

Polygodial의 식품 오염 진균에 대한 항균 활성과 그 활성능에 미치는 온도 및 pH의 영향

이재란 · 이상화* · 홍순덕†

경북대학교 미생물학과
*생명공학연구소

Antifungal Activity of Polygodial against Food-Contaminants and Effects of Temperature and pH on the Action

Jae-Ran Lee, Sang-Hwa Lee*†, and Soon-Duck Hong

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-201, Korea
*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea

Abstract

The antifungal activity of polygodial, which was isolated from *Polygonum hydropiper* used as a hot spice in Japan, was investigated through measuring its MICs and MFCs against several food-contaminants including 4 strains of *Saccharomyces cerevisiae*, 3 strains of *Zygosaccharomyces* species, and 5 strains of *Aspergillus* species. All yeast-like fungi exhibited strong antifungal susceptibilities with MICs and MFCs below 3.13 μ g/ml. Strains of *Aspergillus* species showed moderate with MIC of 25-50 μ g/ml and MFC of 50-100 μ g/ml. However these fungal strains to sorbic acid, as already known, revealed very weak with MICs of 200-800 μ g/ml and MFCs above 1600 μ g/ml. In addition, effects of various pHs and temperatures on the antifungal activity of polygodial were tested against *S. cerevisiae*. At 4 $^{\circ}$ C, the fungicidal activity of polygodial gradually increased with incubation time and reached the maximum(MFC of 3.13 μ g/ml) in 5 hours. At temperatures in the range of 30-45 $^{\circ}$ C, the activity of polygodial increased in proportion to temperature rise and in particular at 45 $^{\circ}$ C was possible with the concentration of 0.1 μ g/ml. On the other hand, medium pH was also identified to affect the antifungal activity of polygodial. Namely, compared to neutral(pH 7), acidic(pH 3) and basic(pH 9) medium synergized its activity(MIC and MFC) to 8- and 2-fold, respectively.

Key words : Polygodial, Food-contaminant, Antifungal activity

서 론

항진균성 식품 보존제는 진균의 생육을 억제하여 식품의

변질을 방지하는 첨가물로서 benzoic acid와 sorbic acid 등이 현재 널리 사용되고 있다^{1,2)}. 그러나 이러한 화학 보존제들은 오늘날 유통 판매 구조하에서 그 사용이 크게 요구

† Corresponding author

됨³⁾에도 불구하고 근래 단기간 혹은 장기간의 “Standard Toxicology Program”에 따른 안전성 조사에서 allergy나 발암과의 관련 여부가 의심되고 있기에^{4,5)} 소비자들로부터 실제 사용이 기피되고 있다. 이에 안전하고 효과적인 새로운 천연 보존제의 개발을 위해 식품 양념이나 약용 식물들로부터 향균 성분이 활발히 탐색되고 있다^{6,7)}.

Drimane sesquiterpene dialdehyde의 구조적 특징을 갖는 polygodial은 일본등에서 매운 맛을 내는 양념으로 사용되고 있는 *Polygonum hydropiper*⁸⁾ 식물로부터 처음 분리된 후 *Warburgia ugandensis*, *W. stuhlmannii*⁹⁾, *Pseudowintera colorata*¹⁰⁾ 등의 여러 식물들에서도 확인되고 있다. Polygodial은 병원성 진균에 대한 향균 활성 조사에서 *Candida albicans* 등의 효모성 진균들과 *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Penicillium marneffeii* 등의 균사성 진균들에 대해 amphotericin B와 비교될 수 있는 강한 살균활성을 나타내었다. 또한 polygodial은 actinomycin D 혹은 rifampicin과의 조합에서 *C. albicans*에 대한 이들의 향진균 활성을 상승시키는 것으로 나타났^{11,12,13)}.

새로운 향진균성 천연 보존제로서의 가능성을 검토하기 위해, *S. cerevisiae*와 최근 내열성 식품 오염균으로 큰 문제가 되고 있는 *Zygosaccharomyces* 속¹⁴⁾, 그리고 aflatoxin을 생산하는 *Aspergillus* 속¹⁵⁾의 여러 균주들에 대한 polygodial의 향진균 활성을 평가하고 그 활성능에 미치는 온도와 pH의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28383, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28382, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 60530과 *Zygosaccharomyces bailii* ATCC 60483, *Zygosaccharomyces bisporus* ATCC 38993, *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 34890, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus parasiticus* ATCC 22789, *Aspergillus parasiticus* ATCC 26691, *Aspergillus flavus* ATCC 15548, *Aspergillus flavus* ATCC 10124의 균주들은 American Type Culture Collection(Rockville, MD)으로부터 구입되었으며 10% glycerol을 포함하는 yeast nitrogen broth (Difco Labo-

ratories, Detroit, MI)에 현탁하여 -80°C에서 보존되었다. 균주들은 Sabouraud's dextrose agar (SDA) (Bactopeptone 1%, Dextrose 4%, Bacto-agar 1.8%) 배지를 이용하여 효모성 진균은 35°C, 균사성 진균은 25°C에서 각각 계대되었다.

