

구강위생균에 대한 연(*Nelumbo nucifera*)의 부위별 · 용매별 항균활성

이은수[†] · 한영숙

성신여자대학교 식품영양학과

Anti Oralmicrobial Activity of Various Extracts from Parts of Lotus (*Nelumbo nucifera*)

Eun-Soo Lee[†] and Young-Sook Han

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

Abstract

Anti oralmicrobial effects of *Nelumbo nucifera* were determined against *S.mutans*, *S.sobrinus*, *F.nucleatum*, and *A.actinomycetemcomitans* using paper disc method, minimum inhibitory concentrate (MICs). Extracts of lotus leaf showed the highest yield. MeOH extract is 21%, Chloroform fraction is 4.2%, ethylacetate fraction is 8.2%, water fraction is 19%. Different parts such as flower, leaf, seed and pod showed antimicrobial effects against *S.mutans*, with flower and seed extracts showing strong antimicrobial effect against *S.sobrinus* KCCM11897. Leaf extract(1000pm concentration) showed over 50% inhibitory effect against *S.mutans* and *S.sobrinus* KCCM11897. Flower extract showed over 40% inhibitory effect against *F.nucleatum* and *A.actinomycetemcomitans*. MICs of flower extract against *S.sobrinus* KCCM11897,11898 and leaf extract against *S.mutans*, *S.sobrinus* KCCM11897 were 625 µg/ml, indicating *Nelumbo nucifera* extract can exert antimicrobial activity even at low concentration. All extractes with heat at 120°C had antimicrobial activity, which means that is a very stable substances. *F.nucleatum* and *A.actinomycetemcomitans* was stable against acid it had a trend that the more alkali side was the lower activity.

Key words : lotus, *Nelumbo nucifera*, Anti oralbacteria, cariogenic bacteria, periodontal disease

1. 서 론

연(*Nelumbo nucifera*)은 수생식물 중 부엽식물에 속하는 쌍떡잎 식물으로서 아시아 남부, 북 호주가 원산지이며 생약명은 연(蓮)으로 열매는 9~10월경에 타원형의 수과(樹果)가 까맣게 익는다. 7~8월에 홍색, 백색의 꽃이 피고, 직경 15~20 cm이며 화경(花梗)은 엽병(葉柄)처럼 가시가 있고 끝

에 1개의 꽃이 달린다. 10월에 열매가 익으며 견과(堅果)는 타원형이고 길이 2 cm 정도로서 먹을 수 있다(Borsh T 등 1994). 주로 연못이나 늪에서 자라며 논에서 재배되는 연잎은 원형으로 큰 잎이 뿌리줄기에서 나온다. 자르는 잎 뒷면의 중앙부에 달리며 가시 같은 돌기가 있고 꽃잎과 더불어 수면 위에 떠서 펼쳐진다(Min Hu 등 2002). 연(*Nelumbo nucifera*)의 과실 또는 종자(種子)를 연자(蓮子), 연의 성숙한 종자의 녹색 배아를 연자심(蓮子心), 연의 수술을 연수(蓮鬚), 잎을 하엽(荷葉), 근경(뿌리줄기)을 우(藕), 근경의 마디를 우절(藕節)이라고 한다. 연의 성분으로는 진통작용, 진정작용이 있는 roemerine, nuciferin, arnepavin, N-normuciferine, pronuciferine, N-methylcoclaurine, leucodelphindin, nelunboside,

[†] Corresponding author: Eun-Soo Lee, Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's Univ., Dongseon-dong 3-ga, Seongbuk-gu, Seoul, 136-742, Korea
Tel: 82-2-920-2065
E-mail: lesook85@naver.com

gluconic acid, 10-nonacosanol, dehydrooemerine, dehydronuciferine, dehydroanonaine, N-methylisococlaurine, N-methylcoclaurine, 주석산, 구연산, 호박산, 탄닌 등이 알려져 있다(Yuk 1990). 연은 예로부터 차와 술로 많이 이용하였다. 꽃으로는 연화차를, 잎으로는 하엽차를, 뿌리로는 연근차를 만들어 음용했고 인엽주라고 하여 연꽃잎을 넣어 향기로운 술로 만들었다(Kim YS 등 2002). 음식의 경우 연근정과, 연근찜, 연근전, 연근죽 등의 요리에 주로 쓰였으며 생식으로도 이용해왔다(Tuka Ono 등 2006). 인도와 중국을 중심으로 열대, 온대의 동부아시아를 비롯한 한국, 중국, 일본 등에 널리 분포하고 있으며 관상용 식물뿐만 아니라 양양적 음식으로써 중요한 역할을 하고 있다. 연에 관한 지금까지의 연구결과를 보면 Bhat R 등(2008)이 연에 함유된 영양성분 분석결과를 발표했고, Rai S 등(2006)은 연씨의 항산화 효과, Chiang PY와 Luo YY 등(2007)은 연뿌리의 조리 시 물성의 변화를 연구하는 등 연에 관한 연구가 일부 이루어졌으나 비교적 최근에 진행되어 초기단계라고 할 수 있다.

