J. Exp. Biomed. Sci. 2011, 17(1): 21~25

Antibacterial Activity of Puer Tea Extract on Pathogenic Microorganisms

Hyo Jeong Kim, Su-Won Kim, Sun-Ah Baek, Jong-Won Kim and Min Yoo†

Department of Biology, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

We have analyzed 11 different commercial brands provided by Daboo Culture and Art Center. This study was carried out to determine the antibacterial activity of water extract from puer tea ingredients against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Antibacterial activity of the water extracts was shown against *S. aureus* and *L. monocytogenes* by paper disc method. In case of *S. aureus*, antibacterial activity of the extracts appeared as clear inhibitory zone. This antibacterial activity was greater along with pH and showed the highest effect at pH 10. In case of *L. monocytogenes*, antibacterial activity of the extract appeared as clear inhibitory zone. Some Puer tea appeared to be more powerful in antibacterial activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes*. The polyphenol compounds were 3.46~8.68%, depending upon samples. In conclusion, puer tea is considered as a good choice for well-being food.

Key Words: Puer tea, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, Antibacterial activity, Total polyphenol compound

서 론

보이차는 중국 운남의 대엽종으로 만든 쇄청모차로 일부는 사천 지방의 중엽종으로도 제조된다. 제조과정 중 여러 가지 미생물이 관여하여 미생물이 분비하는 효소에 의해 발효되는 후발효차로 검은색 혹은 흑갈색이다 (Son et al., 2005). 보이차는 카테킨류 함유량이 녹차에 비해 많지만 발효과정 중 중합되거나 분해되어 떫은맛이 없고, 담백하고 순하며 진한 주황빛을 띤다. 여러 번 우려내도 향과 빛깔이 오랫동안 지속되며 장기간 보존할수록 상품의 가치도 올라간다 (Kim et al., 2003). 보이차는 차의 품질의 기본 요소인 화학성분인 폴리페놀을 다량 함유하고 있다. 폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 항산화 작용, 항혈전 작용, 고지혈증 및 지방간 억제 작용 등의 활성을 가지는 자연에서 얻은 항산화제 중 가장 강력한 효과를 나타낸다 (Kim et al., 2003). 이는 새로운 신약 및 건강기능성 음료를 개발하는데 기초가 될 수 있는 물질이다. 중국 문헌인 본초강목십유 (本草綱目拾遺)에서 보이차의 약리적 특성을 기술하기를 "보이차의 향은 독특하며, 숙취 해소와 소화를 돕고, 가래를 식히고, 위를 깨끗이 하며, 갈증 해소와 우리 몸에 해로운 기름기 제거에 좋은 작용이 있다" 고 하였다. 보이차는 장기간 복용하여도 부작용이 없다. 프랑스에서의 임상실험 결과 지방 신진대사 촉진에 효과적으로 작용하며, 혈액 중의 알코올 함량을 저하시키고, 항균 작용이 있으며, 콜레스테롤 및 혈뇨산을 저하시킨다고 알려져 있다 (Park et al., 2004).

포도상구균은 포도상구균과에 속하는 그람 양성 구균의 총칭이며, 이들 균종 중 식중독의 원인이 되는 것은 혈장 응고효소인 coagulase를 생산하는 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)으로, 이 균은 여러 가지 감염증을 일으키는 가장 중요한 균종이며 다른 균종은 기회감염균이다. 황색포도상구균은 우리나라 식중독 발생통계에서 뿐만 아니라 전 세계적으로도 주요 식중독의 발생 원인균으로 알려져 있다 (Bean et al., 1996; Pan et al., 1997). 또한 저항성이 강하여 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하며 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상존하고 있어 식품으로의 오염경로도 매우 다양하다 (Kim et al., 1989).

