

## 다가알코올로부터 추출된 황금, 아카시아, 한라봉 추출물의 천연 방부시스템 연구

박성민<sup>1\*</sup>, 이정아<sup>1</sup>, 윤미영<sup>2</sup>, 김영재<sup>3</sup>, 이상화<sup>4</sup>

### Study of Natural Preservative System Using the Mixture of *Scutellariae radix*, *Acacia nilotica* and *Citrus reticulata* Extracted from Polyhydric Alcohols

Sung-Min Park<sup>1\*</sup>, Kyeong-Ah Lee<sup>1</sup>, Mi-Young Yun<sup>2</sup>, Young-Jae Kim<sup>3</sup>, and Sang-Hwa Lee<sup>4</sup>

접수: 2011년 8월 23일 / 게재승인: 2011년 11월 21일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** The aim of this study was to develop a new natural preservative system to improve the weak points of natural polyhydric alcohols together with the efficiency of natural plants as a preservative. Polyhydric alcohols (glyceryl caprylate and ethylhexylglycerin) and antimicrobial plants (*S. radix*, *A. nilotica* and *C. reticulata*) were tested using the disc diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) method for their antimicrobial activity against the common poultry pathogens, respectively. A study of the preservative efficacy of the cosmetic formulations containing the optimized preservative system demonstrated sufficient preservative efficacy against bacteria and eukaryotic test microbes. These results suggest that the natural preservative system including

polyhydric alcohol extracts containing natural plants could be incorporated in cosmetic formulations.

**Keywords:** natural preservative system, polyhydric alcohols, antimicrobial activity, preservative efficacy, Cosmetics

#### 1. 서론

식품, 의약품 및 화장품 등은 미생물에 의한 부패를 막아 주고 제품에 대해서도 오랫동안 유지하기 위해서 방부제 (preservative)는 필수적이다. 그 중에서 화장품은 유통기간이 비교적 길며, 그 사용 과정 및 보관 방법에 있어서 미생물과 접촉할 가능성이 매우 높고, 각종 미생물의 생장에 필요한 영양소와 수분 함량이 높아 의약품 또는 식품에 비해 방부 처리에 대한 더 많은 필요성과 문제점을 갖고 있다 [1]. 화장품에 사용되는 방부제의 종류는 매우 다양하며 또한 화장품 생산의 증가에 따라 방부제는 더욱 다양해지고 그 사용량도 증가되고 있으나 대부분 화학 방부제로 개발되고 있다. 화학 방부제의 기능은 제품에 미생물의 생육을 저해하여 제품에 안전성과 안정성을 부여하는 것이다. 하지만 동시에 자극 유발의 원인이 되기도 한다 [2].

최근 화장료 방부제의 사용량을 살펴보면 전체 방부제 중에서 파라옥시안식향산 염류 (파라벤류)가 약 60% 이상으로 가장 사용되고 있으며, 이미다졸리디널 우레아 (Germall 류), 디엠디엠히단토인, 페녹시에탄올 등이 사용된다 [3-5].

<sup>1</sup>(주)코씨드바이오팜 기술연구소

<sup>1</sup>R&D Center, CoSeedBioPalm Corporation, Jecheon 363-792, Korea  
Tel: +82-43-274-9097, Fax: +82-43-274-9098  
e-mail: smp@coseed.co.kr

<sup>2</sup>광주여자대학교 미용과학과

<sup>2</sup>Department of Beauty Science, Kwangju Women's University, Kwangju 506-713, Korea

<sup>3</sup>서원대학교 친환경 바이오 소재 및 식품 센터

<sup>3</sup>Seowon University Bio Organic Material & Food Center, Cheongju 361-742, Korea

<sup>4</sup>서원대학교 식품영양학과

<sup>4</sup>Department of Food and Nutrition, Service Industry, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

Germall류는 포르말데히드를 유리하고 일본에서는 사용금지 등으로 그 사용량이 감소되는 추세로서 Germall류 보다 우수한 열안정성과 세포독성이 낮으며 진균류에 보다 우수한 활성을 지닌 페녹시에탄올을 사용하고 있는 실정이다. 하지만, 화학 방부제로서 Germall류 뿐만 아니라 가장 안전하며 화장품, 의약품에 범용적으로 사용되는 파라벤류의 방부제들조차 피부 알러지와 환경호르몬으로서의 가능성 및 내성균 유발이라는 문제 가능성이 대두되고 있다 [6-11].

