

숙성에 의한 흑밤의 영양성분 분석과 항산화 활성

이문희 · 이지수* · 양지원* · 김인범** · †박윤제***,****

공주대학교 응용생명공학과 박사과정 학생, *공주대학교 식품공학과 석사과정 학생, ** (주)밤마을 대표이사,
공주대학교 식품공학과 교수, *공주대학교 응용생명공학과 교수

Analysis of Nutritional Composition and Antioxidant Activity of Black Chestnut by Aging

Moon Hee Lee, Ji Su Lee*, Ji Won Yang*, In Beom Kim** and †Youn-Je Park***,****

Ph.D. Student, Dept. of Applied Biotechnology, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

**M.S Student, Dept. of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Korea*

***CEO, Bammaeul Co., Ltd., Kongju 32590, Korea*

****Professor, Dept. of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Korea*

*****Professor, Dept. of Applied Biotechnology, Kongju National University, Yesan 32439, Korea*

Abstract

Black chestnut (BC) was obtained through aging of fresh chestnut (FC) at 80°C for 15 days. Proximate and mineral compositions along with colors of FC and BC were evaluated. With aging, moisture contents decreased by 50%, whereas sugar contents, carbohydrate contents, and calories increased. Contents of minerals (Fe, P, Ca, Na, Mg, K) were significantly higher in FC than in BC, showing an order of Mg < Ca < P < K in both FC and BC. Using a Hunter color system, it was found that lightness (L), redness (a), and yellowness (b) values of FC were higher than those of BC. Antioxidant and cytotoxic activities of hot water and ethanol (50, 80, 100%) extracts prepared from FC and BC were evaluated. Extraction yields were lower with FC than with BC. Among water and ethanol extracts, water extract showed the highest DPPH radical scavenging activity for both FC and BC. IC₅₀ values for ABTS+ radical scavenging activities increased after aging. Cytotoxicities of FC and BC extracts were similar to each other. They were different against various cell lines (3T3, HeLa, and Sarcoma-180). These results suggest that BC could be used as a new processed food using chestnut.

Key words: black chestnut, antioxidant activity, cytotoxic activity, proximate composition, mineral contents

서 론

밤나무는 우리나라와 중국, 일본 등에서 발견되는 수종으로 해발 700 m 아래의 비교적 해가 잘 들고 따뜻한 산골짜기 숲 속이나 마을 주변 등에서 자란다. 우리나라에서는 전통적으로 밤나무를 울(栗), 잎을 울엽(栗葉), 꽃을 울화(栗花), 종자를 울자(栗子)라고 표현하고 있으며, 밤나무의 씨, 꽃, 잎, 껍질은 주로 약재로 사용하여 왔다. 열매인 밤은 식용으로 널리 애용하고 있을 뿐만 아니라, 한방에서도 주름살, 하혈, 지혈, 건위(健胃), 보신(補腎) 작용 및 칠독(漆毒)의 해독제(解

毒劑)로서 효능(効能)이 있는 것으로 알려져 있다(Im RJ 1999).

2022년 기준으로 밤 수출은 전년대비 3.5%, 평년대비 4.3% 감소하였는데, 이는 밤나무의 재배면적 감소와 고령목 비율 증가, 인건비 상승 등으로 인해 밤 생산량이 감소하였기 때문이다(Korea Rural Economic Institute 2023). 실제 밤 생산량은 연평균 4.4% 정도 감소하고 있으며, 밤 소비량도 점차 감소하고 있다(Korea Rural Economic Institute 2022). 일반적인 밤의 소비 형태는 생밤보다 군밤, 삶은 밤 등 가공한 형태로 구입하여 섭취하고 있다(Seok 등 2019). 이러한 이유는 생밤은 손질이 힘들어 이용하기 어려운 반면에, 밤 가공 제품은

† Corresponding author: Youn-Je Park, Professor, Dept. of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Korea. Tel: +82-41-330-1486, Fax: +82-41-330-1489, E-mail: ypark@kongju.ac.kr

섭취하기에 비교적 편리하기 때문이다. 따라서 밤의 부가가치를 높이고, 소비를 촉진하기 위해서는 새로운 밤 가공방법의 개발과 상품화 연구가 필요하다.

식품을 가공하는 다양한 방법 중 하나인 고온의 열처리에 의한 숙성 가공법은 적당한 온도와 조건에서 오랜 시간 방치하여 발효와 같은 화학 변화를 일으키게 하는 것으로, 새로운 성분이 생성되어 영양소가 변화하거나 물성 변화가 일어난다(Lee 등 2015; Jang 등 2018). 숙성을 이용한 대표적인 식품에는 흑마늘, 흑양파, 흑생강 등이 있으며, 이들은 숙성기간을 통해 과당 함량이 증가하여 먹기 좋은 맛과 조직으로 변화되며, 높은 온도에서 가공할 경우 비효소적 갈변반응이 일어나 색이 진해진다(Jang 등 2008; Lee HS 2010). 율피도 숙성기간이 경과될수록 단맛이 증가하고 떫은맛은 감소하며, 총페놀 함량의 증가와 더불어 DPPH, hydroxyl 라디칼 소거능이 높아져 항산화력이 증가된다(Kim 등 2017).

이렇듯 숙성은 식품 저장 과정에서 풍미를 향상시켜 기호성을 높이고 항산화 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있으나, 밤을 숙성하여 그 효과를 보고한 연구는 없다. 따라서 본 연구에서는 생밤과 흑밤을 활용하여 일반성분, 무기이온, 항산화 활성 및 세포독성을 분석하여 숙성에 의한 밤의 성분 및 생리활성의 변화를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에서 사용한 밤은 (주)밤마을(Gongju, Korea)에서 가공한 것을 제공받아 시료로 사용하였다. 시료에 사용한 밤은 대표적인 밤 생산지로 알려진 충청남도 공주시 정안 지역의 인공육묘로 조성된 밤나무 조성림에서 재배하여 2021년 9월 중순에 수확한 밤을 사용하였으며, 밤의 품종은 과육이 단단하여 식감이 우수하고 당도와 저장성이 뛰어나다고 알려진 옥광밤 품종을 사용하였다. 생밤은 단순히 껍질을 벗긴 것을 사용하였고, 흑밤은 생밤 2 kg을 6 L 스테인리스스틸 내솥 용기에 담아 향온이 유지되는 보온 밥솥(CRP-HUF10BS, Cuckoo electronics, Yangsan, Korea)에 완전 밀폐시켜 80℃에서 15일간 숙성하여 제조하였다. 흑밤 및 생밤은 껍질이 다 벗겨진 상태로 폴리에틸렌 팩에 넣어 진공 포장한 후, 4℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

