J. Fd Hyg. Safety 10(3), 181 - 187(1995)

방아(*Agastache rugosa* O. Kuntze)로부터 동정된 estragole과 방아추출물의 항균효과

박재림 · *김정옥 · 강혜윤 · 김운영 · 천화정
부산여자대학교 식품영양학과, *부산여자대학교 화학과

Estragole Identified and Extracts from *Agastache rugosa* O. Kuntze Inhibited Bacterial Growth

Jae-Rim Bahk, *Jeong-Ok Kim, Hae-Yoon Kang, Woon-Yung Kim and Hwa-Jung Chun
*Dept. of Food and Nutrition, and *Dept. of Chemistry, Pusan Women's University, Pusan, 617-736, Korea*

Abstract—Water extract, and methanol extract, its chloroform and hexane fractions, and estragole from *Agastache rugosa* O. Kuntze were tested to find the inhibiting effect on the growth of several microorganisms. The organisms used were: *Escherichia coli* ATCC 1129, *Staphylococcus aureus* IAM 1011, *Vibrio parahaemolyticus* WP, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Aspergillus oryzae* KFCC 890, *Aspergillus niger* KCCM 11240. Water and methanol extracts at the concentration of 0.5%, and chloroform and hexane fractions at the concentration of 0.05% inhibited the growth of microorganisms from 1/5 to 2/3 of the control group. Estragole identified from the hexane fraction as a major component, its authentic compound completely inhibited the growth of *Vibrio parahaemolyticus* completely at the concentration of 0.03%, and the other bacteria were at 0.05% .

Keywords □ *Agastache rugosa*, Hexane fraction, Antibacterial effect, Estragole

천연물로부터 항균성 물질을 탐색하고 이를 식품에 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.[1,2] 식물 추출물이 항균성을 가지고 있다는 것은 오래전부터 알려져 왔고 그 대표적인 것이 각종 향신료들이다.[3-6] 식품에 이용되는 향신료 중에서 계피, 인경, 마늘, 양파 등이 그 성분과 함께 미생물 증식억제 효능이 밝혀져 있고[7,8] 홍삼, 백삼, 금은화; 우방자, 의이인, 상백피 등의 약용식물이 미생물 증식 및 대사에 미치는 영향에 대해서도 보고[9,10]되어 있다.

방아(*Agastache rugosa* O. Kuntze)는 배초향으로도 불리며 꿀풀과에 속하는 여러해살이 풀로 제주도를 비롯한 전국, 일본, 대만, 동아시아의 온대지방에서 야생한다.[11,12] 어린순은 나물로 무쳐 먹기도 하며 전체에서 풍기는 독특하고 진한 향기로 식품에 향신료로써 재공되며, 한방에서 건위제로 소화불량, 식체, 복통, 토사, 흉통에 사용하며 청량해열제로 감기, 두통 등에 이용되며 종기, 종독에 다른 약제와 함께 이용된다.[13]

이러한 방아에 대한 연구는 주로 일반성분[14]과 향기성분[15]에 대하여만 보고가 되어져 있을 뿐 미생물에 대한 항균작용 등에 대해서는 거의 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 이러한 방아의 물추출물로써 증식억제 효과를 측정하고 methanol추출물과 methanol추출물을 chloroform, hexane, aqueous fraction으로 분획하여 증식억제효과를 조사하였다. 그 중 효과가 가장 컸던 hexane분획물을 GC-MS로 분리, 동정한 결과 estragole이 주성분임이 확인되어, 이 화합물의 표준물질을 사용하여 항균성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 시료는 경남 안동 일대에서 자생하는 방아(*Agastache rugosa* O. Kuntze)를 1992년 7월과 9월에 채취한 것으로 잎부분을 사용하였다.

균주 및 배지 조성

본 연구에 사용된 균주는 세균 *Escherichia coli* ATCC 1129, *Staphylococcus aureus* IAM 1011, *Vibrio parahaemo-*

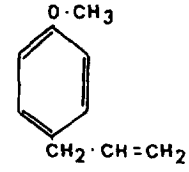
lyticus WP, *Bacillus subtilis* ATCC 6633의 4종이며, 곰팡이 *Aspergillus oryzae* KFCC 890와 *Aspergillus niger* KCCM 11240이었다. 세균의 증식측정용 배지는 TYG broth(tryptone 3 g/l, yeast extract 3 g/l, glucose 3 g/l, KH_2PO_4 1 g/l)를 사용하였으며, 곰팡이는 soluble starch 10 g/l, peptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 1 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/l로 조성된 배지를 사용하였다.

