

## 감잎 추출물의 유산균 생육 및 항산화 효과에 관한 연구

우준영 · 백남수\* · †김영만

한경대학교 식품생물공학과 및 식품생물 산업연구소, \*(주) 메디오젠

### Studies on Antioxidative Effect and Lactic Acid Bacteria Growth of Persimmon Leaf Extracts

Jun-Young Woo, Nam-Soo Paek\* and †Young-Man Kim

Dept. of Food Science & Biotechnology, Food Science & Biotechnology Research Center, Hankyong National University

\*Mediogen, Co. Ltd, Seoul 133-111, Korea

#### Abstract

This study was investigated the growth effect of persimmon leaf extracts on various Lactic acid bacteria, the effect as freeze-dry cryoprotectan, by the changes of vitamin C content, electron donating ability, total cell count and SOD-like activity. The total cell count of *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530 and *L. casei* MG311 in the absence of persimmon leaf extracts(10%) at 37°C after 48hr were  $3.2 \times 10^9$ cfu/mL,  $2.9 \times 10^9$ cfu/mL,  $1.1 \times 10^9$ cfu/mL,  $1.6 \times 10^9$ cfu/mL and  $3 \times 10^9$  cfu/mL, respectively, and pH and total acidity of those were 3.82~3.88, and 1.697~1.842.

On the other hand, the total cell count of *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530 and *L. casei* MG311 in the presence of persimmon leaf extracts at 37°C after 48hr were  $4.4 \times 10^9$ cfu/mL,  $4.3 \times 10^9$ cfu/mL,  $2 \times 10^9$ cfu/mL,  $3.3 \times 10^9$ cfu/mL, and  $3.4 \times 10^9$ cfu/mL, respectively, and pH and total acidity of those were 3.74~3.82 and 1.528~1.805.

The total cell counter of lactic acid bacteria in the presence of persimmon leaf extracts(10%) at 37°C after 48hr higher than those in the absence of persimmon leaf extracts.

In freeze-dry chryoprotectan, the survival rate of *L. acidophilus* MG501 decreased about 30%. In case of *L. brevis* MG19 and *L. bulgaricus* MG515, the survival rate decreased about 10%. However, the survival rate of *L. lactis* MG530 increased about 10% and *L. casei* MG311 showed the almost same effect.

The changes of vitamin C content were the highest in *L. lactis* MG530(190.26mg/mL) and the lowest in *L. acidophilus* MG501(56.05 mg/mL). The electron donating ability indicated to *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530 and *L. casei* MG311 added by 10% persimmon leaf extracts, respectively. when 10% persimmon leaf extracts were added *L. brevis* MG19, the electron donating ability is the highest of all lactic acid bacteria. The SOD-like activity of *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530 and *L. casei* MG311 showed lower than that of control.

Key words: lactic acid bacteria, persimmon leaf extracts, antioxidative effect, DPPH, SOD

† Corresponding author : Young-Man Kim, Department of Food Science & Biotechnology and Food Science & Biotechnology Research Center, Hankyong National University, 67 Seokjeong-dong, Ansong, Kyonggi-do 456-746, Korea.

Tel: +82-31-670-5150, Fax : +82-31-677-0990, E-mail: kimagi@hanmail.net

## 서 론

차는 좋은 영양 및 약리 성분을 함유하고 있을 뿐만 아니라 기호성이 뛰어나 오랜 음용의 역사와 함께 문화생활의 한 부분으로 자리 매김되어져 왔으며 강심, 피로 회복, 두통 치유, 주독 해독, 동맥경화 예방, 항암 작용, 이노작용, 고혈압 혈당 저하 작용, 혈중 지질 농도의 감소 효과 등에 대한 약리효과가 있으며, 인체에 대한 질병 예방이나 치료를 위한 기능성 음료는 물론 일상 음료로써도 그 역할이 크다<sup>1)</sup>.

감은 우리나라에서 그 재배면적으로나 생산량으로 볼 때 최근 다소 감소 추세에 있기는 하나 매우 중요한 위치를 차지하고 있는 과실의 하나로서 오래 전부터 자생하므로 재배에 큰 어려움 없이 생산 농가의 소득 증대에 일조하고 있는 작목의 하나이다<sup>2)</sup>.

감나무(*Diospyrus kaki*)는 우리나라 중부 이남에서 잘 자라는 과실수 중의 하나로 열매인 감은 독특한 맛을 가진 과실로서 이용되고 감나무 잎은 감잎차의 원료로서 오래전부터 민간에서 이용되고 있다. 생활수준의 향상에 따른 건강에 대한 관심은 건강식품 특히, 건강차에 대한 수요를 증가시키고 있으며 옛날부터 건강차로 여겨져 음용하여 온 감잎차에 대한 관심과 수요도 늘고 있다. 감 및 잎의 이용은 꽃감, 수정과, 감식초, 감잎차 등의 가공품이 있으며 특히 감꼭지는 말 꼭질을 막아주고 감잎은 혈압을 내려주는 약리작용과 효능은 동의보감과 본초강목 등의 여러 고문헌에 잘 나타나 있지만 감잎 성분과 그 효과에 관한 연구는 최근에 이루어지고 있다.

감잎에 대한 국내외의 연구동향은 감잎의 성분, 감잎차의 제조방법, 향기성분, 조리방법에 따른 vitamin C의 변화, 특별한 생리적 기능을 갖는 생리활성 물질에 관한 연구 등이 있다<sup>3,4)</sup>. 최근 국민 식생활이 고급화됨에 따라 건강을 중시하는 소비자가 급증하면서 약품이 아닌 식품으로서 맛보다는 인체의 조절기능에 초점을 맞춘 이른바 고 기능성 식품을 요구하고 있는 실정이다. 한편 유산균은 장내 정상 세균총의 유지, 부패세균에 의해서 발생된 독성물질의 분해, 항암효과, 유당분해, 면역증강작용 및 혈중 콜레스테롤의 저하 등의 기능을 가지고 있으며 발효유 제조에 관여하는 유산균들은 다양한 영양요구성을 가지면서, 균종에 따라 여러 가지 vitamin과 무기물, 핵산류 및 질소원으로서 아미노산이나 peptide 성분을 요구한다<sup>5)</sup>. 이에 관한 연구들로는 채소 추출물의 첨가가 유산균의 생육을 촉진시켰다는 보고가<sup>6,7)</sup> 있었으며, 토마토 즙의 첨가가 유산균의 생육을 촉진한다고 보고 되었다<sup>8)</sup>. 또한

인삼, 영지 추출물, 구기자 추출물, 솔잎즙의 첨가가 유산균의 생육을 촉진한다고 볼 수 있었다<sup>9~11)</sup>.

