



## 녹차추출물의 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항균활성

김선준 · 황재호 · 한경호 · 조정용<sup>1</sup> · 마승진<sup>1</sup> · 김두운<sup>2</sup> · 문제학<sup>2</sup> · 박근형<sup>2</sup> · 김선재\*

전남대학교 수산해양대학 식품공학영양학부 및 해양기술학부, <sup>1</sup>목포대학교 식품공학과,  
<sup>2</sup>전남대학교 식품공학과 및 기능성식품연구센터

## Antimicrobial Activities of Green Tea Extract on *Vibrio parahaemolyticus*

Seon-Jun Kim, Jae-Ho Hwang, Kyeong-Ho Han, Jeong-Yong Cho<sup>1</sup>, Seung-Jin Ma<sup>1</sup>,  
Duwoon Kim<sup>2</sup>, Jae-Hak Moon<sup>2</sup>, Keun-Hyung Park<sup>2</sup>, and Seon-Jae Kim\*

Division of Food Science and Nutrition and Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science & Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University,  
Gwangju 500-757, Korea

**Abstract** Green tea extract was tested to determine its antimicrobial effects against the pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. The antimicrobial effect of green tea extract was evaluated by measuring the change in the concentration level of *V. parahaemolyticus* genomic DNA, which was obtained after treatment of green tea ethanol extract with neutral and acidic solvent-fractionation. Green tea extract of the neutral fraction showed concentration-dependent killing of *V. parahaemolyticus*, whereas green tea extract of the acidic fraction significantly inhibited the growth of *V. parahaemolyticus* at the minimum inhibitory concentration of 1,000~1,500 ppm.

**Key words:** green tea, *Vibrio parahaemolyticus*, pathogenic bacteria, antimicrobial activity

### 서 론

*Vibrio parahaemolyticus*는 장염비브리오균이라고도 하며, 전 세계적으로 보건에 위해를 주는 중요한 식중독 원인균으로서(1-3) 특히 어패류를 즐겨 생식하는 우리나라, 일본을 비롯하여 대만, 태국, 라오스, 미국 등지에서 문제시되고 있다(4). 비브리오속 세균에 의한 해산물의 오염은 수산업에 피해를 줄 뿐만 아니라 사람에게도 식중독을 일으키므로 공중보건학적으로 중요하다(5). *V. parahaemolyticus*는 기수지역을 중심으로 전 세계적으로 널리 분포하는 호염성 세균이다. 이 세균의 식중독 관련성은 1950년 일본에서 최초로 밝혀졌고, 주로 하절기에 오염된 수산물의 생식이나 불충분한 가열 후 섭취 시에 발생하는 위장염의 주요 원인이 되고 있으며 일본의 경우 수산물과 관련된 위장염의 70%, 우리나라의 경우는 약 30%가 *V. parahaemolyticus*에 의한 것으로

보고되고 있다(6,7). 세계적으로 이러한 병원성 비브리오속 세균의 검출율이 점차 높아지고 있는 것은 수산업의 발달, 해안지역의 관광객의 증가 및 해산물 가공공장의 증가 등으로 인하여 각종 오염물질이 해안으로 유입됨으로서 연안 해양환경의 오염이 가속화되기 때문이다. 우리나라의 경우 해산물을 많이 섭취하고 또 생선회 등 어패류를 생식하는 식습관 상 비브리오속 세균에 의한 감염 위험성은 매우 크고 식중독 위험이 상존하고 있으므로, 유통 수산물에서 이들 균에 대한 위생관리가 대단히 중요시 되고 있다.

한편 항생제는 사람에서는 주로 감염성세균의 치료를 위해 도입되었지만 가축에서는 질병치료뿐만 아니라 질병예방, 성장촉진 목적으로도 사용되어 왔다. 특히 해상 양식장의 경우 질병의 치료를 위하여 직접 투여뿐만 아니라 질병예방 및 성장촉진을 위하여 간접적으로 사료에 첨가하는 등 수산용 항생제가 광범위하게 사용되어 주변 환경에까지 영향을 미칠 수 있다(8). *V. parahaemolyticus*와 같은 해양상제세균과 육상유래 세균들이 어류 양식 환경에 노출되는 경우 어류 질병예방 및 치료의 목적으

\*Corresponding author: Seon-Jae Kim  
Tel: 82-61-659-3214  
Fax: 82-61-659-3219  
E-mail: foodkims@jnu.ac.kr

로 사용되는 수산용 항생제에 직간접적으로 노출되어 항생제 내성인자를 획득할 가능성이 있으며, 균교대증이나 allergy 유발 등의 안전성에 문제가 될 수 있다(9). 이러한 문제점을 해결하기 위해 천연에서 추출한 물질 중에서 항생물질을 대체하거나 항생제와 병용 시에 그 효과를 상승시켜 항생제 사용량을 저감할 수 있는 항생제 대체물질의 개발의 연구가 시급히 요구되고 있다.