2. 일반성분 분석

생밤과 흑밤의 일반성분 함량 분석은 AOAC(2019)법에 따라 분석하였다. 수분함량은 건조기(OF-21E, Jiotech Co., Ltd, Daejeon, Korea)를 이용하여 105℃ 상압 가열 건조법으로 측정하였고, 조회분은 회화로(FX-27, Daihan scientific Co., Ltd,

Wonju, Korea)를 사용하여 550℃에서 건식회화법으로 측정하였다. 조단백질 함량은 Kjeldahl 증류장치(DNP1500, Raypa, Barcelona, Spain)를 이용하여 Kjeldahl법으로 분석하여 얻은 질소량에 밤의 질소계수인 5.30을 곱하여 계산하였고, 조지방 함량은 soxhlet 추출장치(C-WBA, Changshin science, Busan, Korea)를 이용하여 soxhlet 추출법으로 측정하였다. 탄수화물 함량은 시료의 총 중량에서 수분, 회분, 단백질, 그리고 지방 함량을 제외한 함량으로 표시하였다. 시료의 총 식이섬유 함량 분석은 AOAC(2019)법에 따라 분석하였다. 즉, 식이섬유 분석용 효소 α -amylase(A6380-1G, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), protease(P5380, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 그리고 amyloglucosidase(10115-1G-F, Sigma-Aldrich, Missouri, USA)를 순차적으로 반응시킨 후 에탄올 침전물은 여과하여 침전 잔사량을 구하였고, 잔사 중 회분과 조단백질 함량을 감하여 식이섬유의 무게를 계산하였다. 열량은 앞서 나온 결과 값인 조단백질, 조지방 그리고 당질의 함량에 단백질 4, 지방 9, 당질 4의 계수를 곱하여 각각의 에너지를 킬로칼로리(kcal) 단위로 산출하고 값을 모두 더하여 계산하였다.

3. 무기이온 분석

생밤과 흑밤 시료 중의 무기이온(Mg, Al, Cu, Fe, P, Zn, Ca, K) 분석 방법은 식품공전 일반시험법(Korea Food & Drug Administration 2018)에 따라 실험하였다. 막자사발로 곱게 분쇄한 시료 0.3 g에 10 mL의 질산(Daejung, Siheung, Korea)을 처리한 후, microwave digestion system(8000 MPS, Perkin Elmer, Beaconsfield, UK)을 이용하여 30 bar, 170℃에서 10분 동안 시료를 완전히 용해하였다. 용해된 시료를 상온으로 식힌 후 3차 증류수로 53 g이 되도록 정용한 다음 여과지(Whatman No.2, Whatman Co., Maidstone, UK)로 여과한 후 시험 용액으로 사용하였다. 시험 용액 중의 무기이온 분석은 유도결합 플라즈마 분광분석기(Optima 5000 DV, Perkin Elmer, Beaconsfield, UK)를 이용하여 Jeong 등(2012)의 방법으로 분석하였다. 플라즈마 가스는 아르곤가스를 0.8 MPa의 압력으로 사용하였고, gas flow는 plasma 15 L/min, nebulizer 0.8 L/min로, 온도는 6,000K으로 설정하였다. 시료는 autosampler를 이용하여 주입하였고 시료의 유속은 1.5 mL/min으로 하여 분석하였다.

4. 색도 측정

실험에 사용된 생밤 및 흑밤은 색차계(Chrome Meter CR-300, Minolta Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 색도를 측정하였다. 분쇄하지 않은 원물 상태의 생밤과 흑밤을 이용하여 각각의 표면을 3회 반복하여 측정하였다. 색도는 명도(lightness)를 나타내는 L값, 적색도(redness)를 나타내는 a값과 황색도(yellowness)를 나타내는 b값으로 나타내었다. 사용된 표준 색판의 L값은

95.62, a값은 0.66, b값은 1.06으로 측정되었다.

5. 추출물 제조

생밤과 흑밤의 항산화력 및 세포 독성 측정을 위하여 용매 별로 추출물을 제조하였다. 먼저 생밤과 흑밤을 각각 믹서기 (HMF-300S, Hanil, Seoul, Korea)로 약 5분간 분쇄하였다. 추출 용매는 water 및 50, 80, 100% 에탄올을 이용하였으며 각각 밤과 1:10의 비율로 혼합한 다음 60°C 수욕상에서 150 rpm으로 24시간 동안 교반하며 추출하였다. 추출액은 Whatman No.2 여과지를 이용하여 감압여과한 후, rotary vacuum evaporator (Rotary evaporator N-N Series, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 60°C에서 5배 농축하였다. 농축액을 -80°C에 얼린 다음 동결건조기(Freeze dryer, Ilshin Lab Co., Dongducheon, Korea)를 이용하여 5 mTorr에서 72시간 동안 동결건조한 후 건조된 분말을 시료로 사용하였다. 각 시료의 용매별 추출 수율은 생밤과 흑밤의 중량 대비 최종 동결건조된 분말 중량의 백분율로 나타내었다.

