

무화과잎 페놀성 분획중의 항미생물 활성물질의 정제 및 동정

강성국¹ · 정동욱² · 정희종^{1*}

¹전남대학교 농과대학 식품공학과, ²일양약품(주) 중앙연구소

초록 : 무화과잎의 메탄올추출물을 용매분획하여 얻은 분획중 산성 분획과 페놀성 분획이 항미생물 활성이 강한 것으로 나타났고 페놀성 분획이 산성 분획보다 항미생물 활성이 더 강하여 페놀성 분획중의 항미생물 활성물질을 동정하기 위하여 먼저 silica gel column chromatography, RP-8 column chromatography 및 preparative liquid chromatography를 행하여 정제하였고 정제된 항미생물 활성물질을 IR, ¹H-NMR 및 MS에 의한 기기분석을 통하여 동정한 결과 각각 psoralen, bergapten, umbelliferone 및 β -sitosterol로 구명되었다(1995년 7월 10일 접수, 1995년 8월 3일 수리).

서 론

미생물의 증식을 억제하는 보존제로는 인공합성품이 많이 알려져 있으나 천연물 중에도 상당한 항미생물 활성이 존재하는 것으로 알려져 있으며,¹⁻⁴⁾ 최근에도 항미생물 물질의 탐색과 식품에의 이용에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.⁵⁻⁷⁾ 식물체에 존재하는 천연 항미생물 활성성분들은 식물체중에 천연적으로 존재하거나 물리화학적 자극에 의해 생성되기도 하는데 현재까지 알려진 항미생물 활성물질중에는 효소와 일부 단백질, 유기산, 지방산, 정유성분, 색소관련 성분, humulons과 lupulones, oleuropein, caffeine, theophylline과 theobromine, 및 phytoalexins 등⁸⁾이 있다. 무화과 유액은 치질, 구충제 및 무좀 치료제로 사용되고⁹⁾ 무화과 잎을 채취할 때 많은 유액이 나오지만 무화과 잎에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 무화과 잎 추출물중 항미생물 물질이 존재하는지 여부를 확인하고 미생물의 종류에 따른 활성도를 검토할 뿐만 아니라 항미생물 활성을 갖는 활성물질을 추출하여 용매분획하고 정제한 다음 활성물질의 화학적 구조와 특성을 구명하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 무화과(*Ficus carica* Linn.)잎은 전남 영암에서 乘井도우핀 (Masui Dauphine)의 잎을 1994년 7월에 채취하여 실험에 사용하였다.

무화과잎 메탄올추출물의 조제 및 용매분획

무화과 생잎 15 kg을 분쇄하여 추출용매인 메탄올과 혼합하여 균질기(NISSEI AM-7 homogenizer)를 이용하

여 균질화시킨 다음 약 10배량의 메탄올을 3회로 나누어 12시간 동안 반복 추출하여 메탄올추출물을 얻었고 다시 메탄올추출물은 여과지(Whatman No. 2)로 여과하고 vacuum evaporator(EYELA TYPE N-N)를 사용하여 45°C에서 농축 한 다음 전보¹⁰⁾에서와 같이 ethyl acetate와 세가지 buffer를 사용하여 용매분획하였다.

정제된 활성물질의 항미생물 활성 측정

페놀성 분획의 초기 정제과정에서 얻은 각 분획과 최종 정제물질로 얻은 물질에 대한 항미생물 활성 측정은 무화과 잎 1g 상당량의 추출물과 정제물질 1,000 ppm씩을 각각 paper disc에 적하하여 전보¹⁰⁾에서와 같은 균주와 배지를 사용하여 동일한 측정방법으로 수행하였다.

페놀성 분획의 정제

항미생물 활성이 가장 강한 페놀성 분획으로부터 silica gel column chromatography를 행하여 얻은 5개의 분획중 항미생물 활성이 강하게 나타난 Fr.-B, Fr.-C 및 Fr.-D분획을 정제하기 위하여 Fig. 1에서와 같이 silica gel column chromatography, RP-8 column chromatography, preparative liquid chromatography(detector, UV detector(280 nm); column, Jaigel ODS column; mobile phase, acetonitrile : H₂O(42 : 58); Flow rate, 3.0 ml/min) 및 thin layer chromatography(silica gel plate 60 F₂₅₄, CHCl₃ : MeOH(9 : 1); DC-Fertigplatten RP-8 F_{254s}, 60% MeOH)를 행하였다.