따라서 발효식품 제조에서 중요한 유산균들의 생육과 제품의 품질에 영향을 미치는 새로운 기능성 소재들의 개발은 매우 의미 있는 연구로 사료된다. 감은 다른 과실과는 달리 독특한 떫은맛을 갖고 있으며 그 성분은 탄닌류로서 Gallic acid, Catechins, Tannin acid, Leucoanthocyanin 등을 함유하고 있고 항산화작용이 있음이 알려져 있으며 감잎에는 플라보노이드 배당체, 탄닌, 페놀류, 수지, 카쿠민류 화합물, 환원당, 다당, 정유, 유기산, 엽록소를 함유하며<sup>2)</sup> 특히, 감잎에는 다른 과실 및 차류에 비해 vitamin C의 함량이 높으며 감잎 성분 중 polyphenol 물질이 특별한 생리적 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>.

Uchida 등<sup>13)</sup>은 축합형 탄닌이 활성탄소의 free radical 억제 효과가 있다고 보고하였다. 이 밖에 감잎 플라보노이드의 항산화 활성<sup>14~16)</sup>, 항암효과<sup>17,18)</sup> 및 생리활성물질의 효소 저해 효과<sup>19,20)</sup> 등 많은 보고가 있다. 감잎에서 분리된 flavonoids는 angiotensin-converting enzyme 활성에 저해작용을 갖고 있으며<sup>21)</sup> 감잎의 hexane 분획은 *Salmonella typhimurium* TA100을 이용한 실험에서 항변이원성<sup>22)</sup>을 갖고 있는 것으로 확인되었다.

미생물의 장기보존을 위한 동결건조(Freeze-drying, Lyophilization)는 미생물 균체를 냉동 건조시킴으로서 저장하는 방법을 의미하며<sup>23)</sup>, 대부분의 미생물을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법으로 알려지고 있다<sup>24)</sup>. 동결건조를 최초로 생물체에 적용한 사람은 Shackell(1909)이며, bacteria를 최초로 동결건조한 사람은 Hammer(1911)이다. 낙농공업에서 젖산균 냉동건조 연구는 1950년대 이후에 활발하였다. 동결건조의 장점은 장기간 안정하게 균체를 보존할 수 있고, 다른 미생물이나 환경에 의한 오염을 방지할 수 있으며, 계대 횟수를 줄여주고 좁은 저장공간, 수송, 경제적인 점 등이다. 유산균은 spray dry, 상압건조 등의 일반건조방법으로는 생균체로서 건조할 수 없다. 그러므로 유산균의 활성을 유지하면서 장기 보존할 수 있는 동결건조 방법을 연구하였다. 그러나 동결건조시에 미생물 균체의 손상을 받아 활성과 생존율에 많은 영향을 미치게 되므로 미생물 균체의 생존율을 최대한 높일 수 있는 방법이 요구된다. 동결건조 중 미생물 균체의 생존율은 많은 요인에 의해 영향을 받는데 세균의 종류, 배양 시간, 배양배지, 동결건조 기계, 동결건조 시간, 동결건조 조건, 수분함량, 동결건조시 사용하는 보호제의 종류 등 그 요인은 다양하다.

보호제(cryoprotectant agent)는 동결 및 건조시 생존율에 미치는 가장 중요한 인자이지만 보호제의 역할은 미생물의 종류, 동결조건, 건조 정도 등에 따라 다르며 미생물에 따라선 보호제가 미생물의 생존율에 악영향을 미치는 경우도 있다고 보고하였다<sup>25)</sup>. 보호제에는 저분자물질(아미노산, 유기산)과 고분자물질(다당류, 중합체)이 있다. 전자가 직접적인 보호효과를 발휘하며 보통 저분자물질과 고분자물질을 혼합하여 사용하면 좋다고 알려져 있다. 젖산균의 동결건조시 표준 보호제로서 많은 사람들이 탈지유를 사용하였으며 glutamic acid와 당 알콜, adonitol도 효과가 있다고 보고하였다<sup>26,27)</sup>.

본 연구에서는 유산균 배양시 감잎 추출물을 첨가하여 유산균수와 pH 및 산도에 변화를 조사하였다. 또한 유산균 배양시 감잎 추출물을 첨가하여 항산화 효과와 vitamin C 함량에 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용시료

본 연구에 사용한 감잎(persimmon leaf ; *Diospyros kaki* Thunberg)은 경남 하동군 화개농협에서 제공받아 감잎의 품질변화를 최소화시키기 위해 냉장고(4℃)에 보관하면서 감잎 추출물의 원료로서 사용하였다.

### 2. 사용균주 및 보존

본 연구에 사용된 균주는 (주) 메디오젠에서 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311을 분양받아 MRS agar 배지(Difco, Maryland, USA)에 stab culture 하여 4℃에서 냉장 보관하면서 2주마다 계대하여 사용하였다. 또한 장기보존을 하기 위해서 멸균된 20% (W/V) glycerol(Shinyo Chem. Japan)에 배양액을 현탁하여 -70℃의 deep freezer(Operon-128c, Korea)에 보관하며 사용하였다.

### 3. 사용배지

유산균 증식용 배지는 MRS 배지<sup>28)</sup>(Difco, Maryland, USA)를 사용하였고, 생균수 측정용 배지로는 glucose 함량을 1%로 높인 BCP plate count agar(Eiken chemical, Japan)를 사용하였고, 희석수로는 0.9% 생리식염수를 사용하였다.

### 4. 감잎 추출방법

시료 30 g에 증류수 1L을 넣어 항온수조(water bath)

에서 70℃로 10분간 중탕 처리하여 1차 추출물을 얻었으며, 2차 추출물은 1차 추출물에서 남은 시료를 다시 증류수 1L을 넣어 항온수조에서 70℃로 10분간 중탕 처리하여 얻었다. 이들 1차 추출물과 2차 추출물을 혼합하고 여과지(Whatman No. 2)로 걸러서 얻어진 것을 갈색 병에 보관하면서 동결건조 보호제 및 유산균 생육에 첨가제로 사용하였으며, 항산화 효과 측정에 사용하였다. 시료보관은 냉암소인 냉장고(4℃)에서 보관하여 사용하였다.

