

장내 유해세균에 대한 가자(*Terminalia chebula* Retz.)추출물의 항균 활성

이갑상 · 김성호 · 심규창 · 박정순* · 신용서**

원광대학교 생명자원과학부, *원광보건전문대학 치위생과, **고려대학교 생명공학원

Antimicrobial Activity of *Terminalia chebula* Retz. Extract of against Intestinal Pathogens

Kap-Sang Lee, Sung-Hyo Kim, Kyu-Chang Sim, Chung-Soon Park*
and Yong-Seo Shin**

College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

*Dept. of Dental Hygiene, Wonkwang Junior College, Iksan 570-750, Korea

**The Graduate School of Biotechnology, Korea University Seoul 136-701, Korea

Abstract

Terminalia chebula Retz., which was showed antimicrobial activity against intestinal pathogens through screening herbs related treatments of intestinal diseases, were extracted by methanol and fractionated by n-hexane, ethylether, ethylacetate, and water. Antimicrobial activities of the methanol extract and each fractionates were then investigated under the anaerobic broth system. The methanol extract showed antimicrobial activity against all intestinal pathogens (*Eubacterium limosum* ATCC 10825, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacteroides fragilis* KCTC 5013, *Clostridium perfringens* ATCC 3627, *Staphylococcus aureus* KFCC 11764, and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) tested at 100 to 2,000 μ g/ml of concentration. Especially, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* KFCC 11764 hardly grew at 2,000 μ g/ml of concentration. There is no significant difference of antimicrobial activity among each fractionates. Fraction of *Terminalia chebula* Retz. ethylacetate fractionate, which were fractionated by Sephadex G-200 and Silica gel column chromatography revealed the strongest antimicrobial activity at 12 to 21 and 22 to 34 of fraction number, respectively.

Key words : *Terminalia chebula* Retz. , intestinal pathogens, antimicrobial activity.

서 론

가자는 사군자과(Cambretaceae)에 속하는 가자 나무의 성숙과실을 건조한 것으로 chebulic acid, chebulin 및 tannin이 주성분으로 그 중 tannin은 20~40% 정도로 많은 양이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다^{1,2)}. 한의학에서 가자는 설사, 만성대장염, 이질 등의 처방에 사용되며 그 약리효과는 이미 임상적으로 확인되었다²⁾.

저자들은 장내 세균성 질환에 자주 사용되는 한약재를 중심으로 장내 유해세균에 대한 항균활성을 검색하

여 가자가 장내 유해세균인 *Eubacterium limosum* ATCC 10825, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacteroides fragilis* KCTC 5013, *Clostridium perfringens* ATCC 3627, *Staphylococcus aureus* KFCC 11764 및 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028에 대해 항균활성이 뛰어난 것을 혐기적 broth system에서 확인하였다³⁾.

따라서 본 연구에서는 가자가 장내 유해세균에 대해 뛰어난 항균활성을 보였기에 이 추출물을 용매별로 분획하고 이 분획물이 농도별로 첨가된 혐기적 broth system에서 시험균의 증식저해현상을 평가하고 column chromatography법으로 그 항균물질을 부분정제하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 *Eubacterium limosum* ATCC 10825, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacteroides fragilis* KCTC 5013, *Clostridium perfringens* ATCC 3627, *Staphylococcus aureus* KFCC 11764 및 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028으로 20% 글리세롤이 포함된 modified EG medium⁴⁾에 넣어 -70℃의 deep freezer에 보관하면서, 실험에 사용하기전 동일 배지에서 3회 계대하였다.

2. 가자추출물의 분획

시중에서 구입하여 음건, 분쇄한 가자 2kg을 methanol 10L에 7일간 침지하여 추출하고 여과(Whatman No. 41)한 후 농축(Evaporator, Kikakikai Co., Japan)하고 동결건조(Deep freezer, B. Branun, W. Germany)하여 이 추출물을 증류수에 현탁시키고 n-hexane, ethylether, ethylacetate순으로 추출한 후 분획여두를 이용 분획하고 최종적으로 물층을 얻었다. 이 분획물을 농축하고 동결건조시켜 각 분획물로 하였다.

3. 가자추출물의 분획별 항균활성

가자추출물의 각 분획물이 농도별로 첨가된 혐기성 배지인 modified EG medium을 cap screw tube에 넣고 배지층의 용존산소를 제거하기 위해 혼합가스(CO₂ : 15%, H₂ : 5%, N₂ : balance)로 bubbling시킨 다음, 살균하여 시험균을 4%(v/v)되게 접종하여 37℃의 anaerobic controlled glove box(Sheldon manufacturing, U.S.A.) 내에서 24시간 동안 배양하면서 경시적인 균의 생육을 spectrophotometer(Varian DMS 200, U.S.A.)를 이용하여 흡광도로 측정하였다⁴⁾.

