

# 치자(梔子) 수용성 추출액의 결핵균 외의 기타 Mycobacteria에 대한 항균작용

중앙대학교 의과대학 미생물학교실

최철순 · 신승식 · 정상인 · 양용태

= Abstract =

## Antibacterial Activity of Soluble Extracts of *Gardenia jasminoides* against Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli

Chul Soon Chol, Seung Shik Shin, Sang In Chung and Yong Tae Yang

Department of Microbiology, Chung-Ang University, College of Medicine, Seoul 151, Korea

An attempt was made to verify the antibacterial activities of the soluble extracts of *Gardenia jasminoides*(SEGJ) against mycobacteria other than tubercle bacilli (MOTT); *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare* complex, *M. gordonae* and *M. flavescens*. In addition, the effect of the SEGJ on the yellow pigmentation and violet pigmentation (crocin reaction) of the colonies of the MOTT grown on 7H10-crocin agar plates was observed.

The SEGJ gave a growth stimulatory activity against most species of mycobacteria except for *M. szulgai* at low concentration of the SEGJ in terms of crocin pigment OD=0.02 or less, but exerted an inhibitory activity at high concentration of OD=0.04 or more. The growth-inhibitory activity of the SEGJ was dose-dependent but the yellow pigmentation of the scotochromogens was not affected by the dose of the SEGJ that was growth-inhibitory. Crocin positive reaction was observed only with *M. kansasii*.

### 서 론

치자(*Gardenia fructus*)는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis forma *grandiflora*)의 적갈색 또는 황갈색의 열매이다. 치자의 성분은  $\alpha$ -crocin 색소, glycoside류와 genipin,  $\beta$ -sitosterol유 및 당류로서 D-mannitol을 함유하고 있다<sup>1)</sup>.

치자의 성분별 약리작용은 확실치 않으나 genipin은 sodium dehydrocholate와 같은 담즙분비촉진작용을 갖기 때문에 한방에서 황달과 담도염의 치료제로 사용되고 있으며, crocin 색소는 농가에서 식품과 옷감의 염색을 위한 천연염료로 사용되어 왔다<sup>2)</sup>.

이택주와 손계영(1955)<sup>3)</sup>은 각종 생약제제의 항결핵균작용을 조사하기 위한 일련의 실험에서 치자의 수용성 추출액을 Oggawa 결핵배지에 첨가하여 결핵균을 배양한 결과 치자의 항결핵균작용은 인정

할 수 없었으나 실험에 사용된 BCG균주가 심남색(深藍色)으로 착색되는 것을 관찰하고 이씨현상이라고 하였다. 이 반응은 치자가루나 치자편에 진한 황산 한방울을 떨어뜨릴 때 crocin 색소가 심남색으로 변하는 특성과 일치되므로 소위 이씨현상은 crocin 반응<sup>4)</sup>과 관계가 있다고 생각된다.

최철순등(1974)<sup>5)</sup>은 crocin 반응이 기타(비정형)mycobacteria에 대한 분류동정법으로서의 응용성 유무를 조사하기 위하여 치자의 수용성 추출액을 Lowenstein-Jensen egg medium(이하 crocin-LJ egg 배지로 약칭)에 첨가하여 기타 mycobacteria(Runyon I-IV군)를 배양한 결과 일부 균종은 crocin 양성반응을 보일 뿐 아니라 배지에 crocin을 첨가할 때 mycobacteria의 집락의 발육이 촉진되고 집락의 내면구조가 보다 점조성의 평활집락으로 성장하는 것을 관찰하였다. 이 성적은 치자는 mycobacteria의 발육을 촉진시키는 소위 발육촉진 물질 함유하고 있다는 것을 암시한다. 이와 같은 치자의

세균발육촉진작용은 *Corynebacterium diphtheriae*<sup>1)</sup>, *Streptococcus pyogenes*<sup>2)</sup>, *Salmonella typhi*<sup>3)</sup> 및 *Brucella abortus*<sup>4)</sup> 에서도 확인되었다.

그러나 저자들은 치자의 수용성 추출액의 동일량을 Middlebrook-7H10 한천배지(이하 7H10-crocin 한천배지로 약칭)에 첨가하여 기타 mycobacteria를 배양한 결과 일부 균종의 집락의 발육은 역시 촉진되었으나 일부 균종의 집락은 현저히 억제되는 부정확한 결과를 관찰하였다.

이와 같은 부정확한 성적은 치자의 성분을 첨가한 배지의 종류에 따라 영향을 받지만 치자는 mycobacteria의 발육을 촉진하는 발육촉진물질에 추가하여 발육을 억제하는 발육억제물질을 함유한다는 흥미있는 생각을 갖게 하였다. 그러나 치자의 mycobacteria 발육억제작용이 치자의 발육촉진물질의 양적관계인지 또는 치자의 다른 성분에 의한 것인지는 아직 확실치 않다.

