

홍삼 추출액 파우치 제품으로부터 분리동정된 변패세균에 관한 연구

김영만 · 윤충의 · 김경희¹ · 이은우^{2*}

동의대학교 식품영양학과, ¹(주)오리엔탈바이오텍, ²동의대학교 생명응용학과

Received August 24, 2007 / Accepted October 18, 2007

Studies on Saprogenic Bacteria Isolated from Korean Red Ginseng Extract Product. Young Man Kim, Choong Eui Yoon, Kyoung Hee Kim¹ and Eun Woo Lee^{2*}. Department of Food Science and Nutrition, ¹Oriental Biotech Co., ²Department of Life Science and Biotechnology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea - Five kinds of saprogenic bacteria were isolated from the red ginseng extract product and identified as *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Micrococcus* sp., and *Pseudomonas* sp. by 16S rDNA analysis. Some of the isolated strains were able to grow even at 45°C which are presumed originated from the raw ingredient of red ginseng extract. All of the isolated strains did not show the hemolytic activity, the diarrhea-inducing activity, and the vascular permeability enhancing activity, indicating that these strains are not pathogenic.

Key words – Red ginseng, red ginseng extract, saprogenic bacteria, rDNA sequence

서 론

웰빙 열풍의 영향으로 인삼, 홍삼, 동충하초 등의 건강보조식품 시장이 급속히 확대되고 있다. 그 중에서도 특히 홍삼의 경우, 사포닌 및 갈변색소의 효능이 과학적으로 입증되고 있으며, 소비자들이 간편하게 복용할 수 있는 파우치 포장 제품의 개발로 소비가 증대되고 있는 추세이다[7,8,11].

다양한 파우치 포장 제품 개발을 위한 홍삼 추출액의 추출방법에 대한 다각적인 연구가 이루어지고 있는 가운데, 현재 사용되고 있는 홍삼 추출액의 추출방법은 대부분 물이나 에탄올을 용매로 사용하는 방법이다[3,4,6,10]. 추출과정 중 전분이 다량 추출되면 추출액 제조 후 침전이 발생되고, 홍삼 추출액 중에 함유된 다량의 다당류 및 단당류는 세균과 같은 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 탄소원이 되기 쉽다. 이 때문에 가열 추출 후에 미생물의 영양세포나 내열성 포자가 잔존하는 경우 제품의 품질 저하 및 유통기간 단축의 문제가 발생하기도 한다. 실제로 포장공정이 완전 무균상태로 이루어지기는 힘든 조건이고, 전체공정이 장시간 열처리함에 따라 일반 부패세균은 사멸하나 고온에서도 생존하는 내열성 세균이 차후 제품의 변패를 유발하기 때문에 그 원인균을 규명하는 것이 시급히 해결해야 할 과제이다.

본 연구에서는 열수추출법으로 제조된 홍삼 추출액의 품질관리방법을 모색하고자, 자연변패 된 홍삼 추출액 제품으로부터 변패원인 세균을 분리동정하고, 이들 변패원인균의 세균학적 특성을 규명하고 병원성의 유무를 확인하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

변패원인세균 검출 및 배양용 배지는 GIBCO BRL사, pGEM[®]-T Vector 및 DNA polymerase는 Promega사, Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit은 Perkin Elmer사, 기타 각종 시약은 Sigma Co. (USA)로부터 각각 구입하여 사용하였다.

균주의 분리

변패균주 분리의 시료로 사용된 홍삼 추출액은 (주)오리엔탈바이오텍에서 생산하는 제품 중에서 자연변패된 것을 사용하였다. 자연변패 된 홍삼 추출액 일정량을 10진 희석한 후, Brain Heart Infusion (BHI) 한천 평판배지에 도말하고, 37°C에서 24시간 배양하여 콜로니를 얻었다. 나타난 모든 콜로니를 다시 한번 한천 평판배지에 도말 배양하여 단일 콜로니를 순수 분리한 후, 사면배지에 보관하면서 실험하였다.

