

오배자, 우슬, 가자 및 감초를 포함하는 혼합추출물의 항산화 및 항균 활성

조홍석¹, 강세원¹, 김주희¹, 최민주¹, 유혜원¹, 박으뜸², 전홍성^{2*}

Antioxidant and Antimicrobial Activities of Combined Extracts of *Galla rhois*, *Achyranthes japonica* Nakai, *Terminalia chebula* Retz and *Glycyrrhiza uralensis*

Hong-Suk Cho¹, Se-won kang¹, Ju-Hee Kim¹, Min-Joo Choi¹, Hye-Won Yu¹, Euteum Park², and Hong Sung Chun^{2*}

접수: 2014년 1월 3일 / 게재승인: 2014년 1월 22일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic crude extract and its five different solvent sub-fractions (namely, ethyl acetate fraction, n-butanol fraction, chloroform fraction, n-hexane fraction and the aqueous fraction) from a mixture of four different medicinal herbs (*Galla rhois*, *Achyranthes japonica* Nakai, *Terminalia chebula* Retz and *Glycyrrhiza uralensis*) were investigated. Among all the tested mixture combination of four medicinal herbs, 5:3:1:1 ratio of *Galla*:*Achyranthes* : *Terminalia* : *Glycyrrhiza* had the best antimicrobial effects against four strains of microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and exhibited the highest DPPH radical-scavenging activity. Further sub-fractions with solvents were screened for antioxidant and antimicrobial activities. Antioxidant activity in order was ethyl acetate fraction > n-butanol fraction > chloroform fraction > n-hexane fraction > aqueous fraction. The n-butanol extracted

fraction showed the highest level of antimicrobial activity in comparison to other fractions. In addition, all those fractions did not show any cytotoxicity against human skin cell CCD-986sk. These results suggest that 5:3:1:1 combination extracts of medicinal herbs (*Galla* : *Achyranthes* : *Terminalia* : *Glycyrrhiza*) may be potentially used as a safe natural antimicrobial preservative.

Keywords: *Galla rhois*, *Achyranthes japonica* Nakai, *Terminalia chebula* Retz, *Glycyrrhiza uralensis*, Antimicrobial, Antioxidant, Preservative

1. 서론

화장품은 지질인 오일성분과 물을 주성분으로 여기에 다양한 재료의 혼합으로 만들어진다. 이런 다양한 성분의 혼합으로 인한 그 성분 및 제형 상의 특성이 있기 때문에 미생물로부터 오염되기 쉽다. 특히 미생물의 탄소원이 되는 글리세린과 솔비톨, 질소원이 되는 아미노산 유도체와 단백질 등이 배합되어 있어 세균과 곰팡이 등에 오염되기 쉽다. 이런 문제점을 해결하기 위하여 알맞은 성능을 가진 물질을 선택하여 방부제로 사용해야 한다 [1]. 화장품에 사용되는 방부제는 대부분 화학적으로 합성된 방부제에 의존하고 있다. 제품의 보존을 위하여 방부제를 다량으로 사용할 경우 피부자극

¹월드코스텍 기업부설연구소
¹Research Institute, World Costec. Co. Ltd., Jangsung 515-893, Korea

²조선대학교 생명공학과
²Department of Biotechnology, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel: +82-62-230-6609, Fax: +82-62-230-6609
e-mail: hsjeon@chosun.ac.kr

및 부작용이 유발될 수 있기 때문에 최소량으로도 최대의 항균력을 나타내며 인체에 영향을 주지 않는 방부제를 선택하여야 한다 [2,3]. 주로 사용되는 합성방부제 종류는 파라벤류, 퀴터놀-15, 이미다졸리디닐우레아, 클로페네신, 페녹시에탄올 등이 있다 [4-6]. 화장품, 의약품 등에 광범위하게 사용되는 기존의 합성 방부제들은 피부알러지 유발, 피부자극, 환경호르몬으로서의 가능성 및 내성균 유발이라는 문제점을 가지고 있다. 뿐만 아니라 허용된 기준내의 사용의 경우에도 장기간 사용에 따라 지속적인 체내 축적으로 인한 급·만성 독성, 돌연변이 및 암 유발 등의 새로운 문제 가능성이 대두되고 있다. 이러한 화학 방부제의 단점을 극복하기 위해 최근 천연 방부제나 자체 방부를 가능하게 하는 천연 소재에 관심이 높아지고 있으며, 활발한 연구가 진행되고 있다 [7-11].

