

쌀밥 부패미생물에 대한 녹차 물추출물의 항균 활성

노현정 · 신용서* · 이갑상* · 신미경
원광대학교 식품영양학과, *원광대학교 농화학과

Antimicrobial Activity of Water Extract of Green Tea against Cooked Rice Putrefactive Microorganism

Hyun-Jeong Roh, Yong-Seo Shin*, Kap-Sang Lee* and Mee-Kyung Shin

Department of Food & Nutrition, Wonkwang University

*Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University

Abstract

To extend shelf life of cooked rice, main putrefactive microorganism isolated from cooked rice were identified by using the API 50 CHB kit and fatty acid analysis of the cell and antimicrobial activity of water extract of green tea was tested against isolated strains and some type of strains. The growths of *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* YUFE 2004 and *Staphylococcus aureus* YUFE 2087 were inhibited in broth containing 500 and 1000 ppm of green tea extract. Main putrefactive microorganisms of cooked rice were identified as *Bacillus subtilis* RHJ-I and *Bacillus subtilis* RHJ-II. Green tea extract of 500 and 1000 ppm level inhibited the growth of *Bacillus subtilis* RHJ-I only.

Key words: Green tea, cooked rice, putrefactive microorganism, antimicrobial activity

서 론

식품의 부패 및 변질은 주로 미생물에 의해 야기되고 있으며, 이러한 변질을 막기 위해 water activity의 관리, 고염화, 고당화 등의 방법들이 이용되어 왔으나 적용 spectrum이 한정되는 단점이 있어 합성보존제를 사용하고 있다. 그러나 최근 경제성장과 함께 소비자의 건강 지향적 요구가 증대됨에 따라 합성보존제의 안정성이 문제시되고 있어 천연물로부터 특정성분을 추출, 이를 부패 미생물의 증식억제 혹은 살균에 이용하고자 하는 시도가 이루어지고 있다⁽¹⁻³⁾.

우리나라 식생활에서 쌀밥이 차지하는 비중은 거의 절대적이며 생존 그 자체이기도 하다. 이와같은 쌀밥은 한국 식문화의 중요한 위치를 차지하고 있음에도 불구하고 이에 대한 연구는 취반 기호 특성 및 쌀밥의 레토르트화 등 극히 일부에 한정되어 있으며, 더우기 그 저장성에 대한 연구는 거의 없는 실정에 있다. 최근에는 도시 직장인과 행락객을 중심으로 도시락 문

화가 크게 발달하고 있고, 하절기에 변질, 식중독 발생 등의 문제점이 발생하고 있어 이들의 저장성 향상에 관한 연구가 시급한 실정이다.

한편 녹차에는 여러가지 생리활성 물질이 함유되어 있으며, 그 중에서도 catechin류는 항산화 작용^(4,7), 항균 작용⁽⁸⁻¹¹⁾, 중금속제거 효과^(12,13), 혈압강하 효과⁽¹⁴⁾ 등의 다양한 기능이 있는 것으로 보고 되고 있다.

따라서 본 연구에서는 항균 활성과 같은 여러가지 생리적 유용성이 있을 뿐만 아니라 그 적용방법이 비교적 쉬운 녹차를 선정하여, 쌀밥의 저장성을 향상시킬 목적으로 쌀밥 부패미생물을 분리, 동정하고 이들에 대한 녹차 물추출물의 항균 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

재료

녹차는 시판되고 있는 설록차 萬壽(태평양 화학, 1994)를 구입하여 사용하였다.

추출방법 및 가용성 고형분 함량 측정

수직 환류 냉각관이 부착된 삼각플라스크에 녹차와

Corresponding author: Mee-Kyung Shin, Dept. of Food & Nutrition, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea

증류수(1 : 10, w/v)를 혼합하여 95°C의 수욕상에서 3시간 동안 추출, 여과하고 농축기(Kikakikai Co. Japan)로 농축한 후 녹차 물추출물로 하였다. 이때 시료의 총고형분 함량은 시료 1 g을 취하여 105°C에서 건조한 후 증발잔사량으로 측정하였다.

사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 표준 균주는 본 대학 응용미생물 학교실에 보관중인 것으로 실험에 사용하기전 nutrient broth (Difco, USA)에 3회 계대하였으며 그 목록은 Table 1과 같다.