시료의 추출

물추출물은 방아잎 100 g에 D.W. 200 g을 가하여 mixer로 갈고(2 min.) 두겹의 gauze로 짜고, 그 잔사에 다시 D.W. 100 g을 가하여(2회 반복) 짠 후 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 동결건조 시켜 시료로 이용하였다. Methanol추출물은 방아잎 100 g에 methanol 200 ml을 가하여 grinder로 마쇄(2 min.)한 후 두겹의 gauze로 짜고, 남은 잔사에 다시 methanol 100 ml를 가하여 추출하였다. 이 추출액들을 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 동결건조 시킨 것을 시료로 사용하였다. Hexane 및 chloroform분획은 동결건조 시키기 전의 methanol 추출액에 hexane/methanol/H_2O (10 : 1 : 9)를 1 : 1의 비율로 혼합한 후 separatory funnel에서 hexane층과 aqueous층으로 분획하였고(Fig. 1), 여기에서 aqueous층에 chloroform을 동량 혼합한 후 같은 방법으로 추출하여 chloroform추출물로 하였다. Chloroform추출물과 hexane추출물은 rotary evaporator를 이용하여 용매를 제거한 후 4℃에서 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

Estragole 분리, 동정

방아의 methanol추출물, chloroform 그리고 hexane분획물을 각각의 용매에 0.1% 되도록 녹여 GC와 GC-MS로 분리, 동정한 결과 hexane추출물에서만 주화합물로서 estragole이 밝혀졌다(Fig. 2). 방아의 주 향기성분이 estragole임을 확인하고 표준품 (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA)을 구입하여 실험에 사용하였다. 확인된 estragole의 구조식은 다음과 같다.



이때 GC 분석조건은 Hewlett Packard series II(Hewlett Packard, TX, USA)를 이용하여 column(DB-5)은 fused silica capillary column (50 m×0.25 nm i. d.)을 사용하였다. Column온도는 50~250℃까지 2℃/min으로 하였고, detector는 FID, injector온도는 260℃였다.

증식 측정

시험균주의 전배양 — 증식 측정에 사용될 현탁액을 제조

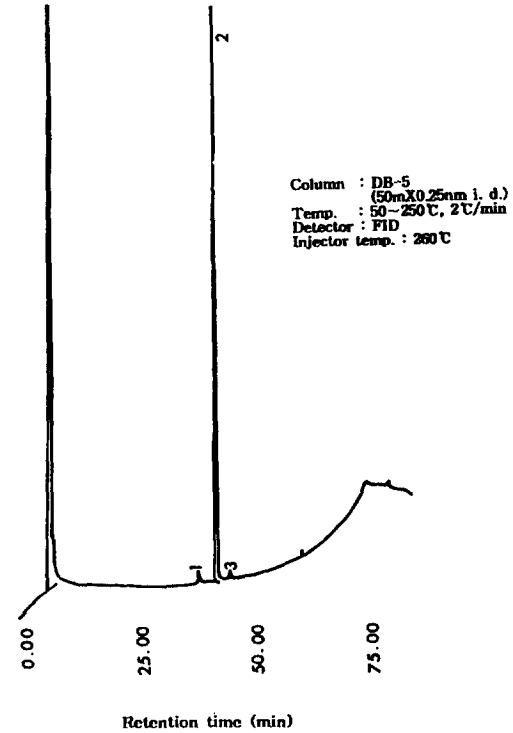


Fig. 1. Fractionation of methanol extract from *Agastache rugosa*.

Fig. 2. GC analysis of hexane extract from *Agastache rugosa* O. Kuntze Peak identification (peak 1 : eugenol, peak 2 : estragole, peak 3 : isoeugenol)

하기 위하여 세균의 경우 nutrient agar 사면배지에 계대배양한 균주 1백금이를 TYG broth 100 m*l*에 접종하여 37 °C에서 6~8시간 배양시킨 후 대수기의 영양세포(1.0×10^6 CFU/m*l*)를 얻었고, 곰팡이는 PDA(potato dextrose agar) 사면배지에 30 °C, 7일간 배양하여 형성된 포자를 멸균된 생리식염수에 수확하였다. 수확한 conidia의 수는 haematometer를 이용하여 계산하였으며, *Aspergillus oryzae*는 2.6×10^7 conidia/m*l*, *A. niger*는 4.5×10^7 conidia/m*l*였다.

