



# Antioxidant and anticariogenic activities of enzymatic hydrolysate from spent coffee grounds

Man-Jin In · Yu Min Jang · Min Young Jo · Hee Jeong Kim · Dong Chung Kim

## 커피박 효소분해물의 항산화 및 항충치균 활성

인만진 · 장유민 · 조민영 · 김희정 · 김동청

Received: 25 October 2023 / Accepted: 15 November 2023 / Published Online: 17 November 2023  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

**Abstract** After treating spent coffee grounds with alkali, extracts were prepared by using Viscozyme and Alcalase, respectively. Treatment of spent coffee grounds with alkali and enzymes increased the content of phenolic compounds in the extracts, thus possessing the good scavenging activities on free and cation radicals. In particular, the extract obtained by continuous treatment with alkali and Alcalase on spent coffee grounds had the best content of phenolic compounds and antioxidant activity, and inhibited the growth of *Streptococcus mutans* in proportion to the concentration. In conclusion, the Alcalase-enzymatic hydrolysate of alkali-treated spent coffee grounds showed excellent antioxidant and anticariogenic effects.

**Keywords** Alcalase-enzymatic hydrolysate · Alkali treatment · Anticariogenic effect · Antioxidant activity · Spent coffee grounds

## 서 론

2021년 세계 커피 소비량이 거의 천만 톤에 이를 정도로 커피

Dong Chung Kim (✉)  
E-mail: kimdc@chungwoon.ac.kr

Department of Chemical and Biological Engineering, Chungwoon University, Incheon 22100, Republic of Korea

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 any medium, provided the original work is properly cited.

는 전 세계에서 가장 많이 소비되는 기호성 음료이다[1]. 상업용 커피로는 주로 아라비카(*Coffea arabica* L.)와 로부스타(*Coffea canephora* L.) 품종이 사용되고, 볶는 과정(roasting)을 거치면서 커피 특유의 색, 맛과 향을 가지게 된다[2]. 커피의 생리활성 성분으로는 각성 작용을 갖는 카페인 대표적이고, chlorogenic acid, ferulic acid 및 caffeic acid 등의 다양한 페놀성 화합물을 다량 함유하고 있다[3,4]. 커피 추출물의 생리활성 물질은 항산화, 항균 및 항고혈압 효과[5-8] 뿐만 아니라 항염증 및 항우울증 효과[4,9]를 나타내어 커피는 건강에 도움이 되는 음료로 각광받고 있다.

커피를 마시기 위해서는 볶는 과정을 거쳐 분쇄한 후에 뜨거운 물로 추출해야 한다. 세계적으로 커피 원두 중량의 약 30%가 마시는 커피로 추출되어 음용되며, 나머지는 커피 찌꺼기(커피박, spent coffee grounds)로 남아 폐기물로 버려진다. 따라서 환경 보존과 자원 재활용의 측면에서 커피박의 처리방안에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다[1,10]. 가장 단순하게는 커피박을 펠렛화하여 연료로 사용하고 있다[11]. 또한 커피박을 기성 음료의 제조를 위한 원료로 재활용하거나[12], 연료용 에탄올 또는 바이오디젤의 생산 원료로 이용하는 방안도 보고되었다[13]. 커피박에는 주로 불용성 성분이 남아있어 활용도가 떨어지는데 효소분해를 통해 불용성 섬유소를 포도당으로 가용화하여 에탄올 발효에 활용하는 연구도 이루어지고 있다[14]. 특히 커피박에는 뛰어난 생리활성을 나타내는 페놀성 화합물이 여전히 다량 남아있기 때문에 커피박 추출물도 항산화 활성을 가진다[15].