오배자 (*Galla rhois*)는 옻나무과에 속한 낙엽소교목인 붉나무 (*Rhus javanica* Linne) 또는 그 밖의 동속 식물의 잎에 오배자 진딧물의 자상에 의하여 생긴 벌레집이다. 성상은 고르지 않고 불규칙하게 2~4개로 갈라진 주머니 모양을 하거나 깨어져 있다. 주요성분인 tannin의 함량이 높아 수렴작용에 의한 지사작용, 항균작용, 선 분비 억제작용을 나타낸다. 한방에서는 설사, 대장염, 이질, 위장 출혈, 각혈, 코피, 식은땀, 자한 등에 쓰이며, 외상성 출혈, 점막의 염증, 궤양, 습진 등에도 쓰인다. 오배자는 항균작용 및 항산화, 항혈전, 간보호 등 약리작용이 있는 것으로 보고되었고, 최근에는 오배자를 이용한 미백 및 항 주름 효과에 관한 연구가 진행되었으며, 오배자 추출물의 항암효과 및 오배자의 주성분인 methyl gallate의 전립선 암세포 억제 효능이 확인되었다 [2,12,13].

우슬 (*Achyranthes japonica* Nakai)은 비름과에 속하는 다년생 식물로서 우리나라 각지의 들판이나 길가에 자생되고 있으며 일본과 중국에도 분포하고 있다. 뿌리에는 oleanolic계 saponin과 steroid계 inokosterone, ecdysterone 등의 성분이 함유되어 있어 예로부터 귀중한 한약재로 사용되고 있다. 진통작용, 혈압강화작용, 항산화, 류마티스 및 관절통과 같은 율혈의 치료 효능, 이노 및 강장제로서의 효능이 있고, 어린순은 나물로 먹기도 한다. 우슬 추출물의 성분인 20-hydroxyecdysone은 일부 그람양성균의 항균 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다 [14-16].

가자 (*Terminalia chebula* Retz)는 사군자과 (Combretaceae)에 속하는 가자나무의 성숙한 열매를 말린 약재로 가려늑, 가리늑, 수풍자, 가리, 가려라고 해서 아시아에서 약용으로 사용되고 있다. 가자의 약리학적 효능으로는 tannin이 많아서 수렴, 지사작용이 있다고 보고되어 있으며, 녹농균, 디프테리아균, 황색포도상구균, 용혈성 연쇄상구균에 억제작용을 일으킨다고 알려져 있다. 이밖에 가자에는 적혈구 응집소라고 불리는 렉틴이 존재한다고 알려져 있다. 한의학에서는 삼(澁)한 맛과 온(溫)한 약성을 가지며 항암활성, 항당뇨활성, 항돌연변이활성, 항균활성, 충치 예방효과 등 다양한 생리활성을 가지고 있음이 알려져 있다 [2,11,17,18].

감초 (*Glycyrrhiza uralensis*)는 콩과 (Leguminosae) 식물에

속하는 다년생 초본으로 한국, 중국 및 일본에서 한약재로서 널리 이용되고 있는 약용식물이다. 뿌리나 근경을 한약재의 원료로 이용하고 있는 식물로서 매우 중요한 한방약물이며 한방 처방 중에서 가장 높은 빈도로 처방되어지는 약물이다. 감초의 가장 주요한 활성성분은 triterpenoid계 saponin인 glycyrrhizin으로 감초 뿌리에 3-5% 정도 함유되어 있고, 항알레르기성, 항산화성, 항괴양성 및 항암성과 같은 생리활성을 가지고 있다. 미량성분인 liquiritigenin, liquiritin 등의 flavonoids는 항균효과를 가진다. 이 중에서 감초의 활성 성분 중 가장 많은 양을 차지하는 glabridin은 체내에서 인체에 해로운 low density lipo- protein (LDL)의 산화를 억제시키는 효과가 있다고 알려져 있다 [19-22].

본 연구에서는 오배자, 우슬, 가자 및 감초가 공통적으로 전통적인 약재로 사용되며, 항산화, 항균 등의 효능을 갖고 있는 점에 착안하여 이들 혼합물질의 항균력과 항산화력을 조사함으로써 천연방부제로서의 활용 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 시약

본 실험에 사용한 4종의 천연물은 화순의 국산 한약재 판매장을 통하여 구입하였다. 4종의 천연물은 blender를 사용 60 mesh로 분쇄한 후 천연물 100 g에 ethanol 1 liter를 첨가한 후 80°C에서 4시간 동안 추출한 후 0.45 μ m (Adventec No. 2) 여과지로 여과하여 얻은 액을 농축 후 동결건조하여 1차적인 에탄올 조추출물로 사용하였다. 에탄올 조추출물의 각 분획은 n-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 n-butanol을 사용하여 순차적으로 분획·추출하여 각 용매별 추출물과 물층을 얻었고 (Fig. 1), 감압 농축 후 동결건조하여 사용하였다. 일반 시약은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 사용균주 및 배지

