

Grapefruit 종자추출물을 이용한 밀감의 저장효과

조성환 · 이현철 · 서일원* · 김재욱** · 장영상*** · 신재익***

경상대학교 식품공학과, *(주)아비콘 케미, **서울대학교 식품공학과, ***농심 기술개발연구소

Efficacy of Grapefruit Seed Extract in the Preservation of *Satsuma mandarin*

Sung-Hwan Cho, Hyun-Chul Lee, Il-Won Seo*, Ze-Uook Kim**,
Young-Sang Chang*** and Zae-Ik Shin***

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

*ABCON Chemie Co., Ltd.,

**Department of Food Technology, Seoul National University

***Nong Shim, Research and Development Center

Abstract

To investigate the efficacy of grapefruit seed extract (GFSE) in the preservation of *Satsuma mandarin*, the citrus fruits were treated with 0 (control, only wash), 100 ppm and 250 ppm, dried and stored for 8 weeks at 15~20°C and 60% RH. While 80% of the control fruits were contaminated and decayed by *Penicillium sp.*, forming the the greenish blue spores, 27% of 100 ppm GFSE-treated fruits were contaminated and decayed and only 13% of 250 ppm GFSE-treated fruits were contaminated and decayed and only 13% of 250 ppm GFSE-treated samples were contaminated and not decayed by the fungi. GFSE showed marded inhibitory action against *Penicillium sp.* which was related to the decay of the citrus fruits in vitro experiments. Fungal growth was completely controlled through use of 500 ppm and the recommended range of GFSE to preserve the citrus fruits was 250~500 ppm. Transmission electron microscopic examination showed the fungal conidiospores the function of which was destroyed by dipping into GFSE.

Key words: grapefruit seed extract, inhibitory effect of fungal growth, electron micrograph

서 론

일반적으로 감귤류의 변패는 자체함유 효소나 오염미생물의 작용 또는 이 두 가지 작용으로 일어나며 저장 및 수송과정에서 동결, 탈수, 손상 등을 입은 것은 효소작용과 미생물의 증식을 더욱 촉진한다. 감귤류의 저장중 변패의 원인이 되는 푸른곰팡이병, 녹색곰팡이병 등은 주로 *penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* 등의 곰팡이가 원인균주로 발생하며 과피의 연화 및 파괴현상을 초래하기도 한다¹⁾. 따라서, 감귤류를 안전하게 저장하기 위해서는 온습도관리에 의한 변패곰팡이의 오염 및 성장을 억제함과 동시에, 강력한 살균효과를 보이면서도 독성이 없는 천연항균제의 이용이 필요한 입장이다. 이러한 취지에서 개발과 더불어, 그 작용기작이 검토되고 있는 천연추출물 중의 하나가 Grapefruit 종자추출물(Grapefruit seed extract : 이하 GFSE라 칭

함)이다^{2,3)}. GFSE의 주요성분은 ascorbic acid, palmitic acid, glucose, naringin 및 tocopherol 등이며 추출용매로서 glycerin이 혼합되어 있음이 확인되고 있으며^{2,3)}, GFSE는 매우 점도높은 액체이며, 냄새가 없고, 옅은 오렌지색 물질로서, 함유성분중, ascorbic acid, naringin 등 화합물의 작용으로 Gram 양성균과 Gram 음성균, 곰팡이 등 폭넓은 범위에 신속하고 효과 높은 살균력을 가지고 있으며^{3, 5)}, 인체에 무해하고²⁾ 산패를 방지하는 성질을 소유하고 있다는 실험적 결과³⁾에 기초를 두고 수출용 및 국내시판용 제주도산 밀감의 품질향상을 도모하기 위하여, 밀감의 수확후 저장중, GFSE를 처리한 밀감과과피의 파손 및 조직의 연화정도를 대조구(GFSE 무처리구)와 비교하고, 오염곰팡이를 분리하여 GFSE 처리가 곰팡이생육에 미치는 항균효과 실험을 실시함과 동시에, 투과전자현미경을 이용하여 곰팡이포자의 형태 변화를 조사함으로써 GFSE의 항균작용을 검토하였다.

