

Allyl Isothiocyanate와 고추냉이분말 첨가에 의한 간장 산막효모의 생육저해 효과

김영성 · 경규항* · 김연순**

신홍대학 환경위생과, *세종대학교 식품공학과, **조선대학교 가정교육과

Inhibition of Soy Sauce Film Yeasts by Allyl Isothiocyanate and Horse-radish Powder

Young-Sung Kim, Kyu-Hang Kyung* and Youn-Soon Kim**

Department of Sanitation, Shin Heung Junior College

*Department of Food Science, Sejong University

**Department of Home Economy Education, Chosun University

Abstract

Allyl isothiocyanate (AITC) and horse-radish powder were tested for the possibility of utilizing them as natural food preservatives to prevent film formation on soy sauce. AITC and horse-radish powder activated with water at 37°C for 1 hr were effective in preventing film formation on soy sauce at the level of 20 ppm and 1.6%, respectively, for the test period of 30 days at 30°C. When horse-radish powder was added directly to soy sauce or added after activation with soy sauce instead of water under the same condition, the preservative effect of horse-radish powder was much lower than when it was activated with water.

Key words: soy sauce, allyl isothiocyanate, horse-radish, film formation.

서 론

간장은 콩을 이용한 발효식품으로 우리 식생활에서 빼 놓을 수 없는 조미식품이다. 예전에는 일반가정에서 전래적인 방법으로 간장을 자가제조하여 소비하였으나 시대적 변화와 주거환경이 변화됨에 따라서 공장생산간장을 많이 사용하고 있다. 간장은 제조, 저장 및 유통과정 중에 산막효모가 혼입되어 번식하면 간장의 표면에 막이 형성되어 제품의 시각적 품질은 물론 이취를 생산하여¹⁻⁶⁾ 상품의 가치를 떨어뜨리기 때문에 시판간장에는 *p*-hydroxy benzoic acid의 butyl ester(POBB), sodium benzoate, sorbic acid 등의 합성 보존료를 첨가하고 있으나⁷⁻¹⁰⁾ 소비자들은 합성 보존료가 첨가된 제품을 기피하고 있으므로, 현재 많은 제조회사에서는 화학보존료 대신에 주정을 천연 보존료로 첨가하고 있다. 그러나 주정은 간장에

2~4%를 첨가하기 때문에 주정냄새로 인하여 식미를 손상시킬 수 있으며, 단백질 변성을 일으키거나, 효소를 불활성화시키는 작용이 있고, 식품의 색상을 변화시킬 수 있음은 물론 가격이 비싸다는 단점이 있다¹¹⁾.

Allyl isothiocyanate (AITC)와 고추냉이 (*Armoracia rusticana*, 영명 horse-radish)분말은 항미생물작용이 잘 알려져 있고 이들은 천연조미료이거나 천연 조미료의 중요 성분이기 때문에 간장의 산막효모를 저해하기 위하여 사용되는 합성 보존료나 ethanol을 대체 또는 사용량을 줄일 수 있는 천연 보존료로 제품 간장에 사용될 수 있는 가능성이 있다. AITC의 항균 효과에 대하여 Esaki와 Ozozaki¹²⁾, 關山¹³⁾, Tokuoka 등¹⁴⁾, 안 등¹⁵⁾이 각종미생물에 대한 항미생물작용을 연구하여 그 효과가 높다는 것을 보고하였다. AITC의 강력한 항균력은 미생물의 유도기를 연장시킴으로써 발휘되며, 항균기작은 AITC에 있는 -NCS (isothio-

* Corresponding author : Young-Sung Kim

cyanate)가 단백질의 -SH기와 반응하여 단백질 분자를 불활성화시켜서 살균력을 갖는 것으로 설명된다¹⁶⁾.