16S rDNA 염기서열 분석에 의한 분리균주의 동정

16S rDNA 염기서열 분석에 의한 분리균주의 동정은 기존의 방법에 따라 실시하였다[1]. 균주로부터 추출한 DNA를 주형으로, primer 6F (5'-GRAGTTTGATCMTGGC-3'; corresponding to positions 6 to 23 of *Escherichia coli* 16S rRNA)와 1492R (5'-GGTTA CCTTGTTACGACTT-3'; corresponding to positions 1472 to 1492 of *E. coli*)를 사용하여 PCR 반응을 실시하였다[2,5]. PCR 산물은 pGEM[®]-T Vector System에 클로닝되었고, 16S rDNA gene의 염기서열 분석은 ABI 310 Automatic Sequencer (Perkin Elmer Co., U.S.A.)와 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit을 사용하여 실시하였다. 확보된 염기서열은 NCBI (National Center

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1537, Fax : +82-51-890-1532

E-mail : ewlee@deu.ac.kr

for Biotechnology Information)에서 제공하는 Blast DNA Database Search Service (blastn 2.0)를 이용하여 비교 검색하여 분리주의 계통발생학적 위치를 추정하였다.

분리한 변태 원인균의 특성 연구

분리된 변태 원인균의 형태학적 및 기본적인 생화학적 특성조사를 위해 FDA 및 Bergey's manual[13] 을 근거로 하여, 형태학적 및 생화학적 시험, Gram staining, oxidase, catalase, indole, hemolysis, MR-VP test, citrate, TSI test 등을 반복 실시하였다. 또한 분리균주 각각의 생육곡선을 나타내기 위해 BHI 배지 200 ml에 1% (v/v) 접종하여 37°C에서 배양하면서 일정시간 간격으로 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 또한 분리된 균주를 pH 2.0-10.0까지 1.0단위로 조정된 peptone water에 한 백금이씩 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양한 후, 균의 증식여부를 확인하였다. 분리균주의 온도에 의한 영향은, 분리균주를 BHI broth에 37°C로 24시간 배양한 균액을 pH 7.0으로 조절하여 제조한 peptone water에 한 백금이씩 접종하여 20-45°C의 온도구간에서 48시간동안 진탕배양한 후 증식여부를 확인하였다.

용혈성 유무 실험

BHI agar 사면배지에서 24시간 배양한 균을 한 백금이 취하여 혈액평판배지 (sheep blood agar)에 희석하고, 37°C에서 24시간 배양 후 집락주변의 투명한 생성여부를 통해 확인하였다.

피부혈관 투과성 항진 실험

실험동물로 Sprague-Dawley계 동물을 효창 사이언스 (대구)로부터 구입하여, 1주일간 표준식으로 순화과정을 거친 후 실험에 사용하였다. BHI broth에서 37°C에서 24시간 배양한 분리균주의 배양액 0.1 ml 씩을 흰쥐 (평균체중 250g)의 털을 깎은 등피 중간층 피하에 주사하고, 6시간 경과 후 흰쥐의 등 피부를 잘라 내피 쪽에서의 혈관투과성항진에 따른 spot 생성 유무를 관찰하였다.

설사유무 실험

실험동물로 생쥐는 ICR계를, 흰쥐는 Sprague-Dawley계

동물을 효창 사이언스 (대구)로부터 구입하여, 1주일간 표준식으로 순화과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 분리된 각각의 균주를 BHI broth 100 ml에 한 백금이 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 600 nm에서의 O.D. (optical density) 값을 동일하게 맞추고, 배양액을 0.85% 생리식염수에 10배 희석하여 공급한 후, 설사유무를 3일간 확인하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

(주)오리엔탈바이오텍에서 생산하는 홍삼 추출액 파우치 제품 중 자연변태된 것을 선택하여 변태원인 미생물의 분리를 시도한 결과, H1에서 H5까지 5종의 세균을 분리하였으며, 각 균주의 평판배지 상에서의 콜로니 성장 및 사진은 Table 1 및 Fig. 1에 각각 나타내었다.

분리균주의 동정

5종의 분리균주를 16S rDNA 염기서열 비교에 의해 동정한 결과, 5종 모두 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)에 등록된 균종과 95-98%의 상동성을 갖는 것으로 확인되었다 (Table 2). 분리균주 H1은 GenBank에 등록된 *Bacillus subtilis* (98%), H2는 *Bacillus* sp. (95%), H3은 *Paenibacillus* sp. (95%), H4는 *Micrococcus* sp. (97%), H5는 *Pseudomonas* sp. (98%)와 모두 95% 이상의 상동성을 보였다.

