

## 쑥의 추출물 및 Coumaric Acid의 항균활성

박 석 규 · \*박 중 철  
순천대학교 식품영양학과, \*한약자원학과

### Antimicrobial Activity of Extracts and Coumaric Acid Isolated from *Artemisia princeps* var. *orientalis*

Seok Kyu Park and \*Jong Cheol Park

Dept. of Food and Nutrition, \*Oriental Medicine Resources,  
Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

#### ABSTRACT

Antimicrobial activity of methanol extract and fraction from mugwort leaves (*Artemisia princeps* var. *orientalis*) was investigated for the screening of natural antimicrobial components. By using agar diffusion method, ethyl acetate (EtOAc) layer fractionated from methanol extract of mugwort leaves showed the highest inhibitory effects against tested microorganisms. The *ortho*-coumaric acid (200~600ppm) isolated from EtOAc layer showed strong antibacterial activities for *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium*. As derivatives of *o*-coumaric acid, antibacterial activity of *para*-coumaric acid was 1.2~1.7 fold higher than that of *o*-coumaric acid. Three types of coumaric acids strongly inhibited the growth of *B. subtilis* in the culture medium. Growth of *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* were effectively inhibited by *o*-, *m*- and *p*-coumaric acids, respectively. Minimum inhibitory dose of *p*-coumaric acid for *B. subtilis* was 100~200 µg/paper disk.

#### 서 론

다양한 식품의 품질보존성을 높이기 위하여 종래에는 화학적 합성품을 많이 사용하여 왔으나, 소비자들의 안전성 문제로 인한 기피현상으로 최근에는 오랫동안 식용해 온 천연 식품재료로부터 인체에 해가 없거나 적은 대체보존료를 개발하기 위하여 많은 연구가 활발히 진행되고 있다(1-3).

현재까지 상품화되어 있거나 항균성을 나타내는 천연물은 주로 lysozyme, polylysine, protamine, conalbumin, avidin 등의 단백질과 acetic, benzoic, maleic, succinic 등의 유기산, 펙틴분해물, 갈변반응물질, 저급지방산 ester, 향신료 등 다양하게 알려져

있으며(4-6), 최근 국내에서도 고추·양파 등의 향신료의 정유성분, 생약제의 항진균성 성분, chitin과 chitosan 등에 대한 연구가 활발하다(7-11).

쑥(*Artemisia princeps* var. *orientalis*)은 옛부터 식물 혹은 약물로서 단군신화에서부터 우리의 생활 속에서 널리 적용되어 왔다. 쑥은 독특한 향기·색(12)과 자생력이 강하며 그 정유성분은 포유동물의 장내 세균에 대한 항균성을 나타내며(13), 또한 해충들도 잘 서식하지 않는 다년초로서 초봄의 어린잎은 구미를 돋우어 소화력을 증강시켜주므로 된장 쑥국이나 쑥떡은 봄철의 건강을 지키는 식용 및 약용 식물임에 분명하다. 특히 쑥의 독특한 향기는 지방에 따라서 액운을 쫓아버린다고 해서 창포와 같이

단오날에 지붕 위에 올려 놓거나 목욕탕에 넣고 목욕하는 풍습이 전해지기도 한다.

본 연구자들은 한방에서 艾葉이라 하여 복통, 지혈, 소화불량, 만성간염, 부인병, 통경 등(14)의 치료에 잎을 말려 사용하고 있는 쑥의 메탄올 추출물에서 항균활성이 강하게 나타남을 알 수 있었다. 본 연구에서는 쑥의 메탄올 추출물의 유기용매에 의한 순차분획물과 이전 연구(15)에서 순수한 정제물질로 확인된 *ortho*-coumaric acid와 그 유도체들의 일부 세균에 대한 항균활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 천연 항균성 물질의 추출재료는 1993년 5월 전남 승주군 시면에서 채집하여 감정한 후, 음건한 한국산 쑥으로 한방에서 애엽(艾葉)으로서 어린순을 식용으로 하는 *Artemisia princeps* var. *orientalis*를 미세하게 마쇄한 후 사용하였다. 쑥의 주요 항균성 물질인 *o*-coumaric acid는 쑥의 ethyl acetate 분획물로부터 분리된 물질을 사용하였고(15), 그 유도체(*meta*-, *para*-coumaric acid)는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다.

