

수용성 Silica에 대한 항균성물질의 흡착 및 내열성

†김 현 수 · 성 립 식 · ¹이 인 선
계명대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹계명대학교 자연과학대학 식품가공학과
(접수 : 2002. 5. 15., 게재승인 : 2002. 8. 2.)

Adsorption and Thermostability of Antimicrobial Compounds on Water-soluble Silica

Hyun-Soo Kim†, Lim-Shik Seong, and In-Seon Lee¹

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

¹Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received : 2002. 5. 15., Accepted : 2002. 8. 2.)

The adsorption of the antimicrobial compounds(AMCs) and their heat-resistance were investigated for the packaging film manufacture, wherein, the antimicrobial compounds were adsorbed on a silica component. The naturally source antimicrobial compounds were produced by methylotropic actinomycetes strains MO-16 and MO-17, extracted with ethylacetate. Antimicrobial compounds adsorbed on water-soluble silica had retained activity against Gram(+) and the Gram(-) bacteria after heat treatment at 150°C for 5min. The benzoic acid showed strong antimicrobial activity to fungi and was stable to heat treatment. The combination of antimicrobial compound plus benzoic acid was synergistic against test strains. Therefore, we estimated that the water-soluble silica is suitable for the packaging film manufacture as a adsorbent of the antimicrobial compounds.

Key Words : Antimicrobial compounds, water-soluble silica, methylotropic actinomycetes, adsorption, thermostability

서 론

식품 중 청과물, 정육, 가공육, 선어, 염장식품 등 신선식품의 선도유지 기술이 옛부터 수없이 연구되어 왔으며 최근에 들어 선도유지를 위해 다양한 기능성 재료를 조합하여 흡수, 가스조절, 습도조절, 항균효과 등의 기능을 가진 포장자재가 개발되어 사용이 되고 있다. 신선식품을 대상으로 한 경우 선도유지를 위해 미생물 생육의 억제에 사용되는 방법으로 저온유지와 항균성 포장자재의 사용이 주류를 이루고 있다. 식품에 있어 미생물의 생육은 1차적으로 표면에서 일어나며 생육의 억제를 위해 항미생물제를 직접 포장필름에 첨가하여 식품의 표면과 접촉 또는 발산에 의해 생육을 억제하는 방법이 연구 개발되고 있다(1). 최근까지 연구된 항균제의 사용은 Ag의 항균효과를 이용하여 Na이온을 Ag로 치환한 합성 zeolite를 필름에 첨가하여 Ag이온이 식품 속으로 서서히 방출하는 효과를 이용한 필름(1)을 비롯하여, 합성 또는 천연화합물을 포장재료에 첨가하여 항균효과를 검토한 결과로서 항

진균성 항생물질인 imazalil을 LDPE 필름에 첨가하여 과일과 채소 및 치즈의 포장에 사용하여 곰팡이의 생육억제 효과가 입증(2,3)되었으며, 항진균제인 benomyl(4), 유기산인 propionate, benzoate, sorbate(5,6), 와사비 추출물(7) 등을 포장재료에 사용한 연구가 보고되어 있다. 또한 국내에서의 연구는 김 등이 은의 항균력을 이용한 은을 입힌 세라믹 분말의 항균효과(8) 및 항균세라믹을 첨가한 LDPE필름의 김치저장성의 보고(9), 대황, 황련 등 식물유래의 항균물질을 첨가한 LDPE필름의 저장성 및 항균효과(10,11)에 대한 보고가 있다. 또한 본 연구자도 합성 세라믹 분말에 대한 항균성 물질의 흡착 및 내열성, 항균성물질이 함유된 세라믹 LDPE필름의 항균효과 및 식품의 저장성에 대한 연구를 보고한 바 있으나(12,13), 합성 세라믹의 착색(갈색)에 의한 사용상의 문제가 지적되어 왔다.

