

양치식물류의 메탄올 추출물에 항균활성 분석

신소림, 이철희*

충북대학교 원예학과

Antimicrobial Activities of Methanol Extracts Obtained from Several Ferns

So Lim Shin and Cheol Hee Lee*

Department of Horticulture, Chungbuk National University, Chengju 361-763, Korea

Abstract - Methanol extracts of the aerial and rhizome parts obtained from ten species of ferns has been screened for antimicrobial activities against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Antimicrobial activities were carried out using broth microdilution method and paper disc diffusion assay and the extracts which showed clear zones more than 15mm in concentration of 2 mg/disc were tested for its antimicrobial activities at the $0.125 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ concentration of each extract for three days. The non-sterilized crude methanol extracts of *Osmunda cinnamomea* var. *fokiensis* rhizome showed the highest antimicrobial activities on *B. subtilis*(39%), *E. coli* (33%) and *L. monocytogenes*(58%) at the concentration of $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ after 72 hours. In *P. acnes*, frond extract of *O. cinnamomea* var. *fokiensis* showed most vigorous antimicrobial activities in the all extracts but it showed weak activity(clear zone diameters below 15 mm). All extracts has the antimicrobial activities on *Streptococcus*, but they exhibited weak activity. At the concentration of $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, only *Osmunda japonica* rhizome extracts showed 28 and 39% of antimicrobial activities on *S. mutans* and *S. sobrinus* after 72 hours and the other extracts showed below 10% of antimicrobial activities on *S. mutans* and *S. sobrinus*.

Key words - *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus*

서 언

다수의 미생물이 식품의 변질을 유발하고 다양한 질병의 원인됨에 따라 항균물질의 사용이 증가하고 있다. 기존에는 주로 합성 항균물질을 사용하였으나(Yoon 등, 2009), 합성 항균물질의 체내 축적에 의한 암, 돌연변이 및 세포 독성 유발 등의 인체 부작용 및 과다 사용으로 인한 미생물의 내성 증가와 같은 위험성이 밝혀지면서, 천연물을 이용하여 항생제를 개발하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다(Bae 등, 1999; Sohn 등, 2000; Berg, 1998). 그 중 식물을 이용한 천연 항균제의 개발이 왕성한데, 이는 식물의 자기방어 기작과 관련된 2차 대사산물이 천연 항균제로써 잠재력을 가지고 있기 때문으로 알려져 있다(Agrios, 1988).

양치식물은 약 4억년 동안 다양한 환경변화에 적응하면서 flavonoids, steroids, alkaloids, phenols, triterpenoid,

amino acids 및 fatty acids 등 다양한 2차 대사산물을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며(Zeng-fu 등, 2008), 특히 다수의 양치식물에서 기타 고등식물에서는 발견되지 않는 독특한 구조의 flavonoids, phytoecdysteroids, triterpenes, polyphenols 등이 분리되어 보고되어 있으므로(Zhao 등, 2007; Shinozaki 등, 2008) 다른 식물보다 항균력이 우수할 것으로 예상된다.

본 연구에서 사용한 *Bacillus subtilis*는 식중독(Ryan과 Ray, 2004), 곡류 부패 및 변질(Jeon 등, 1998), 손상된 안구에 감염되어 결막염, 홍채염 등 만성화농증 유발(Hemady 등, 1990) 및 심내막염(Shin 등, 2005)의 원인으로 알려져 있다. *Escherichia coli*는 식중독(Bae, 2005), 기종성 신우신염과 신우염(Evanoff 등, 1987; Huang과 Tseng, 2000), 복막염(Lee 등, 2008), 무증상 세균뇨, 급성 방광염 및 재발성 방광염 등 방광염(Lee 등, 2007), 패혈증(Lim 등, 1998) 및 기종성 담낭염(Choi 등, 2007) 등을 유발하며,

*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

*Listeria monocytogenes*는 식중독(Mandell 등, 2000), 선회병(Vazquez-Boland 등, 2001) 및 심내막염(Park 등, 1997)을 유발하는 것으로 알려져 있다. *Propionibacterium acnes*는 여드름의 원인 중 하나로 알려져 있으며, 염증성 여드름에 의한 구진, 농포, 낭종, 결절, 및 반홍을 형성하는 주 원인으로 알려져 있다(Leeming 등, 1997; Layton, 2006). 또한 *Streptococcus mutans*와 *S. sobrinus*는 *mutans streptococci*(뮤坦스 연쇄상구균)의 일종으로 치아우식증(충치)를 유발하는 구강 미생물의 일종이다(Whitley와 Beighton, 1998).

본 연구는 우리 주변에 흔히 서식하면서 식품의 변질 및 다양한 인체의 질병을 유발하는 미생물의 생육을 효과적으로 억제할 수 있는 식물소재를 선별하기 위하여 시행하였다. 특히 항균력이 우수할 것으로 예상되지만 그 동안 국내에서 연구가 미흡했던 양치식물을 대상으로 다양한 항균 활성 탐색방법을 이용하여 조추출물 상태에서도 항균력이 우수한 식물소재를 선별하고자 하였으며, 각 식물의 부위 별 항균력을 분석하여 항균소재로 개발 가능한 식물 종과 적정 부위를 선별하여 식물유래 항균제를 개발하기 위한 기초자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

재료수집 및 추출

본 연구에서는 넉줄고사리과의 넉줄고사리, 점고사리과의 점고사리와 고사리, 고비과의 꿩고비, 음양고비 및 고비, 봉의꼬리과의 큰봉의꼬리, 사자잎봉의꼬리, 봉의꼬리, 알록큰봉의꼬리 등 총 4과 5속 10종의 양치식물을 연구재료로 하였다. 연구에 사용한 양치식물은 모두 각 자생지에서 수집한 다음 충북 청주시에 소재한 비닐하우스에서 2년 이상 재배한 것을 사용하였으며, 지상부는 잎의 성숙기

(2007년 7~10월), 근경은 하엽기(2008년 1월)에 수확하였다. 지상부는 포자가 없는 부분을 재료로 하였으며, 근경은 절단하여 내부가 녹색인 것을 선별하여 사용하였다.

