



발효소시지 유래 오염 곰팡이에 대한 에센셜 오일의 항곰팡이능과 항산화능 분석

이은선 · 김종희 · 김부민 · 오미화*
농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과

Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils against Contaminating Fungi Isolated from Fermented Sausages

Eun-Seon Lee, Jong-Hui Kim, Bu-Min Kim, Mi-Hwa Oh*

Division of Animal Products Research and Development, National Institute of Animal Science

Abstract

In this study, we analyzed the antifungal activities of five essential oils (clove, rosemary, thyme, basil, and oregano) against three fungi (*Penicillium oxalicum*, *Penicillium commune*, and *Cladosporium cladosporioides*) isolated from farm-type fermented meat products. Though their antifungal activities differed for each fungus, thyme had the greatest effect. Notably, *C. cladosporioides* showed the highest sensitivity to essential oils, and growth inhibitory effects were greater than for the other two strains. Additionally, ABTS, DPPH, and FRAP analysis confirmed that the five essential oils studied had antioxidant activity. ABTS analysis showed that clove (75%) and oregano (75%) oils had the highest antioxidant activities (both 93.7%). DPPH analysis showed that clove (75%) and rosemary (75%) oils had significantly greater antioxidant activities (both 93.8%) than thyme, basil, or oregano oils. FRAP results indicated that clove and basil oils were the strongest reductants. Comprehensive comparative analysis indicated that clove oil had more antioxidant activity than the other four essential oils. Overall, the study shows that the excellent antifungal properties of clove oil could be harnessed to produce safe fermented meat products by preventing rancidity and mold contamination.

Key Words : Fermented sausage, fungi, essential oil, antifungal activity, antioxidant activity

1. 서 론

최근 1인가구의 증가와 캠핑과 가정대용식 제품 다양화 등으로 국내 식육가공품의 소비가 증가하고 있는 추세이다. 특히 2016년 대비 2018년에는 소시지, 베이컨, 양념육류, 분쇄 가공육류, 기타 육가공품의 원료 사용량이 29% 정도 증가하였다(Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation 2020). 소시지류에 대한 식품공전 상 의미는 식육이나 식육가공품을 그대로 또는 염지하여 분쇄, 세절 후 식품 또는 식품첨가물을 가해 훈연 또는 가열처리 하거나, 저온 발효 숙성 또는 건조하거나 케이싱에 충전하여 냉장·냉동한 것으로, 소시지 및 발효소시지, 혼합소시지 등이 있다(Ministry of food and drug safety 2022). 이 중 발효소시지는 가열·살균공정이 없으며 제조시설에 따라 한 달 내외의 기간 동안 저온에서 발효·숙성과정을 거친 후 판매된다. 해당 기간은 미생물이 오염되거나 생육하기 충분한 기간이며 이를 방지하기 위해 제

조과정 중에 스타터를 첨가하기도 하는데 이 때 스타터를 제외한 기타 오염 미생물은 생육하지 않아야 한다. 발효소시지 제조 시 주로 사용되는 곰팡이 스타터는 *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus xylosus* (Murgia et al. 2019), *Debaryomyces hansenii*, *Penicillium chrysogenum* (Sunesen & Stahnke 2003; Murgia et al. 2019; Álvarez et al. 2022), *Penicillium nalgiovense* (Papagianni & Papamichael 2007; Van Ba et al. 2016) 등으로 이를 첨가하거나 소시지 표면에 분무하고 있다. 곰팡이가 접종된 발효소시지는 전통적인 방식의 발효소시지보다 단백질과 지방의 분해 활성이 뛰어나 유리아미노산과 지방산(휘발성 화학물 전구체)이 축적되어 풍미 향상에 더 효과적이다(Bruna et al. 2001). 발효실의 온·습도는 접종한 스타터가 잘 자랄 수 있도록 완제품이 되기 까지 일정하게 유지하여야 한다. 스타터 곰팡이가 생육할 수 있는 환경은 기타 오염 곰팡이도 더불어 생육이 가능하므로 이에 대한 적절한 관리가 필요하다. *Cladosporium cladosporioides*,

*Corresponding author: Mi-Hwa Oh, Division of Animal Products Research and Development, National Institute of Animal Science, 1500, Kongjipatjwi-ro, Iseo-Myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55365, Korea
Tel: +82-63-238-7379 Fax: +82-63-238-7397 E-mail: moh@korea.kr

