

마이크로웨이브를 이용한 측백나무 추출물의 항균 및 항바이러스 특성

고상원[†] · 이재영 · 김성현* · 이영철*

한국철도기술연구원 교통환경연구실, *가천대학교 바이오테크놀로지학과
(2023년 1월 31일 접수, 2023년 2월 2일 수정, 2023년 2월 17일 채택)

Antibacterial and Antiviral Activities of Microwave-assisted *Thuja orientalis* Extracts

Sangwon Ko[†], Jae-Young Lee, Seong-Hyeon Kim* and Young-Chul Lee*

Transportation Environmental Research Department, Korea Railroad Research Institute, Uiwang 16105, Korea

*Department of BioNano Technology, Gachon University, Seongnam 13120, Korea

(Received January 31, 2023; Revised February 2, 2023; Accepted February 17, 2023)

초 록

본 연구에서는 마이크로웨이브를 이용하여 추출한 측백나무 잎의 성분을 분석하고 세포독성, 항균 및 항바이러스 활성을 평가하였다. 마이크로웨이브 추출법에 따른 주요 성분은 catechin, leucopelargonidin, arecatannin, quinolone 및 kaempferol 유도체 등으로 나타나 플라보노이드와 탄닌 계열 물질을 함유하고 있는 것을 확인하였다. 인간 상피세포 (HaCaT)를 대상으로 한 세포독성 평가에서는 0.11 mg/mL 농도에서 독성이 나타나지 않음을 보였다. 항균 성능은 외용 소독제(의약외품) 효력평가법 가이드라인에 따라 측정하였으며 1.11 mg/mL 농도에서는 그람 음성균인 대장균에 대해 항균 효과가 낮은 반면, 그람 양성균인 황색포도상구균에 대해서는 99.9%의 항균 효율을 나타내었다. 또한, 추출물의 농도를 높이고 균과의 접촉 시간을 증가시킬 경우 대장균에 대해서도 99.9%의 항균 효율을 나타낼 수 있음을 보였다. 항균 활성 외에도 바이러스에 대한 살균제의 활성을 측정하는 표준(ASM E1052-20)에 따라 평가 결과 인플루엔자 A (H1N1)와 SARS-CoV-2에 대해 99.99% 이상의 항바이러스 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 이 결과들은 측백나무 추출물이 항바이러스 소독제나 표면 코팅제, 개인 보호용구 및 방역용 섬유 소재로서 응용될 수 있음을 시사한다.

Abstract

In this study, the components of microwave-assisted extracts obtained from *Thuja orientalis* leaves were analyzed, and the cytotoxicity, antibacterial and antiviral activities were evaluated. The predominant components from microwave-assisted extraction were catechin, leucopelargonidin, arecatannin, quinolone, and kaempferol derivatives, which are classified in the flavonoid and tannin groups. We observed that the 0.11 mg/mL of extract concentration did not show cytotoxicity in HaCaT cells. The antibacterial activities were tested according to the guidelines of methods for determining the bactericidal activity of antimicrobial agents. The extracts showed 99.9% antibacterial efficiency against gram-positive *S. aureus*, while the antibacterial effect on gram-negative *E. coli* was insignificant. When the extract concentration and contact time with bacteria were increased, 99.9% antibacterial efficiency was observed for *E. coli* as well as *S. aureus*. Following the standard to assess the activity of microbicides against viruses in suspension (ASM-E1052-20), the antiviral efficiency was more than 99.99% for influenza A (H1N1) and SARS-CoV-2. These results suggest its potential use in antiviral disinfectants, surface coatings, personal protective equipment, and textiles.

Keywords: Natural products, Cytotoxicity, Influenza A, SARS-CoV-2, Antiviral activity

1. 서 론

최근 SARS-CoV-2 바이러스 대유행이 지속됨에 따라 천연물의 생리 활성물질에 의한 항바이러스 성능 연구가 활발히 진행되고 있다. *In vitro* 및 *in vivo* 방식의 항바이러스 효과에 대한 기존 연구 결과가 재조

명되고 있을 뿐만 아니라 천연물의 정제 분석 및 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 효능 연구가 각광을 받고 있다[1-3]. 천연 생리활성물질은 해조류 다당류, 자생식물 추출물 등을 예로 들 수 있으며 천연물 성분 중 플라보노이드, 알칼로이드, 지방산, 퀴논, 테르펜, 헤파린, 카라기난, 알긴산, 탄닌 등이 박테리아 뿐만 아니라 바이러스에 대해 사멸 효과가 있는 것으로 알려져 있다[4-9]. 천연 대사물질의 항바이러스 작용은 바이러스와 숙주세포 수용체와의 결합을 억제하거나 항바이러스 물질의 정전기적 작용으로 바이러스 표면에 직접 작용하여 외피를 손상시킴으로써 일어난다. 또한 세포 내 대사와 DNA 복제를 방해하여 바이러스는 숙주세포를 감염시키는 능력을 잃게 되어 증식이 억제된다.

