

천연물 유래 항균물질을 포함한 가식성 Pullulan 필름의 충치유발균에 대한 항균효과

- 연구노트 -

김기명¹ · 황권택² · 유상권³ · 이웅수⁴ · 정경환⁴ · 문성권⁴ · 최원석^{4*}

¹전라남도 식품산업연구센터, ²남부대학교 식품영양학과
³강릉원주대학교 해양생명공학부, ⁴충주대학교 식품생명공학부

Antimicrobial Effect of Edible Pullulan Film Containing Natural Antimicrobial Material on Cariogenic Bacteria

Ki-Myong Kim¹, Kwon-Tack Hwang², SangGuan You³, Ung-Soo Lee⁴,
Kyung-Hwan Jung⁴, Sung-Kwon Moon⁴, and Won-Seok Choi^{4*}

¹Jeonnam Biofood Technology Center, Jeonnam 520-330, Korea

²Dept. of Food & Nutrition, Nambu University, Gwangju 506-824, Korea

³Dept. of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangwon 210-702, Korea

⁴Division of Food and Biotechnology, Chungju National University, Chungbuk 368-701, Korea

Abstract

This study was focused on the development of anticariogenic edible films using pullulan containing grapefruit seed extract (GFSE), polylysine or propolis. According to the result of antimicrobial activity (disc diffusion method) of GFSE, polylysine and propolis against *Streptococcus mutans*, antimicrobial pullulan film was produced by adding grapefruit seed extract. The optimum combination of pullulan and sorbitol (plasticizer) was 10~15% (w/v) and 40~50% of pullulan (w/w), respectively. Minimum concentration of grapefruit seed extract for growth inhibition of *Str. mutans* was 50 ppm in medium. Formulation of antimicrobial pullulan films containing grape seed extract was established and these results evidently showed potential for commercial application.

Key words: anticariogenic edible film, grapefruit seed extract, *Streptococcus mutans*

서 론

가식성 필름은 식품을 외부의 위험물질과 충격으로부터 보호하고, 플라스틱 고분자필름에 비해 쉽게 분해되며, 포장 재질에 향미, 색소, 감미료 등의 성분을 첨가하여 내용물에 관능적 특성을 부여할 수 있을 뿐만 아니라, 항산화제 혹은 미생물 억제제 등을 첨가하여 이들 물질의 운반자 기능을 할 수 있으며, 수증기, 기체 및 용질의 이동을 방지하는 식용 가능한 차단막 역할을 함으로서 가식성 천연고분자 필름에 대한 연구가 국제적으로 활발하게 진행되고 있다(1-3).

반면에 생물기원 고분자물질을 재료로 가식성 필름을 제조하였을 경우 플라스틱 필름과 비교하여 수분에 대한 저항성이 약한 치명적인 단점을 가지고 있어, 기존의 가식성 천연고분자 필름에 대한 많은 연구가 주로 이들 필름의 미약한 물성 및 수분 차단성을 개선하려는 것에 주목적을 두었으나(4-8), 이런 연구방향에서 과감히 탈피, 오히려 이를 적극적으로

으로 활용하려는 연구가 필요하다 하겠다.

충치(치아우식증)는 치면세균막내에 존재하는 *Streptococcus mutans*와 같은 산생성균들이 치면에 부착하여 구강으로 섭취된 음식물 중의 발효성 당을 대사에 이용하여 생성된 유기산의 작용으로 치아의 법랑질이나 백악질이 파괴되어 발생하는 질환중의 하나이다(9,10). 이러한 충치에 대한 예방치학적 연구로서 칫솔질, 항균제제의 개발, glucosyl-transferase 합성저해제의 개발, 비발효성 당의 선택적 섭취와 같은 연구가 진행되어 왔으며, 그중 *Streptococcus mutans*에 대한 항균활성을 갖는 물질의 개발과 그 효과에 관한 연구들이 최근 들어 국내외에서 다수 진행되고 있다(11-14). 그러나 이러한 것들은 dental fluorosis, 내성균 출현, 구강점막세포의 궤양이나 경제성과 같은 문제점들이 발생하고 있어 실용화된 경우는 흔치 않다(15).

