

Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Smilax china* Leaf Extracts

Myung-Soo Ko[†] and Jong-Beom Yang

Department of Food Science and Biotechnology, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea

청미래 덩굴 잎 추출물의 항산화 및 항균 활성

고명수[†] · 양종범

동남보건대학 식품생명과학과

Abstract

Hot-water and 70%-ethanol *Smilax china* leaf extracts were prepared, and their total polyphenol and flavonoid contents, DPPH-radical-scavenging ability, nitrite-scavenging ability, and antimicrobial activity were determined. The total polyphenol contents of the hot-water and ethanol extract were 5.433 ± 0.171 and 13.060 ± 0.110 mg/g, respectively; their flavonoid contents were 1.599 ± 0.017 and 3.005 ± 0.084 mg/g; their DPPH-radical-scavenging abilities, assayed at 1.0 mg/mL, were 33.6 and 92.3%; and their nitrite-scavenging abilities, assayed at 0.1-2.0 mg/mL, were 37.9-61.6 and 38.4-77.8%. The 70%-ethanol extract showed higher antimicrobial activity than the hot-water extract. The antimicrobial activities were high in *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus*, in that order. The antimicrobial substances in the two extracts were maintained after heating at 65-125°C for 30 min.

Key words : *Smilax china* leaf, total polyphenol, flavonoid, antioxidant activity, antimicrobial activity

서 론

산화는 육류나 유지식품 등에서 흔히 발생하는 현상이며, 지질의 과산화는 영양가를 감소시키거나 색과 향미에 나쁜 영향을 미치는데, 이러한 지질의 과산화를 방지해줌으로써 식품의 안전성을 높이는 역할을 하는 것이 항산화제이다. 항산화제로는 오래전부터 많은 합성 물질들이 개발되어 왔으나, 그 효과와 경제성 및 안전성 때문에 주로 사용되고 있는 합성 항산화제는 BHA와 BHT의 두 종류에 불과하다(1). 그러나 이들도 다량을 섭취하면 여러 가지 부작용을 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있다(2). 또한 식품의 부패나 식중독 유발 미생물을 제어하여 식품을 장기간 안전하게 저장하기 위한 수단으로 다양한 합성 보존료가 오랫동안 사용되어 오고 있다. 하지만 합성 보존료는 체내 축적 등의 안전성 문제가 지속적으로 대두되고 있다(3). 최근 소비자들의 건강 지향적 성향과 함께 합성 항산화제나 합성 보존료의 사용을 기피하는 대신 천연물에 대한 요구가 높아

지고 있어 식물로부터 항산화 및 항균 작용을 갖는 물질들을 분리하여 식품의 보존에 이용하고자 하는 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

청미래 덩굴(*Smilax china* Linne)은 우리나라 중남부 지방을 비롯하여 중국 및 일본에 널리 분포하며, 백합과(Liliaceae)에 속하는 낙엽활엽 덩굴성 관목으로 명감나무 또는 망개나무라고 불린다. 그 줄기는 마디마다 휘어 있고, 군데군데에 갈고리 같은 가시가 나 있으며, 길이가 3 m 정도로 자란다. 그 잎은 두껍고 넓은 타원형으로 길이가 4-12 cm, 폭이 2-10 cm이고 윤기가 있다(4). 이와 같이 떡을 싸기에 좋은 형태인 청미래 덩굴 잎으로 싸서 만든 망개떡은 여름철에도 보존성이 높아 경남 의령 일대의 전통음식으로 잘 알려져 있는 바, 이에 근거하여 청미래 덩굴 잎을 본 실험의 재료로 선정하였다. 한의학에서는 청미래 덩굴 뿌리를 지칭하여 토복령(土茯領)이라 하며, 위암, 식도암, 결장암, 식용부진 및 구토증 등의 소화기 관련 질병치료에 민간요법으로 전해져 오고 있고, 이노, 매질, 하리, 관절통, 설사, 이질 및 수종 등의 치료에 약으로 쓰인다(4,5). 최근 청미래 덩굴에 대한 여러 가지 약리효과가 알려지면서 청미래 덩굴 뿌리에 대한 연구로는 청미래 덩굴 뿌리 추출

[†]Corresponding author. E-mail : kmsoo@dongnam.ac.kr
Phone : 82-31-249-6434, Fax : 82-31-249-6430

물의 항산화 활성(5), 항균 활성(6), 항염증 및 통증 억제효과(7) 등의 보고가 있고, 청미래 덩굴 잎에 관한 연구로는 청미래 덩굴 잎 추출물의 전자공여능, 아질산염 소거능 및 항균효과(8,9), 청미래 덩굴 잎의 항산화 활성 성분(10) 등의 보고가 있으나, 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 중부 이남의 산야에서 자생하는 청미래 덩굴에 대해 다양한 생리활성을 가진 기능성 식품 소재로서의 이용가능성을 모색하기 위하여 그 잎을 열수 및 에탄올로 추출한 후 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, 항산화 활성, 아질산염 소거능 및 항균 활성 등을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서는 2008년 8월에 경기도 의왕시 부곡동 야산에서 자생하고 있는 청미래 덩굴 잎을 채취하여 이물질 제거하고 물로 세척한 후 음건시킨 다음 분쇄기(DA505, Daesung Artlon Co, Seoul, Korea)로 세절하여 실험재료로 사용하였다.

