

보리차 저장시의 변패 및 변패미생물에 관한 연구

이민정 · 유양자 · *경규항

세종대학교 가정학과 *식품공학과

A microbiological Investigation of Barley Drink During Storage

Min Jeong Lee, Yang Ja Yoo and Kyu Hang Kyung

Department of Home Economics, *Food Science, King Sejong University

Abstract

Quality deterioration of barley drink during storage was examined by measuring viable count, titratable acidity (TA), turbidity and pH of barley drinks with or without barley particles stored at temperatures of 20, 25, 30, and 35°C. Qualitative analysis of organic acids in spoiled barley drink was also performed. TA of barley drink during storage increased to 0.009, 0.0095, 0.0097 and 0.020% at 20, 25, 30 and 35°C, respectively. TA reached the mixima between 7 and 10 days of storage and reduced from then on. pH values followed the exactly reverse trend of TA. The rate of bacterial spoilage of barley drinks was faster when it was stored at higher temperatures. The numbers of bacteria were in the range between 9.0×10^6 — 8.0×10^8 cells/ml depending on the storage temperatures and the different brands. Those samples with higher bacterial growths showed higher optical densities. Volatile organic acids such as acetic, formic, propionic, isobutyric, isovaleric acids were detected in addition to ethyl alcohol. Non-volatile organic acids such as pyruvic, lactic, oxalacetic, succinic, fumaric acids were detected. Among them, acetic and lactic acids were most important in their quantities. Five different kinds of spoilage bacteria were isolated and identified as *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Badillus cirulans*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus brevis*, all of which were found to form endospores.

I. 서 론

보리차는 우리의 식생활에 있어서 중요한 한국 특유의

음료로서 최근에는 인스턴트화한 상품까지 개발되어 시
판되고 있다. 가정에서는 보통 볶은 보리를 물에 넣고
끓인 후 상온에 저장하면서 마시는데 보리차의 소비량이
많은 하절기에는 실온에 하루만 방치하여도 보리차 원래

의 신선한 향미는 없어지고 신맛이 나면서 앙금이 생겨 탁해지고 불쾌한 냄새까지 동반되어 가식성을 잃게 된다. 이와 같은 현상은 볶는 과정 및 끓이는 과정의 열처리를 견디고 남은 포자형성 미생물의 내열성 포자가 발아하여 보리로부터 용출된 영양 물질을 이용하여 증식되기 때문인 것으로 판단된다.

본 논문에서는 보리차의 저장 온도와 관련된 산패 및 혼탁 현상을 조사하였고 이같은 변패와 관련되는 미생물을 분리하여 동정한 후 이로 인해 생성되는 유기산을 분석함으로써 변패 요인을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시 료

시중에서 판매되고 있는 국내 대표적인 식품회사(생산회사명은 생략함)의 보리차용 볶은 보리 3가지를 구입하여 사용하였다.

2. 보리차의 조제 및 변패 관찰

500 ml flask를 멸균하여 가열 살균한 후 250 ml의 수돗물과 볶은 보리 2.5 g을 넣어 전기풍로에 올려놓고 자동전압조절기(voltage regulator)로 전압을 일정하게(120 V) 조정하여 5분간 끓였다. 끓인 보리차 시료는 보리알이 들어있는 시료와 보리알을 무균적으로 제거한 시료로 나누는데, 보리알을 제거할 때에는 끓은 보리차를 실온에서 냉각시켜 보리알을 flask 바닥에 가라앉힌 후 무균실에서 미리 살균해 놓은 flask에 상등액을 따라부어 분리하였다. 이렇게 두 그룹으로 나누어 4, 20, 25, 30, 35°C에서 12일간 저장하면서 보리차의 변패 현상을 관찰하였다.

3. 부패의 지표 측정

각 온도에서 저장된 시료 보리차액 10 ml씩을 매일 취하여 phenolphthalein 용액을 지시약으로 하여 0.1 N-NaOH로 적정한 알카리의 양을 적산의 양으로 환산하여 적정산도로 표시하였고, 동시에 pH는 pH meter(동우기기)로 측정하였다. 그리고 탁도 측정은 spectrophotometer (Model 340, Sequoia-Turner, USA)를 사용하여 600 nm의 파장에서 흡광도로 측정하였으며, 생균수는 trypticase soy agar (Difco Laboratories, Detroit, MI)에 평판주거법에 의해 접종하여 30°C에서

48시간 배양한 후 나타나는 집락을 계수하여 평균하고 colony-forming unit (CFU)로 표시하였다.