수확한 양치식물은 선별한 다음 수세하여 동결건조기(FD8512, IlShin Lab. Co. Ltd., Korea)로 건조한 다음 분쇄하였다. 분쇄 시료는 메탄올과 함께 200 mL의 유리병에 담아 초음파수조(5510-DTH, Bransonic, USA)에서 30분 동안 초음파추출 하였다. 이 때 아크릴로 제작한 초음파수조의 덮개에 유리병의 뚜껑을 붙여 유리병이 초음파수조의 하단에 직접 닿지 않게 하였다. 추출 전 초음파수조의 수온은 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 이었으며, 추출하는 동안 수온은 $2.5 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ 상승하였다. 추출물은 여과지(Advantec No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Japan)를 사용하여 vacuum pump(GAST)로 감압여과하여 잔사를 제거하였으며, 질소 충전하여 -70°C (SW-UF-200, Samwon Engineering Co., Korea)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

미생물 배양

본 연구에 사용된 미생물은 총 6종이었으며, 모두 37°C 의 항온기에서 배양하였다(Table 1). 단, 혐기성 세균인 *P. acnes*는 접종한 다음 gas pak(AnaeroPack®, Mitsubishi gas chemical Co., Inc, Japan)을 넣은 밀폐용기에 넣어 배양하거나 broth 위에 멸균한 미네랄 오일을 도포하여 혐기조건에서 배양하였다.

Broth microdilution법을 이용한 항균활성 탐색

Broth microdilution법을 이용한 추출물의 항균활성 탐색은 Kim 등(2006)의 방법을 응용하여 수행하였다. 각 미생물은 실험 직전 650 nm에서 optimal density(O.D.)를 0.8로 조절하여 사용하였으며, 10종 양치식물의 지상부와 지하부의 추출물은 별도의 멸균과정을 거치지 않았다. 96

Table 1. List of strains and cultural conditions used in this study

Strains		Gram	Media	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Bacillus subtilis</i>		+	BHI broth	37.0 ± 0.5
<i>Escherichia coli</i>	KCTC 1467	-	BHI broth	37.0 ± 0.5
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19115	+	BHI broth	37.0 ± 0.5
<i>Propionibacterium acnes</i>	KCTC 3314	+	RCM broth	37.0 ± 0.5
<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065	+	BHI broth	37.0 ± 0.5
<i>Streptococcus sobrinus</i>	KCTC 3314	+	BHI broth	37.0 ± 0.5

^aIsolated from Chungbuk national university.

well-plate에 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 추출물 20 μL , broth 160 μL , 배양액 20 μL 를 넣어 multichannel pipette으로 고르게 섞은 후 24시간 동안 배양한 다음 Elisa(E max, Molecular Devices Corp., USA)로 650 nm에서 O.D.를 측정하였으며, 추출물의 항균활성을 다음의 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Antimicrobial activity (\%)} = [1 - (A / B)] \times 100$$

A: 실험 직후의 O.D. 값 –

24시간 배양 후의 추출물 처리구의 O.D. 값

B: 실험 직후의 O.D. 값 –

24시간 배양 후의 용매 처리구의 O.D. 값

Paper disc diffusion을 이용한 항균활성 텁색

제균하지 않은 추출물을 감압농축하여 DMSO로 농도를 조절 다음 멸균한 8 mm의 disc(Filter paper, Advantec Toyo Roshi International Inc., Japan)에 2 mg/disc의 농도로 주입하였으며, 용매를 휘발시켰다. 0.7%의 agar를 첨가한 soft agar broth에 650 nm에서 O.D.를 1.0으로 조절한 각 미생물 배양액을 1% v/v로 접종하였으며, magnetic stirrer로 고르게 섞어 준 다음 100×15 mm의 plate에 15 mL씩 분주하여 굳혔다. 미생물을 첨가한 배지를 plate에 분주한 다음 15분 이내에 추출물을 주입한 disc를 치상하였으며, 추출물의 배지 내 침투를 용이하게 하기 위하여 4°C의 냉장고에서 1시간 동안 배양한 다음 37°C의 항온기로 옮겨 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 8 mm disc의 직경을 포함한 clear zone을 측정하였으며, 추출물의 항균활성을 비교하기 위하여 20%로 농도를 조절한 lactic acid(Lactic acid; L-6661, Sigma, USA)를 대조구로 사용하였다.

