KOREAN J. POST-HARVEST SCI. TECHNOL. AGRI. PRODUCTS
Vol. 3. No. 2, pp.187~193(1996)

Grapefruit 종자 추출물의 항균작용 및 미생물 생리기능에 미치는 영향

김 영 록 · 조 성 환
경상대학교 식품공학과

Antimicrobial activities and effect of grapefruit seed extract on the physiological function of microorganism

Young-Rok Kim, Sung-Hwan Cho

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

Abstract

To investigate the antimicrobial activities and effect of grapefruit seed extract(GFSE) on the physiological function of microorganism, antimicrobial activity, fatty acids of bacterial cell lipid and amino acids of bacterial cell protein were measured. The change of cell morphotype was observed by transmission electron microscope.

GFSE was very stable on the wide range temperture and pH. The growth rate of *E. coli* and *B. subtilis* were decreased above 40ppm GFSE. There fore, minimum inhibitory concentration (MIC) of the *E. coli* and *B. subtilis* to GFSE were determined around 40ppm. In the change of fatty acids quantities, hexadecanoate was significantly decreased on the treatment compared with control in case of *E. coli*, whereas tridecanoate was not detected in case of *B. subtilis*. In the change of amino acids quantities, alanine, glutamic acid, glycine, lysine were decreased on the treatment compared with control in case of *E. coli* and *B. subtilis*. Transmission electron microsgraphs(TEM) showed the microbial cells were destroyed by GFSE.

Key words : grapefruit seed extract, antimicrobial activities, fatty acids of bacterial cell lipid, amino acids of bacterial cell protein

서 론

여러가지 미생물의 오염은 농산물 및 그 가공식품의 저장에 있어서의 상품성, 경제성뿐 아니라 안전성과의 밀접한 관련으로 여러가지 살균력을 가진 항균 보존료의 개발이 진행 되어져 왔다. 현재 그 사용이 허용된 항균 보존료로는 안식향산, 소르빈산, 프로피온산 나트륨, Dehydroacetic acid등이 있지만, 독성이 강하여 사용량과 사용 용도에 대해 법적으로 규제되고 있을 뿐 아니라 잔류 독성의 문제까지 야기하고 있다. 따라서 독성이 없으면서 살균력이 있는 항균제의 개

발이 요구되고 있으며, 이러한 취지에서 개발되고 있는 천연 항균제로는 여러가지 식물의 추출물질, 특정 단백질 및 효소, 유기산, bacteriocin등[1-4]을 들수 있겠다. 그러나 천연 항균제로 개발하여 상품화 되어 있는 제품은 lysozyme을 비롯하여 일부 식물 추출물이 항균 제제의 원료 성분으로 이용되고 있는 실정이다. 최근 Grapefruit 종자 추출물 (Grapefruit seed extract:자몽종자추출물 : 이하 GFSE라 칭함)에 대한 항균, 항진균, 항산화 효과가 발표[5-10]되면서 광범위한 분야에서의 적용 가능성이 검토되고 있다. 많은 연구 결과를 통하여 GFSE는 광범위한 분야에서 탁월한 효과를 나타내고 있지만, GFSE에 대한 처리 효과가 부분적인 영역에서 단편적으로 발표되고 있으며 대부분 실제 응용 분야에 있어서의 효과면에 치중한 연구로서 살균 작용으로 인한 미생물의 생리기능에 미치는 영향등에 관한 기초 연구가 부족한 상태이다. 따라서 본 논문에서는 GFSE를 조제한 다음, GFSE 항균 성분의 열 및 pH 안정성을 검토함과 동시에, 공시균주에 대한 생육 저해 곡선 및 최소 저해 농도를 측정[11, 12]하여 GFSE의 항균 효과를 확인하였다. 이와 같은 결과를 토대로 미생물의 세포막 구성 성분인 균체 지질의 지방산 함량 변화 실험[13-16] 및 단백질의 아미노산 함량 변화 실험[17-19]을 통하여 미생물 생합성에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 전자 현미경을 이용하여 공시 균주의 세포 형태 변화[20]를 관찰했다.

