

엽차용 녹차 추출물 및 분획물의 항균효과

정숙현^{1*} · 윤교희²

¹동서대학교 식품생명공학전공

²상지영서대학교 식품영양학과

Antimicrobial Activity of Extracts and Fractions of Green Tea Used for Coarse Tea

Sook Hyun Chung^{1*} and Kyo Hie Yoon²

¹Dept. of Food & Biotechnology, Dongseo University, Busan 617-716, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Sangji Youngseo College, Gangwon 220-702, Korea

Abstract

Antimicrobial activities of green tea extracts used for coarse tea were investigated by disc diffusion method using eight different bacteria. Among the green tea extracts, the 70% ethanol extract demonstrated the strongest antimicrobial activities against *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and thus was further fractionated. Among these fractions, the ethyl acetate fraction showed the strongest antimicrobial activities against *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), and *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). These activities exceeded that of all extracts and fractions tested in this study. Interestingly, although green tea extracts showed significant antimicrobial activity against *Micrococcus luteus* (*M. luteus*), once fractionated, the ethyl acetate fraction did not show any antimicrobial activity against *M. luteus*. MICs of the ethyl acetate fraction were 5 µL/disc against *B. subtilis* and 3 µL/disc against *S. aureus*, *S. mutans* and *V. parahaemolyticus*. 90% inhibition of *B. subtilis* was observed with 0.05% ethyl acetate fraction but *S. mutans* needed over 0.1% ethyl acetate fraction to exhibit the same inhibition as *B. subtilis*. Antimicrobial activities of ethyl acetate fractions were reduced around 10% by thermal treatment at 121°C for 20 min. All the results suggest that the 70% ethanol extract as well as the ethyl acetate fraction from green tea used for coarse tea could be further developed into a natural antimicrobial agent.

Key words: antimicrobial activity, green tea, extract, fraction, MIC

서 론

식품 저장에 관한 기술은 식품관련 산업계와 학계의 연구를 통하여 꾸준히 발전하고 있다. 현재 한국의 식품첨가물 공전에는 총 18종의 화학합성품 보존제가 허가되어, 기준이 설정되어 있다. 그러나 소비자들은 최근의 웰빙 문화와 경제적인 수준 향상으로 천연 첨가물에 대한 요구를 강하게 나타내고 있다(1). 이것은 수세기에 걸쳐 식용 가능한 식물들이 부작용 없이 식품 보존제로서 이용되는 과정을 보면서 새로운 화학합성품에 비하여 천연 물질에 대한 안전성을 소비자가 높게 신뢰하기 때문에 나타나는 현상이다. 미국의 식품첨가물 규정에서는 오래 전부터 식품에 보존제로 사용해 왔거나, 천연물의 추출물을 보존제로서 이용할 때는 합성보존제와는 달리 규제를 하지 않으며, 특별히 이들을 GRAS (Generally Recognized As Safe)급으로 분류하고 있다(2). 식물성 원료로부터 항균력을 과학적으로 증명하여 보여준

최초의 보고서는 19세기 초 Chamberland가 cinnamon oil의 *Bacillus anthracis* 포자에 대한 항균효과였고, 그 이후 phytochemical에 의한 항균의 효과는 catechin, flavonoid, saponin, tannin, thiosulfinate 등의 화학분자들을 대상으로 연구되어 확인되었다(3).

세계적으로 물 다음으로 많이 마시는 차는 그 가공 공정에 따라 약간의 차이는 있으나 차나무(*Camellia sinensis* L.)의 잎을 원료로 하여 제조된다(4). 동양권에서는 서양과 달리 비 발효차인 녹차가 주류를 이루며, 차의 기호성은 카페인이 나타내는 자극적인 효과와 다양한 향미성분에 의한 관능적인 효과로 나타난다(5). 20여년 전부터 녹차의 관능적 효과 외에 다양한 생리적 활성이 그 원인 물질의 확인과 함께 과학적으로 증명되어 발표되고 있다. 특히 녹차의 카테킨은 항산화효과(6,7), 항암효과(8,9), 콜레스테롤 저하효과(10), 항균효과(11-21), virus 감염억제효과(22,23) 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과로서 녹

*Corresponding author. E-mail: shchung@gdsu.dongseo.ac.kr
Phone: 82-51-320-1794, Fax: 82-51-320-1781

차가 건강식품, 식품보존료, 향균제 등의 다양한 제품으로서 개발될 산업적 잠재 가치를 가지고 있다(24).

