

Research Note

감초추출물에 대한 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820의 배양 특성

이수한 · 유희중¹ · 김정환*

을지대학교 식품산업의식학과, ¹서울과학기술대학교 식품공학과

Characteristics of Licorice Extracts Fermented by *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820

Su Han Lee, Hee Jung Ryoo¹, and Jung Hoan Kim*

Department of Food Technology and Service, Eulji University

¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology

Abstract

Aglycon in licorice converted from glycosides by fermentation has been implicated to improved physiological activity, this study was carried out to determine the aglycon production in the cultured licorice-extract broth by *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820. According to inoculum size, pH was decreased -0.32 after 6 days at 10⁶ CFU/mL, pH and contents of the glycyrrhizin in culture broth were rapidly decreased after 2 days at 10⁷ CFU/mL and 10⁸ CFU/mL, the concentration of glycyrrhizin after 6 days were determined 27.5 mg/100 mL and 20.8 mg/100 mL, the utilization rates were 71.8%, 78.6%, respectively. Initial inoculum size should be above 10⁷ CFU/mL on the fermentation of licorice extracts, and immobilized *L. acidophilus* KCCM 32820 was faster decrease than free cell on the fermentation. The metabolites of fermented licorice extracts can be verified the improvement in efficacy of physiological functions, further research need to do.

Key words: licorice, licorice extracts, glycyrrhizin, lactic acid fermentation, *Lactobacillus acidophilus*

서 론

감초(甘草, *Glycyrrhiza uralensis* FISCH)는 원산지가 내몽고로 콩과에 속하는 다년생 초본식물이다. 감초의 주성분은 사포닌 계통의 glycyrrhizin이며 liquiritin 등의 flavonoid도 미량 존재한다. Glycyrrhizin은 감초에 보통 6-14% 함유되어 있으며, 설탕에 비해 약 200 배에 달하는 감미도와 특유의 단맛을 내는 물질로 항알레르기(Kumagai et al., 1967), 만성 간염(Kiso et al., 1984) 및 AIDS를 포함한 바이러스성 질환(Pompei et al., 1979)에 뛰어난 효과가 있고, β-D-glucuronidase에 의해 생체내의 주요 생리활성 성분인 glycyrrhizinic acid로 대사된다(Nemeth et al., 2003). Liquiritin은 감초의 지표물질 flavonoid로서 liquiritigenin (4',7-dihydroxyflavone)에 1개의 glucose가 결합된 배당체이다(Na et al., 2008). Shin et al.(1994)은 감초추출물에

이용하여 *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 영향을 조사하였으며, Ahn et al.(1998)은 감초 추출물중 liquiritigenin이 *Listeria monocytogenes*균에 대해 항균 활성을 보고한 바 있다.

감초의 liquiritin은 *Lactobacillus pentosus* 유래의 β-glucosidase에 의해 liquiritigenin으로 전환되는 것이 확인되었으며(Na et al., 2008), Kim et al.(2004)은 *Aspergillus kawachii*의 조효소액을 첨가함으로써 liquiritigenin의 함량이 증가되었고 이에 따라 항산화작용도 높아졌다고 보고하였다. 또한 누룩을 이용한 경우에도 감초의 liquiritigenin이 증가함이 확인되었다(Ha et al., 2009; Um et al., 2009). 그러므로 미생물, 특히 유산균을 이용하여 감초를 발효할 경우 유산균의 건강증진효과와 함께 glycyrrhizinic acid와 liquiritigenin으로의 전환을 통해, 건강기능성 소재로서의 가치향상을 기대할 수 있겠으나, 예비 실험과정에서 감초 고유의 항균작용에 의한 유산균 생육 저해가 확인되었다. 현재까지의 연구로 볼 때 감초는 배당체인 주요성분이 발효를 통해 비당질로 전환이 될 경우 생리활성이 증가되어 건강기능식품으로의 활용가능성을 높일 수 있을 것으로 생각된다

따라서 본 연구는 감초추출물에 *Lactobacillus acidophilus*

*Corresponding author: Jung Hoan Kim, Department of Food Technology and Service, Eulji University, 553 Sanseong Daero, Sujeong-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do 461-713, Korea
Tel: +82-31-740-7271; Fax: +82-31-740-7349
E-mail: peterkim@eulji.ac.kr
Received October 26, 2012; revised November 21, 2012; accepted November 22, 2012

KCCM 32820를 고농도로 배양하며 glycyrrhizin함량의 변화 관찰 등을 통해 감초추출물 발효액의 제조 가능성을 검토하였으며, 건강기능식품으로서 가치 증진에 대한 기초자료로 제시하고자 수행하였다.

