pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 4, pp. 285~295 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.4.285

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

향신료 정유의 휘발성 성분 및 식중독 세균에 의해 형성된 biofilm 억제 효과

김형은[1] · 김용석[2]*
[1]한국식품산업클러스터진흥원, [2]전북대학교 식품공학과

Volatile Components of Essential Oils from Spices and It's Inhibitory Effects against Biofilm Formed by Food Poisoning Bacteria

Hyeong-Eun Kim[1], Yong-Suk Kim[2]*
[1]*Sauce Industrialization Center, The Food Industry Promotional Agency of Korea, Iksan, Korea*
[2]*Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University, Jeonju, Korea*

(Received July 01, 2022/Revised July 12, 2022/Accepted July 18, 2022)

ABSTRACT - The ability of volatile components of essential oils (EO) from cinnamon, clove, and lemongrass to inhibit biofilms formed on polyethylene and stainless steel by six types of food poisoning bacteria was investigated. The main components of cinnamon EO were identified as cinnamaldehyde (38.30%), linalool (9.61%), β–caryophyllene (8.90%), and 1,3,4-eugenol (8.19%). 1,3,4-Eugenol (61.84%) was the dominant component of clove EO. The major component of lemongrass EO was citral. Citral is a natural mixture of two isomeric acyclic monoterpene aldehydes: geranial (*trans*-citral, 19.11%) and neral (*cis*-citral, 19.23%). Among these major compounds, cinnamaldehyde, linalool, eugenol, and citral exhibited comparatively strong antimicrobial activity in the disc diffusion assay. Treatments with 0.1% eugenol and citral were highly effective on biofilm inhibition on both tested surfaces. Cinnamaldehyde (0.1%) was effective against biofilm formation by *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 and *Staphylococcus aureus* KCCM 11812. These results suggested the potential of cinnamaldehyde, eugenol, and citral treatments in inhibiting the formation of biofilms by food poisoning bacteria.

Keywords: Biofilm, Essential oil, Food poisoning bacteria, Food contact materials, Antimicrobial

Biofilm이란 세균이 액체와 접촉하는 고체의 표면에 부착하여 번식하면서 세포 외 다당류를 생산하고, 이 다당류를 매개로 하여 근처의 세균이 응집하면서 덩어리가 되어 고체 표면에 막(film)을 형성하는 상태이다[1-4]. 주로 수분을 기반으로 하는 식품가공 공정에서 기구나 장비의 표면에 세균의 부착 및 biofilm의 형성은 문제가 되고 있는데[5,6], 식품 중 고농도 유기물질이 식품과 접촉하는 고체의 표면에 남아있게 되면 결과적으로 biofilm을 부드럽게 하여 다른 미생물의 부착을 돕기 때문에 biofilm의 오염이 중요한 위생 문제가 되고 있다[7].

*Correspondence to: Yong-Suk Kim, Department of Food Science & Technology, Jeonbuk National University, 567 Baekje-daero, deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54896, Korea
Tel: +82-63-270-2567, Fax: +82-63-270-2572
E-mail: kimys08@jbnu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

식물에서 추출한 정유의 항균활성에 관한 연구는 오래 전부터 진행되어 왔는데, basil (*Ocimum basilicum*), bitter orange (*Citrus aurantium*), chamomile (*Matricaria chamomilla*), cinnamon (*Cinnamomum zeylandicum*), clove (*Syzygium aromaticum*), lavender (*Lavandula angustifolia*), lemon (*Citrus limon*), oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) 등 허브의 정유가 항균활성을 갖는 것으로 보고되었다[8]. 또한 *Callicarpa japonica* Thumb.[9], *Polygonum cuspidatum* S. et Z.[10], pine needle (*Pinus densiflora* S. and Z.)[11] 등의 식물의 정유도 항균활성이 있는 것으로 알려져 있다.

최근 식물에서 추출한 정유를 활용하여 식중독 미생물에 의해 형성된 biofilm을 억제하는 연구가 이루어지고 있다. Polyethylene 및 stainless steel 표면에서 biofilm의 형성 특성[12], *Coriandrum sativum* L., *Syzygium aromaticum* 정유로 구강에 서식하는 *Candida albicans*에 의한 biofilm

형성 억제[13-15], *Curcuma longa* 정유로 *Streptococcus mutans*에 의한 biofilm 형성억제[16]를 보고하였다. 백리향(thyme)의 정유가 식품가공 공정에서 *Acinetobacter, Sphingomonas, Stentrophomonas*에 의한 biofilm 형성을 억제[17]한다고 보고되었다. 또한 cinnamon, clove 및 lemongrass의 정유가 식중독 미생물에 의한 biofilm 형성을 억제[18]하는 효과가 보고되었다. 이 외에도 우엉(burdock)잎[19], yarrow[20], oregano[21], *Mutellina purpurea*[22] 및 tea tree[23]에서 추출한 정유가 biofilm을 효과적으로 억제한다고 보고되었다.

본 연구에서는 선행연구[18]에서 식중독 세균에 의한 biofilm 형성을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려진 cinnamon, clove 및 lemongrass에서 추출한 정유의 휘발성 성분을 분석하였으며, 그 성분들 중 항균효과가 우수한 휘발성 성분을 선택하여 식중독 세균을 대상으로 항균활성을 시험하였다. 또한 이들 휘발성 정유 성분을 이용하여 식품가공 장비의 소재로 많이 이용되는 polyethylene과 stainless steel 표면에서 식중독 세균에 의한 biofilm 형성 억제효과에 대해 조사하였다.

Materials and Methods

정유의 추출

실험에 사용된 cinnamon (베트남산), clove (마다카스카르산) 및 lemongrass (터키산)는 전주시(Jeonbuk, Korea) 소재 대형마트에서 구입하여 사용하였다.

정유 성분의 추출은 Kim 등[18]의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 수증기 증류(steam distillation)는 clevenger-type essential oil extraction apparatus (EssenLab-plus, Hanil Lab Tech Co., Ltd, Yangju, Korea)를 이용하여 3시간 동안 진행하였다. 증류에 의해 얻은 정유는 물층으로 부터 분리하여 무수황산나트륨(Na_2SO_4 anhydrous)을 첨가한 후 4°C에 보관하여 수분을 제거하였다. 정유는 사용하기 전까지 휘발성 성분의 휘발을 최소화하기 위하여 –40°C의 냉동고에 보관하였다. 준비된 정유 emulsion은 사용하기 전에 30초 동안 균질화하여 사용하였다.

