

*Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 뽕나무 및 고삼 에탄올 추출물의 분획별 효과

한지숙 · 신동화

전북대학교 식품공학과

Antimicrobial Effect of Each Solvent Fraction of *Morus alba* Linne, *Sophora flavescens* AITON on *Listeria monocytogenes*

Ji-Sook Han and Dong-Hwa Shin

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

Abstract

Ethanol 75% extracts of *Morus alba* Linne(Ma) and *Sophora flavescens* AITON(Sf) were fractionated by chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH) and water. Each fractionate was added to tryptic soy broth varying in extract levels and 5 strains of *Listeria monocytogenes*(Lm) were inoculated in them for comparing growth inhibition at 32°C. The CHCl₃ and EtOAc fraction of Ma were superior in growth inhibition of 5 strains but only CHCl₃ fraction of Sf showed comparatively higher inhibition to Lm ATCC 19113. Lm ATCC 19111 and 19113 were totally inhibited by 500 ppm of EtOAc fraction and Lm ATCC 19112, 19114 and 15313 were also absolutely inhibited by 1000 ppm of CHCl₃ fraction of Ma 75% ethanol extract.

Key words: *L. monocytogenes*, *Morus alba* Linne, *Sophora flavescens* AITON, natural antimicrobial, natural inhibitor

서 론

식중독균으로 알려진 *Listeria monocytogenes*⁽¹⁾는 Cole-slaw, 몇 가지 치즈류, 그리고 육류제품에서도 식중독을 발생시켜 북미, 스위스 등에서 큰 충격을 주었다⁽²⁾. 이 균은 가축, 야생동물, 가금류, 어류에서도 매우 높은 빈도로^(3,4) 발견되며 내열성이 있어 균주에 따라서는 63°C에서 5분 생존하나 10분에서는 사멸⁽⁵⁾한다고 알려져 있으며, 식중독은 성인에게도 발생하나 특히 임산부나 유아에게 많이 일어나며 증상은 패혈증, 유산, 뇌막염 등 심각한 장애를 일으킨다고 알려져 있다⁽⁶⁾. *Listeria monocytogenes*는 psychrotroph로서 냉장 온도에서 증식 가능하여 pH 6 이상인 육류에서는 0°C에서도 증식하고 pH 5.6에서는 증식하지 못하여⁽⁷⁾ pH에 대단히 민감한 것으로 알려지고 있다⁽⁸⁾.

냉장식품의 수요가 세계적으로 크게 증가⁽⁹⁾하고 있는데 이들 냉장식품에서는 호냉성 식중독 미생물⁽¹⁰⁾들에 의한 식중독이 발생할 수 있다고 알려지고 있다. 대표적인 냉장식품인 비엔나 소시지, 햄 등 육가공제품에서 Liste-

ria가 평균 8% 정도 검출⁽¹¹⁾되고 식품공장 작업자의 12%가 손에서 *Listeria*가 검출⁽¹²⁾되고 있어 열처리가 충분치 못하고 냉장유통되는 식품의 경우 저온 미생물에 의한 식중독, 특히 *L. monocytogenes*에 의한 위험성이 높다. *L. monocytogenes*의 증식을 억제할 수 있는 수단으로는 젖산균이 내는 bacteriocin⁽¹³⁻¹⁵⁾, polyphosphate⁽¹⁶⁾, monolaurate⁽¹⁷⁾, 정향 등 향신료⁽¹⁸⁾ 그리고 각종 방부제나 식물추출물 그리고 미생물들⁽¹⁹⁾이 연구되고 있다.

이 연구에서는 각종 식물의 75% 에탄올 추출물로 *L. monocytogenes*에 대한 증식 저해정도를 검색한 결과⁽²⁰⁾ 뽕나무껍질과 고삼이 실험대상균에 뚜렷한 효과를 보였기에 이 추출물을 용매별로 분획하고 이 분획물을 농도별로 첨가하여 *L. monocytogenes* 균주들에 대한 증식 저해현상을 관찰하여 원인물질 규명을 위한 기초실험을 실시하였다. 뽕나무껍질은 淸熱祛風, 通經絡에 사용하고, 고삼은 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 淸熱利水에 이용하는 한약재이다⁽²¹⁾.