표준 균주에 대한 항균 활성 측정

Broth system에서 녹차 물추출물이 표준균주의 생육에 미치는 억제효과를 측정하기 위해, nutrient broth 100 ml에 녹차 물추출물의 농도가 0, 500 및 1000 ppm이 되게 첨가, 살균한 후 시험균을 4%(v/v) 되게 접종하여 37°C의 항온기에서 48시간동안 배양하면서 경시적인 균의 생육을 spectrophotometer (Varian DMS 200, U.S.A.)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

쌀밥 부패미생물의 분리 및 동정

부패된 쌀밥 1 g을 취하여 살균된 증류수로 희석한 후, 그 중 0.1 ml를 nutrient agar가 분주된 petri dish에 도말하고 37°C의 항온기에서 24시간동안 배양시킨 다음 colony의 형태학적 특징(색깔, 모양)이 동일한 균주 중 우점하는 균주를 선택하여 순수분리하였다.

분리된 균주는 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁽¹⁵⁾와 Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria^(16,17)의 방법에 준하여 동정하였고, 미생물 자동동정 system인 API 50 CHB Kit를 사용하여 49개 당 이용성을 조사 비교함으로써 동정하였다. 균체 지방산은 분리균주를 blood agar에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 후기 대수증식기의 colony 40~50 mg을 NaOH/methanol용액에 현탁하고 30분간 끓여서 검화하였다. 여기에 HCl/methanol용액을 넣고 80°C에서 10분간 반응시켜 methylation시킨 다음 hexane/ether를 가하여

10분간 진탕, 추출하였다. NaOH용액을 검화 플라스크에 가득 넣은 후 2000×g에서 3분간 원심분리하여 상등액을 회수하고 gas liquid chromatography(GLC)를 이용하여 분석하였다. 사용기기는 Hewlett Packard 5890A였으며, column은 fused silica capillary column (2.5 cm×0.2 mm), injector, detector 온도는 각각 250°C, 300°C였다. 분석된 지방산 조성으로 Microbial Identification System(MIS)을 이용하여 동정하였다⁽¹⁸⁾.

쌀밥 부패미생물에 대한 항균 활성

분리, 동정된 쌀밥 부패미생물의 생육에 대한 녹차 물추출물의 억제효과를 측정하기 위해 nutrient broth에 녹차 물추출물을 0, 500 및 1000 ppm이 되게 첨가, 살균하여 분리균을 접종(4%, v/v)한 후 37°C의 항온기에서 48시간 동안 배양하면서 경시적인 균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 620 nm에서 비색정량하였다.

결과 및 고찰

표준균주에 대한 항균활성

녹차 물추출물이 몇가지 표준균주의 생육에 미치는 억제효과를 broth system에서 측정한 결과는 Fig. 1, 2, 3 및 4와 같다.

즉 녹차 물추출물 첨가로 시험한 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* YUFE 2004 및 *Staphylococcus aureus* YUFE 2087 모두 생육이 억제되는 경향이었으며, 그

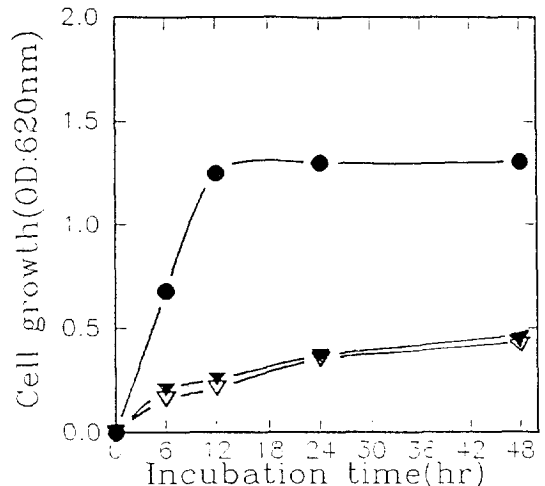


Fig. 1. Inhibitory effect of water extract of green tea on the growth of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 -●-; Control, -▽-; 500 ppm, -▼-; 1000 ppm

Table 1. List of strains used for antimicrobial experiment

<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	6633
<i>Bacillus cereus</i>	YUFE	2004
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC	14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	YUFE	2087

