J. Fd Hyg. Safety 10(4), 225 - 230(1995)

상백피 추출물로부터 항균성 물질의 분리 정제

박욱연 · 김신희 · 김지희* · 김용관** · 장동석

*부산수산대학교 식품공학과, *국립수산진흥원 이용가공실, **부산전문대학 식품가공과*

Purification of Antimicrobial Substance for the Extract from the Root Bark of *Morus alba*

Uk-Yeon Park, Shin-Hee Kim, Ji-Hoe Kim*, Yong-Gwan Kim and Dong-Suck Chang**

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737

**Utilization Research Laboratory, National Fisheries Research and Development Agency*

***Department of Food Processing, Pusan Junior College*

ABSTRACT—The ethanol extract from the root bark of *Morus alba* showed the strongest antimicrobial activity on the growth of almost all the tested microorganisms which were food-borne pathogens and food-related microorganisms.[1)] In order to isolate and purify of antimicrobial substance extracted from the root bark of *Morus alba*, the antimicrobial substance from the ethanol extract which exhibited a strong antimicrobial activity was purified by solvent fractionation, silica gel column chromatography, TLC and HPLC. Among the fractions fractionated by 4 kinds of solvents from the ethanol extract, the antimicrobial activity of ethyl acetate fraction had the strongest antimicrobial activity against *B. subtilis*. Unknown compounds were isolated from the ethyl acetate fraction by silica gel column chromatography, TLC and HPLC and the compounds showed strong absorbance at 207, 217 and 285 nm, therefore, it was supposed to be a kinds of aromatic compound.

Key words □ *Morus alba*, antimicrobial activity, antimicrobial substance, HPLC, aromatic compound

천연식물로부터 식품보존료의 개발을 위한 항균성 물질의 검색에 관한 연구가 보고[1-4]되고 있으며, 이들 중 백급,[5] 단삼,[6] 후박[7] 등은 그람 양성균에 항균력이 있다고 보고된 바 있고, 천명정,[8] 강황,[9] 연교,[10] 치자[11] 등은 어떤 특정한 세균이나 진균류에 대해 항균력이 있다고 보고된 바 있다. 항균작용을 나타내는 성분 중에서는 flavonoids와 alkaloids 등과 같은 phytoalexins에 대한 보고가 있으며, 또한 flavonoids의 구조와 항균력과의 관계 및 항균 작용기구에 대한 보고[12,13]도 있다.

상백피는 뽕나무(*Morus alba*) 뿌리 껍질을 말린 것으로써 옛부터 진해제, 항염증제, 이뇨제 등으로 한방제제에 널리 사용되어 온 생약의 하나이며,[14,15] 이에 대한 생리활성[16,17] 및 항균성에 관한 보고[18-22]가 있다.

저자 등은 전보[1]에서 천연 식품보존료를 개발하기 위한 방안의 하나로 상백피 추출물에 대한 항균성을 검토한 결과, 항균성이 인정되어 본 연구에서는 상백피 추출물로부터 천연 항균성 물질을 분리 정제하기 위하여 에탄올 추출물로부터 각종 용매에 의한 계통분획과 TLC, silica gel column chromatography 및 HPLC를 실시하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

항균력 측정에 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* ATCC

14593을, 배지는 Difco사(USA) 제품의 Mueller Hinton broth를 사용하였다.

시약

각종 chromatography용 용매는 Hayman사(U.K) 및 Junsei사(Japan)의 일급 또는 특급시약을, HPLC용 용매는 Merck사(USA) 제품을 사용하였다.

에탄올 추출물의 조제

수분이 10.7% 함유된 시료 1 kg에 대하여 무수 에탄올 7 *l* 씩을 가하여 상온에서 5시간 동안 2회 진탕 추출한 후, 추출물을 모두 합하여 여과 농축한 다음, 1 *l* 무수 에탄올로 재 용해시킨 것을 에탄올 추출물로 하였으며, 이 때 추출물의 고형분 함량은 32.2 g이었다.

항균력 측정

Amsterdam의 방법[23]에 따라 액체배지 희석법으로 항균력을 측정하였다. 멸균된 Mueller Hinton broth 9.8 m*l*에 추출물을 일정한 농도가 되도록 첨가한 후, 35°C에서 18~24시간 계대 배양된 *B. subtilis*를 최종농도가 10^5/m*l* 가량되게 0.1 m*l*씩 접종하고 멸균수로 10 m*l*가 되도록 한 다음, 35°C에서 24시간 배양한 후 균 증식여부를 흡광도(660 nm)로 측정하여 균 증식이 일어나지 않은 농도로 항균력을 나타내었다.

