

빵 부패미생물에 대한 녹차의 항균작용

김창순[†] · 정순경* · 오유경 · 김래영

창원대학교 식품영양학과

*양산대학 식품가공제과제빵과

Antimicrobial Activity of Green Tea against Putrefactive Microorganism in Steamed Bread

Chang-Soon Kim[†], Sun-Kyung Chung*, Yu-Kyung Oh and Rae-Young Kim

Dept. of Food and Nutrition, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

*Dept. of Food Processing and Baking, Yangsan College, Yangsan 626-740, Korea

Abstract

To evaluate the antimicrobial activity of green tea against putrefactive microorganism in steamed bread, antibacterial activity of green tea extract against well-known strains of spoilage bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus pulmilus* KCTC 3348 and *Bacillus cereus* IFO 12113) and mold (*Aspergillus niger* KCCM 11239) in bread was determined using the paper disk method. The green tea extract (GTE) showed the inhibition effects on the growth of all the strains of bacteria and mold at 1, 2, 3% levels. The activity of GTE was stable in the wide range of pH (4~9) and temperature (50~200°C). When green tea powder (GTP: 1, 3, 5%) was added to steamed bread, increase of total bacterial and mold counts declined during storage at 25°C as the levels of GTP increased. By addition of 5% GTP, mold appeared 1 day late extending shelf life of steamed bread compared to control bread without GTP. Therefore, the levels of GTP added to steamed bread could be more than 5% for extended shelf life and wholesomeness of steamed bread.

Key words: green tea, steamed bread, antibacterial activity, shelf life

서 론

식품가공 산업과 외식산업의 발달이 급격히 증가함에 따라 식품위생에 대한 중요성이 증가되고 있다. 특히, 식품의 원료, 가공, 저장, 유통과정 중 부패미생물에 의한 오염으로 식중독에 걸리기 쉽다. 최근에는 식생활의 서구화로 인해 빵류를 주식대용으로 소비하는 경향이 증가하고 있다. 주식대용으로 주로 소비되고 있는 빵류는 식빵 다음으로 이스트 발효편빵을 들 수 있으며, 편빵은 오븐에 구운 빵류에 비하여 표면의 높은 수분함량으로 유통과정 중에 곰팡이나 *Bacillus* 등과 같은 미생물에 쉽게 노출되어진다. 보존료를 사용하지 않고 있는 현재 국내의 제빵산업체로서는 미생물 증식오염에 대하여 무방비 상태인 형편으로, 특히 온도와 습도가 높은 하절기의 경우 유통기간 중에 곰팡이가 발생하여 연간 3~5%가 버려지고 있다(1). 최근에는 소비자의 건강 지향적 욕구가 증대됨에 따라 식품의 보존성 연장을 위해 합성보존제보다는 천연물로부터 특정성분을 추출해 부패미생물의 생육억제와 저장성 향상에 이용하고자 하는 시도가 이루어지고 있다(2).

천연물의 항균작용에 관한 연구로는 녹차 추출물(3,4), 썩(5), 솔잎(6), 민들레(7), 마늘(8), 갓(9) 등이 있고, 지금까지 섭취해온 식품을 이용하므로 무엇보다도 안전하여 바람직한 천연 보존제로 인식되고 있다. 이러한 천연물을 식품에 이용한 연구들로는 Kim 등(5)의 썩을 첨가한 빵과 떡의 저장성 향상에 대한 연구와 Roh 등(3)의 쌀밥 부패미생물에 대한 녹차 물 추출물의 항균 활성연구가 있다.

