

추출 용매에 따른 산딸기 추출물의 항산화 및 항균 활성

†이 미 희 · 이 정 은
대구과학대학교 식품영양조리과

Antioxidant and Antimicrobial Properties of Various Solvent Extracts from *Robus idaeus*

†Mi-Hee Lee and Jeong-Eun Lee

Dept. of Food and Nutrition and Cook, Taegu Science University, Daegu 41453, Korea

Abstract

The objective of the present study was to determine the total phenol and flavonoid contents and to evaluate the antioxidant potential, of different solvent extracts (ethyl acetate, n-butanol, chloroform, and water) from *Robus idaeus* in various radical scavenging models (DPPH activity, superoxide dismutase (SOD) activity, reducing power, and nitrite scavenging activity), along with their antimicrobial potential. Measurement of total phenol and flavonoid content of the ethyl acetate extract of *R. idaeus* was found to be significantly higher than those of the other extracts. The ethyl acetate extract (at a concentration of 1,000 µg/mL) showed significantly higher reducing power and DPPH radical scavenging activity as compared to the other extracts. Results were dose-dependent. Moreover, the ethyl acetate extract of *R. idaeus* (1,000 µg/mL) showed potent antioxidant efficacy (85.5±1.18%) as evidenced by nitrite scavenging ability at pH 1.2. All solvent extracts of *R. idaeus* showed lower SOD-like activity (13.72~20.54%). In addition, the antimicrobial activity of all solvent extracts except water extract showed strong inhibition (inhibitory zones in mm) of *Staphylococcus aureus* (19.40±1.00 mm) and *Bacillus cereus* (20.50±0.21 mm) growth. In particular, ethyl acetate extracts (100 mg/mL) showed antimicrobial activity comparable to that of tetracycline (0.01 mg/mL), which was used as a positive control. The results of this study indicate that the ethyl acetate extract of *R. idaeus* is a natural antioxidant and antimicrobial, with enriched phenols and flavonoids concentration, that has potential in the development of health-enhancing food products.

Key words: *Robus idaeus*, total polyphenol content, total flavonoid content, antioxidant activities, antimicrobial potential

서 론

최근 생활수준의 향상과 서구화된 간편한 식생활로 인해 사람들의 평균 수명이 늘어나고 있는 반면, 다양한 환경오염 물질과 환경 호르몬, 흡연, 알코올 및 불규칙한 식습관 등으로 생체 내 산화적 스트레스가 증가되면서 비만, 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심혈관 질환과 같은 각종 성인병의 발생률이 급격히 증가하고 있어, 오늘날 사회적 문제로 대두되고 있다. 식품은 전통적으로 신체대사를 위한 기본적인 열량이나 영양을 공급하는 1차적 기능과 맛, 향 등 감각이나 기호를 만족

시키는 2차적 기능을 가진 것으로 알려져 왔으나, 식품에는 건강에 좋은 생리활성성분, 즉 식품의 3차적 기능인 ‘기능성’ 성분이 있다는 사실이 과학적으로 입증됨에 따라 ‘기능성 식품’에 대한 관심도 빠르게 증대되고 있다.

일본은 기능성 식품을 21세기의 식품 산업계를 주도할 품목으로 예시하고 있으며, 미국도 새로운 산업으로 designer foods(생체 기능을 조절할 수 있는 식품)의 가능성을 인식하고 있다. 국내에서도 생활수준 향상과 건강을 중시하는 식생활에 대한 관심이 높아졌으며, 질병 치료의 개념이 아닌 예방의 개념으로써 식품 소재 연구 및 이를 이용한 기능성 제품

† Corresponding author: Mi-Hee Lee, Dept. of Food and Nutrition and Cook, Taegu Science University, Daegu 41453, Korea.
Tel: +82-53-320-1093, Fax: +82-53-320-1765, E-mail: coveymi@tsu.ac.kr

개발에 대한 연구가 증가하고 있다. 이런 관심은 기능성을 가진 식품소재의 이용과 매년 10% 이상의 꾸준한 성장세를 나타내고 있는 건강기능성식품의 판매량에서도 쉽게 찾아볼 수 있다(Jang 등 2003).

산딸기(*Robus idaeus*)는 장미과에 속하는 관목의 열매로, 한국, 일본, 중국을 중심으로 세계적으로 400여 종의 속이 존재한다. 산딸기는 아산이나 산악지역에 자생하며(Han 등 2010), 6~7월에 성숙하여 수확하는 것과 9~10월에 수확하는 것이 있다(Ancos 등 2000; Zhang 등 2010). 산딸기는 주로 생과로 섭취되지만, 잼, 음료, 효소액 등의 가공 식품으로 개발되는 등 서구에서는 가장 널리 이용되고 있는 berry 과실의 일종이다(Lee 등 2014).

