

## 밤나무 꽃과 잎의 화학성분 및 항균활성 검색 -제2보. 항균활성 검색-

조규성\* · 김해영<sup>1</sup>

한경대학교 이공학부 식품공학과, 식품생물산업연구소

<sup>1</sup>경희대학교 생명과학부 식품공학과

(2003년 5월 6일 접수; 2003년 6월 27일 수리)

밤나무의 밤꽃과 밤잎의 항균활성 효과를 조사하기 위하여, 시료를 80% methanol로 추출하여 용매분획을 하였다. 용매분획별 수율은 밤꽃에서 ethylacetate 1.94%, methanol 4.75% 및 water 7.81%였고, 밤잎은 ethylacetate 2.24%, methanol 5.03% 및 water 8.47%였다. 밤꽃과 밤잎의 methanol 분획 추출물은 Gram양성 및 음성의 모든 균주에서 강한 항균활성을 보였으며, ethylacetate 및 water 분획 추출물은 약한 항균활성을 보였다. 최소저해농도는 60 µg/disc 이상에서 항균력이 인정되었다. *Bacillus subtilis*에 대한 생육저해 효과는 control에 비하여 밤꽃과 밤잎 추출물은 모두 낮은 생육저해 효과를 보였으며, 또한 각 추출물은 모두 배양 18시간까지는 현저히 낮은 생육저해를 보이다가 그 후는 약간 높아졌다. 밤꽃 추출물에서는 methanol 추출물이 가장 높은 생육저해효과를 보인 반면에, water 추출물은 다른 추출물에 비하여 낮은 생육저해를 보였으며, 밤잎 추출물은 각 추출물에서 거의 비슷한 생육저해를 보였다. 밤꽃과 밤잎의 methanol 분획 추출물을 *B. subtilis*에 각각 500 ppm 씩 처리한 후, 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과, 추출물을 처리하지 아니한 경우는 전형적인 *Bacilli*의 형태를 보였지만, methanol 분획추출물을 처리한 경우는 세포의 형태가 일그러지고 손상을 입은 형태를 보였다.

**Key words:** 밤나무, 밤꽃, 밤잎, 화학성분, 항균활성

### 서 론

밤나무(*Castanea crenata* Sieb. et. Zucc)의 밤꽃과 밤잎을 활용하여 기능성 식품의 개발이나 천연보존료 개발을 위한 자원으로 활용하고자, 전보에서는 이들의 화학성분을 분석하였으며, 계속하여 항균활성을 검토하였다. 밤나무는 참나무과에 속하며, 그 열매는 전분과 탄수화물을 다량 함유한 과일로서, 영양가도 풍부하여 기호식품 또는 대용 식량자원으로서 널리 재배되는 유실수이다.<sup>1)</sup>

밤에 관련한 연구로는, 우리나라에서는 서 등<sup>2)</sup>의 밤가공 방법, 김 등<sup>3)</sup>의 밤전분의 물리화학적 특성, 임 등<sup>4)</sup>과 나 등<sup>5)</sup>의 밤 저장, 김 등<sup>6)</sup>의 밤묵 제조, 최<sup>7)</sup>는 밤잎차의 식품성분 및 생리활성 기능을, 이<sup>8)</sup>는 밤꽃 추출물의 생물활성을, 권 등<sup>9)</sup>은 밤 귀피의 항산화 물질 등에 관하여 조사한 바 있다. 그리고 외국에서는 Valencia-Barrera 등<sup>10)</sup>은 스페인 지역의 지역별 꿀의 종류별 특성조사, Bunchbauer 등<sup>11)</sup>은 밤꿀의 휘발성분으로 monoterpenes가 풍부함을 확인하였고, Yamaguchi 등<sup>12)</sup>은 밤꽃의 휘발성분을, Amiot 등<sup>13)</sup>은 꿀에 함유된 phenolic compounds를, Talpay 등<sup>14)</sup>은 밤을 포함한 여러 가지 꿀 중의 citric acid 함량을, Battafolini 등<sup>15)</sup>은 꿀중의 당의 조성을, Kullmann<sup>16)</sup>은 꿀 중의 아미노산 조성 등을 조사 보고하였다. 밤은 통조림용으로 가공하거나 전분을 이용한 제품을 만들기도

