

목통(*Akebia quinata* Decaisne)의 물추출물이 *Clostridium perfringens* 및 주요 장내미생물의 생육에 미치는 영향

한복진¹ · 우상규 · 신현경*

*한림대학교 식품영양학과, ¹한림전문대학 전통조리과, 한양대학교 식품영양학과

Effects of the Water Extract of *Akebia* (*Akebia quinata* Decaisne) on the Growth of *Clostridium perfringens* and Some Intestinal Microorganisms

Bok-Jin Han¹, Sang-Kyu Woo and Hyun-Kyung Shin*

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

¹Department of Traditional Cuisine, Hallym Junior College, Chuncheon 206-850, Korea

Department of Food Science and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-790, Korea

Abstract — As a result of screening the medicinal herbs which selectively control human intestinal microflora, water extract of *Akebia quinata* Decaisne was proved to have a strong inhibitory activity against the growth of *Clostridium perfringens*, a major harmful intestinal bacterium. The anti-bacterial activity was stable under the thermal treatment at 100°C for 120 min and in a range of pH 1 to 11. In addition, the water extract of *Akebia quinata* Decaisne showed the antibacterial activities against five different strains of *Clostridia* including *C. perfringens*. On the contrary, the extract did not inhibit the growths of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*. The extract, however, suppressed markedly the growth of *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus aureus* *in vitro*. Alike in the mixed culture inoculated with human feces as starter, *in vivo* tests using rats showed that the extract tends to increase the numbers of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in the intestinal microflora of rats, whereas those of *Clostridia* were attenuated.

사람이나 동물의 장내균총의 구성은 생활환경이나 식이가 일정하고 숙주가 건강하다면 안정된 균형을 유지하지만, 숙주가 섭취한 식이, 약물, 미생물, 기상, 스트레스 또는 세균대사물 등의 요인에 의하여 변동을 일으킨다(1). Hoffmann은 건강한 성인의 분변균총은 *Bacterioides*가 약 60%, *Bifidobacteria*와 *Lactobacilli*가 약 40%, *E. coli*와 *Streptococcus*가 각각 1%, 그리고 *Clostridium*이 1% 이하로 구성되어 있다고 보고하였다(2). 건강하게 장수하려면 *Bifidobacterium* 등의 유익균을 많이, 그리고 *C. perfringens* 등의 유해균은 적은 상태로 장내균총을 유지시키는 것이 제안되고 있다(3). 유해작용을 하는 장내세균으로는 *Clostridium*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* 등이 알려져 있으며, 그중 *C. perfringens*는 각종 독소의 생산과 발암관련 물질인 아민을 생성하며, 특히 노

년기에 접어들면서 급격히 증가하는 대표적 유해균으로 알려져 있다(4). *C. perfringens*는 사람이나 동물뿐만 아니라 토양, 하수 등에서도 발견되고 있는데, 사람의 질병, 식품의 부패, 유아의 괴사성 장염 등도 유발시킨다(5)고 하며, 이러한 질병들은 이 균이 분비하는 효소나 독소 등에 기인한 것으로 보고되어 있다(4, 6).

본 연구자들은 장내균총 개선을 위한 천연소재를 탐색하는 연구의 일환으로 식품소재 및 한약재로부터 장내의 대표적인 유해균인 *C. perfringens*의 생육을 저해시키는 소재를 검색하여 방기, 감자의 단백질 등에 대하여 보고한 바 있으며(7-11), 계속적으로 장내미생물에 영향을 미치는 유효소재를 탐색한 결과, 한약재 중 목통(木通, *Akebia Caulis*)이 *C. perfringens*를 포함한 *Clostridia*와 그밖의 유해균을 저해하는 강력한 활성을 나타내었음을 발견하였다. 한약재 중의 항균성 물질을 검색하는 연구로는 식품부패에 관여하는 미생물에 대한 항균 효과에 대한 연구들이 주로 보고되고 있다(12-14).

Key words: *Akebia quinata* Decaisne, *Clostridium perfringens*, antibacterial activity, intestinal microorganisms

*Corresponding author

목통은 통초(通草)라고도 불리는데, 산야에서 자생하는 으름(*Akebia quinata* DECAISNE)의 덩굴성 줄기를 가로로 잘라 건조한 것으로(15) 소염성 이뇨제로 많이 쓰이고 수종(水腫), 배농(排膿), 진통(鎮痛), 통혈기(通血氣), 통유(通乳), 통경(通經), 진해(鎮咳), 해열(解熱) 등에 효과가 있는 것으로 알려져 한약재로 사용되어 왔다(15-17).