산딸기는 본초강목의 자료에 의하면, 신장에 좋으며 간을 보하고, 양기를 일으킨다고 소개되어 있으며, 피부를 곱게 하고, 머리를 검게 하며, 폐질환에도 잘 듣는다고 기록되어 있다. 최근에는 산딸기 100 g 당 칼륨 130 mg을 함유, 칼륨이 풍부하게 들어있어 체내 노폐물 처리, 에너지 대사 및 뇌기능 활성화에 도움을 주며, 또한, 산딸기(100 g)에 많이 함유되어 있는 비타민 C(28 mg)는 피부미용 및 피로회복에 좋다는 연구결과가 발표되기도 하였다. 산딸기는 callistepin, astragal, isoquercitrin 등과 같은 다양한 종류의 phytochemical 물질을 다량 함유하고 있으며(Han 등 2010), Nam 등(2007)과 Choi 등(2008)은 산딸기 추출물에서 획득한 triterpenoid 성분이 동물 실험에서 고혈당과 고지혈증 억제 효능이 있음을 발표하였다. 이러한 다양한 활성이 밝혀짐에도 불구하고, 다양하게 이용되지 못하고 있는 것은 연한 육질을 가진 산딸기의 특성으로 인한 낮은 저장성 때문이라고 할 수 있다. 이를 해결하기 위하여 여러 가지의 개선책이 제안되고 있으나, 껍질만 한 결과는 나타내지 못하고 있다(Han 등 2010). 산딸기의 소비를 증진시키기 위해서는 가공식품 형태 및 발효 식품의 형태로 개발하거나, 유용 성분을 추출하여 기능성 식품 소재로 사용하는 것이 유리할 것으로 판단된다. 따라서, 본 연구에서는 산딸기의 용매별 추출물을 이용하여 항산화 및 항균 활성을 조사하여 기능성 식품 소재 및 첨가제로서의 이용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 일반 성분 분석

본 연구에 사용한 산딸기는 2015년 6월 전라북도 고창에서 생산한 것을 대구 시내의 마트에서 구입하여 세척한 후 믹서기로 갈아서 실험에 이용하였다. 산딸기의 일반 성분 분석은 Korea Food and Drug Administration(KFDA)의 방법에 따라 분석하였다. 즉, 수분과 회분 함량은 105°C 상압가열건조

법과 550°C 회화법을 이용하였고, 조단백질과 조지방은 세미마이크로킬달법을 적용한 분석기와 에테르 추출법을 적용하여 측정하였다. 탄수화물은 수분, 조단백질, 조지방, 식이섬유 및 회분의 양을 감하여 얻은 양으로서 표시하고, 일반 성분의 시험결과는 백분율로 표시하였다. 실험에 사용한 모든 시약과 용매는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

2. 산딸기 추출액 제조

생 산딸기를 1 kg을 취하여 칼로 으개어 70%(v/v) ethanol에서 3시간 동안 상온 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 1 여과지(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 후, 감압농축기(Eyela Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 60°C에서 감압한 상태로 농축하였다. 농축한 에탄올 추출물을 동결건조기(Ilshin Lab Co., Seoul, Korea)를 이용하여 동결건조하였다. 건조된 에탄올 추출물을 증류수 300 mL에 용해한 후, 극성이 다른 용매인 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol을 순차적으로 분획하여 여과한 여액을 감압·농축한 후 동결건조한 후 각 분획의 수율을 구하였으며, 모든 시료는 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 측정

산딸기 추출액의 총 폴리페놀 함량은 AOAC의 Folin-Denis(1912)의 방법을 사용하여 Folin-reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 정량하였다. 즉, 각 추출물 20 µL에 Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 혼합하여 실온에서 3분간 방치한 다음 10% Na₂CO₃ 80 µL를 혼합하고 다시 실온에서 1시간 방치한 후에 spectrometer(Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(Sigma Chemical Co.)를 표준물질로 사용하였다.

4. 총 플라보노이드 함량 측정

산딸기 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Kang 등(1996)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 추출액 200 µL에 EtOH 800 µL와 2%(w/v) AlCl₃ 1,000 µL를 첨가하고, 실온에서 60분간 반응시킨 다음 분광광도계를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin을 표준물질로 이용하여 검량선을 작성한 다음 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

5. 환원력 측정

산딸기 추출물의 환원력(reducing power)은 Oyaizu M(1986)의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 시료액 250 µL에 200 mM sodium phosphate buffer(pH 6.6) 250 µL, potassium hexacyanoferrate

(III)(10 mg/mL) 250 μ L를 각각 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 250 μ L를 첨가하였다. 이 반응액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 500 μ L에 증류수 500 μ L와 FeCl₃(1 mg/mL) 100 μ L를 가하여 혼합한 반응액의 흡광도 값을 700 nm에서 측정하였다.

