한국생물공학회지 제21권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 21, No. 2, 129-132(2006)

Artemisia princeps var. orientalis 수용성 추출물의 항균효과

[1]조 화 영 · [2]윤 성 용 · [3]박 정 진 · [4]윤 경 원 · † [1,3]박 종 문
[1]포항공과대학교 환경공학부, [2]포항공과대학교 환경연구소, [3]포항공과대학교 화학공학과, [4]순천대학교 한약자원학과
(접수 : 2005. 10. 14., 게재승인 : 2006. 3. 2.)

Antimicrobial Activity of Water-soluble Extract from *Artemisia princeps var. orientalis*

Hwa-Young Cho[1], Sung-Yong Yoon[2], Jeong-Jin Park[3], Kung-Won Yun[4], and Jong Moon Park[1,3]†
[1]School of Environmental Science and Engineering, POSTECH, Korea
[2]Institute of Environment and Energy Technology, POSTECH, Korea
[3]Department of Chemical Engineering, POSTECH, Korea
[4]Department of Oriental Medicine Resources, SCNU, Korea
(Received : 2005. 10. 14., Accepted : 2006. 3. 2.)

The importance of natural preservative has increased in recent years. The natural preservatives have been used in the field of foods, cosmetics and pharmacology. In the present work *Artemisia sp.*, well recognized for their effect of antimicrobial activity, were extracted by methanol and water sequentially for selecting only water-soluble compounds that can be used as additives in food and cosmetics. Antimicrobial activities of water extracts from stem and leaf of *Artemisia princeps var. orientalis* were investigated by the disc diffusion method. Two gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and three gram negative bacteria (*Escherichia coil, Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas putida*) were used for antimicrobial activity studies. The water-soluble compounds from methanol extract showed higher antimicrobial activity than only water extract to these bacteria. Comparative evaluation of water-soluble metabolite profiles with caffeic acid that is known as an antimicrobial compound from *Artemisia sp.* was performed by high performance liquid chromatography with photo-diode array detection.

Key Words : Antimicrobial activity, *Artemisia princeps var. orientalis*, caffeic acid, disc diffusion method, *Staphylococcus aureus*

서 론

지금까지는 미생물에 의한 식품, 화장품 또는 약품의 변질이나 부패를 방지하기 위하여 각종 화학적 합성품을 많이 사용하여 왔으나, 대부분의 경우에 그 안전성이 문제로 제기됨에 따라 최근에는 인체에 무해하거나 합성제에 비해 해가 적은 것으로 알려진 천연항균제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

지금까지 알려진 천연항균성 물질로는 acetic, benzoic, malic, succinic등의 유기산과 lysozyme, polylysine, protamine, conalbumin 등의 단백질 및 정향, 마늘, 양파, 부추, 겨자, 육계, 생강, anise, sage, oregano, rosemary와 같은 정유성분 등이 있다(1). 그 중 정향의 항균성 물질인 eugneol은 *Candida albicans, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium perfingenes* 및 *Escherichia coli*의 생육을 억제하는 것으로 보고된 바 있다(2).

쑥 (*Artemisia princeps var. orientalis*)은 우리나라 전역에 걸쳐 자생하는 번식력이 강한 국화과 (*Compositae*)에 속하는 다년생 초본류로, 약 400여 종의 *Artemisia*속 식물 중 300여 종이 우리나라에 자생하는 것으로 추정되고 있으나 실제 보고된 것은 40종 내외이다(3). 쑥의 향기 성분이나 정유성분은 살충, 항균 및 항종양 등의 여러 가지 생리적 활성이 있는 것으로 알려져 있으며 그 주요 성분은 cineole, α-thujon, sesquiterpene, sesquiterpene alcohol, camper, terpinene-4-ol, coumarin, capillin, borneol 등이라는 보고가 있다(4). 특히 인진쑥 (*Artemisia iwayomogi,* Kitamura)의 에탄올 추출물은 고혈압, 비만, 뇌졸중 등 순환기계 질환의

† Corresponding Author : School of Environmental Science and Engineering, POSTECH, Pohang, Korea
Tel : +82-54-279-2275, Fax : +82-54-279-8437
E-mail : jmpark@postech.ac.kr

치료 및 예방에 효과가 있으며 간 기능 보호효과, 항산화성 효과에 대한 보고가 있고(5, 6), 산쑥 (*Artemisia montana*, Pampan)은 옛부터 한방에서 약용으로 소화, 만성 위장염, 구충, 악취제거로 유효함이 알려져 왔다(7, 8).

