

조리방법을 달리한 마늘 추출물의 항균활성

김용두[†] · 김기만 · 허창기 · 김은선¹ · 조인경² · 김경제¹

[†]순천대학교 식품공학과, ¹광주보건환경연구원, ²남부대학교 식품생명과학과

Antimicrobial Activity of Garlic Extracts according to Different Cooking Methods

Yong Doo Kim[†], Ki Man Kim, Chang Ki Hur, Eun Sun Kim¹, In Kyung Cho² and Kyung Je Kim

Dept. of Food Science and Technology, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

¹Gwangju City Health and Environment Research Institute, Gwangju 502-243, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Nambu University, Gwangju 506-302, Korea

Abstract

This study was conducted to find the antimicrobial activity of garlic extracts by various processing methods(boiled, pan fried, microwave heated, pickled). Ethanol and water extracts from garlic sample were prepared and antimicrobial activities were determined against 10 microorganisms ; food borne pathogens, food poisoning microorganisms, food-related bacteria and yeasts. The ethanol extracts from the fresh and pickled garlic showed antimicrobial activities for test microorganisms, except lactic acid bacteria and yeast. However, the antimicrobial activities were decreased by heat treatment. The minimum inhibitory concentration(MIC) of the fresh garlic extracts was determined to 0.1 mg/mL against an gram positive bacterium and 0.5 mg/mL against an gram negative bacterium. The antimicrobial activities of the ethanol extracts were affected by heating methods and not by pHs.

Key words : garlic, extract, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentrations(MIC), various processing methods

서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 원산지가 지중해와 중앙아시아이나 요즘에는 동남아를 비롯하여 세계 전 지역에서 재배되고 있으며, 그 품종 또한 다양하다(1). 마늘은 예로부터 우리의 식생활에 많이 이용되어 온 향신료로써 식품의 맛을 증진시키고(2-3) 또한 식품의 보존능력이 있으며 식중독과 같은 병원성균의 증식 억제작용(4-10), 항혈전 작용(11), 항암 작용(12), 혈압강하 작용(13), 콜레스테롤 저하 및 노화방지 작용(14) 등의 많은 생리적 활성을 지니고 있어 향신료 외에 기능성 소재로 광범위하게 이용되고 있다. 김(15)등은 마늘의 조리방법에 따른 lipoxygenase 활성도 저해 효과에 대하여, 배(16)등은 조리조건에 따른 마늘의 화발성 함황화합물의 변화에 대해 보고하였다. 한편, 최근 새롭고 다양한 식품들이 유통됨에 따라 보존기간의 연장이나, 식품부패 미생물에 대한 방제 등 식품 보존에 대한 문제가 대두되고 있

다. 그러나 종래에 사용되던 인공합성 보존료들에 대하여 취급 및 사용에 제한을 받고 있다. 따라서 본 연구에서는 생마늘, 마늘장아찌와 생마늘을 여러 가지 방법으로 열처리한 후 항균활성을 비교하여 가공 처리전후 마늘의 식품 보존제로의 작용에 대해 검토하고, 또한 천연 보존료 개발의 일환으로 마늘의 추출물과 분획물을 몇 종의 병원균과 식중독균, 식품과 관련이 있는 몇 종의 균주에 대하여 항균활성 검색과 항균활성 물질의 미생물에 대한 최소저해농도, 항균활성 물질의 미생물 증식에 미치는 영향 등을 밝히고, 마늘의 에탄올 추출물에 함유된 항균활성 물질의 열안정성과 pH 안정성을 조사하여 마늘의 항균활성 물질을 식품 보존료의 이용 가능성 검정을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 마늘은 각각 2003년 4월과 6월에 전남

[†]Corresponding author. E-mail : kyd4218@sunchon.ac.kr,
Phone : 82-61-750-3256, Fax : 82-61-750-3208

순천에서 수확한 것을 구입하여 사용하였으며, 마늘의 경우 음전한 후 정선하여 사용하였다.

사용균주 및 시약

시험에 사용한 균주는 그람 양성균 3종, 그람 음성균 3종, 젖산균 2종 및 효모 2종을 선정하여 사용하였다. 균 생육배지로 세균은 Nutrient broth와 agar(Difco), 젖산균은 Lactobacillus MRS broth와 agar(Difco), 효모는 YM broth와 agar(Difco)를 각각 사용하였다.

