J Korean Soc Food Sci Nutr
46(4), 450~458(2017)

한국식품영양과학회지
https://doi.org/10.3746/jkfn.2017.46.4.450

흑마늘박 추출물의 항균 활성과 미생물 제어를 위한 시금치 세척에의 이용

강지훈[1] · 손현정[1] · 민세철[2] · 오덕환[3] · 송경빈[1]

[1]충남대학교 식품공학과
[2]서울여자대학교 식품공학과
[3]강원대학교 식품생명공학부

Antimicrobial Activity of Black Garlic Pomace Extract and Its Application to Cleansing of Fresh Spinach Leaves for Microbial Control

Ji Hoon Kang[1], Hyeon Jeong Son[1], Sea Cheol Min[2], Deog Hwan Oh[3], and Kyung Bin Song[1]

[1]Department of Food Science and Technology, Chungnam National University
[2]Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University
[3]Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

ABSTRACT In this study, the antimicrobial activity of black garlic pomace extract (BGPE) was examined, and its washing applicability to spinach was investigated. BGPE had antimicrobial activity against both Gram-positive (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium) food-borne pathogens. In particular, antimicrobial activities of BGPE against Gram-positive bacteria were higher than those against Gram-negative bacteria. Spinach samples were treated with 0.5% BGPE to determine the effect of BGPE on reducing naturally existing microorganisms on the surface of spinach leaves. BGPE treatment reduced populations of total aerobic bacteria and yeast/molds in spinach by 1.23~1.35 log CFU/g and 0.82~1.12 log CFU/g during 9 days of storage, respectively, compared with those of control samples. After treatment, there were no significant differences in color quality such as Hunter L, a, and b values and total color difference (ΔE). These results clearly indicate that BGPE treatment can be useful for improving microbiological safety and maintaining color quality of spinach during storage.

Key words: black garlic pomace extract, antimicrobial activity, microbiological safety, spinach leaves

서 론

최근 신선 농산물 소비가 전 세계적으로 증가하고 있는 추세이다(1). 건강에 대한 관심이 높아지면서 신선 농산물은 식이섬유, 비타민, 무기질 등을 섭취할 수 있는 건강식품으로 인식되고 있다(1,2). 그러나 대부분 샐러드로 섭취되기 때문에 병원성 미생물 오염으로 인한 식중독 발생도 같이 증가하고 있다(3,4). 특히 시금치는 다소비 작물이면서 동시에 식중독 발생 건수가 높은 농산물 중 하나인데(5), Leonard 등(6)은 1973년부터 2012년 사이에 shiga toxin-producing *Escherichia coli*(STEC)에 오염된 잎채소 섭취로 인해 100건의 식중독 환자와 6명의 사망자가 발생하였다고 보고하였다. 따라서 신선 농산물 관련 식중독 발생을 줄이기 위한 기술 개발이 필요하다.

Received 31 January 2017; Accepted 14 March 2017
Corresponding author: Kyung Bin Song, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
E-mail: kbsong@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6723

시금치를 비롯한 농산물의 미생물 제어를 위해 가장 널리 사용되고 있는 방법은 염소계 살균제를 이용한 세척 처리 방법이다(7,8). 그러나 염소계 살균제는 제한된 사용 농도(50~200 ppm)로 인해 미생물 제어 효과가 낮고, pH에 따른 효과 차이, 발암물질 생성 등 문제가 대두하고 있어서 이를 대체하기 위한 연구가 많이 수행되고 있다(3,8).

신선 농산물의 미생물 오염 수준을 낮추기 위한 기술로서 비가열처리 방법이 많이 연구되고 있는데, 이산화염소(ClO_2), 오존(O_3), 과산화수소(H_2O_2)와 같은 화학적 처리와 이온화 조사(ionizing irradiation), 초음파(ultrasound), 자외선(ultraviolet-C) 등 물리적 처리가 적용되고 있다(3,9). 최근에는 천연물질을 사용하여 신선 농산물의 미생물학적 안전성을 확보하려는 연구가 진행되고 있는데, 더욱 안전한 식품 섭취를 원하는 소비자의 요구를 충족시킬 수 있는 새로운 형태의 세척 처리 기술이다(10). 현재까지 연구된 천연물질로는 유기산(organic acid), 정유(essential oil), 식물 추출물(plant extract) 등이 대표적인데(2,10-12), 시금치의 경우에도 이들을 적용한 연구가 수행된 바 있다(13,14). 또한, 식품 가공 부산물인 채소와 과일의 껍질과 씨, 주스 착즙

후 남은 박(pomace)으로부터 추출한 천연물질의 항균 효과를 분석한 연구(15)가 보고되고 있으나, 이러한 추출물들의 신선 농산물에 대한 세척 적용 연구는 매우 미미한 실정이다.

흑마늘은 마늘을 일정한 온도(60~70°C)와 습도(80~90%)에서 30~40일 동안 숙성시켜 제조한 것으로, 가공 중 열에 의해 효소가 불활성화되면서 마늘의 주요 항균 성분인 allicin 함량이 감소하고 폴리페놀과 같은 항산화 성분의 함량이 증가한다고 알려져 있다(16,17). 그러나 흑마늘 진액의 항균 및 항산화 활성 변화 등 다양한 연구가 보고되고 있는 반면에(18,19), 흑마늘 진액 추출 후 버려지는 찌꺼기인 흑마늘박의 항균성 및 신선 농산물 대상 세척 적용 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 염소계 살균제를 대체하기 위한 새로운 천연 비가열처리 방법으로 식품 가공 부산물의 활용 가능성을 검토하고자, 흑마늘박 추출물의 주요 병원성 미생물(*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium)에 대한 항균 효과를 확인하고, 시금치에 세척 적용함으로써 저장 중 미생물 제어 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 흑마늘박(black garlic pomace)은 흑마늘 진액 추출 후 버려지는 가공 부산물(껍질 포함)로 경상북도 의성군 의성농산영농조합에서 생산, 가공된 것이었고, 흑마늘박 추출물(black garlic pomace extract, BGPE)의 세척 적용 연구에 사용한 시금치는 전라북도 장수군에서 당일 수확된 것으로 신선하고, 크기가 균일한 것을 선별하여 실험에 사용하였다.

