

## 젖산균 발효를 통한 녹차 추출물의 Epigallocatechin 함량의 증대

최찬영<sup>1</sup>, 박은희<sup>1</sup>, 주영운<sup>2</sup>, 김명동<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교식품생명공학과

<sup>2</sup>(주)다당앤

Received: November 27, 2015 / Revised: January 25, 2016 / Accepted: January 26, 2016

### Increase of Epigallocatechin in Green Tea Extract by Lactic Acid Bacteria Fermentation

Chan-Yeong Choi<sup>1</sup>, Eun-Hee Park<sup>1</sup>, Yoong-Woon Ju<sup>2</sup>, and Myoung-Dong Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

<sup>2</sup>Dadangand Co., 208 Sanhakwan, Ajou University, Suwon 16499, Republic of Korea

Hydrolytic enzyme activities, including those of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -xylosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -arabinofuranosidase,  $\beta$ -arabinosidase, and  $\beta$ -arabinopyranosidase, which are useful for bioconversion, were explored in lactic acid bacteria isolated from Korean traditional fermented foods. Nine bacterial strains were selected for the fermentation of green tea extract prepared by supercritical fluid extraction. Changes in the concentrations of catechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, and epigallocatechin-3-gallate in green tea extract were investigated after fermentation by the selected lactic acid bacteria strains. The strain *Leuconostoc mesenteroides* MBE1424, which showed the highest  $\beta$ -glucuronidase enzyme activity among the tested bacterial strains, increased the epigallocatechin content of the green tea extract by 60%. In addition, *L. mesenteroides* MBE1424 was more resistant than the control strain at high temperature and showed a maximum specific growth rate at 40°C. *L. mesenteroides* MBE1424 was presumed to have an enzyme system containing  $\beta$ -glucuronidase with utility in the bioconversion of green tea extract.

**Keywords:** Green tea extract, *Leuconostoc mesenteroides*, catechin, supercritical fluid extraction, fermented foods

차는 오랜 전통을 지닌 음료로 동백과(*Theaceae*), 동백속(*Camellia*)에 속하는 차나무(*Camellia sinensis*)의 싹이나 잎을 가공한 것으로 제조에 사용된 발효공정의 차이에 의해 녹차, 우롱차, 홍차로 구분된다. 차의 주요 성분으로는 플라보노이드, 카페인, 아미노산, 비타민 및 무기질 등이 있으며 항산화[20], 항암[33], 콜레스테롤 제거[4], 당뇨완화[27], 충치 예방[25] 등의 효능이 보고되었다. 그 중에서도 플라보노이드는 polyphenolic 물질로 구조에 따라서 플라본(flavones), 플라보논(flavanones), 플라보놀(flavonols), 카테킨(catechin) 등으로 분류되며, 구조에 따라서 체내 흡수율이나 활성이 상이한 것으로 보고되고 있다[7]. 녹차에 많이 함유되어 있는 카테킨류는 flavan-3-ol 구조로 주로 epicatechin 형태로 존

재하며 유리형인 EC, EGC와 에스테르형인 ECG, EGCG가 주를 이룬다. 카테킨은 주로 열수 또는 에탄올 등을 이용한 용매추출법[15]을 사용하여 생산하는데, 추출 및 정제과정이 복잡하며 수율이 낮고 가격이 비싸다는 단점이 있다.

초임계 추출법은 임계온도가 낮은 기체를 추출 용매로 사용하기 때문에 열에 불안정한 성분을 최대한 손실없이 추출할 수 있다는 장점이 있으며, 적절한 압력과 온도의 선택으로 추출 단계와 분리단계를 최적화할 수 있고[16], 첨가제를 이용하여 용해도와 선택도를 증가시킬 수 있는 장점이 있다[17]. 초임계 유체에 극성 물질을 첨가하는 경우 녹차의 유용성분인 EGCG의 추출 효율이 증가하는 것으로 보고되었으며[24], 이산화탄소를 이용한 초임계 녹차 추출물을 포유동물 세포주에 첨가한 후 염색체 이상빈도를 측정하여 녹차의 안전성을 확인한 연구결과도 보고된 바 있다[16].