재료 및 방법

재료

뽕나무(*Morus alba* Linne)껍질과 고삼(*Sophora flavescens* AITON)은 전주 시내 건재상에서 93년 4월 구입한

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

후, 건조하여 미세하게 마쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

추출방법 및 Soluble solid 함량 측정⁽²⁾

대상 시료의 추출은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 flask에 예비실험 결과 수율이 높았던 75% ethanol을 시료 5배 정도와 혼합하여 85°C의 수욕상에서 3시간 동안 가열후 여과하여 rotatory vacuum evaporator로 ethanol을 증발시켰고, soluble solid 함량은 증발된 추출물 1 ml를 취하여 105°C에서 건조 후 증발잔사의 양으로 하였다.

사용균주 및 배지

균주는 국립보건원에서 분양받은 *Listeria monocytogenes*(ATCC 15313, ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113 및 ATCC 19114)를 사용하였고 tryptic soy agar에 증식, 4°C에 저장하면서 매 1개월마다 계대배양 하였다. 증식저해 실험용 배지는 tryptic soy broth(Difco)를 사용하였다.

각 추출물의 분획

75% ethanol로 추출하여 얻은 추출물을 chloroform (CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc) 및 butanol(BuOH)로 분획여두를 이용, 순차 분획하여 각각 농축, 각 용매의 분획물을 얻고 최종적으로 물층을 얻었다.

각 분획물의 항균성 검색

각 분획물의 항균성 검색은 slant에 배양된 각 균주 1백균이를 취해 10 ml broth에 접종하여 30°C, 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 액 0.1 ml를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 4~5 mm인 plate에 투입한 후 구부린 유리막대로 균일하게 펼치고, 멸균된 0.65 mm filter paper disc(Whatman No.2)에 각추출물을 흡수시켜 plate 표면 위에 놓아 30°C, 24~48시간 동안 배양한 후 disc 주위의 clear zone의 직경(mm)으로서 비교⁽²³⁾하였다.

각 분획물의 저해농도의 측정

각 분획물을 membrane filter(0.2 µ)로 제균 시키고, broth에 각 추출물의 soluble solid를 농도별로 첨가한 후 각 대상균주의 slant에서 배양된 균주 1백균이를 취해 다시 10 ml broth에 접종, 30°C, 24시간 동안 배양시켜 이 배양액 0.1 ml를 취해 다시 10 ml broth에 접종하여 30°C, 24시간 동안 배양한 배양액 0.1 ml를 각 추출물이 함유된 broth에 접종하여 배양하였다. 추출물의 농도별 항균효과는 미생물의 생육정도를 spectrophotometer (Cecil se 292, England)를 사용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하여 균의 증식정도를 비교하였고 추출물을 넣은 broth를 blank로 사용하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Growth inhibition of different solvent fraction from 75% ethanol extracts of *Morus alba* Linne and *Sophora flavescens* AITON on 5 strains of *L. monocytogenes*

| Plant | Strain (ATCC #) | Clear zone on plate(mm) | | | |
|---------------------------------|-----------------|-------------------------|-------|------|-------|
| | | CHCl ₃ | EtOAc | BuOH | Water |
| <i>Morus alba</i> Linne | 19111 | 25 | 24 | — | — |
| | 19112 | 15 | 15 | 12 | — |
| | 19113 | 22 | 21 | — | — |
| | 19114 | 16 | 15 | 13 | — |
| | 15313 | 16 | 15 | 13 | — |
| <i>Sophora flavescens</i> AITON | 19113 | 15 | — | — | — |

추출물의 분획별 항균성 검색

뽕나무껍질, 고삼의 75% 에탄올 추출물을 chloroform (CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH), 물 순으로 순차 분획하여 disc method⁽²³⁾로 항균성을 비교한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보면 뽕나무나 고삼 추출물의 CHCl₃ 및 EtOAc 분획층에서 모든 균주에 대하여 뚜렷한 증식 저해 현상을 보이고 있으며 균주에 따라서는 일부 BuOH 분획에서도 저해현상을 보이나 그 정도는 비교하여 낮았다.

뽕나무의 경우 *L. monocytogenes* ATCC 19111 균주는 CHCl₃ 분획물에 의하여 가장 크게 증식저해를 받고 있으며 고삼의 경우는 *L. monocytogenes* ATCC 19113에 대해서만 CHCl₃ 분획물이 저해현상을 보이고 있다.