항균활성 측정 시험에 사용한 균주는 한국미생물보존센터

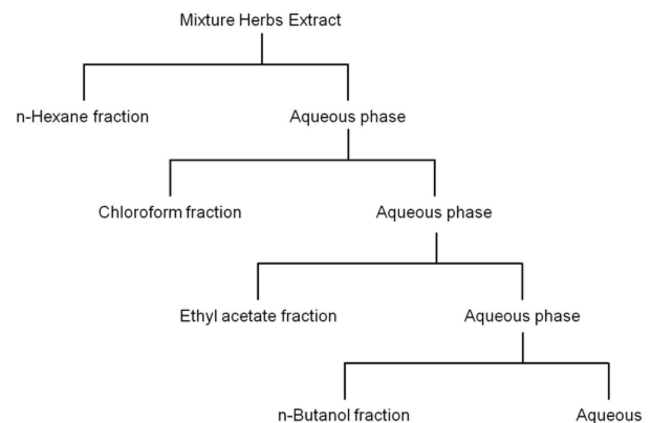


Fig. 1. Flow diagram for the fractionation of mixture extracted from medicinal herbs.

(KCCM)로부터 분양 받았으며, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, KCCM 11764), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*, KCCM 21205), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, KC CM 11952)와 *Escherichia coli* (*E. coli*, CCARM 1238)를 이용하였다. 배지는 BD Science (USA)의 Nutrient Broth (NB), Tryptic Soy Broth (TBS) 와 Luria Bertani Broth (LB) 배지를 사용하였다.

2.3. 항균활성 분석

S. aureus, *S. epidermidis*, *p. aeruginosa*, *E. coli*에 대한 항균활성은 paper disc diffusion 방법과 Minimum inhibitory concentration (MIC) 방법을 사용하였다 [2,23]. TBS, LB 또는 NB agar 배지에 균을 도말한 다음 멸균된 paper disc를 올리고 시료를 paper disc에 흡수시킨 후, 37°C incubator에서 24시간 배양한 다음 디스크 주위의 생육 저해환 (Clear zone) 생성 유무를 확인하였다. MIC 값은 각 시료들을 각 농도별로 희석하고 여기에 균을 접종하고 충분히 배양한 후 균이 자라지 않은 최소저해 농도를 측정하였다. 오배자, 우슬, 가자, 감초의 혼합비율에 따른 항균활성을 확인하기 위해서 20가지 조건의 혼합 조성을 준비하였고 (Table 1), paper disc diffusion과 MIC 방법을 통하여 항균력을 테스트 하였다.

2.4. 항산화 활성 측정

추출물의 항산화능은 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)을 이용하여 라디칼 소거능을 확인하였다 [10,20]. 시료 60 µL와 0.2 mM DPPH 용액 240 µL를 96 well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교한 DPPH 소거효율을 백분율 (%)로 나타내었다.

2.5. 세포배양 및 세포 독성 측정

CCD-986sk 인체 피부 섬유아세포는 ATCC (CRL-1947)에서 분양받아 사용하였다. CCD-986sk는 100 U/mL의 penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 용액으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포독성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 통해 확인하였다. MTT assay는 세포의 생육상을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성하는 원리를 이용한 것이다. 세포를 96 well plate에 well 당 3×10⁴ cells의 농도가 되도록 조절한 후 96 well microplate의 각 well에 분주하고 이것을 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 다음 추출물을 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL 농도가 되도록 배지에 희석하여 첨가하였다. 첨가 후 24시간 동안 배양시킨 후 5 mg/mL의 MTT 용액을 주입하고 세포 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide에 녹인 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율 (%) = (1 - 시료 처리군의 흡광도 / 대조군의 흡광도) × 100의 계산식으로 정량화하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 에탄올 조추출물의 혼합조건에 따른 항균 활성 탐색

제조된 각각의 추출물을 표 1의 함량과 같이 혼합하여 천연 방부제 조성물을 제조한 후, 페이퍼 디스크 확산법 (paper disc diffusion)에 의하여 대장균 (*E. coli*), 황색포도상구균 (*S.*

Table 1. The mixture ratio of crude ethanolic extracts from medicinal herbs Mixture ratio (Mixture ratio; w/w, %)

Samples	<i>Galla rhois</i>	<i>Achyranthes Japonica</i> Nakai	<i>Terminalia chebula</i> Retz	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
1	100	-	-	-
2	-	100	-	-
3	-	-	100	-
4	-	-	-	100
5	60	20	20	-
6	60	20	-	20
7	60	-	20	20
8	-	35	30	35
9	-	60	20	20
10	10	10	10	70
11	10	10	70	10
12	10	70	10	10
13	70	10	10	10
14	60	20	10	10
15	60	10	20	10
16	60	10	10	20
17	55	15	15	15
18	50	30	10	10
19	50	20	20	10
20	40	20	20	20

Table 2. Antimicrobial activity of crude ethanolic extracts from mixtures of medicinal herbs¹⁾ on various microorganisms

Samples	Diameter of inhibition zone (mm)			
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>P.aeruginosa</i>
1	+	+	++	- ²⁾
2	+ ³⁾	-	-	-
3	+	-	+	+
4	+	+	+	+
5	-	+	+	++
6	-	+	++ ⁴⁾	-
7	-	+	++	+
8	+	+	+	-
9	+	++	-	-
10	-	-	+	+
11	-	+	+	+
12	-	+	+	-
13	-	++	+	-
14	+	+	+++ ⁵⁾	+
15	+	+++	+	-
16	+	++	+	-
17	+	+	+++	-
18	++	++	+++	++
19	+	+	+++	-
20	+	++	+	-

¹⁾Mixtures of medicinal herbs in Table 1.