김치, 된장, 식초 등 전통 발효식품에 풍부하게 존재하는 젖산균은 오랫동안 산업적으로 이용된 중요한 스타터 균주

#### \*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

로서, 이들 균주가 생산하는 박테리오신에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[1, 13]. 젖산균을 생물전환용 스타터 균주로 이용하기 위하여 pectin esterase[5],  $\beta$ -glucosidase[11],  $\beta$ -xylosidase[12],  $\beta$ -galactosidase[26],  $\beta$ -arabinofuranosidase[19] 등의 효소 활성에 대한 연구가 보고되었다. 심 등[30]은 *Leuconostoc mesenteroides* YLB8 균주를 이용하여 홍삼의 배당체 진세노사이드에 결합되어 있는 당쇄부위를 제거하여 비배당체 진세노사이드로 구조로 전환시켜 진세노사이드의 흡수율이 향상되는 것을 확인하였다. 양 등[35]은 *Lactobacillus plantarum* 균주에 의하여 생물전환된 갈근탕의 성분변화를 보고하였으며, 박 등[21]은 생물전환을 통한 플라보노이드의 인체 흡수율 증가에 대하여 보고하였다.

본 연구에서는 김치를 비롯한 전통 발효식품으로부터 젖산균을 분리하고,  $\beta$ -glucosidase[30],  $\beta$ -glucuronidase[2],  $\beta$ -xylosidase[19],  $\beta$ -galactosidase[26],  $\beta$ -arabinofuranosidase[18],  $\beta$ -arabinopyranosidase[31],  $\beta$ -arabinosidase[8] 등 기존에 알려진 생물전환과 관련된 효소의 활성을 평가하여 우수 젖산균을 선발하였다. 선발된 젖산균을 녹차 추출물의 발효에 적용한 후 카테킨의 함량 변화를 조사하였고, 카테킨 중 EGC의 함량을 유의적으로 증대시키는 균주를 선정한 후 배양조건에 따른 생육특성을 조사하여 최적배양 조건을 위한 기초 자료를 확보하고자 하였다.

강원도를 포함한 전국에서 수집된 김치를 비롯한 총 40점의 발효식품으로부터 젖산균을 분리하기 위하여 채취된 시료를 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl)에 현탁한 후, 적정농도로 희석하여 MRS(deMan, Rogosa and Sharpe medium, BD, Detroit, MI, USA) 평판배지에 도말하고 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 단일집락을 bromocresol purple(0.015 g/l, BD)이 함유된 MRS 배지에 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 오렌지색으로 변하는 균주를 2차 선별하여 동결 보관하였다. 분리한 젖산균은 MRS 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 배양한 후  $\beta$ -glucosidase (E.C. 3.2.1.21)와  $\beta$ -xylosidase(E.C. 3.2.1.37) 효소활성은 장 등[11, 12]의 방법으로,  $\beta$ -glucuronidase (E.C. 3.2.1.31),  $\beta$ -arabinosidase (E.C. 3.2.1.88),  $\beta$ -arabinofuranosidase(E.C. 3.2.1.55),  $\beta$ -galactosidase(E.C. 3.2.1.23),  $\beta$ -arabinopyranosidase(E.C. 3.2.1.99)는 문헌에 보고된 방법[3, 9, 28, 31, 34]을 이용하여 세포 외 효소활성을 측정하였다.

젖산균 배양액 중의 단백질 농도는 Bradford Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였으며, 적정 농도로 희석된 bovine serum albumin(BSA, Bio-Rad)을 이용하여 검량선을 작성하였다. 발효식품으로부터 분리된 젖산균은 효소활성을 측정한 후 가장 우수한 효소활성을 나타낸 젖산균을 박 등[22]이 보고한 방법으로 동정하였다. 선발한 균주의 생육특성을 조사하기 위하여 배양 온도 및 배

지의 초기 pH를 조절하고 비성장속도를 비교하였다. MRS 배지 초기 pH는 2 N HCl 또는 2 N NaOH를 사용하여 조절하였다.

