

발간등록번호

11-1541000-000544-01

국내산 농산물의 항균활성 및 소취효과를 이용한 식중독 예방용 위생제재 개발

Development of hygienic agents with natural antimicrobials by
domestic agricultural product

국내산 농산물을 이용한 위생제재 개발(제 1 세부)

Development of hygienic agents using domestic agricultural product

개발제품독성평가(위 탁)

Evaluation of toxicity for developed product

산업적 적용기술개발(제 2 세부)

Development of industrial application technology

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

농림수산식품자료실



0006048

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내산 농산물의 항균활성 및 소취효과를 이용한 식중독 예방용 위생제재 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 6월 24 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 김 윤 지

세부연구책임자 : 최 성 욱

연 구 원 : 이 영 철

연 구 원 : 이 남 혁

연 구 원 : 전 향 숙

연 구 원 : 구 민 선

연 구 원 : 김 현 정

연 구 원 : 최 성 욱

위탁연구기관명 : 인천대학교

위탁연구책임자 : 이미가엘

참 여 기 업 : 서울식연

요 약 문

I. 제 목

국내산 농산물의 항균활성 및 소취효과를 이용한 식중독 예방용 위생제재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

항균활성과 알코올소취 활성이 있는 국내산 농산물을 선발, 소재화 하여 항균활성이 강화되고 알코올소취 활성이 있는 손소독제를 개발하고자 한다. 개발된 손소독제에 대하여 독성실험을 실시하여 식중독 예방용 위생제재를 개발하는 기술을 확립하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

■ 1차년도 : 국내산 원료를 이용한 손소독제 개발

- 1) 항균활성 screening
- 2) 알코올탈취능 screening
- 3) 제품개발 가능성 타진

■ 2차년도 : 개발제품의 시제품 생산 및 산업화

- 1) 시제품 생산
- 2) 소비자 인식도 조사
- 3) 독성시험

IV. 연구개발결과

손소독제는 미생물 감염을 방지하는 면에서 매우 효과적인 특징을 가지고 있어 최근 널리 사용되고 있다. 알코올기반 손소독제의 단점이 냄새를 제거하기 위해서 또 항균활성을 증진시키기 위한 연구로서 항균활성과 소취활성이 있는 국내산 농산물을 선발하였다. 항균활성과 소취활성을 정밀 조사하여 최종적으로 후보물질을 선발하였다. 손소독제는 알코올을 기반으로 제조하였는데, 알코올 59%, 알로에베라 40%, 추출물 1% 농도로 제조하였다. 저알코올 손소독제는 천연항균제인 자몽종자 추출물을 이용하여 제조하였으며 알코올 함량은 20%로 대폭 낮추면서 항균력이 우수한 손소독제를 제조할 수 있었다. 초등학생과 중학생을 대상으로 개발된 제품의 소비자 기호도 조사를 실시하였다. 고알코올 손소독제는 대조구에 비하여 2배 정도

높은 기호도를 나타내었으며 저알코올 손소독제는 3배의 높은 소취활성과 기호도를 나타내었다. 개발된 제품의 독성시험으로서 in vivo 및 in vitro 대체 자극시험을 수행하였다. in vivo 안점막 및 피부자극시험을 위해서는 토끼를 이용한 Draize 시험법을 사용하였고, 피부자극 대체시험법으로는 인공피부를 이용한 MTT 분석 및 인터루킨-1 측정, 안점막자극 대체시험법으로 3T3 neutral uptake (NRU) 측정법을 사용하였다. 본 시험에 사용한 손소독제는 in vitro 및 in vivo 피부자극시험 모두에서 비자극성 물질로 판정되었다. 안점막자극시험의 경우, 고알코올 손소독제는 in vitro 대체시험법에서는 음성 결과가 관찰되었지만, in vivo 시험에서는 결막 부종과 발적 현상이 관찰되어서 중등도 자극성 물질로 판정되었으나 각막 혼탁현상이 가역적이기 때문에 시간이 지나면 정상으로 돌아왔다. 그러나 저알코올 손소독제는 자극이 없는 것으로 판정되었다. 종합적으로 본 시험에 사용한 알코올 손소독제는 피부보다는 눈에 자극적인 물질인 것으로 사료된다. 안점막 시험에서 자극성 물질로 판정된 이유는 60% 알콜 성분인 것으로 판단되며 따라서 현재 시중에서 판매되는 대부분의 알콜성분 손세척제는 다 안점막자극을 유발 할 것으로 판단되었다. 그러므로 판매시 유의사항에 눈과의 접촉을 피해야 한다는 주의 문구를 넣어야 할 것으로 생각되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 특허출원 3건
- SCI 논문투고 완료(Toxicology)
- KCI 논문투고 계획
- 학술대회 포스터 발표 - 우수포스터상 수상(2009)
- 기술이전 모색

SUMMARY

I. Title

Development of hygienic agents with natural masking materials and antimicrobials with agricultural product produced in Korea

II. Objective and Significance of Research

The purpose of this research is develop the novel hand sanitizer which can mask the foul smell and having increased antimicrobial activity. Two types of developed hand sanitizer was tested with four irritation studies and compared *in vivo* and *in vitro* results. Through this project we setup the industrialization technology including selection, formulation and toxicological evaluation.

III. Scope and Research Field

■ First year : Development of hand sanitizer

- 1) Screening the antimicrobial activity with agricultural product
- 2) Screening the foul smell masking activity with agricultural product
- 3) Development of product

■ 2차년도 : Product evaluation

- 1) Product
- 2) Evaluation by consumer test
- 3) Evaluation by toxicological test

IV. Result and Recommendation

Alcohol-based hand sanitizers have been proven effective in reducing the spread of microbial infections. However, frequent use of alcohol-based formulations of hand sanitizers can cause adverse skin effects, such as allergic and irritant contact dermatitis. And alcohol-based hand sanitizer has the olfactory cues. So we tried to mask the alcohol foul smell by adding the natural agricultural products extract which having the masking activity. And increasing the antimicrobial activity by adding agricultural products extract or

grapefruit seed extract. High alcohol-based hand sanitizer has the formula, alcohol 59% + aloe vera gel 40% + extract 1% and low alcohol-based has natural antimicrobial agent, grapefruit seed extract and 20% alcohol. Consumer test was conducted on elementary school student and middle school student. High alcohol-based product showed 2 fold increased scores than control and low alcohol-based product showed 3 times higher scores. Toxicological test, irritant potency of two types of alcohol-based hand sanitizers containing aloe vera and clove extract with four irritation studies and compared *in vivo* and *in vitro* results. Aloe vera soothes and protects skin, and clove extracts are widely used to mask unpleasant olfactory cues. The Draize rabbit eye and skin irritancy tests were conducted to evaluate the *in vivo* ocular and dermal irritation potential. For *in vitro* evaluation of skin irritation, tissue damage was assessed with the MTT assay and by examining the release of interleukin-1a (IL-1a) using engineered epidermal equivalents (KeraSkinTM). A 3T3-neutral red uptake (NRU) assay was performed as a potential alternative to the Draize eye irritation test. Sanitizers containing aloe vera and clove extract were non-irritating to skin, and the results were comparable with both the *in vivo* and *in vitro* MTT viability assay. However, an increase in IL-1 release was observed. The results of the *in vivo* eye irritation toxicity studies in rabbits demonstrated reversible conjunctival redness and edema, whereas the test article was non-irritating in the *in vitro* 3T3-NRU study. Based on our results, we propose that alcohol-based hand sanitizers with aloe vera and clove extract are likely to be moderately irritating, especially to the eye. But low alcohol-based hand sanitizer containing natural antimicrobials is non-irritative to the eye.

V. Output and strategy for commercialization

- Patent pending 3
- SCI paper submitted
- KCI paper will be submitted
- Poster presentation – Outstanding poster award
- Technology transfer

CONTENTS

SUMMARY	3
Chapter 1. Outlines of the research	11
Chapter 2. State-of-the-art	16
Chapter 3. Scopes and results of the research	22
Section 1. Screening of antimicrobial activity	22
1. Analysis of reported cases	22
2. Prescreening of antimicrobial activities	42
3. Purification and production method	42
4. Antimicrobial activity	44
Section 2. Screening of deodorizing activity	53
1. Prescreening	53
2. Selection method	53
3. Test product and evaluation	57
Section 3. Primary toxicological test	58
1. Primary test	58
2. in vitro skin irritancy test	62
3. in vitro eye irritation toxicity studies	65
Section 4. Test product	66
1. Alcohol hand sanitizer	66
2. Low alcohol hand sanitizer	70
3. Test product	72
Section 5. Consumer test on test products	73

Section 6. Toxicological test on test products	75
1. Methods	75
2. Result	90?
Chapter 4. Achievement and contribution to related field	91
Chapter 5. Application plan of the research	92
Chapter 6. Technical oversea information collected during research	93
Chapter 7. Reference	95

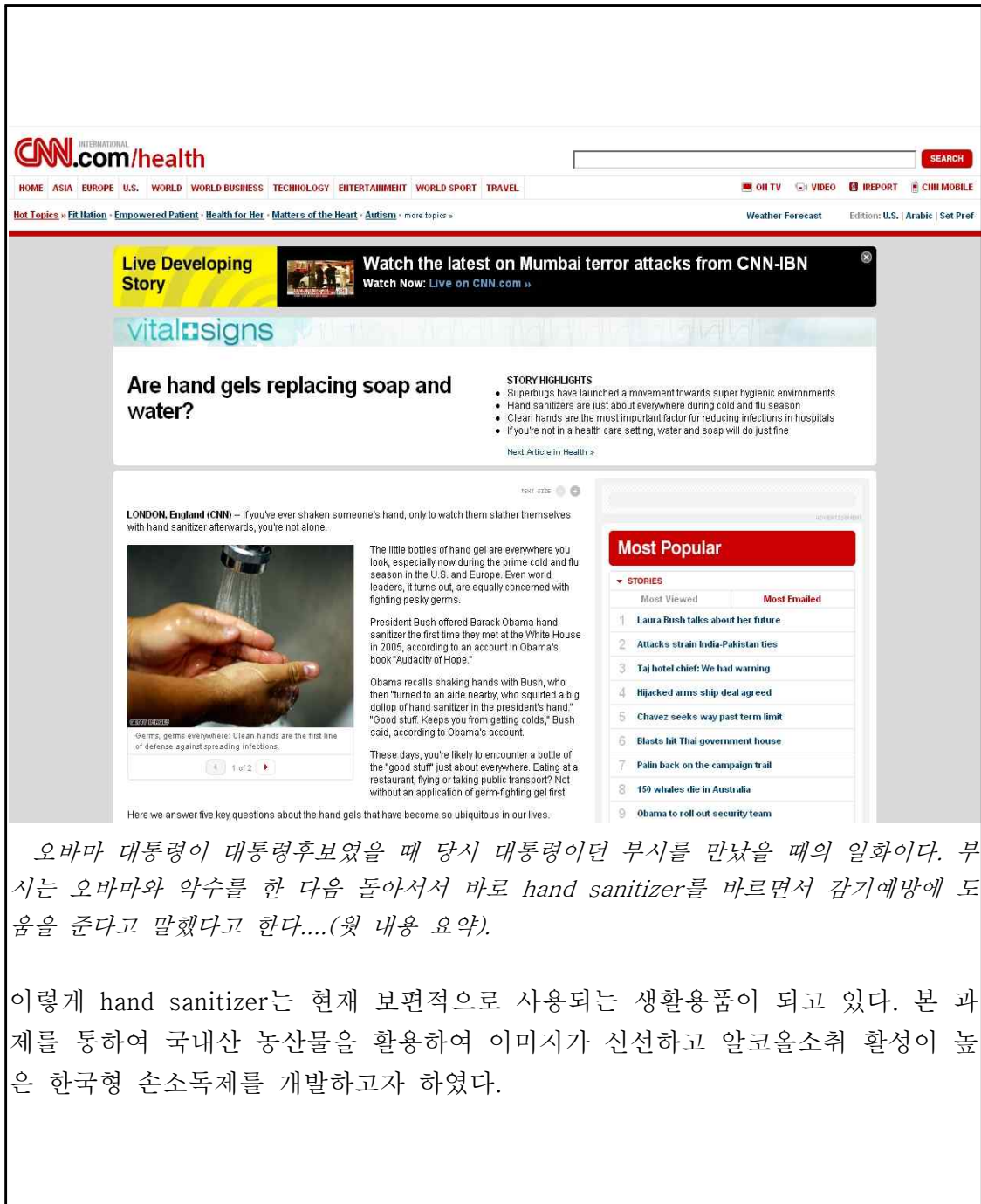
목 차

요 약 문	3
제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절. 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	22
1. 항균활성 Screening	22
가. 기본 문헌 분석	22
나. 항균활성 예비물질 선정	42
다. 선발원료의 소재화 기술 개발	42
라. 추출물의 항균활성 검토	44
(1) 기존 손소독제 항균 활성 측정	44
(2) 손소독제 항균활성 측정방법	45
(3) Kill time 방법에 의한 시판품 항균활성 측정	47
(4) 예비 선발된 소재에 대한 항균활성 측정	47
(5) Kill Time method에 의한 선발소재에 대한 항균활성 측정	49
(6) 에탄올 농도에 따른 추출물의 항균활성	50
(7) 시제품 제조 및 항균활성 측정	51
2. 알코올 소취활성 screening	53
가. 소취활성 예비물질 선정	53
나. 실험방법	53
다. 시제품 제조 및 평가	57
3. 개발제품에 대한 예비독성 실험	58
가. 예비독성 실험	58
(1) 사망률 및 일반증상, 체중 변화	58
(2) 공시시료	58
(3) 부검 및 최종 결론	58

나. 동물대체시험법으로서의 인공피부를 이용한 in vitro 피부자극시험	63
(1) MTT assay	63
(2) IL-1 α 측정	64
다. 동물대체시험법으로서의 인공피부를 이용한 in vitro 안점막자극시험	65
4. 시제품 제조	66
가. 알코올 제품	66
1) 시제품 제조의 concept	66
2) 선발된 시료의 추출 및 농축	69
3) 시제품에 대한 관능검사	69
나. 천연항균제를 이용한 저알코올 제품	70
1) 시제품 제조의 concept	70
2) 알코올 첨가에 의한 저알코올 손세정제 제품 개발	71
다. 시제품 제조	72
5. 시제품에 대한 소비자 인식 조사	73
6. 시제품에 대한 독성실험	75
가. 연구방법	75
(1) 토끼를 이용한 in vivo 피부자극시험	75
(2) 토끼를 이용한 in vivo 안점막자극시험	77
(3) 토끼를 이용한 in vivo 피부자극시험	80
(가) GS-1000 0.1% + 주정 20%	80
(나) 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1%	82
(4) 토끼를 이용한 in vivo 안점막자극시험	83
(가) GS-1000 0.1% + 주정 20%	83
(나) 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1%	86
(5) 결 론	90
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	91
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	92
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	93
제 7 장 참고문헌	94

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성



The screenshot shows a CNN.com/health article page. The main article is titled "Are hand gels replacing soap and water?". It includes a sub-headline "STORY HIGHLIGHTS" with bullet points: "Superbugs have launched a movement towards super hygienic environments", "Hand sanitizers are just about everywhere during cold and flu season", "Clean hands are the most important factor for reducing infections in hospitals", and "If you're not in a health care setting, water and soap will do just fine". The article text mentions President Bush and Barack Obama, and includes a photo of hands being washed. A sidebar on the right lists "Most Popular" stories, with the top one being "Laura Bush talks about her future".

오바마 대통령이 대통령후보였을 때 당시 대통령이던 부시를 만났을 때의 일화이다. 부시는 오바마와 악수를 한 다음 돌아서서 바로 hand sanitizer를 바르면서 감기에방에 도움을 준다고 말했다고 한다....(윗 내용 요약).

이렇게 hand sanitizer는 현재 보편적으로 사용되는 생활용품이 되고 있다. 본 과제를 통하여 국내산 농산물을 활용하여 이미지가 신선하고 알코올소취 활성이 높은 한국형 손소독제를 개발하고자 하였다.

1. 경제적 · 산업적 중요성

- 우리나라 식중독 사고 발생은 2003년에 135건, 7,909명이었으나 2004년에는 165건 10,388명으로 건수는 22.2%, 환자 수는 31.3% 증가하였으며 건당 환자 수도 58.6명에서 63.0명으로 증가하였음
- 2005년도 식약청 자료에 의하면 원인물질로 세균에 의한 식중독이 총 73건이 발생하여 4,406명의 환자가 발생하였음. 세균 분류로는 살모넬라에 의한 식중독이 22건 발생하여 753명의 환자가 발생하였고 황색포도상구균이 16건 발생에 863명의 환자가 발생하였으며 장염비브리오균의 경우 17건 발생에 663명의 환자가 발생하였으며 바실러스 세레우스는 1건 발생에 24명의 환자가 발생하였음. 병원성 대장균의 경우 15건 발생하여 175명의 환자가 발생하였음. 캠필로박터는 1건 발생에 175명의 환자가 발생하였음. 식중독 원인식품으로 햄, 소시지류, 굴, 닭죽, 닭고기, 표고버섯전, 도시락, 음용수, 간장게장, 맛살 등 소비자가 보편적으로 섭취하는 식품에서 식중독이 발생하였음.
- 따라서, 국내의 식중독 발생에 관여하는 대표적인 식중독세균으로는 살모넬라, 황색포도상구균, 장염비브리오, 병원성대장균이라고 할 수 있음.
- 최근 생활수준의 향상과 국민 소득 증가로 외식 기회와 학교 등에서의 단체급식이 증가하면서 식중독 사고가 대형화되고 있어 집단급식소와 음식점에서의 식중독이 107건 8,790명으로 전체 발생건수의 64.8%와 환자수의 84.6%를 차지하였음.
- 학교급식은 2006년 12월 31일 기준으로 현재 초·중·고·특수학교 11,030교 중 99.6%인 10,986교에서 급식을 실시하고 있으며 1일 744만명 즉, 전체 학생의 95.6%가 급식을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 급식관련 식품안전이 매우 중요하다고 할 수 있음
- 따라서 안전한 식품을 공급하는 것이 가장 중요한 문제이며 이와 더불어 음식 섭취시 발생할 수 있는 위해미생물의 오염을 예방하는 것이 필요함. 따라서 손에 대한 개인위생관리가 중요하다고 할 수 있음
- 식중독 미생물은 환경에서 오염되거나, 식품종사자에 의해 오염 되거나 식품자체에 의한 오염 등에 의해 사람에게 감염되어 병을 유발할 수 있음.
- 부적절한 식품종사자의 손 세척은 가열조리된 식품을 오염시키거나 기타 원료 및 기구 등을 오염시킬 수 있음. 특히 화장실을 이용한 식품종사자나 음식 섭취자의 경우에는 위해미생물에 의한 오염 가능성이 크며(*Salmonella*, *E. coli*,

Staphylococcus aureus, *Clostridium perfringens*, *shigellae*, Hepatitis A virus 등) 동물로부터도 위해미생물이 오염될 수 있음(*Yersinia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Klebsiella*).

- 따라서 청결하지 못한 손으로 식품을 취급하거나 섭취하는 것은 식인성 질병 발생의 주요 원인 행위라고 할 수 있음. 환경에는 분변유래의 미생물이 항상 존재할 수 있기 때문에 이로 인하여 식중독이 발생할 수 있음. 따라서 개인위생을 관리하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있음
- 일반적으로 피부에 존재하는 세균의 유형은 상재성세균(resident bacteria)과 비상재성세균(transient bacteria)으로 구분할 수 있음. 피부에 상주하는 상재성미생물의 90% 정도가 그람 음성 *Staphylococci*로서 이 중 *Staphylococcus aureus*는 유일한 식중독 원인균으로 알려져 있음.
- 바이러스의 경우, 최근 단체급식에서 문제가 되고 있는 노로바이러스 및 로터바이러스(Rotaviruses)는 대변/구강의 경로로 감염되어 식품에 오염됨. 일반적으로 유아나 어린아이에게서 위장염을 일으키기도 하며 노인 및 면역성이 결핍된 성인에게도 문제가 됨. 로터바이러스는 구조물이나 손에 남아있는 오염된 물에서 오랜 시간 동안 살아남으며, 손에서는 최대 4시간까지도 생존하므로 접촉 등에 의하여 오염이 용이함.
- A형 간염바이러스(Hepatitis A virus)는 시설·장비의 표면이나 사람의 손에서 7시간까지 생존 가능하기 때문에 식품오염이 용이하고 살균제에 대한 내성이 강함.
- 장갑을 낀 손에 헤르페스바이러스(Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1))가 오염되었을 경우 표면이 습한 식품에 높은 오염율을 나타낸다고 함.
- 리스테리아(*Listeria spp.*)의 경우는 손에서 11시간 동안 생존할 수 있으며, *L. monocytogenes*는 생존시간이 길기 때문에 식품가공설비의 위생관리에 중요한 의미를 가짐.
- 캄필로박터(*Campylobacter*)의 식품오염은 캄필로박터에 오염된 손이 주원인임. 식품종사자가 익히지 않은 식품을 취급할 경우 손을 통하여 식품이나 기구를 교차 오염시킬 수 있음. 캄필로박터는 비누를 사용하여 세척하거나 물만으로 세척한 후 종이타월을 사용하여 건조시키면 효과적으로 제거되며, 70% isopropyl alcohol에 의해 쉽게 제거됨.

