J. Fd Hyg. Safety 18(4), 183-188 (2003)

천연물을 이용한 살균 및 살바이러스 효과에 관한 연구

라정찬† · 이종은 · 송대섭* · 권남훈** · 박봉균** · 박용호*
*RNL 생명과학(주), *서울대학교 수의과대학*

A Study of Antimicrobial & Antiviral Effect of Natural Product

Jeong Chan Ra†, Jong Eun Lee, Dae-sub Song, Nam Hoon Kwon, Bong-kyun Park, and Yong Ho Park
RNL Life Science Co. Ltd.
**Department of Veterinary Medicine Virology,*
***Department of Microbiology, College of Veterinary medicine, Seoul National University*

ABSTRACT – Bactericidal effect of Green-Zone™ was observed, when *Staphylococcus aureus, E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium, S. enteritidis, Listeria monocytogenes,* the causative bacteria of food poisoning, *Vibrio parahaemolyticus,* and *Shigella sonnei* were treated with the diluted solution of Green-Zone™(33.3%~4.1%) for 30 min at 20°C. All the bacteria were killed in 30 sec, when 33.3%-diluted Green-Zone™ was applied, except for *S. aureus.* Coronavirus, the same virus with SARS virus taxonomically, was also killed with the 20%-diluted Green-Zone™. Canine parvovirus and Canine distemper virus were also killed even in the organic matter and hard water, when treated with Green-Zone™. When applied to food such as raw fish, chilled meat, vegetables, Green-Zone™ could also decrease the number of microorganism, expecially for *E. coli.* From these results, Green-Zone™ is thought to be effective for killing virus and bacteria, and also was proved to be safe when applied directly to food.

Key words: Green-Zone™, Natural product, *E. coli*, *Salmoneila*, SARS

공중보건과 위생 모두의 궁극적인 목표는 질병의 예방이다. 질병은 병원체, 숙주, 환경에 영향을 받는데, 그 중 외부에서의 요인인 병원체는 소독 등의 방법에 의해서 예방이 가능하다.[1] 인류는 오래전부터 천연물을 이용하여 병원균을 항균 또는 살균해왔다. 살구, 복숭아, 매실, 마늘, 양파 등이 있다.[2] 근래에 와서는 천연 항균 물질로 키토산 등이 사용되고 있는 실정이다. 키토산은 천연 무독성 생고분자(biopolymer)로 게, 새우 등의 껍질의 주요 성분인 키틴을 탈아세틸화시켜 얻어진 물질이다. 현재 생의학, 식품, 화학산업에서 상업적인 목적으로 사용되면서 각광 받고 있다. 키토산과 키토올리고머는 항균, 항암 등의 생리활성과 밀접한 관계가 있다. 현재 키토산이 키토올리고머에 비하여 세균 성장 저해능이 우수한 것으로 알려지고 있다. 또한 0.1% 키토산 농도시 그람 음성균보다는 그람 양성균에서 더 높은 항균력을 보였다고 한다.[3] 키토산은 곰팡이,[4] 부패균,[5] 치아 부식균[6] 등에서도 항균효과를 나타내었다. 매실은 식중독, 전염병 등의 예방 및 치료를 목적으로 예전부터 사용되어오던 물질이다. 현재도 식품의 보전 등의 목적으로 많이 연구되고 있으며, 특히 구연산, 사과산 등이 많이 함유되어 있어 이를 통한 살균력은 널리 알려져 있다. 매실추출물은 *E. coli* O157:H7,[7] *Vibrio parahaemolyticus*,[8] *Salmonella typhimurium* 등 그람 음성, 양성 모든균에 효과적인 것으로 알려져 있다.[9]

