

변패미생물에 대한 녹차 물추출물의 항균 활성 분석

신영희 · 오병태 · 최성길 · 허호진 · 이승철¹ · 조성환[†]
경상대학교 식품공학과 · 농업생명과학연구원, ¹경남대학교 식품생명학과

Antimicrobial Activity of an Aqueous Extract of Green Tea against Food Putrefactive Microorganisms

Young-Hee Shin, Byung-Tae Oh, Sung-Gil Choi, Ho-Jin Heo, Seung-Cheol Lee¹
and Sung-Hwan Cho[†]

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

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

Recent studies indicate that green tea may have anticancer, antioxidant, and antihypertensive effects, and aids body weight control and the promotion of various desirable physiological functions. However, few studies have investigated the antimicrobial effects of green tea. We sought to determine the antimicrobial activity of green tea extract against food spoilage microorganisms. The extract showed remarkable antimicrobial effects against a wide spectrum of putrefactive and food spoilage microorganisms when used at concentrations greater than 500 µg/ml. The extract showed thermal and pH stability in the range of 40 - 150°C and pH 3 - 11, respectively. Green tea extract seems to be an ideal natural antimicrobial, considering both efficacy and thermal and pH stabilities. Antimicrobial substances in green tea extract were investigated using electron microscopy and a β-galactosidase assay. The data showed that the extract contains several efficacious materials, and that their activities are not synergistic but are instead independent. Our data indicate that hydrophilic antimicrobial substances in green tea extract might control food spoilage microorganisms owing to perturbation of the microbial cell membrane.

Key words : green tea extract, antimicrobial effects, electron microscope analysis, β-galactosidase activity assay

서 론

녹차에 관한 최근까지의 연구결과에서 녹차는 생리활성의 촉진작용뿐 아니라 항암(1,2), 항산화(3-5), 고혈압 억제 효과(6), 항당뇨(7) 등 다방면의 약리효과를 보이는 것으로 보고되고 있다. 이와같이 녹차추출물에 대한 처리효과가 단편적으로 발표되고 있으나, 대부분 약리임상 분야에서 효과면에 치중한 연구로서, 생리활성기전에 기초를 둔 연구는 많지 않다. 그러나 항산화 작용에 관한 연구는 분자적인 이해를 토대로 비교적 활발하게 진행되어 온 반면, 항균

작용을 하는 유효성분 및 작용기작을 규명하기 위한 기초연구가 부족한 상태이다. 녹차성분의 항균작용에 관한 연구로 식중독세균에 대한 항균작용을 검토한 연구(8-11)가 보고되고 있으나, 녹차추출물이 식중독세균의 증식 및 생육 억제효과를 보여 최소생육저해농도를 낮추는 결과를 제시하고 있는 정도이다. 최근 식품산업에 대두되고 있는 병원성 식중독균인 *Escherichia coli* 0157:H에 대한 녹차추출물 및 ethylacetate분획 추출물의 항균효과를 검토한 결과(12)와 아울러, 엽차용 녹차추출물 및 분획물의 항균효과(13)가 발표되면서 녹차의 주요 기능성 물질인 catechin 및 추출용매별 분획물의 항균작용에 대한 접근이 시도되고 있다. 또한, 녹차 등의 기호차가 만성위염, 위십이지장궤양, 위암 등의 위장질환의 원인이 되고 있는 *Helicobacter pylori*의

[†]Corresponding author. E-mail : sunghcho@gsnu.ac.kr,
Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

증식을 억제하고 *vacuolating toxin* 역가를 중화시킬 수 있는 물질을 함유하고 있는 것으로 보고(14)되고 있다. 이와같이 식품의 생체조절기능에 대한 관심이 높아짐에 따라, 녹차의 항산화성 및 항균작용을 구명하고자 하는 연구가 크게 증가해 오고 있는 상황이다. 그러나 현재까지 진행되어 오고 있는 녹차의 항균관련 연구는 그 처리에 따른 미생물의 생육억제현상을 기술하는데 머물러 있는 형편이며, 녹차실험시료 또한 특정 제다회사의 증제차나 덩음차를 이용하고 있어 생녹차의 기능성을 연구하기에는 부족한 점이 많다. 따라서 본 연구에서는 녹차 재배현장에서 직접 채취한 녹차를 일정한 저장조건에서 보관하면서, 녹차추출물의 미생물 생육억제효과를 생리기작의 변화를 중심으로 검토하고자 하였다. 즉, 녹차추출물 처리전후의 전자현미경촬영사진 결과 및 β -galactosidase 효소활성변화를 통하여 녹차추출물이 미생물의 생육과 물질의 수송을 조절하는 세포막의 생화학적 기능에 미치는 영향을 검토하여 녹차추출물의 항균작용을 구명함으로써, 녹차추출물의 항균성을 확인하는데 필요한 기초자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

