

## 감초의 에탄올 추출물의 항균활성 및 안정성 조사

김수정 · 신재윤<sup>1</sup> · 박윤문<sup>2</sup> · 정구민<sup>2</sup> · 이종화<sup>2</sup> · 권대혁<sup>1,\*</sup>  
(주)대평, <sup>1</sup>성균관대학교 유전공학과, <sup>2</sup>안동대학교 식품생명공학과

### Investigation of Antimicrobial Activity and Stability of Ethanol Extracts of Licorice Root (*Glycyrrhiza glabra*)

Su-Jeong Kim, Jae-Yoon Shin<sup>1</sup>, Yoon Moon Park<sup>2</sup>, Koo Min Chung<sup>2</sup>, Jong Hwa Lee<sup>2</sup>, and Dae-Hyuk Kweon<sup>1,\*</sup>

Daepyung Co., Ltd., Sangju, Kyungbuk

<sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Andong National University

**Abstract** Conditions for extraction of antimicrobial materials from licorice root, *Glycyrrhiza glabra*, were optimized. Among solvents tested, 95% ethanol gave highest antimicrobial activity, and was chosen as optimal extracting solvent. Extraction temperature and time were optimal at room temperature and for 12 hr, respectively. Minimal inhibitory concentration (MIC) of 95% ethanol extracts was determined against 14 microorganisms. Reference microorganisms included 6 Gram(-) bacteria, 4 Gram(+) bacteria, and 4 yeast strains. Ethanol extract exerted very strong growth inhibition on Gram(+) bacteria, while was moderately effective for Gram(-) bacteria and yeasts. Treatment at 180°C for 30 min or extreme pHs merely destroyed antimicrobial activity of ethanol extract. These findings suggest ethanol extract of *G. glabra* may be useful as natural preservative.

**Key words:** licorice root, *Glycyrrhiza glabra*, antimicrobial activity, natural preservative

## 서 론

식품의 원료, 가공, 저장 및 유통 중에 예상되는 부패성 및 병원성 미생물에 의한 오염과 균의 증식은 국민의 건강을 심대하게 위협하고 있을 뿐만 아니라 이로 인한 경제적 손실 또한 적지 않다. 이는 식품의 가공 방법 뿐만 아니라 보존기간과 유통방법을 결정하는 중요한 요소이기도 하다. 식중독 원인 미생물이나 부패 미생물을 제어하여 식품을 안전하게 장기간 저장하기 위한 수단으로 가열, 냉장, 냉동, 초고압, 방사선, PEF, 광필스 등 물리적 방법과 알코올, 염소, 과산화수소, 천연물질 등 화학적 방법이 사용되어 왔다. 물리적 방법 중 경제성과 안전성을 고려하여 가장 널리 쓰이는 가열 살균법은 열에 의해 제품의 질이 저하되기 쉽다는 단점을 가지고 있다. 반면, 냉장 및 냉동법은 열처리를 최소화하여 신선함을 유지할 수 있으나 저장, 유통 비용이 높다. 화학적 방법 중에는 편의성과 비용 때문에 nitrite, sorbic acid, sodium metabisulfite, 염소제 등 다양한 합성 보존료가 장기간 사용되어 왔다. 그러나 합성보존료는 체내 축적성 등 안전성에 관한 문제가 지속적으로 대두되고 있고, 물질의 종류, 사용량 등에 따라 잔류독성, 돌연변이 유발 등 인체에 부정적 영향을 주기도 한다(1-3).

최근 참살이(웰빙) 바람을 타고 식생활에 있어서도 상당한 변화가 예상된다. 가공식품의 소비는 현대 생활에서 피할 수 없는 측면이기는 하나, 기피하여야 할 대상으로 인식되고 있는 측면도 없지 않다. 이에 합성 첨가물의 안전성 측면의 문제 제기로 인한 부분이 일조하고 있다. 이와 같은 경향으로 인하여 식품산업계에서도 인공 합성보존제의 사용을 될 수 있는 한 제한하려는 추세이고, 안전성이 확보된 천연 항균성 물질을 식품의 보존에 이용하고자 하는 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 일반적으로 인간이 장기간 식용으로 사용했던 천연물을 그대로 이용하거나 추출하여 보존제로 사용하는 경우, 미국에서는 이를 generally recognized as safe(GRAS) list로 분류하여 관리하고 있다. 따라서 천연 항균물질의 개발과 이용은 인공합성 보존제의 사용으로 인한 부정적인 측면을 해소하고 소비자 기피현상을 유발하지 않으면서도 저장성 향상과 안전성을 확보할 수 있는 좋은 방안이다(4).

