

청미래 덩굴잎(*Smilax china*) 추출물의 전자공여능, 아질산염 소거능 및 항균효과

김철암 · 박정룡[†] · 김정희

영남대학교 생활과학부 식품영양학전공

Electron Donating Abilities, Nitrite Scavenging Effects and Antimicrobial Activities of *Smilax china* Leaf

Tie-Yan Jin, Jyung Rewng Park[†] and Jung Hee Kim

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract

Electron donating abilities, nitrite scavenging effects and antimicrobial activities of various fractions obtained from ethanol extract of *Smilax china* were examined. Among the fractions investigated, the highest electron donating ability was determined with ethyl acetate fraction showing about 81.0% when reacted for 10 min. However, the lowest ability was found from chloroform fraction. Ethyl acetate and butanol fractions also showed very high nitrite scavenging activity at all concentrations tested. All the fractions revealed antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, Gram (+) bacteria, at both 2.5% and 5.0% concentrations. However, no antimicrobial activity was observed on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium*, Gram (-) bacteria, at 2.5%, but very low activity was detected by 5.0% concentration of ethanol extract, ethyl acetate and water fractions.

Key words: *Smilax china* leaf, electron donating ability, nitrite scavenging effect, antimicrobial activity

서 론

소득수준의 향상과 식생활의 변화로 인하여 영양부족으로 인한 질환은 감소하였으나 비만, 관상동맥질환, 당뇨 등 성인병은 지속적으로 증가되고 있다. 따라서 성인병의 예방을 위하여 다양한 종류의 기능성 재료를 이용한 기능성 식품의 개발과 개발 소재로 활용하기 위하여 다양한 식품의 기능성에 대한 관심이 높아지고 있다.

식물의 잎은 비타민과 무기질, 단백질을 비롯한 기타 영양성분이 풍부하게 함유되어 있고 자연계에 널리 분포되어 있어 유용자원임에도 불구하고 매우 제한적으로 이용되어 왔다. 그러나 최근 녹색식품에 대한 관심이 증가되어 들깻잎(1,2), 쑥잎(3)과 같은 전통식용식물뿐만 아니라 차잎(4), 감잎(5~7), 두충나무잎(8,9), 솔잎(10) 등 새로운 잎에 대한 성분 분석과 차음료 및 기능성식품으로의 개발과 생리활성에 대한 많은 연구가 행해지고 있다. 식물의 잎류가 가지는 주요 생리활성으로는 xanthine oxidase와 angiotensin-I converting enzyme등의 효소에 대한 저해효과(11,12), 대추잎(13)과 두충잎(8)의 전자공여작용, 아질산염 소거작용 그리고 다양한 항균작용 등이 보고되고 있다.

본 연구에서 사용한 청미래덩굴(*Smilax china*)은 백합과에 속하는 덩굴성 관목으로 한국을 비롯하여 중국, 일본에 널리 분포되어 있으며 민간요법으로 위암, 식도암, 직장암의 치료제 및 당뇨병, 식욕증진, 구토감소, 식도협착의 소통, 이뇨, 체력증강, 적혈구 생성과 hemoglobin 합성을 증진시키는데 그 뿌리를 약제로 사용해 오고 있다. 또한 청미래덩굴의 항균활성과 항균물질에 대한 연구는 주로 뿌리의 추출물에 대한 연구가 대부분이고 잎에 대해서는 항균활성성분에 대해서만 일부 보고되고 있다(14).

이에 본 연구는 청미래덩굴잎을 기능성 식품의 소재로 이용가능성을 검토할 목적으로 잎의 에탄올추출물로부터 얻은 각각의 분획물에 대한 생리활성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 청미래덩굴잎은 경북 달성군 하빈지역에서 야생하는 청미래덩굴나무에서 2001년 9월에 채취하였다. 채취한 잎은 이물질을 제거하고 물로 깨끗이 씻어 음지에서 물기를 제거한 후 냉동저장(-40°C)하여 실험에 사용하였다.