재료 및 방법

GFSE의 조제

GFSE는 전보³⁾에서 상술한 방법에 준하여 추출·조

Corresponding author: Sung-Hwan Cho, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, 900 Kajwa-dong, Chinju, Gyeongnam 660-701, Korea

제하였다. 즉, 1989년 브라질에서 생산된 grapefruit을 구입하여 그 과육부를 제거하고 분리한 종자들을 수거하여 물로 세척한 다음, 적외선 등이 장치되어 있는 60~70°C의 건조실에서 건조시키고, 5°C 이하의 온도가 유지되는 저온실에서 milling system으로 분쇄하여 건조종자분말을 얻고, glycerine을 용매로 하여 연속추출하여 GFSE를 수집하였다. 이 때 얻어지는 GFSE는 자외선이 조사되는 무균실에서 하룻밤 방치한 후, 4°C로 유지되는 저온실에 보관하면서 사용목적에 알맞도록 2차증류수로 회석하여 얻어진 농도의 GFSE용액을 실험용 시료용액으로 사용하였다.

밀감의 GFSE 처리

제주도 서귀포농장에서 1990년에 수확한 온주밀감 (*Satsuma mandarin*)을 구입하여 수도수로 세척하고 불순물을 제거한 다음, 5~8°C에서 냉장하면서 실험재료로 이용하였다. GFSE를 처리하지 않은 밀감시료를 대조구로 하고, GFSE 100 ppm 및 250 ppm으로 회석·조제된 용액이 담긴 수조내에 밀감을 30분간 침지시켰다가 꺼내어, 표면에 여러군데 구멍이 나 있는 비닐봉지에 각각 담아, 15~20°C, 상대습도 60%인 실내에 보관하면서 외부조직 및 곰팡이 오염정도를 관찰하였다. 이 때, 각 시험구마다 50개의 밀감시료를 무작위로 선별하여 실험에 사용하였다.

항균력 시험

밀감과피에 오염된 곰팡이를 potato dextrose agar 사면배지에 이식시켜 충분히 포자를 형성시킨 후, 생리식염수 10 ml를 사면배지위에 가하여 현탁액으로 만들어 공시균으로 하고 GFSE의 항균력 시험은 GFSE를, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm 및 1,000 ppm의 농도별로 첨가·조제한 potato dextrose agar를 각각 petri dish에 붓고 굳힌 다음, 배지의 중앙부분에 작은 천공을 만들고, 여기에 공시균 1 ml를 접종하여 생육최적 온도인 30°C에서 48시간 동안 배양하고, 형성된 colony의 직경을 측정하여, GFSE를 첨가하지 않은 대조구배지에서 생육한 곰팡이 colony의 직경과의 차를, 대조구에서의 colony 직경에 대한 비율(%)로 환산하여 생육저해율을 산출, 항균력을 비교하였다.

미생물의 형태변화 검사

밀감과피에 오염되어 외피를 균열시키고 내부조직을 연화시키는 변패미생물에 대한 GFSE의 항균기작을 조사하기 위하여, Pyliotis 등⁽⁶⁾의 방법에 준하여 전자현미경적 실험을 실시하였다. 즉, 밀감과피 오염곰팡이를 potato dextrose agar 배지에서 48시간 동안 배양한 다음, 배양균주의 일부를 GFSE 250 ppm 용액에 30분간 침지처리하고 원심분리하여 균체를 분리한 후, 전자현미경 촬영시료를 조제하고, 투과전자현미경(Hitachi H-600 Transmission Electron Microscope)으로 검경하였다. 이

때, 250 ppm의 농도로 회석한 GFSE용액에 처리한 곰팡이 포자를, GFSE 용액에 처리하지 않은 대조구 곰팡이 포자와 그 형태변화를 비교하여, GFSE 용액이 곰팡이 포자구조 및 생체기능변화에 미치는 영향을 중심으로 그 항균효과를 조사하였다.