녹차의 주성분인 탄닌은 catechin류이며, catechin은 flavonol의 유도체로 녹차에는 주로 (-)epicatechin(EC), (-)epigallocatechin(EGC), (-)epicatechin gallate(ECg), (-)epigallocatechin gallate(EGCg) 등이 함유되어 있으며, 이들은 콜레스테롤 억제작용, 항산화 작용 및 항균작용 등의 여러 가지 생리활성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(10-12). 특히 non-gallate 화합물인 (-)EC 및 (-)EGC보다 gallate가 결합된 (-)ECg와 (-)EGCg가 강한 항균작용을 가지며(6), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*과 같은 식중독균(13)과 빵이나 밥 등의 부패 원인균인 *Bacillus subtilis* 등에 항균성이 있다고 밝혀졌다(3). 그러므로 녹차는 천연 항균소재로서의 개발 가능성과 더불어

[†]Corresponding author. E-mail: cskim@changwon.ac.kr
Phone: 82-55-279-7482, Fax: 82-55-281-7480

어 기능성 식품으로서 이용가치가 더욱 증대되리라 생각된다.

본 연구에서는 부패미생물에 대한 녹차의 항균활성을 검색하고 녹차를 첨가한 찜빵의 저장 중 항균효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

녹차 추출물의 항균력 측정 실험과 녹차첨가 찜빵의 총 곰팡이수 실험에 사용된 모든 기구는 미리 dry oven에서 건열 살균하였으며, tryptic soy broth(Difco), pepton(Sigma Chem. Co., USA)과 tartaric acid(Sigma Chem. Co., USA), potato dextrose agar(Difco)를 구입하여 사용하였다. 녹차가루는 2000년 산 대작을 화개농협에서 구입하고 80 mesh로 분쇄하여 사용하였다.

녹차 추출물 제조

녹차 추출물(green tea extract : GTE)은 Wee 등(2)의 방법을 변형하여 다음과 같이 제조하였다. 녹차가루를 90°C 물로 15분간 추출한 후 원심분리(959×g)하여 여과(Whatmann No.1)한 후 동결건조하여 물 추출물을 얻었다. 이 물 추출물 100 g을 80°C의 물 1 L에 녹인 후, 동량의 chloroform으로 추출하여 카페인을 제거하고 그 수용액 층만 분리하여 ethyl acetate로 3회 추출하여 다시 이 ethyl acetate 층을 60°C에서 진공농축기(EYELA N-N series, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)로 농축하여 유기용매를 제거하고, 이 농축물에 소량의 물을 가하여 녹인 다음 동결건조시켜 분말형태의 조카테킨을 조제하였다. 이때 조카테킨의 수율은 4%였다.

공시균의 준비

빵, 과자에서 부패의 원인균으로 작용할 수 있는 세균류와 곰팡이를 배양하여 공시균주로 사용하였다. 사용된 세균류는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus pumilus* KCTC 3348, *Bacillus cereus* IFO 12113의 3종이고 곰팡이는 *Aspergillus niger* KCCM 11239를 사용하였다.

녹차 추출물의 농도별 항균효과

녹차 추출물에 대한 항균력 시험은 disc method(14)에 의해 측정하였다. 즉, 배양된 공시균액 1 mL를 petri dish에 가하고 멸균된 배지를 약 15 mL 부어 굳혀서 그 위에 다시 10 mL를 중첩하여 굳힌다. 그 위에 paper disc를 놓고 동결건조 녹차 추출물시료에 대하여 각 농도로 조제된 액을 10 µL 흡수시켜 30°C에서 48시간 배양 후 균이 증식하지 못한 clear zone의 직경을 대조군과 비교하여 항균력을 시험하였다. 곰팡이에 대해서는 굳혀진 배지에 곰팡이 균주를 도말 후 세균류와 같은 방법으로 측정하였으며 25°C에서 48시간 배양하였다. 녹차 추출물의 농도는 멸균된 증류수를 이용하여 1%, 2%, 3%로 시료를 조제하여 사용하였다.

미생물 생육저해 농도곡선

녹차 추출물에 대한 미생물 생육저해 농도곡선 측정은 turbidimetric assay(14)로 하였다. 먼저 녹차 추출물을 tryptic soy broth(TSB)에 각각 1%, 2%, 3% 농도 단위로 첨가한 후, 각 공시균주의 slant에서 배양된 균주를 1백금이를 취하여 10 mL TSB에 접종한 다음, 30°C에서 48시간 동안 배양시키면서 첨가 농도별 항균효과를 spectrophotometer(DR-20, BAUSH & LOMB, USA)를 이용하여 배양미생물의 생육 정도로 측정하였다. 측정은 배양하는 동안 8시간 간격으로 620 nm에서 흡광도를 측정하고 녹차 추출물을 넣은 TSB를 blank로 하여 비교·검토하였다.

