

뽕잎 중 Catechins의 *Clostridium perfringens*에 대한 생장억제효과

이희삼 · 김선여¹⁾ · 전호정²⁾ · 이상덕²⁾ · 문재유²⁾ · 김애정³⁾ · 이완주 · 류강선

농업과학기술원 잠사곤충부, ¹⁾경희대학교 동서의학대학원,
²⁾서울대학교 농업생명과학대학, ³⁾혜전대학

Growth inhibitory Effect of *Clostridium perfringens* for Catechins sparated from Mulberry Leaf

Heui Sam Lee, Sun Yeou Kim¹⁾, Ho Jung Jeon²⁾, Sang Duk Lee²⁾, Jae Yu Moon²⁾,
Ae-Jung Kim³⁾, Won Chu Lee and Kang Sun Ryu,

Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea

¹⁾Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Seoul, 130-701, Korea

²⁾College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

³⁾Dept. of Food & Nutrition, Hyejeon College, Hongseong, 350-702, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the catechins which separated from mulberry leaf. The Epicatechin contents in mulberry leves was 1.21 ± 0.05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ethylacetate fraction. epigalocatechingallte contents was 3.56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ethylacetate fraction. The cathechins (epicatechin and epigalocate-chingallate) separated from mulberry leaf was shown a strong activity to growth inhibition by the concentration of 5 mg/disc on the *Clostridium perfringens*.

Key words : Mulberry leaf, Catechins, *Clostridium perfringens*

서 론

뽕나무는 뽕나무과(Moraceae)의 뽕나무 속(Morus)에 속하는 식물로 세계 각지에 널리 분포하고, 우리 나라에서 재배되는 뽕나무는 대부분 산상, 백상, 노상 등 3계통의 장려뽕품종들이다(김, 1970).

한편 장내세균은 인체의 장내에서 많은 상호공생 또는 길항 관계를 유지하면서 섭취된 음식물과 소화관으로부터 분리되는 생체성분을 이용하여 증식 및 배설되고 있다. 이러한 장내미생물 균총은 사람의 나이와 식이 등에 따라 크게 영향을 받는다. 인간이 나이가 많으면 소화흡수, 장운동, 면역기능 저하 등에 의해 *Bifidobacterium* 등은 급격히 감소하고, *Clostridium perfringens*, *Clostridium paraputricum* 등은 급격히 증가된다고 하였다(Mitsuoka, 1990; 辨野, 1990).

병원성 미생물로는 *Clostridium perfringens*가 가장 흔히 발견되고, 가장 독성이 강한 균으로 알려져 있다. 이 균은 여러 가지 다양한 독소를 생산하여 신생아의 괴사성 장염,

Pigbel질환, 담석증, 류마치스, 간암 및 바이러스 감염 등에 깊이 관여한다(Smith, 1979).

장내세균에 영향을 미칠 수 있는 방기의 물추출물(신 등, 1992) 감자단백질(신 등, 1992), 녹차추출물(Ahn 등, 1990)과 인삼추출물(Ahn 등, 1990)등이 유해균인 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제한다는 보고가 있다.

또한 한국인들이 섭취하고 있는 식품 소재 162종 중에 알가지, 된장, 양파, 겨자 감자 등의 추출물이 *Clostridium perfringens*의 생육을 강하게 억제하였고, 기타의 장내미생물의 생육에는 영향을 주지 않았다고 하였다(박 등, 1993).

장내 유해균에 대해서는 질병 발생과 관련하여 의학분야에서 활발한 연구가 이루어지고 있으며(Kim 등, 1989), *Clostridium perfringens*의 경우 이 균이 생성한 각종 독소 물질과 이 독소성분들의 작용기작 등에 대한 연구결과가 보고되어 있다(Ahn 등, 1991). 그러나 이 유해균의 생육을 억제시킬 수 있는 소재에 대해서는 연구가 별로 진행되어 있지 않다.

최근 뽕잎이 기능성 식품 소재로서의 가능성이 학술적

으로 검증됨에 따라 천연식품 소재로서 고부가가치를 지니게 되었다. 그러므로 본 연구에서는 뽕잎으로부터 catechins를 분리하여 유해균인 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제하는지 알아보았다.