- 결론적으로 비상재성미생물 즉, 환경에서 손에 오염된 미생물에 의해 병이 유발될 수 있음. 분변 유래의 미생물 등은 낮은 농도(*E. coli*, *Salmonella*)로도 식중독을 유발할 수 있음. 이러한 균은 비누와 물을 사용한 손세척이나 살균제 등에 의해 쉽게 제거될 수 있기 때문에 음식을 섭취하기 전 손 세척 등의 개인위생을 철저히 하는 것이 중요하다고 할 수 있음.
- 그러나, 때때로 비누와 물을 이용한 손세척이 어려운 경우가 있음. 이때에 가장 많이 사용되는 것이 손소독제(hand sanitizer)로서 손에 골고루 비벼 살균제의 항균작용에 의해 위해미생물을 사멸시키는 기능이 있음.
- 손소독제는 보통 알코올을 주원료로 하고 있으며 알로에 베라 등을 첨가하여 보습력을 높이는 경우가 많음. 주성분인 알코올 이외에 에탄올아민 등을 첨가하여 항균력을 증가시킨 제품도 있으며 기능성 증진을 위해 녹차를 첨가한 제품도 있음.
- 이러한 손소독제는 병원에서 손 세척용으로 사용되고 있으나 일상생활에서는 거의 사용되지 않고 있음. 이에 비하여 외국의 경우 일상생활에서도 보편적으로 사용되고 있음
- 과제가 제안되었던 2년전 만 하더라도 국내의 경우 아직까지 본격적인 시장이 형성되지 있지 않았으나 2009년 신종플루가 유행하면서 우후죽순 격으로 각 업체에서 생산 판매되어 국내 시장이 급격하게 형성되었으나 이제는 오히려 어느 정도 안정기에 도달한 것으로 생각됨. 미국의 경우 3M을 비롯하여 71개의 업체가 손소독제 제품을 생산하고 있어 산업적 파급효과는 막대하다고 할 수 있음



다양한 손소독제(Hand sanitizer) 제품

2. 연구개발의 필요성

- 외국의 제품은 보통 알코올 농도가 62%로 되어 있으며 항균력을 강화시키기 위한 트리메탄올아민 등을 첨가한 경우도 있음.
- 국내 농산물의 경우, 항균력에 대한 고찰이 많이 진행되어 항균력이 우수한 소재의 발굴이 어렵지 않음.
- 따라서 국내 실정에 맞게 손소독제를 개발함에 있어,
 - ① 알코올 농도를 60% 미만 제품으로 개발
 - ② 알코올 농도가 저하되어 항균력이 떨어지는 것은 천연항균물질을 이용하여 보완
 - ③ 알코올취가 소비자의 기호도를 저하시키는 주요 원인이 되므로 국내 천연농산물, 향신료, 한약재를 이용하여 알코올 소취 기능이 있는 물질을 발굴하여 적용
 - ④ 의약외품 등록을 위한 체계적인 독성실험을 통하여 약국에서 판매될 수 있는 조건을 확보하여 제품의 지명도를 향상시키고 소비자의 신뢰를 구축하고자 함
 - ⑤ 또한 농산물 등의 천연물을 이용한 위생제재의 개발 프로토콜은 향후 다양한 농산물 및 다양한 위생제재 개발의 초석이 될 수 있음
- 현재, 손소독제는 공장에서 사용되고 있는 분무식 소독제가 널리 이용되고 있으나 개인위생을 관리하기 위해서는 휴대가능한 손소독제가 개발되어야 함
- 이러한 휴대용 손세척용품은 학교, 직장에서 널리 이용될 수 있으며 그 결과 식중독을 대폭적으로 저감화 시키는 역할을 수행할 것으로 기대됨
- 외국의 경우, hand sanitizer가 널리 활용되고 있으나 국내의 경우 아직까지 인식 부족에 의하여 시장이 거의 형성되어 있지 않았으나 작년에 폭발적인 시장이 형성되었으며 향후 제품의 고급화를 통해 과도한 경쟁력을 극복해야 할 것으로 사료됨.
- 따라서, 국내 농산자원의 효율적인 활용 및 국민건강 수호를 위하여 본 과제는 반드시 필요하다고 할 수 있었음
- 본 과제를 통하여 국내산 농산물을 대상으로 소취활성과 항균활성이 있는 농산물을 발굴하였으며 발굴된 농산물을 이용하여 손소독제를 개발하였음. 기존의 손소독제와 유사한 알코올 농도의 제품과 알코올 함량을 대폭 낮춘 저알코올 제품을 개발하였음. 개발된 손소독제에 대하여 소비자 기호도 조사를 실시하였으며 in vivo 피부자극시험, in vivo 안점막 자극시험을 실시하였음.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

<과제계획서 제출시 현황>

(1) 세계적 수준

손소독제는 세계적으로 특히, 미국을 중심으로 100여개 정도의 회사에서 생산되고 있을 정도로 기업화 단계 및 기술 안정화 단계에 위치해 있다고 할 수 있다.

개념정립 단계		기업화 단계	o	기술 안정화 단계	o
---------	--	--------	---	-----------	---

시장규모는 market share가 전문분석기관에서 수행하여 책으로 판매하고 있어 조사하기가 매우 어려웠다. 이러한 전문 데이터의 수립은 커다란 market이 있음을 예시하고 있다고 생각할 수 있다. 미국의 경우 71개의 회사에서 hand sanitizer를 현재 생산하고 있다. 생산회사는 다음과 같다. 3M, Best Sanitizers Inc., Dial Corporation, Ecolab Inc., GOJO Industries, Inc., Health Care Logistics, Medline Industries, Inc., Pure-ific Corporation, Skinvisible, Inc., Sprixx, STERIS Corporation, and Vi-Jon Laboratories, Inc.

(<http://www.google.co.kr/search?complete=1&hl=ko&q=hand+sanitizer+market+share&lr=>)

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
대학	항균활성, 소취활성	부분적인 연구, 산업화 진행 미비
3M 등 71개 회사	hand sanitizer 개발	개발제품 판매

(2) 국내수준

국내의 손소독제는 아직까지 시장이 형성되어 있지 않을 정도이며 이에 따라 관련 연구도 진행된바 없다. 소독제를 취급하는 회사의 특성상 소규모의 생산이 부분적으로 진행된바 있으나 독성실험 등 체계적인 과학을 바탕으로 하기보다는 소독제의 단순혼합에 의해 제조하고 있다. 스프레이 타입의 항균제가 보급되고는 있으나 젤 타입의 손 소독제는 아직까지 보편화되어 있지 않다. 시장규모를 산정하기에는 무리가 있다.

<2차년도 최종 완료인 현재 현황>

(1) 세계적 수준

2년 전에 비하여 커다란 변화 없이 꾸준하게 연구, 생산, 판매되고 있다.

(2) 국내수준

2008년 신종플루가 대유행하였다. 이에 따라 손소독제는 신종플루 예방이라는 차원에서 국민에게 인지되었으며 학교, 학원 등을 통하여 사용되어 사용량이 폭발적으로 증가하였다. 즉, 본 과제가 진행되고 6개월 정도후 부터 손소독제가 널리 알려졌으며 이에 따라 단순하게 알코올, 이소프로필알코올로 제조되어 의약외품으로 등록된 손소독제가 다양한 업체에서 생산되었다. 이에 따라 식약청은 손소독제와 손세정제의 차이점을 홍보하여 올바른 사용을 유도하기도 하였다.

손소독제·손세정제 알고 쓰세요

YTN | 기사입력 2009-12-02 15:51 [기사원문](#)



[동영상 보기](#)

신종플루 확산으로 손 씻기 등 개인위생이 강조되면서 '손소독제'와 '손세정제'에 대한 관심이 높아짐에 따라 보건당국이 두 제품의 용도를 정확히 알고 사용할 것 당부했습니다.

식품의약품안전청은 '손소독제'는 에탄올과 이소프로필알코올 등을 유효성분으로 하는 의약외품이며, 손과 같은 피부의 살균 소독을 목적으로 사용하는 젤 또는 액체로서 물 없이 사용할 수 있다고 설명했습니다.

반면, 물비누 형태의 '손 세정제'는 화장품으로 분류되며 손의 세정과 청결을 위해 물을 사용해 씻어 내는 제품으로, 살균력을 갖고 있진 않습니다.

식약청은 최근 '물 없이 사용하는 손 소독제'라는 이름으로 무허가 의약외품을 마치 화장품인 것처럼 표시·광고를 하여 소비자를 현혹하는 사례가 있다며 주의를 당부했습니다.

의약외품 인정은 식약청에서 이루어지며 유효성분의 안전성이 인정되면 허가되게 된다. 따라서 다양한 업체에서 생산된 제품은 모두 알코올, 이소프로필알코올을 주원료로 하였으므로 의약외품 인정으로 쉽게 허가되었다. 2009년 10월까지 식약청에서 허가된 의약외품 현황은 다음과 같으며 2009년에만 62건이 허가되었다. 그러나 본 연구과제와 같이 농산물 추출액, 천연항균제 첨가와 같은 연구는 진행된 바 없으며 따라서 의약외품으로 허가된 바도 없다.

2009년 10월까지 손소독제 의약외품 허가 현황

번호	제품명	업소명	허가일자
1	닥터핸드겔(이소프로판올)	대한약품공업(주)	2001-02-21
2	플루플러스겔(이소프로판올)	(주)엠포엠	2003-02-05
3	퓨렐인스탄트핸드세니타이저겔(에탄올)	고조코리아(주)	2005-01-07
4	애바가드디외용액(에탄올)	한국쓰리엠(주)	2005-02-01
5	클린애후레쉬손소독제(에탄올)	유씨엘(주)	2005-06-10
6	나노팜나노크린업액(에탄올)	(주)나노팜	2005-08-08
7	핸드크린겔(에탄올)	성광제약(주)	2005-08-29
8	플로닉손청결제겔(에탄올)/비온드디톡스핸드세니타이저겔(에탄올)	(주)엘지생활건강	2005-10-21
9	플로닉손청결제액(에탄올)/비온드디톡스핸드세니타이저액(에탄올)	(주)엘지생활건강	2005-10-31
10	핸드린겔(에탄올)	(주)에버코스	2006-03-28
11	핸드세니타이저겔(에탄올)	한국콜마(주)	2006-04-27
12	플루겔(에탄올54.72%), 옥손소독청결제(에탄올), 이마트손살균청결제(에탄올)	(주)엠포엠	2006-05-29
13	1.포미즈핸드젤(에탄올),2.포미즈핸드젤에이(에탄올),3.포미즈핸드젤비(에탄올),4포미즈핸드젤씨(에탄올),5.엑스루션무향(에탄올),6.엑스루션(에탄올)	(주)호산	2006-09-14
14	세니아 손소독제(에탄올)	(주)삼립식품	2006-11-22
15	마이크로쉴드안티마이크로비알핸드겔	한국존슨앤드존슨메디칼(주)	2007-02-02
16	아쿠아젠후레쉬겔(에탄올)	엔에스팜(주)	2007-08-07
17	크린라이프겔	한신제약(주)	2007-08-14
18	핸즈에이알겔(이소프로판올)	동방에프티엘(주)	2007-10-15
19	디뉴인스탄트컴플리트세니타이저겔(에탄올)	(주)엘리코스메틱	2008-02-05
20	데톨인스탄트핸드세니타이저겔(에탄올96%)	(주)옥시레킷벤키저	2008-02-21
21	미용종가손청결제겔(에탄올)	렉스코스메틱	2008-03-12
22	미샤퍼펙트클린핸즈액(에탄올)/토소옹매직클린손소독액(에탄올)/위쎬손소독액(에탄올)/궁중비책손청결액(에탄올)/그린핑거마이크리즌손소독제(에탄올)/레스티나멀티파워손소독액(에탄올)	(주)코스메카코리아	2008-03-19
23	1알룩아루겔(에탄올)2꽃을든남자핸드클린젤(에탄올)3에바핸드세니타이저겔(에탄올)4아놀드바시니핸드겔(에탄올)5에스투알핸드세니타이저겔(에탄올)6해피바스인텐시브핸드세니타	(주)엔에스텍	2008-03-21

	이저겔(에탄올)7프리메라클린핸드겔(에탄올)8 꽃을든남자닥터클린겔(에탄올)9쥬시위시핸드 클린겔(에탄올)		
24	1.크린앤크린손소독겔(에탄올),2.크린업핸드세 니타이저(에탄올),3.아르떼르퍼펙트핸드세니타 이저(에탄올),4.네오라이프닥터핸드크린(에탄 올),5.해피너스핸드클리너(에탄올),6.클린크리 어겔(에탄올),7.세이프손소독겔(에탄올),8.베노 아손소독겔(에탄올)	(주)나투젠	2008-03-24
25	1)딥퓨리티액(에탄올)2)뉴클린앤후레쉬손소독 제(에탄올)3)24.7핸드세니타이저겔(에탄올)4) 카리오페오리지널핸드세니타이저겔(에탄올)5) 카리오페핸드크린겔(에탄올)6)팜앤닥핸드세니 타이저겔(에탄올)7)에코리더핸드세니타이저겔 (에탄올)8)아쿠아핸드세이프겔(에탄올)	유씨엘(주)	2008-04-18
26	크린벨, 냉장고나라 코코몽 어린이 손 소독제	에버레이드주식회사	2008-04-21
27	그린에듀클린손소독제(에탄올)	(주)그린제약	2008-05-22
28	핸드인후레쉬겔(에탄올)	(주)웰코스	2008-06-04
29	후레시스핸드크린이지겔(이소프로판올)	한국콜마(주)	2008-06-04
30	세이프핸드겔(에탄올)	에이스제약	2008-07-03
31	소키세니타이저겔(에탄올)	(주)소키씨앤티	2008-08-25
32	핸드닥터겔(에탄올)(라벤더향)/핸드닥터겔(에 탄올)(무향)/에버리치핸드스피드겔(에탄올)/퓨 어라벨에프솔루션손소독청결제(에탄올)/닥터자 르트세이프터치손소독제(에탄올)	(주)에버코스	2008-09-19
33	쓰리엠에바가드에스겔(에탄올)	한국콜마(주)	2008-10-21
34	1.인스턴트클리어세니타이저겔(에탄올), 2.퍼펙트클린핸드세니타이저겔(에탄올), 3.프리미엄핸드세니타이저겔(에탄올), 4.인스턴트클리어엠세니타이저겔(에탄올), 5.윈스텝핸드소독겔(에탄올), 6.클린라이프핸드소독겔(에탄올), 7.클린케어핸드세니타이저겔(에탄올), 8.유한클	(주)웰코스	2008-11-17
35	바이오넥서스노린스스프레이	케이티티아이엔씨(K TTINC)	2008-12-05
36	제품1;세이프러스겔(에탄올) 제품2;그리니아겔오리지널(에탄올) 제품3;그리니아겔레몬향(에탄올) 제품4;그리니아겔녹차향(에탄올) 제품5;그리니아겔베르가못향(에탄올)	(주)믹스앤매치	2009-01-09
37	클레시스핸드세니타이저겔(에탄올)	(주)엘시시	2009-01-28
38	킵케어프리미엄인스턴트핸드세니타이저겔(에 탄올)(수출명:킵케어인스턴트핸드세니타이저겔)	코스맥스(주)	2009-02-10
39	아쿠아실버겔손소독제(에탄올)	라파제약(주)	2009-04-17
40	오릭스클린앤클린겔(에탄올)	(주)엘시시	2009-03-06
41	핸드크린겔플러스	성광제약(주)	2009-05-13
42	그린크린겔(에탄올)	(주)그린월드팜	2009-05-29
43	냉장고나라 코코몽 어린이 손 소독제	에버레이드주식회사	2009-07-01
44	에치에스손소독액(에탄올)	(주)한성바이오켄	2009-07-02
45	제품1:멜라후레쉬겔(에탄올),제품2:클린핸드워	그레이스씨앤티	2009-07-08

	시겔(에탄올),제품3:핸드후레쉬세니타이저겔(에탄올)		
46	크린셀드세니타이저겔(에탄올)	신신제약(주)	2009-09-04
47	수핸드크린겔(에탄올)	(주)서울화장품	2009-09-04
48	핸즈클리어겔(이소프로판올)	태극제약(주)	2009-09-04
49	레상스핸드겔(에탄올)	(주)코스메카코리아	2009-09-08
50	클린후레쉬핸드겔(에탄올)	(주)피엘코스메틱	2009-09-09
51	크린손(에탄올)	동인당제약(주)	2009-09-09
52	핸즈클린겔(에탄올)	(주)지원메디코스	2009-09-09
53	핸클겔(에탄올)	동성제약(주)	2009-09-11
54	브이바이핸드세니타이저	에치엔지화장품(주)	2009-09-14
55	에브리데이케어핸드세니타이저겔(에탄올)	쓰리에이팜(주)	2009-09-15
56	핸드세정제겔(에탄올)	(주)한솔장업	2009-09-15
57	1)하이저세니타이저(에탄올)2)네츄로치드손소독제(에탄올)3)클린앰퓨어손소독제(에탄올)4)매직피아손소독제정제(에탄올)5)슈뜨세이프타임(에탄올)6)에코맘핸드세니타이저(에탄올)7)아티언스핸드크리너(에탄올)8)클린손소독제(에탄올)	대봉엘에스(주)	2009-09-15
58	핸드세이퍼겔(에탄올)	주식회사 와이엔에스	2009-09-15
59	터치크린손소독제(에탄올)	(주)케미텍인터내셔널	2009-09-15
60	팬텀아쿠아프레쉬핸드세이프세니타이저겔(에탄올)	(주)우신화장품	2009-09-17
61	인스토리세니타이저겔(에탄올)	장인제약	2009-09-17
62	핸즈클리어가드겔(에탄올)	태극제약(주)	2009-09-17
63	닥터핸드워시겔(에탄올)	꾸메화장품(주)	2009-09-18
64	카멜리아세니타이저	(주)내추럴디앤씨	2009-09-18
65	나드리아로마손소독제겔(에탄올)	나드리화장품(주)	2009-09-18
66	일양손소독제(에탄올)	(주)호산알에프	2009-09-18
67	아란진핸드클린겔(에탄올)	아마란스화장품	2009-09-22
68	피플러스코스소독용에탄올	(주)우신화장품	2009-09-22
69	닥터세이퍼겔(에탄올)	(주)아름다운화장품	2009-09-22
70	케레스소독용에탄올	(주)케레스코스메틱	2009-09-23
71	클린듀핸드세니타이저겔(에탄올)	(주)동구제약	2009-09-23
72	웰라이프겔(에탄올)	일신제약	2009-09-24
73	스킨푸드핸드클린겔(에탄올)	아이피어리스	2009-09-25
74	1.잇츠스킨안티프루핸드세니타이저2.한불크린업핸드워시3.레오롬프로피지에이핸드세니타이저4.청솔안티프루크린겔5.닥터피지에이손소독겔	청솔제약	2009-09-25
75	1.핸드닥터필아로마필아로마겔에탄올2.핸드더블후레쉬겔에탄올3.피토핸드워시겔에탄올4.이지엔테라피겔에탄올5.스킨팜세니타이저겔에탄올6.크리스찬쎄센세니타이저겔에탄올7.서강인후레쉬겔에탄올	(주)스킨팜	2009-09-25
76	제타겔(에탄올)	한국디비케이(주)	2009-09-25
77	미라클3210소독용에탄올	신화약품	2009-09-28
78	1. 데톨손소독제후레쉬겔(에탄올) 2. 데톨손소독제순겔(에탄올)	에치엔지화장품(주)	2009-09-28

79	닥터수손소독제겔(에탄올)	한국알리코팜	2009-09-29
80	제품1 : 필레프리미엄핸드클리닉 제품2 : 넥스트세이프 제품3 : 모우핸드세니타이저 제품4 : 웰피아 제품5 : 프랑코바로니세이프겔 제품6 : 크린락 제품7 : 에이지락세니타이저 제품8 : 자미안세니타이저 제품9 : 허브스토리세니타이저	(주)디베스	2009-09-29
81	이지케어핸드겔	(주)대웅제약	2009-09-29
82	핸즈클리어퓨어겔(에탄올)	태극제약(주)	2009-09-29
83	멜라소독용에탄올	그레이스씨앤티	2009-09-29
84	핸드엔케어클리어겔(에탄올)	대신제약공업(주)	2009-09-30
85	플루119플러스핸즈클린겔(에탄올)	(주)그린원일	2009-09-30
86	아토크손소독겔(에탄올)	(주)나투젠	2009-10-01
87	내츄럴핸드클리어겔(에탄올)	(주)나우코스	2009-10-01
88	세니메이트겔(에탄올)	(주)동구제약	2009-10-01
89	오릭스클린앤클린이코노미겔	(주)엘시시	2009-10-05
90	1.닥터핸즈겔(에탄올)2.핸드메디겔(에탄올)3.핸드클리닉겔(에탄올)4.이크린핸즈겔(에탄올)5.트리즈겔(에탄올)6.깨끗한손이야기겔(에탄올)7.이크린핸드워시겔(에탄올)8.클라드겔(에탄올)9.핸드가드겔(에탄올)	나노웰제약	2009-10-05
91	코디핸즈겔	(주)피비에스	2009-10-06
92	퓨어크린겔(에탄올)	경남제약(주)	2009-10-06
93	에스에이치핸드크린겔(에탄올)	(주)에스에이치제약	2009-10-06
94	1)투핸드인새니타이저(에탄올)2)오색청결보습겔(에탄올)3)다요미손소독청결제(에탄올)4)미앤고운손살균소독제5)화인백손소독청결제(에탄올)6)인탑손소독제(에탄올)7)이너프로즈힐손소독제(에탄올)8)초록마을손소독제(에탄올)	(주)씨아이티	2009-10-07
95	크린세이프(이소프로판올)	(주)디베스	2009-10-07
96	코셀케어핸드세니타이저겔(에탄올)	(주)네슈라화장품	2009-10-09
97	디와이오클렌저이소프로판올액	(주)한국디와이오문 화재단	2009-10-09

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 항균활성 Screening

가. 기본 문헌 분석

한국식품과학회지, 한국식품영양과학회지 등 학진 등재 학술논문집을 대상으로 항균활성이 있는 물질에 대한 정보조사를 실시하였다. 총 76건의 문헌정보를 수집하였으며 이에 대한 분석을 완료하였다. 문헌정보의 분석은 아래의 Table 1에 정리하였다.