이들 항균성 포장필름에 첨가될 수 있는 항균소재는 위생적으로 안전하며, 필름제조시의 내열성, 식품과의 접촉시 용해성, 뛰어난 항균효과, 넓은 항균 spectrum 등이 필요하며, 천연물질의 사용이 우선되고 있다. 본 연구는 전보에서 식품과 농작물 등의 보존성을 증진시키기 위해 천연 항균제를 사용한 새로운 기능이 강화된 포장재료를 개발하고 천연 항균제의 흡착 및 필름 제조시 열에 대한 안정성을 부여하기 위하여 사용한(12,13) 합성 세라믹의 착색도(갈색)에 의해 다양한 분야에의 이용시 받는 제약을 해결하기 위하여 연구를 수

† Corresponding Author : Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Tel : +82-53-580-5284, Fax : +82-53-580-5164
E-mail : hskim@kmu.ac.kr

행하였다. 따라서 토양에서 분리한 생리적 특이성을 지닌 methanol 자화 방선균으로부터 내열성이 우수한 천연 항균성 물질 대량생산 조건을 검토하고 항균성 물질을 추출하여 흡착제 및 안정제로서 수용성 silica에 흡착시킨 후 필름 제조시에 요구되는 내열성, 항균효과 등을 조사한 결과 및 기존 항균성 물질인 benzoic acid와의 공동사용을 통한 항균력의 상승효과에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주의 항균성 물질(AMCs) 생산

본 실험에 사용한 공시균은 김 등이 분리한 균으로 강력한 항균성 물질을 생산하며 methanol자화 방선균으로 동정된 *Streptomyces* sp. MO-16(14) 및 미 동정된 MO-17균(15)을 사용하였다. 공시균은 활성유지를 위해 M배지 (K_2HPO_4 0.3%, NH_4NO_3 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, NaCl 0.1%, MeOH 1%, peptone 0.1%, pH 7.0)에 2주에 한번씩 계대배양하였으며, 공시균의 배양은 25 mL의 M배지 (100 mL Erlenmeyer flask 사용)에 포자현탁액(10^9 spores/ml) 100 μ L를 접종한 후 28°C, 150 rpm에서 2일간 배양하여 -70°C에 보존하여 전배양균으로 사용하였다. 공시균의 항균성 물질의 대량생산 조건을 확립하기 위해 5 L의 fermentor를 사용하였다. 각 균주는 -70°C에 보존한 전배양균을 3%되게 ISP No. 2배지에 접종하여 36-48 시간 배양하였다. 배양 후 3 L의 M배지에 6%되게 배양균을 접종하여 28°C, 40 rpm에서 0.5 L/min aeration의 조건하에 4일간 배양하였다. 배양일수별로 배양액을 sampling하여 pH, 균체량 및 항균활성을 조사하였으며, 배양 4일 후 ethylacetate를 이용하여 생산된 항균성물질을 추출하여 항균활성을 검토하였다.

시험균주 및 배양조건

본 실험의 항균활성 검색에 사용한 시험균 중 곰팡이는 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840, 효모는 *Candida albicans* KCTC 1940를 사용하였다.

곰팡이의 생육배지는 malt extract(Difco Co.) 2%, peptone(Difco Co.) 0.1%와 glucose 2%를 사용하였으며 pH는 6.0으로 조절하였다. 균주를 평판배지 위에 접종하여 28°C에서 5~7일간 배양한 다음, spore용액을 제조하여 4°C에서 보존하여 사용하였다. 효모류는 yeast extract 1%, glucose 2%, peptone 2%, pH 7.0을 사용하여 28°C에서 2~3일간 배양한 다음 4°C에서 보존하면서 사용전에 24시간 계대배양하여 시험균으로 사용하였다. 세균류는 Gram(+)세균 4균주, Gram(-)세균 3균주를 사용하였으며, 각 균주는 LB배지(peptone 1%, NaCl 0.5%, yeast extract 0.5%, pH 7.0)에서 1~2일 배양하여 4°C에 보존하여 사용하였다.

