

식물성 천연 항균복합소재 처리에 의한 마늘종 및 돈육장조림의 저장 효과

정준호¹ · 조성환^{2†}

¹경상대학교 농업생명과학연구원, ²경상대학교 식품공학과

Preservative Effect of Garlic Stalk or Pork Cooked in Soy Sauce by the Addition of Botanical Antimicrobial Agent-Citrus and Red Ginseng Mixture

Jun Ho Jung¹ and Sung Hwan Cho^{2†}

¹Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

The mixture of botanical antimicrobial agent-citrus product and ginseng extract mixture(BAACG) was applied to garlic stalk or pork cooked in soysauce to extend their selflife. BAACG showed a remarkable antimicrobial activity against a wide spectrum of food-borne infection microorganisms and thermal and pH stability. In comparison with scanning electron microscopic photos of microbial cells not-treated and treated with BAACG the physiological cytomembrane function of BAACG-treated microorganisms was destroyed and the dead cell numbers was increased. The quality of garlic stalk or pork cooked in soysauce was controlled by the addition of BAACG in their raw materials. BAACG-treated garlic stalk or pork cookeries showed considerably to decrease the numbers of total cell count and expressed no odor and no sticky state appeared in the control. BAACG was expected to be a preservative agent which could be applied to raw or processed foodstuffs in the view of food safety.

Key words : antimicrobial agent-citrus, red ginseng extract, preservative agent

서 론

오늘날 부패성 및 병원성 미생물의 오염에 따른 부패 또는 중독현상은 의약 분야에서 뿐만 아니라 축산의학, 농작물 저장 산업, 가축사료 등 광범위한 영역에서 당면하고 있는 심각한 문제중의 하나이다. 따라서, 각종 부패성 및 병원성 세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물에 대한 강력한 살균력을 가진 항균제의 개발이 진행(1-4)되어 왔다. 그러나 불행하게도 현재까지 부패성 및 병원성 미생물의 증식을 억제하려는 의도하에서 사용되고 있는 대부분의 화학방부제는 안전한 첨가량 범위내에서는 효과가 적고, 처리효과가 있는 농도 수준에서는 독성을 일으킬 가능성을 보여주고 있다. 이러한 점을 고려하여 볼 때, 이상적인 항균제란 항균활성이 높고 여러 종류의 미생물에 항균작용을 나타내며, 열 및 pH등에 안정하여야 하고, 안전성이 있어 인체에 무해하면서 효과가 극대화 할 수 있어야 할 것이다. 현재까지 미생물의 증식을 억제하는 식품보존료로는 인공합성품이 많이 알려져 있고 이

들이 주로 상업적으로 사용되고 있다. 최근, 식물성 천연소재 중에 함유되어 있는 항균성 물질에 대한 연구가 수행되어 항균성물질의 탐색과 식품에의 이용에 관한 연구(5-11)가 진행되고 있다. 일반적으로 사람이 오랫동안 먹어왔던 천연물을 그대로 이용하거나 추출하여 이용하는 경우 이들의 사용량이나 대상식품 등은 규제하고 있지 않으며 미국에서는 이를 GRAS로 분류하고 있다. 또한 이들 천연물이나 천연물의 추출물을 사용하는 경우 소비자의 기피현상도 없을 것으로 본다. 따라서 이들 천연 항균성 물질의 개발과 이용은 인공 합성 보존제의 대체라는 의미와 소비자 기피현상을 유발시키지 않으면서 각종 가공식품의 저장성 향상 및 저온 유통 식품의 안전성확보 라는 견지에서 그 중요성이 있다.

