

병원성 세균에 대한 탱자즙의 항균효과

미생물과, 밀양대학교 식품과학과*

차인호 · 김미희 · 박지현 · 박은희 · 민상기 · 이영숙 · 이영근*

Antibacterial Activity of *Poncirus trifoliata* Juice against Pathogenic Bacteria

*Microbiology Division,
Dept. of Food Science, Miryang National University**

In-Ho Cha, Mi-Hee Kim, Jee-Hyeon Park, Eun-Hee Park,
Sang-Kee Min, Young-Sook Lee and Young-Gyun Lee*

Abstract

For development of functional food, antibacterial effect of *Poncirus trifoliata* juice was examined. Strong antibacterial activities of *Poncirus trifoliata* juice were observed against Gram positive and negative pathogenic bacteria such as *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium zerosis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Yersinia enterocolitica*. The minimum inhibitory concentration(MIC) of *Poncirus trifoliata* juice against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii* and *Pseudomonas aeruginosa* were 2.5% and the MIC against *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Yersinia enterocolitica* were 1.25%. Also, antibacterial activities of *Poncirus trifoliata* juice treated for 15 min at 30, 50, 100 and 121°C were confirmed to be stable.

Key Words : *Poncirus trifoliata*, antibacterial activity

서 론

식품으로 인한 위해 중 위생상 가장 문제가 되는 것은 식중독이라 할 수 있으며, 경제성장과 소득수준의 향상으로 식생활 방식이 다양화되고, 집단급식 및 외식이 증가함에 따라 식중독의 발생도 매년 증가추세에 있다. WHO의 보고에 따르면 전 세계적으로 전염병과 기생충 질환이 전체사망의 35%를 차지하고 개발 도상국에서 주로 일어난다고 하였으며, 주요 질병은 설사, 말라리아, 결핵, 홍역 등이었고, 이들 중 설사의 70% 이상은 식중독에 의한 것이라고 보고되고 있다⁷⁾.

최근 식품관련 산업에서는 자연계에 존재하는 다양한 동·식물 유래의 각종 유용성분을 이용하여 식품소재로 활용하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 식품산업의 새로운 연구목표가 되고 있다^{1,2,8,9)}. 따라서 국내의 천연자원 및 부산물로부터 기능성을 갖는 물질을 탐색하여 식품이나 식품부원료로 개발하는 것은 효율적인 자원이용의 측면이나 국민의 보건증진에 기여할 수 있는 측면에서 의미 있는 일이라 할 수 있다.

한편, 탱자는 우리나라 중부 경기도 이남지방의 촌락부근에 흔히 울타리용으로 심고 있는 귀화식물로서 5월경에 꽃이피고 9월경에 열매가 성숙되며, 식용, 관상용, 밀원용, 약용 등으로 이용된다

¹⁴⁾. 약용으로 이용되는 탱자는 6~7월경의 미성숙과를 햇볕에 말려 이용하는 지각과 5~6월경의 미성숙과를 이용하는 지실로 구분된다. 지각과 지실은 주로 정유성분인 α -pinene, β -pinene, myrcene, limonene, capric aldehyde, methyl anthranilate, linalool, γ -terpinene 등과 neohesperidin, naringin, rhoifolin, lonicerin 등의 플라보노이드 배당체 및 vitamin C와 쓴맛 성분인 aurantiummarin, aurantiummaric acid 등을 함유하고 있으며^{12,13,15)}, 탱자의 성숙과는 청결한 향기가 진하여 식품소재개발의 원료로써 이용가치가 높은 재료이다. 그럼에도 불구하고 국내에서 기능성 식품 소재개발에 이용된 연구재료들은 대부분 각종 과실류, 다류제, 한약제 등이며 탱자에 관한 연구는 극히 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 천연물로부터 식중독 원인균등 병원성 세균을 제거할 수 있는 기능성 식품 소재개발을 위한 일련의 연구로써 탱자즙의 항균효과를 검정하여 천연항균제 및 가공식품으로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 이용된 탱자는 완숙한 것을 2001년 10월초에 직접 채취하여 과피부분을 제외한 부분을 손으로 착즙하고

하룻밤 동안 10℃에 정치시킨 다음, 상층의 투명한 원액을 실험재료로 하였다.