6. DPPH 라디칼 소거능 측정

전자공여능(electron donating ability, EDA)은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, D9132, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 라디칼 소거 활성을 측정하는 Yang 등(2012)의 방법을 따라 진행하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO; 472301-500ML, Sigma-Aldrich, Missouri, USA)를 이용하여 시료를 완전히 용해시킨 후 0.45 µm PVDF 필터(Millex® PVDF syringe filter, Millipore, Massachusetts, USA)로 여과하여 제조하였다. 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도의 시료 용액 20 µL에 180 µL의 0.1 mM DPPH 용액을 가한 후 20분간 암실에서 반응시킨 다음 micro plate reader(INFINITE 200 PRO, TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값을 이용하여 아래의 식에 의해 라디칼 소거능(%)을 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료군 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}}\right) \times 100$$

7. ABTS⁺에 의한 항산화력 측정

ABTS⁺ 라디칼 소거능은 Jun 등(2014)의 방법으로 분석하였다. 7 mM 2,2'-azinobi(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS; A1888, Sigma-Aldrich, Missouri, USA)와 2.45 mM potassium persulfate(379824-5G, A1888, Sigma-Aldrich, Missouri, USA)를 실온의 암실에서 12시간 동안 방치하여 라디칼을 생성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 phosphate buffer solution(PBS)으로 희석하여 실험에 사용하였다. 시료는 DMSO를 이용하여 완전히 용해시킨 후 0.45 µm PVDF 필터로 여과하여 실험에 이용하였다. 시료 20 µL에 ABTS 시약

을 180 µL 첨가하여 암실에서 10분간 반응시킨 후 micro plate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 아래 식에 의해 라디칼 소거능을 산출한 후 50%의 라디칼 소거능을 나타내는 시료의 농도(IC₅₀, mg/mL)로 나타내었다.

$$\text{ABTS+ 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료군 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}}\right) \times 100$$

8. 세포독성 평가

암세포로서 마우스 섬유아세포인 3T3, 인간의 자궁경부암 세포인 HeLa, 마우스 육종암세포인 Sarcoma-180을 이용하여 MTT[3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay를 시행하였다. 측정 방법은 An 등(2012)의 방법을 변형하여 실시하였다. 세포주를 96 well plate에 5×10⁴ cells/mL로 분주한 후 5% CO₂, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 충분히 부착시켰다. 부착된 세포에 시료를 농도별(2.5, 5, 10 mg/mL)로 처리하여 48시간 동안 반응시킨 다음 각각의 well에 5 mg/mL MTT용액(M2128-1G, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 10 µL를 첨가하여 3시간 동안 반응시켰다. 상층액을 제거한 후에 DMSO 50 µL를 첨가하여 잘 녹인 다음 micro plate reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 이용하여 아래의 식에 의해 세포 생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(\frac{\text{시험군 흡광도} - \text{blank 흡광도}}{\text{대조군 흡광도} - \text{blank 흡광도}}\right) \times 100$$

9. 통계처리

본 실험은 모두 3반복으로 수행하였고 얻은 결과값은 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 일반성분, 무기이온 및 색도에 대한 통계분석은 F 검정법을 사용하여 유의수준 0.05에서 등분산성을 검정하였고, 등분산인 경우 Student t-test를 실시하여 p<0.05, p<0.01, p<0.001로 표기하였고, 등분산이 기각되면 Aspin-Welch t-test를 실시하여 유의수준 0.05에서 양측 검정으로 유의성을 확인하였다. DPPH, ABTS 및 세포 독성에 대한 결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) version 27 프로그램으로 분석하였고, 실험군간 평균 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 검정하였으며 p<0.05 수준에서 유의성을 부여하였다.

결과 및 고찰

1. 일반성분

생밤 및 흑밤의 일반성분을 분석한 결과, 생밤에서 흑밤으로 변화하면서 탄수화물 함량은 100 g당 26.23 g에서 57.97

g으로 약 2배 증가하였고, 당류의 함량은 100 g당 4.77 g에서 29.63 g으로 약 6.1배 증가하였다(Table 1). 이는 흑밤의 제조 과정 중 높은 온도에서 숙성기간을 거치는 동안 효소 반응에 의하여 당류가 증가된 것으로 보이며, 이와 같은 결과는 율피의 환원당 함량이 생울피는 2.31%, 숙성 15일차 율피는 11.13%로 율피를 숙성하는 동안 환원당의 함량이 약 4.8배 증가된 Kim 등(2017)의 결과와 유사하였다. 또한 수분 함량은 2배 가까이 감소한 반면 무게 대비 열량은 100 g당 110.30 kcal에서 240.10 kcal으로 2배 가량 증가하였는데, 이는 수분 함량이 절반으로 줄어들면서 나타난 현상으로 판단된다. Kim 등(2015)의 연구에 의하면 흑마늘의 경우 수분 함량이 숙성 후 1.2배 감소하였는데, 흑밤의 수분 함량이 숙성 단계에서 감소한 것과 일치하였다. 한편 회분과 식이섬유, 조단백질은 생밤과 흑밤에서 유의적인 차이를 나타내지 않는 반면, 조지방은 1.5배 증가하였는데, 마늘의 경우 조회분은 1.1배, 조단백은 1.2배, 조지방은 2.2배가 증가하여 숙성에 의해 조지방 함량이 조회분 및 조단백보다 크게 변화되는 것과 유사하게 나타났다. 그러나, 마늘보다는 밤의 변화가 상대적으로 적게 나타났는데, 이는 시료 및 숙성 조건의 차이에 의한 것으로 판단된다.

2. 무기이온

생밤과 흑밤의 무기이온 함량을 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. 생밤 및 흑밤의 K 함량은 1,745.29 mg/L 및 586.87 mg/L로 분석한 무기이온 중 가장 높은 함량을 나타내었고, Mg<Ca<P 순으로 높은 함량을 나타내었다. Massantini 등(2021)의 연구에서도 밤의 무기이온 중 K가 가장 높은 함

Table 1. Proximate composition and dietary fiber of fresh chestnut and black chestnut

Nutrient	Sample (%)	
	Fresh chestnut	Black chestnut
Crude protein	3.03±0.06 ¹⁾	2.90±0.10
Crude lipid	0.57±0.12 ²⁾	0.90±0.10
Crude ash	0.97±0.06	0.87±0.06
Carbohydrate	26.23±0.06 ^{***}	57.97±0.32
Sugar	4.77±0.15 ^{***}	29.63±0.31
Dietary fiber	5.93±0.15	5.70±0.10
Moisture	69.20±0.00 ^{***}	37.37±0.32
Calorie (kcal/100 g)	110.30±1.06 ^{***}	240.10±1.04

¹⁾ Mean±S.D. (n=3).