Cladosporium herbarum (Gill et al. 1981), *Cladosporium oxysporum* 등 *Cladosporium* 속(Alía et al. 2016)에 속하는 곰팡이는 이미 밭 이취 생성, 케이싱 표면에 포자로 인한 특이색 형성, 털형태의 균사 발생 등으로 발효소시지의 품질에 악영향을 미칠 수 있다(Lozano-Ojalvo et al. 2015). 발효육 제품 제조 시 멸균된 공간이 아닌 열린공간에서 긴 시간 노출되기 때문에 이러한 부패 곰팡이에 오염될 가능성이 높다. 따라서 열처리 없이 바로 섭취하는 발효소시지의 미생물학적 안전성 확보를 위한 기술 개발이 필요하다. 소규모 농가에서는 발효소시지의 미생물 오염을 방지하기 위해 유산균을 활용하여 pH를 낮춤으로써 유해미생물의 성장을 저해하는 일반적인 방법을 주로 사용하고 있다. 연구적인 측면에서 초고압처리 기술(Meloni 2019; Balamurugan et al. 2020), 전자선 조사(Lim & Lee 2007) 등을 활용하여 발효소시지 내 미생물을 제어하는 연구들이 수행된 바 있으나, 이러한 기술들은 고비용 등의 이유로 영세한 농가에서 사용하기는 쉽지 않다. 이에 소규모 발효육제품 생산 농가에서 실제로 적용하기 쉬운 유용미생물과 식물 유래물이 가장 적절한 생물학적 제어물질(Bio-control agents, BCAs)로 인식되고 있다(Álvarez et al. 2022). 이에 본 연구에서는 식품으로 사용 가능한 에센셜 오일을 선발하여 오염 곰팡이에 대한 성장 억제에 대한 연구를 수행하고자 하였다. 다양한 식물에서 추출되는 에센셜 오일은 친유성 액체로서 다양한 휘발성 향미 화합물을 함유하고 있다(Jeong et al. 2014). 이러한 추출물은 항진균능을 포함한 항균력을 보유하고 있어서 유해미생물로부터 식품의 안전성을 증진시킨 다양한 연구결과가 있다. 클로브 오일은 그람음성균과 그람양성균 뿐만 아니라 곰팡이에 대해서도 항균 효과(Zeng et al. 2013; Wang et al. 2018; Bhavaniramy et al. 2019)가 있어서 미생물 억제에 넓은 스펙트럼을 보유하고 있다. 또한 로즈마리는 *Aspergillus ochraceus*가 생산하는 오크라톡신 독소의 생합성 관련 유전자 발현을 저해하는 효과가 있으며 오레가노, 타임, 클로브 역시 *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*의 성장을 억제할 뿐만 아니라 다른 식품 부패 미생물 및 식중독균에도 항균 효과가 있다는 연구 결과가 있다(Viuda-Martos et al. 2007; García-Díez et al. 2016; Álvarez et al. 2022). 본 연구에서는 이러한 결과를 토대로 발효소시지 유래 오염 곰팡이를 억제하기 위한 천연 오일로 클로브, 로즈마리, 타임, 바질, 오레가노를 선정하였다. 선정된 오일은 항곰팡이능과 함께 항산화능에 대한 분석을 진행하여, 발효소시지에 적용 시 오염 곰팡이와 지방 산패를 모두 억제할 수 있는 기능이 있는 에센셜 오일을 최종 선발하고자 한다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 균주 분리 및 동정

본 연구에서는 국내에서 생산된 발효소시지에서 분리한 3

종의 균주(*Penicillium oxalicum*, *Penicillium commune*, *C. cladosporioides*)를 사용하였다. 초저온 냉동고에 저장된 균주는 potato dextrose agar (PDA, Difco, USA)에 도말한 후 동정을 위해서 배지를 큐브 형태로 잘라 표면에 접종한 후 25°C에서 3-5일간 배양하였다. 계대 배양한 균주는 균사를 포함하여 10 µL 일회용 루프(loop and needle, SPL, Korea)로 채취하여 900 µL UltraPure Distilled water (Invitrogen, Waltham, MA, USA)에 현탁한 후 100°C에서 1분간 끓였다. 시료는 솔젠트(Daejoen, Korea)에 분석을 의뢰하였다. 시료의 DNA는 범용 프라이머(universal primer)인 ITS1 (5'-GTA GGT GAA CCT GCG G-3')와 ITS4 (5'-TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')에 의해 증폭 되었다. PCR 증폭 산물은 ABI PRISM 3730LX DNA 분석기(Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 통해 분석되었으며 분석결과 염기서열은 GeneBank로 부터 얻은 유사성이 높은 염기서열에 따라 동정하였다.

2. 항곰팡이능 확인

항곰팡이능을 확인하기 위하여 클로브, 로즈마리, 타임, 바질, 오레가노 5종의 에센셜 오일(Doterra, USA) 100%을 구매하였으며, 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 희석하여 농도별(10, 25, 50, 75%)로 제조하였다. 곰팡이균액은 Lee et al. (2021)에 따라 준비되었다. 먼저 25°C에서 배양된 곰팡이 콜로니를 각각 채취하고 0.03% tween 80 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 현탁하였다. 균액의 농도는 혈구 계수기(C-Chip disposable hemocytometer, INCYTO, Korea)를 사용하여 최종 농도가 10⁶ conidia/mL이 되도록 제조하고 PDA 배지에 300 µL를 도말하였다. 이 때, 접종된 배지 위에 지름 8 mm인 페이퍼디스크(Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)를 부착하여 희석한 농도에 따라서 샘플을 10 µL 접종한 후 25°C에서 3-5일간 배양한다. 배양 후 형성된 저해환(inhibition zone)을 mm 단위로 측정하여 저해능을 확인하였다.

3. 온도저항성 확인 시험

발효소시지 제조 시 비교적 저온에서 발효·숙성되고, 최종적으로 완제품은 냉장온도에서 유통되므로 온도의 범위는 4, 10, 15, 20°C의 범위로 설정하였다. 에센셜 오일을 발효소시지 제조시 표면이나 내부에 적용하였을 때 제조·유통되는 동안 항곰팡이능이 유지되는지를 확인하기 위하여 온도 저항성 실험을 수행하였다. 에센셜 오일 자체의 온도저항성을 확인하기 위하여 원액을 각각의 온도에서 2시간 노출하여 안정화하였다. 이후 앞서 언급한 항곰팡이능 확인 실험과 동일한 방법으로 균액을 도말된 배지 위에 각기 다른 온도에 보관되었던 에센셜 오일을 페이퍼디스크에 접종하여 25°C에서 3-5일간 곰팡이를 배양하여 저해환 크기를 mm 단위로 측정하였다.

