

식품성분과 가공조건이 마늘 Methylene Chloride Extract의 항미생물성에 미치는 영향

신동선 · 이영춘
중앙대학교 식품공학과

Effects of Food Components and Processing Conditions on Antimicrobial Activities of Garlic Methylene Chloride Extract

Doung-Sun Shin and Young-Chun Lee

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Abstract

The antimicrobial activities of methylene chloride extract from garlic and effects of food components and processing conditions on antimicrobial activities. The antimicrobial activities of methylene chloride extract were not significantly affected by addition of starch, protein or fat, regardless of the tested concentrations. The antimicrobial activities of microencapsulated methylene chloride extract were significantly affected by pH and temperature. They were markedly decreased as pH and temperature increased from 6.0 to 9.0 and from 65°C to 95°C, respectively. Water activity of a model food significantly affected the antimicrobial activities of microencapsulated methylene chloride extract. The growth of bacteria was more severely affected by A_w than that of yeast.

Key words: activities, antimicrobial, methylene chloride extract, garlic

서 론

식품의 변질 및 부패는 주로 미생물 작용에 의한 변화가 대부분을 차지하고 있다. 미생물의 증식을 억제하는 보존제로는 인공합성품이 상업적으로 많이 이용되고 있으나 천연물에도 항균성 물질이 알려져 연구(Bass, 1977; Davidson, 1983)가 수행되어 오고 있고, 건강에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있는 가운데 천연물에서 항균성물질의 탐색과 식품에의 이용에 관한 연구가 진행되고 있다.

마늘의 항균성 성분인 alliin은 allyl 2-propenethiosulfinate의 화학 구조를 가졌으며, 이는 alliin이 alliinase에 의해 분해된 것이다(A. stoll과 E. seebeck, 1949, 1951). Saleem 등(1982)에 의하면

마늘에는 alliin 이외에 S-methyl-L-cysteine sulfoxide 등이 함유되어 있고 이 역시 alliinase에 의해 미생물 생육 저해작용이 있는 methyl methanethiosulfinate로 분해된다. 마늘에 함유되어 있는 alliin이나 methyl methanethiosulfinate가 가지는 항미생물 작용은 thiosulfinate가 세포내 중요한 단백질의 SH기와 반응하여 단백질의 활성을 저해하기 때문이라고 보고 하였다. 또한 alliin은 마늘중에 약 0.3~0.4% 존재하며 Gram 양성균과 Gram 음성균 모두에 대하여 포자의 발아와 균의 성장을 억제하는 항균성(Yamata, 1977)을 가지며 대사 질환에 대한 약리작용도 있음이 보고 되었다(Nakata, 1973).

본 연구에서는 마늘로부터 항미생물성 유효성분을 methylene chloride로 추출하여 식품의 대표적인 전분, 단백질, 지방이 항미생물성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 그리고 가열, pH 및 수분활성도가 microencapsulation한 methylene chloride extract (MCE)의 항미생물성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

Corresponding author: Young-Chun Lee, Dept. food Sic. & Tech., Chung-Ang Univ., Naeri san 40-1, Daeduk-myun, Ansong, Kyungi-do 456-756, Korea Phone: (031) 676-2451, Fax: (031) 675-4853, E-mail: leeyc@post.cau.ac.kr

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 마늘은 서산 마늘을 산지에서 직접 구입하여 외피를 제거한 후 PE백에 넣어서 -70°C 의 냉동고에 보관하였다. 이것을 4°C 에서 해동한 후 물기를 제거하고 시료로 사용하였다.

Methylene chloride를 이용한 마늘 추출

예비실험 결과 여러 가지 유기용매를 사용한 마늘 추출물 중 수율은 적지만 가장 항미생물성이 큰 것으로 조사된 methylene chloride을 본 연구에 이용하였다. 마늘 8 kg을 취하여 분쇄기로 20 mesh 크기로 파쇄한 후 30분간 방치하여 alliinase를 활성화시킨 후, 파쇄한 마늘에 methylene chloride를 5배량(w/v)이 되도록 첨가하였다. 이것을 실온에서 4시간 동안 진탕 추출하고 여과한 후 무수황산 나트륨을 가하여 12시간 동안 정치하여 수분을 제거하였다. 그리고 다시 여과한 후 40°C 에서 감압 농축하여 최종 volume이 800 mL이 되도록 정용한 liquid, methylene chloride extract 10 g을 실온에서 완전히 증발시켜 얻은 1g의 건고물을 각각 -70°C 보관하여 사용하였다. 가공조건과 식품성분의 항미생물성 조사는 methylene chloride extract의 건고물을 시료로 하였다.

