

Grapefruit 종자 추출물의 항균성에 관한 연구

최종덕 · 서일원* · 조성환**

통영수산전문대학 수산가공과 · *(주)아비콘케미 · **경상대학교

Studies on the Antimicrobial Activity of Grapefruit Seed Extract

Jong-Duck CHOI, Il-Won SEO and Soung-Hwan CHO

Department of Fisheries Processing, National Tong-Yeong Fisheries Technical College, Chungmu 650-160, Korea

*ABCON CHEMIE Co., Yongdengpo-gu, 150-010, Seoul Korea

**Department of Food Technology, Geongsang National University, Chinju, 660-330, Korea

This study was carried out to investigate the antimicrobial activity of the grapefruit seed extract (GFSE).

The antimicrobial activity of GFSE was strong enough against such bacteria as *Vibrio vulnificus*, *Vibrio fluvialis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Serratia* sp. Growth of the above strains was inhibited by the GFSE'S concentration of 50 ppm.

The growth of *Vibrio vulnificus* was completely inhibited by adding the 50 ppm GFSE to the nutrient broth medium with 3% NaCl. The cell counts of *Vibrio vulnificus* 5.2×10^5 at first in 5% skim milk containing GFSE 0, 10, 30, 50 and 100 ppm were reduced to 35, 48, 5.6×10^2 , 5.3×10^3 and $9.6 \times 10^3/ml$ after 120 hours, respectively.

And growth of *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Pyrenochaeta terrestris* and *Trichoderma viride* were inhibited by the concentration of GFSE 100, 50, 100, 10 and 30 ppm, respectively.

The shelf life of Mulkimchi containing GFSE 50 and 100 ppm was 20 days longer than the control during storage at 5°C and 20°C.

서 론

살균소독제로써 그 사용이 허용되고 있는 화학 물질들은 차아염소산, 차아염소산나트륨염, 차아염소산 칼륨염, 클로라민 B, 클로라민 T, 표백분 염소계 살균제 등이다. 이와같은 살균소독제는 독성이 강하여 사용량에 제한이 있을 뿐 아니라 음료수, 야채, 과일, 식기 등의 소독에는 사용되고 있으나 식품에는 직접 첨가할 수 없는 실정이다.

본 실험에서 사용하고자 하는 grapefruit 종자추

출물(grapefruit seed extract: 이하 GFSE)은 다량의 Tocopherol을 함유하고 은은한 향기를 가지며, 강한 방취력이 있어서 악취 및 부패취 제거에도 뚜렷한 효과가 있는 천연물이다. GFSE의 독성실험에서는 우리나라에서 방부제로 사용이 허용되어 있는 안식향산나트륨의 LD₅₀ 값이 600mg/kg, 솔빈산 칼륨 1,000mg/kg보다 높은 2,900mg/kg으로써 독성이 거의 없는 천연살균 소독제라고 할 수 있다 (Harich, 1985).

GFSE의 살균작용 실험에서 Lee(1987)는 GFSE

의 성분중 ascorbic acid, ascorbyl palmitate 및 Tocopherol 등이 부패성 및 병원성 미생물의 세포벽 및 세포막의 기능을 약화시키고 효소활성을 억제한다고 하였고, Aquiar(1983)는 DNA/RNA에서 비롯되는 세포증식 기작을 방지하여 세균, 곰팡이에 살균효과를 나타내며 조 등(1990)은 곰팡이의 생육 및 독소합성에 저해효과를 가진다고 보고 한 바 있다. GFSE의 사용에로써 Moreira와 Quintero(1987)는 낙농기계 및 설비를 중성세제로 세척한 후 GFSE로 처리하여 살균력을 확인하였고, Carson(1985)은 가정이나 공장에서 유출되는 폐수의 살균소독제로, Guillermo(1982)는 병원용 환자의 의복, 방, 마루 및 화장실의 살균소독제로서의 효과를 보고하였다.