정유의 휘발성 성분 분석

수증기 증류법으로 추출한 정유는 chloroform 용액과 혼합(1:9)한 다음 GC-Mass spectrometry (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 분석하였다. GC-Mass에 의해 분리된 peak의 성분은 mass spectrum library (Wiley 8, NIST 08)를 기준으로 동정하였다[9].

정유의 휘발성 성분 분석을 위한 GC-Mass spectrometry의 분석조건은 다음과 같다(Table 1). Column은 DB-5MS (0.25 mm × 30 m, film thickness 0.25 μm)를 사용하였고, injector와 detector의 온도는 각각 280°C와 260°C로 하였으며, column 오븐의 온도는 70°C에서 3분간 유지시킨 후 300°C까지 10°C/min씩 상승시키고 300°C에서 5분간 유지시켰다. 운반가스는 헬륨(He, 70 kPa)을 사용하였으며, flow rate는 1 mL/min, split ratio는 30 : 1로 하였고, 시료는 1 μL를 주입하였다. Ion source의 온도는 200°C로 하였고, ionizing voltage는 70 eV이었다.

Table 1. GC-MS conditions for analysis of the volatile components of cinnamon, clove, and lemongrass essential oils

	Instruments	Conditions		
GC part	Instrument	GCMS-QP2010 ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan)		
	Column	DB-5MS, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm		
	Carrier gas	Helium		
	Injector temperature	280°C		
	Oven temperature	70°C 3 min hold, 10°C/min to 300°C, 300°C 5 min hold		
	Column flow	1 mL/min		
	Injection volume	1 μL		
	Split ratio	30 : 1		
MS part	Ion source	EI		
	Ion source temperature	200°C		
	Interface temperature	230°C		
	Scan range	SIM mode		
		RT (min)		Components
		7.9 min	71 *m/z*	Linalool
		10.9 min	131 *m/z*	Cinnamaldehyde
		12.2 min	164 *m/z*	Eugenol
		10.3 min, 10.8 min	69 *m/z*	Citral(isomer)

식중독 세균

전북대학교 식품공학과(Jeonju, Korea)에 보관하고 있는 *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Staphylococcus aureus* KCCM 11812의 Gram (+) 식중독 세균과 *Escherichia coli* KCCM 11234, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 11862의 Gram (-) 식중독 세균을 대상으로 biofilm 형성 억제 효과를 시험하였다. 모든 시험 균주는 tryptic soy broth (TSB: Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 0.7 mL와 50% glycerol (v/v) 0.3 mL에 넣어 -80°C 초저온냉동고에 보관하였다. 시험 균주는 TSB (Difco) 배지를 이용하여 계대 배양하고, 30°C에서 24시간 간격으로 2차 활성화하여 실험에 사용하였다[18].

정유 성분의 항균효과 측정

Cinnamon, clove 및 lemongrass의 정유가 항균활성을 나타내게 하는 항균활성 물질을 찾기 위하여 GC-MS 분석을 하였다. 분석을 통하여 향신료 정유의 주성분으로 알려진 cinnamaldehyde 등 12종의 성분을 구입하여 6종의 식중독 세균에 대한 항균활성을 disc diffusion method[24]에 따라 측정하였다(Table 5).

각각의 식중독 세균을 멸균된 TSB에 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 배양액 100 μL를 취하여 triptic soy agar (TSA: Difco) 배지에 균일하게 도말하였다. 12종의 성분은 각각 Tween 20이 2% 첨가된 멸균증류수에 100 μg/mL의 농도로 희석한 후 20 μL를 취하여 멸균된 paper disc (8 mm, Advantec, Toyo Foshi Kaisha, Ltd. Tokyo, Japan)에 점적하여 식중독 세균이 도말된 TSA 평판배지 위에 놓고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 항균 효과는 균주의 성장 억제대(inhibition zone)의 크기(mm)를 측정하여 평가하였으며, 대조구는 실험에 사용한 정유 성분과 같은 농도로 희석한 항생제 tetracycline hydrochoride (Duchefa biochemie, Haarlem, Netherlands)을 사용하여 항균활성을 비교하였다. 측정 시 paper disc의 직경 8 mm을 제외하였으며, 정유 성분의 희석액으로는 2%의 Tween 20이 첨가된 멸균증류수를 사용하였고, disc diffusion method를 통해 항균활성이 없음을 미리 확인하였다.

정유 성분의 minimal inhibitory concentration (MIC) 및 minimal bactericidal concentration (MBC) 측정

Cinnamon, clove 및 lemongrass의 주요 휘발성 항균 성분으로 확인된 cinnamaldehyde, eugenol, linalool 및 citral을 대상으로 MIC 및 MBC test를 통하여 항균활성을 비교하였다[25]. MIC 측정은 액체배지희석법(broth dilution method)을 이용하여 측정하였다. Cinnamaldehyde, eugenol, linalool 및 citral의 처리농도는 최고 10 mg/mL에서부터 2배씩 희석하여 최저농도 0.078 mg/mL까지로 하였다. MIC로 판별된 정유 성분의 농도로부터 그 이상 농도에 해당하는 배양액 100 μL씩을 TSA 고체배지에 직접 도말하여 30°C incubator에서 24시간 배양하여 MBC를 측정하였다.

정유 성분의 biofilm 제거 활성 측정

Cinnamaldehyde, eugenol, linalool 및 citral 성분이 식품 접촉표면에 형성된 식중독 세균의 biofilm을 제거하는 효과를 시험하기 위한 방법은 다음과 같다[26]. 멸균된 플라스틱[polyethylene coverslip (Thermanox® plastic coverslip, NUNC™, Rochester, NY, USA), 13 mm diameter] 및 스테인리스스틸(SUS 304, No.4) 쿠폰에 2차 활성 시킨 식중독 미생물 100 μL를 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 미리 biofilm을 형성시켰다. 플라스틱 및 스테인리스스틸 쿠폰에 남아있는 부유성 미생물을 제거하고 1,000 μL의 멸균 증류수로 3회 세척 후 상온에서 30 분간 건조하였다. 그리고 각 쿠폰에 Tween 20 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)이 2% 첨가된 멸균증류수를 이용하여 0.1% 농도로 희석한 표준물질을 100 μL씩 분주하고 1 시간 동안 상온에 방치하였다. 표준물질을 제거하고 1,000 μL의 멸균 증류수로 3회 세척 후 다시 상온에서 표면을 건조한 후 남은 biofilm을 glass bead법으로 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회의 독립적인 실험을 수행하여 결과를 나타내었다. 결과값은 평균±표준오차(Standard error of mean, SEM)로 표시하였고, 각 실험에서 얻어진 결과값의 유의성 검증은 SAS Package (Statistical Analysis System, SAS version 9.3, SAS Institute INC, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석(analysis of variance), Duncan의 다중범위 검정(Duncan's multiple range test)을 실시하였다 ($P<0.05$)[27].

