

## 감초 성분의 항균활성, 정량 및 방부력에 관한 연구

김혜진, 장하나, 배정윤, 하지훈, 박수남\*

서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오화학제품연구소, 화장품종합기술연구소

Received: October 10, 2014 / Revised: November 10, 2014 / Accepted: November 10, 2014

### Antimicrobial Activity, Quantification and Bactericidal Activities of Licorice Active Ingredients

Hye Jin Kim, Ha Na Jang, Jeong Yun Bae, Ji Hoon Ha, 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, Republic of Korea

The present study was aimed at investigating the antimicrobial activities of licorice's active ingredients. Four samples of licorice ingredients (glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin) were evaluated for their antimicrobial activities against six skin microorganisms. The bioassay applied for determining the antimicrobial effects employed a disc diffusion assay, the minimum inhibitory concentration, and the challenge test. The ingredients showed antibacterial activities. Especially, isoliquiritigenin has significant antimicrobial activities against two Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*) and two Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. These samples had much higher antimicrobial activities than synthetic preservatives. Our results reveal that liquiritigenin and isoliquiritigenin could be useful compounds for the development of antibacterial agents for the preservation of cosmetics and foods. The two flavonoids, liquiritigenin and isoliquiritigenin, sourced from Korea, China, Uzbekistan, were quantified using HPLC. The results demonstrated that Korean licorice has two flavonoids (liquiritigenin, isoliquiritigenin) in much higher quantities than was observed in the licorice obtained from the two other countries. Thus, isoliquiritigenin and Korean licorice extract represent new candidates for antimicrobial agents.

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

## 서론

의학기술의 발달로 평균수명이 증가함으로써 삶의 질이 향상되었고, 건강과 아름다움에 대한 관심도 점차 높아지고 있다. 더불어 주름이나 미백, 아토피, 여드름 등 피부미용에 대한 관심 또한 증가하였다. 특히, 피부는 피부 상재균에 의해서 많은 피부질환이 발생할 수 있다. 피부에 염증을 유발하는 피부 상재균은 대표적으로 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*가 있으며 지루성 피부염과 비듬을 유발하는 효모균인 *Pityrosporum ovale* 등이 있다. *S. aureus*는 화농성 감염을 유발하며 아토피 피부염의 요인으로 아토피 환자 중 90%에서 발견되고 있다. *P. acnes*는 여드름의 주 원인균으로 혐기성 세균이며 피부 안쪽 또는 피

지선에 존재한다. 여드름균은 proinflammatory cytokine 생성을 경유하여 염증을 유발하며 개방성 면포와 구진, 농포, 결절 및 낭종 등을 형성시킨다[6, 10]. *B. subtilis*는 결막염의 원인균이고, *P. aeruginosa*는 수막염과 패혈증을 유발한다[4].

화장품에는 미생물의 탄소원이 되는 글리세린과 질소원이 되는 아미노산 유도체와 단백질 등이 함유되어 있어 세균이나 곰팡이에 의한 오염이 일어나기 쉽다. 미생물이 오염된 제품은 향취이상, 색상변화, 점도변화, 곰팡이 발생 등의 품질 저하 현상을 나타낼 뿐만 아니라 각막궤양과 같은 심각한 안질환 등 인체에 유해한 질병을 유발할 수도 있다[7]. 이 같은 이유로 화장품은 다양한 미생물에 의한 변질을 방지하고 제품의 품질을 오랫동안 유지하기 위해서 보존제가 필수적이다. 기존의 방부제로서 화장품, 의약품에 범용적으로 파라벤류가 사용되었다[9, 11]. 하지만 최근 영국에서 발표한 파라벤의 부작용에 대한 연구 결과에 따라 파라벤 사용에 대한 우려가 증가하고 있다[1, 2, 8, 12]. 이에 따라 제품의 안전성과 경제성을 향상시킬 수 있는 보다 진보된 천연 보존

### \*Corresponding author

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

E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

제의 개발이 요구되고 있다.

