

노루발풀(*Pyrola japonica*) 추출물의 *Bacillus subtilis*에 대한 항균활성

박해건 · 차미란 · 황지환 · 김주영 · 박미숙 · 최선욱 · 박해룡 · 황용일*

경남대학교 식품생명학과

Received July 21, 2006 / Accepted August 30, 2006

Antimicrobial Activity of the Extract from *Pyrola japonica* against *Bacillus subtilis*. Hae-Gun Park, Mi-Ran Cha, Ji-Hwan Hwang, Ju-Young Kim, Mi-Suk Park, Sun-Uk Choi, Hae-Ryong Park and Yong-Il Hwang*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea - The antimicrobial substance from *Pyrola japonica* were extracted and isolated. Eighty percent ethanol extract of dried *Pyrola japonica* was fractionated to hexane, diethyl ether, ethyl acetate and aqueous layer. The hexane-soluble fraction showed the highest inhibitory activity against *Bacillus subtilis*. Moreover the hexane layer was fractionated into 5 groups by silica gel column chromatography. From the results, group No. 2 (18~40 fractions) showed the highest antimicrobial activity. The group was re-separated to 10 fractions by preparative thin layer chromatography and the peak I as active fraction was isolated by HPLC.

Key words - Antimicrobial activity, *Pyrola japonica*, hexane fraction, *Bacillus subtilis*

최근 생활수준의 향상과 함께 식품산업이 발달함에 따라 유통 및 저장과정에서 발생하기 쉬운 식품의 부패나 변질의 원인이 되는 미생물의 증식을 억제하기 위한 노력이 계속되고 있다[1,3,5]. 식품의 저장기간을 연장하기 위한 수단으로 가열 등과 같은 물리적인 방법으로 저장성을 높이기도 하는데, 이는 식품의 영양성분의 파괴 및 품질저하 등을 초래하는 단점이 있으므로 이를 보완하기 위한 방법으로 합성보존료를 사용하기도 한다. 그러나 최근 건강 지향적인 소비자의 요구에 따라 기존의 화학적 합성 보존료의 사용을 기피하고 또한 합성보존료의 지속적인 사용이 인체에 부작용을 일으킬 수 있는 안정성 문제[17]가 제기됨에 따라 인체에 무해하면서 변패를 억제하고 유통기한을 늘릴 수 있는 천연자원의 이용개발이 시도되고 있으며, 특히 식물성 한약재 및 약용식물 유래 항균활성 및 생리활성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다[2,8]. 따라서 인체에 무해하면서 식품의 변패를 억제하고, 저장기간을 늘릴 수 있는 천연물 대체 보존료의 개발이 사회적인 관심사로 대두되고 있다[6,12].

노루발풀(*Pyrola japonica*)은 파혈단, 동녹, 녹제초 등으로 불리는 진달래목, 노루발과의 상록 여러해살이풀로 우리나라와 일본, 중국 등의 산기슭에서 자생한다. 노루발풀의 성분으로는 ursolic acid[13], quinins[10,14], flavonoids[10] 그리고 다양한 phenolic glycoside[9,11,15] 등이 있는 것으로 알려져 있다. 한방에서는 줄기와 잎을 단백뇨 치료에 사용하며, 생즙은 독충에 쏘였을 때 바르는 등 전초를 생약재로 쓴다. 민간에서는 칼에 베인 상처, 뱀 등에 물렸거나 독충 등에 쏘였을 때의 상처에 노루발풀의 잎을 으개어 짜낸 즙을 환부에

문질러 바르면 출혈이 멎고 통증이 없어진다고 알려져 있다 [11]. 또한 부인병인 백태하, 생리불순에도 유효하고 남성에게는 강장효과가 있으며, 다리나 무릎에 무력감이 올 때, 반신불수, 하지마비 등에 내복하거나 혹은 술에 넣었다가 복용하면 효과적이다. 폐병, 늑막염에도 노루발풀 말린 잎을 달여 복용하면 효과가 있다. 말린 잎을 달인 즙은 각기에도 뛰어난 효과가 있다. 또한 동물실험에서 이노작용과 결핵균, 황색포도상 구균에 대한 항균작용이 인정되고 있다.