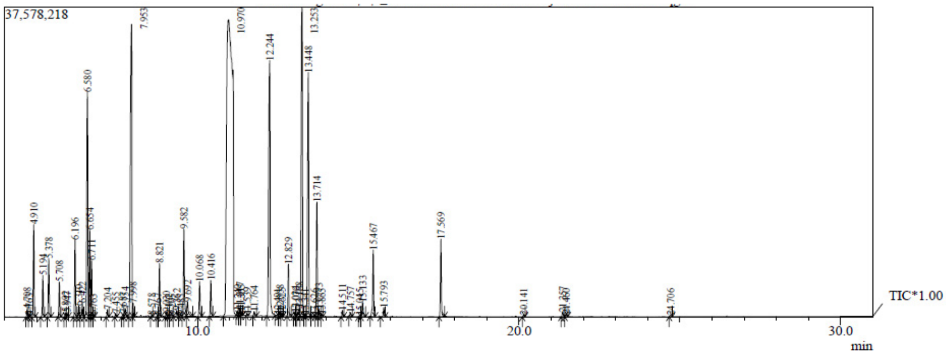
Results and Discussion

정유의 휘발성 성분 분석

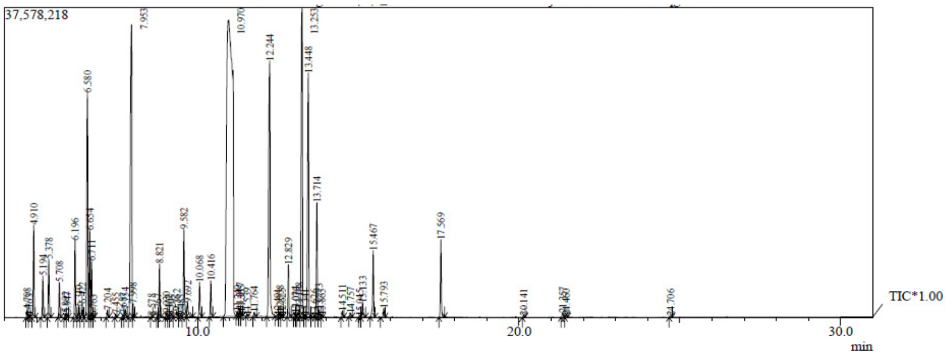
선행연구[18]에서 식중독 세균에 의한 biofilm 형성을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려진 cinnamon, clove 및 lemongrass 정유의 휘발성 성분의 조성비(peak area, %)를 GC-MS로 분석하였다.

Cinnamon 정유의 성분 분석 결과(Fig. 1A) 총 36종류의 물질이 검출되었으며, cinnamaldehyde (38.30%), linalool (9.61%), β–caryophyllene (8.90%) 및 1,3,4-eugenol (8.19%)이 주요 성분으로 확인되었다(Table 2). 이 외에도 cinnamyl acetate (6.11%), *p*-cimene (5.51%), α-caryophyllene (2.21%), α-terpineol (1.93%) 및 pinene (1.69%) 등의 성분들이 검출되었다. El-Baroty 등[28]의 연구결과에서 cinnamaldehyde (45.13%), cinnamyl alcohol (5.13%), eugenol (7.47%), methyl-eugenol

(A) Cinnamon EO



(B) Clove EO



(C) lemongrass EO

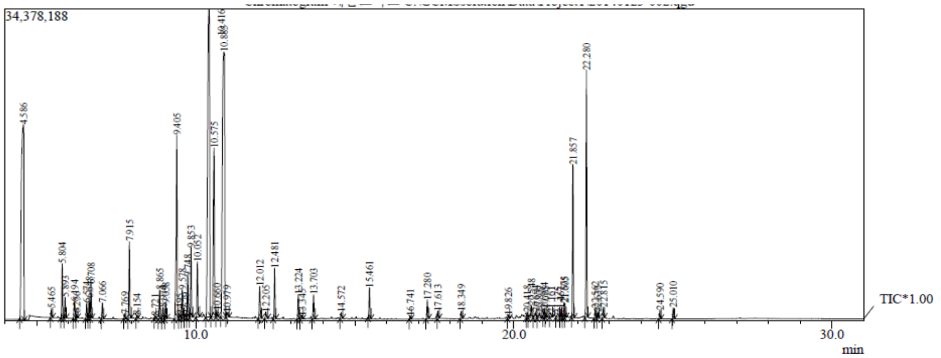


Fig. 1. GC/MS profiles of essential oil (EO) from cinnamon, clove, and lemongrass.

(5.23%) 및 ethyl-cinnamate (3.86%) 등이 cinnamon 정유의 주성분으로 검출되었다고 보고되어 본 연구결과와 유사하였다.

Clove 정유(Fig. 1B)의 경우 1,3,4-eugenol이 61.84%로 주성분으로 확인되었으며, β–caryophyllene (19.41%), eugenol acetate (6.91%), *p*-eugenol (4.69%) 등 12종류의 성분이 검출되었다(Table 3). Clove 정유의 주성분이 eugenol이라는 사실은 이미 많은 연구에서 확인되었으며[29,30], clove 정유의 주성분 중 eugenol이 70-82.6%, β–caryophyllene이 7.219.5%를 차지한다는 Srivastava 등[31]의 연구결과와 그 함량 및 성분이 유사하였다. Clove 정유의 주성분인 eugenol은 항산화[32], 항염증[33], 항암[34], 항균[35] 및 항알레르기[36] 효과가 있다고 알려져 있다.

