

## 고삼투압조건하에서 *Listeria monocytogenes* Scott A의 생육특성과 상엽(桑葉)추출물에 의한 증식억제효과

박 신

대구대학교 농화학과

**초 록 :** NaCl의 농도에 따른 *Listeria monocytogenes*의 증식속도와 세포내 축적되는 삼투보호물질의 농도를 측정하였다. 삼투압스트레스를 받은 *L. monocytogenes*는 삼투보호물질인 glycine betaine과 glutamate를 세포내에 축적하였는데, NaCl의 첨가수준이 4%까지 증가함에 따라 축적되는 glycine betaine과 glutamate의 양도 증가하여 각각 685, 345 nmol/mg protein이 세포내에 축적되었다. *L. monocytogenes*를 효과적으로 제어하기 위해서 NaCl과 상엽추출물을 병용하여 항균효과를 시험하였다. NaCl 2%와 상엽추출물 100 ppm을 TSB에 첨가하여 배양했을 경우 무첨가군에 비해 약 10배 정도의 균수가 저해되었으며, NaCl 2%와 상엽추출물 500 ppm의 경우는 약 10<sup>4</sup>배, NaCl 2%와 상엽추출물 1,000 ppm의 경우는 약 10<sup>6</sup>배 정도의 균수가 감소되어 상엽추출물과 NaCl을 병용하면 단독 사용시 보다 뚜렷한 증식저해효과를 보여 주었다.(1999년 1월 7일 접수, 1999년 2월 4일 수리)

### 서 론

*Listeria monocytogenes*는 육류, 어패류, 치즈, 아이스크림, 냉동식품 등 대부분의 식품을 오염시키며, 임산부, 신생아, 노약자에게 유산, 패혈증, 수막염, 식중독을 일으키는 치명적인 병원균이다.<sup>1,3)</sup> *Listeria*가 처음 발견된 것은 1926년이나 식품이 listeriosis란 질병을 일으키는 매개체란 것이 밝혀진 것은 1980년대 이후의 일이다. 리스테리아균에는 7가지의 균종이 있으나 사람과 동물에 다같이 질병을 일으킬 수 있는 것은 *Listeria monocytogenes* 한가지 뿐이다.<sup>4)</sup>

1980년대 이후 세계적으로 빈발하고 있는 리스테리아균에 의한 대형 식품오염사고가 다행히 우리나라에서는 아직 보고된 바가 없으나, 1993년 국립보건원은 뉴질랜드에서 수입한 홍합에서 다량의 리스테리아균을 발견하였다고 발표한 적이 있으며, 1996년에는 중국에서 수입한 오리고기, 1997년에는 덴마크에서 수입한 냉동 돼지고기, 미국 쓰리프티 페에레스사로부터 수입한 아이스크림, 국내 시판중인 냉동피자, 미국 네브래스카산 수입 소고기 등에서 리스테리아균이 발견된 적이 있어 안심할 수 없는 실정이며, 최근 수입육을 비롯한 냉동식품에서 자주 발견되고 있는 *Escherichia coli* O157 및 *Yersinia enterocolitica*와 더불어 주의를 요하는 병원성균이다.

*L. monocytogenes*는 그람양성세균으로서 열악한 환경조건에서도 살아 남아 식중독을 일으키는 독특한 특성을 가지고 있는데, 특히 고염분, 고당분, 건조 등 삼투압스트레스를 받을 경우 세포내에 삼투보호물질인 osmolytes를 축적함으로써 세포내 팽압을 유지하여 증식할 수 있으며,<sup>5,7)</sup> 또한 저온성균(psychrotroph)으로서 4°C 이하의 냉장상태에서

도 증식할 수 있어 제어하기 매우 힘든 균이다.<sup>8,9)</sup> 본 연구는 고삼투압조건하에서 살아 남을 수 있는 *L. monocytogenes*의 생육특성을 조사하였으며, 리스테리아균의 제어를 위한 상엽추출물과 NaCl의 병용효과를 검토하였다. 상엽은 당뇨병에 효과가 있고 동물실험 결과 콜레스테롤을 낮추고 동맥경화증, 고지혈증 예방치료에 효과가 있음이 보고되고 있으며,<sup>10)</sup> 상엽차로도 시판되고 있는 기능성식품이다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

시험에 사용한 균주는 University of California, Davis의 Dr. G.M. Smith로부터 분양받은 *Listeria monocytogenes* Scott A이며, 균주의 보관은 균주를 tryptic soy agar(TSA, Difco Lab., Detroit, USA)에 접종하여 30°C에서 배양한 후 4°C의 냉장고에 보관하면서 매달 계대배양하였다. *L. monocytogenes*의 완전배지로는 brain heart infusion(BHI, Difco Lab.)을 사용하였으며, 최소배지로는 Pine's medium<sup>11)</sup>(이하PM)을 사용하였다. 또한 항균활성을 검정하기 위한 배지는 TSA와 tryptic soy broth(TSB, Difco Lab.)를 사용하였다.