[†] Corresponding Author: Korea Railroad Research Institute
Transportation Environmental Research Department, Uiwang 16105, Korea
Tel: +82-31-460-5335 e-mail: sko@krii.re.kr

자생식물 추출물 성분 중 대표적으로 플라보노이드(flavonoid)는 폴리페놀(polyphenol) 형태로서 광합성을 하는 세포를 가진 다양한 식물에서 쉽게 발견된다. 페놀성 수산화(phenolic hydroxyl)기는 킬레이팅 작용으로 단백질 등과 결합하는 성질을 가지며 뛰어난 환원력으로 항산화, 소염, 항암, 항균 및 항바이러스 등의 다양한 생리 활성을 보인다. 지질의 산화 및 활성산소에 의해 발생하는 산화반응을 억제하며 노화를 방지하고 암을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있으며 식품, 의약품 및 화장품 등의 원료로 널리 활용되고 있다[10]. 예를 들어 자소엽과 백년초의 플라보노이드 성분인 루테올린(luteolin)과 택시폴린(taxifolin)을 추출하여 라디칼 소거 활성을 측정하고 최소저해농도(Minimum inhibition concentration, MIC) 또는 clear zone 측정을 통해 그람 음성균과 그람 양성균에 대한 항균 효과가 있음을 보고하였다[11,12].

측백나무(*Thuja orientalis*)는 동북아시아와 대한민국 고산지대에 자생하는 상록침엽 고목으로 열매와 잎의 함유 물질과 생리활성 특성이 알려져 있다. 측백나무 열매에는 사포닌, 지방 등이 함유되어 있고 잎에는 플라보노이드, 테르펜, 탄닌, 히노키티올 등이 함유되어 있어 높은 항산화 효과와 살균, 미백 효과를 가진다[13-15]. 이 중 살균 효과의 사례로 경북 지역에서 채취한 측백나무 열매의 파쇄 및 침지를 통한 80% 에탄올 추출물의 경우 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, 및 *Streptococcus pneumoniae*와 같은 그람 양성균에 대해 항균 활성을 나타내었다[16]. 또한 80% 에탄올 추출물의 순차적 분획물 중 *n*-hexane 분획물의 항균 활성이 그람 양성균에 대해 농도 의존적 증가하는 것으로 나타났으며 그람 음성균에 대해서는 항균력을 나타내지 않았다. 측백나무 종피(seed coats)를 수증기 증류하여 얻어진 정유(essential oil)의 경우, 디스크 확산법(disk diffusion method)을 통해 그람 양성균과 그람 음성균에 대해 농도 의존적으로 균 성장 억제 영역(inhibition zone)을 보임을 관찰하였다[17]. 네팔의 Dharan 지역에서 채취한 측백나무 잎의 경우 에틸아세테이트, 에탄올 및 클로로포름 혼합 용매를 이용하여 soxhlet 증류로 oleoresin을 추출하였으며 대장균과 황색포도상구균의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 25 μ L로 보고된 사례가 있다[18]. 반면, 수증기 증류(hydro distillation)를 통한 추출 시에는 α -pinene, 3-carene, cedrol, β -caryophyllene 등의 성분으로 구성된 정유를 수득하였으며 최소저해농도 비교를 통해 그람 음성균(*Vibrio parahaemolyticus*, 1.6 mg/mL)보다 그람 양성균(*S. aureus*, 0.4 mg/mL)에 더 효과적으로 작용함을 보였다[13]. 추출 용매 조건에 따른 성분함량 비교 연구에서는 측백나무 잎을 물이나 에탄올로 추출할 경우보다 메탄올 추출 조건에서 폴리페놀 화합물과 플라보노이드 함량이 높으며, 항산화 활성은 열매보다는 잎 추출물에서 시료 처리 농도 의존적으로 활성이 증가함을 제시하였다[14]. 플라보노이드 계열 성분뿐만 아니라 측백나무 잎의 수증기 증류를 통해 얻어진 히노키티올(hinokitiol) 추출물을 식품 첨가물로 사용하였을 때 세균 증식과 곰팡이 생성을 억제시킬 수 있음을 보고하였다[19]. 앞서 언급한 바와 같이 측백나무의 추출 대상 및 추출 방법에 따라 박테리아를 대상으로 한 살균 효과는 많은 연구 결과가 보고된 반면 항바이러스 효과에 대한 연구는 미미하다. 측백엽을 50 $^{\circ}$ C에서 메탄올로 추출한 후 인플루엔자 A에 대한 항바이러스 성능 측정 결과, 배양 3일 후 89.5%의 항바이러스 활성을 보인 사례가 보고되었다[20]. 또한 80% 에탄올 추출액은 수막 모자이크 바이러스에 의한 식물 감염을 줄이는 효과가 있는 것으로 알려져 있다[21].

천연물의 활성물질 추출 공정방법 중 마이크로웨이브를 이용한 추출(microwave-assisted extraction)은 천연물 성분으로 존재하는 물을 짧은 시간 동안 가열하여 세포벽을 파괴함으로써 유효 성분을 용이하게

추출할 수 있다. 기존 증류 추출, 환류 추출, soxhlet 추출 등에 비해 시간과 에너지가 적게 소요되고 용매 사용량을 줄일 수 있다는 장점이 있어 친환경적인 접근으로 관심을 받고 있다[22]. 최근에는 황칠나무(*Dendropanax moribifera*)와 유럽밤나무(*Castanea sativa*)로부터 마이크로웨이브 추출법으로 생리활성 물질을 분리하여 항산화 특성을 분석한 연구가 발표되었다[22,23]. 본 연구에서는 유기용매 추출 및 수증기 증류법 대신 마이크로웨이브를 이용한 추출법으로 측백나무 잎 추출액을 제조 후, 주요 성분을 액체크로마토그래피 질량분석기로 분석하고 세포독성, 항균 활성 및 인플루엔자 A(H1N1)와 SARS-CoV-2에 대한 항바이러스 성능을 평가하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 기기

측백나무 잎은 경상남도 의령군에서 채취한 것을 공수하였으며 세포배양에 사용하는 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) 배지와 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS), 트립신(trypsin)-EDTA 용액, 그리고 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)은 Gibco社에서 구매하여 사용하였다. 수용성 테트라졸륨(tetrazolium) 용액은 DoGenbio社에서 구매하였다. 3차 증류수는 Milli-Q® directMillipore filter system (Millipore Co., Billerica, MA, USA)을 통해 정수하였다. 액체크로마토그래피 질량분석기(LC-MS)는 Waters synapt xs (Waters Corp., USA)를 이용하였다.

