

## 유백피 추출물의 항세균 작용

이흥용 · 김치경<sup>1\*</sup> · 성태경<sup>1</sup> · 문택규 · 임치주

일동제약(주) 중앙연구소, <sup>1</sup>충북대학교 미생물학과

### Antibacterial Activity of *Ulmus pumila* L. Extract

Lee, Heung-Yong, Chi-Kyung Kim<sup>1\*</sup>, Tae-Kyung Sung<sup>1</sup>,  
Tae-Kyu Mun and Chi-Ju Lim

Research Laboratories, Il-dong Pharm. Co., Ltd., Cheong-ju 360-290, Korea

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheong-ju 360-763, Korea

**Abstract** — Antibacterial activity of the water-soluble portion of *Ulmus pumila* L. extract against 10 bacterial species was studied by both cylinder plate dilution method and broth dilution test tube method. Inhibitory effect of the extract on the bacteria was also investigated by plotting bacterial survival at various concentration of the extract. The crude extract exhibited antibacterial activity against all of the tested bacterial species with exception of *K. pneumoniae*. The fractions of the extract prepared by CM Sephadex-C 50 ion exchange chromatography were also subjected to test the antibacterial activity, and the activity was studied after autoclaving for 20 minutes.

최근 물질특허 제도가 국가간 마찰의 쟁점으로 부각됨에 따라 학계와 산업계에서 신물질 개발에 대한 관심이 고조되고 있으며, 이에 부응하여 전통적으로 사용되어 오던 생약 및 민간 처방약의 약효에 대한 관심도 높아지고 있다. 실제 동서양을 막론하고 전통 약물은 현대 의학에 사용되고 있는 많은 의약품의 중요한 자원으로 이용되어 왔으나, 항 세균제의 분야에 있어서는 기존 항 세균제의 낮은 생산 경비와 우수한 효과 때문에 상대적으로 연구 실적이 미미한 점이 없지 않았다. 그러나 근래에 들어서 천연 약물 중에서 항세균 효과를 갖는 성분에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 단풍나무 류에서 추출된 ginnalin(1), 황화호에서 추출된 artemisic acid(2), 황백이나 황련 등에서 추출된 berberin, 감를 류의 과피에 포함된 성분인 hesperidin(3) 등이 항세균 효과를 가지고 있음이 보고된 바 있다.

본 실험에서는 한의학 서적 및 민간 요법에서 입탁,

오림, 유선염, 늑막염과 같이 미생물에 의하여 기인한 것으로 추정되는 질병의 치료에 사용되어 온(4,5) 유백피(*Ulmus pumila* L.)의 항세균 작용을 조사하였다. 유백피는 우리나라 중부 이북 지방의 산야에서 자생하는 낙엽 교목인 느릅나무과의 비술나무의 줄기 및 뿌리 껍질을 벗겨 말린 것으로, 비술나무는 15 m 이상 자라며 수피는 암회갈색이고 소지는 털이 있고 담화황색이다. 잎은 호상이고 타원형 또는 장타원형으로 끝이 뾰족하고 털이 있다. 학명은 *Ulmus pumila* L.이며 *Ulmus davidiana* var. *japonica* N. 등도 같은 용도로 사용되고 있다(6). 잎의 기본 성분 및 n-hexane 추출물의 정량 분석 등에 대하여 보고된 바 있으나, 항세균 작용에 대하여 보고된 바는 없다(7).

### 재료 및 방법

#### 실험 재료

본 실험에서 사용된 재료는 충북 진천군 일대의 산야에 자생하는 *Ulmus pumila* L.의 수피(유백피)를 1990년 8월부터 1991년 4월 중 채취하여 음건, 세절

**Key words:** Antibacterial activity, *Ulmus pumilla* L. extract

\*Corresponding author

하여 사용하였다.