재료 및 방법

미생물

본 연구에 사용한 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820는 한국미생물보존센터로부터 분양을 받았으며, 균주의 생육 및 보존을 위하여 MRS broth(Difco Laboratories, Detroit, USA)를 사용하였다

감초추출물의 제조

본 연구에 사용된 감초는 서울의 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 감초는 Waring blender(Model 33 BL 73, Dynamics Corp., Hartford, USA)로 분쇄한 후 표준체를 이용하여 30-60 mesh 의 분쇄감초 40 g 당 1000 mL의 증류수를 가하여 수직 환류 냉각관이 부착된 Erlenmeyer flask를 이용하여 95°C의 water bath에서 3 시간 동안 추출한 후, Whatman No. 41 filter paper로 filtration하여 사용하였다.

감초추출물 발효액의 특성 평가

pH는 pH meter(920A, Thermo, Orion, USA)로 직접 측정하였다. 유산균수는 BCP plate count agar(Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 35-37°C에서 72±3 시간 표준평판배양법으로 배양하여 배지상에 자란 colony를 CFU/mL로 환산하였다. 희석 용액으로는 0.1% peptone수를 사용하였다.

유산균 고정화

MRS Broth에 *L. acidophilus* KCCM 32820을 접종하고 35°C에서 100 rpm으로 shaking하면서 15-18 시간 배양하여

연은 배양액을 원심분리기를 이용하여 8,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 제거한 다음, 멸균수로 1 회 세척 후 50 mL의 멸균한 0.1% peptone 용액에 현탁하였다. 현탁액을 동량의 2% Na-alginate(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 용액과 균일하게 섞은 다음 compressor(GSOC-95MC, GSS Brand, Daejeon, Korea) 를 사용하여 4 kg/cm²의 압축공기로 한방울씩 0.3 M CaCl₂용액에 적하하여 1.0-3.0 mm 정도의 직경을 가지는 bead를 형성하였다. 이를 약 1 시간 정도 방치하여 bead를 강화시킨 후 멸균 수로 세척하여 발효에 사용하였다.

Glycyrrhizin의 정량

Glycyrrhizin 함량은 HPLC(SP8800, Spectra-Physics Co. Santa Clara, USA)를 이용하여 Kim et al.(1998)의 방법을 변형하여 측정하였다. Column은 C18(220×4.6 mm)를 사용하였고, 20 µL의 추출물과 phosphoric acid를 이용하여 eluent로는 2% acetic acid : acetonitrile = 20 : 11로 제조하여 사용하였으며, 유속은 2.5 mL/min으로 하였다. Detector로는 UV detector를 이용하고 측정 흡광도는 254 nm로 하였다. Detector의 측정감도는 0.05-0.1, integrator의 attenuation은 32 로 설정하였다.

결과 및 고찰

발효조건 설정

감초 추출물에서 발효 형태를 살펴보고자 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820을 10⁸ CFU/mL, 10⁷ CFU/mL 및 10⁶ CFU/mL가 되도록 접종한 후 pH 및 glycyrrhizin 함량의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

감초추출물의 발효는 *L. acidophilus* KCCM 32820의 접종량에 따라 차이가 있었는데, 접종량 10⁶ CFU/mL의 경우는 발효 6 일간 pH는 -0.32에 불과하여 발효가 진행되지 않은 것으로 나타났다. 반면, 접종량 10⁷ CFU/mL과 10⁸