재료 및 방법

뽕잎 준비

뽕잎은 1998년 5~6월 잠사곤충부 시험포장에서 청일뽕잎을 채취하여 세척한 후에 48시간동안 음건하여 열풍 순환건조기(Wako Co. Ltd., Japan)로 60°C에서 2일간 건조하여 분쇄기로 100메쉬 이하의 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

뽕잎의 Catechins 분석

건조뽕잎 50 g에 250 ml의 물을 가하여 55°C에서 2시간 열탕추출을 2회 수행하였다. 추출액은 Evaporator (Buchi Co. Ltd)로 농축하여 냉동온도 -70°C, 시료온도 40°C, 진공압력 5 µHg하에서 냉동건조하였다. 농축물을 물에 현탁하여 일반적인 극성에 따라 hexane, chloroform, ethylacetate, water 분획을 실시하였다. EtOAc층은 catechins 분석용 시료로 공시하였고(Fig. 1), 뽕잎 중의 catechins 분석을 위한 HPLC 조건은 Table 1과 같다.

Catechins의 *Clostridium perfringens*에 대한 생장억제효과

Catechins의 *Clostridium perfringens*에 대한 생장억제효과를 조사하기 위하여, 장내세균들은 1 ml 생리식염수에 현탁되었다. 0.1 ml의 장내세균용액이 5% horse blood가 첨가된 Brucellar agar(Difco)에 옮겨졌다. catechins는 메탄올에(100 ml) 녹여 0.5, 1.0, 5.0 mg/disc의 농도로 Paper disc(AD VANTEC φ 8 mm, Tokyo Roshi, Japan)에 Drum-

Table 1. HPLC analysis of catechins

Instrument	TSP(CA. USA) spectrasystem gradient pump UV/VIS detector(λ280 nm, 0.05 AUFS) sp 4600 integrator
Column	Phenomenex prodigy ODs(3) 100A (250 mm × 4.60 mm)
Solvent	22% THF
Flow rate	0.8 ml/min
Chart speed	0.5 cm/min
Injection volume	20 µl

mond glass microcapillary로 투여하고, 용액이 포화한 후에 Paper disc를 agar 표면에 놓았다. 모든 plates는 80% N₂, 15% CO₂, 5% H₂의 대기상태에서 48시간 37°C에서 배양하였다.

대조는 메탄올로 하였고, 모든 생육억제효과는 2반복 이상 실험하여 평균하였으며, 생장억제 반응의 표시는 강(+++; zone diameter >20 mm), 보통(++; 16-20 mm), 약(+; 10-15 mm), 무반응(-; <10 mm)으로 표시하였다.

결과 및 고찰

뽕잎 중의 Catechins 분석

뽕잎 50 g으로부터 열수로 추출 및 농축하여 6.70 g을 얻었고, chloroform 분획은 0.66 g, ethylacetate 분획은 0.20 g을 얻었다. 뽕잎 중에 함유된 catechins의 장내세균에 대한 영향을 알아보기 위하여 먼저 HPLC로 분리하였다(Fig. 2, 3).

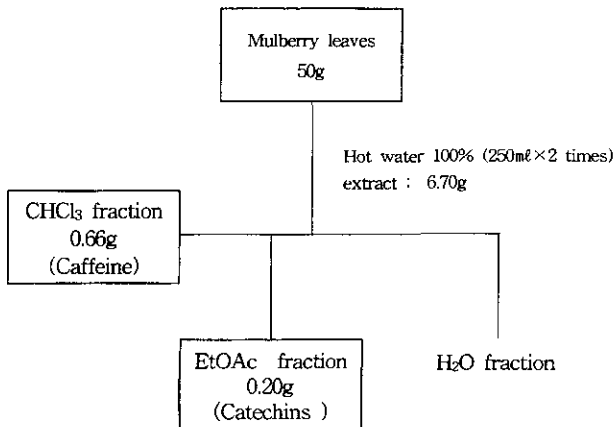


Fig. 1. catechins extraction from mulberry leaves.

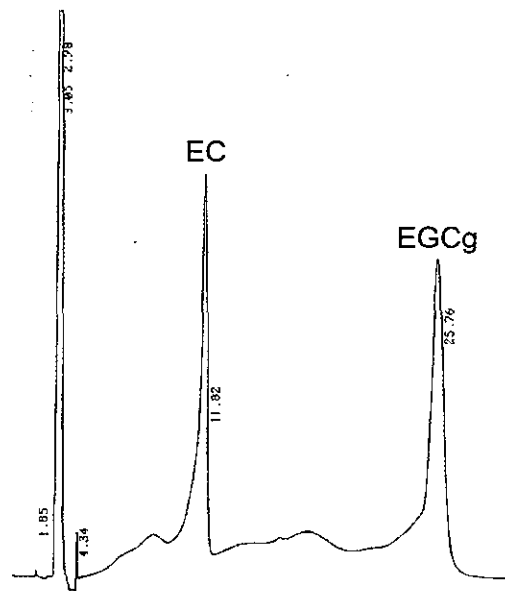


Fig. 2. HPLC chromatogram of authentic catechins. The numbers are retention times(min).

