J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 3, pp. 262~266 (2009)

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

기능성 음료의 곰팡이 제어를 위한 천연항균제 활성 평가

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

Evaluation of Antifungal Activity of Natural Antimicrobials in Fuctional Beverage

Hee-Seok Lee, Ji-Hye Yeon, Sang-Do Ha, Chul-Soo Park[1], Moon-Jae 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 May 22, 2009/Revised June 10, 2009/Accepted June 25, 2009)

ABSTRACT − Antifungal activity of seven natural antimicrobials, such as ε-polylysine, extract of *Yucca shidigera*, TLS (vitamin B1 derivative), BMB-FS, chitooligosaccharide, KDSP 001, and KDSP 002 were investigated for their applications in functional beverage. Five fungi including *Aspergillus niger, Penicillium citrinum, Rhizopus oryzae, Fusarium moniliforme, and Mucor rouxii* were applied as test fungi and mininum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobials were examined. TLS exhibited the strongst antifungal activity among tested antimicrobials and the growth of all fungi was inibited at 100 ppm. The antifungal activity of BMB-FS appeared different. The growth of *Fusarium moniliforme* was inhibited by BMB-FS at 100 ppm, but it exhibit antifungal activity on *P. citrinum,* and *M. rouxii* at 1000ppm. MICs of TLS appeared to be 60 ppm for four test fungi except *A. niger* (100 ppm). These results indicate the possible usage of TLS and BMB-FS as natural antimicrobials in functional beverage.

Key words: Natural antimicrobials, antifungal activity, fungi, functional beverage, minimal inhibitory concentrations (MICs)

식품산업의 발전과 식생활의 간편화로 각종 가공식품이나 인스턴트 식품의 섭취가 늘어나고 있으며, 가공식품의 상품성과 가치를 높이기 위해 산업체에서 nitrite, sorbic acid, sodium metabisulfite와 염소제 등의 식품첨가물를 사용하는 경우가 많이 보고되고 있다[1]. 식품첨가물을 사용하는 방법 이외에도, 가공식품의 저장기간 연장을 위하여 가열, 초고압, 방사선, pulse electric fields 등 물리적 방법과 알코올, 염소, 과산화수소, 천연물 등 화학적 방법이 식품 보존방법으로 사용되고 있다.

식품에 널리 사용되는 식품첨가물의 70% 이상이 화학적으로 합성된 물질이라는 사실은 대부분의 소비자들에게 안전성에 대해 부정적인 견해를 갖게 한다[2-4]. 그렇지만 보존료를 첨가하여 저장기간을 연장한 식품의 시장은 계속 확대되고 있으며, 음료시장에서도 보존료의 사용량은 계속 증가하고 있다[5]. 음료에는 대부분 합성보존료가 첨가되며, 이들의 안전성에 대한 논의가 끊이지 않고 있다. 따라서 안전한 천연보존제의 개발과 이용에 대한 소비자들의 요구가 증대되고 있으며, 다양한 천연항균물질 식품보존제 연구가 활발히 진행되고 있다[6-9]. 천연항균물질들의 연구는 합성보존료의 대체라는 의미와 소비자 기피현상을 유발시키지 않으면서 각종 가공식품의 저장성 향상과 안전성 확보라는 측면에서 특히 중요하다. 식품산업에 사용되는 천연항균물질로는, 동물이나 식물에 천연적으로 존재하는 특정 단백질 및 효소류, 갑각류의 키틴질에서 추출한 키토산, 유기산, 식물의 정유(essential oil) 및 미생물에서 유래된 nisin, ε-polylysine, natamycin 등이 있다[10].

최근 고농도의 비타민을 함유한 기능성음료의 판매가 증가하고 있다. 기능성음료는 일반적으로 낮은 pH와 높은 당함량을 나타내고 있으며, 이 같은 특성으로 일반세균보다 곰팡이에 의해 오염될 가능성이 매우 높다. 이 연구에서는 천연항균물질을 사용하여 곰팡이의 생육을 억제하여 기능성음료의 저장성을 향상시키고자 하며, 항균력을 비교 평가하여 현장에 응용 가능한 정보를 제공하고자 한다.