분리균주의 형태학적 및 생화학적 특성 조사

5종의 분리균주의 형태학적 및 기본적인 생화학적 특성을 살펴본 결과를 Table 3에 나타내었다. 분리된 5균주 모두 MR-VP test에서 음성을 나타내었고, 특히 H4는 catalase, oxidase, citrate, indole 반응 등 실시한 모든 실험에서 음성을 나타내어 다른 균주와 대별되는 양상을 보였다. H4를 제외하 나머지 균주들은 catalase와 oxidase test에서 모두 양성을 보였으며, H1, H2와 H3는 운동성을 가지는 것으로 나타났다.

H3과 높은 유사도를 보인 *Paenibacillus* strain WN9^T는 *Paenibacillus chinjuensis* sp. nov.로 대한민국 진주에서 발견된 exopolysaccharide를 생산하는 편성혐기성의 내생포자를

Table 1. Properties of colonies on solid media of isolated strains

strains	H1	H2	H3	H4	H5
Shape	irregular	irregular	circular	circular	circular
Size (mm)	3-4	3-4	1-2	1-2	1-2
Colour	white	ivory	ivory	yellow	yellow
Opacity	opaque	translucent	translucent	opaque	translucent
Elevation	flat	flat	convex	convex	convex
Surface	rough	dull	smooth	glisten	smooth
Edge	undulate	undulate	entire	entire	entire

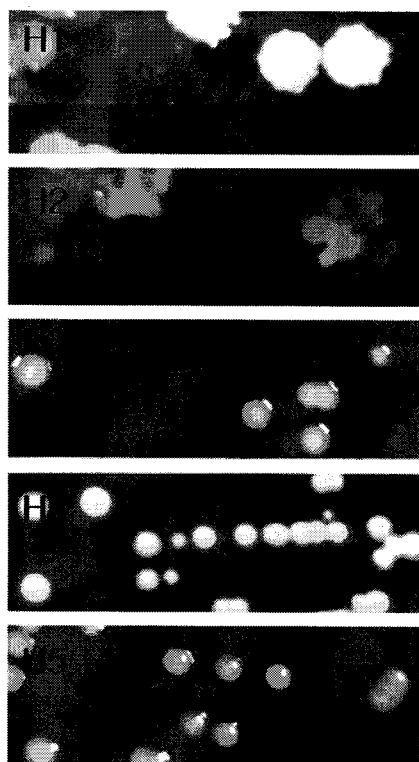


Fig. 1. Morphology of the isolated strains on the plate count agar plate.

Table 2. 16S rRNA gene sequence homology between isolated strains and GenBank registered strains

Strain	GenBank registration	GenBank ID	Homology (%)
H1	<i>Bacillus subtilis</i> strain BFAS	AY775778	98
H2	<i>Bacillus</i> sp. NK395	AF492848	95
H3	<i>Paenibacillus</i> sp. WN9 ^T	AF164345	95
H4	<i>Micrococcus</i> sp. TUT1210	AB188213	97
H5	<i>Pseudomonas</i> sp. BE08	AY456701	98

Table 3. Biochemical characteristics of isolated strains

characteristics	strains				
	H1	H2	H3	H4	H5
Gram staining	+	+	-	+	-
MR	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-
TSI test	A/A	K/K	A/K	K/K	K/K
Catalase	+	+	+	-	+
Oxidase	+	+	+	-	+
Citrate	-	-	-	-	+
Indole	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	-	-

MR, Methyl Red; VP, Voges-Proskauer; TSI, Triple Sugar iron; -, negative; +, positive; A/A, Glucose and lactose and/or sucrose fermentation; K/K, No fermentation; A/K, Glucose fermentation only.

