 1998; 4(2): 77-80.
18. Lee HO, Lee KH, Park NK, Jeong SI, Baek SH, Han DM. Antibacterial effects of *Sophora flavescens* on *Streptococcus mutans*, J Korean Food Nutr 2000; 13(6): 539-46.
19. Min YK, Jeon JK, Kim SG, Chang KW. Inhibitory effects of *Schizandra chinensis* extracts on the growth and adsorption to saliva-coated HA beads of some oral bacteria, J Korean Acad Dent Health 2001; 25(2): 165-83.
20. Kim EM, Cho MJ. Antimicrobial activities of oral bacteria by Lichen extracts, J Korean Acad Dent Health 2012; 12(1): 81-91.
21. MH Kweon, Hwang J, Sung HC. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). J Agric Food Chem 2001; 49: 4646-55. <http://dx.doi.org/10.1021/jf010514x>.
22. Lee MJ, Kim EY, Jeong KO, Park KY, Moon GS. Antimutagenic effects of Korean bamboo trees and inhibitory effect of hepatic toxicity of bamboo extracts coated rice, J Korean Soc Food Sci Nutr 2004; 33: 1279-85.
23. Cooney DO. Activated charcoal: Antidotal and other medical uses, New York: Marcel Dekker, Inc; 1980: 6-15.
24. Park SB, Kim SW, Park JY, Mun SP, Jun JM. Physico-chemical

- properties and VOCs absorption of bamboo charcoal (BCP) composite board, *J Korean Furniture Soc* 2005; 16: 28-35.
25. Bond GR. The role of activated charcoal and gastric emptying in gastrointestinal decontamination: a state-of-the-art review. *Ann Emerg Med* 2002; 39: 273-86. <http://dx.doi.org/10.1067/mem.2002.122058>.
 26. Bradberry SM, Vale JA. Multiple-dose activated charcoal: a review of relevant clinical studies. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996; 33: 407-16. <http://dx.doi.org/10.3109/15563659509013749>.
 27. Gardreault P. Activated charcoal revisited. *Clin Ped Emerg Med* 2005; 6: 76-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpem.2005.04.005>.
 28. Kutlu HR, Unsal I, Gorgulu M. Effects of providing dietary wood (oak) charcoal to broiler chicks and laying hens. *Anim Feed Sci Technol* 2001; 90: 213-26.
 29. Kim SH, Lee IC, Kang SS, Moon CJ, Kim SH, Shin DH, et al. Effects of bamboo charcoal and bamboo leaf supplementation on performance and meat quality in chickens. *J Life Sci* 2011; 21(6): 805-10.
 30. Kim DW, Ryu HI, Hong YG. The adsorption of metal and antibacterial properties on paper using activated carbon and pulp. *Bulletin of Science Education* 2001; 17(1): 15-20.
 31. Choi YH. Study of antimicrobial activity of bamboo vinegar and wood vinegar [Master's thesis]. Graduate School of Industry Technology, Gwangju: Univ. of Chonnam National, 2005.