항균성 물질의 항균활성 및 MIC 측정

배양액중에 생산된 항균성 물질의 확인은 agar diffusion법을 사용하였다. 항균성 필름 제조시 항균효과를 보이는 항균성 물질의 최소 첨가량을 검토하기 위해 MO-16이 생산하는 항균성 물질을 ethylacetate로 추출하여, 농도별로 희석하여 20 μ L씩 paper disc(ϕ 6 mm, Whatman Co.)에 첨가하여 건조

한 후 시험균(1×10^8 cells/mL)이 함유된 평판배지 위에 얹어 28°C(곰팡이, 효모) 및 37°C(세균)에서 1~2일간 배양한 다음, clear zone의 유무로서 확인하였다.

항균성 물질의 silica 흡착효과 및 열안정성

본 연구는 투명한 항균필름의 제조가 목표이므로 다양한 흡착제에 대한 항균성 물질의 흡착 및 내열성을 검토하였다. 공시균으로부터 추출한 항균성 물질 4 mg을 0.5 mL methanol에 용해하여 수용성 및 지용성 silica 0.5 mL(V)에 흡착, 건조 후 150°C에서 일정시간 열처리하여 잔존활성을 측정하였다. 또한 항균성 물질이 흡착된 silica를 polyethylene(PE) 필름 제조시에 사용하는 silica의 농도(600 mL/100 kg-PE, V/W)로 희석하여 paper disc에 20 μ L를 흡착시켜 동일조건에서 열처리한 후 잔존활성을 검토하였다.

항균성 물질과 benzoic acid의 상승효과

본 연구에 이용한 항균성 물질은 주로 세균에 유효하므로 이를 보완하기 위하여 진균에 항균효과가 있는 benzoic acid(BA)를 공동 첨가시 항균활성의 상승효과를 검토하였다. 먼저 BA를 100, 50, 20 mg/mL의 농도로 희석하여 20 μ L씩 paper disc에 올려 항균효과를 검토한 후 100°C, 5분간 열처리하여 내열성을 확인하였다. BA와 항균성 물질의 상승효과는 2 mg/mL의 BA와 항균력이 없는 농도인 0.01 mg/mL의 항균성 물질을 동량으로 혼합하여 20 μ L를 paper disc에 올려 항균 활성을 검토하였다.

결과 및 고찰

항균성 물질 대량생산 조건

항균성 물질의 대량생산 조건은 앞에서 언급한 바와 같이 생산배지에 전배양균을 6% 되게 접종하여 동일조건에서 4일간 배양하면서 pH, 균체량 및 항균활성을 조사하였으며 ethylacetate를 이용하여 생산된 항균성 물질을 추출하여 생산성을 검토하였다. Table 1에서 보인 바와 같이 배양일수에 따라 균체량이나 배양액의 pH에는 큰 변화가 없었으며, 배양 2일째 항균성 물질 생산이 양호하다고 판단되었다. 배양 4일 후 배양액 3 L를 ethylacetate로 추출한 결과, MO-16은 143 mg, MO-17은 174 mg의 항균성 물질을 생산하였다.

항균성 물질의 MIC

항균필름 제조시 항균성 물질의 최소 첨가량을 검토하기 위해 MO-16이 생산하는 항균성 물질을 농도별로 희석하여 항균활성을 검토하였다. Table 2에서 보는바와 같이 0.1 mg/mL의 농도에서는 항균 활성이 존재하나 0.01 mg/mL의 농도에서는 항균 활성이 없으므로 0.05 mg/mL의 농도에서 *E. coli* 및 *S. aureus*를 대상으로 항균 활성을 확인한 후, 이 농도에서 항균 spectrum을 검토하였다. Table 3의 결과에서 보는바와 같이, 진균을 제외한 모든 세균에서 항균효과가 입증되었다. 따라서 필름 제조시 polyethylene(PE)수지에 첨가하는 항균성 물질의 최적 유효농도는 5 g/100 kg-PE(0.05 mg/ml)으로 결정하였다.