리스테리아균 (*Listeria monocytogenes*)은 자연계에 널리 분포되어 있으며 유제품, 육제품, 그리고 특히 수산식품에서도 많이 발견되고 있는 세균이며 그람 양성의 단간

*접수일: 2011년 3월 22일 / 수정일: 2011년 3월 23일
채택일: 2011년 3월 24일
†교신저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000,
계명대학교 자연과학대학 생물학과
Tel: +82-53-580-5537, Fax: +82-53-580-5537
e-mail: ymin@kmu.ac.kr

Table 1. Kind of Puer Teas for experiments

No.	Sample name
1	Tong Shun xiang (15~20 years)
2	Qizi bing
3	04181 (2006)
4	qīng bǐng (2003)
5	puer tea (3~5 years)
6	shúbǐng (2001~2002)
7	shúbǐng qīng bǐng (2004)
8	Puer tea (10 years)
9	04181 (2008)
10	04081 (2008)
11	03081 (2008)

균으로 포자 및 캡슐은 형성하지 않는다 (Kim, 1992). 리스테리아균은 리스테리아 감염증 (listeriosis)의 발생을 유발하는데 이는 사람, 소, 양, 돼지, 가금류 등을 감염시켜 감염된 동물의 젖이나 변을 통해 균이 환경에 퍼지게 된다. 이를 사람은 오염된 식품의 섭취나 감염된 동물과의 접촉을 통해 감염된다. 이와 같은 음식물 섭취로 인하여 발생하는 식중독을 보이차를 통해 방지하고자 생육저해환 (clear zone) 생성유무를 확인하여 식중독균의 위험에서 벗어나고자 한다. 그러나 국내·외 대부분의 연구가 녹차에 대한 것인 반면에 보이차에 대한 연구는 그다지 많지 않은 실정이다. 발효식품이 건강에 좋다는 결과는 여러 연구에서 익히 알려진 사실이기에 본 연구를 통해 보이차 연구와 발효식품 연구의 기초 자료를 축적하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 공시 재료인 보이차는 다부문화예술원 (경상북도 칠곡군 소재)에서 Table 1에 나타낸 바와 같이 11종의 시료를 받아 실험에 사용하였다. 보이차의 제조번호에서 앞의 두 숫자는 보이차의 생산 시작년도를, 맨 뒤의 숫자는 공장대표 번호를, 가운데 두 숫자는 보이차의 급수를 나타낸다. 04081 (2008)은 쿤밍 차공장에서 0~8등급의 보이차로 2004년에 생산을 시작하여 2008년도에 수확한 종류라는 것이다.

사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받은 식중독 공시균주 2종인 황색포도상구균과 리스테리아균을 사용하였다. 배지는 Trypticase soybroth (TS)와 Brain Heart Infusion Agar (BHI)는 Difco (USA)의 제품을 사용하였고, 4℃에서 보관하면서 3주마다 계대배양하여 실험에 사용하였다.

시료의 추출

시료추출은 열수 추출을 하였다. 50 ml tube에 각각의 시료 2 g씩 넣고 용매 20 ml를 넣었다. 용매는 hot plate 위에서 100℃까지 가열하여 사용하였다. Shaking incubator에서 시험관을 기울여서 80 rpm으로 60℃에서 1시간 동안 섞어주면서 시료를 추출하였다. 보이차 추출물은 Whatman No.2 여과지를 사용하여 1차 여과과정 후 pore size 0.45 μl syringe 용 멸균 필터로 2차 여과과정 후 사용하였다.

항균력 측정

실험에 앞서 황색포도상구균과 리스테리아균을 TS 액체배지와 BHI 액체배지에서 18시간 배양한 다음, 고체배지와 soft 배지를 준비하였다. 총 11종의 시료농축액을 가지고 항균활성을 측정하였다. 11종의 보이차 원액 250 μl를 각각 2배, 5배로 speed vac concentrator에서 1시간 정도 농축하여 시료를 준비하였다. 또한 5배로 농축된 시료를 121℃에서 10분간 고압멸균하여 시료를 준비하였다. Soft 배지를 30~45초 정도 열을 가해 녹인 후, 15 ml 시험관에 3 ml씩 담고 황색포도상구균과 리스테리아균을 5 μl를 접종하였다. 균이 접종된 시험관을 고체배지에 골고루 편평해지도록 붓고 굳을 때까지 놓아두었다. 보이차 2배 농축액 (200 mg/ml)과 5배 농축액 (500 mg/ml)을 각각 25 μl에 paper disc를 넣어 10분간 반응하여 배지 위에 올려두고 36시간 배양하여 생육저해환 (inhibitory zone)을 확인하였다.

