

## 방기(*Sinomenium acutum*)의 물추출물이 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향

신옥호 · 유시승<sup>1</sup> · 이완규<sup>2</sup> · 신현경\*

한림대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>숙명여자대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>충북대학교 수의학과

## Effects of the Water-extract of *Sinomeniacuti Radix*(*Sinomenium acutum*) on the Growth of Some Intestinal Microorganisms

Shin, Ok-Ho, Sea-Song Yoo<sup>1</sup>, Wan-Kyu Lee<sup>2</sup> and Hyun-Kyung Shin\*

Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Chung-buk National University, Cheong-ju 360-763, Korea

**Abstract** — The water extract of *Sinomeniacuti Radix* (*Sinomenium acutum*) was found out to have a strong inhibition activity on the growth of *Clostridium perfringens*. The anti-bacterial activity was stable at the range of pH 1 to pH 13 and kept in a thermal treatment at 121°C for 15 minutes. The minimal inhibition concentration of the *Sinomeniacuti Radix* extract on the growth of *Cl. perfringens* was 1000 ppm. The *Sinomeniacuti Radix* extract also suppressed the growth of *Cl. ramosum*, *Cl. paraputrificum*, *Cl. butyricum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteriodes fragilis*, *Eubacterium limosum*. The extract, however, did not inhibit the growth of *Bif. adolescentis*, *Bif. infantis*, *Bif. longum*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. On the other hand, the extract showed a promoting effect for the growth of *Bif. animalis* and *Lactobacillus acidophilus*.

한약재는 그동안 대부분 임상적 경험을 기초로하여 발전되어 왔으며 주로 질병에 대한 직접적인 치료수단으로 이용되기 보다는, 예방치료의 목적으로 더 많이 사용되고 있다(1). 한약재료의 주된 성분은 alkaloides, 배당체, 탄닌, 탄수화물, 나무진, 인지질, 비타민, 스테로이드 등으로서 최근에 각 성분의 약리작용에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(2). 한약재 중 항균작용을 나타내는 물질로서는 flavonoids와 alkaloids 등과 같은 phytoalexins(3-6)에 대해 많은 연구가 이루어져 있는 바 이들은 미생물의 DNA, RNA, 단백질 및 세포막과 같은 생체 고분자 물질의 생합성을 방해함으로써 항균작용을 갖는다고 알려져 있다(7, 8). 국내에서도 우리가 상용하고 있는 한약재료로부터 항균성 물질을 검색하는 연구가 많이

진행되고 있고 이런 연구들은 주로 식품 보존시 문제가 되는 효모, 곰팡이, 식중독을 일으키는 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* 등이 주된 대상이 되고 있으나(9) 혐기성 장관세균에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 인체 장관내 존재하는 장내 미생물 중 병원성 미생물로는 *Clostridium perfringens*가 가장 흔히 발견되고 가장 독성이 강한 균으로 알려져 있다. 이 균은 흙속에서도 g당  $5 \times 10^4$  존재할 뿐 아니라 동양인에서는 분변 g당  $10^4$  정도 존재하고 서양인 분변에서는  $10^9$ 으로 다량 존재하고 있다(10). *Cl. perfringens*는 여러가지 다양한 독소를 생산하여 신생아의 괴사성 장염, pig-bel 질환, 담석증, 류마치스, 간암 및 virus 감염 등에 깊이 관여한다(10). 또한 *Cl. perfringens*는 노인이 되면 장관내에 그 수가 현저히 증가하는 것으로 미루어 사람의 노화에도 깊이 관여하고 있는 것으로 추정되고 있다(11). 한편 *Bifidobacteria*는 분변 g당  $10^9 \sim 10^{11}$  정도 존재하며 유해균의 장관내 정착을 억제할 뿐 아니라 발암물질을

Key words: *Sinomenium acutum*, *Clostridium perfringens*, anti-bacterial activity, intestinal microorganisms.

\*Corresponding author

제거하고 혈중 cholesterol 농도를 낮추어주는 등의 역할을 함으로써 최근 장내에 존재하는 가장 유익한 균으로 인정되고 있다(12).

저자들은 장내 균총의 개선을 위한 천연소재를 탐색하기 위한 연구의 일환으로 한약재로부터 장내 균총 중 대표적 병원성균인 *Cl. perfringens*의 생육을 억제시키는 소재를 검색한 결과(13) 방기(*Sinomenium acutum*, 防己)를 물, 아세톤, 에틸아세테이트 또는 부탄올로 추출한 추출물이 모두 이 균에 대해 강력한 항균활성을 나타내어 이중 한약재의 일반적인 섭취 형태인 물추출물이 주요 장내 세균의 생육에 미치는 영향을 조사하여 보고한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에 사용한 장관내 주요 미생물은 ATCC나 KCTC에서 구입하였으며(Table 1) 이들을 EGLF 한천배지(Table 2)에 계대하면서 사용하였다.

### 방기 물추출물의 제조

방기를 마쇄한 후 3배량의 물을 가하여 4°C에서 12시간씩 2회 추출한 후 추출액을 합하여 냉동 건조하여 보관하면서 본 실험에 사용하였다. 이때 방기 물추출물의 수율은 6.2%였다.

Table 1. List of strains used

<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25258
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703
<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC 25527
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ATCC 29521
<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC 15697
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15707
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC 25525
<i>Clostridium butyricum</i>	ATCC 19398
<i>Clostridium paraputrificum</i>	ATCC 25780
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124
<i>Clostridium ramosum</i>	ATCC 25582
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775
<i>Eubacterium limosum</i>	ATCC 8486
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCTC 3151
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCTC 3168
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600

### 방기 물추출물의 *Clostridium perfringens* 생육억제 농도 조사

방기 물추출물이 *Cl. perfringens*의 생육을 억제하는 유효 농도를 측정하기 위하여 reinforced clostridial broth medium(Table 3)에 방기 물추출물을 농도별로 첨가한 후 혐기적으로 액체 배양하면서 균 증식 억제 정도를 조사하였다.