경상남도 사천시에서 2015년도에 수확한 녹차 150 g에 1,000 ml의 주정(95%, Korea Ethanol Supplies Company, Seoul, Korea)을 첨가하고 (주)다당앤에서 자체 제작한 초임계 추출장치에 투입하였다. 초임계 추출기의 압력은 80 bar, 추출온도는 70°C로 설정하였다. 멸균 증류수로 희석한 주정(80%, v/v)을 보조용매로 사용하였으며 10 ml/min의 유속으로 35분간 추출기로 투입하여 녹차 추출물을 침지하였다. 이산화탄소와 보조용매를 각각 70 ml/min, 10 ml/min의 유속으로 150분간 투입하여 녹차를 추출하였다. 추출물은 60°C에서 농축한 후 동결건조하여 분말형태의 초임계 녹차추출물을 제작하였다.

녹차 추출물의 발효에 사용할 젖산균은 MRS 배지에 단일 집락을 접종하여 30°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양한 후 원심분리하여 멸균 증류수로 2회 세척하였다. 녹차추출물은 고형분의 농도가 100 mg/ml이 되도록 멸균 증류수에 현탁한 후, 전배양한 젖산균을 초기 세포농도(OD<sub>600</sub>)가 1.0이 되도록 접종하였다. 균주를 접종하고 일부를 회수하여 발효전 시료로서 -80°C에 보관하였으며, 나머지는 30°C에서 48시간 동안 200 rpm으로 진탕배양하여 발효물을 제조한 후 -80°C에 보관하였다. 시료는 동결건조한 후 10 mg/ml의 농도로 메탄올에 현탁한 후 여과지(Sartorius Stedim Biotech, Concord, CA, USA)로 여과하여 카테킨 함량 측정에 사용하였다.

시료에 함유된 카테킨의 농도는 high performance liquid chromatograph(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 컬럼은 HC-C18(Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, 0.1%(v/v)의 acetic acid와 acetonitrile의 비율이 15:85-30:70(v/v)이 되도록 농도구배를 설정하고 1 ml/min의 유속으로 흘려주었다. 검출기로 photodiode array detector(Waters)를 사용하였으며, 상업적으로 판매되는 카테킨(EGCG, ECG, ECG, EC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 구입하여 정량 분석을 위한 표준물질로 사용하였다.

녹차추출물은 150 g의 녹차를 초임계 추출장치에 투입하여 주정을 보조용매로 사용하여 제작하였다. 초임계 녹차추출물은 60°C에서 농축하고 동결 건조하여 최종 54 g의 초임계 추출 녹차분말을 회수하여 약 36%의 회수율을 나타냈다.

전국에서 수집된 발효식품으로부터 156 종의 젖산균을 분리하고  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -arabinosidase 등의 효소활성을 측정하여 우수한 효소활성을 나타낸 9 종의 젖산균을 선발하였다(Table 1). 분리된 젖산균 중  $\beta$ -glucuronidase 효소활성이 우수한 것으로 나타난 MBE1424

**Table 1. Lactic acid bacteria used for fermentation of green tea extract.**

Stock No.	Strain name	Origin	Similarity (%)	Enzyme activity (unit/mg protein)
MBE1424	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Baechu kimchi	100	$\beta$ -glucuronidase (0.59 $\pm$ 0.19)
MBE1429	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Wooung kimchi	99	$\beta$ -arabinosidase (0.36 $\pm$ 0.08)
MBE1440	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kakduki	100	$\beta$ -arabinofuranosidase (0.20 $\pm$ 0.00)
MBE1456	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Baechu kimchi	99	$\beta$ -glucosidase (0.15 $\pm$ 0.02)
MBE1518	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Baechu kimchi	100	$\beta$ -arabinofuranosidase (0.20 $\pm$ 0.01)
MBE1558	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Baechu kimchi	100	$\beta$ -galactosidase (0.64 $\pm$ 0.25)
MBE1563	<i>Lactobacillus</i> sp.	Oisobaki kimchi	99	$\beta$ -arabinopyranosidase (0.21 $\pm$ 0.03)
MBE1573	<i>Leuconostoc lactis</i>	Baechu kimchi	100	$\beta$ -xylosidase (2.12 $\pm$ 0.01)
MBE1982	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Baechu kimchi	99	$\beta$ -glucosidase (0.17 $\pm$ 0.03)