6. 항산화 활성 측정

1) DPPH 라디칼 소거능 측정

산딸기 추출액의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois MS(1958)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 50 μ L에 0.15 mM DPPH 용액 150 μ L를 가한 다음, 실온에서 30분간 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출액의 DPPH 라디칼 소거능은 $(1 - (\text{시료용액 첨가군의 흡광도}/\text{시료용액 무첨가군의 흡광도})) \times 100$ 으로 표기하였으며, 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다. 또한 상대 활성 비교를 위하여 양성 대조군으로 ascorbic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 증류수에 녹여 사용하였다.

2) SOD 유사활성 측정

추출액의 SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법을 변형한 Kim 등(2001)의 방법으로 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 산화 정도를 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 각 추출물 100 μ L에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl] aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.5) 1,500 μ L와 7.2 mM pyrogallol 100 μ L를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 500 μ L를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하고, SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

3) 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능 측정은 1 mM NaNO₂ 용액 2 mL에 추출물 1 mL를 가하고, 0.1 N KCl(pH 1.2), 0.2 M citrate phosphate buffer(pH 1.2, pH 3.0, pH 6.0)로 각각 pH를 보정한 다음, 반응액의 부피를 10 mL로 정용하였다. 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1 mL씩 취하고, 2%(w/v) acetic acid 5 mL와 30%(w/v) acetic acid에 용해한 Griess 시약(1% sulfanylic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 400 μ L를 가하여 15분간 방치한 다음, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 증류수 400 μ L를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하여 잔존하는 아질산염 양을 구하고, 아질산염 소거능은 추출액을 첨가하기 전과 후의 아

질산염 백분율(%)로 표시하였다.

$$N(\%) = 1 - \frac{(A - C)}{B} \times 100$$

N : Nitrite scavenging ability

A : Absorbance of 1 mM NaNO₂ added sample after standing for 1 hr

B : Absorbance of 1 mM NaNO₂

C : Absorbance of control

7. Disc diffusion assay에 의한 항균 활성 측정

각 추출물의 항균 활성은 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였으며, 측정에 사용된 균주는 *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)로 총 4종을 사용하였고, 성장 최적 조건에서 배양시켰다. 배양된 균주를 0.85% 식염수에 희석하여 고체 배지에 도말한 후, 균주가 잘 고정되도록 배지를 실온에서 2시간 정도 건조하였다. 멸균된 8 mm paper disc를 균주를 도말한 평판 배지에 올리고 100 mg/mL로 메탄올에 용해한 시료를 40 μ L씩 점적하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균 활성을 비교하였다. 양성 대조군으로 tetracycline을 사용하였고, 0.01 mg/mL와 0.1 mg/mL의 2개의 농도로 측정하였다.

8. 통계처리

본 실험 결과는 3회 반복 측정 후 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, SPSS(Statistical Package for the Social Science) 21.0 프로그램을 이용하여 각 실험군 간의 유의성을 검증한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 수율, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

본 연구에 사용한 산딸기의 일반성분은 수분 91.5%, 조단백질 1.25%, 조지방 0.35%, 탄수화물 6.90%으로 조사되었다. 산딸기를 수세하여 갈은 후에 70% ethanol에서 추출하여 감압 농축한 후 고형분 함량을 추출 수율(%)로 계산한 결과는 Table 1과 같다. 극성이 낮은 용매인 n-hexane, chloroform, ethyl acetate 추출물에서는 각각 0%, 1.53%, 2.21%로 비교적 낮은 반면에, n-butanol과 water 추출물에서는 5.02%, 10.29%로 비극성 용매들에 비해서는 추출 수율이 높은 것으로 나타났다. 산딸기의 용매별 수율이 전반적으로 낮은 것은 원료의 수분 함량이 90% 이상이기 때문에 추출 수율이 10% 이하로 나타

난 것으로 판단되며, 이는 수분 함량이 80~90% 이상인 채소 추출물의 수율이 10% 이하로 조사되었다는 결과와도 일치하였다(Kim 등 2012).

식물체에 함유되어 있는 페놀성 화합물들은 항 돌연변이 원성, 콜레스테롤 저하작용, 정장작용, 항암 및 항산화작용 등의 다양한 항산화 생리활성 기능을 가지고 있는데, 이것은 추출용매에 따른 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성격이 있어 이러한 생리활성 기능을 나타내는 주체로 인정되고 있다고 알려져 있다(Ju 등 2009). 특히 항산화 작용과 관련하여 최근 생체 내에서의 산소 free radical 반응이 생체조직의 노화나 질병과 관련이 있으며, 페놀성 물질의 hydroxyl group은 유지의 유리기 수용체로서 유지 산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정된 화합물을 형성하도록 하여 산화억제 작용을 한다. 즉, 페놀 함량이 높게 나타남은 산화 억제 작용이 높음을 의미한다(Choi 등 2006; Lee 등 2005).