한국국립보건원은 3월17일자로 급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrom, SARS, 사스)을 법정 4종 전염병으로 정하였다. WHO에 따르면 2002년 11월 1일부터 2003년 4월 16일까지 전세계 22개국에서 3293명의 SARS 환자가 발생, 159명이 사망했으며(치사율: 4.8%) 지역내 전파가 확인된 곳은 중국(베이징, 홍콩, 광둥성, 산시성, 대만), 싱가포르, 베트남(하노이), 캐나다(토론토), 영국(런던), 미국이지만 대만, 런던, 미국은 국한된 지역내 전파(limited local transmission: SARS로 알려진 환자와 밀접한 접촉을 통한 전염 외에 다른 전염경로는 보고되지 않은 경우)로 고려하고 있다고 발표했다. 이 증후군의 원인 바이러스는 변종 사스 코로나 바이러스로 동물유래 바이러스로 알려져 있다.[10]

살균제의 개발로 현대에는 미생물보다는 바이러스의 의한 전염병이 더욱 확산되고 있다. 그러나 살바이러스에 효과적인 제품의 개발에 관한 연구가 미비한 관계로 본 연구에서는 살균 및 살바이러스에도 효과적인 천연 제품을 개발하고자 한다. 천연물질인 키토산, 매실 등을 이용하여 개발한 그린존™을 각종 식중독 균 및 전염성 바이러스에 대한 살멸

†Author to whom correspondence should be addressed.

효과 등을 관찰하였으며, 기존에 사용되고 있는 식품 신선도 보존제 등과 상추 등에 있는 균에 대한 저해 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

그린존^{TM}의 제조

키토산 3.5 g/L에 매실농축액, 젖산 등을 혼합하여 열을 가해 1차 증류수에 녹인 후 1 μm 필터를 이용하여 여과한 후 시험에 사용하였다.

살균력 시험

살균력 시험을 위한 균주로는 주요 식품 위해 미생물인 *Staphylococcus aureus* FRI 913, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894(SLT I(+), SLT II(+)), *Salmonella enterica serova Typhimurium isolate*, *Salmonella enterica serova Enteritidis ATCC 13076*, *Listeria monocytogenes ATCC 11285*, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17803와 *Salmonella enterica serova* Thphi isolate, *Shigella sonnei* human isolate를 사용하였다. 각각의 세균은 혈액배지를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 배양하여 단독 colony를 확인한 후 Tryptic Soy Broth(TSB)에서 18시간 배양하여 사용하였다. 그린존과 세균 혼합액을 반응 시킨 후, 반응액 0.1 m*l*를 TSB 10 m*l*와 혼합, 희석하여 반응을 중지시키고 Plate Count Agar(PCA)를 이용, 생존균수를 측정하였다(*V. parahaemolyticus*의 경우는 3% NaCl 첨가).[11]

살바이러스 시험

항바이러스 시험을 위해서 Canine parvovirus C-780916 (CPV), Canine distemper virus Lederle straine(CDV), Transmissible gastroenteritis virus(TGEV)를 사용하였다. 각 바이러스의 감염을 위해서 CRFK cell(CPV), Vero cell(CDV), ST cell(TGEV)을 각각의 배지에서 배양하여 사용하였다. 그린존과 바이러스 배양액을 4°C에서 30분간 반응시킨 후 미리 만들어 놓은 96 well plate내의 세포에 감염시켜 37°C에서 3~4일간 배양시킨다. 배양 후 세포의 감염정도를 가지고 바이러스의 살멸 효과를 판독하였다.[11]

식품내의 균 저해 효과 시험

식품을 그린존 처리군과 비처리군으로 나누어 방치한 후, 각 시간에 식품을 적당량 취하여 미생물 수를 측정하였다. 각 식품마다 적당량 시료의 무게를 재어 9배의 멸균 생리식염수와 함께 멸균봉투(WHIRL-PAK, Nasco)에 넣어 스토마커(Stomacher, Seward)를 이용하여 으깬 후, 필터를 이용하여 액만을 모았다. 이 액을 Nutrient Agar(Merck)에 도말한 후 37°C 항온기에 2일정도 보관 한 후 형성된 colony의 수를 측정하였다. 세균의 저해율은

100−(처리군의 세균수/대조군의 세균수)×100=저해율 %

로 하여 나타내었다.