로 명명된 균주와  $\beta$ -arabinosidase,  $\beta$ -arabinofuranosidase 효소활성이 각각 우수하였던 MBE1429, MBE1440 균주는 기존에 보고된 *Leuconostoc mesenteroides*와 16S rDNA 유전자의 염기서열이 99% 이상의 상동성을 나타내었다. *Leuconostoc mesenteroides* MBE1424 균주는 배추김치에서 분리되었고, 세포 외  $\beta$ -glucuronidase(0.59  $\pm$  0.19 unit/mg protein) 효소활성이 분리된 균주 중에서 가장 우수하였으며, MBE1429와 MBE1440 균주는 각각  $\beta$ -arabinosidase,  $\beta$ -arabinofuranosidase 효소활성이 우수하였다.

$\beta$ -Glucosidase 활성이 우수한 것으로 나타난 MBE1456과 MBE1982 균주는 *Lactobacillus plantarum*과 16S rDNA 유전자 염기서열이 100% 상동성을 나타냈다.  $\beta$ -arabinofuranosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -arabinopyranosidase,  $\beta$ -xylosidase 효소활성이 우수한 균주로 선발된 MBE1518, MBE1558, MBE1563, MBE1573 균주는 각각 *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc lactis*로 동정되었다.

선발한 젖산균을 이용하여 초임계 녹차추출물의 발효물을 제작하고 젖산균 발효에 의한 EGCG, EGC, ECG, EC 등 카테킨의 함량 변화를 측정하였다(Table 2). EGCG, ECG, EC의 함량은 젖산균 발효에 의하여 유의적인 변화는 없었으나, EGC의 함량은 9종의 젖산균 발효에 의하여 모두 유의적으로 증가하였다. 그 중에서도 MBE1424, MBE1429 및 MBE1440 균주에 의한 발효물에서 EGC의 함량이 각각 60%, 50%, 38% 증가하였다. 박 등[23]은 1종의 *Lactobacillus*

*graminis*, 2종의 *Leuconostoc mesenteroides* 등의 젖산균을 이용하여 녹차 추출물을 발효하였으나, EGC의 함량은 증가하지 않았다. 김 등[14]은 *Lactobacillus brevis* 유래의  $\beta$ -glucuronidase를 이용하여 배당체인 baicalin과 wogonoside를 비배당체인 baicalein과 wogonoside로 생물전환한 결과를 보고하였다. 배추김치에서 분리한 MBE1424 균주는 녹차에 함유된 카테킨 중에서 EGC의 함량을 증가시켰으며, 이러한 결과는  $\beta$ -glucuronidase를 포함하는 생물전환계에 의하여 에스테르형 카테킨인 ECG와 EGCG가 가수분해되어 유리형태인 EGC의 함량이 증가하는 것으로 추정되며[29], 보다 명확한 원인을 규명하기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

발효에 의하여 EGC의 함량을 가장 현저히 증가시킨 MBE1424 균주를 *Leuconostoc mesenteroides* MBE1424로 명명하고 한국미생물보존센터에 기탁하였다(KCCM43175). 카테킨 중 EC은 본 연구에서 사용한 대다수의 젖산균 발효물에서 함량이 다소 감소하는 경향을 나타냈으나, MBE1424 균주를 이용하여 제작한 발효물에서는 함량이 약 8% 증가하였다.

젖산균을 이용한 초임계 녹차 추출물 발효에서  $\beta$ -glucuronidase 효소활성이 우수하였던 MBE1424로 명명된 *Leuconostoc mesenteroides* 균주가 녹차의 카테킨 함량을 증대시키는 것으로 나타났으며 녹차 추출물 발효공정에 가장 적합한 균주로 판단되었다.  $\beta$ -glucuronidase를 활용한 생물전환 기술에 대한 연구는 현재까지 미미한 수준이나, Amin