이상에서 알 수 있듯이 GFSE의 살균소독 효과에 대하여는 다소의 보고가 있으나 식품보존에 관련된 미생물의 항균력과 실제 식품보장 효과에 관한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 식품품질의 저하에 관여하는 여러가지 미생물과 특히 괴저병의 원인이 되고 있는 *V. vulnificus*에 대한 GFSE의 항균력을 검토하고 실제 식품에서의 항균효과를 검토하기 위하여 물김치를 대상으로 실험하여 다음의 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. Grapefruit 종자 추출물의 조제

브라질산 grapefruit를 구입하여 그 과육부를 제거하고 분리한 종자들을 수거하여 물로 세척한 다음, 적외선 등이 장치되어 있는 건조실에서 drum-drying시킨 종자들을 조 등(1990)의 방법에 따라 일정한 규격의 제품이 되도록 조제하여 사용하였다.

2. 항균력 시험

1) 사용균주

항균력 시험용으로 사용된 균주는 실험실에서 분리·동정한 균주와 표준균주 등을 병행 사용하였는데 그 출처는 Table 1과 같다.

2) 항균력 시험용 배지

항균력 시험에서 일반세균은 nutrient broth를, 곰팡이는 potato dextrose broth를 사용하였고 *Vibrio* 균주는 nutrient broth에 3% NaCl을 첨가한 배지를 항균력 시험배지로 사용하였다.

Table 1. Microorganisms submitted for the test of antimicrobial activity of GFSE

	Tested organisms	Source
Bacteria	<i>Vibrio vulnificus</i>	sea water
	<i>Vibrio fluvialis</i>	sea water
	<i>Bacillus cereus</i> IMA1110	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	
	<i>Serratia</i> sp.	food
Molds	<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC20235	
	<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC26268	
	<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC9644	
	<i>Pyrenochaeta terrestris</i> ATCC32327	
	<i>Trichoderma viride</i> ATCC32098	

그리고 *Vibrio vulnificus* 균주를 5% skim milk에 접종하여 GFSE의 살균력을 실험한 경우, 균수의 측정은 TCBS 한전배지를 이용하여 30℃에서 48시간 배양하여 집락수를 계측하였다.

3) 공시균의 준비

곰팡이류는 potato dextrose agar 사면배지에서 충분히 포자를 형성시킨 후 생리식염수 10ml를 사면배지위에 가하여 현탁액으로 만들어 공시균으로 하였고 세균류는 nutrient broth에, *Vibrio*속은 3% NaCl을 첨가한 nutrient broth에 각각 접종하여 적온에서 18시간 배양한 배양액을 공시균으로 사용하였다.

4) 항균력 시험

항균력 시험은 멸균된 항균력 시험용 배지 8ml에 공시균 1ml와 농도별로 준비된 GFSE 희석용액 1ml를 가하여 10ml가 되게 한 다음 생육 최저온도에서 배양하여 균의 증식유무로 판정하였다. 이때 사용한 GFSE 희석용액은 앞에서 조제한 GFSE 10g에 생리식염수 90g을 가하여 희석하고 단계희석법으로 각각의 농도를 조절한 후 고압증기멸균기(121℃, 15Lbs, 15분)에서 멸균하여 사용하였다.

세균의 증식유무는 육안으로 탁도를 확인하였으며, 그중 *Vibrio vulnificus*는 spectrophotometer를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 곰팡이의 증식은 균사체의 형성유무로 관찰하였다.

3. 물김치 저장실험

물김치(배추 12%, 무우 25%, 마늘 2%, 파1.5%, 생강 1.2%, 제품의 최종 식염농도 1.2%)에 GFSE의 농도가 0, 50, 100ppm이 되도록 조절하여 장 등(1989)의 방법에 따라 5℃와 20℃에서 숙성시키면

서 물김치의 pH를 측정하여 숙성도를 비교하여 나타내었다. 물김치 내용물의 비율은 중량 %이다.

결과 및 고찰

1. GFSE의 물리·화학적 특성

GFSE는 grapefruit 종자를 연속추출과정에서 추출하여 제조한 것으로 화학성분의 조성은 ascorbic acid, palmitic acid 등의 amino산과 약 1%의 toco-pherol이 함유되어 있는 혼합물로 구성되어 있다. 물리적 특성은 레몬빛 황색의 점도가 높은 액체물 질로서 약간 쓴맛이 나며 레몬향의 산성 pH용액(2.5~3.0)으로 물, 알콜, 유기산등에 잘 용해되고 Fig. 1에서와 같이 582nm에서 최대의 흡광도를 나타내었다.

