J. Fd Hyg. Safety 11(3), 203 - 207(1996)

홍삼에서 분리한 *Aspergillus* sp.의 동정 및 식품보존료가 균의 성장에 미치는 영향

곽이성* · 주종재†

*한국인삼연초연구원, 군산대학교 식품영양학과

Identification of *Aspergillus* sp. Isolated from Red-Ginseng and Effect of Preservative on Its Growth

Yi Seong Kwak* and Jong Jae Choo†

*Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Shinseong-dong, Taejon 305-345

Department of Foods and Nutrition, Kunsan National University, Kunsan, Cheonbuk 573-701

ABSTRACT — One kind of fungus was isolated and identified from comtaminated red-ginseng in order to give fundermental data for improving hygienic quality of ginseng product. The isolated strain was identified as *Aspergillus* sp. Hyphae of the strain had septum structure. The strain showed vesicle and sterigmata structure which were typical characteristics of *Aspergillus* species. The growth of the strain was slightly inhibited by sodium benzoate and potassium sorbate at a concentration of 0.05%. The strain showed no growth at 4.0% potassium sorbate. The isolated strain *Aspergillus* sp. showed no significant degradation in the presence of red-ginseng saponins.

Key words □ *Aspergillus* sp., Red-ginseng, Saponin

최근에 홍삼을 비롯하여 생약복방제, 캡슐 등 다양한 종류의 인삼제품이 제조되고 있어 제품의 유효성분 보존 및 품질관리 측면에서인삼부패 미생물의 방제 및 관리의 필요성이 점차 증대되고 있다. 그러나 지금까지는 인삼의 특정성분과 미생물 생육과의 관계에 대한 연구[1-5]는 많은 반면 인삼의 부패미생물 자체에 대한 연구[6,7]는 미미한 실정이다.

수분은 식품을 장기간 저장할 때 식품성분과 직접, 간접적으로 작용하여 식품의 안정성을 파괴하며, 생물학적으로도 미생물의 성장, 번식에 이용되어 식품의 저장성 및 안정성을 떨어뜨리므로 GMP 품질관리 측면에서 인삼제품의 수분관리는 중요하다 하겠다. 홍삼은 수삼을 증숙하고 건조하여 제조한 제품(수분함량 13% 이하)[8]으로 부패미생물 중에서 세균보다는 곰팡이의 오염이 문제가 된다고 알려져 있다. 따라서 저자 등은 인삼제품의 품질안정성을 확보하기 위한 기초자료를 제공하고자 오염된 홍삼에서 부패성 곰팡이 1종을 분리하여 그 형태학적, 배양학적 특성을 조사하여 균의 동정을 행하였다. 아울러 이 균이 오염되었을 경우 품질안정성을 고려하여 이 균이 인삼 사포닌에 미치는 영향을 조사하였고 또한 식품보존료가 이 균의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

실험재료

홍삼은 시중에서 취급상 부주의로 인해 오염이 발생한 한국담배인삼공사제품을 수거하여 사용하였다. Saponin 정성 및 정량에 사용된 시약류로서 TLC plate는 silica gel 60F254 plate(Merck Co., Art 5554 aluminium sheet, layer thickness 0.25 mm)을 사용하였고 발색시약인 sulfuric acid는 특급시약을, 전개용매류는 일급시약을 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 acetonitrile, n-butanol, 증류수는 Merck사의 HPLC용 용매류를 사용하였다. 인삼사포닌 ginsenoside 표준성분은 한국인삼연초연구원에서 분리한 표준품을 TLC 확인 및 HPLC 정량용 표준품으로 사용하였다.

곰팡이의 분리

오염 홍삼을 Waring blendor로 조쇄한 후 약 10 g을 취하여 PDA 배지(DIFCO Co.)에 pour plate method[9]로 접종하

였다. PDA plate에서 발생한 곰팡이를 순수분리하여 동일한 PDA 사면배지에서 25℃, 7일간 배양한 후 4℃에 보관하면서 균주의 동정에 사용하였다.