본 연구에서는 항균성과 안전성이 우수한 것으로 보고(11, 12)된 식물성 천연항균제품(Botanical Antimicrobial Agents-Citrus product : BAAC)에 홍삼추출물(ginseng extract)을 첨가하여 항균력을 증강시킨 천연항균소재(Botanical Antimicrobial Agent-Citrus and Ginseng extract mixture : BAACG)를 제조하고 시중에서 판매, 유통되고 있는 마늘종 무침, 돈육장조림 등의 반찬류 식품군에 적용하여 선도유지 효과를 실험하여 좋은 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

†Corresponding author. E-mail : sunghcho@nongae.gsnu.ac.kr, Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

재료 및 방법

재료

본 실험에서 BAACG의 항균력을 검토하기 위한 항균력 검사에 사용된 공시균주는 식품의 부패나 변질에 관여하는 미생물로 *Listeria monocytogene*, *Escherichia coli*, *Fusarium sp.* 및 *Candida albicans* 등을 사용하였으며, 미생물 배양과 항균력 측정용 배지는 Tryptic soy agar(TSA, Difco제품) 및 Brain heart infusion agar(BHIA, Difco제품) 등을 사용하였다.

식물성 천연 항균복합소재(BAACG)의 조제

본 실험에 응용된 천연 식물성 항균소재는 전보(11, 12)에 준하여 추출, 분리수집하였다. 즉, 먼저, 자몽, 오렌지 및 감귤 등의 citrus fruits를 세척한 후, 천연항균제 수용액에 침지하여 살균한 다음, G.M.P.(Good Manufacture practice)에 의거하여 일정 중량으로 계량한 citrus fruits를 밀봉된 Ball mill(Type A-5, Nikkato Co., Japan) 분쇄기에서 분쇄하였다. 분쇄물을 밀봉된 플라스틱 용기내에서 발효시킨 후, 원심분리를 이용하여 고체와 액체를 분리하고 자외선 조사하에서 여과한 후, 시럽을 탈수하고 20~25%정도로 농축하였다. 이와 같이 조제된 시럽원액에 천연유기산, bioflavonoids, 생물학적 발효촉진제, glycerine 등 항균작용의 상승제를 첨가하여 균일하게 혼합하고 표준화하여 안정화된 액체 제품의 BAAC를 제조하였다. BAAC원액과 홍삼추출물을 1 : 1의 중량비율로 혼합하여 homogenizer(S.T.M. company)로 2분간 150 × 100 rpm으로 균질화시켜 BAACG를 제조하였다. 이와 같이 G. M. P.시설하에서 제조된 식물성 천연항균제품은 물리, 화학적 및 관능학적 분석 결과를 토대로 최종 품질관리 공정을 거쳐 실험용 시료로 하였다. 전술한 홍삼추출물은 충남 금산에서 6년 홍삼근을 수증기로 압출, 조제한 것을 구입하여 사용하였다.

항균성 검사

부패성 및 병원성 공시 균주에 대한 천연항균복합소재 BAACG의 항균성은 여러 농도의 천연항균소재의 추출물용액으로 포화된 paper disk를 brain heart infusion agar(BHIA) plate 상에 접촉시켜 공시균주의 증식도를 비교하여 생육억제 정도를 측정하는 paper disk method(13)을 이용하였다. 즉, TSA의 slant media에 배양된 공시균주 1 백금이를 취하여 10 mL tryptic soy broth(TSB)에 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양한 후, 일정 농도(10 µL/mL)로 희석한 공시균주 균용액 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 5~8 mm인 BHIA plate상에 주입하고 구부린 유리막대로 균일하게 펼친 다음, 멸균된 10 mm filter paper disk(Whatman NO.2)에 BAACG 0(Control), 50 µg, 100 µg, 250 µg을 각각 접종한

후 30°C에서 48~72시간 동안 배양한 후 disk주위에서의 미생물의 생육 저해도를 비교하여 BAACG의 항균력을 검토하였다.

항균물질의 열 및 pH안정성 검사

paper disc method에 의하여 BAACG의 열안정성을 측정하기 위하여 추출물을 40, 60, 80, 100, 120, 150°C에서 각각 30분 동안 열처리한 후 처리온도별로 BAACG의 농도가 500 ppm이 되도록 멸균증류수로 조제한 다음, 항균력 검사 방법과 동일하게 비교 측정하였다. 또한, pH안정성은 BAACG의 pH를 phosphate buffer 4, 6, 7, 8, 10으로 조정한 후 37°C에서 1시간 방치한 다음 다시 pH 7로 중화시켜 열안정성 시험과 같은 방법으로 생육저해환을 비교 검토하여 pH안정성을 측정하였다.