### 사용균주 및 Plate 조제

Gram positive 균주로는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, Gram negative 균주로는 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*을 사용하였다. Test plate는 hard agar(1.5%)의 LB배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%)로 plate를 조제한 후, 전배양한 상기의 시험균이 들어 있는 배양액 50 $\mu$ l를 soft agar(0.6%)의 LB배지 6ml와 혼합하여 중층시키고, 냉장고(4 $^{\circ}$ C)에 보관하여 굳게 한 후 즉시 랩으로 싸서 2주 정도는 그대로 사용하였다.

### 항균활성 측정

항균활성은 agar diffusion method를 이용하였는데, 쑥중의 용매분획물, *o*-coumaric acid 및 그 유도체의 용해액(50 $\mu$ l/methanol)을 멸균된 filter paper disk(Toyo seisakusho, 8mm)에 spot한 다음, 80 $^{\circ}$ C의 dry oven에서 용매를 완전히 휘발시키고 중층 시험용 plate 표면에 놓아 밀착시키고 냉장고에서 1시간 동안 방치시킨 후, 인큐베이트에서 배양(30~35 $^{\circ}$ C, 24hr)한 다음 clear zone의 직경을 측

정하여 항균력을 비교하였다. 실험 결과치는 분석 및 시료 반복 횟수를 각각 3회로 실시하여 구하였다.

### 미생물 증식의 억제

액체배지에서의 미생물 증식에 미치는 coumaric acid의 농도별 영향은 L-type test tube에 멸균된 LB배지 4.8ml, 무균 membrane filter(0.25 $\mu$ m, Millipore Co., U. S. A.)로 제균된 항균물질의 농도별(100~700ppm/methanol 용해) 용액 100 $\mu$ l와 전배양액 100 $\mu$ l를 가하여 진탕배양(100rpm, 35 $^{\circ}$ C, 20hr)한 다음, 항균물질액 대신 methanol 100 $\mu$ l를 가한 대조구와 함께 660nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 반고체 agar배지에서 최소 저지투여량(minimum inhibitory dose, MID)은 agar diffusion method를 이용하였다.

### 추출물의 분획

시료의 중량에 대하여 5배의 methanol을 가하여 3시간 동안 95 $^{\circ}$ C의 환류냉각장치에서 3회 반복하여 추출하였다. 추출액을 rotary vacuum evaporator로 감압농축한 methanol 추출물에 H<sub>2</sub>O-methanol(9:1)을 가한 후의 물 층에 chloroform, ethylacetate, n-butanol순의 순차용매분획을 실시하였다(Fig. 1). 분획물의 soluble solid 함량은 감압농축된 추출물 1ml을 취하여 105 $^{\circ}$ C에서 건조 후 증발잔사의 양(mg)으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 분획물의 항균활성

쑥의 각 분획물 0.01g을 0.5ml methanol에 용해하여 그 중 50 $\mu$ l를 paper disk에 spot하여 그람양성 및 음성세균에 대한 항균활성은 Table 1과 같다. Methanol과 chloroform 추출물은 *E. coli*(직경 9.4, 10.0mm)와 *S. typhimurium*(9.4, 9.2mm)의 그람음성균에 비교적 항균활성이 양호하였으며, ethyl acetate 분획물은 다른 분획물보다 대부분의 시험균에 대하여 우수한 항균활성을 나타내었고, 특히 *B. subtilis*(10.4mm)와 *S. typhimurium*(10.0mm)에 효과적이었다. Butanol 층은 대부분의 시험균에 항균활성이 낮게 나타났으며, 저온세균인 *P. aeruginosa*는 4가지 분획물 모두에 대하여 가장 낮은 항균활성 pattern을 나타내었다. 또한 Gram 양성균과 음성균에 대한 분획물 자체의 항균성은 뚜렷한 차이는 나

