J. Fd Hyg. Safety 20(1), 48-52 (2005)

Escherichia coli O157:H7균에 대한 녹차 추출물 및 분획물의 항균효과

조선영 · 최재호 · 함승시 · 오덕환†
강원대학교 바이오산업공학부

Antimicrobial Activities of Green Tea Extract and Fractions on the *E. coli* O157:H7

Sun-Young Cho, Jae-Ho Choi, Seung-Shi Ham and Deog-Hwan Oh†
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT – This study was investigated to determine the antimicrobial activity of ethanol extract of green tea, and of solvent fractionated ethanol extract on *Escherichia coli* O157:H7. MIC value of ethanol extracts and solvent fractionated ethanol extract (hexane, ethyl-acetate, chloroform and water) were 2000 μg/ml, 0, 500 μg/ml, 2000 μg/ml, 1000 μg/ml, respectively. The antimicrobial activity of ethylacetate fraction against *E. coli* O157:H7 ranged from 250~2000 μg/disk. The antimicrobial activity was significantly increased as concentration dependent. When *E. coli* O157:H7 was pH-adjusted TSB containing 1000 μg/ml ethylacetate, *E. coli* O157:H7 was significantly inhibited at initial pH of 10, whereas the pathogen grew well in the presence of pH 4.5-pH 9. The inhibitory effect of the ethylacetate fraction on the growth of *E. coli* O157:H7 was investigated. Growth of both strain in the tested conditions were rapidly occurred up to 12 h, but no growth was occurred in the presence of 250-1000 μg/mL of ethylacetate fraction for 72 h.

Key words: Antimicrobial activity, tea extract, *E. coli* O157:H7

최근 식품산업의 급격한 발전과 식품의 세계화 및 인스턴트 식품의 대량화 등으로 식품저장기간을 연장하고 상품가치를 높이기 위한 수단으로 식품 보존료의 사용이 증가하고 있으나 대부분의 식품 보존료는 화학합성품으로 높은 농도로 사용할 경우 안정성에 심각한 영향을 나타낸다. 따라서 소비자들은 합성첨가제를 이용한 식품의 사용을 꺼리는 한편 천연물에 대한 요구가 높아지고 있다. 그러므로 안정성의 문제가 없는 천연 첨가제 물질의 개발과 이용은 각종 가공식품의 저장성 향상 및 저온 식품의 안정성 확보라는 면에서 필연적이라 하겠다. 이러한 측면에서 최근에는 향신료, 식품 재료 및 생약재등에서 천연물질에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는데,[1-3] 이중에서 차류는 모든 식용식물 중에서 독성이 없는 가장 좋은 천연 항균성물질중의 하나로서 주목받고 있다.[4]

차류는 지금까지 영양섭취를 목적으로 하지 않고 향과 맛을 즐기는 기호성 식품으로 취급되어 왔는데 최근 생체리듬의 조절, 면역력의 증진, 질병의 예방이나 회복, 노화 억제 등 신체조절을 기능을 갖는 천연 기능성 식품으로서 주목받고 있다. 특히 녹차에는 여러 가지 생리활성 물질이 함유되어 있으며, 그 중에서 주성분인 카테킨은 폴리페놀 화합물로서 epicatechin (EC), epigallocatechin (GC), epicatechin gallate (ECG) 및 epigallocatechin gallate (EGCG) 의 4종류로 나뉘어지며[5] 혈중콜레스테롤을 저하시키고,[6] 고혈압이나 동맥경화를 예방하고 과산화지질의 생성을 억제하여 노화를 지연시키며,[7] 중성지질의 생성을 억제하여 비만의 방지 등 성인병 예방이나 암 예방에 관계하는 기능성분이 밝혀졌고,[8] 충치억제, 식품의 항산화제[9-12] 및 항균제,[13-16] 중금속제거효과,[17,18] 혈압강화 효과[19] 등 여러 가지 생리활성효과를 나타낸다고 보고되고 있다.