녹차시료

잎녹차는 경남 하동군 악양면에서 재배 중인 재래종 (*Camellia sinensis*. var. *sinensis*) 품종을 2007년 6월 채취하여 전통식 방법으로 덩음차로 제조한 것을 구입하여 4°C 냉풍건조를 통해 수분활성도 각각 0.81, 0.69 및 0.23으로 맞추어 20°C 데시케이트에 보관하면서 시료로 사용하였다. 아울러, 분말녹차는 구입한 덩음차를 분쇄기를 이용하여 분쇄 후 100 mesh체를 통해 거른 후, 수분활성도 각각 0.81, 0.69 및 0.23으로 맞추어 20°C 데시케이트에 보관하면서 시료로 사용하였다. 추출온도에 따른 추출수율의 변화를 살펴보기 위하여 증류수를 원료중량의 9배가 되게 한 다음 40°C, 60°C, 80°C, 100°C로 추출온도를 달리하여 3시간동안 추출하여 추출수율을 측정하였다. 한편, 녹차추출물은 잎 녹차 또는 분말녹차를 열탕추출하고 여과한 후, rotary evaporator(Eyela, NE-1, Tokyo, Japan)로 농축하고 freeze drier(Clean Vac.8, Biotron, Seoul, Korea) 로 건조하여 조제하였다. 녹차추출물을 일정량의 증류수에 희석하여 일정농도의 녹차추출물용액을 준비하여 실험에 사용하였다.

녹차시료의 일반성분 분석

녹차시료의 일반성분은 AOAC법(15)에 준하여 수분은 dry oven method, 회분은 직접 회화법, 총질소는 Kjeldahl법, 전당은 Somogyi변법, 지방은 Soxhlet 추출법으로 측정하였다.

항균력 시험균주

본 실험에서 녹차추출물의 항균력 검색용 균주는 식품원료 및 가공식품의 변질에 관여하는 부패미생물 및 젖산균을 대상으로, 경상대학교 식품공학과에 보관중인 미생물을 계대배양하여 실험에 사용하였다. 곰팡이 및 효모는 *potato dextrose agar*(PDA), 세균은 *brain heart infusion agar*(BHIA) 등의 사면배지에 계대배양하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

항균력 검사

녹차추출물의 세균 및 효모에 대한 항균력을 측정하기 위하여 전보(16)와 같이 여러농도의 녹차추출물용액으로 포화된 *paper disk*를 BHIA plate상에 접촉시켜 공시균주의 증식도를 비교하여 생육저해정도를 측정하는 *paper disk*확산법(17)을 이용하였으며, 기존 항균제와 녹차추출물의 항균력도 동일한 방법에 준하여 비교, 검토하였다. 즉, 멸균하여 미리 건조시킨 BHIA배지에 각 세균의 24시간 배양액 100 μ L를 평판도말한 후 GTE 2,000 μ g/mL(0.2%상당), sodium benzoate 및 potassium sulfate 각각 2% 용액을 직경 10 mm의 *paper disk*에 60 μ L씩 주입하여 확산시킨 후 37°C에서 48시간 배양했을 때, 생육 저해환의 크기를 비교하였다. 아울러, GTE가 유산균의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 멸균된 *Lactobacilli* MRS 배지에 계대 배양한 유산균주를 단독균주로 하여 접종 도말한 후 GTE를 농도별 (250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1,000 μ g/mL)로 하여 *paper disk*에 분주하여 30°C incubator에서 배양한 후 *paper disk* 주위의 생육 저해환을 관찰하였다.

녹차추출물 항균물질의 열 및 pH 안정성 조사

항균활성물질의 열안정성을 측정하기 위하여 녹차추출물을 40°C에서 150°C의 온도범위 중, 일정온도에서 30분동안 각각 열처리한 후 시료용액으로 사용하였다. 살균, 냉각한 PDA배지 표면에 500 μ g/mL 농도의 시험용액을 일정간격으로 위치한 *paper disk*에 접종하고, *paper disk* 확산법으로 대조구와 같이 37°C에서 24시간동안 배양하여 *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus aureus*의 생육저해환을 측정·비교하였다. 또한 pH안정성은 염산이나 수산화나트륨으로 GTE의 pH를 3에서 11까지 조정된 후, 50 μ L씩을 채취하여 *paper disk*에 접종하고, 열안정성과 동일한 방법으로 생육저해환을 측정·비교하였다.

녹차추출물처리 미생물의 생육저해도 측정

녹차추출물에 함유된 항균물질의 미생물 생육저해 최소 농도를 측정하기 위하여 GTE를 membrane filter(0.2 μ m)로 제균시키고, tryptic soy broth(TSB)에 여러 가지 농도단위로 첨가한 후, 사면배지에서 각 공시균주 1백균이를 취하여 10 mL TSB에 접종, 30°C에서 24시간동안 전 배양시키고,

이 배양액 0.1 mL를 취해 상기와 동일한 배양조건으로 계대 배양한 배양액 0.1 mL를 여러 농도의 녹차추출물이 함유된 plate count agar상에 평판도말하고 30°C에서 3일간 배양하여 생존균수를 대조구와 비교·측정하여 미생물의 생육저해 정도를 배양시간별로 조사하였다.