그러므로 저자들은 우선 치자의 기타 mycobacteria에 대한 발육촉진과 억제작용의 유무를 확인하기 위하여 치자의 수용성 추출액의 농도의 구배를 달리하는 7H10-crocin 한천 평판배지에 8종의 기타 mycobacteria를 선상접종하고 35°C에서 5주

간 배양하면서 세균집락의 출현일, 크기 및 색소생산능에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세 균

기타 mycobacteria의 제 I 군(광발색균), 제 II 군(암발색균) 및 제 III 군(광비발색균)에 속한 8개 균종을 사용하였다. 이 연구에 사용된 균종, 혈청형 및 균주는 표 1 과 같다.

### 2. 치자의 수용성 추출액

치자는 잘 건조되고 부패되지 않은 것을 시장에서 구입하여 사용하였다. 치자의 표피를 제거하고 씨가 포함된 과육을 사용하였다. 치자의 수용성추출액은 치자의 과육 10g을 1차 종류수 1l에 넣어 60~70°C에서 30분간 증탕하여 추출된 등황색의 수용성 추출액(crocin 색소로 약기함)을 1N NaOH로 pH 6.8로 조절한 다음 여과하여 사용하였다. 치자의 수용성 추출액의 농도는 crocin 색소의 농도를 "Spectronic 20" 물 이용하여 600nm에서 OD를 측정할 때 OD=0.08이었으며 이것을 원액으로 사용

Table 1. Species, serovar and strain of mycobacteria

Species	Serovar	Strain*
<i>M. kansasii</i>		TMC 1201
<i>M. scrofulaceum</i>	41	Bridge, Cardiff 2729
	42	CDC 1198, P29
	43	Brooks, M 150
<i>M. simiae</i>	1	1598, 7729 Krasnow
	2	W-55, W-58
<i>M. szulgai</i>		Johnson 1878
<i>M. xenopi</i>		TMC 1470, 1481, 1482
<i>M. gordonae</i>		TMC 1318, 1319
<i>M. flavescens</i>		TMC 1541
<i>M. avium</i>	1	16907, 11907-300
	2	14141-1395
	3	128 Germany
	4	TMC 1463, 13528-1029
	8	ATCC 23435
	10	Ila 1602-1965
	13	ATCC 25122
	14	Edg. Boone

\* Distributed from Dr. D.D. Gwinn, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20205, USA

하였다.

### 3. 세균배지

Middlbrook 7H10 agar(Difco) 기본배지를 0.5% glycerol과 crocin 색소의 농도를 OD=0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04 및 0.08 함유하는 증류수에 배지의 처방대로 만들었으며 OADC는 추가하지 않았다.

### 4. 세균배양

Mycobacteria의 접종액은 L-J egg사면배지에 발육된 균체를 직경 3mm의 멸균 루프로 취하여 TB broth(Difco)에 이식한 다음 35°C에서 일주일간 배양한 배양액을 사용하였다.

위의 배양액을 직경 3mm의 루프로 한 루프씩 취하여 7H10-crocin 한천 평판배지위에 분리집락이 관찰되도록 선상점종하고 종이 테이프로 페트리 접시를 밀봉한 다음 35°C에서 5주간 배양하였다.

### 5. 세균집락의 관찰

세균집락의 출현일을 비교하기 위하여 배양후 3일부터 매일 가시집락의 출현을 현미경적으로 관찰하였으며, crocin의 농도별로 세균집락수와 집락의

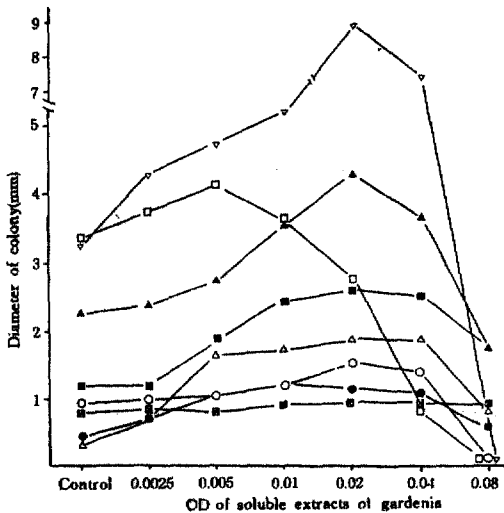


Fig. 1. Colonial growth of mycobacteria other than tubercle bacilli on 7H10 agar containing different concentration of soluble extracts of *Gardenia jasminoides* (crocin). Inoculum was streakcultured on 7H10 agar plate and incubated at 35°C for 5 weeks. The largest 3 to 5 colonies of each strain were selected and the diameter of each colony was measured with a microcalliper. The figures illustrate the mean of colony size of *M. kansasii* (▲), *M. scrofulaceum* (●), *M. simiae*(△), *M. szulgai*(◻), *M. xenopi*(□), *M. gordonae*(■), *M. flavescens*(▽) and *M. avium* complex(O) on 7H10 agar containing different concentration of crocin.