가공방법

실험에 사용한 마늘은 생마늘, 자숙, 후라이팬과 전자렌지로 구운 마늘, 마늘 장아찌를 사용하였다. 즉, 자숙은 마늘 10 g을 polyethylene film으로 싸서 끓는 증류수에 넣고 30분간 완전히 익힌 것을 사용하였고, 구운 마늘은 후라이팬에 30분간 볶아 완전히 익혀서 사용하였으며, 전자렌지(2450 MHz)를 이용한 마늘의 가공은 통마늘을 전자렌지로 30분간 가열한 후 시료로 사용하였다. 마늘장아찌는 마늘 1 kg을 3% 초산 2 L에 일주일 동안 담근 후 이를 꺼내어 가열처리한 조미간장 2 L에 담근 뒤 2달 동안 숙성시킨 후 사용하였다.

마늘의 용매별 추출물

각각 마늘에 대한 물 추출물은 시료 100 g에 3배량의 증류수를 첨가하고 homogenizer로 마쇄한 다음 상온에서 24시간 동안 교반, 침출시켜 1차 추출하고, 다시 증류수 300 mL를 가하여 동일한 방법으로 2차 추출한 후 추출액 모두를 여과(Whatman No.2)하였다. 이 추출 여액을 rotary vacuum evaporator로 40°C 수육상에서 완전감압 농축하여 얻은 추출물을 냉장실(4°C)에 보관하면서 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 에탄올 추출물 역시 물 추출물과 같은 방법으로 추출한 후, 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

항균력 측정

각각의 마늘 즉 생것과 자숙, 구운 것, 전자렌지로 익힌 것, 장아찌의 물 추출물과 에탄올 추출물 항균활성 검색에 사용한 균주는 slant에 배양된 각각의 균주 1백금이를 취해 10 mL broth의 균 생육배지에 접종하고 각각 균주의 생육적온에서 10~18시간씩 3회 계대 배양하여 사용하였다. 실험방법은 이등(17-22)의 방법에 준하였다.

항균성 물질의 열 및 pH 안정성 조사

마늘에서 항균 활성을 나타내는 물질의 열 안정성을 측정하기 위하여 생마늘 에탄올 추출물을 50°C~100°C까지 10°C 간격으로 각각 1시간 동안 열처리한 후 대조구와 같이 한천

배지 확산법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다. 또한 pH 안정성은 생 마늘 추출물을 pH 3~11 까지 조절한 후 상온에서 1시간 방치한 다음, 다시 각각의 균주 최적 pH로 중화시켜서 열 안정성과 동일한 방법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다.

에탄올 추출물의 분획

생마늘 100 g을 상기 방법에 따라 에탄올 추출물 22.7 g을 얻었다. 즉 에탄올 추출물을 분획 여두에서 핵산 : 에탄올 : 물(10:1:9 v/v/v) 1 L씩 3회 추출, 농축하여 핵산추출 분획물 3.4 g을 얻었다. 계속해서 같은 방법으로 남은 수용액 층에 연이어 디에틸에테르, 에칠아세테이트 각 용매별로 순차적으로 추출한 후 완전감압 농축하여 각각의 분획물로 2.5 g, 8.2 g을 얻고 최종적으로 물 분획물 11.1 g을 얻어 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

결과 및 고찰

항균력 검색

추출 용매에 따른 항균활성 물질의 추출능을 확인하기 위하여 각각의 마늘로부터 에탄올, 물추출물의 항균활성 검색 결과는 Table 1과 같다. 즉, 생마늘의 경우 에탄올 추출물과 물 추출물 모두 그람양성균, 음성균 모두에서 항균활성이

Table 1. Antimicrobial activity of the extracts of garlic by various processing methods

Strains	Clear zone on plate(mm) ¹⁾ (8.0 mg/disc)									
	water extract					ethanol extract				
	A ²⁾	B ³⁾	C ⁴⁾	D ⁵⁾	E ⁶⁾	A	B	C	D	E
<i>B. cereus</i>	23	- ⁷⁾	-	-	16	25	-	-	-	17
<i>B. subtilis</i>	21	-	-	-	17	23	-	-	-	17
<i>S. aureus</i>	21	-	-	-	16	24	-	-	-	16
<i>E. coli</i>	22	-	-	-	18	26	-	-	-	19
<i>S. typhimurium</i>	20	-	-	-	17	24	-	-	-	18
<i>P. fluorescens</i>	20	-	-	-	17	24	-	-	-	18
<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. anomala</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾ Diameter (mm).

²⁾ Fresh garlic.

³⁾ Boiled garlic.

⁴⁾ Pan fried garlic.

⁵⁾ Microwave heated garlic.

⁶⁾ Pickled garlic.