이러한 흐름에 맞추어 식물성 항균추출물이 배합된 천연 화장품과 파라벤/포르말데히드-Free 방부제 개발이 활발히 진행되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 항균 활성을 가지는 황금, 아카시아 그리고 한라봉의 식물성 항균 추출물의 유효성, 안전성 그리고 안정성 문제에 대한 한계성을 극복하고, 천연물로부터 유래된 다가알코올 (Polyhydric alcohol)로 추출된 천연 항균추출물을 적용하여 제형 내 방부 활성이 우수한 천연 방부시스템을 확인하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 기기 및 시약

초고압진공추출기 (Dimapuretech, Korea), Rotary vacuum evaporator (EYELA N-1000, Japan), 동결 건조기 (Ilshin Lab, Korea)을 사용하였다. 실험 재료인 황금과 아카시아는 충북 제천시와 한라봉은 제주도에서 채취한 것을 2010년 6월경 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 천연물 생약재 추출용재로 야자나무와 카카오의 오일로부터 추출된 글리세릴카프릴레이트 (glyceryl caprylate, GMCY)와 곡류로부터 추출된 에틸헥실글리세린 (ethylhexylglycerin, EG)의 다가알코올은 각각 Dr. Straetmans GmbH사 (Germany)와 ADEKA Corporation사 (Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 화학 합성 방부제로서 사용된 Euxyl K300<sup>®</sup> (phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben)은 Schuke & Mayr (Germany)사에서 구입하여 사용하였다. 그 외 나머지 시약들은 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 천연물의 다가알코올 추출 제조

건조된 황금, 아카시아, 한라봉을 각각 100 g을 잘게 자른 후 70% 에탄올 1000 mL을 첨가한 후 환류 추출 하고 실온에서 1일간 냉각시켰다. 0.45  $\mu\text{m}$ 여과지로 여과하여 얻어진 여액을 paper disc법을 이용한 항균성 평가 시료로 사용하였고, 감압 농축기로 농축한 후 동결건조 하여 건조분말을 제조하였다. 또한, 2종의 다가알코올 (GMCY, EG) 추출용재를 이용하여 비가열처리 추출 기술인 초고압 기술 (Ultra High Pressure Technology)로 3종의 천연물 100 g을 조합비에 따라 다가알코올 1000 mL을 첨가한 후 10~1000 MPa의 압력을 이용하여 다가알코올 추출물을 제조하였다. 이들을 시험 균주에 대한 최소저해농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)와 화장품 제형 내 방부력 시험에 평가 대상 시료로 사용하였다.

### 2.3. 사용 균주 및 배지

항균 활성 측정 시험 및 방부력 시험에 사용한 균주는 항생균 활성에 그람 양성균 *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P)와 그람 음성균 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027)와 *Escherichia coli* (ATCC8739)를 이용하고, 세균용 배지는 독일 Merck사의 Tryptic soy agar (TSA)와 Tryptic soy broth (TSB)를 사용하였다. 항진균 활성에는 효모류인 *Candida albicans* (ATCC10231)를 이용하였으며, 진균용 배지는 독일 Merck사의 Potato dextrose agar (PDA), Potato dextrose broth (PDB)을 사용하였다.

### 2.4. 항균 활성 탐색

항균 활성을 탐색하기 위하여 항균 활성을 나타내는 저해환의 직경을 측정하는 paper disc법 [12]을 이용하였다. 배양기에서 배양한 균주를 적정 농도로 희석하여 (세균류의 경우  $1 \times 10^6$  cells/mL, 진균류의 경우  $1 \times 10^5$  cells/mL) 미리 만들어진 고체 배지에 0.5 mL씩 분주하고 말린 다음, 멸균된 paper disc에 추출물을 100  $\mu\text{L}$ 씩 점적, 건조한 후, paper disc를 올린다. 일정 시간 배양기에서 배양한 후 (세균류의 경우 32°C 48 h, 진균류의 경우 25°C 72 h) 나타난 저해환의 직경 크기로 추출물의 항균 활성을 비교하였다.