결과 및 고찰

식품위해균에 대한 그린존의 살균효과

키토산의 살균력을 보는 기존연구들은 균저해능을 최대로 보기 위해 균과의 접촉 시간을 37°C에서 72시간이 되도록 하였다.[12] 그러나 식품 등의 위생을 위하여 사용될 경우 이러한 접촉시간은 큰 의미가 없기 때문에 그린존^{TM}과 균과의 접촉 시간을 20°C에서 30분으로 하고 각 균에 대한 살균효과를 관찰하였다. 그린존^{TM}의 살균효과를 보기 위하여 멸균증류수로 3배부터 48배까지 희석하여 시험을 수행하였다. 생존균수를 4log 감소($10^7 \times 10^3$ CFU/m*l*)시켰을 경우를 측정하여 살균력 유무를 판단하였으며, 그 결과를 그람 양성균과 음성균으로 나누어 Table 1에 나타내었다.

키토산의 살균 효과는 그람 음성균보다 그람 양성균에서 대부분 우수하다고 알려져 있다. 그러나, 그린존^{TM}의 경우는 그람 양성균, 음성균 모두에서 우수한 살균 효과를 나타내었다. *S. aureus*의 경우 다른 균주들과 다르게 야외 분리균주

Table 1. Antibacterial effect of Green-Zone^{TM} on food-born pathogen

Dilution Fold	Gram Positive		Gram Negative			
	S. aureus	*L. monocytogenes*	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. enteritidis*	*V. parahaemolyticus*
3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
6	(−)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
12	(−)	(+)	(−)	(+)	(+)	(+)
24	(−)	(+)	(−)	(−)	(+)	(−)
48	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)

*(+): effective, 4 log reduction, (−): non-effective

이기 때문에 다소 살균능이 떨어진 것으로 보이나, 그린존 3배 희석액에서도 살균능력을 보임으로 식중독균에 대해서 그린존의 살균 효과는 우수하다고 볼 수 있다. 그람 음성균의 경우 키토산 외막의 막성질을 약화시키므로서 막을 손상시켜 항균력을 나타낸다고 한다. 그린존의 경우는 막성질의 약화를 상승시켜 기존의 키토산보다 높은 살균 효과를 나타낸다고 보여진다.[13]

그린존 원액의 시간에 따른 유해균 사멸 효과를 보기 위하여 30초, 1분, 5분 간격으로 유해균의 생존균수를 측정하여 Fig. 1에 결과를 나타내었다.

식중독 원인균 *S. aureus, E. coli* O157:H7, *S. typhimurium, S. enteritidis, L. monocytogenes,* 장티프스 원인균 *S. typhi,* 폐혈증 원인균 *V. parahaemolticus,* 세균성 이질 원인균 *S. sonnei*에서 그린존™은 모두 살균 효과를 나타내었다. *S. aureus*을 제외하고는 모두 30초내에 살멸효과를 나타내었다. 이는 그린존™이 소독제의 효과도 지니고 있음을 나타내는 것이다.

바이러스에 대한 그린존의 효과

사스의 병원체는 변종 사스 코로나 바이러스이다. 코로나 바이러스는 envelope에 부착하고 있는 크고(약 20 nm길이의) 잘 분활된 꽃잎모양의 spike, 혹은 "peplomer"를 가지고 있으며, RNA를 함유하는 나선상의 nucleocapsid를 지니고 있다.[14] 일반적으로 코로나 바이러스는 소화기 계통의 질병을 일으키