녹차추출물처리 미생물 세포의 전자현미경적 형태변화 조사

녹차추출물이 미생물의 세포형태에 미치는 영향을 알아보기 위하여, Scanning electron microscope(SEM)에 의한 녹차추출물 처리전후의 미생물 세포의 형태변화를 관찰하였다(18). 즉, 공시균주를 녹차추출물 무처리구인 대조구와 함께, 250 µg/mL 농도의 녹차추출물이 첨가된 각각의 TSB에서 36~48시간동안 배양한 다음, 배양액 1 mL를 eppendorf tube에 옮긴 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 1 mL의 4% neutral buffered para-formaldehyde (NBP)를 가하여 다시 원심분리한 후 천천히 진탕하면서 2회 세척하였다. 여기에 1 mL의 NBP를 다시 가하여 4°C에서 48시간동안 고정시키고 0.015 M phosphate buffer solution(PBS, pH 7.2)을 1 mL 가하고 진탕하면서 2회 세척한 후 무수 알콜로 진탕하여 탈수하고 임계점 건조기로 건조한 후, 대조구와 함께 미생물세포의 형태변화를 관찰하였다.

β-Galactosidase (β-D-galactoside galactohydrolase : EC 3.2.1.23)의 정량

녹차추출물이 세포막에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포를 파쇄하지 않고 녹차추출물 존재시에 *Collectotrichum fragariae* ATCC 58568의 β-galactosidase 효소활성이 정량되는가의 여부를 Miller의 방법(19)에 준하여 살펴보았다. *Collectotrichum fragariae*가 β-galactosidase 효소활성을 나타내는 정도는 isopropyl-β-D-thiogalactoside(IPTG)와 X-gal (5-bro-mo-4 -chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)을 함유한 배지에서 확인한 후, *Collectotrichum fragariae*를 영양배지에 접종한 뒤 30°C에서 12시간 배양한 후, M9 medium으로 옮겨 주고 600 nm에서의 흡광도가 0.5~0.7이 되도록 배양한 다음, 0°C에 방치하여 성장을 억제하였다. 배양액 1.5 ml에 같은 부피의 완충용액 [100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 50 mM β-mercaptoethanol]을 가하고, 최종 농도가 3%가 되도록 각각 증류수, toluene, 녹차추출물을 첨가, 처리하고, 10초간 세계 흔들여 주었다. toluene 제거를 위해 37°C에서 40분간 방치하고 28°C로 옮겨 5분간 더 방치한 후, 0.6 mL ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, 4 mg/mL)를 가하여 주었고 28°C에서 18시간 동안 방치하였다. 1M Na₂CO₃ 1.5 mL를 가하여 반응을 정지시키고, 원심 분리하고 상등액의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다. 증류수를 넣은 경우를

0으로 하고 toluene을 넣어준 경우를 100으로 하여 녹차추출물이 세포막에 미치는 영향을 비교하였다.

결과 및 고찰

녹차시료의 일반성분

시중에 판매되는 덩음차의 일반성분 분석결과는 Table 1과 같다. 덩음 녹차의 수분함량은 1.36%, 조회분 함량은 13.23%, 조지방은 2.67%였으며, 조단백질은 37.25%, 탄수화물은 37.28%로 가장 높았으며, 조섬유는 8.21%이었다. 본 실험결과에서 녹차의 수분함량은 Lee 등(20)의 3.3~3.9%에 비하여 다소 낮은 편이었는데 본 실험에 사용한 덩음 녹차의 경우 덩음과 건조의 횟수에 따른 수분 손실에 의한 것으로 생각된다. 단백질 함량은 Lee 등(20)이 한국산 녹차에서 전질소 함량을 3.1~3.8%로 보고하여 상당한 차이를 보였다. Lee 등(21)은 채엽시기에 따라 전질소 함량이 3.87~6.27%로 어린잎에 질소 함량이 높다고 보고하였으며, Kim 등(22)은 녹차의 총 아미노산 함량이 1.2~4.5%로 채엽 시기가 늦을수록 감소하는데 특히 어린 잎일수록 아미노산 중 theanine이 많이 함유되어 녹차의 맛이 좋은 것으로 보고하였다. 한편, Jeon과 Park(23)은 전질소 함량을 6.08~6.60%로 보고하였는데 녹차의 덩음 횟수에 따른 차이는 큰 영향이 없는 것으로 보고하였다. 이와같은 연구결과는 본 실험결과에서도 확인되었다.

Table 1. Proximate composition of roasted green tea

	(%, w/w)					
	Moisture	Crude ash	Crude fat	Crude protein ¹⁾	Carbohydrate ²⁾	Crude fiber
Roast green tea	1.36±0.01 ³⁾	13.23±0.00	2.67±0.92	37.25±0.03	37.28±3.69	8.21±0.49

¹⁾N × 6.25.

²⁾100 - (sum of moisture, crude protein, crude lipid and crude ash contents)

³⁾mean±S.D.

GTE의 추출수율

덩음차를 건조된 상태로 구입하여 추출·농축하고 동결 건조기로 건조하여 조제한 GTE의 추출 수율은 Table 2, Table 3 및 Table 4와 같다. 먼저, 잎차 시료 및 분쇄한 시료의 추출수율을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 100°C의 단일 온도에서 추출하였을 때 추출수율이 분말은 21.30%였으며, 잎차의 경우 19.08%이었다. 따라서, 분말화한 것과 잎차간의 추출수율은 유의적인 차이가 없었다.