결과 및 고찰

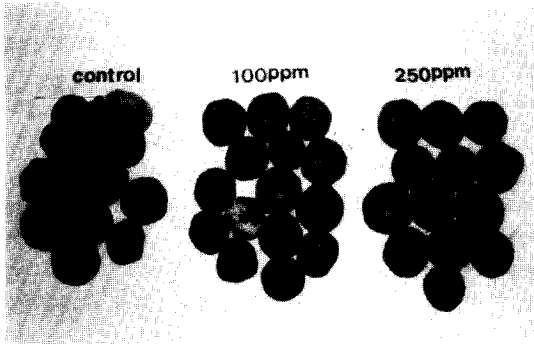
밀감의 GFSE 처리효과

GFSE를 처리하지 않은 밀감시료를 대조구로 하고, 시료밀감을 GFSE 100 ppm 및 250 ppm에서 30분간 침지시켜 15~20°C에서 저장하면서 외관상의 변화를 관찰한 결과, 1주일이 경과하기까지 GFSE 처리시험구의 경우에는 별다른 외관상의 차이를 볼 수 없었으나, 대조구의 경우, 약간의 밀감과피에 곰팡이가 오염되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 외피조직의 연화현상이 발생하기 시작하였으며, Table 1에서 보는 바와 같이 저장기간이 경과할 수록 변패정도가 두드러지게 나타났다. 즉, 2주일 경과 후 대조구의 경우, 대부분의 외피조직이 물러지고 일부의 밀감은 심하게 부패하였으며, 실험시료중 20% 정도가 곰팡이에 오염되어 외피가 균열하기 시작하였다. 이에 반하여 GFSE 100 ppm 및 250 ppm 처리구의 경우, 과피의 연화 및 파손 등 뚜렷한 변패현상을 찾아볼 수 없었다. 4주 결과 후 대조구의 경우, 53%가 부패곰팡이에 의하여 외피가 분해되고 내부의 과육도 연화되었으며 내피도 붕괴되어 삼출액이 많아졌고 나머지 20% 정도도 곰팡이가 오염되어 변패가 시작되는 양상을 나타내었다. 반면, GFSE를 처리한 시험구의 경우, 100 ppm 처리구는 6% 정도만의 시료밀감에 미생물이 오염되었음을 확인할 수 있었으며, 250 ppm 처리구의 경우, 전혀 부패미생물의 오염 및 밀감조직의 결손을 관찰할 수 없었다. 8주 경과 후 대조구의 경우, 80% 정도의 밀감과피가 심하게 푸른곰팡이로 오염되었고 내부과육조직이 연화되었으며 그 중 93% 정도가 폐기되는 현상을 보인 반면, 100 ppm의 GFSE를 처리한 시험구의 경우, 27% 정도 곰팡이가 오염되어 그 중 반수의 밀감이 과피가 분해·파손되었을 뿐이었으며, 250 ppm의 GFSE 처리시험구의 경우, 단지 13%의 밀감과피에서만 오염된 곰팡이를 확인할 수 있었으며, 과육의 조직감이 좋고 과즙의 용출이 거의 일어나지 않아 GFSE 처리에 의한 밀감의 상품적 가치가 크게 감소하지 않음을 알 수 있었다.

15~20°C에서 8주 동안 저장된 대조구와 GFSE처리 밀감의 모습은 Fig. 1과 같다. 즉, 밀감에는 각종 유기산이 함유되어 있어 pH가 낮고 표피가 wax화 되고 있으므로 세균의 침해는 적었으나 곰팡이의 피해는 큰 것으로 나타났다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 현미경 검경 결과, penicillus는 2단 이상 분기하고 좌우대칭적이며, 타원형의 분생자를 소유하고 청록색의 colony를 형성하는 *Penicillium*속이 밀감의 저장초기부터 발생하기 시작하여 과

Table 1. Effect of grapefruit seed extract on fungal contamination and rind breakdown of *Satsuma mandarin* stored at 15~20°C for 8 weeks

Treatments	Fungal contamination (%)				Rind breakdown (%)			
	2	4	6	8(weeks)	2	4	6	8(weeks)
Control	20	53	68	80	7	24	49	74
GFSE(100 ppm)	0	6	15	27	0	2	7	14
GFSE(250 ppm)	0	0	5	13	0	0	1	5

**Fig. 1. Photograph of *Satsuma mandarin* washed only in tap water (control) and steeped in 100 ppm & 250 ppm of grapefruit seed extract, respectively, dried and stored at 15~20°C for 8 weeks**

일 표면에서 회녹색의 웅단모양으로 번져나가 과실의 연화를 촉진하는 원인균주임을 알 수 있었다.

