

# 대장균과 녹농균에 대항하는 황금과 황련 및 살리실산 조성물의 항균상승효과

김수영 · 김지현<sup>1</sup> · 유강열 · 이현서<sup>1</sup> · 전인화<sup>1</sup> · 강현주<sup>1</sup> · 이정노<sup>2</sup> · 최병민<sup>3</sup> · 장선일<sup>1,4\*</sup>

(재)전주생물소재연구소, 1: ㈜아토크엔에이부설연구소, 2: 한국폴리텍바이오대학,  
3: 원광대학교 의과대학 생화학교실, 4: 전주대학교 보건관리학과

## Synergic Antimicrobial Activity of Scutellariae Radix, Coptidis Rhizoma and Salicylic Acid Combination against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

Su Young Kim, Ji Hyeun Kim<sup>1</sup>, Kang Yeol Yu, Hyun Seo Lee<sup>1</sup>, In Hwa Jeon<sup>1</sup>, Hyun Ju Kang<sup>1</sup>, Jungno Lee<sup>2</sup>, Byung MinChoi<sup>3</sup>, Seon Il Jang<sup>1,4\*</sup>

Jeonju Biomaterials Institute, 1: Ato Q&A Corporation, 2: Biocampus of Korea Polytechnic All Rights Reserved,  
3: Department of Biochemistry, School of Medicine, Wonkwang University, 4: Department of Health & Science, Jeonju University

*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* are pathogenic bacteria that should not be detected in cosmetics and foodstuffs. Therefore, we first investigated the antimicrobial activities of extracts of Scutellariae Radix(SR), Coptidis Rhizoma (CR) and salicylic acid(SA) in these pathogenic microorganisms. Although SA has been known to exhibit anti-inflammation and antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, a high concentration of SA may cause serious side effects such as skin redness, skin burning, peeling or tissue damage. Hence, we focused on diminishing side effects followed by treatment of a high concentration of SA and investigated whether the combinations of SA with various concentrations(25-400 mg/mL), SR and CR with a concentration(100 mg/mL) which did not show antimicrobial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* exhibited meaningful antimicrobial effect against both strains. In our results, the combinations of SA with the lowest concentration(25 mg/mL), SR(100 mg/mL) and CR(100 mg/mL) exhibited significant antimicrobial activity against *E. coli* in comparison to SA alone(25 mg/mL) showing no antimicrobial activity. Moreover, the combinations of SA (100 mg/mL), SR and CR showed seven times higher antimicrobial activity against *E. coli* than SA alone(100 mg/mL) and exhibited a significant antimicrobial activity in comparison to ampicillin ( $p<0.05$ ). The combinations of SA(100 mg/mL), SR and CR showed two times higher antimicrobial activity against *P. aeruginosa* than SA alone. Therefore, these results indicated that the combinations of SR, CR and SA with low concentration expressed the synergistic antimicrobial effect against *E. coli* and *P. aeruginosa* and showed great potential as an antimicrobial agent.

Key words : Scutellariae Radix, Coptidis Rhizoma, salicylic acid, synergic antimicrobial activities

### 서 론

인체에 유해한 병원성 미생물(pathogenic microorganism)은 한약재를 비롯한 일반의약품, 식품과 화장품에서 검출되지 않아야 하거나 법적으로 기준 수 이하로 검출되어야한다<sup>1)</sup>. 이러한 병원성 미생물로는 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠(*Listeria monocytogenes*) 및 바실러스 세리우스(*Bacillus. cereus*)등과 같은 세균이 있다<sup>2)</sup>. 이러한 병원성 미생물

\* To whom correspondence should be addressed at : Seon Il Jang,  
Department of Health & Science, Jeonju University, 303, Cheonjam-ro,  
Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Korea  
· E-mail : sonjjang@jj.ac.kr, · Tel : 063-220-3124  
· Received : 2014/06/07 · Revised : 2014/06/20 · Accepted : 2014/07/07

이나 부패 미생물을 제어하여 식품이나 화장품등을 장기적으로 저장 및 보존 할 수 있는 수단으로 방사선, 가열, 초고압 등의 물리적인 방법과 알코올, 과산화수소 또는 천연 물질등을 이용한 화학적 방법이 사용되어 왔다. 이 중에서 편리함과 경제적인 측면 때문에 sorbic acid, nitrite, 염소계 등 여러 합성 보존제 및 항균제가 장기간 사용되어 왔다. 그러나 이들 합성 보존제나 합성 항균제는 인체내 축적성에 따른 안전성 문제나 이들이 함유하고 있는 물질의 종류와 사용량에 따라 인체에 심각한 부작용을 초래하기도 한다. 특히 합성항균제를 장기간 과다하게 사용할 경우 인체에 잔류되어 독성을 유발하거나 새로운 내성균을 낳을 수 있다는 것이다<sup>8)</sup>. 특히 외용제에 사용되는 안식향산(benzoic acid), 파라옥시안식향산에스테르(paraben), 이미다졸 우레아(imidazolidinyl urea) 및 클로로페네신(chlorphenesin)등은 제형의 안정성 및 방부 유효성은 우수하지만 독성, 피부자극 및 알레르기를 유발할 수 있다는 단점이 있다<sup>9)</sup>. 그러므로 인체에 부작용을 최소화할 수 있는 한약재를 비롯한 천연물 유래 항균 기능을 나타내는 항균제의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

