

## 탈지 녹차씨 추출물의 항효모 활성 안정성 및 산막 형성 억제능 평가

양은주 · 서예슬

(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터

### Stability of Anti-Yeast Activities and Inhibitory Effects of Defatted Green Tea Seed Extracts on Yeast Film Formation

Eun Ju Yang and Ye-Seul Seo

Food Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation

**ABSTRACT** Water and 75% ethanol extracts were prepared from defatted green tea seeds and evaluated for their anti-yeast activities. The antimicrobial activities of defatted green tea seed extracts (DGTSEs) were tested against food-spoilage bacteria, yeasts, and molds. DGTSEs exhibited antimicrobial activities with minimum inhibitory concentrations of 39~1,250 µg/mL against three bacteria, two molds, and all tested yeast strains. Ethanol extract showed higher antimicrobial activity than water extract. The stability of anti-yeast activities of DGTSEs was examined under different conditions of temperature, pH, and NaCl concentrations. The anti-yeast activities of DGTSEs were stable at pH 3~9, 0~20% NaCl, and 100°C for 30 min. However, anti-yeast activities of DGTSEs decreased upon heating at 70°C for 24 h or 121°C for 15 min. DGTSEs were applied to food models to determine their inhibitory effects on yeast film formation. Water and 75% ethanol extracts were effective in preventing yeast film formation at concentrations more than 156 and 39 µg/mL in soy sauce, 156 and 78 µg/mL in pickle sauce, and 78 and 39 µg/mL in kimchi, respectively.

**Key words:** defatted green tea seed extract, anti-yeast activity, stability, film-forming yeast, natural preservative

## 서 론

최근 식품산업의 발달과 식생활의 변화로 다양한 가공식품들이 개발되고 있으며, 식품의 제조, 가공 및 유통과정에서 미생물에 의한 부패와 변질을 제어하기 위하여 다양한 방법들이 사용되고 있다. 가열, 초고압, 방사선, 냉장 및 냉동 등 물리적 방법과 보존료를 첨가하는 화학적 방법이 사용되고 있으며(1), 특히 합성 보존료는 편의성과 비용 면에서 우수한 장점을 보유하므로 다양한 합성 보존료가 장기간 사용되어 왔다(2). 그러나 합성 보존료를 지속해서 사용할 경우 체내 축적에 따른 독성 및 발암성 등 안전성의 문제가 대두하면서 부정적인 인식이 퍼짐에 따라 소비자들이 합성 보존료가 첨가된 식품의 사용을 기피하고 있다(3). 또한, 소비자들의 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 유기농, 화학합성품 무첨가, 친환경 식품의 수요가 증가하면서 소비자의 기피를 유발하지 않으면서 식품의 저장성과 안전성을 확보할 수 있는 천연보존제의 개발이 활발히 진행되고 있다(4,5). 천연보존제 연구 분야에서 대부분의 연구가 식중독균이

나 식품 부패 세균을 제어하는 방향으로 진행됐으며, 효모를 억제할 수 있는 천연소재에 대한 연구는 미비한 실정이다(6). 그러나 효모는 와인, 우유, 과일, 주스, 음료, 베이커리 제품, 잼, 육가공식품 등 다양한 식품에서 부패를 일으키며, 식품 산업에서 상당한 경제적 손실을 초래하고 있다(7,8). *Saccharomyces cerevisiae*는 과일주스와 소프트드링크에서 부패를 유발하며, 산막효모인 *Pichia anomala*는 와인, 요구르트, 피클류 등 여러 제품에서 부패를 일으키는 것으로 보고되었다(9). *Zygosaccharomyces* 속은 꿀, 시럽, 농축 과일주스 등 고당 식품의 부패와 연관성이 높은 것으로 알려져 있다(10). *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Trichosporon* 속이 대표적인 식품 부패 효모로 알려져 있으며, 이들 효모는 당 발효를 통한 알코올 생성, 알코올 발효를 통한 산막 형성, CO<sub>2</sub> 가스 생성에 의한 용기의 파손, 이취 생성 등 식품의 품질 손상을 유발한다(11).

천연보존제 개발을 위한 항균 소재로 키토산, lysozyme, 정유, 식물추출물, 박테리옌 등이 연구되어 왔다(12). 특히 식용 가능한 식물 유래의 소재는 항균 효과뿐만 아니라 유용한 생리활성을 보유하며, 별도의 정제과정 없이 식품에 첨가할 수 있으므로 경제성과 안전성이 확보된 천연 보존 소재로서 활용 가능성이 매우 높다. 식물 유래의 소재 중 항효

모 활성에 대한 연구보고는 식물 정유 성분이 대부분이나, 정유는 용해도가 낮고 낮은 pH에서 활성이 있으며 특유의 냄새를 갖는 휘발성 물질을 함유하여 식품의 관능에 영향을 주므로 식품 산업에서 적용이 매우 제한적이다(13). 따라서 식품에 안정적으로 적용할 수 있는 항효모 활성 식물 소재는 산업적 활용도가 높을 것으로 기대된다.

본 연구팀은 전보에서 녹차씨를 항효모 활성 천연 보존 소재로 개발하기 위하여 산업적 공정에 활용 가능한 원료 전처리 조건과 추출 조건을 평가하였다(11). 본 연구에서는 탈지 녹차씨 추출물의 산업적 활용도를 평가하기 위하여 항균 스펙트럼과 온도, pH, NaCl 처리에 의한 항효모 활성의 안정성을 조사하였다. 또한, 식품 모델을 이용하여 탈지 녹차씨 추출물이 산막효모를 억제하여 식품에서 산막 형성을 저해할 수 있는지 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 녹차씨는 경남 하동군에서 2015년 11월에 수확한 것을 건조하지 않은 상태로 (주)청인(Suncheon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 구입한 녹차씨는 물로 세척한 후 50°C 건조기(JSOF-250T, JS Research Inc., Gongju, Korea)에서 16시간 건조하였다. 건조 녹차씨는 롤 밀 분쇄기(DK-260S, Garyeo Industry Co., Ltd., Siheung, Korea)에서 3회 반복 분쇄하였다. 분쇄된 녹차씨 2 kg을 100°C에서 15분간 볶음 처리한 후 착유기(리베로 두발 윈터치, Poongjin Food Machine Co., Busan, Korea)에서 650 kgf/cm<sup>2</sup>의 압력으로 30분간 압착하여 오일이 제거된 탈지 녹차씨를 추출 원료로 사용하였다.

