

장내 유해세균에 대한 빈랑 추출물의 항균 활성

이갑상 · 김성호 · 전승호 · 박성수* · 박정순** · 신용서***

원광대학교 생명자원과학부, *송원전문대학 식품영양과,

원광보건전문대학 치위생과, *고려대학교 생명공학원

Antimicrobial Activity of *Areca catachu* L. Extract of against Intestinal Pathogens

Kap-Sang Lee, Sung-Hyo Kim, Seung-Ho Chun, Sung-Soo Park*,
Chung-Soon Park** and Yong-Seo Shin***

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

*Dept. of Food Nutrition, Song Won Junior College, Kwangju 520-210, Korea

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

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

Abstract

Areca catachu L. 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. All fractions of *Areca catachu* L. except of n-hexane showed antimicrobial activity against all tested pathogens. Especially, ethylacetate fraction of them had the most significant inhibition activity. There is no significant difference of antimicrobial activity among each fractionates. Fraction of *Areca catachu* L. ethylacetate fractionate, which were fractionated by Sephadex G-200 and Silica gel column chromatography revealed the strongest antimicrobial activity at 5 to 7 and 20 of fraction number, respectively.

Key words : *Areca catachu* L., intestinal pathogens, antimicrobial activity.

서 론

빈랑은 종려과(Palmae)에 속하는 빈랑나무의 성숙과실을 건조한 것으로 종자에는 0.3~0.7%의 여러 가지 alkaloid가 있으며, alkaloid의 주성분은 arecoline, arecolidine, guvacoline, guvacine 등이 있다¹⁻⁴⁾. 한의학에서 빈랑은 위장의 보호, 타액의 분비, 살충, 항진균 및 항virus 효과가 있으며, 소화액의 분비와 위장의 연동축진에 사용되며 그 약리효과는 이미 임상적으로 확인되었다^{2,3)}.

전보⁵⁾에서 저자들은 장내 세균성 질환에 자주 사용되는 한약재를 중심으로 장내 유해세균에 대한 항

균활성을 검색하여 빈랑 메탄올 추출물이 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 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 빈랑이 장내 유해세균에 대해 뛰어난 항균활성을 보였기에 이 추출물을 용매별로 분획하고 이 분획물이 농도별로 첨가된 혐기적 broth system에서 몇 종의 장내 유해세균의 증식 저해 현상을 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 medium⁶⁾에 넣어 -70℃의 deep freezer에 보관하면서, 실험에 사용하기전 동일배지에서 3회 계대하였다.

2. 빈랑 추출물의 분획

시중에서 구입하여 음건, 분쇄한 빈랑 2kg을 methanol 10L에 7일간 침적하여 추출하고 여과(Whatman No. 41)한 후 농축(Evaporator, Kikakikai Co., Japan)하고 동결건조(Deep freezer, B. Braun, 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. 빈랑 추출물의 분획별 항균활성

빈랑 추출물의 각 분획물이 농도별로 첨가된 혐기성 배지인 modified EG medium을 cap screw tube에 넣고 배지 중의 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 측정하였다⁶⁾.

4. Column chromatography를 이용한 항균성 물질의 부분정제

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

용출하여 항균물질을 부분 정제하였다.

결과 및 고찰

1. 빈랑 추출물의 분획별 항균활성

6종의 장내 유해세균에 대한 빈랑 추출물의 분획별 항균활성을 혐기적 broth system에서 측정한 결과는 Fig. 1~5와 같다. 빈랑의 메탄올 추출물은 시험한 *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 균주 모두에 대해 항균활성을 나타내었으며 특히 1,000 μ g/ml과 2,000 μ g/ml에서는 거의 생육하지 못하여 강한 항균활성을 나타냈다. n-Hexane분획은 모든 균에 대해 첨가 농도가 증가할수록 항균활성을 나타내고는 있지만 다른 분획에 비해 그 항균활성이 비교적 낮은 것으로 나타났다. Ethylether분획은 시험한 모든 균에 대해 항균활성

