

상백피 추출물중 *Listeria monocytogenes* 증식억제 물질의 분리 및 효과

안은영 · 한지숙 · 신동화
전북대학교 식품공학과

Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Pure Compound Isolated from Extract of *Morus alba* Linne Bark

Eun-Young An, Ji-Sook Han and Dong-Hwa Shin
Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

Abstract

The crude extract of *Morus alba* Linne bark which showed strong antimicrobial activity on *Listeria monocytogenes* was fractionated by some solvents and applied column chromatography for purification of active component. By silica gel column chromatography, active fraction (F-5') was purely isolated and confirmed their strong bactericidal effect on *Listeria monocytogenes* tested at level of 100 and 300 ppm in tryptic soy broth. The cell wall observed by SEM was abnormal after treatment of F-5'.

Key words: *Morus alba*, bactericidal effect, *Listeria monocytogenes*

서 론

우리나라에 분포하는 뽕나무과 식물은 6속 11종이 있으며 뽕나무속은 산상(*Morus. bombycis* Koidzumi), 몽고 뽕나무(*M. monglica* C. K. Schen), 돌 뽕나무(*M. tiliaefolia* Makino) 및 백상(*M. alba* Linne) 등 4종이 있으며 그외 가새 뽕나무 변종과 함께 중국에서 전래된 노상(*M. lhou* Ser. Koidzumi)이 있으며 재배되고 있는 것은 산상, 백상, 노상으로 알려지고 있다⁽¹⁾. 상백피에는 Kuwanon E 등 대단히 많은 물질이 함유되어 있으며⁽²⁾ 이들 중에는 숨이차고 기침이나는 것을 막는 약리적 활성⁽³⁾과 함께 폭넓은 항균활성을 갖는 물질이 함유되어 있다고⁽⁴⁾ 알려지고 있다. 특히 상백피에 함유된 물질이 식중독균⁽⁵⁾으로 알려진 *Listeria monocytogenes*의 증식억제 효과⁽⁶⁾가 알려지면서 원인물질^(7,8)과 항균관련 물질⁽⁹⁾을 밝히려는 연구가 진행되었다. 특히 상백피에서는 새로운 물질들이 확인되면서, Kuwanon 관련구조를 갖는 화합물들이 밝혀지고 있는데 이들에 대한 약리적 효과도 규명되고 있다^(9,10).

*Listeria monocytogenes*의 증식억제 효과가 있는 백상피 추출물의 원인물질은 Kuwanon G로 추정⁽⁷⁾되는

데 이 물질은 flavone 골격을 가졌고 많은 이성체들이 있다⁽¹¹⁾. 이 물질에 의한 *Listeria monocytogenes*의 증식억제 효과에 대한 연구는 아직까지 보고되지 않아 이에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단되어 관련 균주별, 분리 물질의 첨가 농도별 증식억제 및 살균효과를 관찰하였기에 이에 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

균주는 국립보건원에서 분양받은 *Listeria monocytogenes* 5종(ATCC 19111, ATCC 19112, ATCC 19113, ATCC 19114 및 ATCC 15313)을 사용하였고 tryptic soy agar에 접종, 30°C에서 48시간 배양시킨 후 4°C에서 보관하면서 매 1개월마다 계대배양하여 사용하였다. 항균활성 효과 실험용 배지는 tryptic soy agar, tryptic soy broth (Difco)를 사용하였다.

순수 물질의 정제⁽¹²⁾

뽕나무(*Morus alba* Linne) 껍질을 전주식 소재 건재상에서 구입하여 시료중량 5배의 75% ethanol을 가해 78°C에서 3시간 추출한 후 이 추출물을 chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol 순으로 순차분획하였다. 각 분획물중 항균효과와 수율이 높은 chloroform 분획층을

Corresponding author: Dong-Hwa Shin, Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Dukjindong, Chonju, Chonbuk 560-756, Korea