용매별 분획의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과(Table 1), ethyl acetate, n-butanol, chloroform, water 추출물 순으로 나타났으며, 이중 ethyl acetate 추출물은 76.32 mg/g으로 다른 용매 추출물에 비하여 유의적으로 높았다. 이러한 결과는 Kim 등(1996)이 신의대의 분획 추출물에 관한 실험에서 chloroform과 ethyl acetate 분획에 페놀과 유기산 및 지방산 일부와 이외에도 많은 성분들이 함유되어 있어 항산화 활성이 높다고 한 내용과도 유사하였다. 또한 Kim 등(2007)은 애기달맞이꽃의 용매별 분획의 총 폴리페놀 함량이 ethyl acetate 분획, n-butanol 분획, water 분획, n-hexane 분획 순이었다고 보고하였으며, 본 실험 결과와 유사한 경향이였다.

총 플라보노이드 함량은 ethyl acetate>n-butanol>chloroform>

Table 1. Yield, total polyphenol and total flavonoid contents of solvent extract from *Rubus idaeus*

	Yield (%, w/w of 100 g dry sample)	Total polyphenol (mg/g) ¹⁾	Total flavonoid (mg/g) ²⁾
n-Hexane	-	-	-
Chloroform	1.53±0.05 ^{c3)}	24.40±0.38 ^b	14.59±0.30 ^b
Ethyl acetate	2.21±0.12 ^c	76.32±2.53 ^a	34.43±0.21 ^a
n-Butanol	5.02±0.14 ^b	52.32±0.09 ^c	26.04±0.89 ^c
Water	11.29±0.21 ^a	11.17±0.39 ^c	10.62±1.60 ^d

The values represent mean±S.D. of triplicate independent experiments.

1) Values were mean±S.D. analyzed using gallic acid as a standard.

2) Values were mean±S.D. analyzed using quercetin as a standard.

3) Values with different superscripts in a column are significantly different at $p<0.05$ by ANOVA with Duncan's multiple range test (n=3).

water 순으로 각각 34.43, 26.04, 14.59 및 10.62 mg/g의 함량을 나타내어 ethyl acetate 추출물에서 가장 높았으며, 총 폴리페놀 함량의 결과와도 일치하였다. Jeon 등(2012)은 참취 추출물과 용매 분획물의 총 플라보노이드를 측정한 결과, ethyl acetate 분획물에서 가장 높았고, water 분획물에서 가장 낮았다고 보고하였는데, ethyl acetate 추출물이 총 플라보노이드 함량이 높게 나타난 본 연구와 일치한 결과를 나타내었다.

2. 환원력 측정

환원력은 reductones가 제공하는 수소원자가 free radical 사슬을 분해함으로써 시작되고, 따라서 환원력은 첨가되는 시료의 농도 변화에 따라 큰 변화를 나타내고, 흡광도의 값 자체가 시료의 환원력을 나타낸다(Gordon MF 1990). 용매별로 산딸기 추출물을 첨가하여 금속이온의 환원력을 측정한 결과(Fig. 1), 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 가장 높았던 ethyl acetate 추출물의 활성이 가장 우수하였으며, 농도가 10 µg/mL에서 최대 O.D 값(700 nm) 0.24, 100 µg/mL에서 최대 O.D 값(700 nm) 0.82 및 1,000 µg/mL에서는 최대 O.D 값(700 nm) 1.54의 활성을 나타내어 시료의 농도가 증가할수록 환원력이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 ethyl acetate 추출물을 제외한 다른 추출물들은 낮은 환원력을 나타내었다. Hwang 등(2011)은 미나리 추출물의 환원력을 측정한 결과, ethyl acetate와 n-butanol 용매 추출물이 다른 용매(n-hexane, chloroform, water) 추출물에 비하여 높은 흡광도를 나타내었다고 보고하였는데, 본 연구결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

3. DPPH 라디칼 소거능 측정

Free radical은 생물학적 손상의 주요 요인으로 잘 알려져

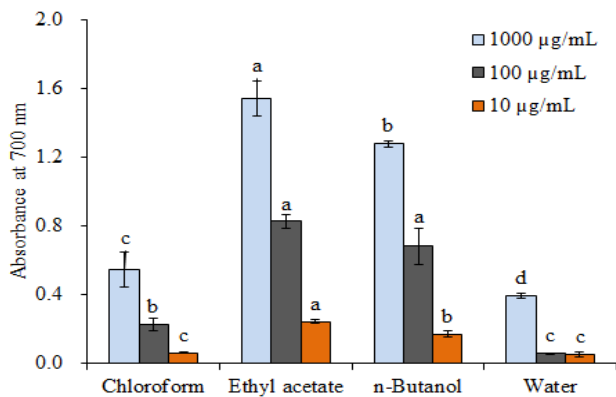


Fig. 1. Reducing power of solvent extract from *Rubus idaeus*. The values represent mean±S.D. of triplicate independent experiments. Values with different superscripts in a column on the same concentrations are significantly different at $p<0.05$ by ANOVA with Duncan's multiple range test.