추출물의 농도 및 배양시간별 항균활성 분석

추출물의 농도 및 배양시간에 따른 항균활성은 Moon 등(2008b)의 방법을 응용하여 분석하였다. -70°C에서 보관하던 추출물은 0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000 mg·mL⁻¹로 조절하여 사용하였다. 추출물에 DMSO가 2% 미만으로 첨가되도록 DMSO와 broth를 이용하여 희석하였으며, 별도의 제균처리는 하지 않았다. 650 nm에서 O.D.를 0.4로 조절한 미생물 배양액 100 μL 와 추출물 100 μL 를 96 well-plate에 주입한 후, multichannel pipette으로 고르게 섞어주었으며, 37°C의 항온기에서 배양하면서 0, 6,

12, 18, 24, 36, 48, 60, 72시간 간격으로 Elisa를 이용하여 650 nm에서 O.D.를 측정하였다. 농도별 추출물의 항균활성을 시간별 O.D.의 증가량을 그래프로 나타내어 추출물을 첨가하지 않은 대조구에서의 O.D. 증가량과 비교하였다.

결과 및 고찰

Broth microdilution법을 이용한 항균활성 텁색

6종의 식품 부패성 및 병원성 미생물에 대한 10종 양치식물의 지상부와 지하부 메탄을 추출물의 항균활성을 Table 2와 같다. *B. subtilis*의 생육은 지하부보다 지상부 추출물이 효과적으로 억제하였으며, 봉의꼬리, 음양고비 및 고비의 지상부 추출물은 90% 이상의 우수한 생육 억제효과를 보였다. 식품 부패 및 병원성을 가지는 *E. coli*와 *L. monocytogenens*에 대해서는 꿩고비의 지하부 추출물이 가장 우수한 항균활성을 보였다. 그 외에도 *E. coli*에 대해서는 봉의꼬리, 큰봉의꼬리, 고비, 고사리, 점고사리, 알록큰봉의꼬리의 지상부와 큰봉의꼬리 및 알록큰봉의꼬리의 지하부 추출물이 50% 이상의 항균활성을 보였으며, *L. monocytogenens*에 대해서는 봉의꼬리, 사자잎봉의꼬리 및 고비의 지하부와 꿩고비의 지상부 추출물이 50% 이상의 항균활성을 보였다. 반면 *P. acnes*에 대해서는 꿩고비의 지상부 이외에는 50% 항균활성을 나타내는 추출물이 없었다. 치아우식의 원인균인 *S. mutans*에 대해서는 알록큰봉의꼬리의 지하부가 68.09%로 가장 우수한 항균력을 보였으며, 그 외에도 알록큰봉의꼬리, 점고사리, 꿩고비의 지상부와 큰봉의꼬리, 고비 및 점고사리의 지하부 추출물이 50% 이상의 항균활성을 보였다. *S. sobrinus*에 대해서는 큰봉의꼬리의 지하부 추출물이 66.75%의 억제활성을 보여 가장 우수한 항균활성을 보였으며, 그 외에도 고비, 꿩고비, 봉의꼬리의 지상부와 지하부, 점고사리의 지상부 및 사자잎봉의꼬리, 음양고비의 지하부가 50% 이상의 항균활성을 보였다.

식물 종과 부위에 따라 항균력은 다르게 나타났으나, 고사리와 꿩고비의 지상부와 꿩고비, 넉줄고사리, 봉의꼬리, 알록큰봉의꼬리, 음양고비 및 큰봉의꼬리의 지하부는 연구에 사용한 6종 미생물의 생육을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 특히, 꿩고비의 지상부는 *L. monocytogenes*, *P. acnes*, *S. mutans*, *S. borinus*에 대하여 50% 이상의 항균력을 보였으며, 꿩고비의 지하부는 *B. subtilis*, *E. coli*,

Table 2. Antimicrobial activities obtained from methanol extract of ferns

Scientific name	Korean name	Part ^z	Antimicrobial activities (%) ^y					
			B ^x	E	L	P	M	S
<i>Davallia mariesii</i>	넉줄고사리	F	83.46	37.42	N.D. ^w	N.D.	10.95	26.76
		R	49.83	20.15	21.85	11.69	31.64	43.43
<i>Hypolepis punctata</i>	점고사리	F	14.16	52.25	N.D.	N.D.	61.85	61.18
		R	N.D.	27.20	18.08	N.D.	57.58	37.11
<i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>latiusculum</i>	고사리	F	67.78	54.91	7.02	23.73	28.03	38.94
		R	2.59	22.48	1.38	N.D.	8.21	19.62
<i>Osmunda cinnamomea</i> var. <i>fokiensis</i>	꿩고비	F	19.79	43.43	65.16	55.51	52.36	51.09
		R	58.08	67.10	72.88	34.13	45.49	59.52
<i>Osmunda claytoniana</i>	음양고비	F	92.23	N.D.	7.22	N.D.	19.61	13.79
		R	16.92	37.69	30.07	20.56	14.79	60.51
<i>Osmunda japonica</i>	고비	F	91.33	58.01	19.20	N.D.	44.65	56.84
		R	30.25	26.58	60.72	N.D.	59.80	62.40
<i>Pteris cretica</i>	큰봉의꼬리	F	83.84	64.29	1.01	N.D.	42.09	49.32
		R	54.27	52.98	8.85	4.46	61.91	66.75
<i>Pteris cretica</i> 'Wilsonii'	사자잎봉의꼬리	F	69.41	49.71	N.D.	N.D.	14.73	27.92
		R	25.10	N.D.	66.22	N.D.	34.27	61.76
<i>Pteris multifida</i>	봉의꼬리	F	93.47	66.81	29.32	N.D.	22.98	50.17
		R	44.70	37.90	71.40	15.14	37.15	60.52
<i>Pteris nipponica</i>	알록큰봉의꼬리	F	47.65	51.35	2.84	N.D.	64.31	62.13
		R	2.43	51.69	20.32	8.87	68.09	63.29

^xF: frond, R: rhizome.^yAntimicrobial activities in methanolic extraction of several ferns at 5 mg·mL⁻¹.^zB: *Bacillus subtilis*, E: *Escherichia coli*, L: *Listeria monocytogenes*, P: *Propionibacterium acnes*, M: *Streptococcus mutans*, S: *S. sobrinus*.^wNot detected.