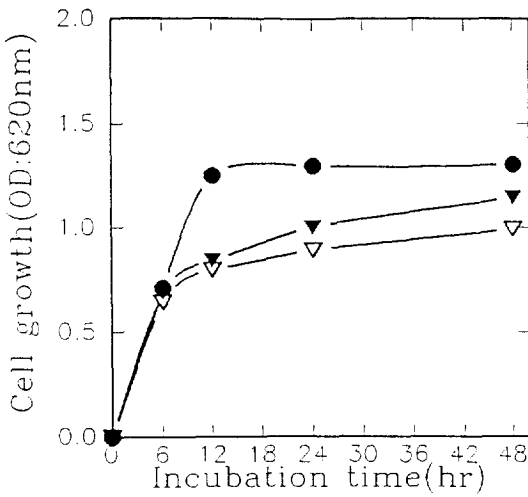


Fig. 2. Inhibitory effect of water extract of green tea on the growth of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 Symbols are same as Fig. 1

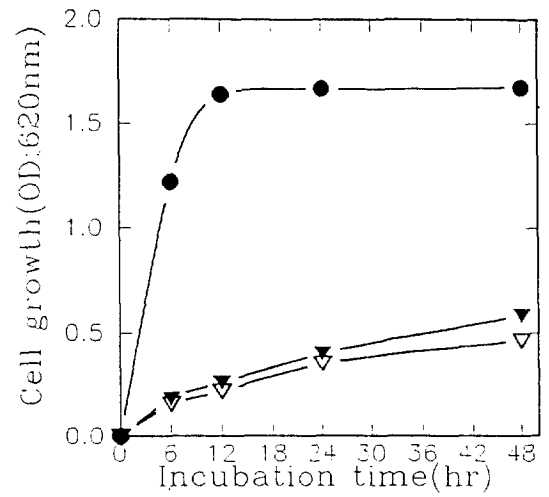


Fig. 4. Inhibitory effect of water extract of green tea on the growth of *Staphylococcus aureus* YUFE 2087 Symbols are same as Fig. 1

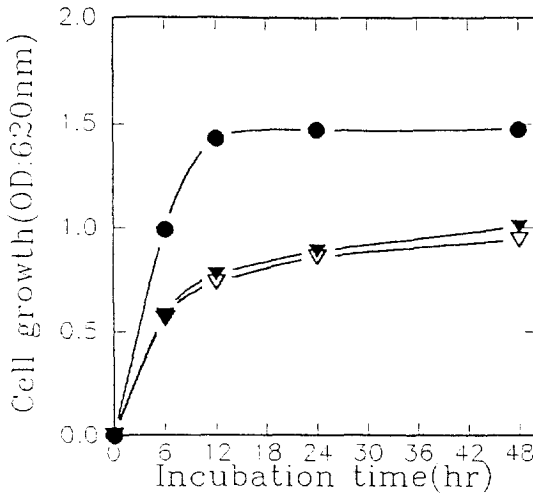


Fig. 3. Inhibitory effect of water extract of green tea on the growth of *Bacillus cereus* YUFE 2004 Symbols are same as Fig. 1

Table 2. Morphological and physiological characteristics of isolated putrefactive strains from cooked rice

Characteristics	Strain I	Strain II
* Morphological test		
Shape	rod	rod
Gram stain	+	+
* Physiological test		
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
Temperature sensitivity	+	+
25°C		
35°C	+++	+++
45°C	+	+
Citrate utilization	+	+
Nitrate reduction	+	+
Indole production	-	-

Symbols: +; Positive, -; Negative

중 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028에 대한 항균 활성이 다소 낮은 것으로 나타났다. 이는 천연물에서 분리한 phenolic 화합물이 각종 세균, 효모에 대해 생육억제 활성 및 효소저해 활성이 있다는 보고^(9,11)에서 알 수 있듯이 녹차 성분 중 catechin류에 의해 시험균의 대사과정에 관여하는 효소의 활성이 저해되어 그 생육이 억제된 것으로 생각된다.