병원성 미생물 배양

흑마늘박 추출물의 항균 효과 분석을 위해 *E. coli* O157:H7(ATCC 43889, NCTC 12079), *S.* Typhimurium(ATCC 14028, KCTC 2421), *L. monocytogenes*(ATCC 19111, 19115), *S. aureus*(ATCC 10537, KCTC 1621)를 사용하였다. *E. coli* O157:H7과 *S.* Typhimurium은 25 mL tryptic soy broth(TSB, Difco Co., Detroit, MI, USA)에 접종 후 shaking incubator(37°C, 150 rpm)에서 18~24시간 배양하였고, *L. monocytogenes*와 *S. aureus*는 25 mL brain heart infusion(BHI, Difco Co.)에 접종하여 동일한 조건에서 배양하였다. 배양된 각 strain culture는 원심분리기를 이용하여 2,000×*g*, 10분 조건에서 원심분리 한 후 얻어진 침전물을 0.1% 멸균 펩톤수로 2회 세척하였다. 세척 후 동일한 volume의 멸균 펩톤수를 각 strain culture에 혼합하여 각 병원성 미생물의 cocktail culture를 제조하였으며, 항균 효과 분석 실험 전 최종적인 균 농도가 10^5~10^6 CFU/mL가 되도록 희석하여 사용하였다.

흑마늘박 추출물 제조

흑마늘박에 남아 있는 수분을 제거하기 위해 drying oven (DDO-102, Daeil Engineering Co., Seoul, Korea)을 이용하여 70°C에서 24시간 동안 건조한 후, 30,000 rpm의 blender(Osaka Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan)로 분쇄하였다. 흑마늘박 추출물 제조를 위한 예비 실험으로 물, 에탄올, 메탄올을 이용하여 추출을 진행한 후 수율, 항산화 활성, 총 페놀 함량 등을 비교 평가한 다음 80% 메탄올을 최적 추출 용매로 선정하여(data not shown), 흑마늘박(100 g)을 2 L 메탄올에 혼합하여(1:20; w:v) 3시간 동안 상온에서 교반 추출하였다. 흑마늘박 추출물은 감압 여과 및 농축하여 10%의 농축 추출물로 준비하였으며, 각 실험에 사용하기 전 희석하여 사용하였다.

흑마늘박의 총 페놀 함량

흑마늘박의 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol 방법으로 측정하였다(20). 흑마늘박을 1:20 비율로 80% 메탄올에 혼합하고 흑마늘박 추출물 제조와 동일하게 3시간 동안 추출한 후 30분간 정치하였다. 추출 용액 100 μL를 1.5 mL 증류수에 혼합한 후 2 N Folin-Ciocalteu 용액 100 μL를 첨가하여 30초 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 용액에 sodium carbonate(20%) 300 μL를 추가로 혼합하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후, UV spectrophotometer(UV-2450, UV-visible, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 사용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흑마늘박의 총 페놀 함량 계산을 위해 gallic acid를 표준물질로 이용하였고, mg gallic acid equivalent(GAE)/g dry weight로 표현하였다.

흑마늘박 추출물의 성분 분석

흑마늘박 추출물의 항산화 및 항균 활성을 나타내는 성분 분석을 위해 HPLC(Waters 2695, Waters Inc., Milford, CT, USA)를 사용하였다. 25% 메탄올에 흑마늘박 추출물을 0.25%가 되도록 첨가하고, 0.2 μm Whatman™ syringe filter(PVDF filter, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)로 2회 여과하여 시료를 준비하였다. HPLC 분석 시 사용한 column은 Kinetex 5u EVO C18(5 μm, 250×4.6 mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)이었으며, UV detector(Waters 2489, Waters Inc.)를 사용하여 280 nm에서 검출하였다. 용매 A(0.1% formic acid in water)와 용매 B(0.1% formic acid in acetonitrile)를 이동상으로 사용하였으며, 85% 용매 A와 15% 용매 B를 0.5 mL/min의 유속 조건에서 15분 동안 등용매 용리하여 분석하였다. 표준물질로 *S*-allyl-cysteine, gallic acid, caffeic acid, hydroxybenzoic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

흑마늘박 추출물의 항산화 활성 분석

흑마늘박 추출물의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성과 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 라디칼 소거 활성 방법을 사용하여 측정하였다. DPPH assay는 0.1 mM로 제조된 DPPH 용액 0.95 mL에 0.05 mL의 농도별 흑마늘박 추출물(1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 mg/mL)을 첨가한 후 암소에서 30분 동안 반응시킨 다음 UV spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 추출물 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 계산하여 나타내었다. ABTS assay 수행을 위해 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 제조된 ABTS radical cation 용액을 734 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 희석하여 준비하였다. 준비된 ABTS 용액 2.94 mL에 1~50 mg/mL 농도의 흑마늘박 추출물을 각각 0.06 mL 첨가하고 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 734 nm에서 반응 용액의 흡광도를 측정한 후 DPPH assay와 동일하게 추출물 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 계산하여 %로 값을 표현하였다.

흑마늘박 추출물의 항균 활성 분석

흑마늘박 추출물의 항균 활성 분석은 disc diffusion test 방법을 사용하여 측정하였다. 5~6 log CFU/mL의 균 농도로 준비된 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium cocktail culture를 멸균 면봉을 이용하여 muller-hinton agar(MHA, Difco Co.)에 각각 도말하였다. 멸균된 paper disc(8 mm, Toyo Roshi Kasha Ltd., Tokyo, Japan)에 흑마늘박 추출물이 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mg/disc가 되도록 분주하고 clean bench에서 30분간 건조하였다. 건조된 disc를 각 병원성 미생물(cocktail culture)이 도말된 MHA 배지에 올리고 37°C에서 24시간 배양 후 형성된 inhibition zone의 크기를 측정하여 항균 활성을 측정하였으며, inhibition zone은 mm로 표시하였다. 흑마늘박 추출물의 항균 활성을 확인하기 위해 ampicillin (10 μg/disc)을 positive control로 사용하였다.

