

김치에서 분리한 *Pediococcus pentosaceus*와 *Lactobacillus brevis*에 대한 녹차 물추출물의 항균 효과

신미경·신용서*

원광대학교 식품영양학과, 원광대학교 농화학과*

Antimicrobial Effect of Water Extract of Green Tea against *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis* Isolated from Kimchi

Mee-Kyung Shin and Yong-Seo Shin*

Dept. of Food and Nutrition, Wonkwang University

*Dept. of Agricultural Chemistry, Wonkwang University

ABSTRACT

In this study, we isolated lactic acid bacteria from kimchi, which were identified as *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis* by using API 50 CHL Kit, some morphological and physiological tests. The water extract of green tea(50, 100, 500, 1000ppm) inhibited the growth of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis* in broth system. Furthermore, their time were prolonged to about 4 hours at 500 to 1000ppm. The leakage amount of intracellular materials and Mg^{++} in tested bacteria cells increased with increasing concentration of green tea water extract.

Key words: *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis*, Antimicrobial effect, Kimchi, Green tea.

I. 서론

김치는 우리나라 고유의 전통 발효식품 중의 하나로 비타민과 무기질이 많아 연중, 특히 겨울철의 중요한 부식이 되어왔다. 김치는 주로 가정에서 담글어 자가공급하였으나, 최근 경제성장에 따른 식생활 패턴 및 주거양식의 변화 그리고 핵가족 현상에

따라 공장김치의 수요가 점차 증가하고 있는 실정에 있다. 그러나 대량생산에 따른 가장 큰 문제점인 유통시의 과숙 또는 산패현상으로 장기보존이 어려우며, 유통기간의 표준화를 이룰 수 없어 이에 대한 연구가 여러 방면에서 진행되어 왔다. 즉, 김치의 선도 유지의 방법으로 방사선처리^{1,2)}, pH 조정제³⁾, 인공 합성 보존제처리⁴⁾, retort pouch 저장⁵⁾, 순간살균법⁶⁾, 통조림 제조법⁷⁾ 및 항균성이 있는 향신료 첨가⁸⁾

등의 연구들이 보고 되고 있으나 안전성, 경제성 및 품질저하 등의 문제점들이 많아 거의 실용화되지 못하고 있다.

한편 녹차에는 다양한 생리활성물질이 함유되어 있으며, 그 중에서도 catechin류는 항돌연변이⁹⁾, 항암작용¹⁰⁾, 항산화작용^{11~14)}, 항균작용^{15~18)}, 중금속 제거효과^{19,20)} 및 혈압강하효과^{21,22)} 등의 여러 가지 기능이 있는 것으로 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 녹차 물추출물이 김치의 천연 보존제로서의 가치가 있는지를 검토하기 위하여, 일차적으로 녹차 물추출물의 김치에서 분리한 젖산균에 대한 항균활성과 그 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

녹차는 시판되고 있는 태평양화학의 설록차 萬壽(1994)를 구입하여 사용하였다.

2. 녹차 물추출물 조제

수직 환류 냉각관이 부착된 삼각플라스크에 녹차와 증류수(1:10, w/v)를 넣고 95℃의 수욕상에서 3시간동안 추출하고 여과하여 진공농축기(Evaporator, Kikakikai Co., Japan)로 농축한 후 동결건조(Freeze dryer, B. Braun, W. Germany)하여 녹차 물추출물로 하였다.²³⁾

3. 김치에서 젖산균의 분리 및 동정

김치 착즙액을 살균된 saline solution(0.85% NaCl)을 이용하여 적정배수로 희석하고 Lactobacilli MRS agar(Difco, U.S.A.)에 도말한 후 37℃에서 48시간 배양한 후에 생성된 colony의 형태적 특징(색깔, 모양, 크기)이 동일한 균주를 선발하여 순수분리 하였다. 분리된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology²⁴⁾와 Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria^{25,26)}의 방법에 준하여 형태적, 생리적 및 생화학적 특성을 조사하였고, 미생물 자동동정 system인 API 50 CHL Kit를 사용하여 49개 당 이용성을 조사, 비교함으로써 동정하였다²³⁾.

