

대장균과 살모넬라균에 대한 박하와 배초향 정유성분의 항균활성

이승은[†] · 박춘근 · 차문석 · 김진경 · 성낙술 · 방경환 · 방진기

작물시험장 특용작물과

Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Malivaud and *Agastache rugosa* O. Kuntze on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*

Seung Eun Lee[†], Chun Geon Park, Moon Seok Cha, Jin Kyong Kim,
Nak Sul Seong, Kyong Hwan Bang and Jin Ki Bang

National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT : For developing natural presevatives, essential oils of *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Malivaud and *Agastache rugosa* O. Kuntze were analyzed the composition of two oils and experimented on microorganism survival. Main components of *Mentha arvensis* oil were isomenthol (26.84%) and menthol (25.48%), and those of *Agastache rugosa* oil were estragole (79.83%) and limonene (4.13%) from GC-MSD analysis. Inhibition activities of *Mentha arvensis* oil against growth of *Escherichia coli* O157 : H7 ATCC 43895 and *Salmonella typhimurium* ATCC 7988 were observed from their clear zone (9~14 mm & 9~13 mm), and that of *Agastache rugosa* oil were done from the clear zone (13~20 mm & 10~18 mm) by concentration-dependent manner, respectively. In the inhibition test on CFU/ml of the microorganisms, both of the plant essential oils at concentration of 5 and 10 mg showed potent growth inhibition activities from 9 hour of incubation. Analysis using transmission electron microscope on *E. coli* also showed antimicrobial activities of the oils as deformation of the cell and loss of the intracellular materials.

Key words : antimicrobial, essential oil, *Mentha arvensis*, *Agastache rugosa*

서 언

산업의 발달과 함께 제품의 고급화, 편의화 추세에 따라 냉장, 냉동식품에 대한 수요가 증가하고 있어 이들 식품을 유통기간 동안 미생물로부터 안전하게 보존할 수 있는 보존료의 사용도 증가하고 있다. 현재 우리나라 식품위생법에서는 벤조산 (benzoic acid)을 비롯한 13종의 합성품이 보존료로 사용 허가되어 있으나 이들의 지속적인 사용은 만성독성, 발암성, 돌연변이 유발성 등의 위

험성 때문에 합성보존료를 대신할 천연보존료에 대한 요구가 증가하고 있으며 이에 따른 천연보존료의 개발이 시급하다. 이러한 요구에 따라 현재 천연 자원으로부터 보존료 개발 연구가 활발하게 이루어지고 있으며 (Park et al., 1997; Kim, 1998; Oh et al., 1999) 그 중에는 식물의 정유가 보유하는 향미생물 효과에 관한 연구도 포함된다 (Yun et al., 1992; Cho et al., 1997; Seo et al., 1999). 병원성 미생물 중 *Salmonella typhimurium*은 인간에서 장티푸스 등 장내 질병을 유발

[†] Corresponding author (Phone) : 031-290-6718, E-mail : tahitie@rda.go.kr
Received 25 July 2002 / Accepted 22 August 2002

하며 (Choi et al., 1994), *Escherichia coli* O157은 미국, 일본에서 대규모 식중독 사태를 일으키고 감염시 출혈성 신증후군 (hemolytic uremic syndrome) 및 출혈성 장염 (hemolytic colitis) 등의 증상을 유발하므로 (Yang et al., 1999) 이들에 대한 식물 정유성분의 항균효과를 밝히고자 하였다. 본 연구에서는 독특한 향기를 가지며 오랜 동안 약용으로 이용되어 온 박하와 배초향 (鄭 &辛, 1990)의 정유성분을 분석하고 이들의 항균효과를 실험하였다. 한편, 박하의 물추출물은 비만세포로부터 히스타민의 방출을 억제하는 항알레르기 활성을 가지는 것으로 보고되어 있고 (Shin & Kim, 1998) 배초향으로부터는 암세포 성장분화와 관련된 신호전달 과정에서 중요한 영역인 Grb2-Shc에 대해 결합 저해 활성을 가지는 lutein과 항산화활성을 가지는 로즈마린산이 분리되었으며 (Lee et al., 1999a; Kim et al., 1999a) 그 메탄올 추출물은 HIV integrase 저해활성을 가지는 것으로 보고되어 있다 (Kim et al., 1999b).

