

## 관중(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)의 식중독 미생물 증식 억제 물질의 분리 및 항균작용

한지숙 · 이지영 · 백남인<sup>1</sup> · 신동화\*

전북대학교 응용생물공학부(식품공학 전공) 및 농업과학기술연구소

<sup>1</sup>경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터

### Isolation and Antimicrobial Action of Growth Inhibitory Substance on Food-borne Microorganisms from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai

Ji-Sook Han, Ji-Young Lee, Nam-In Baek<sup>1</sup> and Dong-Hwa Shin\*

Faculty of Biotechnology(Food Science & Technology Major), Chonbuk National University

<sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyunghee University

The ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai showed strong growth inhibition against 5 strains of *Listeria monocytogenes* at the concentrations of 100~500 ppm and the minimum inhibitory concentration of n-hexane fraction was under 50 ppm. The D8-2-5 fraction isolated from n-hexane fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai showed a strong bactericidal activity on 5 strains of *L. monocytogenes* at 20 ppm level in tryptic soy broth medium. At the level, the viable count was reduced 4~6 log cycle compared to initial cell number. Observation by the measurement of adenosine triphosphate (ATP) contents and transmission electron microscope showed that disruptions of the cell wall and elution of intracellular ATP are assumed to be due to the bactericidal activity. In addition, the n-hexane fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai showed the strong growth inhibitions at 50 ppm on *Vibrio parahaemolyticus* and *Bacillus cereus*, and at 25 ppm on *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** *Dryopteris crassirhizoma* Nakai, food-borne microorganisms, antimicrobial activity, adenosine triphosphate, TEM

### 서 론

관중(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)은 그 뿌리줄기를 회초미, 면마(綿馬)라고도 하며 면마과에 속하는 다년생 초본으로서, 우리나라 각지의 깊은 산골짜기 또는 나무숲의 그늘진 습한 땅에서 자란다. 세계적으로는 아시아 동부, 중국, 일본에도 분포되어 있다. 그 성질은 맛이 쓰고 차가우며<sup>(1)</sup>, 구충, 지혈의 효능이 있고, 대하, 이하선염을 치료하는데 사용된다<sup>(2)</sup>. 관중의 약효 성분으로 촌충 구제에 효과가 있는 물질은 filmaron으로 확인되었고, plavaspidic acid AB와 plavaspidic acid PB는 충치균에 대한 항균작용이 강하며, 그밖에 wogonin, baicalin, baicalein 등 flavonoid계 성분이 함유되어 있다고 알려져 있다<sup>(3)</sup>. 민간에서는 유행성 감기나 유행성 뇌척수막염, 그리고 마진(麻疹)의 예방을 목적으로 차처럼 달

여 먹는다. 그러나 독성과 자극성이 있고, 자궁수축 작용이 있으므로 간염환자, 급성위염환자, 임신부에게는 쓰지 않는다<sup>(4)</sup>.

이러한 특성을 가진 관중은 열수 추출물에서의 항 Herpes simplex virus type-1에 대한 효과가 있고<sup>(5)</sup>, 항알레르기 성분<sup>(6)</sup>, 충치원성 세균에 대한 항균활성 성분<sup>(7)</sup>등의 연구에 대한 보고는 있으나, 식중독 미생물의 증식 억제 효과에 대한 연구는 아직까지 보고되지 않아 이에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단되어, 저온증식이 가능하여 문제가 되고 있는 *Listeria monocytogenes*의 6종의 식중독 미생물을 대상으로 항균효과가 있는 유효물질을 분리하여 분획별 및 첨가 농도별 증식억제 효과 및 살균효과를 실험하였고, 이러한 항균 유효물질의 항균기작을 밝히고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

관중 에탄올 추출물에 대한 항균활성을 *L. monocytogenes* 5 균주를 대상으로 검색하였고, 관중의 항균 스펙트럼을 확인하기 위해 유해 식중독 미생물 6종을 대상으로 항균효과를 확인하였다. 이때 사용한 균주와 배지는 Table 1과 같다.

\*Corresponding author : Dong-Hwa Shin, Faculty of Biotechnology (Food Science & Technology Major), Chonbuk National University, Dukjin-Dong, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea  
Tel: 82-63-270-2570  
Fax: 82-63-270-2572  
E-mail: dhshin@moak.chonbuk.ac.kr

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganisms tested	Media used	Temp. (°C)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	TSB & TSA <sup>1)</sup>	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19112	TSB & TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	TSB & TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19114	TSB & TSA	32
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	TSB & TSA	32
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	NB & NA <sup>2)</sup>	30
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	NB & NA <sup>2)</sup>	30
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 33844	TSB & TSA+3% NaCl	30
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7	ATCC 43894	TSB & TSA	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	TSB & TSA	37
<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM 12021	NB & NA <sup>3)</sup>	37

<sup>1)</sup>TSB & TSA: Tryptic soy broth & Tryptic soy agar(Difco).

<sup>2)</sup>NB & NA: Nutrient broth & Nutrient agar(Oxoid).

<sup>3)</sup>NB & NA: Nutrient broth & Nutrient agar(Difco).

### 관중의 에탄올 추출 및 분획

Han의 방법<sup>(8)</sup>에 따라 관중(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)은 전주 시내 소재 한약방에서 건조상태로 구입하여 분쇄기로 마쇄하여 75% 에탄올을 5배 정도(w/v) 혼합하여 환류냉각관이 부착된 플라스크에 넣고, 80°C 수욕상에서 3시간동안 가열, 추출 후 여과(Whatman No. 2)한 여액을 진공회전농축기(EYELA, Japan)로 농축하였다.

에탄올 추출물을 농축하여 물층만 남긴 후 분액깔대기를 이용하여 약 4배의 핵산을 가하여 핵산 분획물을 2회 반복하여 얻고 동일한 방법으로 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차로 가하여 각각의 순차 용매 분획물을 얻었다. 각 분획물은 진공회전농축기와 진공건조기(New Power Engineering Co., Korea)로 용매를 완전히 제거한 후 고형분 함량을 구한 다음 에탄올로 적정 농도로 조절하여 0.2 µm membrane filter로 제균한 다음 항균효과 실험에 사용하였다.