2.2. 측백나무 잎 추출물 제조

측백나무 잎 추출물은 전자레인지(Magic MMO-20M7, SK magic社)를 이용한 마이크로웨이브 추출법(microwave-assisted extraction)으로 제조하였다. 측백나무 잎을 물로 세척 후 공기 중에 건조시킨 뒤, 10 g을 정량하여 800 W 전자레인지에 5분간 조사시켰다. 실온에서 식힌 후, 막자사발을 이용해 분쇄된 측백나무 잎을 거름종이에 옮겨 담고 100 mL 증류수를 용매로 사용하여 불순물과 여과액을 분리하였다. 동결 건조 후 111 mg의 고체상 측백나무 잎 추출물을 수득하였다.

2.3. 세포독성 평가

측백나무 잎 추출물의 세포독성은 인간 상피세포(human epithelial keratinocyte cell, HaCaT)를 이용하여 24시간 접촉시킨 후 대조군 세포와 흡광도를 비교하여 세포의 생존율을 평가하였다. 인간 상피세포는 가천대학교 바이오토포연구원에서 분양받았으며 DMEM 배지 89%에 FBS 10%와 페니실린-스트렙토마이신 1%를 혼합한 성장 배지에서 배양하였다. 세포 밀도가 70%를 넘었을 때 트립신-EDTA 용액에 세포를 부유시켜 계대배양(subculture)을 진행해 세포를 유지하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소 환경에서 배양하였고 측백나무 잎 추출물의 희석 시 PBS를 사용하였다. 먼저, 세포밀도가 70% 이상이고 계대수(passage number)가 5 미만인 인간 상피세포를 수확 후, 96 well plate에 5×10^4 cell/mL 농도로 100 μ L씩 접종하여 24시간 동안 배양시켰다. 측백나무 잎 추출물 111 mg을 증류수 100 mL에 용해시킨 용액의 농도를 100%로 하여, 10 μ L의 측백나무 잎 추출물을 100%, 75%, 50%, 25%, 10% 농도 조건으로 첨가 후 다시 24시간 배양시켰다. 추출물 고유의 색깔에 의한 흡광도 측정 방해를 방지하기 위해 각 well에 들어있는 모든 배지를 제거 후, 100 μ L의 성장 배지와 10 μ L의 수용성 테트라졸륨 용액을 첨가하였다. 외부 빛 차단 조건에

서 2시간 반응시킨 후, 흡광도 측정기(Perkin Elmer Multimode Plate Reader Victor X5, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용해 450 nm 파장에서 각 well의 흡광도를 측정하고 측백나무 추출물을 넣지 않은 대조군과 비교하여 세포 생존율을 계산하였다.

2.4. 항균 성능 분석

대장균 또는 황색포도상구균에 대한 항균 성능 시험은 외용소독제 (의약외품) 효력평가법 가이드라인을 준용하여 한국분석시험연구원 에서 진행하였다. 10%의 nutrient broth (NB)를 함유하는 멸균생리식 염수를 대조군으로 사용하였으며, 22.2 mg/mL 또는 1.11 mg/mL 농도 의 측백나무 잎 추출물을 시험군으로 하였다. 대조군 및 시험군에 대장 균액(*Escherichia coli*, *E. coli*) 또는 황색포도상구균액(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)을 10⁴ CFU의 농도로 접종하였다. 균이 접종된 대조 군과 시험군을 상온에서 지정시간 방치 후, 완충액으로 세척해 준 뒤 각각 100 µL를 취하여 한천배지에 도말하여 37 °C에서 배양하였다. 24시간 후 균 수의 콜로니(colony)를 계수하고, 대조군과 비교하여 균 감소율(%)을 계산하였다.

$$\text{균 감소율 (\%)} = \frac{[(\text{반응 시간 후 대조군에서의 균 수} - \text{반응 시간 후 시험군에서의 균 수}) / (\text{반응 시간 후 대조군에서의 균 수})] \times 100}$$

2.5. 항바이러스 성능 분석

인플루엔자 A 바이러스(H1N1)와 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 사 멸 시험은 현탁 상태에서 바이러스에 대한 살균제의 활성을 평가하는 표준(ASTM E1052-20)의 절차에 따라 (주케이알 바이오텍에서 수행하 였다. 대조군으로는 PBS를 사용하였으며 측백나무 잎 추출액(1.11 mg/mL) 자체의 세포독성을 중화하기 위하여 10% FBS를 이용하였다. 인플루엔자 A 바이러스(H1N1, PR8 strain)의 접종농도는 2.96 × 10⁷ TCID₅₀/mL이며 SARS-CoV-2 바이러스는 1.78 × 10⁸ TCID₅₀/mL 농도 로 접종하였다. 측백나무 잎 추출액 4.5 mL와 바이러스 0.5 mL를 9:1 의 비율로 혼합하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰으며, 대조군인 PBS 또한 동일 조건으로 바이러스와 혼합하였다. 반응 이후 반응물에 10% FBS 중화제를 첨가하여 상온에 5분 동안 둔 후, 10배 연속으로 희석하여 희석액을 제조하였다. 인플루엔자 A 바이러스 희석액은 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 숙주세포에 감염시켰으며, SARS-CoV-2 바이러스의 경우 희석액을 Vero-E6 숙주세포에 감염시 켜다. 감염된 세포를 37 °C 및 5% 이산화탄소 조건의 세포 배양기에 서 3일간 배양 후 현미경을 통해 세포병변효과(cytopathic effect, CPE) 를 관찰하였다. 대조군과 시험군에서 크리스탈 바이올렛(crystal vio- let) 염색 시약에 의해 염색된 well의 수를 세어 Spearman-Kärber 방법 으로 바이러스의 희석배수를 고려하여 바이러스 감염가(Tissue Culture Infective Dose 50%, TCID₅₀)와 바이러스 감소 농도(Virus re- duction of infectivity titer, log₁₀TCID₅₀/mL)를 계산하였다[24].