열 및 pH 안정성 검사

제빵류는 만드는 과정에서 반죽을 하거나 발효를 하는 동안 pH가 저하되므로 녹차가 가지는 항균력은 넓은 pH 범위에서 안정성을 가져야 하며, 또한 높은 온도에서 굽거나 찌므로 100°C 이상의 높은 온도에서도 안정성을 가져야 한다. 따라서 녹차 추출물에 대한 열 안정성을 측정하기 위하여 녹차 추출물을 sand bath에서 50, 100, 150, 200°C에서 각각 30분 동안 열처리한 후 처리온도별로 3% 농도가 되도록 살균증류수로 조제한 다음, 항균력 시험 방법과 동일하게 비교 측정하였다. 또한 pH 안정성은 pH를 4, 5, 7, 9로 조정된 후 30°C에서 1시간 방치한 다음, 다시 pH 7로 중화시켜 열 안정성 시험과 같은 방법으로 생육저해현을 비교·검토하여 pH 안정성을 측정하였다.

찜빵의 제조 및 저장 중 미생물 측정

녹차 첨가 찜빵은 본 실험실에서 이미 Oh 등(15)에 의하여 개발된 찜빵 배합비 및 제조방법에 준하여 제조하였으며, 이때 찜빵의 최종 수분함량은 AACC법 44-16에 따라 측정하였다(16). 녹차 가루를 0, 1, 3, 5%(밀가루 중량 기준) 넣어 제조한 찜빵을 25°C에서 7일간 저장하면서 각 실험에 사용하였다. 총 곰팡이수 측정을 AACC method 45-50(16)에 준하여 저장일수별로 다음과 같은 방법으로 실시하였다. PDA(potato dextrose agar) 배지를 만들어서 멸균한 후, ethanol로 화염 멸균한 homogenizer에 시료 15 g을 넣고 멸균 희석수로 잘 마쇄한 다음, 10배 희석법으로 희석하여 각 원액을 배지에 0.1 mL를 넣고 도말한다. 37°C의 incubator에서 48시간 배양한 후 생성되는 집락수를 계수하였다. 총 세균수는 PCA(Plate count agar, Difco, USA) 배지를 사용하여 총 곰팡이 측정과 동일한 방법으로 하였으며, 48시간 배양 후 colony수를 측정하였다.

결과 및 고찰

녹차 추출물의 농도별 항균효과

녹차 추출물(green tea extract : GTE)의 항균력 결과를 Fig. 1에 제시하였다. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus*

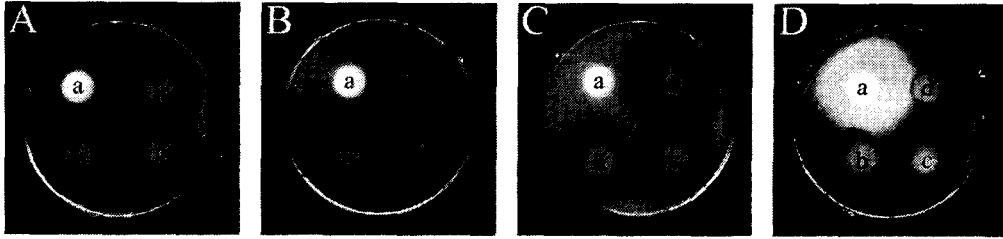


Fig. 1. Inhibitory effect of GTE on the growth of microorganisms.

A: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, B: *Bacillus pumilus* KCTC 3348, C: *Bacillus cereus* IFO 12113, D: *Aspergillus niger* KCCM 11239. a: 0%, b: 1%, c: 2%, d: 3%.

pumilus KCTC 3348, *Bacillus cereus* IFO 12113 그리고 곰팡이인 *Aspergillus niger* KCCM 11239 모두 GTE 1% 이상에서 우수한 항균력을 가지고 있는 것으로 나타났고, 세균류에 대해서는 농도에 비례하여 항균력이 증가하는 것을 알 수 있었다. 그리고 곰팡이에 대해서는 1%, 2%, 3% 모두에서 증식이 억제됨을 확인할 수 있었다.