4. 부패 미생물의 분리 및 동정⁴⁾

1) 세균의 형태학적 특성

세균을 순수분리하기 위해 quadrant streaking법으로 접종하여 28°C에서 72시간 동안 배양한 후 microcrometer로 크기를 측정하고 14일간 배양하면서 포자 염색¹⁾을 하여 포자형성 여부를 조사하였다.

2) 세균의 생리학적 특성

순수분리한 세균을 TSA배지에 접종하여 28°C에서 3일간 배양시켜 Gram 염색²⁾, 운동성, catalase 생성 검사, 산소의 요구성, 고온 및 저온에서의 성장 검사, Casein의 가수분해³⁾, Sodium chloride에서 성장 검사⁴⁾, Esculin의 가수분해⁴⁾, 전분의 분해성^{1,3)}, 자당에서의 다당류 생성 검사¹⁾, Yeast glucose litmus milk acid⁴⁾, Sabouraud dextrose agar에서의 성장, mannitol salt agar⁴⁾, Methyl red검사^{1,4)} 포도당으로부터 가스 생성검사^{1,4)}, Nitrate reduction 시험⁵⁾을 하였다.

Table 1. Conditions of gas chromatography analysis

Chromatography : Hewlett Packard 5790A, USA		
10% sp-1000/1% H ₃ PO ₄ S.S.column		
Detector : FID		
Detector flame : H ₂ , Air		
Conditions :		
Volatiles	Oven Temp.	150°C
	Injector Temp.	190°C
	Detector Temp.	220°C
	Carrier gas (N ₂) flow rate	50 ml/min
	RANGE 1	ATT ₂ ↑ 4
	ATTENUATION 8	CHTSP 1.0
		PD WK 0.04
		THRSH 5
Non-volatiles	Oven Temp.	110°C
	Injector Temp.	190°C
	Detector Temp.	220°C
	Carrier gas (N ₂) flow rate	86 ml/min
	RANGE 1	ATT ₂ ↑ 4
	ATTENUATION 4	CHTSP 1.0
		PD WK 0.04
		THRSH 5

5. 유기산 분석

저장중에 변패된 보리차의 유기산을 Table 1과 같은 조건에서 gas chromatography (GC)로 분석하였다. 이때 휘발성 유기산 표준물질로는 acetic, formic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric, valeric, isocaproic, caproic, heptanoic acid를 썼고, 비휘발성 유기산으로는 pyruvic, lactic, oxalic, oxalacetic, methymalonic, fumaric, malonic, succinic acid를 썼다.

II. 결과 및 고찰

1. 산도 및 pH의 변화

보리차를 상온에서 보관하면서 소비할때 가장 빨리 나타나는 품질 저하 현상중의 하나가 신맛이 나는 산패현상으로서 이는 보리차를 저장하는 동안 미생물의 작용으로 과도한 산이 생성되기 때문이다. 보리차의 산도가 0.01%정도가 되면 신맛을 느낄 수 있다⁷⁾. 보리차를 미생물이 빠른 속도로 번식할 수 없는 환경(4°C)에서 저장할 때 보리알이 제거된 상태에서는 산도의 증가없이 초기부터 0.004%에 지나지 않았고 보리알이 들어있는 상태에서는 산도가 점진적으로 증가하여 0.006%로서 신맛을 느낄 정도는 아니었다(Fig. 1). 보리알이 들어있는 시료에서 냉장 저장중에 산도가 증가하여 pH가 감소되는 현상은 묽은 보리중의 가열산화된 물질이 용액중에서 용출되어 나오며 이 물질이 산성을 띄기 때문으로 보인다.

보리차를 4, 20, 25, 30, 35°C의 각각 다른 온도에서 저장하며 산도 및 pH변화를 관찰하였을 때에도 보리알이 없는 시료에서는 산도에 뚜렷한 변화가 없이 대체적으로 0.005%이하를 나타내었으나 보리알이 들어있을 때에는 산도가 증가하고 pH가 감소하게 되며 산도는 저온에 저장한 보리차의 약 2배로 증가하여 0.009%가 되고(20~30°C) 더 높은 온도(35°C)에서는 산도가 최고 0.02%까지 상승하였다(Fig. 2).