치아우식증이란 치아의 표면에 부착한 치면세균막 내의 세균에 의해 치아의 경조직이 파괴되는 병변으로 세균에 의해 생성된 유기산에 의해 치질의 무기질 성분(칼슘염)이 탈회되고, 다시 세균으로부터의 효소에 의해 유기질 성분이 분해되는 것이다(Kim YK 등 1998).

치아우식증의 유발원인으로는 식품의 구성성분, 플라그 내에 서식하는 Streptococcus mutans, Lactobacilli 등의 박테리아, 타액, 미네랄과 불소와 같은 미량 원소들이다. 각 인자의 관여도는 서로 다르며, 치아나 치면의 형태와 구조에 따라 개인차이가 나타난다. 치아우식증은 치태 내 세균이 치아표면에 부착하는 것에서부터 시작된다. 음식물에 함유된 sucrose가 유입되면 치아표면에 glucosyltransferase(GTase)를 생산하고, 불용성 포도당 중합체(glucose polymer)인 glucan을 합성함으로써 치아표면에 치면세균막(dental plaque)을 형성해나간다. 그리고 결국 충치균등의 유해세균이 발효에 의해 lactic acid나 citric acid등의 산을 생성함으로써 에나멜 층을 부식시켜 치아손실이 발생한다(Islam B 등 2007). 이러한 구강질환을 억제하기 위하여 가장 광범위하게 사용되는 방법으로는 1) bisbiguanide계의 chlorhexidine, 2) 유기 또는 무기불소 도포 3) 최근 항충치 효과로 연구된 D-xylitol, xylitol, D-sorbitol 등의 당 대체 물질이 있다(Park KG 1999).

그러나 최근 소비자들은 건강 지향적 욕구의 증대와 안정성에 대한 의식 고조로 이러한 합성 향균제에 대한 기피현상이 강하게 일고 있으며 천연유래의 향균제에 대한 선호인식이 높아지고 있다. 천연 유래의 향균제 중 전통의학에서는 주위에서 흔히 구할 수 있는 자생식물인 연의효능에 대해 강조하고 백련잎의 꼭지를 따서 섭취하면 잇몸질환을 억제하여 충치, 구취에 효과가 있다고 전해지고 있으나 아직 과학적 입증이 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 연을 부위별로 분리하여 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥의 추출물에 대한 항충치 및 구취예방 효과를 탐색해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥은 2009년 8월에서 9월 사이 충청북도 (보은연꽃농장)에서 수집하고 대한식물도감(Lee CB 1999)을 참고로 하여 동정하였다. 동정된 연은 증류수로 2~3회 수세한 뒤 물기를 제거한 후 7일간 음건 하였고 분쇄기(HMF-340, Hanil, Korea)로 분쇄한 후 50 mesh standard sieve size를 통과시켜 추출용 시료로 사용하였다. methanol, chloroform, ethylacetate는 Jusei(Japan)사와 Duksan(Korea)사의 시약을 사용하였다. 항균성 측정을 위한 paper disc는 Whatman(USA)사의 제품을 사용하였으며 membrane filter는 Advatec(USA)사의 제품을 사용하였다. 배지는 Trypticase Soy Agar(BBL, Becton Dickinson, MD, USA.)와 Trypticase Soybean Broth (BBL, Becton Dickinson, MD, USA.)를 사용하였고, 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받아 계대하여 37°C incubator에서 24시간 배양하였

Table 1. List of microorganism and media used for antimicrobial activity tests

Microorganism	Media	Temperature (°C)
Cariogenic bacteria, Gram(+)		
<i>Streptococcus mutans</i> KCCM 40105	TSA, TSB	37
<i>Streptococcus sobrinus</i> KCCM 11897		
<i>Streptococcus sobrinus</i> KCCM 11898		
Cariogenic bacteria, Gram(-)		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> KCCM 42108	TSA, TSB	37
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> KCCM 41632		

다. Incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였다.

2. 항균 검색용 추출물의 추출조건

시료에 가장 적합한 추출조건을 찾기 위하여 메탄올 농도, 추출시간, 추출용매 등의 조건별로 각각 추출한 다음 여과(Whatman No.2)하여 rotary vacuum evaporator(Eyela N-1NW, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 50℃에서 감압 농축, 건조하여 수율을 측정하였다. 또한 수율을 측정한 건조물은 용매에 녹여 적당한 농도로 희석하여 항균활성에 사용하였다.

메탄올 농도별 추출 조건을 결정하기 위하여 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥을 각각 500 g에 50, 70, 95, 99.5%의 메탄올을 중량 10배를 가해 상온에서 24시간 추출한 후 여과액을 감압 농축, 건조하여 수율 및 항균활성을 측정하였다. 또한 메탄올의 추출 시간별 항균력을 알아보기 위하여 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥에 메탄올 중량의 10배를 가하고 추출시간이 6, 12, 18, 24시간이 되도록 순차적으로 여과하여 감압농축, 건조 후 수율 및 항균활성을 측정하였다.