#### 종균접종 및 증식속도 측정

고체배지에서 배양된 *L. monocytogenes*를 BHI 10 ml에 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양(150 rpm)한 다음, 균 현탁액 0.1 ml를 다시 새로운 BHI 10 ml에 접종하고 18시간 진탕배양시켜 세포 현탁액을 얻었다. 이 세포 현탁액을 4°C에서 10분간 원심분리(9,000×g)하고 PM으로 2회 세척

찾는말 : 리스테리아, 상엽, 삼투압스트레스, 항균효과  
\*연락처

한 다음 10 ml의 PM에 다시 희석하여 종균으로 사용하였다. 균의 증식속도 측정은 가지달린 플라스크에 실험목적에 따라 제조된 PM이나 BHI를 15 ml 넣고 종균 1%를 접종한 후 30°C에서 진탕배양하면서 일정시간마다 녹색필터(no. 54)의 Klett-Summerson 비색계를 통해 탁도를 측정하였다.

#### 상업추출물의 제조

상업추출물의 제조는 수직으로 환류냉각관을 부착한 500 ml용 둥근 플라스크에 잘게 분쇄한 상업 20 g을 담고 10배량의 증류수 또는 70% ethanol을 가해 물추출물은 95°C, ethanol 추출물은 80°C에서 2시간동안 추출, 여과(Whatman No. 5A)한 후 여과한 여액과 잔사를 재추출하여 얻은 여액을 합하여 물추출물은 70°C, ethanol 추출물은 60°C의 수욕상에서 rotary evaporator로 감압농축한 후 동결건조하였다. 시험시 물추출물은 50% methanol 10 ml에, ethanol 추출물은 99.8% methanol 10 ml에 각각 용해시켜 사용하였다.

#### <sup>13</sup>C NMR 측정

0~5%의 NaCl이 첨가된 BHI배지 1 l에 상기 방법으로 제조된 *L. monocytogenes* 종균을 5% 접종한 후 30°C에서 진탕배양하였다. 배양액이 후기대수기에 도달하면 9,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였으며, 분리된 세포는 7% perchloric acid로 추출하였다. <sup>13</sup>C NMR 측정을 위한 시료준비는 Smith와 Smith의 방법<sup>12)</sup>에 준하여 실시하였다. <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 General Electric Omega 300 spectrometer를 사용하여 75.58 MHz에서 얻어졌으며, 기타 parameter도 위에서 언급된 방법<sup>12)</sup>과 같았다. Osmolytes의 농도는 표준물질인 50 mM alanine의 resonance intensity와 비교함으로써 결정하였으며, 세포내 osmolyte의 함량은 Lowry 등의 방법<sup>13)</sup>에 의하여 측정된 단백질량으로 표준화하였다.

#### 추출물의 항균활성

상업추출물의 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성을 paper disc법<sup>14)</sup>으로 조사하였다. Paper disc법은 종균의 균수를 약 10<sup>7</sup> CFU/ml로 조정하여 TSA 평판배지(0.75% agar)에 접종도말하고 추출물을 멸균된 disc(8 mm, Toyo Seisakusho Co.)에 50 μl씩 흡수, 건조시켜 plate 표면위에 올려놓은 다음 0.85% 식염수 75 μl로 확산시켰다. 그리고 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)으로 항균활성을 측정하였다. 대조구로서는 인공 합성보존료인 benzoate(2 g/l)와 sorbate(2 g/l)를 사용하여 추출물의 항균활성 실험과 동일하게 측정하였다.

