Korean Chem. Eng. Res., 51(5), 536-539 (2013)
http://dx.doi.org/10.9713/kcer.2013.51.5.536

황벽나무, 두충나무 등을 포함하는 복합수목추출물의 항균활성 및 안전성 시험

김현우 · 신혜진 · 황단비 · 이지은 · 박만춘 · 김진홍* · 김동욱†

인제대학교 제약공학과
621-749 경남 김해시 어방동 607
*바이오메틱스
621-749 경남 김해시 어방동 인제대학교 성산관 F-1006
(2013년 5월 22일 접수, 2013년 6월 23일 수정본 접수, 2013년 7월 2일 채택)

Antimicrobial Activity and Safety Test of Mixed Plant Extracts Including *Phellodendron Amurense and Eucommia Ulmides Oliv.*

Hyunwoo Kim, Hyejin Shin, Danbi Hwang, Jieun Lee, Manchun Bak, Jinhong Kim* and Donguk Kim†

Department of Pharmaceutical Engineering, Inje University, 607 eobang-dong, Gimhae-si, Gyongnam 621-749, Korea
**Biometics, F-10, Sungsan-building, Inje University, eobang-dong, Gimhae-si, Gyongnam 621-749, Korea*
(Received 22 May 2013; Received in revised form 23 June 2013; accepted 2 July 2013)

요 약

본 연구에서는 황벽나무, 두충나무 등을 포함하는 복합수목추출물의 항균활성 효과 및 안전성에 대해 검토하였다. 항균활성은 피부상재균이며 기회 병원성균인 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* 및 *Candida albicans*에 대해 disc 확산법으로 실험되었다. 안전성 시험으로는 단회 경구투여 독성시험, 단회투여 흡입독성시험, 반복투여 흡입독성시험이 실시되었다. 항균력효과시험 결과 추출물은 *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans*에 대해 우수한 항균활성을 보여주었으나, *Escherichia coli*에서는 항균활성이 없었다. 복합수목추출물의 단회 경구투여 독성시험, 단회투여 흡입독성시험 및 반복투여 흡입독성시험의 결과 독성은 관찰되지 않았다. 따라서 황벽나무, 두충나무 등을 포함한 복합수목추출물은 천연 항살균제로서 상업화 가능성이 매우 높음을 알 수 있었다.

Abstract – In this study, mixed plant extracts including *Phellodendro namurense* and *Eucommia ulmides Oliv* were tested for antimicrobial activity and safety. Antimicrobial activity was measured by disc diffusion method using normal skin flora and opportunistic microbes such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* and *Candida albicans.* As safety test, single dose oral toxicity test, single dose inhalation toxicity test and repeat dose inhalation toxicity test were done. From antimicrobial test, plant extracts showed significant antimicrobial activity *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans,* however, did not indicate any antibacterial effect on *Escherichia coli.* From 3 kinds of safety tests, toxicity of mixed plant extracts was not observed. From experimental results, mixed plant extracts including *Phellodendro namurense* and *Eucommia ulmides Oliv* showed good potential for natural antimicrobial agent.

Key words: *Phellodendro Namurense, Eucommia Ulmides Oliv.,* Antimicrobial Activity, Safety

1. 서 론

현재 가정 내 세균이나 곰팡이가 악취와 오염의 원인이 되고 있고 이를 제거하기 위해 많은 항균제나 곰팡이 제거제가 사용되고 있다. 보통 항균제나 곰팡이 제거제, 방향제 등은 유기계, 무기계, 천연계의 3가지 종류로 나뉘어진다. 유기계는 소독 및 살균 효과는 좋으나 지속시간이 짧으며, 대표적으로 포름알데히드가 있다. 무기계는 은이나 구리 등 중금속 계가 있으며 안전성도 비교적 높으며 효과 지속시간도 길다. 하지만 항균면에서 볼 때는 은이나 구리의 이온이 세포막의 단백질을 변성시키게 되므로 곰팡이 방지의 효과는 약하다고 볼 수 있다. 그에 비해 천연계는 항균과 곰팡이 방지의 효과가 있고 무엇보다 안전성이 뛰어나다는 장점이 있다[1]. 2011년도에 발생한 가습기 살균제로 인한 피해 사건들도 유기계 가습기 살균제로 인한 폐질환 등이 사회적으로 큰 문제를 야기하였다[2]. 따라서 안전성이 우수한 천연 항살균 소재에 대한 연구개발의 필요성이 증가하고 있다.