재료 및 방법

Grapefruit 종자 추출물의 조제

외국산 자몽을 구입하여 그 과육부를 제거하고 분리한 종자들을 수거하여 물로 세척한 다음, 적외선 장치되어 있는 60~70℃ 의 건조실에서 30~60분 동안 Drum drying을 행하여 건조시킨 자몽의 종자를 5℃ 이하의 온도가 유지되는 저온실에서 특정한 Milling system으로 80~320mesh 크기로 분쇄하여 건조분말종자 80%와 추출용매 glycerin 20%의 중량 비율로 혼합한 후, 수일간 연속 추출 하고 층 분리시켜 자몽 추출물(Grapefruit seed extract 이하 GFSE로 칭함)을 수집하였고, 이때 얻어진 종자 추출 물질을 실험에 알맞도록 증류수로 희석 하여 사용하였다.

GFSE의 열 및 pH의 안정성 시험

GFSE의 열 안정성을 측정하기 위하여 40℃~120℃ 까지 1시간 동안 열 처리한 후, 처리 온도별로 GFSE 1000㎎ 농도가 되게한 paper disk를 *Staphylococcus aureus* 및 *Bacillus cereus*가 도말된 Potato dextrose agar 위에서 35℃ , 24시간 배양시킨 다음 disk주위의 생육 저해환을 측정 비교했다. 또한 pH안정성은 염산이나 수산화 나트륨으로 pH 2~12까지 조정한 후 37℃ 에서 1시간 방치한 다음, 다시 pH 7로 중화시켜 열 안정성과 같은 방법으로 생육 저해환을 측정 비교했다.

공시 균주의 생육 저해 곡선

공시 균주인 *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*에 대한 최소농도의 항균 효과를 알아보기 위하여 공시균주를 각각 TSB에 접종한 뒤 35℃ , 24시간 배양시킨다음 600nm에서 O.D=0.4가 되게 pH 7 인산염 완충액으로 희석시키고, 이 희석액과 0, 10, 20, 40, 60, 80㎎농도의 GFSE 시험 용액 및 TSB를 35℃. 6, 12, 24, 48시간 동안 배양 후 각 시험군 별로 1㎖씩 PCA(Plate count agar)에 도말한 다음 35℃, 24시간 배양한 후에 colony를 count했다.

균체 지질 구성 지방산 함량의 변화

GFSE의 처리로 인한 *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*의 균체 지질의 지방산 함량의 변화를 조사하기 위해 시료의 전처리는 TSA배지 표면에서 배양된 공시 균주를 긁어 현탁 균액을 만들

고, 이를 screw cap 시험관에 옮겨 원심분리(2500rpm. 15분)한 후 균체를 회수한 다음 멸균 증류수로써 세척한 뒤, 처리구에는 100㎎의 농도 GFSE 10㎖를, 대조구에는 인산염 완충액(pH 7.0) 10㎖를 첨가한 다음 35℃, 6시간 방치하였다. 이들 균액을 원심분리(2500rpm. 15분)하여 집균한 균체에 50%메탄올에 녹인 5%수산화 나트륨 4㎖를 첨가하고, 100℃ 에서 30분간 가열한 다음 실온으로 방냉시킨뒤 6N염산으로써 pH 2가 되도록 조절하였다. 이를 Methyl ester화시키기 위하여 10% BF_3 methanol 4㎖첨가하고 85℃ 에서 5분간 가열한 뒤 실온으로 방냉시켜 n-hexane으로 추출한 다음 탈수와 농축을 시킨 다음 이들 시료를 G.C (Hewlett-Packard 5890 Series Ⅱ, USA)로써 Table 1과 같은 조건에서 분석하였다.

