

방기 및 감초의 에탄올 추출물이 *Listeria monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향

신동화 · 한지숙 · 김문숙
전북대학교 식품공학과

Antimicrobial Effect of Ethanol Extracts of *Sinomenium acutum*(Thunb.)
Rehd. et Wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var.
Glandulifera Regel et Zucc on *Listeria monocytogenes*

Dong-Hwa Shin, Ji-Sook Han and Moon-Sook Kim

Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju

Abstract

The growth inhibitions of each strain on tryptic soy broth containing various concentration of 75% ethanol extract of *Sinomenium acutum*(Thunb.) Rehd. et wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var. glandulifera Regel were compared which were exhibited comparatively strong growth inhibition on *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, 19112, 19113, 19114 and 15313 at previous screening test by disk method. The *Sinomenium acutum*(Thunb.) Rehd. et wils extract showed partly effect by its concentration in broth to *L. monocytogenes* ATCC 19111 and 19114. The *Glycyrrhiza glabra* L. var. glandulifera Regel extract inhibited the growth of all test strains and even 100 ppm of the extract in the broth inhibited the growth of all test strains of *L. monocytogenes* for 12 to 48 hours. The extract stopped the growth totally of all strains in 500 ppm addition level. *L. monocytogenes* ATCC 19113 was more sensitive than other strains.

Key Words: *L. monocytogenes*, *Sinomenium acutum*(Thunb.) Rehd. et wils, *Glycyrrhiza glabra* L. var. glandulifera Regel et zucc, natural inhibitor, antimicrobial

서 론

*Listeria monocytogenes*는 1980년대 이후 문제가 대두된 식중독균⁽¹⁾으로 저온증식이 가능하며⁽²⁾ 열저항성이 있고⁽³⁾ 특히 냉장 식품에서 문제⁽⁴⁾가 되고 있다. 미국과 구라과에서 *Listeria*에 의한 식중독이 빈번히 발생⁽⁵⁾하여 이를 방지하기 위한 많은 시도가 이루어졌으며 특히 냉장식품에서 barrier의 개념으로 *Listeria*의 번식을 막기 위한 연구가 활발히 진행⁽⁶⁾되고 있다. 최근 연구 결과에 의하면 몇 가지 천연물에는 *L. monocytogenes*의 성장을 억제하거나 사멸시킬 수 있는 물질이 존재한다고 알려지고 있는데 젓산균에서 생성되는 bacteriocin⁽⁷⁾, cocoa 분말⁽⁸⁾, 우유에 들어있는 lactoferricin⁽⁹⁾ 등과 함께 일부 식물의 정유⁽¹⁰⁾에서 *L. monocytogenes*에 대한 항균성 물질이 제시되고 있다.

이와 같이 우리가 오랫동안 식용해온 동식물의 특수 성분이 식중독 미생물의 성장을 저지할 수 있다면 이

성분을 이용, 유해성의 시비 없이 효과적으로 식중독 발생을 막을 수 있는 가능성이 있다고 본다. 따라서 본 실험에서는 냉장 식품에서 특히 문제가 되는 *L. monocytogenes*을 대상으로 폭넓은 항균성 검색실험을 거쳐 선발된 방기 및 감초에탄올 추출물의 항균성을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

방기 및 감초는 1993년도 중국에서 수확, 건조한 제품을 건재상(전주, 남창당건재한약방)에서 구입, 사용하였다.

추출방법

분쇄기로 곱게 마쇄한 시료에 5배 정도의 75% 에탄올을 혼합하여 환류 냉각관을 부착시킨 플라스크에 넣고 85°C 수욕상에서 3시간 가열, 추출후 여과하여 rotary vacuum evaporator에서 에탄올을 증발시켜 추출물을 얻었고 추출물중 가용성 고형분량은 농축물 1 ml을 취하여 105°C에서 건조후 증발 잔사의 양으로 하였다.