**Table 2. Changes in catechin contents in green tea extract by lactic acid bacteria fermentation \***

Sample		EGCG	EGC	ECG	EC
Control	Before**	181.4 ± 0.1 <sup>cde***</sup>	141.4 ± 6.3 <sup>b</sup>	55.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	50.0 ± 1.4 <sup>a</sup>
	After**	177.9 ± 0.0 <sup>cde</sup>	131.0 ± 14.0 <sup>b</sup>	54.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	49.9 ± 1.2 <sup>a</sup>
MBE 1424	Before	184.7 ± 1.3 <sup>cdef</sup>	137.3 ± 4.3 <sup>b</sup>	56.2 ± 1.6 <sup>a</sup>	53.8 ± 1.5 <sup>a</sup>
	After	185.2 ± 5.5 <sup>cdef</sup>	219.4 ± 6.7 <sup>g</sup>	58.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	58.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
MBE 1429	Before	184.4 ± 4.5 <sup>cdef</sup>	136.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	52.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	58.5 ± 0.6 <sup>a</sup>
	After	184.4 ± 9.6 <sup>cdef</sup>	205.7 ± 5.8 <sup>fg</sup>	49.8 ± 6.6 <sup>a</sup>	51.9 ± 1.7 <sup>a</sup>
MBE 1440	Before	189.5 ± 1.6 <sup>def</sup>	132.4 ± 14.0 <sup>b</sup>	55.2 ± 3.1 <sup>a</sup>	57.5 ± 1.6 <sup>a</sup>
	After	184.1 ± 0.2 <sup>cdef</sup>	182.7 ± 20.1 <sup>cdef</sup>	50.4 ± 7.0 <sup>a</sup>	54.4 ± 0.5 <sup>a</sup>
MBE 1456	Before	182.7 ± 24.8 <sup>cdef</sup>	133.2 ± 42.3 <sup>b</sup>	54.7 ± 8.5 <sup>a</sup>	59.6 ± 0.9 <sup>a</sup>
	After	187.7 ± 7.4 <sup>def</sup>	191.9 ± 7.6 <sup>ef</sup>	49.3 ± 5.0 <sup>a</sup>	53.6 ± 2.1 <sup>a</sup>
MBE 1518	Before	189.7 ± 3.1 <sup>def</sup>	130.2 ± 2.6 <sup>b</sup>	55.8 ± 3.7 <sup>a</sup>	57.5 ± 1.0 <sup>a</sup>
	After	192.7 ± 7.8 <sup>ef</sup>	187.1 ± 2.8 <sup>cdef</sup>	55.1 ± 1.4 <sup>a</sup>	54.7 ± 0.6 <sup>a</sup>
MBE 1558	Before	187.8 ± 1.3 <sup>def</sup>	137.0 ± 14.3 <sup>b</sup>	55.0 ± 3.3 <sup>a</sup>	58.5 ± 2.8 <sup>a</sup>
	After	179.1 ± 0.0 <sup>cde</sup>	167.4 ± 19.4 <sup>cd</sup>	51.9 ± 2.1 <sup>a</sup>	53.2 ± 0.6 <sup>a</sup>
MBE 1563	Before	180.6 ± 16.3 <sup>cde</sup>	136.3 ± 7.0 <sup>b</sup>	58.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	50.6 ± 2.8 <sup>a</sup>
	After	189.4 ± 7.0 <sup>def</sup>	164.5 ± 25.2 <sup>c</sup>	52.1 ± 3.9 <sup>a</sup>	49.7 ± 2.7 <sup>a</sup>
MBE 1573	Before	185.4 ± 1.4 <sup>cdef</sup>	135.1 ± 13.6 <sup>b</sup>	56.8 ± 2.1 <sup>a</sup>	56.4 ± 0.9 <sup>a</sup>
	After	185.4 ± 8.7 <sup>cdef</sup>	185.8 ± 7.8 <sup>cdef</sup>	51.9 ± 3.9 <sup>a</sup>	50.7 ± 1.7 <sup>a</sup>
MBE 1982	Before	185.2 ± 14.8 <sup>cdef</sup>	132.3 ± 17.7 <sup>b</sup>	59.7 ± 4.0 <sup>a</sup>	56.5 ± 3.8 <sup>a</sup>
	After	185.8 ± 8.1 <sup>cdef</sup>	197.0 ± 17.9 <sup>ef</sup>	51.2 ± 2.9 <sup>a</sup>	52.3 ± 4.0 <sup>a</sup>

\*Each lactic acid bacterium was used to ferment green tea extract as described in Materials and Methods.