### 항균 활성 방기 물추출물의 열 및 pH 안정성 조사

항균 활성물질의 열안정성을 측정하기 위하여 방기 물추출물을 40°C에서 90°C까지 1시간 동안 열처리하

Table 2. EGLF agar medium for maintenance of anaerobic bacteria

Lab-lemco powder (Oxoid)	2.1 g
Proteose peptone No. 3	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0 g
Glucose	1.0 g
Soluble starch	0.5 g
L-Cystine	0.2 g
Anti-form (Tween 80)	5 ml
Agar	17.0 g
0.1% resazurin	1.0 ml
Liver extract	75 ml
Fildes solution*	40 ml
4% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	100 ml
Distilled water	100 ml
pH 7.6~7.8	

\*One of the components of Fildes solution, horse blood, was replaced with cow blood.

Table 3. Medium composition of reinforced clostridial broth

Bacto-Tryptose	10 g
Bacto-Beef extract	10 g
Bacto-Yeast extract	3 g
Bacto-Dextrose	5 g
Sodium chloride	5 g
Soluble starch	1 g
L-Cystein hydrochloride	0.5 g
Sodium acetate	3 g
Bacto-agar	0.5 g
Distilled water	1000 ml
pH 7.6	

**Table 4. Medium composition of modified EG broth**

Beef extract	2 g
Proteous peptone No. 3	10 g
Yeast extract	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
Soluble starch	0.5 g
Glucose	1.5 g
L-Cystein hydrochloride	0.4 g
Silicon antifoamer	0.25 ml
Tween 80	0.5 g
Distilled water	1000 ml
pH 7.6	

거나 121°C 에서 15분간 열처리한 후 reinforced clostridial broth medium에 1000 ppm이 되도록 첨가한 다음 *Cl. perfringens*의 생육억제능을 측정하였다. 한편 방기 물추출을 염산이나 수산화나트륨으로 pH 1에서 pH 13까지 조정한 후 37°C 에서 1시간 방치한 다음 다시 pH 7로 중화시켜서 *Cl. perfringens*의 생육억제 정도를 측정하였다.

