

감귤 부패 사상균에 대한 감귤 정유와 시판 합성 농약의 항균 효과

김유경¹ · 고정삼² · 허윤희 · 고영환*

제주대학교 식품공학과, ¹제주도농업기술원 농업환경과, ²제주대학교 원예생명과학부

초 록 : 감귤저장 방법의 개선과 감귤 껍질의 효율적인 활용을 위해서 시판 중인 농약제제와 감귤정유의 감귤 부패 관련 사상균에 대한 살균 작용을 조사하였다. *Alternaria alternata*, *Rhizopus sp.*, *Botrytis cinerea*, *Monilia candida*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* 등 6종의 사상균에 대한 시판 합성 농약제제 11종의 생육저해 효과를 조사한 결과, mancozeb 또는 fluazinam을 함유한 제제의 활성 범위가 가장 넓었고, conazole 계통의 화합물이 중간 정도의 활성 범위를 나타내었으며, iprodione, benomyl, azoxystrobin 또는 thiophanate를 함유한 제제의 항균활성 범위가 가장 좁은 것으로 나타났다. 농약제제의 생육저해 효과는 대상 균주에 따라 달랐으며, *Penicillium italicum*과 *Alternaria alternata*는 각종 살균제의 처리에 대한 생존력이 비교적 강하였다. 감귤 정유를 상기 6개 균주의 포자와 각각 접촉시켰을 때는 그 어느 균주의 생존 포자도 검출되지 않았으며, 감귤정유의 살균력은 paper disk법과 현미경 관찰로도 증명되었다. 이는 감귤정유가 광범위한 살균력을 지니고 있음을 제시한다. 따라서 감귤 정유를 감귤저장에 활용하는 방법을 검토할 필요가 있다. (1999년 9월 4일 접수, 1999년 10월 13일 수리)

서 론

감귤의 저장 중 과일의 부패를 억제하기 위한 방제법이 시급히 요구되어, 감귤의 저장성에 관해 비교적 많은 연구가 진행되었으며,^{1,4)} 과일 자체의 품종 개량을 통한 병충해 저항성 과피를 지닌 품종의 육성,^{5,6)} 부패 곰팡이 생육 억제용으로 미생물 제제⁷⁾ 및 유기합성 화합물의 사용,⁸⁻¹⁰⁾ 저장 전 예비 열처리에 의한 과일조직의 경화¹¹⁻¹³⁾ 등의 방법으로 저장성을 높이려는 연구가 진행되고 있다.

Schiffmann-Nadal 등¹⁴⁾은 생장조절제인 2,4-dichlorophenoxyacetic acid와 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid를 *Aspergillus citri*와 *Penicillium citri*에 의한 감귤 꼭지의 부패방지를 위하여 사용하였다. 천연화합물인 grapefruit seed extracts (GFSE)를 이용한 밀감의 상온저장 효과를 검토한 결과, GFSE 처리구는 대조구에 비해서 부패율이 낮고, 과육의 조직감도 우수하였다는 보고가 있다.^{15,16)} 한편, 감귤 정유의 주요 구성분인 d-limonene이 *Aspergillus parasiticus*의 생장을 억제한다는 보고¹⁷⁾와 감귤 정유가 식물 병원균인 *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium moniliforme*, *Ceratocystis paradoxa* 등에 항균성을 나타낸다는 보고¹⁸⁾가 있었다.

감귤저장을 위해서 재배농가에서는 일반적으로 무분별하게 항균성 농약제제를 사용하고 있어, 농약제제의 부패 방지 효과의 유무와 잔류 독성이 문제점으로 남아있다. 이에 따라, 밀감의 저장전 처리에 필요한 정보를 얻고자 시판 중인 농약제제의 항균 효능을 검토할 필요성이 대두되었다. 또한, 감귤 과피에는 다량의 정유가 함유되어 있어서,¹⁹⁾ 감귤가공 공정 중에 발

생되는 부산물인 과피의 처리와 효율적인 활용을 위하여 감귤 부패와 관련된 사상균에 대한 정유의 살균 작용을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

부패 감귤로부터 분리된 *Alternaria alternata*, *Rhizopus sp.*, *Botrytis cinerea*, *Monilia candida*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* 등 6종의 사상균²⁰⁾을 공시 균주로 사용하였다.