Table 1. 문헌조사에 의한 항균활성 분석

	제목	공시시료 (원료)	추출방법	실험방법	선발된 항균물질 및 결론(요약)
1	카레 향신료 정유성분의 항균성	카레원료에 사용되는 13종의 향신료	정유성분	Agar diffusion method	1. clove, cumin, nutmeg, oregano, rosemary 2. 낮은 농도(0.2~9mg/ml)에서도 높은 항균 효과를 나타내었음 3. 그람 양성균에 효과적
2	식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성 물질의 탐색	31종 식물	75% 에탄올, 물	Agar diffusion method	1. 식품 부패미생물 실험 2. 황백, 산초, 참깨묵, 지치, 줄참나무, 오동나무 3. 천연물에서도 상당한 항균성 물질 존재
3	식품 부패미생물에 대한 천연 항균성물질의 농도별 및 분획별 항균특성	생약재, 식용 식물 및 부산물	75% 에탄올, 물	Agar diffusion method	1. 황백, 느릅뿌리, 질경이, 민들레 2. 부탄올과 클로르포름 분획에서 얻어진 물질이 높은 항균성
4	영지의 항균성 물질에 관한 연구	영지	n-hexane methanol, 물	Agar diffusion, cup method	1. 영지의 ethylacetate fraction B, fraction E 2. 세균에 대해서만 활성
5	식용 식물로부터 얻은 추출물의 두부, 어묵, 막걸리 변질균에 대한 항균성 검색	생약재, 식용 식물 및 부산물	75% 에탄올, 물	Agar diffusion method	1. 두부와 막걸리 변질 균에 황백 에탄올 추출물이 항균효과 2. 어묵 변질 균에 황백, 정향, 오배자, 리기다, 백급 및 적작약 에탄올 추출물이 항균효과

6	수산 미이용자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색	비식용 수산폐기물 , 식용. 비식용 해조류	물, diethylether, acetone, methanol	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 모자반 에테르, 메탄올추출물 <i>B. subtilis</i>에 항균효과 2. 모자반의 에테르, 아세톤, 메탄올 추출물, 참빗풀의 에테르, 아세톤 추출물은 <i>S. aureus</i>에 대해 항균효과 3. 에테르 추출물은 <i>S. aureus</i>에 대해 항균효과
7	환삼덩굴의 용매분획별 항균성 및 항산화성	환삼덩굴	물, 메탄올, 부탄올, 에칠아세테이트, 헥산	Agar diffusion method, serial dilution method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 환삼덩굴 메탄올 추출액의 부탄올 분획 2. 메탄올 추출물 항균성이 물 추출물 보다 우수 3. 메탄올 추출물의 부탄올 분획은 모든 시험균주에 항균성, 특히 <i>S. aureus</i>와 <i>Sacch. cerevisiae</i>에 대한 항균성 우수, 모든 분획이 <i>S. aureus</i>에 대해 항균성
8	초임계이산화탄소에 의한 톳과 알로에 추출물의 수율 및 항균활성	건조톳, 알로에 베라	초임계이산화탄소, 에탄올	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 톳과 알로에의 초임계이산화탄소와 에탄올 추출액 2. 모든 추출물이 <i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>Sac. cerevisiae</i>, <i>Alternaria</i> sp.에 대하여 항균활성 3. 세균, 효모, 곰팡이 순으로 항균활성이 작아짐
9	김치 발효미생물에 대한 대나무 잎 추출물의 항균력	대나무잎	methanol, acetate, ethylether, ethyl acetate	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 대나무잎의 ethyl acetate 추출물 2. <i>Brettanomyces custersii</i>, <i>Klebsiella oxytoca</i>, <i>Pichia membranaefaciens</i>에 대하여 강한 항균력, pH가 7일 때 보다 pH5일 때 더 강함, <i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>S.aureus</i> 등에서도 높은 항균력

10	쌀밥 부패미생물에 대한 녹차 물추출물의 항균 활성	녹차	증류수	생육저해에 대한 흡광도 측정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 녹차 물 추출물 2. 쌀밥 부패에 관여하는 주요 미생물인 <i>Bacillus subtilis</i>의 생육은 녹차 물추출물이 500, 100 ppm 첨가된 broth system에서 억제
11	매실과육부로부터 추출한 항균물질의 특성	매실	물, 에탄올	생육저해농도 곡선 및 최소저해농도 측정	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Bacillus cereus</i>, <i>Streptococcus faecalis</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Collectotrlchum fragriae</i>, <i>Fusarium</i> sp.에 대하여 매실추출물의 농도가 진해질수록 항균효과가 높아짐. 2. 열처리에 안정한 항균효과 3. 넓은 pH 범위(pH 3~11)에서 거의 동일한 항균효과 4. 친수성 분획이 소수성 분획보다 큰 항균 효과
12	국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균특성	한약재	75% EtOH 클로로포, 에틸아세테이트, 부탄올	생육저해에 대한 흡광도 측정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 가자육, 금앵자, 소목, 육두구는 뚜렷한 증식억제효과 2. 가자육, 금앵자, 소목 추출물은 에틸아세테이트 분획물에서 육두구는 클로로포름 분획물에서 더 높은 항균성
13	저급지방산 모노글리세라이드와 아디핀산의 항균작용에 관한 연구	저급지방산 모노글리세라이드(monocaprylin, monocaprin monolaurin), 아디핀산		최소저해농도 (MIC)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gram 음성균 저급지방산 모노글리세라이드(MG)는 단독으로 거의 항균효과가 없으나 아디핀산(AP)과 혼합 첨가시 적은 농도에서 강한 항균효과, 2. Gram 양성균 MG 단독으로 항균효과 있으나 높은 농도가 첨가되어야 하며 AP 혼합 첨가시 강한 항균작용 3. 유산균 항균효과가 적음 4. 효모 및 곰팡이 AP보다 MG가 강한 항균작용 5. Gram 양성균, 효모 및 곰팡이 MG C10이 MG C8보다 강한 항균작용

14	감초로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정	감초	에탄올, 클로로포름 , 에틸아세테 이트, 부탄올	최소저해농도 (MIC), 표준평판한천 배양법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 감초 75% 에탄올 추출물 의 에틸아세테이트 분획물 을 정제한 항균활성 소획 분: liquiritigenin 2. liquiritigenin의 항균활성 <ol style="list-style-type: none"> ① <i>L. monocytogenes</i> 10-50 ppm에서 증식억제, 50 및 100 ppm에서 살균 효과 ② <i>S. aureus</i> 30-50 ppm 에서 증식억제 ③ <i>E. coli</i> 100 ppm에서도 증식억제 효과 없음
15	고삼으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정	고삼	75% 에탄올, 클로로포름 , 에틸아세테 이트, 부탄올	최소저해농도 (MIC), 표준평판한천 배양법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 고삼 75% 에탄올 추출물 의 클로로포름 분획의 항균 활성 소획분: kushenol F 2. kushenol F의 항균 활성 <ol style="list-style-type: none"> ① <i>L. monocytogenes</i>: 30-50 ppm에서 살균 효과 ② <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>: 10 ppm에서 증식억제 ③ <i>E.coli</i>: 100 ppm에서도 증식억제 효과 없음
16	키토산 및 키토산 올리고당의 김치 관련 미생물에 대한 항균 특성	키토산, 키토산 올리고당	키토산, 키토산 올리고당	최소증식저해 농도(MIC), Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 키토산 및 키토산 올리고 당의 김치관련 미생물에 대 한 항균성 검토 2. C-4 키토산(분자량:16,000, 탈아세틸화도:99%)으로부 터 제조한 5~7량체의 함량 이 높은 키토산 올리고당 3. 3.0% 키토산은 9~20 mm, 5.0% 키토산 올리고당은 8~24 mm의 성장억제환, 키토산의 MIC는 0.01~0.05%, 키토산 올리고당의 MIC는 0.05~0.2% 4. 김치 유래 총 microflora에 대하여도 항균력, 특히 적 숙기

17	식품부패 및 병원성미생물에 대한 천연약용식물 추출물의 항균효과	한약재	에탄올	최소저해농도 (MIC), Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 산사, 황련, 측죽, 창출, 석창포 에탄올 추출물 : 그람양성, 음성 세균 모두 강한 항균성 2. 토사자 에탄올추출물: 그람 음성균 세균에서만 항균성 3. 황련 에탄올추출물(항균력 가장 높음) <ol style="list-style-type: none"> ① 다른 한약재에 비해 적은 농도에서 다양하고 강한 항균력 ② 그람양성, 음성 세균에서 강한 항균력 ③ 열에 안정 ④ 알칼리성에서 더욱 강한 항균력 5. 황련 에탄올 추출물로부터 부분정제한 물질 <ol style="list-style-type: none"> ① 그람양성균, 그람음성균, 효모, 곰팡이균: 항균력 있음 ② <i>Candida utilis</i>, <i>Rhizopus javanicus</i> : 항균력 없음 : <i>Listeria monocytogenes</i> 36시간까지 생육억제, 그 이후부터 급속한 생육, <i>Staphylococcus aureus</i>는 완전히 생육 억제 ④ 100 ug/ml 첨가시 : <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> 모두 생육 억제
18	과산화피로인산나트륨의 항균성 및 안정성	과산화피로인산나트륨		Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 과산화피로인산나트륨 2. 0.1%(w/v) 농도에서 항균력

19	항균활성이 있는 한약재의 복합첨가가 김치 숙성에 미치는 영향	한약재 (울금, 자초, 감초, 고삼, 오미자)	95% ethanol	pour plate method	1. pH 감소와 산도증가 억제 : 고삼·감초, 감초·오미자. 2. 미생물 성장 억제 : 고삼·감초, 감초·오미자
20	구상나무 리그난류의 항균활성	구상나무	에탄올	Agar diffusion method	구상나무 목부 에탄올 추출물의 디에틸에테르 가용부로부터 단리된 리그난류 : 10^3 ppm 및 10^4 ppm 농도에서 <i>K. pneumoniae</i> 와 <i>V. paragaenolyticus</i> 균에서 높은 활성
21	휘발성 Allyl Isothiocyanate계 화합물의 항균 활성에 관한 연구	천연에서 발견되는 휘발성 항균 물질		최소증식저해 농도(MIC)	1. Allyl isothiocyanate(AIT), benzyl isothiocyanate(BIT), ethyl isothiocyanate(EIT) : MIC는 100-200ug/dish, 증식저해 정도는 곰팡이 > 효모 > Gram 음성 세균 > Gram 양성 세균 순. 2. 초산 : MIC는 50-500 ug/dish로 isothiocyanate계보다 낮음 3. isothiocyanate계와 초산 혼합 : isothiocyanate계 단독으로 사용하는 것과 비슷
22	참치백자로부터 추출한 Protamine의 특성 및 항균활성	참치 백자	염산추출법	Agar diffusion method	1. 연어 백자로부터 추출한 standard protamine(SP)보다 참치 백자로부터 추출한 protamine (TP)의 항균효과가 약함. 2. 참치백자로부터 추출한 TP를 pepsin 처리 했을 때 SP와 유사한 수준으로 활성 향상
23	<i>Streptococcus mutans</i> 에 대한 키토산의 항균효과	키토산		pour plate method	약 30,000의 분자량을 갖는 키토산이 가장 높은 항균활성

24	섬바디로부터 분리된 Falcarindiol과 유화제와의 혼합에 따른 <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 항균 상승효과	섬바디, monoglyceride(MG)		최소증식저해 농도(MIC)	섬바디로부터 분리된 falcarindiol과 monoglyceride와의 혼합물은 살균효과가 단독 사용시 보다 상승
25	약용식물 추출물의 <i>Helicobacter pylori</i> 에 대한 항균활성	약용식물	증류수, chloroform, ethyl acetate, butanol	2-fold dilution 방법, 최소증식저해 농도(MIC), Agar diffusion method	<i>H. pylori</i> 의 urease 활성은 소목, 소엽, 황련에 의해 80% 이상 억제, 특히, 소목은 urease 활성을 95% 이상 억제
26	소세지 제조시 첨가한 키토산의 분자량에 따른 항균성 및 품질변화	키토산			1. 키토산 분자량 약 120,000의 경우 대부분의 미생물이 0.01% 첨가시 80% 이상의 생육 저해율 2. 키토산 분자량 약 30,000의 경우 0.1% 첨가시 80% 이상의 생육 저해율
27	식중독성 미생물에 대한 한약재 용매 분획 추출물의 항균력 검색	한약재	50% methanol, hexane, H ₂ O	Agar diffusion method, 최소증식저해 농도(MIC)	1. 50% methanol 추출물 : 대부분의 미생물에 대해 높은 항균효과 2. 황련시료 : <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 에 대한 항균력 3. 쇠비름, 사군자, 백작약, 대황시료 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Penicillium citreonigrum</i> 에 대해 높은 항균력

28	길항균에 의한 Aspergillus flavus 억제 및 aflatoxin의 분해	길항균			길항성 균주가 aflatoxin에 대 한 분해활성을 가짐
29	영글 과즙 및 과피 추출물의 항균효과	영글 과즙 및 과피	MeoH, EtOAc, acetone	최소증식저해 농도(MIC)	1. 영글 과즙 추출물이 과피 추출물 보다 항균효과 우수. 2. 영글 과즙 아세톤 추출물 의 항균효과가 우수 3. <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> 0157:H7에 대하여 우수
30	작약추출물의 항균특성	작약뿌리	ethanol	Agar diffusion method, 생육저해곡선	작약추출물이 농도에 비례하 는 항균력, 500 ppm 이상에 서 미생물의 생육 완전히 억 제, 열 및 pH에 안정
31	된장추출물의 항균활성	된장	80% methanol, Chlorofo r, Ethyl acetate, Butanol		Ethyl acetate, Butanol층에서 높은 항균활성
32	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7, <i>Staphylococcus aureus</i> 및 <i>candida albicans</i> 에 대한 키토산의 항균 효과	키토산	3% 염산, 50% NaOH	poured plate method	1. <i>E. coli</i> 0157:H7, <i>S. aureus</i> : 분자량 10,000인 키토산 일때, 키토산 0.1 mg/ml 첨가시 가장 강한 항균활성, 2. <i>C. albicans</i> : 6량체의 키토산 올리고당 일 때, chitohexaose 1 mg/ml 첨가시 가장 강한 활성. 3. 키토산 처리 1시간 이내 에서 사멸 속도가 가장 높음
33	식품의 주요 성분이 예덕나무 핵산추출물의 <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 항균활성에 미치는 영향	예덕나무 잎	75% 에탄올, <i>n</i> -hexane	생균수 계수	soluble starch(1%, 3%)는 예덕나무 hexane 분획물 1,000 ppm 및 linolenic acid 1,000 ppm의 항균 활성을 저 해하지 않음.

34	식중독 미생물에 대한 유기산 및 에탄올의 항균활성 비교연구	유기산, 에탄올		흡광도 측정에 의한 증식곡선의 면적, 최대성장율 (MGR), MGT (minimum generation time), DT (detection time)	<p>1. 7% 에탄올 : 24시간 동안 모든 균주 증식 못함</p> <p>2. 0.1% 유기산</p> <p>① <i>S. aureus</i> : 프로피온산이 증식 저해 효과</p> <p>② <i>S. typhimurium</i> : 초산이 증식 저해 효과</p> <p>③ <i>L. monocytogenes</i> : 프로피온산, 주석산, 젖산이 증식 저해 효과</p> <p>④ <i>E. coli</i> 0157:H7 : 초산, 프로피온산이 증식 저해 효과</p> <p>3. 1% 에탄올, 0.01% 유기산 병용</p> <p>① <i>S. typhimurium</i> : AREA에서 2% 에탄올 및 0.05% 초산의 증식 저해율과 비슷</p> <p>② <i>L. monocytogenes</i> : AREA에서 0.05% 프로피온산 및 MGR, MGT, DT에서 2% 에탄올과 비슷</p> <p>③ <i>S. aureus</i> : 0.01% 프로피온산을 단독으로 사용했을 때가 오히려 증식 저해 효과가 높음</p> <p>④ <i>E. coli</i> 0157:H7 : AREA를 제외하고 증식 저해 받지 않음</p>
35	오미자종자의 항산화성, 항균성, 아질산염소거능	오미자	hexane, water, methanol, ethanol, ethyl acetate, chloroform, buthanol	Agar diffusion method	오미자종자 methanol 추출물을 buthanol로 분획했을 때 <i>L. planterum</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> 에서 항균활성이 가장 큼

36	국내 및 인도네시아산 식물의 에탄올 추출물의 항균효과	국내식물 150종 및 인도네시아 식물 82종	70% 에탄올, ether, 60% methanol, acetonitrile 등	Agar diffusion method, 최소증식저해농도(MIC)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 강황, 소목, 육두구, 익지인, 죽엽, 초두구, asam, bolong-bolong, clove, gambir, klembak, pasak bumi의 항균력 우수 2. 주 항균성분 <ol style="list-style-type: none"> ① 육두구 : limonene, caprylic acid ② bolong-bolong : α-terpineol
37	연어정자로부터 제조된 프로타민의 항균성 및 항산화성	연어정자	H ₂ SO ₄ , 에탄올, 온수	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 곰팡이를 제외한 그람양성 및 그람 음성균의 성장 대부분 억제 2. 초음파 전처리로 제조한 UU6, 마이크로파 전처리로 제조한 P60의 항균 활성이 높음
38	운향으로부터 <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 항균 활성 물질의 분리 및 구조 동정	운향	75% 에탄올, <i>n</i> -헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 물	Agar diffusion method, 최소증식저해농도(MIC), 표준 평판 한천 배양법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 운향 75% 에탄올 추출물을 클로로포름으로 분획한 후 silicagel column chromatography로 소분획 : gravacridonechlorine 2. gravacridonechlorine의 항균활성 강력한 살균
39	<i>streptococcus mutans</i> 에 대한 specific IgY의 항균력	면역화된 IgY의 함유 계란	λ -carrageenan, 증류수	평판배양법, 시간별 흡광도 측정, 플라그형성력 test	<ol style="list-style-type: none"> 1. 면역화 여부 면역화된 조난황 specific IgY를 첨가한 처리구의 <i>S. mutans</i>균 응집 효과 확실 2. 조 난황 specific IgY 농도별 <ol style="list-style-type: none"> ① 5%이상 첨가구에서 균체 응집현상 ② 탁도는 10% 이상에서 탁월한 효과 ③ 균수가 많을 수록 많이 응집 ④ 15%에서 플라그 형성이 75% 저해

40	식중독균에 대한 신갈나무 잎 추출물과 유기산의 항균효과	신갈나무 잎	증류수, 75% 에탄올, 메탄올	Agar diffusion method, 최소증식저해 농도(MIC)	1. 추출 온도별 60℃가 가장 높은 항균력 2. 추출 용매별 에탄올이 가장 높은 항균력 3. 젖산, 구연산, 초산 및 신갈나무 잎 에탄올 추출물 의 병용 처리시 <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, <i>E. coli</i> 0157:H7 0019에는 효과가 없지만, <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 19111에는 상승항균 효과
41	예덕나무로부터 <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> 에 대한 항균 활성 물질의 분리 및 구조 동정	예덕나무	75% 에탄올, 헥산, 클로로포름 , 에틸아세테 이트	Agar diffusion method, 최소증식저해 농도(MIC)	예덕나무 75% 에탄올 추출물 의 헥산 분획의 항균 활성이 우수한 소획분 M34-4-4: linolenic acid - 50ppm에서 <i>L. monocytogenes</i> 2균주 증식 저해
42	오미자로부터 항균활성 물질의 분리 및 항균효과	오미자	methanol, n-hexane, dichlorom ethane, ethyl acetate, butanol	Agar diffusion method	오미자 methanol 조추출물의 ethyl acetate: compound, trimethylcitrate
43	관중(<i>Dryopteris</i> <i>crassirhizoma</i> Nakai)의 식중독 미생물 증식 억제 물질의 분리 및 항균작용	관중	75% 에탄올 헥산 클로로포름 에틸아세테 이트부탄올	최소증식저해 농도(MIC)	관중 에탄올 추출물의 헥산 분획물의 소획분 D8-2-5 : 살균효과, <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> , <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> 에 대하여 50ppm 첨가 수준에서 균증식 완전히 억 제, <i>Staphylococcus aureus</i> 에 대하여 25ppm 첨가시 균증식 완전히 억제

44	식중독 미생물에 대한 큰까지수영(<i>Lysimachia clethroides</i> Duby)의 항균활성	77종 식물	75% 에탄올, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올	Bioscreen C (최소증식저해농도;MIC)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 천연 식물체를 이용한 식중독 미생물의 제어 실험 2. 감송향, 사인, 진득찰, 천향련, 침향, 큰까지수영, 호프 3. 큰까지수영의 순차 용매분획물의 식중독미생물 증식억제 효과
45	항균성 물질을 생산하는 <i>Lactobacillus amylovorus</i> IMC-1의 배양학적 특성	<i>L. amylovorus</i> IMC-1		흡광도 전기영동	<ol style="list-style-type: none"> 1. 발효식품의 제조에 유용한 starter 개발 및 probiotics로서 이용 가능성 항균성 물질 검토 2. <i>L. amylovorus</i> IMC-1이 생산한 항균성 물질: 강한 살균작용 <ol style="list-style-type: none"> ① <i>Escherichia coli</i> 0157 배양 24시간째 2log 감소, 48시간 배양 후 검출되지 않음. ② <i>Shigella flexneri</i> 배양 4시간째 2log 이상 감소, 6시간 배양 후 검출되지 않음.
46	신생아 분변 및 동치미에서 분리한 젖산균 대사산물의 항균특성	신생아 분변과 동치미		Bioscreen C (최소증식저해농도;MIC)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 항균활성이 우수한 젖산균 선발 2. <i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Lactobacillus fermentum</i>
47	식용가능한 약용식물 추출물의 항균 특성	62종 특용작물	80% 에탄올, 물	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 식품에 사용가능한 천연보존제 개발하기 위해 특용작물 대상으로 실험 2. 복분자, 가자육, 오배자 3종 선발 3. 가자육과 오배자 추출물이 비교적 넓은 항균력을 나타냈고, MIC도 낮은 수치를 나타냄. 4. 천연 식품보존제로서의 가능성
48	국내산 대나무 줄기와 잎의 에탄올 추출물의 항균활성	국내산 대나무	70% 에탄올	Agar diffusion method, MIC	<ol style="list-style-type: none"> 1. 국내산 대나무의 천연 보존제로서의 가능성 검토 2. 왕대줄기 70% 에탄올 추출물