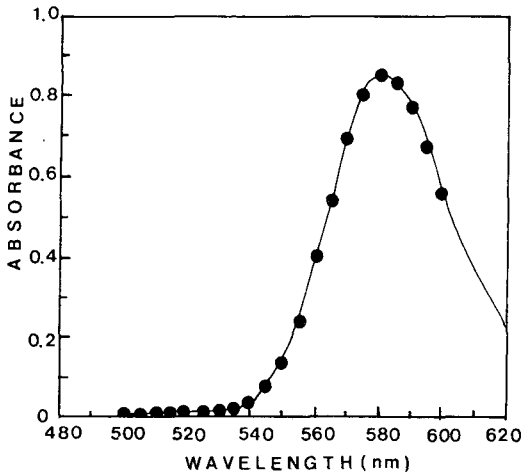


Fig. 1. Absorption spectra of GFSE.

2. GFSE의 항균력 시험

1) 세균에 대한 항균성

일반세균들에 대한 GFSE의 항균성을 알아보기 위하여 nutrient broth에 GFSE의 농도를 각각 0, 10, 30, 50, 100 및 1,000ppm으로 조절하고 균배양액을 접종하여 48시간 배양한 후 균의 증식유무를 육안으로 확인한 결과는 Table 2와 같다.

*Vibrio vulnificus*와 *Vibrio fluvialis*는 50ppm, *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*는 30ppm, *Serratia*속은 10ppm 이상에서 균의 증식이 억제된 결과로 보아 GFSE의 세균에 대한 항균력은 균종간에 차이가 있음을 알 수 있었다.

2) *Vibrio vulnificus*에 대한 항균성

3% NaCl이 첨가된 nutrient broth배지에 GFSE의 농도가 0, 10, 30, 50 및 100ppm이 되도록 조절하고 *Vibrio vulnificus*균 배양액을 접종한 후 35℃에서 배양하면서 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

GFSE의 농도가 0에서 30ppm까지는 *Vibrio vulnificus* 균주의 증식을 확인할 수 있었으나 50ppm 이상의 첨가에서는 72시간까지 균의 증식을 볼 수 없었다.

한편 *V. vulnificus*의 GFSE에 대한 살균효과를 실험하기 위하여 GFSE의 농도가 0, 10, 30, 50, 100 및 300ppm으로 조절된 5% skim milk 50ml에 공시균 1ml를 접종하여 25℃에 저장하면서 균수 변화를 측정하였는데 그 결과는 Fig. 3과 같다.

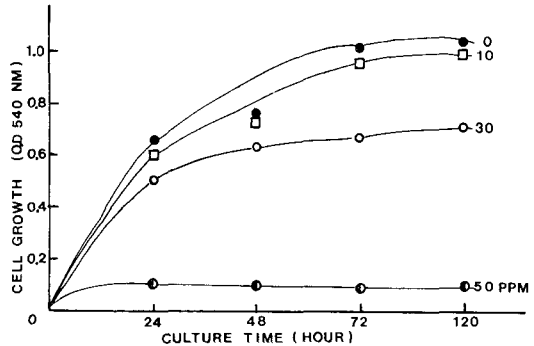


Fig. 2. Effect of GFSE on the growth of *Vibrio vulnificus* in nutrient broth with 3% NaCl.

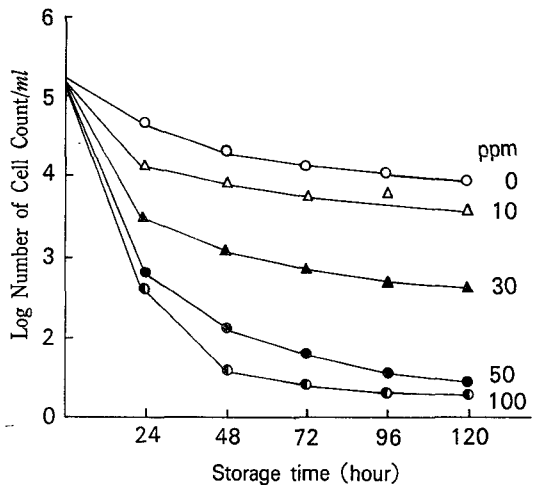


Fig. 3. Change of *Vibrio vulnificus* cell counts in skim milk during storage at 25℃.