신선한 보리차의 pH는 대체적으로 6.5~7.0에 위치하면서 냉장저장중 보리알이 들어있다 하더라도 12일 후의 pH는 5.9까지 내려갔으나 저장온도를 높여 20°C로 하였을 때에는 일주일 후에 5.7, 25°C에서 5.4, 30°C에서 5.3, 그리고 35°C에서 4.9까지 내려가서 산도 증가

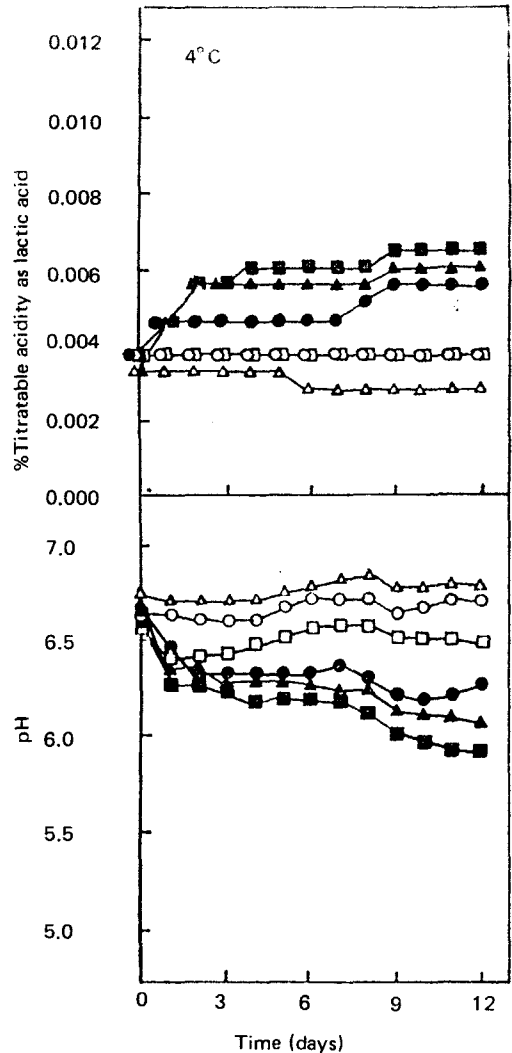


Fig. 1. Time course changes of titratable acidities and pH of barley drinks with and without barley particles incubated at 4°C. ○●; brand 1, □■; brand 2, ▲△; brand 3, open; without barley particles, closed; with barley particles.

양상과 비교할 때 서로 잘 일치되는 결과를 보여주었다. 그런데 20°C 이상에서 저장할 때 산도는 중반까지 상승하다가 중반 이후 감소하는 경향을 띄며 pH 역시 산도의 변화와 잘 일치되는 현상을 나타내 중반까지 감소하다가 중반 이후 상승하였다(Fig. 2). 이는 보리알로부터 산성 물질이 용출되어 나오는 것은 물론 미생물이 번식하면서 초기에는 발효의 결과로 생긴 유기산을 소모하고 보리성