따라서 본 연구에서는 커피박으로부터 페놀성 화합물과 같은 생리활성 물질의 회수를 극대화하기 위해 위해 효소 분해법을 도입하였고, 커피박 효소분해물의 항산화 및 항충치균 활성을 탐색함으로써 폐자원으로 버려지는 커피박을 생리활성 소재로 활용하기 위한 방안을 제시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

커피박은 아라비카종의 Brazil santos fc cerrado 커피(GSC International, Yongin, Republic of Korea) 분말을 에스프레소 머신(Classe10USB, Rancilio, Villastanza di Parabiago, Italy)으로 추출하고 남은 잔사를 열풍건조기에서 80 °C로 4시간 건조시킨 후 시료로 사용하였다. Folin-Ciocalteu 시약, sodium carbonate, gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline)-sulfonic acid (ABTS)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 제품이었다. Alcalase와 Viscozyme은 Novozyme (Bagsvaerd, Denmark)의 제품을 사용하였다. *Streptococcus mutans* KCTC 3065 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Daejeon, Republic of Korea)에서 분양받은 것을 Brain heart infusion (BHI) agar 배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 배양하여 사용하였다.

### 커피박의 알카리 처리 및 효소 분해

커피박의 무처리군은 건조 커피박 분말 5 g을 95 g의 증류수에 침지시킨 후 100 °C에서 1시간 동안 추출하였다. 알카리 처리군은 5 g의 커피박 분말과 5 g의 NaOH를 90 g의 증류수에 넣은 후 100 °C에서 1시간 동안 추출하였다. 알카리+Viscozyme 처리군은 알카리 처리군의 pH를 5.0으로 조정후 커피박 중량 대비 2% (w/w) Viscozyme을 첨가하고 50 °C에서 120 rpm으로 2시간 반응시켰다. 알카리+Alcalase 처리군은 알카리 처리군의 pH를 8.0으로 조정후 커피박 중량 대비 2% (w/w) Alcalase를 첨가하고 50 °C에서 120 rpm으로 2시간 반응시켰다. 최종적으로 무처리군, 알카리 처리군, 알카리+Viscozyme 및 알카리+Alcalase 처리군의 pH를 각각 7.0으로 조정후 원심분리(3,000×g, 10분)하여 상등액을 얻고 0.45 mm 시린지 필터로 여과하여 실험에 사용하였다.

### 폴리페놀 함량

커피박 추출물들의 페놀성 화합물 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 Folin-Denis 방법으로 확인하였다[16]. 각 시료에 Folin-Ciocalteu 용액을 넣고 5분간 상온에서 반응시킨 후 6% sodium carbonate 용액을 첨가하였다. 상온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 유리 및 양이온 라디칼 소거활성 측정

커피박 추출물들의 ABTS 양이온라디칼 소거활성은 Re 등의 방법[17]으로, DPPH 유리라디칼 소거활성은 Blois의 방법[18]으로 확인하였다. 양이온라디칼 소거활성 확인을 위해 흡광도를 1.500±0.02로 보정한 7.5 mM ABTS 용액을 각 시료에 넣고 실온에서 90분 반응시킨 후 414 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 유리라디칼 소거활성 확인을 위해 0.2 mM DPPH 용액을 각 시료에 넣고 실온에서 30분 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

### *Streptococcus mutans*에 대한 항균 효과 측정

커피박 추출물의 무처리군, 알카리 처리군, 알카리+Viscozyme 및 알카리+Alcalase 처리군 시료는 BHI broth를 이용하여 각각

고형분 기준으로 5-20 mg/mL로 희석한 후 0.20 mm 시린지 필터로 여과하여 제균하였다. 각 희석한 시료를 24-well plate에서 *S. mutans* 배양액(1×10<sup>5</sup> CFU/mL) 및 BHI broth와 함께 혼합하고 36 °C에서 21시간 정지 배양한 다음 660 nm에서의 흡광도로 균의 생육을 측정하였다. 각 추출물의 항균 효과는 추출물을 첨가하지 않은 BHI broth에 *S. mutans*를 배양한 대조군과 비교하여 상대적인 비율로 나타내었다.

