

## 침엽수 추출물의 항균·항산화 효과

조 춘 구<sup>†</sup>·김 경 례·김 주 찬

승실대학교 환경·화학공학과  
(2007년 9월 12일 접수, 2007년 9월 28일 채택)

### The Effect of Antibacteria and Antioxidation Activities from Needle Leaf Tree

Choon Koo Zhoh<sup>†</sup>, Kyung Rae Kim, and Joo Chan Kim

Department of Chemical & Environmental Engineering, Soong Sil University 816, Hyungnam memorial building,  
Soongsil University, 511, Sangdo-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-743, Korea

(Received September 12, 2007; Accepted September 28, 2007)

**요약:** 산업발전에 따라 환경분야가 대두됨에 따라 민감성 피부에 화장품을 사용하는데 있어 부작용이 증가하였다. 이에 따라 저 자극성 방부제의 개발을 위하여 항암효과가 입증된 침엽수 중 구상나무, 향나무의 활성성분을 추출하여 항균력을 측정 평가하였다. 항균력 측정에는 Broth dilution법이 사용되었으며, 균주는 그람 음성균인 *Escherichia coli*와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*를 사용하였다. 그 결과 항균효과는 향나무와 구상나무가 625 ppm에서 methyl paraben에 비하여 각각 17.02 %, 8.5 % 더 높은 효과를 나타냈다. 항산화 효과 측정은 DPPH법, 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법, 총 플라보노이드의 함량은 Nieva Moreno법을 사용하여 분석하였다. 항산화 효과에서 향나무는 5,000 ppm에서 45 %, 구상나무는 44 %의 항산화 효과를 나타냈으며 분석 결과 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함유량과 비례하였다. 침엽수 추출물의 세포독성실험은 피부섬유아세포인 CCK-986sk를 사용하였다. 그 결과 향나무, 구상나무가 39 ppm에서 1,250 ppm까지의 모든 농도에서 95 % 이상의 높은 세포 생존율을 나타냈다. 이상을 종합해 본 결과 향나무 줄기, 구상나무 잎은 합성물질을 대체할 수 있는 방부제 및 보조 항산화제로서 사용이 가능하다고 할 수 있다.

**Abstract:** We studied anti-microbial and anti-oxidant activities of bio-active components in stem of *Juniperus chinensis* L. and leaf of *Abies koreana* Wilson. Those plants of needle leaf tree family were reported to contain anti-cancer compounds. The anti-bacterial activity was tested by Broth dilution method against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. As results, *Juniperus chinensis* L. and *Abies koreana* Wilson extracts showed 17.0 % and 8.5 % higher anti-bacterial activity than methyl paraben, respectively. The free radical scavenging activity of *Juniperus chinensis* L. and *Abies koreana* Wilson extracts showed 45 % and 44 % at 5,000 ppm. We measured polyphenol (catechin equivalent) and flavonoids quantity. The *Juniperus chinensis* L. extract contained 312 mg/g of polyphenol and 105 mg/g of flavonoids. The *Abies koreana* Wilson extract contained 280 mg/g of polyphenol and 103.8 mg/g of flavonoids. The cytotoxicity of extracts was measured by neutral red assay. Extracts did not affect the viability of CCK-986sk cells up to a concentration of 1,250 ppm. In conclusion, these data suggest that extracts of needle leaf trees would be usefull as antiseptic agents and anti-oxidants for cosmetic products.

**Keywords:** Needle leaf tree extract, antibacterial activity, antioxidant, abies koreana wilson, juniperus chinensis L.

## 1. 서 론

환경오염에 의해 민감성피부가 증가하고, 경제성장에 따라 건강에 대한 관심도가 급증하면서 천연생리활성물질에 대한 관심이 증대되고 있다[1,2]. 이를 위하여 식물

자원으로부터 치료제 및 건강보조제 등에 관한 연구는 꾸준히 이루어지고 있다[3].