항균력 시험

이들 곰팡이에 대한 GFSE의 항균성을 알아보기 위하여, potato dextrose broth에 GFSE의 농도가 0(대조구), 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm 및 1,000 ppm이 되도록 첨가하고, 밀감 과피에 오염된 *Penicillium*속 곰팡이의 포자현탁액 1 ml를 접종한 후, 30°C에서 48시간 배양하여 형성된 colony의 직경을 측정하여 얻어진 결과는 Table 2와 같다. 즉, 곰팡이의 생육은 GFSE 처리에 의하여 크게 저해되었으며, 대조구에 비하여 GFSE 50 ppm 처리로 40.5%, 100 ppm 처리로 71.8%, 250 ppm 처리로 91.2%의 생육저해효과를 관찰할 수 있었고, 500 ppm 이상의 GFSE 처리농도로 곰팡이의 생육을 완전히 저해할 수 있었다. 이 결과는 skyrin 생합성곰팡이인 *Penicillium islandicum*이 GFSE 500~750 ppm 농도로 균의 생육이 억제되었다는 조⁽⁴⁾ 등의 처리 효과와 비슷한 결과로서, GFSE의 우수한 항진균작용을 나타내 주고 있다. *Penicillium*속에 대한 항균효과 실험으로, Clabe 등⁽⁸⁾은 0.1~0.5% sodium diacetate로 사료에 오염된 *Penicillium expansum*의 생육을 저해하였고, Ahmad⁽⁹⁾은 200 ppm의 butylated hydroxyanisole로 *Penicillium sp.*의 성장을 억제하였으며, Lisker 등⁽¹⁰⁾은 밀감제품의 우수한 항진균제로서 monolaurin 등 medium-

Table 2. Inhibitory effect of grapefruit seed extract on growth^a of *Penicillium sp.* contaminated on *Satsuma mandarin*

GFSE concentration (ppm)	Colony diameter (mm)	% Inhibition ^b
0	22.7	—
50	13.5	40.5
100	6.4	71.8
250	2.0	91.2
500	0	100.0
1,000	0	100.0

^aGrowth condition: at 30°C for 48 hrs

^b% Inhibition =

$$\frac{\text{Diameter of colony grown in the medium without GFSE} - \text{Diameter of colony grown in the medium with GFSE}}{\text{Diameter of colony grown in the medium without GFSE}}$$

Diameter of colony grown in the medium without GFSE

chain의 지방산과 기타 화합물을 병용하여 16종의 곰팡이에 대한 항균효과를 비교·조사한 실험에서 monolaurin, tert-butyl hydro-xyanisole 및 ethylenediaminetetracetic acid의 혼합물이 가장 높은 항균력을 보였으며 특히, *Penicillium digitatum* 및 *Penicillium patulum*에 대하여 이들 혼합물은 sorbic acid 또는 propionic acid에 비하여 항진균작용이 높다고 보고하였다. 또한, Chichester 등⁽¹¹⁾은 *Penicillium digitatum* 및 *Penicillium citrinum*에 대한 benzoic acid의 최소저해농도를 각각, pH 5.0에서 400~500 ppm 및 2,000 ppm이라고 발표하였다. 따라서, *Penicillium*속에 대한 기존의 항곰팡이 작용은 이상에서 서술한 화합물에 비하여 곰팡이 생육에 미치는 최소저해농도로 낮은 편이었으며, 이들 화합물이 모두 화학합성제품이 첨가되었다는 점을 고려할 때, 천연식물성 추출물인 GFSE의 안정성 및 유용성은 높게 평가될 수 있을 것으로 생각된다.