GTE 항균력을 알아본 연구들에 의하면 GTE의 *Escherichia coli* O157:H7은 GTE 1% 농도에서 사멸하였고(13), *Bacillus subtilis* ATCC 6633은 GTE 500 ppm과 1000 ppm에서 생육이 억제되었으며(3), *Listeria monocytogenes*의 경우에는 GTE 2% 농도에서도 생균수는 감소하였으나 사멸하지는 않았고, *Staphylococcus aureus*는 GTE 1% 농도에서, *Salmonella typhimurium*은 GTE 3% 농도에서 생육저해환이 형성되었다(6).

열 및 pH 안정성 검사

GTE의 열 안정성은 Fig. 2에, pH 변화에 대한 안정성은 Fig. 3에 나타내었다. GTE의 열 안정성은 넓은 온도 범위(50

~200°C)에서 세균류로 선택된 3종류에 대하여 열을 가하지 않았을 때와 동일하게 항균력이 유지됨을 알 수 있었고, 곰팡이에 대해서도 세균류와 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

Park 등(17)은 *Escherichia coli* O157:H7은 산성조건보다는 알칼리성 조건에서 GTE에 의해 생육이 억제되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 pH 안정성의 경우, pH 사용범위(4~9)에 관계없이 실험에 사용한 3종류의 세균과 곰팡이에 대하여 동일한 크기의 환으로 항균력을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 GTE는 열 및 pH에 대하여 안정한 것으로 생각된다.

미생물 생육저해 농도곡선

GTE의 공시균주에 대한 생육억제 효과를 확인하기 위하여 측정된 생육저해 농도곡선은 Fig. 4와 같다. 세균 3종류 모두 GTE 1% 이상에서 생육이 억제되는 것으로 나타났다.

녹차가루 첨가 찰빵에서의 미생물변화

GTE의 항균력 뿐만 아니라 녹차가루(GTP)를 첨가한 찰빵에서의 미생물 변화를 알아보기 위해 GTP 0, 1, 3, 5%를

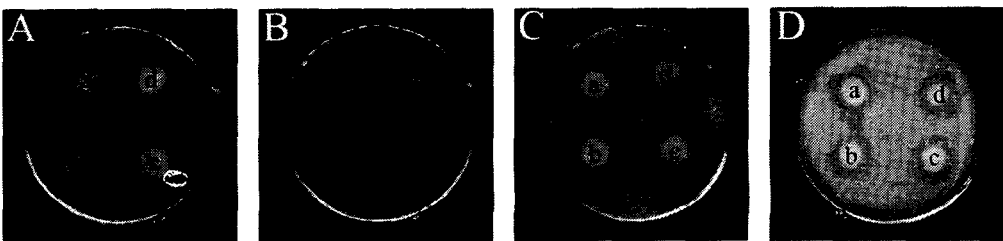


Fig. 2. Thermal stability of GTE (3%) for the growth inhibition of microorganisms.

A: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, B: *Bacillus pumilus* KCTC 3348, C: *Bacillus cereus* IFO 12113, D: *Aspergillus niger* KCCM 11239. a: 50°C, b: 100°C, c: 150°C, d: 200°C.

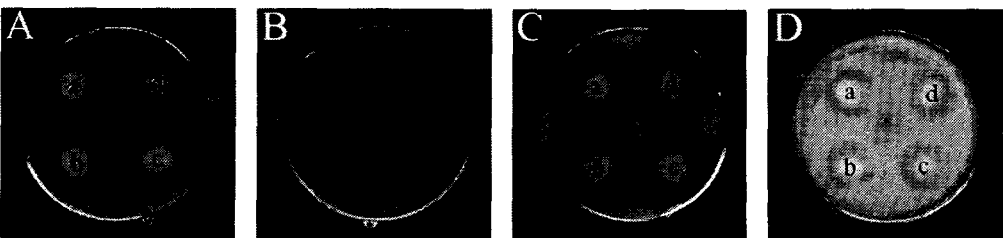


Fig. 3. pH stability of GTE (3%) for the growth inhibition of microorganisms.