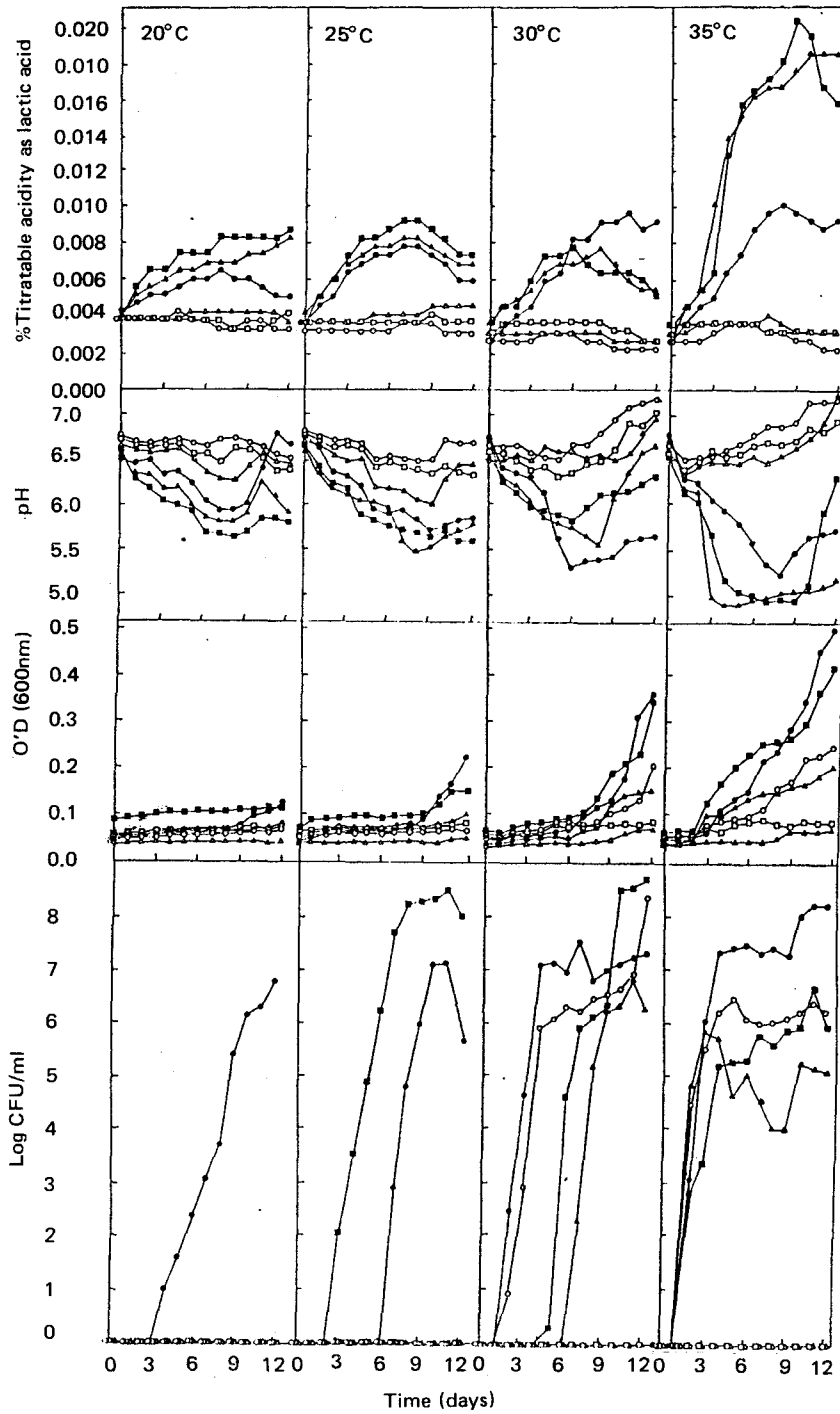


Fig. 2. Time course changes of titratable acidities, pH, optical densities, viable cell counts of barley drinks with and without barley particles incubated at *different temperatures*.
 ○● ; brand 1, □■ ; brand 2, △▲ ; brand 3, open; without barley particles, closed; with barley particles.

분을 분해시켜 알칼리성 물질을 생성시키기 때문일 수 있다. 밤이 쉰 때의 산취는 탄수화물의 분해로 생긴 butyric acid 등이라고 보고되었으며^{7,8)} 보리차가 쉰 때에도 그와 유사한 현상이 일어나리라고 생각되나 이는 분석하여 밝혀져야 할 것이다.

2. 탁도와 생균수의 변화

보리차가 변패될 때 시각적으로 가장 잘 나타나는 현상은 불투명한 부유물질이 생겨 보리차가 탁해지는 것으로서 이는 변패를 유발시키는 세균의 존재 때문일 수 있으나 한편 시간이 경과하면서 보리의 조직이 비생물적으로 분해되거나 또는 묽은 보리에서 용출되어 나온 중합체, 예를 들면 펙틴이나 단백질들이 침전되어 나타날 수도 있다. 하지만 탁도를 가장 현저하게 유발시킬 수 있는 요인은 생물학적 요인으로서 세균이 번식하고 이 세균이 식물의 조직을 분해하는 효소를 방출함으로써 보리 조직 단편들이 생기게 되고 미생물세포와 함께 이들이 부유하면서 보리차를 탁하게 하는 것이라고 본다.