Corresponding author: Dong-Hwa Shin, Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Dukjin-Dong, Chonju, Chonbuk 560-756, Korea

Table 1. Growth inhibition of ethanol extracts from *Sinomenium acutum*(Thunb.) Rehd. et wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel on *Listeria monocytogenes*

Botanical name	Korean name	<i>L. monocytogenes</i>					S.S ⁽¹⁾
		ATCC 15313	ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	
<i>Sinomenium acutum</i> (Thunb.) Rehd. et wils	Bangi	13 ⁽²⁾	15	13	13	15	1.5
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i> Regel et zucc	Kamcho	20	20	21	20	21	1.4

¹⁾S.S: mg of solid content of extract/disc:
²⁾Clear zone diameter(mm)

사용균주 및 배지

균주는 *Listeria monocytogenes* 5균주(ATCC 15313, ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113, ATCC 19114)를 국립보건원에서 분양받아 tryptic soy agar(Difco)에 32°C, 1~2일 증식, 4°C에 보관하면서, 매 1개월마다 계대배양하면서, 사용하였고 증식저해 실험용 배지는 tryptic soy broth(Difco)를 사용하였다.

추출물의 항균성 검색

slant에 배양된 각 시험 균주를 1백금이씩 취해 10 ml tryptic soy broth에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하여 활성화시켰다. 이 배양액 0.1 ml를 실온에서 하룻밤 건조한 tryptic soy agar plate에 떨어뜨린 후 구부린 유리막대로 균일하게 도포하였다. 각 시험균이 접종된 plate위에 방기 및 감초 추출물을 흡수시킨 0.65 mm filterpaper disc(Whatman No. 2)를 놓고 30°C에서 24~48시간 동안 배양후 disc 주위에 나타나는 clear zone의 직경(mm)으로 항균성을 비교⁽¹¹⁾하였다.

추출물의 저해 정도 측정

각 추출물을 membrane filter(0.2 µm pore size)로 제균시키고, broth에 각 추출물의 soluble solid를 계산, ppm단위로 첨가한 후 각 대상균주의 slant에서 1백금을 취해 10 ml broth에 접종, 30°C, 24시간 동안 배양시킨 배양액 0.1 ml를 각 추출물이 함유된 broth에 접종하여 30°C에서 배양하였다. 추출물의 농도별 항균 효과는 미생물의 생육정도를 spectrophotometer(Cecil se 292, England)를 사용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였고, 추출물을 넣은 broth를 blank로 사용하였다.

결과 및 고찰

Disk method에 의한 1차 항균성 검색

쑥새, 자초, 황백, 질경이 등 많은 식물⁽¹²⁻¹⁵⁾들과 정향, 올스파이스 등 널리 쓰이는 향신료⁽¹⁶⁻¹⁸⁾들은 폭 넓은 균에 대하여 항균성이 있다고 알려져 있으므로 *Listeria monocytogenes*에 대해서도 효과가 있는 식물이 있을 것으로 판단, 54종의 식물에 대한 예비검색 결과 방기 및

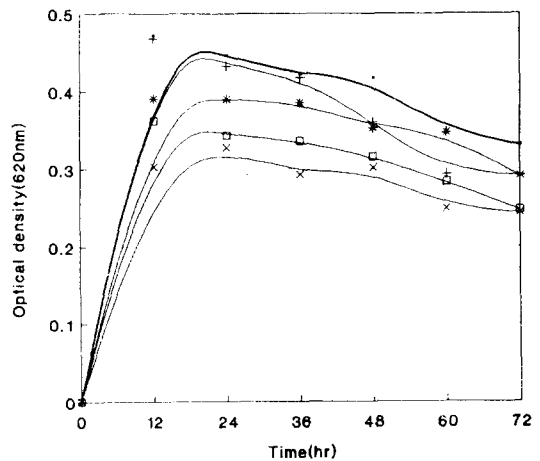


Fig. 1. Growth inhibition of 75% ethanol extract of *Sinomenium acutum*(Thunb.) Rehd. et wils on *L. monocytogenes* ATCC 19111
 ■—■: 0 ppm, +—+: 100 ppm, *—*: 500 ppm, □—□: 1000 ppm, ×—×: 2000 ppm

감초에서 상당한 항균효과를 확인하였다.