²⁾ Means with star markers are significantly different between fresh chestnut and black chestnut by student's *t*-test (**p*<0.05, ****p*<0.001).

량을 나타내어 본 연구와 일치하였고, Jeong 등(2012)도 밤의 무기이온 중 K가 가장 높고, Ca<Mg<P 순으로 높게 나타나 분석 결과와 유사하였다. 한편 흑밤의 무기이온 함량은 Zn을 제외하고 생밤보다 매우 낮게 측정되었다. Jeon 등(2016)은 85°C에서 숙성한 흑토란을 제조한 후 무기이온 함량을 측정한 결과 Fe, P, Ca, Na, Mg, K의 함량이 모두 감소하였고, 이는 토란의 숙성과정에서 수분이 빠져나가며, 무기이온이 용출되어 나타난 현상이라고 보고하였다. 본 연구에서도 흑밤의 무기이온 함량 감소가 숙성과정 중 수분 감소에 따른 무기이온 용출에 의한 것으로 판단된다.

3. 색도

생밤 및 흑밤의 색도는 Table 3에 나타내었다. 생밤의 명도(L)는 65.81이었으나, 숙성 후 흑밤은 30.11로 측정되어 약 2배 낮아졌으며, 적색도(a)는 생밤 3.00에서 흑밤 2.11로 약간 줄어들었으나 유의적인 차이는 없었다. 황색도(b)는 생밤 24.79에서 숙성 후 흑밤 2.66으로 약 9배 가량 줄어들어 가장 높은 변화를 나타내었다. Bedmíček 등(2021)에 의하면, 7가지 마늘을 숙성한 흑마늘의 평균 명도는 83.95에서 18.11로 4.6배 낮아졌고, 평균 황색도는 22.03에서 4.69로 4.7배 감소하였다. 원료 생강과 숙성 후 흑생강의 색도를 측정한 연구에서도 원료 생강의 명도는 70.89이었으나, 숙성 후 25.47로 낮아졌고 적색도는 -7.96에서 6.71로 높아진 반면 황색도는 38.39에서 숙성 후 16.15로 감소하였다(Lee & Kim 2020). 이와 같은 결과로 볼 때 숙성 공정이 대부분의 식품에서 색도 변화를 발생시키며, 특히 명도 및 황색도의 변화에 큰 영향

Table 2. Mineral content of fresh chestnut and black chestnut

Mineral	Sample (ppm)	
	Fresh chestnut	Black chestnut
Mg	412.19±11.68 ^{**1)2)}	202.20±0.38
Al	63.91±2.00 ^{***}	7.61±0.06
Cu	7.35±0.73 ^{**}	0.06±0.07
Fe	56.73±1.15 ^{***}	33.31±0.05
Na	127.41±2.54 ^{***}	104.64±0.96
P	752.49±14.17 ^{***}	267.52±0.66
Zn	6.26±0.29 [*]	7.14±0.04
Ca	482.96±15.01 ^{**}	245.01±0.28
K	1,745.29±41.45 ^{***}	586.87±3.70

¹⁾ Mean±S.D. (n=3).

²⁾ Means with star markers are significantly different between fresh chestnut and black chestnut by student's *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

Table 3. Colorimetric characteristics of fresh chestnut and black chestnut

Sample	Hunter's color value ¹⁾		
	L	a	b
Fresh chestnut	65.81±0.57 ^{***2)}	3.00±1.30	24.79±2.25 ^{**}
Black chestnut	30.11±0.63	2.11±0.56	2.66±0.10

¹⁾ Values are means±S.D. (n=3). L, lightness; a, redness; b, yellowness.

²⁾ Means with star markers are significantly different between fresh chestnut and black chestnut by student's *t*-test (^{**} $p<0.01$, ^{***} $p<0.001$).

을 미치는 것으로 보인다. 비발효 가공식품에서 갈변은 캐러멜 반응, maillard 반응 등에 의하여 일어나는데, 흑밤의 갈변은 고온의 열처리에 의해 숙성되는 동안 a-amino group이 당과 반응하여 비효소적으로 갈변되는 maillard 반응이 관여된 것으로 판단된다(Kim 등 2018).

4. 추출 수율

생밤 및 흑밤의 용매별 추출 수율을 비교한 결과, 생밤은 80% 에탄올로 추출하였을 때 6.56%로 가장 높은 수율을 나타내었고, 100% 에탄올 추출물은 6.45%로 시료 중 두 번째로 높은 수율을 나타내었으나, 두 시료간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 흑밤 또한 80% 에탄올을 이용하여 추출하였을 때 18.30%로 가장 높은 수율을 나타내었다(Fig. 1). 또한 생밤과 흑밤의 추출 수율은 물 추출 조건에서 각각 5.33%, 11.76%로 흑밤이 2.21배 높았고, 50% 에탄올 추출 조건에서도 각각 4.50%, 12.30%로 흑밤이 2.73배 높았으며, 100% 에탄올 추출 조건에서 각각 6.45%, 12.30%로 흑밤이 1.91배 높은 함량으로 측정되어, 모든 추출 용매 조건에서 생밤보다 숙성 후 흑밤의 추출 수율이 증가하였다. Purev 등(2012)의 연구에서도 생마늘과 흑마늘을 알코올 함량과 온도 및 추출 시간에 따른 수율을 측정한 결과, 추출 조건에 따라 1.39~13.01배까지 생마늘보다 숙성된 흑마늘의 수율이 증가하였다. 또한 Kim 등(2017)은 흑올피의 숙성이 진행됨에 따라 가용성 고형물의 함량이 증가되었는데, 이는 숙성 중 장시간의 열처리를 통해 올피 내 화합물이 구조적 변화를 일으켜 성분 용출이 용이해졌기 때문인 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 흑밤의 숙성 과정 중 열처리로 인하여 불용성 성분들이 가용화되어 생밤보다 흑밤의 추출 수율이 증가한 것으로 판단된다.

