pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 4, pp. 449~455 (2012)

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

# 다양한 유래에서 분리된 황색포도상구균에 대한 유기산과 천연항균물질의 저해 효과

**김보람[1] · 유진희[1] · 정규석[2] · 허성기[2] · 이선영[1]***

[1]중앙대학교 식품공학부, [2]농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물과

# Inhibitory Effect of Organic Acids and Natural Occurring Antimicrobials Against *Staphylococcus aureus* Isolates from Various Origins

Bo-Ram Kim[1], Jin-Hee Yoo[1], Kyu-Seok Jung[2], Sung gi Heu[2], and Sun-Young Lee[1]*

[1]*Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 72-1, Nae-ri, Daedeok-myeon, Anseong-si, Gyeonggi-do 456-756, Korea*

[2]*Microbial Safety Division, Department of Agro-food Safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Gyeonggi-do 441-857, Korea*

(Received October 18, 2012/Revised October 30, 2012/Accepted November 14, 2012)

**ABSTRACT** - The purpose of this study is to evaluate antimicrobial effects of organic acid and some natural occurring antimicrobials against *Staphylococcus aureus* isolated from various origins (vegetables, peanut, pea leaf, *kim- bab*, person, perilla leaf, and animal) and to calculate their MIC and MBC values. Five organic acids (acetic, lactic, citric, malic, and propionic acid), three essential oils (carvacrol, thymol, and eugenol), and two other natural antimicrobials (nisin and cinnamic acid) were evaluated for their antimicrobial effects against 113 strains of *S. aureus* using combination treatments. Propionic acid (7%), nisin (1%), thymol (1%), carvacrol (1%) showed antimicrobial activities against *S. aureus* strains in agar disc diffusion test. And, carvacrol, thymol, and nisin were found to be the most effective with the lowest MIC values of 0.0313%, 0.0625%, and 0.0625% against *S.aureus*, respectively. Propionic acid (0.2313%) and citric acid (0.6000%) were the most effective among organic acids tested. Therefore, these five antimicrobials were selected for next combination treatments. Combination of propionic acid and citric acid were showed the strongest inhibitory effectiveness against *S. aureus* among combination treatments. These results suggest that organic acid such as propionic and citric acid, and natural occurring antimicrobial such as nisin, carvacrol, and thymol might be possibly used as preservatives for inhibiting *S. aureus* in foods.

**Key wards:** *Stapylococcus aureus*, Essential oil, Antimicrobial

## 서 론

최근 경제 성장에 따른 소득수준의 향상으로 식생활 패턴이 바뀌고 외식 및 즉석조리식품 소비증가에 따라 식중독이 증가하는 추세이다[1]. 실제로 우리나라의 식중독 발생 통계에 따르면 외식의 생활화로 인해 5년 전보다 발생건수가 2.5배 증가하였고, 환자수는 20% 증가하였다[2]. 특히, 유원지나 터미널에서 판매되는 김밥의 위생점검 결과 총 77개의 김밥 중 21개에서 식중독 균이 검출되었으며, 원인균으로는 황색포도상구균(*Stapylococcus aureus*)과 *Bacillus cereus*가 검출되었다[3]. 따라서 최근 식중독을 야기할 수 있는 병원성 미생물을 제어하는 노력이 중요시 되고 있다.

식중독 주요 원인균인 황색포도상구균은 사람과 동물의 장관 및 피부 등에 분포하며, 식중독 이외에 화농성 염증, 표피박탈성 피부염 등의 원인이 된다. 이 균은 독소형으로 단백독소인 장관독소(enterotoxin)는 열에 강하여 100°C에서 30분 정도 가열처리로는 거의 무독화되지 않고 섭취한 사람에게 급성위장장해를 일으킨다[4]. 이에 따라 식품에서의 황색포도상구균을 제어하기 위하여 여러 종류의 합성 보존료를 사용하여 식중독의 발생빈도를 줄이려는 추세이다. 합성 보존료는 사용농도가 높을수록 효과적이나

*Correspondence to: Sun-Young Lee, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 72-1 Nae-ri, Daedeok-myeon, Anseong-si, Gyeonggi-do 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-4587, Fax: 82-31-676-8741
E-mail: nina6026@cau.ac.kr

목적하는 기능 외에 바람직하지 못한 부작용을 나타내어 안전성 문제가 대두되고 있다. 또한 장기간 사용할 경우 돌연변이 및 만성독성을 유발시킨다고 보고되었다[5-6].