Table 2. Effect of pulverizing on extraction yield of green tea

	(unit:%)	
Condition	Raw	Powder
Extraction yield	19.08	21.30

또한, GTE의 추출온도에 따른 추출수율을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 즉, 40°C에서는 9.57%, 60°C에서는 10.41%, 90°C의 경우는 15.34%로 나타났고, 100°C의 경우는 19.08%로 가장 높은 추출 수율을 보였다. 따라서, 추출 온도가 높을수록 추출 수율이 높아지는 것을 관찰할 수 있었으며, 최적추출온도는 100°C로 설정할 수 있었다.

Table 3. Extraction yields of Green tea by using various different temperature of water

(unit : %)				
Temperature	40°C	60°C	80°C	100°C
Extraction yield	9.57	10.41	15.34	19.08

한편, 녹차의 추출용매별 추출 수율은 Table 4와 같다. 물에서 19.08%로 가장 높았고, butanol에서 15.16%, ethanol에서 12.12%, acetone에서 0.84%, ethyl ether에서 0.84% 순으로 나타났다. 따라서, 수율이 높고 항균력이 뛰어난 물추출물(수용성 GTE)을 본 실험의 항균성 검토 시료로 사용하였다.

Table 4. Extraction yields of green tea by using various solvents

(unit : %)					
Solvent	Distilled water	Butanol	acetone	Ethanol	Ethyl ether
Extraction yields	19.08	15.16	0.84	12.12	0.84

수용성 GTE의 항균작용

공시균주에 대하여 수용성 GTE의 농도를 0(Control), 250, 500, 1000 µg/mL으로 처리하여 paper disk법에 의한 미생물의 생육저해환을 측정한 결과는 Fig. 1 및 Table 5와

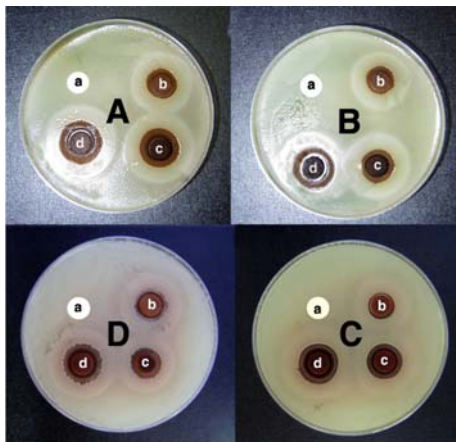


Fig. 1. Inhibition effect of green tea extract at different concentrations on the growth of microorganisms.

A: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 B: *Escherichia coli* ATCC 4157
 C: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 D: *Fusarium oxysporum* ATCC 46995
 a : Control b: 250 µg/mL c: 500 µg/mL d: 1,000 µg/mL.

같다. 즉, GTE의 농도가 증가할수록 생육저해환의 크기가 증가하여 clear zone의 크기가 250 µg/mL 처리구 14-15 mm, 500 µg/mL 처리구 16-18 mm, 1,000 µg/mL 처리구 18-20 mm로 GTE 500 µg/mL 이상의 농도에 침지 처리한 paper disk 주위에는 균의 증식이 억제되는 clear zone을 형성함으로써 GTE의 항균력을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. GTE는 Gram양성균, Gram음성균, 효모 및 곰팡이 등 넓은 영역의 미생물에 대하여 뚜렷한 생육저해환을 보여 항균작용이 우수한 것으로 나타났다. 아울러, 이들은 공시균주에 대해서는 농도에 비례하여 항균력이 증가하는 것을 알 수 있었다.

Table 5. Growth inhibition zone(mm) of microorganisms by different concentrations of green tea extract

Microorganism	Concentration of CTE(µg/mL)			
	0	250	500	1,000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10	15	18	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 4157	10	14	17	18
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	10	15	17	18
<i>Fusarium oxysporum</i> ATCC 46995	10	15	16	19

추출용매별 항균작용

5가지 서로 다른 용매를 사용하여 추출한 녹차의 항균력 실험결과는 Table 6과 같다. 즉, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*에 대해 용매별 효과는 물추출물에서 clear zone이 17-18 mm, butanol 13 mm, ethanol 13-14 mm, acetone 10-11 mm 등으로 나타나 추출용매가 물인 경우가 가장 큰 생육저해환을 보였고, 다음으로 ethanol, butanol 순으로 나타났다. Park 등 (24)은 20종의 한약재를 다른 용매로 추출시, 추출용매나 시료에 따라 항균력의 차이를 나타낸다고 하였다. 녹차의 경우 물추출물이 가장 강한 항균력을 보여, 실생활에서 끓는 물에 녹차를 우려내어 음용하는 시음 습관은 항균효과면에서 이상적인 것으로 생각된다.

Table 6. Growth inhibition zone of microorganisms by green tea extract from various solvents

Solvent	(GTE conc. : 500 µg/mL)	
	Growth inhibition zone(mm) of microorganisms	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Water	18	17
Butanol	13	13
Ethanol	14	13
Acetone	11	10
Ether	10	10

저장환경별 녹차추출물의 항균작용

녹차시료(잎녹차와 분말녹차)를 수분활성도가 각각

0.23, 0.69 및 0.81로 유지되는 20℃의 저장실에서 4주간 저장하면서, 저장기간과 수분활성도에 따른 녹차시료의 항균력을 paper disk법에 의한 clear zone의 크기로 비교한 결과, 잎녹차의 경우 16-18 mm, 분말녹차의 경우 15-17 mm로 잎녹차가 분말녹차보다 다소 항균력이 높은 것으로 나타났고, 저장 4주째까지는 저장환경별 녹차시료의 항균력은 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며, 수분활성도가 낮을수록 잎녹차와 분말녹차 모두 항균력이 높은 것으로 나타났으나, 결론적으로 추론해 보면, 주어진 실험범위에서의 저장기간과 수분활성도에 따라 녹차시료의 항균력은 유의적인 차이가 없었다.