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용된 박하와 배초향은 2000년 5월 수원 작물시험장 약용식물 전시포에서 채취하여 세척한 후 사용하였다. 분석에 사용된 미생물은 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895와 *Salmonella typhimurium* ATCC 7988이었으며 실험에는 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895의 경우 nutrient broth와 agar (Difco Co., USA)를, *S. typhimurium* ATCC 7988는 tryptic soy broth (TSB)와 agar (Difco Co., USA) 등의 배지를 사용하였다.

정유성분의 추출, 조성분석 및 동정

정유성분을 분석하기 위해 박하와 배초향 각각 1 kg씩을 연속수증기증류장치 (SDE: Simultaneous Steam and Extraction Apparatus)를 개량한 Schultz의 방법에 따라 diethyl ether로 추출하여 무수 Na_2SO_4 로 탈수한 후 여과하고 상압, 38°C의 수조에서 수 ml로 농축하였고 그 조성을 분석하기 위해 Table 1에 나타낸 조건으로 GC (Hewlett Packard HP 6890, USA) 및 MSD (Hewlett Packard HP 5973, USA)를 사용하여 분석하였다.

항균력 측정 및 세균의 내부구조 관찰

박하와 배초향 정유추출물의 생육저해력 측정을 위하여 멸균된 각각의 생육배지를 petri dish에 15 ml씩 분주하여 응고시킨 후 전배양한 시험균액을 무균적으로 첨가

Table 1. Conditions of Gas chromatography/Mass spectrometry for volatile components analysis

Instrument	HP6890 GC/HP 5973 MSD
Column	Ultra-1(cross linked methyl siloxane ; 50 m×0.2×0.33 μm)
Injector Temp.	250°C
Oven Temp.	250°C
Auxiliary Temp.	230°C
Carrier Gas(flow rate)	He (0.8ml/min)
Split Ratio	1 : 40
Ionization Mode	Electron Impact (70eV)
MS Source Temp.	230°C

하여 혼합한 다음 멸균된 paper disk를 agar 배지 위에 놓고 0.45 μm membrane filter (Nalgene Co, USA)로 제균시킨 0, 2, 5, 10 mg 농도의 정유추출물을 일정량씩 흡수시켰으며 37°C incubator에서 48시간 동안 배양한 다음 disk 주변의 clear zone을 관찰하였다. 박하와 배초향 정유를 함유한 배지에서 세균의 배양 중 생균수 측정을 위해서는 제균된 정유성분을 전배양한 배양액으로부터 10 ml의 TSB 배지를 함유하는 시험관에 10^5 CFU/ml의 농도로 분주하였고 0, 1, 2, 5, 10 mg 농도의 정유 추출물을 넣은 후 37°C incubator에서 일정한 시간 간격으로 배양하고 3, 6, 9, 12, 24, 36 및 48시간에 생성된 colony 수를 측정하였다. 또한 정유의 처리가 미생물의 내부구조에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하기 위해 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895에 대하여 전자현미경 (TEM: transmission electron microscope, LEO 906-E, Germany) 촬영을 행하였다.

결과 및 고찰

정유성분의 조성

박하 정유성분에 대한 분석 결과 isomenthol 26.84%, menthol 25.48%, menthofuran 13.32%, eucalyptol 5.28%, neomenthol 3.35%, trans-dihydrocarvone 2.44% 등이 주성분으로 분석되었는데 (Table 2) 이러한 정유의 성분 함량은 수확시기와 영양분의 함량에 따라 변화될 수 있는 것으로 보고되고 있다 (Shi & Park, 1994; Oh & Chae, 1993). 배초향 정유성분에 대한 GC-MSD 분석결과 Table 3에 나타낸 것처럼 estragole이 79.83%로서 가장 높은 함량을 보였으며 limonene 4.13%, trans-isopulegone 3.45%, β -caryophyllene 1.