49	장미 에탄올 추출물의 항산화성 및 항균성	장미(<i>Rosa hybrida</i> L. cv. Mary Devor)	0, 75, 85, 95% 에탄올	일반성분, 산가, 과산화물가, TBA가 측정. Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 장미를 이용하여 기능성 조사 및 이용성 탐색 2. α-tocopherol, BHT보다 장미 추출물의 항산화 효과가 높음 3. 85% 에탄올 추출물에서 가장 긴 유도기간 나타냈고, 시험균주에 대해 유의적으로 높은 항균효과를 나타냄 4. 장미 추출물의 항산화성과 항균성 확인
50	오미자(<i>Schizandra chinensis</i>) 추출물의 항균물질 분리	오미자	물증류법	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 오미자의 essential oil에 존재하는 항미생물 활성물질 분리 2. 오미자 정유, citronellol 및 terpineol을 첨가한 배지에서 <i>E. coli</i> 보다는 <i>S. aureus</i>에 대해 항균력 큼 3. 농도별 오미자 정유 첨가 시 <i>S. aureus</i>의 경우 6~12 시간까지 생육억제 4. citronellol과 terpineol이 오미자 정유성분 중에 존재하는 항균물질임
51	생마늘즙과 열처리 마늘즙의 항균활성 비교	마늘	분쇄	생균수 측정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 식중독 세균과 젖산균에 대한 생마늘의 항균력과 마늘에 열처리하여 항균력 측정 2. 생마늘의 경우, 식중독 세균은 0.5% 이상, 젖산균은 1.5% 이상에서 많은 집락 감소 3. 생마늘 농도 1%가 식품에 첨가하거나 보존제로 사용할 때 가장 효과적임
52	마늘즙의 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 에 대한 항균작용	통마늘	마쇄	생균수 측정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 마늘즙 처리량 3%에서는 생균수 5 log, 5%에서는 6 log의 생균수 감소 2. 마늘즙의 가장 뚜렷한 저해 효과는 저장 9일에 약 2 log의 생균수 감소 3. 마늘의 조미료로서 기능과 천연 방부제로써의 항균효과

53	매실과 오미자 추출물의 항균성과 기능성 고추장의 제조	대추, 구기자, 매실, 오미자 발효추출액 (건솔잎, 헛개나무, 감잎, 오리나무, 갈화)	물	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 천연물로부터 항균성의 효능 탐색, 기능성 식품개발 목적 2. 오미자와 매실의 항균력은 6~10 mm, 대추와 구기자는 1 mm, 솔잎 등은 거의 보이지 않음 3. <i>S. chinensis</i> H-20에 대한 농도 의존성은 50µl에는 5배, 75µl에는 완전 저해효능 4. 관능평가에서 찹쌀고추장이 3.39와 비교해서 매실고추장은 4.29, 오미자고추장은 2.43으로 나타났으며, 견고성은 매실고추장은 4.45배, 오미자고추장은 1.78배로 높음
54	회분식과 연속식에 의한 루테린 생산 및 루테린의 항균 특성	<i>Lactobacillus reuteri</i>		흡광도 또는 MIC	<ol style="list-style-type: none"> 1. 다양한 조건에서 루테린의 생산성 비교 연구 2. 회분식 배양에서 온도가 높을수록 시간당 생산량 증가 3. 아미노산 첨가한 상황에서 루테린 활성 조사시 proline을 제외한 대부분에서 활성 저하 4. 루테린은 다양한 식중독균의 사멸을 유도 5. 회분식에 비교하여 연속식 공정으로 루테린 생산 현저히 증가
55	<i>Helicobacter pylori</i> 에 대한 항균활성을 나타내는 <i>Pediococcus pentosaceus</i> CBT SL4 배양물의 감염방어 및 제균활성	김치분리 유산균주 (<i>P. pentosaceus</i> CBT SL4)	배양액 농축 건조	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pediococcus pentosaceus</i> CBT SL4 균이 생산하는 항균물질 농축건조물은 <i>Helicobacter pylori</i>에 대하여 평판 및 액상배양 조건에서 생육억제 2. 보균자 인체 실험: 제균작용 3. 사막모래쥐 실험: 감염방어 및 제균작용

56	지치추출물의 식중독성 미생물에 대한 항균 효과	지치	petroleum ether, chloroform, ethyl methanol, ethyl acetate	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 지치 추출물 농도별 항균 활성 : ethyl acetate 추출물이 가장 큰 항균력 지치 추출물의 균주별 항균활성 : <i>S. aureus</i>, <i>S. dysenteriae</i> 가 가장 민감하게 반응 지치의 ethyl acetate 추출물과 산두근의 ethyl acetate 추출물 혼합시 항균활성 : 단독으로 사용했을 때 보다 상승 효과
57	가공조건에 따른 marta rosemary의 항균성	marta rosemar	증류수, 95% ethanol, 1-butanol, hexane	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 에탄올, butanol, hexane 추출 균주에 따른 에탄올 추출물의 항균성 : <i>S. typhimurium</i>, <i>B. subtilis</i>에 대하여 높은 항균활성 용매별 항균성 : butanol, hexane 추출액이 높은 항균성
58	차나무 종자 추출물의 항균활성 및 항종양활성	차나무의 열매와 잎	70% 에탄올, 증류수	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 차나무 종자의 70% 에탄올과 물 추출물에서 효모에 대한 항균활성 차나무 종자 물 추출물 항종양 활성
59	동백나무 잎 추출물이 식품유해 미생물에 미치는 항균 효과	동백나무 잎	methanol, n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol	Agar diffusion method, Turbidimetric Assay, MIC	동백나무 잎 methanol 추출물 (water, butanol 분획물)
60	생약재의 항균, 항고혈압 및 항암 활성	32종의 생약재	70% 에탄올, 증류수	Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 항균 활성 : 가자의 물 추출물, 70% 에탄올 추출물 항곰팡이 활성 : 계피의 70% 에탄올추출물

61	마늘 추출물의 항균, 항고혈압 및 항암활성	마늘	methanol, ethyl acetate, chloroform, hexane	Agar diffusion method	항균, 항곰팡이 활성 : 마늘 ethyl acetate, chloroform 추출물
62	혼합비율에 따른 키토산/젤라틴 혼합용액의 항균활성에 관한 연구	키토산, 젤라틴		Agar diffusion method, 최소증식저해 농도(MIC)	1. 키토산/젤라틴 혼합용액 2. <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> : 키토산/ 젤라틴 = 2/8(항균활성을 나타내는 키토산의 절대량은 0.3mg) 3. <i>L. monocytogenes</i> : 키토산/ 젤라틴 = 4/6(항균활성을 나타내는 키토산의 절대량은 0.6mg)
63	감초 추출물이 항생제 내성균주의 항균활성에 미치는 영향	감초	MeOH, n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol	최소증식저해 농도(MIC)	1. 감초 hexane, chloroform 분획물 2. 감초 chloroform 분획물 : 200 mg/100ml 이상에서 항생제 내성 포도상구균에 대해 항균효과
64	식품부패세균에 대한 가자 추출물의 항균활성	가자	증류수, 70% ethanol, butanol, hexane, acetone, chloroform	Agar diffusion method	1. 가자 증류수, 70% ethanol 추출물의 butanol 분획물 : <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> 균종에 대해 좋은 항균활성
65	홍국첨가 김치추출물의 항균활성 및 암세포 증식억제 활성	<i>Manascus purpureus</i>	80% 주정	Agar diffusion method	1. 홍국 첨가한 김치 추출물 : 암세포주 증식 저해 활성 및 항균활성 2. 김치 발효가 진행되면서 김치 대조군 및 홍국첨가 김치균의 항균성 증가 3. 홍국 함량이 증가할수록 항균활성 증가

66	식중독 유발세균의 증식에 미치는 금은화 추출물의 항균효과	금은화, 인진쑈	petroleum ether, chloroform , ethyl acetate, methanol	Agar diffusion method, 미생물 생육 곡선 측정	1. 금은화 ethyl acetate 추출물 : <i>S. epidermidis</i> , <i>S. dysenteriae</i> 성장 억제 효과 2. 금은화 ethyl acetate 추출 물 < 금은화 ethyl acetate 추출물+인진쑈 ethyl acetate 추출물
67	야콘 K-23의 항균성 및 기능성 야콘잼의 제조	야콘, 결명자, 가시오가피 , 당귀	열탕추출 분쇄추출	Agar diffusion method	1. 식중독 원인균에 대해 결 명자, 당귀, 가시오가피는 7~10mm, 야콘 추출물은 10mm의 항균력 나타냄 2. 야콘 잼 제조한 결과, 연초 록색의 상품가치가 높고, 조직감과 색상 우수함
68	메밀 가수분해물의 항고혈압, 항균 및 항곰팡이 활성	단메밀, 쓴메밀	증류수, Viscozyme L, Alcalase 2.4L 효소 2%(V/W)	Agar diffusion method	1. 메밀에 효소를 첨가 가수 분해물 제조하고, 항균, 항 곰팡이, 항고혈압 활성 조사 2. Viscozyme L 첨가한 단메 밀 가수분해물 : <i>L. monocytogenes</i> , <i>S.</i> <i>typhimurium</i> 에 3~7.2 mm 로 항균 활성 나타냄, <i>T.</i> <i>reesei</i> 에 3.74~12 mm로 항곰팡이 활성 나타냄.
69	감초의 에탄올 추출물의 항균활성 및 안정성 조사	유럽감초 (<i>Glycyrrhi</i> <i>za glabra</i> var.)	물, 헥산, 아세톤,메 탄올, 에탄올 에틸아세테 이트	Agar diffusion method	1. 감초에서 항균력을 가지는 유효물질 얻기 위해 추출 조건의 최적화, 최적 추출 물의 항균활성과 안전성 조사 2. 감초 95% 에탄올 상온에서 12시간 추출물: Gram(+) 세균에 탁월한 항균활성
70	암대극 추출물의 항산화 및 항균활성	암대극	80% ethanol, 증류수, n-hexane, dichlorom ethane, ethylaceta te, butanol	Agar diffusion method, MIC, 미생물 생육 곡선 측정	암대극의 80% ethanol 추출 물의 ethylacetate, butanol 분 획물 (특히, ethylacetate 분획물)

71	<p>몇 가지 천연 향신료 정유의 <i>Vibrio</i>속 균주들에 대한 항균효과 및 그 휘발성 성분</p>	<p>생강, 겨자, 마늘, 정향</p>	<p>정유성분</p>	<p>기체상 접촉</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Vibrio</i>속 균주를 효과적으로 제어하고자 휘발성과 항균활성이 있는 6종의 정유의 항균효과 비교 2. 생강, 겨자, 마늘, 정향 정유 처리 3. 생강 정유 처리 <ol style="list-style-type: none"> ① <i>V. parahaemolyticus</i>에 대하여 22.5~ 85.7%의 증식억제율 ② 주요 휘발성 성분은 β-bisabolene와 β-sesquiphellandrene 4. 겨자 정유 처리 <ol style="list-style-type: none"> ① <i>V. paprahaemolyticus</i>에 1000 ppm 처리시 100% 증식 억제율 ② 겨자의 주요성분은 ally isothiocyanate와 4-isothiocyanato-1-butene 5. 마늘 정유 처리 <ol style="list-style-type: none"> ① 1000ppm 처리시 <i>V. paprahaemolyticus</i>에 22.8%, <i>V. vulnificus</i> 01 14.6%, <i>V. vulnificus</i> 02 32.9% ② 휘발성 성분은 dimethyl sulfide와 methyl-2-propenyl sulfide 6. 정향 싹과 잎 및 전체 정유 처리 <ol style="list-style-type: none"> ① <i>V. vulnificus</i> 02 증식억제율 60.6~80.3%로 높은 항균활성 ② 휘발성 성분은 eugenol, β-caryophyllene
----	---	-----------------------	-------------	---------------	---

72	죽초액의 항균활성 및 대두유에 대한 산패 억제 효과	기계식, 재래식 죽초액 (푸른 왕대)	탄화	MIC, MLC, Agar diffusion method	<ol style="list-style-type: none"> 1. 재래식 죽초액 > 기계식 죽초액 2. 그람양성균 > 그람음성균 > 젖산균 > 효모
73	오존화 올리브유의 항균성 및 변이원성 평가	오존화 올리브유		Agar diffusion method, 최소증식저해 농도(MIC)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 오존화 올리브유 2. Agar diffusion method: 항균활성이 나타나기 시작한 농도 <ul style="list-style-type: none"> ① <i>Propionibacterium acnes</i>: 4mg/ml ② <i>Staphylococcus epidermidis</i>: 1mg/ml ③ <i>Staphylococcus aureus</i>: 0.5mg/ml ④ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: 0.5mg/ml 3. 최소증식저해농도(MIC) <ul style="list-style-type: none"> ① <i>Propionibacterium acnes</i>: 8mg/ml ② <i>Staphylococcus epidermidis</i>: 8mg/ml ③ <i>Staphylococcus aureus</i>: 10mg/ml ④ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: 8mg/ml
74	우슬추출물의 <i>Clostridium difficile</i> 에 대한 항균 효과	40여 가지의 생약재	95% 에탄올, n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol, water	Agar diffusion method, 최소증식저해 농도(MIC)	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Clostridium difficile</i>에 대한 생육저해 활성 측정: 우슬, 희침, 황백은 1,000ppm 농도에서 90%이상의 높은 항균활성, 특히 우슬의 ethylacetate 분획물이 가장 높은 항균활성 2. 우슬의 ethylacetate 분획물의 <i>Clostridium difficile</i>에 대한 MIC: 625ug/ml

75	<i>Salmonella gallinarum</i> 에 대한 specific IgY의 항균력	면역화된 IgY 함유 계란	증류수, 0.1% λ-carrageenan	현미경적 관찰 및 탁도 측정, pH 변화	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Salmonella gallinarum</i>로 면역화된 산란계로부터 생산된 계란 난황 중에 들어 있는 anti-<i>Salmonella gallinarum</i> specific IgY의 효능 검토 2. 전체 IgY 중 anti-<i>Salmonella gallinarum</i> IgY의 특이항체 비율은 23% 3. 생산된 IgY는 <i>Salmonella gallinarum</i>에 만 선택성을 갖는 것으로 나타남 4. 균체들의 응집현상은 IgY 0.2% 이상 첨가, pH와 탁도는 IgY 0.1% 이상 첨가 구에서 <i>S. gallinarum</i> 성장 억제에 탁월한 효과를 볼 수 있음. 5. <i>S. gallinarum</i>로 면역화된 닭으로부터 생산된 계란에서 추출된 IgY를 사용하면 가금티푸스를 예방하는데 이용될 수 있음
76	식품유해균에 대한 홍국 추출물의 항균활성	홍국	70% 에탄올	Agar diffusion method, dilution test	<ol style="list-style-type: none"> 1. 항균활성을 나타내는 색소 물질을 함유한 <i>Monascus</i> 균주 중 붉은 색소 생산력이 높은 6종 <i>Monascus</i> 균주로 홍국제조 2. <i>M. kaoliang</i> ATCC 46597, <i>M. purpureus</i> IFO 4482가 식중독균에 대해 항균활성이 높고, 농도에 따른 증식억제효과가 나타났으며 배양 48시간까지 지속적 유지 3. 천연의 붉은색을 띠는 홍국추출물이 식품의 천연착색제 및 보존제 소재로의 적용 가능성

나. 항균활성 예비물질 선정

문헌정보 분석 결과를 이용하여 최종적으로 20여종의 예비후보물질을 선발하였다. 금앵자, 지유, 고삼, 구기자, 육두구, 소목, 가시오가피, 자근, 황백, 강황, 작약, 정향, 우슬, 황련, 느릅나무근, 오배자가 선발되었으며 사과, 오이, 녹차, 감초도 예비물질로 선정하였다.

다. 선발원료의 소재화 기술 개발

선발원료의 최적 추출조건 설정을 위하여 사과, 오이, 녹차, 감초를 대표시료로 하여 최적 추출조건을 설정하고자 하였다. 열수추출물의 경우 마쇄한 시료 100g에 5배에 상당하는 물을 첨가하여 환류냉각관을 부착시킨 플라스크에서 100℃에서 6시간 추출하고 여과지(Whatman No. 2)로 여과하였다. 에탄올 추출물은 마쇄한 시료 100g에 5배에 상당하는 에탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 추출한 후 여과하여 제조하였다. 추출수율은 추출물을 1 mL 취하여 105℃ 상압가열건조법으로 수분정량을 실시한 후 최종 추출물의 양을 보정하여 계산하였다.

Table 2. Determination of extracting solvent

Solvents	Soluble solid (%)			
	사과	오이	녹차	감초
water	6.1	1.3	4.7	8.2
60% EtOH	4.6	1.0	4.7	6.0
100% EtOH	4.7	1.0	1.5	1.2

Table 3. Comparison of 30 second Time Kill results for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Solvents	Average Log ₁₀ Reduction (log CFU/ml)			
	사과	오이	녹차	감초
water	- ¹⁾	-	-	-
60% EtOH	-	-	0.14±0.05	3.30±0.11
100% EtOH	0.07±0.06	0.09±0.08	0.07±0.02	0.03±0.02

1)no inhibition

실험결과 감초를 60% 에탄올로 추출한 처리구가 가장 높은 항균활성을 나타내었으며 이 외의 다른 처리구는 대조구와 거의 유사한 경향을 나타내었다. 60% 에탄올로 시간에 따른 추출특성을 측정하였다. 60% 에탄올로 상온에서 처리한 후 6시간, 12시간, 18시간, 24시간 처리한 후 항균활성의 변화를 측정하였다. 실험결과 추출시간에 따라 항균활성의 급격한 변화는 없었으며 6시간부터 24시간까지 거의 일정한 양상을 나타내었다. 따라서 추출시간은 커다란 변수가 되지 않음을 알 수 있었다.

Table 4. 추출시간에 따른 항균 활성

추출시간 (h)	항균활성	고형분 함량
6	4.02±0.07	6.0
12	4.08±0.02	6.1
18	4.12±0.10	6.1
24	4.13±0.10	6.3

추출온도에 따른 항균활성의 변화를 측정하였다 4℃, 20℃, 30℃, 40℃로 처리한 항균활성의 변화를 측정하여 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 실험결과 추출온도에 따라 항균력의 급격한 변화는 없는 것으로 나타났다. 따라서 60% 에탄올로 추출할 때 추출온도도 중요한 요소가 아님을 알 수 있었다.

Table 5. 추출온도에 따른 항균 활성

추출온도 (℃)	항균활성	고형분 함량
4	3.97±0.03	6.0
20	4.23±0.07	6.1
30	4.35±0.14	6.1
40	4.32±0.04	6.2

최종적으로 손세척제에 활용한 시료의 추출은 5배량의 60%(w/w) 에탄올을 가하여 상온에서 하룻밤 정도 정치하면서 추출하는 것이 공정상 효율적임을 알 수 있었으며 이후의 실험은 모두 이 조건에서 실시하였다.

라. 추출물의 항균활성 검토

(1) 기존 손소독제 항균 활성 측정

현재 시중에서 구할 수 있는 손소독제와 학회에서 홍보물로 수거한 손소독제를 대상으로 항균활성을 측정하였다. Agar 농도는 0.8%를 사용하였으며 paper disk에 50µl의 손소독제를 넣어 plate에 올려서 배양하였으며 성장억제활성으로 형성된 억제환의 크기를 측정하고자 하였다. 그 결과 대부분의 hand sanitizer에서는 항균활성이 없거나 미약한 것으로 나타났다. 이는 paper disk method는 강한 sanitizer의 항균활성 측정에 적합한 방법이기 때문에 상대적으로 항균활성이 낮은 hand sanitizer의 항균활성은 측정되지 않은 것으로 판단되었으며 따라서 항균활성을 좀 더 미세하게 측정할 수 있는 대안적인 실험법이 필요함을 알 수 있었다.

Table 6. 시중에서 구입하거나 학회에서 확보한 hand sanitizer의 항균효과(paper disk method)

No.	Sanitizer	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>E. coli</i> 0157:H7 ATCC 43895	<i>Sal.</i> <i>typhimurium</i> <i>m</i> ATCC 6994	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> <i>es</i> ATCC 19113
	control	-	-	-	-	-
1	3M	-	-	-	-	-
2	KAY ACTIGEL	-	-	-	-	-
3	Purell	-	-	-	-	-
4	FSNS (Food Safety net Services)	-	-	-	-	-
5	BIOMIST	-	-	-	-	-
6	FSRIO (Food Safety Research Information office)	-	-	-	0.6	-

* paper disc size : 8mm

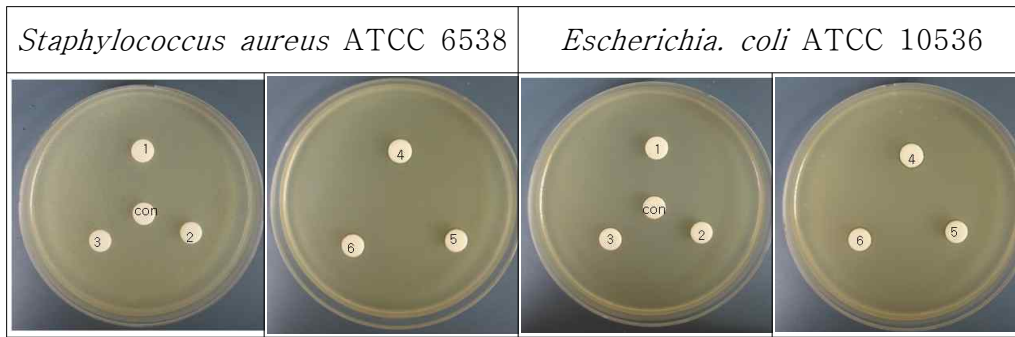


Figure 1. 시판 손세척제의 항균활성

(2) 손소독제 항균활성 측정방법

2008년도 IAFP(International Association for Food Protection) 학회에 참석하여 수집한 정보를 활용하여 새로운 항균활성 측정방법인 time-kill 방법을 확립하고 hand sanitizer의 항균활성 측정에 이용하고자 하였다. 새로운 방법은 “Standard guide for assessment of antimicrobial activity using a time-kill procedure. ASTM international”을 참고하여 확립하였으며 실험방법은 다음과 같다.