따라서 본 논문에서는 목통 물추출물이 *C. perfringens*를 비롯한 주요 장내세균의 생육에 미치는 영향을 *in vitro* 실험으로 조사하고, 흰쥐에 목통분말을 섭취시켜 흰쥐의 주요 장내균총 변화에 미치는 영향을 조사하여 이를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 장내미생물은 Table 1과 같이 8속 11종으로 ATCC나 KCTC에서 구입하여 사용하였다. 이들 균주는 EGLF 한천배지(18) 상에서 계대하면서 실험하기 바로 전에 reinforced clostridial broth medium(RCM)(18)에서 활성화시켜 사용하였다.

배양 방법 및 장치

장내세균의 혐기적 배양은 Mitsuoka 등의 방법(1, 18)에 따라서 산소를 제거한 CO₂ 가스로 치환하여 배양하였다.

목통 물추출물의 제조

목통를 마쇄한 후 10배량의 물을 가하여 50°C 항온조에서 1시간씩 3회 진탕추출한 후 수분함량이 5° Bx까지 되도록 감압농축하여 냉동보관하면서 본 실험에 사용하였으며, 이때 목통 물추출물의 수율은

고형분으로 환산하여 12%이었으며 실험에 첨가한 농도표시는 고형분으로 계산한 것이다.

목통 물추출물의 *Clostridium perfringens* 생육저해 농도 조사

목통물추출물이 *C. perfringens*의 생육을 저해하는 유효농도를 측정하기 위하여 RCM 배지에 목통 물추출물을 농도별로 첨가한 후 활성화시킨 *C. perfringens*를 0.1% 량을 접종하여 48시간 동안 배양하면서 생육 저해정도를 조사하였다.

목통 물추출물의 *C. perfringens*에 대한 생육저해 활성물질의 열 및 pH 안정성 조사

목통 물추출물 중 *C. perfringens*에 대한 생육저해 활성물질의 열안정성을 측정하기 위하여 100°C에서 10분부터 120분까지 열처리를 하거나 121°C에서 5분, 10분, 15분 동안 열처리한 후 RCM 배지에 예비실험 결과 *C. perfringens*의 생육저해에 충분한 붕도로 나타난 1,000 ppm 되도록 첨가하여 *C. perfringens*의 생육저해 활성을 측정하였다. 또한 목통 물추출물을 염산이나 수산화나트륨으로 pH 1~11까지 조정한 후 37°C에서 1시간 방치한 다음 다시 pH 7로 중화시켜서 *C. perfringens*의 생육저해 정도를 측정하였다.

목통 물추출물이 주요 장내미생물의 생육에 미치는 효과 조사

목통 물추출물의 주요 장내균에 대한 생육효과를 조사하기 위하여 modified EG 액체배지(18)에 목통 물추출물을 1,000 ppm이 되도록 첨가하여 100°C에서 5분간 열처리한 후 활성화 시킨 대표적 장내미생물 표준균주를 배양액의 1% 량을 접종하여 48시간동안 혐기배양하면서 균의 상대적 증식정도를 600 nm에서 optical density(O.D.) 값과 pH 값을 측정하여 조사하였다.

인변중균의 혼합배양에 의한 *in vitro* 평가

목통 물추출물이 주요장내균의 혼합배양시 균총의 조성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 modified EG 액체배지에 목통 물추출물을 1,000 ppm이 되도록 첨가하여 살균한 후에 건강한 한국인(32세, 여)의 분변을 혐기성 희석액(18)으로 10⁻³배로 희석한 후 배양액의 2.5%량을 접종하여 37°C 항온기에서 48시간 배양하면서 O.D. 값과 pH 값을 측정하였다. 배양중의 생균수(colony forming unit; cfu/ml) 조사를 위하여 배양 24시간 후에 배양액을 취하여 총혐기성균 검출배지로 BL 배지(18), *Bifidobacteria*는 BS 배지(18), *Lactobaci-*

Table 1. List of intestinal bacteria used in this study

Genera	Species
<i>Clostridium</i>	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124
	<i>C. paraputrificum</i> ATCC 25780
	<i>C. ramosum</i> ATCC 25582
	<i>C. butylicum</i> ATCC 19398
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> ATCC 15707
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> KCTC 3151
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> ATCC 11775
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 12600
<i>Bacteroides</i>	<i>Bac. fragilis</i> ATCC 25285
<i>Enterococcus</i>	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 19433
<i>Eubacterium</i>	<i>Eub. limosum</i> ATCC 8486