또한 pH에서도 환이 생성되는지 알아보기 위해 11종의 보이차 원액 500 μl를 10배로 농축하여 얻은 25 μl에 pH 2, pH 7, pH 10의 tris-buffer를 각각 25 μl씩 섞어서 paper disc를 넣어 10분간 반응하였다. Soft 배지를 각각 30~45초 정도 열에 가해 녹인 후, 15 ml 시험관에 3 ml씩 담고 황색포도상구균과 리스테리아균 5 μl를 접종하였다. 균이 접종된 시험관을 고체배지에 골고루 편평해지도록 붓고 굳을 때까지 놓아두었다. Paper disc를 배지위에 올려두고 36시간 배양하여 생육저해환을 확인하였다.

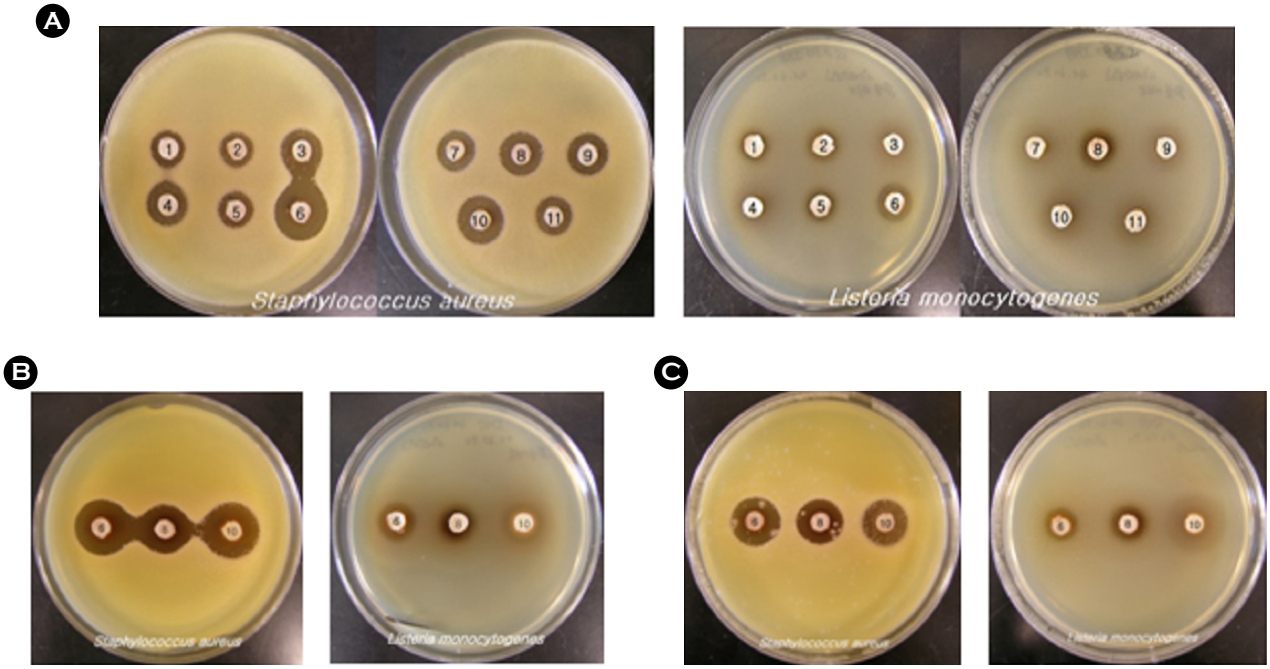

Fig. 1. Antibacterial activity of Puer tea extract to *S. aureus* and *L. monocytogenes*. (A) two-fold concentrated Puer tea extract (200 mg/ml) (B) five-fold concentrated Puer tea extract (500 mg/ml) (C) five-fold concentrated Puer tea extract after autoclaving sterilization. Numbers represent samples used for the experiments.

