

천연항균균제처리를 병용한 과채류의 자연저온저장기술 개발에 관한 연구 ¹⁾

조성환* · 정진환* · 류충호**

(*경상대학교 식품공학과, **대전전문대 환경관리과)

Inhibitory Effects of Natural Antimicrobial Agent on Postharvest Decay in Fruits and Vegetables under Natural Low Temperatures

Cho, Sung-Hwan* · Chung, Jin-Hwan* · Ryu, Chung-Ho**

*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Korea

**Department of Environmental Management, Taejon Junior College, Taejon, 302-210, Korea

Abstract

In order to prevent the postharvest decay and to promote the freshness retention of fruits and vegetables grapefruit seed extract(GFSE), natural microorganism control agent, was applied to the preservation of fresh fruits and vegetables. Fresh fruits and vegetables treated with GFSE and stored in polyethylene film(0.1mm) at 10°C ~ 15°C of natural low temperature kept better qualities in color and texture than the GFSE-not-treated control. The treatment using GFSE in a 250ppm to 500ppm concentration seemed to be an effective one for the control of *Botrytis cinerea* isolated in red wine grapes. After 4 weeks of storage the firmness rate of cucumbers treated with the dilute GFSE was four times higher than that of non-treated ones. GFSE showed effective inhibitory action towards plant pathological bacteria and fungi which were involved in the decay of fruits and vegetables. Minimum inhibitory concentrations of GFSE towards them were in the range of 250ppm to 500ppm. Direct visualization of microbial cells and spores using electron microscopy showed microbial cells and fungal spores the function of which was destroyed by treating with the dilute solutions of GFSE. It was observed that GFSE would reduce disease damages and have bactericide & fungicide properties during the storage of such fruits and vegetables as egg plant, wild edible greens, kumquat, and kiwifruit.

KEY WORDS : grapefruit seed extract, freshness retention, natural microorganism control agent

I. 서 론

일반적으로 수확후 과채류의 변패는 자체 함유효소나 오염미생물의 작용 또는 이 두가지 작용으로 일어나며 저장

및 수송과정에서 동결, 탈수, 손상등을 입은 것은 더욱 효소 작용과 미생물의 증식을 촉진하여 부패가 심화되고 신선도를 상실하게 된다. 즉, 과채류는 수확후 저장중에 호흡작용, 증산작용등의 생리작용 뿐만아니라 곰팡이를 비롯한 식물 병리미생물의 오염 및 성장으로 부패현상을 일으키고 과채

¹⁾ 이 논문은 한국영양식량학회지 (*J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(2), 428~434(1994)에 게재되었음.

류 자체의 경도가 저하되며, 영양분이 손실되거나, 부패되지는 않는 것이라도 외관, 맛, 신선도등이 떨어져 상품가치를 잃게 된다. 현재까지 많은 비용의 시설비 및 경영비가 소요되는 여러가지의 과채류의 저장시설 및 기술이 개발 이용되고 있으나 현재의 농촌실정으로 미루어, 산지농가에서는 직접적으로 그 이용이 불가능한 처리 기술들이다. 본 연구에서는 과채류의 저장중 선도유지를 도모하기 위한 산지농가에서의 간이처리방법의 일환으로, 과채류의 외피에 오염, 부패를 유발하는 변패미생물의 생육을 억제하고 과채류의 호흡작용을 감소시켜 과채류의 선도유지기간을 연장하기 위하여, 항균력이 뛰어난 천연항균제인 grapefruit 종자추출물 (Grapefruit Seed Extract : 이하 GFSE라 칭함)¹⁻⁴에 침지처리한 과채류를 polyethylene film에 포장하고 반지하식 자연저온 저장고에서 저장하면서 과채류의 외관, 부패율 및 경도를 측정하여 과채류의 신선도를 평가하였다. 한편, 전자현미경을 이용하여 과채류의 변패를 유발하는 오염미생물의 형태학적, 생리학적 변화를 추적하여, 이를 근거로 하여 GFSE에 함유되어 있는 항균물질의 효력을 이해하고, 더 나아가 농산물 보존제로서의 신소재 개발 가능성을 타진하였다.

II. 재료 및 방법

1. Grapefruit종자추출물의 조제

본 실험에 사용한 grapefruit 종자추출물은 전보^{1,2}에 준하여 추출·조제하였다.