시판 합성 농약제제의 항균력

감귤 재배농가에서 흔히 구입해서 사용하는 살균성 농약제제 10종과 개발 중인 농약 1종에 대해서 항균력을 조사하였다. 이들 합성농약의 유효성분과 그 함량은 다음과 같다. 살균제 A(iprodione, 50%), 살균제 B(fenbuconazole, 3%), 살균제 C(benomyl, 50%), 살균제 D(fenbuconazole과 mancozeb, 66.5%), 살균제 E(tebuconazole, 15%와 tolyfluanid, 50%), 살균제 F(cyproconazole, 4.5%), 살균제 G(azoxystrobin, 10%), 살균제 H(유효성분 미상, 10%), 살균제 I(fluazinam, 50%), 살균제 J(thiophanate, 70%), 살균제 K(mancozeb, 75%). 이들 각각의 약제를 멸균 냉각시킨 potato dextrose agar(PDA, Difco, USA) 배지에 유효성분의 최종농도가 0.2%(w/v)가 되도록 섞어서 사용하였다. 각 균주는 모세관을 이용하여 직경 1 mm 내외의 원반 형태로 고체배지에 접촉한 후 28°C 내외에서 배양하였고, 배양 8일 및 20일 후에 나타난 균총의 직경을 측정하였다.

감귤정유의 분리

온주밀감의 껍질로부터 증류법(Fig. 1 참조)으로 감귤정유를

찾는말 : 살균제, 농약, 감귤정유, 사상균
*연락처

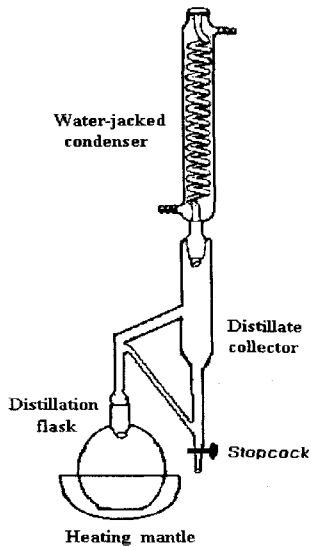


Fig. 1. Distillation apparatus for extraction of citrus oils.

분리하였다. 분리된 감귤정유의 구성분은 주로 d-limonene으로 약 68%를 차지하였다.¹⁹⁾

감귤정유의 항균력

사상균을 PDA 평판배지에서 배양한 후 생성된 포자를 회수

하여 멸균증류수 또는 감귤정유에 현탁시켰다. 일정 시간이 지난 후, 포자 현탁액의 일부를 취하여 PDA 또는 bacto YM Agar(YMA, Difco, USA) 배지에 평판 도말하여 28°C에서 배양하였고, 배양 4일, 8일, 20일 후에 나타나는 균총을 조사하였다. 그와 더불어, PDA 평판배지를 사용하여 paper disk법²¹⁾으로 정유의 항균력을 검정하였다. PDA 배지에 사상균의 포자를 도말한 후, 그 위에 감귤정유를 흡착시킨 paper disk(φ 8 mm, Advantec, Japan)를 올려놓고, 배양 중에 나타나는 생육 저지대를 조사하였다. 필요에 따라서는 광학현미경(Olympus CK2, Japan)으로 포자를 관찰하였다.