최소발육저지농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)는 추출물을 105°C에서 건조시킨 후 증발잔사의 잔유물 무게를 측정하여 배지 1 m*l*에 대한 첨가량(μg)으로 나타내었다. 이때 첨가되는 용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 대조구를 설정하여 실시하였다.

용매별 계통분획

상백피 에탄올 추출물에 대하여 클로로포름, 아세트산 에틸, 부탄올 및 물을 사용하여 Fig. 1과 같은 방법으로 용매 계통분획을 실시하였다.

즉, 분별 깔때기에 10% 에탄올 추출물과 클로로포름을 1 :1의 비율로 가한 다음, 클로로포름 분획물을 얻었고, 계속하여 같은 방법으로 아세트산 에틸 분획물 및 부탄올 분획물을 얻었다.

Silica gel column chromatography

Column(ϕ 2.3×50 cm)에 시료 무게에 대하여 10배 정도의 활성화된 silica gel(Art. 7734, Merck Co., USA)을 디클로로 메탄으로 현탁시켜 충진한 후, 디클로로 메탄 : 메탄올 용매계로 메탄올의 농도를 0, 2, 5 및 100%(v/v)까지 단계적으로 증가시키면서 용출하였다. 이때 유속은 2.0 m*l*/min로 분획당 10 m*l* 씩 분취하였다.

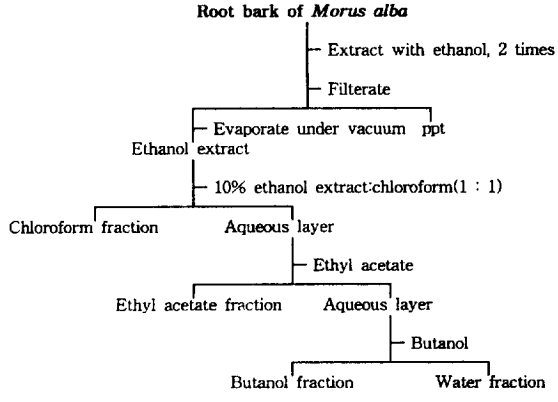

Fig. 1. Scheme of solvent fractionation from the extract of the root bark of *Morus alba*.

Table 1. The condition of high performance liquid chromatography for antimicrobial substance analysis

Instrument	Spectra-Physics P-4000(USA)
Column	Spheri-10 RP-18(4.6×220 mm)
Column temperature	40°C
Solvent	MeOH : H_2O(15 : 85~85 : 15, v/v)
Injection volume	20 μ*l*
Flow rate	1.0 m*l*/min
Chart speed	0.5 cm/min
Detector	UV 217 nm

Thin layer chromatography(TLC)

시료를 silica gel plate(Art. 11798, Merck Co., USA)상에 점적한 후, 전개용매에 의하여 포화상태가 형성된 chamber 내에서 전개시켰다. 이때 전개 용매는 디클로로 메탄 : 메탄올 용매계(10 : 1, v/v)를 사용하였고, TLC plate는 254 nm의 UV하에서 관찰하였으며, 또한 60% 황산용액을 분무한 후 120°C에서 10분간 가열 발색시켜 단일 성분의 분리 정도를 확인하였다.

High performance liquid chromatography(HPLC)

Spheri-10 RP-18 column(4.6×220 mm)을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 HPLC를 행하였다. 이 때 사용된

Table 2. Minimum inhibitory concentration(MIC) of each solvent fractions obtained from the extract of the root bark of *Morus alba* on the growth of *B. subtilis*

Fractions	MIC(μg/m*l*)
Chloroform	4.26
Ethyl acetate	2.33
Butanol	51.84
Water	>1360

>; Means that the tested microorganisms were not inhibited with those concentrations.

용매는 메탄올 농도가 40분 동안 15~85%까지 되도록 직선 구배로 용출시켰으며, 유속은 1.0 m*l*/min, 시료 주입량은 20 μ*l*였다.

결과 및 고찰

용매 계통 분획된 항균성 물질의 항균력

상백피 에탄올 추출물로부터 항균성 물질을 분리 정제하기 위하여 Fig. 1과 같은 방법으로 용매별로 계통 분획하여 얻은 클로로포름, 아세트산 에틸, 부탄올 및 물 분획물에 대한 항균력은 Table 2와 같다.