에틸렌 상태의 화장품은 장기간 보관을 하며 사용하는 과정에서 산화되어 쉽게 성상이 변하며 미생물에 의한 오염을 피하기 어렵다. 미생물에 노출되면 상이 파괴되고 변질되어 기능저하를 가져오게 되고 에틸렌 안정성과 효능이 떨어져 부작용을 초래할 수 있다[4,5]. 이를 방지하

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: ckzhon@ssu.ac.kr)

기 위하여 화장품에는 미생물의 번식을 억제하는 방부제를 사용하게 되고 다른물질에 비하여 상대적으로 활성이 낮은 라디칼을 함유한 항산화제를 사용하게 된다[6].

따라서 화장품에 있어서 방부제와 항산화제의 사용이 필수적이지만 기존에 사용되고 있는 합성물질들은 민감성 피부에 알러지를 유발할 수 있으므로 비교적 인체에 무해한 물질로 알려진 천연방부제 및 천연 항산화제의 대체가 필요로 하게 되었다[7].

침엽수에는 다양한 휘발성분을 가진 피톤치드라는 향균물질을 함유하고 있으며 이는 외부균으로부터 보호하는 역할을 한다. 또한 항산화, 항암 등에 대한 효과까지 있는 것으로 보고되고 있다[8].

구상나무(*Abies koreana* Wilson)는 소나무과의 상록 교목으로 한라산, 지리산, 덕유산 등에서 500 ~ 1,500 m의 아고산지대에 한정분포하고 있어[8], 형질교환의 가능성이 적다[9]. 잎은 앞면이 녹색이고 뒷면은 흰색의 숨구멍줄이 2개가 있는 형태로 의약분야에서도 주목되고 있다[10].

향나무(*Juniperus chinensis* L.)의 줄기는 회갈색이고 세로로 얇게 조각조각 벗겨지는 형태이며, 암세포 생육 억제활성, 혈당저하, 간해독, 고혈압 억제 등의 생리활성이 보고되었다[11].

본 연구에서는 기존에 화장품의 방부제로 사용되었던 paraben류를 대체하기 위하여 구상나무 잎, 향나무 줄기의 생리활성물질을 추출 및 분석하여 방부효과 및 항산화효과를 갖는 천연물질을 얻기 위한 기초자료를 얻는 목적으로 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 추출 재료 및 방법

구상나무 잎은 한라산에서 자생하고 있는 나무를 대상으로 2005년 4월에 채취하였으며 향나무 줄기는 한국산으로 서울 경동시장 소재 한약전문 상가에서 구입하여 사용하였다. 구상나무 잎과 향나무 줄기를 건조시킨 뒤 분쇄하여 500 g을 취하고 각각 10배의 95 % ethanol로 2회 반복 추출하였다. 얻어진 시료를 Whatman 0.45  $\mu$ m 여과지로 2회 여과한 후, 45 °C에서 rotavaper (R-205, BUCHI labortechnik AG, Swiss)를 사용하여 감압농축하고 5,000 ppm부터 2차 증류수를 2배씩 희석하여 18 ppm까지 제조하였다.

### 2.2. 항균실험

항균실험은 Broth dilution법을 이용했으며 균주는 그람 양성균주인 *Escherichia coli* (*E. coli*)와 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)로서 유전자은행(KCTC)에서 구입하여

사용하였다. 두 균주의 배지는 1,000 mL에 yeast extract 5 g/L, trypton 10 g/L, NaCl 10 g/L를 용해하여 121 °C autoclave에서 15 min 동안 멸균한 후 45 °C로 냉각하여 petri dish에 각각 15 mL씩 주입하였고, 고체배지는 액상배지에 Bacto agar를 15 g/L 첨가하여 제조하였으며 중균을 액상배지에 희석하여 30 °C에서 24 h 동안 shaking incubator에서 배양한 뒤, 고체배지에 1,000배 희석한 *E. coli* 및 *S. aureus*와 각 추출물을 농도별로 0.01 mL 도포하여 24 h 동안 37 °C incubator에서 배양한 뒤 생성된 균의 colony를 계수하였다. 또한 대조군으로써 수용성 방부제인 methyl paraben을 같은 조건에서 실험하였다.