그러나 차류의 천연 식품 보존제로서의 기능성 검색을 위한 연구는 많이 보고되고 있으나 국내에서 차 추출물의 식품 부패에 관여하는 세균이나 병원성균의 항균 작용에 관한 보고는 많지 않다. 지금까지 국내에서의 차 추출물의 항균성 시험은 국내외산 녹차 추출물의 항균 작용,[13] 식품 유해균에 대한 녹차, 오룡차 및 홍차 추출물의 항균 효과[14-16]와 쌀밥 부패 미생물과 *Pediococcus pentosaceus*와 *Lactobacillus brevis*에 대한 녹차 물추출물의 항균 작용[15-20] 등이 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 항균활성과 같은 여러 가지 생리적 유용성이 있을 뿐만 아니라 그 적용 방법이 비교적 쉬운 녹차를 여러 가지 유기 용매로 특정 성분을 추출한 다

†Author to whom correspondence should be addressed.

음 이 추출물로부터 병원성 균인 *E. coli* O157:H7균에 대한 항균성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 조제

본 실험에 사용된 차는 (주)태평양화학 제품인 시판용 녹차를 춘천 시내 슈퍼마켓에서 구입하여 본 실험에 사용하였다.

사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli* O157:H7 933, 932, 009균을 미국 조지아대학 식품공학과에서 분양받아 사용하였으며, 각 균의 생육 및 보존을 위해서 tryptic soy broth(TSB; Difco)와 tryptic soy agar(TSA; Difco)를 사용하였다.

추출 및 분획물의 조제

녹차의 추출은 수직으로 환류 냉각관을 부착시킨 flask에 시료 10배에 해당하는 90%의 에탄올을 사용하여 45°C의 수욕상에서 12시간 동안 추출한 후 여과하였으며(3×) 각 추출액을 rotatory vacuum evaporator로 감압 농축한 다음 농축물을 동결 건조기를(VD-16, Taitec Co., Japan) 사용하여 건조한 후 4°C 냉장에 보존하면서 실험에 사용하였다. 에탄올 추출물로부터 분획물을 얻기 위하여 핵산, 에틸아세테이트 및 클로로포름 용매로 순차적으로 분획하여 각각 용출한 다음 최종적으로 물분획을 얻고 각각의 용출액을 농축하여 동결 건조한 후 본 실험에 사용하였다.

추출물의 MIC 검색

각각의 녹차 추출물을 0.45 μm membrane filter(Nalgene Co., USA)로 제균시킨 후 전배양한 배양액으로부터 10 ml의 TSB배지를 함유하는 시험관에 10^5 CFU/mL의 농도로 분주하였고 각각 적당량 농도의 추출물을 넣은 후 35°C 배양기에서 24시간 배양후 탁도를 나타내지 않은 최소저해농도를 minimal inhibitory concentration(MIC)로 나타내었다.

에틸아세테이트 분획물의 농도별 항균성 및 pH의 영향 검색

추출물의 농도별 항균성 시험은 TSA 배지를 100 mL씩 삼각 플라스크에 분주하여 멸균한 후, 45°C 수욕상에 보관하면서 전배양한 각 시험균액을 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 항균 검색용 배지를 만들었다. 분획물 중 가장 강한 항균력을 나타낸 에틸아세테이트 분획물의 항균력에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 500 μg/mL과 1000 μg/mL의 에틸아세테이트 분획물을 함유하는 TSB배지를 pH meter (ORION-420a, ORION Research Inc., USA)로 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 이용하여 pH를 각각 4.5, 5, 7, 9, 10으로 조정한 후, 최종 농도가 10^5 CFU/mL이 되게 전배양한 시험균을 접종한 후 35°C 배양기에서 24시간 배양하여 standard plate count 방법으로 콜로니를 counting 하였다.

에틸아세테이트 분획물의 생육저해효과

TSB 배지를 500 mL 삼각 플라스크에 각각 100 ml씩 분주하여 121°C에서 15분 동안 살균한 다음 0.45 μm membrane filter로 제균시킨 에틸아세테이트 분획물을 적당한 농도씩 무균적으로 배지에 분주한 후 전배양한 *E. coli* O157:H7 933과 932 배양액으로부터 각각 최종 농도가 10^5 CFU/mL이 되게 무균적으로 접종하였다. 각 플라스크는 35°C에서 72시간동안 배양하였고 추출물의 농도별 생육저해효과를 측정하기 위하여 배양하는 동안 각 sample은 12시간마다 채취하여 Spectrophotometer(Milton Roy Spectronic 21D, USA)를 사용하여 620 mm에서 흡광도를 측정하였으며 시험균이 없는 에틸아세테이트 분획물이 함유된 broth를 blank로 사용하였다.