2. 사용균주 및 배지

탱자즙의 항균활성을 검정하기 위하여 사용한 균주는 그람음성 세균 8종 및 그

람양성 세균 14종 등 22종의 병원성 세균을 사용하였으며, 각 균주들은 최적배지에서 2회 이상 계대배양하여 활성화시킨 후 사용하였다. 사용한 균주 및 배양 온도는 Table 1과 같으며, 비브리오 속균의 배양을 위한 배지에는 1%의 NaCl

Table 1. Used strains and growth condition

Used strains	Media	Temp. (°C)
Gram Positive		
- <i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	MHA	37
- <i>Bacillus subtilis</i> ATCC17686	MHA	37
- <i>Corynebacterium zerosis</i> ATCC9755	MHA	37
- <i>Listeria monocytogenes</i> (isolates from food)	BAP	30
- <i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	MHA	37
- <i>Rhodococcus equi</i> ATCC6939	MHA	37
- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538P	MHA	37
- <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	MHA	37
Gram Negative		
- <i>Citrobacter freundii</i> ATCC6750	MHA	37
- <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	MHA	37
- <i>Escherichia coli</i> ATCC9637	MHA	37
- <i>Escherichia coli</i> O157 (isolates from patient)	MHA	37
- <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC10031	MHA	37
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	MHA	37
- <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC13076	MHA	37
- <i>Salmonella typhi</i> (isolates from patient)	MHA	37
- <i>Shigella sonnei</i> ATCC9290	MHA	37
- <i>Vibrio alginolyticus</i> (isolates from sea water)	MHAN	37
- <i>Vibrio cholerae</i> (isolates from patient)	MHAN	37
- <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (isolates from patient)	MHAN	37
- <i>Vibrio vulnificus</i> (isolates from patient)	MHAN	37
- <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC29729	MHA	30

MHA : Mueller Hinton agar

BAP : blood agar plate

MHAN : Mueller Hinton agar with 1% NaCl

을 첨가하였다.

3. 세균현탁액의 조제

각 공시균의 최적배지에서 자란 집락 1 백균이를 10ml의 Mueller Hinton broth (Difco)에 접종하고 최적온도에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후, 멸균된 생리식염수로 2.5×10^5 CFU/ml의 농도가 되도록 균수를 조절하여 항균 효과 검증에 이용할 세균현탁액으로 사용하였다.

4. 항균력 측정

탱자즙의 항균력은 Zaika의 방법에 따라 paper disk법¹¹⁾으로 측정하였다. 세균현탁액 100 μ l를 각 배지에 분주하여 유리봉으로 골고루 도말한 다음 세균현탁액이 배지에 스며들도록 실온에 잠시 보관하였다. 탱자즙 50 μ l를 포함한 paper disk를 도말된 배지의 표면에 부착시키고, 각 공시균의 최적온도에서 24시간 배양한 다음, 형성된 억제환의 크기로 항균력 정도를 확인하였다.

5. 병원성 세균에 대한 탱자즙의

최소억제 농도

공시균에 대한 탱자즙의 MIC (minimum inhibitory concentration)를 확인하기 위하여 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% 및 0.313%가 되도록 탱자즙을 첨가한 Mueller Hinton agar

에 조제된 세균현탁액을 Steers 등¹⁰⁾의 방법에 따라 multiple inoculator로 접종한 다음, 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 탱자즙의 MIC는 탱자즙을 포함한 평판배지에서 균이 성장하지 않는 최소 농도로 결정하였다.