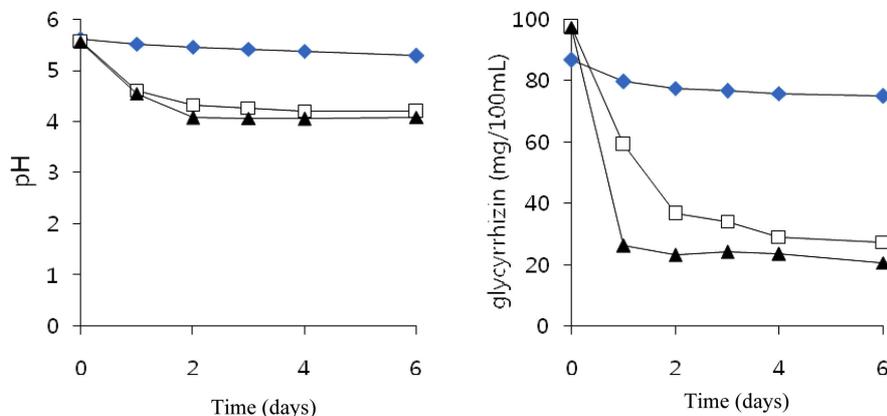


Fig. 1. Changes of pH and glycyrrhizin in licorice extracts fermented with *L. acidophilus* KCCM 32820. Inoculum size were 10⁶ CFU/mL (◆), 10⁷ CFU/mL (□) and 10⁸ CFU/mL (▲).

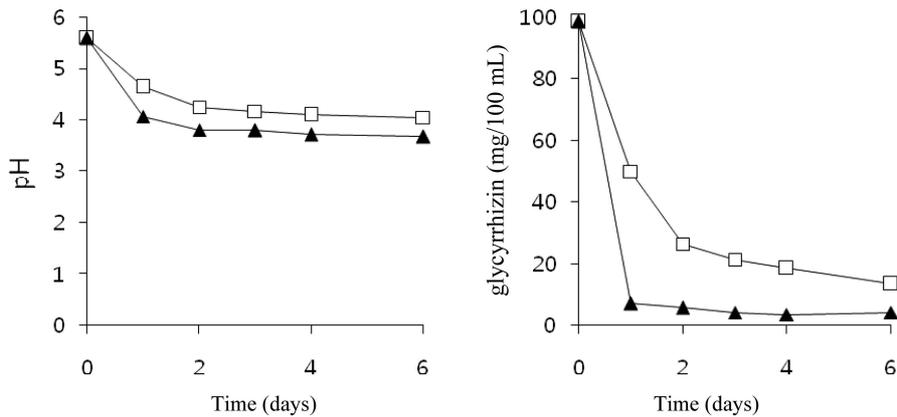


Fig. 2. Changes of pH and glycyrrhizin in licorice extracts fermented with immobilized *L. acidophilus* KCCM 32820. Inoculum size were 10⁷ CFU/mL (□) and 10⁸ CFU/mL (▲).

CFU/mL 수준에서는 발효 2 일까지 pH가 급속도로 떨어진 후 완만한 변화가 진행되었으며, 발효 6 일 후 pH는 각각 4.20과 4.09로서 10⁸ CFU/mL로 접종한 경우의 pH가 더 낮았다.

발효 중 glycyrrhizin 의 함량은 pH의 변화와 유사한 양상으로 나타났는데, 접종량 10⁶ CFU/mL 수준에서는 glycyrrhizin 의 이용이 저조하여 발효 6 일 후의 감초추출물내 glycyrrhizin 의 잔류농도는 75.1 mg/100 mL, 이용률은 13.4% 였다. 그러나 *L. acidophilus* KCCM 32820의 접종 수준을 10⁷ CFU/mL 과 10⁸ CFU/mL 로 높이면 *L. acidophilus* KCCM 32820의 glycyrrhizin 소모량도 늘어나, 발효 6 일 후 glycyrrhizin 의 농도는 27.5 mg/100 mL 및 20.8 mg/100 mL 였으며 이용률은 71.8% 및 78.6% 였다.

따라서 감초 추출물의 발효는 초기 유산균의 농도에 따라 발효의 진행 정도가 결정되며, 초기 접종량을 10⁷ CFU/mL 이상의 고농도로 접종하여 발효시키는 것이 효과적일 것이다. 또한 감초추출물의 발효를 진행시키기 위해서는 추출물 내의 항균 물질로부터 유산균이 보호될 수 있도록 하여 발효의 정지를 막아야 할 것으로 사료되었다.