흑마늘박 추출물의 시금치 세척 처리 및 저장 조건

예비 실험을 통해 시금치 시료에 대한 흑마늘박 추출물의 세척 농도를 0.5%로 선정하였고, 시료와 세척 용액의 비율이 1:10(w:v)이 되도록 0.5% 흑마늘박 추출물을 준비하여 5분 동안 시금치 시료를 침지 세척한 후 bio-safety clean bench에서 30분간 건조하여 표면에 남아있는 여분의 수분을 제거하였다. 또한, 흑마늘박 추출물의 세척 효과를 비교하기 위해 동일한 조건에서 단순 물 세척 처리를 한 후 미생물 수를 비교 분석하였다. 각 세척 처리된 시금치 시료는 low-density polyethylene film bag(18 cm×20 cm)에 포장한 뒤 4±1°C에서 9일 동안 저장하면서 미생물 수 및 품질 변화를 측정하였다.

저장 중 시금치의 미생물 수 측정

시금치 시료(10 g)와 0.1% 멸균 펩톤수(90 mL)를 멸균 bag에 넣은 후 균질기(MIX 2 Stomacher, AES Laboratoire, Combourg, France)를 이용하여 3분간 균질시켰다. 균질된 각 시료는 펩톤수(0.1%)로 10배수 연속 희석하였다. 미생물 수 측정을 위해 준비된 희석 용액을 각각의 배지에 0.1 mL씩 분주하여 실험하였으며, 총 호기성 세균의 검출은 plate count agar(PCA, Difco Co.)를 사용하였고, 효모 및 곰팡이는 potato dextrose agar(PDA, Difco Co.)를 사용하여 각각 37°C와 25°C에서 2~3일간 배양한 후 형성된 colony를 계수하였다. 검출된 각 미생물 수는 시료 g당 log colony forming unit(CFU)으로 표현하였고, 3회 반복 실험하였다.

저장 중 시금치의 색도 측정

시금치의 저장 중 표면 색도는 Minolta Chroma Meter CR-400 색차계(Konica Minolta Sensing Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 시료의 각각 다른 표면을 10회 이상 반복 측정한 뒤 Hunter L, a, b 값을 평균값으로 나타내었다. Hunter 색도 값의 보정을 위한 표준 백판은 L=97.9, a=-0.42, b=2.58이었다. 또한, 저장 중 시금치 표면의 총색차(ΔE)를 확인하기 위하여 Kang 등(20)의 계산식을 이용하여 값을 계산하였다.

통계 분석

본 연구에서 수행된 모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였고, 대조구와 처리구 간의 유의성 검증은 SAS version 9.4 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석(analysis of variance)을 수행하였다. 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, $P<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 평균값의 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

흑마늘박의 총 페놀 함량 및 흑마늘박 추출물의 항산화 활성 분석

흑마늘박의 총 페놀 함량과 흑마늘박 추출물의 농도별 항산화 활성 변화를 분석하였다. 건조 흑마늘박의 총 페놀 함량은 4.68±1.01 mg GAE/g dry weight로 측정되었다(data not shown). Jang 등(21)의 선행 연구 결과에 따르면 건조 흑마늘의 총 페놀 함량은 10.0±1.0 mg/g으로 건조 마늘(3.67±0.22 mg/g)보다 2.5배 이상 높게 나타났다. 본 연구에서 사용된 흑마늘박은 흑마늘 진액 추출 후 남은 부산물로 추출 과정에서 phenolic compounds와 같은 성분들이 다량 용출되었음에도 일반 마늘보다 높은 총 페놀 함량을 유지하였는데, 이는 흑마늘 진액 추출 시 껍질까지 모두 사용하였기 때문에 껍질 내 페놀 함량이 영향을 미친 것으로 생각된

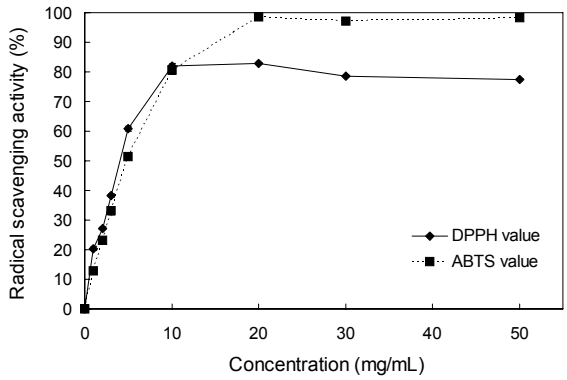

Fig. 1. DPPH and ABTS radical scavenging activities of black garlic pomace extract. ■: ABTS radical scavenging activity, ◆: DPPH radical scavenging activity.

다. 마늘 육질과 비교하였을 때 마늘 껍질의 총 페놀 함량은 대략 7배 이상 더 높다고 알려져 있으며(22), Kallel 등(23)의 보고에 따르면 추출 용매에 따라 다소 상이하지만 마늘 껍질의 총 페놀 함량은 약 3~25 mg GAE/g으로 측정되었다. 특히 50%와 100% 메탄올을 용매로 추출하였을 때 가장 많은 25, 22 mg GAE/g의 총 페놀이 마늘 껍질로부터 추출되었는데, 본 연구에서도 80% 메탄올을 사용함으로써 높은 함량의 페놀이 추출된 것으로 판단된다.

흑마늘박 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 분석한 결과(Fig. 1), 0~3 mg/mL 농도 범위에서 DPPH 라디칼 소거 활성은 0~38.21%였으며, 5 mg/mL부터 많이 증가하여 20 mg/mL까지 60.88~82.90%를 나타낸 후 50 mg/mL까지 유지되었다. ABTS 라디칼 소거 활성도 DPPH 결과와 동일한 양상을 보였는데, 10 mg/mL에서 약 80%의 활성을 보였고, 20 mg/mL 이상에서 98%의 활성이 유지되었다. 흑마늘박 추출물의 농도 증가에 따른 라디칼 소거 활성 증가 현상은 흑마늘 추출물과 유사한 경향을 나타내었다. Shin 등(24)은 흑마늘을 95% 메탄올을 이용하여 추출한 후 농도에 따른 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성 변화를 보고하였는데, 0.1~1 mg/mL 범위에서 15.28~65.93%의 DPPH 라디칼 소거 활성 증가를 관찰하였고, ABTS의 경우 동일 농도 범위에서 9.50~49.48%의 증가 경향을 확인하였다. 1 mg/mL 흑마늘박 추출물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성은 각각 20.33, 12.85%로 흑마늘 추출물의 65.93, 49.48%에 비하여 낮은 활성을 나타내었는데, 이는 앞선 선행 연구 결과(21)에서도 확인하였듯이 흑마늘 자체의 총 페놀 함량이 흑마늘박보다 두 배 이상 높게 나타난 것과 일치하는 결과라고 생각된다. 또한, 흑마늘박은 열처리와 착즙 과정 등 다양한 가공 공정을 거친 후 발생하는 부산물이기 때문에 항산화 활성이 낮게 나타난 것이라고 판단된다. 그러나 본 연구 결과를 통해 5 mg/mL(0.5%) 이상의 흑마늘박 추출물은 흑마늘 및 마늘 껍질 추출물과 같이 항산화 활성(DPPH: 60.88%, ABTS: 51.55%)을 나타낼 수 있기에 충분한 활용 가치가 있다고 판단된다.