천연 항균물질에는 전통적으로 사용해 온 소금, 식초 등 일반 식품소재 외에도 동물, 식물, 미생물 등에서 유래한 것들이 많이 있으나(5), 식품에 적용하기 위해서는 관능적 측면에서 해결되어야 할 문제가 남아있는 것도 있고, 항균력이 약하거나 항균 스펙트럼이 좁아 아직까지 천연 항균제로 개발되어 상품화된 제품은 극히 일부에 지나지 않고 있다(6). 생약재와 식물성분, 향신료 등은 천연보존료를 개발하기 위한 좋은 소재가 되며 연구 또한 많이 진행되고 있다(7,8). 생리활성을 가지고 있어 식용으로 사용되어 온 생약류는 정제하거나 순수 분리하는 과정을 거치지 않고 식품에 직접 첨가가 가능하므로 그 경우 항균 효과와 인체에 유용한 생리활성을 동시에 얻을 수 있는 효과가 있다(9). 우리나라에서는 향신료로 많이 사용되는 마늘, 양파, 생강 등의 성분에 의한 항균성에 대한 연구(10-12)가 많이 진행되었다. 또한, 생약

\*Corresponding author: Dae-Hyuk Kweon, Department of Genetic Engineering, Faculty of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do, 440-746 Korea

Tel: 82-31-290-7869

Fax: 82-31-290-7870

E-mail: dhkweon@skku.edu

Received September 23, 2005; accepted March 15, 2006

재 중 산사, 황련, 측백, 창출, 석창포 등의 에탄올 추출물이 Gram (+) 및 Gram(-) 세균 모두에 강한 항균성을 가지고 있으며 상백피 추출물은 *Listeria monocytogenes*의 증식을 억제한다는 보고(13)가 있다. 오미자, 울금, 자초, 고삼 등도 항균활성이 있다고 알려져 있다. 또한, 이들 천연물 추출물의 일부는 항산화 활성을 가진다는 보고가 있다(14,15).

생약재 중 거의 모든 한약의 구성성분으로 쓰여 그 안전성이 이미 입증된 감초 추출물이 *L. monocytogenes*에 대하여 항균활성을 가진다는 보고(16)는 있으나 다른 미생물에 대한 보고는 미미하고, 또한 여러 한약재와 비교하여 항산화 활성이 있다고는 보고하였으나 체계적으로 보고된 예는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 추출용매의 종류나 추출조건별로 감초 추출 조건을 최적화 한 후 획득한 감초 추출물을 Gram(-) 세균, Gram(+) 세균 및 효모 등 여러 미생물에 대하여 항균활성을 비교하였고 열과 pH 변화에 대한 안정성을 확인하여 천연 식품보존료로서의 이용 가능성을 타진하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

감초는 (주)대평에서 사용 중인 유럽감초(*Glycyrrhiza glabra* var.)의 근절편을 사용하였다.

### 사용균주 및 시약

항균활성 실험에 사용된 균주는 식품의 부패나 병원성 미생물로 알려진 Gram(-), Gram(+) 세균과 효모를 사용하였다(Table 1). 시험균주 중 세균은 tryptic soy broth와 agar배지(Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 배양하였고 효모는 YM broth와 agar로 25°C에서 배양하였다.

추출에 사용된 용매는 증류수, 헥산(99.5%), 아세톤(95.0%), 메탄올(99.5%), 에탄올(99.5%), 에틸 아세테이트(99.5%) 등(Duksan Pure Chemicals, Korea)을 사용하였다.

### 감초의 추출조건

최적 추출용매를 선정하기 위해 먼저 다양한 극성을 가진 용매를 이용하여 다음과 같은 방법으로 추출 실험을 수행하였다. 감초 500 g에 물, 메탄올, 에탄올, 에틸 아세테이트, 아세톤, 헥산

을 감초 증량의 5배를 첨가하여 상온에서 24시간 추출한 후 여과지(Watman No. 2)로 여과하였다. 이후 rotary vacuum evaporator (Eyela N-1NW, Rikakikai Co., Japan)로 50°C에서 감압농축한 후 건조하여 항균활성 조사의 시료로 사용하였다. 수율은 초기 증량(500 g)에 대한 최종 건조 시료의 증량 백분율로 정의하였다. 수율을 측정할 건조물은 용매에 녹여 적당한 농도로 희석한 후 항균 활성 측정에 사용하였다. 이하 에탄올 농도, 온도, 시간에 따른 추출은 동일한 과정을 거쳐 수행되었다. 에탄올의 농도는 0, 50, 75, 95, 99.5%를 이용하였으며, 온도는 4, 20, 35, 50°C에서 수행하였다. 추출시간은 6, 12, 18, 24시간으로 하였다.

### 항균활성의 측정

항균활성은 크게 2가지로 측정하였다. Agar diffusion method는 추출 조건을 선정하고, 추출물에 의한 미생물 생육의 최소 억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하는데 이용하였다. 액체 희석법은 추출물에 의한 미생물의 생육 저해 효과를 정량적으로 표현하는데 이용하였다.

Agar diffusion method는 아래와 같은 절차를 거쳐 수행되었다. 사면 배양하여 보관중인 시험균주를 액체 배지에 여러 번 계대 배양하면서 활성화시켰다. 최적 배지에 접종하고, 24시간 배양한 배양액을 0.75% soft agar배지 5 mL에 균체수가  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 이 되도록 접종하여 미리 준비한 1.5% hard agar배지에 증충하였다. 완전히 굳은 배지 위에 지름 6 mm filter paper disc(Whatman, USA)를 올리고 여러 추출조건으로 조제하여 건조한 감초 추출물을 점적하였다. 이때, 추출 건조물은 고형분 농도 10 mg/mL로 한 후 20 µL씩 점적하였다. 각 균주의 최적배양조건에서 24시간 배양한 후 disc 주위의 생육저해환(clear zone)의 크기로 항균활성을 측정하였다. 이때 용매가 항균력에 미치는 효과를 검토하기 위해 에탄올 20 µL 처리구를 대조구로 하여 동일한 방법으로 항균력을 측정하였다. 또한 감초 에탄올 추출물을 여러 농도로 희석하여 disc에 점적한 후 배양하여 clear zone이 생성되지 않는 최소 억제 농도를 측정하였다.