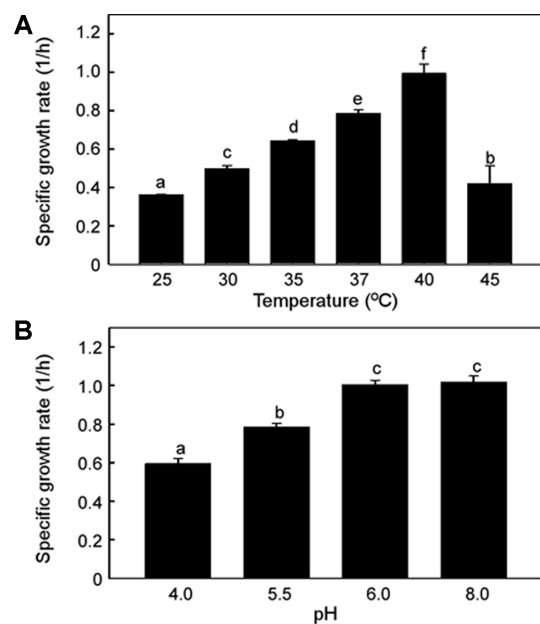
Averages and standard errors obtained from three independent experiments were shown.

\*\*Before and After means samples obtained before and after fermentation, respectively.

\*\*\*Different letters in each row mean significant difference between means ( $p < 0.05$ ).

등[2]은 *Aspergillus terreus*의  $\beta$ -glucuronidase에 의한 가수분해반응을 통하여 감초에 함유된 glycyrrhizin의 생물전환에 대하여 보고하였다.

*Leuconostoc mesenteroides* MBE1424 균주의 생육 특성을 조사하기 위하여 배양 온도와 배지의 초기 pH를 조절하여 배양하였다. MBE1424 균주를 다양한 온도에서 배양하고 비성장속도를 측정하였는데 40°C에서 비성장속도가  $0.99 \pm 0.05$ (1/h)로 상대적으로 가장 우수하였다(Fig. 1A). 기존에 보고된 *Leuconostoc mesenteroides* A02 균주는 30°C에서 가장 높은 성장속도를 나타냈으며[32], *Leuconostoc mesenteroides* JFY 균주는 34°C 이상에서 균주의 생육이 억제되었다[36]. 본 연구에서 분리된 MBE1424 균주는 문헌에 보고된 기존의 *Leuconostoc mesenteroides* 균주보다 열내성이 우수한 균주로 판단되며 산업적 이용이 기대된다. MBE1424 균주를 초기 pH가 조절된 MRS 배지에서 배양하고 비성장속도를 측정하였다(Fig. 1B). 배지의 초기 pH를 6 또는 8로 조절하였을 때, 유사한 수준의 비성장속도를 나타냈으며, pH 4로 조절한 MRS 배지에서 비성장속도가  $0.59 \pm 0.03$ (1/h)으로 다른 pH에서 보다 상대적으로 가장 낮은 수준을 나타내었다.



**Fig. 1. Influences of temperature (A) and pH (B) on specific growth rate of *Leuconostoc mesenteroides* MBE1424.** Different letters mean significant difference between means.



녹차를 자연발효한 시료의 성분 분석을 통하여 총 카테킨의 함량 감소가 보고된 바 있으며[6], 김 등[10]은 *Lactobacillus bulgaricus*를 이용한 발효차에서 카테킨의 함량 변화를 조사하였으나 유의적인 차이는 없었다. 또한, 박 등[23]은 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* 등의 젖산균을 이용하여 녹차 발효물을 제작한 결과 EGCG, EGC 등의 카테킨이 50% 가량 감소하고, gallicocatechin gallate와 gallicocatechin의 함량이 증가되는 것을 보고하였다.