A: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, B: *Bacillus pumilus* KCTC 3348, C: *Bacillus cereus* IFO 12113, D: *Aspergillus niger* KCCM 11239. a: pH 4, b: pH 5, c: pH 7, d: pH 9.

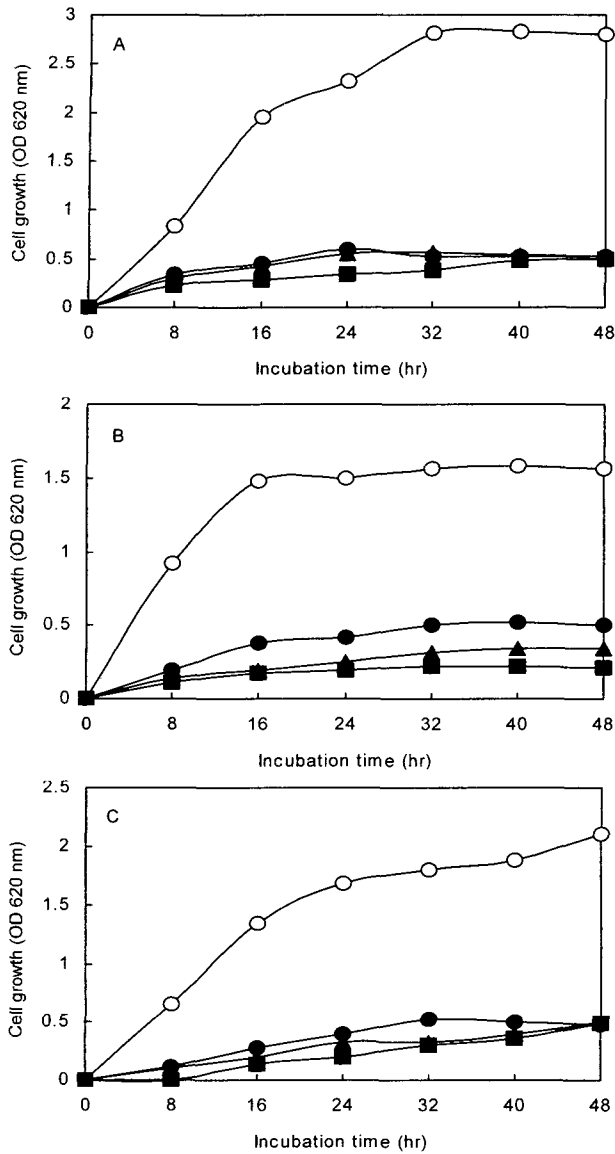


Fig. 4. Inhibitory effect of GTE on the growth of microorganisms.
 A: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, B: *Bacillus pumilus* KCTC 3348, C: *Bacillus cereus* IFO 12113.
 ○—○: 0% (Control), ●—●: 1%, ▲—▲: 2%, ■—■: 3%.

첨가하여 제조한 찜빵을 25°C에서 7일간 저장하면서 총 곰팡이수와 총 세균수의 변화를 살펴보았다. GTP 0, 1, 3, 5% 첨가한 녹차찜빵의 최종 수분함량은 40~42% 범위였으며, 저장

일수별 생성된 총 곰팡이수와 총 세균수는 3번 반복하여 평균값으로 하였고, 그 값은 Table 1과 Fig. 5에 나타내었다.

