

동치미 젖산균에 대한 대나무(이대)잎 추출물의 항균활성

김미정 · 권오진* · 장명숙†

단국대학교 식품영양학과

*한국원자력연구소

Antibacterial Activity of the Bamboo(*Pseudosasa japonica* Makino) Leaves Extracts on Lactic Acid Bacteria Related to *Dongchimi*

Mi-Jung Kim, Oh-Jin Kwon* and Myung-Sook Jang†

Dept. of Food Science and Nutrition, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

*Dept. of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

Abstract

Antibacterial activities of the bamboo(*Pseudosasa japonica* Makino) leaves extract on lactic acid bacteria related to *Dongchimi* fermentation were investigated. The bamboo leaves were extracted with 70% ethanol, fractionated it with 4 solvents which have a different polarity. Total viable count was very similar to those obtained by lactic acid bacteria during fermentation of *Dongchimi*. Its maximum counts were $\approx 10^7$ CFU/ml at 8 days of fermentation. Lactic acid bacteria isolated during *Dongchimi* fermentation were identified as *Leuconostoc* species(BK-2, BK-07, BK-22), *Lactobacillus* species(BK-05, BK-08) and *Streptococcus* species(BK-15). 70% ethanol extract of the bamboo leaves showed antibacterial activity against strain BK-02, BK-07, BK-15 and BK-22. Especially, strain BK-22 was more effective to the extracted substance. Among the each fractions, 70% ethanol and diethyl ether had the strongest antibacterial activity against strain BK-22 and BK-07, respectively. The two fractions also showed similar activities against all of the test strains.

Key words: *Dongchimi*, bamboo leaves extract, lactic acid bacteria, antibacterial activity

서 론

천연물에 존재하는 항균활성 물질을 식품의 보존에 이용하고자 생약재 성분, 향신료와 그 정유성분, 마늘, 파, 쪽 추출물에서 유래된 성분, 미생물이 생성하는 항균활성 물질 등을 중심으로 연구가 계속되어 왔다(1-5). 이러한 천연 항균활성 물질의 경우 대개가 그 활성이 낮고 추출된 물질은 식품의 맛과 색택에 많은 영향을 미치므로 아직까지 식품산업에 실용화되지 못하고 있는 실정이다(6,7). 한편, 우리의 전통 발효식품인 김치의 보존성 증대 혹은 향미기간의 연장을 위한 시도가 일부 연구자들에 의해 수행되어 왔고(3,4,8-10) 저자들도 대나무(이대, *Pseudosasa japonica* Makino)잎 추출물의 식품관련 미생물에 대한 항균활성을 단편적으로 보고한 바 있다(11). 일반적으로 김치의 주발효균은 *Leuconostoc mesenteroides*이며 *Lactobacillus plantarum*은 산패

에 관여한다고 보고되고 있으며(12-15), 김치는 호기성 세균과 젖산균이 발효를 주도하고 있고 말기에는 효모들도 분리, 확인된 바 있다(16,17).

이에 본 연구에서는 김치류의 위생 및 장기간의 신선도 유지를 위한 기초 연구로서 전보(11)에 이어 옛부터 동치미 담금에 이용되어 온 대나무 잎에서의 추출물을 대상으로 이들을 여러 용매별로 분획하여 동치미 발효에 관여하는 젖산균에 대해 항균활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 무는 1995년 11월 18일 서울 가락동 농수산물 도매시장에서 구입한 전북 고창산 재래종 동치미 무(*Raphanus Sativus* L., 품종: 태백)이며 부재료인 쪽파, 마늘, 생강도 같이 구입하여 사용하였다.

† To whom all correspondence should be addressed

소금은 염도 88% 이상인 재제염(신진염업사)을 사용하였고 대나무잎은 자연산 이대(*Pseudosasa japonica* Makino)의 잎으로서 1995년 11월 17일에 전북 익산시 신동 야산에서 채취하여 사용하였다.