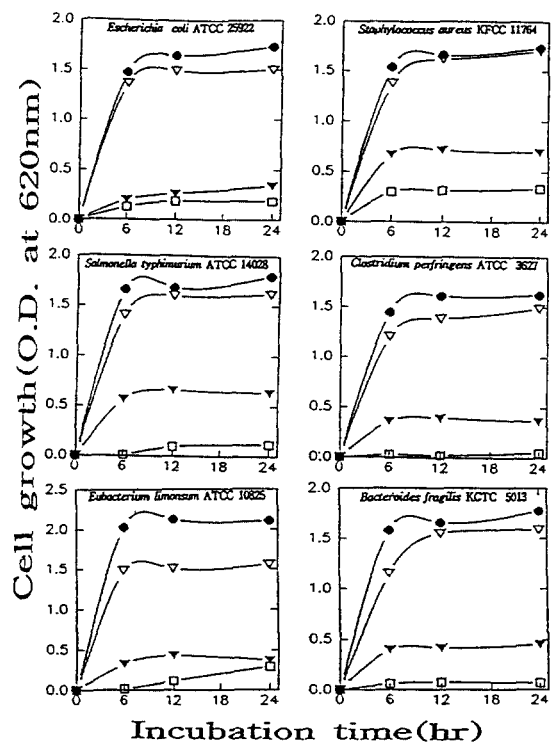


Fig. 1. Inhibition effect of *Areca catachu* L. methanol extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.

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

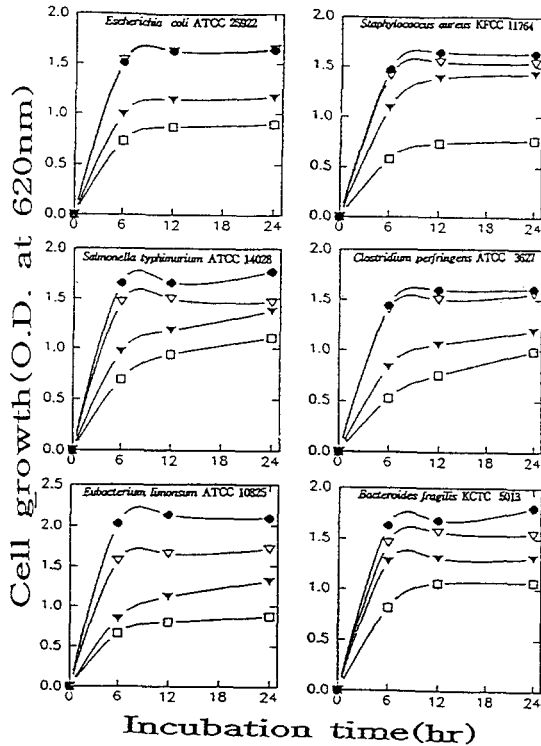


Fig. 2. Inhibition effect of *Areca catachu* L. hexane extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.

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

을 보였으며 특히 1,000 μ g/ml와 2,000 μ g/ml에서는 뚜렷한 항균활성을 보였고, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028은 2,000 μ g/ml 첨가농도에서 거의 생육하지 못하였다. 에틸아세테이트 분획은 모든 균에서 항균활성을 보였으며 2,000 μ g/ml에서 거의 생육하지 못했다. 특히 빈랑의 유기용매 분획물 중에서 ethylacetate추출물이 가장 뛰어난 항균활성을 나타내었다. 물분획 역시 추출물의 농도가 증가할수록 항균활성이 증가하였으며 특히 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Clostridium perfringens* ATCC 3627은 2,000 μ g/ml에서 거의 생육하지 못했다. 이상의 결과에서, 빈랑의 항균활성은 분획용매 별로 그 항균력에 큰 차이가 없는 것으로 보아 단일물질이 아님을 추정할 수가 있으며 각 균주에 대한 항균 활성에도 큰 차이가 없는 것으로 나타나 그 항균 spectrum 역시 비교적 광범위한 것으로 사료된다. 구⁷⁾ 등은 한약재로부터 *Clostridium perfringens*의 생육을 억제시키는 소재를 검색한 결과 방기의 물, 아세톤, 에틸아세테이트 또는 부탄올 추출물이 모두 항균