3. 용매에 따른 분획물의 제조

연꽃, 연잎, 연씨, 연밥의 추출물 조제는 조제된 연의 분말시료와 methanol을 1:10(w/v)의 비율로 혼합하여 실온에서 6시간 동안 3회 반복하여 교반 추출하였다. 이 추출액을 여과지(Whatman No.2)로 여과한 후 회전 진공 증발기(Rotary evaporator R-124, BUCHI, Switzerland)로 45℃의 수욕상에서 감압 농축하였다.

methanol 추출물은 극성에 chloroform, ethylacetate 및 water로 Fig. 3에 나타난 바와 같이 순차적으로 용매 분획하였다. 즉 methanol 추출물에 10배의 증류수와 n-hexane을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 n-hexane 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 chloroform, ethylacetate, butanol, water 층을 분획하여 각각의 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 3회 반복 실시하였다. 각 분획물은 해당 용매로 용해시켜 0.45 μm membrane filter로 제균한 후 4℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 고형분의 함량은 농축된 분획물 1 mL을 취하여 105℃에서 건조 후 증발 잔사량을 계산하였다 (Fig. 1).

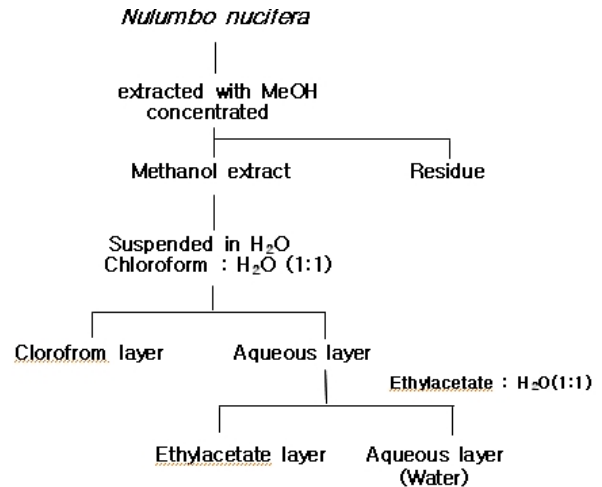


Fig. 1. Scheme of extraction and solvent fractionation of methanol extract from *Nulumbo nucifera*

4. 추출물과 분획물의 항균력 측정

세균에 대한 항균력을 측정하기 위하여 paper disc methods를 이용하였다. 각 균주를 백금으로 취하여 10의 broth에 접종하고, 37℃에서 18시간 동안 배양하여 활성화시켰다. 이 활성화된 균주는 10 μL를 TSB배지에 도말하였다. 그리고 멸균된 paper disc (6.0mm diameter and 1.0mm thickness, Whatman AA disc, England)에 1.0mg/disc의 농도로 각 추출물을 흡수시켜 추출용매에 휘발시키고 난 후, 균주를 도말한 TSA 배지 표면 위에 놓아 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 disc 주위의 inhibition zone의 직경 (mm)을 측정하였다. 대조군으로 DMS를 같은 부피로 흡수시켜 휘발시킨 disc를 사용하였고 위 실험은 3회 반복 측정하였다.

5. 농도별 미생물 생육 저해곡선 측정

연 추출물의 생육저해 농도 측정은 농도별 항균력 측정과 마찬가지로 Turbidimetric assay로 하였다. 즉, 균이 활성화된 10 mL의 TSB 배지에 추출물과 분획물을 농도별로 첨가하고 37℃에서 배양하면서 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48시간이 되는 때에 650 nm에서 microplate reader (Biolog Inc. USA)로 흡광도를 측정하였다.

6. 미생물의 성장 저해율 측정

미생물의 성장 저해 측정은 TSB 배지 10 mL에 추출물을 1000 ppm 농도로 주입하고, 각 균주의 활성액을 0.1 mL 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 microplate reader(Biolog Inc. USA)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하고 다음 식을 이용하여 성장 저해율(%)을 확인하였다.

$$\% \text{ inhibitory effect} = \frac{[(\text{Control-Control Blank}) - (\text{Treatment-Treatment Blank})]}{(\text{Control-Control Blank})} \times 100$$

7. 추출물의 최소저해농도 측정

각 균주의 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)는 broth microdilution method(Amsterdam D. 1996)을 통해 다음과 같이 결정하였다. 즉, well plate에 BHI를 100 µL 씩 분주하고 100 µL의 추출물을 two-fold dilution하여 농도를 조절한 후 균의 농도를 2×10⁴~10⁵ CFU/mL첨가하였다. 그 후 37°C에서 24시간 배양한 뒤, 650 nm에서 microplate reader(Biolog Inc. USA)로 흡광도를 측정하였다. 혼탁이 나타나지 않은 well의 해당 시료 농도를 MIC값으로 결정하였다.