황금(Scutellariae Radix)과 황련(Coptidis Rhizoma)은 (약리작용으로)항균을 비롯한 항암, 항염증 및 항알레르기등과 같은 약리작용이 매우 우수한 것으로 알려져 있다<sup>7-9)</sup>. 황금과 황련은 식중독과 피부과민반응을 일으켜 인체에 치명적인 영향을 주는 *S. aureus*와 *B. cereus* 등에 대한 항균 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>10-14)</sup>. 그러나 일반적으로 황금과 황련 추출물 등 한약재를 비롯한 천연물의 경우 항균효과가 있을 지라도 매우 높은 농도에서 그 기능이 나타나는 경우가 많고 균종에 따라서 항균 효과가 없을 수 있다. 그러므로 황금과 황련 추출물의 항균 기능을 높이기 위해서는 방부제로 활용되는 항균제와 복합적으로 사용해야 할 필요성이 있다. 살리실산(salicylic acid: 2-hydroxybenzoic acid)는 pH가 2.4인 유기산의 하나인 식물성 호르몬으로서 버드나무 껍질에서 처음으로 추출된 이래 항염 및 항균 작용이 있는 것으로 알려지면서 대량으로 합성할 수 있는 기술이 개발되어 최근에는 피부 각질의 제거, 여드름 개선 및 피부염 치료 및 개선에 활용되고 있다<sup>15-17)</sup>. 그러나 살리실산은 비교적 높은 농도에서 항균 효과가 있고, 6% 이상의 고농도에서는 피부 작열감, 가려움증, 홍반, 조직 손상 및 파괴를 야기할 수 있기 때문에 단독으로 항균제로 사용하는 데는 한계점이 있어 다른 항균제와 복합적으로 사용해야 할 필요성이 있다<sup>9)</sup>.

본 연구는 천연물로서 그 효과와 가치가 우수한 황금과 황련의 항균효과를 바탕으로 먼저 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 및 *B. cereus* 등 병원성 미생물에 대한 황금과 황련 추출물 및 살리실산의 항균 효과 농도를 확인한 후 인체에 가능한 부작용을 최소화 할 수 있는 농도의 황금과 황련 추출물 그리고 살리실산을 농도별로 처리하여 이들 조합에 따른 항균효과를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Ampicillin, gentamicin 418, oxacillin, salicylic acid 및 dimethyl sulfoxide 등은 Sigma-Aldrich사(Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Mueller Hinton Broth (MHB), Nutrient agar (NA), Tryptic soy agar (TSA), Lactose broth (LB) 및 Brain Heart Infusion (BHI) 등 배지는 Difco-BBL사(Lawrence, KS, USA)로부터 구입하였다.

#### 2) 균주 및 유지

*E. coli* (ATCC 8739), *P. aeruginosa* (ATCC 9027) 및 *S. aureus* (ATCC 6538) 및 *L. monocytogenes* (ATCC 19115) 등은 ATCC사(Manassas, VA, USA)로부터 구입하였으며, *B. cereus* (JBE0006, isolate)는 (재)전주생물소재연구소(전북, 대한민국)로부터 분양받아 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 황금과 황련 추출

실험에 사용한 황금과 황련은 전라북도 진안군 한방약초센터 2013년 5월 25일에 구입하여 우석대학교 한의과대학 분초방제학교실에서 동정하였다. 황금(#2013-05-S25)과 황련(#2013-05-C25)의 표본은 전주대학교 보건관리학과 연구실의 표본실에 보관하였다. 잘 건조된 황금과 황련은 500 g을 대상으로 약 1~3 mm 정도로 세절하여 믹서기로 마쇄한 후 200 g을 정량하여 80% 에탄올 2,000 mL에 주입한 후 7일간 방치한 후 Sonics & Materials사(Danbury, CT, USA)사를 사용하여 20 kHz 초음파 출력으로 5분간 처리한 후 상층액을 취하여 3,000rpm으로 원심 분리 한 다음 상층액을 취하고 0.45 µm 필터로 여과하여 감압농축기를 사용하여 농축하였다. 농축된 반 고형의 내용물을 -70℃에 냉동시킨 후 냉동 건조시켜 약 황금과 황련 추출물은 각각 18.5 g과 17.6을 얻고 실험에 사용하였다.