형성하는 그람 양성간균이다[14]. H3은 *P. chinjuensis* sp. nov.와 catalase 및 oxidase test 양성, 포도당 이용능, 운동성, 및 생육온도와 NaCl의 영향, 적정 pH 등에서 동일한 특성을 나타내었다. 그러나 H3은 그람염색의 결과 음성으로 나타났는데, *P. chinjuensis* sp. nov.가 장기간배양 후의 그람염색 결과는 불명확하였다는 기록으로 볼 때, 본 연구의 결과도 같은 원인에서 기인하였다고 사료된다. H4와 rDNA 서열에서 97%의 상동성을 보인 *Micrococcus* sp. TUT1210은 음식물 쓰레기 발효기에서 분리된 단백질 분해능이 뛰어난 호중온성의 *Micrococcus luteus*로 동정되었다[9]. H5와 rDNA 서열에서 98%의 높은 상동성을 보인 *Pseudomonas* sp. BE08은 사탕무 잎의 병든 부위에서 분리된 식물유래의 균주로 *P. syringae* ATCC19310과 높은 유사성을 나타낸다고 보고된 바 있다[12].

분리균주 생장의 온도, NaCl 및 pH의 영향

분리균주를 pH 7.0 으로 조절한 peptone water에 접종하여 20-45℃까지 5℃ 단위로 24시간 진탕배양한 결과, H1, H2, H3 및 H5는 35℃에서, H4는 30℃에서 가장 잘 성장하였다 (Table 4). 또한 H1, H3, 및 H4는 45℃에서도 성장하였으며, H2와 H5균주는 45℃에서 사멸하였다. NaCl농도의 영향에

Table 4. Effect of temperature, pH, and NaCl concentration on the growth of isolated strains

characteristics	strains				
	H1	H2	H3	H4	H5
Growth at					
20℃	+++	-	-	+	+++
25℃	+++	-	-	+	+++
30℃	+++	+	+	++	+++
35℃	+++	+++	+++	+	+++
40℃	++	+	+	+	++
45℃	++	-	+	+	-
Growth in NaCl					
0.5%	+	+	+	+	++
1.0%	+	+	+	+	++
2.0%	+	-	-	-	++
3.0%	+	-	-	-	+
4.0%	-	-	-	-	-
Growth at pH					
2.0	-	-	-	-	-
3.0	-	-	-	-	-
4.0	-	-	-	-	-
5.0	-	-	-	-	-
6.0	++	++	++	++	++
7.0	++	++	++	++	++
8.0	++	++	++	++	++
9.0	-	-	-	-	-
10.0	-	-	-	-	-

-, negative; +, positive.

있어서, H1과 H5는 NaCl 3%까지 성장하였고, H2, H3, H4는 NaCl 2% 이상에서는 성장하지 못하였다 (Table 4). 또한 분리균주 성장에의 pH의 영향을 살펴본 결과, 5종의 분리균주 모두 pH 6-8의 중성 조건에서 잘 생육하였다 (Table 4).

90°C 이상의 고온에서 장시간 열수추출하는 홍삼 추출액 제조과정을 고려해 볼 때, 45°C에서의 생육활성을 보인 H1, H3 및 H4 균주는 홍삼 추출액의 원재료에 포함되어 있던 내생포자를 형성하는 균주로 추정되며, 45°C에서 사멸한 H2와 H5 균주는 추출 후 포장과정이나 보관 시에 혼입된 균주로 추정할 수 있다. 분리된 5균주는 모두 pH 6-8에서는 성장하나 pH 5 이하나 pH 9 이상에서는 성장하지 못하였다. 분리된 5균주의 배양액의 혼합액을 새로 제조한 홍삼 추출액에 투여하여 37°C에서 24시간 배양하여 본 결과, 균주들의 생장은 관찰되지 않았고 홍삼 추출액의 변패도 일어나지 않았다 (data not shown). 이 결과는 홍삼 추출액 제품의 자연변패

의 경우, pH가 4.5 전후인 홍삼 추출액 제품의 보관과정 중에 보관 온도 등의 외부영향에 의해 제품의 pH가 6 이상으로 상승된 후, 변패원인균의 성장에 의해 변패가 시작될 수 있음을 시사한다.

생육곡선

분리균주의 배양시간대별 증식상태를 600 nm에서의 흡광도로 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 그 결과 균종의 특성에 따라 생육곡선이 다르게 나타났다. 대수증식기에 있어서의 단위시간당 흡광도 증가율은 H3이 가장 높았으며, H2가 가장 느린 증식율을 나타내었다.