Table 2. Composition of experimental diet (g/kg)

Ingredient	Amount
Sucrose	500.0
Cornstarch	150.0
Casein	200.0
Cellulose	50.0
Corn oil	50.0
DL-methionine	3.0
Choline bitartrate	2.0
AIN-vitamin mixture*	10.0
AIN-mineral mixture**	35.0
*Vitamin mixture (g/kg)	
Thiamin HCl	600 mg
Riboflavin	600 mg
Pyridoxine HCl	700 mg
Nicotinic acid	3.0 g
D-Calcium pantothenate	1.6 g
Folic acid	200 mg
D-Biotine	20 mg
Cyanocobalamin	200 mg
Vitamin A	400,000 I.U.
dl- α -Tocopheryl acetate	5,000 I.U.
Cholecalciferol (vitamin D ₃)	2.5 mg
Menaquinone	5.0 mg
Sucrose, finely powered to make	1,000 g
**Mineral mixture (g/kg)	
Calcium phosphate, dibasic	500.0 g
Sodium chloride	74.0 g
Potassium citrate, monohydrate	220.0 g
Potassium sulfate	52.0 g
Magnesium oxide	24.0 g
Manganous carbonate	3.5 g
Ferric citrate	6.0 g
Zinc carbonate	1.6 g
Cupric carbonate	0.3 g
Potassium iodate	0.01 g
Sodium selenite	0.01 g
Chromium potassium sulfate	0.55 g
Sucrose, finely powered to make	1,000 g

illus는 LBS 배지(18), *E. coli*는 DHL 배지(18), *C. perfringens*는 NN 배지(18)에 도달한 다음, 48시간 배양후 생균수를 각각 측정하였다.

동물사육실험

실험쥐를 이용하여 목통이 장내 미생물에 미치는 영향을 조사하였다. 실험동물은 체중이 100~130 g 정도되는 생후 4주된 Sprague-Dawley계 숫쥐를 2주

일동안 일정조건에서 고형사료로 적응시킨 후, 한군당 10마리씩 완전 임의배치하여 2주간 급식하였다. 본 실험에서 사용한 식이는 AIN standard(19)를 참고하여 Table 2와 같이 배합하였으며, 실험식은 대조구는 정상식이를, 시험구는 건조한 목통분말을 정상식의 2%가 되도록 첨가하여 사용하였고, 사료와 물은 자유급식시켰다. 흰쥐의 장내균총 조사는 흰쥐를 에테르로 희생시켜 해부한 후 대장에서 내용물을 분리하여 그 중 1g을 취하여 혐기희석액으로 10⁻⁸배까지 희석한 다음 총혐기성균 검출배지로서 BL 배지, *Bifidobacteria*는 BL 배지에서 현미경으로 동정 확인하였고, *Lactobacilli*는 LBS 배지, *Bacteroides*는 NBGT 배지, *Eubacteria*는 ES 배지, *Peptococcaceae*는 PS 배지, *Streptococcus*는 TATAC 배지, *Staphylococcus*는 PEES 배지, *Enterobacteriaceae*는 DHL 배지, *Clostridia*는 분변 희석액을 80°C에서 10분간 열처리하여 PNC 배지를 사용하여 도달한 다음 48시간 배양후 생균수를 각각 측정하였다. 균총검사에 사용한 배지는 모두 Mitsuoka의 방법(1, 18)에 따랐다.

통계분석

동물사육실험에서 얻은 결과치는 SPSS(Statistical package for social science)를 이용하여 대조구와 실험구와의 차이를 유의수준 p=0.05에서 T-검정과 분산분석(ANOVA, analysis of variance)으로 검정하였다.

결과 및 고찰

목통 물추출물의 *Clostridium perfringens* 생육저해 효과

목통의 물추출물을 5 ppm에서 2,000 ppm까지 농도별로 첨가한 RCM 배지에 장내 유해균인 *Clostridium perfringens*의 배양액을 접종한 다음 48시간 동안 배양하면서 생육상태를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 목통 물추출물을 5 ppm 첨가한 경우 균의 생육이 거의 저해되지 않았고, 500 ppm 이상 첨가한 경우는 생육이 현저하게 저해되었다.