### 탈지 녹차씨 추출물 제조

물 추출은 탈지 녹차씨 분말 100 g에 15배의 증류수를 가하여 50°C에서 4시간 동안 추출하였다. 에탄올 추출은 탈지 녹차씨 분말 100 g에 15배의 75% 에탄올을 가하여 70°C에서 4시간 동안 추출한 후 감압 농축기를 이용하여 용매를 휘발시켰다. 각각의 추출액은 55 µm bag filter로 여과한 후 동결 건조(PVTFD 10R, IlShin Lab Co., Ltd., Dongducheon, Korea)하여 항효모 활성 평가 시료로 사용하였다.

### 항균 스펙트럼 측정

탈지 녹차씨 추출물의 항균 스펙트럼은 세균, 효모, 곰팡이 지시균주에 대한 항균 활성을 측정하여 평가하였다. 그람 양성균으로 *Bacillus cereus* KCCM 11204, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* KCTC 40307, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621을, 그람 음성균으로 *Escherichia coli* KCTC 12119, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 사용하였다. 효모 지시균으로

*Pichia membranifaciens* ATCC 22687, *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 14680, *Candida albicans* ATCC 11006, *Candida krusei* ATCC 32196, *Kluyveromyces fragilis* KCTC 7156을, 곰팡이 지시균으로 *Aspergillus flavus* ATCC 9643, *Aspergillus niger* ATCC 9029, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, *Cladosporium cladosporioides* KCCM 32317을 사용하였다. 세균의 배양은 *E. faecalis*와 *L. monocytogenes*는 BHI broth(Brain Heart Infusion broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에서, 나머지 세균은 LB broth(Luria-Bertani broth, Becton, Dickinson and Company)에서 37°C, 16시간 배양하여 실험에 사용하였다. 효모는 YM broth(Yeast Mold broth, Becton, Dickinson and Company), 30°C 조건에서 *Candida* 속은 24시간, 나머지 균주는 48시간 배양하여 실험에 사용하였다. 곰팡이는 PDA 배지(Potato Dextrose Agar, Becton, Dickinson and Company)에서 30°C, 7일 동안 배양하여 형성된 포자를 0.1% Tween 80으로 회수하여 포자액을 제조한 후 실험에 사용하였다.

항균 활성은 액체배지 희석법을 이용하여 지시균에 대한 최소생육억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)를 결정하였다. 96-well plate에 각 지시균의 배지를 100 µL씩 분주한 후 물 또는 75% 에탄올 추출물 100 µL를 최대 5,000 µg/mL에서 최저 농도 9.8 µg/mL까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. 지시균은 1×10<sup>6</sup> CFU/mL가 되도록 각각의 well에 100 µL의 균주액 또는 곰팡이 포자액을 첨가하여 각 지시균의 배양조건으로 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 증가가 나타나지 않는 최소 농도를 확인하였다.

### 항효모 활성 안정성 평가

탈지 녹차씨 추출물의 온도, pH, NaCl 처리에 대한 항효모 활성의 안정성을 조사하였다. 온도에 대한 영향을 알아보기 위하여 각 추출물을 멸균수에 2% 농도로 용해한 후 -20°C, 4°C, 30°C, 50°C, 70°C에서 24시간, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분 동안 처리하였다. pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 물 또는 75% 에탄올 추출물을 pH 3.0(50 mM glycine-HCl), pH 4.0(50 mM sodium acetate), pH 5.0(50 mM sodium acetate), pH 7.0(50 mM sodium phosphate), pH 9.0(50 mM glycine-NaOH) 완충액에 2% 농도로 용해해 37°C에서 2시간 동안 처리하였다. NaCl에 대한 영향을 알아보기 위하여 5%, 10%, 15%, 20% NaCl 용액에 각 추출물을 2% 농도로 용해해 37°C에서 2시간 동안 처리하였다. 탈지 녹차씨 추출물을 pH, 온도, NaCl에 조건별로 처리한 후 *P. membranifaciens*, *Z. rouxii*, *C. albicans* 지시균에 대한 MIC를 항균 스펙트럼 실험과 동일한 방법으로 측정하였다. 항효모 활성 평가에서 각 추출물이 용해되지 않은 완충액 및 NaCl 용액을 대조군으로 사용하였다.

**식품 모델에서 산막 형성 억제능 평가**

식품에서 탈지 녹차씨 추출물의 산막 형성 억제능을 평가하기 위하여 간장, 장아찌 소스, 김치를 식품 모델로 이용하여 실험을 하였다. 실험에 사용한 간장과 장아찌 소스는 보존제가 첨가되지 않은 제품을 전남 순천시에 소재한 매일식품(주)으로부터 제공받아 사용하였다. 간장과 장아찌 소스에서 산막 형성 억제 실험을 위하여 48-well plate에 멸균수를 0.5 mL씩 분주한 후 물 또는 75% 에탄올 추출물을 2배씩 연속적으로 희석하였다. 간장 또는 장아찌 소스에 산막효모인 *P. membranifaciens*를  $2 \times 10^6$  CFU/mL로 첨가한 후 탈지 녹차씨 추출물이 농도별로 첨가된 각 well에 0.5 mL씩 분주하고 30°C에 7일 동안 저장하면서 효모에 의한 산막 형성을 관찰하였다. 식품 모델로 실험에 사용한 김치는 보존료가 첨가되지 않은 가정 제조 김치로서 4°C에서 30일 발효된 김치를 사용하였다. 이때 김치의 pH는 4.5, 염도는 1.9%를 나타내었다. 김치를 1×1 cm 크기로 절단한 후 *P. membranifaciens*를  $1 \times 10^6$  CFU/g으로 첨가하여 잘 혼합하였다. 24-well plate에 효모가 첨가된 김치를 2 g씩 분주한 후 멸균수에 희석된 탈지 녹차씨 추출물 0.1 mL를 첨가하여 잘 혼합하고 30°C에 7일 동안 저장하면서 김치 표면의 산막 형성 여부를 관찰하였다. 상기의 방법에서 탈지 녹차씨 추출물을 첨가하지 않은 식품을 대조군으로 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**탈지 녹차씨 추출물의 항균 스펙트럼**