1. Material and inoculum suspension preparation

(1) 균

- 9-10 log CFU/ml 되도록 준비

(2) BPB(Butterfield Phosphate Buffer Water with Neutralizer)

- 1.25ml Phosphate buffer stock solution, 10g Tween 80, 3g Lecithin을 넣고 총 부피가 1L가 되도록 멸균증류수로 채우고 pH 7.2±0.2 맞춘 후 tube에 9ml씩 넣고 멸균

※ Phosphate buffer stock solution

- 34g KH₂PO₄을 500ml 멸균증류수에 용해하고 pH 7.2±0.2조정 후 증류수를 가하여 1L로 맞춘 후 멸균

(3) PBS(Phosphate Buffered Saline Dilution Water)

- 1.25ml Phosphate buffer stock solution, 8.75g NaCl을 넣고 총 부피가 1L가 되도록 멸균증류수로 채우고 pH 7.2±0.2 맞춘 후 tube에 9ml씩 넣고 멸균

※ Phosphate buffer stock solution

- 34g KH_2PO_4 을 500ml 멸균증류수에 용해하고 pH 7.2 ± 0.2 조정 후 증류수를 가하여 1L로 맞춘 후 멸균

(4) Sanitizer

- 30°C로 준비

2. Procedure

- (1) Sanitizer 9.9ml에 균 0.1ml 넣고 혼합
- (2) 30초 동안 반응
- (3) 9ml BPB에 1ml Sanitizer/균 혼합액 넣고 혼합
- (4) counting 가능한 균수까지 9ml BPB로 serial dilution
- (5) pour plate method로 균 수 counting

3. 중화검증

(1) Neutralizer Effectiveness

- ① 9ml BPB에 1ml sanitizer 넣고 혼합
- ② 9.9ml BPB/sanitizer에 0.1ml 균을 넣고 혼합
- ③ counting 가능한 균수까지 9ml BPB로 serial dilution
- ④ pour plate method로 균 수 counting

(2) Neutralizer Toxicity

- ① 9ml BPB에 1ml PBS 넣고 혼합
- ② 9.9ml BPB/PBS에 0.1ml 균을 넣고 혼합
- ③ counting 가능한 균수까지 9ml PBS로 serial dilution
- ④ pour plate method로 균 수 counting

(3) Test Organism viability

- ① 9.9ml PBS에 0.1ml균 넣고 혼합
- ② counting 가능한 균수까지 9ml PBS로 serial dilution

(4) Test Material Control

- ① 9.9ml sanitizer에 0.1ml균 넣고 혼합
- ② counting 가능한 균수까지 9ml PBS로 serial dilution

4. Calculate the log reduction

처음 균수 - 반응 후 균수

<참고문헌>

. BPB(Butterfield Phosphate Buffer Water with Neutralizer)

- APPENDIX VII Test for adequacy of neutralizer, HTR Study No. 03-122085-106, FDA

. 중화검증

- Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents, ASTM E1054-02

(3) Kill time 방법에 의한 시판품 항균활성 측정

Paper disk method에서 항균활성이 나타나지 않은 hand sanitizer를 대상으로 kill time method를 이용하여 항균활성을 측정하였다. 대상 시료로는 3M hand instant sanitizer(3M), KAY Actigel Hand Sanitizer(Kay Chemical Company), Purell Instant Hand Sanitizer(GOJO Industries, Inc.)를 사용하였으며 측정균으로는 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028을 사용하였다. 그 결과 10^6 CFU/ml 이상으로 감소하는 것으로 측정되어 paper disk method에 비하여 hand sanitizer의 항균활성 측정에 적합함을 알 수 있었다.

(4) 예비 선발된 소재에 대한 항균활성 측정

항균활성이 있는 것으로 선발된 20종의 시료에 대하여 60% 에탄올로 추출한 후에 paper disk method를 이용하여 항균활성을 측정하였다. 추출액을 0.65 mm paper disk에 5 μ l씩 흡수시킨 후 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 10536이 접종된 plate 표면위에 놓아 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양후 disk 주위에 생기는 clear zone의 직경으로 항균활성을 비교하였다.

Table 7. Growth inhibition of 60% ethanol extracts on several microorganisms

No	Solvent	Clear zone on plate(mm)			Soluble solid(%)
		<i>S. typhimurium</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	
1	사과	—	—	—	4.8
2	오이	—	—	—	1.1
3	녹차	—	—	—	4.8
4	감초	± ²⁾	±	— ³⁾	5.5
5	금앵자	—	—	—	6.9
6	지유	±	±	±	5.2
7	고삼	—	—	—	6.6
8	구기자	—	—	—	6.0
9	육두구	—	—	—	2.5
10	소목	—	—	—	0.5
11	가시오가피	±	—	—	1.9
12	자근	±	—	—	10.8
13	황백	—	—	—	3.1
14	강황	—	—	—	1.9
15	작약	—	—	—	4.9
16	정향	±	2 ¹⁾	2	4.4
17	우슬	—	—	—	9.8
18	황련	±	5	4	5.4
19	느릅나무근	—	—	—	2.1
20	오배자	±	±	±	18.9

¹⁾(Clear zone diameter - paper diameter)/2, ²⁾very weak activity

³⁾no activity

실험결과 감초, 지유, 자근, 정향, 황련, 오배자에서 항균활성이 있는 것으로 나타났으며 정향과 황련이 항균활성이 높은 것으로 나타났다.

(5) Kill Time method에 의한 선발소재에 대한 항균활성 측정

Sanitizer 9.9ml에 균 0.1ml 넣고 혼합하여 30초 동안 반응 후 1 ml을 취하여 여기에 9ml 희석액(BPW with neutralizer)을 넣고 혼합하고 serial dilution을 통하여 pour plate method로 균수를 측정하였다. 사용균주로는 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 10536을 사용하였다. 그 결과 *Salmonella typhimurium*에 대해서는 정향, 오배자가 항균활성이 높은 것으로 측정되었으며 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 감초, 황련, 정향, 오배자가 항균활성이 높은 것으로 측정되었다. 또한 *E. coli*에 대해서는 역시 정향과 오배자가 항균활성이 높은 것으로 측정되었다. 그러나 시판품인 hand sanitizer에서 나타났던 10⁶ CFU/ml 수준은 나타나지 않았다. 농산물에서 추출할 수 있는 추출물의 항균활성이 손소독제에 주성분인 에탄올에 비하여 높지 않음을 의미하였다.

Table 8. Comparison of 30 second Time Kill results for 60% ethanol extracts from several microorganisms

No	Solvent	Average Log ₁₀ Reduction (log CFU/ml)		
		<i>S. typhimurium</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	사과	0.16±0.02	— ¹⁾	—
2	오이	—	—	—
3	녹차	—	—	—
4	감초	—	1.03±0.25	—
5	금앵자	0.01±0.13	—	—
6	지유	0.10±0.14	—	—
7	고삼	—	—	—
8	구기자	0.02±0.12	—	—
9	육두구	—	—	—
10	소목	—	—	—
11	가시오가피	0.36±0.08	0.16±0.38	—
12	자근	—	—	—
13	황백	—	0.02±0.07	—
14	강황	0.46±0.11	—	0.99±0.13
15	작약	—	—	—
16	정향	≥6.48	≥6.28	≥6.57
17	우슬	—	—	—
18	황련	0.59±0.21	1.54±0.27	0.58±0.16
19	느릅나무근	—	—	—
20	오배자	6.48±0.05	1.50±0.10	3.11±0.05

¹⁾no inhibition

(6) 에탄올 농도에 따른 추출물의 항균활성

에탄올 농도에 따라 추출되는 항균물질이 다를 수 있으므로 에탄올 농도에 따른 항균활성의 변화를 측정하였다. 시료로는 항균력이 높은 것으로 측정된 정향을 사용하였으며 에탄올 농도는 60, 70, 80, 90, 100%에서 정향 50g에 각 농도별 에탄올을 시료 중량의 5배를 혼합하여 상온에서 24시간 추출 후 여과지(Whatman No.2)로 여과하여 rotary vacuum evaporator로 에탄올을 증발시켰다. 에탄올 농도에 따라 농축되는 비율이 다르므로 증류수를 이용하여 최종 부피가 100 mL가 되게 정용하여 항균실험에 공시하였다.

① Paper disc법

추출물을 이용하여 paper disc 방법으로 항균력을 측정한 결과 추출용매의 에탄올 농도가 증가할 수록 항균력이 감소하는 것을 알 수 있었다. 60% 에탄올추출물이 가장 높은 항균활성을 나타내었으며 100% 에탄올 추출물은 paper disc method에서는 항균력이 나타나지 않았다.

Table 9. Growth inhibition from extracts of clove prepared with various ethanol concentration

Solvent	Clear zone on plate(mm)		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>
60% Clove	3.4 ¹⁾	3.6	2.2
70% Clove	2.3	3.2	2.5
80% Clove	2.7	2.3	3.5
90% Clove	1.4	1.6	1.7
100% Clove	- ²⁾	-	-

1)(Clear zone diameter - paper diameter)/2

2)no activity

② Kill Time method

손세척제의 항균활성 측정에 사용되는 방법인 kill time method에 따라 항균력을 측정하였다. *Salmonella typhimurium*과 *E. coli*는 모든 추출물에서 log 7 이상의 저감효과를 나타내어 항균력이 높게 측정되었으나 *Staphylococcus aureus*는 60% 에

탄을 추출물에서 가장 높은 저감효과를 나타내었으며 알코올농도가 증가할수록 항균력이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 추출하는 알코올농도에 따라 항균력 조정이 가능함을 알 수 있었으며 사용용도 및 목적에 따라 추출농도를 조절하는 것이 가능함을 알 수 있었다.

Table 10. Comparison of 30 second Time Kill results from extracts of clove prepared with various ethanol concentration

Solvent	Average Log ₁₀ Reduction (log CFU/ml)		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>
60% Clove	≥7.94	6.01±1.19	≥7.7
70% Clove	≥7.94	4.95±0.21	≥7.7
80% Clove	≥7.94	3.81±0.16	≥7.7
90% Clove	≥7.94	5.21±0.62	≥7.7
100% Clove	≥7.94	2.46±0.13	≥7.7

(7) 시제품 제조 및 항균활성 측정

항균실험 결과 항균력이 비교적 높은 것으로 나타난 정향, 황련과 항균력이 없는 것으로 나타난 소목, 육두구를 이용하여 손세척제 시제품을 제조하였다. 각 시료 50g에 100% ethanol로 시료 중량의 5배를 혼합하여 상온에서 24시간 추출 후 여과지(Whatman No.2)로 여과하여 rotary vacuum evaporator로 에탄올을 증발시켰으며 최종용액이 100 mL가 되게 증류수로 정용하여 사용하였다. 최종적으로 시제품은 59%(w/w) Ethanol, 40%(w/w) 알로에 베라 용액에 1%(w/w) 추출물을 첨가하여 제조하였다. 대조구로는 추출물을 첨가하지 않고 증류수를 첨가하였다.

① Paper disc법

최종 시제품을 paper disc method를 이용하여 항균력을 측정하였다. 모든 시제품에서 항균력이 측정되지 않았다. 이는 시판품에 대한 항균력 측정 결과와 동일하였는데 paper disc method는 비교적 높은 항균력 측정에 적합하기 때문으로 생각되었다.

Table 11. Growth inhibition demonstrated by Hand sanitizer on several microorganisms

Solvent	Clear zone on plate(mm)		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Eugenia caryophyllata(정향)	- ¹⁾	-	-
Hwangryeon(황련)	-	-	-
Caesalpinia sappan(소목)	-	-	-
Myristica fragrans(육두구)	-	-	-
Control			

1)no activity

② Kill Time method

손 세척제의 항균활성 측정에 사용되는 항균력 측정방법인 kill time method를 이용하여 시제품에 대한 항균활성을 측정하였다. 실험결과 *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*에서는 log 7 이상의 항균활성을 나타내었으며 *E. coli*에 대해서는 log 5 이상의 항균활성을 나타내어 시판품 측정 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 시판품의 경우 에탄올 아민이 첨가되어 항균력을 증진시키지만 이로 인해 에탄올아민 특유의 냄새로 기호도가 떨어지는 결과를 나타내기도 한다. 정향추출물을 첨가하여 제조한 손소독제의 경우 대장균에 대하여 소목, 육두구를 첨가한 손소독제 보다 10배, 100배의 항균력이 있음을 알 수 있었다.

Table 12. Comparison of 30 second Time Kill results for Hand sanitizer from several microorganisms

Solvent	Average Log ₁₀ Reduction (log CFU/ml)		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Eugenia caryophyllata(정향)	≥7.86	≥7.48	6.22±0.14
Hwangryeon(황련)	≥7.86	≥7.48	5.31±0.21
Caesalpinia sappan(소목)	≥7.86	≥7.48	5.15±0.09
Myristica fragrans(육두구)	≥7.86	≥7.48	4.31±0.21

2. 알코올 소취활성 screening

가. 소취활성 예비물질 선정

손세척제는 알코올 성분이 60% 이상이므로 알코올 냄새가 강하여 사람들이 기피하는 원인이 될 수 있다. 따라서 알코올 냄새를 덜 느끼게 할 수 있는 소재를 선발하고자 하였다. 실험에 공시한 시료의 예비선발은 인터넷, 새싹채소류, 이미지가 좋은 농산물 등 다양한 카타고리를 설정하여 실시하였다.

Table 13. 소취활성에 사용된 소재의 예비선발

선발 기준	선발된 소재
논문에 보고된 소재	녹차, 감, 사과, 쑥
인터넷 상식	귤과육, 귤과피, 레몬과육, 레몬과피, 오렌지 과육, 과피와 금귤
허브	에플민트, 바질, 타임, 페러민트, 로즈마리
새싹채소류	알팔과싹, 적무싹, 적양배추싹, 브로콜리싹, 청무싹, 보리순, 메밀싹, 유채싹, 배추싹, 다채싹
해조류	파래, 다시마, 톳나물, 건미역, 메생이
녹색채소류	파슬리, 신선초, 청겨자, 비타민, 청경채, 깻잎, 미나리, 케일, 비트잎, 당귀, 치커리, 쑥갓, 적상추, 적로메인, 근대, 샐러리, 브로콜리, 돈나물, 참나물, 취나물, 시금치, 아스파라거스, 냉이, 달래애호박, 부추, 오이(27종)
이미지가 좋은 농산물	수삼, 파프리카, 참외, 키위, 바나나, 당근, 파인애플, 자몽(과육, 과피), 양상추, 양배추, 무, 고구마, 토마토, 포도(레드글로브, 청포도, 캠벨), 딸기, 배, 양송이버섯, 표고버섯, 가지, 망고, 밤, 감자, 단호박, 단호박씨(27종)

나. 실험방법

시료에 60% 에탄올을 5배량 첨가하여 추출하였다. 녹차와 건미역은 수분함량이 낮으므로 10배량의 용매를 첨가하여 추출하였다. 시료에 에탄올을 넣고 하룻밤 침지하여 추출한 후 Whatman No. 2 filter paper를 이용하여 여과하였으며 여과액에

대하여 소취활성과 전체적인 기호도에 대한 관능검사를 실시하였다. 소취활성은 에탄올 냄새가 나지 않으면 5점을, 냄새가 많이 나면 1점을 기록하게 하였으며 기호도는 좋으면 5점, 나쁘면 1점을 기록하게 하였다.

그 결과 육두구, 가시오가피, 황백, 정향, 황련, 굴(과피), 보리순, 셀러리, 오이, 부추, 돈나물, 갯잎, 근대, 아스파라거스, 냉이, 딸기, 양송이 버섯이 알코올에 대한 소취활성이 우수한 것으로 측정되었다.



Fig. 2. 하룻밤 침지한 후의 시료의 모양
(적무새싹, 바질, 적양배추새싹, 알팔과새싹, 타임)



Fig. 3. 여과후의 추출액 색택



Fig. 4. 관능검사에 사용된 추출액

Table 14. 소취활성에 대한 관능검사 결과

분류	No.	시료	소취	기호
소취(논문)	1	녹차	3.67	3.67
	2	사과(껍질 포함)	1.67	1.83
	3	감(껍질 포함)	3.00	2.63
	4	쭈	3.90	2.40
향균(논문)	5	금앵자	3.83	1.67
	6	지유	3.17	2.17
	7	고삼	2.50	2.33
	8	구기자	3.83	1.67
	9	육두구	4.00	2.83
	10	소목	2.83	2.50
	11	가시오가피	4.17	2.50
	12	자근	3.33	1.50
	13	황백	4.00	2.50
	14	강황	3.17	2.00
	15	작약	3.00	2.33
	16	정향	4.00	2.83
	17	우슬	2.83	2.83
	18	황련	4.17	2.17
	19	느릅나무근	2.83	2.33
	20	감초	3.83	2.67
	21	호두	2.50	2.20
	22	마늘	3.80	1.50
인터넷 상식	23	귤(과육)	1.67	1.33
	24	귤(과피)	4.00	4.50
	25	레몬(과육)	2.50	3.00
	26	레몬(과피)	3.17	3.83
	27	오렌지(과육)	1.83	1.40
	28	오렌지(과피)	3.33	3.33
	29	금귤(껍질 포함)	3.57	4.57
허브	30	애플민트	2.70	1.70
	31	바질	3.60	2.67
	32	타임	3.20	2.78

	33	페퍼민트	3.40	2.70	
	34	로즈마리	3.70	3.44	
새싹	35	알팔파싹	3.50	2.80	
	36	적무싹	3.40	1.30	
	37	적양배추싹	3.90	1.78	
	38	브로콜리싹	3.90	2.22	
	39	청무싹	3.30	1.20	
	40	메밀싹	3.88	2.85	
	41	유채싹	3.54	1.33	
	42	배추싹	2.92	2.15	
	43	다채싹	2.92	1.96	
		44	보리순	4.14	2.29
	해조류	45	과래	3.38	2.00
46		다시마	3.54	2.08	
47		툇나물	3.31	1.67	
48		메생이	3.77	2.54	
49		건미역	3.57	1.57	
녹색 채소	50	파슬리	2.33	2.50	
	51	샐러리	4.00	3.67	
	52	오이(껍질 포함)	4.00	3.83	
	53	부추	4.00	1.80	
	54	신선초	3.73	2.71	
	55	청겨자	3.65	1.96	
	56	비타민	3.62	2.13	
	57	청경채	2.54	2.50	
	58	브로콜리	3.85	2.08	
	59	돈나물	4.17	3.42	
	60	깻잎	4.08	3.58	
	61	미나리	3.23	2.69	
	62	케일	3.69	2.08	
	63	비트잎	3.88	2.27	
	64	당귀	3.54	2.69	
	65	치커리	3.21	2.75	
	66	쭈갓	2.96	2.15	
	67	적상추	3.46	2.15	
	68	적로메인	3.27	1.92	
	69	근대	4.15	3.08	
	70	참나물	3.71	2.43	
	71	취나물	3.43	2.14	
	72	시금치	2.71	1.86	
	73	아스파라거스	4.29	3.00	
	74	냉이	4.14	1.71	
	75	달래	3.43	1.57	
	76	애호박	2.71	2.29	
	이미지	77	수삼	3.17	3.00
		78	파프리카(빨강)	3.67	2.67
		79	참외(껍질 포함)	3.00	3.00

80	당근	1.67	1.33
81	바나나(과육)	1.83	2.83
82	과인애플	3.17	4.17
83	자몽(과육)	2.00	2.67
84	자몽(과피)	3.50	4.33
85	키위(껍질 제외)	3.67	2.00
86	양상추	3.31	2.63
87	양배추	3.27	2.00
88	무	3.54	1.83
89	고구마(껍질 포함)	2.54	1.96
90	토마토(껍질 포함)	3.04	3.00
91	포도(레드글로브, 껍질, 씨 포함)	2.19	1.63
92	포도(청포도, 껍질, 씨 포함)	2.85	2.04
93	배(껍질 포함)	2.46	1.75
94	포도(캠벨, 냉동, 껍질, 씨 포함)	2.00	2.54
95	단호박(과육)	2.92	2.31
96	단호박(씨)	2.42	2.00
97	딸기	4.14	4.71
98	양송이버섯	4.14	2.29
99	가지	2.00	2.29
100	망고(껍질 포함)	2.86	3.00
101	밤(껍질 제외)	2.86	2.43
102	감자(껍질 제외)	2.86	2.43
103	표고버섯	3.14	2.43

다. 시제품 제조 및 평가

소취활성이 높은 것으로 평가된 시료중 딸기, 귤을 소취활성이 없는 시료로 측정된 사과, 당근을 이용하여 시제품을 제조하여 평가하였다. 시료 50g에 60% 에탄올을 250 mL 첨가하여 24시간 침지한 후 여과 및 농축하여 사용하였다. 최종 시제품의 조성은 에탄올 59%(w/w), 알로에 베라 40%(w/w)와 추출물 1%(w/w)로 구성하였다. 소취활성은 에탄올 냄새가 안 나면 5점, 많이 나면 1점을 기준으로 하였으며 기호도는 좋으면 5점, 나쁘면 1점을 기준으로 하였다.

Table 15. 소취활성이 높은 소재를 이용한 시제품 제조 및 평가

시료		소취	기호
소취활성 있는 시료	딸기	3.90	3.00
	귤	2.50	1.70
소취활성 없는 시료	사과	2.75	2.10
	당근	2.95	2.15

딸기의 경우 소취활성이 비교적 높게 나왔으나 소취활성이 없는 시료인 사과, 당근에 비하여 월등하지 않았으며 관능적인 기호도도 유사하였다. 귤의 경우 오히려 기호도가 떨어지는 것으로 측정되었다. 따라서 소취활성은 알코올 냄새의 제거 뿐만 아니라 전체적으로 기호도를 상승시킬 수 있는 배합비를 선정하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

3. 개발제품에 대한 예비독성 실험

가. 예비독성 실험

(1) 사망률 및 일반증상, 체중 변화

시험 기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 발견되지 않았다. 또한, 시험 기간 동안 모든 시험동물에서 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 다수의 시험동물에서 일시적인 체중감소가 관찰되었으나 시험기간 중 모든 시험동물이 회복되었다.

