J. Fd Hyg. Safety 10(1), 33-39(1995)

Grapefruit 종자추출물로부터 광범위 항균제 개발 및 응용에 관한 연구 -Grapefruit 종자추출물의 항균력 검색-

조성환† · 이상열* · 김재원** · 고경혁*** · 서일원****

경상대학교 식품공학과, *생화학과, **미생물학과, ***의과대학 병리학교실, ****(주)아비콘 케미

Development and Application of Natural Antimicrobial Agent Isolated from Grapefruit Seed Extract -Antimicrobial Activities of Grapefruit Seed Extract-

Sung-hwan Cho†, Sang-Yul Lee*, Jae-Won Kim, Gyung-Hyuck Ko*** and Il-Won Seo****

*Department of Food Science and Technology, *Department of Biochemistry, **Department of Microbiology, ***Department of Pathology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Korea and ****ABCON Chemie Co., Ltd., Seoul, 135-010, Korea*

ABSTRACT—The antibacterial and antifungal effect of grapefruit seed extract(GFSE) was investigated for its purpose of application to a diverse spectrum of field as sanitizers, disinfectants and preservatives. GFSE showed comparatively high content of such flavoniods as naringin and hesperidin and ascorbic acid. GFSE containing a low level of organic acids is a heavy viscous and water-soluble liquid. As a result of the antimicrobial test of GFSE, *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae* did not survive at detectable levels when treated with more than 100 ppm of GFSE. The minimum inhibitory concentrations of GFSE for a wide variety of pathogenic and putrefactive bacteria, fungi and yeasts were 100 ppm and 250 ppm, respectively. In the comparable electron micrograph of microbial cells treated with GFSE or not, we could conclude that GFSE destroy microorganisms by disrupting the functions of the cell wall membrane and microbial spores.

Key words □ Antibacterial and antifungal effect, Grapefruit seed extract, Electron micrograph

현재 식품 보존료로서 그 사용이 허용되고 있는 화학물질들은 안식향산나트륨, 아염소산나트륨, 소르빈산, 디케닐, Dehydroacetic acid, 프로피온산나트륨들이다. 이와같은 합성살균제는 독성이 강하여 사용량에 제한이 있고 음료수, 야채, 과일, 농산물기기 등의 소독, 살균에 부분적으로 그 사용이 허가되어 있으나 그 잔류독성이 크게 문제되어 오고 있다. 이와 같은 상황에서 독성이 없으면서 살균력이 있는 항균제의 사용은 필수적인 것이며, 이러한 취지에서 개발과 더불어, 그 적용분야 및 사용방법을 검토하고 있는 천연항균제로는 식물추출물, 특정단백질 및 효소류, 유기산류, bacteriocin 등[1-4]을 들 수 있다. 그러나, 아직까지, 천연항균제로 개발하여 상품화되어 있는 제품은 lysozyme를 비롯하여 일부 식물추출물이 항균제제의 원료성분으로 이용되고 있는 형편이며, 생산체제가 대량화하지 못하고 있는 실정이다. 최근, Grapefruit 종자추출물(Grapefruit seed extract : 자몽종자추출물 : 이하 GFSE라 칭함)에 대한 항균, 항진균 및 항산화 효과가 발표되면서 광범위한 분야에서 적용가능성을 검토해 오고 있다[5-20]. 많은 연구결과를 통하여 GFSE는 광범위한 분야에서 탁월한 효과를 나타내고 있으나, 아직까지 GFSE의 활성물질이

† To whom correspondence should be adressed.