본 연구에 앞서 저자들은 원산지별 감초 추출물(한국, 중국, 우즈베키스탄)의 항균활성 비교를 통해 한국 감초 추출물이 중국, 우즈베키스탄 감초 추출물 보다 큰 항균활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 합성 방부제인 메틸 파라벤이나 프로필 파라벤 보다도 높은 항균활성을 나타내었다[7].

본 연구에서는 감초성분들(예, glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin)의 피부상재균에 대한 항균활성을 측정하였고, 그 성분들이 화장품에서 천연 보존제로서 이용이 가능한지를 검토하였다. 또한 원산지별 감초추출물에서 감초 항균활성 성분의 정량을 통해 한국 감초가 중국, 우즈베키스탄 감초 보다 높은 항균활성을 나타내는 원인을 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 기기 및 시약

본 연구에서 사용된 에탄올, 에틸아세테이트, 헥산, DMSO 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 감초 성분의 항균 활성물질 사용된 glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin과 항균활성 비교물질로 사용된 화장품 방부제인 메틸 파라벤, 프로필 파라벤과 정량분석에서 내부 표준물질로 사용된 에틸 파라벤은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 원산지별 감초의 isoliquiritigenin과 liquiritigenin의 정량 분석을 위해 사용된 한국(충북 제천), 중국, 우즈베키스탄 감초는 경동시장 약업사를 통해 한약재로 판매되는 원료를 구입하였다. High-performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, Japan)를 사용하였고, LC-20AT pump, SPD-M20A UV detector와 computer intergrating apparatus으로 구성되어 있으며, 컬럼은 Shim-pack VP-ODS C18 (250 mm × 4.6 mm)를 사용하였다.

### 감초 성분의 항균활성 측정

본 실험에 사용된 균주는 피부 상재균으로, 그람 양성 균주 3종, 그람 음성 균주 2종 및 효모균 1종으로 총 6종의 균주이며, 여드름의 원인균인 *P. acnes* KCCM41747와 비듬균인 *P. ovale* KCCM11894, 호기성 그람 양성균주인 *S. aureus* KCCM11335, *B. subtilis* KCCM11779, 호기성 그람 음성균주인 *E. coli* KCCM40271, *P. aeruginosa* KCCM11804를 한국 미생물 보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

*P. acnes*의 배양 배지는 reinforced clostridial (RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 gaspack system (Merck Anaerocult®

Gaspacksystem, Germany)을 사용하여 밀봉하여 37°C에서 72 h 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 24 h 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 24 h 동안 동안 배양하여 사용하였다.

### Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

감초성분의 항균활성은 시험 균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였다. 대조균으로는 합성 방부제인 메틸 파라벤과 프로필 파라벤을 사용하였다. 배양된 균주는  $1 \times 10^7$  CFU/ml로 조절한 후 본 실험에 사용하였다. 평판배지에 배양된 각 균주를 멸균 면봉을 이용하여 100 µl씩 도말하여 준비하였고, 시료를 disc 당 0.5, 2.5 mg이 되도록 paper disc (diameter 8 mm, Roshi kaisha. Ltd., Tokyo, Japan)에 천천히 흡수시킨 뒤, 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시켰다. 각각의 시료가 흡수된 paper disc를 균주를 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 우수한 항균 활성을 보인 isoliquiritigenin과 liquiritigenin의 최소저해농도를 측정하기 위하여 agar-dilution method를 참고하여 실험을 진행하였다. 각각의 균주는  $1 \times 10^7$  CFU/ml로 조절한 후 사용하였고, 메틸 파라벤과 프로필 파라벤은 대조균으로 사용하였다. 시료는 2배 희석법을 이용하여 DMSO로 농도를 희석한 후에 사용하였고, 시료 2 ml를 함유한 배지 20 ml를 petri dish에 주입한 후 시험 균을 평판배지 위에 100 µl씩 도말하여 배양하였다. 배양 후, 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 최소저해농도로 결정하였다.