검액의 조제—물추출물을 제외한 각 추출물을 배지에 용해시키기 위해 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 1%까지 첨가하여 균의 증식에 영향을 미치지 않는 것을 확인하고(3회 실험), 물추출물과 methanol추출물의 배양액중의 농도는 0.1%, 0.3%, 0.5%되게 하였고, 3차의 예비실험 결과 chloro-form추출물과 hexane추출물은 그 물질들의 증식억제 정도가 커서 methanol추출물보다 1/10 농도로 희석하여 배양액중의 농도가 0.01%, 0.03%, 0.05%되게 첨가한 후 멸균하였다. Estragole의 첨가는 0.5 m*l*의 DMF (N,N-Dimethylformamide)에 녹여 배지 첨가농도 0.01%, 0.03%, 0.05%로 하였다. 멸균된 배양액에 대수기의 균 현탁액 1 m*l*를 각각 접종하여 37 °C, 200 rpm으로 진탕배양하였다.

증식 측정—세균의 증식은 spectrophotometer(Spectronic 20D, Milton Roy Co.)를 사용하여 600 nm에서 흡광치(optical density)를 측정하였다. Methanol추출물과 hexane 추출물, chloroform추출물의 흡광치는 균주 접종 직후부터 12시간까지는 3시간 단위로, 48시간까지는 6시간 단위로 측정하였고, estragole은 균주 접종 직후부터 12시간까지는 4시간 단위로 그 이후는 6시간 단위로 측정하였다. 곰팡이의 증식은 건조균체 측정법을 이용하여 배양액을 여과지(Whatman No. 2)로 고정된 funnel을 통하여 여과한 다음 40 m*l*의 멸균된 생리식염수(0.9%)와 증류수로 mycelia를 각각 1회 세척하였다. 여과지를 funnel에서 분리한 후 90 °C에서 10시간 건조시킨 다음 desiccator에 24시간 방냉하여 중량을 측정하여 증식을 파악하였다.

결과 및 고찰

물추출물의 증식 억제

방아잎을 증류수로 갈아 추출한 물추출물로 증식억제 정도를 측정한 결과 시료 첨가농도 0.1%를 제외하고 0.3%, 0.5%, 1%에서 4종의 세균에 대해 모두 증식억제효과를 나타내었고, 그 농도가 증가할수록 억제 정도도 커졌다(Fig. 3). 이 결과를 기초로 미생물 증식억제 물질을 확인하기 위하여 방아를 methanol로 추출한 다음 chloroform, hexane으로 분획한 분획물과 hexane분획물의 주성분인 estragole을 시료로 하여 실험한 결과는 다음과 같다.

Methanol 추출물의 증식 억제

Methanol추출물을 시료로 하였을 경우 *E. coli*는 첨가된 추출물의 농도가 증가함에 따라 균주의 증식이 억제되었다(Fig. 4). 최대 증식기에서 대조군에 비해 첨가농도 0.1%의

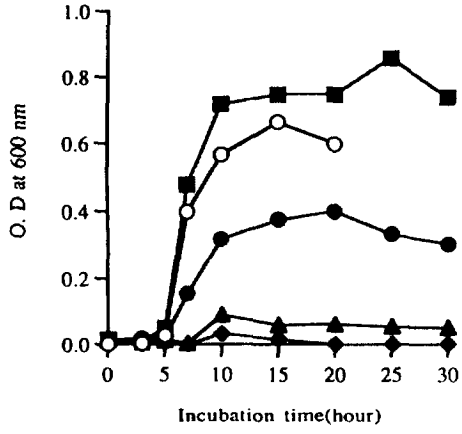


Fig. 3. Effect of water extract from *Agastache rugosa* O. Kuntze on the growth of *E. Coli*.