6. 탱자즙의 열 안정성

탱자즙 항균성의 열 안정성은 *V. cholerae*를 indicator strain으로 사용하여 실시하였다. 탱자즙을 30°C, 50°C, 100°C 및 121°C에서 각각 15분간 처리하여 paper disk 법으로 항균활성을 측정하는 다음, 열처리하지 않은 탱자즙의 항균활성과 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 탱자즙의 항균 스펙트럼

병원성 세균 22종에 대한 탱자즙의 항균활성을 paper disk 법으로 확인한 결과는 Table 2와 같다. 탱자즙은 공시한 전 균주에 항균활성을 나타내었고, 특히 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium zerosis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi* 등의 그람양성세균 6종, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*

Table 2. Antibacterial activity of *Poncirus trifoliata* juice against pathogenic microorganisms

Strains	Juice of <i>Poncirus trifoliata</i>
Gram Positive	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	14.22 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC17686	13.36
<i>Corynebacterium zerosis</i> ATCC9755	12.04
<i>Listeria monocytogenes</i> (isolates from food)	12.08
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	19.31
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939	20.38
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	+
Gram Negative	
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC6750	+
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC9637	+
<i>Escherichia coli</i> O157 (isolates from patient)	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC10031	10.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	10.48
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC13076	+
<i>Salmonella typhi</i> (isolates from patient)	+
<i>Shigella sonnei</i> ATCC9290	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> (isolates from sea water)	17.04
<i>Vibrio cholerae</i> (isolates from patient)	18.78
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (isolates from patient)	18.92
<i>Vibrio vulnificus</i> (isolates from patient)	19.04
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC29729	15.04

+, weak activity; a, diameter(mm) of clear zone

등의 그람음성세균 7종에 대하여 비교적 높은 항균활성을 보였으며, 이들 균종들에 대하여 모두 뚜렷한 억제환을 나타내었다 (Fig. 1).

탱자는 예로부터 한약재로 빈번히 사용되어져왔으나 대부분 미성숙과인 지실이나 지각의 형태로 사용되어져 성숙과의 효능에 대해서는 언급된 부분이 미미한 실정이다. 지실이나 지각은 자궁에 대하여 수축력과 긴장력을 증가시키는 효능, 위장의 운동을 규칙적이고 강하게 하는 효능 및 안전범위가 넓고, 독성이 없는 혈압상승효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 또한 위통, 위하수, 자궁하수, 유방결핵, 수종, 식체, 변비 등의 치료에 사용되는 것으로도 알려져 있으며, *in vitro*에서 결핵균에 대하여 1:10000의 농도로 정균작용을 나타낸다고 밝혀져 있다¹³⁾.

본 연구에서는 성숙과인 탱자즙을 기능성 식품으로 직접 이용할 수 있는 가능성을 제시하기 위하여 식중독 원인균을 포함한 병원성 세균을 대상으로 항균활성을 검색하여 본 결과 다양한 그람양성 세균과 그람음성 세균에 항균활성을 나타내어 비교적 넓은 범위의 항균 스펙트럼을 나타내었다. 특히 *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*의 그람양성균 2종, 4종의 *Vibrio* spp. 및 *Yersinia enterocolitica* 등에는 15mm 이상의 억제환을 형성하여 높은 항균성을 나타내었다.

2. 탱자즙의 최소억제농도

공시된 22종의 병원성 세균에 대한 탱자즙의 최소억제농도는 Table 3과 같다. 전 공시균은 10% 및 5% 농도가 첨가된 배지에서 성장하지 못한 반면, 0.625%이하의 농도에서는 모두 성장하였다. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii* 및 *Pseudomonas aeruginosa* 등의 세균들에 대한 탱자즙의 MIC는 2.5%였으며, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* 및 *Yersinia enterocolitica* 등의 세균들에 대한 탱자즙의 MIC는 1.25%로 다소 낮았다. 이러한 결과는 *Vibrio* spp.와 *Yersinia enterocolitica* 등은 다른 병원성 균종 보다 탱자즙에 대하여 감수성이 높다는 것을 의미하며, 탱자즙을 이용하여 이와 같은 균종들을 제거할 수 있는 기능성 식품 및 천연살균제의 개발 가능성을 시사하여 준다.