하며, 삼계탕, 한약제와 함께 넣어 보신용 음식으로 사용하기도 한다.<sup>17)</sup>

밤나무는 모든 부위에 걸쳐 약리학적 효과가 있는 것으로 한 방에서는 알려져 있으며,<sup>18)</sup> 특히 밤나무 잎은 알레르기성 질환 및 천식(喉疔火毒)에, 밤꽃은 설사(下痢), 혈변(血便)에 치료효과가 있다<sup>19,20)</sup>고 알려져 있기 때문에, 밤꽃이나 잎, 나무껍질 등은 새로운 천연 보존료와 생리활성물질의 소재로서 활용가능성이 충분히 있다. 따라서 본 연구는 밤꽃과 밤잎을 원료로 하는 기능성 식품의 개발이나 천연 보존료 개발을 위한 기초자료로 활용하고자, 이들의 항균활성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료.** 밤꽃과 밤잎은 2002년 6월 경기도 안성시 한경대학교 부속농장에서 채취하여, 깨끗이 세척하고서 60°C로 열풍건조한 다음, 분쇄하여 냉동보관 하면서 실험에 사용하였다. 시료의 추출은 80% methanol로 실온에서 마쇄, 추출하여, 여액을 모아서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 methanol extract를 만들어 냉장보관 하면서 실험에 사용하였다.

**용매분획별 추출 및 수율 측정.** Methanol extract 시료의 용매별 추출은, 각 시료 20 g을 silica gel column에 넣고서 Fig. 1과 같은 방법으로 ethylacetate, 메탄올 및 물로 용매별로 추출, 농축하고 수율을 측정하였다. 용매별 및 각 분획별 가용성 고형분의 함량은 추출시료를 정용한 후 정용액 1 ml를 취하여 105°C에서 건조 후 증발 잔량을 확인, 시료에 대한 가용성 고형분 함량을 백분율로 나타내었다.<sup>8,26)</sup>

\*연락처

Phone: 82-31-670-5153; Fax: 82-31-677-0990

E-mail: gscho@hnu.hankyong.ac.kr

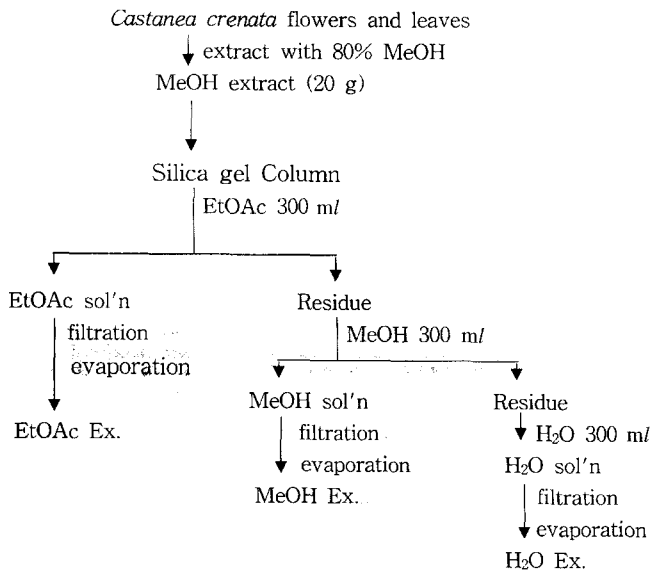


Fig. 1. Extraction procedure of methanol extracts of *Castanea crenata* flowers and leaves.

Table 1. List of strains and cultivation conditions used for screening of antimicrobial activity test

Strains	Cultivation conditions
Gram(+) bacteria	
<i>Bacillus cereus</i> (KCCM40935)	30°C, Nutrient agar
<i>Bacillus subtilis</i> (KCCM11315)	30°C, Nutrient agar
<i>Micrococcus luteus</i> (KCCM11326)	26°C, Lacto. MRS Broth
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	37°C, Trypticase soy agar
Gram(-) bacteria	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC13048)	37°C, Lacto. MRS Broth
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KCCM40890)	37°C, Nutrient agar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	37°C, Nutrient agar
<i>Salmonella enteritidis</i> (KCCM12021)	37°C, Nutrient agar

**공시균주.** 밤꽃과 밤잎 추출물의 항균활성 검색을 위하여 Table 1과 같이 식품부패 및 식품위생 관련 세균을 이용하였다.

**항균활성 검색.** 각각의 공시균주들에 대해 agar를 넣지 않은 broth상태의 생육배지를 제조하여 멸균한 후, slant 상태로 배양한 균주 1 백금이를 취하여 10 ml broth의 균 생육 배지에 접종하고, shaking incubator에서 균주들의 생육최적온도를 맞추어 18~24시간 배양하여 사용하였다.