보리차를 각각 다른 온도(20, 25, 30, 35°C)에 저장하는 동안 탁도가 증가함은 물론 세균수도 증가하였던 바 20°C에서는 한 시료에서 보리알이 있을 때만 5일 이후부터 부패양상이 나타나기 시작해 12일째에 9.0×10^6 cells/ml까지 번식하였고 25°C에서도 역시 보리알이 있는 두 시료에서만 $1.0 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^8$ cells/ml로 나타났었다. 30°C에서는 보리알이 있을 때에는 물론 보리알이 없을 때에도 세균의 번식이 관찰되었는데 그 숫자는 $4.0 \times 10^6 \sim 8.0 \times 10^8$ cells/ml로 나타났으며 탁도도 세균이 많이 번식한 시료에서 높게 나타난 것을 알 수 있다 (Fig. 2). 35°C에서는 더욱 많은 시료에서 미생물이 번식한 것을 관찰할 수 있는데 보리알이 없는 시료에서도 번식하기는 하였으나 주로 보리알이 들어있는 시료에서 세균의 번식이 많았음을 알 수 있다. 보리차에서 미생물의 번식과 탁도의 증가현상은 모든 시료에서 일정하게 같은 양상으로 나타나지 않고 시험을 할때마다 다른 양상을 보였는데 이는 사용한 시료에 부착되었던 미생물의 종류가 달랐음은 물론 그 숫자도 다양하기 때문에 시료에 따라 위와 같은 차이를 유발시켰을 것으로 사료된다. 보건 위생상의 이유로 법에서는 음료수 1ml당 생균수(일반세균) 100이하로 규정하고 있는데⁹⁾ 이로 볼때 20°C에서 5일간, 25°C에서 3일간, 30°C에서 1.5일간, 35°C에서 1일 동안은 두고 마실 수 있다는 것이다.

본 연구에서는 가정에서보다는 훨씬 무균적으로 시험을 했기 때문에 부패의 빈도나 정도가 가정 보리차보다는 낫다고 생각할 때 실제 가정의 보리차는 변패의 빈도 및 정도가 이 연구의 결과보다 심하다고 보아야겠다.

3. 부패세균의 성질

보리차의 변패시험중 7가지의 대표적인 부패미생물을 분리하여 이 세균의 형태학적·생리학적 성질을 검사하여 본 결과(Table 2) 3가지 세균은 같은 균종으로 밝혀져서 각각 다른 5가지의 세균이 확인되었고 이들은 모두 포자를 형성할 수 있는 세균이었다. 이 세균들의 특징으로서 그람 염색을 할 때 확실히 그람양성으로 나타난 균주(#1)가 있었는가 하면 그람 배리어블로 나타난 것들(#2, 3)과 최종적으로 한 종류로 밝혀진 5, 6과 7번은 그람 음성으로 나타났던 바 이 세균은 극단적인 그람 배리어블이었던 것으로 사료된다.

분리 세균은 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*와 세 균주가 같은 것으로 나타난 부패세균은 *Bacillus brevis*로 동정되었다.

이상의 5가지 다른 분리 세균을 살균된 보리차에 순수 배양 상태로 접종하여 배양하면서 변패양상을 관찰하면 보리차를 이용한 변패관찰 때에는 달리 탁도와 생균수와 의 비례관계가 잘 성립되고 적정산도와 pH도 미생물의 증식현상과 부합되리라고 생각된다.

4. 유기산의 정성분석

유기산의 정성분석 결과 휘발성 유기산으로는 acetic, formic, propionic, isobutyric, isovaleric acid가 검출되었고, 양적으로는 ethanol이 많이 검출되었다(Fig. 4). 휘발성 유기산 중에서는 acetic acid의 검출량이 가장 많았고 그 양은 휘발성 물질의 약 10~23%가 검출되었다. 단 다른 보고^{7,8)}에서 밤이 쉰 때 나타난 것으로 보고된 butyric acid는 검출되지 않은 점이 특이하다.

비휘발성 유기산으로는 pyruvic, lactic, oxalacetic, succinic, fumaric acid가 대표적으로 검출되었고 대체로 lactic acid와 succinic acid가 많은 양 검출되었다(Fig. 4).

위 유기산 중에서 보리차의 관능적 품질에 큰 영향을 미친 것은 그 성질로 보아 acetic acid와 ethanol의 영향이 컸던 것으로 판단된다.

