

발간등록번호
11-1543000-002581-01

위생관리를 위한 다중효용 천연화합물 활용기술 개발 최종보고서  
 축산업에서 곰팡이와 세균을 동시에 제거하는 경제적

# 축산업에서 곰팡이와 세균을 동시에 제거하는 경제적 위생관리를 위한 다중효용 천연화합물 활용기술개발

## 최종보고서

2019

2019.03.21.

주관연구기관 / 국민대학교 산학협력단

**농 립 축 산 식 품 부**

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

2019  
 농림식품기술기획평가원  
 농림축산식품부

<제출문>

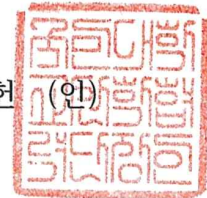
## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농생명산업기술개발사업”(개발기간: 2017.12.28.~2018.12.27.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019.02.10.

주관연구기관명: 국민대학교 산학협력단 (대표자) 차주현 (인)



주관연구책임자 : 김태종

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	1545016165 (117123-01-1)	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.12.28~ 2018.12.27	단 계 구 분	총 단 1 계
연구사업명	단 위 사 업	생명자원 생산·관리기술 사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	축산업에서 곰팡이와 세균을 동시에 제거하는 경제적 위생관리를 위한 다중효용 천연화합물 활용기술개발			
	세부 과제명	축산업에서 곰팡이와 세균을 동시에 제거하는 경제적 위생관리를 위한 다중효용 천연화합물 활용기술개발			
연구책임자	김태종	해당단계 참여연구원 수	총: 5 명 내부: 5 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부:49,175천원 민간: 0천원 계:49,175천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 5 명 내부: 5 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부:49,175천원 민간: 0천원 계:49,175천원
연구기관명 및 소속부서명	국민대학교 산학협력단			참여기업명:	해당 없음
국제공동연구	상대국명:	해당 없음		상대국 연구기관명:	해당 없음
위탁연구	연구기관명:	해당 없음		연구책임자:	해당 없음

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 연구기간 내에 특허권 확보
-------------------------	----------------------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록· 기탁 번호		10-2018-0139461									
		10-2018-0139457									
		10-2018-0139445									
		10-2018-0139460									
		10-2018-0139458									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장 비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수  
164

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>경제적이고 단순한 방법을 통해 곰팡이와 세균을 동시에 억제하는 다중효용 천연 식물추출물을 활용하는 적정기술을 개발하고 현장의 적용 가이드라인을 제시하여 안전하고 효과적이며 단순한 축산 위생기술을 제공한다.</p> <p>가격이 저렴한 식용 식물 추출물 library에 포함된 300여개 추출물 시료를 이용하여 항진균, 항세균 활성을 동시에 가지는 다중효용 추출물을 선행연구에서 1차로 선별하였고, 선별된 식물로부터 단순하고 실용적인 추출물을 생산하는 적정기술을 개발한다. 추출물의 생산 단가 계산과 적정기술 적합성 평가를 통해 최종 대상 추출물과 추출기술을 결정한다. 최종 결정된 적정기술을 통해 생산된 다중효용 식물 추출물을 동물과 환경에 적용하는 응용기술을 확립한다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곰팡이와 세균을 동시에 억제하는 안전한 다중효용 천연 식물추출물 제시</li> <li>- 선별 식물의 적정기술에 적합한 추출방법 제시</li> <li>- 최종 결정된 다중효용 식물 추출물을 동물과 환경에서 적용하여 상승효과를 가지는 응용기술을 확립</li> <li>- 특허 5건 출원 및 기술 이전 완료</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 안전한 천연 식물 살균제의 확보를 통한 다양한 제품에 응용개발 가능</li> <li>- 위생적인 생활환경을 제공하는 안전한 천연소재 제공</li> <li>- 농산물의 활용을 통한 농산물 산업화 및 시장 확대</li> <li>- 개발된 적정 기술의 기술이전을 통한 산업현장에 기술 전파</li> <li>- 안전한 천연물을 활용한 동물 질병 예방으로 안전한 먹거리 확보</li> <li>- 적은 비용으로 생산하고 실용적인 위생기술을 제공하여 축산업의 경쟁력 확보</li> <li>- 소득수준과 상관없는 현장 적용기술을 보급하여 다른 나라에 기술적 지원 강화</li> <li>- 기업의 이익보다 사회적 이익의 최대화</li> <li>- 2019년도에 반려동물용 살균 티슈 제품화 예정</li> <li>- 기술을 이전받은 업체에서는 추가적인 제품개발을 통해 다양한 위생용품을 개발할 계획</li> <li>- 천연 식물 추출물의 살균력 작용기작에 대한 추가 연구를 통해 위생적인 미생물 조절을 위한 기반 지식을 확보할 계획</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	식물 추출물	항진균	항균활성	동물위생	천연물
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	plant extract	antifungal	antibacterial	animal hygiene	natural product

# 〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	14
제 1 절 연구개발 목적.....	14
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	15
1. 반려동물의 피부건강 관리를 위한 천연소재의 필요성.....	15
2. 축산업에 이용 가능한 병원성 세균과 곰팡이를 동시에 억제하는 경제적 다중효용 천연소재의 필요성.....	16
3. 핵심기술.....	18
4. 연구의 필요성.....	19
제 3 절 연구개발 범위.....	20
1. 연구개발 대상의 국내·외 현황.....	20
가. 반려동물 관련 제품 시장 현황. ....	20
나. 가축 동물의 피부병 사례 (-농림축산검역본부 인용).....	20
다. 항생제 사용의 문제점.....	21
라. 해외 동물병원성 세균 관련 산업동향.....	21
마. 국내 특허 현황 - 식물 추출물(항진균 효과 중심으로).....	21
제 2 장 연구수행 내용 및 결과 .....	23
제 1 절 연구개발 추진 계획.....	23
1. 연구개발 추진전략 및 방법.....	23
2. 연구개발 추진체계.....	25
3. 연구개발 추진일정.....	25
제 2 절 연구내용 및 결과.....	26
1. 다중효용 천연화합물 선별.....	26
가. 연구목적 .....	26
나. 실험방법 및 재료 .....	26
다. 결과 및 고찰 .....	28
라. 결론.....	49
2. 추출물 제조 방법에 따른 살균력 평가의 비교 .....	50
가. 연구목적 .....	50
나. 실험방법 및 재료 .....	50
다. 결과 및 고찰 .....	52
라. 결론.....	62
3. 추출물 농도별 효능 평가 비교.....	63
가. 메탄올 추출물의 농도별 <i>Candida albicans</i> 에 대한 생장 억제 효과 관찰.....	63
나. 선별된 용매 추출물의 농도별 <i>Candida albicans</i> 에 대한 생장 억제 효과 관찰.....	71

다. 세균류에 대한 추출물의 농도별 생장 억제 효과 관찰.....	82
4. 추출물 조합에 의한 상승효과 관찰.....	102
가. 연구목적 .....	102
나. 실험방법 및 재료 .....	102
다. 결과 및 고찰 .....	106
라. 결론.....	130
5. 적정 기술 수준의 추출물 제조 방법.....	131
가. 연구목적 .....	131
나. 실험방법 및 재료 .....	131
다. 결과 및 고찰 .....	133
라. 결론.....	145
6. 현장 적용 살균력 측정.....	146
가. 연구목적 .....	146
나. 실험방법 및 재료 .....	146
다. 결과 및 고찰 .....	149
라. 결론.....	150
7. 월가계산 .....	150
제 3 절 연구개발 성과.....	151
1. 특허 출원 (5건).....	151
가. 정향 추출물 및 황백 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물 (2018).....	151
나. 정향 추출물 및 후박 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물 (2018).....	152
다. 고본 추출물 및 후박 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물 (2018).....	153
라. 석창포 추출물 및 황백 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물 (2018)..	154
마. 생약재 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물 (2018).....	155
2. 기술이전 .....	156
3. 사업화 계획.....	157
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도.....	158
제 1 절 연구개발 목표.....	158
제 2 절 목표 달성 여부.....	159
1. 연구개발 성과 및 평가방법.....	159
가. 정성적 평가.....	159
나. 정량적 평가.....	159
제 3 절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등).....	160
제 4 장 연구결과의 활용 계획.....	161
제 1 절 연구개발 결과의 활용방안.....	161
제 2 절 기대성과 및 파급효과.....	162
1. 기대성과.....	162

2. 파급효과.....	162
가. 기술적 측면.....	162
나. 경제적.산업적 측면.....	162
붙임. 참고문헌.....	163
[별첨 1] 연구개발보고서 초록.....	165
[별첨 2] 자체평가의견서 .....	166
[별첨 3] 연구성과 활용계획서.....	170



# 표 목 차

표 1. 정향 추출물의 수율 비교 .....	52
표 2. 황금 추출물의 수율 비교.....	53
표 3. 고본 추출물의 수율 비교.....	54
표 4. 급성자 추출물의 수율 비교.....	55
표 5. 목단피 추출물의 수율 비교.....	56
표 6. 석창포 추출물의 수율 비교.....	57
표 7. 지유 추출물의 수율 비교.....	58
표 8. 초과 추출물의 수율 비교.....	59
표 9. 황백 추출물의 수율 비교.....	60
표 10. 후박 추출물의 수율 비교.....	61
표 11. 추출 방법에 따른 10개 추출물의 살균력 비교.....	62
표 12. 정향 메탄올 추출물과 황백 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>C. albicans</i> 의 성장률.....	106
표 13. 정향 메탄올 추출물과 후박 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>C. albicans</i> 의 성장률.....	109
표 14. 고본 메탄올 추출물과 후박 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>C. albicans</i> 의 성장률.....	111
표 15. 석창포 메탄올 추출물과 황백 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>C. albicans</i> 의 성장률.....	113
표 16. 정향 열수 추출물과 황백 열수 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>C. albicans</i> 의 성장률.....	115
표 17. 정향 열수 추출물과 후박 초임계 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>C. albicans</i> 의 성장률.....	117
표 18. 황금 열수 추출물과 석창포 초임계 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>C. albicans</i> 의 성장률.....	119
표 19. 정향 열수 추출물과 후박 초임계 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>S. aureus</i> 의 성장률.....	121
표 20. 황금 열수 추출물과 석창포 초임계 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>S. aureus</i> 의 성장률.....	123
표 21. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>S. aureus</i> 의 성장률.....	125
표 22. 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>E. coli</i> 의 성장률.....	127
표 23. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 <i>E. coli</i> 의 성장률.....	129

# 그 립 목 차

그림 1. 식물 추출물에 의한 곰팡이와 세균을 동세에 억제.....	18
그림 2. 과제의 연구개발 흐름도.....	24
그림 3. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 계지의 생육억제한 관찰.....	28
그림 4. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 계피의 생육억제한 관찰.....	28
그림 5. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 목방기의 생육억제한 관찰.....	28
그림 6. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 육계의 생육억제한 관찰.....	29
그림 7. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 정향의 생육억제한 관찰.....	29
그림 8. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 황금의 생육억제한 관찰.....	29
그림 9. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 고본의 생육억제한 관찰.....	30
그림 10. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 급성자의 생육억제한 관찰.....	30
그림 11. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 목단피의 생육억제한 관찰.....	30
그림 12. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 삼내자의 생육억제한 관찰.....	31
그림 13. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 석창포의 생육억제한 관찰.....	31
그림 14. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 원지의 생육억제한 관찰.....	31
그림 15. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 장미꽃의 생육억제한 관찰.....	32
그림 16. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 지유의 생육억제한 관찰.....	32
그림 17. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 천궁의 생육억제한 관찰.....	32
그림 18. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 초과의 생육억제한 관찰.....	33
그림 19. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 황백의 생육억제한 관찰.....	33
그림 20. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 후박의 생육억제한 관찰.....	33
그림 21. <i>C. albicans</i> 의 생장에 대한 18개 한약재의 영향.....	34
그림 22. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 계지의 생육억제한 관찰.....	35
그림 23. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 계피의 생육억제한 관찰.....	35
그림 24. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 목방기의 생육억제한 관찰.....	35
그림 25. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 육계의 생육억제한 관찰.....	36
그림 26. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 정향의 생육억제한 관찰.....	36
그림 27. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 황금의 생육억제한 관찰.....	36
그림 28. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 고본의 생육억제한 관찰.....	37
그림 29. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 급성자의 생육억제한 관찰.....	37
그림 30. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 목단피의 생육억제한 관찰.....	37
그림 31. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 삼내자의 생육억제한 관찰.....	38
그림 32. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 석창포의 생육억제한 관찰.....	38
그림 33. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 원지의 생육억제한 관찰.....	38
그림 34. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 장미꽃의 생육억제한 관찰.....	39
그림 35. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 지유의 생육억제한 관찰.....	39
그림 36. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 천궁의 생육억제한 관찰.....	39

그림 37. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 초과의 생육억제한 관찰.....	40
그림 38. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 황백의 생육억제한 관찰.....	40
그림 39. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 후박의 생육억제한 관찰.....	40
그림 40. <i>M. pachydermatis</i> 의 생장에 대한 18개 한약재의 영향.....	41
그림 41. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 계지의 생육억제한 관찰.....	42
그림 42. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 계피의 생육억제한 관찰.....	42
그림 43. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 목방기의 생육억제한 관찰.....	42
그림 44. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 육계의 생육억제한 관찰.....	43
그림 45. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 정향의 생육억제한 관찰.....	43
그림 46. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 황금의 생육억제한 관찰.....	43
그림 47. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 고본의 생육억제한 관찰.....	44
그림 48. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 급성자의 생육억제한 관찰.....	44
그림 49. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 목단피의 생육억제한 관찰.....	44
그림 50. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 삼내자의 생육억제한 관찰.....	45
그림 51. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 석창포의 생육억제한 관찰.....	45
그림 52. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 원지의 생육억제한 관찰.....	45
그림 53. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 장미꽃의 생육억제한 관찰.....	46
그림 54. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 지유의 생육억제한 관찰.....	46
그림 55. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 천궁의 생육억제한 관찰.....	46
그림 56. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 초과의 생육억제한 관찰.....	47
그림 57. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 황백의 생육억제한 관찰.....	47
그림 58. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 후박의 생육억제한 관찰.....	47
그림 59. <i>S. aureus</i> 의 생장에 대한 18개 한약재의 영향 (환 지름 크기를 그래프로 나타낸 것).....	48
그림 60. 추출 방법에 따른 정향 추출물의 살균력 비교.....	52
그림 61. 추출 방법에 따른 황금 추출물의 살균력 비교.....	53
그림 62. 추출 방법에 따른 고본 추출물의 살균력 비교.....	54
그림 63. 추출 방법에 따른 급성자 추출물의 살균력 비교.....	55
그림 64. 추출 방법에 따른 목단피 추출물의 살균력 비교.....	56
그림 65. 추출 방법에 따른 석창포 추출물의 살균력 비교.....	57
그림 66. 추출 방법에 따른 지유 추출물의 살균력 비교.....	58
그림 67. 추출 방법에 따른 초과 추출물의 살균력 비교.....	59
그림 68. 추출 방법에 따른 황백 추출물의 살균력 비교.....	60
그림 69. 추출 방법에 따른 후박 추출물의 살균력 비교.....	61
그림 70. 정향 메탄올 추출물의 농도별 균의 생장 관찰.....	65
그림 71. 황금 메탄올 추출물의 농도별 균의 생장 관찰.....	65
그림 72. 고본 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	66
그림 73. 급성자 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	66
그림 74. 목단피 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	67
그림 75. 석창포 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	67
그림 76. 지유 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	68

그림 77. 초과 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	68
그림 78. 황백 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	69
그림 79. 후박 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	69
그림 80. 정향 100°C 물 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	76
그림 81. 황금 100°C 물 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	76
그림 82. 고본 에탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	77
그림 83. 급성자 에탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	77
그림 84. 목단피 100°C 물 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	78
그림 85. 석창포 초임계 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	78
그림 86. 지유 열수 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	79
그림 87. 초과 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	79
그림 88. 황백 100°C 물 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	80
그림 89. 후박 초임계 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	80
그림 90. 정향 열수 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	86
그림 91. 황금 열수 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	86
그림 92. 황백 열수 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	87
그림 93. 고본 메탄올 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	87
그림 94. 석창포 메탄올 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	88
그림 95. 황백 메탄올 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	88
그림 96. 후박 메탄올 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	89
그림 97. 석창포 초임계 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	89
그림 98. 후박 초임계 추출물의 농도별 <i>S. aureus</i> 의 성장 관찰.....	90
그림 99. 정향 열수 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	91
그림 100. 황금 열수 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	91
그림 101. 황백 열수 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	92
그림 102. 고본 메탄올 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	92
그림 103. 석창포 메탄올 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	93
그림 104. 황백 메탄올 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	93
그림 105. 후박 메탄올 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	94
그림 106. 석창포 초임계 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	94
그림 107. 후박 초임계 추출물의 농도별 <i>E. coli</i> 의 성장 관찰.....	95
그림 108. 정향 열수 추출물의 농도별 <i>P. aeruginosa</i> 의 성장 관찰.....	96
그림 109. 황금 열수 추출물의 농도별 <i>P. aeruginosa</i> 의 성장 관찰.....	96
그림 110. 황백 열수 추출물의 농도별 <i>P. aeruginosa</i> 의 성장 관찰.....	97
그림 111. 고본 메탄올 추출물의 농도별 <i>P. aeruginosa</i> 의 성장 관찰.....	97
그림 112. 석창포 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	98
그림 113. 황백 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	98
그림 114. 후박 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰.....	99
그림 115. 석창포 초임계 추출물의 농도별 <i>P. aeruginosa</i> 의 성장 관찰.....	99
그림 116. 후박 초임계 추출물의 농도별 <i>P. aeruginosa</i> 의 성장 관찰.....	100

그림 117. 정향 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>C. albicans</i> 성장률(%).....	106
그림 118. 정향 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>C. albicans</i> 성장률(%).....	108
그림 119. 고본 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>C. albicans</i> 성장률(%).....	110
그림 120. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>C. albicans</i> 성장률(%).....	112
그림 121. 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 <i>C. albicans</i> 세포 밀도.....	114
그림 122. 대조군 대비 각 추출물 첨가 시 <i>C. albicans</i> 성장률(%).....	114
그림 123. 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 <i>C. albicans</i> 세포 밀도.....	116
그림 124. 대조군 대비 각 추출물 첨가 시 <i>C. albicans</i> 성장률(%).....	116
그림 125. 황금 열수 추출물 및 석창포 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 <i>C. albicans</i> 세포 밀도.....	118
그림 126. 대조군 대비 각 추출물 첨가 시 <i>C. albicans</i> 성장률(%).....	118
그림 127. 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 <i>S. aureus</i> 세포밀도.....	120
그림 128. 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>S. aureus</i> 성장률(%).....	120
그림 129. 황금 열수 추출물 및 석창포 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 <i>S. aureus</i> 세포밀도.....	122
그림 130. 황금 열수 추출물 및 석창포 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>S. aureus</i> 성장률(%).....	122
그림 131. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 <i>S. aureus</i> 세포밀도.....	124
그림 132. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>S. aureus</i> 성장률(%).....	124
그림 133. 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 <i>E. coli</i> 세포밀도.....	126
그림 134. 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>E. coli</i> 성장률(%).....	126
그림 135. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 <i>E. coli</i> 세포밀도.....	128
그림 136. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 <i>E. coli</i> 성장률(%).....	128
그림 137. 파쇄 정도에 따른 정향 추출물의 성장 억제 효과 비교.....	133
그림 138. 용매 비율에 따른 정향 추출물의 성장 억제 효과 비교.....	134
그림 139. 추출 시간에 따른 정향 추출물의 성장 억제 효과 비교.....	135

그림 140. 추출 온도에 따른 정향 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	136
그림 141. 파쇄 정도에 따른 장미꽃 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	137
그림 142. 용매 비율에 따른 장미꽃 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	138
그림 143. 추출 시간에 따른 장미꽃 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	139
그림 144. 추출 온도에 따른 장미꽃 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	140
그림 145. 파쇄 정도에 따른 지유 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	141
그림 146. 용매 비율에 따른 지유 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	142
그림 147. 추출 시간에 따른 지유 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	143
그림 148. 추출 온도에 따른 지유 추출물의 생장 억제 효과 비교.....	144

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적

곰팡이와 세균을 동시에 억제하는 다중효용 천연 식물 추출물 유래 동물 위생관리 방법 개발

- 가축의 질병을 치료, 예방하기 위해 사용되는 항생제, 항진균제는 축산업의 생산량을 높여 경제적인 이익을 주었다. 하지만 그 오남용으로 인해 강한 내성을 가진 세균의 지속적인 출현을 야기하여 최근 국내/외에서 Ampicillin 등의 항생제에 동시 내성을 나타내는 슈퍼박테리아가 발견되었다. 이는 축산업을 통해 사람에게 전파되어 사람은 물론 농, 수, 축산 산업과 환경에 까지 광범위한 피해를 낼 수 있다. 때문에 가축 질병의 원인체(곰팡이, 세균)를 억제할 수 있는 항생제의 대체 치료제의 개발이 필요한 실정이다.
- 항생제와 항진균제의 사용은 축산물의 오염을 유발하여 결국은 사람이 섭취하게 된다. 따라서 항생제, 항진균제의 화합물이 아닌 천연 물질을 이용한 동일한 생육억제 방법을 제안한다.
- 본 연구에 의해 천연물질의 추출물 방법과 얻어진 추출물의 사용방법은 동물의 위생 개선을 위한 적정 기술을 제공한다.
- 세균과 곰팡이의 생육을 동시에 억제하는 방법을 제공함으로써 단순하고 경제적이며 현장에서 편리한 동물 위생방법을 제공한다.
- 본 연구를 통해 개발된 기술을 통해 항생제, 항진균제를 대체한 천연 물질을 사용하여 더 강한 항생제 내성균의 출현을 막을 수 있고, 오염되지 않은 안전한 먹거리를 확보할 수 있다.
- 세균과 곰팡이의 생육을 동시에 억제하는 물질을 통해 질병을 예방, 치료하여 가축 질병 발생에 따른 경제적인 손실을 줄일 수 있다.
- 사용되는 한약재를 재배하는 농가의 소득에 이바지할 수 있다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 반려동물의 피부건강 관리를 위한 천연소재의 필요성

최근 저출산에 따른 핵가족화와 독신자, 노부부 등 1 - 2인 가구가 증가하고 있다. 통계청에 따르면 2015년 기준, 국내 1인 가구는 5,061천 가구가 있으며, 전체 18,705천 가구 중 약 27.1%를 차지하는 비율이다. 이렇게 가족 구성원이 감소하고 홀로 고립된 생활을 함으로써 발생하는 정서적 외로움을 위안삼기 위해 개와 고양이와 같은 반려동물을 찾는 사람들이 증가하고 있다. 반려 동물들은 세균과 곰팡이에 지속적으로 노출되는데, 이러한 것들이 피부병을 유발하는 것으로 알려져 있다.

반려동물들에게 발생하는 피부병은 그 원인이 매우 다양하고 치료가 어려우며 치료에는 오랜 기간이 걸린다. 또한 오랜 기간 동안 치료를 지속한다 할지라도 완치가 어려우며, 근본적인 원인과 치료법 또한 정확하게 알기 어려운 경우가 많다. 동물들은 피부병이 발생한 부위를 심하게 긁음으로써 상처를 내기 때문에, 이로 인해 병원균에 의한 추가 감염이 발생되어 악화될 가능성이 있다. 따라서 반려동물의 피부병은 예방이 최선의 방법으로 알려져 있다.

현재 알려진 피부병을 유발하는 직접적인 원인 중 하나는, 진균류와 세균에 의한 감염이다. 대표적인 피부병 진균류에는 효모균의 일종인 *Malassezia pachydermatis*(*M. pachydermatis*), 세균류에는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)가 알려져 있다. 이 두 미생물은 피부 상재균이지만, 면역력 감소, 증식하기 좋은 피부 환경 등에 의하여 과증식을 하게 되면 피부병을 유발한다. 또한 이 두 미생물은 동물뿐만 아니라 사람에게도 전염되어 피부병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 치료를 위한 동물 진료는 비용이 비싸기 때문에 경제적 부담이 많이 된다.

동물의 피부는 털로 둘러싸여 있기 때문에 관리가 어렵고, 따뜻하며 습하기 때문에 미생물이 자랄 수 있는 최적의 환경이다. 시대가 변함에 따라 동물과 사람간의 거리가 가까워지고 있으며, 그로 인해 인수공통 감염원에 대한 질병 문제가 대두되고 있다.

반려동물에서는 털 고르기를 위해 털을 지속적으로 깎고 반려동물과 주인이 신체접촉을 하므로 세균과 곰팡이에 의한 감염성 피부 질환을 치료하고 예방하기 위해 항생제나 항진균제를 조심스럽게 사용하여야 한다. 또한 약품형태의 항생제나 항진균제를 세균과 곰팡이 감염을 예방하기 위한 지속적으로 사용할 수 없다.

이에 본 연구에서는 사람과 동물에 무해한 식물 추출물을 이용하여 세균과 곰팡이의 생장을 동시에 억제하는 방법을 개발하고자 한다. 개발될 식물 추출물을 이용한 방법은 동물의 털이나 피부에 적용하여 그 주변 환경을 개선함으로써, 반려동물과 주인에게 해롭지 않으면서 병원성 세균과 곰팡이의 증식을 억제하여 피부병을 예방에 도움이 될 것이다.



## 2. 축산업에 이용 가능한 병원성 세균과 곰팡이를 동시에 억제하는 경제적 다중효용 천연소재의 필요성

국내 축산업의 생산은 지속적으로 증가하는 추세에 있으며, 2015년 기준 그 총 생산액이 19조원에 달한다(국립축산과학원, 최근 축산업 현황 및 전망, 2016년 4분기). 하지만 예로부터 곰팡이, 세균, 바이러스 등으로 인한 가축의 전염병이 문제가 되어왔고, 그로 인한 축산업 및 관련 산업에서의 피해액은 연간 2조 2억원에 달한다(이명현, 우리나라 사회기반 강화를 위한 가축질병 대응 R&D 현황 및 전망).

가축 전염성 질병 중 상대적으로 전염성이 강하고 질병으로 인한 피해가 심한 것들은 가축전염예방법을 통하여 국가 차원에서 관리하고 있다. 대표적으로 제 1종 가축전염병에는 구제역, 돼지열병, 고병원성 조류인플루엔자 등이 있고, 제 2종에는 탄저, 브루셀라병, 결핵병, 광견병, 소해면상뇌증 등이 있으며, 제 3종에는 부저병, 저병원성 조류인플루엔자 등이 있다. 이러한 전염성이 강한 가축 질병들 중 일부는 동물뿐만 아니라 사람에게도 전염될 위험이 있는 인수공통전염병으로 알려져 있다. 현재까지 약 250여종이 인수공통전염병으로 확인되며, 이 중 약 60여종이 사람에게도 치명적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 대표적인 질병으로는 탄저, 조류인플루엔자, 브루셀라병, 광우병, 돼지일본뇌염, 결핵, 광견병 등이 있다(가축전염병 예방법 제2조).

2013년 질병관리본부와 동국대학교 산학협력단에서 실시한 ‘축산업 관련 종사자 대상 인수공통감염병 감염실태조사’에 따르면, 경북지역 축산업자 862명, 전국 가축방역사 173명, 검사원 111명 총 1,146명의 조사대상자 중 1,144명에 대해 혈액을 채취하여 분석한 결과 브루셀라증, 규열의 혈청양성자는 각각 4명, 117명이었다. 또한 2000년 경남 창녕에서 탄저병으로 폐사한 소를 섭취하여 5명 피부 탄저병 발생, 2명이 사망한 사례가 있다(임현술, 송영구 등, 탄저병의 개요, 2005) 이런 사례를 통해 가축의 질병은 경제적으로도, 인간의 건강에도 큰 영향을 끼치며, 이에 대한 피해를 줄이기 위해 질병이 발생하지 않도록 예방하고, 발생할 경우 그 피해가 커지지 않도록 즉각적으로 대처해야 한다.

현재까지 가축의 질병을 예방하는 방법에는 축사의 정기적인 소독, 깨끗한 청소, 가축의 정기 검사, 백신 투여 등이 있다. 이를 통해 질병 발생이 지속적으로 줄어들고 있으나, 아직도 조류인플루엔자, 결핵, 브루셀라병 등의 발생이 계속해서 보고되고 있다.(국가가축방역통합시스템 홈페이지, 국내현황 - 법정가축전염병 발생현황) 질병 발생 후에는 가축의 집단 폐사 조치를 한다. 최근 2017년 3월 국내에서 AI, 구제역, 브루셀라병이 연달아 발생하여, 지난해 브루셀라병으로 살처분된 소는 396마리이다(“AI→브루셀라→구제역→브루셀라...지긋지긋한 가축 돌림병” 연합뉴스, 2017.03.06.).

예로부터 질병의 치료, 예방, 가축의 성장 촉진을 목적으로 항생제가 널리 사용되고 있다. 하지만 우리나라는 특히 항생제의 오남용이 심각해, 현재 흔히 사용되고 있는 Ampicillin 등의 항생제에 내성을 가진 슈퍼 박테리아의 출현을 야기하였다(국립수의과학검역원, 동물에 사용되는 항생제 현황과 내성균) 이 내성균은 사람에게도 옮겨져, 최근에는 강력한 항생제인 카바페넴에 내성을 가진 장내세균(CRE)가 전국에서 발견되고 있다(“국내 슈퍼박테리아 확산, 가축에 항생제 많이 쓴 탓” 조선일보, 2017.09.15.) 2013년 기준 페니실린 내성률이 70.5%, 테트라사이클린에 대한 내성률은 29.5%에 달하는 것으로 보고되었다(식품의약품안전평가원). 또한 항생제가 환경에

배출될 경우 자연 생태계에 치명적인 교란을 일으킬 가능성이 있다. 게다가 항생 물질의 단기 투여에 의해 쇼크 등과 같은 급성부작용이 발생하는 경우도 있고, 반복 투여는 동물들에게 알레르기 반응을 일으키거나 중독 증상을 유발하는 경우도 있다. 이러한 발병 요인은 단독 혹은 함께 사용한 어떠한 항생 물질이 동물의 신경과 근육간의 기능을 차단하거나 심장혈관계의 작용을 억제 또는 약물 대사작용의 억제를 가져오게 됨으로써 발생한다. 또한 과량의 항생제가 포함된 사료를 먹고 자란 가축으로부터 제조된 축산 식품을 인간이 섭취하였을 때, 인간에게 어떠한 영향이 있을지 알 수 없다.

이처럼 사람이 직접 접촉, 섭취하는 가축에 대해 더 안전하고, 경제적이고, 쉽게 적용할 수 있는 새로운 소재를 개발할 필요가 있다.

### 3. 핵심기술

본 연구에서는 값싼 식물을 손쉬운 방법으로 추출하여 곰팡이와 세균의 성장을 동시에 억제하는 다중효용 소재를 발굴하여 동물의 사육 현장에서 쉽게 적용가능한 위생개선 기술을 제공하고자 한다. 이는 기존의 항생제와 항진균제의 사용을 최소화하여 항생제 내성균과 같은 (1)내성균의 출현을 최소화하며 (2)축산물의 항생제와 항진균제의 오염을 억제한다. 값싼 식물과 적정기술을 사용한 추출물의 생산은 (3)소득의 수준과 관계없이 사용할 수 있는 경제적 동물 위생방법을 제공한다. 사용되는 농작물의 (4)재배 농가의 소득을 증진시킨다.



그림 1. 식물 추출물에 의한 곰팡이와 세균을 동시에 억제

#### 4. 연구의 필요성

축산 농가의 밀집화로 인한 구조 변화와, 동물을 가족으로 여기는 반려동물로써의 인식 변화로 인해 인간과 동물의 거리가 보다 더 가까워졌다. 이로 인해 동물 관련 용품 사업의 규모가 거대해지고, 상품의 질이 고급화되고 있다. 동물들은 항상 털 고르기를 하면서 자신의 몸을 핥으며, 동물의 피부는 사람보다 예민하고 약하기 때문에 자극이 적고 안전한 자연 유래 제품이 선호되고 있다.

농가 규모의 밀집화로 인해 현재 동물들에게 발생하는 질병들을 예방, 치료하기 위해서 다양한 항생제를 사용하고 있는 실정이다. 항생제는 질병의 원인을 정확히 알아야 하며, 전문가의 처방에 따라 목적에 맞게 적절하게 사용해야 한다. 그러나 전문 지식이 없는 대부분의 사람들이 자가 치료 및 예방 목적이라는 이유로 대량의 항생제를 구입하여 남용, 오용하고 있다. 지속적인 항생제의 오·남용으로 인해 항생제 내성 균주의 출현이 큰 문제가 되고 있다. 또한 현재 개발된 항생물질 중 일부는 동물들에게 예상하지 못한 쇼크 등 심각한 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다.

이러한 현황으로 미루어보아 내성균주의 출현 위험이 적으면서, 사람과 동물에게 무해하며, 접근이 용이하며 사용하기 쉬운 질병 예방, 치료 소재의 개발이 시급한 실정이다. 본 연구진은 이러한 문제를 해결하기 위해 자연 유래 식물 추출물을 이용하고자 한다. 식물 자원으로부터 소재를 개발함으로써 농가 경제 소득의 경제적 효과도 기대할 수 있다는 이점이 있다.

## 제 3 절 연구개발 범위

### 1. 연구개발 대상의 국내·외 현황

#### 가. 반려동물 관련 제품 시장 현황

반려동물 관련 제품의 시장은 나날이 성장하고 있다. 최근 핵가족화와 1인 가구가 증가하여 애완동물을 기르는 가정이 증가하고 있으며, 동물에 대한 인식이 단순히 애완동물에서 하나의 가족 구성원으로 여기는 반려동물로 변화한 것을 가장 큰 이유로 볼 수 있다. 이러한 인식의 변화로 인해 반려동물들에게 보다 더 좋은 것을 해주려는 생각을 갖게 되면서 사료, 간식, 용품 등 반려 동물 관련 산업 시장이 크게 증가하고 있으며, 고급화 되고 있다. 실제 반려동물 관련 시장 수요는 2015년 기준 약 1조 2천억원 이상의 규모로 급성장하였다.

과거에는 개와 고양이 같은 동물들을 키우다가 싫증이 나면 버릴 수 있는 하나의 물건으로 취급하였으며, 병들거나 다친 동물의 경우 그 치료비가 매우 비싸 실제로 유기하는 경우도 많았다. 실제로 반려동물을 키우는데 과도한 의료비 부담이 큰 문제로 대두되고 있다. 특히 반려동물은 털이 피부를 덮고 때문에, 통풍이 잘 안되며 각종 진드기나 병원균이 서식하기 좋은 환경을 이루고 있어서 피부병에 쉽게 노출되어있다. 이러한 피부 질병을 미리 예방하기 위해 영양소가 함유된 고급 사료, 또는 고급 미용 제품 시장이 크게 성장하고 있다.

#### 나. 가축 동물의 피부병 사례 (-농림축산검역본부 인용)

- (1) 소버짐병(소피부진균증): 소 버짐병은 세계적으로 곰팡이에 의한 전염병으로, 나이에 관계없이 발생하나 특히 2살 이하의 소에 많으며 발육부진, 모피의 손상 등 경제적 피해를 주며, 사람에게도 피부병을 유발하는 인수공통전염병임. 소 버짐병은 젖소에서 17.7~60%의 비율로 발생되었다는 보고가 있으며, 송아지에서 감수성이 2살 이하의 육성우에서 50% 이상 발생으로 높으며, 특히 축사에서 장기간 사육하는 겨울과 초봄사이에 집중적으로 나타난다.
- (2) 닭의 포도상 구균증 : 높은 폐사를 일으키는 급성폐혈증과 피부 조직에서의 농양 형성, 관절염, 골수염 등을 동반하는 아급성 감염을 특징으로 하는 세균성 전염성 질병으로 국내에서도 흔하게 발생하고 있다. 원인체인 *Staphylococcus aureus*는 그람양성의 구균으로서 건조한 외부 환경 조건이나 소독제에 대해 저항성이 강하고 항생제에 대해 내성이 잘 생기는 세균으로 알려져 있다.
- (3) 브루셀라병: 브루셀라병은 브루셀라속(*Brucella*)에 속한 균에 의한 인수공통감염병으로, 소, 산양, 돼지 등의 가축과 사람이 질병에 걸릴 수 있다. 주 증상은 가축에게는 생식기관 염증, 유산, 불임이고, 사람에게에는 발열, 피로, 권태감, 두통 등의 증상을 보인다. 감염된 가축은 도살처분하고, 사람의 경우에는 약물을 투여하나 약물투여를 중지하면 재발하는 경우가 많고 내균성으로 치료가 쉽지 않다. 예방으로는 백신접종, 정기검사, 가축 거래시 검사증명서 확인 등이 있다. 국내에서는 1955년에 처음으로 발견되어 현재까지 산발적으로 발생하고 있다.
- (4) 소결핵병 : 소결핵병은 우형 결핵균 (*Mycobacterium bovis*)에 의하여 발생하는 인수공통감염병으로, 소, 돼지, 사슴, 고양이, 개, 면양 등의 가축과 사람이 질병에 걸릴 수 있다. 소결핵의 증상은 쇠약, 식욕결핍, 체중감소, 결절 병변 발생 등이 있다. 사람의 경우에는 호흡기 및 소화기를 통해 감염되어 폐결핵, 장결핵 등을 유발한다. 감염된 소는 살처분하고

외부와 차단하여 감염 지역의 병원체를 박멸하기 위해 반복 검사, 추적조사 등을 시행한다. 국내에서는 1913년에 최초로 발견되어 1940년대까지 높은 발생을 보이다가 지속적인 검사로 발생이 감소하여 현재도 질병 발생이 확인되고 있다.

#### 다. 항생제 사용의 문제점

- 축산업에서 항생제는 가축의 질병 치료와 예방, 성장 촉진을 목적으로 사용되었다. 2016년 기준 항생제의 국내 총 판매량은 약 921톤으로, 2008년부터 판매량이 감소하여 2013년에 가장 적게 판매되었으나 그 이후 점차 증가하는 추세이다(농림축산검역본부, 2016년도 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링-가축, 축산물) 2016년 축종별 판매실적은 돼지 47~57%, 수산용 17~24%, 닭 17~21%, 소 5~8%로 돼지에서 가장 많이 판매되었다. 2016년 성분별 판매실적은 tetracyclines 계열 항생제(Oxytetracycline, Chlortetracycline 등) 249톤, penicillins 계열 항생제(Amoxyicillin, Ampicillin 등) 약 246톤으로 가장 많이 팔렸다.
- 식품의약품안전평가원에 따르면 유통 중인 축·수산물에서 검출된 황색포도상구균의 각 항생제에 대한 내성률이 증가하고 있다. 항생제 내성균은 음식을 통해 사람에게 전달돼 질병 치료 시 심각한 문제를 일으킬 가능성이 크다. 2013년 기준, 페니실린 내성률이 70.5%이고, 테트라사이클린에 대한 내성률은 29.5%이다. 농가에서는 자가치료 및 예방목적이라는 이유로 의사 처방 없이 항생제를 대량 구입해 가축의 각종 질병예방에 사용하고 있는 실정이다. 항생제를 무분별하게 사용하고 환경에 배출할 경우 약보다 균의 내성이 더 빠르게 발전해 사람이 균을 통제할 수 없는 상황이 올 수 있다.
- 항생물질의 반복투여에 의해 알레르기 반응을 일으키거나 중독증상을 나타내는 경우 또는 단기투여에 의해 급성부작용(쇼크)을 일으키는 경우를 말한다. 발병요인은 단독 혹은 같이 사용한 어떤 항생물질이 동물의 신경과 근육간의 기능을 차단하거나 심장혈관계의 작용을 억제 또는 약물 대사작용의 억제를 가져 오게 되어 부작용이 온다. 대표적인 예로는 테트라사이클린류, 스트렙토마이신류, 클로람페니콜류가 있다.

#### 라. 해외 동물병원성 세균 관련 산업동향 (출처: 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단)

- 동물용 의약품의 세계 시장은 지속적으로 증가하고 있으며, 2010년 기준 201억 달러(약 23조원)로 2006년 160달러에서 26% 증가한 수치이다.
- 동물용 의약품의 해외 시장 규모 확대는 우리나라 동물용의약품 산업에 좋은 기회로 다가올 수 있다. 국내 시장 규모가 세계시장의 3%가 되지 않는 상황에서 동물의약품 업체들은 해외시장을 적극 공략해야한다.

#### 마. 국내 특허 현황 - 식물 추출물(항진균 효과 중심으로)

- 2008 년 산호말 속(*Corallina* sp.) 해조류 추출물을 유효성분으로 포함하는 말라세지아속 진균에 대한 항균 조성물
- 2008 년 파래 속 (*Enteromorpha* sp.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 말라세지아속 진균에

대한 향균 조성물

- 2012 년 생달나무 추출 정유를 유효성분으로 포함하는 향균성 조성물
- 2013 년 동백나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물
- 2013 년 탕자나무 속(*Poncirus* sp.) 식물 및/ 치자 속(*Gardenia* sp.) 식물의 과실 추출물을 포함하는 항진균용 조성물
- 2015 년 장미 추출물을 함유하는 항진균용 조성물 (아모레퍼시픽)
- 2015 년 천연 발효물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 말라세지아속 진균에 대한 향균 조성물 (우영 씨앗, 월계수 잎, 아카시아 꽃, 죽순, 구지뽕 열매, 메밀, 쇠비름, 배)

## 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 추진 계획

#### 1. 연구개발 추진전략 및 방법

- 본 연구팀은 2013 - 2014년도, 2016 - 2017 년도에 차세대 바이오 그린 21 사업 중에 농생명바이오식의약소재개발사업단에서 “바이오필름 형성 억제를 통한 구강 미생물 개선 물질의 개발” 로 연구 과제 수행하였으며 이를 통하여 식물 추출물을 제조할 수 있는 기술과 다양한 식물 추출물을 보유하고 있음
- 다양한 미생물을 배양 및 다룰 수 있으며, 추출물의 효능을 확인하는 스크리닝 기술 보유

#### <연구개발 방법>

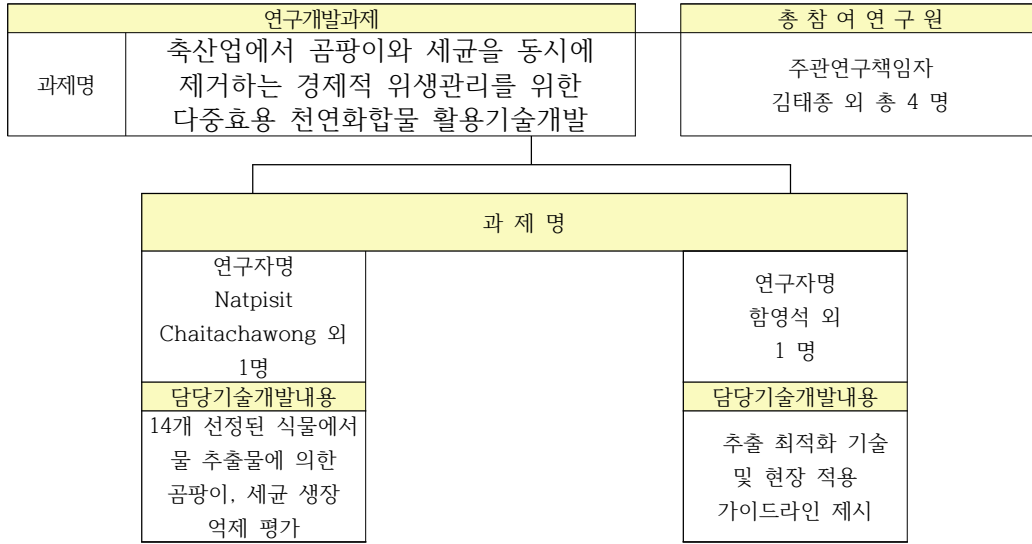
- 선행연구에서 기 보유한 300여개의 식물 추출물에서 곰팡이와 세균의 생장을 동시에 억제하는 다중효용 시료 14개 확보
- 14개의 확보된 시료에서 물 추출물에 의한 곰팡이와 세균의 생장을 동시에 억제하는 다중효용 시료 선별
- 식물 고형분의 상태, 용매의 비율, 침지시간, 침지 온도의 최적화에 의한 적정기술 개발
- 제조 가격과 적정기술 적합성에 의해 최종 후보 추출물 선정
- 혼합에 의한 곰팡이 세균 동시 살균효과 상승 효과 검토
- 분무 양, 분무 간격, 온도에 따른 효과 변화, pH에 따른 효과 변화의 최적화를 통한 현장적용 적정기술 개발
- 특허 출원 및 기술이전





그림 2. 과제의 연구개발 흐름도

## 2. 연구개발 추진체계



## 3. 연구개발 추진일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	14종 식물 물 추출물 제조 및 평가														10,000	김태종 (국민대 산학협력단)
2	추출방법의 최적화														11,000	김태종 (국민대 산학협력단)
3	제조가격 등 평가에 의한 최종 식물 선정														1,000	김태종 (국민대 산학협력단)
4	효과 상승방법 검토														11,000	김태종 (국민대 산학협력단)
5	현장적용기술 확립														11,000	김태종 (국민대 산학협력단)
6	특허 출원 및 기술이전														4,000	김태종 (국민대 산학협력단)
7	완료보고서 작성														1,175	김태종 (국민대 산학협력단)

## 제 2 절 연구내용 및 결과

### 1. 다중효용 천연화합물 선별

#### 가. 연구 목적

300개의 한약재를 메탄올을 용매로 하여 추출물을 제조하고, 그 추출물들을 진균류인 *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis*와 세균류 *Staphylococcus aureus*에 처리하여 성장 억제 효과가 있는 추출물만을 선별해 낸다.

#### 나. 실험방법 및 재료

##### (1) 메탄올 용매를 이용한 추출물 제조 방법

경동시장 지운당 약국으로부터 구매한 한약재를 5cm 이하의 크기로 파쇄한 후, 30g의 파쇄된 한약재를 플라스크에 넣고, 300mL의 99.5% 메탄올을 용매로 하여 3시간 동안 50°C 항온수조에서 침지 추출하였다. 30분 간격으로 4회 내지 6회 플라스크를 흔들어 용매와 생약재를 혼합해주었다. 추출 후 여과지 (Whatman™ No.1 qualitative filter paper)를 이용하여 감압장치로 고형분을 여과하여 제거하였다. 여과된 추출물은 회전 농축기를 이용하여 농축하고 60°C 건조기에서 최대 2주 동안 정치하여, 메탄올을 제거하고 고형분의 추출물을 얻었다. 상기 건조시킨 고형분 추출물의 무게를 측정하여 30g 한약재로부터 얻을 수 있는 각각의 양을 측정하여 결과로 나타내었다.

##### (2) 한약재 추출물 시료 준비

한약재 메탄올 추출물의 고형분 50mg을 메탄올 용매 1mL에 용해시켜 녹인 후 5분간 50°C의 물 증탕을 통해 최대한 추출물이 용매에 용해되도록 하였다. 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후, 13,000rpm에서 10분간 원심분리 후 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

##### (3) 균의 활성 효과 관찰

###### (가) *Candida albicans*에 대한 paper disc 실험 방법

추출물에 의한 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 관찰하기 위해 Paper disc 방법을 이용하였다. 추출물은 disc용 paper(Adventec, Ø6mm, 두께 0.7mm)를 사용하여 처리하였다. disc용 paper에 한약재 시료를 20µL씩 로딩하고 건조하는 단계를 5번 반복하여 한약재 시료 0.1mL를 처리한다. 즉, paper에 한약재 추출물 고형분 5mg을 함유하도록 한다. 대조균은 한약재를 녹인 용매인 99.5% 메탄올 0.1mL를 처리하여 진행하였다.

이후 전배양한 *C. albicans*의 흡광도를 측정하고, 측정된 균의 농도가  $O.D_{600nm}=1$ 이 되도록 YPD 배지로 희석한다.  $O.D_{600nm}=1$ 의 농도를 갖는 *C. albicans*를 YPD agar plate에 0.1mL 분주하여 spread 도말한다. 플레이트에 균일하게 균이 도말되도록 충분히 spreading한 후 건조된 한약재 paper를 균이 도말된 plate에 올려놓는다. control은 한약재를 녹인 용매인 메탄올로 하였으며, 모든 방법은 동일하다. 26°C 인큐베이터에서 24hr 동안 배양한다.

배양 24hr 후 paper 주위에 생육억제환이 1mm 이상 생긴 것을 선별하여 항진균

효과가 있다고 판단한다. 이것은 Gel-doc을 통해 모두 일정한 크기로 사진을 찍고, disc용 paper를 포함하여 clear zone의 전체 지름을 mm 단위로 측정한다. 플레이트에 나타난 환의 가로와 세로의 크기를 각각 측정한다. 3개의 플레이트이므로 측정한 6개의 값을 평균을 내어 최종 환의 지름 크기로 사용한다.

(나) *Malassezia pachydermatis*에 대한 paper disc 실험 방법

추출물에 의한 *M. pachydermatis*의 성장 억제 효과를 관찰하기 위해 Paper disc 방법을 이용하였다. 추출물은 disc용 paper(Adventec,  $\varnothing$ 6mm, 두께 0.7mm)를 사용하여 처리하였다. disc용 paper에 한약재 시료를 20 $\mu$ L씩 로딩하고 건조하는 단계를 5번 반복하여 한약재 시료 0.1mL를 처리한다. 즉, paper에 한약재 추출물 고형분 5mg을 함유하도록 한다. 대조군은 한약재를 녹인 용매인 99.5% 메탄올 0.1mL를 처리하여 진행하였다.

이후 전배양한 *M. pachydermatis*의 흡광도를 측정하고, 측정한 균의 농도가  $O.D_{600nm}=1.5$ 가 되도록 mDixon 배지로 희석한다.  $O.D_{600nm}=1.5$ 의 농도를 갖는 *M. pachydermatis*를 mDixon agar plate에 0.1mL 분주하여 도말한다. 플레이트에 균일하게 균이 도말되도록 충분히 spreading한 후 건조된 한약재 paper를 균이 도말된 plate에 올려놓는다. control은 한약재를 녹인 용매인 메탄올로 하였으며, 모든 방법은 동일하다. 30 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 2일 동안 배양한다.