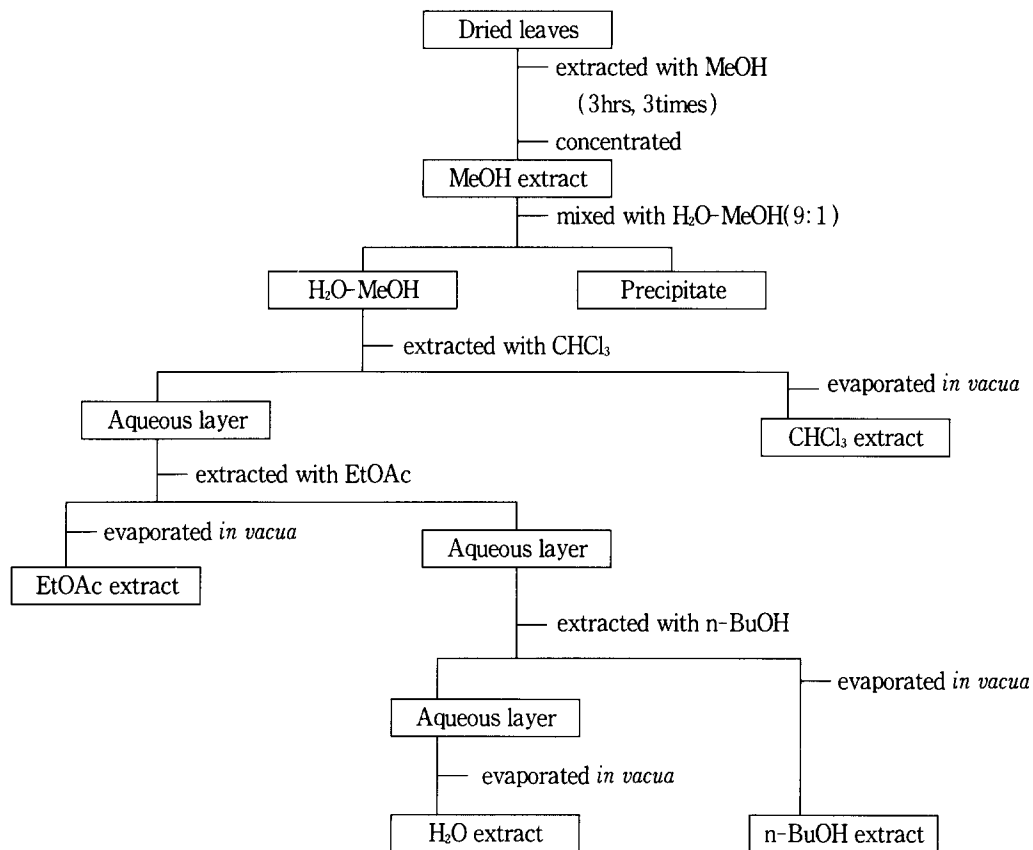


Fig 1. Fractionation of antibacterial substance form *Artemisia princeps* var. *orientalis*.

Table 1. Inhibitory activity of extract and fraction of *Artemisia princeps* var. *orientalis* expressed by diameter of clear zone in mm.

Groups	Gram(+) Bacteria		Gram(-) Bacteria		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
MeOH	8.2	8.2	9.4	8.2	9.4
CHCl <sub>3</sub>	8.4	9.0	10.0	8.6	9.2
EtOAc	10.4	9.6	9.8	8.4	10.0
BuOH	8.8	8.6	8.8	8.2	8.6

타내지 않았다. Methanol 추출물은 배와 변(16)의 *Mangolia kobus*, *M. obovata*, *Acanthopanax sieboldianum*, *Diospyras celebica* 식물 추출물의 항균활성 보다는 약간 낮게 나타났다.

o-Coumaric acid와 그 유도체의 항균활성  
속 추출물의 분획물 중에 항균활성이 우수한

ethyl acetate fraction으로부터 순수하게 정제된 물질인 o-coumaric acid와 유도체인 m-, p-coumaric acid의 항균활성을 농도별로 조사한 결과 (Table 2), o-coumaric acid는 *B. subtilis* > *S. aureus*, *S. typhimurium* > *E. coli* 순으로 항균활성이 강하였다. m-coumaric acid는 *S. typhimurium*과 *B. subtilis*에 특히 강하였으며, p-coumaric acid는 *B. subtilis*에

Table 2. Inhibitory activity of o-coumaric acid isolated from *Artemisia princeps* var. *orientalis* and its derivatives, m- and p-coumaric acid.

Compounds ( $\mu$ g/disk)	Gram(+) Bacteria		Gram(-) Bacteria		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
o-Coumaric acid					
(200)	12.6	12.6	12.3	11.6	12.6
(400)	15.0	15.0	12.6	12.0	15.0
(600)	18.0	16.5	13.5	12.8	16.6
m-Coumaric acid					
(200)	12.4	12.6	12.6	11.8	14.4
(400)	15.8	14.1	14.1	12.3	18.0
(600)	16.5	15.4	15.7	12.6	21.2
p-Coumaric acid					
(200)	15.6	13.3	12.9	11.2	13.3
(400)	18.4	15.6	15.0	12.6	15.0
(600)	21.0	16.9	15.6	13.9	17.6

이주 강한 활성을 나타내었으며 다음으로 *S. typhimurium* > *S. aureus* > *E. coli* 순이었다. 3가지 이성체 모두 저농성 세균인 *P. aeruginosa*에는 상대적으로 낮은 항균활성을 나타내었다. 전체적으로 보아 p-coumaric acid가 o-, m-coumaric acid보다 항균활성이 대체로 높게 나타났으며, 시험균 중에는 *B. subtilis*와 *S. typhimurium*에 대하여 항균활성이 강하게 나타났다.