#### 상업추출물과 NaCl의 병용처리 효과

TSB 배지 100 ml에 상업추출물과 NaCl을 첨가한 후 종균 1 ml(약 10<sup>9</sup> CFU)를 접종하여 30°C에서 0~48시간 진탕배양(150 rpm)한 후 각 배양기간별로 배양액 1 ml를 무균적으로 채취하여 동일배지로 적절히 희석한 다음 TSA 배지가 들어 있는 petri dish에 0.1 ml씩 접종하여 spreader로

도말하고 30°C에서 배양한 후에 생성된 집락을 계수하여 조사하였다. 이때 첨가되는 용매자체의 항균활성을 배제하기 위하여 모든 시험은 대조구를 설정하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 삼투압스트레스시 *L. monocytogenes* 세포내 축적되는 삼투보호물질

*L. monocytogenes*의 삼투압 스트레스원으로서 NaCl을 사용하였으며, NaCl의 농도에 따른 *L. monocytogenes*의 증식속도를 측정하였다. Table 1은 최소배지와 완전배지에 첨가된 NaCl의 농도에 따른 *L. monocytogenes*의 증식속도를 나타낸 것인데, 완전배지인 BHI에서는 상당히 높은 농도인 5%의 NaCl에서도 증식속도가 0.92 generation/h로 나타나 대조구인 NaCl 무첨가구에 비해 증식속도가 크게 감소하지 않았으나, 최소배지인 PM에서는 NaCl을 5% 첨가시 대조구에 비해 성장속도가 현저히 감소하였다. Ko 등<sup>7)</sup>은 glycine betaine 첨가가 삼투압스트레스를 받은 *L. monocytogenes*의 증식속도를 현저히 증가시킨다고 하였는데, glycine betaine을 첨가하지 않은 본실험의 결과 최소배지인 PM에서 보다 완전배지인 BHI에서 삼투압스트레스에 대한 저항성이 높게 나타난 것은 BHI에는 glycine betaine과 같은 삼투보호물질이 있어 고삼투압조건하에서 *L. monocytogenes* 세포막을 통해 세포내에 축적되기 때문이라고 생각할 수 있으며, 이런 현상은 *E. coli*<sup>15)</sup>, *Y. enterocolitica*<sup>16)</sup>, *P. aeruginosa*<sup>17)</sup> 등의 세균에서도 보고되고 있다. 따라서 본연구에서는 0~5%의 NaCl이 첨가된 BHI에 *L. monocytogenes*를 배양시켜, *L. monocytogenes* 세포내 축적되는 삼투보호물질을 <sup>13</sup>C NMR을 통해 검출함으로써 삼투압스트레스의 강도에 따른 *L. monocytogenes* 세포내 축적되는 삼투보호물질의 종류 및 함량을 비교하였다. Fig. 1은 BHI에 0~5%의 NaCl을 첨가하여 *L. monocytogenes*를 후기대수기까지 진탕 배양한 후 원심분리하여 회수한 균체를 7% perchloric acid로 추출하여 <sup>13</sup>C NMR을 통해 검출한 결과인데, *L. monocytogenes*는 삼투압스트레스를 받을 경우, 주로 glycine betaine과 glutamate를 세포내에 축적하였는데, NaCl을 첨가하지 않은 경우 극소량의 glycine betaine과 glutamate만 검출되었으나, NaCl의 첨가수준이 4%까지 증가함에 따라 축적되는 glycine betaine과 glutamate의 양도 증가하였다.

Table 1. Growth of *L. monocytogenes* Scott A in PM and BHI supplemented with NaCl at 30°C

NaCl (%)	Growth rate (generation/h) in	
	PM	BHI
0	0.98±0.10 <sup>b)</sup>	1.22±0.10
1	0.95±0.09	1.18±0.11
2	0.75±0.08	1.14±0.08
3	0.60±0.05	1.11±0.11
4	0.35±0.02	1.01±0.09
5	0.10±0.01	0.92±0.08
6	0.05±0.01	0.65±0.05

<sup>b)</sup>Mean ± SD.

Glycine betaine의 경우 NaCl을 첨가하지 않았을 때 20 nmol/mg protein 이하의 극미량이 검출되었으나 NaCl의 첨가수준이 4%까지 증가함에 따라 약 685 nmol/mg protein 수준까지 세포내에 축적되어 *L. monocytogenes*의 가장 주요한 삼투보호물질이었다. Glutamate도 NaCl을 첨가하지 않았을 경우 약 100 nmol/mg protein 수준이었으나 NaCl을 첨가함에 따라 증가하여 NaCl이 4%일 때 약 345 nmol/mg protein이었다. 반면 일부 미생물에서 삼투보호물질로 작용하는 carnitine은 NaCl이 증가함에 따라 다소 감소하는 경향을 보였다.