—○— CON —■— 0.1%
—●— 0.3% —▲— 0.5%
—◆— 1%

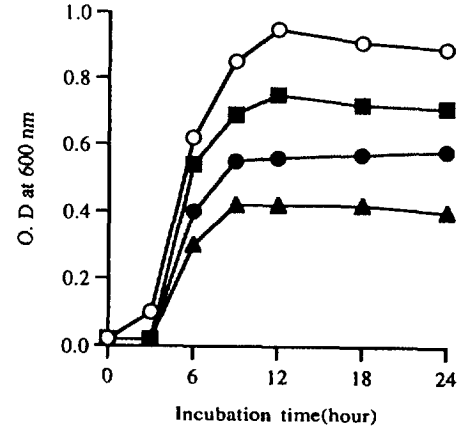


Fig. 4. Effect of methanol extract from *Agastache rugosa* O. Kuntze on the growth of *E. Coli*.

—○— CON —■— 0.1%
—●— 0.3% —▲— 0.5%

경우 대조군(O.D 0.95)의 80%(O.D 0.75), 0.3%에서는 62%(O.D 0.56), 0.5%에서는 45%(O.D 0.42)로 각각 증식을 크게 억제하였고, *S. aureus*의 증식은 추출물 첨가농도 0.1%에서는 대조군과 유사한 증식을 나타내었지만 첨가농도 0.3%에서는 유도기가 지연되면서 증식이 대조군에 비해 약 80%, 0.5%에서는 대조군에 비해 68%로 억제되었다. *V. parahaemolyticus*는 첨가농도 0.1%에서 유도기가 약간 지연되었으나 대조군과 거의 유사한 증식을 보여 큰 영향을 미치지 않은 것으로 보이나 0.3%, 0.5%에서는 유도기가 18시간 지연되면서 현저한 억제효과를 나타내었다. *B. subtilis*는 첨가된 시료농도 0.1%에서 최대증식에 이르는 시간이 약 6시간 단축되었고, 0.3%와 0.5%에서는 증식이 억제되었다. 한약재 추출물중 에탄올 추출물이 대부분의 세균에 대하여 증식억제 효과를 보이는 것은 치자, 오미자, 자초 등의 3종이었으며 목단피, 황백, 금은화 등의 3종은 gram(+)균에만 효과를 나타냈고 특히 황백의 경우 *S. aureus*에 대하여 0.01%의 첨가로 균의 증식이 억제되었다[16]고 한다. 박 등[17]에 의하면 자초를 상온에서 95% 에탄올로 24시간 추출한 물질을 0.1% 첨가하여 *V. parahaemolyticus*의 증식을 억제하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 이 등[18]의 연구와 마찬가지로 gram(+)균과 gram(−)균에 대하여 높은 억제효과를 나타내었다. *A. oryzae*의 증식은 대조군과 시료첨가농도 0.1%, 0.3%에서는 유사한 곡선을 나타내었고 0.5%에서 증식이 가장 억제되었다. *A. niger*의 경우 배양 48시간부터는 각 농도에서 대조군보다 증식이 억제되었다.

Chloroform 추출물의 증식 억제

방아의 chloroform추출물의 세균증식억제정도를 측정한 결과, *E. coli*는 시료 첨가농도 0.01%, 0.03%, 0.05%에서 모두 증식이 억제되었으며, 특히 0.05%에서는 대조군 흡광치의 62.8%로 증식이 억제되었다(Fig. 5). *S. aureus*의 증식은 초기부터 유도기의 연장과 더불어 억제되었으며, 대조군에 비해 농도에 따른 증식은 첨가농도 0.01%에서 대조군 흡광치의 87.5%, 0.03%에서 69.4%, 그리고 0.05%에서는 57.4%로 나타났다. *V. parahaemolyticus*의 실험 결과 시료농도 0.01%에서는 거의 효과가 나타나지 않았고, 0.03%와 0.05%는 대조군의 흡광치에 비해 각각 84.1%, 63.5%에 머물렀다. *B. subtilis*의 증식은 시료 첨가농도 0.01%, 0.03%에서는 대조군에 비해 유도기가 연장되었으나 증식정도에 있어서는 영향을 미치지 않았다. 그러나 0.05%첨가시에는 유도기가 상당히 지연되었으며 증식은 대조군 흡광치의 81.25%에 머물렀다. 정 등[19]의 영지의 methanol추출물을 용매의 극성에 따라 chloroform ethyl acetate, n-butanol 및 수층으로 분획한 추출물의 항균성 실험에서는 chloroform층에서 항균 활성이 나타나지 않았으나, n-butanol층에서 *E. coli, S. aureus, V. parahaemolyticus*에서 항균력이 나타났다고 보고하고 있다. 본 실험에서는 chloroform추출물이 그 농도가 methanol추출물의 1/10에 불과한 것을 감안하면 억제 효과가 있는 것으로 나타났으며 *B. subtilis*의 예에서는 0.05% 첨가시 대조군 흡광치의 81.25%에 한정되지만 유도기의 연장과 함께 그 효과를 다소나마 인정할 수 있었다.