분리균주의 용혈성

분리균주의 병원성 유무를 판단하기 위해, 먼저 분리균주의 용혈활성을 실험하였다. BHI broth에서 24시간 전배양한

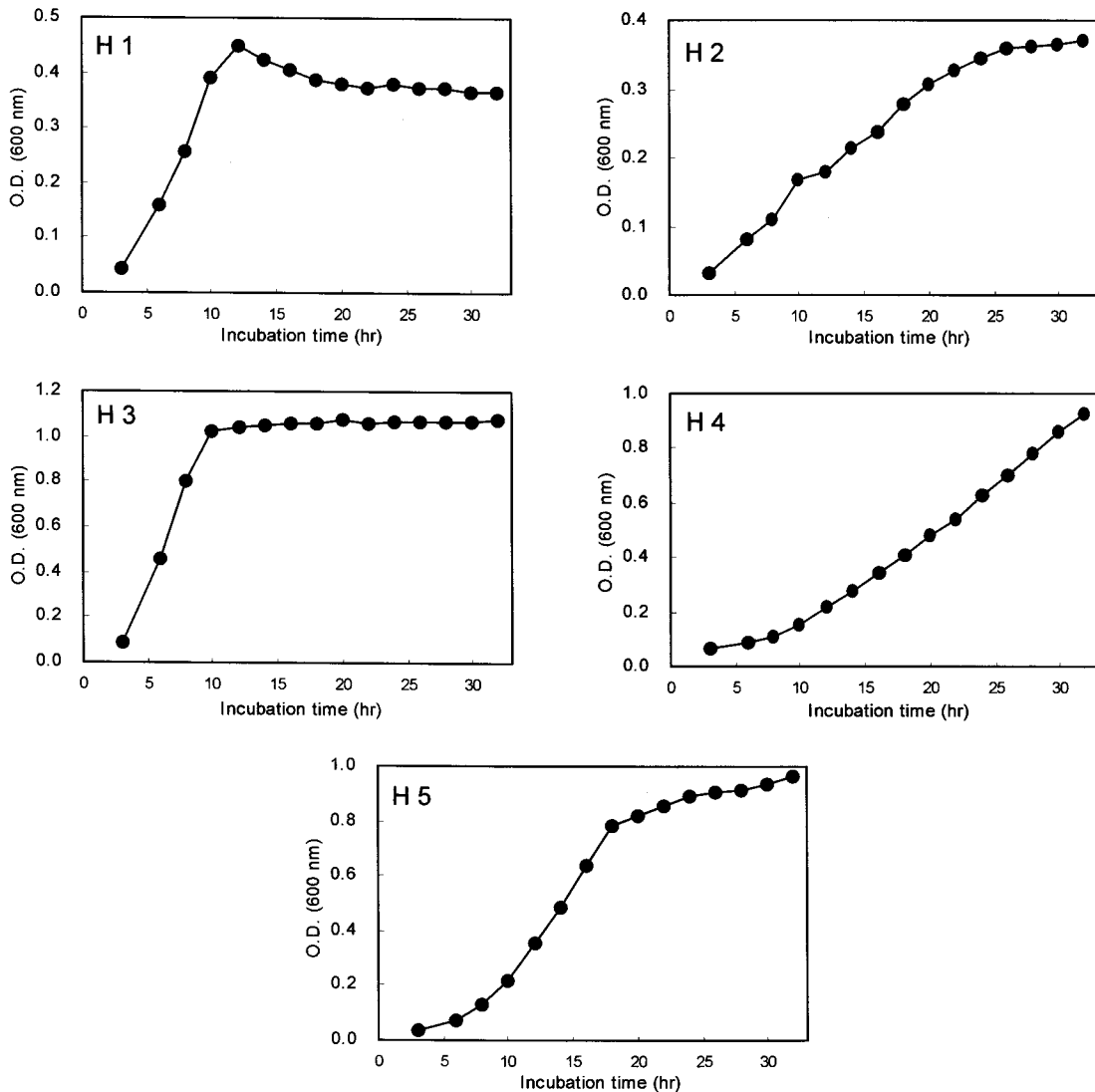


Fig. 2. Growth curves of isolated strains.