미생물 세포의 전자 현미경학적 형태변화 조사

BAACG의 처리로 인한 공시균주의 세포형태 및 세포막에 미치는 기능성 변화를 알아보기 위해 전자현미경을 이용하여 처리한 후의 세포구조를 관찰하였다. BAACG 500 ppm의 농도로 처리한 것과 처리하지 않은 대조구 균체세포의 전자현미경 촬영사진을 비교 검토하여 미생물 세포조직의 변화를 측정하였다(10, 11). 즉, 주사전자현미경(SEM : scanning electron microscope : XL30S FEG, philips Co., Netherladn)의 조직표본 제작과정은 0.1 M phosphate buffer(pH 7.2)로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde용액으로 4°C에서 24시간 동안 고정하였다. 그리고 1% osmium tetroxide(OsO₄)로 4°C에서 2시간 동안이나 후 고정하였으며, 고정이 끝난 재료는 0.1M phosphate buffer로 세척하고 ethanol을 이용하여 실온에서 15분 간격으로 단계별로 탈수하였다. 탈수된 조직은 critical point dryer로 건조시킨 후 ion sputter를 이용하여 gold ion particle을 두께 20 nm로 피막을 입힌 후 주사전자현미경으로 관찰하였다.

식물성 천연 항균복합소재(BAACG)의 처리

마늘종 무침, 돈육 장조림 등의 반찬류를 제조하는 원료 중에 천연항균소재 BAACG를 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm의 농도로 500 µL씩 첨가하고 균질화시킨 후, 20°C, 상대습도 60%인 실내에 보관하면서 경시적인 저장실험용 시료로 이용하였다. BAACG를 처리하지 않은 반찬류를 대조구로 하고, 처리구와 동일한 과정을 거쳐 외부조직상태 및 미생물 오염정도를 관찰하였다.

미생물 균수측정

clean bench(5균상 JS-SCB-1300A)에서 eppendorf tube에 멸균 증류수 900 µL와 무균적으로 취한 각각의 시료(저장기간

별로 채취한 것을 균질기로 마쇄하여 채취한 상등액)100 μL를 멸균 증류수로 10⁶ 배 단계별로 희석시킨 후, 각각의 희석액 시료 100 μL를 plate count agar(PCA)배지에 접종하여 도말시킨 후, parafilm으로 petri dish를 잘 싼 후 37℃ 항온기에서 24-48시간 배양시켜 형성된 colony수를 계측하였다. 대장균수는 동일한 방법으로 coliform agar 배지(Merck, Germany)상에서 측정하였다.

결과 및 고찰

식물성 천연 항균복합소재(BAACG)의 항균성 검사

본 연구실에서 추출, 조제하여 이용한 BAACG의 항균력을 변패된 시료에서 분리(10)하거나 공시균주로 이용되는 미생물에 대하여 paper disk법으로 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, BAACG는 Gram양성균 및 Gram음성균, 곰팡이 및 효모 등 광범위한 영역의 미생물에 대하여 뚜렷한 생육저해환을 나타내었으며 처리한 BAACG의 농도가 증가할수록 생육저해환의 직경이 증가하는 것으로 나타나 BAACG의 항균성을 확인할 수 있었다.