### 원산지별 감초 추출물의 isoliquiritigenin 및 liquiritigenin 정량

**점액의 제조:** 대한약전 정량법(개정9)에 따라 한국, 중국, 우즈베키스탄 감초 각각 10 g에 내부표준물질로 에틸 파라벤 0.02 g을 넣고 50% 에탄올 100 ml에 24 h 침적시킨 후 여과하였다. 24 h 동안 증발된 50% 에탄올을 보정하여 정확하게 100 ml로 만들어 사용하였다. 원산지별 감초 추출물 에틸아세테이트 분획을 만들기 위해 50% 에탄올 추출물을 감압한 후 헥산을 이용하여 비극성 성분을 제거하였다. 이후

에틸아세테이트로 추출한 분획을 감압 및 건조하여 파우더를 얻어 검액을 조제하는데 사용하였다. 원산지별 감초 추출물 에틸아세테이트 분획 파우더를 100% 에탄올에 녹인 후 syringe filter (Milli-pore 0.45 µm, USA)로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다. HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적을 회귀직선 방정식에 대입하여 각각의 isoliquiritigenin과 liquiritigenin의 함량을 구했으며 각각의 시료에 대해 3회 반복하여 성분의 함량(%)을 산출하였다.

**표준품의 준비:** Isoliquiritigenin 1 mg을 100% 에탄올 1 ml에 녹인 후 80, 60, 40, 30, 15 µg/ml의 농도로 희석하여 검량선을 작성하였고, liquiritigenin은 0.1 mg을 100% 에탄올 1 ml에 녹인 후 8, 6, 2, 1 µg/ml의 농도로 희석하여 검량선을 작성하였다. 내부표준물질로 사용한 에틸 파라벤은 0.1 mg을 100% 에탄올 1 ml에 녹인 후 8, 6, 4, 2 µg/ml의 농도로 희석하여 검량선을 작성하였다.

#### HPLC 기기 분석 조건

HPLC (Shimadzu, Japan)의 조건은 고정상으로 Shim pack VP-ODS (L: 250 mm, LD: 4.6mm) 컬럼을 사용하였으며 이동상으로는 2% acetic acid in water와 0.5% acetic acid in 50% acetonitrile (40:60)을 이용하여 기울기 용리하여 254 nm에서 검출하였다. 유속은 1.0 ml/min로 분석하였으며 시료는 20 µl 주입하였다.

#### Isoliquiritigenin의 challenge test

감초성분의 항균활성 측정에서 가장 우수한 항균활성을 나타낸 성분인 isoliquiritigenin의 방부력을 측정하기 위해서 challenge test를 시행하였다. Isoliquiritigenin 0.20%를 함유한 크림을 제조하였고 대조군으로 방부제를 첨가하지 않은 크림과, 메틸 파라벤 0.20% 함유한 크림을 제조하여 실험에 사용하였다(Table 1). 시험 균은 isoliquiritigenin이 항균활성을 나타낸 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*을 사용하였고, 배양된 균주의 균수는  $10^6$ - $10^7$  CFU/ml로 맞추어 크림에 접종하였다. 시험 균이 접종된 크림은 37°C, 100 rpm으로 조정된 shaking incubator에서 보관하여 실험에 사용하였다. 각각의 시험 균이 접종된 크림을 1 g씩 취해 멸균된 증류수로 희석하고 고체배지에 도말하였다. 그 후 배양하여 0일차 균 수를 측정하고, 7일 후 균 수가 처음 균 수보다 99.9% 사멸하는지를 확인하였다. 1주마다 균 수를 측정하여 4주까지 균 수를 확인하였다. 실험은 방부제의 유효성 측정에 대한 시험방법의 법규 중 CTFA 법을 기준으로 시행하였다[3].