4. 항산화능(ABTS, DPPH, FRAP assay) 확인 시험

1) ABTS assay

항산화능 분석은 ABTS antioxidant capacity assay kit (Bioquochem, Austrias, Spain)를 활용하여 측정하였다. ABTS와 potassium persulfate 를 어두운 곳에 방치하면 ABTS 라디칼이 생성되고 사용되는 시료의 항산화력에 의해 라디칼이 소거 되면서 청록색이 무색으로 변하게 된다. 이러한 원리를 이용하여 흡광도 측정을 통해 라디칼의 소거 활성능을 분석하는 방법으로 소수성을 가지거나 친수성인 시료에 모두 적용이 가능하다(Yu et al. 2011). ABTS 용액은 734 nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.02 가 되도록 시약을 제조하였다. 시료의 항산화능 측정을 위해 200 μ L의 ABTS 용액과 5 μ L의 샘플 희석액을 혼합하여 96 well plate에 분주하였다. 플레이트에서 시료를 5분간 반응시킨 후 27°C, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 항산화능은 비타민 C값에 대비하여 계산된 비타민C 등가 항산화 활성능(vitamin C equivalents antioxidant capacity CEAC, μ g/mL)과 산화 저해능(%)으로 표기하였다.

$$\text{Inhibition of } A_{734 \text{ nm}} (\%) = (1 - A_f/A_0) * 100$$

A_f : 표준용액에 무처리한 흡광도

A_0 : 5분간 반응시킨 후 측정된 시료의 흡광도

$$\text{CEAC } (\mu\text{g/mL}) = (\text{sample inhibition } A_{734 \text{ nm}} - \text{intercept}) / \text{slope}$$

2) DPPH assay

본 연구에서는 DPPH antioxidant capacity assay kit (Bioquochem, Austrias, Spain)를 활용하여 측정하였다. DPPH는 라디칼이 항산화물질에 의해 소거되면서 색이 변하는 원리를 활용하여 항산화능을 분석하는 방법이다. 표준용액으로 비타민 E 유사체이며 동일한 항산화제 역할을 하는 트롤록스(6-하이드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-카르복실산)를 희석하여 사용하였다. 시료의 항산화능 측정을 위해 200 μ L의 DPPH 용액과 2 L의 샘플 희석액을 혼합하여 96 well plate에 분주하였다. 혼합된 플레이트는 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 트롤록스 등가 항산화 활성능(trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC, μ g/mL)와 산화 저해능(%)으로 표기하였다.

$$\text{Inhibition of } A_{517 \text{ nm}} (\%) = (1 - A_f/A_0) * 100$$

A_f : 표준용액에 무처리한 흡광도

A_0 : 517 nm에서 측정된 시료의 흡광도

$$\text{TEAC } (\mu\text{g/mL})$$

$$= (\text{sample inhibition } A_{734 \text{ nm}} - \text{intercept}) / \text{slope} * \text{dilution factor}$$

3) FRAP assay

항산화능 분석을 위해 FRAP (Ferric reducing antioxidant power) antioxidant capacity assay kit (Bioquochem, Austrias, Spain)를 활용하였다. 이 분석의 원리는 페놀성 화합물의 Fe^{3+} 를 Fe^{2+} 로 환원시키는 능력을 측정하는 방법으로 시료의 항산화능에 비례하여 빠른 속도로 반응한다. 시료의 항산화능 측정을 위해 미리 제조된 FRAP 분석 용액 220 μ L와 10 μ L의 샘플 희석액을 혼합하여 96 well plate에 분주하였다. 준비된 시료는 시약과 함께 4분간 균일하게 혼합 단계를 거친다. 혼합된 플레이트는 반응 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 연구에서 항산화능은 FRAP 값으로 표기하였으며 이 값은 Fe^{2+} 의 농도와 관련이 있다.

$$\text{FRAP } (\mu\text{g/mL}) = (A_{593 \text{ nm}} - \text{intercept}) / \text{slope} * \text{dilution factor}$$

$A_{593 \text{ nm}}$: 593 nm에서 측정된 시료의 흡광도

5. 통계처리

각 에센셜 오일의 항산화능 분석 및 항곰팡이능 확인을 위한 실험은 모두 3회 반복 되었으며, SAS v.9.4 software (SAS institute, Cary, NC, USA)의 ANOVA 분석을 통해 유의성($p < 0.05$)을 평가하였다. 유의적인 차이가 있는 결과값에 대해서는 Duncan's multiple range test를 통해서 그룹핑을 하여 윗첨자로 표기하였다.