무엇이며, 어떠한 기작에 의해 살균이 되는 지에 관한 기초연구는 거의 이루어져 있지 않다. 천연물에는 우리가 아직 확인하지 못한 여러 성분들이 존재하고, 또한 이미 알고는 있으나, 그 물질의 효용을 제대로 파악치 못하여, 산업화, 실용화가 되지 못하고 있다. 본 연구에서는, GFSE의 보존료로서의 역할과 살균제로서의 탁월한 효능을 분자적인 수준에서 이해하려 함에 그 목표를 둔다. GFSE의 보존료로서의 역활과 살균제로서의 효용은 이미 그 기초적 연구 결과가 있으나, 1) 어떠한 mechanism에 의해서 2) GFSE의 어떤 성분에 의해서 이러한 효능을 보이는 지는 풀어야할 숙제이다. 본 연구에서는 이 두가지 의문점을 해결하기 위해, GFSE의 항균력 검색, 안전성 검사, 활성물질의 분리 및 동정, 미생물생리대사에 미치는 영향 등을 중심으로 세부과제를 정하고, 각 세부과제간의 긴밀한 협조체제를 통하여 GFSE의 항균mechanism을 이해하고자 한다. 이와 같은 실험목적과 연구진행과정의 일환으로 먼저, GFSE의 광범위한 항균력을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

재료 및 방법

Grpefruit 종자추출물의 조제[5,9]

외국산 자몽(grapefruit)을 구입하여 그 과육부를 제거하고 분리한 종자들을 수거하여 물로 세척한 다음, 적외선 장치들이 장치되어 있는 60~70℃의 건조실에서 30~60분 동안 Drum drying을 행하여 건조시킨 자몽의 종자를 5℃ 이하의 온도가 유지되는 저온실에서 특정한 Milling system으로 80~320 mesh 크기로 분쇄하여 건조 분말종자 80%와 추출용매 glycerin 20%의 중량비율로 혼합한 후, 수일간 연속 추출하고, 층분리시켜 자몽추출물(Grapefruit Seed Extract)을 수집한다. 이때 얻어지는 종자추출물은 자외선이 조사되는 무균실에서 특정온도, 압력, 시간 등의 조건하에서 품질관리 방법에 의한 검사를 실시하여 일정한 규격의 제품이 되도록 하여 사용목적에, 알맞도록 2차 증류수로 희석하여 일정한 농도의 GFSE용액을 실험용으로 사용한다.

Grapefruit 종자추출물의 항균력검사용 공시균주

본 실험에 이용한 항균력 검사용 부패성 및 병원성 Gram 양성균 및 Gram 음성균, 곰팡이 및 효모 등의 공시균주는 본 연구자의 실험실에 소장중이거나 국립보건원으로부터 구입한 균주를 이용하였다.

Grapefruit 종자추출물의 항균성 검사

부패성 및 병원성 공시 균주에 대한 GFSE의 항균성은 여러농도의 Grapeftuit 종자추출물용액으로 포화된 paper disk를 Modified Vogel Johnson Agar (MVJA) plate상에 접촉시켜 공시균주의 증식도를 비교하여 생육저해정도를 측정하는 disk method[21]을 이용하였다. 즉, Tryptic Soy Agar(TSA)의 slant media에 배양된 공시균주 1백금이를 취하여 10 ml Tryptic soy broth(TSB)에 접종하고 30℃에서 24시간동안 배양한 후, 일정농도(10^5/ml)로 희석한 공시균주 균용액 0.1 ml를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 5~8 mm인 MVJA plate상에 주입하고 구부린 유리막대로 균일하게 펼친 다음, 멸균된 6 mm filter paper disk (Whatman No.2)를 phosphate buffer(pH 7.0)로 희석시킨 0(대조구), 50 ppm, 100 ppm 및 250 ppm 농도의 grapefruit 종자추출물 용액에 각각 침지·포화시켜 MVJA plate표면에 놓고 30℃에서 48~72시간동안 배양한 후 disk 주위에서의 균의 생육저해도를 비교하여 GFSE의 항균력을 검토하였다. 곰팡이의 경우에는 MJVA plate의 중앙에 균주를 접종하고, 상기한 방법과 동일한 조건에서 배양하여 항균성을 비교하였다.

