

## 녹차추출물로부터 항균물질의 분리 및 구조동정

신영희 · 이승철<sup>1</sup> · 최성길 · 허호진 · 조성환<sup>†</sup>

경상대학교 식품공학과 · 농업생명과학연구원, <sup>1</sup>경남대학교 식품생명공학과

## Separation and Identification of Antimicrobial Substances from Green Tea Extracts

Young-Hee Shin, Seung-Cheol Lee<sup>1</sup>, Sung-Gil Choi,  
Ho Jin Heo and Sung-Hwan Cho<sup>†</sup>

Department of Food Science and Technology · Institute of Agriculture and Life Science,  
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

### Abstract

Green tea has been shown to have multifunctional health-promoting properties including cholesterol level control, an antidiabetic effect and anticancer, antioxidant, and antimicrobial properties, in both in vivo and in vitro experiments. We earlier reported antifungal and antibacterial effects of green tea extract by investigating cell membrane functions. The purpose of the present study was to purify and identify antimicrobial substances from green tea extract. Such materials were extracted from green tea (*Camellia sinensis*, var. *sinensis*) and purified by high-performance liquid chromatography. The antimicrobial substances in the extract were identified as epicatechin gallate and epigallocatechin gallate by nuclear magnetic resonance spectrophotometry.

**Key words** : antimicrobial substances, *Camellia sinensis*, var. *sinensis*, high performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance spectrophotometer analysis.

### 서 론

현재까지 녹차 유래 유용물질들의 생리학적 기능 및 그 화학적 구조에 대해서는 국내외적으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 녹차에 관한 최근까지의 연구결과에서, 녹차는 건강한 생리활성 촉진작용(1-3)뿐만 아니라, 콜레스테롤 저해 효과(4), 항당뇨(5), 항암(6,7), 항산화(8-11), 항균(11-14) 등 다방면의 약리효과를 보이는 것으로 보고되고 있다. 본 연구진에서도 녹차 제품의 저장환경별 유용물질들의 생리학적 기능 및 활성물질의 변화(15-18)에 대하여 연구결과를 보고한 바 있다. 아울러, 본 연구진은 녹차추출물 처리전후의 전자현미경촬영사진 결과 및  $\beta$ -galactosidase 효소활성

변화를 통하여 녹차추출물이 미생물의 생육과 물질의 수송을 조절하는 세포막의 생화학적 기능에 미치는 영향을 검토하여 녹차추출물의 항균작용을 구명한 바 있다(19). 현재까지, 녹차추출물의 항균활성물질로는 (-)-epigallocatechin gallate가 가장 강한 암세포 성장억제 및 항균작용이 있는 것으로 보고(20)되어 있으며, 녹차의 정유 성분인 benzene, bonyl acetate, campene,  $\alpha, \beta, \gamma$ -pinnene 등이 미생물에 대한 항균효과가 있는 것으로 발표되었다(21). 그러나, 대부분의 녹차추출물의 항균효과나 항균성분이 항균기작에 기초를 둔 분자구조적인 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 따라서, 본 실험에서는 전보(19)에서 항균작용이 구명된 경남 하동산 녹차의 항균물질을 분리하고 그 성분들의 구조를 동정하여, 녹차추출물의 기능성 구명을 위한 기초자료를 획득하였기에 보고하고자 한다.

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : sunghcho@gnu.ac.kr  
Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

재료 및 방법

녹차시료의 조제

잎녹차는 경남 하동군 악양면에서 재배 중인 재래종 (*Camellia sinensis*. var. *sinensis*) 품종을 2007년 6월 채취하여 전통식 방법으로 덫음차로 제조한 것을 구입하여, 분쇄기를 이용하여 분쇄 후 100 mesh체를 통해 거른 후, 4°C 냉풍건조를 통해 수분활성도를 0.23으로 맞추어 20°C 데시케이트에 보관하면서 시료로 사용하였다. 녹차추출물 (Green tea extract : 이하 GTE로 칭함)은 분쇄한 덫음차를 100°C의 water bath에서 3시간동안 추출하여 1차 여과포를 이용하여 여과하였다. 여과액은 10분동안 5,000 rpm에서 원심분리하여 상정액을 수집하고 2차 여과시켜 얻은 액을 Rotary vaccum evaporator(Yamato, Japan)로 최초량의 1/10로 농축하고 동결건조하여 시료를 powder상으로 조제하였다.