#### 결과 및 고찰

##### 감초성분의 disc diffusion assay에 의한 항균활성

감초의 대표적인 구성성분인 glycyrrhizin, liquiritin,

**Table 1. Formulation of the cream containing 0.20% isoliquiritigenin.**

Components	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
Isoliquiritigenin	-	-	0.2

Table 2. Antimicrobial activities of licorice ingredients against bacteria.

Strains	Size of clear zone (diameter, mm)									
	Control	Concentration. of licorice ingredients (mg/disc)								
		DMSO	Glycyrrhizin		Liquiritin		Liquiritigenin		Isoliquiritigenin	
			0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5
<i>P. ovale</i>	- <sup>1)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Gram positive bacteria</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	11	13	24	26		
<i>P. acnes</i>	-	-	-	-	12	14	17	22		
<b>Gram negative bacteria</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i>	-	11	13	20	23	20	23	22	24	
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	21	22	

<sup>1)</sup>No inhibition.

liquiritigenin, isoliquiritigenin 중 항균활성에 영향을 미치는 성분을 알아보기 위하여 disc diffusion assay를 통해 항균활성을 측정하였다. 시험균주는 피부 상재균으로서 3종의 그람 양성균(*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acnes*), 2종의 그람 음성균(*E. coli*, *P. aeruginosa*)과 비듬균인 *P. ovale*를 포함한 총 6종의 균주에 대해 실험을 실시하였으며 결과는 Table 2에 나타내었다. 감초의 지표성분인 glycyrrhizin과 liquiritin은 병원성균인 *E. coli*에 대해서만 항균활성을 나타내었으며 liquiritin이 glycyrrhizin 보다 높은 항균활성을 나타냄을 확인하였다. Liquiritin 구조에서 당이 제거된 형태인 liquiritigenin은 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli* 총 3종의 균에 대해 항균활성을 나타내었다. Isoliquiritigenin은 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* 총 4종의 균에 대하여 항균활성을 나타내었고 감초 성분들 중 가장 높은 항균활성이 있음을 확인하였다.

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

감초 구성성분의 disc diffusion assay에서 높은 항균활성을 나타내었던 isoliquiritigenin과 liquiritigenin의 최소저해

농도를 측정하였다(Table 3). Isoliquiritigenin의 최소저해농도는 *B. subtilis* (156 µg/ml), *P. acnes* (625 µg/ml), *E. coli* (78 µg/ml), *P. aeruginosa* (312 µg/ml)를 나타내었다. Liquiritigenin의 최소저해농도는 *B. subtilis* (1,150 µg/ml), *P. acnes* (2,300 µg/ml), *E. coli* (250 µg/ml)를 나타내었다. 메틸 파라벤의 최소저해농도는 *B. subtilis* (2,500 µg/ml), *P. acnes* (2,500 µg/ml), *E. coli* (1,250 µg/ml), *P. aeruginosa* (5,000 µg/ml) 이며 프로필 파라벤의 최소저해농도는 *B. subtilis* (625 µg/ml), *P. acnes* (625 µg/ml), *E. coli* (625 µg/ml), *P. aeruginosa* (10,000 µg/ml)을 나타냈다. 대조군인 메틸 파라벤, 프로필 파라벤과 최소저해농도를 비교해보면 isoliquiritigenin은 메틸 파라벤 보다 항균활성이 *B. subtilis* (16배), *P. acnes* (4배), *E. coli* (16배), *P. aeruginosa* (16배) 높음을 확인하였고, 프로필 파라벤 보다는 항균활성이 *B. subtilis* (4배), *P. acnes* (동일), *E. coli* (8배), *P. aeruginosa* (32배) 높음을 확인하였다. Liquiritigenin은 메틸 파라벤 보다 항균활성이 *B. subtilis* (2배), *P. acnes* (동일), *E. coli* (5배) 높았고, 프로필 파라벤 보다는 *E. coli* (2.5배)의 경우만 높은 항균활성을 나타내었다. 단 *B. subtilis* (2배)와 *P. acnes* (3.7배)의 경우 프로필 파라벤이 liquiritigenin보다 높은 활

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC, µg/ml) of isoliquiritigenin and liquiritigenin against bacteria.