*Correspondence to: Chan Lee, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3035, Fax: 82-31-676-8865
E-mail: chanlee@cau.ac.kr

재료 및 방법

사용균주 및 배양

사용된 균주는 *Aspergillus niger* KCCM 11240, *Penicillium citrinum* KCCM 11619, *Rhizopus oryzae* KCCM 11272, *Fusarium moniliforme* KCCM 11403, *Mucor rouxii* KCCM 60146, 5종류의 곰팡이로서 한국종균협회(Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양 받았다. 이 곰팡이 균주를 10% tartaric acid을 이용하여 pH 3.5로 보정된Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 25°C에서 7일간 전 배양한 뒤 포자를 분리하였다. 분리된 포자를 Potato Dextrose broth (PDB, Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하고 (10^5 CFU/mL) 25°C, 150 rpm의 조건으로 7일 동안 배양하였다.

곰팡이 생장저해활성 조사 및 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 설정

광동제약(주)에서 제조하여 시중에 유통되는 기능성 음료(주원료 : 액상과당 7%, 사과과즙 3%, 비타민C 0.5%, 타우린 0.01%, 구연산 0.1%, 정제수) 100 mL에 천연항균제(ε-Polylysine(폴리리신, 액상, ㈜신승하이켐, 대한민국), 유카 추출물(Yucca(*Yucca shidigera*) extract, 분말, 데져트킹, 미국), TLS (Vitamin B_1 유도체, 분말, 신코, 일본), 복합황금추출물(BMB-FS, 액상, ㈜테코스, 대한민국), 키토 올리고당(Chitooligosaccharide, 분말, 혜전대학, 대한민국), KDSP 001(폴리리신, 유카추출물, 3:1 혼합)과 KDSP 002 (폴리리신, 유카추출물, 1:3 혼합))들을 각각 100, 500, 1,000, 2,000 ppm의 농도로 첨가한 후, PDB에서 배양된 5종류의 곰팡이들의 포자를 cheese cloth를 통해 분리한 뒤, 10^5 CFU/mL씩 접종하였다. 접종된 시료들을 25°C, 150 rpm 조건에서 7일간 배양한 뒤, Whatman filter paper No.4 (Whatman International, Maidstone, United Kingdom)를 사용하여 균사체를 분리하였다. 분리된 균사체를 건조하여 건조 균체량 변화를 조사하였으며, 건조 균체량은 ++ : > 1.0 g/L, + : < 1.0 g/L, - : ND (Not Detected) 으로 표시하였다. 대조군으로 0.05%의 안식향산나트륨(Sodium benzoate)를 첨가하여 항균력을 비교하였으며 조사된 천연항균물질 중 활성이 뛰어난 물질을 선별하여 농도에 따른 활성의 변화를 통해 최소저해농도를 설정하였다.

결과 및 고찰

곰팡이 생장저해활성 조사 및 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 설정

낮은 pH(3.0 ± 0.1)와 높은 당농도(12 ± 0.1%) 특성을 보이는 기능성 음료에서 일반적으로 부패 혹은 식중독세균은 성장이 불가능 하며 그에 따른 품질 손상 가능성은 매우 적은 편이다. 하지만 곰팡이의 경우 일반세균이 자라기에 불가능한 환경에서도 성장이 가능하며 오염되면 제품의 상품성 가치를 떨어뜨리게 된다. 조사된 곰팡이 5종에 대한 천연항균제들의 항균력은 Table 1과 같다. 7가지의 천연항균물질 중 *A. niger, P. citrinum, R. oryzae, F. moniliforme, M. rouxii* 모든 곰팡이에 대하여 항균활성을 보인 물질은 vitamin B_1 유도체인 TLS이었으며, 100 ppm 이상의 농도에서 항균효과를 나타냈다. 황금추출물인 BMB-FS는 *F. moniliforme*을 상대로 100 ppm이상의 농도에서 성장저해활성을 보였으나 BMB-FS는 *P. citrinum*와 *M. rouxii*에 대해서는 상대적으로 약한 항균활성을 나타내었다. 이 추출물을 1,000 ppm이상의 농도를 처리해야만 균사체 성장이 저해되기 시작하였고, *M. rouxii*는 2,000 ppm에서 성장을 하지 않았다. 조와 김(2001)은 BMB-FS가 500 ppm 이상에서 *Bacillus cereus, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Vibrio parahaemolyticus*의 성장을 저해한다고 보고하였으며[11], 이와 서(2005)의 연구에서도 BMB-FS은 *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Shi. flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Sal. enteritidis*에 대해서 성장저해활성을 나타냈다[12]. 일반세균과 달리 곰팡이의 성장을 억제하기 위해서는 고농도의 BMB-FS가 필요한 것으로 판단되었다.