*A. oryzae*의 증식은 시료 농도 0.01%를 처리하였을때 배

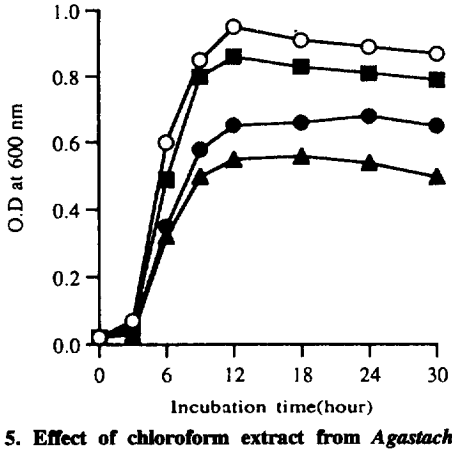


Fig. 5. Effect of chloroform extract from *Agastache rugosa* O. Kuntze on the growth of *E. Coli*.

—○— CON —■— 0.1%
—●— 0.3% —▲— 0.5%

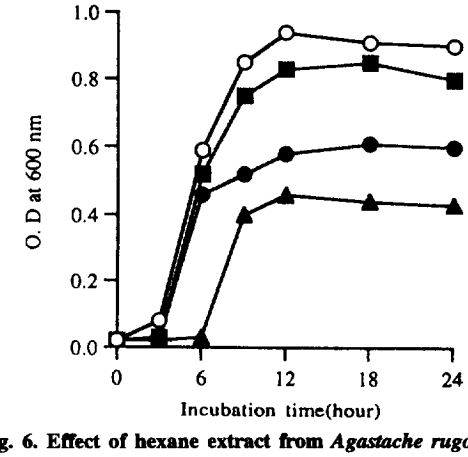


Fig. 6. Effect of hexane extract from *Agastache rugosa* O. Kuntze on the growth of *E. Coli*.

—○— CON —■— 0.1%
—●— 0.3% —▲— 0.5%

양 48시간에서 증식이 대조군에 비해 촉진되었으며 54시간부터는 각 농도에서 증식이 억제되었다. *A. niger*의 증식은 *A. oryzae*와 마찬가지로 대조군에 비해 각 농도에서 증식억제를 보였으며 0.05%에서 가장 높은 억제효과를 나타냈으며 각 농도에서 60시간에 최대의 활성을 보였다가 서서히 증식이 감소되었다.

Hexane 추출물의 증식 억제

방아의 hexane추출물을 배지중에 0.01%, 0.03%, 0.05% 첨가하여 증식억제 정도를 측정한 결과 *E. coli*는 첨가농도가 증가할수록 증식억제 정도가 커져 methanol추출물에서의 결과와 거의 유사하게 나타났다(Fig. 6). *S. aureus*의 증식은 시료 0.01% 첨가한 경우 생육초기에 증식이 다소 촉진되는듯 하였으나 24시간 경과 후 증식이 억제되었고, 0.05% 첨가시는 유도기가 지연되면서 최대증식기도 단축되었고 배양 36시간에서는 대조군에 비해 약 60%의 증식으로 상당한 억제효과를 보였다. *B. subtilis*의 증식은 시료 첨가농도 0.01%에서는 배양 초기에 생육이 억제되었으나 시간이 경과함에 따라 별 다른 차이가 없어졌으며, 0.03%와 0.05%에서는 각각 대조군에 비해 78%, 75%의 증식에 그쳤다.