Strains	MIC (µg/ml)				
	Control	Positive control		Licorice ingredient	
		DMSO	Methyl paraben	Propyl paraben	Isoliquiritigenin
<i>B. subtilis</i>	- <sup>1)</sup>	2,500	625	156	1150
<i>P. acnes</i>	-	2,500	625	625	2300
<i>E. coli</i>	-	1,250	625	78	250
<i>P. aeruginosa</i>	-	5,000	10,000	312	-

<sup>1)</sup>No inhibition.

성을 나타내었다.

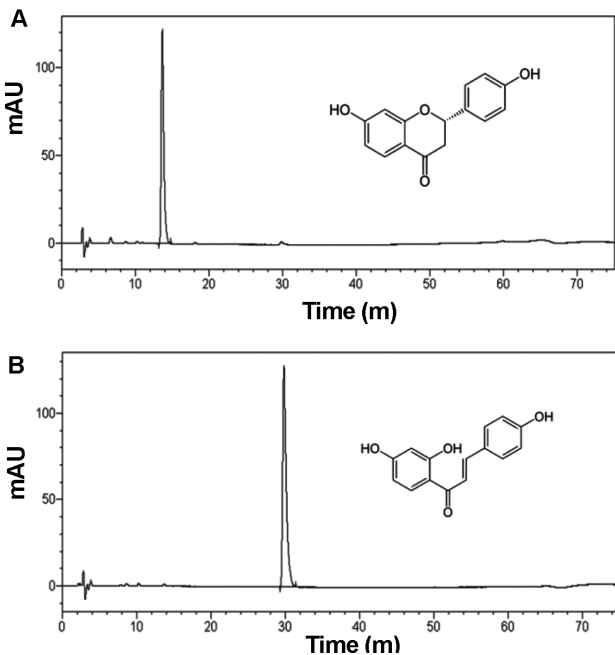
이상의 실험결과를 통해 감초의 플라보노이드 성분인 isoliquiritigenin, liquiritigenin이 감초가 뛰어난 항균활성을 나타내는데 기여하는 성분이라고 사료된다.

**감초 중의 isoliquiritigenin 및 liquiritigenin 함량 측정을 위한 검량선 작성**

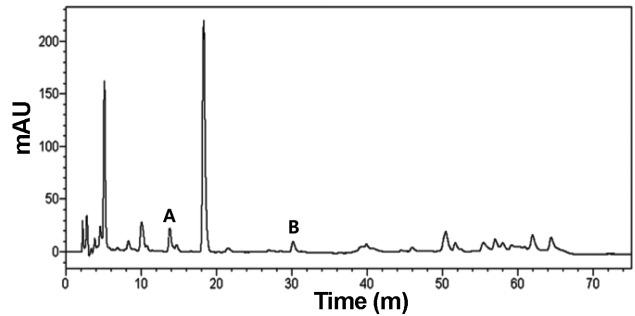
유의성 있는 검량선을 얻기 위해 3가지 이상 농도에서 실험을 실시하였으며, regression equation을  $y = ax + b$ 의 형태로 구하여 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선은 R<sup>2</sup> 값을 통하여 직선성을 판단하였고, R<sup>2</sup>의 값이 0.99일 때 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다. Isoliquiritigenin과 liquiritigenin 검량선의 상관계수는 R<sup>2</sup> = 0.9997로 양호한 직선성을 나타내어 정량분석에 적합한 검량선을 얻었다. 또한 isoliquiritigenin, liquiritigenin 표준품 80 µg/ml을 3번 연속 분석하였을 때, isoliquiritigenin과 liquiritigenin의 피크 면적의 측정 재현성은 각각 상대표준편차(RSD) 0.02%, 0.05%로 우수하였다. Isoliquiritigenin과 liquiritigenin의 머무름 시간의 재현성도 각각 상대표준편차(RSD) 0.14%, 0.06%로 우수하였다.