배양 2일 후 paper 주위에 생육억제환이 1mm 이상 생긴 것을 선별하여 항진균 효과가 있다고 판단한다. 이것은 Gel-doc을 통해 모두 일정한 크기로 사진을 찍고, disc용 paper를 포함하여 clear zone의 전체 지름을 mm 단위로 측정한다. 플레이트에 나타난 환의 가로와 세로의 크기를 각각 측정한다. 2개의 플레이트이므로 측정한 4개의 값을 평균을 내어 최종 환의 지름 크기로 사용한다.

(다) *Staphylococcus aureus*에 대한 paper disc 실험 방법

추출물에 의한 *S. aureus*의 성장 억제 효과를 관찰하기 위해 Paper disc 방법을 이용하였다. 추출물은 disc용 paper(Adventec,  $\varnothing$ 6mm, 두께 0.7mm)를 사용하여 처리하였다. disc용 paper에 한약재 시료를 20 $\mu$ L씩 로딩하고 건조하는 단계를 5번 반복하여 한약재 시료 0.1mL를 처리한다. 즉, paper에 한약재 추출물 고형분 5mg을 함유하도록 한다. 대조군은 한약재를 녹인 용매인 99.5% 메탄올 0.1mL를 처리하여 진행하였다.

이후 전배양한 *S. aureus*의 흡광도를 측정하고, 측정한 균의 농도가  $O.D_{600nm}=1$ 이 되도록 TSB 배지로 희석한다.  $O.D_{600nm}=1$ 의 농도를 갖는 *S. aureus*를 TSA plate에 0.1mL 분주하여 spread 도말한다. 플레이트에 균일하게 균이 도말되도록 충분히 spreading한 후 건조된 한약재 paper를 균이 도말된 plate에 올려놓는다. control은 한약재를 녹인 용매인 메탄올로 하였으며, 모든 방법은 동일하다. 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 1일간 배양한다.

배양 1일 후 paper 주위에 생육억제환이 1mm 이상 생긴 것을 선별하여 항진균 효과가 있다고 판단한다. 이것은 Gel-doc을 통해 모두 일정한 크기로 사진을 찍고, disc용 paper를 포함하여 clear zone의 전체 지름을 mm 단위로 측정한다. 플레이트에 나타난 환의 가로와 세로의 크기를 각각 측정한다. 2개의 플레이트이므로 측정한 4개의 값을 평균을 내어 최종 환의 지름 크기로 사용한다.

다. 결과 및 고찰

(1). *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과 관찰

(가) 계지 추출물

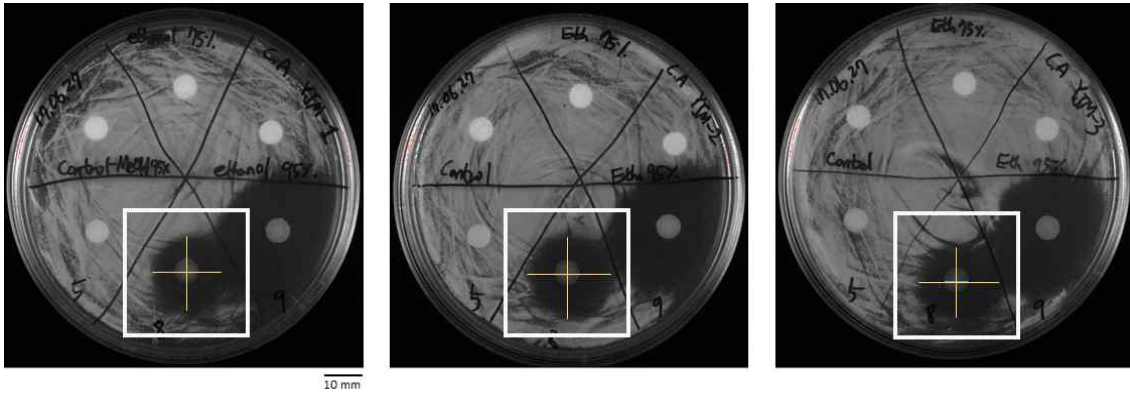


그림 3. *C. albicans* 의 성장에 대한 계지의 생육억제한 관찰

→ 계지 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 19.8mm이다.

(나) 계피 추출물

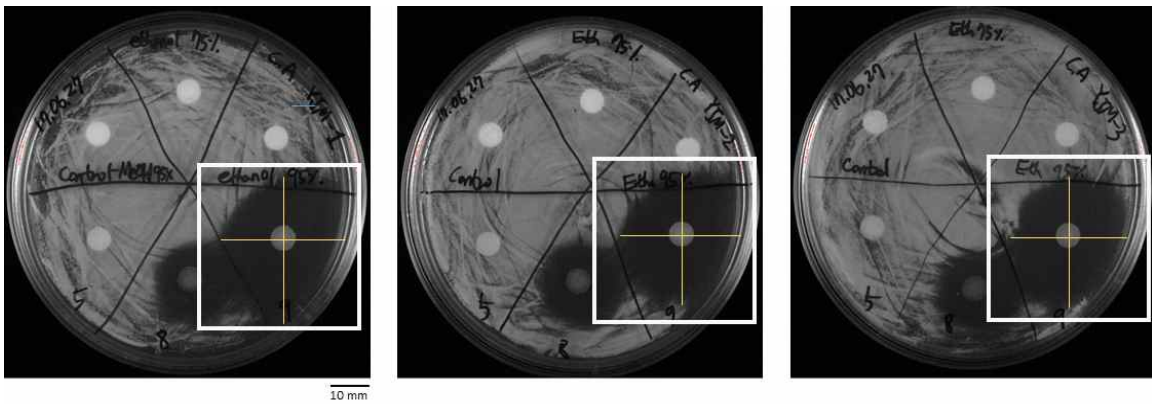


그림 4. *C. albicans* 의 성장에 대한 계피의 생육억제한 관찰

→ 계피 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 32.8mm이다.

(다) 목방기 추출물

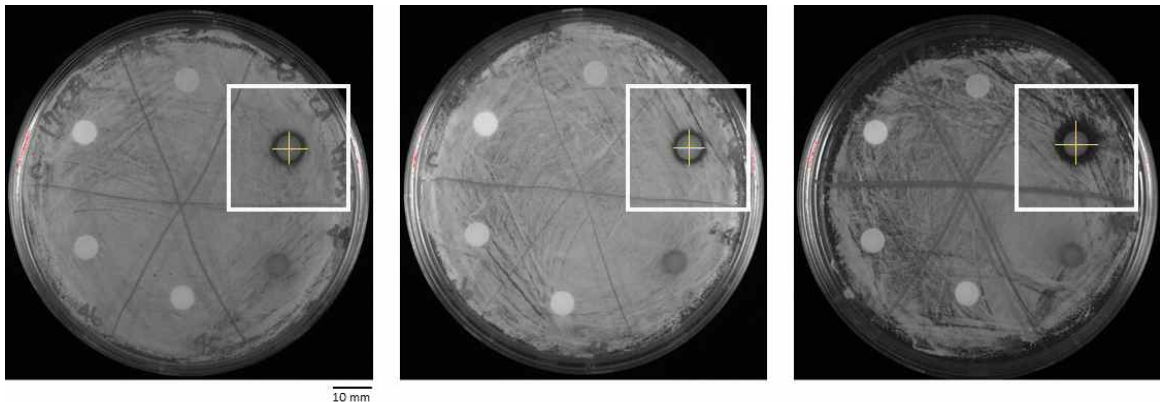


그림 5. *C. albicans* 의 성장에 대한 목방기의 생육억제한 관찰

→ 목방기 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 9.3mm이다.

(라) 육계 추출물

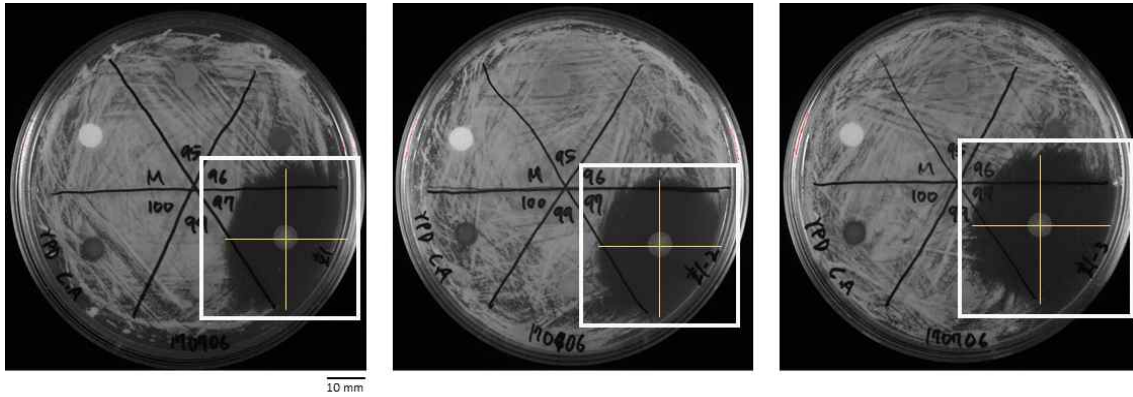


그림 6. *C. albicans* 의 생장에 대한 육계의 생육억제한 관찰  
 → 육계 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 34.8mm이다.

(마) 정향 추출물

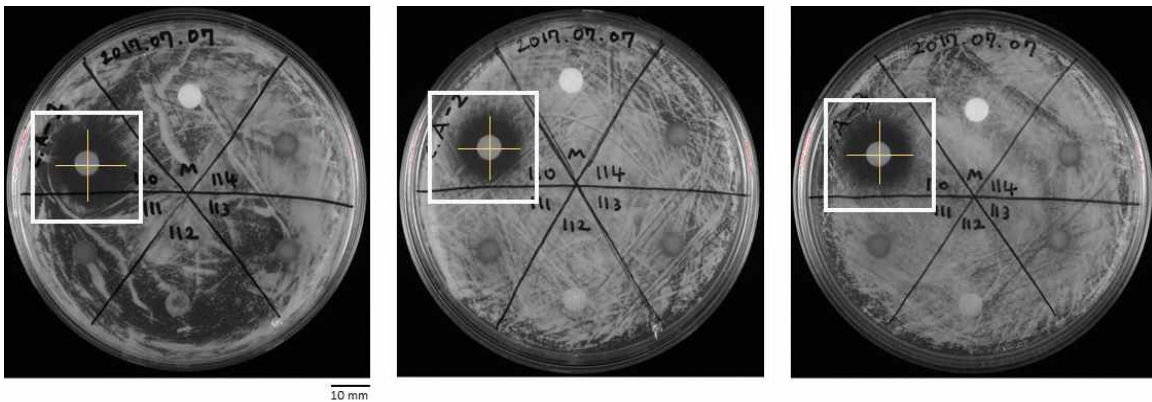


그림 7. *C. albicans* 의 생장에 대한 정향의 생육억제한 관찰  
 → 정향 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 16.8mm이다.

(바) 황금 추출물

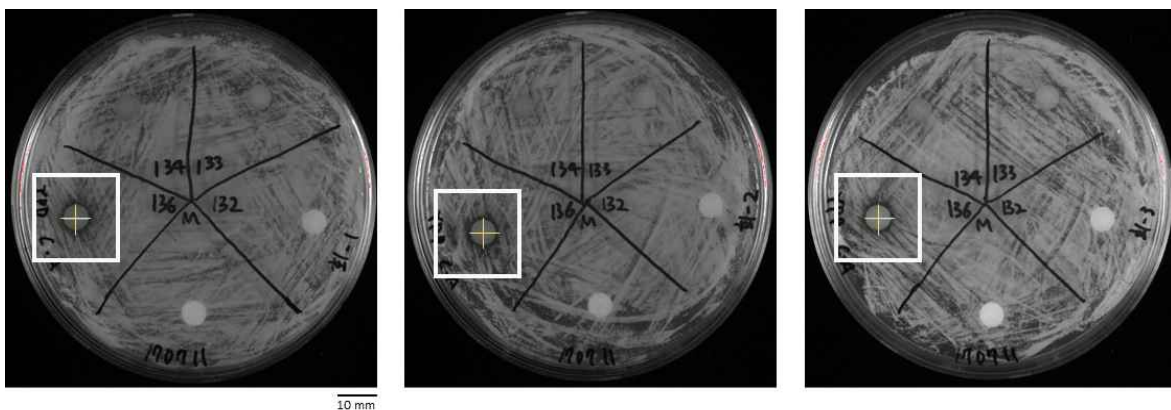


그림 8. *C. albicans* 의 생장에 대한 황금의 생육억제한 관찰  
 → 황금 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 7.5mm이다.

(사) 고분 추출물

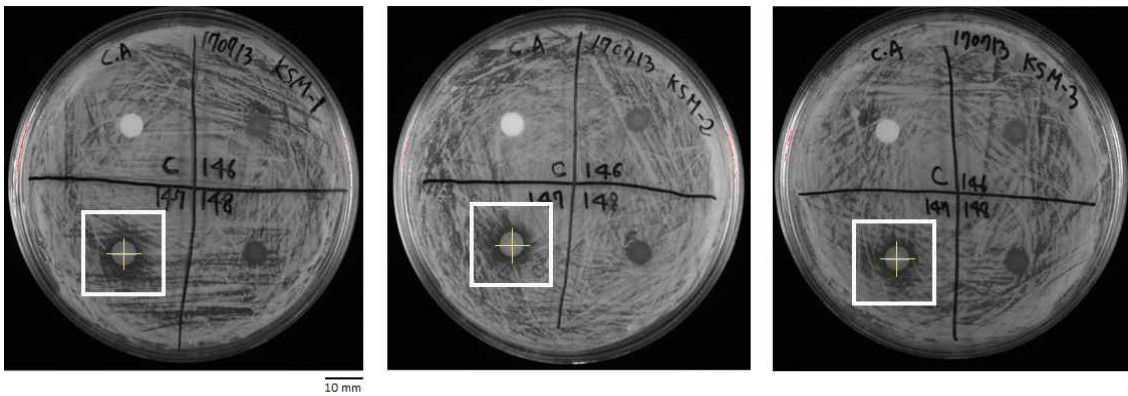


그림 9. *C. albicans* 의 생장에 대한 고분의 생육억제환 관찰  
 → 고분 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 8.8mm이다.

(아) 급성자 추출물

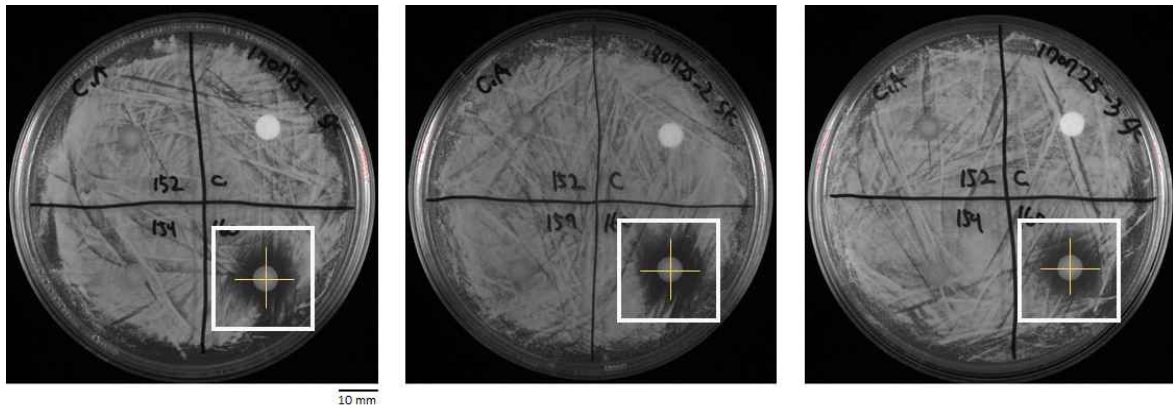


그림 10. *C. albicans* 의 생장에 대한 급성자의 생육억제환 관찰  
 → 급성자 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 14.8mm이다.

(자) 목단피 추출물

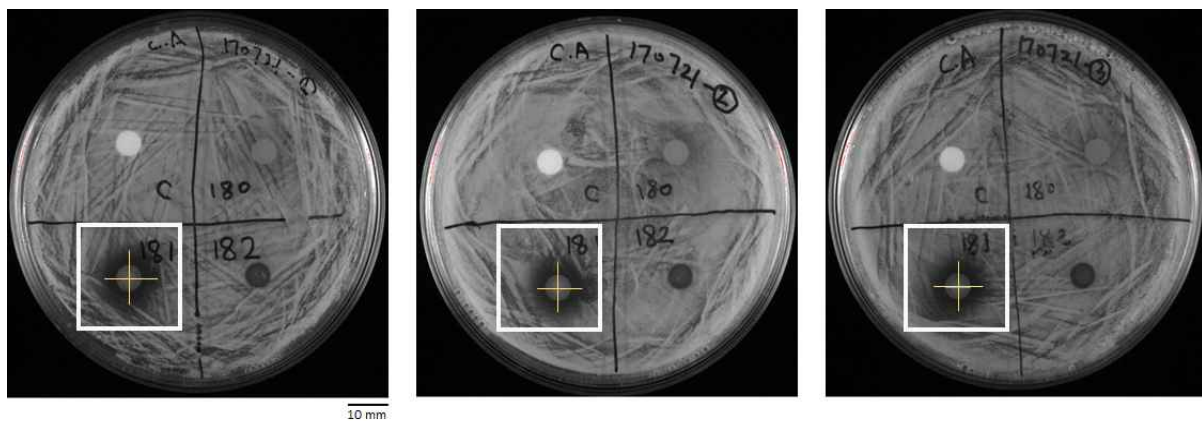


그림 11. *C. albicans* 의 생장에 대한 목단피의 생육억제환 관찰  
 → 목단피 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 12.2mm이다.

(차) 삼내자 추출물

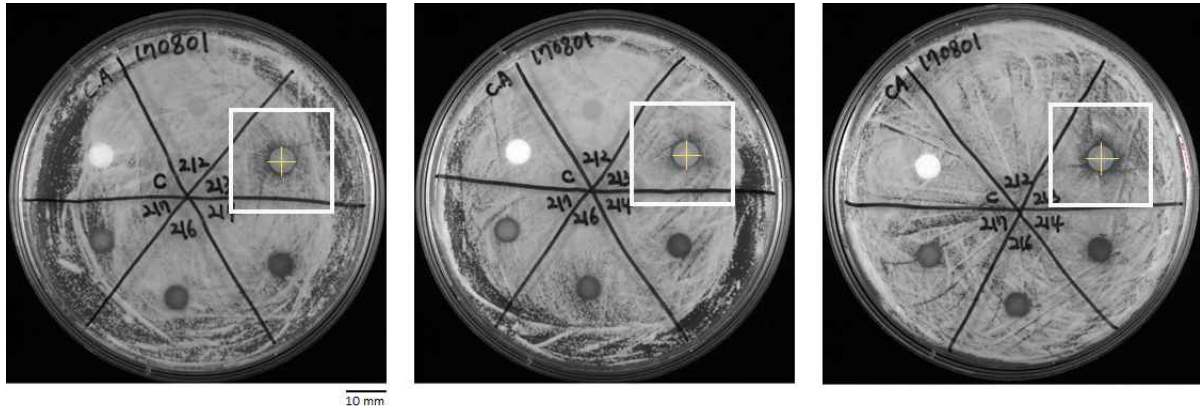


그림 12. *C. albicans* 의 생장에 대한 삼내자의 생육억제환 관찰  
 → 삼내자 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 7.3mm이다.

(카) 석창포 추출물

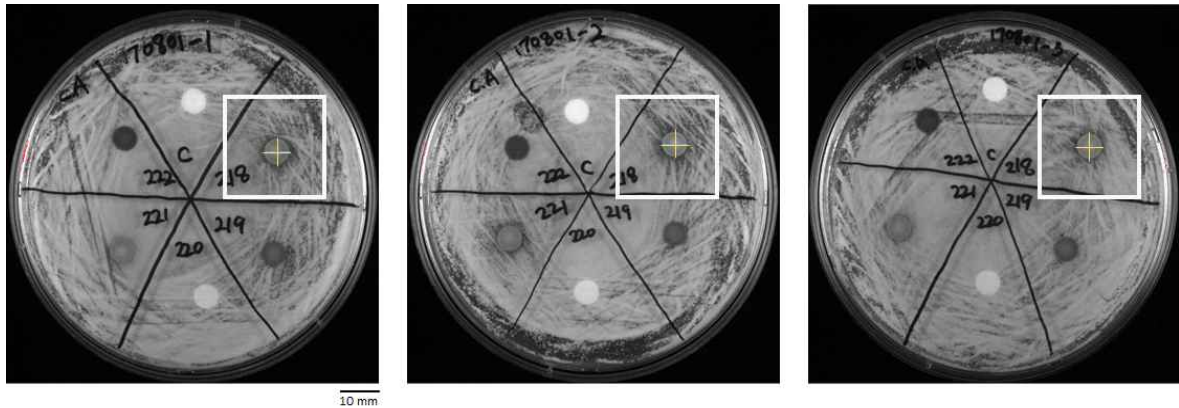


그림 13. *C. albicans* 의 생장에 대한 석창포의 생육억제환 관찰  
 → 석창포 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 7mm이다.

(타) 원지 추출물

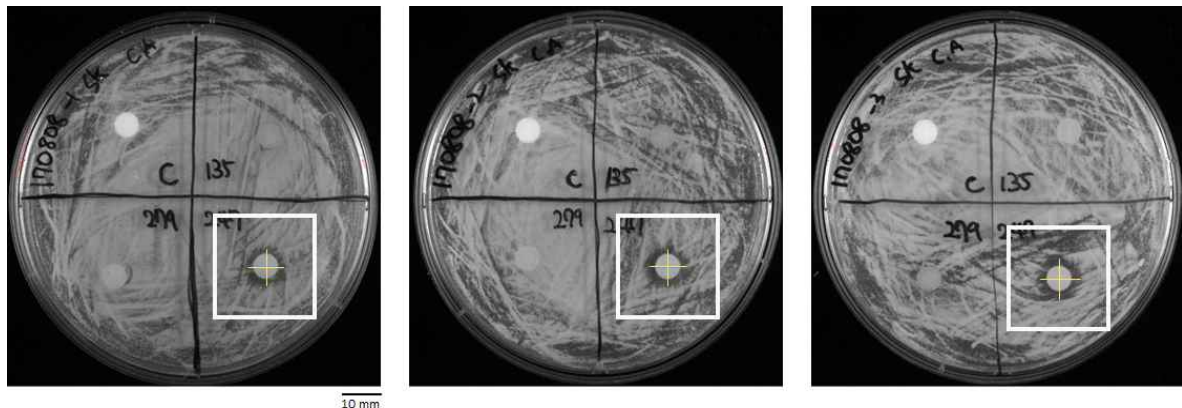


그림 14. *C. albicans* 의 생장에 대한 원지의 생육억제환 관찰  
 → 원지 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 9.3mm이다.



(파) 장미꽃 추출물

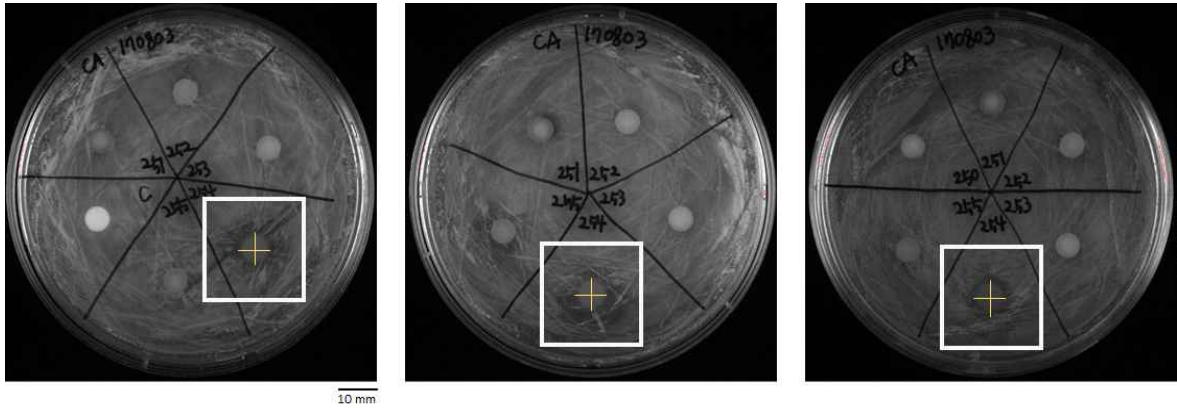


그림 15. *C. albicans* 의 생장에 대한 장미꽃의 생육억제환 관찰  
 → 장미꽃 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 8.2mm이다.

(하) 지유 추출물

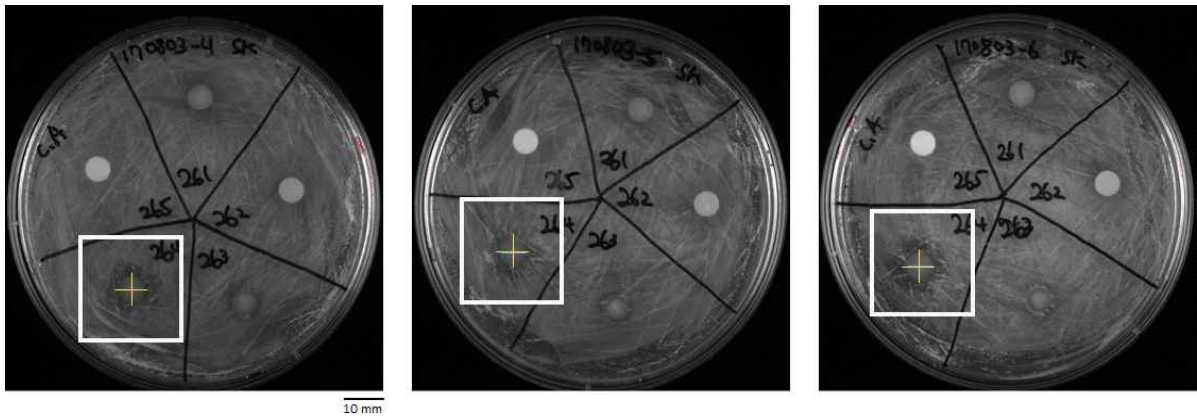


그림 16. *C. albicans* 의 생장에 대한 지유의 생육억제환 관찰  
 → 지유 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 8mm이다.

(거) 천궁 추출물

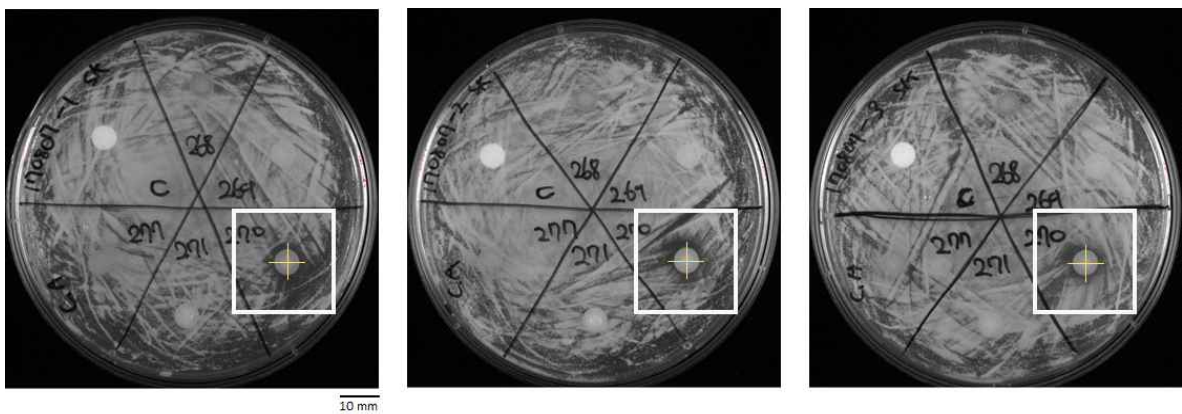


그림 17. *C. albicans* 의 생장에 대한 천궁의 생육억제환 관찰  
 → 천궁 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 9mm이다.

(너) 초과 추출물

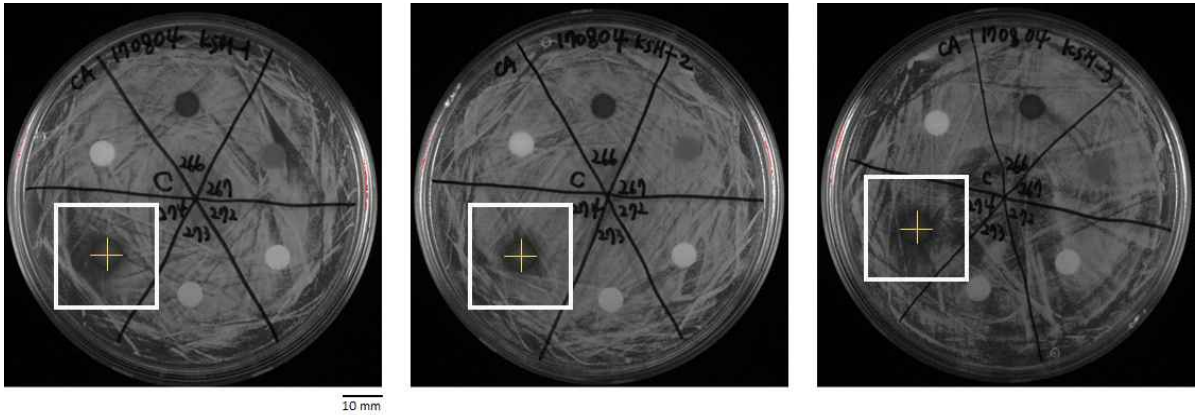


그림 18. *C. albicans* 의 생장에 대한 초과의 생육억제한 관찰  
 → 초과 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 8mm이다.

(더) 황백 추출물

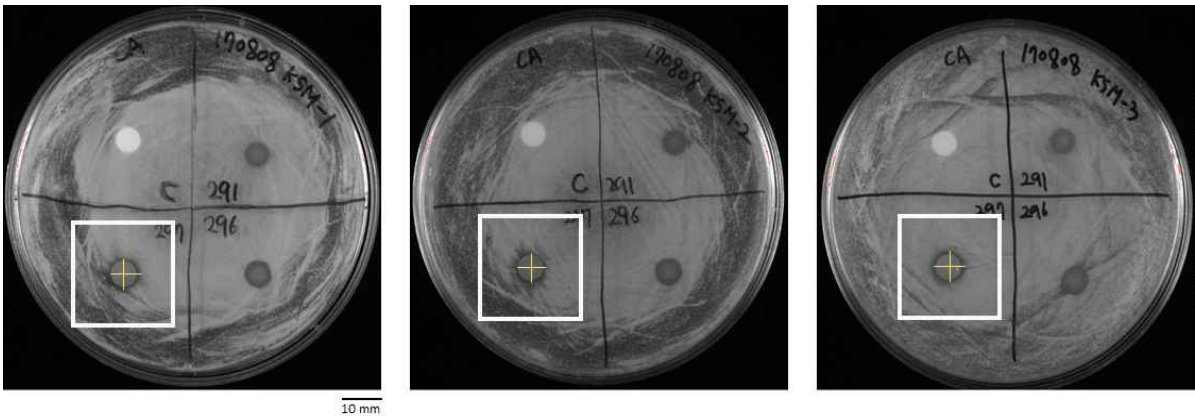


그림 19. *C. albicans* 의 생장에 대한 황백의 생육억제한 관찰  
 → 황백 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 7.5mm이다.

(러) 후박 추출물

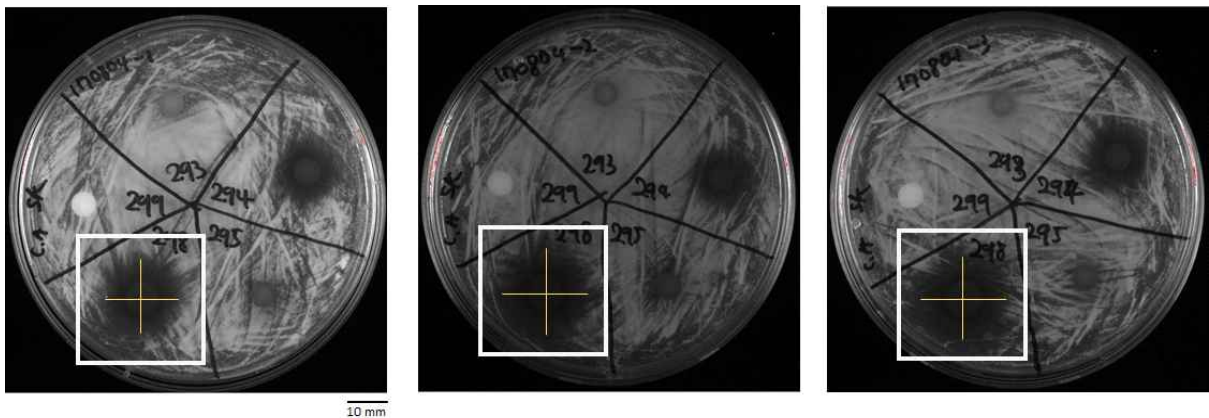


그림 20. *C. albicans* 의 생장에 대한 후박의 생육억제한 관찰  
 → 후박 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 19.8mm이다.

(머) *C. albicans*에 대한 메탄올 추출물의 성장 억제 효과 관찰 (종합)

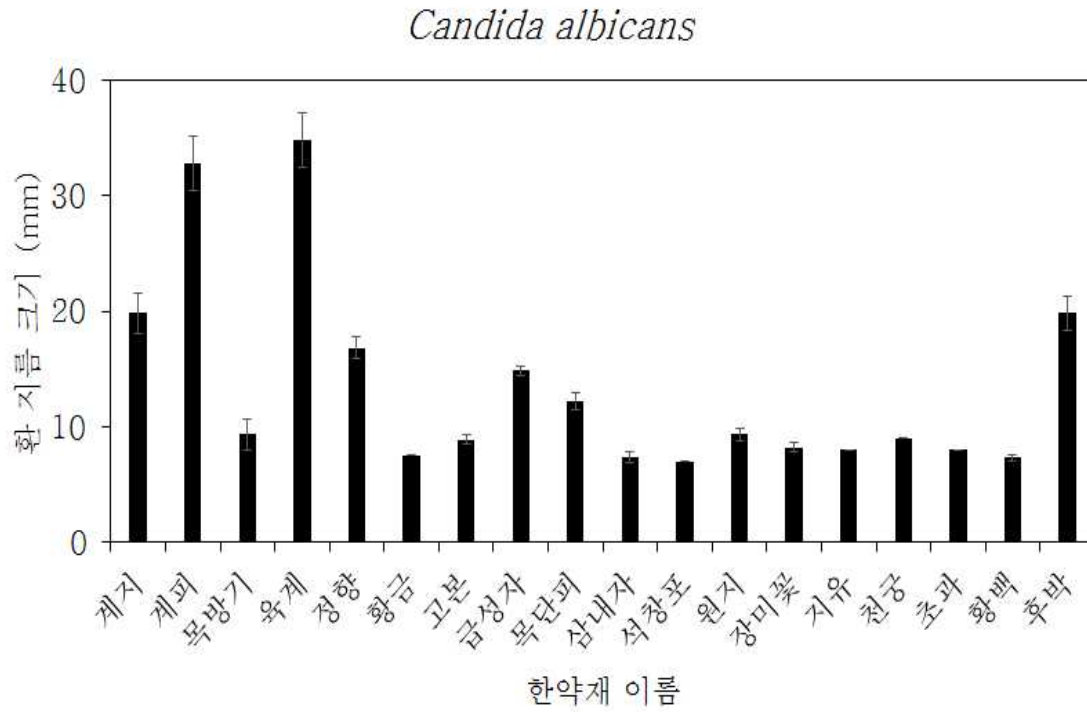


그림 21. *C. albicans* 의 성장에 대한 18개 한약재의 영향

(1) *M. pachydermatis*에 대한 성장 억제 효과 관찰

(가) 계지 추출물

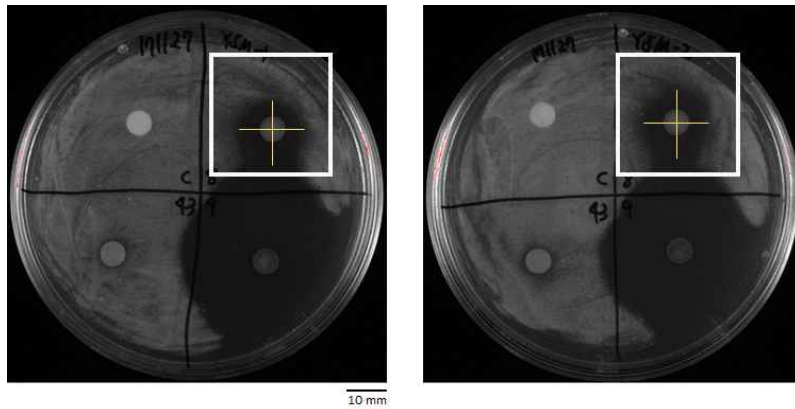


그림 22. *M. pachydermatis*의 성장에 대한 계지의 생육억제환 관찰

→ 계지 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 16.3mm이다.

(나) 계피 추출물

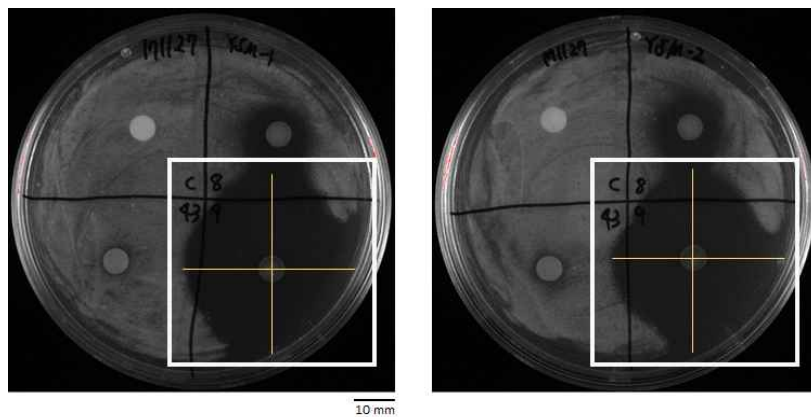


그림 23. *M. pachydermatis*의 성장에 대한 계피의 생육억제환 관찰

→ 계피 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 43.3mm이다.

(다) 목방기 추출물

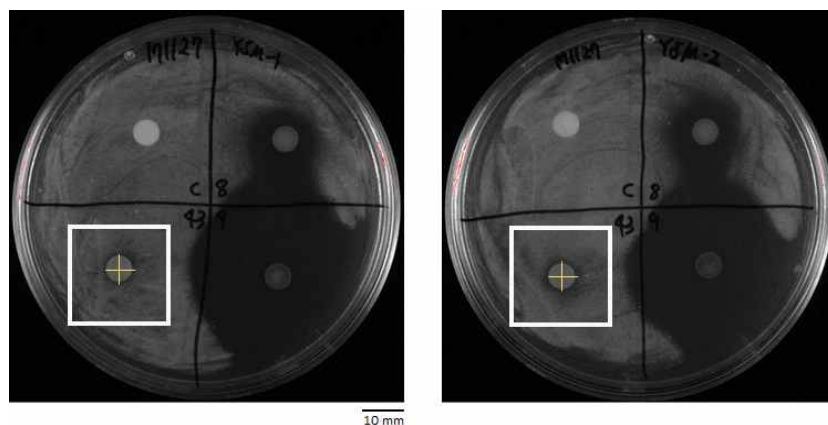


그림 24. *M. pachydermatis*의 성장에 대한 목방기의 생육억제환 관찰

→ 목방기 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 7mm이다.

(라) 육계 추출물

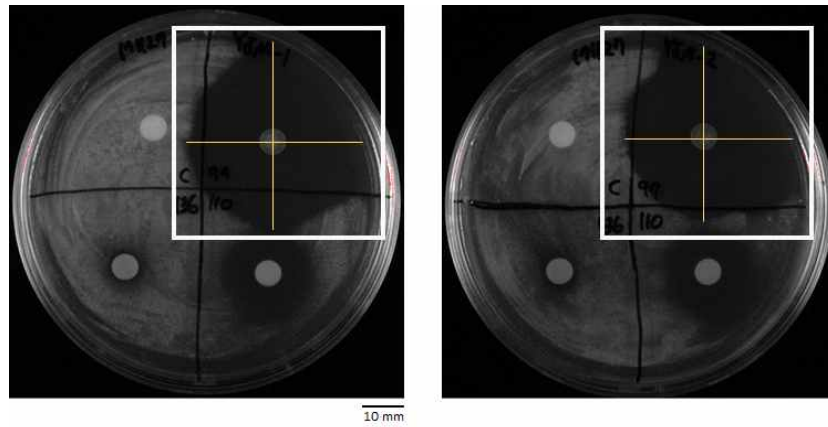


그림 25. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 육계의 생육억제환 관찰  
→ 육계 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 42.3mm이다.

(마) 정향 추출물

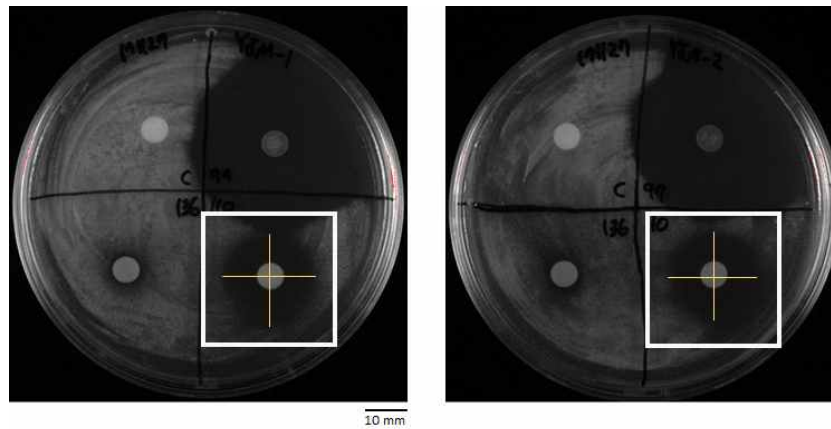


그림 26. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 정향의 생육억제환 관찰  
→ 정향 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 21.5mm이다.

(바) 황금 추출물

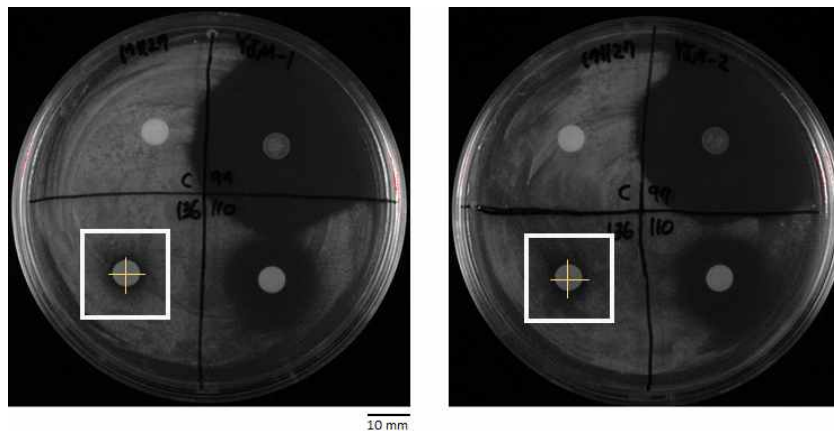


그림 27. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 황금의 생육억제환 관찰  
→ 황금 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 8.5mm이다.

(사) 고분 추출물

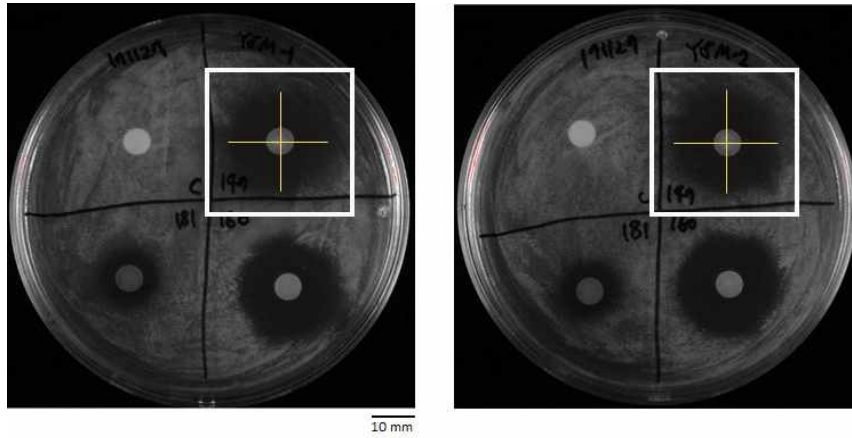


그림 28. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 고분의 생육억제환 관찰  
→ 고분 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 23.5mm이다.

(아) 급성자 추출물

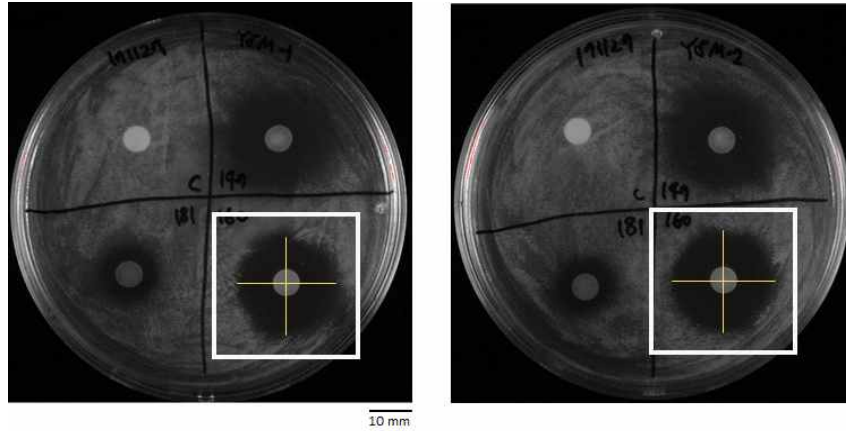


그림 29. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 급성자의 생육억제환 관찰  
→ 급성자 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 23.5mm이다.

(자) 목단피 추출물

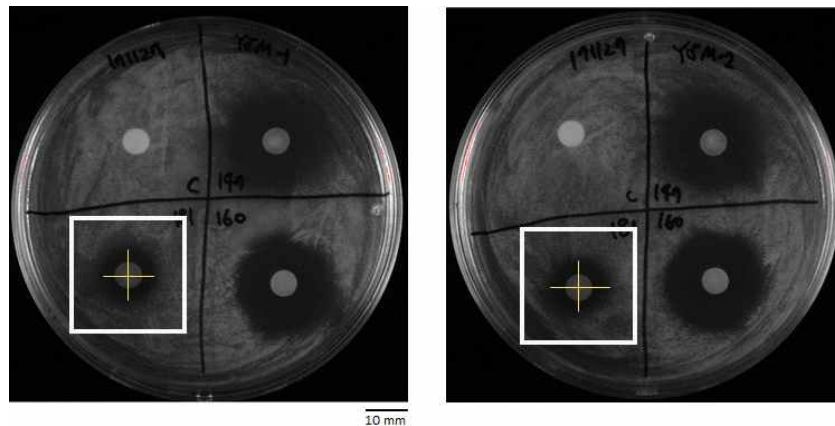


그림 30. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 목단피의 생육억제환 관찰  
→ 목단피 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 12.5mm이다.

(차) 삼내자 추출물

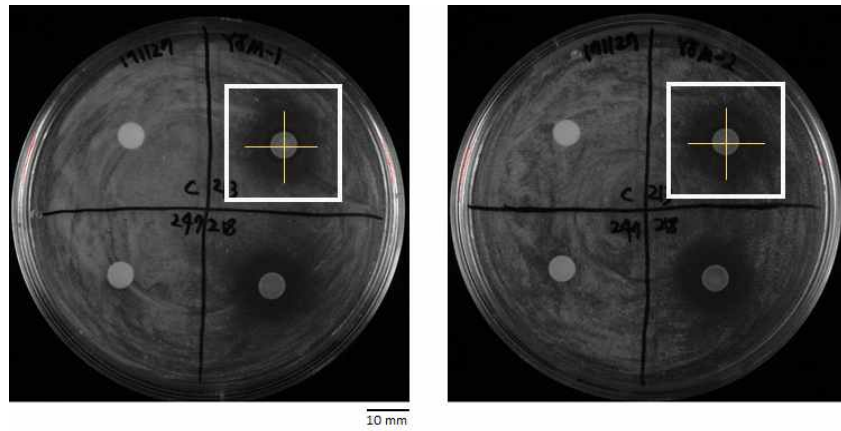


그림 31. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 삼내자의 생육억제환 관찰  
→ 삼내자 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 17.3mm이다.

(카) 석창포 추출물

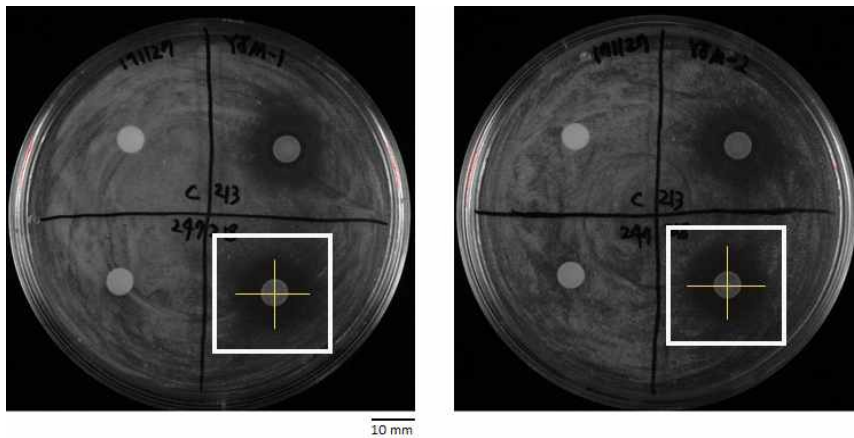


그림 32. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 석창포의 생육억제환 관찰  
→ 석창포 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 17mm이다.