L. monocytogenes, *S. sobrinus*에 대하여 50% 이상의 항균력을 보여 식물 추출물 중 항균 스펙트럼이 가장 넓고 항균력이 우수한 것으로 나타났다.

Paper disc diffusion법을 이용한 항균활성 탐색

상기의 연구에서 50% 이상의 항균활성을 보인 추출물을 대상으로 paper disc diffusion법을 이용하여 항균활성을 분석하였다(Table 3). 그 결과, *B. subtilis*에 대해서는 넉줄고사리의 지상부 추출물이 20%의 lactic acid와 유사한 억제환을 보여 항균활성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 한편 broth microdilution법으로 항균력을 검정했을 때 항균력이 가장 우수한 것으로 나타난 꿩고비의 지하부 추

출물은 넉줄고사리 지상부 추출물보다 항균력이 낮게 나타났다. *E. coli*에 대해서는 꿩고비 지하부의 추출물이 항균활성이 가장 우수하였으나, 20%의 lactic acid보다 항균력이 다소 낮은 것으로 나타났다. 또한 96-wall plate를 이용하여 측정했을 때에는 항균력이 비교적 우수하였던 점고사리, 큰봉의꼬리, 고비, 고사리, 봉의꼬리 및 알록큰봉의꼬리의 지상부 추출물은 억제환을 형성하지 않았다. *L. monocytogenes*에 대해서는 꿩고비와 고비의 지하부 추출물이 17 mm의 억제환을 보여 항균력이 우수한 것으로 나타났으나, 20%의 lactic acid(22 mm)보다 항균력이 낮은 것으로 나타났다. 한편 2 mg/disc의 농도로 paper disc diffusion법으로 분석한 결과, *P. acnes*에 대하여 생육 억

Table 3. Antimicrobial activities of crude methanol extracts of ferns against various microbials

Scientific name	Part ^z	Clear zone (mm) ^y					
		B ^x	E	L	P	M	S
Lactic acid (20%)		19 ± 0.9	21 ± 0.6	22 ± 1.2	21 ± 0.6	21 ± 0.6	21 ± 0.0
<i>Davallia mariesii</i>	F	19 ± 0.6	- ^w	-	-	-	-
<i>Hypolepis punctata</i>	F	-	N.D. ^v	-	-	14 ± 0.9	11 ± 0.3
	R	-	-	-	-	13 ± 0.3	-
<i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>latiusculum</i>	F	11 ± 0.3	N.D.	-	-	-	-
<i>Osmunda cinnamomea</i> var. <i>fokiensis</i>	F	-	-	14 ± 0.9	N.D.	15 ± 1.0	13 ± 0.7
	R	18 ± 0.9	19 ± 0.9	17 ± 0.4	-	-	14 ± 0.7
<i>Osmunda claytoniana</i>	F	11 ± 0.7	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	19 ± 0.8
<i>Osmunda japonica</i>	F	12 ± 0.6	N.D.	-	-	-	13 ± 0.6
	R	-	-	17 ± 0.3	-	17 ± 0.3	16 ± 0.7
<i>Pteris cretica</i>	F	N.D.	N.D.	-	-	-	-
	R	12 ± 0.6	13 ± 0.9	-	-	16 ± 1.2	15 ± 0.3
<i>Pteris cretica</i> 'Wilsonii'	F	N.D.	-	-	-	-	-
	R	-	-	11 ± 0.7	-	-	13 ± 0.0
<i>Pteris multifida</i>	F	10 ± 0.3	N.D.	-	-	-	12 ± 0.3
	R	-	-	13 ± 0.3	-	-	11 ± 0.6
<i>Pteris nipponica</i>	F	-	N.D.	-	-	15 ± 0.3	12 ± 0.3
	R	-	13 ± 0.7	-	-	12 ± 0.6	12 ± 0.3

^zF=frond, R=rhizome.^ymm: disc diameter (8 mm) was included.^xB= *Bacillus subtilis*, E= *Escherichia coli*, L= *Listeria monocytogenes*, P= *Propionibacterium acnes*, M= *Streptococcus mutans*, S= *S. sobrinus*.^wNot available (under 50% of antimicrobial activities, refer to Table 1).^vNot detected.

제효과를 보이는 추출물은 없었다. *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대해서는 96-wall plate에서 50% 이상의 억제효과를 보였던 모든 추출물이 일정 크기 이상의 억제환을 보였으며, *S. mutans*에 대해서는 고비의 지하부 추출물, *S. sobrinus*에 대해서는 음양고비의 지하부 추출물이 가장 우수한 항균력을 보였다. 그러나 모든 추출물이 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에서 20%의 lactic acid보다 항균력이 낮은 것으로 나타났다.