추출물의 항균활성시험은 paper disc(8 mm)를 이용한 한천배지 확산법(agar diffusion method)을 이용하였다.<sup>21)</sup> 즉 멸균된 여과지에 시료 100 µg을 흡수시킨 후 추출용매를 휘발시키고, 미리 45°C로 식힌 배지에 균을 접종하여 둔 평판배지에 밀착시킨 다음, 멸균수를 75 µl씩을 가하여 추출물을 확산시키고, 4°C에서 1시간 동안 방치·안정화시킨 후, 균주별 각각의 생육 온도에서 24~48시간 배양하여 paper disc주위에 생성된 저해환 (inhibition zone)의 직경(mm)을 측정하여 비교하였다.

**최소저해농도측정.** 최소저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 항균력 시험을 통하여 비교적 항균활성이 높았던 5종의 균주 *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*

Table 2. Yields of various solvent extracts and soluble dried matter from methanol concentrates (unit: %)

Yields/Samples	<i>Castanea crenata</i>	
	Flowers	Leaves
80% Methanol extract	16.32	17.21
Various solvent extracts		
Ethylacetate fraction	1.94	2.24
Methanol fraction	4.75	5.03
Water fraction	7.81	8.47
Soluble dried matter		
Ethylacetate fraction	4.70	2.86
Methanol fraction	38.58	40.18
Water fraction	47.24	48.62

에 대하여 조사하였다. MIC검색은 시료를 methanol로 용해시켜, 최종농도가 10, 20, 50, 80, 100 및 150 µg/disc가 되도록 8 mm paper disc에 흡수시킨 후, 항균활성 시험방법과 동일하게 측정하였다.<sup>22)</sup>

**미생물의 생육저해효과.** 추출물이 미생물의 생육에 미치는 저해영향은, 공시 균주들을 액체배지 50 ml에 한 백금이 접종한 후, 각 균주의 배양조건에서 24시간 배양하여 활성화시켜 사용하였다. 각 미생물의 액체배지에 추출물을 0.5% 농도로 첨가하여, 각 균주의 배양조건에서 배양하면서, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 및 48시간에서 경시적으로 배양액 2 ml를 채취하여, spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 미생물의 증식곡선으로 하였다.<sup>23)</sup>

**미생물의 형태관찰.** 미생물에 대한 추출물의 저해효과를 보기 위하여 추출물이 처리된 미생물과 처리되지 않은 미생물의 형태를 SEM전자현미경으로 관찰하였다. 즉, 각 미생물을 배양하여 대수증식기의 단계에서 추출물을 500 ppm 첨가 한 후 3시간 방치하였다. 그 후 원심분리하여 균체를 분리하고, 0.05 M phosphate buffer로 희석하여 0.45 µm membrane filter에 균체를 고정하였다. 이를 5% glutaldehyde 용액에 하룻밤 담구고 멸균수로 세척한 뒤 30~100% 에탄올에 차례로 담구고 탈수하고 다시 isoamyl acetate에 약 30분간 담구어 건조시킨 다음 전자현미경으로 관찰하였다.<sup>8)</sup>

## 결과 및 고찰

**용매분획별 추출수율.** 밤꽃과 밤잎의 methanol extract의 용매분획별 추출수율과 가용성 고형분 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 시료를 80% methanol로 추출한 결과 밤꽃은 16.32%, 밤잎은 17.21%의 수율을 보였다.