결과 및 고찰

천연 식품보존제의 개발을 위한 목적으로 일반 대중들이 기호식품으로 많이 이용하고 있는 녹차를 사용하여 에탄올로 추출한 추출액과 에탄올 추출물로부터 얻은 각각의 분획물의 *E. coli* O157:H7균에 대한 최소저해농도를 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 에탄올 추출물은 *E. coli* O157:H7 3균 모두 2000 μg/mL에서 MIC를 나타내었다. 분획물의 경우, 에틸아세테이트 분획물이 모든 대상 시험균에 대하여 500 μg/mL로 가장 항균활성이 좋았으나, 핵산 분획물은 3종류의 시험균 모두 전혀 항균활성을 나타내지 않았

Table 1. Minimal inhibitory concentration of organic solvent fractions from ethanol extract of green tea on *E. coli* O157: H7[1)]

Organic solvent	MIC(μg/mL)		
	933	932	009
ethanol extract	2000	2000	2000
hexane fraction	-	-	-
ethylacetate fraction	500	500	500
chloroform fraction	2000	2000	2000
water fraction	1000	1000	500

[1)] Final cell concentration for *E. coli* O157: H7 was approximately 1×10^7 CFU/mL

Table 2. Antimicrobial activity of different concentrations of ethylacetate fraction on *E. coli* O157: H7[1)]

Concentration (μg/disk)	Inhibition Zone (mm)[2)]		
	933	932	009
250	12	13	13
500	17	16	14
1000	21	20	22
2000	33	24	34

[1)] Final cell concentration for *E. coli* O157: H7 was approximately 1×10^7 CFU/mL

[2)] Given concentration of ethylacetate fraction were observed into paper disk (8 mm diameter) and the diameter (mm) of clear zone was confirmed around the colony.

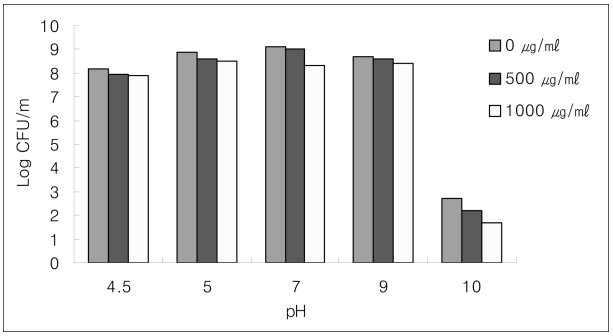

Fig. 1. Antimicrobial effect of ethylacetate fraction adjusted with different pH values against *E. coli* O157:H7 933 inoculated with initial inoculum of 10^5 CFU/mL at 35°C for 24 h.

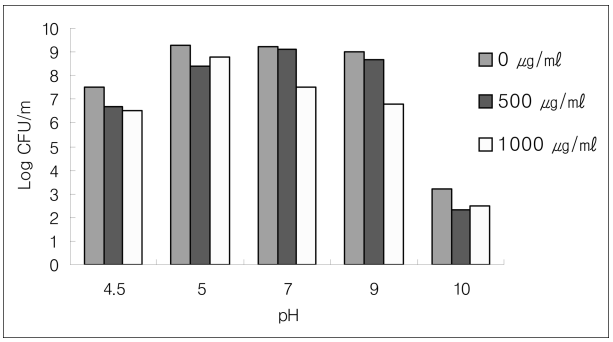

Fig. 2. Antimicrobial of ethylacetate fraction adjusted with different pH values against *E. coli* O157:H7 932 inoculated with initial inoculum of 10^5 CFU/mL at 35°C for 24 h

다. 물 분획층도 균종에 따라 차이는 있지만 *E. coli* O157:H7균에 대해 큰 항균활성을 보였지만 에틸아세테이트 분획물보다는 약한 항균력을 나타내었다. 최소저해농도에서 가장 강한 항균력을 나타낸 에틸아세테이트 분획물의 농도별 항균활성을 검색한 결과는 Table 2와 같다. 균종에 따라 약간의 항균력차이는 있지만 항균력은 농도의존성을 나타내었다. 각 균주에 대하여 250 μg/disk의 농도에서는 12-13 mm의 생육저해환을 나타냈으나 농도가 증가할수록 항균력은 더욱 증가 하였으며 2000 μg/disk 농도에서는 24-34 mm로 가장 큰 항균활성을 나타내었다.