최근 기능성 식품개발이나 특정 목적을 위하여 한약재나 천연식물재료를 이용한 생리활성물질 규명에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다^{3,4,6)}. 그러나 대부분의 연구재료는 무기 및 유기용매를 이용하여 추출한 추출액의 이용방법이나 유효 성분규명에 관한 것이기 때문에 실제 유효한 성분이 다량 함유되어 있는 재료를 발견할 지라도 개발비용 측면에서 많은 문제점에 부딪히게 된다. 이와

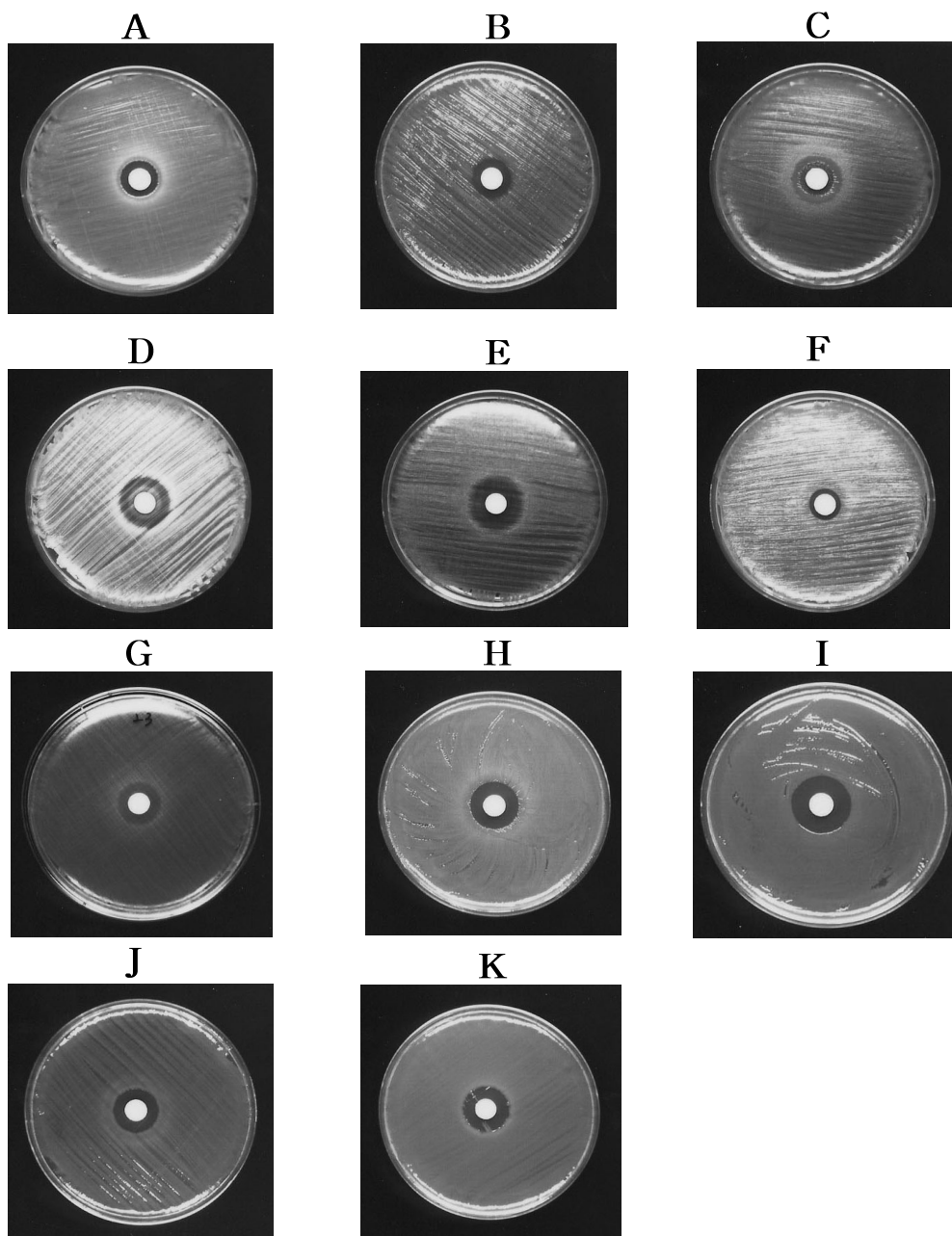


Fig. 1. Antimicrobial activities of *Poncirus trifoliata* juice.