### 시료의 조제

유백피 추출액의 조제는 대한 약전의 유동 엑기스 조제법(8)을 변경 응용하여 조제하였는데, 시료 1 kg을 2.5l의 methanol(Wako Chemicals Co., 시약 1 급)로 48시간 동안 상온에서 침출시킨 후 1차 추출하고 다시 2.5l의 methanol을 가하여 상온에서 48시간 침출하여 2차 추출한 후, 1차 추출액과 2차 추출액을 evaporator(Buchi RE 121, Switzerland)로 80℃의 수욕상에서 감압 농축하여 약 100 ml의 농축액을 만들었다. 이 농축액에 90℃의 증류수를 500 ml 가하여 24시간 방치한 후 4,000×g로 원심분리하여 침전된 수지 성분을 1차 제거하고 5℃의 냉장고에서 24시간 보관하여 침전된 수지 성분 등을 2차 제거하였다. 수지 성분의 제거가 끝난 후 n-hexane 500 ml을 가하여 잘 교반하여 lipid 성분을 녹여서 분액 여두로 n-hexane 층을 제거한 후, evaporator로 수용액을 농축하여 잔존된 n-hexane을 제거하고, 수분 측정기(Karl-Fisher Scientific Co., 645 multi-dosimat, Switzerland)로 수분 함량을 측정하여 50%가 되도록 시료를 조제하였다.

### 시험 균주

본 실험에서는 항생제의 역가 측정에 일반적으로 사용되고 있는 American Type Culture Collection(ATCC) 균주 및 National Collection of Type Cultures(NCTC) 균주 중 Table 1과 같이 그람 양성균 5종과 그람 음성균 5종을 선정하여 사용하였다.

### 사용 배지

원통 평판 확산법과 한천배지 희석 평판법에는 Tryptic Soy Agar(Difco) 및 Mueller Hinton Agar(Difco)를 사용하였으며, 시험균의 seed culture, broth dilution test tube method와 증식곡선의 측정에는 Mueller Hinton Broth(Difco)를 사용하였고 생균수의 측정을 위한 분석용 배지로는 Luria-Bertani(LB) Agar를 각각 사용하였다(9).

### 원통 평판 확산법에 의한 항균력 측정

각 시험균주를 MHB에서 6~8시간 배양한 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 균체를 수거한 후 생리 식염

Table 1. Bacterial strains employed in this study

Gram reaction	Bacterial species	
Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 10541
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341
Gram negative	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6229
	<i>Kebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 7829
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10490

수를 희석하여 균체의 수가 Mcfarland nephelometer barium sulfate 표준 용액 No.0.5와 같도록 조정된 후 0.1 ml pipetting하여 4.5 ml의 종충용 배지에 섞은 후 기충용 배지를 Petri dish에 20 ml씩 고르게 펴서 균한 Petri dish 위에 도말하였다. 이 Petri dish 위에 stainless steel cylinder(지름 8 mm, 높이 10 mm, Fisher Scientific Co.)를 대각선 방향으로 4개씩 엮고 밀착시킨 후 준비된 유백피 추출액을 원통에 주입하고 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 억제환을 측정하였다(10).

### Minimal Inhibitory Concentration(MIC) 측정

MIC는 고체 배지와 액체 배지에서 각각 측정하였으며, 고체 배지에서의 MIC 측정에 사용된 방법은 한천배지 희석 평판법으로, 시료의 건물 함량이 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/ml이 되도록 조절된 MHA 배지를 Petri dish에 부어 고르게 펴서 균한 후 준비된 균체의 현탁액을 멸균된 면봉을 사용하여 접종하였다. 접종이 끝난 Petri.dish는 37℃ incubator에 넣고 18~20시간 배양하여 생장이 되지 않은 최저 농도를 MIC값으로 결정하였다(9).

액체배지에서 MIC는 액체배지 희석법으로 측정하였는데, 유백피의 건물 함량이 각각 40, 20, 10, 5, 2.5 mg/ml 포함되도록 조절된 MHB 배지를 준비하여 균 희석액을 각각 0.1 ml씩 접종하고 37℃ incubator에서 18시간 배양한 후 균의 증식이 나타나지 않은 최소 농도를 MIC 값으로 결정하였다. 균 희석액은 8시간 전에 계대 배양한 시험균 적량을 생리 식염수에 현탁하여 Mcfarland 표준 용액 No.0.5에 맞추어 균

액을 조제한 후 이 균액을 다시 100배 희석하여 사용하였다.