항균력 시험균주

본 실험에서 녹차추출물의 항균력 검색용 균주는 식품원료 및 가공식품의 변질에 관여하는 부패미생물을 대상으로, 경상대학교 식품공학과에 보관중인 미생물을 계대배양하여 실험에 사용하였다. 항균력 검색용 공시균주는 brain heart infusion agar(BHIA) 등의 사면배지에 계대배양하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

항균력 검사

항균력 시험은 녹차추출물 분획물로 포화시킨 paper disk를 배지상에 접촉시켜, 앞에서 기술한 부패균주를 공시균주로 하여, 공시균주의 증식도를 비교하여 생육저해정도를 측정하는 paper disk 확산법(22)을 이용하였다. 즉, 각 공시균주의 한 백금이를 따서, 10 mL nutrient rich 액체 배지에서 24시간 배양한 후, 이중 0.1 mL을 0.75% BHIA 10 mL에 첨가하여 petri dish에 고르게 부었다. 잘 굳힌 후 표면에 paper disk(thick, 지름 10 mm)를 얹고, 무처리한 대조구와 함께 나머지 paper disk에 녹차추출물의 추출용매별 항균성이 높은 일정농도(250 mg/disk)의 High performance liquid chromatography(HPLC) 분획물을 각각 첨가한 후, 30°C에서 48 시간동안 배양한 후, disk 주위의 생육저해의 직경을 측정하여 항균성을 비교하였다.

항균활성물질의 분리 및 동정

항균력이 탁월한 녹차추출물로부터 항균활성물질을 HPLC를 이용하여 순수하게 분리하고, nuclear magnetic resonance(NMR) spectrophotometer 측정기에 의하여 항균활성물질의 화학구조를 동정하였다. 즉, 먼저 녹차에 함유된 catechin을 HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분리·정량하였다. 본 연구에서 이용된 HPLC는 CTO 10AVP column

oven, LC-6AD pump, SIL-10ADVP auto sample injector 및 SAP-10AVP UV/VIS detector로 구성되었으며, 210 nm에서 흡광도를 측정하였다(23). 사용된 column은 Shim-pack CLC guard column(10x4 mm)이 결합된 Shimadzu Shim-VP ODS column 5 μm(250x4.6 mm)이었으며, column 온도는 40°C로 고정하였다. 이동상의 용매는 A는 0.1% orthophosphoric acid(v/v, in water)이며, B는 0.1% orthophosphoric acid(v/v, in methanol)를 사용하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min이었고, 용매구배는 0~5분 B용매 40%, 5~12분 B용매 40~50%, 12~27분 B용매 50%로 유지, 27~30분 B용매 50~20% 및 30~35분 B용매 20~0%로 하였다. 위와 같은 HPLC 방법에 의하여 획득한 fraction중, 항균성이 있는 부분을 수거하여 동결건조하여 1H-NMR 및 13C-NMR 분석용 시료로 사용하였다. 본 실험에서는 NMR분석기기(Bruker DRX500 500 MHz, Germany)를 사용하였으며 TMS (Trimethyl silane: Cambridge isotope laboratory, Inc., U.S.A.)를 기준물질로 사용하였다.

결과 및 고찰

항균활성 물질의 분리

항균력이 탁월한 녹차추출물로부터 녹차에 함유된 catechin을 HPLC를 이용하여 순수하게 분리하여 얻어진 결과는 Fig. 1과 같다. 이와같이 분리된 catechin 분획물질중, 세균 및 효모에 대한 항균력을 보이는 분획물(Compound A 및 Compound B)을 BHIA plate상에 위치된 paper disk상에 분주하고, 공시균주의 증식도를 비교하여 생육저해정도를 측정하는 paper disk확산법을 실시한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이, Compound A 및 Compound B에서 모두 뚜렷한 생육저해환을 나타내고 있어 강력한 항균작용을 소유한 물질을 함유한 분획임을 확인할 수 있었다.