4. 녹차 물추출물의 분리된 김치 젖산균에 대한 항균 활성

녹차 물추출물이 분리, 동정된 젖산균의 생육에 미치는 억제효과를 측정하기 위해 Lactobacilli MRS broth(Difco, U.S.A.)에 녹차 물추출물을 10, 50, 100, 500, 1000ppm이 되게 첨가, 살균한 후 시험균을 접종(4%, v/v)하여 37℃에서 48시간 동안 배양하면서 경시적인 균의 생육을 620nm(Spectrophotometer, Varian DMS200)에서 흡광도 측정하였다²³⁾

5. 분리된 김치 젖산균의 세포막 투과성 측정

녹차 물추출물이 김치 젖산균의 세포막 투과성에 미치는 영향을 측정하기 위해 신등^{27,28)}의 방법에 준하여 녹차 물추출물이 첨가된 Lactobacilli MRS broth에 분리된 젖산균을 접종하고 37℃에서 24시간 배양시킨 후 Fig. 1과 같이 배양액을 원심분리(Sorvall Instrument, Dupon, Model RC-5C, 10000×g, 20min, 4℃)하여 균체를 회수 하였다. 회수된 균체를 일정량씩 취하여 0.1M phosphate buffer solution(PBS, pH 7.0)에 resuspension시킨 후 37℃에서 2시간 방치 다시 원심분리(10000×g, 20min, 4℃)하여 상등액을 얻었다. 이때 세포막의 투과성은 상등액을 260nm에서 비색정량하여 세

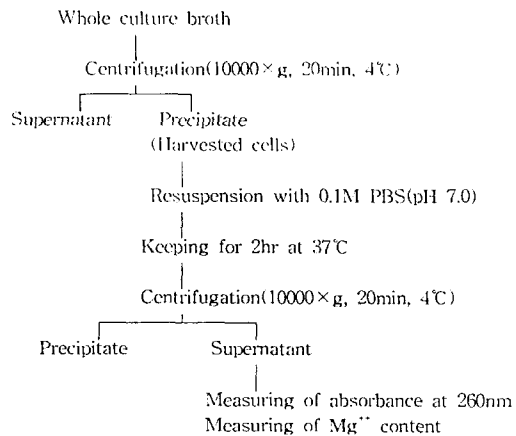


Fig. 1. Flow sheet for evaluation of cellular permeability.

Table 1. Conditions for atomic absorption spectrophotometer

Lamp current	3.5(mA)
Wavelength	228.8(nm)
Spectral band pass	0.5(nm)
Optimum working range	0.5~2.0(μ m/ml)
Fuel	acetylene
Support	air
Flame stoichiometry	oxidizing

포박으로 누출된 세포질 성분의 양과 Atomic absorption spectrophotometer (AAS, Varian spectra AA 30/40)를 이용하여 누출된 Mg^{++} 함량을 측정하여 평가하였다. 이때 AAS의 분석조건은 Table 1과 같다.

III. 결과 및 고찰

1. 김치젖산균의 분리 및 동정

숙성된 김치에서 분리된 균주의 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 균주 I은 Gram양성의 구균으로 catalase와 oxidase가 음성이며 arginine으로 부터 NH_3 을 생성하였고 25 $^{\circ}C$ 에서 가장 잘 생육하였다. 균주 II는 Gram양성의 간균으로 catalase와 oxidase가 음성이었으며 arginine으로 부터 NH_3 을 생성하였고, 생육 최적온도

Table 2. Morphological and physiological characteristics of isolated putrefactive strains from boiled rice.

Characteristics	Strain I	Strain II
* Morphological test		
Shape	cocci	rod
Gram stain	+	+
* Physiological test		
production catalase	-	-
production oxidase	-	-
NH_3 from arginine	+	+
Temperature sensitivity		
25 $^{\circ}C$	+++	+++
35 $^{\circ}C$	++	+
45 $^{\circ}C$	+	-

+: Positive, -: Negative

Table 3. Carbohydrate fermentation of isolated lactic acid bacteria from kimchi

	Strain I	Strain II
Glycerol	-	-
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	+	+
Ribose	+	+
D-Xylose	+	+
L-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
β -Methyl-xyloside	-	-
Galactose	+	+
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannose	+	+
L-Sorbose	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
α -Methyl-D-mannoside	-	-
α -Methyl-D-glucoside	+	-
N Acetylglucosamine	+	+
Amygdaline	+	-
Arbutine	+	+
Esculine	+	+
Salicine	+	+
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	-	+
Melibiose	+	+
Saccharose	+	+
Trehalose	+	+
Inuline	-	-
Melezitose	-	-
D-Raffinose	+	+
Amidon	-	-
Glycogene	-	-
Xylitol	-	-
β -Gentiobiose	+	+
D-Turanose	-	-
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	+	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-

Table 3. Continued

	Strain I	Strain II
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
Gluconate	-	+
2 ceto-gluconate	-	-
5 ceto-gluconate	-	+