### 2.5. 항균력 측정

다가알코올 GMCY와 EG의 각각의 항균활성과 최적 조합비 그리고 다가알코올로 추출된 천연물 생약재의 항균 효과를 파악하기 위하여 최소 저해 농도 (MIC)를 고체 배지 희석법 [13]을 이용하여 측정하였다. MIC 값은 각 시료들을 2배수 농도로 연속적으로 희석하여 한천 배지에 처리한 후 시험 균주들이 한천 배지에서 자라지 않는 최소 저해 농도로 하였다. 각 시료들을 다양한 농도로 10 mL TSA나 PDA 배지에 넣고 잘 섞은 후 petri dish에 부었다. 각 배지가 고체화된 후 4종의 시험 균주들을 백금이를 이용하여 긁은 후 세균은 32°C incubator에서 48 h, 진균은 25°C incubator에서 72 h 배양 후 균들의 성장을 관찰하였다.

### 2.6. 시험 제형의 준비

방부 활성 측정을 위하여, Table 2에 나타난 원료를 이용, O/W 유액 제형을 설계하고, MIC 평가에서 항균성이 우수한 최적 조합비로 구성된 황금, 아카시아 그리고 한라봉 생약재의 다가알코올 추출물을 선정하여 시험에 사용하였다.

### 2.7. 방부 활성 확인 시험

방부 활성의 확인은 CTFA의 Microbiology Guidelines의 방법 [14]과 Linear regression method [15]를 변형하여 측정하였다. 시험 균은 적절한 시기에 액체 배지에 접종한 후 배양하여 준비하고, 시험용 배지에 희석한 후, 적절한 용기에 담아 준비된 각 방부력 시험 대상 제품에 세균류의 경우  $1 \times 10^6$  cells/mL, 진균류의 경우  $1 \times 10^5$  cells/mL되게 접종하였다. 접종한 제품은 접종 직후부터, 접종 2주일 경과 후 까지 시간경과에 따라 시료를 채취한 후, 생균수 시험을 수행하고, 세균의 경우 32°C 배양기에서 48 h, 진균의 경우 25°C

배양기에서 72 h 배양한 후 생균수를 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 천연물 생약재의 항균 활성 탐색

황금, 아카시아 그리고 한라봉 추출물들의 세균, 진균에 대한 항균 활성을 알아보기 위해 paper disc법을 이용한 저해환 측정 결과를 Table 1에 나타내었다. *S. aureus*에 대한 저해환 크기를 측정한 결과 황금, 한라봉, 아카시아 순으로 각각 35mm, 26 mm, 10 mm로 저해 활성을 나타내었다. 또한, 그람 음성균인 *E. coli*와 *P. aeruginosa*에 대한 저해환 크기를 측정한 결과 황금이 가장 우수한 것으로 나타내었다. 진균류인 *C. albicans*에 대한 항균 활성은 특이적으로 아카시아 추출물이 강한 저해환 (ckar zone)을 나타내어 진균류의 성장을 억제하는데 우수한 항균 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 세균과 진균에서 각각 우수한 항균활성 특성을 나타내는 황금, 한라봉, 아카시아를 이용하여 세균과 진균을 모두 포함한 항균 스펙트럼을 넓히고자 3종의 생약재에 대한 최적의 조합비를 결정하는 실험을 진행하여 그 결과를 Table 2에 기술하였다. 황금, 한라봉, 아카시아 추출물이 각각 6 : 3 : 1 비율로 조합될 경우 모든 균에서 우수한 항균을 나타내어 천연방부제 및 항균제로서의 역할을 충분히 수행할 것으로 기대된다.