Pullulan은 *Aureobasidium pullulans*이 만들어내는 미생물유래 수용성 천연다당류로, 뛰어난 코팅 및 필름형성능을

*Corresponding author. E-mail: choiws@cjnu.ac.kr
Phone: 82-43-820-5249, Fax: 82-43-820-5240

갖고 있고 향미가 없으며 입에 잘 녹아 구강청정필름이나 사탕의 속포장필름 등으로 식품에서 다양하게 사용되고 있다(16).

본 연구에서는 최근 생활수준의 향상과 소비자들의 건강에 대한 관심의 증가 및 중요성 인식으로 다양한 형태의 천연항균물질에 대한 관심이 고조되고 있으며, 또한 당류섭취량 증가 등의 식생활패턴의 변화에 따라 발생률이 점차 증가 추세에 있는 충치에 대한 예방적 연구로, 최근 들어 기능성 소재로의 탐색연구가 활발히 이루어지고 있고 실용화된 자몽종자추출물(grapefruit seed extract)(17-19), 폴리라이신(polylysine)(20,21) 및 프로폴리스(propolis)(22,23) 등 항균력이 뛰어난 천연항균물질을 pullulan 필름형성용액에 첨가하여 천연고분자 필름을 제조함으로써, 친수성 천연고분자 가식필름이 지닌 포장재로서의 속성용해단점을 오히려 적극적으로 활용, 가식성필름을 이용한 충치예방 및 구강 청결 등의 치의적 상품개발 가능성을 타진해 보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

자몽종자추출물은 추출물 원액(DF-100)을 (주)에프에이뱅크(경기도 안산시)에서 구입하여 사용하였으며, 프로폴리스는 수용성프로폴리스액(PROBEE PROPOLIS)을 서울프로폴리스(주)(대전)에서 구입하여 시료로 사용하였다.

ϵ -Polylysine은 (주)신승하이캡(서울)에서 공급받아 사용하였으며, 글리세린(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)은 자몽종자추출액 및 수용성프로폴리스추출액에 포함되어 있어 항균성을 측정하기 위해 사용하였다.

Pullulan은 (주)케이비피(경기도 평택시)에서 구입하였으며, sorbitol(Sigma Chemical Co.)을 가소제로 사용하였다.

충치유발균주의 배양

한국생명공학연구원 생물자원센터(대전)에서 분양받은 충치유발균주 *Streptococcus mutans*(KCTC 3065)를 Brain heart infusion broth(Difco Co., Detroit, USA) 배지에서 37°C에서 3~5일간 혐기적 조건하에서 계대배양 하여 사용하였다.

항미생물 활성 측정

Disc method: *Streptococcus mutans*가 접종된 petri-dish의 배지표면에 자몽종자추출물, 수용성프로폴리스 또는 polylysine이 각각 40 μ L가 함유된 8 mm 지름의 종이 disc를 부착시킨 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 미생물 inhibition zone의 크기를 vernier caliper(Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)로 측정하여 항미생물 활성을 조사하였다.

최소생육저지농도 측정: *Streptococcus mutans* 단일 콜로니를 액체배지(BHI broth)에 접종하고 다시 37°C배양기에서 24시간 배양하여 균주의 활성을 높인 후, 자몽종자추출

액을 포함한 pullulan 필름(2.5×3 cm) 1개, 2개, 3개 및 4개를 액체배지 10 mL에 첨가한 후, 이 액체배지를 37°C배양기에서 배양시키면서 시간에 따라 흡광도 655 nm에서 배지의 탁도를 spectrophotometer로 측정하여 균주의 증식여부를 확인함으로써 최소생육저지농도(Minimum Inhibition Concentration, MIC)를 조사하였다(11). 한편, pullulan 필름(2.5×3 cm) 내에 포함되어 있는 자몽종자추출물의 농도를 계산하여, 액체배지 전체의 용적에 대한 농도를 ppm으로 나타내었다.

필름 제조

자몽종자추출물을 함유할 pullulan 필름형성용액은 5~20%(w/v) pullulan 수용액에 sorbitol을 가소제로 pullulan 질량의 20~60%(w/w) 비율로 첨가하여 제조하였다.