### 통계 처리

데이터는 Excel 2010 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA) 프로그램을 이용하여 평균 ± 표준편차로 나타내었고, t-test를 통해 대조군과의 통계적 유의성을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

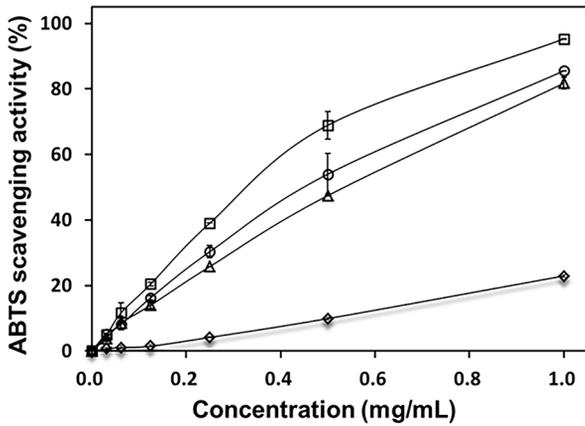
커피박을 열수로 추출하였을 때는 수율이 0.73±0.06%로 매우 낮았으나, 알카리 처리만으로도 3.63±0.12% (*p* < 0.01)로 4.97배 증가하였다(Table 1). 알카리+Viscozyme 처리군에서는 수율이 알카리 처리군과 큰 차이가 없었으나, 알카리+Alcalase 처리군에서는 수율이 3.83±0.06% (*p* < 0.01)로 더욱 높아졌다(Table 1). 커피박을 발효 배지로 활용하기 위한 기존의 연구에서도 커피박을 알카리로 처리하는 것이 산 처리에 비해 총당의 추출 수율이 3.17배 증가하는 것으로 나타나[14], NaOH 처리만으로도 추출 수율이 크게 향상된 본 연구와 유사한 결과를 보여주었다.

페놀성 화합물의 농도를 비교한 결과, 커피박을 열수 추출한 무처리군에서는 0.93±0.06 mg/mL이었고, 알카리 처리군에서는 2.24±0.11 mg/mL (*p* < 0.01)로 나타나 NaOH 처리만으로도 페놀성 화합물이 잘 추출됨을 알 수 있었다(Table 1). 알카리+Viscozyme 처리군에서는 페놀성 화합물이 2.72±0.22 mg/mL (*p* < 0.01)인 반면, 알카리+Alcalase 처리군은 3.21±0.24 mg/mL (*p* < 0.01)로 나타나 NaOH 처리에 이은 Alcalase 효소 반응이 페놀성 화합물의 추출을 크게 향상시킴을 알 수 있었다(Table 1). 기존의 연구에서도 들기름을 짜고 남은 찌꺼기인 들깨박을 Alcalase로 분해하였을 때 페놀성 화합물이 2.4배 증가하였고[19], 홍삼을 Alcalase로 처리했을 때도 페놀성 화합물이 1.8배 증가하였다[20]. 또한 인삼을 *Bacillus polymyxa* 유래의 단백질 분해효소로 처리했을 때도 페놀성 화합물이 2배 가량 증가한다는 연구[21]와도 유사한 결과를 보여주었다. 일반적으로 식물에 효소를 처리하면 조직을 파괴시켜 페놀성 화합물이 잘 추출되고[22,23],

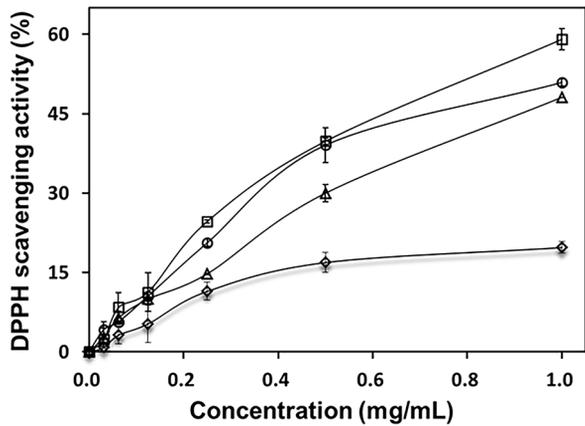
**Table 1** Yields and phenolic contents of spent coffee grounds extracts