있는데, DPPH는 517 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 매우 안정한 free radical로 free radical 소거 활성을 측정하는데 사용되는 보라색 화합물이다. DPPH radical은 항산화 활성을 가지는 물질과 만나면 전자를 주어 radical이 소거되고, 흡광도 값은 감소되는 원리를 이용하여 radical 소거 활성을 측정할 수 있다(Kang 등 2009).

Fig. 2는 산딸기 용매 추출물의 DPPH 라디칼 소거 작용을 측정한 결과이다. 동일한 시료 농도 1,000 µg/mL에서 ethyl acetate 추출물 77.9%, chloroform 추출물 43.2%, n-butanol 추출물 25.63%, water 추출물 19.3%의 순으로 나타나 ethyl acetate 추출물의 활성이 가장 우수함을 확인하였다. Kang 등(1996)은 전자 공여능이 phenolic acid와 flavonoid 및 기타 페놀성 물질에 대한 항산화 작용의 지표로서, 이 물질들은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였다. 또한, Kim 등(2012)은 야채 추출물에서 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높은 시료일수록 DPPH 라디칼 소거 활성이 높았다고 발표하였다. 본 연구에서도 산딸기 추출물 중에서 ethyl acetate 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 높았는데, 이 추출물에서는 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높은 것으로 나타났으므로 상관관계가 있음을 확인하였다. Lee 등(2014)은 국내 여러 지역의 농가에서 재배 중인 산딸기와 자생 중인 산딸기를 수집해 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능을 조사한 결과, 총 폴리페놀의 함량이 높은 시료일수록 항산화능이 높은 것으로 나타나, 본 연구 결과와 일치하는 결과를 나

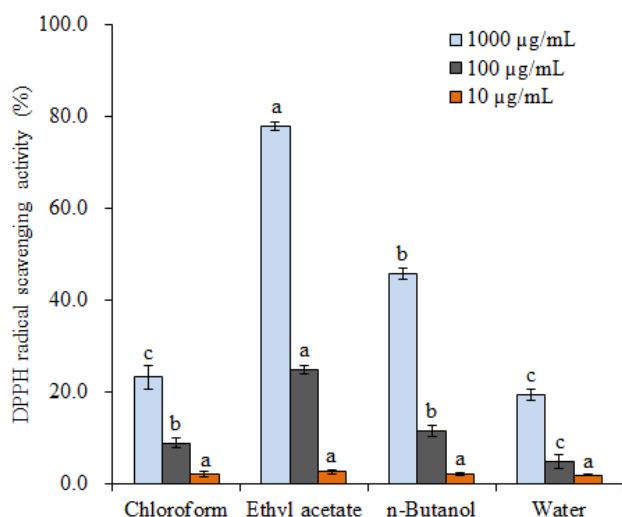


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of solvent extract from *Rubus idaeus*. The values represent mean±S.D. of triplicate independent experiments. Values with different superscripts in a column on the same concentrations are significantly different at $p < 0.05$ by ANOVA with Duncan's multiple range test.

타내었다.

4. SOD 유사 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD)는 생체 내에서 superoxide radical을 과산화수소로 환원시켜주는 천연 항산화효소로 인체 내에서 산화방지와 노화억제와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 산딸기 추출물의 SOD 활성을 측정한 결과(Fig. 3), 1,000 µg/mL의 동일한 농도에서 17.53, 20.54, 18.63, 13.72%의 활성을 나타내었으나, 양성대조구로 사용한 L-ascorbic acid의 85.63%보다는 매우 낮은 값을 보였다. 이는 치자, 마늘, 녹차, 오미자 등의 식물체 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과, 녹차 추출물을 제외한 나머지에서 8~40% 정도의 낮은 활성을 보인 결과와 비교해볼 때, 산딸기 용매별 추출물의 SOD 유사 활성능은 다른 과실류에 비해서 낮음을 확인하였다(Jeong 등 2008; Kim 등 2001).