이러한 안전성의 문제로 소비자들의 불안이 고조됨에 따라 합성 보존료보다는 천연 보존료를 선호하게 되어 천연 항균성 물질에 대한 연구 및 개발이 진행되고 있다[7]. 천연 항균물질로는 전통적으로 사용해온 소금, 식초 등 일반 식품 소재 뿐만이 아니라 동물이나 식물에 천연적으로 존재하는 특정 단백질 및 효소류, 갑각류의 키틴질에서 추출한 키토산, 유기산, 식물의 정유(essential oil) 및 미생물에서 유래된 nisin, ε-polylysine, natamysin 등이 있다[8]. 다양한 천연 항균물질 중 식물에서 유래된 항균물질은 대부분이 alkaloid류, flavonoid류, terpenoid류, phenolic compound류, quinone류 및 휘발성 오일 등의 이차대사산물이거나 그 유도체들로 알려져 있다[9-10]. 식물의 휘발성 이차 대사산물인 정유(essential oil) 성분은 항산화, 항균효과를 가지고 있고, 수세기 동안 천연의 항균 복합제나 단일물질로서 이용되어 왔다[11]. 항진균성과 항균성을 갖고 있다고 알려진 유기산은 초산, 젖산, 구연산, 사과산 등 여러 종류가 있으며 식품의 원료에 천연적으로 혹은 발효산물로 존재하거나 인공적으로 첨가되는 경우가 있다[12]. 항균기작은 비해리된 분자가 이온화되면서 세포 내 pH를 변화시키거나 세포막의 투과성을 변경시켜 기질이동을 방해하고, NADH 산화를 막아 전자 전달 체계에 이상을 준다고 알려져 있다[13]. 유산균이 생성해 낸 항균성 펩타이드 또는 단백질인 박테리오신(bacteriocin)은 장내 유익균에 영향을 주지 않고, 잔류성이 없어 현재 식품 등의 천연 보존제로 각광 받고 있다[14]. 다양한 박테리오신 중 유일하게 그 사용이 허가된 *Lactococcus lactis*의 균주에 의해 생성되는 nisin은 분자량이 약 3,500 Da인 펩타이드성 항균물질[15-16]로써 펩티도글라이칸의 생성을 저지하여 *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Stapylococcus, Streptococcus* 등의 그람양성균의 생육을 효과적으로 억제 또는 사멸시킨다고 알려져 있으며[17-20], 발효유, 치즈, 통조림 식품, 알코올 음료, 김치, 어패류, 과일 및 야채류, 냉동제품 등의 저장성 향상을 위해 사용되고 있다. 또한 유기산, lysozyme, lauricidin, lactoperoxidase 등의 다른 항균제와의 병합처리에 대한 연구도 활발하게 진행 중이다[21-22]. 그러나 아직까지 천연 항균물질이 맛, 냄새 등 관능적 문제와 중량기준으로 볼 때 합성 보존료에 비해 상대적으로 낮은 항균성으로 인해 실용화되는 경우는 많지 않은 실정이다.

이에 본 연구에서는 황색포도상구균에 대한 정유, 유기산, nisin 및 그 밖의 자연유래 항균 물질의 항균성을 agar disc diffusion test와 최소저해농도(MIC)로 측정하고 이 물질들의 혼합처리 시 항균성에 대한 상승효과를 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

Agar disc diffusion test에는 113개의 서로 다른 식품 및 동물에서 분리된 *S. aureus*를 사용하였다(Table 1). 각각의 균주를 5 ml Tryptic Soy Broth (TSB: Difcolaboratory, Detroit, MI, USA)를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 뒤 실험에 사용하였다. 자연유래 항균 물질인 유기산과 그 밖의 자연유래 항균물질의 최소저해농도와 최소

