

## 겨자 가수분해물의 항균성 변화

서권일 · 박석규\* · 박정로\* · 김홍출 · 최진상 · 심기환†

경상대학교 식품공학과

\*순천대학교 식품영양학과

### Changes in Antimicrobial Activity of Hydrolyzate from Mustard Seed(*Brassica juncea*)

Kwon-Il Seo, Seok-Kyu Park\*, Jeong-Ro Park\*, Hong-Chul Kim, Jine-Shang Choi and Ki-Hwan Shim†

Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

#### Abstract

Changes in antimicrobial activities were evaluated as mustard seed homogenate(MSH) was incubated at 37°C for 24 hours ; in addition, the minimum inhibitory dose(MID) and minimum inhibitory concentration(MIC) were determined against microorganisms using water extract of mustard seed. Antimicrobial activity was very low at the early stage of mustard seed hydrolysis ; however, drastic increase was observed at 12 hour hydrolysis reaching the maximum at 24 hour. Acidity of MSH increased as the incubation proceeded and after 36 hour incubation it did not show any significant changes. MID and MIC results indicated that water extract of mustard seed exerted relatively strong antimicrobial activities against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Vibrio parahaemolyticus*, and *V. cholera* non 01 J-3. Volatile components of mustard seed hydrolysate was steadily increased ; total isothiocyanate, in particular, was determined to be the highest at the hydrolysis time of 24 hour.

**Key words** : mustard seed, hydrolysis, antimicrobial activity, antimicrobial substance

#### 서론

겨자는 백색, 황색, 갈색 및 흑색의 4종이 있으나 갈색과 흑색이 매우 유사하여 백겨자(white mustard), 황겨자(yellow mustard) 및 흑겨자(brown black mustard)로 구분하기도 한다(1). 백겨자와 황겨자는 서부 유럽이 원산지이나 지금은 세계 각국에서 널리 재배되고 있으며, 흑겨자는 북남미 및 유럽에서 재배되고 있다. 백겨자와 황겨자는 myrosinase에 의하여 배당체 sinalbin이 가수분해되어 p-hydroxybenzyl isothiocyanate, glucose 및 sinapine bisulfate를 생성하고, 흑겨자는 배당체인 sinigrin이 myrosinase에 의하여 가수분해되어 매우 자극적인 방향과 강하게 푹 쏘는 맛을 가지고 있는 allyl isothiocyanate와 glucose 및 potassium hydrogen sulfate를 생성하는데(2), 이들 isothiocyanate는 강한 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 전남 여천군 돌산지방에서 다량 생산되고 있는 흑겨자(*Brassica juncea*)의 최대 항균활성조건을 찾기 위하여 겨자의 가수분해 시간에 따른 isothiocyanate류와 기타 항균성을 함유하고 있는 증류물질 등을 비교 분석하고, 그 항균력을 측정하였으며, 아울러 각종 미생물에 대한 겨자 물 추출물의 최소 저해 농도 및 최소 저해 투여량을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험재료, 사용균주 및 배지

실험재료인 겨자(mustard, *Brassica juncea*), 사용균주 및 배지는 전보(3)와 동일한 것을 사용하였다.

##### 겨자의 항균물질 추출

겨자의 항균물질을 추출하기 위하여 겨자를 분쇄하

†To whom all correspondence should be addressed

여 10g당 증류수 90ml의 비율로 첨가한 후 겨자 myrosinase의 최적 활성 온도인 37°C의 항온기에 시간별로 방치(0, 12, 24 및 48시간)시킨 후 교반 추출하여 여과한 상청액과 남은 잔사에 증류수를 첨가하여 2, 3차 교반하고 추출 여과한 상청액을 함께 모아 농축하였다.

**항균력 측정**

항균력 측정은 Farag 등의 방법(4)을 변형하여 전보(3)와 같은 방법으로 실험하였다.