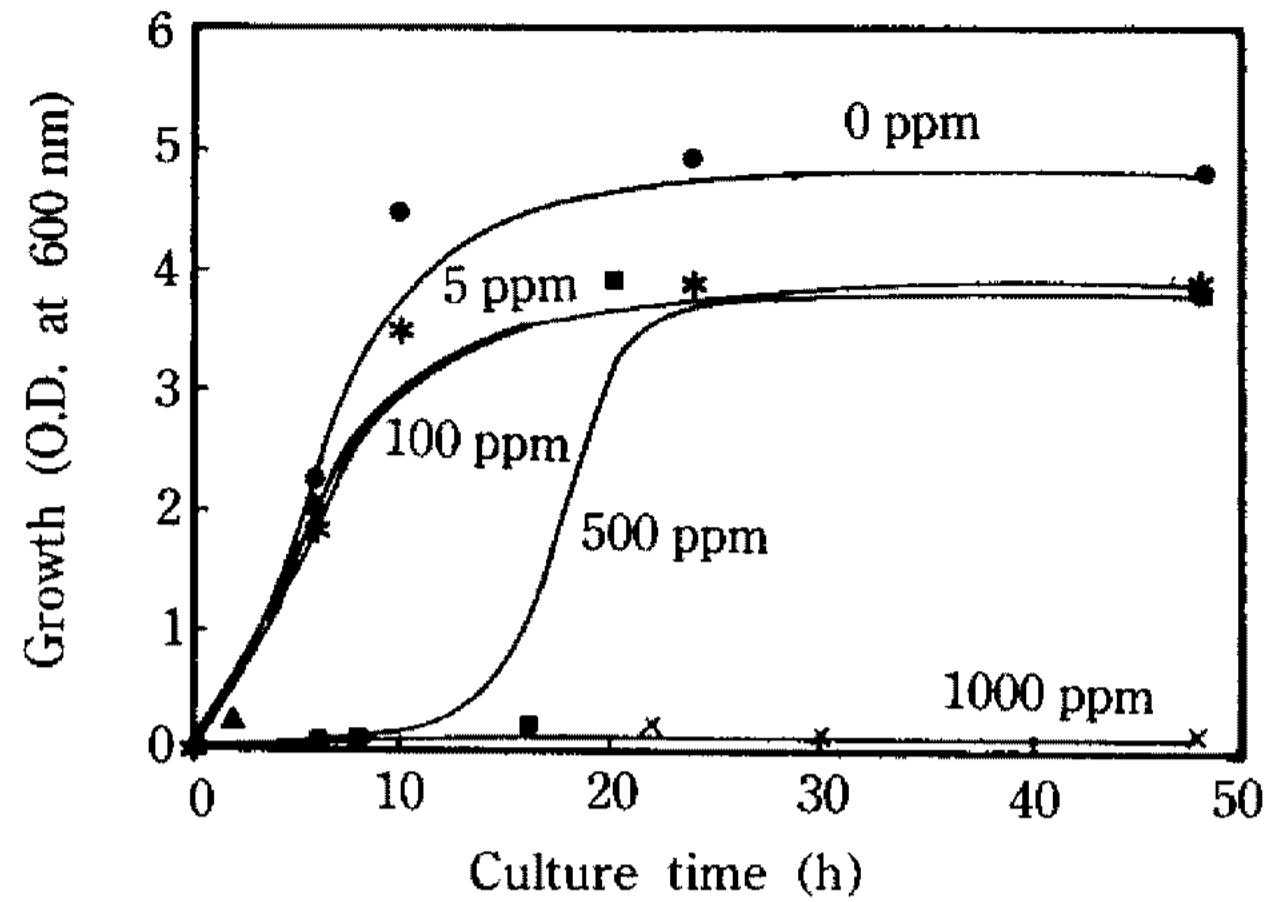
#### 방기 물추출물의 장내 미생물 증식효과 조사

방기 물추출물의 장내 주요균에 대한 증식효과를 조사하기 위하여 시험균 1백금니를 modified EG 액체 배지(Table 4) 10 ml에 접종하여 37°C 에서 48시간 동안 배양하여 종균을 만들고 이를 동 배지에 방기 추출물이 1,000 ppm이 되도록 첨가한 배양액에 1%량 접종하여 48시간 동안 혐기배양하면서 균 증식 정도를 600 nm에서 optical density로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 방기 추출물에 의한 *Clostridium* 속균의 생육억제

방기 물추출물을 5 ppm에서 1000 ppm까지 농도별로 첨가한 배지에 대표적 장내 유해균인 *Cl. perfringens*의 배양액을 1% 되도록 접종한 다음 37°C 에서 48시간 동안 배양하면서 생육상태를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 5 ppm의 방기 물추출물 첨가로 초기균 생육에는 큰 영향이 없었으나 최종 균수는 감소되었다. 500 ppm을 첨가할 경우 초기균 및 최종 균수가 모두 억제되었으며, 1000 ppm 첨가로 *Cl. perfringens*의 균 생육은 완전히 억제되었다. 한편 방기 추출물이 *Cl. perfringens*에 대해서 뚜렷한 항균력을 나타냄에 따라 *Clostridium*속 균종 장내에 자주 나



**Fig. 1. Growth inhibition of *Cl. perfringens* with *Sino-meniicuti Radix* extract.**

타나는 *Cl. ramosum*, *Cl. paraputrificum* 및 *Cl. butyricum*의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과, 1,000 ppm 첨가시 Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 이들 세균의 생육을 모두 강하게 억제하였다.

현재까지 알려진 방기의 약효성분으로 alcohol, acetone 및 chloroform과 같은 유기용매에 의해서 추출되는 sinomenine류와 sitosterol 등이 보고되어 있고(14) 이중 sinomenine은 진통작용, 소염작용, 해열작용, 이뇨작용 및 기침을 멈추게 하는 작용을 하는 것으로 알려져 있으나(18) 이 성분의 항균활성에 대한 보고는 아직 찾아볼 수 없었다. 따라서 방기 추출물 중 *Clostridium*에 대한 항균 활성물질에 대한 순수분리 및 화학구조의 규명 등이 앞으로 더 이루어져야 할 것이다.

#### 항균 활성의 열 및 pH 안정성

방기 물추출물을 40°C 에서 90°C 까지 10°C 간격으로 1시간 동안 그리고 121°C 에서 15분간 열처리한 후 균 생육 정도를 *Cl. perfringens*를 48시간 배양하여 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 90°C 에서 1시간 및 121°C 에서 15분 열처리에 서도 *Cl. perfringens*의 생육을 완전히 억제하는 것으로 보아 방기의 추출물 중 항균활성을 나타내는 성분은 열에 대단히 안정한 물질임을 알 수 있다. 한편 방기 추출물이 나타내는 항균 활성의 pH 변화에 대한 안정성을 조사하기 위하여 방기 추출물의 pH를 1부터 13까지 조절한 후 *Cl. perfringens*의 생육 억제활성을 측정된 결과 Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이 강산 및 강알카리 조건에서도 항균 활성이 잘 유지되는 것을 알 수 있다.