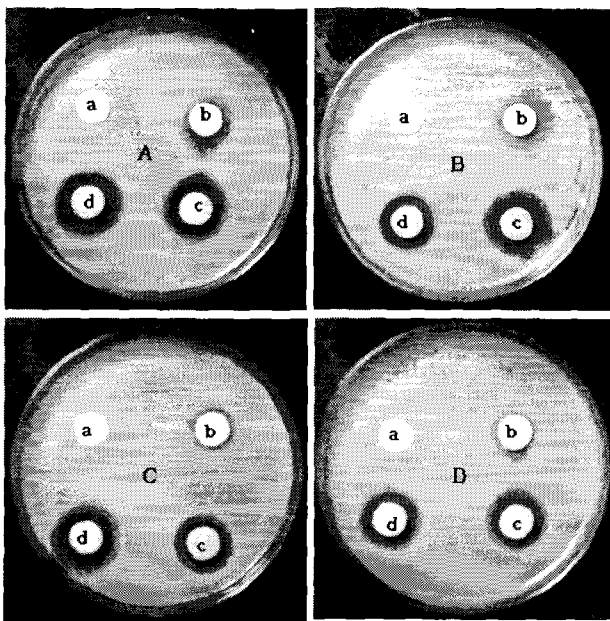


Fig. 1. Inhibitory effect of BAACG on the growth of microorganisms.

A : *Listeria monocytogenes*, B : *Escherichia coli*,
C : *Fusarium sp.*, D : *Candida albicans*.
a : Control, b : 50 μg, c : 100 μg, d : 250 μg of BAACG.

항균물질의 열 및 pH 안정성

paper disc method에 의하여 항균력이 가장 뛰어난 것으로

나타난 BAACG의 열안정성 및 pH 안정성을 검토한 결과는 Fig. 2에서 보여 주고 있다. Fig. 2에서 나타난 것처럼 넓은 영역의 열처리 온도(40℃~150℃)와 pH 범위 (pH 4~10)에서 동일한 크기의 생육저해환을 보임으로써 BAACG는 광범위한 범위의 열과 pH에 안정한 것으로 나타났다.

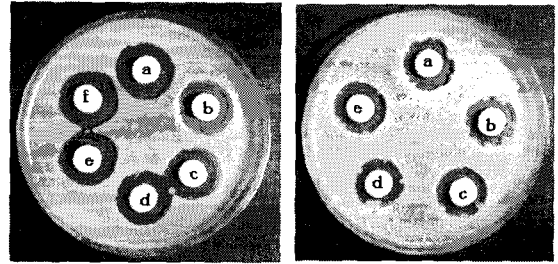


Fig. 2. Thermal(Left) and pH(Right) stability of natural antimicrobial agent(BAACG) against the growth of *Listeria monocytogenes*.

a : 40℃, b : 60℃, c : 80℃, d : 100℃, e : 120℃, f : 150℃(Left).
a : pH 4, b : pH 6, c : pH 7, d : pH 8, e : pH 10(Right).

항균물질처리에 의한 미생물의 형태변화

BAACG가 미생물세포생리특성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양된 공시균주를 사용하여 BAACG의 농도를 500 ppm으로 처리한 것을 처리하지 않은 대조군 균주와 함께 전자현미경 촬영시료로 조제하여 SEM을 촬영한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. 즉, BAACG용액에 처리한 미생물 균체 세포 및 포자는 세포막의 기능이 파괴되어 세포막의 기능이 상실되어 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되었으며, 세포막의 삼투조절기능의 상실로 인하여 세포내용이 빈 ghost형태의 균체수가 증가함을 알 수 있었다. 이러한 기작에 의해 결국은 미생물이 사멸하게 되는 것으로 사료된다.

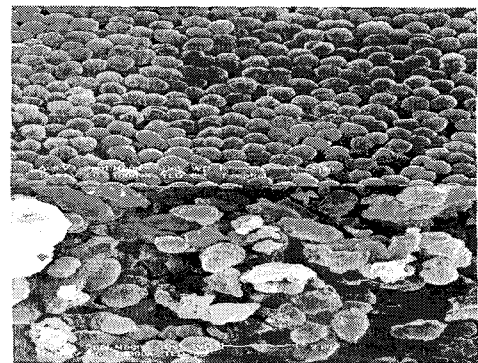


Fig. 3. Scanning electron micrograms (Magnification x 5,000) of *Escherichia coli* not-treated (Top : Control) and treated with 500 ppm of BAACG(Bottom).