페놀성 분획중의 항미생물 활성물질의 동정

정제된 항미생물 활성물질을 동정하기 위하여 Infrared absorption spectroscopy(IR), ¹H-nuclear magnetic re-

찾는말 : 무화과잎, 항미생물 활성물질, 페놀성 분획
*연락처자

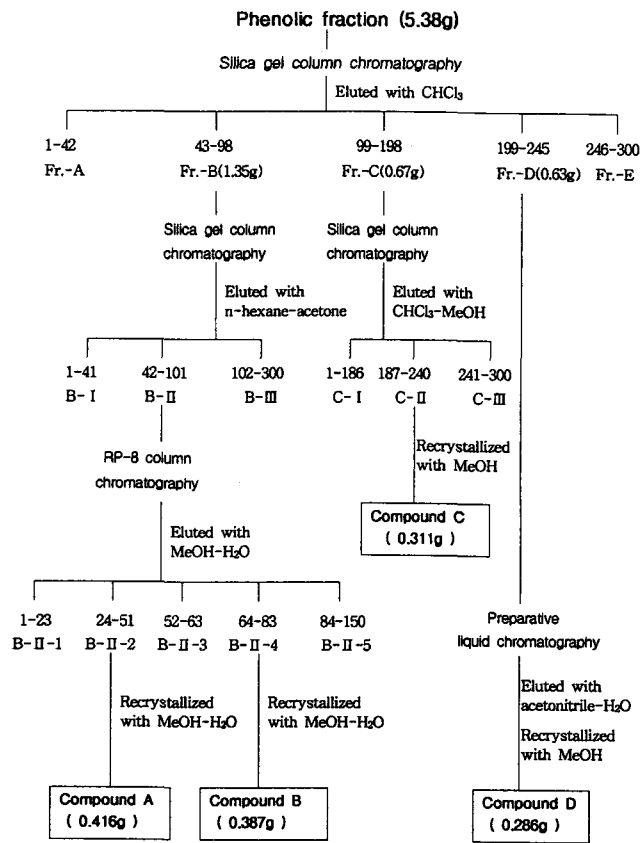


Fig. 1. Purification procedure of antimicrobial substances in phenolic fraction of fig leaves.

sonance spectroscopy(NMR) 및 Mass spectrometry(MS)를 행하였다. 즉 IR spectroscopy는 IR spectrometer(Shimadzu Model IR-435)를 사용하여 정제된 시료 1mg과 KBr 100mg을 mortar를 이용하여 잘 혼합한 후 약 10 Kg/cm²의 힘으로 KBr disc를 제작하여 spectrum을 얻었으며 ¹H-NMR은 Bruker AM-200(200 MHz, Germany)에 의해 CDCl₃를 용매로 사용하고 tetramethylsilane(TMS)를 internal standard로 사용하여 측정하였으며 MS는 직접 주입장치(Direct injection port, DIP)를 장치한 MS-DS spectrometer(TSQ 7000, USA)를 이용하여 ionization voltage 70 eV, ion source temperature 200°C에서 측정하였다.

결과 및 고찰

페놀성 분획의 정제

페놀성 분획(5.38g)의 정제는 먼저 silica gel column chromatography를 행하고 TLC상의 동일한 R_f치에 따라 Fr.-A(840 ml, R_f=0.87), Fr.-B(1120 ml, R_f=0.83), Fr.-C(2000 ml, R_f=0.71), Fr.-D(940 ml, R_f=0.51), Fr.-E(1100 ml, R_f=0.23)를 얻었고(Fig. 1) 이들중 Fr.-B, Fr.-C 및 Fr.-D에서 강한 항미생물 활성이 인정되었다.

