J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 3, pp. 189~193 (2009)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

기능성 음료 중 효모 제어를 위한 천연항균제 혼합조성물 평가

연지혜 · 조서희 · 이희석 · 하상도 · 박철수[1] · 우문제[1] · 이상훈[1] · 김진수[1] · 이찬*
중앙대학교 식품공학과, [1]광동제약

Evaluation of Natural Antimicrobial Formulas against Yeasts in Functional Beverages

Ji-Hye Yeon, Seo-Hee Jo, Hee-Seok Lee, Sang-Do Ha, Chul-Soo Park[1], Moon-Jea Woo[1], Sang-Hun Lee[1], Jin-Soo Kim[1], and Chan Lee*
Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, [1]Kwang-Dong Pharmaceutical Co., Ltd.
(Received April 14, 2009/Revised July 15, 2009/Accepted August 21, 2009)

ABSTRACT - The purpose of this study was to investigate the antimicrobial activities of natural antimicrobials (10 formulas, F1~F10) against yeasts in functional beverages. The growth rates of yeasts were different with the ten different natural antimicrobial formulas tested. Yeasts grew for 14 days and the antimicrobial effect was observed between 14 and 18 days. Levels of *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, and *P. membranaefaciens* were reduced to the limit of detection (ND) < 10 CFU/mL) after 28 days. Resistance against the antimicrobial effect was greatest for *P. membranaefaciens,* which grew to a level of 0.12~1.48 $\log_{10}$ CFU/mL after 14 days and was reduced to a level of 1.61~3.55 $\log_{10}$ CFU/mL after 28 days. The resistance of *C. albicans* was also high with a growth level of 0.13~1.28 $\log_{10}$ CFU/mL after 14 days and reduction to 1.51~5.30 $\log_{10}$ CFU/mL after 28 days. The antimicrobial effect of F10 was strongest for *P. membranaefaciens*. Every treatment reduced the microbial levels to 2.68~5.62 $\log_{10}$ CFU/mL after 6 months. F2, F4, F5, F6, and F10 reduced the *C. albicans* level to ND after 28 days while F1, F3, F8, and F9 reduced yeasts to the ND level after 6 months. The antimicrobial activities observed here will be useful for development of natural antimicrobials.

Key words: Natural antimicrobials, antimicrobial effect, yeasts, functional beverage

생활 수준의 향상과 식생활 양식의 변화로 가공식품의 수요가 크게 증가함에 따라 식품첨가물 사용이 보다 다양해지고 있다. 특히 식품첨가물의 연구 개발 및 식품 가공기술의 진보로 편리하고 간편한 식생활의 영위가 가능하게 되었다. 식품첨가물 중 가공식품에 첨가되어 식품의 보존기간을 높여주는 보존료는 가공, 유통 중이거나 저장 중의 식품이 산소나 미생물 등의 침투로 식품의 품질이 저하되는 것을 억제시켜 주는 것으로서 항세균제, 항곰팡이제, 항살충제, 노화 억제제, 항산화제 등이 있다[1]. 그러나 합성보존료는 소비자들이 기피하는 경향이 있으며, 보건 당국도 식품첨가물로서의 사용에 엄격한 제한을 두고 있다[2-4].

이러한 천연 항균성 물질의 개발과 이용은 합성보존료의 대체라는 의미와 소비자 기피현상을 유발시키지 않으면서 각종 가공식품의 저장성 향상과 안전성 확보라는 견지에서 그 중요성이 있다[5,6]. 따라서 식품의 안전성 및 식품 첨가물에 대한 인식이 날로 높아지는 가운데, 천연물질로부터 신규 천연 보존제의 개발 및 사용에 많은 관심과 연구가 집중되고 있다. 일반적으로 보존료는 단독으로 식품에 첨가하기도 하지만 다른 물질과 병용처리하여 그 상승효과를 이용하기도 하는데, 지금까지 천연항균제로 알려진 것으로는 향신료[7], 유기산[8], 저급지방산[9], 라이소자임[10, 11], 락토페린[12], 박테리오신[13]과 폴리리신(ε-polylysine)[14-17] 등이 있으나 아직까지는 실용화 및 산업화가 활성화되지 못하고 있다.