**세균의 증식에 미치는 농도의 영향**

유백피 추출물이 *in vitro*에서 세균의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 측정된 MIC 값을 기준으로 하여 MIC 값보다 높은 농도와 낮은 농도에서 그람 양성균 2종과 그람 음성균 2종을 선정하여 증식곡선을 측정하였다.

**유백피 추출물 중 항세균 성분의 열 안정성 조사**

추출물 중에 포함된 항세균성 물질의 열 안정성을 조사하기 위하여 Ausubel 등(11)의 방법을 응용하여 chromatography법으로 부분 정제하여 각 분획을 원통 평판 확산법으로 억제환의 생성을 측정하고, 각 분획을 121°C로 20분간 고압 멸균한 후 동일한 방법으로 억제환의 생성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**각 시험 균주에 대한 항균 효과**

유백피 추출액은 사용된 10가지의 균주 중 *K. pneumoniae*를 제외한 모든 균주에 대하여 추출물의 농도와 비례하는 억제환을 형성하였다(Table 2). 각 균주에 대한 억제환의 크기는 건물 함량이 20 mg/ml인 경우에 그람 양성균인 *S. aureus*와 *M. luteus*에

**Table 2. Inhibition zone of bacterial species on cylinder plate agar diffusion method by the extract of *Ulmus pumilla* L**

Bacterial species	diameter (mm) of inhibition zone at various conc. (mg/ml)				
	control	5	10	15	20
<i>S. aureus</i>	0	13	13	14	15
<i>S. epidermidis</i>	0	10	11	12	14
<i>S. faecalis</i>	0	12	13	14	188
<i>B. subtilis</i>	0	11	12	13	17
<i>M. luteus</i>	0	10	12	14	18
<i>E. coli</i>	0	11	12	12	13
<i>S. typhi</i>	0	14	14	15	16
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0
<i>P. vulgaris</i>	0	11	12	13	15
<i>P. aeruginosa</i>	0	13	14	14	14

All plates was incubated at 37°C for 48 hours.

대해서 18 mm이었으나, 같은 농도에서 그람 음성균 *S. typhi*에서는 16 mm, *E. coli*에서는 13 mm에 불과하여 그람 양성균에 대한 항균력이 그람 음성균에 대한 항균력보다 큰 것으로 나타났다. 고체 배지와 액체 배지에서의 MIC 측정 결과 고체 배지에서의 MIC가 액체 배지에서의 MIC보다는 높은 것으로 측정되었는데(Table 3, 4), 이는 액체 배지에서의 균증식에 대한 물리적인 조건이 고체 배지보다는 양호하기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 이 추출물은 완

**Table 3. MIC of the extract against bacterial species by broth dilution test tube method**

Bacterial species	Growth at various concentrations (mg/ml)						MIC (mg/ml)
	control	2.5	5	10	20	40	
<i>S. aureus</i>	+	+	+	-	-	-	10
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	-	-	20
<i>S. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	5
<i>B. subtilis</i>	+	+	-	-	-	-	5
<i>M. luteus</i>	+	+	+	+	-	-	20
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	-	30
<i>S. typhi</i>	+	+	+	+	-	-	20
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. vulgaris</i>	+	+	+	+	-	-	20
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	-	20

+, Growth after 18 hours incubation at 37°C

-, No growth after 18 hours incubation at 37°C

**Table 4. MIC of the extract against bacterial species by agar plate dilution method**

Bacterial species	Growth at various concentrations (mg/ml)						MIC (mg/ml)
	control	2.5	5	10	20	40	
<i>S. aureus</i>	+	+	-	-	-	-	2.5
<i>S. epidermidis</i>	+	+	-	-	-	-	2.5
<i>S. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	5
<i>B. subtilis</i>	+	+	-	-	-	-	2.5
<i>M. luteus</i>	+	+	+	-	-	-	5
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	10
<i>S. typhi</i>	+	+	+	-	-	-	5
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. vulgaris</i>	+	+	+	-	-	-	5
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	-	10