균주의 동정

균주는 czapek's agar($NaNO_3$ 3 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, KCl 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, sucrose 30.0 g, agar 15.0 g, pH 6.8, water 1000 ml) 및 malt extract agar (malt extract 20.0 g, peptone 1.0 g, dextrose 20.0 g, agar 20.0 g, D.W. 1000 ml) plate에 각각 3점 접종하여 25℃에서 10일간 배양한 후 그 형태학적 특성을 조사하였다. 콜로니의 특성은 해부현미경(stereoscopic microscope)을 사용하여 관찰하였고 미세구조는 광학현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다. 균주의 동정은 Raper 등의 The Genus Aspergillus[10] 및 Domsch 등의 Compendium of Soil Fungi[11]에 준하여 실행하였다.

보존료 농도별 생육억제효과 조사

보존료 농도를 0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0%로 달리하여 PDA 배지에 넣고 plate를 만든 다음 순수분리된 곰팡이 포자를 1백금이 접종하여 25℃에서 60시간 배양한 후 곰팡이의 생육억제효과를 조사하였다.[6] 곰팡이의 생육정도는 colony의 직경(mm)으로 표시하였으며 균의 성장저해율은 보존료 무첨가구에 대한 보존료첨가구의 상대적인 성장 비율(%)로 표시하였다.

사포닌 분석

시료 일정량을 둥근 플라스크에 취하고 10배량의 80% ethanol을 가하여 75~80℃의 water bath에서 5시간씩 3회 반복 추출하였다. 상기 추출액은 최 등[12]의 방법에 따라 수포화 n-butanol 추출법으로 추출분획 후 조사포닌을 5% 메타놀 용액(v/w)이 되도록 메탄올에 용해 시켜 검액으로 하였다. Silica gel TLC plate판에 검액을 5 μl씩 점적하여 chloroform/methanol/water(65:35:10, low phase)로 전개한 후 30% 황산시액을 분무하여 110℃에서 5분간 발색시켜 확인하였다. HPLC 분석은 Lichrosorb-NH_2 column(Merck, 10 μm, ID 0.46 cm × 25 cm)에 acetonitrile/water/n-butanol (80:20:0.25)을 이동상으로 하여 differential refractometer (RI 401) 검출기로 검출정량하였다.

결과 및 고찰

곰팡이의 분리 및 동정

오염된 홍삼에서 미생물을 분리한 결과 대부분 곰팡이로 추정되는 colony가 나타났으며 그중에서 가장 발생빈도수가 많은 곰팡이 colony를 분리하여 Raper 등의 분류법[10]에 준하여 형태학적 특성을 관찰한 결과는 Fig. 1~3과 같았다. Fig. 1은 분리균의 colony 특성을 보여주는 사진이다. 분리균의 colony 특성은 czapek's agar 배지에서는 colony의 색이 노란 크림색을 나타내었고 벨벳모양의 표면특성을 나타낸 반면 malt extract agar 배지에서는 청녹색을 띈 양털모양으로 중앙부분이 융기하였다. 또한 두 배지상에서 25℃, 30일 이상배양 하였을 경우에도 sclerotia는 관찰되지않았다. Fig. 2 및 Fig. 3에서 보는 바와같이 분리균주의 입체구조 및 미세구조를 조사한 결과 균사는 격벽이 있었고 또한 Aspergillus 속의 전형적인 특징중의 하나인 vesicle도 관찰되었다. Conidiophore의 맨끝이 분지하여 sterigmata가 생기고 그 선단에는 conidia가 착생하였으며 conidia는 난형이었다. 지금까지 요약된 이상의 결과(Table 1)로 부터 오염된 홍삼으로부터 분리된 미생물은 전형적인 곰팡이로서 불완전 균류인 *Aspergillus* sp. 유연균주로 생각된다.

*Aspergillus*는 낮은 수분활성도(0.85 이하)에서도 잘 생육하는 곰팡이 균주로서 수분함량 15.0% 이하의 곡류 및 옥수수 등에 번식하여 변질을 야기시킨다고 알려져 있다.[13] 곽[6] 및 정[7] 등은 인삼에서 *Aspergillus, Penicillium* 및 *Mucor* 속의 존재를 확인하였으며 *Aspergillus* 및 *Penicillium* 속이 인삼제품에서 가장 잘 생육한다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와도 일치하는 것으로 생각된다.

