

한약 탕전 팩의 미생물 연구

유영법, 마진열, 하혜경, 황대선, 김복규, 신광수¹, 신현규

한국한의학연구원 한약제제연구부

¹대전대학교 미생물학과

ABSTRACT

Observation of Microorganism in Herbal Decoction manufactured by Korean Medical Clinic

Young-Beob Yu, Jin-Yeul Ma, Hye-Kyung Ha, Dae-Sun Huang, Bok-Kyu Kim, Kwang-Soo Shin¹, Hyun-Kyoo Shin

Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Jeonmin-dong 461-24, Yuseong-gu, Daejeon, Korea

¹Department of Microbiology, College of Science, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea.

Objectives : This study presents observation of microorganism such as total aerobic bacteria, total fungus, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella typhimurium* in herbal decoction manufactured by Korean medical clinic.

Methods : We examined to observe microorganism using the requirements for the experimental methods recommended by FDA. For the identification, we observed microscopic methods and

-
- 교신저자 : 신현규
 - 대전시 유성구 전민동 461-24, 한국한의학연구원 한약제제연구부
 - Tel: 042-868-9464 E-mail: hkshin@kiom.re.kr
 - 제1저자 : 유영법
 - 한국한의학연구원 한약제제연구부
 - Tel: 042-868-9463 E-mail: ybyu@kiom.re.kr
 - 접수 : 2007/ 12/ 6 채택 : 2007/ 12/ 17

carried out polymerase chain reaction (PCR) and DNA purification. The purified DNA samples were analyzed by DNA sequencer. As compared with NCBI database, the results were identified by sequences similarity.

Results and conclusion : 26 (55%) of 46 decoctions observed positive for microbial test. 12 (46%) of 26 positive decoctions exceed requirement of microbial limit test. These microbial colony identified genus of *Bacillus* using microscopic and DNA sequencing methods.

Key word : Herbal decoction, microorganism, *Bacillus*, DNA sequence

I. 서 론

한방의료기관에서 환자에게 제공되는 한약 탕액에 대해서는 현행 의료법이나 약사법상 탕전 공간이나 방식에 대한 SOP (Standard Operating Procedures) 규정 없이 한의사의 자가 탕전 방법을 택하고 있다. 이에 따라 탕액의 품질관리, 위생 및 전탕액의 보관기간, 보관방법 등에 대한 지침이 없는 현 상태에서 소비자들이 한약에 대한 불신을 가져올 수 있다.

현재 한방의료기관에서는 주로 한약재를 80-120℃로 끓인 후 레톨트 파우치(Retort pouch)로 포장하여 보관하는 것이 일반적인 방법이다. 그러나 의약품인 생약 액상제제의 경우 GMP 시설을 통해 “의약품등의 미생물한도기준및시험방법” (2005. 12. 29 식품의약품안전청 고시 제2005- 83호)에 따라 세균은 1×10^3 이하, 진균은 1×10^2 이하, 특정미생물 중 대장균·살모넬라·녹농균·황색포도상구균 불검출 되어야 한다고 고시하고 있다¹⁾.

본 연구에서는 한방의료기관 자가 탕전 시설에서 조제된 탕액의 미생물 생존 여부를 확인하고, 이들 미생물의 집락수와 분자생물학적 방법에 따

른 미생물의 동정을 실시하여, 의약품인 한방의료기관 조제 탕액에 대한 관리와 향후 원외탕전실에 대한 SOP규정을 만드는데 기여하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

실험에 사용한 시료는 연구소 1개소와, D시의 10개 한방의료기관을 무작위로 선정하여, 자가조제 방식에 따른 한약탕액을 3-5팩을 공급받아 사용하였다. 시료의 추출에 사용한 추출, 추출온도, 추출시간, 용제의 양, 압력여부 등은 Table 1의 방법에 따랐다.

2. 방 법

1) 미생물 검출시험

한약처방내의 미생물 검출여부를 확인하기 위하여 식품의약품안전청 고시제 2005- 83호 “의약품등의 미생물한도기준및시험방법” 에 따라 다음과 같이 실시하였다.

