

## 밤잎茶 물추출물의 항산화 및 항미생물 효과

최옥범 · 유경수\* · 박근형

전남대학교 식품공학과, \*전남대학교 약학대학

### Antioxidative and Antimicrobial Effects of Water Extracts with *Castanea crenata* Leaf Tea

Ok-Beom Choi, Gyurng-Soo Yoo\* and Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

\*College of Pharmacy, Chonnam National University

#### Abstract

Antioxidative and antimicrobial effects of the extracts of *Castanea crenata* leaf tea, steamed tea and semi-fermented tea were investigated. Antioxidative effects were by measuring the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)-radical scavenging activity of the extracts. The effects were stronger than that of synthetic antioxidant such as BHT at the same concentration. The  $SC_{50}$  value (50% radical scavenging effects of  $1 \times 10^{-4}$  M DPPH) of steamed tea, semi-fermented tea and BHT were 53.3  $\mu$ g/mL, 49.9  $\mu$ g/mL and 101.0  $\mu$ g/mL, respectively. The antimicrobial effects of methanol extracts (8 mg, 20 mg) of 0.2 g and 0.5 g. eq. of *Castanea crenata* leaf tea were stronger than those of 0.65 mg of benzoic acid, against gram(+) bacteria such as *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *L. mesenteroides* and *B. subtilis* and gram(-) bacteria such as *E. coli*, *S. typhimurium*, and *P. aeruginosa*.

Key words : *castanea crenata* leaf tea extracts, antioxidative effects, antimicrobial effects

#### 서 론

최근 식품관련 산업 및 학계에서는 자연계에 존재하는 다양한 동·식물 및 미생물로 부터 얻어지는 각종 유용성분을 식품소재로 활용 하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히, 생체조절 기능이나 방어능력이 있는 것으로 알려진 일부 성분들은 인체의 생리 기능 조절 및 항상성 유지에 관여하여 질병예방과 노화억제 등 건강을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀짐에 따라 이들을 이용한 기능성 식품의 개발이 식품산업의 새로운 연구 목표가 되고 있다<sup>(1-4)</sup>. 따라서 국내의 고유 전통식품이나 천연자원 및 부산물로 부터 기능성을 갖는 다양한 물질을 탐색하여 이들을 식품으로 개발하는 것은 자원의 효율적인 이용과 국민 보건 증진에 기여할 수 있는 측면에서 의미 있는 일이라 할 수 있다.

한편, 각종 식물성 재료 및 곡물류 등을 이용해 제조한 다류제품에서도 생리활성 기능이 있는 것으로 밝혀지면서 녹차를 비롯한 다류식품의 소비가 크게 증가하고 있으며, 우리나라에서는 생강, 감잎, 두충, 오미자, 구기자, 산수유, 신선초 등 다양한 식물을 원료로 기능성 식품 및 다류제품으로 이용하고 있다<sup>(5,6)</sup>.

이에 저자 등은 우리나라 전역에 걸쳐 자생 또는 재배되고 있는 식물로 주로 과실을 수확하여 식용하거나 일부를 한약재 및 앙금 등의 가공식품으로 이용하고 있는 밤나무가 과실 이외에도 수피, 뿌리, 꽃, 잎을 달인 액이나 분말은 창상 및 염증의 치료에 효과가 있고, 특히 잎은 우리나라와 유럽등지에서 옷나무에 의한 알레르기 질환이나 천식성 기침에 민간약<sup>(7,8)</sup>으로 알려져 있는 것에 주목하여, 이들의 활용 방안으로 밤나무 잎을 불발효와 반발효 형태의 차로 제조하였으며, 제조한 밤잎茶的 화학성분 및 항알레르기 효과 등을 보고한 바 있다<sup>(9,10)</sup>.

본 연구에서는 밤잎茶가 갖는 또다른 기능성 탐색의 일환으로 밤잎茶 추출물의 항산화 및 항미생물 효과를 점정하여 이를 보고한다.

Corresponding author : Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 300 Yongbong-Dong, Kwangju 500-757, Korea

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 밤나무(*Castanea crenata* S. et Z) 잎 차는 전보<sup>(9,10,11)</sup>에서 제시된 바와 같이 잎을 수확후 바로 증제하여 효소활성을 억제시켜 건조하여 만든 불발효차인 증제차(Steamed tea)와 잎을 유념한 뒤 위조시켜 효소작용을 이용하여 만든 반발효의 형태인 반발효차(Semi-fermented tea)를 실험재료로 하였다.