노루발풀에 관한 연구로는 노루발풀의 성분분석[9-11,13,14]이나 수분 포텐셜, 치사온도 및 탄수화물량의 변화들의 연구[16]가 선행되었으나, 노루발풀의 항균활성에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 천연보존료 개발의 일환으로 노루발풀을 이용하여 80% ethanol 추출물의 식품위해 세균에 대한 항균활성을 검색하고, 여러 종류의 용매를 순차적으로 분획하여 silica gel chromatography, preparative thin-layer chromatography (prep. TLC), high performance liquid chromatography (HPLC)로 항균활성 물질을 분리하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 노루발풀은 2005년 9월, 양산시 서창 지역에서 채취하여 가볍게 수세한 뒤 물기를 제거하고, 건조시킨 후 상온에서 보관하여 시료로 사용하였다. 시료 추출용 유기용매는 99%이상의 1급 시약(Daejung Chemical, Ltd, Korea)으로 ethanol, hexane, diethyl ether, ethyl acetate 등을 사용하였고, HPLC 분석용매는 Baker사(USA)의 특급용매를 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-249-2685, Fax : +82-55-249-2995

E-mail : yihwang@kyungnam.ac.kr

사용균주 및 배지

항균실험에 사용한 균주는 식품을 변질시키는 균으로 알려진 대표적인 그람 양성균 *B. subtilis*와 오염의 지표 균이면서 부패세균인 그람 음성균 *Escherichia coli*를 사용하여 활성을 측정하였다. 균의 생육 배지로는 두 균주 모두에 대하여 nutrient broth를 사용하여 37°C incubator에서 9~10시간 배양하였다. 항균활성 측정을 위한 고체배지로는 nutrient agar 배지를 사용하였다.

추출물 제조 및 용매분획

건조된 노루발풀 100 g에 80% ethanol 5 l를 가하여 3일 동안 상온에서 침출시켜 추출 한 후, 여지(5C. 110 mm, Advantec, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd.,Tokyo, Japan)로 여과하여 불순물을 제거하고, 이 여액을 감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압 농축하여 80% ethanol 추출물을 얻었다. Ethanol 추출물은 서로 극성을 달리하여 hexane, diethyl ether, ethyl acetate로 순차적으로 용매분획 하였다. 즉, hexane과 물을 같은 비율로 하여 분획여두에서 hexane 층을 분획하고, 동일한 방법으로 남은 수용액 층에 diethyl ether, ethyl acetate, 물 층으로 분획하여 각각의 용매 분획물을 얻었다(Fig. 1). 각 분획물의 항균활성을 확인하고, 활성 분획물은 감압 농축하여 적당한 농도로 희석해서 사용하였다.

항균활성 측정

본 실험에서는 노루발풀의 추출물과 각 분획물의 항균활

성을 확인하기 위해서 paper disc diffusion assay 방법[7]을 사용하였다. 평판배지에 배양된 각각의 균주를 1 백금이 취하여 nutrient broth 배지에 접종하고, 37°C의 incubator에서 9~10시간 동안 배양하여 사용하였다. 항균활성 시험용 평판배지의 조제는 nutrient agar배지를 멸균하여 적절하게 식힌 후 상기 배양액 1%를 혼합하여 petridish에 분주하여 응고시킨 후 사용하였다. 80% ethanol 추출물 및 각 용매 분획물을 각각 10 µg/disc, 20 µg/disc, 30 µg/disc, 40 µg/disc, 50 µg/disc 씩 paper disc (8 mm, Advantec)에 천천히 흡수시켜 완전히 말린 후 배지 위에 밀착되도록 올린 다음 37°C incubator에서 overnight 시킨 후 paper disc 주변의 생육저해환의 직경 (mm)을 통해 활성을 측정하였다.

