

## 원산지별 감초 추출물의 항균 활성 비교 및 천연방부제로서의 효능 연구

김혜진, 배정윤, 장하나, 박수남\*

서울과학기술대학교 정밀화학과, 나노바이오화장품연구실, 화장품종합기술연구소

Received : July 26, 2013 / Revised : August 26, 2013 / Accepted : August 27, 2013

**Comparative Study on the Antimicrobial Activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* Extracts with Various Countries of Origin as Natural Antiseptics.** Kim, Hye Jin, Jeong Yun Bae, Ha Na Jang, and Soo Nam Park\*. *Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic Laboratory, and Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea*

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activities of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts with various countries of origin. Three samples of licorice with various origins (Korea, China, and Uzbekistan) were evaluated for their antimicrobial activities against six skin microflora. The bioassay applied for determining the antimicrobial effects included the disc diffusion assay, minimum inhibitory concentration, and challenge test. The ethyl acetate fractions of *G. uralensis* and *G. glabra* extracts showed significant antimicrobial activities against two gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*) and two gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. These samples had much more intensive antimicrobial activities than synthetic preservatives on *B. subtilis*, *P. acnes*, and *P. aeruginosa*, especially. Korean licorice showed the highest antimicrobial activity amongst the samples tested. In view of the observed inhibitory features of these *G. uralensis* and *G. glabra* extracts, it is suggested that they could be used as natural antiseptics against bacterial contamination in cosmetics and foods, instead of the common synthetic preservatives currently employed.

**Keywords:** *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, antimicrobial activity, natural antiseptics

### 서 론

피부는 외부 자극으로부터 신체를 보호하는 기관으로, 화학적, 물리적, 생물학적 피부 장벽기능을 통한 체온 조절 작용, 에너지 저장 작용, 분비 및 흡수 작용, 비타민 D 합성 등의 많은 역할을 수행하고 있다. 반면 지속적인 스트레스 및 외부로부터의 자극에 반복하여 노출될 경우 1차적으로 가장 손상 받기 쉬운 부분이기도 하다. 피부에 영향을 미치는 요인으로는 세균, 곰팡이, 바이러스와 같은 생물학적 원인, 자외선, 외상 같은 물리적 원인, 내인성, 외인성 화학물질에 의한 화학적 원인, 항원, 항체 반응에 관여되는 면역학적 원인으로 크게 구별된다[10, 16]. 특히 피부는 피부 상재균에 의해서 많은 피부질환이 발생할 수 있다. 피부에 염증을 유발하는 피부 상재균주로는 대표적으로 그람 양성균은 *Staphylococcus*

*aureus*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*가 존재하며, 그람 음성균은 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas aeruginosa*가 있으며 지루성 피부염과 비듬을 유발하는 효모균인 *Pityrosporum ovale* 등이 있다[14]. *S. aureus*는 직경이 0.5~1.5  $\mu\text{m}$  정도의 황색 구균으로 불규칙적인 포도송이 형태를 이루며 코, 피부, 겨드랑이나 회음부에서 존재한다. 그리고 피부의 상처를 통해서 화농을 일으키며, 피부 표면의 부스럼, 종기의 원인균이다. 아토피 피부염의 1차 요인일 뿐만 아니라 2차 요인으로서 피부 모공이 감염되거나, 땀샘이 막힌 상태에서의 감염, 상처에 침입하여 발병하며 정상인은 10% 이내인 반면, 아토피 환자의 90%가 피부에서 발견되고 있다. *P. acnes*는 여드름의 주 원인균으로 혐기성 세균이며 피부 안쪽 또는 피지선에 존재하고 청소년기 호르몬 활동이 증가하면 피지선의 분비가 활발할 때 번창한다. *P. acnes*가 리파아제를 분비하여 수지를 분해하면 많은 양의 글리세롤과 지방산이 생기고, 이를 영양분으로 *P. acnes*는 엄청난 수로 증가하고, *P. acnes*의 대사산물에 의해 부분적으로 염증이 생기고 여드름이 발생한다[11, 17]. *B. subtilis*는 결막염

#### \*Corresponding author

Tel: +82-2-970-6451, Fax: +82-2-972-9585

E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

의 원인균이며 이러한 염증에 스테로이드제를 사용하는데 피부 위축, 구순 주위 피부염, 자반증, 간 손상 등 부작용을 야기하며 또한 비스테로이드성 소염제라 할지라도 위장관 손상의 부작용이 있다[7].

화장품에는 다량의 물이 함유되어 있어 세균이나 곰팡이에 의한 오염이 일어나기 쉽다. 미생물이 오염된 제품은 향취이상, 색상변화, 점도변화, 곰팡이 발생 등의 품질 저하 현상을 나타낼 뿐만 아니라 각막괴양과 같은 심각한 안질환 등 인체에 유해한 질병을 유발할 수도 있다[4]. 이 같은 이유로 화장품은 다양한 미생물에 의한 변질을 방지하고 제품의 품질을 오랫동안 유지하기 위해서 방부제가 필수적이다. 기존의 방부제로서 화장품, 의약품에 범용적으로 파라벤류가 사용되었는데 파라벤은 파라옥시안식향산 에스테르로 명명된 알킬기에 따라 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 부틸 파라벤 등이 있고 땀 냄새 제거제, 발한 억제제, 토너, 크림 등 수 많은 화장품에 방부제로 첨가되는 원료다[12, 15].