방기 및 감초의 75% 에탄올 추출물을 disk method로 *L. monocytogenes* 5균주에 대하여 증식저해 정도를 비교한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보면 방기 추출물은 실험대상 균주 중 *L. monocytogenes* ATCC 19111, ATCC 19114에 대하여 부분적으로 효과가 있었고 감초 추출물은 실험대상 5균주 모두에 강한 항균성을 보였다. 감초의 1차 항균성 실험은 과 등⁽¹⁹⁾에 의하여 행하여진 실험에서도 3종의 병원성세균에 효과가 있었다.

방기 추출물의 농도별 항균 효과

방기(防己)는 방기과에 속하는 다년생 덩굴로 수종(水腫) 또는 각기(脚氣)에 사용하는 한약재^(20,21)이다. 방기의 75% 에탄올 추출물은 예비 실험 결과(Table 1) 비교적 높은 항균성을 보였기로 *L. monocytogenes* 5균주에 대하여 첨가량을 달리하면서 증식 억제 효과를 관찰한 결과는 Fig.1 및 Fig.2와 같다. 이 결과를 보면 다른

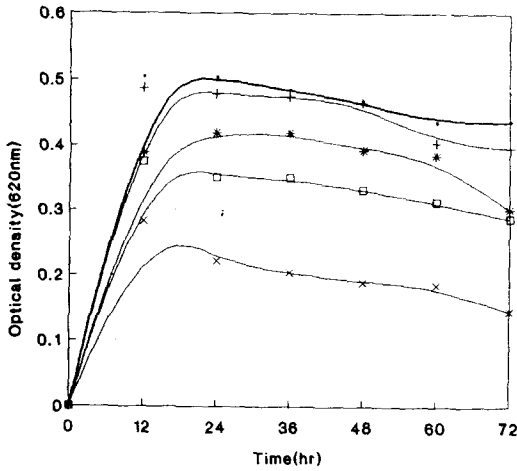


Fig. 2. Growth inhibition of 75% ethanol extract of *Si-nomenium acutum*(Thunb.) Rehd. et wils on *L. monocytogenes* ATCC 19114
 ■—■; 0 ppm, +—+; 100 ppm, *—*; 500 ppm, □—□; 1000 ppm, ×—×; 2000 ppm

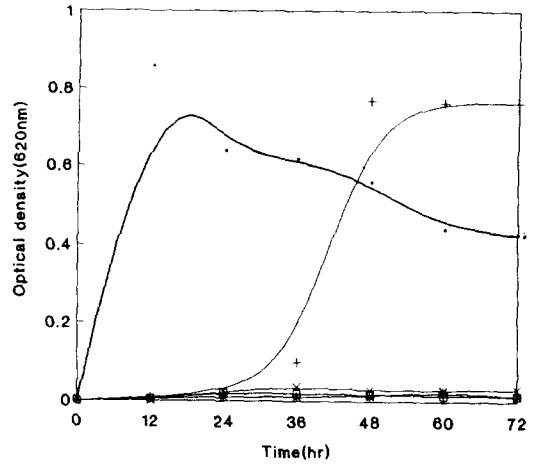


Fig. 3. Growth inhibition of 75% ethanol extract of *Gly-cyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et zucc on *L. monocytogenes* ATCC 19111
 ■—■; 0 ppm, +—+; 100 ppm, *—*; 500 ppm, □—□; 1000 ppm, ×—×; 2000 ppm

균주에는 증식 억제 효과가 미미하였으나 *L. monocytogenes* ATCC 19111과 ATCC 19114에는 어느 정도 효과를 보이고 있다.

Fig.1에서 보던 방기 75% 에탄올 추출물의 *L. monocytogenes* ATCC 19111에 대한 증식억제 현상은 추출물 첨가량에 비례하고 있으나 2000 ppm 첨가에서 증식은 어느정도 억제되나 그 효과가 뚜렷하지 못한 것을 알 수 있다. 대상 실험 균주는 배양 12~24시간에서 최고 수준에 올랐다가 서서히 감소하는 경향을 보였고 전체 증식 정도는 방기추출물의 첨가량이 높아질수록 낮았다.