3. 결과 및 고찰

3.1. 측백나무 잎 추출물의 성분 분석

측백나무 잎을 마이크로웨이브 처리 후 증류수로 추출한 용액을 액 체크로마토그래피 질량분석기를 통해 성분을 분석하였다. Table 1에 검출 세기가 높은 순서로 주요 성분을 나타내었으며, Figure 1에는 대 표적으로 세 가지 성분의 구조를 나타내었다. 가장 많이 함유된 천연

Table 1. Representative Chemical Composition of *Thuja orientalis* Extract

No.	Component name	Formula	Retention time (min)	Intensity (%)
1	Catechin-(4 α→8)-catechin	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	2.24	8.55
2	Leucopelargonidin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	2.37	5.93
3	Arecatannin A1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	2.30	5.01
4	1-Methyl-2-[(Z)-8-tetradecenyl]-4(1H)-quinolone	C ₂₄ H ₃₅ NO	7.18	4.84
5	Catechin-(4 α→8)-catechin	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	2.48	3.71
6	Arecatannin A1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	2.61	3.04
7	Catechin-(4 α→8)-catechin	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	2.07	3.01
8	Kaempferol 3-O-(6"-O-p-coumaroyl)glucoside	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	1.79	2.26
9	(-)-Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	2.72	2.17
10	Leucopelargonidin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	2.72	2.17
11	Arecatannin A1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	2.12	2.13
12	Kaempferol-3,7-diglucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	3.26	1.55
13	2,6-Dimethylaniline	C ₈ H ₁₁ N	13.86	1.53
14	Ranunculin	C ₁₁ H ₁₆ O ₈	1.15	1.08
15	2,6-Dimethylaniline	C ₈ H ₁₁ N	11.85	0.98
16	Skimmin	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	2.26	0.95
17	Dehydroabietic acid	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	4.68	0.93
18	Kaempferol 3-O-(6"-O-p-coumaroyl)glucoside	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	1.09	0.90
19	2,6-Dimethylaniline	C ₈ H ₁₁ N	13.47	0.79
20	Kadsurenin B	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	9.12	0.77
21	Andrographoside	C ₂₆ H ₄₂ O ₉	4.68	0.74
22	Calycanthoside	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	2.61	0.73
23	Dehydroabietic acid	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	5.08	0.72
25	Kadsurenin K	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	9.17	0.72
26	Lucidumoside A	C ₂₅ H ₃₄ O ₁₂	2.94	0.65

활성 성분은 catechin, leucopelargonidin, arecatannin, quinolone 및 kaempferol 유도체 등으로 확인되었다. 이는 측백나무 잎에 플라보노 이드, 탄닌 성분 등이 함유되어 있어 높은 활성산소 제거 효과를 가진 다는 선행연구와 비슷한 결과를 보인다[13]. Catechin은 flavan-3-ol 구 조를 가지고 있으며, leucopelargonidin는 flavan-3,4-diol에 속하는 플 라보노이드로서 항균 및 항바이러스 활성은 세포막과 외피 기능의 억 제, 유전자 대사 방해를 통해 일어난다[10]. Arecatannin은 proantho- cyanidin에 속하는 축합형 탄닌(condensed tannin)으로 폴리페놀의 일 종이며, 탄닌과 마찬가지로 항산화, 항균 등의 생리 활성을 보인다 [25-28]. 1-Methyl-2[(Z)-8-tetradecenyl]-4(1H)-quinolone은 퀴놀론 유 도체로 4-quinolone은 DNA 선회효소(gyrase)작용 억제제를 통해 항균 성능을 보이며[29] aliphatic 치환기에 따른 항균 특성 연구가 보고되 었다[30]. Kaempferol은 전형적인 C6-C3-C6 구조를 가진 flavonol 중 의 하나로, catechin과 같이 강한 항산화 효능 외에 SARS-CoV-2의 주 요 단백질인 3CLpro (3 chymotrypsin-like protease)의 작용을 억제하 여 숙주의 바이러스 감염을 방지하는 대사 작용을 하는 것으로 제시 되었다[3,10,31].

