Korean Chem. Eng. Res., 54(6), 762-766 (2016)
http://dx.doi.org/10.9713/kcer.2016.54.6.762
PISSN 0304-128X, EISSN 2233-9558

황벽나무, 두충나무 추출물 등을 포함한 천연 추출물의 항균력 및 안전성

노대영 · 조수현 · 양형욱 · 한동균 · 김진홍* · 김동욱†

인제대학교 제약공학과
50834 경남 김해시 어방동 607
*바이오메틱스
46706 부산광역시 강서구 강동동 94-11
(2016년 8월 9일 접수, 2016년 9월 5일 수정본 접수, 2016년 9월 6일 채택)

Antimicrobial Activity and Safety Test of Natural extract including *Phellodendro namurense, Eucommia ulmides Oliv* extracts

Daeyoung Noh, Suehyeon Joe, Hyunguk Yang, Donggyun Han, Jinhong Kim* and Donguk Kim†

Department of Pharmaceutical Engineering, Inje University, 607, Eobang-dong, Gimhae, Gyongnam, 50834, Korea
**Biometics, 94-11, Gangdong-dong, Gangseo-gu, Busan, 46706, Korea*
(Received 9 August 2016; Received in revised form 5 September 2016; accepted 6 September 2016)

요 약

본 연구에서는 황벽나무, 두충나무, 귀룽나무 추출물 등을 포함하는 천연추출물에대해 항균활성 효과 및 안전성에 대해 검토하였다. 항균활성은 기회 병원성균인 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* 및 *Candida albicans*에 대해 실험되었다. 안전성 시험으로는 세포독성실험, 단회 경구투여 독성시험, 단회 흡입투여 독성시험, 반복 흡입투여 독성시험, 안점막 자극시험이 실시되었다. 항균력효과시험 결과 추출물은 *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Candida albicans* 4가지 균 모두에 대해 우수한 항균활성을 보여주었다. 천연추출물의 단회 경구투여 독성시험, 단회 흡입투여 독성시험 및 반복 흡입투여 독성시험, 안점막 자극시험의 결과 독성은 관찰되지 않았다. 따라서 황벽나무, 두충나무, 귀룽나무 추출물 등을 포함한 천연추출물은 뛰어난 안전성과 항균력이 있음을 확인하였다.

Abstract – In this study, natural extract including *Phellodendro namurense, Eucommia ulmides Oliv* and *Prunus padus* were tested for antimicrobial activity and safety. Antimicrobial activity was measured by using opportunistic microbes such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* and *Candida albicans.* As safety test, cell viability test, single dose oral toxicity test, single dose inhalation toxicity test, repeat dose inhalation toxicity test and eye irritation test were done. From antimicrobial test, natural extract showed execellent antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Escherichia coli.* From 5 kinds of safety tests, toxicity was not observed. From experimental results, natural extract including *Phellodendro namurense, Eucommia ulmides Oliv* and *Prunus padus* showed superb safety and antimicrobial effect.

Key words: *Phellodendro namurense*, *Eucommia ulmides Oliv*, Antimicrobial activity, Safety, Natural extract

1. 서 론

세계보건기구에 의하면 세계적으로 모기로 인한 말라리아, 일본뇌염, 뎅기열, 황열병, 사상충증, 살인진드기의 개체 수 증가 등 해충에 의한 영향 및 피해가 급격히 증가하고 있다. 우리나라 또한 안전지대가 아니며 2013년 말라리아 환자는 445명, 사망률이 높은 일본 뇌염모기 환자는 14명으로 집계되었다[1].

현재 시판되는 모기기피제와 살충제 중에는 안전성이 보장된 제품은 거의 찾아볼 수 없으며 위험성은 날로 증가하고 있다. 식품의약품 안전처에서 살충제 성분으로 허가하고 있는 55개의 성분 중 13개가 미국과 EU에서 안전성이 입증되지 않아 사용이 금지되었으며 살충제 속에 포함된 벤젠, 포름알데히드 등의 휘발성 유기화합물 수치는 실내 공기질 권고기준의 55배가 넘는다[2].

2011년도에 발생한 가습기 살균제로 인한 피해 사건들도 유기계 가습기 살균제로 인한 폐질환 등이 사회적으로 큰 문제를 야기하였다[1]. 따라서 안전성이 우수한 천연 살충제 및 살균제 소재에 대한

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: pedkim@inje.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

연구개발의 필요성이 증가하고 있다.