### 5. 유산균의 생육조건

MRS broth에서 37℃로 72시간 정치배양하면서 생육시간에 따른 생균수를 측정하기 위하여 배양 12시간 별로 pH, 산도 및 생균수를 조사하였다.

pH meter(Istec720P, Korea)를 이용하여 pH 측정을 하였고, 생균수 측정은 생성된 집락수를 계측하고, 그 평균 집락수에 희석배수를 곱하여 배양액 mL당 생균수를 산출하였다<sup>29)</sup>.

### 6. 산도 측정

시료 10 mL에 동량의 증류수를 가하여 1% phenolphthalein alcohol 0.5 mL를 가한 후 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 엷은 홍색이 30초간 유지되는 시점에서의 소비량을 측정하여 다음 식에 의해 총산을 적정하여, 그 적정값을 lactic acid 함량(%)으로 환산하여 표시하였다.

$$\text{Total activity(\%)} = \frac{0.1\text{N NaOH(mL)} \times f \times 0.9}{\text{시료의 중량}} \\ (f=0.1\text{N NaOH의 factor})$$

### 7. 감잎 추출물 첨가에 따른 유산균의 생육조건

MRS broth에 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311을 5%씩 접종하고 감잎 추출물을 배양액에 10%씩 첨가하여 37℃로 72시간 정치배양하면서 생육시간에 따른 생균수를 측정하기 위하여 배양 12시간 별로 pH 측정 및 생균수를 조사하였다. pH meter(Istec720P, Korea)를 이용하여 pH 측정을 하였고, 생균수 측정은 생성된 집락수를 계측하고 그 평균 집락수에 희석배수를 곱하여 배양액 mL당 생균수를 산출하였다. MRS broth에 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MGT9, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311을 5%씩 접종하고 감잎 추출물을 배양액에 0%, 5%, 10%, 15%, 20%씩 첨가하여 37℃에서 48시간 정치배양하면서 생균수

를 조사하였다.

**8. 동결건조 보호제 성분으로서의 감잎 추출물 효과**

MRS broth에 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311 을 5%씩 접종하여 배양한 것과 감잎 추출물 10%를 첨가한 배양액을 원심분리(1000×g/15min)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 skim milk 10%, sucrose 5%로 구성된 기본 보호제 조성물을 첨가하여 균질화 한 후 -40℃로 동결시킨 다음 동결건조기에서 건조하였다. 건조된 균체는 분쇄하여 분말화 시킨 다음 멸균 생리식염수에 단계 희석하여 BCP배지에 도말한 후 37℃에서 48시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 동결 건조 후의 생존율을 측정하였다.

**9. 가혹조건에서의 동결건조균 원료의 경시변화**

동결 건조한 균 원료를 vial에 넣고 온도 37℃, 습도 70%를 유지하는 항온항습기(SE-96HP)에서 1개월간 방치시킨 후 시료를 채취하여 멸균 생리식염수에 단계 희석하여 BCP 배지에 도말한 후 37℃에서 48시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 가혹조건에서의 생존율을 측정하였다.

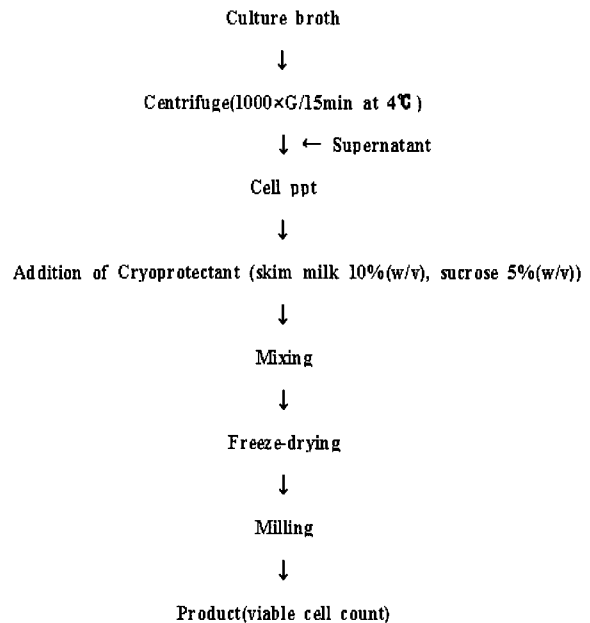
**10. 유산균 배양시 감잎 추출물 첨가에 따른 Vitamin C 함량 변화**

MRS broth에 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311 에 감잎 추출물 10%를 첨가한 배양액(1,000×g)에서 15분간 원심분리한 상정액을 0.45 μ membrane filter (ADVANTEL TOYO, Japan)로 여과한 후 사용하였다. 감잎의 총 vitamin C의 양을 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP법)<sup>30)</sup>에 의해 측정하였으며, 감잎 추출물의 경우는 추출액 중의 일부를 5% meta-phosphoric acid로 희석한 후 총 vitamin C의 양을 측정하였다.

**11. 유산균 배양시 감잎 추출물 첨가에 따른 항산화 효과**

**1) 전자공여능 측정**

전자공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois 방법<sup>31)</sup>을 응용하여 각 시료의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 전자공여능을 측정하였다. 시험관에 0.15M DPPH 용액 4 mL와 시료 0.4 mL을 넣고 잘 혼합한 후 실온에서 30분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 따로 공시험을 하여 대조구의



**Fig. 1. Procedure of freeze-drying for lactic acid bacteria.**

흡광도를 같은 조건에서 측정하였다. 이들 측정값을 다음 식에 대입하여 DPPH radical 소거활성을 계산하였다.

$$EDA(\%) = 1 - \frac{SA}{CA} \times 100$$

SA : sample absorbance  
CA : control absorbance

**2) SOD 유사활성**

Superoxide 라디칼( $\cdot O_2^-$ ) 소거활성은 Iio 등<sup>32)</sup>의 방법에 따라 xanthine-xanthine oxidase cytochrome C 환원법으로 측정하였다. 즉, 시료 0.2 mL, 50mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  완충용액 (pH 7.8) 1.2 mL, 1 mM xanthine 0.2 mL와 0.05 mM cytochrome C 0.2 mL를 혼합하였다.