하지만 이러한 추출물을 얻기 위해 지금까지는 정유나 에탄올 그리고 메탄올을 사용한 경우가 대부분이었고 (9-12), 인체에 무해한 물 추출물에 대한 연구 결과는 거의 찾아볼 수 없었다. 이러한 유기용매를 이용한 추출은 인체에 해를 줄 뿐만 아니라 식품이나 화장품 등으로의 천연 항균제로 그 이용범위가 제한될 수 있다. 본 연구에서는 쑥의 메탄올 추출물과 물 추출물의 항균성을 비교했으며, 메탄올로 1차 추출을 한 후 물로 다시 추출한 결과물의 항균성을 측정함과 동시에 그람 양성균과 그람 음성균에 따른 균주 특징을 알아보고자 하였다. 그리고 쑥의 항균능력의 주된 화합물로 보고 된 바 있는 caffeic acid(13, 14)와의 비교를 통해서 쑥의 물 추출물이 식품이나 화장품의 보존료나 항균제로써 개발하기 위한 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 *Artemisia princeps var. orientalis*은 순천대학교 한약자원학과의 윤경원 교수팀으로부터 분양받았다. *Artemisia princeps var. orientalis*의 기관에 따른 항균성 측정을 위해 줄기 부분과 잎 부분으로 분류한 다음, 미세하게 마쇄한 후 사용하였다. 또한 쑥의 주요 항균성 물질이라 보고되어 있는 caffeic acid는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다.

추출물의 분획

쑥 10 g을 물 1 ml로 50℃에서 1시간, 25℃에서 1시간 동안 초음파기를 통해서 추출한 후 20분 동안 원심분리하였으며 메탄올을 이용한 추출도 동일하게 진행하였다. 물로만 추출한 샘플은 상등액을 샘플로 이용하였고, 메탄올로 1차 추출한 샘플은 건조 후 다시 물을 이용하여 같은 방법으로 2차 추출을 한 후 상등액을 샘플로 이용하였다.

균주

그람양성균으로는 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1927)와 *Bacillus subtilis* (KCTC 1021)를 사용하였으며, 그람음성균으로는 *Escherichia coil* (KCTC 1039), *Agrobacterium tumefaciens* (KCTC 12031) 그리고 *Pseudomonas putida* (KCTC 1641)를 사용하였다. *Agrobacterium tumefaciens*는 YEP (Yeast Extract Peptone) 배지, *Escherichia coil*는 LB (Linsmaier and Skoog) 배지, 나머지 균주는 NA (Nutrient Agar) 배지에서 배양하였다.

항균성 측정

항균성은 disc diffusion 방법을 사용하였다(15-17). Plate에 OD_{600} 0.7인 균주 (100 μl) 접종한 후 균주가 배지에 완전히 스며든 다음, 쑥의 추출물이나 caffeic acid를 멸균된 디스크에 10 μl 떨어뜨린 후 용매를 완전히 휘발시키고, 디스크를 배지에 올려놓았다. 이것을 인큐베이터에서 30℃, 24시간 동안 배양한 다음 clear zone을 확인하였다.

분석

고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, Waters, USA) 분석에 사용한 칼럼은 Phenomenon synergi 4 μ polar-RP 80A column (150 mm x 4.6 mm)이며, 유동상은 50% 증류수, 50% 메탄올, 0.2% triethylamine 그리고 pH 3으로 맞춘 후 isocratic 조건을 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min로 유지하였고, 분석에 사용한 검출기는 photo-diode array detector를 사용하였으며 UV 283 nm에서 확인하였다. 분획 조건은 gradient로 증류수와 메탄올의 조건이 0-10분 60 : 40, 10-20분 20 : 80, 20-22분 60 : 40, 22-30분 60 : 40이었으며 유속은 0.5 mL/min이었다.

