

머루 줄기와 자소자로부터 분리한 Resveratrol 올리고머와 Flavonoid의 항균효과

손락호* · 진휘승* · 함아름** · 마웅친***,1,# · 남궁우***,1,#

*정산생명공학연구소, **서울대학교천연물과학연구소

(Received September 9, 2009; Revised December 8, 2009; Accepted December 8, 2009)

Antimicrobial Activity of Resveratrol Oligomers and Flavonoids from the Stems of *Vitis coignetiae* Pulliat and the Seeds of *Perilla frutescens* (L.) Britton

Rak Ho Son*, Hwi Seung Chin*, Ahrom Ham**, Woongchun Mar***,1,# and Kung-Woo Nam***,1,#

*R&D Center, Jung San Bio Technology, #61 Dukjel-Ri, Jeongnam-Myun, Whasoung-City, Kyunggi-Do 445-96, Korea

**Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract - We studied the antimicrobial activities of five compounds isolated from the stems of *Vitis coignetiae* Pulliat and the seeds of *Perilla frutescens* (L.) Britton. Based on spectroscopic evidence, compounds 1 to 5 were characterized as resveratrol, ϵ -viniferin, ampelopsin E, apigenin, and luteolin, respectively. The antimicrobial activities against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and -negative (*Pseudomonas aeruginosa*) bacteria and a fungus (*Candida albicans*) were investigated using the disc diffusion and broth dilution methods. *C. albicans* was not inhibited by the five compounds. Compounds 2 and 5 had significant anti-microbial activity against *S. aureus*, and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of compound 2 against *S. aureus* was 7.2 μ M. Compounds 4 and 5 significantly inhibited *P. aeruginosa* and the minimum inhibitory concentration (MIC) of compounds 2 and 5 was 0.07 and 2.0 μ M, respectively. Compounds 2, 4, and 5 had strong anti-microbial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

Keywords □ *Vitis coignetiae*, *Perilla frutescens*, antimicrobial

식품을 장기간 안전하게 보관하기 위하여 소르빈산(sorbic acid), 벤조산(benzoic acid) 및 염소제 등이 이용되고 있다.¹⁾ 현재 14종의 화학합성품이 우리나라 식품위생법에 보존료 용도로 허가되었으며, 허용기준 또한 설정되어 있다.²⁾ 그러나 이들 합성 보존료는 기준치이하의 섭취에 따른 안전성은 입증되었지만, 이들을 장기간 지속적으로 섭취 또는 병용 하였을 때 체내 축적에 의한 만성독성, 발암성, 돌연변이 유발, 기형 유발 등의 부작용이 보고되고 있다.³⁾ 이러한 이유로 합성 보존료를 사용한 식품들에 대한 소비자의 기피현상이 날로 증가하고 있다. 따라서 천연소재를 활용하여 부작용이 적은 보존제의 개발은 국민의 건강 유지에 중요한 분야이다.

머루는 우리나라 산야에서 흔히 볼 수 있는 포도나무과 덩굴

성 목본식물⁴⁾이다. 우리나라에는 머루(*Vitis coignetiae*), 왕머루(*V. amurensis*), 새머루(*V. flexuosa*), 까마귀머루(*V. thunbergii* var. *Sinuata*) 및 개머루(*Ampelopsis heterophylla*) 5종이 자생하고 있다.⁵⁾ 머루에는 여러 oligostilbene 화합물이 존재하며, 이러한 stilbene은 고등식물의 잎, 나무껍질, 목질 부분에 존재하는 이차적 부산물로서 식물체 내에서는 유도체의 형태로 존재한다. 대표적인 stilbene 화합물인 resveratrol은 혈소판 응집억제,⁶⁾ 지질대사 제어,⁷⁾ 항산화 작용,⁸⁾ 항염증 작용,⁹⁾ 암세포 성장 억제¹⁰⁾ 및 암 예방¹¹⁾ 및 여성 호르몬 에스트로젠 유사작용이 보고되었다.¹²⁾

자소(*Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Dence.)는 꿀풀과(Labiata) 초본식물로서 식용 또는 약용으로 재배되어 왔으며, 우리나라에서는 전국의 들에서 자라며 일부 농가에서 재배되기도 한다.^{13,14)} 자소의 잎은 자소엽이라 하며 주요 성분으로는 perillaldehyde이며, 그 외 eugenol, naginataketone 및 isogomaketone 등으로 감기풍한, 오감발열, 해수, 천식에 사용한다. 열매를 자소자라하며 강기, 소담, 윤페 활장의 효능이 있고, 해역, 담천, 기체변비를 치료한다고 알려져 있다.¹⁵⁾ 또한

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로

(전화) 031-373-1021 (팩스) 031-375-1023

(E-mail) kwnam1@snu.ac.kr

(전화) 02-880-2473 (팩스) 02-3672-5488

(E-mail) mars@snu.ac.kr

¹⁾These authors contributed equally to this work.