+: Fermented, -: Not fermented

는 25℃이었으나 45℃에서는 생육하지 못하였다. 또한 균주 I과 II의 API 50 CHL Kit를 이용한 49개 당 이용성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 즉 API 50 CHL Kit의 Identification table의 type strain과 비교할 때 균주 I은 49개 당 이용성이 *Pediococcus pentosaceus*와 일치하는 것으로 나타났으며, 균주 II는 *Lactobacillus brevis*와 amygdaline 음성 및 5 ceto-gluconate 양성인 점에서 차이가 있었을 뿐 나머지 47개 당 이용성은 동일한 것으로 나타났다. 이상의 형태학적, 생리학적 특성과 API 50 CHL Kit와의 당 이용성의 결과를 비교 검토하여 균주 I, II는 각각 *Pediococcus pentosaceus* 및 *Lactobacillus brevis*로 동정되었다.

2. 녹차물추출물의 *Pediococcus pentosaceus* 및 *Lactobacillus brevis*에 대한 항균활성

녹차가 김치의 천연보존제로서 가치가 있는지를 평가하기 위해 *Pediococcus pentosaceus*와 *Lactobacillus brevis*로 동정된 김치 젖산균에 대한 녹차 물추출물의 항균활성을 broth system에서 측정한 결과는 Fig. 2 및 3과 같다. 즉 녹차 물추출물의 첨가(50, 100, 500, 1000ppm)로 *Pediococcus pentosaceus* 및 *Lactobacillus brevis*의 생육이 억제되었으며 첨가농도가 높을수록 항균활성이 증가하였다. 특히 500, 1000ppm 첨가시에는 시험균 2종의 유도기가 약 4시간 연장되어 그 항균효과가 뛰어났으며 *Pediococcus pentosaceus* 보다는 *Lactobacillus brevis*에 대해 항활성이 더 높게 나타났다. 梶本^{11,12)}은 녹차성분 중 항균작용을 나타내는 성분은 catechin류로 알코올이나 물에 추출된다고 보고하였으며, Okuda등¹⁷⁾과 Namba등¹⁸⁾은 천연물에서 분리한 catechin류와 같은 phenol성 화합물이 각종 세균, 효모의 생육억

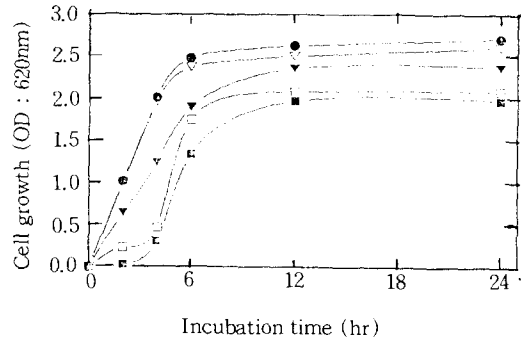


Fig. 2. Inhibitory effect of green tea water extract on the growth of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Kimchi

●-: Control, ▽-: 50 ppm
 ▼-: 100ppm □-: 500ppm
 ■-: 1000ppm

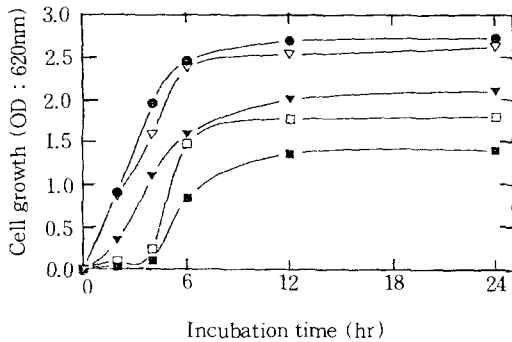


Fig. 3. Inhibitory effect of green tea water extract on the growth of *Lactobacillus brevis* isolated from Kimchi

●-: Control, ▽-: 50 ppm
 ▼-: 100ppm □-: 500ppm
 ■-: 1000ppm

제활성 및 효소저해활성이 있음을 보고하여 녹차중에 존재하는 catechin류가 균의 생육을 억제 하였을 것으로 사료된다.