두충나무(*Eucommia ulmides Oliv.*)는 낙엽교목으로 열매는 편평한 긴 타원형이고 자르면 고무같은점질의 실이 나오며, 가지, 잎에도 점질이 함유되어 있다. 한방에서 두충은 간(肝)과 신(腎)을 보하고, 힘줄과 뼈를 튼튼하게 하며, 항균 및 살균력이 탁월한 것으로 나타나 있다[3]. 황벽나무(*Phellodendro namurense*)는 낙엽활엽교목으로서 한국, 중국, 만주 그리고 일본 등지에 자생하며[4]. 수피와 열매는 살균작용이 있어 장티푸스, 콜레라, 당뇨의 치료 및 건위제, 정장제 등으로 많이 쓰이며 노란색 많이 쓰이는 다용도 특용수종이다. 황벽나무의 속껍질은 국민 건강에 기여하는 생약제로 쓰이는 나무로 90년대 중반부터 조림수종으로 장려하고 있다[5].

녹차(Green tea)는 발효시키지 않은 찻잎을 사용해서 만든 차를 말한다. 녹차에서는 비타민 C와 폴리페놀(polyphenol)이 풍부하며 항산화작용, 콜레스테롤 제거효과, 혈압상승 억제작용, 항암효과 등을 갖고 있어 오늘날 현대인들의 성인병예방에 좋은 식품이다[6]. 귀룽나무(*Prunus padus* L.)는 벚나무류에 속하고 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본, 유럽 지방에 분포하는 낙엽활엽교목으로 키 15 m, 직경 80 cm까지도 자라며 습기가 많은 계곡 주위 음지에서 잘 자란다. 추위에 강하며 생장도 빠르고 다양한 약용으로도 사용 될 수 있다. 흰털귀룽나무와 서룽귀룽나무가 거풍, 진통, 지사의 효능이 있다고 알려져 있다[7].

본 연구에서는 황벽나무, 두충나무, 녹차 및 귀룽나무 등을 포함하는 천연 추출물에 대해 항균력 시험 및 안전성 시험을 실시하여 천연 살충제 및 살균제로서의 활용가능성을 조사하고자 하였다.

2. 실 험

2-1. 수목추출물

본 연구에서 사용한 수목추출물은 바이오메틱스에 의해 제공되었으며 황벽나무, 두충나무, 녹차 및 귀룽나무 등의 껍질을 건조 후 분쇄, 열수추출 및 숙성을 과정을 거쳐서 제조되었다. 이 과정에서 유효 물질의 성분 파괴를 최소화하고 유효성분을 고농도로 획득하기 위해 역삼투 및 초음파 추출법이 사용되었다. 각각의 추출물을 황벽나무 추출물 25%, 녹차 추출물 30%, 귀룽나무 추출물 25% 올리브 리퀴드 5% 그외에 천연방부제를 포함한 각종 성분 15%를 섞어서 사용하였다.

2-2. 항균력 시험

추출물의 항균력을 확인하기 위해 피부에 상재하며 기회병원성을 일으키는 *Staphylococcus aureus*(포도상구균, 그람양성균), *Pseudomonas aeruginosa*(녹농균, 그람음성균), *Escherichia coli*(대장균, 그람음성균)의 세균과 *Candida albicans*(효모, 진균)에 대해 실험을 실시하였다. 항균력 시험은 추출물을 각각 10%, 30%, 50%, 70%, 100%의 농도로 증류수에 희석하여 실험을 진행하였으며 양성대조군으로는 Penicillin과 Itraconazole을 사용하였으며 음성대조군으로는 증류수를 사용하였다. 추출물과 균을 9:1의 비율로 혼합하여 24시간 배양하였다. 배양된 추출물과 균 혼합물을 *Staphylococcus aureus*는 TSA (Tryptic Soy Agar)배지, P*seudomonas aeruginosa*와 *Escherichia coli*는 NA (Nutrient Agar)배지, *Candida albicans*는 YMA (Yeast Malt Agar)배지에 1 mL씩 분주하고 37 ºC에서 24시간 동안 배양 후 항균력을 평가하였다.