한편 물 추출물과 100% 에탄올 추출물을 비교하였을 때 생밤과 흑밤의 물 추출 수율은 각각 5.33%, 11.76%였으나, 100% 에탄올 추출 수율은 각각 6.45%, 12.30%로 나타나 물보다 에탄올의 추출 수율이 높은 것을 알 수 있었다. Nam 등(2014)도 오미자를 물과 70% 에탄올을 이용하여 추출하였을

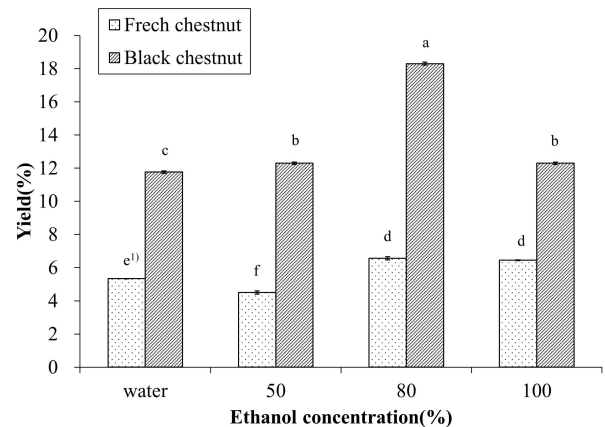


Fig. 1. Extraction yields of fresh chestnut and black chestnut. ¹⁾ Means with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

때 물 추출 수율보다 에탄올 추출 시 수율이 1.85배 증가한다고 보고하였다. 결과적으로 생밤보다는 숙성된 흑밤을 사용하고 80% 에탄올을 이용하여 추출하면 가용성 함량을 높여 고수율의 추출물을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

5. DPPH 라디칼 소거능

생밤 및 흑밤 모두 물 추출물이 에탄올 추출물보다 전반적으로 높은 항산화 활성을 나타내었다(Table 4). 생밤 및 흑밤의 물 추출물은 시료 농도 200 mg/mL에서 각각 89.24%, 51.07%의 저해율을 나타내며, 모든 추출 용매 중 가장 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 건물과의 항산화 효과가 에탄올 추출물보다 물 추출물에서 더 높게 나타난 것과 일치하였다(Kim 등 2014). 또한 시료 농도 200 mg/mL에서 모든 용매의 추출물이 흑밤보다 생밤에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. Hwang JY(2011)의 연구에서는 90°C에서 증숙한 밤의 폴리페놀 함량이 10분 후 1.5배, 20분 후 1.7배 줄어들었고, Park 등(2019)의 연구에서도 강황 추출물을 25°C 및 90°C에 처리하여 항산화 물질의 열 안정성을 분석한 결과, 25°C에서는 항산화 활성이 유지된 반면, 90°C에서는 항산화 활성이 크게 감소하였다. 장기간의 열처리에 의해 밤에 포함된 폴리페놀 성분이 줄어들며, 항산화 활성이 낮아지는 것으로 판단된다(Duodu KG 2011). 시료 농도 200 mg/mL에서는 생밤 추출물이 흑밤 추출물보다 모든 농도에서 항산화 활성이 높았으나, 100 mg/mL의 농도에서는 유의적인 차이가 나지 않았다. 50 mg/mL의 농도에서는 100%, 80% 에탄올을 이용한 추출물에서 흑밤 추출물이 생밤 추출물보다 항산화 활성이 약간 높았으며, 다른 용매에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 25 mg/mL의 농도에서는 전반적으로 흑밤 추출물의 항산화

Table 4. DPPH radical scavenging activity (%) of water and ethanol extracts of fresh chestnut and black chestnut

Sample	Ethanol concentration (%)	Sample concentration (mg/mL)			
		25	50	100	200
Fresh chestnut	Water	12.40±2.76 ^{a1)2)}	19.88±2.78 ^a	42.90±8.00 ^a	89.24±1.69 ^a
	50	4.09±1.77 ^c	7.40±1.46 ^c	24.09±2.68 ^b	61.48±2.84 ^b
	80	3.97±1.06 ^c	9.86±2.95 ^{de}	21.17±1.10 ^b	58.97±0.84 ^b
	100	9.52±1.22 ^b	13.23±1.91 ^{cd}	23.30±2.83 ^b	50.24±1.38 ^c
Black chestnut	Water	12.98±0.81 ^a	19.11±3.64 ^{ab}	39.24±5.41 ^a	51.07±2.11 ^c
	50	4.95±1.02 ^c	10.60±2.11 ^{de}	24.15±1.48 ^b	37.14±3.05 ^d
	80	6.11±0.63 ^c	15.30±1.59 ^{bc}	20.62±1.25 ^b	36.91±0.33 ^d
	100	11.19±0.75 ^{ab}	17.62±1.02 ^{ab}	23.27±2.45 ^b	37.65±0.94 ^d

1) Mean±S.D. (n=3).

2) Means with different superscripts in a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

활성이 생밤 추출물보다 높게 측정되었으나 유의미한 차이는 나타나지 않았다. 한편 생밤 추출물과 흑밤 추출물은 모두 대부분의 농도에서 IC_{50} 값을 계산하지 못할 정도의 매우 낮은 항산화 활성을 나타내었다. Barreira 등(2008)은 밤나무의 꽃, 잎, 밤 외피, 밤 내피 그리고 밤 과육의 항산화 활성을 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 IC_{50} 으로 나타내었는데, 밤 과육만 매우 낮은 항산화 활성을 보여 IC_{50} 값으로 나타내지 못하였다. 이는 밤 과육 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 매우 낮게 나타난 본 연구 결과와 일치한다.

6. ABTS⁺에 의한 항산화력

생밤 및 흑밤 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 시료의 라디칼 소거능이 50%가 되는 농도인 IC_{50} 값으로 나타내었다 (Fig. 2). 100% 에탄올을 이용하여 추출하였을 때, 생밤 추출물은 IC_{50} 값이 5.9 mg/mL로 추출 용매 중 가장 높은 항산화 활성을 나타내었고 흑밤은 13.5 mg/mL로 추출 용매 중 가장 낮은 항산화 능력을 나타내었다. 이와 반대로 50% 에탄올을 이용하여 추출하였을 때에는 생밤 추출물의 IC_{50} 은 7.1 mg/mL로 추출 용매 중 가장 낮은 항산화 활성을 나타내었고, 흑밤 추출물은 11.1 mg/mL로 추출 용매 중 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 추출 용매의 에탄올 함량에 따른 ABTS⁺ 라디칼 소거능의 변화는 생밤 추출물과 흑밤 추출물에서 서로 반대되는 경향을 나타내었다. 생밤 추출물의 항산화 활성은 물 추출물보다 50% 에탄올 추출물이 더 낮았지만 에탄올 함량이 증가할수록 다시 증가하였고, 반대로 흑밤 추출물은 물 추출물보다 50% 에탄올 추출물의 항산화 활성이 더 높았지만, 에탄올 함량이 증가할수록 다시 감소하였다.