*B. subtilis*에 대한 용매별 분획물의 MIC를 살펴보면, 아세트산 에틸 분획물의 경우 2.33 μg/m*l*로 가장 강한 항균력을 나타내었고, 그 다음은 클로로포름 분획물로 4.26 μg/m*l*, 부탄올 분획물은 51.84 μg/m*l*로 나타났으며, 물 분획물은 1,360 μg/m*l*의 농도에서는 항균력이 나타나지 않았다 (Table 2).

김 등[24]은 한국산 꾸지뽕나무 잎의 용매별 분획물 중에서 클로로포름 분획물은 *B. subtilis*에 대해서 만 항균력을 나타내었으나, 아세트산 분획물은 *S. aureus, B. subtilis* 및 *E. coli*에 대하여 폭 넓은 항균효과를 나타내었다고 보고한 바 있으며, 신 등[25]은 뽕나물 75% 에탄올 추출물을 용매 계통 분획한 결과, 클로로포름과 아세트산 에틸 분획물이 *L. monocytogenes*에 대하여 높은 항균성을 나타내었다고 하였다.

이상의 결과에서 아세트산 에틸 분획물은 에탄올 추출물(MIC, 6.4 μg/m*l*)[1] 보다는 약 3배 정도, 클로로포름 분획보다는 약 2배 정도 항균력이 강한것으로 나타나 이후부터는 아세트산 에틸 분획물로부터 항균성 물질의 분리를 행하였다.

Table 3. Minimum inhibitory concentration(MIC) of fractions fractionated by silica gel column chromatography on the growth of *B. subtilis*

Fraction number	MIC(μg/m*l*)
1~12	>200
13~58	2.87
59~98	>280
99~121	>220
122~130	12.3
131~216	>22.7
217~234	>56.1
235~260	>88.5

Fraction 1~260 were fractionated by silica gel column chromatography and then chromatography was eluted by stepwise with dichloromethane/methanol(100 : 0, 98 : 2, 95 : 5, 0 : 100, v/v).

>; Means that the tested microorganisms were not inhibited with those concentrations.

Table 4. Antibacterial activity of fractions separated by TLC on the growth of *B. subtilis*

Rf value	Concentration(1.0%)
0.1	+
0.2	+
0.24	+
0.35	-
0.4	+
0.52	+
0.56	+
0.67	+
0.73	+
0.8	+
0.9	+
0.93	+
0.98	+

Solvents system; dichloromethane/methanol(10 : 1, v/v).
+; growth, -; no growth.

각종 chromatography에 의한 항균성 물질의 분리 정제

상백피 에탄올 추출물을 용매 계통분획하여 얻은 분획물 중 항균력이 가장 높게 나타났던 아세트산 에틸 분획물로부터 항균성 물질을 분리하기 위하여 silica gel column

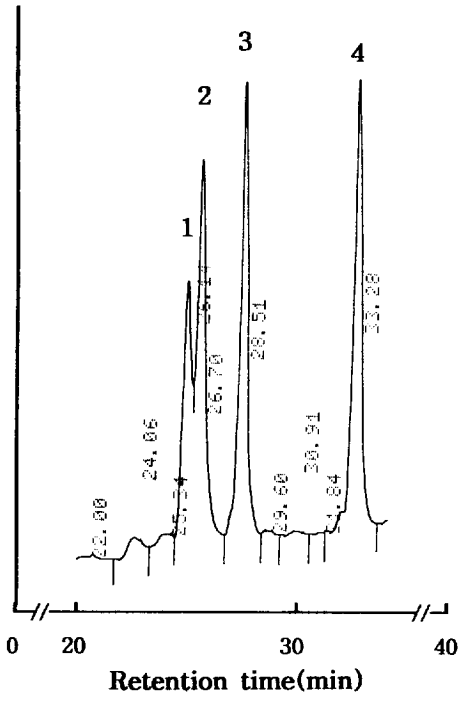

Fig. 2. HPLC chromatogram of antimicrobial active fraction obtained by TLC.

Column: Spheri-10 RP-18 column(ϕ 4.6×220 mm), Mobile phase; MeOH : H_2O(15 : 85~85 : 15, linear gradient), Flow rate; 1.0 m*l*/min, Detector; UV(217 nm).

chromatography를 행하여 얻은 각 분획물들의 *B. subtilis*에 대한 항균력을 측정한 결과는 Table 3과 같다.