식중독 균주 및 식품 부패균에 대한 탈지 녹차씨 추출물의 항균 활성을 평가하여 항균 스펙트럼을 조사하였다. 세균 7종, 효모 5종, 곰팡이 4종에 대한 탈지 녹차씨의 물 추출물

과 75% 에탄올 추출물의 최소생육억제농도(MIC)를 측정하여 Table 1에 나타내었다. 추출 용매와 상관없이 생육억제 효과를 나타낸 미생물의 종류는 동일하였다. 세균에 대해서는 그람 양성균 중 *S. aureus*, 그람 음성균 중 *S. enterica* subsp. *enterica*, *P. aeruginosa*, 곰팡이는 지시균 중 *P. roqueforti*, *C. cladosporioides*에 대한 억제 효과를 나타내었다. 효모에 대해서는 지시균 5종을 모두 억제하는 것으로 나타나 항효모 활성이 우수함을 확인하였다. Yoon 등(14)의 연구에서 녹차씨 물 추출물과 70% 에탄올 추출물의 항균 활성 스펙트럼을 조사한 결과, 그람 양성균인 *Micrococcus luteus*, *Enterococcus hirae*, 그람 음성균인 *Salmonella* Typhimurium, 곰팡이인 *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, 효모인 *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*에 대한 억제 효과를 나타내었다. 이들의 연구에서 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대한 억제 효과는 나타나지 않아 본 연구와 상이한 결과를 나타내었으나, 이는 실험 방법 및 각 지시균 strain의 감수성의 차이로 생각된다.

녹차씨는 사포닌 함량이 많은 것으로 알려져 있으며, 녹차씨 사포닌의 gastroprotective effect(15), hyaluronidase inhibitory activity(16), 항암 활성(17), 항균 활성(17,18) 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다. Joshi 등(17)은 녹차씨에서 분리한 4종의 사포닌이 세균, 효모, 곰팡이에 대한 항균 활성을 나타냄을 보고하였으며, 항세균보다 항진균 활성이 더 우수하였다. Tomita 등(18)은 녹차씨에서 분리한 theasaponin E<sub>1</sub>이 효모의 내염성을 손상해 항효모 활성을 나타냄을 보고하였다. 본 연구에서 항균 활성을 나타내는 탈지 녹차씨 추출물의 주요 항균 물질도 사포닌 성분일 가능성이 높으며, 75% 에탄올 추출물이 물 추출물보다 좀 더 우수한 활성을 나타내는 결과는 사포닌 성분의 추출 수율

**Table 1.** Antimicrobial activity of defatted green tea seed extract against food spoilage microorganisms

Microorganism	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)		
	WE <sup>1)</sup>	EE <sup>2)</sup>	
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus cereus</i> KCCM 11204	— <sup>3)</sup>	—
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	—	—
	<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 40307	—	—
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	625	78
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> KCTC 12119	—	—
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 19430	1,250	625
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	78	39
Yeast	<i>Pichia membranifaciens</i> ATCC 22687	313	156
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> ATCC 14680	625	313
	<i>Candida albicans</i> ATCC 11006	625	313
	<i>Candida krusei</i> ATCC 32196	625	625
	<i>Kluyveromyces fragilis</i> KCTC 7156	625	313
Mold	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9643	—	—
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9029	—	—
	<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	625	313
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> KCCM 32317	156	78

<sup>1)</sup>WE: water extract. <sup>2)</sup>EE: 75% ethanol extract. <sup>3)</sup>No inhibition. Values are expressed as the mean (n=3).

차이에 따른 영향일 것으로 생각된다.

합성제품을 대체하여 인체에 안전한 천연보존제 및 향균제를 개발하기 위해 다양한 천연소재들의 향균 활성이 연구되고 있으나 향균 활성 범위는 대부분 세균에 집중되어 있다. 상산나무 잎 추출물의 세균, 효모, 곰팡이에 대한 항미생물 활성을 측정된 결과 메탄올과 70% 에탄올 추출물은 일부 세균만 억제하는 것으로 나타났다(19). 대나무 줄기와 잎의 에탄올 추출물의 세균과 효모에 대한 향균 활성을 측정된 결과 5% 농도에서 그람 양성균에 대한 향균 활성은 우수하였으나, 효모에 대한 억제 효과는 나타나지 않았다(20). 현재까지 식품부패 효모를 저해할 수 있는 천연소재는 극히 미비하므로 항효모 활성이 우수한 탈지 녹차씨 추출물은 효모의 부패가 문제시되는 식품군에서 천연보존제로 활용 가치가 높으며, 항세균 활성이 우수한 천연소재와의 조합을 통하여 다양한 미생물을 억제할 수 있는 보존제로 개발될 수 있다.