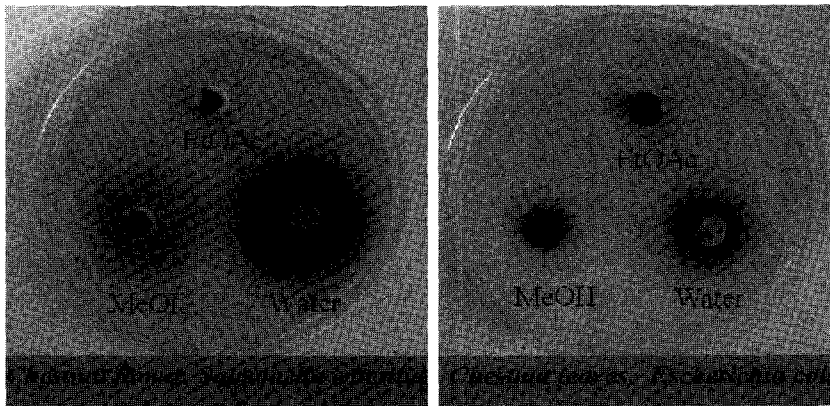
이 추출물들을 각각 용매분획을 한 결과의 수율은 밤꽃에서 ethylacetate 1.94%, methanol 4.75% 및 water 7.81%였고, 밤잎은 ethylacetate 2.24%, methanol 5.03% 및 water 8.47%였다.

또한 각 분획 추출물의 가용성 고형분 함량을 조사한 결과 밤꽃은 water 47.24%, methanol 38.58%, ethylacetate 4.70%였으며, 밤잎도 water 48.62%, methanol 40.18%, ethylacetate 2.86%의 많은 순서로 나타났다. 그리고 밤꽃과 밤잎을 비교해

Table 3. Screening of antimicrobial activities of *Castanea crenata* flowers and leaves (concentration 100 µg/disc)

(unit: mm)

Strains\Sample\Solvents	<i>Castanea crenata</i>					
	Flowers Ex.			Leaves Ex.		
	EtOAc	MeOH	H <sub>2</sub> O	EtOAc	MeOH	H <sub>2</sub> O
Gram(+) bacteria						
<i>Bacillus cereus</i>	10	13	-	13	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	10	21	16	11	20	18
<i>Micrococcus luteus</i>	10	10	-	11	15	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	17	-	-	19	-
Gram(-) bacteria						
<i>Escherichia coli</i>	18	22	11	11	23	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	13	10	12	18	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	20	13	10	21	14
<i>Salmonella enteritidis</i>	12	18	16	-	13	10

Fig. 2. Antimicrobial activities of *Castanea crenata* flower and leaves by paper disc method (concentration 100 µg/disc) (left; chestnut flower, right; chestnut leaves).

보면 밤꽃보다 밤잎에서 추출수를 및 가용성 고형분의 수율이 각각 높게 나타났다. 밤꽃의 용매분획별 수율과 가용성 고형분을 이<sup>8)</sup>의 개화후 밤꽃 추출물의 수율과 가용성 고형분 수율의 결과와 비교하면 유사한 결과를 보였다.

**항균활성 검색.** 밤꽃과 밤잎의 항균활성을 검색한 결과는 Fig. 2 및 Table 3과 같다. 밤꽃과 밤잎 각각의 용매별 추출물을 100 µg/disc 농도로 항균활성을 조사한 결과, methanol 추출물은 Gram positive bacteria 및 Gram negative bacteria에서 거의 모든 균주에서 항균활성을 보이는데 비하여, water 추출물은 Gram negative bacteria 모두에서 항균활성을 보이지만, Gram positive bacteria에서는 *Bacillus subtilis* 및 *Micrococcus luteus*에서만 항균활성을 보였다. 한편 ethylacetate 추출물은 *Staphylococcus aureus*를 제외한 대부분의 균주에서 항균활성을 보였으나 항균활성력이 미미하게 나타났다. 이처럼 밤꽃 및 밤잎의 용매별 추출물의 항균활성은 methanol 추출물이 가장 강하게 나타났다.

흥미로운 사실은 Gram negative bacteria에서는 추출물 대부분의 균주에서 항균활성이 있었으나, Gram positive bacteria에서는 *Bacillus subtilis*에서만 모든 추출물이 항균활성을 보이는 흥미로운 결과를 보였다. 이러한 결과는 오 등<sup>23)</sup>의 식품유해세균에 대한 차류 추출물의 항균활성 효과는, Gram 음성세균보다는 Gram 양성세균에 훨씬 강하게 작용하였다는 보고와는 유

사한 균도 있는 반면에, 대부분의 균에서 상반된 결과를 보이고 있다. 또한 Yeo 등<sup>24)</sup>과 Ikigai 등<sup>25)</sup>은 차류의 폴리페놀 화합물인 카테킨이 Gram 음성균 보다 Gram 양성균에 매우 강한 항균력을 보였다고 하였다. 한편 백 등<sup>22)</sup>은 국내산 대나무 줄기와 잎의 에탄올 추출물의 항균활성 검색에서 Gram 음성균 보다 Gram 양성균에서 매우 강한 항균활성이 있다고 보고하였다. 이러한 차이는 시료와 균주가 다르고 균의 배양조건이 상이하기 때문으로 생각되며, 앞으로 보다 폭넓은 연구가 필요할 것으로 생각한다. 한편 본 실험의 결과는 이<sup>8)</sup>의 개화후 밤꽃의 항균활성을 조사한 결과와는 유사한 결과를 보였다.