보존료 농도별 생육억제효과

홍삼에 오염된 곰팡이를 방제하기 위해서는 인체에 무해한 가스상태로 살균처리하는 것이 바람직하지만 현재까지 그러한 방법은 개발되지 않은 실정이다. 한편 곰팡이가 오염되면 변색 등의 외관적 품질손상 뿐만아니라 수분함량증가, 온도의 상승을 초래하며, 또한 유독성 물질을 생성하기도 한다.[13] 홍삼을 이용한 드링크나 엑기스 등의 제품을 제조할 때 이러한 미생물의 오염가능성도 배제할 수 없으므로 기초자료 획득이라는 측면에서 산업적으로 광범위하게 이용되어지고 있는 보존료, sodium benzoate 및 potassium sorbate를 사용하여 분리균 *Aspergillus* sp.에 대한 생육억제효과를 조사하였다.

Table 2는 보존료 sodium benzoate가 분리균 *Aspergillus* sp.의 생육에 미치는 영향을 조사한 것이다. Table 2에 나타낸 바와같이 보존료 무첨가 대조군에서는 균의 성장 콜로니가 37.3 mm으로 나타났으나 0.25%의 sodium benzoate를 첨가하였을 때는 27.0 mm로 균의 성장이 27.6% 저해되었다. sodium benzoate의 농도가 증가할 수록

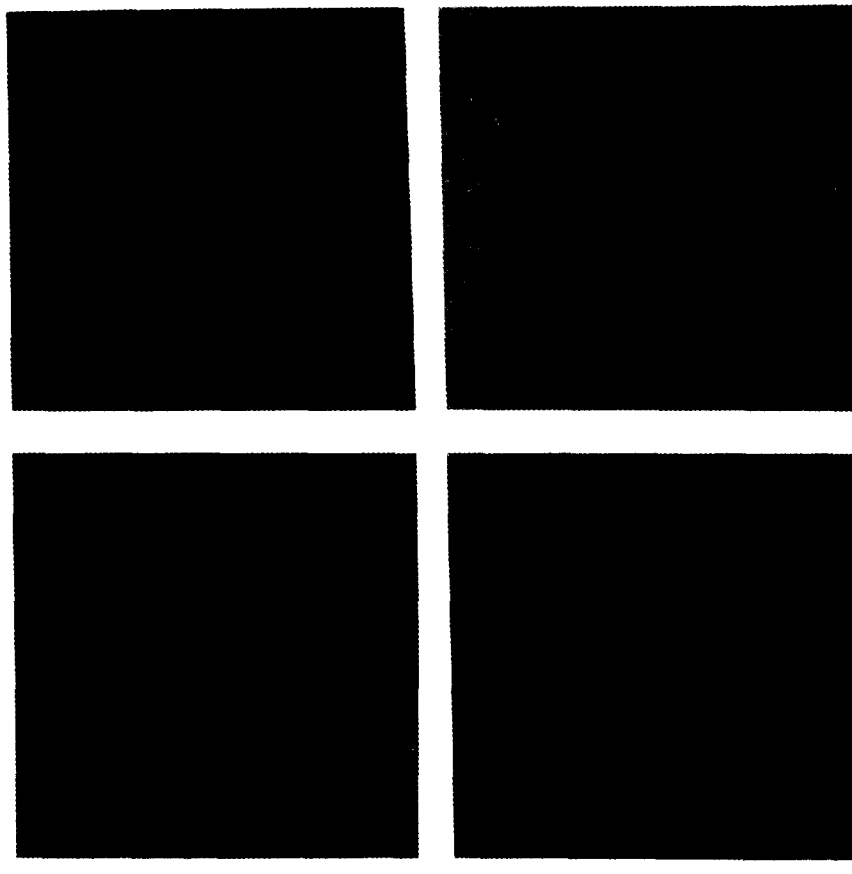

Fig. 1. Colonies of the isolated fungus on the various media.
The fungus was cultured at 25°C for 10 days.

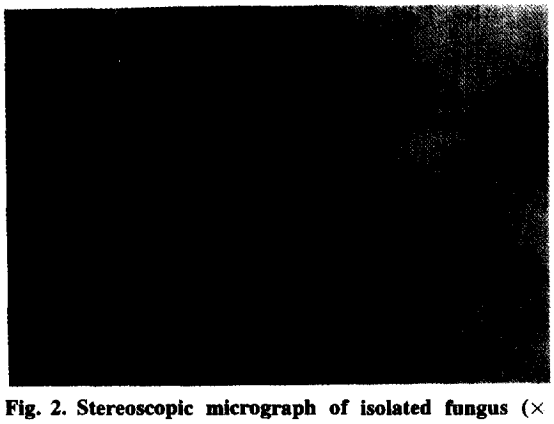

Fig. 2. Stereoscopic micrograph of isolated fungus (× 100).
The fungus was cultured at 25°C for 10 days.

