식물 추출물을 활용한 식중독균 항균 효과 탐구

참여 학생 : 3304 도성민, 3102 권호승, 3206 도수현
지도 교사 : 권순환

목차

서론

문제 제기 : 식중독균 문제와 항생제 내성의 심각성

연구 목적 : 천연 항균 물질을 탐색하고, 조합 실험을 통해 최적 항균제를 찾는 것

“자연에서 찾은 식물 추출물이 항균 효과를 가질 수 있을까?”

탐구 1 - 사전 조사

대장균 이란? : 네이버 포스트

대장균 : 그람 음성균, 항균 효과를 위해서는 외막 파괴나 세포 내 단백질 합성을 저해하는 기작이 필요

황색포도상구균 - 나무위키

황색포도상구균 : 그람 양성균, 외막이 없어 항균 물질이 비교적 쉽게 작용 가능

탐구 1 - 사전 조사

< 디스크 확산법 >

- 항균 물질이 포함된 종이 디스크를 세균이 배양된 배지 위에 올려둠
- 시간이 지나면 항균 물질이 확산하며 세균의 성장을 억제
- 항균 효과가 있으면 **저지대(Inhibition Zone)가 형성**

탐구 1 - 사전 조사

< MIC 및 MLC >

- MIC : 세균의 성장을 억 제할 수 있는 가장 낮은 농도
- MLC : 세균을 완전히 사멸 시킬 수 있는 가장 낮은 농도

탐구 1 - 항균성 탐색 실험 과정

실험 설계

- 10가지 식물(고삼, 관중, 깻잎, 비트, 뽕잎, 송이, 생강, 쑥, 포도근, 황련) 추출물 추출 후 항균 효과 실험
- 가장 효과가 좋은 두 가지 식물을 골라서 MIC 및 MLC 측정 실험