Lemongrass 정유(Fig. 1C)의 경우 Table 4와 같이 총 53종류의 성분이 확인되었으며, 주요 휘발성 성분은 citral의 이성질체인 geranial (19.11%), neral (19.23%)로 확인되

Table 2. Volatile components of cinnamon essential oil by GC-MSD

Peak No.	RT[1] (min)	Components	Peak area (%)[2]
1	4.708	1,1,7-Trimethyltricy-clo(2.2.1.0(2.6))heptane	0.15
2	4.910	Pinene	1.69
3	5.194	Camphene	0.76
4	5.378	Benzaldehyde	1.14
5	5.708	β-Pinene	0.64
6	6.196	1-Phellandrene	1.39
7	6.310	3,7,7-Trimethyl-bicyclo(4.1.0)hept-3-ene	0.19
8	6.422	α-Terpinene	0.26
9	6.580	*p*-Cimene	5.51
10	6.654	(+)-(R)-Limonene	1.59
11	6.711	1,8-Cineole	0.98
12	7.204	γ-Terpinen	0.13
13	7.754	2-Carene	0.21
14	7.953	Linalool	9.62
15	7.998	Nonanal	0.20
16	8.821	4-Isopropyl-1-methyl-3-cyclohexen-1-ol	0.99
17	9.362	1-Isopropyl-4-methyl-3-cyclohexen-1-ol	0.14
18	9.582	α-Terpineol	1.93
19	9.692	Estragole	0.43
20	10.068	*trans*-Cinnamaldehyde	0.79
21	10.416	Cumaldehyde	0.71
22	10.970	Cinnamaldehyde	38.30
23	11.317	Geranyl formate	0.11
24	12.244	1,3,4-Eugenol	8.19
25	12.829	Eugenol methyl ether	0.95
26	13.168	Cinnamic acid	0.26
27	13.253	β–Caryophyllene	8.90
28	13.448	Cinnamyl acetate	6.11
29	13.714	α-Caryophyllene	2.21
30	13.773	Cinnamoyl chloride	0.16
31	14.511	Eugenol acetate	0.12
32	15.133	Cyclopropane,1-acetyl-2-methylene-1-phenyl	0.32
33	15.467	Caryophyllene oxide	1.42
34	15.793	Humulene oxide	0.20
35	17.569	Ascabiol	1.59
36	21.357	Benzenepropanoic acid	0.11
		Others	1.60
		Total	100.00

[1] Retention time based on the peak of GC-MS chromatogram.
[2] Peak area on the GC-MS chromatogram.

Table 3. Volatile components of clove essential oil by GC-MSD

Peak No.	RT[1] (min)	Components	Peak area (%)[2]
1	10.542	4-Allyphenol	0.14
2	12.255	1,3,4-Eugenol	61.84
3	12.425	*p*-Eugenol	4.69
4	12.591	Copaene	0.27
5	13.275	β–Caryophyllene	19.41
6	13.723	α-Humulene	3.34
7	14.272	α-Guaien	0.11
8	14.541	Eugenol acetate	6.91
9	14.58	β-Cadinene	0.62
10	15.409	5-Oxatricyclo[8.2.0.0(4,6)-] dodecane, 4,12,12-trimethyl-9-methylene-, [1R-(1R*,4R*,6R*,10S*)]-	0.21
11	15.471	Caryophyllene oxide	1.47
12	15.794	Humulene oxide	0.18
		Others	0.81
		Total	100.00

[1] Retention time based on the peak of GC-MS chromatogram.
[2] Peak area on the GC-MS chromatogram.

Table 4. Volatile components of lemongrass essential oil by GC-MSD

Peak No.	RT (min)[1]	Components	Peak area (%)[2]
1	4.586	3-Methoxy-3-methylbutanol	15.32
2	5.465	Mentha-1,4,8-Triene	0.21
3	5.804	6-Methylhept-5-en-2-one	1.29
4	5.893	β-Myrcene	0.48
5	6.194	1,5,8-ρ-Mentahtriene	0.53
6	6.256	2-tert-Butoxyethanol	0.11
7	6.574	1,3,8-ρ-Mentahtriene	0.38
8	6.648	D-Limonene	0.49
9	6.708	Eucalyptol (1,8-cineole)	0.83
10	7.066	2-Methyl-2,4-dimethoxybutane	0.38
11	7.769	2,6-Dimethyl styrene	0.13
12	7.915	(+-)-Linalool	1.90
13	8.865	(R)-(+)-Citronellal	0.70
14	8.974	Perillic alcohol	0.31
15	9.058	Limonene oxide	0.39
16	9.405	*cis*-Carveol	5.91
17	9.495	5-Isopropenyl-2-methylenecyclohexanol	0.13
18	9.578	*p*-Menth-1-en-8-ol	0.81
19	9.679	Valeric acid, 3-methylbut-2-enyl ester	0.11

Table 4. (Continued) Volatile components of lemongrass essential oil by GC-MSD

Peak No.	RT[1] (min)	Components	Peak area (%)[2]
20	9.748	Cyclopentanone, 2-cyclopentyl-	1.10
21	9.853	Carveol	1.82
22	10.052	[1,1'-Bicyclopentyl]-2-one	1.49
23	10.416	Geranial (*trans*-citral, citral A)	19.11
24	10.575	Geraniol	6.19
25	10.660	3-Carvomenthenone	0.17
26	10.885	Neral (*cis*-citral, citral B)	19.23
27	10.979	6-Methyl-7-octen-2-one	0.23
28	12.012	Berbenone	0.96
29	12.205	*p*-Eugenol	0.23
30	12.481	Geraniol acetate	1.22
31	13.224	β–Caryophyllene	0.64
32	13.703	α-Humulene	0.66
33	14.572	Cadina-1(10),4-diene	0.19
34	15.461	Caryophyllene oxide	0.82
35	17.280	2,6-Octadiene, 1-(1-ethoxyethoxy)-3,7-dimethyl-	0.49
36	17.613	Methoprene	0.19
37	18.349	(2E)-1-(1-Ethoxyethoxy)-3,7-dimethyl-2,6-octadiene	0.20
38	20.418	2,6,11,15-Tetramethyl-hexadeca-2,6,8,10,14-pentaene	0.18
39	20.548	3,7,7-Trimethyl-1-penta-1,3-dienyl-2-oxabicyclo[3.2.0]hept-3-ene	0.47
40	20.694	α-Farnesene	0.56
41	20.809	Geranyl geraniol	0.21
42	20.954	trans-α-Bergamotene	0.27
43	21.005	Diallylphenylvinylsilane	0.10
44	21.375	Retinol	0.21
45	21.575	Allyl ionone 1	0.44
46	21.605	2,6,11,15-Tetramethyl-hexadeca-2,6,8,10,14-pentaene	0.34
47	21.857	*O*-Geranyl	3.80
48	22.280	2,6-Octadiene,1-(1-ethoxyethoxy)-3,7-dimethyl	6.38
49	22.562	Longiverbenone	0.29
50	22.635	3,5,9-Trimethyl-deca-2,4,8-trien-1-ol	0.18
51	22.815	3,7,11-Trimethyl-dodeca-2,4,6,10-tetraenal	0.29
52	24.590	Farnesol isomer B	0.22
53	25.010	(E)-3,7-Dimethylocta-2,6-diene-1-thiol	0.29
		Others	0.40
		Total	99.98

[1] Retention time based on the peak of GC-MS chromatogram.
[2] Peak area on the GC-MS chromatogram.

