

녹차 추출물을 이용한 어병세균의 collagen 분해효소 및 생육 억제

박선미 · 박수일* · 허민도* · 홍용기[†]

부경대학교 생물공학과, *부경대학교 수산생명의학과

녹차 추출물을 이용하여 각종 어병세균의 collagenase 활성과 생성 억제 및 생육저해 효과를 조사하였다. 어병세균의 감염시에 필요한 효소인 collagenase 활성을 8종의 어병세균에 대하여 측정된 결과 0.08-0.7 unit/ml 범위로 나타났다. 그중 collagenase 활성이 높은 *Edwardsiella tarda*의 collagenase 활성은 0.2 mg/ml의 녹차 추출물이 첨가된 배양액에서 거의 100% 저해되었다. *E. tarda*의 collagenase 생합성은 ST배지에서 25°C, 16시간 배양하였을 때 가장 높게 나타났다. 이 효소는 0.08 mg/ml의 녹차 추출물이 첨가된 배양액에서 1/3이상 생합성이 감소하였다. 또한 균의 생육에 미치는 녹차 추출물의 영향을 조사한 결과 8 mg/ml이 첨가된 배양액 내에서 균의 생육이 완전히 억제되었다.

Key words: Antimicrobial effect, Collagenase, Enzyme inhibition, Fish pathogenic bacteria, Green tea extract

어류의 고 밀도 집약적 양식환경으로 인하여 유발되는 각종 질병들 중에서 대부분이 세균성 질병이므로 이에 대한 대책 마련이 절실히 요구되고 있다. 현재 어류의 세균성 질병 치료를 위하여 사용되고 있는 화학 요법제는 다제 내성균의 출현 및 증가로 인하여 양식장의 장기적인 사용에 있어서 문제점이 제기되고 있다(Aoki *et al.*, 1985). 최 및 김(1994)은 뱀장어 양식장에서 분리한 *Edwardsiella tarda* 균에 대한 약제내성 검사를 한 결과, penicillin 등에 80-100% 내성율을 보였으며, 모든 분리 균주가 다제 내성을 나타내었다고 보고하였다. 이러한 결과는 경제적 부담의 가중은 물론 항생제 치료의 한계점이라 볼수있다. 최근 질병의 발생을 예방하는 방법으로서 사육수의 관리 및 몇 가지의 백신처리 방법 등이 알려져 있으나, 백신은 특정 병원체에 대한 면역능만 증강시키는 단점이 있다. 이 점에 대한 대책의 일환으로 사료에 유용물질 즉 미역 등 각종 해조류의 첨가에 따른 면역능의 증가, 생리 상태, 성장 촉진 및 육질개선 등의 방법들이 연구 보고되고 있다(Yone *et al.*, 1986; Satoh *et al.*, 1987). 그러나 직접적인 감염

경로의 차단 즉 세균이 어체에 감염시 생성하는 각종 효소의 생성억제나 이들 효소의 활성 저해 등으로 어병을 예방 내지는 재감염 방지 효과에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 자연계의 천연 물질이며, 세계의 음료 중에서 가장 오랜 역사를 가지고 있는 녹차(green tea)의 성분 중 카테킨(catechin)은 성인병 예방이나 암 전이에 관여하는 collagenase 효소의 활성 억제 및 세균성 collagenase 활성에 대한 억제, 차잎 중의 비타민 C, E류는 과산화지질의 생성억제 및 노화억제 효과가 있음이 알려져 있다(Makimura *et al.*, 1993; Sazuki *et al.*, 1997). 또한 녹차에는 오래 전부터 항균효과가 있는 것으로도 알려져 왔다(McNaught, 1996). 이러한 효과는 직접적으로 살균력을 가지거나, 세균의 효소를 억제하는 두 가지 측면에서 증명되어져 왔다(Tona *et al.*, 1989; Hamilton-Miller, 1995). 따라서 본 연구는 녹차 추출물의 세균성 어류 질병 예방효과를 알아보기 위하여 병원균의 어류감염에 있어서 일차적인 역할을 하는 것으로 알려진 collagenase의 활성 및 생성 억제, 그리고 어병균의 생육 억제 효과를 조사하였다.

[†]Corresponding author

재료 및 방법

균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 어병 세균으로 알려진 *Aeromonas hydrophila* FPC344, *Edwardsiella tarda* FSW910410, *Flexibacter maritimus* NCMB2514, *Vibrio anguillarum* YT80572와 분리균주인 *Acinetobacter* sp., *Cytophaga* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp.를 사용하였다. 배지는 담수유래의 어병세균인 경우 Bacto Trypticase soy broth (TSB) medium을, 해수 유래의 어병 세균인 경우 ST medium (Bacto TSB medium+2% NaCl)을 각각 이용하였다.