**Table 1.** Source and origin of *Staphylococcus aureus* used in this study.

| Strains | No. | Origins | Source |
|---|---|---|---|
| R-1, R-2, R-4, R-5[1)], R-9, R-10, R-11 | 7 | Leaf vegetable | Rural Development Administration |
| R-12 | 1 | Peanut | Rural Development Administration |
| H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14[1)], H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23 | 23 | Pea leaf | Rural Development Administration |
| D-1, D-3, D-4, D-5, D-6, D-7, D-8, D-9, D-10[1)], D-12, D-13, D-14, D-15, D-16, D-17, D-18, D-19, D-20, D-22, D-23, D-24, D-25, D-26, D-28, D-29, D-30, | 26 | Perilla leaf | Rural Development Administration |
| K-13, K-14, K-15, K-17, K18, K-19, K-20, K-21, K-23, K-24, K-25, K-26 | 12 | *Kim-bab* | Kyungwon univ. |
| S-198, SS-25 | 2 | Person | Rural Development Administration |
| K-1, K-3, K-4, K-5, K-7, K-8, K-9, K-10, K-11, K-12 | 10 | Person | Kyungwon |
| C-1, C-2, C-5, C-6, C-7 | 5 | Person | Asan Medical Center |
| C-30, C-32, C-34, C-35, C-36, C-37 | 6 | Person | Korea University Guro Hospital |
| C-64, C-65, C-66, C-68, C-69, C-80, C-71 | 7 | Person | Kyeongbuk univ. |
| C-76, C-78[1)], C-79, C-80, C-88 | 5 | Person | Institute of health |
| C-93, C-96, C-98, C-99, C-100 | 5 | Person | KNOAR |
| C-50, C-51[1)], C-52, C-53 | 4 | Animal | Chonbuk National univ. |

[1)]Selected strains used MIC and combination experiment

사멸농도 측정, 자연유래 항균물질 혼합처리 시 최소저해농도를 측정하는 실험에는 5개의 유래별로 선별한 *S. aureus* (쌈채소: *S. aureus* R-5, 완두잎: *S. aureus* H-14, 들깨잎: *S. aureus* D-10, 동물: *S. aureus* C-51, 사람: *S. aureus* C-78)를 사용하였다.

### 항균물질의 준비

유기산은 acetic acid (Duksan pure chemical, Seoul, Korea), lactic acid (Kanto Cemical, Tokyo, Japan), malic acid (Junsei chemical, Tokyo, Japan), citric acid (Sigma, Steinheim, Germany), propionic acid (Samchun chemical Co., Seoul, Korea)를 사용하였다. 다섯 종류의 유기산은 6 N NaOH로 희석시켜 pH 4의 용액으로 사용하였다. 그 밖의 자연유래 항균물질은 carvacrol (Sigma, Steinheim, German), thymol (Daejung chemicals & Metals, Incheon, Korea), nisin (Sigma, Steinheim, Germany), eugenol (Wako pure chemical, Osaka, Japan), cinnamic acid (Junsei chemical, Tokyo, Japan)을 실험에 사용하였다. Carvacrol, thymol, eugenol, cinnamic acid는 95% ethanol로 용해시켜 1% 용액으로 사용하였고 nisin은 0.02 N HCl로 용해시켜 1% 용액으로 사용하였다. 각각 자연유래 항균물질의 최소저해농도와 최소사멸농도 측정은 항균효과가 나타나지 않은 lactic acid, cinnamic acid를 제외한 8종의 항균물질을 사용하였으며, 자연유래 항균물질 혼합처리 시 최소저해농도 측정은 항균효과가 높게 나타난 propionic acid, citric acid와 carvacrol, nisin, thymol을 8 MIC (MIC의 8배 농도)가 되도록 만든 후 두 배씩 희석하여 2 MIC (MIC의 2배 농도)까지 만들었다. 다음과 같은 항균물질 carvacrol과 nisin, carvacrol과 thymol, carvacrol과 propionic acid, carvacrol과 citric acid, propionic acid와 citric acid를 각각의 농도로 결합하여 최소저해농도를 측정하였다.

### Agar disc diffusion test

0.75% Bacto-agar (Difco)를 포함하고 있는 TSB를 멸균하여 45°C로 식힌 뒤 각각의 배양된 미생물을 0.1 ml 접종하고 멸균 petri-dish에 분주하였다. 상온에서 agar가 굳도록 말린 뒤 멸균 paper disc (지름: 6 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 agar배지 위에 정렬하고 각각의 준비된 항균물질 10 µl 를 paper disc에 분주하여 37°C에서 18시간 동안 배양하였으며 배양 후에 생성된 clear zone의 지름(cm)을 측정하여 항균성을 비교하였다.