탐구 1 - 항균성 탐색 실험 과정

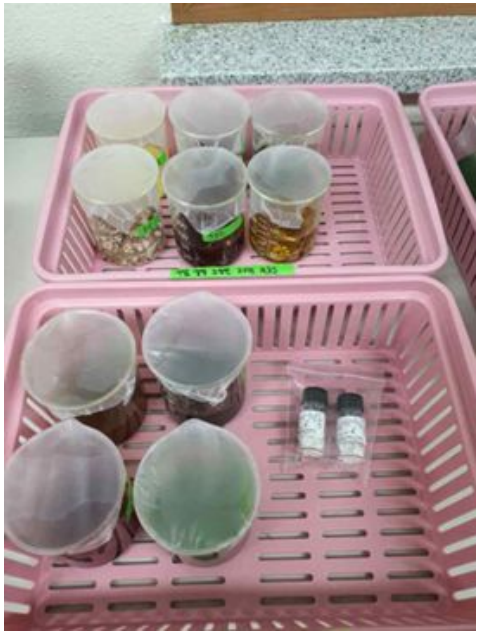
1. 배지 제작

- 고온고압 멸균기 활용
- 대장균 : TSA / 황색포도상구균 : BHIA

탐구 1 - 항균성 탐색 실험 과정

2. 식물 추출물 준비

- 천연물 세척 및 분쇄
- 상온 침출법 (80% GR 급 에틸 알코올)
- 추출물 농축



탐구 1 - 항균성 탐색 실험 과정

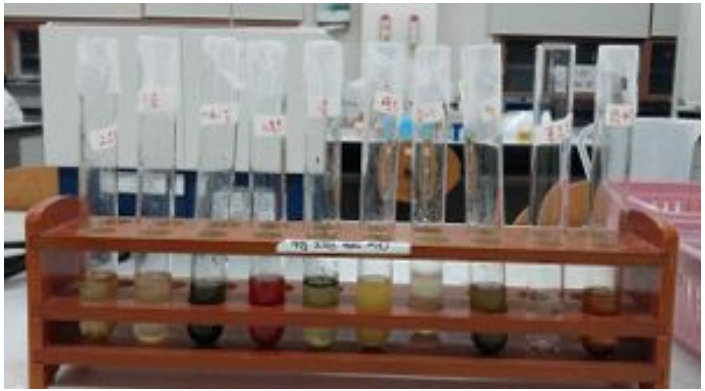
2. 식물 추출물 준비

- 천연물 세척 및 분쇄
- 상온 침출법 (80% GR 급 에틸 알코올)
- 추출물 농축

탐구 1 - 항균성 탐색 실험 과정

2. 식물 추출물 준비

- 천연물 세척 및 분쇄
- 상온 침출법 (80% GR 급 에틸 알코올)
- 추출물 농축

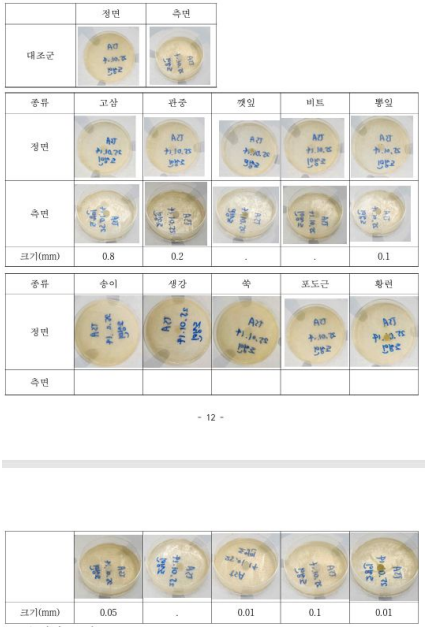


탐구 1 - 항균성 탐색 실험 과정

3. 균주 배양 및 식물 추출물 항균성 측정

- Spreading Plating
- Paper disc 항균 테스트
- inhibition zone 측정

탐구 1 - 항균성 탐색 실험 결과

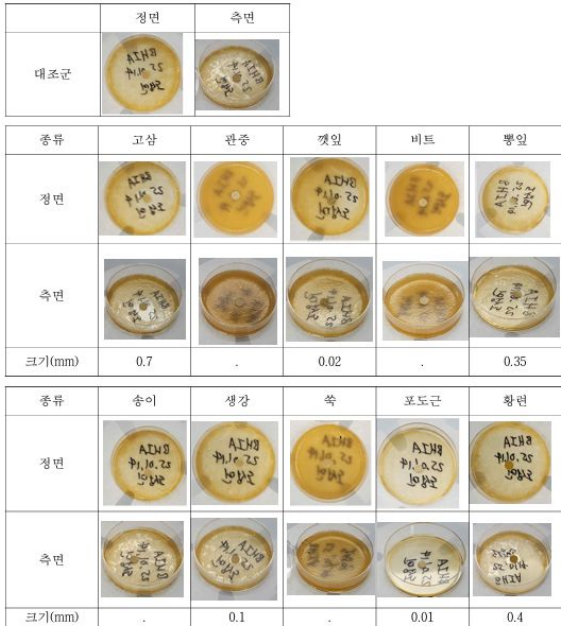


	정면	측면
대조군		

종류	고삼	관중	잿잎	비트	뽕잎
정면					
측면					
크기(mm)	0.8	0.2	.	.	0.1

종류	송이	생강	쑥	포도근	황련
정면					