항균활성 물질 분리

노루발풀의 80% ethanol 추출물로부터 얻은 분획물들의 항균활성을 측정 비교한 후, 활성을 나타낸 hexane 분획물로부터 유효성분을 검색할 목적으로 silica gel chromatography를 실시하였다. 즉, hexane 분획물 1 g을 얻은 후, silica gel이 충전된 컬럼에 넣어 CHCl₃:MeOH=50:1의 전개용매를 이용하여 column chromatography를 실시하여 100개의 fraction을 얻었다(Fig. 2). 활성 층으로부터 prep. TLC를 실시하기 위해 silica gel TLC plate (20 cm × 20 cm × 0.5 cm, Merck)에 시료를 loading하여 hexane:ethyl acetate = 4:1 용매로 전개 시켜 10개의 소분획으로 나누었고, 이 중 항균력이 우수한 fraction No. 3를 단일분리하기 위해 Table 1의 조건으로 HPLC 분석을 실시하였다.

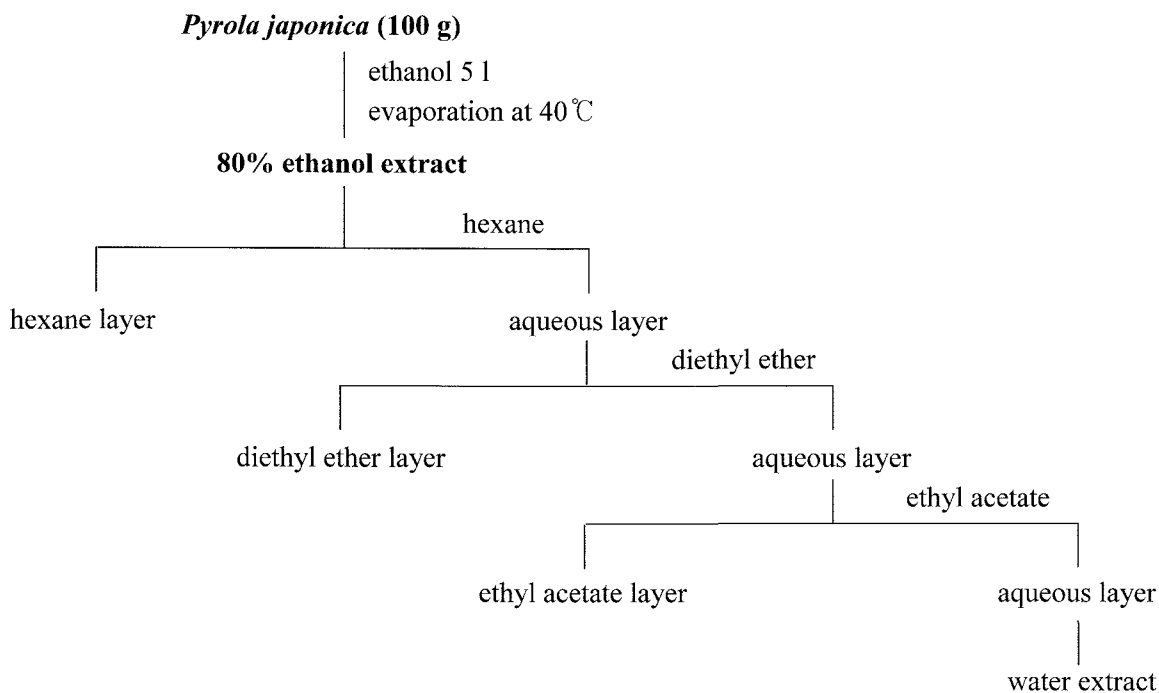


Fig. 1. Fractionation of 80% ethanol extract from *Pyrola japonica*.