*A. niger*에 대해서는 TLS만이 강한 항균력을 나타내었으며 100 ppm에서도 그 효과가 있는 것으로 관찰되었다. 키토올리고당의 경우에는 1,000 ppm이상 첨가되어야 곰팡이들의 균체량이 감소되는 (1 g/L이하) 것을 볼 수 있었다(Table 1). 지(2006)는 키토산이 *Candida albicans*와 *Trichophyton rubrum*에 대해 50, 100 ng/mL의 농도에서 생육억제를 나타낸 반면, 키토올리고당은 100 ng/mL 이하의 농도에서는 생육억제활성을 나타내지 못했다고 보고하였다[13]. *P. citrinum*는 TLS와 BMB-FS 이외에 유카 추출물과 키토올리고당을 2,000 ppm 첨가될 경우 1 g/L 이하의 균체량으로 생육이 저해되는 것으로 나타났다 (Table 1). Jin 등(2006)은 유카잎 MeOH추출물을 1.0% 함유한 PDA에 *Fusarium oxysporum, Phytophthora capsici, Botrytis cinerea*를 배양 시, 각 균에 대해 34.0%, 62.0%, 41.0%의 생육억제활성을 나타냈다고 보고하였다[14]. *P. citrinum*와 *M. rouxii*을 상대로 항균활성을 보였던 BMB-FS경우 *R. oryzae*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았지만 TLS와 함께 키토올리고당이 항균활성을 보였으며 그 농도가 1,000 ppm 이상 이였다(Table 1). *F. moniliform*의 경우 조사된 5종류 곰팡이 중 가장 다양한 천연항균제로부터 균사체 성장의 저해를 보였다. TLS, BMB-FS뿐만 아니라 첨가 농도가 1,000 ppm이상일 경우 유카추출물, 키토올리고당 그리고 KDSP 002가 항균활성을 보였으며, 키토올리고당을 2,000 ppm 첨가할 경우 균체의 성장을 찾아볼 수 없었다 (Table 1). 마지막으로 *M. rouxii*의 경우 TLS와 BMB-FS

Table 1. Antifungal activity of natural antimicrobials

Strains		Concentration of natural antimicrobials (ppm)			
		100	200	1,000	2,000
Aspergillus niger KCCM 11240	유카 추출물	++	++	++	++
	KDSP 001	++	++	++	++
	KDSP 002	++	++	++	++
	키토 올리고당	++	++	+	+
	BMB-FS	++	++	++	++
	TLS	-	-	-	-
	ε-Polylysine	++	++	++	++
Penicillium citrinum KCCM 11619	유카 추출물	++	++	++	+
	KDSP 001	++	++	++	++
	KDSP 002	++	++	++	++
	키토 올리고당	++	++	++	+
	BMB-FS	++	++	+	+
	TLS	-	-	-	-
	ε-Polylysine	++	++	++	++
Rhizopus oryzae KCCM 11272	유카 추출물	++	++	++	++
	KDSP 001	++	++	++	++
	KDSP 002	++	++	++	++
	키토 올리고당	++	++	+	+
	BMB-FS	++	++	++	++
	TLS	-	-	-	-
	ε-Polylysine	++	++	++	++
Fusarium moniliforme KCCM 11403	유카 추출물	++	++	+	+
	KDSP 001	++	++	++	+
	KDSP 002	+	+	+	+
	키토 올리고당	++	++	+	-
	BMB-FS	-	-	-	-
	TLS	-	-	-	-
	ε-Polylysine	++	++	++	++
Mucor rouxii KCCM 60146	유카 추출물	++	++	++	++
	KDSP 001	++	++	+	+
	KDSP 002	++	++	++	++
	키토 올리고당	++	++	++	++
	BMB-FS	++	++	+	-
	TLS	-	-	-	-
	ε-Polylysine	++	++	++	++