#### 3.2. 다가알코올류 (GMCY, EG)의 항균 활성

화장품 성분 중에 하나인 다가알코올은 일반적으로 피부 컨디셔닝제, 유화제 등의 용제로 사용되는 원료로서, 최근 자체 항균 기능으로 화장품 보존제로 각광을 받고 있다. 본 연구에서는 천연 방부시스템을 확립하기 위하여 천연물로부터 추출된 글리세릴카프릴레이트 (GMCY)와 에칠헥실글리세린 (EG)을 선별하였고, 이들의 항균 활성을 Table 3에 나타내었다. GMCY는 상대적으로 그람 양성균인 *S. aureus*에 대한 강한 항균 활성을 나타내었지만 *P. aeruginosa* 균에 다소 약한 항균 활성을 나타내었다. 또한, EG는 그람 음성균인 *E. coli*에 대한 약한 항균활성을 나타내었고, 나머지 균들에 대해서는 유사한 항균 활성을 나타내었다. 따라서, 2종의 다가알코올을 조합한 최적의 항균 활성을 비교 시험한 결과, GMCY 80%와 EG 20% 비율로 혼합된 시료에서 모든 균에 대한 항균 활성이 우수한 것으로 나타내었다.

**Table 1.** Evaluation of antibacterial activity, indicated by diameter of inhibition zone (mm) of plant extracts against microorganisms

Plants	Diameter of inhibition zone (mm)			
	Gram (+)		Gram (-)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<i>S. radix</i>	35	22	24	10
<i>A. nilotica</i>	10	5	0	22
<i>C. reticulata</i>	26	18	10	10

**Table 2.** Screening of optimal combination rate of antimicrobial plant extracts

Plant extract	Combination rate	Diameter of inhibition zone (mm)			
		Gram (+)		Gram (-)	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<i>S. radix</i>	1 : 9 : 1	22	10	12	5
	3 : 6 : 1	22	15	10	5
<i>C. reticulata</i>	1 : 1 : 1	22	20	15	15
	6 : 3 : 1	38	22	22	18
<i>A. nilotica</i>	9 : 1 : 1	30	18	16	8

#### 3.3. 천연물-다가알코올 (Natural-polyol) 추출물의 항균 활성

최적의 항균활성 조합비 (6 : 3 : 1)로 구성된 황금, 한라봉 그리고 아카시아의 혼합 생약재와 천연물 유래 GMCY와 EG로 구성된 다가알코올을 초고압 추출기술을 이용하여 추출된 천연물-다가알코올 (Natural-polyol) 추출물을 수득하여 다가알코올 구성 비율에 따른 항균 활성을 Table 4에 나타내었다. 다가알코올 비율은 앞서 언급한 (Table 3) 결과와 큰 차이는 없었으나, 항균활성을 나타내는 3종의 혼합 생약재가 추출된 다가알코올 추출물 (Natural-polyol)은 일반 다가알코올에 비해 우수한 항균 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 기존에 화학 합성방부제와도 대체 가능한 수준의 MIC 값을 나타내었으며 (ref), 천연물이 가지는 피부세포 활성 및 항산화 활성과 함께 천연방부제 및 항균제로서의 기능적 역할이 충분할 것으로 사료된다.

**Table 3.** MIC of polyhydric alcohols against various microorganisms

Polyhydric alcohols	Minimum Inhibitory Concentration (MIC, W/V %)				
	Gram (+)		Gram (-)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	
Glyceryl caprylate (GMCY)	0.03	0.35	0.15	0.15	
Ethylhexylglycerin (EG)	0.25	0.20	0.40	0.25	
GMCY (%) EG (%)					
20	80	0.20	0.30	0.35	0.20
40	60	0.30	> 0.5	0.30	0.25
50	50	0.20	0.30	0.25	0.20
60	40	0.15	0.45	0.25	0.20
80	20	0.05	0.20	0.10	0.15