⁷⁾ No inhibitory zone was formed.

강하였으나, 젖산균과 효모에서는 항균활성이 나타나지 않았고, 마늘장아찌에서는 생마늘보다 항균력은 약하였으나 유사한 결과를 나타났다. 그러나 열처리한 자숙마늘, 구운 마늘, 전자렌지로 익힌 마늘은 항균활성이 나타나지 않았다. 이 결과로 볼 때 마늘의 항균성물질은 가공방법 중 열처리에 의하여 활성이 급격히 소실됨을 알 수 있었다. 이는 정(6)등이 보고한 열처리 마늘즙의 항균활성 감소에 대한 내용과 유사한 결과를 보여주고 있다.

에탄올 추출물의 최소저해농도

항균활성 검색에 사용된 10 균주에 대해서 항균활성이 우수하였던 생마늘의 에탄올 추출물의 각 균주에 대한 추출물 농도의 영향을 조사하기 위하여 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL 농도별로 가한 액체배지 처리군에서의 각각의 흡광도(660 nm)를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 생마늘의 최소저해농도는 세균의 gram 양성균은 0.1 mg/mL 그램 음성균은 0.5 mg/mL로 차이를 보였으며, 효모와 젖산균은 2 mg/mL로 세균에 비하여 높은 농도에서 생육이 저해됨을 보여 항균활성이 비교적 낮게 나타났다. 따라서 생마늘 에탄올 추출물에 함유된 항균활성 물질은 세균의 경우 항균활성이 강하였으나, 효모와 젖산균의 경우 항균활성이 아주 약한 결과를 나타났다.

열 안정성 측정

마늘 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질의 열 안정성을 조사하기 위하여 에탄올 추출물을 50~100°C까지 10°C간격으로 1시간 동안 열처리하고, 이 에탄올 추출물 8 mg을 paper disk에 분주한 후 gram 양성균인 *B. cereus*와 gram

Table 2. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the ethanol extracts from garlic against target microorganisms

Strains	growth at concentration(mg/mL)				
	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0
<i>B. cereus</i>	+	+	±	-	-
<i>S. subtilis</i>	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	±	-	-
<i>E. coli</i>	+	±	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	+	+	-	-	-
<i>P. fluorescens</i>	+	+	±	-	-
<i>L. plantarum</i>	+	+	+	+	+
<i>L. mesenteroides</i>	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+
<i>H. anomala</i>	+	+	+	+	+

음성균인 *E. coli* 두 균주에 대한 생육저해환을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 즉 gram 음성균과 양성균 모두 50°C에서 항균활성이 비교적 안정하였으나 60°C 이상 되면서 활성이 급격히 낮아졌다. 또한, 항균활성을 시간대 별로 살펴보면 80°C에서는 20분 동안 비교적 안정하였으나 30분 이후 급격히 감소하기 시작하였고 90°C 이상에서 10분 이상 가열시 항균활성이 거의 나타나지 않았다. 이는 배(16)등이 조리시 마늘을 첨가하고 30분 이상 끓일 경우 항균력을 갖는 휘발성 함황화합물이 감소한다는 내용과 유사한 결과를 보여주고 있다.

Table 3. Effect of heat treatment of ethanol extracts on the growth inhibitory activity of garlic against *B. cereus* and *E. coli*

Strains	Control	Clear zone on plate (mm) ¹⁾ (8.0 mg/disc)																						
		Heating temp./Heating time (min)																						
		30	40	50	60	30	40	50	60	30	40	50	60	20	30	40	50	10	20	30	5	10	15	20
<i>B. cereus</i>	22	21.3	21.3	20.3	19.3	18.2	18.0	17.6	15.3	17.1	15.4	14.7	14.2	19.0	17.4	14.4	-	15.0	11.5	-	14.3	12.4	10.2	-
<i>E. coli</i>	21	21.2	21.2	20.0	19.1	18.6	17.6	16.5	15.5	16.8	15.7	14.8	14.4	18.7	15.4	12.1	-	14.7	12.2	-	14.4	11.1	9.1	-

1) Diameter (mm).