전체적으로 뽕나무 추출물이 모든 실험 대상 균주에 대하여 높은 증식 저해효과를 나타내고 있다. 그러나 물층에서는 전연 항균성이 나타나지 않아 증식 저해 물질의 특성과 극성에 관련이 있을 것으로 판단된다. 한편 각 추출물을 함유한 disc에는 보통 1.4~1.9 mg/disc의 고형분이 함유되어 있었다.

뽕나무껍질 추출물의 분획물 농도별 항균효과

뽕나무 75% 에탄올 추출물의 각 용매별 분획물을 농도별로 tryptic soy broth에 첨가하여 *Listeria monocytogenes* 균주별로 실험한 결과는 Fig. 1~5와 같다.

우선 Fig. 1에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19111 균주는 CHCl₃ 분획물 500 ppm 이상에서는 전혀 증식하지 못하고 있으며 100 ppm 첨가 수준에서도 12시간 까지 상당한 증식억제 현상을 보이고 있다. EtOAc 분획물은 100 ppm부터 거의 완전히 증식을 억제하여 72 시간까지도 변화가 없었다.

Table 1에서 disc method에 의한 증식 저해는 분획물간에 뚜렷한 차이가 없었으나 농도별 첨가 수준에서는 EtOAc가 더 효과적임을 보여주고 있다. Allspice와 같은 향신료들은 1% 수준에서 증식억제 효과가⁽¹⁶⁾ 있는 것을 감안할 때 100 ppm 수준은 크게 낮은 농도이나 9 ppm

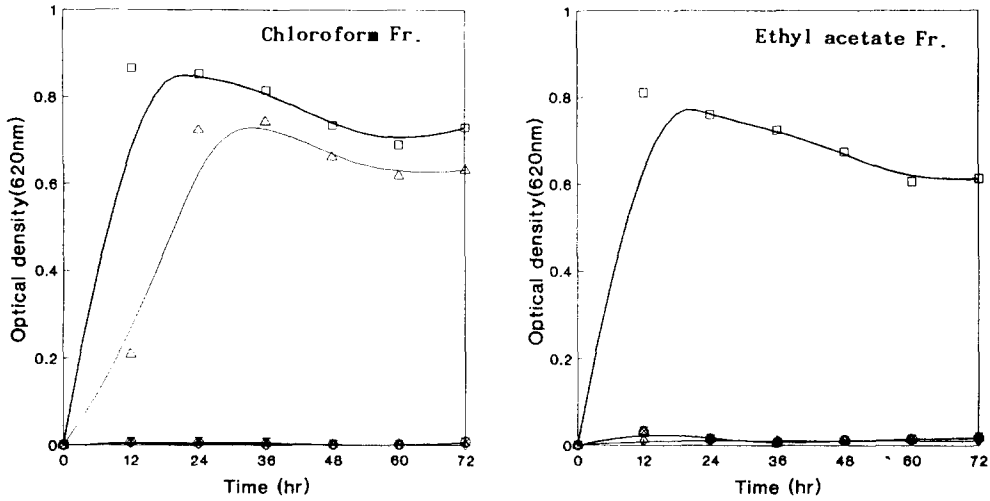


Fig. 1. Growth inhibitions of chloroform and ethyl acetate fraction(Fr.) of 75% ethanol extract from *Morus alba* Linne on *L. monocytogenes* ATCC 19111