쌀밥 부패미생물의 분리 및 동정

부패된 쌀밥에서 분리된 균주의 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 균주 I과 II

는 모두 같은 결과로 Gram 양성, 호기성 간균이었으며, 35°C에서 가장 잘 생육하였다. Catalase와 oxidase가 양성이며, citrate와 nitrate를 이용하였다. Voges-Proskauer반응은 양성, indole production은 음성이었다. 또한 API 50 CHB kit를 이용한 균주 I과 II의 49개 당 이용성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 즉 API 50 CHB의 동정표와 비교할 때 분리된 균주 I은 49개 당 이용성이 *Bacillus subtilis*와 일치하는 것으로 나타났다. 균주 II는 amygdaline, arbutine 및 gentiobiose가 음성인 점에서 차이가 있었을 뿐 나머지 46개 당 이용성은 *Bacillus subtilis*와 동일한 것으로 나타났다. 상기 형태적, 생리적 특성과 API 50 CHB kit 결과 *Ba-*

Table 3. Carbohydrate fermentation of isolated putrefactive strain from cooked rice

Characteristics	Results	
	Strain I	Strain II
Glycerol	+	+
Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	+	+
Ribose	+	±
D-Xylose	±	±
L-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
β Methyl-xyloside	-	-
Galactose	±	±
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannose	+	+
L-Sorbose	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	+	+
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	+
α Methyl-D-mannoside	-	-
α Methyl-D-glucoside	±	±
N Acetyl glucosamine	-	-
Amygdaline	+	-
Arbutine	+	-
Esculine	+	+
Salicine	+	±
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	-	-
Melibiose	+	+
Saccharose	+	+
Trehalose	+	+
Inuline	+	+
Melezitose	-	-
D-Raffinose	+	±
Amidon	+	+
Glycogen	+	+
Xylitol	-	-
β Gentiobiose	±	-
D-Turanose	+	+
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
Gluconate	-	-
2 ceto-gluconate	-	-
5 ceto-gluconate	-	-

Symbols: +; Fermented, -; Not fermented, ±; Slightly fermented

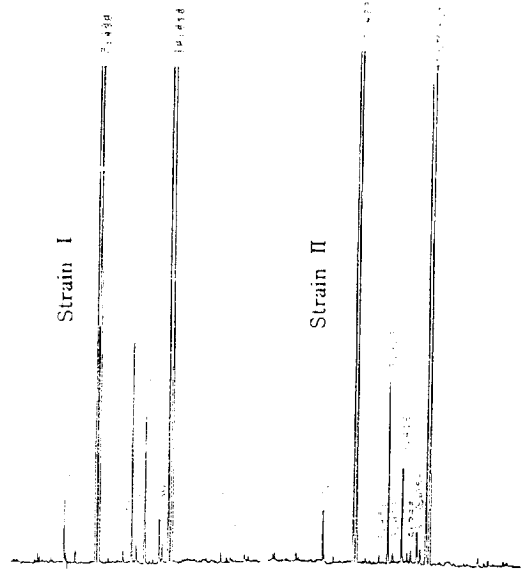


Fig. 5. Gas liquid chromatographic profiles of fatty acid in putrefactive bacteria from cooked rice

서 배양한 분리 균주 I과 II의 균체 지방산의 chromatographic profile은 Fig. 5와 같으며, 그 조성은 Table 4와 같다. 균주 I의 경우 균체 지방산 조성은 15:0 ANTEISO (38.12%), 15:0 ISO (23.53%), 17:0 ISO (14.23%), 17:0 ANTEISO (13.43%)순으로 우점한 지방산 형태를 보였다. 이러한 결과는 MIS^(TM)의 표준균주와 유사도(0.788)를 비교한 결과 *Bacillus subtilis*와 가장 유사한 균체 지방산을 가지는 미생물로 밝혀져 분리된 균주 I은 최종적으로 *Bacillus subtilis* RHJ-I로 명명하였다. 균주 II의 경우 균체 지방산 조성은 15:0 ANTEISO (38.66%), 15:0 ISO (20.84%), 17:0 ANTEISO (14.55%), 17:0 ISO (14.11%)의 우점순으로 나타났으며 0.763의 유사도로 *Bacillus subtilis*와 가장 유사한 균체 지방산 조성을 가져 최종적으로 *Bacillus subtilis* RHJ-II로 명명하였다.

쌀밥의 부패는 주로 *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. mycoides* 및 *B. circulans*와 같은 *Bacillus*속에 의해서 일어나며, 특히 수분함량이 10~20% 정도 제거되면 *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* 등의 곰팡이가 번식하는 것으로 알려져 있다⁽²⁰⁾. 그러나 보관 조건(장소, 온도, 습도 등)에 따라 부패에 관여하는 균종도 다를 수 있으며, 본 실험의 결과에서도 쌀밥 부패의 주요 미생물은 *Bacillus subtilis*인 것으로 판명되었다.