L. monocytogenes ATCC 19114에 대해서는 Fig.2와 같이 2000 ppm 첨가시 상당한 증식억제 현상을 보이고, 배양 12시간에서 증식정도는 최고에 이르나 그 이후 감소하는 추세를 보여 증식이 일어나지 않고 있음을 보여주고 있다. 이 균주에 대해서도 방기 75% 에탄올 추출물의 첨가 농도에 따라 증식이 비례적으로 억제됨을 알 수 있다.

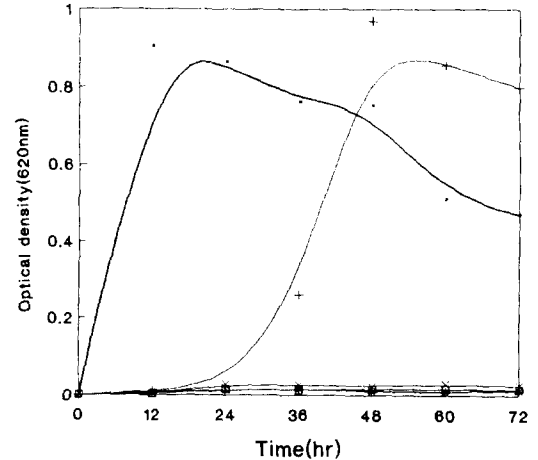


Fig. 4. Growth inhibition of 75% ethanol extract of *Gly-cyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et zucc on *L. monocytogenes* ATCC 19112
 ■—■; 0 ppm, +—+; 100 ppm, *—*; 500 ppm, □—□; 1000 ppm, ×—×; 2000 ppm

감초 추출물의 농도별 항균 효과

감초는 일명 국노(國老)라 하며 성질은 따스하고 맛은 달고 독이 없으며 모든 약을 화합시키는 성질이 있어⁽²²⁾ 한방에서 널리 쓰이고 있으며 일부 음료에 사용하기도 한다.

시판되는 감초를 75% 에탄올로 추출한 후 농축액으로 예비실험한 결과 실험대상 균주 모두에 상당한 증식 저해 효과를 보였기로 이 추출물을 각 균주에 대하여 농도별로 증식 저해 정도를 비교한 결과는 Fig.3~7과 같다.

Fig.3 및 Fig.4에서 보던 감초 추출물은 *L. monocy-*

genes ATCC 19111 및 19112에 대하여 강한 증식 저해 현상을 보여 증식 배지에 추출물을 500 ppm 이상 첨가시 균증식을 완전히 정지시키는 것을 보여주고 있으며 72 시간 배양 이후에도 전연 증식 현상을 보이지 않아 bacteriocidal 현상이 예상되고 있다. 아울러 100 ppm 첨가 시에도 배양 24시간 까지 전연 증식하지 않고 그 이후 서서히 증가하는 현상을 보이는 반면 감초 추출물은 첨가하지 않은 처리구에서는 12시간에 최고 증식 현상을

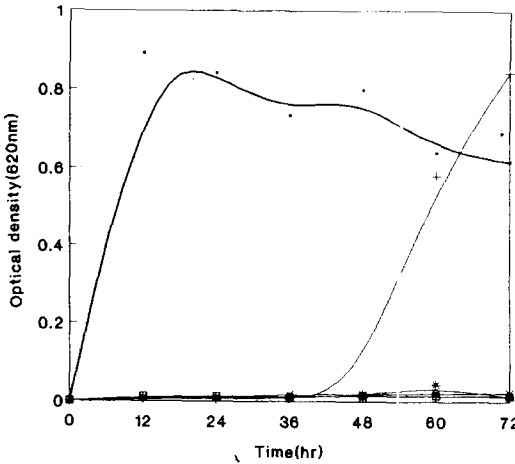


Fig. 5. Growth inhibition of 75% ethanol extract of *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et zucc on *L. monocytogenes* ATCC 19113
 ■—■; 0 ppm, +—+; 100 ppm, *—*; 500 ppm, □—□; 1000 ppm, ×—×; 2000 ppm