[†]Corresponding author. E-mail: jrpark@yu.ac.kr
Phone: 82-53-810-2873, Fax: 82-53-810-4666

에탄올 추출물과 분획물 조제

청미래덩굴잎의 ethanol 추출물은 Kim의 방법(8)에 따라 잎 100 g을 취하여 세척한 후 70% ethanol 1 L를 사용하여 homogenizer로 15,000 rpm에서 5분 동안 추출하고 이를 6,000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음 여과자로 여과하였다으며 여액은 회전진공농축기를 사용하여 40°C에서 감압 농축하여 ethanol을 제거하고 동결건조하였다. Chloroform분획은 동결 건조한 에탄올 추출물 분말 20 g에 chloroform 100 mL를 넣고 homogenizer로 10,000 rpm에서 3분간 추출하여 여과하였다. 여액은 회전진공농축기로 40°C에서 농축시킨 다음 질소가스를 사용하여 완전건조시켰다. Chloroform으로 추출하고 남은 잔류물에 위와 동일한 방법으로 ethyl acetate, butanol, methanol을 사용하여 각각의 분획으로 조제하였으며 마지막 잔류물은 물 분획으로 하였다.

전자공여능 측정

추출물과 분획물 시료에 대한 전자공여능은 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)에 대한 환원력으로 측정하였다(15). 즉, 시료 0.2 mL에 4×10^{-4} M의 DPPH 용액 2 mL를 가하고 vortex로 10초간 진탕한 후 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 10분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 전자공여능은 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도를 이용하여 백분율로 나타내었다.

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Gray와 Dugan방법(16)에 의하여 측정하였다. 즉 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL에 일정농도 1 mg, 5 mg, 10 mg의 시료 추출물을 가하고 0.1 N HCl(pH 3.0)을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조정한 다음 총량을 10 mL하였다. 이 용액을 37°C 수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 각 반응액을 1 mL씩 취하여 2% acetic acid 5 mL, Griess 시약 0.4 mL을 가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합물을 실온에서 15분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산량을 측정하였다. 아질산염 소거능은 시료 무첨가시의 흡광도에 대한 시료첨가시의 흡광도 비를 나타내었다.

항균활성 측정

본 실험에 사용한 균주는 Gram(+)균으로 *Listeria monocytogenes* ATCC 7644와 *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, Gram(-)균으로 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895와 *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311을 사용하였다.

사용균주는 nutrient broth 배지로 37°C에서 24시간 3회 계대배양한 것을 사용하였다. 항균력 시험용 평판배지의 조제는 각각의 생육배지로 살균된 기초용 배지를 petri dish에 15 mL씩 분주하여 사용하였으며 사용균주의 수는 $10^5 \sim 10^6$ 개/mL되게 시험균액을 조제한 후 0.1 mL를 취해 기층용배지(nutrient broth에 1.5% agar) 위에 유리봉으로 고르게 편 후 응고시켜 접종평판배지로 사용하였다(17).

추출물의 항균활성은 paper disc method로 측정하였다(18). 각 분획물의 시험용액은 일정농도로 희석한 후 0.2 μm 필터로 여과하여 세균한 후 살균된 여과 paper disc(8 mm, Difco Co., USA)에 100 μL 흡수시킨 다음 용매를 휘발시키고 미리 준비된 균접종평판배지에 밀착시켰다. 배지는 37°C에서 배양한 후 disc 주변의 억제환의 크기로 항균력을 측정하였다(19).

결과 및 고찰

용매별 각 분획의 수율

청미래덩굴잎 ethanol 추출물의 순차용매 분획별 수율은 Table 1과 같다. 70% ethanol 추출물로부터 얻어진 각 용매별 분획의 수율은 극성이 높은 수용성분획과 methanol분획이 각각 63.73%와 26.40%로 가장 높았고 chloroform, ethyl acetate, butanol분획은 7.52%, 1.40%, 0.95% 순으로 낮은 수율을 나타내었다. 이는 극성이 높은 용매에서 높은 수율을 나타내는 일반적인 천연생약재의 추출수율과 잘 일치하고 있다.

전자공여작용

DPPH가 vitamin C와 E 등과 같은 항산화물질에 의해 전자를 받아 비가역적으로 안정한 분자를 형성하여 탈색되는 원리를 이용하여 측정한 청미래덩굴잎의 각 분획별 전자공여능은 Table 2와 같다. 흡광도의 변화를 10분간 측정한 결과 각 분획의 전자공여능은 chloroform분획에서 25.9%로 가장 낮았으며 ethyl acetate분획에서 80.9%로 가장 높게 나타났다. Chloroform분획과 물분획을 제외한 나머지 분획에서는 약 60% 이상의 비교적 높은 전자공여능을 나타내었다. 청미래덩굴잎의 ethyl acetate분획에서 가장 높은 전자공여능을 나타낸 결과는 두충잎(8)의 ethanol 추출물에서 가장 높게 나타난 결과와는 다소 차이를 보여주고 있다. Ethyl acetate 분획에는 일반적으로 phenol성 화합물이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데 이러한 화합물들이 작용하여 전자공여능을 향상시키는 것으로 추정된다.

