

식중독세균에 대한 녹차 물추출물의 항균작용

박 찬 성
경산대학교 생명자원공학부

Antibacterial Activity of Water Extract of Green Tea against Pathogenic Bacteria

Chan-Sung Park
Faculty of Life Resources Engineering, Kyungsan University

Abstract

The sensitivity of various pathogenic bacteria(*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 196E, *Salmonella typhimurium*) to the water extract of green tea was tested. Tryptic soy broth was inoculated with 10^5 CFU/ml of pathogenic bacteria and incubated at 35°C for 30 hours. The extract was added at a final concentration of 0~2%(w/v) into culture broth at the mid or late exponential phase of bacteria. The growth of pathogenic bacteria was inhibited with increasing concentrations of the extract in culture broth and the late exponential phase cells were more resistant than the mid exponential phase cells. Gram positive bacteria(*L. monocytogenes* and *S. aureus* 196E) were more sensitive than Gram negative bacteria(*E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium*). *S. aureus* had the highest sensitivity, followed by *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7. *S. typhimurium* was the most resistant to the the water extract of green tea.

Key words : antibacterial activity, water extract of green tea, pathogenic bacteria

서 론

환경오염과 더불어 세균의 오염도 증가되어 공해가 심한 연안 해수에서 *Salmonella*와 *S. aureus* 검출률이 높고(1) 오염된 환경에서 자란 shellfish에서 *S. aureus*와 *Vibrio parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* 등의 식중독세균 검출률이 높아져(2,3) 식중독 사고의 위험성이 점차 높아지고 있다. 식중독세균은 smoked fish(4), 양송이 통조림(5), 육류(6) 등, 점차 다양한 식품으로부터 검출되고 있으며 이러한 식중독 환자의 치료비가 막대한 경제적 손실이 되고 있다(7). 세계 각국에서 발생하는 식중독사고의 대부분이 세균에 그 원인이 있으며, 원인식품은 점차 다양해지고 식중독사고의 규모가 대형화되고 있기 때문에 식중독세

균에 대한 관심이 점차 높아지고 있다.

미생물에 의한 식품의 부패와 변질을 방지하고 식중독사고를 예방하기 위하여 여러종류의 합성보존료를 사용하고 있으나 소비자들은 합성첨가물의 안전성에 문제가 있다고 인식하고 있으며(8) 소비자들은 안전한 천연물의 사용을 희망하고 있다(9). 천연물로서는 지금까지 섭취해온 식품을 이용하는 것이 안전한 것으로 생각되고 있다. 천연물의 항균작용에 관한 연구는 쑥(10), 솔잎(11), 녹차(12), 한약재(13,14), 마늘(15,16), 민들레(17), 정향(18,19) 등의 다양한 식용식물이 각종 세균에 대하여 항균활성이 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 식용식물은 항산화성(20,21)을 비롯한 건강식품으로서의 가치(22,23)를 갖고 있기 때문에 가장 바람직한 천연 보존제로 인식되고 있다. 이들 식용식물이나 그 추출물을 직접 식품에 이용한 연구로서 녹차 폴리페놀의 항균성을 이용한 과자와 음료의 개발(24), 쑥을 첨가한 빵과 떡의 저장성 향상

Corresponding author : Chan-Sung Park, Faculty of Life Resources Science, Kyungsan University, Kyungsan, 712-240, Korea

(25) 등이 보고되고 있다.

본 연구는 식용식품의 식중독세균에 대한 항균성을 조사하여 식품에 보존제로서 이용할 수 있는 방안을 모색하기 위하여 녹차 물추출물로서 중요한 4 종류의 식중독세균(*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium*)에 대한 증식억제 작용을 검토하였다.

재료 및 방법

시료의 조제

본 실험에 사용한 녹차는 태평양화학의 뒤음차를 사용하였으며, 녹차 물추출물은 녹차 증량의 10배의 물을 가한 후 50°C에서 5분간씩, 3회 추출후 여과하여 rotary vacuum evaporator로 농축하고 동결건조하여 실험에 사용하였다.

사용균주

본 실험에는 대표적 식중독세균으로서 Gram 양성 균인 *L. monocytogenes* (ATCC 7644)와 *S. aureus* 196E (ATCC 13565)를 사용하였고 Gram 음성균은 *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895)와 *S. typhimurium* (ATCC 13311)을 사용하였다.