Nakazawa¹⁶⁾가 자소에서 분리한 apigenin과 4,5-trimethoxy-cinnamic acid는 항우울증에 대한 유사효과를 나타낸다고 보고되었다. 자소자에 함유된 apigenin과 luteolin은 1:1 비율로 함유되었음을 확인하였다.¹⁷⁾ 그 외에 anthocyanin과 flavones에 대한 성분이 보고되었으나 자소자를 이용한 항-균력 연구는 *Streptococci*와 *Porphyromonas gingivalis* 등에서 보고되었으나 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Candida albicans*에 대한 보고는 이루어져 있지 않다.

본 연구에서는 약용 및 민간치료에 이용되어 온 머루 줄기와 자소자로부터 분리한 화합물에 대하여 disc diffusion법 및 부분적으로 Modify한 Broth dilution test를 통 *S. aureus*(Gram⁺), *P. aeruginosa*(Gram⁻) 및 *C. albicans*(진균류)에 대한 항균-활성을 측정하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에 사용된 머루 줄기는 2008년 12월 경동시장에서 1 kg 구입하여 수세 후 음건, 분쇄하여 사용하였으며, 자소자는 2008년 12월 경동시장에서 5 kg 구입하여 수세 후 음건하여 사용하였다. 증거시료는 정산생명공학연구소의 시료 보관소에 [증거번호: 머루줄기(J0070/JS); 자소자(S0051/JS)] 보관 하였다.

머루 줄기의 용매 추출 및 항균활성 물질의 분리

구입 한 머루 줄기 950 g 건조 분말을 MeOH 용매 5l씩 3회 냉침 추출하여 얻어진 추출액을 농축하여 MeOH Extract 42.82 g을 얻었다. MeOH Extract는 다시 증류수를 이용하여 현탁시키고 *n*-Hexane, Chloroform, Ethyl acetate의 순서로 순차 분획하여 *n*-Hexane 분획 2.1 g, Chloroform 분획 2.72 g, Ethyl acetate 분획 23.8 g, Water 분획 14 g를 얻었다.

Ethyl acetate 분획 23.8 g를 *n*-Hexane : Ethyl acetate=1 : 1에서 EtOAc 단독까지 gradient용매로 silica-gel [Kiesel gel 60 (70~230 and 230~400 mesh, ASTM Art. 7734 and 9385, Merck)] column chromatography(C.C)를 실시하여 8개의 분획(E1-E8)으로 나누었으며, 그 중 E3(3.77 g)과 E6(5.35 g)을 각각 분리 하였다. E3은 RP Lobar-A C.C(50% MeOH)를 실시하여 5개의 분획물 E31-E35로 분리 하였으며, E31은 최종적으로 MeOH로 재결정을 통해 Compound 1(21.6 mg)을 얻었다. E33은 MeOH 단독 용매를 이용, Sephadex LH-20(Amersham Biosciences) C.C를 실시하여 compound 2(157 mg)를 단리 하였다. 또한 E6(5.35 g)을 MeOH-DW(1 : 1)을 유출용매로 하는 Sephadex LH-20 C.C를 실시하여 3개의 부분획(E61-E63)을 분리 하였고, 최종적으로 45% MeOH을 유출용매로 하는 RP Lobar-A C.C를 실시하여 최종 화합물 Compound 3(157 mg)을 단리 하였다. 분리된 화합물 compound 1~3은 LC-MS(Agilent