었으며 geraniol (6.19%), *cis*-carveol (5.91%)도 검출되었다.

정유 성분의 항균효과

본 연구에서 사용된 cinnamon, clove 및 lemongrass 등 향신료의 정유가 항균활성을 나타내게 하는 항균활성 물질을 찾기 위하여 GC-MS 분석을 통하여 향신료 정유의 주성분으로 알려진 cinnamaldehyde 등 12종의 성분을 구입하여 6종의 식중독 세균에 대한 항균활성을 측정하였다 (Table 5).

Cinnamon 정유의 항균물질은 알려진 바와 같이 cinnamaldehyde에 의한 것이었으며, 이 외에도 linalool 및 eugenol 또한 모든 시험균주에 대하여 항균활성을 나타내었으나 cinnamyl acetate는 항균활성을 나타내지 않았다. Clove 정유에서는 eugenol만 항균활성을 나타내었으며, β–caryophyllene, α-humulone, eugenol acetate는 항균활성을 나타내지 않았다. Lemongrass 정유는 citral이 6종의 시험균주에 대하여 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, *cis*-carveol은 *B. cereus* ATCC 13061, *E. coli* KCCM 11234, *P. aeruginosa* ATCC 27853 및 *S.* Typhimurium ATCC 11862에서 항균활성을 나타냈다. 그러나 3-methoxy-3-methylbutanol과 geraniol은 항균활성을 나타내지 않았다.

각각의 성분이 항균활성을 나타내는 기작에 대한 연구들이 진행되어왔는데, clear zone이 가장 넓게 나타난 cinnamaldehyde는 아미노산의 decarboxylase 작용을 억제하여 세균을 사멸시키는 것으로 알려져 있으며[30], eugenol 또한 아미노산의 decarboxylase 작용을 억제하고, amylase와 protease의 생산을 억제해 세포의 효소활성을 방해하여 세균을 사멸시킨다고 보고되었다[30]. Citral은 500 ppm 농도에서 세균, 효모 및 곰팡이 등에 넓은 항균 스펙트럼을 보이는 것으로 알려져 있으며[30], citral의 항균작용은 보통 세포벽과 membrane을 파괴한다고 알려져 있으나 성장이 저해되고 세포가 손상되거나 불활성화 되는 기작은 명확히 정의되지 않았다[37-39].

정유 성분의 MIC 및 MBC

Cinnamon, clove 및 lemongrass 등 향신료의 정유 성분 중 disc diffusion 방법에 의해 항균활성이 우수한 것으로 나타난 cinnamaldehyde, eugenol, linalool 및 citral을 선정 (Table 5)하여 6종의 식중독 세균에 대한 최소억제농도 (MIC) 및 최소살균농도(MBC)를 측정하였다(Table 6).

Cinnamaldehyde는 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*에 대해서 낮은 MIC (0.020 mg/mL)와 MBC (0.039 mg/mL)를 나타내었으나 *S. aureus*, *P. aeruginosa, S.* Typhimurium에 대해서는 상대적으로 높은 MIC (0.039 mg/mL)와 MBC (0.078 mg/mL)를 나타내었다. Eugenol은 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa, S.* Typhimurium에 대해서

Table 5. Antimicrobial activities of major compounds of essential oils using disc diffusion assay

(Unit : Mean±SD inhibition zone (mm))

	Compounds	Strains					
		B. cereus ATCC 13061	*L. monocytogenes* ATCC 19112	*S. aureus* KCCM 11812	*E. coli* KCCM 11234	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S.* Typhimurium ATCC 11862
Cinnamon	*p*-Cimene	ND[1)]	ND	ND	ND	ND	ND
	Linalool	11.67±0.58[d2)]	10.67±1.15[b]	10.33±0.58[c]	11.33±1.15[b]	11.33±1.15[a]	9.67±1.15[b]
	Cinnamaldehyde	34.67±4.16[a]	23.33±4.16[a]	24.00±3.00[a]	16.33±0.58[a]	12.00±1.00[a]	15.67±2.08[a]
	Cinnamyl acetate	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clove	1,3,4-Eugenol	23.00±1.73[b]	13.67±0.58[b]	14.67±2.08[b]	17.33±1.15[a]	10.33±0.58[a]	11.00±1.00[b]
	Caryophyllene	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	α-Humulene	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Eugenol acetate	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lemongrass	3-Methoxy-3-methylbutanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	cis-Carveol	2.67±0.58[e]	ND	ND	3.33±1.15[c]	2.67±1.15[b]	2.00±0.00[c]
	Citral	16.67±1.15[c]	10.67±1.15[b]	11.33±2.31[b]	11.33±1.15[b]	11.33±1.15[a]	10.00±1.73[b]
	Geraniol	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Data represent means±standard deviations of three measurements.

[1)]ND: Not Detected.

[2)]Means with the different letters within a column are significant different (P<0.05).

Table 6. MIC and MBC of cinnamaldehyde, eugenol, linalool, and citral against food poisoning bacteria (Uint : mg/mL)

Strains	Components							
	Cinnamaldehyde		Eugenol		Linalool		Citral	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
B. cereus ATCC 13061	0.020<	0.039<	0.039<	0.078<	0.078<	0.150<	0.020<	0.039<
L. monocytogenes ATCC 19112	0.020<	0.039<	0.039<	0.078<	0.078<	0.150<	0.020<	0.039<
S. aureus KCCM 11812	0.039<	0.078<	0.078<	0.150<	0.078<	0.150<	0.039<	0.078<
E. coli KCCM 11234	0.020<	0.039<	0.078<	0.150<	0.031<	0.300<	0.020<	0.039<
P. aeruginosa ATCC 27853	0.039<	0.078<	0.039<	0.078<	0.078<	0.150<	0.039<	0.078<
S. Typhimurium ATCC 11862	0.039<	0.078<	0.039<	0.078<	0.078<	0.150<	0.039<	0.078<

낮은 MIC (0.039 mg/mL)와 MBC (0.078 mg/mL)를 나타내었으나 *S. aureus*, *E. coli*에 대해서는 상대적으로 높은 MIC (0.078 mg/mL)와 MBC (0.150 mg/mL)를 나타내었다. Linalool은 *E. coli*에 대해서만 낮은 MIC (0.031 mg/mL)를 나타내었으며 MBC는 다른 식중독 세균의 경우(0.150 mg/mL)보다 높은 0.300 mg/mL를 나타내었다. Citral은 모든 시험균주에 대하여 cinnamaldehyde와 같은 MIC (0.020-0.039 mg/mL)와 MBC (0.039-0.078 mg/mL)를 나타내었다.