Ethanol extract was heated for 10~60 min at 60~90°C and heated for 5~20 min at 100°C.

pH 안정성 측정

생마늘의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질의 pH 안정성을 조사하기 위하여 에탄올 추출물을 pH 3~11까지 조절한 후 상온에서 1시간 방치한 다음, 다시 각각 균주의 최적 pH로 중화시켜서 gram 양성균인 *B. cereus*와 gram

음성균인 *E. coli* 두 균주에 대한 생육저해환을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 생마늘의 에탄올 추출물을 pH 3~11까지에서 항균활성 검색 결과를 보면, pH 1인 강산과 pH 11인 강알카리에서는 항균활성이 감소되는 것으로 나타났다. *B. cereus*에서 20 mm로 대조구의 21 mm와 거의 비슷하였으며, *E. coli*에서 20.5 mm로 대조구의 22 mm와 비슷하게

나타났다. 즉, 두 균주 모두 생육저해환의 크기가 대조구와 거의 비슷한 것으로 보아 생마늘의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질은 강산, 강알칼리 조건에서도 항균활성이 지속적으로 유지되는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Effect of pH change on the antimicrobial activity of ethanol extracts for *B. cereus* and *E. coli*.

Strains	Control	Clear zone on plate (mm) ¹⁾ (8.0 mg/disc)					
		pH					
		1	3	5	7	9	11
<i>B. cereus</i>	21	18	20.3	21.1	19.8	20.6	17.3
<i>E. coli</i>	22	17	20.2	21.0	20.6	19.6	18.5

¹⁾ Diameter

The ethanol extract was adjusted to pH 1~11 for 60 min at room temperature.

에탄올 추출물 분획의 항균활성

생마늘을 에탄올 추출물의 항균성 물질을 분리할 목적으로 용매 계통 분획을 위하여 헥산, 에테르, 에틸아세테이트, 및 물의 순으로 분획을 하여 각각의 용매분획 항균활성을 disk plate method에 의한 생육저해환을 측정하여 각 균주에 대한 억제 효과를 검색한 결과는 Table 5와 같다. *B. cereus*, *S. aureus* 및 *E. coli*는 헥산 분획물에서는 항균활성을 보이지 않았고 디에틸 에테르 층에서는 젖산균과 효모를 제외한 세균에서 약한 항균활성을 보였다. 균주별로 보면 에칠 아세테이트 분획물에서 *B. cereus* 15 mm, *S. aureus* 16 mm 및 *E. coli* 14 mm *P. fluorescens* 13 mm로 높은 항균효과

Table 5. Antimicrobial activities of fractions from ethanol extracts of Garlic against several microorganisms

Strains	Clear zone on plate (mm) ¹⁾ (8.0 mg/disc)				
	Ethanol extracts	Water extracts	Ethyl acetate extracts	Diethyl ether extracts	n-Hexane extracts
<i>B. cereus</i>	21	15	15	9	-
<i>B. subtilis</i>	23	14	16	10	-
<i>S. aureus</i>	19	15	16	10	-
<i>E. coli</i>	21	15	14	9.5	-
<i>S. typhimurium</i>	24	13	14	-	-
<i>P. fluorescens</i>	24	14	13	9.5	-
<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
<i>H. anomala</i>	-	-	-	-	-

¹⁾ Diameter.

를 보였으나 젖산균과 효모에서는 항균효과가 거의 없었다. 이상의 결과로 볼 때 생마늘 에탄올 추출물 중의 항균성 물질은 비교적 극성이 강한 용매에만 용해되는 물질로 추정할 수 있었다.

요약

조리방법을 달리한 마늘을 대상으로 새로운 식품개발 및 천연 보존료 개발의 일환으로 물, 에탄올로 추출한 항균활성 물질을 몇 종의 병원균과 식중독균 식품과 관련이 있는 세균, 젖산균 및 효모등 10개 균주에 대한 항균활성 검색을 하였으며, 항균력이 강한 마늘 에탄올 추출물을 용매 계통 분획하여 각 분획별 항균활성을 조사하였다. 또한 에탄올 추출물의 최소저해농도, 추출물에 함유된 항균성물질의 열 안정성, pH 등을 조사하였다. 생마늘과 마늘장아찌 추출물의 항균활성은 에탄올 추출물과 물 추출물이 10균주 중 세균에 대하여 항균활성이 강하였으나, 젖산균 및 효모에 대해서는 항균활성이 나타나지 않았다. 열처리한 자숙마늘, 구운 마늘, 전자렌지로 익힌 마늘은 항균활성이 나타나지 않았으며 이러한 결과로 볼 때 마늘의 항균성물질은 가공방법 중 열처리에 의하여 활성이 급격히 소실됨을 알 수 있었다. 마늘의 에탄올 추출물을 헥산, 디에칠에테르, 에칠아세테이트 및 물로 용매계통 분획하여 얻은 각 분획물의 항균활성은 에탄올, 에칠아세테이트와 물층에서 강한 항균활성을 보였고 균주별로 일반세균은 항균활성이 나타났으며, 효모와 젖산균에서는 항균활성이 나타나지 않았다. 생마늘의 에탄올 추출물의 최소저해농도는 그람양성세균은 0.1 mg/mL 이었고, 그람음성세균은 0.5 mg/mL 효모와 젖산균은 2 mg/mL 이었다. 마늘의 에탄올 추출물에 함유되어 있는 항균활성 물질은 50°C에서는 비교적 안정하나 온도가 높아질수록 점점 clear zone이 작아져 90°C에서 10분 이상 가열시 항균활성은 급격히 저하되었고, pH 변화에서는 비교적 안정한 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2003년 순천대학교 대학자체 연구비에 의해 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 武政三男 (1981) スハイス百科事典. 三秀書房, 東京, 日本. p.173-177