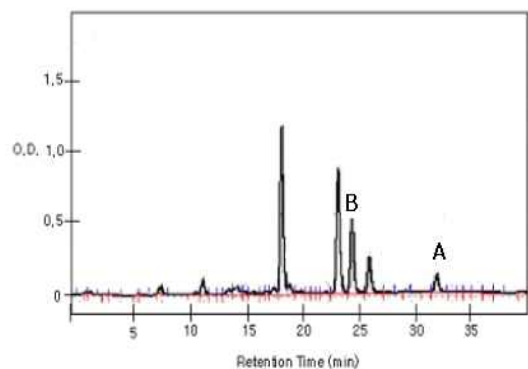
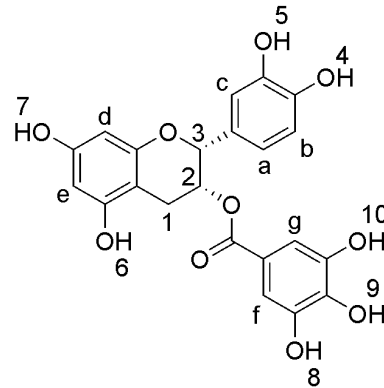


Fig. 1. HPLC chromatogram of catechin purified from green tea extract.

**Table 1. Inhibitory zone (mm) caused by the antimicrobial fractions of HPLC from GTE against food spoilage microorganisms**

Antimicrobial Fraction	Microorganism			
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Control	10	10	10	10
Compound A	17	16	17	17
Compound B	18	19	18	18

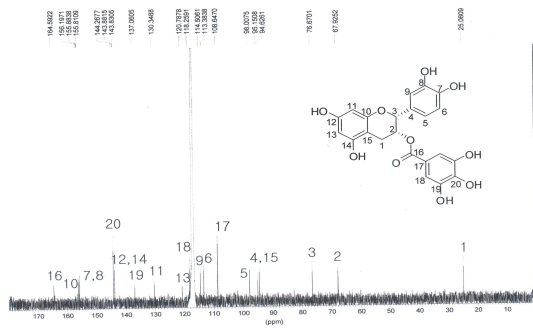


**Fig. 4. Chemical structure of (-)-epicatechin gallate**

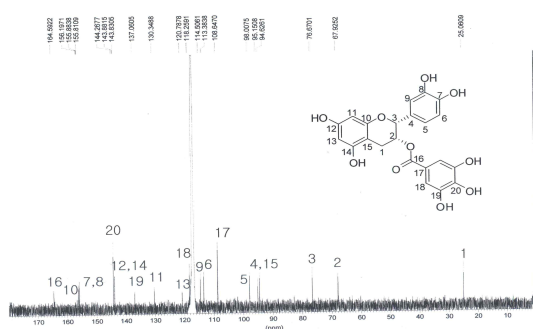
**NMR에 의한 항균물질의 구조분석**

전술한 결과에서와 같이, HPLC에서 분리한 각 항균분획 물질(Compound A 및 Compound B)의 구조분석을 위해 <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼을 실온에서 측정하였다. 먼저, Compound A 분획물의 경우, Fig. 2 및 Fig. 3에서 보는 바와 같이, Compound A의 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼으로부터 모든 특성 공명선의 해석이 다음과 같이 가능하며, 본 시료가 epicatechin gallate(ECG, Fig. 4)임을 규명하였다. 먼저, Fig. 2에서 보는 바와 같이, (-)-epicatechin gallate의 세 방향족 고리의 7개의 수소 (a, b, c, d, e, f, g)가 5.96에서 6.93 ppm에서 나타남을 확인하였다. a와 b의 수소는 6.84와 6.83 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다.