상염추출물의 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성

*L. monocytogenes*는 이와같이 삼투보호물질을 축적함으로써 고삼투압 조건하에서도 살아 남을 수 있으며, 4°C 이하의 저온에서도 증식할 수 있기 때문에 *L. monocytogenes*의 증식억제는 식품의 안전성 측면에서 매우 중요하다고 하겠다. 따라서 본 연구에서는 *L. monocytogenes*의 제어를 위해 상염추출물의 항균활성을 시험하였는데, Table 2는 상염을 70% 에탄올 혹은 물로 추출한 상염추출물의 *L. monocytogenes*에 대한 항균효과를 paper disc법<sup>(4)</sup>으로 조사한 결과이다. 상염 에탄올추출물은 16.5 mm의 저해환이 나타났는데 이는 물추출물에 비해 항균활성이 강하였으며, 대조구로 사용된 sorbate와 benzoate에 비해서도 항균활성이 강하였다. 한 등<sup>(8)</sup>은 *L. monocytogenes*의 증식을 억제하는 식용가능한 추출물 34종을 검색한 결과 상백피의 경우 16~21 mm의 저해환이 나타났으며 나머지는 대체로 15 mm이하의 저해환이 나타났다고 보고하였는데, 본 실험의 결과 상염추출물도 상백피와 비슷한 정도의 상당히 강한 항균활성을 보였다. 한편 화학보존료로서 benzoate는 간장에 0.6 g/kg 이하, sorbate는 식육이나 어육제품에 2.0 g/kg 이하로 각각 사용기준이 정해져 있는데 비해 본실험의 상염추출물은 *L. monocytogenes*에 대해 기존 사용 중인 benzoate와 sorbate보다도 항균활성이 높게 나타났고, 우수한 항균효과와 더불어 천연보존료로서 인체에 대한 안전성으로 인해 이용가치가 높다고 하겠다.

*L. monocytogenes*의 제어를 위한 상염추출물과 NaCl의 병용처리 효과

햄, 소시지 등 육가공품에는 NaCl, sorbate 등의 보존료가 일반식품보다 많이 첨가되고 있으면서도 일반식품보다 많

Table 2. Antibacterial activity of *M. alba* leaf extract on *L. monocytogenes*

Food preservatives	Size of inhibitory zone on plate (∅, mm)
<i>Morus alba</i> leaf (ethanol extract)	16.5
<i>Morus alba</i> leaf (water extract)	W <sup>1)</sup>
Sorbate (0.2%)	4.0
Benzoate (0.2%)	W

<sup>1)</sup>Weak inhibitory zone was formed during 24 hr cultivation.

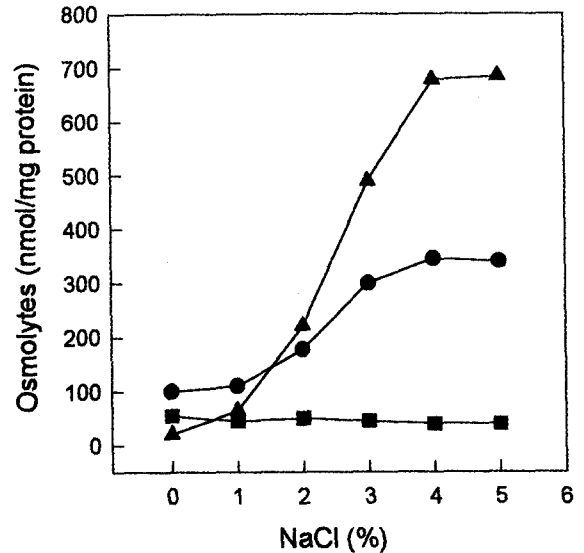


Fig. 1. Intracellular accumulation of osmolytes in *L. monocytogenes* as a function of NaCl concentration in the medium. Cells were grown in BHI medium with NaCl as indicated. The amounts of glutamate (●-●), carnitine (■-■), and glycine betaine (▲-▲) were quantitated by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy.