결과 및 고찰

쑥의 추출방법에 따른 비교

Fig. 1은 쑥을 잎 부분과 줄기부분으로 구분하여 마쇄한 샘플을 물에서만 추출한 것과 메탄올에서 1차 추출 후 물로 2차 추출한 것을 비교 분석하였다. 전체적으로 줄기와 잎에서 추출한 물질의 HPLC peak profiling이 유사한 것으로 보아 추출물의 성분 차이는 미미한 것으로 보이며, 메탄올 추출 후 물로 추출한 샘플에서는 물로만 추출한 샘플에 비해 잎 부분에서 추출물의 함량이 2.5배가량 더 많이 포함된 것을 알 수 있었다. 추출방법에 따라서는 물로만 추출했을 경우가 메탄올 추출 후 물로 추출한 방법보다 친수성 화합물이 더 많은 것으로 나타났다.

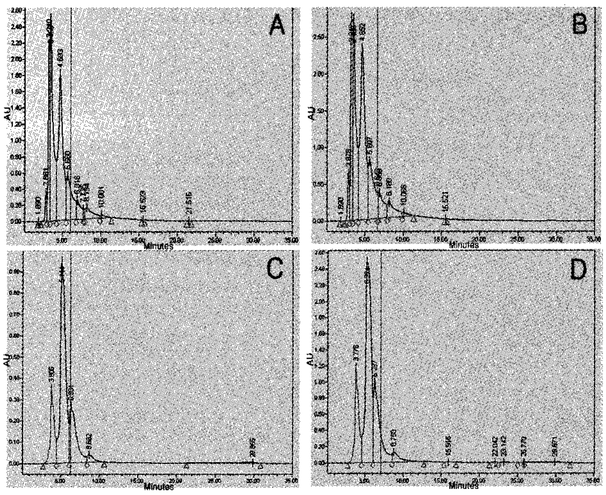

Figure 1. The comparison of only water extract with water-soluble compounds from methanol extract from samples by HPLC (only water extract from stem of *Artemisia* (A), only water extract from leaf of *Artemisia* (B), water soluble compounds from methanol extract from stem of *Artemisia* (C), water soluble compounds from methanol extract from leaf of *Artemisia* (D)).

쑥의 기관별과 추출방법에 따른 항균성

쑥의 기관별에 따라서 줄기와 잎으로 구분하였으며 추출방법에 따라서는 물로만 추출하였을 경우와 메탄올 추출 후 물로 추출하였을 경우로 구분하였다. 균주는 *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coil, Agrobacterium tumefaciens*, 그리고 *Pseudomonas putida*에 대해서 disc diffusion method를 이용해서 항균성을 측정하였다. 일반적으로 그람양성균은 그람음성균에 비해 페니실린과 리소자임에 대해서는 감수성이 낮고, 스트렙토마이신에 대해서는 감수성이 높은 것으로 알려졌으나 쑥 추출물의 경우 Fig. 2와 같이 그람양성균과 그람음성균에 상관없이 메탄올로 추출한 다음 물로 추출한 것이 *Staphylococcus aureus*에 대해서 가장 큰 항균력을 나타내었다. 기관별로는 잎 부분이 줄기 부분보다 항균효과가 컸다(Fig. 2). Fig 1의 (C), (D)와 같이 줄기 부분과 잎 부분은 HPLC분석 결과 성분에서의 차이보다는 양에서 차이를 보였고 따라서 항균활성에서의 줄기와 잎 부분의 차이도 또한 줄기와 잎에서의 성분 차이보다는 추출되는 물질 함량의 차이로 판단되었다.

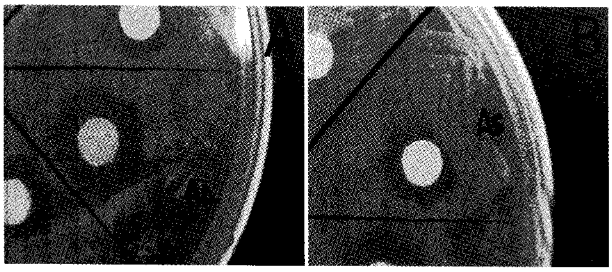

Figure 2. The effect of antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus* was showed by disc diffusion method (water-soluble compounds from methanol extract from stem of *Artemisia* (A), water-soluble compounds from methanol extract from leaf of *Artemisia* (B)).