+, Growth after 18 hours incubation at 37°C

-, No growth after 18 hours incubation at 37°C

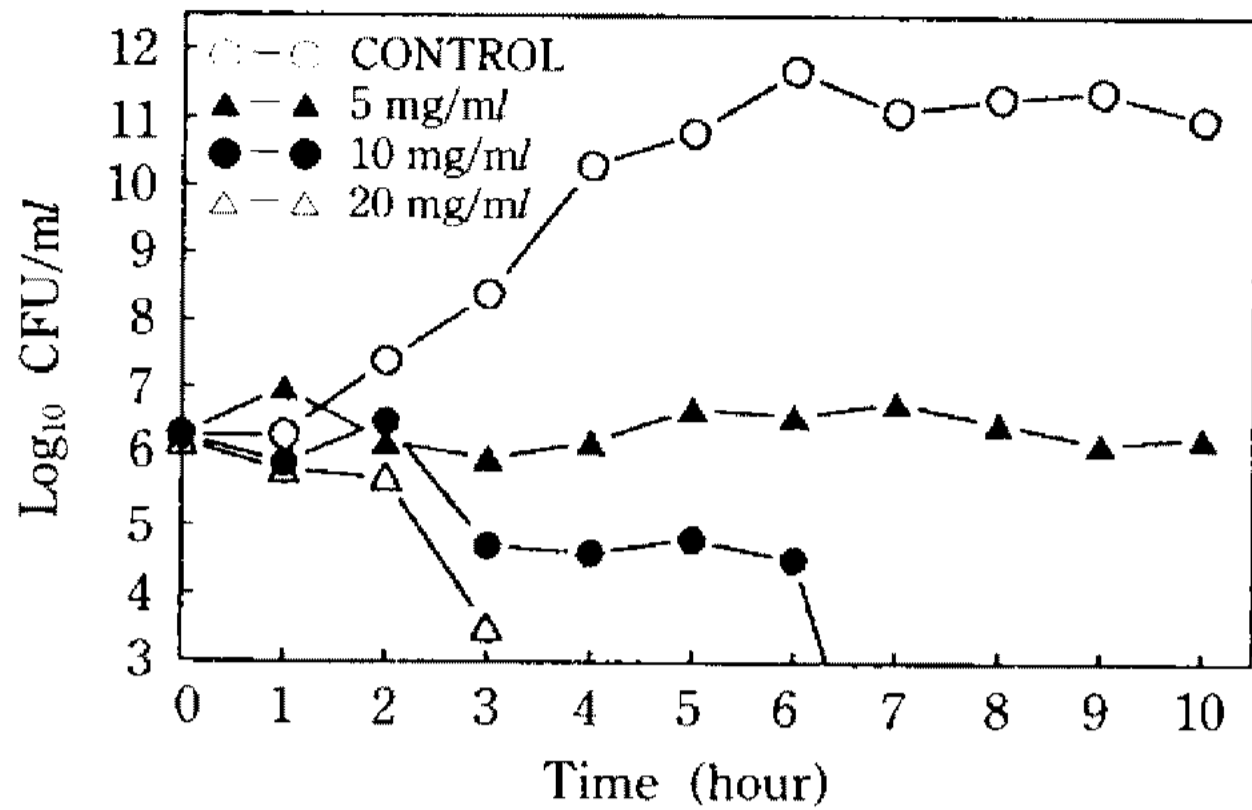


Fig. 1. Antibacterial effect of the extract of *Ulmus pumilla* L. on growth of *S. aureus*.