본 연구는 항균력이 우수하다고 알려진 ε-polylysine, 키토올리고당, 복합황금추출물(BMB-FS)을 사용하여 경제성과 관능적 특성 등을 고려하여 조합한 10가지 혼합조성물의 기능성 음료 중 효모에 대한 항균력을 평가하여 실용화하고자 하였다.

*Correspondence to: Chan Lee, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3035, Fax: 82-31-675-4853
E-mail: chanlee@cau.ac.kr

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 시료는 광동제약㈜에서 제조하여 시중에 판매되는 기능성 음료(주원료 : 액상과당 7%, 사과과즙 3%, 비타민C 0.5%, 타우린 0.01%, 구연산 0.1%, 정제수)로서 2006년 6월 포장, 살균된 제품을 사용하였다.

천연항균제 조성물 선정

살균된 기능성 음료에 천연항균제 ε-Polylysine(폴리리신, 액상, ㈜신승하이켐, 대한민국), 복합황금추출물(BMB-FS, 액상, ㈜테코스, 대한민국), 키토올리고당(Chitooligosaccharide, 분말, 혜전대학, 대한민국)을 조합하여 10가지 혼합조성물(FI~F10)을 만들어 Table 1에 나타내었다.

효모 접종

사용된 효모 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*(KCCM 11293), *Zygosaccharomyces bailii*(KCCM50165), *Pichia membranaefaciens*(KCCM 32592), *Candida albicans*(KCCM 50658), *Pichia anomala*(KCCM 50502)를 한국종균협회(Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양받아 사용하였다. Acidified Potato Dextrose Agar (APDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 접종하여 25°C에서 24~48시간, 3회 계대 배양하였다. 농도 별로 조합된 F1~F10을 기능성 음료 100 mL 에 10^4 CFU/mL수준이 되도록 접종하여, 천연항균제를 첨가하지 않은 것을 비교 대상으로 25°C에서 6개월 동안 APDA 배지를 활용하여 4-5일간 상온에서 효모의 생균수를 측정하며, 항균력을 평가하였다.

결과 및 고찰

천연항균제를 첨가하지 않은 기능성 음료에서의 균수 변화

비교 대상으로 천연 항균제를 첨가하지 않은 기능성 음료에 5종의 효모(*S. cerevisiae, Z. bailii, P. membranaefaciens, C. albicans, P. anomala*)를 접종한 후 2개월간 생균수 변화를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 다섯 가지 효모의 초기 균수는 각각 3.91, 4.00, 2.52, 4.43, 3.78 $\log_{10}$ CFU/mL에서 2개월 후에는 각각 5.53, 5.77, 5.70, 5.97, 5.85 $\log_{10}$ CFU/mL로 약 1.5~2 log 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 보존제를 첨가하지 않은 상태에서 효모에 오염된 기능성 음료가 시중에 유통이 된다면 낮은 pH(3.0 ± 0.1), 높은 당농도(12 ± 0.1%)에도 불구하고 생육이 가능한 효모로 인한 품질 저하 및 안전성 문제가 발생할 수 있음을 알 수 있다.

Table 1. Formulations of Natural Antimicrobials.

No.	ε-Polylysine (ppm)	Chitooligosaccharide (ppm)	*Scutellaria baicalensis* extract (ppm)
F1	40	50	-
F2	40	100	-
F3	40	10	-
F4	50	30	-
F5	50	50	-
F6	50	100	-
F7	-	50	50
F8	-	50	100
F9	-	50	150
F10	-	50	200

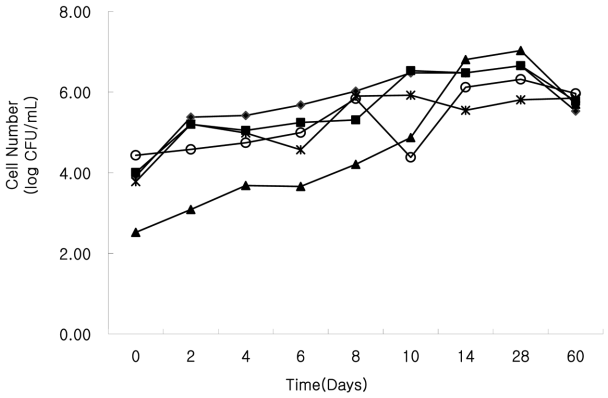

Fig. 1. Changes of yeasts in functional beverage without natural antimicrobials. ◆ : *S. cereviseae*, ■ : *Z. Bailii*, ▲ : *P. memrabefaciens*, ○ : *C. albicans*, *: *P. anolmala*.