시료의 추출 및 조제

증제차와 반발효차 각각 100 g을 2 L의 100°C 열수로 30분간 환류추출하여 냉각한 후 여과하고, 여액을 다시 1,400×g에서 20분간 원심분리한 뒤 상층액을 동결건조하여 항산화 및 항미생물 효과의 검정 시료로 하였다. 한편, 항미생물 효과의 검정을 위한 시료는 상기의 방법으로 제조한 증제차와 반발효차의 동결건조물에 10배량의 *n*-hexane, EtOAc, MeOH로 순차 추출하여 각 용매 추출물을 얻었다. 즉, 각각의 시료에 *n*-hexane을 가하여 magnetic stirrer에서 열을 가하지 않고 1시간 추출한 후 여과하고, 남은 잔사를 다시 EtOAc로 1시간 추출하였으며, EtOAc 추출후 남은 잔사를 다시 동일한 방법으로 MeOH 추출물을 얻은 다음 각 용매 추출물의 항미생물 활성을 측정하였다.

DPPH 법에 의한 항산화 활성 측정

항산화 활성의 검정은 각 시료의 DPPH-free radical 소거활성을 측정하는 Blois<sup>(12,13)</sup>의 방법을 응용하여 실시하였다. 즉, 증제차와 반발효차 동결건조물의 농도를 달리한 수용액 시료 0.1 mL에 1×10<sup>-4</sup> M의 DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, U.S.A.)용액 0.9 mL를 가하여 교반한 다음 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 free radical 소거활성에 의한 시료와 대조군의 흡광도 감소치로 활성을 측정하였으며, 이때 비교물질로 합성항산화제인 BHT (Butylated hydroxytoluene, Sigma, U.S.A)와 천연항산화제인 α-tocopherol(Sigma, U.S.A.)을 사용하여 동일한 방법으로 실험하였다. 한편, 시료와 대조구는 각각의 농도를 달리하여 활성을 측정한 후 DPPH-radical scavenging activity curve로 부터 DPPH의 50%의 라디칼 소거활성에 필요한 농도(SC<sub>50</sub>)를 구하였다.

항미생물 활성 측정

항미생물 활성의 측정은 paper disc법<sup>(14,15)</sup>으로 실시

하였다. Pour-plate method에 의해 45°C로 조절된 각각의 멸균배지 15 mL에 검정에 사용된 각 미생물의 전배양액 0.1 mL를 혼합시킨 후 petri dish에 넣고 응고시킨 다음, 일정량의 시료를 흡착시킨 후 용매를 제거한 paper disc를 올린 뒤 0.85%의 식염수 75 μL로 확산시킨 다음, 세균중 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1628은 37°C에서 16시간, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104, *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3100, *Vibrio vulnificus* CDC C7184는 30°C에서 16시간, 효모 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1850와 *Candida albicans* ATCC 10231은 30°C에서 16시간 배양하여 clear zone의 크기(mm)로 활성을 측정하였으며, 대조구로 benzoic acid를 사용하였다. 이때 활성 검정을 위해 사용된 미생물은 해당조건에서 3회 반복하여 전배양을 실시한 후 접종균주로 사용하였으며, 사용된 배지는 세균의 경우, *S. mutans*는 BHI배지(Difco), *V. vulnificus*는 LB배지(Difco), 젖산균은 *Lactobacilli* MRS 배지(Difco)였으며, 그 밖의 세균은 Nutrient 배지(Difco)를 사용하였고, 효모는 YM배지(Difco)를 사용하였다.

결과 및 고찰

항산화 효과

증제차와 반발효차 각각의 동결건조물을 농도를 달리한 시료 0.1 mL에 1×10<sup>-4</sup> M의 DPPH용액 0.9 mL를 가하여 10분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였을 때 Fig. 1에 나타난 바와 같이 증제차와 반발효차 약 25 μg 추출물에 해당하는 동결건조물 5 μg의 수준에서 각각 16%, 17%의 라디칼 소거활성을 나타냈으며, 농도에 비례하여 어느 한계까지는 활성은 점차 증가하였다. 이때 대조구로 사용한 α-tocopherol은 5 μg의 농도에서 80% 이상의 활성을 나타내 DPPH에서 매우 민감하게 활성을 갖는 물질로 확인되었으며, 반면 또 다른 대조구인 BHT는 동일 농도에서 7% 정도의 활성이 나타났고, 30 μg에서 비슷한 수준의 활성을 갖는 것을 비교해 볼때 밤나무 잎차가 상당한 활성이 있음을 확인하였다. 또한 본 실험 모델로부터 시료와 대조구의 농도를 각각 달리하여 활성을 측정한 후 free radical 소거 활성을 명확히 제시할 수 있는 DPPH 시험법에 의해 측정된 DPPH-