고정화 유산균을 이용한 감초 추출물의 발효

감초추출물에서 *L. acidophilus* KCCM 32820의 배양에 있어서 높은 농도의 균수를 유지하기 위하여 Na-Alginate 를 이용하여 고정화시킨 균을 발효에 이용하였다. Fig. 2는 감초 추출물에 고정화한 균의 수를 10⁷ 및 10⁸ CFU/mL 이 되도록 접종하고 35°C에서 배양하면서 pH와 glycyrrhizin 함량의 변화를 관찰한 결과이다. 그 결과, 고정화 균을 이용한 경우에도 10⁷ CFU/mL에 비해 10⁸ CFU/mL을 접종하면 glycyrrhizin의 감소와 pH저하 속도가 빨랐다. 즉 고정화균 10⁸ CFU/mL의 경우 pH는 1 일 이후부터는 4.0 이하로 나타났으며 그 변화속도가 현저히 떨어졌고, glycyrrhizin의 함량도 1 일 이후는 잔존률이 10% 미만이었다. 고정화균의

접종수준 10⁷ CFU/mL의 경우는 이에 비해 완만한 변화 속도를 보이나 Fig. 1의 비고정화균을 사용한 경우에 비해서는 pH와 glycyrrhizin함량의 저하 속도가 빨랐으며, 발효기간내 지속적인 감소가 있었다. 또한 고정화균을 접종한 경우 glycyrrhizin의 이용률은 발효 6 일 후 10⁷ CFU/mL 의 경우 86.2%, 10⁸ CFU/mL의 경우 95.7%로 비고정화균의 경우에 비해 높았다.

L. acidophilus KCCM 32820의 접종수준과 고정화 여부에 따른 발효 중 생균수의 변화는 Fig. 3과 같다. *L. acidophilus* KCCM 32820는 감초추출물에서 glycyrrhizin 등에 의한 생육 억제 작용과 영양고갈 등으로 인해 생균수는 지속적으로 감소하는 패턴을 보여, 비고정화 균은 발효 2 일을 경과하면서 10⁶ CFU/mL 이하로 생존율이 급격하게 하락하였다. 반면 고정화 균은 이에 비해 높은 생존율을 나타내어 발효시간

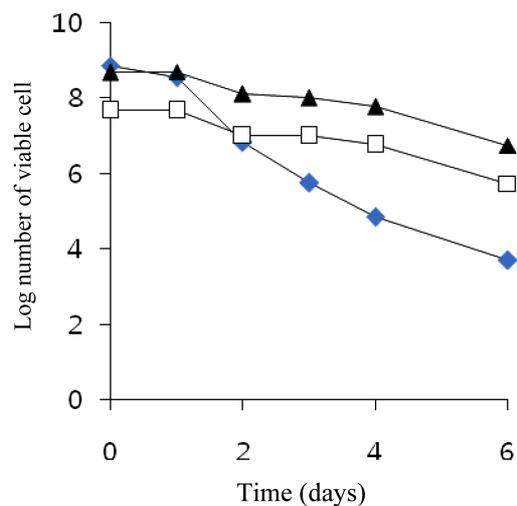


Fig. 3. Changes of viable cell in licorice extracts fermented with free and immobilized *L. acidophilus* KCCM 32820. Inoculum size were 10⁸ CFU/mL of free cell (◆), and 10⁷ CFU/mL (□) and 10⁸ CFU/mL of immobilized cell (▲).

이 경과할수록 고정화균을 사용한 경우가 비고정화균을 접종한 경우에 비해 *L. acidophilus* KCCM 32820의 잔존률이 높게 유지되었으며, 10^8 CFU/mL를 접종한 경우에도 6일 후 10^6 CFU/mL 이상을 유지하였다. 따라서 고정화 균을 10^7 CFU/mL 이상으로 접종하여 감초 추출물을 발효시킬 경우, 신속하게 발효를 진행시키고 동시에 항균 물질 등으로부터 *L. acidophilus* KCCM 32820의 생육억제를 완화시킬 수 있음을 확인하였다.