* 0.05% 안식향산나트륨: -
++ : > 1.0 g/L, + : < 1.0 g/L, - : ND (Not Detected).

이외에 KDSP 001이 항균활성을 나타내었으며, 1,000 ppm 이상일 경우 균체량이 1 g/L 이하로 조사되었다(Table 1). 대조군으로 안식향산나트륨을 0.05% 첨가한 시료에서는 5종류 모든 곰팡이의 균체 성장을 살펴볼 수 없었다.

실험에 사용된 7종류의 천연물질 중 vitamin B_1유도체인 TLS가 조사 대상 곰팡이에 대한 항균 활성이 가장 뛰어났으며, TLS의 최소저해농도를 알아보기 위하여 100 ml의 비타민 음료에 TLS를 각각 10, 20, 40, 60, 80 ppm에 해당하는 양을 첨가하여 농도의 변화에 따른 항균활성을 살펴보았다. 그 결과, 5종류의 곰팡이 모두 TLS가 40 ppm 이하로 첨가되었을 경우에는 성장에 저해를 나타내지 않았으며, 60 ppm 이상 첨가되었을 경우 균체의 성장에 저해가 있는 것으로 나타났다(1 g/L). 80 ppm 이상의 첨가농도에서는 *A. niger*를 제외한 4종류의 곰팡이는 생육이 불

Table 2. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of TLS

Strains	Concentration of TLS (ppm)				
	10	20	40	60	80
Aspergillus niger KCCM 11240	++	++	++	+	+
Penicillium citrinum KCCM 11619	++	++	++	+	-
Rhizopus oryzae KCCM 11272	++	++	++	+	-
Fusarium moniliforme KCCM 11403	++	++	++	+	-
Mucor rouxii KCCM 60146	++	++	++	+	-

++ : > 1.0 g/L, + : < 1.0 g/L, - : ND (Not Detected).

가능 하였다(Table 2). 이 결과를 바탕으로 천연항균물질인 TLS의 5종류의 곰팡이에 대한 균체 성장 최소저해농도는 60 ppm으로 나타났다. *A. niger*의 경우 최소 100 ppm 이상을 첨가해야 균체의 성장을 억제할 수 있었다

결과를 종합해 볼 때, 균주에 따라 저항성의 차이는 나타났지만 조사한 7가지의 천연항균물질 중 TLS, BMB-FS 등이 항균활성을 나타내는 것으로 분석되었으며, 곰팡이의 성장을 가장 강력히 저해하는 물질은 TLS로 나타났다. 식품부패균에 대한 높은 항균활성을 이용하여 면류, 소스류 등에 널리 사용되고 있는 ε-Polylysine[15, 16] 경우 곰팡이에 대한 생장저해활성은 거의 나타내지 못하였다. 5 종류의 곰팡이 중 *A. niger*가 천연항균물질에 대한 저항성이 가장 크게 나타났으며, *F. moniliform*의 경우 다른 곰팡이들에 비해 천연항균물질에 민감한 반응을 보였다.