공시균주의 최소저해 농도측정[11,17]

부패성 및 병원성 공시균주를 Tryptic soy broth (TSB)배지에 접종하고 30℃에서 24시간동안 배양한 후, phosphate buffer(pH 7.0)로 희석하여 접종균주로 배양하였다. 희석된 배양액 0.1 ml를 grapefruit 종자추출물이 0~1,000 μg/ml 농도로 함유되어 있는 TSB배지에 첨가하고, 30℃에서 3일간 배양하였다. 각 시험구의 배양액 1 ml씩을, plate count agar상에 평판도 말하고 30℃에서 3일동안 배양하여 생존균수의 유무를 확인하여, 공시균주의 최소저해 농도를 측정하였다.

GFSE의 살균력에 의한 공시균주세포의 형태적 변화 조사

부패성 및 병원성 미생물에 대한 grapefruit 종자추출물의 항균작용을 조사하기 위하여 다음과 같이, 전자현미경 촬영시료를 조제하여 GFSE 처리전후의 미생물의 세포형태의 변화를 검토하였다. 즉, 본 실험에 사용되는 공시균주를 TSB배지에서 일정시간동안 배양한 다음, 배양균주의 일부를 GFSE용액(100~500 ppm)에 30분간 침지처리하고 원심분리하여 비교

적 순수한 공시균주로 분리한 후, 전보의 방법[22,23]에 준해서 전처리하여 전자현미경 촬영시료를 조제하고 투과전자현미경(Hitachi H-600 Transmission Electon Microscope)으로 검경하였다. 이 때, 50~250 ppm의 농도로 희석한 GFSE용액에 처리한 균체세포를, GFSE용액에 처리하지 않은 대조구 균체세포와 그 형태변화를 비교하여, GFSE용액이 공시균주의 세포 형태 및 생체기능변화에 미치는 영향을 중심으로 그 항균작용을 조사하였다.

결과 및 고찰

Grapefruit 종자추출물의 조제 및 그 물리·화학적 특성분석

외국산 grapefruit의 과육부를 제거하고 분리한 종자들을 수거하여 건조시킨 grapefruit종자를 5℃ 이하의 온도가 유지되는 저온실에서 특정한 Milling system으로 분쇄한 후, 건조 분말종자 80%와 추출용매 glycerin 20%의 중량비율로 혼합하여 수일간 연속 추출하고, 층분리시켜 Grapefruit 종자추출물(GFSE)을 수집하였다. 이와 같이 추출, 조제한 GFSE는 실험 전기간동안 처리조건에 알맞도록 사용하기 위하여 4℃가 유지되는 냉장고에 보관하면서 실험재료로 이용하였다. Grapefruit 종자를 연속추출장치에서 glycerine으로 추출·조제한 grapefruit 종자추출물의 화학성분은 ascorbic acid 7.2%, naringin 2.3%, hesperidine 1.0%, 단백질태질소화합물 2.4%, 지방 0.8%, 무기질 0.7%, 조섬유 0.3%, glycerine 5.0%이며, 이외에도 미량성분으로 β-limonene, citric acid, chlorogenic acid, oxalic acid, p-coumaric acid, malic acid, fumaric acid 등이 검출되었다. 한편, GFSE는 레몬빛 황색의 점도가 높은 액체물질로서 약간 쓴 맛이 나며, 비중이 25℃에서 1.10, 인화점이 142.0℃, 점도가 130 centistoke, surface tension이 38.5 dynes/cm인 산성 pH용액(pH 2.5~3.0)으로 물, 알콜, 유기산 등에 잘 용해되고 580 nm에서 최대흡광도를 나타내었다.