최근 영국에서 발표한 연구결과에 따르면 유방암 세포에서 파라벤의 농도가 정상인들에 비해 월등히 높음을 확인하여 파라벤이 체내의 세포조직 내부에 축적될 수 있다고 보고 되었다[3]. 또한 파라벤이 여성호르몬의 일종인 에스트로겐과 유사한 작용을 수행할 수 있어 파라벤이 내분비계를 교란하는 장애물질로 작용할 수도 있다는 의견도 있다[1, 9, 13, 15].

천연 항균물질에 관한 연구는 정유, 향신료, 한약재 등과 alkaloid, flavonoid, phytoalexin, 항균 펩타이드 등이 보고 되어 있다[2, 8]. 하지만 제품의 안전성과 경제성을 향상시킬 수 있는 보다 진보된 천연 방부제의 개발이 요구되고 있다.

본 연구에 앞서 저자들은 한국산 감초 추출물의 항산화, 항노화, 세포보호 효과를 중국산 감초와 우즈베키스탄 감초에 대하여 비교 분석하여 이미 보고한 바 있다[5]. 상기 보고된 논문에서 한국산 감초 추출물이 자유 라디칼(1,1-phenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성에서 중국산 감초 추출물 및 우즈베키스탄 감초 추출물과 비교해서 매우 우수함을 확인하였고, 또한 광노화에 있어서 중요한 활성산소인  $^1O_2$ 으로 유도된 세포막 손상에 대한 보호효과가 한국산 감초 추출물이 매우 우수함을 확인하였다. 즉, 감초 추출물 중 아글리론 분획(10  $\mu\text{g/ml}$ )에 대한 실험에서 한국 감초( $\tau_{50} = 847.4$  min)가 동일한 종인 중국 감초( $\tau_{50} = 194.3$  min)보다 약 4배나 더 큰 세포보호 활성을 나타내었다. 이상의 결과를 통해 수입산 감초 추출물과 비교해서 한국산 감초 추출물에 우수한 항산화 활성과 세포보호 활성이 있음을 확인하였다. 저자들은 한국산 감초 추출물 함유 크림을 제조하고 그 안정성을 확인하였다[6]. 이 논문에서는 한국산 감초 추출물을 화장품에 이용할 목적으로 온도별 저장 조건 및 태양광선하에서 감초 추출물의 분획물 함유 크림의 pH, 점도, 흡광도 및

색도의 변화를 측정하여 제형 안정성을 확인한 바 있다. 따라서 한국산 감초 추출물이 천연 항산화제로서 화장품 원료로 이용할 때 제형상에서 안정하며 제품화가 가능하다고 판단되었다.

본 연구에서는 원산지별 감초 추출물의 항균활성 비교를 통해 한국 감초 추출물의 우수한 항균력을 확인하였다. 또한 화장품의 방부제로 기존에 널리 사용되었던 파라벤류의 단점을 보완할 수 있는 천연방부제를 개발하기 위하여 한국 감초 추출물을 함유한 크림과 메틸 파라벤을 함유한 크림의 방부능을 비교하여 한국 감초가 천연방부제로써 화장품 원료로 이용 가능한지를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 기기 및 시약

본 연구에서 사용된 에탄올, 에틸아세테이트, 헥산, DMSO 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 감초추출물의 항균 활성 비교물질로 화장품방부제인 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 1,2-hexanediol은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 원산지별 감초의 분획 및 추출

본 연구에서 사용된 한국(충북 제천), 중국, 우즈베키스탄 감초는 경동시장 약업사를 통해 한약재로 판매되는 원료를 구입하였다. 100 g의 건조된 감초를 1 L의 50% 에탄올 용액에 24시간동안 침적시킨 후 여과한 여액을 감압 및 건조하여 50% 에탄올 추출물 파우더를 얻었다.

에틸아세테이트 분획을 만들기 위해, 50% 에탄올 추출물을 감압·농축한 후 헥산을 이용하여 염록소 등의 비극성 성분을 제거하였다. 이후 에틸아세테이트로 추출한 분획을 감압 및 건조하여 파우더를 얻은 다음 실험에 사용하였다.

2가지 형태의 감초 추출물(50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획)은 모두 화장품의 원료로 이용 가능한 형태의 추출물로서 이들의 항균활성을 측정하여 그 응용 가능성을 검토하였다.

### 원산지별 감초 추출물의 항균활성 측정

**사용균주:** 본 실험에 사용된 균주는 피부 상재균으로써, 그람 양성균주 3종, 그람 음성균주 2종 및 효모균 1종으로 총 6종의 균주이며, 여드름의 원인균인 *P. acnes* ATCC6919와 비듬균인 *P. ovale* ATCC12078, 호기성 그람 양성균주인 *S. aureus* ATCC6538, *B. subtilis* ATCC19659, 호기성 그람 음성균주인 *E. coli* ATCC23736, *P. aeruginosa* ATCC29336를 한국 미생물 보존센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였다.

**배지 및 배양조건:** *P. acnes*의 배양 배지는 Reinforced

**Table 1. List of strains and cultivation condition used for anti-microbial experiment.**

Strains	Media	Temperature	Time
<i>S. aureus</i> (ATCC6538)	MH <sup>a</sup>	37°C	24 h
<i>B. subtilis</i> (ATCC19659)	MH	37°C	24 h
<i>E. coli</i> (ATCC23736)	MH	37°C	24 h
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC29336)	MH	37°C	24 h
<i>P. ovale</i> (ATCC12078)	Pityrosporum medium <sup>b</sup>	30°C	72 h
<i>P. acnes</i> (ATCC6919)	RC <sup>c</sup>	37°C (CO <sub>2</sub> )	72 h

<sup>a</sup>Mueller-Hinton medium.