### 관중의 항균 활성물질 분리

관중 에탄올 추출물을 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차 분획하여 항균활성을 확인한 결과 핵산 분획물이 다른 순차 분획물에 비하여 항균효과가 높아 핵산 분획층으로부터 Fig. 1의 순서에 따라 항균 활성물질을 분리하였다.

즉, 핵산 분획물(29 g)을 silica gel(600 g, 70~230 mesh, Merck)이 핵산 : 클로로포름 : 에탄올(6 : 0.5 : 1, v/v) 용매로 현탁·충진된 column(5.5×49 cm)에 흡착시킨 후 클로로포름과 에탄올의 비율을 단계적으로 증가시키면서 (6 : 1 : 4 (v/v) → 메탄올) 용출시키고 thin layer chromatography(TLC)로 확인하여 총 8개의 소획분(D1~D8)을 얻었고, 이 중에서 항균활성과 수율이 우수한 D8 획분으로부터 다시 항균 활성물질을 분리하였다.

획분 D8(7.10 g)은 핵산 : 클로로포름 : 에틸아세테이트 : 메탄올 : 아세트산(8 : 2 : 2 : 1 : 0.5, v/v)로 현탁·충진된 silica gel column(180 g, 3.6×34 cm)에서 메탄올 비율을 단계적으로 증가시키면서 용출시켜 총 8개의 소획분(D8-1~D8-8)을 얻었고 이 중에서 항균효과와 수율이 우수한 D8-2(2.74 g) 획분을 다시 핵산 : 에틸아세테이트 : 부탄올(11 : 3 : 2, v/v) 용매계로

preparative thin layer chromatography(PTLC, silica gel 60, 2 mm)하여 5개의 소획분을 얻었다. 이 중에서 항균효과가 인정되면서 수율과 정제도가 우수한 D8-2-5(0.18 g) 소획분을 얻었다. 1, 2, 3차 chromatography의 용리물들은 TLC상에서 전개시킨 후 UV(254 nm, 365 nm)의 흡수 band와 황산(20%) 발색시 나타나는 점적의 양상에 따라 분류하였다.

### Adenosine triphosphate(ATP) 정량

Choi의 방법<sup>(9)</sup>에 따라 *L. monocytogenes* ATCC 19113을 32°C에서 12시간 정지배양 한 후, 배양액 5 mL와 pH 7.4로 맞춘 phosphate buffer solution(PBS) 10 mL를 첨가하여 2000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 균체를 세척하였다(2회 반복). 원심분리 후 상정액을 제거한 후 얻어진 균체 500 µL에 단일 물질 D8-2-5 획분을 20 ppm 첨가하고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응종결 후 PBS 1 mL를 첨가하여 7000 rpm에서 순간 원심분리하고, 얼음에 방치하여 반응을 중지시킨 다음 두 단계로 나누어 ATP 양을 측정하였다. 세포 외 ATP 양은 상정액 20 µL에 100 mM의 glycine buffer(pH 7.0) 80 µL를 처리하고 luciferase-luciferin 100 µL를 첨가하여 ATP 양을 측정하였다. 세포 내 ATP 양은 100 µL의 균체 현탁액에 100 mM의 glycine buffer(pH 7.0) 100 µL를 처리하고 25 mM HEPES 2%중 Triton-X 100 처리를 하여 균체가 깨지도록 sonicator로 50/60 Hz에서 1분간 처리한 후 luciferase-luciferin 100 µL를 첨가하여 Luminometer(Lumat LB 9510, The Netherlands)를 이용하여 ATP 양을 측정하였다.

Luciferase-luciferin(Sigma Co., USA) 50 mg을 25 mM HEPES(pH 7.4) 5 mL에 녹여 0.5 mL씩 micro tube에 분주하여 -20°C에 보관하였다. 사용 직전 luciferase-luciferin은 1 mL HEPES로 희석하여 사용하였다.

### 투과전자현미경 시료 처리

항균활성 물질을 처리한 *L. monocytogenes* 세포의 변화를 관찰하기 위한 투과전자현미경 측정용 시료는 Ahn 등<sup>(10)</sup>의 방법에 준하여 준비하였다. 즉, 배양하여 동결한 미생물 세포의 절취한 부위를 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.2) 고정액에서 2시간 전 고정하

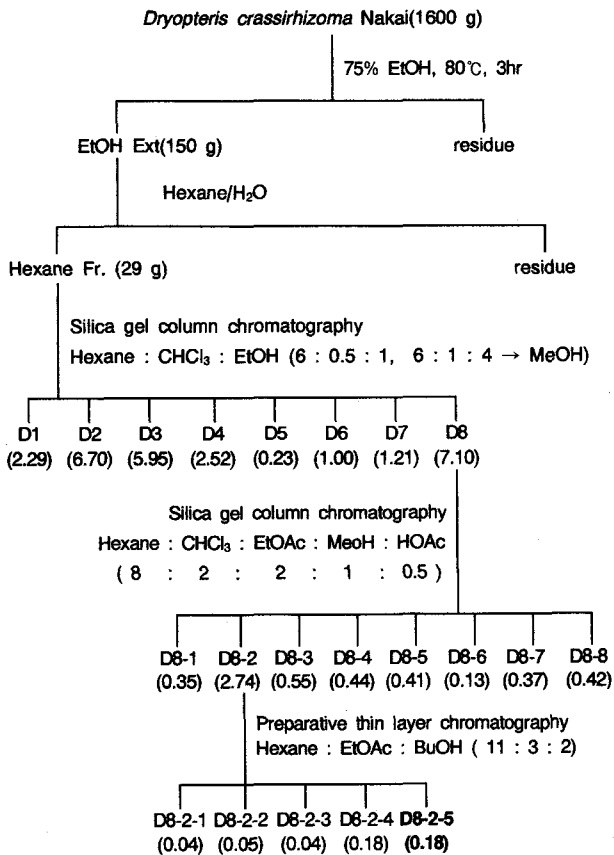


Fig. 1. Isolation flow diagram of the antimicrobial compound from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai.