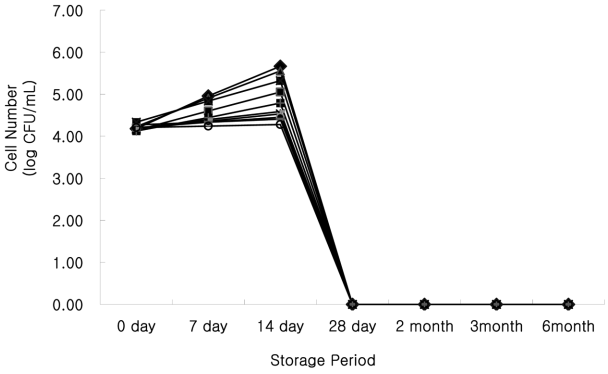

Fig. 2. Growth inhibition of *S. cerevisiae* by natural antimicrobials formulas in functional beverage. ◆ : F1, ■ : F2, ▲ : F3, X : F4, *: F5, ● : F6, | : F7, ▪ : F8, — : F9, ○ : F10.

천연항균제 조성물을 첨가한 기능성 음료 중 효모 생균수 변화

개발된 10가지 천연항균제 혼합조성물을 첨가한 후 *S. cerevisiae*를 접종하여 6개월 동안 균수 변화를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 천연항균제 10종의 혼합조성물에 따라 각 효모들의 성장속도가 달라 천연항균제 농도에 따른 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 특히 F1의 효과가 탁월하였다. 초기14일까지 0.08~1.48 $\log_{10}$ CFU/mL

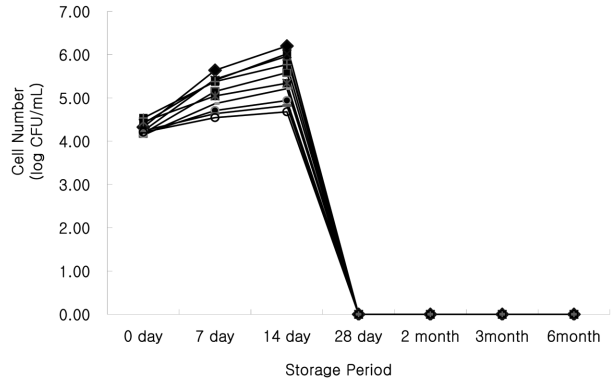

Fig. 3. Growth inhibition of *Z. Bailii* by natural antimicrobials in functional beverage. ◆ : F1, ■ : F2, ▲ : F3, X : F4, * : F5, ● : F6, ▏ : F7, ▪ : F8, — : F9, ○ : F10.

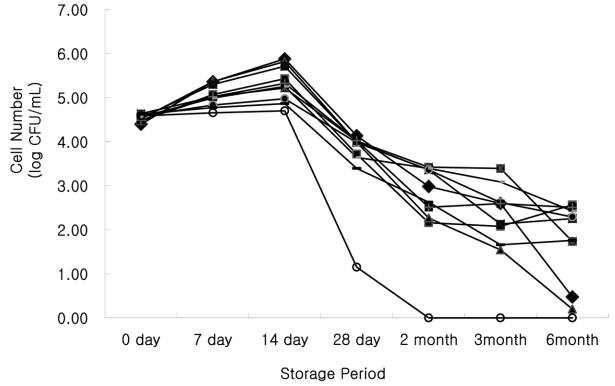

Fig. 4. Growth inhibition of *P. memrabefaciens* by natural antimicrobials in functional beverage. ◆ : F1, ■ : F2, ▲ : F3, X : F4, * : F5, ● : F6, ▏ : F7, ▪ : F8, — : F9, ○ : F10.