**최소저해농도추정 (MIC).** 밤꽃과 밤잎의 비교적 항균활성이 높은 methanol 추출물에 대하여 최소저해농도를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 각 균주에 있어서 최소저해농도는 60 µg/disc 이상에서 항균력이 인정되었다. 그러나 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* 및 *Salmonella enteritidis*는 밤꽃 추출물에서 30 µg/disc에서도 약간의 항균활성력을 보이기도 하였다. 오 등<sup>23)</sup>은 대나무 잎의 에탄올 추출물은 20 µg/disc 이상에서, 공 등<sup>26)</sup>은 신갈나무 잎의 에탄올 추출물은 *Bacillus subtilis*에 대하여 250 µg/ml 농도에서 최소저해농도를 나타내었고, 나머지 균들은 500 µg/ml 농도에서 최소저해농도가 나타났다고 보고하면서, 솔빈산과 벤조익산과의 비교결과 이들보다 더 강한 항균력이 있었다고 하였다. 따라서 향후 새로운 천연보존제의 개발은

Table 4. Minimum inhibitory concentrations of methanol extracts from *Castanea crenata* flowers and leaves by paper disc method

Strain\Inhibition	Inhibition zone <sup>1)</sup>					
	10 <sup>2)</sup>	20	50	80	100	150
Chestnut flower extract						
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	++	+++	+++	+++
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	+	++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	-	+	++	++	+++	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	++	+++	+++
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	+	+	++	+++	+++
Chestnut leaves extract						
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	++	+++	+++	+++
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	+	++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+++	+++	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	++	+++	+++
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	++	++	+++	+++

<sup>1)</sup>Inhibition zone; -: none, +: 9-12 mm, ++: 13-15 mm, +++: 16 mm up

<sup>2)</sup>Concentration of test sample; 100 mg/ml, unit; µg/disc

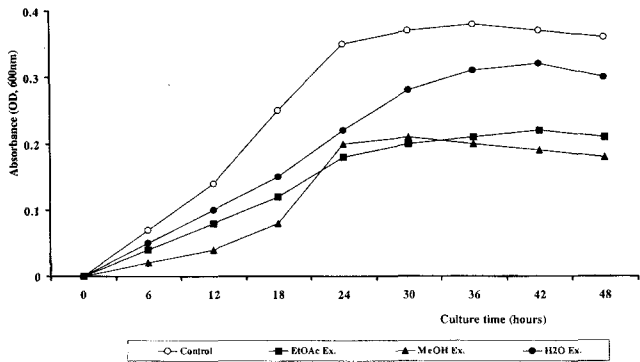


Fig. 3. Growth inhibition of *Bacillus subtilis* according to various solvents extracts from *Castanea crenata* flowers (0.5% concentration).

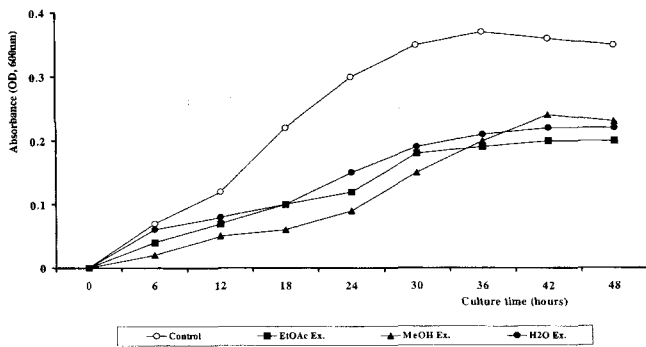


Fig. 4. Growth inhibition of *Bacillus subtilis* according to various solvents extracts from *Castanea crenata* leaves (0.5% concentration).