크기를 관찰하였다. 집락의 크기는 집락의 직경을 충분히 측정할 수 있는 제 5주 배양에서만 측정하였으며, 집락의 직경은 microcalliper로 측정하였다.

## 성 적

### 1. 치자의 수용성 추출액의 농도별 세균집락의 성장

치자의 수용성 추출액의 crocin 색소의 농도가 OD=0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 및 0.0025 함유된 7H10-crocin 한천 평판배지에 각종 mycobacteria를 선상배양하여 35°C에서 5주간 배양한 다음 각 균종별로 평판배지에 분리된 집락중에 가장 큰 집락 3~5개를 선발하여 집락의 크기를 측정하고 평균치를 구한 성적은 그림 1과 같다.

즉, *M. flavescens*, *M. kansasii*, *M. gordonae* 및 *M. simiae*의 집락의 크기는 배지에 추가된 crocin색소의 농도가 OD=0.0025부터 OD=0.02까지 증가됨에 따라 점차 비례하여 증가되었다. 그러나 사용된 모든 균종의 세균집락의 성장은 crocin색소의 농도가 OD=0.04 이상에서부터 감소되었으며 OD=0.08에서 현저히 또는 완전히 억제되었다. 특히 *M. xenopi*는 crocin색소의 농도가 OD=0.005까지는 농도에 비례하여 완만하게 증가되었으나 OD=0.01 이상에서 부터는 농도에 반비례하여 억제되었으며 농도 OD=0.08에서는 완전히 억제되었다.

*M. scrofulaceum*은 crocin색소의 농도가 OD=0.01까지, *M. avium-intracellulare* complex는 OD=0.04까지 농도간에 집락의 크기는 큰 차이가 없었으나 OD=0.08에서는 완전히 억제되었다.

*M. szulgai*의 집락은 crocin색소의 농도 OD=0.0025부터 OD=0.08까지 농도간에 차이가 없었으며 OD=0.08에서도 억제되지 않았다.

### 2. 세균집락수에 미치는 영향

치자의 수용성 추출액의 각종 기타 mycobacteria에 대한 항균작용을 비교하기 위하여 치자의 수용성 추출액의 crocin농도가 OD=0.01, 0.04 및 0.08를 함유하는 7H10-crocin 한천 평판배지에 각 균종의 균부유액을 직경 3mm의 표준 백금이로 한 백금야씩 취하여 선상배양한 다음 35°C에서 5주간 배양후 집락수를 계산한 성적은 표 2와 같다.

즉, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. flavescens* 및 *M. xenopi*의 세균집락수는 crocin의 농도의 증가에 따라 현저히 감소되었다. 그러나 *M. szulgai*와 *M. simiae*는 사용된 crocin의 농도간에 차이가 없었다.

**Table 2.** Number of visible colonies of mycobacteria other than tubercle bacilli grown on 7H10 agar containing different concentration of soluble extracts of *Gardenia jasminoides* (crocin)<sup>a</sup>

Species	Strain	Concentration of crocin <sup>b</sup>			
		Control	0.01	0.04	0.08
<i>M. kansasii</i>	TMC 1201	Spread <sup>c</sup>	Spread	< 50	1
<i>M. scrofulaceum</i>	41-Bridge	Spread	Spread	<300	< 30
<i>M. simiae</i>	2-W 58	Spread	Spread	Spread	Spread
<i>M. szulgai</i>	Johnson 1878	Spread	Spread	Spread	Spread
<i>M. xenopi</i>	TMC 1470	<300	< 300	< 30	NV
<i>M. gordonae</i>	TMC 1318	Spread	Spread	<300	3
<i>M. flavescens</i>	TMC 1543	Spread	Spread	< 30	4
<i>M. avium</i> complex	Edg. Boone	Spread	Spread	<200	2

<sup>a</sup>One loopful inoculum was streakcultured on 7H10 agar containing different concentration of soluble extracts of *Gardenia jasminoides* (crocin) and incubated at 35°C for 5 weeks.

<sup>b</sup>Concentration of crocin was standardized in terms of optical density of crocin pigment at 600 nm.