사용배지

전배양 및 본배양을 위한 액체배지는 tryptic soy broth(TSB, Difco)를 사용하였으며 생균수의 측정을 위한 고체배지는 tryptic soy agar(TSA, Difco)를, 균액의 희석액으로는 0.1% peptone수를 사용하였다.

증식 및 생존억제 실험

증식억제 실험을 위하여 보존균주의 사면배지로부터 1 백금이를 TSB 10ml에 접종한 후 35°C에서 18~24시간씩 액체배지에서 2회 계대배양하였다. 배양액을 적당한 농도로 희석하여 실험초기의 생균수가 10^5 CFU/ml 정도 되도록 접종하여 배양하였다. 시험균 4종류에 대하여 대수증식기 중기(4.5~6 시간 배양 후)에 도달하였을 때 녹차 물추출물을 액체배지에 0~2%(w/v) 되게 첨가하여 세균의 증식억제작용을 생균수의 변화로서 조사하였다. 한편, *E. coli*의 경우에는 대수증식기 말기에 녹차 물추출물을 첨가하였을 때의 증식억제 정도를 대수증식기 중기에 첨가한 경우와 비교하였다. 생균수의 측정은 배양액 또는 그 희석액 ml당의 colony forming unit(CFU/ml)로 나타내었다.

결과 및 고찰

녹차 물추출물의 *L. monocytogenes*에 대한 증식억제 효과

Fig. 1은 TSB에 *L. monocytogenes*를 1.1×10^5 CFU/ml 되게 접종하여 대수증식기 중기(6시간)까지 배양한 후 녹차 물추출물을 0~2% 첨가하여 35°C에서 배양하였을 때의 생균수 변화이다. 대조구의 경우에는 30시간의 배양기간 동안 4.1 log cycle 증가하였으며 녹차 물추출물을 첨가한 경우에는 첨가후 3시간동안 배양액 생균수가 첨가 직전보다 0.4~0.9 log cycle 감소하였다. 이후에도 녹차 물추출물 0.5% 첨가구에서 생균수의 증가는 거의 없었으며 1% 이상 첨가시에는 저장말기까지 첨가 전보다 약 0.7~2 log cycle 감소하여 *L. monocytogenes*에 대하여 강한 항균 활성을 나타내었다. Kumar와 Berwal(15)은 마늘의 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성을 조사한 연구에서, 이 세균이 마늘에 대하여는 강한 내성을 나타내어 본 연구 결과와 상반된 결과를 보고하였다. 이와같이 *L. monocytogenes*에 대한 항균성이 서로 다른 점은 마늘과 녹차의 항균성 물질이 각각 다른데 기인한 것으로 추정된다.

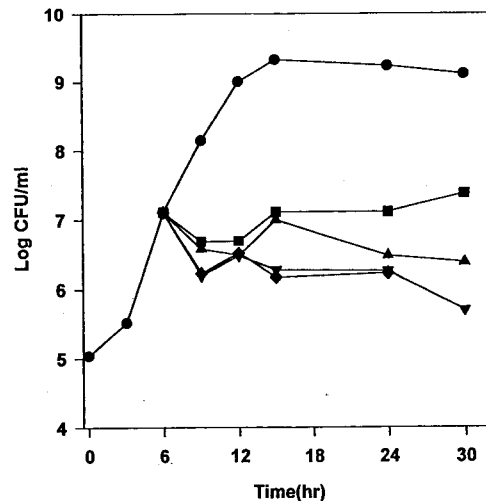


Fig. 1. Effect of water extract of green tea on the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

The extract was added at the mid exponential phase(6 hours after cultivation) of bacteria into the culture broth at each final concentration as following :
 ●; 0%, ■; 0.5%, ▲; 1.0%, ▼; 1.5%, ◆; 2.0%.

녹차 물추출물의 *S. aureus*에 대한 증식억제 효과

Fig. 2는 TSB에 *S. aureus*를 1.4×10^5 cells/ml 되게 접종하여 대수증식기 중기(6시간)까지 배양한 후 녹차 물추출물을 첨가하여 35°C에서 배양하였을 때의 생균수 변화이다. 녹차 물추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우에는 배양말기까지 생균수가 약 4 log cycle 증가하였다. 녹차 물추출물을 첨가한 경우에는 첨가 후부터 계속적으로 생균수가 감소했으며 감소정도는 배양시간의 경과와 첨가한 녹차 물추출물의 농도에 비례하였다. *S. aureus*의 배양 말기의 생균수는 대조구와 비교하여 녹차 물추출물의 농도에 따라 5.7~8.9 log cycle 까지 큰 차이를 나타내었으며 이러한 녹차의 *S. aureus*에 대한 항균작용은 천연 보존제로서의 개발 가능성이 큰 것으로 기대된다. 녹차 물추출물이 *S. aureus*에 대하여 강한 항균활성을 나타낸 점은 여러 연구자들이 자초(14), 민들레(17), 오배자(26), 정향(27) 등을 이용한 경우에도 비슷한 결과를 나타내었다.