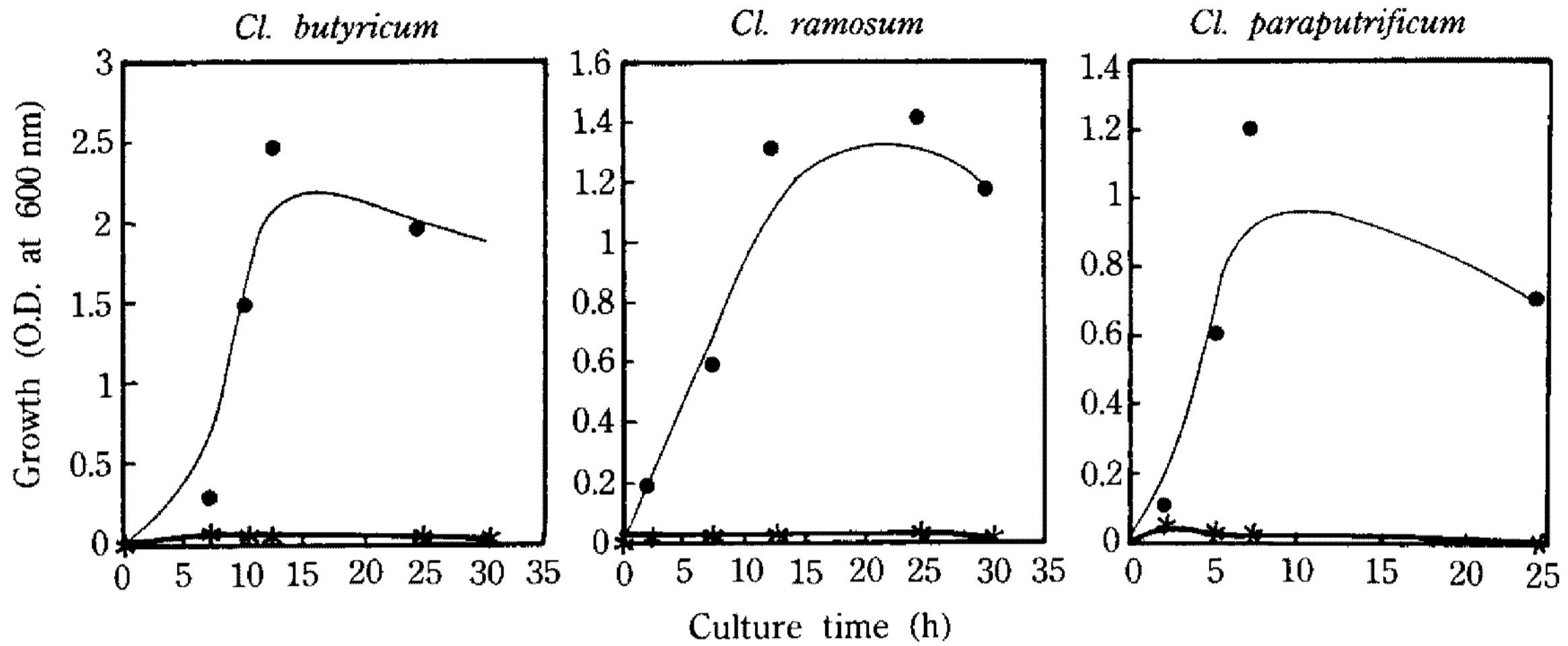


Fig. 2. Growth inhibition of some *Clostridia* with (\*; 1,000 ppm) or without (●) *Sinomeniacuti Radix* extract.

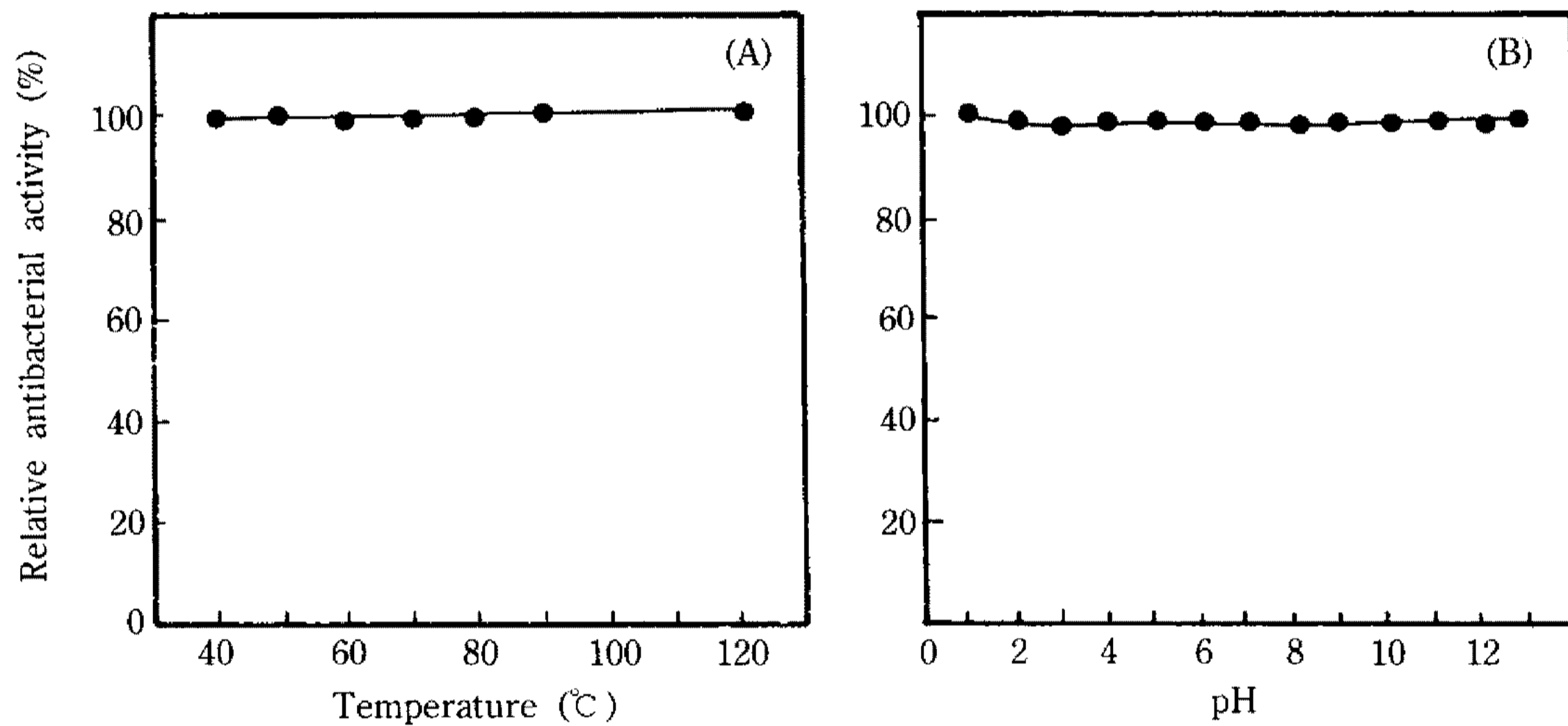


Fig. 3. Stabilities of the antibacterial activity against *Cl. perfringens* of *Sinomeniacuti Radix* extract treated at different temperature (A) and pH (B).