에틸아세테이트 분획물의 pH변화에 따른 *E. coli* O157:H7 933 및 932균의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 1과 2에 나타내었다. *E. coli* O157:H7 933균 은 에틸아세테이트 분획물의 pH가 4.5, 5, 7, 9의 조건하에 놓였을때 생육억제 작용에 별 영향이 없었지만 pH 10에서는 강한 증식 억제 작용이 있었다. 또한, 에틸아세테이트 분획물의 농도에 상관없이 933균은 주어진 농도에서 모두 생육하였다. 반면에, 932균은 pH 4.5에서 933균보다 생육이 약간 더 저해되었으며 에틸아세테이트 분획물의 농도가 증가함에 따라 균의 생육이 더 많이 저해되었다. 따라서, 본 연구결과, *E. coli* O157:H7균은 알칼리성보다는 산성조건하에서 저항성이 강한 것으로 사료된다. Siragusa와 Nettles[21)]은 육류의 표면에 특정병원균을 접종한 후 유기산의 세척 효과를 측정한 결과 *E. coli* O157:H7균이 다른 장내세균이나 식중독 세균에 비하여 현저한 산 저항성을 갖는 것으로 나타났으며, Zhoa[22)] 등은 *E. coli* O157:H7균은 pH 3.6-4.0인 사과 사이다에서 생육이 가능하다고 보고하였고, Brackett[23)] 등은 소고기의 표면에 오염된 *E. coli* O157:H7균을 제거하기 위하여 20°C와 50°C에서 초산, 구연산 및 젖산을 처리한 결과 효력이 없는 것으로 보고하였다. 또한 Abdule-Raouf[24)] 등도 초산으로 pH 4.7과 5.0으로 조정된 beef slurries에서는 거의 효과가 없는 것으로 보고하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 *E. coli* O157:H7균은 산성조건에서는 강한 내성이 있어 생육이 가능하다는 것을 의미한다. 일반적으로 많은 병원성균은 산성 조건에서 생육이 불가능한데 비하여 O-157균은 산성조건에서 강한 내성이 있어 생육이 가능하기 때문에 특히 산성 식품에 관한 안전성이 심각한 우려가 될 수 있다.

E. coli O157:H7균에 대한 녹차의 에틸아세테이트 분획물의 균증식 억제 효과가 높아서 시간의 변화에 의한 이 균의 생육저해 효과를 조사한 결과를 Fig. 3과 4에 나타내었다. *E. coli* O157:H7 933균은 12시간까지는 모든 농도에서 자랐으나 그 이후부터는 생육이 저해되었으며 1000 μg/mL이 농도에서는 가장 생육이 많이 억제되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 932균에서도 비슷한 경향을 나타내었다(Fig. 4). 대조군은 72시간까지 지속적으로 생육하였으나 에틸아세테이트 분획물을 함유하는 배지에서는 농도 의존적으로 생육이 저해되었다. 여[14)] 등은 녹차, 우롱차, 홍차에서의 항균 효과는 비발효차인 녹차의 항균 효과가 가장 좋았다고 보고하였으

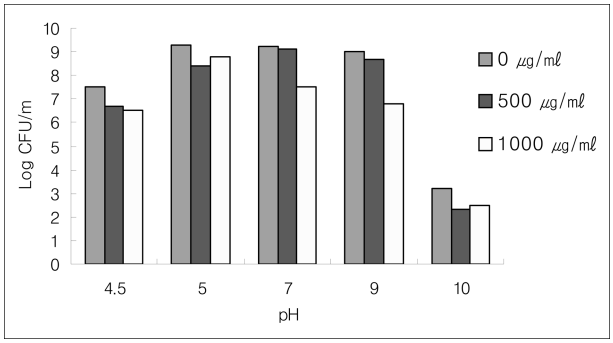

Fig. 3. Inhibitory effect of ethylacetate fraction on the growth of *E. coli* O157:H7 933 at 35°C