B. cereus(A), *Y. enterocolitica*(B), *B. subtilis*(C), *M. luteus*(D), *R. equi*(E), *C. zerosis*(F), *S. aureus*(G), *V. alginolyticus*(H), *V. cholerae*(I), *V. parahemolyticus*(J) and *V. vulnificus*(K). Paper disk (8mm) contained 50μl of *Poncirus trifoliata* juice.

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Poncirus trifoliata* juice against pathogenic microorganisms

Strains	MIC of <i>Poncirus trifoliata</i> juice(%)					
	10.0	5.0	2.5	1.25	0.625	0.313
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	-	-	■	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC17686	-	■	+	+	+	+
<i>Corynebacterium zerosis</i> ATCC9755	-	■	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> (isolates from food)	-	-	■	+	+	+
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	-	-	■	+	+	+
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC6939	-	-	■	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538P	-	■	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	-	-	■	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC6750	-	-	■	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	-	■	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC9637	-	■	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157 (isolates from patient)	-	■	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC10031	-	■	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	-	-	■	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC13076	-	■	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i> (isolates from patient)	-	■	+	+	+	+
<i>Shigella sonnei</i> ATCC9290	-	-	■	+	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> (isolates from sea water)	-	-	■	+	+	+
<i>Vibrio cholerae</i> (isolates from patient)	-	-	-	■	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (isolates from patient)	-	-	-	■	+	+
<i>Vibrio vulnificus</i> (isolates from patient)	-	-	-	■	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC29729	-	-	-	■	+	+

The shadow indicates MIC of each bacteria. +, growth; -, no growth

같은 관점에서 볼 때, 본 연구결과에서 나타난 탱자즙의 항균성에 관한 자료들은 기능성 식품 및 천연살균제의 개발에 용이하게 접근할 수 있는 자료로써 중요한 의미를 가진다고 사료된다.

3. 탱자즙의 열 안정성

탱자즙을 온도별로 열처리한 다음 *V. cholerae* 균을 대상으로 항균활성에 대한 안정성을 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. 30°C, 50°C, 100°C 및 121°C에서 15분간 열처리한 각 탱자즙의 *V. cholerae*에 대한 항균성은 열처리하지 않은 탱자즙의 항균성과 동일한 결과를 나타내어

열에 대하여 매우 안정한 것으로 확인되었다. 항균성 물질의 열에 대한 안정성 기능성 식품 개발에 중요한 요소 중의 하나가 된다. 식품의 안전성 측면에서 살균되어야 하는 기능성 식품일 경우, 가열 살균함으로써 특정 기능이 소실되어 버린다면 기능성 식품으로서의 의의가 없어지기 때문에 열 안정성은 매우 중요한 의미를 갖는다. 본 연구에서는 다양한 온도로 가열 처리한 탱자즙이 *V. cholerae* 균 뿐만 아니라 공시된 나머지 21종의 병원성 세균에 대하여도 가열 처리되지 않은 탱자즙의 항균활성과 동일한 결과를 나타내었다 (결과 미제시).

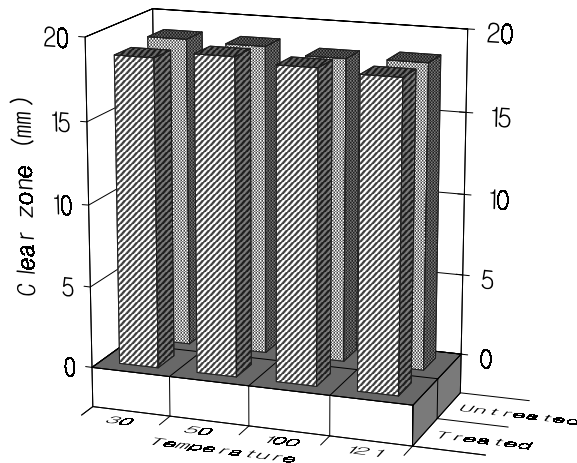


Fig. 2. Stability of antimicrobial activity of *Poncirus trifoliata* juice treated by heat. Indicator strain was used *V. cholerae*.