본 연구는 항균효과가 있는 감초를 유산균으로 발효하여 생리활성을 갖는 성분으로의 전환 가능성을 검토한 것이다. 따라서 glycyrrhizic acid, liquiritigenin 등 발효생성물의 정량과 함께 이들의 기능성에 대한 in vitro 및 in vivo의 추가적인 연구를 통해 감초추출물의 효능 증대에 대한 결론을 얻을 수 있을 것이다.

요 약

감초는 배당체인 주요성분이 발효를 통해 무배당체로 전환이 될 경우 생리활성을 증가시켜 건강기능식품으로의 활용가능성을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 감초추출물에 *Lactobacillus acidophilus* KCCM 32820를 고농도로 배양하며 glycyrrhizin함량의 관찰 등을 통해 감초추출물 발효액의 제조 가능성을 검토하였다. 감초 추출물은 접종량 10^6 CFU/mL의 발효에서는 6일 후 pH의 변화가 -0.32였으나, 접종량 10^7 CFU/mL과 10^8 CFU/mL 수준에서 pH와 glycyrrhizin의 함량은 발효 2일까지 급속도로 떨어진 후 완만한 변화하여, 발효 6일 후의 감초추출물 내 glycyrrhizin의 잔류농도는 27.5 mg/100 mL 및 20.8 mg/100 mL 였으며 이용률은 71.8% 및 78.6% 였다. 따라서 감초 추출물의 발효는 초기 접종량을 10^7 CFU/mL 이상의 고농도로 접종하여 발효시키는 것이 효과적이었다. Na-alginate로 고정화한 균을 접종한 경우가 비고정화균의 배양에 비해서는 pH와 glycyrrhizin함량의 저하 속도가 빨랐다. 향후 발효생성물의 정량과 함께 이들의 기능성에 대한 추가적인 연구 결과를 통해 감초추출물의 효능 증대에 대한 결론을 얻을 수 있을 것이다.

참고문헌

- Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA. 1998. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 680-687.
- Ha BJ, Ku CS, Bae DJ, Hwang KS, Kim CH, Jang DI. 2009. Bio-conversion of liquiritin and liquiritin apioside from *Glycyrrhiza uralensis* root to liquiritigenin during nuruk fermentation. In: Proceedings of 6th International Conference on Korean Society for Biotechnology and Bioengineering. April 9-11, Pohang, Korea, p. 198.
- Kim SI, Kim JE, So JH, Rhee, IK, Chung, SK, Lee KB, Yoo YC, Song KS. 2004. Changes in liquiritigenin contents in licorice extract treated by the crude enzyme extract from *Aspergillus kawachii*. Korean J. Pharmacogn 35: 309-314.
- Kim YK, Kim KS, Bang JK, Yu HS, Lee ST. 1998. Growth characteristics, glycyrrhizin and free sugar content of licorice species. Korean J. Medicinal Crop Sci. 6: 108-113.
- Kiso Y, Tohin M, Ino H, Hattori M, Saamoto T, Namba T. 1984. Mechanism of antihepatotoxin activity of glycyrrhizin. Effect on free radical generation and lipid peroxidation. Planta Medica. 50: 298-302.
- Kumagai A, Nanaboshi M, Asanuma Y, Yagur T, Nishino K. 1967. Effect of glycyrrhizin on thymolytic and immuno-suppressive action of cortisone. Endocrinol. Jpn. 14: 39-42.
- Na IS, Park MJ, Noh CH, Min JW, Bang MH, Yang DC. 2008. Production of Flavonoid Aglycone from Korean *Glycyrrhizae Radix* by Biofermentation Process. Korean J. Oriental Physiol. Pathology 22: 569-574.
- Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. 2003. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in human. Eur J. Nutr. 42: 29-42.
- Pompei R, Flore O, Marcialis MA, Loddo B. 1979. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and activates virus particles. Nature 281: 689-690.
- Shin DH, Han JS, Kim MS. 1994. Antimicrobial effect of ethanol extract of *Sonomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var. Glanduliferaregel et zucc on *Listeria monocytogenes*. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 627-632.
- Um YR, Shim KS, Lee JH, Park HY, Ma JY. 2009. Quantitative Analysis of Glycyrrhizic Acid in Fermented *Glycyrrhizae Radix* by HPLC. Korean J. Oriental Med. 15:85-89.