향진균 물질

향진균성 phytochemical인 polygodial은 *Polygonum hydropiper* (Polygonaceae)의 싹으로부터 이전 방법에 준하여 순수 분리되었다⁸⁾. Sigma 사(St. Louis, MO)로부터 구입된 sorbic acid는 향진균 활성 비교 화합물로 사용되었다. 향진균 활성 측정을 위해 polygodial과 sorbic acid의 순차적 두 배 희석액들이 Dimethylformamide(EM Science, Gibbstown, NJ) 용매에서 최종 농도의 100배로 만들어진 후 다시 RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 액체 배지에 10배 희석되었다.

MICs와 MFCs의 측정

효모성 진균의 향진균 감수성은 이전에 보고된 macrobroth희석법¹⁶⁾에 준하여 결정되었다. 간단히 살펴보면, 화합물들의 순차적 두배 희석액들은(0.3 ml) 10⁵ CFU/ml의 신선한 종균을 포함하는 RPMI 1640 액체 배지(2.7 ml)와 혼합되었다. 조사 시험관들은 35°C에서 48시간 동안 진탕 없이 배양되었다. MIC(minimum inhibitory concentration)는 육안상 균 생육이 없는 화합물의 최저 농도로 결정하였다.

균사성 진균의 감수성은 아래 내용을 제외하고는 효모성 진균들을 위한 방법과 동일하게 조사되었다. SDA 배지상의 진균 포자를 0.05% Tween-80 용액을 이용하여 수집하고 이를 10⁵ CFU/ml로 조정된 다음 종균으로 사용하였다. 향진균 활성은 YM (glucose 1.0%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, 0.165M MOPS buffer, pH 7.0) 액체 배지에서 25°C, 5일간 정치 배양하여 조사되었다.

MFC(minimum fungicidal concentration)는 다음과 같이 조사되었다. MIC를 결정한 후 균 생육이 없는 각 시험관으로부터 30 µl를 취하고 이들을 신선한 SDA 배지(3 ml)에 가하였다. 48시간 배양후 미생물의 생육이 나타나지 않는 화합물의 최소 농도로 결정하였다.

결론 및 고찰

식품 오염 진균들에 대한 polygodial의 항진균 활성은 macrobroth 희석법을 이용하여 MIC와 MFC들을 측정하여 조사되었다(Table 1). Polygodial은 *S. cerevisiae*의 여러 균주들에 대해 0.39-1.56 μ g/ml의 농도 범위에서 정균활성(MIC)을 나타내었으며 0.78 μ g/ml-3.13 μ g/ml의 농도 범위에서는 살균활성(MFC)을 나타내었다. 또한 polygodial은 *Zygosaccharomyces* 속의 여러 균주들에 대해 3.13 μ g/ml의 농도에서 정균 및 살균활성을 나타내었으며 *Aspergillus*속의 균주들에 대해서는 25-50 μ g/ml에서 정균활성을 그리고 50-100 μ g/ml에서 살균활성을 각각 나타내었다. 한편 가장 대표적인 항진균 식품 보존제인 sorbic acid는 200-800 μ g/ml의 농도에서 정균활성을 나타내었고 1600 μ g/ml 이상의 농도에서는 살균활성을 나타내었다. 따라서 polygodial은 매우 강한 항진균 활성을 갖는 것으로 판단되며 특히 polygodial의 살균활성은 식품으로부터 오염균을 완전히 제거할 수 있기에 식품 보존제로서 매우 효과적인 것으로 기대된다.

식품의 다양한 온도와 pH들은 항진균성 보존제의 활성에 큰 영향을 줄 수 있기에 이들 조건에서 먼저 polygodial의

안정성을 조사하였다(Table 2). pH 3, 5, 7, 9로 조절된 각 완충액(MOPS buffer, 0.165 M)에 polygodial을 녹인(100 μ g/ml) 후 30 $^{\circ}$ C, 100 $^{\circ}$ C의 온도 조건에서 2시간 동안 반응시킨후 *S. cerevisiae* ATCC 7754에 대한 정균활성(MIC)을 조사하였다. 30 $^{\circ}$ C에서, polygodial의 활성은 무처리구와 비교할때 산성 pH들에서 2배 감소되었으며 염기성 조건(pH 9)에서는 4배 감소되었다. 100 $^{\circ}$ C의 반응 온도에서, polygodial의 활성은 중성에서는 전혀 감소되지 않았으나 산성 pH들에서는 2배 감소하였으며 염기성 조건(pH 9)에서는 16배 감소하였다. 즉 polygodial은 중성 pH에서는 열에 매우 안정하며 산성 pH들에서는 온도에 관계없이 다소 불안정하며(50%의 실패) 염기성 pH들에서는 산성에서 보다 더 불안정하며 특히 고온에서는 매우 불안정한 것으로 보여진다.