(타) 원지 추출물

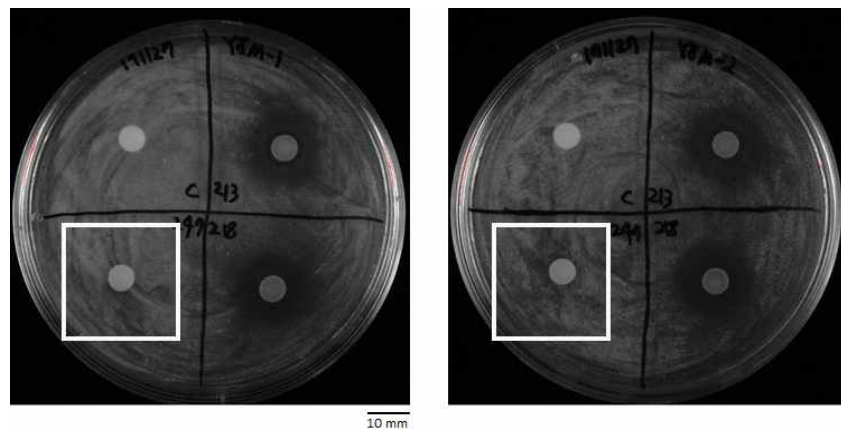


그림 33. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 원지의 생육억제환 관찰  
→ 원지 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 0mm이다.

(파) 장미꽃 추출물

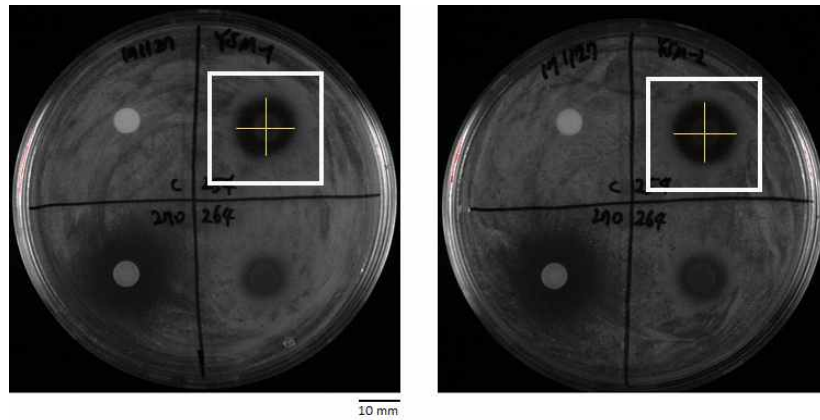


그림 34. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 장미꽃의 생육억제환 관찰  
→ 장미꽃 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 14.4mm이다.

(하) 지유 추출물

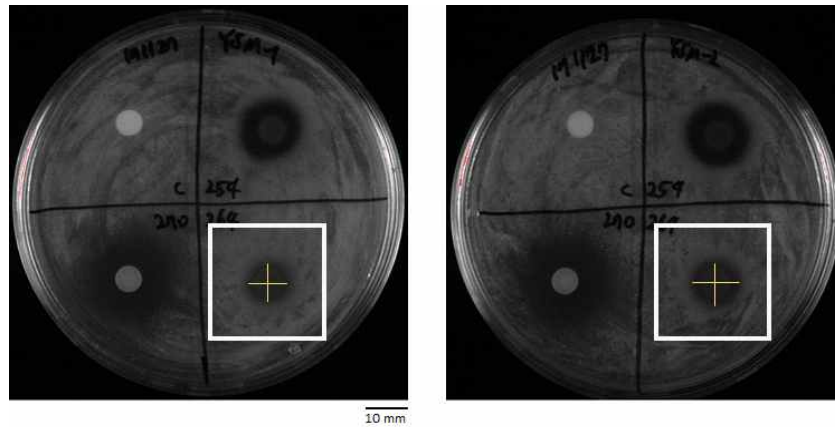


그림 35. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 지유의 생육억제환 관찰  
→ 지유 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 9.8mm이다.

(거) 천궁 추출물

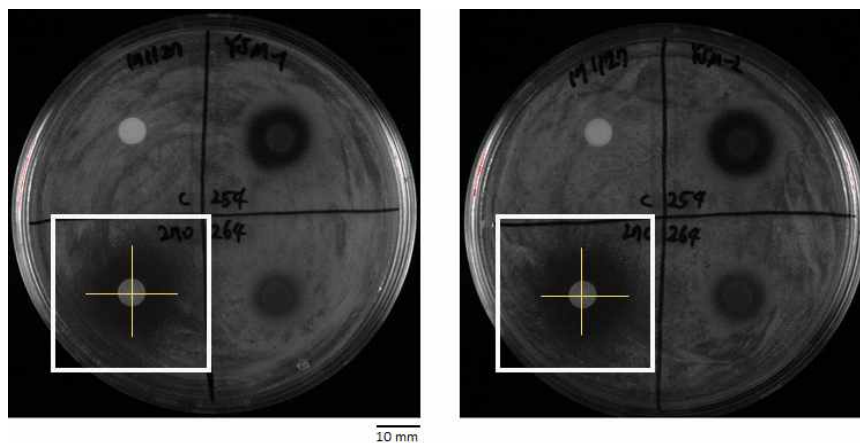


그림 36. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 천궁의 생육억제환 관찰  
→ 천궁 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 20.5mm이다.



(너) 초과 추출물

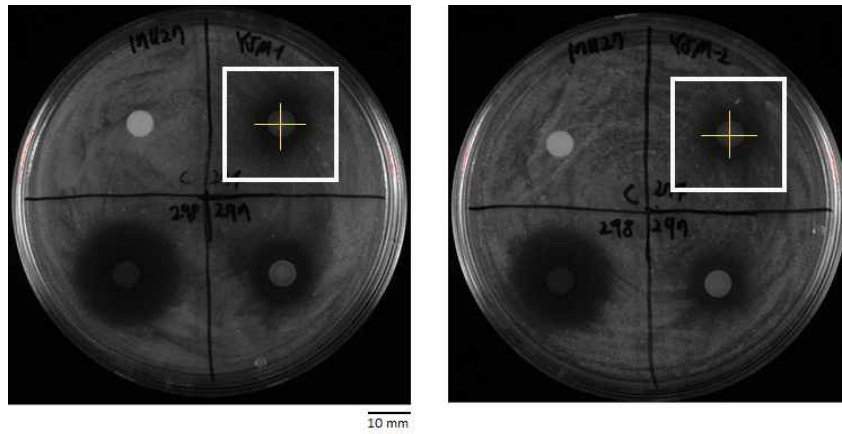


그림 37. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 초과의 생육억제한 관찰  
→ 초과 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 11.8mm이다.

(디) 황백 추출물

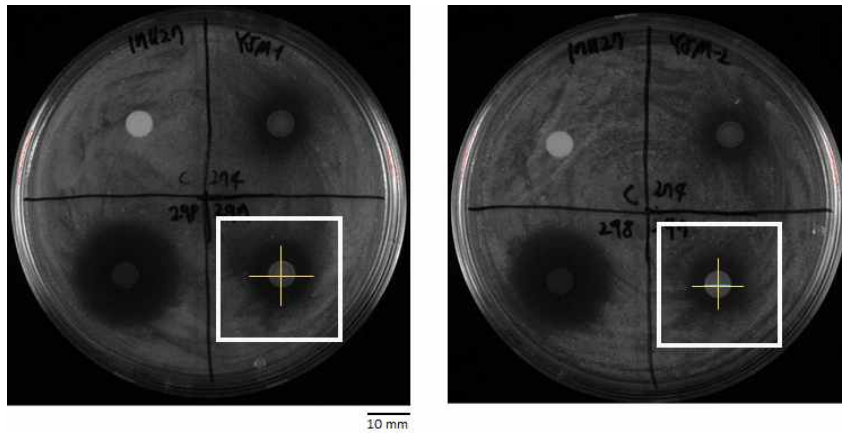


그림 38. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 황백의 생육억제한 관찰  
→ 황백 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 13.3mm이다.

(러) 후박 추출물

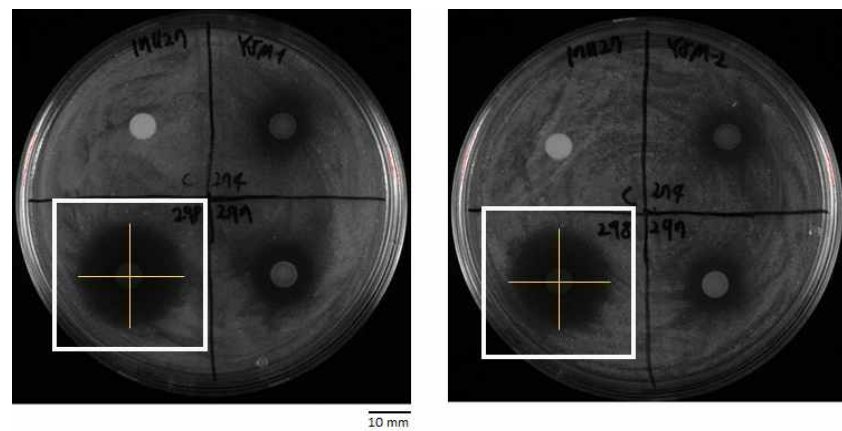


그림 39. *M. pachydermatis* 의 생장에 대한 후박의 생육억제한 관찰  
→ 후박 추출물에 의한 생육억제한의 크기는 24.8mm이다.

(며) *M. pachydermatis*에 대한 메탄올 추출물의 성장 억제 효과 관찰

*Malassezia pachydermatis*

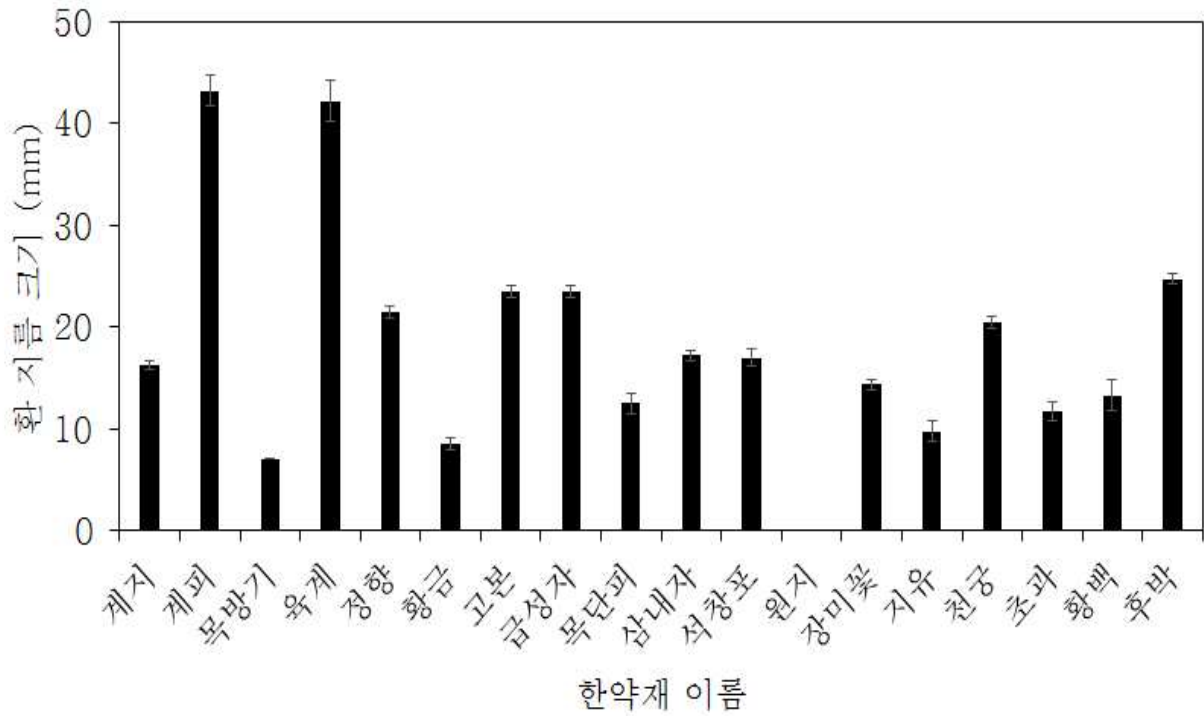


그림 40. *M. pachydermatis* 의 성장에 대한 18개 한약재의 영향

(3). *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과 관찰

(가) 계지 추출물

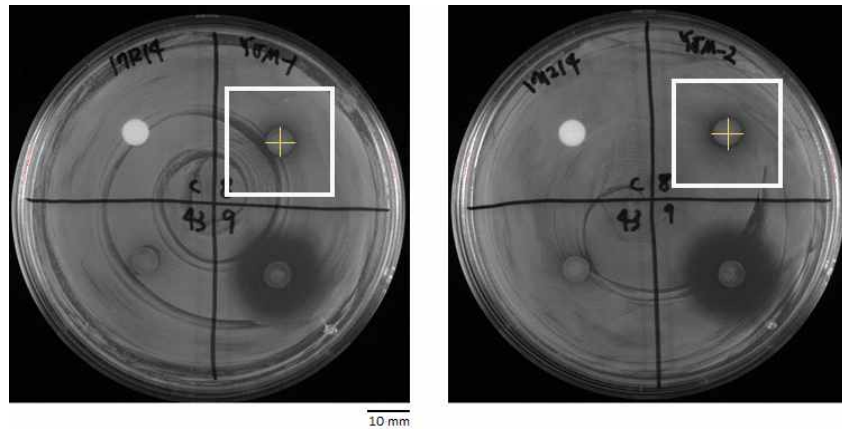


그림 41. *S. aureus*의 성장에 대한 계지의 생육억제환 관찰

→ 계지 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 7.3mm이다.

(나) 계피 추출물

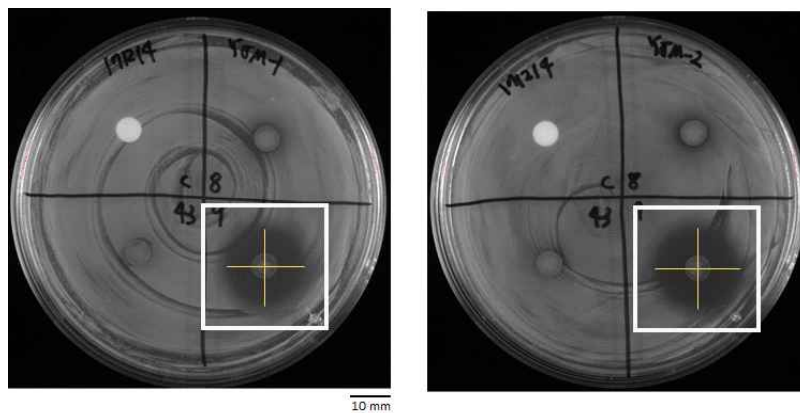


그림 42. *S. aureus*의 성장에 대한 계피의 생육억제환 관찰

→ 계피 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 19.8mm이다.

(다) 목방기 추출물

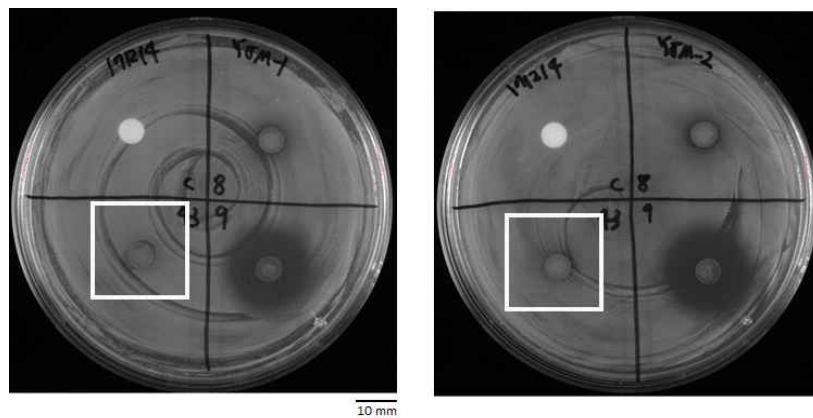


그림 43. *S. aureus*의 성장에 대한 목방기의 생육억제환 관찰

→ 목방기 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 0mm이다.

(라) 육계 추출물

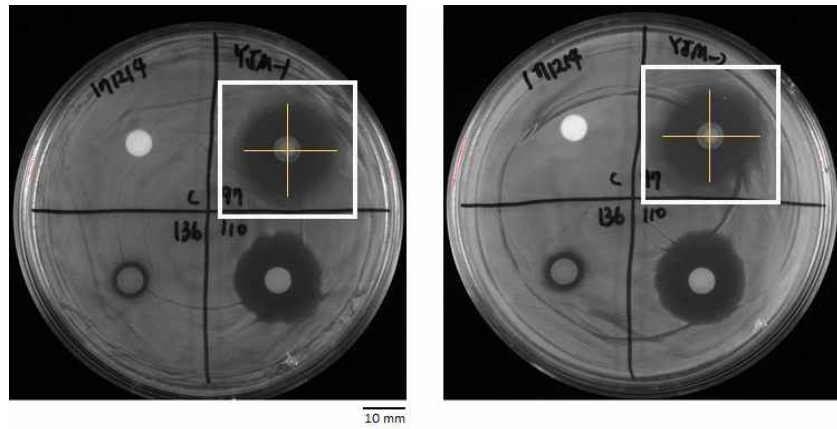


그림 44. *S. aureus*의 생장에 대한 육계의 생육억제환 관찰  
→ 육계 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 22.3mm이다.

(마) 정향 추출물

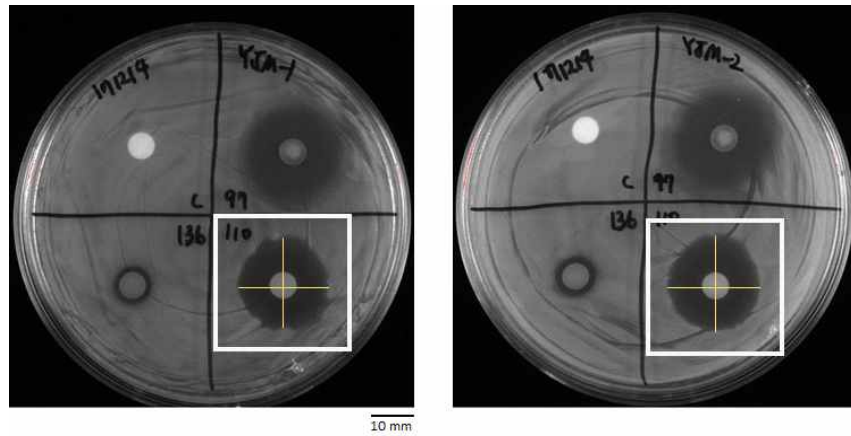


그림 45. *S. aureus*의 생장에 대한 정향의 생육억제환 관찰  
→ 정향 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 21.8mm이다.

(바) 황금 추출물

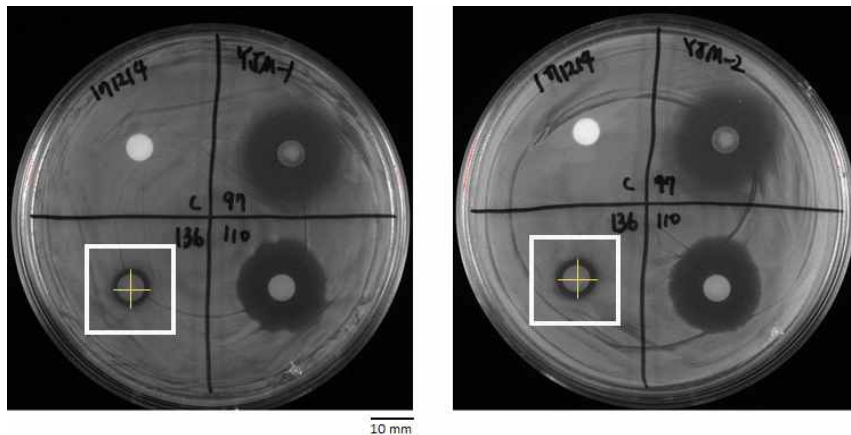


그림 46. *S. aureus*의 생장에 대한 황금의 생육억제환 관찰  
→ 황금 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 8.9mm이다.

(사) 고분 추출물

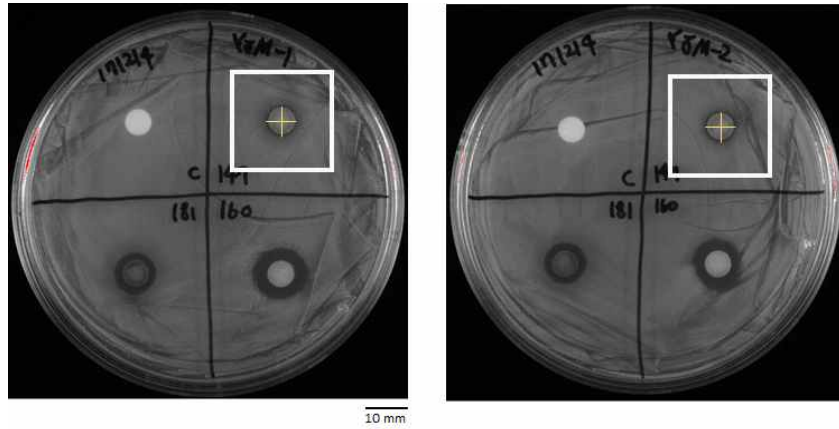


그림 47. *S. aureus*의 생장에 대한 고분의 생육억제환 관찰  
→ 고분 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 7mm이다.

(아) 급성자 추출물

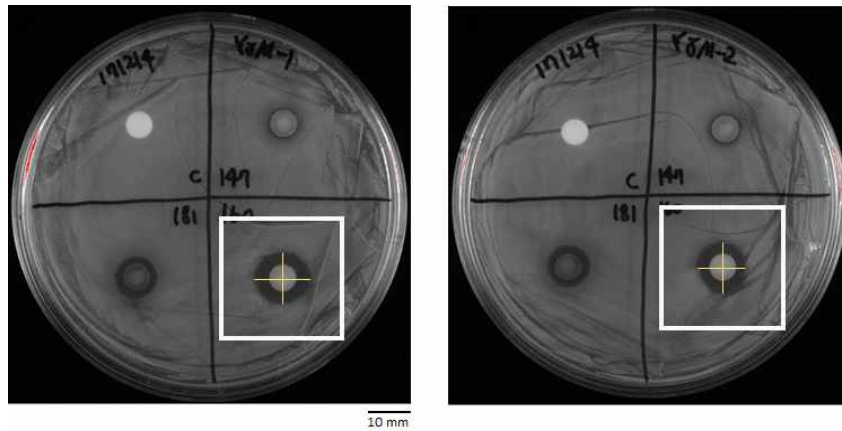


그림 48. *S. aureus*의 생장에 대한 급성자의 생육억제환 관찰  
→ 급성자 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 12mm이다.

(자) 목단피 추출물

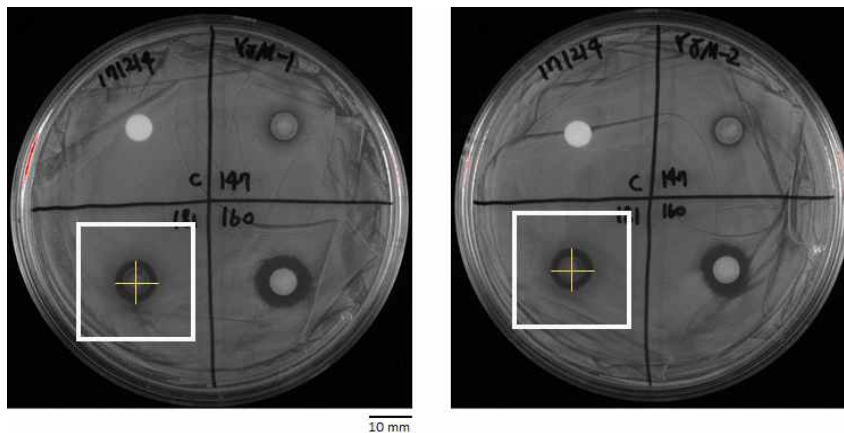


그림 49. *S. aureus*의 생장에 대한 목단피의 생육억제환 관찰  
→ 목단피 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 10mm이다.

(차) 삼내자 추출물

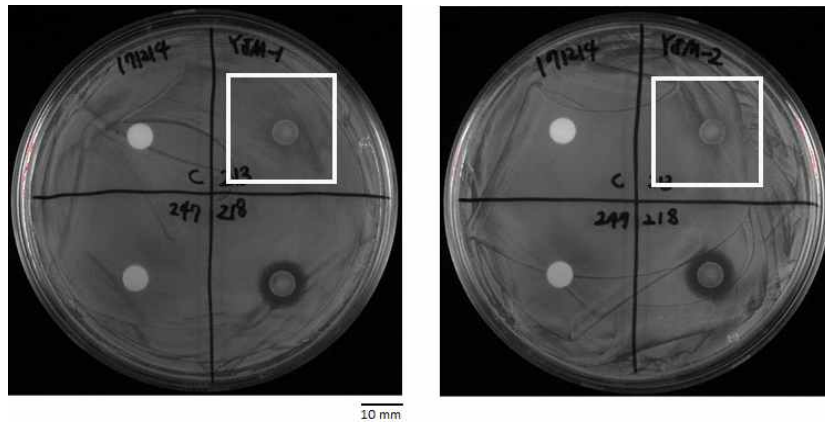


그림 50. *S. aureus*의 생장에 대한 삼내자의 생육억제환 관찰  
 → 삼내자 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 0mm이다.

(카) 석창포 추출물

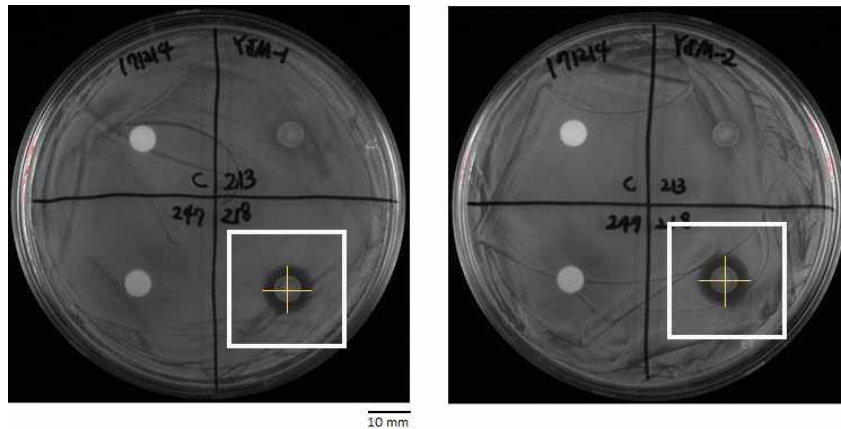


그림 51. *S. aureus*의 생장에 대한 석창포의 생육억제환 관찰  
 → 석창포 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 11.6mm이다.

(타) 원지 추출물

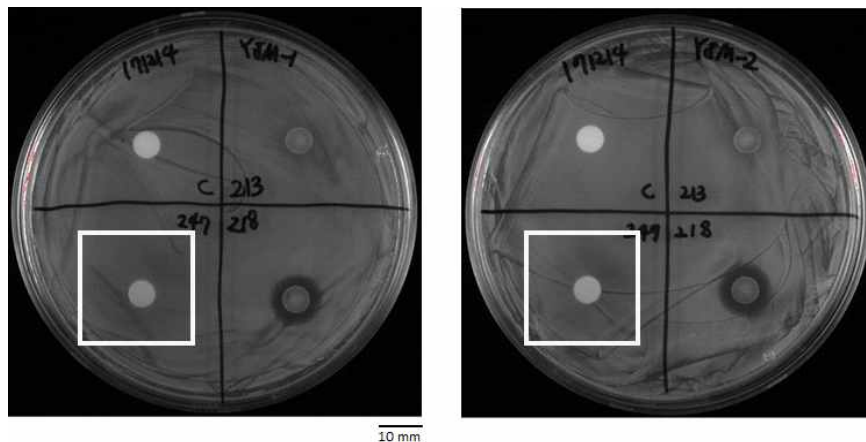


그림 52. *S. aureus*의 생장에 대한 원지의 생육억제환 관찰  
 → 원지 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 0mm이다.

(파) 장미꽃 추출물

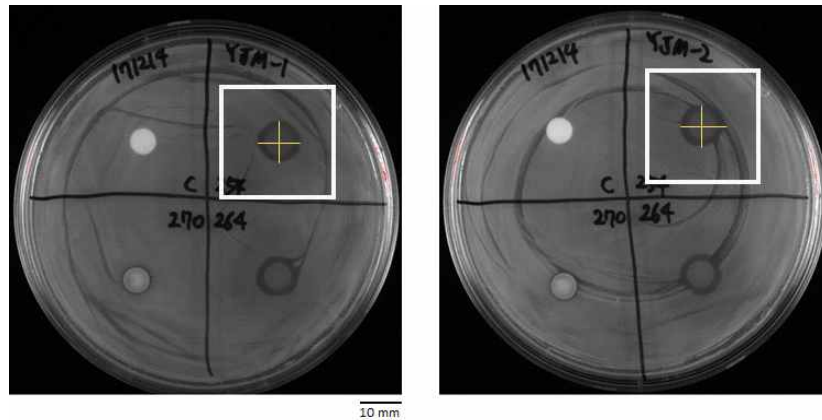


그림 53. *S. aureus*의 생장에 대한 장미꽃의 생육억제환 관찰  
→ 장미꽃 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 10.3mm이다.

(하) 지유 추출물

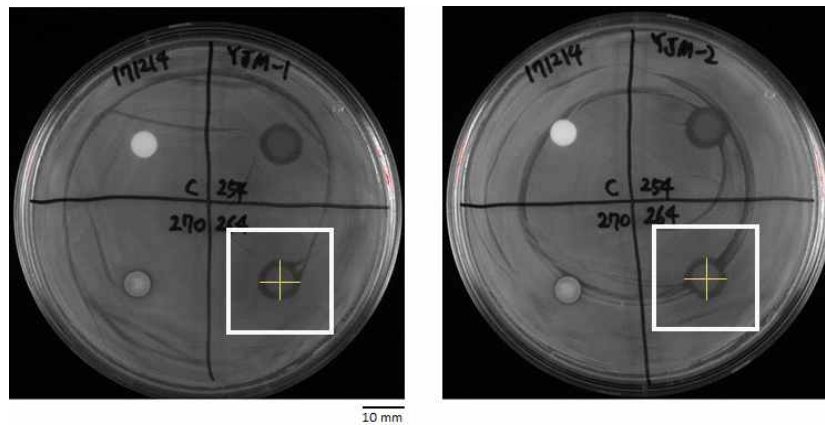


그림 54. *S. aureus*의 생장에 대한 지유의 생육억제환 관찰  
→ 지유 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 9.8mm이다.

(거) 천궁 추출물

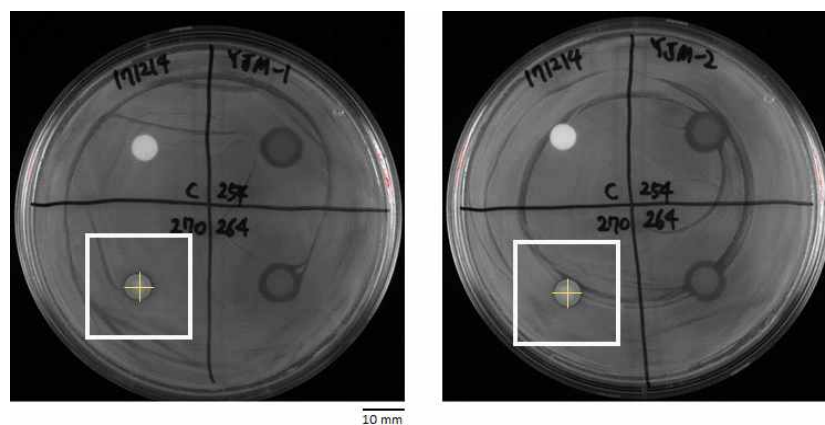


그림 55. *S. aureus*의 생장에 대한 천궁의 생육억제환 관찰  
→ 천궁 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 7mm이다.

(너) 초과 추출물

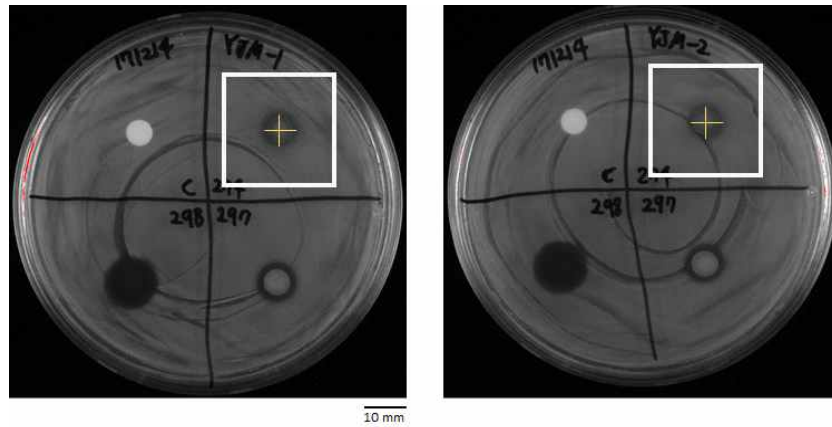


그림 56. *S. aureus*의 생장에 대한 초과의 생육억제환 관찰  
→ 초과 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 7.5mm이다.

(더) 황백 추출물

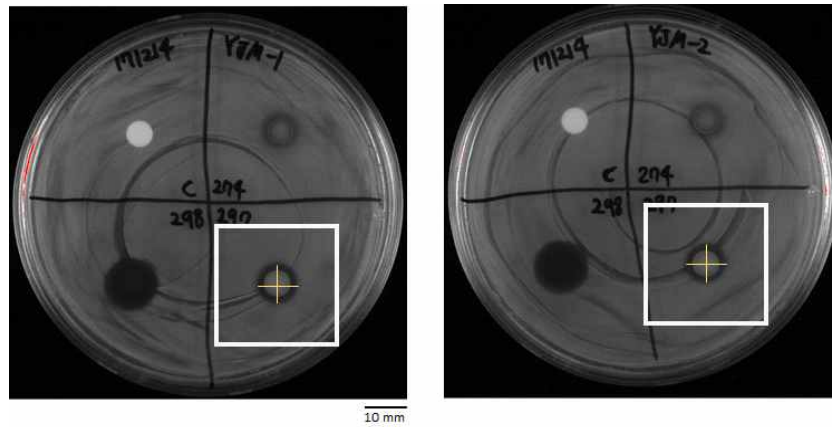


그림 57. *S. aureus*의 생장에 대한 황백의 생육억제환 관찰  
→ 황백 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 9.3mm이다.

(러) 후박 추출물

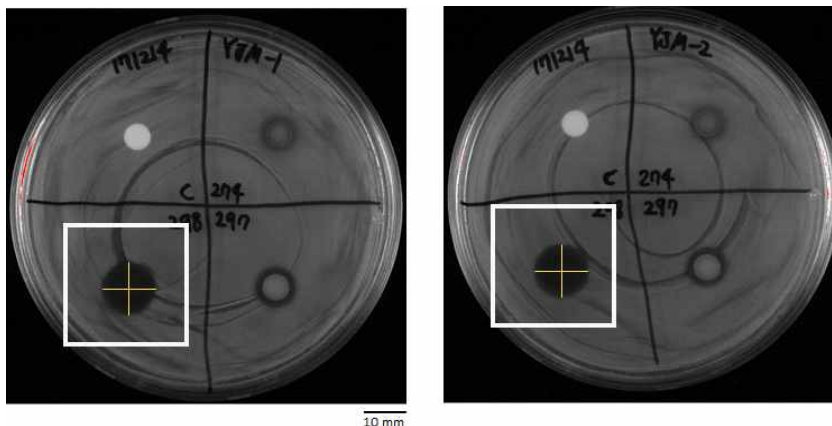


그림 58. *S. aureus*의 생장에 대한 후박의 생육억제환 관찰  
→ 후박 추출물에 의한 생육억제환의 크기는 12.3mm이다.



(며) *S. aureus*에 대한 메탄올 추출물의 성장 억제 효과 관찰

### *Staphylococcus aureus*

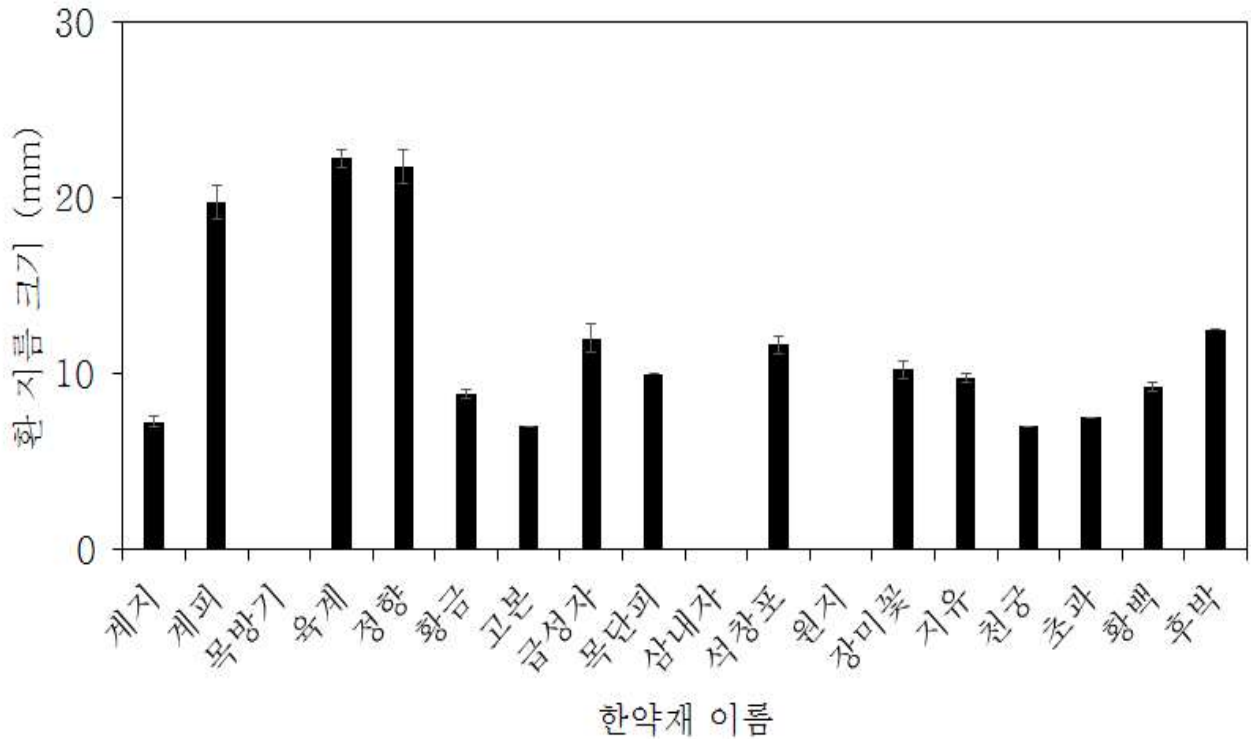


그림 59. *S. aureus*의 성장에 대한 18개 한약재의 영향 (환 지름 크기를 그래프로 나타낸 것)

이 paper disc 방법을 통해 약 300개의 한약재 중에서 18개의 한약재가 *C. albicans*의 성장을 억제하는 것을 확인하였다. 효과가 큰 순서대로 나타내면, 육계, 계피, 계지, 후박, 정향, 급성자, 목단피, 목방기, 원지, 천궁, 고본, 장미꽃, 지유, 초과, 황금, 삼내자, 황백, 석창포 순서이다.

*M. pachydermatis*의 paper disc 결과에서, 이 18개 한약재 추출물 중 17개가 *M. pachydermatis*의 성장을 억제하는 것을 확인하였다. 효과가 큰 순서대로 나열하면, 계피, 육계, 후박, 고본, 급성자, 정향, 천궁, 삼내자, 석창포, 계지, 장미꽃, 황백, 목단피, 초과, 지유, 황금, 목방기 순서이다.

다음으로 *S. aureus*의 paper disc 결과에서, 또한 18개 한약재 추출물 중 15개가 *S. aureus*의 성장을 억제하는 것을 확인하였다. 이것을 효과가 큰 순서대로 나타내면, 육계, 정향, 계피, 후박, 급성자, 석창포, 장미꽃, 목단피, 지유, 황백, 황금, 초과, 계지, 천궁, 고본 순서이다.

#### 라. 결론

천연 물질인 한약재를 메탄올을 용매로 추출하여 진균류인 *C. albicans*, *M. pachydermatis*와 세균류인 *S. aureus*의 생장을 동시에 억제할 수 있는 한약재를 15개 선별하였다. 15개 한약재는 계지, 계피, 육계, 정향, 황금, 고본, 급성자, 목단피, 석창포, 장미꽃, 지유, 천궁, 초과, 황백, 후박이다. 이 추출물들은 진균류와 세균류의 생장을 억제할 수 있는 물질을 가지고 있는 것으로 판단된다.

## 2. 추출물 제조 방법에 따른 살균력 평가의 비교

### 가. 연구 목적

진균류 2종류와 세균류 1종류에 대해 동시에 성장 억제 효과를 나타낸 15개 한약재들을 선별하였다. 이를 95% 에탄올, 50% 에탄올, 50°C 물, 100°C 물, 초임계 이산화탄소로 각각 추출하여 *C. albicans*에 처리함으로써 추출 방법에 따른 한약재별 최적 추출 방법을 제시하고자 한다.

### 나. 실험방법 및 재료

#### (1) 추출물 제조 방법

##### (가) 95% 에탄올 용매, 50% 에탄올, 물을 이용한 추출물 제조 방법

2차 증류수, 95% 에탄올, 50% 에탄올 세 가지 용매로 15개 한약재를 각각 추출한다.

경동시장 지운당 약국으로부터 구매한 한약재를 5cm 이하의 크기로 파쇄한 후, 30g의 파쇄된 한약재를 플라스크에 넣고, 300mL의 용매로 하여 3시간 동안 50°C 항온수조에서 침지 추출하였다. 30분 간격으로 4회 내지 6회 플라스크를 흔들어 용매와 생약재를 혼합해주었다. 추출 후 여과지 (Whatman™ No.1 qualitative filter paper)를 이용하여 감압장치로 고형분을 여과하여 제거하였다. 여과된 추출물은 회전 농축기를 이용하여 농축하고 60°C 건조기에서 최대 2주 동안 정치하여 에탄올을 제거하고 고형분의 추출물을 얻었다.

##### (나) 환류 추출기를 이용한 추출물 제조 방법

한약재 10g을 100mL의 2차 증류수를 용매로 하여 환류 추출 장치를 통해 추출하였다. 추출 시간은 4시간 내지 5시간 사이이다. 추출 후 여과지 (Whatman™ No.1 qualitative filter paper)를 이용하여 감압장치로 고형분을 여과하여 제거하였다. 여과된 추출물은 건조기에서 정치한 후 동결건조하여 추출물을 얻었다.

##### (다) 초임계 추출물 제조 방법

고분, 정향, 급성자, 석창포, 황백, 후박 (지운당 한약국, 경동시장, 서울, 대한민국)을 EnSNature에 의뢰하여 초임계 추출을 수행하였다. 한약재를 10L 초임계 추출기(Extractor)에 투입하여, 350bar 및 50°C의 조건에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 4시간에서 6시간 동안 추출하였다. 추출 후 여과지(whatman™ grade 4 qualitative filter paper; GE Healthcare Life Sciences)를 이용하여 불순물을 제거하였다.

#### (2) 항진균 효과 관찰 방법

##### (가) Paper disc 방법을 통한 항진균 효과 관찰

한약재 추출물의 고형분 50mg을 각각 2차 증류수 1mL에 용해시켜 녹인 후 5분간 50°C의 물 증탕을 통해 최대한 추출물이 용매에 용해되도록 하였다. 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후, 13,000rpm에서 10분간 원심분리 후 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

추출물에 의한 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 관찰하기 위해 Paper disc 방법을 이용하였다. 추출물은 disc용 paper(Adventec, Ø6mm, 두께 0.7mm)를 사용하여 처리하였다. disc용

paper에 한약재 시료를 20 $\mu$ L씩 로딩하고 건조하는 단계를 5번 반복하여 한약재 시료 0.1mL를 처리한다. 즉, paper에 한약재 추출물 고형분 5mg을 함유하도록 한다. 대조군은 한약재를 녹인 용매인 2차 증류수 0.1mL를 처리하여 진행하였다.

이후 전배양한 *C. albicans*의 흡광도를 측정하고, 측정된 균의 농도가 O.D<sub>600nm</sub>=1이 되도록 YPD 배지로 희석한다. O.D<sub>600nm</sub>=1의 농도를 갖는 *C. albicans*를 YPD agar plate에 0.1mL 분주하여 spread 도말한다. 플레이트에 균일하게 균이 도말되도록 충분히 spreading한 후 건조된 한약재 paper를 균이 도말된 plate에 올려놓는다. 26 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 24hr 동안 배양한다.

배양 24hr 후 paper 주위에 생육억제환이 1mm 이상 생긴 것을 선별하여 항진균 효과가 있다고 판단한다. 이것은 Gel-doc을 통해 모두 일정한 크기로 사진을 찍고, disc용 paper를 포함하여 clear zone의 전체 지름을 mm 단위로 측정한다. 플레이트에 나타난 환의 가로와 세로의 크기를 각각 측정한다. 3개의 플레이트이므로 측정된 6개의 값을 평균을 내어 최종 환의 지름 크기로 사용한다.

#### (나) 100 $^{\circ}$ C 물 추출물의 항진균 효과 관찰

한약재 추출물의 고형분 100mg을 2차 증류수 1mL에 용해시켜 녹인 후 5분간 50 $^{\circ}$ C의 물 증탕을 통해 최대한 추출물이 용매에 용해되도록 하였다. 불턱싱하여 충분히 용해시킨 후, 13,000rpm에서 10분간 원심분리 후 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

YPD 배지를 5mL씩 분주한 각각의 test tube에 추출물의 최종 처리 농도가 4.76g/L가 되도록 추출물을 250 $\mu$ L씩 처리하였다. 대조군으로는 5mL의 배지에 2차 증류수를 250 $\mu$ L 처리한 것으로 하였다. 전배양한 배양액의 세포농도를 Abs<sub>600</sub>로 측정한다. 측정된 세포 농도 값을 이용하여 각각의 test tube에 Abs<sub>600</sub>=0.05가 되도록 접종한다. 26 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양한다. 이 후 배양액을 spectrophotometer (Mecasys Co.의 Optizen2120uv)로 Abs<sub>600</sub>를 측정하여 증류수 처리 대조군과 비교하여 세포 성장 정도를 비교한다.

#### (다) 초임계 추출물의 항진균 효과 관찰

한약재 추출물의 고형분 100mg을 Tween 20 1mL에 용해시켜 녹인 후 5분간 50 $^{\circ}$ C의 물 증탕을 통해 최대한 추출물이 용매에 용해되도록 하였다. Tween 20은 점성이 있으므로 무게를 제어 1mL을 정량하였다.

YPD 배지를 5mL씩 분주한 각각의 test tube에 추출물의 최종 처리 농도가 1.96g/L가 되도록 추출물을 100 $\mu$ L씩 처리하였다. 대조군으로는 5mL의 배지에 Tween 20을 100 $\mu$ L 처리한 것으로 하였다. 전배양한 배양액의 세포농도를 Abs<sub>600</sub>으로 측정한다. 측정된 세포 농도 값을 이용하여 각각의 test tube에 Abs<sub>600</sub>=0.05가 되도록 접종한다. 26 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양한다. 이 후 배양액을 spectrophotometer (Mecasys Co.의 Optizen2120uv)로 Abs<sub>600</sub>를 측정하여 Tween 20 처리 대조군과 비교하여 세포 성장 정도를 비교한다.

다. 결과 및 고찰

(1) 정향 추출물의 항진균 효과 관찰

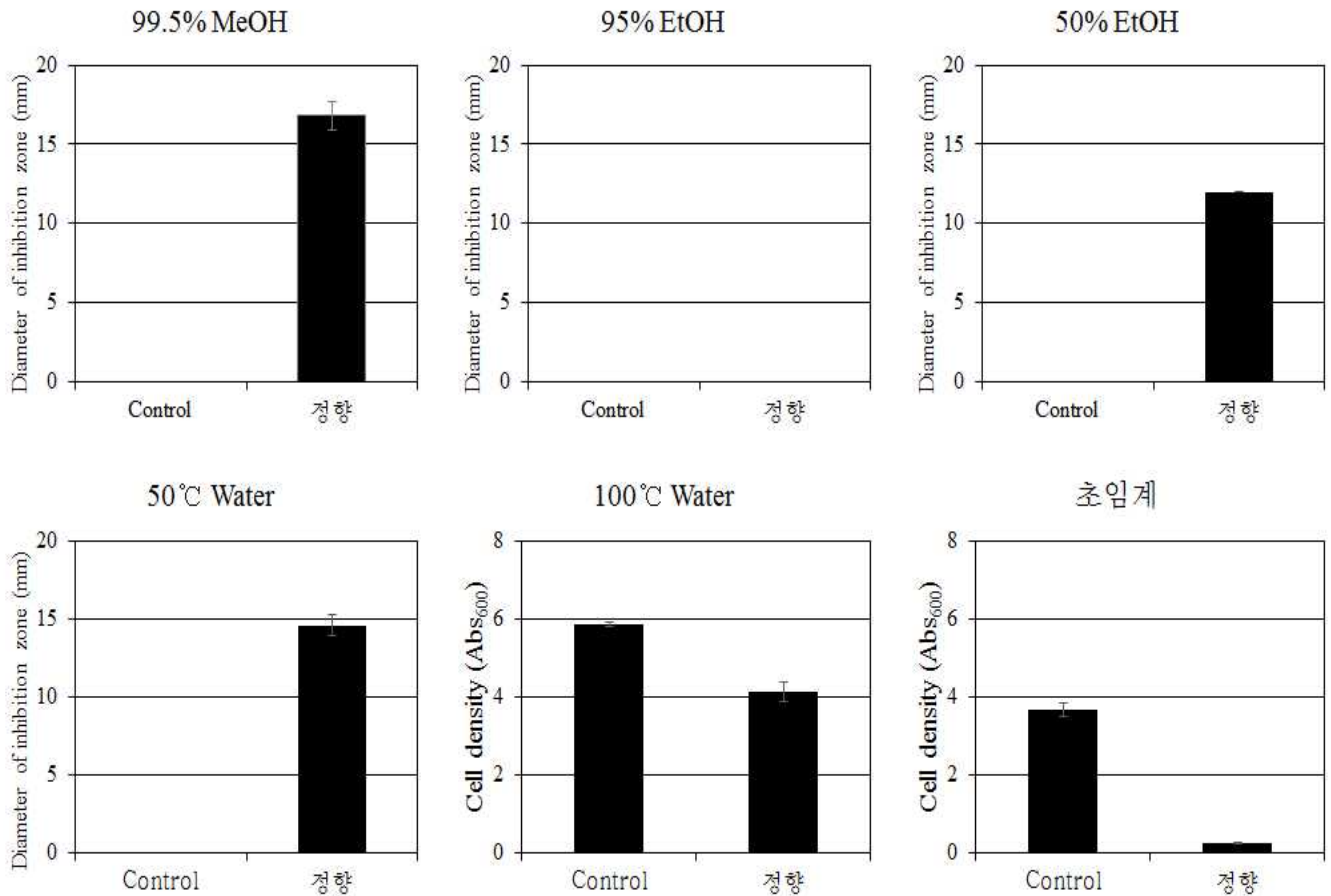


그림 60. 추출 방법에 따른 정향 추출물의 살균력 비교

표 1. 정향 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water	초임계
수율 (%)	4.23	19.67	33.35	13.73	17.81	18.17

정향 95% 에탄올 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 살균 효과가 없는 것으로 관찰되었다. 50% 에탄올 추출물을 용해시켜 실험한 결과에서는 12mm의 생육억제환이 관찰되었다. 50°C 물 추출물을 처리하였을 때는 14.58mm의 생육억제환이 관찰되었다. 추출물 용매의 에탄올의 함량이 점점 낮아질수록 생육억제환의 크기가 커졌다. 이것은 정향의 살균력을 가지는 물질이 물을 용매로 하였을 때 더 잘 용출되었을 것이라 예상할 수 있다.