담금방법

실험에 사용한 무는 깨끗히 씻어 물을 뺀 후 양끝에서 5cm씩 잘라내고 4×1.5×1cm의 크기로 썰었으며 부재료인 마늘, 생강은 다듬은 후 깨끗이 씻어 얇게 썰었고, 쪽파는 2~3뿌리씩 말아 묶어 2점의 거즈로 만든 주머니(15×15cm)에 넣어 사용하였으며 한병에 사용한 재료의 양은 Table 1과 같다. 사용한 무와 동치미 담금액의 비율은 1 : 1.5(w/v)로 하였다. 미리 1%의 KMnO₄용액으로 처리한 8L(18×31cm)의 투명한 유리병에 각 원,부재료와 동치미 담금액을 넣어 담금 즉시 10°C에 저장하여 75일까지 발효 숙성시키면서 실험에 사용하였다. 이때 실온은 15±0.5°C였고, 소금물의 온도는 17°C였다.

총균수 및 젖산균수의 변화

동치미의 발효 중의 총 균수와 젖산균수는 발효기간 별로 동치미 담금액 1ml를 0.85% 생리식염수로 희석하여 총 균수는 plate count 배지를, 젖산균수는 Lactobacillus MRS(MRS) 배지를 각각 사용하여 pouring culture method로 접종한 다음, 각각 30°C와 37°C에서 48~72시간 배양하여 나타난 colony를 계수하였고 실험은 2회 반복, 측정하였다.

젖산균의 분리 및 동정

젖산균의 분리는 발효 13~23일째의 동치미 담금액 1ml를 0.1M phosphate buffer(pH 6.5)로 희석하여 MRS 평판에 0.2ml 접종하고 30°C에서 50시간 배양한 후 생성된 colony 중 육안으로 그 형태적 특징이 뚜렷하게 구분되는 균주만을 분리하였다. 분리균주들은 MRS-

BPB 평판배지(*Leuconostoc*: 암청색, *Lactobacillus*: 담청색 혹은 흰색)와 m-EA 평판배지(*Streptococcus*: 붉은색, *Pediococcus*: 흰색, *Aerococcus*: 핑크색)에서 전형적인 colony를 생성하는 8종의 균주만을 최종 선별하였다. 구별하기 어려운 colony는 재차 동일한 평판배지에 순수점종하여 확인한 후 50% glycerol에 냉동보관하면서 실험시 마다 MRS 액체배지에서 활성화시켜 사용하였다. 분리된 균주는 0.002% bromophenol blue를 첨가한 MRS(MRS-BPB)와 m-Enterococcus(m-EA) 평판배지에 접종하여 30°C에서 2~4일 배양한 후 생성된 colony의 특징을 관찰하고 gram 염색과 catalase 반응을 확인한 다음, 각각 2분씩 API system(API System S.A., La Balme Les Grottes, France, 1992)으로 동정하였다. 즉 MRS 평판배지에서 30°C에서 50시간 배양하여 생성된 colony를 멸균 swab를 사용하여 2ml의 멸균증류수나 5ml의 suspension medium(demineralized water)에 현탁하였다. 현탁액은 API 20 STREP의 gallery에 접종하여 30°C에서 4시간 배양시킨 후 각 시약을 첨가하고 10분 후 결과를 판독하여 각 반응결과에 부여된 수치를 합하여 7자리의 숫자로 표시한 다음 API 20 STREP analytical profile index로 동정하였고 index에 없거나 혼동될 우려가 있을 때는 24시간 재배양하여 판독하였다.

대나무잎 추출물의 제조

대나무잎의 70% ethanol extract 추출 및 각 분획의 분리는 용매의 극성차를 이용해 비극성용매 분획으로부터 극성용매 분획으로 각각 분리하였다. 즉 500ml용 등근 플라스크에 대나무 생잎 20g을 담고 20배량의 70% ethanol을 가하여 80±2°C의 수욕상에서 2시간 동안 추출한 후 여과지(Whatman No. 5A)로 여과하였다. 1차 추출된 잔사는 위와 같은 조작으로 1회 반복 추출 후 총 추출여액을 합한 다음, 감압농축하여 70% ethanol 추출액을 얻었다. 용매의 극성차를 이용한 분획 분리는 위의 70% ethanol 추출물을 물 50ml에 용해시켜 분액깔대기에 넣고 petroleum ether(50ml씩 3회 반복)로 추출하여 petroleum ether fraction을 얻었다. 그 수층을 다시 분액깔대기에 넣고 위와 같은 방법으로 diethyl ether fraction, ethyl acetate fraction, 수포화 n-butanol fraction 및 aqueous fraction으로 각각 분획하였다. Aqueous fraction은 10ml의 50% methanol에, 그외의 분획 농축물들은 10ml의 99.8%의 methanol에 각각 용해시켜 실험에 사용하였다.