²⁾- Not detected.

³⁾+ 9~11 mm.

⁴⁾++ 12~14 mm.

⁵⁾+++ 15 mm over.

aureus), 표피포도상구균 (*S. epidermidis*) 및 녹농균 (*P. aeruginosa*)에 대하여 항균 활성을 측정하고, 그 결과를 표 2에 나타내었다. 각 조성물은 중량별로 혼합한 후 5 µg/mL 되도록 녹인 후 paper에 충분히 흡수시킨 후 실험을 진행하였다. 각 균주에 대한 저해환 크기는 오배자의 경우 대장균, 황색포도상구균과 표피포도상구균에서는 항균활성이 나타났으나, 녹농균에 대한 항균 활성은 나타나지 않아 오배자 추출물이 다른 균주에 비해 녹농균에서 항균활성이 낮게 나타난 기존의 연구와 유사한 결과를 나타냈다 [2]. 우슬과 가자의 경우 *E. coli*에 대한 항균 활성이 보고된 바 있으나 본 실험에서는 *E. coli*에 대한 항균활성은 나타나지 않았다. 이는 추출물의 농도와 추출방법에 따른 차이가 나타난 것으로 여겨진다 [2,23]. 감초 추출물의 경우에는 기존의 연구에서처럼 안정적으로 고른 항균활성을 보였다 [24]. 에탄올 조추출물의 혼합조건에 따른 균주에 대한 저해환의 크기를 살펴보면 *S. aureus*의 항균활성은 18번 혼합 조건에서 항균 활성이 가장 뛰어나게 나타났으며, *E. coli*의 항균활성은 15번 혼합 조건에서 *S. epidermidis*의 항균활성은 14, 17, 18, 19번 혼합 조건에서 *P. aeruginosa*의 항균활성은 5번, 18번 혼합 조건에서 항균 활성이 가장 우수하게 나타났다. 4가지 균주에 대한 항균 활성이 전체적으로 뛰어나게 나타난 혼합비율은 오배자:우슬:가자:감초의 비율이 5:3:1:1로 혼합된 18번 혼합조건이었으며 실험에 사용한 균주 모두에 대해 inhibition zone이 12

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of crude ethanolic extracts from mixtures of medicinal herbs against several microorganisms

Samples	MIC (%)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
14	1	1	1	1
15	0.1	1	1	5
16	1	1	1	5
17	5	1	1	1
18	0.1	1	1	1
19	5	1	1	1
20	1	1	5	1

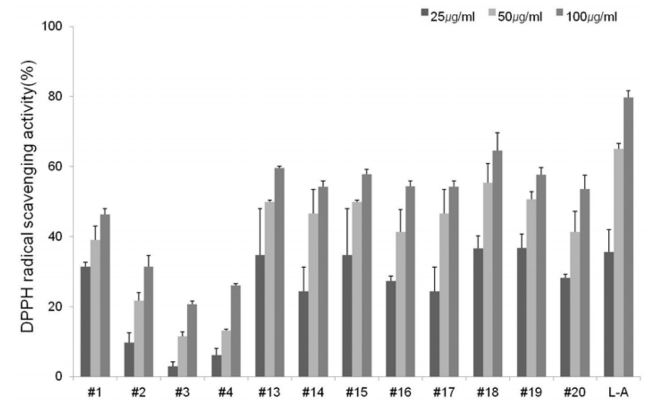


Fig. 2. DPPH radical scavenging effect in crude ethanolic extracts from mixtures of medicinal herbs. L-A: L-ascorbic acid, #No.: Ethanol extracts of medicinal herbs as described in Table 1. Results are mean±SD (n=3).

mm 이상 나타나 우수한 항균활성을 보였다 (Table 2).