2. 저장고의 설치

과채류의 저장을 위한 농가용 반지하식 간이저장고는 전보³와 같이 설치하여, 외기의 온습도변화에 따라 환기함으로써 저장고내의 온도 및 습도가 각각 10℃~15℃, 80%~90%로 유지되도록 하였다.

3. 과채류의 GFSE처리 및 Film포장⁴⁾

경남지역에서 생산되고 있는 가지, 산나물, 오이등의 채소작물과, 금귤, 양다래, 포도, 과수작물을 전보⁴와 같이, 수확 직후, GFSE희석용액속에 100ppm~300ppm 농도수준별로 처리한 후, 서늘한 장소에서 15분정도 방치하였다가, 0.1mm두께의 polyethylene film봉지에 넣고 밀봉한 다음, 일정규격의

plastic상자에 담아 자연저온(10℃~15℃)이 유지되는 반지하식 저장고에 보관하면서 외관, 부패율, 조직의 경도등 품질상태를 비교·검토하였다.

4. 과채류의 경도측정

저장중, 조직감의 변화가 심한 과채류의 하나인 오이를 실험대상으로 선정하여, 경도변화를 관찰하였으며 과채류의 경도는 Instron Universal Test Machine(Model 1000, England)을 사용하여 측정하였고 저장기간별 오이의 경도값은 수확직후의 경도값에 대한 백분율로 나타내었다. 이 때 texturometer의 측정조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Measuring condition of texturometer

Type of texturometer	Instron, Model 1000
Full scale range	50-500kg
Cross head speed	10cm/min
Plunger	∅ 9.5mm
Load transducer	50kg

5. GFSE의 항균력

채소 및 과일류에 오염되어 변패를 일으키는 부패성 또는 병원성 공시균주에 대한 GFSE의 항균성은 Disk method^{5,6}를 사용하였다. 즉, 살균수(대조구), 50ppm, 100ppm 또는 250ppm의 GFSE용액에 침지 포화시킨 paper disk를 TSA(Tryptic Soy Agar) plate상에 접촉시키고 시험균주를 접종하여 미생물의 증식도를 비교하여 생육저해도를 측정하는 방법을 이용하였다. 즉, slant media에 배양된 시험균주 1백균이를 취하여 10ml TSB(Tryptic Soy Broth)에 접종하고 30℃에서 24시간동안 배양한 후, 일정농도(10⁵/ml)로 희석한 시험균주용액 0.1ml를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 5~8mm인 TSA plate상의 중앙에 주입하고 conradi봉으로 균일하게 펼친 다음, 대조구 및 여러농도의 GFSE용액에 각각 침지·포화시킨 6mm filter paper disk(Whatman No.2)를 미생물접종주위에 같은 거리로 위치하게 놓고 30℃에서 48시간동안 배양한 후, disk주위의 균의 증식도를 측정하여 GFSE의 항균력을 검토하였다.

6. 최소저해농도^{7,8)}

과채류변패미생물중에서 본연구자의 실험실이나 식물병리학실에 분리·보관중인 10종의 공시균주를 Tryptic soy-

broth (TSB)배지에 접종하고 30℃에서 24시간동안 배양한 후 phosphate buffer(0.1M, pH 7.0)로 희석하여(10^5 ml) 접종균주로 배양하였다. 희석된 배양액 0.1ml를 grapefruit종자추출물 또는 sodium hypochlorite이 0(대조구), 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,000ppm의 농도로 함유되어 있는 10ml의 TSB배지에 첨가하고, 30℃에서 세균은 2일, 곰팡이는 3일간 각각 배양한 다음, 각 시험구의 배양액 0.1ml씩을, 세균은 nutrient agar, 곰팡이는 potato dextrose agar상에 평판도말하고 30℃에서 세균은 2일, 곰팡이는 3일동안 배양하여 생존균의 유무를 확인하여, 공시균주의 최소저해농도를 측정하였다. 이때, GFSE와 함께, 일반과채류의 살균소독제인 sodium hypochlorite의 처리농도별 미생물의 생육관계를 비교·검토하였다.