한편, 이러한 결과는 DPPH 라디칼 소거능 측정 실험에서 생밤과 흑밤 모두 물 추출물이 가장 높은 항산화 활성을 나타낸 결과와 상이하였다. 이는 ABTS⁺와 DPPH 라디칼 소거

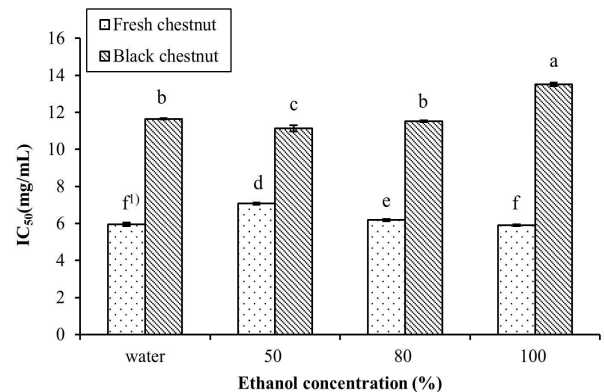


Fig. 2. ABTS⁺ radical scavenging activity (IC_{50}) of fresh chestnut and black chestnut extracts. 1) Means with different superscripts in a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

능 측정법은 모두 항산화 활성을 측정하는 방법이나, DPPH 라디칼 소거능 측정법은 폐놀성 및 방향성 아민 화합물이 함유된 시료에서 자유 라디칼을 소거하여 항산화 활성을 측정하는데 비해 (Prior 등 2005; Shi 등 2009), ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정법은 양이온 라디칼을 소거하는 극성 및 비극성 물질의 전자공여능을 측정하기 때문에 나타나는 현상이다 (Wang 등 1998). 따라서 항산화 물질의 특성에 따라 각 라디칼을 소거하는 정도가 다르므로 항산화 활성에 차이를 나타낸 것으로 판단된다 (Lee 등 2010).

7. 세포독성

3T3 세포에서 100% 에탄올을 이용한 생밤 추출물의 세포 생존율은 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도에서 각각 122.49, 110.76, 95.35%를 나타내었고, 흑밤 추출물의 세포 생존율 또한

122.40, 115.69, 112.12%를 나타내어 모든 처리 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 3). 그러나 물을 이용하여 추출한 생밤 추출물은 동일한 농도에서 각각 41.86, 39.53, 32.72%의 세포 생존율을 나타내었고, 흑밤 추출물은 각각 44.38, 39.49, 34.26%의 세포 생존율을 나타내어 매우 높은 세

포 독성을 나타내었다. 자궁경부암세포인 HeLa 세포에서는 모든 생밤과 흑밤 추출물의 세포생존율이 61.56% 이하로 강한 세포독성을 나타내었으며, 생밤 및 흑밤 모두에서 물 추출물이 100% 에탄올 추출물보다 더 높은 세포 독성을 나타내었다. Jung 등(2016)의 연구에서도 HeLa 세포에 대한 율피