5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 성장을 29.7% 억제하였으며, 초임계 추출물을 처리하여 실험한 결과 92.7% 억제하였다. 초임계 추출물은 생산 비용이 높아 경제적이지 않으므로 *C. albicans*의 성장을 약 30% 억제할 수 있는 100°C 물 추출물을 최종 추출 조건으로 선정하였다.

(2) 황금 추출물의 항진균 효과 관찰

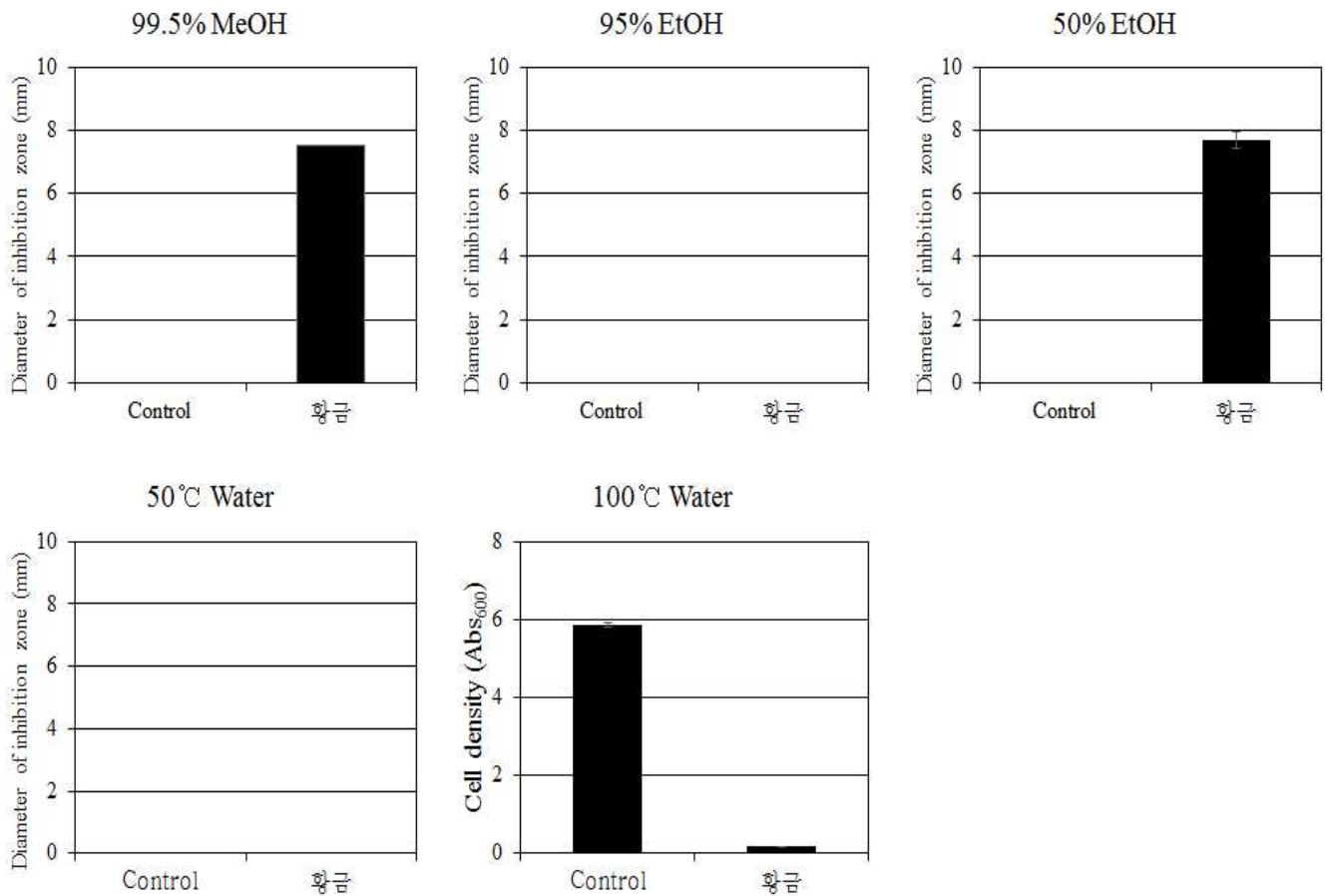


그림 61. 추출 방법에 따른 황금 추출물의 살균력 비교

표 2. 황금 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water
수율 (%)	22.27	2.36	35.02	11.04	42.19

황금 95% 에탄올 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 살균 효과가 없는 것으로 관찰되었다. 마찬가지로, 50°C 물 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과에서도 살균 효과가 없는 것으로 관찰되었다. 50% 에탄올 추출물을 용해시켜 실험한 결과에서는 7.7mm의 생육억제환이 관찰되었다. 5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 성장을 97% 억제하였다. 다른 추출물에 비해 100°C 물 추출물에서 대조군 대비 효과가 크므로 황금은 100°C 물 추출물을 사용한다.

(3) 고본 추출물의 항진균 효과 관찰

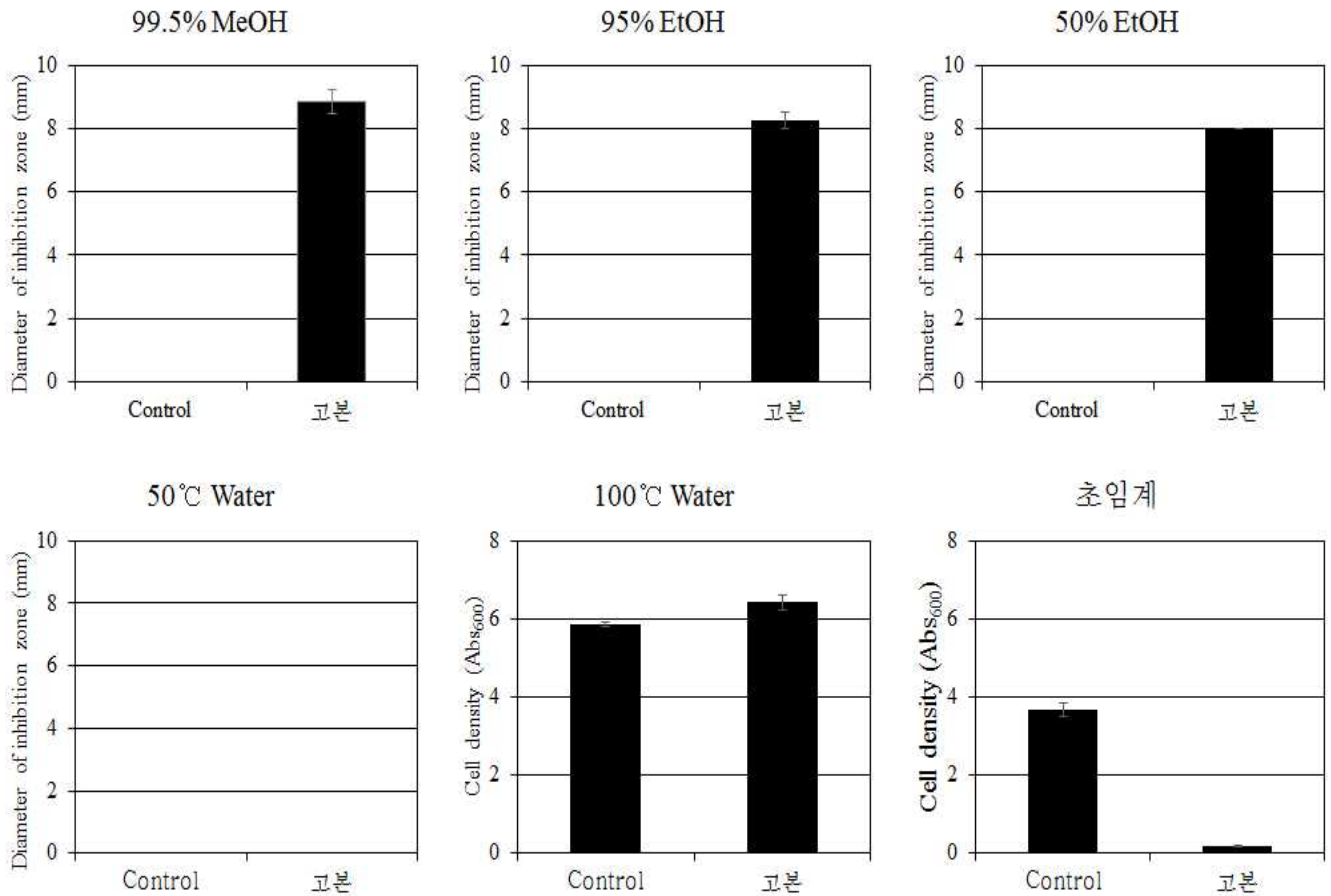


그림 62. 추출 방법에 따른 고본 추출물의 살균력 비교

표 3. 고본 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water	초임계
수율 (%)	15.35	4.52	32.42	30.29	17.48	3.25

고본 50°C 물 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 살균 효과가 없는 것으로 관찰되었다. 그러나 50% 에탄올과 95% 에탄올 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과에서는 메탄올 추출물의 결과와 비슷한 살균 효과를 나타내었다. 이는 고본에 살균력을 가지고 있는 물질이 물 용매보다 유기 용매로 하였을 때 더 잘 용출되었을 것이라 예상할 수 있다. 5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 성장을 억제하지 않았으며, 초임계 추출물을 처리하여 실험한 결과 95.7% 억제하였다.

초임계 추출물은 생산 비용이 많이 들어 경제적이지 않으며 물을 용매로 하였을 때 살균력이 가장 낮다. 메탄올 추출물은 인체에 안전성이 검증되지 않으므로 고본의 최종 추출 용매로 95% 에탄올을 선정하였다.

(4) 급성자 추출물의 항진균 효과 관찰

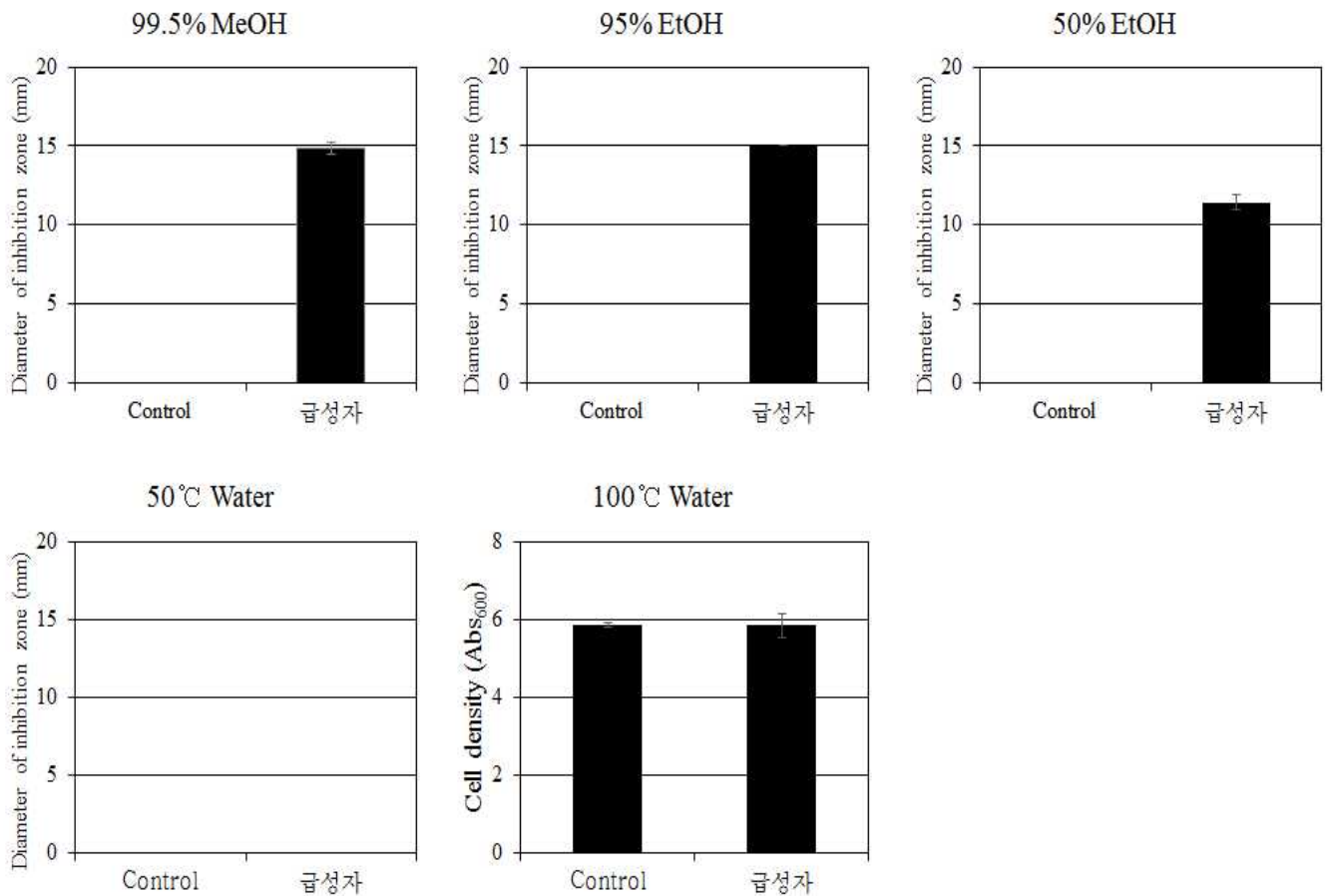


그림 63. 추출 방법에 따른 급성자 추출물의 살균력 비교

표 4. 급성자 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water
수율 (%)	2.34	0.84	5.57	5.25	4.7

급성자 50°C 물 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 살균 효과가 없는 것으로 관찰되었다. 95% 에탄올 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 15mm의 생육억제환을 나타내어 메탄올 추출물의 결과와 유사한 값을 나타내었다. 50% 에탄올 추출물의 결과에서는 생육억제환이 11.4mm로 95% 에탄올 추출물의 결과보다 상대적으로 더 작은 생육억제환을 나타내었다. 5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 성장을 억제하지 않았다. 위의 결과를 종합하였을 때 이는 95% 에탄올 추출물에서 가장 살균력이 좋은 것을 의미하므로 급성자의 최종 추출 용매는 95% 에탄올로 선정하였다.



(5) 목단피 추출물의 항진균 효과 관찰

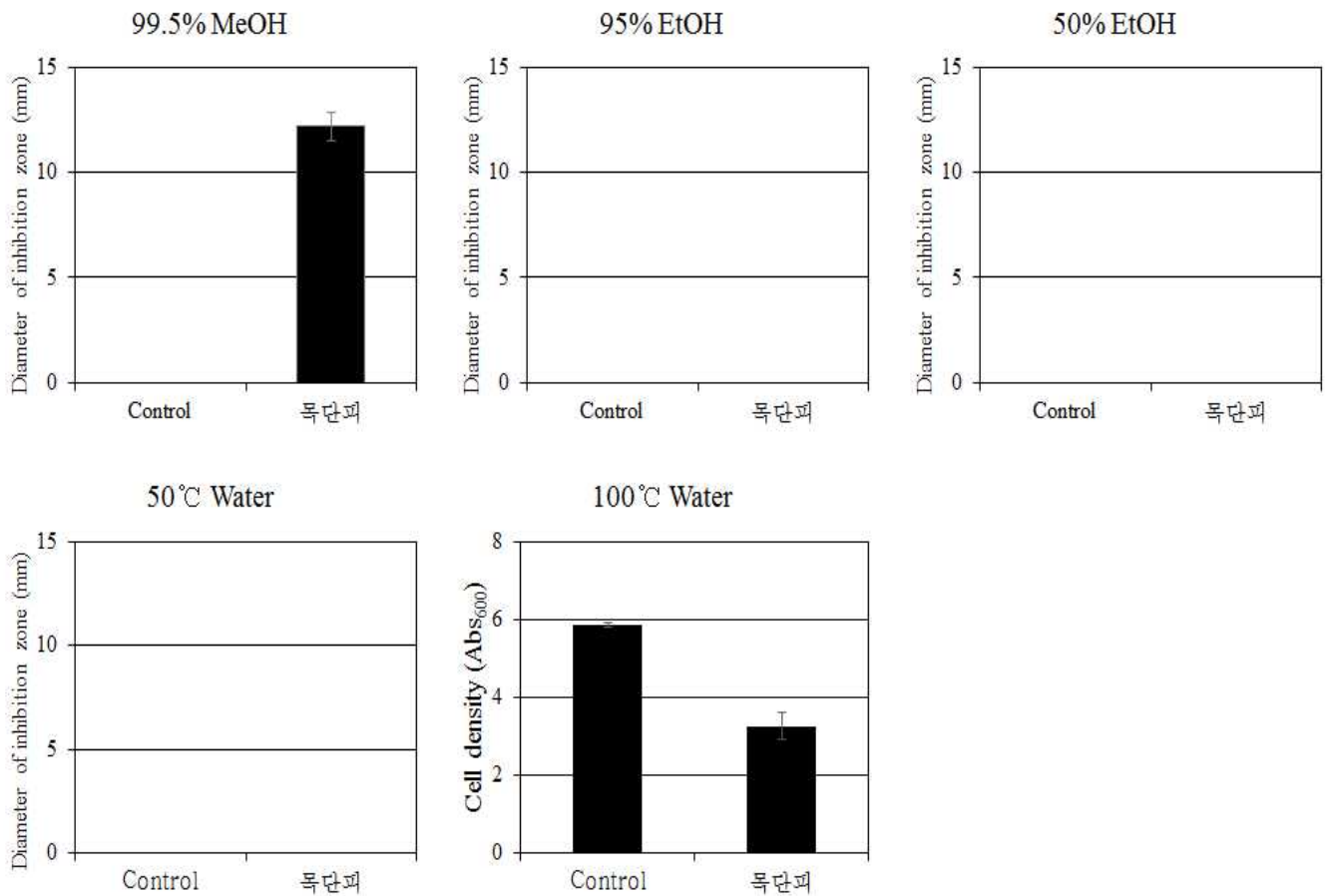


그림 64. 추출 방법에 따른 목단피 추출물의 살균력 비교

표 5. 목단피 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water
수율 (%)	16.44	28.04	8.03	11.98	14.26

목단피 95% 에탄올 추출물, 50% 에탄올 추출물과 50°C 물 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 이들 추출물들에 대해서는 살균 효과가 없었다.

5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 성장을 44.4% 억제하였다. 다른 추출물에 비해 100°C 물 추출물에서 대조군 대비 성장 억제 효과가 크므로 목단피는 100°C 물 추출물을 사용한다.

(6) 석창포 추출물의 항진균 효과 관찰

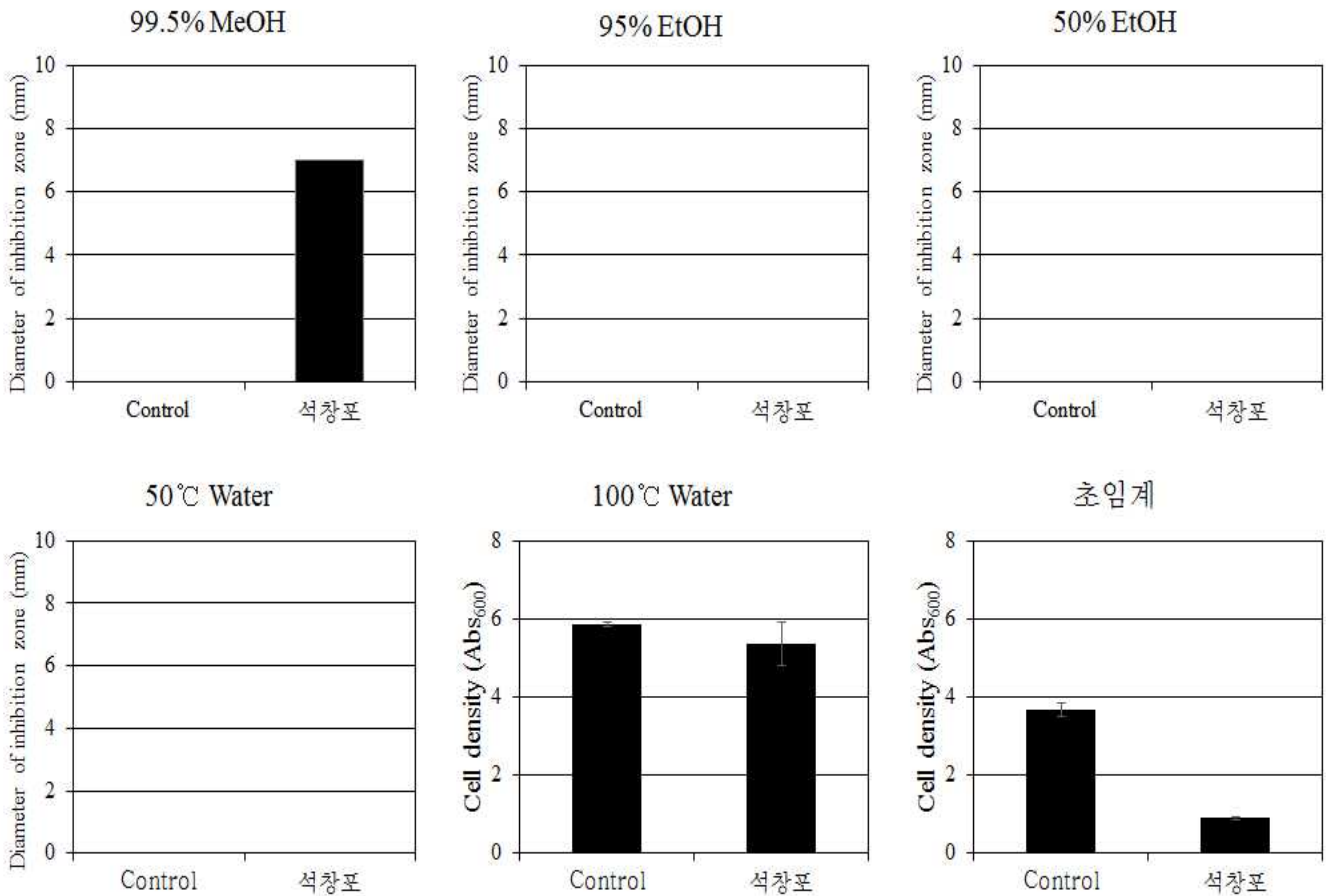


그림 65. 추출 방법에 따른 석창포 추출물의 살균력 비교

표 6. 석창포 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water	초임계
수율 (%)	8.21	4.39	13.04	9.10	9.45	1.57

석창포 95% 에탄올 추출물, 50% 에탄올 추출물과 50°C 물 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 이들 추출물들에 대해서는 살균 효과가 없었다.

5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 성장을 8.6% 억제하였으며, 초임계 추출물을 처리하여 실험한 결과 75.6% 억제하였다.

석창포는 안전성이 검증되지 않은 메탄올 추출물을 제외하고, 물 용매 추출물과 에탄올 용매 추출물에서는 살균 효과가 없거나 낮으므로 대조군 대비 성장 억제 효과가 가장 높은 초임계 추출물을 사용한다.

(7) 지유 추출물의 항진균 효과 관찰

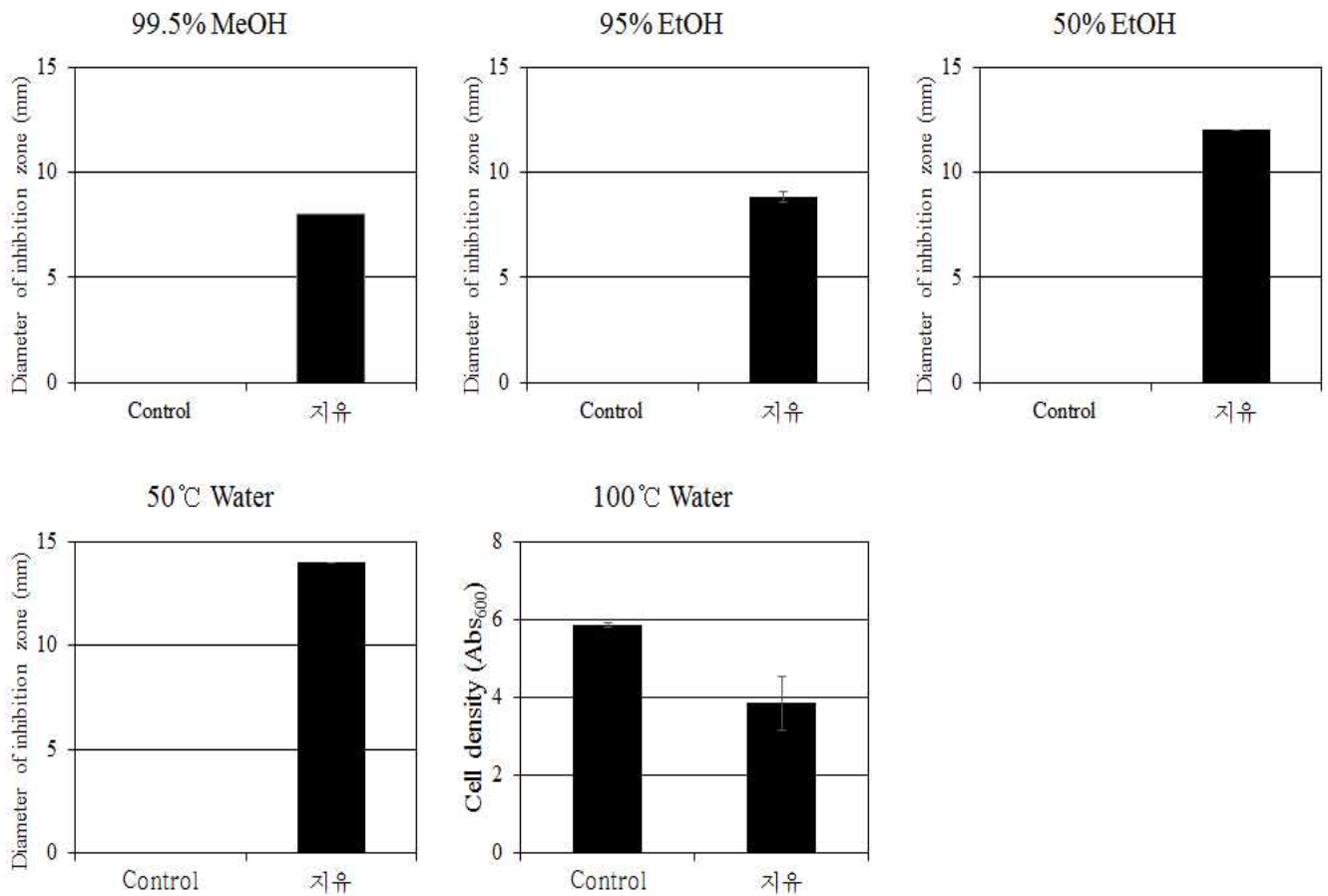


그림 66. 추출 방법에 따른 지유 추출물의 살균력 비교

표 7. 지유 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water
수율 (%)	34.15	19.73	15.69	26.22	24.69

지유 95% 에탄올 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 8.8mm의 생육 억제환이 관찰 되었으며, 50% 에탄올 추출물은 12mm의 생육억제환이 관찰되었다. 50°C 물 추출물은 14mm의 생육억제환이 관찰되었다. 지유는 물 용매의 비율이 높은 추출물일수록 생장 억제 효과가 더 커진다. 이는 지유에 살균력을 가지고 있는 물질이 수용성 용매에 더 잘 용출되었을 것이라 예상할 수 있다.

5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 생장을 약 34% 억제하였다. 지유는 100°C 물 용매에서도 살균력을 나타내었으므로 최종 추출 용매로 100°C 물을 사용한다.

(8) 초과 추출물의 항진균 효과 관찰

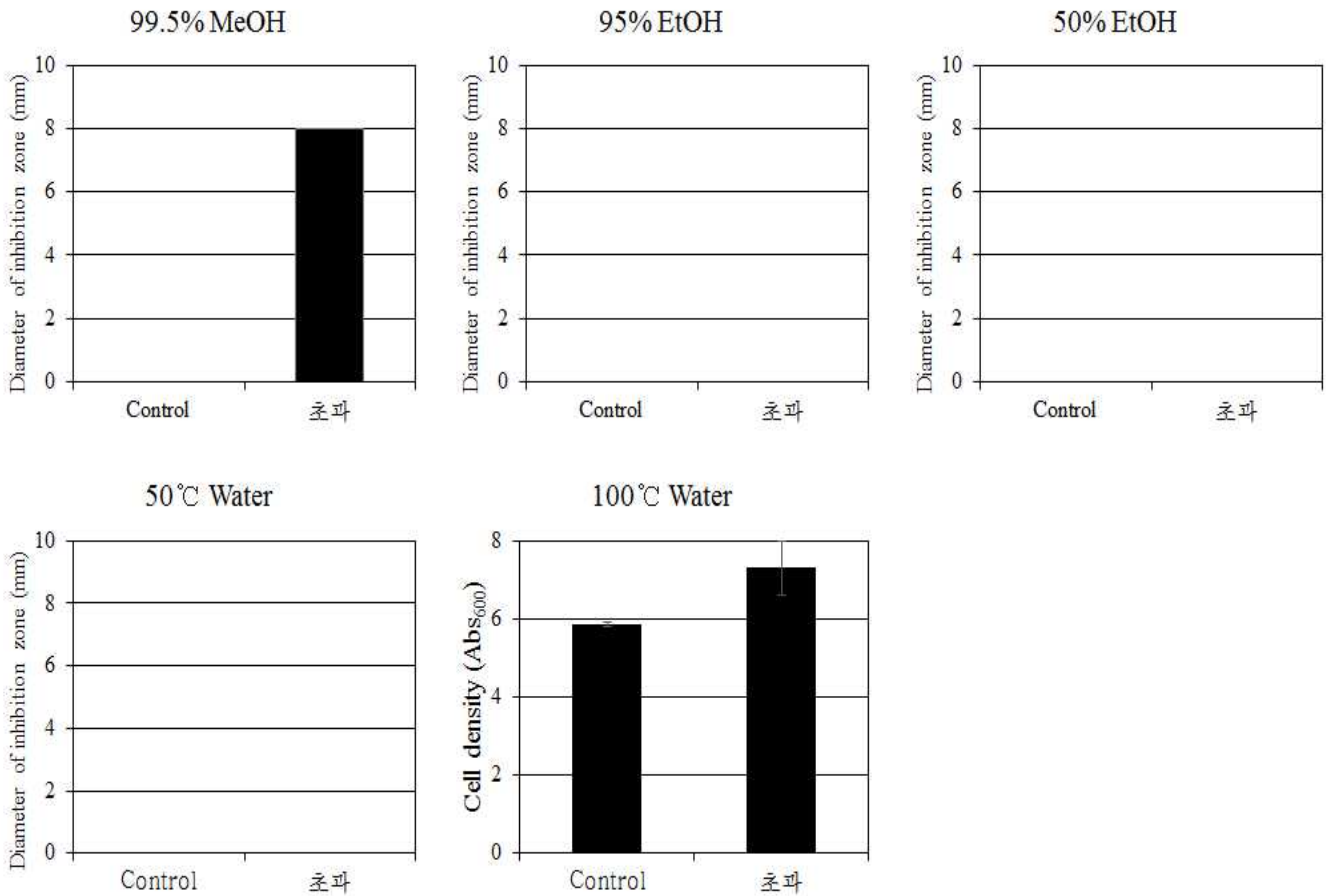


그림 67. 추출 방법에 따른 초과 추출물의 살균력 비교

표 8. 초과 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water
수율 (%)	5.48	3.35	8.14	5.12	5.12

초과 95% 에탄올 추출물, 50% 에탄올 추출물과 50°C 물 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 이들 추출물들에 대해서는 살균 효과가 없었다.

5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과에서도 *C. albicans*의 성장을 억제하지 않았다.

메탄올 용매를 제외한 다른 용매의 추출물에서는 *C. albicans*의 성장을 억제하지 못하였기 때문에 초과는 최종 추출 용매로 메탄올을 선정하였다.

(9) 황백 추출물의 항진균 효과 관찰

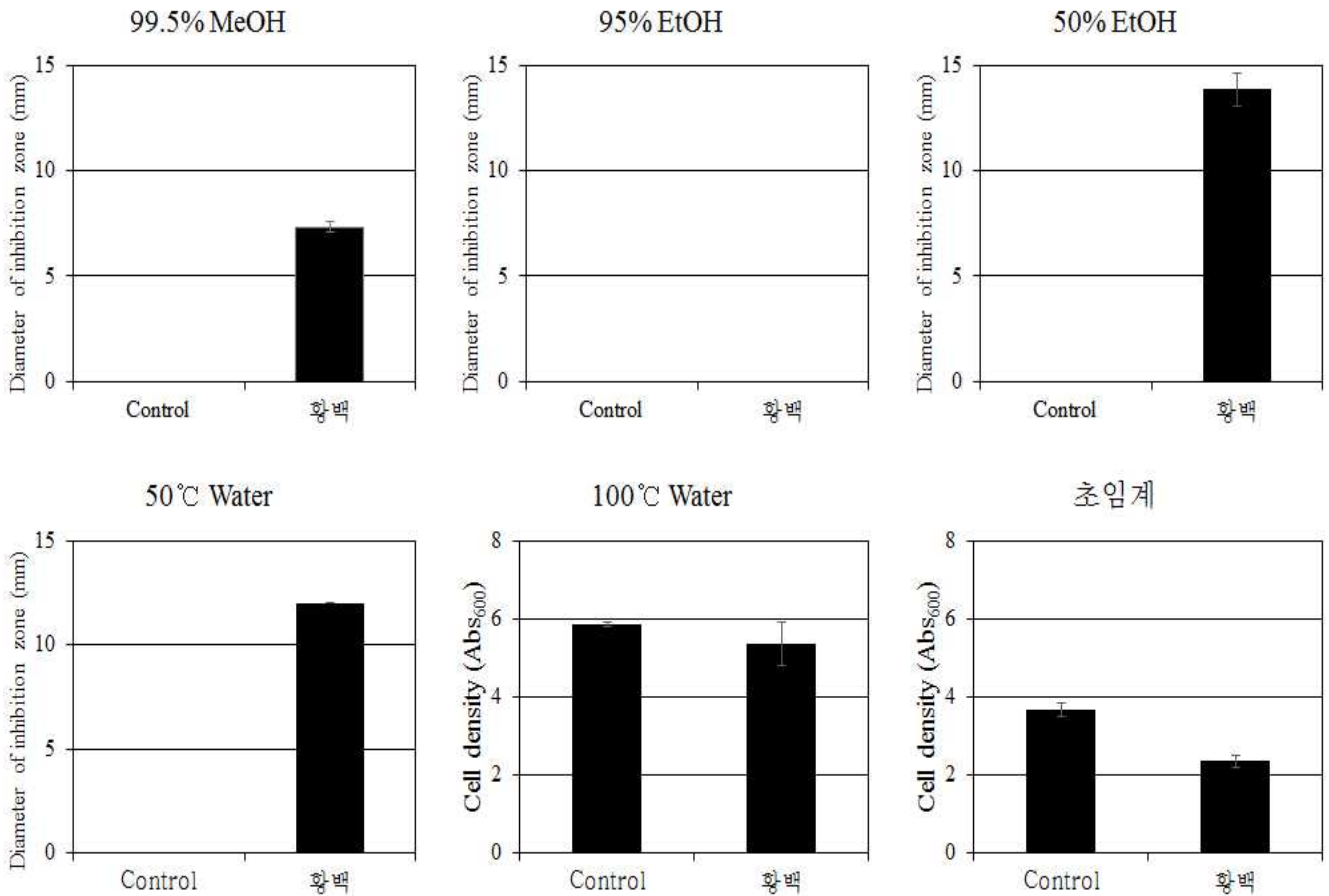


그림 68. 추출 방법에 따른 황백 추출물의 살균력 비교

표 9. 황백 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water	초임계
수율 (%)	12.61	9.47	9.41	10.76	12.80	1.33

황백 95% 에탄올 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과에서는 살균 효과가 없었다. 그러나, 50% 에탄올 추출물은 13.8mm, 50°C 물 추출물은 12mm의 생육억제환이 관찰되었다. 5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 성장을 8.6% 억제하였으며, 초임계 추출물을 처리하여 실험한 결과 35.7% 억제하였다.

초임계 추출물은 생산 비용이 높아 경제적이지 않기 때문에 다른 용매에서 살균력이 관찰되면 최종 추출 용매에서 제외한다. paper disc 결과와 test tube에서 배양한 결과에서 물을 용매로 하였을 때 살균력을 관찰할 수 있었으므로 최종 추출 용매로 100°C 물을 사용한다.

(10) 후박 추출물의 항진균 효과 관찰

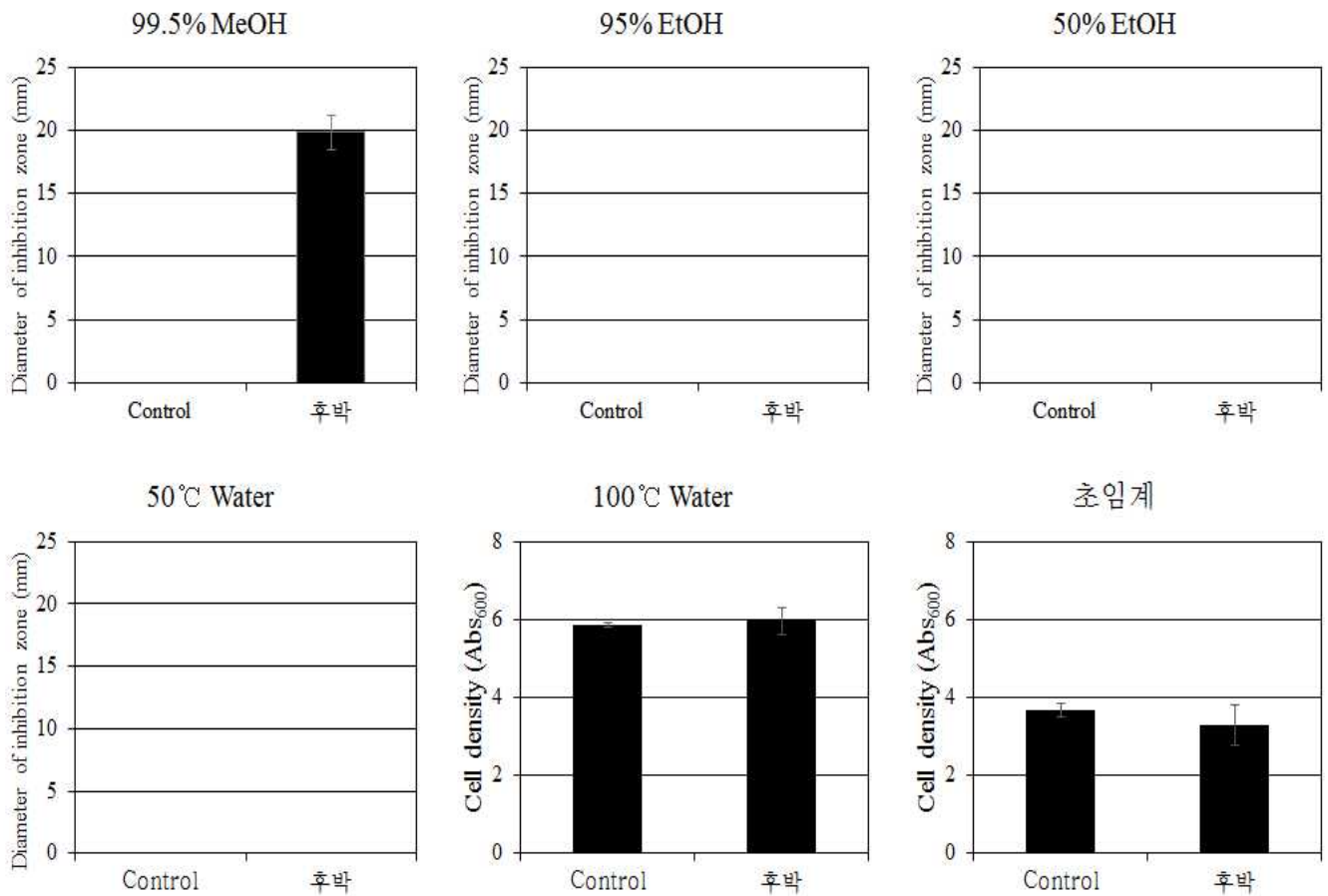


그림 69. 추출 방법에 따른 후박 추출물의 살균력 비교

표 10. 후박 추출물의 수율 비교

추출 방법	MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water	초임계
수율 (%)	14.83	10.7	14.56	8.37	8.92	1.72

후박 95% 에탄올 추출물, 50% 에탄올 추출물과 50°C 물 추출물을 증류수에 용해시켜 실험한 결과 이들 추출물들에 대해서는 살균 효과가 없었다.

5ml test tube에 100°C 물 추출물을 처리하여 실험한 결과 *C. albicans*의 생장을 억제하지 않았다. 그러나 초임계 추출물을 처리하여 실험한 결과에서 *C. albicans*의 생장을 10.6% 억제하였다.

후박은 안전성이 검증되지 않은 메탄올 추출물을 제외하고 물 용매 추출물과 에탄올 용매 추출물에서 살균 효과가 없으므로 초임계 추출물을 사용한다.

라. 결론

표 11. 추출 방법에 따른 10개 추출물의 살균력 비교

	Paper disc method (mm) (5mg load)				5ml test tube broth 생장 억제율(%)	
	99.5% MeOH	95% EtOH	50% EtOH	50°C Water	100°C Water (4.76g/L)	초임계 (1.96g/L)
정향	16.8	0	12	14.58	29.7	92.7
황금	7.5	0	7.7	0	97.0	-
고분	8.8	8.25	8	0	효과X	95.4
급성자	14.8	15	11.4	0	0.3	-
목단피	12.2	0	0	0	44.4	-
석창포	7.0	0	0	0	8.6	75.6
지유	8.0	8.83	12	14	34.4	-
초과	8.0	0	0	0	효과X	-
황백	7.3	0	13.8	12	72.1	35.7
후박	19.8	0	0	0	효과X	10.6

위의 결과를 정리하여 나타낸 표이다. 최종 선별된 용매는 색으로 표시하였다.

정향, 지유 추출물은 물 용매 비율이 높아질수록 성장 억제율이 높아졌다. 또한 황금, 목단피, 황백은 100°C 물 추출물에서 효과가 월등히 높았다. 따라서 이 5개 한약재는 100°C 물 추출을 최적 추출 방법으로 선정하였다.

고분, 급성자는 물 용매 추출물에서 효과가 없고, 에탄올이나 메탄올 용매의 추출물에서 살균 효과가 나타났다. 이것은 살균력을 가지고 있는 물질이 물 용매보다 유기 용매에서 더 잘 용출되었을 것이라 예상할 수 있다.

초과는 메탄올 용매 추출물을 제외하고 다른 용매 추출물에서 효과를 나타내지 않았으므로 메탄올 추출물로 선정하였다.

석창포와 후박은 초임계 추출물을 제외하고 나머지 용매에서 큰 효과를 보이지 않았다.

최종 추출 방법은 정향, 지유, 황금, 목단피, 황백은 100°C 물 추출물, 고분, 급성자는 에탄올 추출물, 초과는 메탄올 추출물, 석창포와 후박은 초임계 추출물로 정하였다.

### 3. 추출물 농도별 효능 평가 비교

가. 메탄올 추출물의 농도별 *Candida albicans*에 대한 성장 억제 효과 관찰

(1) 연구 목적

선별된 15개 한약재의 메탄올 추출물들이 액체 배지 상태에 처리 되었을 때 어느 농도에서 균의 성장 억제 효과가 있는지 확인하기 위하여 추출물의 농도별 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 그래프로 나타낸다.

(2) 실험방법 및 재료

(가) 추출물의 농도별 시료 제작

- 메탄올로 추출한 한약재 고형분을 메탄올 용매에 녹여서 사용한다.
- 한약재 시료를 배지에 처리하는 양은 동일하게 하되, 시료의 제조 농도를 다르게 한다. 시료는 농도별로 각각 제조한다.
- 앞서 수득한 한약재 고형분 추출물을 각각 다음과 같은 농도로 1mL씩 제조한다.

한약재 이름	추출물 stock 제조 농도 (g/L)
정향	50, 25, 13, 6
황금	200, 100, 50, 25, 13, 6, 3
고본	200, 100, 50, 25, 13
급성자	200, 100, 50
목단피	100, 50, 25, 13
석창포	200, 100, 50, 25
지유	25, 13, 6
초과	50, 25, 13, 6
황백	50, 25, 13, 6, 3
후박	100, 50, 25, 13, 6, 3, 2

- 메탄올 용매 1mL에 용해시켜 녹인 후 5분간 50℃의 물 중탕을 통해 최대한 추출물이 용매에 용해되도록 한다. 볼텍싱을 통하여 충분히 용해시킨 후, 13,000rpm에서 10분간 원심분리 후 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 실험에 이용하였다.

(나) 살균력 test 방법

- *Candida albicans* KCTC 7965를 대상 균주로 하였다.
- 실험의 대조군으로는 5mL의 YPD 배지에 추출물의 용매인 메탄올을 1% 처리한 것으로 한다.
- 5mL의 YPD 배지가 분주된 test tube에 앞서 제작한 추출물 시료를 50μL씩 처리하여 최종 처리 농도가 다음과 같이 되도록 한다.



한약재 이름	최종 미생물에 적용되는 추출물 농도 (g/L)
정향	0.5, 0.25, 0.13, 0.06
황금	1.98, 0.99, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03
고본	1.98, 0.99, 0.5, 0.25, 0.13
급성자	1.98, 0.99, 0.5
목단피	0.99, 0.5, 0.25, 0.13
석창포	1.98, 0.99, 0.5, 0.25
지유	0.25, 0.13, 0.06
초과	0.5, 0.25, 0.13, 0.06
황백	0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03
후박	0.99, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03, 0.02

- 전배양한 배양액의 세포농도를 Abs<sub>600</sub>으로 측정한다.
- 4번 과정에서 측정된 세포 농도 값을 이용하여 각각의 test tube에 Abs<sub>600</sub>=0.05가 되도록 접종한다.
- 26°C 에서 250rpm으로 18시간 배양 한다.
- 이 후, 배양액을 spectrophotometer (Mecasys Co.의 Optizen2120 UV)로 Abs<sub>600</sub>를 측정하여 메탄을 처리 대조군과 비교하여 세포 성장 정도를 비교한다.

(3) 결과 및 고찰

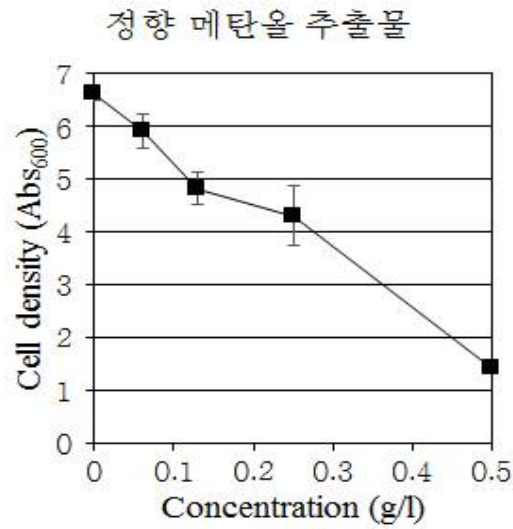


그림 70. 정향 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 70은 정향 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 70에 나타난 바와 같이, 정향 메탄올 추출물의 농도가 증가할수록 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있고, 최대 농도인 0.5g/L 에서는 대조군 대비 78.73%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였다.

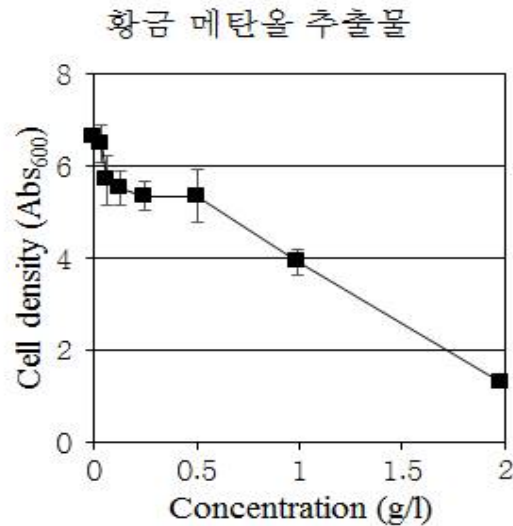


그림 71. 황금 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 71는 황금 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 71에 나타난 바와 같이, 황금 메탄올 추출물의 농도가 0.03g/L에서는 균의 생장이 억제되지 않았으나 0.06g/L에서 0.5g/L의 농도에서는 15~20% 정도로 비슷하게 균의 성장을 억제하였다. 0.5g/L 이상부터 농도가 증가할수록 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있고, 최대 농도인 2g/L 에서는 대조군 대비 80%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였다.