측면					

크기(mm)	0.05	.	0.01	0.1	0.01

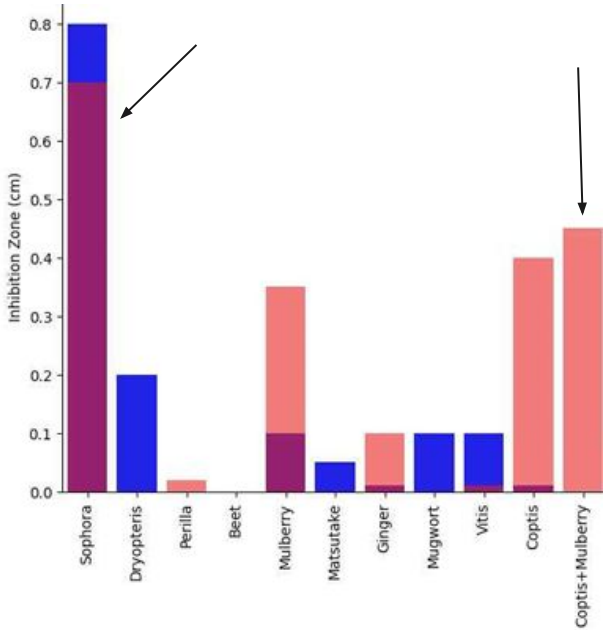


	정면	측면
대조군		

종류	고삼	관중	잿잎	비트	뽕잎
정면					
측면					
크기(mm)	0.7	.	0.02	.	0.35

종류	송이	생강	쑥	포도근	황련
정면					
측면					
크기(mm)	.	0.1	.	0.01	0.4

탐구 1 - 항균성 탐색 실험 결과

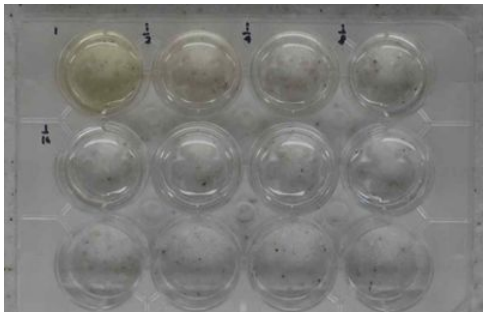


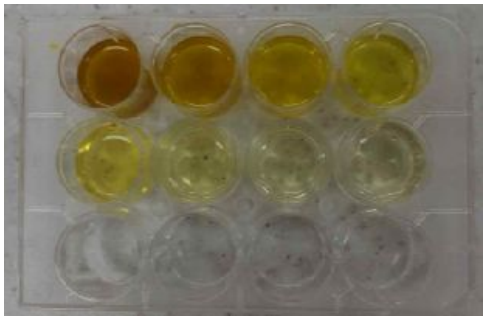
- 고삼과 황련에서 가장 큰 항균성을 띰
- 고삼 : 대 – 0.8 / 황 – 0.7
- 황련 : 대 – 0.01 / 황 – 0.4

탐구 1 - MIC 및 MLC 측정 실험 과정

1. 추출물 농도 희석

- 추출물 초기 농도 : 20mg/ml > 1/2씩 단계적으로 희석
- 희석된 각각을 100μl씩 96-well plate에 분주



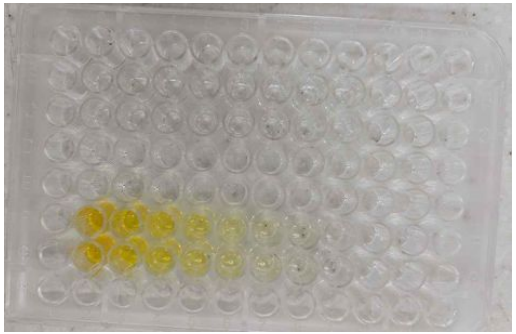


왼 : 고삼 / 오 : 황련

탐구 1 - MIC 및 MLC 측정 실험 과정

1. 추출물 농도 희석

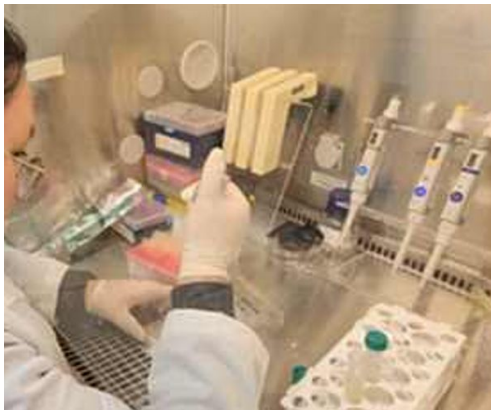
- 추출물 초기 농도 : 20mg/ml > 1/2씩 단계적으로 희석
- 희석된 각각을 100μl씩 96-well plate에 분주