<sup>b</sup>Malt extract agar 6%, oxbile 2%, tween 40 1%, glycerol monooleate 0.25%.

<sup>c</sup>Reinforced clostridial medium.

clostridial(RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system(Merck Anaerocult<sup>®</sup> Gaspack system, Germany)을 사용하여 밀봉하고 37°C에서 72시간 동안 혐기성 배양하였다. 호기성 그람 양성균주인 *S. aureus*, *B. subtilis*와 그람 음성균주인 *E. coli*, *P. aeruginosa*는 Mueller-Hinton 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37°C incubator에서 24시간 배양하였다. 또한 비듬균인 *P. ovale*는 pityrosporum 배지(Malt extract agar 6%, ox-bile 2%, tween 40 1%, glycerol mono-oleate 0.25%)를 사용하였으며 균을 접종한 뒤 30°C에서 24시간 동안 배양하여 사용하였다 (Table 1).

#### Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

원산지별 감초의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 항균활성은 시험균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였다. 대조군으로는 화장품 방부제로 사용되는 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 1,2-hexanediol을 사용하였다. 배양된 균주는  $1 \times 10^7$  CFU/ml로 조절된 후 본 실험에 사용하였다. 평판배지에 배양된 각 균주를 멸균 면봉을 이용하여 100  $\mu$ l씩 도말하여 준비하였고, 시료를 disc 당 0.5, 2.5 mg이 되도록 paper disc (diamenter 8 mm, Roshi kaisha. Ltd., Tokyo, Japan)에 천천히 흡수시킨 뒤, 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시켰다. 각각의 시료가 흡수된 paper disc를 균주가 도말한 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 배양한 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

#### 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

Disc diffusion assay에서 낮은 농도(0.5 mg/disc)에서도

항균 활성을 보인 원산지별 감초의 50% 에탄올추출물 및 에틸아세테이트 분획에 대한 정확한 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위하여 agar-dilution method을 참고하여 진행하였다. 각각의 균주는  $1 \times 10^7$  CFU/ml로 조절된 후 본 실험에 사용하였다. 화장품 방부제로 사용되는 메틸 파라벤, 프로필 파라벤은 대조군으로 사용되었다. 시료는 2배 희석법을 이용하여 DMSO로 농도를 희석한 후에 사용하였다. 그 후에 시료를 2 ml씩 함유한 배지 20 ml를 Petridish에 주입하였고, 시험균을 평판배지 위에 100  $\mu$ l씩 도말하여 배양하였다. 배양 후, 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

#### 감초 추출물의 challenge test

감초 추출물의 challenge test를 시행하기 위하여 원산지별 감초의 항균활성 비교에서 우수한 항균활성을 나타낸 한국산 감초 추출물 에틸아세테이트 분획과 중국산 감초 추출물 에틸아세테이트 분획 각각 0.20%를 함유한 크림을 제조

**Table 2. Formulation of the cream containing 0.20% ethyl acetate fraction of *G. uralensis* extract.**

Component	Content (%)		
	Negative control cream	Positive control cream	Sample cream
D.W	Up to 100	Up to 100	Up to 100
Glycerine	7.0	7.0	7.0
1,3-BG	5.0	5.0	5.0
Xanthan gum (Keltrol-F)	0.1	0.1	0.1
TEA	0.2	0.2	0.2
Methyl paraben	-	0.2	-
Ceto-stearyl alcohol (Lanette-o)	2.0	2.0	2.0
Stearic acid	1.0	1.0	1.0
PEG-100 stearate (Alracel #165)	1.5	1.5	1.5
Bees wax	1.0	1.0	1.0
Glyceryl monostearate (GMS-205)	1.0	1.0	1.0
Squalane (Pripure R 3795)	8.0	8.0	8.0
Caprylic capric triglyceride	5.0	5.0	5.0
Paraffin wax	2.5	2.5	2.5
Dimethicone (Si-200/100 CS)	0.3	0.3	0.3
EtOH : 1,3-BG (1 : 4)	1.0	1.0	1.0
Ethyl acetate fraction of <i>G. uralensis</i> extract	-	-	0.20

하였고, 대조군으로 방부제를 첨가하지 않은 크림과, 메틸 파라벤 0.20% 함유한 크림을 제조하여 사용하였다(Table 2). 시험균은 감초 추출물 에틸아세테이트 분획에서 항균활성을 나타낸 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*를 사용하였고, 균 수는  $10^6$ ~ $10^7$  CFU/ml로 맞추어 크림에 접종하였다. 시험균이 접종된 크림은 37°C, 100 rpm으로 조정된 shaking incubator에서 보관하여 실험에 사용하였다. 각각의 시험균이 접종된 크림을 1 g씩 취해 멸균된 증류수로 희석하고 고체배지에 도말하여 1일 후 균 수를 측정하고, 7일 후 균 수가 처음 균 수보다 99.90% 사멸하는지를 확인하였다. 그 후 1주마다 균 수를 측정하여 4주까지 균 수를 확인하였다. 실험은 방부제의 유효성 측정에 대한 시험방법의 법규 중 CTFA법을 기준으로 시행하였다.