### 자연유래 항균물질의 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)조사

멸균된 TSB가 100 µl씩 있는 96-well plate에 만들어진 항균물질용액을 100 µl씩 넣은 후 서로 다른 식품 및 동물에서 분리된 *S. aureus*를 각각의 항균물질에 20 µl씩 접종하고 37°C, 20시간 동안 배양하였다. 배양한 96-well plate는 595 nm에서 흡광도를 측정하였고 소수 둘째자리에서 반올림했을 때의 흡광도가 0.4와 0.1 이하인 최소농도를 각각 결합용액의 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)로 설정하였다.

## 결과 및 고찰

### Agar disc diffusion test

*S. aureus*을 자연에서 유래된 여러 항균물질에 대한 항균력을 평가하기 위하여 agar disc diffusion test를 시행하였다(Table 2). 5종류의 유기산 중 propionic acid는 clear zone의 크기가 2.5-3.0 cm로 가장 좋은 항균력을 나타냈으며(Fig. 1) 그 밖의 자연유래 항균물질 중 carvacrol, nisin, thymol의 clear zone 크기가 1.0-1.5 cm로 측정되어 항균 효과가 높게 관찰되었다. 이외에도 유기산 중 citric acid의 clear zone 크기가 1.5-2.0 cm로 나타나 propionic acid 다음으로 항균력이 높게 측정되었다. 이러한 항균물질의 항균작용은 항균물질이 세포막 등의 세포 기관에 손상을 일으키거나 세포의 항상성을 방해함으로써 ATP 에너지의 소비를 촉진시키고, 이에 의한 대사 고갈을 야기함으로써 발생하는 것으로 보고되고 있다[23]. 기존에 보고된 타 연구의 결과에서도 본 연구와 유사한 연구결과를 보고하고 있다.

**Table 2.** Grouping of 113 *Staphylococcus aureus* strains by clear zone (cm) as a result of agar diffusion tests of organic acids and other natural antimicrobials.

| Clear zone size (cm) | Organic acids | | | | | Other antimicrobials | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Acetic acid | Propionic acid | Citric acid | Malic acid | Lactic acid | Thymol | Carvacrol | Eugenol | Nisin | Cinnamic acid |
| 0.0-0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.5-1.0 | 96 | 26 | 102 | 111 | 113 | 80 | 100 | 113 | 72 | 113 |
| 1.0-1.5 | 17 | 40 | 10 | 2 | 0 | 33 | 13 | 0 | 41 | 0 |
| 1.5-2.0 | 0 | 43 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2.0-2.5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2.5-3.0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

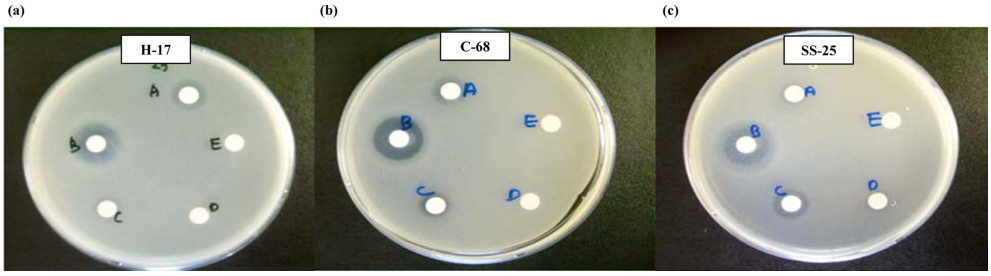


**Fig. 1.** Digital photographs of agar diffusion test results using organic acids (A: Acetic acid, B: Propionic acid, C: Citric acid, D: Malic acid, E: Lactic acid) against *Staphylococcus aureus* H-17, C-68, and SS-25.

안 등[1]의 유기산 항균활성 비교연구에서 유기산의 *S. aureus*에 대한 증식 저해 효과를 관찰하였으며, 이 중 propionic acid의 경우 본 실험의 agar disc diffusion test 결과와 동일하게 가장 높은 증식 저해 효과 및 항균력을 보여주었다. 또한 이 등[24]의 연구에서 매실과육에 함유된 유기산(citric acid, malic acid, oxalic acid, succinic acid, tartaric acid, fumaric acid, maleic acid, α-ketoglutaric acid 등)의 농도수준에 따른 항균력을 본 결과 유기산이 함유된 매실착즙액 3%와 4%를 함유한 배지상에서 *S. aureus*에 대한 성장은 배양 후 24시간 이내 모두 저해되었다는 연구결과를 나타내었다. 이 외에도 thyme과 oregano의 정유에는 carvacrol과 thymol이 주성분으로 함유되어 있으며 이러한 유기산 성분들이 다양한 진균과 *S. aureus* 등과 같은 박테리아에 효과가 있음이 보고된 바 있다고 확인되었다[23]. 따라서 본 실험의 연구결과와 여러 연구의 결과 propionic acid나 항균효과가 높았던 자연항균물질을 통해 식중독의 대표적 균인 *S. aureus*의 증식을 저해할 수 있으며, 이를 통해 식품에 사용할 수 있는 천연항균물질 개발에 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