8. 열 및 pH 안정성 측정

추출물의 열 안정성을 측정하기 위해 40, 80, 100, 120°C에서 1시간 동안 열처리한 후 처리 온도별로 추출물의 농도가 1mg/disc가 되도록 paper disc method로서 항균력 측정 방법과 동일하게 측정하였다. pH 안정성은 pH에 따라 용매를 2, 5, 7, 9, 11로 조정한 후 시료를 가하고 37°C에서 1시간 동안 방치한 다음 pH 7로 중화시켜 열 안정성과 동일한 방법으로 측정, 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 연 추출물과 용매별 분획물의 추출수율

연 시료의 methanol 추출물과 용매별 분획물의 수율은 Table 2와 같다. 연의 각 부위 중 연잎 추출물의 수율이 가장 높았는데 연잎의 methanol 추출물 수율은 21% 였다. 추출물의 용매별 수율은 chloroform 분획물은 4.2%, ethylacetate

분획물은 8.2%, water 분획물은 19% 내외로 비교적 높은 수율을 나타내었다. 즉, methanol, water, ethylacetate, chloroform 순으로 수율이 감소하였다.

Table 2. Extraction yield of various solvents from different parts of *Nulumbo nucifera*

Sample	Extraction yield (%) ^a			
	Methanol	Chloroform	Ethylacetate	Water
Flower	17.22	5.22	4.53	1.24
Leaf	21.45	4.23	8.26	19.13
Seed	9.83	1.83	5.92	6.73
Pod	8.93	1.81	2.45	4.36

^a Extraction yield(%) = [solid content(g) in extract / solid content(g) in raw material (dry weight)] × 100

2. 시료 추출 조건의 결정

메탄올 농도별 연꽃 추출물의 5종의 균주에 대한 항균활성은 methanol 50% 농도에서 가장 항균성이 높게 나타났고, 그 다음으로 70, 95%의 농도 순으로 높게 나타났다. 연잎 추출물에서는 50, 70, 95%의 농도에서 거의 비슷한 항균성을 보였고, 연씨 추출물은 70%의 농도에서 전반적으로 가장 높게 나타났다. 연밥 추출물은 50과 70%에서 항균활성이 높았다. 즉, 메탄올 농도가 높아질수록 추출 수율은 증가하나 항균활성이 감소하였는데 이는 쌍화차의 에탄올 50% 농도가 지는 가용성 고형분이 높아지고 그 이상의 농도에서는 낮아졌다는 보고(Cho KY 1989)와 구기가, 당귀, 오미자, 오갈피 등의 식물성분 추출물이 에탄올의 농도가 높을수록 추출물의 가용성 고형분은 낮아지나 항균력이 높아졌다고 한 결과(Oh SL 등 1993)와 유사하였다. 이와 같은 결과에 따라 연의 각 부위별 추출의 최적화를 위하여 연꽃과 연잎은 50%로, 연씨와 연밥은 70%의 농도의 메탄올 농도로 추출하기로 결정하였다.

추출시간에 따른 영향을 살펴보기 위하여 6시간 단위로 추출하였을 때 시간에 따른 항균활성은 연꽃 추출물의 경우 6시간 추출에서 가장 높았고 추출이 오래 진행 될수록 항균력이 감소하는 결과를 나타내었다. 연잎 추출물 역시 6과 12시간에서 가장 높았고 시간이 지남에 따라 약간 감소하는 경향을 보였다. 연씨와 연밥 추출물은 12시간에서 항균성이

높게 나타났으나 24시간 추출에서는 항균성이 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 수율은 6시간부터 증가하기 시작하였으나 12시간 이후부터는 거의 변화가 없고 24시간 추출에서는 오히려 그 활성이 감소하는 것으로 보아 12시간 이내에 추출이 모두 이루어지는 것으로 보인다. 이에 따라 항균 활성 물질의 추출 조건으로 연꽃, 연잎은 50%, 그리고 연씨, 연밥 추출물은 70%의 메탄올 농도로 상온에서 12시간 추출하는 것이 경제성 및 추출수율을 고려할 때 가장 효과적인 것으로 여겨진다.

3. 분획물의 항균력

Table 3에서 나타난 것과 같이 3종의 용매 분획 중 ethylacetate 분획추출물이 5종의 실험 균주에 대하여 다른 분획물에 비해 비교적 광범위한 항균력을 나타내었으며 특히, 증치균의 80~90%를 차지하는 *S. mutans*의 성장을 저해했다. 또한 chloroform 추출물도 비교적 활성이 우수하였으며 *F. nucleatum*의 특정균에서 공통적으로 항균활성이 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과는 절경이의 MeOH 추출물을 n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 물 등을 순차적으로 분획한 결과와도 유사하게 나타났다(Jeon YO 등

1998). 이러한 증치, 구취균에 대한 항균력과 특히 ethylacetate 분획물에서 항균성이 높게 나타 난 이유는 연의 페놀성분에 기인한 것으로 판단된다. 식물세포에 존재하는 생리활성 물질 중 페놀성 성분들은 천연 항산화제로서 뿐만 아니라 항균성을 가지고 있다는 보고(Kim OM 등 2003)에 따라 연에 함유 되어 있는 페놀성 물질에 의해 항균효과가 나타났다고 사료 된다. 이는 연잎 추출물의 항균효과(Lee KS 등 2006)를 검색한 연구결과에서 총 페놀함량을 AOAC법에 의해 살펴본 결과 ethylacetate에서 가장 페놀함량이 높게 나타났고, 그 다음으로 chloroform, hexane, water 순으로 높게 나타났다는 연구결과에서도 뒷받침 된다.