본 연구를 통하여 배추김치로부터  $\beta$ -glucuronidase 효소 활성이 우수한 *Leuconostoc mesenteroides* MBE1424 균주를 분리하였으며, 이 균주는 녹차 추출물의 카테킨 중 EGC의 함량을 약 60% 증가시켰으며, 대조구 균주와 비교하여 상대적으로 내열성이 우수하였다. 초임계 녹차 추출물에 함유된 카테킨 중 EGC의 함량을 증가시키는 생물전환 효소계가  $\beta$ -glucuronidase와 관련이 있을 것으로 추정되며, 선발 균주의 산업적 응용을 위하여 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 요 약

전통발효 식품으로부터 젖산균을 분리하고,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -xylosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -arabinofuranosidase,  $\beta$ -arabinosidase,  $\beta$ -arabinopyranosidase 등 생물전환과 관련된 유용 효소활성을 조사하였다. 효소활성 평가를 통하여 선발된 9점의 젖산균 발효에 의한 epigallocatechin-3-gallate(EGCG), epigallocatechin(EGC), epicatechin gallate(EGC), 및 epicatechin(EC)의 함량 변화를 조사하였다. 배추 김치에서 분리된 *Leuconostoc mesenteroides* MBE1424로 명명된 균주는 발효에 의하여 카테킨 중 EGC의 함량을 약 60% 증가시켰으며, 배양온도 40°C에서 가장 우수한 비성장속도를 나타내어 기존에 보고된 균주보다 상대적으로 내열성이 우수한 것으로 판단되었다. *Leuconostoc mesenteroides* 균주는 녹차 추출물의 생물전환에 필요한 유용한 효소계를 보유하고 있는 것으로 추정되었다.

## Acknowledgments

This research was supported by High Value-Added Food Technology Development Program (314048-03), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

## References

1. Ahn JE, Kim JK, Lee HR, Eom HJ, Han NS. 2012. Isolation and characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* B16

- from Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 721–726.
2. Amin HAS, El-Menoufy HA, El-Mehalawy AA, Mostafa ES. 2011. Biosynthesis of glycyrrhetic acid 3-O-mono- $\beta$ -D-glucuronide by free and immobilized *Aspergillus terreus*  $\beta$ -D-glucuronidase. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **69**: 54–59.
3. Beggs WH, Rogers P. 1966. Galactose repression of  $\beta$ -galactosidase induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **91**: 1869–1874.
4. Bursill CA, Abbey M, Roach PD. 2007. A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* **193**: 86–93.
5. Choi SY, Jung BM, Kim HJ, Seong SH, Kim WJ, Park WS. 2000. Extracellular enzyme activities of the lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 59–61.
6. Chung YH, Shin MK. 2005. A study on the physicochemical properties of korean teas according to degree of fermentation. *Korean J. Food & Nutr.* **18**: 944–101.
7. Elisa T, Maurizio LG, Santo G, Danila DM, Marco G. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **104**: 466–479.
8. Gamero A, Manzanares P, Querol A, Belloch C. 2011. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. *Int. J. Food Microbiol.* **145**: 92–97.
9. Gottschalk TE, Nielsen JE, Rasmussen P. 1996. Detection of endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 240–244.
10. Han SK, Song YS, Lee JS, Bang JK, Suh SJ, Cho JY, et al. 2010. Changes of the chemical constituents and antioxidant activity during microbial-fermented tea (*Camellia sinensis* L.) processing. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 21–26.
11. Jang MH, Kim MD. 2010. Exploration of  $\beta$ -glucosidase activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Food Eng. Prog.* **14**: 243–248.
12. Jang MH, Kim MD. 2011.  $\beta$ -1,4-xylosidase activity of *Leuconostoc* lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **43**: 169–175.
13. Jin HS, Kim JB, Tun TJ, Lee KJ. 2008. Selection of Kimchi starters based on the microbial composition of Kimchi and their effects. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 671–675.
14. Kim HS, Kim JY, Park MS, Zheng H, Ji GE. 2009. Cloning and expression of  $\beta$ -glucuronidase from *Lactobacillus brevis* in *E. coli* and application in the bioconversion of baicalin and wogonin. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 1650–1655.
15. Kim JI, Row KH. 2001. Recovery of catechin compound from korean green tea by solvent extraction and partition. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 442–445.
16. Koo YC, Lee HS, Park BG, Kim EJ, Lee SJ, Kim KH, et al. 2006. Chromosome aberration test of water extract of decaffeinated green tea using supercritical carbon dioxide with mammalian cell line. *Env. Mutagens Carcinogens* **26**: 63–68.
17. Lucien FP, Foster NR. 2000. Solubilities of solid mixtures in supercritical carbon dioxide: a review. *J. Supercritical Fluids* **17**: 111–134.