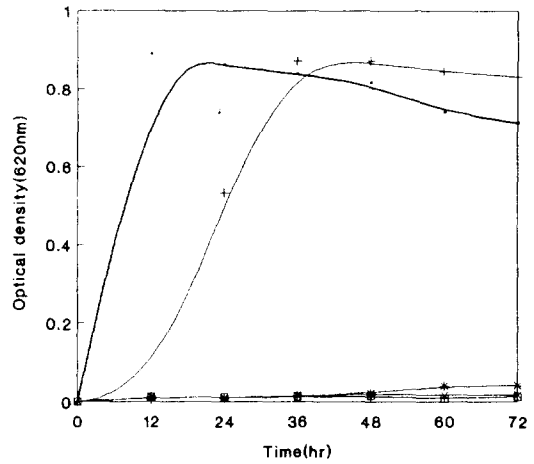


Fig. 6. Growth inhibition of 75% ethanol extract of *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et zucc on *L. monocytogenes* ATCC 19114
 ■—■; 0 ppm, +—+; 100 ppm, *—*; 500 ppm, □—□; 1000 ppm, ×—×; 2000 ppm

보여 그 차이를 뚜렷히 보이고 있다.

L. monocytogenes ATCC 19113에 대한 감초추출물 첨가 효과를 관찰해 본 결과는 Fig. 5와 같은데 증식 저해 양상은 Fig. 3 및 Fig. 4와 같으나 이 균주에 대해서는 항균성이 더욱 두드러져 100 ppm 첨가시에도 배양 48 시간 까지 전연 증식 현상을 보이지 않고 60시간에 증식 초기 현상을 보이고 있다. 따라서 *L. monocytogenes* ATCC 19112 균주는 감초의 에탄올 추출물에 대단히 민감한 반응을 보이고 있음을 알 수 있다.

L. monocytogenes ATCC 19114의 경우를 보면 Fig. 6과 같이 첨가량 500 ppm 이상에서 완전한 증식 억제가 일어나며 100 ppm 첨가시 12시간 까지 증식현상이 없으나 24시간에 상당한 증식이 있고 36시간에서 무첨가구와 비슷한 양상을 보이고 있다. 따라서 이 결과를 Fig. 3, 4, 5와 비교해 볼때 증식 저해 정도는 다소 감소됨을 알 수 있다.

한편 *L. monocytogenes* ATCC 15313에 대한 항균효과를 관찰해보면 Fig. 7과 같이 다른 균주와 비슷한 양상을 보이는데 추출물 100 ppm 첨가시 배양 36시간 까지 완전 증식 저해 현상을 보였고 그 이후 증식이 시작되고 있다.

이상 Fig. 3~7을 종합하여 고찰해 보면 감초의 75% 에탄올 추출물은 실험대상으로 한 *L. monocytogenes* 5 균주에 대하여 대단히 강한 증식 억제 현상을 보였고 그 저해 정도는 배양액에 100 ppm 첨가 수준에서도 12~36시간 까지 완전 증식 억제 현상을 보였다. 또한 균주마다 감초 추출물에 대한 증식 저해정도는 달라서 *L. monocytogenes* ATCC 19113은 100 ppm 첨가 수준에서 배양 48시간 까지 완전히 증식을 저해하나 *L. monocyto-*

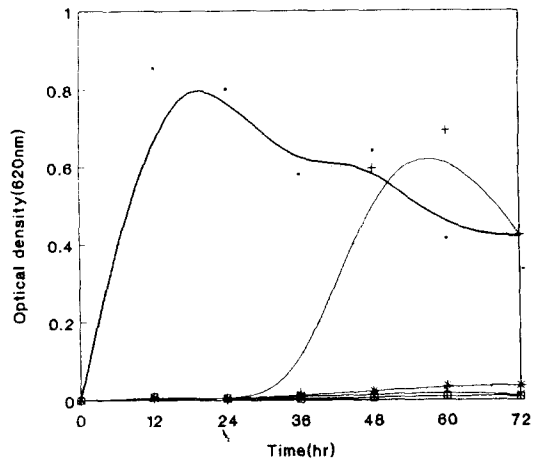


Fig. 7. Growth inhibition of 75% ethanol extract of *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et zucc on *L. monocytogenes* ATCC 15313
 ■—■; 0 ppm, +—+; 100 ppm, *—*; 500 ppm, □—□; 1000 ppm, ×—×; 2000 ppm

genes ATCC 19114는 배양 12시간 이후 부터 균이 증식하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 모든 대상 균주에 대하여 감초 추출물을 500 ppm 이상 첨가하면 72시간 까지 완전히 증식을 증식시킬 수 있음을 확인하여 대단히 강한 항균성이 있음을 알 수 있었다.