액체 희석법은 감초 추출물을 적당한 농도로 에탄올에 녹인 후 membrane filter로 제공한 다음 2진 희석하여 각 균주의 액체 배지에 100, 50, 25 µg/mL가 되도록 0.1 mL씩을 분주하고 여러 번 계대하여 활성화시킨 시험균주를 0.1 mL씩 동일하게 접종하였다. 일정한 시간 간격으로 620 nm에서 흡광광도계(UV-1202, Shimadzu,

Table 1. Reference microorganisms tested and their growth conditions

	Reference microorganisms	Media	Temperature (°C)
Gram(-)	<i>Escherichia coli</i> KFRI 272	Tryptic soy agar	37
	<i>Escherichia coli</i> BE 1182	Tryptic soy agar	37
	<i>Salmonella typhimurium</i> SL1102	Tryptic soy agar	37
	<i>Salmonella paratyphi-A</i> ATCC 11511	Tryptic soy agar	37
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Tryptic soy agar	37
	<i>Shigella flexneri</i> KFRI 445	Tryptic soy agar	37
Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i> KFRI 240	Tryptic soy agar	37
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Tryptic soy agar	37
	<i>Bacillus subtilis</i> KFRI 179	Tryptic soy agar	37
	<i>Streptococcus mutans</i> KCTC 3065	Tryptic soy agar	37
Yeast	<i>Debaryomyces hansenii</i> KFRI 912	YM agar	24
	<i>Candida albicans</i> IFO 12732	YM agar	24
	<i>Candida lipolytica</i> KFRI 908	YM agar	24
	<i>Pichia anomala</i> KCCM 50502	YM agar	24

Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였고 시료가 첨가되지 않은 에탄올 0.1 mL가 접종된 대조구와 증식억제효과를 비교하였다.

**추출물의 열 및 pH 안정성 검사**

감초 추출물의 열 안정성을 알아보기 위해 추출물을 제균한 후 80, 100, 120, 180°C에서 각각 30분 동안 열처리한 다음 agar diffusion method로 생육저해환 형성의 정도를 측정하여 추출물의 열안정성을 살펴보았다.

또한 pH 안정성은 감초 추출물을 염산과 수산화나트륨으로 pH를 3, 5, 7, 9로 조절하여 실온에서 1시간 방치한 후 중화시킨 다음 agar diffusion method를 이용하여 생육저해환을 측정함으로써 항균활성의 변화를 알아보았다. 모든 조건은 독립적인 3반복 실험을 통하여 통계처리를 통하여 재현성과 유의성을 검증하였다.

**통계처리**

실험자료의 통계분석은 SAS를 이용하여 one-way ANOVA 검정을 수행하였으며, 처리효과와 유의성이 있을 경우 처리구간 평균치의 유의성 비교는 Duncan의 다중비교검정( $p < 0.05$ )을 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**추출 용매의 종류에 따른 감초의 항균 활성**

추출용매의 종류에 따른 항균 물질의 추출효과를 알아보기 위하여 물, 에탄올, 메탄올, 에틸 아세테이트, 아세톤, 헥산 등 극성이 다른 6가지의 용매로 추출하였다. 각 용매의 추출 수율은 물

16.3%, 메탄올 2.7%, 에탄올 2.4%, 아세톤 1.6%, 에틸 아세테이트 2.2%, 헥산 0.02%이었다(Table 2). 감초를 물로 추출하였을 때 고형분 양이 가장 많았으며 유기용매로 추출하였을 때는 추출 수율이 상당히 낮았다. 유기용매 중 메탄올, 에탄올, 아세톤, 에틸 아세테이트의 추출 수율은 유의한 차이를 보이지 않았으나 극성이 매우 낮은 헥산은 추출된 고형분 양이 매우 적어 대조적이었다.

각 용매 추출물을 10 mg/mL 농도로 조제하여 agar diffusion method로 *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *S. aureus*에 대한 항균활성을 비교하였다(Table 2). 추출용매별 항균활성은 물, 헥산 추출구에서는 전혀 활성이 없었고 아세톤과 메탄올에서는 약한 항균활성을 보였으며 에틸 아세테이트와 에탄올 추출구가 가장 높은 활성을 보였다. 황백, 정향 등 한약재를 포함한 31종의 식물을 대상으로 에탄올과 물로 추출한 결과 에탄올 추출물이 Gram(+) 세균과 Gram(-) 세균 및 효모에 대하여 항균활성을 가진다는 보고와 일치하는 결과이다(17). 자초, 오미자 및 목단피 등의 한약재 20종을 대상으로 물과 에탄올로 추출하여 항균력을 비교한 결과(18) 에탄올 추출물이 물 추출물보다 2-100배 정도 효과가 좋다는 보고와, 단삼을 극성이 다른 6종류 용매를 사용하여 추출한 결과 에탄올 추출구가 항균활성이 우수하다고 한 보고(19)와도 유사하였다. 또한 영귤을 용매별로 추출하였을 때 비극성용매인 헥산보다는 메탄올과 같은 극성용매에서 항균물질이 원활히 추출된다고 보고된 바 있다(20).