**Table 4.** Comparison of MIC of polyhydric alcohols and Natural-polyols against various microorganisms

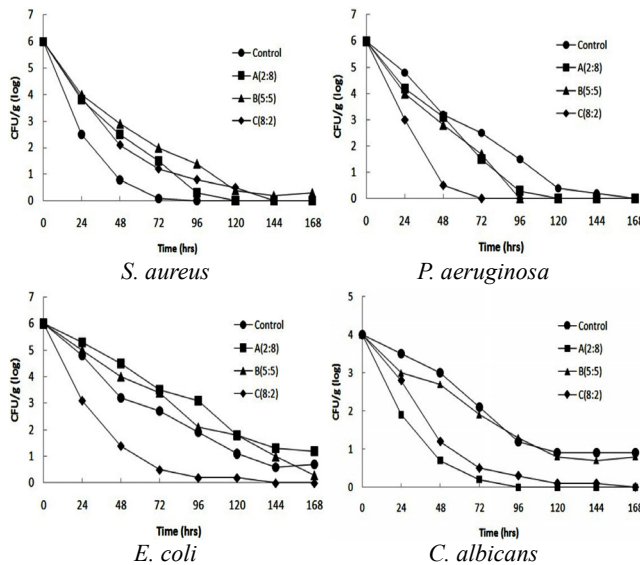
Polyhydric alcohols	Minimum Inhibitory Concentration (MIC, W/V %)			
	Gram (+)		Gram (-)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
GMCY : EG (2 : 8)	0.20	0.30	0.35	0.20
Natural-polyol (2 : 8)	0.20	0.25	0.35	0.15
GMCY : EG (5 : 5)	0.20	0.30	0.25	0.20
Natural-polyol (5 : 5)	0.20	0.25	0.20	0.20
GMCY : EG (8 : 2)	0.05	0.20	0.10	0.15
Natural-polyol (8 : 2)	0.05	0.10	0.05	0.10

**Table 5.** Composition of the cosmetic products (O/W formula)

Raw Material	Dosage (% w/w)			
	Control	A	B	C
Euxyl K300 (preservative)	0.50	-	-	-
Natural-polyol (2 : 8)	-	0.5	-	-
Natural-polyol (5 : 5)	-	-	0.50	-
Natural-polyol (8 : 2)	-	-	-	0.50
Butylene glycol	4.00	4.00	4.00	4.00
Cetearyl alcohol	0.50	0.50	0.50	0.50
Glyceryl stearate	0.30	0.30	0.30	0.30
Polysorbate 60	0.60	0.60	0.60	0.60
PEG-20 Methyl glucose sequistearate	1.30	1.30	1.30	1.30
Acrylate / sodiumacryl amide copolymer	0.10	0.10	0.10	0.10
Purified water	92.7	92.7	92.7	92.7
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

**3.4. 천연물-다가알코올 (Natural-polyol) 추출물을 함유한 화장품 제형의 방부 활성**

항균 활성을 나타내는 황금, 한라봉 그리고 아카시아로 구성된 혼합 생약제를 GMCY와 EG의 혼합비를 각각 2 : 8, 5 : 5 그리고 8 : 2 함량으로 조성된 다가알코올을 초고압 기술로 추출된 천연물-다가알코올 (Natural-polyol)을 첨가한 O/W 제형의 유액을 제조하고, 방부 활성 효과를 Fig. 1에 나타내었다. 기존 화학 방부제로 널리 사용되고 있는 phenoxyethanol과 paraben류가 혼합된 방부제를 첨가하여 천연물-다가알코올 (Natural-polyol) 추출물과 방부 활성을 비교 실험하였다.



**Fig. 1.** Preservative properties of Euxyl® K300 (control) and Natural-polyols (A-C) in cosmetic products. A (■), B (▲) and C (◆) were mixture ratio of glyceryl caprylate (GMCY) and ethylhexylglycerin (EG), respectively.

O/W 제형에 첨가된 천연물-다가알코올 추출물은 다가알코올 혼합비가 8 : 2 (GMCY : EG)일 때 다른 혼합비에 비해 우수한 방부 활성을 나타내었다. 이는 MIC 항균 활성과도

유사한 결과이며, *P. aeruginosa*를 제외한 모든 균에서 기존 화학방부제 (Euxyl K300) 보다 우수한 방부 활성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 최근 화장품 분야에서 파라벤을 포함한 화학 방부제 사용 감소와 무방부제 함유 제품 추세에 적합한 천연 방부시스템으로서 역할이 충분히 기대된다.