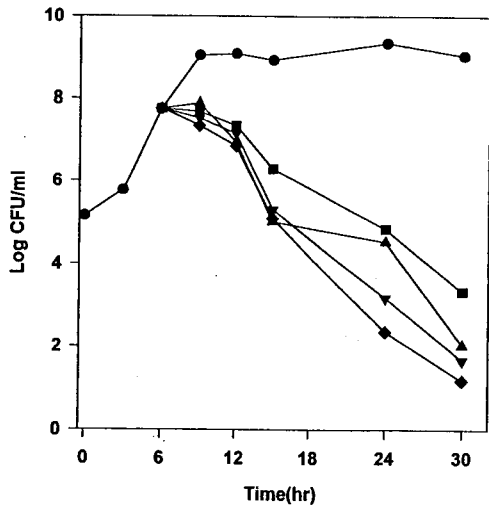


Fig. 2. Effect of water extract of green tea on the growth of *Staphylococcus aureus* 196E (ATCC 13565).

The extract was added at the mid exponential phase(6 hours after cultivation) of bacteria into the culture broth at each final concentration as following :
 ●; 0%, ■; 0.5%, ▲; 1.0%, ▼; 1.5%, ◆; 2.0%.

녹차 물추출물의 *S. typhimurium*에 대한 증식억제 효과

Fig. 3은 TSB에 *S. typhimurium*을 1.0×10^5 CFU/ml 되게 접종하여 대수증식기에 도달할 때 까지(4.5시간)

배양한 후 녹차 물추출물을 첨가하였을 때의 생균수 변화이다. 녹차 물추출물을 첨가한 직후에는 대조구에 비해 0.5~1 log cycle 정도 증식이 억제되었으나 시간이 경과하면서 녹차 물추출물에 대하여 강한 내성을 나타내었다. 한편, 정 등(22)은 영지 추출물이 *S. typhimurium*에 대하여 강한 항균활성을 나타낸다고 보고하여 각종 식중독세균에 대하여 많은 연구자들의 검토를 통하여 천연 보존제의 개발이 빨라질 것으로 생각된다.

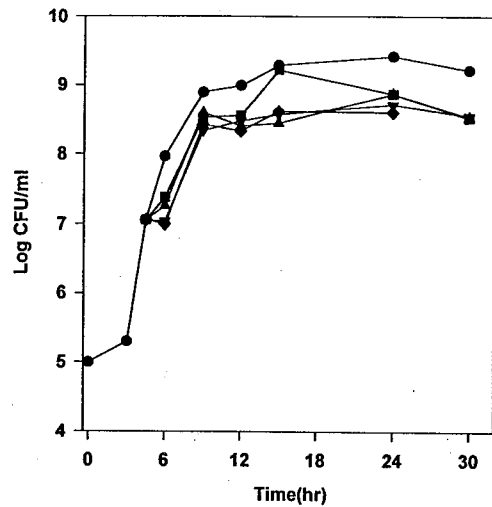


Fig. 3. Effect of water extract of green tea on the growth of *Salmonella typhimurium* ATCC 13311.

The extract was added at the mid exponential phase(4.5 hours after cultivation) of bacteria into the culture broth at each final concentration as following :
 ●; 0%, ■; 0.5%, ▲; 1.0%, ▼; 1.5%, ◆; 2.0%.

녹차 물추출물의 *E. coli* O157:H7에 대한 증식억제 효과

Fig. 4는 TSB에 *E. coli* O157:H7을 2.5×10^5 CFU/ml 되게 접종하여 35°C에서 대수증식기 중기(4.5시간)에 도달할 때까지 배양한 후 녹차 물추출물을 첨가하여 배양했을 때의 세균의 증식 억제효과를 나타낸 그림이다. 30시간 배양했을 때 녹차 물추출물을 첨가하지 않은 대조구의 생균수는 1.4×10^9 CFU/ml로서 약 3.8 log cycle 증가하였다. 세균의 대수증식기에 녹차 물추출물을 0.5% 첨가하여 배양한 경우에는 배양 말기까지 대조구에 비하여 0.2~0.5 log cycle 낮은 생균수를 나타내었다. 녹차 물추출물을 1% 이상 첨가한 후 2시간 배양하였을 때의 생균수는 첨가직전에 비