한편, 현재 녹차 추출물의 항균성에 관한 연구는 대부분이 1번차인 고급 녹차를 시료로 하였고, 가격이 저렴하여 산업성이 있는 4번차를 시료로 한 경우는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 채엽 시기가 늦어짐에 따라 카테킨의 함량이 증가됨을 보여준 이전의 보고들(25-28)에 근거하여, 가격이 저렴한 엽차용 녹차를 산업적으로 보다 효율적으로 이용할 목적으로 9월에 수확한 후 증자시킨 4번 녹차의 추출물과 이의 여러 가지 용매 분획물의 세균에 대한 항균효과를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

추출물과 분획물의 세균에 대한 항균활성을 검토하기 위하여 사용한 녹차는 전라남도 보성군 봉산리에 위치한 대한다업(주)의 보성다원에서 2005년 9월에 채취한 것을 증자, 건조 및 분쇄한 다음 체가름(200 mesh)하여 제조하였고, 이를 -20°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

녹차 추출물 및 분획물의 제조

녹차 추출물 및 분획물은 Wee 등(27)의 방법을 약간 수정한 아래의 방법에 따라 상온수 추출물, 열수(80°C의 물) 추출물, 70% ethanol 추출물을 제조하였고, 분획물은 70% ethanol 추출물로부터 여러 가지 용매를 사용하여 다음과 같이 분획하였다. 즉, 상온수 추출물은 녹차 분말 100 g을 증류수 1 L에 가한 후 진탕추출(상온, 12시간) 및 원심분리(3,000 rpm, 15분)하여, 상등액을 취한 다음, 다시 여과(Whatmann No.1, Maidstone, England)하여 제조하였고, 이의 분말은 여액을 농축 및 동결건조 하여 제조하였다. 열수 추출물 및 이의 분말은 80°C 증류수를 이용하여 3시간 동안 진탕시켜 추출한 후 상온수 추출물과 이의 분말 제조공정과 동일한 과정으로 제조하였다. 70% ethanol 추출물은 녹차 분말 100 g을 70% ethanol 1 L에 가하여 진탕추출(상온, 6시간) 및 원심분리(3,000 rpm, 15분)하여 상등액을 취한 다음, 다시 여과(Whatmann No.1, Maidstone, England)하여 제조하였고, 이의 분말은 농축 및 동결건조 하여 제조하였다. 녹차의

70% ethanol 추출물 유래 분획물은 앞의 방법에 의하여 제조된 70% ethanol 추출물에 hexane, ethanol, 증류수를 10:1:9(v/v/v)의 비율로 혼합한 용액 500 mL을 가하여 진탕추출(상온, 6시간, 3회)한 다음, hexane층을 분리, 농축 및 동결건조 하여 hexane 분획물을 제조하였고, 수용액층에는 chloroform 500 mL을 가하여 hexane 분획물 제조와 동일한 과정을 거쳐서 chloroform 분획물을 제조하였으며, ethyl acetate 분획물 및 butanol 분획물도 동일한 과정을 거쳐서 순차적으로 제조하였다. 사용된 용매는 모두 Merck(Darmstadt, Germany)사의 GR 급으로 사용하였다.

시험균주

항균력 조사에 사용된 균주는 식품 관련 *Escherichia coli* (*E. coli*) KCTC 1116, *Salmonella* Typhimurium(*S. Typhimurium*) KCTC 1925, *Klebsiella pneumoniae*(*K. pneumoniae*) KCTC 2208 및 *Vibrio parahaemolyticus*(*V. parahaemolyticus*) KCTC 2471과 같은 4종의 그람 음성 세균과 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*) KCTC 1916, *Bacillus subtilis*(*B. subtilis*) KCTC 1021, *Micrococcus luteus*(*M. luteus*) KCTC 1056 및 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*) KCTC 3300과 같은 4종의 그람 양성 세균으로 구성된 총 8종을 선정하였으며, 이들의 특징은 Table 1과 같다.

항균활성

항균활성의 측정은 paper disc(8 mm size, Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용한 disc 확산법으로 실시하였다(29). Table 1에 정리된 8종의 균주들 각 특성에 맞게 14시간 전배양 시킨 균액을 spectrophotometer(UV/VIS-1201, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 600 nm에서 흡광도 0.5가 되도록 희석시켰다. 이어서 희석된 균액 50 µL를 2 mL의 top agar(0.75% agar)에 잘 혼합하여 준비된 평판배지에 중첩하여 균했다. 멸균된 paper disc를 잘 밀착시킨 후 준비된 5% 추출물을 여과하여(0.45 µm pore size, MFS 13, Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan) 제균시킨 후 50 µL를 취하여 paper disc에 흡수시켰다. 그 위에 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl) 25 µL를 가하여 추출물을 확산시켜 주었다. Control은 5% 추출물을 대신하여 멸균된 생리식염수 50 µL를 paper disc에 흡수시켰다. 각 균의 적정온도에