**4. 결론**

본 연구에서는 항균 활성을 나타내는 황금, 한라봉 그리고 아카시아 추출물의 최적 조합비를 확인하고, 글리세릴카프릴레이트 (GMCY)와 에틸헥실글리세린 (EG)이 혼합된 다가알코올로부터 추출된 천연물-다가알코올 (Natural-polyol) 추출물이 함유된 O/W 제형 내 세균과 진균에 대한 방부 활성을 확인하였다. 천연물 생약제 중, 황금은 세균과 진균 모두에서 우수한 항균 활성을 나타내었으며, 아카시아 추출물은 진균에 대한 높은 항균 활성을 보였다. 더 넓은 항균 스펙트럼을 위해서 황금, 한라봉 그리고 아카시아의 최적 조합비 확인한 결과, 황금 (6) : 한라봉 (3) : 아카시아 (1)의 조합 비율일 때 우수한 항균 활성을 나타내었다. 최적의 혼합 생약제를 천연물로부터 추출한 GMCY (80%)와 EG (20%)의 혼합 다가알코올로부터 초고압 기술로 추출하여 얻어진 천연물-다가알코올 (Natural-polyol) 추출물을 O/W 제형의 유액에 0.5% 첨부한 후, 방부 활성을 확인하였다. 기존 화학방부제에 비해 높은 방부 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

본 연구를 통하여 화장품 주방부제로서 파라벤류와 페녹시에탄올 등 그 사용량이 감소되는 추세와 피부 알러지와 환경호르몬 등의 안전성 문제를 해결하고, 식물성 항균추출물의 한계성을 극복하고자 천연물 유래 다가알코올을 이용한 천연 방부시스템을 확립하였다.

**감사**

본 연구는 지식경제부의 지역혁신센터 (RIC) 사업의 일환으로 서원대학교 친환경 바이오 소재 및 센터 (BioRIC)의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

**References**

1. Varvaresou, A., S. Papageorgiou, E. Protoparp, H. Kntziou, V. Kefala, and C. Demtzos (2009) Self-preserving cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* 31: 163-175.
2. Orth, D. S. and J. J. Kabara (1998) Preseervative-free and self-preserving cosmetics and drugs. *Cosmet. Toil.* 113: 51-58.
3. 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.
4. 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. Dentistry*. 27: 101-106.
5. Steinberg, D. (2002) Frequency of use of preservatives. *Cosmet. Toil*. 117: 41-44.
  6. Vilaplana, J. and C. Romaguera (2000) Contact dermatitis from parabens used as preservatives in eyedrops. *Contact Dermatitis* 43: 248.
  7. Cooper, S. M. and S. Shaw (1998) Allergic contact dermatitis from parabens in a tar shampoo. *Contact Dermatitis* 39: 140.
  8. Bonnevie, P. (1940) Overfølsomhed for aetylparaoxybenzoat (Mycoten). *Nordisk. Medicin*. 6: 684-685.
  9. Sarkany, L. (1960) Contact dermatitis from paraben. *Br. J. Dermatol.* 72: 345-347.
  10. Fisher, A. A. (1973) The paraben paradox. *Cutis* 12: 830-832.
  11. Routledge, E. J., J. Parker, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter (1998) Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharm.* 153: 12-19.
  12. Kalembe, D. and A. Kunicka (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829.
  13. Seo, S. B., C. S. Ryu, G. W. Ahn, H. B. Kim, B. K. Jo, S. H. Kim, J. D. Lee and T. Kajiuchi (2002) Development of a natural preservative system using the mixture of chitosan-Inula helenium L. extract. *Int. J. Cosmet. Sci.* 24: 195-206.
  14. CTFA Microbiology Guidelines, M-3 A Method for Preservation Testing of Water Miscible Personal Care Products, M-4 Method for Preservation Testing of Eye Area Cosmetics, U.S.A.
  15. Orth, D. S. and D. Enigl (1993) Preservative efficacy testing by a rapid screening method for estimation of D-values. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 44: 329-336.