추출물의 조제

환류냉각관이 부착된 2 L 용량의 둥근 플라스크에 세절된 청미래 덩굴 잎 250 g과 증류수 1,000 mL를 가하여 95°C의 수욕 상에서 3시간 동안 추출한 후 다시 잔사에 증류수 500 mL를 넣어 1시간 동안 더 추출하여 거르러 거른 다음 감압 여과하였고, 그 여액을 회전감압농축기(N-1100S, Eyela, Tokyo, Japan)로 60°C의 수욕 상에서 감압 농축하여 열수 추출물로 하였다. 또 세절한 청미래 덩굴 잎 250 g과 70% 에탄올 1,000 mL를 추출용기에 가하여 3일 동안 침출시켜 추출한 후 다시 잔사에 70% 에탄올 500 mL를 넣어 한 번 더 추출하여 거르러 거른 다음 열수 추출물과 같은 방법으로 여과 및 감압 농축하여 에탄올 추출물로 하였다. 열수 추출물과 에탄올 추출물은 상압가열건조법으로 총고형분 함량을 측정하여 일정 농도로 희석한 후 -40°C에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법(11)을 응용하여 측정하였다. 즉, 추출물 희석액 5 mL에 0.2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2 mL를 첨가하고 잘 혼합하여 3분간 방치한 후 10% 탄산나트륨 용액 2 mL를 서서히 가하여 혼합하였다. 이 혼합액을 30분간 방치한 후 분광광도계를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 별도로 tannic acid (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) 표준용액을 최종농도가 0, 5, 10, 20, 30, 40 µg/mL이 되도록 한 후 위와 동일한

방법으로 760 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 산출하였다. 플라보노이드 함량은 Kim 등(12)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시험관에 시험액 0.5 mL를 취하고, 80%(v/v) 에탄올 1.5 mL, 10%(w/v) 질산암모늄 용액 0.1 mL, 1 M 초산칼륨 용액 0.1 mL 및 증류수 2.8 mL를 가하여 충분히 교반한 후 40분간 실온에서 방치한 다음 분광광도계를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 증류수를 대조액으로 하였다. 별도로 quercetin (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) 표준용액을 최종농도가 0, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL이 되도록 한 후 위와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였으며, 10%(w/v) 질산암모늄 용액 대신 증류수 0.1 mL를 가한 것의 흡광도를 빼 흡광도의 차를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 플라보노이드 함량을 산출하였다. 각 실험은 3회 반복하여 실시하였고 평균과 표준편차를 계산하여 그 결과를 비교하였다.

DPPH radical 소거법에 의한 항산화 활성 측정

항산화 활성은 Blois (13)의 방법을 약간 변형하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거법으로 측정하였다. 즉, 시험관에 0.1 mM DPPH 용액 4.5 mL를 가하고, 여기에 각 추출물 희석액 0.5 mL씩을 가하여 격렬하게 혼합한 후 암소에서 10분간 방치한 다음 분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 추출물 대신 에탄올을 가하여 대조구로 하였고, 시료의 흡광도에 대한 대조구와 시료의 흡광도의 차이를 백분율로 하여 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 이로부터 소거능과 시료농도 간의 직선회귀식을 구한 후 50%의 소거능을 나타내는 시료의 농도를 산출하여 IC₅₀으로 결과를 나타내었다. 또한 양성대조구로 L-ascorbic acid를 사용하여 활성을 비교하였다.

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Gray와 Dugan (14)의 방법을 응용하여 측정하였다. 즉, 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL에 일정 농도의 추출물 1 mL를 가하고, 0.1 N HCl로 반응용액의 pH를 1.2로 조정하여 다음 총량을 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 mL씩 취하여 2% 초산용액 5 mL와 Griess 시약(30% 초산용액으로 용해한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 실온에서 15분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산의 양을 구하였다. 공시험은 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 mL 가하여 동일하게 실시하였으며, 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 하여 아질산염 소거능을 나타내었다. 또한 추출물에 대한 양성대조구로 L-ascorbic acid를 사용하여 활성을 비교하였다.

Table 1. List of microorganism used for antimicrobial activity test

Strains	Cultivation condition
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Nutrient media, 30°C
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11764	Nutrient media, 37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	Brain heart infusion media, 37°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Trypticase soy media, 37°C
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 40253	Nutrient media, 30°C
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Nutrient media with 3% NaCl, 37°C

항균 활성 측정

본 실험에서는 6종의 식중독 세균을 시험균주로 사용하였고, 균주의 종류와 배양조건은 Table 1과 같다. 먼저 공시균주를 사면배지에서 3회 계대배양하여 활성화시킨 후 각 균주 용 액체배지에 무균적으로 1백금이 접종하여 진탕배양기(Shaking Bath TS-300, Advantec, Kashiwa, Japan)에서 24시간 배양한 다음 분광광도계(UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 660 nm에서 흡광도가 0.3이 되도록 멸균증류수로 현탁시켜 시험균액으로 사용하였다. 항균 활성은 paper disc (직경 8 mm)를 이용한 디스크 확산법(disc diffusion method)으로 측정하였다(15). 즉, 페트리 접시에 멸균된 각 기층용 배지를 15 mL씩 분주하여 응고시키고, 그 위에 증충용 배지와 각 시험균액을 잘 혼합시켜 분주한 후 다시 응고시켜 이층의 시험용 평판배지를 만들었다. 이 평판배지 위에 멸균된 paper disc를 올려놓고 밀착시킨 후 미리 0.45 µm membrane filter로 제균시킨 시료용액을 30 µL씩 흡수시킨 다음 각 균주의 최적 배양온도에서 16시간 배양하여 디스크 주변에 형성된 저해환의 크기(mm)를 캘리퍼(Calliper, Mitutoyo, Tokyo, Japan)로 측정하였으며, 대조구로 1% sorbic acid 용액을 사용하여 항균 활성을 비교하였다. 농도별 항균 활성은 추출물의 고형분 함량이 0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 및 20.0%가 되도록 조제한 후 위와 같이 측정하였다. 또한 열 안정성은 추출액을 65, 80, 95, 110 및 125°C의 온도에서 30분 동안 항온수조(Water bath NE-1, Eyela, Tokyo, Japan)와 고압멸균기(Autoclave VS-1321-80, Vision Scientific Co, Bucheon, Korea)를 이용하여 열처리한 후 위와 같이 디스크 확산법으로 생육저해환의 크기를 측정하여 열처리를 하지 않은 대조구와 비교하였다. 각 실험은 3회 반복하여 실시하였고 평균치로 그 결과를 나타내었다.

Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents of *Smilax china* leaf extracts

	Contents (mg/g)	
	Hot water extract	Ethanol extract
Total polyphenol	5.433±0.171	13.060±0.110
Flavonoid	1.599±0.017	3.005±0.084

Each value is mean±standard deviation of three replicate experiments.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며, 항산화 및 항균 작용 등의 여러 가지 생리활성을 가진다(16). 본 실험에서 청미래 덩굴 잎 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 함량은 tannic acid 표준곡선($R^2=0.9991$)을 이용하여, 플라보노이드 함량은 quercetin 표준곡선($R^2=0.9999$)을 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다. 즉, 열수 추출물과 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 5.433±0.171 mg/g 및 13.060±0.110 mg/g으로 열수 추출물보다 에탄올 추출물에 2.4배 정도 더 많이 함유되어 있었다. 또한 플라보노이드 함량도 열수 추출물과 에탄올 추출물에 각각 1.599±0.017 mg/g 및 3.005±0.084 mg/g 함유되어 있어서 열수 추출물보다 에탄올 추출물에 1.9배 정도 더 많았다. 이와 같이 총 폴리페놀과 플라보노이드는 열수 추출물에 비해 에탄올 추출물에 더 많이 함유되어 있었고, 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 총 폴리페놀 함량이 플라보노이드보다 3.4배 이상 많아 청미래 덩굴 잎 추출물에는 플라보노이드 외의 다른 페놀성 화합물을 많이 함유하는 것으로 나타났다. 이는 화살나무 잎 열수 추출물의 총 페놀 함량은 10.6 mg/g이었다는 보고(17)와 선학초 잎 메탄올 추출물의 총 페놀 함량은 15.3 mg/g이었다는 보고(18) 및 자색고구마 메탄올 추출물의 총 페놀 함량은 13.1 mg/g이었다는 보고(19)와 유사하였다. 그리고 총 폴리페놀 함량이 0.43 mg/g인 울금 에탄올 추출물(20), 0.362 mg/g인 연잎 에탄올 추출물(21), 0.279 mg/g인 모과 에탄올 추출물(22), 0.12 mg/g인 하교초 줄기 에탄올 추출물(23) 및 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 각각 79.65 µg/g 및 4.43 µg/g인 질경이 물 추출물(24) 등과 비교하면 본 실험의 청미래 덩굴 잎 에탄올 추출물에는 상당히 많은 폴리페놀과 플라보노이드가 함유되어 있는 것으로 나타났다.

DPPH radical 소거법에 의한 항산화 활성

청미래 덩굴 잎 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 열수 추출물의 경우 추출물의 농도가 증가할수록 소거능이 완만하게 증가하여 1, 2 및 3 mg/mL의 농도에서 각각 33.6%, 54.4% 및 73.3%였다. 이는 1 mg/mL의 농도에서 25.5%, 2.5 mg/mL의 농도에서 49%의 소거능을 나타내었다는 오미자 열수 추출물(25)보다 다소 높은 수준이었다. 에탄올 추출물의 경우에는 0.25, 0.5 및 1 mg/mL의 농도에서 소거능이 각각 50.9%, 83.5% 및 92.3%로 급속히 증가하여 높은 소거능을 보임으로써 열수 추출물보다 강력한 항산화 활성을

나타내었다. 이러한 결과는 호주산 올리브 잎 에탄올 추출물 1 mg/mL의 농도에서 63.32%의 소거능을 나타내었다는 보고(26), 청미래 덩굴 잎 에탄올 추출물 3 mg/mL의 농도에서 65.8%의 소거능을 나타내었다는 선행 연구결과(9)나 선학초 잎 메탄올 추출물 0.5 mg/mL의 농도에서 소거능이 74.4%였다는 보고(18) 및 20종의 생약재를 대상으로 1 mg/mL의 농도에서 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 소거능이 비교적 높은 오가피, 음양곽 및 산수유가 각각 72%, 70% 및 67%였다는 결과(1)보다도 높은 수준이었다.