흑마늘박 추출물의 항균 효과 및 성분 분석

흑마늘박 추출물의 병원성 미생물에 대한 항균 효과를 분석하여 Table 1에 나타내었다. Disc diffusion test 결과, 흑마늘박 추출물은 실험에 사용된 모든 병원성 미생물에 대해 항균성을 보이는 것으로 확인되었다. 0~20 mg 농도 범위에서는 4종류의 병원성 미생물 모두에서 항균 효과가 나타나지 않았으나, 25 mg부터 *L. monocytogenes*와 *S. aureus*에서 inhibition zone이 측정되었고, *E. coli* O157:H7과 *S.* Typhimurium의 경우에는 30 mg부터 측정이 가능하였다. 또한, 흑마늘박 추출물의 농도가 증가할수록 유의적으로 높은 항균성을 나타내었고, 40 mg 흑마늘박 추출물의 *L. monocytogenes*와 *S. aureus*에 대한 inhibition zone은 각각 15.02, 13.80 mm였으며, *E. coli* O157:H7과 *S.* Typhimurium에 대해서는 11.65, 12.10 mm의 inhibition zone을 나타내어 positive control(ampicillin)과 유사한 수준의 항균 활성을 보였다(Table 1). 일반적으로 식품 가공 부산물 등으로부터 추출된 천연 물질들은 그람 음성균보다 그람 양성균에 대해 더 높은 항균성을 갖는 것으로 알려져 있는데(25), 본 연구 결과에서도 동일한 경향이 확인되었다. Positive control로 사용된 ampicillin 처리 또한 그람 음성균(*E. coli* O157:H7: 11 mm, *S.* Typhimurium: 16 mm)보다 양

Table 1. The antimicrobial activity of black garlic pomace extract at different concentrations against food-borne pathogens

Treatment	Concentration	Inhibition zone (mm)			
		L. monocytogenes	*S. aureus*	*E. coli* O157:H7	*S.* Typhimurium
Black garlic pomace extract	0 (mg/disc)	ND (−)[1)]	−	−	−
	10	−	−	−	−
	15	−	−	−	−
	20	−	−	−	−
	25	9.22±0.17[e2)]	9.41±0.24[e]	−	−
	30	11.39±0.22[d]	10.64±0.37[d]	9.40±0.04[c]	9.52±0.60[c]
	35	13.35±0.33[c]	12.03±0.16[c]	10.55±0.29[b]	11.15±0.39[b]
	40	15.02±0.76[b]	13.80±0.35[b]	11.65±0.20[a]	12.10±0.40[b]
Ampicillin	10 (μg/disc)	21.08±0.53[a]	30.52±0.26[a]	10.96±0.50[b]	16.19±1.02[a]

[1)]ND: not detected (<8 mm).
[2)]Any means in the column (a-e) followed by different letters are significantly (P<0.05) different by Duncan's multiple range test.

성균(*L. monocytogenes*: 21 mm, *S. aureus*: 30 mm)에서 유의적으로 큰 inhibition zone을 형성하였는데, 이러한 차이가 발생한 이유는 그람 양성균과 음성균 사이의 세포막 차이에 의한 것(26)으로 음성균의 경우 외막(outer membrane)이 존재하여 양성균보다 천연 물질을 비롯한 항균 물질에 저항력이 큰 것으로 판단된다.

일반 마늘의 경우 마늘 조직이 파괴되면서 마늘 육질 내 효소인 alliinase에 의해 alliin이 allicin으로 변하고, 이 allicin이 항균성을 갖는 것으로 알려져 있다(17). 그러나 흑마늘 제조 과정 중 열처리로 인해 alliinase의 활성이 저해됨에 따라 allicin 함량이 감소한다고 보고된 바 있다(16). Chung 등(27)은 생마늘즙과 열처리 마늘즙의 항균 활성을 비교하였는데, 열처리 마늘즙이 실험에 사용된 모든 병원성 미생물에 대해 낮은 항균성을 나타내었다고 보고하였다. 또한, Jung과 Sohn(18)은 껍질이 제거된 생마늘 추출물과 흑마늘 추출물의 항균 활성을 비교 분석한 결과, 흑마늘 추출물은 그람 양성균과 음성균 모두에서 항균 활성을 나타내지 않았다고 보고하였다. 이러한 결과를 통해 껍질을 제외한 흑마늘 육질에는 allicin과 같은 항균성 성분이 존재하지 않기 때문에 항균 활성이 나타나지 않은 것으로 생각된다. 반면에 본 연구에서 사용된 흑마늘박은 흑마늘 진액 추출 후 흑마늘 육질과 껍질이 모두 잔존하는 부산물이기 때문에, 육질이 아닌 껍질로부터 항균성을 나타내는 기능성 성분이 용출되었다고 판단된다. 일반적으로 과채류로부터 발생하는 가공 부산물인 박(pomace), 껍질(peels, husks), 씨(seeds) 등에는 풍부한 phenolic compounds가 함유되어 있어 항균성 등 다양한 기능성을 가진다고 보고되었다(15). Kallel 등(23)도 마늘 껍질 추출물이 높은 항균성을 나타낸다고 보고하였으며, LC/MS 분석을 통해 gallic acid, caffeic acid, hydroxybenzoic acid 등 다양한 종류의 phenolic compounds가 있음을 확인하였다. 이에 따라 본 연구에서도 HPLC 분석을 통해 흑마늘박 추출물의 항균성을 나타내는 주요 성분을 분석하였다.