제조 후 3일부터 GTP 5%첨가균을 제외한 나머지 시료 모두에서 곰팡이가 나타나기 시작하였으며, GTP 5%첨가균은 저장 5일째부터 곰팡이가 나타나 저장 7일째는 GTP 5%첨가균이 6.90×10^5 CFU/g으로 가장 낮았다. 여기서 곰팡이균수는 앞서의 GTE 농도별 항균효과에 비교해서 GTP 첨가%별 효과가 현저하게 나타나지 않은 것 같다. 이는 GTP로부터 추출한 GTE의 수율이 4%인 것을 감안하면 찜빵에 사용된 GTP내의 실제 카테킨농도는 GTE에 비해 매우 낮은 수준이었기 때문으로 판단된다. 또한 찜빵제조에서 GTP 농도 %는 배합비에서 밀가루 대비 %이므로 실제 GTE %보다는 적은량이 첨가되었다. 따라서 찜빵에서 녹차가루의 항곰팡이 효과는 밀가루 대비 5% 이상의 첨가 수준에서 차이점을 나타내므로 그 이상의 첨가시 가능하리라고 생각된다. 대조군(GTP 0%)과 GTP 1% 첨가균은 저장 3일 이후에, GTP 3%는 5일 이후 총 세균수가 10^7 CFU/g을 넘어 부패가 진행중이었으나 GTP 5% 첨가균에서는 저장 7일 이후에 10^7 CFU/g을 나타내어 녹차가루 첨가량이 증가할수록 저장중의 찜빵의 세균수 증가폭이 감소하였다. 이는 Jung과 Cho(18)의 녹차가루 첨가 두부 침지액의 저장 기간에 따른 총 미생물수의 변화에서와 같이 GTP의 첨가량이 증가할수록 총 미생물수의 증가폭이 감소하는 것과 유사하였다.

공시균주에 대한 항균력과 찜빵의 저장 중 미생물 생육 변

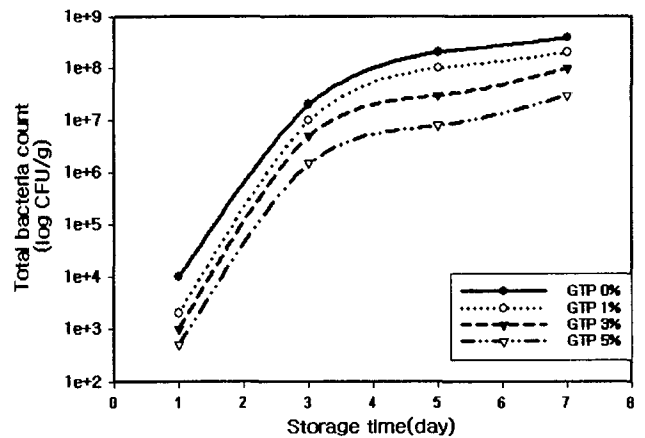


Fig. 5. Total bacteria count of steamed bread with addition of green tea powder (GTP) during 7 day incubation at 25°C.

Table 1. Total mold count of steamed bread with addition of green tea powder (GTP) during 7 day incubation at 25°C

Sample	Total mold count (CFU ¹⁾ /g)				
	0 day	1 day	3 day	5 day	7 day
Control	ND ²⁾	ND	1.03×10^6	3.53×10^6	5.95×10^6
GTP 1%	ND	ND	3.10×10^5	2.16×10^6	4.23×10^6
GTP 3%	ND	ND	2.50×10^5	5.30×10^5	1.83×10^6
GTP 5%	ND	ND	ND	3.80×10^5	6.90×10^5

¹⁾CFU: Colony forming unit.

²⁾ND: Not detective.

화를 조사한 결과 녹차에 의해서 빵을 부패시키는 세균과 곰팡이의 생육이 저해됨을 알았다. 그러므로 녹차를 첨가하여 찜빵을 제조하면 세균과 곰팡이의 생육이 억제되어 더욱 위생적인 빵을 만들 수 있으며 녹차의 첨가량에 따라 저장기간을 연장시키는 효과를 볼 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