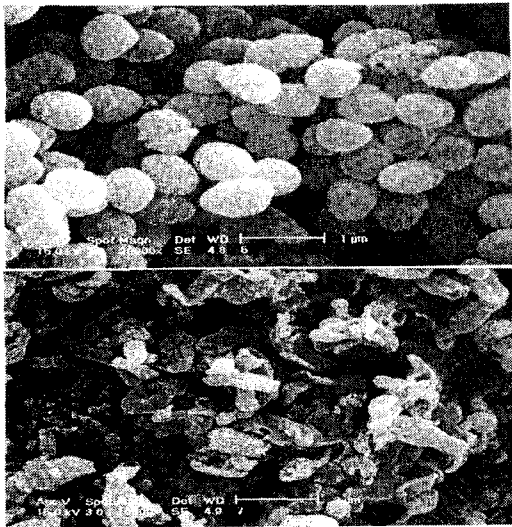


Fig. 4. Scanning electron micrograms (Magnification x 5,000) of *Staphylococcus aureus* not-treated (Top : Control) and treated with 500 ppm of BAACG (Bottom).

총균수의 변화

마늘종 무침과 돈육장조림에 BAACG를 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm의 농도 500 μL씩 첨가하여 상온에서 7일 동안 저장하면서 오염되어 생육하고 있는 총균수를 측정된 결과는 각각 Fig. 5 및 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 저장 7일까지 천연항균소재를 농도별로 첨가한 마늘종 무침과 돈육장조림의 경우, 미생물의 총균수는 크게 증가하지 않았으나, 대조구의 경우, 지속적으로 균밀도가 증가하였다. 즉, 마늘종 무침의 대조구에서는 6.3×10^4 CFU/mL이 검출되었는데 반하여, BAACG 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm 처리구에서는 각각 5.5×10^3 CFU/mL, 2.0×10^3 CFU/mL 및 1.3×10^3 CFU/mL로 나타났으며, 돈육장조림의 경우는 대조구에서는 7.5×10^4 CFU/mL이 검출되었는데 반하여, 각 농도별 BAACG 처리구에서는 각각 2.5×10^3 CFU/mL, 2.0×10^3 CFU/mL 및 1.3×10^3 CFU/mL로 나타났다. 이러한 결과로 미루어, BAACG의 처리가 오염미생물의 생육을 크게 억제하는 것으로 판단되었다.

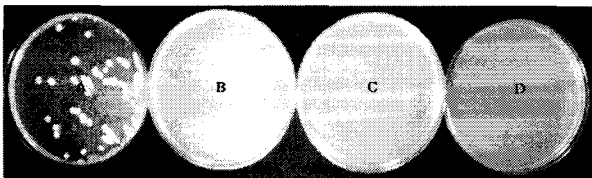


Fig. 5. Total bacterial counts in the stem of garlic stalk cooked in soysauce, treated with various concentration of BAACG after storing for 7 days at 20°C.

A : Control, B : 100 ppm, C : 500 ppm, D : 1,000 ppm of BAACG.

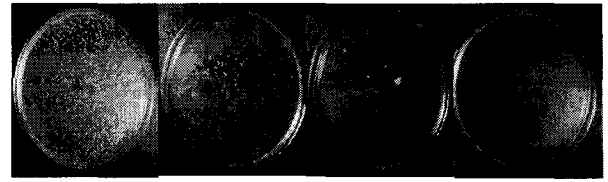


Fig. 6. Total bacterial counts in pork cooked in soysauce, treated with various concentration of BAACG after storing for 7 days at 20°C.

A : Control, B : 100 ppm, C : 500 ppm, D : 1,000 ppm of BAACG.