흑마늘박 추출물의 주요 성분 분석을 위해 *S*-allyl-cysteine 및 3종류의 phenolic compounds(gallic acid, caffeic acid, hydroxybenzoic acid)를 표준물질로 사용하여 HPLC 분석을 하였다(Fig. 2). 흑마늘의 경우 제조 과정을 통해 *S*-allyl-cysteine 함량이 생마늘에 비해 6배 이상 증가한다고 알려져 있고, 이 성분에 의해 항산화 활성이 높아짐은 물론 항암, 항염증 등의 생리 활성이 나타난다고 보고된 바 있다(28,29). 그러나 본 연구에서 사용된 흑마늘박 추출물은 *S*-allyl-cysteine 성분이 없는 것으로 확인되었는데, 이는 *S*-allyl-cysteine이 흑마늘 진액 추출 과정 중 대부분 용출되었기 때문이라고 생각된다. 또한, *S*-allyl-cysteine이 다양한 생리 활성 기능을 나타내지만, 항균성은 나타내지 않는다고 보고되었다(18). 따라서 흑마늘박 추출물의 항균 활성은 *S*-allyl-cysteine이 아닌 phenolic compounds에 의한 것으로 판단되는데, HPLC 분석 결과를 통해

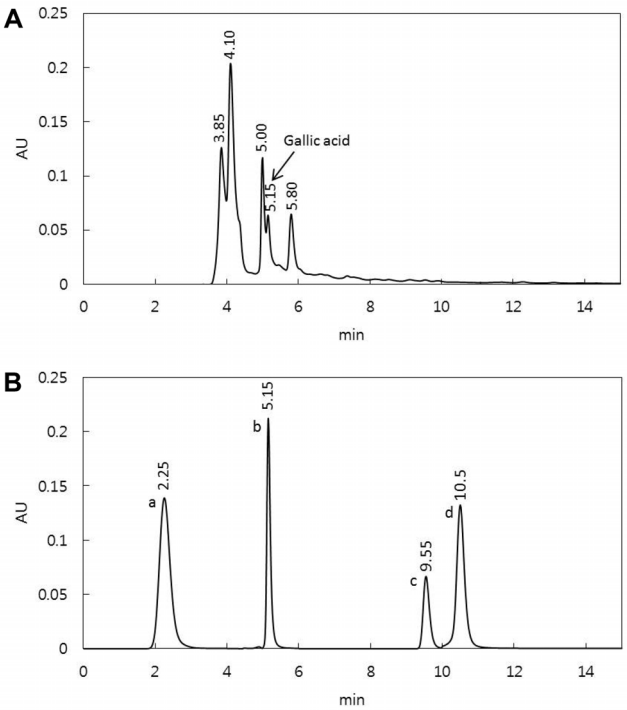

Fig. 2. HPLC chromatogram of black garlic pomace extract. (A) Black garlic pomace extract. (B) Standards: a, *S*-allyl-cysteine; b, gallic acid; c, hydroxybenzoic acid; d, caffeic acid.

흑마늘박 추출물에는 gallic acid를 포함한 5종류의 phenolic compounds로 예측되는 성분이 있다는 것이 확인되었다(Fig. 2). 본 연구 결과 흑마늘박 추출물의 항균성은 gallic acid를 포함한 다양한 phenolic compounds의 복합적 작용에 의한 것이라고 생각되며, 추후 각 성분의 동정에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. Phenolic compounds의 항균성은 phenolic compounds 분자에 존재하는 수산기가 미생물 세포막에 결합하여 막 구조를 붕괴하고, 이로 인해 미생물 세포 내 주요 성분들의 용출을 야기하기 때문인 것으로 알려져 있다(15). 특히 gallic acid는 미생물 세포막의 2가 양이온과 강하게 결합함으로써 막 구조를 파괴하여 미생물을 사멸시키는 것으로 알려져 있으며(30), *S.* Typhimurium, *S. aureus*와 같은 병원성 미생물에 대해서도 높은 항균성을 가진다고 보고된 바 있다(31). 이러한 phenolic compounds의 작용으로 인해 흑마늘박 추출물이 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium 모두에 항균성을 보인 것으로 생각된다. 이러한 결과로부터 대부분 버려지는 흑마늘박 추출물은 천연 항균제로서 농산물의 미생물학적 안전성을 확보하기 위한 세척제로 활용될 수 있다고 판단된다.

시금치에 대한 흑마늘박 추출물의 세척 적용 효과

흑마늘박 추출물의 신선 농산물에 대한 세척 적용 효과를 확인하기 위하여 시금치 시료에 0.5% 흑마늘박 추출물을 처리한 후 저장 중 총 호기성 세균과 효모 및 곰팡이 수를