탐구 1 - MIC 및 MLC 측정 실험 과정

2. 균주 준비 및 접종

- 배양된 균주 10^5CFU/ml로 희석 (단계 희석법 이용)
- 각 well에 균주 희석액을 20μl씩 추가

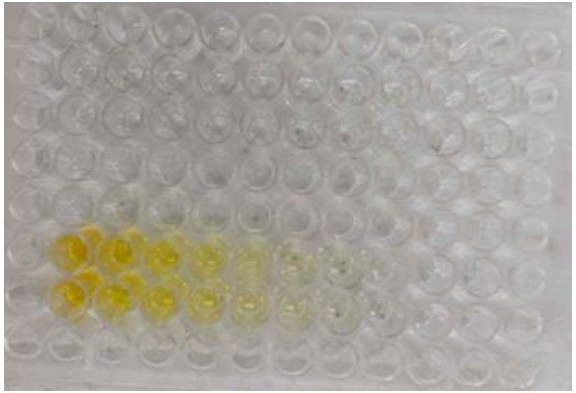


3. 배양 후 MIC 측정 실험

탐구 1 - MIC 및 MLC 실험 결과 및 보완책

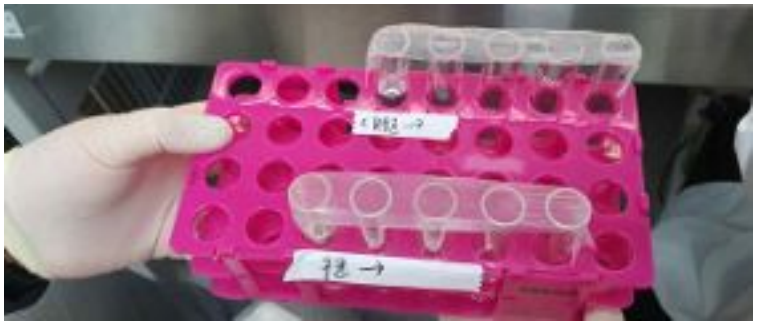
- 탁도가 맨눈으로 측정 불가
- 일단 배지 모든 용액을 분주하여 배양

> 모든 배지에서 너무 많은 균주의 집락이 형성



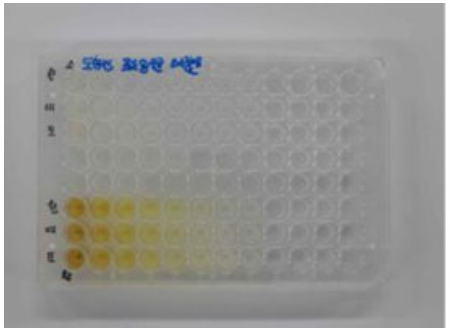
탐구 1 - MIC 및 MLC 실험 결과 및 보완책

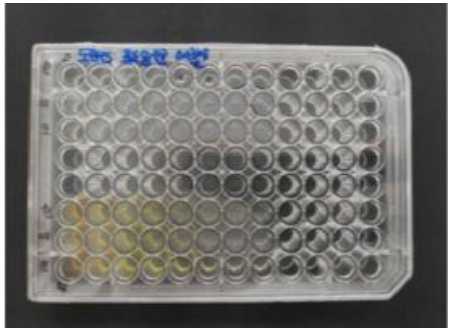
- 균주 희석(10,000 배 희석)
- 비교할 수 있도록 원래의 시약 또 한 같이 분주



탐구 1 - MIC 및 MLC 실험 2차 결과

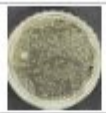
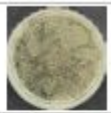
- 전부 균주+원액보다 탁도가 낮아짐
- 희석이 부족할 수 도 있음을 확인하고, 120㎕의 용액에서 100㎕, 20㎕를 따로 분주

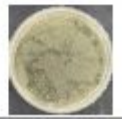
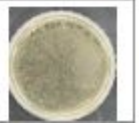




탐구 1 - MIC 및 MLC 실험 2차 결과

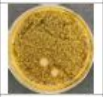
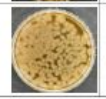
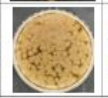
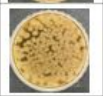
1) 고삼 - 대장균

희석 횟수(번)	1	2	3	4
희석 X (22)				
희석 O (23)				