2-3. 세포독성시험

소재의 안전성시험으로 세포독성시험인 MTT assay를 사용하였다. 정량은 Mosmann 방법을 변형하여 측정하였다[8,9]. B16 F10 mouse melanoma cell(한국세포주은행)을 1×10^4 cell/ml 씩 분주하여 24시간 배양 후 100~1,000 μg/ml의 농도로 희석한 추출물의 시료가 첨가된 새 배지로 교체하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 여기에 EZ-Cytox(두젠바이오)를 각 well당 20 μl 첨가한 후 37 ºC, 5% CO_2 incubator (Sanyo,Japan)에서 배양 1시간 후 450 nm에서 ELISA reader (PowerWave XS2, BioTek, USA)로 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(cell viability)은 아래의 식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = [(\text{Exp.} - \text{Blank})/\text{Control}] \times 100$$

Exp: 세포를 포함한 추출물의 흡광도
Blank: 세포를 포함하지 않은 추출물의 흡광도
Control: 세포를 포함한 증류수의 흡광도

2-4. 안전성시험

안전성 시험은 단회 경구투여 독성시험, 단회 흡입투여 독성 시험, 반복 흡입투여 독성시험 및 안점막 자극시험을 실시하였다. 4종의 동물시험은 식품의약품안전처 의약품등의 독성시험기준에 따라 시험되었다[2]. 단회 경구 투여 독성시험은 생후 6주령의 ICR Mouse를 10마리 구입하여 실험군 5마리, 대조군 5마리로 각각 분류하였다. 모든 Mouse는 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 시험 당시 실험군, 대조군 동물들의 평균 무게는 20 g 이었으며 100% 농도의 추출물 2 mL를 5마리의 실험군에 각각 경구 투여 하였다. 투여 후 일정량의 사료와 물을 섭취 시키고 14일간 몸무게 측정과 상태변화를 관찰하였다.

단회투여 흡입 독성시험은 생후 5주령의 SD-Rat을 10마리 구입하여 100% 추출물 실험군 5마리, 대조군 5마리로 분류하였다. 모든 Rat은 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 시험 당시 실험군, 대조군 동물들의 평균무게는 171 g 이었으며 50 mL의 100% 추출물, 증류수를 4시간 동안 흡입챔버를 통해 흡입투여 하였다. 흡입투여 후 일정량의 사료와 물을 섭취 시키고 14일간 몸무게 측정과 상태변화를 관찰하였다[10].

반복투여 흡입투여독성 시험은 생후 5주령의 SD-Rat을 5마리 구입하여 100% 추출물 실험군 5마리, 대조군 5마리로 실험하였다. 모든 Rat은 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 시험 시작 당시 Rat 들의 평균 무게는 165 g 이었으며 100% 추출물을 하루 6시간 30일 간 흡입투여 하였다. 자동분사기를 이용하여 15분마다 분사 되었으며 하루 총 분사량은 약 5~6 mL 이었다. 일정량의 사료와 물을 섭취 하도록 하고 하루 6시간 흡입투여 후 매일 무게측정 및 상태변화를 관찰하였다[10].

안점막 자극시험은 생후 9주령의 백색토끼를 3마리 구입하여 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 토끼의 왼쪽 눈에는 100% 추출물을 100 μL를 넣고 오른쪽 눈에는 식염수 100 μL를 넣은 후, 토끼 눈의 상태를 1, 24, 48, 72 시간 관찰 하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 항균력 시험