Table 2. Morphological and physiological characteristics of bacterial isolates from spoiled barley drinks

Culture No.	1	2	3	4	5	6	7
Colony characteristics on TSA	Irregular cream-colored	Circular cream-colored	Circular cream-colored	Circular cream-colored	Circular cream-colored	Circular cream-colored	Circular cream-colored
Cell size (μm),	(2.0-3.0) x(0.8-1.0)	(2.5-3.0) x(0.5-0.8)	(2.5-3.0) x(0.5-1.0)	(1.5-3.0) x(0.8-1.0)	(3.0-3.5) x(1.0-1.2)	(1.5-2.0) x(1.0-1.2)	(1.5-2.0) x(1.0-1.2)
Shape	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Spore	+	+	+	+	+	+	+
Gram stain	+	±	±	-	-	-	-
Anaerobic growth	+	±	+	±	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 4°C	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 50°C	+	+	+	+	+	+	+
Casein hydrolysis	+	±	±	-	±	±	±
Starch hydrolysis	+	+	+	±	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	-	-	-
Dextran formation	+	-	-	-	-	-	-
Sabouraud Dextrose Agar	+	+	+	-	+	+	±
Yeast Glucose Litmas Milk Agar	+	+	+	+	±	±	-
Mannitol Salt Agar	+	-	-	-	-	-	-
Growth on NaCl	+	+	-	+	-	-	-
4.5%	+	+	-	+	-	-	-
7%	+	-	-	-	-	-	-
Products of action on Glucose	Acid Gas	+	+	+	+	-	-
Nitrate reduced to Nitrite	+	+	+	+	-	-	-
Methyl red test	Glucose	+	+	+	±	±	-
	Galactose	-	±	+	±	±	±
	Maltose	+	+	+	+	-	-
	Sucrose	+	+	+	±	-	-
	Lactose	-	+	±	±	-	-
	Sorbitol	-	±	-	±	-	-
	Ribose	+	+	+	+	+	+
	Raffinose	±	±	±	±	-	-
	Trehalose	+	±	±	±	-	-
	Salicin	+	+	+	±	-	-
	Mannose	+	±	±	-	-	-
	Manitol	±	+	±	±	±	±
	Identification	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. brevis</i>	

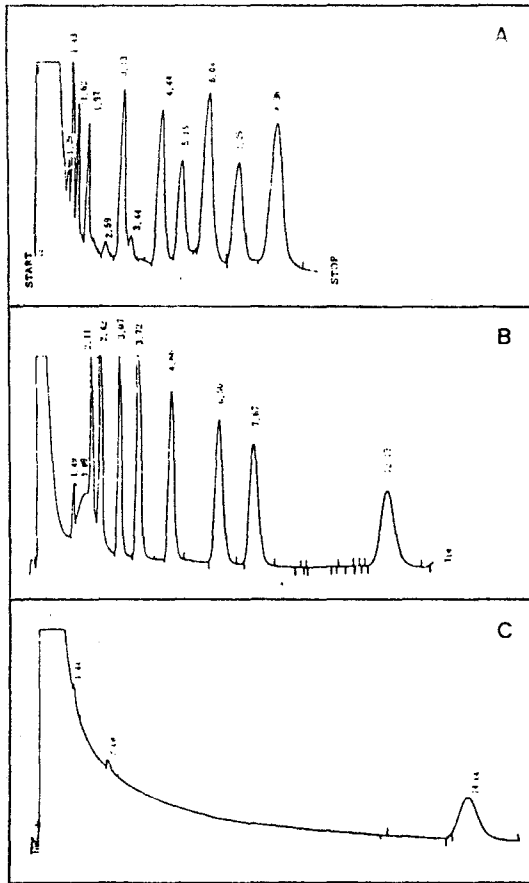


Fig. 3. Chromatograms of standard organic acids and ethanol.

A; non-volatile organic acids, B; volatile organic acids, C; ethanol.

III. 요약

냉장 온도에서 보리차를 저장하는 동안에 보리알을 그대로 둔 상태에서는 보리차의 산도가 증가되고 pH는 감소하는 경향이 뚜렷이 나타나나 보리알이 제거된 상태에서는 산도나 pH의 변동이 없어 보리차를 저장하는 동안 볶은 보리로부터 산성물질이 용출된다는 사실이 밝혀졌다. 보리차의 저장온도를 높여 20~35℃에 저장하였을 때에는 온도가 상승함에 따라 세균이 출현하는 빈도가 증가하였으며 모든 시료에서 산도가 저장 일주일 정도까지 증가하다가 그 이후 약간씩 감소하기 시작하는 때부