많은 식물로부터 가능성이 충분히 시사된다.<sup>27,28)</sup>

**세균의 생육저해효과.** 밤꽃과 밤잎의 용매별 추출물에 대하여 *Bacillus subtilis*의 생육저해효과를 측정된 결과는 Fig. 3, 4와 같다. *Bacillus subtilis*에 대한 생육저해 효과는 밤꽃과 밤잎 추출물을 0.5%씩 배지에 첨가하여, 배양한 결과 control에 비하여 모두 낮은 증식도를 보였다. 각 추출물 모두 배양초기에

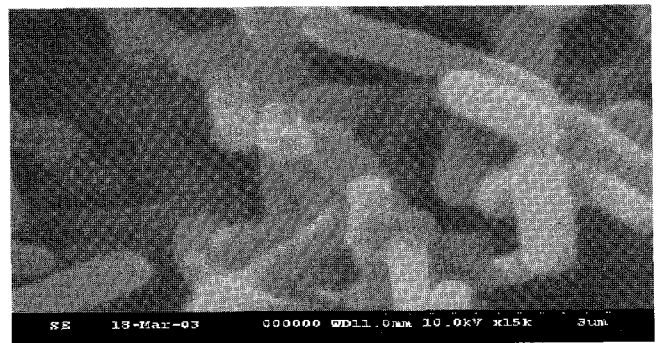


Fig. 5. Scanning electron micrograph of *Bacillus subtilis*. (nontreated, magnification: ×15,000)

는 배양18시간까지는 현저히 낮은 생육저해를 보이다가 그 후 는 약간 증식도가 높아졌다. 밤꽃 추출물에서는 methanol 추출 물이 가장 낮은 생육저해효과를 보인 반면에, water 추출물은 다른 추출물에 비하여 높은 증식도를 보였으며, 밤잎 추출물은 각 추출물에서 거의 비슷한 증식도를 보였다. 백 등<sup>22)</sup>은 대나무 잎 추출물이 0.5% 및 1.0% 첨가시는 매우 높은 생육저해 효과를 보였으나, 0.05% 및 0.1% 첨가시는 별다른 생육저해를 볼 수 없었고 오히려 대조군보다 생육이 더 활성화되었다고 하였다. 이유는 낮은 농도의 추출물은 생육 초기에는 저해되지만, 시간의 경과에 따라 추출물의 여러성분들이 오히려 균의 생육을 활발하게 하는 것이라 하였다.<sup>29)</sup>

**현미경 관찰.** 밤꽃과 밤잎의 methanol fraction extracts를 각각 500 ppm씩 처리한 후 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과는 Fig. 5~7과 같다. 추출물을 처리하지 아니한 경우는 전형적인 *Bacilli*의 형태(Fig. 5)를 볼 수 있지만, methanol 추출 물을 처리한 경우는 세포의 형태가 일그러지고 손상을 입은 형태를 관찰할 수 있었다.

미생물의 생육을 억제하는 항미생물 메카니즘은, 미생물의 세포벽 구성성분인 peptidoglycan 합성을 저해하는 것과 세포막에 이상을 유발시키는 것, 단백질의 합성을 저해시키는 것, 핵합

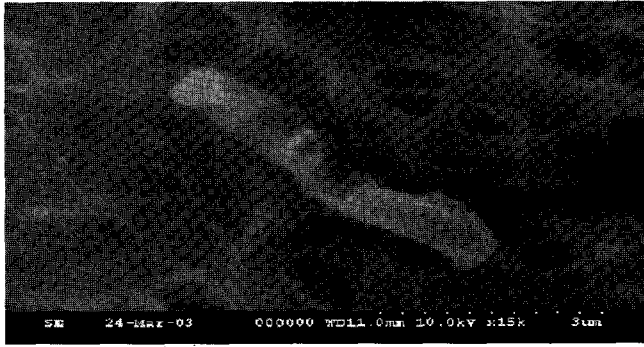


Fig. 6. Scanning electron micrograph of *Bacillus subtilis* treated with methanol extracts from *Castanea crenata* flowers. (treated with 500 ppm of methylalcohol extract, magnification:  $\times 15,000$ )