5종의 분리균주를 혈액평판배지 (sheep blood agar)에 희석하고, 37°C에서 24시간 배양 후 콜로니 주변의 투명환 생성 여부를 관찰하였다. 그 결과, 5균주의 콜로니의 주변에 투명환이 생성되지 않아 용혈성이 없음을 나타내었고, 이에 따라 용혈성에 의해 유발되는 병원성을 나타내지 않을 것으로 추정되었다 (Fig. 3).

피부혈관 투과성 항진작용

마취한 흰쥐 (rat)의 등피 중간층에 분리균주의 배양액 0.1 ml를 주사하여 6시간 경과 후, 흰쥐의 등 피부를 잘라 내피 쪽에서의 혈관투과성 항진작용을 확인하였다. 그 결과, Fig. 4에서와 같이 5종의 분리 균주 모두 혈장알부민의 유출에 의한 spot 형성이 나타나지 않아, 피부혈관 투과성에 의한 항진작용을 나타내지 않았다.

설사유발성

BHI broth에 접종한 5종의 분리균주 배양액을 3일간 흰쥐 (rat)와 생쥐 (mouse)에 공급하고 실험동물의 분변을 관찰한 결과, 실험된 모든 집단에서 설사반응이 나타나지 않았다.

분리된 5균주의 홍삼파우치 부패균주가 사람에게 노출되었을 경우의 병원성 유무를 판단하기 위해 실시한 용혈성 실험, 피부혈관 항진성 실험 및 설사유발성 유무 실험에서 모두 음성으로 나타난 결과로 미루어볼 때, 분리균주 5균주는 사람에게 병원성을 나타내지 않음이 거의 확실시 된다.

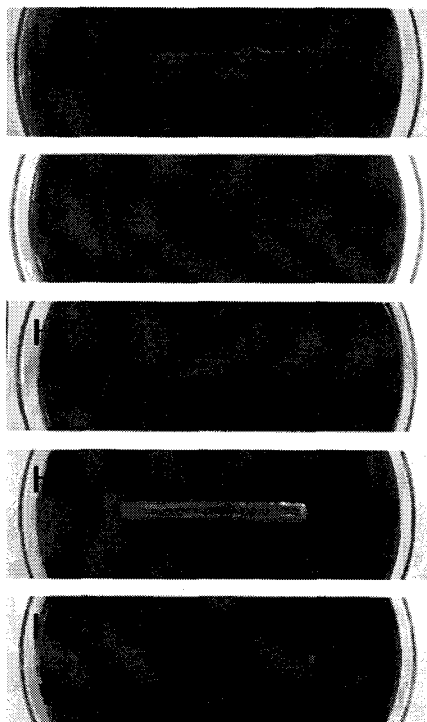


Fig. 3. Hemolysis activity of isolated strains on the sheep blood agar plate.



Fig. 4. Vascular permeability enhancing activity by isolated strains on the rat skin. C, negative control: H1-H5, numbers of isolated strains.

이 연구에서 분리된 홍삼 추출액 파우치 제품의 변패 원인세균들은 대부분 제품의 원재료로부터 잔존하거나, 혹은 일부는 제조과정 중에 오염되어 제품에 포함된 것으로 추정된다. 분리동정 되어진 5종의 균주는 GenBank에 등록된 균종들과 95%이상의 상동성을 가지고 있었다. 동정되어진 균주들의 병원성에 대해서는, 본 연구에서 실시한 실험 결과 상으로는 나타나지 않았다. 분리된 균주의 특성에 대해서는 자세히 알려져 있지 않은 균주들도 있으나, 분리된 5균주 모두 pH 6-8에서만 증식이 가능하며, pH 4.5 전후의 홍삼 추출액 제품에서는 쉽게 증식할 수 없는 것으로 나타났다. 또한 분리균주 중에는 열처리에도 잔존할 수 있는 내생포자를 생성하는 균주도 있기 때문에, 가열처리 식품은 제조 후 급냉과 저온저장이 필수적 이라고 사료된다.