목통 물추출물의 *C. perfringens* 생육저해활성물질의 열 및 pH 안정성

목통의 물추출물을 1,000 ppm 함유한 배지를 다양하게 열처리한 다음 *C. perfringens*을 접종하여 생육저해 활성의 변화를 측정된 결과 Fig. 2와 같다. 100°C에서 120분과 121°C에서 15분동안 열처리에도 *C. perfringens*의 생육을 강력하게 저해시키는 것으로 나타

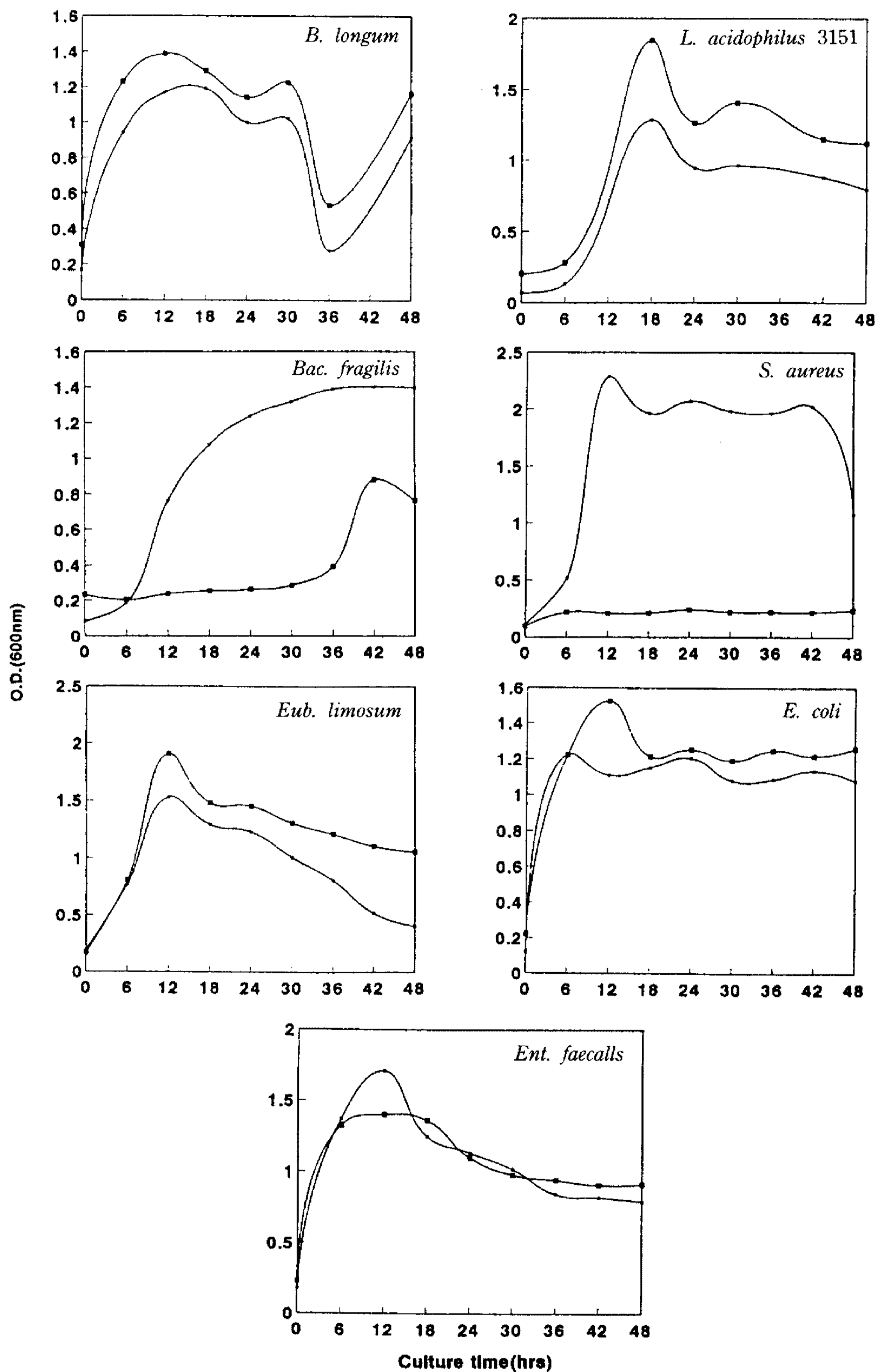


Fig. 5. Growth of some intestinal microorganisms with the water extract of Akebia.
 -□-: Control (No addition), -■-: Akebia extract 1,000 ppm