녹차추출물 조제

본 실험에 이용한 녹차 잎은 3-6 cm 크기의 시판 녹차 재료로써 가치가 낮은 녹차 잎을 사용하였다. 건조 녹차 잎 100 g에 50% methanol 1.2 l를 넣어 실온에서 하루씩 3회 추출하여 millipore microfilter(0.45 μ m)로 여과하였다. 여과액을 40 °C에서 감압하에 용매를 제거한 후, 동결 건조하여 실험에 사용하였다(Matsuda *et al.*, 1986).

효소액 조제

어병 세균을 TSB배지 및 ST배지(5 ml)를 이용하여 25°C에서 16시간 배양하였다. 배양액을 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액에 황산암모늄 90%포화 농도로 첨가하여 염석을 행하였다. 침전물은 4°C에서 12,000×g로 15분간 원심분리하여 회수하였다. 이에 100 μ l의 phosphate-buffered saline, pH7.4(PBS)를 첨가하여 재현탁시킨 후, 4°C에서 PBS용액으로 10시간 투석하여 효소액으로 사용하였다.

Collagenolytic activity 측정

반응용액은 효소액 20 μ l에 4 mM CaCl₂가 함유된 50 mM Tris-HCl, pH7.5 완충용액 80 μ l와 collagen (insoluble type I from bovine achielles tendon, Sigma Chemical Co.) 0.2 mg을 첨가하였다. 이 반응 혼합액을 20°C에서 1시간 반응시킨 후, 1 N acetic acid 10 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 유리 아미노산의 생성량은 ninhydrin에 의한 Sasagawa *et al.*(1993)의 방법에 준하여 측

정하였다. 효소 1 unit는 1시간당 570 nm에서의 흡광도 1.0의 증가에 필요한 효소량으로 정의하였다.

Collagenase 활성 억제

녹차 추출물의 첨가에 따른 collagenase 활성의 억제율을 조사하기 위하여, 반응액 내에 녹차 추출물을 각각 0.02, 0.04, 0.1, 0.2 mg/ml를 첨가하여 효소반응을 상기와 동일한 방법으로 행하였다.

Collagenase 생합성 억제

*E. tarda*균을 ST배지에서 25°C, 16시간 배양시킨 후, 10,000×g에서 10분간(4°C) 원심분리하여 균체만을 수거하였다. 여기에 새로운 ST배지로 균을 일정한 농도 즉 OD₆₆₀에서 0.7되게 조절한 후, 다양한 농도의 녹차추출물(0.04, 0.08, 0.4, 0.8, 4, 8 mg/ml)를 첨가하여 20°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이때 균의 생육도와 더불어 배양액내의 collagenase의 생성량을 측정하였다.

세균 생육 억제

다양한 농도의 녹차 추출물(0.04, 0.4, 4, 8 mg/ml)를 첨가한 30 ml의 ST배지에 *E. tarda*균주를 5×10⁶ CFU/ml의 농도로 접종하였다. 균의 생육도는 25°C에서 교반하면서(180 rpm) 40시간동안 8시간 간격으로 OD₆₆₀에서 균의 생육도를 측정하였으며, 동시에 배양액 내에 생성된 collagenolytic activity도 측정하였다.

결과 및 고찰

녹차추출물 조제

건조 녹차 잎으로부터 50%의 methanol을 용매로 사용하여 3회 추출한 후 동결 건조한 녹차 추출물의 건물량은 건조 녹차 100 g당 약 30 g정도였다.

각종 어병세균들의 collagenase 활성

각종 어병세균 즉 *Aeromonas hydrophyla*, *Cytophaga* sp., *Edwardsiella tarda*, *Flexibacter maritimus*, *Staphylococcus* sp., *Vibrio anguillarum* 등의 collagenase 효소 역가를 측정된 결과, 대부분의 어병세균에서 0.08-0.7 unit/ml의 활성이 검출되었으며, 그 중에서 *E. tarda*과 *F. maritimus*

Table 1. Comparison of collagenolytic activity from fish pathogenic bacteria

Strain	Enzyme activity (unit/ml)
<i>Acinetobacter</i> sp.	0.15 ± 0.07
<i>Aeromonas hydrophyla</i> FPC344	0.36 ± 0.09
<i>Cytophaga</i> sp.	0.11 ± 0.01
<i>Edwardsiella tarda</i> FSW910410	0.64 ± 0.06
<i>Flexibacter maritimus</i> NCMB2514	0.71 ± 0.19
<i>Micrococcus</i> sp.	0.08 ± 0.06
<i>Staphylococcus</i> sp.	0.52 ± 0.06
<i>Vibrio anguillarum</i> YT80572	0.26 ± 0.16