Table 1. Operating conditions of Gas Chromatography

Instrument	Hewlett-Packard 5890 SeriesⅡ, USA
Column	SPB-1(30m×0.32㎜ ID)
Oven Temp.	150℃~250℃ (4℃/min)
Detector	FID, 280℃
Carrier gas	N_2

균체 단백질 구성 아미노산 함량의 변화

GFSE의 처리로 인한 *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*의 균체단백질의 아미노산 함량의 변화를 조사하기 위해 시료의 전처리는 집균한 균체를 탈지하고 이를 분해용 시험관에 넣고 6N염산을 20㎖가하고 질소가스로 10분간 충진하여 산소를 제거한 후 밀봉하여 110℃ 에서 22시간동안 가수분해시켰다. 가수 분해물을 여과한 다음 여과액을 vacuum rotary evaporater를 이용하여 50℃ 에서 염산과 물을 완전히 증발시켰고 아미노산 분석기의 시료희석용 완충용액인 구연산 나트륨 완충액(pH2.2)를 이용해서 최종액량이 25㎖되게 희석한 후 membrane filter(pore size 0.45㎛)로써 여과하여 얻은 여액 40㎕를 취하여 분석하였고, 산 분해에 의하여 파괴되기 쉬운 cystine과 methionine은 performic acid 산화법으로 측정하였다. 이들 시료를 분석하기위한 아미노산 자동분석기(LKB-4150, England)의 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Operating conditions of Amino Acid Analyzer

Instrument	Automatic amino acid analyzer (LKB-4150 Alpha, England)
Column	ULTROPAC 11 cation exchange resion (11㎛±2㎛)to height of 220㎜
buffer flow rate	40㎖/hr
Ninhydrin flow rate	25㎖/hr

전자 현미경에 의한 공시 균주의 세포 조직 변화 관찰

GFSE의 처리로 인한 공시 균주의 세포 조직 변화를 알아보기 위해 배양된 *Streptococcus thermophillus*를 적당 농도의 GFSE에서 30분간 침지한 후 원심 분리한 다음 2.5%glutaldehyde 용액(1~4℃ , pH7~7.4)에서 2~4시간 진탕 고정하고, 1~2% osmium tetra oxide 용액(1~4℃, pH7~7.4)에서 30분에 한번 씩 흔들면서 균주를 고정하여 인산염 완충액(pH7.0)로 진탕 수세하여 고정을 마무리한 다음 50%에탄올과 무수 에탄올로 실온에서 20분씩 진탕하여 탈수하였다. 다시 propylene oxide로 30분 간 2회 처리 하여 치환한 후 Epon 화합물 (포매제:Epon812, 강화제: DDSA, MSA, 가속제:DMP-30)과 아세톤과의 혼합비를 3:7, 5:5, 7:3또는 100%Epon화합물로 각각 1시간씩 처리하여 포매 시켰다. 포매된 재료는 37℃ Electron Microscope(EM) oven에서 12시간, 45℃ EM oven에서 12시간, 60℃ EM oven에서 48시간 총 72시간 열중합하고 LKM-V형 ultramicrotome으로 0.5~2.0㎛두께의 semithin section을 제작한 후 toluidine blue로 단염색하고 염색된 세포를 다시 ultrathin section(60~90nm)으로 박절한 다음 광학현미경으로 관찰 대상부위를 확인하였다. 동일한 부위에서 은색절편을 제작하여 copper grid (200 mesh)부착시킨 다음 1

%uranyle acetate와 leadcitrate를 사용하여 double stain으로 염색하고 투과전자현미경(Hitachi-600 Transmission Electron Microscope)으로 검경하였으며, 이때 GFSE 용액에 처리하지 않은 대조구와 그 형태 변화를 비교 하였다.