본 연구 결과와 같이 다수의 연구에서 broth microdilution 법과 paper disc diffusion법으로 항균력을 측정했을 때 유사한 경향을 보이지만 항균력이 반드시 일치하지 않은

것으로 나타나는데(Kim 등, 2000; Moon 등, 2008a), 이는 broth microdilution법에서는 미생물의 균사 또는 포자 형성 등으로 인하여 O.D. 값을 정확하게 산출하기 어려운 경우가 있으며, paper disc diffusion법에서는 배지 내 습도 등으로 인하여 disc에 주입한 추출물 또는 항생제의 확산이 불규칙할 수 있기 때문이다(Moon 등, 2008a). 따라서 다양한 방법으로 항균물질의 항균력을 측정할 필요가 있는 것으로 생각된다.

추출농도 및 배양시간별 항균활성 분석

상기의 연구에서 50% 이상의 항균활성을 보이고 15 mm

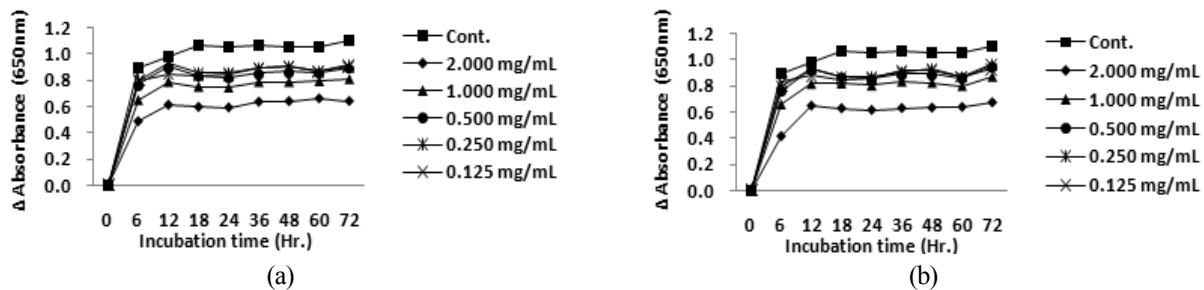


Fig. 1. Inhibitory effects of crude methanol extracts on the growth of *Bacillus subtilis*. A: Frond of *Davallia mariesii*, B: Rhizome of *Osmunda cinnamomea* var. *fokiensis*.

이상의 억제환을 형성한 추출물을 대상으로 $0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 72시간동안 각 미생물의 생육에 미치는 효과를 분석한 결과, 모든 추출물이 $0.125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서도 항균력을 보였으나 식물 종과 부위 및 대상 미생물에 따라 항균활성과 지속시간은 각기 달랐다. 내열성 포자를 생성하여 100°C 가량의 고온에서도 수십분 동안 생존할 수 있는 식품 부패성 미생물 (Ahn 등, 2000)인 *B. subtilis*에 대해서 항균성이 우수한 것으로 나타난 넉줄고사리의 지상부와 꿩고비의 지하부의 메탄올 조추출물은 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 72시간까지 각 42, 39%의 억제활성을 보였으며, 배양초기부터 *B. subtilis*의 생육을 빠르게 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). *E. coli*에 대해서는 꿩고비의 지하부 추추출이 항균활성이 가장 우수하였으나 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 33%의 비교적 낮은 억제활성을 보였다(Fig. 2). 꿩고비의 지하부 추출물을 *E. coli*와 함께 배양한 결과, 배양 6시간까지는 억제활성이 거의 나타나지 않아 꿩고비의 지하부 추출물은 *E. coli*의 증식기에 효과적으로 생육을 억제하지 못하여 항균활성이 낮은 것으로 생각되었다. 일반적으로 그람 음성균의 세포벽 구조가 그람 양성균보다 복잡하기 때문에 식물 추출물은 그람 양성균에서 항균활성이 높게 나타나는데(Smith-Palmer 등, 1998; Kitzberger 등, 2007; Boussaada 등, 2008; Michelin 등, 2009), 본 연구에서도 꿩고비의 지하부 추출물이 그람 음성균인 *E. coli*의 세포벽을 빠르게 침투하지 못하여 항균력이 낮게 나타난 것으로 생각되었다. *L. monocytogenes*에 대해서는 꿩고비와 고비의 지하부 추출물에서 생육억제활성이 가장 우수하였는데, $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 배양 72시간 후 각 58, 53%의 억제활성을 보였으며, $0.125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 낮은 농도에서도 배양 72시간 후에 각 34, 44%의 억제활성을 보였다(Fig. 3). *S. mutans*

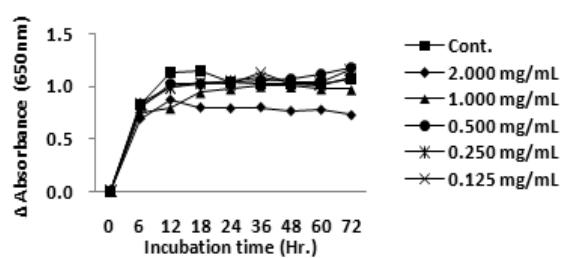


Fig. 2. Inhibitory effects of rhizome crude methanol extracts obtained from *Osmunda cinnamomea* var. *fokiensis* on the growth of *Escherichia coli*.