여기에 550 nm에서 분당 흡광도의 변화가 0.02가 되도록 희석한 xanthine oxidase 0.2 mL를 가하여 3분간의 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 superoxide anion의 소거능은 아래의 식으로부터 구하였다.

Superoxide anion scavenging activity =

$$\left(1 - \frac{Abs}{Abc}\right) \times 100$$

Abc : Absorbance of control at 550 nm

Abs : Absorbance after sample treatment at 550 nm

## 결과 및 고찰

### 1. 유산균의 생육조건

MRS broth에서 생육곡선을 조사한 결과는 Fig. 2 및 3에 나타내었다. *L. acidophilus* MG501 24시간 배양에  $1.4 \times 10^9$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $3.2 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.82이며 산도는 1.832를 나타내었다. 48시간 이후에 균수는 감소하였으며 pH는 낮아지고 산도는 높아짐을 알 수 있었다.

*L. brevis* MG19는 배양 24시간에  $1.5 \times 10^9$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $2.9 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.83이며 산도는 1.842를 나타

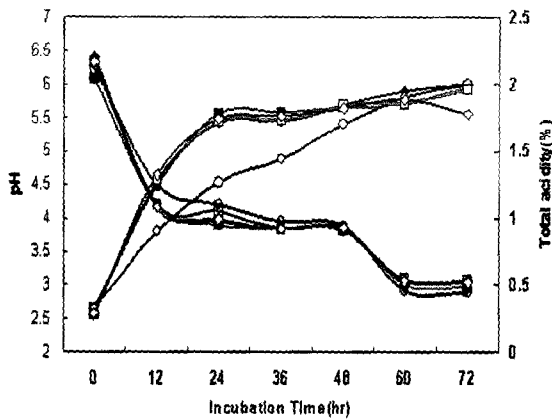


Fig. 2. Growth curve of pH total acidity in MRS broth. *L. acidophilus* MG501(-■-), *L. brevis* MG19(-◆-), *L. bulgaricus* MG515(-○-), *L. lactis* MG530(-□-), *L. casei* MG311(-◇-).

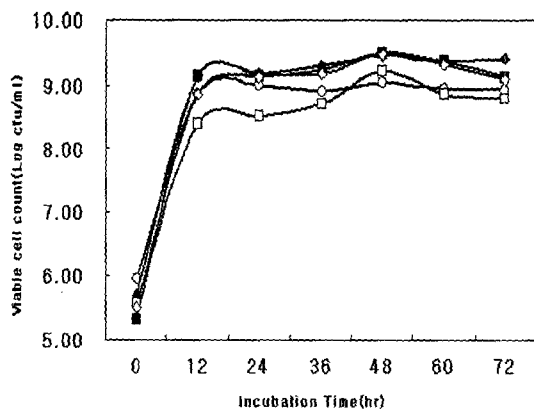


Fig. 3. Growth curve of viable cell count in MRS broth. *L. acidophilus* MG501(-■-), *L. brevis* MG19(-◆-), *L. bulgaricus* MG515(-○-), *L. lactis* MG530(-□-), *L. casei* MG311(-◇-).

내었다. 그 후 균수가 감소하였으며 pH는 3.06까지 떨어지고 산도는 계속하여 증가하였다.

*L. bulgaricus* MG515는 배양 24시간에  $9.7 \times 10^8$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $1.1 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.88이며 산도는 1.697을 나타내었다. 그 후 균수가 감소하였으며 pH는 2.90까지 떨어지고 산도는 계속하여 증가하였다.

*L. lactis* MG530는 배양 24시간에  $3.2 \times 10^8$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $1.6 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.85이며 산도는 1.840을 나타내었다. 그 후 균수가 감소하였으며 pH는 3.07까지 떨어지고 산도는 계속하여 증가하였다.

*L. casei* MG311는 배양 24시간에  $7.2 \times 10^8$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $3 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.86이며 산도는 1.823을 나타내었다. 그 후 균수가 감소하였으며 pH는 3.05까지 떨어지고 산도의 차이는 거의 보이지 않았다.

### 2. 감잎 추출물 첨가에 따른 유산균의 생육조건

*L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311의 고형분 함량 4.83 mg/g인 감잎 추출물 10%를 첨가한 배지에서의 생육곡선을 조사한 결과를 Fig. 4 및 5에 나타내었다. *L. acidophilus* MG501 24시간 배양에  $2.9 \times 10^9$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $4.4 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.74이며 산도는 1.645를 나타내었다. 48시간 이후에 균수는 감소하였으며 pH는 낮아지고 산도는 큰 차이가 없었음을 알 수 있었다.

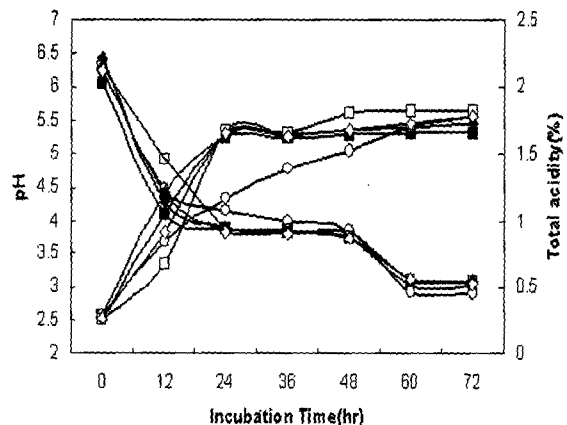


Fig. 4. Growth curve of pH, total acidity in MRS broth added with persimmon leaf extracts 10% concentration. *L. acidophilus* MG501(-■-), *L. brevis* MG19(-◆-), *L. bulgaricus* MG515(-○-), *L. lactis* MG530(-□-), *L. casei* MG311(-◇-).

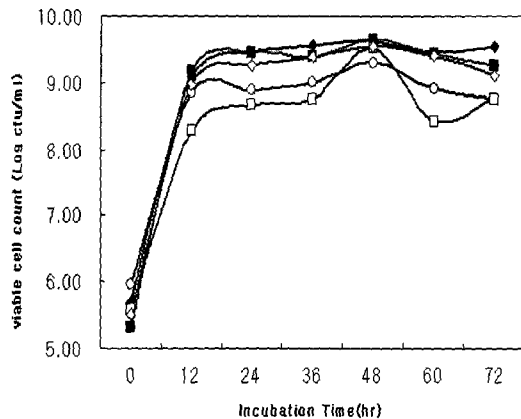


Fig. 5. Growth curve of viable cell count in MRS broth added with persimmon leaf extracts 10% concentration. *L. acidophilus* MG501(■-), *L. brevis* MG19(◆-), *L. bulgaricus* MG515(○-), *L. lactis* MG530(□-), *L. casei* MG311(◇-).