희석 횟수(번)	5	6	7	8
희석 X (22)				
희석 O (23)				

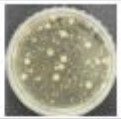
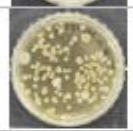
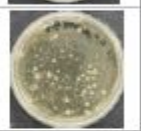
2) 고삼 - 포도상구균

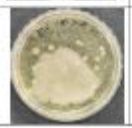
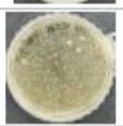
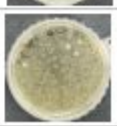
희석 횟수(번)	1	2	3	4
희석 X (22)				
희석 O (23)				

희석 횟수(번)	5	6	7	8
희석 X (22)				
희석 O (23)				

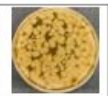
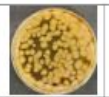
탐구 1 - MIC 및 MLC 실험 2차 결과

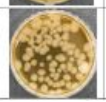
3) 황련 – 대장균

희석 횟수(번)	1	2	3	4
희석 X (22)				
희석 O (23)				

희석 횟수(번)	5	6	7	8
희석 X (22)				
희석 O (23)				

희석 횟수(번)	1	2	3	4

희석 X (22)				
희석 O (23)				

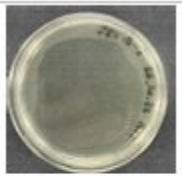
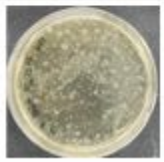
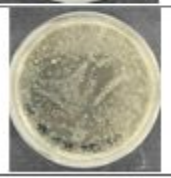
희석 횟수(번)	5	6	7	8
희석 X (22)				
희석 O (23)				

탐구 1 - MIC 및 MLC 실험 2차 결과

< 고삼 >

1) 대장균
- 1회 희석 농도에서 MLC 확인
- 2회 희석 시 세균 성장 > MLC 설정 어려움

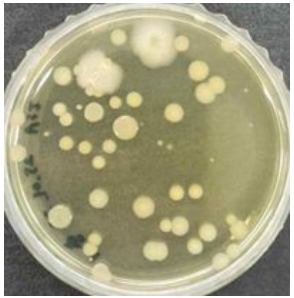
2) 포도상구균
- 완전한 균 억제 없음

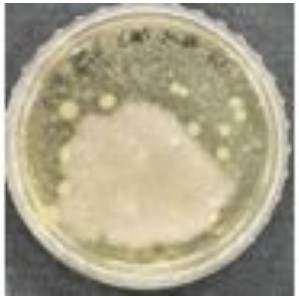
희석 횟수(번)	1	2	3
희석 X (22)			
희석 O (23)			

탐구 1 - MIC 및 MLC 실험 2차 결과

< 황련 >

- 대장균, 포도상구균 모두 완전한 균 억제 없음
- 곰팡이 오염 발생
- 균 집락이 일정한 패턴 없이 증감





탐구 2 - 사전 조사

- checkerboard test

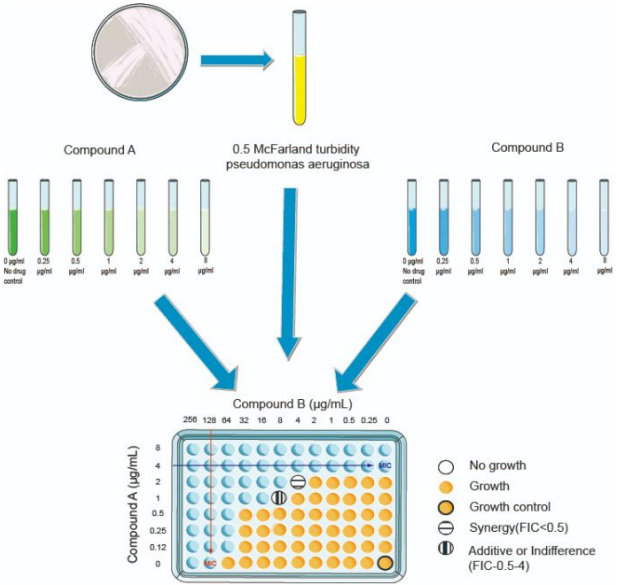


그림 1. Pseudomonas aeruginosa에 대한 시너지 효과를 보여주는 체커보드 방법.