**최소 저해투여량 및 최소 저해농도 측정**

최소 저해 투여량(minimum inhibitory dose : MID) 측정은 한천배지 회석 평판법(paper disc agar diffusion method)으로 하였다. 즉, 겨자 g당 200μl로 농축한 겨자 물 추출물을 여지 disc에 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 및 100μl를 가한 다음 균주가 도달된 평판배지에 올려놓고 각 균주의 최적 온도에서 최적 시간 배양하여 항균활성이 나타난 농도를 MID로 결정하였다. 최소 저해 농도(minimum inhibitory concentration : MIC) 측정은 액체배지 회석법으로 측정하였다. 즉 시험관에 5ml의 생육배지를 넣고 대수기 중기까지 배양된 균체 배양액 1%를 접종한 후 겨자 g당 200μl로 농축한 겨자 물 추출물의 함량을 배지 ml당 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 및 100μl가 되도록 접종하고 각 균주의 최적 온도에서 24시간 공망이는 6일 배양한 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 균의 증식이 완전히 억제된 농도를 MIC 값으로 결정하였다.

**연속증류추출법에 의한 증류성분 분석**

증류성분은 Maarse와 Kepner의 방법(5)에 준하여 Likens와 Nikerson(6)이 고안한 연속증류추출(SDE)법으로 추출하여 GC 및 GC-MS를 이용하여 전보(3)와 같은 조건으로 분석 및 동정하였다.

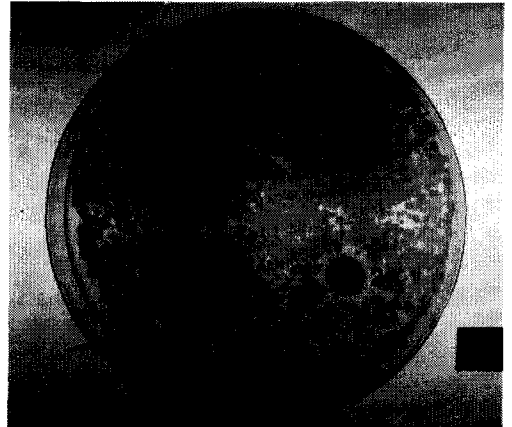
**결과 및 고찰**

**가수분해 시간에 따른 물 추출물의 항균성**

가수분해 시간에 따른 겨자의 항균성을 조사하기 위하여 마쇄한 겨자에 물을 첨가하여 37°C의 배양기에서 0, 12, 24 및 48시간 방치한 후 항균활성을 검색한 결과는 Fig. 1과 Table 1에서 보는 바와 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 *Staphylococcus aureus* 균에 대한 항균력은 처음에 항균성이 아주 약하게 나

타났던 것이 12시간 방치 후는 크게 증가하였고, 24시간에는 최대의 항균성을 나타내었으며, 48시간 방치 후에는 24시간 방치 후와 비슷한 결과였다.



**Fig. 1. Antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* with water extract of hydrolyzed mustard seed.**  
1 : 0 hour, 2 : 12 hour, 3 : 24 hour, 4 : 48 hour

**Table 1. Antimicrobial activities of water extracts as affected by the hydrolysis time of mustard seed**

Strains	Hydrolysis time(hour)			
	0	12	24	48
Gram(+) bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i>	+	++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++	+++	+++
<i>Streptococcus mutans</i>	±	+	++	++
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	++	+++	++
Gram(-) bacteria				
<i>Escherichia coli</i>	+	++	+++	++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	±	+	++	++
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	++	+++	+++
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+	++	+++	+++
<i>Vibrio cholera non 01 J-3</i>	+	++	+++	++
Lactic acid bacteria				
<i>Lactobacillus plantarum</i>	±	+	++	++
<i>Lactobacillus brevis</i>	±	+	++	++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	±	+	++	++
Yeast				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	++	+++	++
<i>Saccharomyces coreanus</i>	+	++	+++	++
Mold				
<i>Aspergillus oryzae</i>	±	+	++	++
<i>Fusarium solani</i>	±	+	++	++

± : Very slight inhibition(8~9mm)  
 + : Slight inhibition(9~10mm)  
 ++ : Moderate inhibition(10~14mm)  
 +++ : Heavy inhibition(14mm~)  
 Each disc contains 60μl extract equivalent to 300mg mustard seed

Table 1에서 보는 바와 같이 다른 시험 균주들은 24시간 가수분해시킨 것이 가장 항균성이 크게 나타났으며, 대체로 젖산균과 곰팡이에 대한 항균활성이 다른 균주에 비해 낮게 나타났다. 따라서 겨자로 부터 항균물질을 추출하기 위하여는 생겨자 물 추출물 보다는 37°C에서 24시간 가수분해한 물 추출물이 더 바람직하다고 생각된다.