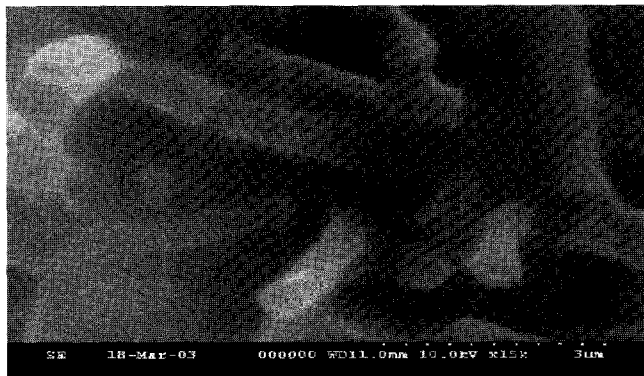


Fig. 7. Scanning electron micrograph of *Bacillus subtilis* treated with methanol extracts from *Castanea crenata* leaves. (treated with 500 ppm of methylalcohol extract, magnification:  $\times 15,000$ )

성을 저해시키는 것, DNA 합성저해제로의 역할 및 미생물의 대사기능 저해 기작 등이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>30)</sup>

밤꽃과 밤잎 추출물의 사용으로 미생물의 생육억제 기작과정을 현미경 사진만으로 설명하기는 곤란하지만, 조 등<sup>31)</sup>의 자몽씨 추출물 용액의 처리로 균체의 세포막 기능이 파괴되어, 세포내용물이 균체의외부로 유출되어 균체의 생육이 억제된다는 보고와 같이, 본 실험의 결과도 미생물의 세포벽 및 세포막 기능의 저해로 인하여 세포의 형태가 일그러지고 손상을 입은 형태로 나타난 것으로 추측된다.

### 감사의 글

본 연구는 2002년도 환경대학교 학술연구 조성비의 지원을 받아 수행하였기에 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Kim, J. H., Kim, J. C., Ko, K. C., Kim, G. R. and Lee, J. C. (1998) In *Detailed expositions of a fruit tree and horticulture* (4th ed.). Hyangmoonsa, Seoul, pp. 382-396.
- Suh, K. B., Han, P. J. and Lee, S. J. (1974) Studies on the processing of chestnut (*Castanea pubinervis* Schneid). *Korean J. Food Sci. Technol.* **6**, 98-108.
- Kim, S. K., Jeon, Y. J., Kim, Y. T., Lee, B. J. and Kang, O. J. (1995) Physicochemical and textural properties of chestnut starches. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 594-600.
- Yim, H., Kim, C. O., Shin, D. W. and Suh, K. B. (1980) Study on the storage of chestnut. *Korean J. Food Sci. Technol.* **12**, 170-175.
- Nha, Y. A. and Yang, C. B. (1996) Changes of constituent components in chestnut during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 1164-1170.
- Kim, S. K., Jeon, Y. J., Kim, Y. T., Lee, B. J. and Kang, O. J. (1995) Sensory evaluation and retrogradation properties of chestnut mook. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 601-605.
- Choi, O. B. (1999) Physiological activity and chemical composition of *Castanea crenata* leaf tea, Ph.D. Thesis, Chonnam University, Kwangju, Korea.
- Lee, Y. S. (1996) Chemical components and biological activities of chestnut flower (*Castanea crenata*). Ph.D. Thesis, Kyongsang University, Jinju, Korea.
- Kwon, E. J., Kim, Y. C., Kwon, M. S., Kim, C. S., Kang, W. W., Lee, J. B. and Chung, S. K. (2001) Antioxidative activity of solvent fraction and isolation of antioxidative compound from chestnut husk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 726-731.
- Valencia-Barrera, R.M., Fombella-Blanco, M.A., Fernandez-Gonzalez, D., Diaz-Gonzales, T. E., (1994) Pollen spectra of honey from different phytogeographical regions of the Leon proven: Dep. de Biologia vegetal Universidad de Leon, E-2471 Leon, Spain *Grrana*, **33**, 268-275.
- Bunchbauer, Gerhard, Jirovetz, Leopold, Wasicky, Michael, Nikiforov, Alexej. (1994) Volatile common horsechestnut blossoms were analyzed by GC/FID, GC/FTIR/MSD and GC sniffing technique. *J. Essent. Oil Res.* **6**, 93-95.
- Yamaguchi, K., Shibamoto, T. (1980) Volatile constituents of the chestnut flower (*Castanea crenata*). *J. Agric. Food Chem.* **28**, 82-84.
- Amito M. J., Aubert S. Gonnet M. Tachini M. (1989) The phenolic compounds in honeys preliminary study on identification and family quantification Lab. De biochimie metabolique et technologie station de technologie des produits vegetaux. *Apidologie* **20**, 115-126.
- Talpay B. (1988) The ingredients of honey citric acid (citrate). *Dtsch. Lebensm-Rundsch* **84**, 41-44.
- Battafolini, M. B. (1974) Sugar composition of some uniflora honeys and the nectars they are derived from. *Apic. Abstr.* **25**, 123-129.
- Kullmann E. (1974) Qualitative determination of free amino acids and the honey dew honeys mixed honey and honeys from flowers. *Apidologie* **5**, 21-38.
- Park, C. S., Kim, W. S., Ahn, C. Y. and Lee, M. H. (1999) In *Chestnut, persimmon, date, walnut*. Naewyoi Press, Seoul. pp. 75-94.
- Kwan, S. B. (1990) In *Atlas of pharmacognogy encyclophedia (plants)*. Yonglim Press, Seoul, pp. 806-808.
- Lee, T. B. (1994) In *Illustrated flora of Korea*. Hyangmoon Press, Seoul. p. 274.
- Roberto Chiej (1984) In *The MacDonald encyclopedia of medical plants*. MacDonald Press, Britain. p. 72.