결과 및 고찰

Alternaria alternata, *Rhizopus sp.*, *Botrytis cinerea*, *Monilia candida*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* 등 6종의 감귤 부패관련 사상균에 대한 시판 합성 농약제제의 생육저해능을 조사하여 얻어진 결과를 Table 1에 요약하였다. 사용한 균주와 약제에 따라서 독특한 생육저해 양상이 관찰되었다. 각 농약 제품 중에 함유된 계면활성제, 증량제, 용제, 보조제 등이 항균 작용에 미치는 효과를 무시한다면, mancozeb와 fluazinam의 항균 활성 범위가 가장 넓었고, tebuconazole, cyproconazole, fenbuconazole 등 conazole 계통의 화합물이 중간 정도의

Table 1. Inhibitory effects of agrochemicals on growth of molds isolated from putrefied fruits of *Citrus unshiu*

Agrochemicals (effective component) ¹⁾	Incubation time (days)	Molds tested					
		<i>Alternaria alternata</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Monilia candida</i>	<i>Penicillium italicum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
Untreated	8	2.6 ²⁾	4.2	5.0	5.6	2.1	4.5
	20	5.8	>8.5	>8.5	>8.5	4.4	7.8
Fungicide A (iprodione)	8	0.0	0.0	0.4	0.0	0.2	0.4
	20	0.6	0.3	0.5	0.0	0.3	2.1
Fungicide B (fenbuconazole)	8	0.8	0.0	0.0	0.0	0.8	0.3
	20	1.2	0.0	0.2	0.0	1.3	1.1
Fungicide C (benomyl)	8	1.4	0.4	4.3	0.0	1.4	0.4
	20	2.6	2.6	>8.5	0.0	2.9	1.5
Fungicide D (fenbuconazole and mancozeb)	8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fungicide E (tebuconazole and tolylfluanid)	8	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0
	20	0.6	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0
Fungicide F (cyproconazole)	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	0.3	0.3	0.2	0.1	0.5	0.2
Fungicide G (azoxystrobin)	8	1.0	0.6	2.1	2.2	1.4	1.0
	20	2.0	2.1	>8.5	>8.5	2.4	2.8
Fungicide H (unknown)	8	0.0	0.0	0.4	0.0	0.2	0.4
	20	0.6	0.3	0.5	0.0	0.6	1.3
Fungicide I (fluazinam)	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
	20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8
Fungicide J (thiophanate)	8	0.8	2.4	1.9	0.0	1.9	2.8
	20	2.6	4.4	6.0	0.0	3.0	5.8
Fungicide K (mancozeb)	8	0.3	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	20	0.6	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0

¹⁾Agrochemicals were obtained from the market and their trade names were not specified. Each agrochemical was used at a final effective component concentration of 0.2%(w/v).

²⁾Values indicate the mean colony diameter(cm) of 4 replications on agar plates after incubation. The inoculum size of each colony was 1 mm and the plate diameter was 8.5 cm.

Table 2. Fungicidal effects of citrus oils on various molds isolated from putrefied fruit of *Citrus unshiu*

Molds tested	Growth after treatment ¹⁾ with	
	Distilled water	Citrus oils
<i>Alternaria alternata</i>	Lawn of mold	No growth at all
<i>Rhizopus sp.</i>	Lawn of mold	No growth at all
<i>Botrytis cinerea</i>	Lawn of mold	No growth at all
<i>Monilia candida</i>	Lawn of mold	No growth at all
<i>Penicillium italicum</i>	Lawn of mold	No growth at all
<i>Penicillium digitatum</i>	Lawn of mold	No growth at all

¹⁾Spores(1×10^8 /ml) of each mold were suspended in distilled water or in citrus oils for 30 minutes, and then their suspensions were spreaded 100 μ l each on PDA plates.

Table 3. Time-dependent fungicidal effect of citrus oils on spores of *Penicillium italicum*¹⁾

Solvent for suspension	Treatment time(min) ²⁾						
	0	5	10	20	30	40	60
Distilled water	1×10^8	1×10^8	1×10^8	1×10^8	1×10^8	1×10^8	1×10^8
Citrus oils	1×10^8	3×10^5	230	0	0	0	0

¹⁾The numbers indicate the number of spores/ml survived.
²⁾Spores were suspended in distilled water or in citrus oils for the designated time periods, and then their suspensions were spreaded on agar plates after dilution if necessary.