Group	Yield (%)	Phenolic content <sup>1)</sup> (mg GAE/mL)
No treatment	0.73±0.06	0.93±0.06
Alkali	3.63±0.12**	2.24±0.11**
Alkali+Viscozyme	3.67±0.12**	2.72±0.22**
Alkali+Alcalase	3.83±0.06**	3.21±0.24**

<sup>1)</sup>Phenolic contents were expressed as gallic acid equivalents (GAE) Data represented means and SD of triplicate measurements Data were statistically different from the value of no treatment group (\*\**p* < 0.01)



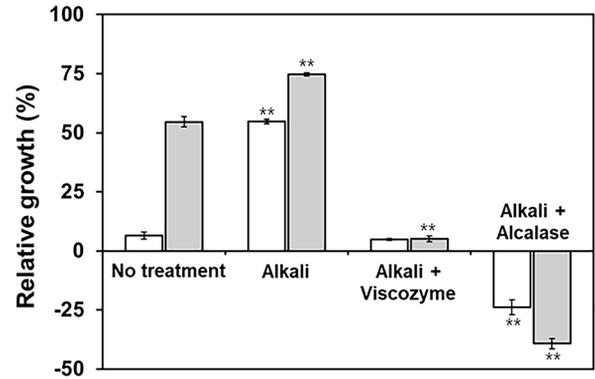
**Fig. 1** ABTS cation radical scavenging activities of spent coffee grounds extracts. Each extract was divided into no treatment (◇), alkali treatment (△), alkali+Viscozyme treatment (○), and alkali+Alcalase treatment (□) groups, respectively. Their scavenging activities against ABTS cation radicals according to the concentration of spent coffee grounds was observed. Data were means and SD of triplicate measurements



**Fig. 2** DPPH free radical scavenging activities of spent coffee grounds extracts. Each extract was divided into no treatment (◇), alkali treatment (△), alkali+Viscozyme treatment (○), and alkali+Alcalase treatment (□) groups, respectively. Their scavenging activities against DPPH free radicals according to the concentration of spent coffee grounds was observed. Data were means and SD of triplicate measurements

배당체 형태이거나 단백질에 둘러 쌓인 페놀성 화합물을 유리형으로 전환시켜 추출 수율이 증가한다고 알려져 있다[24].

무처리군, 알카리 처리군, 알카리+Viscozyme 및 알카리+Alcalase 처리군의 ABTS 양이온라디칼에 대한 소거 활성은 Figure 1에 나타내었다. 처음에 투입한 커피박 현탁액 기준으로 0.5 mg/mL 농도에서 무처리군은 9.95±0.42%의 양이온라디칼을 소거한 반면에 알카리 처리군은 47.44±0.02%, 알카리+Viscozyme 처리군은 54.00±6.39%, 알카리+Alcalase 처리군은 68.93±4.23%의 ABTS 양이온라디칼을 소거하였다. 양이온라디칼 소거활성은 각 추출물이 가지고 있는 폴리페놀 함량에 비례하였다. 커피박의 알카리 처리만으로도 양이온라디칼 소거활성이 4.9배 증가했으며, 알카리+Alcalase 처리군에서는 7.1배 증가하였다.