**방기 추출물이 기타 장내 미생물의 생육에 미치는 영향**

방기 추출물이 *Clostridium*속 균 이외의 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 액체 배지에 방기의 물추출물을 1,000 ppm씩 첨가하여 생육실험을 행하였다. 장내 세균 중 대표적 유익균인 *Bifidobacterium* 중 *Bifidobacterium adolescentis*는 방기 추출물에 균생육이 전혀 영향을 받지 않았으며, *Bif. infantis*는 생육 초기에는 생육촉진 효과가 있었으나 최종 균수에는 큰 영향이 없었다(Fig. 4). 그리고 *Bif. longum*은 초기 균생육은 약간 억제되었으나 최종 균수는 증가되었으며, *Bif. bifidum*은 균생육이 많이 억제되었다. 동물 장관내에 많이 존재하는 *Bif. thermophilum*은 방기 추출물에 의하여 최종 균수가 감소되었으나 *Bif. animalis*의 경우 최종 균수가 증가

되었다(Fig. 4). 한편 인체내에 존재하는 주요 유익균인 *Lactobacillus acidophilus*의 경우 모두 방기 추출물에 의해 균생육이 촉진되었다(Fig. 5). 그러나 인체 장관내 가장 많이 존재하는 것으로 알려진 *Bacteroides fragilis*와 *Eubacterium limosum*은 방기 추출물에 의하여 균생육이 강하게 억제되었으며(Fig. 6), 반면 편성혐기성 Gram 음성균인 *E. coli*와 *Enterococcus faecalis* 그리고 염증을 일으키는 대표적 화농균인 *Staphylococcus aureus*의 균생육에는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 7).

이상 조사된 바와 같이 방기 추출물은 *Clostridium*속균, *Bif. bifidum*, *Bacteroides fragilis* 및 *Eubacterium limosum*에 대해서는 강한 생육억제작용을 나타낸 반면 *Lactobacillus acidophilus*는 생육이 강하게 촉진되는 흥미있는 결과를 나타낸 것은 균의 특

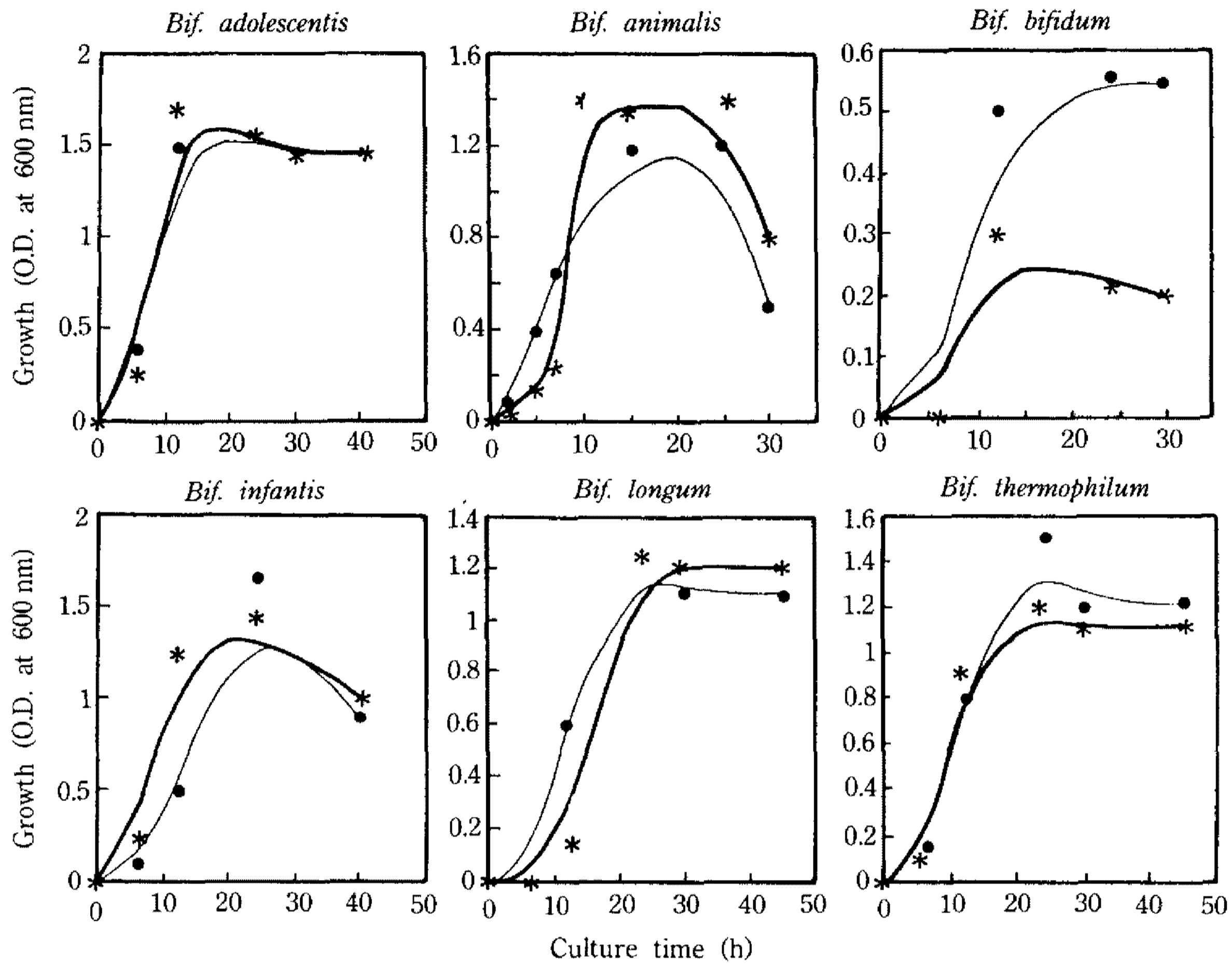


Fig. 4. Growth of some *Bifidobacteria* with (\*; 1,000 ppm) or without (●) *Sinomeniiaucti Radix* extract.