#### 2) 디스크확산 항균 실험

실험에 사용한 황금과 황련 추출물 및 살리실산에 대한 항균활성 탐색은 통상적으로 사용하는 디스크 확산법으로 검증하였다. *E. coli*와 *B. cereus*의 배양에 사용된 배지는 LB였고, *P. aeruginosa*와 *S. aureus* 그리고 *L. monocytogenes*는 각각 NA와 TSA, BHI 배지를 사용하였다. 각 세균은 2~3개의 집락( $10^{4-5}$  CFU/mL)을 얻어 접종하였다. 추출물과 살리실산은 여러 가지 농도별로 DMSO에 용해시켜 멸균한 paper disc(직경 7 mm)에 10 µl씩 점적하였다. 표준 항생제는 ampicillin(5 mg/mL), gentamicin 418 5 mg/mL 및 oxacillin(100 mg/mL)을 사용하였다. DMSO가 완전히 건조된 다음 평판배지에 치상하여 35℃로 유지하여 20-24시간 후, paper disk 주변의 생육저지대인 투명대(clear zone)를 측정하여 항균활성을 조사하였다.

#### 3) 생육억제농도(MIC) 측정

MIC(minimum inhibitory concentration) 측정은 상기와 같이 고형 agar 배지에서 각 세균을 배양한 후 0.5 McFarland standard에 준하여 5개의 집락( $10^8$  CFU/mL)을 얻고 MHB 배지에 희석하여 접종 한 후 35℃에서 2-3시간 동안 유지하였다. 본 실험에 사용한 황금과 황련의 추출물 및 살리실산은 8.0 mg/mL

농도로 적정하여 각각 2배 계열로 희석하였다. 각 세균과 추출물 또는 약물이 함유된 MHB을 96 well 플레이트에 옮기고 35°C에서 18-20시간 동안 배양한 후 고, 595 nm에서 Multilabel Counter(1420, Perkin Elmer, San Diego, CA, USA)로 측정하여 MIC 값을 얻었다.

4) 통계처리

모든 실험값은 평균 또는 평균±표준편차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. 황금과 황련 추출물의 항균 효과

본 연구는 200 mg/mL과 400 mg/mL의 황금 및 황련 추출물과 표준 항생제를 처리하여 5가지 미생물에 대한 생육억제 효과를 조사하였다.

그 결과 Fig. 1과 같이 *E. coli*에 대한 표준 항생제인 ampicillin의 생육저지대 크기가 6.1±0.5 mm로 나타나 높은 항균성을 보인 반면, 황금 추출물(200 mg/mL과 400 mg/mL)은 모두 2.0 mm 이하로 항균활성이 없었다. *P. aeruginosa*과 *L. monocytogenes*에 대한 표준 항생제 gentamicin 418과 oxacillin의 생육저지대의 크기는 각각 3.1±0.3 mm과 4.9±0.3 mm로 나타났으나 사용된 황금 추출물의 모든 농도에서 항균활성이 없었다. 그러나 *S. aureus*의 경우 황금 추출물 400 mg/mL의 농도에서 생육저지대는 3.6±0.2 mm로 나타나 표준 항생제 gentamicin 418의 생육저지대(4.6±0.3 mm) 보다 낮았지만 항균활성이 좋았다. 특히 *B. cereus*의 경우 황금 추출물 200 mg/mL 농도에서는 생육저지대의 크기가 3.0±0.4 mm로 나타났으며, 황금 추출물 400 mg/mL 농도에서는 생육저지대의 크기가 4.0±0.4 mm 나타나 표준 항생제로 사용한 oxacillin(4.0±0.2 mm)의 항균 효과와 유사하였다(Fig. 1).

한편 황련의 추출물을 항균효과를 표준항생제와 비교한 결과 Fig. 2와 같이 *E. coli*와 *P. aeruginosa*의 경우 황련 추출물의 경우 황금 추출물과 유사하게 사용된 농도에서 항균활성이 없었지만, *S. aureus*, *L. monocytogenes*와 *B. cereus* 균에서는 높은 항균 활성을 보였다. 즉, *S. aureus*의 경우 200 mg/mL의 황련 추출물의 생육저지대 크기는 4.6±0.4 mm으로 표준 항생제인 gentamicin 418(4.6±0.3 mm)와 유사하였고, 400 mg/mL의 황련 추출물의 생육저지대 크기는 6.0±0.3 mm으로 gentamicin 418에 비해 항균 활성이 유의하게 높았다(p<0.05). *L. monocytogenes*의 경우 황련 추출물 200 mg/mL과 400 mg/mL의 생육저지대 크기는 각각 3.1±0.2 mm와 4.4±0.3 mm로 나타나 표준항생제인 oxacillin(4.9±0.3 mm)보다 항균 활성이 낮았다. *B. cereus*의 경우 200 mg/mL의 황련 추출물의 생육저지대 크기는 3.01±0.3 mm으로 표준 항생제인 gentamicin 418(4.1±0.3 mm)보다 항균 활성이 낮았지만, 400 mg/mL의 황련 추출물의 생육저지대 크기는 5.0±0.3 mm으로 gentamicin 418에 비해 항균 활성이 유의하게 높았다(p<0.05).