곰팡이 포자의 형태변화

GFSE 처리가 곰팡이 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 투과전자현미경을 이용하여 GFSE(250 ppm) 처리 전후의 곰팡이 포자(conidia)의 세포구조를 비교 검토한 결과는 Fig. 2의 (a) 및 (b)와 같다. 즉, 밀감과피에

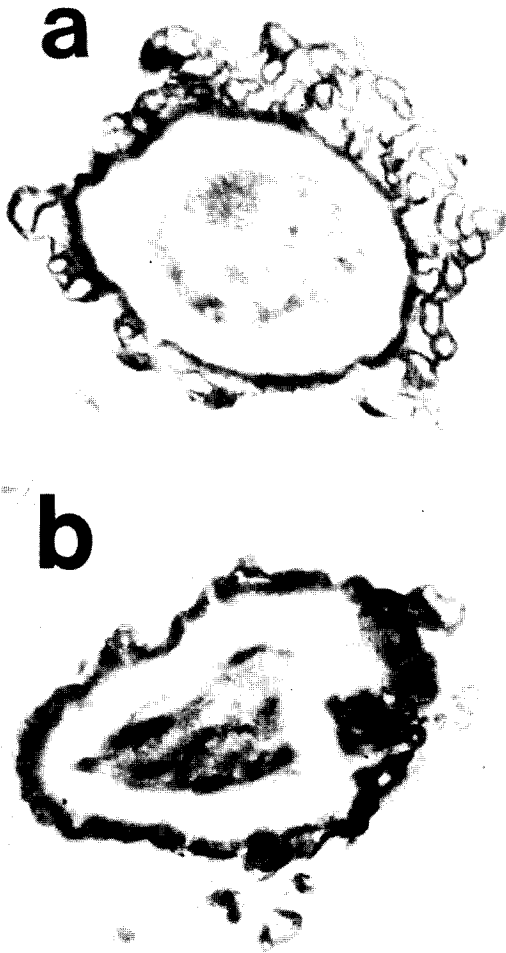


Fig. 2. Transmission electron micrographs of a conidiospore of *Penicillium* sp. contaminated on *Satsuma mandarin* (a) and a conidiospore of *Penicillium* sp. treated with grapefruit seed extract (b) (magnification: $\times 20,000$)

오염되어 과피의 파손 및 과육조직의 연화현상을 일으키는 *Penicillium*속의 생육포자인 conidia 세포구조가 GFSE 처리에 의하여 포자 형태뿐만 아니라, 포자구조 내용물의 유실로 정상적인 발아기능이 어려워지고 생식수단으로서의 포자구실이 파괴되어 곰팡이를 사멸케 하는 결과를 초래하는 것으로 나타났다. 주위에 두꺼운 층으로 형성되어 있던 포자벽이 파괴되어 떨어져 나가고, 포자 내용물도 소멸되어 가고 있는 현상을 보여주고 있었다. 이것은 GFSE가 미생물의 세포내 생리활성효소의 기능을 약화시키고, DNA/RNA 유전정보기작을 방해한다는 연구보고⁽¹²⁾로 미루어, Fig. 2의 결과는 포자의 세포벽 및 세포막의 기능이 상실되어 포자내용물의 소실 등으로

인한 GFSE의 항균작용에 기인하는 것으로 생각된다. 이와 같은 GFSE의 항균기작을 확립하기 위하여서는 먼저, 항균작용에 관여하는 GFSE의 유효활성물질을 규명하고, 이들의 복합적인 작용기작을 조사하는 기초연구가 선행되어야 하며, 처리 전후의 미생물의 세포형태 변화, 생리작용억제기작 등 GFSE의 미생물생육억제작용에 관한 다각적인 실험이 더 많이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