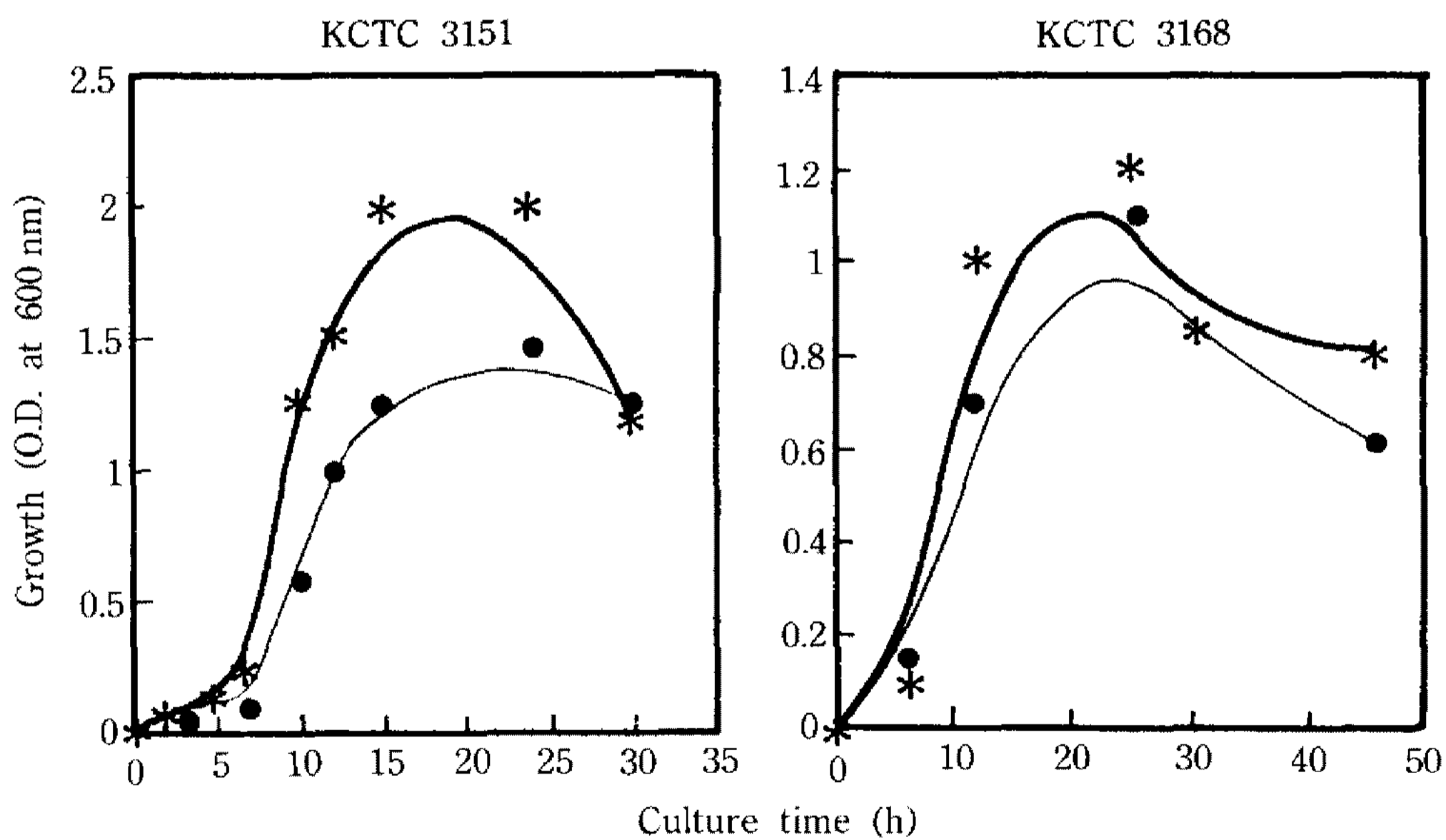


Fig. 5. Growth of *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3151 and KCTC 3168 with (\*; 1,000 ppm) or without (●) *Sinomeniiaucti Radix* extract.

성에 따른 영향도 있겠으나 방기 물추출물에 서로 다른 여러 성분들이 혼합되어 있을 가능성이 높다. *Clostridium*은 인체 장관내에 분변 g당  $10^5$  이하로

존재하면서 숙주의 노화를 촉진하고 질병을 유발시키는 것으로 보고되어 있는데(10), 방기 물추출물이 선택적으로 *Clostridium*의 생육을 잘 억제하였으므로