Caffeic acid와 비교

쑥의 메탄올 추출 후 물로 추출한 물질의 항균에 해당하는 주요 성분을 규명하기 위해 쑥의 주요 항균물질로 알려져 있으며 90ppm에서 mycorrhizal의 콜로니 성장을 저해하는 것을 보인 caffeic aicd(15)와 줄기, 잎 부분의 추출물의 UV 특성곡선을 비교해 보았다. 줄기 부분과 잎 부분에서 체류시간 6~7분 사이에 기존의 항균성을 보이는 것으로 알려진 caffeic acid와 유사한 UV profiling을 나타내는 물질을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 항균성을 나타낸 물질이 caffeic acid인지 확인하기 위해 caffeic acid를 disc diffusion 방법을 이용하여 5가지 균주에 관하여 항균성 실험을 하였다. 0, 200, 1000, 5000, 7500, 10000 ppm의 농도로 실험을 하였을 경우 Fig. 4와 같이 어떤 균주에서도 항균성을 나타내지 않았다. 이로써 기존의 결과와 달리 disc diffusion method로 caffeic acid의 항균성을 확인 할 수 없었다.

쑥의 분획

추출물의 항균성분은 caffeic acid가 아니었으므로 Fig. 2에서 나타낸 항균성을 지니는 물질을 찾기 위해 추출물을 분획하였다. Fig. 5는 쑥의 잎에서 메탄올 추출 후 물로 추출한 샘플을 크게 세 부분으로 분리한 것을 보여준다. 체류시간 4.27분의 peak를 Un-Known(UK) 1로, 10.48분의 peak를 Un-Known(UK) 2로, 그리고 12.65분의 peak를 Un-Known(UK) 3로 각각 명명하였다.

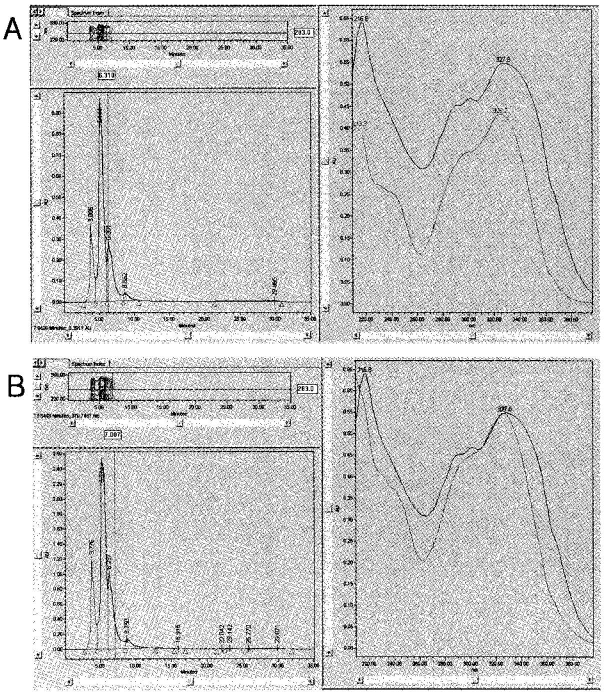

Figure 3. The PDA comparison of samples with caffeic acid by HPLC. Red line is sample and blue line is caffeic acid (Samples- water-soluble compounds from methanol extract from stem of *Artemisia* (A), leaf of *Artemisia* (B)).