추출물의 항균활성 측정

대나무잎의 70% ethanol 추출물의 항균활성 실험은

Table 1. Formulas of *Dongchimi* prepared in 8 liter-glass jar

Ingredients	Weight(g)	Ratio(%w/w)
Raw Chinese radish	2800.0	100.0
Small green onion	28.0	1.0
Garlic	14.0	0.5
Ginger	8.4	0.3
Distilled water(ml)	4200.0	150.0
Bamboo leaves ¹⁾		

¹⁾ Varied as experimental treatments; 0, 1, 3, 5 and 7% to Chinese radish weight

분리균주들을 MRS 액체배지 10ml에 1백균이를 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 활성화하고 배양액 0.1ml($10^5 \sim 10^7$ CFU/ml)를 추출물이 0~5%(v/v)의 농도로 첨가된 동일배지에서 증식시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 대조구 보다 균주들의 증식이 억제되었을 경우 항균활성 양상으로 판정하였다. 각 분획별 추출물의 항균활성은 paper disc법(7)으로 조사하였다. 즉 균주들을 MRS 액체배지에서 활성화시킨 후, 그 액을 0.2ml를 MRS 평판(0.75% agar)에 접종하여 plate 위에 도말하고 각 분획별 추출물을 멸균된 disc(8mm, Toyo Seisakusho Co.)에 40μl씩 흡수, 건조시켜 plate 표면에 올려놓은 다음 0.85% 식염수 75μl로 확산시켰다. 그리고 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)으로 항균활성을 측정하였다. 대조구로서는 인공 합성보존료 sorbic acid를 사용하였으며 농도는 0.5%(5mg/ml), 1.0%(10mg/ml)로 조절한 후 대나무잎 추출액의 항균활성 실험과 동일하게 측정하였다.

결과 및 고찰

총균수 및 젖산균수의 변화

김치발효에 관여하는 미생물들은 대부분 구체적으로 밝혀지고 있고 본 실험에서도 발효시간별 총 균수 및 젖산균수의 변화가 상당히 심할 것으로 판단되어

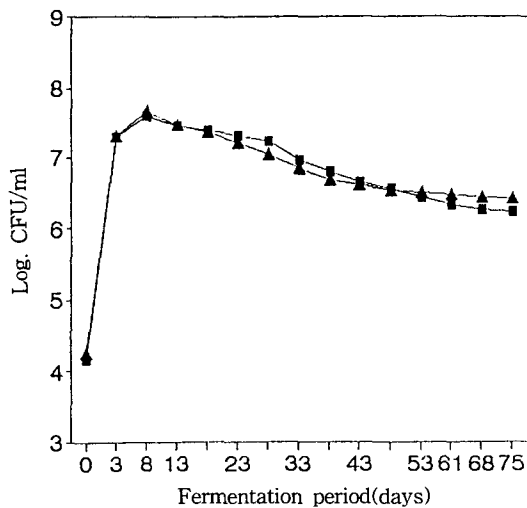


Fig. 1. Changes in total viable and lactic acid bacteria count of Dongchimi during fermentation at 10°C. ■-■: Total viable cell count ▲-▲: Lactic acid bacteria

이를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 동치미 담금액에서의 총 균수는 발효기간별로 뚜렷한 차이 없이 비슷한 양상을 나타내었고 최고 수치에 이르는 시간이 발효 8일째 6.0×10^7 으로 나타났고 그 후 발효 28일째까지 감소하다가 그 후에는 감소 속도가 빨라 발효 75일째는 1.8×10^6 으로 나타났다. 젖산균수는 그 증감의 양상이 총 균수의 경우와 비슷하였다. 홍 등(17)은 10°C에서 포장방법별 젖산균의 분포를 조사한 결과, 각 포장구는 발효 8~11일째 $10^9 \sim 10^{11}$ 으로 최대에 달한다고 보고하였고 신 등(18)은 시판 김치의 총 균수가 15°C의 경우 발효 6일에, 5°C의 경우 발효 12일 후에 각각 최고에 도달하여 10^8 에 이른다고 보고하였다.