기존 항균제와 녹차추출물의 항균력 비교

Fig. 2는 GTE에 의해 형성된 *Escherichia coli*와 *Sacharomyces cerevisiae*의 생육저해환의 크기를 기존 보존료(sodium benzoate, potassium sulfate)와 비교한 결과이다. 즉, GTE (0.2%)의 clear zone 20 mm, 2%의 보존료 sodium benzoate 및 potassium sulfate 각각 clear zone이 15-19 mm 및 16-18 mm로 나타나 GTE처리구가 기존보존료보다 더 크고 뚜렷한 생육저해환을 나타내었다. 따라서 GTE는 천연항균제 또는 보존료로서의 이용 가능성을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

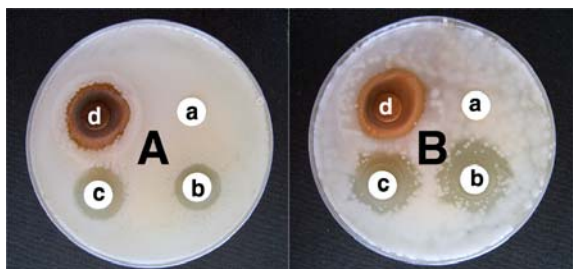


Fig. 2. Comparison of inhibitory zone by the green tea extracts, sodium benzoate and potassium sulfate against putrefactive organisms.

A : *Escherichia coli* B : *Sacharomyces cerevisiae*
a : Control b : sodium benzoate(2%) c : potassium sulfate(2%) d : GTE(0.2%).

녹차추출물의 젖산균 생육에 미치는 효과

GTE가 유산균 생육에 미치는 영향은 Fig. 3과 같이 *Leuconostoc citreum*과 *Lactobacillus plantarum*에 대한 생육저해환은 나타나지 않았다. 녹차에 함유된 polyphenol 중에서 생리활성 작용을 나타내는 주요 성분은 catechin인 것으로 알려져 있다. Wee와 Park(25)은 녹차엽에서 분말 형태로 차엽 catechin을 조제하여 김치 산패에 관여하는 미생물을 대상으로 항미생물 활성을 검정한 결과, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Lactobacillus plantarum* 및 *Pediococcus cerevisiae*에 대해서는 2 mg/mL 첨가 수준, *Streptococcus faecalis*는 4 mg/ml 첨가 수준, *Lactobacillus brevis*는 5 mg/mL 첨가 수준에서부터 균의 생육이 억제되기 시작하였

으나 *Saccharomyces cerevisiae*에 대한 생육억제 효과는 낮았다고 하였다. 또한 Park 등(26)도 김치의 발효에 주도적인 역할을 하는 유산균인 *Leuconostoc* sp.와 *Lactobacillus* sp.가 녹차 분말 0.5% 첨가에 의해 발효 숙성 중 전반적인 유산균 수가 적고 증가 폭도 적었다고 보고하였다. 한편 Jung 등(27)의 가루녹차 첨가에 의한 유산균의 영향에 대한 보고에 따르면, 가루녹차 첨가는 배양 초기에는 유산균의 생육에 큰 영향을 미치지 않았으며 오히려, 배양 9시간부터 가루녹차 첨가에 의한 유산균의 증식 촉진 효과가 나타나는 것으로 보고하고 있다. 본 실험 결과에서도 일정시간 배양중에는 녹차추출물에 의해 김치 유산균의 생육이 억제되지 않는 것으로 나타났으며, 김치 유산균 등의 장내 유용미생물은 GTE에 의한 생육 저해 효과가 뚜렷하지 않은 것으로 판단되었다.

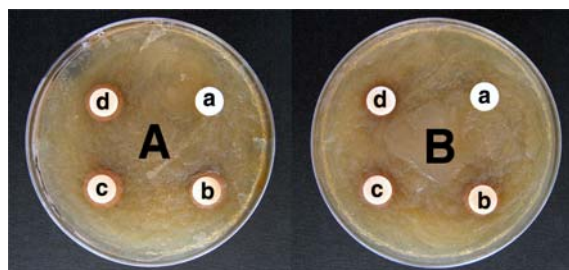


Fig. 3. Inhibition effect of green tea extract at different concentration on the growth of lactic acid bacteria.

A: *Leuconostoc citreum* (ATCC 49370) B: *Lactobacillus plantarum* (ATCC14917)
a : Control b: 250 µg/mL c: 500 µg/mL d: 1,000 µg/mL.

GTE의 미생물 생육저해 농도곡선측정

GTE의 공시 균주에 대한 생육저해 최소농도를 확인하기 위하여 측정한 생육저해 농도곡선은 Fig. 4와 같다. 즉, *Staphylococcus aureus*에서는 250 µg/mL 이상에서 생육이 완전히 억제되는 것으로 나타났으며, *Escherichia coli* 및 *Fusarium oxysporum*에서도 각각 100 µg/mL 및 500 µg/mL 이상에서 거의 생육이 억제되는 것으로 나타났다.