#### 미생물 증식에 미치는 영향

썩으로부터 추출된 o-coumaric acid와 그 유도체를 100~700ppm 농도별로 5가지 시험균의 초기 액체배지에 첨가한 다음, 20시간 배양한 결과는 Fig. 2~4와 같다.

o-coumaric acid는 *B. subtilis*와 *S. typhimurium*에 대하여 200ppm 이상에서 균증식이 억제효과가 크게 나타나기 시작하여 700ppm에서는 50% 정도 생육억제를 받았다. *E. coli*는 낮은 농도에서는 별 효과가 없었으나 500ppm 이상에서는 급격한 균 증식 억제현상을 나타내었으며, *S. aureus*와 *P. aeruginosa*는 별로 효과가 없었다. m-coumaric acid는 *P. aeruginosa*에 대하여 400ppm 이상에서 증식 억제에 효과적이었는데 o-coumaric acid 경우와는 상이하였다. *B. subtilis*에는 비교적 효과적이었으나 *E. coli*와 *S. aureus*에는 효과가 거의 없었다. p-coumaric acid는 *B. subtilis*에 대하여 100ppm 낮은 농도에서도 30% 이상 증식 억제를 나타내었으며 700ppm에서는 50% 정도를 나타내었다. *S. aureus*와 *E. coli*

에 대해서도 500ppm 이상에서는 비교적 증식 억제에 효과적이었으나 *P. aeruginosa*와 *S. typhimurium*에는 효과가 낮게 나타났다.

액체배양은 agar 반고체 배양과는 약간 상이한 pattern을 나타내었는데, 특히 *P. aeruginosa*와 *S. aureus*는 각각 m-, p-coumaric acid 첨가 액체배양에서 농도 증가에 따른 균 증식 억제가 agar 배지와 달리 뚜렷하게 나타났다. 전반적으로 액체배양의 경우 *B. subtilis*에 대해서는 강한 항균활성을 나타내었으며, 나머지 균주에 대해서는 이성체의 종류에 따라 약간씩 다른 항균활성이 나타났다.

Agar diffusion법으로 *B. subtilis* 증식에 대한 p-

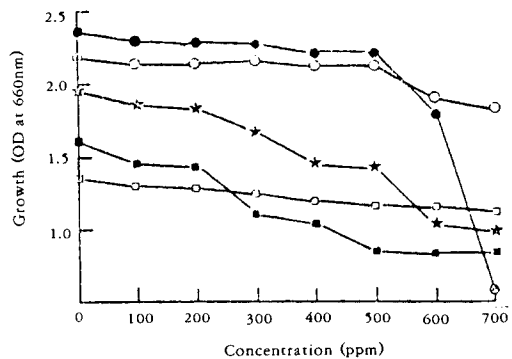


Fig. 2. Effect of growth inhibition by o-coumaric acid isolated from *Artemisia* var. *orientalis*. *E. coli* (●), *S. aureus* (○), *S. typhimurium* (★), *B. subtilis* (■), *P. aeruginosa* (□).

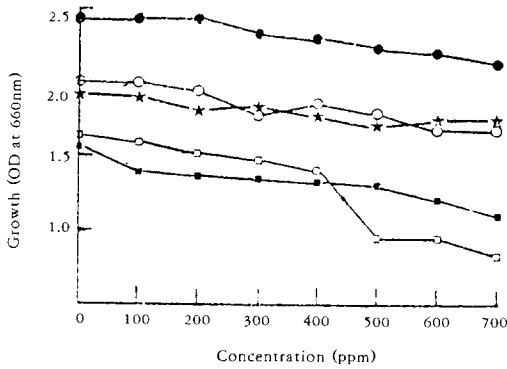


Fig 3. Effect of growth inhibition by m-coumaric acid. Symbols are similar as shown in Fig 2.