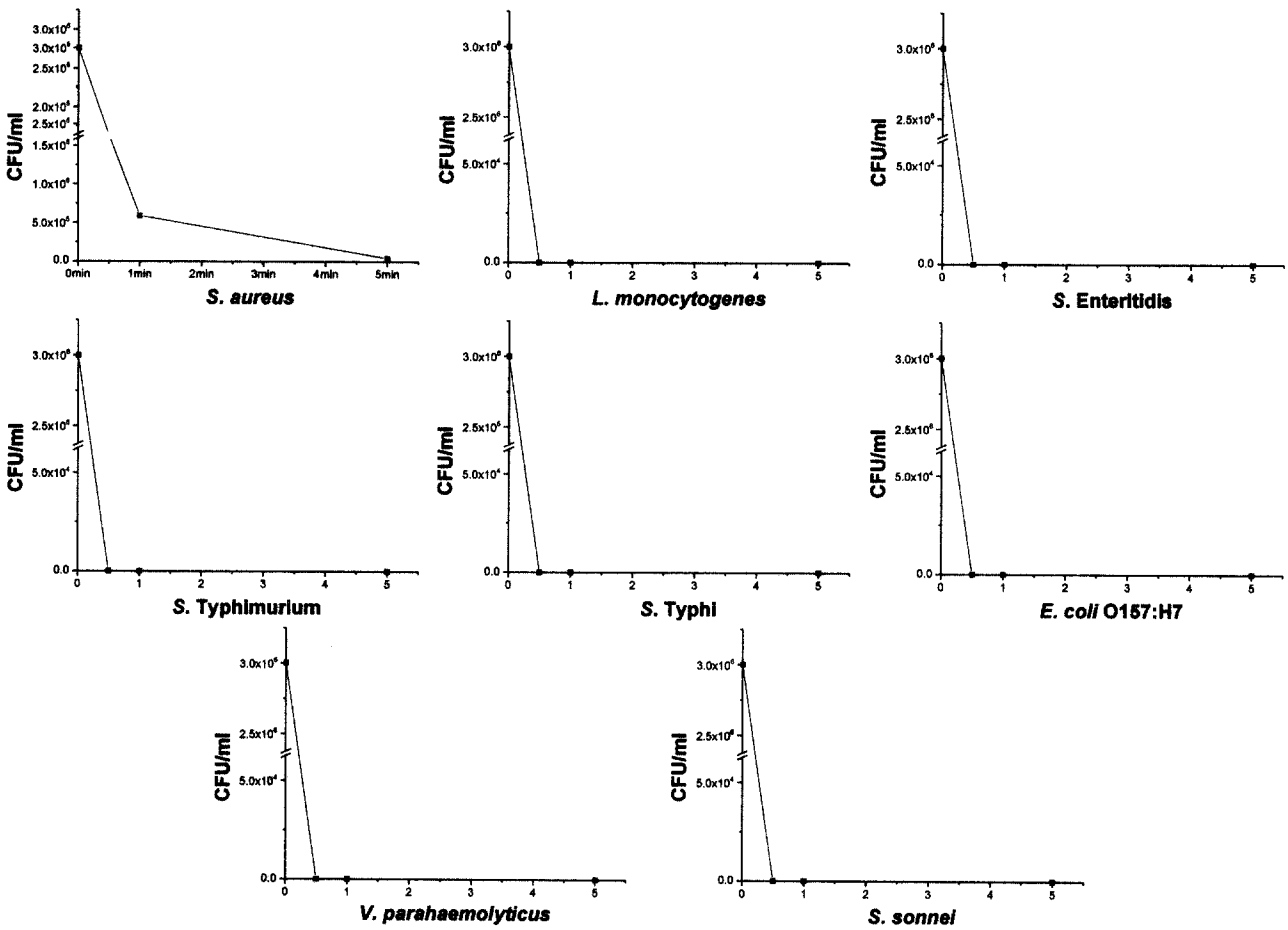

Fig. 1. Antibacterial efficacy of Green-Zone™ on different contact periods.

Table 2. pH of Green-Zone™, citosan diluted solutions

Dilution fold (Chitosan concentration)	Green-Zone™ pH	Concentration	Chitosan pH
1 (3,500 ppm)	4.5	10,000 ppm	7.5
5 (700 ppm)	6.5	5,000 ppm	7.5
10 (350 ppm)	7.0	2500 ppm	7.5

나, 사스의 경우 호흡기 질병을 유발한 변종이다. 이에 본 실험에서는 돼지의 호흡기 질병에 병원체인 TGEV를 이용하여 시험을 수행하였다. 세포 및 바이러스의 살멸 효과에 pH가 관여할 수도 있기 때문에 pH를 측정하여 Table 2에 나타내었다. 모든 경우에 pH가 4 이상으로 나타난 것으로 보아 시험에서 pH가 영향을 주지 않으리라고 사료된다.