항균 활성 범위를 지녔으며, iprodione, benomyl, azoxystrobin, thiophanate 등의 항균활성 범위가 가장 좁은 것으로 나타났다. 11종의 약제 중 mancozeb 또는 fluazinam 성분을 함유한 살균제 D, 살균제 K 그리고 살균제 I가 비교적 광범위하게 사상균에 대한 항균효과를 보였다. 배양기간이 경과하면서 균총의 크기가 증대되는 경향이 있었다. 약제에 따라서는, cyproconazole을 함유하고 있는 살균제 F인 경우처럼, 8일간 배양에도 생육이 없다가 20일 배양 후에는 생육이 관찰되었는데, 이는 균주의 저항성화 돌연변이 또는 약제의 효능 감소가 원인일 수 있다. 한편, 감귤 부패와 관련된 공시 균주 6종 중에서 *Penicillium italicum*과 *Alternaria alternata*가 각종 약제의 처리에도 살아남는 능력이 다른 균주들 보다 강하였다.

유기합성 살균제인 iprodione, fenbuconazole, benomyl, mancozeb, tebuconazole, tolyfluanid, cyproconazole, azoxystrobin, fluazinam, thiophanate 등은 모두 다 사상균에 대한 살균력이 우수한 것으로 공인 받고 상품화된 물질들이다. 그럼에도 불구하고, 이들 항균물질은 감귤저장 중 부패를 유발하는 사상균들에 대해서 완전한 살균 효과를 나타내지 못하였다. 이는 각종 부패 관련 사상균을 비특이적으로 제어할 수 있는 살균제의 필요성을 제기한다.

부패한 온주 밀감으로부터 분리된 사상균의 포자를 감귤 정유에 현탁시켰을 때의 접촉에 의한 살균효과를 조사한 결과, 감귤정유에 30분간 포자를 현탁시킨 후, 포자현탁액을 PDA 고체배지에 평판도말 배양하였을 때 생존 포자가 전혀 검출되지 않았다(Table 2). 이는 감귤 정유가 이미 보고된 *Aspergillus parasiticus*의 성장 저해능¹⁷⁾과 *Colltotrichum falcatum*, *Fusarium moniliforme* 그리고 *Ceratocystis paradoxa*에 대한 항균

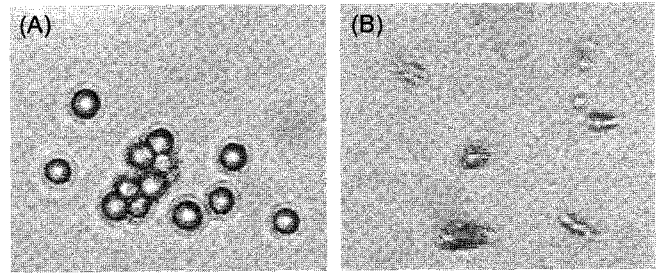


Fig. 2. Effect of citrus oils treatment on spores of *Penicillium italicum*. Spores were suspended in distilled water (A) or citrus oils (B) for 60 min and then observed under microscope with 600 \times magnification.

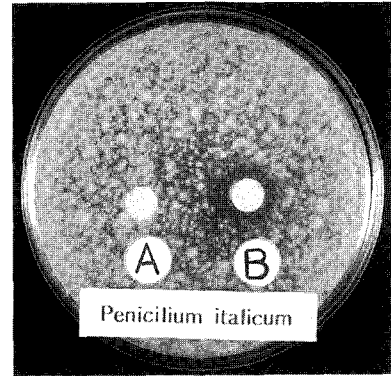


Fig. 3. Growth-inhibitory effects of citrus essential oils on a mold *Penicillium italicum*. Spores were seeded on agar plates by spreading, and then paper disks soaked with distilled water (A) or citrus oils (B) were overlaid prior to incubation.