고, 완충액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)으로 10분씩 3회 세척한 후, 1% OsO<sub>4</sub>(25°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)에서 2시간동안 후 고정하였다. 고정이 끝난 시료는 동일 완충용액으로 수회 세척한 후, ethanol 농도 상승순으로 탈수 하였으며, propylene oxide로 치환하여 Epon-812로 포매한 다음, 60°C oven에서 36시간 중합반응시켰다. 포매된 조직은 ultramicrotome(ULTRACUTE, Leica)으로 초박절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(CM 20, Philips)으로 100 kV에서 관찰하였다.

#### 사용기기 및 재료

항균활성 검색용 기기로는 Bioscreen C(Labsystem, Helsinki, Finland)를 사용하였고, 항균물질의 분획에는 fraction collector(Foxy JR., Isco. Inc., USA), ATP 정량을 위하여 sonicator(BRANSON-Bransonultrasonics Co., USA)와 Lumimeter(Lumat LB 9510, The Netherlands)를 사용하였다. 순수분리용 컬럼의 충진제 및 TLC는 silica gel 60, TLC plate(silica gel 60, F<sub>254</sub>), PTLC plate(silica gel 60, F<sub>254</sub>, 2 mm)를 Merck(Germany)사에서 구입하여 사용하였다.

#### 관중 에탄올 추출물의 1차 항균효과

Oh의 방법<sup>(11)</sup>에 따라 *L. monocytogenes*를 배양한 사면배지에서 1백금이를 취해 10 mL 액체배지에 접종하여 32°C에서 24시간 배양시킨 후 이 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배

지에 접종하여 32°C에서 24시간 배양하여 균체 배양액을 만들었다. 에탄올로 추출한 항균성 시료는 75% 에탄올로 완전히 용해시키거나 필요에 따라 희석한 후 membrane filter(0.2 μm)로 제균하여 액체배지 9.8 mL에 첨가량이 1000 ppm이 되도록 항균활성이 확인된 각 추출물 시료를 첨가(0.1 mL) 하였다. 이 배지에 균체 배양액 0.1 mL를 접종한 후 32°C에서 72시간 동안 배양하면서 12시간 간격으로 600 nm에서 Bioscreen C를 이용하여 optical density(O.D.)를 측정하여 증식억제 효과를 실험하였다. 이때 에탄올로 추출한 시료를 용해시키는데 사용한 에탄올량(0.075 mL) 만큼을 대조구에 첨가하여 에탄올 자체의 항균력이 감안 되도록 하였다.

#### 관중 용매 분획물과 소획분의 농도별 항균효과

Oh의 방법<sup>(11)</sup>에 따라 관중 에탄올 추출물을 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차 분획하여 분획물을 얻었다. 이 순차 분획물 역시 같은 방법으로 *L. monocytogenes*에 대한 각 순차 분획물별 최소증식저해농도(MIC)를 조사하였다. 또한 항균효과가 인정된 순차 용매 분획물의 *V. parahaemolyticus*의 5 종의 식중독 미생물에 대한 항균 스펙트럼과 항균 유효 단일물질을 분리하기 위해서 column chromatography와 PTLC를 하여 얻어진 각각의 소획분의 항균활성도 Bioscreen C를 이용하여 MIC를 조사하였다.

#### 관중 항균활성 단일획분의 살균효과

Oh의 방법<sup>(11)</sup>에 따라 *L. monocytogenes*를 배양한 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL 액체배지에 접종, 32°C에서 24시간 배양하여 균수를 10<sup>8-9</sup> CFU/mL으로 맞춘 후 이 균체 배양액 0.1 mL를 정제된 물질이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 32°C에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 표준평판한천 배양법에 의해 생균수를 계수하였다. 같은 방법으로 균체 배양액 0.1 mL와 각 처리구에 추출물 용해에 사용된 양과 동일한 에탄올(0.075 mL)을 가한 배지를 대조구로 하였다.

## 결과 및 고찰

#### 관중 에탄올 추출물 및 순차 용매 분획물의 항균효과

관중 에탄올 추출물을 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 층으로 순차 분획한 후, 에탄올 추출물 및 각각의 분획물에 대하여 항균활성을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 보면 관중 에탄올 추출물을 50, 100, 500 ppm 농도로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5 균주를 배양시킨 결과 500 ppm 첨가시 5 균주 모두 72시간까지 균 증식이 완전히 억제되었으며, 100 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* ATCC 19113, ATCC 15313 균주는 12시간까지 균증식이 억제되었으나 그 이후 균증식을 관찰할 수 있었고, *L. monocytogenes* ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19114 균주에는 항균효과를 나타내지 않았다. 이는 Ahn<sup>(12)</sup>과 Han<sup>(13)</sup>의 경우와 유사한 수준임을 확인하였다.

또한 용매 분획물의 항균효과를 살펴보면, hexan 분획물이 5 균주 모두에 대하여 MIC가 50 ppm 이하로서 균주에 따른 감수성의 차이는 나타나지 않았고, 클로로포름, 에틸아세테

**Table 2. Minimum inhibitory concentration of ethanol extract and solvent fractions of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai**

<i>Listeria monocytogenes</i>	Minimum inhibitory concentration (M, ppm)				
	EtOH extract	Hexane fraction	CHCl <sub>3</sub> fraction	EtOAc fraction	BuOH fraction
ATCC 19111	100<M<500	<50	100<M<500	1000<	1000<
ATCC 19112	100<M<500	<50	100<M<500	1000<	1000<
ATCC 19113	100<M<500	<50	100	1000<	1000<
ATCC 19114	100<M<500	<50	50<M<100	1000<	1000<
ATCC 15313	100<M<500	<50	50<M<100	1000<	1000<

**Table 3. Minimum inhibitory concentration (M, ppm) of the 1st column chromatography fractions obtained from n-hexane extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *Listeria monocytogenes***