항균물질의 열 및 pH 안정성

녹차추출물이 함유하는 항균물질의 열 및 pH의 안정성을 측정하는 결과 Fig. 5 및 Fig. 6과 같다. 즉, 열안정성 실험 결과는 Fig. 5에서와 같이, *Escherichia coli*의 생육저해환은 전처리 온도범위에서 관계없이 생육저해환의 직경이 17 mm 정도로 일정하였고, *Staphylococcus aureus*의 경우에도 전처리 온도에 관계없이 약 16 mm로 일정하여 광범위한 처리 온도범위에서 녹차추출물이 뚜렷한 항균력을 나타내었다. 그리고 녹차추출물의 항균성분의 pH에 대한 안정성은 Fig. 6에서와 같이 넓은 pH범위 (pH 3~11)에서 동일한 크기의 생육저해환을 나타내어 pH안정성을 보였으며, *Escherichia coli*의 생육저해환의 지름은 약 18 mm 정도로 전처리 pH에 관계없이 일정하였고, *Staphylococcus aureus*

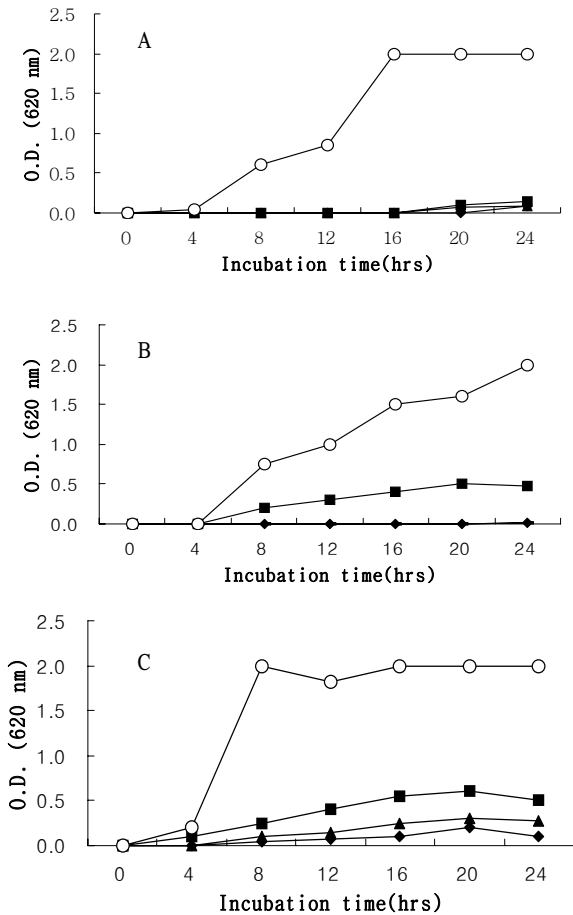


Fig. 4. Microbial growth curve in the medium containing green tea extract.

A : *Escherichia coli* B : *Staphylococcus aureus* C : *Fusarium oxysporum*
 ○ : Control; ● : 100 µg/mL ; ■ : 500 µg/mL;
 ▲ : 1,000 µg/mL; ◆ : 2,500 µg/mL; □ : 5,000 µg/mL.

의 경우, 생육저해환의 지름은 약 16 mm 정도로 전처리 pH에 관계없이 일정하게 나타나 녹차추출물의 항균활성물질은 넓은 pH범위에서 안정하였다. 따라서 녹차를 원료로 한 가공식품에 대해서 뚜렷한 항균효과 및 저장효과를 기대할 수 있었다.

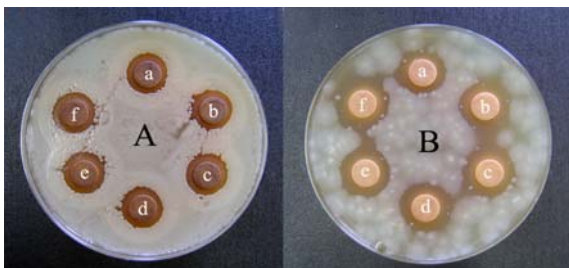


Fig. 5. Thermal stability of green tea extract on the growth inhibition of microorganism.

A : *Escherichia coli* B : *Staphylococcus aureus*
 a: 40°C-treated b: 60°C-treated c: 80°C-treated
 d: 100°C-treated e: 120°C-treated f: 150°C-treated.

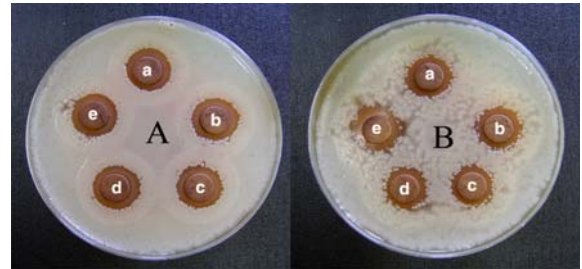


Fig. 6. pH stability of green tea extract on the growth inhibition of microorganism.

A : *Escherichia coli* B : *Staphylococcus aureus*
 a: pH 3.0, b: pH 5.0, c: pH 7.0, d: pH 9.0, e: pH 11.0.