에 대해서는 상기의 연구에서 꿩고비와 알록큰봉의꼬리의 지상부와 고비와 큰봉의꼬리의 지하부가 항균활성이 가장 우수한 것으로 나타났으나, $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 고비의 지하부 추출물은 28%, 그 외 3종의 추출물은 10% 이하의 낮은 항균활성을 보였다(Fig. 4). *S. sobrinus*에 대해서는 음양고비, 고비 및 큰봉의꼬리의 지하부 추출물이 항균활성이 높은 것으로 나타났으나 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 농도에서 배양 72시간 후 고비 39%, 음양고비 11%, 큰봉의꼬리 6%로 항균활성이 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5).

일반적으로 항생물질이란 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 이하의 저농도에서 미생물의 생육을 억제하거나 사멸시키는 물질이라고 정의하는데(Lee, 2005), 본 연구에서 사용된 넉줄고사리, 꿩고비, 고비, 음양고비, 큰봉의꼬리 및 알록큰봉의꼬리의 추출물은 조추출물 상태에서도 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 이하의 농도에서도 일부 미생물의 생육을 억제시킬 수 있으므로 항균소재로 개발 가치가 있는 것으로 생각된다. 특히 꿩고비의 지하부 추출물은 *B. subtilis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*의 생육억제활성이 우수하고 10종 양치식물의 지상부와 지하부 추출물 중 항균 스펙트럼이 가장 높은 것으로 나타나 차후 다양한 방법으로 천연 항균물질로써의 개발 가능성에

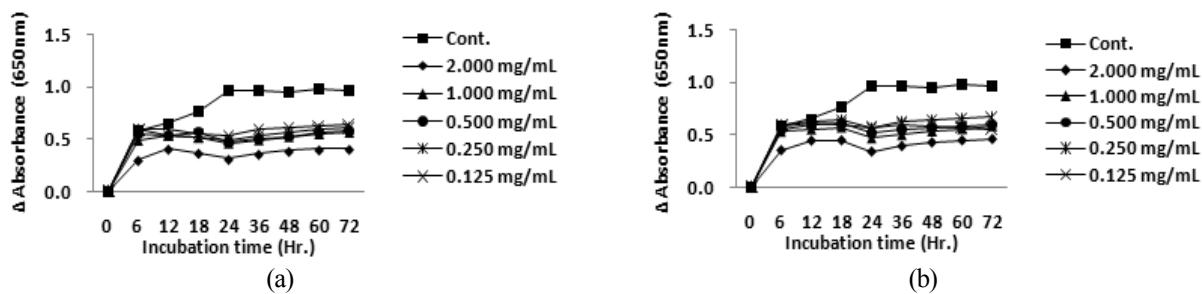


Fig. 3. Inhibitory effects of rhizome crude methanol extracts on the growth of *Listeria monocytogenes*. A: *Osmunda cinnamomea* var. *fokiensis*, B: *Osmunda japonica*.

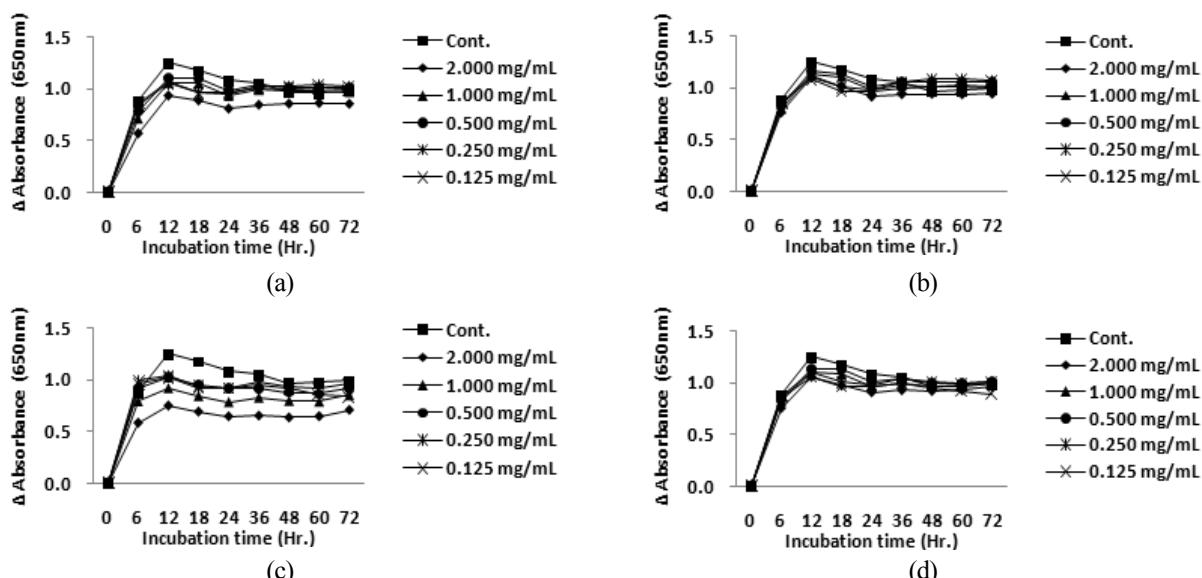


Fig. 4. Inhibitory effects of crude methanol extracts on the growth of *Streptococcus mutans*. A: Frond of *Osmunda cinnamomea* var. *fokiensis*, B: Frond of *Pteris nipponica*, C: Rhizome of *Osmunda japonica*, D: Rhizome of *Pteris cretica*.