4. Column chromatography를 이용한 항균성 물질의 부분정제

각 용매별 분획의 항균성 실험에서 항균활성이 뛰어난 n-hexane분획물을 선정하여 유효성분을 추적할 목적으로 10% methanol로 평형화된 Sephadex G-200 (1.5×30cm)과 Silica gel(1.5×30cm)에 동일 용매로 loading하고 2.0ml/min의 속도(Pump FE441, B. Braun, W. Germany)로 용출하여 항균물질을 부분정제하였다.

결과 및 고찰

1. 가자추출물의 분획별 항균활성

6종의 장내 유해세균에 대한 가자추출물의 분획별 항균활성을 혐기적 broth system에서 측정한 결과는 Fig 1~5와 같다. 가자 메탄올 추출물은 100~2,000μg/ml농도에서 6종의 시험균 모두에 대해 항균활성을 나타내었으며, 특히 2,000μg/ml첨가 농도에서 *Bacteroides fragilis* KCTC 5013, *Salmonella typhimurimn* ATCC 14028, *Eubacterium limosum* ATCC 10825 및 *Clostridium perfringens* ATCC 3627은 거의 생육하지 못하였다. 각 분획별 항균활성은 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 11764, *Eubacterium limosum* ATCC 10825, *Bacterides fragilis* KCTC 5013 및 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 균주들에 대해서 각 분획간에 유의적인 차이가 없었으며,

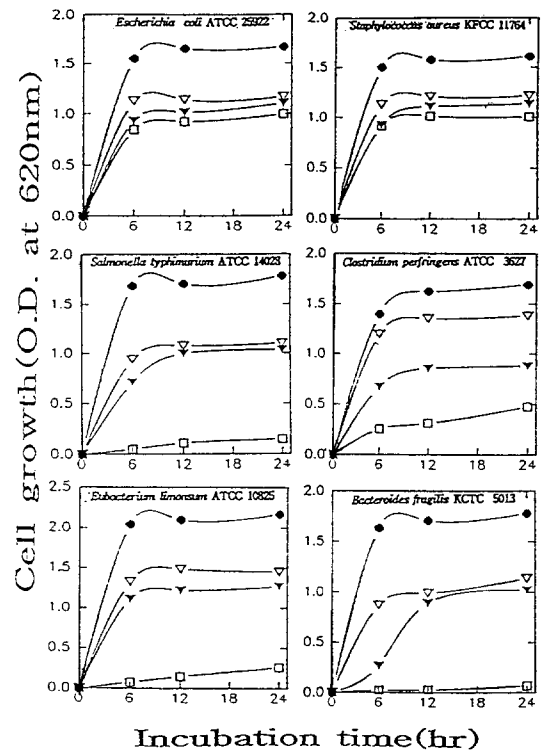


Fig. 1. Inhibition effect of *Terminalia chebula* Reatz. methanol extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.
 -●- : 0 μg/ml, -▽- : 100 μg/ml, -▼- : 1,000 μg/ml, -□- : 2,000 μg/ml.

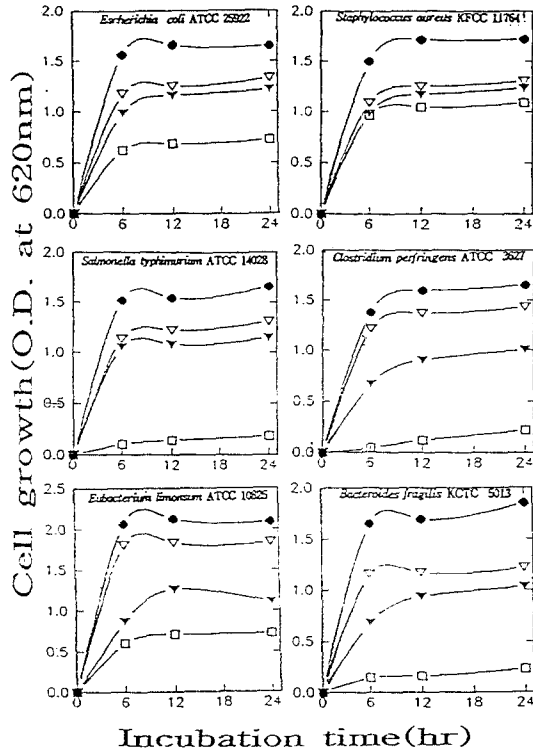


Fig. 2. Inhibition effect of *Terminalia chebula* Reatz. hexane extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.