결 과

GFSE의 열 및 pH의 안정성

GFSE의 열 안정성을 측정하기 위하여 40℃~120℃ 까지 1시간 동안 열 처리한 후, 처리 온도별로 GFSE 1000ppm 농도가 되게한 다음 disk 주위의 생육 저해환을 측정한 결과는 Fig. 1과 같았다. 즉, *Staphylococcus aureus*의 생육 저해환의 지름은 처리 온도와 관계없이 대체로 20mm정도였으며, *Bacillus cereus*의 경우에는 처리 온도와 관계없이 대체로 15mm였다. 또한 pH 안정성을 측정하기 위하여 pH 2~12까지 조정한 후 37℃ 에서 1시간 방치한 다음, 다시 pH 7로 중화시켜 생육 저해환을 측정한 결과는 Fig. 2와 같았다. 즉, *Staphylococcus aureus*의 생육저해환의 지름은 대체로 20mm정도 였으나 알칼리성에서는 조금 작아진 18mm였고, *Bacillus cereus*의 경우 생육 저해환의 지름은 대체로 16mm정도 였으나 알칼리성에서는 조금 작아진 15mm였다. Fig. 1과 Fig. 2의 결과에서 보는 바와 같이 GFSE는 열이나 산에 대해서는 매우 안정하다는 것을 알 수 있었다.

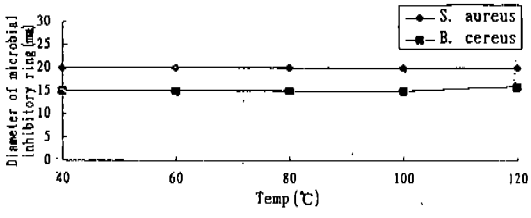

Fig 1. Temperatures stability of GFSE on the growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*

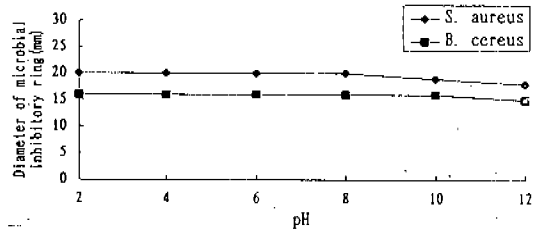

Fig 2. pH stability of GFSE on the growth inhibition of *Staphylococcus* aureus and *Bacillus cereus*

공시 균주의 생육 저해 곡선

공시 균주인 *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*에 대한 최소 농도의 항균 효과를 알아보기 위하여, GFSE 0, 10, 20, 40, 60, 80ppm의 농도로 처리한 시험 용액을 35℃ , 6~48시간 동안 배양 후 각 시험군 별로 1mℓ씩 PCA (Plate count agar)에 도말한 다음 35℃ , 24시간 배양한 후에 colony를 count한 결과는 Fig. 3과 Fig. 4와 같으며, 생육이 현저히 감소되는 최소 저해 농도는 보는 바와 같이 *Escherichia coli*와 *Bacillus subtilis* 모두 40ppm인 것을 알 수 있었다.

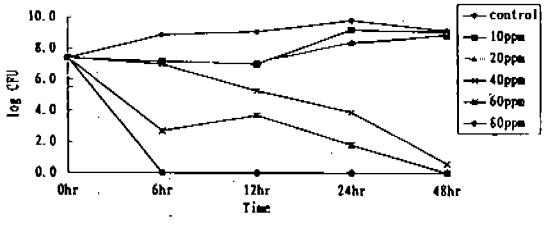

Fig 3. Gorwth curve of *E. coli* on the media of GFSE added to Plate count agar

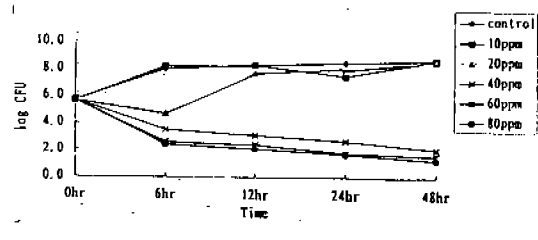

Fig 4. Gorwth curve of *B. subtilis* on the media of GFSE added to Plate count agar