Polygodial의 항진균 활성에 미치는 온도 효과는 *S. cerevisiae* ATCC 7754 균주 현탁액(최종 농도 10⁵ CFU/ml)과 polygodial 희석액들을 혼합한 후 여러 온도에서 배양하면서 시간별로 살균활성(MFC)을 측정하여 조사되었다(Table 3). Polygodial은 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양후 최고 활성(최저 MFC 1.56 μ g/ml)을 나타내었으며 저온(4 $^{\circ}$ C)에서는 배양 시간에 비례적으로 증가하는 활성을 나타내었으며 5

Table 1. In vitro antifungal susceptibilities of food-contaminants to polygodial and sorbic acid

Fungal strains(ATCC)	Polygodial		Sorbic acid	
	MIC ^a	MFC ^b	MIC ^a	MFC ^b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 7754	1.56	3.13	400	1600
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 28383	3.13	3.13	400	>1600
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 28382	1.56	3.13	200	1600
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 60530	0.39	0.78	400	1600
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> 60483	3.13	3.13	800	>1600
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i> 38993	3.13	3.13	800	>1600
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> 34890	3.13	3.13	400	1600
<i>Aspergillus niger</i> 16404	25	50	800	>1600
<i>Aspergillus parasiticus</i> 22789	50	50	800	>1600
<i>Aspergillus parasiticus</i> 26691	50	100	400	>1600
<i>Aspergillus flavus</i> 15548	25	50	800	>1600
<i>Aspergillus flavus</i> 10124	50	100	800	>1600

^a μ g/ml. Determined by macrobroth dilution method.

^b μ g/ml. Determined by observation of fungal growth in 100-fold dilutions after MIC tests.

Table 2. Effects of pH and temperature on the stability of polygodial

Temp.(°C)	MIC(μ g/ml) at pH :			
	3	5	7	9
30	3.13	3.13	1.56	6.25
100	3.13	3.13	1.56	25

*After incubation at each condition for 2h, the remaining fungistatic activity(MIC) of polygodial was tested against *S. cerevisiae* ATCC 7754.

Table 3. Effect of incubation temperature on the antifungal activity of polygodial

Temp.(°C)	MFC(μ g/ml)* after incubation time(h) ;				
	1	2	3	4	5
4	50	12.5	6.25	6.25	3.13
30	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13
35	6.25	3.13	1.56	1.56	1.56
40	1.56	1.56	0.78	0.78	0.78
45	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10

*It was tested against *S. cerevisiae* ATCC 7754.

시간만에 30°C에서와 같은 활성(1.56 μ g/ml의 MFC)을 나타내었다. 또한 고온(35-45°C)에서 polygodial의 살균활성은 배양 온도와 상승적으로 작용하였는데 즉 35°C에서 1.56 μ g/ml, 40°C에서 0.78 μ g/ml, 45°C에서 0.2 μ g/ml의 MFC를 나타내었다. 따라서 polygodial은 냉장 보관중인 식품에서도 강한 항진균 활성을 나타내며 또한 식품의 열살균시 완전히 냉각되기 전에 polygodial을 첨가할 때 식품 보존 효과를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

Polygodial의 항진균 활성에 미치는 pH 효과는 pH 3, 5, 7, 9로 조정된 완충액(MOPS buffer) 배지들에서 *S. cerevisiae* ATCC 7754에 대한 MIC와 MFC들을 측정하여 조사되었다(Table 3). Polygodial의 정균활성(MIC)은 중성(pH 7) 배지에서 보다 산성 및 염기성 배지에서 더 강한 활성을 나타내었고 특히 산성 배지에서는 상당히 강화된 활성을 나타내었다. 또한 polygodial의 살균활성도 중성 배지에서 보다 산성 및 염기성 배지들에서 더 강하게 나타났다. 즉 polygodial은 식품의 다양한 pH 조건들에 관계없이 항진균 활성을 나타낼 뿐 아니라 산성 및 염기성 조건에서

Table 4. Effect of medium pH on the antifungal activity of polygodial

pH	MIC(μ g/ml)	MFC(μ g/ml)
3	0.20	0.39
5	0.39	0.78
7	1.56	3.13
9	0.78	0.78

* The pH of fungal medium(RPMI 1640) was adjusted with 0.165 M MOPS buffer.

**The antifungal activity of polygodial was tested against *S. cerevisiae* ATCC 7754.

는 오히려 더 강한 식품 보존 효과를 나타낼 것으로 추측된다.