—●— : 0 µg/ml, —▽— : 100 µg/ml, —▼— : 1,000 µg/ml, —□— : 2,000 µg/ml.

Clostridium perfringens ATCC 3627의 경우에는 ethyl-acetate분획과 ethylether층에서는 항균력이 크게 나타나지 않았으나 n-hexane분획과 물층에서는 뛰어난 항균활성을 보였다. 이상의 결과에서 가자의 항균활성은 분획용매별로 그 항균력에 큰 차이가 없는 것으로 나타남으로 보아 단일물질이 아님을 추정할 수가 있으며, 각 균주에 대한 항균활성에도 큰 차이가 없는 것으로 나타나 그 항균 spectrum역시 비교적 광범위한 것으로 사료된다. 구⁶⁾ 등은 한약재로부터 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제시키는 소재를 검색한 결과 방기의 물, 아세톤, 에틸아세테이트 또는 부탄올 추출물이 모두 항균활성을 나타낸다고 보고하였으며, 식물체내에 존재하는 항균성 물질들은 대부분 단일 물질이 아니기 때문에 여러 종류의 유기용매에 의해서 추출되어진다고 알려져 있어⁷⁻⁹⁾ 본 실험의 결과와도 유사하였다.

Bacteroides spp., *Eubacterium* spp., *Escherichia*

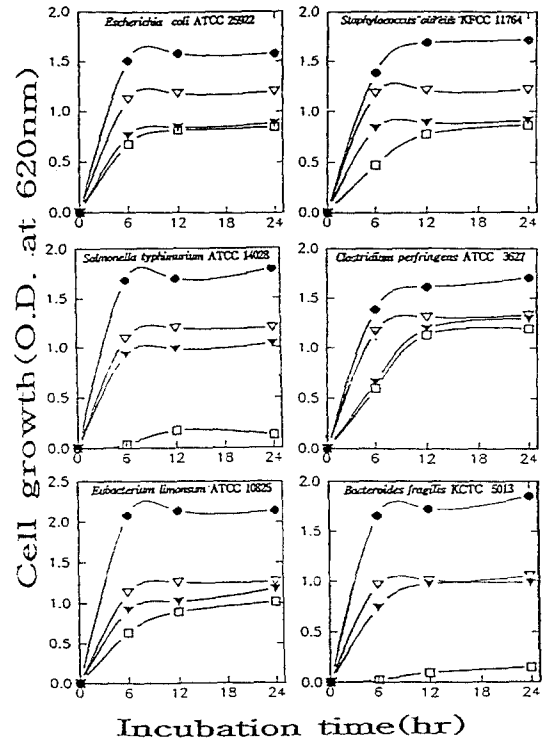


Fig. 3. Inhibition effect of *Terminalia chebula* Reatz. ethylether extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.

—●— : 0 µg/ml, —▽— : 100 µg/ml, —▼— : 1,000 µg/ml, —□— : 2,000 µg/ml.

coli, *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. 및 *Salmonella* spp. 등과 같은 장내 유해세균은 장내에서 NH₃, H₂S, amines, indole 및 phenol 등을 생성하거나 각종 독소 및 발암물질을 생성하여 노화를 촉진시키고 질병을 유발시키는 것으로 보고¹⁰⁾되고 있으며, 특히 *Clostridium perfringens*는 동양인에서는 분변 g당 10⁴정도 존재하고 서양인의 분변에서는 10⁹으로 다량 존재하고 있는 장내 병원성 미생물중 가장 독성이 강한 균¹¹⁾으로 다양한 독소를 생산하여 신생아의 괴사성 장염, pig-bel 질환, 담석증, 류마치스, 간암 및 virus감염 등에 깊이 관여하는 것으로 보고되고 있으며, 노인이 되면 장관내에 그 수가 현저히 증가하는 것으로 미루어 사람의 노화에도 깊이 관여하고 있는 것으로 추정된다¹²⁾. 이상과 같은 장내 유해세균은 가자추출물에 의해 그 생육이 강력히 억제되는 것으로 나타나 가자는 장내 세균총 개선에 매우 유효하게 사용될 가능성이 있을 것으로 생각되며