Fr.-B(1.35g)는 n-hexane : acetone(3 : 1)용매계를 사용하여 silica gel column chromatography를 행하고 항미

Table 1. Antimicrobial activities of fractions obtained with silica gel column chromatography from phenolic fraction of fig leaves

Microorganism	Clear zone (mm) ¹⁾				
	Fr.-A	Fr.-B	Fr.-C	Fr.-D	Fr.-E
Gram positive bacteria					
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 ²⁾	— ³⁾	18	12	14	—
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11	21	13	17	—
Gram negative bacterium					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	11	26	13	15	—
Yeast					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	—	23	11	18	—
Mold					
<i>Aspergillus flavus</i> KCTC 1375 ⁴⁾	—	22	13	14	—

¹⁾Concentration of each fraction was 1g fresh wt. equivalent per disc. ²⁾ATCC is an abbreviation for American Type Culture Collection. ³⁾not detected. ⁴⁾KCTC is an abbreviation for Korean Collection for Type Culture.

생물 활성을 측정 한 결과 B-II분획에서 항미생물 활성이 인정되었다. 이를 재정제하기 위하여 RP-8 column chromatography(용출용매: 60% 수용성 MeOH, 3 L)를 행한 결과 B-II-2 분획과 B-II-4 분획에서 항미생물 활성이 인정되었으며 60% 수용성 MeOH과 함께 재결정을 반복하여 백색 침상의 결정체인 compound A(0.416g)와 compound B(0.387g)를 각각 얻었다.

Fr.-C(0.67g)는 CHCl₃ : MeOH, 30 : 1(6 L)의 용매계를 사용하여 silica gel column chromatography를 행한 결과 C-II분획에서 항미생물 활성이 인정되었으며 재정제하기 위하여 silica gel column chromatography를 같은 조건으로 반복하여 행한 후 메탄올과 함께 반복 재결정을 행하여 compound C(0.311g)를 얻었다.

Fr. D(0.63g)는 preparative liquid chromatography(용출용매, acetonitrile: H₂O, 42 : 58)를 행하여 메탄올과 함께 재결정을 하여 compound D(0.286g)를 얻었다.

페놀성 분획의 정제분획에 대한 항미생물 활성 측정

페놀성 분획을 silica gel column chromatography를 수행하여 얻은 정제분획에 대한 항미생물 활성을 측정한 결과는 Table 1에서와 같이 5개 분획중 Fr.-E를 제외한 4개의 분획이 모두 항미생물 활성을 갖는 것으로 나타났고 특히 Fr.-B가 모든 공시균주에 대하여 강한 활성을 나타냈으며 Fr.-A는 항미생물 활성이 상대적으로 약한 것으로 나타났다.

페놀성 분획의 항미생물 활성물질의 동정

페놀성 분획으로부터 정제된 4가지 활성물질을 동정하였는데 compound A의 경우 IR spectrum을 분석한 결과 IR_{max}: 1724(C=O), 1653(C=C), 그리고 1650~1450 cm⁻¹에서 복잡한 방향족화합물의 흡수를 보였다. ¹H-NMR spectrum을 측정 한 결과 δ 6.37(1H, d, J=9.6 Hz, H-3), 6.83 (1H, d, J=3.2 Hz, H-3'), 7.47(1H, s, H-8), 7.67(2

H, s, H-5), 7.68(1H, d, J=1.7 Hz, H-2') 그리고 7.78(1H, d, J=1.6 Hz, H-4)의 signal을 확인하였으며 구조중에 6개의 수소를 갖고 있었다. Mass spectrum은 molecular ion peak가 m/z 186에서 나타났고 base peak가 m/z 131에서 그리고 fragment ion peak가 m/z 168.9, 158.0, 147.0, 118.9에서 나타났다. 이를 Wiley/NBS mass library와 비교한 결과 psoralen(C₁₁H₆O₃, 7H-Furo[3,2-g][1]-benzopyren-7-one)으로 추정되었으며 표준품과의 비교분석에 의해 확인되었다.

Compound B의 IR spectrum을 분석한 결과 IR_{max}: 1733 cm⁻¹(C=O)과 1628 cm⁻¹(C=C)를 나타내 compound A와 거의 유사한 spectrum을 보였으며 ¹H-NMR spectrum을 측정된 결과 δ 4.29(3H, s, OCH₃), 6.28(1H, d, J=9.8 Hz, H-3), 7.04(1H, d, J=2.3 Hz, H-3'), 7.15(1H, s, H-8), 7.60(1H, d, J=2.4 Hz, H-2') 그리고 8.17(1H, d, J=9.7 Hz, H-4)의 signal을 나타냈다. Mass spectrum은 molecular ion peak가 m/z 216에서 나타났고 base peak가 m/z 173.1에서 그리고 fragment ion peak가 m/z 201.1, 188.1, 158.2, 145.2 및 131.1에서 나타났다. 이는 psoralen과 유사한 구조로서 구조중에 methoxy기(OCH₃)를 갖고 있는 물질로 Wiley/NBS mass library와 비교한 결과 bergapten(C₁₂H₈O₄, 7H-Furo [3,2-g][1] benzopyren-7-one-4-methoxy)으로 추정되었고 표준품과 비교하여 확인되었다.