7. 전자현미경학적 실험

과채류에 오염되어 외피를 균열시키고 내부조직을 연화시키는 변패미생물에 대한 GFSE의 항균작용을 조사하기 위하여, GFSE용액(세균: 100ppm, 곰팡이: 1,000ppm)으로 처리한 미생물 균체 또는 포자를, 처리하지 않은 대조구 미생물과 함께, 진보⁹⁻¹²와 같은 방법에 준하여 전자현미경촬영시료로

조제하여 현미경적 방법을 이용한다. 투과전자현미경(Hitachi H-600)으로 검경하여 GFSE용액이 미생물 세포구조변화에 미치는 영향을 중심으로 그 항균작용을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 과채류의 선도유지효과

경남지역에서 생산되고 있는 가지, 산나물등의 채소작물과, 금귤, 양다래등의 과수작물등의 과채류를 각각 250 ppm, 100ppm, 300ppm 및 300ppm의 GFSE희석용액속에 침지 처리하고, 이와는 별도로 살균수로 세척처리한 대조구와 함께, 풍건하여 polyethylene film봉지에 넣고 자연저온(10℃~15℃)이 유지되는 반지식 간이저장고에 보관하면서 외관상의 변화등 품질상태를 비교 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, GFSE처리 과채류는 대조구에 비하여 병해발생율을 크게 감소시킬 수 있었으며, 작물의 종류에 따라 다소 차이를 보이고 있으나, 대체적으로 상당기간동안(가지: 35일, 산나물: 50일, 양다래: 30일, 금귤: 25일) 선도를 유지하고 조직감이 뒤떨어지지 않아 상품가치를 부여할 수 있게 하였다.

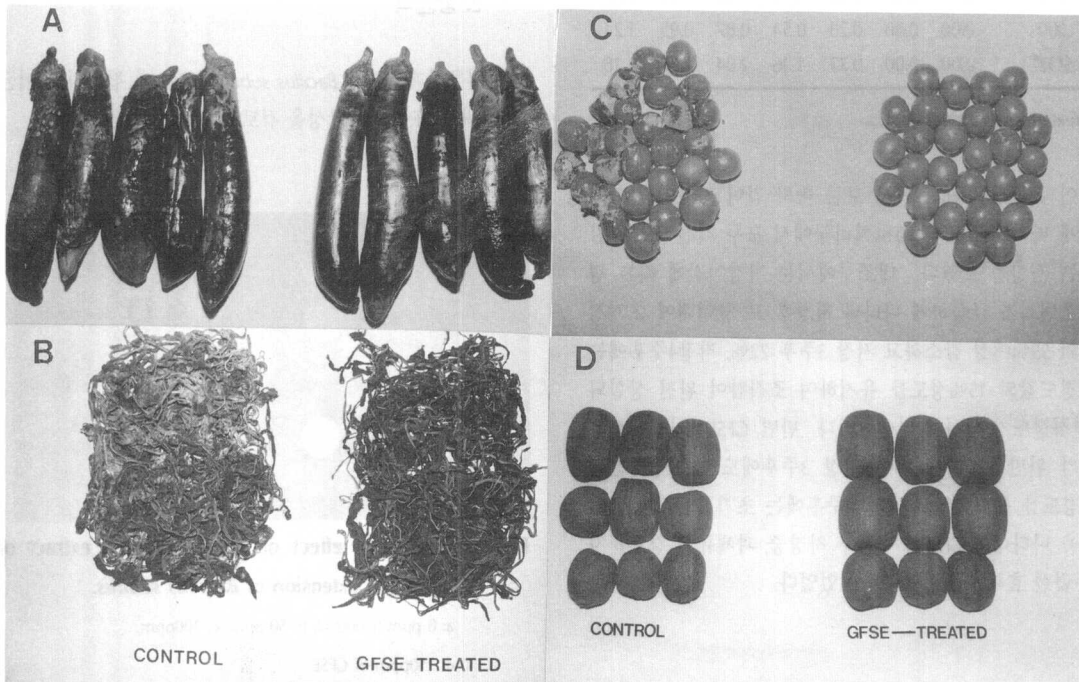


Fig. 1. Photographs of egg plant(A), wild edible greens(B), kumquat(C), and kiwifruit(D) non-treated or treated with 100ppm~300ppm of grapefruit seed extract and stored at 10℃ ~ 15℃.