황벽나무(*Phellodendro namurense*)는 낙엽교목으로서 높이는 10 m 정도이다. 나무껍질은 코르크가 발달하고 회색이며 깊게 갈라진다. 낙엽교목으로 전남을 제외한 우리나라 전역에 분포하며 중국

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: pedkim@inje.ac.kr

북부, 만주, 일본 북해도에서 히로시마까지 분포하고 있다[3]. 수피와 열매는 살균작용이 있어 장티푸스, 콜레라, 당뇨의 치료 및 건위제, 정장제 등으로 많이 쓰이는 다용도 특용수종이다. 황벽나무의 속껍질은 국민 건강에 기여하는 생약제로 쓰이는 나무로 90년대 중반부터 조림수종으로 장려하고 있다[4].

두충나무(*Eucommia ulmides Oliv.*)는 낙엽교목으로 잎은 호생하며 맥 위에는 잔털이 있고, 열매는 편평한 긴 타원형이고 자르면 고무 같은 점질의 실이 나오며, 가지, 잎에도 점질이 함유되어 있다. 한방에서 두충은 간(肝)과 신(腎)을 보하고, 힘줄과 뼈를 튼튼하게 하며, 항균 및 살균력이 탁월한 것으로 나타나 있다[5].

녹차(Green tea)는 발효시키지 않은 찻잎을 사용해서 만든 차를 말한다. 녹차에는 비타민 C와 폴리페놀(polyphenol)이 풍부하며 항산화작용, 콜레스테롤 제거효과, 혈압상승 억제작용, 항암효과 등을 갖고 있어 오늘날 현대인들의 성인병예방에 좋은 식품이다[6]. 귀룽나무(*Prunus padus* L.)는 벚나무류에 속하고 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본, 유럽 지방에 분포하는 낙엽활엽교목으로 키 15 m, 직경 80 cm까지도 자라며 습기가 많은 계곡 주위 음지에서 잘 자란다. 추위에 강하며 생장도 빠르고 다양한 약용으로도 사용될 수 있다. 흰털귀룽나무와 서룽귀룽나무가 거풍, 진통, 지사의 효능이 있다고 알려져 있다[7].

본 연구에서는 황벽나무, 두충나무, 녹차 및 귀룽나무 등을 포함하는 수목추출물에서 항균력 시험 및 안전성 시험을 실시하여 천연 항살균제로서의 가능성을 조사하고자 하였다.

2. 실 험

2-1. 소재의 획득 및 항균력 시험

본 연구에서 사용한 수목추출물은 바이오메틱스에 의해 제공되었으며 황벽나무, 두충나무, 녹차 및 귀룽나무 등의 껍질을 건조 후 분쇄, 열수추출 및 숙성을 과정을 거쳐서 제조되었다. 이 과정에서 유효 물질의 성분 파괴를 최소화하고 유효성분을 고농도로 획득하기 위해 역삼투 및 초음파 추출법을 사용되었으며, 3종의 추출물이 최종적으로 시험되었다. 수목추출물 A의 조성은 황벽나무추출물 3%, 두충나무추출물 6%, 귀룽나무추출물 3%, 녹차추출물 8% 및 기타추출물 15%로 이루어져 있고, 수목추출물 B는 황벽나무추출물 2%, 두충나무추출물 6%, 귀룽나무추출물 3%, 녹차추출물 7% 및 기타추출물 12%로 이루어져 있으며, 수목추출물 C는 황벽나무추출물 4%, 두충나무추출물 5%, 귀룽나무추출물 2%, 녹차추출물 5% 및 기타추출물 14%로 이루어져 있다.

항균력 시험은 피부에 상재하며 기회병원성을 일으키는 *Staphylococcus aureus*(포도상구균, 그람양성균), *Pseudomonas aeruginosa*(녹농균, 그람음성균), *Escherichia coli*(대장균, 그람음성균)의 세균과 *Candida albicans*(효모, 진균)에 대해 실험을 실시하였다[8]. 항균력 시험은 원판확산법(disc diffusion method)을 사용하였다[9,10]. A추출물, B추출물, C추출물 각각 100% 75% 50% 와 양성 대조군으로 페니실린을, 음성대조군으로 증류수를 사용하였다. TSA (Tryptic Soy Agar) 배지에 각각의 1 ml씩 균을 분주하여 건조시킨 후, 종이원판을 균을 건조시킨 plate에 배치 후 각각의 대조군과 추출물 20 μl를 분주하였다. 37 ºC에서 24시간 동안 배양 후 종이원판 주위에 생성된 clear zone (투명환, mm)의 직경을 측정하여 항균력을 평가하였다.