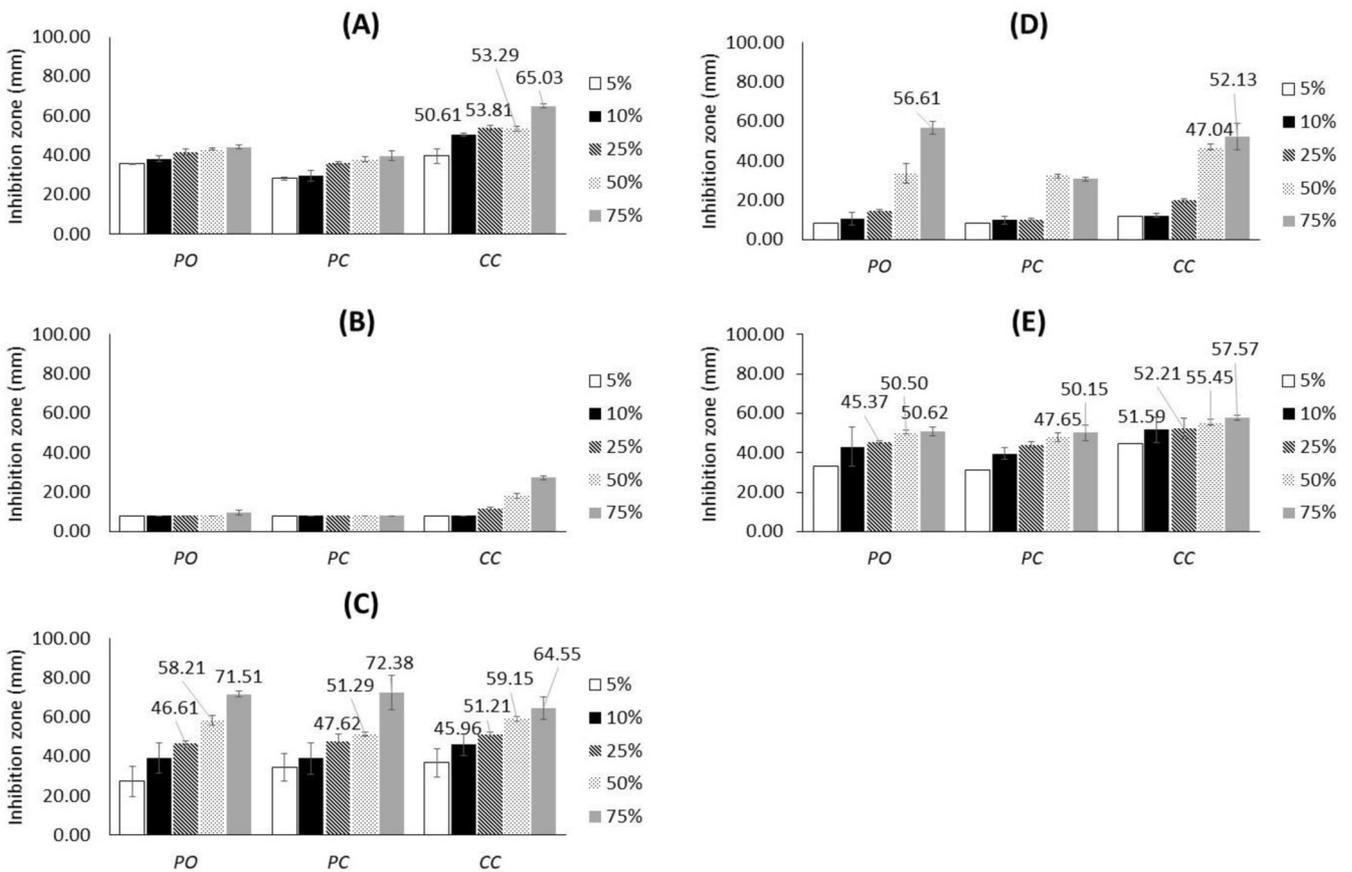
III. 결과 및 고찰

1. 곰팡이 등정

국내 소규모 농가에서 제조된 발효육제품에서 곰팡이를 분리한 결과, 검출 빈도가 높은 곰팡이 3종은 *P. commune* (GeneBank No. MK660351.1), *P. oxalicum* (GeneBank No. KY964490.1), *C. cladosporioides* (GeneBank No. MT367212.1) 이었다. 분리된 곰팡이 중 *Cladosporium* 속은 발효육제품 제조 시 많이 검출되는 속 중 하나로써 제품의 품질을 저하시키는 검은색 반점을 형성하여 경제적 손실을 야기할 수 있다(Alía et al. 2016). 또한 *Penicillium* 속은 발효소시지에서 검출되는 전체 곰팡이 중 50% 이상을 차지하며, 발효생협에서는 60% 이상을 차지하는데, 이렇게 검출 빈도가 높은 이유는 다른 종에 비해 저온에서 잘 성장하기 때문이다(Cook 1995; Bruna et al. 2001). 이에 본 연구에서는 실제 발효소시지에서 높은 빈도로 검출된 *Penicillium* 2종과 *Cladosporium* 1종을 대상으로 에센셜 오일의 항곰팡이능을 분석하였다.

2. 에센셜 오일의 항곰팡이능 및 온도 안정성 분석

식품에서 사용 가능하게 제조된 바질, 오레가노, 타임, 클로브, 로즈마리 에센셜 오일의 항곰팡이능을 확인한 결과는



<Figure 1> Antifungal effect of five essential oils.

(A) clove; (B) rosemary; (C) thyme; (D) basil; (E) oregano. PO, PC, and CC on the x-axis are *Penicillium oxalicum*, *P. commune*, and *Cladosporium cladosporioides*, respectively.

<Figure 1>과 같다. 가장 높은 농도인 75%에서 에센셜 오일 5종의 항곰팡이능을 각각 비교한 결과, 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났으며, 타임, 오레가노, 클로브에서 항곰팡이 효과가 큰 것을 확인하였다($p < 0.05$). 또한 대부분의 에센셜 오일은 농도가 증가함에 따라 항곰팡이 효과가 유의적으로 증가하였으나($p < 0.05$) 로즈마리 오일의 경우 농도가 증가하여도 *P. oxalicum*와 *P. commune*를 더 효과적으로 저감하지는 않았다($p > 0.05$). 특히 농도에 따른 항곰팡이능의 차이가 없었을 뿐만 아니라 저해환의 크기가 8.0-9.6 mm로 무처리구(8.0 mm)와 비교하였을 때도 큰 차이를 보이지 않았다. Hlebova et al. (2021)의 연구 결과에 따르면 *Aspergillus* 속 (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*)에 대해 타임, 오레가노, 클로브 오일은 우수한 항곰팡이능을 보인 반면 로즈마리나 바질 오일에서는 그 효과가 저조하였는데, 이는 본 연구에서 사용한 에센셜 오일의 적용 결과와 유사한 양상이었다. Jeong et al. (2014)의 연구에 따르면 저해환의 크기에 따라 항곰팡이능을 음성(-), 10-15 mm(+), 16-25 mm(++), 26-35 mm(+++), 36-45 mm(++++) , 45 mm 이상(++++)으로 구분하였다. 각 에센셜 오일의 항산화 활성을 위의 결과를 참고하여 구분해본