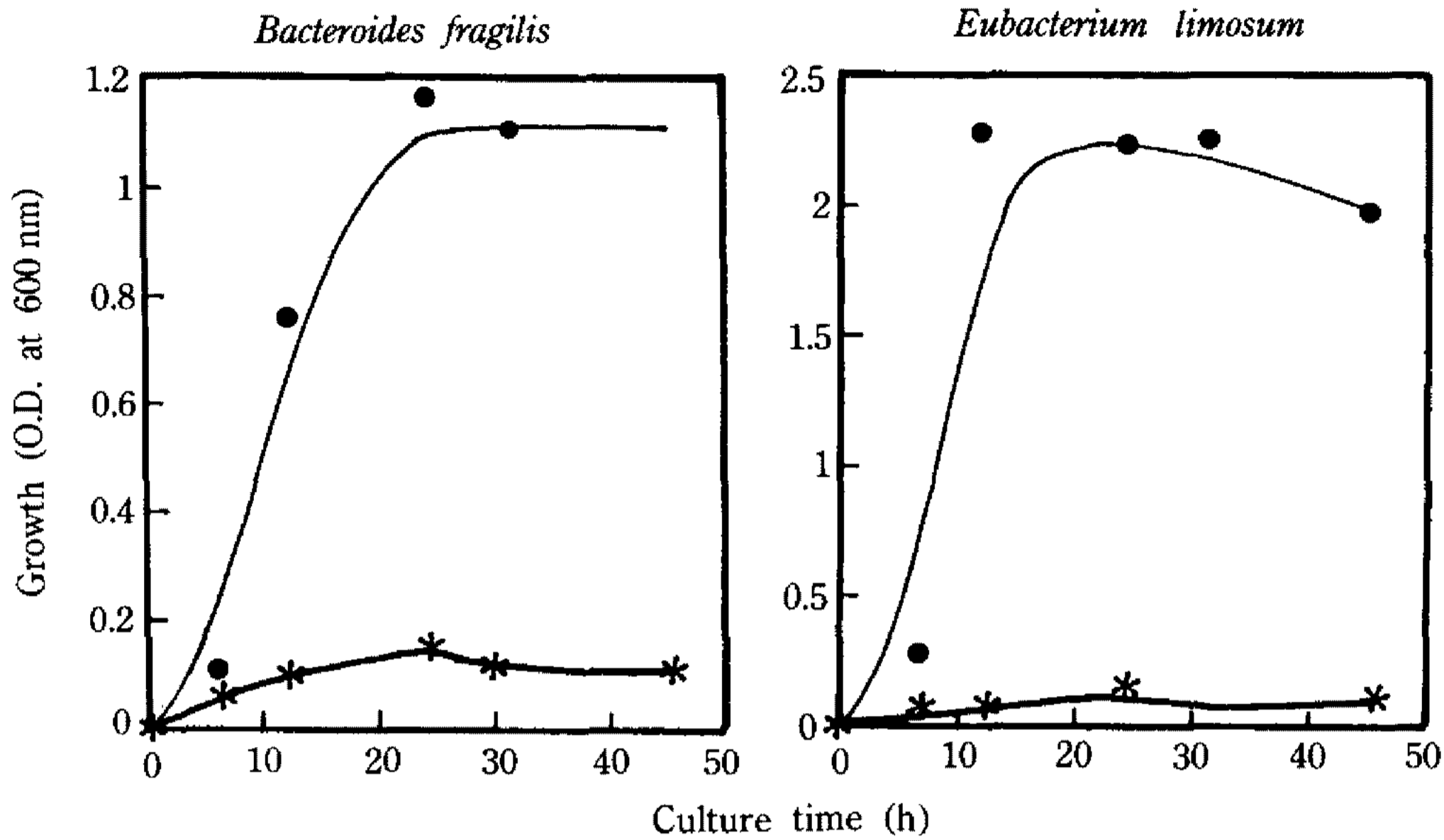


Fig. 6. Growth of *Bacteroides fragilis* and *Eubacterium limosum* with (\*; 1,000 ppm) or without (●) *Sinomeniacuti Radix* extract.

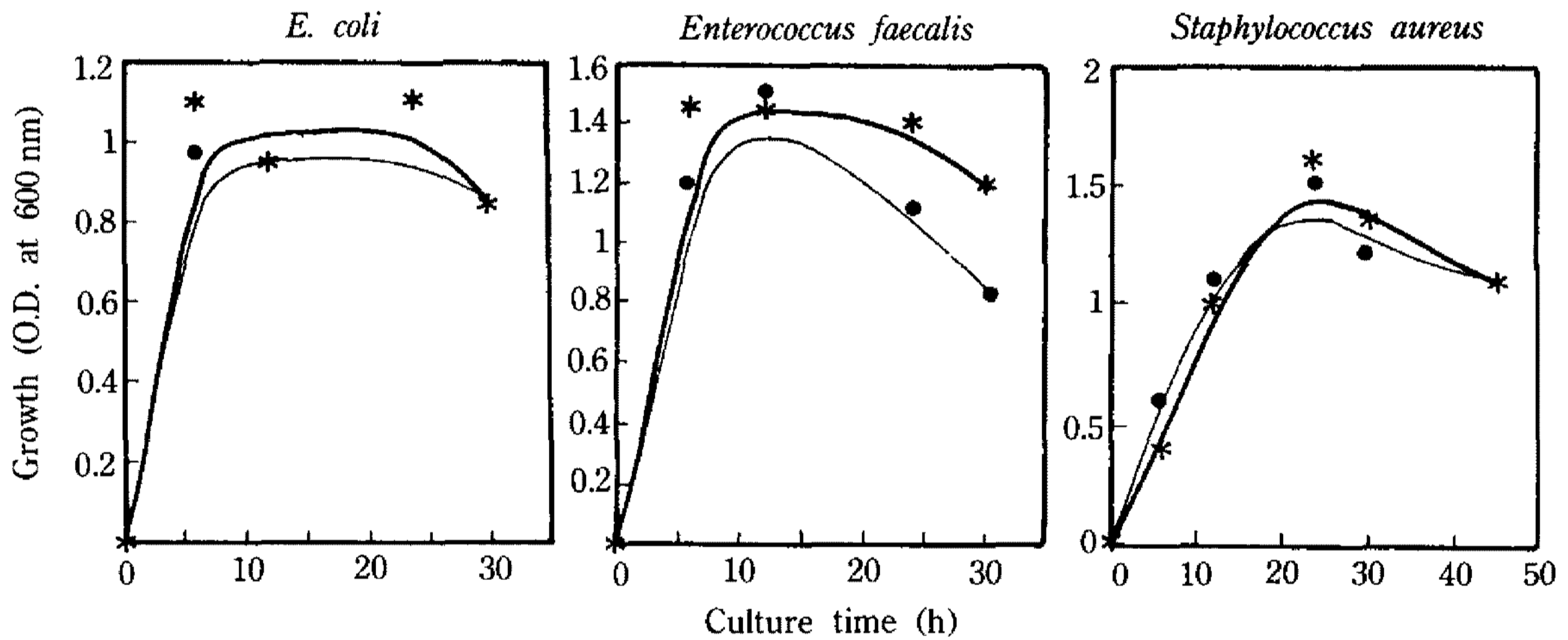


Fig. 7. Growth of *E. coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* with (\*; 1,000 ppm) or without (●) *Sinomeniacuti Radix* extract.