미생물세포의 형태변화

GTE의 미생물세포 형태에 미치는 영향을 조사하기 위하여 경상대학교 식품공학과에 보관중인 *Staphylococcus aureus* 및 *Fusarium oxysporum* 균체세포를 500 µg/mL의 GTE용액으로 처리한 균체세포 및 포자를 처리하지 않은 대조군과 함께 전자현미경 검경시료로 조제하여 SEM으로 촬영한 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8과 같다. 즉, Fig. 7 및 Fig. 8에서와 같이 GTE처리로 미생물 균체가 세포벽 또는 세포막의 파괴로 인하여 세포형태의 변화가 뚜렷하게 발생하고, 사멸하게 되어 미생물 균체세포에 대한 GTE의 항균작용을 확인할 수 있었다. 따라서, 부패성 및 병원성 균주오염 가능성이 있는 식품을 GTE로 예방처리함으로써, 변패성 미생물균주에 의한 농축수산 식품원료 및 그 가공식품의 변패현상을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

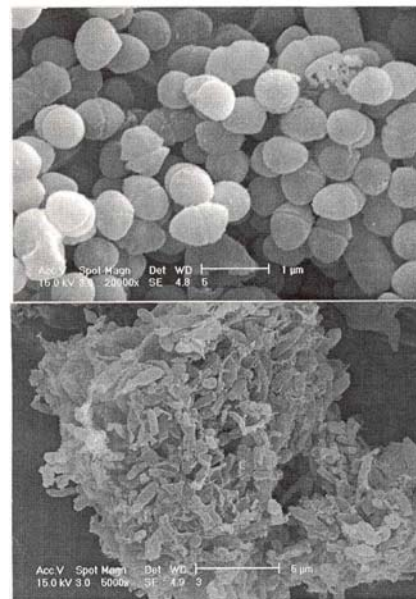


Fig. 7. Scanning electron micrographs of *Staphylococcus aureus* treated with.

(Bottom : 500 µg/mL) or without (Top: Control) GTE(Magnification : x 10,000).

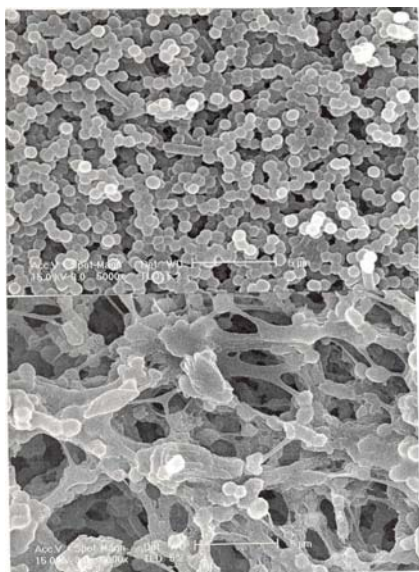


Fig. 8. Scanning electron micrographs of *Fusarium oxysporum* treated with.

(Bottom : 500 µg/mL) or without (Top: Control) GTE(Magnification : x 10,000).

GTE 처리가 변패미생물의 세포막 기능에 미치는 효과

GTE를 미생물 세포에 처리하였을 때, 세포막 기능에 대한 영향을 알아보기 위하여 GTE의 존재하에서 *E. coli*의 세포내 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. *E. coli*의 β -galactosidase 생성유무를 알아보기 위하여 IPTG와 X-gal을 가한 배지에 배양하여 파란색 colony의 발현으로 이 효소의 활성을 확인할 수 있었다. 이어서, 세포를 배양한 후, ONPG와 세포 혼합액에 증류수, toluene, acetone, GTE (0.01% 및 0.05%)를 가하였다. 측정하고자 하는 효소 β -galactosidase가 배양세포내에 존재하므로 GTE가 세포막에 영향을 주어 세포막이 손상을 받아 β -galactosidase가 세포밖으로 유출되어, toluene을 가하여 준 대조군에서처럼 효소 활성이 검출되었다. Fig. 9에 나타낸 바와 같이,

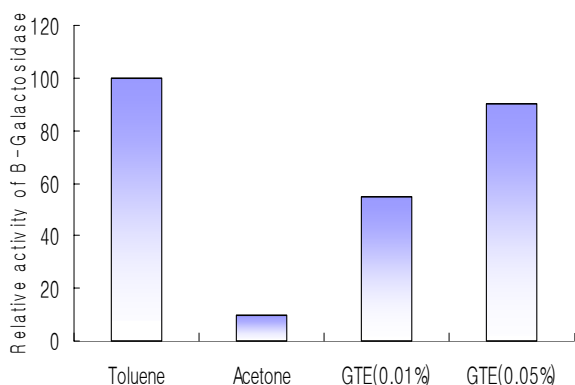


Fig. 9. The effect of GTE on the membrane perturbation of *Escherchia coli*.

The cells were treated with the reagents including toluene, acetone, GTE(0.01% or 0.05%) in the media containing ONPG as substrate for β -galactosidase.