2-2. 안전성 시험

안전성 시험은 단회 경구투여 독성시험, 단회투여 흡입독성시험, 반복투여 흡입독성시험을 실시하였으며, 식품의약품안전처 의약품 등의 독성시험기준에 따라 시험되었다[11,12]. 단회 경구 투여 독성시험은 생후 6주령의 ICR Rat을 10마리 구입하여 실험군 5마리, 대조군 5마리로 각각 분류하였다. 모든 Rat은 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 시험 당시 실험군, 대조군 동물들의 평균 무게는 200 g 이었으며 100% 농도의 A추출물 2 mL를 5마리의 실험군에 각각 경구 투여 하였다. 투여 후 일정량의 사료와 물을 섭취시키고 14일간 몸무게 측정과 상태변화를 관찰하였다.

단회투여 흡입 독성시험은 생후 6주령의 ICR Rat을 16마리 구입하여 100% A추출물 실험군 4마리, 80% A추출물 실험군 4마리, 비투여 대조군 4마리로 분류하였다. 모든 Rat은 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 시험 당시 실험군, 대조군 동물들의 평균무게는 195 g 이었으며 각각 50 mL의 100%, 80% A추출물을 4시간 동안 흡입챔버를 통해 흡입투여 하였다. 흡입투여 후 일정량의 사료와 물을 섭취시키고 7일간 몸무게 측정과 상태변화를 관찰하였다.

반복투여 흡입독성시험은 생후 6주령의 ICR Rat을 5마리 구입하여 100% A추출물 실험군 5마리로 실험하였다. 모든 Rat은 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 시험 시작 당시 Rat 들의 평균무게는 212 g이었으며 100% A추출물을 하루 6시간 90일 간 흡입투여 하였다. 자동분사기를 이용하여 15분마다 분사 되었으며 하루 총 분사량은 약 5~6 mL이었다. 일정량의 사료와 물을 섭취 하도록 하고 하루 6시간 흡입투여 후 매일 무게측정 및 상태변화를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

복합 수목추출물에 대한 항균력 시험은 원판확산법을 사용해 측정하였으며 수목추출물 A의 *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Candida albicans*에 대한 항균력 실험결과가 Fig. 1과 Table 1에 나타나있다. 위 실험에서 양성대조군으로 Penicillin이, 음성대조군으로는 증류수가 사용되었다. 추출물 A의 항

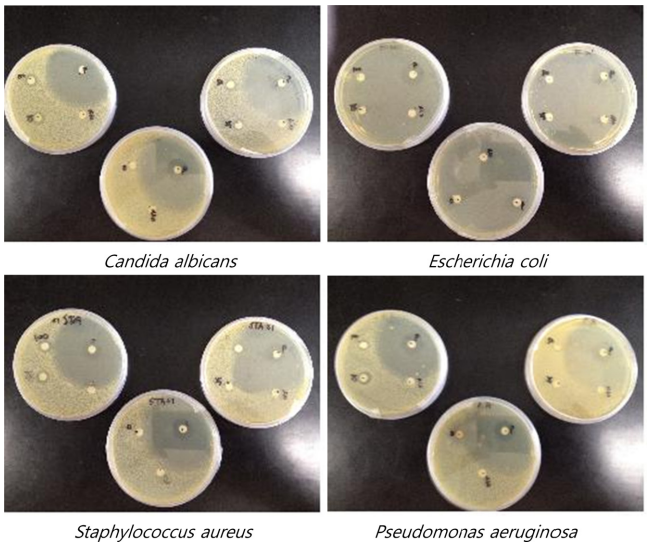

Fig. 1. Antibacterial effect of mixed plant extracts A by disc diffusion method.

Table 1. Antibacterial effect of mixed plant extracts A (unit: mm), disc size=6 mm

	Candida albicans	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*
Penicillin	64	18	56	52
Deionized water	6	6	6	6
Extracts 100%	14	6	10	10
Extracts 75%	10	6	8	10
Extracts 50%	8	6	8	7
Extracts 25%	7	6	7	7
Extracts 10%	6	6	6	6

Table 2. Antibacterial effect of mixed plant extracts B (unit: mm), disc size=6 mm

	Candida albicans	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*
Penicillin	56	18	60	56
Deionized water	6	6	6	6
Extracts 100%	10	6	16	12
Extracts 75%	7	6	14	11
Extracts 50%	6	6	6	7
Extracts 25%	6	6	6	6
Extracts 10%	6	6	6	6

Table 3. Antibacterial effect of mixed plant extracts C (unit : mm), disc size=6 mm