가수분해 시간에 따른 산도 변화

겨자의 가수분해에 따른 적정산도를 조사하기 위하여 물에 겨자가루를 농도별(0. 0.1, 0.3, 0.5 및 1%)로 첨가한 후 37°C에서 3일간 방치하면서 산도를 측정한 결과는 Fig. 2와 같았다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 0, 0.1, 0.3, 0.5 및 1%의 농도로 겨자가 첨가된 물의 산도 처음에 0.01, 0.03, 0.06, 0.09 및 0.23으로 겨자 첨가 농도가 높을수록 높게 나타났다. 또한 겨자가 첨가된 물의 산도는 36시간 경과시 0.1, 0.3, 0.5 및 1%의 농도에서 0.07, 0.27, 0.43 및 0.84로 크게 증가하였으며, 그 이후의 시간에는 0.5 및 1% 농도에서만 미량 증가하였고 그 농도 이하에서는 변화가 거의 없었다.

겨자 물 추출물의 최소저해투여량 및 최소저해농도

각종 시험균주에 대한 겨자 물 추출물의 최소 생육 저해 정도를 조사하기 위하여 24시간 가수분해하여 겨자 g당 200μl로 농축한 겨자 물 추출물의 최소 저해 투여

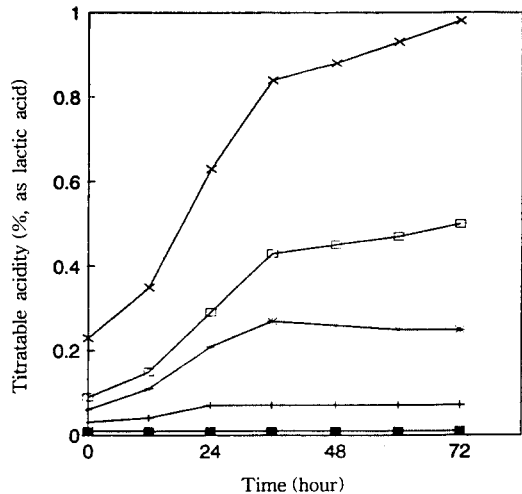


Fig. 2. Changes in acidity of mustard seed suspension during hydrolysis.

■ : 0%, + : 0.1%, \* : 0.3%, □ : 0.5%, × : 1.0%

량(MID) 및 최소 저해 농도(MIC)를 측정하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 고체배지를 이용한 MID는 *Bacillus subtilis*가 70μl/disc로 다른 실험 균주에 비하여 낮았으며, 젖산균에서 95μl/disc로 높게 나타났다. 액체배지를 이용한 MIC는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* 및 *Vibrio parahaemolyticus* 균주에서 70μl/ml로 다른 실험 균주에 비하여 낮게 나타났으며, 젖산균 및 곰팡이에서 90μl/ml로 가장 높게 나타났다. 이와 같이 겨자 물 추출물은 다른 시험균주에 비하여 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 및 *Vibrio* 균주에 대한 항균활성이 양호하였으며, 젖산균과 곰팡이에 대한 항균활성은 낮게 나타났다.

Isshiki 등(7)은 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Fusarium solani*에 대한 allyl isothiocyanate vapor의 MID는 각각 420, 420, 110, 210, 62 및 110μg/disc라고 보고하였으며, 徳丸(8)과 Farag 등(4)은 향신료들이 그람 음성균 보다 그람 양성균에 대하여 강한 항균력을 가진다고 보고하였는데, 이 보고들이 본 결과와 일치하지 않는 것은 각종 향신

Table 2. MID and MIC against the water extract of mustard seed

Strains	MID(μl/disc)	MIC(μl/ml)
Gram(+) bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i>	70	70
<i>Staphylococcus aureus</i>	80	70
<i>Streptococcus mutans</i>	90	80
<i>Streptococcus faecalis</i>	80	80
Gram(-) bacteria		
<i>Escherichia coli</i>	80	80
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	90	80
<i>Salmonella typhimurium</i>	80	70
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	75	70
<i>Vibrio cholera non 01 J-3</i>	80	80
Lactic acid bacteria		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	95	90
<i>actobacillus brevis</i>	95	90
<i>Leuconostoc mensenteroides</i>	95	90
Yeast		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80	80
<i>Saccharomyces coreanus</i>	85	80
Mold		
<i>Aspergillus oryzae</i>	90	90
<i>Fusarium solani</i>	90	90