## 결과 및 고찰

### 원산지별 감초 추출물의 수득률

한국, 중국, 우즈베키스탄 감초 각 100 g을 50% 에탄올 1 L에 24시간 동안 침적시킨 후 여과 및 감압하여 50% 에탄올 추출물 파우더를 얻었고, 이때 수득률은 한국 감초(19.24%), 중국 감초(18.34%), 우즈베키스탄 감초(17.33%)이었다. 에틸아세테이트 분획은 50% 에탄올로 추출한 것을 헥산으로 비극성 물질을 제거한 뒤 에틸아세테이트로 분획하여 추출하였고, 감압하여 파우더를 얻었다.

원산지별 감초 추출물 에틸아세테이트 분획의 수득률은 한국 감초(2.22%), 중국 감초(2.43%), 우즈베키스탄 감초(2.07%)이었다. 에틸아세테이트 분획은 플라보노이드류를 많

이 함유하고 있으며, 본 연구에서는 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획을 실험에 사용하였다.

### Disc diffusion assay에 의한 항균활성

원산지별 감초 추출물의 disc diffusion assay에 의한 항균활성: 원산지별 감초 추출물에 대한 항균활성은 3종의 그람 양성균(*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acnes*), 2종의 그람 음성균(*E. coli*, *P. aeruginosa*)과 지루성피부염과 비듬을 유발하는 균인 *P. ovale*을 포함한 총 6종의 피부 상재균을 disc diffusion assay로 실시하였으며 결과는 Table 3에 나타내었다. 원산지별 감초의 50% 에탄올 추출물은 공통적으로 그람 양성균인 *B. subtilis*와 *P. acnes*에 대하여 항균활성을 나타내었다. 50% 에탄올 추출물의 *B. subtilis*에 대한 항균활성은 한국, 중국, 우즈베키스탄 감초 모두 2.5 mg/disc 농도에서 clear zone이 14 mm로 동일한 항균활성을 나타내었다. *P. acnes*에 대한 항균활성은 한국 감초와 우즈베키스탄 감초가 2.5 mg/disc 농도에서 clear zone이 13 mm로 동일한 항균활성을 나타내었고 중국 감초보다 높은 항균활성을 나타내었다. 원산지별 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대한 항균활성은 그람 양성균인 *B. subtilis*, *P. acnes*와 그람 음성균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*, 총 4종의 균에 대하여 항균활성을 나타내었다. 원산지별 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획의 *B. subtilis*에 대한 항균활성은 한국, 중국, 우즈베키스탄 감초 모두 2.5 mg/disc 농도에서 clear zone이 18 mm로 동일한 항균활성을 나타내었다. 여드름균인 *P. acnes*에 대한 에틸아세테이트 분획의 항균활성은 한국 감초가 2.5 mg/disc 농도에서 clear zone이 18 mm로 중국 감초와 우즈베키스탄

Table 3. Antimicrobial activities of *G. uralensis* and *G. glabra* fractions.

Strains	Size of clear zone (diameter, mm)												
	Control conc. (mg/disc)	Fraction conc. (mg/disc)											
		DMSO	<i>G. uralensis</i> (KOREA)				<i>G. uralensis</i> (CHINA)				<i>G. glabra</i> (UZBEKISTAN)		
			Extract	Ethyl acetate	Extract	Ethyl acetate	Extract	Ethyl acetate	Extract	Ethyl acetate	Extract	Ethyl acetate	
	0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5	
<i>P. ovale</i>	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gram positive bacteria</b>	-												
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	12	14	15	18	11	14	14	18	12	14	14	18
<i>P. acnes</i>	-	11	13	16	18	10	12	13	15	11	13	12	14
<b>Gram negative bacteria</b>	-												
<i>E. coli</i>	-	-	-	13	16	-	-	12	15	-	-	12	15
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	19	22			17	21	-	-	14	17

<sup>a</sup>No inhibition.

감초가 같은 농도에서 clear zone이 15 mm, 14 mm인 것과 비교해서, 한국 감초가 중국, 우즈베키스탄 감초 보다 *P. acnes*에 대한 항균활성이 우수함을 확인하였다. 병원성균인 *E. coli*와 방부제에 대한 내성이 강하여 화장품산업에서 주의해야 하는 균인 *P. aeruginosa*에 대한 원산지별 감초 추출물 중 에틸아세테이트 분획의 항균활성 모두 한국 감초가 중국, 우즈베키스탄 감초 보다 우수한 항균활성을 나타냄을 disc diffusion assay를 통해 확인하였다. 원산지별 감초의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 항균활성 비교결과를 통해 50% 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획으로 그람 음성균인 *E. coli*와 *P. aeruginosa*, 두 균을 더 저해함을 확인하였고, 에틸아세테이트 분획은 50% 에탄올 추출물보다 항균활성을 나타내는 플라보노이드 성분이 다수 포함되어 있어 더 우수한 항균활성을 나타내는 것으로 판단된다.