본 연구에서는 발효가 끝났으나 가열처리나 조미처리를 하지 않은 생간장을 여과 제균한 뒤에 고추냉이 분말 또는 AITC를 첨가하고 상품간장에 막을 형성하는 것으로 확인된 산막효모들¹⁷⁾을 접종·배양하면서, 이들 천연물질의 산막효모 생육저해 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용된 간장은 발효는 완성되었으나 가열처리나 조미처리를 하지 않은 생간장으로서 국내 대표적인 장류 제조회사에서 제공한 것을 사용하였다. 산막효모 배양시험 전에 여과 제균 (membrane filter; 0.45 μm pore size, 25 mm diameter, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI)하여 시료로 사용하였다.

2. 산막효모

유통 중에 시판제품에 효모막이 발생되어 반품된 시판간장 (국내 두 회사제품으로 제조회사에서 제공)에서 분리한 산막효모로서 *Zygosaccharomyces rouxii*로 동정된 SS-1, SS-2, SP-1 세 균주¹⁷⁾를 저해시험에 사용하였다.

3. 제균간장에서 막발생 실험

제균된 간장을 뚜껑이 있는 시험관에 20 ml씩 넣고 미리 YMPG(yeast extract 0.3%-malt extract 0.3%-peptone 0.5%-glucose 1.0%) 액체배지에서 36시간 동안 배양한 산막효모(*Zygosaccharomyces rouxii* SS-1, SS-2, SP-1)를 각각 1% 접종하고 30일 동안 배양하며 막형성 유무를 매일 관찰하였다. 이때 표면에 흰색의 막이 최초로 관찰되는 날을 막생성일로 표시하였다.

4. 일반성분 분석

간장의 일반성분은 일본 장유시험법¹⁸⁾에 따라서 분석하였다.

5. 천연 항균성 물질 용액의 조제

Allyl isothiocyanate (AITC; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) 0.1 ml를 70% ethanol 9.9 ml에 용해 (1,000 ppm)하고 멸균된 membrane filter로 여과제균하여 필요한 농도로 희석하여 여과 제균된 간장에 첨

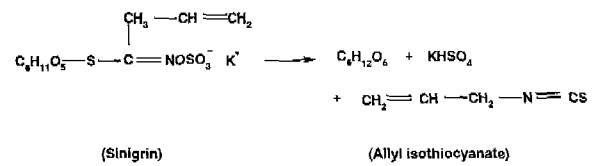


Fig. 1. The formation of allyl isothiocyanate from sinigrin.

가하였다. 고추냉이 분말(오뚜기 제유, 경기도)은 官本의 방법¹⁹⁾(고추냉이분말 3g에 물 2ml를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰을 때 6.3mg/g의 AITC가 생산된다는 보고)에 따라 고추냉이 분말을 AITC량으로 환산하여 물이나 간장에 현탁하여 사용하였고 sinigrin으로부터 AITC의 형성작용은 Fig. 1과 같다.

6. 고추냉이 분말로부터 AITC를 포함하는 휘발성물질의 분석

고추냉이분말을 위에서와 같이 분말 3g에 물 또는 간장을 2 ml 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 chloroform으로 추출하여 GC/MS로 분석하였다. 이때 Mass spectra는 mass selective detector (Hewlett-Packard Co., Wilmington, DE, USA)가 장치되어 있는 Capillary Gas Chromatograph (Hewlett-Packard Co.)를 사용하여 분석하였다. Oven의 온도는 100°C에서 시작하여 매분 5°C씩 상승시켜 250°C까지 올렸으며 250°C에서는 20분간 유지하였다. 시료는 splittless mode로 주입하였으며 injection port와 detector의 온도는 각각 280°C와 250°C로 하였다. 70eV에서 electron impact ionization시켰으며 45에서 350 dalton까지의 mass를 scan하였다.

결과 및 고찰

1. 산막 발생 간장의 일반 성분

간장에 산막효모의 번식으로 말미암아 막이 생겼을 때 간장의 성분에 미치는 영향을 알아보고 산막효모가 번식하게 되는 원인을 분석하기 위하여 유통 중에 산막효모가 번식하여 제조회사로 반품된 제품을 제공받아 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 정상적인 제품간장의 환원당 함량은 보통 5% 이상인데 막이 발생한 간장은 환원당의 함량이 감소하였음을 알 수 있고 이와 같은 현상은 Honoaka²⁰⁾가 일반간장에서 관찰하고 이는 간장 중의 산막효모 생육에 따라 환원당이 소비된 것이라고 설명하였다.