<sup>c</sup>Spread; not countable colonies because of spreading growth. NV; non-visible with naked eyes but only visible microscopically

**Table 3.** Incubation time required for a single cell of mycobacteria to grow into a visible colony on Middlebrook 7H10 agar containing soluble extracts of *Gardenia jasminoides*<sup>a</sup>

Species	Strain	Incubation Time (day) <sup>b</sup>	
		Control	7H10-Crocin
<i>M. kansasii</i>	TMC 1201	9	6
<i>M. scrofulaceum</i>	41-Bridge	7	6
	42-Cardiff	8	7
	CDC 1198	7	6
	43-Brooks	7	6
	Mean	7.0 ± 0.6	6.2 ± 0.4
<i>M. simiae</i>	1-1595	10	6
	1-7729	9	6
	2-W 55	10	6
	2-W 58	9	7
	Mean	9.5 ± 0.5	6.3 ± 0.4
<i>M. szulgai</i>	Johnson 7898	10	10
<i>M. xenopi</i>	TMC 1470	10	9
<i>M. gordonae</i>	TMC 1318	7	8
<i>M. flavescens</i>	TMC 1541	5	3

<sup>a</sup>Inoculum was streakcultured on 7H10 agar 7H10-crocin agar plates and incubated at 35°C for 21 days.

<sup>b</sup>Mean of 3 plate cultures

### 3. Crocin 저농도의 발육촉진작용

치자의 수용성 추출액은 crocin 색소의 농도 OD = 0.02 이하에서는 발육촉진작용을 나타냈다. 그러므로 치자의 수용성 추출액의 발육촉진작용이 균종

과 균주에 따라 일정하지 또는 차이가 있는지를 조사하기 위하여 crocin 색소의 농도 OD=0.02를 함유한 crocin-7H10 한천 평판배지에 각종 기타 mycobacteria를 선상배양한 다음 35°C에서 5주간 배양하면서 집락의 출현일수와 세균집락의 크기를 비

**Table 4.** Colonial growth of different mycobacteria other than tubercle bacilli on 7H10 agar containing soluble extracts of *Gardenia jasminoides*<sup>a</sup>

Species	No. of strain tested	Colony Size (mm) <sup>b</sup>		
		Control	7H10-Crocin	p
<i>M. kansasii</i>	1	2.10 ± 0.55 <sup>c</sup>	4.30 ± 0.10	0.001
<i>M. scrofulaceum</i>	6	0.47 ± 0.13	1.23 ± 0.35	0.001
<i>M. simiac</i>	4	0.90 ± 0.10	1.34 ± 0.44	NS <sup>d</sup>
<i>M. szulgai</i>	2	0.94 ± 0.05	0.95 ± 0.10	NS
<i>M. xenopi</i>	2	3.40 ± 0.40	2.78 ± 1.10	NS
<i>M. gordonae</i>	1	1.20 ± 0.40	2.60 ± 1.00	0.001
<i>M. flavescens</i>	1	3.80 ± 0.80	8.45 ± 0.95	0.001
<i>M. avium</i> complex	11	0.98 ± 0.28	1.54 ± 0.36	0.001

<sup>a</sup>Inoculum was streakcultured on 7H10 agar containing soluble extracts of *Gardenia jasminoides* OD=0.02 at 600 nm and incubated at 35°C for 5 weeks.

<sup>b</sup>The largest 3 to 5 colonies of each strain were selected and diameter of colony was measured with a microcalliper.

<sup>c</sup>Mean of 3-5 colonies

<sup>d</sup>NS; not significant difference

**Fig. 2.** Colonial characteristics of *M. xenopi* TMC 1482(No. 25), *M. kansasii* TMC 1201(No. 26), *M. gordonae* TMC 1318(No. 27) and TMC 1319(No. 28) on 7H10-crocin agar plates containing different concentration of soluble extracts of *Gardenia jasminoides*(crocin pigment). Note the larger size of the colonies on 7H10-crocin agar media containing higher concentration of crocin, but more inhibitory at higher concentration of crocin pigment. Production of yellow pigment took place on the 7H10-crocin agar as the colonies mature but the intensity of yellow pigment was not affected. Photochromogenic *M. kansasii* produced violet pigment(crocin positive reaction) but did not produce yellow pigment without exposure of light on the 7H10-crocin agar media containing crocin at the concentration of OD=0.04.

교한 성적은 표 3 및 4와 같다.

즉, 각종 기타 mycobacteria의 7H10 한천 및 crocin-7H10 한천 배지에서 집락의 출현일수를 비교한 결과, *M. szulgai*와 *M. gordonae*를 제외하고, 모든 균종의 집락의 출현일수는 crocin-7H10 한천배지에서 대조배지에 비하여 1 내지 4일 빨랐으나 실험군간에 통계적으로는 유의성 차이가 없었다.