MID was carried out by agar diffusion method  
 MIC was carried out by broth dilution method  
 Yield of concentrated water extract from mustard seed was 200μl per gram

료의 성분 차이와 시험균주의 생육상태 및 시료의 처리방법 등의 차이에서 비롯된 것으로 생각된다. 또한 정 등(9)은 카레향신료 정유성분의 항균성을 조사하였는데, 그 중 clove와 oregano의 정유성분이 그람 양성균에 속하는 젖산균에 대하여 그람 음성균 보다 더 높은 농도의 생육 저해 농도를 요구하였다고 보고하였으며, 이는 본 결과와도 일치하였다.

#### 가수분해 시간에 따른 겨자 물 추출물의 증류성분 함량 변화

가수분해 시간에 따른 겨자 물 추출물의 항균성과 증류성분의 상관관계를 조사하기 위하여 가수분해 시간에 따른 겨자 물 추출물의 휘발성분을 분석하고 그 함량을 측정된 결과는 Fig. 3 및 Table 3과 같다.

겨자의 증류성분은 처음에 peak 면적이 작게 나타났으나 12시간 가수분해시는 조금 크게 나타났고, 24와 48시간 때에는 다른 gas chromatogram과 비교하여 peak의 수가 많고 면적도 크게 나타났다. 또한 3-isothiocyanate-1-propene의 함량이 처음에 276.30ppm이었던 것이 가수분해 시간 12 및 24시간으로 증가함에 따라 288.74 및 491.84ppm으로 증가하였으며, 48시

간 경과시는 314.90ppm으로 감소하였다. 4-isothiocyanato-1-butene 및 2-isothiocyanatoethyl benzene의 함량도 초기에는 각각 22.47 및 1.24ppm이었으나 12 및 24시간으로 가수분해 시간이 지남에 따라 각각 35.44 및 37.05ppm과 3.76 및 5.68ppm으로 점차 증가하였으나, 48시간 경과시는 각각 36.62 및 4.04ppm으로 역시 미량 감소하였다. 그의 nitrile류와 hexadecanoic acid를 비롯한 산의 함량은 isothiocyanate류와는 달리 48시간 가수분해시까지 계속 증가하는 경향이었다.

Appelgvist와 Josefsson(10)은 100g의 유채씨 분말에 15mg의 myrosinase를 첨가하여 30°C에서 방치하였을 때 시간이 지남에 따라 isothiocyanate의 생성량이 점차 증가하여 30시간째에 최대치를 나타내었고, 그 이후는 변화가 없었다고 보고하였다. Tookey 등(11)은 겨자 중의 배당체인 glucosinolate가 효소 myrosinase에 의하여 isothiocyanate, nitrile 및 thiocyanate로 분해되며, 이때 강산(-HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>)이 생성된다고 보고하였으며, Zsolnai(12)는 그람 음성균에 대하여 isothiocyanate가 항균활성을 나타내며, 이는 sulfhydryl site에 의한 것이라는 보고하였는데, 이들 보고와 본 실험결과 및 앞의 가수분해 시간에 따른 항균성의 결과를 종합하여 생각하여 볼 때 가수분해 시간이 지남