2. 살리실산의 항균 효과

본 연구는 농도에 따른 살리실산의 항균 효과를 알아보고자 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 및 *B. cereus* 등 5종을 대상으로 살리실산의 농도를 25-400 mg/mL으로 적정하여 디스크 확산법으로 실험하였다. 그 결과 Table 1와 같이 50 mg/mL 농도 이하의 살리실산은 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 및 *L. monocytogenes*에서 항균활성이 거의 없었지만, *B. cereus*에서는 생육저지대 크기가 평균 3.0 mm로 비교적 높은 항균 활성을 보여주었다. 살리실산 100 mg/mL 농도에서는 *P. aeruginosa*와 *B. cereus*에 대한 생육저지대의 크기가 각각 평균 2.5 mm와 4.1 mm로 나타나 이들 균에 대한 살리실산의 항균활성이 *E. coli*, *S. aureus* 및 *L. monocytogenes*에 비해 상대적으로 높음을 알 수 있었다. 살리실산 200 mg/mL 농도 이상에서는 모든 세균에 대한 생육저지대 크기가 2.8-5.8 mm로 나타나 항균 활성이 농도 의존적으로 높게 나타남을 알 수 있었다.

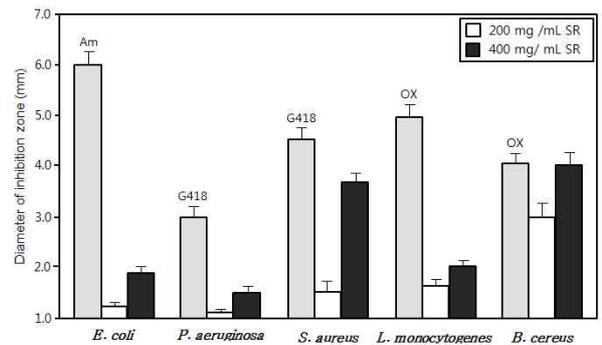
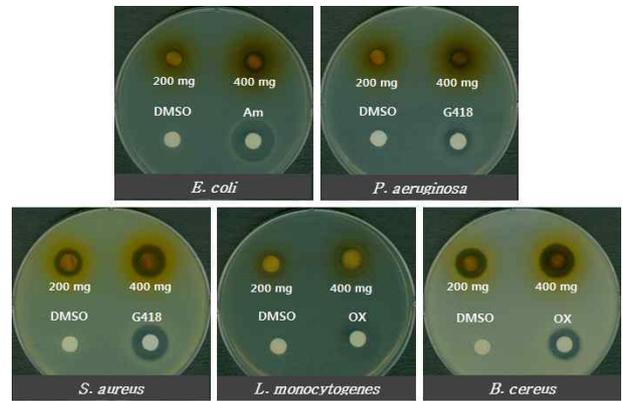


Fig. 1. Inhibition zone(mm) of *Scutellariae Radix* extract(SR) against five strains of pathogenic microorganisms. SR extracts(200 and 400 mg/mL), ampicillin(Am, 5 mg/mL), gentamicin 418(G418, 5 mg/mL) and oxacillin(OX, 100 mg/mL) were prepared in DMSO. Sterile paper discs were placed in the agar plate and 10μL of each concentration was transported onto each disc. These plates were incubated at 37°C for 20-24 hours, following which the inhibition zones were measured. Values are shown as mean ± SD of three independent experiments.

3. 황금과 황련 추출물 및 살리실산의 미생물에 대한 최소생육억제농도

황금과 황련 추출물 그리고 살리실산의 미생물 최소생육억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 측정한 결과는 Table 2와 같다.

황금 추출물의 경우 *S. aureus* 와 *B. cereus*에 대하여 각각 4.09 mg/mL와 3.52 mg/mL농도에서 비교적 높은 항균활성을 나타냈으나, 8 mg/mL 이상의 고농도에서는 상대적으로 *E. coli* 와 *P. aeruginosa*에 대한 약한 항균활성을 보였다. 황련 추출물은 *S. aureus*에 대해서는 0.51 mg/mL농도에서 우수한 항균활성을 나타내었으나 *E. coli*, *P. aeruginosa* 및 *L. monocytogenes*에 대해서 8 mg/mL 이상의 고농도에서도 항균 효과가 없었다. 살리실산의 경우 전 균종에 대해서 황금과 황련 추출물 농도보다 약 2~4배 낮은 농도(0.51-4.09 mg/mL)에서 항균활성을 나타냈다. 이러한 결과는, 디스크 확산법을 이용한 황금(Fig. 1)과 황련 추출물(Fig. 2) 그리고 살리실산(Table 1)의 *E. coli* 와 *P. aeruginosa*에 대한 항균활성 측정에서 고농도(400mg/mL)의 황금 및 황련 추출물이 *E. coli* 와 *P. aeruginosa*에 대한 항균 효과를 나타내지 않았고 살리실산의 경우 황금 및 황련 추출물 농도보다 약 4배 낮은 농도에서(100mg/mL)에서 이들 균에 대한 항균성이 나타난 결과들과 비슷한 경향성을 보임을 알 수 있다.