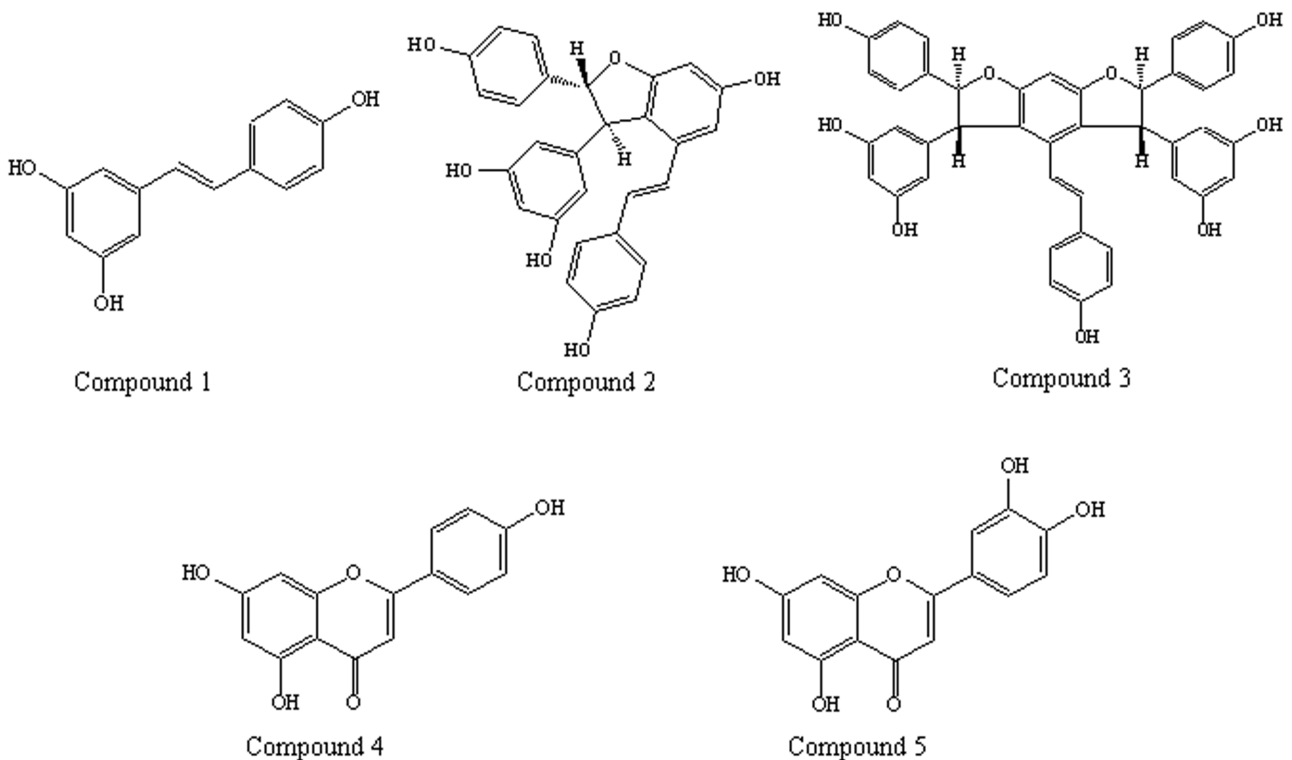


Fig. 1 – Structures of five compounds.

1100LC/MSD trap classic), (m/z) spectrum에 의해 LC-ESI-MS(m/z): 227[M-H]⁻으로 C₁₄H₁₂O₃인 resveratrol(compound 1)과 LC-ESI-MS(m/z): 453[M-H]⁻으로 C₂₈H₂₂O₆인 ε-viniferin(compound 2)으로 확인되었으며 compound 3은 LC-ESI-MS(m/z): 679[M-H]⁻으로 C₄₂H₃₂O₉인 ampelopsin E(compound 3)로 확인 되었다(Fig. 1).

자소자의 용매 추출 및 항균활성 물질의 분리

구입 한 자소자 4.9 kg 건조 분말을 n-Hexane 25 l씩 3회 냉침하였으며, 그 결과 얻어진 추출액을 농축하여 n-Hexane extract 619 g을 얻었고, 남은 잔사는 완전히 건조시킨 후 MeOH 용매 20 l씩 3회 냉침 추출하여 얻어진 추출액을 농축하여 MeOH Extract 318 g을 얻었다. MeOH Extract는 다시 증류수를 이용하여 현탁시키고 n-Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol의 순서로 순차 분획하여 n-Hexane 분획 227 g, Chloroform 분획 10.5 g, Ethyl acetate 분획 11.3 g, Butanol 분획 11 g, Water 분획 57 g을 얻었다.

