



효모에 의한 기능성 음료 변질 제어를 위한 천연항균물질 항균력 평가

연지혜 · 이지영 · 이희석 · 하상도 · 박철수¹ · 우문제¹ · 이상훈¹ · 김진수¹ · 이찬*

중앙대학교 식품공학과, ¹광동제약

Evaluation of the Natural Antimicrobials against Yeasts in Functional Beverages to Control Quality Loss

Ji-Hye Yeon, Ji-Young Lee, Hee-Seok Lee, Sang-Do Ha, Chul-Soo Park¹, Moon-Jea Woo¹, Sang-Hun Lee¹, Jin-Soo Kim¹, and Chan Lee*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, ¹Kwang-Dong Pharmaceutical Co., Ltd.

(Received April 17, 2009/Revised July 13, 2009/Accepted September 21, 2009)

ABSTRACT - We investigated eight active natural antimicrobials for preservation of functional beverages that are usually degraded by yeasts rather than by bacteria due to a high sugar content and a low pH. Five strains of yeasts (*S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *P. membranaefaciens*, *C. albicans*, and *P. Anomala*) were tested with eight natural antimicrobial agents (ϵ -polylysine, yucca extract, vitamin B₁ derivative, scutellaria baicalensis extract, chitooligosaccharid, allyl isothiocyanate, sucrose-fatty acid ester, and oligosaccharide). The lowest minimal inhibitory concentrations (MIC) were 10 ppm for oligosaccharide and sucrose-fatty acid ester against *S. cerevisiae* and *Z. bailii*, 10 ppm for allyl isothiocyanate against *P. membranaefaciens* and *C. albican*, and 10 ppm for allyl isothiocyanate and oligosaccharide against *P. anomala*. No growth were observed for five kinds of yeasts in functional beverages containing sodium benzoate at concentration of 0.015% or higher. The resistance of *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, and *P. Anomala* against natural antimicrobial agents was lower than those of *P. membranaefaciens* and *C. albican*. Allyl isothiocyanate, oligosaccharide, and sucrose-fatty acid ester showed the highest antimicrobial activities among the eight tested antimicrobials. These results can be applied to develop new natural antimicrobial agents to improve microbial quality of functional beverages.

Key words: Natural antimicrobials, antimicrobial effect, yeasts, functional beverage, minimal inhibitory concentration (MIC)

최근 식품의 변질로 인한 식중독이 사회의 커다란 문제로 대두됨에 따라 식품 안전성에 대한 관심이 증가하고 있다. 식중독 원인 미생물이나 부패 미생물을 제어하기 위해 식품을 안전하게 장기간 저장하기 위한 수단으로 가열, 초고압, 방사선, PEF, 광펄스 등 물리적 방법과 알코올, 염소, 과산화수소, 천연물질 등 화학적 방법이 사용되고 있다. 그 중 편의성과 비용 때문에 nitrite, sorbic acid, sodium metabisulfite, 염소제 등 다양한 합성 보존료가 장기간 사용되어 왔으나 안전성에 관한 문제가 지속적으로 대두되고 있다¹⁻³. 최근 소비자들의 생활수준의 향상과 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 합성보존료 보다는 천연보존료를 선호하게 되어 천연 항균성 물질 연구, 개발이 급증하게 되었다⁴.

이러한 천연 항균성 물질의 개발과 이용은 합성보존료의 대체라는 의미와 소비자 기피현상을 유발시키지 않으면서 각종 가공식품의 저장성 향상과 안전성 확보라는 측면에서 그 중요성이 인정된다^{5,6}. 식품산업에 사용되는 천연항균제로는 전통적으로 사용해 온 소금, 식초 등 일반 식품 소재뿐만 아니라 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 있다⁷. 그러나 맛, 냄새 등 관능적 문제, 낮은 항균력 및 항균 범위의 협소함 때문에 그 사용에 제한이 있어 실제로 산업화된 경우는 매우 드물다⁸. 이에 다양한 항균물질의 농도별로 타겟균에 대한 항균력을 측정하여, 경제성과 관능적 특성 등에 적합하여야만 실용화가 사용 가능할 것이다.