	Candida albicans	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*
Penicillin	54	16	50	54
Deionized water	6	6	6	6
Extracts 100%	12	6	12	8
Extracts 75%	7	6	7	7
Extracts 50%	7	6	6	6
Extracts 25%	6	6	6	6
Extracts 10%	6	6	6	6

균활성은 *Candida albicans*에 대해 농도 의존적으로 증가하였으며 100% 원액에서 통상의 천연물질과 비교 시 우수한 항균활성을 보여주었다[13,14]. *Candida albicans*는 피부에 상재하는 기회병원성 진균으로 피부에서 칸다다증, 질염 등 다양한 질환을 일으킨다. 추출물 A는 이외에도 *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*에 대해서도 약간의 항균활성을 보여주었으나, *Escherichia coli*에 대해서는 항균활성이 없었다.

복합 수목추출물 B의 경우에는 *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균활성이 보통의 천연물질에 비해 우수하였다. 반면 *Candida albicans*에 대해서는 약한 활성을 보여주었고, *Escherichia coli*에 대해서는 항균활성이 없었다.

복합 수목추출물 C의 경우에는 *Staphylococcus aureu*와 *Candida albicans*에 대해 통상의 천연물질과 비교 시 우수한 항균활성을 나타내었다. 따라서 수목추출물이 포함된 탈취제를 제조할 경우 환경에 따라 다양한 조성을 사용하면 각 경우에 맞는 최적의 항균활성을 제공할 수 있다.

항균, 살균제로서의 안전성을 알아보기 위하여 수목추출물 A를 사용하여 단회 경구투여 독성시험, 단회투여 흡입독성시험, 반복투여 흡입독성시험을 실시하였다. 단회 경구투여 독성시험은 수목추출물 A 100% 농도 2mL를 5마리의 실험동물에 경구투여하였다. 시험 후 14일간의 경과 관찰 기간 동안 실험군의 무게는 11% 증가하였고 대조군은 12% 증가하였다. 또한 위 경과 기간 동안 실험군에서 특별한 이상 증후 및 사망개체는 발생하지 않았다. 따라서 단회 경구투여 독성시험 결과 수목추출물 A는 독성이 나타나지 않았다(Table 4).

Table 4. Single dose oral toxicity test of mixed plant extracts A (Unit: mice weight g)

	Experimental group		Control group	
	Day0	After 14 days	Day0	After 14 days
Rat1	210	229	188	216
Rat2	186	227	196	222
Rat3	195	220	195	218
Rat4	206	223	202	223
Rat5	208	220	208	225
Average	201	224(+11%)	198	221(+12%)

살균제나 항균제는 주로 스프레이 형태로 만들어져서 사용되기 때문에 흡입독성에 대한 문제가 발생할 수 있으며 그에 대한 안전성시험으로 단회 흡입 및 반복 흡입독성 시험을 실시하였다. 단회투여 흡입독성시험은 복합수목추출물 A의 농도 100%, 80% 및 비투여대조군을 대상으로 실험하였으며 모든 Rat은 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 시험 당시 실험군, 대조군 동물들의 평균무게는 195 g 이었으며 각각 50 mL의 100%, 80% A추출물을 4시간 동안 총 15 mL을 챔버 안에서 흡입투여하였다.

흡입투여 후 7일간 몸무게 측정과 상태변화를 관찰한 결과 수목추출물 100%, 80% 투여 시험군은 대조군과 비교했을 때 몸무게의 차이가 없었으며 특이사항 및 사망개체는 발생하지 않았다(Table 5). 따라서 복합수목추출물 A는 단회투여 흡입독성시험 결과 독성이 나타나지 않았다.

Table 5. Single dose inhalation toxicity test of mixed plant extracts A (Unit: mice weight g)

		Extracts100% group	Extracts 80% group	Control group
0 day	Rat1	256	227	229
	Rat2	245	226	227
	Rat3	259	258	220
	Rat4	245	218	223
	Average	251	232	225
7 day	Rat1	255	229	233
	Rat2	245	225	223
	Rat3	249	267	218
	Rat4	247	221	233
	Average	249(-1%)	236(+2%)	227(+1%)

Fig. 2. Repeat dose inhalation toxicity test of mixed plant extracts A.

반복투여 흡입독성시험은 복합수목추출물 A의 농도 100%를 실험군 5마리 대상으로 실험하였으며 모든 Rat은 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 복합수목추출물 A의 100% 농도를 하루 6시간 총 90일간 흡입투여하였다. 자동 분사기를 이용하여 15분마다 한번씩 분사가 이루어 졌으며 하루 총 분사량은 약 5~6 mL이었다. 매일 6시간 흡입 후 실험동물들의 무게를 측정하고 90일 동안 실험동물들의 행동 및 이상징후를 관찰한 결과 실험군의 몸무게에서 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으며 이상 징후 및 사망개체도 없었다 (Fig. 2, Table 6). 따라서 반복투여 흡입독성시험 결과 복합수목추출물은 독성이 나타나지 않았다.