(1) 총 호기성 세균

약재 1 ml 씩을 페트리접시에 넣고 그 위에 멸균 후 45℃로 식힌 15 ml의 카제인대두소화한천배

지를 넣어 잘 혼합하여 35℃에서 배양하고 나타나는 균집수를 측정하였다

(2) 총 진균

총 호기성 세균 측정법과 동일하나 배지는 항생제가 첨가된 사부로포도당한천배지를 사용하고 배양은 25℃에서 7일간 배양한 후 총 진균수를 측정하였다.

(3) 대장균

약재 10 ml에 유당액체배지 90 ml를 첨가하여 35℃에서 36시간 배양한 후 0.1 ml을 취하여 맥콘키한천배지위에 도말하고 35℃에서 24시간 배양하였다.

(4) 녹농균

약재 10 ml을 카제인대두소화액체배지 100 ml에 넣고 35℃에서 48시간 배양한 후 0.1 ml을 취하여 세트리미드 한천배지에 도말하여 35℃에서 48시간 배양하였다. 형광을 띠는 녹색의 집락여부를 관찰하였다.

(5) 황색포도상구균

녹농균의 경우와 동일한 방법으로 실험하였으며, 배양 후 0.1 ml을 취하여 배어드파카한천배지(baird-parker agar)에 이식하여 35℃에서 48시간 배양하였다. 검정색이고 집락주위에 투명대가 형성되는 집락여부를 관찰하였다.

(6) 살모넬라

약재 10 ml을 테트라치오네트담즙브릴리안트그린액체배지 90 ml에 옮겨 42℃에서 24시간 배양한 후 0.1 ml을 취하여 데옥시콜레이트시트레이트한천배지와 엑스엘디한천배지에 접종하여 35℃에서 48시간 배양하였다. 데옥시콜레이트시트레이트한천배지에서는 백색의 대형 집락 형성 여부, 엑스엘디한천배지에서는 중앙 부위가 검정색인 적색의 대형집락 형성 유무를 관찰하였다.

2) 한약제에서 분리한 호기성 세균의 분자생물학적 동정

Table 1. Extraction method of herbal decoction in several Korean Medical Clinic.

Clinic	Research Institute	Korean Medical Clinic									
	K	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Temp.(℃)	100	100	120	80	130	100	100	.	115~120	120	100
Time (hr)	2	3	3	5	2	3	3	5.5	2.5	3.5	12
Drug/Water	1000g/20000ml	2000g/7000ml	1000g/4500ml	1000g/1200ml	1580g/7000ml		600g/6000ml	1200g/6000ml	1300g/5300ml	1000g/1100ml	
Pressure	N	Y	Y/N	N	Y	N	N	N	Y		N
Capacity	120ml	120ml	100ml	120ml	110ml	100ml	120ml	120ml	150ml	100ml	120ml

K: Samples of research institute, A~J: Samples of Korean Medical Clinic in D City

(1) PCR에 의한 16S rDNA의 증폭

Eubacteria domain의 공통적인 서열을 인지하는 primer로는 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였다. 반응 완충액으로 3차 증류수 33.5 µl, 10 X PCR 완충액 5 µl, dNTP (2.5 mM) 4 µl, 각 primer 2 µl (10 pM), Taq polymerase (5 u/µl) 0.5 µl 및

template DNA (TDW 20 µl에 소량의 colony를 푼 것) 3 µl 순으로 최종 부피가 50 µl가 되도록 제조하였다. PCR 조건은 pre-heat (94 ℃, 10 min)를 거쳐 30 cycle의 증폭 (94℃, 1 min 30 sec, 45 ℃, 1 min, 72℃, 2 min)을 수행한 후 final extention (72 ℃, 8 min)의 조건으로 수행하였다. PCR 수행 후 반응액을 1% agarose gel에서 전기영동하여 약 1.5kb에 해당하는 DNA band를 확인

하였다.