최근 비타민 음료 등 기능성 음료 시장이 급격히 팽창하고 있다. 이러한 기능성 음료는 낮은 pH(3.0±0.1), 높은 당농도(12±0.1%) 때문에 세균은 성장이 불가능하고

*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

효모가 주된 변패 원인균이 되어 소비자 클레임의 원인이 되고 있다. 효모의 경우 당발효를 통한 알코올 생성, 알코올 발효를 통한 산막 형성, 발효를 통한 CO₂ gas 생성 등으로 용기의 파손, 품질 손상 등을 일으킬 수 있다. 이러한 당 음료 변패의 주 원인균은 *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida albicans*, *Pichia anomala* 등이 주로 알려져 있다. 당함량이 높은 기능성 음료가 시장에서 성공하기 위해서는 이러한 변패 원인 효모의 제어가 필수적인데, 가열의 경우 영양소 손실과 변색으로 이어져 한계가 있다. 본 연구는 효모에 의한 변패가 문제시 되고 있는 기능성음료의 저장성을 향상시키고자 주요 천연항균제 8종을 선별하여 그 항균력을 평가하였다.

재료 및 방법

재료

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

천연항균제

살균된 기능성 음료 100 mL에 대한민국 식품공전에서 허용된 천연항균제인 ε-Polylysine(폴리리신, 액상, (주)신승하이켄, 대한민국), 유카추출물(*Yucca (Yucca shidigera) extract*, 분말, 데저트킹, 미국), TLS(Vitamin B₁ 유도체, 분말, 신코, 일본), 복합황금추출물(BMB-FS, 액상, (주)테코스, 대한민국), 키토올리고당(Chitooligosaccharide, 분말, 혜전대학, 대한민국), Allyl Isothiocyanate(Natural extracts LTD, 인도), 자당 지방산 에스테르(Sucrose-fatty acid ester, Mitsubishi-Kagaku Foods co., 일본), 올리고당(Oligosaccharide, 액상, 혜전대학, 대한민국) 5~1,000 ppm과 대조군으로 안식향산나트륨(Sodium benzoate) 500, 150 ppm을 첨가하였다.

효모 균주 및 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 설정

사용된 효모 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*(KCCM 11293), *Zygosaccharomyces bailii*(KCCM50165), *Pichia membranaefaciens*(KCCM 32592), *Candida albicans*(KCCM 50658), *Pichia anomala*(KCCM 50502)로서 한국종균협회(Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양 받아 사용하였다. Acidified Potato Dextrose Agar (APDA, Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 25°C에서 24~48시간씩 3회 계대 배양하였다. 위에서 농도 별로 준비된 비타민음료 100 mL 에 10⁴ CFU/mL 수준이 되도록 접종하여, 25°C에서 5일 동안 배양하면서 640 nm에서의 흡광도(Spectrophotometer, ELx808, Biotech Ltd., Winooski, VI, USA)를 측정하여 균 주의 성장 여부에 따라 MIC를 결정하였는데, 균의 성장이 전혀 없는 농도를 MIC로 간주하였다.

결과 및 고찰

효모에 대한 천연항균제의 최소저해농도(MIC) 설정

다섯 가지 효모에 대한 8가지 천연항균제의 MIC를 Table 1에 나타내었다. *S. cerevisiae*의 MIC는 ε-Polylysine 50 ppm, 유카추출물 200 ppm, TLS 80 ppm, 복합황금추출물 300 ppm, 키토올리고당 30 ppm, allyl isothiocyanate 30 ppm, 올리고당 용액 10 ppm, 자당지방산에스테르 10 ppm으로 나타나 이들 중 가장 저항력이 낮음을 알 수 있다. Esaki와 Ozozaki (1982)에 따르면, 무에 함유되어 있는 allyl isothiocyanate 4.34 mM에서 *S. cerevisiae*의 생육이 저해된다고 보고하였고⁹⁾, Tokuoka 등¹⁰⁾은 Allyl isothiocyanate 9.5 mg/L에서 *S. cerevisiae*의 생육저해효과가 있다고 보고하였는데 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