현재 가정용 항균, 항균제품, 소취, 탈취제제품으로는 세계적으로 방향, 소취, 탈취 및 제균 기능 갖춘 다기능제품 속속 등장하고 있다. 방향 등은 단일기능 제품보다는 다기능 제품이 주목을 받고 있으며, 단순히 향기만을 발산하는 방향제 제품이 아니라 냄새를 효과적으로 제거하거나 완화하는 소취제 기능을 겸비한 방향, 소취제라는 새로운 상품 카테고리가 등장하였다. 그러나 시중에 판매되고 있는 유기계, 무기계 살균제는 효능은 우수하였으나 안전성에 심각한 문제가 있어서 그 대체제의 개발이 절실히 요구된다. 본 연구 결과 황벽나무, 두충나무 등이 포함된 복합수목추출물은 *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans*에 대해 우수한 항균력을 가지고 있었으며, 또한 단회 경구투여 독성시험, 단회투여 흡입독성시험 및 반복투여 독성시험의 결과에서도 안전성이 확인되어 차후 스프레이 제형의 우수한 항균탈취제로서 상업화가 가능할 것으로 기대된다.

Table 6. Repeat dose inhalation toxicity test of mixed plant extracts A (Unit: mice weight g)

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Average
0 day	220	211	221	183	228	212.6
30 day	210	205	211	168	215	201.8(-5%)
60 day	231	220	228	182	226	217.4(+2%)
90 day	244	224	232	191	240	226.2(+6%)

4. 결 론

본 연구에서는 황벽나무, 두충나무 등을 포함한 복합수목추출물에서 항균력시험과 안전성 시험을 실시하여 항살균제로서의 이용가능성을 검토하였다. 항균력효과시험 결과 추출물은 *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*에 대한 우수한 항균활성을 보여주었다. 복합수목추출물의 단회 경구투여 독성시험, 단회투여 흡입독성시험 및 반복투여 흡입독성시험의 결과 독성은 관찰되지 않았다. 따라서 황벽나무, 두충나무 등을 포함한 복합수목추출물은 안전한 천연 항살균제로서의 응용가능성이 매우 높음을 알 수 있었다.

감 사

이 논문은 2012년 중소기업청 산학연공동기술개발사업(주관기관 인제대 산학협력단)의 지원으로 수행되었습니다.

References

1. Korea Institute of Science and Technology Information, www.kisti.re.kr.
2. Ministry of Health and Welfare, www.mw.go.kr.
3. Pharmacognosy Researchers, Modern pharmacognosy, Hak Chan publishing, Seoul(2000).
4. http://www.nongup.gyeonggi.kr.
5. Park, J. C., Functional Food and oriental Medicine, Hyoilbooks, Seoul(2007).
6. Korea forest service, www.forest.go.kr.
7. Jung, D. H., Yoon, B. H. and Lee, Y. H., Encyclopedia of Tea life Culture(2012).
8. KDA Textbook Editing Board, Dermatology, 5th Ed., Ryo Moon Gak, Seoul(2008).
9. Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., Official Methods of Analysis, 15th ed., Washington D.C.(1990).
10. Kim, G. E., Kim, J. H., Hong, S. K., Kim, T. and Kim, D., "Anti-acne and Anti-atopic Dermatitis Effect of Plant Extracts Including *Eucommia Ulmoides Oliv* and *Phellodendron Amurense*," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **48**, 700-703 (2010).
11. Korea Food and Drug Administration, http://www.mfds.go.kr/index.jsp.(2013).
12. Kim, T., Kim, S., Kang, W. Y., Baek, H., Jeon, H. Y., Kim, B.Y., Kim, C. G. and Kim, D., "Porcine Amniotic Fluid as Possible Antiwrinkle Cosmetic Agent,"*Korean J. Chem. Eng.*, **28**, 1839-1843(2011).
13. Boo, H. C., Shin, J. S., Hwang, S. J., Bae, C. S. and Park, S. H., "Antimicrobial Effects and Antioxidative Activities of the Cosmetic Composition Having Natural Plant Pigments," *Korean J. Plant Res.* **25**, 80-88(2012).
14. Singh, G. S. and Pandeya, S. N., "Natural Products in Discovery of Potential and Safer Antibacterial Agents," *Research Signpost*, **37**, 63-101(2011).