□—□: 0 ppm, △—△: 100 ppm, ×—×: 500 ppm, ○—○: 1000 ppm, ◇—◇: 2000 ppm

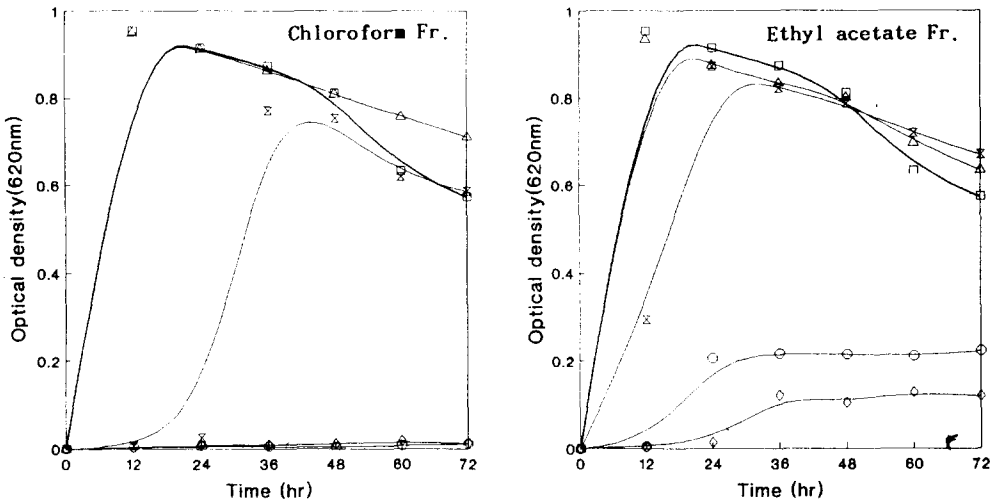


Fig. 2. Growth inhibitions of chloroform and ethyl acetate fraction(Fr.) of 75% ethanol extract from *Morus alba* Linne on *L. monocytogenes* ATCC 19112

□—□: 0 ppm, △—△: 100 ppm, ×—×: 500 ppm, ○—○: 1000 ppm, ◇—◇: 2000 ppm

에서 억제되는 glycerol monolaurate 첨가수준보다는 높았다⁽¹⁷⁾.

Fig. 1에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19111은 뽕나무 추출물의 CHCl_3 분획물에서는 500 ppm에서 EtOAc 분획물에서는 100 ppm 첨가시 거의 증식을 억제 당하고 있다. *L. monocytogenes* ATCC 19112은 CHCl_3 분획물 1000 ppm이 되어야 완전 증식억제 현상을 보이며 100 ppm은 거의 효과가 없고 500 ppm에서는 24시간까지 증식을 억제하나 그 이후 빠르게 증식함을 알 수 있다. EtOAc 분획물은 그렇게 효과적이지 못하여 Table 1의

disc method에 의한 결과와는 일치하지 않고 있다.

Fig. 3에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19113은 CHCl_3 분획물 500 ppm 첨가수준에서 24시간까지는 완전 증식억제 효과가 있으나 EtOAc 분획물은 500 ppm 이상에서는 72시간까지 전혀 증식하지 못하는 것을 알 수 있다. Sodium benzoate⁽²⁴⁾의 경우 pH 5.6에서는 0.15~0.3% 수준에서 정균 혹은 살균이 가능한 것으로 보고되고 있다.

Fig. 4에서 보면 *L. monocytogenes* ATCC 19114는 CHCl_3 분획물 500 ppm 첨가에서 24시간까지 완전히

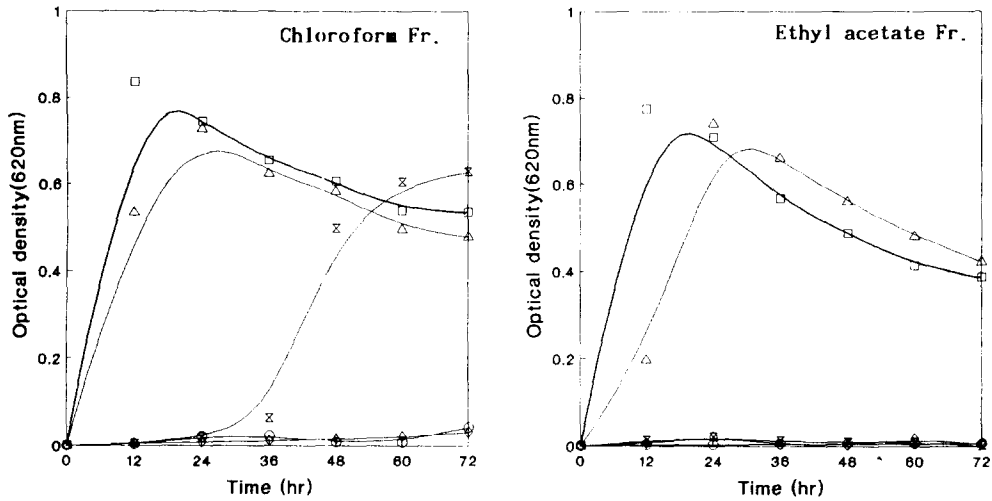


Fig. 3. Growth inhibitions of chloroform and ethyl acetate fraction(Fr.) of 75% ethanol extract from *Morus alba* Linne on *L. monocytogenes* ATCC 19113