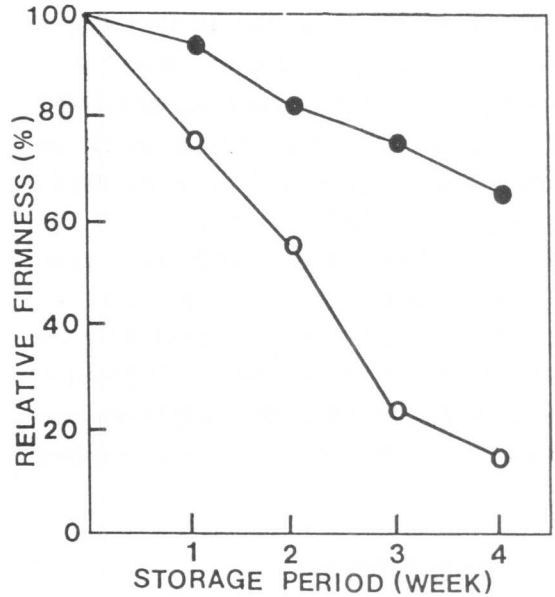
아울러, 적포도주용 포도에 기생하여 병패를 유발하는 *Botrytis cinerea*의 성장억제를 도모하기 위하여 GFSE용액 (100ppm, 250ppm, 500ppm)을 처리한 시험구와 SO₂(500ppm) 처리시험구를 무처리한 대조구 시험 포도를 10℃~15℃로 유지되는 반지하식 저장고에 저장하면서 부패율을 비교·검토하였다. 저장후 6주째 무처리구에서는 7.55%가 *Botrytis cinerea*의 오염에 의해서 부패되었고, GFSE용액을 처리한 시험구의 경우, 100ppm처리구에서 3.71%, 250ppm처리구에서 1.97%, 500ppm처리구에서 1.24%로 부패율이 크게 감소하였으며, 250ppm이상의 GFSE용액처리로 일반적으로 이용되고 있는 SO₂ 살균처리법보다 우수한 부패율 감소 효과를 유도할 수 있었다.

Table 2. Effect of GFSE treatment on the red wine grapes for the control of *Botrytis cinerea*

GFSE Concentration (ppm)	% of grapes damaged by <i>Botrytis cinerea</i> warehousing time in weeks						
	0	1	2	3	4	5	6
0(Control)	0.00	0.73	1.88	2.72	4.15	6.43	7.55
100	0.00	0.00	1.20	1.57	2.69	3.17	3.71
250	0.00	0.00	0.46	0.82	1.12	1.48	1.97
500	0.00	0.00	0.23	0.54	0.87	0.95	1.24
SO ₂ *	0.00	0.00	0.77	1.36	2.04	2.67	3.18

* Treated with 500ppm of SO₂.

오이의 경도는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 저장기간이 경과함에 따라 대조구와 GFSE처리구에서 모두 직선적으로 감소하는 경향을 보였다. 대조구에서는 저장기간에 따른 경도감소변화가 극심하게 나타나 저장후 2주일 이내에 초기경도값의 55%이상 감소하고 저장 3주후 22%, 저장4주후에는 초기경도값의 15%정도를 유지하여 조직감이 완전 상실되고 연화정도가 심하게 진행되었다. 반면, GFSE처리구에서는 경도가 완만하게 저하되어 저장 3주후에도 초기경도값의 75%정도를 유지하였고 저장 4주후에는 초기경도값의 65% 이상을 나타내어 GFSE가 수확후 저장중, 과채류의 경도유지에 뚜렷한 효과가 있음을 알 수 있었다.



○—○: Control, ●—●: GFSE-treated

Fig. 2. Changes in firmness of cucumbers treated with 300ppm of grapefruit seed extract and stored at 10℃~15℃.

2. 항균력

과채류변패균주인 *Bacillus subtilis*를 TSA에 접종하여 이균주에 대한 GFSE의 항균성을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다.

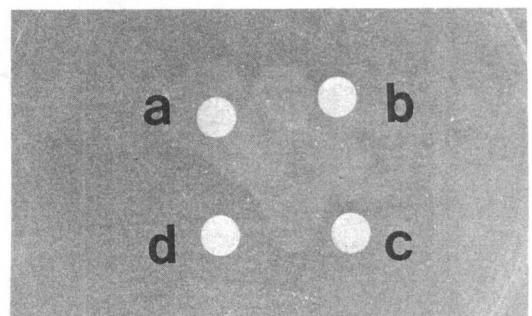


Fig. 3. Inhibitory effect of grapefruit seed extract of mycellial extension of *Bacillus subtilis*.

a: 0 ppm (Control), b: 50 ppm, c: 100ppm, d: 250ppm of GFSE

즉, GFSE 100ppm 이상의 농도에 침지처리한 paper disk주 위에는 균의 증식이 억제되어 clear zone을 형성함으로써 GFSE의 항균력을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다.