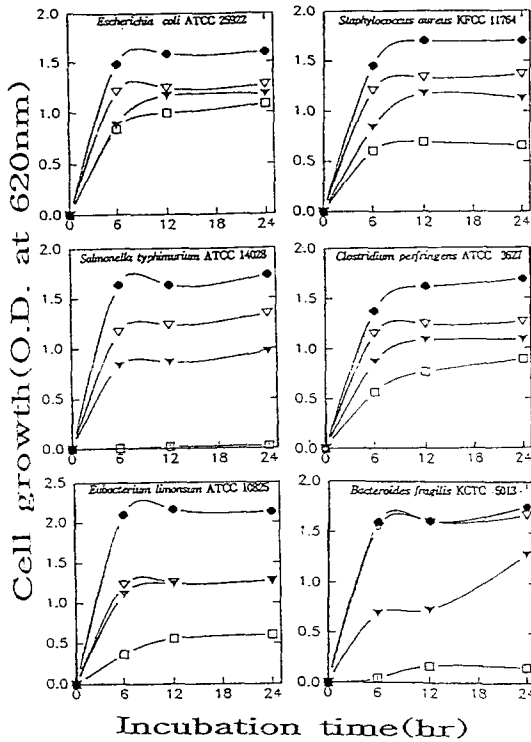


Fig. 4. Inhibition effect of *Terminalia chebula* Reatz. ethylacetate extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.
 -●- : 0 µg/ml, -▽- : 100 µg/ml, -▼- : 1,000 µg/ml, -□- : 2,000 µg/ml.

한의학에서 장내질환 처방에 가자를 사용하는 것은 주로 질환유발 원인균의 생육을 억제시키기 위한 것으로 추정할 수가 있다.

2. Column chromatography법에 의한 항균성 물질의 부분정제

각 유기용매 분획물의 항균활성을 측정한 후 그 중 활성이 가장 강한 ethylacetate분획물을 선정하여 그 유효성분을 부분정제할 목적으로 Sephadex G-200 (1.5×30cm, Sigma)와 Silica gel(1.5×30cm, Merck)가 충전된 column chromatography를 행하여 *Clostridium perfringens* ATCC 3627에 대한 상대적인 항균활성을 측정한 결과는 Fig. 6 및 7과 같다.

즉 가자의 ethylacetate분획을 Sephadex G-200 column chromatography를 행한 결과 30개 분획중 주로 12번에서 21번까지의 분획에서 강한 항균활성을 나

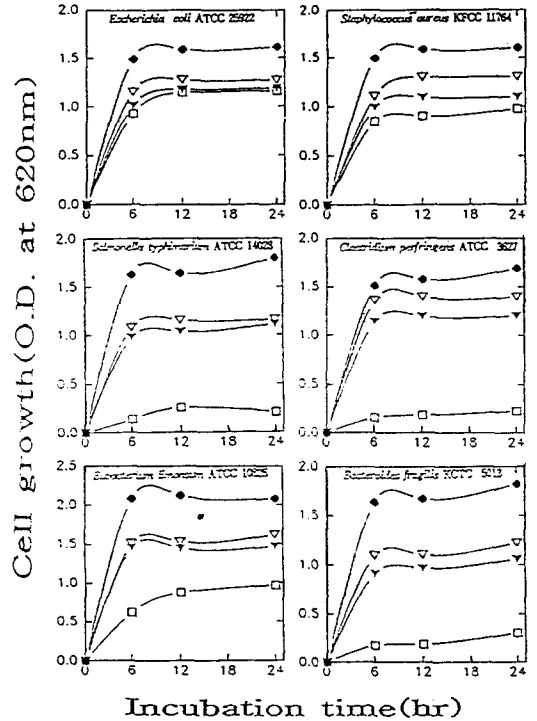


Fig. 5. Inhibition effect of *Terminalia chebula* Reatz. water extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.
 -●- : 0 µg/ml, -▽- : 100 µg/ml, -▼- : 1,000 µg/ml, -□- : 2,000 µg/ml.

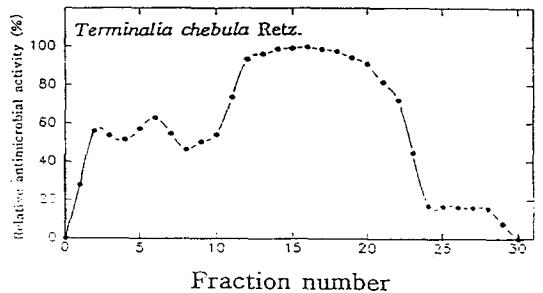


Fig. 6. Antimicrobial activities against *Clostridium perfringens* ATCC 3627 of each fraction of the ethylacetate extract fractionated by the Sephadex G-200 column chromatography.