사용 균주 및 균의 전배양

이 실험에 사용된 균주와 균의 전배양은 Table 1과 같다.

가공조건이 항미생물성에 미치는 영향 연구

마이크로캡슐화는 Benita (1996)와 Patrick (1984)의 방법을 이용하여 저온에서 실시하였다. Methylene chloride solids와 cyclodextrin를 1:2 (g/g) 비율로 하여 고형분 함량이 40%가 되도록 멸균수를 첨가하여 homogenizer로 잘 균질화한 다음 압력 ≤ 2 torr, 40°C 에서 냉동건조하여 분말을 얻었다. 분말은 밀봉하여 -70°C 냉동고에 보관하여 시료로 사용하였다.

온도 및 pH가 항미생물성에 미치는 영향

이 실험을 위하여 마이크로캡슐화된 분말을 사용하였다. 지표균주는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7를 사용하였고, 온도와 pH를 달리한 조건에서 시행하였다. 각 pH 시료를 선정된 3처리 온도에서 경시

Table 1. List of microorganisms and culture conditions used to determine antimicrobial activities

Microorganisms	Media	Culture conditions
Gram positive bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 1021)	LB(LBA)	37°C , 24 hr
<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 1621)	LB(LBA)	37°C , 24 hr
<i>Listeria monocytogenes</i> (KCTC 2715)	LB(LBA)	37°C , 24 hr
Gram negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> (KCTC 2344)	LB(LBA)	37°C , 24 hr
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (ATCC 35150)	LB(LBA)	37°C , 24 hr
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	LB(LBA)	37°C , 24 hr
Yeasts		
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> (KCCM11666)	YM(YMA)	27°C , 48 hr
<i>Candida utilis</i> (KCCM 11750)	YM(YMA)	27°C , 48 hr
Molds		
<i>Aspergillus niger</i> (KCCM 11478)	PD(PDA)	27°C , 72 hr
<i>Aspergillus flavus</i> (KCCM 60130)	PD(PDA)	27°C , 72 hr

LB: Luria-Bertani broth, LBA: Luria-Bertani Agar, YM: Yeast-malto extract broth, YMA: Yeast-malto extract Agar, PD: Potato Dextrose broth, PDA: Potato Dextrose Agar

적으로 30분간 처리한 후 sampling하여 4°C 에서 30분간 냉각한 후 가열처리 않된 원래의 시료를 대조구로 하였다. pH 및 가열처리된 시료를 처리구로 하여 균의 접종원($10^5 \sim 10^6$ CFU/mL)을 배지에 1%가 되도록 첨가하여 24시간 진탕 시키면서 배양한 후 660 nm 흡광도에 의한 MIC(minimal inhibition concentration)를 측정하였다. MIC 측정은 세균과 효모는 Doubling dilution method(Hisae 등, 1993; Lorian, 1986)으로 실시하였으며, 곰팡이는 균체의 건조량으로 측정하였다.

수분활성도가 항미생물성에 미치는 영향

모델식품으로는 potato strach 30%와 whole milk powder 70%(유당 38%, 단백질 26%, 지방 27%, 기타 9%)를 blender로 잘 혼합하여 25°C 에서 수분활성도가 Aw 0.99, Aw 0.90, Aw 0.80이 되도록 멸균수로 잘 조절하여 측정하였다. 각각의 모델식품에

지표균을 *B. subtilis*는 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL를 접종 하였고, *Staphy. aureus*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7는 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL을 접종 하였다. Methylene chloride solids은 0.025%~0.150% 범위의 농도로 첨가한 것을 처리구로하여 잘 밀봉하여 수분활성도를 유지 시키면서 24시간 진탕시키면서 배양한 후 균체수를 측정 하였다.