2. C.J. Cavallito, J.S. Back and C.M. Suter (1994) Alliin the antibacterial principle of *Allium sativum*. II.determination of the chemical stuctre. *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 7-12
3. Al-Deaimy, K. S. and M. M. Barakat (1970) Antimicrobial and preservative acitiviy of galic on fresh ground camel meat. I. effect of fresh ground garlic segments. *J. Sci. Food Agric.*, 21, 110-112
4. Kim, M.G., Kim, S.Y., Shin, W.S. and Lee, J.S. (2003) Antimicrobial activity of garlic juice against *Escherichia coli* O157:H7. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 35, 752-755
5. Byun P.H., Kim, W.J. and Yoon, S.K. (2001) Effects of extraction conditions on the functional properties of garlic extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 33, 507-513
6. Kun, S.C., Kim, J.Y. and kim, Y.G. (2003) Comparison of antibacterial activities of garlic juice and heat-treated garlic juice. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 35, 540-543
7. Kim, S.J and Park, K.H. (1996) Antimicrobial substances in leek(*Allium tuberosum*). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 604-608
8. Chung, L.M. and paik, S.B. (1990) Identification of antifungal activity substances on seed born disease from garlic and taxus extracts. *Anal. Sci. Technol.*, 22, 716-719
9. Choi, H.K. (2001) A study on the antibacterial activity of garlic against *Escherichia coli* O157, *J. Korean practical Arts Edu.* 14, 159-167
10. Park, S.I., Lee, H.K. and kang, K.H. (1998) A study on the effect of oligosaccharides on growth of intestinal bacteria. *Korean J. Dairy Sci.*, 10, 159-169
11. Nishimura, H., Hanny, W. and Mizutani, J. (1998) Volatile flavor components and antithrombotic agents; Vinylidithiins from *Allium victorialis* L. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 563-568
12. Kim, S.H., Park, K.Y., Suh, M.J. and Chung. H.Y. (1994) Effect of garlic(*Allium sativum*) on the glutathione S-transferase activity and the level of glutathione in the mouse liver. *Korean J. Food Sci. Nutr.*, 23, 436-443
13. Ruffin, J. and Hunter, S.A. (1983) An evaluation of the effect of garlic as an antihypertensive agent . *Ctyobios*, 37, 85-89
14. Kamanna, V.S. and Chandrasekara, N. (1983) Biochmical and physiological effects of and garlic (*Allium sativum* Linn.). *J. Sci. Ind. Res.*, 42, 353-35
15. Kim, M.R, Mo, E.K. and Lee, K.J. (1993) Inhibition of lipoxygenase activity by the extract of various processed galic. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 9, 215-221
16. Bae, H.J and Chun, H. J. Changes in volatile sulfur compounds of garlic under various cooking condition. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 18, 365-371
17. Piddock LJV. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 307-318
18. Bauer, A.W., Kirby, M.M., Sherris, J.C. and Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-496
19. 李在根, 龍口和惠, 提將和, 渡邊忠雄. (1985) グリシンと二, 三の薬剤の抗菌力併用效果. *日本食品衛生學雑誌*. 26, 279-284
20. MacLowry, J.D. and Jaqua, M.J. (1970) Detailed methodology and implementation semiautomated serial dilution microtechnique for antimicrobial suseptibility testing. *Appl., Microbiol.*, 20, 46-53
21. Pearson, R.D., Steigbigel, R.T., Davis, H.T. and Chapman, S.W. (1980) Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 18, 699-708
22. Murray, P.R. and Jorgensen, J.H. (1981) Quantitative susceptibility test methods in major united states medical centers. *Antimicrob. Agents Chemother*, 20, 66-70

(접수 2004년 7월 23일, 채택 2004년 9월 3일)