Compound C의 IR spectrum을 분석한 결과 IR_{max}: 3500(-OH), 2935(CH₃, CH₂, CH) 그리고 1650~1400 cm⁻¹에서 아주 복잡한 흡수를 나타냈고 ¹H-NMR spectrum을 측정된 결과 1.00 ppm에서 대단히 복잡한 signal을 보였으며 δ 3.20 (1H, m, H-3) 및 δ 5.38(1H, t-like, H-6)의 signal을 확인할 수 있었다. 또한 mass spectrum은 molecular ion peak가 m/z 414에서 나타났고 fragment ion peak가 m/z 303, 254, 213, 159, 146, 107, 95 등에서 나타나 Wiley/NBS mass library와 비교한 결과 β-sitosterol(C₂₉H₅₀O, 5-stigmen-3β-ol, MW. 414)로 동정되었는데 표준품의 기기분석 결과와 비교하여 확인하였다.

Compound D의 IR spectrum을 분석한 결과 IR_{max}: 3300(-OH), 1723(C=O) 그리고 1690 cm⁻¹(C=C)로 인정되는 흡수를 나타냈으며 1650~1450 cm⁻¹에서 방향족

화합물의 복잡한 흡수를 나타냈고 ¹H-NMR spectrum을 측정된 결과 δ 6.21 (1H, d, J=9.5, H-3), 6.73(1H, s, H-8), 6.78(1H, s, H-6), 7.55(1H, d, J=8.5, H-5), 7.95(1H, d, J=9.7, H-4) 그리고 10.55 (1H, s, OH)의 signal을 나타냈다. 또한 mass spectrum은 molecular ion peak가 m/z 162에서 base peak가 m/z 134에서 그리고 fragment ion peak가 m/z 104와 78에서 나타났으며 Wiley/NBS mass library와 비교한 결과 umbelliferone (C₉H₆O₃, MW. 162)으로 추정되었고 표준품과 비교하여 동정하였다. 이들 동정된 활성물질의 구조는 Fig. 2와 같다.

동정된 활성물질의 항미생물 활성 측정

페놀성 분획으로부터 동정된 항미생물 활성물질인 psoralen, bergapten, β-sitosterol 및 umbelliferone에 대한 항미생물 활성을 측정된 결과 Table 2에서와 같이 psoralen과 bergapten이 β-sitosterol과 umbelliferone에 비하여 항미생물 활성이 훨씬 높았고 β-sitosterol은 모든 사용균주에 대하여 낮은 활성을 보였다. Umbelliferone의 경우 psoralen과 bergapten에 비하여 모든 사용균주에 대한 활성이 전반적으로 낮은 편이었으나 aflatoxin 생산 곰팡이인 *Aspergillus flavus*에 대해서는 다른 균주에 대해서보다 강한 활성을 보인 것이 특징적이었다. β-Sitosterol

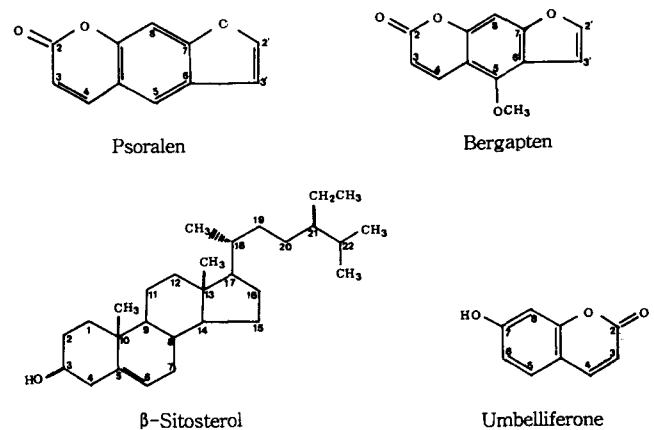


Fig. 2. Chemical structures of antimicrobial substances isolated from fig leaves.