결과 타임은 25% 이상의 농도로 처리 하였을 때 세 균주에서 모두 저해환의 크기가 45 mm 이상으로 매우 높은 활성을 보였다. 오레가노 25% 처리 시 *P. commune*을 제외한 나머지 두 균주에서 저해환의 크기가 45 mm 이상으로 매우 높은 항곰팡이 효과가 확인 되었으며, *P. commune*도 효과가 높은 편(43.98 mm)으로 확인되었다. 클로브는 *Penicillium* 속인 두 균주를 대상으로 항곰팡이 효과가 높게 나타났으나 *C. cladosporioides*에서는 보통 수준(30 mm 미만)의 항곰팡이능을 보였다. 반대로 로즈마리는 *C. cladosporioides*에서만 유의적인 항곰팡이능을 확인할 수 있었으나 효과(<30 mm)가 크지는 않은 것으로 확인되었다. 에센셜 오일을 실제 식품에 적용한 연구로는 빵과 곡류 중 유해미생물 성장을 억제하기 위해 직접적으로 증기처리 또는 표면에 도포하는 방식으로 사용하거나, 간접적으로 식품포장지에 균질화한 오일을 결합시켜 저장·유통 중 유해미생물 제어 효과를 규명한 연구가 있다(Jeong et al. 2014; Das et al. 2020; Sharma et al. 2021). 본 연구에서 사용된 에센셜 오일은 미국 식품의약국 (US food and drug administration)에서 “일반적으로 안전하다고 인정되는 물질(Generally regarded as safe)”에 포함 되어 식품첨가물로 사용하여도 안전할 것으로 사료된다(Dima

<Table 1> Analysis of antifungal activity according to temperature resistance of essential oils

	Essential oil	Temperature (°C)			
		4	10	15	20
A	Clove	50.9±3.2 ^{a1)}	47.9±10.2 ^a	45.0±3.0 ^a	49.7±3.1 ^a
	Rosemary	9.9±1.6 ^b	12.9±1.9 ^a	9.3±0.7 ^b	10.7±0.6 ^{ab}
	Thyme	68.1±7.5 ^a	70.0±4.7 ^a	63.6±9.3 ^a	76.1±7.8 ^a
	Basil	57.8±13.8 ^a	63.1±4.7 ^a	66.8±4.4 ^a	67.2±1.5 ^a
	Oregano	52.6±6.4 ^a	54.0±4.7 ^a	59.5±3.9 ^a	57.9±5.6 ^a
B	Clove	41.4±9.3 ^a	41.0±3.4 ^a	38.2±4.4 ^a	41.1±3.6 ^a
	Rosemary	9.3±0.2 ^a	16.0±4.4 ^a	12.1±3.5 ^a	11.2±1.7 ^a
	Thyme	63.6±18.6 ^a	77.9±12.3 ^a	76.0±15.7 ^a	69.6±13.5 ^a
	Basil	31.7±10.0 ^a	32.5±8.1 ^a	32.9±11.7 ^a	36.8±1.9 ^a
	Oregano	53.9±6.5 ^a	48.3±2.7 ^a	52.4±6.5 ^a	57.1±8.8 ^a
C	Clove	48.9±2.4 ^a	52.9±4.3 ^a	50.0±3.7 ^a	48.3±2.6 ^a
	Rosemary	15.9±1.4 ^a	20.9±3.0 ^a	20.4±6.7 ^a	19.9±1.2 ^a
	Thyme	77.8±12.5 ^a	80.8±7.3 ^a	78.4±11.4 ^a	74.8±9.0 ^a
	Basil	45.0±8.8 ^b	59.1±1.4 ^a	57.8±9.5 ^a	62.5±0.8 ^a
	Oregano	56.3±1.6 ^a	49.3±5.5 ^a	61.5±9.4 ^a	58.4±2.9 ^a

¹⁾Values are means±standard deviations. Within each row, means with different letters are significantly different (p<0.05, Duncan’s multiple range test).

A: *P. oxalicum*, B: *P. commune*, C: *C. cladosporioides*

& Dima 2015; Falleh et al. 2020; US food and drug Administration 2022). 현재까지는 에센셜 오일에 대한 식품 간의 상호작용이나 동물 실험을 통한 의학적인 연구는 부족하지만 다양한 식품 산업에서 천연 보존제 또는 향신료로 사용하고 있다(Dima & Dima 2015; Falleh et al. 2020).

발효소시지는 제조과정 중에 숙성실(10-15°C)에서 오랜 시간 발효 및 숙성 단계를 거치게 된다. 이에 따라 제조 중 노출되는 온도를 포함한 범위(4, 10, 15, 20°C)에서 항곰팡이능을 확인하였으며, 그 결과는 <Table 1>에 나타내었다. 온도 조건과 관계없이 클로브와 오레가노, 타임은 40 mm 이상(++++)의 높은 항곰팡이능을 유지하였다. 로즈마리 오일의 경우는 *P. oxalicum*에 처리한 후 온도별로 항곰팡이능을 비교한 결과 유의적인 차이(p<0.05)를 보였으나, r-sqaure값은 0.61로 낮은 상관관계를 보였다. 이외에 *C. cladosporioides*도 바질 에센셜 오일을 처리했을 때 온도별로 저해환 크기에 유의적인 차이(p<0.05)가 있었으나, r-square값은 0.60으로 낮은 상관관계를 보였다. 이에 본 연구에서 사용된 에센셜 오일의 항곰팡이능은 온도에 의한 영향이 매우 낮은 것으로 나타나 발효소시지에 적용하기에 적절하다고 사료된다.

3. 에센셜 오일의 항산화능 분석

다양한 구성 성분을 가진 식물 추출물의 항산화능을 정확하게 평가하기 위해서는 최소한 두 가지 이상의 다른 분석법을 사용해야 한다(Nuutila et al. 2003). 본 연구에서는 세 가지 분석방법(ABTS, DPPH, FRAP)을 통해서 각 천연물의

항산화능을 평가하였다. 본 연구에서는 클로버, 로즈마리, 타임, 바질, 오레가노 에센셜 오일의 ABTS 라디칼 소거능을 측정하여 <Table 2>에 제시하였다. 로즈마리의 경우 최대 75%의 농도에서도 산화저해능이 29.3% 정도로 매우 미미한 수준이었으나, 나머지 4종의 에센셜 오일은 93% 이상의 높은 산화저해능을 보였다. 또한 5종 모두에서 오일의 농도가 높아짐에 따라서 산화저해능 및 CEAC 값도 유의적으로 증가하였다(p<0.05).