Chromatography를 행한 260개의 분획 중 13번에서 58번까지의 분획물이 가장 강한 항균력(MIC, 2.87 μg/m*l*)을 나타내었고, 그 다음은 122~130번까지의 분획물이 항균력(MIC, 12.3 μg/m*l*)을 보였으며, 그 외 다른 분획물에서는 항균력이 나타나지 않았다(Table 3).

Silica gel column chromatography를 행하여 항균력이 제일 높았던 분획물에 대하여 TLC를 행하여 *B. subtili*에 대한 항균력을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

0.35의 Rf 값을 나타내는 분획물이 1.0%의 농도에서 항균력을 나타내었고, 그 외의 분획물들은 항균력이 나타나지 않았다(Table 4).

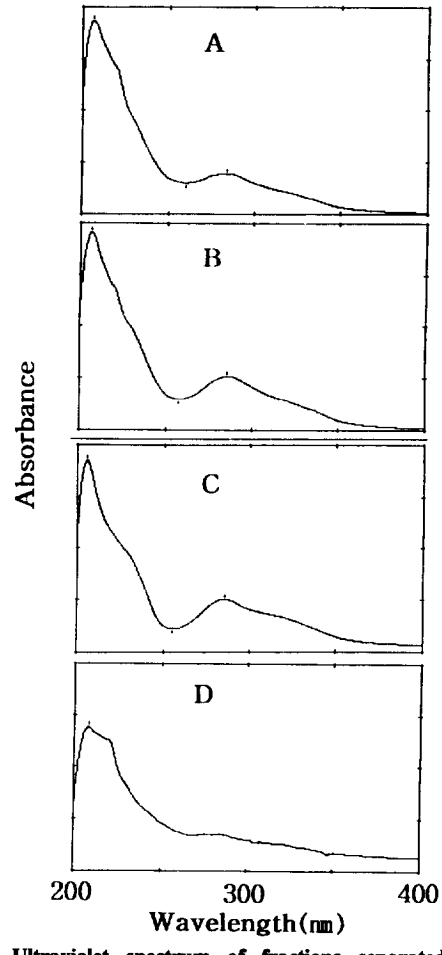

Fig. 3. Ultraviolet spectrum of fractions separated by HPLC.

A; Fraction 1 separated by HPLC, B; Fraction 2 separated by HPLC, C; Fraction 3 separated by HPLC, D; Fraction 4 separated by HPLC.

항균력이 인정된 TLC 분획물에 대하여 HPLC를 행하였다. Fig. 2에서와 같이 4개의 물질을 분리할 수 있었으며, 190~400 nm의 자외선 분광광도계에 의한 흡수파장을 측정한 결과, 이들 물질은 207, 217 및 285 nm 부근에서 흡수 peak를 나타내어(Fig. 3) 방향족 화합물로 추정된다.

국문요약

상백피 에탄올 추출물로부터 천연 항균성 물질을 분리 정제하기 위하여 클로로포름, 아세트산 에틸, 부탄올 및 물 순으로 용매별 계통 분획을 실시하여 각 분획별로 항균력을 검토하였다. 그 결과, 아세트산 에틸 분획물이 제일 강한 항균력을 나타내었다. 항균력이 제일 우수한 아세트산 에틸 분획물에 대하여 TLC, silica gel column chromatography 및 HPLC를 실시하여 4개의 항균성 물질을 분리 정제하였으며, 이들은 207, 217 및 285 nm 부근에서 각각 흡수 peak를 나타내어 방향족 화합물로 추정되었다.