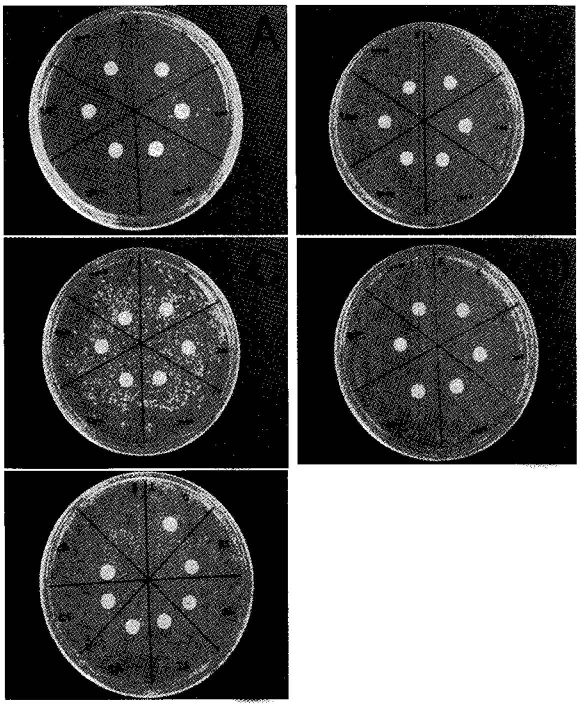

Figure 4. Antimicrobial activities test with caffeic acid by disc diffusion method (*Agrobacterium tumefaciens* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Pseudomonas putida* (C), *Escherichia coli* (D), *Bacillus subtilis* (E)).

분획 물질의 항균성

분획한 추출물 UK 1, UK 2, 그리고 UK 3을 이용하여 *Staphylococcus aureus*에 대한 disc diffusion method 항균성 실험을 수행하였다. 그 결과 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 UK 2가 가장 큰 항균능력을 보였으며 UK 2와 UK 3의 농도의 차이를 고려하더라도 UK 2가 *Staphylococcus aureus*의 성장을 저해하는 주된 성분임을 알 수 있었다. UK 2의 물질 규명을 위해서 LC-MS를 이용하여 분자량을 알아본 결과, 기존의 *Artemisia princeps var. orientalis*에 존재하는 21가지 물질 (caffoxylquinic acid, chlorogenic acid, Isochlorogenic acid, cyperene, isohumulere, yomogin, herniarin, isofraxidin, scopoletin, dihydroxycinnamic acid, copaene, himachalene, farnesene 등) (18)과는 다른 물질임을 확인할 수 있었다. 그러나 어떤 물질인지 규명하기는 위해서는 *Artemisia princeps var. orientalis*의 메탄올 추출 후 물 추출물에 대한 보다 면밀한 분석 화학적 자료가 축적되어야 할 것으로 사료된다.

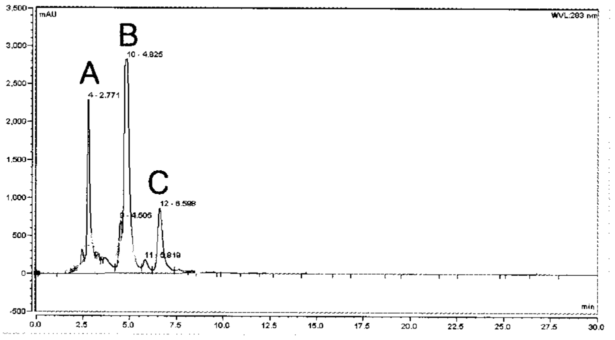

Figure 5. The water-soluble compounds from leaf of *Artemisia* were separated into three parts by HPLC.

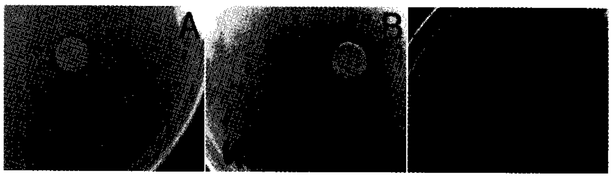

Figure 6. Antimicrobial activity of *Staphylococcus aureus* was showed at UK2 extensively (UK1 (A), UK2 (B), UK3 (C)).