c의 수소는 6.93 ppm에서 이중선으로 나타났으며, d와 e는 5.99와 5.97 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다. 또한 f와 g의 수소는 같은 조건상에 놓여 있어서 6.90 ppm에서 단일선으로 나타났다. 방향족에 붙어있는 OH의 수소 4-10은 6.76과 6.74의 두 개의 단일선과 그 사이에서 넓은 영역을 가지고 나타났다. 지방족 고리에 있는 수소 1은 2.79에서 2.99사이에서 이중-이중선으로 나왔으며, 2의 수소는 5.50 ppm에서 다중선으로 나타났으며, 3의 수소는 5.07 ppm에서 단일선으로 나타났다. 아울러, Fig. 3에서 보는 바와 같이, compound A의 모든 탄소 공명선은 잘 해석이 가능해 <sup>1</sup>H-NMR의 해석 결과와 동일하게 (-)-epicatechin gallate으로 규명되었다. 산소를 포함하는 지방족 고리의 3개의 1, 2, 3 탄소가 25.06, 67.93, 76.67 ppm에서 각각 나타났다. 카르보닐 탄소 16의 경우, 인접한 산소의 벅김효과에 의해서 가장 저장인 164.59 ppm에서 나타나는 특징을 보이고 있다. OH기가 붙어 있는 방향족 탄소인 7, 8, 12, 14, 19, 20의 피크가 155.88, 155.81, 143.88, 143.83, 137.06, 144.27 ppm에서 각각 나타났으며, 나머지 방향족 탄소들은 94.63, 95.15, 98.01, 108.65, 113.38, 114.51, 118.26, 120.79, 130.35, 156.20 ppm에서 나타났다.



**Fig. 2. 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Compound (A) in CDCl<sub>3</sub>.**



**Fig. 3. 125 MHz <sup>13</sup>C-NMR spectrum of Compound (A) in CDCl<sub>3</sub>.**

한편, Fig. 5 및 Fig. 6에서 보는 바와 같이, Compound B의 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼으로부터 모든 특성 공명선의 해석이 다음과 같이 가능하며, 본 시료가 epigallocatechin gallate(EGCG, Fig. 7)임을 규명하였다. 먼저, Fig. 5에서 보는 바와같이, compound B의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼으로부터 모든 특성공명선의 해석이 다음과 같이 가능하며 본 물질이 (-)-epigallocatechin gallate임을 확인할 수 있었다. (-)-epigallocatechin gallate의 세 방향족 고리의 6개의 수소 (a, b, c, d, e, f)가 5.96에서 6.91 ppm에서 나타남을 확인하였다. a와 b의 수소는 같은 조건의 위치에 존재하기 때문에 6.69 ppm에서 단일선으로 나타났다.

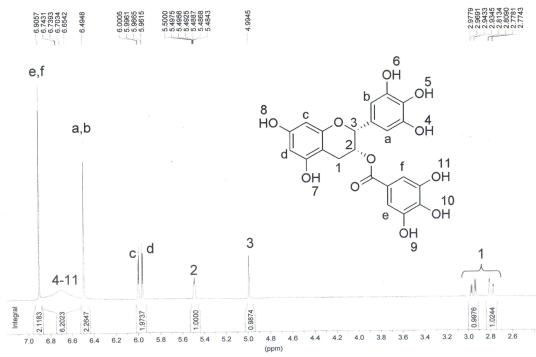


Fig. 5. 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Compound (B) in CDCl<sub>3</sub>.

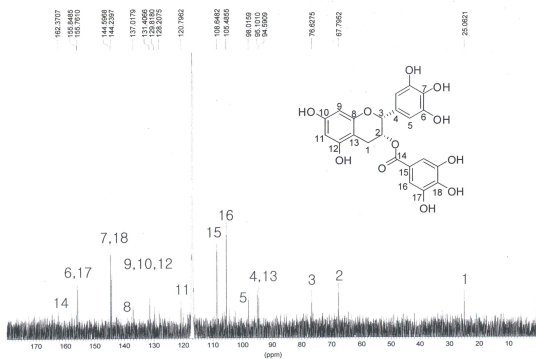


Fig. 6. 125 MHz <sup>13</sup>C-NMR spectrum of Compound (B) in CDCl<sub>3</sub>.