4. 생육 저해곡선

추출물들이 *S. mutans*의 생육특성에 미치는 영향은 연의 각 부위별 모든 추출물에서 생육저해가 나타났고 연꽃과 연씨 추출물은 4시간의 유도기에서는 농도 별로 차이를 보이지 않다가 8시간에 접어들며 농도 증가에 따른 효과를 보이기 시작했다.

추출물들이 *S. sobrinus* KCCM11897의 생육특성에 미치는 영향은 연씨 추출물은 12시간 이전까지는 균 증식이 높아져

Table 3. Antimicrobial activities of various solvent fractions originated from different parts (flower, leaf, seed and pod) of *Nulumbo nucifera*

Part	Fraction	Strains				
		<i>S. mutans</i>	<i>S. Sobrinus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Flower	Methanol	+++	+++	+++	+++	+++
	Chloroform	-	+	+	+	-
	Ethyl acetate	++	+++	+++	+++	-
	Water	-	-	-	-	-
Leaf	Methanol	+++	+++	+++	+++	+++
	Chloroform	-	+	++	++	-
	Ethyl acetate	+++	+++	+++	+++	+++
	Water	-	-	-	-	-
seed	Methanol	++	++	++	++	++
	Chloroform	++	++	-	++	-
	Ethyl acetate	++	-	++	++	-
	Water	-	-	-	-	-
Pod	Methanol	++	+++	+++	++	++
	Chloroform	++	-	-	++	+
	Ethyl acetate	+++	+++	++	++	+
	Water	-	-	-	-	-

- : No inhibition (6 mm) + : Very slight inhibition (6~7 mm)
 ++ : Moderate inhibition (7~9 mm) +++ : Heavy inhibition (9~11 mm)

6 이은수 · 한영숙

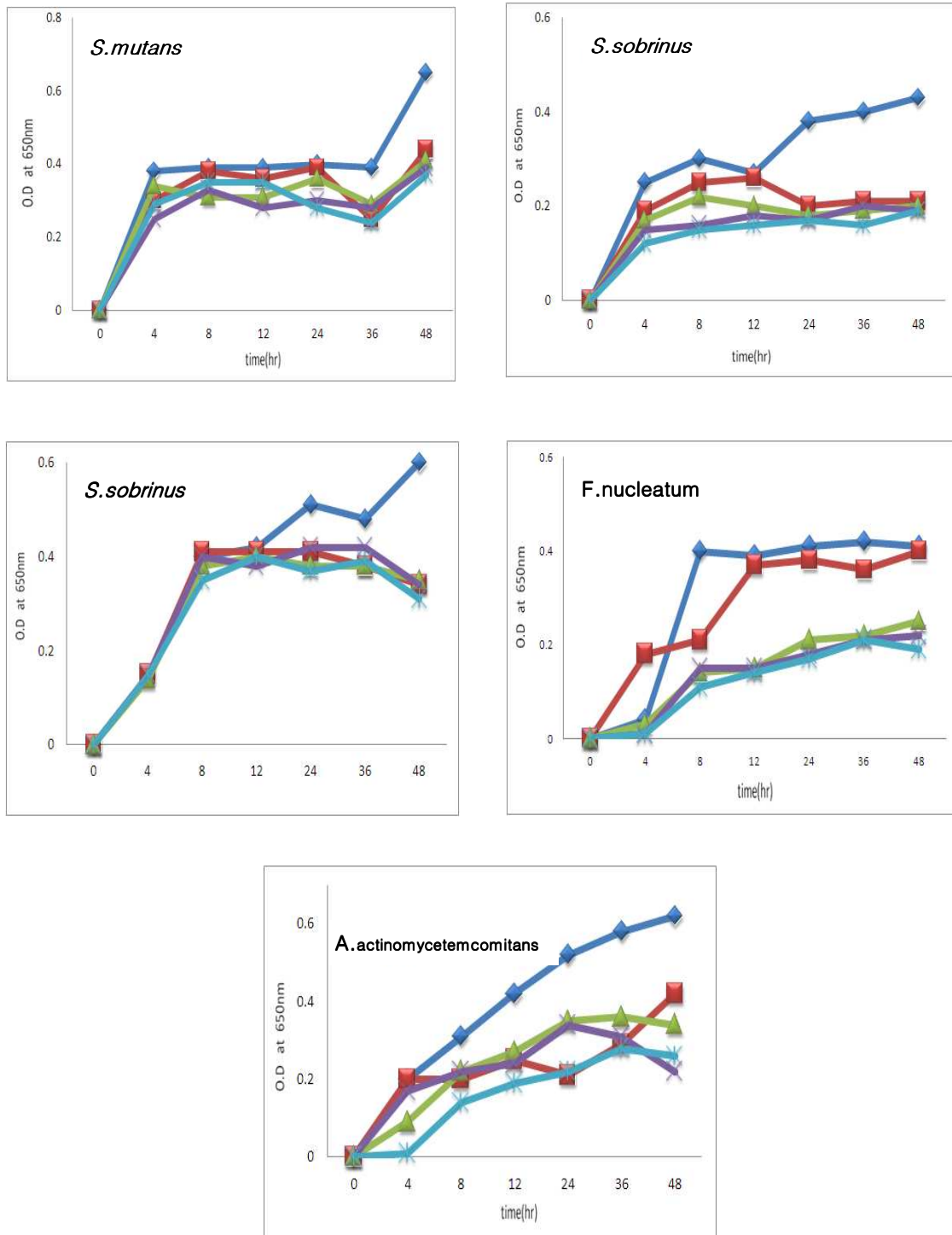


Fig. 2. Growth curves of *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sobrinus*, *F. nucleatum*, and *A. actinomycetemcomitans* by the addition of leaf extracts of *Nulium bonucifera*