FRAP 분석은 Fe³⁺가 Fe²⁺로 환원되는 원리를 이용한 것으로 <Table 3>에 결과 값을 제시하였다. 이 분석법은 환원된 철이온(Fe²⁺)의 양을 측정한 값으로 Fe²⁺가 높을수록 항산화능이 우수하다(Yu et al. 2011). 본 연구에서 이 세 가지 에센셜 오일의 FRAP를 분석한 결과 로즈마리 36.8-163.5 µg/mL, 오레가노 106.6-969.9 µg/mL, 클로브 287.5-1580.5 µg/mL로 나타났으며 Viuda-Martos et al. (2010)의 연구에서도 유사하게 로즈마리가 오레가노나 클로브에 비해서 항산화능이 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다. 이 외에 Saricaoğlu & Turhan (2018)의 연구에서 열수 추출한 타임(310.4 µg/mL), 로즈마리(278.4 µg/mL), 클로브 오일(721.1 µg/mL)의 항산화능을 FRAP 방법으로 측정한 결과 클로브 오일의 항산화능이 가장 우수하여 본 연구의 결과와 유사함을 확인할 수 있었다.

항산화능 분석법 중 DPPH의 분석 결과는 <Table 4>에 제시하였다. 75%의 에센셜 오일로 DPPH 분석을 수행한 결과 클로브의 산화저해능이 93.8%로 가장 높은 수준을 보였다.

<Table 2> Results of ABTS assay of clove, rosemary, thyme, basil and oregano essential oil at different concentration

	Con. (%)	Clove	Rosemary	Thyme	Basil	Oregano
ABTS inhibition (%)	10	86.7±0.8 ^{1)b}	18.0±2.5 ^b	87.8±0.6 ^c	90.3±2.8 ^b	88.6±1.5 ^b
	25	88.0±0.3 ^b	21.4±7.0 ^{ab}	81.6±0.6 ^b	91.1±1.1 ^{ab}	89.6±0.9 ^b
	50	93.0±2.8 ^a	22.6±6.0 ^{ab}	93.7±0.1 ^a	93.0±0.6 ^a	93.1±0.6 ^a
	75	93.7±0.19 ^a	29.3±4.9 ^a	93.3±0.3 ^a	93.4±0.3 ^a	93.7±0.5 ^a
CEAC (µg/mL)	10	858.1±7.7 ^b	176.4±25.1 ^b	868.2±5.6 ^b	893.6±28.0 ^b	876.7±14.6 ^b
	25	871.0±3.2 ^b	210.2±68.9 ^{ab}	807.0±6.2 ^c	900.7±10.7 ^{ab}	886.2±9.3 ^b
	50	919.7±27.6 ^a	222.4±59.6 ^{ab}	926.8±1.3 ^a	919.7±5.5 ^a	920.7±5.5 ^c
	75	927.1±1.9 ^a	288.8±49.0 ^a	922.7±3.0 ^a	923.8±2.6 ^a	926.8±4.9 ^d

¹⁾Values are means±standard deviations. Within each column, means with different letters are significantly different ($p<0.05$, Duncan's multiple range test).

<Table 3> Results of FRAP assay of clove, rosemary, thyme, basil and oregano essential oil at different concentration

	Con. (%)	Clove	Rosemary	Thyme	Basil	Oregano
Iron (II) standard (µg/mL)	10	287.5±57.0 ^d	36.8±4.8 ^c	159.4±24.2 ^c	207.1±5.7 ^c	106.6±25.1 ^d
	25	535.3±357.7 ^c	62.8±3.1 ^c	338.4±10.5 ^c	620.6±14.3 ^c	315.5±80.7 ^c
	50	1060.6±130.0 ^b	122.6±27.4 ^b	647.0±12.9 ^b	1369.8±59.5 ^b	602.2±139.5 ^b
	75	1580.5±140.0 ^a	163.5±24.6 ^a	1275.5±282.3 ^a	2140.5±619.9 ^a	969.9±62.2 ^a

¹⁾Values are means±standard deviations. Within each column, means with different letters are significantly different ($p<0.05$, Duncan's multiple range test).

<Table 4> Results of DPPH assay of clove, rosemary, thyme, basil and oregano essential oil at different concentration

	Con. (%)	Clove	Rosemary	Thyme	Basil	Oregano
DPPH inhibition (%)	10	92.9±0.9 ^a	93.5±1.1 ^a	63.3±19.5 ^a	47.9±11.1 ^a	56.2±18.9 ^a
	25	93.1±1.1 ^a	93.5±0.5 ^a	79.5±8.7 ^b	48.7±9.7 ^a	69.9±16.6 ^a
	50	93.3±1.0 ^a	94.1±0.1 ^a	80.2±9.5 ^c	57.9±26.1 ^a	77.1±10.5 ^a
	75	93.8±1.5 ^a	93.8±0.2 ^a	83.7±6.5 ^d	62.4±20.5 ^a	79.3±9.7 ^a
TEAC (µg/mL)	10	778.8±7.6 ^a	784.4±9.0 ^a	536.2±159.8 ^b	409.7±91.2 ^a	478.1±155.0 ^a
	25	780.9±8.9 ^a	784.2±4.5 ^a	669.2±71.7 ^{ab}	416.2±79.6 ^a	590.7±136.7 ^a
	50	782.3±8.6 ^a	789.1±0.5 ^a	674.8±77.8 ^{ab}	491.5±214.0 ^a	649.4±86.0 ^a
	75	786.6±12.5 ^a	786.9±1.7 ^a	703.3±53.6 ^a	529.1±168.4 ^a	667.9±79.7 ^a

¹⁾Values are means±standard deviations. Within each column, means with different letters are significantly different ($p<0.05$, Duncan's multiple range test).