### 2.3. 항산화실험

항산화 실험은 Bondent[12]의 방법에 준하여 측정하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 methanol에 용해시켜  $5 \times 10^{-4}$  M로 제조하였으며, 각 시료 또한 methanol을 사용하여 희석하였다. 0.1 mL DPPH 용액  $5 \times 10^{-4}$  M과 각각의 추출물 0.1 mL를 20 °C에서 30 min 간 반응시키고 DR4000 (HACH, USA)을 이용하여 517 nm의 흡광도에서 측정하였다. 오차를 줄이기 위하여 시료 자체의 흡광도를 측정하여 보정하였으며, 대조군으로는 기존의 합성항산화제로써 널리 사용되고 있는 butylated hydroxy toluene (BHT)을 사용하였다.

### 2.4. 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 이용하여 측정하였다[13]. 초순수를 사용하여 100 ppm으로 희석한 각 추출물 시료 2 mL와 2배 희석한 Folin 시약 2 mL를 혼합하여 3분간 방치한 후 10 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 mL를 넣어 1 h 동안 반응 시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 catechin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다. 표준곡선은 catechin의 최종농도가 5, 10, 20 ppm가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등의 방법에 의해 측정하였다[14]. Ethanol을 사용하여 5,000 ppm으로 희석한 각 추출물 시료 0.1 mL와 80 % ethanol 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 초순수로 희석한 10 % aluminium nitrate nonahydrate와 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80 % ethanol 4.3 mL을 가하여 실온에 40 min 동안 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다. 표준곡선은 quercetin의 최종농도를 5, 10, 20 ppm가 되도록 적정하여 위와 같은 방법으로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

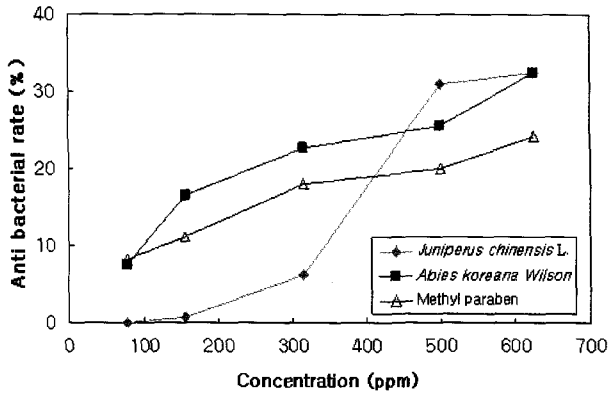


Figure 1. Antibacterial activity of *E. coli* after applying a needle-leaf tree extracts.

### 2.5. 세포독성실험

피부섬유아세포(CCK-986sk)는 Korean cell line bank (KCLB 21947)에서 구입하였으며 배지는 10 % fetal bovine serum (FBS)에 antibiotic-antimycotic를 0.2 % 첨가하여 minimum essential medium eagle (MEME) 배지를 만들었으며, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 배양하여 사용하였다.

0.5 % FBS MEME (2.5 × 10<sup>4</sup> cell/mL)를 96 well에 100 μL씩 분주한 후 항균효과가 있는 최저농도의 시료를 100 μL 혼합하고, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 7일 동안 배양했다. 96 well의 배지를 제거한 후, neutral red 용액 200 μL을 넣고 2 h 동안 반응시키고 염색시약을 제거한다. 그리고 1 % CaCl<sub>2</sub>와 1 % formaldehyde 용액 100 μL을 넣어 1 min 동안 반응시키고, 1 % acetic acid와 50 % ethanol 100 μL를 15 min 동안 상온에서 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