에탄올이 다른 용매에 비해 항균 물질 추출 수율과 활성이 뛰어난 뿐만 아니라 식용으로서 그 안전성이 높고 최종 제품의 인허가 시에도 유리하므로 감초에서 항균활성 물질을 추출할 때에 에탄올을 사용하는 것이 좋은 것으로 사료된다.

**Table 2. Comparison of antibacterial activities of *Glycyrrhiza glabra* extracts prepared with various solvents**

Solvents	Yields <sup>1)</sup> (%)	Microorganism			
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Water	16.3 ± 0.55 <sup>a2)</sup>	- <sup>3)</sup>	-	-	-
Methanol	2.7 ± 0.09 <sup>b</sup>	+	+	+	+
Ethanol	2.4 ± 0.10 <sup>b</sup>	+	++	+++	+++
Acetone	1.6 ± 0.14 <sup>bc</sup>	+	+	+	+
Ethyl acetate	2.2 ± 0.11 <sup>b</sup>	++	+	+++	+++
<i>n</i> -Hexane	0.02 ± 0.00 <sup>c</sup>	-	-	-	-

<sup>1)</sup>Data indicate means ± SD.

<sup>2)a-c</sup>Values with different superscript within in a column are significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>-: no inhibition (6 mm).

+: weak inhibition (6-8 mm).

++: moderate inhibition (8-10 mm).

+++ : strong inhibition (>10 mm).

**Table 3. Comparison of the antibacterial activity of *Glycyrrhiza glabra* extracted with various concentrations of ethanol**

Ethanol Conc. (%)	Yields <sup>1)</sup> (%)	Microorganism			
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
50	12.3 ± 0.20 <sup>a2)</sup>	- <sup>3)</sup>	-	-	-
75	8.9 ± 0.23 <sup>b</sup>	-	+	+	+
95	2.6 ± 0.12 <sup>c</sup>	++	+++	++	++
99.5	2.4 ± 0.07 <sup>c</sup>	++	+++	+++	++

<sup>1)</sup>Data indicate means ± SD.

<sup>2)a-c</sup>Values with different superscript within in a column are significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>-: no inhibition (6 mm).

+: weak inhibition (6-8 mm).

++: moderate inhibition (8-10 mm).

+++ : strong inhibition (>10 mm).

**Table 4. Comparison of the antibacterial activity of *Glycyrrhiza glabra* extracted with 95% ethanol at various temperatures**

Extraction Temp. (°C)	Yields <sup>1)</sup> (%)	Microorganism			
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
4	2.6 ± 0.30 <sup>a2)</sup>	++ <sup>3)</sup>	++	+++	+++
20	2.5 ± 0.29 <sup>a</sup>	++	+++	++	+++
35	2.3 ± 0.43 <sup>a</sup>	++	+	++	++
50	2.4 ± 0.54 <sup>a</sup>	+	+	++	++

<sup>1)</sup>Data indicate means ± SD.

<sup>2)a</sup>Values with different superscript within in a column are significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup> -: no inhibition (6 mm).

+: weak inhibition (6-8 mm).

++: moderate inhibition (8-10 mm).

+++: strong inhibition (>10 mm).

**Table 5. Effect of extraction time on the antibacterial activity of *Glycyrrhiza glabra* extracted with 95% ethanol at room temperature**

Extraction time (hr)	Yields <sup>1)</sup> (%)	Microorganism			
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
6	1.9 ± 0.19 <sup>a2)</sup>	+ <sup>3)</sup>	+	++	++
12	2.4 ± 0.17 <sup>a</sup>	+	++	+++	+++
18	2.5 ± 0.06 <sup>a</sup>	++	++	+++	+++
24	2.5 ± 0.39 <sup>a</sup>	++	++	+++	+++

<sup>1)</sup>Data indicate means ± SD.

<sup>2)a</sup>Values with different superscript within in a column are significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup> -: no inhibition (6 mm).

+: weak inhibition (6-8 mm).

++: moderate inhibition (8-10 mm).

+++: strong inhibition (>10 mm).

### 에탄올 농도의 결정

감초의 추출 용매로 선택된 에탄올의 농도를 50, 75, 95, 99.5%로 하여 감초 중량의 5배가 되게 가한 다음 상온에서 24시간 추출하여 *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *S. aureus*에 대한 항균활성을 비교하여 최적 에탄올 농도를 결정하였다(Table 3). 에탄올 농도 95%는 무수에탄올(99.5%)과 비교하여 추출 수율(각 2.6, 2.4%)과 활성에서 큰 차이를 보이지 않았으나 에탄올 농도 75% 이하에서는 항균력이 크게 감소하였으며 50% 추출구에서는 항균활성이 거의 관찰되지 않았다. 에탄올 농도별 추출수율은 에탄올 농도가 낮아질수록 증가하였는데 이는 물의 추출 수율(16.3%)이 가장 높은 앞서의 결과로도 유추 가능하다. 또한 쌍화차가 에탄올 50% 농도까지는 가용성 고형분이 높아지고 그 이상의 농도에서는 낮아졌다는 보고(21)와 구기자, 당귀, 오미자, 오갈피 등의 생약제도 에탄올 농도가 높을수록 추출물의 가용성 고형분이 낮아졌다는 보고(22)와도 일치하는 결과이다. 따라서 감초의 항균 활성을 가지는 성분은 물에는 추출되지 않는 성분이라고 사료된다. 95% 에탄올은 무수에탄올에 비해 가격 또한 월등히 저렴하므로 95% 에탄올로 추출하는 것이 경제적이라고 판단된다.