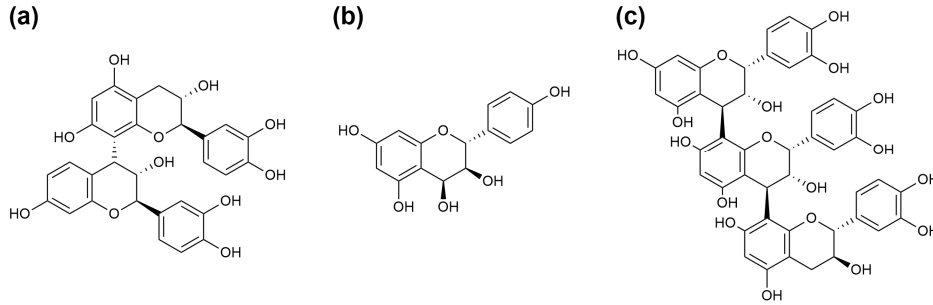


Figure 1. Structure of (a) catechin-(4α→8)-catechin, (b) leucopelargonidin, and (c) arecatannin A1.

3.2. 세포독성 평가

측백나무 잎 추출물의 세포독성은 인간상피세포(human epithelial keratinocyte cell, HaCaT)를 이용하였으며 MTT assay 법을 통해 평가하였다[32]. 세포막이 손상되거나 세포가 죽는 경우 산화-환원효소의 일종인 탈수소 효소(lactate dehydrogenase, LDH)를 방출하게 되며 LDH는 수용성 테트라졸륨과 반응하여 formazan을 형성하며 색상 변화를 일으킨다. 따라서 세포의 생존율 변화에 따라 달라진 색상의 차이를 이용해 측백나무 잎 추출물이 처리된 세포의 생존율을 측정하였다. 측백나무 잎을 80% 에탄올에 침지 후 환류 추출한 경우 인간유래 악성 흑색종 세포주인 SK-MEL-2 세포에 처리한 결과 0.10 mg/mL에서는 88.49%의 세포 생존율을 보였으며, 0.05 mg/mL 이하 농도에서는 독성이 나타나지 않는 것으로 알려져 있다[15]. 마이크로웨이브 추출액의 인간 상피세포에 대한 세포독성을 알아보기로 추출액 농도 1.11 mg/mL를 100% 농도로 하여 10~100% 희석 비율에 따라 세포 생존율을 비교하였다. 450 nm 파장에서의 흡광도를 Figure 2에 나타내었으며 측백나무 잎 추출물을 처리하지 않은 대조군과 비교해 세포 생존율을 계산하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 대조군의 생존율 100% 대비, 1.11 mg/mL 농도에서는 55%의 생존율을 보였으며, 농도가 감소할수록 생존율이 증가함을 보였다. 10% 농도에서 생존율이 101%로 나타나 0.11 mg/mL 농도에서는 독성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

3.3. 항균 성능 특성

측백나무 잎 추출물의 항균 성능 평가는 외용소독제(의약외품) 효력평가법 가이드라인에 따라 진행하였으며 균과의 접촉시간에 따른 항균 성능 결과를 Table 3에 나타내었다. 대조군은 10%의 NB를 함유하는 멸균 생리식염수를 사용하였고 22.2 mg/mL 농도의 측백나무 잎

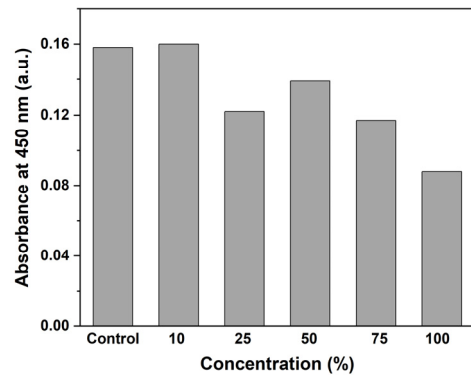


Figure 2. The absorbance based cytotoxicity assay for *Thuja orientalis* extract.

Table 2. Effect of *Thuja orientalis* Extract on HaCaT Viability

Concentration (%)	Control	10	25	50	75	100
Cell viability (%)	100	101	77	87	75	55

추출물을 시험군으로 하였다. 대장균 또는 황색포도상구균을 10⁴ CFU의 농도로 대조군과 시험군에 접종 후, 2시간 접촉 결과 대조군의 균 농도는 각각 6.9 × 10³ CFU와 8.7 × 10³ CFU로 나타난 반면, 시험군의 균 농도는 각각 4.8 × 10³ CFU와 5.0 × 10³ CFU로 산출되어 대조군 대비 30.4%, 42.5%의 균 감소율을 보였다. 균 액 접종 후 24시간 경과 시, 대조군은 대장균과 황색포도상구균에 대해 각각 1.0 × 10⁶ CFU와 7.3 × 10⁴ CFU의 농도를 나타내었다. 반면, 시험군에서는 균 주 2종 모두 < 10 CFU 농도로 육안상 검출되지 않는 것으로 나타나

Table 3. The Antibacterial Activity of *Thuja orientalis* Against *E. coli* and *S. aureus*

Contact time (h)	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Bacterial cell number (CFU)	antibacterial efficiency (%)	Bacterial cell number (CFU)	antibacterial efficiency (%)
2	^a 6.9 × 10 ³	-	^a 8.7 × 10 ³	-
2	4.8 × 10 ³	30.4	5.0 × 10 ³	42.5
24	^a 1.0 × 10 ⁶	-	^a 7.3 × 10 ⁴	-
24	^b < 10	99.9	^b < 10	99.9
^c 24	^a 9.8 × 10 ⁴	-	^a 8.5 × 10 ³	-
^c 24	7.9 × 10 ⁴	19.4	^b < 10	99.9

^a Bacterial cell number for control. ^b < 10 CFU indicates that bacteria were hardly detected by naked eyes on the culture media. ^c 1.11 mg/mL of *Thuja orientalis* extracts was used.