(2) 공시시료

1차년도 연구내용이므로 용량설정시험을 포함한 예비실험의 형태로 진행하였으며 공시시료는 주관연구기관에서 받은 시료(알코올 59%, 알로에베라 40%, 물 1%)이었으며 본 실험은 2차년도에 진행하기로 설계되어 있었다.

(3) 부검 및 최종 결론

시험 종료시 모든 생존 동물의 부검 결과 특이한 용간 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험조건에서 손 세척제의 LD50 (반수치사량)은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 사료된다.

Table 15. 부형체대조군 (SD rat, 수컷)

동물 번호	체 중 (g)					초기 증상								
	0 day	1 day	3 day	7 day	14 day	0.5h	1h	2h	3h	4h	5h	6h		
1	243.75	247.69	268.36	297.91	345.94	-	-	-	-	-	-	-		
2	250.82	254.04	282.88	315.54	363.65	-	-	-	-	-	-	-		
3	248.54	248.35	270.30	305.59	351.46	-	-	-	-	-	-	-		
4	258.29	256.09	282.74	312.90	354.49	-	-	-	-	-	-	-		
5	264.24	265.21	293.25	331.02	377.30	-	-	-	-	-	-	-		
평균	253.13	254.28	279.51	312.59	358.57	X								
SD	8.13	7.10	10.24	12.38	12.28									
임 상 증 상														
동물번호 \ 일자	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
폐사수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
부 검 소 견														
1. NAD			2. NAD			3. NAD			4. NAD			5. NAD		
NAD: No abnormal detected (육안적 이상소견 관찰되지 않음)														
임상증상소견표 : ' - ' : No abnormalities														

Table 16. 2,000 mg/kg 투여군 (SD rat, 수컷)

동물 번호	체 중 (g)					초기 증상								
	0 day	1 day	3 day	7 day	14 day	0.5h	1h	2h	3h	4h	5h	6h		
6	244.57	243.56	266.48	300.50	341.69	-	-	-	-	-	-	-		
7	250.39	253.33	276.75	306.67	357.09	-	-	-	-	-	-	-		
8	252.43	254.56	277.63	311.94	353.62	-	-	-	-	-	-	-		
9	252.15	254.58	271.14	303.72	346.78	-	-	-	-	-	-	-		
10	257.83	259.06	283.20	311.71	355.55	-	-	-	-	-	-	-		
평균	251.47	252.98	275.64	306.91	350.95	X								
SD	4.76	5.80	6.09	4.99	6.50									
임 상 증 상														
동물 번호 \ 알자	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
폐사수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
부 검 소 견														
6. NAD			7. NAD			8. NAD			9. NAD			10. NAD		
NAD: No abnormal detected (육안적 이상소견 관찰되지 않음) 임상증상소견표 : ' - ' : No abnormalities														

Table 17. 부형체대조군 (SD rat, 암컷)

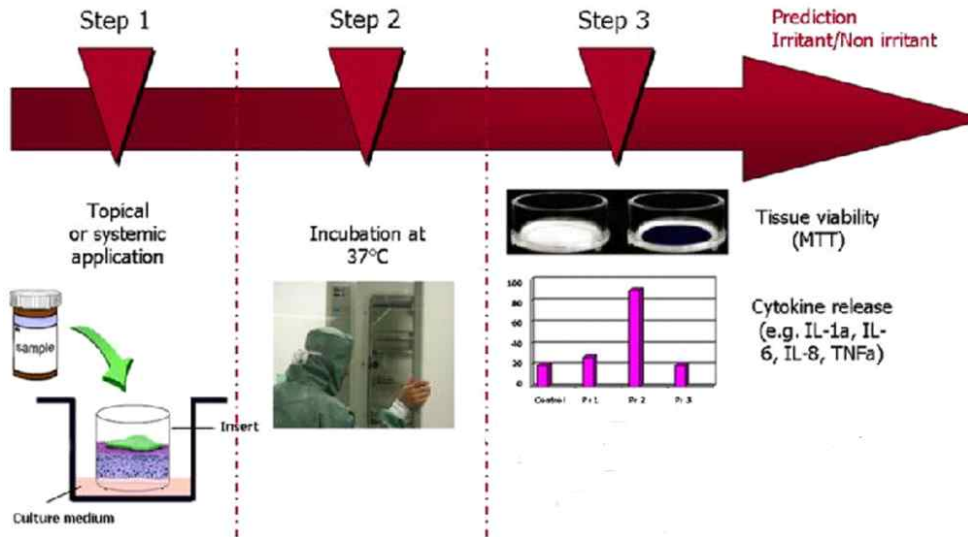
동물 번호	체 중 (g)					초기 증상								
	0 day	1 day	3 day	7 day	14 day	0.5h	1h	2h	3h	4h	5h	6h		
11	232.17	217.81	238.67	236.80	252.41	-	-	-	-	-	-	-		
12	241.40	234.78	239.93	249.65	252.49	-	-	-	-	-	-	-		
13	239.82	238.66	250.19	256.72	267.12	-	-	-	-	-	-	-		
14	244.63	243.96	245.72	252.82	260.19	-	-	-	-	-	-	-		
15	245.65	242.19	255.07	256.21	266.56	-	-	-	-	-	-	-		
평균	240.71	235.48	245.92	250.44	259.75	X								
SD	5.38	10.49	6.90	8.14	7.20									
임 상 증 상														
동물 번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
폐사수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
부 검 소 견														
11. NAD			12. NAD			13. NAD			14. NAD			15. NAD		
NAD: No abnormal detected (육안적 이상소견 관찰되지 않음) 임상증상소견표 : ' - ' : No abnormalities														

Table 18. 2,000 mg/kg 투여군 (SD rat, 암컷)

동물번호	체 중 (g)					초기 증상								
	0 day	1 day	3 day	7 day	14 day	0.5h	1h	2h	3h	4h	5h	6h		
16	228.42	232.79	233.15	235.99	244.16	-	-	-	-	-	-	-		
17	248.04	248.59	246.04	247.44	264.96	-	-	-	-	-	-	-		
18	236.85	238.79	245.49	250.42	254.09	-	-	-	-	-	-	-		
19	243.07	242.15	244.11	249.85	270.51	-	-	-	-	-	-	-		
20	249.45	252.28	261.57	268.01	279.30	-	-	-	-	-	-	-		
평균	241.17	242.92	246.07	250.34	262.60	X								
SD	8.67	7.75	10.14	11.48	13.78									
임 상 증 상														
일자 동물번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
폐사수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
부 검 소 견														
16. NAD		17. NAD			18. NAD			19. NAD			20. NAD			
NAD: No abnormal detected (육안적 이상소견 관찰되지 않음) 임상증상소견표 : ' - ' : No abnormalities														

나. 동물대체시험법으로서의 인공피부를 이용한 in vitro 피부자극시험

인공피부를 이용한 피극자극 측정 지표로서 MTT 분석을 통한 세포생존률과 IL-1α 값을 아래의 그림에서 보여주는 방법에 따라 측정하였다.



(1) MTT assay

손세척제는 100% 원액을 처리한 경우에도 인공피부의 생육에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 하지만, 양성대조군으로 사용한 SDS의 경우, 2.5%의 최저농도에서도 매우 심한 성장 억제가 관찰되었다. 따라서, 본 시험에 사용한 손세척제는 비자극성으로 판정되었다.

Table 19. MTT assay

시험물질		Absorbance at 540 nm						평균	SD
		#1		#2					
부형제대조군(PBS)		0.215	0.169	0.363	0.233	0.183	0.191	0.226	0.071
손세척제	12.5%	0.233		0.172		0.203		0.043	
	25%	0.265		0.171		0.218		0.066	
	50%	0.157		0.189		0.173		0.023	
	100%	0.204		0.203		0.204		0.001	
양성대조군 (SDS)	2.5%	0.009		0.02		0.015		0.008	
	5%	0.015		0.012		0.014		0.002	
	10%	0.022		0.008		0.015		0.010	
	20%	0.009		0.011		0.010		0.001	

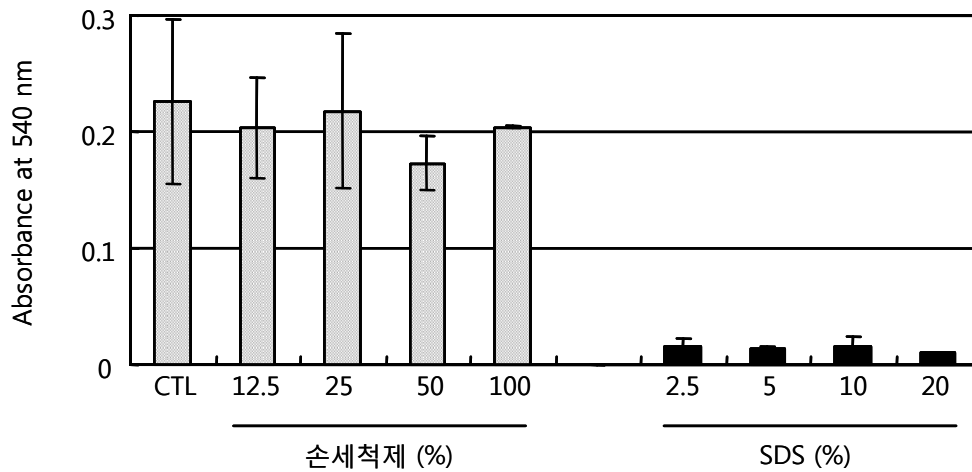


Figure 3. 손세척제의 MTT assay

(2) IL-1 α 측정

MTT 분석을 이용한 세포생존률 측정에서 비자극성으로 판정된 물질의 경우에도 specificity를 높이기 위한 측정지표로 IL-1 α 값을 사용하는 것이 일반적이다. 따라서 본 연구에서도 손세척제에 대한 IL-1 α 값을 측정하였다. 측정값이 60 pg/mL이하인 경우 비자극성으로 판정하였다. 처리결과, 100%로 처리한 경우에는 IL-1 α 수준이 90.13 pg/mL로서 자극성이 있는 것으로 판정되었다.

Table 20. IL-1 α assay

시험물질	IL-1 α 농도 (pg/mL)							
	#1			#2			평균	SD
부형제대조군(PBS)	32.81	4.86	0	0.52	0	0	6.37	11.95
손세척제	12.5%	2.15		0.93			1.54	0.86
	25%	0.25		2.83			1.54	1.82
	50%	3.64		9.75			6.70	4.32
	100%	74.74		105.53			90.13	21.78
양성대조군 (SDS)	2.5%	41.36		31.46			36.41	7.00

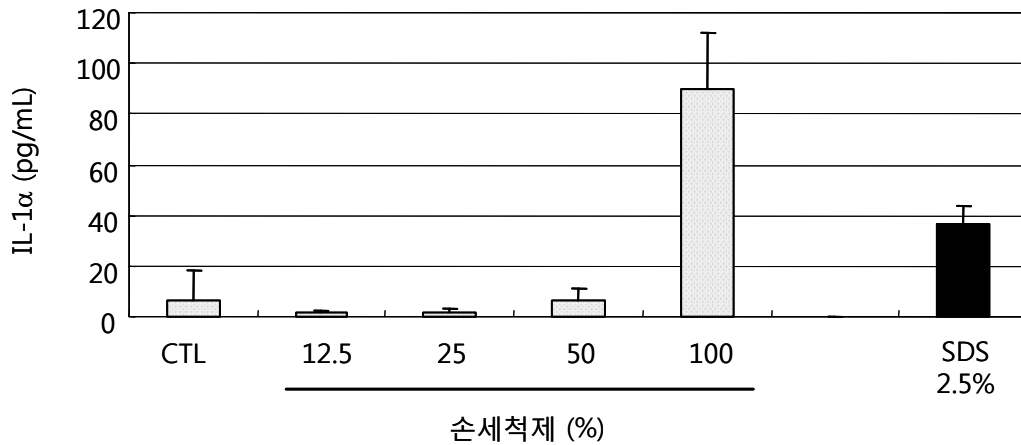


Figure 5. 손세척제의 IL-1α assay

다. 동물대체시험법으로서의 인공피부를 이용한 in vitro 안점막자극시험

Neutral red uptake assay는 세포내로 유입되어 있던 neutral red가 화학물질에 의해 세포막 등이 파괴되면서 배지로 빠져나오는 양을 측정하는 방법으로서 세계 여러 나라에서 Draize test의 대체법으로서 인정받고 있다. 본 연구결과는 5 μL부터 자극을 유발하는 것으로 나타났다.

Table 21. Neutral Red Uptake Assay

시험물질	Absorbance at 540 nm								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Ave	SD	
부형제대조군	0.14	0.11	0.087	0.087	0.093	0.037	0.092	0.034	
손세척제 (μL)	1	0.071	0.103	0.083	0.057	0.066	0.116	0.083	0.023
	5	0.031	0.013	0.01	0.001	-0.01	0.04	0.014	0.019
	10	0.012	-0.011	0.029	0.029	0.008	0.01	0.019	0.015
	25	-0.006	0.002	-0.018	-0.018	-0.014	-0.014	0	0.008
	50	0.013	0.022	0.023	0.017	0.011	-0.002	0.014	0.009
	100	0.005	0.025	-0.002	-0.004	0.002	0.001	0.005	0.011
양성대조군 SDS (%)	0.05	0.018	0.015	0.04	0.035	0.033	0.001	0.024	0.015
	0.1	0.009	0.02	-0.021	-0.015	-0.002	-0.017	0	0.016
	0.2	0.037	0.05	0.023	0.042	0.034	0.016	0.034	0.012

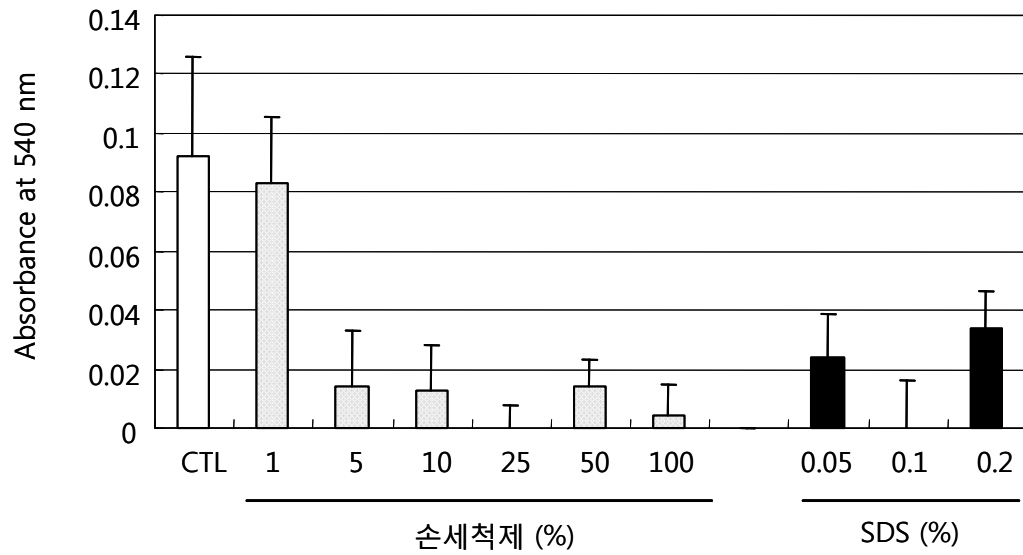


Figure 6. Neutral Red Uptake Assay

4. 시제품 제조

가. 알코올 제품

1) 시제품 제조의 concept

항균활성이 우수할 것으로 기대되는 예비 선발된 20종 시료에 대하여 항균활성을 측정하여 Table 8의 결과를 다시 Table 22에 나타내었다. 그 결과 정향이 가장 항균력이 높게 측정되었으며 오배자, 황련, 감초, 강황의 순으로 나타났다.

Table 22. 예비선발된 20종의 시료에 대한 항균활성

No	시료	Average Log ₁₀ Reduction (log CFU/ml)			순위
		<i>S. typhimurium</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	
1	사과	0.16±0.02	- ¹⁾	-	
2	오이	-	-	-	
3	녹차	-	-	-	
4	감초	-	1.03±0.25	-	4
5	금앵자	0.01±0.13	-	-	
6	지유	0.10±0.14	-	-	
7	고삼	-	-	-	
8	구기자	0.02±0.12	-	-	
9	육두구	-	-	-	
10	소목	-	-	-	
11	가시오가피	0.36±0.08	0.16±0.38	-	
12	자근	-	-	-	
13	황백	-	0.02±0.07	-	
14	강황	0.46±0.11	-	0.99±0.13	5
15	작약	-	-	-	
16	정향	≥6.48	≥6.28	≥6.57	1
17	우슬	-	-	-	
18	황련	0.59±0.21	1.54±0.27	0.58±0.16	3
19	느릅나무근	-	-	-	
20	오배자	6.48±0.05	1.50±0.10	3.11±0.05	2

Table 14의 관능검사 결과 상위 18개 시료에 대하여 정리하여 Table 23에 나타내었다. 관능검사를 시행하여 소취활성과 기호도로 나타냈으며 그 항목의 합이 7점 이상인 시료는 꿀 과피, 셀러리, 오이, 돈나물, 근대, 아스파라거스, 딸기, 녹차로 나타났다.

Table 23. 소취활성이 우수한 것

번호	시료	소취활성	기호도	합계	순위
1	육두구	4.00	2.83	6.83	
2	가시오가피	4.17	2.50	6.67	
3	황백	4.00	2.50	6.5	
4	정향	4.00	2.83	6.83	
5	황련	4.17	2.17	6.34	
6	귤(과피)	4.00	4.50	8.5	2
7	보리순	4.14	2.29	6.43	
8	샬러리	4.00	3.67	7.67	4
9	오이(껍질 포함)	4.00	3.83	7.83	3
10	부추	4.00	1.80	5.8	
11	돈나물	4.17	3.42	7.59	
12	갯잎	4.08	3.58	7.66	5
13	근대	4.15	3.08	7.23	
14	아스파라거스	4.29	3.00	7.29	
15	냉이	4.14	1.71	5.85	
16	딸기	4.14	4.71	8.85	1
17	양송이버섯	4.14	2.29	6.43	
18	녹차	3.67	3.67	7.34	

손세정제는 알코올이 60% 이상 첨가되어 있어 손세정에 적합할 정도의 향균활성이 있는 것으로 판단되며 더욱이 본 실험결과 손세정제에서 대부분의 향균활성은 시료추출물에서 기인하지 않고 알코올 함량에 기인하는 것으로 나타나므로 향균활성이 보장된 시료는 의미가 크지 않다고 생각되었다. 따라서 향균활성을 증진시키기 보다는 알코올 냄새가 저하된 시제품을 개발하는 것이 더욱더 의미가 있다고 판단되었다. 그러므로 우선적으로 향균활성 증진보다는 소취활성에 주안점을 두고 제품을 개발하고자 하였다. 따라서 최종적으로 소취활성이 우수한 후보물질로는 딸기, 귤과피, 오이가 선발되었으며 소취활성과 동시에 향균활성이 우수한 후보물질로는 가시오갈피, 정향, 황련이 선발되었다.

2) 선발된 시료의 추출 및 농축

딸기, 귤과피, 오이, 가시오갈피, 정향, 황련에 60% 알코올을 시료 중량의 5배를 첨가하여 상온에서 24시간 추출한 후 여과지(Whatman No.2)로 여과하였다. 여과 후 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하였다. 그 결과 가시오가피, 귤과피, 황련의 농축비율이 높은 것으로 측정되었다.

Table 24. 선발시료의 추출 및 농축

	추출 전		추출 후 부피 (ml)	농축 후 부피 (ml)	농축 비율(D)
	시료(g)	60% 알코올(ml)			
소취활성	귤 과피 1000	5000	4060	1620	3.70
	딸기 1000	5000	5320	2636	2.28
	오이 1000	5000	5570	2222	2.70
소취 + 항균활성	가시오가피 20	100	78	27	4.44
	정향 20	100	84	38	3.16
	황련 20	100	78	30	4.00

※ 농축 정도: (추출전 시료 무게 및 용매 부피 / 농축후 부피) × 100

3) 시제품에 대한 관능검사

6가지 선발된 시료를 이용하여 시제품을 제조하였다. (알코올 59% + 알로에베라 40%) 조성물에 추출물을 1% 첨가하여 제품을 제조하였으며 관능검사를 통하여 최종시제품을 선발하고자 하였다. 10명의 패널을 대상으로 5점 평점법으로 관능검사를 실시하였다. 소취활성은 “에탄올 냄새가 안 나면 5점, 대조구로 사용된 60% 알코올과 동일하면 1점”을 기준으로 하였으며 종합적 기호도는 “좋으면 5점, 나쁘면 1점”을 기준으로 하였다. 그 결과 가시오갈피, 정향, 황련도 소취활성이 높게 나타났지만 종합적 기호도는 특유의 한약냄새로 인하여 낮게 측정되었다. 최종적으로 딸기가 소취활성과 종합적 기호도가 모두 우수한 것으로 판단되었다.

Table 25. 최종시제품 선발용 관능검사 결과

	귤	딸기	오이	가시 오갈피	정향	황련
소취활성	4.0	4.2	4.0	4.1	4.1	4.2
종합적 기호도	2.8	4.5	2.8	2.5	2.9	2.5
합계	6.8	8.7	6.8	6.6	7	6.7

나. 천연항균제를 이용한 저알코올 제품

1) 시제품 제조의 concept

알코올은 휘산성이 있어 자주 손세정제를 사용하는 작업자의 경우 알코올 휘산 시 손에 있는 수분이 같이 휘발되므로 손을 건조하게 할 수 있다. 따라서 알코올이 전혀 들어있지 않는 손세정제나 알코올 함량을 낮춘 제품이 개발되면 그 활용도가 높아 질 것이라고 생각된다.