**화장품 방부제의 disc diffusion assay에 의한 항균활성:** 원산지별 감초 추출물의 항균활성에 대한 대조군으로써 화장품 방부제로 이용되고 있는 파라벤류인 메틸 파라벤, 프로필 파라벤과 파라벤의 발암물질 검출에 따른 문제점으로 파라벤 대체제로써 화장품원료, 생활용품 등에 방부제 역할을 하는 1,2-hexanediol의 항균활성을 disc diffusion assay를 통해 확인하였다. 시험균주는 피부 상재균으로써 3종의 그람 양성균(*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acnes*), 2종의 그람 음성균(*E. coli*, *P. aeruginosa*)과 비듬균인 *P. ovale*을 포함한 총 6종의 균주에 대해 실험을 실시하였으며 결과는 Table 4에 나타내었다. 메틸 파라벤은 2.5 mg/disc 농도에서 6종 균주 모두에 대해 항균활성을 나타내었으며 특히 비듬균인 *P. ovale*에 대해 높은 항균활성을 나타내었다. 프로필 파라벤은 비듬균을 제외한 그람 양성균(*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acnes*)과 그람 음성균(*E. coli*, *P. aeruginosa*) 총 5종의 균주

에 대해 항균활성을 나타내었으며, *B. subtilis*와 *P. acnes* 균주에서 메틸 파라벤 보다 우수한 항균활성을 나타내었다. 그러나 1,2-hexanediol은 메틸 파라벤과 프로필 파라벤과 같은 농도에서 disc diffusion assay를 시행하였을 때 6가지 시험균에 대하여 항균활성을 나타내지 않았다. 원산지별 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획에서 높은 항균활성을 나타내었던 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획과 메틸 파라벤과 프로필 파라벤과의 항균활성을 비교해보면, 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획이 *P. ovale*과 *S. aureus*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았지만 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* 균주에 대해서는 메틸 파라벤과 프로필 파라벤 보다 우수한 항균활성을 나타냄을 확인하였다.

**최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정**

Disc diffusion assay의 결과를 바탕으로 원산지별 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획에서 높은 항균활성을 나타내었던 그람 양성균인 *B. subtilis*, *P. acnes*와 그람 음성균인 *E. coli*, *P. aeruginosa* 총 4종의 균주에 대해 최소저해농도를 측정하였다(Table 5). 원산지별 감초의 50% 에탄올 추출물의 최소저해농도는 disc diffusion assay에서 항균활성을 나타내었던 *B. subtilis*와 *P. acnes*에 대해 측정하였다. *B. subtilis*에 대한 원산지별 감초의 50% 에탄올 추출물의 최소저해농도는 한국(625 µg/ml), 중국(625 µg/ml), 우즈베키스탄(625 µg/ml)으로 동일한 항균활성을 나타내었다. *P. acnes*에 대한 원산지별 감초의 50% 에탄올 추출물의 최소저해농도는 한국(5,000 µg/ml), 중국(10,000 µg/ml), 우즈베키스탄(5,000 µg/ml)로 한국과 우즈베키스탄 감초의 50% 에탄올 추출물이 중국 감초의 50% 에탄올 추출물 보다 *P. acnes*에 대

**Table 4. Antimicrobial activities of positive controls.**

Strains	Control conc. (mg/disc)	Size of clear zone (diameter, mm)					
		Positive control conc. (mg/disc)					
		DMSO	Methyl paraben		Propyl paraben		1,2-Hexanediol
		0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5
<i>P. ovale</i>	- <sup>a</sup>	18	24	-	-	-	-
<b>Gram positive bacteria</b>	-						
<i>S. aureus</i>	-	-	12	-	9	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	11	13	15	-	-
<i>P. acnes</i>	-	-	14	14	17	-	-
<b>Gram negative bacteria</b>	-						
<i>E. coli</i>	-	10	18	-	8.5	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	10	18	-	9	-	-

<sup>a</sup>No inhibition.

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC,  $\mu\text{g/ml}$ ) of *G. uralensis* and *G. glabra* fractions against bacteria.

Strains	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	Control	Positive control		Fractions					
	DMSO	Methyl paraben	Propyl paraben	<i>G. uralensis</i> (KOREA)		<i>G. uralensis</i> (CHINA)		<i>G. glabra</i> (UZBEKISTAN)	
				Extract	Ethyl acetate	Extract	Ethyl acetate	Extract	Ethyl acetate
<i>B. subtilis</i>	- <sup>a</sup>	2500	10000	625	625	625	1250	625	625
<i>P. acnes</i>	-	2500	1250	5000	156	10000	625	5000	2500
<i>E. coli</i>	-	625	625	-	5000	-	10000	-	10000
<i>P. aeruginosa</i>	-	2500	625	-	78	-	156	-	5000

<sup>a</sup>No inhibition.

해 2배 우수한 항균활성을 나타내었다.

50% 에탄올 추출물 보다 뛰어난 항균활성을 나타내었던 원산지별 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획의 *B. subtilis*에 대한 최소저해농도는 한국(625  $\mu\text{g/ml}$ ), 중국(625  $\mu\text{g/ml}$ ), 우즈베키스탄(625  $\mu\text{g/ml}$ )으로 50% 에탄올 추출물과 동일한 항균활성을 나타내었고, 여드름균인 *P. acnes*에 대한 최소저해농도는 한국(156  $\mu\text{g/ml}$ ), 중국(625  $\mu\text{g/ml}$ ), 우즈베키스탄(2,500  $\mu\text{g/ml}$ )로 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획이 중국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다는 약 4배, 우즈베키스탄 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다는 약 16배 더 우수한 항균활성을 나타내었다. *E. coli*에 대한 최소저해농도는 한국(5,000  $\mu\text{g/ml}$ ), 중국(10,000  $\mu\text{g/ml}$ ), 우즈베키스탄(10,000  $\mu\text{g/ml}$ )로 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획이 중국, 우즈베키스탄 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다 *E. coli*에 대해서 2배 좋은 항균활성을 나타냄을 확인하였다. *P. aeruginosa*에 대한 최소저해농도는 한국(78  $\mu\text{g/ml}$ ), 중국(156  $\mu\text{g/ml}$ ), 우즈베키스탄(5,000  $\mu\text{g/ml}$ )로, 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획의 *P. aeruginosa*에 대한 항균활성이 중국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다 2배, 우즈베키스탄 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다는 약 64배 뛰어난 항균활성을 나타냄을 확인하였다.