Table 4. The Antiviral Activity of *Thuja orientalis* Against Influenza A (H1N1) and SARS-CoV-2

Type of Virus	Average of infectivity titer of control (\log_{10} TCID ₅₀ /mL)	Average of infectivity titer of <i>Thuja orientalis</i> (\log_{10} TCID ₅₀ /mL)	Virus reduction of infectivity titer (\log_{10} TCID ₅₀ /mL)	Efficiency of virus reduction (%)
Influenza A (H1N1)	6.600	≤ 2.500	≥ 4.100	≥ 99.992
SARS-CoV-2	7.916	3.750	4.167	99.993

대조군 대비 99.9%의 항균 효율을 보였다. 1.11 mg/mL의 추출액 농도에서는 대장균 접종 후 24시간 접촉 시 대조군과 유사한 균 수가 검출되어 항균 효과가 없는 반면, 황색포도상구균에 대해서는 접종 후 24시간 배양 결과 황색포도상구균이 검출되지 않아 99.9%의 항균 효율을 보임을 확인하였다. 이는 수증기 증류를 통해 얻은 측백나무 잎 추출물이 그람 음성균보다 그람 양성균에 대해 높은 항균 활성을 보인 사례와 유사한 경향을 보이지만[13], 마이크로웨이브 추출물의 경우 농도를 높이고 균과의 접촉시간을 증가시킬 경우 그람 음성균인 대장균에 대해서도 99.9%의 항균 효율을 나타낼 수 있음을 보였다.

3.4. 항바이러스 성능 특성

마이크로웨이브를 이용한 측백나무 잎 추출액의 바이러스 제거 성능을 측정하기 위해 인플루엔자 A (H1N1)와 SARS-CoV-2를 대상으로 하였다. 1.11 mg/mL의 측백나무 잎 추출액 농도를 사용하여 현탁 상태에서 바이러스에 대한 살균제의 활성을 측정하는 표준(ASM E1052-20)에 따라 평가하고 결과를 Table 4에 정리하였다. 인플루엔자 A(H1N1) 바이러스는 *Ortho-myxoviridea* 과, 인플루엔자 바이러스 속에 속하며 대유행을 일으키는 아형 중 하나이다. 본 실험에서는 인플루엔자 연구에 주로 사용되는 strain 중 하나인 8개의 RNA 분절을 가진 PR8 strain을 사용하였다. SARS-CoV-2는 *Coronaviridae* 과 베타 코로나 바이러스(beta-coronaviruses)로 분류되며 양성 단일 가닥 RNA를 계층으로 지닌 구형 모양의 바이러스이다[33]. 바이러스의 활성 확인은 각각의 숙주세포인 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 세포와 Vero-E6 세포에 바이러스를 감염시킨 후, 50% 조직배양 감염량 분석법(Median tissue culture infectious dose assay, TCID₅₀)으로 평가하였다[34]. Influenza A (H1N1) 바이러스를 PBS 대조군과 시험군에 2.96×10^7 TCID₅₀/mL 농도로 접종한 후, 2시간 뒤 수거하여 희석액을 제조하였다. 각 희석액을 MDCK 세포에 감염시켜 3일간 배양한 뒤 바이러스 역가를 산출하여 비교하였다. 초기 바이러스 역가는 7.471 \log_{10} TCID₅₀/mL이며, 시험방법 상 바이러스 희석배수를 고려한 최소 검출한계는 2.500 \log_{10} TCID₅₀/mL이다. 2시간 동안 바이러스와 반응 후 활성을 측정된 결과 대조군의 역가는 6.600 \log_{10} TCID₅₀/mL로 나타났으며 시험군의 역가는 2.500 \log_{10} TCID₅₀/mL 이하로 확인되었다. 따라서 Influenza A (H1N1)의 감소 농도는 4.100 이상으로 산출되어 바이러스 제거 효율은 99.992% 이상임을 보였다. SARS-CoV-2에 대한 항바이러스 활성 평가에서 대조군과 시험군의 접종농도는 1.78×10^8 TCID₅₀/mL로 하였다. 각 희석액을 Vero-E6 세포에 감염시킨 뒤 3일간 배양 후 바이러스 역가를 계산하였으며 초기 바이러스 역가는 8.250 \log_{10} TCID₅₀/mL이다. 대조군의 역가는 7.916 \log_{10} TCID₅₀/mL로 나타났으며 시험군의 역가는 3.750 \log_{10} TCID₅₀/mL로 확인되었다. 따라서 SARS-CoV-2의 감소 농도는 4.167 \log_{10} TCID₅₀/mL로 산출되어 바이러스 제거 효율은 99.993%으로 나타났다. 인플루엔자 A의 경우 측백나무 잎 추출물 시험군과 2시간 반응 후 바이러스 농도는 최소 검출한계인 2.500 \log_{10} TCID₅₀/mL 이하로 나타났음에도 불구하고

SARS-CoV-2의 제거 효율보다 낮은 이유는 SARS-CoV-2 접종농도가 1.78×10^8 TCID₅₀/mL로 높아진 것에 기인한다.