Table 1. List of microorganisms for antimicrobial activity test

Strains	Characters	Culture conditions
<i>E. coli</i> KCTC 1116	G ⁻	Nutrient media, 36°C
<i>S. Typhimurium</i> KCTC 1925	G ⁻	
<i>K. pneumoniae</i> KCTC 2208	G ⁻	
<i>S. aureus</i> KCTC 1916	G ⁺	
<i>B. subtilis</i> KCTC 1021	G ⁺	Nutrient media, 30°C
<i>M. luteus</i> KCTC 1056	G ⁺	
<i>V. parahaemolyticus</i> KCTC 2471	G ⁻	Nutrient media added 3% NaCl, 30°C
<i>S. mutans</i> KCTC 3300	G ⁺	Brain heart infusion, 36°C

서 24시간 배양 후 paper disc 주위의 투명환의 지름을 측정하였다. 항균활성은 투명환의 지름으로 나타내었다. 배지는 모두 Difco(Detroit, MI, USA) 제품의 것을 사용하였다.

Ethyl acetate 분획물의 최소저해효과(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

Ethyl acetate 분획물의 MIC는 항균활성이 강하게 나타난 5% ethyl acetate 분획물을 시료로 하여 항균활성의 측정에서 두드러진 효과를 보인 *S. aureus*, *B. subtilis*, *V. parahaemolyticus* 및 *S. mutans*를 대상으로 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 즉, 5% ethyl acetate 분획물의 양을 달리하여 paper disc에 가한 다음 항균활성 측정과 동일한 방법으로 실험하였고, ethyl acetate 분획물의 MIC는 투명환이 9 mm 이상이 되는 농도로 하였다.

Ethyl acetate 분획물의 생육저해효과

Ethyl acetate 분획물의 생육저해효과는 항균활성 측정과 MIC의 결과에 근거하여 *B. subtilis* 및 *S. mutans*를 대상으로 ethyl acetate 분획물의 농도에 따른 생육저해효과를 측정하였다. 즉, ethyl acetate 분획물의 농도를 각각 0.1%, 0.05%, 0.01%로 준비한 배지 20 mL에 *B. subtilis*와 *S. mutans*의 준비된 균액(흡광도를 600 nm에서 1.5로 희석하여 조정된 균액)을 각각 0.1 mL씩 첨가하여 각각 30°C와 36°C에서 배양하면서 4시간 간격으로 24시간 동안 흡광도를 측정하여 균의 생육저해의 정도를 측정하였다.

열 안정성 측정

항균활성이 우수한 ethyl acetate 분획물을 121°C에서 20분간 열처리한 후 *B. subtilis*, *V. parahaemolyticus* 그리고 *S. mutans*를 대상으로 항균활성 측정과 같은 방법으로 측정된 다음 녹차 추출물의 열 안정성은 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{열안정성(\%)} = \frac{B}{A} \times 100$$

A: ethyl acetate 분획물의 항균활성 측정치(mm)

B: 열처리된 ethyl acetate 분획물의 항균활성 측정치(mm)

결과 및 고찰

수율

여러 가지 추출용매에 따른 녹차분말 추출수율은 Table 2에 나타내었다. 수 추출물의 수율은 상온수 및 열수와 같이 추출수의 온도에 관계없이 수율이 아주 낮아 상온수 추출물이 4.6%, 열수 추출물이 1.1%로 나타났다. 이와 같이 녹차 추출물의 수율이 열수 추출에 비하여 상온수 추출이 높은 것은 추출시간의 차이(상온수 추출: 12시간, 열수 추출: 3시간) 때문이라 판단되었다. 70% ethanol 추출물의 수율은 33.0%로 상온수 추출물의 수율에 비교할 때 추출 시간이

Table 2. Extraction yield of green tea extracts and its fractions with various solvents

Extracts	Yield (%)
Room temperature water	4.6
Hot water at 80°C	1.1
70% ethanol	33.0 (100) ¹⁾
Fractions	Yield (%)
Hexane	5.4 (16.3)
Chloroform	1.1 (3.3)
Ethyl acetate	11.2 (33.8)
Butanol	7.4 (22.5)

¹⁾The values in parentheses mean % of 70% ethanol extract basis.