5. 아질산염 소거능 측정

아질산염은 우리가 흔히 섭취하는 생선이나 육류 등에 발색, 풍미증진, 항균작용 및 산패 방지를 위해 첨가제로 많이 이용되고 있지만, 이러한 아질산염을 섭취했을 경우 동물이나 인체의 위 내에서 아민류와 반응하여 발암성 물질로 알려진 nitrosamine을 생성하게 된다. 또한 이들 일부는 체내에서 diazoalkane으로 전환되어 핵산이나 단백질 등의 세포내 성분들을 alkyl화함으로써 암을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 nitrosamine의 생성 억제 기전과 관련하여 phenol계 유도체들이 nitroso 화합물의 생성을 억제한다는 보고들이 있다(Lim 등 2007). 산딸기 추출물의 아질산염 소거능을 측정한

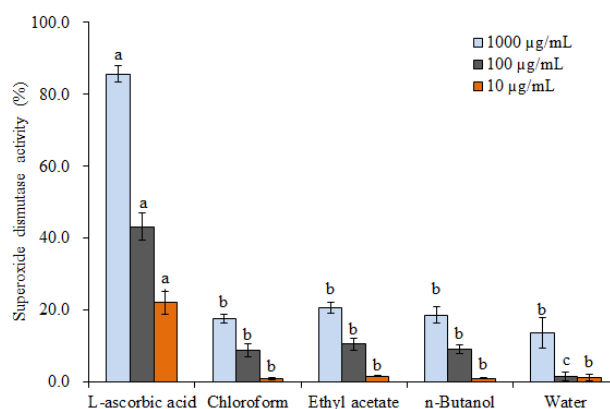


Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD) activity of solvent extract from *Rubus idaeus*. The values represent mean±S.D. of triplicate independent experiments. Values with different superscripts in a column on the same concentrations are significantly different at $p < 0.05$ by ANOVA with Duncan's multiple range test.

결과(Table 2), pH가 증가함에 따라 아질산염 소거능이 감소하는 경향을 나타냈다. 즉, 인체내 위내의 pH와 유사한 pH 1.2와 pH 3.0에서 아질산염 소거능이 pH 6.0과 비교하여 높았다. 또한, 추출 용매별로 차이를 보였으며, ethyl acetate 추출물이 아질산염 소거능이 가장 높았으며, n-butanol, chloroform, 그리고 water 추출물 순으로 나타났다. 이러한 결과는 조릿대 잎(Park & Lim 2009)과 머루 과피(Choi 등 2006)의 분획에서 ethyl acetate, n-butanol, water 순으로 아질산염 소거작용이 높게 나타난 결과와 유사하였다. 또한, 겨우살이 추출물(Ju 등 2009),

야채 추출물(Kim 등 1987a), 해조류 추출물(Kim 등 1987b)의 아질산염 소거작용에서 pH 의존성이 매우 커 pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 크다는 보고와 일치되는 경향을 보였다.

6. 항균 활성 측정

산딸기 추출물을 이용하여 식중독균에 대한 항균 활성을 분석한 결과, Table 3에서 보는 것과 같이 *S. aureus*, *B. cereus*와 *E. coli* O157:H7균에서는 항균 활성이 나타났으나, *L. monocytogenes*에서는 항균 활성이 없는 것으로 나타났다. 특히, *B.*

Table 2. Nitrite scavenging abilities of solvent extract from *Robus idaeus*

Solvent	Nitrite scavenging ability (%)			
	10 µg/mL	100 µg/mL	1,000 µg/mL	
pH 1.2	L-Ascorbic acid	30.24±0.98 ^{a1)}	60.73±1.52 ^a	86.71±3.18 ^{aa}
	Chloroform	11.23±1.18 ^c	26.33±2.89 ^c	65.52±2.58 ^c
	Ethyl acetate	25.48±2.01 ^b	52.78±1.42 ^b	85.50±1.18 ^{aa}
	n-Butanol	23.01±4.91 ^b	47.84±3.46 ^b	74.18±2.88 ^b
	Water	10.43±2.51 ^c	20.28±3.18 ^c	35.42±2.65 ^d
pH 3.0	L-Ascorbic acid	20.24±1.64 ^a	40.43±1.57 ^a	76.91±1.18 ^a
	Chloroform	10.54±0.09 ^c	30.44±2.80 ^b	54.97±2.50 ^c
	Ethyl acetate	20.09±1.97 ^a	42.11±1.41 ^a	72.96±2.17 ^a
	n-Butanol	15.21±0.01 ^b	35.73±3.44 ^b	64.95±2.86 ^b
	Water	1.25±0.04 ^d	8.84±3.15 ^c	15.26±2.62 ^d
pH 6.0	L-Ascorbic acid	25.34±0.58 ^a	41.13±2.52 ^a	52.11±1.14 ^a
	Chloroform	4.76±1.37 ^b	22.61±8.57 ^b	34.37±2.79 ^b
	Ethyl acetate	15.07±1.74 ^b	39.04±1.44 ^a	55.08±1.31 ^a
	n-Butanol	2.30±1.26 ^d	10.59±3.52 ^c	17.64±3.20 ^c
	Water	0.73±0.18 ^c	2.72±0.46 ^d	11.00±0.14 ^d

The values represent mean±S.D. of triplicate independent experiments.