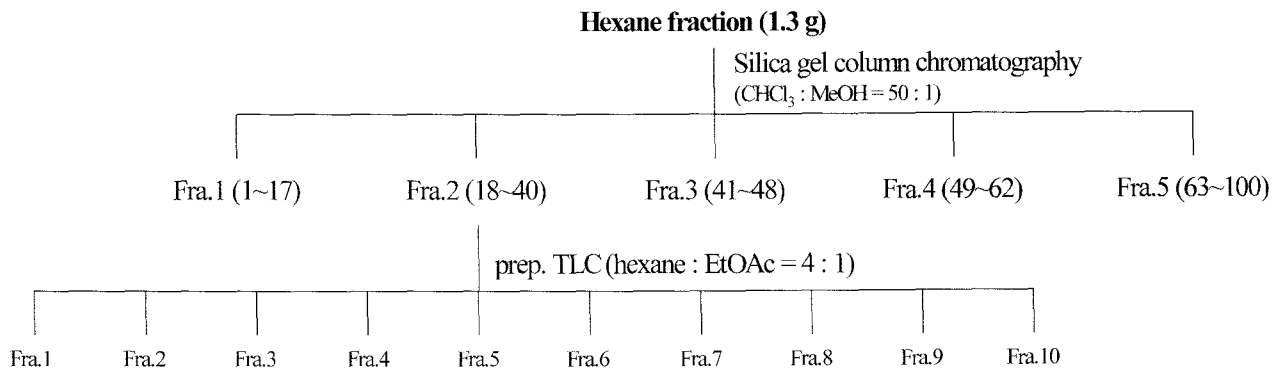


Fig. 2. Fractionation of *n*-hexane extract from silica gel column chromatography and prep. TLC.

결과 및 고찰

노루발풀 추출물의 항균활성

노루발풀의 80% ethanol 추출물의 항균활성을 paper disc method를 이용하여 실험한 결과는 Table 2와 같다. 즉, 80% ethanol 추출물의 2종의 식품 부패균에 대한 항균효과 측정 결과 그람 음성균 *E. coli* 에서는 활성이 나타나지 않은 반면 그람 양성균 *B. subtilis*에 대해서는 항균활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 이는 노루발풀의 methanol과 ethyl acetate 추출물에서도 그람 양성균에 대해서 활성을 보였던 연구[4]와 유사한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 노루발풀의 그람 양성균에 대한 항균활성은 추출물의 농도가 증가할

수록 항균활성을 나타내는 생육억제환이 증가하는 것으로 보아 항균활성이 증가하는 것을 보여 주고, 이는 추출물의 항균활성은 추출물의 농도에 의존적으로 증가한다는 것을 시사한다.

또한, 그람 양성균 *B. subtilis*에 대하여 활성을 나타낸 노루발풀의 80% ethanol 추출물은 항균 물질을 분리하기 위한 목적으로 hexane, diethyl ether, ethyl acetate 및 물 순으로 점차 극성을 높이면서 분획 추출하여 항균활성을 확인한 결과는 Table 3과 같다. 노루발풀의 hexane 층에서 강력한 항균활성을 보인데 반하여 나머지 용매 층에서는 그람 양성균에 대한 항균활성이 나타나지 않았다. 이것으로 볼 때 노루발풀의 항균활성을 나타내는 물질은 비극성의 성질을 가지는 물질임을 예상할 수 있다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for analysis of antimicrobial compound from *Pyrola japonica*.

Requester	Condition
Column	HAISIL 100 C18, 5 mm
Flow rate	1 ml/min
Eluent	MeOH:Water (7:3, v/v)
Wave length	254 nm
Injection volume	5 µl

Table 2. Antimicrobial activity of 80% ethanol extract from *Pyrola japonica* against typical gram positive and negative bacteria.

Sample name	Conc. (µg/disc)	Test organisms	
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>Pyrola japonica</i>	10	+	-
	20	+	-
	30	++	-
	40	+++	-
	50	+++	-

- : No inhibition
 + : Very slight inhibition (8-10 mm)
 ++ : Moderate inhibition (10-15 mm)
 +++ : Strong inhibition (15-20 mm)

Hexane 분획물의 항균성

Hexane 분획물을 silica gel column chromatography를 실시하여 100개의 분획을 얻을 수 있었다(Fig. 2). Silica gel column chromatography를 통해 획득된 100개의 분획물을 다시 analytical TLC를 실시하여 5개의 분획물 그룹으로 나누어 활성을 확인한 결과 No. 18~40까지의 fraction에서 강한 항균활성을 확인 할 수 있었다(Table 4). 항균활성이 높은 No. 2 그룹의 회수물 410 mg에 대하여 prep. TLC를 실시하여 10개의 소분획물로 다시 분리하였다. 획득된 10개의 분획물에 대해서 항균활성을 확인한 결과 No. 1에서 No. 5까지

Table 3. Antimicrobial activity of various solvent fractions from 80% ethanol extract of *Pyrola japonica*.