6시간으로 상온수 추출 시간의 절반임에도 불구하고 7배 이상의 높은 추출수율을 보임으로써 70% ethanol이 녹차 추출용매로서 효과적임을 알 수 있었다. Sung(30)은 100% ethanol을 사용하여 78°C에서 9시간동안 녹차를 추출한 결과 65%의 추출물 수율로서 70% ethanol을 사용하여 상온에서 6시간 동안 추출한 본 실험의 결과에 비하여 약 2배 정도 높았다고 보고한 바 있다. 70% ethanol 추출물로부터 여러 가지 용매를 달리하여 분획한 분획물의 수율은 ethyl acetate 분획물이 11.2%로 가장 높은 추출수율을 보였고, 다음으로 butanol 분획물(7.4%), hexane 분획물(5.4%)의 순이었으며, chloroform 분획물이 1.1%로 가장 낮았다. Ethyl acetate 분획물은 조 카테킨으로서 ethyl acetate 수율이 11.2%인 결과는 조 카테킨의 함량에서는, 녹차의 카테킨 함량이 채엽 시기, 품종 및 생산지 등에 따라 다양하지만 건조녹차 기준으로 약 10~15%인 전보고(3,28)를 참고할 때, 9월 채엽 녹차가 상당한 가치가 있는 것으로 판단되었다. 그러나 녹차 카테킨 조성성분 중 항균효과가 탁월한 (-)-epicatechin gallate(ECG) 및 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG)(3) 등에 대한 9월 채엽 녹차의 성분 분석이 필요한 것으로 생각된다.

항균활성

녹차 추출물에 대한 항균활성을 *E. coli*, *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae* 및 *V. parahaemolyticus*와 같은 4종의 그램 음성 세균과 *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* 및 *S. mutans*와 같은 4종의 그램 양성 세균으로 구성된 총 8종의 세균에 대하여 disc 확산법으로 실시한 결과는 Table 3에, 그리고 Table 3의 결과 중 ethyl acetate 추출물에서 우수한 항균활성을 나타낸 *B. subtilis*의 disc 확산법에 의한 항균효과 사진은 Fig. 1에 나타내었다. 8종의 세균에 대한 녹차 추출물 간의 항균활성은 상온수 추출물의 경우 *E. coli*(10.1 mm), *S. Typhimurium*(13.3 mm), *K. pneumoniae*(12.3 mm), *M. luteus*(13.3 mm) 및 *S. mutans*(12 mm)와 같은 5종의 세균에 대하여 가장 높았고, 열수 추출물의 경우 *B. subtilis*(14.5 mm)와 같은 1종의 세균에 대하여 가장 높았으며, 70% 에탄올 추출물의 경우 *V. parahaemolyticus*(15.5 mm) 및 *S. aureus*(13.5 mm)와 같은 2종의 세균에 대하여 가장 높아, 추출

Table 3. Antimicrobial activities of green tea extracts and its fractions with various solvents¹⁾ (Inhibition zone: mm)²⁾

Microorganisms	Solvents						
	Water	Hot water	70% ethanol	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol
<i>E. coli</i>	10.1	8.0	8.0	0.0	8.0	8.0	8.0
<i>S. Typhimurium</i>	13.3	11.5	8.5	8.0	8.0	8.0	0.0
<i>K. pneumoniae</i>	12.3	8.0	8.0	8.0	8.0	11.5	9.0
<i>V. parahaemolyticus</i>	14.3	15.0	15.5	9.5	8.0	25.5	13.0
<i>S. aureus</i>	11.0	11.0	13.5	10.0	8.0	19.0	8.5
<i>B. subtilis</i>	14.0	14.5	12.0	8.0	0.0	17.5	11.5
<i>M. luteus</i>	13.3	12.0	8.0	8.0	0.0	0.0	8.0
<i>S. mutans</i>	12.0	9.0	11.0	16.0	9.0	17.5	9.5
Total	100.3	89.0	84.5	61.5	49.0	107.0	67.5

¹⁾50 µL of 5% extract or fraction was loaded per disc.

²⁾Mean of three measurements.

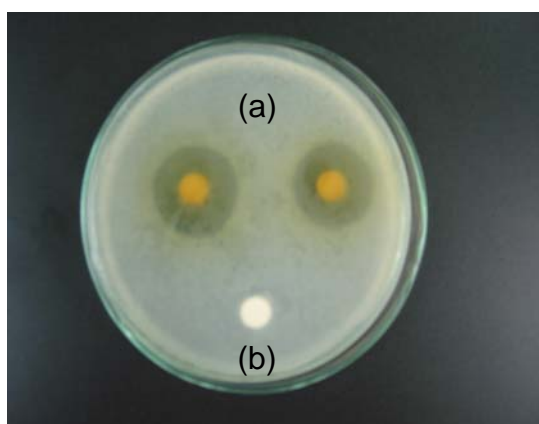


Fig. 1. Paper disc test of *B. subtilis* with ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of green tea (a: 5%, b: control).