대하여 연구할 필요가 있는 것으로 생각되었다.

적 요

10종 양치식물의 지상부와 지하부 메탄올 추출물을 대상으로 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* 등 병원성 미생물에 대한 항균활성을 broth microdilution법과 paper diffusion법을 이용하여 분석하였다. 억제환이 15 mm 이상으로 나타난 추출물을 대상으로 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg·mL⁻¹의 농도에서 3일 동안 각 미생물의 생육 억제에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, *B. subtilis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*에 대해서는

꿩고비의 지하부 추출물에서 억제활성이 가장 우수하였으며, 살균처리하지 않은 조추출물 상태에서 2 mg·mL⁻¹의 농도에서 72시간 이후에도 각 39, 33, 58%의 억제활성을 보였다. *P. acnes*에 대해서는 꿩고비 지상부 추출물이 가장 우수한 항균활성을 보였으나, 15 mm 미만의 억제환을 보여 항균력이 약한 것으로 나타났다. *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대해서는 다수의 양치식물이 비교적 우수한 항균활성을 보여 양치식물의 추출물은 전반적으로 *Streptococcus*에 대한 감수성이 높은 것으로 생각되었다. 그러나 고비의 지하부 추출물이 2 mg·mL⁻¹의 농도에서 72시간 후 각 28, 39%, 그 외의 추출물은 10% 내외의 낮은 항균활성을 보여 10종의 양치식물 추출물 중에는 *Streptococcus*에 대하여 뛰어난 항균력을 보이는 추출물은 없는 것으로 생각되었다.

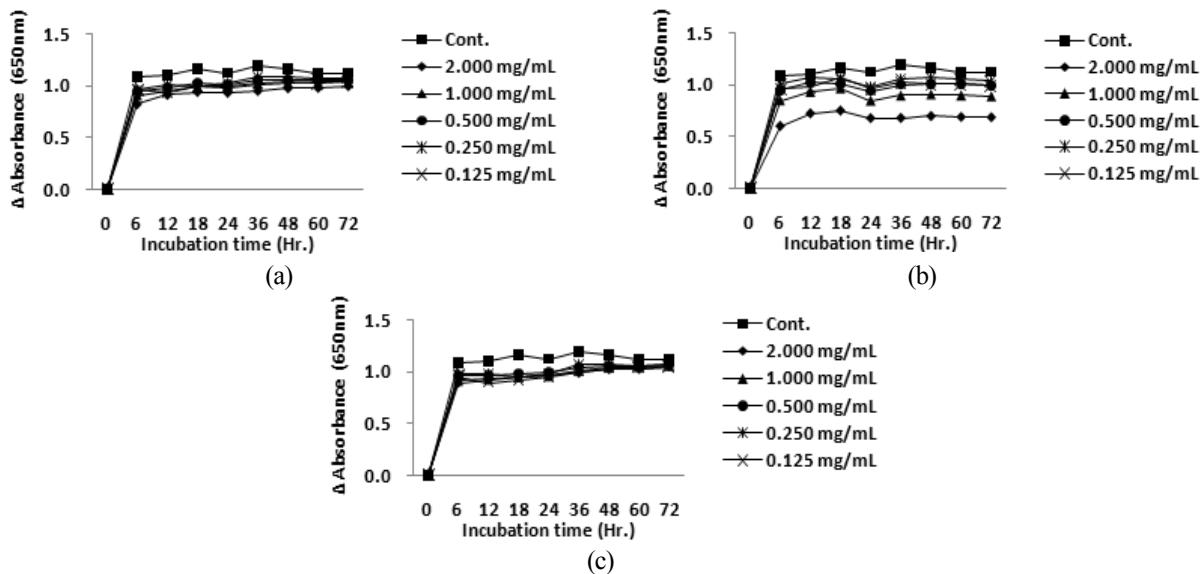


Fig. 5. Inhibitory effects of rhizome crude methanol extracts on the growth of *Streptococcus sobrinus*. A: *Osmunda claytoniana*, B: *Osmunda japonica*, C: *Pteris cretica*.

사사

이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Agrios, G. N. 1988. Plant Pathology. Academic Press. Inc., New York. p. 325-450.
- Ahn, D.J., Y.S. Kwak, M.J. Kim, J.C. Lee, C.S. Shin, and K.T. Jeong. 2000. Screening of herbal plant extracts showing antimicrobial activity against some food spoilage and pathogenic microorganisms. J. Medic. Crop Sci. 8:109-116(in Korean).
- Bae, J.H. 2005. Antimicrobial effect of *Hedyotis diffusa* extracts on food-born pathogens. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 34:107-112(in Korean).
- Boussaada, O., S. Ammar, D. Saidana, J. Chriaa, I. Chraif, M. Daami, A.N. Helal, and Z. Mighri. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. Microbiol. Res. 163:87-95.
- Choi, Y.H., H.A. Bae, E.K. Eo, and G.Y. Jung. 2007. Death due to sepsis in emphysematous cholecystitis. J. Kor. Surg.