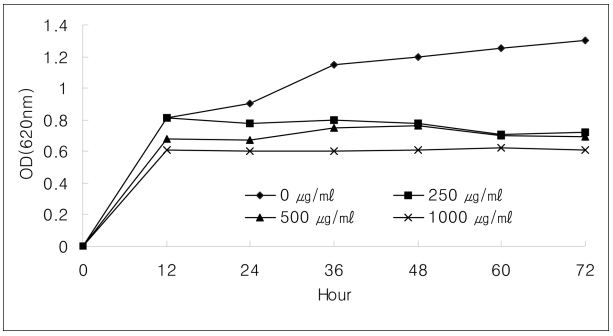

Fig. 4. Inhibitory effect of ethylacetate fraction on the growth of *E. coli* O157:H7 932 at 35°C

며, 오[16] 등도 다양한 식품 유해균에 대한 녹차 추출물의 항균활성이 좋았다고 보고했다. 일반적으로 카테킨류 중 non-gallate화합물인 (-)-EC 및 (-)-EGC 보다 gallate기가 결합된 (-)-ECG나 (-)-EGCG가 강한 항균작용을 나타내며 그중 (-)-EGCG가 가장 강한 항균력을 (-)-EC가 가장 낮은 항균력을 나타내는데 이러한 결과로 볼 때 에틸아세테이트 분획층의 항균활성이 가장 좋은 것은 다른 분획물에 비하여 (-)-EGCG의 높은 함량이 다른 분획물에 비해 높은 것으로 사료된다.

카테킨은 냉동으로 열처리 같은 물리적인 조건에 대하여 매우 안정하여 임상적으로 유용한 물질이며 장염, 호흡기질환, 피부염, 치주염 등의 질병치료에 널리 이용되고 있다.25) 또한 용액상태에서 카테킨은 한달 이상 냉장저장 하여도 매우 안정하며 열에 강하기 때문에 생식회를 많이 섭취하는 우리나라 사람에게는 식중독을 예방하기 위하여 회를 먹은 후 뜨거운 녹차를 마시면 식중독 예방에 매우 도움이 되며, 특히 여름철과 같이 세균성 식중독에 오염되기 쉬운 계절에는 식사를 하면서 한잔의 녹차를 곁들여 마시면 식중독을 사전에 예방할 수 있는 좋은 방법이라 생각된다. 따라서 본 실험에서 사용한 녹차의 성분에는 O-157균과 같이 식품에서 부패의 원인 및 식중독을 유발하는 유해 세균에 대한 항균 작용이 우수하며, 또한 여러 가지 생리활성과 인체에 대한 무독성이 인정되므로 녹차를 자주 복용하여 예방차원에서 식품으로서의 기호성과 기능성을 가지면서 식품으로서의 가치를 증진시킬 수 있고 다양한 건강의 위해로부터 보호받을 수 있을 것으로 사료된다.

국문요약

본 연구는 시판되는 증자 녹차의 에탄올 추출물과 에탄올 추출물로부터 분획한 분획물로부터 최근 병원성 식중독균으로서 문제시되고 있는 *E. coli* O157:H7균에 대한 항균성을 검색하였다. 에탄올 추출물로부터 그 유효성분을 조사하기 위하여 핵산, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 물로서 분획한 후 MIC를 검색한 결과 에틸아세테이트 분획물이 500 μg/ml의 농도로 가장 강한 활성을 나타내었으며, 핵산 분획물은 활성이 없었다. 가장 강한 항균력을 나타낸 에틸아세테이트 분획물의 농도별 항균력 및 pH에 대한 영향을 조사한 결과 균종에 따라 차이는 있지만 3균주 모두 250-2000 μg/disk 농도에서 생육이 억제되었다. 또한 *E. coli* O157:H7균은 산성조건에서는 생육이 가능하지만 pH 10 이상의 강한 알칼리 조건에서는 생육이 크게 억제되었다. 35°C에서 *E. coli* O157:H7 933과 932균에 대한 에틸아세테이트 분획물의 농도별 생육저해 효과를 검색한 결과 두 균주 모두 250 μg/ml, 500 μg/ml의 농도에서는 12시간 이후부터 생육하기 시작하였으나 1000 μg/ml의 농도에서는 생육이 크게 저해되었다.

참고문헌

1. Lee, B. W., Shin, D. H. : Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for food spoilage micro-organisms. *Korean J. Food Sci. Technl.*, **23**, 205-211 (1991).
2. Shin, D. H., Kim, M. S., Han, J. S. : Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-born bacteria. *Korean J. Food Sci.*

Technol., **29**, 808-816(1997).