은 *L. monocytogenes*균이 검출되고 있으며<sup>9)</sup> 저장의 실패로 인해 많은 양이 해마다 폐기되고 있는 실정인 바, *L. monocytogenes*의 효과적인 증식억제를 위해 NaCl과 상염추출물을 동시에 첨가하여 항균효과를 시험하였다. Fig. 2는 상염추출물을 단독으로 첨가하여 상염추출물의 농도에 따른 항균효과를 조사한 것인데, 상염 에탄올추출물의 농도를 0~2,000 ppm으로 첨가, 배양시간별로 균수를 측정하여 *L. monocytogenes*에 대한 증식저해효과를 조사하였다. 상염추출물의 농도가 100 ppm까지는 항균효과가 거의 없었으

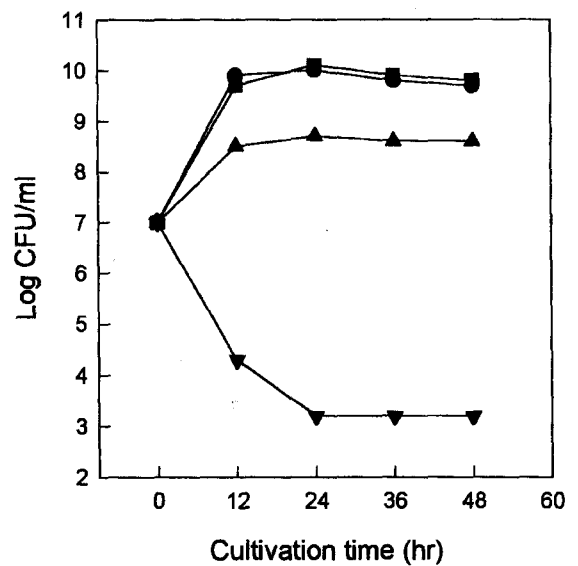


Fig. 2 Growth inhibition of *L. monocytogenes* in TSB supplemented with various concentrations of *M. alba* leaf extract. ●-●: 0 ppm, ■-■: 100 ppm, ▲-▲: 500 ppm, ▼-▼: 2,000 ppm

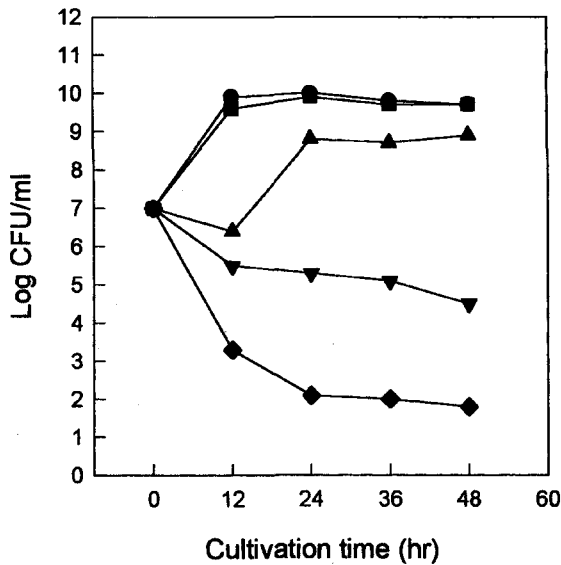


Fig. 3. Growth inhibition of *L. monocytogenes* in TSB supplemented with NaCl and various concentrations of *M. alba* leaf extract. ●—●: Control (No addition), ■—■: NaCl 2%, ▲—▲: NaCl 2% plus *M. alba* leaf extract 100 ppm, ▼—▼: NaCl 2% plus *M. alba* leaf extract 500 ppm, ◆—◆: NaCl 2% plus *M. alba* leaf extract 1,000 ppm