**Fig. 3** Growth inhibitory activity of spent coffee grounds extracts against *Streptococcus mutans*. Each extract was divided into no treatment, alkali treatment, alkali+Viscozyme treatment, and alkali+Alcalase treatment groups, respectively. The growth inhibition effect against *S. mutans* according to their concentration (□; 5 mg/mL, ■; 10 mg/mL) was observed. The growth inhibition effect of each extract was expressed as a relative ratio to the growth rate of the control group. Data were means and SD of triplicate measurements. Data were statistically different from the value of no treatment group (\*\* $p < 0.01$ )

커피박 기준으로 1.0 mg/mL 농도에서 각 추출물의 유리라디칼 소거능을 보면, 무처리군은 19.75±1.08%인 반면에 알카리 처리군은 48.11±0.00%, 알카리+Viscozyme 처리군은 50.91±0.70%, 알카리+Alcalase 처리군은 59.06±1.98%로 나타났다(Fig. 2). 각 추출물의 유리라디칼 소거활성 역시 폴리페놀 함량에 비례하였다. 커피박의 알카리 처리만으로도 유리라디칼 소거능이 2.4배 증가했으며, 알카리+Alcalase 처리군에서는 3.0배 증가하였다. 커피박을 NaOH에 이어 Alcalase로 처리하면 커피박 추출물의 페놀성 화합물 함량이 크게 증가하였고, 이에 따라 양이온라디칼 및 유리라디칼 소거능과 같은 항산화 활성이 크게 향상됨을 알 수 있었다. 식물 추출물들이 페놀성 화합물을 많이 함유할수록 항산화 활성이 높다는 기존의 보고[25,26]와 같이, 본 연구에서도 페놀성 화합물의 함량이 가장 높은 알카리+Alcalase 처리군에서 항산화 활성이 우수한 것으로 나타났다. 이는 홍삼과 들깨박을 Alcalase로 처리했을 때도 폴리페놀의 추출량이 크게 늘어나면서 항산화 활성이 증가한 것과 같은 양상을 보여주었다[19,20].

무처리, 알카리 처리, 알카리+Viscozyme 및 알카리+Alcalase 처리한 커피박 추출물들이 충치 유발균인 *S. mutans*의 생육에 미치는 영향을 추출물을 첨가하지 않고 배양한 대조군과 비교하였다(Fig. 3). 각 추출물을 10 mg/mL의 농도로 첨가한 후 *S. mutans* 균을 배양하여 상대적인 생육 정도를 대조군과 비교한 결과, 무처리군에서는 54.61±2.11%, 알카리 처리군에서는 74.70±0.068% ( $p < 0.01$ ), 알카리+Viscozyme 처리군에서는 5.06±0.112% ( $p < 0.01$ )로 정도의 차이는 있으나 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 *S. mutans* 균의 생육이 증가하였다. 그러나 알카리+Alcalase 처리군에서는 -39.29±2.23% ( $p < 0.01$ )로 우수한 생육 억제 효과를 보여주었다. 알카리+Alcalase 처리로 얻어진 추출물을 5-20 mg/mL 수준으로 처리했을 때 균 생육의 억제 정도는 추출물의 농도에 비례하였다. 이는 로스팅한 커피

의 열수추출물이 *S. mutans*의 생육을 저해하며[27], 폴리페놀 화합물을 함유한 녹차와 홍차 추출물의 농도에 비례하여 *S. mutans*의 생육이 저해되는 결과[28]와 동일한 경향이다. 본 연구에서도 커피박을 알칼리와 Alcalase로 처리하면 총 페놀성 화합물 함량이 증가하고, *S. mutans* 균의 생육이 크게 억제되는 효과를 나타내었다. 페놀성 화합물의 종류 및 농도에 따라 상이한 항충치균 활성을 보인다는 보고[29]를 고려하면, 이러한 결과는 커피박의 추출 조건(알칼리, 효소 종류)에 따라 페놀성 화합물의 추출량에 차이가 있고, 화학적 성질이 상이한 페놀성 화합물들의 추출 정도가 달라짐에 기인한 것으로 판단된다. 페놀성 화합물은 항산화 활성을 나타낼 뿐만 아니라 항염증 및 항균 효과를 갖는 것으로 알려져 있다[30,31]. 이러한 페놀성 화합물은 뛰어난 천연 항균제로서 항생제 내성 세균에 대한 효과적인 대안으로 모색되고 있다[32].