Fraction No.	Yield (g)	<i>L. monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
D1	2.29	50<M	50<M	50<M	50<M	50<M
D2	6.70	50<M	50<M	50<M	50<M	50<M
D3	5.95	25<M<50	25<M<50	25<M<50	25<M<50	25<M<50
D4	2.52	25<M<50	25<M<50	25<M<50	25<M<50	25<M<50
D5	0.23	25<M<50	25<M<50	25<M<50	25<M<50	25<M<50
D6	1.00	25<M<50	25<M<50	25<M<50	25<M<50	25<M<50
D7	1.21	25	25	25	25	25
D8	7.10	25	25	25	25	25

**Table 4. Minimum inhibitory concentration(M, ppm) of the 2nd column chromatography fractions obtained from n-hexane extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *Listeria monocytogenes***

Fraction No.	Yield (g)	<i>L. monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
D8-1	0.35	10<M<25	10<M<25	10<M<25	10<M<25	10<M<25
D8-2	2.74	10<M<25	10<M<25	10<M<25	10<M<25	10<M<25
D8-3	0.55	10<M<25	10<M<25	10<M<25	10<M<25	10<M<25
D8-4	0.44	10<M<25	10<M<25	10<M<25	10<M<25	10<M<25
D8-5	0.41	25<M	25<M	25<M	25<M	25<M
D8-6	0.13	25<M	25<M	25<M	25<M	25<M
D8-7	0.37	25<M	25<M	25<M	25<M	25<M
D8-8	0.42	25<M	25<M	25<M	25<M	25<M

**Table 5. Minimum inhibitory concentration of the preparative thin layer chromatography fractions obtained from n-hexane extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *Listeria monocytogenes***

Fraction No.	Yield (mg)	<i>L. monocytogenes</i>				
		ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
D8-2-1	4.2	20<M	20<M	20<M	20<M	20<M
D8-2-2	5.4	20<M	20<M	20<M	20<M	20<M
D8-2-3	3.88	20<M	20<M	20<M	20<M	20<M
D8-2-4	18.03	20	20	20	20	20
D8-2-5	17.79	20	20	20	20	20

이트, 부탄올층의 분획물에 비해서 항균활성이 우수한 것으로 나타났다.

클로로포름 분획물의 경우, 500 ppm 첨가시 5 균주 모두 균증식이 완전히 억제되었으며, *L. monocytogenes* ATCC 19111와 19112에 대해서는 100 ppm 첨가시 36시간까지, 50 ppm 첨가시 12시간까지 균 증식이 억제되었다. *L. monocytogenes* ATCC 19113 균주에 대해서는 100 ppm 첨가시 60시간까지 균증식이 억제되었으며, *L. monocytogenes* ATCC

19114와 ATCC 15313, 두 균주에 대해서는 100 ppm 첨가시 72시간까지 완전 증식억제를 보였고, 50 ppm 첨가시 각각 24시간, 36시간까지 균증식 억제를 보였다. 그러나 에틸아세테이트와 부탄올 층의 경우 500 ppm 수준 이하의 농도에서는 모든 균이 증식하여 항균활성이 나타나지 않았다.

이는 관중 클로로포름 분획층 100 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* ATCC 19111, ATCC 19113에 대해서는 36시간까지, *L. monocytogenes* ATCC 19112, ATCC 15313에 대해서