물 간에 세균의 종류에 따른 항균 활성능에 차이가 인정되었다. 이상의 여러 가지 추출방법에 따른 녹차 추출물 중 상온 수 추출물과 열수 추출물과 같은 수 추출물의 낮은 수율을 감안할 때 식품 보존료의 개발에는 경제적 측면에서 선호할 만한 방법은 아닌 것으로 생각되었다. 한편, 70% 에탄올 추출물로부터 여러 가지 용매를 달리하여 분획한 분획물 간의 항균활성은 70% ethanol 추출물에 비하여 ethyl acetate 분획물이 *V. parahaemolyticus*(25.5 mm), *K. pneumoniae* (11.5 mm), *S. aureus*(19.0 mm), *B. subtilis*(17.5 mm), *S. mutans*(17.5 mm)와 같은 5종의 세균에 대하여 높았고, hexane 분획물이 구강세균인 *S. mutans*(16 mm)와 같은 1종에 대하여 높았으나, ethyl acetate 분획물에 비하여 낮았으며, 기타 분획물의 경우 세균의 종류에 관계없이 모두 낮았다.

한편 녹차 추출물의 항균효과를 검토하는 연구에서, Park 등(15)은 *S. aureus*에 대한 항균력이 *S. Typhimurium*에 대한 항균력보다 강하였다고 보고하였고, Yeo 등(19)은 *V. parahaemolyticus*가 낮은 농도에서 항균효과를 나타내었다고 보고하여 본 실험의 결과와 잘 일치하였다. 또한, Cho 등(11)은 여러 가지 용매로 분획한 녹차 추출물 유래 분획물

의 항균활성은 chloroform 분획물과 hexane 분획물에 비하여 ethyl acetate 분획물이 높았다고 보고한 바 있다. 한편, ethyl acetate 분획물의 여러 가지 세균에 대한 항균효과는 그람 음성세균인 *V. parahaemolyticus*에 대하여 가장 높았고, *K. pneumoniae*에도 상당한 효과가 인정되었으나, *E. coli*와 *S. Typhimurium*에는 아주 약한 효과를 나타내었다. 또한 그람 양성세균에서는 *M. luteus*를 제외한 실험군중 3종 즉 *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. mutans*에 대하여 강한 항균효과를 나타내었다.

최소저해농도(MIC)

항균활성이 가장 강하게 나타난 녹차 70% ethanol 추출물 유래 ethyl acetate 분획물의 MIC에 대한 결과를 Table 4에 나타내었다. 녹차 70% ethanol 추출물 유래 ethyl acetate 분획물의 MIC는 *B. subtilis*의 경우 5 µL/disc이었고, *S. aureus*와 *S. mutans*의 경우 3 µL/disc이었으며 *V. parahaemolyticus*의 경우 3 µL/disc 이하이었다. 한편, Yeo 등(19)은 녹차 추출물이 *V. parahaemolyticus*에 대하여 MIC가 60 µg/mL로 아주 낮았다고 보고한 바 있고 Baek 등(31)은 대나무 추출물이 *S. aureus*에 대하여 MIC가 10 µL/disc, *S. mutans*에 대하여 MIC가 20 µL/disc이었다고 보고한 사실로 미루어 보아 본 실험의 녹차 ethyl acetate 분획물은 실험군중에 대한 MIC가 아주 낮아, 항균제 혹은 천연 식품보존료로서의 개발 가능성은 높은 것으로 판단되었다.

Table 4. Minimum inhibitory concentrations of ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of green tea on bacteria

Microorganisms	Inhibition zone ¹⁾					
	Concentrations (µL/disc) ²⁾					
	50	30	20	10	5	3
<i>S. aureus</i>	+++	+++	++	++	+-	+-
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	++	+	+	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+++	+++	++	+	+
<i>S. mutans</i>	+++	++	++	+	+	+-

¹⁾+++ : >15 mm, ++ : 11~15 mm, + : 9~11 mm, +- : 9 mm, - : none.

²⁾Loaded volume of 5% ethyl acetate fraction.