본 연구를 통해 홍삼파우치 제품의 변패세균으로 동정된 5균주에 대해 그 특성들을 더욱 구체적으로 파악하여, 그 결과를 바탕으로 변패원인균을 관리하는 방법을 개발하는 것이 필요하다. 이러한 호열성 세균의 분리동정과 제어기술 개발은 홍삼 추출액 파우치제품 뿐만 아니라 열처리를 하여 포장하는 건강음료 제조 및 관리에 전반적으로 응용될 수 있고, 건강음료 및 식품의 유통기한 산정과 연장에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

홍삼 추출액 제품의 변패원인균을 분리동정하고 생화학적 특성 및 병원성 유무를 판단하였다. 분리된 5가지의 균주는 각각 *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*로 동정되었으며, 이 중 *Bacillus subtilis*와

Paenibacillus sp., *Micrococcus* sp.는 홍삼 추출액의 원재료로부터 기인한 내생포자를 형성하는 내열성 균주로 추정되었다. 분리된 균주 대부분은 낮은 염도와 중성 pH 조건에서 잘 자라며, 영양요구성이 단순한 호중온성 세균들이었다. 또한 용혈성과 설사유발성을 나타내지 않았으며, 흰쥐 (rat)를 이용한 피부혈관 투과성 항진작용 실험에서도 음성을 나타내어, 수행한 실험 결과 내에서는 분리된 5균주 모두 병원성이 없는 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 연구는 2005학년도 동의대학교 연구년 지원과 (재)테크노파크 과제 (홍삼 파우치 제품의 변패세균 분리 동정과정 제어기술 개발) 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Hwang, S. J. and Y. M. Kim. 2005. Isolation and identification of histamine-degrading bacteria from salted mackerel. *J. Life. Sci.* **15**, 743-748.
- Ishida, Y., M. Eguchi and H. Kadota. 1986. Existence of obligately oligotrophic bacteria population in the South China Sea and West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **30**, 197-203.
- Jeong, S. I., C. S. Kim, N. W. Lee, K. J. Choi, Y. G. Lee and I. K. Kim. 1998. Determination of ginseng saponins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Sci. & Tech.* **11**, 436-439.
- Kim, B. M., S. H. Park and D. S. Chung. 1997. Studies on α -amylase from Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) (I)-separation of crude ginseng α -amylase and its some properties. *J. Seoul Woman's Univ.* 337-348.
- Kim, C. H., Y. Sako and Y. Ishida. 1995. Inheritance of PSP toxin composition in the toxin dinoflagellate *Alexandrium* spp. *Korean J. Phycol.* **10**, 59-67.
- Kim, C. S., K. J. Choi, S. C. Kim, S. Y. Ko and H. S. Sung. 1998. Controls of the hydrolysis of ginseng saponins by neutralization of organic acids in red ginseng extract preparation. *J. Ginseng Res.* **22**, 205-210.
- Kim, N. H., H. M. Lee, C. H. Choi and S. K. Lee. 1998. Clinical effect of Korean red ginseng on osteoporosis. *J. Ginseng Res.* **22**, 114-121.
- Kim, N. M., J. T. Lee and J. W. Yang. 1996. Change in chemical components of red ginseng extract solution and physiochemical properties of precipitates formed during sterilization and storage. *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 54-59.
- Narihiro, T., S. Takebayashi and A. Hiraishi. 2004. Activity and phylogenetic composition of proteolytic bacteria in mesophilic fed-batch garbage composters. *Microbes. Environ.* **19**, 292-300.
- Oh, H. I., S. J. Lee, J. H. Do, S. D. Kim and S. K. Hong. 1981. Physical and chemical characteristics of *Panax ginseng* starch. *Korean J. Ginseng Sci.* **5**, 114-121.
- Park, S. C., Y. H. Noh and J. H. Koo. 1995. Effect of ginseng components on content of cholesterol and activity of acyl CoA: Cholesterol acyltransferase in Hep G2 cell cultured in cholesterol rich medium. *Korean J. Ginseng Sci.* **19**, 212-218.
- Rezzonico, F., G. Defago and Y. Moenne-Loccoz. 2004. Comparison of ATPase-encoding type III secretion system *hrcN* genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonads* and in phytopathogenic proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5119-5131.
- Sveath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Williams and Wikins, Baltimore.
- Yoon, J. H., W. T. Seo, Y. K. Shin, Y. H. Kho, K. H. Kang and Y. H. Park. 2002. *Paenibacillus chinjuensis* sp. nov., a novel exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 415-421.