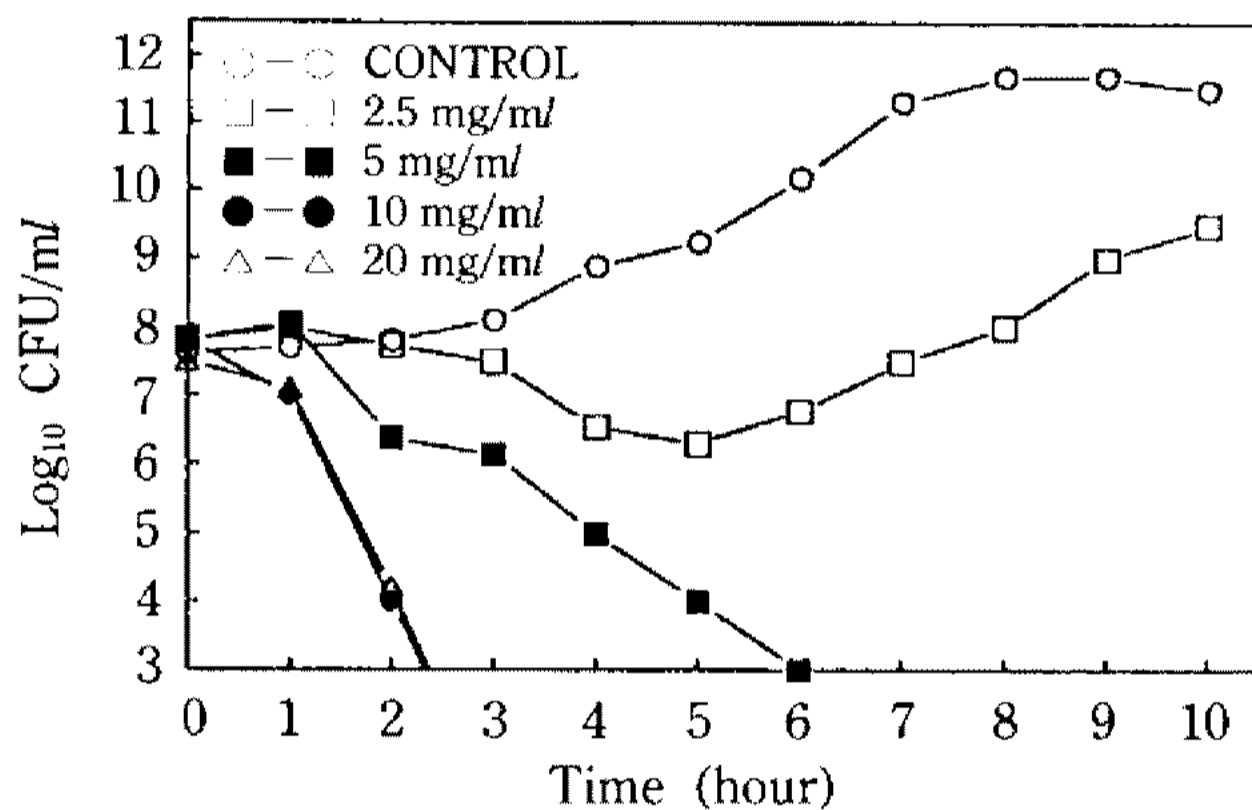


Fig. 2. Antibacterial effect of the extract of *Ulmus pumilla* L. on growth of *B. subtilis*.

전히 정제되지 않은 상태이기 때문에 점도가 높아 한천 배지를 통하여 확산되어 나가는데 저해를 받을 수 있을 것으로 추정되어 정제의 진행 정도에 따라 확산 범위가 커질 수 있을 것이며 이로 인하여 억제환의 크기는 달라질 수 있을 것으로 보여진다.

### 세균의 증식에 미치는 영향

항균력의 측정에 사용된 10가지의 균주 중 *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*와 *K. pneumoniae*에 대하여 유백피 추출물을 첨가한 배지에서의 증식 곡선을 측정 한 결과는 Fig. 1~3과 같다. 각 균주에 대한 유백피 추출물의 함량은 액체배지 희석법으로 측정된 MIC를 기준으로 그보다 높은 농도와 낮은 농도로 각각 조절하였다.