대상으로하여 처음 *n*-butanol:chloroform (1:9, 2:8, 3:7), 다음 수포화 butanol, 마지막으로 methanol:water (5:5)의 용매로 silica gel (70~230 mesh, Merk) column (4×100 cm)으로 순차용리하였다. 1차 silica gel column chromatography후 얻어진 항균효과가 가장 높은 용리물에 대해 methanol:acetic acid:chloroform=1:0.5:6의 용매조건으로 2차 column (silica gel 60, 70~230 mesh, Merk, 3.3×41 cm) chromatography를 실시하였다. 분리 후 얻어진 각 용리물은 항균효과 실험 후 항균효과가 가장높은 획분(fraction 5)에 대해 HPLC (Spectra-physics SP 8800, C₁₈ column)를 통하여 93% (peak area) 정제도를 확인한 후 bactericidal 효과 실험용 시료로 사용하였다. 순수물질 획분(fraction 5)은 butanol:2M-NH₄OH=10:1의 용매조건으로 preparative layer chromatography (silica gel 60-F254)로 정제한 후 TLC (silica gel 60-F254)로 단일 점적임을 확인하였다.

항균효과검색-Disc diffusion method⁽¹³⁾

사면배지에 배양된 각 시험균주를 1백금이씩 취해 10 mL tryptic soy broth 에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 tryptic soy agar plate 에 떨어뜨린 후 균일하게 도포하였다. 각 시험균이 접종된 plate 위에 분획물을 흡수시킨 6.5 mm filter paper (Whatman No.2)를 놓고 30°C에서 24시간 배양 후 disc 주위에 나타난 clear zone의 직경(mm)으로 항균성을 비교하였다⁽¹⁴⁾.

Bactericidal 효과 측정

각 균주가 배양된 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL broth에 접종, 30°C에서 24시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 분리된 순수물질(F-5)을 100 ppm 및 300 ppm 수준으로 첨가한 broth에 접종하여 30°C에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 생균수를 계수하고 같은 방법으로 균주배양액 0.1 mL의 생균수 (control)를 계수하였다. 이때 F-5'가 물에 녹지 않아 7 mg을 75% ethanol 0.7 mL에 녹인 후 100 ppm 경우 0.1 mL를 broth 9.9 mL에 주입하고 300 ppm 경우 0.3 mL를 broth 9.7 mL에 주입하였다. 이때 첨가된 ethanol양에 대한 균증식 억제 양상을 관찰하여 영향이 없음을 확인하였다.

전자현미경 관찰

Bactericidal 효과가 가장 높았던 *L. monocytogenes* ATCC 15313 균주 배양액을 F-5'가 100 ppm 및 300 ppm 수준으로 첨가된 배지에 접종하여 30°C에서 12시

간 배양한 후 균을 분리하여 이를 전자현미경(SEM, Hitachi S-4100, Japan)으로 균의 상태를 관찰하였다.

결과 및 고찰

분획물의 항균성

에탄올(75%)을 용매로 하여 뽕나무 껍질에서 얻은 조추출물을 다시 극성이 다른 용매로 순차 분획하여 항균효과가 우수하였던 chloroform층을 silica gel column으로 1차 분리하여 얻어진 분획물에 대하여 항균성을 비교해본 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보면 Fraction 5 (F-5), F-6, 그리고 F-7에서 모든 실험균에 대하여 높은 항균성을 보이고 있으며 특히 F-7 분획물이 다른 분획구보다 높은 항균성을 보이고 있다. 천연물에서 항균성은 유효물질의 특성에 따라 용매에 용출 정도가 다른 바^(4,8,14) 실험에 사용한 상백피 추출물의 경우 유효물질이 용출되는 용매의 구성은 butanol:chloroform=5:5의 용매비율에서 가장 효과가 좋았고 한 구획에 집중되어 있는 것을 감안한다면 특정 물질이 관여하고 있다는 가능성을 보였다. Table 1에서 효과가 높았던 F-7을 다시 용매조건을 달리하여 silica gel column으로 분리하여 각 획분에 대한 항균활성을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 보면 F-5'은 실험 대상 5균주에서는 균주에 따라서 감수성은 약간씩 다르나 높은 항균활성

Table 1. Antimicrobial activities after silicagel partition column chromatograph of chloroform fraction from ethanol extract of *Morus alba* Linne bark

Fraction No. (elution volume)	<i>L. monocytogenes</i>				
	ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
F-1 ¹⁾ (100)	- ⁷⁾	-	-	-	-
F-2 ¹⁾ (100)	-	-	-	-	-
F-3 ¹⁾ (360)	-	-	10.0	12.0	13.0
F-4 ¹⁾ (240)	-	-	7.0	10.5	10.0
F-5 ²⁾ (670)	10.5 ⁸⁾	14.0	9.0	9.0	10.0
F-6 ³⁾ (100)	12.5	14.0	9.0	12.0	10.0
F-7 ⁴⁾ (1800)	14.0	10.0	10.0	14.0	12.0
F-8 ⁵⁾ (800)	-	7.5	-	-	-
F-9 ⁶⁾ (500)	-	-	-	-	-
F-10 ⁶⁾ (500)	-	-	-	-	-

¹⁾*n*-BuOH:CHCl₃=1:9.