요 약

*Artemisia princeps var. orientalis*의 수용성 추출물이 식품, 화장품, 의약품 등의 항균제로 이용될 수 있는지에 대해 연구 하였다. 순수한 물을 이용한 추출물에서는 항균성을 찾기 힘들었고, 쑥의 줄기와 잎 부분에서 메탄올로 추출한 후 물로 추출한 물이 *Staphylococcus aureus*에 대해서 항균성을 크게 나타냈으며, 잎이 줄기 부분보다 더 큰 항균성을 나타냄을 확인했다. 항균성을 갖는 물질을 밝혀내기 위해 쑥의 주된 항균 성분이라 알려진 caffeic acid와 비교 실험을 하였다. UV 특성곡선에서 caffeic acid와 유사한 phenolic compound의 profiling은 확인할 수 있었으나 caffeic acid의 disc diffusion method를 이용한 실험에서는 항균능력을 나타내지 않았다. 물질규명을 위해 추출물을 세 부분으로 분획 하였고, 이 중에서 *Staphylococcus aureus*에 대해 항균성은 UK 2에서 크게 나타났다. 본 연구는 *Artemisia princeps var. orientalis*의 메탄올 후 물 추출물이 항균제로써의 가능성을 알아봄으로써 식품 또는 화장품의 보존료나 항균제의 이용성이 있음을 충분히 확인하였다.

REFERENCES

1. Zaika, L. L. (1988), Spices and herbs: Their antimicrobial activity and it's determination, *J. Food Safety* **9**, 97.
2. Karapinar, M. (1990), Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Asperigillus parasiticus*, *International J. Food Microbial.* **10**, 193.
3. Lee, S. M. (1975), Studies on the identification of korean traditional folk medicine, *Kor.J. Raw Med.* **6**, 75.
4. Chung, H. S., B. G. Lee, S. T. Sim, and J. G. Lee (1989), Effect of essential oil from *Artemisia* on microorganism growth, Kor. *J. Dietary Cul.* **4**, 417- 424.
5. Nam, S. M., S. S. Ham, S. J. Kim, D. H. Oh, I. J. Kang, S. Y. Lee, and C. K. Chung (1998), Effects of *Artemisia iwayomogi* KITAMURA ethanol extracts on lowring serum and liver lipids in rats, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 338.
6. Nam, S. M., J. G. Kim, S. S. Han, S. J. Kim, M. E. Chung, and C. K. Chung (1999), Effects of *Artemisia iwayomogi* KITAMURA ethanol extracts on antioxident enzymes in rats administerd Benzopyrene, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 199.
7. Song, J. T. (1989), Institute of Korea natural plant, p284.
8. Hwang, B. G. (1982), Principle of disease and natural medical-food, *Dong-A*, p38.
9. Seidakhmetova, R. B., A. A. Beisenbaeva, G. A., Atazhanova, E. M. Suleimenov, R. N. Pak, A. T. Kulyyasov, and S. M. Adekenov (2002), Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Artemisia glabella*, *Pharma Chem. J.* **36**, 27-30.
10. Yang, S. L., M. F. Roberts, M. J. O'Neill, F. Bucar, and J. D. Phillipson (1995), Flavonoids and chromenes from *Artemisia annua*, *Phytochem.* **38**, 255-257.
11. Bachir, B. and A. Tantaoui (1984), Method to study antimicrobial effects of essential oils. Application to the antifungal activity of six moroccan essences, *J. Food protection* **47**, 748.
12. Fabien, J. (2002), Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil, *Fitoterapia* **73**, 532-535.
13. Sheu, S. J. and Y. W. Tan (1999), Determination of phenolic compounds in *Artemisia capollaris, J. High Chromatogr.* **22**, 222-224.
14. YUN, K. W. (2002), Mycorrhizal colonization and plant growth affected by aqueous extract of *Artemisia princeps var. orientalis* and two phenolic compounds, *J. Chem. Ecol.* **28**, 353-362.
15. Kartal, M., S. Yildiz, S. Kaya, S. Kurucu, and G. Topcu (2003), Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia, *J. Ethnopharmacol.* **86**, 69-73.
16. Rabe, T. and J. V. Staden (1997), Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purpose, *J. Ethnopharmacol.* **56**, 81-87.
17. Chang, H. L., X. Z. Wong, L. Hong, and X. T. Ren (2001), Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi, *J. Biotechnol.* **88**, 277-282.
18. Chang, Y. M. (2003), Oriental medicine science, *SNU napri.*