### 온도, pH 및 NaCl 안정성

가공식품은 제조 공정에서 대부분 열처리와 pH 조정 과정을 거치게 되며, 장류나 조미식품의 경우 고농도의 소금을 함유하고 있다. 천연보존제 개발 단계에서 우수한 향균 활성을 나타낸 천연소재라 할지라도 실제 식품에 첨가할 경우 가공 공정에 따라 고온에서 향균 물질의 분해, pH 변화에 따른 향균 활성의 저하, 고농도의 염에서 향균 물질 구조 및 활성의 변화 등이 발생할 수 있다. 탈지 녹차씨 추출물의 산업적 활용 가능성을 검토하기 위하여 항효모 활성에 대한 온도, pH 및 NaCl의 영향을 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 탈지 녹차씨의 물 추출물과 75% 에탄올 추출물을

다양한 온도 및 시간에서 처리한 후 효모 지시균에 대한 MIC를 측정된 결과 물 추출물과 75% 에탄올 추출물 모두 -20°C, 4°C, 30°C, 50°C에서 24시간, 100°C에서 30분 동안 처리한 경우 항효모 활성에 영향이 없었다. 70°C에서 24시간 및 121°C에서 15분 동안 처리한 경우 항효모 활성이 2배 정도 감소하는 결과를 나타내었으나 항효모 활성이 실활되지는 않았다. 고온 처리에서 탈지 녹차씨 추출물의 항효모 활성 감소 결과는 전보(11)에서 물을 용매로 한 추출온도 평가를 통하여 90°C 추출에서 항효모 활성이 감소한 결과와 일치한다. Yoon 등(14)의 연구에서도 녹차씨 물 추출물의 열 안정성 조사를 통하여 80°C 이상의 열처리에서 향균 활성이 감소하는 결과를 나타내었으나, 121°C에서 15분 열처리에도 향균 활성 잔존율이 78~85%를 유지하여 열에 비교적 안정한 것으로 보고하였다. Ha 등(21)은 매실박 메탄올 추출물의 열 안정성을 조사한 결과 100°C에서 30분 동안의 열처리에서도 향균력의 변화가 거의 없음을 보고하였으며, Koh(22)는 삼백초 에탄올 추출물의 열 안정성을 조사한 결과 100°C에서 1시간 동안 열처리한 후에도 대조군과 유사한 향균 활성을 나타내어 열에 매우 안정한 것으로 평가되었다. 본 연구에서 탈지 녹차씨 추출물은 다양한 온도에서 비교적 안정하며, 100°C에서 30분 동안의 열처리에도 항효모 활성이 유지되므로 식품의 제조 공정에서 열처리 후에도 보존 활성에 영향이 없을 것으로 생각된다.

탈지 녹차씨 물 추출물과 75% 에탄올 추출물의 항효모 활성에 대한 pH 안정성을 조사하기 위하여 pH 3, 4, 5, 7, 9에서 각 추출물을 처리한 후 효모 지시균에 대한 MIC를 측정하였다. 실험 결과 모든 pH 처리군에서 항효모 활성이 대조군과 동일하게 유지되어 pH 안정성이 우수한 것으로

**Table 2.** Effect of temperature, pH, and NaCl treatment on anti-yeast activity of defatted green tea seed extract

Treatment	Minimum inhibitory concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	<i>P. membranifaciens</i>		<i>Z. rouxii</i>		<i>C. albicans</i>		
	WE <sup>1)</sup>	EE <sup>2)</sup>	WE	EE	WE	EE	
Temperature	-20°C, 24 h	313	156	625	313	625	313
	4°C, 24 h	313	156	625	313	625	313
	30°C, 24 h	313	156	625	313	625	313
	50°C, 24 h	313	156	625	313	625	313
	70°C, 24 h	313	313	1,250	625	1,250	625
	100°C, 30 min	313	156	625	313	625	313
	121°C, 15 min	625	313	1,250	625	1,250	625
pH	3	313	156	625	313	625	313
	4	313	156	625	313	625	313
	5	313	156	625	313	625	313
	7	313	156	625	313	625	313
	9	313	156	625	313	625	313
NaCl	0%	313	156	625	313	625	313
	5%	313	156	625	313	625	313
	10%	313	156	625	313	625	313
	15%	313	156	625	313	625	313
	20%	313	156	625	313	625	313

<sup>1)</sup>WT: water extract. <sup>2)</sup>ET: 75% ethanol extract.  
Values are expressed as the mean (n=3).

평가되었다. 항균 활성 식물추출물의 pH 안정성을 조사한 보고 중 삼백초 에탄올 추출물이 pH 3~11에서 지시균인 *B. cereus*와 *E. coli*에 대한 항균 활성이 유지되어 pH에 안정한 결과를 나타내었다(22). 반면 감초 에탄올 추출물의 pH 안정성을 조사한 결과 pH 3~7에서는 안정하였으나, pH 9의 알칼리 조건에서는 항균 활성이 감소하였다(23). Lee 등(24)은 마늘 추출물의 pH에 따른 항균 활성을 측정된 결과 pH 4~7에서는 항균력이 동일하였으나, pH 8 이상부터 지시균에 따라 활성이 감소하거나 나타나지 않았으며, 이러한 결과는 항균물질인 allicin이 알칼리 상태에서 불안정하기 때문으로 보고하였다. 식물유래 추출물의 항균 활성에 대한 pH의 영향은 항균 물질의 종류 및 구조에 따라 다양한 결과를 나타내는 것으로 생각된다.