*S. aureus*에 있어서는 MIC인 10 mg/ml의 유백피 추출물이 함유된 배지에서는 생균수가 서서히 감소되었으나 그보다 높은 농도에서는 배양 3시간 경과 후에 대부분의 cell이 사멸하였고 MIC보다 낮은 농도에서는 유도기가 유지되는 시간이 조금 길어진 후

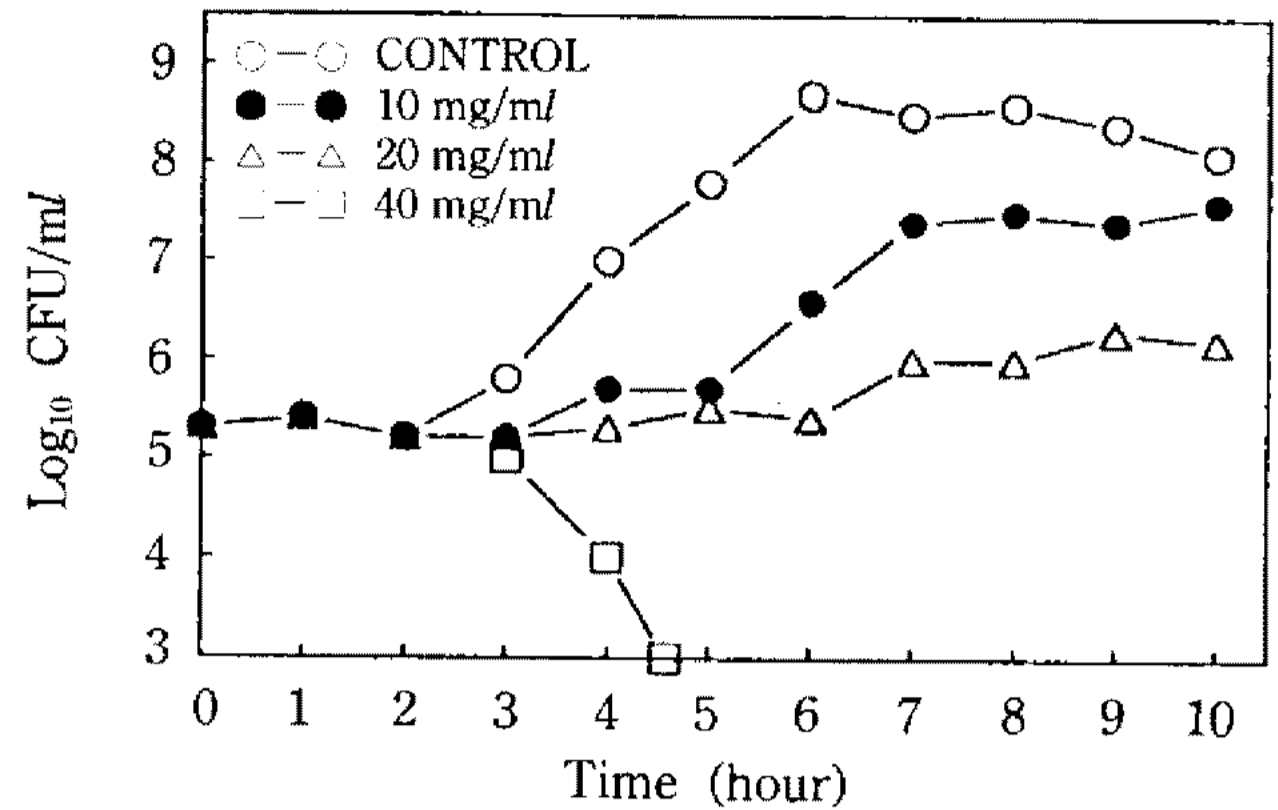


Fig. 3. Antibacterial effect of the extract of *Ulmus pumilla* L. on growth of *E. coli*.

서서히 생균수가 증가하는 양상을 보였다.

*B. subtilis*는 MIC보다 낮은 농도의 추출물을 함유한 배지에서는 균수가 증가하였고, 높은 농도인 10~20 mg/ml의 추출물을 함유한 배지에서는 농도에 관계없이 2시간 경과한 이후의 생균수는 급격히 줄었으나 배양 10시간 경과 시까지도 계속 생균 수가 검출이 되었는데 이는 *B. subtilis* 자체의 spore의 외부 환경변화에 대한 내성 때문인 것으로 보여진다.