식품성분이 항미생물성에 미치는 영향

식품 성분중 대표적인 전분(strach), 단백질(casein), 지방(soy bean oil)을 각각 5%, 15%, 25% 농도로 하고 각각의 균($10^5 \sim 10^8$ CFU/ml)을 접종하여 충분히 혼합한 후 5 mL씩 sampling 하였다. 여기에 methylene chloride solids은 *B. subtilis* 경우에는 0.02%, *Staph. aureus*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7는 0.07%를 각각 첨가하여 배양 시간은 예비실험을 통하여 *B. subtilis*은 2시간 *E. coli*와 *E. coli* O157:H7는 4시간 배양한 후 standard plate count 방법으로 균체수를 측정하여 배양전 균체수와 배양후 균체수를 서로 비교하였다.

결과 및 고찰

Methylene chloride extract 건고물의 항미생물 측정 결과

Methylene chloride extract 건고물의 MIC 농도 범위는 Gram 양성세균인 *B. subtilis*, *Staph. aureus*, *Li. monocytogenes*와 Gram 음성세균인 *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* 모두 0.1%로 MIC 값을 결정 하였다. *C. monocytogen*와 *S. cerevisiae* 각각 0.1%이었고, 곰팡이는 *Asp. niger* 와 *Asp. flavus* 모두 0.03%로 MIC값이 결정 되었다(Table 2).

온도 및 pH가 항미생물성에 미치는 영향 결과

Microencapsulation한 methylene chloride extract 건고물을 이용하여 pH 및 온도를 달리하여 항미생물성을 측정 하였다. pH 4.0의 대조구는 *B. subtilis*, *Staph. aureus*와 *E. coli* O157:H7 모두 0.06%, *E. coli*는 0.1% 이었다. 65°C에서 *B. subtilis*와 *Staph. aureus*는 0.06%, *E. coli*와 *E. coli* O157:H7는 0.1%의 MIC 값을 얻었으며, 80°C처리에서 *B. subtilis*를 제외한 나머지 균주는 0.1%, 95°C에서는 모두 0.1%의 MIC값을 나타냈다. pH 6.5에서 대조

Table 2. MIC of methylene chloride solids on microorganisms

Microorganism	Methylene chloride extract solids MIC (%)
Gram-positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 1021)	0.1 %
<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 1621)	0.1 %
<i>Listeria monocytogenes</i> (KCTC 2715)	0.1 %
Gram-negative bacteria	
<i>E. coli</i> (KCTC 2344)	0.1 %
<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 35150)	0.1 %
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	0.1 %
Yeast	
<i>Sacch. cerevisiae</i> (KCCM 11666)	0.1 %
<i>Candida utilis</i> (KCCM 11750)	0.1 %
Fungi	
<i>Asp. flavus</i> (KCCM 60130)	0.03 %
<i>Asp. niger</i> (KCCM 11478)	0.03 %

Table 3. Effects of temperature on MIC of microencapsulated methylene chloride solids to the selected index bacteria

Temp.	MIC (%)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
pH 4.0				
Control	0.06%	0.1%	0.06%	0.06%
65°C	0.06%	0.1%	0.06%	0.1%
80°C	0.06%	0.1%	0.1%	0.1%
95°C	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
pH 6.5				
Control	0.06%	0.06%	0.1%	0.1%
65°C	0.06%	0.1%	0.1%	0.1%
80°C	0.06%	0.1%	0.16%	0.16%
95°C	0.16%	<0.16%	<0.16%	<0.16%
pH 9.0				
Control	0.16%	<0.16%	<0.16%	<0.16%
65°C	<0.16%	<0.16%	<0.16%	<0.16%
80°C	<0.16%	<0.16%	<0.16%	<0.16%
95°C	<0.16%	<0.16%	<0.16%	<0.16%

구의 MIC는 *B. subtilis*와 *Staph. aureus*는 0.06%, *E. coli* O157:H7와 *E. coli*는 0.1% 이었다. 65°C 처리에서는 대조구와 거의 유사한 결과가 나타났으며, 80°C에서 *Staph. aureus*의 2종은 0.1%, *B. subtilis*는 0.06% 이었으며, 95°C 처리에서는 *E. coli*

O157:H7와 *E. coli*의 경우에는 0.16%의 MIC값을 얻었다. pH 9.0인 경우에는 대조구에서만 *Staph. aureus*가 0.16%이었고, 처리구의 3처리에서는 모두 MIC를 결정할 수 없었다(Table 3).