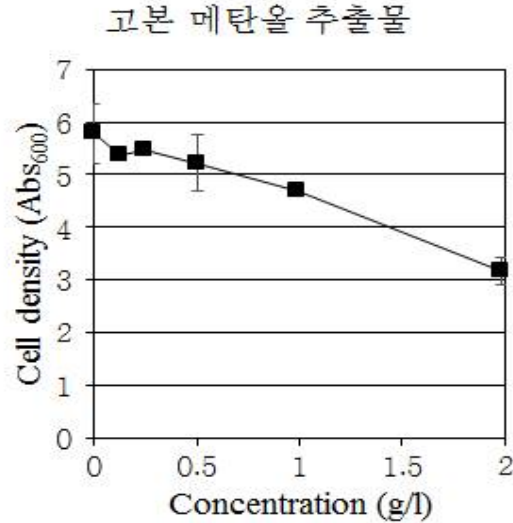


그림 72. 고분 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 72은 고분 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 72에 나타난 바와 같이, 고분 메탄올 추출물의 농도가 증가할수록 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있고, 최대 농도인 2g/L 에서는 대조군 대비 45%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였다.

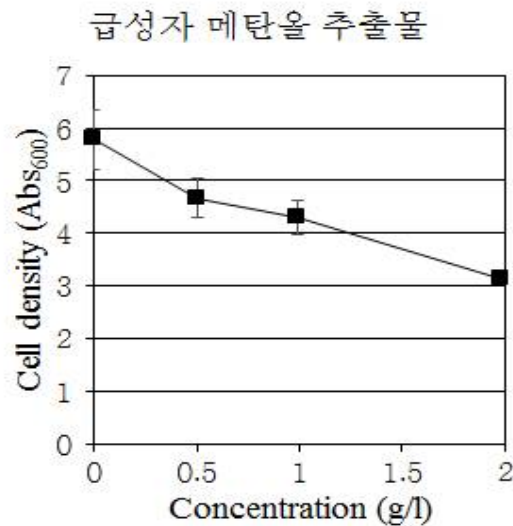


그림 73. 급성자 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 73은 급성자 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 73에 나타난 바와 같이, 급성자 메탄올 추출물의 농도가 증가할수록 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있고, 최대 농도인 2g/L 에서는 대조군 대비 46%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였다.

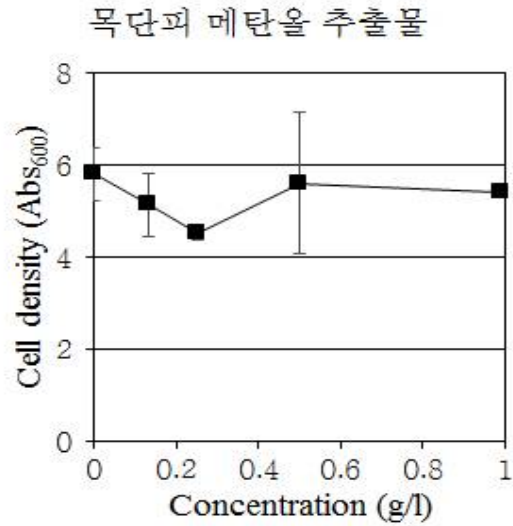


그림 74. 목단피 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 74는 목단피 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 74에 나타난 바와 같이, 0.25g/L 농도에서 대조군 대비 21%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였다. 이보다 더 높은 농도에서는 그 이상의 성장 억제 효과를 나타내지는 않았다.

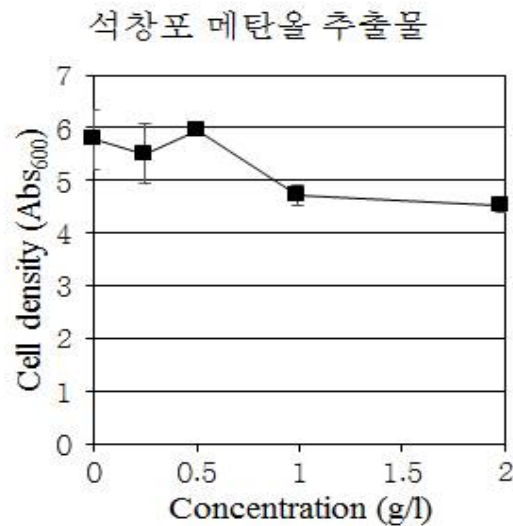


그림 75. 석창포 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 75은 석창포 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 75에 나타난 바와 같이, 0.5g/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나 1g/L 농도의 석창포 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 18%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 2g/L 농도의 석창포 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 22%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

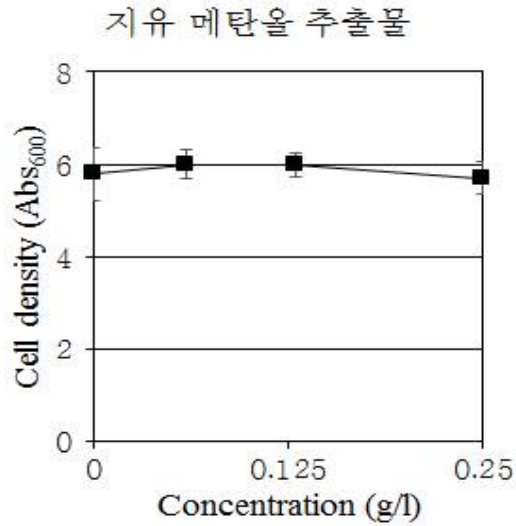


그림 76. 지유 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 76는 지유 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 76에 나타난 바와 같이, 지유 메탄올 추출물은 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았다.

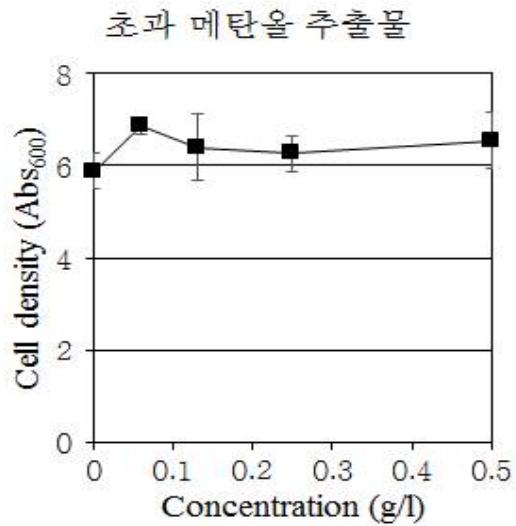


그림 77. 초과 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 77는 초과 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 77에 나타난 바와 같이, 초과 메탄올 추출물은 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았다.

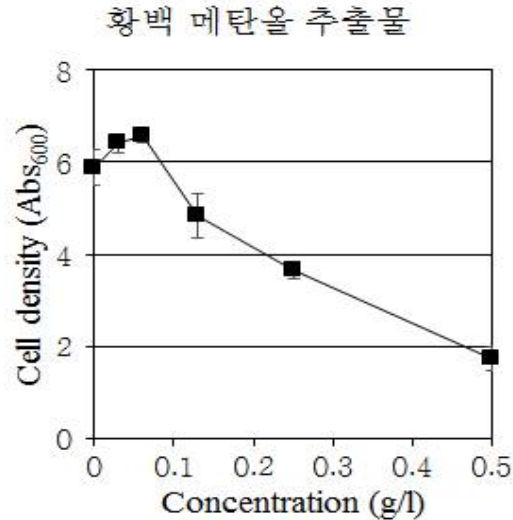


그림 78. 황백 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 78은 황백 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 78에 나타난 바와 같이, 0.06g/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나 0.13g/L부터 농도가 증가할수록 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있었다. 0.13g/L의 황백 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 18%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 0.5g/L 농도의 황백 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 71%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

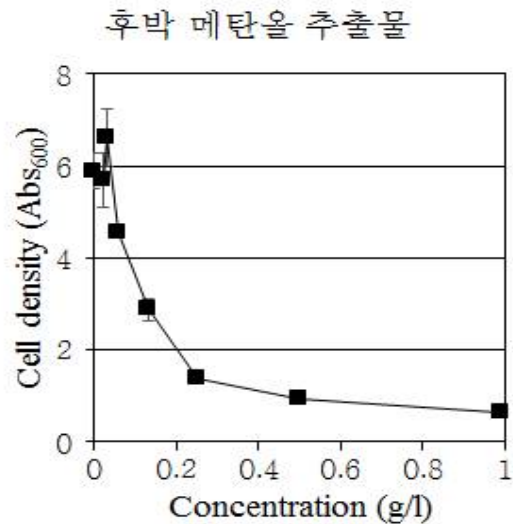


그림 79. 후박 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 79은 후박 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 79에 나타난 바와 같이, 0.03g/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나 0.06g/L부터 농도가 증가할수록 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있었다. 0.06g/L의 후박 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 22%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 최고 농도인 1g/L의 후박 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 89%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

#### (4) 결론

후박, 정향, 황백 이 0.5g/L 농도에서 각각 84%, 79%, 71%의 생장 억제율을 나타내었고 이것은 다른 추출물에 비해 낮은 농도에서 높은 생장 억제율을 나타낸다. 2g/L의 농도에서는 황금이 80%, 급성자가 46%, 고본이 45%, 석창포가 22%의 생장 억제율을 나타내었으며, 목단피, 지유, 초과 메탄올 추출물은 균의 생장 억제 효과가 없는 것으로 나타났다. 이들을 선정된 추출 방법으로 제조한 추출물로 농도별 그래프를 나타내어 비교하고, 이 농도별 그래프를 토대로 하여 상승 효과를 위한 한약재 처리 농도를 정하고 상승효과를 검토할 것이다.

## 나. 선별된 용매 추출물의 농도별 *Candida albicans*에 대한 성장 억제 효과 관찰

### (1) 연구 목적

메탄올 추출물을 다른 용매로 추출하여 제조하고, 그 추출물의 농도별 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 그래프로 나타낸다. 이를 통해 이들의 상승 효과 관찰을 위한 추출물 혼합 실험에 사용할 추출물의 농도를 선정한다. 마찬가지로 대조군 대비 균의 생장이 20% 억제되는 농도를 찾고 그 농도에서 추출물들을 혼합하여 이들의 상승효과를 확인한다.

### (2) 실험방법 및 재료

#### (가) 추출물의 농도별 시료 제작

##### - 정향 열수 추출물의 농도별 시료 제작

정향 열수 추출물 0.08g을 RPMI1640 배지 2ml에 용해시켜 40g/L 농도의 stock을 제조한 후 15분간 50℃의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

##### - 황금 열수 추출물의 농도별 시료 제작

황금 열수 추출물 0.02g을 RPMI 1640 2ml에 용해시켜 10g/L 농도의 stock을 제조한 후 15분간 50℃의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

##### - 고본 에탄올 추출물의 농도별 시료 제작

고본 에탄올 추출물 0.16g을 RPMI 1640 2ml에 용해시켜 80g/L 농도의 stock을 제조한 후 15분간 50℃의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

##### - 급성자 에탄올 추출물의 농도별 시료 제작

급성자 에탄올 추출물 0.02g을 RPMI 1640 2ml에 용해시켜 10g/L 농도의 stock을 제조한 후 15분간 50℃의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

##### - 목단피 열수 추출물의 농도별 시료 제작

목단피 열수 추출물 0.02g을 RPMI 1640 2ml에 용해시켜 10g/L 농도의 stock을 제조한 후 15분간 50℃의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.



- 석창포 초임계 추출물의 농도별 시료 제작

석창포(지운당 한약국, 경동시장, 서울, 대한민국)을 EnSNature에 의뢰하여 초임계 추출을 수행하였다. 석창포 3220g을 10L 초임계 추출기(Extractor)에 투입하여, 350bar 및 50°C의 조건에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 6시간 동안 추출하였다. 추출 후 여과지(whatman™ grade 4 qualitative filter paper; GE Healthcare Life Sciences)를 이용하여 불순물을 제거하였다. 3,220g의 석창포로부터 수득된 초임계 추출물의 양은 50.4g이었고, 수율은 1.57%였다. 초임계 추출물 0.1g을 RPMI 1640 배지에 희석한 50% tween 20 1mL에 용해시켜 100g/L 농도의 stock을 제조한 후 불텍싱하여 추출물이 균일하게 용해되도록 하여 추후 실험에 사용하였다.

- 지유 열수 추출물의 농도별 시료 제작

지유 열수 추출물 0.02g을 RPMI 1640 2ml에 용해시켜 10g/L 농도의 stock을 제조한 후 15분간 50°C의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

- 초과 메탄올 추출물의 농도별 시료 제작

초과 메탄올 추출물 0.5g을 메탄올 2ml에 용해시켜 25g/L 농도의 stock을 제조한 후 15분간 50°C의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

- 황백 열수 추출물의 농도별 시료 제작

황백 열수 추출물 0.1015g을 RPMI1640 배지 2ml에 용해시켜 50g/L 농도의 stock을 제조한 후 15분간 50°C의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

- 후박 초임계 추출물의 농도별 시료 제작

후박(지운당 한약국, 경동시장, 서울, 대한민국)을 EnSNature에 의뢰하여 초임계 추출을 수행하였다. 후박 3200g을 10L 초임계 추출기(Extractor)에 투입하여, 350bar 및 50°C의 조건에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 5시간 동안 추출하였다. 추출 후 여과지(whatman™ grade 4 qualitative filter paper; GE Healthcare Life Sciences)를 이용하여 불순물을 제거하였다. 3,200g의 후박으로부터 수득된 초임계 추출물의 양은 55.0g이었고, 수율은 1.72%였다. 초임계 추출물 0.1012g을 RPMI 1640 배지에 희석한 50% tween20 1ml에 용해시켜 100g/L 농도의 stock을 제조한 후 불텍싱하여 추출물이 균일하게 용해되도록 하여 추후 실험에 사용하였다.

(나) 균주 및 배양 배지 준비

- *Candida albicans* KCTC 7965는 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, 대한민국)로부터 분양받았다.

실험에 사용된 배지는 다음과 같다.

- SDA 배지는 한천을 이용한 고형배지를 만드는데 사용한 배지로 -80°C 에서 보관하고 있는 균주를 활발한 생육 상태로 만드는 배지이다. 배지의 조성은 다음과 같다.

Sabouraud Broth (BD 238230)	30g
Agar	15g
Water	1000mL

완성된 배지는 4°C 에서 보관하였다.

- RPMI 1640 배지는 Petri dish에서 SDA 배지를 통해 활발한 생육 상태가 된 균을 CLSI M27-A2 method에 따라 이용할 때 사용하는 배지이다. 완성된 배지는 4°C 에서 보관하고 배지의 조성은 다음과 같다.

RPMI 1640	10.4g
MOPS[3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]	34.53g
1M Sodium hydroxide	pH 7.0이 되도록 첨가
Water	make up 1000mL

(다) 96 well polystyrene microplate를 이용한 CLSI M27-A2 법을 통한 성장 억제 평가

*C. albicans* KCTC 7965 균주 스톡을 SDA 한천 플레이트에 획선도말(streaking)하여 35°C 에서 2일간 배양하였다. 이후 단일 균집을 취하여 0.145mol/L 식염수에 현탁하고 15초 동안 볼텍싱하였다. 현탁액을 Optizen 2120uv spectrophotometer(Mecasys Co., 대한민국)를 이용해 530nm에서 흡광도를 측정하여 세포 밀도(cell density)가 0.5의 맥팔란드 탁도(McFarland standard)가 되는지 확인하고, 필요에 따라 0.5의 맥팔란드 탁도가 되도록 식염수를 첨가하였다. 0.5의 맥팔란드 탁도를 갖는 현탁액에 식염수를 첨가하여 100배 희석하고, 추가로 RPMI 1640 배지를 이용하여 10배 희석하여, 마이크로플레이트에 처리하기 직전 농도가  $1 \times 10^3$  내지  $5 \times 10^3$  CFU/ml가 되도록 희석한 *C. albicans* 균 현탁액을 마이크로플레이트에 각각 100µl 씩 분주하였다.

- 정향 열수 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 정향 열수 추출물 스톡(40g/L)을 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 농도가 0.0625g/L가 되도록 RPMI1640 배지로 640배 희석하였다. 0.0625g/L 농도의 정향 열수 추출물을 RPMI1640 배지를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 31.25mg/L, 15.63mg/L, 7.81mg/L, 3.91mg/L, 1.95mg/L, 0.98mg/L 농도의 정향 열수 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100µl 씩 분주하고 대조군으로서 정향 열수 추출물이 포함되지 않은 RPMI1640 배지 100µl 를 분주하였다.

- 황금 열수 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 황금 열수 추출물 스톡(10g/L)을 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 RPMI 1640 배지로 200배 희석하여 0.05g/L의 황금 열수 추출물을 제조하였다. 0.05g/L 농도의 황금 열수 추출물을 RPMI 1640 배지를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 제조한 0.025g/L, 0.013g/L, 6.25mg/L, 3.13mg/L, 1.56mg/L 또는 0.78mg/L 농도의 황금 열수 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이

분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 황금 열수 추출물이 포함되지 않은 RPMI 1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하였다.

- 고본 에탄올 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 고본 에탄올 추출물 스탁(80g/L)을 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 RPMI 1640 배지로 800배 희석하여 0.1g/L의 고본 에탄올 추출물을 제조하였다. 0.1g/L 농도의 고본 에탄올 추출물을 RPMI 1640 배지를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 제조한 0.1g/L, 0.05g/L, 0.025g/L, 0.013g/L, 6.25mg/L, 3.13mg/L, 1.56mg/L 또는 0.78mg/L 농도의 고본 에탄올 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 고본 에탄올 추출물이 포함되지 않은 RPMI 1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하였다.

- 급성자 에탄올 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 급성자 에탄올 추출물 스탁(10g/L)을 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 RPMI 1640 배지로 0.6배 희석하여 6g/L의 급성자 에탄올 추출물을 제조하였다. 6g/L 농도의 급성자 에탄올 추출물을 RPMI 1640 배지를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 제조한 3g/L, 1.5g/L, 0.75g/L, 0.375g/L 또는 0.1875g/L 농도의 급성자 에탄올 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 급성자 에탄올 추출물이 포함되지 않은 RPMI 1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하였다.

- 목단피 열수 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 목단피 열수 추출물 스탁(10g/L)을 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 RPMI 1640 배지로 100배 희석하여 0.1g/L의 목단피 열수 추출물을 제조하였다. 0.1g/L 농도의 목단피 열수 추출물을 RPMI 1640 배지를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 제조한 0.05g/L, 0.025g/L, 0.0125g/L, 6.25mg/L 또는 3.13mg/L 농도의 목단피 열수 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 목단피 열수 추출물이 포함되지 않은 RPMI 1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하였다.

- 석창포 초임계 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 석창포 초임계 추출물 스탁(100g/L)을 농도가 2g/L가 되도록 RPMI 1640 배지로 50배 희석하였다. 2g/L 농도의 석창포 초임계 추출물을 1% tween 20를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 제조한 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.126g/L, 62.5mg/L 또는 31.3mg/L 농도의 석창포 초임계 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 석창포 초임계 추출물이 포함되지 않고 1% tween 20이 포함된 RPMI 1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하여 최종적으로 배지 내 tween20 농도가 0.5%가 되도록 하였다.

- 지유 열수 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 지유 열수 추출물 스탁(10g/L)을 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 RPMI 1640 배지로 1000배 희석하여 0.01g/L의 지유 열수 추출물을 제조하였다. 0.01g/L 농도의 지유 열수 추출물을 RPMI 1640 배지를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 제조한 5mg/L, 2.5mg/L, 1.25mg/L, 0.63mg/L 또는 0.31mg/L 농도의 지유 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는

마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 자유 열수 추출물이 포함되지 않은 RPMI 1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하였다.

- 초과 메탄올 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 초과 메탄올 추출물 스톡(25g/L)을 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 RPMI 1640 배지로 50배 희석하여 0.5g/L의 초과 메탄올 추출물을 제조하였다. 0.5g/L 농도의 초과 메탄올 추출물을 RPMI 1640 배지를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 제조한 0.5g/L, 0.25g/L, 0.126g/L, 62.5mg/L, 31.3mg/L 또는 15.6mg/L 농도의 초과 메탄올 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 초과 메탄올 추출물이 포함되지 않은 RPMI 1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하였다.

- 황백 열수 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 황백 열수 추출물 스톡(50g/L)을 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 농도가 2.5g/L가 되도록 RPMI1640 배지로 20배 희석하였다. 2.5g/L 농도의 황백 열수 추출물을 RPMI1640 배지를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 1.25g/L, 0.625g/L, 0.313g/L, 0.156g/L, 78.1mg/L, 39.06mg/L 농도의 황백 열수 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 황백 열수 추출물이 포함되지 않은 RPMI1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하였다.

- 후박 초임계 추출물의 농도에 따른 항진균 효과

제조한 후박 초임계 추출물 스톡(100g/L)을 농도가 2g/L가 되도록 RPMI1640 배지로 50배 희석하였다. 2g/L 농도의 후박 초임계 추출물을 1% tween20를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 62.5mg/L, 31.25mg/L 농도의 후박 초임계 추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ l씩 분주하고 대조군으로서 후박 초임계 추출물이 포함되지 않은 1% tween 20이 포함된 RPMI1640 배지 100 $\mu$ l를 분주하였다.

상기와 같이 *C. albicans* 균 및 추출물이 분주된 마이크로플레이트를 35 $^{\circ}$ C에서 48시간 두어 배양 후 가라앉는 균을 피펫팅하여 현탁시키고 마이크로플레이트 리더(Dynex Opsys MRTM Microplate Reader)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 이를 *C. albicans*의 세포 밀도로 나타내었다.

(3) 결과 및 고찰

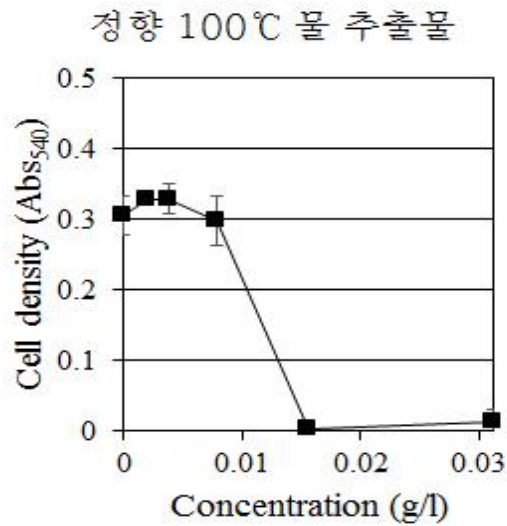


그림 80. 정향 100°C 물 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 80은 정향 열수 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 80에 나타난 바와 같이, 7.81mg/L 보다 낮은 농도에서는 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보이지 않았으나 15.63mg/L 농도 이후에서는 *C. albicans*에 대해 우수한 살균 효과를 나타내었다.

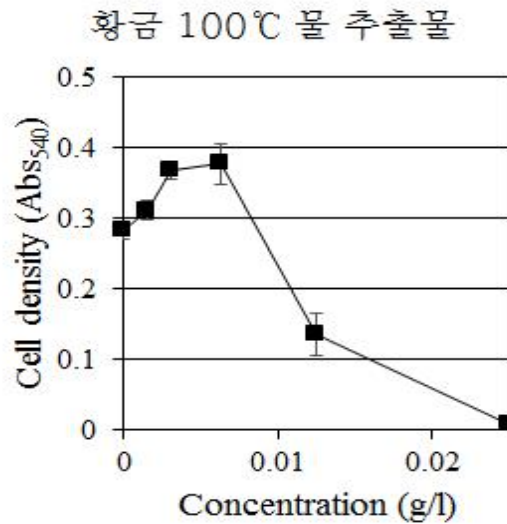


그림 81. 황금 100°C 물 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 81은 황금 열수 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 81에 나타난 바와 같이, 6.25mg/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.013g/L 농도의 황금 열수 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 48%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 0.025g/L 농도의 황금 열수 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 97%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

고본 에탄올 추출물

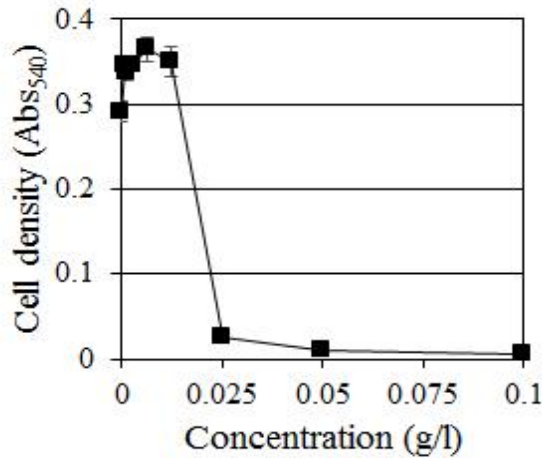


그림 82. 고본 에탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 82은 고본 에탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 82에 나타난 바와 같이, 12.5mg/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.025g/L 농도의 고본 에탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 91%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 0.1g/L 농도의 고본 에탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 98%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

급성자 에탄올 추출물

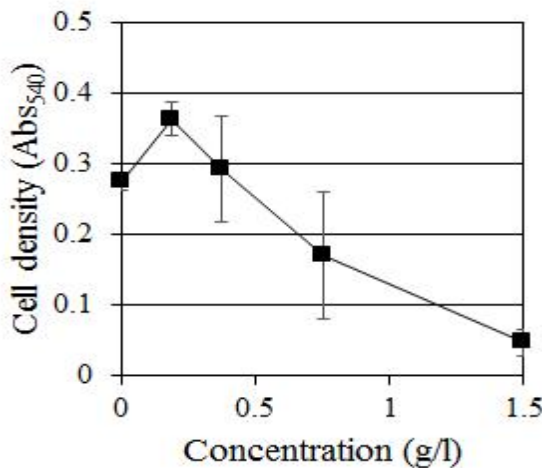


그림 83. 급성자 에탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 83은 급성자 에탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 83에 나타난 바와 같이, 0.375g/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.75g/L 농도의 급성자 에탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 38%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 1.5g/L 농도의 급성자 에탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 83%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

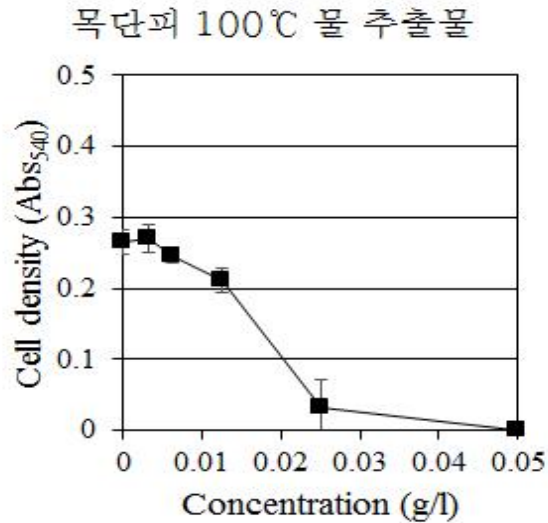


그림 84. 목단피 100°C 물 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 84는 목단피 열수 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 84에 나타난 바와 같이, 3.13mg/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 6.25mg/L 농도 이상부터 성장 억제가 관찰되었다. 6.25mg/L의 농도에서 대조군 대비 약 7%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 0.05g/L 농도의 목단피 열수 추출물 첨가 시 대조군 대비 100%로 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

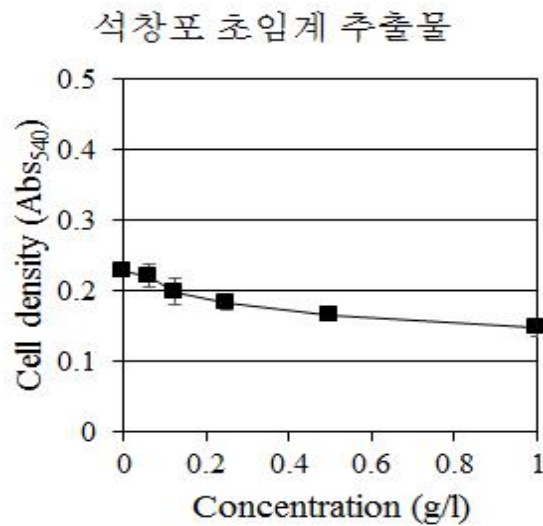


그림 85. 석창포 초임계 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 85은 석창포 초임계 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 85에 나타난 바와 같이, 추출물의 농도가 증가할수록 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있었고 최대 농도인 1g/L에서는 대조군 대비 약 35%의 억제 효과를 보였다.

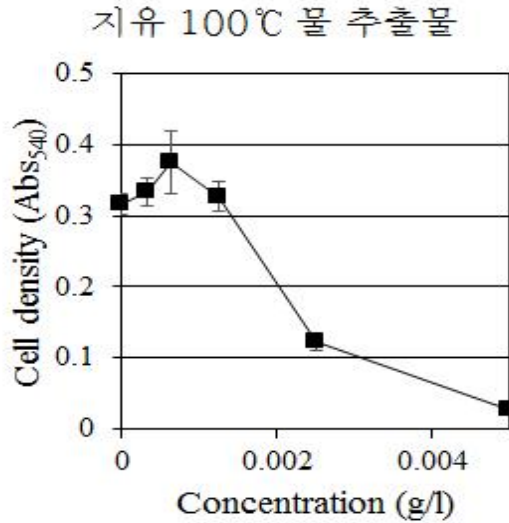


그림 86. 지유 열수 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 86는 지유 열수 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 86에 나타난 바와 같이, 1.25mg/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 2.5mg/L 농도의 지유 열수 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 61%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 5mg/L 농도의 지유 열수 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 92%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

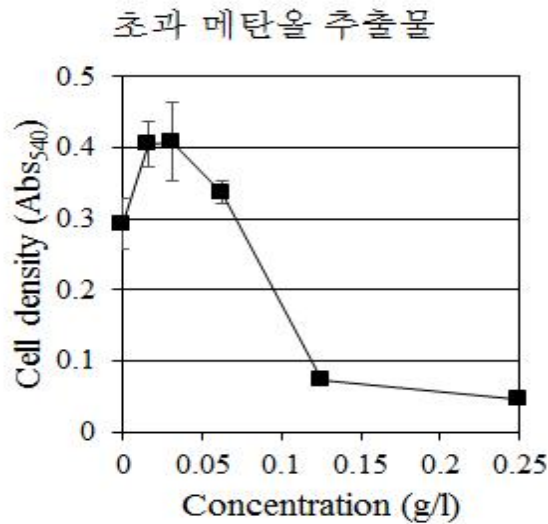


그림 87. 초과 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 87는 초과 메탄올 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 87에 나타난 바와 같이, 6.25mg/L 농도 이전에는 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.013g/L 농도의 초과 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 75%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였고, 0.025g/L 농도의 초과 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 85%의 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.



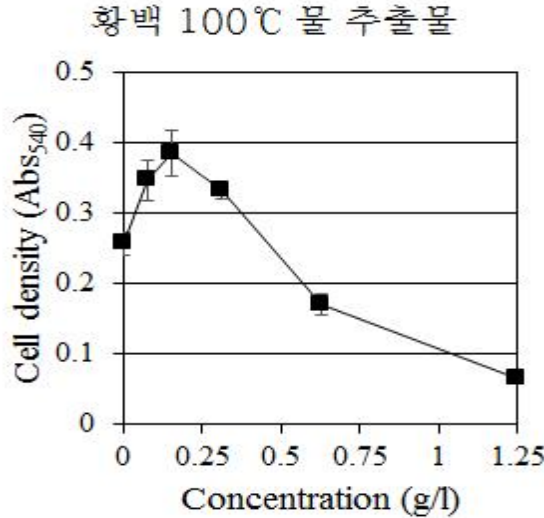


그림 88. 황백 100°C 물 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 88은 황백 열수 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 88에 나타난 바와 같이, 0.313g/L 보다 낮은 농도에서는 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보이지 않았으나 0.625g/L 농도에서는 대조군 대비 약 33%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였고 1.25g/L 농도에서는 약 74%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였다.

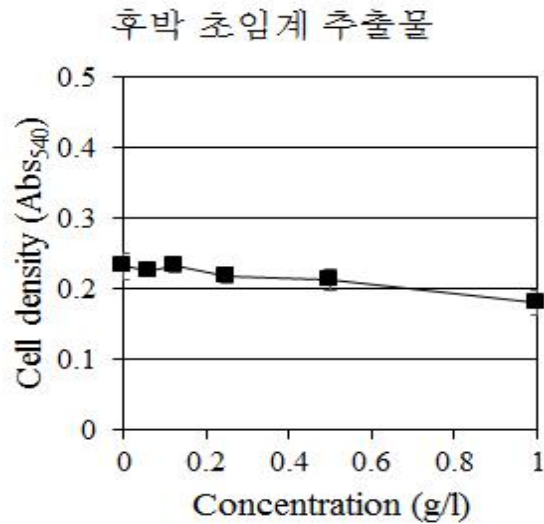


그림 89. 후박 초임계 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 89은 후박 초임계 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 89에 나타난 바와 같이, 후박 초임계 추출물의 농도가 증가할수록 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있고, 최대 농도인 1g/L 에서는 대조군 대비 약 22%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였다.

#### (4) 결론

지유 열수 추출물은 5mg/L의 농도에서 92%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 나타내었고, 정향 열수 추출물은 15.6mg/L의 농도에서 100%, 초과 매탄올 추출물은 13mg/L에서 75%, 황금 열수 추출물은 13mg/L에서 48%, 고분 에탄올 추출물은 25mg/L에서 91%, 목단피 열수 추출물은 50mg/L에서 100%의 성장 억제 효과를 나타내었다. 이 추출물들은 다른 추출물에 비해 더 낮은 농도에서도 강력한 살균 효과를 갖는 것을 의미한다.

급성자 에탄올 추출물은 1.5g/L에서 83%, 황백 열수 추출물은 1.25g/L에서 74%, 석창포 초임계 추출물은 1g/L에서 35%, 후박 초임계 추출물은 1g/L에서 22%의 성장 억제 효과를 나타내었다.

따라서 위의 나열된 추출물의 순서대로 *C. albicans*에 대하여 낮은 농도에서 큰 살균력을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

다. 세균류에 대한 추출물의 농도별 성장 억제 효과 관찰

(1) 연구목적

선별된 한약재 추출물들이 액체 배지 상태에 처리 되었을 때 어느 농도에서 세균의 성장 억제 효과가 있는지 확인한다. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 세 가지 세균류에 대하여 추출물의 농도별 성장 억제 효과를 그래프로 나타낸다.

(2) 실험방법 및 재료

(가) *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과 관찰 방법

*S. aureus*에 대한 항균 효과를 살펴보기 위하여, 변형된 CLSI M27-A2 방법에 따라 추출물 처리 시 *S. aureus*의 세포 밀도를 살펴보았다.

- 추출물 시료의 준비

추출물 농도는 배지에 추출물을 처리하였을 때 추출물에 의해 혼탁도가 나타나지 않는 범위 내에서 최대의 농도로 처리하였다.

정향, 황금 열수 추출물 0.1g을 TSB 배지 1ml에 각각 용해시켜 100g/L 농도의 시료를 제조하였다. 고본, 후박, 석창포, 황백 메탄올 추출물 0.1g을 메탄올 1ml에 각각 용해시켜 100g/L 농도의 시료를 제조하였다.

석창포, 후박 초임계 추출물 0.1g을 Tween 20이 50% 첨가된 TSB 배지에 각각 용해하여 시료를 제조하였다.

시료를 제조한 후 5분간 50°C의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

- 추출물의 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과 관찰 방법

전배양한 *S. aureus* 균을 spectrophotometer로 600nm에서 측정하여 흡광도(ABS) 값이 0.1이 되도록 TSB 배지를 첨가하여 희석한 후에 *S. aureus* 균 현탁액을 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 따라서 추출물 시료 100 $\mu$ L와 혼합 시 균 현탁액의 흡광도 값이 0.05가 되도록 하였다.

추출물 처리 시, 정향, 황금 열수 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 TSB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, 2g/L의 시료를 TSB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였다. 대조군으로는 추출물이 포함되지 않은 TSB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다.

고본, 후박, 석창포, 황백 메탄올 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 TSB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, 메탄올이 2% 첨가된 TSB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 대조군은 추출물이 포함되지 않고 메탄올이 2% 첨가된 TSB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였으며 대조군은 최종적으로 메탄올의 농도가 1%가 되도록 하였다.

석창포, 후박 초임계 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 TSB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, Tween 20이 1% 첨가된 TSB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 대조군은 추출물이 포함되지 않고 Tween 20이 1% 첨가된 TSB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였으며 대조군은 최종적으로 Tween 20의 농도가 0.5%가 되도록 하였다.

상기와 같이 *S. aureus* 균 및 추출물이 분주된 마이크로플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 두어 배양 후 가라앉는 균을 피펫팅하여 현탁시키고 마이크로 플레이트 리더(Dynex Opsys MR™ Microplate Reader)로 595nm에서 흡광도를 측정하여, *S. aureus*의 세포 밀도를 살펴보고, *S. aureus*의 성장률을 계산하여 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균 효과를 살펴보았다.

#### (나) *E. coli*에 대한 성장 억제 효과 관찰 방법

*E. coli*에 대한 항균 효과를 살펴보기 위하여, 변형된 CLSI M27-A2 방법에 따라 추출물 처리 시 *E. coli*의 세포 밀도를 살펴보았다.

##### - 추출물 시료의 준비

추출물 농도는 배지에 추출물을 처리하였을 때 추출물에 의해 혼탁도가 나타나지 않는 범위 내에서 최대의 농도로 처리하였다.

정향, 황금 열수 추출물 0.1g을 NB 배지 1ml에 각각 용해시켜 100g/L 농도의 시료를 제조하였다. 고본, 후박, 석창포, 황백 메탄올 추출물 0.1g을 메탄올 1ml에 각각 용해시켜 100g/L 농도의 시료를 제조하였다.

석창포, 후박 초임계 추출물 0.1g을 Tween 20이 50% 첨가된 NB 배지에 각각 용해하여 시료를 제조하였다.

시료를 제조한 후 5분간 50 $^{\circ}$ C의 물에 중탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 중탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

##### - 추출물의 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과 관찰 방법

전배양한 *E. coli* 균을 spectrophotometer로 600nm에서 측정하여 흡광도(ABS) 값이 0.1이 되도록 NB 배지를 첨가하여 희석한 후에 *E. coli* 균 현탁액을 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 따라서 추출물 시료 100 $\mu$ L와 혼합 시 균 현탁액의 흡광도 값이 0.05가 되도록 하였다.

추출물 처리 시, 정향, 황금 열수 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 NB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, 2g/L의 시료를 NB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였다. 대조군으로는 추출물이 포함되지 않은 NB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다.

고본, 후박, 석창포, 황백 메탄올 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 NB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, 메탄올이 2% 첨가된 NB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 대조군은 추출물이 포함되지 않고 메탄올이 2% 첨가된

NB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였으며 대조군은 최종적으로 메탄올의 농도가 1%가 되도록 하였다.

석창포, 후박 초임계 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 NB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, Tween 20이 1% 첨가된 NB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 대조군은 추출물이 포함되지 않고 Tween 20이 1% 첨가된 NB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였으며 대조군은 최종적으로 Tween 20의 농도가 0.5%가 되도록 하였다.

상기와 같이 *E. coli* 균 및 추출물이 분주된 마이크로플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 두어 배양 후 가라앉는 균을 피펫팅하여 현탁시키고 마이크로 플레이트 리더(Dynex Opsys MR<sup>TM</sup> Microplate Reader)로 595nm에서 흡광도를 측정하여, *E. coli*의 세포 밀도를 살펴보고, *E. coli*의 성장률을 계산하여 추출물의 *E. coli*에 대한 항균 효과를 살펴보았다.

#### (다) *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과 관찰 방법

*P. aeruginosa*에 대한 항균 효과를 살펴보기 위하여, 변형된 CLSI M27-A2 방법에 따라 추출물 처리 시 *P. aeruginosa*의 세포 밀도를 살펴보았다.

##### - 추출물 시료의 준비

추출물 농도는 배지에 추출물을 처리하였을 때 추출물에 의해 혼탁도가 나타나지 않는 범위 내에서 최대의 농도로 처리하였다.

정향, 황금 열수 추출물 0.1g을 NB 배지 1ml에 각각 용해시켜 100g/L 농도의 시료를 제조하였다. 고본, 후박, 석창포, 황백 메탄올 추출물 0.1g을 메탄올 1ml에 각각 용해시켜 100g/L 농도의 시료를 제조하였다.

석창포, 후박 초임계 추출물 0.1g을 Tween 20이 50% 첨가된 NB 배지에 각각 용해하여 시료를 제조하였다.

시료를 제조한 후 5분간 50 $^{\circ}$ C의 물에 증탕하여 추출물이 최대한 배지에 용해되도록 하였다. 증탕한 추출물을 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 추후 실험에 사용하였다.

##### - 추출물의 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과 관찰 방법

전배양한 *P. aeruginosa* 균을 spectrophotometer로 600nm에서 측정하여 흡광도(ABS) 값이 0.1이 되도록 NB 배지를 첨가하여 희석한 후에 *P. aeruginosa* 균 현탁액을 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 따라서 추출물 시료 100 $\mu$ L와 혼합 시 균 현탁액의 흡광도 값이 0.05가 되도록 하였다.

추출물 처리 시, 정향, 황금 열수 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 NB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, 2g/L의 시료를 NB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였다. 대조군으로는 추출물이 포함되지 않은 NB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다.

고분, 후박, 석창포, 황백 메탄올 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 NB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, 메탄올이 2% 첨가된 NB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 대조군은 추출물이 포함되지 않고 메탄올이 2% 첨가된 NB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였으며 대조군은 최종적으로 메탄올의 농도가 1%가 되도록 하였다.

석창포, 후박 초임계 추출물은 각각의 최고 처리 농도가 1g/L가 되도록 NB 배지로 50배 희석하여 2g/L의 시료를 제작하고, Tween 20이 1% 첨가된 NB 배지로 2배씩 연속희석하여 microplate well에 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 대조군은 추출물이 포함되지 않고 Tween 20이 1% 첨가된 NB 배지 100 $\mu$ L를 분주한 것으로 하였다. 따라서 균 현탁액 100 $\mu$ L와 혼합 시 추출물의 최종 처리 농도가 1g/L, 0.5g/L, 0.25g/L, 0.125g/L, 0.0625g/L, 31.3mg/L, 15.6mg/L 및 7.8mg/L가 되도록 하였으며 대조군은 최종적으로 Tween 20의 농도가 0.5%가 되도록 하였다.

상기와 같이 *P. aeruginosa* 균 및 추출물이 분주된 마이크로플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 두어 배양 후 가라앉는 균을 피펫팅하여 현탁시키고 마이크로 플레이트 리더(Dynex Opsys MR<sup>TM</sup> Microplate Reader)로 595nm에서 흡광도를 측정하여, *P. aeruginosa*의 세포 밀도를 살펴보고, *P. aeruginosa*의 성장률을 계산하여 추출물의 *P. aeruginosa*에 대한 항균 효과를 살펴보았다.

(3) 결과 및 고찰

(가) *Staphylococcus aureus*

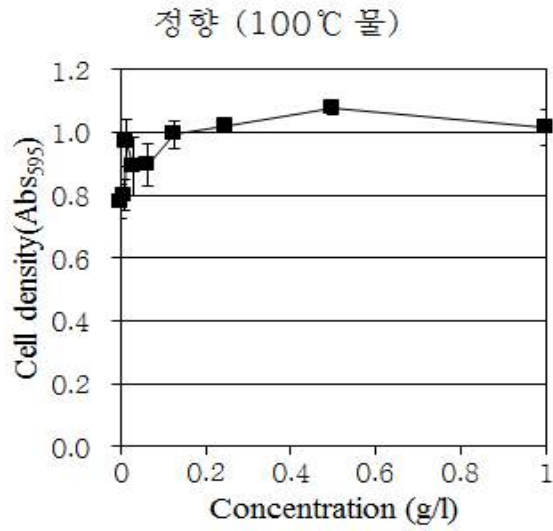


그림 90. 정향 열수 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 90은 정향 열수 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 90에 나타난 바와 같이, 정향 열수 추출물은 *S. aureus*의 성장을 억제하지 않았다.

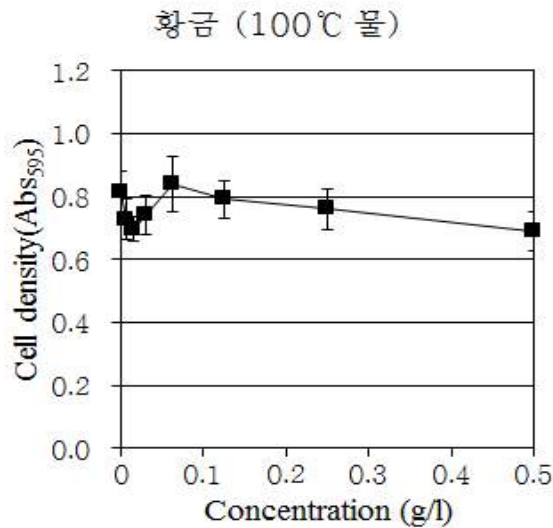


그림 91. 황금 열수 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 91는 황금 열수 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 91에 나타난 바와 같이, 황금 열수 추출물은 *S. aureus*의 성장을 억제하지 않았다.

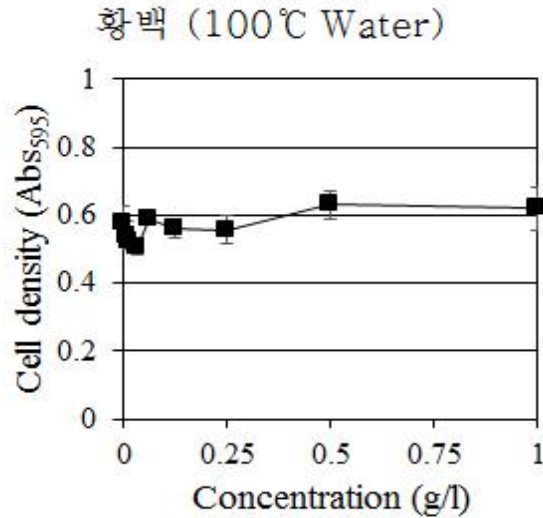


그림 92. 황백 열수 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 92은 황백 열수 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 92에 나타난 바와 같이, 황백 열수 추출물은 *S. aureus*의 성장을 억제하지 않았다.

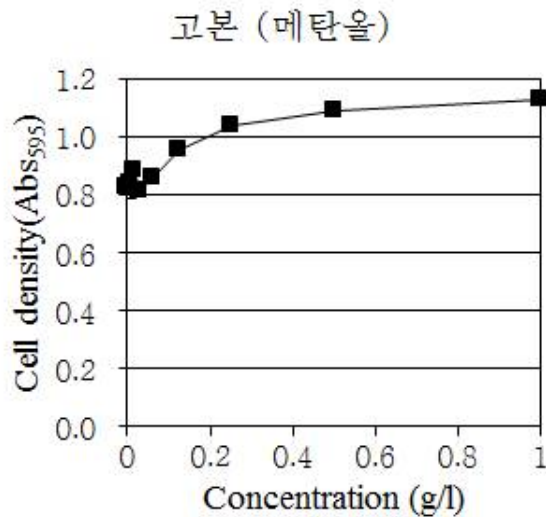


그림 93. 고본 메탄올 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 93은 고본 메탄올 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 93에 나타난 바와 같이, 고본 메탄올 추출물은 *S. aureus*의 성장을 억제하지 않았다.



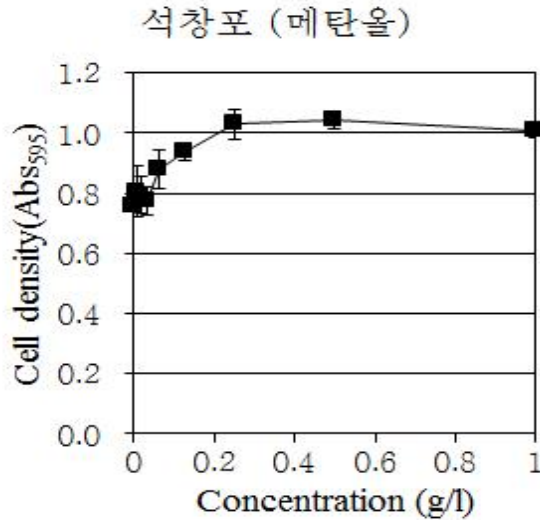


그림 94. 석창포 메탄올 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 94는 석창포 메탄올 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 94에 나타난 바와 같이, 석창포 메탄올 추출물은 *S. aureus*의 성장을 억제하지 않았다.

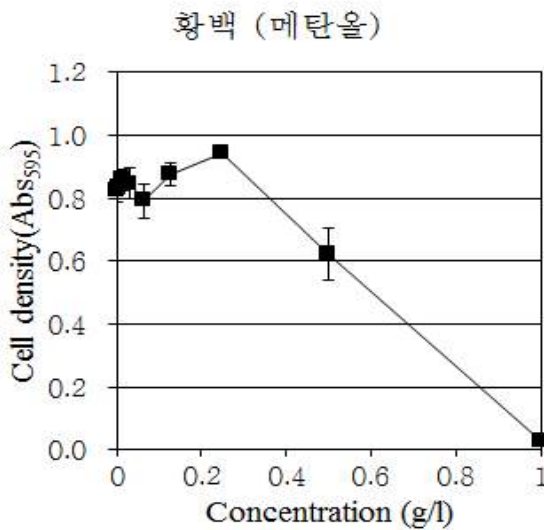


그림 95. 황백 메탄올 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 95은 황백 메탄올 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 95에 나타난 바와 같이, 0.25g/L 농도 이전에는 *S. aureus*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.5g/L 농도 이상부터 성장 억제가 관찰되었다. 0.5g/L의 농도에서 대조군 대비 약 24%의 *S. aureus*의 성장을 억제하였고, 1g/L 농도의 황백 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 97%로 *S. aureus*의 성장을 억제하였다.