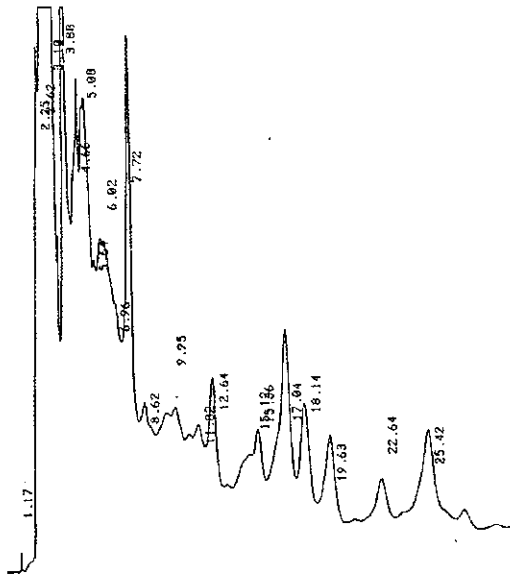


Fig. 3. HPLC chromatogram of catechins in mulberry leaves. The numbers are retention times(min).

표준품인 Catechins의 검출시간은 EC(Epicatechin)는 11.82분, EGCg(Epigallocatechingallate)는 25.76분이었으며, 뽕잎 중에서 분리된 성분의 검출시간은 EC는 11.82분, EGCg는 25.42분이었다.

뽕잎 중의 Catechins 함량

HPLC를 사용하여 뽕잎 중에 함유된 Catechin의 함량을 알아본 결과, (-)epicatechin(EC)의 함량은 $1.21 \pm 0.05 \mu\text{g}$ 이고, (-)epigallocatechingallate(EGCg)는 $3.56 \pm 0.12 \mu\text{g}$ 이었다(Table 2).

녹차는 polyphenol계 화합물이 다량 함유되어 있고 이들은 강한 항산화작용, 중금속 흡착 및 돌연변이 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(김, 1999).

그러나 뽕잎 중의 catechins는 녹차에 비하여 매우 적은 양이 함유되어 있으며, 반면에 다양한 플라보노이드가 함유되어 있어서 강한 항산화 작용, 혈중 콜레스테롤 억제 효과 및 중금속 흡착작용이 있는 것으로 보고하였다(김, 1999; 김 등, 1998).

뽕잎 중에는 녹차에 존재하는 카테킨이 적어서 떫은 맛이 적으므로 음용수로 이용이 가능할 것으로 생각된다.

뽕잎 중의 Catechins의 장내 세균 성장억제 효과

뽕잎에서 분리된 catechins 종류인 EC((-)epicatechin)과 EGCg((-)epigallocatechingallate)의 유해균인 *Clostridium perfringens* ATCC-13124에 대한 생육억제 실험을 하였다(Table 3).

Table 2. Catechin contents in mulberry leaves ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of EtOAc fraction)

Mulberry leaves	
EC	1.21 ± 0.05
EGCg	3.56 ± 0.12

Table 3. Growth inhibitory activity of mulberry catechins against *Clostridium perfringens* ATCC-13124

<i>Clostridium perfringens</i> ATCC-13124.			
	0.5	1.0	5.0 mg/disc
EC	-	-	+
EGCg	-	-	++

*Inhibition responses ; strong(zone diameter 20 mm) : +++; moderate(zone diameter 16~20 mm) : ++; weak(zone diameter 10~15 mm) : + ; no response(zone diameter 10 mm) : - ; EC, (-)epicatechin ; EGCg, (-)epigallocatechingallate

EC의 0.5-1.0 mg./disc 농도에서는 *Clostridium perfringens*균의 생육을 억제하지 못하였으나, 5 mg/disc 농도에서는 약한 활성억제효과를 보였다. EGCg 또한 0.5-1.0 mg/disc 농도에서는 *Clostridium perfringens*균의 생육을 억제하지 못하였으나, 5 mg/disc 농도에서는 강한 활성억제효과를 보였다.