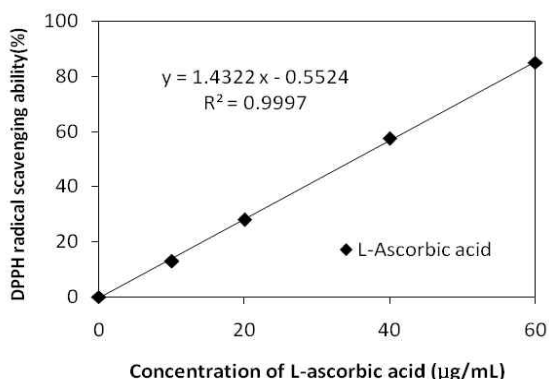
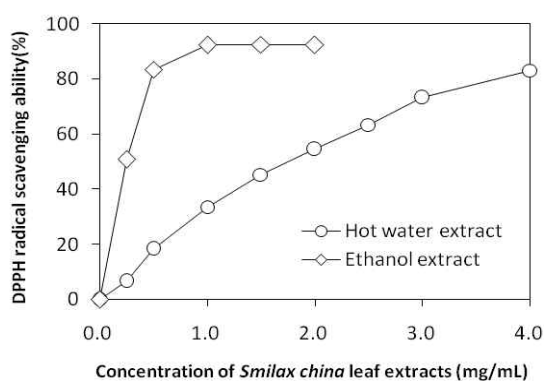


Fig. 1. DPPH radical scavenging ability of hot water and ethanol extract from *Smilax china* leaves and L-ascorbic acid.

한편, 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid를 양성대조구로 사용하여 청미래 덩굴 잎과 50% 소거능을 나타내는 IC₅₀을 비교한 결과, Table 3과 같이 L-ascorbic acid는 0.033 mg/mL의 IC₅₀을 보였고, 이를 기준으로 하면 청미래 덩굴 잎 열수 추출물과 에탄올 추출물은 각각 1.722 mg/mL 및 0.281 mg/mL의 IC₅₀을 보여 L-ascorbic acid의 1.9×10^2 및 1.2×10^1 배 정도의 효능을 나타내었다. 이와 같이 청미래 덩굴 잎은 양성대조구인 L-ascorbic acid보다 소거능이 낮게 나타났으나, 송화분, 참나무 및 백합화분(27) 중에서 IC₅₀ 값이 가장 낮게 나타났다는 백합화분 100% 에탄올 추출물(14.0 mg/mL)이나 송화분 50% 에탄올 추출물(40.0 mg/mL)보다도 IC₅₀ 값이 낮게 나타나 DPPH radical 소거능

이 우수한 것으로 판단된다. 또한 열수 추출물에 비해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 각각 2.4배 및 1.9배 더 많은 에탄올 추출물이 DPPH radical 소거능에 있어서도 1.0 mg/mL의 농도에서 92.3%의 소거능을 보여 같은 농도에서 33.6%의 소거능을 보인 열수 추출물에 비해 높은 항산화 활성을 나타낸 것으로 보아 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH radical 소거능은 밀접한 관련성이 있음을 알 수 있었다. 이는 송화분, 참나무 및 백합화분 추출물의 항산화 효능과 총 폴리페놀 함량과의 상관성을 조사한 결과 총 폴리페놀 함량이 높을수록 DPPH radical 소거능이 높았다는 보고(27)와 일치하였다. 이와 같이 본 실험에 사용한 청미래 덩굴 잎 열수 추출물과 에탄올 추출물은 이상의 연구결과들과 비교해볼 때 DPPH radical 소거능이 비교적 높게 나타났고, 특히 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 높은 DPPH radical 소거 활성을 보이므로 청미래 덩굴 잎 에탄올 추출물은 항산화 활성이 높은 기능성 식품 소재로서의 이용가능성이 높다고 판단된다.

Table 3. Antioxidant activity of *Smilax china* leaf extracts by DPPH radical scavenging method

Extracts	Antioxidant activity (IC ₅₀ : mg/mL)
Hot water extract	1.722
Ethanol extract	0.281
L-Ascorbic acid	0.033

아질산염 소거능

아질산염은 식육가공품의 발색제로 이용되고 있으나, 위장 내의 강산성 조건에서 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2급 및 3급 아민류와 nitroso화 반응을 하여 발암물질로 알려진 nitrosoamine을 생성하는 것으로 알려져 있다(14). Nitroso화 반응을 억제하기 위해서는 nitrosoamine 생성 기질인 아민의 생성을 억제하거나 아질산염을 소거해야 하는데, 본 실험에서는 청미래 덩굴 잎의 열수 및 에탄올 추출물을 아질산염 용액과 동량 혼합하여 pH를 1.2로 조절 한 후 각 추출물의 아질산염 소거능을 측정하였고, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 즉, 청미래 덩굴 잎 열수 추출물과 에탄올 추출물의 아질산염 소거능은 추출물의 농도가 0.1 mg/mL에서 2.0 mg/mL로 증가할수록 각각 37.9%에서 61.6%, 그리고 38.4%에서 77.8%로 증가하였으며, 같은 농도에서는 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 소거능이 더 우수하였다. 이는 청미래 덩굴 잎 에탄올 추출물 10 mg/mL의 농도에서 73.5%의 소거능을 나타내었다는 선행 연구결과(9)와 비교하면 본 실험의 1.5 mg/mL의 농도에 상당하는 에탄올 추출물의 소거능과 유사하여 본 실험에서의 소거능이 높게 나타났고, 한약재인 당귀, 목통, 골담초 물 및 에탄올 추출물 1 mg/mL의 농도에서 33-42%의 소거능을 나타내었다는 보고(28)나 동충하초 균사체 에탄올 추출물 1 mg/mL의 농도

에서 37%의 소거능을 나타내었다는 보고(29) 및 썩 에탄올 추출물 1 mg/mL의 농도에서 27%의 소거능을 나타내었다는 보고(30)보다 아질산염 소거능이 높게 나타났다.