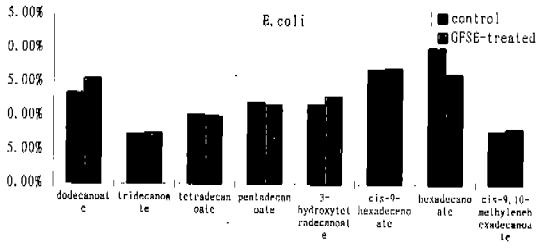

Fig 5. Fatty acids composition of the cells of *E. coli*

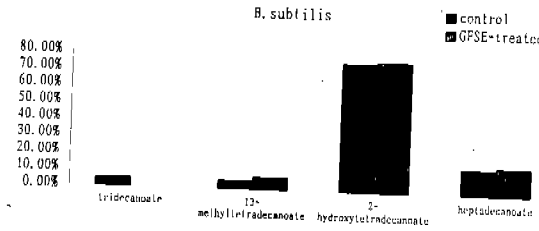

Fig 6. Fatty acids composition of the cells of *B. subtilis*

균체 지질 구성 지방산 함량의 변화

GFSE의 처리로 인한 *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*의 균체 지질의 지방산 함량의 변화를 조사하기 위하여 GC로써 분석한 결과는 Fig. 5,6과 같으며 *E. coli*의 경우에 GFSE 처리 하였을때 hexadecanoate의 함량이 현격하게 감소하였고, *B. subtilis*의 경우는 GFSE 처리 하였을때 tridecanoate가 검출되지 않고 있다.

균체 단백질 구성 아미노산 함량의 변화

GFSE의 처리로 인한 *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*의 균체단백질의 아미노산 함량의 변화를 조사하기 위하여 아미노산 자동분석기로써 분석한 결과는 Fig. 7, 8 과 같으며, *E. coli*의 경우에 GFSE처리 하였을때 alanine, glutamic acid, glycine, lysine의 함량이 감소하였고, *B. subtilus*의 경우에도 GFSE 처리 하였을때 alanine, glutamic acid, glycine, lysine의 함량이 감소되는 것을 볼 수 있다.

전자 현미경에 의한 공시 균주의 세포 조직 변화 관찰

GFSE의 처리로 인한 *Streptococcus thermophillus*의 세포 조직 및 형태적 변화를 알아보기 위한 전자현미경(TEM) 관찰 결과는 Fig. 9와 같으며, 전자현미경 상에서 *Streptococcus thermophilus*의 세포막 기능의 파괴로 인한 세포질 부분의 ghost를 볼수 있다.