수목추출물의 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

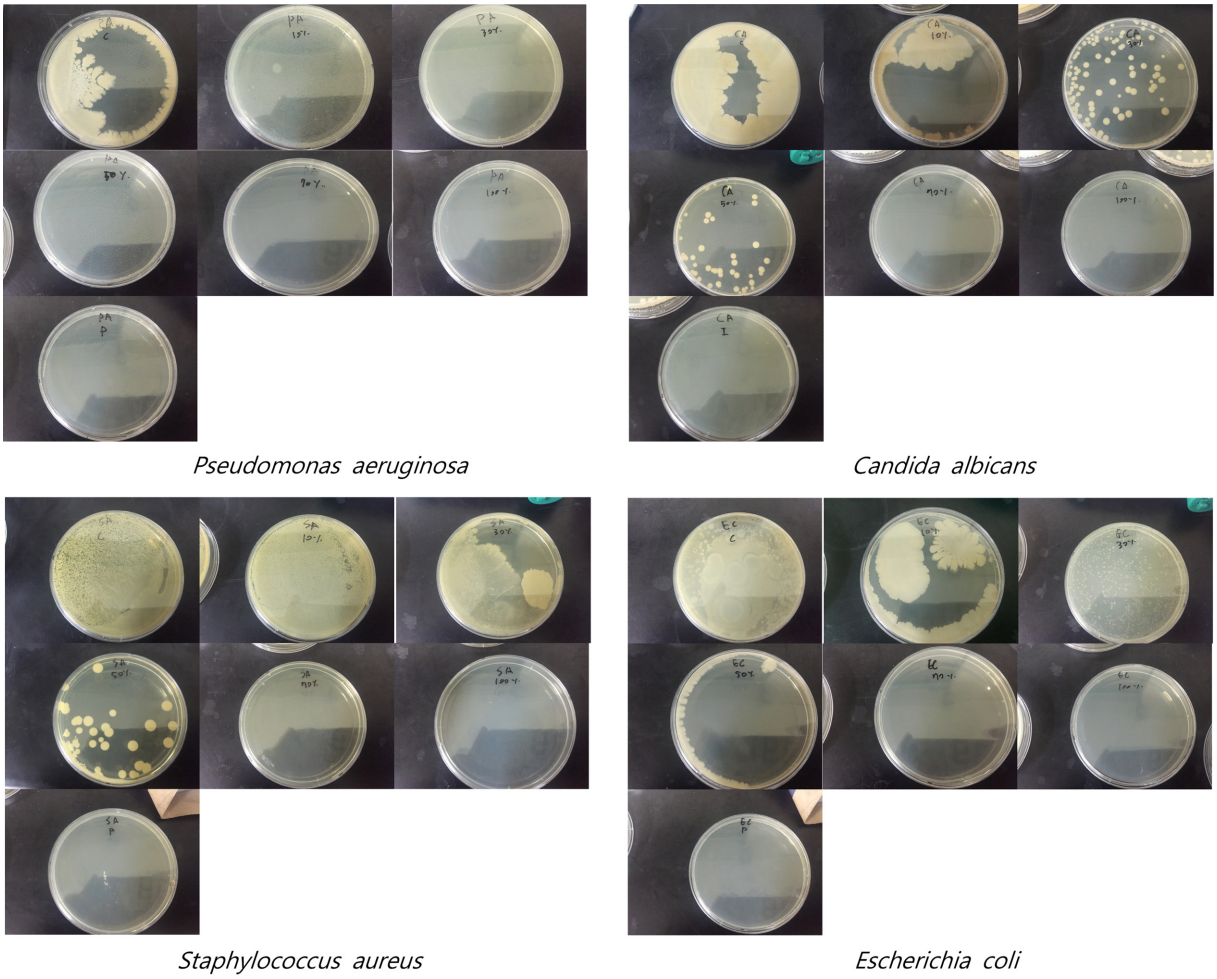

Fig. 1. Antimicrobial effect of natural extract including *Phellodendro namurense*, *Eucommia ulmides Oliv* extracts. From top right to left, purified water, 10%, 30%, 50%, 70%, 100% extract, Penicillin or Itraconazole.

Escherichia coli, *Candida albicans*에 대한 항균력 실험을 진행하였다. 위 실험에서 양성대조군으로 Penicillin과 Itraconazole을 음성대조군으로는 증류수가 사용되었다. *Staphylococcus aureus*는 기회감염을 일으키는 주요 원인균으로 피부감염, 골관절염, 균혈증, 폐렴 등을 유발시킨다[11]. Fig. 1의 결과를 보면 *Staphylococcus aureus*에서는 추출물 70% 이상의 농도에서 항균활성을 보여주었다. *Pseudomonas aeruginosa*의 경우 추출물 50% 이상의 농도에서 항균활성을 보였고, 원내감염의 주요 원인균으로서 폐감염, 요로감염, 혈액감염, 창상감염 등을 일으킨다[12]. 또한 흔히 알려진 대장균인 *Escherichia coli*와 구강, 식도, 생식기 및 각종 피부에 감염을 일으키는 *Candida albicans*에서도 70%이상의 추출물 농도에서 항균활성을 확인하였다.