탐구 2 - 실험 과정

1. 24-well Plate에 추출물 조합

- 황련과 뽕잎, 비트와 쑥, 고삼과 황련, 송이와 포도근, 깻잎과 관종, 고삼과 생강, 뽕잎과 포도근, 쑥과 생강, 깻잎과 송이, 비트와 관종 총 10가지

2. Spreading Plating

3. Paper disc 항균 테스트

4. inhibition zone 측정

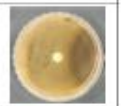
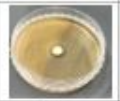
탐구 2 - 실험 결과

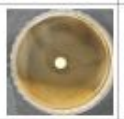
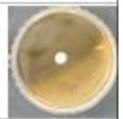
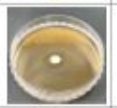
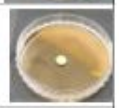
1) 대장균

종류	황련, 뽕잎	비트, 쑥	고삼, 황련	송이, 포도근	깻잎, 관중
정면					
측면					
크기(mm)	0	0.1	0.65	0.5	0.35

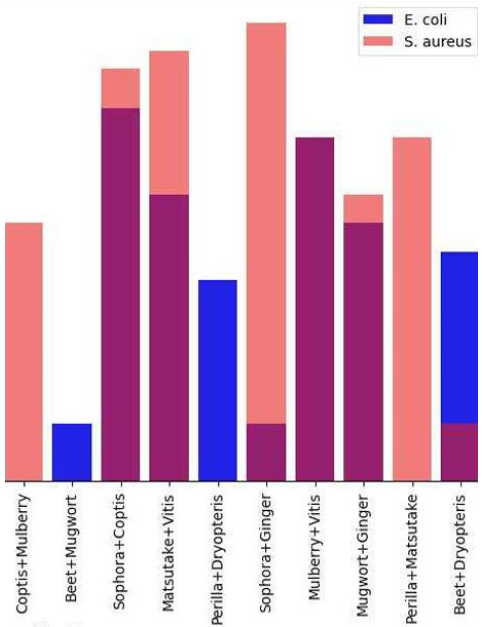
종류	고삼, 생강	뽕잎, 포도근	쑥, 생강	깻잎, 송이	비트, 관중
정면					
측면					
크기(mm)	0.1	0.6	0.45	0	0.4