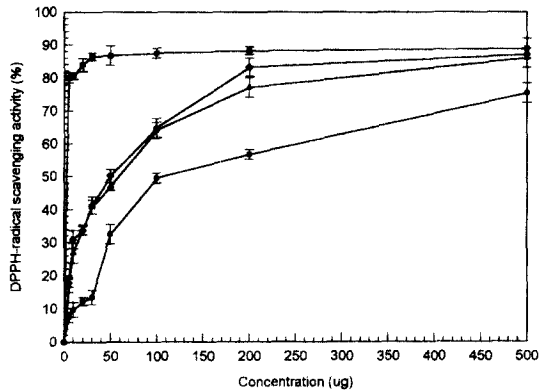


Fig. 1. DPPH-radical scavenging activity of *Castanea crenata* leaf tea. ■: Tocopherol, ▲: Non-fermented steaming tea, ●: BHT ◆: Semi-fermented rolling tea, \*Activity(%) was expressed as  $100 \times$  difference of absorbance between reactant of tea extract and control with DPPH

radical scavenging activity curve로부터 DPPH의 50%의 라디칼 소거활성에 필요한 농도(SC<sub>50</sub>)를 비교한 결과, 증제차와 반발효차는 각각 53.3 µg/mL와 49.9 µg/mL로 나타났고, 이는 밤잎차 약 0.25 mg 추출물에 상당하는 양이다. 또한 BHT의 SC<sub>50</sub>은 101.0 µg/mL으로 나타났고, tocopherol은 5 µg/mL 이하에서 SC<sub>50</sub>이 나타나 강한 free radical 소거 활성을 갖고 있음을 확인하였다. 한편, 여<sup>(5)</sup> 등이 녹차, 오롱차, 홍

차 추출물의 항산화 효과에 대한 보고에서 SC<sub>50</sub>값이 증제차 11.3 µg/mL, 오롱차 12.7 µg/mL, 홍차 14.9 µg/mL으로 제시하였는데 밤잎차에서도 이에 상당하는 활성을 나타내어 두종의 밤잎차 모두 항산화 효과가 있음이 확인되었다.

#### 항미생물 효과

증제차와 반발효차의 동결건조물의 항미생물 활성은 항균활성 물질의 검정법으로 확립된 paper disc법<sup>(14)</sup>으로 측정된 결과 강한 활성이 나타나자 이들 물질을 각각 *n*-hexane, EtOAc, MeOH로 순차 추출하여 정제한다음 각각의 추출물에서 항미생물 활성을 측정하였다. 그 결과 MeOH추출물에 대부분 활성이 집중되는 것으로 나타나 밤잎차 0.2 g, 0.5 g에 해당하는 동결건조물(증제차, 반발효차 1 g당 수율  $\approx$  0.19 g, 0.21 g)의 MeOH 추출물 8 mg과 20 mg으로 13종의 미생물에 대해 생육저해 활성을 측정된 결과, Table 1에 제시한 바와 같이 Gram양성 세균 중에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*는 대조구로 사용한 benzoic acid 0.65 mg보다 강한 활성이 나타났고, *M. luteus*와 *L. mesenteroides*, *B. subtilis*에서도 활성이 인정되었으며, Gram음성 세균인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*에서도 강한 활성이 나타났다. 그외 *S. mutans*를 비롯한 몇몇 균주와 효모에서는 활성이 미약하였지만 증제차와 반발효차 모

Table 1. Antimicrobial activity of MeOH extract from water extracts of *Castanea crenata* leaf tea

Microorganism	Clear zone (mm)				
	<sup>1</sup> NF-steaming tea		<sup>2</sup> SF-rolling tea		<sup>3</sup> B.A.
	0.2 g	0.5 g	0.2 g	0.5 g	0.65
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 5638	<sup>4</sup> 12.2 ± 0.3	15.3 ± 0.6	12.3 ± 0.6	15.7 ± 0.6	13.7 ± 0.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<sup>5</sup> —	15.2 ± 0.3	11.0 ± 0.0	14.7 ± 0.6	14.7 ± 0.6
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	—	13.7 ± 0.6	—	14.3 ± 0.5	12.7 ± 0.6
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	11.5 ± 0.5	15.7 ± 0.6	11.7 ± 0.6	16.7 ± 0.6	12.0 ± 1.0
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	12.0 ± 0.5	13.7 ± 0.6	11.7 ± 0.6	13.6 ± 0.6	12.0 ± 0.0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	12.3 ± 0.6	16.3 ± 0.6	11.6 ± 0.5	14.7 ± 0.6	11.7 ± 0.6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	12.7 ± 0.6	15.3 ± 0.6	12.0 ± 1.0	15.0 ± 0.5	12.7 ± 0.6
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	11.2 ± 0.3	16.3 ± 0.3	12.3 ± 0.6	16.0 ± 0.0	11.7 ± 0.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1628	12.7 ± 0.6	16.7 ± 0.3	12.3 ± 0.6	16.3 ± 1.2	13.0 ± 0.5
<i>Vibrio vulnificus</i> CDC C7184	—	11.3 ± 0.6	—	11.7 ± 0.6	11.7 ± 0.6
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11.7 ± 0.6	16.3 ± 0.6	11.0 ± 0.0	16.7 ± 0.6	12.7 ± 0.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1850	11.0 ± 0.0	12.3 ± 0.6	11.3 ± 0.6	12.7 ± 0.6	13.7 ± 0.6