Bacteria have cultured in Trypticase soy broth or Trypticase soy broth containing 2% NaCl at 25°C for 16 hrs. The activity of collagenase, precipitated by 90% ammonium sulfate from cultured fluid, was assayed at 20°C for 1 hr in reaction mixture (0.2 mg Type I insoluble collagen, 20 µl enzyme, 80 µl 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 4 mM CaCl₂). The enzyme unit is expressed as the amount of enzyme required to increase the absorbance (570 nm) by 1.0 h⁻¹ of assay.

균주에서 비교적 높은 활성을 나타내었다(Table 1).

각종 어병세균들에 대한 생육 억제효과

녹차 추출물이 어병세균의 생육에 미치는 영향을 측정하기 위하여 각각의 생육배지에 0.4 및 4 mg/ml의 녹차 추출물을 첨가하여 25°C에서 24시

간 및 48시간 배양후 생육도를 조사하였다. 그 결과 *V. anguillarum*과 *Cytophaga* sp.는 4 mg/ml의 추출물이 첨가된 배지에서 100% 생육이 저해되었다. 그러나 *E. tarda*의 경우 58-65%의 비교적 낮은 생육 저해율을 나타내었다(Table 2).

녹차추출물의 collagenase 활성 억제

비교적 collagenase 활성이 높게 나타난 *E. tarda*를 대상으로 녹차 추출물이 효소 자체의 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여, 다양한 농도의 추출물 존재 하에서 collagen 분해반응을 행하여 효소활성의 억제 효과를 조사하였다. 그 결과, 반응액 내의 녹차 추출물 농도가 높아짐에 따라 효소활성은 점차적으로 저해되었으며, 0.2 mg/ml의 양이 첨가된 반응액에서는 효소활성이 거의 100% 저해되었다(Fig. 1).

Collagenase 생성에 미치는 영향

*E. tarda*가 생육하면서 생성하는 collagenase량을 측정 한 결과, 16시간 배양(OD₆₆₀: 0.6-0.8)하였을 때 효소의 생성도가 가장 높게 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 0.04 mg/ml의 녹차 추출물을 첨가하였을 때도 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 0.4 mg/ml의 농도를 첨가하였을 때는 거의 효소생성이 관찰되지 않았다. 또한 collagenase 효소 생합성의 저해효과를 본 결과, 추출물 0.04 mg/ml를 첨가한 경우 대조구와 거의 차이가 없었으나,

Table 2. Comparison of growth inhibition of fish pathogenic bacteria by green tea extract

Strain	Tea extract (mg/ml)			
	0.4		4	
	Culture time (hrs)			
	24	48	24	48
<i>Acinetobacter</i> sp.	0.0	9.3	48.9	81.5
<i>Aeromonas hydrophyla</i> FPC344	9.1	16.5	99.2	100.0
<i>Cytophaga</i> sp.	9.6	16.7	100.0	100.0
<i>Edwardsiella tarda</i> FSW910410	9.8	11.0	58.2	65.5
<i>Flexibacter maritimus</i> NCMB2514	9.5	21.5	73.8	85.2
<i>Micrococcus</i> sp.	12.9	9.0	81.4	87.7
<i>Staphylococcus</i> sp.	0.0	0.4	59.1	82.0
<i>Vibrio anguillarum</i> YT80572	12.0	11.7	100.0	100.0

The rate of growth inhibition was calculated as the relative percentage; [(A-B)/A] × 100, where A is OD₆₆₀ value of culture broth without the tea extract, and B is OD₆₆₀ value of culture broth with the tea extract.

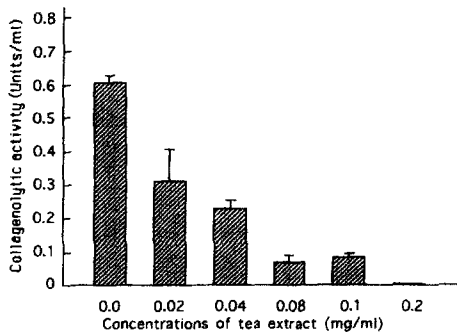


Fig. 1. Inhibition of collagenolytic activity from *Edwardsiella tarda* by tea extract. Each concentration of the tea extract was added in the enzyme reaction mixture. The enzyme unit is expressed as the amount of enzyme required to increase the absorbance (570 nm) by 1.0 h^{-1} of assay.