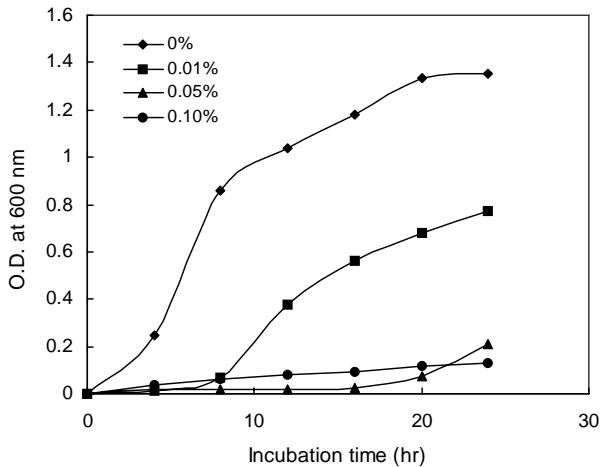


Fig. 2. Effect of ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of green tea on the growth of *B. subtilis*.

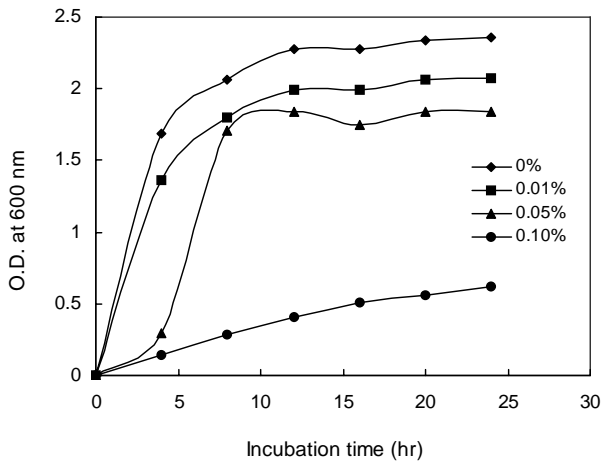


Fig. 3. Effect of ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of green tea on the growth of *S. mutans*.

증식억제효과

녹차 70% ethanol 추출물 유래 ethyl acetate 분획물의 농도가 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%로 첨가된 배지에서 *B. subtilis* 및 *S. mutans*를 배양시키면서 24시간 동안 4시간마다 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세균의 증식억제효과를 살펴 본 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. Ethyl acetate 분획물의 첨가 농도에 따른 *B. subtilis*의 증식곡선은 control(0%)은 정상적인 균의 성장곡선을 나타내었고, 0.01% 농도에서는 ethyl acetate 분획물 효과에 의해 control보다 유도기가 4시간 이상 연장되었으며, 24시간 배양한 뒤 control과 비교하였을 때 약 50%정도의 증식억제효과가 있었다. 0.05%와 0.1% 추출물 첨가에서는 균의 증식이 거의 나타나지 않고 있다. *S. mutans*의 0.01%, 0.05% 농도에서는 농도 증가와 함께 비례하여 증식억제의 정도가 증가됨을 나타내었고, 0.1%의 추출물 첨가에서는 24시간 배양 후 control에 비해 약 75% 정도의 증식억제효과가 있었다. Cho 등(11)은 *E. coli*

Table 5. Thermal stability of ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of green tea for antimicrobial activity¹⁾ (Inhibition zone: mm)

Microorganisms	No-heat	Heat
<i>B. subtilis</i>	17.0 ^A	15.0 ^B (88.2%) ²⁾
<i>V. parahaemolyticus</i>	22.0	18.5 (84.1%)
<i>S. mutans</i>	16.5	15.0 (90.9%)

¹⁾With 50 μ L of heated (121°C, 20 min) or no-heated 5% ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract per disc.

²⁾Thermal stabilities were calculated as B/A \times 100.

O157:H7 932의 배양에서 0.1% 녹차 추출물 유래 ethyl acetate 분획물을 첨가한 경우 control에 비하여 24시간 배양에서 약 25%, 72시간 배양에서는 약 50%의 증식억제를 볼 수 있었다고 보고한 바 있다. 이와 같은 본 실험의 결과와 Cho 등(11)의 보고로 미루어 보아 녹차 추출물의 증식 억제 효과는 균종에 따라 아주 다양한 형태로 나타난다고 판단되었다.