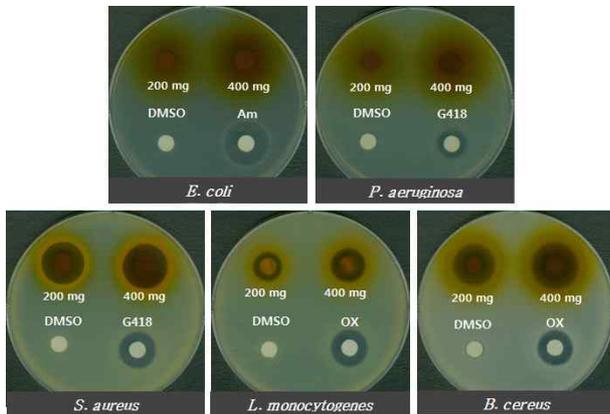


Fig. 2. Inhibition zone(mm) of Coptidis Rhizoma extract(CR) against five strains of pathogenic microorganisms. CR extracts(200 and 400 mg/mL), ampicillin(Am, 5 mg/mL), gentamicin 418(G418, 5 mg/mL) and oxacillin(OX, 100 mg/mL) were prepared in DMSO. Sterile paper discs were placed in the agar plate and 10ul of each concentration was transported onto each disc. These plates were incubated at 37°C for 20-24 hours, following which the inhibition zones were measured. Values are shown as mean ± SD of three independent experiments. @p<0.05 versus G418 group. \$p<0.05 versus OX group.

4. 황금과 황련 추출물 및 살리실산의 조성물의 항균작용에 대한 상승효과

마지막으로 황금과 황련 추출물에 대한 항균활성이 가장 낮

은 *E. coli* 와 *P. aeruginosa* 균을 대상으로 황금 및 황련 추출물을 동시에 처리한 실험군과 여기에 살리실산의 농도에 따른 항균 작용에 대한 상승효과를 알아보고자 하였다. 먼저 황금과 황련 추출물의 최고 농도인 400 mg/mL에서 *E. coli* 와 *P. aeruginosa* 균은 생육저지대 크기가 2.0 mm 이하로 항균활성이 없었다(Fig. 1과 2). 항균 활성이 없는 100 mg/mL 농도의 황금과 황련 추출 물을 각각 동량으로 섞어 최종 200 mg/mL 농도로 적정한 다음 이들의 항균작용에 대한 효과를 조사한 결과 역시 상승효과는 없었다(Fig. 3). 그러므로 황금과 황련 추출물의 농도를 각각 100 mg/mL로 고정하고 살리실산의 최저 항균 활성 농도를 결정하기 위하여 25-200 mg/mL농도의 살리실산을 이들 추출물에 첨가하여 각각의 항균작용을 조사하였으며, 표준항생제인 ampicillin(5 mg/mL), gentamicin 418(5 mg/mL) 그리고 살리실산(400 mg/mL)을 단독으로 처리한 군과 항균활성 정도를 비교 하였다.

Table 1. Dose-dependant antimicrobial activity of salicylic acid(SA) against five strains of pathogenic microorganisms

Strain	Mean inhibition zone(mm) of SA(mg/mL)				
	25	50	100	200	400
<i>E. coli</i>	-	±	1.5	2.8	5.3
<i>P. aeruginosa</i>	-	±	2.5	3.2	3.8
<i>S. aureus</i>	-	-	1.5	2.3	2.8
<i>L. monocytogenes</i>	-	±	1.5	3.3	4.5
<i>B. cereus</i>	±	3.0	4.1	5.3	5.8

-: no antimicrobial activity, ±: slight antimicrobial activity

Table 2. Antimicrobial activity(MIC) of SR, CR and SA against five strains of pathogenic microorganisms

Strains	Extracts*	Minimum inhibition concentration(mg/mL)		
		SR	CR	SA
<i>E. coli</i>		> 8.00	> 8.00	2.04
<i>P. aeruginosa</i>		> 8.00	> 8.00	4.09
<i>S. aureus</i>		4.09	0.51	2.04
<i>L. monocytogenes</i>		6.18	> 8.00	3.15
<i>B. cereus</i>		3.52	2.05	0.51