측정하였다(Table 2, 3). 저장 초기 대조구 시금치의 총 호기성 세균 수는 6.04 log CFU/g이었고, 효모 및 곰팡이 수는 4.72 log CFU/g이었다. 단순 물 세척 처리구의 경우에는 각각 5.58, 4.42 log CFU/g으로 대조구와 비교하여 0.46, 0.30 log CFU/g의 매우 낮은 미생물 수 감소를 나타내었다. 시금치와 같은 농산물에 대한 단순 물 세척 처리에 의한 낮은 미생물 수 감소는 여러 연구 결과를 통해 보고되었는데(13,32), 이는 잎 채소류의 미생물 제어에 단순 물 세척 처리가 효과적이지 않음을 보여준다. 이와는 대조적으로 0.5% 흑마늘박 추출물 세척 처리구의 경우 단순 물 세척 처리구보다 총 호기성 세균과 효모 및 곰팡이 수가 각각 0.77, 0.68 log CFU/g만큼 더 감소한 4.81, 3.74 log CFU/g의 미생물 수를 보였다(Table 2, 3). 이는 식품 가공 부산물인 흑마늘박 추출물이 기존 세척 처리 효과가 있다고 알려진 유기산, 식물 추출물 등의 천연물질과 비슷한 미생물 수 감소 효과를 가진다는 것을 보여준다. Sagong 등(33)은 상추에 병원성 미생물인 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *L. monocytogenes*를 인위적으로 접종한 후 다양한 유기산 처리(malic acid, lactic acid, citric acid, 0.3~2%, 5분)의 미생물 제어 효과를 확인하였는데, 0.5~1.8 log CFU/g의 미생물 수가 감소하였다고 보고하였고, Huang과 Chen(34)도 시금치 어린잎에 *E. coli* O157:H7 접종 후 1~2% 농도의 유기산(citric acid, lactic acid, tartaric acid, malic acid, acetic acid)으로 5분 동안 처리하였을 때 1.5~1.9 log CFU/g의 미생물 수 감소를 관찰하였다. 이와 더불어 Orue 등(12)은 고수, 파슬리, 시금치에 식물 추출물(Mexican lime, 0.53~0.82%; oregano, 0.52~0.64%)을 처리한 후 총 호기성 세균에 대한 감소 효과를 측정하였는데, 1.2~1.4 log CFU/g의 미생물 수가 감소하였다고 보고하였다. 이러한 유기산 및 식물 추출물의 다른 농산물들에 대한 유사한 처리 효과는 흑마늘박 추출물이 시금치가 아닌 다른 농산물에 적용되어도 비슷한 미생물 수 감소 효과를 발휘할 수 있다는 것을 보여주는 결과라고 생각되며, 본 연구에서 적용된 흑마늘박 추출물이 농산물의 미생물학적 안전성을 제고하는 데 활용될 수 있다고 판단된다.

흑마늘박 추출물 처리의 미생물 수 감소 효과는 저장 중에도 지속되었는데, 저장 9일 후 대조구 시료의 총 호기성 세균과 효모 및 곰팡이 수가 각각 6.65, 5.36 log CFU/g이지만, 흑마늘박 추출물 처리구는 각각 5.30, 4.54 log CFU/g으로 대조구와 비교하여 1.35, 0.78 log CFU/g의 미생물 수 감소를 나타내었다. 그러나 단순 물 세척 처리구의 미생물 수는 대조구와 비교하였을 때 흑마늘박 추출물 처리보다 유의적으로 큰 차이를 보이지 않아 저장 중에 오히려 초기 제어 수준을 유지하지 못함을 보였다. Poimenidou 등(13)은 시금치와 상추에 다양한 세척 처리(물, 유기산, 차아염소산 나트륨, 정유) 후 7일 동안 저장하였을 때 단순 물 세척 처리를 제외하고는 모두 미생물 제어 효과가 유지되었다고 보고하였고, Kang 등(32)도 치콘에 이산화염소수와 단순 물 세척 처리 후 11일 동안 저장 실험한 결과, 이산화염소수의 미생물 제어 효과가 저장 초기와 유사하게 지속된 반면에 단순 물 세척 처리의 효과는 오히려 감소하는 경향을 나타냈다고 보고하였다. 이러한 결과로부터 흑마늘박 추출물 처리가 단순 물 세척 처리보다는 매우 효과적이며, 농산물의 미생물 제어를 위해 기존 연구된 다양한 비가열처리와 유사한 효과를 가진다고 판단된다.

흑마늘박 추출물 처리 후 시금치의 색도 품질 변화를 확인하기 위하여 저장 9일 동안 Hunter 색도 값(L, a, b)과 총색차(ΔE) 변화를 측정하였다(Table 4). 저장 초기 대조구 시

Table 2. The change in the populations of total aerobic bacteria in spinach leaves after treatment with 0.5% black garlic pomace extract during storage at 4°C (Unit: log CFU/g)

Treatment	Storage time (days)					
	0	1	3	5	7	9
Control[1)]	6.04±0.16[Ac2)]	6.05±0.16[Ac]	6.33±0.26[Ab]	6.45±0.16[Aab]	6.49±0.14[Aab]	6.65±0.06[Aa]
Water washing	5.58±0.18[Bb]	5.60±0.09[Bb]	6.00±0.24[Ba]	6.11±0.12[Ba]	6.19±0.21[Ba]	6.22±0.06[Ba]
Black garlic pomace extract 0.5%	4.81±0.17[Cb]	4.82±0.07[Cb]	5.01±0.22[Cab]	5.17±0.18[Ca]	5.24±0.15[Ca]	5.30±0.18[Ca]

[1)]Control: no treatment.
[2)]Any means in the same column (A-C) or same row (a-c) followed by different letters are not significantly (P<0.05) different by Duncan's multiple range test.

Table 3. The change in the populations of yeast and molds in spinach leaves after treatment with 0.5% black garlic pomace extract during storage at 4°C (Unit: log CFU/g)

Treatment	Storage time (days)					
	0	1	3	5	7	9
Control[1)]	4.72±0.13[Ad2)]	4.89±0.08[Acd]	5.07±0.14[Abc]	5.14±0.15[Aab]	5.19±0.16[Aab]	5.36±0.35[Aa]
Water washing	4.42±0.15[Bc]	4.47±0.11[Bc]	4.51±0.07[Bc]	4.72±0.16[Bb]	4.83±0.05[Ab]	5.16±0.06[ABa]
Black garlic pomace extract 0.5%	3.74±0.06[Cb]	3.77±0.28[Cb]	4.13±0.19[Cab]	4.24±0.21[Ca]	4.23±0.07[Ba]	4.54±0.19[Ba]

[1)]Control: no treatment.
[2)]Any means in the same column (A-C) or same row (a-d) followed by different letters are not significantly (P<0.05) different by Duncan's multiple range test.