GFSE 활성물질의 항균력검사

GFSE의 항균력을 측정하기 위하여 부패성 또는 병원성 공시균주에 대한 GFSE의 항균력 실험결과는 다음과 같다. 즉, 공시균주인 *Bacillus subtilis*를 MVJA plate상에 접종하여 이 균주에 대한 GFSE의 항균성을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, GFSE 100 ppm 이상의 농도에 침지처리한 paper disk 주위에는 균의

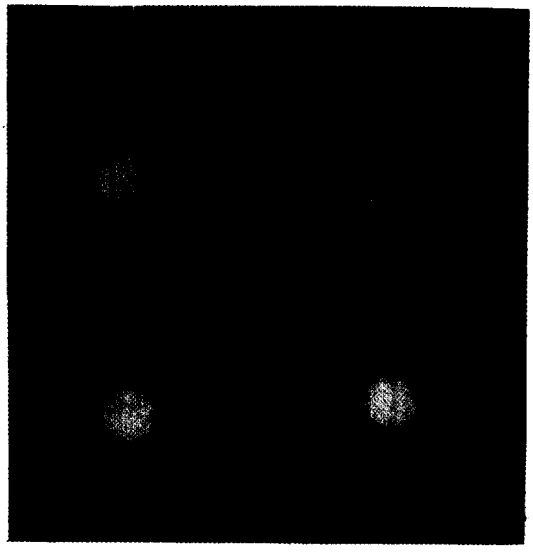

Fig. 1. Inhibitory effect of grapefruit seed extract of mycellial extension of *Bacillus subtilis*.
a: 0 ppm (Control), b: 50 ppm, c: 100 ppm, d: 250 ppm of GFSE.

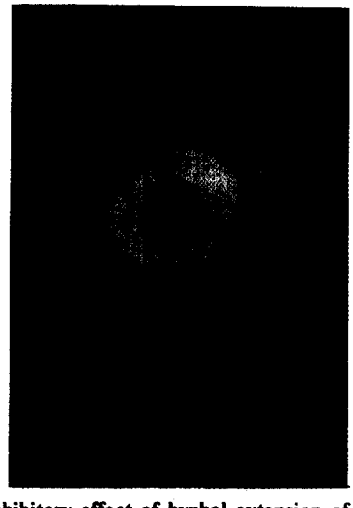

Fig. 2. Inhibitory effect of hyphal extension of *Aspergillus oryzae* by grapefruit seed extract.
a: 0 ppm (Control), b: 50 ppm, c: 100 ppm, d: 250 ppm of GFSE.

증식이 억제되어 clear zone을 형성함으로써 GFSE의 항균력을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 한편, 곰팡이 공시균주인 *Aspergillus oryzae*에 대한 동일한 항균력