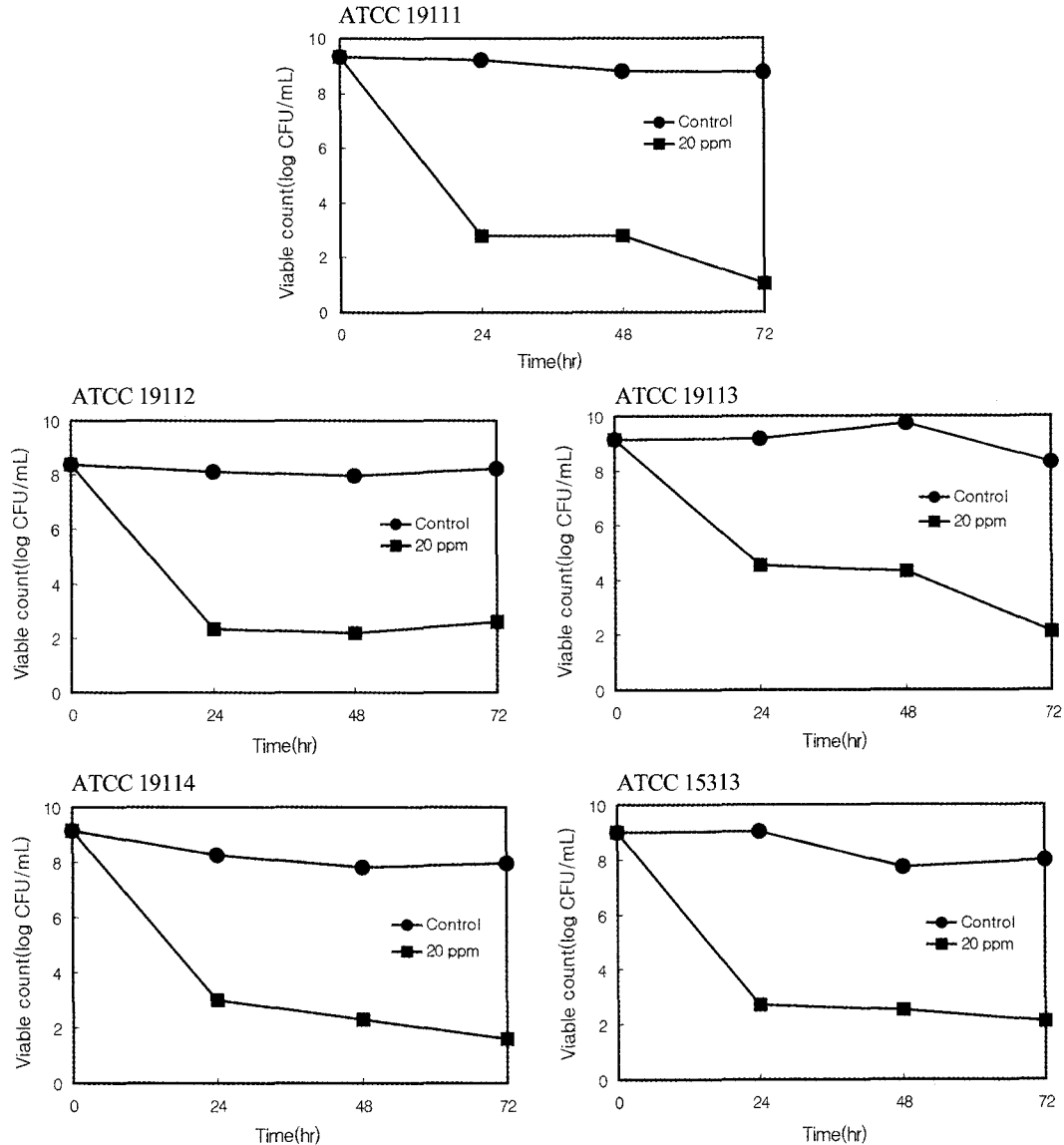


Fig. 2. Bactericidal effect of purified D8-2-5 fraction isolated from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *Listeria monocytogenes* for 72 hr at 32°C.

는 24시간, *L. monocytogenes* ATCC 19114에 대해서는 12시간까지 균증식 억제효과를 보였다는 결과<sup>(12)</sup>와 다소 차이가 있었다. Ahn<sup>(12)</sup>의 경우 1차 분획 용매가 클로로포름이었으나, 본 실험에서는 1차 분획 용매가 헥산이었고 클로로포름은 2차 분획 용매로 사용하였다. 따라서 항균 유효물질이 1차 분획 용매인 헥산층에서 용출 되었으며, 용매 분획시 클로로포름의 경우는 gum물질이 석출되어 항균 유효물질이 클로로포름층으로 완전히 용출되지 못하여 항균효과가 떨어진 것으로 추정된다. 이에 항균효과가 우수하고, 분획후 농축했을 때 gum물질이 적어 실험에 방해되지 않는 헥산층의 항균 유효물질을 분리하였다.

#### 관중 헥산 분획물의 1차 column chromatography 후 얻은 소획분들의 항균효과

관중 헥산 분획물로부터 항균 활성물질을 분리하기 위하여 먼저 TLC상에서 분리능이 우수한 용매조건을 탐색한 후에 선

택된 용매조건인 헥산 : 클로로포름 : 에탄올(6:0.5:1, 6:1:4)에서 silica gel column chromatography를 실시한 결과 총 8개의 소획분(D1~D8)을 얻었고, 용해시킨 각각의 소획분을 25 및 50 ppm 수준으로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5 균주에 대하여 항균효과를 실험한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는 바와 같이 소획분 D3, D4, D5, D6은 50 ppm 첨가 수준에서 5 균주 모두 완전 증식억제 효과가 있었으며, D7, D8 획분의 경우 25 ppm 첨가수준에서 완전 증식억제 효과가 있었다.

D7 획분의 경우 전개용매(헥산 : 클로로포름 : 에탄올, 6:1:4)로 전개하여 황산 발색시 3~4개의 spot으로 분리되었으며, 발색시 색깔이 진하게 보이는 주요 분리 대상 물질이 없이 3~4개의 spot이 고르게 분포되어 있었다. 그러나 D8 획분의 경우  $R_f$  0~0.1 사이에 뚜렷한 갈색물질이 관찰되면서, 그 수율도 우수하였으므로 D8 획분을 2차 분리용 시료로 선정하였다.



Fig. 3. Thin section of *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 showing normal cell wall taken by transmission electron microscope (100kV).

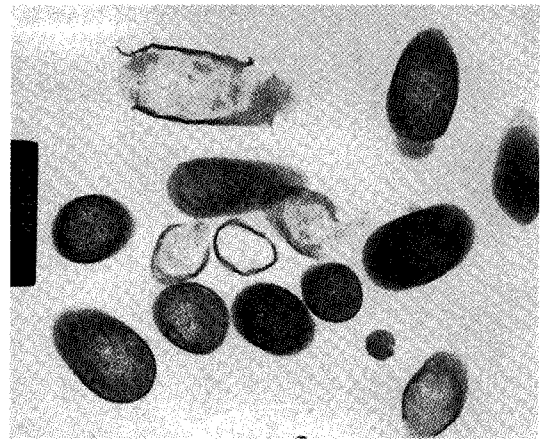


Fig. 4. Thin section of *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 treated by purified D8-2-5 fraction isolated from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai showing cell wall disruption taken by transmission electron microscope (100kV).

### 관중 분획물의 2차 column chromatography 후 얻은 소획분들의 항균효과

관중 핵산 분획물을 1차 column chromatography하여 얻은 소획분을 핵산 : 클로로포름 : 에틸아세테이트 : 메탄올 : 아세트산(8:2:2:1:0.5)의 용매계로 2차 silica gel column chromatography를 실시한 결과, 총 8개의 소획분을 얻었고(D8-1~D8-8), 용해시킨 각각의 소획분을 10 및 25 ppm 수준으로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5 균주에 대하여 항균효과를 실험한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4와 같이 4개의 소획분 D8-1~D8-4는 25 ppm 첨가수준에서 *L. monocytogenes* 5 균주 모두에 대하여 완전 증식억제 효과가 있었으며, 10 ppm 첨가수준에서는 5 균주 모두 12 시간까지 균증식 억제를 보이다가 그 이후에는 균이 증식되는 것을 관찰할 수 있었다.

항균효과가 비슷한 4개의 소획분 중 D8-2 획분은 수율이 높고,  $R_f$  0.6에서 뚜렷한 band가 관찰되며 황산 발색시 갈색의 물질이 관찰되었으므로 D8-2 획분을 3차 분리용 시료로 선정하였다.