3-2. 세포독성시험

특정 성분의 살균제나 살충제로의 응용가능성을 살펴보기 위해서는 무엇보다도 소재의 안전성이 가장 중요하다. 살충제와 살균제의 경우 매우 자주 사용되기에 소재의 유효성에 앞서 안전성이 우선 검토되어야 한다. 동물실험 이전에 먼저 살아있는 세포를 이용하여 MTT assay를 진행하였으며 추출물이 동물세포를 사멸시키는 정도를 평가하는 시험이다. 100~1,000 μg/ml 범위의 농도에서 추출물에서 세포독성이 전혀 나타나지 않았다. Fig. 2에서 보면 추출물

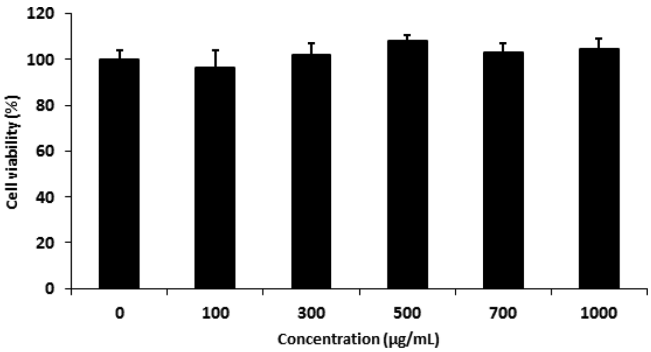

Fig. 2. Cell toxicity of natural extract including *Phellodendro namurense*, *Eucommia ulmides Oliv* extracts by MTT assay.

이 높은 안전성을 가짐으로 살균제나 살충제 제조시 고농도까지 사용이 가능하여 여러 면에서 유용한 장점을 가질 것으로 보여진다.

3-3. 안전성시험

살균제, 살충제로서의 안전성을 알아보기 위하여 추출물을 사용하여 단회 경구투여 독성시험, 단회 흡입투여 독성시험, 반복 흡입투여 독성시험과 안점막 자극시험을 실시하였다. Table 1의 결과를 보면 단회 경구투여 독성시험은 추출물 100%농도 2 mL/kg로 5마

Table 1. Weight of mice in single dose oral toxicity test of natural extract including *Phellodendro namurense, Eucommia ulmides Oliv* extracts (Unit : g)

	Experimental group		Control group	
	0 Day	After 14days	0 Day	After 14days
Mouse1	20.8	22	19.8	21.3
Mouse2	20.7	21.9	20.2	22
Mouse3	19.7	21.7	21	22.3
Mouse4	21.1	22.2	19.7	21.4
Mouse5	19.9	21.8	20.7	22
Average	20.46	21.92	20.28	21.8

리의 Mouse에 경구투여 하였다. 실험 후 2주 동안 실험군 및 대조군을 관찰하였고 실험 2주 후에도 특별한 이상 증후 및 사망개체는 발생하지 않았으며 실험동물군의 평균무게도 2주 후 증류수를 투여한 대조군과 비교하였을 시 뚜렷한 차이가 없는 것으로 보아 특별한 독성은 관찰되지 않았다.

살충제나 살균제는 주로 스프레이 형태로 만들어져서 사용되기 때문에 흡입독성에 대한 문제가 발생할 수 있으며 그에 대한 안전성시험으로 단회 흡입 및 반복 흡입독성 시험을 실시하였다. 단회 흡입투여 독성시험은 추출물의 농도 100%와 비투여대조군을 대상으로 실험하였으며 모든 Rat은 실험 환경에 적응하도록 1주일간 적응시켰다. 시험 당시 실험군, 대조군 동물들의 평균무게는 175 g 이었으며 각각 50 mL의 추출물을 4시간 동안 총 15 mL을 챔버 안에서 흡입투여 하였다. 흡입투여 후 14일간 몸무게 측정은 Table 2를 통해 확인 할수 있었고 상태변화를 관찰한 결과 대조군과 비교했을 때 큰 차이는 없었으며 특이사항 및 사망개체는 발생하지 않았다.

반복 흡입투여 독성시험은 추출물의 농도 100%를 실험군 5마리와 증류수투여군 5마리를 대상으로 실험을 진행하였으며 Rat은 1주일간 실험 환경에 적응시켰다. 추출물 100% 농도와 증류수를 각각 하루 6시간 총 60일간 흡입투여 하였다. 자동 분사기를 이용하여

Table 2. Weight of rat in single dose inhalation toxicity test of natural extract including *Phellodendro namurense, Eucommia ulmides Oliv* extracts (Unit : g)