며 타임 83.7%, 오레가노 79.3% 순으로 나타났다. 반대로 바질은 앞선 다른 오일에 비해 최저 62.4%로 항산화능이 낮았다. 증기 증류법을 통해 만들어진 50 g/L의 에센셜 오일(타임, 오레가노, 클로브, 로즈마리)의 항산화능을 확인한 다른 연구에서도 본 연구의 결과와 동일하게 클로브(98.74%)의 항산화능이 가장 높았으며 이후 타임(93.94%), 오레가노(87.19%), 로즈마리(56.95%) 순으로 확인되었다(Viuda-Martos et al. 2010). Embuscado(2015)에서 DPPH 분석을 수행한 결과 로즈마리의 산화 저해능이 90.1% 수준으로 본 연구(93.5-94.1%)와 비슷한 수준으로 제시되었다. Mutlu-Ingok et al. (2021)의 연구에서는 타임이 634 µg/mL으로 오레가노와 생강 에센셜 오일 등에 비해 높은 항산화력을 보

였으나, 저해능(%)을 비교하였을 때는 타임과 오레가노 오일에서 각각 56.2, 53.4%의 수치를 보여 유의적인 차이가 없었다($p>0.05$). 본 연구에서도 두 허브류의 산화저해능이 99.3%, 99.7%로 같은 농도에서 높은 항산화 효과를 나타내었다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 농가형 발효육제품에서 분리한 곰팡이 중 다수 검출된 3종(*P. oxalicum*, *P. commune*, *C. cladosporioides*)을 선발하여 천연물 5종(클로브, 로즈마리, 타임, 바질, 오레가노)에 대한 항곰팡이능을 분석하였다. 항곰팡이능은 균종

에 따라 효과가 큰 천연물이 일부 달랐으나 전반적으로 타 임이 가장 효과가 있는 것을 확인하였다. 이외에 클로브와 오레가노, 바질도 항곰팡이능 효과가 높은 것으로 나타났다. 목표 곰팡이 3종 중 *C. cladosporioides*가 바질과 오레가노, 클로브, 로즈마리에 대해 민감도가 높은 편으로, 다른 두 균주에 비해 성장 저해 효과가 큰 것으로 나타났다. 또한 동일 천연물(5종)을 대상으로 ABTS, FRAP, DPPH 분석을 통해 항산화능을 확인하였다. ABTS 분석 결과 75%의 클로브와 오레가노가 가장 높은 산화저해능(93.7%)을 보였다. 라디칼 소거 활성능을 대조군(비타민 C) 대비 계산한 CEAC 값도 각각 927.1, 926.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 높았다. DPPH 분석에서는 75%의 클로브와 로즈마리가 각각 93.8%의 산화저해능을 보였으며, 이는 타임, 바질, 오레가노에 비해 유의적으로 높은 수치였다($p < 0.05$). 더불어 비타민E의 유사체인 트롤록스를 비교대상으로 한 라디칼 소거 활성능을 계산한 결과, 클로브와 로즈마리가 각각 786.6, 786.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 높았다. 마지막으로 FRAP분석 결과 환원력은 바질(2,140.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)과 클로브(1,580.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 순으로 높았다. 세 가지 항산화능 분석 결과를 종합적으로 고려하였을 때 에센셜 오일 5종 중 클로브 오일의 항산화능이 가장 우수하였다. 결론적으로 본 연구의 분석 결과를 토대로 종합적인 측면을 고려하였을 때 클로브 오일이 발효소시지에 적용하기 가장 적절한 것으로 판단하였다. 클로브 오일은 항산화능과 함께 항진균능이 우수하여, 제품 제조 시 활용하면 안전한 발효소시지 생산에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 이 기술을 현장에 보급하기 위해서는 선별된 에센셜 오일을 제품에 실제로 적용하여 발효·숙성 기간 중 품질 변화를 확인하는 추가적인 연구가 필요하다.

저자정보

이은선(국립축산과학원, 농업연구사, 0000-0002-3957-0575)
김중희(국립축산과학원, 박사후연구원, 0000-0001-8669-993x)

김부민(국립축산과학원, 농업연구사, 0000-0001-7836-3360)
오미화(국립축산과학원, 농업연구관, 0000-0001-7838-5260)