(◆: 0 ppm, ■: 100 ppm, ▲: 250 ppm, ×: 500 ppm, *:1000 ppm)

대조구와 큰 차이가 없었으나 250, 500, 1000ppm의 농도에 서는 28시간 이후에 균 증식이 상당히 억제됨을 알 수 있었다. 연의 각 부위 중에서는 연꽃과 연잎 추출물에서 생육 저해가 가장 잘 나타났고 연잎 추출물에서는 생육저해를 나타내기는 하였으나 시간이 흐를수록 농도 별 영향력이 줄어드는 결과를 나타내었다. 연밥 추출물에서는 대조군과 비교하여 거의 생육저해가 나타나지 않아 *S.sobrinus* KCCM11897에 대한 항균효과가 검증되지 않았다.

추출물들이 *S.sobrinus* KCCM11898의 생육특성에 미치는 영향은 모든 추출물에서 대조군과 비교하여 생육 저해 효과가 나타났다. 특히 연씨에서 항균효과가 가장 좋은 것으로 나타났고 농도에 의해 항균효과가 증가함을 알 수 있었다. 한편, 연꽃은 다른 농도에서는 생육 저해를 보였으나 100 ppm 농도의 추출물을 넣었을 때는 오히려 대조군 보다 생육이 촉진 되었다. 이와 같은 결과는 Baek 등(2002)의 왕대 줄기추출물의 시간경과에 따라 생육저해효과를 연구한 결과와 유사하였으며 그 이유는 낮은 농도의 추출물이 오히려 균의 생육을 촉진시키기 때문 이라고 사료 된다.

사용된 추출물들이 *F.nucleatum*의 생육특성에 미치는 영향은 8시간에서 급격히 균의 성장이 촉진되는 특성을 보였는데 연잎은 그 성장을 강력히 저해하는 효과를 가져왔다. 연씨 추출물은 처음 12시간 까지는 생육 저해를 보 이다가 그 이후 효과가 감소하여 대조군과 거의 비슷한 곡선을 나타 냈고 이 균에 대하여 연밥 추출물은 항균효과를 거의 보이지 않았다.

실험에 사용된 추출물들이 *A.actinomyetemcomitans*의 생육특성에 미치는 영향은 모든 추출물에서 생육 저해 효과가 나타났으며 연씨는 *S.mutans*와 마찬가지로 4시간의 유도기에서는 저해효과를 보이지 않다가 8시간에서 농도에 따른 항균효과를 나타내기 시작하였다. 모든 추출물 중 연잎에서의 항균효과가 가장 컸으며 이는 paper

disc의 결과와도 유사한 경향을 나타냈다. 모든 추출물 중에서 가장 효과가 우수하였던 연잎 추출물의 각 균주별 생육 곡선은 Fig. 2에 나타낸 바와 같다.

그람양성균과 그람음성균의 전반적인 항균 활성의 비교에서는 그람양성균인 *S.mutans*와 *S.sobrinus*가 그람음성균인 *F.nucleatum*와 *A.actinomyetemcomitans*에 비해 각 농도에서 흡광도가 더 낮게 나타나 항균활성이 높았음을 알 수 있었다. 이는 Nakamura S(1999)등이 보고한 바와 같이 그람 양성균의 세포벽은 펩티도글리칸이 표면에 노출되어 항균 물질과 쉽게 결합되어 항균성을 나타내지만, 그람음성균은 lipopolysaccharide를 주성분으로 하는 외막이 peptidoglycan을 보호하여 항균물질이 결합되기 어렵기 때문에 항균성이 낮은 것으로 생각된다.

5. 미생물의 생육저해율

연꽃, 연잎, 연씨, 연밥의 추출물의 농도를 1000ppm으로 하여 TSB배지에 첨가한 후 미생물에 대한 생육저해를 알아보기 위하여 흡광도를 측정 한 후 식에 따라 저해율을 구하였다. 그 결과 모든 추출물에서 높은 생육 저해 효과를 나