앞서 언급한 바와 같이 측백나무 잎 추출물에 대한 인플루엔자 A (H1N1) 및 SARS-CoV-2 바이러스 감소율은 모두 99.99% 이상임을 확인하였으며, 항바이러스 효과는 수소 결합 형성이 가능한 수산화기를 포함하는 활성 성분에 의한 것으로 볼 수 있다. 플라보노이드, 지방산, 탄닌, 테르펜 등의 식물성 화학물질의 바이러스 억제 기작은 다르지만 SARS-CoV-2 억제를 위한 천연 대사물질은 소수성 방향족 고리, 수산화기, 및 당류를 포함하는 것으로 알려져 있다[3]. 따라서 마이크로웨이브 추출법으로 제조된 측백나무 잎 추출물은 향후 천연물 기반 항바이러스 소독제나 표면 코팅제, 의료 보호복 및 방역용 필터의 소재로서 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

4. 결 론

본 연구에서는 측백나무 잎을 마이크로웨이브를 이용하여 추출액을 제조 후 성분을 액체크로마토그래피 질량분석기로 분석하고 세포 독성, 항균 및 항바이러스 활성을 평가하였다. 마이크로웨이브 추출 공정에 따른 주요 성분은 catechin, leucopelargonidin, arecatannin, quinalone 및 kaempferol 유도체 등으로 나타나 플라보노이드 및 탄닌 계열 물질을 함유하고 있음을 보였다. 세포독성은 인간 상피세포 (HaCaT)를 대상으로 MTT assay 법을 통해 측정된 결과 0.11 mg/mL의 농도에서 대조군 대비 세포 생존율이 감소하지 않는 것으로 확인되었다. 외용소독제(의약외품) 효력평가법 가이드라인에 따른 항균 성능 측정 결과 1.11 mg/mL 농도에서는 그람 음성균인 대장균에 대해 항균 효과가 낮은 반면, 그람 양성균인 황색포도상구균에 대해서는 접종 후 24시간 배양 시 99.9%의 항균 효율을 보임을 확인하였다. 또한 추출물의 농도를 22.2 mg/mL로 높일 경우, 그람 음성균인 대장균에 대해서도 99.9%의 항균 효율을 나타낼 수 있음을 보였다. 측백나무 잎의 마이크로웨이브를 이용한 추출물은 대장균과 황색포도상구균에 대한 항균 효과 외에도 인플루엔자 A (H1N1)와 SARS-CoV-2에 대해 99.99% 이상의 항바이러스 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 최근 천연물 기반 생리활성 물질에 관심이 높아짐에 따라 측백나무 추출물은 항바이러스 소독제나 방부제, 표면 코팅제, 개인 보호용구 및 방역용 섬유 소재로서 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 한국철도기술연구원 주요사업 연구비 지원으로 수행되었습니다(PK2303F2).