- Soc. 72:250-253(in Korean).
- Evanoff, G.V., C.S. Thompson, R. Foley, and E.J. Weinman. 1987. Spectrum of gas within the kidney: emphysematous pyelonephritis and emphysematous pyelitis. Am. J. Med. 83:149-54.
- Hemady, R., M. Zaltas, B. Paton, C.S. Foster, and A.S. Baker. 1990. Bacillus-induced endophthalmitis: new series of 10 cases and review of the literature. Br. J. Ophthalmol. 74:26-29.
- Huang, J.J. and C.C. Tseng. 2000. Emphysematous pyelonephritis: clinicoradiological classification, management, prognosis, and pathogenesis. Arch. Intern. Med. 160:797-805.
- Jeon, Y.O., K.H. Kim, S.I. Kim, and Y.S. Han. 1998. Screening if antimicrobial activity of the plantain(*Plantago asiatica* L.) extract. Kor. J. Soc. 14: 498-502(in Korean).
- Kim, H.J., H.W. Lim, S.W. Choi, and C.S. Yoo. 2006. Antimicrobial effect of ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *Propionibacterium acnes*. J. Soc. Cosmet. Scient. Kor. 32:201-208(in Korean).
- Kim, Y.S., H.J. Lee, J.R. Lee, B.K. Kang, W.I. Lee, Y.C. Kil, J.T. Suh, and H.J. Suh. 2000. Comparative evaluation of fluconazole susceptibility methods for *Candida* species -Broth microdilution test, E test and disk diffusion test-. Kor. J. Clin. Pathol. 20:36-40(in Korean).
- Kitzberger, C.S.G., A. Smania Jr., R.C. Pedrosa, and S.R.S.

- Ferreira. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake(*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *J. Food Engin.* 80:631-638.
- Layton, A.M. 2006. A review on the treatment of acne vulgaris. *Int. J. Clin. Pract.* 60:64-72.
- Lee, M.H. 2005. Antibiotics. Shin-II Books, Seoul(in Korean).
- Lee, S.G., J.B. Cho, Y.B. Shon, S.W. Park, S.J. Kim, D.K. Jin, and K.H. Paik. 2008. Peritoneal dialysis associated peritonitis and empirical antibiotics therapy in Korean children with chronic renal failure. *J. Kor. Soc. Pediatr. Nephrol.* 12:213-220(in Korean).
- Lee, S.J., S.J. Kim, Y.H. Choi, Y.N. Woo, B.W. Kim, S.G. Chang, M.E. Kim, C.S. Kim, J.G. Lee, B.S. Sim, H.J. Kim, B.H. Chung, I.R. Cho, and S.D. Lee. 2007. Safety of Uro-Vaxom treatment for patients with recurrent cystitis: an open multicenter study. *Kor. J. Urol.* 48:428-432(in Korean).
- Leeming, J.P., J.E. Sanaim, and J.L. Burton. 1997. Susceptibility of *Malassezia furfur* subgroups to terbinafine. *Br. J. Dermatol.* 137:764-767.
- Lim, W.H., J.H. Shin, S.P. Suh, and D.W. Ryang. 1998. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis using differential quantitative blood cultures. *Kor. J. Clin. Pathol.* 18:208-214(in Korean).
- Mandell, G.L., J.E. Bennett, and R. Dolin. 2000. Principles and practice of infectious disease. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Michielin, E.M.S., A.A. Salvador, C.A.S. Riehl, A.Smânia Jr., E.F.A. Smânia, and S.R.S. Ferreira. 2009. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Biores. Thechnol.* 100:6615-6623.
- Moon, S.K., D.H. Shin, J.S. Choi, K.H. Kim, and K.J. Kim. 2008a. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Kor. J. Med. Mycol.* 13:61-74(in Korean).
- Moon, Y.G., C.Y. Song, I.K. Yeo, G.Y. Kim, and M.S. Heo. 2008b. Antibacterial activities of *Suaeda maritima* extract. *J. Life Sci.* 18:776-781(in Korean).
- Park, B.G., I.S. Chun, Y.P. Rhee, S.Y. Choi, K.R. Kim, S.H. Jang, J.Y. Hwang, D.J. Choi, B.G. Seo, S.H. Kim, and S.J. Kim. 1997. A case of *Listeria monocytogenes* endocarditis in apparently healthy adult. *Kor. Circul. J.* 27:671-676(in Korean).
- Ryan, K.J. and C.G. Ray. 2004. Sherris medical microbiology. McGraw Hill, New York.
- Shin, J.H., S.K. Sung, J.D. Shim, H.R. Kim, S.W. Park, and J.N. Lee. 2005. A case of *Paenibacillus alvei* cellulitis in immunocompetent patient. *Kor. J. Lab. Med.* 25:53-55(in Korean).
- Shinozaki, J., M. Shibuya, K. Masuda, and Y. Ebizuka. 2008. Squalene cyclase and oxidosqualene cyclase from a fern. *FEBS Lett.* 582:310-318.
- Smith-Palmer, A., J. Stewart, and L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:118-122.
- Vazquez-Boland, J.A., M. Kuhn, P. Berche, T. Charaboty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:584-640.
- Whiley, R.A. and D. Beighton. 1998. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* 13, 195-216.
- Zeng-fu, L.I., H. Huil, Z. Hang-yi, and Z. Jun-chen. 2008. Review on the extraction of flavonoids from fern. *J. Sanm. Univ.* 25:22(in Chinese).
- Zhao, Z., J. Jin, J. Ruan, C. Zhu, C. Lim, W. Fang, and Y. Cai. 2007. Antioxidant flavonoid glycosides from aerial parts of the fern *Abacopteris penangiana*. *J. Nat. Prod.* 70:1683-1686.

(접수일 2010.6.28; 수락일 2010.10.2)