이상의 결과에서 버려지는 폐자원인 커피박을 알칼리와 Alcalase로 연속 처리하면 페놀성 화합물 함량이 크게 증가하였고, 뛰어난 항산화 활성과 충치균 생육 억제 효과를 보여주었다. 따라서 알칼리 처리한 커피박의 Alcalase 효소분해물은 항산화 식품 소재뿐만 아니라 충치의 예방과 완화를 목적으로 하는 구강용 제품에 활용가능성이 있을 것으로 사료된다. 향후 커피박 효소분해물 중 뛰어난 항균 효과를 가지는 페놀성 화합물을 분리하여 확인하는 후속 연구가 필요할 것이다.

## 초 록

커피박을 알칼리 처리한 후 Viscozyme과 Alcalase로 효소분해하여 추출물을 얻었다. 커피박을 알칼리와 효소로 처리하였을 때 추출물의 페놀성 화합물 함량이 증가하였고, 이에 따라 양이온라디칼과 유리라디칼에 대한 우수한 소거 활성을 나타내었다. 특히 커피박에 알칼리와 Alcalase를 병행 처리하였을 때 페놀성 화합물 함량과 항산화 활성이 가장 높게 나타났고, 농도에 비례하여 *Streptococcus mutans* 균의 생육을 억제하였다. 결론적으로 알칼리 처리된 커피박의 Alcalase 효소분해물은 우수한 항산화 및 항충치균 효과를 나타내었다.

**Keywords** 알칼리 처리 · 커피박 · 항산화 · 항충치균 · Alcalase 효소분해물

**감사의 글** 본 연구는 2023학년도 청운대학교 학술연구구조성비 지원에 의해 수행된 것입니다.

## References

- Johnson K, Liu Y, Lu M (2022) A review of recent advances in spent coffee grounds upcycle technologies and practices. *Front Chem Eng* 4: 838605. doi: 10.3389/fceng.2022.838605
- Münchow M, Alstrup J, Steen I, Giacalone D (2020) Roasting conditions and coffee flavor: a multi-study empirical investigation. *Beverages* 6: 29. doi: 10.3390/beverages6020029
- Minamisawa M, Yoshida S, Takai N (2004) Determination of biologically active substances in roasted coffee using a diode-array HPLC system. *Anal Sci* 20: 325–328. doi: 10.2116/analsci.20.325
- Hall S, Desbrow B, Anoopkumar-Dukie S, Davey AK, Arora D, McDermott C, Schubert MM, Perkins AV, Kiefel MJ, Grant GD (2009) A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. *Food Res Int* 76: 626–636. doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.027
- Jo SJ, In MJ, Kim DC (2016) Effect of the roasting intensity and extraction time of coffee bean on the antioxidant activity of coffee extract. *Food Eng Prog* 20: 165–169. doi: 10.13050/foodengprog.2016.20.2.165
- del Castillo MD, Ames JM, Gordon MH (2002) Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem* 50: 3698–3703. doi: 10.1021/jf011702q
- Almeida AAP, Farah A, Silva DAM, Nunan EA, Glória MBA (2006) Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J Agric Food Chem* 54: 8738–8743. doi: 10.1021/jf0617317
- Rufian-Henares JA, Morales FJ (2007) Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. *J Agric Food Chem* 55: 1480–1485. doi: 10.1021/jf062604d
- Tenore GC, Daglia M, Orlando V, D'Urso E, Saadat SH, Novellino E, Nabavi SF, Nabavi SM (2015) Coffee and depression: a short review of literature. *Curr Pharm Des* 21:5034–5040. doi: 10.2174/1381612821666150825145112
- Ballesteros LF, Teixeira JA, Mussatto SI (2014) Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food Bioprocess Technol* 7: 3493–3503. doi: 10.1007/s11947-014-1349-z
- Bottani E, Tebaldi L, Volpi A (2019) The role of ICT in supporting spent coffee grounds collection and valorization: a quantitative assessment. *Sustainability* 11: 6572. doi: 10.3390/SU11236572
- Muzaifa M, Rahmi F, Syarifudin (2021) Utilization of coffee by-products as profitable foods - a mini review. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* 672: 012077. doi: 10.1088/1755-1315/672/1/012077
- Mussatto SI, Machado EMS, Carneiro LM, Teixeira JA (2012) Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Appl Energy* 92: 763–768. doi: 10.1016/j.apenergy.2011.08.020
- Jin LS, Salimi MN, Kamal SZ (2020) Optimization of pretreatment and enzymatic hydrolysis of spent coffee ground for the production of fermentable sugar. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 743: 012030. doi: 10.1088/1757-899X/743/1/012030
- Yen WJ, Wang BS, Chang LW, Duh PD (2005) Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J Agric Food Chem* 53: 2658–2663. doi: 10.1021/jf0402429
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239–243. doi: 10.1016/S0021-9258(18)88697-5
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231–1237. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200. doi: 10.1038/1811199a0
- Shin YS, Lee TJ, In MJ, Kim DC (2021) Preparation of enzymatic hydrolysate from defatted perilla seed residue and its application to *Leuconostoc mesenteroides* cultivation. *J Appl Biol Chem* 64: 97–102. doi: 10.3839/jabc.2021.015
- Kim DC, Lee TJ, In MJ (2019) Potential of proteolytic enzyme treatment for production of Korean red ginseng extract. *J Appl Biol Chem* 62: 385–389. doi: 10.3839/jabc.2019.053
- Kim YC, Cho CW, Rhee YK, Yoo KM, Rho J (2007) Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1482–1485
- Landbo AK, Meyer AS (2001) Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenol from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *J Agric Food Chem* 49: 3169–3177. doi: 10.1021/jf001443p