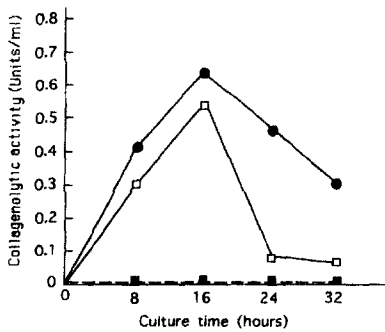


Fig. 2. Effect of tea extract on the production of collagenase from *Edwardsiella tarda*. Tea extracts of 0 mg/ml (●), 0.04 mg/ml (□) and 0.4 mg/ml (■) were added in the medium, and the amount of produced enzyme was assayed from the cultured fluid after 16 hrs.

0.08-0.8 mg/ml의 농도로 첨가하였을 때는 효소 생성이 대조구에 비해 약 1/3 이상 크게 감소하였다 (Fig. 3). 이때 추출물이 0.8 mg/ml 농도 범위까지 존재하는 배양액 내에서의 *E. tarda* 균 생육은 대조구와 거의 변화가 없었다. 이러한 결과는 낮은 농도의 녹차 추출물은 균의 생육에는 거의 영향을 미치지 않는 반면 효소의 생성 또는 활성을 크게 저해하는 것으로 나타났다.

E. tarda 균 생육에 미치는 영향

비교적 collagenase 효소 활성이 높게 나타난 *E. tarda*를 이용하여 녹차 추출물을 0.04, 0.4, 4 및 8 mg/ml의 농도로 각각 첨가하여 균의 생육에 미치는 최소저해농도를 측정하였다. 그 결과 녹차 추

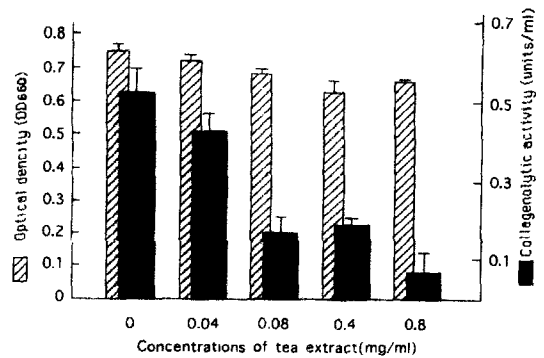


Fig. 3. Repression of the collagenase biosynthesis from *Edwardsiella tarda* by tea extract. Cells of *E. tarda* ($OD_{660} = 0.7$) were reacted with each concentration of the tea extract at 20°C for 1 hr. The amount of released enzyme (▨) and the optical density of cell growth (■) were assayed.

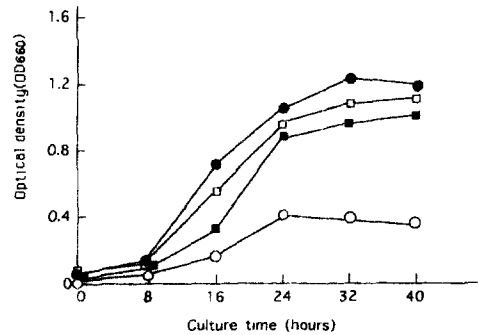


Fig. 4. Effect of tea extract on the cell growth of *Edwardsiella tarda*. Tea extracts of 0 mg/ml (●), 0.04 mg/ml (□), 0.4 mg/ml (■) and 4 mg/ml (○) were added in the culture medium. The cell growth was measured as the value of optical density at 660 nm.

출물이 첨가되지 않은 대조구보다 첨가된 농도가 높아짐에 따라 균의 생육도는 점차적으로 떨어져, 추출물이 4 mg/ml의 농도에서는 균의 생육이 현저히 저해되었다 (Fig. 4). 최소 생육억제농도(MIC)를 측정하기 위하여 동일한 균 농도(5×10^6 CFU/ml)의 배양액에 다양한 농도의 녹차 추출물을 첨가하여 25°C 에서 48시간 배양 후 생균수를 조사하였다. 그 결과 LD_{50} 은 3.5 mg/ml의 녹차 추출물이 첨가된 경우이며, 최소 생육억제농도는 8 mg/ml이었다 (Fig. 5).