하여 1% 첨가시에 약 0.4 log cycle, 1.5%에서 1.6 log cycle, 2%에서 1.8 log cycle 감소하여 녹차 물추출물의 농도가 높을수록 증식억제효과는 증가하였다. 그러나 녹차 물추출물을 첨가한 2~4.5시간 후부터 세균은 회복되기 시작하여 배양 말기에는 녹차 물추출물 2% 첨가시에도 대조구와의 생균수 차이가 0.8 log cycle에 불과하여 녹차 물추출물의 *E. coli* O157:H7에 대한 항균활성은 낮은 편이었다. 이러한 결과는 마늘이 *E. coli*에 대하여 아주 강한 항균 활성이 있다고 보고한 김 등(28), Kumar와 Berwal(15)의 보고와는 상반된 결과이다.

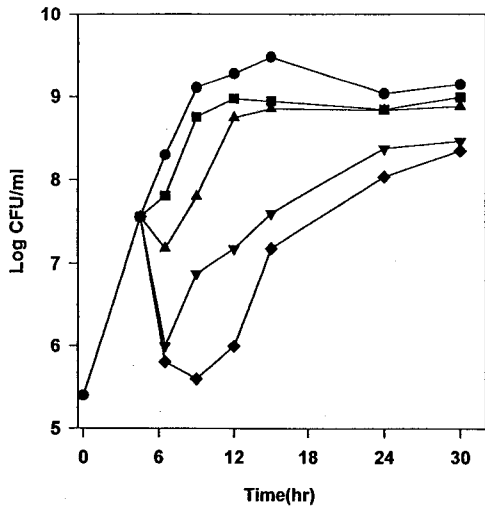


Fig. 4. Effect of water extract of green tea on the growth of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895.

The extract was added at the mid exponential phase(4.5 hours after cultivation) of bacteria into the culture broth at each final concentration as following :
●; 0%, ■; 0.5%, ▲; 1.0%, ▼; 1.5%, ◆; 2.0%.

Fig. 5는 TSB에 *E. coli* O157:H7을 접종하여 대수증식기 말기(6시간)까지 배양한 후 녹차 물추출물을 첨가하였을 때의 세균의 증식 억제효과를 나타낸 그림이다. 녹차 물추출물을 첨가하기 직전의 생균수는 4.3×10^6 CFU/ml였으며 녹차 물추출물 첨가후 배양 말기까지의 생균수 변화는 각각 대조구가 0.5 log cycle, 녹차 물추출물 0.5%와 1.0% 첨가 농도에서 0.2 log cycle 증가하였으나 1.5%와 2.0%에서는 각각 0.4, 1.2 log cycle 감소하였다. 대수증식기의 말기에 첨가한 녹차 물추출물의 *E. coli*에 대한 증식 억제작용은 대수증식기 중기에 첨가한 경우(Fig. 4)에 비하여 그 효과가 월등히 약하게 나타났다.

*E. coli*의 증식억제작용에 관하여 Cox 등(29)이 tea tree oil로서 조사한 결과, tea tree oil에 의한 세포내 K^+ 의 누출 증가와 호흡 억제작용이 세균의 증식을 억제되며 대수증식기의 세포에 비하여 정지기의 세포가 tea tree oil에 대하여 더욱 강한 내성을 나타낸 것으로 보고하였다. 본 실험 결과에서 대수증식기 중기보다 말기에 녹차 물추출물에 대한 내성이 증가한 결과는 Cox 등(29)의 결과와 유사하며 그 원인은 정지기에 가까워 질수록 대사산물이 축적되고 Gram 음성균의 세포벽 lipopolysaccharide(LPS)층을 증가시켜 내성이 증가하는 데 그 원인이 있을 것으로 추정된다.

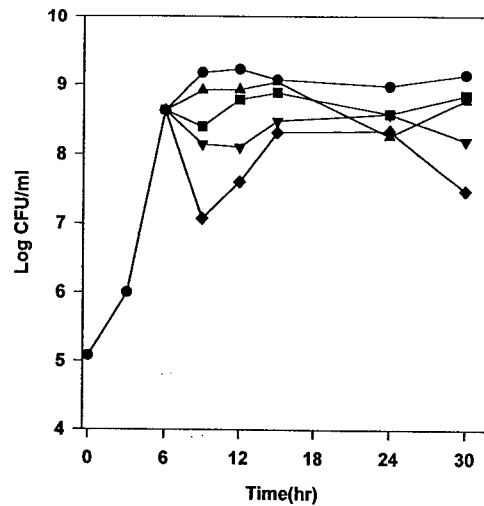


Fig. 5. Effect of water extract of green tea on the growth of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895.