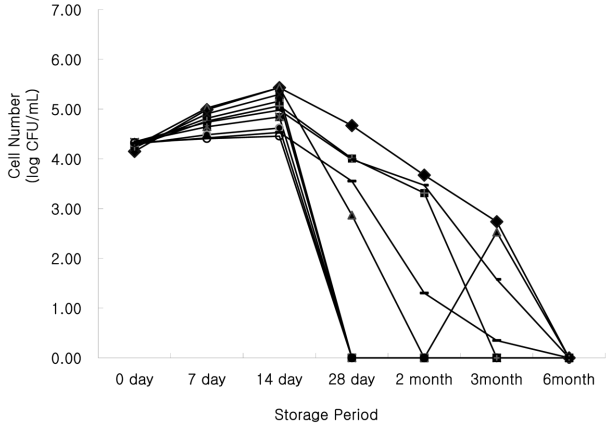

Fig. 5. Growth inhibition of *C. albicans* by natural antimicrobials in functional beverage. ◆ : F1, ■ : F2, ▲ : F3, X : F4, * : F5, ● : F6, ▏ : F7, ▪ : F8, — : F9, ○ : F10.

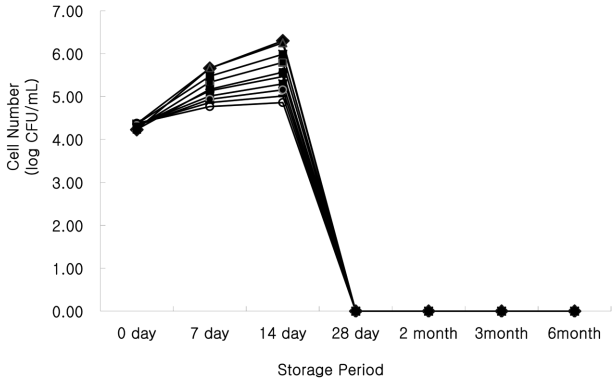

Fig. 6. Growth inhibition of *P. anolmala* by natural antimicrobials in functional beverage. ◆ : F1, ■ : F2, ▲ : F3, X : F4, * : F5, ● : F6, ▏ : F7, ▪ : F8, — : F9, ○ : F10.

가 증가하였으나, 28 일이 지난 후 F1~F10 모두 검출한계(ND < 10 CFU/mL) 이하로 감소하여 2~4주 사이에 항균효과가 발휘되는 것으로 나타났다.

개발된 10가지 천연항균제 혼합 조성물을 첨가한 후 *Z. bailii*를 접종하여 6개월 동안 균수 변화를 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 초기14일까지 0.47~1.87 $\log_{10}$CFU/mL가 증가하였으나, 28일이 지난 후 F1~F10 모두 검출한계(ND < 10 CFU/mL) 이하로 감소하여 2~4주 사이에 항균효과가 발휘되는 것으로 나타났다.

개발된 10가지 천연항균제 혼합 조성물을 첨가한 후 *P. membranefaciens*를 접종하여 6개월 동안 균수 변화를 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 초기 14 일까지 0.12~1.48 $\log_{10}$CFU/mL가 증가하였으나, 28 일이 지난 후 1.61~3.55 $\log_{10}$CFU/mL가 감소하였고, F10에서는 2개월이 지난 후 검출한계(ND < 10 CFU/mL) 이하로 감소하였다. 전체적으로 6 개월이 지난 후 2.68~5.62 $\log_{10}$CFU/mL가 감소한 것으로 나타났다.

개발된 10가지 천연항균제 혼합 조성물을 첨가한 후 *C. albicans*를 접종하여 6개월 동안 균수 변화를 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 초기14일까지 0.13~1.28 $\log_{10}$ CFU/mL가 증가하였으나, 28 일이 지난 후에는 감소하여 1.51~5.30 $\log_{10}$ CFU/mL가 감소하였고 F2, F4, F5, F6, F10에서 검출한계 이하로 감소하였다. 그리고 3 개월이 지난 후 F7에서 검출한계(ND < 10 CFU/mL) 이하로 감소하였으며, 6 개월이 지난 후에는 F1, F3, F8, F9도 검출한계 이하로 감소한 것으로 나타났다.