*L. brevis* MG19는 배양 24시간에  $2.8 \times 10^9$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $4.3 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.82이며 산도는 1.684를 나타내었다. 그 후 균수가 감소하였으며 pH는 3.09까지 떨어지고 산도는 큰 차이를 보이지 않았다.

*L. bulgaricus* MG515는 배양 24시간에  $7.6 \times 10^8$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $2 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.85이며 산도는 1.528을 나타내었다. 그 후 균수가 감소하였으며 pH는 2.91까지 떨어지고 산도는 계속하여 증가하였다.

*L. lactis* MG530는 배양 24시간에  $4.7 \times 10^8$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $3.3 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.75이며 산도는 1.805를 나타내었다. 그 후 균수가 감소하였으며 pH는 3.06까지 떨어지고 산도는 큰 차이를 보이지 않았다.

*L. casei* MG311는 배양 24시간에  $1.8 \times 10^9$  cfu/mL까지 생육하였고 48시간에 균수가  $3.4 \times 10^9$  cfu/mL에 이르렀으며 이때의 pH는 3.74이며 산도는 1.673을 나타내었다. 그 후 균수가 감소하였으며 pH는 3.05까지 떨어지고 산도는 증가하였다.

이상의 결과로 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311 모두 최적 배양시간이 48시간임을 확인하였으며, MRS broth 배지에서 유산균을 배양할 때보다 균수가 증가하는 결과를 볼 수 있었으며 pH는 약간 낮아졌고 산도는 0.2정도 낮아진 것을 볼 수 있었다. 또한 유산균증식에 vitamin C에 의해 균증식이 활발히 이루어지는 경향이 있으므로 감잎 추출물에 함유된 vitamin

C에 작용으로 인하여 대조군보다 균 증식이 증가하는 경향을 보였다.

감잎 추출물 10% 첨가한 농도에서 최적에 균수가 나타나는지 확인하기 위하여 감잎 추출물 농도를 각각 0%, 5%, 10%, 15%, 20%로 첨가하여 생균수와 pH 및 산도를 측정 한 결과, *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311 모두 감잎 추출물 10% 첨가한 배지에서 균수가 최적임을 알 수 있었다.

이상 감잎 추출물 농도별 균수, pH, 산도를 요약하면 Table 1과 같았다.

### 3. 동결건조 보호제로서의 효과

동결건조 보호제로서의 효과를 조사한 결과, skim milk 10%(w/v), sucrose 5%(w/v)로 구성된 기본 보호제 조성물에 고형분함량 4.83 mg/g인 감잎 추출물 10%(v/v)를 첨가한 경우 Table 2에서와 같이 *L. aciophilus* MG501 균주의 경우 대조군과 비교하여 약 30% 정도 생존을 감소를 보였으며 *L. brevis* MG19 및 *L. bulgaricus* MG515의 경우는 약 10% 정도 생존을 감소를 보였다. 반면에 *L. lactis* MG530에서는 대조군보다 약 10% 정도 생존을 증가를 보였으며 *L. casei* MG311 균에서는 거의 동등한 효과를 나타냈다.

이 결과는 동결건조 보호제 사용시 *L. lactis* MG530, *L. casei* MG 311 균에서 감잎 추출물에 존재하는 vitamin C의 영향으로 생존율이 증가하는 경향을 보였다. 따라서 고형분 함량 4.83 mg/g인 감잎 추출물 10%에서 균종에 따라 보호제로서 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

### 4. 가혹조건에서의 경시변화

동결건조균 원료에 대한 가혹조건에서의 경시변화를 조사하기 위하여 생존율을 측정 한 결과 감잎 추출물 10% 첨가하여 동결 건조한 균 원료를 온도 37°C, 습도 70%를 유지하여 항온 항습기에서 한 달간 방치시킨 후 생존율(Table 3)은 *L. acidophilus* MG501의 경우 대조군에 비해 약 2.5%, *L. bulgaricus* MG515은 2.8%, *L. lactis* MG530와 *L. casei* MG311의 경우 약 2%의 생존율 증가를 보여 가혹조건에서 균의 생존율을 연장시키는 역할을 하는 것으로 보이며, *L. brevis* MG19의 경우는 약 7% 정도 감소하는 경향을 보였다.

동결건조 보호제 사용시 *L. acidophilus* MG501은 생존율이 감소하는 경향을 보였지만 경시변화에서는 생존율이 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 *L. lactis* MG530와 *L. casei* MG311의 경우 동결건조 보호제 사용과 동일하게 생존율이 증가하였다.

**Table 1. Result of pH, total acidity and viable cell count of selected strains in MRS broth added with Persimmon leaf extracts**

Concentration (%)	After culture for 48 hours	<i>L. acidophilus</i> MG 50	<i>L. brevis</i> MG19	<i>L. bulgaricus</i> MG515	<i>L. lactis</i> MG530	<i>L. casei</i> MG310
0	Final pH	3.94	3.95	3.89	3.93	3.86
	Acidity(%)	1.858	1.852	1.680	1.820	1.823
	Viable cell (cfu/ml)	3.3×10 <sup>9</sup>	3.1×10 <sup>9</sup>	1.2×10 <sup>9</sup>	1.5×10 <sup>9</sup>	3×10 <sup>9</sup>
5	Final pH	3.93	3.75	3.85	3.76	3.84
	Acidity(%)	1.796	1.839	1.630	1.830	1.789
	Viable cell(cfu/ml)	3.3×10 <sup>9</sup>	3.×10 <sup>9</sup>	1.6×10 <sup>9</sup>	2.9×10 <sup>9</sup>	3.1×10 <sup>9</sup>
10	Final pH	3.73	3.81	3.85	3.75	3.74
	Acidity(%)	1.650	1.690	1.521	1.810	1.673
	Viable cell(cfu/ml)	4.6×10 <sup>9</sup>	4.5×10 <sup>9</sup>	2.2×10 <sup>9</sup>	3.5×10 <sup>9</sup>	3.4×10 <sup>9</sup>
15	Final pH	3.75	3.75	3.84	3.75	3.85
	Acidity(%)	1.630	1.685	1.152	1.793	1.816
	Viable cell(cfu/ml)	4.0×10 <sup>9</sup>	3.3×10 <sup>9</sup>	1.9×10 <sup>9</sup>	2.8×10 <sup>9</sup>	2.9×10 <sup>9</sup>
20	Final pH	3.75	3.74	3.84	3.75	3.78
	Acidity(%)	1.630	1.630	1.449	1.585	1.820
	Viable cell(cfu/ml)	2.6×10 <sup>9</sup>	2.8×10 <sup>9</sup>	1.1×10 <sup>9</sup>	1.3×10 <sup>9</sup>	2.7×10 <sup>9</sup>