Ethyl acetate 분획 11.3 g 을 CHCl₃:MeOH=20:1에서 MeOH 단독까지 gradient 용매로, silica-gel C.C를 실시하여 4개의 fraction으로 나누었으며 그 중 2번 fraction은 compound 4에 해당하는 부위로 1.07 g을 얻었고 3번 fraction은 compound 4와 5가 혼합된 부위로 3.56 g을 얻었다. 3번 fraction은 다시 MeOH 단독 용매를 이용, Sephadex LH-20 C.C을 실시하여 compound 4와 5로 분리 하였고, 최종적으로 MeOH로 Sephadex LH-20 C.C을 재실시하여 최종 정제된 미황색 분말 compound 4(1.22 g)와 미황색 분말 compound 5(1.19 g)를 얻었다. 획득된 compound 4와 5는 LC-MS(Agilent 1100LC/MSD trap classic), (m/z) spectrum에 의해 LC-ESI-MS(m/z): 271[M+H]⁺으로 C₁₅H₁₀O₅인 Apigenin(compound 4)과 LC-ESI-MS(m/z): 287[M+H]⁺으로 C₁₅H₁₀O₆인 Luteolin(compound 5)으로 확인되었다(Fig. 1).

사용 균주 및 배지

실험에 사용된 균주인 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*는 한국유전자은행(KCTC)에서 분양을 받아 실험에 사용하였다(Table I). 균주는 사면배지에 배양되어 있는 균주의 단일 집단을 일 백금이 취한 후, *S. aureus*와 *P. aeruginosa*는 37°C에서, *C. albicans*는 28°C에서 24시간 액체 배양하여 활성화시켜 사용하

였다. 균의 생육 배지는 Nutrient Broth(NB, Difco), Potato Dextrose Broth(PDB, Difco)와 Tryptic Soy Broth(TSB, Merck)를 사용하였다. Agar powder는 Merck사의 제품을 사용하였다.

항균 활성

항균 활성 평가는 paper disc(8 mm size, Advantec)를 이용한 disc diffusion 법으로 항균 활성을 측정하였다.¹⁸⁾ 해당 평판배지에 균주를 streaking하여 배양한 후 배양된 각 균주 일 백금이를 취해 10 ml 액체 배지에 접종 후 배양하여 활성화 시켜, ELISA reader(Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 595 nm에서 측정하여 흡광도가 0.08~0.1(0.5 McFarland nephelometer)이 되게 하여 균수를 1.5×10⁸ cfu/ml로 사용하였다. 항-균력 시험용 평판배지는 해당 배지에 agar를 1.5~2% 첨가 후 121°C에서 15분간 멸균하고 60°C 정도로 냉각한 후 멸균된 petri-dish에 약 15~20 ml씩 분주하였다. 배지에 멸균된 glass spreader로 균을 고르게 spreading한 후, paper disc를 올려놓은 다음 시료가 10 mM/disc가 되도록 0.5% DMSO에 용해시킨 후 20 μl를 주입하여 완전히 흡수시킨 후 incubator(DX7, Hanyoung)에서 24시간 배양시켜 paper disc 주위의 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

최소억제농도(Minimal Inhibitory Concentration: MIC)

MIC 평가는 96 well plate를 이용한 Broth dilution test를 일부 변형하여 수행하였다. 각각의 균주를 활성화 시킨 후 ELISA reader(Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 595 nm에서 측정하여 흡광도가 0.08~0.1(0.5 McFarland nephelometer)이 되게 하여 균수를 1.5×10⁸ cfu/ml이 되도록 배양 배지를 이용하여 희석하였다. 희석한 균액을 96-well plate에 200 μl/well로 분주하였다. 시료는 최종 농도 100, 10, 1, 0.1, 0.01 μM이 되도록 하였다. 36°C incubator에서 24시간 추가 배양한 후 균의 생육이 나타나지 않는 최소억제농도(MIC)로 결정하였다.

생육 저해율 측정(Fifty percent inhibitory concentration: IC₅₀)

생육 저해율 측정은 최소억제농도와 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 시료를 처리하지 않은 시료균을 100%로 보고 시료 처리균의 흡광도를 측정하여 50%의 생육 억제율을 나타내는 시료의 농도를 IC₅₀으로 나타내었다.