아질산염 소거작용

대표적인 육제품 탈색제인 아질산염은 염지과정에 사용되어 색을 고정시키는 중요첨가제이며 botulinum균의 독소생성을 억제하는 작용이 있다. 아질산염은 헤모글로빈의 철을 산화하여 메트헤모글로빈을 생성하거나 아민과 결합하여 발암성인 nitrosamine을 생성한다. 청미래덩굴잎의 아질산염

Table 1. Yield of each fraction obtained from ethanol extract of *Smilax china* leaf

Solvent	Yield (%)
Chloroform	7.52
Ethyl acetate	1.40
Butanol	0.95
Methanol	26.40
Water	63.73

Table 2. Electron donating abilities of ethanol extract and fractions from *Smilax china* leaf¹⁾

Fractions	Reaction time (min)					(%)
	0.5	1.0	3.0	5.0	10.0	
Ethanol ex.	28.4±0.2 ²⁾	45.8±0.2	54.9±0.1	60.0±0.2	65.8±0.1	
Chloroform fr.	11.2±0.1	16.7±0.3	20.2±0.2	24.1±0.2	25.9±0.1	
Ethyl acetate fr.	40.5±0.2	53.8±0.2	63.7±0.2	76.9±0.2	80.9±0.2	
Butanol fr.	34.7±0.1	46.3±0.2	59.3±0.4	67.3±0.3	75.0±0.2	
Methanol fr.	27.0±0.2	42.4±0.1	52.0±0.2	56.0±0.2	61.4±0.2	
Water fr.	19.2±0.2	25.0±0.2	32.7±0.2	36.5±0.3	38.5±0.3	

¹⁾Electron donating ability was determined at 0.3% concentration of each fraction.²⁾Mean±SD (n=3).

소거작용은 Table 3과 같이 측정한 분획별 전 농도에서 ethyl acetate분획이 가장 높게 나타났으며 10 mg/mL 첨가시 90% 이상의 소거능을 나타내었다. 또한 butanol분획 역시 ethyl acetate분획과 비슷하게 높은 소거능을 보여주었다. Ethanol 추출물의 경우 10 mg/mL 첨가시 73.5%의 소거능을 나타내었고 다음으로 methanol, water, chloroform분획 순으로 나타났다. 청미래덩굴잎의 아질산염소거능은 두충잎(8)에 비해서는 다소 낮게 나타났지만 대추잎(13)보다는 다소 높은 소거능을 나타내었다.

아질산염 소거능에 영향을 미치는 성분으로는 ascorbic acid, 성분간의 상호작용에 의해 생성되는 melanoidin, 아미노산과 펩타이드, 페놀과 flavonoid화합물 등이 보고(20,21) 되고 있으며 청미래덩굴잎의 아질산염 소거작용은 각 분획에 용해되어 있는 이러한 성분들이 복합적으로 작용한 것으로 추정된다.

Table 3. Nitrite scavenging effect of different fractions obtained from ethanol extract of *Smilax china* leaf at pH 1.2 (%)

Fractions	Concentration (mg/mL)		
	1.0	5.0	10.0
Ethanol ex.	44.9±0.1 ¹⁾	60.2±0.2	73.5±0.1
Chloroform fr.	32.2±0.3	46.2±0.2	54.7±0.2
Ethyl acetate fr.	58.3±0.3	85.1±0.2	91.1±0.2
Butanol fr.	56.1±0.2	82.2±0.2	88.3±0.2
Methanol fr.	42.1±0.2	57.2±0.2	67.6±0.2
Water fr.	40.1±0.2	56.2±0.2	65.2±0.2

¹⁾Mean±SD (n=3).

항균작용

청미래덩굴잎 추출물과 분획물 농도 2.5%와 5.0%에서 식중독균 중, Gram(+)균인 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 2종과 Gram(-)균인 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*에 대한 항균작용을 실험한 결과는 Table 4와 Table 5에 나타낸 바와 같다.