이들 필름형성용액을 90°C 수욕상에서 30분 동안 가열한 다음 상온에서 식힌 후, 진공펌프로 필름형성용액에 녹아있는 용존 기체를 제거한 이후에 필요한 농도의 자몽종자추출액을 첨가하였다.

가식성 단백질 필름은 이들 필름형성용액을 film applicator(Micrometric Film Applicator K3570, Elcometer Instrument Ltd., Manchester, England)를 이용하여 코팅두께를 조절한 후, 소수성필름으로 표면 처리된 유리판에 부어 수평을 유지하면서 50°C 조건에서 건조시켜 제조하였다(1).

필름의 용해도실험

필름의 용해도는 Kim 등(1)의 수용성물질(total soluble matter) 함량측정방법을 응용하여 측정하였다. 즉, 필름시료(2.5×3 cm)를 105°C 건조기에서 8시간 동안 건조시킨 다음 무게를 정확히 측정한 후 30 mL의 증류수가 들어있는 삼각 flask에 집어넣고 aluminum foil로 삼각 flask의 입구를 막아 수분의 증발을 방지한 후, 8시간 동안 상온에서 정치시켰다. 시간이 경과 후 증류수에 녹지 않은 필름잔사를 모아 105°C 건조기에서 건조시킨 후 무게를 재서 다음 식에 의해 계산된 값을 필름의 용해도로 정의 측정 하였다.

필름의 용해도(%) = [(건조된 필름의 무게 - 증류수에 녹지 않은 필름의 잔사) / 건조된 필름의 무게] × 100

필름의 두께 측정

각 필름의 두께는 0.001 mm의 정밀도를 갖는 micrometer (Digimatic outside micrometer, Mitutoyo, Kanagawa, Japan)을 이용하여 시료의 중심부와 주변 부위를 5회 이상 측정하였다.

결과 및 고찰

천연항균물질의 충치유발균에 대한 활성

항균작용이 있다고 알려진 천연물질인 자몽종자추출액, 수용성프로폴리스액 및 polylysine 용액을 농도별로 40 μ L 씩 paper disc에 묻혀 clear zone 측정을 통해 충치유발균

Table 1. Antimicrobial effect of grapefruit seed extract, propolis and polylysine on cariogenic bacteria (*Streptococcus mutans*)

Natural antimicrobial material Concentration	Diameter of clear zone (mm)				
	100%	50%	10%	5%	1%
Grapefruit seed extract		18.7±0.2	17.4±0.3	9.2±0.1	ND ¹⁾
Propolis	13.2±0.3	9.6±0.2	ND		
Polylysine		14.7±0.3	ND		

¹⁾ND: not detected.



Fig. 1. Antimicrobial effect of grapefruit seed extract (GFSE) on cariogenic bacteria (*Streptococcus mutans*). Numbers (0.5, 1, 5, 10) on figure mean concentrations (%) of GFSE.

(*Streptococcus mutans*)에 대한 항미생물 활성을 측정하였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1 및 Fig. 1의 결과에서 보여주는 바와 같이 자몽종자추출액의 경우 10%의 농도에서 *Streptococcus mutans* 균에 대해 확실한 항균활성이 있음을 보여주었으며, 5%의 농도에서도 미약하나마 clear zone을 형성하였다. 프로폴리스액의 경우 원액에서 확실한 항균활성을 보여주었으며, 50% 농도에서는 미약한 항균활성을 보여주었다. Polylysine의 경우 50%의 용액에서는 확실한 clear zone이 나타난 반면 10% 용액에서는 나타나지 않아 *Streptococcus mutans* 균에 대한 항균활성은 자몽종자추출물보다 크지 않은 것으로 나타났다.

더불어 본 측정방법을 통해 10% 농도의 자몽종자추출액은 *Streptococcus mutans*에 대해 24시간까지도 항균효과가 유지되는 것으로 관찰되었다.

한편 자몽종자추출액에 포함되어 있는 글리세린의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균활성을 측정한 결과 50%의 농도에서도 항균활성은 관찰되지 않았다.