\* SR: Scutellariae radix, CR: Coptidis Rhizoma, SA: salicylic acid

그 결과 *E. coli*를 대상으로 황금 추출물(100 mg/mL)과 황련 추출물 (100 mg/mL)을 동시에 처리한 대조군의 경우 항균활성이 없었지만(1.1 mm 이하) 살리실산을 농도별로 처리한 결과 유의하게 항균효과가 상승되었다(Fig. 3). 즉, 살리실산 25 mg/mL 과 50 mg/mL의 생육저지대는 각각 4.5±0.2 mm와 5.0±0.1mm 로 살리실산을 처리하지 않은 황금과 황련을 처리한 대조군보다 항균활성이 유의하게 높았으며, 살리실산 50 mg/mL과 100 mg/mL 처리군은 생육저지대가 10.0±0.3 mm와 10.8±0.6 mm로 ampicillin 처리군(6.0±0.2 mm)과 살리실산 단독처리군(5.4±0.2 mm) 보다도 유의하게 항균활성이 상승되었다(p<0.05). 특히 황금과 황련 그리고 살리실산(200 mg/mL) 처리군은 단독 살리실산처리군과 표준항생제로 사용된 ampicillin에 비해서 생육저지대의 크기가 약 50% 이상 증가되어 항균활성이 항균성이 상승되었다. 또한 *P. aeruginosa* 균을 대상으로 실험한 결과 황금과 황련 추출물에 첨가된 살리실산 50 mg/mL농도 이하에서는 아무런

항균효과에 대한 상승 작용이 없었던 반면, 황금과 황련 추출물에 살리실산 100 mg/mL 또는 200 mg/mL을 처리군에서는 현저히 항균 활성이 높았다( $p < 0.05$ ). 특히 살리실산 200 mg/mL 처리군( $5.2 \pm 0.3$  mm)에서는 살리실산(400 mg/mL) 단독 처리군( $3.7 \pm 0.2$  mm)에 비해서 생육저지대의 크기가 약 30%로 증가되어 유의하게 항균활성이 높아졌을 뿐만 아니라( $p < 0.05$ ) gentamicin 418의 처리군 보다도 항균효과가 우수하였다(Fig. 3).

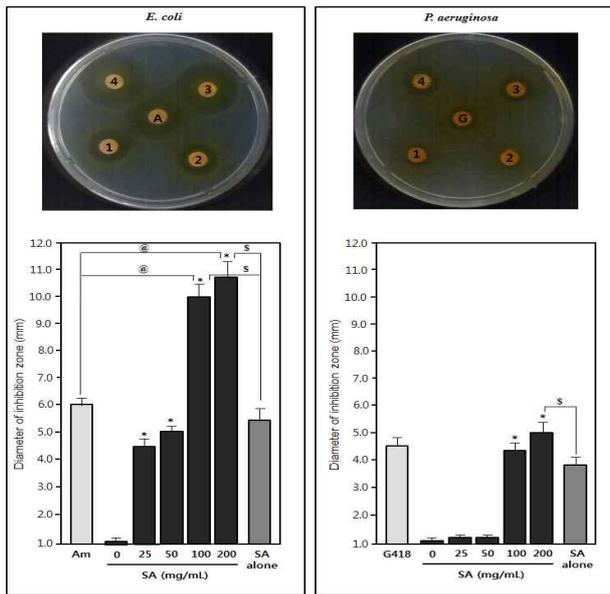


Fig. 3. Synergistic antimicrobial activity (clear zone: mm) of *Scutellariae Radix*(SR), *Coptidis Rhizoma*(CR) and *Salicylic Acid*(SA) combination against *E. coli* and *P. aeruginosa*. SR, CR, SA, ampicillin(5 mg/mL) and gentamicin 418(5 mg/mL) were prepared in DMSO. Sterile paper discs were placed in the agar plate and 10ul of each concentration was transported onto each disc. These plates were incubated at 37°C for 20-24 hours, following which the inhibition zones were measured. 1: SR+CR+SA(25 mg/mL), 2: SR+CR+SA(50 mg/mL), 3: SR+CR+SA(100 mg/mL), 4: SR+CR+SA(200 mg/mL), SR: 100 mg/mL, CR: 100 mg/mL, 0: SR+CR only, SA alone(400 mg/mL), A(Am): ampicilin and G(G418): gentamicin418. Values are shown as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$  versus SR plus CR group. @ $p < 0.05$  versus Am group. \$ $p < 0.05$  versus G418 group.

## 고찰

주로 식품에 사용되는 안식향산과 화장품을 비롯한 외용제에 사용하는 파라벤, 이미다졸 우레아 및 클로로페네신 등은 제형의 안정성 및 방부 유효성은 우수하지만 독성, 피부자극 및 알레르기를 유발할 수 있다는 단점이 있다<sup>9</sup>). 그러므로 인체에 부작용이 최소화될 수 있는 한약재를 비롯한 천연물 유래 항균 기능을 나타내는 항균제의 개발이 필요한 바 본 연구는 황금과 황련을 에탄올 용매를 활용하여 추출한 후, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 및 *B. cereus* 등 5종의 미생물을 대상으로 각 추출물의 농도별로 디스크 확산법을 통해 생육저지대 크기를 측정하였다.