*Listeria monocytogenes*의 증식 저해에 대해서는 주로 젓산균이 내는 bacteriocin의 효과에 대해서 많은 연구^{23, 25)}가 이루어지고 있으나 식물 추출물의 효과에 대

해서는 극히 제한된 분야의 연구⁽²⁶⁾가 이루어져 이에 대한 더 많은 노력이 필요할 것으로 본다. 특히 일부 한약재가 각종 식중독 미생물 증식 억제에 상당한 효과가 있으며 *L. monocytogenes*의 증식 저해에도 관여⁽²⁶⁾하는 것이 확인된 것은 이 분야 연구의 필요성을 확인하여 주고 있다. 그러나 한약재인 tin men chu와 siu mao heung 추출물을 단독으로 사용하였을 때 *L. monocytogenes*의 증식 억제 효과가 뚜렷하였으나 peptone 같은 단백질을 추가하였을 경우 증식 억제 효과가 감소한다고 보고⁽²⁶⁾되어 효과가 있는 식물 추출물을 단백질 식품에 적용하였을 경우 그 효과에 대해서는 별도의 비교 실험이 있어야 할 것으로 판단된다.

한편 *L. monocytogenes*의 증식 억제 인자에 대해서는 lactic acid 등과 같은 유기산⁽²⁷⁾, sodium polyphosphate⁽²⁸⁾ 뿐만 아니라 glycerol monolaurate⁽²⁹⁾ 등과 함께 각종 향신료⁽³⁰⁾ 및 modified atmosphere⁽³¹⁾에서도 억제 효과가 있는 등 다양한 방법이 있으나 식물 추출물로부터 억제 인자의 검출은 그 안전성 면에서 계속 연구되어야 할 분야로 사료된다.

요 약

Disk method에 의한 예비 실험 결과 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, 19112, 19113, 19114 및 15313에 대하여 성장억제 효과가 있었던 방기 및 감초의 75% ethanol 추출물을 농도별로 tryptic soy broth에 첨가하고 각 균주를 증식, 그 저해 정도를 비교하였다. 방기는 실험대상 균주 중 *L. monocytogenes* ATCC 19111 및 19114에 부분적으로 효과가 있었고 첨가 농도에 따라 그 증식 저해 정도는 비례하였다. 감초 추출물은 실험대상 5균주 모두에 강한 항균성을 보였으며 대부분 100 ppm 첨가에서도 12~48시간 동안 완전히 증식을 억제 하였으며 500 ppm 첨가 수준에서는 모든 균에 대하여 완전 증식 억제 현상을 보여 우수한 증식 억제제로 확인되었다. 특히 *L. monocytogenes* ATCC 19113의 경우 100 ppm 첨가에서도 48시간 까지 완전 성장 억제가 가능하였다.

문 헌

- Gray, M.L. and Killinger, A.H.: *Listeria monocytogenes* and *listeria* infections. *Bacteriol. Rev.*, **3**, 309(1966)
- Lovett, J.: *Listeria monocytogenes* In Foodborne Bacterial Pathogens. Doyle M.P.(ed.), Marcel Dekker Inc., New York. p.284(1989)
- Brown, W.L.: Designing *Listeria monocytogenes* thermal inactivation studies for extended-shelf-life refrigerated foods. *Food Tech.*, **45**(4), 152(1991)
- James, S.J. and Evans, J.: Consumer handling of chilled foods: Temperature performance. *Rev. Int. Froid.*, **15**(5), 299(1992)
- Park, J.R. and Marth, E.H.: Listeriosis and *Listeria*