□—□; 0 ppm, △—△; 100 ppm, ×—×; 500 ppm, ○—○; 1000 ppm, ◇—◇; 2000 ppm

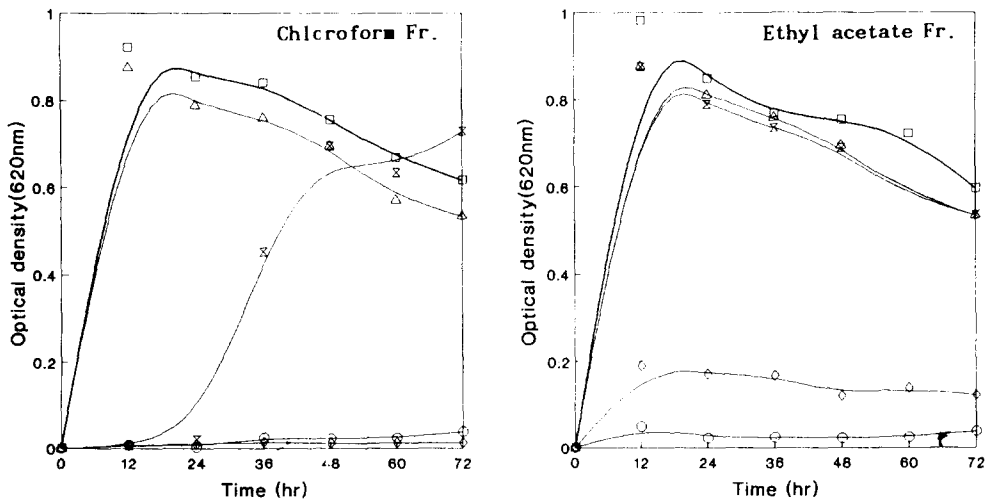


Fig. 4. Growth inhibitions of chloroform and ethyl acetate fraction(Fr.) of 75% ethanol extract from *Morus alba* Linne on *L. monocytogenes* ATCC 19114

□—□; 0 ppm, △—△; 100 ppm, ×—×; 500 ppm, ○—○; 1000 ppm, ◇—◇; 2000 ppm

증식 억제되었고 1000 ppm 이상에서는 72시간 까지도 증식의 징후가 없었으나 EtOAc분획물은 2000 ppm만이 72시간까지 증식 억제효과가 있어 이 균주에는 CHCl₃ 분획물이 더 효과가 있었다.

L. monocytogenes ATCC 15313은 다른 균주에 비하여 뽕나무 추출물이 증식억제 효과가 낮은데(Fig. 5) CHCl₃이나 EtOAc 분획물 모두 1000 ppm 이상이 되어야 완전 증식 억제효과를 나타내고 있다.

전체적으로 뽕나무 추출물의 용매별 분획물은 균주에 따라서 약간의 차이는 있지만 CHCl₃ 분획물에서 균 증식

억제 효과가 높으며 EtOAc 분획물도 CHCl₃과 비슷한 경향을 보이고 있으며 대개 억제농도는 500~1000 ppm 수준이었다. 보존제로 사용하는 potassium sorbate는 0.3%⁽²⁵⁾, sodium propionate는 0.15~1.10%⁽²⁶⁾에서 증식 억제 혹은 살균효과가 있는가 하면 일부 식물추출물은 500~5000 ppm 수준에서 효과가 인정⁽²⁷⁾되고 있어 뽕나무 추출물의 억제효과 농도보다 높았으나 달걀 흰자의 lysozyme은 100 ppm 첨가에서 살균 혹은 정균효과가 있다⁽²⁸⁾고 알려지고 있다.