막이 생성된 간장은 알콜 함량도 매우 낮았으며 두

Table 1. Quality characteristics of commercial soy sauces film-formed during distribution

Soy sauce	T.N. ¹⁾ (%)	R.S. ²⁾ (%)	Alc. (%)	NaCl (%)	T.A. ³⁾ (ml)	B.A. ⁴⁾	pH
B Company(Normal)	1.740	5.80	2.30	15.08	26.04	0.90	5.10
A Company(Film-formed)	1.201	Trace	0.16	15.04	8.15	1.95	5.90
B Company(Film-formed)	1.747	1.72	1.12	14.52	25.55	0.87	5.45

¹⁾ : Total nitrogen, ²⁾ : Reducing sugar, ³⁾ : Total acid, ml of 0.1N-NaCl, ⁴⁾ : Buffer action

시료중 하나(A)는 정상적인 제품간장에 비해 적정산도도 매우 낮았으며 pH는 상대적으로 높아 미생물의 번식이 용이한 상태이었다. 이상을 종합해 보면 시판 간장의 유통 중에 효모에 의한 변패가 잘 일어나는 간장은 제품발효중 생산된 알콜이나 산도가 낮은 점을 지적할 수 있었으나 보존료의 첨가가 충분하지 않았을 가능성도 배제할 수는 없다. 보존료는 보통 pH가 낮을 때 효과가 높은 점으로 미루어보아 산도가 낮고 pH가 높은 제품은 보존료를 정상적으로 첨가하였다고 하더라도 산막효모의 번식을 충분히 억제하지는 못했을 가능성이 있다.

2. 산막효모의 번식이 시험간장 성분에 미치는 영향

산막효모를 여과제균한 간장에 접종하여 5일 및 15일 배양 후 일반성분을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 배양 5일째까지는 변화가 없었으나 환원당은 15일 후에 급격히 감소하였고, ethanol은 약간 증가하였다. 환원당이 급격히 감소한 이유는 효모가 에너지원으로 이용하였기 때문이며 그 결과 약간의 ethanol을 생성한 것으로 사료된다. 환원당의 감소는 장²¹⁾과 김과 김²²⁾의 보고와 같이 ethanol 발효 및 유기산 발효에 의해

glucose 등의 당당류가 소모되기 때문이라 생각되고, 김과 김²²⁾은 숙성기간을 통해 ethanol의 생성이 없었음에도 불구하고 당분이 감소한 것은 산막효모의 영양원으로 소모되므로 당분이 감소한 것으로 생각된다고 보고하였다.

3. AITC의 산막효모 생육저해 효과

제균간장에 AITC를 첨가하여 30°C에서 30일 배양하여 산막효모의 생육저해효과를 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 제균간장을 사용한 무첨가 시험구에서 SS-1은 평균 9일, SS-2균은 평균 6일, SP-1균은 10일째부터, 그리고 AITC가 10 ppm가 첨가된 시험구에서 SS-1, SP-1균은 막을 형성하지 않아 AITC에 매우 민감하였고, SS-2균은 15일부터 산막을 형성하여서 다른 두 산막효모보다는 AITC에 견디는 힘이 강했다. 그러나 20 ppm이상이 첨가되었을 때는 모든 효모가 시험기간 30일 동안 막을 형성하지 않아서 AITC를 간장의 산막효모 번식에 따르는 막생성을 효과적으로 억제할 수 있는 천연 보존료로 사용할 수 있는 가능성이 있다.