이런 결과로 보아 가공조건에 따른 항균력은 pH나 온도의 영향을 받으며, pH가 낮고 온도가 낮을수록 MIC값이 적게 나타났으므로 pH와 온도가 항미생물성에 크게 영향을 주는 것으로 확인 되었다.

수분활성도가 항미생물성에 미치는 영향

세균의 경우에 methylene chloride solids의 생육저해 농도는 0.1%, 효모의 경우는 0.05%로 나타났다(Fig. 1, Fig 2). Acott (1976)등에 의하면 식품의 수분활성도는 미생물 증식억제 및 생존에도 영향이 있는 것으로 보고한 결과와 유사한 것으로 사료되며, 수분활성도가 methylene chloride solids의 항미생물성에 영향을 미치는 것은 수분활성도가 효소의

활성에도 영향을 미치는 때문으로 추측 되었다.

식품성분이 항미생물성에 미치는 영향 결과

Potato starch는 *B. subtilis*의 경우에는 10^5 CFU/mL에서 10^1 CFU/mL, *Staph. aureus*의 2종은 10^8 CFU/mL에서 10^3 ~ 10^5 CFU/mL로 첨가량의 농도와 관계없이 SPC가 큰 차이를 보이지 않았다. Casein은 *B. subtilis*에서 균체수가 10^5 CFU/mL에서 10^1 CFU/mL로 제외하고 나머지는 10^8 CFU/mL에서 10^4 CFU/mL로 SPC가 측정되었으며, soybean oil은 *B. subtilis* 10^6 CFU/mL에서 10^2 CFU/mL으로, *Staph. aureus*의 2종은 10^8 CFU/mL에서 10^4 ~ 10^5 CFU/mL로 균체수가 측정되었다(Table 4).

이 결과로 보아 methylene chloride extract 건고물은 potato starch, casein, soybean oil 첨가량 및 균주에 따라 약간의 차이는 있었지만 유의성 있는 차이를 보이지 않은 것으로 보아 이들 식품성분은