Prabuseenivasan 등[40)]은 cinnamon과 clove 정유의 MIC가 *E. coli*에 대해서 >1.6 mg/mL, *P. aeruginosa*에 대해서 0.8-1.6 mg/mL 그리고 *S. aureus*에 대해서는 3.2-6.4 mg/mL을 나타내었다고 보고하였으며, 본 연구에서는 정유가 아닌 항균활성 성분을 대상으로 시험하였기 때문에 MIC 농도가 더 낮게 나타난 것으로 생각된다. 전체적으로 Cinnamaldehyde와 citral의 6종의 식중독 세균에 대한 MIC 및 MBC가 eugenol과 linalool의 경우보다 낮게 나타났다.

Table 7. Inhibition effect of 0.1% cinnamaldehyde, eugenol, linalool, and citral treatment against biofilm formation by food poisoning bacteria on polyethylene and stainless steel coupon surface

Strains	Volatile components	Polyethylene		Stainless steel	
		Log CFU/coupon	Inhibition rate (%)	Log CFU/coupon	Inhibition rate (%)
B. cereus ATCC13061	Control	4.36±0.02$^{a\,1)}$	-	4.29±0.01$^{a\,1)}$	-
	Cinnamaldehyde	2.95±0.05^{c}	32.33±0.75^{c}	2.33±0.11^{d}	45.99±2.79^{b}
	Eugenol	2.69±0.03^{d}	38.24±0.27^{b}	2.04±0.00^{e}	52.44±0.12^{a}
	Linalool	3.31±0.01^{b}	24.09±0.71^{d}	3.51±0.03^{b}	18.21±0.57^{d}
	Citral	ND$^{e2)}$	100.00±0.00^{a}	3.36±0.01^{c}	21.72±0.38^{c}
L. monocytogenes ATCC19112	Control	4.03±0.04^{a}	-	4.48±0.01^{a}	-
	Cinnamaldehyde	ND^{b}	100.00±0.00^{a}	ND$^{b2)}$	100.00±0.00^{a}
	Eugenol	ND^{b}	100.00±0.00^{a}	ND^{b}	100.00±0.00^{a}
	Linalool	ND^{b}	100.00±0.00^{a}	ND^{b}	100.00±0.00^{a}
	Citral	ND^{b}	100.00±0.00^{a}	ND^{b}	100.00±0.00^{a}
S. aureus KCCM11812	Control	4.84±0.05^{a}	-	4.35±0.06^{a}	-
	Cinnamaldehyde	ND^{c}	100.00±0.00^{a}	ND^{b}	100.00±0.00^{a}
	Eugenol	ND^{c}	100.00±0.00^{a}	ND^{b}	100.00±0.00^{a}
	Linalool	2.79±0.09^{b}	42.56±2.39^{b}	ND^{b}	100.00±0.00^{a}
	Citral	ND^{c}	100.00±0.00^{a}	ND^{b}	100.00±0.00^{a}
E. coli KCCM11234	Control	5.38±0.03^{a}	-	5.61±0.02^{a}	-
	Cinnamaldehyde	ND^{b}	100.00±0.00^{a}	2.37±0.07^{d}	57.80±1.28^{b}
	Eugenol	ND^{b}	100.00±0.00^{a}	2.70±0.04^{c}	51.83±0.56^{c}
	Linalool	ND^{b}	100.00±0.00^{a}	3.07±0.01^{b}	45.19±0.32^{d}
	Citral	ND^{b}	100.00±0.00^{a}	ND^{e}	100.00±0.00^{a}
P. aeruginosa ATCC27853	Control	6.75±0.03^{a}	-	6.62±0.03^{a}	-
	Cinnamaldehyde	3.00±0.00^{b}	55.60±0.14^{c}	ND^{c}	100.00±0.00^{a}
	Eugenol	ND^{d}	100.00±0.00^{a}	ND^{c}	100.00±0.00^{a}
	Linalool	2.65±0.06^{c}	60.76±0.71^{b}	4.25±0.06^{b}	35.96±1.28^{b}
	Citral	ND^{d}	100.00±0.00^{a}	ND^{c}	100.00±0.00^{a}
S. Typhimurium ATCC11862	Control	6.93±0.02^{a}	-	6.90±0.01^{a}	-
	Cinnamaldehyde	2.77±0.01^{c}	60.08±0.03^{b}	ND^{c}	100.00±0.00^{a}
	Eugenol	ND^{d}	100.00±0.00^{a}	ND^{c}	100.00±0.00^{a}
	Linalool	4.03±0.01^{b}	41.84±0.01^{c}	2.74±0.00^{b}	60.33±0.12^{b}
	Citral	ND^{d}	100.00±0.00^{a}	ND^{c}	100.00±0.00^{a}

Data represent means±standard deviations of three measurements.
[1)]Means with the different letters within a column are significantly different (P<0.05).
[2)]ND: Not detected.

정유 성분의 biofilm 억제 활성

Cinnamon, clove 및 lemongrass 정유의 주요 휘발성 성분이면서 항균활성을 나타내는 cinnamaldehyde, eugenol, linalool 및 citral을 이용하여 6종의 식중독 세균이 식품접촉 표면(polyethylene 및 stainless steel coupon)에 형성한 biofilm을 억제하는 효과를 시험한 결과는 Table 7과 같다.

Polyethylene coupon 표면에서 *B. cereus* ATCC 13061은 4.36±0.02 log CFU/coupon (Control)의 biofilm을 형성하였으며, citral에 의해 100% 억제되었다. 그 다음으로 eugenol이 2.69±0.03 log CFU/coupon으로 38.24% 정도의 biofilm 억제율을 나타내었다. Stainless steel coupon 표면에서 *B. cereus* ATCC 13061은 4.29±0.01 log CFU/coupon (Control)의 biofilm을 형성하였으며 eugenol에 의하여 2.04±0.00 log CFU/coupon으로 52.44% 정도의 biofilm 억제율을 나타내

었다. Citral의 경우 stainless steel coupon 표면에서는 3.36±0.01 log CFU/coupon (biofilm 억제율 21.72%)으로 polyethylene coupon 표면과는 다른 경향을 나타났다.