특이하게도 *K. pneumoniae*에 대하여서는 농도에 따른 약간의 차이는 있으나 유백피 추출물이 거의 증식에 영향을 미치지 못하였다.

*E. coli*에 대하여서는 MIC 값보다 낮은 농도에서는 추출물의 농도에 따라 전체적인 생균의 수에 차이는 있지만 비교적 정상적인 증식 곡선을 나타내었다.

### 열 안정성

Cation exchanger인 CM Sephadex C-50으로 분획을 얻어 각 균에 대한 항균력을 측정 한 결과 column을 통과시킨 30개의 분획 중에서 3번부터 8번까지의 분획에서 항균력이 확인되었다(Fig. 4). 또한 각 분획의 흡광도를 측정 한 결과 유백피 추출물 중에 포함된 색소 물질은 비교적 빠른 속도로 column을 통과하여 column을 일찍 통과한 분획에 다량 분포되었는데 색소 물질과 항세균력과는 상관 관계가 없었다. 또한 MHA 배지에서 *B. subtilis*와 *S. aureus*에 대하여 원통 평판 확산법으로 각각 상이한 농도의 추출액에 의한 억제환의 크기를 측정하고, 열 처리한 추출액으로 동일한 방법으로 억제환의 크기를 측정하여 비교한 결과, 별다른 차이점을 발견할 수 없었으므로 유백피 추출물 중의 항세균성 물질은 열에