그러나 표 4에서 보는 바와 같이 각종 mycobacteria의 crocin-7H10 및 7H10 한천배지위에 5주간 배양후 발육된 집락의 크기를 비교할 때 *M. flavescens*( $8.45 \pm 0.95 : 3.80 \pm 0.80$ mm), *M. kansasii*( $4.30 \pm 0.10 : 2.10 \pm 0.55$ mm), *M. gordonae*( $2.60 \pm 1.00 : 1.20 \pm 0.40$ mm), *M. avium-intracellulare* complex( $1.54 \pm 0.36 : 0.98 \pm 0.28$ mm), 및 *M. scrofulaceum*( $1.23 \pm 0.35 : 0.47 \pm 0.13$ mm)은 crocin 첨가배지에서 발육이 현저히 증강되고 실험군간에 통계적으로 유의성이 인정되었다 ( $< 0.001$ ). 그러나 *M. simiae*( $1.34 \pm 0.44 :$

$0.90 \pm 0.10$ mm)와 *M. szulgai*( $0.95 \pm 0.10 : 0.94 \pm 0.05$ mm)는 crocin첨가배지에서 발육이 약간 증강되었으나 통계적으로 유의성 차이가 없었다. 반대로 *M. xenopi*( $2.78 \pm 0.10 : 3.40 \pm 0.40$ mm)는 crocin첨가배지에서 대조배지에 비하여 오히려 발육이 억제되었다.

#### 4. 집락의 색소형성

Crocin 색소가 기타 mycobacteria 중에 암발색균의 분류동정에 중요한 특성인 황색 또는 등황색색소생산에 영향을 주는지를 조사하기 위하여 암발색균에 속한 *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. gordonae* 및 *M. flavescens* 그리고 광발색균인 *M. kansasii*를 crocin 색소의 농도를 OD=0.0025, 0.005, 0.01, 0.04 및 0.08 함유된 crocin-7H10 한천 평판배지에 선상배양하고 광선의 노출없이 35°C에서 5주간 배양한 후 각 집락의 색소생산을 육안적으로 비교하였다

**Fig. 3.** Colonial size of unidentified strains of rapid grower, strain 79-1097 belonging to cluster No. 10b and strain 80-465 belonging to cluster No. 4b isolated from sputa of patients with tuberculosis-like diseases on 7H10 agar plates with or without crocin pigment. Note the larger size of the colonies on 7H10 agar medium containing crocin pigment at the concentration of OD=0.02. Broth culture of mycobacteria were streaked and incubated at 35°C for 7 days.

(그림 2 참조).

암발색균 6종의 세균집락은 crocin색소의 농도의 증가에 따라 발육된 세균집락의 총수와 크기에는 영향을 주었으나 황색색소의 생산은 육안적으로 차이를 인정할 수 없었다(그림 2 참조). 또한 광발색균인 *M. kansasii*는 광선의 노출이 완전히 차단된 상태에서 배양할 때 색소생산은 역시 음성이었다. 그러나 *M. kansasii*의 crocin양성반응(violet 색소생산)은 crocin색소의 증가에 따라 강양성반응을 보였다. 즉, crocin의 농도가 OD=0.04일 때 가장 민감한 반응을 보였으며, OD=0.08에서 균집락수는 현저히 억제되었고 crocin반응도 역시 감소되었다. 이 실험에 사용된 8종의 비정형 mycobacteria 균종 중에 단지 *M. kansasii*만이 crocin양성반응을 나타냈으며 나머지 균종들은 모두 crocin음성반응이었다.

## 고 찰

이 연구에서 저자들은 치자의 수용성추출액(이하 crocin색소액으로 약칭함)이 지연 발육균(slow growers)에 속한 주요 병원성 기타 mycobacteria(mycobacteria other than tubercle bacilli; MOTT로 약칭함)의 집락의 발육에 미치는 영향을 조사하였다.

Crocin색소액이 기타 mycobacteria세균집락의 발

육에 미치는 효과를 분석하기 위하여 균부유액을 crocin색소액이 함유된 Middlebrook 7H10한천평판배지(이하 7H10-crocin한천배지로 약칭함)에 선상배양하여 35°C에서 5주간 배양한 다음 세균집락의 크기와 성상을 비교하였다.