개발된 10가지 천연항균제 혼합 조성물을 첨가한 후 *P. anolmala*를 접종하여 6개월 동안 균수 변화를 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 초기 14일까지 0.48~2.07 $\log_{10}$ CFU/mL가 증가하였으나, 28 일부터는 F1~F10 모두 검출한계(ND < 10 CFU/mL) 이하로 감소하여 2~4주 사이에 항균효과가 발휘되는 것으로 나타났다.

위의 결과들을 전반적으로 보면 0~14 일까지는 균수가 증가하다가 28일 이후에는 *S. cerevisiae, Z. bailii, P. anolmala*는 검출한계 이하까지 균수가 감소하고, *P. membranaefaciens, C. albicans*는 균수가 초기 접종균수(10^4 CFU/mL) 이하로 감소하는 경향을 보였다. Heo 와 Cho[18]

의 연구결과에 따르면, polylysine으로 항균력을 검사한 결과 gram-negative균, gram-positive균 등 폭넓은 미생물영역에 대하여 넓은 범위의 처리 온도(40°C~150°C), pH(4~10) 영역에서 뚜렷한 항균력을 보였다고 보고하였다. 또한 Shim 등[19,20]은 chitooligosaccharide-HCl과 polylysine을 혼합하여 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 최소저해농도와 항균력에 관해 보고하였으며, 이 등[21]은 김치 보존성 증진을 위해 자초, 황금과 게껍질(CS) 첨가가 가능함을 보고하였고, 김 등[22]은 복합황금추출물에 의한 염장식품(단무지), 유제품(화이트소스), 난가공식품(유대란)의 저장기간 연장 및 미생물 감소를 관찰하였다고 하였다. 기존에 보고되어진 연구들 중에는 본 실험에서 사용된 천연물질을 단독으로 사용하여 그 생육 억제효과를 확인한 실험결과들이 있지만 이들을 병용하여 처리하여 얻은 결과는 없었다. 본 연구에서 사용된 천연항균제 ε-Polylysine, 복합황금추출물, 키토올리고당은 항균력이 입증되었으며, 향후 천연항균제 혼합조성물로써 실용적 사용이 기대된다.

요 약

본 연구는 ε-polylysine, 키토올리고당, 복합황금추출(BMB-FS)을 조합한 10가지 혼합조성물의 효모에 대한 항균력을 평가하여 식품산업에 적용하고자 하였다. 천연항균제 10종의 formula에 따라 각 효모의 성장 속도가 차이가 났으나, 14일까지는 균수가 증가하였고 14~28 일 사이에 항균효과가 나타나 28일 이후에는 *S. cerevisiae, Z. bailii, P. anolmala*는 검출한계 (ND < 10 CFU/mL) 이하까지 감소하여 천연항균제에 민감한 반응을 보였다. *P. membranaefaciens*는 가장 저항성이 강한 균으로 14일까지 0.12~1.48 $\log_{10}$ CFU/mL가 증가하였으나, 28일이 지난 후 1.61~3.55 $\log_{10}$ CFU/mL가 감소하였고, F10에서는 2 개월이 지난 후 검출한계 이하로 감소하여 가장 항균효과가 크게 나타났다. 대부분 6개월이 지난 후 2.68~5.62 $\log_{10}$ CFU/mL가 감소한 것으로 나타났다. *C. albicans*는 두 번째로 저항성이 강한 균으로 14일까지 0.13~1.28 $\log_{10}$ CFU/mL가 증가하였으나 14~28일 사이에 감소하기 시작하여 28일 째에는 1.51~5.30 $\log_{10}$ CFU/mL가 감소하였고, F2, F4, F5, F6, F10은 검출한계 이하로 감소시켰다. 6개월이 지난 후에는 F1, F3, F8, F9도 검출한계 이하로 감소한 것으로 나타났다. 이에 따라 본 연구는 기능성 음료의 효모에 의한 변질을 막을 수 있는 천연 항균제 조성물을 개발 하여 실용화 하고자 하였다.