한편, 양성대조구로서 환원력이 강한 아스코르빈산을 20-80 µg/mL의 농도로 조제하여 각 추출물과 아질산염 소거능을 비교한 결과, 아스코르빈산의 농도가 증가할수록 아질산염 소거능이 27.9%에서 98.2%로 증가하여 열수 및 에탄올 추출물보다 낮은 농도에서 급격한 증가 패턴을 보였으며, 아스코르빈산의 아질산염 소거능 40 µg/mL에 상당하는 열수 추출물과 에탄올 추출물의 농도는 각각 1.0 mg/mL

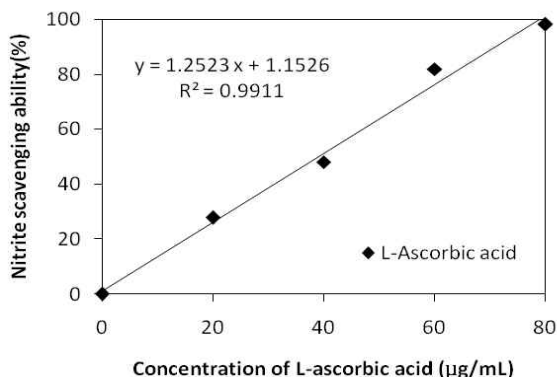
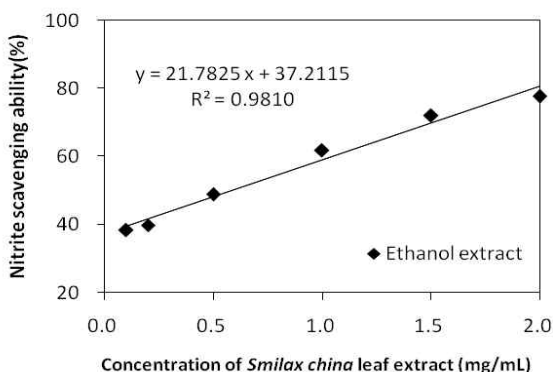
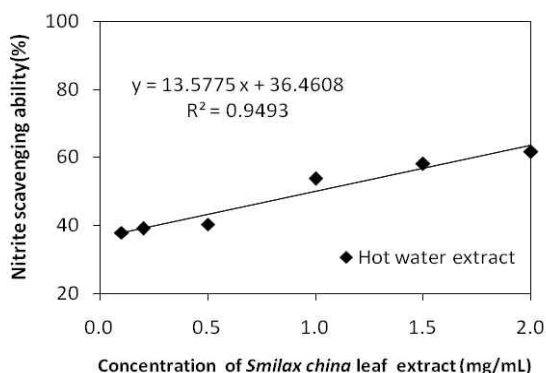


Fig. 2. Nitrite scavenging ability of hot water and ethanol extract from *Smilax china* leaves and L-ascorbic acid.

및 0.6 mg/mL 정도였다. 이러한 결과는 DPPH radical 소거능의 패턴과 유사한 경향으로 추출물의 항산화 활성이 높을수록 아질산염 소거능도 높게 나타났다. 그러므로 청미래 덩굴 잎에 함유된 폴리페놀 화합물이 DPPH radical 소거능과 아질산염 소거능에 크게 관여하는 것으로 생각된다. 이미 알려진 바와 같이 아스코르빈산과 같은 환원성 물질은 아질산염과 반응하면 nitrosoamine의 생성을 억제하고(31), 폴리페놀 화합물은 아질산염을 분해하여 nitrosoamine의 생성을 효과적으로 억제하며(32), 각종 페놀은 아민의 니트로화(nitrosation)의 저해제로 관여한다(33). 이상에서 본 바와 같이 본 실험에 사용한 청미래 덩굴 잎 열수 추출물과 에탄올 추출물은 아질산염 소거능이 비교적 높게 나타났고, 특히 에탄올 추출물은 열수 추출물보다 높은 아질산염 소거 활성을 보이므로 청미래 덩굴 잎 에탄올 추출물은 발색제로 아질산염이 사용되는 식육가공품 등에 기능성 식품 소재로서의 이용가능성이 높다고 판단된다.

항균 활성

청미래 덩굴 잎 열수 및 에탄올 추출물의 항균 활성을 조사하기 위하여 각 추출물을 paper disc 당 8.4 mg의 농도로 흡수시켜 주요 식중독 세균에 대한 생육저해환을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 열수 추출물의 경우 *Bacillus cereus*에 대해 20.7 mm의 저해환을 보여 강한 항균 활성을 나타내었고, 다음으로 *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*의 순이었으며, 이들 4 균주에 대해서는 대조구로 사용된 1% sorbic acid 용액과 비교하여 항균 활성이 높게 나타났다. 반면에 *Listeria monocytogenes*와 *Escherichia coli*에 대해서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 에탄올 추출물의 경우에는 *B. cereus*에 대해 22.3 mm의 저해환을 보여 열수 추출물보다 강력한

Table 4. Antimicrobial activities of *Smilax china* leaf extracts against various microorganisms

Strains	Clear zone on plate (mm)		
	<i>Smilax china</i> leaf extracts ¹⁾		Sorbic acid solution ²⁾
	Hot water extract	Ethanol extract	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	20.7	22.3	11.0
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11764	16.3	17.5	9.1
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	- ³⁾	-	9.2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	9.0
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 40253	17.8	19.3	10.2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	19.1	20.5	10.6

Each value is mean of three replicate experiments.

¹⁾Concentration of *Smilax china* leaf extracts loaded on paper disc was 8.4 mg/8 mm paper disc.

²⁾Concentration of sorbic acid loaded on paper disc was 0.3 mg/8 mm paper disc.

³⁾No growth inhibition.