(2) 16S rDNA PCR 산물의 정제 및 염기서열 분석

PCR 산물을 1% agarose gel에서 전기영동한 후 1.5kb에 해당하는 부분을 잘라내어 AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA의 염기서열분석은 COSMO Genetech (Korea)에 의뢰하였다. 분석된 염기서열 자료를 미국 NCBI의 database에 수록된 세균의 염기서열과의 유사도를 비교하여 동정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 한약 탕전의 미생물 검출

10개소의 한방의료기관과 1개소의 연구기관의 한약탕전물의 미생물 검출 실험을 실시하였다. 실험은 미생물 검출의 정확성을 위하여 2차에 걸쳐 실시하였다.

1차 실험한 결과 K 연구기관의 한방탕전에서는 진균, 대장균, 녹농균, 황색포도상구균 및 살모넬라는 검출되지 않아 미생물 허용 기준을 충족하였으나, 총 호기성 세균이 400-420 CFU/ml 정도 관찰되었다 (Table 2). 이는 “의약품등의 미생물 허용 기준”인 1×10^3 /ml 이하의 조건에는 적합하나, 보존기간이 길어짐에 따라 세균수의 증가, 또는 약효성분의 변화 등 예기치 못한 결과를 초래할 수 있을 것으로 판단되었다. 1차 실험에서 미생물이 검출되므로써 이를 정확히 확인하기 위하여 한약 탕전물을 다시 제조하여 총 호기성세균의 군집을 재조사하였다. 그 결과 1차 실험결과 보다 더 많은 미생물이 검출되었으며, 3개의 시료 모두에서 의약품 등의 미생물 허용기준치를 초과하였다 (Table 3).

K 연구기관의 한약탕전에서 호기성 미생물이 관찰됨으로써 좀 더 많은 한약탕전의 미생물 실태 조사의 필요성이 대두되었다. 이에 따라 D시의 10개소 한방의료기관의 한약 탕액의 미생물학적 검

사를 실시하였다. 그 결과 E와 F 한방의료기관에서 각각 1.24×10^3 과 6.61×10^3 의 허용기준치를 상회하는 총호기성 세균이 검출되었다. 그리고 G와 I 한방의료기관에서는 허용기준치에는 적합하나 다수의 세균이 검출되었으며, A, B, C, H, J 한방의료기관에서는 소량의 미생물이 검출되었다 (Table 2). 미생물이 전혀 검출되지 않은 의료기관은 D의료기관 단 1개의 기관뿐이었다. 허용기준치에 적합한 탕전들도 보존기간이 길어짐에 따라 세균수의 증가, 또는 약효성분의 변화 등 예기치 못한 결과를 초래할 수 있을 것으로 판단되었다. 1차 실험의 결과를 검토하고 3개월 후에 미생물이 전혀 검출되지 않은 D 한방의료기관과 상대적으로 미생물이 적게 검출된 B와 C의료기관을 대상으로 본 연구자들이 직접 처방한十全大補湯 원료 한약재를 보낸 후 각 한방의료기관에서 탕전하도록 하였다. 그리고 그 시료를 회수한 후 다시 미생물 실험을 실시하였다. 그 결과 1차 실험에서 전혀 미생물이 검출되지 않았던 D 한방의료기관 탕전액에서 미생물 허용기준치를 초과하는 미생물이 검출되었으며 B와 C의료기관에서는 미생물이 검출되지 않았다 (Table 3).

미생물검출실험에 사용한 46개 시료중 26개의 시료 (55%)에서 미생물이 검출되었으며 미생물이 검출된 26개 시료중 12개의 시료 (46%)가 의약품등의 미생물 허용 기준을 초과하는 것으로 나타났다. 이는 원료한약재의 미생물 여부, 한약탕전방법, 한약탕전의 항균활성여부 등이 복합적으로 관여하여 나타나는 현상으로 생각하여 볼 수 있을 것이다.

본 연구에서 한약탕전 팩 내의 미생물 존재가 확인되었으나 그 위해성과 안전성에 관한 기준이 없어서 결과에 대한 평가가 모호한 실정이다. 향후 본 연구를 바탕으로 미생물의 발생 기원과 한약탕전 SOP 마련 등에 관한 심도있는 연구가 더 진행되어야 하며, 정부 차원에서 한방의료기관의 한약 탕전 및 탕전 팩을 의약품 기준에 맞게 관리할 필요가 있다고 사료된다.