The extract was added at the late exponential phase(6 hours after cultivation) of bacteria into the culture broth at each final concentration as following :
●; 0%, ■; 0.5%, ▲; 1.0%, ▼; 1.5%, ◆; 2.0%.

이상에서 4종류의 식중독세균에 대하여 대수증식기 중기에 첨가한 녹차 물추출물의 농도가 각 세균의 증식에 미치는 영향(Fig. 1~Fig. 4)을 30시간 배양 후의 생균수로서 Table 1에 요약하였다. 녹차 물추출물이 세균의 증식에 미치는 억제효과의 크기는 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. typhimurium*의 순으로서 Gram 양성균(*L. monocytogenes*, *S. aureus*)이 Gram 음성균(*E. coli*, *S. typhimurium*)에 비하여 억제효과가 월등하였다. Shelef 등(30)과 Smith-Palmer 등(27)이 향신료로서 식중독세균에 대하여 실험한 결과에서도 Gram 양성균이 Gram 음성균에 비하여 증식억제효과가 컸으며 특히 *S. aureus*가 향신료에 의해 쉽

계 억제될 수 있다고 보고하여 본 실험의 결과와 비슷한 결과이다. 그러나 Kumar와 Berwal(15)은 마늘에 의한 식중독세균 증식억제작용이 *E. coli* > *S. aureus* > *S. typhimurium* > *L. monocytogenes*의 순으로 보고하여 본 실험 결과와는 상당한 차이를 나타내었는데 이는 각각의 식물이 나타내는 항균성 물질이 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다.

Table 1. Changes in the viable cell counts of pathogenic bacteria by water extract of green tea.

(unit : Log CFU/ml)

Dose(%)	Pathogenic bacteria			
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
0	9.15	9.23	9.11	9.04
0.5	9.00	8.53	7.38	3.34
1.0	8.89	8.54	6.38	2.04
1.5	8.48	8.56	5.76	1.68
2.0	8.36	8.61	5.15	1.18

Viable cell counts were determined by the plate count agar method. Inoculum size of bacteria was about 5 Log CFU/ml and incubation time was 30 hours. The extract was added at the mid exponential phase(4.5~6 hours after cultivation) of each bacteria.

요 약

4종류의 식중독세균(*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 196E, *Salmonella typhimurium*)에 대하여 녹차 물추출물에 의한 항균작용을 조사하였다. 각 식중독세균을 tryptic soy broth(TSB)에 약 10⁵CFU/ml 정도 되게 접종하여 35°C에서 30시간 배양하였다. 세균의 배양중 대수증식기의 중기 혹은 말기에 녹차 물추출물을 0~2%(w/v)의 농도로 첨가하였을 때 증식억제 정도를 생균수 변화로서 비교하였다. 식중독세균의 증식은 첨가한 녹차 물추출물의 농도에 비례하여 억제되었으며 대수증식기 말기의 세균이 중기의 세균에 비하여 녹차 물추출물에 대한 내성이 컸다. Gram 양성균(*L. monocytogenes*, *S. aureus*)의 경우가 Gram 음성균(*E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*)에 비하여 녹차 물추출물에 의한 억제효과는 월등히 컸다. 녹차 물추출물에 의한 증식억제 효과의 크기는 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7의 순이었으며, *S. typhimurium*에서 가장 강한 내성을 나타내었다.