공시균 접종 24시간 후의 균수변화는 최초균수 $5.2 \times 10^5/ml$ 에서 GFSE의 농도 0, 10, 30, 50 및 100 ppm에 따라 각각 6.5×10^4 , 4.0×10^4 , 3.5×10^3 , 8.4×10^2 , $6.3 \times 10^2/ml$ 로 감소하였으며 저장 120시간 후에는 9.6×10^3 , 5.3×10^3 , 5.6×10^2 , 48, 35/ml로 각각 감소되었다.

위의 결과로 미루어 GFSE 50ppm 이상의 농도를 첨가한 경우 *Vibrio vulnificus*에 대한 살균력이 있음을 알 수 있었다.

3) 곰팡이에 대한 항균성

각종 곰팡이들에 대한 GFSE의 항균성을 알아보기 위하여 potato dextrose broth에 GFSE의 농도를 0, 30, 50, 100, 500 및 1,000ppm으로 조절하고 포자현탁액 1ml를 접종한 후 균사체 형성 유무를 확인한 결과는 Table 3과 같다.

*Aspergillus parasiticus*는 GFSE의 농도 500ppm 이하에서, *Aspergillus versicolor*는 100ppm 이하에서 균의 증식이 억제되어 같은 *Aspergillus*속 이라도 균종간에 차이가 있었다. 그밖에 *Penicillium funiculosum*은 500, *Pyrenochaeta terrestris*는 30, *Trichoderma viride*는 50ppm 이하에서 균의 증식이 억제되어 농도에 따라 증식의 차이는 있으나 GFSE에 민감한 것으로 추정되었다.

3. 물김치 보장효과 실험

GFSE는 용해도가 높기 때문에 액상식품 보존에 효과가 높을 것으로 추정되어 물김치를 대상식품으로 하여 숙성 지연효과를 검토하였다. GFSE의 농도를 0, 50 및 100ppm으로 조절한 후 수돗물에 물김치를 담고 5℃와 20℃에서 저장하면서 pH를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

5℃ 저장에서 대조구는 완만한 속도로 지속적인 pH저하를 나타내었으나 50ppm과 100ppm에서는 처음에는 다소 감소하였지만 저장 20일과 25일까지 pH변동이 거의 없었다. 20℃ 저장에서 대조구는 비교적 빠른 속도로 pH저하를 나타내었으나 5ppm과 100ppm에서는 저장 17일과 20일까지 pH변동이 적었다. 따라서 GFSE의 첨가로 저장온도에 따라 다소 차이는 있으나 물김치의 보존기간을 상당히 연장시킬 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 토대로 GFSE는 곰팡이 및 세균의 생육 억제효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이의 항균력은 Harich(1982), Aquiar(1983), Lee(1987), 조 등(1990)이 보고한 바와 같이 GFSE가 세포벽 합성저해, 균체내 작용효소력 약화 및 RNA/DN, 유전정보 기작을 파괴함으로써 항균력이 강한 것으로 생각된다. 물론 각각의 곰팡이 및 세균의 생육 저해에 관한 많은 연구가 진행되어야 하겠지

Table 2. Effect of GFSE on the growth of bacteria in the nutrient broth

Test Organisms	Concentration of DF-100 (ppm)					
	1,000	100	50	30	10	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Serratia sp.</i>	-	-	-	-	-	+

Table 3. Effect of GFSE on the growth of moulds in the potato dextrose broth

Test Organisms	Concentration of GFSE (ppm)					
	1,000	500	100	50	30	0
<i>Aspergillus parasiticus</i>	-	-	+	+	+	+
<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Penicillium funiculosum</i>	-	-	+	+	+	+
<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Trichoderma viride</i>	-	-	-	-	+	+

GFSE는 우리나라에서 방부제로 허용되어 있는 안식향산나트륨이나 솔빈산 칼륨보다 안전하여 천연 식품보존료로 이용 가능하다고 생각된다. 그러나 GFSE를 식품보존료로 사용하기 위하여 안전성 등에 관하여 많은 연구가 진행될 필요가 있다고 생각된다.