²⁾*n*-BuOH:CHCl₃=1:9, 3:7.

³⁾*n*-BuOH:CHCl₃=5:5.

⁴⁾*n*-BuOH:CHCl₃=5:5, saturated BuOH.

⁵⁾saturated BuOH.

⁶⁾MeOH.

⁷⁾no inhibition.

⁸⁾clear zone diameter (mm).

Table 2. Antimicrobial activities after silicagel partition column chromatograph of F-7 from Table 1

Fraction No. (elution volume)	<i>L. monocytogenes</i>				
	ATCC 19111	ATCC 19112	ATCC 19113	ATCC 19114	ATCC 15313
F-1 ⁹⁾ (144)	12.0 ¹¹⁾	-	-	-	-
F-2 ⁹⁾ (54)	- ¹²⁾	-	-	-	-
F-3 ⁹⁾ (108)	11.5	-	-	-	12.5
F-4 ⁹⁾ (72)	17.0	-	14.0	-	16.0
F-5 ⁹⁾ (198)	16.5	11.0	13.0	14.5	17.8
F-6 ⁹⁾ (162)	14.5	-	-	11.5	10.0
F-7 ¹⁰⁾ (130)	-	-	-	-	12.5

⁹⁾MeOH:HOAc:CHCl₃=1:0.5:6.

¹⁰⁾MeOH.



Fig. 1. Thin layer chromatogram of Kuwanon G. (BuOH: 2M-NH₄OH=10:1, R_f=0.58).

을 보이고 있으며 다른 분획에 비하여 효과가 높은 경향으로 보아 이 분획에 항균활성 물질이 존재함을 알 수 있었다. 이 분획을 PTLC로 다시 정제한 후 TLC로 단일 물질 여부를 조사한 결과 이 분획에는 순수물질 형태로 존재하는 것을 단일 점적으로 확인하였고 이 결과는 Fig. 1과 같다.

분획물의 농도별 항균효과

F-5' 분획을 농도별로 tryptic soy broth에 첨가한 후 *Listeria monocytogenes* 5균주를 각각 접종하여 증식양상을 관찰한 결과는 Fig. 2-6와 같다. Fig. 2-6에서 보는 바와같이 F-5' 분획물은 100 ppm 농도로 첨가 하였을 때 뚜렷한 살균효과를 보이고 있으며 첨가량이 증가함에 따라 살균효과는 더욱 향상됨을 보여주고 있다.

각종 식물 추출물에 의한 *Listeria monocytogenes*를 포함한 식중독 미생물과 부패 미생물의 증식억제 효과

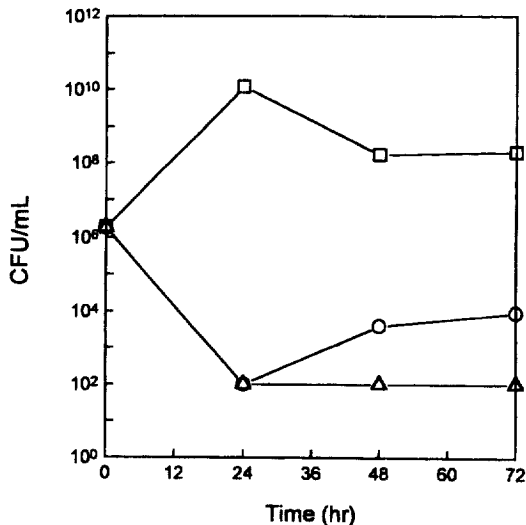


Fig. 2. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19111. □—□: control, ○—○: 100 ppm, △—△: 300 ppm.