**Table 2. Survival rate of selected strains in freeze-dry using the persimmon leaf extracts as cryoprotectan**

Strain	After freeze-drying survival rate(%)	
	Control(%)	Addition with persimmon leaf extracts(%)
<i>L. acidophilus</i> MG 501	93.9	65.6
<i>L. brevis</i> MG19	80.0	68.7
<i>L. bulgaricus</i> MG515	70.3	61.1
<i>L. lactis</i> MG530	83.8	91.6
<i>L. casei</i> MG311	75.5	73.2

### 5. 유산균 배양시 감잎 추출물 첨가에 따른 Vitamin C 함량 변화

유산균 배양시 고형분함량 4.83 mg/g인 감잎 추출물 첨가에 따른 vitamin C 함량을 측정된 결과 Fig. 6과 같이 *L. lactis* MG530에서 대조군보다 약 2배 증가한 190.26 mg/100 g으로 함량이 가장 높았으며 *L. acidophilus* MG501가 대조군보다 약 3배 감소한 56.05 mg/100g으로 가장 낮게 나타났다.

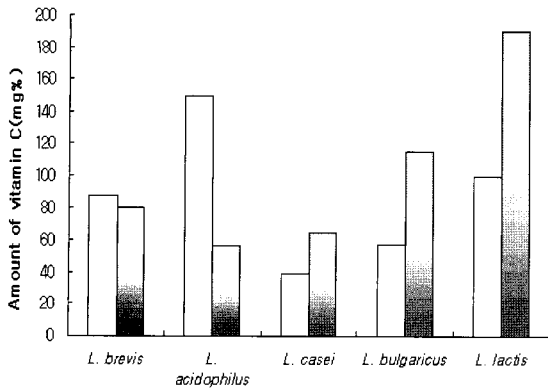
*L. casei* MG311, *L. bulgaricus* MG515에서 각각 대조

**Table 3. Survival rate of in freeze-dried cell powder using the persimmon leaf extracts as cryoprotectant after 1 month storage period at the 37°C and humidity 70%**

Strain	Survival rate(%) after 1 month storage period(%)	
	Control(%)	Addition with persimmon leaf extracts(%)
<i>L. acidophilus</i> MG 501	13.5	16.0
<i>L. brevis</i> MG19	18.0	11.5
<i>L. bulgaricus</i> MG515	11.0	13.8
<i>L. lactis</i> MG530	8.9	10.9
<i>L. casei</i> MG311	8.0	10.6

군보다 약 2배 증가한 64.51 mg/100g, 115.17 mg/100g으로 함량이 *L. lactis* MG530에 vitamin C 함량 190.26 mg/100 g보다는 전반적으로 낮은 수치를 나타냈었으며 *L. brevis* MG19는 대조군보다 약간 감소한 것으로 나타났다.

차 잎 중에는 생체 내에서 과산화지질의 생성을 억제하고 발암과 노화 억제에도 유효한 베타-카로틴, vitamin C 및 E 등이 함유되어 있다. 그 중 vitamin C는 영양소로서의 기능 외에도 활성산소의 제거를 도와주



**Fig. 6. The change of total vitamin C of persimmon leaf extracts by lactic acid bacteria growth. Lactic acid bacteria growth -□-, Lactic acid bacteria growth with the addition 10% Persimmon leaf extracts -■-,**

는 작용과 과산화물의 분해를 촉진하고 발암물질인 니트로사민의 생성을 막아주며 간지질 과산화물을 저하시킨다는 보고가 있다<sup>33)</sup>. 이러한 vitamin C의 역할은 농도에 따라 달라지는데 낮은 농도(250 ppm 이하)에서는 지방산화를 촉진시키나, 높은 농도(500 ppm 이상)에서는 Fe<sup>2+</sup> 이온과 Fe<sup>3+</sup> 이온의 균형을 깨뜨려 지방 산화 정도를 역전시키거나 또는 산소포집제(Oxygen scavenger)로 작용함으로써 지방산화를 억제시킨다고 보고하였다<sup>34)</sup>. 이와 같이 vitamin C는 차의 영양적인 면이나 기능적인 면에서 매우 중요한 요인으로 자리 잡고 있어 차의 가공시 vitamin C 함량도 품질지표의 하나가 된다<sup>33)</sup>.

**6. 유산균 배양시 감잎 추출물 첨가에 따른 항산화 효과**

**1) DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 Free Radical Scavenging Activity Test**

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거효과 측정은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식품의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되고, 인체 내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용으로 이용되고 있다. 라디칼 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다. 따라서 전자공여능 측정은 DPPH 라디칼 소거법으로 측정하며, DPPH는 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질로 항산화 효과가 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화 효과를 검정한다.

본 실험에서 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19,

*L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311에 감잎 추출물 10%를 첨가하여 전자공여능을 측정 한 결과는 Fig. 7과 같았다.

*L. brevis* MG19의 감잎 추출물 10% 첨가한 전자공여능은 43.4%로 가장 높게 나타났으며 대조군보다 높게 나타났다.

반면에 *L. acidophilus* MG501는 감잎추출물 10% 첨가한 전자공여능은 대조군보다 낮게 나타났다.

*L. casei* MG311는 감잎 추출물 10% 첨가한 대조군보다 4배 정도 높게 나타냈다.