21. Korean national institute of health. (1996) Antimicrobial test. pp. 59-70.
22. Baek, J. W., Chung, S. H. and Moon, G. S. (2002) Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 1073-1078.
23. Oh, D. H., Lee, M. K. and Park, B. K. (1999) Antimicrobial activities of commercially available tea on the harmful foodborne organisms. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 100-106.
24. Yeo, S. G., Ahn, C. W., Kim, I. S., Park, Y. H. and Kim, S. B. (1995) Antimicrobial effect of tea extract from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 293-298.
25. Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. and Shimamura, T. (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochem. Biophys. Acta* **1147**, 132
26. Kong, Y. J., Kang, T. S., Lee, M. K., Park, B. K. and Oh, D. H. (2001) Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fractions of *Quercus mongolica* leaf. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 338-343.
27. EL-Shenawy, M. A. and Marth, E. H. (1988) Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *J. Food Port.* **51**, 525-528.
28. EL-Shenawy, M. A. and Marth, E. H. (1989) Inactivation of *Listeria monocytogenes* by sodium benzoate together with some organic acids. *J. Food Port.* **52**, 771-775.
29. Chung, K. H., Lee, S. H., Lee, Y. C. and Kim, J. T. (2001) Antimicrobial activity of *Omija* (*Schizandra chinensis*) extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 127-132.
30. Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. (2002) In *Microbiology* (5th ed), Antimicrobial chemotherapy. McGraw-Hill Co., N.Y., USA, pp. 805-822.
31. Cho, S. H., Lee, H. C., Seo, I. W., Kim, Z. U., Chang, Y. S. and Shin, Z. I. (1991) Efficacy of grapefruit seed extract in the preservation of *Satsuma mandarin*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**, 614-618.

---

#### Screening of Antimicrobial Activity from *Castanea crenata* Sieb. et Zucc. Leaves and Flowers. II. Screening of Antimicrobial Activities

Gyu-Seong Cho\* and Hae-Yeong Kim<sup>1</sup> (*Department of Food Science and Technology, Han Kyong National University, Anseong 456-749, Korea;* <sup>1</sup>*Department of Food Science and Technology, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea*)

**Abstract:** Chestnut (*Castanea crenata* S. et Z.) leaves and flowers were extracted with 80% methanol and then fractionated with ethylacetate, methanol and water. Their antimicrobial activities in each fraction were investigated. Methanol fraction of the chestnut leaves and flower showed strong antimicrobial activities against both of Gram positive and Gram negative bacteria. The ethylacetate and water fraction, however, showed only weak antimicrobial activities when the antimicrobial activities were occurred. Minimal inhibitory concentration (MIC) of the methanol extracts of the chestnut leaves and flowers against 5 strains of Gram positive and Gram negative bacteria were at 60 µg/disc. The extracts of the chestnut leaves and flowers inhibited the growth of *Bacillus subtilis* at 0.5% (w/w) concentration. In order to investigate the effect of extraction methods on the *B. subtilis*, scanning electron microscope was used. The *B. subtilis* was damaged when the methanol extracts of the chestnut leaves and flowers were at 500 ppm.

---

Key words: *Castanea crenata*, chestnut leaves and flower, antimicrobial activity

\*Corresponding author