증류수를 가해준 대조군에서의 값을 0으로 하고 toluene을 가하여 준 대조군을 100으로 하였을 때, GTE 0.01%의 경우 55%, GTE 0.05%의 경우 90%의 활성이 검출되었다. acetone을 가하여 세포막을 손상하여 얻은 값이 10%였는데 이를 토대로 보면, GTE는 acetone보다 세포막을 더 손상시키는 것으로 판단되었다. 이 결과는 전자현미경을 이용한 미생물 세포형태의 변화에서 보여준 실험결과와 잘 일치하였으며, GTE의 항균작용은 미생물의 세포막 기능에 손상을 주는 인자에 기인하는 것으로 생각되었다.

요 약

녹차는 생리활성의 촉진작용뿐 아니라 항암, 항산화, 고혈압 억제효과, 체중조절 등 다방면의 약리효과를 보이는 것으로 보고되고 있다. 아울러, 녹차의 항균 및 항진균 작용에 관한 연구결과도 발표되고 있으나, 항균작용 기작에 접근한 기초 연구는 별로 많지 않다. 본 연구는 식품변패미생물에 대한 녹차추출물의 항균작용을 구명하는 기초자료를 획득하는데 그 목적이 있다. 녹차추출물의 항균력을 조사한 결과, 500 µg/mL 이상의 농도에서 뚜렷한 항균활성을 보였고, 광역의 병원성 및 부패성 미생물들에 대하여 항균활성을 나타내었다. 또한, 녹차추출물의 항균물질은 넓은 범위의 온도(40~150°C) 및 pH(3~11)에서 안정성을 나타냈다. 따라서 녹차추출물의 항균물질은 항균활성이 높고, 항균 대상 미생물의 분야가 광범위할 뿐 아니라, 넓은 범위의 온도 및 pH에 안정하여 이상적인 천연 항균제로서의 개발가능성을 제시하였다. 아울러, 녹차추출물의 항균작용을 알기 위하여, 녹차추출물 처리가 미생물 세포막 기능에 미치는 영향을 조사한 결과, 녹차추출물의 주요 작용기작은 세포막 perturbation에 기인한 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 연구결과로 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 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
- Park, H.K., Han, D.W., Park, Y.H. and Park, J.C. (2006) Differential biological responses of green tea polyphenol in normal cells vs cancer cells. *Curr. App. Phys.*, 5, 449-452

3. Chen, H., Zhang, M., Qu, Z. and Xie, B. (2008) Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea(*Camellia Sinensis*). *Food Chem.*, 106, 559-563
4. Kapsokefalou, M., Zhu, L. and Milledr, D.D. (2006) Adding iron to green tea may decrease its antioxidant capacity in rats after an oral dose of the mixture. *Nutr. Res.*, 26, 480-485
5. 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
6. Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T. (1987) Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 61, 803-807
7. 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
8. Park, C.S. (1998) Antibacterial activity of water extract of green tea against pathogenic bacteria. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.*, 5, 286-291
9. 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
10. Park, C.S., Cha, M.S., and Kim, M.S. (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
11. 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
12. Cho, S.Y., Choi, J.H., Ham, S.S., and Oh, D.H. (2005) Antimicrobial activities of green tea extract and fractions on the *E. coli* O157:H7. *J. Food Hyg. Safety*, 20, 48-52
13. 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
14. Chung, Y.S., Kanf, K.H., and Chang, M.W. (2001) Effects of green and taste teas on the growth and vacuolating toxin titer of *Helicobacter pylori*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 16, 163-169
15. A.O.A.C. (2000) The scientific association dedicated to analytical excellence Washington D.C. U.S.A., p.17-24
16. Ha, M.H., Park, W.P., Lee, S.C., Choi, S.G., and Cho, S.H. (2006) Antimicrobial characteristic of *Prunus mume* extract. *Korean J. Food Preserv.*, 13, 198-203
17. Piddock, L.J.V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 307-310
18. Bendayan, M. (1984) Protein-A-gold electron microscopic immunocytochemistry : methods, applications and limitations. *J. Elect. Microsc. Technol.*, 1, 243-270
19. Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., p.352-355.
20. Lee, Y.J., Ahn, M.S. and Hong, K.H. (1998) A study on the content of general compounds, amino acid, Vitamins, catechins, alkaloids in green, oolong and black tea. *J. Food Hyg. Safety*, 13, 377-382
21. Lee, S.H., Choi, K.S. and Choi, J. (2004) Changes of chemical components of tea due to plucking season during cultivation in greenhouse. *J. Korean Tea Soc.*, 10, 63-73
22. Kim, S.H., Han, D.S. and Park, J.D. (2004) Changes of some chemical compounds of Korean (Posong) green tea according to harvest periods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 36, 542-546
23. Jeon, J.R. and Park, G.S. (1999) Korea Green Tea by Ku Jeung Ku Po's I. Analysis of general compositions and chemical compositions. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 15, 91-101
24. Park, U.Y., Chang, D.S. and Cho, H.R. (1992) Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 21, 91-96
25. Wee, J.H. and Park, K.H. (1997) Retardation of kimchi fermentation and growth inhibition of related microorganism by tea catechins. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 29, 1275-1280
26. Park, M.J., Jeon, Y.S. and Han, J.S. (2001) Fermentation characteristics of mustard leaf kimchi added green tea and pumpkin powder. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 30, 215-221
27. Jung, D.W., Nam, E.S. and Park, S.I. (2005) Effect of green tea powder on growth of lactic culture. *Korean J. Food Nutr.* 18, 325-333