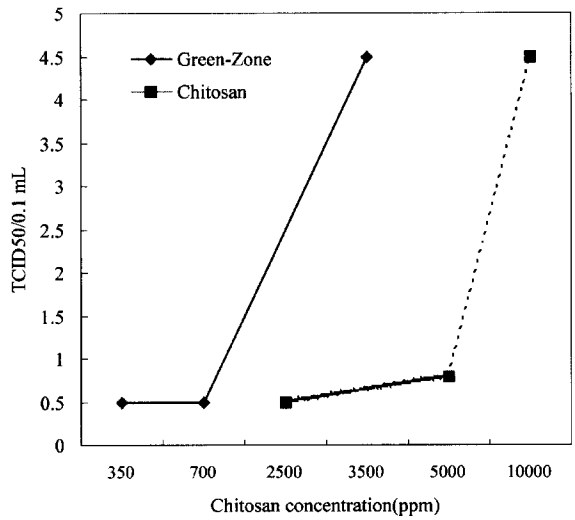

Fig. 2. Antiviral efficacy on Corona virus.

코로나 바이러스에 대한 그린존™과 키토산의 살바이러스 효과를 Fig. 2에 나타내었다. 소독제 시험방법 등에서 바이러스 $TCID_{50}$ 값이 4이상 줄었을 경우 살바이러스 효과가 있다고 관찰되어진다. 그린존™의 경우 5배 희석액에서 살바이러스 효과가 관찰되었고 키토산의 경우는 10,000 ppm에서 살바이러스 효과가 나타났다. 키토산과 그린존™에서 살바이러스 효과가 모두 나타났지만 키토산 단일의 경우 10,000 ppm에서 나타나던 효과가 그린존™의 경우 키토산으로 700 ppm 농도에서 효과가 나타난 것으로 보아 그린존™의 매실농축액, 젖산 등이 키토산과 상호 상승작용을 일으켜 효과를 증대시킨 것으로 볼 수 있다.

사스의 전파는 주로 비말(작은 침방울)을 통해 감염되는 것으로 알려져 있다. 즉 사스 환자가 기침, 재채기, 말할 때 배출되는 호흡기 비말에 의해 전파가 되는 것이다. 이렇듯 대부분의 전염병들의 감염경로는 유기물이나 물 등을 매개로 하기 때문에 유기물이나 경수 조건하에서도 살바이러스 효과를 나타내어야만 한다. 개의 소장염, 구토, 설사 등의 원인체인 개파보바이러스(CPV)와 소화기, 신경계에 침입하여 질병을 일으키는 개디스템퍼바이러스(CDV)를 이용하여 유기물, 경수 조건 등에서 시험을 수행하여 Table 3에 나타내

Table 3. Antiviral efficacy of Green-Zone™ on CPV and CDV

Treatment	CPV(Canine Parvovirus)			CDV(Canine Distempervirus)		
	Green-Zone™	10 dilution	20 dilution	Green-Zone™	10 dilution	20 dilution
Distilled water (DW)	4/4 (+)	4/4 (+)	3/4 (–)	4/4 (+)	4/4 (+)	3/4 (–)
Hard water (HW)	4/4 (+)	4/4 (+)	3/4 (–)	4/4 (+)	4/4 (+)	3/4 (–)
DW+Organic material	4/4 (+)	3/4 (–)	2/4 (–)	4/4 (+)	3/4 (–)	2/4 (–)
HW+Organic material	4/4 (+)	3/4 (–)	2/4 (–)	4/4 (+)	3/4 (–)	2/4 (–)

*No. of effective/No. of sample, (+): Effective, (–): Non-effective.