이들 결과로부터 천연물질 중 항균활성을 지닌 것으로 알려진 polylysine, 수용성프로폴리스, 자몽종자추출물 중에서 실험결과 *Streptococcus mutans*에 대해 가장 항균효과가 높은 자몽종자추출물을 가식성필름에 혼합하기로 결정하였다.

Pullulan 필름의 제조 및 특성

자몽종자추출액을 함유할 가식성필름의 성분인 pullulan의 농도 및 sorbitol의 농도 변화에 의한 필름형성능력을 조사해 보았다. 일반적으로 pullulan의 농도가 높을수록 필름의 형성능력도 증가하나 경제성 및 용해도 등의 이유로 적정 농도의 사용이 요구되며 본 실험결과 10~15%(w/v)의 농도가 이러한 욕구를 충족시킬 수 있는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 Rhim(16)과 Lazaridou 등(24)의 실험 농도에 비해서는 다소 높은 농도였으나 Shih(25)와 Kim 등(26)의 실험 농도에 비해서는 낮은 농도였다. 가소제로 사용된 sorbitol의 농도는 사용된 pullulan 양의 40~50%(w/w)의 농도에서 적절한 필름의 유연성을 제공해주는 것으로 나타났다. 사용된 sorbitol의 농도는 Lazaridou 등(24) 및 Rhim(16)의 실험에서보다는 다소 높은 것으로 나타났다.

위의 조성비로 만들어진 필름은 가식성필름으로 사용될 수 있을 만큼 충분한 강도와 유연성을 지니고 있었으며, 필름의 두께를 Table 2에 나타내었다. 본 실험에서 제조된 pullulan 필름의 경우 시판되고 있는 필름의 두께와 비교하여 약 2배정도 두꺼웠다. 이는 시판제품의 제조기술과 비교할 때 기술적 미숙함이 드러난 결과로, 상업적 제조기술을 활용 시 극복될 수 있는 문제로 사료된다.

한편 만들어진 pullulan 필름의 물에 대한 용해도는 매우 높아 본 실험방법으로는 측정할 수 없을 만큼 신속하고도 완전히 용해되었다. 본 실험 결과 제조된 pullulan 필름은 시판 구강청정필름의 용해도와 유사하게 구강에서 쉽게 용해되었으며, 따라서 항충치활성을 지닌 물질을 첨가하여 충치를 예방하는 가식성필름으로 활용이 가능함을 알 수 있었다.

자몽종자추출물을 함유한 필름의 충치유발균에 대한 항균활성

Pullulan 필름의 경우 물에 대한 용해도가 매우 높아 clear zone 직경을 측정하는 방법으로 항균활성을 측정하는 것이 불가능하여, *Streptococcus mutans* 균이 들어 있는 액체배양액에 자몽종자추출액을 함유한 pullulan 필름을 넣어 배양

Table 2. Thickness of manufactured pullulan film (10%, w/v) and commercial pullulan film

Type	Thickness (μm)
Manufactured pullulan film (10%)	84.7±5.0
Commercial pullulan film	37.2±4.2

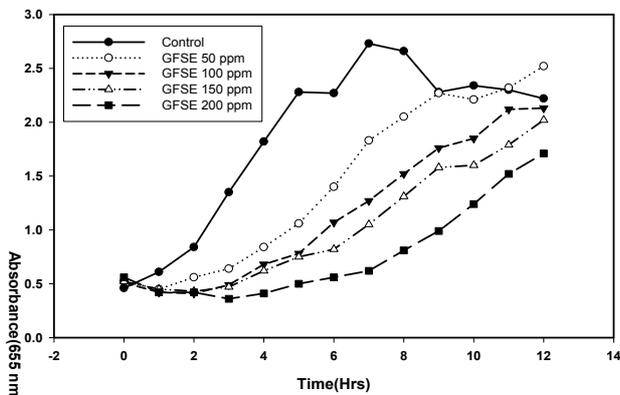


Fig. 2. Antimicrobial effect of edible film containing grapefruit seed extract (GFSE, 50~200 ppm) on cariogenic bacteria (*Streptococcus mutans*).