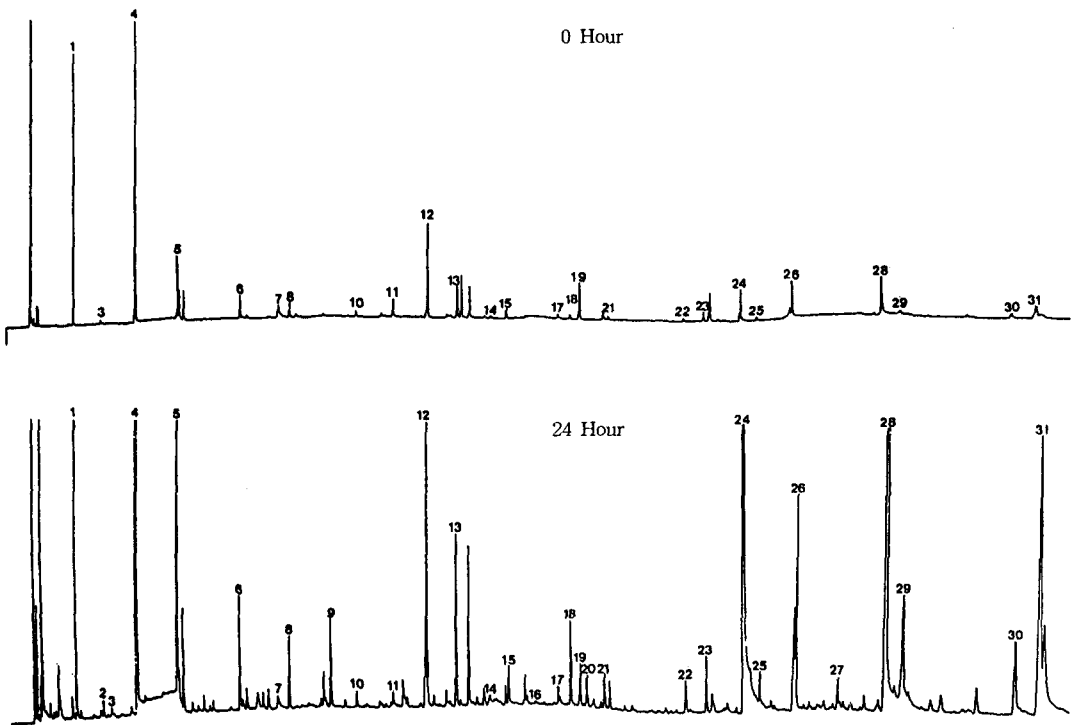


Fig. 3. Gas chromatogram of distillate from water extract of mustard seed hydrolyzed for 0 and 24 hour at 37°C.

Table 3. Distillate composition of mustard seed homogenate during hydrolysis

(Unit : ppm)

Peak No.	Components <sup>1)</sup>	R. T.	Time(hour)			
			0	12	24	46
1	2-Methyl propenenitrile	6.477	58.51	5.24	46.85	59.62
2	1,1-Dichloro cyclohexane	9.165	ND	ND	1.49	1.63
3	Isocyano methane	9.597	ND	ND	1.06	0.66
4	3-Isothiocyanato-1-propene(Allyl isothiocyanate)	12.751	276.30	288.74	491.84	314.90
5	4-Isothiocyanato-1-butene(3-butenyl isothiocyanate)	16.655	22.47	35.44	37.05	36.62
6	4-Decanol(Internal stand ard)	23.042	5.00	5.00	5.00	5.00
7	Benzeneacetaldehyde	26.480	10.58	5.47	2.37	68.31
8	2-Furancarboxaldehyde	27.626	5.65	4.23	6.80	11.18
9	Methyl-2-prophenyl disulfide	32.087	1.17	5.86	9.41	14.17
10	2-(Methylthio) Ethanol	34.152	2.72	1.91	1.74	2.01
11	Hexanoic acid	37.815	5.27	4.05	0.62	26.00
12	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol	40.870	44.80	54.56	56.53	57.75
13	Pentanoic acid	43.425	15.80	3.07	19.19	23.58
14	Benzene propane nitrile	47.199	1.99	3.99	2.16	3.38
15	Octanoic acid	48.804	5.13	1.99	1.87	5.08
16	1-Undecanol	51.697	ND	ND	0.34	1.44
17	6-Methyl-1-heptene	54.010	2.08	2.65	1.96	1.59
18	4-Hydroxy-3-methylacetophenone	55.075	1.48	6.16	9.57	16.30
19	2-Isothiocyanatoethyl benzene(2-phenylethyl isothiocyanate)	56.044	1.24	3.76	5.68	4.04
20	1-Dodecanol	57.282	1.39	1.41	1.74	0.77
21	Semicarbazone butyraldehyde	58.915	1.86	2.37	4.50	1.35
22	Unknown	66.138	2.06	3.97	4.03	6.18
23	Diocetyl ester hexanedioic acid	68.290	3.24	2.88	6.15	11.95
24	2,6-Dimethyl-3-(methoxymethyl)-p-benzoquinone	71.704	19.04	133.88	161.17	292.68
25	Trichloroecicosyl silane	74.280	1.63	4.31	2.96	4.81
26	Decanoic acid	76.825	18.47	23.60	22.70	37.92
27	Diocetyl ester hexanoic acid	81.596	ND	9.51	3.70	9.37
28	Hexadecanoic acid	85.579	25.58	50.10	189.84	284.50
29	Bicyclo[7.1.0] decane	87.384	2.13	9.07	22.60	46.55
30	Tetrahydro-3-methyl-4-methylene-furan	98.423	4.73	4.92	16.98	47.11
31	Glaudelsine	100.802	7.90	18.94	71.52	220.41