이는 장내 균총 개선에 매우 유효하게 사용될 가능성이 있을 것으로 생각된다. 최근 *E. coli*와 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* 등의 생육을 잘 억제하는 것으로 알려진 flavonoids, alkaloids 및 caffeic acid sugar ester 등에 대한 연구는 많이 되어 있으나 (4-8), *Clostridium*을 선택적으로 억제하는 물질에 대한 연구는 미약한 편이다. 식물체내에 존재하는 항균 활성물질은 ethanol, methanol, chloroform 등과 같은 유기용매에 의해서 잘 추출된다고 보고되어 있으나(4-8) 한약재의 일반적인 섭취 형태인 물추출물의 항균활성에 대한 연구는 찾아보기 어렵다. 방기

물추출물 중 *Clostridium*을 선택적으로 억제하는 성분 에 대해서는 앞으로 연구가 더 이루어져야 할 것이며 그 화학적 구조분석과 작용기작에 대한 연구와 더불어, 장내 균총에 대한 종합적인 영향을 파악하기 위한 *in vivo* 실험이 행해져야 할 것이다.

### 요 약

한약재로부터 장내의 대표적 유해균인 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제시키는 소재를 탐색한 결과 방기 물추출물에서 강력한 항균활성을 발견하였다. 방기 추출물의 항균활성은 pH 1부터 pH 13까지의



범위에서 안정하였으며 121°C 에서 15분간의 열처리에서도 활성이 유지되었다. 방기 추출물은 *Cl. perfringens*, *Cl. paraputrificum*, *Cl. ramosum* 및 *Cl. butyricum* 등 실험에 사용한 모든 *Clostridium* 속균의 생육을 강력하게 억제하였다. 그리고 *Clostridium* 이외의 주요 장내균에 대한 영향을 조사한 결과 *Bif. bifidum*, *Bacteroides fragilis* 및 *Eubacterium limosum*에 대해서는 역시 그 생육을 억제하였으나 *By. radoscentis*, *Bif. infantis*, *Bif. longum*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* 그리고 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 생육억제 효과가 크게 나타나지 않았다. 반면 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bif. animalis*에 대해서는 생육촉진효과를 보여주었다.

### 참고문헌

1. 과학백과사전출판사. 1990. 실용동의약학, Pp. 10-18. 일월서각.
2. 문관심. 1991. 약초의 성분과 이용, Pp. 26-29. 일월서각.
3. Mitscher, L.A., S.R. Gollapudi, D.C. Gerlach, S. D. Drake, E.A. Veliz and J.A. Ward. 1988. Erycristin, a new antimicrobial petrocarpan from *Erythrina crista-galli*. *Phytochemistry* **27**: 381-385.
4. Tomas-Barberan, F.A., J.D. Msonthi and K. Hostettann. 1988. Antifungal epicuticular methylated flavoids from *Helichrysum intens*. *Phytochemistry* **27**: 753-755.
5. Ravn, H. and I. Brimer. 1988. Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subsp. *major*. *Phytochemistry* **27**: 3433-3437.
6. Mitscher, L.A., S.K. Okwuoke, S.R. Gollapudi, S. Drake and E. Avona. 1988. Antimicrobial petrocarpans of Nigerian *Erythrina mildbraedii*. *Phytochemistry* **26**: 2231-2234.
7. Mori, A., C. Nishino, N. Enoki and S. Tawata. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. **26**: 2231-2234.
8. Tomas-Lorente, F., E. Iniesta-Sanmartin, F.A. Tomas-Barberan, W. Trowitzsch-Kienast and V. Wray. 1989. Antifungal phloroglucinol derivatives and lipophilic flavonoids from *Helichrysum decumbens*. *Phytochemistry* **28**: 1613-1615.
9. 과학백과사전출판사. 1990. 실용동의약학. Pp. 29. 일월서각.
10. Smith, L.D.S. 1979. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Reviews of infectious disease* **1**: 254-262.
11. Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* **1**: 3-24.
12. Laroia, S. and J.H. Martin. 1990. Bifidobacteria as potential dietary adjuncts in cultured dairy products. *Cultured dairy products journal*. **November**: 18-22.
13. 구영조, 신현경. 1992. 국산식품소재의 장내 미생물에 대한 영향 분석 및 이를 이용한 기능성 식품개발 (특정연구과제보고서), 과학기술처.
14. 과학백과사전출판사. 1990. 실용동의약학, Pp. 371-372. 일월서각.
15. Mitsuoka, T. 1984. 腸内菌의 세계, Pp. 320. 叢文社, 東京.
16. Mitsuoka, T. 1984. 腸内菌의 세계, Pp. 45-46. 叢文社, 東京.
17. 李時診. 1977. 도해 본초강목, Pp. 761-762. 고문사.
18. 문관심. 1991. 약초의 성분과 이용, Pp. 257-259. 일월서각.

(Received May 15, 1992)