젖산균의 분리 및 동정

동치미 담금액을 MRS 평판배지에 접종, 배양한 후 육안으로 colony 형태가 다른 24주를 1차 분리하였으며 분리균주들은 MRS-BPB 평판배지(*Leuconostoc*: 암청색, *Lactobacillus*: 담청색 혹은 흰색)와 m-EA 평판배지(*Streptococcus*: 붉은 색, *Pediococcus*: 흰색, *Aerococcus*: 핑크색)에서 전형적인 colony를 생성하는 6종의 균주만을 최종 선별하였다. 선별된 균주들은 gram 양성균, catalase 음성으로 plate count agar나 nutrient agar 등의 증균배지에서 생육이 억제 혹은 저해되었으나 Gaspak jar에서의 혐기배양시에 증식이 좋았고 배양액 중의 pH도 4~5까지 내려가 선별균주들이 배양액 중에 산성물질을 생성함을 알 수 있었다. 이러한 배양 및 형태적 특징을 바탕으로 분리균주들을 API 20 STREP kit를 사용하여 최종 동정한 결과는 Table 2와 같다. BK-02, BK-07 및 BK-22 균주는 Gram 양성, 통성혐기적 간균으로 반유동 고층배지에서 운동성이 없었으며 Voges-Proskauer와 esculin 반응은 양성이었으며 L-arabinose, mannitol, trehalose, raffinose 등의 당을 분해하였다. 이러한 특징들은 API 20 STREP analytical profile index로 확인한 결과, *Leuconostoc* sp.로 동정되었다. 한편, BK-05와 BK-08 균주는 *Lactobacillus* sp.로, BK-15 균주는 *Streptococcus* sp.로 각각 동정되었다. 일반적으로 김치의 발효에 관여하는 젖산균들의 증식 양상은 식물성 재료 및 발효 온도에 따라 다소 차이는 있으나 *Leuconostoc* sp.는 발효 초기에 나타나 적숙기에 그 수가 최대로 되고 *Streptococcus* sp.는 발효 6~9일째까지 증가하다가 적숙기 이후에 급속히 감소하여 *Lactobacillus* sp.의 수가 최대로 될 때 김치가 완전히 시어진다고 보고되고 있다(19).

Table 2. Differential characteristics of strains selected from *Dongchimi*

Characteristics	BK-02	BK-05	BK-07	BK-08	BK-15	BK-22
Shape	Cocci	Rod	Cocc	Rod	Cocc	Cocci
Gram stain	+ ¹⁾	+	+	+	+	+
Motile	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis						
hippurate	-	-	-	-	-	-
esculin	+	+	+	+	+	+
Pyrrolidonylamidase	-	-	-	-	-	-
α -galactosidase	+	-	+	-	+	+
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	+	-	+	-	-	+
Alkaline phosphatase	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	-	-	-	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-
Acid production from						
ribose	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-(+) ²⁾	-	+	-	-	-(+)
mannitol	-(+)	-	-	-	+	-
sorbitol	-	-	-	-	-	-
lactose	-	+	-	+	-	-
trehalose	+	+	+	+	+	+
inulin	-	-	-	-	-	-
raffinose	-(+)	-	-(+)	-	-(+)	-(+)
starch	-	-	-	+	-	-
glycogen	-	-	-	-	-	-

Incubate at 30°C for 4 hours to obtain a ¹⁾first reading and 24 hours to obtain a ²⁾second reading