3.2. 에탄올 조추출물의 혼합조건에 따른 최소저해 농도 측정

Paper disc법에 의하여 항균성이 우수하다고 평가되는 조합인 14~20번 혼합조건 (Table 1)의 항균활성을 최소저해농도 (MIC) 측정법을 이용하여 추가 확인하였다 (Table 3). *S. aureus*에 대한 항균 활성의 경우는 15번과 18번 혼합조성이 0.1%의 매우 낮은 농도에서도 항균활성을 보였으며, *E. coli*에 대해서는 14~20번 혼합조성 모두 1%의 동일한 MIC 효과를 보였다. *S. epidermidis*에 대해서는 20번 혼합조성이 5%, 14~19번 혼합조성은 1%의 MIC를 나타냈다. *P. aeruginosa*에 대해서는 15번, 16번 조성이 5%, 14번과 17~20번 혼합 조성은 1%의 MIC를 보였다. 전체적으로 paper disc에 의한 저해환 실험의 결과와 마찬가지로 18번 혼합조건이 가장 광범위하게 뛰어난 항균활성을 나타냄을 확인하였다.

3.3 에탄올 조추출물의 혼합조건에 따른 free radical 소거 효과

DPPH는 항산화 물질과 반응하면 radical이 소거되므로 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 에탄올 조추출물

Table 4. Yield of five different fractions from crude ethanolic extract¹⁾

Fractions	Yield (w/w of 5 g dry sample, %)
n-Hexane	0.31 (6%)
Chloroform	0.19 (3%)
Ethyl acetate	1.97 (39.4%)
n-Butanol	0.34 (6.8%)
Aqueous	1.9 (38%)

¹⁾5:3:1:1 mixture of *Galla Rhois* : *Achyranthes Japonica Nakai* : *Terminalia chebula Retz* : *Glycyrrhiza uralensis*.

의 혼합조건에 따른 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 오배자, 우슬, 가자, 감초 단독처리군 (샘플 1~4번, Table 1)과 paper disc결과 상대적으로 효능이 좋은 그룹인 혼합조건 13~20번 샘플 (Table 1)의 항산화 활성을 확인하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다. DPPH의 결과 각각의 추출물과 혼합추출물에서 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가함을 볼 수 있었다. 100 µg/mL 농도의 단독 처리군 (샘플 1~4번)에서는 오배자 추출물 (샘플 1번)이 가장 높은 항산화 활성 (46%)을 나타냈으며, 우슬 31%, 감초 26%, 가자 20%의 순으로 높은 항산화 활성을 나타냈다. 혼합추출물의 경우는 모든 샘플에서 농도 의존적으로 높은 항산화 효과를 나타냈고, 그 중에서 항균활성이 가장 뛰어난 18번 조합에서 단독 추출물을 처리한 결과에 비하여 가장 뚜렷하게 상승된 항산화 효과를 보여주었다.

3.4. 에탄올 조추출물의 분획 추출

항균테스트와 항산화활성 측정 결과 18번 조합인 오배자:우슬:가자:감초 (5:3:1:1)의 조합이 다른 혼합 조건과 비교했을 때, 근소하지만 가장 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이에 오배자:우슬:가자:감초를 5:3:1:1로 섞어 에탄올로 조추출한 후 용매의 극성차이를 이용하여 용매분획으로 각각 분리하였다 (Fig. 1). 에탄올 조추출물의 용매별 분획의 수율은 aqueous 분획과 극성이 낮은 ethyl acetate 분획에서 각각 38%, 39.4%로 높게 나타났으며, chloroform, n-hexane, n-butanol 분획은 각각 3%, 6%, 6.8%의 수율을 보였다 (Table 4).

3.5. 분획추출물의 free radical 소거 활성

에탄올 조추출물 (샘플 18번, 오배자:우슬:가자:감초 5:3:1:1 혼합추출물) 및 분획추출물의 free radical 소거활성을 측정하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid와 BHA를 사용하였다. 에탄올 조추출물 (샘플 18번)의 free radical 소거 활성은 L-ascorbic acid보다는 낮지만 BHA보다는 높은 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3). 다섯 가지 분획 추출물의 free radical 소거활성은 ethyl acetate (EA) 분획물에서 가장 높게 나타났고, 다음으로 n-butanol (BuOH), chloroform (Ch), n-hexane (Hex), aqueous (Aqu) 순으로 나타났다 (Fig. 3). 이는 오배자와 우슬의 분획 추출물 중 ethyl acetate와 n-butanol의 분획물의 항산화 활성이 높게 나타난 기존의 연구 결과와 일치한다 [15,25].

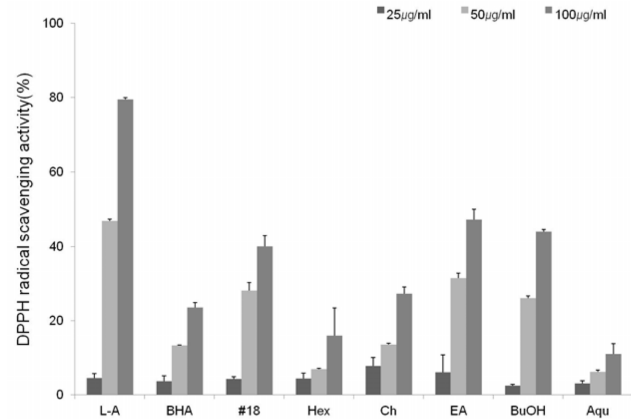


Fig. 3. DPPH radical scavenging activities of ethanolic crude extract from medicinal herbs and its five different solvent sub-fractions. L-A: L-ascorbic acid, BHA: Butylated hydroxyanisole, #18: Crude ethanolic extract from 5:3:1:1 mixture as described in table 1, Hex: n-Hexane fraction, Ch: Chloroform fraction, EA: Ethyl-acetate fraction, BuOH: Butanol fraction, Aqu: Aqueous fraction. Results are mean±SD (n=3).