Table 5. Effect of concentration of *Smilax china* leaf extracts on antimicrobial activities against various microorganisms

Strains	Clear zone on plate (mm)										SA ²⁾
	<i>Smilax china</i> leaf extracts										
	Hot water extract (mg)					Ethanol extract (mg)					
	0.375 ¹⁾	0.75	1.5	3.0	6.0	0.375	0.75	1.5	3.0	6.0	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	— ³⁾	—	11.1	14.6	18.7	—	9.8	11.7	16.0	21.1	11.0
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11764	—	9.7	10.8	13.0	14.9	9.4	10.3	11.4	13.5	15.8	9.1
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 40253	—	9.8	11.5	14.0	16.3	9.7	10.6	12.3	14.7	17.2	10.2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	—	9.3	10.1	12.9	16.7	9.7	10.1	12.2	14.3	18.0	10.6

Each value is mean of three replicate experiments.

¹⁾Concentration of *Smilax china* leaf extracts loaded on 8 mm paper disc.

²⁾Concentration of sorbic acid loaded on paper disc was 0.3 mg/8 mm paper disc.

³⁾No growth inhibition.

Table 6. Effect of heat treatment of *Smilax china* leaf extracts on antimicrobial activities against various microorganisms

Strains	Clear zone on plate (mm)											
	<i>Smilax china</i> leaf extracts ¹⁾											
	Hot water extract						Ethanol extract					
	C ²⁾	65°C	80°C	95°C	110°C	125°C	C	65°C	80°C	95°C	110°C	125°C
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	20.7	20.5	21.3	20.2	21.0	19.8	22.3	21.9	22.0	21.8	22.2	21.6
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11764	16.3	17.0	16.6	15.7	16.7	15.8	17.5	18.4	18.2	17.8	18.0	17.1
<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 40253	17.8	18.5	18.2	17.4	17.9	17.0	19.3	19.5	19.1	18.7	19.4	18.8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	19.1	18.8	19.5	18.7	19.0	18.5	20.5	21.1	20.5	20.2	19.8	19.6

Each value is mean of three replicate experiments.

¹⁾Concentration of *Smilax china* leaf extracts loaded on paper disc was 8.4 mg/8 mm paper disc.

²⁾Control.

항균 활성을 나타내었고, 다음으로 *V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*, *S. aureus*의 순이었으며, 이들 4 균주에 대해서도 대조구로 사용된 1% sorbic acid 용액과 비교하여 항균 활성이 매우 높게 나타났으나, 열수 추출물과 마찬가지로 *L. monocytogenes*와 *E. coli*에 대해서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 이와 같이 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 공시된 6 균주 중에서 *B. cereus*에 대한 항균 활성이 가장 강하였고, *L. monocytogenes*와 *E. coli*에 대해서는 항균 활성이 나타나지 않았으며, 열수 추출물보다 에탄올 추출물이 *B. cereus*를 비롯한 4 균주에 대해 강한 항균 활성을 나타내었다. 밤나무 잎(34), 신갈나무 잎(35), 자소 잎(36) 및 삼백초 잎(37)의 경우 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 식품 부패 및 병원성 미생물에 대한 항균 활성이 높았다는 보고와 31종의 식물을 에탄올과 물로 추출하여 항균 활성을 검색한 결과 대부분 에탄올 추출물의 항균성이 높아 식물의 항균성 물질 추출에는 에탄올이 더 적절하다는 보고(38)는 본 실험의 결과와 일치하였다. 하지만 이들 보고(34,35,37)에서는 *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*에 대해 강한 항균 활성을 보였다고 하여 *E. coli*에 대해서는 전혀 항균활성을 나타내지 않은 본 실험의 결과와는 다소 차이가

있었다. 또한 약용식물 추출물에 대한 항미생물 활성 검색 결과 강한 항균력을 보이는 약용식물 추출물에는 폴리페놀 함량이 높은 것으로 나타났다고 보고된 바 있고(39), 올리브 잎 분획물의 항균력은 페놀성 화합물의 함량과 상관관계가 있는 것으로 나타났다고 보고된 바 있어(40), 본 실험에서도 페놀성 물질들이 항균 활성에 크게 영향을 준 것으로 생각된다.

공시된 6 균주 중에서 항균 활성을 보인 4 균주에 대해 청미래 덩굴 잎 열수 및 에탄올 추출물의 농도에 따른 항균 활성을 알아보기 위하여 각 추출액의 고형분 함량을 0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 및 20.0%가 되도록 조제한 후 paper disc 당 30 µL씩 흡수시켜 0.375-6.0 mg/disc의 농도에서 생육저해를 측정된 결과는 Table 5와 같다. 즉, 열수 추출물과 에탄올 추출물은 6.0 mg/disc의 농도에서 4 균주에 대해 항균 활성을 나타내었으나, 농도가 낮을수록 활성이 저하되었다. *B. cereus*에 대해서는 두 추출물 모두 1.5 mg/disc 이상의 농도에서 대조구인 1% sorbic acid 용액과 유사하거나 강한 항균 활성을 보였고, *S. aureus*에 대해서는 열수 추출물은 0.75 mg/disc, 에탄올 추출물은 0.375 mg/disc의 농도에서 1% sorbic acid 용액과 유사하거나 높은 항균 활성

을 나타내었다. 또 *S. typhimurium*에 대해서는 열수 추출물과 에탄올 추출물이 각각 1.5 및 0.75 mg/disc의 농도에서 1% sorbic acid 용액과 유사하거나 높은 항균 활성을 보였고, *V. parahaemolyticus*에 대해서는 열수 추출물은 3.0 mg/disc, 에탄올 추출물은 1.5 mg/disc의 농도에서 1% sorbic acid 용액보다 높은 항균 활성을 나타내었다. 이와 같이 *B. cereus*에 대해서는 추출물의 농도가 높을수록 높은 항균 활성을 나타내었고, *S. aureus*에 대해서는 낮은 농도에서도 대조구와 유사한 항균 활성을 보였다. 또한 에탄올 추출물이 공시된 4 균주에 대해 전 농도에서 열수 추출물보다 높은 항균 활성을 나타내었다.