Table 1. Cultural conditions for antimicrobial compound production on fermentor culture

Strains	Incubation time (days)	Packed volume(ml)	Final pH	Antimicrobial activity		Antimicrobial compound production (mg)
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
MO-16	1	0.3	7.5	-	-	
	2	0.3	7.5	10	10.5	
	3	0.3	7.5	9	10	
	4	0.3	7.5	9	9	143
MO-17	1	0.3	7.5	-	-	
	2	0.3	7.5	10	11	
	3	0.3	7.5	10	10	174
	4	0.3	7.5	9	9	

Symbols : -, no visible clear zone

Table 2. Minimal inhibitory concentration(MIC) of antimicrobial compound produced by MO-16 strain

Test strains	AMC(mg/mL)		
	0.1	0.01	0.001
	Inhibitory zone(ϕ , mm)		
<i>Escherichia coli</i>	13	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-

Table 3. Antimicrobial spectra of antimicrobial compound produced by MO-16 strain

Test strain	AMC
	0.05 mg/mL
	Inhibitory zone(ϕ , mm)
Gram(+) bacteria	
<i>Bacillus thermoglucosidus</i>	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>Streptococcus equii</i>	9
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	12
Gram(-) bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
<i>Serratia marcescens</i>	10
Fungi	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-

항균성 물질의 silica 흡착효과 및 열안정성 검토

본 연구는 투명한 항균필름의 제조가 목표이므로 각종 흡착제중 투명성 확보를 위해 수용성 및 지용성 silica를 흡착제로 사용하여 항균성 물질의 흡착 및 내열성을 검토하였다. 지용성 silica에는 항균성 물질이 흡착이 되지 않았으므로 수용성 silica를 흡착제로 사용하였다. 항균성 물질을 methanol에 용해하여 수용성 silica에 흡착시켜 건조한 후 150℃에서 일정 시간 열처리하여 잔존활성을 측정하였다. 항균성 물질 흡착 silica를 첨가하여 필름을 제작할 경우, 필름의 항균력을 검토하기 위하여 항균성 물질이 흡착된 silica를 필름 제조시 사용하는 silica의 농도(600 mL/100 kg-PE, v/w)로 희석하여 paper disc에 20 μ L씩 첨가하여 동일조건에서 열처리한 후 잔존활

성을 검토하였다. Table 4와 Figure 1에서 보인 바와 같이 silica에 흡착된 항균성 물질은 열처리 2분까지 항균활성이 유지되었으며, paper disc에 흡착시킨 항균성 물질은 1분까지 안정하였다. 따라서 필름 제조시에 처리온도에 대한 retention time이 30초-1분인 점을 고려할 때 silica에 흡착된 항균성 물질은 안정하다고 사료되었다. 또한 필름 제조시 첨가하는 silica 농도로 희석하여 paper disc에 흡착시켜 열처리한 후 항균 spectrum을 검토한 결과, Table 5에서 보는바와 같이 열처리 5분에도 진균을 제외한 대부분의 세균에서의 항균효과가 유지되었다. 이들 결과에서 흡착제 및 안정화제로서 수용성 silica의 사용이 가능하며 흡착된 항균성 물질의 silica에 흡착 및 안정성이 확인되었다.

Table 4. Heat-stability of antimicrobial compound adsorbed on water-soluble silica

Sample	Heat treatment (150 °C)					
	None	0.5 min	1 min	2 min	3 min	5 min
Inhibitory zone(ϕ , mm)						
<i>Escherichia coli</i>						
Silica ¹⁾	17	17	15	13	7	5
Paper disc ²⁾	10	10	8	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>						
Silica ¹⁾	17	17	15	15	5	5
Paper disc ²⁾	11	10	8	+	-	-

¹⁾ : silica + AMC treatment, ²⁾ : Paper disc adsorption of silica + AMC, Symbols : -, no visible clear zone; +, slight visible clear zone

Table 5. Residual activity of the antimicrobial compound on adsorbent by heat treatment