대조균인 메틸 파라벤과 프로필 파라벤의 최소저해농도는 메틸 파라벤은 *B. subtilis* (2,500  $\mu\text{g/ml}$ ), *P. acnes* (2,500  $\mu\text{g/ml}$ ), *E. coli* (625  $\mu\text{g/ml}$ ), *P. aeruginosa* (2,500  $\mu\text{g/ml}$ )이고, 프로필 파라벤은 *B. subtilis* (10,000  $\mu\text{g/ml}$ ), *P. acnes* (1,250  $\mu\text{g/ml}$ ), *E. coli* (625  $\mu\text{g/ml}$ ), *P. aeruginosa* (625  $\mu\text{g/ml}$ )을 나타냈다. 프로필 파라벤은 메틸 파라벤 보다 여드름균인 *P. acnes*에서 항균활성이 2배, *P. aeruginosa*에서 항균활성이 4배 우수함을 확인하였고, *B. subtilis*에 대한 항균활성은 메틸 파라벤이 프로필 파라벤 보다 4배 우수하였고, *E. coli*에 대해서는 동일한 항균활성을 나타내었다. 원산지별 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획에서 가장 뛰어난 항균활성을 나타낸 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획과 대

조균인 메틸 파라벤과 프로필 파라벤의 최소저해농도를 비교한 결과, 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획이 메틸 파라벤 보다 항균활성이 *B. subtilis* (4배), *P. acnes* (16배), *P. aeruginosa* (32배)에 대해 우수함을 확인하였고, 프로필 파라벤 보다도 항균활성이 *B. subtilis* (16배), *P. acnes* (8배), *P. aeruginosa* (8배)에 대해 우수함을 확인하였다.

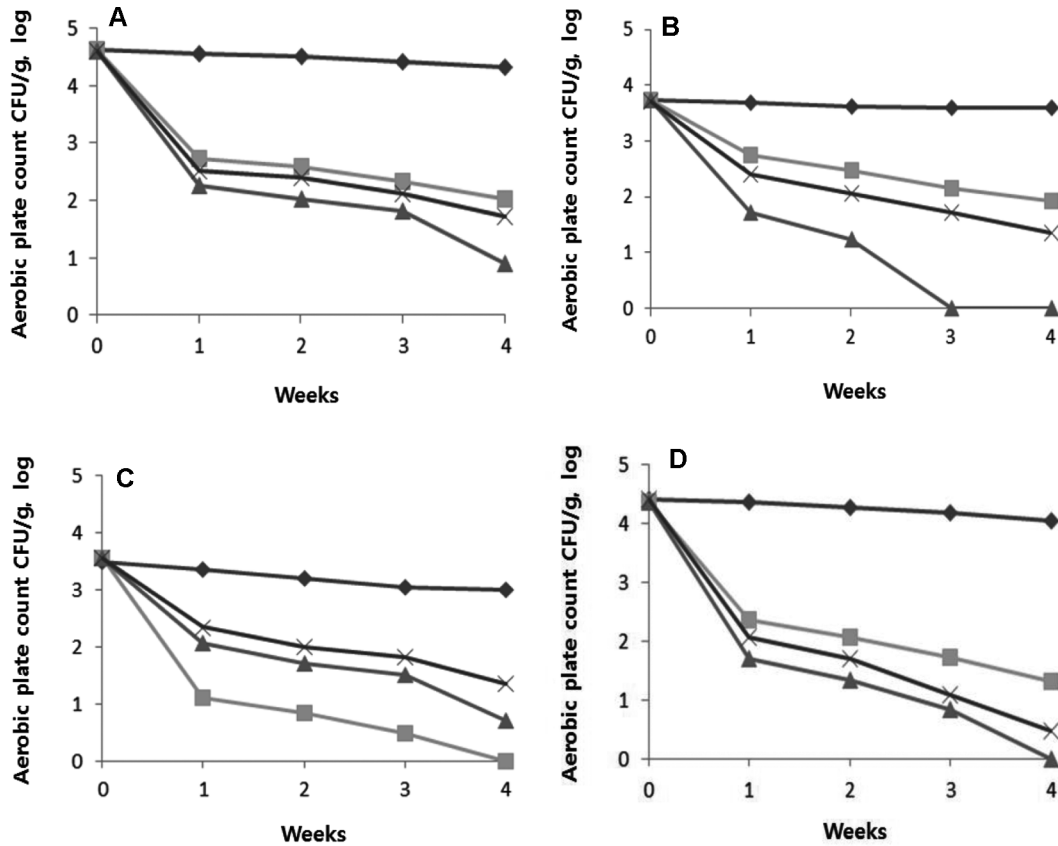
이상의 원산지별 감초 추출물의 항균활성 비교실험 결과로 중국, 우즈베키스탄 감초 추출물 보다 한국 감초 추출물이 더 뛰어난 항균활성을 나타냄을 확인하였다.