열안정성

녹차 70% ethanol 추출물 유래 ethyl acetate 분획물의 열안정성을 disc 확산법으로 실험한 결과를 Table 5에 나타내었다. 열처리된(121°C, 20분) 5% ethyl acetate 분획물의 *S. mutans*, *B. subtilis* 및 *V. parahaemolyticus*를 대상으로 한 항균활성을 열처리되지 않은 5% ethyl acetate 분획물의 항균활성과 비교 조사한 결과에서 열처리된 ethyl acetate 분획물은 각각의 균종에 대하여 90.9%, 88.2% 및 84.1%의 항균활성의 열안정성을 나타내었다. *V. parahaemolyticus*에 대한 항균활성이 열에 가장 민감하여 15.9%의 항균능 감소를 보였고, *S. mutans*에 대한 항균활성은 열에 가장 안정적으로 9.1%의 항균능 감소를 나타내었다. 이것은 Kim 등(13)이 녹차의 열수 추출물을 50~200°C로 30분간 열처리하여 3종의 *Bacillus*속 균을 대상으로 항균효과를 조사한 실험에서 열처리가 항균활성의 증감에는 영향을 미치지 않았다고 보고하여 본 실험의 *B. subtilis*에서 보여준 11.8% 항균활성의 감소와는 차이가 있었다. 이와 같은 본 실험의 결과와 Kim 등(13)의 결과 간에 차이는 추출용매를 달리하여 추출한 성분 간의 열안정성 차이 때문이라 판단되었다. Kubo 등(32)은 거의 모든 주요 녹차의 향기성분이 항균효과를 나타내고 있으며 특히 terpenol계 성분인 nerolidol과 indole은 중요한 항균활성을 나타내거나 다른 성분들의 항균효과를 강화시키는 것으로 보고하였으며, 이러한 향기 성분들은 휘발성이 큰 화합물들로서 열처리와 크게 상관이 있을 것으로 생각된다.

요약

9월에 수확하여 엽차용 녹차로 시판되는 보성산 녹차를 상온수, 80°C 열수, 70% ethanol 용액으로 추출하고, 70% ethanol 추출물을 다시 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol로 분획한 다음 녹차 추출물과 분획물의 그래프 양성균