알코올의 항균활성을 대신할 수 있는 물질로는 천연항균제를 활용하였다. 본 실험에서 선발된 항균소재를 활용하고자 하였으나 항균력이 너무 낮게 측정되어 알코올 농도를 대폭적으로 저하시켰을 경우 항균활성을 보완하기 어렵다는 판단에 따랐다. 천연항균제는 항균활성이 높다고 보편적으로 인정되며 상업적으로 사용되고 있는 자몽종자 추출물을 사용하였다. 먼저 자몽종자추출물을 희석하여 손세정제를 제조해야 하므로 자몽종자추출물의 희석에 따른 항균활성의 변화를 측정하였다. 자몽종자추출물을 희석하여 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005% 비율로 제조한 후 항균활성을 측정하였다. 항균활성은 향후 개발된 제품에 대하여 식약청 허가를 얻기 위해서 Time kill 방법과 동일한 원리인 식품공전 방법에 따라 실시하였다. 시험 중 모든 시약, 시험균, 시험액은 항온수조에서 $20\pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며 간섭물질(청정, 오염) 0.1 mL을 멸균시험관에 넣고 시험균 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538과 *E. coli* ATCC 10536를 각각 0.1 mL 첨가하여 혼합하고 $20\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 2 min \pm 10 sec 동안 방치한 후 시험용액 9.8 mL을 첨가하여 $20\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 5 min \pm 10 sec 동안 반응시켰다. 이 액 1.0 mL를 중화제 8.0 mL와 물 1.0 mL가 들어있는 멸균시험관에 첨가하고 $20\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 5 min \pm 10 sec 동안 중화시켰다. 이 중화반응 혼합액을 1.0 mL씩을 펠트리접시에 각각 넣고 TSA를 분주하여 잘 섞은 후 $36\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 24시간 배양하여 발생한 집락수로부터 살균소독력을 계산하였다. 실험결과 자몽종자 추출물 0.05%(w/w) 수준에서 *E. coli*에 대해서는 log 6 이상의 살균력을 나타내었으며

*Staphylococcus aureus*에 대해서는 청정조건 일 때는 log 5 이상을 나타내었지만 오염조건에서는 log 3 수준을 나타내었다.

Table 26. 자몽종자추출물 희석에 따른 항균력

시험용액		Average log ₁₀ Reduction (log CFU/ml)	
		<i>E.coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
대조구	청정	0.08 ± 0.04	0.22 ± 0.10
	오염	0.31 ± 0.10	0.29 ± 0.04
0.005	청정	0.57	0.57 ± 0.29
	오염	0.49 ± 0.03	0.17 ± 0.15
0.01	청정	≥ 6.17	2.37 ± 0.09
	오염	2.28 ± 0.10	0.18 ± 0.24
0.05	청정	≥ 6.17	4.80
	오염	≥ 6.17	3.89
0.1	청정	≥ 6.17	≥ 5.80
	오염	≥ 6.17	≥ 5.80

2) 알코올 첨가에 의한 저알코올 손세정제 제품 개발

저농도 알코올 손세정제를 개발하기 위하여 자몽종자추출물 희석액에 알코올을 첨가하여 항균활성을 증진시키고자 하였다. 자몽종자추출물 희석액은 *Staphylococcus aureus*에 대하여 청정조건과 오염조건에서 log 4 수준의 살균효과를 나타낸 0.05%를 기준으로 하였다. 알코올을 10% 농도로 첨가 하였을때 20% 농도 이상에서는 log 5 이상의 살균효과가 나타나는 것으로 측정되었다.

Table 27. 자몽종자추출물 희석액에 알코올 첨가로 인한 항균활성 변화

시험용액	간섭물질	Average log ₁₀ Reduction (log CFU/ml)	
		<i>E.coli</i> ATCC 10536	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
Blank	청정	0.20±0.28	0.41±0.26
	오염	0.11±0.13	0.24±0.13
C (자몽종자추출물 0.05%)	청정	≥6.52	2.93±0.07
	오염	0.36±0.10	1.91±0.05
+Ach 10%	청정	≥6.52	2.18±0.11
	오염	2.53±0.11	3.03±0.03
+Ach 20%	청정	≥6.52	≥6.25
	오염	≥6.52	≥6.25
+Ach 30%	청정	≥6.52	≥6.25
	오염	≥6.52	≥6.25
+Ach 40%	청정	≥6.52	≥6.25
	오염	≥6.52	≥6.25
+Ach 50%	청정	≥6.52	≥6.25
	오염	≥6.52	≥6.25
+Ach 60%	청정	≥6.52	≥6.25
	오염	≥6.52	≥6.25

다. 시제품 제조

알코올이 함유된 최종시제품은 알코올 59%(w/w), 알로에베라겔 40%(w/w)와 소취효과와 전체적 기호도가 우수하였던 딸기추출물 1%(w/w)를 혼합하여 제조하였다. 알코올이 적게 함유된 저알코올 최종시제품은 알코올 20%, 자몽종자추출물 0.05%(w/w), 알로에베라겔 40%(w/w), 물 38.95%(w/w)과 딸기추출물 1%(w/w)를 혼합하여 제조하였다. 시제품에 대한 독성시험용 시료로는 알코올 59%(w/w), 알로에베라 40%(w/w)와 정향추출물 1%(w/w)를 송부하였다. 정향은 소취활성과 항균활성이 높은 최종시료이었으며 우리가 음식으로 섭취하는 딸기에 비해 강한 독성이 있을 것으로 예상되어 사용하였다. 저알코올 제품으로는 자몽종자추출물 함량을 2배로 올려 0.1%(w/w) 농도로 조정하였으며 알코올을 20% 첨가하여 제조하였다.

5. 시제품에 대한 소비자 인식 조사

제조된 시제품에 대하여 소비자 인식 조사를 실시하였다. 대상으로는 손세정제 사용빈도가 가장 높은 초등학생과 중학생으로 하였으며 총 50명에 대하여 조사하였다. 손세정제 기호도 조사표를 구성하여 2010년 3월에 분당 지역에서 실시하였다. 소비자 인식 조사는 비교우위를 정하는 것으로 구성하였다 가)와 나) 시제품에서 알코올 냄새의 강약 비교 및 전체적 기호도에 대하여 강약을 비교하였다. 또한 다)와 라) 시제품에서도 역시 동일한 방법으로 조사하였다. 가)와 나) 시제품에서는 딸기추출물 첨가에 의한 소취효과에 대하여 조사하고자 하였으며 다)와 라) 시제품에서는 고알코올 제품과 저알코올 제품간의 비교를 실시하였다.

가) 알코올 59% + 알로에베라 40% + 증류수 1%

나) 알코올 59% + 알로에베라 40% + 딸기추출물 1%

다) 알코올 59% + 알로에베라 40% + 딸기추출물 1%

라) 알코올 20% + 자몽종자추출물 0.05% + 알로에베라 40% + 증류수 39.95%
+ 딸기추출물 1%



Fig 7. 소비자 인식 조사에 사용된 시료

손소독제 기호도 조사

안녕하세요. 한국식품연구원 안전성연구단입니다.

본 설문은 손세정제의 기호도를 알아보기 위한 평가로 정답이 존재하지 않으므로 있는 그대로의 생각을 기입하여 주시기 바랍니다. 감사합니다.

<관능평가 방법>

1. 관능평가를 하기 전 **비누를 사용하지 않고** 양손을 물로 깨끗이 씻어주세요.
2. **한쪽 손등에는 (가)시료, 다른 한쪽 손등에는 (나)시료**를 바르고 비교 해주세요.
3. (가), (나) 평가를 마치고 양손을 **비누를 사용하지 않고** 물로 깨끗이 씻어주세요.
4. (다), (라) 평가도 (가), (나) 평가와 **동일한 방법**으로 비교평가 해주세요.

성명 :

나이 : 만 세 (초등, 중등) 성별 : 남, 여

<시료 (가), (나) 비교 평가>

1. 다음 (가), (나) 두 가지 시료의 냄새를 맡아보고, **알코올 냄새가 적게** 나는 시료에 ○ 표시해주세요.

가. () 나. ()

2. 다음 (가),(나) 두 가지의 시료 중 **더 좋은** 시료에 ○ 표시해주세요.

가. () 나. ()



<시료 (다), (라) 비교 평가>

1. 다음 (다),(라) 두 가지 시료의 냄새를 맡아보고, **알코올 냄새가 적게** 나는 시료에 ○ 표시해주세요.

다. () 라. ()

2. 다음 (다),(라) 두 가지의 시료 중 **더 좋은** 시료에 ○ 표시해주세요.

다. () 라. ()



소비자 인식도 조사에 응한 사람은 총 50명으로서 초등학생이 34명 이었으며 중학생이 16명이었다. 성별로는 남자가 20명이었으며 여자가 30명이었다. 조사 결과 가)와 나) 시제품의 경우 딸기추출물을 첨가한 처리구에 대하여 66%가 알코올 소취효과가 있는 것으로 표시하였으며 또한 전체적인 기호도도 2배 정도 높은 것으로 나타났다. 고알코올과 저알코올을 비교한 결과 저알코올 제품이 알코올 소취효과가 우수한 것으로 나타났으며(82%) 전체적인 기호도도 4배 이상 높게 나타났다.

Table 28. 시제품에 대한 소비자 인식도 조사 결과

처리구	딸기 추출물 첨가 비교(명)		고알코올과 저알코올 비교(명)	
	증류수	딸기추출물	고알코올	저알코올
알코올 냄새 약한 시료	17	33	9	41
전체적 기호도	17	33	9	41

6. 시제품에 대한 독성실험

가. 연구방법

(1) 토끼를 이용한 in vivo 피부자극시험

□ 시험물질 및 시험계

- 시험물질 I: 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1%
- 시험물질 II: GS-1000 0.1% + 주정 20%
- 시험물질 조제방법: 시험물질 원액 사용
- 대조물질: 멸균생리식염주사액 (4015P61, 대한약품공업주식회사)
- 시험계: New Zealand White계 숫컷 토끼 (한림실험동물연구소)
- 사육환경: 사육기간 중 스테인레스제 사육상자에 개별사육하였으며, 사료와 음수는 자유급이 하였다.

- 투여방법 및 투여양 - 제모는 시험물질 적용 약 24시간 전에 실시하였으며, 도포부위는 찰과피부 2개소와 비찰과피부 2개소로 하였다. 2개소의 찰과피부는 수정칼을 이용하여, 각질층은 손상되나 진피는 손상되지 않고 피가 나지 않을 정도로 찰과상을 입혔다. 시험물질 투여량은 시험부위인 찰과피부 1개소와 비찰과피부 1개소에 각각 0.5 mL씩 흡수성 거즈를 이용하여 1회 적용하였으며, 시험물질이 적용부위에 잘 고정되도록 침투성이 없고 반응성이 없는 비닐(Tegader™

1626W, 3M Health Care)로 덮은 후 고탄 재질의 박지로 덮고 테이프 등을 사용하여 24시간 폐쇄접촉 시켰다. 대조구획은 멸균생리수를 0,5 mL 적용한 흡수성 거즈를 동일한 방법으로 고정하였다.

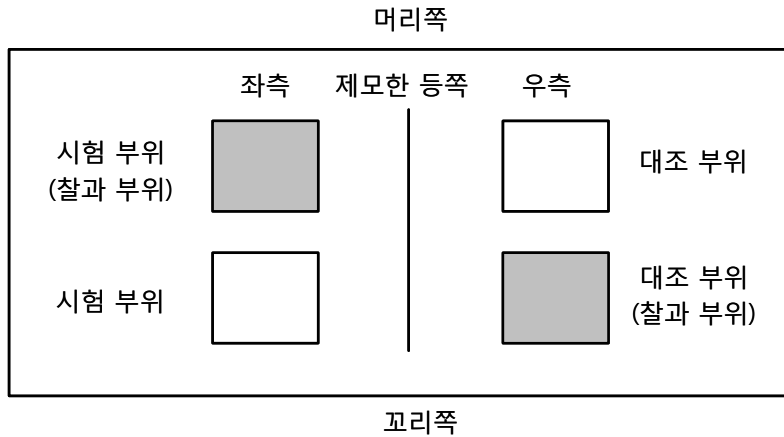


Fig. 8. 피부 적용 부위의 위치

□ 투여 횟수 및 투여기간 - 투여 당일에 1회 적용했고, 시험물질을 피부에 24시간 동안 노출시킨 후 시험물질이 잔류되지 않도록 미온의 멸균생리식염수를 이용하여 도포부위를 부드럽게 세정해 주었다.

□ 관찰 및 적용항목

- 1) 일반증상 관찰 - 외관, 사료섭취 및 물 섭취상태, 사망동물의 유무 등을 시험물질 적용 후 72시간까지 매일 관찰하였다.
- 2) 체중측정 - 시험물질 적용 후 24시간, 48시간 및 72시간 후에 개체별 체중을 측정하였다.
- 3) 적용부의 관찰 - 시험물질 제거 후 24시간, 48시간 및 72시간째에 홍반과 가피 형성 및 부종 등의 자극성 유무를 관찰하였다.
- 4) 피부반응의 평가 및 자극성의 판정 - 피부 반응 평가는 식품의약품안전청 고시 제2009-116호 의약품등의 독성시험기준 피부반응기준표에 따라 평가하였고, 시험물질 적용후 24시간, 72시간때의 홍반 평점과 부종 평점을 더해서 평균치를 산출하고 평균의 합계를 4로 나누어 피부자극성을 1차피부자극지수 (P.I.I: Primary Irritation Index)로 평가하였다.

Table 29. 토끼의 자극반응 범주

구 분	1차 피부자극지수 (P.I.I)
비자극성 (Negligible)	0.0 - 0.5
약한 자극성 (Slight)	0.6 - 2.0
중등도 자극성 (Moderate)	2.1 - 5.0
강한 자극성 (Severe)	5.1 - 8.0

Table 30. 피부반응 점수체계

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적과 가벼운 정도의 가피)	4
(2) 부종 형성	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 수 있을 정도)	2
보통의 부종 (약 1 mm 상승)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부의 밖에까지 확장된 상태)	4
총 가능 점수	8

(2) 토끼를 이용한 in vivo 안점막자극시험

□ 시험물질 및 시험계

- 시험물질 I: 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1%
- 시험물질 II: GS-1000 0.1% + 주정 20%
- 시험물질 조제방법: 시험물질 원액 사용
- 대조물질 및 안구세정액: 멸균생리식염주사액 (4015P61, 대한약품공업주식회사)
- 시험계: New Zealand White계 숫컷 토끼 (한림실험동물연구소)
- 사육환경: 사육기간 중 스테인레스제 사육상자에 개별사육하였으며, 사료와 음수는 자유급이 하였다.

- 투여경로 및 시험군의 구성 - 건강한 수컷 9마리를 이용하여 비세안군 6마리와 세안군 3마리로 구성하여 시험물질을 결막낭에 투여하였다. 비세안군과 세안군 동물에 대해서 좌측 안구를 시험물질 처치구획으로, 우측 안구를 대조구획으로 설정하였다.
- 투여방법 및 투여량 - 시험개시 전 24시간 이내에 동물의 양안을 검사하여 각막, 결막, 홍채 등의 안구손상이 없는 개체를 선발하여 사용하였다. 좌안 결막낭내에 시험물질을 1회 0.1 mL 적용하고 적용 후 시험물질의 누출 방지를 위해 양 안검을 잡아 약 1초간 폐안시켰다. 세척군의 3마리에 관해서는 점안 20-30초후 양쪽 눈을 미온의 멸균생리식염수로 세척을 하였고 투여 후 1시간째에 생리적 기전에 의해 시험물질이 제거되지 않을 경우에도 양안 모두 미온의 멸균생리식염수로 잔류물이 없도록 세척한다.
- 관찰 및 적용항목
 - 1) 일반증상관찰 - 외관, 사료섭취 및 물 섭취 상태, 사망동물의 유무 등을 시험물질 적용 후 시험종료일까지 매일 관찰하였다.
 - 2) 체중측정 - 시험물질 적용 직전과 적용 후 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째에 개체별 체중을 측정하였다.
 - 3) 적용부의 관찰 - 시험물질 적용 후 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째에 Slit Lamp (제조사: ECONOM SET, 독일)를 이용하여 각막, 홍채, 결막에서의 자극성 유무를 관찰하였다.
 - 4) 안점막반응의 평가 및 자극성의 판정 - 안점막반응 평가는 식품의약품안전청 고시 제2009-116호 독성시험기준 안구병변의 등급표에 따라 평가하였다. 자극성의 정도 판정은 안구병변의 등급에 따라 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일째의 개체별 안자극지수[I.I.O.I. (The individual index of ocular irritation)]를 산출하였고, 이를 이용하여 각 시기별 평균안자극지수 [M.I.O.I (Mean index of ocular irritation)]를 산출하였으며, 평균안자극지수 중 최고치를 급성안자극지수 [I.A.O.I (The index of acute ocular irritation)]로 이용하여 안자극성 판단 자극표에 따라 안점막 자극정도로 구분하였다.

Table 31. 안자극판정표

정 도	구 분
0 ~ 5	Non irritant
5 ~ 15	Mild irritant
15 ~ 30	Moderate irritant
30 ~ 60	Severe irritant
60 ~ 80	Extreme irritant
80 ~ 110	Maximal irritant

Table 32. 안구 병변의 등급

(1) 각막	
(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도 (가장 농후한 지점을 관찰함)	
○ 화농이나 혼탁이 없음	0
○ 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나 (정상적인 투명성이 약간 둔화 된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
○ 반투명한 부분이 쉽게 관측되나, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
○ 진주 색깔을 나타내고 홍채의 말단이 관찰되지 않으며 동공의 크기가 가까스로 관찰됨	3
○ 각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨	4
(B) 혼탁된 각막의 범위	
○ 1/4 이하 (그러나 0은 아니다)	1
○ 1/4 이상 1/2 미만	2
○ 1/2 이상 3/4 미만	3
○ 3/4 이상 1 까지	4
점수 = A x B x 5 최대치 = 80	
(2) 홍채	
(A) 반응치	
○ 정상	0
○ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈이 단독 혹은 혼합되어 나타나고 홍채는 빛에 대해 반응함 (둔한 반응은 양성)	1
○ 빛에 대해 반응 없으며, 출혈되고 대부분 파괴됨 (이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부)	2
점수 = A x 5 최대치 = 10	
(3) 결막	
(A) 발적	
○ 혈관은 정상	0
○ 몇몇 혈관은 명확히 충혈	1
○ 넓은 심홍색 색조, 각각의 혈관은 쉽게 관찰 안됨	2
○ 얇은 선홍색	3
(B) 결막 부종	
○ 부풀지 않음	0
○ 정상보다 약간 종창 (순막 포함)	1
○ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
○ 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창	3
○ 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창	4
(C) 배출물	
○ 배출물 없음	0
○ 약간의 배출물 (정상 동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은 양 제외)	1
○ 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	2
○ 눈 주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	3
점수 = (A + B + C) x 2 최대치 = 20	

(3) 토끼를 이용한 in vivo 피부자극시험

(가) GS-1000 0.1% + 주정 20%

① 사망률 및 일반증상, 체중변화

모든 동물에 있어서 특이한 일반 증상은 관찰되지 않았으며, 빈사 및 폐사 동물은 발견되지 않았다. 또한, 모든 동물에서 시험물질 적용으로 기인된 체중 변화는 관찰되지 않았다.

② 작용부위 관찰 및 자극성의 판정

시험물질을 도포 24, 72시간째 피부 반응 평가결과 1차 피부 자극지수 (P.I.I.)가 '0.1'로 비자극성 물질로 평가되었다.

Table 33. 피부반응 평가표

군			시 험 군								대 조 군							
피부반응			홍반·가피				부 증				홍반·가피				부 증			
적용부위			비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과	
관찰시간			24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
동물번호	성	체중 (kg)																
1	♂	2.0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	♂	2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	♂	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	♂	2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	♂	2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	♂	2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
소 계			0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
평 균 (소계/6)			0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
평균의 합계			0.4								0.2							
1차피부자극지수 (평균의 합계/4)			0.1								0.05							



Fig. 9. GS-1000 0.1% + 주정 20% 처리 24, 72시간 후 피부자극 반응



Fig. 10. 대조물질 처리 24, 72시간 후 피부자극 반응

(나) 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1%

① 사망률 및 일반증상, 체중변화

모든 동물에 있어서 특이한 일반 증상은 관찰되지 않았으며, 빈사 및 폐사 동물은 발견되지 않았다. 또한, 모든 동물에서 시험물질 적용으로 기인된 체중 변화는 관찰되지 않았다.

② 작용부위 관찰 및 자극성의 판정

시험물질을 도포 24, 72시간째 피부 반응 평가결과 1차 피부 자극지수 (P.I.I.)가 '0.2'로 비자극성 물질로 평가되었다.

Table 34. 피부반응 평가표

군			시 험 군								대 조 군							
피부반응			홍반·가피				부 증				홍반·가피				부 증			
적용부위			비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과	
관찰시간			24		72		24		72		24		72		24		72	
동물 번호	성	체중 (kg)	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
1	♂	2.2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	♂	2.1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	♂	2.3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
4	♂	2.0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	♂	2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	♂	2.2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
소 계			0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
평 균 (소계/6)			0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
평균의 합계			0.8								0.7							
1차피부자극지수(평균의 합계/4)			0.2								0.2							



Fig. 11. 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1% 처리 24, 72시간 후 피부자극 반응



Fig. 12. 대조물질 처리 24, 72시간 후 피부자극 반응

(4) 토끼를 이용한 in vivo 안점막자극시험

(가) GS-1000 0.1% + 주정 20%

① 적용부위관찰 및 자극성의 판정

급성 안자극지수 (I.A.O.I) 값은 '0.0'으로 안점막 판정표에 따라 비자극물로 판정되었다.