공시된 6 균주 중에서 항균 활성을 보인 4 균주에 대해 청미래 덩굴 잎 열수 및 에탄올 추출물의 열 안정성을 알아보기 위해 각 추출물을 65°C에서 125°C까지 15°C 간격으로 30분간 열처리한 후 paper disc 당 8.4 mg의 농도로 흡수시켜 생육저해환을 측정된 결과는 Table 6과 같다. 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 65-125°C에서 30분간 열처리 후에도 공시된 4 균주에 대해 열처리 전과 생육저해환이 유사하여 항균 활성이 그대로 유지되었다. 이와 같이 공시균주에 대한 항균 활성은 열처리 온도에 크게 영향을 받지 않았다. 강황 에탄올 추출물(41)과 용아초 에탄올 추출물(42)은 열처리 온도가 80°C에서 121°C까지 증가함에 따라 식중독 세균에 대한 항균 활성이 점차 감소하였다는 보고와 비교하면 청미래 덩굴 잎 열수 추출물과 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균 물질은 열에 매우 안정성이 높은 것으로 판단된다.

이상에서 본 바와 같이 추출물의 항균 활성과 대조구로서 식품 보존료로 널리 사용되고 있는 소르빈산의 항균 활성을 비교한 결과, 청미래 덩굴 잎의 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 항균 활성이 강하고, 열 안정성이 높으며, 식중독 유발 공시균주에 대해 대조구로 사용된 1.0% 소르빈산보다 높은 항균 활성을 나타내므로 청미래 덩굴 잎의 에탄올 추출물은 높은 항균 활성을 가진 기능성 식품 소재로서의 이용가능성이 높다고 판단된다.

요 약

우리나라 중부 이남의 산야에서 자생하는 청미래 덩굴에 대해 다양한 생리활성을 가진 기능성 식품 소재로서의 이용 가능성을 모색하기 위하여 그 잎을 열수 및 에탄올로 추출한 후 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, 항산화 활성, 아질산염 소거능 및 항균 활성 등을 검토하였다. 청미래 덩굴 잎의 열수 추출물과 에탄올 추출물에는 총 폴리페놀이 각각 5.433±0.171 mg/g 및 13.060±0.110 mg/g 함유되어 있었고, 플라보노이드는 각각 1.599±0.017 mg/g 및 3.005±0.084 mg/g 함유되어 있었다. DPPH radical 소거능은

1 mg/mL의 농도에서 열수 추출물과 에탄올 추출물이 각각 33.6% 및 92.3%였고, 농도가 증가할수록 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 소거능이 급속히 증가하여 강력한 항산화 활성을 나타내었다. 아질산염 소거능은 추출물의 농도가 0.1 mg/mL에서 2.0 mg/mL로 증가할수록 열수 추출물은 37.9%에서 61.6%, 에탄올 추출물은 38.4%에서 77.8%로 증가하였고, 같은 농도에서는 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 소거능이 더 높았다. 항균 활성은 공시된 6 균주 중에서 *Listeria monocytogenes*와 *Escherichia coli*를 제외한 4균주에 대해서 *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*의 순으로 강하게 나타났고, 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 강한 활성을 나타내었다. *B. cereus*에 대해서는 두 추출물 모두 1.5 mg/disc 이상의 농도에서 대조구인 1% sorbic acid 용액과 유사하거나 강한 항균 활성을 보였고, *S. aureus*에 대해서는 낮은 농도에서도 대조구와 유사한 항균 활성을 보였다. 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 65-125°C에서 30분간 열처리 후에도 공시된 4 균주에 대해 항균 활성이 그대로 유지되어 열 안정성이 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 동남보건대학 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*, 36, 333-338
- Branen AL (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc*, 52, 59-63
- Cho MH, Bae EK, Ha SD, Park JY (2005) Application of natural antimicrobials to food industry. *Food Science and Industry*, 38, 36-45
- Kim TJ (1993) *Alpine flowers of Korea*, Kyohaksa, Seoul, Korea, p 542
- Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee MK, Moon KY (2006) Antioxidant activity of extracts from *Smilax china* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 35, 1133-1138
- Song JH, Kwon HD, Lee WK, Park IH (1997) Antimicrobial activity of crude extracts from *Smilax china* root. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 12, 560-564