23. Lee PH, Park SY, Jang TH, Yim SH, Nam SH, In MJ, Kim DC, Chae HJ (2014) Effects of complex carbohydrase treatment on physiological activities of pear peel and core. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 404–410. doi: 10.3746/jkfn.2014.43.3.404
24. Son JY, Jang SH (2013) Physiological activities of enzyme hydrolysates in ethanol extracts from sesame, black sesame and perilla cake. *Korean J Food Cookery Sci* 29: 407–416. doi: 10.9724/kfcs.2013.29.4.407
25. Jeong GH, Jeong YH, Nam JH, Kim TH (2020) Characterization of antioxidant constituents from perilla cake. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 49: 900–906. doi: 10.3746/jkfn.2020.49.8.900
26. Zhang YB, Bae MJ, An BJ, Choi HJ, Bae JH, Kim S, Choi C (2003) Effect of antioxidant activity and change in quality of chemical composition and polyphenol compound during long-term storage. *Korean J Food Sci Technol* 35: 115–120
27. Yoon HS, Jee YJ (2015) Inhibitory effects of coffee beans on dental caries causing *Streptococcus mutans* activity. *Int J Clin Prev Dent* 11: 159–164. doi: 10.15236/ijcpd.2015.11.3.159
28. Barroso H, Ramalhete R, Domingues A, Maci S (2018) Inhibitory activity of a green and black tea blend on *Streptococcus mutans*. *J Oral Microbiol* 10: 1481322. doi: 10.1080/20002297.2018.1481322
29. Kim SJ, Park IB, Kang SG, Chung DO, Jung ST (2005) Anticariogenic activity and glucosyltransferase inhibition of phenolic compounds. *Korean J Food Culture* 20: 603–607
30. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 31: 435–445. doi: 10.1016/j.mam.2010.09.006
31. Manso T, Lores M, de Miguel T (2022) Antimicrobial activity of polyphenols and natural polyphenolic extracts on clinical isolates. *Antibiotics* 11: 46. doi: 10.3390/antibiotics11010046
32. Hwang MK, Lee YH, Kim DC (2021) Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. extract against skin flora. *J Appl Biol Chem* 64: 83–87. doi: 10.3839/jabc.2021.013