Table 2. The components identified from *Mentha arvensis* by GC-MSD

Peak No.	Retention Time	Volatile Components	Content (%)
1	12.83	α -pinene	0.82
2	14.85	β -pinene	1.08
3	17.19	limonene	1.94
4	17.47	eucalyptol	5.28
5	23.76	p-menthone	0.56
6	24.27	menthofuran	13.32
7	24.46	neomenthol	3.35
8	25.28	isomenthol	26.84
9	25.57	neoisomenthol	1.51
10	25.97	trans-dihydrocarvone	2.44
11	28.17	carvone	1.90
12	29.37	3-menthene	1.81
13	30.59	menthol	25.48
14	31.18	carane	1.59
15	35.08	β -boubonene	0.68
16	36.83	trans-caryophyllene	1.44
17	39.55	germacrene D	1.31
18	44.52	viridiflorol	0.60
		others	3.76

Table 3. The components identified from *Agastache rugosa* by GC/MSD

Peak No.	Retention Time	Volatile Components	Content (%)
1	8.19	2-pentanol	0.71
2	14.60	1-octen-3-ol	0.46
3	15.06	β -myrcene	0.09
4	17.36	limonene	4.13
5	20.65	octenyl acetate	1.50
6	23.64	menthone	1.33
7	24.73	trans-isopulegone	3.05
8	26.55	estragole	79.83
9	28.80	pulegone	0.12
10	35.31	methyl eugenol	0.12
11	36.86	β -caryophyllene	1.82
12	39.62	germacrene D	0.97
13	40.26	bicyclogermacrene	0.62
14	43.67	germacrene d-4-ol	0.22
15	46.85	Y-muurolol	0.26
		others	4.77

82%, octenyl acetate 1.50% 및 menthone 1.33% 등으로 나타나 이 성분들이 박하의 향기에 큰 영향을 미칠 것으로 생각되었다. 한편 Lee 등 (1994)은 배초향 정유의 탄화수소화합물 분석의 주성분이 β -caryophyllene (59.3%), limonene (13.1%) δ -caryophyllene (10.7%) 이고 함산소화합물 분석의 주성분은 methyl chavicol (79.1%), cis-3-(1-propenyl)phenol (4.5%)등인 것으로 보고하였으며 Lee 등 (1999b)은 isomenthone, dihydrocarvone, vanillin, methyl eugenol, anethole, menthone등이 total ion peak area에 있어서 92.5, 67.5, 51.8, 45.2, 31.5 및 26.3의 순으로 높게 나타난 것으로 보고해 본 연구의 결과와는 매우 상이하였는데 이것은 시료 수확시기가 다르기 때문으로 사료된다.

생육저해환 측정에 의한 생육억제효과 확인

박하와 배초향 정유의 E. coli O157 : H7 ATCC 43895와 S. typhimurium ATCC 7988에 대한 항균력을 확인하기 위해 0, 2, 5, 10 mg의 농도에서 생육저해환을 측정한 결과를 Fig. 3과 Table 4에 나타내었다. 박하의 정유성분은 두 미생물에 대해 2, 5, 10 mg의 농도에서 약 9~14 mm의 clear zone을 나타내었으며 배초향의 경우 약 10~20 mm의 clear zone 크기를 나타내었고 두 미생물 모두에서 박하와 배초향은 농도 의존적으로 생육을 억제시키는 것으로 판단되었다.

Table 4. Inhibition zone of *Mentha arvensis* and *Agastache rugosa* essential oils on pathogenic bacteria

Essential Oil	Concentration (mg)	Diameter (mm)	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Mentha arvensis</i>	2	9.46	9.33
	5	12.01	13.21
	10	14.61	13.76
<i>Agastache rugosa</i>	2	10.95	13.48
	5	14.05	16.38
	10	18.79	20.78

생균수 측정에 의한 항균효과 확인

박하와 배초향의 최소저해농도 (minimum inhibitory concentration : MIC)를 구하기 위해 정유성분을 0, 1, 2, 5, 10 mg의 농도로 첨가한 시험균에 시험균주인 E. coli O157 : H7 ATCC 43895 및 S. typhimurium

ATCC 7988을 각각 접종하고 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 얻은 생육저해곡선을 Fig. 1과 2에 나타내었다. 박하의 정유는 농도가 증가할수록 미생물의 수를 감소시켰으며 5 mg의 농도에서 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895에 대해서 9시간이후부터 그리고 *S. typhimurium* ATCC 7988에 대해서 6시간부터 생균수를 감소시켰고 미생물수의 감소는 10 mg에서는 3~6시간 더 빨리 나타났다. 동일 농도에서 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895는 36시간이후에, *S. typhimurium* ATCC 7988은 48시간째에 검출되지 않았다. 배초향 정유성분도 두 세균에 대해 모든 농도에서 성장억제효과를 보였으며 5 mg의 농도이상에서는 배양 3시간이후부터 세균수를 감소시켜 박하의 정유성분보다 높은 성장억제효과를 나타내었다. 10 mg 농도의 배초향 정유는 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895에 대해 배양 24시간부터, *S. typhimurium* ATCC 7988은 배양 36시간이후부터 생육을 완전히 억제시켰다.