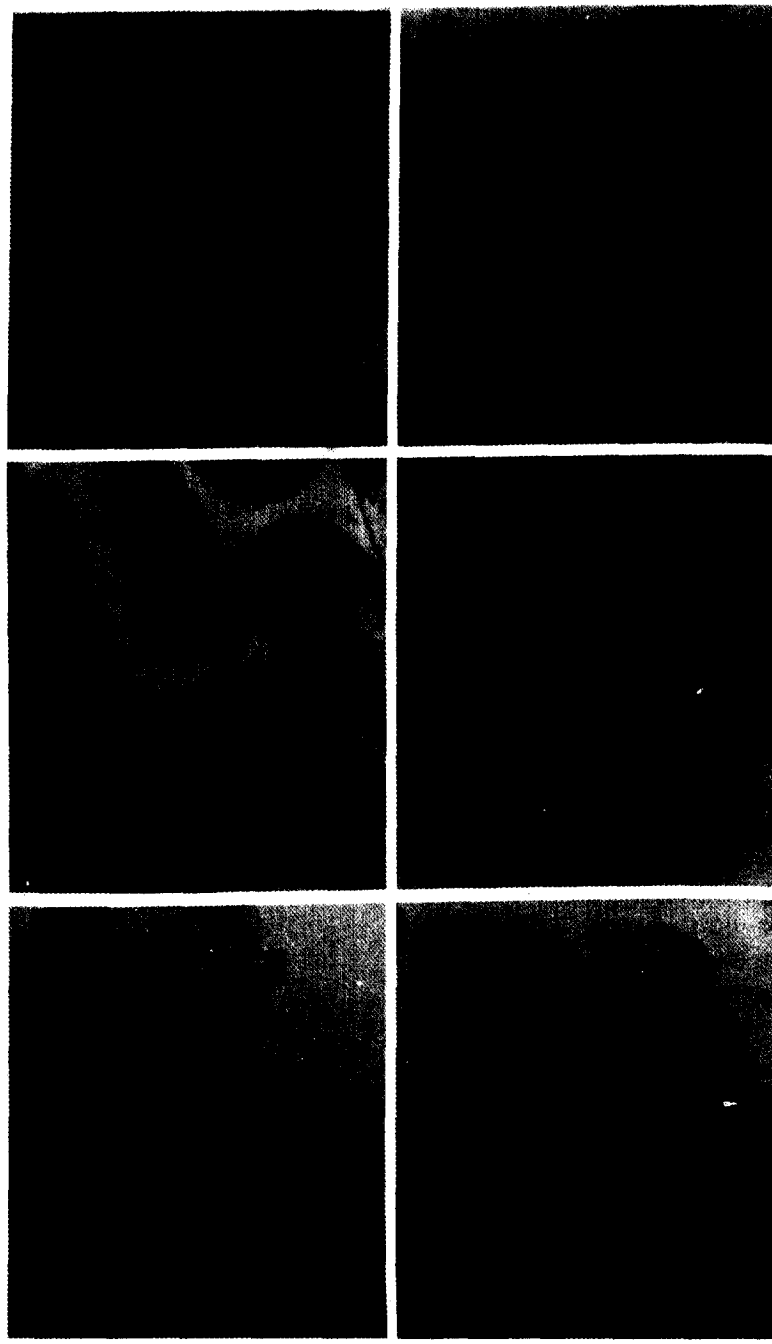

Fig. 3. Transmission electron micrographs of *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Bacillus subtilis* from top to bottom. (Magnification: ×30,000).
A: Control, B: treated with grapefruit seed extract.

Table 1. Minimum inhibitory concentration(M.I.C.) of microorganisms tested for antimicrobial activity of grapefruit seed extract

Tested organisms	M.I.C.(ppm)
Bacteria	
Bacillus subtilis ATCC 6633	50
Salmonella choleraesuis ATCC 6958	25
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	20
Streptococcus faecalis FDA M-19	50
Psedomonas aeruginosa ATCC 10145	500
Proteus vulgaris ATCC 8427	50
Krebsiella pneumonia ATCC 4352	50
Clostidium botulinum ATCC 11772	100
Fungi and Yeasts	
Aspergillus niger ATCC 10145	200
Aspergillus oryzae ATCC 1003	250
Penicillium isalandicum ATCC 26535	250
Penicillium roqueforti USDA 6989	100
Candida albicans ATCC 10231	50
Pullularia pullulans ATCC 9348	25
Trichophyton sp.	10
Fusarium sp.	25

시험결과에서도 Fig. 2에서 보는 바와 같이 GFSE의 농도가 진해질수록 곰팡이의 생육이 뚜렷하게 억제되어 GFSE의 항진균효과를 확인할 수 있었다.

공시균주의 최소저해농도

부패성 및 병원성 공시균주를 GFSE가 일정농도로 함유되어 있는 Tryptic soy broth배지에 접종하고 30℃에서 3일간 배양한 후, 각 시험구의 배양액 1 ml씩을, plate count agar상에 평판도말하고, 30℃에서 3일 동안 배양하여 생존균수의 유무를 확인하여, 공시균주의 최소저해농도를 측정한 결과는 다음 Table 1과 같다.

즉, 대부분의 세균은 100 ppm 이하의 최소저해농도로 생육이 억제되었고 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145만은 MIC가 500 ppm으로 비교적 높은 편이었으며, 곰팡이 및 효모의 경우도 미생물 생육을 저해하는 GFSE의 최소농도가 10~250 ppm으로 나타났다.