*illus subtilis*로 추정되었지만 더 정확한 균주 동정을 위하여 균체 지방산 조성을 검토하였다. Blood agar에

쌀밥 부패미생물에 대한 항균 활성

취반시 녹차 물추출물 첨가가 쌀밥의 저장성에 대

Table 4. Contents of fatty acid in putrefactive bacteria isolated from cooked rice

Fatty acid	Relative content (%)	
	Strain I	Strain II
14:0 ISO	1.07	1.36
14:0	0.24	-
15:0 ISO	23.53	20.84
15:0 ANTEISO	38.12	38.66
15:0 ISO 3OH	-	0.37
15:0 2OH	-	0.43
16:1 w7c alcohol	0.25	-
16:0 ISO	4.08	5.05
16:1 w11c	0.40	0.29
16:0	2.98	2.77
ISO 17:1 w10c	0.93	0.99
17:1 ISO I/ANTEI	0.46	0.58
B	14.23	14.11
17:0 ISO	13.43	14.55
17:0 ANTEISO	0.28	-
18:0	-	-

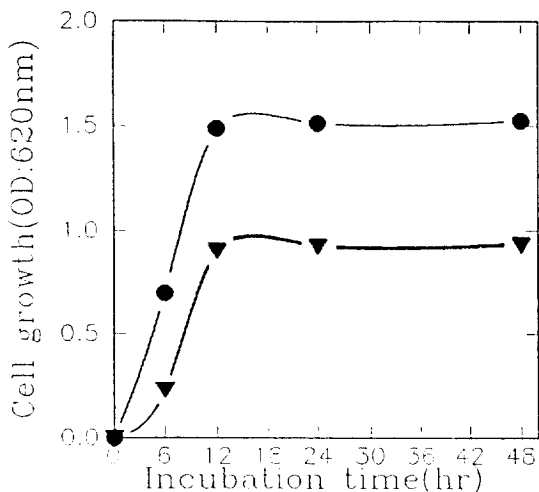


Fig. 6. Inhibitory effect of water extract of green tea on the growth of *Bacillus subtilis* RHJ-I from cooked rice Symbols are same as Fig. 1

해 연장효과가 있는지 여부를 검토하고자 *Bacillus subtilis*로 동정된 쌀밥 부패미생물 2균주에 대한 녹차 물추출물의 항균 활성을 broth system에서 측정한 결과는 Fig. 6 및 7과 같다.

녹차 물추출물 500, 1000 ppm 첨가로 *Bacillus subtilis* RHJ-I의 생육이 억제되었으나, *Bacillus subtilis* RHJ-II의 생육은 억제시키지 못하였다. 부패된 쌀밥에서 분리된 균주가 표준균주에 비해 녹차 물추출물에 대해 내성이 강한 것으로 나타났는데, 이는 표준 균주에 비해 야생 균주가 외부환경에 대응하는 능력이 우수하다는 것을 의미하고 있다. 비록 녹차 물추출물이

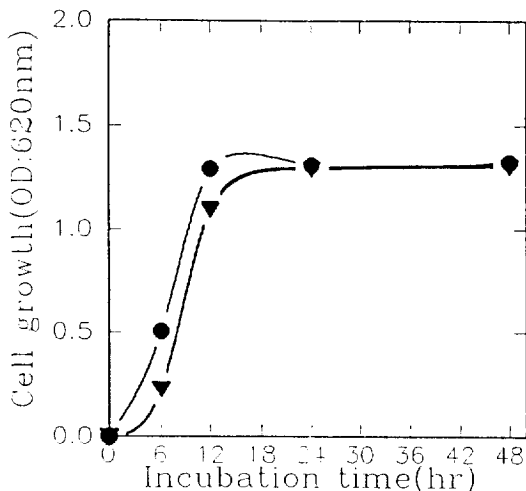


Fig. 7. Inhibitory effect of water extract of green tea on the growth of *Bacillus subtilis* RHJ-II from cooked rice Symbols are same as Fig. 1

Bacillus subtilis RHJ-II의 생육은 억제시키지 못하였으나 *Bacillus subtilis* RHJ-I의 생육을 억제시켜 취반시 녹차 물추출물 첨가가 쌀밥의 저장성을 향상시킬 것으로 사료된다.