		Experimental group	Control group
0 Day	Rat1	185	170
	Rat2	190	174
	Rat3	171	175
	Rat4	175	169
	Rat5	170	182
	Average	178.1	174
7 Day	Rat1	190	177
	Rat2	196	180
	Rat3	177	182
	Rat4	183	176
	Rat5	180	189
	Average	185.2	180.8
14 Day	Rat1	199	187
	Rat2	204	190
	Rat3	186	190
	Rat4	191	184
	Rat5	189	196
	Average	193.8	189.4

Table 3. Weight of rat in repeat dose inhalation toxicity test of natural extract including *Phellodendro namurense, Eucommia ulmides Oliv* extracts (Unit : g)

	Control group					
	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Average
0 day	163	167	168	162	161	164.2
14 day	168	170	173	168	170	169.8
28 day	177	178	179	173	180	177.4
42 day	187	188	189	185	189	187.6
56 day	201	202	204	198	200	201
60 day	207	203	212	200	205	205.4
	Experimental group					
	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Average
0 day	162	167	159	160	161	161.8
14 day	169	170	170	169	169	169.4
28 day	176	176	174	175	174	175
42 day	187	184	186	188	186	186.2
56 day	203	195	198	200	197	198.6
60 day	208	200	205	208	203	203.8

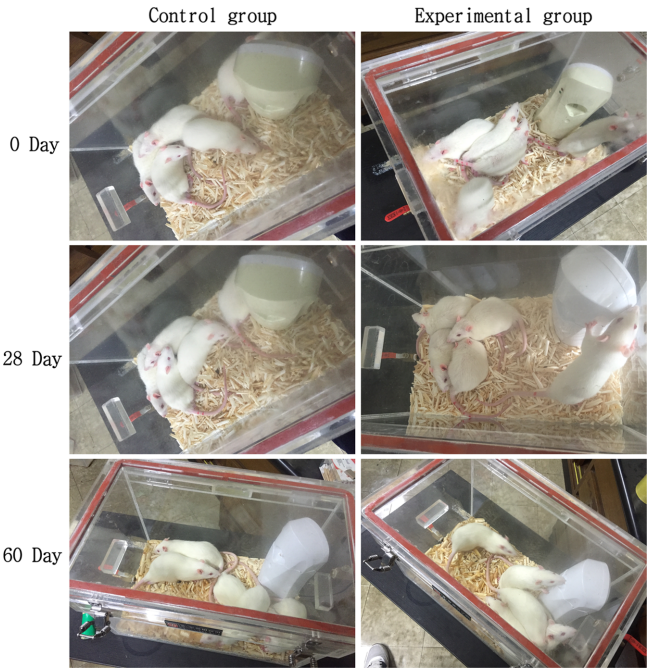

Fig. 3. Repeat dose inhalation toxicity test of natural extract including *Phellodendro namurense, Eucommia ulmides Oliv* extracts.

15분마다 한번씩 분사가 이루어 졌으며 하루 총 분사량은 약 5~6 mL이었다. 매일 6시간 흡입 후 실험동물들의 무게를 측정하고 60일 동안 실험동물들의 행동 및 이상징후를 관찰한 결과는 Table 3과 Fig. 3에 나타냈고 뚜렷한 이상 징후 및 사망개체는 발생하지 않은 것으로 보아 반복적으로 흡입 시에도 본 추출물은 안전성이 우수하였다.

살균제나 살충제가 스프레이 형태로 제조되어 사용 시에 점막자극을 일으킬 수 있는데 그 중에 특히 안점막의 경우 스프레이 형태에 노출이 많이 되므로 토끼를 이용하여 안점막 시험을 진행하였다.