전자현미경을 이용한 부패성 및 병원성 공시균주의 세포형태변화

Fig. 4. Mycelial morphology of *Fusarium oxysporum*(A: Control) and *Fusarium oxysporum* treated with grapefruit seed extract(B).
(Magnification: ×40,000).

GFSE의 미생물세포생리특성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 국립보건원으로부터 구입,분양받거나 본 연구자의 실험실에 보관중인 미생물 *Salmonella choleraesuis, Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis* 및 *Fusarium oxysporum* 등을 50 ppm~250 ppm 농도의 GFSE용액으로 처리한 것을 처리하지 않은

대조구 균주와 함께 전자현미경 촬영시료로 조제하여 촬영한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 GFSE를 처리한 균체세포는 세포막의 기능이 파괴되어 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되며, 세포막의 투과기능이 깨어져 속이 빈 ghost 형태의 균체수가 증대함을 알 수 있었다. 또한, *Bacillus subtilis*의 세포내에 형성되어 있는 내생포자도 포자막의 생리기능이 파괴되어, 포자로서의 증식기능마저 상실되어 GFSE의 뚜렷한 항균효과를 보여 주었다. 한편, 곰팡이 *Fusarium oxysporum*의 균사체를 GFSE용액으로 처리한 것과 처리하지 않은 대조구 균주와 함께 전자현미경 촬영시료를 조제하여 촬영한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, GFSE용액을 처리함으로 해서 미생물의 세포내 생리활성효소의 기능이 약화되고, 세포벽 또는 세포막이 파손되어 삼투기능이 상실됨으로 해서 미생물생리가 중단되고 생육이 억제되는 것을 볼 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

국문요약

미생물에 의한 변패가 문제가 되어 그 대책마련이 필요한 분야에 넓게 적용할 목적으로 Grapefruit종자추출물(GFSE)로부터 광범위 천연항균제의 개발을 시도하여 그 항균 및 항진균효과를 검토하였다. 본실험에서 조제한 GFSE는 naringin 및 hesperidin과 같은 flavonoid계통의 화합물과 ascorbic acid를 비교적 높게 함유하고 있었으며, 미량의 유기산이 존재하는 산성의 점질성 물질로 물, 알코올 등 극성용매에 용해성이 큰 것으로 나타났다. GFSE의 항균력 시험결과, 공시균주인 *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae* 모두 100 ppm 이상의 농도에서 GFSE의 뚜렷한 항균효과를 관찰할 수 있었으며, GFSE의 미생물생육억제를 위한 최소저해농도는 세균의 경우, 대부분 100 ppm 이하였으며, 곰팡이 및 효모의 경우, 250 ppm 이하였다. 아울러, GFSE로 처리한 미생물세포의 전자현미경촬영사진을 무처리구와 비교한 결과, GFSE를 처리한 균체세포는 세포막 기능이 파괴되어 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되며, 세포내에 형성되어 있는 내생포자도 포자막의 생리기능이 파괴되어 미생물의 생육 및 증식이 억제됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Beuchat, L.R. and Golden, D.A.: Antimicrobials occuring naturally in foods. *Food Technol,* **43**, 134 (1989).
2. Zaika, L.L.: Spices and herbs; their antimicrobial activity and it's determination. *J. Food Safety,* **9**, 97 (1988).
3. Bailey, A.V., Delucca, A.J. and Moreau, J.P.: Antimicrobial properties of some erucic acid acid derivatives. *J. Am. Oil Soc.,* **66**, 932 (1989).
4. Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R.W. and Hutkins, R.W.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pedioccus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *J. Food Protect.,* **53**, 194 (1990).
5. Harich, J.: To determine the antibacterial properties of Grapefruit seed extract and comparison with benzalkonium chloride and chlorohexidine. Experimental data carried out in Chemie Haus, Inc. (1988).
6. Miele, W.H.: Against *Salmonella typhimuricim, Escherichia coli* and *Staphyloccus aureus.* Microbiogical food anaysis report reviewed and approved by Southern testing and research laboratories, Inc. (Wilson, NC, U.S.A.) (1988).
7. Lee, T.E.: Efficacy report of Grapefruit seed extract against *Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus*