### 자연유래 항균물질의 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)

쌈채소, 완두잎, 들깨잎, 사람, 동물 등에서 유래된 113종의 *S. aureus* 중 origin별로 선별한 5종의 *S. aureus*를 최소저해농도 측정 실험에 이용하였으며, agar disc diffusion test 결과 항균효과가 나타나지 않은 cinnamic acid와 lactic acid를 제외한 총 8개의 항균물질로 최소저해농도를 측정하였다. Table 3는 4종의 유기산과 4종의 그 밖의 자연유래 항균물질에 대한 최소저해농도(MIC)와 최소사멸농도(MBC)의 결과이다. 유기산의 최소저해농도 측정 결과, acetic acid는 0.38%, propionic acid는 *S. aureus* C-78를 제외하면 0.23%, citric acid는 *S. aureus* C-51를 제외한 균주에서 0.60%로 나타났다. Malic acid는 *S. aureus* R-5, D-10을 제외한 균주에서 1.68%로 나타났다. 이 결과 4종의 유기산 항균물질 중 propionic acid가 *S. aureus* C-78을 제외한 4종의 *S. aureus* 균주에서 최소저해농도가 0.23%로 항균효과가 가장 높음을 알 수 있었으며, agar disc diffusion test를 통한 항균력 측정결과와 동일하게 나타남을 알 수 있었다. 그 밖의 자연항균 물질의 경우 최소저해농도가 tymol은 5종의 *S. aureus*에 대하여 0.06%, carvacrol은 *S.*

**Table 3.** Minimum inhibitory concentration (MIC)[1] and minimum bactericidal concentration (MBC)[2] of organic acid and other antimicrobials against 5 strains of *Staphylococcus aureus.*

| Strain | | Organic acids | | | | Other antimicrobials | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Acetic acid | Propionic acid | Citric acid | Malic acid | Thymol | Cavacrol | Eugenol | Nisin |
| *S.aureus* R-5 | MIC | 0.38 | 0.23 | 0.60 | 3.35 | 0.06 | 0.03 | 0.13 | 0.06 |
| | MBC | 1.50 | 1.85 | 19.20 | 13.40 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| *S.aureus* H-14 | MIC | 0.38 | 0.23 | 0.60 | 1.68 | 0.06 | 0.06 | 0.13 | 0.13 |
| | MBC | 1.50 | 1.85 | 9.60 | 6.70 | 0.13 | 0.13 | 0.25 | 0.13 |
| *S.aureus* D-10 | MIC | 0.38 | 0.23 | 0.60 | 3.35 | 0.06 | 0.06 | 0.13 | 0.06 |
| | MBC | 1.50 | 1.85 | 9.60 | 13.40 | 0.13 | 0.13 | 0.25 | 0.13 |
| *S.aureus* C-51 | MIC | 0.38 | 0.23 | 1.20 | 1.68 | 0.06 | 0.06 | 0.13 | 0.13 |
| | MBC | 1.50 | 3.70 | 4.80 | 6.70 | 0.06 | 0.13 | 0.25 | 0.13 |
| *S.aureus* C-78 | MIC | 0.38 | 0.46 | 0.60 | 1.68 | 0.06 | 0.03 | 0.06 | 0.06 |
| | MBC | 1.50 | 1.85 | 4.80 | 6.70 | 0.06 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |

[1] MIC: Optical density at 595 nm was less than 0.4
[2] MBC: Optical density at 595 nm was less than 0.1