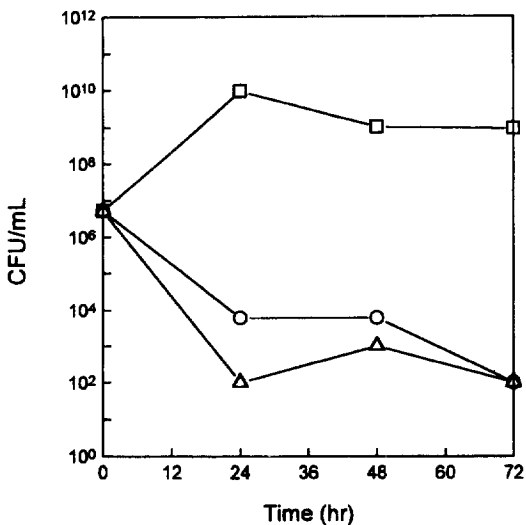


Fig. 3. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19112. □—□: control, ○—○: 100 ppm, △—△: 300 ppm.

는 많이 알려 졌는데 Tin men chu와 Sin mao heung⁽¹⁵⁾의 경우 *Listeria monocytogenes* Scott A와 함께 식중독을 억제하는 기능이 있으며 그 첨가수준은 대략 5,000 ppm이었고 *Bacillus cereus* 등에 대한 황백등 몇가지 식물추출물의 항균효과 수준은 500-2000 ppm⁽¹⁶⁾, grape fruit종과 추출물은 *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae*의 증식저해는 100 ppm⁽¹⁷⁾에서 항균활성을 보이고 있으며 돌산갓의 추출물은 *Bacillus subtilis* 등 몇가지 균종

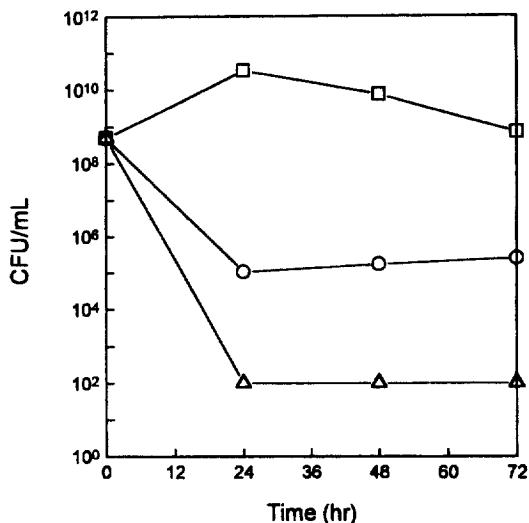


Fig. 4. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19113. □—□: control, ○—○: 100 ppm, △—△: 300 ppm.

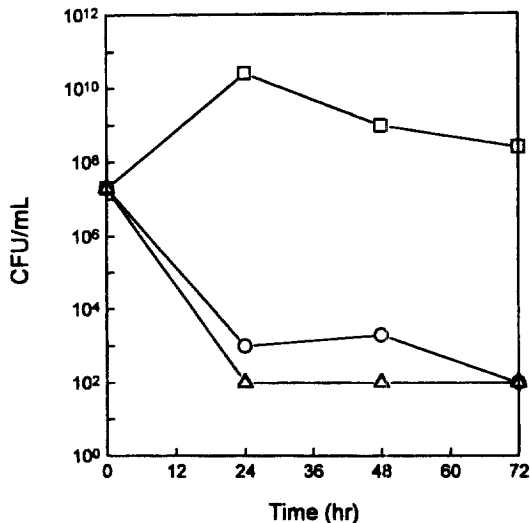


Fig. 6. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19113. □—□: control, ○—○: 100 ppm, △—△: 300 ppm.

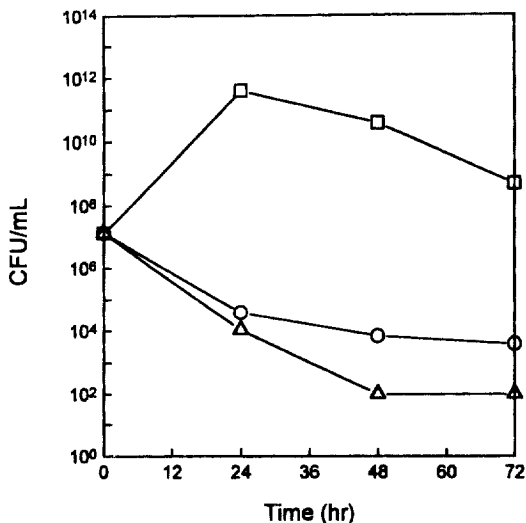


Fig. 5. Bactericidal effect of F-5' on *L. monocytogenes* ATCC 19114. □—□: control, ○—○: 100 ppm, △—△: 300 ppm.