대장균수의 변화

저장 1주일 경과후 마늘종 무침과 돈육장조림의 대조구와 첨가농도를 달리한 BAACG의 처리구를 각각 stomacher로 마쇄하여 채취한 상등액을 검액으로 사용하여 대장균수를 측정된 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8에서 보는 바와 같다. 즉 마늘종 무침과 돈육장조림의 대조구에서는 각각 4.5×10^3 CFU/mL, 5.6×10^3 CFU/mL의 많은 대장균이 검출되었는데 반하여, 농도를 달리하여 BAACG를 처리한 마늘종 무침에서는 1.5×10^2 CFU/mL, 3.6×10^2 CFU/mL 및 1.3×10^2 CFU/mL로 나타났고, 돈육장조림의 경우에는 2.1×10^2 CFU/mL, 3.9×10 CFU/mL 및 1.2×10 CFU/mL로 나타나 대조구에 비해 훨씬 작은 수의 대장균이 검출되었다. 이상의 실험결과로 미루어 BAACG의 처리구의 경우가 대조구에 비해 대장균의 생육이 크게 억제 되었음을 알 수 있다.

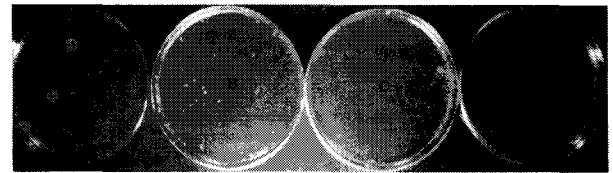


Fig. 7. Cell count of *Escherichia coli* isolated from garlic stalk cooked in soysauce, treated with various concentration of BAACG and stored for 7 days at 20°C.

A : Control, B : 100 ppm, C : 500 ppm, D : 1,000 ppm of BAACG.

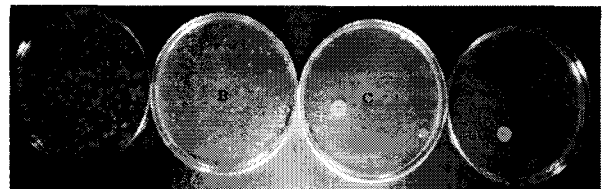


Fig. 8. Cell count of *Escherichia coli* isolated from pork cooked in soysauce, treated with various concentration of BAACG and stored for 7 days at 20°C.

A : Control, B : 100 ppm, C : 500 ppm, D : 1,000ppm of BAACG.

외관상의 변화

천연항균소재 BAACG를 농도별로 첨가, 침지 처리한 시료를 저장기간별 균수 측정과 더불어 상온에서 1주일간 저장하면서 외관상의 변화를 측정하였다. 마늘종무침의 경우, 대조구에서는 5일이 경과한 후부터 부패가 시작되어 1주일 이 경과후에는 강한 부패취와 아울러, 점질성 물질의 생성으로 상품가치가 크게 떨어진 상태였다. 돈육 장조림의 대조구의 경우도, 저장 3일째부터 강한 부패취와 함께 백색의 점질성 물질이 형성되어 관능적으로도 부패상태를 인지할 수 있었다. 이에 반하여, BAACG처리 시험구의 경우, 500 ppm 이상의 처리농도에서는 같은 저장 기간의 대조구들에 비해 점질성 물질의 형성과 부패취가 미약하여 선도 유지 효과가 있음을 외관상으로도 확인할 수 있었다.