Strains	Heat treatment	AMC + silica					
		None	0.5 min	1 min	2 min	3 min	5 min
Inhibitory zone(ϕ , mm)							
Gram(+) bacteria							
<i>Bacillus thermoglucosidus</i>		12	12	12	12	12	12
<i>Staphylococcus aureus</i>		11	10	11	11	11	11
<i>Streptococcus equii</i>		8	8	8	8	8	8
<i>Streptococcus zooepidermicus</i>		11	11	11	10	10	10
Gram(-) bacteria							
<i>Escherichia coli</i>		10	10	10	10	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		10	10	9	10	10	9
<i>Serratia marcescens</i>		9	9	9	9	9	8
Fungi							
<i>Candida albicans</i>		-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>		-	-	-	-	-	-

^{a)} : Paper disc adsorption of AMC on silica

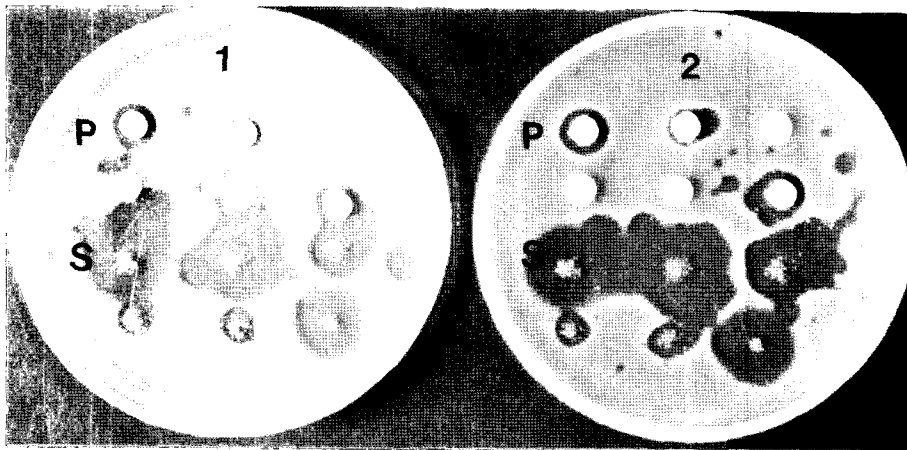


Figure 1. Heat-stability of antimicrobial compound with water-soluble silica in Table 4. P; Residual activity of the paper disc adsorption of silica + AMC by heat treatment (30 sec, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, None) S; Residual activity of the silica + AMC by heat treatment (30 sec, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, None). 1; *E. coli*, 2; *S. aureus*

Benzoic acid(BA)의 항균효과 및 내열성

항진균 효과를 보이는 benzoic acid의 항균효과 및 100°C에서 5분간 열처리한 후 항균활성을 검토한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 세균 및 곰팡이에 강한 항균효과를 나타내었으며, 특히 곰팡이에 대한 항균 효과가 우수하였다. 또한 열

처리 후에도 항균효과가 안정하였으므로 항균필름 제조시에 항균제로서 첨가가 가능하다고 사료되었다.

BA와 항균성 물질의 혼합에 의한 상승효과

항균활성을 나타내지 않는 농도의 BA(2 mg/mL)와 항균성

Table 6. Antimicrobial activity of benzoic acid

Test strains	Heat treatment Benzoic acid Conc.(mg/mL)	None			Heat(100°C, 5min)		
		100	50	20	100	50	20
		Inhibitory zone(ϕ , mm)					
<i>Escherichia coli</i>		15	13	7	15	13	7
<i>Staphylococcus aureus</i>		16	14	8	16	13	8
<i>Aspergillus fumigatus</i>		34	32	17	34	32	17

Table 7. Antimicrobial activity of the mixture of antimicrobial compound and BA

Strains	AMC(0.01 mg/mL)	BA ¹⁾ (2 mg/mL)	AMC(0.01 mg/mL) + BA(2 mg/mL)
		Inhibitory zone(ϕ , mm), () : unclear zone	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	(9.5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	(10)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	(8.5)	(8.5)

¹⁾BA : benzoic acid

물질(0.01 mg/mL)을 혼합하여 공동 사용에 의한 상승효과를 검토하였다. Table 7에서 보듯이와 같이, 약간의 항균효과를 나타내는 결과에서 항균필름의 제조에 공동 사용할 경우 항균효과의 증대가 예상되었다.