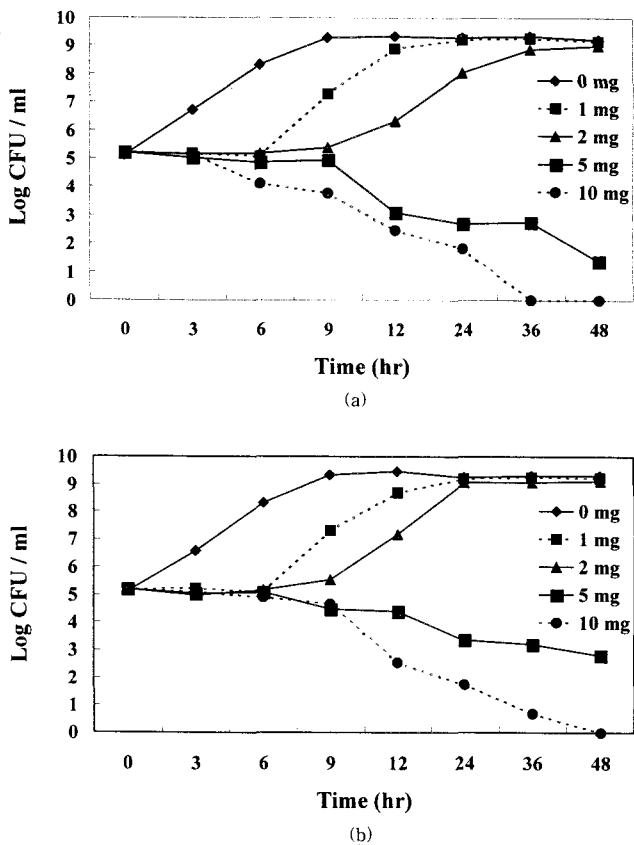


Fig. 1. Effect of *Mentha arvensis* essential oil on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 (a) and *Salmonella typhimurium* ATCC 7988(b).

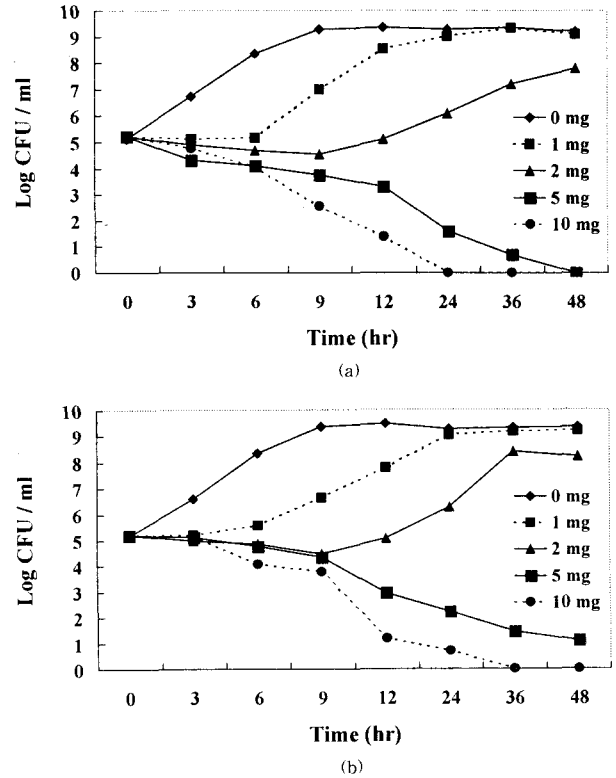


Fig. 2. Effect of *Agastache rugosa* essential oil on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 (a) and *Salmonella typhimurium* ATCC 7988(b).