## 3. 실험결과

### 3.1. 항균 효과

미생물은 주로 유상에서보다 수상에서 활발하므로 수상에 존재하는 미생물에 대한 항균효과를 알아보았다. 예 멸균의 장기보관시 쉽게 발생되는 대표적 균인 *E. coli*, *S. aureus*에 대한 추출물의 항균 효과를 Broth dilution법에 의해 실험하였다. *E. coli*에 대한 항균실험에서 향나무 줄기, 구상나무 잎, methyl paraben은 농도에 비례하여 항균효과가 나타났다. 95 % ethanol 추출물, 625 ppm에서 methyl paraben에 비해 향나무 줄기는 79.3 %, 구상나무 잎은 34.3 % 더 높은 항균효과를 나타냈다(Figure 1).

*S. aureus*는 각 추출물이 500 ppm 이상에서 *E. coli*보다 더 높은 항균력을 보였으며 625 ppm에서 가장 큰 효과를 나타냈다. 대조군인 methyl paraben에 대하여 향나

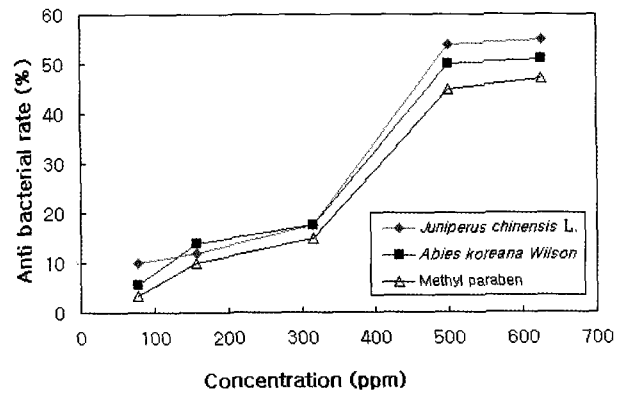


Figure 2. Antibacterial activity of *S. aureus* after applying a needle-leaf tree extracts.

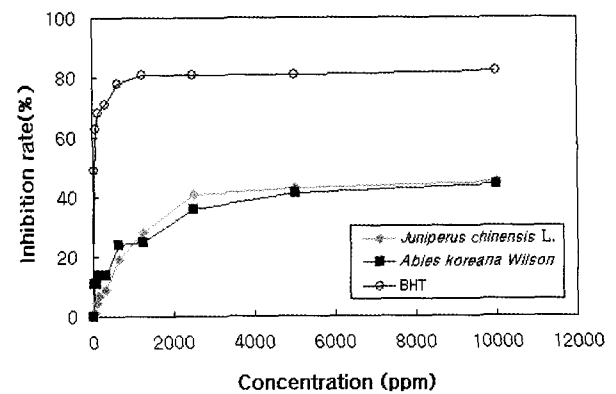


Figure 3. The effect of a needle-leaf tree extracts on the removal of DPPH free radical.

무 줄기가 17.0 %, 구상나무 잎이 8.5 % 더 높은 항균효과를 보여 *E. coli*에 이어 *S. aureus*에서도 향나무가 가장 높은 항균효과를 나타냈다.(Figure 2).

### 3.2. 항산화 효과

폴리페놀계는 수소원자를 라디칼에게 제공하여 안정한 비라디칼을 만들어 주며, 퍼옥시 라디칼은 비교적 안정한 공명혼성체를 형성할 수 있기 때문에 산소와 반응이 어려워 프리라디칼을 안정화 시키며 이들은 쉽게 산화되기 때문에 항산화제로 사용된다. 본 실험의 DPPH free radical 소거 효과에 대한 결과는 Figure 3에 나타내었다.