Table I – List of strains used in the experiments

Organisms	Strains	Culture conditions
Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	TSB, 37°C
Gram-negative	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 2513	PDB, 37°C
Fungus	<i>Candida albicans</i> KCTC 2965	NB, 28°C

Table II – Evaluation of antimicrobial activities of the compounds against two bacteria and a fungus

Compound	Diameter of growth inhibition zone		
	Gram-positive	Gram-negative	Fungus
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	-	-	-
2	+++	-	-
3	-	-	-
4	-	+	-
5	++	++	-
Ampicillin	+++	+	-
Euxyl K400	-	-	++

Size of the growth inhibition zone: -, not detected; +, less than 1.5 mm; ++, 1.5~3 mm; +++, 3~5 mm. Concentration: 10 mM

실험결과 및 고찰

분리된 화합물의 항균 활성 효과

머루 줄기에서 분리한 compound 1, 2, 3과 자소자에서 분리한 compound 4, 5를 disc diffusion 방법으로 *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*에 대한 항균 활성을 조사하였고, 그 결과를 Table II에 나타내었다. 10 mM/disc 농도로 처리한 결과, 머루 줄기에서 분리한 화합물 중 compound 1과 3은 3가지 균에 대하여 항균 활성을 보이지 않았으며, compound 2는 그람 양성균인 *S. aureus*에 대해서는 강한 항균 활성을 보이지만 그람 음성균인 *P. aeruginosa*에 대해서는 항균 활성을 나타내지 않았다. Compound 2가 그람 양성균에서만 활성을 보이는 이유는 그람 음성균의 경우 그람 양성균과는 달리 세포막을 둘러싸고 있는 외막이 소수성물질이나 분자량이 큰 친수성물질의 유입을 억제하기 때문인 것으로 사료된다.¹⁹⁾ 자소자에서 분리한 2가지 화합물 중 compound 4는 *P. aeruginosa*에 대해서만 약한 항균 활성을 보였으며, compound 5는 *C. albicans*를 제외한 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대해 항균 활성을 보였다.

최소억제농도

항균 활성 결과를 바탕으로 100, 10, 1, 0.1, 0.01 µM 농도로 항균활성이 있는 compound 2, 4, 5에 대하여 MIC를 조사한 결과를 Table III에 나타내었다. *S. aureus*에 대한 compound 2와 compound 5의 MIC는 각각 0.07, 2 µM이었으며, *P. aeruginosa*에 대한 compound 4와 compound 5는 0.01 µM 이하에서 균의 성장을 억제함을 알 수 있었다. Yamamoto 등¹⁸⁾의 보고에 따르면 자소자에서 분리한 compound 4와 compound 5에 대하여 *Streptococci*의 여러 종과 *Porphyromonas gingivalis*에 대하여 항균 활성과 MIC에 대하여 실험을 진행하였고, 그 결과 compound 5의 MIC는 50~800 µg/ml로 종에 따라 차이를 보였으며, compound 4는 1600 µg/ml 이상인 것으로 보고되었다. 따라서

Table III – Minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds against two bacteria and a fungus

Compound	MIC (µM)		
	Gram-positive	Gram-negative	Fungus
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	-	-	-
2	0.07±0.012	-	-
3	-	-	-
4	-	<0.01	-
5	2±0.24	<0.01	-
Ampicillin	<0.01	0.04±0.0008	-
Euxyl K400	-	-	<0.01

Table IV – The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of the compounds against two different bacteria and a fungus

Compound	IC ₅₀ (µM)		
	Gram-positive	Gram-negative	Fungi
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	-	-	-
2	7.2±1.24	-	-
3	-	-	-
4	-	>100	-
5	>100	>100	-
Ampicillin	0.011±0.002	>100	-
Euxyl K400	-	-	>100

compound 4와 compound 5는 본 실험에서 사용한 균주인 *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대하여 항-균력이 높음을 알 수 있었다.

생육 저해율 측정

최소억제농도와 동일한 방법으로 생육 저해율(IC₅₀)을 측정하는 결과를 Table IV에 나타내었다. *S. aureus*에 대한 compound 2의 IC₅₀은 7.2 µM이었으며, compound 5는 100 µM 이상으로 측정되었다. *P. aeruginosa*에 대한 compound 4와 5의 IC₅₀ 또한 100 µM 이상인 것으로 확인되었다.