다양한 NaCl 농도에 탈지 녹차씨 추출물을 처리하여 항효모 활성에 대한 NaCl의 영향을 평가하였다. 물과 75% 에탄올 추출물을 각각 5, 10, 15, 20%의 NaCl 농도에서 처리한 후 효모 지시균에 대한 MIC를 측정된 결과 NaCl 무처리군과 동일한 활성을 나타내어 고농도의 염에서도 매우 안정한 것으로 확인되었다. 식물유래 추출물의 항균 활성에 대한 안정성은 주로 열과 pH 처리에 대한 영향을 일반적으로 평가하고 있으나, NaCl에 대한 영향을 평가한 연구는 극히 드물다. Yoon과 Choi(25)는 *Listeria monocytogenes*에 대한 우수한 생육저해 효과를 나타낸 보골지와 고삼 추출물의 열(60, 80, 100°C), NaCl(2, 4, 6%) 및 산(pH 4, 5, 6, 7)에 대한 안정성을 평가하였으며, 모든 평가 항목에서 항균 활성이 유지되어 안정성이 우수함을 보고하였다. 가공식품의 염도는 제품의 유형에 따라 매우 다양하며 발효식품이나 조미식품의 경우 20%에 가까운 염도를 나타내는 식품이 있다. 고염 식품에서 부패를 일으키는 미생물은 세균이나 곰팡이보다는 내삼투압성 효모가 문제시되며, *Z. rouxii* 효모가 대표적이다(26). 본 연구에서 탈지 녹차씨 추출물은 20% NaCl 농도에서도 항효모 활성이 유지되므로 고염 식품에서 부패 효모를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 탈지 녹차씨 물 추출물과 75% 에탄올 추출물의 항효모 활성은 고온처리에도 비교적 안정하며 pH와 NaCl에 대한 안정성이 매우 우수하였다. 이러한 특성은 탈

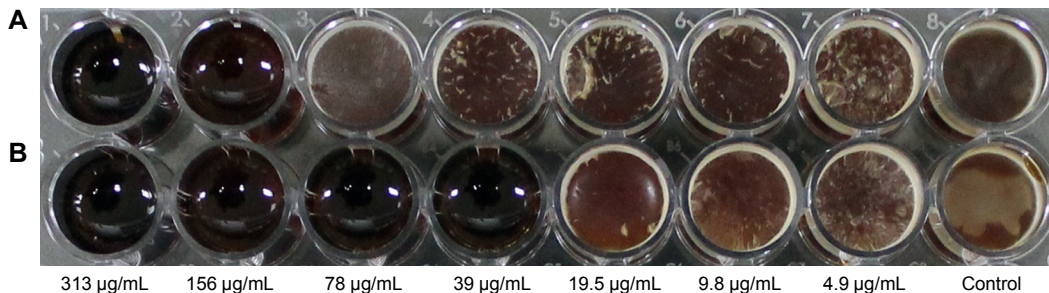
지 녹차씨 추출물이 산업적 공정에 대한 내구성이 우수함을 나타내며, 식품 보존제로 사용될 경우 식품의 유형이나 제조 공정에 상관없이 항효모 활성이 안정적으로 유지될 수 있을 것으로 추정된다.

**식품 모델에서 산막 형성 억제능 평가**

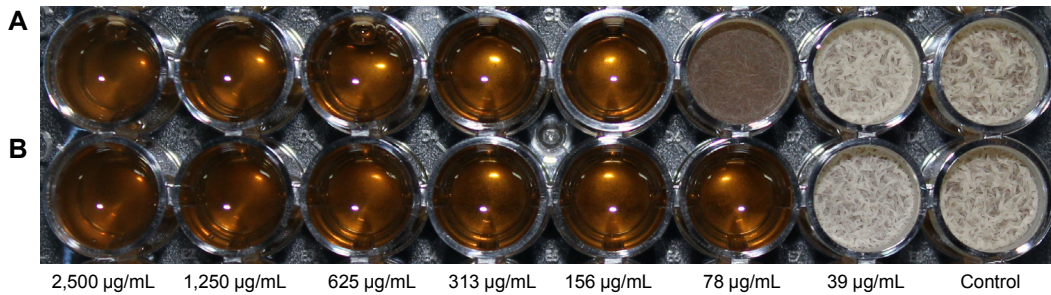
효모는 음료 제품, 소스류, 잼, 유제품, 피클류, 육가공식품뿐만 아니라 발효식품인 장류, 와인, 치즈, 김치 등 다양한 식품에서 부패를 일으키고 있다(27-29). 식품에서 효모의 부패는 알코올과 가스 생성, 변색 및 이미와 이취의 발생을 유발하며, 산막효모의 경우 식품의 표면에 산막을 형성하여 식품의 품질을 저하하는 현상을 나타낸다(30). 최근 화학보존제에 대한 안전성 문제가 대두하면서 천연보존제의 개발을 위해 다양한 천연소재가 후보 물질로 검토되고 있으며 식품에 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 천연 항균 소재의 경우 항균 활성이 약하거나 항균 스펙트럼이 좁거나 특유의 맛과 냄새로 관능적 문제가 발생하여 실제 상품화된 제품은 드문 실정이다(31). 또한, 실제 식품에 적용 시 항균물질의 활성 부위가 다양한 식품 성분과 반응하거나 가공처리 중 활성이 저하될 수 있으므로 *in vitro* 상의 항균 활성과 다른 결과를 나타낼 수 있다(32). 본 연구에서는 탈지 녹차씨 추출물의 산업적 활용도를 평가하기 위하여 식품을 이용한 모델 시스템에서 탈지 녹차씨 추출물이 산막 효모인 *P. membranifaciens*가 생성하는 산막을 억제할 수 있는지 평가하였다.

*P. membranifaciens*가 첨가된 간장에 탈지 녹차씨 물 추출물과 75% 에탄올 추출물을 4.9~313 µg/mL 범위에서 각각 농도별로 첨가한 후 효모 생육 온도인 30°C에 저장하면서 효모에 의한 산막 형성 여부를 관찰하였다. 저장 2일째부터 간장 표면에 막이 조금씩 형성되기 시작하여 저장 6일째에 Fig. 1의 결과와 같이 대조구와 일부 시험구에서 산막이 뚜렷하게 형성되었다. 그러나 물 추출물 156 µg/mL 이상, 75% 에탄올 추출물 39 µg/mL 이상의 추출물을 첨가한 간장에서는 산막 형성이 억제되었다. 산막 형성 억제능은 *in vitro* 실험과 동일하게 75% 에탄올 추출물의 억제 활성이 더 우수하였다.