**감초 추출물 에틸아세테이트 분획의 HPLC 크로마토그램과 감초 성분인 isoliquiritigenin 및 liquiritigenin의 정량**

표준품 isoliquiritigenin과 liquiritigenin의 HPLC 분석 결



**Fig. 1. HPLC profile of liquiritigenin (A) and isoliquiritigenin (B).**



**Fig. 2. HPLC profile of ethyl acetate fraction of the licorice cultured in Korea. (A) liquiritigenin and (B) isoliquiritigenin.**

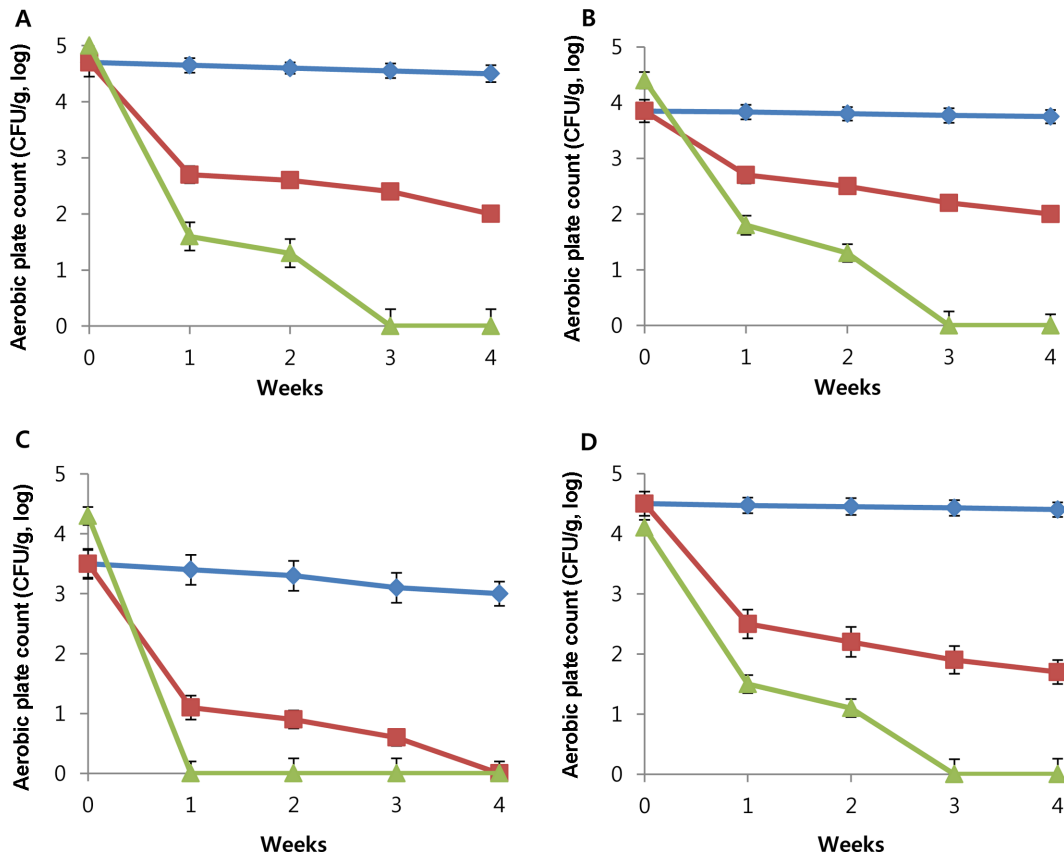
**Table 4. Content ratio of isoliquiritigenin and liquiritigenin according to various licorice origins.**

Origins	Isoliquiritigenin (%)	Liquiritigenin (%)
Korea	0.026	0.161
China	0.017	0.125
Uzbekistan	0.022	0.005