2) 황색 포도상구균

종류	황련, 뽕잎	비트, 쑥	고삼, 황련	송이, 포도근	깻잎, 관중
정면					
측면					
크기(mm)	0.45	0	0.72	0.75	0

종류	고삼, 생강	뽕잎, 포도근	쑥, 생강	깻잎, 송이	비트, 관중
정면					
측면					
크기(mm)	0.8	0.6	0.5	0.6	0.1

탐구 2 - 실험 결과



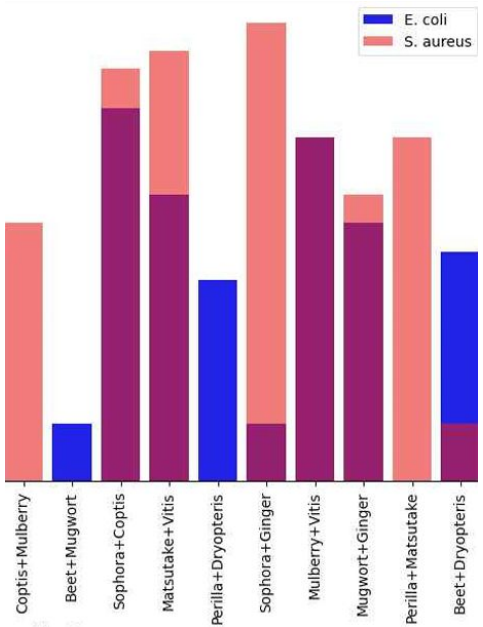
< 대장균 >

- 고삼+황련 > 뽕잎+포도근 > 송이+포도근

< 포도상구균 >

- 고삼+생강 > 송이+포도근 > 고삼+황련

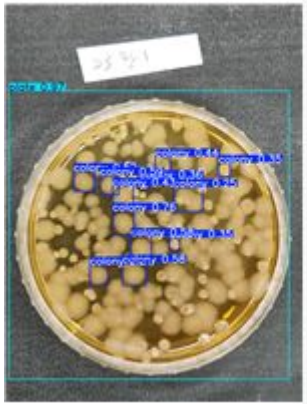
탐구 2 - 실험 결과



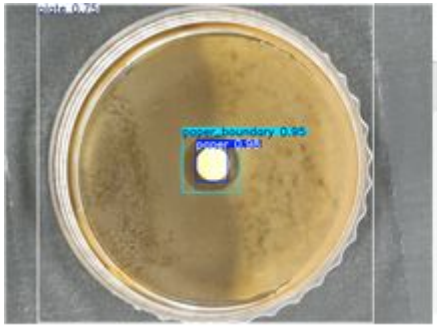
- 개별 활성이 없던 관중, 비트, 송이, 쑥도 조합에 따라 항균 활성 증가
- 특히, 고삼이 포함된 조합에서 강한 항균 효과 확인
- 조합에 따라 시너지 효과 발생 가능성 시사

> 고삼 기반 천연 항균제 개발 가능성 탐색 필요

자동화 프로그램



	Filename	Count
2	037404c8-	22
3	139f2dd2-	7
4	220a5248-	11
5	2262f679-	9
6	2a2d3171-	0
7	2ba74b81-	12
8	2f7229aa-2	17
9	3c27a375-	8
10	3d40a308-	5
11	4cd700ee-	21
12	4de58705-	2
13	5101e8e7-	12



	Filename	Count
2	0545b15f-	3.751289
3	58f44cad-2	4.487071
4	60e4008e-	4.288514
5	bb93922a-	6.6028

자동화 프로그램

```python
import os
import pandas as pd

def list_files(directory):
    try:
        return os.listdir(directory)
    except FileNotFoundError:
        return []

folder_path = r'C:\Users\kwonj\yolo_paper\runs\detect\predict2\labels'
files = list_files(folder_path)

data = []
for i in files:
    paper = 0
    boundary = 0
    with open(os.path.join(folder_path, i), 'r') as f:
        for line in f:
            if line.startswith('1'):
                boundary = line.split()[3]
            if line.startswith('0'):
                paper = line.split()[3]
    data.append([i, 2.5*float(boundary)/float(paper)])

df = pd.DataFrame(data, columns=['Filename', 'Count'])
df.to_excel('output.xlsx', index=False)
```

```python
from ultralytics import YOLO

model = YOLO('yolo_custom.pt')

import os

def list_files(directory):
    try:
        return os.listdir(directory)
    except FileNotFoundError:
        return []

folder_path = r'C:\Users\kwonj\yolo_paper\images'
files = list_files(folder_path)
print(files)
for i in files:
    model.predict(source = f'images/{i}', show=True, save=True, save_frames=True, save_txt=True,show_boxes=True)
```

결론

< 핵심 연구 결과 >

- 고삼: 대장균 & 황색포도상구균 모두에서 가장 강한 항균 효과
- 황련: 포도상구균에서 강한 효과, 대장균에서는 비교적 낮음

- 관중, 비트, 송이, 쑥: 개별 실험에서는 효과 미미했으나 일부 조합에서 항균 효과 증가

결론

< 시너지 효과 확인 >

- 고삼+황련, 고삼+생강 조합에서 가장 강한 항균 활성
- 특정 조합 시 예상보다 더 큰 항균 효과 → 추출물 간 시너지 효과 가능성

결론

< 의의 및 활용 >

- 천연 항균제 개발 가능성 제시
- 조합 최적화 전략 중요
- Python(Matplotlib & Seaborn)으로 시각화 → 한눈에 항균 효과 및 시너지 효과 분석 가능