시키면서 시간에 따라 흡광도를 측정하여 자몽종자추출액의 최소생육저지농도를 측정하였다. 필름제조용액에 첨가한 자몽종자추출액의 양으로부터 제조된 필름에 포함된 자몽종자추출액의 양을 계산하였고, 이를 기준으로 시판 구강청정필름과 동일한 크기인 2.5×3 cm의 필름질편에 포함된 자몽종자추출액 양을 계산한 결과, 액체배양액에 필름질편을 한 개 첨가할 경우 자몽종자추출액의 농도가 약 50 ppm이 되는 것으로 계산되었다. 따라서 이 필름질편의 첨부 숫자를 늘려가면서 배양액내 자몽종자추출액의 농도를 증가시켜 최소생육저지농도를 측정하였다.

Pullulan 필름을 대조군으로 하였으며, 자몽종자추출물을 함유한 필름질편을 1~4개 첨가하여 항균활성을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 자몽종자추출물을 함유한 필름 1개를 배양액에 첨가하였을 경우 그림에서 보는 바와 같이 *Streptococcus mutans*의 활성을 억제하는 것으로 나타났으며, 첨가된 필름의 개수가 증가할수록 *Streptococcus mutans*에 항균활성도 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다. 본 실험에서 나타난 자몽종자추출액의 항균활성효과는 Hong 등(27)과 Lim 등(28)의 실험에서 조사된 *E. coli* O157:H7(400 ppm)과 *L. monocytogenes*(500 ppm)에 대한 항균효과보다는 높게 나타난 것으로 확인되었으며, Cho 등(29) 및 Park과 Kim(30)의 실험에서 조사된 *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella* Enteritidis(50 ppm)등에 대한 항균효과와는 유사한 결과를 나타내는 것으로 확인되었다. 이들 결과로부터 자몽종자추출물의 경우 *Streptococcus mutans*에 대한 항균활성이 매우 높음을 확인하였다.

요 약

천연항균물질인 자몽종자추출물(grapefruit seed extract), 폴리라이신(polylysine) 및 프로폴리스(propolis)의 충치유발균 *Streptococcus mutans*에 대한 항균활성을 측정

하여 가식성필름에 첨가 천연고분자 필름을 제조함으로써, 충치예방 및 구강청결 등의 치의적 상품개발 가능성을 타진해 보고자 하였다. Disc method를 이용한 예비 항균활성실험 결과, 자몽종자추출액의 경우 10%(w/w)의 농도에서 *Streptococcus mutans* 균에 대해 확실한 항균활성이 나타나, 이를 pullulan 필름제조 용액에 첨가하여 항균성 가식필름을 제조하였다. Pullulan 10~15%(w/w)의 농도와 사용된 pullulan 양의 40~50%(w/w)의 sorbitol 농도에서 적절한 항균필름이 제조되었다. 자몽종자추출액 50 ppm을 함유한 pullulan 필름은 *Streptococcus mutans*의 활성을 억제하는 것으로 나타나, 자몽종자추출액을 함유한 가식성 항균필름은 충치예방상품으로 개발 가능성이 높을 것으로 사료된다.