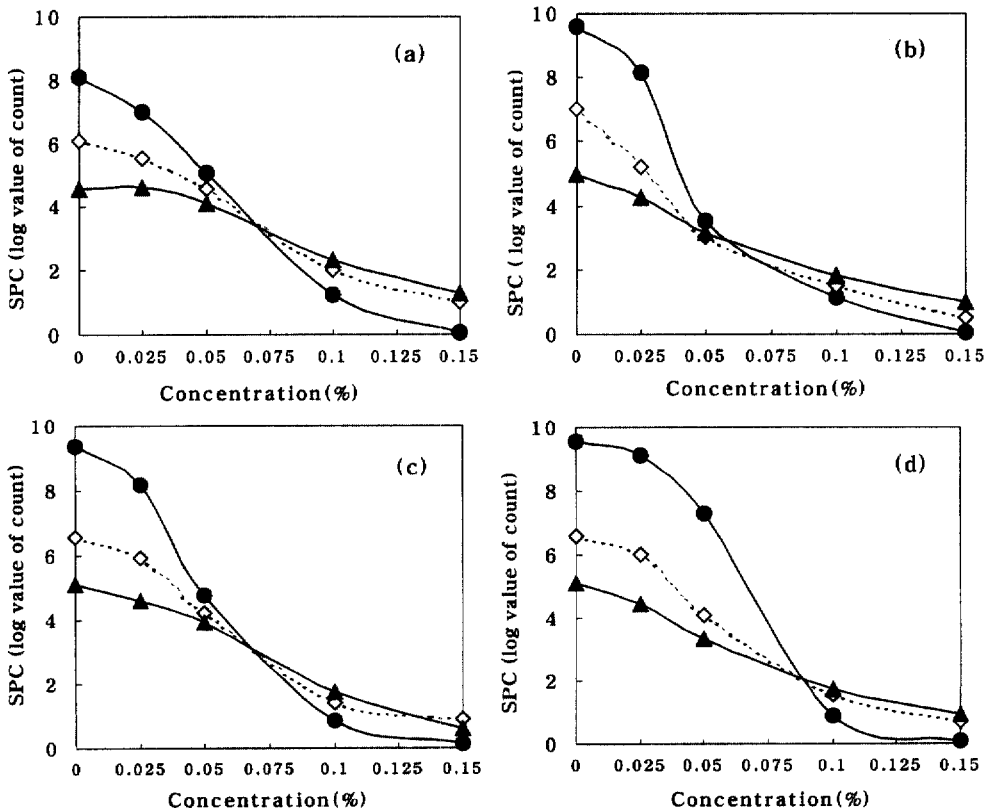


Fig. 1. Effects of Aw on antimicrobial activity of methylene chlorid extract on SPC of selected index bacteria inoculated to the model food.

(a) *Bacillus subtilis*, (b) *Staphylococcus aureus*, (c) *Escherichia coli*, (d) *Escherichia coli* O157:H7

● - ● : Aw 0.99, ◇ - ◇ : Aw 0.9, ▲ - ▲ : Aw 0.8

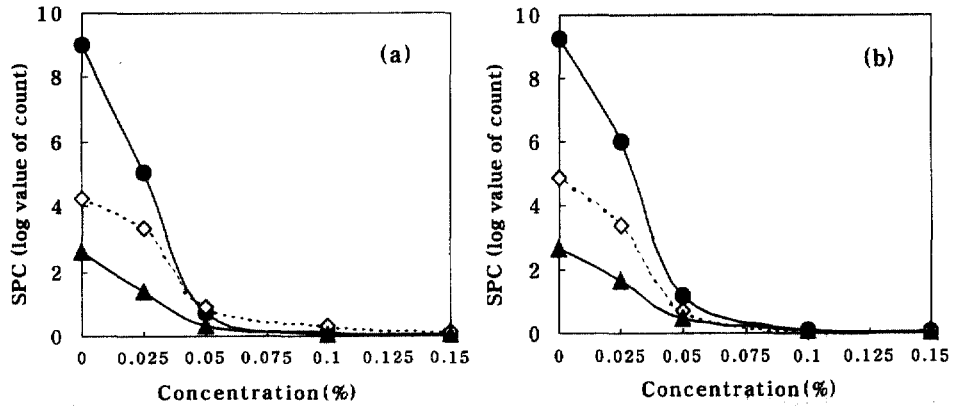


Fig. 2. Effects of Aw on antimicrobial activity of methylene chlorid extract on SPC of selected index yeasts inoculated to the model food

(a) *Candida monocytogenes*, (b) *Saccharomyces cerevisiae*, (● - ● : Aw 0.99, ◇ - ◇ : Aw 0.9, ▲ - ▲ : Aw 0.8)

Table 4. Effects of starch, casein, soybean oil on antimicrobial activities of methylene chloride solids to the selected index bacteria

	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> 0157:H7
단위: SPC (CFU/mL)				
Starch				
Control	6.5×10^5	4.3×10^8	2.8×10^8	1.8×10^8
0%	9.0×10^1	4.0×10^3	3.8×10^4	1.7×10^5
5%	5.0×10^1	4.3×10^3	1.2×10^4	1.8×10^5
15%	8.0×10^1	6.1×10^3	1.8×10^4	1.4×10^5
25%	6.0×10^1	8.8×10^3	1.1×10^4	1.0×10^5
Casein				
Control	8.7×10^5	4.6×10^8	2.1×10^8	2.4×10^8
0%	7.0×10^1	1.8×10^4	2.8×10^4	3.2×10^4
5%	8.0×10^1	1.7×10^4	2.7×10^4	4.7×10^4
15%	9.0×10^1	1.3×10^4	2.5×10^4	4.1×10^4
25%	8.0×10^1	1.5×10^4	3.3×10^4	5.0×10^4
Soybean oil				
Control	3.1×10^6	1.6×10^8	2.9×10^8	3.9×10^8
0%	2.8×10^2	3.2×10^4	1.2×10^5	3.2×10^5
5%	6.8×10^2	3.0×10^4	1.1×10^5	1.2×10^5
15%	5.7×10^2	2.6×10^4	1.1×10^5	3.3×10^5
25%	8.9×10^2	2.9×10^4	1.2×10^5	3.6×10^5

methylene chloride extract 건조물의 항미생물성에 영향을 미치지 않는 것으로 평가 되었다.