참고문헌

1. 최원균, 노용철, 황성연: 자몽종자추출물과 폴리리신혼합물의 식품부패균에 대한 항균효과, 한국식생활문화학회지, **15**, 9-15 (2000).
2. Sibel, R.: Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Bibel, R(Ed.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 69 (2003).
3. Davidson, P.M. and Post, L.S.: Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials, *In Antimicrobials in foods.* Branen, A.L. Davidson, P.M., Eds, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 371 (1983).
4. Lewis, R.J.: Their regulatory status their use by the food industry, *In Food additives handbook.* Dean, R.W. eds. Nostrand Reinhold, New york, pp. 3-27 (1989).
5. 이영철, 오세욱, 홍희도: 식용가능한 약용식물 추출물의 항균 특성, 한국식품과학회지, **34**, 700-709 (2002).
6. 정준호, 조성환: 천연항균제 처리에 의한 가공두부의 선도유지 효과, 한국식품저장유통과학회지, **10**, 41-46 (2003).
7. Conner, D.E. and Beuchat, L.R.: Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts, *J. Food Sci.*, **49**, 429-434 (1984).
8. Freese, E., Sheu, C.W. and Galliers, E.: Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives, *Nature*, **241**, 321-325 (1973).
9. Quattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J. and Begin, A.: Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms, *Int. J. Food Microbiol.*, **37**, 155-162 (1997).
10. Ibrahim, H.R., Yamada, M., Matsushita, K., Kobayashi, K. and Kato, A.: Enhanced bactericidal action of lysozyme to Escherichia coli by inserting a hydrophobic pentapeptide into its C terminus, *J. Biol. Chem.*, **18**, 5059-5063 (1994).
11. Proctor, V.A. and Cunningham, F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **26**, 359-395 (1998).
12. Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T.J. and Ellison, R.T.: Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment, *Infect. Immun.*, **61**, 719-728 (1993).
13. Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hiller, A.J., Wettenhall, R.E., Hickey, M.W. and Coventry, M.J.: Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicollin 126, a bacteriocin produced by Camobacterium piscicola JG126. *Appl. Envrion. Microbiol.*, **62**, 2897-2903 (1996).
14. Thomas, E.L, Jefferson, M.M. and Grisham, M.B.: Myeloperoxidase-catalyzed incorporation of amines into proteins: role of hypochlorous acid and dichloramines, *Biochemistry*, **21**, 6299-6308 (1982).
15. Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T. and Sakai, H.: Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine, *J. Antibiot.*, **37**, 1449-1455 (1984).
16. Gunn, J.S. and Miller, S.I.: PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance, *J. Bacteriol.*, **178**, 6857-6867 (1996).
17. Soukos, N.S., Ximenez-Fyvie, L.A., Hamblin, M.R., Socransky, S.S. and Hasan, T.: Targeted antimicrobial photochemotherapy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2595-2601 (1998).
18. Heo, C.Y. and Cho, S.H.: Antimicrobial activity of polyl-

ysine produced by *Streptomyces sp*., *J. Agric Life Science*, **36**, 47-52 (2003).
19. Shim, J.M., Lee, M.K., Cho, S.Y., Park, B.K. and Oh, D.H.: Antimicrobial activity of chitooligosaccharide-HCl and polylysine against *Escherichia coli* O157:H7, 한국식품영양과학회 학술발표회, P6-15 (2000).
20. Shim, J.M., Lee, M.K., Cho, S.Y., Park, B.K. and Oh, D.H.: Antimicrobial activity of chitooligosaccharide-HCl and polylysine against *Listeria monocytogenes*, 한국식품영양과학회 학술발표회, P6-16 (2000).
21. 이신호, 박경남, 임용숙: 자초(Lothospermum erythrorhizon), 황금(Scutellaria baicalensis G.) 추출혼합물과 오존처리한 게껍질(Crab shell)의 첨가가 배추김치 발효에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지, **28**, 359-364 (1999).
22. 김도경, 안영란, 현광욱, 김철: 복합황금추출물을 이용한 식품의 저장기간 연장 및 미생물 변화연구, 한국식품저장유통학회 학술발표회, P1-10 (2008).