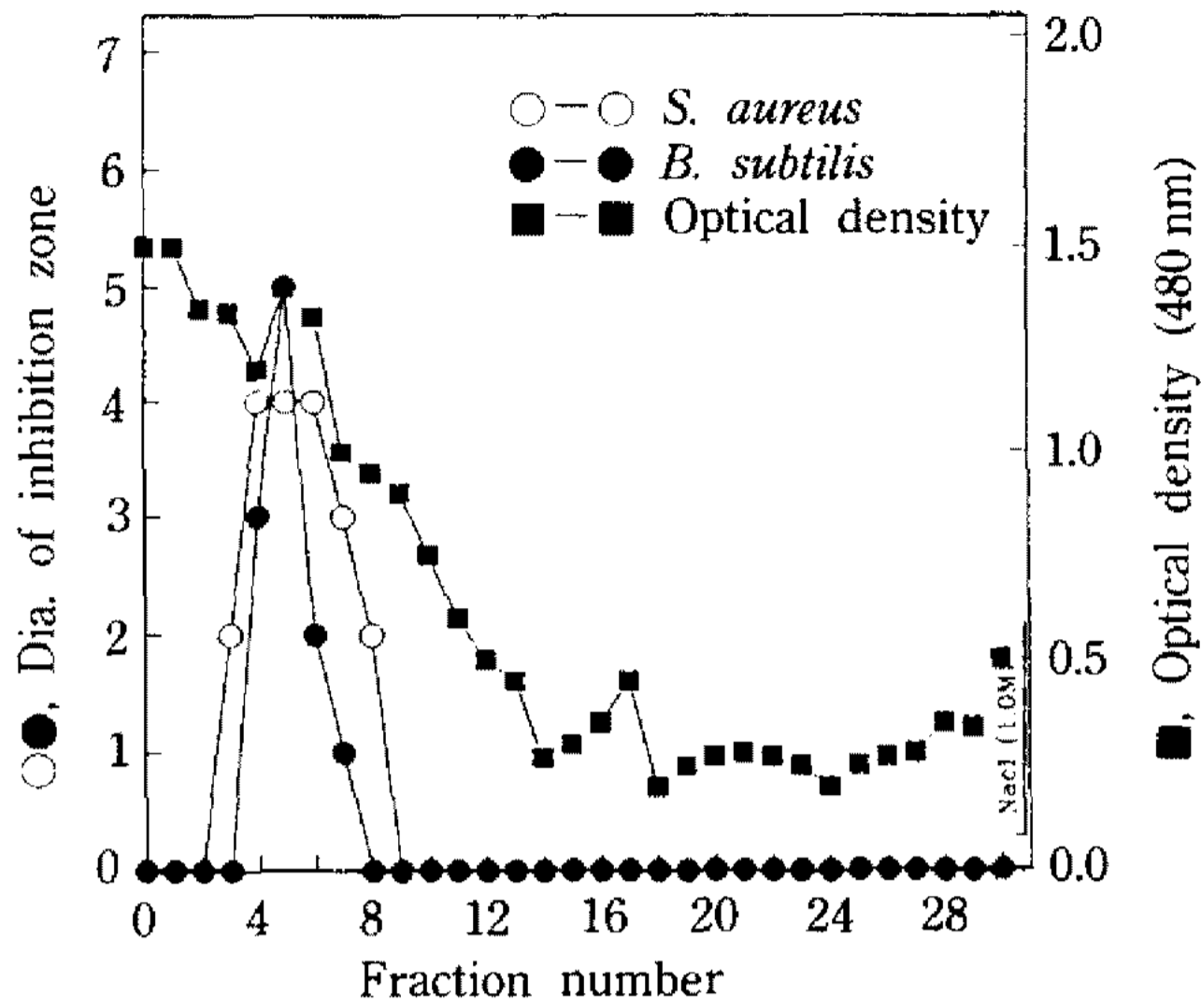


Fig. 4. Inhibition activity of each fraction of the extract separated by the CM-Sephadex C50.

대하여 매우 안정한 것으로 판단된다.

### 요 약

유백피 추출물의 항세균 효과를 측정하기 위해 각각 다른 농도의 추출물을 함유한 배지에서 MIC를 측정하고, 증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같았다.

이 추출물은 실험에 사용된 세균 중 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. faecalis*, *B. subtilis*, *M. luteus*와 같은 그람 양성균 및 *E. coli*, *S. typhi*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*와 같은 그람 음성균에서 높았고, *K. pneumoniae*에 대해서는 항균력을 나타내지 않았다. 이 추출물 중의 항세균 효과를 가진 물질은 121°C에서 20분간 멸균한 후에도 항세균 효과에는 별다른 변화가 없었다.

### 참고문헌

1. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주. 1988. 한국 유용식물 자원 연구 총람, pp. 2-3. 한국화학연구소, 대전.
2. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주. 1988. 한국 유용식물 자원 연구 총람, pp. 215-226. 한국화학연구소, 대전.
3. 한성순, 김수영, 유일준. 1986. 한국산 천연약품 자원에 관한 연구(IV). hesperidin 및 그 유도체의 항균작용. 충북대학교 약학논문집 1: 42-47.
4. 김영훈, 신길구, 김재성, 배원식. 1988. 國譯增補 東醫寶鑑(허준 원저. 1814. 동의보감. 完營 重刊 木板本の 한국 개역판), pp. 81, 188, 211, 943, 1004. 남산당, 서울.
5. 문화방송 편집국. 1987. 한국 민간요법 대전, pp. 168-171. 금박출판사, 서울.
6. 김재길. 1984. 원색 천연약물 대사전, 하권, pp. 171, 남산당, 서울.
7. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주. 1988. 한국 유용식물 자원 연구 총람, pp. 2. 한국화학연구소, 대전.
8. 보건사회부. 1987. 대한약전, p. 19. 한국 메디칼 인덱스사, 서울.
9. Anderson, T.G. 1970. Antimicrobial agents (Section IV), pp. 299-303. In J.E. Blair., E.H. Lennette and J.D. Truont (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Benson, H.J. 1990. *Microbiological applications, A Laboratory Manual in General Microbiology*. pp. 136-137. 5th ed. W.C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
11. Anderson, T.G. 1970. Antimicrobial agents (Section IV), pp. 303-308. In J.E. Blair., E.H. Lennette and J.D. Truont (ed.), *In Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1989. *Short Protocols in Molecular Biology*, pp. 310-314. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

(Received October 22, 1991)

1. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주. 1988. 한국