과 그램 음성균 8종에 대한 항균활성에 대하여 조사를 하였다. 녹차의 추출 수율은 70% ethanol 추출물은 33.0%, ethyl acetate 분획물은 11.2%를 보였다. 8종의 세균에 대한 녹차 추출물 간의 항균활성은 70% 에탄올 추출물의 경우 수 추출물에 비하여 *Vibrio parahaemolyticus*(*V. parahaemolyticu*) 및 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)에 대하여 가장 높았다. 70% 에탄올 추출물로부터 여러 가지 용매를 달리하여 분획한 분획물 간의 항균활성은 70% ethanol 추출물에 비하여 ethyl acetate 분획물의 경우 *Klebsiella pneumoniae*, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*(*B. subtilis*) 및 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)와 같은 5종의 세균에 대하여 높았다. 70% ethanol 추출물 유래 ethyl acetate 분획물의 MIC는 *B. subtilis*의 경우 5 µL/disc이었고, *S. aureus*와 *S. mutans*의 경우 3 µL/disc이었으며, *V. parahaemolyticus*의 경우 3 µL/disc 이하로 아주 낮았다. Ethyl acetate 분획물의 첨가 농도에 따른 항균효과는 *B. subtilis*와 *S. mutans* 두 균종에서 확연히 나타났고 *B. subtilis*는 0.05% 이상의 첨가로 24시간 증식시켰을 때 control에 비하여 균증식이 90% 이상 억제됨을 보였으며, *S. mutans*는 동일한 균증식 억제 효과를 얻기 위하여 0.1% 이상의 ethyl acetate 분획물 농도가 요구되었다. Ethyl acetate 분획물의 열처리(121°C, 20분)는 균종에 따라 10%정도의 항균활성을 감소시켰다. 이와 같은 결과를 종합할 때 9월에 채엽된 저렴한 녹차로 천연 항균제 혹은 식품보존료의 개발은 충분한 잠재력이 있는 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구 결과의 일부는 2006년도 동서대학교 학술연구조성비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Gould GW. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J Food Prot* 59(Suppl): 82-86.
- Frazier WC, Westhoff DC. 1988. Preservation by food additives. In *Food microbiology*. 4th ed. McGraw-Hill International Book Co., Singapore. p 146.
- Junera LR, Okubo T, Hung P. 2000. Catechins. In *Natural food antimicrobial systems*. Naidu AS, ed. CRC press, New York. p 381-398.
- Stagg GV. 1980. Tea-the element of cuppa. *Nutr Bull* 29: 233-245.
- Rall TW. 1990. *Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 8th ed. Pergamon, New York. p 618-637.
- Serafini M, Ghiselli A, Luzzi-Ferro A. 1996. *In vivo* anti-oxidant effect of green and black tea in man. *European J Clin Nutr* 50: 28-32.
- Ryu BH, Park CO. 1997. Antioxidant effect of green tea extracts on enzymatic activities of hairless mice skin induced by ultraviolet B light. *Korean J Food Sci Technol* 29: 355-361.
- Morre DJ, Morre DM, Sun H, Cooper R, Chang J, Janle EM. 2003. Tea catechin synergies I inhibition of cancer cell proliferation and of a cancer specific cell surface oxidase (ECTO-NOX). *Pharmacol Toxicol* 92: 234-241.
- Ahn TG, Kim DW, Lee BR, Han SJ. 2006. The effect of green tea extract on cisplatin in cervical cancer cell lines. *Korean J Obstetrics and Gynecology* 49: 592-598.
- Jin HH, Yang JL, Jeong JH, Kim YH. 2004. Hypocholesterolemic effects of green tea in cholesterol-fed rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 47-51.
- Cho SY, Choi JH, Ham SS, Oh DH. 2005. Antimicrobial activities of green tea extract and fractions on the *E. coli* O157:H7. *J Food Hyg Safety* 20: 48-52.
- Choe IU, Jeong CH, Park YG. 2003. Anticariogenic activities of various plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1221-1225.
- Kim CS, Chung SK, Oh YK, Kim RY. 2003. Antimicrobial activity of green tea against putrefactive microorganism in steamed bread. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 413-417.
- Hamilton-Miller JMT. 2001. Anti-cariogenic properties of green tea (*Camellia siensis*). *J Med Microbiol* 50: 299-302.
- Park CS, Cha MS, Kim ML. 2001. Changes in the antibacterial activity of green tea extracts in various pH of culture broth against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*. *Korean J Postharvest Sci Technol* 8: 206-212.
- Park CS, Cha MS. 2000. Comparison of antibacterial activities of green tea extracts and preservatives to the pathogenic bacteria. *Korean J Food & Nutr* 13: 36-44.
- Cho YS, Kim HS, Kim SK, Kwon OC, Jeong SJ, Lee YM. 1997. Antibacterial and bactericidal activity of green tea extracts. *J Korean Tea Soc* 3: 89-103.
- Roh HJ, Shin YS, Lee KS, Shin MK. 1996. Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked rice putrefactive microorganism. *Korean J Food Sci Technol* 28: 66-71.
- Yeo SG, Ahn CW, Kim IS, Park YB, Park YH, Kim SB. 1995. Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 293-298.
- Hamilton-Miller JMT. 1995. Antimicrobial properties of tea (*Camellia siensis* L.). *Antimicrob Agent Chemother* 39: 2375-2377.
- Kim YG. 1995. Antibacterial activities of Korean and foreign green tea extract. *Korean J Env Hlth Soc* 21: 39-46.
- Mikoyama A, Ushijima H, Nishimura S, Koike H, Toda M, Hara Y, Shimamura T. 1991. Inhibition of rotavirus and enterovirus infections by tea extracts. *Japan J Med Sci Biol* 44: 181-186.
- Shimamura T, Hara Y. 1991. Preventive and curative medication against infection with influenza virus, containing tea or tea polyphenols. *European Patent* EP 417385 A2.
- Kim HY, Lee YJ, Hong KH, Kwon YK, Lee JU, Kim SH. 1999. Studies on the development of natural preservatives from natural products. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1667-1678.
- Harvest of green tea. http://www.dongsuhtea.com/study/teainfo_03.asp
- Kim SH, Han DS, Park JD. 2004. Changes of some chemical compounds of Korean (posong) green tea according to harvest periods. *Korean J Food Sci Technol* 36: 542-546.
- Wee JH, Moon JH, Park KH. 1999. Catechin content and composition of domestic tea leaves at different plucking

- time. *Korean J Food Sci Technol* 31: 20-23.
28. Oh MJ, Hong BH. 1995. Variation of pectin, catechins and caffeine contents in Korean tea (*Camellia sinensis* L.) by harvesting time and processing recipe. *Korean J Crop Sci* 40: 775-781.
29. Pidcock LJV. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J Appl Bacteriol* 68: 307-312.
30. Sung KC. 2006. A study on the pharmaceutical characteristics and analysis of green-tea extract. *J Korean Oil Chemists' Soc* 23: 115-124.
31. Baek JW, Chung SH, Moon GS. 2002. Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1073-1078.
32. Kubo I, Muroi H, Himejima M. 1992. Antimicrobial activities of green tea flavor components and their combination effect. *J Agric Food Chem* 39: 245-248.

(2008년 8월 11일 접수; 2008년 11월 4일 채택)