과, isoliquiritigenin은 30.23 min, liquiritigenin은 13.85 min에서 피크가 확인되었다(Fig. 1). 또한 추출물 중 isoliquiritigenin과 liquiritigenin의 정량을 위해 원산지별 감초 추출물 아세테이트 분획을 HPLC로 분석하였다. 한국산 감초추출물 에틸아세테이트 분획의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 2에 나타내었다. 내부 표준물질로는 에틸 파라벤을 사용하여 isoliquiritigenin과 liquiritigenin을 정량하였다. 원재료인 건조된 감초 중량 당 isoliquiritigenin의 함량은 한국산 감초가 0.026%, 중국산 0.017%, 우즈베키스탄산 0.022%였고, liquiritigenin은 한국산이 0.161%, 중국산 0.125% 및 우즈베키스탄산 0.005%로, 한국 감초에 isoliquiritigenin과 liquiritigenin이 가장 많이 함유되어 있음을 확인하였다(Table 4). 따라서 한국산 감초가 중국 및 우즈베키스탄 감초보다 큰 항균활성을 나타낼 수 있음을 시사한다.

**Isoliquiritigenin의 challenge test**

*B. subtilis*에 대한 challenge test: *B. subtilis*가 접종된 isoliquiritigenin 함유 크림의 7일 후 측정된 균 수는 초기 균 수 보다 99.90% 이상 감소하여 방부제의 유효성 측정에 대한 시험방법의 법규 인 CTFA 법을 기준에 부합하는 것을 확인하였다. 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, isoliquiritigenin을 함유한 크림이 메틸 파라벤을 함유한 크림보다 시간에 따른 균 수의 감소율이 큼을 확인하였다(Fig. 3A).



**Fig. 3.** 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, —■— : cream containing 0.20% methyl paraben, —▲— : cream containing 0.20% isoliquiritigenin.

*P. acnes*에 대한 challenge test: *P. acnes*가 접종된 isoliquiritigenin 함유 크림의 7일 후 측정된 균 수는 초기 균 수 보다 99.90% 이상 감소하였지만, 메틸 파라벤을 함유한 크림은 89.29% 감소하였다. 방부제를 첨가하지 않은 크림은 4주 동안 균 수의 감소율이 크지 않았다. isoliquiritigenin을 함유한 크림은 2주까지 균 수가 급한 감소율을 보였고, 3주와 4주에서는 균이 거의 확인되지 않았다. 이로써 isoliquiritigenin을 함유한 크림이 여드름균인 *P. acnes*에 대해 강한 방부력을 나타냄을 확인하였다(Fig. 3B).

*E. coli*에 대한 challenge test: *E. coli*가 접종된 isoliquiritigenin 함유 크림의 7일 후 측정된 균 수는 초기 균 수 보다 99.90% 이상 감소하여 방부제의 유효성 측정에 대한 시험방법의 법규인 CTFA 법을 기준에 부합하는 것을 확인하였다. 메틸파라벤을 함유한 크림도 7일 후 균 수가 초기 균 수 보다 99.90% 이상 감소하였고 방부제를 첨가하지 않은 크림은 초기 균 수와 비슷한 균 수를 유지하였다. 4주 동안 1주 마다 균 수를 측정하였고, isoliquiritigenin을 함유한 크림이 methyl paraben을 함유한 크림보다 시간에 따른 균

수의 감소율이 훨씬 큼을 확인하였다(Fig. 3C).

*P. aeruginosa*에 대한 challenge test: *P. aeruginosa*가 접종된 isoliquiritigenin을 함유한 크림의 7일 후 측정된 균 수는 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 파라벤 0.20% 함유한 크림은 *P. aeruginosa*에 대하여 CTFA법 기준에 맞는 방부력을 나타내지 못하였음을 확인하였다. 방부제를 첨가하지 않은 크림은 4주 동안 초기 균 수와 비슷한 균 수를 유지하였다. 이로써 isoliquiritigenin이 합성 방부제인 메틸 파라벤 보다 *P. aeruginosa*에 대해 방부력이 뛰어난 것을 확인하였다(Fig. 3D).