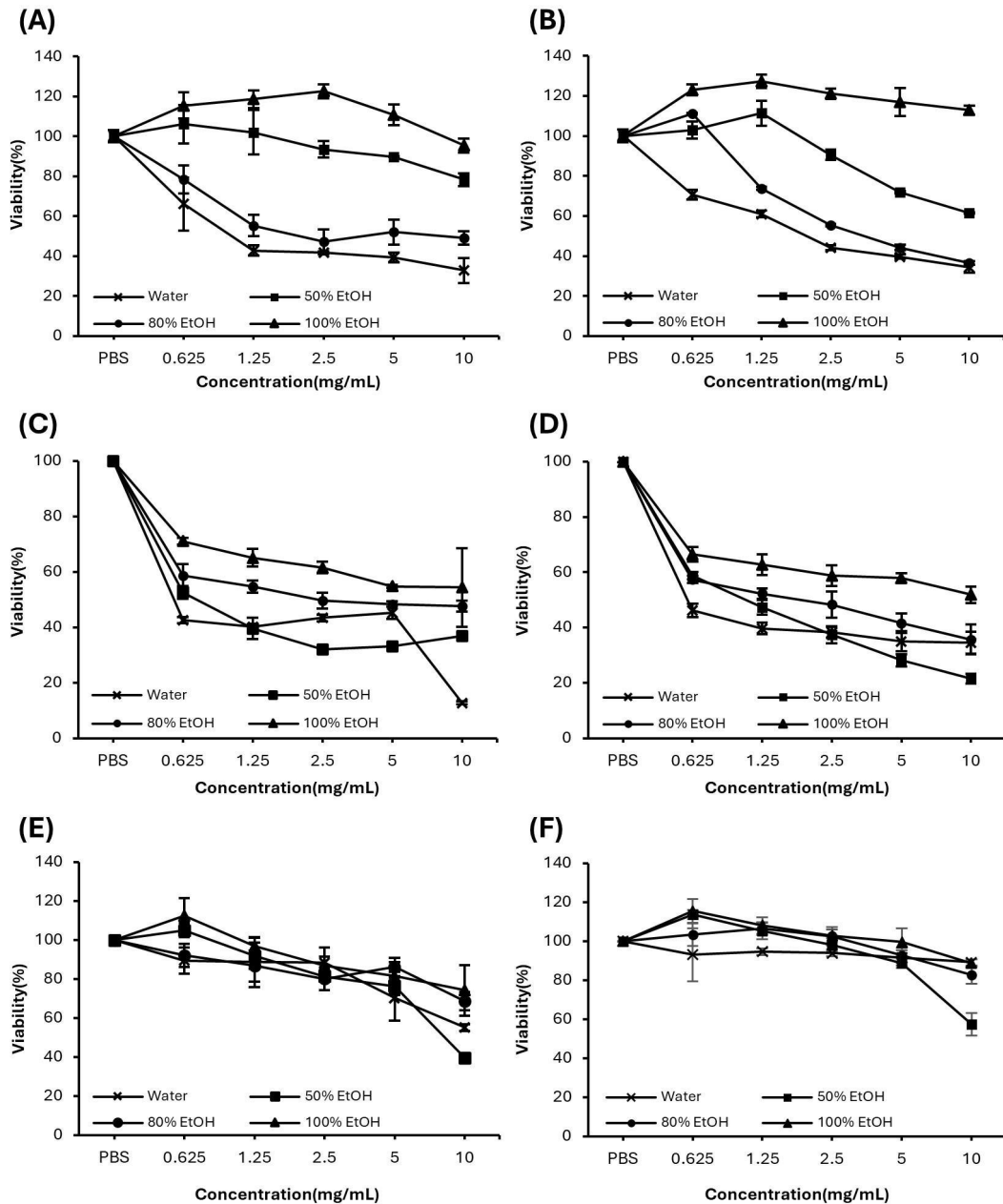


Fig. 3. Cytotoxicity of fresh chestnut and black chestnut extracts. (A) Cytotoxicity of fresh chestnut extracts in 3T3 cells, (B) Cytotoxicity of black chestnut extracts in 3T3 cells, (C) Cytotoxicity of fresh chestnut extracts in HeLa cells, (D) Cytotoxicity of black chestnut extracts in HeLa cells, (E) Cytotoxicity of fresh chestnut extracts in Sarcoma-180 cells, (F) Cytotoxicity of black chestnut extracts in Sarcoma-180 cells.

의 세포독성을 알아본 결과 물 추출물의 IC₅₀ 값이 0.32 mg/mL이고, 에탄올 추출물은 0.75 mg/mL로 물 추출물이 더 높은 항암 효과를 나타내어 본 연구와 일치되는 경향을 나타내었다. Sarcoma-180 세포의 생밤과 흑밤 추출물에 대한 세포 생존율은 대부분의 농도에서 70% 이상을 나타내어 큰 세포독성을 나타내지 않았으며, 생밤과 흑밤 추출물에서 모두 물 추출물과 100% 에탄올 추출물의 세포 생존율이 대부분 유의차를 나타내지 않아서, 물 추출물과 100% 에탄올 추출물 사이의 세포 독성은 유사한 것으로 판단되었다. 다만 생밤 추출물의 세포 생존율이 흑밤 추출물보다 대체적으로 조금 낮게 측정되었다.

한편 생밤 및 흑밤 추출물이 HeLa 세포에 대해서는 강한 독성을 나타낸 반면, Sarcoma-180 세포에 대해서는 세포독성을 거의 나타내지 않았는데, 이는 추출물이 암세포의 종류에 따라 다르게 반응하기 때문인 것으로 판단된다. Sorice 등 (2016)도 울피 추출물을 6가지 인간 종양 세포주에 처리한 결과 HepG2 세포에서만 성장을 강하게 억제한 반면, HaCaT, A375, MCF7, HT29 및 H460 세포에서는 매우 높은 생존율을 나타내어 본 연구와 유사하게 세포에 따라 반응이 달라지는 결과를 보고하였다.

요약 및 결론

생밤과 흑밤의 영양성분과 무기이온 및 색도를 분석하고 물과 50, 80, 100% 에탄올 용매로 추출하여 각 추출조건에서의 항산화 효과 및 세포 독성을 측정하였다. 흑밤의 일반성분 분석에서는 생밤보다 수분함량이 감소한 반면, 당류, 탄수화물, 조지방 함량 및 열량은 증가하였고, 식이섬유나 회분, 조단백 등은 유의적인 차이가 나지 않았다. 무기이온 분석에서 생밤 및 흑밤 모두 K의 함량이 가장 높은 것으로 측정되었고 흑밤보다 생밤의 무기이온 함량이 더 높게 나타났다. 색도 측정 결과 흑밤의 색도는 명도 30.11, 적색도 2.11, 황색도 2.66으로 측정되었으며, 생밤과 비교하여 각각 2.2배, 1.4배, 9.3배 감소하였다. 생밤과 흑밤 추출물의 추출 수율은 모든 조건에서 흑밤이 약 2~3배 높게 나타났다. DPPH를 이용한 항산화 활성은 생밤과 흑밤 모두 물 추출물에서 가장 높게 나타났다. ABTS를 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과, 생밤은 100% 에탄올 추출물에서 항산화 활성이 가장 높게 나타났으나 흑밤은 50% 에탄올 추출물에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 세포독성은 생밤과 흑밤 추출물 사이에 큰 차이가 없었으며, 3T3 세포에서 생밤과 흑밤 추출물 모두 물 추출물은 강한 세포독성을 나타내었으나, 100% 에탄올 추출물은 세포독성을 나타내지 않았다. HeLa 세포에 대해서는 대부분 세포독성을 나타낸 반면, Sarcoma-180 세포에

대해서는 거의 나타내지 않아 세포 종류에 따라 다른 세포독성을 나타내었다. 본 연구를 종합해 볼 때, 밤의 숙성 가공은 당류, 탄수화물, 조지방 및 열량의 증가와 수분의 감소가 일어나 기호성이 증가할 것으로 기대되는 반면, 추출 수율은 증가하지만 항산화 활성은 낮아지고 세포독성은 큰 변화가 없어 전반적으로 생리활성은 감소하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 2022년 공주대학교 학술연구지원사업의 연구 지원에 의하여 수행한 연구 결과입니다.