Fig. 3. Photomicrograph showing detail conidial head structure of the isolated fungus (× 400).
The fungus was cultured at 25°C for 10 days.

Table 1. Morphological characteristics of the isolated fungus from contminated red ginseng

Characteristics	Czapek's agar	Malt extract agar
Growth	φ25-30 mm	φ15-20mm
Colony color	yellowish cream color (yellowish cream color at center becoming lighter toward the margin)	yellow green to gray
Colony reverse	orange - reddish color	yellowish brown color
Characteristics of surface	texture velvet, radiately wrinkled	texture lanose, central area raised
Exudate	pale yellowish exudate	absent
Sterigmata	strictely biseriate	strictely biseriate
Conidia	elliptcal to subglobose 3 μm in diameter	elliptical to subglobose 3 μm in diameter
Cleistothecia	absent	absent
Sclerotia	absent	absent

* The fungus was cultivated at 25°C for 10 days

Table 2. The effects of sodium benzoate at various concentrations on the growth of isolated *Aspergillus* sp.

Sodium benzoate Conc.(%)	Colony size (mm)[a]	Growth inhibition rate(%)
0.00	37.3	-
0.25	27.0	27.6
0.50	25.3	32.2
1.00	21.0	43.7
2.00	17.0	54.4
4.00	7.5	79.9

The isolated *Aspergillus* sp. was incubated on PDA plate at 28°C for 5 days.

[a]Values are means of four measurements.

균의 생육이 점차 억제되어 4.0% 첨가하였을 경우에 79.9%의 균성장저해율을 나타내었다. Table 3은 potassium sorbate를 사용하였을 경우의 *Aspergillus* sp.생육억제 효과를 나타낸 것인데 표에서 보는 바와같이 0.25%의 potassium sorbate를 첨가하였을 때 균의 생육이 22.3 mm로 균의 성장저해율이 40.2%로 나타났다. 또한 potassium sorbate를 4.0% 첨가하였을 때는 전혀 균의 생육을 관찰할 수 없어서 100%의 성장저해율을 나타내었다. 이와같은 사실로부터 분리균 *Aspergillus* sp.는 sodim benzoate 보다는 potassium sorbate에 대해서 더욱 큰 생육억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

Table 3. The effects of potassium sorbate at various concentrations on the growth of isolated *Aspergillus* sp.

Potassium sorbate Conc.(%)	Colony size[a] (mm)	Growth inhibition rate(%)
0.00	37.3	-
0.25	22.3	40.2
0.50	16.5	55.8
1.00	11.5	69.2
2.00	7.8	79.1
4.00	0.0	100.0

The isolated *Aspergillus* sp. was incubated on PDA plate at 28°C for 5 days.

[a]Values are means of four measurements.

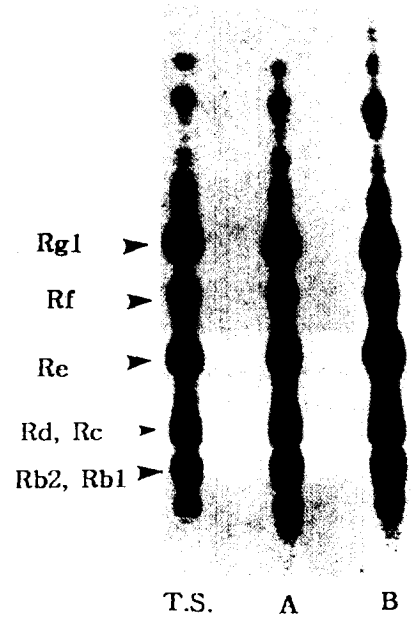

Fig. 4. TLC ginsenoside pattern of red-ginseng powder inoculated with the isolated *Aspergillus* sp.
T.S.: total saponin, A: control, B: red-ginseng powder inoculated with isolated *Aspergillus* sp. (incubation at 28°C for 10 days)

사포닌 함량변화

분리균 *Aspergillus* sp.을 홍삼분말에 인위적으로 접종하고 28°C에서 10일간 배양한 후 홍삼분말의 사포닌 함량변화를 조사한 결과는 Fig. 4 및 Table 4에 나타낸 바와

Table 4. Changes in contents of crude saponin and major ginsenosides in red-ginseng powder inoculated with isolated *Aspergillus* sp