Test organism	Solvent fractions			
	Hexane	Diethyl ether	Ethyl acetate	Water
<i>B. subtilis</i>	+++	-	-	-

- : No inhibition
 + : Very slight inhibition (8-10 mm)
 ++ : Moderate inhibition (10-15 mm)
 +++ : Strong inhibition (15-20 mm)

Table 4. Antimicrobial activity of the fraction groups after silica gel chromatography.

Test organism	Fraction No.				
	1	2	3	4	5
	1~17	18~40	41~48	49~62	62~100
<i>B. subtilis</i>	-	+++	-	+	-

- : No inhibition
 + : Very slight inhibition (8-10 mm)
 ++ : Moderate inhibition (10-15 mm)
 +++ : Strong inhibition (15-20 mm)

Table 5. Antimicrobial activity of the fractions after prep. TLC.

Test organism	Fraction No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>B. subtilis</i>	+	++	+++	+	+	-	-	-	-	-

- : No inhibition
 + : Very slight inhibition (8-10 mm)
 ++ : Moderate inhibition (10-15 mm)
 +++ : Strong inhibition (15-20 mm)

의 분획물에서는 항균활성을 나타내었으며 특히 No. 3의 분획물에서는 강한 저지능을 보였다. 그렇지만 No. 6 이후의 분획물에서는 뚜렷한 항균활성이 보이지 않았다(Table 5).

항균활성 물질의 분리

노루발풀의 80% ethanol 추출물로부터 여러 가지 용매별로 계통 분획하여 획득한 분획물 중 항균활성을 나타낸 hexane 분획물로부터 silica gel column chromatography와 preparative TLC를 실시하여 획득한 10개의 분획물 중에서 항균활성을 보인 No. 1에서 No. 5까지의 분획물의 유효성분을 알아보기 위하여 HPLC를 통해 단일 분리한 결과 retention time이 9분과 13분대인 두 개의 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이렇게 나타난 두 peak 중 노루발풀의 *B. subtilis*에 대한 항균활성을 나타내는 물질을 선별하기 위해서 preparative HPLC를 통해 획득된 두 peak의 분획물에 대해 항균성을 실험해본 결과 peak I에서 항균활성을 보이는 것으로 보아 peak I의 단일물질이 노루발풀의 *B. subtilis*에 대한 항균활성을 나타내는 물질임을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

요 약

우리나라 전국 산지에서 쉽게 구할 수 있는 노루발풀을 건조시켜 80% ethanol 추출물과 여러 가지 용매 분획물의 미생물 증식 억제 효과에 대해서 검색하였다. 노루발풀의 80% ethanol 추출물은 그람 양성균 *B. subtilis*에서 농도 의존적으로 항균활성을 나타내는 반면 그람 음성균 *E. coli*에서는 활

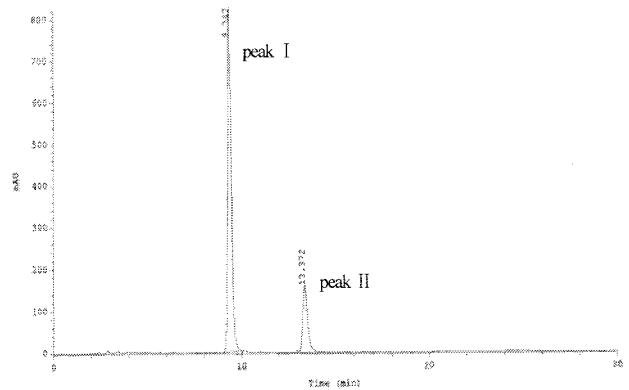


Fig. 3. HPLC spectrum of the fractions of antimicrobial activity after prep. TLC.