요 약

쌀밥의 저장성을 향상시킬 목적으로 쌀밥 부패 미생물을 분리, 동정하고 이들과 표준 균주에 대한 녹차 물추출물의 항균활성을 측정하였다. 표준균주 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* YUFE 2004 및 *Staphylococcus aureus* YUFE 2087 모두 녹차 물추출물이 500, 1000 ppm 첨가된 broth system에서 생육이 억제되었다. 쌀밥 부패에 관여하는 주요 미생물은 두 균주 모두에서 형태적, 생리적 특성과 API 50 CHB kit 그리고 균체 지방산 분석을 통해 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 분리, 동정된 균주 중 *Bacillus subtilis* RHJ-I의 생육은 녹차 물추출물이 500, 1000 ppm 첨가된 broth system에서 그 생육이 억제되었다.

문 헌

1. 이병완, 신동화 : 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색. 한국식품과학 회지, 23, 200 (1991)
2. Ismael, A. and Pierson, M.: Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B and 1623E by essential oil of spices. *J. Food Sci.*, 55, 1676 (1990)
3. Briozzo, J., Nunez, L., Chirife, J., Herszage, L. and

- D'Aquino, M.: Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J. Appl. Bact.*, **66**, 69 (1989)
4. 梶本五郎: 茶葉中の抗酸化成分および抗菌性成分について(第1報). 茶葉より得たアルコール抽出物および水抽出物の抗酸化性および抗菌性について. *日本食品工業學會誌*, **10**, 1 (1963)
 5. 梶本五郎: 茶葉中の抗酸化成分および抗菌性成分について(第2報). ペンバクロマトグラフィによる抗酸化成分および抗菌性成分の檢索. *日本食品工業學會誌*, **10**, 3 (1963)
 6. 松崎妙子, 原征彦: 茶葉カテキン類の抗酸化作用について. *日本農藝化學會誌*, **59**, 129 (1985)
 7. 이주원, 신호선: 녹차 물추출물의 항산화효과. *한국식품과학회지*, **25**, 759 (1993)
 8. 原征彦, 石上正: 茶ポリフェノール類の食中毒細菌に對する抗菌活性. *日本食品工業學會誌*, **36**, 46 (1989)
 9. 原征彦, 渡邊眞由美: 茶ポリフェノール類のボツリヌス菌に對する抗菌作用. *日本食品工業學會誌*, **36**, 1 (1989)
 10. Okuda, T., Yoshida, T. and Ashida, M.: Tannins of medicinal plants and drugs. *Hetero-cycles*, **16**, 1618 (1981)
 11. Namba, T., Tsunozuka, Y., Nunoms, S., Takeda, T., Kakiuchi, Y. Z. Kobayashi, K., Takagi, S. and Hattori, M.: Studies on dental caries prevention by traditional Chinese medicines (Part IV). Screening of crude drugs for antiplague action and effect of artemisia capillaris pikes on adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface and synthesis of glucan by glucosyltransferase. *Shoyakugaku Zasshi*, **38**, 253 (1984)
 12. 최성인, 이정희, 이서래: 막투과법에 의한 녹차음료의 카드뮴 및 제거효과. *한국식품과학회지*, **26**, 740 (1994)
 13. 최성인, 이정희, 이서래: 동물실험에 의한 녹차음료의 카드뮴 및 납 제거효과. *한국식품과학회지*, **26**, 745 (1994)
 14. 조영재, 안봉진, 최칭: 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해효과. *한국식품과학회지*, **25**, 238 (1993)
 15. Peter H. A. S., Nicholas S. M. and Sharpe M. E.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, U.S.A., p.1105 (1986)
 16. Macfaddin, J. F.: *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed, Williams & Wilkins, U.S.A. (1984)
 17. Christine L. C. and T. R. Johnson.: *Laboratory Experiments in Microbiology*, The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc., California, U.S.A. (1984)
 18. 이창호, 오희목, 권태중, 서현효, 권기석, 배경숙, 이문수, 윤병대: Benzene 분해균주 *Flavobacterium* sp. BEN2의 분리 및 특성. *한국미생물학회지*, **32**, 323 (1994)
 19. Miller, L. T. and T. Berger: *Bacteria Identification by Gas Chromatography of Whole Cell Fatty Acid*. Hewlett-Packard Application; Note, p.228 (1985)
 20. 日本微生物學會: 微生物學辭典. 持報堂出版株式會社, 日本, p.380 (1989)

(1995년 8월 10일 접수)