### 관중 분획물의 3차 PTLC 후 얻은 소획분들의 항균효과

관중 핵산 분획물을 2차 column chromatography하여 얻은 D8-2 획분을 핵산 : 에틸아세테이트 : 부탄올(13:3:2)의 용매계로 PTLC를 실시한 결과 총 5개의 소획분을 얻었고(D8-2-1~D8-2-5), 용해시킨 각각의 소획분을 10 및 20 ppm 수준으로 배지에 첨가하여 항균효과를 관찰한 결과는 Table 5와 같다.

Table 5에서 보면 D8-2-4와 8-2-5 획분을 20 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* 5 균주 모두 균증식을 완전히 억제시켰고, D8-2-4 획분의 경우 10 ppm 첨가시 5 균주 모두 증식억제 효과가 없었다. D8-2-5 획분은 10 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* ATCC 19113, ATCC 19114의 증식을 24시간 동안 억제하였으며, *L. monocytogenes* ATCC 19111은 36시간, *L. monocytogenes* ATCC 19112와 ATCC 15313에 대해서는 48 시간 동안 균증식을 억제하였다.

이들 결과를 종합해 볼 때 관중에서 분리한 D8-2-5 획분의 항균활성은, 용해성이 높고 독성이 낮기 때문에 식품보존

제 또는 산화제로서 가장 많이 사용되는 유기산 중에서 acetic acid와 propionic acid를 2000 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* Scott A의 성장을 완전히 억제했다는 결과<sup>(14)</sup>와 영글과즙 acetone 추출물을 1500 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* ATCC 19111의 성장을 완전히 억제하였다는 결과<sup>(15)</sup>보다도 그 항균력이 월등하였다.

소획분 D8-2-5를 핵산 : 에틸아세테이트 : 부탄올(6:3:2)의 용매계로 TLC상에서 전개시킨 후 UV상에서 관찰해 본 결과  $R_f$  0.42인 단일점적으로 관찰되었고, 황산 발색시 동일  $R_f$  상에서 갈색물질이 관찰되었으므로, 순수 분리된 물질로 추정되었다.

### 단일물질로 추정된 D8-2-5 획분의 살균효과

Bioscreen C를 이용한 O.D. 측정은 균수가  $10^5$  CFU/mL 이하에서의 균증식 양상은 관찰할 수 없기 때문에 항균물질의 살균효과와 정균효과를 알아보기 위해 표준한천배양법으로 생균수를 측정하였다.

단일물질로 추정되며 그 항균효과가 인정된 D8-2-5 획분의 항균활성을 Bioscreen C로 관찰하였을 때의 최소 증식 저해농도(MIC)인 20 ppm을 액체배지에 첨가하여 32°C에서 72 시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 생균수를 측정하였고, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보면 D8-2-5 획분을 첨가하지 않은 대조구에 비해 20 ppm 첨가시 *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. monocytogenes* ATCC 19112, *L. monocytogenes* ATCC 19114 및 *L. monocytogenes* ATCC 15313의 경우 모두 균수가 6 log cycle 정도 감소하였다. *L. monocytogenes* ATCC 19113은 24 시간 경과 후 그 균수가 초기 균수에 비하여 4 log cycle 정도 감소하였고, 또한 72 시간까지 *L. monocytogenes* ATCC 19112를 제외하고, 균수가 꾸준히 감소하는 경향을 보였으며, ATCC 19112도 그 증식이 미미하였다.

D8-2-5 획분의 *L. monocytogenes*에 대한 항균효과는 예덕 나무에서 분리한 linolenic acid(MIC 50 ppm)<sup>(16)</sup>와 섬바디에서 분리한 falcarindiol(MIC 30 ppm)<sup>(17)</sup>보다도 우수한 천연 항균