요 약

항균성 물질이 함유된 투명한 신기능 포장필름의 제조를 위하여 흡착제로서 수용성 silica를 선택하여 항균성 물질의 흡착 및 내열성을 조사하였다. Methanol 자화 방선균 (MO-16, MO-17)이 생산하는 천연 항균성 물질을 ethylacetate로 추출, 농축하여 silica에 흡착시킨 후 열처리한 결과 150°C에서 5분까지 항균효과가 유지되었다. 따라서 투명필름의 제조시에 흡착제로서 silica의 첨가가 효과적이라고 판단되었다. 항균제인 benzoic acid(BA)는 세균 및 곰팡이에 강한 항균효과를 나타내었으며, 특히 곰팡이에 대한 항균력이 우수하였고, 100°C, 5분간 열처리시에도 항균력을 유지하였다. 또한 항균성 물질과 공동 첨가시 약간의 상승효과를 나타내어 필름 제조시 공동 첨가하므로써 첨가량의 감소에 따른 비용의 절감 및 항진균 효과가 보완된 필름제조가 가능하다고 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

REFERENCES

- Hotchkiss, J. H (1995), Safety Considerations in Active Packaging. In *Active Food Packaging*. M. L. Rooney, Ed., p 238. Blackie Academic & Professional, London, England.
- Hale, P. W., W. R. Miller, and J. J. Smoot (1986), Evolution of a heat-shrinkable copolymer film coated with imazalil for decay control of florida grapefruit. *Trop. Sci.* **26**, 67-71.
- Weng, Y. -M. and J. H. Hotchkiss (1992), Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene film containing the antimycotic imazalil. *J. Food Protec.* **9**, 29-37.
- Halek, G. W. and A. Garg (1989), Fungal inhibition by a fungicide coupled to an ionomeric film. *J. Food Safety*, **9**, 215-222.
- Weng, Y. -M. (1992), Development and application of food packaging films containing antimicrobial agents. Ph.D. Dissertation, Cornell University, Ithaca, NY.
- Weng, Y. -M. and J. H. Hotchkiss (1993), Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. *Pack. Technol. Sci.* **6**, 123-128.
- Koichiro, Y. (1993), Maintenance of freshness by antimicrobial packaging material using a component of horseradish. *Food Sci.* **35**, 102-107
- Kim, K. S., H. S. Sun, K. W. Bae, and C. Y. Park (1997), Disinfecting effect and growth enhancement of silver coated ceramic powder in vegetable. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 35-39.
- Kim, K. S., Y. K. Kang, J. D. Kim, J. B. Eun, and C. H. Park (1998), Storage of kimchi in LDPE film containing antibiotic ceramic. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 811- 816.
- An, D. S., Y. I. Hwang, S. H. Cho, and D. S. Lee (1998), Packaging of fresh curled lettuce and cucumber by using low density polyethylene films impregnated with antimicrobial agents. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nur.* **27**, 675-681.
- Chung, S. K., S. H. Cho, and D. S. Lee (1998), Modified atmosphere packaging of fresh strawberry by antimicrobial plastic films. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 1140-1145.
- Kim, H. S., L. S. Seong, and T. S. Yu (2000), Adsorption and thermostability of antimicrobial agents on synthetic ceramic powder. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 594-599.
- Kim, H. S., L. S. Seong, and T. S. Yu (2000), Antimicrobial activity and food storage of LDPE ceramic film containing antimicrobial agents. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 600-604.
- Kim, H. S. and J. S. Lee (1999), Purification and production conditions of antimicrobial compound from methylotrophic actinomycetes strain M-16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 391-398.
- Kim, H. S. and J. S. Lee (1998), Isolation and production conditions of antimicrobial compound from methylotrophic actinomycetes strain M-17. *J. Inst. Nat. Sci.* **17**, 75-84.