3. 공시균주의 최소저해농도

GFSE의 과채류변패균주에 대한 항균성을 토대로,

Table 3과 같은 10종의 공시균주에 대한 최소저해농도를 측정하여, 광범위한 미생물에 대한 GFSE의 항균력을 검토하였다. 이때, GFSE와 함께, 이와는 별도로 일반과채류의 살균소독제인 sodium hypochlorite의 처리농도별 미생물의 생육관계를 비교 검토한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Effects of GFSE and sodium hypochlorite on the growth of bacteria and molds on the nutrient agar and on the potato dextrose agar, respectively

Test organisms	Concentration of GFSE or sodium hypochlorite(ppm)					
	2000	1000	500	250	100	0
<i>Bacillus subtilis</i>	-(*)	-(-)	-(-)	-(-)	-(+)	+(+)
<i>Erwinia aroideae</i>	-(-)	-(-)	-(-)	-(+)	+(+)	+(+)
<i>Escherichia coli</i>	-(-)	-(-)	-(+)	-(+)	+(+)	+(+)
<i>Rhizopus nigricans</i>	-(-)	-(-)	-(-)	-(+)	+(+)	+(+)
<i>Alternaria tenuis</i>	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(+)	+(+)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	-(-)	-(-)	+(-)	+(-)	+(+)	+(+)
<i>Fusarium solani</i>	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)
<i>Penicillium digitatum</i>	-(-)	-(-)	+(-)	+(+)	+(+)	+(+)
<i>Trichoderma viride</i>	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)
<i>Trichothecium roseum</i>	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)

+ : Growth - : No growth

* The inhibitory effect of sodium hypochlorite for bacteria and molds is expressed in the parenthesis.

즉, 상기한 균주에 대한 GFSE의 공시균주에 대한 최소저해농도는 세균 100ppm~250ppm, 곰팡이 250ppm~500ppm으로서 그 항균활성은 sodium hypochlorite에 비하여 뒤떨어지지 않으며, 강력한 항균제로서 광범위한 범위에서 그 사용을 인정할 수 있었다.

4. 전자현미경을 이용한 과채류변패미생물의 형태변화

변패된 과채류에서 분리한 *Bacillus subtilis*에 대하여 100ppm농도의 GFSE용액으로 처리한 것과 처리하지 않은 대조구 균주를 함께, 전자현미경 촬영시료로 조제하고 사진촬영하여 얻어진 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, GFSE를 처리한 *Bacillus subtilis*균체세포는 세포막의 기능이 파괴되어 세포내용물이 균체외부로 유출되어

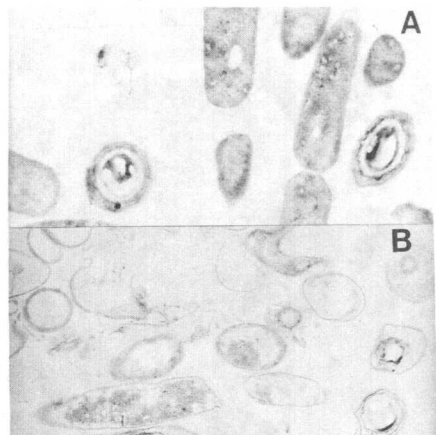


Fig. 4. Transmission electron micrographs of *Bacillus subtilis* contaminated on vegetables (A:Control) and *Bacillus subtilis* treated with grapefruit seed extract(B:100ppm). (Magnification: x 17,000)

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, 과채류에 오염되어 저장 중 과채류의 병해의 요인이 되는 곰팡이 *Fusarium sp.*의 균사체를 GFSE용액(1,000 ppm)으로 처리한 것과 처리하지 않은 대조군 균주와 함께 전자현미경 촬영시료를 조제하여 촬영한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, 세균의 경우, 세포내용물이 균체 밖으로 유출되어 사멸하는 반면, 균사체를 형성하는 곰팡이의 경우, GFSE용액을 처리함으로써 해서 균사체 세포벽이 파손 또는 분열되어 미생물생리가 중단되어 생육이 억제되는 것을 볼 수 있었다. 아울러, 밀감과피에 오염되어 과피의 파손 및 과육조직의 연화현상을 일으키는 *Aspergillus sp.*의 생육포자인 conidia 세포구조가 GFSE처리에 의하여 포자형태 뿐만 아니라 포자 구조 내용물의 유실로 정상적인 발아 기능이 어려워지고 생식수단으로의 포자구실이 파괴되어 떨어져 나가고, 포자내용물도 소멸되어 가고 있는 현상을 보여 주고 있다(Fig. 6). 이것은 GFSE가 미생물의 세포내 생리활성효소의 기능을