나 500 ppm 수준으로 첨가했을 때 무첨가구에 비해 약  $10^{12}$  배 정도의 균수가 저해되어 약간의 항균효과가 있었으며, 2,000 ppm 수준에서는 약  $10^7$  배 정도의 균수가 감소되어 *L. monocytogenes*에 대한 증식저해효과가 뚜렷함을 보여주고 있다. Fig. 3은 상업추출물과 NaCl을 병용처리한 결과인데, 식품에서의 NaCl의 농도는 염장품을 제외하고는 일반적으로 2%를 초과하지 않으므로 본연구에서는 NaCl을 2%로 고정하였으며 상업 에탄올추출물의 농도를 0~1,000 ppm으로 조정하여 병용처리하였으며, NaCl과 상업추출물을 전혀 첨가하지 않은 순수한 TSB에서 배양한 것을 대조구로 하였다. NaCl 2%와 상업추출물 100 ppm을 TSB에 첨가하여 배양했을 경우 대조구에 비해 약 10배 정도의 균수가 저해되어 약간의 항균효과가 있었는데, Fig. 2에서 상업추출물을 100 ppm 농도로 단독 첨가시 항균효과가 거의 없었던 것에 비해 NaCl과 병용으로 인해 약간의 상승효과가 나타났다고 할 수 있다. 또한 NaCl 2%와 상업추출물 500 ppm의 경우는 약  $10^5$  배, NaCl 2%와 상업추출물 1,000 ppm의 경우는 약  $10^6$  배 정도의 균수가 감소되어 상업추출물과 NaCl을 병용하면 단독 사용시보다 뚜렷한 증식저해효과를 보여 주었다. 이는 화학적보존료인 benzoate와 sorbate를 대체할 수 있는 효과적인 미생물 제어 방법 중의 하나라고 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 1998년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의한 논문이며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Kvenberg, J. (1988) Outbreaks of listeriosis/*Listeria*-contaminated foods. *Microbiol. Sci.* **5**(12), 355-358.
- Marth, E. (1988) Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.* **42**(4), 165-168.
- Ryser, E. and Marth, E. (1989) New food-borne pathogens of public health significance. *J. Amer. Dietetic Ass'n.* **89**(7), 948-954.
- Schlech, W., III. (1988) Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.* **42**(4), 176-178.
- Cole, M., Jones, M. and Holyoak, C. (1990) The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(1), 63-72.
- Csonka, L. N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**(1), 121-147.
- Ko, R., Smith, L. T. and Smith, G. M. (1994) Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **172**, 426-431.
- Walker, S., Archer, P. and Banks, J. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **68**(2), 157-162.
- Vorster, S. M., Greebe, R. P. and Mortje, G. L. (1993) The incidence of *Listeria* in processed meats in South Africa. *J. Food Prot.* **56**(2) 169-172.
- Myo, C. S. (1989) Coloured medicinal plant of Korea. 1st ed., Academic Co., Seoul.
- Pine, L., Malcom, G., Brooks, J. and Daneshvar, M. (1989) Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can. J. Microbiol.* **35**, 245-254.
- Smith, L. T. and Smith, G. M. (1989) An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **171**, 4714-4717.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Singh, J., Khanna, A. and Chander, H. (1979) Antibacterial activity of yogurt starter in cow and buffalo milk. *J. Food Prot.* **42**, 664-665.
- Perroud, B. and Le Rudulier, D. (1985) Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161**(1), 393-401.
- Park, S., Smith, L. T. and Smith, G. M. (1995) Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(12), 4378-4381.
- D'souza-Ault, M. R., Smith, L. T. and Smith, G. M. (1993) Roles of N-Acetyl glutamylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 473-478.
- Han, J. S., Shin, D. H., Yun, S. E. and Kim, M. S. (1994) Antimicrobial effects on *Listeria monocytogenes* by some edible plant extracts (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**(5), 545-551.

---

**Growth Characteristics of *Listeria monocytogenes* Scott A under High Osmotic Condition and Antibacterial Effect by *Morus alba* L. Leaf Extract**

Shin Park(Department of Agricultural Chemistry, Taegu University, Kyungsan-si, Kyungbook 712-714, Korea)

**Abstract** : Growth rate and osmolyte accumulation of *L. monocytogenes* were measured at the varying concentrations of NaCl. *L. monocytogenes* accumulated glycine betaine and glutamate intracellularly when grown under osmotic stress by NaCl, and the amounts of them increased as the concentration of NaCl was increased. They were 685 and 345 nmol/mg protein, respectively, when grown in the BHI supplemented with 4% NaCl. In order to inhibit *L. monocytogenes* effectively, both NaCl and *Morus alba* L. leaf extract were supplemented in TSB, and antibacterial effect of those supplements on *L. monocytogenes* was tested. Growth of *L. monocytogenes* grown in TSB supplemented with 2% NaCl and 100 ppm *M. alba* leaf extract decreased by 10 times in CFU/ml unit comparing to the growth of control. When grown in TSB, supplemented with 2% NaCl plus 500 ppm *M. alba* leaf extract and 2% NaCl plus 1,000 ppm *M. alba* leaf extract, growth of *L. monocytogenes* decreased by  $10^5$  and  $10^8$  times in CFU/ml unit, respectively.

---

Key words : *Listeria monocytogenes*, *Morus alba* L. leaf, osmotic stress, antibacterial effect