*P. membranifaciens*가 첨가된 장아찌 소스에서 탈지 녹



**Fig. 1.** Effect of defatted green tea seed extract on film-forming of *Pichia membranifaciens* in soy sauce after 6 days at 30°C. A, water extract; B, 75% ethanol extract.



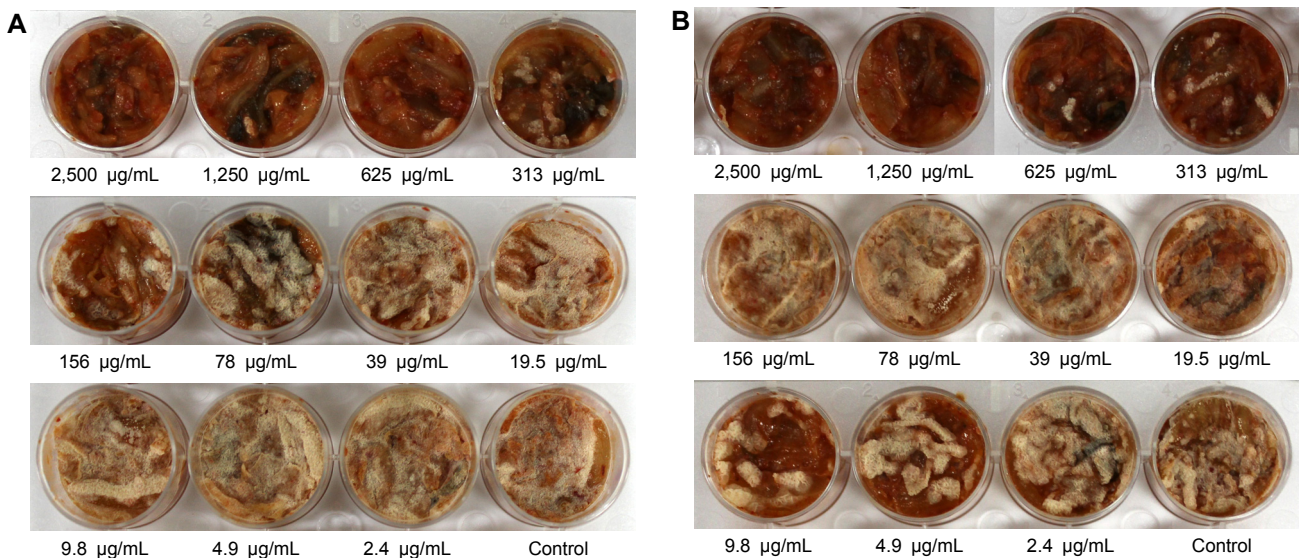
**Fig. 2.** Effect of defatted green tea seed extract on film-forming of *Pichia membranifaciens* in pickle sauce after 2 days at 30°C. A, water extract; B, 75% ethanol extract.

차씨 추출물에 의한 산막 형성 억제 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 39~2,500 µg/mL 범위에서 물과 75% 에탄올 추출물을 각각 농도별로 첨가하여 30°C에 저장하면서 산막 형성 여부를 관찰한 결과 저장 2일째에 뚜렷한 산막이 형성되었으며, 물 추출물은 156 µg/mL, 75% 에탄올 추출물은 78 µg/mL 이상의 농도에서 산막 형성이 억제되었다. 장아찌 소스의 경우 간장보다 산막 형성이 빨리 진행되었으며, 산막의 형태도 희고 두껍게 형성되어 각 식품의 성분 및 이화학적 특성에 따라 산막효모에 의한 부패 진행이 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

김치에서 산막효모는 김치 발효 말기에 검출되며, 김치 표면에 흰 반점에서 더 나아가 흰 피막이 형성되고 이때 김치 연부현상과 이취가 동시에 생성된다(33). 김치에서 산막효모의 검출은 김치의 상품가치를 크게 손상하며, 수출물량에서 검출 시 전량 반품으로 이어지는 큰 문제를 야기한다(34). 본 연구에서 *P. membranifaciens*가 첨가된 김치에 탈지 녹차씨 추출물을 농도별로 처리한 후 30°C에서 저장하면서 김치 표면에 발생하는 산막의 형성이 억제되는지 관찰하였다(Fig. 3). 대조구는 저장 1일째에 김치 표면에 흰 반점

이 나타나기 시작하여 저장 2일째에 흰 피막이 뚜렷이 형성되었다. 물 추출물을 첨가한 경우 39 µg/mL 농도까지는 대조구와 유사하게 김치의 전체 표면에 흰 피막이 형성되었으나, 78 µg/mL 이상부터 농도 비례적으로 흰 피막이 감소하기 시작하여 625 µg/mL 이상의 농도에서는 효모에 의한 산막의 발생이 상당히 억제되었다. 75% 에탄올 추출물을 첨가한 경우에도 농도 의존적으로 산막 형성이 억제되는 경향을 나타내었으나, 산막 발생이 억제되는 농도가 39 µg/mL 이상부터 관찰되어 물 추출물에 비해 억제 활성이 좀더 우수한 것으로 확인되었다.

항효모 활성을 나타내는 천연 보존 소재에 대한 *in vitro* 연구 보고는 다수 있으나 실제 식품 모델에서 항효모 활성을 검증한 보고는 소수에 불과하다. Monu 등(35)은 셀러드드레싱을 식품 모델로 하여 식물 정유의 성분 중 *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, thymol에 의한 *Schizosaccharomyces pombe*와 *Zygosaccharomyces bailii* 효모의 생육 억제 활성을 측정한 결과 *trans*-cinnamaldehyde의 항효모 활성이 가장 우수하였음을 보고하였다. 그러나 *in vitro* 평가에서 나타난 항효모 활성보다 식품 모델에서



**Fig. 3.** Effect of defatted green tea seed extract on film-forming of *Pichia membranifaciens* in kimchi after 2 days at 30°C. A, water extract; B, 75% ethanol extract.