3. *Pediococcus pentosaceus* 및 *Lactobacillus brevis*의 세포막 투과성 변화

녹차 물추출물이 첨가된 broth 에서 시험균의 생육억제는 농도구배에 의해 세포질내로 이동된 녹차

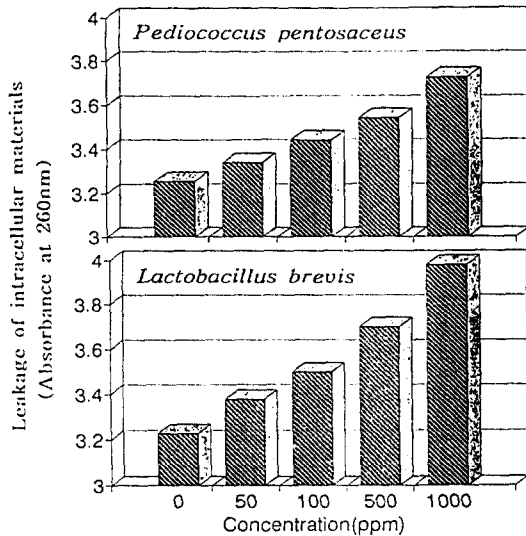


Fig. 4. Effect of green tea water extract on the cellular permeability of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis* isolated from Kimchi.

Cellular permeability expressed as amount of UV-absorbing materials by reading A_{260nm} with spectrophotometer.

Each value is the mean of three trials.

성분중의 catechin류가 시험균의 대사과정 중의 효소들을 저해하여 나타날수도 있으나 일차적으로는 녹차 물추출물과 직접 접촉되는 세포막에 영향을 줄 것으로 사료되어 세포막 투과성을 측정하였으며 그 결과는 Fig. 4 및 Table 3과 같다. 이때 막투과성은 시험균을 녹차 물추출물에 노출시킨 후 균체를 회수하여 0.1M PBS에서 용출된 세포질 성분량과 Mg^{++} 량으로 측정하였다.

Pediococcus pentosaceus 및 *Lactobacillus brevis* 모두 같은 경향으로 용출된 세포질 성분과 Mg^{++} 은 녹차물추출물 첨가 농도가 증가할 수록 많아졌으며, 두 균종간에는 항균활성(Fig. 2, 3)이 더 높게 나타난 *Lactobacillus brevis*가 *Pediococcus pentosaceus*보다 용출량이 많았다. 이는 시험균의 세포막에 있는 여러가지 막수송단백질인 permease가 녹차의 catechin류 등에 의해 그 활성이 저해됨으로써 세포막의 선택적 투과성 기작이 억제 되었거나 파괴

Table 4. Effect of green tea water extract on the leakage of intracellular Mg^{++} in *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis* isolated from Kimchi

Concentration (ppm)	Leakage of intracellular Mg^{++} (ppm)	
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
0	1.933	2.036
50	1.952	2.320
100	1.973	2.647
500	2.061	2.687
1000	2.103	2.819

Each value is the mean of three trials.

되어 삼투압에 의해 세포질 성분 또는 Mg^{++} 이 균체보다 상대적으로 농도가 낮은 0.1M PBS로 유출되는 것으로 사료된다. 일반적으로 catechin류의 phenolic 수산기가 효소단백질의 아미드결합 부위와 수소결합을 함으로써 효소단백질-catechin복합체의 침전물을 형성하여 각종 효소를 저해하는 것으로 보고²⁹⁾하고 있다.

IV. 요약

김치의 천연보존제로 녹차의 가치를 평가하기 위해 김치로부터 젖산균을 분리 동정하고 broth system에서 분리균에 대한 녹차 물추출물의 항균활성과 그 특성을 조사하였다. 김치에서 분리된 균은 형태학적, 생리학적 특성 및 API 50 CHL Kit에 의한 당이용성을 비교 검토한 결과 *Pediococcus pentosaceus*와 *Lactobacillus brevis*로 동정되었다. 분리, 동정된 시험균은 녹차 물추출물에 의해 그 생육이 억제 되었으며, 특히 500, 1000ppm 첨가농도에서는 유도기가 약 4시간 연장되는 뛰어난 억제효과를 나타내었다. 시험균의 세포질성분과 Mg^{++} 의 유출량은 첨가농도가 높을수록 증가하는 것으로 나타나 녹차 물추출물이 시험균의 세포막투과성 기작에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