청미래덩굴잎 ethanol 추출물이 Gram(+)균인 *L. monocytogenes*와 *S. aureus*에 대한 억제효과는 매우 뚜렷하게 나타났다. 분획물의 농도 2.5%에서 butanol 분획의 clear zone 이 각각 17 mm와 19 mm로서 억제효과가 가장 높게 나타났고 그 다음으로 methanol분획, ethanol 추출물, water분획 순이었다. Ethyl acetate분획과 chloroform분획의 항균작용은 가장 약한 것으로 나타났으며 Gram(-)균인 *E. coli* O157:H7과 *S. Typhimurium*에 대한 억제효과는 나타나지 않았다. 5.0%의 ethanol 추출물과 ethyl acetate, methanol, water분획을 사용한 경우 Gram(+)균인 *L. monocytogenes*와 *S. aureus*에 대한 억제효과는 2.5%농도보다 증가하였으며 Gram(-)균인 *E. coli* O157:H7과 *S. Typhimurium*에 대한 억제효과가 ethanol, ethyl acetate, water분획에서 낮게 나타났다. 비교군으로 사용한 1% sorbic acid와 비교해 볼 때 5.0%의 butanol분획에서 거의 비슷한 항균효과가 나타나 분획물 중에 Gram(+)균인 *L. monocytogenes*와 *S. aureus* 성장을 강하게 억제하는 물질이 존재한다는 것을 추측할 수 있었다. 반면에 Gram(-)균인 *E. coli* O157:H7과 *S. Typhimurium* 대해서는 항균효과가 매우 미약하거나 거의 없는 것으로 나타났다. 두 충잎(8)과 비하여 Gram(+)균인 *L. monocytogenes*, *S. aureus*

Table 4. Comparison of antimicrobial activity of the ethanol extract and the fractions obtained from the extract of *Smilax china* leaf (mm)

Fractions	Gram (+)		Gram (-)	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella Typhimurium</i>
2.5% Ethanol ex.	12	12	ND ¹⁾	ND
2.5% Chloroform fr.	10	10	ND	ND
2.5% Ethyl acetate fr.	10	10	ND	ND
2.5% Butanol fr.	17	19	ND	ND
2.5% Methanol fr.	14	13	ND	ND
2.5% Water fr.	12	13	ND	ND
1.0% Sorbic acid	25	28	20	18

¹⁾ND: not detected (8 mm).

Table 5. Comparison of antimicrobial activity of the ethanol extract and the fractions obtained from the extract of *Smilax china* leaf (mm)

Fractions	Gram (+)		Gram (-)	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella Typhimurium</i>
5% Ethanol ex.	16	17	10	10
5% Chloroform fr.	12	12	ND ¹⁾	ND
5% Ethyl acetate fr.	12	14	10	10
5% Butanol fr.	21	25	ND	ND
5% Methanol fr.	18	16	10	ND
5% Water fr.	15	17	9	9
1% Sorbic acid	25	28	20	18

¹⁾ND: not detected (8 mm).

항균효과가 강하게 나타났고, Gram(-)균인 *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*에 대한 항균효과는 낮게 나타났다. Kim 등(22)에 의하면 Gram 반응이 식물성 정유성분의 항균작용과 특정한 관계가 있는 것은 아니라고 보고하였다.

한편, 천연식물의 항균작용에 관해서는 오래 전부터 천연보존료에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으며 특히 최근에는 천연식품을 섭취함으로서 식중독과 관련된 항균효과에 대한 연구결과에 의하면 식품 중에 함유되어 있는 페놀성화합물과 유기산이 항균작용에 관여한다고 보고하고 있다(23). 또한 청미래덩굴잎의 항균작용을 나타내는 물질은 특정용매에만 용출되는 것이 아니고 다른 용매에 의해서도 용출되는 것으로 보아 여러 종류의 성분이 복합적으로 작용하는 것으로 추정된다.