추후 게재할 논문으로 한국 감초가 중국, 우즈베키스탄 감초 보다 뛰어난 항균활성을 나타내는데 기여하는 작용에 대해 실험 진행 중으로, 감초 성분들의 항균활성 및 정량실험을 통해 한국 감초가 중국, 우즈베키스탄 감초 보다 항균활성을 나타내는 isoliquiritigenin, liquiritigenin 함량이 많아 우수한 항균활성을 나타내는 것으로 추측해 볼 수 있다.

#### 감초 추출물의 challenge test

항균력이 가장 우수하였던 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획의 화장품에서의 방부력을 측정하기 위해 challenge test를 실시하였다. 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획의 항균활성 결과를 바탕으로 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획 0.20% 함유 크림을 제조하였고, 방부력을 비교하기 위해 한국 감초 다음으로 우수한 항균활성을 나타내었던 중국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획 0.20% 함유 크림과, 합성방부제인 메틸 파라벤 0.20% 함유 크림, 방부제를 첨가하지 않은 크림을 제조하였다. 각각 제조한 크림에 균 수를  $10^6$ ~ $10^7$  CFU/ml로 맞춘 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*을 각 크림에 접종하여 시간에 따른 균 수(CFU/g)를 측정하고 그래프로 나타내었다(Fig. 1).

***B. subtilis*에 대한 challenge test:** *B. subtilis*가 접종된 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획 함유 크림의 7일 후 측정된 균 수는 초기 균 수 보다 99.90% 이상 감소하여 방부제의 유효성 측정에 대한 시험방법의 법규인 CTFA법



**Fig. 1. Changes in the viable count of mycota by type of antimicrobial agent added to cream.** (A) *B. subtilis*, (B) *P. acnes*, (C) *E. coli*, (D) *P. aeruginosa* (—◆—: control cream, —■—: control cream containing 0.20% methyl paraben, —▲—: sample cream containing 0.20% ethyl acetate fraction of *G. uralensis* (Korea) extract, —×—: sample cream containing 0.20% ethyl acetate fraction of *G. uralensis* (China) extract).

을 기준에 부합하는 것을 확인하였다. 중국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획 함유 크림도 7일 후 균 수가 99.90% 이상 감소하였다. 하지만 메틸 파라벤을 함유한 크림은 7일 후 균 수가 초기 균 수 보다 98.75% 감소하였고 방부제를 첨가하지 않은 크림은 초기 균 수와 비슷한 균 수를 유지하였다. 4주 동안 1주 마다 균 수를 측정하였고, 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획을 함유한 크림이 중국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획과 메틸 파라벤을 함유한 크림보다 시간에 따른 균 수의 감소율이 큼을 확인하였다.

***P. acnes*에 대한 challenge test:** *P. acnes*가 접종된 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 함유 크림의 7일 후 측정된 균 수는 초기 균 수 보다 99.90% 이상 감소하였지만, 중국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획을 함유한 크림은 95.03% 감소하였고 메틸 파라벤을 함유한 크림은 89.29% 감소하였다. 방부제를 첨가하지 않은 크림은 4주 동안 균 수의 감소율이 크지 않았다. 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획을 함유한 크림은 2주까지 균 수의 급한 감소율을 보였고,

3주와 4주에서는 균이 거의 확인되지 않았다. 이로써 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획을 함유한 크림이 여드름 균인 *P. acnes*에 대해 강한 방부력을 나타냄을 확인하였다.

***E. coli*에 대한 challenge test:** *E. coli*가 접종된 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획과 중국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획을 각각 함유한 크림에서 7일 후 측정된 균 수는 초기 균 수에서 각각 96.82%, 93.92% 감소를 보였다. 하지만 합성방부제인 메틸 파라벤을 함유한 크림은 7일 후 *E. coli* 수가 초기 균 수 보다 99.90% 이상 감소하였다. 방부제를 첨가하지 않은 크림은 4주 동안 균 수의 감소가 크지 않음을 확인하였다. *E. coli*에 대해서는 한국 감초 에틸아세테이트 분획 보다 메틸 파라벤이 방부력이 강하였지만 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획의 함량을 0.20%에서 이상으로 증가시키면 *E. coli*에 대해서도 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획이 CTFA법 기준에 맞는 방부력을 가질 수 있는 가능성이 있을 것이라 예상된다.

***P. aeruginosa*에 대한 challenge test:** *P. aeruginosa*

가 접종된 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획과 중국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획을 각각 함유한 크림은 7일 후 균 수를 측정하였을 때 초기 균 수 보다 99.90% 이상의 감소를 보였다. 메틸 파라벤을 함유한 크림은 7일 후 *P. aeruginosa* 수가 초기 균 수 보다 98.71% 감소하여 메틸 파라벤을 0.20% 함유한 크림은 *P. aeruginosa*에 대하여 CTFA 법 기준에 맞는 방부력을 나타내지 못하였음을 확인하였다. 방부제를 첨가하지 않은 크림은 4주 동안 초기 균 수와 비슷한 균 수를 유지하였다. 4주 동안 각 시료를 함유한 크림의 균 수를 측정하여 비교한 결과, 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획을 함유한 크림의 균 수가 제일 많이 감소하였다. 이로써 한국 감초 추출물 에틸아세테이트 분획이 화장품 방부제인 메틸 파라벤 보다 *P. aeruginosa*에 대해 방부력이 뛰어난 것을 확인하였다.