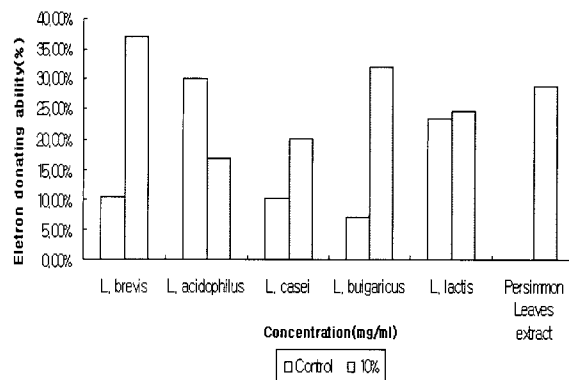
*L. bulgaricus* MG515는 감잎 추출물 10% 첨가한 전자공여능은 대조군보다 31.96 %로 높게 나타났으며 *L. lactis* MG530는 대조군보다 낮게 나타났다.

이와 같은 결과로 *L. brevis* MG19와 *L. bulgaricus* MG515에 감잎 추출물을 첨가한 다른 균종보다 전자공여능이 높게 나타났으며 유산균 발효에 영향을 주는 것으로 생각된다.

DPPH는 vitamin C, 토코페롤, poly-hydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로써 전자공여능의 차이 측정이 가능하다. 따라서 항산화물질의 전자공여능을 측정할 때에는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)법이 편리하다고 알려져 있으나, 색소가 함유된 추출물의 경우 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)법의 적용에는 많은 경향이 요구된다<sup>35)</sup>.

**2) Superoxide Dismutase(SOD) 유사활성**

노화 억제에 관련된 생리 기능성으로는 항산화 활성과 superoxide dismutase(SOD) 유사활성을 들 수 있다. 산소가 superoxide radical과 hydrogen peroxide 등과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되면 노화와



**Fig. 7. Electron donating ability of selected strains in MRS broth added with persimmon leaf extracts.**



압, 각종 뇌질환 등 생체에 치명적인 산소 독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다<sup>36,37</sup>). 생체 내에 있는 free radical과 활성산소 및 과산화물들을 제거하거나 생성을 억제하는 물질로는 SOD, catalase peroxidase 등의 항산화 효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요소 등과 같은 항산화물질이 있는데 지금까지 개발되어 사용되고 있는 항산화제로는 BHT, BHA 등과 같은 합성 항산화제, vitamin C,  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids, flavonoids, 탄닌 등과 같은 일부 천연 항산화제 및 SOD와 같은 항산화 효소에 국한되어 있는 실정이다<sup>38,39</sup>). 그런데 이들 항산화제는 독성, 낮은 활성 및 용도의 한계성 등의 여러 가지 문제로 인하여 사용에 제한을 받고 있다. 따라서 보다 안전하면서도 강한 항산화제를 천연물 또는 미생물 대사산물로부터 탐색하는 연구가 진행되고 있다<sup>36,40</sup>).

본 실험에서는 Iio 등의 방법을 이용하여 감잎 추출물의 SOD 유사활성을 측정된 결과 Fig. 8과 같이 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311은 전반적으로 대조군보다 SOD 유사활성이 낮게 나타났었다. Park 등 감잎으로부터 vitamin C, SOD 유사활성 물질을 효과적으로 이용하기 위해서는 80°C 또는 90°C에 3분 동안 추출하는 것이 효과적이라고 하였다. 반면에 본 실험에서는 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311은 37°C/48hr 배양하면서 SOD 유사활성물질이 상당량 파괴된 것으로 생각된다.

감잎의 vitamin C 함량은 건조와 발효 방법에 따라 차이를 나타내었으며 SOD 유사 활성물질은 활성산소의 시발물질이라 할 수 있으며 superoxide anion의 저해 물질로는 생체 내 superoxide dismutase(SOD)라는 효소

가 있지만 이의 일종으로 SOD와 작용 기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성물질이라 부르며 식물체를 대상으로 탐색하는 효능이 평가된 바 있다<sup>3</sup>).

## 요 약

본 연구는 감잎 추출물을 이용하여 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311 균종에 대한 생육조건 및 동결건조 보호제로서의 효과, 가혹조건에서의 경시변화, vitamin C 함량 변화, DPPH 라디칼 소거효과, SOD 유사활성을 조사하였다.

유산균 생육은 *L. acidophilus* MG501, *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515, *L. lactis* MG530, *L. casei* MG311에서 각각 37°C/48hr 동안 배양한 후  $3.2 \times 10^9$ cfu/mL,  $2.9 \times 10^9$ cfu/mL,  $1.1 \times 10^9$ cfu/mL,  $1.6 \times 10^9$ cfu/mL,  $3 \times 10^9$ cfu/mL 생균수를 나타냈으며 pH는 3.82~3.88, 산도는 1.697~1.842를 나타내었다. 반면에 감잎 추출물 10% 첨가에  $4.4 \times 10^9$ cfu/mL,  $4.3 \times 10^9$ cfu/mL,  $2 \times 10^9$ cfu/mL,  $3.3 \times 10^9$ cfu/mL,  $3.4 \times 10^9$ cfu/mL에 생균수를 보여 유산균 생육시 감잎 추출물 첨가가 유산균 증식에 효과를 보였으며 pH는 3.74~3.82, 산도는 1.528~1.805로 낮게 나타내었다.

동결건조 보호제에서는 *L. acidophilus* MG501은 약 30% 정도 생존율의 감소를 보였으며 *L. brevis* MG19, *L. bulgaricus* MG515의 경우는 약 10% 정도 생존율 감소를 보였다. 반면에 *L. lactis* MG530는 약 10% 정도 생존율 증가를 보였으며 *L. casei* MG311은 거의 동등한 효과를 나타냈다. Vitamin C 함량 변화는 *L. lactis* MG530에서 190.26mg/mL로 가장 높게 나타났으며 *L. acidophilus* MG501에서는 56.05mg/mL로 가장 낮게 나타났다.

DPPH 라디칼 소거효과는 감잎 추출물 10% 첨가에 높았으며 그중에서도 *L. brevis* MG19에 감잎 추출물을 10% 첨가하여 배양한 경우 효과가 가장 높게 나타났다. SOD 유사활성은 전반적으로 대조군보다 비교적 낮은 활성을 나타냈다.