Hexane추출물에 대한 *A. oryzae*의 증식을 측정한 결과는 대조군과 시료 첨가농도 0.01%에서는 48시간 이후 정상기를 보였으나 0.03%와 0.05%에서는 54시간이후부터 정상기를 나타냈으며 0.05%에서 증식억제효과가 가장 컸다. *A. niger*의 증식은 배양 36시간까지는 대조군과 시료 첨가농도 0.01%, 0.03%에서 오히려 증식이 촉진되었으나 48시간 이후부터는 대조군보다 각 농도에서 사멸이 촉진되어 증식

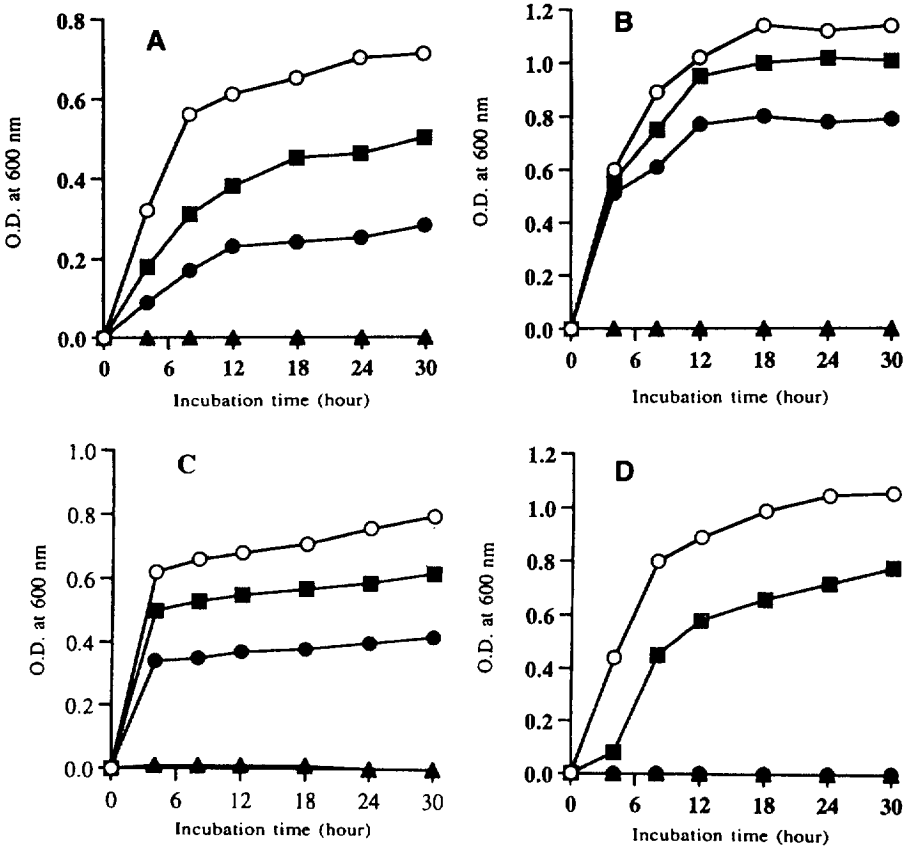


Fig. 7. Effect of estragole from *Agastache rugosa* O. Kuntze on the bacterial growth.

A : *E. coli*, B : *B. subtilis*, C : *St aureus*, D : *V. parahaemolyticus*

—○— cntrol —■— 0.01% —●— 0.03% —▲— 0.05%

율 가장 억제한 0.05%에서는 66시간 이후 급속한 사멸곡선을 나타내었다.

Estragole의 증식 억제

방아의 hexane층에서 확인된 주성분 estragole을 시료로 하여 증식억제 정도를 측정하였다. Estragole은 서양 향신료인 tarragon(estragon, *Artemisia dracunculus*)과 sweet basil, anise의 정유(essential oil)에 다량 함유되어 있는 성분이다. Estragole의 첨가농도 0.01%에서도 상당한 억제효과를 나타내었으나, 0.03%에서 균종에 따라 정도는 다르지만 증식을 완전히 억제하는 것으로 나타났고, 0.05%에서는 대조군에 비해 증식이 완전히 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 7). 특히 *V. parahaemolyticus*의 증식은 시료 농도 0.03%에서부터 완전히 억제되었다(Fig. 7D). 쑥씨의 정유성분인 terpinen-4-ol이 1,000 ppm에서 *B. subtilis*의 증식을 완전히 억제하였다는 보고가 있다.[20] 본 실험 결과, 방아의 향기성분인 estragole (1-Methoxy-4 -(2-propenyl) benzene)이 미생물 증식을 억제하는 효과가 있음이 밝혀졌다. 추후에 estragole 이외의 다른 향기성분이 세균의 증식과 대사에 미치는 영향에 대한 연구를 보고할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 한국과학재단 일반기초연구비 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