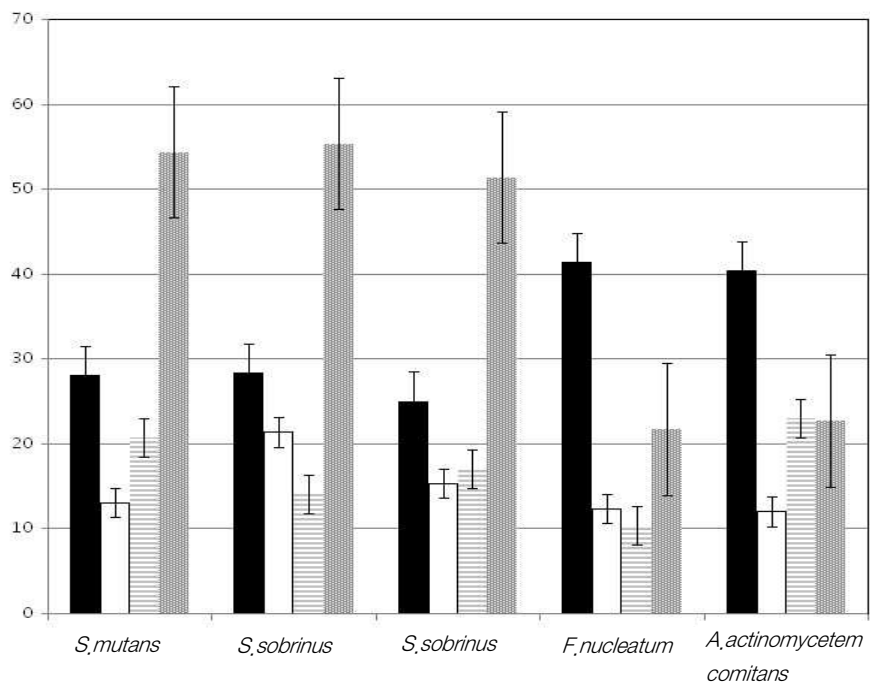


Fig. 3. Inhibitory effect of Nulumbo nucifera against microorganisms for 24 hr at 37°C (■:flower □:seed ▨:pod ■:leaf)

Table 4. Minimum inhibition concentration of the extract of *Nulumbo nucifera* against several microorganisms

Sample	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>S. mutans</i>	<i>S. Sobrinus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Flower	2500	625	625	2500	1250
Seed	ND	2500	2500	ND	ND
Pod	ND	ND	2500	1250	1250
Leaf	625	625	1250	625	ND

ND : Not Detected

타냈고, 그 중 연잎의 methanol 추출물은 균주에 대하여 50% 이상의 강력한 생육 저해율을 보여 가장 효과가 높게 나타났다. 그 다음으로 연꽃 추출물에서는 *F.nucleatum*과 *A.actinomycetemcomitans* 균주에서 모두 40% 이상의 높은 항균활성을 나타내었다. 연씨와 연밥 추출물에서도 모든 균주에 대해 생육 저해율을 보였으나 20% 이하의 비교적 낮은 수준이었다(Fig. 3).

6. 최소저해농도

각 추출물에 대하여 broth microdilution 법을 시행하여 균의 최소저해농도를 측정할 결과는 Table 4와 같았다. 연꽃은 *S.sobrinus* KCCM11897, KCCM11898에 대해서 625 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 MIC 값 중 가장 낮은 값을 나타내어 적은 양으로도 항균 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 연잎 추출물 역시 높은 항균활성을 보였는데 *S.mutans*, *F.nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans* 세 균주에서 625 $\mu\text{g/mL}$ 의 값을 나타내어 항균 효과가 우수함을 나타내었다. 이는 Han YS(2005)의 동백나무 추출물을 이용한 MIC 결과에서도 *Staphylococcus aureus*가 625 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 낮은 값을 나타내어 항균효과의 우수성을 검증한 결과와 유사하였다. 연씨와 연밥 추출물에서는 대부분 2500 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 MIC값이 나타나 항균활성이 낮음을 알 수 있었다.

7. 안정성

연의 각 추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 40, 80, 100, 120 $^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 1시간 동안 열처리 한 결과 모든 열처리 균에서 대조군과 차이가 거의 없는 항균 활성을 나타내었다. 120 $^{\circ}\text{C}$ 이상에서 그 활성이 약간 낮아지는 추출물도 있었으나

미약한 수준이었고 *F.nucleatum*을 제외한 모든 추출물에서 항균활성이 있는 것으로 보아 연 추출물은 열에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다. 연의 각 추출물의 pH 변화에 대한 항균 활성을 조사하기 위하여 methanol 추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조절하고 1시간 동안 처리한 결과 각각의 추출물은 각 pH 조건에 대하여 대조군과 비교 시 항균활성에 있어 차이가 나타나지 않아 pH 안정성이 매우 우수함을 알 수 있었다. 한편 *S.sobrinus* KCCM11897, *S.sobrinus* KCCM11898은 산성에 대해서는 안정한 반면 알칼리 쪽으로 갈수록 항균활성이 낮아지는 경향을 나타냈으나, 활성을 완전히 잃지 않고 비교적 높은 양상을 나타내었다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 치주질환과 충치 예방을 위한 연의 부위별 항균효과를 탐색하기 위한 목적으로 국내에 자생하는 연 시료를 부위별로 연꽃, 연잎, 연씨, 연밥으로 구분하여 충치, 구취 관련 미생물 5종 (*S.mutans*, *S.sobrinus* KCCM11897, *S.sobrinus* KCCM11898, *F.nucleatum*, *A.actinomycetemcomitans*)에 대한 항균활성을 살펴보았다. 용매별 항균효과를 살펴보았을 때 3종의 용매 분획 중 ethylacetate 분획 추출물이 5종의 실험 균주에 대하여 clear zone이 비교적 넓어 높은 항균효과를 나타내었으며, 특히 *S.mutans*의 생육을 강력하게 억제했다. 연의 부위별 추출물을 이용하여 균의 생육도를 균주별로 조사한 결과 모든 추출물은 *S.mutans*의 생육을 억제하였다. 또한 연꽃과 연씨 추출물은 *S.sobrinus* KCCM11897의 생육저해를, 연씨 추출물은 *S.sobrinus* KCCM11898, 연잎추출물은 구취유발균인 *F.nucleatum*과 *A.actinomycetemcomitans*