L. monocytogenes ATCC 19112는 polyethylene coupon 표면에서 4.03±0.04 log CFU/coupon, stainless steel coupon 표면에서 4.48±0.01 log CFU/coupon의 biofilm이 형성되었으나, cinnamaldehyde, eugenol, linalool 및 citral 처리에 의하여 biofilm이 100% 억제되었다.

S. aureus KCCM 11812는 polyethylene coupon 표면에서 4.84±0.05 log CFU/coupon 및 stainless steel coupon 표면에서 4.35±0.06 log CFU/coupon의 biofilm이 형성되었으나 polyethylene coupon 표면에서 linalool 처리에 의해 2.79±0.09 log CFU/coupon의 biofilm이 남은 것을 제외하고 나머지 처리구에서는 모든 시험균주의 biofilm이 억제되었다.

E. coli KCCM 11234는 polyethylene coupon 표면에서 5.38±0.03 log CFU/coupon의 biofilm이 형성되었으나 cinnamaldehyde, eugenol, linalool 및 citral 처리에 의하여 biofilm이 100% 억제되었다. 그러나 stainless steel coupon 표면에서는 citral 처리에 의해서만 100% 억제 효과가 나타났으며, cinnamaldehyde, eugenol 및 linalool은 각각 57.80% 51.93% 및 45.19% 정도의 억제율을 보여 polyethylene coupon 표면과 차이가 있었다.

P. aeruginosa ATCC 27853에 대해서는 eugenol과 citral 처리에 의하여 polyethylene coupon과 stainless steel coupon 표면 모두에서 biofilm이 100% 억제 효과가 있었으며, stainless steel coupon 표면에서는 cinnamaldehyde도 biofilm을 100% 억제하였다. Stainless steel coupon 표면에서 linalool 처리에 의해 6.62±0.03 log CFU/coupon의 biofilm을 2.37 log 정도 억제하여 4.25±0.06 log CFU/coupon의 biofilm이 남은 것을 확인하였다.

S. Typhimurium ATCC 11862에 대해서는 *P. aeruginosa* ATCC 27853와 동일하게 polyethylene coupon 표면에서는 eugenol과 citral 처리에 의해, stainless steel coupon 표면에서는 cinnamaldehyde, eugenol 및 citral 처리에 의하여 biofilm이 100% 억제되었다. Polyethylene coupon 표면에서도 cinnamaldehyde 처리에 의하여 6.93±0.02 log CFU/coupon의 biofilm을 2.77±0.01 log CFU/coupon으로 4 log CFU/coupon 이상의 biofilm 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

정유 성분의 항균활성 평가에서 MIC 및 MBC 농도가 다른 성분에 비하여 높게 나타난 linalool의 경우 biofilm 억제 활성도 다른 성분과 비교하였을 때 낮은 것으로 확인되었다.

Citral의 경우 stainless steel coupon 표면에 형성된 *B. cereus* ATCC 13061의 biofilm을 제외하고 모든 시험균주의 biofilm을 억제하여 가장 큰 효과를 나타내었다. Khan과 Ahmad[41]는 phytocompounds (cinnamaldehyde, citral, eugenol과 geraniol)을 이용하여 *Candida albicans*의 biofilm을 제어한 결과 eugenol > cinnamaldehyde > geraniol > citral 순으로 biofilm 형성을 억제하였다고 보고하여 본 연구결과와 다소 차이가 있었다.

Citral은 myrtle trees, African basil, lemons, limes, lemongrass, oranges 및 bergamot과 같은 식물의 잎과 과일 등에서 쉽게 찾을 수 있는 성분으로서 geranial과 neral의 두 가지 물질의 이성질체가 혼합되어 있어 강한 레몬향을 내기 때문에 음료나 다른 식품 등에 향을 내기 위해서 사용하기도 한다[37]. 또한 citral은 generally recognized as safe (GRAS)로 등록된 식품 첨가물로서, 미국 FDA에 의해 식품에 사용할 수 있도록 허가되어 있기 때문에 식품산업에 항균제로서 다양하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

국문요약

식중독 세균에 의한 biofilm 형성을 억제하는 효과를 시험하기 위하여 cinnamon, clove 및 lemongrass 정유의 휘발성 성분을 분석하였다. 또한 정유의 주요 항균활성 성분이 polyethylene과 stainless steel 표면에서 식중독 세균에 의한 biofilm 형성을 억제하는 효과에 대하여 조사하였다. Cinnamon 정유의 주요 휘발성 성분은 cinnamaldehyde (38.30%), linalool (9.61%), β–caryophyllene (8.90%) 및 1,3,4-eugenol (8.19%)로 동정되었다. Clove 정유의 주요 휘발성 성분은 1,3,4-eugenol (61.84%)로 분석되었다. Lemongrass의 주요 휘발성 성분은 citral의 이성질체인 geranial (19.11%)과 neral (19.23%)로 검출되었으며, citral은 isomeric acyclic monoterpene aldehydes로서 geranial (*trans*-citral, 19.11%)과 neral (*cis*-citral, 19.23%)의 혼합물로 분석되었다. Cinnamon, clove 및 lemongrass의 주요 성분 중 cinnamaldehyde, linalool, eugenol 및 citral이 disc diffusion assay에 의해 시험한 6종의 식중독 세균에 대하여 강한 항균활성을 나타냈다. Eugenol (0.1%)과 citral은 polyethylene 및 stainless steel coupon 표면에서 식중독 세균에 의해 형성된 biofilm에 대하여 강한 억제 작용을 나타났다. Cinnamaldehyde (0.1%)는 *Listeria monocytogenes* ATCC 19112와 *Staphylococcus aureus* KCCM 11812에 의해 형성된 biofilm에 대해 강한 억제 작용을 나타냈다. 연구 결과 cinnamaldehyde, eugenol 및 citral 처리에 의해 식중독 세균에 의한 biofilm 형성을 억제가 가능할 것으로 판단된다.