에 대하여 400~600 ppm 농도에서 증식 지연효과가 인정되었고 그 원인 물질은 allysiothiocyanate⁽⁸⁾로 확인하였다. 또한 썩씨중 항균활성 물질은 terpinen-4-01로 알려졌다으며 항균활성 수준은 1000~1500 ppm이었다⁽⁹⁾.

이들 결과와 F-5' 분획물의 *Listeria monocytogenes*의 증식저해 농도수준을 비교하면 상당히 낮은 경향을 보이고 있어 증식저해 혹은 살균제로서의 활성이 높은 것을 확인 할 수 있었다. 상백피 추출물의 항균

성에 대한 연구에서 원인물질을 추정된 결과⁽⁸⁾가 있어 본 실험에서 분리된 물질의 구조확인이 필요할 것으로 본다.

살균작용에 대한 세포의 형태변화

상백피 추출물에서 분리된 F-5'획분을 첨가하여 tryptic soy broth에서 *Listeria monocytogenes*를 증식시켰을 경우 비첨가구(control)에서는 미생물의 증식이 급격히 일어났으나 (Fig. 2~Fig. 6) 첨가구의 경우 오히려 미생물의 감소현상이 일어나는 것을 알 수 있으며 이를 통하여 F-5' 획분이 *Listeria monocytogenes*의 살균에 관여 한다는 것을 알 수 있었다. 살균에 관여하는 기작을 확인코자 F-5'획분을 300 ppm 농도를 첨가하여 증식시킨 균체의 표면을 관찰한 결과는 Fig. 7과 같다. Fig. 7에서 보면 비처리구(Fig. 7-A)의 균체 표면은 매끄러우나 처리구(Fig. 7-B)의 균체 표면은 손상되었거나 형태가 이상을 이르킨 모습을 볼 수 있다. 이는 F-5'물질이 *Listeria monocytogenes* 균체에 이상을 이르키고 있음을 보여주고 있으며 grape fruit종자 추출물의 경우 *Salmonella choleraesuis* 등 미생물의 세포막이 파괴 되어 내용량이 유출되는 현상⁽¹⁰⁾과 유사한 경향으로 추정된다.

요 약

상백피를 75% 에탄올로 추출하여 얻은 조 추출물

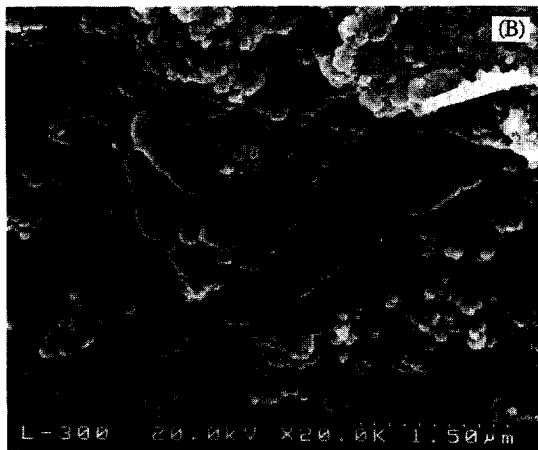
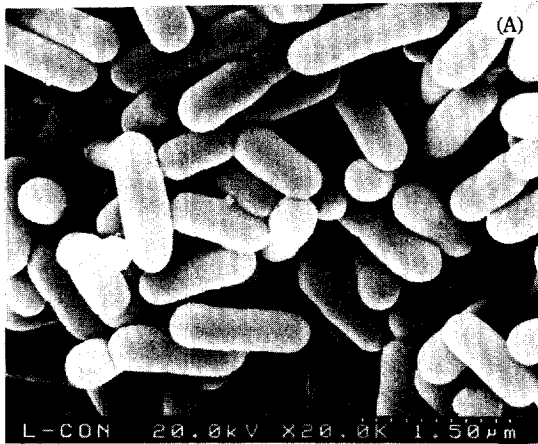


Fig. 7. Scanning electron micrographs (X20,000) of *L. monocytogenes* ATCC15313. A: control, B: treated with 300 ppm of F-5' at 30°C for 12 hours.