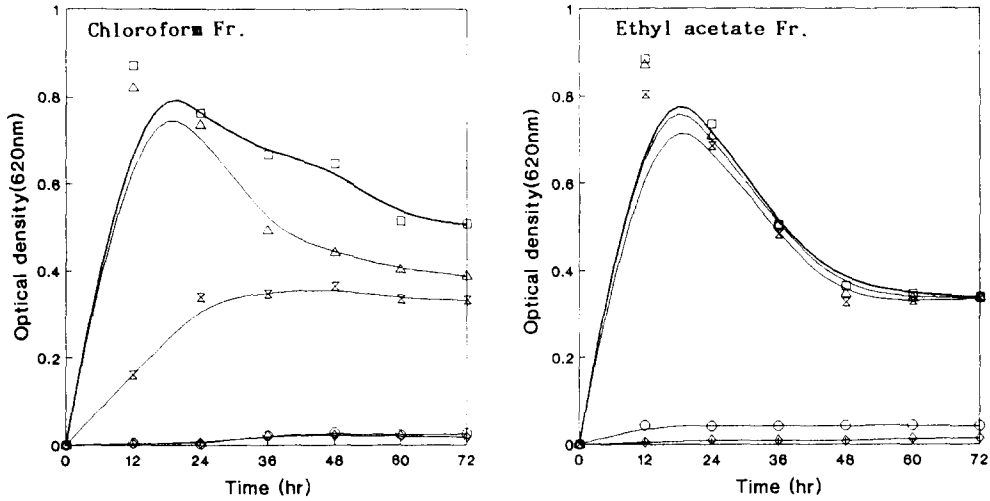


Fig. 5. Growth inhibitions of chloroform and ethyl acetate fraction(Fr.) of 75% ethanol extract from *Morus alba* Linne on *L. monocytogenes* ATCC 15313

□—□; 0 ppm, △—△; 100 ppm, ×—×; 500 ppm, ○—○; 1000 ppm, ◇—◇; 2000 ppm

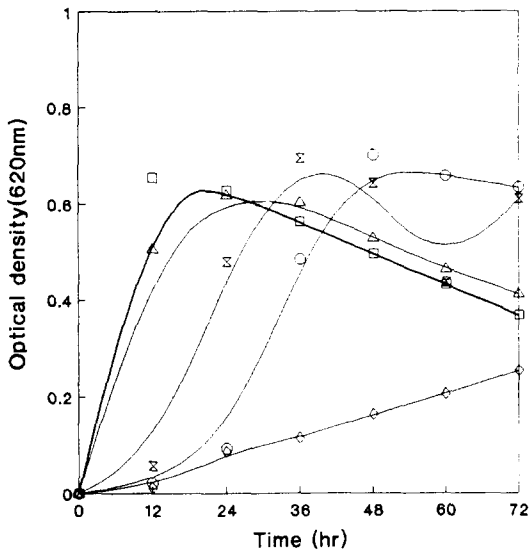


Fig. 6. Growth inhibitions of chloroform fraction(Fr.) of 75% ethanol extract from *Sophora flavescens* AITON on *L. monocytogenes* ATCC 19113

□—□; 0 ppm, △—△; 100 ppm, ×—×; 500 ppm, ○—○; 1000 ppm, ◇—◇; 2000 ppm

500 ppm 첨가시 12시간까지는 상당한 억제 효과가 있으나 그 이후는 2000 ppm만이 뚜렷한 증식 저해 현상을 보여 뽕나무 추출물 보다는 효과가 크게 떨어지는 것을 알 수 있다.

요 약

Listeria monocytogenes(Lm)에 항균성이 있는 뽕나무와 고삼 75% 에탄올 추출물을 chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH), 물 순으로 순차 분획하여 얻은 분획물을 tryptic soy broth에 농도별로 첨가하여 5균주의 *L. monocytogenes*의 증식 저해효과를 관찰하였다. 뽕나무 추출물의 CHCl₃ 및 EtOAc 분획물은 실험 대상균주 모두에 뚜렷한 증식 억제효과를 보였고, 고삼은 Lm ATCC 19113 균주에 대하여 CHCl₃ 분획물이 비교적 높은 항균성을 보였다. 뽕나무 추출물의 경우 Lm ATCC 19111 균주는 EtOAc 분획물 500 ppm에서, Lm ATCC 19112 균주는 CHCl₃ 분획물 1000 ppm에서, Lm ATCC 19113 균주는 EtOAc 분획물 500 ppm에서, Lm ATCC 19114 및 15313 균주는 CHCl₃ 분획물 1000 ppm에서 완전증식 억제효과를 보였다.