References

1. M. Musarra-Pizzo, R. Pennisi, I. Ben-Amor, G. Mandalari, and M.

- T. Sciortino, Antiviral activity exerted by natural products against human viruses. *Viruses*, **13**, 828 (2021).
2. L.-T. Lin, W.-C. Hsu, and C.-C. Lin, Antiviral natural products and herbal medicines, *J. Tradit. Complement. Med.*, **4**, 24-35 (2014).
 3. A. da S. Antonio, L. S. M. Wiedemann, and V. F. Veiga-Junior, Natural products' role against COVID-19, *RSC Adv.*, **10**, 23379-23393 (2020).
 4. A. Frediansyah, F. Sofyantoro, S. Alhumaid, A. Al Mutair, H. Albayat, H. I. Altaweil, H. M. Al-Afghani, A. A. AlRamadhan, M. R. AlGhazal, S. A. Turkistani, A. A. Abuzaid, and A. A. Rabaan, Microbial natural products with antiviral activities, including anti-SARS-CoV-2: A Review, *Molecules*, **27**, 4305 (2022).
 5. K. Hwang, Antiviral activity of chitosan, chitin, and polysaccharides derived from seaweed, *J. Chitin Chitosan*, **25**, 93-104 (2020).
 6. Y. Jeong, L. T. Thuy, S. H. Ki, S. Ko, S. Kim, W. K. Cho, J. S. Choi, and S. M. Kang, Multipurpose antifouling coating of solid surfaces with the marine-derived polymer fucoidan, *Macromol. Biosci.* **18**, 1800137 (2018).
 7. S. Kim, J.-M. Moon, J. S. Choi, W. K. Cho, and S. M. Kang, Mussel-inspired approach to constructing robust multilayered alginate films for antibacterial applications, *Adv. Fuct. Mater.*, **26**, 4099-4105 (2016).
 8. B. Kaczmarek, Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials-a minireview, *Materials*, **13**, 3224 (2020).
 9. S. Ko, J.-Y. Lee, and D. Park, Recent progress of antibacterial coatings on solid substrates through antifouling polymers, *Appl. Chem. Eng.*, **32**, 371-378 (2021).
 10. T. P. T. Cushnie and A. J. Lamb, Antimicrobial activity of flavonoids, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**, 343-356 (2005).
 11. H. J. Jeong, S. H. Xuan, B. R. Song, S. L. Lee, Y. J. Lee, and S. N. Park, Antimicrobial and antioxidant activities of *Perilla frutescens* var. *acuta* extract and its fraction and their component analyses, *Appl. Chem. Eng.*, **29**, 716-725 (2018).
 12. J.-H. Kwon, T.-Y. Kim, J.-K. Kim, and J.-Y. Kim, Characteristics of *Opuntia monacantha* Haw. for the functional raw material production, *Appl. Chem. Eng.*, **28**, 252-256 (2017).
 13. M. J. Khubeiz, G. Mansour, and B. Zahraa, Antibacterial and phytochemical investigation of *Thuja orientalis* (L.) leaves essential oil from Syria, *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, **7**, 243-247 (2016).
 14. H.-Y. Ahn, S.-J. Heo, M.-J. Kang, J.-H. Lee, J.-Y. Cha, and Y.-S. Cho, Antioxidative activity and chemical characteristics of leaf and fruit extracts from *Thuja orientalis*, *J. Life Sci.*, **21**, 746-752 (2011).
 15. J.-H. Mo and S.-J. Oh, Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of extract of *Thuja orientalis*, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**, 189-194 (2015).
 16. T. H. Youm and H. B. Lim, Antimicrobial activities of organic extracts from fruit of *Thuja orientalis* L., *J. Medicinal Crop Sci.*, **18**, 315-322 (2010).
 17. R. K. Jain and S.C Garg, Antimicrobial activity of the essential oil of *Thuja orientalis* L, *Anc. Sci. Life*, **16**, 186-189 (1997).
 18. S. N. Sah, S. Regmi, and M. K. Tamang, Antibacterial effects of *Thuja* leaves extract, *J. Medicinal Crop Sci.*, **18**, 315-322 (2010).
 19. K.-J. Kang and J.-S. Kim, Effects of hinokitiol extract of *Thuja orientalis* on shelf-life of bread, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 624-628 (2000).
 20. J.-N. Won, S.-Y. Lee, D. Song, and H. Poo, Antiviral activity of the plant extracts from *Thuja orientalis*, *Aster spathulifolius*, and *Pinus thunbergii* against influenza virus A/PR/8/34. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 125-130 (2013).
 21. E. K. F. Elbeshehy, E. M. R. Metwali, and O. A. Almaghrabi, Antiviral activity of *Thuja orientalis* extracts against watermelon mosaic virus (WMV) on *Citrullus lanatus*, *Saudi J. Biol. Sci.*, **22**, 211-219 (2015)
 22. H. T. Hoang, J. S. Park, S. H. Kim, J.-Y. Moon, and Y.-C. Lee, Microwave-assisted *Dendropanax morbigera* extract for cosmetic applications, *Antioxidants*, **11**, 998 (2022).
 23. D. Pinto, A. M. Silva, V. Freitas, A. Vallverdú-Queralt, C. Delerue-Matos, and F. Rodrigues, Microwave-assisted extraction as a green technology approach to recover polyphenols from *Castanea sativa* Shells, *ACS Food Sci. Technol.*, **1**, 229-241 (2021).
 24. S. Ko, J.-Y. Lee, and D. Park, Antibacterial and antiviral activities of multi-coating polyester textiles, *Appl. Chem. Eng.*, **33**, 444-450 (2022).
 25. X. Chen, Y. He, and Y. Deng, Chemical composition, pharmacological, and toxicological effects of betal nut, *Evid.-based Complement. Altern. Med.*, **2021**, 1808081 (2021).
 26. M. Suda, K. Takanashi, M. Katoh, K. Matsumoto, K. Kawaguchi, S. Kawahara, H. Fujii, and H. Makabe, Synthesis of arecatannin A1 from dimeric epicatechin electrophile, *Nat. Prod. Commun.*, **10**, 959-962 (2015).
 27. I. T. Kusumoto, T. Nakabayashi, H. Kida, H. Miyashiro, M. Hattori, T. Namba, K. Shimotohno, Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease, *Phytother. Res.*, **9**, 180-184 (1995).
 28. B. Kaczmarek, Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials-a minireview, *Materials*, **13**, 3224 (2020).
 29. J. J. Hilliard, H. M. Krause, J. I. Bernstein, J. A. Fernandez, V. Nguyen, K. A. Ohemeng, and J. F. Barrett, A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **390**, 59-67 (1995).
 30. A. Wube, J.-D. Guzman, A. Hüfner, C. Hochfellner, M. Blunder, R. Bauer, S. Gibbons, S. Bhakta, and F. Bucar, Synthesis and antibacterial evaluation of a new series of *N*-Alkyl-2-alkynyl(*E*)-alkenyl-4-(1*H*)-quinolones, *Molecules*, **17**, 8217-8240 (2012).
 31. S. Khaerunnisa, H. Kurniawan, R. Awaluddin, S. Suhartati, and S. Soetjipto, Potential inhibitor of COVID-19 main protease (M^{pro}) from several medicinal plant compounds by molecular docking study, *Preprints.org*, 2020030226 (2020).
 32. J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo, and A. Blázquez-Castro, Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives, *Acta Histochem.*, **120**, 159-167 (2018).
 33. T. Flerlage, D. F. Boyd, V. Meliopoulos, P. G. Thomas, and S. Schultz-Cherry, Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract, *Nat. Rev. Microbiol.*, **19**, 425-441 (2021).
 34. C. Cermelli, A. Cuoghi, M. Scuri, C. Bettua, R. Neglia, A. Ardizzoni, E. Blasi, T. Iannitti, and B. Palmieri, In vitro evaluation of antiviral and virucidal activity of a high molecular weight hyaluronic acid, *Viro. J.*, **8**, 141 (2011).

Authors

Sangwon Ko; Ph.D., Senior Researcher, Transportation Environmental Research Department, Korea Railroad Research Institute, Uiwang 16105; sko@krri.re.kr

Jae-Young Lee; Ph.D., Principle Researcher, Transportation Environmental Research Department, Korea Railroad Research Institute, Uiwang 16105; iyoung@krri.re.kr

Seong-Hyeon Kim; Master's Degree, Researcher, Department of BioNano Technology, Gachon University, Seongnam 13120, Korea; shaera@gachon.ac.kr

Young-Chul Lee; Ph.D., Associate Professor, Department of BioNano Technology, Gachon University, Seongnam 13120, Korea; dreamdb@gachon.ac.kr