Table 5. Antimicrobial activity of fractions of ethanolic extract from medicinal herbs¹⁾

Fractions	Clear zone diameter (mm)			
	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
n-Hexane	++	+	+	-
Chloroform	++	+	++	-
Ethyl acetate	++	+	+	++
n-Butanol	++	++	+++	+
Aqueous	+	++	+	-

¹⁾Mixtures of 5:3:1:1 medicinal herbs in Table 1.

²⁾- not detected.

³⁾+ 9~11 mm.

⁴⁾++ 12~14 mm.

⁵⁾+++15 mm over.

5 µg/mL of each fraction was applied into paper disc and then the diameter of the growth inhibition zone was measured. (n=3)

3.6. 분획추출물의 항균활성

분획추출물의 항균활성은 paper disc법으로 측정하였다 (Table 5). 분획추출물의 항균활성을 보면 *S. aureus* 균주에 대해서는 n-butanol, chloroform, ethyl acetate, n-hexane 분획이 우수한 항균활성을 나타내었고, aqueous 분획도 약간 낮은 수준이지만 비교적 우수한 항균활성을 보였다. *S. epidermidis* 균주에 대해서는 n-butanol 분획이 가장 뛰어난 활성을 나타냈으며, 다음으로 aqueous, chloroform, ethyl acetate, n-hexane층 순으로 항균활성이 나타났다. *E. coli* 균주에 대해서는 n-butanol 분획이 가장 뛰어난 활성을 나타냈으며, 다음으로 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, aqueous층 순으로 항균활성이 나타났다. *P. aeruginosa* 균주에 대해서는 ethyl acetate, n-butanol, chloroform, n-hexane, aqueous층 순으로 항균활성이 나타났다. 전체적인 항균 활성을 보면 n-butanol 분획 추출물에서 다양한 균에 대한 항균활성이 가장 뛰어나고 다음으로 ethyl acetate

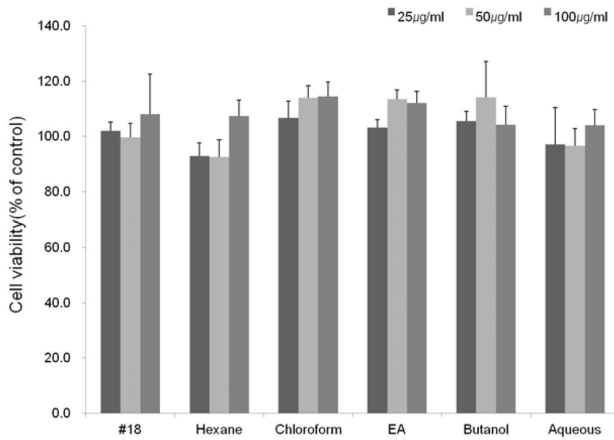


Fig. 4. Toxicity of crude ethanolic extract (#18, 5:3:1:1 mixture of medicinal herbs as described in Table 1) and its five different sub-fractions in CCD-986sk human skin cell. Cell viability was assessed by MTT assay. Hex: n-Hexane fraction, Ch: Chloroform fraction, EA: Ethyl-acetate fraction, BuOH: Butanol fraction, Aqu: Aqueous fraction.

분획 추출물에서 높은 항균활성이 나타남을 알 수 있었다. 분획추출물별 항균활성은 오배자, 우슬은 ethyl acetate, 가자는 n-butanol, 감초는 ethyl acetate 분획층에서 항균활성이 가장 뛰어나게 나타났다고 보고되어져 유사한 결과가 나왔다 [11,14,26,27].

3.7. 에탄올 조추출물 및 분획추출물의 세포독성

에탄올 조추출물 (샘플 18번, 오배자:우슬:가자:감초 5:3:1:1 혼합추출물)과 이것의 분획 추출물이 인간 피부세포에 독성을 보이는지 여부를 조사하였다. 세포주는 human skin fibroblast인 CCD-986sk 세포주를 사용하였고, MTT assay를 통하여 측정하였다. 오배자, 우슬, 가자, 감초 추출물들이 다양한 세포에서 세포독성을 보이지 않는 것으로 보고 되었지만, 인간 피부유래의 CCD-986sk 세포에서의 독성 여부는 아직까지 확인되지 않았다 [26,28-30]. 세포독성 측정 결과 에탄올 조추출물과 그것의 분획 추출물 5종류 모두 CCD-986sk 세포 생존율에 영향을 주지 않았으며, 인간 피부 세포에 독성을 보이지 않는 안전한 것으로 확인하였다 (Fig. 4).