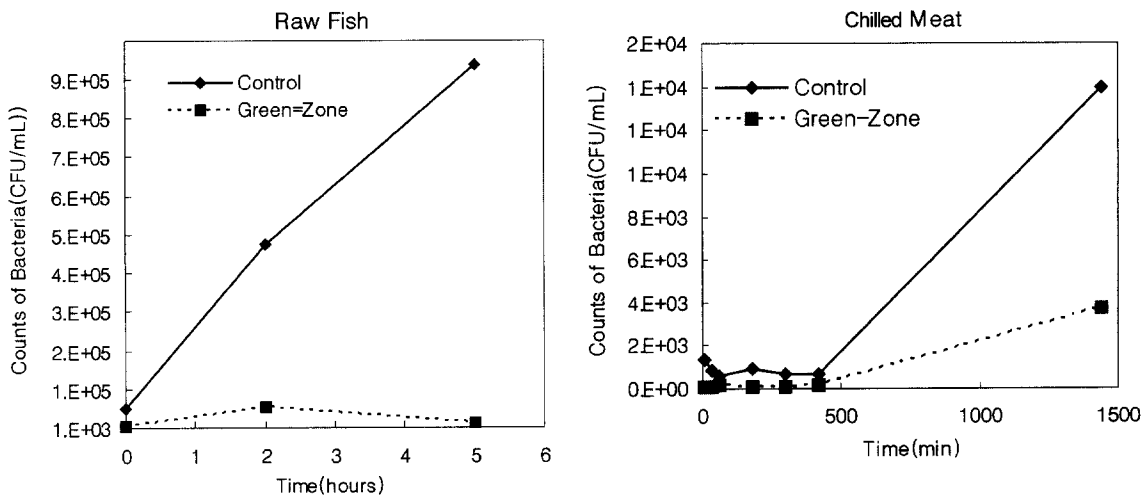

Fig. 3. Inhibition effect of bacteria growth in raw fish and Chilled meat.

었다.

유기물이 존재할 경우 그린존™의 살바이러스 효과가 감소되었다. 이는 유기물이 바이러스를 보호하기 때문으로 사료된다. 원액의 그린존™을 사용할 경우 유기물 조건에서도 바이러스를 살멸하는 효과를 나타내었다. 따라서 그린존™은 전염경로상의 바이러스에도 효과적일 수 있을 것으로 사료된다.

식품 내에서의 미생물 생육 저해 효과

식품을 상온에서 공기 중에 방치할 시 식품을 배지로 이용하여 미생물의 수는 계속적으로 증가하게 된다. 방치되어 있는 식품(회, 고기)에 그린존™을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 미생물의 수가 얼마나 증가하는지를 관찰하여 Fig. 3에 나타내었다.

공기중에 회와 냉장육을 방치해놓은 결과 시간이 경과함에 따라 미생물의 수는 급격하게 증가하였다. 이는 기존 미생물의 수가 늚과 동시에 공기중의 미생물이 계속 음식에 접촉하기 때문이다. 그러나 그린존™을 분무한 경우 미생물의 수의 증가가 둔화됨을 볼 수 있었다. 이는 회와 고기 표면에 있는 미생물을 살균하는 효과와 더불어 계속적으로 접촉하는 미생물로부터 식품의 신선도를 보호할 수 있는 효과를 가지고 있음을 나타내는 것이다. HACCP 등 때문에 회와 고기는 비교적 미생물 오염이 적다. 채소의 경우는 땅에서 직접 경작되기 때문에 유해균 감염의 가능성이 더욱 높다. 그린존™의 채소내 존재하는 미생물의 살균효과를 알아보기 위하여 기존에 식품 신선도 보존제로 사용되고 있는 C 제품과 채소 등의 세척을 목적으로 시판되고 있는 세척제 D 제품을 이용하여 비교 시험을 수행하였다. 물로만 1분 세척한 군을 대조군으로 하고, 물로 5분 세척한 군을 물세척군으로 나누어 시험을 수행하였고, 대장균과 총균수를 관찰하여 Table 4에 나타내었다.