Table 2. Antimicrobial activities of the purified compounds from phenolic fraction of fig leaves against selected microorganisms

Compound ¹⁾	Microorganism				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 ²⁾	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 ³⁾	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>A. flavus</i> KCTC 1375
Psoralen	24 ⁴⁾	22	32	24	25
Bergapten	22	20	27	28	24
β-Sitosterol	— ⁵⁾	11	11	11	11
Umbelliferone	16	17	18	13	21

¹⁾Concentration of the purified compounds was 1,000 ppm per disc. ²⁾ATCC is an abbreviation for American Type Culture Collection. ³⁾KCTC is an abbreviation for Korean Collection for Type Culture. ⁴⁾Figures meant the diameter(mm) of clear zone resulted from the microbial growth inhibition by antimicrobial compounds. ⁵⁾not detected.

terol의 경우 초기 정제단계인 silica gel column chromatography를 행한 후에는 약간의 활성이 확인 되었으나 완전히 정제한 후에는 거의 활성이 나타나지 않은 것으로 보아 이는 초기 정제 단계에서는 미량의 다른 활성물질이 혼합되었던 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 지방대육성 연구비의 지원으로 수행된 연구의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Fleming, H. P., W. M. Walter and J. R. Etchells (1969) Isolation of a bacterial inhibition from green olives. *Appl. Microbiol.* **18**, 856-860.
2. 白田 昭, 高橋幸吉 (1979) クワ科木本植物の枝木部における抗菌性物質の生成と蓄積. *日植病報* **45**, 156-161.
3. Clark, A. M., T. M. Jurgens and C. D. Hufford (1990) Anti-microbial activity of Juglone. *Phytochemistry Research* **4**, 11-14.
4. Masae, Y. and A. Tomiko (1988) Screening for antimicrobial action of Chinese crude drugs, and active principles of Hu-zhang. *生藥學雜誌* **42**, 153-158.
5. Beuchat, L. R. and D. A. Golden (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* **43**, 134-137.
6. 유영선, 박기분, 김영배 (1993) 생약제 및 향신료의 *Streptococcus mutans* 증식 억제 효과. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 187-191.
7. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이용호 (1994) 수산미이용자원중에 존재하는 항균성 물질의 검색. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**, 261-265.
8. Davidson, P. M. and L. S. Post (1983) Naturally Occurring and Miscellaneous Food Antimicrobials. In 'Antimicrobials in Foods' Branen, A. L. and Davidson, P. M., ed. p. 371, Marcel Dekker Inc., New York.
9. 薬品植物學研究會 (1984) '薬品植物學各論', p.130-131, 進明出版社.
10. 강성국, 정희중 (1995) 무화과잎의 용매분획 및 항미생물 활성. *한국농화학회지* **38**, 289-292.

Purification and Identification of Antimicrobial Substances in Phenolic Fraction of Fig Leaves

Seong-Kuk Kang¹, Dong-Ok Chung² and Hee-Jong Chung^{1*} (¹Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwangju; ²Central Research Lab., Il Yang Pharmaceutical Company, Yongin, Korea)

Abstract: Fig leaves were extracted with methanol and then fractionated with ethyl acetate and various buffers to get active fractions and determined the antimicrobial activities. The acidic and phenolic fractions fractionated from the methanol extract of fig leaves showed the strong antimicrobial activities, but the basic and neutral fractions did not show any activities. The degree of antimicrobial activities of phenolic fraction against tested bacteria was higher than those of acidic fraction, but these against yeasts and mold were almost equivalent to those of acidic fraction. Especially, phenolic fraction was mostly affected on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Four antimicrobial substances purified from the phenolic fraction which showed the strongest antimicrobial activities among the fractions from fig leaves, were identified as psoralen (C₁₁H₆O₃, MW. 186), bergapten (C₁₂H₈O₄, MW. 216), β-sitosterol (C₂₉H₅₀O, MW. 414) and umbelliferone (C₉H₆O₃, MW. 162).

*Corresponding author