효모 저해 활성이 상당히 감소하였으며, 이는 모델 식품인 셀러드드레싱에 함유된 지방과 전분이 정유의 항균 활성을 방해하는 원인이라고 보고하였다. Hung과 Kyung(36)은 식품 모델 시스템으로 오이 피클을 이용하여 마늘 유래 물질의 산막 형성 저해 효과를 측정한 결과 무첨가군은 발효 3일째에 산막이 형성되었으나, 열처리 마늘 추출물은 0.5% 첨가군에서 발효 5일째 산막이 형성되었으며 2% 첨가군은 산막 형성이 20일까지 지연되는 효과를 나타내었다. Sarnoski 등(6)은 사과 주스 배지에서 땅콩 껍질 추출물에 의한 *Saccharomyces cerevisiae* 효모의 생육 억제 효과를 보고하였으며, 4 mg/mL 첨가군에서는 16.6%, 10 mg/mL 첨가군에서는 57%의 저해 효과를 나타내었으나 식품에 적용하기에는 추출물의 농도가 지나치게 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서는 탈지 녹차씨 추출물이 *in vitro* 평가에서 156~625 µg/mL 범위의 농도에서 효모의 생육을 억제하였으며, 식품 모델에서는 *in vitro* 평가보다 낮은 농도에서도 산막 형성 억제능을 나타내어 가공식품의 보존제로서 산업적으로 적용하기에 가능한 농도 범위를 나타내었다. 현재까지 항효모 활성 천연소재로서 가장 많은 연구가 이루어진 소재는 식물 정유이며, mentha oil은 효모 지시균에 따라 0.28~2.25 mg/mL의 범위에서 MIC를 나타내었고(8), eucalyptus oil은 효모 지시균에 따라 0.56~4.5 mg/mL의 범위에서 MIC를 나타내었다(37). 그러나 식물 정유는 실제 식품에서 pH, 식품 성분(단백질, 지방, 양이온), 수분 활성도 및 다른 성분들에 의해 항균 활성이 방해받을 것으로 알려져 있다(35). 본 연구에서 탈지 녹차씨 추출물은 간장, 장아찌 소스, 김치를 이용한 식품 모델에서 *in vitro* 항효모 활성과 큰 차이를 보이지 않아 이들 식품과 유사한 유형의 가공식품에서 탈지 녹차씨 추출물은 부패성 효모를 억제할 수 있는 천연 보존제로써 활용이 가능할 것으로 평가된다. 후속 실험으로 다양한 식품 유형에 대한 적용 실험을 통하여 탈지 녹차씨 추출물의 활용 범위는 확장이 가능할 것으로 기대된다.

**요 약**

탈지 녹차씨 추출물을 식품에 적용할 수 있는 보존 소재로 개발하기 위해 물 또는 75% 에탄올 추출물을 이용하여 항효모 활성을 평가하였다. 탈지 녹차씨 추출물의 항균 스펙트럼을 조사한 결과 세균과 곰팡이에서는 일부 지시균을 저해했지만, 효모 지시균 5종에 대해서는 모두 생육 저해 활성을 나타내어 항효모 활성이 우수함을 확인하였다. 추출 용매에 따른 활성은 75% 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 2배 정도 활성이 우수하였다. 탈지 녹차씨 추출물의 온도, pH, NaCl 처리에 대한 항효모 활성 안정성을 평가한 결과, 물과 75% 에탄올 추출물 모두 pH 3~9와 0~20% NaCl 처리에 안정하였으며, 온도에 대한 영향은 70°C, 24시간 및 121°C, 15분 처리에 항효모 활성이 2배 정도 감소하였으나 다른 온도 처리에는 모두 안정하였다. 산막효모인 *P. membrani-*

*faciens*가 첨가된 식품 모델에 탈지 녹차씨 추출물을 농도 별로 처리한 후 산막 형성이 억제되는지 평가하였다. 물과 75% 에탄올 추출물은 간장에서 각각 156 µg/mL, 39 µg/mL, 장아찌 소스에서 각각 156 µg/mL, 78 µg/mL 이상의 농도에서 산막 형성을 억제하였다. 김치에서 물 추출물은 78 µg/mL 이상, 75% 에탄올 추출물은 39 µg/mL 이상의 농도에서 농도 의존적으로 산막 형성 억제능이 나타났다. 항효모 활성 안정성이 우수하며 실제 식품에서 산막효모를 효과적으로 억제하는 탈지 녹차씨 추출물은 효모의 부패를 저해할 수 있는 천연 보존 소재로서 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

**감사의 글**

본 연구는 산업통상자원부 경제협력권산업육성사업(A012100076)으로 수행한 연구의 일부로 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