### 추출온도와 시간의 결정

감초에 95% 에탄올을 중량의 5배를 가해 4, 20, 35, 50°C에서 추출하여 항균활성을 확인한 결과, agar diffusion method에 의한 항균활성은 4-35°C까지는 차이가 없었으며 각 균주마다 50°C에서는 약간 감소하는 경향을 보였으나 수율(2.3-2.6%)에는 큰 차이가 없었다(Table 4).

한편, 추출시간을 달리하면서 추출한 다음 항균활성을 측정한 결과 수율은 6시간 이후부터 증가하기 시작하여 12시간 이후부터는 2.4-2.5%로 거의 변화가 없어 95% 에탄올로 추출할 때 12

시간 이내에 추출이 대부분 이루어지는 것으로 보인다(Table 5). 따라서 경제성을 고려할 때 감초를 95% 에탄올로 상온에서 12시간 추출하는 것이 가장 좋을 것으로 여겨진다.

### 감초 에탄올 추출물의 항균활성

95% 에탄올로 상온에서 12시간 추출하여 조제한 감초 에탄올 추출물을 agar diffusion method를 이용하여 14종의 미생물에 대한 항균활성을 측정하였다. 대부분의 Gram(-)균의 경우 250 µg/mL 이상에서 항균활성을 보였으나 Gram(+)-균에 대해서는 25 µg/mL 농도에서도 항균활성을 보였다. 효모는 50-500 µg/mL 사이에서 균종에 따라 항균활성을 보이는 범위는 다양하였다(Table 6).

감초 추출물의 항균활성을 좀 더 정량적으로 분석하고자 감초 추출물을 함유한 액체 배지에서 몇 종의 지시균주를 배양하며 생육저해 정도를 측정하였다. Gram(+)-균 중 *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. mutans* 등은 모두 25 µg/mL에서도 생육이 억제되었다(Fig. 1). 이는 감초 75% 에탄올 추출물이 Gram(+)-세균 중 *L. monocytogenes*에 대해 강한 항균활성을 보인다는 결과(16)와도 일치한다. Gram(-) 세균 중 *E. coli*는 100 µg/mL에서도 억제효과가 없었고, *S. typhimurium*에 대하여는 25 µg/mL에서 약한 억제효과를 보였으며 50 µg/mL 이상에서는 정균효과를 인정할 수 있을 정도로 생육을 저해하였다(Fig. 2). 효모 중 *C. albicans*, *P. anomala*에 대해서는 100 µg/mL에서는 균 증식 억제 효과가 확실하였다(data not shown).

액체배양을 통한 분석 또한 agar diffusion method를 이용한 것도 동일하게 Gram(+)-세균에 대해 매우 강한 항균활성을 띄고 있으며, Gram(-) 세균에 대해서는 약한 항균활성을, 그리고 효모에 대해서는 중간정도의 활성을 띄고 있음을 확인할 수 있었다. Gram(+)-세균에 대해서는 25 µg/mL 이하의 농도에서도 비성장속

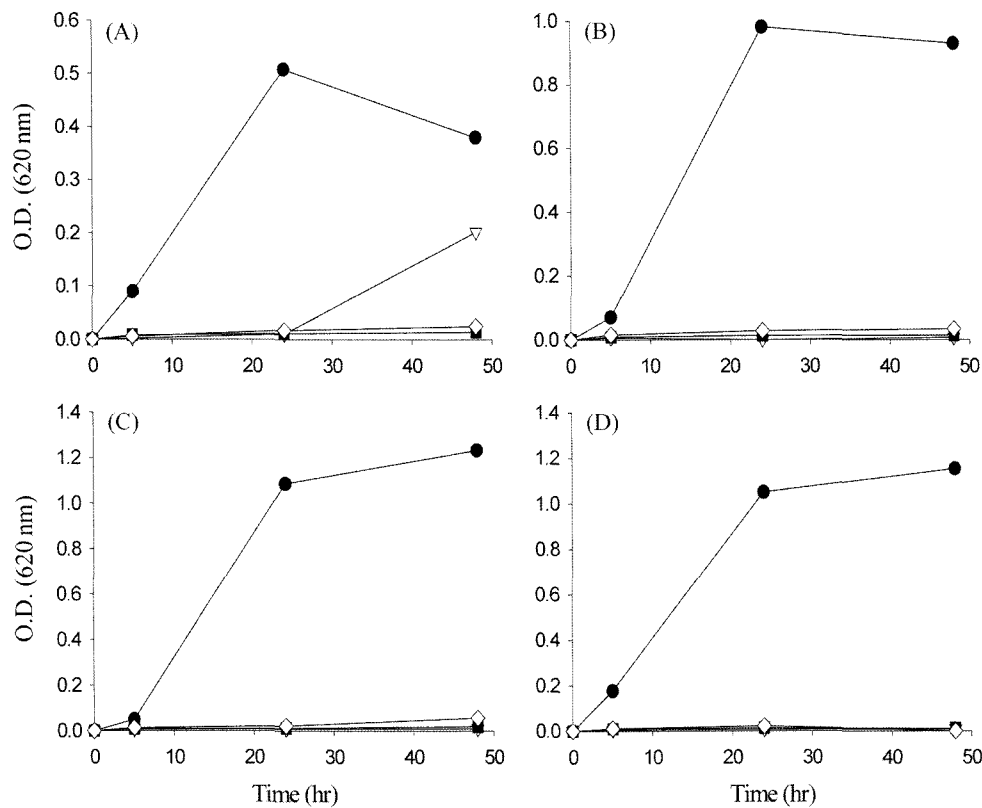
**Table 6. Antimicrobial activity of *Glycyrrhiza glabra* extracts prepared at the determined extraction condition on various microorganisms**