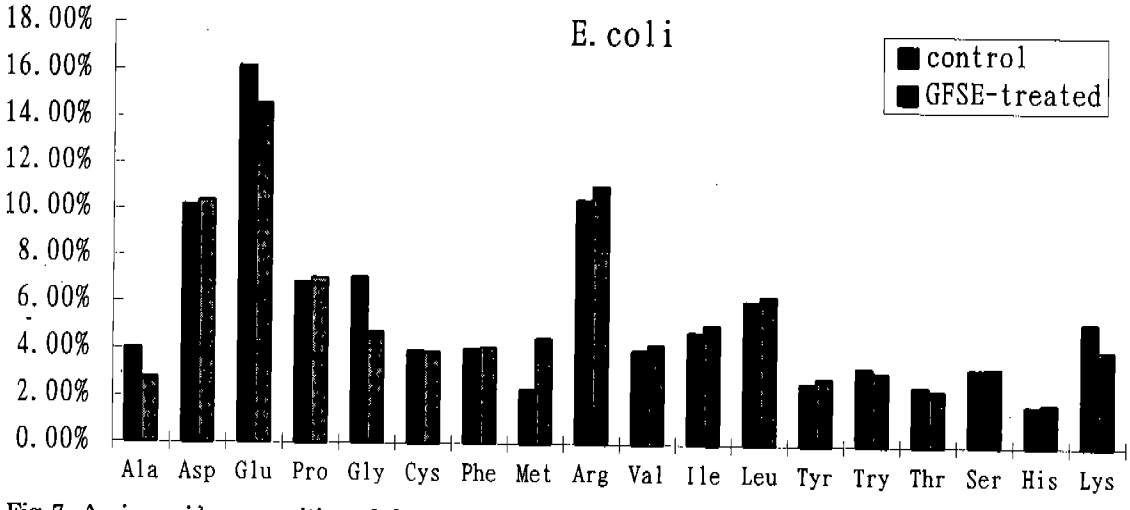

Fig 7. Amino acids composition of the cells of *E. coli*

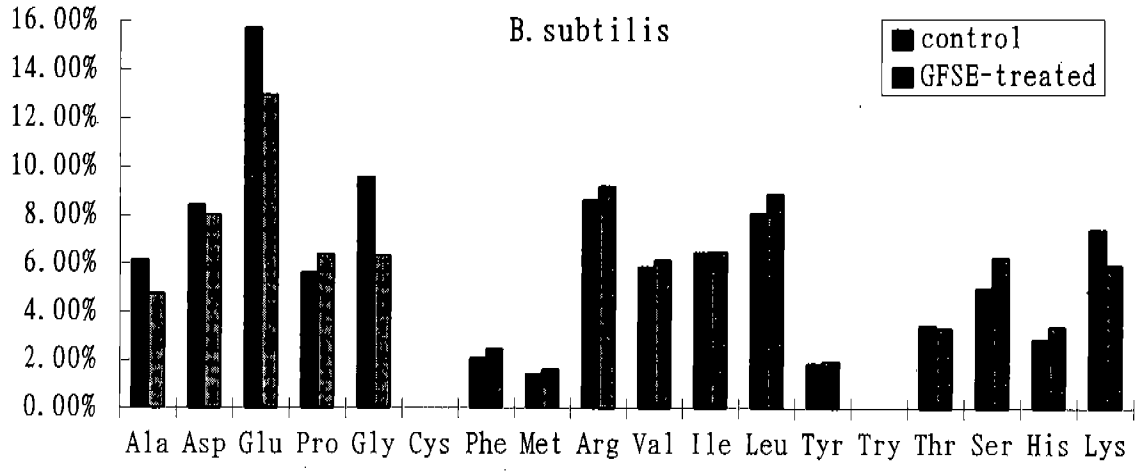

Fig 8. Amino acids composition of the cells of *B. subtilis*

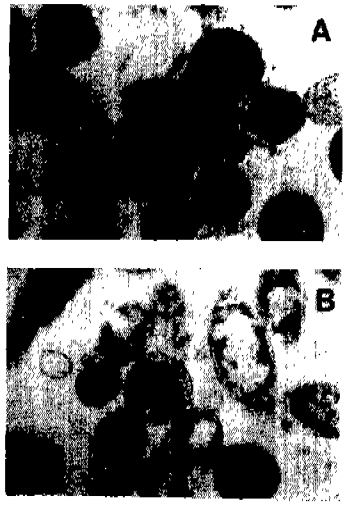

Fig 9. Transmission electron micrographs of Streptococcus thermophillus not treated (A:control) and treated with GFSE (B : 250ppm) (magnification: ×1700)

고 찰

GFSE에 대한 공시 균주의 항균 작용 및 미생물 생리 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여, GFSE의 항균력 검사와 세포막 구성 성분인 균체 지질의 지방산과 균체 단백질의 아미노산 함량 변화의 측정 및 전자 현미경에 의한 공시균주의 세포 조직과 형태 변화등을 살펴 보았었다.