*Z. bailii*에 대한 MIC는 ε-Polylysine 50 ppm, 유카추출물 700 ppm, TLS 100 ppm, 복합황금추출물은 500 ppm, 키토올리고당 300 ppm, allyl isothiocyanate 30 ppm, 올리고

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Natural Antimicrobials against Five Strains of Yeasts in Functional Beverage (unit: ppm)

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>P. membranaefaciens</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. anomala</i>
ε-Polylysine	50	50	70	70	80
Yucca(<i>Yucca shidigera</i>) extract	200	700	500	400	500
Vitamin B ₁ derivative	80	100	300	150	70
Scutellaria baicalensis extract	300	500	600	700	1,000
Chitooligosaccharide	30	300	90	50	700
Allyl isothiocyanate	30	30	10	10	10
Oligosaccharide	10	10	≥ 1,000	80	10
Sucrose-fatty acid ester	10	10	30	30	≥ 1,000
500 ppm Sodium benzoate			No Growth		
150 ppm Sodium benzoate			No Growth		

당 용액 10 ppm, 자당지방산에스테르 10 ppm으로 나타나 *S. cerevisiae*와 유사한 저항력을 보였다. *P. membranefaciens*에 대해서는 ϵ -Polylysine 70 ppm, 유카추출물 500 ppm, TLS 300 ppm, 복합황금추출물 600 ppm, 키토올리고당 90 ppm, allyl isothiocyanate 10 ppm, 올리고당 용액 1,000 ppm 이상, 자당지방산에스테르 30 ppm으로 나타나 allyl isothiocyanate 이 가장 높은 항균력을 나타내었으며, 올리고당은 1,000 ppm 이상으로 거의 항균효과가 없었다. 저급 지방산인 ethyl acetate로 추출물을 사용하여 *P. membranefaciens*에 대한 항균효과를 측정한 결과 강한 항균력을 보였다는 Tokuoka 등¹¹⁾의 연구결과도 있어 기타 천연항균제에 대한 개발이 기대된다.

*C. albicans*의 MIC는 ϵ -Polylysine 70 ppm, 유카추출물 400 ppm, TLS 150 ppm, 복합황금추출물 700 ppm, 키토 올리고당 50 ppm, allyl isothiocyanate 10 ppm, 올리고당 용액 80 ppm, 자당지방산에스테르 30 ppm으로 나타나 allyl isothiocyanate 사용 시 가장 높은 항균력을 나타내었다. 關山(1993)¹²⁾의 천연항균제의 *C. albican*에 대한 최소저해농도가 5~10 ppm 범위에 있다고 한 결과는 본 실험과 유사하였다.

*P. anomala*의 MIC는 ϵ -Polylysine 80 ppm, 유카추출물 500 ppm, TLS 70 ppm, 복합황금추출물 1,000 ppm, 키토 올리고당 700 ppm, allyl isothiocyanate 10 ppm, 올리고당 용액 10 ppm, 자당지방산에스테르 1,000 ppm 이상으로 나타나 allyl isothiocyanate, 올리고당 용액이 가장 강한 항균력을 보였다. Magnusson(2003)이 연구한 천연항균제인 유기산의 경우 *P. anomala*의 생육저해효과가 거의 없다는 보고¹³⁾와 5% 유기산 농도 처리에도 *P. anomala*의 생존이 유지되고 있다는 연구¹⁴⁾에서 알 수 있듯이 본 연구에서 선정된 천연항균제의 항균력은 높은 것으로 볼 수 있다. 대조구로 사용된 0.015%, 0.050% 안식향산나트륨에서는 효모 다섯 균주 모두가 성장하지 않는 것으로 나타났다.