탱자는 운향과에 속하는 낙엽교목으로써 옛부터 지각과 지실이라는 이름으로 한약재로 널리 사용되어 왔으나, 식품의 부재료로써는 거의 이용되어지지 않는다. 탱자의 미숙과 중에는 vitamin C가 23.2~60.3mg% 함유되어 있고, 과피에는 5.6~14.18mg%의 neo-hesperidin, 1.5~4.0mg%의 naringin을 비롯하여 rhoifolin, lonicerin 등의 플라보노이드 배당체가 함유되어 있으며, 성숙될수록 neosporidin의량은 줄어들고 naringin의량이 증가한다¹³⁾. 이러한 탱자는 신맛이 강하고 향기가 강하기 때문에 다류, 주류, 향신료, 양념류 등의 가공식품에 널리 이용될 수 있는 가능성이 있을 뿐만 아니라 본 연구에서 우수한 항균력이 확인되어 이와 관련된 기능성 식품개발을 위한 원료로서도 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

기능성 식품소재 개발을 위하여 탱자즙의 항균활성을 확인하였다. 탱자즙은 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium zerosis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi* 등의 그람양성세균 6종, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio para-*

haemolyticus, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* 등의 그람음성세균 7종에 대하여 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii* 및 *Pseudomonas aeruginosa* 등의 세균들에 대한 탱자즙의 최소억제농도는 2.5%였으며, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus* 및 *Yersinia enterocolitica* 등의 세균들에 대한 탱자즙의 최소억제농도는 1.25% 이었다. 또한 30℃, 50℃, 100℃ 및 121℃에서 15분간 각각 열처리한 탱자즙의 *V. cholerae*에 대한 항균성은 열처리하지 않은 탱자즙의 항균성과 동일한 결과를 나타내어 열에 대하여 매우 안정하였다.

참고문헌

1. Elliott, M. Jr. : Biological properties of plant flavonoids: An overview. *J. Pharmacognosy*, **34**: 344~348, 1996.
2. Israel Goldberg : *Functional Foods*. pp.3~555, Chapman & Hall Press, New York, USA. 1994.
3. Kawamura, J. and T. Takeo : Antibacterial activity of tea catechin to *Streptococcus mutans*.

- Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **36**: 463~467, 1989.
4. Kim, Y. D., Y. J. Kim, S. W. Oh, Y. J. Kang and Y. C. Lee : Antimicrobial activity of solvent extracts from *Citrus sudachi* juice and peel. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**: 1613~1618, 1999.
 5. Lee, B. Y. and D. H. Shin : Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractions for food spoilage microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**: 205 ~211, 1991.
 6. Lee, K. M. : Quality characteristics of Korean Citrus Sudachi influenced by harvest time. *Ph D thesis*, Duk-sung Women's Univ., Seoul, Korea, 1999.
 7. Yang, J. S. : Food irradiation for safety of microbiological aspect (in Korean). *Food Science and Industry*, **30**: 131~136, 1997.
 8. Pszczola, D. E. : Designer food. *Food Technology*, **47**: 92~101, 1993.
 9. Sadaki, O. : The development of functional foods and materials. *Bioindustry*, **13**: 44~50, 1996.
 10. Steers, W., E. L. Flotz and B. S. Grabes : An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, **2**: 307~311, 1969.
 11. Zaika, L. L. : Spice and herbs; Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food. Safety*, **9**: 97~100, 1988.
 12. 김재길, *임상응용한약포제학*. pp.114~116, 약업신문사출판국, 1992.
 13. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균, *중약대사전*. pp.5210~5127, 도서출판 정담, 1998.
 14. 김태정, *한국의 자원식물* (II). p. 269, 서울대학교 출판부, 1996.
 15. 정보섭, 신민교, *도해향약(생약) 대사전(식물편)*, pp.791~793, 영림사, 1988.