성¹⁸⁾ 이외에도 공시균주 6개 종에 대해서도 살균력을 지니고 있음을 제시한다. 6개 균주 중에서 유기합성 농약제제의 처리 시 생존력이 비교적 강한 *Penicillium italicum*을 선택하여 그 포자를 감귤정유와 접촉시킨 후 시간의 경과에 따른 생존 포자수를 조사한 결과, 감귤정유와 접촉 20분 이내에 1×10^8 개의 포자가 완전히 사멸되었다(Table 3). 광학현미경으로 생존포자(Fig. 2A)와 사멸된 포자(Fig. 2B)를 비교 관찰하였을 때, 감귤정유에 의해서 포자의 형태가 파괴되고, 색상이 변함을 알 수 있었다. Paper disk법으로 감귤정유의 항균력을 조사하였을 때에도 감귤정유가 존재하는 paper disk의 주위에는 사상균 *Penicillium italicum*이 증식하지 못하는 생육저지대가 나타났다(Fig. 3). 이는 GFSE를 사상균에 처리했을 때와 비슷한 현상이다. 천연화합물인 GFSE를 *Penicillium sp.*에 처리하면 세포벽 및 세포막의 기능이 상실되고, 포자 내용물의 유실로 생식기능이 파괴되어 항균작용이 나타난다고 하였다.^{15,16)}

위와 같이 감귤정유는 주요 감귤부패 원인균인 모든 공시 균주에 대해서 살균효과가 입증되어, 앞으로 감귤저장을 위한 적용 방법, 특히 훈증제로의 이용을 검토할 필요가 있다. 감귤 정유는 물리화학적 특성상 훈증제로의 사용이 가능하다.^{22,23)}

감사의 글

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의해 이

루어진 연구결과의 일부로서, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Park, N. P., Choi, E. H., Byun, K. E. and Back, J. H. (1972) Studies on the storage of citrus fruits; I. Comparison of the storage qualities and freshness of *Citrus unshiu* oranges between the growing districts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **4**, 285-289.
2. Eckert, J. W. (1995) Postharvest disease control; Experience with citrus fruits. *Tree Fruit Postharvest J.* (Washington State Univ.), **6**, 9-12.
3. Iba, Y., Yamada, Y. and Nishiura, M. (1974) Studies on the cold storage of Satsuma mandarin; I. Effect of storage temperature and humidity on the decay of fruits in cold storage. *The Bulletin of the Fruit Tree Research Station*, series B, No.1, 59-84.
4. Koh, J. S., Yang, Y. T., Song, S. C., Kim, S. H. and Kim, J. Y. (1997) Cold storage characteristics of early variety of *Citrus unshiu* produced in Cheju with various treatments. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 117-122.
5. Ju, R., Tian, Y., Shen, Q., Liu, C. and Mang, K. (1994) Cloning of polygalacturonase(PG) cDNA and inhibition effects of its antisense RNA on the expression of PG gene in transgenic tomato plants. *Chin. J. Biotechnol.* **10**, 67-74.
6. Yashioka, H. (1992) Role of pectin and pectin degrading enzymes on the softening of fruits and vegetables. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **39**, 733-737.
7. Janisiewicz, W. J. and Bors, B. (1995) Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3261-3267.
8. Holmes, G. J. and Eckert, J. W. (1995) Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease J.* **79**, 110-126.
9. Lisker, N. and Poster, N. (1982) Antifungal activity of lauricidin and related compounds. *J. Food. Safety* **4**, 27-30.
10. Shirra, M. and Mulas, M. (1995) Influence of postharvest hot-water dip and imazalil-fungicide treatments on cold-stored 'Di Massa' lemons. *Adv. Hort. Sci.* **9**, 43-46.
11. Rodov, V., Nen-Yehoshua, S., Albagli, R. and Fang, D. Q. (1995) Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. *Postharvest Biol. Technol.* **50**, 119-127.
12. Miller, W. R. and McDonald, R. E. (1992) Postharvest quality of early season grapefruit after forced-air vapor heat treatment. *Hortscience* **27**, 422-424.
13. Miller, W. R., McDonald, R. E., Hatton, T. T. and Ismail, M. (1988) Phytotoxicity to grapefruit exposed to hot water immersion treatment. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **101**, 192-195.
14. Schiffmann-Nadal, M., Lattar, F. S. and Waks, J. (1972) The effect of 2,4-D applied in waxes on the preservation of Marsh seedless grapefruit and Valencia orange during prolonged storage. *Hortscience* **7**, 120-121.
15. Cho, S. H., Seo, I. W. and Lee, K. H. (1993) Prevention from microbial post-harvest injury of fruits and vegetables by using grapefruit seed extract, a natural antimicrobial agent. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **36**, 265-270.
16. Cho, S. H., Lee, H. C., Seo, I. W., Kim, Z. U., Chang, Y. S. and Shin, Z. I. (1991) Efficacy of grapefruit seed extract in the preservation of Satsuma mandarin. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**, 614-618.
17. Alderman, G. G. and Marth, E. H. (1976) Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by citrus oils. *Z. Lebensm-Unters-Forsch* **160**, 353-358.
18. Singh, G. (1993) Chemical and fungitoxic investigation on the essential oil of *Citrus sinensis*. *Z. Pflanzenkr Pflanzenschutz* **100**, 69-74.
19. Kim, Y. K., Hyun, S. W. and Ko, Y. H. (1999) Analysis of essential oils from the peel of mandarin(*Citrus unshiu* Marc. Var. Okitsu). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 1178-1183.
20. Ko, Y. H. and Kim, S. J. (1996) Collection and identification of molds from citrus oranges during post-harvest storage. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**, 1142-1145.
21. Jacques, F. and Acar, M. D. (1980) The disk susceptibility test. *In Antibiotics in Laboratory Medicine*, pp. 24-54, Williams and Wilkins, Baltimore/London.
22. Donpedro, K. N. (1996) Fumigant toxicity of citrus peel oils against adult and immature stages of storage insect pests. *Pesticide Sci.* **47**, 213-223.
23. Donpedro, K. N. (1996) Fumigant toxicity is the major route of insecticidal activity of citrus peel essential oils. *Pesticide Sci.* **46**, 71-78.