황금 추출물(400 mg/mL)의 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 및 *L. monocytogenes*에 대한 항균효과는 낮았지만, *B. cereus*에 대한 항균효과는 표준 항생제의 항균성과 차이가 없음을 알 수

있다. 또한 400 mg/mL 농도에서 황련 추출물의 경우 *E. coli*와 *P. aeruginosa*에서는 항균 효과가 낮았을지라도 *S. aureus*, 와 *B. cereus*에서는 표준 항생제보다 우수한 항균성을 보였는데, 이 결과는 다른 연구에서 보고된 결과와 유사함을 알 수 있었는데<sup>18-20</sup>, 본 연구의 황금 및 황련 추출물의 항균 효과는 배 등<sup>18</sup>과 최 등<sup>19</sup>의 사용농도보다 높은 것은 시료의 채취시기 또는 추출용매에 따라 다를 수 있기 때문이라 사료된다.

살리실산은 산성이면서 페놀류 계통의 천연물 유래 물질로 항균, 해열, 진통, 항염증 및 피부각질의 연화 등 약리 효과가 알려졌고, 각종 약물에 살리실산을 결합시켜 용해성, 안정성 및 약리성 등을 개량하는 데 사용되고 있다<sup>16,17</sup>). 그러나 고농도에서는 안전성이 문제시 되어 낮은 농도에서 사용이 권장되는 약물이기도 하다. 그러므로 본 연구 결과는 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 및 *L. monocytogenes*에서 100 mg/mL 이상의 살리실산 농도에서 항균 효과가 있었지만, *B. cereus*의 경우 낮은 농도에서도 항균활성이 있음을 알 수 있었다.

황련 추출물은 *S. aureus*에 대해서는 0.51 mg/mL농도에서 우수한 항균활성을 나타내었으나 *E. coli*, *P. aeruginosa* 및 *L. monocytogenes*에 대해서 8 mg/mL 이상의 고농도에서도 항균 효과가 없었다. 살리실산의 경우 전 균종에 대해서 황금과 황련 추출물 농도보다 약 2~4배 낮은 농도(0.51-4.09 mg/mL)에서 항균 활성을 나타냈다. 이러한 결과는, 디스크 확산법을 이용한 황금(Fig. 1)과 황련 추출물(Fig. 2) 그리고 살리실산(Table 1)의 *E. coli*와 *P. aeruginosa*에 대한 항균활성 측정에서 고농도(400mg/mL)의 황금 및 황련 추출물이 *E. coli*와 *P. aeruginosa*에 대한 항균 효과를 나타내지 않았고 살리실산의 경우 황금 및 황련 추출물 농도보다 약 4배 낮은 농도에서(100mg/mL)에서 이들 균에 대한 항균성이 나타난 결과들과 비슷한 경향성을 보임을 알 수 있다.

지금까지의 연구 결과에 따르면 살리실산은 식물성 호르몬으로서 병원균이 만들어내는 세균독성에 관여하는 다양한 요소들의 생산에 영향을 주어 병원균들의 형태적 그리고 생리학적 많은 변형을 유도함으로써 항균효과를 나타낸다고 알려져 있다<sup>21</sup>). *E. coli*의 중요한 병원성 인자 중 하나인 펌브리아(fimbriae)는 *E. coli*가 숙주세포의 상피에 부착하는데 중요한 역할을 하는데 살리실산은 펌브리아 합성을 억제하여 *E. coli*의 성장을 현저하게 감소시킨다. 또한 *S. aureus*에 대한 vancomycin의 효능은 살리실산 첨가 시 훨씬 증가한다고 알려져 있는데 이것은 살리실산이 미생물 세포막의 막 전위차(membrane potential)를 증가시켜 세포내로 항생제와 같은 약제의 유입을 용이하게 하기 때문이다. 본 연구에서도 저농도의 살리실산이 *E. coli*와 *P. aeruginosa* 세포내로 황금과 황련 추출물의 유입을 용이하게 하는데 중요한 역할을 함으로써 이들 균주에 대한 항균 활성의 상승 작용을 가져온 것으로 생각 된다. 또한 살리실산을 지금까지 항균효과가 있는 것으로 알려진 한약재를 비롯한 천연물질과 동시에 사용할 경우 항균 효과가 상승될 것으로 사료된다. 더불어 살리실산은 피부각질의 제거, 여드름 개선 및 피부염 치료 및 개선에 활용되고 있지만<sup>15-17</sup>), 산성이 강하기 때문에 고농도로 사용할 경우 화장품이나 식품에 사용되는 에멀전 제조시 제형이 해리될 수 때문에

본 연구에서 제시한 최소 농도를 사용할 필요성이 있을 것이다.

## 결 론

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 연구에서 사용한 5가지 병원성 세균 중 *E. coli*와 *P. aeruginosa*에 대해서 항균활성이 없는 농도의 황금과 황련 추출물(100 mg/mL)에 항균활성이 없거나 약하게 나타나는 농도의 살리실산(25, 50 or 100 mg/mL)을 동시 처리 했을 때 이들 균주들에 대한 항균효과가 고농도의 살리실산(400 mg/mL)을 단독으로 처리 했을 때 보이는 항균활성이나 표준항생제의 항균 활성보다 유의성 있게 증가했음을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구의 결과는 살리실산을 최소화된 농도에서 황금과 황련의 동시처리하는 식품이나 화장품에 비롯한 외용제의 제품에 방부제로 사용할 수 있는 근거자료를 제공하였다. 그러나 황금과 황련 및 살리실산의 항균상승작용에 대한 분자적 기전에 대해서는 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2013년도 제품공정개선기술개발사업으로 중소기업청의 지원을 받아 연구되었으며(S2122493), 부분적으로 2013년도 산학연협력 기술개발사업(C0102117)으로 중소기업청의 지원을 받아 수행되었다.