7. Shu XS, Gao ZH, Yang XL (2006) Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract. *J Ethnopharmacol*, 103, 327-332
8. Jin TY, Park JR, Kim JH (2004) Electron donating abilities, nitrite scavenging effects and antimicrobial activities of *Smilax china* leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 33, 621-625
9. Choi HY (2004) Antimicrobial effect of ethanol extract of *Smilax china* leaf. *Korean J Sanitation*, 19, 22-30
10. Cha BC, Lee EH (2007) Antioxidant activity of flavonoids from the leaves of *Smilax china* Linne. *Korean J Pharmacogn*, 38, 31-36
11. Folin AD, Denis W (1915) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem*, 22, 305-308
12. Kim EJ, Lee HJ, Kim HJ, Nam HS, Lee MK, Kim HY, Lee JH, Kang YS, Lee JO, Kim HY (2005) Comparison of colorimetric methods for the determination of flavonoid in propolis extract products. *Korean J Food Sci Technol*, 37, 918-921
13. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200
14. Gray JI, Dugan JLR (1975) Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci*, 40, 981-985
15. Piddock LJG (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J Appl Bacteriol*, 68, 307-318
16. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS (2005) Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J Food Sci Technol*, 37, 233-240
17. Kwon GJ, Choi DS, Wang MH (2007) Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean J Food Sci Technol*, 39, 569-574
18. Jang SH, Yu EA, Han KS, Shin SC, Kim HK, Lee SG (2008) Changes in total polyphenol contents and DPPH radical scavenging activity of *Agrimonia pilosa* according to harvest time and various part. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 16, 397-401
19. Song J, Chung MN, Kim JT, Chi HY, Son JR (2005) Quality characteristics and antioxidative activities in various cultivars of sweet potato. *Korean J Crop Sci*, 50, 141-146
20. Kim HJ, Lee JW, Kim YD (2011) Antimicrobial activity and antioxidant effect of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma zedoaria*. *Korean J Food Preserv*, 18, 219-225
21. Lee KS, Kim MG, Lee KY (2006) Antioxidant activity of ethanol extract from Lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 35, 182-186
22. Lee YM, Shin HD, Lee JJ, Lee MY (2007) Antioxidative effect of *Chaenomeles fructus* ethanol extract. *Korean J Food Preserv*, 14, 177-182
23. Seo JK, Kang MJ, Shin JH, Lee SJ, Jeong HK, Sung NJ, Chung YC (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts from different parts of Hagocho (*Prunella vulgaris*). *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 1425-1432
24. Park SJ, Shin EH, Kim CA (2011) Component analysis and antioxidant activity of *Plantago asiatica* L. *Korean J Food Preserv*, 18, 212-218
25. Cho HE, Choi YJ, Cho EK (2010) Antioxidant and nitrite scavenging activity and α -glucosidase inhibitory effect of water extract from *Schizandra chinensis* Baillon. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 481-486
26. Choi NY, Lee JH, Shin HS (2008) Antioxidant activity and nitrite scavenging ability of olive leaf (*Olea europaea* L.) fractions. *Korean J Food Sci Technol*, 40, 257-264
27. Kim SJ, Youn KS, Park HS (2005) Antioxidative effect of pine, oak, and lily pollen extracts. *Korean J Food Sci Technol*, 37, 833-837
28. Park CS (2005) Antioxidative and nitrite scavenging abilities of medicinal plant extracts. *Korean J Food Preserv*, 12, 631-636
29. Park CS, Kwon CJ, Choi MA, Park GS, Choi KH (2002) Antioxidative and nitrite scavenging activities of *Coddyceps militaris* extracts. *Korean J Food Preserv*, 9, 109-113
30. Park CS, Kwon CJ, Choi MA, Park GS, Choi KH (2002) Antioxidative and nitrite scavenging activities of mugwort and needle extracts. *Korean J Food Preserv*, 9, 248-252
31. Mirvish SS, Wallcave L, Eagen M, Shubik P (1972) Ascorbate-nitrite reaction; Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*, 177, 65
32. Takashi Y, Yamamoto M, Tamura A (1978) Studies on the formation of nitrosamines; The effects of some polyphenols on nitrosation of diethylamine. *J Food Hyg Soc*, 19, 224
33. Shenoy NR, Choughuley ASU (1989) Effect of certain phenolics on nitrosamine formation. *J Agric Food Chem*, 37, 721
34. Kim YD, Cho DB, Kim KJ, Kim KM, Hur CK, Cho IK (2005) Antimicrobial activity of the solvent extracts

- from of chestnut. Korean J Food Preserv, 12, 257-262
35. Kong YJ, Park BK, Oh DH (2001) Antimicrobial activity of *Quercus mongolica* leaf ethanol extract and organic acids against food-borne microorganisms. Korean J Food Sci Technol, 33, 178-183
36. Lee KS, Lee JC, Han KH, Oh MJ (1999) Antimicrobial activities of extracts of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo on spoilage or foodborne disease microorganisms. Korean J Postharvest Sci Technol, 6, 239-244
37. Koh MS (2004) Antimicrobial activity of *Saururus chinensis* Bail extract. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 1098-1105
38. Lee BW, Shin DH (1991) Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. Korean J Food Sci Technol, 23, 200-204
39. Moon JS, Kim SJ, Park YM, Hwang IS, Kim EH, Park JW, Park IB, Kim SW, Kang SG, Park YK, Jung ST (2004) Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and the content of phenolic compounds. Korean J Food Preserv, 11, 207-213
40. Lee OH, Lee HB, Son JY (2004) Antimicrobial activities and nitrite scavenging ability of olive leaf fractions. Korean J Soc Food Cookery Sci, 20, 204-210
41. Park KN, Jeong EJ, Lee SH (2007) Antimicrobial activity of tumeric (*Curcuma aromatica* Salab.) extracts against various pathogens and spoilage bacteria isolated from tofu. Korean J Food Preserv, 14, 207-212
42. Park NY, Park KN, Lee SH (2004) Antimicrobial activities and food preservative effects of *Agrimoniae herba*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 244-248

(접수 2011년 4월 18일 수정 2011년 9월 28일 채택 2011년 10월 7일)