을 다시 용매별로 순차 분획 후 *Listeria monocytogenes* 5균주에 대하여 증식저해 효과를 비교한 후 항균활성 물질을 확인하였다. 활성이 있는 획분을 1차 및 2차 column chromatography를 통하여 활성 물질을 순수 분리하여 활성 물질 획분(F-5)을 얻었고 이 획분을 tryptic soy broth에 100 및 300 ppm을 첨가하여 *Listeria monocytogenes*를 증식시킨 결과 배양시간에 따라 뚜렷한 균수의 감소가 관찰되어 높은 살균효과가 인정되었으며 처리된 균체의 세포벽의 비정상적인 형태가 전자현미경을 통하여 관찰되었다.

감사의 글

이 연구는 1996년도 농림수산기술개발사업으로 수행한 결과의 일부로 이에 감사드린다.

문 헌

1. 김문협, 김락정, 김원경, 김윤식, 권대락, 최병희, 한계룡 : 잠사학개론 학문사 p.28 (1972)
2. 전통 동양약물 데이터 베이스 : 서울대학교 천연물과학연구소(1996)
3. 허준 : 동의보감, 여강출판사, p.1766 (1994)
4. 한지숙, 신동화 : *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 뽕나무 및 고삼 에탄올 추출물의 분획별 효과. 한국식품과학회지, **26**, 539 (1994)
5. Harrison, M.A., Huang, Y.W., Chao, C.H. and Shinemen, T.: Fate of *Listeria monocytogenes* on packed, refrigerated, and frozen seafood. *J. Food Prot.*, **54**, 524 (1991)
6. 한지숙, 신동화, 윤세억, 김문숙 : *Listeria monocytogenes*의 증식을 억제하는 사용 가능한 식물추출물의 검색. 한국식품과학회지, **26**, 545 (1994)
7. 신동화, 문성필, 한지숙, 안은영 : 상피추출물중 *Listeria monocytogenes* 증식 억제 물질의 분리. 한국식품과학회 제56차 학술 발표회 초록(1996)
8. 박옥연, 김선희, 김지희, 김용만, 장동석 : 상백피 추출물로 부터 항균성물질의 분리정제. 한국식품위생·안전성학회지, **10**, 225 (1995)
9. Nomura, T. and Fukai, T.: Constituents of the cultivated mulberry tree. VII. Isolation of three new isoprenoid-flavanones, Kuwanon D.E. and F from root bark of *Morus alba* L. *J. Med. Plant Res.*, **42**, 79 (1981)
10. Nomura, T., Fukai, T., Matsumoto, J., Imashimizu, A., Terada, S. and Hama, M.: Constituents of the cultivated mulberry tree. X. Structure of Kuwanon I, a new natural diels-alder adduct from the root bark of *Morus alba*. *J. Med. Plant Res.*, **46**, 167 (1982)
11. Harborne. J. B. and Baxster, H.: *Phytochemical Dictionary*. Taylor & Francis, London, p.403 (1993)
12. 우원식 : 천연물 화학연구법. 서울대학교출판부(1989)
13. Davidson, P.M. and Parish, M.E.: Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, **43**, 148 (1989)
14. 마승진, 고병섭, 박근형 : 두릅 수피에서 항미생물 활성을 갖는 3,4-dihydro xybenzoic acid의 분리. 한국식품과학회지, **27**, 807 (1995)
15. Chung, K.T., Thomasson, W.R., and Wu-Yuan, C.D.: Growth inhibition of selected food-borne bacteria, particularly *Listeria monocytogenes*, by plant extracts. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 498 (1990)
16. 이병완, 신동화 : 식물 부패 미생물에 대한 천연 항균성 물질의 농도별 및 분 획별 항균 특성. 한국식품과학회지, **23**, 205 (1991)
17. 조성환, 이상열, 김재원, 고경력, 서일원 : Grapefruit 중 자추출물로 부터 광범 위 항균제 개발 및 응용에 관한 연구-Grapefruit중 자 추출물의 항균제 검색. 한국식품위생·안전성학회지, **10**, 33 (1995)
18. 박석규, 박정로, 이상원, 서권일, 강성구, 심기환 : 돌산 갯 전회리 추출물의 항 균활성 및 열안정성. 한국영양식량학회지, **24**, 707 (1995)
19. 정병선, 이병구, 심선택, 이정근 : 쑥씨 중의 정유성분이 미생물의 생육에 미치는 영향. 한국식문화학회지, **4**, 417 (1989)

(1997년 5월 9일 접수)