4. 결론

본 연구에서는 천연 항균소재를 탐색하기 위하여 오배자, 우슬, 가자, 감초의 ethanol 조추출물과 이의 혼합추출물에 대한 분획 추출물을 이용하여 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*에 대한 항균효과를 알아보았다. 오배자, 우슬, 가자, 감초 단독으로 항균활성을 paper disc방법으로 알아본 결과 오배자 추출물에서 항균활성이 가장 뛰어난 항균 활성을 보였으며, 오배자, 우슬, 가자, 감초 추출물의 서로 다른 배합에 따른 항균활성은 오배자:우슬:가자:감초의 비율이 5:3:1:1

의 비율로 혼합하였을 경우 가장 뛰어난 항균활성을 보였다. 서로 다른 혼합 비율에 따른 MIC방법을 이용한 항균활성과 DPPH assay를 통한 항산화 활성에서도 5:3:1:1의 비율로 혼합하였을 경우 가장 뛰어난 활성을 보였다.

오배자:우슬:가자:감초 5:3:1:1 혼합물의 에탄올 조추출물을 유기용매로 분획추출을 하여 활성을 알아보았다. 분획추출물의 수율은 ethyl acetate (39.4%), aqueous (38%), n-butanol (6.8%), n-hexane (6%), chloroform (3%) 순으로 ethyl acetate와 aqueous 분획 층에서 수율이 매우 높게 나왔다. 분획별 항산화 활성은 ethyl acetate 분획 층에서 가장 뛰어난 활성을 보였고, 다음으로 n-butanol, chloroform, n-hexane, aqueous층 순으로 나타났다. 분획별 항균활성은 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*에서는 n-butanol 분획 층에서 *P. aeruginosa*에 대한 항균활성은 ethyl acetate 분획 층에서 가장 높게 나타났다.

Human fibroblast cell line인 CCD-986sk 세포주에서 세포독성 확인 결과 에탄올 조추출물과 분획추출물 모두에서 세포독성은 보이지 않았다.

본 연구를 통하여 기존의 화학방부제를 대신하여 천연 한방 추출물인 오배자, 우슬, 가자, 감초 추출물로 이루어진 혼합물을 이용하여 천연항산화제 및 항균활성을 가진 기능성 소재개발이 가능할 것으로 사료된다.

감사

본 연구는 산업통상자원부의 “3G-Bio연계 친환경생물소재 고도화 사업” 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, M. J., T. K. Jung, I. G. Hong, and K. S. Yoon (2006) Comparison of anti-microbial oils as natural preservatives. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 32: 99-103.
- Cho, E. M., J. T. Bae, H. B. Pyo, and G. S. Lee (2008) Antimicrobial plant extracts as an alternative of chemical preservative: Preservative efficacy of *Terminalia chebula*, *Rhus japonica* (gallut) and *Cinnmorum cassia* extract in the cosmetic formular. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 34: 325-331.
- Park, S. M., K. A. Lee, M. Y. Yun, Y. J. Kim, and S. H. Lee (2011) Study of natural preservative system using the mixture of *Scutellariae radix*, *Acacia nilotica* and *Citrus reticulata* extracted from polyhydric alcohols. *KSBB J.* 26: 533-537.
- Yang, H. G., H. J. Kim, H. S. Kim, and S. N. Park (2012) Antioxidative and antibacterial activities of *Artemisia princeps* Pampanini extracts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 40: 250-260.
- Lee, J. Y., J. N. Lee, G. T. Lee, and K. K. Lee (2012) Development of antimicrobial plant extracts and its application to cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 38: 171-179.
- Kim, S. Y., D. H. Won, and S. N. Park (2010) Antibacterial activ-