References

- An IJ, Kwon JK, Lee JS, Park HS, Kim DC, Choi BJ, Lee KM, Park YJ, Jung JY. 2012. Induction of apoptosis in human cancer cells with *Compositae* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:584-590
- AOAC. 2019. Nuts and nut products. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 21st ed. pp.1-3. Association of Official Analytical Communities
- Barreira JCM, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem* 107:1106-1113
- Bedrníček J, Laknerová I, Lorenc F, Probio de Moraes P, Jarošová M, Samková E, Tříška J, Vrchotová N, Kadlec J, Smetana P. 2021. The use of a thermal process to produce black garlic: Differences in the physicochemical and sensory characteristics using seven varieties of fresh garlic. *Foods* 10:2703
- Duodu KG. 2011. Effects of processing on antioxidant phenolics of cereal and legume grains. In Awika JM, Piironen V, Bean S (Eds.), *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*. pp.31-54. American Chemical Society
- Hwang JY. 2011. Changes in quality characteristics of peeled chestnuts with storage temperature. *Korean J Food Nutr* 24:71-78
- Im RJ. 1999. *Flora Medica Coreana*. 20th ed. p.86. Hankookmunhwas
- Jang EK, Seo JH, Lee SP. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean J Food Sci Technol* 40:443-448
- Jang GY, Kim DH, Park CH, Shin YS, Kang TS, Jeong HS, Choi J. 2018. Changes in reducing sugar and catalpol

- contents of *Rehmannia* root slurry with aging treatments. *Korean J Food Nutr* 31:559-564
- Jeon YH, Lee JW, Son YJ, Hwang IK. 2016. Characteristics and sensory optimization of taro (*Colocasia esculenta*) under different aging conditions for food application of black taro. *Korean J Food Sci Technol* 48:133-141
- Jeong HR, Jo YN, Jeong JH, Jin DE, Song BG, Jin YR, Kim MJ, Lee U, Heo HJ. 2012. Change in the chemical composition of chestnuts (*Castanea crenata*) from different periods. *Korean J Food Sci Technol* 44:393-400
- Jun DH, Cho WA, Lee JB, Jang MJ, Park JY, Kim SH, Lee JT. 2014. Antioxidant activity of chestnut (*Castanea crenata* S. et Z.) bur fermented by *Lactobacillus casei*. *J Life Sci* 24:1193-1199
- Jung BS, Lee NK, Na DS, Yu HH, Paik HD. 2016. Comparative analysis of the antioxidant and anticancer activities of chestnut inner shell extracts prepared with various solvents. *J Sci Food Agric* 96:2097-2102
- Kim D, Kim KH, Yook HS. 2015. Analysis of active components of giant black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44:1672-1681
- Kim HH, Lee SJ, Chung YH, Kim SH, Sung NJ. 2018. Physicochemical properties and antioxidant activities from hot-air and freeze dried aged black ginger (*Zingiber officinale*). *J Life Sci* 28:153-161
- Kim JH, Lim WJ, Kim MR. 2017. Quality characteristics and antioxidant activities of aged black chestnut inner shells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46:343-349
- Kim JY, Kim SY, Kwon HM, Kim CH, Lee SJ, Park SC, Kim KH. 2014. Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activity on chestnut, chestnut sell and leavers of *Castanea crenata* extracts. *Korean J Medic Crop Sci* 22:8-16
- Korea Rural Economic Institute. 2022. Trends and prospects for supply and demand of major short-term forest products. Available from <http://library.krei.re.kr/pyxis-api/1/digital-files/845ce2f0-e038-4a93-b897-539e81a733c8> [cited 22 January 2023]
- Korea Rural Economic Institute. 2023. Forestry observation information. Available from <https://www.krei.re.kr/krei/selectBbsNttList.do?bbsNo=74&key=81> [cited 4 May 2023]
- Korea Food & Drug Administration. 2018. Korean Food Standards Codex. Korea Food & Drug Administration
- Lee GY, So YJ, Jeon YH, Kang HJ, Hwang IK. 2015. Changes in the physicochemical properties and sensory characteristics of burdock (*Arctium lappa*) during repeated steaming and drying procedures. *Korean J Food Sci Technol* 47:336-344
- Lee HS. 2010. Effects on antioxidative capacity and lipid improvement of black garlic according to different aging periods. Ph.D. Thesis, Kyungsoong Univ. Busan. Korea.
- Lee SJ, Kim SH. 2020. Optimization of processing condition for antioxidant activities from aged black ginger using response surface methodology. *J Agric Life Sci* 54:99-108
- Lee SJ, Shin JH, Kang MJ, Jung WJ, Ryu JH, Kim RJ, Sung NJ. 2010. Antioxidants activity of aged red garlic. *J Life Sci* 20:775-781
- Massantini R, Moschetti R, Frangipane MT. 2021. Evaluating progress of chestnut quality: A review of recent developments. *Trends Food Sci Technol* 113:245-254
- Nam SY, Lee JY, Ko JS, Kim JB, Jang HH, Kim HR, Lee YM. 2014. Changes in antioxidant and antimicrobial activities of *Schizandra chinensis* Baillon under different solvent extraction. *Korean J Int Agric* 26:513-518
- Park CY, Lee KY, Gul K, Rahman MS, Kim AN, Chun J, Kim HJ, Choi SG. 2019. Phenolics and antioxidant activity of aqueous turmeric extracts as affected by heating temperature and time. *LWT-Food Sci Technol* 105:149-155
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-4302
- Purev U, Chung MJ, Oh DH. 2012. Individual differences on immunostimulatory activity of raw and black garlic extract in human primary immune cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34:651-660
- Seok HD, Choi JY, Byun SY, Min SH. 2019. Analysis on consumer's preference for non-timber forest product (shiitake, chest nut, persimmon): Social big-data analysis. *J Korean Soc For Sci* 108:97-108
- Shi J, Gong J, Liu J, Wu X, Zhang Y. 2009. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT-Food Sci Technol* 42:477-482
- Sorice A, Siano F, Capone F, Guerriero E, Picariello G, Budillon A, Ciliberto G, Paolucci M, Costantini S, Volpe MG. 2016. Potential anticancer effects of polyphenols from chestnut shell extracts: Modulation of cell growth, and cytokinomic and metabolomic profiles. *Molecules* 21:1411
- Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVioe EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46:4869-4873

Yang YR, Cho JY, Park YK. 2012. Isolation and identification of antioxidative compounds 3,4-dihydroxybenzoic acid from black onion. *Korean J Food Preserv* 19:229-234

Received 11 January, 2024
Revised 05 February, 2024
Accepted 13 February, 2024