그린존™, 제품 C, 제품 D 모두 총균수와 대장균의 수를 억제하는 효과를 내타내었다. 각 군에서의 세균 저해율은 Fig. 4에 나타내었다.

그린존™의 경우 다른 제품에 비하여 총균과 대장균 모두에서 높은 저해율을 나타내었다. 특히 그린존™의 경우 다른 제품에 비하여 대장균의 저해율이 무척 뛰어남을 알 수 있었다.

결 론

아파트 등의 공동생활 및 학교 급식 등으로 군집 생활을 많이 하는 현대에서는 식중독, 전염병 등이 더욱 큰 문제로 대두되고 있다. 냉장 등의 방법이 발달된 현재지만 식중독은

Table 4. Counts of Microorganism in lettuce

Treatment	Counts of all microorganism	Counts of E. coli
1. Control	2×10^5	2×10^4
2. Water	6×10^4	2×10^4
3. 1/3 Green-Zone	4×10^3	9×10^2
4. 1/15 Green-Zone	1×10^4	8×10^3
5. C	6×10^3	2×10^3
6. 1/5 C	4×10^4	1×10^4
7. D	7×10^3	4×10^3
8. 1/5 D	2×10^4	1×10^4

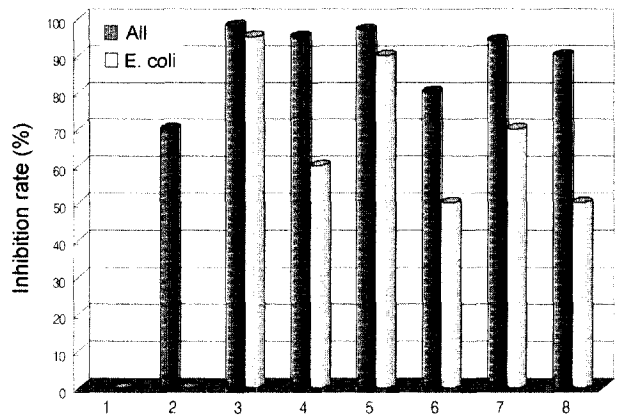

Fig. 4. Inhibition rate of Microorganism growth.

더욱 늘어가고 있으며, 사스 등의 변종 바이러스에 의한 전염병도 계속 증가하고 있다. 새로운 바이러스 및 병원균에 의한 질병들이 급증하면서 질병의 치료보다는 소독 등의 방법에 의한 예방이 더욱 중요하다. 그린존™은 이러한 식중독균, 각종 병인성 바이러스 들에 효과적인 살균 및 살 바이러스 효과를 보일 뿐만 아니라 인체에 무해한 원료로 구성된 안전한 제품이다. 그린존™의 주원료인 키토산은 마우스에 10 g/kg b.w을 투여하여 급성 독성을 관찰한 결과 어떠한 독성도 나타나지 않았으며,[15] 매실은 식품에서 주원료로 사용량의 제한이 없는 식품이다.

현대의 질병들은 수인성 바이러스 들이 점차 인체에 감염되면서 인체의 질병으로 자리잡고 있다. 애볼라 바이러스, 코로나 바이러스 등이 그 예이다. 또한 애완견등의 보급화로 동물과 직접 접촉하는 사람의 수가 증가한 만큼 동물 유래 바이러스에 대한 살바이러스가 중요한 시점이다. 그린존™은 돼지 유래의 바이러스는 물론, 애완견 유래의 홍역(CDV), 파보(CPV)에도 효과적으로 나타났다. 따라서 그린존은 안전하면서 인류의 공중보건 향상을 위하여 충분히 기여할 수 있는 제품으로 사료된다.