¹⁾ Values with different superscripts in a column are significantly different at $p<0.05$ by ANOVA with Duncan's multiple range test ($n=3$).

Table 3. Antimicrobial activities of solvent extract from *Robus idaeus*

	Diameter of inhibition zone (mm) ¹⁾			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
Tetracycline(0.1 mg/mL)	31.50±2.12 ^{a3)}	23.00±0.43 ^a	23.50±0.62 ^a	17.50±0.77 ^a
Tetracycline(0.01 mg/mL)	20.50±0.71 ^b	16.70±0.22 ^b	10.50±0.71 ^b	- ²⁾
Chloroform	5.00±0.71 ^d	11.00±1.41 ^c	-	-
Ethyl acetate	19.40±1.00 ^b	20.50±0.21 ^b	-	12.00±0.25 ^b
n-Butanol	10.00±0.52 ^c	12.50±0.76 ^c	-	-
Water	-	10.50±0.82 ^c	-	-

The values represent mean±S.D. of triplicate independent experiments.

¹⁾ Paper disc (8 mm) was included.

²⁾ No inhibition.

³⁾ Values with different superscripts in a column are significantly different at $p<0.05$ by ANOVA with Duncan's multiple range test ($n=3$).

*cereus*에 대해서 모든 추출물에서 효과가 나타났고, ethyl acetate 추출물은 양성대조군으로 사용한 tetracycline과 유사한 항균력이 있음을 확인하였다. *S. aureus*에 있어서는 water 추출물은 inhibition zone이 전혀 나타나지 않아 항균 활성이 없었으나, ethyl acetate, n-butanol, chloroform 추출물에서는 19.40 mm, 10.00 mm, 5.00 mm로 항균력을 확인하였다. *E. coli*을 대상으로 한 실험에서는 chloroform, n-butanol, water 추출물에서는 항균 효능이 없었으며, ethyl acetate 추출물만이 inhibition zone이 생성되었다. Yu 등(2011)은 *S. aureus*와 *E. coli*의 두 가지 균에 대하여 로즈마리의 methanol 추출물과 용매별 분획물의 항균 효과를 조사한 결과, *E. coli* 균에 있어서는 n-butanol과 water 분획물은 항균력이 나타나지 않은 반면에 chloroform, ethyl acetate 분획물들에서는 10 mm/disc 이상의 항균력이 나타난다고 보고하였다. 이때 대조군으로 사용한 100% methanol과 50% methanol은 네 가지 균에 대한 항균 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다(data not shown). 또한, ethyl acetate 추출물은 *L. monocytogenes*를 제외한 나머지 3개의 균주에서 가장 우수한 항균력을 나타내었으므로 산딸기를 항균용 소재로 이용할 경우, ethyl acetate 추출물을 제조하는 것이 가장 적합할 것으로 판단된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 산딸기의 용매별 추출물에 함유된 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 정량하고, DPPH 라디칼 소거능, SOD 유사활성, 환원력 및 아질산염 소거능과 같은 항산화 활성과 식중독균에 대한 항균 활성을 측정하였다. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 ethyl acetate 추출물이 다른 추출물에 비하여 전체적으로 높았으며, 환원력은 ethyl acetate 추출물에서 1,000 µg/mL일 때 1.54의 활성을 나타내어 가장 우수하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 추출물의 농도가 높아질수록 억제효과가 증가하였으며, ethyl acetate 추출물에서 가장 높았고, 그 다음으로는 n-butanol, chloroform 순으로 나타났다. 그러나, SOD 유사활성은 모든 용매 추출물에서 13.72~20.54% 범위의 낮은 활성을 나타내었다. 아질산염에 대한 소거능을 측정한 결과, 앞의 결과와 마찬가지로 ethyl acetate 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, pH 1.2의 조건에서는 1,000 µg/mL의 농도에서 85.5%로 가장 뛰어난 소거능을 보였다. 또한, 4가지 대표적인 식중독 유발균을 대상으로 항균 활성을 측정한 결과, 물 추출물을 제외한 모든 추출물에서 *Staphylococcus aureus*(19.40±1.00 mm)와 *Bacillus cereus*(20.50±0.21 mm) 균주에 대하여 강한 항균 활성을 나타내었고, 특히, ethyl acetate 추출물은 양성대조군으로 사용한 tetracycline과 유사한 항균 활성을 나타내었다. 따라서, 본 연구 결과, 산딸기