타내었으며, silica gel column chromatography에서는 40개 분획중 항균활성 성분은 주로 22번에서 34번까지의 분획에 존재하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에

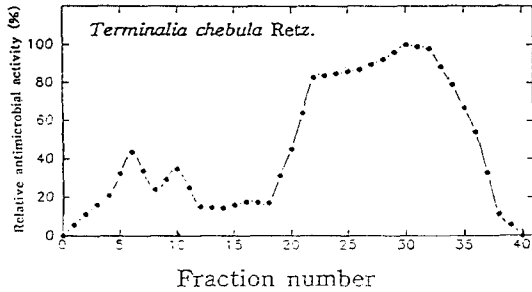


Fig. 7. Antimicrobial activities against *Clostridium perfringens* ATCC 3627 of each fraction of the ethylacetate extract fractionated by the Silica gel column chromatography.

서 보면 가자의 항균성 물질을 두가지 column chromatography를 이용하여 부분정제하였으나, 그 정제 정도가 비교적 뚜렷하지 못하였다. 따라서 이에 대한 연구가 앞으로 더 이루어져야 할 것이며 그 화학적 구조분석과 항균작용기작에 대한 연구도 더 진행되어야 할 것이다.

감사의 말

이 연구는 1996년도 원광대학교의 교비 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

요 약

장내유해세균에 대한 세균성 장내질환치료와 관련된 한약재의 항균활성 검색을 통해 우수한 효과가 인정된 가자를 선정하고 혐기적 broth system에서 각 용매별 분획물의 6종의 장내유해세균에 대한 항균활성을 측정하였으며 그 항균물질을 column chromatography법에 의해 부분 정제하였다. 가자 메탄을 추출물은 100~2,000 g/ml농도에서 시험균 *Eubacterium limosum* ATCC 10825, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacteroides fragilis* KCTC 5013, *Clostridium perfringens* ATCC 3627, *Staphylococcus aureus* KFCC 11764 및 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 모두에 대해 항

균활성을 보였으며 특히 2,000 g/ml농도에서는 *Escherichia coli* ATCC 25922 및 *Staphylococcus aureus* KFCC 11764을 제외하고는 거의 생육하지 못하였다. 각 분획물(n-hexane, ethylether, ethylacetate 및 water)들간의 항균활성은 *Clostridium perfringens* ATCC 3627을 제외하고는 유의적인 차이가 없었다. 가자의 ethylacetate분획은 Sephadex G-200 column chromatography에 의한 30개 분획중 12에서 21번까지의 분획에서 강한 항균활성을 나타내었으며 silica gel column chromatography에 의한 40개 분획중에서는 22에서 34번까지의 분획에서 항균활성을 보였다.

참고문헌

1. 차진현 : 실용동의학. 일월서각, 서울, p. 353 (1990).
2. 이상인 : 한약임상응용, 성보사, 서울, p. 392, 123 (1990).
3. 이갑상, 김성효, 신용서 : 장내질환의 치료와 관련된 한약재의 장내유해세균에 대한 항균활성, *한국식품영양학회지*, 투고중 (1997).
4. 신용서, 김성효, 이갑상 : 혐기적 산성조건하에서 젖산균의 생존과 그 특성, *한국산업미생물학회지*, 23(4), 373 (1995).
5. 전제욱, 서유태, 전기봉, 심영철, 박원재 : 천연물로부터 *Streptococcus mutans* 및 glucosyltransferase저해제 개발, 대한치주연구소 산학연 학술심포지움, p. 49 (1993).
6. 구영조, 신현경 : 국산산소계의 장내미생물에 대한 영향 분석 및 이를 이용한 기능성식품 개발, 특정연구과제보고서, 과학기술처 (1992).
7. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., and Tawata, S. : Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry*, 26(4), 2231 (1987).
8. Ravn, H., and Brimer, I. : Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantage major* subsp. *major*, *Phytochemistry*, 27(6), 3433 (1988).
9. Tomas-Barberan, F. A., Msonthi, J. D., and Hostettann, K. : Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum intens*, *Phytochemistry*, 27(2), 753 (1988).
10. 강국희 : 유산균식품학, 성균관대학출판부, p. 290 (1990).
11. Smith, L. D. S. : Virulence factors of *Clostridium perfringens*, *Reviews of Infectious Disease*, 1(1), 254 (1979).
12. Mitsuoka, T. : Recent trends in research on intestinal flora, *Bifidobacteria Microflora*, 1(1), 3 (1982).