일반적으로 미생물에 의한 변패를 방지하여 저장성을 향상시키기 위해 보존료를 단독으로 사용하지 않고 하나 이상의 보존료를 병용사용하여 상승효과를 보는 방법이 사용되고 있다. 연구 결과를 바탕으로 곰팡이 생장저해활성을 보인 천연항균물질들을 조합하여 최적의 비율을 결정하면 기능성음료의 보존성 향상에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

기능성 음료의 저장성을 향상시키고자, 7종류의 천연항균물질(ε-Polylysine, 유카추출물, TLS(Vitamin B_1 유도체), BMB-FS(황금추출물), 키토올리고당, KDSP 001, KDSP 002)의 곰팡이 성장저해활성을 비교 평가하였다. *Aspergillus niger, Penicillium citrinum, Rhizopus oryzae, Fusarium moniliforme, Mucor rouxii*, 5 종류의 곰팡이를 상대로 활성을 살펴 보았으며, 성장저해활성이 가장 뛰어난 물질의 최소저해농도를 조사하였다. 모든 곰팡이에 대하여 성장저해활성을 보인 물질은 vitamin B_1 유도체인 TLS 이었으며, 100 ppm 이상의 농도에서는 균사체가 성장하지 못하였다. 황금추출물 BMB-FS의 경우 *F. moniliforme*을 상대로 100 ppm이상의 모든 농도에서 성장저해활성을 보였으며 *P. citrinum*와 *M. rouxii*의 경우 1,000 ppm이상의 농도가 되어야 균체 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 가장 뛰어난 활성을 보여준 TLS의 최소저해농도(MIC)는 *A. niger*를 제외한 4가지 곰팡이에 대하여 60 ppm으로 나타났으며, *A. niger*에 대한 MIC는 100 ppm으로 분석되었다. 이 같은 결과는 기능성 음료의 저장기간을 연장시키는데 중요한 정보를 제공하며, 천연보존료 연구에 도움이 될 것이라 생각된다.

참고문헌

1. Park, S.K., Lee, T.S. and Park, S.K. : Estimation of daily dietary intake of food red colors. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 75-80 (2005).
2. Sibel, R. : Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Bibel, R(Ed.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK (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, Robert, W. D. (Ed.), Nostrand Reinhold, New York. p. 3-27 (1989).
5. 곽종명, 허정림, 허탁 : 음료수용 포장용기의 환경영향, 한국공업화학회지, **2**(1), 274-277 (1998).
6. 이영철, 오세욱, 홍희도 : 식용 가능한 약용식물 추출물의 항균 특성, 한국식품과학회지, **34**, 700-709 (2002).
7. Beuchat, L.R. and Golden, D.A. : Antimicrobials occuring naturally in food, *Food Technol.,* **43**, 134-139 (1989).
8. Kim, H.Y., Lee, Y.J., Kim, S.H., Hong, K.H., Kwon, Y.K., Lee, J.Y., Ha, S.C., Cho, H.Y., Chang, I.S., Lee, C.W. and Kim, K.S. : Studies on the development of natural preservatives from natural products, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31,** 1667-1678 (1999).

9. Lee Y.C, Oh S.W, Hong H.D. Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.,* **34,** 700-709 (2002).
10. 김용석, 신동화 : 천연 휘발성 항균물질의 연구현황과 식품가공에의 이용, 한국식품과학회지, **35**, 159-165 (2003).
11. 조성환, 김영록 : 황금추출물의 항균활성. 한국식품영양과학회지, **35**(5), 964-968 (2001).
12. 이종기, 서진종 : 황금탕 및 황금추출물의 식중독 세균에 대한 생육억제 효과. 한국식품영양과학회지, **34**(10), 1606-1610 (2005).
13. 지희윤 : 키토산의 *Candida albicans*와 *Trichophyton rubrum*에 대한 항진균 작용과 Apoptosis 유도작용, 한국균학회지, **34**(2), 119-121 (2006).
14. Jin, Y.L., Jung, W.J., Kuk, J.H., Kim, J.B., and Park, R.D. : Antifungal and Antioxidative Activities of *Yucca smallina* Fern, *Agr. Chem. Biotechnol.,* **49**(4), 165-170 (2006).
15. Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T. and Sakai, H : Antimicrobial action of a ε-poly-L-lysine, *J. Antibiot.,* **37**(11), 1449-1455 (1984).
16. Heo, C.Y. and Cho, S.H. : Antimicrobial Activity of Polylysine Produced by *Streptomyces* sp, *J. Agriculture and Life Sci.*, **36**(1), 47-52 (2002).