Table 4. The change in the color of spinach leaves after treatment with black garlic pomace extract during storage at 4°C

Color parameter	Treatment	Storage time (days)					
		0	1	3	5	7	9
L	Control[1)]	27.43±0.41$^{Aab2)}$	27.65±0.72^{Aa}	26.79±0.27^{Bbc}	26.81±0.32^{Bbc}	26.77±0.33^{Bbc}	26.67±0.35^{Ac}
	Water washing	27.70±0.44^{Aa}	27.49±0.64^{Aab}	26.90±0.45^{Bbc}	26.80±0.38^{Bbc}	26.88±0.15^{Bbc}	26.71±0.27^{Ac}
	Black garlic pomace extract 0.5%	27.59±0.42^{Aa}	27.58±0.49^{Aa}	27.57±0.23^{Aa}	27.54±0.31^{Aa}	27.59±0.44^{Aa}	27.51±0.38^{Aa}
a	Control	-6.65±0.17^{Ab}	-6.64±0.43^{Ab}	-6.25±0.25^{Aab}	-6.03±0.28^{Aa}	-6.01±0.12^{Aa}	-6.01±0.07^{Aa}
	Water washing	-6.33±0.18^{Aa}	-6.27±0.05^{Aa}	-6.33±0.33^{Aa}	-6.03±0.13^{Aa}	-6.03±0.10^{Aa}	-6.04±0.15^{Aa}
	Black garlic pomace extract 0.5%	-6.64±0.32^{Aa}	-6.64±0.26^{Aa}	-6.65±0.32^{Aa}	-6.59±0.05^{Ba}	-6.57±0.36^{Aa}	-6.66±0.19^{Ba}
b	Control	7.51±0.33^{Aa}	7.53±0.11^{Aa}	7.62±0.11^{Aa}	7.52±0.28^{Aa}	7.52±0.24^{Aa}	7.63±0.30^{Aa}
	Water washing	7.41±0.14^{Aa}	7.42±0.19^{Aa}	7.49±0.25^{Aa}	7.45±0.23^{Aa}	7.41±0.12^{Aa}	7.41±0.25^{Aa}
	Black garlic pomace extract 0.5%	7.45±0.29^{Aa}	7.42±0.34^{Aa}	7.55±0.43^{Aa}	7.47±0.11^{Aa}	7.47±0.32^{Aa}	7.53±0.17^{Aa}
ΔE	Control	–	0.23±0.06^{Ab}	0.72±0.19^{Aa}	0.72±0.09^{Aa}	0.71±0.12^{Aa}	0.72±0.08^{Aa}
	Water washing	0.23±0.06^{Ab}	0.23±0.08^{Ab}	0.72±0.12^{Aa}	0.72±0.07^{Aa}	0.72±0.09^{Aa}	0.73±0.11^{Aa}
	Black garlic pomace extract 0.5%	0.22±0.09^{Aa}	0.23±0.03^{Aa}	0.23±0.08^{Ba}	0.23±0.08^{Ba}	0.23±0.07^{Ba}	0.23±0.04^{Ba}

[1)]Control: no treatment.
[2)]Any means in the same column (A,B) or same row (a-c) followed by different letters are significantly (P<0.05) different by Duncan's multiple range test.

금치의 Hunter L, a, b 값은 각각 27.43, -6.65, 7.51로 측정되었는데, b 값의 경우에는 저장 중 처리구와 대조구 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 저장 중에 L 값과 a 값도 대조구와 세척 처리구 간의 큰 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 대조구와 단순 물 세척 처리구에서는 다소 변화를 나타내어 상대적으로 L 값은 감소하고 a 값은 증가하였다. 반면에 흑마늘박 추출물 처리구의 Hunter 색도 값은 저장 9일 동안 초기와 동일하게 유지되어 색도 품질 유지 측면에서 단순 물 세척 처리보다 효과적임을 나타내었다. 또한, 총색차의 경우에도 저장 3일 후부터 대조구와 단순 물 세척 처리구는 0.72 값을 나타냈지만, 흑마늘박 추출물 처리구는 저장 초기 값인 0.23을 저장 9일까지 유지하였다. 이것은 흑마늘박 추출물에 존재하는 phenolic compounds가 색도 품질을 유지하는 것을 보여주는 결과로, 다양한 phenolic compounds가 함유된 포도잎 추출물을 상추에 처리하였을 때 polyphenol oxidase의 활성이 저해되어 대조구보다 색도 품질이 높게 유지되었다는 결과(35)와 유사하였다. 이러한 결과들로부터 본 연구에서 적용된 흑마늘박 추출물 처리가 단순 물 세척 처리와 비교하여 시금치의 색도 품질을 더욱 잘 유지할 수 있는 세척 처리 방법이라고 판단된다.

요 약

본 연구에서는 흑마늘 진액 가공 후 발생하는 흑마늘박의 활용 가능성을 검토하고자 흑마늘박 추출물의 항균성과 시금치에 대한 세척 적용 효과를 분석하였다. 흑마늘박 추출물은 주요 병원성 미생물인 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium에 대해 모두 항균성을 나타냈으며, 특히 그람 양성균인 *L. monocytogenes*와 *S. aureus*에 더 효과적으로 작용하였다. 시금치에 0.5% 흑마늘박 추출물을 처리한 후 4±1°C에서 9일 동안 저장하면서 미생물 수 변화를 측정하였다. 흑마늘박 추출물 처리는 대조구와 비교하여 저장 9일 동안 시금치의 총 호기성 세균 수를 1.23~1.35 log CFU/g, 효모 및 곰팡이 수는 0.82~1.12 log CFU/g 감소시켰다. 또한, 흑마늘박 추출물 처리는 저장 9일 동안 시금치의 Hunter 색도 값 및 총색차 값을 저장 초기와 유의적인 차이 없이 지속시켰기에 색도 품질 유지 측면에서 단순 물 세척 처리구보다 더 효과적이라고 판단된다. 따라서 본 연구 결과를 통해 흑마늘박 추출물은 병원성 미생물에 대해 높은 항균성을 가지면서 동시에 시금치와 같은 신선 농산물의 미생물 제어를 위한 효과적인 세척 처리 물질로써 활용될 수 있다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원(314059-03)의 지원에 의해 수행된 것으로, 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Oladunjoye AO, Oyewole SA, Singh S, Ijabadeniyi OA. 2017. Prediction of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 growth on fresh-cut produce treated with bacteriophage and sucrose monolaurate by using artificial neural network. *LWT −Food Sci Technol* 76: 9-17.
2. Siroli L, Patrignani F, Serrazanetti DI, Tappi S, Rocculi P, Gardini F, Lanciotti R. 2015. Natural antimicrobials to pro-