Table 2. Total aerobic bacteria in herbal decoction.

Replicate	No.	Colony Forming Unit (CFU)/ml										
		Research Institute	Korean Medical Clinic									
		K	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
I	1	4.00×10^2	4.33×10^1	3.33	3.33	0	1.24×10^3	6.61×10^3	1.77×10^2	0	0	0
	2	4.20×10^2	0	0	3.33	0	1.29×10^3	6.01×10^3	3.33	0	3.33	3.33
	3	4.10×10^2	0	0	0	0	1.07×10^3	7.19×10^3	1.00×10^1	3.33	0	0
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.20×10^2	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-

K: Samples of research institute, A~J: Samples of Korean Medical Clinic in D City

Table 3. Total aerobic bacteria in herbal decoction.

Replicate	No.	Colony Forming Unit (CFU)/ml										
		Research Institute	Korean Medical Clinic									
		K	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
II	6	5.03×10^3	-	0	0	TNTC	-	-	-	-	-	-
	7	5.23×10^3	-	0	0	TNTC	-	-	-	-	-	-
	8	TNTC	-	0	0	TNTC	-	-	-	-	-	-

TNTC : too numerous to count; K: Samples of research institute; A~J: Samples of Korean Medical Clinic in D City

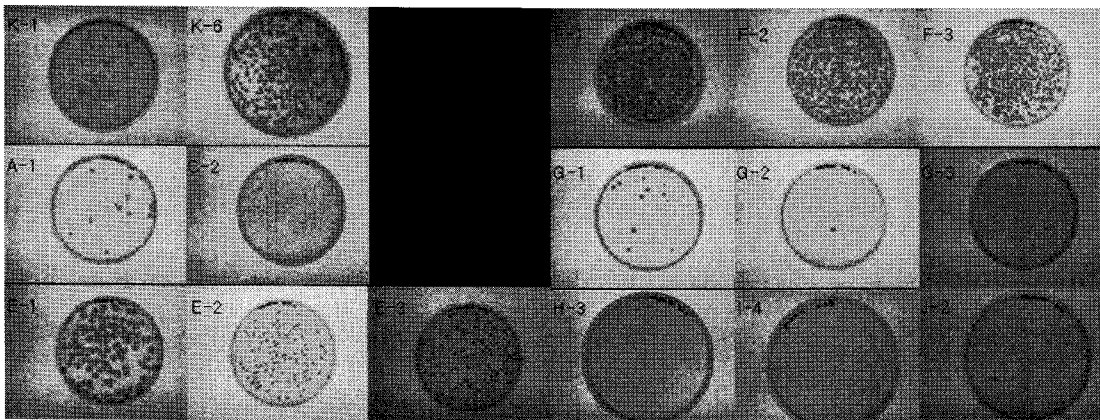


Fig. 1. Total aerobic bacteria in herbal decoction.

K: Samples of research institute, A~J: Samples of Korean Medical Clinic in D City, The arabic numerals indicate samples number.

2. 균주의 현미경 검정

한약탕전에서 검출된 미생물을 현미경을 통한 동정을 실시하였다. 시험구에서 검출된 호기성 세균을 도말평판법 (spread plate) 및 획선평판법

(streak plate)으로 순수분리 및 배양하여 집락 (colony) 의 형태가 다른 집락을 얻었다²⁾. 각 집락을 영양한천배지 (Nutrient Agar Media)에서 37 °C의 조건으로 24시간 배양한 후 single colony를 얻어 Crystal violet 및 Safranin으로 염색하여

1000배의 배율로 현미경 검경을 하였다. 현미경상에서 관찰한 호기성 세균은 크기, 길이 및 폭의 차이는 있으나 전부 간균 (bacilli)에 속하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 일반적으로 증탕온도가 100 °C 정도임을 고려할 경우 고온에서 생존이 가능한 호기성 세균은 *Bacillus*속 일 것으로 추정되므로 현미경적 특성 또한 이를 뒷받침하는 결과로 판단된다. 그러나 자연계에 존재하는 호기성 세균은 매우 다양하므로 정확한 동정을 위해서는 16S rDNA 염기서열 분석 등 분자생물학적 실험이 요구된다.