AITC는 휘발성이 매우 높고 특유의 자극성 냄새를 갖고 있기는 하나 첨가량이 매우 적고 간장은 고유의

Table 2. Changes in composition of soy sauce after 5 and 15 days of incubation with the film-forming yeasts

Strain	Days of incubation	NaCl (%)	T.N. ¹⁾ (%)	R.S. ²⁾ (%)	Ethanol (%)	pH	B.A. ³⁾
Control	0	16.17	1.75	2.97	0.90	4.93	0.97
SS-1	5	16.66	1.76	3.05	0.83	4.93	0.96
	15	16.44	1.72	1.01	1.34	4.91	0.97
SS-2	5	16.71	1.77	2.87	0.82	4.93	0.94
	15	16.29	1.71	1.01	1.33	4.91	0.98
SP-1	5	16.42	1.76	3.14	1.13	4.91	0.94
	15	16.19	1.70	1.01	1.79	4.91	0.95

¹⁾ : Total nitrogen, ²⁾ : Reducing sugar, ³⁾ : Buffer action

Table 3. Inhibition effects of AITC on the film formation on soy sauce incubated at 30°C for 30 days¹

Strains	AITC(ppm)	Day of film appearance
	0	9
SS-1	10	>30
	20	>30
	50	>30
SS-2	0	6
	10	15
	20	>30
	50	>30
SP-1	0	10
	10	>30
	20	>30
	50	>30

¹: Average of duplicate experiments

>30: No Film formation was observed after 30 days of incubation

냄새가 있기 때문에 냄새에 지극히 예민한 사람들도 AITC의 첨가를 잘 구별하지 못할 정도이다.

AITC에 의한 항균실험으로는 Esaki와 Ozozaki¹²⁾가 무 중에 함유되어 있는 AITC 5.6 mM에서 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*의 생육이 저해되었고, 4.34 mM에서 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Aspergillus oryzae*의 생육이 저해된다고 보고하였고, 홍과 윤²³⁾은 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치발효에 미치는 영향에서 겨자유 200 ppm과 분말겨자 0.1%를 병용실험시 적숙시에 이르는 시간이 연장되었다고 보고하였다. Tokuoka 등¹⁴⁾은 AITC에 의한 효모에 대한 생육저해작용에서 *Hansenula anomala*는 14.8 mg/l, *Saccharomyces cerevisiae*는 9.5 mg/l, *Zygosaccharomyces rouxii*는 2.8 mg/l, 농도에서 생육저해효과가 있다고 보고하였고, 關山¹³⁾은 allyl mustard oil의 각 균에 대한 최소 발육저지 농도에서 곰팡이는 5~15 ppm, Gram(+)세균은 20~30 ppm, Gram(-)세균은 5~30 ppm 농도에 생육저해효과가 있다고 보고하였고, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala*, *Torulasporea delbreuckii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* 등의 최소 발육저지 농도가 5~10ppm 범위에 있다고 한 결과는 본 실험과 유사한 결과를 나타낸다. 이상과 같은 실험결과를 고려할 AITC는 간장에 합성 보존료로 사용되는 POBB와 ethanol의 대체 보존효과를 기대할 수 있을

Table 4. Inhibition effects of horse-radish powder on film formation by yeasts on soy sauce incubated at 30°C for 30 days¹

Strains	AITC* (ppm)	Day of film formation**		
		P	W	S
	0	9	9	9
SS-1	10	7	>30	18
	20	8	>30	21
	30	>30	>30	>30
	40	>30	>30	>30
	0	6	6	6
SS-2	10	21	>30	>30
	20	>30	>30	>30
	30	>30	>30	>30
	40	>30	>30	>30
	0	10	10	10
SP-1	10	15	>30	15
	20	15	>30	>30
	30	>30	>30	>30
	40	>30	>30	>30

¹: Average of duplicate experiments

*: Horse-radish powder added as AITC equivalent

P: Horse-radish powder was added to soy sauce directly without pre-treatment

W: Horse-radish powder was pre-treated with water at 37°C for 1hr

S: Horse-radish powder was pre-treated with soy sauce at 37°C for 1hr

>30: No film formation was observed during 30 days of storage.

것으로 사료된다.