Microorganism	Concentrations (µg/mL)					MIC <sup>2)</sup> (µg/mL)
	500	250	100	50	25	
<i>E. coli</i> KFRI 272	+ <sup>1)</sup>	+	-	-	-	250
<i>E. coli</i> BE 1186	+++	++	++	-	-	100
<i>Salmonella typhimurium</i>	++	++	-	-	-	250
<i>Salmonella paratyphi-A</i>	+++	++	-	-	-	250
<i>Salmonella enteritidis</i>	++	-	-	-	-	500
<i>Shigella flexneri</i>	++	+	-	-	-	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	+++	+++	++	<25
<i>Listeria monocytogenes</i>	+++	+++	+++	+++	++	<25
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	++	<25
<i>Streptococcus mutans</i>	+++	+++	+++	+++	++	<25
<i>Debaryomyces hansenii</i>	++	+	-	-	-	250
<i>Candida albicans</i>	++	++	+	-	-	100
<i>Candida lipolytica</i>	++	+	+	+	-	50
<i>Pichia anomala</i>	++	++	++	++	+	<25

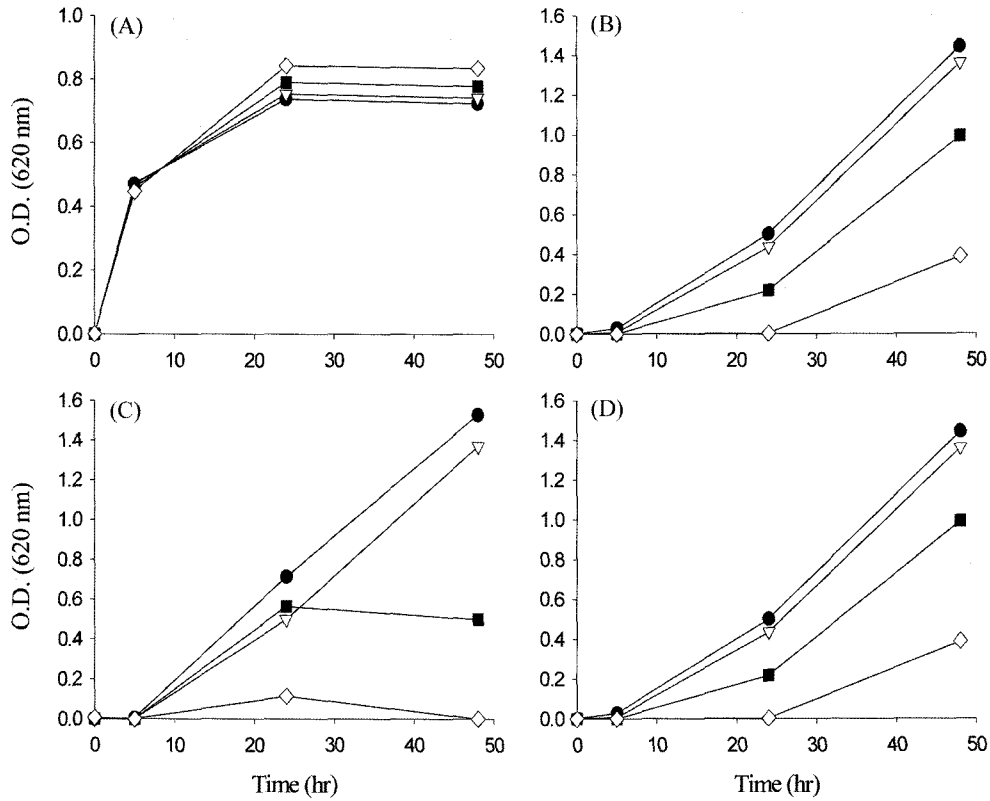
<sup>1)</sup>-: no inhibition (6 mm).  
 +: weak inhibition (6-8 mm).  
 ++: moderate inhibition (8-10 mm).  
 +++: strong inhibition (>10 mm).  
<sup>2)</sup>minimal inhibitory concentration.

도가 1/10 이하로 감소하였으며, 효모와 *S. typhimurium*에 대해서는 50 µg/mL 농도에서 약 1/2의 비성장속도의 감소를 보였다. 그러나 *E. coli*에 대해서는 100 µg/mL까지는 거의 생육저해효과를 보이지 않았다.