따라서 본 연구 결과를 미루어 볼 때, 시판용 녹차를 만들고 남은 폐자원인 차 잎으로부터 추출한 물질이 어병을 유발시키는 *E. tarda*의 생육에

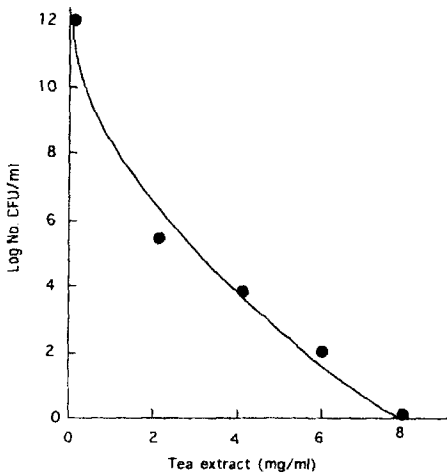


Fig. 5. Minimal inhibition concentration of tea extract against the cell growth of *Edwardsiella tarda*. Cells of *E. tarda* (5×10^6 /ml) were cultured with each concentration of tea extract at 20°C for 2 days. The survived cells were counted on ST agar medium after 1 day.

미치는 항균활성 및 collagenase 효소 억제작용 등이 있음이 관찰되었다. 그리고 녹차는 우리 인간의 식용음료로써 널리 애용되어 온 천연 식품이므로 이로 인한 부수적인 독성작용 등의 부작용 문제점은 비교적 적을 것으로 생각된다. 그러나 녹차를 이용하여 균의 생육 및 감염에 필수적인 효소의 생성 및 활성을 억제함으로써 세균 감염의 예방학적 차원에서 이용되어 질 수 있으리라 여겨지지만, 이는 실제로 양식장에서 어체에 대한 생체실험으로 재확인되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 부경대학교 특성화사업단의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 박 선미는 부경대학교 해양식량자원개발 특성화 사업단 박사 후 전임연구원임.

참고문헌

Aoki, T., Kankzawa, T. and Kitato, T.: Epidemiological surveillance of drug resistant *Vibrio anguillarum* strains. *Fish Pathol.*, 29: 199-208, 1985.

Hamilton-Miller, J. M. T.: Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicro. Agent and Chemo.*, 39: 2375-2377, 1995.

Makimura, M., Hirasawam, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S., Taguchi, T. and Otake, S.: Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J. Periodontol.*, 64: 630-636, 1993.

Matsuda, H., Chisaka, T., Kubomura, Y., Yamahara, J., Sawada, T., Fujimura, H. and Kimura, H.: Effects of crude drugs on experimental hypercholesterolemia. I. Tea and its active principles. *J. Ethnopharmacol.*, 17: 213-224, 1986.

McNaught, J. G.: On the action of cold or lukewarm tea on *Bacillus typhosus*. *J. Royal Army Medical Corps.*, 7: 372-373, 1996.

Sasagawa, Y., Kamio, Y., Matsubara, Y., Suzuki, K., Kojima, H. and Izaki, K.: Purification and properties of collagenase from *Cytophaga* sp. L43-1 strain. *Bio-sci. Biotech. Biochem.*, 57: 1894-1898, 1993.

Satoh, K., Nakagawa, H. and Kasahara, S.: Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 1115-1120, 1987.

Sazuki, M., Imazawa, H., Mita, T., Haram Y. and Ise-mura, M.: Inhibition of collagenase from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61: 1504-1506, 1997.

Tona, M., Okube, S., Onishi, R. and Shimamura, T.: Antibacterial and antibactericidal activities of Japanese green tea. *Nippon Saikingaku Zasshi*, 44: 669-672, 1989.

Yone, Y., Furuichi, M. and Urano, K.: Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* supplements on absorption of dietary nutrients and blood sugar and plasma free amino-N levels of red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52: 1817-1819, 1986.

최민순, 김영길: 양만장 사육조에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제내성과 R plasmid. *J. Fish Pathol.*, 7: 37-46, 1994.

Inhibitory Effect of Green Tea Extract on Collagenase Activity and Growth of Fish Pathogenic Bacteria

Sun-Mee Park, Soo-Il Park*, Min-Do Huh* and Yong-Ki Hong

Department of Biotechnology, Pukyong National University,

**Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University*

Green tea extract has been suggested to possess properties of collagenase inhibition and antimicrobial effect to fish pathogenic bacteria. Most fish pathogenic bacteria showed collagenase activities of 0.08-0.7 unit/ml. Among them, *Edwardsiella tarda* produced large amount of collagenase in the ST medium at 25 °C after 16 hrs. Biosynthesis of the enzyme from *E. tarda* was decreased to 1/3 by addition of 0.08-0.8 mg/ml of tea extract in the culture medium. The collagenase activity was inhibited almost 100% in the reaction mixture by 0.2 mg/ml of the extract. Then, the minimal inhibition concentration against *E. tarda* growth appeared as 8 mg/ml of the tea extract in the culture medium.

Key words: Antimicrobial effect, Collagenase, Enzyme inhibition, Fish pathogenic bacteria, Green tea extract