Table 3. Changes of human fecal microorganisms in the broth culture with the water extract of Akebia

Group	Culture time (hr)	Microorganisms (cfu/ml)*				
		Total anaerobes	<i>Bifidobacteria</i>	<i>Lactobacilli</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. perfringens</i>
Control	0	5.41± 0.6	4.47± 0.73	3.94± 0.77	3.71± 0.50	3.39± 1.19
	12	8.40± 0.73	7.56± 0.71	6.60± 0.52	7.16± 0.67	5.54± 0.41
	24	8.00± 0.42	7.47± 0.88	6.74± 0.8	6.74± 0.82	5.51± 1.49
	36	8.24± 0.5	7.2 ± 0.99	6.66± 0.75	6.75± 0.81	<3.0
Akebia extract	0	5.41± 0.6	4.47± 0.73	3.94± 0.77	3.71± 0.50	3.39± 1.19
	12	8.85± 0.58	7.40± 0.41	7.34± 0.62	5.98± 1.56	<3.0
	24	8.94± 0.44	7.54± 0.62	8.12± 0.19	5.8 ± 1.46	<3.0
	36	8.95± 0.51	7.45± 0.36	8.03± 0.66	5.8 ± 1.48	<3.0

*Bacterial counts expressed as log₁₀ per ml of cultured broth

Table 4. Food intake, weight gain and food efficiency ratio (FER) of rats fed with Akebia powder diet¹⁾

Group	Subject	Food intake		Weight gain		FER
		total	g/day	total	g/day	
Control	10	353.4± 12.8 ^{b2)}	25.24	93.0± 5.6	6.64	0.27± 0.02 ^b
Akebia 2%	9	288.8± 9.9 ^a	20.6	71.1± 2.9	5.08	0.25± 0.01 ^a

¹⁾ Mean± SE

²⁾ Values with defferent superscripts are significantly different among groups at p<0.05 according to T-test.

Table 5. Effect of Akebia diet on the intestinal microorganisms of rats¹⁾

Group	Microorganisms (cfu/g)									
	Total anaerobe	<i>Bifidobacteria</i>	<i>Lactobacilli</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Eubacteria</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Clostridia</i>
Control	8.79 ± 0.11	7.35 ± 0.13	7.95 ± 0.22 ^{a2)}	7.78 ± 0.11	7.35 ± 0.16	8.01 ± 0.24	6.96 ± 0.20	6.00 ± 0.14	6.80 ± 0.28	5.05 ± 0.19
Akebia	9.23 ± 0.22	7.64 ± 0.25	8.39 ± 0.21 ^b	8.10 ± 0.15	7.42 ± 0.13	8.14 ± 0.27	6.69 ± 0.28	5.23 ± 0.39	6.67 ± 0.29	4.85 ± 0.63

¹⁾ Bacterial counts expressed as mean± S.E. log₁₀ per gram of feces of rats.

²⁾ Values with defferent superscripts are significantly different among groups at p<0.05 according to T-test.

장내유익균인 *Bifidobacteria*와 *Lactobacilli* 및 쥐의 주요균인 *Bacteroides*, *Eubacteria*, *Peptococcaceae*는 약간씩 증가하는 경향을 보여주었다. 한편 *Streptococcus*는 감소하였고, 장내 유해균으로 알려진 *Staphylococcus*, *E. coli*, *Clostridia* 들도 약간씩 감소하는 경향을 나타냈다.

이상과 같이 목통을 첨가한 식이로 사육한 흰쥐의 *in vivo* 실험 결과 흰쥐의 장내세균중 유익균인 *Bifidobacteria*와 *Lactobacilli*는 증가시키면서 유해균들은 저해시키는 경향이 있는 것으로 나타나 장내균총의 개선에 효과가 있을 것으로 기대된다.

요 약

한약재 중에서 인체의 장내균총을 개선시킬 수 있는 소재를 탐색한 결과 목통의 물추출물이 장내의 대표적 유해균인 *C. perfringens*의 생육을 강력하게 저해시키는 활성을 나타내었다. 이 항균활성은 100°C에서 120분 동안 열처리하거나 pH 1~11의 범위에서도 활성의 변화가 거의 없이 안정하였다. 목통의 물추출물은 *in vitro* 실험에서 *C. perfringens* 및 다른 *Clostridium*에 대해서도 강력한 저해활성을 나타내었다. 한편 장내 유익균인 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 균에 대해서는 생육 저해효과가 전혀 없었으며 *Escherichia coli*와 *Enterococcus faecalis*의 생육에도 별 영향을 미치지 않았으나 *Bacteroides fragilis*와 *Staphylococcus aureus*의 생육은 강력하게 저해하였다.