vulgarias, Candida albican. Reports on the effect of Grapefruit seed extract on pathogenic microorganisms encounted by poultry in Malaysia. (1987).
8. Shannon, W.M.: The comparison of the antivial, antibacterial, and antifungal properties of a new disinfectant formulation (IMVSOL: GFSE) with those of a positive control disinfectant (NOLVASAN) in vitro. Report to ImuTech, Inc. Huntingdon. Valley, PA19006, U.S.A. (1984).
9. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생: 자몽종자추출물이 *Penicillium islandicum* 생육 및 독소성분 skyrin 생합성에 미치는 저해효과. 한국농화학회지 **33**(2), 169 (1990).
10. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생: 수산물에 대한 Grapefruit 종자추출물의 항균 및 항산화 효과. 한국수산학회지 **23**(4), 289 (1990).
11. 최종덕, 서일원, 조성환: Grapefruit 종자 추출물의 항균성에 관한 연구. 한국수산학회지 **23**(4), 297 (1990).
12. 조성환, 주인생, 서일원, 김재욱: 어묵에 처리한 Grapefruit 종자추출물의 보장효과. 한국식품위생학회지 **6**(1), 67 (1991).
13. 조성환, 이현철, 서일원, 김재욱, 장영상, 신재익: Grapefruit 종자추출물을 이용한 밀감의 저장효과. 한국식품과학회지 **23**(5), 614 (1991).
14. 조성환, 정덕화, 서일원, 이현숙, 황보혜, 박우포: Grapefruit 종자추출물을 이용한 *Aspergillus parasiticus*의 생육 및 Aflatoxin 생성억제 효과. 한국식품위생학회지 **7**(1), 15 (1992).
15. 조성환, 서일원, 전상수, 라택균, 정수근, 강동훈: 천연항균성 물질을 이용한 *Vibrio vulnificus*의 살균 및 독소생성 억제효과. 한국식품위생학회지 **7**(2), 99 (1992).
16. 조성환, 이상열, 서일원, 이근희: 농축산물 및 그 가공제품의 자연식물성 항균제를 이용한 저장효과. 농업과학논문집(농업산학협동편) **35**, 275 (1993).
17. 조성환, 서일원, 이근희: 천연항균제처리에 의한 과채류의 선도유지 및 병해방지에 관한 연구 -저장중 병리적 장해 방지를 중심으로- 한국농화학회지 **36**(4), 265 (1993).
18. 조성환, 김기옥, 이근희: 천연항균제처리에 의한 과채류의 선도유지 및 병해방지에 관한 연구 -Grapefruit종자추출물로 부터 활성물질의 분리를 중심으로- 한국농산물저장유통학회지 **1**, 1 (1994).
19. 조성환, 정진환, 류충호: 천연항균제처리를 병용한 과채류의 자연저온저장기술개발에 관한 연구. 한국영양식량학회지 **23**(2), 315 (1994).
20. 강동훈, 전상수, 정덕화, 조성환: 남해안연안에 분포되어 있는 *Vibrio parahaemolyticus*의 성상 및 Grapefruit seed extract처리에 의한 항균효과. 한국식품위생학회지 **9**(3), 141 (1994).
21. Davidson, P.M. and Parish, M.E.: Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, **43**, 148 (1989).
22. Pyliotis, N.A., Withecross, M.J. and Jacobsen, J.V.: Localization of gibberlic acid-induced acid phosphorylase activity in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells with the electron microscope. *Planta* **147**, 134 (1979).
23. 이현철: Grapefruit 종자추출물을 이용한 농작물의 저장효과. 경상대학교 대학원 석사학위논문 p. 9 (1992).