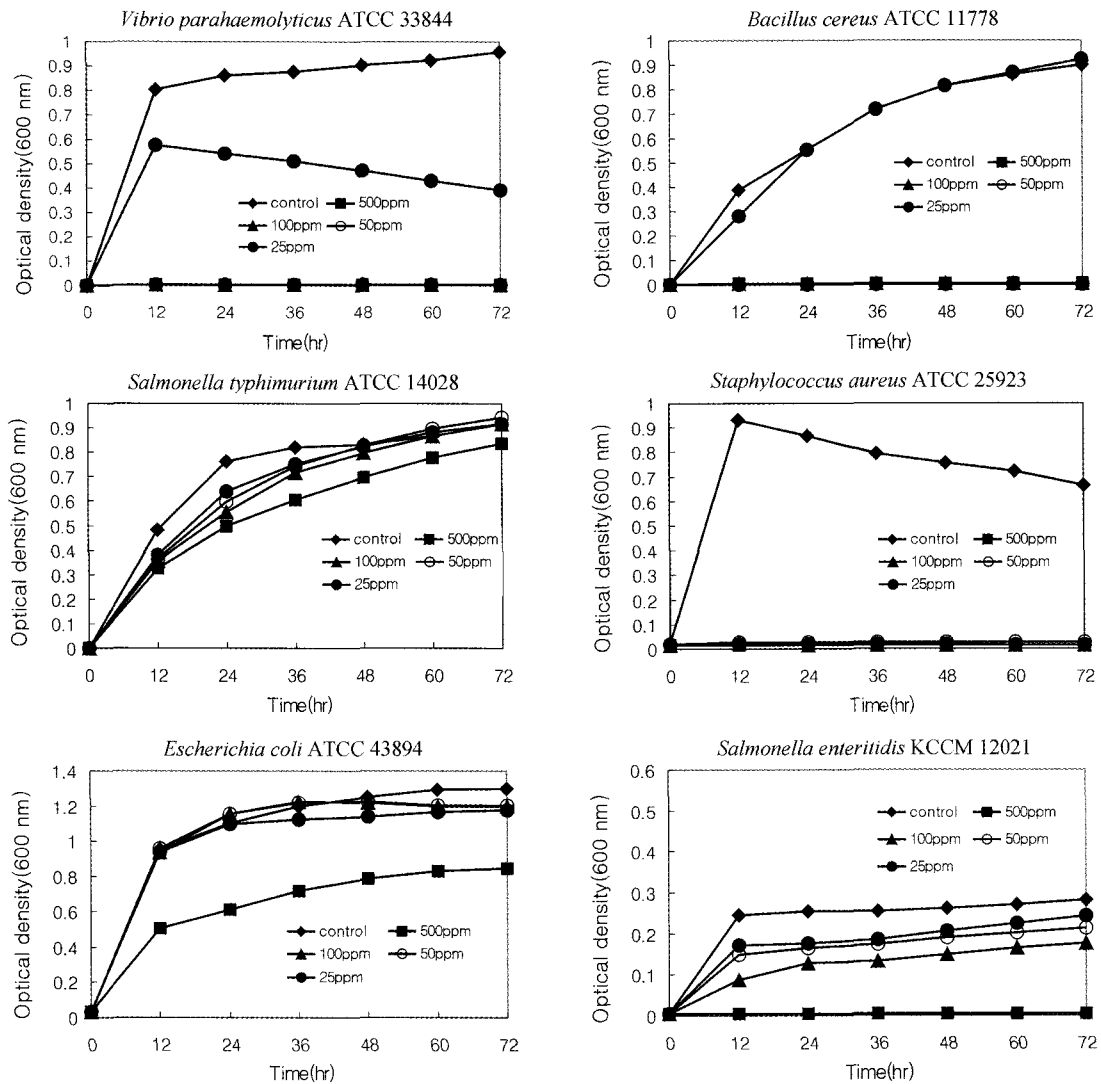


Fig. 5. Growth inhibition by n-hexane fraction of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on several food-borne microorganisms for 72 hr.

물질임을 알 수 있다.

#### D8-2-5 획분 처리시 세포내·외의 ATP 함량변화

관중에서 분리된 D8-2-5 획분을 20 ppm 첨가한 배지에 *L. monocytogenes* ATCC 19113을 증식시키면서 균체내와 균체 외의 ATP 함량을 측정하였다. 세포내의 ATP 함량의 경우 D8-2-5 획분을 첨가하지 않은 세포내 ATP 함량을 100%로 보았을 때, D8-2-5를 처리한 세포내 ATP 함량은 4.85%로 그 양이 현저하게 감소하였고, 세포외의 ATP 함량의 경우 D8-2-5 획분을 첨가하지 않은 세포외의 ATP 함량을 100%로 보았을 때, D8-2-5를 처리한 세포외의 ATP 함량은 740%로 그 양이 현저하게 증가하였다(결과는 나타내지 않음).

이 결과로 보아 D8-2-5 획분은 *L. monocytogenes*의 세포벽 파괴 또는 이상을 일으켜, 균체내에 있는 ATP가 균체 밖으로 용출됨에 따라 그 항균효과를 나타낸다고 볼 수 있다. 이와 같은 결과는 allyl isothiocyanate의 *L. monocytogenes*에 대한 살균효과를 관찰<sup>(10)</sup>한 결과와 같은 경향을 보이고 있는데, allyl isothiocyanate의 *L. monocytogenes*에 대한 항균작용으로 세포벽의 파괴를 확인하였다. D8-2-5 획분을 처리하는

경우도 어느 형태로든 세포벽의 파괴 혹은 이상 현상이 일어났음을 알 수 있고, 이 결과로 보아 D8-2-5 획분의 항균 효과는 정균(靜菌)이 아닌 살균(殺菌)효과가 있을 것으로 추정된다.

#### D8-2-5 획분 처리시 세포의 형태변화

관중 D8-2-5 획분의 살균에 관여하는 기작을 확인하고자 D8-2-5 획분을 20 ppm 농도로 첨가하여 32°C에서 12시간 증식시킨 균체의 표면을 관찰한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. Fig. 3에서 보면 관중 D8-2-5 획분을 처리하지 않은 *L. monocytogenes*의 세포를 관찰한 결과 균체의 표면이 매끄럽고 세포 내부의 내용물이 정상적으로 차있는 형태를 관찰할 수 있었고, 관중 D8-2-5 획분을 처리한 세포를 관찰한 결과 (Fig. 4) 세포의 세포막 구조가 깨지면서 세포내 내용물이 유출된 것을 관찰할 수 있었다. 이는 상백피 추출물이 *L. monocytogenes*에 대하여<sup>(18)</sup>, grape fruit 종자 추출물이 *Salmonella choleraesuis* 등 미생물의 세포막을 파괴하여 미생물의 세포내 내용물이 유출되면서 항균효과를 나타낸다는 보고<sup>(19)</sup>와 유사한 현상으로 볼 수 있다.

## 관중의 항균 스펙트럼

관중의 핵산 분획물은 *L. monocytogenes*에 대해 우수한 항균효과를 보였으므로 *L. monocytogenes* 이외의 다른 6종의 식중독균에 대한 항균 spectrum을 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다.

*V. parahaemolyticus*와 5종의 식중독균에 관중 핵산 분획물을 25, 50, 100, 500 ppm씩 첨가했을 때 *V. parahaemolyticus*와 *B. cereus*의 경우 50 ppm 첨가시 균증식을 완전히 억제시켰으며, *S. aureus*의 경우 25 ppm 첨가시에도 균증식이 완전히 억제되었다.

그러나 *E. coli* O157:H7과 *S. enteritidis*, *S. typhimurium*의 경우에는 관중 핵산 분획물의 첨가농도에 비례적으로 균증식이 억제되는 경향을 보였으나, 배양기간이 경과할수록 대조구의 균증식과 같이 증식되는 것을 관찰할 수 있었다.

이들 결과를 종합해 볼 때 관중 핵산 분획물은 *V. parahaemolyticus*, *B. cereus*, *S. aureus* 등 식중독균의 증식을 억제할 수 있는 효과적인 식물추출물인 것으로 생각된다. 이는 녹차 추출물이 *B. subtilis*와 *B. cereus* 등에 대해 각각 500 ppm, 1000 ppm의 농도에서 뚜렷한 항균효과를 나타낸다는 결과<sup>(20)</sup>와 황백과 느릅뿌리 에탄올 추출물이 *B. cereus*와 *Lactobacillus plantarum*에 대해 1000~2000 ppm 범위에서 항균효과가 있었다는 결과<sup>(21)</sup>, 그리고 유백피 메탄올 추출물이 *B. cereus*와 *S. aureus*에 대해 300 ppm수준에서 항균효과가 있었다는 결과<sup>(22)</sup>보다도 관중 핵산 분획물의 항균효과가 우수함을 보여주고 있다. 그러나 Gram(-)균인 *E. coli* O157:H7 및 *S. enteritidis*와 *S. typhimurium*에는 비교적 그 효과가 낮았다.