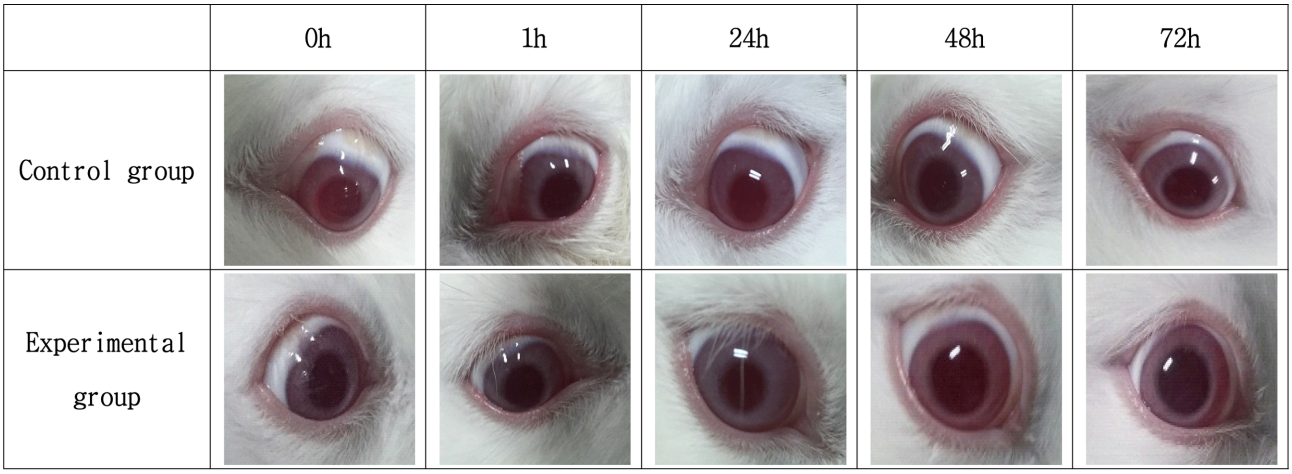

Fig. 4. Eye irritation test of natural extract including *Phellodendro namurense, Eucommia ulmides Oliv* extracts.

토끼 3마리를 사육실에 옮기고, 11일간 실험환경에 적응시켰다. 토끼의 한쪽 눈에 추출물 100%를 100 μL를 넣고 반대쪽 눈에는 식염수(대조군) 100 μL를 넣은 후, 토끼 눈의 상태를 1, 24, 48, 72 시간 동안 관찰하면서 시료의 안점막 자극을 확인 하였으며 Fig. 4에서 확인 할 수 있듯 안점막에서는 이상 징후를 확인 할 수 없었다. 위의 결과로 보아 추출물이 안점막을 자극하지 않는 물질임을 확인 할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 황벽나무, 두충나무, 귀룽나무 추출물 등을 포함한 천연 추출물에서 항균력시험과 안전성 시험을 실시하여 천연추출물의 안전성과 살균능력을 확인 하였다. 항균력효과시험 결과 추출물은 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*에 대한 우수한 항균활성을 보여주었다. 세포독성실험에서도 별다른 세포독성이 나타나지 않았다. 천연 추출물의 단회 경구투여 독성시험, 단회 흡입투여 독성시험, 반복 흡입투여 독성시험 및 안점막 자극시험의 결과 독성은 관찰되지 않았다. 따라서 황벽나무, 두충나무, 귀룽나무 추출물 등을 포함한 천연 추출물은 뛰어난 항균 활성과 안전성을 확인 할 수 있었다.

감 사

본 연구는 2015년도 창업성장기술개발사업의 재원으로 수행되었습니다.

References

1. Ministry of Health and Welfare, http://www.mohw.go.kr/(2013).
2. Korea Food and Drug Administration, http://www.mfds.go.kr/index.jsp.(2015).
3. Pharmacognosy Researchers, *Modern pharmacognosy*, Hak Chan publishing, Seoul(2000).
4. Read, R. A. Phellodendron. In: Seeds of Woody Plants in the United States. Forest Service. USDA. Washington. pp. 578-579(1974).
5. Park, J. C., Functional Food and oriental Medicine, Hyoilbooks, Seoul(2007).
6. Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C., Official methods of analysis, 15thed., Washington DC. (1990).
7. Jung, D. H., Yoon, B. H. and Lee, Y. H. Tea Living Culture Book (2012).
8. Mosmann, T., "Rapid Colorimetric Assay for the Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxic Assay," *J. Immun Method*, **65**, 55-65(1983).
9. Kim, H., Shin, H. S., Hwang, D., Lee, J., Bak, M., Kim, J. and Kim, D., "Antimicrobial Activity and Safety Test of Mixed Plant Extracts Including *Phellodendron Amurense and Eucommia Ulmides Oliv*," *Korean Chem. Eng. Res*., **51**(5), 536-539(2013).
10. Hwang, D., Kim, H., Shin, H., Jeong, H., Kim, J. and Kim, D., "Cosmetic Effects of *Prunus padus* Bark Extract," *Korean J. Chem. Eng*., **31**(12), 2280-2285(2014).
11. Lowy, F. D., "Staphylococcus Aureus Infections," *N. Engl. J. Med*., **339**, 520-532(1998).
12. El Solh, A. A. and Alhajhusain, A., "Update on the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia," *J. Antimicrob Chemother.,* **64**, 229-38(2009).