Gram(+) 세균을 이용한 분자생물학적 실험의 항생제로 많이 쓰이는 chloramphenicol의 적정 농도가 20-30 µg/mL 임을 고려할 때 감초의 에탄올 추출물의 항균활성이 매우 뛰어남을 알 수 있다. 강력한 천연물 항균제로 알려진 마늘의 정유성분이 *E. coli*



**Fig. 1. Inhibitory effects of *Glycyrrhiza glabra* extracts on the growth of *Bacillus subtilis* (A), *Listeria monocytogenes* (B), *Streptococcus mutans*, (C) and *Staphylococcus aureus* (D). ●: control culture without the extracts, ▽: 25 µg/mL extracts, ■: 50 µg/mL extracts, ◇: 100 µg/mL extracts.**



**Fig. 2. Inhibitory effects of *Glycyrrhiza glabra* extracts on the growth of *Escherichia coli* (A), *Salmonella typhimurium* (B), *Candida albicans* (C), and *Pichia anomala* (D).** ●: Control culture without the extracts, ▽: 25 µg/mL extracts, ■: 50 µg/mL extracts, ◇: 100 µg/mL extracts.

O157:H7, *Aspergillus*속 곰팡이, *Hansenula anomala*, *Kloeckera apiculata* 등 부패효모의 증식을 저해하는데 효과적이라고 하며, 특히 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*의 성장을 효과적으로 억제하여 aflatoxin의 합성을 억제한다고 알려져 있다(23). 본 실험의 결과와 전체적으로 직접적인 항균활성능의 비교는 가능하지 않으나, *E. coli*의 경우 250 µg/mL의 감초 에탄올 추출물 또한 균의 증식을 억제하는 데에는 충분히 효과적이었으며, 효모들에 대한 증식 억제 효과도 좋았으므로, 항균활성에 있어서 마늘의 정유 성분에서 크게 뒤지지 않는 것으로 사료된다. 양파의 경우 1%의 추출물에서 *S. typhimurium*의 성장이 억제되고 5% 농도에서는 사멸되었지만 *E. coli*에게는 효과가 없다고 한다(24). 그러나 감초 에탄올 추출물의 경우 250 µg/mL 농도에서 *S. typhimurium*을 사멸하였으며, *E. coli*에 대하여도 100-250 µg/mL 농도에서 항균활성이 명확히 관찰되었으므로 양파의 항균활성보다 뛰어난 것으로 사료된다. 약용식물 중 황백은 식품의 부패에 관여하는 *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* 등에 대한 항균성을 나타내고, 이 추출물이 두부, 어묵, 막걸리, 간장 등에 첨가된 경우에도 항균효과를 나타낸다고 하나(9,18), 식품첨가물로 인정받지 못하고 있는 상황이다. 감초의 메탄올 추출물은 2 mg/mL의 고농도에서 항생제 내성이 있는 황색포도상구균에 대해 항균효과가 있다고 보고되었으나(25), 본 연구에 의하면 에탄올 추출물이 메탄올 추출물보다 *S. aureus*에 대하여 훨씬 높은 항균활성을 가지고 있었다. 한편, 감초의 75% 에탄올 추출물의 항균 활성 분획물은 liquiritigenin으로 동정된 바 있다(26). 따라서 감초의 에탄올 추출물은 항균활성이 뛰어난 뿐만 아니라 안전성 또한 인정되므로 유용한 천연 식품보존제로서의 역할이 기대된다.

**감초 에탄올 추출물의 안정성**

감초 에탄올 추출물의 열 및 pH 안정성을 조사하였다. 추출물의 열 안정성을 조사하기 위해 추출물을 80, 100, 120, 180°C에서 각각 30분간 열처리 한 후 Gram(+) 세균에 대한 생육저해환을 측정하였다(Table 7A). 또한 감초 에탄올 추출물의 pH 안정성을 조사하기 위해 추출물을 pH 3, 5, 7, 9가 되도록 염산 또는 수산화나트륨으로 처리한 후 Gram(+) 세균에 대한 생육저해환을 측정하였다(Table 7B).

감초 에탄올 추출물의 Gram(+) 세균에 대한 항균활성은 높은 열처리를 하여도 120°C까지는 생육저해환 크기의 변화는 거의 없어 열에 매우 안정한 것으로 보인다. 이는 감초 에탄올 추출물의 항균물질이 60-120°C까지 안정하다는 보고와도 유사하다.

감초 에탄올 추출물의 항균활성은 pH 3-7에서는 상당히 안정한 것으로 나타났다. pH 9의 알칼리로 변화면서 생육저해환이 약간 감소하는 경향을 보였다. 대부분의 식품의 pH가 산성에서 중성이고 감초 에탄올 추출물은 열과 pH에 대하여 비교적 안정한 것으로 나타났으므로 감초의 에탄올 추출물은 식품의 가공 처리에도 적합한 식품첨가물로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

**요 약**

본 연구에서는 한방재료인 감초에서 항균력을 가지는 유효물질을 얻기 위해 추출 조건을 최적화한 후 최적 추출물의 항균 활성과 안정성을 조사하였다. 추출용매를 선정한 후 용매의 농도, 추출 온도, 추출 시간 등을 결정하였다. 감초를 서로 다른 극성을 가진 물, 메탄올, 에탄올, 아세톤, 에틸 아세테이트, 헥산 등의

**Table 7. Stability of the ethanol extracts against extreme heat (A) and pH treatment (B). Antibacterial activity was measured after heat/pH treatment using agar diffusion method against 4 Gram(+) bacteria**

(A)				
Temp. (°C)	Microorganisms			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>
80	+++ <sup>1)</sup>	+++	+++	+++
100	+++	+++	+++	+++
120	+++	+++	+++	+++
180	++	+++	++	++

(B)				
pH	Microorganisms			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>
3	+++ <sup>1)</sup>	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++	+++
9	++	++	+ / ++	++

<sup>1)</sup>:- No inhibition (6 mm).  
 +: Weak inhibition (6-8 mm).  
 ++: Moderate inhibition (8-10 mm).  
 +++: Strong inhibition (>10 mm).