요 약

본 실험에서는 식품의 미생물작용에 의한 변질의 저해 효과가 뛰어난 식물성 천연항균제품(Botanical Antimicrobial Agent-Citrus product)에 홍삼추출물을 첨가하여 조제한 식물성 천연 항균복합소재(Botanical Antimicrobial Agent-Citrus and Red Ginseng extract mixture : BAACG)의 항균력 검사, 열 및 pH안정성, 미생물 세포막의 형태 및 기능성 변화를 검토하고 BAACG를 가공 반찬류인 마늘 종무침과 돈육장조림 제조원료중에 농도별로 처리하고, 상온에 저장하면서 오염 미생물 총균수 및 대장균수의 변화와 아울러, 제품의 외관상 변화를 무처리 대조구와 비교하면서 조사하였다. BAACG는 광범위한 영역의 미생물에 대하여 뚜렷한 항균력을 보였으며, 넓은 범위의 열 및 pH에서 안정성을 나타냈다. 또한, 주사전자현미경 촬영사진의 결과, BAACG를 처리한 균체 세포는 세포막 및 세포벽 기능이 파괴되어 세포 내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되며 성장을 저해 또는 사멸시키는 것으로 나타났다. 반찬류에 BAACG를 처리하여 선도유지기간을 연장할 수 있는지를 판정하는 실험에서, 대장균수는 모든 처리구에서 BAACG의 첨가에 의해 성장이 억제되었으며 농도가 증가시킬수록 균 증식 억제 효과가 뚜렷하였으며, 총균수도 압도적으로 낮은 값을 보여주었다. 외관상의 변화와 상품가치를 측정된 결과는 마늘종무침의 경우, 대조구에서는 5일이 경과한 후부터 부패가 시작되어 1주일 이 경과 후에는 강한 부패취와 아울러, 점질성 물질의 생성으로 상품가치가 크게 떨어진 상태였다. 돈육 장조림의 대조구의 경우, 저장 3일째부터 강한 부패취와 함께, 점질성 물질이 형성되어 관능적으로도 부패상태를 인지할 수 있었다. 이에 반하여, BAACG처리 시험구의 경우, 일정 처리농도 이상에서는 점질성 물질의 형성과 부패취가 미약하여 선도 유지 효과가 있음을 외관상으로도

확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 볼 때, BAACG의 처리는 가공 반찬류의 저장성을 최대한 연장할 수 있음을 확인하였고, 반찬류뿐만 아니라, 여러 식품군에 다양하게 적용할 수 있음을 시사해 주었다.

감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과 중의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Shin, D.H., Kim, M.S. and Han J.S. (1991) Antimicrobial effect of ethanol extracts from Some medicinal herbs and their fractionates against food-born bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol* 29, 808-816
2. Beuchat, L.R. and Golden, D.A. (1989)Antimicrobials occuring naturally in foods. *Food Technol.*, 43, 134-142
3. Singh, H.B. and Singh, U.P. (1980) Inhibition of growth and sclerotium formation in *Rhizocroniasolani* by garlic oil. *Mycologia*, 72, 1022-1026
4. Briozzo, J., Nunez, L., Chirfe, J., Herszage, L., and D'Aquino, M. (1989) Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 66-69
5. Zaika, L.L. (1988) Spices and herbs. their antimicrobial activity and it's determination. *J.Food Safety*, 9, 97-101
6. Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., Takahara, Y. and Ichimura, K. (1979) Antifungal activity and molecuar orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Biol. Chem.*, 43, 2365-2369
7. Cho, S.H. and Kim, Y.R. (2001) Antimicrobial Characteristics of *Scutellariae Radix* Extract. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr*, 30, 964-968
8. Marwan, A.G. and Nagel, C.W. (1986) Microbial inhibitors in cranberries. *J. Food Sci*, 51, 1009-1012
9. Ross, Z.M., O'gara, E.A., Hill, D.J., Sleightholme, H.V. and Maslin D. J. (2001) Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder : *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 475-480
10. Kim, G.S., Seong, J.D., Park, S.Y., Oh, S.R. and Kwack, Y.H. (2000) Steroidal saponins from the rhizomes of

- asparagus oligoclonos and their antibacterial activity. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol* 43, 136-140
11. Jung, J.H. and Cho, S.H. (2003) Effect of Steeping treatment in the natural antimicrobial agent solution on the quality control of processed tofu. *Korean Journal of Food Preservation* 10, 41-46
12. Jung, J.H. and Cho, S.H. (2003) Antimicrobial antioxidant effect of botanical antimicrobial agent-citrus product on Pollack or Ascidian fishmeat. *Korean Journal of Food Preservation* 10, 401-405
13. Piddock, L.J.V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 307-310
-

(접수 2004년1 월 8일, 채택 2004년 3월 5일)