V. 참고문헌

1. 이희성, 이근배: 방사선을 이용한 김치 저장에 관한 연구, 원자력논문집, 5(1):64, 1965.
2. 차보숙, 김우정, 변명우, 권중호, 조한옥: 김치의 저장성 연장을 위한 gamma선 조사, 한국 식품과학회지, 21(1):109, 1989.
3. 김순농: 김치숙성에 미치는 pH조정제의 영향, 한국영양식량학회지, 14(3):259, 1985.
4. 송석훈, 조재선, 김권: 김치 보존에 관한 연구 (김치 발효에 미치는 방부제의 영향에 관하여), 기술연구보고서, 5, 1966.
5. 변유량, 신승규, 김주봉, 조은경: Retort pouch 김치의 전열 특성과 살균조건에 관한 연구, 한국식품과학회지, 15(4):414, 1983.
6. 이남진: 김치의 순간살균에 관한 기초연구, 서울대학교 대학원 석사학위논문, 1981.
7. 이춘영, 김호식, 전재근: 김치 통조림 제조에 관한 연구, 한국농화학회지, 10 : 33, 1968.
8. 윤석인, 박길동, 김영찬, 임영희, 이철: 산초추출물을 첨가한 김치류의 보존연장방법, 특허 공보 제1766호, 1990.
9. Cheng, S. J., Gao, Y. N., Ho, C. T., and Wang, Z. Y.: Studies on antimutagenicity and anticarcinogenicity of green tea antioxidant, 食品科學과 産業, 22(1) : 13, 1989.
10. Hara, Y., Matsuzaki, S., and Nakamura, K.: Anti-tumor activity of tea catechin, 日本營養食糧學會誌, 42(1) : 39, 1989.
11. 梶本五郎: 茶葉中の抗酸化成分および抗菌成分について(第1報), 茶葉より得たアルコールに抽出物および水抽出物の抗酸化性および抗菌性について, 日本食品工業學會誌, 10(1):1, 1963.
12. 梶本五郎: 茶葉中の抗酸化成分および抗菌成分について(第2報), ペンバクロトグラフィによる抗酸化成分および抗菌成分の檢索, 日本食品工業學會誌, 10(1):7, 1963.
13. 松崎妙子, 原征彦: 茶葉カテキン類の抗酸化作用について, 日本農藝化學會誌, 59(2):129, 1985.
14. 이주원, 신효선: 녹차추출물의 항산화 효과, 한국식품과학회지, 25(6):759, 1993.
15. 原征彦, 石上正: 茶ポリフェノール類の食中毒細菌に對する 抗菌活性, 日本食品工業學會誌, 36(12):996, 1989.
16. 原征彦, 渡邊眞由美: 茶ポリフェノール類のボツリヌス菌に對する 抗菌作用, 日本食品工業學會誌, 36(12):951, 1989.
17. Okuda, T., Yoshida, T. and Ashida, M.: Tannins of medicinal plants and drugs, Hetero- cycles, 16:1618, 1981.
18. Namba, T., Tsunozuka, Y., Nunoms, S., Takeda, T., Kakiuchi, Y. Z., Kobayashi, K., Takagi, S. and Hattori, M.: Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines(part IV). Screening of crude drugs for anti-plague action and effect of artemisia capillaris pikes on adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface and synthesis of glucan by glucosyltransferase, Shoyakugaku Zasshi, 38(3):253, 1984.
19. 최성인, 이정희, 이서래: 막투과법에 의한 녹차 음료의 카드뮴 및 제거효과, 한국식품과학회지, 26(6):740, 1994.
20. 최성인, 이정희, 이서래: 동물실험에 의한 녹차 음료의 카드뮴 및 납 제거효과, 한국식품과학회지, 26(6):745, 1994.
21. 조영재, 안봉전, 최청: 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해효과, 한국식품과학회지, 25(3):238, 1993.
22. Hara, Y. S. and Tono-Oka, F.: Hypotensive effect of tea catechins on blood pressure of rats, 日本營養食糧學會誌, 43(3):345, 1990.
23. 노현정, 신용서, 이갑상, 신미경: 쌀밥 부패미생물에 대한 녹차추출물의 항균활성, 한국식품과학회지, 투고중, 1995.
24. Peter, H. A. S., Nicholas, S. M., Sharpe, M.

- E., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, p. 1105, U.S.A, 1986.
25. Macfaddin, J. F.: Biochemical Tests for Identification of Medicial Bacteria, 2nd ed, Williams & Wilkins, 1105, U.S.A, 1984.
26. Christine, L. C. and Johnson T. R.: Laboratory Experiments in Microbiology, The Benjamin/Cummings publishing Company Inc., California, U.S.A, 1984.
27. 신용서, 김성효, 이갑상: 혐기적 산성조건하에서 젖산균의 생존과 그특성. 한국산업미생물학회지, 23(4):373, 1995.
28. 신용서, 김성효, 김동환, 이갑상: 혐기적 조건하에서 젖산균의 cadmium축적, 한국산업미생물학 회지, 23(3) : 352, 1995.
29. Funayama, S. and Hikono, H.: Hypotensive principles of Diospyros Kaki Leaves, Chem. Pharm. Bull., 27(1):286, 1979.