총 폴리페놀 함량 측정

보이차 열수추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis (AOAC, 2005) 방법을 일부 변형하여 비색 정량하였다. 보이차 추출물을 희석하여 희석액을 60 μl에 2배 희석한 phenol 시약 (Folin regent) 60 μl를 넣은 후, 3분간 정치하고 10% sodium carbonate (10% Na_2CO_3) 60 μl를 첨가하여 혼합한 후 30℃ incubator에서 1시간 정치하였다. Spectra max 340pc microplate readers기를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기준물질은 galic acid를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 이 검량곡선으로부터 시료 중의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

농도별 항균력 측정

본 연구에서는 보이차농축추출물이 황색포도상구균과 리스테리아균에 대하여 항균력을 가지고 있는지 알아보기 위해 측정해 본 결과 거의 모든 시료에 대해서 생육저해환 (clear inhibitory zone)이 생성되는 것을 알 수 있다.

2배 농축시 황색포도상구균의 경우, 6번 시료에서 가장 큰 저해환을 나타났으며 3번, 8번, 10번의 시료가 그 다음으로 저해환이 크다는 것을 알 수 있었다. 리스테리아균의 경우에서도 황색포도상구균과 마찬가지로 6번 시료에서 가장 큰 저해환을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 따라서 2배 농축액의 실험결과를 바탕으로 6번, 8번, 10번 시료를 선택하여 5배 농축액으로 실험한 결과 황색포도상구균의 경우, 8번 < 10번 < 6번의 순으로 저해환이 크다는 것을 알 수 있었으며, 리스테리아균의 경우, 2배 농축시와 유의한 결과를 보였다 (Fig. 1B). 전체적으로 황색포도상구균에 대해 리스테리아균보다 항균력이 강한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B).

또한 5배 농축액을 고압·멸균하여 배양한 후 실험을 한 결과 5배 농축시 실험결과와 유사하게 나타났다 (Fig. 1C). 따라서 보이차 추출물이 고압·멸균하여도 안정하다는 것을 알 수 있었다.

pH별 항균력 측정

pH별로 실험한 결과, 황색포도상구균의 경우, pH 2와 pH 7에서는 큰 효능이 없었지만, pH 10에서 모든 시료에서 저해환이 나타났음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 리스테리아균의 경우, pH 10에서 6번, 8번, 10번 시료에서만 선별적으로 항균력을 가짐을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 따라서 황색포도상구균의 경우, 리스테리아균보다 크고

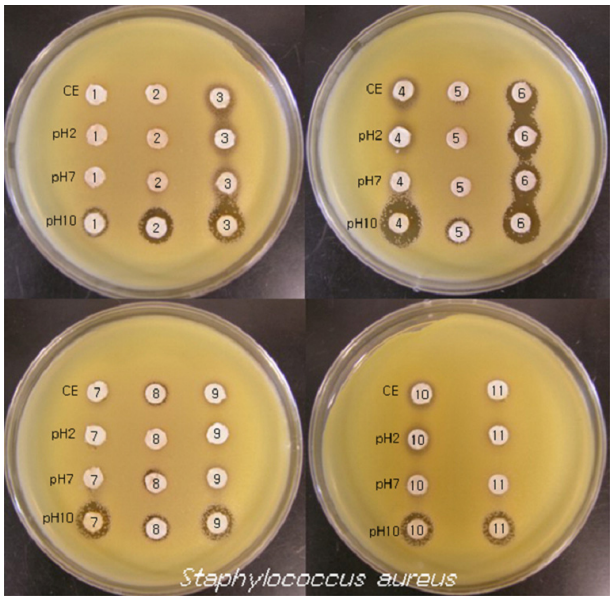

Fig. 2. Antibacterial activity of Puer tea extract to *S. aureus* along with pH conditions. Numbers represent samples used for the experiments. CE; crude extract