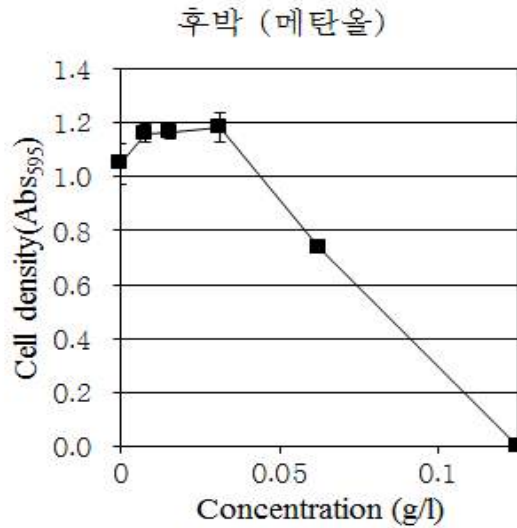


그림 96. 후박 메탄올 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 96는 후박 메탄올 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 96에 나타난 바와 같이, 0.031g/L 농도 이전에는 *S. aureus*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.0625g/L 농도 이상부터 성장 억제가 관찰되었다. 0.0625g/L의 농도에서 대조군 대비 약 30%의 *S. aureus*의 성장을 억제하였고, 0.125g/L 농도의 후박 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 100%로 *S. aureus*의 성장을 억제하였다.

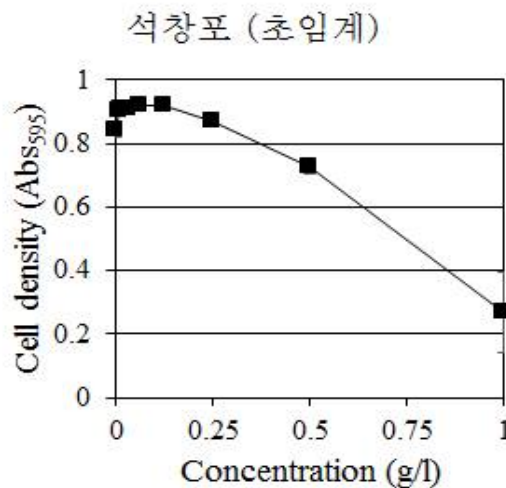


그림 97. 석창포 초임계 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 97는 석창포 초임계 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 97에 나타난 바와 같이, 0.25g/L 농도 이전에는 *S. aureus*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.5g/L 농도 이상부터 성장 억제가 관찰되었다. 0.5g/L의 농도에서 대조군 대비 약 14%의 *S. aureus*의 성장을 억제하였고, 최고 농도인 1g/L 농도의 석창포 초임계 추출물 첨가 시 대조군 대비 68%로 *S. aureus*의 성장을 억제하였다.

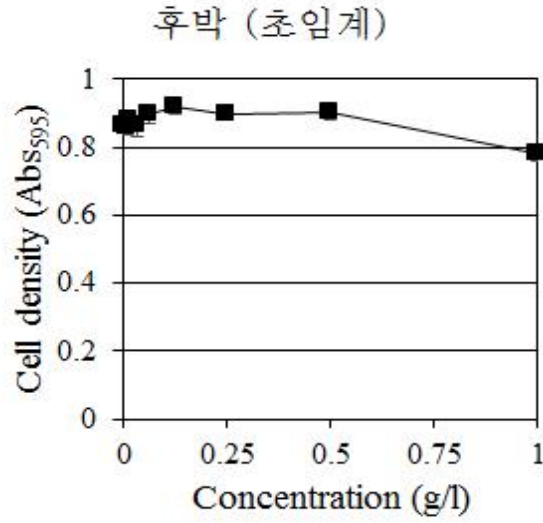


그림 98. 후박 초임계 추출물의 농도별 *S. aureus*의 성장 관찰

그림 98은 후박 초임계 추출물의 농도에 따른 *S. aureus*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 98에 나타난 바와 같이, 후박 초임계 추출물은 *S. aureus*의 성장을 억제하지 않았다.

(2) *Escherichia coli*

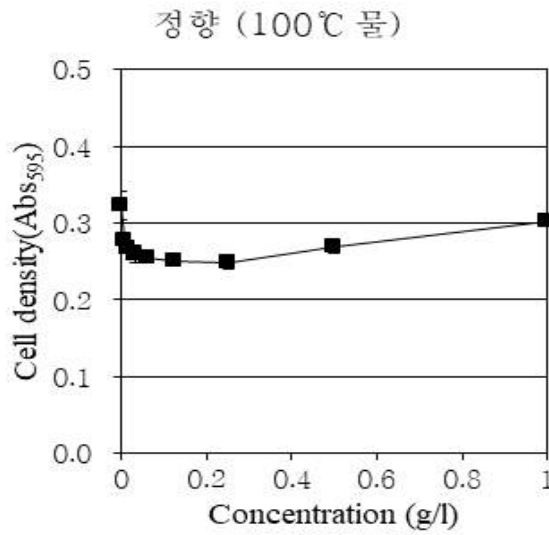


그림 99. 정향 열수 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 99은 정향 열수 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 99에 나타난 바와 같이, 정향 열수 추출물은 *E. coli*의 성장을 억제하지 않았다.

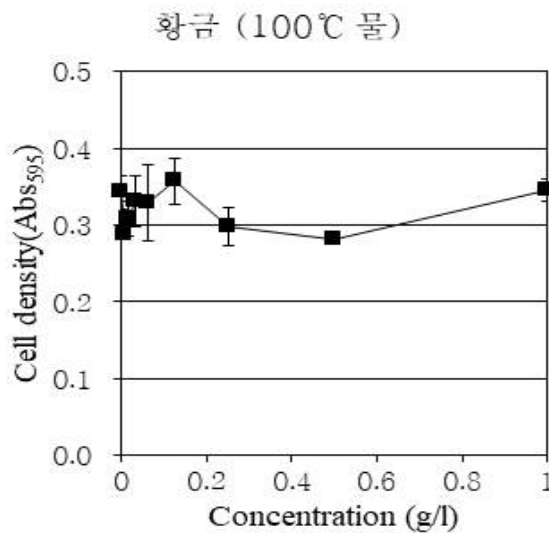


그림 100. 황금 열수 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 100은 황금 열수 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 100에 나타난 바와 같이, 황금 열수 추출물은 *E. coli*의 성장을 억제하지 않았다.

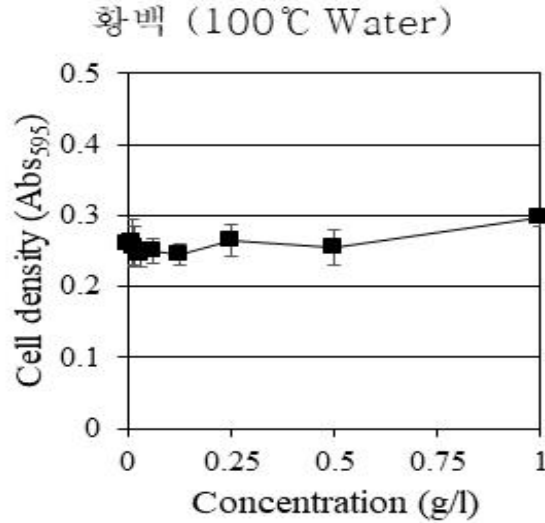


그림 101. 황백 열수 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 101는 황백 열수 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 101에 나타난 바와 같이, 황백 열수 추출물은 *E. coli*의 성장을 억제하지 않았다.

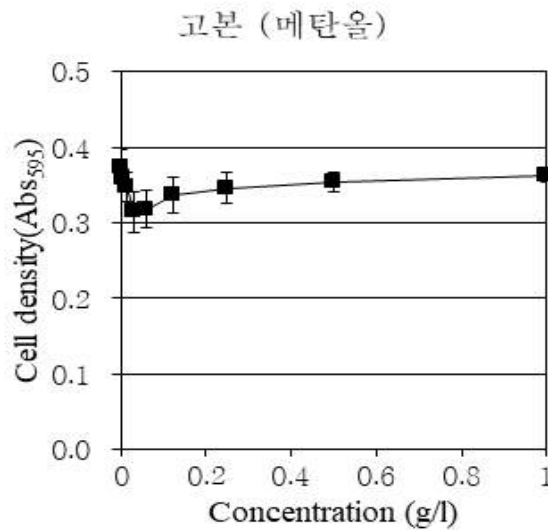


그림 102. 고분 메탄올 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 102은 고분 메탄올 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 102에 나타난 바와 같이, 고분 메탄올 추출물은 *E. coli*의 성장을 억제하지 않았다.

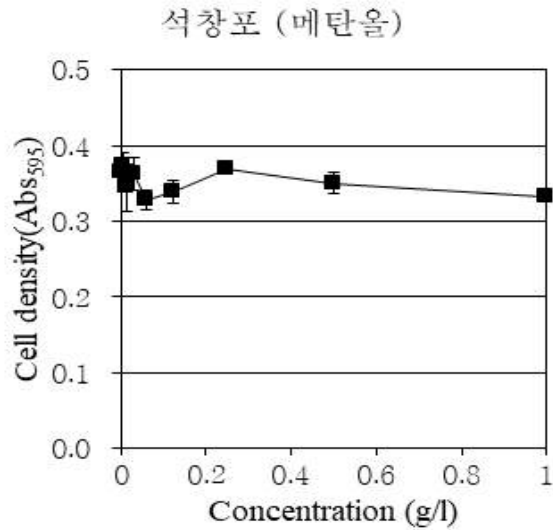


그림 103. 석창포 메탄올 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 103은 석창포 메탄올 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 103에 나타난 바와 같이, 석창포 메탄올 추출물은 *E. coli*의 성장을 억제하지 않았다.

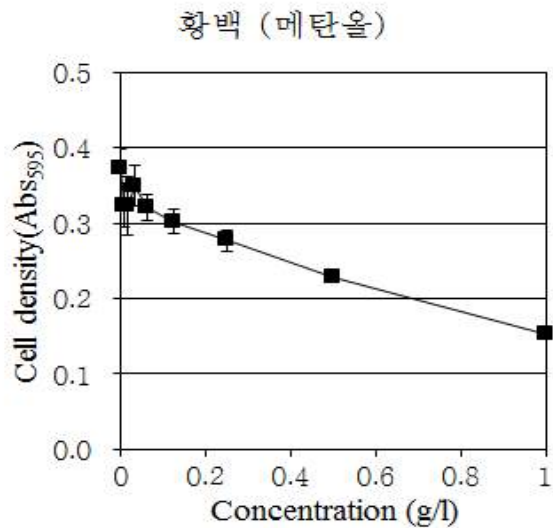


그림 104. 황백 메탄올 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 104는 황백 메탄올 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 104에 나타난 바와 같이, 0.03g/L 농도 이전에는 *E. coli*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.0625g/L 농도 이상부터 성장 억제가 관찰되었다. 0.0625g/L의 농도에서 대조군 대비 약 14%의 *E. coli*의 성장을 억제하였고, 최고 농도인 1g/L 농도의 황백 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 59%로 *E. coli*의 성장을 억제하였다.

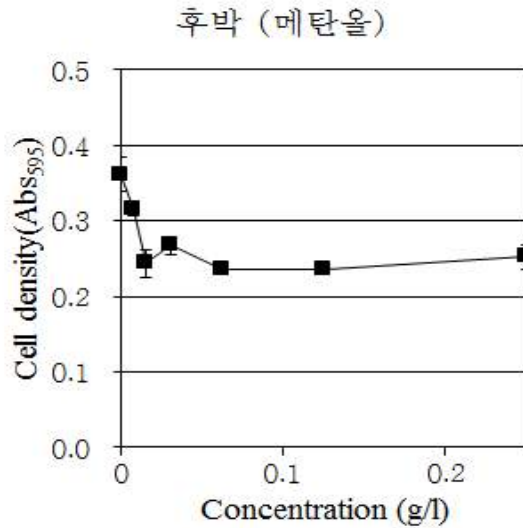


그림 105. 후박 메탄올 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 105은 후박 메탄올 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 105에 나타난 바와 같이, 15.6mg/L 이전에는 농도가 증가함에 따라 *E. coli*의 생장이 점차 감소하다가 15.6mg/L에서 0.25g/L 구간에서는 비슷한 *E. coli*의 성장 억제 효과를 나타내었다. 15.6mg/L의 농도에서 대조군 대비 약 33%의 *E. coli*의 성장을 억제하였고, 최고 농도인 0.25g/L 농도의 후박 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 30%로 *E. coli*의 성장을 억제하였다.

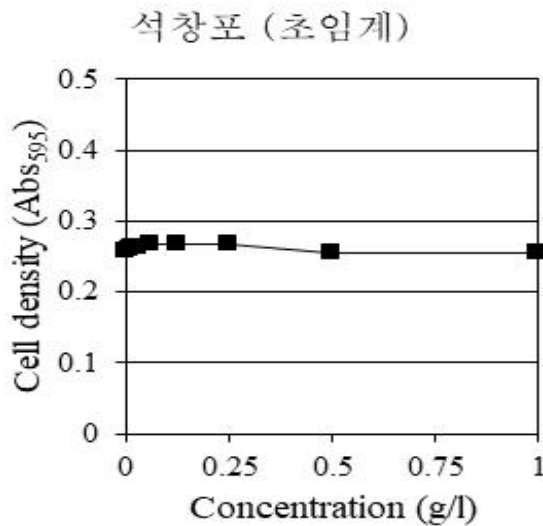


그림 106. 석창포 초임계 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 106는 석창포 초임계 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 106에 나타난 바와 같이, 석창포 초임계 추출물은 *E. coli*의 성장을 억제하지 않았다.

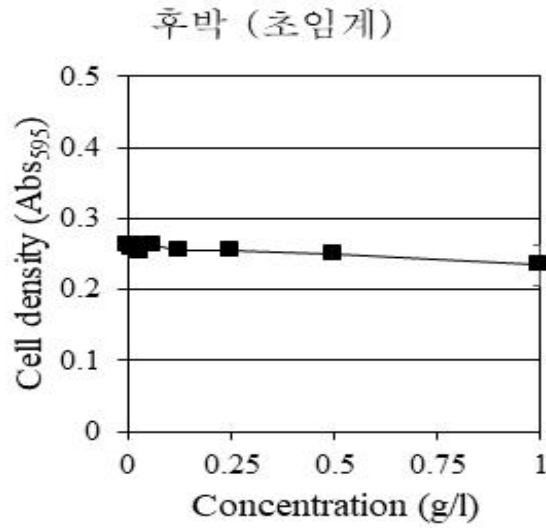


그림 107. 후박 초임계 추출물의 농도별 *E. coli*의 성장 관찰

그림 107는 후박 초임계 추출물의 농도에 따른 *E. coli*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 107에 나타난 바와 같이, 후박 초임계 추출물은 *E. coli*의 성장을 억제하지 않았다.



(3) *Pseudomonas aeruginosa*

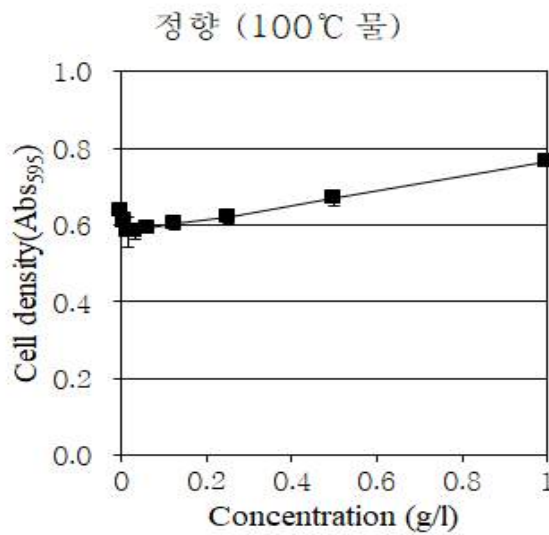


그림 108. 정향 열수 추출물의 농도별 *P. aeruginosa*의 성장 관찰

그림 108은 정향 열수 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 108에 나타난 바와 같이, 정향 열수 추출물은 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하지 않았다.

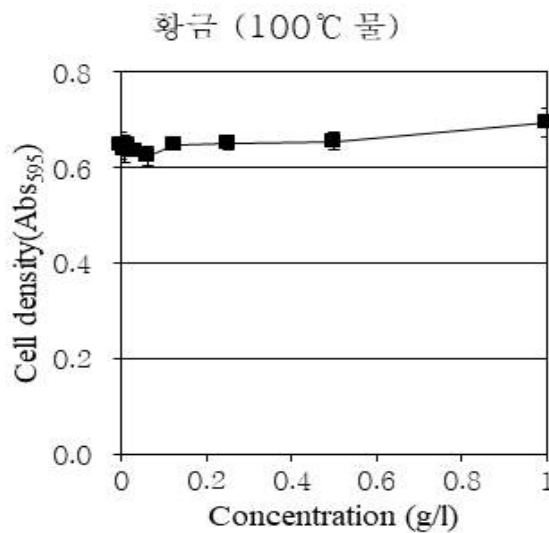


그림 109. 황금 열수 추출물의 농도별 *P. aeruginosa*의 성장 관찰

그림 109은 황금 열수 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 109에 나타난 바와 같이, 황금 열수 추출물은 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하지 않았다.

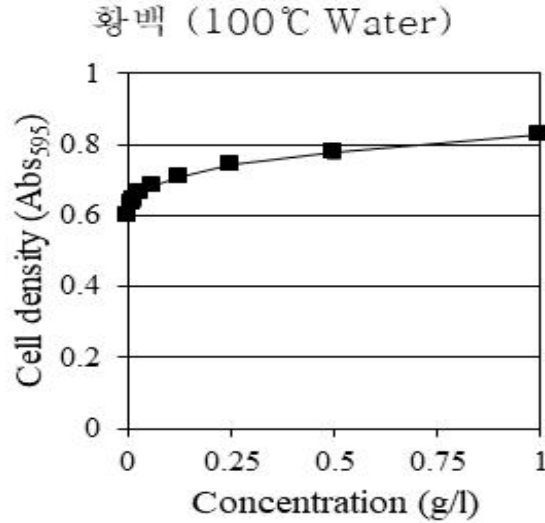


그림 110. 황백 열수 추출물의 농도별 *P. aeruginosa*의 성장 관찰

그림 110은 황백 열수 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 110에 나타난 바와 같이, 황백 열수 추출물은 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하지 않았다.

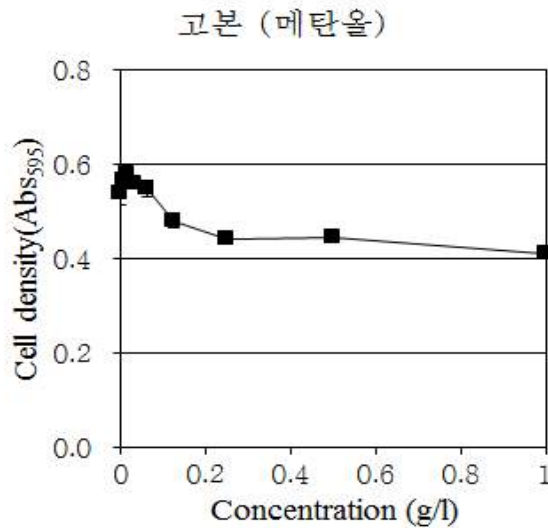


그림 111. 고본 메탄올 추출물의 농도별 *P. aeruginosa*의 성장 관찰

그림 111는 고본 메탄올 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 111에 나타난 바와 같이, 0.063g/L 농도 이전에는 *P. aeruginosa*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나, 0.125g/L 농도의 고본 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 11%의 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하였고, 1g/L 농도의 고본 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 24%의 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하였다.

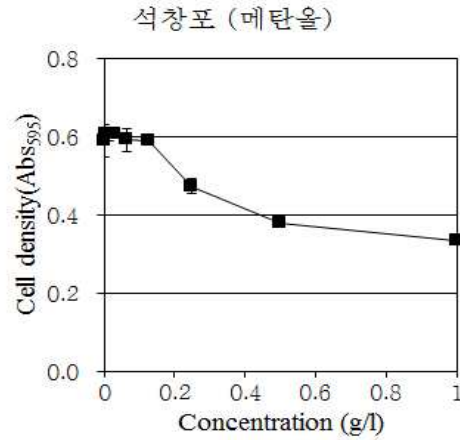


그림 112. 석창포 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 112은 석창포 메탄올 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 112에 나타난 바와 같이, 0.13g/L 농도 이전에는 *P. aeruginosa*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나 0.25g/L부터 농도가 증가할수록 *P. aeruginosa*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있었다. 0.25g/L의 석창포 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 20%의 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하였고, 1g/L 농도의 석창포 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 43%의 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하였다.

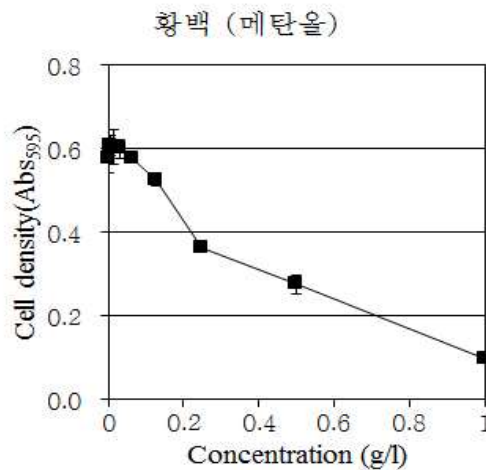


그림 113. 황백 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 113은 황백 메탄올 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 113에 나타난 바와 같이, 0.06g/L 농도 이전에는 *P. aeruginosa*의 성장 억제 효과가 나타나지 않았으나 0.13g/L부터 농도가 증가할수록 *P. aeruginosa*의 성장 억제 효과가 증가된다는 것을 확인할 수 있었다. 0.13g/L의 황백 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 19%의 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하였고, 최고 농도인 1g/L 농도의 황백 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 약 83%의 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하였다.

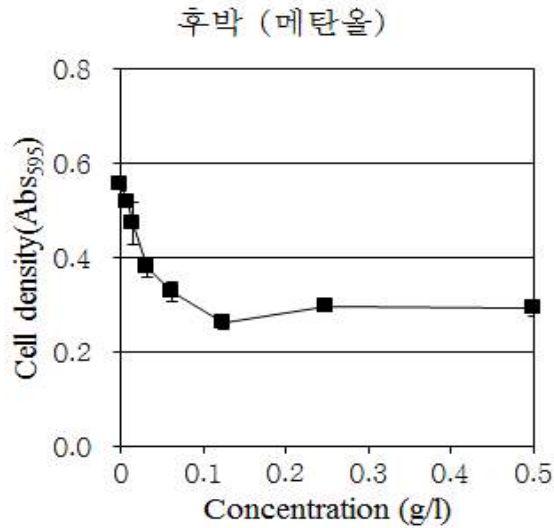


그림 114. 후박 메탄올 추출물의 농도별 균의 성장 관찰

그림 114는 후박 메탄올 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 114에 나타난 바와 같이, 0.125g/L 이전에는 농도가 증가함에 따라 *P. aeruginosa*의 생장이 점차 감소하다가 0.125g/L에서 0.5g/L 구간에서는 비슷한 *P. aeruginosa*의 성장 억제 효과를 나타내었다. 0.125g/L의 농도에서 대조군 대비 약 53%의 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하였고, 최고 농도인 0.5g/L 농도의 후박 메탄올 추출물 첨가 시 대조군 대비 47%로 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하였다.

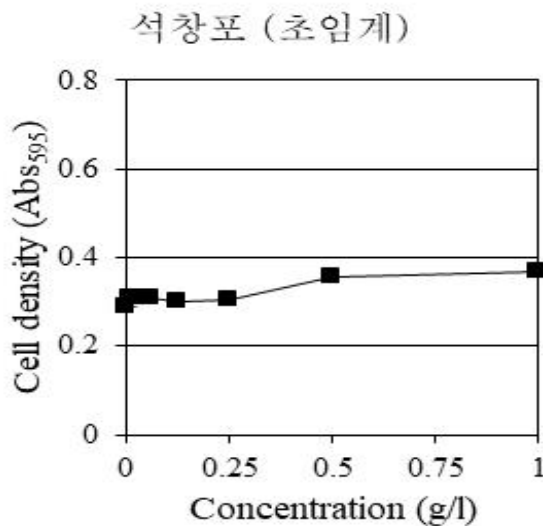


그림 115. 석창포 초임계 추출물의 농도별 *P. aeruginosa*의 성장 관찰

그림 115은 석창포 초임계 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 115에 나타난 바와 같이, 석창포 초임계 추출물은 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하지 않았다.

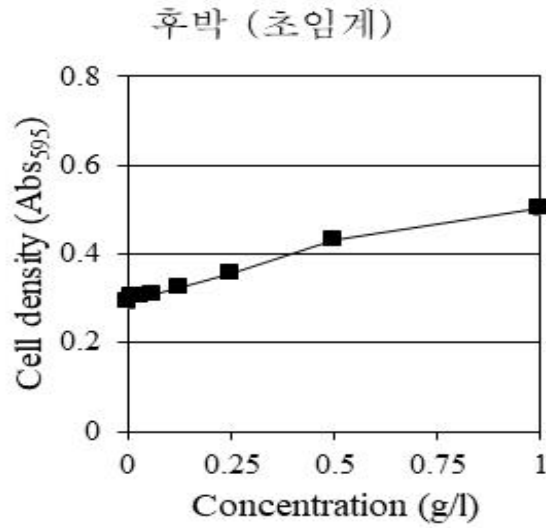


그림 116. 후박 초임계 추출물의 농도별 *P. aeruginosa*의 성장 관찰

그림 116는 후박 초임계 추출물의 농도에 따른 *P. aeruginosa*에 대한 성장 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸다. 그림 116에 나타난 바와 같이, 후박 초임계 추출물은 *P. aeruginosa*의 성장을 억제하지 않았다.

#### (4) 결론

*S. aureus*에 대하여 성장 억제 효과를 나타낸 추출물은 황백 메탄올 추출물, 후박 메탄올 추출물 및 석창포 초임계 추출물이다. 이 중에서 후박 메탄올 추출물은 0.125g/L에서 100%의 성장 억제 효과를 나타내었고, 황백 메탄올 추출물은 1g/L에서 97%, 석창포 초임계 추출물은 1g/L에서 68%의 성장 억제 효과를 나타내었다. 따라서 *S. aureus*에 대하여 후박 메탄올 추출물이 가장 낮은 농도에서 큰 성장 억제효과를 나타내며, 다음으로 황백 메탄올 추출물, 석창포 초임계 추출물 순서로 성장 억제 효과를 나타낸다.

*E. coli*에 대하여 성장 억제 효과를 나타낸 추출물은 황백 메탄올 추출물과 후박 메탄올 추출물이다. 이 중에서 후박 메탄올 추출물은 15.6mg/L에서 33%의 성장 억제 효과를 나타내었으며, 황백 메탄올 추출물은 1g/L에서 59%의 성장 억제 효과를 나타내었다. 따라서 *E. coli*에 대하여 후박 메탄올 추출물이 황백 메탄올 추출물보다 낮은 농도에서 같은 성장 억제 효과를 나타낼 수 있다.

*P. aeruginosa*에 대하여 성장 억제 효과를 나타낸 추출물은 고분 메탄올 추출물, 석창포 메탄올 추출물, 황백 메탄올 추출물, 후박 메탄올 추출물이다. 이 중에서 각각의 추출물을 0.5g/L 처리 했을 때 황백 메탄올 추출물은 52%, 석창포 메탄올 추출물은 36%, 후박 메탄올 추출물은 47%, 고분 메탄올 추출물은 17%로 *P. aeruginosa*의 성장 억제 효과를 나타내었다.

따라서 3가지 균주에 대해서 모두 성장 억제 효과를 나타낸 것은 황백 메탄올 추출물과 후박 메탄올 추출물이다.

#### 4. 추출물 조합에 의한 상승효과 관찰

##### 가. 연구 목적

앞선 연구를 통해 선별된 추출물들을 조합하여 진균류와 세균류에 대해 성장 억제 효과를 상승시키는 조합을 선별한다. 진균류에 대해서는 *C. albicans*를 시험 균주로 하며, 세균류에 대해서는 *S. aureus*와 *E. coli* 두 가지 균주를 시험 균주로 한다. 상승효과란 두 가지 추출물 조합의 효과가 단일 추출물의 항균 효과를 합한 것인 상가적 효과보다 우수한 항균 활성을 나타내는 것을 의미한다.

##### 나. 실험방법 및 재료

###### (1) 메탄올 A+B 추출물의 *C. albicans*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 방법

###### (가) 메탄올 추출물 시료의 준비

다음의 추출물 시료의 농도는 앞서 실험한 농도별 *C. albicans*에 대한 성장 관찰 그래프를 통해 *C. albicans*의 성장을 20%만큼 억제하는 메탄올 추출물의 농도를 선정하였다.

두 개의 추출물을 조합하여 추출물 간의 혼합에 따른 *C. albicans*에 대한 상승적인 항균 효과가 있는지를 살펴보았다. 추출물 A와 추출물 B를 혼합 시, 이 조합은 A+B 추출물이며 추출물 A만을 처리한 것(1x A)과 추출물 B만을 처리한 것(1x B), 추출물 A 농도의 2배만큼 처리한 것(2x A), 추출물 B 농도의 2배만큼 처리한 것(2x B)과 비교하여 그래프로 나타낸다.

선정된 각각의 추출물 농도에 맞게 추출물을 메탄올 1mL에 용해시켜 녹인 후 5분간 50°C의 물중탕을 통해 최대한 추출물이 용매에 용해되도록 한다. 불텍싱하여 충분히 용해시킨 후, 13,000rpm에서 10분간 원심분리 후 불용성 물질을 제외한 상등액을 취하여 실험에 이용하였다.

###### (나) 메탄올 A+B 추출물의 *C. albicans*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 방법

YPD 배지를 5mL씩 분주한 각각의 test tube에 1x A, 2x A, 1x B, 2x B, A+B 농도가 되도록 처리한다. 대조군으로는 메탄올을 배지 5mL의 1% 처리한 것(1x 농도의 대조군)과, 2% 처리한 것(2x 농도의 대조군)으로 하였다. 전배양한 배양액의 세포농도를 Abs<sub>600</sub>으로 측정하고 측정된 세포 농도 값을 이용하여 각각의 test tube에 Abs<sub>600</sub>=0.05가 되도록 접종한다. 이것을 26°C에서 18시간 배양하여 배양액을 spectrophotometer (Mecasys Co.의 Optizen2120uv)로 Abs<sub>600</sub>를 측정하고 메탄올 처리 대조군과 비교하여 세포 성장 정도를 비교한다. 1x A와 1x B는 메탄올을 1%처리한 대조군 대비 비율로, A+B 조합, 2x A, 2x B는 메탄올을 2% 처리한 대조군 대비 비율로 나타내었다.

###### (2) 열수 및 초임계 A+B 추출물의 *C. albicans*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 방법

###### (가) 열수 및 초임계 추출물 시료의 준비

선정된 용매의 추출물 농도에 따라 *C. albicans*에 대한 항진균 결과를 바탕으로 실험에 사용될 추출물 농도를 정하였다.

추출물의 농도가 2배가 되어도 성장 억제 효과가 50% 이상이 되지 않으면서 해당 농도에서도 성장 억제를 보이지 않는 농도를 정하였다.

정향 열수 추출물 0.005g/L, 황백 열수 추출물 0.156g/L, 후박 초임계 추출물 0.25g/L, 석창포

초임계 추출물 0.125g/L, 황금 열수 추출물 3.13mg/L, 고본 메탄올 추출물 0.89g/L, 후박 메탄올 추출물 0.06g/L, 석창포 메탄올 추출물 0.99g/L, 황백 메탄올 추출물 0.13g/L를 사용하여 추출물의 혼합에 따른 *C. albicans*에 대한 상승적인 항균 효과가 있는지를 살펴보았다.

1-2와 마찬가지로, 추출물 A와 추출물 B를 혼합 시, 이 조합은 A+B 추출물이며 추출물 A만을 처리한 것(1x A)과 추출물 B만을 처리한 것(1x B), 추출물 A 농도의 2배만큼 처리한 것(2x A), 추출물 B 농도의 2배만큼 처리한 것(2x B)과 비교하여 그래프로 나타낸다.

#### (나) 열수 및 초임계 A+B 추출물의 *C. albicans*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 방법

열수 및 초임계 추출물의 상승효과 관찰은 CLSI M27-A2 방법으로 진행하였다. *C. albicans* KCTC 7965 균주 스톱을 SDA 한천 플레이트에 획선도말(streaking)하여 35°C에서 2일간 배양하였다. 이후 단일 균집을 취하여 0.145mol/L 식염수에 현탁하고 15초 동안 볼텍싱하였다. 현탁액을 Optizen 2120uv spectrophotometer(Mecasys Co., 대한민국)를 이용해 530nm에서 흡광도를 측정하여 세포 밀도(cell density)가 0.5의 맥팔란드 탁도(McFarland standard)가 되는지 확인하고, 필요에 따라 0.5의 맥팔란드 탁도가 되도록 식염수를 첨가하였다. 0.5의 맥팔란드 탁도를 갖는 현탁액에 식염수를 첨가하여 100배 희석하고, 추가로 RPMI 1640 배지를 이용하여 10배 희석하여, 마이크로플레이트에 처리하기 직전 농도가  $1 \times 10^3$  내지  $5 \times 10^3$  CFU/mL이 되도록 희석한 *C. albicans* 균 현탁액을 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ L씩 분주하였다.

추출물을 *C. albicans* 균 현탁액이 분주되어 있는 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ L씩 분주하고 열수 추출물을 처리한 경우 RPMI 1640 배지를 대조군으로 하였고, 초임계 추출물을 처리한 경우 초임계 추출물에는 0.25% tween 20이 포함되어 있으므로 0.25% tween 20이 포함된 RPMI 1640 배지를 대조군으로 하여 *C. albicans*의 대조군에 대한 상대적인 성장률을 백분율로 계산하였다.

상기와 같이 *C. albicans* 균 및 추출물이 분주된 마이크로플레이트를 35°C에서 48시간 두어 배양 후 가라앉는 균을 피펫팅하여 현탁시키고 마이크로플레이트 리더(Dynex Opsys MRTM Microplate Reader)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 이를 *C. albicans*의 세포 밀도(cell density)로 나타내었다. 이 세포 밀도 값은 *C. albicans*의 증식 또는 성장 결과를 반영한다.

상대적인 균주의 성장률(Relative cell density, %)는 하기 수학적 식 1에 의해 계산하고 그 결과 값을 표에 기재하였다.

#### (3) A+B 추출물의 *S. aureus*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 방법

*S. aureus*에 대한 항균 효과를 살펴보기 위하여, 변형된 CLSI M27-A2 방법에 따라 추출물 처리 시 *S. aureus*의 세포 밀도를 살펴보았다.

##### (가) 추출물 시료의 준비

추출물 농도는 배지에 추출물을 처리하였을 때 추출물에 의해 혼탁도가 나타나지 않는 범위 내에서 최대의 농도로 처리하였다. 정향 열수 추출물 0.5g/L, 후박 초임계 추출물 0.5g/L, 황금 열수 추출물 0.5g/L, 석창포 초임계 추출물 0.25g/L, 석창포 메탄올 추출물 0.5g/L, 황백 메탄올 추출물 0.25g/L를 사용하여 추출물의 혼합에 따른 *S. aureus*에 대한 상승적인 항균 효과가 있는지를 살펴보았다.

##### (나) A+B 추출물의 *S. aureus*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 방법



전배양한 *S. aureus* 균을 spectrophotometer로 600nm에서 측정하여 흡광도(ABS) 값이 0.1이 되도록 TSB 배지를 첨가하여 희석한 후에 *S. aureus* 균 현탁액을 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 추출물 처리 시, 최종 처리 농도가 3-1에 기재된 농도가 되도록 추출물 A+B 혼합물 100 $\mu$ L, 추출물 A 50 $\mu$ L와 배지 TSB 50 $\mu$ L 혼합물(1x A)(총 100 $\mu$ L), 추출물 B 50 $\mu$ L와 배지 TSB 50 $\mu$ L 혼합물(1x B)(총 100 $\mu$ L)을 각각 *S. aureus* 균 현탁액이 분주된 마이크로플레이트에 분주하였다.

상기와 같이 *S. aureus* 균 및 추출물이 분주된 마이크로플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 두어 배양 후 가라앉는 균을 피펫팅하여 현탁시키고 마이크로 플레이트 리더(Dynex Opsys MR™ Microplate Reader)로 595nm에서 흡광도를 측정하여, *S. aureus*의 세포 밀도를 살펴보고, *S. aureus*의 성장률을 계산하여 추출물 A+B의 *S. aureus*에 대한 항균 효과를 살펴보았다. 실험에 사용한 각 추출물의 농도 및 *S. aureus*의 성장률을 표 에 기재하였다.

#### (4) A+B 추출물의 *E. coli*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 방법

*E. coli*에 대한 항균 효과를 살펴보기 위하여, 변형된 CLSI M27-A2 방법에 따라 추출물 처리 시 *E. coli*의 세포 밀도를 살펴보았다.

##### (가) 추출물 시료의 준비

추출물 농도는 배지에 추출물을 처리하였을 때 추출물에 의해 혼탁도가 나타나지 않는 범위 내에서 최대의 농도로 처리하였다. 정향 열수 추출물 0.5g/L, 황백 열수 추출물 0.5g/L, 석창포 메탄올 추출물 0.5g/L, 황백 메탄올 추출물 0.25g/L를 사용하여 추출물의 혼합에 따른 *E. coli*에 대한 상승적인 항균 효과가 있는지를 살펴보았다.

##### (나) A+B 추출물의 *E. coli*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 방법

전배양한 *E. coli* 균을 spectrophotometer로 600nm에서 측정하여 흡광도(ABS) 값이 0.1이 되도록 NB 배지를 첨가하여 희석한 후에 *E. coli* 균 현탁액을 마이크로플레이트에 각각 100 $\mu$ L씩 분주하였다. 추출물 처리 시, 최종 처리 농도가 3-1에 기재된 농도가 되도록 추출물 A+B 혼합물 100 $\mu$ L, 추출물 A 50 $\mu$ L와 배지 NB 50 $\mu$ L 혼합물(1x A)(총 100 $\mu$ L), 추출물 B 50 $\mu$ L와 배지 NB 50 $\mu$ L 혼합물(1x B)(총 100 $\mu$ L)을 각각 *E. coli* 균 현탁액이 분주된 마이크로플레이트에 분주하였다.

상기와 같이 *E. coli* 균 및 추출물이 분주된 마이크로플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 두어 배양 후 가라앉는 균을 피펫팅하여 현탁시키고 마이크로 플레이트 리더(Dynex Opsys MR™ Microplate Reader)로 595nm에서 흡광도를 측정하여, *E. coli*의 세포 밀도를 살펴보고, *E. coli*의 성장률을 계산하여 추출물 A+B의 *E. coli*에 대한 항균 효과를 살펴보았다. 실험에 사용한 각 추출물의 농도 및 *E. coli*의 성장률을 표 에 기재하였다.

#### (5) 성장률 계산법 및 상승효과 판단의 기준

상대적인 균주의 성장률(Relative cell density, %)는 하기 수학적 식 1에 의해 계산하고 그 결과 값을 표에 기재하였다.

(수학적 식 1). 상대적인 균주의 성장률(%) = (추출물 첨가 시 세포 밀도 / 대조군의 세포 밀도) X 100

임의의 추출물 A와 추출물 B를 혼합 시 추출물 A를 처리했을 때의 미생물의 성장률(%)을 a라 하고, 추출물 B를 처리했을 때의 성장률(%)은 b라 할 때, 기대 성장률(%)은 하기 수학적 식 2에

의해 계산되었다.

(수학식 2). 기대 성장률(%) =  $(a \times b) / 100$

A 추출물 및 B 추출물을 포함하는 조성물을 처리했을 때의 성장률(%)을 A+B라 할 때, A+B의 값이 상기 수학식 2에 의하여 계산된 기대 성장률 보다 낮으면, 미생물의 성장 또는 증식을 예상보다 억제하였으므로, 추출물의 혼합에 의해 상승적인 항균 효과가 있는 것으로 판단한다.

다. 결과 및 고찰

(1)가. 메탄올 A+B 추출물의 *C. albicans*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 결과

메탄올 추출물 농도별 그래프를 통해 *C. albicans*의 성장을 20%만큼 억제하는 11개 추출물을 두 개씩 혼합하여 상승효과의 여부를 관찰하였다. 그 중에서 상승효과를 나타낸 4개의 추출물 조합을 결과로 제시하였다.

(가) 정향 + 황백

정향 추출물은 농도별 그래프에 선형 추세선을 그려서 *C. albicans*의 성장이 20%만 억제될 때의 농도를 계산하여 선정하였다. 정향 추출물의 경향식은  $y = -152.01x + 98.194$ 이며,  $y$ 값이 80되게 하는  $x$ 값은 0.12이다. 따라서 정향 추출물은 0.12g/L의 농도로 처리하였다.

황백 추출물은 농도 0.13g/L에서 *C. albicans*의 성장이 17.84% 억제되었으므로 상승효과를 관찰하기 위해 0.13g/L의 농도로 처리하였다.

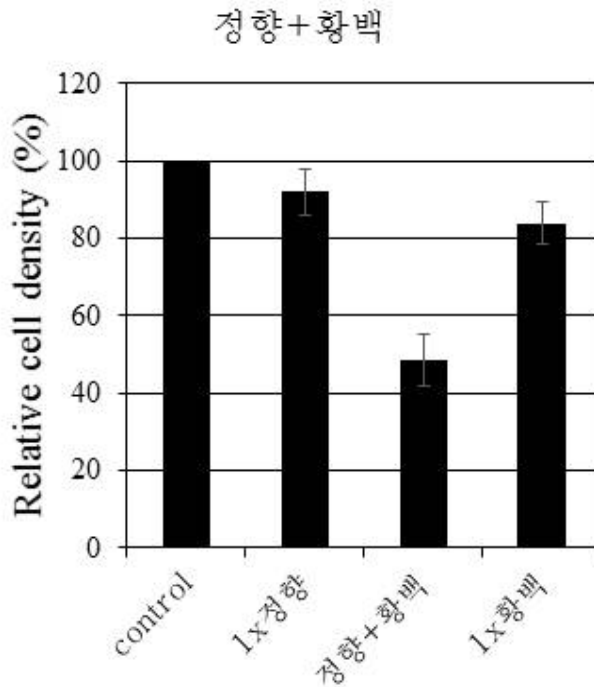


그림 117. 정향 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *C. albicans* 성장률(%)

표 12. 정향 메탄올 추출물과 황백 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *C. albicans*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>C. albicans</i> 성장률(%)
정향 메탄올 추출물	0.12	92
황백 메탄올 추출물	0.13	84
정향 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합	0.12(정향)+0.13(황백)	49

그림 117에 나타난 바와 같이 정향 메탄올 추출물과 황백 메탄올 추출물을 단독으로 각각 처리한 경우 대조군 대비 정향 추출물은 8%, 황백 추출물은 16%로 *C. albicans*의 성장을 억제하였다.

이때 (수학식 2)에 기재된 방법으로 기대 성장률을 계산하면, 77.28%이다. 이에 비해 정향 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물을 혼합하여 처리 시에 대조군 대비 약 51%의 *C. albicans* 성장 억제 효과를 보였다. 이 때의 A+B값은 49%로, 기대 성장률 대비 약 36.6%의 *C. albicans*의 생장이 억제 되었으므로 정향 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 의하여 우수한 상승적(synergistic)인 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

상기와 같은 결과로부터 정향 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물을 처리 시 정향 추출물 및 황백 추출물을 개별적으로 처리하였을 때보다, 각각 6배, 3배의 *C. albicans*에 대해 성장 억제 효과가 있는 것을 알 수 있다.

(나) 정향 + 후박

정향 추출물은 농도별 그래프에 선형 추세선을 그려서 *C. albicans*의 성장이 20%만 억제될 때의 농도를 계산하여 선정하였다. 정향 추출물의 경향식은  $y = -152.01x + 98.194$ 이며,  $y$ 값이 80되게 하는  $x$ 값은 0.12이다. 따라서 정향 추출물은 0.12g/L의 농도로 처리하였다.

후박 추출물은 농도 0.06g/L에서 *C. albicans*의 성장이 22.44% 억제되었으므로 상승효과를 관찰하기 위해 0.06g/L의 농도로 처리하였다.

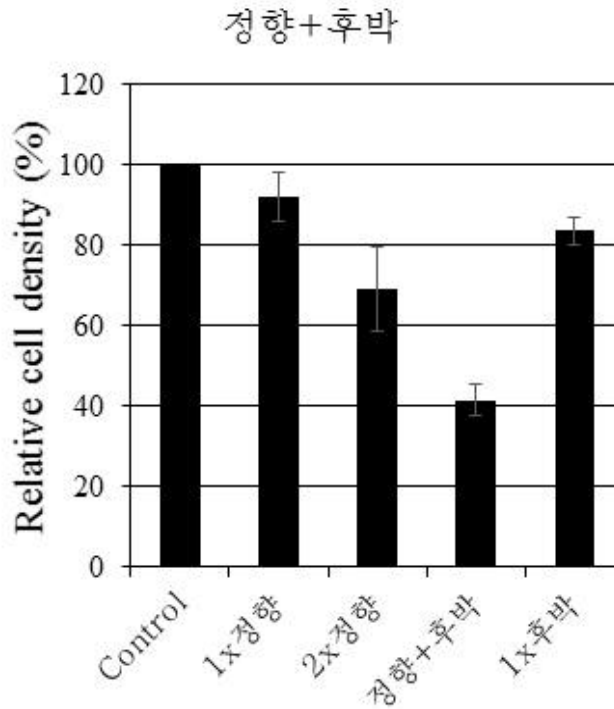


그림 118. 정향 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *C. albicans* 성장률(%)

표 13. 정향 메탄올 추출물과 후박 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *C. albicans*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>C. albicans</i> 성장률(%)
1x 정향 메탄올 추출물	0.12	92
2x 정향 메탄올 추출물	0.24	69
1x 후박 메탄올 추출물	0.06	84
정향 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물의 혼합	0.12(정향)+0.06(후박)	42

그림 118에 나타난 바와 같이 정향 메탄올 추출물과 후박 메탄올 추출물을 단독으로 각각 처리한 경우 대조군 대비 정향 추출물은 8%, 후박 추출물은 16%로 *C. albicans*의 성장을 억제하였다. (수학식 2)에 기재된 방법으로 기대 성장률을 계산하면, 77.28%이다. 이에 비해 정향 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물을 혼합하여 처리 시에 대조군 대비 약 58%의 *C. albicans* 성장 억제 효과를 보였다. 상기와 같은 결과로부터 정향 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물을 혼합하여 처리 시 정향 추출물 및 후박 추출물을 개별적으로 처리하였을 때보다, 각각 7배, 3.5배의 *C. albicans*에 대해 성장 억제 효과가 있는 것을 알 수 있고, 이 때의 A+B값은 42%로, 기대 성장률 대비 약 45.7%의 *C. albicans*의 생장이 억제 되었으므로 정향 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물의 우수한 상승적(synergistic)인 항균 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

더욱이, 정향 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물의 혼합에 따른 추출물의 농도 증가에 의하여 항균활성이 나타날 수 있으나 정향 메탄올 추출물의 농도를 2배 증가(0.24g/L)시켜 처리하였을 경우, 대조군 대비 31% 성장 억제 효과가 관찰되었고, 정향 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물을 혼합하여 처리 시 정향 단일 추출물의 농도를 2배(0.24g/L)로 처리하였을 때보다, 약 1.9배 정도 *C. albicans* 성장 억제 효과가 증가되었음을 확인할 수 있었다.

(다) 고분 + 후박

고분 추출물은 그래프에 선형 추세선을 그려서 *C. albicans*의 성장이 20%만 억제될 때의 농도를 계산하여 선정한다. 고분 추출물의 경향식은  $y = -21.601x + 99.454$ 이며,  $y$ 값이 80되게 하는  $x$ 값은 0.90이다. 따라서 고분 추출물은 0.9g/L의 농도로 처리하였다.

후박 추출물은 농도 0.06g/L에서 *C. albicans*의 성장이 22.44% 억제되었으므로 상승효과를 관찰하기 위해 0.06g/L의 농도로 처리하였다.

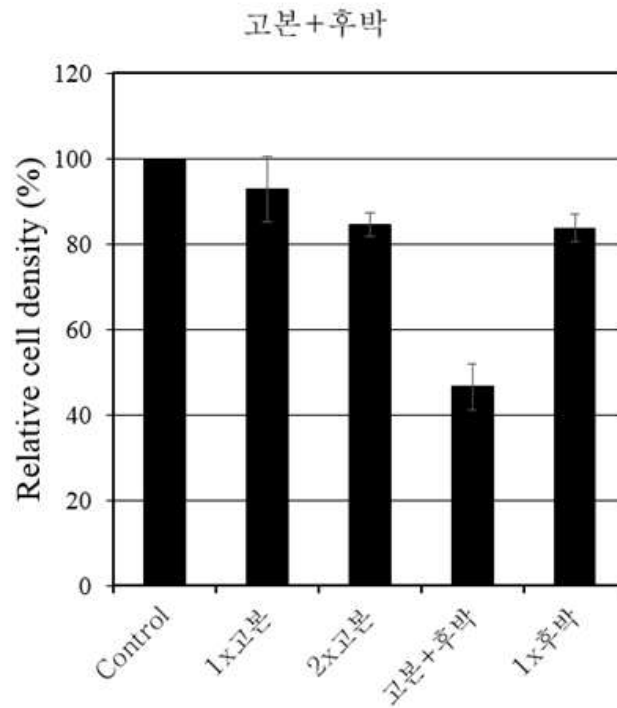


그림 119. 고분 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *C. albicans* 성장률(%)

표 14. 고분 메탄올 추출물과 후박 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *C. albicans*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>C. albicans</i> 성장률(%)
1x 고분 메탄올 추출물	0.89	93
2x 고분 메탄올 추출물	1.76	84
1x 후박 메탄올 추출물	0.06	84
고분 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물	0.89(고분)+0.06(후박)	47

그림 119에 나타난 것과 같이, 고분 추출물과 후박 추출물을 각각 처리한 경우 대조군 대비 고분은 7%, 후박은 16%로 *C. albicans*의 성장을 억제하였다. 고분 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물 포함하는 조성물 처리 시 53%의 *C. albicans*의 성장 억제 효과를 나타냈으며, 이때의 A+B는 46%으로 기대 성장률 대비 약 41.1%의 *C. albicans*의 생장이 억제 되었으므로 고분 메탄올 추출물 및 후박 메탄올 추출물의 혼합에 의하여 *C. albicans*에 대해 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

더욱이, 표 14 및 그림 119에 나타난 바와 같이 고분 메탄올 추출물을 2배 농도(1.76g/L)로 처리했을 때(16%의 *C. albicans* 성장 억제 효과)보다도 고분 메탄올 추출물(0.89g/L) 및 후박 메탄올 추출물(0.06g/L)을 포함하는 조성물이 우수한 효과 (53%의 *C. albicans* 성장 억제 효과)를 나타낸다.