향나무 줄기와 구상나무 잎의 95 % ethanol 추출물은 농도에 비례하여 항산화 효과가 증가하다가 5,000 ppm 이상의 농도에서는 거의 일정하였다. 이 농도에서의 항산화 효과는 각각 45 %, 44 %이었다. 또한 기준 합성항산화제인 BHT는 625 ppm 이상에서 큰 변화폭을 보이지 않으면서 82 %의 항산화 효과가 나타나 가장 많은 항산화 효과를 보인 향나무에 비하여 1.9배의 높은 결과를 보였다.

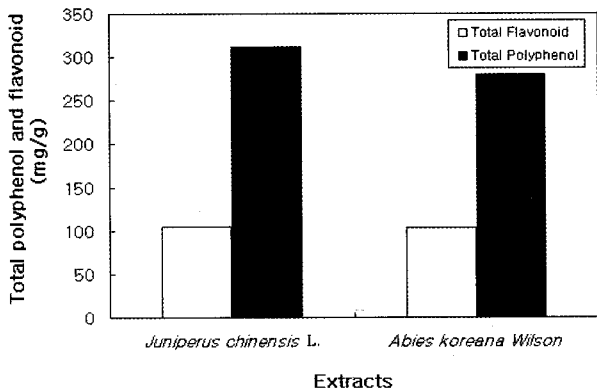


Figure 4. Contents of total polyphenol and flavonoid in a needle-leaf tree extracts.

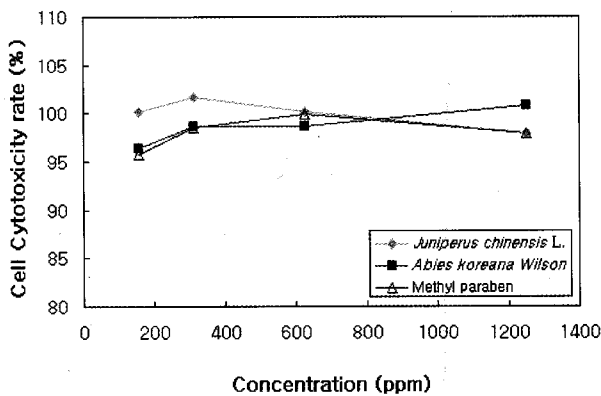


Figure 5. The cell cytotoxicity of a needle-leaf tree extract.

3.3. 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 알아보기 위해 각각 catechin과 quercetin을 기준물질로 사용하여 측정된 결과를 Figure 4에 나타내었다.

총 폴리페놀 함량은 향나무 줄기가 312 mg/g, 구상나무 잎 280 mg/g으로 나타났으며 플라보노이드는 향나무 줄기 105 mg/g, 구상나무 잎 103.8 mg/g으로 나타났었다 (Figure 4).

폴리페놀성분 중 주요 항산화 물질인 플라보노이드의 함량차이는 1.2 mg/g으로 거의 같은 양이 함유하고 있어 DPPH free radical 소거효과와 비슷한 경향임을 알 수 있었다. DPPH free radical 소거효과도 향나무 줄기와 구상나무 잎이 10,000 ppm에서 비슷한 항산화 효과를 나타냈다.

3.4. 세포독성측정

추출물의 피부에 대한 자극정도를 측정하기 위하여 피부섬유아세포(CCK-986sk)를 사용하여 세포독성실험을 하

였다. 각 추출물과 methylparaben에 대한 피부섬유아세포의 생존율을 Figure 5에 나타내었다. Figure 5를 통하여 향나무 줄기, 구상나무 잎 그리고 methyl paraben이 모두 blank에 대하여 95 % 이상의 높은 세포생존율을 나타냈으며, 특히 800 ppm 이하에서는 향나무 줄기가, 800 ppm 이상에서는 구상나무 잎이 methyl paraben에 비하여 일반적으로 예멸전에는 1,000 ppm의 방부제(methyl paraben)를 사용하여 1,000 ppm으로 실험한 결과 향나무 줄기는 세포생존율이 높은 것을 알 수 있었다(Figure 5).