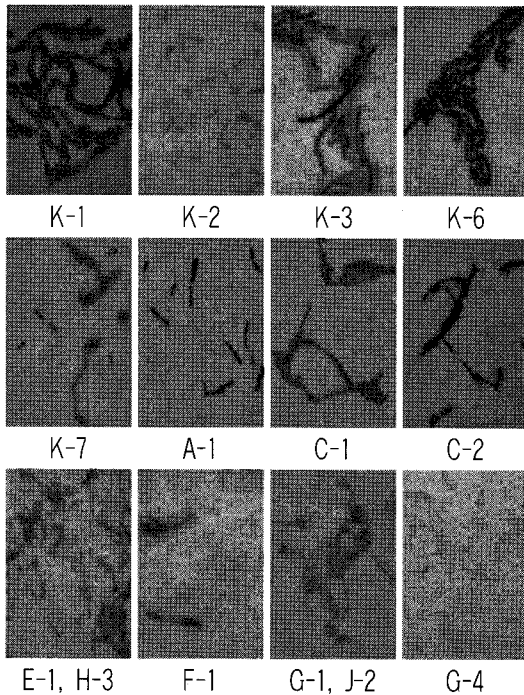


Fig. 2. Morphological characteristics of isolates.

K: Samples of research institute. A~J: Samples of Korean Medical Clinic in D City. The arabic numerals indicate samples number.

3. 균주의 분자생물학적 동정

현미경 검경을 통한 실험에서 한약탕액에서 검출된 균주가 *Bacillus*속 일 것으로 추정되었으나 좀 더 정확한 동정을 위하여 분자생물학적 실험을

실시하였다³⁾. Eubacteria domain의 공통적인 서열을 인지하는 primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하여 PCR을 수행한 결과 약 1.5kb에 해당하는 DNA band를 확인하였다 (Fig. 3). DNA band를 정제하여 염기서열을 분석하여 (Fig. 4, 5) NCBI의 database에 수록된 세균의 염기서열과의 유사도를 비교하여 동정하였다. K-1 균주는 *Bacillus megaterium* 16S rDNA와 99%의 유사도를 보였으며, *Bacillus* sp. PN13 균주의 16S rDNA와는 98%의 유사도를 보여 *B. megaterium*으로 동정하였다 (Fig. 4). K-2 균주는 *Paenibacillus rhizosphaerae* CECAP16 균주, *P. cineris* LMG 18439T 및 *P. cineris* LMG 21976 균주의 16S rDNA와 99%의 유사도를 보였다(Fig. 5).

이외에도 모든 시료에서 검출된 미생물들이 *Bacillus* 속 미생물들로 밝혀졌다. 연구기관의 시료인 K-3은 *B. megaterium*, K-7은 *B. subtilis*로 동정하였으며, 한방의료기관의 시료인 A-1은 *B. cereus*, C-1과 G-4는 *B. circulans*로 동정하였으며, C-2, E-1, H-3, F-1, G-1과 J-2는 모두 *B. subtilis*로 동정하였다 (Table 4).

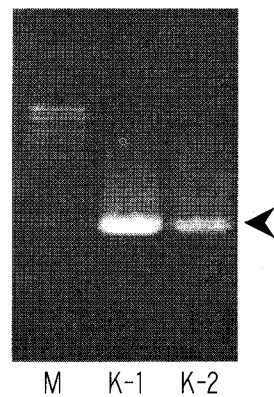


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products.

M: DNA size marker; K: Samples of research institute. The arabic numerals indicate samples number.