Sample	Crude saponin (%)	Ginsenoside[a]						
		Rg_1	Re	Rd	Rc	Rb_2	Rb_1	Total
A	6.52	0.40	0.66	0.30	0.40	0.60	1.32	3.68
B	6.49	0.45	0.65	0.25	0.38	0.55	1.28	3.56

A: control, B: red-ginseng powder inoculated with isolated *Aspergillus* sp. (incubation at 28°C for 10 days). [a]Content was calculated by dry base weight of red-ginseng powder

같다. Fig. 4는 홍삼분말의 TLC chromatogram pattern을 나타낸 것인데, 홍삼분말의 사포닌 패턴은 분리균 *Aspergillus* sp.을 접종한 후에도 대조군과 동일한 사포닌 패턴을 나타내어 사포닌 함량에 변화가 없음을 추론할 수 있었다. 또한 Table 4에 낸 바와같이 사포닌 성분의 HPLC 분석결과 각각의 사포닌 성분은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과로 부터 분리균 *Aspergillus* sp.는 홍삼에 오염되었을 경우에도 인삼의 유효성분인 사포닌에는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 추론할 수 있겠다.

국문요약

염된 홍삼분말로부터 분리된 곰팡이의 배양학적 특성 및 미세구조를 조사한 결과 이 균주는 불완전균류(Fungi imperfecti)에 속하는 *spergillus*sp.의 유연균주로 동정되었다. 분리균주는 0.25%의 sodium benzoate 농도에서 점차 생육이 억제되어 4.0% 농도에서는 79.9%의 생육이 저해되었다. 보존료 potassium sorbate를 사용하였을 경우에는 sodium benzoate보다 더욱 큰 생육억제효과를 나타내어 4.0% 농도에서 완전히 생육이 억제되었다. 순수분리균 *Aspergillus* sp.가 인삼의 사포닌 분해에 미치는 영향을 조사하기위하여 TLC 및 HPLC로 분석한 결과 사포닌 성분에는 큰 영향을 나타내지 않았다.

참고문헌

1. 박세호, 유태종, 이석진: 인삼성분이 효모의 알콜발효에 미치는 영향 (1.효모의 생리에 미치는 영향). 고려인삼학회지, **5**, 139-147 (1981).
2. 양재원, 유태종: 인삼 extracts가 유산균의 생육에 미치는 영향. 고려인삼학회지, **3**, 113-126 (1979).
3. Cho, Y.D., Kim, T.U. and Choi, H.G.: 인삼사포닌 분획이 세포벽 에 미치는 영향(E.coli K-12의 세포막에 관하여). *Korean J. Ginseng Sci.*, **5**, 65-72 (1981).
4. 정노팔: 인삼의 효과에 관한 세포생리학적 연구(제1편: Saccharomyces의 분열에 미치는 영향, 제2편: Saccharomyces의 분열에 미치는 saponin과 histamine의 영향. 대한생리학회지, **3**, 45-49 (1969).
5. Joo, C.N., Cho, Y.D. and Kwon, H.Y.: Biochemical studies on ginseng saponins (XII) (The effect of ginseng saponin on bacterial growth). *Korean Biochem. J.*, **11**, 113-125 (1978).
6. 곽이성, 박채규, 김나미, 전병선, 양재원, 이광승: 고려인삼에서 분리된 *Penicillium* sp.의 동정 및 열저항성. 고려인삼학회지, **17**, 148-152 (1993).
7. 정동곤, 박길동, 하승수, 주현규: 인삼부패곰팡이의 형태 및 생리학적 특성에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **14**, 391-397 (1986).
8. 한국담배인삼공사: 홍삼 및 홍삼제품 품질교범, pp. 19 (1990).
9. Collins, C.H. and Patricia, M.L.: *Mycological Methods*. Fifth edition, Butterworth, New York, pp. 89 (1984).
10. Raper, K.B.: *The Genus Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company, New York (1949).
11. Domsch, K.H., Gams, W. and Traute-Hei Anderson: *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, New York (1980).
12. 최진호, 김우정, 양재원, 성현순: 열처리에 의한 홍삼엑기스의 성 분변화. 한국농화학회지, **24**, 50-58 (1981).
13. 곽이성: 쌀 저장중 균군의 변화에 관한 연구. 석사학위논문, 고려대학교 대학원 (1989).