의 성장을 저해하였다. 생육저해율을 확인한 결과 연잎 추출물은 *S. mutans*와 *S. sobrinus* KCCM11897 균주에 대하여 50% 이상의 강력한 생육 저해율을 보여 가장 효과가 높게 나타났다. 균의 최소저해 농도(MIC)를 측정된 결과는 연꽃 추출물이 *S. sobrinus* KCCM11897, KCCM11898에 대해 625 µg/mL의 농도로 MIC값 중 가장 낮은 값을 나타냈고, 연잎 역시 *S. mutans*와 *S. sobrinus* KCCM11897에서 625 µg/mL의 값을 나타내어 적은 양으로도 항균활성을 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Amsterdam D. 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media: Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, V. pp 52-111. Fourth Edition: Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian (ed). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA
- Baek JW, Chung SH, Moon GS. 2002. Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. *Korean J Food Sci Technol* 34(6):1073-1078
- Bhat R, Sridhar KR. 2008. Nutrition quality evaluation of electron beam-irradiated lotus (*Nelumbo nucifera*) seeds. *Food Chem* 107(1):174-184
- Borsh T, Barthlott W. 1994. Classification and distribution of the genus *Nelumbo adans* (*Nelumbonaccae*). *Beitr Biol Pflazen* 68:421-450
- Chiang PY, Luo YY. 2007. Effects of pressurized cooking on the relationship between the chemical composition and texture changes of lotus root (*Nelumbo nucifera*). *Food Chem* 105(2):480-484
- Cho KY. 1989. Studies on extraction conditions of SSANH WHA tea. *J Korean Soc Food Nutr* 18(1):34-39
- Han YS. 2005. Antimicrobial Effects of *Camellia Japonica* L. leaves extract on food-borne pathogenic microorganisms. *Korean J Food Sci Technol* 37(1):113-121
- Islam B, Khan SN, Khan AU. 2007. Dental caries: From infection to prevention. *International medical journal of experimental and clinical research* 13(11):196-203
- Jeon YO, Kim KH, Kim SI, Han YS. 1998. Screening of antimicrobial activity of the plantain extract, *Korean Soc Food Sci* 14(5):498-502
- Kim YK, Han MD. 1998. *Dental microbiology*. Komoon Publishing Co. pp261-283
- Kim YS, Jeon SS, Jeong ST. 2002. Effect of lotus root powder on the baking quality of white bread, *Korean J Food Cookery Sci* 18(4):413-425
- Kim OM, Ha DJ, Jeong YJ. 2003. Antibacterial activity of vinegars on *Streptococcus mutans* caused dental caries. *Korean J Food Preserv* 10(4):565-569
- Ko BS, Jun DW, Jang JS. 2006. Effect of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves on insulin action and secretion *in vitro*. *Korean J Food Sci Technol* 38(1):114-120
- Lee CB. 1999. *Korean Plants Pictorial Book*. Hyangmoon Publishing Co. Korea. pp79-81
- Lee KS, Kim MG. 2006. Antioxidative activity of ethanol extract from lotus leaf. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 35(2):182-186
- Lee KS, Oh CS, Lee KY. 2006. Antimicrobial effect of the fractions extracted from Lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 35(2):219-223
- Min Hu, Leif Skibsted. 2002. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus. *Food Chem* 76(3):327-328
- Nakamura S, Kato A, Kobatashi K. 1991. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate *J Agric Food Chem* 39(4):647-650
- Oh SL, Kim SS, Min BY, Chung DH. 1993. Composition of free sugar, free amino acid non-volatile organic acid and tannins in extracts of *L. chinensis* M., *A. acutloba* K., *Schizandra chinensis* B. and *A. sessiliflorum* S. *J Korean Soc Food Nutr* 22(2):76-81
- Park KG. 1999. *Oral Biochemistry*. Koonja Book, pp 487- 509
- Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Pada SB, Mukherjee PK. 2006. Antioxidants activity of *Nelumbo nucifera* (sacre lotus) seeds. *J Ethnopharmacology* 104(3):322-327
- Shin MK, Han SH. 2006. Effects lotus leaf powder on lipid concentrations in rat fed high fat diet rats. *Korean J Food Culture* 21(2):202-208
- Tuka Ono, Eri H, Yukitaka F, Shoji I. 2006. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J Ethno.* 106(2):238-244
- Yuk CS. 1990. *Coloured medicinal plants of Korea*. Academy Book Co. Korea. pp 219-230