추출물의 항균활성 측정

동치미의 발효미생물에 대한 대나무잎의 70% ethanol 추출물의 항균활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 동치미에서 분리한 젖산균들 중에서 BK-05와 BK-08 균주는 5% 농도의 추출물에서도 증식되었으나 BK-02, BK-07, BK-15 및 BK-22 균주는 본 농도에서 완전히 저해되었으며, 특히 BK-22 균주는 4%의 농도에서도 증식되지 못하여 강한 항균활성을 나타내었다. 본 결과는 서 등(20)의 겨자 가수분해물이 젖산균에 대한 항균활성이 낮다는 보고와 상이하였으며, 이는 실험균주의 증식상태, 시료의 성분 및 처리방법 등의 차이에서 비롯된 것으로 생각된다. 70% ethanol 추출물로부터 항균활성 물질을 분리할 목적으로 petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate 및 n-butanol 순으로 분획하였다. Table 4는 분획별 추출물의 항균활성을 나타낸 것으로 BK-22 균주는 70% ethanol 분획추출물에서 항균활성이 가장 높게 나타나 본 추출물은 현재 사용중인 합성보존료(21)인 1.0% sorbic acid(10mg/ml)와는 항균활성이 우수하였으며 전반적으로 0.5% sorbic acid(5mg/ml)와는 거의 유사하거나 오히려 항균활성

이 우수하였다. 또한 본 분획추출물은 전보(11)에서 보고한 바와 같이 일반 식품오염 균주에 대해서도 높은 항균활성을 나타내어 일반적인 가공식품의 보존제로서 이용가능성도 있을 것으로 생각된다. BK-7 균주는 diethyl ether 분획추출물에서 13mm로 항균활성이 가장 높았고 또한 본 균주는 모든 분획추출물에서 항균활성이 나타났다. 이러한 결과로서 대나무잎의 항균활성 물질은 특정 용매에만 용해되지 않고 일부 다른 용매에도 용해되는 성분으로 한가지 성분이 아닌 여러가지 성분이 복합적으로 작용하는 것으로 생각되며 본 항균활성 물질은 주로 70% ethanol과 petroleum ether의 두 분획추출물로 많이 이행되었다. 이와 신(6)은 n-butanol에서, 박 등(5)과 정과 유(7)는 ethyl acetate 분획에서 각각 항균활성이 좋았다고 보고하였다.

이상의 결과로 보면 몇가지 분획추출물들이 젖산균들에 대해 항균활성이 있음이 확인되었고 차후 이들 추출물의 농도를 달리하여 실제 동치미 담금시에 적용하면 이미 보고된 식품위생관련 미생물에 대한 항균활성과 더불어 숙성조절이나 보존성 연장에 이용되어 김치의 위생 및 과학화에 크게 활용될 것으로 생각된다.

Table 3. Antibacterial activities of 70% ethanol extract¹⁾ from bamboo leaves

Strains	Concentration of extract(%)					
	0	1	2	3	4	5
BK-02	+	+	+	+	W	-
BK-05	+	+	+	+	+	W
BK-07	+	+	+	+	W	-
BK-08	+	+	+	+	+	W
BK-15	+	+	+	+	W	-
BK-22	+	+	+	W	-	-

¹⁾10g of sample was extracted in 200ml of 70% ethanol at 80±2°C for 2 hours, then filtered and concentrated into 10ml of 99.8% methanol

-: No growth, w: weak growth

Table 4. Antibacterial activities of each fractions obtained from 70% ethanol extract from bamboo leaves

Strains	Inhibition zone on plate(mm) ¹⁾							Sorbic acid	
	70 Et-OH	Petroleum ether	Diethyl ether	Ethyl acetate	n-Butanol	Aqueous	0.5%	1.0%	
	BK-02	12	9	- ²⁾	-	-	9.5	10	14.5
BK-05	10	10	8.5	-	-	-	11	15	
BK-07	11	10	13	10	11	9	9	11.5	
BK-08	10	-	-	-	9	9	11	15	
BK-15	9.5	8.5	-	-	-	-	8.5	10	
BK-22	13	8.5	-	-	-	-	8.5	11.5	