요 약

청미래덩굴잎의 ethanol 추출물로부터 얻은 용매별 각 분획물의 전자공여능, 아질산염소거능 그리고 항균활성을 측정한 결과 다음과 같다. 각 용매별 분획의 수율은 극성이 높은 수용성 분획과 methanol분획이 각각 63.73%와 26.40%로 높게 나타났다. 전자공여능은 ethyl acetate 분획에서 가장 높게 나타났으며 10분간 반응시켰을 때 약 81%정도 달했다. 반면 chloroform분획에서는 약 26%로 가장 낮았다. 아질산염소거능은 ethyl acetate와 butanol분획에서 가장 높게 나타났다. 항균활성은 모든 분획의 2.5%와 5.0%의 농도에서 Gram(+)균인 *Listeria monocytogenes*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 항균작용이 나타났으나 2.5% 농도에서는 Gram(-)균인 *Escherichia coli* O157:H7과 *Salmonella Typhimurium*에 대해서는 전혀 활성이 없었으며 5.0% 농도에서는 ethanol 추출물, ethyl acetate와 물분획에서 아주 낮은 활성이 측정되었다.

문 현

- Hong YP, Kim SY, Choi WY. 1986. Post-harvest changes in quality and biochemical components of perilla leaves. *Korean J Food Sci Technol* 18: 255-259.

- Lee KI, Rhee SH, Kim JO, Chung HY, Park KY. 1993. Antimutagenic and antioxidative effects of perilla leaf extracts. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 175-181.
- Kang YH, Park YK, Oh SK, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
- Rhi JW, Shin HS. 1993. Antioxidant effect aqueous extract from green tea. *Korean J Food Sci Technol* 25: 759-763.
- Kim ES, Kim MK. 1999. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of persimmon, green tea and pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean Nutrition Soc* 32: 337-352.
- Chung SH, Moon KD, Kim JK, Seong JH, Sohn TH. 1994. Changes of chemical components in persimmon leaves during growth for processing persimmon leaves tea. *Korean J Food Sci Technol* 26: 141-146.
- Park YJ, Kang MH, Kim JI, Park OJ, Lee MS, Jang HD. 1995. Change of vitamin C and superoxide dismutase (SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *Korean J Food Sci Technol* 27: 281-285.
- Kim JB. 1998. Changes of components during growth and physiological functionality of *Eucommia ulmoides* leaves. *PhD Dissertation*. Yeungnam University, Gyeongsan, Korea.
- Park JC, Kim SH. 1995. Flavonoid analysis from the leaves of *Eucommia ulmoides*. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 901-905.
- Choi MY, Choi EJ, Lee E, Rhim TJ, Cha BC, Park HJ. 1997. Antimicrobial activities of pine needle extract. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 293-297.
- Cho YJ, Chun SS, Choi C. 1993. Inhibitory effect of condensed tannins isolated from Korean green tea against xanthine oxidase. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 418-422.
- An BJ. 1998. Chemical structure and isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from Korean green tea. *J Life Resources and Industry* (Research Institute for Development of Life Resources, Daegu Hanny University) 2: 67-69.
- Jin Q. 1998. Studies on the chemical composition and functional properties of jujuba leaf. *MS Thesis*. Yeungnam University, Gyeongsan, Korea.
- Song JH, Kwon HD, Lee WK, Park IH. 1998. Antimicrobial activity and composition of extract from *Smilax china* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 574-584.
- Kim MJ, Byun MW, Jang MS. 1996. Physiological and antimicrobial activity of bamboo (*Sasa coreana Nakai*) leaves. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 135-142.
- Gray JJ, Dugan Jr LR. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci* 40: 981-982.
- Chung KH, Lee SH, Kim JT. 2001. Antimicrobial activity of omija (*Schizandra chinensis*) extracts. *J Korean Soc Food*

- Sci Nutr* 30: 127-132.
18. Lee BW, Shin DH. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Korean J Food Sci Technol* 23: 200-204.
19. Davidson PM, Parish ME. 1989. Methods for testing the efficiency of food antimicrobials. *Korean J Food Sci Technol* 43: 148-154.
20. Archer MC, Weisman M. 1975. Reaction of nitrite with ascorbate and its relation to nitrosamine formation. *J Nat Cancer Inst* 54: 1203-1205.
21. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibitory of nitrosamine of formation by non-dialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1335.
22. Kim JM, Marshall MR, Weie I. 1995. Antibacterial activity of some essence oil component against five food borne pathogens. *J Agric Food Chem* 43: 2839-2845.
23. Chuyen NV, Kurata T, Kato H, Fujimaki M. 1982. Antimicrobial activity of kumazasa (*Susa albomarginata*). *Agric Biol Chem* 46: 971-978.

(2004년 1월 15일 접수; 2004년 3월 16일 채택)