요 약

마늘 extract의 항미생물성과 대표적인 식품성분인 전분, 단백질, 지방이 항미생물성에 미치는 영향 및 가열, pH, Aw등의 가공조건이 microencapsulated

methylene chloride solids의 항미생물성에 미치는 영향을 조사하였다.

Methylene chloride extract 건조물의 항미생물성은 전분, 단백질 및 지방의 첨가 및 균주에 따라 약간의 차이는 있었지만 첨가 농도와 관계있는 차이가 나타나지 않았으므로 식품성분이 항미생물성에 영향을 주지않는 것으로 평가 되었다.

마이크로 캡슐화된 methylene chloride extract 건

고물의 가공조건에 따른 항미생물성은 pH 4.0~6.0의 산성 영역에서 높게 유지되었으며, pH 9.0로 갈수록 급격히 감소 되었다. 그리고 온도가 상승함에 따라 항미생물성이 감소하는 경향을 보였다. pH나 온도등의 가공조건이 항미생물성에 미치는 영향은 pH는 4.0, 6.5, 9.0순으로, 온도는 65°C, 80°C, 95°C 순으로 항미생물성에 영향을 주었다.

Methylene chloride extract 건고물의 수분활성도에 따른 미생물 생육억제 영향을 알아보기 위해서 Aw 0.99, Aw 0.90, Aw 0.80의 모델식품에 미생물을 접종 하였다. 세균의 경우에는 균주마다 0.5~1%로 다르게 나타났으며, 효모는 0.5%로 세균보다는 생육 저해 농도가 낮게 나타났다. Aw 0.99에서는 생육 저해곡선이 기울기가 급한 반면 Aw 0.80에서는 완만 하였다. 이 결과로 보아 수분활성도는 methylene chloride extract 건고물의 항미생물성에 영향을 미치는 것으로 평가 되었다.

문 헌

- Arthur stoll and Ewald Seebeck. 1951. Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic. *Advan. Enzymol.* **11**: 377-400.
- Arthur stoll and Ewald Seebeck. 1949. Uber alliin, die genuine mutter substance des knoblauchols. *Helv. Chim. Acta.* **31**: 189-210.
- Acott, K.A. Sloan, A.E. and Labuza, T.P. 1976. Evaluation of agents in a microbial challenge study for an intermediate moisture dog food. *J. Food. Sci.* **48**: 541-546
- Bass, G.K. 1977. Methods of testing disinfectants. In *Disinfection, Sterillization* 2nd (ed.), Block, S.S., ed., Lea and Febiger, Philadelphia. 49
- Davidson, P.M. and Post, L.S. 1983. Naturally occurring and miscellaneous food antinicrobials. In *Antimicrobials in Foods* Branen A.L. and Davidson P.M.(ed.), Marcel Dekker, Inc. New York. 371
- Hisae, M. and Isao, K. 1993. Bactericidal activity of anacardic acid against *Streptococcus* mutants and their potentiation. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1780
- Lorian, M. D. 1986. *Antibiotics in Laboratory medicine.* 2nd ed., Willams and Wilkins.
- Nakata, T. 1973. Effect of fresh garlic extract on tumor growth. *Jpa. J. Hyg.* **27**: 538-542
- Patrick B. Deasy. 1984. *Microencapsulation and related drug processes.* Marcel dekker, Inc., New York
- Simon Benita. 1996. *Microencapsulation: Methods and industrial application,* Marcel Dekker, Inc., New York
- Saleem, Z. M and Al-Delaimy, K. S. 1982. Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. *J. Food. Prot.* **45**: 1007
- Shim, K.H. Seo, K.I. Kang, K.S, Moon, J. S and Kim, H. C. 1995. Antimicrobial substances of distilled components from mustard seed. *J. Korean Soc. Food. Nutr.* **24**: 948-955
- Yamata, Y. and K. Azuma. 1977. Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of alliin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**: 743-751
- 정동효. 1998. 식품 천연 보존료, 대광서림.
- 이병완, 신동화. 1991. 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연항균성 물질의 검색 *J. Food Sci. Technol.* **23**: 200-204