수확한 밀감(*Satsuma mandarin*)을 grapefruit 종자추출물(GFSE)로 처리하여 15~20°C, 상대습도 60% 조건하에서 저장하면서 밀감과과피의 파손 및 연화정도를 대조구(GFSE 무처리구)와 비교하고, 오염곰팡이를 분리하여 GFSE 처리가 곰팡이 생육에 미치는 항균효과 실험을 실시함과 동시에 투과전자현미경을 이용하여 곰팡이 포자의 형태변화를 중심으로 항균효과를 관찰하였다. 저장 8주후, 대조구의 경우, 밀감시료중 80% 정도는 과피가 심하게 곰팡이로 오염되어 파손되었으며 내부과육조직도 연화되어 폐기현상을 보인 반면, 100 ppm의 GFSE 처리시험구의 경우, 밀감시료의 27% 정도 곰팡이가 오염되었고, 그 중 반수정도만 과피가 분해·파손되었으며 250 ppm GFSE 처리시험구는 단지, 13%의 밀감과과피에서만 곰팡이가 오염되었을 뿐 아니라, 박피해낸 과육의 조직감도 우수하였고 과즙액의 용출현상도 보이지 않아 기호도면에서 저장초기의 밀감시료에 뒤떨어지지 않는 것으로 나타났다. 한편, 변태밀감과과피에 오염된 *Penicillium*속 곰팡이를 분리하여 GFSE 처리에 의한 곰팡이 생육저해율을 조사한 결과, 100 ppm 농도에서 71.8%, 250 ppm 농도에서 91.2%, 500 ppm 이상의 농도처리로 100% 저해율을 나타냄으로써, 곰팡이에 의한 밀감변태현상을 방지하기 위한 GFSE의 최소저해농도는 250~500 ppm 정도로 판명되었다. 또한, GFSE 처리 전후의 곰팡이 포자 conidia의 세포구조를 비교·검토한 결과, GFSE 처리에 의하여 포자벽주위의 세포구조가 붕괴되고 포자내용물의 유실현상이 심화되어, 곰팡이의 증식기능이 크게 상실되어 곰팡이를 사멸케 하는 결과를 초래하는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1990~1991년도 재단법인 울촌 장학회 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부로서 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

1. 김찬조, 장지현: 식품미생물학. 수학사. pp.323(1991)
2. Harich, J.: DF-100. U.S. Patent 1, 354, 818(1982)

3. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 수산물에 대한 Grapefruit종자추출물의 항균 및 항산화효과. 한국수산학회지, **23**, 289(1990)
4. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 자몽종자추출물의 *Penicillium islandicum* 생육 및 독소성분 skyrin생합성에 미치는 저해효과. 한국농화학회지, **33**, 169(1990)
5. 최종덕, 서일원, 조성환 : Grapefruit종자추출물의 항균성에 관한 연구. 한국수산학회지, **23**, 297(1990)
6. Pylotis, N.A., Asford, A.E., Whitecross, M.J. and Jacobsen, J.V.: Localization of gibberellic acid-induced acid phosphatase activity in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells with the electron microscope. *Planta*, **147**, 134(1979)
7. Scott, F.M., Bystrom, B.G. and Bowler, F.: *Persea americana*, meso-carp cell structure; light and electron microscope study. *Bot. gaz.*, **124**, 423(1963)
8. Glabe, E.F. and Maryanski, J.K.: Sodium diacetate; An effective mold inhibitor. *Cereal Foods World*, **26**, 285(1981)
9. Ahmad, S. and Brannen, A.L.: Inhibition of mold growth by butylated hydroxy-anisole. *J. Food Sci.*, **46**, 1059(1981)
10. Lisker, N. and Poster, N.: Antifungal activity of Lauricidin and related compounds. *J. Food Safety*, **4**, 27 (1982)
11. Chichester, D.F. and Tanner, F.W.: Antimicrobial food additive. In *Hand-book of Food additives*, 2nd ed., Furia, T.E.(ed.), Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio, p.115(1972)
12. Miele, W.H.: Efficacy of grapefruit seed extract against *Salmonella thphi*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Microbiological food analysis report reviewed and approved by Southern testing and research laboratories, Inc. Wilson, NC, U.S.A.(1988)

(1991년 8월 8일 접수)