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 농가제조 발효육제품의 유해미생물 제어를 위한 천연물 및 유용미생물 활용 기술 개발, 과제번호: PJ01594201)에 의해 이루어진 결과이며 지원에 감사드립니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Alía A, Andrade MJ, Rodríguez A, Reyes-Prieto M, Bernáldez V, Córdoba JJ. 2016. Identification and control of moulds responsible for black spot spoilage in dry-cured ham. *Meat Sci.*, 122:16-24
- Álvarez M, Delgado J, Núñez F, Roncero E, Andrade MJ. 2022. Proteomic approach to unveil the ochratoxin A repression by *Debaryomyces hansenii* and rosemary on *Penicillium nordicum* during dry-cured fermented sausages ripening. *Food Control*, 137:108695
- Balamurugan S, Gemell, C, Lau ATY, Arvaj L, Strange P, Gao A, Barbut S. 2020. High pressure processing during drying of fermented sausages can enhance safety and reduce time required to produce a dry fermented product. *Food Control*, 113:107224
- Bhavaniramy S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Sci. Technol.*, 2(2):49-55
- Bruna JM, Ordóñez JA, Fernández M, Herranz B, de la Hoz L. 2001. Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Sci.*, 59(1):87-96
- Cook PE. 1995. Fungal ripened meats and meat products. In *Fermented meats* Springer, Boston, MA, pp 110-129
- Das S, Kumar Singh V, Kumar Dwivedy A, Kumar Chaudhari A, Upadhyay N, Singh A, Saha AK, Chuadhury SR, Prakash B, Dubey NK. 2020. Assessment of chemically characterised *Myristica fragrans* essential oil against fungi contaminating stored scented rice and its mode of action as novel aflatoxin inhibitor. *Nat. Prod. Res.*, 34(11):1611-1615
- Dima C, Dima S. 2015. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Curr. Opin. Food Sci.*, 5:29-35
- Embuscado ME. 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants—a mini review. *J. Funct. Foods*, 18:811-819
- Falleh H, Jemaa MB, Saada M, Ksouri R. 2020. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chem.*, 330:127268
- García-Díez, J, Alheiro J, Pinto AL, Soares L, Falco V, Fraqueza MJ, Patarata L. 2016. Behaviour of food-borne pathogens on dry cured sausage manufactured with herbs and spices essential oils and their sensorial acceptability. *Food Control*, 59:262-270
- Gill CO, Lowry PD, DI MENNA ME. 1981. A note on the identities of organisms causing black spot spoilage of meat. *J. Appl. Bacteriol.*, 51(1):183-187
- Hlebová M, Hleba L, Medo J, Kováčik A, Čuboň J, Ivana C, Klouček P. 2021. Antifungal and synergistic activities of some selected essential oils on the growth of significant indoor fungi of the genus *Aspergillus*. *J. Environ. Sci.*

- Health A, 56(12):1335-1346
- Jeong EJ, Lee NK, Oh J, Jang SE, Lee JS, Bae IH, Oh HH, Jung HK, Jeong YS. 2014. Inhibitory effect of cinnamon essential oils on selected cheese-contaminating fungi (*Penicillium* spp.) during the cheese-ripening process. *Food Sci. Biotechnol.*, 23(4):1193-1198
- Lee ES, Kim JH, Kim BM, Oh MH. 2021. Effect of physical control technology on *Aspergillus ochraceus* reduction. *J. Food Hyg. Saf.*, 36(5):447-453
- Lim DG, Lee MH. 2007. Combination effect of packaging and electron beam irradiation on quality traits of fermented sausages during storage. *J. Anim. Sci. Technol.*, 49(4):539-548.
- Lozano-Ojalvo D, Rodríguez A, Cordero M, Bernáldez V, Reyes-Prieto M, Córdoba JJ. 2015. Characterisation and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry-cured fermented sausages. *Meat Sci.*, 100:283-290
- Meloni, D. 2019. High-hydrostatic-pressure (HHP) processing technology as a novel control method for *Listeria monocytogenes* occurrence in Mediterranean-style dry-fermented sausages. *Foods*, 8(12):672
- Murgia MA, Marongiu A, Aponte M, Blaiotta G, Deiana P, Mangia NP. 2019. Impact of a selected *Debaryomyces hansenii* strain's inoculation on the quality of Sardinian fermented sausages. *Food Res. Int.*, 121:144-150
- Mutlu-Ingok A, Catalkaya G, Capanoglu E, Karbancioglu-Guler F. 2021. Antioxidant and antimicrobial activities of fennel, ginger, oregano and thyme essential oils. *Food Front.*, 2(4):508-518
- Nuutila, AM., Puupponen-Pimiä R, Aarni M, Oksman-Caldente KM. 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chem.*, 81(4):485-493
- Papagianni M, Papamichael EM. 2007. Modeling growth, substrate consumption and product formation of *Penicillium nalgiovense* grown on meat simulation medium in submerged batch culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34(3), 225-F231
- Saricaoglu FT, Turhan S. 2018. Antimicrobial activity and antioxidant capacity of thyme, rosemary and clove essential oils and their mixtures. *J. Inno. Sci. Eng.*, 2(1):25-33
- Sharma S, Barkauskaite S, Jaiswal AK, Jaiswal S. 2021. Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chem.*, 343:128403
- Sunesen LO, Stahnke LH. 2003. Mould starter cultures for dry sausages—selection, application and effects. *Meat Sci.*, 65(3):935-948
- Van Ba H, Seo HW, Kim JH, Cho SH, Kim YS, Ham JS, Seong, PN. 2016. The effects of starter culture types on the technological quality, lipid oxidation and biogenic amines in fermented sausages. *LWT-Food Sci. Technol.*, 74:191-198
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J. Food Saf.*, 27(1):91-101
- Viuda-Martos M, Ruiz Navajas Y, Sánchez Zapata E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J.*, 25(1):13-19
- Wang YF, Jia JX, Tian YQ, Shu X, Ren XJ, Guan Y, Yan ZY. 2018. Antifungal effects of clove oil microcapsule on meat products. *LWT-Food Sci. Technol.*, 89:604-609
- Yu MH, Chae IG, Jung YT, Jeong YS, Kim HI, Lee IS. 2011. Antioxidative and antimicrobial activities of methanol extract from *Rosmarinus officinalis* L. and their fractions. *J. Life Sci.*, 21(3):375-384
- Zeng R, Chen JY, Lin LC. 2013. Antimicrobial activity of clove essential oils and eugenol against food-borne bacteria. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 35(4):852-857
- Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation Food Information Statistics System Processed Food Segment Market Status Report 2020. Available from: <https://www.atfis.or.kr/>, [accessed 2022.7.5]
- Ministry of Food and Drug Safety, Food code 2022, Available from: <http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/>, [accessed 2022.7.5]
- US Food and Drug Administration 2022, Code of Federal Regulation Title 21 182.10, Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=182.10>, [accessed 2022.8.31]

Received August 23, 2022; revised August 31, 2022; accepted August 31, 2022