Ahn 등(1991)은 polyphenol계 화합물인 catechin, (-)epicatechin, (+)-gallocatechin, (-)epicatechin gallate, (-)epigallocatechin과 (-)epigallocatechin gallate를 분리하여 유해세균인 *Clostridium* sp.에 대하여 성장억제효과를 측정 한 결과, 강한 활성억제효과가 있다고 보고하였다. 뽕잎에서 분리된 카테킨 또한 녹차에서 분리된 성분과 같은 구조를 가지고 있으며 이들 성분에 의하여 유해세균의 생육을 억제하는 것으로 생각된다.

또한 뽕잎 추출물을 4주간 투여한 후 대장내의 세균수를 조사한 결과, catechins가 *Clostridium* sp.를 줄였다고 하였다(이 등, 2000). 이는 뽕잎 중의 polyphenol계 화합물에 속하는 플라보노이드 계통과 카테킨 성분이 유해세균의 성장을 억제하는 것으로 생각된다.

따라서 뽕잎은 기능성 식품을 선호하는 현대인들에게 성인병 예방 및 장기기능개선, 상용할 수 있는 음용수로 가능성이 있기 때문에 소비층을 확대시키기 위하여 구체적이고 광범위한 많은 연구들이 앞으로 수행되어야 한다.

적 요

뽕잎으로부터 catechins를 분리하여 유해균인 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제하는지 알아보았다.

1) 뽕잎 EtOAc층으로부터 HPLC를 사용하여 뽕잎 중에 함유된 Catechin의 함량은 EC의 함량은 1.21 ± 0.05

μg이고, EGCg는 3.56±0.12 μg이었다.

2) 뽕잎에서 분리된 catechins 종류인 EC의 0.5-1.0 mg./disc 농도에서는 *Clostridium perfringens*균의 생육을 억제하지 못하였으나, 5 mg/disc 농도에서는 약한 활성억제효과를 보였고, EGCg 또한 0.5-1.0 mg/disc 농도에서는 *Clostridium perfringens*균의 생육을 억제하지 못하였으나, 5 mg/disc 농도에서는 강한 활성억제효과를 보였다.

인용문헌

김문협(1970) 재상학. 향문사. p67.

辨野義己(1990) 食餌とヒト腸内フローラの構成. ビフィズス. **4** : 1-12.

Mitsuoka, T.(1990) Bifidobacteria and their role in human health. J. of Industrial Microbiology. **6** : 263.

Smith, L.D.S.(1979) Virulence factors of *Clostridium perfringens*. Reviews of infectious disease. **1**: 254-262.

신옥호·유시승·이완규·신현경(1992) 방기(*Sinomenium acutum*)의 추출물이 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향. 산업미생물학회지. **20**(5) : 491-497.

신현경·신옥호·구영조(1992) 감자단백질이 *Clostridium perfringens* 및 주요 장내미생물의 생육에 미치는 영향. 산업미생물학회지. **20**(3) : 249-256.

Ahn, Y.J., Kawamura, T., Kim, M., Yamamoto, T., Fushisawa, T. and Mitsuoka, T.(1990) Effect of green tea extract on growth of intestinal bacteria. Microbial Ecology in Health and disease. **3**: 223-229.

박종현·한남수·유진영·권동진·신현경·구영조(1993) *Bifidobacterium spp*와 *Clostridium perfringens*의 생육에 영향을 주는 식품소재의 탐색. 한국식품과학회지. **25** (5) : 582-588.

Kim, H.Y., Bae, H.S. and Baek, Y.J.(1989) Journal of Korean Cancer Association. **23**(2) : 188-196.

Ahn, Y.J., Kawamura, T., Kim, M., Yamamoto, T. and Mitsuoka, T.(1991) Tea Phenols: Selective Growth Inhibitors of *Clostridium spp*. Agric. Biol. Chem. **55**(5) : 1425-1426.

Ahn, Y.J., Kim, M., Kawamura, T., Yamamoto, T., Fushisawa, T. and Mitsuoka, T.(1990) Effects of Panax ginseng extract on growth responses of human intestinal bacteria and bacterial metabolism. Korean journal of Ginseng Science. **14** : 253-264.

김선여(1999) 1999년 심포지움 뽕잎 함유 생체활성성분의 식품 이용전망. 한국잡사학회. 24-25.

김선여·이원주·김현복·김애정·김순경(1998) 뽕잎추출물이 콜레스테롤 투여 흰쥐의 혈청지질에 미치는 영향. 한국식품과학영양학회지. **27**(6) : 1217-1222.

이희삼·전호정·이상덕·문재유·김애정·류강선 (2000) 식이 뽕잎이 흰쥐의 장내균총 구성에 미치는 영향. 한국식품과학회 투고중