## 참고문헌

- Hwang, KA, Kim, KS, Park, CS and Shin, SR. Changes on the characteristics of *Lindera obtusiloba* BL. leaf teas by manufacturing process. *Korean J. Food & Nutr.* 16:365-371. 2003

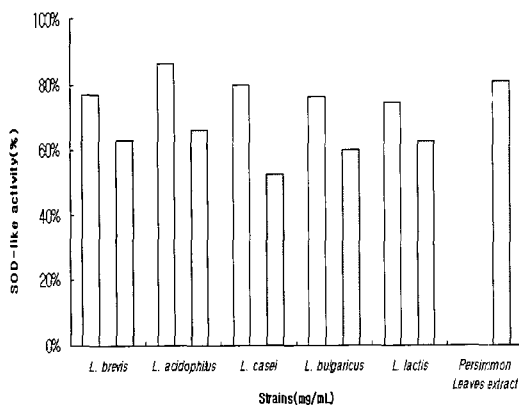


Fig. 8. SOD-like activity of selected strains in MRS broth added with persimmon leaf extracts.

2. Bae, DK, Choi, HJ, Son, JH, Pack, MH and Bae, JH. The study of developing and stability of functional beverage from Korean persimmon (*Diospyros kaki folium*) leaf. *J. Korean Food Sci. Technol.* 32:860-866. 2000
3. Park, YJ, Kang, MH, Kim, JI, Pack, OJ, Lee, MS and Jang, HD. Changes of vitamin C and superoxide dismutase(SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *J. Korean Food Sci. Technol.* 27:281-285. 1995
4. Shin, DH. Separation of antioxidant compounds from persimmon leaves. *J. of Korea Oil Chemists' Soc.* 14:103-107. 1997
5. Kim, HS and Gilliland, SE. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose in humans. *J. Dairy Sci.* 66:959-966. 1983
6. Mickle, FL. *Lactobacillus lycopersicin* sp., the causative organism of the gaseous fermentation of tomato pulp and related products. *Abstract Bacteriol.* 8:403-404. 1924
7. Kulp, WL. Scientific apparatus and laboratory methods an agar medium for plating *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*. *Science* 66:512-513. 1927
8. Kuiken, KA, Norman, WH, Lyman, CM, Hale, F and Blotter, L. The microbiological determination of amino acid. *J. Biol. Chem.* 151:615-625. 1943
9. Metcalf, D, Hucker, GJ and Carpenter, DC. A growth factor in certain vegetable juices. *J. Bacteriol.* 51:381-384. 1946
10. Koo, HH and Chung, SH. Effects of *Panas ginseng* and *Ganoderma lucidum* extract on the growth of lactic acid bacteria. *Korea J. Food Nutr.* 7:45-50. 1994
11. Yun, DH. Effect of chlorella cellular powder on the growth of lactic acid bacteria. M.S. Thesis, Korea Univ. 1980
12. Chung, SH, Moon, KD, Kim, JK, Seong, JH and Sohn, TH. Changes of chemical components in persimmon leaves during growth for processing persimmon leaves tea. *J. Korea Food Sci. Technol.* 26:141-247. 1994
13. Uchida, S, Edamatsu, R, Hiramatsu, M, Mori, A, Nonaka, GY, Nishioka, I, Niwa, M and Ozaki, M. Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Med. Sci. Res.* 15:831-834. 1987
14. Chio, SW, Kang, WW, Chung, SK and Cheon, SH. Antioxidative activity of flavonoids in persimmon leaves. *Foods and Biotechnol.* 5:119-123. 1996
15. Kim, JH, Kim, KY, Roh, YK and Choi, SW. Antioxidative substances and their changes in the leaves of persimmon(*Diospyros kaki*) during growth. *Korean J. PostHarvest Sci. Technol. Agri. Products* 4:323-330. 1997
16. Moon, SH, Kim, KH and Park, KY. Antitumor Effect of persimmon Leaves *in vivo* using Sarcoma 180 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25:865-870. 1996
17. Park, MH. Effect of polyphenol compounds from persimmon leaves (*Diospyros kaki folium*) on immunofunctional and biological activity. Ph. D. Thesis, Yeungnam Univ. Kyungsan, Korea. 1998
18. An, BJ. Structural studying of glucosyltransferase and tyrosinase inhibitors isolated from *Diospyros kaki folium*, *Artocarpus heterophyllus folium*. Ph. D. Thesis, Yeungnam Univ. Kyungsan, Korea. 1991
19. Kameda, K, Takaku, T, Okuda, H and Kimura, Y. Inhibitory effect of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Natl. Products.* 50: 680. 1987
20. Moon, SH, Kim, JO, Rhee, SH, Park, KY, Kim, KH and Rhew, TH. Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22:307. 1993
21. Heckley, RJ. Preservation of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 24:15-28. 1978
22. Morich, T. Lactic acid bacteria in animal industry Japanese. *J. Zooteeh Sci.* 44(11): 535-553. 1973
23. Heckley, RJ. Perservation of bacteria by lyophilization. *Adv. Appl. Microbiol.* 3:1-28. 1961
24. Valdez, GF, Giori GS, Giori, AA, Holgado PR and Oliver G. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(1). 1983
25. Deman, JC, Rogosa, M and Shape, ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130. 1960
26. Shan, N and Jelen, P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *J. Food. Sci.* 55:506-509, 1990
27. 차의 공정분석법 : 일본차엽 시험 연구보고 p. 6

- 1970
28. Blois, MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200. 1958
  29. Donnelly, JK, McLellan, KM, Walker, JL and Robinson, DS. Superoxide dismutase in foods. A review. *Food Chem.* 33:243. 1989
  30. Lee, JW, Kim, SY and Kwak, CS. Effects of excess vitamin C feeding on blood and liver lipid and its peroxidational levels and platelet thromboxane A2 formation in rats. *Korean J. Nutr.* 30:639-647. 1997
  31. Sato, K and Hegarty, GR. Warmed over flavor in cooked meats. *J. Food Sci.* 36: 1098-1102. 1971
  32. Kim, SM, Cho, YS and Sung, SK. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *J. Korea Food Sci. Technol.* 33:626-632. 2001
  33. *Korean Soc. Food Sci. Technol.* Symposium of health-aid food, Abstract. 1997
  34. Kim, SM, Kim, EJ, Jo, YS and Sung, SK. Antioxidant activities of pine leaves extracts from different extraction methods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31:27-532. 1999
  35. Lee, GY, Kim, JH, Sohn, JR and Lee, JS. Detection and extraction condition of physiological functional compounds from bran of Heugjinju byeo rice. *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.* 8:296-301. 2001
  36. Kang, WH, Park, YG, Oh, SY and Moon, KD. Function alities of extracts from pine leaves and ssug. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27:978-984. 1996

---

(2004년 12월 31일 접수; 2005년 2월 6일 채택)