*aureus* R-5, C-78에 대하여 0.03%, *S. aureus* D-10, C-51에 대하여는 0.06%로 나타났다. Eugenol은 *S. aureus* C-78을 제외하고 4종의 균주에서 0.13%로 나타났다. Nisin은 *S. aureus* H-14, C-51에 대하여 0.13%, *S. aureus* R-5, D-10, C-78에 대하여 0.06%로 나타났다. 따라서 본 실험 결과 carvacrol의 최소저해농도가 0.03%로 유기산을 제외한 그 밖의 자연유래 항균물질 중 항균효과가 가장 높음을 알 수 있었다. 최소사멸농도(MBC)의 결과에서 유기산 중 acetic acid는 1.50%, propionic acid 는 *S. aureus* C-51은 3.70%, 나머지 4종은 1.85%로 나타났다. Citric acid는 *S. aureus* C-51, C-78에서 4.80%로 나타났으며 malic acid는 *S. aureus* H-14, C-51, C-78에서 6.70%로 나타났다. 따라서 최소사멸농도 측정결과 유기산 중 acetic acid가 1.50%로 가장 높은 사멸효과를 나타내었다. 그 밖의 자연유래 항균물질에서 thymol은 *S. aureus* C-51, C-78에서 0.06%로 나타났고, carvacrol은 5종 모든 균주에서 0.13%로 나타났다. Eugenol에서는 R-5, C-78 에서 0.13%로 나타났다. Nisin은 모든 균주에서 0.13%로 나타났다. 따라서 유기산을 제외한 그 밖의 자연유래 항균물질 중 thymol의 최소사멸농도(MBC)가 0.06%로 가장 높은 사멸효과를 나타내었다. 본 실험 결과 유기산의 propionic aicd와 acetic acid는 각각 최소저해농도와 최소사멸농도에서 높은 항균효과를 보였으며 안 등[1]의 연구에서 유기산에 대한 최소저해농도 측정 시 *E. coli* O157:H7의 경우도 acetic acid와 propionic acid의 증식저해효과 및 항균효과를 나타내었고, Chung 등[25] *Salmonella*의 항균효과에 대해 연구한 결과 증식 저해에 가장 효과적인 유기산은 본 실험에서 항균력이 높다고 측정된 유기산의 acetic acid와 propionic acid로 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 여러 연구들과 본 실험에서 유기산과 그 밖의 자연유래 항균물질들 중 propionic acid가 강한 항균활성을 나타내었다. 이는 유기산이 세포 내부로 들어갈 수 있는 정도와 해리되는 효과의 차이 때문에 발생하는 것으로 사료된다. 예를 들어 citric acid와 lactic acid는 세포 내부로 들어갈 수 있는 능력은 낮지만, 세포 내부에서 해리되는 능력이 매우 뛰어나며, 따라서 cytoplasm을 산성화 하여 항균작용을 일으키는 것으로 알려져 있다[26]. 기존의 몇몇 연구결과는 acetic acid와 propionic aicd 등의 유기산이 그람 음성균에게 높은 항균효과를 나타내는 것을 보고하고 있다. 그러나 본 연구결과를 통해서 그람 양성균인 *S. aureus*에서도 propionic acid와 같은 유기산이 높은 항균력을 나타내어 이 같은 유기산이나 다른 자연유래 항균물질을 이용하여 식품에 활용할 수 있는 자연친화적 항균제 및 보존제 등을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

### 항균물질 결합 처리 시 최소저해농도

Table 4는 총 5종의 자연항균 물질인 유기산과 그 밖의 자연유래 항균물질을 각각의 최소저해농도로부터 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC까지 다양한 농도로 혼합처리 시 *S. aureus*에 대한 최소저해농도를 측정한 결과이다. 본 연구결과 *S. aureus* D-10의 균은 propionic acid와 citric acid의 1/8 MIC로 결합 시 최소저해농도로 나타났으며, *S. aureus* C-51 균은 propionic acid와 citric acid의 1/16 MIC로 결합 시 최소저해농도로 나타났다. *S. aureus* C-78 균은 propionic acid와 citric acid의 1/4 MIC로 결합 시 최소저해농도가 나타났다. 따라서 본 연구결과를 바탕으로 propionic acid와 citric acid의 혼합처리 시 *S. aureus*에 대한 최소저해농도가 가장 낮아 항균효과가 높음을 알 수 있었다. Fernandes 등[26]의 연구에서 catfish fillet에서 미생물의 증식 저해에 가장 효과적인 유기산 또한 본 실험의 항균력이 가장 좋다고 측정된 propionic acid이었으며 그 다음으로 lactic acid와 acetic acid로 나타났다. 이러한 propionic acid와 같은 유기산의 항균활성은 비해리된 유기산의 작용 때문이며 비해리된 유기산은 세포 내부로 수송되어 세포의 pH를 변화시켜 세포 내 효소의 변성을 초래함으로써[27] 항균작용이 일어난다. 몇몇 유기산의 결합 처리에서의 항균력이 증가되는 효과에 대하여는 보다 많은 항균 기작에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