long the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce. *Postharvest Biol Technol* 103: 35-44.
3. Meireles A, Giaouris E, Simões M. 2016. Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Res Int* 82: 71-85.
4. Van der Linder I, Llano KRA, Eriksson M, De Vos WH, Van Damme EJM, Uyttendaele M, Devlieghere F. 2016. Minimal processing of iceberg lettuce has no substantial influence on the survival, attachment and internalization of *E. coli* O157 and *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* 238: 40-49.
5. Zhang M, Oh JK, Huang SY, Lin YR, Liu Y, Mannan MS, Cisneros-Zevallos L, Akbulut M. 2015. Priming with nano-aerosolized water and sequential dip-washing with hydrogen peroxide: An efficient sanitization method to inactivate *Salmonella* Typhimurium LT2 on spinach. *J Food Eng* 161: 8-15.
6. Leonard SR, Mammel MK, Lacher DW, Elkins CA. 2016. Strain-level discrimination of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in spinach using metagenomic sequencing. *PLoS ONE* 11: e0167870.
7. Gómez-López VM, Gil MI, Allende A. 2017. A novel electrochemical device as a disinfection system to maintain water quality during washing of ready to eat fresh produce. *Food Control* 71: 242-247.
8. Shynkaryk MV, Pyatkovskyy TI, Yousef AE, Sastry SK. 2016. Gaseous ozone treatment of baby spinach within the existing production chain for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Eng* 191: 10-18.
9. Goodburn C, Wallace CA. 2013. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control* 32: 418-427.
10. Siroli L, Patrignani F, Serrazanetti DI, Tabanelli G, Montanari C, Gardini F, Lanciotti R. 2015. Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiol* 47: 74-84.
11. Van Haute S, López-Gálvez F, Gómez-López VM, Eriksson M, Devlieghere F, Allende A, Sampers I. 2015. Methodology for modeling the disinfection efficiency of fresh-cut leafy vegetables wash water applied on peracetic acid combined with lactic acid. *Int J Food Microbiol* 208: 102-113.
12. Orue N, García S, Feng P, Heredia N. 2013. Decontamination of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* O157:H7 from leafy green vegetables using edible plant extracts. *J Food Sci* 78: M290-M296.
13. Poimenidou SV, Bikouli VC, Gardeli C, Mitsi C, Tarantilis PA, Nychas GJ, Skandamis PN. 2016. Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157:H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. *Int J Food Microbiol* 220: 6-18.
14. Ganesh V, Hettiarachchy NS, Griffis CL, Martin EM, Ricke SC. 2012. Electrostatic spraying of food-grade organic and inorganic acids and plant extracts to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and iceberg lettuce. *J Food Sci* 77: M391-M396.
15. Gyawali R, Ibrahim SA. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 46: 412-429.
16. Kim MS, Kim MJ, Bang WS, Kim KS, Park SS. 2012. Determination of *S*-allyl-L-cystein, diallyl disulfide, and total amino acids of black garlic after spontaneous short-term fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 661-665.
17. El-Sayed HS, Chizzola R, Ramadan AA, Edris AE. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food Chem* 221: 196-204.
18. Jung IC, Sohn HY. 2014. Antioxidation, antimicrobial and antithrombosis activities of aged black garlic (*Allium sativum* L.). *Korean J Microbiol Biotechnol* 42: 285-292.
19. Toledano-Medina MA, Pérez-Aparicio J, Moreno-Rojas R, Merinas-Amo T. 2016. Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves. *Food Chem* 199: 135-139.
20. Kang JH, Park SM, Kim HG, Son HJ, Song KJ, Cho M, Kim JR, Lee JY, Song KB. 2015. Gaseous chlorine dioxide treatment to produce high quality paprika for export. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1072-1078.
21. Jang EK, Seo JH, Lee SP. 2008. Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean J Food Sci Technol* 40: 443-448.
22. Kim RJ, Kang MJ, Lee SJ, Shin JH, Sung NJ. 2010. Physicochemical characteristics and antioxidant activities of fermented garlic husk. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1731-1738.
23. Kallel F, Driss D, Chaari F, Belghith L, Bouaziz F, Ghorbel R, Chaabouni SE. 2014. Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. *Ind Crops Prod* 62: 34-41.
24. Shin JH, Lee HG, Kang MJ, Lee SJ, Sung NJ. 2010. Antioxidant activity of solvent fraction from black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 933-940.
25. Casquete R, Castro SM, Martín A, Ruiz-Moyano S, Saraiva JA, Córdoba MG, Teixeira P. 2015. Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innov Food Sci Emerg Technol* 31: 37-44.
26. Sun X, Wang Z, Kadouh H, Zhou K. 2014. The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT－Food Sci Technol* 57: 83-89.
27. Chung KS, Kim YJ, Kim Y. 2003. Comparison of antibacterial activities of garlic juice and heat-treated garlic juice. *Korean J Food Sci Technol* 35: 540-543.
28. Bae SE, Cho SY, Won YD, Lee SH, Park HJ. 2012. A comparative study of the different analytical methods for analysis of S-allyl-cysteine in black garlic by HPLC. *LWT－Food Sci Technol* 46: 532-535.
29. Kim D, Kim KH, Yook HS. 2015. Analysis of active components of giant black garlic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1672-1681.
30. Sarjit A, Wang Y, Dykes GA. 2015. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food Microbiol* 46: 227-233.
31. Oyedeji O, Taiwo FO, Ayinde FO, Ajayi OS, Oziegbe M, Kelani MT, Adewole AH. 2014. *In vitro* antimicrobial and antioxidant analysis of gallic acid from the leaves of *Ludwigia abyssinica* A. Rich. *European J Med Plants* 4: 1098-1112.
32. Kang JH, Park J, Oh DH, Song KB. 2012. Effects of combined treatment of aqueous chlorine dioxide and UV-C or electron beam irradiation on microbial growth and quality in chicon during storage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1632-1638.
33. Sagong HG, Lee SY, Chang PS, Heu S, Ryu S, Choi YJ, Kang DH. 2011. Combined effect of ultrasound and organic

acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *Int J Food Microbiol* 145: 287-292.
34. Huang Y, Chen H. 2011. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. *Food Control* 22: 1178-1183.
35. Altunkaya A. 2014. Effect of grape leaf extract on phenolic profile and browning of fresh-cut lettuce (*Lactuca sativa*). *J Food Process Preserv* 38: 527-534.