천연물질인 녹차는 여러 가지 생리활성 물질이 함유되어 있으며, 그 중에서 주성분인 catechin은 폴리페놀화합물로서 epicatechin (EC), epigallocatechin (GC), epicatechin gallate (EGC) 및 epigallocatechin gallate (EGCG)의 4종류로 나누어지며, 녹차는 혈중 콜레스테롤을 저하시키고, 고혈압이나 동맥경화를 예방하고 과산화지질의 생성을 억제하여 노화를 지연시키며, 중성지방의 생성을 억제하여 비만의 방지 등 성인병 예방이나 암 예방에 관계하는 기능성분이 밝혀졌고, 충치억제, 식품의 항산화제 및 항균제, 증금속제거효과, 혈압강화 효과 등 (10-15) 여러 가지 연구가 보고되고 있으나 아직까지 어류질병과 관련된 *V. parahaemolyticus*에 대한 항균효과에 관한 보고는 미미하다.

따라서 본 연구에서는 식중독의 예방과 어류의 감염 질환의 치료제를 위한 천연항균제로서의 녹차의 이용 가능성을 위한 기초자료를 마련하고자 녹차 추출물의 *in vitro*에서의 *V. parahaemolyticus*에 대한 항균효과, 최소발육저지농도 등을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 사용균주

본 연구에 사용한 녹차는 전남 보성 춘파다원에서 재배된 재래종 찻잎을 이용하여 제조한 녹차를 제공받아 시료로 사용하였다. 그리고 실험에 사용된 균주 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2729는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받아 1% NaCl이 첨가된 Brain heart infusion (BHI) broth (Difco™, BD, USA)에 접종하여 25°C에서 16시간 진탕 배양하여 사용하였다. 녹차추출액은 Kim 등(16)에 의해 보고된 시료를 본 연구에 사용하였다.

### 항균활성 측정

녹차의 ethanol 추출물, 중성획분, 산성획분의 항균활성은 disc-diffusion assay (17)를 이용하여 측정하였다. 각각의 추출물을 membrane filter (0.45 µm)에 여과한 것을 멸균된 직경 6 mm paper disc에 3.0 mg/disc의 농도를 흡착하여 실온에서 건조시켰다. 이를 *V. parahaemolyticus*가 접종된 agar plate에 올려 24시간 동안 25°C에서 배

양하고 disc를 포함한 growth inhibition zone (mm)의 직경을 측정하였다.

### *V. parahaemolyticus*의 genomic DNA 함량측정

비브리오 패혈증의 원인균 *V. parahaemolyticus*를 1% NaCl이 첨가된 BHI broth에 접종하여 25°C에서 16시간 진탕 배양한 후, 최종적으로 5 mL배지에 세균이 각각 10<sup>7</sup> CFU/mL 정도 포함되도록 희석하고 각 추출물의 농도를 500~2,000 ppm이 되도록 첨가한 후 25°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 배양 후 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 침전된 세포를 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology Inc. Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA 5 µL씩 취하여 1% agarose gel electrophoresis를 통해 대조군과 실험군의 genomic DNA를 ethidium bromide로 염색하여 DNA band의 형광 세기를 TINA 2.0 program (BIO-Imaging Analyzer, FUJI, Japan)으로 결정하여 증식 저해율을 계산하였다(18,19).

### 녹차추출물이 처리된 *V. parahaemolyticus*의 생육양상

녹차의 각각의 추출물을 진공 농축하여 얻어진 농축물에 대하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해하고(최종 농도 0.5%이하) brine heart infusion (BHI) 배지와 marine broth (Difco™) 배지에 500~2,000 ppm이 되도록 조절 한 후 각각의 농도에 대해서 *V. parahaemolyticus* 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

즉 어류병원성세균 *V. parahaemolyticus*를 1% NaCl이 첨가된 BHI broth에 미리 진탕배양한 후 균수를 10<sup>7</sup> cfu/mL로 조정된 시료와 동량으로 96 well plate (Costar® 3595)에서 혼합 후, microplate reader (SPECTRA MAX340, USA)에 넣어 25°C에서 24시간 동안 배양하면서 15분 간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세균의 증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 최소생육억제농도의 결정

녹차추출물의 어류병원성세균에 대한 최소발육저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 broth-microdilution법에 의하여 측정하였다(20). 즉 실험세균을 18시간 배양하여 10<sup>7</sup> cfu/mL로 조정하여 시료와 동량(1:1)으로 96-well microplate에서 혼합하여 24시간 배양 후 0.2 mg/mL의 *p*-iodonitrotetrazolium violet (*p*-INT) 40 µL를 가하여 2시간 동안 반응 시킨 후 INT formazan의 생성에 의한 red color가 발생되지 않은 최소농도를 MIC로 결정하였다.