CCTTCCTGTCACCTTAGGCGGCTAGCTCCTT
 ACGGTTACTCCACCGACTTCGGGTGTTACAA
 ACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA
 AGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCT
 GATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCAT
 GTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
 AGAATGGTTTTATGGGATTGGCTTGACCTCG
 CGGTCTTGACGCCCTTTGTACCATCCATTGT
 AGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCA
 TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC
 GGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCC
 CAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGT
 TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
 CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA
 CCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAACGCT
 CTATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGA
 CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATT
 AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
 CCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA
 CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGT
 TAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCT
 AACACTTAGCACTCATCGTTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCC
 CACGCTTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTTACA
 GACCAAAAAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTC
 CTCCACATCTCTACGCATTTCCACCGCTACAC
 GTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAG
 TTCCCCAGTTTCAATGACCCTTCCACGGTTG
 GAGCCGTGGGCTTTCACATTAACCTTAAA
 GAAAACGTCTTGCGCGCCGCTTACGG

Fig. 4. DNA sequence of partial 16S rDNA of strain K-1.

K: Samples of research institute. The arabic numerals indicate samples number.

CAATTCTACCCACTTCGGGCGGCTGGCTCCTT
 GCGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGTAA
 ACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA
 AGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCT
 GATCCGCGATTACTAGCAATTCCGACTTCAT
 GCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTG
 AGACCAGCTTTGATAGGATTGGCTCCACCTC
 GCGGCTTCGCTTCCCGTTGACTGGCCATTG
 TAGTACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC
 ATGATGATTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTC
 CGGTTTGTACCCGGCAGTCATTCTAGAGTGC
 CCACCCGAAGTGCTGGCAACTAAAATCAAGG
 GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
 CTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAC
 CACCTGTCTCCTCTGTCCCCGAAGGAAAGGTA
 TATCTCTGTACCGGTCAGAGGGATGTCAAGA
 CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATT
 AAACCACATACTCCACTGCTTGTGCGGGTCC
 CCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA
 CCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGTGT
 TAACTTCGGCACCAAGGGTATCGAAACCCCT
 AACACCTAGCATTTCATCGTTTTACGGCGTGG
 CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC
 ACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGCC
 CAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTC
 CACATATCTACGCATTTCCACCGCTACACGTG
 GAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTC
 ACCCAGTTTCCAGTGCGAACCAAGGTTGAGC
 CTTGGCCTTAAACACCAGACTTAAATGACCG
 CCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGG
 ACACGCTTGCCTCCTACGTATTACCGCGGCT
 GCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTTCT
 CAGTACCGT

Fig. 5. DNA sequence of partial 16S rDNA of strain K-2.

K: Samples of research institute. The arabic numerals indicate samples number.

Table 4. Identification of Bacteria isolated from herbal decoctions.

Strain No.	Identification	Similarity (%)	Accession No.
K-1	<i>B. megaterium</i>	99	DQ666685
K-2	<i>Paenibacillus rhizosphaerae (cineris)</i>	99	AY751755
K-3	<i>B. megaterium</i>	98	DQ666685
K-6	<i>Bacillus</i> sp.	99	EF612723
K-7	<i>B. subtilis</i>	97	DQ659146
A-1	<i>B. cereus</i>	98	EF473136
C-1	<i>B. circulans</i>	98	DQ374636
C-2	<i>B. subtilis</i>	90	EF101729
E-1, H-3	<i>B. subtilis</i>	99	EF101729
F-1	<i>B. subtilis</i>	99	EF541143
G-1, J-2	<i>B. subtilis</i>	99	EF101729
G-4	<i>B. circulans</i>	98	AB271747

K: Samples of research institute. A~J: Samples of Korean Medical Clinic in D City. The arabic numerals indicate samples number.

참고문헌

1. 식품의약품안전청. 의약품등의미생물한도기준및 시험방법. 서울. 식품의약품안전청 고시 제 2005-83호 2005. pp. 1-3.
2. Claus D and Berkeley, RCW. Genus *Bacillus* cohn. In Bergey's manual of systematic bacteriology. The willams & Wilkins, Baltimore, 1986, pp. 1105-1139.
3. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 1991: 173, 697-703.