결론

< 의의 및 활용 >

- Python(Matplotlib & Seaborn)으로 시각화

  → 한눈에 항균 효과 및 시너지 효과 분석 가능

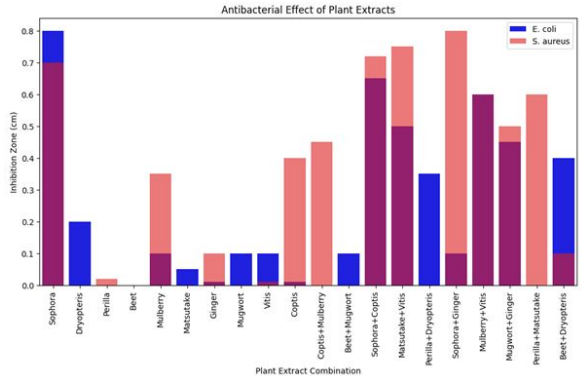
```python
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns

# 실험 데이터 정리
data = {
    "Combination": [
        "Sophora", "Dryopteris", "Perilla", "Beet", "Mulberry", "Matsutake",
        "Ginger", "Mugwort", "Vitis", "Coptis",
        "Coptis+Mulberry", "Beet+Mugwort", "Sophora+Coptis", "Matsutake+Vitis",
        "Perilla+Dryopteris", "Sophora+Ginger", "Mulberry+Vitis",
        "Mugwort+Ginger", "Perilla+Matsutake", "Beet+Dryopteris"
    ],
    "E_coli": [0.8, 0.2, 0, 0, 0.1, 0.05, 0.01, 0.1, 0.1, 0.01, 0, 0.1, 0.65, 0.5, 0.35, 0.1, 0.6, 0.45, 0, 0.4],
    "S_aureus": [0.7, 0, 0.02, 0, 0.35, 0, 0.1, 0, 0.01, 0.4, 0.45, 0, 0.72, 0.75, 0, 0.8, 0.6, 0.5, 0.6, 0.1]
}

df = pd.DataFrame(data)

# 그래프 시각화
plt.figure(figsize=(12, 6))
sns.barplot(x="Combination", y="E_coli", data=df, color='blue', label="E. coli")
sns.barplot(x="Combination", y="S_aureus", data=df, color='red', alpha=0.6, label="S. aureus")

plt.xticks(rotation=90)
plt.xlabel("Plant Extract Combination")  # 추출물 조합
plt.ylabel("Inhibition Zone (cm)")  # 항균 효과 (Inhibition Zone 크기)
plt.title("Antibacterial Effect of Plant Extracts")  # 식물 추출물의 항균 효과 비교
plt.legend()
plt.show()
```



제언

< 연구 한계점 및 보완 필요성 >

- FT-IR 측정 어려움 → 액체 시료의 한계로 인해 화학 성분 분석 불가능
- 균 성장 측정의 어려움 → 정확한 정량 분석 필요
- 곰팡이 오염 및 불규칙한 성장 패턴 → 실험 환경 통제 및 멸균 과정 강화 필요

제언

< 후속 연구 및 실용화 방향 >

1) 천연 항균제 개발 가능성

: 고삼, 황련, 생강 등의 추출물을 활용한 식품 보존제, 한방 항균제, 감염 치료제 개발

2) 추출물 조합 최적화 연구

: Checkerboard Test 및 FIC Index 분석을 통해 최적 항균 조합 탐색

제언

3) 실험 방법 개선 및 정량적 분석 필요

: OD600(광학 밀도) 측정 추가, HPLC 분석을 통한 항균 활성 성분 정량화

4) 약물 합성 및 실용화 연구

: 주요 활성 성분 정제 후 화학적 합성 및 유도체 연구 진행, LC-MS 분석을 활용한 최적 항균제 개발

5) AI 및 분자 모델링 활용

: 머신러닝 기반 예측 모델로 새로운 천연 항균제 후보군 탐색, 분자 모델링을 활용한 항균제

제언

< 기대 효과 >

- 천연 항균제 개발 및 실용화 가능성 확대
- 최적 조합 및 활성 성분 분석을 통한 신약 개발 기초 제공