이상의 결과들을 통하여 감초 성분의 항균활성을 확인하였으며, 원산지별 감초 추출물(한국, 중국, 우즈베키스탄) 중 한국산 감초가 큰 항균력을 나타내는데 기여하는 성분은 isoliquiritigenin과 liquiritigenin 함량으로 이 성분들이 중국산과 우즈베키스탄산 보다 많이 함유되어 있음을 확인하였다. 본 연구에 앞서 감초 추출물의 천연 보존제로서의 효

능을 평가한 바 있으며, 감초 성분 중 가장 강력한 항균활성을 나타낸 isoliquiritigenin은 파라벤류를 대체 할 수 있는 천연 보존제로써 식품 및 화장품 분야에서 이용 가능성이 있다고 판단된다.

## 요약

본 연구에서는 감초성분인 glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin의 항균활성을 측정하고, 원산지별 감초 추출물에서 항균활성 성분인 isoliquiritigenin과 liquiritigenin을 정량하여 비교평가하였다. 또한 challenge test를 통하여 가장 뛰어난 항균활성을 나타낸 isoliquiritigenin과 합성 방부제인 메틸 파라벤과의 방부력을 비교하였다. 감초 성분의 항균활성을 disc diffusion assay를 통해 측정할 결과, Liquiritigenin과 isoliquiritigenin이 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*에 대해 저해활성을 보였다. 특히 감초 성분 중 큰 항균활성을 나타낸 isoliquiritigenin과 합성 방부제로 사용되는 메틸 파라벤과 프로필 파라벤의 최소저해능도를 비교한 결과 isoliquiritigenin이 강력한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다. HPLC를 통해 원산지별 감초 추출물 isoliquiritigenin과 liquiritigenin을 정량한 결과, 이들의 함량은 한국산 감초가 중국산 감초와 우즈베키스탄산 감초보다 높은 것을 확인하였다. 이를 통해 한국산 감초가 우수한 항균력을 나타내는데 isoliquiritigenin, liquiritigenin 함량이 영향을 미치는 것으로 판단된다. Isoliquiritigenin의 *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*에 대한 challenge test를 통해 메틸 파라벤 보다 isoliquiritigenin이 뛰어난 방부력을 나타냄을 확인하였다. 이상의 본 연구 결과로부터 감초 성분의 항균활성을 확인하였고, 원산지별 감초(한국, 중국, 우즈베키스탄) 중 한국 감초가 우수한 항균활성을 나타낸 isoliquiritigenin은 파라벤류를 대체 할 수 있는 천연 보존제로써 이용 가능성이 있다고 판단된다.

## 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.
- 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.
- Farrinton JK, Martz EL, Wells SJ, Ennis CC, Holder J, Levchuk JW, et al. 1994. Ability of laboratory methods to predict in-use efficacy of antimicrobial preservatives in an experimental cosmetic. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4553-4558.
- Gerald PB, Ricardo B, Victor F, Leena J. 1983. Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect Dis.* **5**: 279-313.
- Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, Barchiesi F, Paggi MA, Petrelli E, et al. 2000. Comparative activities of polycationic peptides and clinically used antimicrobial agents against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**: 807-810.
- Graham GM, Farrar MD, Cruse-sawyer JE, Holland KT, Ingham E. 2004. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL. *Pediatr. Brit. J. Dermatol.* **150**: 421-428.
- Kim HJ, Bae JY, Jang HN, Park SN. 2013. Comparative study on antimicrobial activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts in various country of origin as natural antiseptics. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 358-366.
- 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.
- 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.
- Vowels BR, Yang S, Leyden JJ. 1995. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infect. Immun.* **63**: 3158-3165.
- Rastogi SC, Schouten A, de Kruijff N, Weijland JW. 1995. Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact. Dermatitis.* **32**: 28-30.
- Routledge, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (Parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharm.* **153**: 12-19.