Conflict of Interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Yong-Suk Kim https://orcid.org/0000-0003-1331-4175
Hyeong-Eun Kim https://orcid.org/0000-0002-9944-4597

References

1. Yun, H.J., Kho, Y.L., Na, S.S., Lee, Y.W., Studies on growth and decontamination of *Listeria monocytogenes* attached to food contact surface materials. *Korean J. Environ. Health Soc.*, **27**, 75-82 (2001).
2. Xu, H., Zou, Y.Y., Lee, H.Y., Ahn, J.H., Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. *J. Food Sci.*, **75**, 580-585 (2010).
3. Choi, Y.W., Lee, H.W., Kim, S.M., Lee, J.C., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Kim, J.M., Biofilm forming ability and production of curli and cellulose in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Korean J. Microbiol.*, **47**, 335-341 (2011).
4. Jahid, I.K., Ha, S.D., A review of microbial biofilms of produce: Future challenge to food safety. *Food Sci. Biotechnol.*, **21**, 299-316 (2012).
5. Zottola, E.A., Sasahara, K.C., Microbial biofilms in the food processing industry-should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 125-148 (1994).
6. Tarver, T., Biofilms a threat to food safety. *Food Technol.*, **63**, 46-48 (2009).
7. Baick, S.C., Chung, W.H., Microbial biofilm in dairy processing environments. *J. Anim. Sci. Technol.*, **42**, 203-214 (2000).
8. Fortino, S.S., Maria, G.M.N., Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, **23**, 136-141 (2012).
9. Kim, Y.S., Shin, D.H., Volatile constituents from the leaves of *Callicarpa japonica* thumb. and their antibacterial activities. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 781-787 (2004).
10. Kim, Y.S., Hwang, C.S., Shin, D.H., Volatile constituents from the leaves of *Polygonum cuspidatum* S. et Z. and their anti-bacterial activities. *Food Microbiol.*, **22**, 139-144 (2005).
11. Kim, Y.S., Shin, D.H., Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* S. and Z.) extracts. *Food Microbiol.*, **22**, 37-45 (2005).
12. Kim, H.E., Kim, Y.S., Biofilm formation characteristics of major foodborne pathogens on polyethylene and stainless steel surfaces. *J. Food Hyg. Saf.*, **35**, 195-204 (2020).
13. Furletti, V.F., Texixerira, I.P., Pereda, O., Mardegan, R.C., Sartoratto, A., Figueira, G.M., Duarte, R.M.T., Rehder, V.L.G., Duarte, M.C.T., Hofling, J.F., Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. *Evid. Based Complem. Alter. Med.*, Article ID 985832, 1-9 (2011).
14. Ahmad, K.M.S., Ahmad, I., Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J. Ethnopharm.*, **140**, 416-423 (2012).
15. Taweechaisupapong, S., Aieamsarrd, J., Chitropas, P., Khunkitti, W., Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation. *South African J. Botany*, **81**, 95-102 (2012).
16. Lee, K.H., Kim, B.S., Keum, K.S., Yu, H.H., Kim, Y.H., Chang, B.S., Ra, J.Y., Moon, H.D., Choi, N.Y., You, Y.O., Essential oil of *Curcuma longa* inhibits *Streptoococcus mutans* biofilm formation. *J. Food Sci.*, **76**, 226-230 (2011).
17. Szczepanski, S., Lipski, A., Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Cont.*, **36**, 224-229 (2014).
18. Kim, H.E., Kim, Y.S., Inhibitory effects of cinnamon, clove and lemongrass essential oils against biofilm formation by food poisoning bacteria. *J. Food Hyg. Saf.*, **36**, 430-439 (2020).
19. Lou, Z., Liu, Y., Hong, Y., Song, X., Wang, H., Ai, L., Antibiofilm activities and chemical composition of essential oil from burdock leaf. *Food Sci. Res.*, **19**, 915-921 (2013).
20. Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., Palombo, E.A., Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Cont.*, 29, 125-130 (2013).
21. Schillaci, D., Napoli, E.M., Cusimano, M.G., Vitale, M., Ruberto, G., *Origanum vulgare* subsp. hirtum essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *J. Food Protect.*, **76**, 1747-1752 (2013).
22. Sieniawska, E., Los, R., Baj, T., Malm, A., Glowniak, K., Antimicrobial efficacy of *Mutellina purpurea* essential oil and α-pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilm cultures. *Ind. Crop Prod.*, **51**, 152-157 (2013).
23. Budzynska, A., Szakiel, M.W., Sadowska, B., Kalemba, D., Rozalska, B.. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Polish J. Microbiol.*, **60**, 35-41 (2011).
24. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., Antibiotic sensitivity testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493-496 (1966).
25. Andrews, J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrobial Chemoth.*, **48**, 5-16 (2001).
26. Monil, A.D., Kamlesh, A.S., Ramarkrishna, N.P., Schilling, M.W., Juan, L.S., Production of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surface by essential oils. *J. Food Protect.*, **75**, 1332-1337 (2012).
27. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1990).
28. El-Baroty, G.S., Abd El-Baky, H.H., Farag, R.S., Saleh, M.A., Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African J. Biochem. Res.*, **4**, 167-174 (2010).
29. Sara, B., Essential oil: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 223-253 (2004).
30. Valgimigli, L., Essential oils as natural food additives: Com-

position, applications, antioxidant and antimicrobial properties. *Adv. Food Saf. Food Microbiol.*, 153-172 (2012).
31. Srivastava, A.K., Srivastava, S.K., Syamsundar, K.V., Bud and leaf essential oil composition *of Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour Fragr. J.*, **20**, 51–53 (2005).
32. Ito, M., Murakami, K., Yoshino, M., Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 461-466 (2005).
33. Oztuurk, A., Ozbek, H., The anti-inflammatory activity of eugenia caryophyllata essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. *Eur. J. Gen. Med.*, **2**, 159-163 (2005).
34. Kaur, G., Athar, M., Alam, M., Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Mol. Carcinog.*, **49**, 290-301 (2010).
35. Wang, C., Zhang, J., Chen, J., Fan, Y., Shi, Z., Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Trop. Plant Pathol.*, **35**, 137-143 (2010).
36. Kim, S.H., Shin, T.Y., Kim, H.Y., Lee, Y.M., Lee, E.H., Shin, B.K., Kim, Y.C., An, N.H., Kim, H.M., Inhibition of immediate allergic reaction by eugenol. *Yakhak Hoeji*, **40**, 679-683 (1996).
37. Somolinos, M., Garcia, D., Condon, S., Mackey, B., Pagan, P., Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *J. Applied Microbiol.*, **108**, 1928–1939 (2009).
38. Vavid, C., Mohamed, A.A., Eduard, B., Baruch, R., Natib, D., Einat, S., Microtubules are an intracellular target of the plant terpene citral. *The Plant J.*, **61**, 399-408 (2010).
39. Cristiana, B.S., Silvia, S.G., Vanessa, W., Elfrides, E.S.S., Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *The Brazilian J. Infect. Dis.*, **12**, 63-66 (2008).
40. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oil. *BMC Complem. Altern. Med.*, **6**, 10.1186/1472-6882-6-39 (2006).
41. Khan, M.S.A., Ahmad, I., Antibiofilm activity of certain phytocompounds and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrobial Chemother.*, **67**, 618-621 (2012).