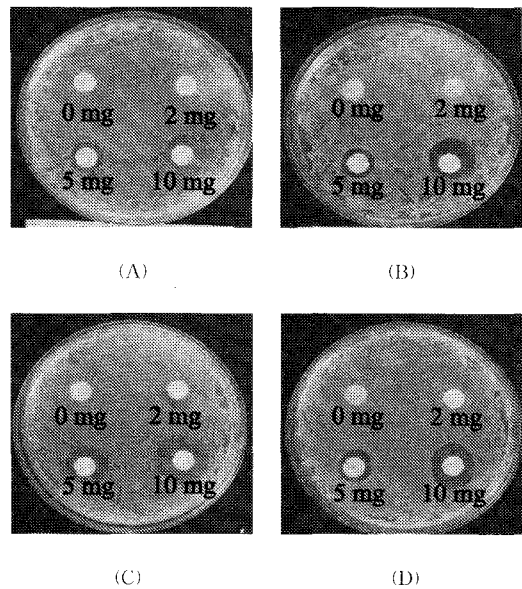


Fig. 3. Growth inhibition activity of essential oil from *Mentha arvensis* (A & B) and *Agastache rugosa* (C & D) on the pathogenic bacteria. (B & D, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895; A & C, *Salmonella typhimurium* ATCC 7988)

미생물 세포의 내부구조에 대한 영향

시험균주로 사용된 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895의 세포구조에 대한 정유성분의 항균작용을 확인하기 위해 정유 처리군과 무처리군에 대한 전자현미경사진을 TEM을 사용하여 촬영한 결과는 Fig. 4와 같다. 무처리군

(A)에 비해 박하 정유처리군 (B) 및 배초향 정유 처리군 (C)는 세균의 외부형태와 내부구조가 크게 변형되어 있고 세포내용물이 유실되었음을 관찰할 수 있어 박하와 배초향 정유 성분이 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895에 대해 효과적인 항균작용을 나타내는 것을 알 수 있었다.

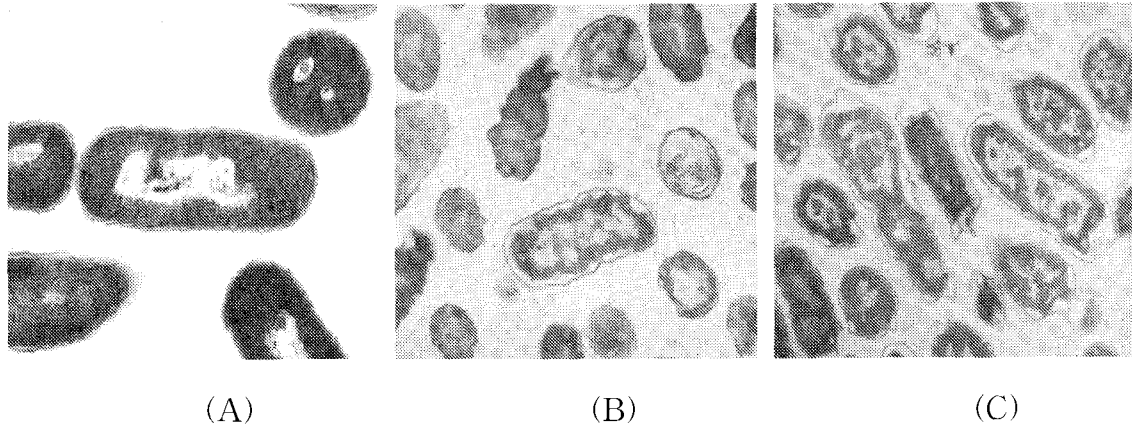


Fig. 4. Transmission electron micrographs of *Escherichia coli* treated with none (A), *Mentha arvensis* oil (B) and *Agastache rugosa* oil (C).