용매별 추출물 중에서 ethyl acetate 추출물은 항산화 활성 및 우수한 항균 활성을 가지고 있으므로 항산화제 및 기능성 식품 개발의 소재로서 충분히 이용 가치가 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 대구과학대학교 교내 연구과제의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

- Ancos B, González EM, Cano MP. 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry. *J Agric Food Chem* 48:4565-4570
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1198-1200
- Choi JW, Yoo YM, Kim MY, Nam JH, Nugroho A, Park HJ. 2008. Anti-hyperlipidemic and anti-hyperlipidemic effects of the triterpenoid-rich fractions from *Rubus coreanus* and *Rubus crataegifolius* and their main component, niga-ichigoside F1, in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Natural Product Sciences* 14:260-264
- Choi SY, Cho HS, Sung NJ. 2006. The antioxidative and nitrite scavenging ability of solvent extracts from wild grape (*Vitis coignetia*) skin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35:961-966
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12:239-249.
- Gordon MF. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In B. J. F. Hudson, Food Antioxidants. London: Elsevier Applied Science p 1-18
- Han WC, Ji SH, Surh J, Kim MH, Lee JC, Kim SH, Jang KH. 2010. Effect of supplementation of *Rubus crataegifolius* on fermentation characteristics of *Rosa rugosa* wine. *J East Asian Dietary Life* 20:321-327
- Hwang CR, Hwang IG, Kim HY, Kang TS, Kim YB, Joo SS, Lee JS, Jeong HS. 2011. Antioxidant compound and activity of dropwort (*Oenanthe javanica*) ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:316-320
- Jang KW, Park SH, Ha SD. 2003. Market trends in functional foods. *Food Sci Industry* 36:17-25
- Jeon SM, Lee JY, Kim HW, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, Kim HR, Park DS. 2012. Antioxidant activity of extracts and fractions from *Aster scaber*. *J Korean Soc Food Sci*

- Nutr* 41:1197-1204
- Jeong HJ, Kim SA, Kwon JH, Kim HK. 2008. Physiological activities of *Gardeniae fructus* extracts by microwave-assisted extraction as affected by solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:282-287
- Ju MJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK. 2009. Physiological activities of mistletoe extracts from *Viscum album* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:529-534
- Kang DY, Shin MO, Shon JH, Bae SJ. 2009. The antioxidative and antimicrobial effects of *Celastrus orbiculatus*. *J Life Sci* 19:52-57
- Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds (in Korean). *Korean Food Sci Technol* 28:232-239
- Kim DS, Ahn BW, Yeum DM, Lee DH, Kim SB, Park YH. 1987a. Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. 1. Nitrite scavenging effect of vegetable extracts. *Bull Korean Fish Soc* 20:463-468
- Kim DS, Ahn BW, Yeum DM, Lee DH, Park YH, Kim DS. 1987b. Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. 2. Nitrite scavenging effect of seaweed extracts. *Bull Korean Fish Soc* 20:469-473
- Kim JY, Lee JA, Park SY. 2007. Antibacterial activities of *Oenothera laciniata* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:255-261
- Kim KH, Kim HJ, Byun MW, Yook HS. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from six vegetables containing different sulfur compounds. *Korean Soc Food Sci Nutr* 41:577-583
- Kim MJ, Byun MW, Jang MS. 1996. Physiological and antibacterial activity of bamboo (*Sasa coreana* Nakai) leaves. *J Korean Soc Food Nutr* 25:135-142
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33:626-632
- Lee HH, Moon YS, Yun HK, Park PJ, Kwak EJ. 2014. Contents of bioactive constituents and antioxidant activities of cultivated and wild raspberries. *Kor J Hort Sci Technol* 32:115-122
- 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
- Lim JA, Yun BW, Baek SH. 2007. Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of methanol extract from *Salvia plebeia* R. Br. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15:183-188
- Nam JH, Jung HJ, Taponjhou LA, Lee KT, Choi JW, Kim WB, Park HJ. 2007. The anti-hyperlipidemic effect and constituents of the 19 α -hydroxyursane-type triterpenoid fraction obtained from the leaves of *Rubus crataegifolius*. *Natural Product Sciences* 13:152-159
- Oyaizu M. 1986. Studies of products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr* 44:307-315
- Park YO, Lim HS, 2009. Antioxidant activities of bamboo (*Sasa borealis*) leaf extract according to extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:1640-1648
- Yu MH, Chae IG, Jung YT, Kim HI, Lee IS. 2011. Antioxidative and antimicrobial activities of methanol extract from *Rosmarinus officinalis* L. and their fractions. *J Life Sci* 21:375-384
- Zhang L, Li J, Hogan S, Chung H, Welbaum GE, Zhou K. 2010. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chem* 119:592-599

Received 24 July, 2015

Revised 22 September, 2015

Accepted 23 September, 2015