약화시키고 DNA/RNA 유전정보 기작을 방해한다는 연구보고¹³⁾로 미루어 세포벽 및 세포막의 기능이 상실되어 포자내용물의 소실 등으로 인한 GFSE의 항균작용에 기인하는 것으로 생각된다.

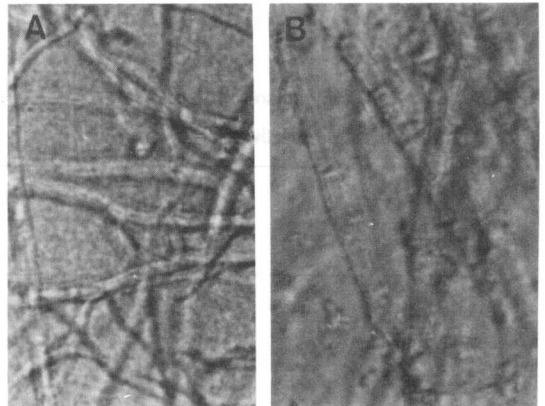


Fig. 5. Mycelial morphology of *Fusarium sp.* contaminated on fruits (A:Control) and *Fusarium sp.* treated with 1,000ppm of grapefruit seed extract(B). (Magnification : x 35,000)

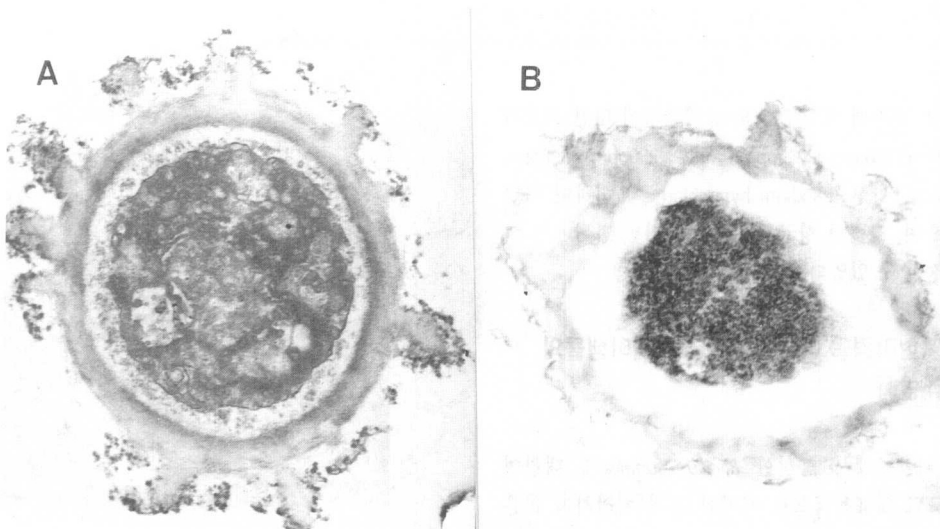


Fig. 6. Transmission electron micrographs of conidiospore of *Aspergillus sp.* contaminated on fruits and vegetables(A) and a conidiospore of *Aspergillus sp.* treated with 1,000ppm of GFSE(B).

(Magnification : x 35,000)

앞에서 언급한 바와 같이 현재까지의 실험결과로, GFSE는 농산물 특히, 과채류의 선도유지 및 병해방지에 탁월한 효능을 소유하고 있었다. 이와 같은 신선도 유지효과 및 항균 능력은 직접적인 GFSE처리 실험결과로 확인될 수 있었으나 그 효능을 나타내는 물질의 분리나 작용기작 등의 지속적인 연구가 진행되어야 할 것이며, GFSE의 방부제로서의 역할과 살균제로서의 탁월한 효능을 분자적인 수준에서 이해하러함에 그 목표를 두어 효능물질의 분리 및 기능을 연구할 필요가 있을 것이다.