Growth-inhibitory Effects of Citrus Oils and Synthetic Agricultural Fungicides on Molds Isolated from Putrefied Citrus Fruits

Yu-Kyoung Kim¹, Jeong-Sam Koh², Yoon-Hee Huh and Young Hwan Ko*(*Department of Food Science and Engineering, Cheju National University, Cheju, 690-756, Korea; ¹Agricultural Environment Research Division, Chejudo Agricultural Research and Extension Services, Cheju, 690-170, Korea; ²Faculty of Horticulture and Life Science, Cheju National University, Cheju, 690-756, Korea*)

Abstract : Growth-inhibitory effects of citrus oils and agricultural fungicides, which were on the market, on several molds isolated from putrefied citrus fruits were investigated. When fungicidal activities of 11 kinds of synthetic agrochemicals against 6 species of molds, *Alternaria alternata*, *Rhizopus sp.*, *Botrytis cinerea*, *Monilia candida*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*, were investigated, agrochemicals containing mancozeb or fluazinam as an effective component had the broadest fungicidal spectrum. Agrochemicals containing iprodione, benomyl, azoxystrobin or thiophanate were less effective on the molds and those containing conazole derivative were intermediately effective. Resistance of the molds to the agrochemicals were species- and agrochemical-dependent. Among those molds tested, *Penicillium italicum* and *Alternaria alternata* showed relatively higher level of survival in the presence of synthetic fungicides. On the other hand, when the molds were exposed to citrus oils by direct contact, no cell could survive regardless of the species. The fungicidal activity of citrus oils was also confirmed by paper disk method and microscopic observation. These results suggested that citrus oils had broad killing activity against molds. Therefore, it would be necessary to design method for the application of citrus oils in order to improve post-harvest storage of citrus fruits.

Key words : fungicide, agrochemicals, citrus oils, molds

*Corresponding author