참고문헌

1. 박욱연, 김영목, 김신회, 장동석: 상백피 추출물의 항균력 및 최적추출조건 검토 한국식품위생 · 안전성학회지, **10**, 139-145 (1995).
2. 목종수, 박욱연, 김영목, 장동석: 용매와 추출조건에 따른 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 항균력. 한국영양식량학회지, **23**, 1001-1007 (1994).
3. 박욱연, 장동석, 조학래: 한약재 추출물의 항균효과 검색. 한국영양식량학회지. **21**, 91-96 (1992).
4. 이병환, 신동화: 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연항균성물질의 검색. 한국식품과학회지. **23**, 200-204 (1991).
5. Takagi, S., Yamaki, M. and Inoue, K.: Antimicrobial agents from *Bletilla striata*. *Phytochemistry,* **22**, 1011-1015 (1983).
6. Gao, Y.G., Song, Y.M., Yang, Y.Y., Liu, W.F. and Tang, J.X.: Pharmacology of tanshinone. *Acta. Pharm. Sin.*, **14**, 75-82 (1979).
7. Namba, T., Tsunezuka, M. and Hattori, M.: Dental caries prevention by traditional Chinese medicines. 2. Potent antibacterial action of Magnoliae Cortex extracts against *Streptococcus mutans*. *Planta. Med,* **44**, 100-106 (1982).
8. Maruyama, M. and Shibata, F.: Stereochemistry of granilin isolated from *Carpesium abrotanoides*. *Phytochemistry,* **14**, 2247-2248 (1975).
9. Gupta, S.K., Banejee, B. and Achari, B.: Isolation of ethyl *p*-methoxycinnamate, the major antifungal principle of *Curcuma zedoaria*. *Lioydia,* **39**, 218-222 (1976).
10. Endo, K. and Hikino, H.: Structure of forsythoside C and D, antibacterial principle of *Forsythia suspensa* fruits. *Heterocycles,* **16**, 1311-1314 (1982).
11. Ohashi, H., Tsurushima, T., Ueno, T. and Fukami, H.: Cerbinal, a pseudoazulene iridoid, as a potent antifungal compound isolated from *Gardenia jasminoides* Ellis. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2655-2657 (1986).
12. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. and Tawata, S.: Antibacterial activity and mode of action plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry.* **26**, 2231-2234 (1987).
13. Schultz, T.P., Boldin, W.D., Fisher, T.H., Nicholas, D.D., McMurtrey, K.D. and Pobanz, K.: Structure-Fungicidal properties of some 3-and 4-hydroxylated stilbenes and bibenzyl analogues. *Phytochemistry,* **31**, 3801-3806 (1992).
14. 金在佶: 原色天然藥物大辭典(下卷). 南山堂, 서울, pp. 148 (1984).
15. Tang, W. and Eisenbrand, G.: *Chinese drugs of plant origin*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 891-902 (1992).
16. Fukai, T., Hano, Y., Hirakura, K., Nomura, T., Uzawa, J. and Fukushima, K.: Structure of two natural hypotensive diels-alder type adducts, mulberrofurans F and G, from the cultivated mulberry tree(*Morus lhou* Koidz.). *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3195-3204 (1985).
17. Oshima, Y., Konno, C., Hikino, H. and Matsushita, K.: Structure of moracenin B, A hypotensive of *Morus* root barks. *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3381-3384 (1980).
18. Nomura, T., Fukai, T., Uno, J. and Arai, T.: Mulberrofuran A, A new isoprenoid 2-arylbenzofuran from the root bark of the cultivated mulberry tree(*Morus alba* L.). *Heterocycles,* **9**, 1593-1601 (1978).
19. Takasugi, M., Nagao, S., Masamune, T., Shirata, A. and Takahashi, K.: Structure of moracin A and B, New phytoalexins from diseased mulberry. *Tetrahedron Lett.,* **9**, 797-798 (1978).
20. Takasugi, M., Munoz, L., Masamune, T., Shirata, A. and Takahashi, K.: Stilbene phytoalexins from diseased mulberry. *Chem. Lett.*, 1241-1242 (1978).

21. Takasugi, M., Ishikawa, S., Nagao, S., Masamune, T., Shirata, A. and Takahashi, K.: Albanins F and G, Natural diels-alder adducts from mulberry. *Chem. Lett.*, 1577-1580 (1980).
22. 劉承兆, 徐正植: *Candida albicans*에 대한 생약의 항진균성에 관한 연구. 생약학회지. **5**, 147-154 (1974).
23. Amsterdam, D.: Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. *In "Antibiotics laboratory medicine"* 3rd ed. Lorian, V., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 17-105 (1991).
24. 김성환, 김남재, 최재수, 박종철: 꾸지뽕나무 잎의 생리활성 및 HPLC에 의한 성분의 정량, 한국영양식량학회지, **22**, 68-72 (1993).
25. 신동화, 한지숙, 안은숙: *Listeria monocytogenes*에 대한 천연 항균성 물질의 검색. 식품과학과 산업, **26**, 106 (1993).