또한 일반적으로 보존제는 식품에 첨가 시 식품성분과의 상호작용에 의하여 단독으로 처리 시 길항되는 경향이 있기 때문에 이러한 단점을 극복하기 위하여 다른 물질과 병용처리를 하는데[27] 본 연구에서도 항균효과가 높게 측

**Table 4.** Minimum inhibitory concentration (MIC)[1] of combination.

| Strain | Antimicrobial | Cavacrol | Citric acid |
|---|---|---|---|
| *S. aureus* R-5 | Nisin | 1/2 MIC | - |
| | Thymol | MIC | - |
| | Propionic acid | MIC | 1/2 MIC |
| | Citric acid | MIC | - |
| *S. aureus* H-14 | Nisin | MIC | - |
| | Thymol | MIC | - |
| | Propionic acid | MIC | 1/2 MIC |
| | Citric acid | MIC | - |
| *S. aureus* D-10 | Nisin | MIC | - |
| | Thymol | 2 MIC | - |
| | Propionic acid | 1/4 MIC | 1/8 MIC |
| | Citric acid | MIC | - |
| *S. aureus* C-51 | Nisin | MIC | - |
| | Thymol | 2MIC | - |
| | Propionic acid | MIC | 1/16 MIC |
| | Citric acid | 2MIC | - |
| *S. aureus* C-78 | Nisin | MIC | - |
| | Thymol | 2 MIC | - |
| | Propionic acid | MIC | 1/4 MIC |
| | Citric acid | MIC | - |