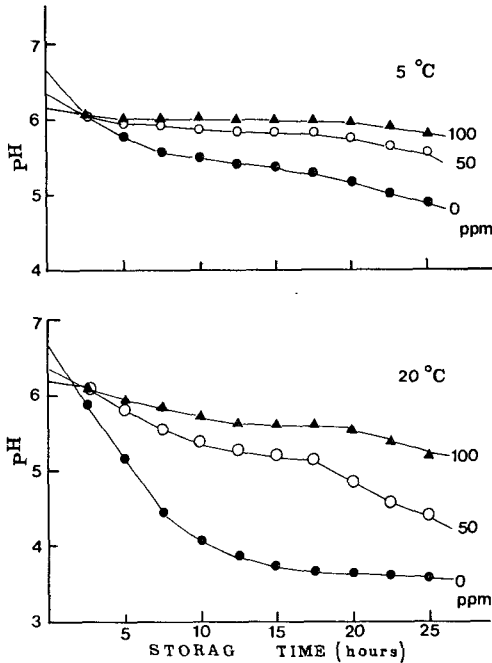


Fig. 4. The preservative effect of GFSE for Mulkimchi stored at 5°C and 20°C.

요 약

Grapefruit seed extract(GFSE)의 여러가지 미생물에 대한 항균력과 물김치 저장 효과를 검토한 결과는 다음과 같다.

1. GFSE의 세균류에 대한 항균력에서 *Vibrio*속은 50ppm, *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*는 30ppm, *Serratia*속은 10ppm 이상에서 균의 증식이 억제되었다.

2. 세균중 패혈증 원인균으로 알려진 *Vibrio vulnificus*에 대한 항균성은 nutrient broth에서 GFSE 30ppm 농도까지는 증식을 확인할 수 있었으나 50ppm 이상의 첨가에서는 72시간까지 균의 증식을 볼 수 없었다. 그리고 5% skim milk에서의 본 균에 대한 GFSE 살균력을 실험한 결과 $5.2 \times 10^5/ml$ 에서 저장 120시간 후에는 GFSE농도 0, 10, 30, 50 및

100ppm에서 각각 9.6×10^3 , 5.3×10^3 , 5.6×10^2 , 48, 35/ml로 감소되어 GFSE농도 50ppm 이상에서는 살균효과가 있음을 알 수 있었다.

3. 곰팡이류에 대한 항균력은 *Aspergillus parasiticus*가 100ppm, *Aspergillus versicolor* 50, *Penicillium funiculosum* 100, *Pyrenochaeta terrestris* 30 그리고 *Trichoderma viride*는 30ppm까지 증식하였으나 그 이상의 농도에서는 증식이 억제되었다.

4. 물김치에 GFSE를 각각 50, 100ppm 첨가하여 5°C와 20°C에서 저장하면서 pH변화를 확인한 결과 5°C에서는 20일과 25일, 20°C에서는 17일과 20일까지 pH변동이 거의 없어 물김치의 보존기간을 연장시킬 수 있었다.

참 고 문 헌

- Aquiar, L. A. B. 1983. Inhibition of *Aspergillus flavus* production of aflatoxin with DF-100. IX Latin American Microbiological Congress, Sao Paulo, Brazil.
- Carson, J. R. 1985. DF-100 as a domestic wastewater disinfectant. Analytical data in water & wastewater operations, Armadillo environmental services, Florida, U. S. A.
- Guillermo, F. G. 1982. Evaluation of the effectiveness of DF-100 in the control of the intrahospital infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and other agents in the center for clinical research of the nutrition and food technology research institute, University of Chile. Reports of Associate Institution of the United Nations University.
- Harich, J. 1980. DF-100. U. S. Patent 1,354,818(1985), FDA No. R-0013982(1982). Chemie research & manufacturing Co. Publication.
- Lee, T. E. 1987. Efficacy report of DF-100. Conference of genetics & cell biology, University of Malaya, Kuala Lumpur.
- Moreira, R. and W. Quintero. 1987. The grapefruit seed extract "DF-100" in dairy industries sanitation and its uses in cheeses and yogurts manufacturing processes. Chemie Brasileira Industria Co., Research paper.
- 張東錫·趙鶴來·具孝英·崔潤卿. 1989. 계 加工廢棄物을 이용한 食品保存料의 開發에 관한 研究. 韓水誌, 22(2), 70~78.

조성환 · 서일원 · 최종덕 · 주인생. 1990. Grapefruit
종자 추출물(DF-100)이 *Penicillium islandicum*
의 생육 및 독소성분 skyrin생합성에 미치는
저해효과. 한국농화학회지, 33(2), 169~173.

1990년 6월 18일 접수

1990년 9월 21일 수리