인변종균의 혼합배양의 결과 단일균배양의 결과와 마찬가지로 *Bifidobacteria*와 *Lactobacilli*는 증가시켰으며, *E. coli*에는 별 효과가 없었고, *C. perfringens*의 생육은 강하게 저해시킨 것으로 나타났다. 흰쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서도 *Bifidobacteria*와 *Lactobacilli*의 수는 약간 증가시키는 경향을 나타냈다. 반면 *Clostridia*의 균수는 감소하는 경향을 나타냈다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업에 의해 지원된 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 光岡知足. 1990. 腸内菌叢の生態學, Pp. 107-125. 腸内細菌學. 朝倉書店, 東京.
2. 本間道, 光岡知足. 1979. 비피더스菌(*Bifidobacterium*). Pp. 134. 株式會社 야쿠르트, 東京.
3. Mitsuoka, T. 1989. The intestinal flora and Bio-Homerostasis. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
4. Smith, L.D.S. 1979. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Reviews of Infections Diseases* 1: 254.
5. Granum, M.P.E. 1983. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. *Int. J. Food. Microbiol.* 10: 126.
6. McDonel, J.L. 1980. *Clostridium perfringens* toxin (Type A, B, C, D). *Pharmac. Ther.* 10: 617.
7. 신옥호, 유시승, 이완규, 신현경. 1990. 방기의 물추출물이 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향. 한국산업미생물학회지 20: 491-497.
8. 신현경, 신옥호, 구영조. 1990. 감자단백질이 *Clostridium perfringens* 및 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향. 산업미생물학회지 20: 249-256.
9. 구영조, 신현경. 1992. 국산식품소재의 장내 미생물에 대한 영향분석 및 이를 이용한 기능성식품개발(특정연구과제보고서). 과학기술처.
10. 박종현, 한남수, 유진영, 권동진, 신현경, 구영조. 1993. *Bifidobacterium* spp.와 *Clostridium perfringens*의 생육에 영향을 주는 식품소재의 탐색. 한국식품과학회지 25: 582-588.
11. 한복진, 이선화, 신현경. 1994. 산채류가 장내세균의 *in vitro* 생육에 미치는 영향. 한국영양학회지 27: 717-728.
12. 박옥연, 장동석, 조학래. 1992. 한약재 추출물의 항균효과 검색. 한국영양식량학회지 21: 91-96.
13. 이병완, 신동화. 1990. 식품 부패미생물에 대한 천연항균성물질이 농도별 및 분획별 항균특성. 한국식품과학회지 23: 205-211.
14. 박옥연, 장동석, 조학래. 1992. 자초추출물의 항균특성. 한국영양식량학회지 21: 97-100.
15. 육창수 외. 1981. 한약의 약리·성분·임상응용. Pp. 471. 계유문화사, 서울.
16. 과학백과사전출판사 편. 1990. 실용동의약학. Pp. 370-371. 일월서각, 서울.
17. 許浚 原著. 1991. 증보국역 東醫寶鑑. Pp. 1192. 남산당, 서울.
18. 光岡知足. 1980. 腸内菌叢の檢索法, Pp. 53-65. 腸内細の世界, 叢文社, 東京.
19. AIN Standard for nutrition studies report. 1977. *J. Nutr.* 107: 1340.
20. Mitscher, L.A., S.K. Jokwuke, S.R. Gollapudi, S. Drako, and E. Avona. 1990. Antimicrobial pete-rocarpans of Nigerian *Erythrina mildbraedii*. *Phytochemistry* 726: 2231 -2234.
21. Okubo, T., N. Ishihara, A. Oura, M. Serit, M.J. Kim, T. Yamamoto, and T. Mitsuoka. 1992. *In vivo* Effects of Tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(4): 588-591.
22. Ahn, Y.J., T. Kawamura, M.J. Kim, T. Yamamoto, and T. Mitsuoka. 1991. Tea polyphenols: Selective growth Inhibitors of *Clostridium* spp. *Agric. Biol. Chem.* 55(5): 1425-1426.
23. 한대식. 1988. 생약학. Pp. 108-109. 동명사, 서울.

(Received 8 May 1995)