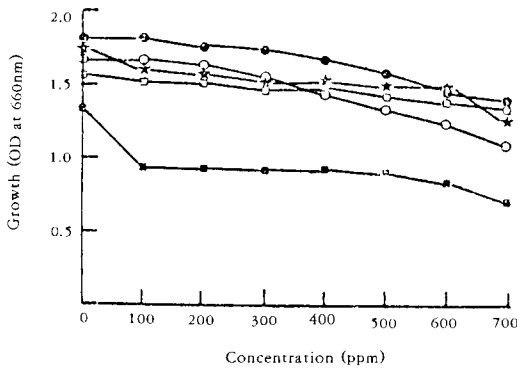


Fig 4. Effect of growth inhibition by p-coumaric acid. Symbols are similar as shown in Fig 2.

coumaric acid의 MID를 측정된 결과 100~200 $\mu$ g의 범위로 나타내었는데, 배 등(17)의 *Streptococcus mutans*에 대하여 튜립나무(*Liriodendron tulipifera*)에서 유래한 물질로 항균력이 우수하다고 알려진 berberine(100 $\mu$ g 이하)과  $\beta$ -liriodenolide(60 $\mu$ g)와는 비슷하거나 약간 낮은 항균력을 나타내었으며, magnolol(10 $\mu$ g)의 항균력보다는 떨어졌다. 또한 Isshiki 등(18)의 allyl isothiocyanate의 MID(200~400 $\mu$ g/dish)와 유사하였다.

요 약

천연자원에서 항균성 물질을 찾고자 수종의 식용

식물을 검색하는 과정에서 쑥(*Artemisia princeps* var. *orientalis*)의 추출물이 항균활성이 비교적 높았다. 쑥의 메탄올 추출물을 계통분획한 ethyl acetate 분획물(EtOAc)은 agar diffusion법에서 항균활성이 가장 높았으며, EtOAc로부터 분리된 화합물 중 o-coumaric acid(200~600ppm)는 *B. subtilis*(12.6~18.0mm)와 *S. typhimurium*(12.6~16.6mm)에 대하여 우수한 항균활성을 나타내었고, 그 유도체인 p-coumaric acid는 약 1.2~1.7배 정도의 항균활성을 증가시켰다. Coumaric acid의 3가지는 액체배양에서 *B. subtilis* 증식을 모두 강하게 억제하였으며, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* 및 *S. aureus*의 증식억제에는 각각 o-, m- 및 p-coumaric acid가 효과적이었다. *B. subtilis*의 반고체 agar 배양에서 p-coumaric acid의 MID는 100~200 $\mu$ g/disk였다.

참고 문헌

1. 芝崎勳(1983), *New Food Industry*, **25**, 28.
2. 野崎一彦(1986), *月刊フートケミカル*, **2**, 45.
3. 太田静行(1990), *月刊フートケミカル*, **2**, 48.
4. 芝崎勳, 笹島正秋(1985), *天然物による食品の保藏技術*, p. 75, 오茶水企劃, 東京.
5. 山下晴美(1985), *New Food Industry*, **27**, 35.
6. 岩下惠子, 長谷川紀子, 星野厚子(1983), *すかいら-くフドサイエンス研究報告書*, **2**, 47.
7. B. S. Chung, B. G. Lee, S. T. Shim and J. K. Lee(1989), *Korean J. Dietary Culture*, **4**, 417.
8. B. W. Lee and D. H. Shin(1991), *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 200.
9. B. W. Lee and D. H. Shin(1991), *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 205.
10. U. Y. Park, D. S. Chang and H. R. Cho (1992), *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 91.
11. C. K. Chung, O. K. Park, I. J. Yoo and C. U. Choi(1990), *Korean J. Food Sci. Technol.*, **22**, 716.
12. J. G. Nagy(1966), Ph. D. Thesis, Colorado State Univ.
13. J. O. Kim, Y. S. Kim, J. H. Lee, M. N. Kim, S. H. Rhee, S. H. Moon and K. Y. Park (1992), *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 308.
14. 김재길(1984), *원색천연약물대사전*(상), p. 244, 남산당, 서울.
15. J. C. Park, H. S. Young, Y. B. Yu and J. H.

- Lee(1994), *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**, 70.
16. K. H. Bae and J. H. Byun(1987), *Kor. J. Pharmacogen.*, **18**, 1.
17. K. I. Bae, B. H. Kim, P. K. Myung, K. S. Chung and J. H. Baek(1990), *Yakhak Hoeji*, **34**, 277.
18. K. Isshiki, K. Tokuoka, R. Mori and S. Chiba (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1476.