이 연구에 사용된 8종의 기타 mycobacteria; *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare* complex, *M. goodii* 및 *M. flavescens* 중에 *M. szulgai*를 제외한 대부분의 기타 mycobacteria는 crocin색소의 농도가 OD=0.02까지 농도에 비례하여 세균집락의 성장이 촉진되었으며 가시집락(visible colony)의 출현일도 7H10-crocin한천배지에서 대조배지(7H10한천배지)에서 보다 4일 정도 빨랐다. 이 성적은 치자의 수용성 추출액은 mycobacteria의 성장을 촉진시키는 소위 발육촉진물질을 함유하고 있다는 것을 뒷받침한다. 이 성적은 '최철순등', '봉만전등' 및 '정상인등'의 성적과 일치한다.

치자의 각종 기타 mycobacteria에 대한 발육촉진물질의 성분은 치자성분중에 포함된 glycoside류와 genipin중의 일부성분 또는 D-mannitol 당류들에 의한 것으로 추정되지만 아직 확실한 것은 알 수 없다.

각종 기타 mycobacteria의 7H10한천배지와 crocin-7H10한천배지에서 세균집락의 발육차이를 비교할 때 crocin색소에 의한 세균집락의 증가는 *M. flavescens*(4.65mm), *M. kansasii*(2.2mm), *M. goodii*(1.4mm), *M. scrofulaceum*(0.76mm), *M. avium*(0.56mm) 및 *M. simiae*(0.44mm)의 순으로 집락의 발육이 증강되었다. 그러나 균종간의 세균집락의 성장을 비교할 때 치자가 함유된 7H10-crocin한천배지에서 집락의 발육이 보다 우세한 균종은 역시 대조배지(7H10한천배지)에서도 다른 균종에 비하여 우세한 발육을 보였다. 이 성적은 치자의 mycobacteria에 대한 발육촉진작용은 일차적으로 균종의 치자성분의 이용성에 의존하며 치자성분의 mycobacteria에 대한 발육촉진작용은 이차적인 것으로 생각된다.

그러나 대부분의 기타 mycobacteria의 성장은 7H10한천배지에 추가된 crocin색소의 농도가 OD=0.04 이상일 때는 현저히 억제되었으며, OD=0.08에서는 집락의 형성이 완전히 억제되었다. 또한 *M. szulgai*와 *M. simiae*를 제외한 기타 mycobacteria의 집락의 총수도 배지에 crocin의 농도를 높임에 따라 현저한 차이로 감소되었다. 이 성적은 치자는 분명히 항-mycobacteria 작용을 갖는 발육억제물질을 함유한다는 것을 뒷받침한다. 즉 치자는 기타 myco-

**Fig. 4.** Streak culture of a unidentified strain of rapid grower, strain 79-1052(cluster No. 10b) isolated from sputum of a patient with pulmonary tuberculosis-like disease. Note the large inocula on the primary inoculum of the heavy streak grew massively but small inocula on the second and third quadrants of successive diluted streak failed to grow on crocin-7H10 agar plate containing crocin pigment at the concentration of OD=0.04.

bacteria의 발육을 촉진시키는 소위 "발육촉진물질" 외에도 발육을 억제시키는 "발육억제물질"을 함께 갖고 있다고 생각된다. 먼저 연구에서 7H10-crocin 한천배지의 생산배지에 따라 부정확한 성적을 보인 것은 바로 치자의 수용성 추출액이 이상의 두가지 물질을 함유하고 있기 때문인 것으로 추정할 수 있다.

이 연구에서 8종의 기타 mycobacteria 중에서 *M. xenopi*는 다른 mycobacteria에 대하여 발육촉진작용을 나타낸 crocin의 최적발육농도(OD=0.02)에서 오히려 억제되었는데 이것은 *M. xenopi*의 최적발육농도가 OD=0.005로 낮기 때문으로 생각된다. 이 성적은 이 연구에 사용된 8종의 기타 mycobacteria 중에서 *M. xenopi*가 치자성분에 가장 감수성이 높다는 것을 의미한다.

성적에는 기술되지 않았으나 유사폐결핵 환자의 객담에서 분리된 기타 mycobacteria 제IV군에 속한 신속발육균 79-1097과 80-465를 7H10-crocin한천과 7H10한천 평판배지에 선상배양 할 때 지연 발육균(slow growers)과 같이 세균집락의 크기가 crocin성분에 의하여 증강되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 3 참조).