<sup>1</sup>) Non-fermented steaming tea extracts (g eq.) /10 mm paper disc

<sup>2</sup>) Semi-fermented rolling tea extracts (g eq.) /10 mm paper disc

<sup>3</sup>) Benzoic acid 0.65 mg/10 mm paper disc

<sup>4</sup>) Inhibition value are the mean S.D. (n=3)

<sup>5</sup>) No growth inhibition

두 비교적 넓은 항균 spectra를 나타내 밤잎차의 항미생물 효과가 확인되었다. 이에 저자 등은 밤나무 잎차가 갖고 있는 항미생물 활성 물질을 규명 하고자 진행 중에 있다.

요 약

밤나무 잎을 이용해 제조한 불발효 처리한 증제차와 반발효차의 항산화 및 항미생물 효과를 탐색하였다. 각각의 밤잎차 물추출물을 동결건조한 시료를 DPPH-radical scavenging activity를 측정하여 항산화 효과를 검토한 결과, 두 종류의 차 모두 대조구로 사용한 BHT 보다 동일농도에서 강한 활성이 나타났으며, 이들의 SC<sub>50</sub>은 증제차 53.3 µg/mL, 반발효차 49.9 µg/mL, BHT 101.0 µg/mL으로 나타났다. 또한 paper disc법을 이용하여 각각의 차 0.2 g, 0.5 g에 상당하는 동결건조물의 MeOH추출물 8 mg과 20 mg으로 다양한 미생물에 대해 항미생물 활성을 측정한 결과, gram양성 세균 중에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*, gram음성 세균인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*는 대조구로 사용한 0.65 mg의 benzoic acid보다 강한 활성이 나타났고, *M. luteus*와 *L. mesenteroides*, *B. subtilis*에서도 활성이 인정되어 증제차와 반발효차 모두 비교적 넓은 항균 spectra와 활성을 갖고 있음이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부 첨단농업기술개발 사업비 및 전남대학교 학술연구비 지원으로 수행된 것이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Israel Goldberg. Functional Foods, pp. 3-550. Chapman & Hall Press, New York, USA (1994)

2. Pszczola, D.E. Designer food. Food Technology 47: 92-101 (1993)

3. Sadaki, O. The development of functional foods and materials, Bioindustry 13: 44-50 (1996)

4. Elliott, M. Jr. Biological properties of plant flavonoids: An overview. J. Pharmacognosy 34: 344-348 (1996)

5. Yeo, S.G., Ann, C.W., Lee, Y.W., Lee, T.G., Park, Y.H and Kim, S.B. Antioxidative effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. J. Korean Soc. Food Nutr. 24: 299-304 (1995)

6. Lee, J.O., Kim, M.C., Kim, M.H., Park, J.S., Park, E.J., Kim, J.W., Song, K.H., Shin, D.W., Mok, J.m. and Shin H.K. Studies on the phenolic compounds and the anti-oxidant properties of various plants used as commercial teas (I). The Annual Report of KFDA 1: 21-32 (1995)

7. Lee, T.B. Illustrated Flora of Korea, p. 273. Hyangmoon Press, Seoul, Korea (1994)

8. Roberto, C. The Macdonald Encyclopedia of Medical Plants, No. 72. Macdonald Press, London, UK (1984)

9. Choi, O.B., Yoo, G.S. and Park, K.H. The processing of tea with *Castanea crenata* leaves and its chemical composition. J. Kor. Tea Soc. 3: 105-115 (1997)

10. Choi, O.B., Kim, K.M., Yoo, G.S. and Park, K.H. Anti-allergic effects of *Castanea crenata* leaf tea. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 468-471 (1998)

11. Choi, O.B., Yoo, G.S. and Park, K.H. Storage stability of *Castanea crenata* leaf tea. J. Kor. Tea Soc. 4: 105-113 (1998)

12. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200 (1958)

13. Naoki, A., Takashi, M. and Akira, H. Novel oxidized Sorbicilin dimers with DPPH-Radical scavenging activity from a fungus. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 2120-2126 (1998)

14. Zaika, L.L. Spices and herbs, Thier antimicrobial activity and it's determination. J. Food Safety 9: 97-118 (1988)

15. Davidson, P.M. and Parish, M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials, J. Food Technol. 43: 148-155 (1989)

(1997년 4월 20일 접수)