4. 결 론

화장품의 장기보관에 있어서 필수적인 방부제와 항산화제를 합성물질에서 천연물질로 대체함으로써 피부에 자극을 줄일 수 있는 것에 대하여 검토하였다. *E. coli* 및 *S. aureus*에 대한 항균실험에서 각 추출물들이 항균효과를 나타냈으며 그 중 향나무 줄기가 기존의 수용성 합성 방부제인 methyl paraben에 대하여 *E. coli*는 500 ppm에서 48.6 %, *S. aureus*는 625 ppm에서 17.0 % 더 향상된 항균효과를 나타내 가장 높은 항균효과를 보였다.

DPPH free radical 소거효과에서 향나무 줄기는 45 %, 구상나무 잎은 44 %의 효과가 나타났다.

피부섬유아세포인 CCK-986sk를 사용한 세포독성실험에서는 향나무 줄기와 구상나무 잎이 각각 39 ppm에서 1,250 ppm까지의 모든 농도에서 95 % 이상의 높은 세포 생존율을 보였다.

그러므로 향나무 줄기, 구상나무 잎 추출물은 모두 방부제 및 보조항산화제로 대체 가능성을 시사하였으며, 그 중 향나무 줄기가 구상나무에 비해 효과가 높고 피부에 대한 자극이 있는 합성물질을 대체할 천연생리활성물질로써 적극적인 검토가 필요하다고 본다.

참 고 문 헌

1. K. J. Lee and K. H. Row, Comparison of extraction methods for aglycone isoflavones from Korean soybean, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 421 (2004).
2. Y. L. Hong, M. H. Kim, C. Ahn, H. Y. Lee, and J. D. Kim, Studies on the biological activities of the extract from *Hovenia dulcis* Thunb, *Inst. Agr. Sci.* **11**, 1 (2000).
3. M. K. Lee, Y. G. Kim, S. W. An, M. H. Kim, J. H. Lee, and H. Y. Lee, Biological activities of *Hovenia dulcis* Thunb, *Korean J. Medicinal Crop. Soc.*, **7**, 185 (1999).
4. S. R. Marouchoc, Cosmetic preservation, *Cosmet.*

- Technol.* **2**, 38 (1980).
5. D. K. Brannan, *Cosmetic microbiology*, 593, Sandiego academic press, Sandiago, USA (1993).
  6. I. Y. Kim, S. W. Jung, H. C. Ryoo, and C. K. Zhoh, Anti-aging effects of the extracts from leaf, stem, fruit and seed of Yew (*Taxus cuspidata* Sieb) by solvent extraction method, *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea*, **30**(2), 211 (2004).
  7. C. K. Zhoh, B. N. Kim, S. H. Hong, and C. G. Han, The antimicrobial effects of natural aromas for substitution of parabens, *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea*, **28**(1), 166 (2002).
  8. Y. G. Kim, Studies on the extractives of *Abies koreana* Wilson-concerned with lignans, *J. Korean Wood Sci. Tech.*, **25**(4), 1 (1997).
  9. R. Crawford, *Ecological case stories of plant adaptation to adversity*, 253, Blackwell scientific publications, England (1989).
  10. S. Jodai and S. Kazuhiko, *Wood science chemistry* 8th, 69, Kaijousya, Tokyo (1993).
  11. T. H. Kim, A study of physiology comparison of *Juniperus chinensis* L. and *Juniperus rigida* Sieb. extract, *NIAST*, **11**, 174 (2000).
  12. V. Bondet, W. Brand-wiliams, and C. Berset, Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **30**, 609 (1979).
  13. O. Folin and W. Denis, On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents, *J. Biol. Chem.*, **12**, 239 (1912).
  14. M. M. Nivea, A. R. Sampietro, and M. A. Vattuone, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, *J. Ethnopharmacol.*, **71**, 109 (1999).