결론

머루 줄기에서 분리한 3종의 화합물 resveratrol(compound 1), ε-Viniferin(compound 2), ampelopsin E(compound 3)와 자소자에서 분리한 2종의 화합물 apigenin(compound 4)과 luteolin(compound 5)의 구조를 결정하였으며 그람 양성균(*S. aureus*)과 그람 음성균(*P. aeruginosa*) 진균류인(*C. albicans*)에 대하여 disc diffusion 및 broth dilution 방법으로 항균 활성을 조사하였다. 그 결과, *S. aureus*(Gram⁺)에 대하여 compound 2와 compound 5에서 높은 항균 활성을 보였으며, compound 2의 MIC와 IC₅₀은 각각 0.07과 7.2 µM, compound 5의 MIC는 2 µM이었다. *P. aeruginosa*(Gram⁻)의 MIC는 compound 4와 compound 5 모두

0.01 μ M 보다 낮은 농도에서 나타났다. 진균류인 *C. albicans*에 서는 5종의 compound 모두가 뚜렷한 항균 활성을 나타내지 않았다. 이상의 결과를 볼 때 항균 효과가 높은 compound 2, 4, 5는 Gram⁺, Gram⁻균의 증식억제 효능이 높으므로 천연 보존제로서의 활용 가능성이 높게 나타났다.

감사의 말씀

본 연구는 2009년도 정산생명공학연구소 R&D 지원비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Cherry, J. P. : Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. *Food Technol.* **53**, 54 (1999).
- Chang, D. S., Shin, D. H., Chung, D. H., Kim, C. M. and Lee, I. S. : Food hygiene. Jungmoongak, Seoul. p. 244 (2002).
- Ferrand, C., Marc, F and Fritsch, P. : Chemical and toxicological studies of products resulting from sorbic acid and methylamine interaction in food conditions. *Amino Acids.* **18**, 251 (2000).
- Lee, D. H., Yu, H. E. and Lee, J. S. : Quality characteristics and physiological functionality of wild grape wine. *J. Natural. Sci.* **15**, 69 (2004).
- Chonbuk University. : Development of tree shape, fruiting management and processing technology of coating rice in Gailiangmeru (*Vitis* spp.). 2005 Report of Ministry of Agriculture and Forestry, p. 3 (2005).
- Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G. and Goldberg, D. M. : The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta.* **235**, 207 (1995).
- Seo, S. H., Lee, H. L., Lee, S. J., Choe, S. W. and Jo, S. H. : Effects of paeonia seed extracts and resveratrol on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diets. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **32**, 1102 (2003).
- Fremont, L., Belguendouz, L. and Delpal, S. : Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.* **64**, 2511 (1999).
- MacCarrone, M., Lorenzon, T., Guerrieri, P. and Agro, A. F. : Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur. J. Biochem.* **265**, 27 (1999).
- Lee, H. S., Sur, E. Y. and Kim, W. K. : Resveratrol induces apoptosis in SW480 human colon cancer cell lines. *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 80 (2004).
- Fontecave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Geres, C. and Guittet, O. : Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett.* **421**, 277 (1998).
- Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P. Y. and Jameson, J. L. : Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14138 (1997).
- Chol, S. G. and Lee, J. I. : Effects of Planting Dates on Major Agronomic Characteristics and Yield of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Kupo Personal Authors.* **36**, 143 (1991).
- Park, H. J., Chung, D. H., Kim, S. G. and Kwon, B. S. : Influences of sowing time and nursery period on growth and yield of *Perilla frutescens* BRITTON var. *acuta* KUDO. *Korean J. Crop. Sci.* **3**, 1 (1995).
- 배기환 : 한국의 약용식물. 교학사, 서울 p. 441 (2000).
- Nakazawa, T., Yasuda, T., Ueda, J. and Ohsawa, K. : Antidepressant-like effects of apigenin and 2,4,5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla frutescens* in the forced swimming test. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 474 (2003).
- Ishikura, N. : Anthocyanins and flavones in leaves and seeds of *Perilla* plant. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1855 (1981).
- Yamamoto, H. and Ogawa, T. : Antimicrobial activity of *Perilla* seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 921 (2002).
- Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi, K. : New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agr. Food Chem.* **39**, 647 (1991).