## 요 약

본 연구에서는 원산지별 감초 추출물의 항균활성을 측정하여 비교 평가하였고, challenge test를 통해 화장품방부제인 메틸 파라벤과 감초 추출물의 방부력을 비교하였다. 1. 원산지별 감초 추출물의 수득률의 경우 50% 에탄올 추출물의 수득률은 한국 감초(19.24%), 중국 감초(18.34%), 우즈베키스탄 감초(17.33%)이고, 에틸아세테이트 분획의 수득률은 한국 감초(2.22%), 중국 감초(2.43%), 우즈베키스탄 감초(2.07%)이었다. 2. 원산지별 감초 추출물의 항균활성은 50% 에탄올 추출물 보다 에틸아세테이트 분획에서 항균활성이 우수하였으며 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* 균을 저해하였다. 최소저해농도(MIC) 측정을 통해 원산지별 감초 추출물 에틸아세테이트 분획의 항균활성을 비교한 결과, *B. subtilis*에 대한 최소저해농도는 한국(625 µg/ml), 중국(625 µg/ml), 우즈베키스탄(625 µg/ml)로 동일한 항균활성을 나타내었고, *P. acnes*에 대한 최소저해농도는 한국(156 µg/ml), 중국(625 µg/ml), 우즈베키스탄(2,500 µg/ml)로 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획이 중국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다는 약 4배, 우즈베키스탄 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다는 약 16배 더 우수한 항균활성을 나타내었다. *E. coli*에 대한 최소저해농도는 한국(5,000 µg/ml), 중국(10,000 µg/ml), 우즈베키스탄(10,000 µg/ml)로 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획이 중국, 우즈베키스탄 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다 *E. coli*에 대해서 2배 좋은 항균활성을 나타냄을 확인하였다. *P. aeruginosa*에 대한 최소저해농도는 한국(78 µg/ml), 중국(156 µg/ml), 우즈베키스탄(5,000 µg/ml)로, 한국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획의 *P. aeruginosa*에 대한 항균활성이 중국 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다 2배, 우

즈베키스탄 감초 추출물의 에틸아세테이트 분획 보다는 약 64배 뛰어난 항균활성을 나타냄을 확인하였다. 한국 감초 추출물이 중국, 우즈베키스탄 감초 추출물보다 뛰어난 항균활성을 보이며, 화장품방부제로 쓰이는 파라벤류 보다 높은 항균활성을 가지고 있음을 확인하였다. 3. *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*에 대한 challenge test를 통해 메틸 파라벤 보다 한국 감초 추출물이 우수한 방부력을 나타냄을 확인하였다. 이상의 본 연구 결과로부터 한국 감초 추출물이 중국, 우즈베키스탄 감초 추출물보다 항균활성이 우수함을 확인하였다. 한국 감초 추출물이 여드름균인 *P. acnes*에 대한 우수한 항균활성을 나타내므로 한국 감초 추출물이 여드름치료제의 기능성원료로서 이용가능성과 화장품방부제로 쓰이는 파라벤류를 대체할 수 있는 천연방부제로써 응용 가능성이 크다고 사료된다.

## Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ008489)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

## References

- Andersen. 1995. Final report on the safety assessment of isobutylparaben and isopropylparaben. *J. Am. Coll. Toxicol.* **14**: 364-372.
- Bizri JN, Wahem IA. 1994. Citric acid and antimicrobials affect microbiological stability and quality of tomato juice. *J. Food. Sci.* **59**: 130-135.
- Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* **24**: 5-13.
- Edwin JR, Joanne P, Jenny O, John A, John PS. 1998. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharm.* **153**: 12-19.
- Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, et al. 2013. Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **39**: 1-8.
- Kim HJ, Jang HN, Bae JY, Park SN. 2013. A Study on the Stability of the Cream Containing *Glycyrrhiza uralensis* Extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **39**: 117-125.
- Kim YS, Park HS, Kim KS, Shin HS, Kim BS, Choi WS, et al. 1995. Postmarketing surveillance for nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Korean. Acad. Fam. Med.* **16**: 600-607.
- El-Shenawy MA, Marth EH. 1989. Inhibition of inactivation of *Listeria monocytogenes* by sodium benzoate together with some organic acids. *J. Food. Protect.* **52**: 771-778.
- Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K,



- Imagawa M, *et al.* 2000. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health. Sci.* **46**: 282-298.
10. Park JA, Choi MO. 2011. Antimicrobial activity and anti-inflammation effect to the human skin pathogens by the *Rumex crispus L.* Root Extracts. *Korean J. Aesthet. Cosmetol.* **9**: 9-16.
11. Raimer SS. 2000. Managing pediatric atopic dermatitis. *Clin Pediatr.* **39**: 1-14.
12. Rastogi SC, Schouten A, de Kruijf N, Weijland JW. 1995. Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis.* **32**: 28-30.
13. Routledge, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (Parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharm.* **153**: 12-19.
14. Sohn HY, Kim YS, Kum EJ, Kwon YS, Son KH. 2006. Screening of anti-acne activity of atural products *Propioibacterium acnes*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 265-272.
15. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. 2001. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  and PR. *Food. Chem. Toxicol.* **39**: 1225-1232.
16. Toyoda M, Morohashi M. 2001. Pathogenesis of acne. *Med. Electron. Microse.* **34**: 29-40.
17. Winston MH, Shalita AR. 1991. Acne vulgaris, patogenesis and treatment. *Pediatr. Clin. N. Am.* **38**: 889-903.