- ity and component analysis of *Persicaria perfoliata* extracts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38: 278-282.
7. Esposito, E., F. Bortolotti, C. Nastruzzi, E. Menegatti, and R. Cortesi (2003) Diffusion of preservatives from topical dosage forms: A comparative study. *J. Cosmet. Sci.* 54: 239-250.
 8. Steinberg, D., Z. Hirschfeld, I. Tayeb, S. Ben-Yosef, A. David, and M. Friedman (1999) The effect of parabens in a mouthwash and incorporated into a sustained release varnish on salivary bacteria. *J. Dent.* 27: 101-106.
 9. Vilaplana, J. and C. Romaguera (2000) Contact dermatitis from parabens used as preservatives in eyedrops. *Contact Dermatitis.* 43: 248.
 10. Nam, S. H. and M. Y. Kang (2000) Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43: 141-147.
 11. Kim, K. J., J. R. Do, J. H. Jo, Y. M. Kim, B. S. Kim, S. D. Lim, and S. N. Kang (2005) Antibacterial activity of *Terminalia chebula* Retz. extract against food spoilage microorganisms. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 37: 498-503.
 12. Choi, H. S., J. S. Kim, D. S. Jang, Y. B. Yu, Y. C. Kim, and J. S. Lee (2005) Antibacterial activities of *Galla Rhois* extracts against fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.* 18: 239-245.
 13. Jo, H. C., K. S. Han, and E. Y. An (2000) Gall formation on different age, habitat, and parasite position in *Rhus javanica* L.. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 8: 304-311.
 14. Jung, S. M., S. I. Choi, S. M. Park, and T. R. Heo (2007) Antimicrobial effect of *Achyranthes japonica* Nakai extracts against *Clostridium difficile*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 39: 564-568.
 15. Park, J. S., N. S. Seong, and Y. J. Lee (2007) Comparative study on the anti-oxidative effects of *Achyranthis japonicae* Radix, *Achyranthis bidentatae* Radix and *Cyathulae* Radix. *Kor. J. Herbology.* 22: 155-167.
 16. Kim, E. S., S. I. Jeong, J. H. Kim, C. Park, S. M. kim, J. K. Kim, K. M. Lee, S. H. Lee, H. So, and R. Park (2009) Synergistic effects of the combination of 20-hydroxyecdysone with ampicillin and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1576-1581.
 17. Jang, S. J., G. D. Lee, J. S. Kim, and H. S. Yoon (1992) Antioxidative effectiveness of *Terminalia chebula* Retz extracts. *Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.* 10: 11-17.
 18. Chae, I. G., M. H. Yu, H. I. Kim, and I. S. Lee (2011) Anti-inflammatory and anti-oxidative activity of methanol extract from *Terminalia chebula* Retz., *Lavandula spica* L., and *Dalbergia odorifera* T. in RAW 264.7 cells. *J. Life Sci.* 21: 561-567.
 19. Han, S. B., H. A. Gu, S. J. Kim, H. J. Kim, S. S. Kwon, H. S. Kim, S. H. Jeon, J. P. Hwang, and S. N. Park (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.
 20. Woo, K. S., K. I. Jang, K. Y. Kim, H. B. Lee, and H. S. Jeong (2006) Antioxidative activity of heat treated Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 38: 355-360.
 21. Kim, S. J., D. H. Kweon, and J. H. Lee (2006) Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of Licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Kor. J. Food Sci. Technol.* 38: 584-588.
 22. Lee, J. W., Y. J. Ji, M. H. Yu, H. G. Im, M. H. Hwangbo, and I. S. Lee (2005) Antimicrobial effect of extract of *Glycyrrhiza uralensis* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 37: 456-464.
 23. Cai, H., S. I. Choi, Y. M. Lee, and T. R. Heo (2002) Antimicrobial effects of herbal medicine extracts on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 17: 537-542.
 24. Kim, S. J., J. Y. Shin, Y. M. Park, K. M. Chung, J. H. Lee, and D. H. Kweon (2006) Investigation of antimicrobial activity and stability of ethanol extracts of Licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Kor. J. Food Sci. Technol.* 38: 241-248.
 25. Bae, J. S., H. S. Lee, H. Y. Lee, B. H. Yoo, T. W. Kim, Y. H. Kim, and T. H. Kim (2012) Evaluation of acetylcholinesterase inhibitory and antioxidative activities of *Rhus javanica*. *Kor. J. Food Preserv.* 19: 751-756.
 26. Seo, H. S. (2010) *Studies on the antimicrobial effect and antioxidative activity of fermented Galla Rhois Extract*. Ph.D. Thesis. University of Joongbu, Kumsan-gum, Chung-nam, Korea.
 27. Ahn, E. Y., D. H. Shin, N. I. Baek, and J. A. Oh (1998) Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30: 680-687.
 28. Kim, M. S., J. S. Jeong, H. Y. Lee, Y. S. Ju, G. S. Bae, S. W. Seo, I. J. Cho, S. J. Park, and H. J. Song (2011) The anti-inflammatory effect of *Achyranthes japonica* on lipopolysaccharide-induced inflammatory activity in murine macrophages. *Kor. J. Herbology.* 26: 51-57.
 29. Lee, H. S., Y. C. Koo, and K. W. Lee (2009) Suppressive activity of extract of *Terminalia chebula* Retz. on hepatic fibrosis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 41: 597-601.
 30. Im, S. J., N. Y. Lim, S. W. Lee, G. S. Kwak, S. H. Ahn, Y. J. Mun, and W. H. Woo (2003) Effect of *Glycyrrhizae* Radix water extract on the melanogenesis of human melanoma cell. *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* 17: 368-373.