국문요약

식중독 원인균인 *S. aureus, E. coli* O157:H7, *S. typhimurium, S. enteritidis, L. monocytogenes,* 장티프스 원인균 *S. typhi,* 패혈증 원인균 *V. parahaemolyticus,* 세균성 이질 원인균 *S. sonnei*를 20℃에서 30분간 그린존™과 접촉시킨 결과 최소 3배 희석액부터 최대 24배 희석액에서 균에 대한 살멸 효과를 나타내었다. 그린존™ 3배 희석액을 이용하여 30초, 1분, 5분간 균과 접촉시킨 결과 *S. aureus*만 제외하고 모두 30초에 100% 살멸하는 효과를 나타내었다. 그린존™을 이용하여 사스의 원인체와 동일한 바이러스인 코로나 바이러스에 대한 살바이러스 효과를 본 결과 제품의 5배 희석액까지 유효한 살바이러스 효과를 보였다. 사람과 접촉이 많은 애완견 바이러스인 파보바이러스(CPV), 디스템퍼바이러스(CDV)에 대하여 시험한 결과 유기물과 경수 등의 악조건에서도 바이러스를 살멸하는 효과를 나타내었다. 그린존™을 이용한 회와 냉장육 등에서의 적용 시험결과 미생물 생육이 현저히 저해됨을 알 수 있었다. 채소내의 미생물에 대한 살멸효과 시험에서도 미생물의 수가 현저하게 감소하였고, 특히 대장균의 수가 현저하게 감소하였다. 그린존™은 세균, 바이러스의 살멸에 탁월한 효과를 보이며, 음식물에 직접 처리할 시에도 그 안전성과 효능이 입증되었다.

참고문헌

1. 한국수의공중보건학회, 수의공중보건학교육협의회 편, 수의공중보건학, 문운당, pp. 1-2 (1996).
2. 이인란, 김경숙: 한국산 Prunus속 종자의 항균성과 청산배당체에 관한 연구, 생약학회지, **19**(2), 120-126 (1988).
3. No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., and Meyers, S.P.: Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, Int. *J. Food Microbiol.*, **74**, 65-72 (2002).
4. Roller, S. and Covil, N.: The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice, Int. *J. Food Microbiol.*, **47**, 67-77 (1999).
5. Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A. and Holley, R.A.: Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan, *Int. J. Food Microbiol,* **62**, 139-148 (2000).
6. kinci, G., Şenel, S., Akincibay, H., Kaş, S. Ericiş, S., Wilson, C.G. and Hincal, A.A.: Effect of chitosan on a periodontal pathogen Porphyromonaqs gingivalis, *Int. J. Pharmaceutics,* **235**, 121-127 (2002).
7. Sakagami, Y.: Inhibitory effect of the extract of *Prumus mume* Sieb. et Zucc. on Vero-toxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Biocontrol. Sci.,* **6**(1), 53-56 (2001).
8. Nose, M.: Ichirou Hirata, Teruyosih Arai, Motohiro Nishijima, Senzou Sakai and Toshio Miyazaki : Antibacterial action of Bainku-Ekisu(Japanese Apricot Fruit Extracts), a traditional drug, on *Vibrio parahaemolyticus* and its organic acid components, *J. the Food Hyg. Soc. of Japan,* **29**(6), 402-407 (1988).
9. 김경숙, 이인환: Prunus속 식물(종자)의 항균력과 활성물질에 관한 연구, 이화여자대학교 석사 논문, (1986).
10. http://dis.mohw.go.kr/sars_index.asp
11. 국립수의과학검역원: 소독제 효력시험 지침. 예규 제30호, (2003).
12. 조성범, 이용욱, 김정현: *E. coli* O157:H7과 *Staphylococcus aureus*의 증식억제에 대한 키토산과 소르빈산의 상승효과에 관한 연구, *J. Fd Hyg. Safety,* **13**(2), 112-120 (1998).
13. Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R. Rhoades, J., Roller, S.: Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria, *Int. J. Food Microbiol,* **71**, 235-244 (2001).
14. 김우호 편저: 동물바이러스학, 강원출판사, pp. 36-37 (1992).
15. Landes, D.R. and Bough, W.A.: Effect of chitin-a coagulating agent for food processing wastes - in the diets of rats on growth and lever and blood composition, *Bull. Environm. Contam. & Toxicol,* **15**, 555-563 (1976).