¹⁾Diameter, ²⁾No inhibitory zone was formed during 24hr's cultivation

요 약

대나무잎 추출물을 대상으로 이들을 여러 용매별로 분획하여 동치미 발효에 관여하는 젖산균에 대해 항균 활성을 조사하였다. 동치미 담금액 중의 총 균수는 젖산균수와 발효기간별로 대체적으로 비슷한 양상을 나타내었고 발효 8일째 ≈10⁷CFU/ml로 최고 수치를 나타내었다. 동치미에서 분리한 젖산균을 동정한 결과, BK-02, BK-07 및 BK-22 균주는 *Leuconostoc* species로, BK-05와 BK-08 균주는 *Lactobacillus* species로, BK-15 균주는 *Streptococcus* species로 각각 확인되었다. 대나무잎(이대)의 70% ethanol 추출물은 BK-02, BK-07, BK-15 및 BK-22 균주들에 대해 항균활성을 나타내었으며 특히, BK-22 균주에서 가장 효과가 좋았다. 각 분획별 항균활성은 BK-22 균주가 70% ethanol 분획에서, BK-7 균주가 diethyl ether 분획에서 강하게 나타났으며, 이 두 추출물이 대부분의 분리 균주들에 대해서 항균활성을 나타내었다.

문 헌

1. Koho, K. H. : Antimicrobial effect of short-chain fatty acids against *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods and Biotechnology*, 5, 42(1996)

2. Huhtanen, C. N. : Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. *J. Food Sci.*, 43, 195(1980)

3. 윤석인, 박길동, 김영찬, 임영희, 이철 : 산초추출물을 첨가한 김치류의 보존 연장법. 특허공보 제 1776호(1990)

4. 홍완두, 윤선 : 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치 발효에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, 21, 331(1989)

5. 박옥연, 장동석, 조학래 : 한약재 추출물의 항균효과 검색. *한국영양식품과학회지*, 21, 91(1992)

6. 이병완, 신동화 : 식품부패 미생물의 증식을 억제하는 천연 향료성 물질의 검색. *한국식품과학회지*, 23, 200(1991)

7. 정대균, 유리나 : 김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. *한국식품과학회지*, 27, 1035(1995)

8. 김선재, 박근형 : 식물성 김치재료추출물의 항미생물활성. *한국식품과학회지*, 27, 216(1995)

9. 박현근, 임종락, 한홍의 : 각 온도에서 김치발효중 미생물의 천이과정. *인하대학교기초과학연구소 논문집*, 제 11집, p.161(1990)

10. 문광덕, 변정아, 김석중, 한대석 : 김치의 선도유지를 위한 천연 보존제의 탐색. *한국식품과학회지*, 27, 216(1995)

11. 김미정, 변명우, 장명숙 : 대나무(이대)잎의 생리활성 및 항균성 효과. *한국영양식품과학회지*, 25, 135(1996)

12. Mheen, T. I. and Kwon, T. W. : Effect of temperature and salt concentration on *Kimchi* fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 16, 443(1984)

13. 김호식, 정윤수 : 김치 및 김에서 분리한 호기성 세균의 동정에 관하여. *한국농화학회지*, 3, 19(1962)

14. 김호식, 황규찬 : 김치의 미생물학적 연구(제 2보). 호기성 세균의 분리과 동정. *과연회보*, 5, 51(1960)

15. 이철우, 고창여, 하덕보 : 김치 발효중의 젖산균의 경시

- 적 변화 및 분리 젖산균의 동정. 산업미생물학회지, **20**, 102(1992)
16. 강상모, 김혜자, 이철수, 양차범 : 김치의 내산성 균주를 이용한 산패지연 및 관능향상에 관한 연구. 한국식품과학회 김치의 과학 심포지움발표논문집, 제1권, p.137(1994)
17. 홍석인, 박노현, 김길환 : 포장방법에 따른 김치의 품질 변화. 한국식품과학회 김치의 과학 심포지움발표논문집, 제1권, p.384(1994)
18. 신동화, 김문숙, 한지숙, 임대관, 박완수 : 시판김치의 발효 온도별 성분과 미생물 변화. 한국식품과학회지, **28**, 137(1996)
19. Ha, J. H., Hawer, W. S., Kim, Y. J. and Nam, Y. J. : Changes of free sugar in kimchi during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**, 63(1989)
20. 서권일, 박석규, 박정로, 김홍출, 최진상, 심기환 : 겨자가수분해물의 항균성 변화. 한국영양식량학회지, **25**, 129(1996)
21. Sofos, J. N. and Busta, F. F. : Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food Prot.*, **44**, 614(1981)

(1996년 7월 19 접수)

* 정정 : 한국영양식량학회지 **25**(1), 135~142(1996)에 게재된 내용중 신의대는 이대(*Pseudosasa japonica* Makino)로 정정합니다.