또한 흥미있는 관찰은 그림 4에서 보는 바와 같이 유사폐결핵환자의 객담에서 분리된 신속발육균에 속한 균주(79-1032)를 crocin농도가 최적농도보다 높은 OD=0.04로 함유된 7H10-crocin한천 평판배지에 선상접종할 때 접종균량이 적은 회색부위에서만 집락의 발육이 억제된다는 사실이었다. 이러한 현상은 결핵균(*M. tuberculosis*)을 Middlebrook 7H10한천 평판배지에 선상접종할 때도 흔히 관찰되는 현상이다. 이러한 억제현상은 일반적으로 간단한 합성배지에 결핵균을 선상접종할 때 관찰되는데 이러한 억제현상은 합성배지에 들어 있는 독성 지방산에 의한 것이며 동물의 혈청과 알부민(실제 7H10한천배지에 OADC를 첨가하여 중화시키고 있음)의 추가로써 이러한 독성작용이 중화된다는 것이 잘 알려져 있다. 이러한 사실로 미루어 보아 치자의 각종 기타 mycobacteria 균종에 대한 항-mycobacteria 작용은 치자성분 중에 함유되어 있는  $\beta$ -sitosterol을 포함한 지방산에 의한 독성으로도 추정할 수 있으나 아직 확실치 않다.

그러나 이 연구에 사용된 대부분의 균종을 crocin색소의 농도가 OD=0.08 함유된 7H10-crocin한천배지에 선상접종하여 배양할 때 세균의 발육억제는 접종균량의 다소에 관계없이 모두 억제되었다(그림 1 참조). 이 성적은 치자의 항균작용은 치자의 식물성 지방산 보다는 다른 강력한 항균물질에 의한

것으로 추정된다.

최근 치자에서 추출되는 galioside와 gardenoside의 성분이 포도구균과 플렐시엘라균에 대하여 항균작용을 나타낸다는 것이 Ishiguro 등에 의하여 보고되었다<sup>11</sup>. 즉, 이들은 galioside와 C-8이성체인 gardenoside를 효소로 가수분해 하면 항균활성을 갖는 aglucone과 항균활성이 없는 gardenogenin A를 포함한 두가지 성분으로 분해된다는 것을 관찰하였다. 이 성적으로 보아 치자의 항-mycobacteria 효과는 치자의 수용성 추출액속에 들어있는 gardenoside의 어떤 성분에 의한 것으로 추정된다.

그러므로 치자의 항-mycobacteria 작용이 gardenoside의 어떤 성분에 의한 것인지에 관한 문제는 앞으로 흥미있는 연구과제이다.

Mycobacteria의 배양실험에서 발육속도와 색소생산실험을 통하여 mycobacteria를 지연 발육균과 신속발육균으로, 그리고 암발색균, 광발색균 및 광비발색균으로 분류하는 것은 임상결핵균 검사실에서 환자의 치료대책을 신속히 세우는데 중요한 분류 및 동정법이 된다<sup>12-14</sup>.

그러므로 7H10한천배지에 crocin색소를 추가할 때 crocin성분이 각종 mycobacteria의 발육속도와 색소생산에 어떻게 영향을 주는지를 밝히는 것은 역시 중요한 연구과제이다. 이 연구에서는 8종의 기타 mycobacteria 균종을 7H10한천과 7H10-crocin한천평판배지에 선상접종하여 집락의 출현일수를 비교한 결과 *M. flavescens*가 5일에서 3일로 단축시킨 것을 제외하고 모든 균종은 7~10일에서 6~7일로 단축되었다.

이 성적은 7H10-crocin한천배지를 이용한 신속발육균과 지연 발육균의 분류는 현행 배양 7일 기준을 배양 5일 기준으로 단축할 수 있다는 것을 의미한다. 지금까지 *M. flavescens*는 연구자에 따라 신속발육균 또는 지연 발육균으로 분류하는데 7H10-crocin한천배지에서의 발육으로 미루어 보아 신속발육균에 포함시키는 것이 타당하다고 생각되었다.

또한 crocin색소액을 기타 mycobacteria의 발육 촉진 목적으로 사용할 때 기타 mycobacteria의 분류에 유용한 색소생산능에 영향을 주는가를 조사하기 위하여 crocin색소의 농도의 구배를 달리하는 7H10-crocin한천 평판배지에 암발색균에 속한 *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. flavescens*와 광발색균에 속한 *M. kansasii*를 각각 선상배양하여 암실에서 5주간 배양하면서 세균집락의 황색색소생산의 증강유무를 조사한 결과 crocin색소의 증가에 따라 색소생산은 증강되지 않았다. 그러나 세균집락의 crocin반응(violet색소침착)은 crocin의 농



도 OD=0.04에서 가장 민감한 반응을 나타냈다. 이 연구에 사용된 8종의 기타 mycobacteria 중에 단지 광발색균에 속한 *M. kansasii*만이 crocin양성반응을 보였다. 이 성적은 crocin색소의 농도 OD=0.04를 함유하는 7H10-crocin한천평판배지는 *M. kansasii*를 다른 유사균종으로부터 감별하기 위한 생물학적 특성을 조사하는 데 이용될 수 있는 유용한 감별배지가 될 수 있다는 것을 의미한다.