문 헌

고삼 추출물의 분획물 농도별 항균효과

고삼 추출물은 *L. monocytogenes* ATCC 19113 균주에 대해서만 증식억제 효과가 있고 용매별 분획 결과 CHCl₃ 분획물에서 상당한 효과(Table 1)를 보여 이를 농도별로 첨가하여 증식 저해정도를 관찰한 결과는 Fig. 6과 같다. Fig. 6에서 보면 균 증식의 양상은 첨가 농도에 비례하

- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Jonson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. and Broome, C.V.: Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, 308, 203(1983)
- WHO: Report of the WHO informal working group on food-borne listeriosis, Geneva, 15-19. Feb., 2-18

- (1988)
3. Gray, M.L.: Epidemiological aspects of listeriosis. *Am. J. Public Health.*, **53**, 554(1963)
 4. Mccarthy, S.A.: Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and resistance to biocides. *Food Tech.*, **46** (12), 84(1992)
 5. Donker-voet, J.: My view on the epiderniology of listeria infections. In: Second symposium on Listeria infection. Gray, M.L. ed. Montana state college, Boseman, Montana(1962)
 6. Concon, J.M. : Food toxicology, Part B: Contaminants and additives. Marcel Dekker Inc., New York p.977 (1988)
 7. Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B.: Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: Equations describing the effects of temperature and pH. *J. Food Prot.*, **56**, 96(1993)
 8. 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)
 9. Lechowich, R.V.: Microbiological challenges of refrigerated food. *Food Tech.*, **42**(2), 84(1988)
 10. Kornacki, J.L. and Gabis, D.A.: Microorganisms and refrigeration temperatures. *Dairy, Food and Environ. Sanit.*, **10**(4), 192(1990)
 11. Vorster, S.M., Greebe, R.P. and Mortje, G.L.: The incidence of Listeria in processed meats in South Africa. *J. Food Prot.*, **56**(2), 169(1993)
 12. Kerr, K.G., Birkenhead, D., Seale, K., Major, J. and Hawkey, P.M.: Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. *J. Food Prot.*, **56**(6), 525(1993)
 13. 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 foods. *J. Food Sci.*, **58**, 430(1993)
 14. Motlagh, A.M., Johnson, M.C. and Ray, B.: Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Prot.*, **54**, 873(1991)
 15. Degnan, A.J., Yousef, A.E. and Luchansky, J.B.: Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packed wieners. *J. Food Prot.*, **55**, 98(1992)
 16. Zaika, L.L. and Kim, A.H.: Effect of sodium polyphosphate on growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **56**, 577(1993)
 17. 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)
 18. Hefnawy, Y.A., Moustafa, S.I. and Marth, E.H.: Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. *J. Food Prot.*, **56**, 876(1993)
 19. Farber, J.M.: Prevention and control of foodborne Listeriosis. *Dairy, Food and Environ. Sanit.*, **12**, 334(1992)
 20. 한지숙, 신동화, 윤세억, 김문숙 : *Listeria monocytogenes*의 증식억제 식물 추출물의 검색. 한국식품과학회지 투고중.
 21. 신민교 : 임상본초학. 남산당, p.314, 672(1986)
 22. 신동화, 이병완 : 식품 부패 미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색. 한국식품과학회지, **23**, 200 (1991)
 23. Board, R.G. and Lovelock, D.W.: Some methods for microbiological assay. Academic press, New York, p.91 (1975)
 24. El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H.: Inhibition or inactivation of *Listeria monocytogenes* by sodium benzoate together with some organic acids. *J. Food Prot.*, **52**, 771(1989)
 25. El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H.: Inhibition or inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *J. Food Prot.*, **51**, 842(1988)
 26. El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H.: Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of sodium propionate. *Int J. Food Microbial.*, **8**, 85(1989)
 27. Chung, K.T., Thomasson, W.R. and Christine, D.W.Y.: Growth inhibition of selected food-borne bacteria particularly *Listeria monocytogenes* by plant extract. *J. Appl. Bacterio.*, **69**, 498(1990)
 28. Hughey, V.L. and Johnson, E.A.: Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and foodborne disease. *Appl. Environ. Microbial.*, **53** (9), 2165(1987)

(1994년 4월 30일 접수)