- monocytogenes*. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.*, **17**(6), 634(1989)
- Scott, V.N.: Factors to be considered in establishing good manufacturing practices for the production of refrigerated foods. *Dairy Food Sanit.*, **8**, 288(1988)
- Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R.W. and Hutkins, R.W.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *J. Food Prot.*, **53**, 194(1990)
- Pearson, L.J. and Marth, E.H.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cocoa in a broth medium and neutralization of this effect by casein. *J. Food Prot.*, **53**, 38(1990)
- Wakabayashi, H., Bellamy, W., Takase, M. and Tomita, M.: Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potential antimicrobial peptide derived from cow's milk. *J. Food Prot.*, **55**, 238(1992)
- Aureli, P., Costantini, A. and Zolea, S.: Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **55**, 344(1992)
- Conner, D.E. and Beuchat, L.R.: Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. *J. Food Sci.*, **49**, 429(1984)
- 이병완, 신동화: 식품 부패미생물에 대한 천연 항균성 물질의 농도별 및 분획별 항균 특성. *한국식품과학회지*, **23**(2), 205(1991)
- 정병선, 이병구, 심선택, 이정근: 쑥씨중의 정유성분이 미생물의 생육에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **4**, 417(1989)
- Kihwan, B. and Jaehwa, B.: Screening of leaves of higher plants for antimicrobial action. *Kor. J. Pharmacogn.*, **18**, 1(1987)
- 박옥연, 장동석, 조학래: 자초 추출물의 항균특성. *한국영양식량학회*, **21**(1), 97(1992)
- 정창기, 박완규, 유익재, 박기문, 최춘언: 카레 향신료 정유성분의 항균성. *한국식품과학회지*, **22**, 716(1990)
- Briozzo, J., Nunez, L., Chirife, J., Herszage, L. and D'Aquino, M.: Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 69(1989)
- Shlef, L.A., Naglik, O.A. and Bogen, D.W.: Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. *J. Food Sci.*, **45**, 1042(1980)
- 곽이성, 양재원, 이광승: 일부 병원성 미생물에 대해 항균활성을 보이는 생약의 탐색. *한국식품위생학회*, **8**(3), 141(1993)
- 신민교: 임상본초학. 남산당, 서울, p.604(1986)
- 육창수: 원색 한국 약용 식물도감. 아카데미서적, 서울, p.477(1990)
- 황도연: 원방 최선 방약합편, 김의건 편역. 동양종합통신 교육원, p.54(1989)
- Lee, S.H. and Frank, J.F.: Competitive growth and attachment of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ATCC 11454. *J. Microbio. Biotech.*, **2**, 73(1992)
- Motlagh, A.M., Holla, S., Johnson, M.C., Bay, B. and Field, R.A.: Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin ACH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Food Prot.*, **55**, 337(1992)

25. Liao, C.C., Yousef, A.E., Richter, E.R. and Chism, G.W.: *Pediococcus acidilactici* PO₂ bacteriocin production in whey permeate and inhibition of *Listeria monocytogenes* in food. *J. Food Sci.*, **58**, 430(1993)
26. Chung, K.T., Thomasson, W.R. and Wu-Yuan, C.D.: Growth inhibition of selected food-borne bacteria, particularly *Listeria monocytogenes*, by plant extracts. *J. Applied Bacterio.*, **69**, 498(1990)
27. Buchanan, R.L., Golden, M.H. and Whiting, R.C.: Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J. Food Prot.*, **56**, 474(1993)
28. Zaika, L.L. and Kim, H.A.: Effect of sodium poly phosphates on growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **56**, 577, 4(1993)
29. Oh, D.H. and Marshall, D.L.: Influence of temperature, pH and glycerol monolaurate on growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **56**, 744(1993)
30. Hefnawy, Y.A., Moustafa, S.I. and Marth, E.H.: Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. *J. Food Prot.*, **56**, 876(1993)
31. Ingham, S.C., Escude, J.M. and Mccown, P.: Comparative growth rates of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked chicken loaf stored under air and two modified atmospheres. *J. Food Prot.*, **53**, 289(1990)

(1994년 8월 23일 접수)