따라서, 이로부터 고분 메탄올 추출물과 후박 메탄올 추출물의 혼합은 우수한 상승적인 항균 효과가 존재하고, 낮은 농도에서도 효과적으로 *C. albicans*의 성장 또는 증식 억제 효과를 갖는 것을 알 수 있다.



(라) 석창포 + 황백

정향 추출물은 농도별 그래프에 선형 추세선을 그려서 *C. albicans*의 성장이 20%만 억제될 때의 농도를 계산하여 선정하였다. 정향 추출물의 경향식은  $y = -152.01x + 98.194$ 이며,  $y$ 값이 80되게 하는  $x$ 값은 0.12이다. 따라서 정향 추출물은 0.12g/L의 농도로 처리하였다.

황백 추출물은 농도 0.13g/L에서 *C. albicans*의 성장이 17.84% 억제되었으므로 상승효과를 관찰하기 위해 0.13g/L의 농도로 처리하였다.

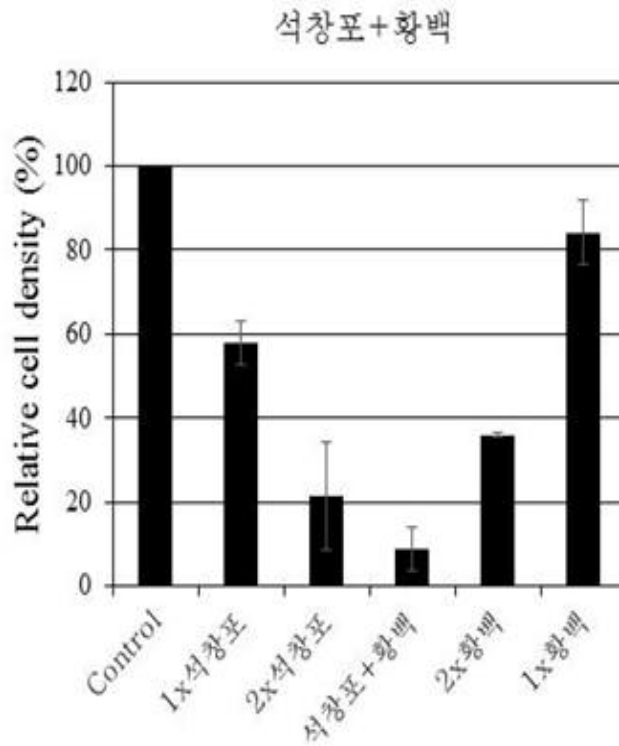


그림 120. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *C. albicans* 성장률(%)

표 15. 석창포 메탄올 추출물과 황백 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *C. albicans*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>C. albicans</i> 성장률(%)
1x 석창포 메탄올 추출물	0.99	58
2x 석창포 메탄올 추출물	1.96	22
1x 황백 메탄올 추출물	0.13	84
2x 황백 메탄올 추출물	0.25	36
석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합	0.99(석창포)+ 0.13 (황백)	9

그림 120에 나타난 바와 같이, 석창포 메탄올 추출물(0.99g/L)은 대조군 대비 *C. albicans* 성장을 42% 억제하고, 황백 메탄올 추출물(0.13g/L)은 대조군 대비 *C. albicans* 성장을 16% 억제하였고, 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물을 혼합한 조성물을 처리 시 대조군 대비 91%의 *C. albicans* 성장 억제 효과를 보였다. 이 때의 A+B값은 9%로서 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 따른 기대 성장률 대비 약 81.5%의 *C. albicans*의 생장이 억제 되었으므로 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 의하여 *C. albicans*에 대해 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

더욱이, 표 15 및 그림 120에 나타난 바와 같이 석창포 메탄올 추출물을 2배 농도(1.96g/L)로 처리했을 때(78%의 *C. albicans* 성장 억제)와 황백 메탄올 추출물을 2배 농도(0.25g/L)로 처리했을 때(64%의 *C. albicans* 성장 억제)보다도 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물을 혼합한 조성물이 우수한 *C. albicans* 성장 억제 효과를 나타낸다.

따라서, 이로부터 석창포 메탄올 추출물과 황백 메탄올 추출물의 혼합은 우수한 상승적(synergistic)인 항균 효과가 존재하고, 낮은 농도에서도 효과적으로 *C. albicans*의 성장 또는 증식 억제 효과를 갖는 것을 알 수 있다.

(2) 열수 및 초임계 A+B 추출물의 *C. albicans*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 결과  
 (가) 정향 + 황백

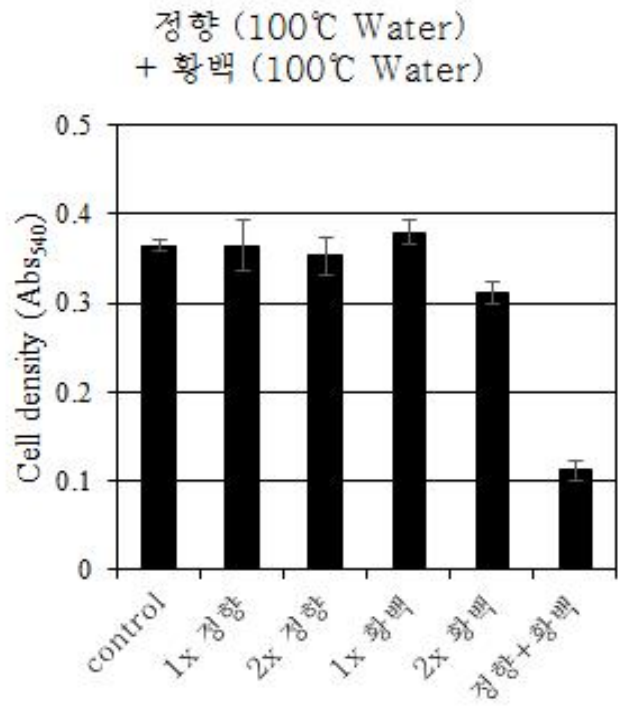


그림 121. 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 *C. albicans* 세포 밀도

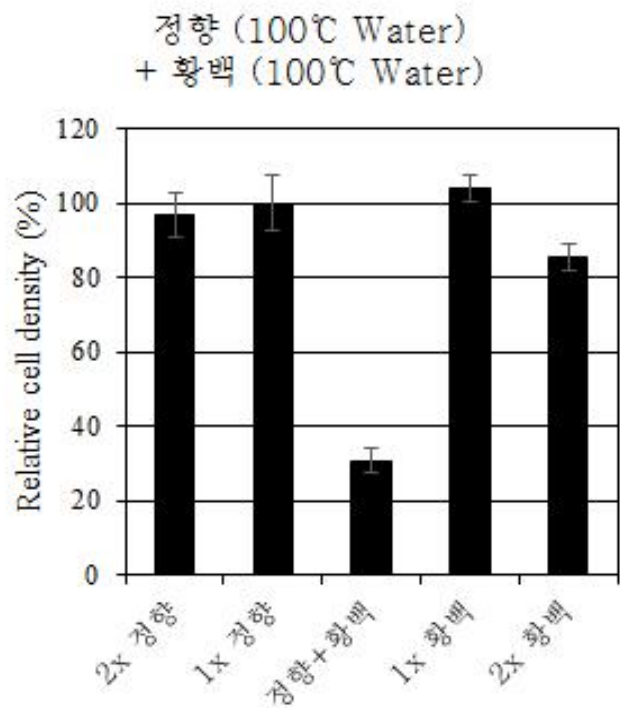


그림 122. 대조군 대비 각 추출물 첨가 시 *C. albicans* 성장률(%)

표 16. 정향 열수 추출물과 황백 열수 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *C. albicans*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>C. albicans</i> 성장률(%)
1x 정향 열수 추출물	0.005	99.9
2x 정향 열수 추출물	0.01	96.8
1x 황백 열수 추출물	0.156	104.1
2x 황백 열수 추출물	0.313	85.3
정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물의 혼합	0.005(정향)+ 0.156(황백)	31

그림 121과 그림 122에 나타난 바와 같이, 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물은 대조군 대비 *C. albicans* 성장 억제 효과를 나타내지 않는다. 반면, 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물을 혼합한 조성물을 처리 시 대조군 대비 약 69%의 *C. albicans* 성장 억제 효과를 보였다. 이때의 A+B값은 31%로, 기대 성장률 대비 약 70.2%의 *C. albicans*의 생장이 억제 되었으므로 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물의 혼합에 의하여 *C. albicans*에 대해 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

더욱이, 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물은 *C. albicans*에 대해 성장 억제 효과를 보이지 않고, 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물의 혼합에 따른 추출물의 농도 증가에 의하여 항균활성이 나타날 수 있으나, 표 , 그림 및 그림 에 나타난 바와 같이 정향 열수 추출물을 2배 농도(0.01g/L)로 처리했을 때와 황백 열수 추출물을 2배 농도(0.313g/L)로 처리했을 때보다도 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물을 혼합한 조성물이 4배 정도 우수한 *C. albicans* 성장 억제 효과를 나타낸다.

따라서, 이로부터 정향 열수 추출물과 황백 열수 추출물의 혼합은 우수한 상승적(synergistic)인 항균 효과가 존재하고, 낮은 농도에서도 효과적으로 *C. albicans*의 성장 또는 증식 억제 효과를 갖는 것을 알 수 있다.

(나) 정향 + 후박

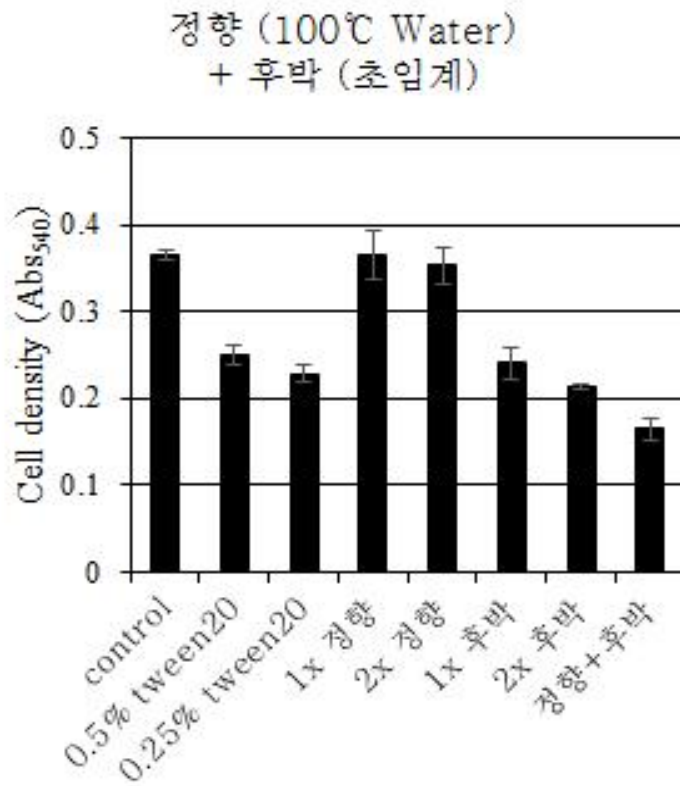


그림 123. 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 *C. albicans* 세포 밀도

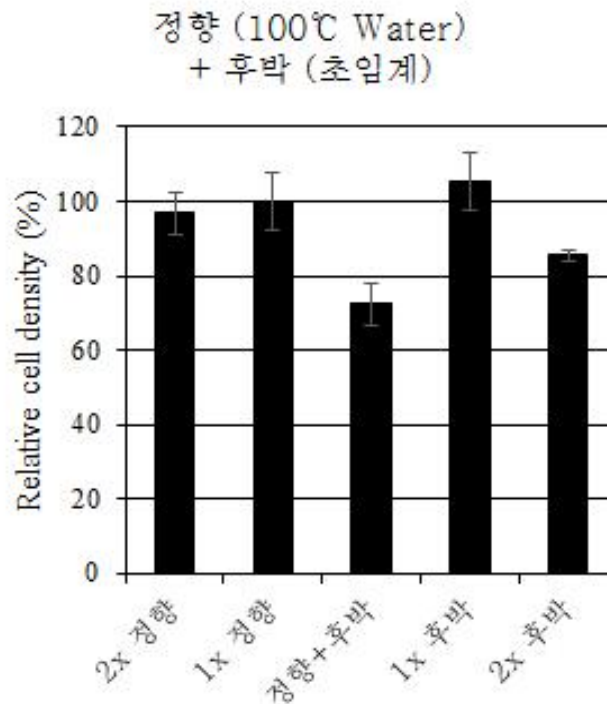


그림 124. 대조군 대비 각 추출물 첨가 시 *C. albicans* 성장률(%)

표 17. 정향 열수 추출물과 후박 초임계 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *C. albicans*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>C. albicans</i> 성장률(%)
1x 정향 열수 추출물	0.005	99.9
2x 정향 열수 추출물	0.01	96.8
1x 후박 초임계 추출물	0.25	105.3
2x 후박 초임계 추출물	0.5	85.5
정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물의 혼합	0.005(정향)+0.25(후박)	73

그림 123 및 그림 124에 나타난 바와 같이, 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물은 대조군 대비 *C. albicans* 성장 억제 효과를 나타내지 않는다. 반면, 후박 초임계 추출물과 정향 열수 추출물을 혼합한 조성물 처리 시 대조군 대비 약 27%의 *C. albicans* 성장 억제 효과를 보였다. 이때의 A+B값은 73%로, 기대 성장률 대비 약 30.6%의 *C. albicans*의 생장이 억제 되었으므로 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물의 혼합에 의하여 *C. albicans*에 대해 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

더욱이, 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물은 *C. albicans*에 대해 성장 억제 효과를 보이지 않고, 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물의 혼합에 따른 추출물의 농도 증가에 의하여 항균활성이 나타날 수 있으나, 표 17, 그림 121 및 그림 122에 나타난 바와 같이 정향 열수 추출물을 2배 농도(0.01g/L)로 처리했을 때와 후박 초임계 추출물을 2배 농도(0.5g/L)로 처리했을 때보다도 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물 혼합한 조성물이 우수한 *C. albicans* 성장 억제 효과를 나타낸다.

따라서, 이로부터 정향 열수 추출물과 후박 초임계 추출물의 혼합은 우수한 상승적인 항균 효과가 존재하고, 낮은 농도에서도 효과적으로 *C. albicans*의 성장 또는 증식 억제 효과를 갖는 것을 알 수 있다.

(다) 황금 + 석창포

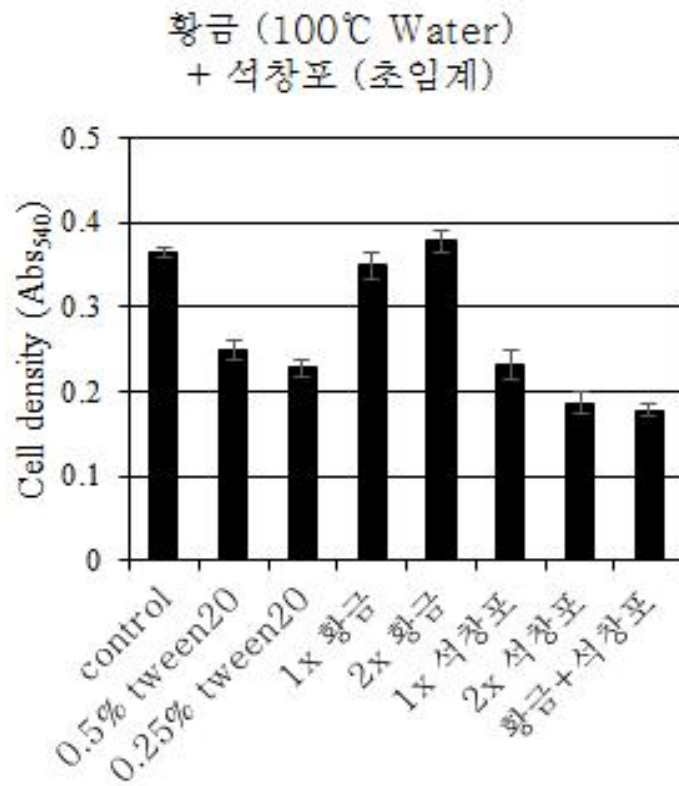


그림 125. 황금 열수 추출물 및 석창포 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 *C. albicans* 세포 밀도

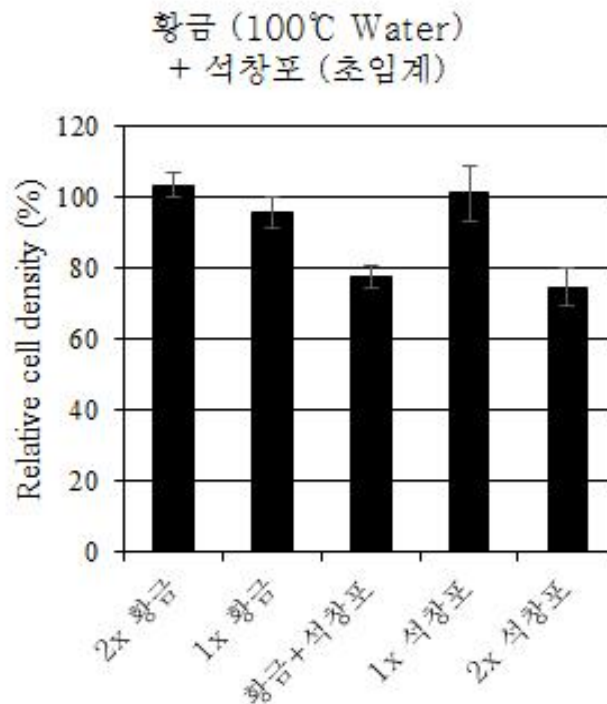


그림 126. 대조군 대비 각 추출물 첨가 시 *C. albicans* 성장률(%)

표 18. 황금 열수 추출물과 석창포 초임계 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *C. albicans*의 성장률

추출물	농도	<i>C. albicans</i> 성장률(%)
1x 석창포 초임계 추출물	0.125g/L	101.3
2x 석창포 초임계 추출물	0.25g/L	74.7
1x 황금 열수 추출물	3.13mg/L	95.7
2x 황금 열수 추출물	6.25mg/L	103.4
석창포 초임계 추출물 및 황금 열수 추출물의 혼합	0.125g/L(석창포)+ 3.13mg/L(황금)	77.9

그림 125 및 그림 126에 나타난 바와 같이, 석창포 초임계 추출물은 대조군 대비 *C. albicans*의 성장 억제효과를 보이지 않았고, 황금 열수 추출물은 대조군 대비 4.3% *C. albicans*의 성장을 억제하였다. 이로부터 계산된 기대 성장률은 96.9%이다. 석창포 초임계 추출물과 황금 열수 추출물을 포함하는 조성물을 첨가 시 약 20% *C. albicans*의 성장 억제 효과를 보였고, 이때의 A+B 값은 77.9%로, 기대 성장률보다 19.6% 더 *C. albicans*의 성장 억제 효과가 나타났다. 따라서 석창포 초임계 추출물 및 황금 열수 추출물의 혼합에 의하여 *C. albicans*에 대해 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

더욱이, 표 18, 그림 125 및 그림 126에 나타난 바와 같이 황금 열수 추출물을 2배 농도(6.25mg/L)로 처리했을 때보다도 석창포 초임계 추출물(0.125g/L) 및 황금 열수 추출물(3.13mg/L)을 포함하는 조성물이 25.5% 더 우수한 *C. albicans* 성장 억제 효과를 나타낸다.

따라서, 이로부터 황금 열수 추출물과 석창포 초임계 추출물의 혼합은 우수한 상승적인 항균 효과가 존재하고, 낮은 농도에서도 효과적으로 *C. albicans*의 성장 또는 증식 억제 효과를 갖는 것을 알 수 있다.



(3) A+B 추출물의 *S. aureus*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 결과  
 (가) 정향 + 후박

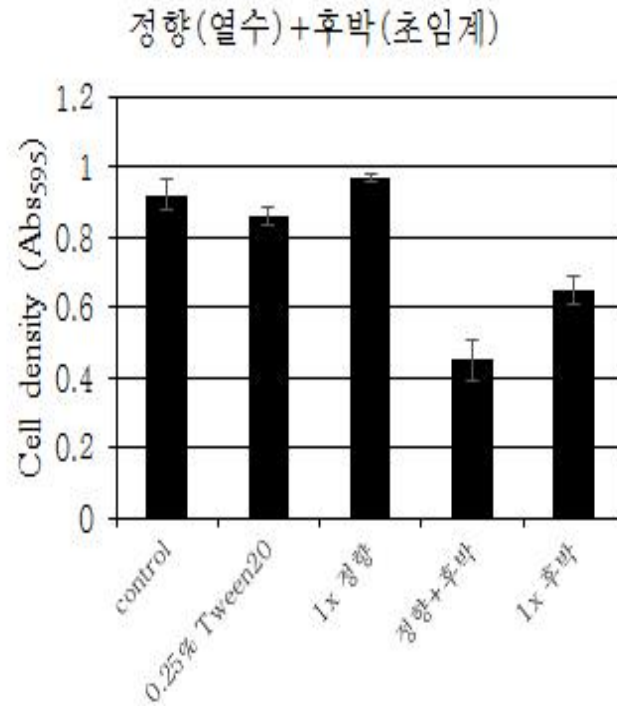


그림 127. 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 *S. aureus* 세포밀도

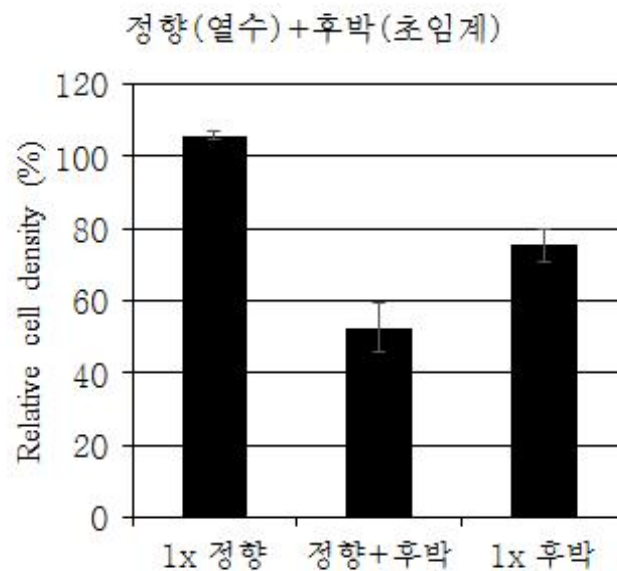


그림 128. 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *S. aureus* 성장률(%)

표 19. 정향 열수 추출물과 후박 초임계 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *S. aureus*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>S. aureus</i> 성장률(%)
1x 정향 열수 추출물	0.5	105.6
1x 후박 초임계 추출물	0.5	75.4
정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물의 혼합	0.5(정향)+0.5(후박)	52.7

기재된 방법으로 상대적인 균주 성장률 및 기대 성장률을 계산하였다. 정향 열수 추출물 처리 시 *S. aureus*의 성장률은 105.6%이며, 후박 초임계 추출물 처리 시 *S. aureus*의 성장률은 75.4%이다. 따라서 이 두 가지 추출물을 혼합했을 때의 기대 성장률은 79.6%이다. 실험 결과 정향과 후박 추출물을 혼합하였을 때의 성장률은 52.7%이므로, 기대 성장률 대비 약 33.8%의 *S. aureus* 생장이 억제되었으므로 정향 열수 추출물 및 후박 초임계 추출물의 혼합에 의하여 *S. aureus*에 대해서도 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

(나) 황금 + 석창포

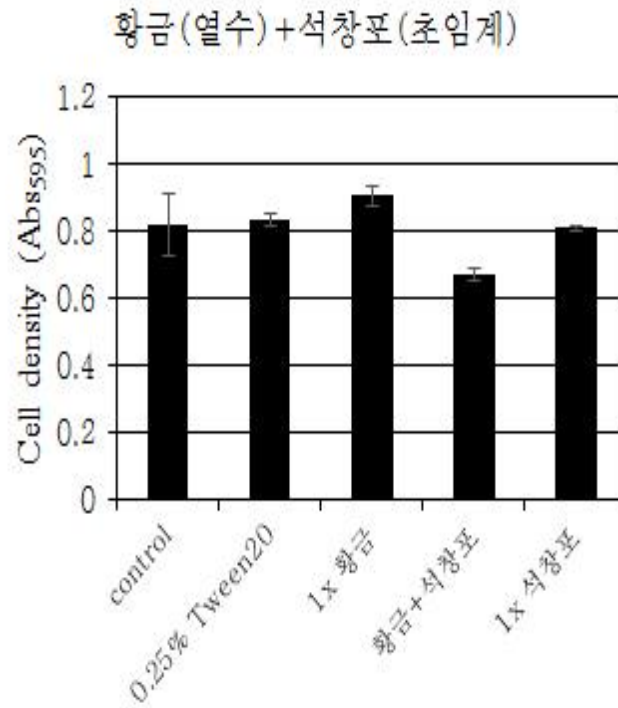


그림 129. 황금 열수 추출물 및 석창포 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 *S. aureus* 세포밀도

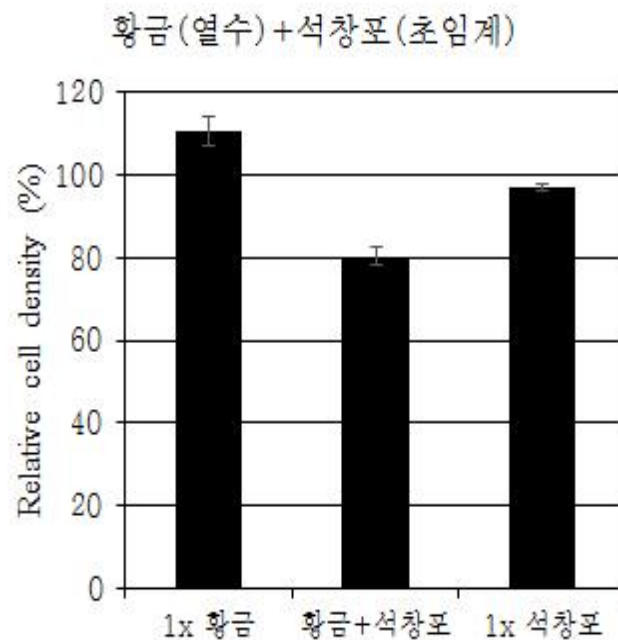


그림 130. 황금 열수 추출물 및 석창포 초임계 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *S. aureus* 성장률(%)

표 20. 황금 열수 추출물과 석창포 초임계 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *S. aureus*의 성장률

추출물	농도(g/L)	<i>S. aureus</i> 성장률(%)
1x 석창포 초임계 추출물	0.25	96.9
1x 황금 열수 추출물	0.5	110.2
석창포 초임계 추출물 및 황금 열수 추출물	0.25(석창포)+0.5(황금)	80.3

기재된 방법으로 상대적인 균주 성장률 및 기대 성장률을 계산하였다. 석창포 초임계 추출물 처리 시 *S. aureus*의 성장률은 96.9%이며, 황금 열수 추출물 처리 시 *S. aureus*의 성장률은 110.2%이다. 황금 열수 추출물을 개별적으로 처리 시 *S. aureus*의 성장 또는 증식을 전혀 억제시키지 못하였다. 석창포 초임계 추출물 및 황금 열수 추출물을 혼합했을 때의 기대 성장률은 106.8%이고, 실험 결과 석창포와 황금 추출물을 혼합한 조성물의 처리 시 *S. aureus*의 성장률은 80.3%이므로, 기대 성장률 대비 약 24.8% 정도 *S. aureus*의 생장이 억제되었으므로 석창포 초임계 추출물 및 황금 열수 추출물의 혼합에 의하여 *S. aureus*에 대해서도 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

(다) 석창포 + 황백

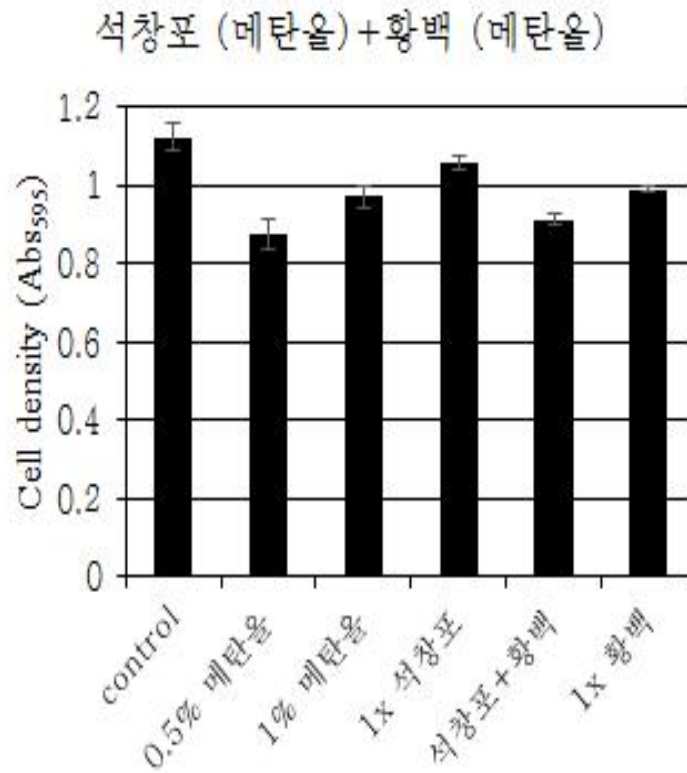


그림 131. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 *S. aureus* 세포밀도

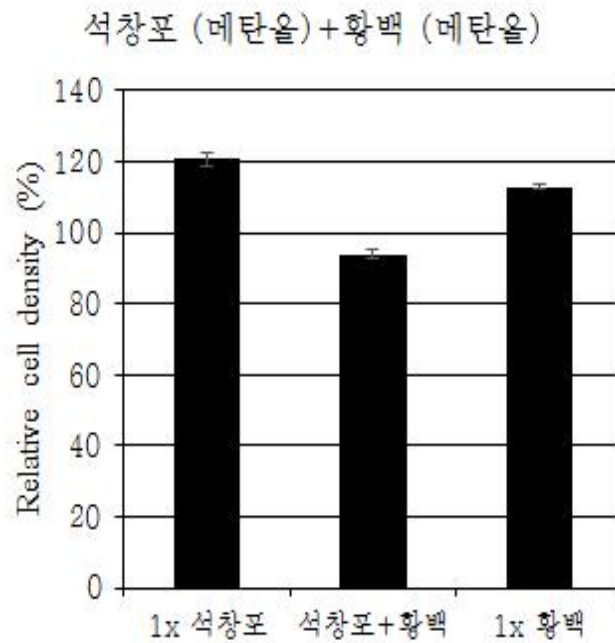


그림 132. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *S. aureus* 성장률(%)

표 21. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *S. aureus*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>S. aureus</i> 성장률(%)
1x 석창포 메탄올 추출물	0.5	121
1x 황백 메탄올 추출물	0.25	113
석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합	0.5(석창포)+0.25(황백)	94

기재된 방법으로 상대적인 균주 성장률 및 기대 성장률을 계산하였다. 석창포 메탄올 추출물 처리 시 *S. aureus*의 성장률은 120.6%이며, 황백 메탄올 추출물 처리 시 *S. aureus*의 성장률은 113.0%이다. 따라서 이 두 가지 추출물을 혼합했을 때의 기대 성장률은 136.3%이다. 실험 결과 석창포와 황백 추출물을 혼합하였을 때의 성장률은 94%이므로, 기대 성장률 대비 약 31.0%의 *S. aureus* 생장이 억제되었으므로 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 의하여 *S. aureus*에 대해서도 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

(4) A+B 추출물의 *E. coli*에 대한 성장 억제 상승효과 관찰 결과  
 (가) 정향 + 황백

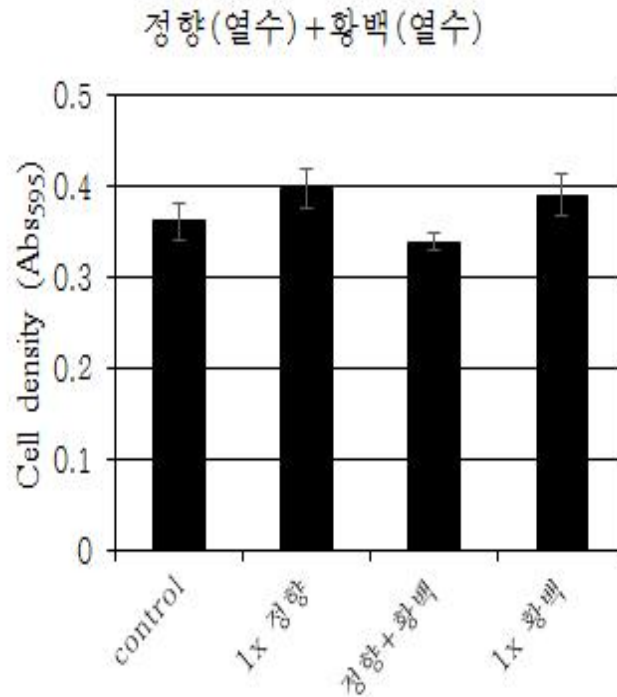


그림 133. 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 *E. coli* 세포밀도

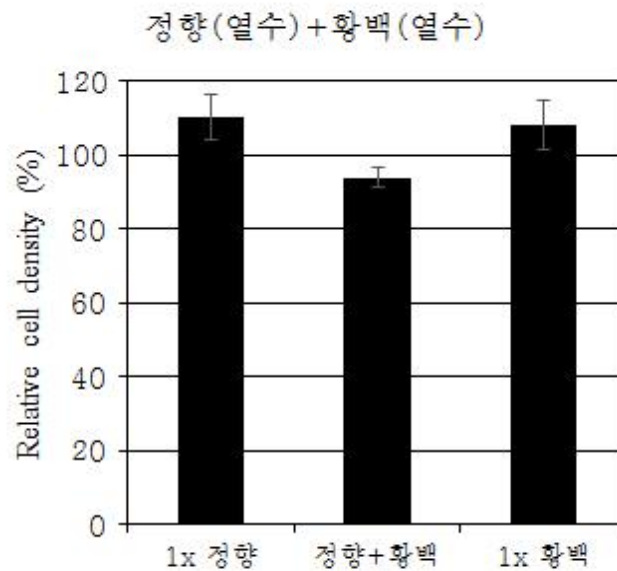


그림 134. 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *E. coli* 성장률(%)

표 22. 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *E. coli*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>E. coli</i> 성장률(%)
1x 정향 열수 추출물	0.5	110.0
1x 황백 열수 추출물	0.5	108.0
정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물의 혼합	0.5(정향)+0.5(황백)	93.8

기재된 방법으로 상대적인 균주 성장률 및 기대 성장률을 계산하였다. 정향 열수 추출물 처리 시 *E. coli*의 성장률은 110.0%이며, 황백 열수 추출물 처리 시 *E. coli*의 성장률은 108.0%이다. 정향 열수 추출물 또는 황백 열수 추출물을 개별적으로 처리 시 *E. coli*의 성장 또는 증식을 전혀 억제시키지 못하였다. 이때, 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물을 혼합했을 때의 기대 성장률은 118.8%이다. 실험 결과 정향과 황백 추출물을 혼합한 조성물의 처리 시 *E. coli*의 성장률은 93.8%이므로, 기대 성장률 대비 약 21%의 *E. coli*의 생장이 억제되었으므로 정향 열수 추출물 및 황백 열수 추출물의 혼합에 의하여 *E. coli*에 대해서도 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.



(나) 석창포 + 황백

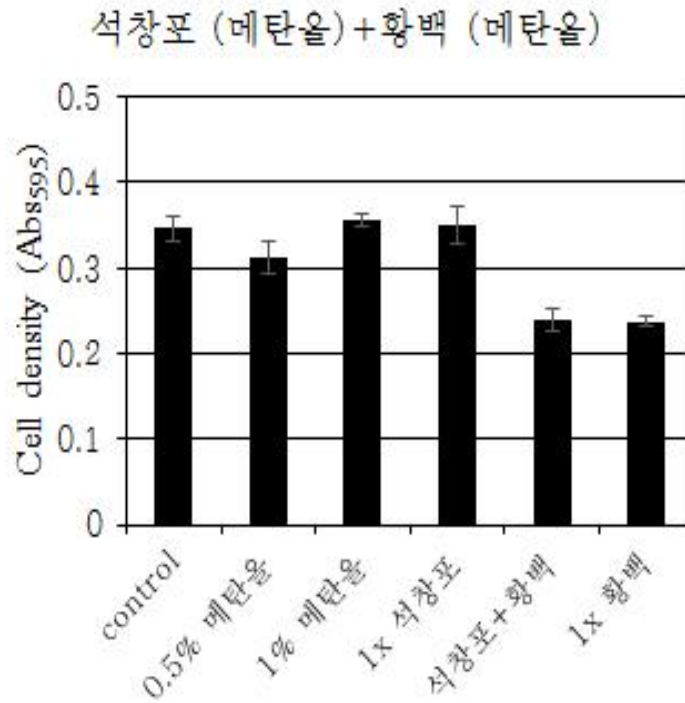


그림 135. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 *E. coli* 세포밀도

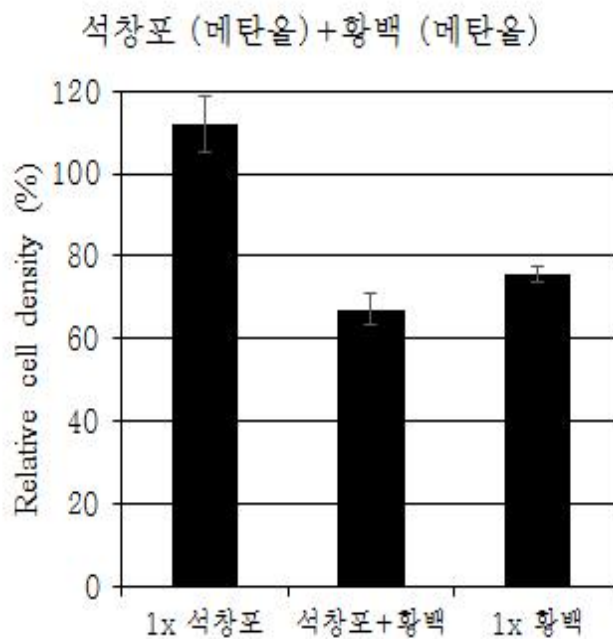


그림 136. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물 각각 또는 혼합하여 첨가 시 측정된 대조군 대비 *E. coli* 성장률(%)

표 23. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 사용된 추출물 농도와 *E. coli*의 성장률

추출물	농도 (g/L)	<i>E. coli</i> 성장률(%)
1x 석창포 메탄올 추출물	0.5	112.1
1x 황백 메탄올 추출물	0.25	75.8
석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합	0.5(석창포)+0.25(황백)	67

기재된 방법으로 상대적인 균주 성장률 및 기대 성장률을 계산하였다. 석창포 메탄올 추출물 처리 시 *E. coli*의 성장률은 112.1%이며, 황백 메탄올 추출물 처리 시 *E. coli*의 성장률은 75.8%이다. 석창포 메탄올 추출물을 개별적으로 처리 시 *E. coli*의 성장 또는 증식을 전혀 억제시키지 못하였다. 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물을 혼합했을 때의 기대 성장률은 85%이다. 실험 결과 석창포 추출물과 황백 추출물을 혼합한 조성물의 처리 시 *E. coli*의 성장률은 67%이므로, 기대 성장률 대비 약 21.0% *E. coli*의 생장이 억제되었으므로 석창포 메탄올 추출물 및 황백 메탄올 추출물의 혼합에 의하여 *E. coli*에 대해서도 우수한 상승적인(synergistic) 항균 효과를 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

라. 결론

진균류인 *C. albicans*에 대해 성장 억제 상승효과를 나타내는 추출물 조합을 선별하였다. 총 7개의 조합으로, 정향 열수 추출물+황백 열수 추출물, 정향 메탄올 추출물+ 황백 메탄올 추출물, 정향 열수 추출물+후박 초임계 추출물, 정향 메탄올 추출물+후박 메탄올 추출물, 황금 열수 추출물+석창포 초임계 추출물, 고본 메탄올 추출물+후박 메탄올 추출물, 석창포 메탄올 추출물+황백 메탄올 추출물 조합이다. 이것은 추출물을 개별적으로 처리한 것보다 우수한 상승효과를 나타내었다.

선별된 추출물 조합 중에서 세균류인 *S. aureus*에 대해 성장 억제 상승효과를 나타내는 조합은 정향 열수 추출물+후박 초임계 추출물, 황금 열수 추출물+석창포 초임계 추출물, 석창포 메탄올 추출물+황백 메탄올 추출물이며, *E. coli*에 대해 성장 억제 상승효과를 나타내는 조합은 정향 열수 추출물+황백 열수 추출물, 석창포 메탄올 추출물+황백 메탄올 추출물 조합이다.

세 가지 균주 모두에 상승효과를 나타낸 조합은 석창포 메탄올 추출물+황백 메탄올 추출물 조합이며, 고본 메탄올 추출물+후박 메탄올 추출물 조합을 제외한 나머지 조합에 대해서는 진균류와 세균류 모두 상승효과를 나타내었다.

이를 통해 상승효과를 갖는 추출물 조합을 사용함으로써 더 낮은 농도의 추출물을 사용하면서 더 높은 항균 활성 효과를 나타내어 추출물의 경제적인 사용이 가능하게 될 것이다.

## 5. 적정 기술 수준의 추출물 제조 방법

### 가. 연구 목적

물을 용매로 하여 추출한 한약재의 *Candida albicans*에 대한 성장 억제 효과가 가장 우수한 최적 추출 조건을 탐색한다. 각각의 한약재를 파쇄 정도, 한약재와 용매의 비율, 추출 시간, 추출 온도 조건을 변경하여 추출하였을 때 *Candida albicans*의 성장 억제 정도가 어떤 차이가 있는 지 비교하여 농도별 그래프로 제시한다.

### 나. 실험방법 및 재료

#### (1) 한약재 추출물 제조 방법

추출물의 기본 추출 조건은 망치 파쇄, 용매 비율 1:10, 3시간, 50℃이며 용매는 전부 2차 증류수를 사용하였다. 각각 4가지 조건의 변경에 따른 성장 억제 효과의 비교를 위하여 변경되는 각각의 조건 이외의 모든 조건은 기본 추출 조건에 맞게 추출물을 제조하였다.

#### (가) 파쇄 정도에 따른 추출물의 비교

- 파쇄 전의 경우 한약재를 구입한 상태 그대로 무게만 정량하여 추출한다.
- 망치 파쇄의 경우 육안으로 확인하였을 때 1cm 이하가 되도록 10~15회 망치로 파쇄하였다.
- 믹서 파쇄의 경우 믹서기로 10초씩 3회 파쇄하였다.

#### (나) 용매 비율에 따른 추출물의 비교

- 한약재 대비 용매의 양이 5배, 10배, 20배가 되도록 각각 추출하였다.
- 따라서 10g 한약재당 용매의 양이 50mL, 100mL, 200mL로 하여 추출하였으며, 이것은 용매 비율 1:5, 1:10 및 1:20으로 나타내었다.

#### (다) 추출 시간에 따른 추출물의 비교

- 용매에 한약재가 침지되는 시간을 1시간, 3시간 및 5시간으로 하여 각각 추출하여 제조하였다.

#### (라) 추출 온도에 따른 추출물의 비교

- 용매에 한약재가 침지되는 온도를 25℃, 50℃, 75℃, 100℃로 하여 추출물을 제조하였다.

#### (2) 농도별 성장 억제 효과 평가 방법

96 well polystyrene microplate를 이용한 CLSI 법을 통하여 성장 억제를 평가한다.

#### (가) 사용한 배지

- SDA 배지는 -80℃에서 보관하고 있는 균주를 활발한 생육 상태로 만드는 배지로 사용하였다.
- RPMI 1640 배지는 Petri dish에서 SDA 배지를 통해 활발한 생육 상태가 된 균을 CLSI M27-A2 method에 따라 이용할 때 사용하는 배지이다.

(나) 미생물 배양

동결 건조된 *Candida albicans*를 SDA agar plate에 streaking 한 후 35°C 에서 2일간 배양하였다.

(다) 추출물 시료 준비

각각의 추출물을 0.02g 정량하여 RPMI 1640배지 1mL에 용해시켜 추출물 시료를 제조한다. 최종적으로 처리되는 최고 농도가 정향 추출물은 31mg/L, 장미꽃 추출물은 20mg/L, 지유 추출물은 5mg/L가 되도록 추출물 시료를 RPMI 1640 배지로 희석하여 microplate에 처리한다. 이 농도의 추출물을 배지로 4회 연속희석하여 최종 처리 농도가 정향 추출물은 31.3mg/L, 15.6mg/L, 7.8mg/L, 3.9mg/L, 2mg/L, 장미꽃 추출물은 20mg/L, 10mg/L, 5mg/L, 2.5mg/L, 1.3mg/L, 지유 추출물은 5mg/L, 2.5mg/L, 1.3mg/L, 0.6mg/L, 0.3mg/L가 되도록 한다.

microplate에 농도별로 serial dilution한 추출물 용액을 100  $\mu$ l씩 넣고 RPMI 1640 배지 100  $\mu$ l 를 control로 사용할 부분에 놓았다.

streaking한 *Candida albicans*의 단일 균집을 0.145 mol/L saline(식염수)에 현탁하고 15초 동안 vortex 하였다. vortex 한 현탁액을 Spectrophotometer (Mecasys Co.의 Optizen2120uv)를 이용해 530nm의 흡광도를 측정하여 세포 밀도가 0.5 McFarland standard가 되는지 확인하였다. 필요에 따라 세포 밀도가 0.5 McFarland standard가 되도록 saline을 첨가하여 조정하였다.

0.5 McFarland standard의 밀도인 현탁액을 saline으로 100배 희석하고, 추가로 RPMI 1640 배지로 10배 희석하여 microplate에 처리하기 직전 농도인  $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$  CFU/ml 가 되도록 하여 희석한 균 현탁액을 microplate에 추출물 100  $\mu$ l 가 놓여져 있는 부분과 control로 사용할 부분에 100  $\mu$ l 씩 놓았다.

35°C 에서 48시간 배양 후 가라앉는 균을 multipipette으로 pipetting 한 후에 Microplate reader (Dynex Opsys MRTM Microplate Reader)로 540nm의 흡광도를 측정하고 이를 *Candida albicans*의 cell density로 이용하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 정향

(가) 파쇄 정도에 따른 효과 비교

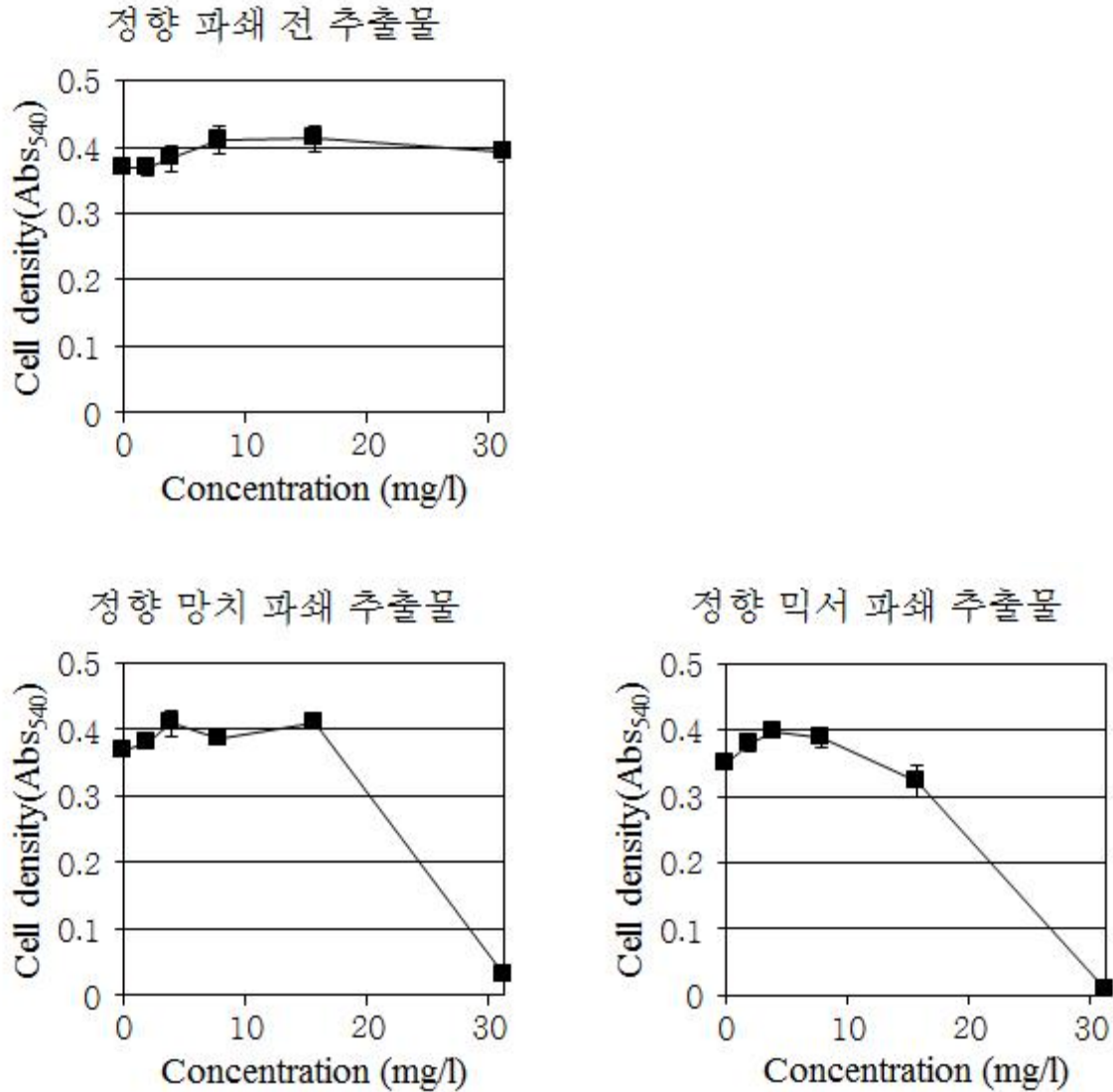


그림 137. 파쇄 정도에 따른 정향 추출물의 성장 억제 효과 비교

정향 파쇄 전 추출물은 동일한 농도에서 균의 성장 억제를 나타내지 않았지만 망치 파쇄 추출물과 믹서 파쇄 추출물은 31mg/L에서 각각 91%와 98%의 성장 억제를 나타내었다. 이것은 파쇄 정도에 따른 추출물의 결과, 정향은 파쇄를 해야 추출물의 효과가 높아지는 것을 알 수 있다. 또한 같은 농도에서 믹서로 파쇄한 추출물의 결과가 망치로 파쇄한 결과보다 높은 살균력을 나타내는 것으로 보아, 정향 입자의 크기가 작을수록 살균력을 나타내는 성분의 추출이 잘 되는 것을 알 수 있다.