## 결 론

치자 수용성 추출액 (이하 crocin색소액으로 약칭)의 결핵균 이외의 기타 mycobacteria(mycobacteria other than tubercle bacilli)에 대한 항균작용을 조사하기 위하여 crocin색소액이 함유된 Middlebrook 7H10 한천 평판배지 (이하 7H10-crocin 한천배지로 약칭)에 *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare* complex, *M. gordonae* 및 *M. flavescens*를 선상 접종하여 35°C에서 5주간 배양하면서 세균집락의 성장과 발육억제 효과를 조사하였다.

7H10-crocin 배지와 7H10한천배지간에 8종의 기타 mycobacteria 세균집락의 성장을 비교할 때 대부분의 기타 mycobacteria의 집락의 성장은 치자성분이 OD=0.04 이하로 함유된 배지에서는 발육이 촉진되었으나 그 이상의 농도에서는 억제되었다.

대부분의 기타 mycobacteria에 대한 치자성분의 최적발육농도는 OD=0.02이었으나 *M. xenopi*에 대한 최적농도는 OD=0.005이었다.

기타 mycobacteria의 집락의 성장은 최적농도까지는 농도에 비례하여 증강되었으나 그 이상의 농도에서는 현저히 또는 완전히 억제되었다. 그러나 *M. szulgai*의 성장은 crocin농도 OD=0.08까지 농도의 변화에 영향을 받지 않았다.

이 성적은 치자는 기타 mycobacteria에 대한 발육촉진물질과 항균제물질을 함께 갖고 있다는 것을 뒷받침한다.

## 참 고 문 헌

- 1) 권혁진, 최철순, 정상인, 양용태: 유사 폐결핵 환자의 재담에서 분리한 신속발육 mycobacteria의 분류동정. *중앙의대지*, 9: 39, 1984.
- 2) 봉만전, 정상인, 최철순, 양용태: 치자 (*Gardeniae fructus*)의 수용성 추출액(crocin색소)이 피력성세균의 증식에 미치는 영향. *중앙의대지*, 8: 343, 1983.

- 3) 양석원, 최철순, 정상인, 양용태: *Mycobacterium fortuitum-chelonei* complex의 간이생물학적 분류동정. *중앙의대지*, 8: 349, 1983.
- 4) 이택주, 손제영: 식물체로부터 출발한 항균소 물질에 관한 연구. *V. Gardeniae fructus*를 가한 배지에서의 항산균의 태도. *중앙가축위생연구보고*, 3: 78, 1955.
- 5) 정상인, 최철순, 양용태: 치자(*Gardeniae fructus*)의 수용성 추출액첨가배지에서의 각종 세균의 crocin반응. *중앙의대지*, 7: 301, 1982.
- 6) 최철순, 장중대, 양용태: 5개 생물학적 특성에 의한 *Mycobacteria* 제IV군의 균집합체 분류 및 *M. fortuitum-chelonei* complex동정. *중앙의대지*, 10: 281, 1985.
- 7) 한덕룡: 치자(梔子): *Gardeniae fructus*. p.172-174, *현대생약학*, 생약학연구회, 한국실습교재사, 서울, 1985.
- 8) Choi CS, Kim JH, Yoon YD, Lee HS and Lee TC: Subdivision of opportunist mycobacteria by the difference of pigment production on Lowenstein-Jensen medium containing crocin. *J. Kor. Soc. Microbiol.* 9:33, 1974.
- 9) Ishiguro K, Yamaki M and Takagi S: Studies on the iridoid related compounds. I. On the antimicrobial activity of aucubigenin and certain iridoid aglycones. *Yakugaku Zasshi*, 8, 755, 1982.
- 10) Ishiguro K, Yamaki M and Takagi S: Studies on iridoid-related compounds. II. The structure and antimicrobial activity of agrucones of galioside and gardenoside. *J. Nat. Prod.* 46:532, 1983.
- 11) Ishiguro K, Yamaki M and Takagi S.: Studies on iridoid-related compounds. III. Gentiopical, the aglucone of gentiopicroside. *Planta Medica* 49: 193, 1983.
- 12) Runyon EH: Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am. J. Clin. Pathol.* 54:578, 1970.
- 13) Timpe A and Runyon EH: The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease. *J. Lab. Clin. Med.* 44:202, 1954.
- 14) Vestal AL: Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. *DHEW Public Health Service Publication No. (CDC) 75-8230*, 1975.

15) Wayne LG and Doubek JR: Diagnostic key to mycobacteria encountered in clinical

laboratories. *Appl. Microbiol.* 16:925, 1968.