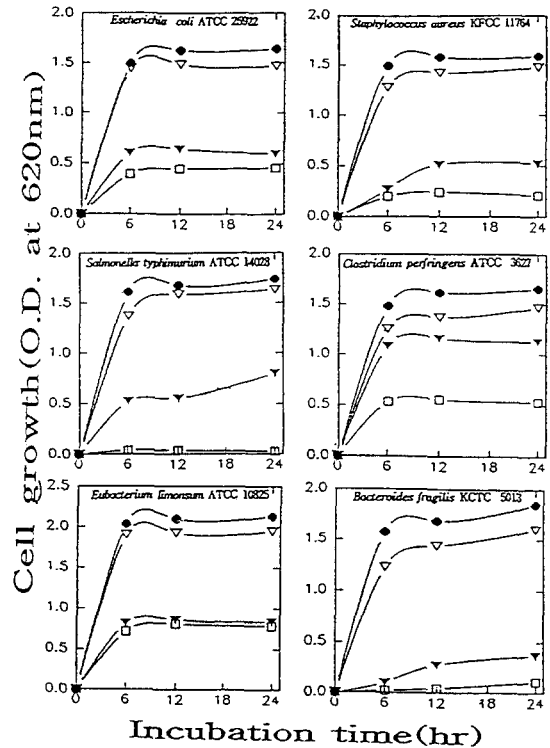


Fig. 3. Inhibition effect of *Areca catachu* L. ethylether extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.

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

활성을 나타낸다고 보고하였으며, 식물체내에 존재하는 항균성 물질들은 대부분 단일물질이 아니기 때문에 여러종류의 유기용매에 의해서 추출되어진다고 알려져 있어^{8~10)} 본 실험의 결과와도 유사하였다.

이²⁾는 빈랑의 주성분이 tannin, chebulic acid 및 chebulin 등의 페놀성 화합물과 arecadine 및 arecolin 등과 같은 alkaloid류라고 보고하였으며, 이러한 성분들은 항균활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 특히 페놀성 화합물의 OH기는 미생물의 효소단백질의 아미드 결합부위와 수소결합을 함으로써 효소활성을 비선택적으로 저해하는 효과가 있는 것으로 보고^{11~13)}되고 있고, 수소공여능이 강하여 항균, 항산화 효과가 큰 것으로 알려지고 있어¹⁴⁾ 본 실험에서 나타난 빈랑의 항균효과는 빈랑에 존재하는 페놀성 화합물에 의한 시험균의 세포막에 존재하는 여러 가지 active transport protein(permease)이나 synthesis protein의 활성이 저해되어 생육이 억제되었거나, 세포질내로 유입된 페놀성 화합물에 의해 각종 대사과정에 관여하는 효소의 활성이 저해되어 그 생육이 억제

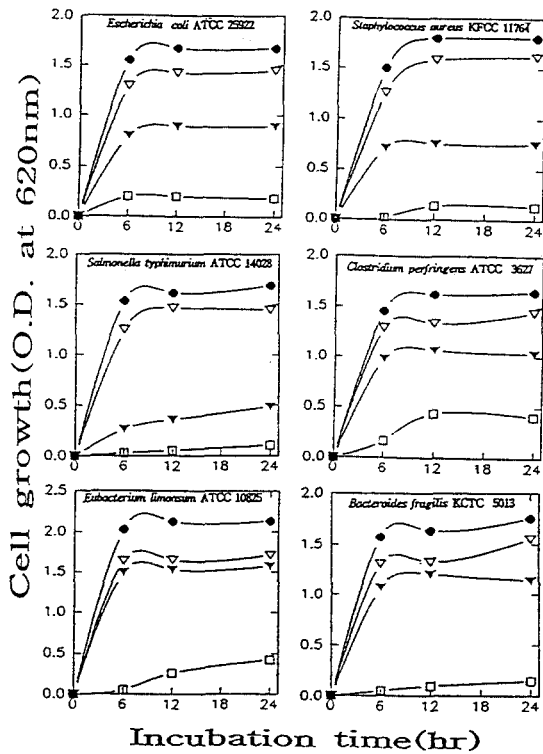


Fig. 4. Inhibition effect of *Areca catachu L.* ethylacetate extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.