수행된 실험 결과, GFSE는 공시 균주인 *Staphylococcus aureus* 및 *Bacillus cereus*에 대해서 다양한 범위의 온도 및 pH에 대한 안정성을 나타내고 있었으며, 공시 균주 *E. coli*와 *B. subtilis*의 생장율이 GFSE 40ppm이상의 농도에서 급격히 감소되는 것으로 보아 GFSE의 항균성을 확인할 수 있었다. GFSE 처리로 인한 *E. coli*와 *B. subtilis*의 균체 지방산 함량 변화 및 균체 아미노산 함량 변화는 공시 균주인 *E. coli*와 *B. subtilis*의 세포막 구성 성분인 지방과 단백질의 대사에 영향을 미쳐 생장을 억제하는 것으로 추정할 수 있었고, 아울러 GFSE를 처리한 공시 균주 *Streptococcus thermophillus*의 균체 세포를 전자 현미경으로 관찰한 결과 세포막의 기능이 파괴되어 세포 내용물이 외부로 유출되는 등의 형태 변화도 볼 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Beuchat, L. R. and Golden, D. A.(1989) Antimicrobials occuring naturally in foods. Food Technol, 43, 134.
2. Zaika, L. L.(1988) Spices and herbs ; their antimicrobial activity and it_s determination. J. Food safety, 9, 97.

3. Bailey, A. V., Delucca, A. J. and Moreau, J. P.(1989) Antimicrobial properties of some erucic acid and derivatives. J. Am. Oil Soc., 66, 932.
4. Berry, E D., Liewen, M. B., Mandigo, R. W. and Hutkins, R. W.(1990) Inhibition of Listeria moriocytogenes by bacteriocin producing Pedioccus during the manufacture of fermented semidry sausage. J. food Protect, 53, 194.
5. Harich, J. (1988) To determine the antibacterial properties of Grapefruit seed extract and comparison with benzalkonium chloride and chlorohexidine. Experimental data carried out in Chemie Haus, Inc.
6. Miele, W. H.(1988) Against *Salmonella typhimuricim, Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Microbiological food analysis report reviewed and approved by Southern testing and research laboratories, Inc. (Wilson, NC, U.S. A).
7. Lee, T. E.(1987) Efficacy report of Grapefruit seed extract against *Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgarias, Candida albican*. Reports on the effect of Grapefruit seed extract on pathogenic microorganisms encounted by poultry in malaysia.
8. Shannon, W. M.(1984) 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.
9. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생(1990) 수산물에 대한 Grapefruit seed extract 종자추출물의 항균 및 항산화 효과. 한국수산학회지, 23 (4), 289.
10. 이현철(1992) Grapefruit 종자추출물을 이용한 농작물의 저장효과. 경상대학교 대학원 석사학위논문.
11. 조성환, 정진환, 류충호(1994) 천연항균제처리를 병용한 과채류의 자연 저온저장기술 개발에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 23 (2), 316.
12. 최종덕, 서일원, 조성환(1990) Grapefruit 종자추출물의 항균성에 관한 연구. 한국수산학회지, 23 (4), 296.
13. G. L. Jones and G. A. Hebert(1979) "Legionnaires" the disease, the bacterium and methodology. Center for Disease Control, Atalanta, Georgia 30333, 47-54.
14. Moss, C. W., and S. B. Dees.(1975) Identification of microorganisms by gas chromatographic-mass spectrometric analyses of cellular fatty acids. J. Chromatogr. 112, 595-604.
15. Moss, C. W., and S. B. Dees.(1979) Further studies of the cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires' disease bacteria. J. Clin. Microbiol., 9: 648-649.
16. 朴京錫 레지오넬라症 LEGIONELLOSIS, 79-84.
17. George, J. R., L. Pine, M. W. Reeves and W. K. Ilarrell.(1980) Amino acid requirements of Legionella pneumophila. J. Clin. Microbiol. 11, 286-291.
18. Official methods of the association of official analytical chemist. (1980) 13th, Washington, D. .C. Method. 14, 602-607.
19. 이기령, 권태완, 이태령 (1960) 이온교환 크로마토그래피에 의한 두류단백질의 아미노산 조성에 대하여, 과연 휘보, 5, 2.
20. Pyliotis, N. A., Withecross, M. J. and Jacobsen, J. V.(1979) Localization of gibberlic acid-induced acid phosphorylase activity in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells with the electron microscope. Planta, 147, 134.