적 요

과채류의 신선도 유지 및 병리적 장애를 감소시켜 저장성을 증진시키기 위하여, 천연 식물성 항균제인 grapefruit종자추출물(Grapefruit seed extract : GFSE)로 처리하고 polyethylene film포장하여 과채류의 품질 향상을 유도할 수 있었고 과채류 변패 미생물의 오염 및 생육을 억제할 수 있었다. GFSE는 세균, 곰팡이등 광범위한 범위의 병리미생물에 대하여 250ppm~500ppm의 처리농도로 뚜렷한 항균효과를 나타내었다. 변패된 과채류에서 분리한 *Bacillus subtilis*와 같은 세균균체세포에 대하여 100ppm이상의 GFSE용액처리로 균의 증식이 억제되는 뚜렷한 항균력을 관찰할 수 있었으며, 전자현미경 실험결과, 균체세포 및 내세포자의 세포막기능이 파괴되어 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며, 곰팡이 *Fusarium sp.*의 균사체도 1,000ppm의 용액처리로 세포벽기능이 파괴되었고, *Aspergillus sp.*의 포자 내용물도 GFSE처리로 소실되어 정상적인 발아기능이 저해됨을 알 수 있었다. 한편, 농가에서 수확한 가지, 산나물, 오이, 양다래, 금귤, 포도등을 GFSE용액에 침지처리하고 polyethylene film포장하여 자연저온(10℃~15℃)에서 저장함으로써, 선택 및 조직면에서 우수한 저장효과를 얻을 수 있었고, 포도에 GFSE를 처리한 경우, *Botrytis cinerea*에 의한 부패율을 크게 감소시켰다. 아울러, GFSE처리한 오이의 경도는 저장 4주후에도 초기경도값의 65%이상을 나타내어 대조구의 15%에 비하여 높은 경도를 유지하고 있었다. 실험결과를 고찰하여 볼 때, GFSE를 병용한 과채류의 자연저온방법은 과채류의 선도연장 및 품질보존 효과에 우수함을 알 수 있었다.

인용 문헌

- 1) Harich, J. : DF-100. U. S. A. Patent, 1, 354, 818, FDA No. R-0013982 (1980)
- 2) 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 수산물에 대한 Grapefruit종자추출물의 항균 및 항산화효과. 한국수산학회지, **23**(4), 289(1990)
- 3) 조성환, 이상열, 서일원, 이근희 : 농축산물 및 그 가공제품의 자연식물성 항균제를 이용한 저장효과. 농업논문집(92 농촌진흥청 농업산학협동), **35**, 275(1993)
- 4) 조성환, 서일원, 이근희 : 천연항균제처리에 의한 과채류의 선도유지 및 병해방지에 관한 연구. 한국농화학회지, **36**(4), 265(1993)
- 5) Davidson, P. M. and Parish, M. E. : Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technology, **43**, 148 (1989)
- 6) Beuchat, L. R. and brackett, R. E. : Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **53**, 198(1990)
- 7) 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. A report submitted to ImUTech, inc. Huntingdon Valley, PA 19006, U. S. A. (1984)
- 8) 최종덕, 서일원, 조성환 : Grapefruit종자추출물의 항균성에 관한 연구. 한국수산학회지, **23**(4), 296(1990)
- 9) Pylotis, 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)
- 10) Bodayan, M. : Protein A gold electron microscopic immunochemistry; methods, application and limitations, J. Elect. Microsc. Tech., **1**, 243(1984)
- 11) Altman, L. G., Schneider, B. G. and Papaermaster, D. S. : Rapid embedding of tissues in icryl K4M for immunoelectron microscopy, J. Histochem. Cytochem., **32**(11), 1217(1984)

- 12) 조성환, 정덕화, 서일원, 이현숙, 황보혜, 박우포: Grapefruit종자추출물을 이용한 *Aspergillus parasiticus*의 생육 및 Aflatoxin생성억제효과. 한국식품위생학지, 7(1), 15 (1992)
- 13) Ionescu, G., Kiehl, R., Wichmann-Kunz, F., Williams, Ch., Bauml, L. and Levine, S. : Oral citrus seed extract in atopic eczema ; in vitro and in vivo studies on intestinal microflora. Journal of orthomolecular medicine 5(3),155(1990)