요 약

식품양념으로 사용되고 있는 *Polygonum hydropiper*로부터 분리된 polygodial의 항진균 활성은 *Saccharomyces cerevisiae* 4균주, *Zygosaccharomyces* 속의 3균주, 그리고 *Aspergillus* 속의 5균주를 포함하는 식품 오염균들에 대해 그 MIC와 MFC들을 측정하여 조사되었다. 모든 효모성 진균들은 3.13 μ g/ml 이하의 MIC와 MFC를 갖는 강한 항진균 감수성을 나타내었다. *Aspergillus* 속의 균주들은 25-50 μ g/ml의 MIC와 50-100 μ g/ml의 MFC를 갖는 다소 낮은 감수성을 보였다. 그러나 이미 알려진 바와 같이 sorbic acid는 200-800 μ g/ml의 MIC와 1600 μ g/ml 이상의 MFC를 갖는 매우 약한 항진균 활성을 나타내었다. 또한 polygodial의 항진균 활성에 대한 다양한 온도와 pH들의 효과가 *S. cerevisiae*를 대상으로 조사되었다. 4°C에서, polygodial의 살균활성(MFC)은 배양 시간과 함께 점진적으로 증가하여 5시간만에 최고(3.13 μ g/ml의 MFC)에 도달하였다. 30-45°C의 온도 범위에서, polygodial의 살균활성은 온도 상승에 비례적으로 증가하였으며 특히 45°C에서는 0.1 μ g/ml의 농도에서도 가능하였다. 한편 배지 pH는 또한 polygodial의 항진균 활성에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. 즉, 중성에 비해 산성(pH 3) 및 염기성(pH 9) 배지는 polygodial의 항진균(정균 및 살균)활성을 각각 8배, 2배 상승시켰다.

참 고 문 헌

1. Chipley, J. R. : *Sodium benzoate and benzoic acid* ; pp. 11-48, Davidson, P. M. and Branen, A. L, Antimicrobials in Foods, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1993)
2. Chichester, D. F. and Tanner, F. W. Jr. : *Antimicrobial food additives* ; pp.115-184, Furia, T.E., Handbook of Food Additives, 2nd edition, CRC press, Cleveland, Ohio (1980)
3. Branen, A. L. : *Introduction to use of antimicrobials* ; pp.1-10, Davidson, P. M. and Branen, A. L, Antimicrobials in Foods, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1993)
4. Michils, A., Vandermonden, G., Duchateau, J. and Yernault, J. C. : Anaphylaxis with sodium benzoate, *Lancet*, 337, 1424 (1991)
5. Parke, D. V. and Lewis, D. F. V. : Safety aspects of food preservatives, *Food Additives and Contaminants*, 9, 5, 561 (1992)
6. Corner, D. E. : *Naturally occurring compounds* ; pp. 441-468, Davidson, P. M. and Branen, A. L, Antimicrobials in Foods, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., N.Y. (1993)
7. Shelef, L. A. : Antimicrobial effects of spices, *Journal of Food Safety*, 6, 29 (1984)
8. Barnes, C. S. and Loder, J. W. : The structure of polygodial : A new sesquiterpene dialdehyde from *Polygonum hydropiper* L., *Aust. J. Chem.* 15, 322 (1962)
9. Tanaguchi, M., Chayya, A., Kubo, I. and Nakanishi, K. : Screening of East African plants for antimicrobial activity, *Chem. Pharm. Bull.* 26, 2910 (1978)
10. McCallion, R. F., Cole, A. L. J., Walker, J. R. L., Blunt, J. W. and Munro, M. H. G. : Antibiotic substances from New Zealand Plants, II. Polygodial, an anti-*Candida* agent from *Pseudowintera colorata*. *Planta Medica*, 44, 134 (1982)
11. Kubo, I. : Polygodial, an antifungal potentiator, *Journal of Natural Products*, 51, 22 (1988)
12. Kubo, I. : Synergistic effect of polygodial on antifungal activity, *Drug News Perspect.* 2, 292 (1989)
13. Anke, H. and Sterner, O. : Comparison of the antimicrobial and cytotoxic activities of twenty unsaturated sesquiterpene dialdehydes from plants and mushrooms, *Planta Medica*, 57, 344 (1991)
14. Golden, D. A. and Beuchat, L. R. : Effects of potassium sorbate on growth patterns, morphology, and heat resistance of *Zygosaccharomyces rouxii* at reduced water activity, *Can. J. Microbiol.* 38, 1252 (1992)
15. 서정훈 : *Aflatoxin* ; pp.167-187, 미생물 독소, 형설출판사 (1991)
16. Kubo, I. and Himejima, M. : Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 39, 2290 (1991)