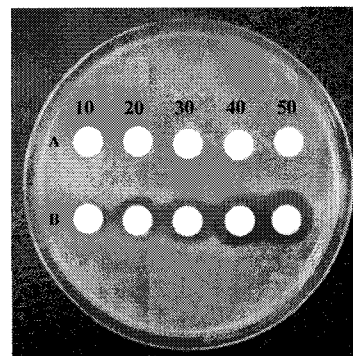


Fig. 4. Antimicrobial activities of *Pyrola japonica* against *Bacillus subtilis* (mg/disc). A: peak II, B: peak I

성이 나타나지 않았다. 노루발풀의 80% ethanol 추출물을 용매 분획하여 얻은 분획물 중 hexane층에서 항균활성이 나타나는 것을 확인하였다. 노루발풀의 항균활성 물질을 검색하기 위한 목적으로 hexane 분획물을 silica gel column chromatography, prep. TLC 및 HPLC를 실시하였으며 그 결과, peak I의 단일 물질이 노루발풀의 *B. subtilis*에 대한 항균활성을 나타내는 물질임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2005학년도 경남대학교 학술진흥연구비 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bae, J. H. 2004. Antimicrobial effect of *Pulsatilla koreana* extracts on food-borne pathogens. *Kor. J. Nutr.* **37**, 655-661.
2. Choi, O. K., Y. S. Kim, G. S. Cho and C. K. Sung. 2002. Screening for antimicrobial activity from Korean plants. *Korean J. Food & Nutr.* **15**, 300-306.
3. Chung, K. S., J. Y. Kim and Y. M. Kim. 2003. Comparison

- of antibacterial activities of garlic juice and heat-treated garlic juice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 540-543.
4. Do, D. S., S. M. Lee, M. K. Na and K. H. Bae. 2002. Antimicrobial activity of medicinal plant extracts against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**, 319-323.
 5. Hahn, Y. S. 2005. Antimicrobial effects of *Camellia japonica* L. leaves extract on food-borne pathogenic microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 113-121.
 6. Han, W. S. 2005. Isolation of the antimicrobial compound from *Aralia cordata* Thund. extract. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**, 182-185.
 7. Hwang, J. S. and Y. S. Han. 2003. Isolation and identification of antimicrobial compound from Mokdan bark (*Paeonia suffruticosa* ANDR). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1059-1065.
 8. Jang, S. Y., H. J. Choi, N. Y. Ha, O. M. Kim and Y. J. Jeong. 2004. Study on the antimicrobial effects of citrus peel by different extract methods. *Korean J. Food Preserv.* **11**, 319-324.
 9. Chang, J. and T. Inui. 2004. Novel phenolic glycoside dimer and trimer from the whole herb of *Pyrola rotundifolia*. *Chem. Pharm. Bull.* **53**, 1051-1053.
 10. Kagawa, K., K. Tokura, K. Uchida, H. Kakushi, T. Shike and H. Nakai. 1992. Platelet aggregation inhibitors and inotropic constituents in *Pyrola herba*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2083-2087.
 11. Kim, J. S., S. H. Shim, Y. Xu, S. S. Kang, K. H. Son, H. W. Chang, H. P. Kim and K. H. Bae. 2004. Phenolic glycosides from *Pyrola japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 714-717.
 12. Kim, K. J., J. R. Do, J. H. Jo, Y. M. Kim, B. S. Kim, S. D. Lim and S. N. Kang. 2005. Antibacterial activity of *Terminalia chebula* Retz. extract against food spoilage microorganisms. *Korean J. Food sci. Technol.* **37**, 498-503.
 13. Kosuge T., M. Yokota, K. Sugiyama, T. Mure, H. Yamazawa and T. Yamamoto. 1985. Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 5355-5357.
 14. Lee, S. M., R. B. An, B. S. Min, M. K. Na, C. H. Lee, S. J. Kang, H. Y. Maeng and K. H. Bae. 2001. A new naphthoquinone from *Pyrola japonica*. *Arch. Pharm. Res.* **24**, 522-523.
 15. Nigel, B. P. and N. J. Brennen. 1997. Antimicrobial and cytotoxic phenolic glycoside esters from the New Zealand tree *Toronia toru*. *J. Nat. Prod.* **60**, 623-626.
 16. Ryu, B. T. and J. H. Kim. 1990. Changes in leaf water potential, lethal temperature and carbohydrate content of wintergreen (*Pyrola japonica* Klenze) during overwintering. *Korean J. Ecol.* **13**, 59-66.
 17. Shim, C. J., G. H. Lee, J. H. Jung, S. D. Yi, Y. H. Kim and M. J. Oh. 2004. Isolation and identification of antimicrobial active substances from *Rhodiola sachlinensis*. *Korean J. Food Preserv.* **11**, 63-70.