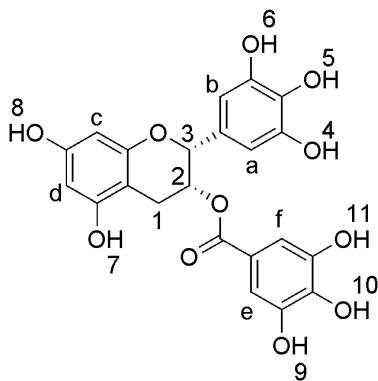


Fig. 7. Chemical structure of (-)-epigallocatechin gallate

마찬가지로 e와 f의 수소도 같은 조건에 놓여 있고, 카르보닐기의 벅김효과 때문에 가장 저자장인 6.91 ppm에서 단일선으로 나타났다. c와 d는 6.00과 5.97 ppm에서 각각 이중선으로 나타났다. 방향족에 붙어있는 OH의 수소는 4-11은 6.74에서 6.65 ppm 사이에서 넓은 영역을 가지고 나타났다. 지방족 고리에 있는 수소는 1은 2.77에서 2.98사이에서

이중-이중선으로 나왔으며, 2의 수소는 5.49 ppm에서 다중선으로 나타났으며, 3의 수소는 4.99 ppm에서 단일선으로 나타났다. 아울러, Fig. 6에서 보는 바와 같이, compound B의 모든 탄소 공명선은 잘 해석이 가능해 <sup>1</sup>H-NMR의 해석 결과와 동일하게 (-)-epigallocatechin gallate으로 규명되었다. 산소를 포함하는 지방족 고리의 3개의 1, 2, 3 탄소가 25.06, 67.80, 76.63 ppm에서 각각 나타났다. 카르보닐 탄소 14의 경우, 인접한 산소의 벅김효과에 의해서 가장 저자장인 162.37 ppm에서 나타나는 특징을 보이고 있다. OH기가 붙어 있는 방향족 탄소인 6, 7, 10, 12, 17, 18의 피크가 155.76, 144.24, 129.81, 128.21, 155.85, 144.60 ppm에서 각각 나타났으며, 나머지 방향족 탄소들은 94.59, 95.10, 98.01, 105.49, 108.65, 120.80, 131.41, 137.02 ppm에서 나타났다.

이상과 같은 기기분석결과, 녹차추출물에 함유된 항균활성물질은 (-)-epicatechin gallate 및 (-)-epigallocatechin gallate로 규명되었다. 이는 Oh(24) 및 Cho(25) 등도 다양한 식품 유해균에 대한 녹차추출물의 항균활성이 좋았다고 보고한 내용과 일치하며, 일반적으로 catechin 류 중, gallate기가 결합된 (-)-ECG나 (-)-EGCG가 강한 항균작용을 나타내는 것으로 판단되었다.

### 요 약

녹차에 관한 최근까지의 연구결과에서, 녹차는 생리활성의 촉진작용뿐만 아니라 항암, 항산화, 고혈압 억제효과, 체중 조절 등 다방면의 약리효과를 보이는 것으로 보고되고 있다. 아울러, 녹차의 항균 및 항진균 작용에 관한 연구결과도 발표되고 있으며, 본 연구팀에 의해서도 녹차추출물의 항균작용을 확인한 바 있어, 본 연구에서는 탁월한 항균작용을 소유하고 있는 녹차분획물질을 분리하여 그 분자구조를 동정하는데 목적이 있다. 따라서, 녹차추출물에서 탁월한 항균력을 가지는 항균활성물질을 HPLC 분리방법 및 NMR 분석법으로 분리·동정한 결과, 각각 (-)-epicatechin gallate 및 (-)-epigallocatechin gallate로 확인되었다.

### 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 연구결과 일부로 이에 감사드리며, 아울러, 본 실험의 기기분석에 도움을 주신 경상대학교 화학과 이 심성교수님 여러분에게도 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Cespy, V. and Williamson, G. (1994) A review of the