3. Oh, D. H., Ham, S. S., Park, B. K., Ahn, C., Yu, J. Y. : Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. *Korean J. Food Sci. Techmol.,* **30**, 957-963(1998).
4. Davidson, P. M. and Post, L. S. : Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In "Antimicrobials in foods" Branen, A. L. and Davidson, P. M.(eds.), Marcel Dekker, Inc., New York p.371(1983).
5. Maeda, S and Nakagawa, M. : General chemical and physical analysises on various kinds of green tea. *Tea Research J.,* **545**, 85-88(1977).
6. Muramatsu, K., Fukuyo, M. and Hara, Y. : Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.,* **32**, 613-615(1986).
7. Masak, H., Atsumi, T. and Sakurai, H. : Detection of hydroxygen proxide hydroxy radicals in murine skin firoblasts under UVB irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **206**, 474-479(1995).
8. Fujita, Y., Yamane, T., Tanaka, M., Kuwata, K., Okuzumi, J., Takahashi, T., Fujiki, H. and Okuda, T. : Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N-nitro-N-nitroguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. Cancer Res.,* 80, 503-508(1989).
9. Rhi, J. W. Shin, H. S. : Antioxidant effect of aqueous extract obtained from green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **25,** 759-763(1993).
10. Lee, J. O., Kim, M. C., Kim, M. H., Park, J. S. Park, E. J. : Studies on the phenolic compounds and the antioxidant properties of various plant used as commercial teas. *The Annual Report of KFDA,* **1**, p. 21-32(1996).
11. Park, C. O. Jin, S. H. Ryu, B. H. : Antioxidant activity of green tea extracts toward human low density lipoprotein. *Korean J. food Sci. Technol.,* **28**, 850-858(1996).
12. Ryu, B. H., Park, C. O. : Antioxidant effect of green tea extracts on enzymatic activities of hairless mice skin induce by ultraviolet B light. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **29**, 355-361(1997).
13. Kim, Y. G. : Antibacteria activities of korean and foreign green tea extract. *Kor. J. Env. Hlth. Soc*., **21**, 39-49(1995).
14. Yeo, S. G., Ahn, C. W., Kim, I. S., Park, Y. B., Park, Y. H., Kim, S. B. : Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 293-298(1995).
15. Rho, H. J., Shin Y. S., Lee, K. S. Shin, M. K. : Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked rice putrefactive microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol*., **28**, 66-71(1996).
16. Oh, D. H., Lee, M. K. Park, B. K. : Antimicrobial activities of comercially available tea on the harmful foodborne organisms. *J. Korean soc. Food Nutr*. **28**, 100-106(1999).
17. Choi, S. I., Lee, J. H., lee, S.R. : Effect of green tea beveratgge for the removal of cadmium and lead by animal experiments. *J. Food Sci. Technol.,* **26**, 740-744(1994).
18. Choi, S. I., Lee, J. H., Lee, S. R. : Effect of green tea beverage on the removal of cadmium and lead by membrane filtration. *J. Food Sci. Technol*., **26**, 745-750(1994).
19. Cho, Y. J., Ahn, B. J. Choi, C. : Inhibition effect of against angiotensin converting enzyme of flavan-3-ols isolated kroean green tea. *J. Food Sci. Technol*., **25**, 238-242(1993).
20. Shin, M. K., Shin, Y. S. : Antimicrobial effect of water extract of green tea against Pediococcus pentosaceus and Lactobacillus brevis isolated from kimchi. *J. East Asian Soc. Dietary Life*. **5**, 309-315(1995).
21. Siragusa, G. R. and Nettlesl, C. G. : Efficacy of organic acid decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the beef carcass tissue in a pilot scale model carcass washing system. Summary report prepared by U.S.Dept. of Agricutural Research Service, U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, NE(1993).
22. Zhoa, T., Doyle, M.O. and Besser, R.E. : Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without prevervatives. *Appl. and Environ. Microbiol.* 59, 2526-2530(1993).
23. Brackett, R.E., Hao, Y.Y. and Doyle, M.P. : Ineffectness of hot acid sprays to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. J.Food Prot.57, 198-203(1994).
24. Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R.. and Ammar, M.S. : Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidualants, and temperature. *Appl. and Environ. Microbiol.* 31, 847-852(1993).