—●— : 0 μ g/ml, — ∇ — : 100 μ g/ml, — \blacktriangledown — : 1,000 μ g/ml, —□— : 2,000 μ g/ml.

되어 나타난 것으로 추정할 수 있으며, 이에 대한 연구가 더 행해져야 할 것이다. 이상과 같은 장내 유해세균은 빈랑 추출물에 의해 그 생육이 강력히 억제되는 것으로 나타나 빈랑은 장내 세균총 개선에 매우 유효하게 사용될 가능성이 있을 것으로 생각되며, 한의학에서 장내 질환 처방에 빈랑을 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 비교적 강한 ethylacetate 분획물을 선정하여 그 유효성분을 부분정제할 목적으로 Sephadex G-200(1.5 \times 30cm, Sigma)와 Silica gel(1.5 \times 30cm, Merck)이 충전된 column chromatography를 행하여 *Clostridium perfringens* ATCC 3627에 대한 상대적인 항균활성을 측정한 결과는 Fig. 6 및 7

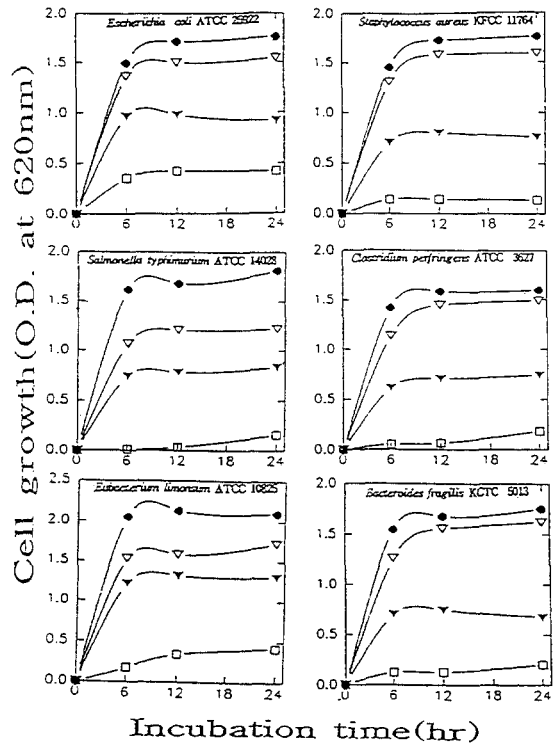


Fig. 5. Inhibition effect of *Areca catachu L.* water extract on growth of intestinal pathogens in modified EG medium under the anaerobic condition.

—●— : 0 μ g/ml, — ∇ — : 100 μ g/ml, — \blacktriangledown — : 1,000 μ g/ml, —□— : 2,000 μ g/ml.

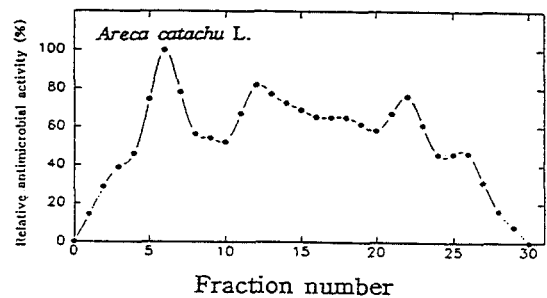


Fig. 6. Antimicrobial activities against *Clostridium perfringens* ATCC 3627 of each fraction of the ethylacetate extract fractionated by the Sephadex G-200 column chromatography.

과 같다.