[1] MIC: Optical density at 595 nm was less than 0.4

정된 물질들을 혼합 처리를 하였으며, propionic acid와 citric acid의 혼합처리 시 최소저해농도에서도 단독처리시보다 항균효과가 더 높아져 상승효과를 가져오는 결과를 볼 수 있었다. 따라서 이와 같은 혼합처리 방법을 통해 최소저해농도에서의 높은 항균성을 지닌 항균물질을 찾고, 혼합 처리시 항균력에 대한 상승효과를 갖는 천연물질들을 이용하여 합성보존료를 대체할 수 있는 천연보존제 물질을 개발할 수 있도록 하는 전문적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 다양한 유래에서 분리한 병원성 세균 *S. aureus*에 대한 5종의 유기산(acetic, propionic, citric, malic, lactic acid)과 3종의 정유성분(carvacrol, thymol, eugenol) 및 그 밖의 자연유래 항균물질(nisin, cinnamic acid)의 항균효과, 최소저해농도 및 각각의 최소사멸농도를 연구하였으며, 이를 바탕으로 항균물질간의 혼합처리 시 항균효과를 평가함으로써 이와 같은 자연유래 항균물질들의 화학합성 보존제 대체 가능성을 연구하고자 하였다. Agar disc diffusion실험을 통해 propionic acid (1.38 cm) > nisin (1.00 cm) > thymol (0.98 cm) > carvacrol (0.90 cm) 순으로 *S. aureus*에 대해서 높은 항균력을 나타내었다. 최소저해농도는 carvacrol (0.06%), thymol (0.06%), nisin (0.06%) 이 항균효과가 가장 좋은 것으로 나타났다. 그 이외의 항균물질의 경우 eugenol (0.13%), propionic acid (0.23%), acetic acid (0.38%), citric acid (0.60%), malic acid (1.66%) 순으로 효과가 나타났다. 이를 바탕으로 항균물질간의 혼합 처리시 propionic acid와 citric acid의 결합처리 효과가 가장 높게 나타났다. 자연유래 항균물질은 합성 보존료에 비해 항균활성이 미약해 보존료의 이용이 어렵지만 본 연구결과 자연유래 항균물질들의 혼합처리를 통해 시너지 효과를 알 수 있었다. 따라서 자연유래 항균물질의 혼합처리를 통한 연구가 계속적으로 이루어진다면 인공 합성 보존료를 대신하는 천연 보존료의 상업적 이용이 가능할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: PJ008513-022012)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Ahn, Y.S. and Shin, D.H.: Antimicrobial effects of organic acid and ethanol on several foodborne microorganisms. *Kor. J. Food Sci. Technol*., **31**, 1315-1323 (1999).
2. KFDA: http://www.kfda.go.kr/index.html (2007).
3. KFDA: http://www.kfda.go.kr/index.html (2008).
4. Jang, J.S., Go, J.M. and Kim, Y.H.: Inhibitory effect of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* by lactic acid and hydrogen peroxide. *Kor. J. Env. Hlth*., **31**, 115-119 (2005).
5. Branen, A.L.: Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAPCS*, **52**, 59-63 (1975).
6. Kim, D.H and Lee, Y.C.: Quality changes in minced ginger prepared with frozen ginger during storage. *Kor. J. Food Sci. Technol*., **36**, 943-951 (2004).
7. Oh, D., Ham, S.S., Park, B.K., Ahn, C. and Yu, J.Y.: Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. *Kor. J. Food Sci. Technol*., **30**, 957-963 (1998).
8. Kim, Y.S. and Shin, D.H.: Researches on the volatile antimicrobials compounds from edible plants and their food application. *Kor. J. Food Sci. Technol*., **35**, 159-165 (2003).
9. Mitscher, L.A, Park, Y.H. and Clark, D.: Antimicrobial agents from higher plants, antimicrobials isoflavonoids and related substance from *Glycyrrhiza glabra* L.var *Typica*. *J. Nat. Prod*., **43**, 259-269 (1980).
10. Lee, B.W. and Shin, D.H.: Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganism. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 200-204 (1991).
11. Misaghi, A. and Basti, A.A.: Effects of *Zataria Multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control*., **18**, 1043-1049 (2007).
12. Beuchat, L.R. and Golden, D.A.: Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol*., **43**, 134-142 (1989).
13. Freese, E., Sheu, C.W. and Galliers, E.: Function of lipophilic acids as antimicrobials food additives. *Nature*., **241**, 321-325 (1973).
14. Ha, S.D., Cho, M., Bae, E.K. and Park, J.: Application of natural antimicrobials to food industry. *Food Sci. Ind*., **38**, 36-45 (2005).
15. Hurst, A.: Nisin. *Adv. Appl. Microbiol*., **27**, 85-123 (1981).
16. Jarvis, B., Jeffcoat, J. and Cheeseman, G.C.: Molecular weight distribution of nisin. *Biochem. Biophys. Acta.,* **168**, 153-155 (1968)
17. Anderson, A.A., Michener, H.D. and Olcott, H.S.: Effect of some antibiotics on *Clostridium botulinum. Antibiotics Chemother*., **3**, 521-526 (1953).
18. Hawley, H.B.: Nisin in food technology. *Food Manuf*., **32**, 370-376 (1957).
19. Linnet, P.E. and Strominger, J.L.: Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother*., **4**, 231-236 (1973).
20. O'Brein, R.T., Titus, D.S., Delvin, K.A., Stumbo, C.R. and Lewis, J.C.: Antibiotics in food preservation II. Studies on the influence of subtilin and nisin on the thermal resistance of food spoilage bacteria. *Food Technol*., **10**, 352-355 (1956).
21. Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N.S. and Johnson, M.G.: Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria mono-*

*cytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara. J. Food Sci*., **69**, (2003).
22. Dufour, M., Simmonds, R.S. and Bremer, P.J.: Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of natural antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol*., **85**, 249-258 (2003).
23. Cho, H.J. and Shin, D.: Antifungal activity of some essential oils their major constituents on 3 plant pathogenic fungi. *J. Life Sci.,* **14**, 1003-1008 (2004).
24. Lee, H.A., Nam, E.S. and Park, S.I.: Antimicrobial activity of Maesil(*Prunus mume*) juice against selected pathogenic microorganisms. *Kor. J. Food & Nutr*., **16**, 29-34 (2003).
25. Chung, K.C. and Goepfert, J.M.: Growth of *Salmonella* at low pH. *J. Food Sci*., **35**, 326-328 (1970).
26. Fernandes, C.F., Flick, G.J., Cohen, J. and Thomas, T.B.: Role of organic acids during processing to improve quality of channel catfish fillets. *J. Food Prot*., **61**, 495-498 (1998).
27. Kong, Y.J., Park, B.K. and Oh, D.H.: Antimicrobial activity of *Quercus mongolica* leaf ethanol extract and organic acids against food-borne microorganisms. *Kor. J. Food Sci. Technol*., **33**, 178-183 (2001).