용매로 추출한 후 항균 활성을 조사함으로써 에탄올을 최적 추출 용매로 선정할 수 있었다. 에탄올 농도별로 추출하였을 때는 무수에탄올일 때 항균 활성이 가장 높았으나 95% 농도에는 유의한 차를 보이지 않았으므로 비용을 고려하여 추출 용매는 95% 에탄올로 선택하였다. 95% 에탄올로 감초를 추출할 때 상온에서 12시간 추출하는 것이 바람직한 것으로 조사되었다. 이후 14종의 Gram(+) 세균, Gram(-) 세균, 효모 등을 이용하여 추출물의 항균 활성을 조사하였다. 여러 미생물에 대한 최소 억제 농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)는 Gram(-) 세균은 250 µg/mL, Gram(+) 세균은 25 µg/mL 이었고 효모는 50-500 µg/mL로 조사 되어, Gram(+) 세균에 대한 탁월한 항균활성을 가졌다. 추출물을 열과 pH 처리한 후 항균활성이 감소하지 않고 잘 유지되는 것으로 보아 상기의 추출물은 열과 pH에는 비교적 안정하다고 판단된다. 감초 에탄올 추출물은 여러 미생물에 대한 항균활성을 가지며 열과 pH 에 대해서도 안정하므로 식품의 천연보존료로서 사용이 가능하리라 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2003학년도 안동대학교 특별학술연구비에 의하여 연구되었음.

### 문헌

- Sibel R. Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Sibel R (ed). Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK. (2003)
- Davidson P M, Post LS. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. p. 371. In: Antimicrobials in Foods. Branen AL, Davidson PM (eds). Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA (1983)
- Lewis RJ. Their regulatory status their use by the food industry. pp. 3-27. In: Food additives Handbook. Robert WD (ed). Nostrand Reinhold, New York, NY, USA (1989)
- Jung JH, Cho SH. Effect of steeping treatment in the natural antimicrobial agent solution on the quality control of processed tofu.

- Korean J. Food Preserv. 10: 41-46 (2003)
- Cho MH, Bae EK, Ha SD, Park JY. Application of natural antimicrobials to food industry. Food Sci. Ind. 38: 36-45 (2005)
- An BJ. The material of natural anti-bacterial agents for the food preservative. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 4: 5-16 (1999)
- Nam SH, Kang MY. Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 43: 141-147 (2000)
- Cho SY, Han YB, Shin KH. Screening for antioxidant activity of edible plants. J. Korean Soc. Food Nutr. 30: 133-137 (2001)
- Lee YC, Oh, SW, Hong HD. Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 700-709 (2002)
- Kwak HJ, Kwon YJ, Jeong PH, Kwon JH, Kim HK. Physiological activity and antioxidative effect of methanol extract from onion (*Allium cepa* L.). J. Korean Soc. Food Nutr. 29: 349-355 (2000)
- Byun PH, Kim WJ, Yoon SK. Effects of extraction conditions on the functional properties of garlic extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 507-513 (2001)
- Kim EJ, Ahn MS. Antioxidative effect of ginger extracts. Korean J. Food Soc. Food Sci. 9: 37-42 (1993)
- Park UY, Kim YM, Kim SH, Chang DS. Investigation of optimum extracting condition and antimicrobial activity of the extract from the root bark of *Morus alba*. J. Food Hyg. Safety 10: 139-145 (1995)
- Jung KT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 928-935 (2000)
- Jang JK, Han JY. The antioxidant ability of grape seed extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 524-528 (2002)
- Shin DH, Han JS, Kim MS. Antimicrobial effect of ethanol extracts of *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et zucc on *Listeria monocytogenes*. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 627-632 (1994)
- Park UY, Chang DS, Cho HR. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 91-96 (1992)
- Lee BW, Shin DH. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 200-204 (1991)
- Mok JS, Park UY, Kim YM, Chang DS. Effects of solvents and

- extracting condition on the antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae* radix (*Salvia miltiorrhiza*) extract. J. Korean Soc. Food Nutr. 23: 1001-1007 (1994)
20. Kim YD, Kim YJ, Oh SW, Kang YJ, Lee YC. Antimicrobial activities of solvent extracts from *Citrus sudachi* juice and peel. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1613-1618 (1999)
21. Cho KY. Studies on the extraction condition of SSANG WHA tea. J. Korean Soc. Food Nutr. 18: 34-39 (1989)
22. Oh SL, Kim SS, Min BY, Chung DH. Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic acids and tannins in the extracts of *L. chinensis* M., *A. acutiloba* K., *Schizandra chinensis* B. and *A. sessiliflorum* S. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 76-81 (1993)
23. Kim YS., Shin DH. Researches on the volatile antimicrobial compounds from edible plants and their food application. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 159-165 (2003)
24. Michael GJ, Reese HV. Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. Appl. Microbiol. 17: 903-905 (1969)
25. Lee JW, Ji YJ, Yu MH, Im HG, Hwangbo MH, Lee IS. Antimicrobial effect of extract of *Glycyrrhiza uralensis* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 456-464 (2005)
26. Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis*. FISCH 30: 680-687 (1998)