즉 빈랑의 ethylacetate 분획을 Sephadex G-200 column chromatography를 행한 결과 30개 분획중 주로 5번에서 7번까지의 분획에서 강한 항균활

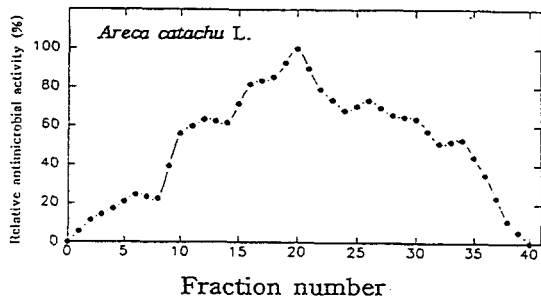


Fig. 7. Antimicrobial activities against *Clostridium perfringens* ATCC 3627 of each fraction of the ethylacetate extract fractionated by the Silica gel column chromatography.

성을 나타내었으며, Silica gel column chromatography에서는 40개 분획중 항균활성성분은 주로 20번에서 가장 높은 활성을 보였다. 이상의 결과에서 보면 빈량의 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.

요 약

장내 유해세균에 대한 세균성 장내 질환치료와 관련된 한약재의 항균활성 검색을 통해 우수한 효과가 인정된 빈량을 선정하고 혐기적 broth system에서 각 용매별 분획물의 6종의 장내 유해세균에 대한 항균활성을 측정하였으며 그 항균물질을 column chromatography법에 의해 부분 정제하였다. 빈량의 경우, n-hexane을 제외하고 각 분획에서 뛰어난 항균력을 나타내었으며, 특히 ethylacetate 분획의 항균활성이 뛰어났다. 빈량의 ethylacetate 분획은, Sephadex G-200 column chromatography에 의한 30개 분획중 5에서 7번까지의 분획에서 강한 항균활성을 나타내었으며 Silica gel column chromatography에 의한 40개 분획 중에서는 20번 분획에서 항균활성을 보였다.

참고문헌

1. 차진현 : 실용농의약학. 일월서각, p. 505 (1990).
2. 이상인 : 한약임상응용. 성보사, p. 497 (1990).
3. 분관심 : 약초의 성분과 이용. 일월서각, p. 697 (1994).
4. Huang, K. C. : The pharmacology of Chinese Herbs. CRC press, p. 328 (1993).
5. 김성호, 신용서, 이갑상 : 장내 질환의 치료와 관련된 한약재의 장내 유해세균에 대한 항균활성. *한국식품과학회지*, 11(1), (1995).
6. 신용서, 김성호, 이갑상 : 혐기적 산성조건하에서 젖산균의 생존과 그 특성. *한국산업미생물학회지*, 23, 373 (1995).
7. 구영조, 신현경 : 국산 신소재의 장내 미생물에 대한 영향 분석 및 이를 이용한 기능성 식품 개발. *특정연구과제보고서*, 과학기술처 (1992).
8. 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, 2231 (1987).
9. Ravn, H. and Brimer, I. : Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subsp. *major*. *Phytochemistry*, 27, 3433 (1988).
10. Tomas-Barberan, F. A., Msonthi, J. D., and Hostettann, K. : Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum intens*. *Phytochemistry*, 27, 753 (1988).
11. 조영제, 안봉진, 최청 : 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물이 Angiotensin Converting Enzyme 저해효과. *한국식품과학회지*, 25, 238 (1993).
12. 전체옥, 서유택, 전기봉, 심영철, 박원재 : 천연물로부터 *Streptococcus mutans* 및 glucosyltransferase저해제 개발. *대한치주연구소 산학연 학술심포지움*, p. 49 (1993).
13. Miriam, P. R. : The influence of pH on the convertogenic activity of plant phenolics. *Mutation Research*, 135, 109 (1984).
14. 김정숙, 이기동, 권중호, 윤형식 : 가자 항산화성 물질의 분리 및 확인. *한국농화학회지*, 36, 239 (1993).

(1997년 11월 22일 접수)