<sup>1)</sup>Components were isolated from water extract of mustard seed, which was hydrolyzed at 37°C for 24 hours previously, by SDE method

ND : Means no detected

에 따라 isothiocyanate, nitrile 및 산 종류의 항균성 물질들이 생성되어 가수분해시간이 지남에 따라 항균력이 증진되어 24시간 때에 최대의 항균력이 나타나는 것이라 생각된다.

### 요 약

겨자의 가수분해 시간에 따른 항균력을 비교하고, 각종 미생물에 대한 겨자 물 추출물의 최소 저해 농도 및 최소 저해 투여량을 측정한 결과 다음과 같았다. 겨자의 자가분해 시간에 따른 물 추출물의 항균성은 처음에 아주 약하게 나타났던 것이 12시간 방치 후 크게 증가하였다. 최대 항균활성은 24시간 방치 후 나타났으며 이후 거의 변하지 않았다. 겨자를 첨가한 물의 산도는 시간이 지남에 따라 증가하였고, 겨자의 농도가 클

수록 그 정도도 크게 나타났다. 37°C에서 24시간 자가분해한 겨자 물 추출물의 MID는 *Bacillus subtilis*가 70µl/disc로 다른 실험 군주에 비하여 낮았으며, 젖산균이 95µl/disc로써 높게 나타났다. MIC는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* 및 *Vibrio parahaemolyticus*균이 70µl/ml로 다른 실험 군주에 비하여 낮게 나타났으며, 젖산균 및 곰팡이에서 90µl/ml로 높게 나타났다. 자가분해 시간에 따른 겨자 물 추출물의 증류성분은 자가분해 시간이 지남에 따라 점차 증가하는 경향이었고, isothiocyanate류의 함량은 24시간 때에 최대치를 나타내었다.

### 감사의 글

본 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제

연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Farrell, K. T. : Spices, condiments and seasonings. AVI. New York, p.150(1985)
2. Macleod, A. J. : Volatile flavour compounds of the *Cruciferae*. p.307(1974)
3. 심기환, 서권일, 강갑석, 문주석, 김홍출 : 겨자 증류성 분증 향균성 물질. 한국영양식량학회지, **24**, 948(1995)
4. Farag, R. S., Daw, J. Y., Hewedi, F. M. and El-Baroty, G. S. A. : Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.*, **52**, 665(1989)
5. Maarse, H. and Kepner, R. E. : Changes in composition of volatile terpenes in douglas fir needles during maturation. *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 1095 (1970)
6. Likens, S. T. and Nikerson, G. B. : Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, **5**, 13(1964)
7. Isshiki, K., Tokuoka, K. and Chiba, S. : Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1476(1992)
8. 徳丸七恵 : 香辛料의 抗菌性と 抗酸化性. *New Food industry*, **30**, 8(1988)
9. 정창기, 박완규, 유익제, 박기문, 최춘원 : 카레 향신료 정유성분의 향균성. 한국식품과학회지, **22**, 716(1990)
10. Appelqvist, E. and Josefsson, A. : Method for quantitative determination of isothiocyanates and oxazolidinethiones in digests of seed meals of rape and turnip rape. *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 510(1967)
11. Tookey, H. L., Van Etten, C. H. and Daxenbichler, M. E. : Toxic constituents of plant food stuffs. 2nd ed., New York, p.103(1980)
12. Zsolnai, T. : Die antimicrobielle wirkung von thio-cyanaten and isothiocyanaten. *Arzneim. Forschyng*, **16**, 870(1966)

(1995년 10월 5일 접수)