적 요

박하와 배초향 정유의 보존료로서의 이용가능성을 타진하기 위해 그 성분조성을 GC-MSD 분석에 의해 실험한 결과 박하 정유의 주된 성분은 isomenthol로서 전체 정유성분 중 26.84%, menthol이 25.48%이었으며 배초향 정유에는 estragole이 79.83%, limonene이 0.12% 함유되어 있었다. 2, 5, 10 mg 농도에서 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895에 대한 박하 정유의 생육저해환은 9~14 mm, 배초향 정유는 10~18 mm, *S. typhimurium* ATCC 7988에 대해서는 박하 정유가 9~13 mm, 배초향 정유가 13~20 mm으로 나타나 두 정유성분 모두 농도 의존적으로 항균작용을 나타내었다. 생균수 측정 실험에서 박하 정유는 2 mg이하의 저농도에서 9시간까지 세균의 증식을 억제시켰으며 5 mg 이상의 농도에서는 9시간이후 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895와 *S. typhimurium* ATCC 7988을 모두 사멸시켰다. 배초향 정유는 2 mg이하의 농도에서 12시간까지 세균의 증식이 억제되었고 5 mg이상의 농도에서는 6시간이후 세균이 사멸되었다. *E. coli* O157:H7 ATCC 43895에 대한 박하와 배초향 정유 성분의 항균작용을 전자현미경 촬영에 의해 확인한 결과 형태학적인 변화와 세포막과 세포벽의 분리 및 세포내용물 유실이 관찰되어 두 정유성분의 항균효과를 관찰할 수 있었다.

LITERATURE CITED

Cho SH, Moon HI, Yu JH (1997) Antimicrobial activities of volatile essential oils from Korean aromatic plants. *Nat. Prod. Sci.* 3 : 141-147

Choi KH, Namkung H, Paik IK (1994) Effects of dietary fructooligosaccharides on the suppression of intestinal colonization of *Salmonella typhimurium* in broiler chickens. *Korean J. Anim. Sci.* 36 : 277-284

Kim HS (1998) Antimicrobial activity and characteristics of *Amblytropis pauciflora* Kitagawa extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27 : 993-999

Kim JB, Kim JB, Cho KJ, Hwang YS, Park RD (1999a) Isolation, identification, and activity of rosmarinic acid, a potent antioxidant extracted from Korean *Agastache rugosa*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 42 : 262-266

Kim HK, Lee HK, Shin CG, Huh H (1999b) HIV integrase inhibitory activity of *Agastache rugosa*. *Arch. Pharm. Res.* 22 : 520-523

Lee ES, Ahn BT, Lee SB, Kim HK, Bok SH, Jeong TS (1999a) Isolation of Gb2-Shc domain binding inhibition component from *Agastache rugosa*. *Kor. J. Pharmacogn.* 30 : 404-408

Lee SW, Kim JB, Kim KS, Kim MS (1999b) Changes of growth characteristics, rosmarinic acid and essential oil contents according to harvest time in *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 7 : 83-88

Oh BI, Chae YA (1993) Effects of carbon and nitrogen sources on the essential oil production and its composition in callus

- culture of *Mentha piperita* L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 1 : 58-62
- Oh DW, Lee MK, Park BK** (1999) Antimicrobial activities of commercially available tea on the harmful foodborne organisms. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28 : 100-106
- Park HY, Lee CK, Park WK, Lee EH** (1997) Antimicrobial effect of *Caridine denticulata denticulata*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26 : 54-59
- Schultz TH, Flath RA, Mon TR, Enggling SB, Teranishi R** (1977) Isolation of volatile components from a model system. J. Agric. Food Chem. 25 : 446-461
- Seo KL, Lee HJ, Koh KH** (1999) Antimicrobial activity of the volatile components from fruit peel of chopi (*Zanthoxylum piperitum* DC). Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 : 179-183
- Shin KE, Park HK** (1994) Changes of essential oils from *Mentha piperita* L. influenced by various cultivation conditions and harvesting time. Korean J. Food Sci. Technol. 26 : 512-519
- Shin TY, Kim DK** (1998) Antiallergic activity of *Menthae herba*. Kor. J. Pharmacogn. 29 : 248-253
- Yang SJ, Yoon JW, Seo KS, Koo HC, Kim SH, Bae HS, Baek YJ, Park YH** (1999) Prophylactic effects of *Bifidobacterium longum* HY8001 against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 enteric infection and evaluation of vero cytotoxin neutralizing effects. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 : 419-425
- Yun KW, Dubey NK, Han DM, Kil BS** (1992) Antifungal activity of some essential oils against four fungi. Korean J. Ecol. 15 : 281-285
- 鄭晉燮, 辛民教** (1990) 圖解鄉藥(生藥)大事典(植物篇), 永林社, p. 839-852