- Davidson PM. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. ASM Press, Washington, DC, USA. p 593-627.
- Cho M, Bae EK, Ha SD, Park J. 2005. Application of natural antimicrobials to food industry. *Food Science and Industry* 38(2): 36-45.
- Ahn SM, Choi TH, Kwun IS, Sohn HY. 2011. Antifungal activity of methylene chloride fraction of *Pimpinella brachycarpa* against *Aspergillus niger*. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39: 168-174.
- Seow YX, Yeo CR, Chung HL, Yuk HG. 2014. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54: 625-644.
- Juneja VK, Dwivedi HP, Yan X. 2012. Novel natural food antimicrobials. *Annu Rev Food Sci Technol* 3: 381-403.
- Sarnoski PJ, Boyer RR, O'Keefe SF. 2012. Application of proanthocyanidins from peanut skins as a natural yeast inhibitory agent. *J Food Sci* 77: M242-M249.
- Stratford M. 2006. Food and beverage spoilage yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*. Querol A, Fleet GH, eds. Springer-Verlag, Berlin, Germany. p 335-380.
- Tyagi AK, Gottardi D, Malik A, Guerzoni ME. 2013. Antiyeast activity of mentha oil and vapours through *in vitro* and *in vivo* (real fruit juices) assays. *Food Chem* 137: 108-114.
- Tserennadmid R, Takó M, Galgóczy L, Papp T, Pesti T, Pesti M, Vágvölgyi C, Almássy K, Krisch J. 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruits juices and milk. *Int J Food Microbiol* 144: 480-486.
- Wang H, Hu Z, Long F, Guo C, Niu C, Yuan Y, Yue T. 2016. Combined effect of sugar content and pH on the growth of a wild strain of *Zygosaccharomyces rouxii* and time for spoilage in concentrated apple juice. *Food Control* 59: 298-305.
- Yang EJ, Seon YK, Wee JH. 2016. Extraction yield and antiyeast activity of extract from green tea seeds by pretreatment and extraction conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 1351-1357.
- Gyawali R, Ibrahim SA. 2014. Natural products as anti-

- microbial agents. *Food Control* 46: 412-429.
13. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol* 94: 223-253.
  14. Yoon WH, Choi JH, Lee KH, Kim CH. 2005. Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L.. *Korean J Food Sci Technol* 37: 108-112.
  15. Morikawa T, Li N, Nagatomo A, Matsuda H, Li X, Yoshikawa M. 2006. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). *J Nat Prod* 69: 185-190.
  16. Myose M, Warashina T, Miyase T. 2012. Triterpene saponins with hyaluronidase inhibitory activity from the seeds of *Camellia sinensis*. *Chem Pharm Bull* 60: 612-623.
  17. Joshi R, Sood S, Dogra P, Mahendru M, Kumar D, Bhangalia S, Pal HC, Kumar N, Bhushan S, Gulati A, Saxena AK, Gulati A. 2013. In vitro cytotoxicity, antimicrobial, and metal-chelating activity of triterpene saponins from tea seed grown in Kangra valley, India. *Med Chem Res* 22: 4030-4038.
  18. Tomita M, Yamamoto S, Yamaguchi K, Ohigashi H, Yagi T, Kohata K, Berden JA. 2000. Theasaponin E<sub>1</sub> destroys the salt tolerance of yeasts. *J Biosci Bioeng* 90: 637-642.
  19. Choe SB, Kang ST. 2014. Investigation of antimicrobial activity and stability of *Orixa japonica* Thunb. leaf extract. *Korean J Food Sci Technol* 46: 39-43.
  20. Baek JW, Chung SH, Moon GS. 2002. Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1073-1078.
  21. Ha MH, Park WP, Lee SC, Heo HJ, Cho SH. 2007. Antimicrobial characteristic of methanolic extracts from *Prunus mune* byproducts against food spoilage microorganisms. *Korean J Food Preserv* 14: 183-187.
  22. Koh MS. 2004. Antimicrobial activity of *Saururus chinensis* Baill extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1098-1105.
  23. Kim SJ, Shin JY, Park YM, Chung KM, Lee JH, Kweon DH. 2006. Investigation of antimicrobial activity and stability of ethanol extracts of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J Food Sci Technol* 38: 241-248.
  24. Lee WW, Son SK, Lee GR, Kim GH, Kim YH. 2011. Antimicrobial effects of garlic extract against pathogenic bacteria. *Korean J Vet Serv* 34: 167-178.
  25. Yoon Y, Choi KH. 2012. Antimicrobial activities of therapeutic herbal plants against *Listeria monocytogenes* and the herbal plant cytotoxicity on Caco-2 cell. *Lett Appl Microbiol* 55: 47-55.
  26. Pribylova L, de Montigny J, Sychrova H. 2007. Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast* 24: 171-180.
  27. Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN. 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control* 18: 409-413.
  28. Kim YS, Kyung KH, Kim YS. 2000. Inhibition of soy sauce film yeasts by allyl isothiocyanate and horse-radish powder. *Korean J Food Nutr* 13: 263-268.
  29. Kim JH, Kim MR. 2001. The inhibitory effects of chloroform fraction extracted from the dandelion (*Taraxacum platycarpum* D.) against lactic acid bacteria and yeast related to kimchi fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 33: 560-566.
  30. Yeon JH, Lee JY, Lee HS, Ha SD, Park CS, Woo MJ, Lee SH, Kim JS, Lee C. 2009. Evaluation of the natural antimicrobials against yeasts in functional beverages to control quality loss. *J Food Hyg Saf* 24: 273-276.
  31. Cha JY, Ha SE, Sim SM, Park JK, Chung YO, Kim HJ, Park NB. 2008. Antimicrobial effects of ethanol extracts of Korea endemic herb plants. *J Life Sci* 18: 228-233.
  32. Negi PS. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol* 156: 7-17.
  33. Shin DH, Kim MS, Han JS, Lim DK, Bak WS. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 28: 137-145.
  34. Chang JY, Choi YR, Chang HC. 2011. Change in the microbial profiles of commercial kimchi during fermentation. *Korean J Food Preserv* 18: 786-794.
  35. Monu EA, Techathuvanan C, Wallis A, Critzer FJ, Davidson PM. 2016. Plant essential oils and components on growth of spoilage yeasts in microbiological media and a model salad dressing. *Food Control* 65: 73-77.
  36. Hung LD, Kyung KH. 2006. Inhibition of yeast film formation in fermented vegetables by materials derived from garlic using cucumber pickle fermentation as a model system. *Food Sci Biotechnol* 15: 469-473.
  37. Tyagi AK, Bukvicki D, Gottardi D, Tabanelli G, Montanari C, Malik A, Guerzoni ME. 2014. Eucalyptus essential oil as a natural food preservative: *in vivo* and *in vitro* antiyeast potential. *Biomed Res Int* 2014: 969143.