4. 고추냉이 분말의 산막효모 생육저해 효과

제균간장에 고추냉이 분말의 처리조건을 달리하여 AITC로 환산하여 10, 20, 30 및 40 ppm으로 첨가하여 30°C에서 30일 배양하며 산막효모의 생육저해 효과를 관찰한 결과는 Table 4와 같다. 무첨가 시험구에서 SS-1균은 9일째부터, SS-2균은 6일째부터, SP-1균은 10일째부터 산막을 형성하기 시작하였고 전처리를 하지 않고 고추냉이 분말을 AITC로 환산하여 10 ppm이 되도록 가루자체를 간장에 첨가한 시험구에서 SS-1균은 7일째부터, SS-2균은 21일째부터, SP-1균은 15일째부터 막이 형성되었고, 20 ppm 첨가된 시험구에서 SS-1균은 8일부터, SP-1균은 15일부터 막이 형성되었고, SS-2균은 막을 형성하지 않았고, 30 ppm

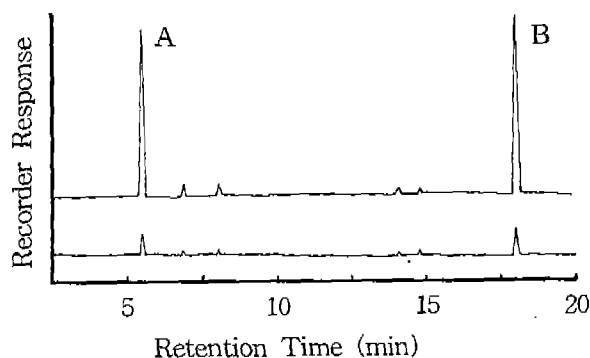


Fig. 2. Gas chromatogram of horse-radish powder in water (top) and in soy sauce (bottom). A: AITC, B: Benzene (2-isothiocyanatoethyl)

첨가된 전 시험구에서는 막을 형성하지 않았다(Table 4).

宮本¹⁹⁾의 방법대로 고추냉이 분말과 물을 3:2로 혼합하여 37°C에서 1시간 반응 후 AITC로 환산하여 10 ppm 또는 그 이상 첨가한 전 시험구에서는 막을 형성하지 않았다(Table 4). 그러나 고추냉이 분말을 물대신 간장을 써서 3:2로 혼합하여 37°C에서 1시간 반응 후 AITC로 10 ppm 첨가된 시험구에서 SS-1과 SP-1이 각각 18일째와 15일째, 그리고 SS-1은 20ppm equivalent가 첨가되었을 때도 21일째부터 막을 형성하여 고추냉이 분말은 그대로 또는 간장에 개어서 37°C에서 반응시키는 것보다 물에서 반응시켰을 때 AITC등의 분해산물이 가장 효과적으로 생산되는 것으로 판단된다. 이와 같은 현상은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 물을 용매로 사용하였을 때에 간장을 용매로 사용했을 때보다 매우 많은 양의 AITC와 기타 휘발성물질이 생산되는 것으로 나타났다. 고추냉이 분말에 함유하고 있는 AITC를 생성하는 myrosinase 효소는 간장의 비교적 낮은 pH(≈5)의 영향으로 활성이 저해되었던 것으로 생각된다.

요 약

제품간장에 산막효모가 번식하여 제품의 품질을 저하시키는 것을 방지하기 위하여 기존의 합성보존료를 대체할 수 있는 천연물질로서 allyl isothiocyanate (AITC)와 가수분해 되었을 때 AITC를 생성하는 sinigrin을 주요 성분으로 함유하고 있는 고추냉이 분말의 효과를 실험하였다. AITC와 고추냉이 분말을 가열처리와 조미를 하지 않은 발효직후의 제균 생산장