- health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J. Nutr.*, 134, 3431-3440
2. Choi, S.I., Lee, J.H. and Lee, S.R. (1994) Effect of green tea beverage on the removal of cadmium and lead by animal experiments. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 740-744
  3. Mandel, S.A., Avramovich-Tirosh, Y., Reznichenko, L., Zheng, H., Weinreb, O., Amit, T. and Youdim, M.B. (2005) Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signalling pathway. *Neurosignals*, 14, 46-60
  4. Muramatsu, K., Fukuro, M. and Hara, Y. (1986) Effect of green tea catechins of plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32, 613-615
  5. Sabu, M.C., Smitha, K., and Ramadasan, K. (2002) Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J. Ethnopharmacol.*, 83, 109-116
  6. Chung, F.L., Schwartz, J., Herzog, C.R. and Yang, Y.M. (2003) Tea and cancer prevention, Studies in animals and humans. *J. Nutr.* 133, 3268-3274
  7. Morre, D.M. and Morre, D.J. (2006) Anticancer activity of grape and grape skin extracts alone and combined with green tea infusions. *Cancer Lett.*, 238, 202-209
  8. Cai, Y.J., Ma, L.P., Hou, L.F., Li, B.Z., Yang, L.Y. and Liu, Z.L. (2002) Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chem. Phys. Lipids*, 120, 109-117
  9. Kang, S.T., Yoo, U.H., Nam, K.H., Kang, J.Y. and Oh, K.S. (2007) Antioxidative effects of green tea extract on the oxidation of anchovy oil. *J. Agric. Life Sci.*, 41, 47-53
  10. Lee, K.J. (2008) Antioxidant activity analysis of catechin compounds in Korean green tea using HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> antioxidant screening system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23, 96-100
  11. Pilar Almajano, M., Rosa Carbó, Angel López Jiménez J., Gordon, M.H. (2008) Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.*, 108, 55-63
  12. Park, C.S. and Cha, M.S. (2000) Comparison of antibacterial activities of green tea extracts and preservatives to the pathogenic bacteria. *Korean J. Food Nutr.*, 13, 36-44
  13. Cho, Y.S., Kim, H.S., Kim, S.K., Kwon, O.C., Jeong, S.J., and Lee, Y.M. (1997) Antibacterial and bactericidal activity of green tea extracts. *J. Korean. Tea Soc.*, 3, 89-103
  14. Chung, S.H. and Yoon, K.H. (2008) Antimicrobial activity of extracts and fractions of green tea used for coarse tea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 37, 1382-1388
  15. Kim, Y.I., Park, J.Y., Choi, S.J., Kim, J.K., Jeong, C.H., Choi, S.G., Lee, S.C., Cho, S.H., and Heo, H.J. (2008) Protective effect of green tea extract on amyloid  $\beta$  peptide-induced neurotoxicity. *Korean J. Food Preserv.*, 15, 743-748
  16. Lee, J.M., Lim, S.W., Cho, S.H., Choi, S.G., Heo, H.J., and Lee, S.C. (2009) Effect of relative humidity and storage temperature on the quality of green tea powder. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 38, 83-88
  17. Jeong, C.H., Kanf, S.T., Joo, O.S., Lee, S.C., Shin, Y.H., Shim, K.H., Cho, S.H., Choi, S.G., and Heo, H.J. (2009) Phenolic content, antioxidant effect and acetylcholinesterase inhibitory activity of Korean commercial green, puer, oolong and black teas. *Korean J. Food Preserv.*, 16, 230-237
  18. Choi, G.N., Joeng, C.H., Kim, J.H., Kwak, J.H., Shin, Y.H., Lee, S.H., Cho, S.H., Choi, S.G., and Heo, H.J. (2009) Effect of storage temperature and water activity on antioxidant activities of powdered green tea extracts. *Korean J. Food Preserv.*, 16, 333-341
  19. Shin, Y.H., Oh, B.T., Choi, S.G., Heo, H.J., Lee, S.C., and Cho, S.H. (2009) Antimicrobial activity of an aqueous extract of green tea against food putrefactive microorganisms. *Korean J. Food Preserv.*, 16, 392-399
  20. Ahmad, A., Feyes, D.K., Nieminen, A.L., Agarwal, R., and Mukhtar, H. (1997) Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cell. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89, 1886-1889
  21. Sung, K.C. (2005) Characteristics and analysis on the refined oil component of green tea. *J. Korean Oil Chemists' Soc.*, 22, 241-249
  22. Piddock, L.J.V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 307-310
  23. Wang, H., Provan, G.J. and Helliwell, K. (2003) HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food Chem.*, 81, 307-312
  24. Oh, D.H., Lee, M.K., Park, B.K. (1999) Antimicrobial activities of commercially available tea on the harmful foodborne organisms. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 28, 100-106
  25. Cho, S.Y., Choi, J.H., Ham, S.S. and Oh, D.H. (2005) Antimicrobial activities of green tea extract and fractions on the *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Hyg. Safety*, 20, 48-52