참고문헌

1. Efstratiou, M.A., Mavridou, A., Richardson, S.C. and Papadakis, J.A. (1998) Correlation of bacterial indicator organisms with *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in sea water. *Let. Appl. Microbiol.*, **26**, 342-346
2. Martinez-Manzanares, E., Morinigo, M.A., Castro, D., Balebona, M.C., Munoz, M.A. and Borrego, J.J. (1992) Relationship between indicators of fecal pollution in shellfish-growing water and the occurrence of human pathogenic microorganisms in shellfish. *J. Food Prot.*, **55**, 609-614.
3. Monfort, P., Minet, J., Piclet, G. and Cormier, M. (1998) Incidence of *Listeria* spp. in Breton live shellfish. *Let. Appl. Microbiol.*, **26**, 205-208
4. Heintz, M.L. and Johnson, J.M. (1998) The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *J. Food Prot.*, **61**(3): 318-323
5. Hardt-English, P., York, G., Stier, R. and Cocotas, P. (1990) Staphylococcal food poisoning outbreaks caused by canned mushrooms from China. *Food Technol.*, **44**, 74-76
6. Korsak, N., Daube, G., Ghafir, Y., Chahed, A., Jolly, S., and Vindevogel, H. (1998) An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *J. Food Prot.*, **61**(5), 534-541
7. Todd, E.C.D. (1989) Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *J. Food Prot.*, **52**, 595-601.
8. Brewer, M.S., Sprouls, G.K. and Russon, C. (1994) Consumer attitudes toward food safety issues. *J. Food Safety*, **14**, 63-76.
9. Gould, G.W. (1996) Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot.*, Suppl., 82-86.
10. 권동진, 박종현, 권 민, 유진영, 구영조 (1997) 축의 *Cl. perfringens*에 대한 생육 저해 물질의 최적 추출 조건. *한국농화학회지*, **40**, 267-270.
11. 국주희, 마승진, 박근형 (1997) 술잎에서 항미생물 활성을 갖는 benzoic acid의 분리 및 동정, *한국식품과학회지*, **29**(2), 204-210

12. Senji, S., Kim, M., Taniguchi, M. and Yamamoto, T. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2307
13. 이신호, 최우정 (1998) 한약재 추출물이 김치 관련 유산균의 성장과 김치의 숙성에 미치는 효과. *한국식품과학회지*, **30**(3), 624-629
14. 박옥연, 장동석, 조학래 (1992) 자초(*Lithospermum erythrorhizon*) 추출물의 항균특성. *한국영양식량학회지*, **21**(1), 97-100
15. Kumar, M. and Berwal, J.S. (1998) Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *J. Appl. Bacteriol.*, **84**, 213-215
16. Yin, M.C. and Cheng, W.S. (1998) Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *J. Food Prot.*, **61**(1): 123-125
17. 김건희, 전희정, 한영실 (1998) 민들레(*Taraxacum platycarpum*) 추출물의 항균성검색. *한국조리과학회지*, **14**(1), 114-118
18. 박찬성, 최미애 (1997) 저온저장중 Clove(*Eugenia caryophyllata* Thumb.)가 *Listeria monocytogenes*와 *Salmonella typhimurium*의 생존에 미치는 영향. *한국조리과학회지*, **13**(5), 602-608
19. 박찬성 (1998) Clove(*Eugenia caryophyllata* Thumb.)에 의한 *Escherichia coli* O157:H7의 증식과 생존억제. *한국조리과학회지*, **14**(1), 9-15
20. 강우석, 김정환, 박은주, 윤광로 (1998) 울금 에탄올 추출물의 항산화 활성 비교. *식품과학회지*, **30**(2), 266-271
21. Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Beek, T. and Linssen, J. P H (1998) Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.*, **77**, 140-146
22. 정동욱, 정지훈 (1992) 영지의 항균성 물질에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **24**(6), 552-557
23. 박난영, 이기동, 정용진, 김현구, 권중호 (1998) 전자공여작용과 관능적 특성을 고려한 산국(山菊)에 탄을 추출물의 제조조건 최적화. *한국식품과학회지*, **30**(3), 523-528
24. 川上 正子, 原 征彦 (1998) 綠茶ポリフェノールの食品への利用. *New Food Ind.*, **40**(1), 33-40
25. 김순임, 김경진, 정해옥, 한영실 (1998) 썩 침가가 빵과 떡의 저장성 향상에 미치는 영향. *한국조리과학회지*, **14**(1), 106-113
26. 이만종, 김관필, 김성호, 정낙현, 임무현 (1997) 오배자와 포도 껍질 추출물의 항균 활성에 관한 연구. *식품영양학회지*, **10**(2), 174-179
27. Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. (1998) Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Let. Appl. Microbiol.*, **26**, 118-122
28. 김연순, 박경숙, 경규향, 심선택, 김현구 (1996) 마늘즙액의 대장균 생육 저해 작용. *한국식품과학회지*, **28**(4), 730-735
29. Cox, S.D., Gustafson, J.E. Mann, C.M., Markham, J.L., Liew, Y.C., Hartland, R.P. Bell, H.C., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G. (1998) Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Let. Appl. Microbiol.*, **26**(5), 355-358
30. Shelef, L.A., Naglik, O.A. and Bogen, D.W. (1980) Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. *J. Food Sci.*, **45**, 1042-1048

(1998년 7월 20일 접수)