빵 부패미생물에 대한 녹차추출물의 항균활성을 조사하고 녹차가루를 첨가한 찜빵의 저장 중 항균효과를 알아보코자 하였다. 사용된 세균 3 종류인 *Bacillus subtilis* ARCC 6633, *Bacillus pumilus* KCTC 3348, *Bacillus cereus* IFO 12113과 곰팡이 *Aspergillus niger* KCCM 11239 모두 GTE 1% 이상에서 우수한 항균력을 가지고 있으며, 생육이 억제됨을 확인하였다. GTE의 열 안정성은 넓은 온도 범위(50~200°C)에서 열을 가하지 않았을 때와 동일하게 항균력이 유지되었고, pH 사용범위(4~9)에 관계없이 동일한 환으로 항균력을 나타내었다. 녹차를 첨가한 찜빵을 25°C에 저장하면서 총 곰팡이 수와 총 세균 수를 측정한 결과 대조군, GTP 1%, 3% 첨가군 모두 저장 3일째에 곰팡이가 나타났으나 GTP 5%첨가군에서는 저장 5일째에 나타났다. 총 세균 수는 저장 3일 이후 10⁷ CFU/g을 넘어 부패가 진행 중이었으나 GTP 3%는 5일째에, GTP 5% 첨가군은 7일째에 10⁷ CFU/g을 나타냈다. 그러므로 찜빵에서의 녹차의 항균 효과에 따른 저장기간 연장은 녹차가루 첨가량 5% 이상의 수준에서 가능하리라고 추측된다.

문 헌

1. 서남석. 1998. 제빵산업의 현황과 전망. *식품기술* 11: 15-29.
2. Wee JH, Moon JH, Park KH. 1999. Catechin content and composition of domestic tea leaves at different plucking time. *Korean J Food Sci Technol* 31: 20-23.
3. Roh HJ, Shin YS, Lee KS, Shin MK. 1996. Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked rice putrefactive microorganism. *Korean J Food Sci Technol*

- 28: 66-71.
4. Cho YS, Kim HS, Kim SK, Kwon OC. 1997. Antibacterial and bactericidal activity of green tea extracts. *J Korean Tea Soc* 3: 89-103.
5. Kim SI, Kim KJ, Jung HO, Han YS. 1998. Effects of mugwort on the extention of shelf-life of bread and rice cake. *Korean J Soc Food Sci* 14: 106-113.
6. Park CS. 2000. Effects of pine needle and green tea extracts on the survival of pathogenic bacteria. *Korean J Soc Food Sci* 16: 40-46.
7. Kim KH, Min KC, Lee SH, Han YS. 1999. Isolation and identification of antimicrobial compound from dandelion. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 822-829.
8. Kumar M, Berwal JS. 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic. *Appl Bacteriol* 84: 213-215.
9. Kang SK. 1995. Isolation and antimicrobial activity of antimicrobial substance obtained from leaf-mustard. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 24: 695-701.
10. Matsumoto N, Ishigaki OF, Iwashima H, Hara Y. 1993. Reduction of blood glucose levels by tea catechin. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 525-517.
11. Yeo SG, Ahn CW, Lee YW, Lee TK, Park YH, Kim SB. 1995. Antioxidative effects of tea extracts from green tea, oolong tea, black tea. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 299-304.
12. Yeo SG, Ahn CW, Park YB, Park YH, Kim SB. 1995. Antimicrobial effects of tea extracts from green tea, oolong and black tea. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 293-298.
13. Park CS. 1998. Antibacterial activity water extract of green tea against pathogenic bacteria. *Korean J Postharvest Sci Technol* 5: 286-291.
14. Piddock LJV. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacterial. *J Appl Bacteriol* 68: 307-312.
15. Oh YK, Kim CS, Chang DJ. 2002. Optimization of steamed bread making with addition of green tea powder using response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 451-459.
16. AACC. 1983. *Approved Methods of the AACC*. 8th ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
17. Park CS, Cha MS, Kim ML. 2001. Change in the antibacterial activity of green tea extracts in various pH of culture broth against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*. *Korean J Postharvest Sci Technol* 8: 206-212.
18. Jung JY, Cho EJ. 2002. The effect of green tea powder levels on storage characteristics of tofu. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 18: 129-135.

(2002년 7월 5일 접수; 2003년 4월 10일 채택)