ϵ -Poly-L-lysine은 *Streptomyces albulus*를 호기 배양한 다음 배양 여액을 분리, 정제하여 얻는 물질로서, L-lysine monomer 가 약 10~30개 정도 결합된 균질한 선형고분자 형태다¹⁵⁾. 분자속에 소수성의 메틸렌기, 친수성의 아미노기와 카르복실기를 가지고 있어서 계면활성작용을 하며 측쇄에는 아미노기만이 존재하고 polylysine의 amino group 들은 수용액 속에서 (+) 전하를 띠어 polycation이 되어 정균효과를 지닌다고 알려져 있다¹⁶⁾. 즉, polylysine의 amino group이 미생물의 세포벽에 흡착되어 미생물의 증식을 억제한다고 한다¹⁷⁾. Allyl Isothiocyanate의 강력한 항균력은 미생물의 유도기를 연장시킴으로써 발휘되며, 항균작용은 allyl isothiocyanate에 있는 -NCS(isothio-cyanate)가 단백질의 -SH기와 반응하여 단백질 분자를 불활성화시켜 살균력을 갖는다고 알려져 있다¹⁸⁾. 유카(*Yucca shidigera*)는 미국의 남부지방과 멕시코에 서식하는 식물로 다양한 종류

의 steroidal saponin과 polycaccharides를 함유하고 있어 항진균성, 항세균성, 항원충제의 가능성을 나타내고 있는데, steroidal saponin은 membrane sterol과 반응하고, membrane의 기능을 파괴하여 세포의 성장을 정지시킨다고 알려져 있다¹⁹⁾.

이상의 결과를 종합해 볼 때 균주별 저항성에 차이는 보이지만 대체적으로 ϵ -Polylysine, TLS, 키토올리고당, allyl isothiocyanate, 올리고당 용액, 자당지방산에스테르가 큰 항균력을 나타내었다. TLS는 특유의 나쁜 관능적 특성과 용해성으로 인해 실용적 사용이 곤란하며 자당지방산에스테르는 상온에서 기능성 음료에 용해되지 않고 가열해야만 용해되는 문제점이 나타났다. 또한 5개 균주 중 *P. membranefaciens*, *C. albicans*이 천연항균제에 대한 저항성이 컸으며, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *P. anomala*는 위의 2개 균주에 비해 비교적 천연항균제에 민감한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 약한 살균처리 후 유통되는 기능성 음료의 효모에 의한 품질 저하를 줄이는데 활용될 수 있으리라 사료된다. 본 연구에서 제시된 ϵ -Polylysine, 키토 올리고당, allyl isothiocyanate, 올리고당 용액 등이 비타민 등 기능성 음료에 효모 변패 방지제로 첨가된다면 향후 알코올 생성, 산막 형성, CO₂ gas 생성 등으로 인한 용기의 파손, 품질 손상 등과 같은 소비자 클레임 문제가 해결될 것으로 기대된다. 일반적으로 보존료는 단독으로 식품에 첨가되기도 하지만, 다른 물질과 병용 처리하여 그 상승효과를 이용하기도 하는데 본 연구 결과 높은 항균력을 나타낸 항균제들을 이용하여 조성물을 개발하는 연구가 향후 필요할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 당 함량이 높고(12±0.1%) pH가 낮아(3.0±0.1) 세균보다는 효모에 의한 변패가 문제시 되고 있는 기능성 음료의 저장성을 향상시키고자 주요 천연항균제 8종의 항균력을 평가하였다. 이에 따라 대표적인 효모균주 *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida albicans*, *Pichia anomala* 5종을 대상으로 ϵ -Polylysine, 유카추출물, vitamin B₁ derivative, scutellaria baicalensis extract, 키토올리고당, allyl Isothiocyanate, 자당지방산에스테르, 올리고당 등 8가지 주요 항균력을 test 하여 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)로 나타내었다. *S. cerevisiae*와 *Z. bailii*는 올리고당 용액 10 ppm, 자당지방산에스테르 10 ppm, *P. membranaefaciens*와 *C. albicans*는 allyl isothiocyanate 10 ppm, *P. anomala*는 Allyl isothiocyanate 10 ppm, 올리고당 용액 10 ppm 사용 시 가장 높은 항균력을 나타냈다. 0.015% 이상의 안식향산나트륨 첨가 기능성 음료에서는 다섯 효모균 모두 증식이 관찰되지 않았다. 종합적으로 *S.*