에 첨가하여 30°C에서 30일간 배양하면서 산막효모의 생육저해효과를 실험한 결과 AITC 20 ppm과 고추냉이 분말(몇%)를 첨가한 시험구에서 산막효모의 생육이 저해되어 시험기간동안 막이 나타나지 않았다. 고추냉이 분말을 그대로 첨가하거나 간장을 반응액으로 사용한 시험구는 고추냉이 분말을 물에 분산시켜 37°C에서 반응시킨 뒤 간장에 첨가한 때보다 산막효모 저해효과가 낮았다. 고추냉이를 물과 함께 활성화시켰을 때는 간장액을 넣고 활성화시켰을 때에 비해 훨씬 많은 양의 AITC가 생성되었다. 산막 생성 저해효과 면에서 보았을 때, 물로 활성화시켰을 때는 간장액에서 활성화시켰을 때보다 3배 이상의 AITC가 생성된 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 松山正宣 : 耐塩性酵母に関する研究. 味會技術, 103, 1 (1962).
2. Nagahama, T. and Imahara, H. : Studies on the Film-soja-yeast. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 33(11), 949 (1959).
3. 大西 博 : 醬油醸造と微生物(Ⅲ). *J. Jpn. Soy Sauce Res. Inst.*, 5(3), 129 (1979).
4. 이택수, 이석진 : 간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구. *한국농화학회지* 13(1), 97 (1970).
5. Nakase, T. : Spoilage of foods by yeasts. *J. Food Hygiene, Jpn.*, 18(4), 309 (1977).
6. 中浜敏雄 : 酵母の産膜性と非産膜性. *J. Brew. Soc. Jpn.*, 70(9), 637 (1975).
7. 장학길, 박승규, 경규항 : 농가식품조리가공 보존연구. *농영연-연조-2*, 16 (1988).
8. 문범수, 김복성, 이영민, 박운민 : 醬油의 防腐劑에 關한 研究. *국립보건의연구원보*, 251 (1969).
9. Momoto, M., Narahashi, Y. and Nikawa, Y. : Studies on the antimicrobial action of sorbic acid. - The effect of medium pH on its inhibitory power. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 29, 805 (1955).
10. 竹内弘明 : Studies on decrease of p-oxybutyl benzoate in laminated can with vinylchloride. *日本醬油技術會 秋季 研究 發表會*, 16 (1966).
11. 정동효 : 식품의 안전과 보존향상을 위한 주정활용. *식품기술*, 6(3), 149 (1993).
12. 정동효 : 식품살균론. 대광서림, p.342 (1985).
13. Esaki, H. and Ozozaki, H. : Antimicrobial action of pungent principles in radishroot. *榮養と食糧*, 35(3), 207 (1982).
14. 關山泰司 : カラシ抽出物 製劑の 抗菌效果と その 應用. *日本食品工業*, 55 (1993).

15. 안은숙, 김지혜, 신동화 : 휘발성 Allyl isothiocyanate 계 화합물의 항균 활성에 관한 연구. *한국식품과학회지* 31(1), 206 (1999).
16. Tokuoka, K., Mori, R. and Isshiki, K. : Inhibitory effect of volatile mustard extract on the growth of yeasts. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39(1), 68 (1992).
17. Tang, C. S. : Benzyl isothiocyanate as a naturally occurring papain inhibitor. *J. Food Sci.*, 39, 94 (1974).
18. 김영성, 경규항 : 팽창된 시판 간장에 존재하는 효모의 분리 및 동정. *한국식품영양학회지*, 10, 97 (1997).
19. 井口信議 : しょうゆ試験法, 日本醬油研究所, (1985).
20. 宮本 悌次郎 : ワサビ シナモンの抗菌性と その 利用. *フドケミカル*-2, 30(1988).
21. Hanaoka, Y. : Studies on preservation of soy sauce. *日本醸造工學會誌*, 45(4), 312 (1967).
22. 張智鉉 : 韓國간장의 담금中の 化學的 變化 및 담금期間에 對하여. *한국농화학회지*, 6, 8 (1965).
23. 김형수, 김재욱 : 보리를 利用한 간장製造에 관한 연구. *한국농화학회지*, 29(2), 107 (1986).
24. 김상순 : *Aspergillus oryzae* 및 *Aspergillus soyae*를 이 용한 改良메주의 형상에 의한 醬類의 품질비교. *한국식품과학회지*, 10(1), 63 (1978).
25. 홍완수, 윤선 : 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치 발효에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, 21(3), 331 (1989).

(2000년 6월 15일 접수)