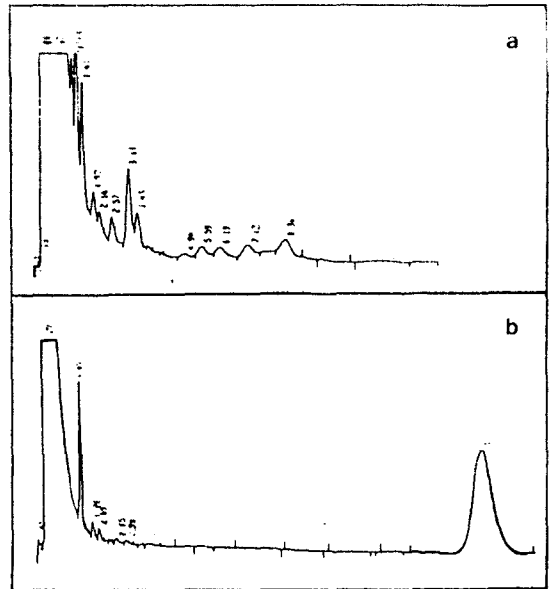


Fig. 4. Chromatograms of organic acid and ethanol of barley drinks during storage.

a; non-volatile organic acids, b; volatile organic acids and ethanol.

터 증가하기 시작하여 산도와 pH는 적절한 관계를 나타냄이 관찰되었다.

변패되어 혼탁해진 시료로부터 미생물을 분리하여 이 세균들의 형태학적 생리학적 성질을 조사하여 본 결과 분리세균 모두가 *Bacillus*속에 속하는 포자형성 세균으로 동정되어 분리된 세균은 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus brevis*이었다. 이 세균들이 보리차에 번식하게 된 원인은 이들이 내열성 포자를 만들기 때문에 보리를 볶는 과정이나 볶은 보리를 물에 넣고 끓이는 가열 과정에서도 견딜 수 있었다고 판단된다.

변패되고 있는 보리차의 유기산 분석 결과로 휘발성 유기산으로는 acetic acid가 현저히 검출되었고 유기산은 아니지만 많은 양의 ethanol이 검출되었다. 비휘발성 유기산으로는 lactic acid와 succinic acid의 검출빈도가 가장 높았고 양적으로도 많은 결과가 나타났으며 보리차의 관능적인 면에서 볼 때 변패되는 보리차는 주로 acetic acid와 ethanol이 변패취의 주요물질인 것으로 생각된다.

보리차의 보리알을 제거하고 저장하였을 때에는 보리

알을 그대로 두고 저장하였을 때보다 미생물에 의한 변패 빈도나 정도가 약하게 나타났는데 그 원인은 보리알에 부착되어 있는 미생물 포자를 보리알과 동시에 제거함은 물론 보리알로부터 용출되어 나올 영양소를 제거하였기 때문이라고 생각되나 세균수의 증감이 일률적이지 못한 점이 아직 의문으로 남는다. 그러므로 보리차를 끓인 후에는 보리알을 제거하고 될 수 있으면 20°C 이하의 낮은 온도에 저장하는 것이 미생물의 성장을 억제할 뿐 아니라 보리차의 산패 및 혼탁 방지에 유리하다고 할 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) 정동효, 주현규, 유주현, 서정훈, 미생물 실험, 유봉출판사, p. 112, 1980.
- 2) 유태중, 정동효, 조한옥, 조덕봉, 양차법, 이희무, 이종갑, 식품 미생물학실험서, 보성문화사, p. 151, 1983.
- 3) Smibert, R.M. and Krieg, N.R., General characterization in manual of methods for general bacteriology. (ed.), Gerhardt, P.R., Murray, G.E., Costillow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1981.
- 4) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD., 1974.
- 5) DIFCO Manual (10th ed.), Difco Laboratories, Detroit, MI p. 616, 1984.
- 6) Holdeman, I.V., Cato, E.P. and W.E.C. Moore, Anaerobe laboratory manual (4th ed.), Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, VI.
- 7) 홍유희, 석사학위논문, 세종대학교 대학원, 1986.
- 8) 이서래, 신호선, 최신 식품화학, 신광출판사, p. 300, 1977.
- 9) 신호선, 신광순, 정영채, 이용구, 최신식품 위생학, 신광출판사, p. 21.
- 10) 유태중, 이상건, 김두진, 식품가공학, 문운당, p. 329, 1977.