## 요 약

관중 에탄올 추출물의 *Listeria monocytogenes* 5 균주에 대한 최소증식저해농도(MIC)는 100 ppm~500 ppm이었고, 핵산 분획물의 경우 MIC는 50 ppm 이하이었다. 핵산 분획물의 항균 활성물질을 분리, 정제하여 얻은 D8-2-5획분의 경우는 MIC가 20 ppm이었다. 항균활성이 인정된 D8-2-5획분의 살균효과를 알아보기 위해 생균수를 측정한 결과 초기 접종균수보다 4~6 log cycle 정도 감소하여 살균효과가 입증되었다. 또한 D8-2-5획분을 처리한 균체와 처리하지 않은 균체를 투과전자현미경으로 관찰했을 때 D8-2-5획분을 처리하지 않은 균체 세포벽의 비정상적인 형태를 관찰할 수 있었다. 또한 관중 핵산 분획물의 항균 spectrum을 관찰한 결과 *Vibrio parahaemolyticus*와 *Bacillus cereus*에 대하여 50 ppm 첨가 수준에서 균증식을 완전히 억제시켰으며, *Staphylococcus aureus*의 경우 25 ppm 첨가시에도 균증식이 완전히 억제되었다.

## 감사의 글

이 논문은 보건의료기술 연구개발사업(관리번호: HMP-99 F 06 0001, 식품중 각종 위해요인의 위해성 평가와 관리방안 수립에 관한 연구)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

## 문 헌

1. Seoul National University Natural Products Research Institute:

- Traditional Oriental Medicines Database (1996)
- Huang, K.C. Chemotherapy. pp325-326. In: The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press. Inc., Boca Raton, USA (1993)
  - Bae, K.H. The Medicinal Plants of Korea. pp25. Kyo Hak Pub. Co., Ltd. Seoul, Korea (2000)
  - Im, R.J. Encyclopedia of Chosun Medicinal Plant III. pp148-149. Hankukmoonwhasa, Seoul, Korea (1997)
  - Kang, B.J., Yang, K.S., Park, K.J. and Kim, M.H. Screening of antiviral activities of Korean medicinal herbs and traditional prescriptions against Herpes simplex virus type-1. J. Korean Soc. Virology. 27: 227-237 (1997)
  - Choi, H.K. Anti-allergic constituents from *Crassirhizomae Rhizoma*. M.S. Thesis, Chonnam National University, Kwangju, Korea (2000)
  - Do, D.S. Antibacterial components of *Dryopteris crassirhizoma* against a *Streptococcus mutans* OMZ 176. M.S. Thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea (1994)
  - Han, J.S. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by plant extract. M.S. Thesis, Chonbuk National University, Chonju, Korea (1995)
  - Choi, B.K., Kim, T.B., Shin, H.K. and Lee, S.B. Determination of intracellular ATP of bacteria on the surface of chicken. Korean J. Food Sci. Technol. 18: 88-92 (1986)
  - Ahn, E.S., Kim, Y.S. and Shin, D.H. Observation of bactericidal effect of allyl isothiocyanate on *Listeria monocytogenes*. Food Sci. Biotechnol. 10: 31-35 (2000)
  - Oh, J.A. Isolation and identification of growth inhibition substance on *Listeria monocytogenes* from *Dystaenia takesimana* Kitagawa. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 984-993 (1999)
  - Ahn, E.Y. Isolation and identification of antimicrobial active substance from edible plant extract. M.S. Thesis, Chonbuk National University, Chonju, Korea (1998)
  - Shin, D.H., Han, J.S. and Kim, M.S. Antimicrobial effect of ethanol extracts of *Sinomenium actum* (Thunb.) Rehd. et Wils and *Glycyrrhiza glabra* L. var. *Glandulifera* Regel et Zucc on *Listeria monocytogenes*. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 627-632 (1994)
  - Lee, S.H., Jo, H.S. and Kim, S.H. Effect of organic acids on growth and heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Korean Soc. Food Nutr. 23: 293-297 (1994)
  - Kim, Y.D., Kim, Y.J., Oh, S.W., Kang, Y.J. and Lee, Y.C. Antimicrobial activities of solvent extracts from *Citrus sudachi* juice and peel. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1613-1618 (1999)
  - Ahn, Y.S. Isolation and identification of antimicrobial substance from *Ruta graveolens* Linne and *Mallotus japonicus* Muell on *Listeria monocytogenes*. M.S. Thesis, Chonbuk National University, Chonju, Korea (2000)
  - Oh, J.A. Isolation and identification of growth inhibition substance on *Listeria monocytogenes* from edible plant and synergistic effect with monoglyceride. M.S. Thesis, Chonbuk National University, Chonju, Korea (1999)
  - Ahn, E.Y., Han, J.S. and Shin, D.H. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by pure compound isolated from extract of *Morus alba* Linne bark. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 1236-1240 (1997)
  - Cho, S.H., Lee, S.Y., Kim, J.W., Ko, G.H. and Seo, I.W. Antimicrobial activities of grapefruit seed extract. J. Food Hyg. Safety, 10: 33-37 (1995)
  - Roh, H.J., Shin, Y.S., Lee, K.S. and Shin, M.K. Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked rice putrefactive microorganism. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 66-71 (1996)
  - Lee, B.W. and Shin, D.H. Antimicrobial effect of some plant extracts & their fractionates for food spoilage microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 205-211 (1991)
  - Park, J.S., Shim, C.J., Jung, J.H., Lee, G.H., Sung, C.K. and Oh, M.J. Antimicrobial activity of *Ulm cortex* extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 1022-1028 (1999)

(2001년 1월 31일 접수)