국문요약

식품에 향신료로 제공되는 방아(*Agastache rugosa* O. Kunze)의 물과 methanol 추출물, methanol 추출물을 chloroform과 hexane으로 분획한 분획물과 chloroform과 hexane분획물의 주 성분인 estragole을 재료로 하여 6종의 미생물(*Escherichia coli* ATCC 1129, *Staphylococcus aureus* IAM 1011, *Vibrio parahaemolyticus* WP, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Aspergillus oryzae* KFCC 890, *Aspergillus niger* KCCM 11240)의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 물과 methanol추출물(0.1%, 0.3%, 0.5%), chloroform과 hexane 분획물(0.01%, 0.03%, 0.05%)의 시료 첨가농도 0.1% 또는 0.01%에서는 대조군과 유사한 증식을 나타냈지만 농도가 0.3%, 0.5% 또는 0.03%, 0.05%로 증가할수록 대조군의 1/5~2/3정도의 증식에 그치는 억제 효과가 나타났다. 증식억제 효과는 hexane 분획물에서 가장 크게 나타났으며 estragole의 표준품을 이용한 항균시험 결과 첨가농도 0.03%에서 *Vibrio parahaemolyticus*의 증식을 완전히 억제하였고, 0.05%에서는 모든 세균의 증식이 완전히 억제되어 항균효과가 큰 성분으로 밝혀졌다.

참고문헌

1. Ibrahim, H. R., Kato, A. and Kobayashi, K.: Antimi-crobial effects of lysozyme against gramnegative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2077 (1991).
2. Fukai, K., Ishigami, T. and Hara, Y.: Antimicrobial effects of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **55** 1895 (1991).
3. Himejima, M. and Kubo, I.: Antibacterial agents from the Cashew *Anacardium occidentale*(Anacardiaceae) nutshell oil. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 418 (1991).
4. Zaika, L. L. and Kissinger, J. C.: Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. *J. Food Science.*, **46**, 1205 (1981).
5. Beuchat, L. R.: Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food Science.*, **41**, 899 (1976).
6. Yoo, J. Y., Min, B. Y., Suh, K. B., Hah, D. M.: Effects of spices on the growth of lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **10**, 124 (1987).
7. Dewit, J. C., Notermans, S., Gorin, N. and Kampelmacher, E. H.: Effect of garlic oil or onion oil on toxin production by *Clostridium botulinum* in meat slurry. *J. Food Protection.*, **42**, 222 (1979).
8. Johnson, M. G. and Vaughn, R. H.: Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. *Appl. Microbiology.*, **17**, 903 (1969).
9. Lee, H. Y., Kim, C. H., Sung, T. K., Mun, T. K. and Lim, C. J.: Antibacterial activity of *Ulmus pumils* L. extract.

Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **20**, 1 (1992).

10. Park, U. Y., Chang, D. S. and Cho, H. R.: Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **21**, 91 (1992).
11. 이덕봉: 한국 동식물 도감, 식물편(유용식물), 문교부, 405 (1961).
12. 이창복: 대한 식물 도감, 향문사, 649 (1979).
13. 김재길: 원색 천연약물 대사전, 남산당, 498 (1984).
14. Ann, B. and Yang, C. B.: Chemical composition of Bangah (*Agastache rugosa* O. Kuntze) herb. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 375 (1991).
15. Ann, B. and Yang, C. B.: Volatile flavor components of Bangah (*Agastache rugosa* O. Kuntze) herb. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 582 (1991).
16. 박옥연, 장동석, 조학래: 한약재 추출물의 항균효과 검색. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **21**, 91 (1992).
17. 박옥연, 장동석, 조학래: 자초 (*Lithospermum erythrorhizon*) 추출물의 항균 특성. 한국영양식량학회지, **21**, 97 (1992).
18. 이홍용, 김치경, 성태경, 문택규, 임치주: 유백피 추출물의 항세균작용. 한국산업미생물학회지, **20**, 1 (1992).
19. Chung, D. O. and Jung, J. H.: Studies on antibacterial substances of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **24**, 552 (1992).
20. Jung, B. S., Lee, B. K., Shim, S. T. and Lee, J. K.: Effect of the volatile constitutents of Mugwort Seed extract on the growth of microorganism. *Kor. J. Dietary Culture*, **4**, 417 (1989).