## References

1. 김성조, 심우창, 천석조, 유의형, 김동철, 정명섭, 박경진, 송범호, 홍성삼, 이철수, 식중독 예방사업 중장기 계획 연구. 식품의약품안전청 연구결과보고서 pp 8-12, 2006.
2. 윤기선, 이종정. 식중독균 미생물의 위해평가를 위한 종합계획 및 예측모델링 개발. 식품의약품안전청 연구결과보고서 pp 14-16, 2010.
3. de Oliveira, C.S., Lira, B.F., Barbosa-Filho, J.M., Lorenzo, J.G., de Athayde-Filho, P.F. Synthetic approaches and pharmacological activity of 1,3,4-oxadiazoles: a review of the literature from 2000-2012. *Molecules* 17: 10192-10231, 2012.
4. Alekshun, M.N., Levy, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128: 1037-1050, 2007.
5. Matsuda, S., Oh, K., Hirayama, H. Pharmacokinetic and clinical evaluation of levofloxacin in obstetrical and gynecological field. *Jpn J Antibiot* 45: 285-292, 1992.
6. 신계호, 곽일영, 이성원, 서경희, 문성준, 장이섭. 화학방부제 배합량 감소를 위한 폴리올류의 항균, 방부영향력 연구. 대한화장품학회지 33: 111-115, 2007.
7. Yimam, M., Brownell, L., Hodges, M., Jia, Q. Analgesic effects of a standardized bioflavonoid composition from *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu*. *J Diet Suppl* 9:

- 155-165, 2012.
8. Kowalczyk, E., Krzesiński, P., Kura, M., Niedworok, J., Kowalski, J., Błaszczyk, J. Pharmacological effects of flavonoids from *Scutellaria baicalensis*. *Przegl Lek* 63: 95-96, 2006.
9. Ma, B.L., Ma, Y.M. Pharmacokinetic properties, potential herb-drug interactions and acute toxicity of oral *Rhizoma coptidis* alkaloids. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9: 51-61, 2013.
10. Yun, B.Y., Zhou, L., Xie, K.P., Wang, Y.J., Xie, M.J. Antibacterial activity and mechanism of baicalein. *Yao Xue Xue Bao* 47: 1587-1592, 2012.
11. Bae, J.H., Lee, M.J., Lee, S.M. Antimicrobialeffect of *Cutellaria Baicalensis* george extracts on Food-Borne pathogens. *J Kor Micribiol Biotechnol* 33: 35-40, 2005.
12. Lee, J.H., Stein, B.D. Antimicrobial activity of a combination of *Mume fructus*, *Schizandrae fructus*, and *Coptidis rhizoma* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26, O111, and O157 and its effect on Shiga toxin releases. *Foodborne Pathog Dis* 8: 643-646, 2011.
13. 정윤희. 황련 발효추출물의 항균효과 및 항산화활성에 관한 연구. 중부대학교 박사학위논문 pp 31-56, 2009.
14. Choi, U.K., Kim, M.H., Lee, N.H. Optimization of antibacterial activity by Gold-Thread (*Coptidis Rhizoma* Franch) against *Streptococcus mutans* using evolutionary operation-factorial design technique. *J Microbiol Biotechnol* 17: 1880-1884, 2007.
15. Mahdi, J.G., Mahdi, A.J., Mahdi, A.J., Bowen, I.D. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow treeand antiproliferative and anticancer potential. *Cell Prolif* 39: 147-155, 2006.
16. Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., Fan, B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal Behav* 4: 493-496, 2009.
17. Eisen, D.P. Manifold beneficial effects of acetyl salicylic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on sepsis. *Intensive Care Med* 38: 1249-1257, 2012.
18. 배지현, 이명진, 이선미. 황금(*Cutellaria baicalensis* George) 추출물의 식중독성 미생물에 대한 항균효과. *한국미생물·생명공학회지* 33: 35-40, 2005.
19. 최미숙. 황금, 황련, 황백 (*Scutellaria baicalensis*, *Coptis chinensis*, *Phellodendron amurense*) 추출물의 항균효과. 숭실대학교 석사학위 논문 pp 14-17, 2009.
20. 김은경. 식중독균에 대한 식물 추출물의 항균시너지 효과. 원광대학교 석사학위논문 pp 10-20, 2012.
21. Christoper, T.D. Price, Ian, R.L., John, E.G. The effects od salicylate on bacteria. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 1029-1043, 2000.