cerevisiae, *Z. bailii*, *P. anomala*의 저항성이 *P. membranae-faciens*, *C. albicans* 보다 낮았으며, 균주별 차이는 보였으나 allyl isothiocyanate, 올리고당, 자당지방산에스테르가 큰 항균력을 보였다. 본 연구결과는 기능성 음료의 합성 보존료를 대체할 수 있는 천연항균제의 개발 및 이용에 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Sibel, R.: Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Bibel, R(Ed.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK (2003).
2. 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).
3. 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).
4. 오덕환, 함승시, 박부길, 안철, 유진영: 식품부패 및 병원 미생물에 대한 천연약용식품 추출물의 항균효과. 한국식품과학회지, **30**, 957-963 (1998).
5. 이영철, 오세욱, 홍희도: 식용 가능한 약용식물 추출물의 항균 특성. 한국식품과학회지, **34**, 700-709 (2002).
6. 정준호, 조성환: 천연항균제 처리에 의한 가공두부의 선도유지 효과. 한국식품저장유통 과학회지, **10**, 41-46 (2003).
7. 김용석, 신동화: 천연 휘발성 항균물질의 연구현황과 식품가공에의 이용. 한국식품과 학회지, **35**, 159-165 (2003).
8. 안봉전: 식품 보존제로서 천연항균물질 소개. 식품산업과 영양, **4**, 5-16 (1999).
9. Esaki, H. and Ozozaki, H.: Antimicrobial action of pungent principles in radishroot, 菜食と食糧, **35**, 207 (1982).
10. Tokuoka, K., Mori, R. and Isshiki, K.: Inhibitory effect of volatile mustard extract on the growth of yeasts, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkiaishi, **39**, 68 (1992).
11. 정대균, 유리나: 김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. 한국식품과학회지, **27**, 1035-1038 (1995).
12. 關山泰司: カラツ抽出物 製劑の 抗菌効果と その 用, 日本食品工業, 55 (1993).
13. Magnusson, J.: Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, **14**, 129-135 (2003).
14. 김종신, 이현준, 이영택, 장학길, 박종현: 에탄올과 유기산에 의한 가공쌀 부패효모의 생육저해 효과. 한국식품위생안전성학회지, **22**, 99-104 (2007).
15. Kahar, P., Kengo, K., Iwata, T., Hiraki, J., Kojima, M. and Okebe, M. Production of ϵ -Polylysine in an airlift bioactor (ABR) *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 274-280 (2002).
16. Shima, S. and Sakai, H. Polysine produced by streptomycetes. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1807-1809 (1997).
17. Kito, M., Onji, Y., Yoshida, T. and Nagasawa, T. Occurrence of ϵ -Poly-L-lysine-degrading enzyme in ϵ -Poly-L-lysine-tolerant *Sphingobacterium multivorum* OJ10: purification and characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**, 147-151 (2002).
18. Tokuoka, K., Mori, R. and Isshiki, K. Inhibitory effect of volatile mustard extract on the growth of yeasts. *Nippon Shouhin Kogyo Gakkaishi*, **39**, 68 (1992).
19. Wang, Y., McAllister, T.A., Yanke, L.J. and Cheeke, P.R. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 887-896 (1992).