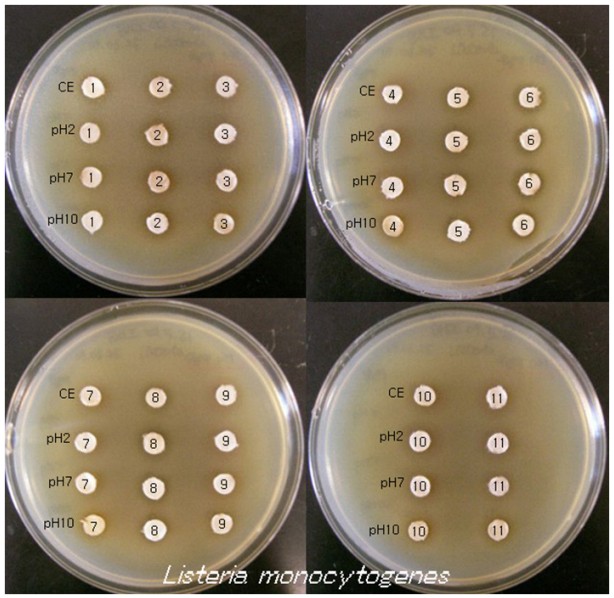

Fig. 3. Antibacterial activity of Puer tea extract to *L. monocytogenes* along with pH conditions. Numbers represent samples used for the experiments. CE; crude extract

뚜렷한 clear zone을 생성하였는데 이는 보이차의 성분이 리스테리아균보다 황색포도상구균을 더 효과적으로 생육을 저해한다고 생각되어 진다. 만일 보이차의 항균물질이 단백질이라면 온도와 pH의 영향으로 변성이 될 수 있는데 높은 온도에서도 항균력이 나타는 것으로 보아 항균

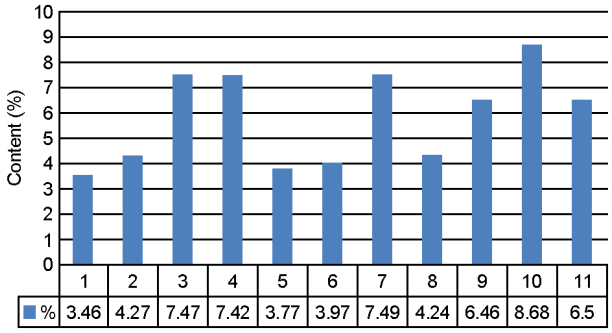

Fig. 4. Total contents of polyphenol compounds in 11 Puer tea samples. Numbers represent samples used for the experiments. (■%: total contents)

물질의 성분이 단백질이 아닌 폴리페놀이라고 생각되어 진다.

총 폴리페놀 함량 분석

폴리페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. 그리고 항산화 작용, 항혈전 작용, 고지혈증 및 지방간 억제 작용 등의 활성을 가지고 있는데 보이차의 총 폴리페놀 함량은 Fig. 4와 같다. 보이차 시료 11개의 폴리페놀 함량은 약 3~9%의 함유량을 보였다. 그 중 폴리페놀 함량이 가장 높은 것은 10번 시료로 100 g당 8.68%의 폴리페놀을 함유하고 있음을 확인할 수 있었으나, 1번 시료에서는 100 g당 3.46%로 가장 낮은 폴리페놀 함유량을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 폴리페놀과 항균력과의 관계에 대해 좀더 실험을 넓혀가야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

Bean NH, Goulding JS, Lao C, Angulo FJ. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United State, 1988-1992. Mob Mortal W Rep. 1996. 45: 1-66.

Kim DH, Kwon KR, Lee KH, Ju YR, Oh KS, Kang HS. Studies on staphylococcal food-poisoning and enterotoxin prosactivity. Report of National Institute of Health 1989. 26: 111-121.

Kim DR, Kwak GS, Jeong SM, Lee SC, Ha JU. Comparison of the antioxidative abilities of commercial gal geun tang. J Kor Soc Food Sci Nutr. 2003. 32: 728-732.

Kim JH. *Listeria monocytogenes*. J Agric Sci. 1992. 6: 229-257.

Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW, Horng CB. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. J

Clin Microbiol. 1997. 35: 1260-1262.
Park SH, Yoon HK, Koo SJ. Effects of Camelia sinensis L on Blood Alcohol Concentration and Activities of Acute Alcohol Metabolic Enzymes in ICR Mouse. J East Asian Soc Dietary Life 2004. 14: 634-639.
Son GM, Bae SM, Chung JY, Shin DJ, Sung TS. Antioxidative Effect on the Green Tea and Puer Tea Extracts. Kor J Food Nutr. 2005. 18: 219-224.