Table 35. 안반응 평가표

군			세척군			비세척군						
동물번호			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
체중			2.7	2.1	2.4	2.1	2.3	2.3	2.3	2.4	2.0	
각막	A. 혼탁정도	1일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	B. 혼탁범위	1일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	홍채	C. 반 응	1일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			2일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			4일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7일			0	0	0	0	0	0	0	0	0	
결막	D. 발 적	1일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	E. 결막부종	1일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F. 배 출 물	1일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I.I.O.I		1일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
M.I.O.I		1일	0.00			0.00						
		2일	0.00			0.00						
		3일	0.00			0.00						
		4일	0.00			0.00						
		7일	0.00			0.00						



Fig. 13. GS-1000 0.1% + 주정 20% 처리 1, 2, 3, 4, 7 일 후 안점막자극 반응

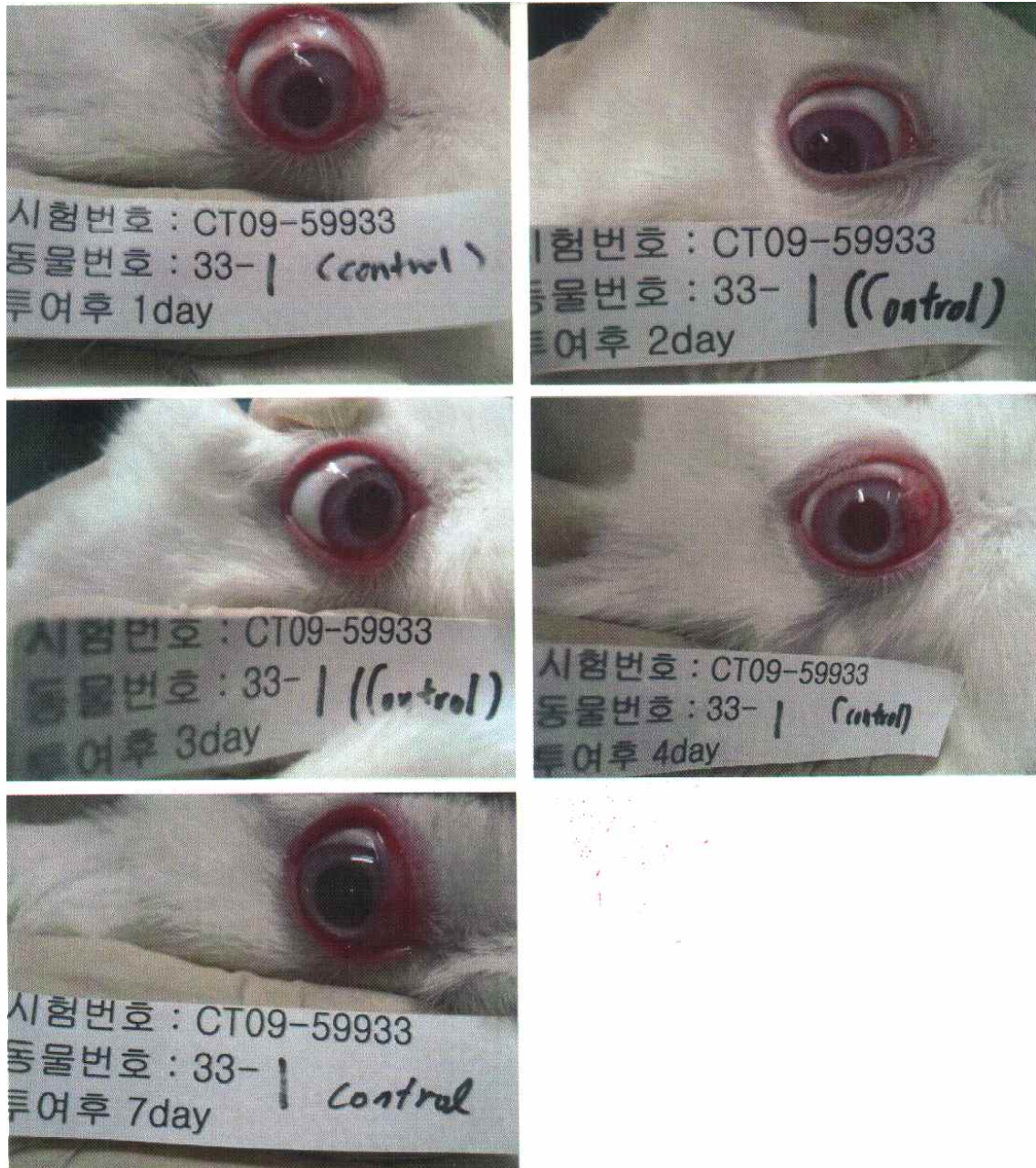


Fig. 14. 대조물질 처리 1, 2, 3, 4, 7 일 후 안점막자극 반응

(나) 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1%

① 적용부위관찰 및 자극성의 판정

시험물질 투여 후 1일째에 모든 동물에서 결막내 발적, 부종, 배출물이 관찰되었고 비세척군에서 2/6례의 각막 혼탁과 2/6례의 홍채에 약간의 충혈이 나타났다. 투여 후 7일째 모든 동물에서 안자극이 회복되어 시험을 종료하였다. 급성 안자극지수 (I.A.O.I) 값은 '17.7'로 안점막 판정표에 따라 중등도자극물로 판정되었다.

Table 36. 안반응 평가표

군			세척군			비세척군					
동물번호			1	2	3	4	5	6	7	8	9
체중			2.1	2.0	2.2	2.3	2.0	2.3	2.2	2.3	2.0
각막	A. 혼탁정도	1일	0	0	0	0	0	2	0	0	0
		2일	0	0	0	0	0	2	0	0	0
		3일	0	0	0	0	0	2	0	0	0
		4일	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B. 혼탁범위	1일	0	0	0	0	0	2	0	0	0
		2일	0	0	0	0	0	2	0	0	0
		3일	0	0	0	0	0	2	0	0	0
		4일	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
홍채	C. 반 응	1일	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		2일	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		3일	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		4일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
결막	D. 발 적	1일	1	2	2	2	2	2	1	2	1
		2일	1	1	1	1	2	2	1	1	0
		3일	1	1	1	1	1	2	1	0	0
		4일	1	0	0	1	0	1	0	0	0
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E. 결막부종	1일	1	2	2	2	2	3	1	0	1
		2일	1	2	1	1	1	2	1	2	0
		3일	0	1	0	1	1	2	0	1	0
		4일	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F. 배 출 물	1일	1	2	2	2	2	3	2	2	1
		2일	0	1	1	1	1	2	1	1	1
		3일	1	0	0	1	1	2	0	1	0
		4일	0	0	0	0	0	2	0	0	0
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I.I.O.I		1일	6	12	12	12	12	41	8	27	6
		2일	4	8	6	6	8	37	6	16	2
		3일	4	4	2	6	6	37	2	2	0
		4일	2	0	0	2	0	13	0	0	0
		7일	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M.I.O.I		1일	10.0			17.7					
		2일	6.0			12.5					
		3일	3.3			8.8					
		4일	0.7			2.5					
		7일	0.0			0.0					



Fig. 15. 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1% 처리 1, 2, 3, 4, 7 일 후 안점막자극 반응



Fig. 16. 대조물질 처리 1, 2, 3, 4, 7 일 후 안점막자극 반응

(5) 결 론

(가) in vivo 피부자극시험

- 본 시험은 New Zealand White계 토끼의 찰과와 비찰과 피부에 시료의 접촉을 통한 피부자극성을 평가하기 위하여 실시하였다. 시험 24시간 전에 토끼 등 부위의 털을 제모하고, 시험물질 0.5 mL을 6마리의 토끼의 찰과와 비찰과 피부에 직접 적용하고 비자극성테이프로 고정 후 24시간 폐쇄접포 시켰다. 적용 부위의 관찰은 시료 적용 후 24, 72시간째에 홍반과 가피형성 및 부종 등의 피부자극성 유무를 관찰하였고, 피부반응평가표에 따라 점수화로 산출하였다.
- GS-1000 0.1% + 주정 20%를 시험한 결과 일차자극지수(P.I.I.)값이 '0.1'로 비자극성 물질로 평가되었다.
- 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1% 를 시험한 결과 일차자극지수 (P.I.I.)값이 '0.2'로 비자극성 물질로 평가되었다.

(나) in vivo 안점막자극시험

- Albino Rabbit (NEW계)을 대상으로 시험물질에 대한 안점막 자극시험을 실시하였다. 시험동물은 체중 2-3 kg의 건강하고 시험개시 24시간전에 안검사시 눈에 이상이 없는 토끼 9마리를 사용하였다. 시험물질을 9마리의 토끼 좌안에 0.1 mL씩 점안하고 그중 3마리는 20-30 초 후 양쪽 눈에 멸균생리식염수로 세안하고, 나머지 6마리는 세안하지 않았다. 시험물질 적용 부위의 관찰은 시험물질 적용 후 1, 2, 3, 4, 7 일에 실시하였고, 안구병변 등급에 따라 평가하고 급성안 자극지수를 산출하여 판정표에 따라 자극도를 구분하였다.
- GS-1000 0.1% + 주정 20%를 시험한 결과, 급성 안자극지수 (I.A.O.I) 값이 '0.0'으로 안점막 판정표에 따라 비자극물로 판정되었다.
- 주정 59% + 알로에베라 40% + 정향추출물 1% 를 시험한 결과, 급성 안자극지수 (I.A.O.I) 값이 '17.7'로 안점막 판정표에 따라 중등도자극물로 판정되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구목표 및 평가의 착안점	목표달성도	관련분야의 기술발전에 기여도
1차 년도	항균활성 Screening (효율성)	100	- 손소독제의 살균효율 측정 방법을 확립하여 과학적인 기준을 제시하였음 - 정보 검색 후 선발된 후보물질에 대한 항균 활성 평가를 통하여 천연물 선발 관련 기술발전에 새로운 접근법을 제시하였음
	알코올 탈취능 Screening (효율성)	100	- 알코올탈취 활성을 가지는 후보물질 선발은 다양한 카타고리를 설정하여 효율적으로 수행 되도록 설계하였음 - 탈취 효능은 전자코 등의 장비를 이용하여 할 수 있으나 본 실험에서는 사람이 직접 관능적으로 선발하는 방법으로 효율성을 증진시켰음
	제품개발 (논리성)	100	- 항균과 탈취 관련 특허 3편에 대한 출원을 완료하였음. 관련 분야의 기술발전에 기여할 수 있을 것으로 생각됨
2차 년도	시제품 생산 (논리성)	100	- 항균활성과 소취활성 중 소취활성을 중시하여 제품을 개발하였음. 항균활성 증진은 현재 알코올손소독제 수준의 알코올 농도에서는 의미가 별로 없음 - 알코올 함량을 대폭적으로 낮추고 부족한 항균활성을 천연항균제인 자몽종자 추출물로 보강한 저알코올 손소독제 제품을 개발하고자 하였음. 저알코올 손소독제 기술 개발에 논리성을 부여하였음
	소비자인식도 조사 (적절성)	100	- 주로 손소독제를 사용하고 있는 소비자층인 초등학생, 중학생을 대상으로 조사하였음
	독성실험 (적절성)	100	- 손소독제의 의약외품 허가를 위한 독성실험법을 확립하였으므로 관련분야 기술 발전에 기여할 것으로 사료됨
	산업화 방안 모색 (효율성)	100	- 단순화된 배합비를 가지고 있는 현재 시장에 기능성 강조로 산업화 방안을 마련해야 할 것임
최종 평가	기술개발 (논리성)	100	- 에탄올, 이소프로필알코올 이외의 기능성물질이 첨가된 손소독제의 의약외품 허가를 위한 제품 개발, 독성시험 등 일련의 시험법 확립으로 관련분야 기술 발전에 기여할 것으로 생각됨
	산업화 (효율성)	100	- 손세정제의 제조, 독성검사 등 산업화를 위한 관련분야 기술 발전에 기여하였음

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 참여업체에 대한 실용화를 위한 기술이전 논의가 2년차 시작 시점에서 이루어진바 있음
- 기술이전 논의 시기는 신종플루에 의해 손소독제가 널리 퍼지고 있는 상황이었음
- 시의적으로 급하기 때문에 1년차 연구결과에 대한 기술이전을 기획하였으나 여러 가지 이유로 무산된 바 있음
- 과제가 완료된 시점에서 다시 기술이전을 위해 노력할 계획임

나. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 관련성이 높지 않음

다. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

① 특허출원

- 알코올소취 기능이 부여된 손소독제의 제조방법. 2009. 7월 출원
- 항균력이 증진된 손소독제의 제조방법. 2009. 7월 출원
- 알코올소취 기능이 부여되고 항균활성이 증진된 손소독제의 제조방법. 2009. 7월 출원

② 논문

- Assessment of dermal and ocular irritation potential of alcohol hand sanitizers containing aloe vera and clove extract with in vitro and in vivo methods. Toxicology. SCI 투고(2010. 5월초 투고완료)
- 자몽종자추출물과 유기산 병합 사용에 의한 항균효과 변화 (2010. 8월초 투고예정)

③ 학술발표

- 알코올 소취효과가 우수한 국내산 농산물 소재선발 및 이를 이용한 손소독제 개발(2009. 한국식품영양과학회 발표, 우수포스터상 수상)

라. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 항균활성 관련된 연구에 연계 가능

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 외국의 경우 다양한 손소독제가 생산, 판매되고 있으나 국내와 비교하여 월등한 기술이 있다고 보기는 어려움
- 그러나 미국의 경우, 손소독제의 살균력 측정을 위한 Time kill 방법 등이 확립이 되어 있어 이를 이용하여 손소독제의 성능을 검증함
- Time kill 방법을 검증하여 보고서에 서술하였음

제 7 장 참고문헌

1. 박현국, 김상범. 자몽종자 추출물의 항균성. 한국식품영양학회. 19. 526-531 (2006)
2. Eum J and Park Y. Antimicrobial activity of medicinal plant extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Exp. Biomed. Sci. 13. 189-195 (2007)
3. Park HS, Jun DY, Fang Z, Woo, MH, Kim YH. Antimicrobial activity of seeds of *Zanthoxylum piperitum* against oral pathogen streptococcus mutans. J. Life Sci. 18(2). 167-174 (2008)
4. Choi JD, Seo IW, Cho SH. Studies on the antimicrobial activity of grapefruit seed extract. Bull. Korean Fish. Soc. 23, 297-302 (1990)
5. Lee TE. Efficacy report of DF-100. Conference of genetics & cell biology. University of Malaya, Kuala Lumpur (1987)
6. Cho SH, Seo IW, Cho JD, Joo IS. Inhibitory effects of grapefruit seed extract (DF-100) on growth and toxin production of *Penicillium islandicum*. J. Korean Agric. Chem. Soc. 33, 169-172 (1990)
7. Moreira R, Quintero W. The grapefruit seed extract "DF-100" in dairy industries sanitization and its uses in cheese and yogurts manufacturing processes. Chemie. Brasileira Industria Co., Research Paper (1987)
8. Carson JR, DF-100 as a domestic wastewater disinfectant. Analytical environmental services, Florida, USA (1985)
9. Guillermo FG, Evaluation of the effectiveness of DF-100 in the control of the intrahospital infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and other agents in the center for clinical research of the nutrition and food technology research institute, University of Chile, Report of associate institution of the United Nations University (1982)
10. Wikipedia.
11. von Woedtke T, Schlüter B, Pflügel P, Lindequist U, Jülich WD. "Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained". *Pharmazie* 54 (6): 452-6 (1999)
12. Ganzera M, Aberham A, Stuppner H. "Development and validation of an HPLC/UV/MS method for simultaneous determination of 18 preservatives in

- grapefruit seed extract". *J. Agric. Food Chem.* 54 (11): 3768-72 (2006)
13. Sims, Judith. Gale Encyclopedia of Alternative Medicine. Available in e-book format. *Thomson Gale.* (2001)
 14. Melissa Meisel. [Cosmetics Go Green](#). Happi, Rodman Publishing (2007)
 15. Takeoka G, Dao L, Wong RY, Lundin R, Mahoney N. "Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts". *J. Agric. Food Chem.* 49 (7): 3316-20 (2001)
 16. Takeoka GR, Dao LT, Wong RY, Harden LA. "Identification of benzalkonium chloride in commercial grapefruit seed extracts". *J. Agric. Food Chem.* 53 (19): 7630-6 (2005)
 17. Todd Caldecott. [Grapefruit seed extract antibiotic activity is due to preservative compounds](#). Townsend Letter for Doctors and Patients. 2005.
 18. Avula B, Dentali S, Khan IA. "Simultaneous identification and quantification by liquid chromatography of benzethonium chloride, methyl paraben and triclosan in commercial products labeled as grapefruit seed extract". *Pharmazie* 62 (8): 593-6 (2007)
 19. Sugimoto N, Tada A, Kuroyanagi M, *et al.* "[Survey of synthetic disinfectants in grapefruit seed extract and its compounded products]" (in Japanese). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 49 (1): 56-62 (2008)
 20. Bekiroglu S, Myrberg O, Ostman K, *et al.* "Validation of a quantitative NMR method for suspected counterfeit products exemplified on determination of benzethonium chloride in grapefruit seed extracts". *J Pharm Biomed Anal* 47 (4-5): 958-61 (2008)
 21. Dowling, Curtis F.; Morton, Julia Frances. [Fruits of warm climates](#). Miami, Fla: J.F. Morton. pp. 152-8 (1987)
 22. Michael Quinion. [World Wide Words: Questions &Answers; Grapefruit](#) (2009)
 23. Fellers PJ, Nikdel S, Lee HS. "Nutrient content and nutrition labeling of several processed Florida citrus juice products". *J Am Diet Assoc* 90 (8): 1079-84 (1990)
 24. Worwood, Valerie Ann. *The complete book of essential oils and aromatherapy*. Novato, Calif: New World Library (1991)
 25. Cerda JJ, Robbins FL, Burgin CW, Baumgartner TG, Rice RW. "The effects

- of grapefruit pectin on patients at risk for coronary heart disease without altering diet or lifestyle". *Clin Cardiol* 11 (9): 589-94 (1988)
26. Arthington JD, Kunkle WE, Martin AM. "Citrus pulp for cattle". *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 18 (2): 317-26, vii. (2002)
 27. Reagor L, Gusman J, McCoy L, Carino E, Hegggers JP. "The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. An in vitro agar assay". *J Altern Complement Med* 8 (3): 325-32 (2002)
 28. Hegggers JP, Cottingham J, Gusman J, *et al.* "The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity". *J Altern Complement Med* 8 (3): 333-40 (2002)
 29. Cvetnić Z, Vladimir-Knezević S. "Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract". *Acta Pharm* 54 (3): 243-50 (2004)
 30. Kampf G, Kramer A. "[Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs](#)". *Clin. Microbiol. Rev.* 17 (4): 863-93, table of contents (2004)
 31. Sakamoto S, Sato K, Maitani T, Yamada T. "[Analysis of components in natural food additive "grapefruit seed extract" by HPLC and LC/MS]" (in Japanese). *Eisei Shikenjo Hokoku* (114): 38-42 (1996)
 32. Chiambaretta F, Pouliquen P, Rigal D. "[Allergy and preservatives. Apropos of 3 cases of allergy to benzalkonium chloride]" (in French). *J Fr Ophtalmol* 20 (1): 8-16 (1997)
 33. Liu H, Routley I, Teichmann KD. "Toxic endothelial cell destruction from intraocular benzalkonium chloride". *J Cataract Refract Surg* 27 (11): 1746-50 (2001)
 34. Eleraky NZ, Potgieter LN, Kennedy MA. "Virucidal efficacy of four new disinfectants". *J Am Anim Hosp Assoc* 38 (3): 231-4 (2002)
 35. Armando C, Maythe S, Beatriz NP. "[Antioxidant activity of grapefruit seed extract on vegetable oils](#)". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77 (4): 463-7 (1997)
 36. Giamperi L, Fraternali D, Bucchini A, Ricci D. "Antioxidant activity of Citrus paradisi seeds glyceric extract". *Fitoterapia* 75 (2): 221-4 (2004)
 37. Drewnowski A, Gomez-Carneors C. "Bitter taste, phytonutrients, and

- consumer: a review". *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 1424-35 (2000)
38. Tirillini B. "Grapefruit: the last decade acquisitions". *Fitoterapia* 71: 29-37 (2000)
39. Andrew W. Saul, Ph.D. [Vitamin C Has Been Known To Fight 30 Major Diseases... For Over 50 Years.](#) *Orthomolecular Medicine News Service.* March 15 (2006)
40. [Vitamin C.](#) *American Cancer Society* (2009)
41. The World's Healthiest Foods; Grapefruit. *The George Mateljan Foundation.* (2009)
42. Bennett RD, Hasegawa S, Herman Z. "Glucosides of acidic limonoids in citrus". *Phytochemistry* 28: 2777-81 (1989)
43. Ohta H, Fong CH, Berhow M, Hasegawa. "Thin-layer and high-performance liquid chromatographic analyses of limonoids and limonoid glucosides in citrus seeds". *J. Chromatogr.* 639: 295-302 (1993)
44. Braddock RJ, Bryan CR. "Extraction parameters and capillary electrophoresis analysis of limonin glucoside and phlorin in citrus products". *J. Agric. Food Chem.* 49: 5982-8 (2001)
45. Tushiswili LS, Durmishidze SV, Sulaberidze KV. "Sterols of grapefruit, orange, mandarin pulps (*Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus unshiu*)". *Chem. Nat. Comp.* 18: 445-7 (1983)
46. Vanamala J, Leonardi T, Patil BS, *et al.* "Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit". *Carcinogenesis* 27 (6): 1257-65 (2006)
47. Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, *et al.* "Changes in plasma lipid and antioxidant activity in rats as a result of naringin and red grapefruit supplementation". *J. Agric. Food Chem.* 53 (8): 3223-8 (2005)
48. Bakalar, Nicholas. [Experts Reveal the Secret Powers of Grapefruit Juice.](#) *The New York Times.* March 21 (2006)
49. Brandin H, Myrberg O, Rundlöf T, Arvidsson AK, Brenning G. "Adverse effects by artificial grapefruit seed extract products in patients on warfarin therapy". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 63 (6): 565-70 (2007)
50. He K, Iyer KR, Hayes RN, Sinz MW, Woolf TF, Hollenberg PF. "Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of

- grapefruit juice". *Chem. Res. Toxicol.* 11 (4): 252-9 (1998)
51. Sharamon, S., Baginski, B.J. The Healing Power of Grapefruit Seed. *Lotus Press, Wisconsin* (1996)
 52. Allan Sachs. *The authoritative guide to grapefruit seed extract.* Mendocino, CA: Life Rhythm (1997)