18. Marcolongo L, Ionata E, La Cara F, Amore A, Giacobbe S, Pepe O, Faraco V. 2014. The effect of pleurotus ostreatus arabinofuranosidase and its evolved variant in lignocellulosic biomasses conversion. *Fungal Genet. Biol.* **72**: 162–167.
19. McCleary BV, McKie VA, Draga A, Rooney E, Mangan D, Larkin J. 2015. Hydrolysis of wheat flour arabinoxylan, acid-debranched wheat flour arabinoxylan and arabino-xylo-oligosaccharides by  $\beta$ -xyylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -xylosidase. *Carbohydr. Res.* **407**: 79–96.
20. Oh JH, Kim EH, Kim JL, Moon YI, Kang YH, Kang JS. 2004. Study on antioxidant potency of green tea by DPPH method. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 1079–1084.
21. Park CD, Jung HK, Park CH, Jung YS, Hong JH, Ko HS, et al. 2012. Isolation of citrus peel flavonoid bioconversion microorganism and inhibitory effect on the oxidative damage in pancreatic beta cells. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **27**: 67–74.
22. Park CD, Jung HK, Park HH, Hong JH. 2007. Identification and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Hahyangju nuruk*. *Korean J. Food Preserv.* **14**: 188–193.
23. Park SB, Han BK, Oh YJ, Lee SJ, Cha SK, Park YS, Choi HJ. 2012. Bioconversion of green tea extract using lactic acid bacteria. *Food Eng. Prog.* **16**: 26–32.
24. Ra YJ, Lee YW, Kim JD, Row KH. 2001. Supercritical fluid extraction of catechin compounds from green tea. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 327–331.
25. Rasheed A, Haider M. 1998. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. *Arch. Pharm. Res.* **21**: 348–352.
26. Rhimi M, Aghajari N, Jaouadi B, Juy M, Boudebouze S, Maguin E, et al. 2009. Exploring the acidotolerance of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: an attractive enzyme for lactose bioconversion. *Res. Microbiol.* **160**: 775–784.
27. Ryu OH, Lee J, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, et al. 2006. Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **71**: 356–358.
28. Sá-Nogueira I, Nogueira TV, Soares S, de Lencastre H. 1997. The *Bacillus subtilis* L-arabinose (*ara*) operon: nucleotide sequence, genetic organization and expression. *Microbiology* **143**: 957–969.
29. Sears KD, Casebier RL, Hergert HL. 1974. The structure of catechinic acid. A base rearrangement product of catechin. *J. Org. Chem.* **39**: 3244–3247.
30. Shim KS, Park GG, Park YS. 2014. Bioconversion of puffed red ginseng extract using  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Eng. Prog.* **18**: 332–340.
31. Shin HY, Park SY, Sung JH, Kim DH. 2003. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-arabinopyranosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium metabolizing ginsenoside Rb2 and Rc. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7116–7123.
32. So MH, Lee YS. 1997. Influences of cultural temperature on growth rates of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Food Nutr.* **10**: 110–116.
33. Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Sueoka E, Matsuyama S, Imai K, et al. 1999. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat. Res.* **428**: 339–344.
34. Uesaka E, Sato M, Raiju M, Kaji A. 1978.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*. *J. Bacteriol.* **133**: 1073–1077.
35. Yang MC, Kim DS, Jeong, SW, Ma JY. 2011. Bioconversion constituents of galgeun-tang fermented by *Lactobacillus plantarum*. *J. Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **19**: 446–455.
36. Yoo SK, Hur SS, Song SH, Kim KM, Whang KS. 2005. Optimizing of mannitol fermentation by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY. *J. Life Sci.* **15**: 374–381.