문 헌

- Kim KM, Lee BY, Kim YT, Choi SG, Lee JS, Cho SY, Choi WS. 2006. Development of antimicrobial edible film incorporated with green tea extract. *Food Sci Biotechnol* 15: 478-481.
- Krochta JM, De Mulder-Johnston C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technol* 51: 61-74.
- Han JH, Gennadios A. 2005. Edible films and coatings: a review. In *Innovations in Food Packaging*. Han JH, ed. Elsevier Academic Press, Oxford, UK. p 239-262.
- Sohail SS, Wang B, Biswas MAS, Oh JH. 2006. Physical morphological and barrier properties of edible casein films with wax applications. *J Food Sci* 71: 255-259.
- Han JH, Seo GH, Park IM, Kim GN, Lee DS. 2006. Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions. *J Food Sci* 71: 290-296.
- Avena-Bustillos RJ, Olsen CW, Olson DA, Chiou B, Yee E, Bechtel PJ, Mchugh TH. 2006. Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *J Food Sci* 71: 202-207.
- Shin GH, Lee YH, Lee JS, Choi WS, Park HJ. 2002. Preparation of plastic and biopolymer multilayer films by plasma source ion implantation. *J Agric Food Chem* 50: 4608-4614.
- Lee MS, Ma YH, Park SK, Bae DH, Ha SD, Song KB. 2005. Physicochemical properties of soy protein isolate films laminated with corn zein or wheat gluten. *Korean J Food Sci Technol* 37: 142-146.
- Hamada S, Ooshima T, Torii M, Imanishi H, Masuda N, Mizuno J, Sobue S, Kotani S. 1978. Dental caries induction in experimental animals by clinical strains of *Streptococcus mutans* isolated from Japanese children. *Microbiol Immunol* 22: 301-314.
- Mosci F, Perito S, Bassa S, Capuano A. 1990. The role of *Streptococcus mutans* in human caries. *Minerva Stomatol* 39: 413-429.
- Choi HD, Koh YJ, Choi IW, Kim YS, Park YK. 2007. Anticariogenic activity and glucosyltransferase inhibitory effects of extracts from pine needle and twig. *Korean J Food Sci Technol* 39: 336-341.
- Kim SJ, Park YM, Jung ST. 2005. Anticariogenic effects and inhibition of glucosyltransferase activity of *Chrysanthemum indicum* L. extract. *Korean J Food Culture* 20: 341-345.
- Yoon SY, Kim SH, Chung HL, Lee JJ, Huh CS, Baek YJ.

2000. Anticariogenic effects of unripe apple extract. *Korean J Food Sci Technol* 32: 168-173.
14. Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. 1990. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull* 38: 717-720.
 15. Park YM, Kim SJ, Jo KH, Yang EJ, Jung ST. 2006. Anticariogenic and antioxidant activities from medicinal herbs. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 284-293.
 16. Rhim JH. 2003. Characteristics of pullulan-based edible films. *Food Sci Biotechnol* 12: 161-165.
 17. Lim GO, Hong YH, Song KB. 2009. Preparation of gelatin film containing grapefruit seed extract and its antimicrobial effect. *Korean J Food Preserv* 16: 134-137.
 18. Han MR, Kim MH. 2006. Effects of alkaline ionic water and grapefruit seed extract added immersion solutions on storage characteristics of mulberry leaf soybean curd. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 108-113.
 19. Heggors JP, Cottingham J, Gusman J, Reagor L, McCoy L, Carino E, Cox R, Zhao JG. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity. *J Altern Complement Med* 8: 333-340.
 20. Kim SC, Kim JC, Park KJ, Choi JU. 2005. Antimicrobial activity of polylysine coated film. *Korean J Food Preserv* 12: 323-328.
 21. Choi OK, Noh YC, Hwang SY. 2000. Antimicrobial activity of grapefruit seed extracts and polylysine mixture against food-borne pathogens. *Korean J Dietary Culture* 15: 9-15.
 22. Cha JY, Cho YJ, Kim CJ, Kim CT. 2007. Characteristics of gelatin packaging film incorporated with propolis for food storage. *Food Eng Prog* 11: 112-118.
 23. Son YR. 2003. Studies on the antimicrobial effect of extracts of propolis. *J Fd Hyg Safety* 18: 189-194.
 24. Lazaridou A, Biliaderis CG, Kontogiorgos V. 2003. Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymers* 52: 151-166.
 25. Shih FF. 1996. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. *Cereal Chem* 73: 406-409.
 26. Kim KW, Ko CJ, Park HJ. 2002. Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. *J Food Sci* 67: 218-222.
 27. Hong YH, Lim GO, Song KB. 2009. Physical properties of Gelidium corneum-gelatin blend films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. *J Food Sci* 74: C6-C10.
 28. Lim GO, Hong YH, Song KB. 2009. Preparation of gelatin film containing grapefruit seed extract and its antimicrobial effect. *Korean J Food Preserv* 16: 134-137.
 29. Cho SH, Lee SY, Kim JW, Ko GH, Seo IW. 1995. Development and application of natural antimicrobial agent isolated from grapefruit seed extract. *J Fd Hyg Safety* 10: 33-39.
 30. Park HK, Kim SB. 2006. Antimicrobial activity of grapefruit seed extract. *Korean J Food Nutr* 19: 526-531.

(2009년 7월 27일 접수; 2009년 8월 6일 채택)