(나) 용매 비율에 따른 효과 비교

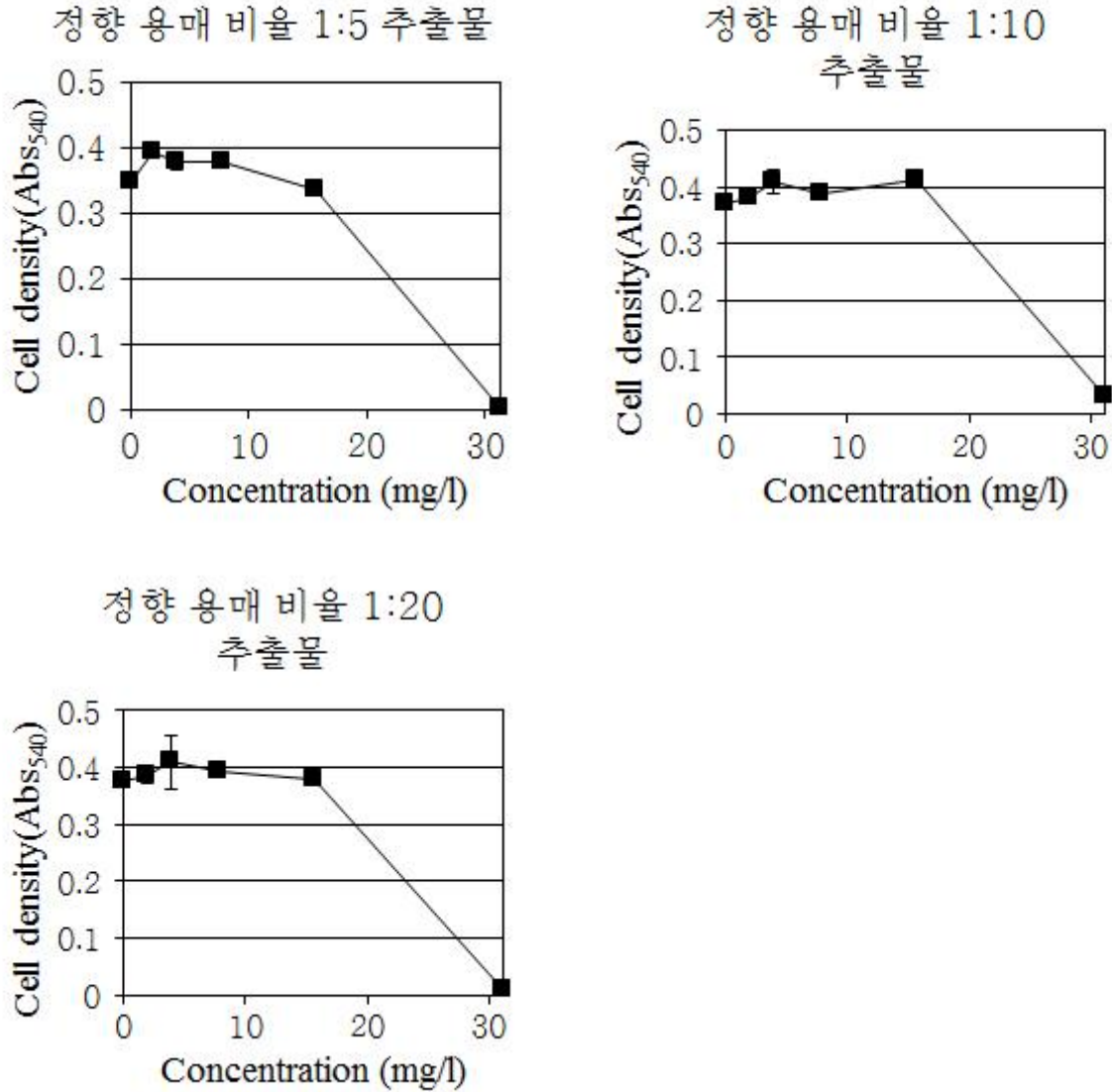


그림 138. 용매 비율에 따른 정향 추출물의 성장 억제 효과 비교

농도가 16mg/L일 때, 용매 비율이 1:10인 추출물과 1:20인 추출물은 성장 억제를 나타내지 않았지만 용매 비율 1:5 추출물은 약 4%의 성장 억제율을 나타내었다. 또한 31mg/L의 농도에서는 용매 비율이 1:5인 추출물은 99%, 1:10인 추출물은 91%, 1:20인 추출물은 98%의 성장 억제율을 나타내었다. 이는 같은 농도에서 용매 비율에 따른 큰 차이를 나타내지 않는 결과이므로 생산 시 사용되는 용매의 양에 따른 비용 및 농축 과정에서 사용되는 비용을 고려하여 추출물을 적당한 가격 조건에서 생산하여야 한다.

(다) 추출 시간에 따른 효과 비교

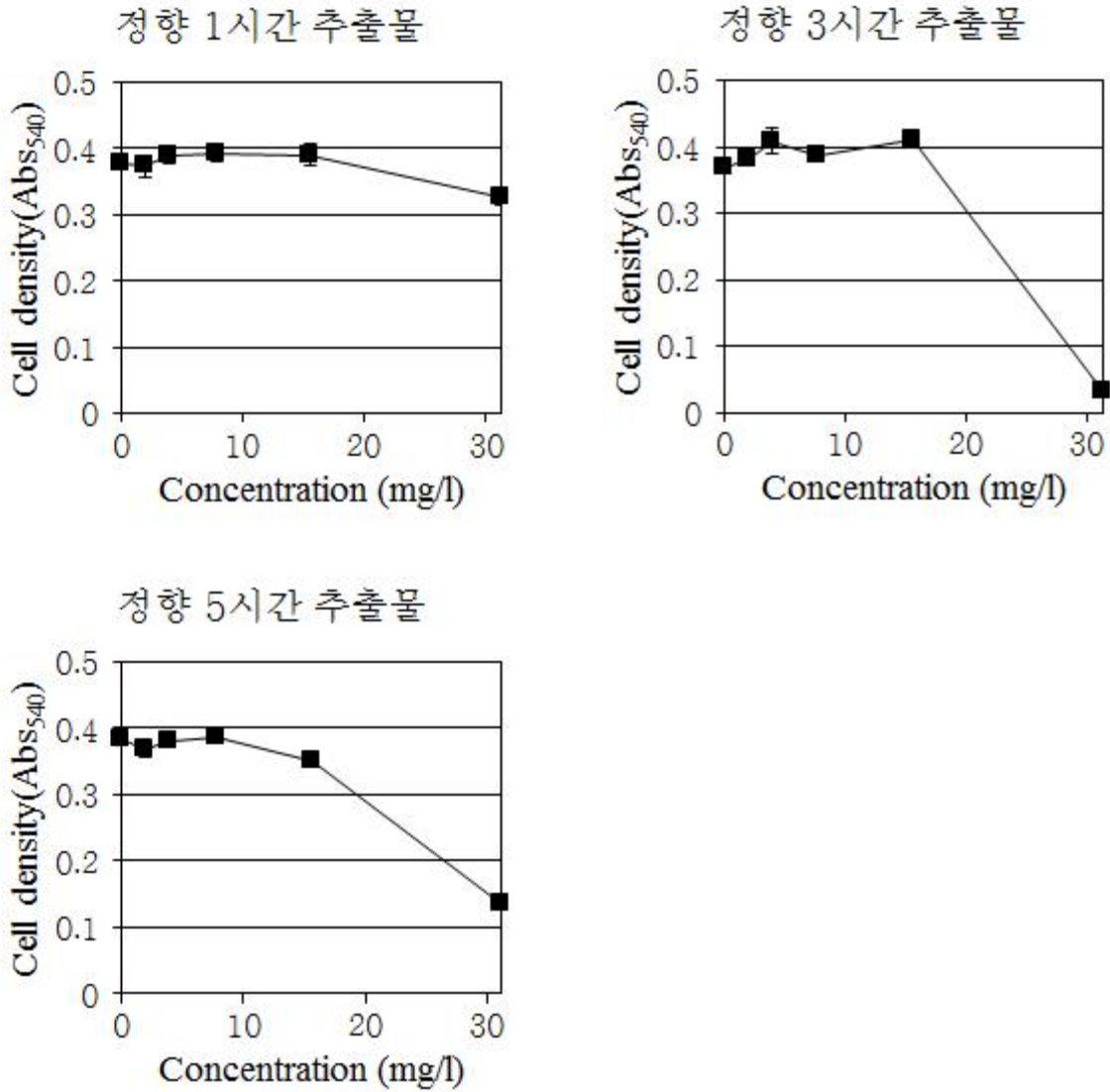


그림 139. 추출 시간에 따른 정향 추출물의 성장 억제 효과 비교

31mg/L의 농도에서 1시간 추출물은 14%의 성장 억제율을 나타내었으나, 3시간 추출물은 91%, 5시간 추출물은 64%의 성장 억제율을 나타내었다. 세 가지 조건 중에서는 3시간 동안 추출하였을 때가 같은 농도를 사용하여 가장 큰 성장 억제 효과를 나타내는 추출 조건이다.



(라) 추출 온도에 따른 효과 비교

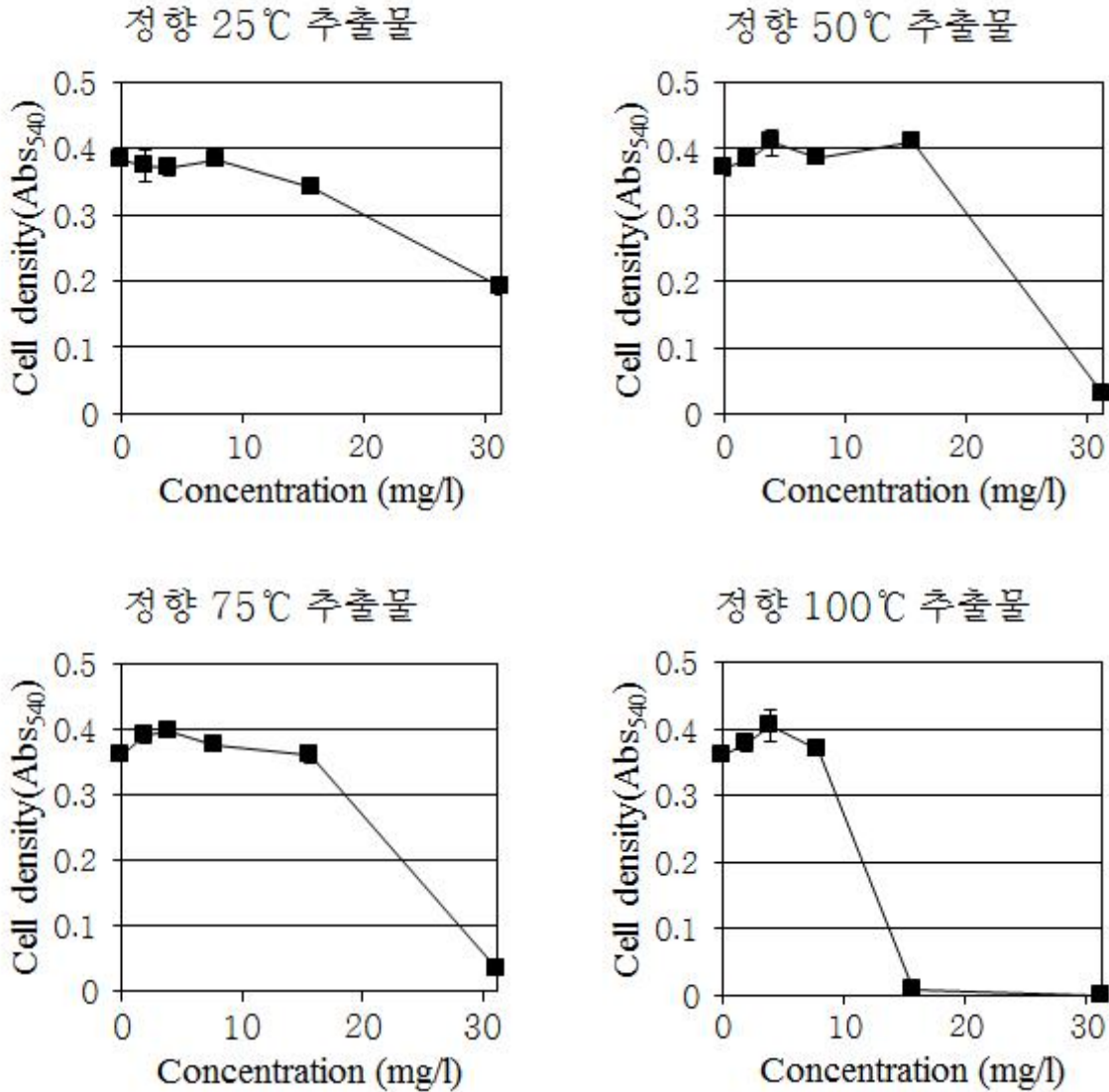


그림 140. 추출 온도에 따른 정향 추출물의 성장 억제 효과 비교

16mg/L 농도에서 50°C 추출물과 75°C 추출물은 성장 억제 효과를 나타내지 않았으며, 25°C 추출물은 11%, 100°C 추출물은 98%의 성장 억제 효과를 나타내었다. 가장 높은 농도인 31mg/L의 농도에서 25°C 추출물은 50%, 50°C 추출물은 91%, 75°C 추출물은 91%, 100°C 추출물은 100% 성장 억제 효과를 나타내었다. 따라서 추출 온도에 따른 성장 억제 효과는 100°C 추출물이 낮은 농도에서도 가장 큰 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

(2) 장미꽃

(가) 파쇄 정도에 따른 효과 비교

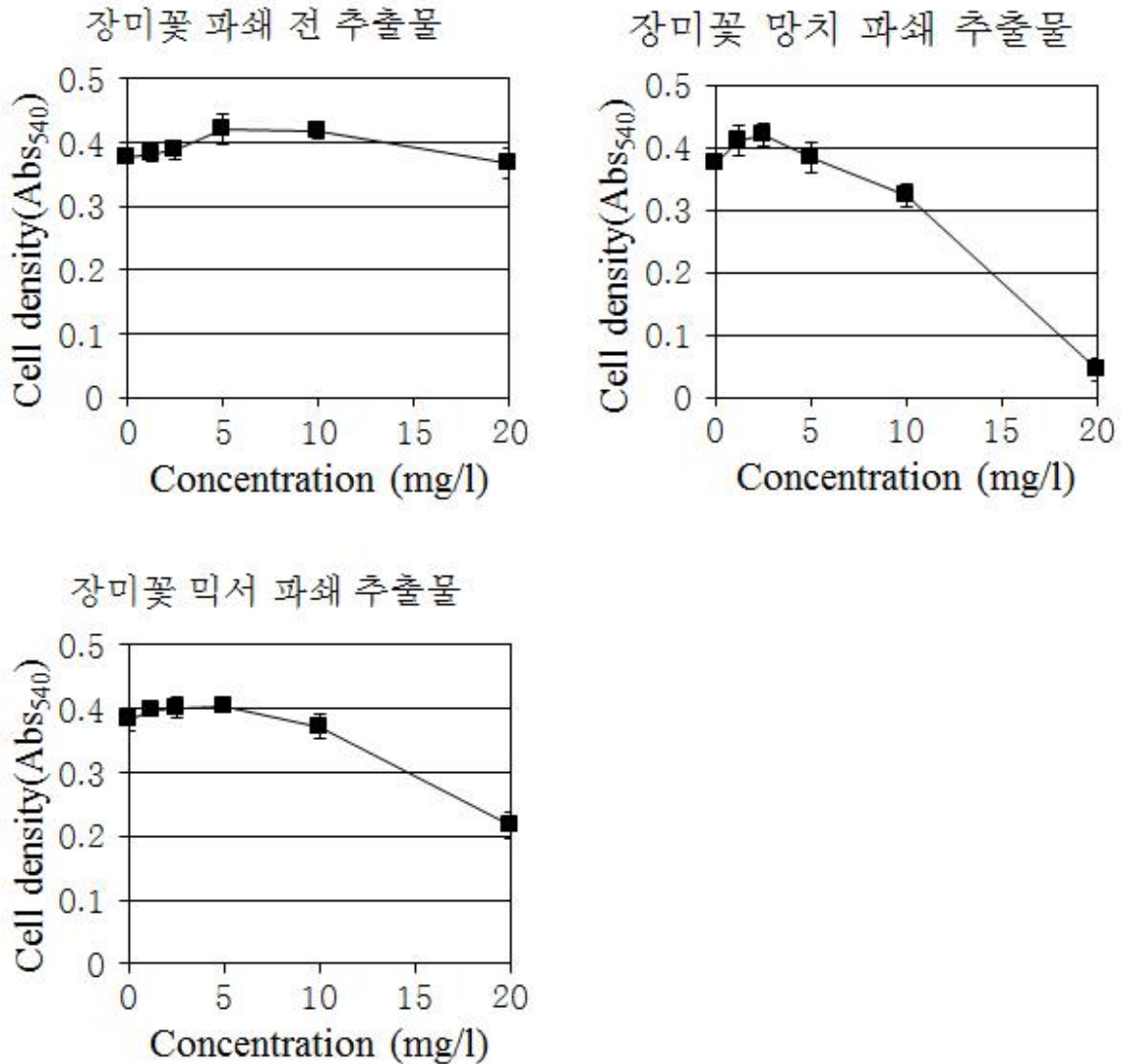


그림 141. 파쇄 정도에 따른 장미꽃 추출물의 성장 억제 효과 비교

20mg/L의 농도에서 파쇄 전 추출물은 성장 억제 효과를 나타내지 않았으나 망치 파쇄 추출물은 88%, 믹서 파쇄 추출물은 57%의 성장 억제 효과를 나타내었다. 이것은 파쇄 정도에 따른 추출물의 결과, 장미꽃은 파쇄를 해야 추출물의 효과가 높아지는 것을 알 수 있다. 또한 망치 파쇄와 믹서 파쇄의 효과를 비교해 보았을 때 이들 중에서 망치 파쇄 추출물이 가장 좋은 살균력을 나타내었다.

(나) 용매 비율에 따른 효과 비교

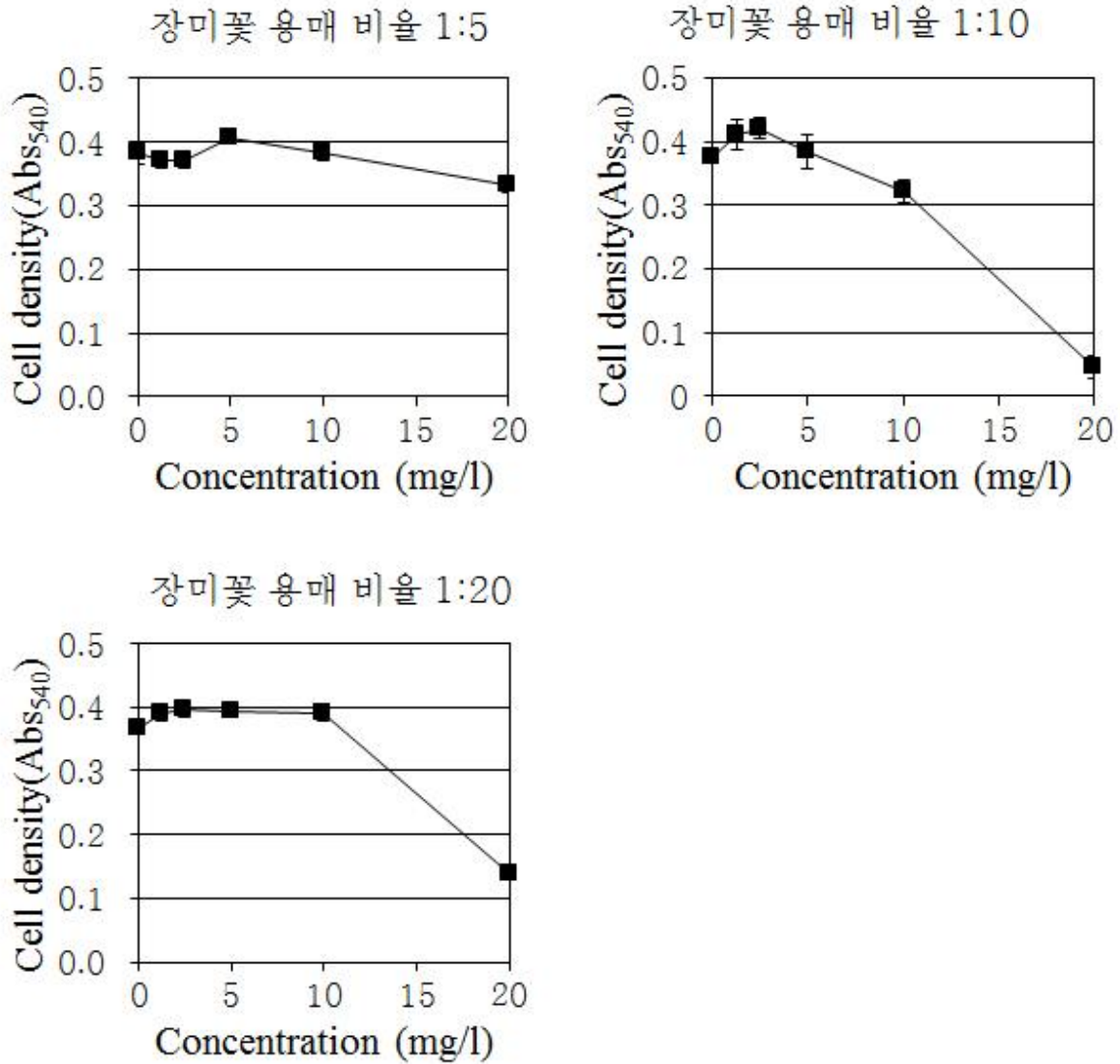


그림 142. 용매 비율에 따른 장미꽃 추출물의 성장 억제 효과 비교

농도가 20mg/L일 때, 용매 비율이 1:5인 추출물은 약 13%의 성장 억제율을 나타내었으나, 용매 비율 1:10 추출물은 88%, 1:20 추출물은 63%의 성장 억제율을 나타내었다. 또한 10mg/L의 농도에서 용매 비율이 1:5인 추출물과 1:20인 추출물은 성장 억제 효과를 나타내지 않았으나, 1:10인 추출물에서는 14% 성장 억제 효과를 나타내었다. 따라서 용매 비율이 1:10일 때 가장 좋은 억제 효과를 나타낸다.

(다) 추출 시간에 따른 효과 비교

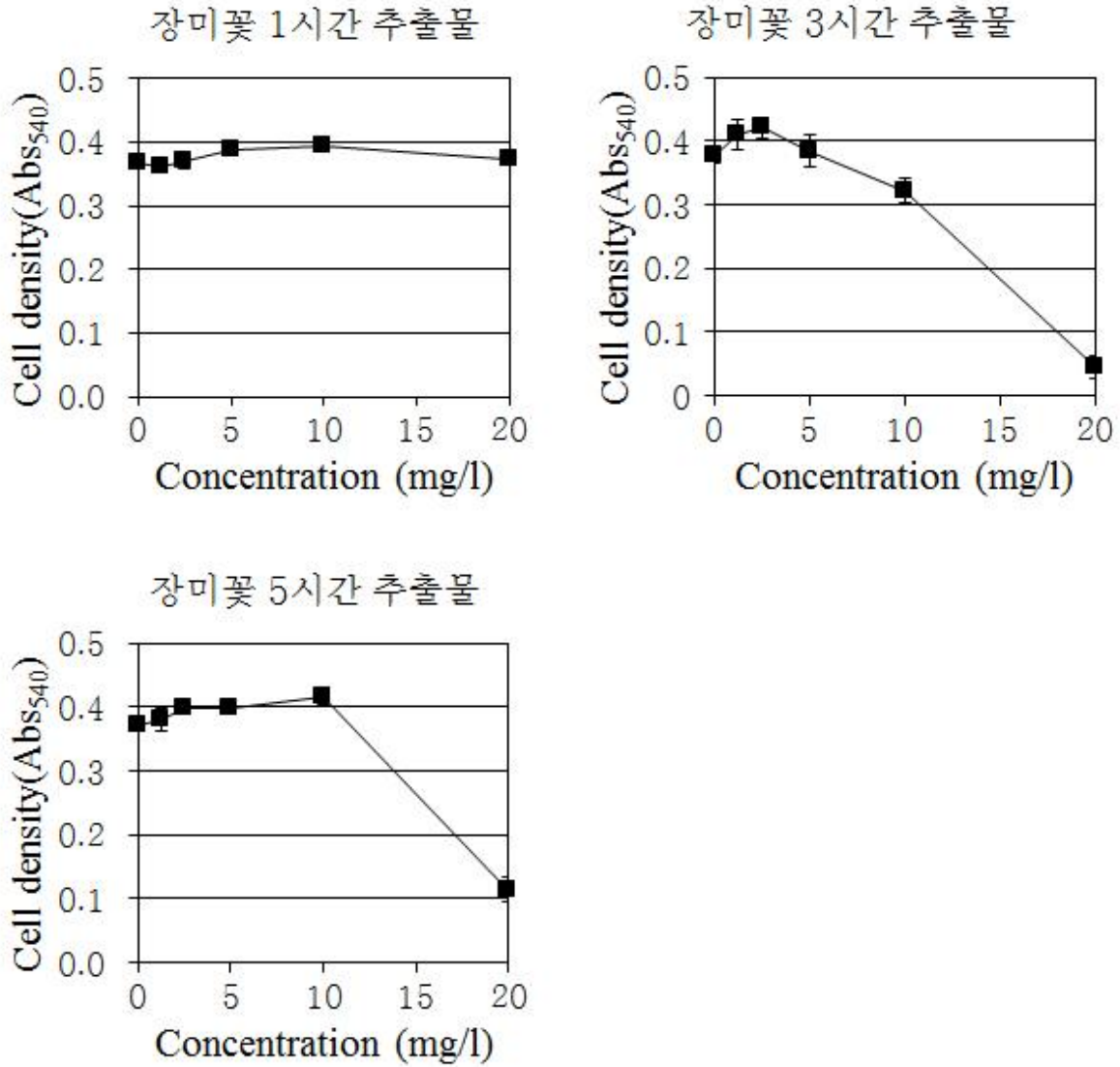


그림 143. 추출 시간에 따른 장미꽃 추출물의 성장 억제 효과 비교

장미꽃을 1시간 동안 추출하였을 때는 균의 성장 억제 효과를 나타내지 않았지만, 3시간 및 5시간을 추출하였을 때는 균의 성장 억제 효과를 나타내었다. 20mg/L의 농도에서 3시간 추출물은 88%, 5시간 추출물은 69%의 균의 성장 억제 효과를 나타내었다. 더 낮은 농도인 10mg/L에서는 3시간 추출물에서만 균의 성장을 억제하였다. 따라서 장미꽃은 시간에 따른 추출 조건 중에서 3시간 동안 추출하였을 때 가장 높은 균의 성장 억제 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

(라) 추출 온도에 따른 효과 비교

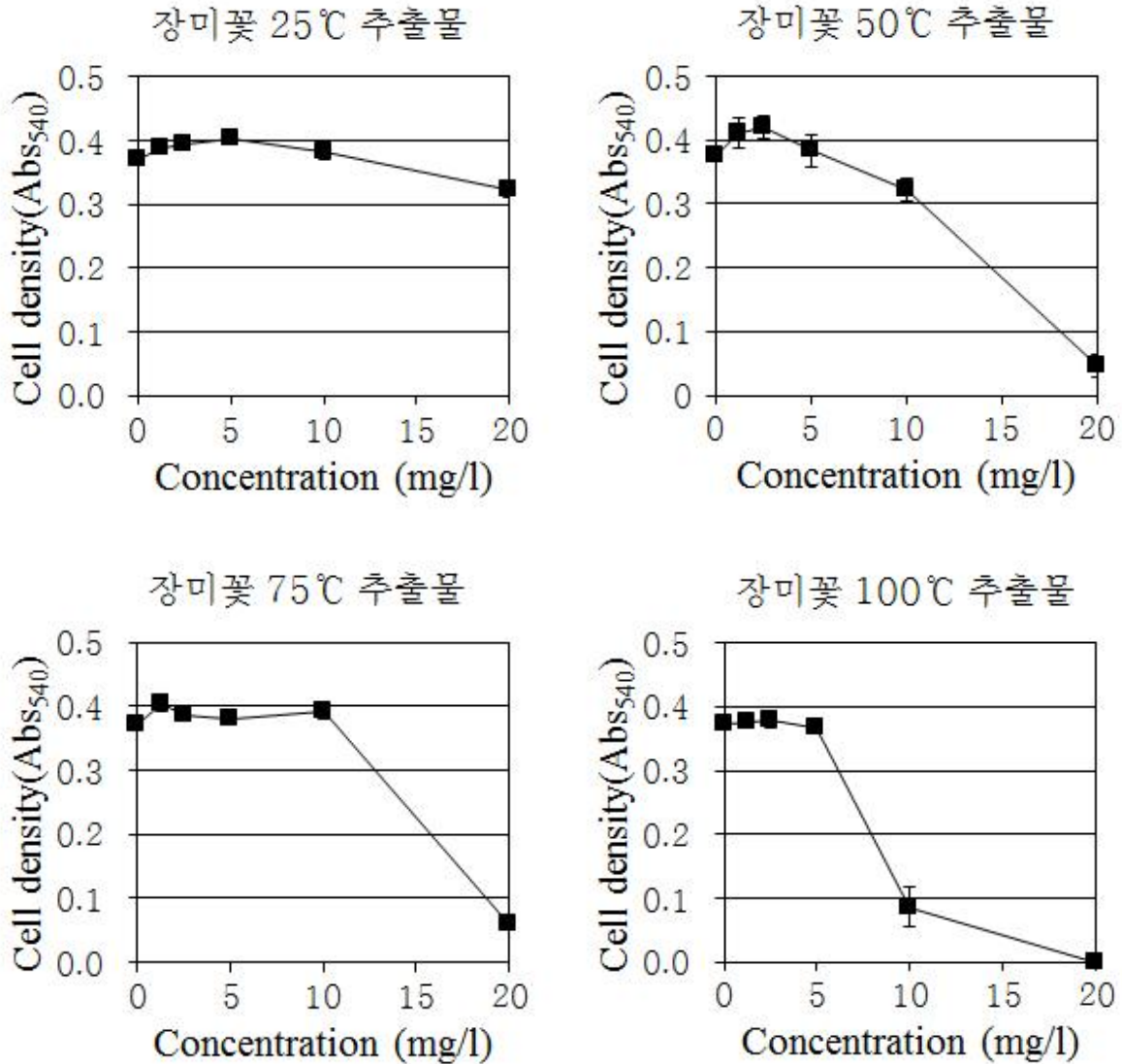


그림 144. 추출 온도에 따른 장미꽃 추출물의 생장 억제 효과 비교

20mg/L 농도에서는 25°C 추출물은 13%의 가장 낮은 생장 억제 효과를 나타내었고, 50°C와 75°C가 각각 88%, 84%로 비슷한 생장 억제 효과를 나타내었으며 100°C에서 100%의 생장 억제 효과를 나타내었다.

더 낮은 농도인 10mg/L 농도의 결과를 비교해 보았을 때, 25°C 추출물과 75°C 추출물에서는 균의 생장 억제 효과가 나타나지 않았으며, 50°C 추출물에서 14%, 100°C 추출물에서 77%의 생장 억제 효과를 나타내었다. 따라서 이것은 온도를 100°C로 추출한 추출물에서 효과가 가장 우수한 것을 알 수 있다.

(3) 지유

(가) 파쇄 정도에 따른 효과 비교

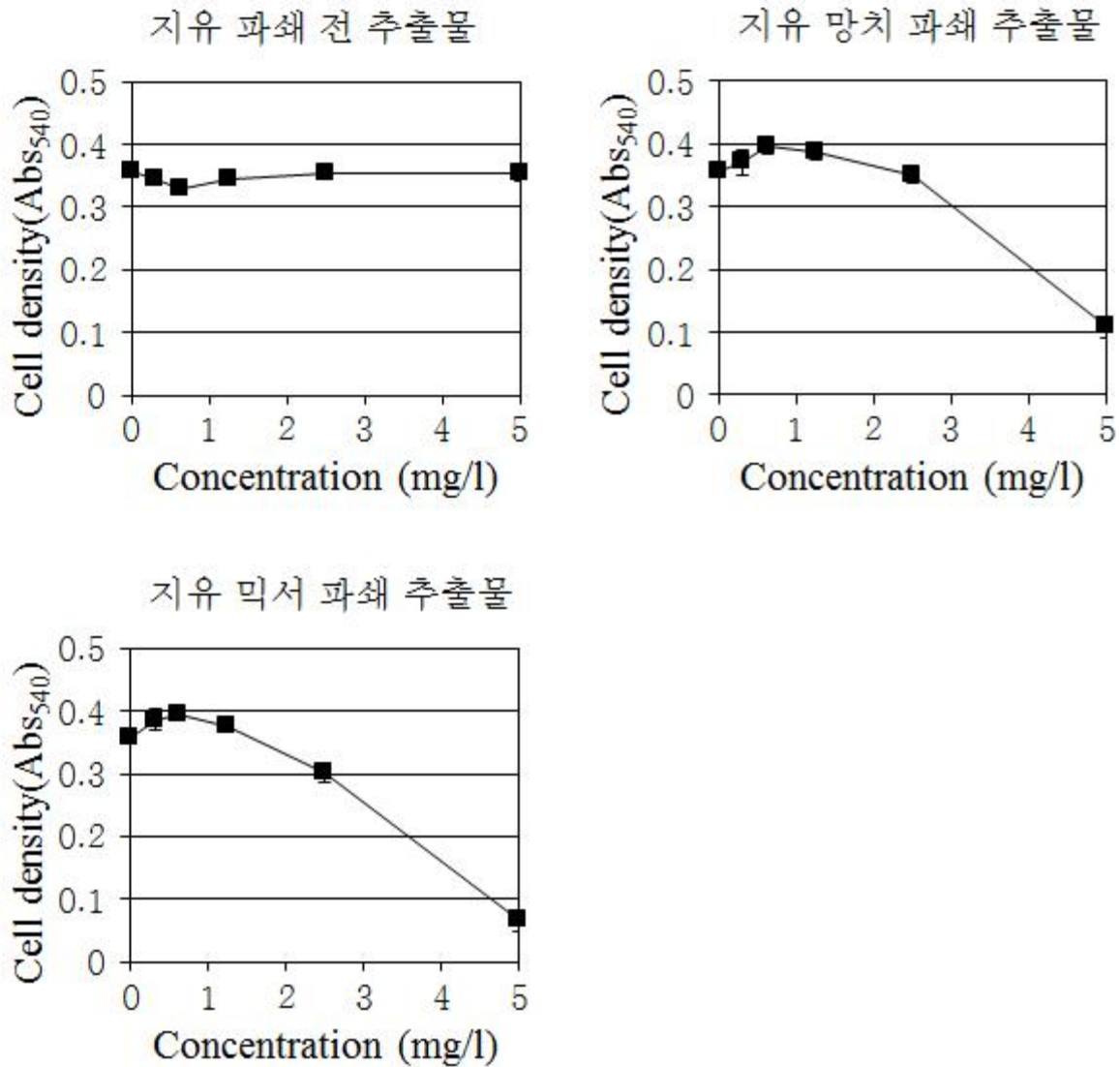


그림 145. 파쇄 정도에 따른 지유 추출물의 성장 억제 효과 비교

지유 파쇄 전 추출물은 모든 농도에서 균의 성장 억제를 나타내지 않았지만 망치 파쇄 추출물과 믹서 파쇄 추출물은 5mg/L에서 각각 70%와 82%의 성장 억제를 나타내었다. 이것은 파쇄 정도에 따른 추출물의 결과, 지유는 파쇄를 해야 추출물의 효과가 높아지는 것을 알 수 있다. 또한 같은 농도에서 믹서로 파쇄한 추출물의 결과가 망치로 파쇄한 결과보다 높은 살균력을 나타내는 것으로 보아, 지유 입자의 크기가 작을수록 살균력을 나타내는 성분의 추출이 잘 되는 것을 알 수 있다.

(나) 용매 비율에 따른 효과 비교

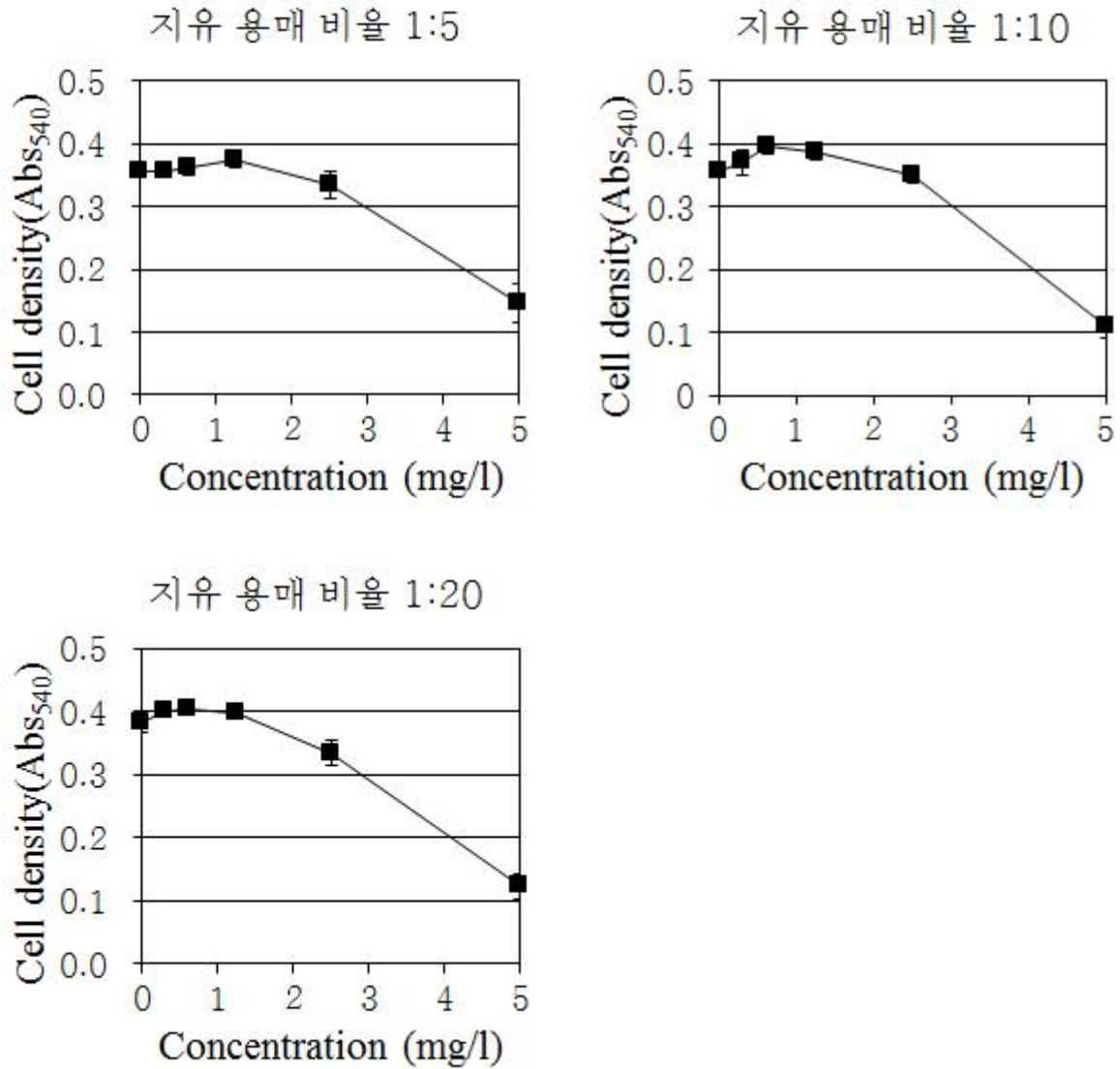


그림 146. 용매 비율에 따른 지유 추출물의 성장 억제 효과 비교

2.5mg/L의 농도에서 용매 비율이 1:5인 추출물은 7%, 1:10인 추출물은 2%의 낮은 효과를 나타내었으며, 1:20인 추출물에서는 13% 성장 억제 효과를 나타내었다. 또한 농도가 5mg/L일 때, 용매 비율이 1:5인 추출물은 약 59%의 성장 억제율을 나타내었으나, 용매 비율 1:10 추출물은 70%, 1:20 추출물은 68%의 성장 억제율을 나타내었다. 따라서 용매 비율이 높을수록 균의 억제 효과가 높은 것을 나타낸다.

(다) 추출 시간에 따른 효과 비교

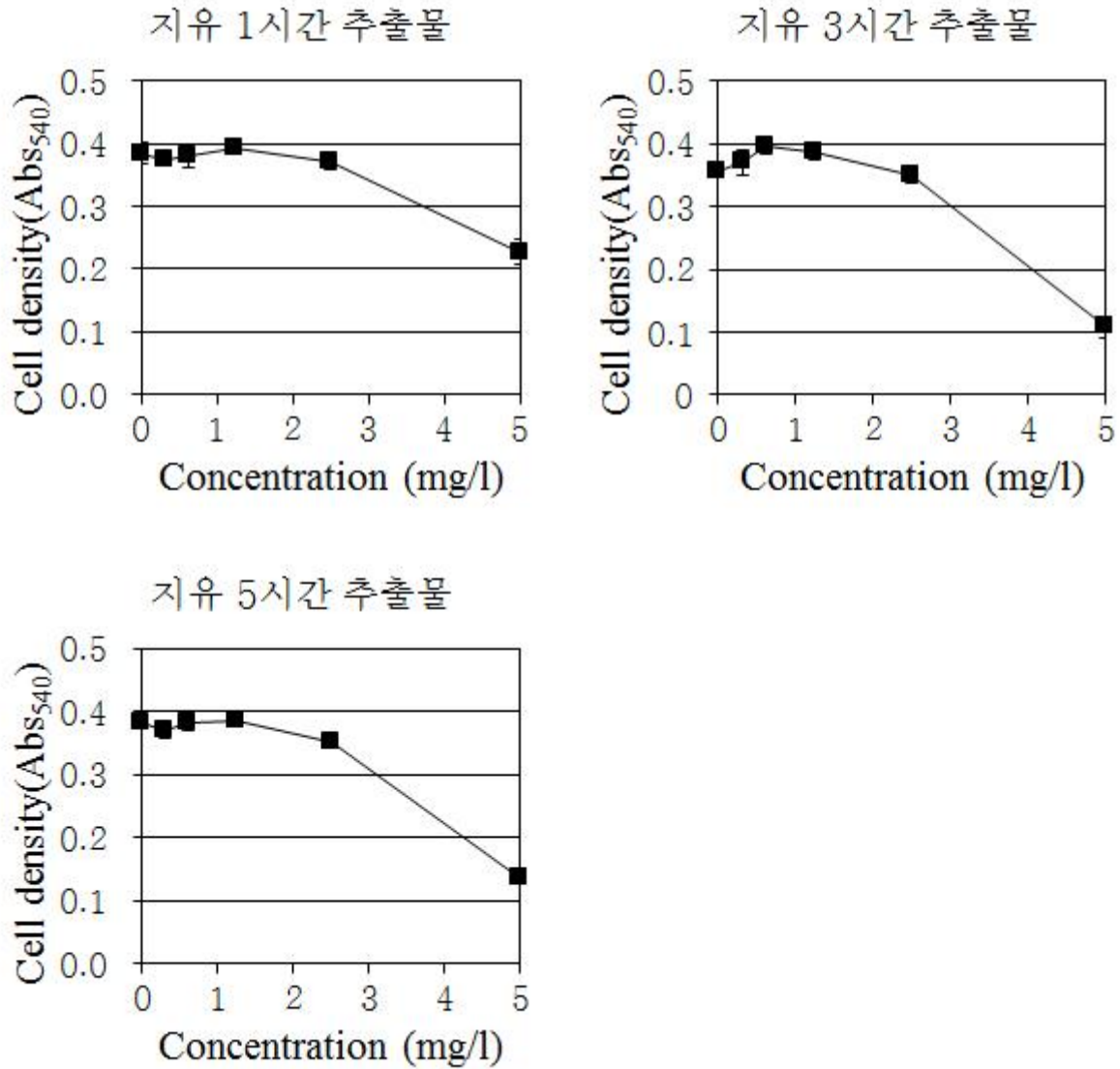


그림 147. 추출 시간에 따른 지유 추출물의 생장 억제 효과 비교

5mg/L의 농도에서 1시간 추출물은 41%, 3시간 추출물은 70%, 5시간 추출물은 64%의 균의 생장 억제 효과를 나타내었다. 따라서 지유는 시간에 따른 추출 조건 중에서 3시간 동안 추출하였을 때 가장 높은 균의 생장 억제 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.



(라) 추출 온도에 따른 효과 비교

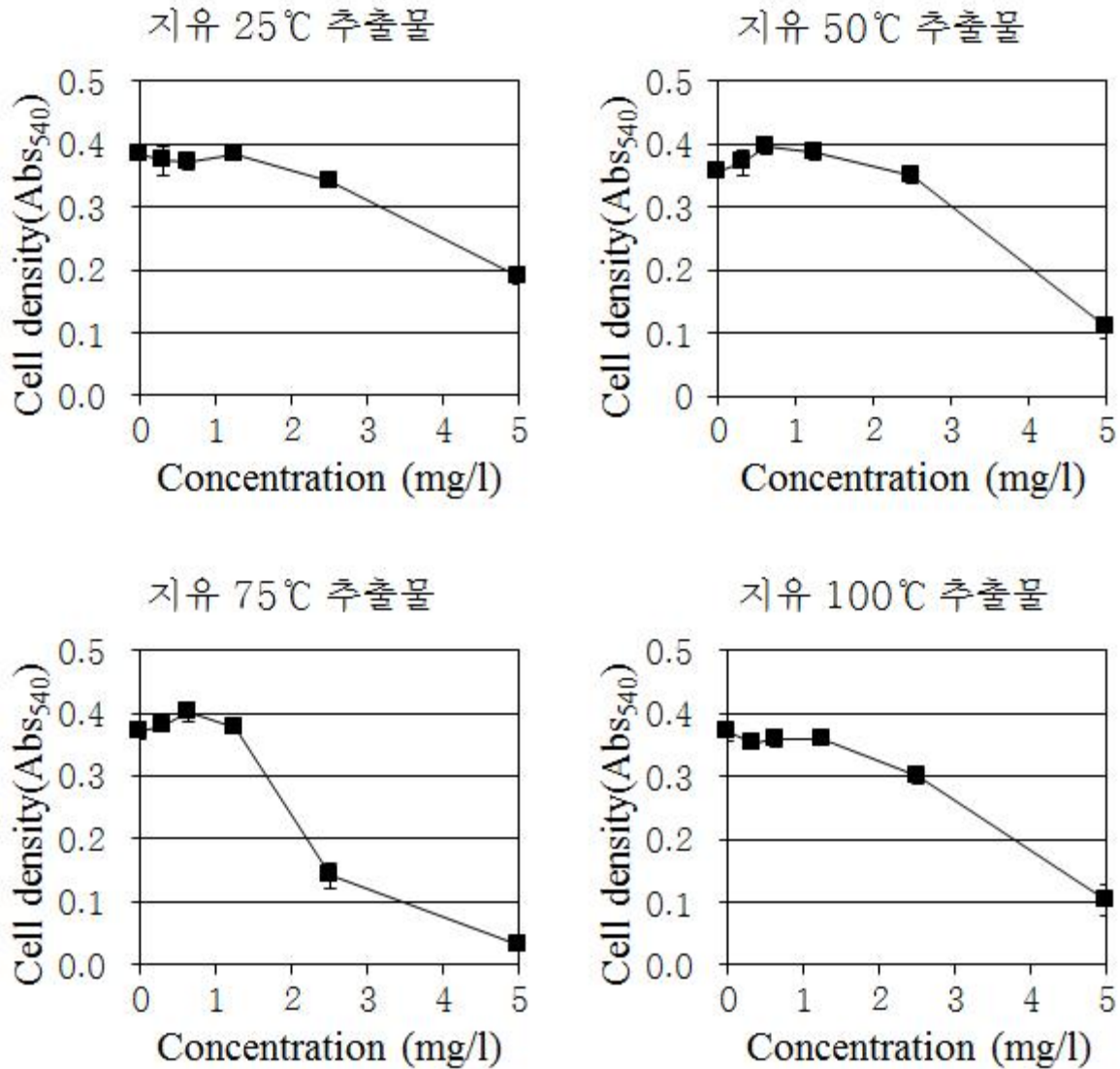


그림 148. 추출 온도에 따른 지유 추출물의 성장 억제 효과 비교

5mg/L 농도에서 25°C 추출물은 50%의 균의 성장 억제를 나타내었으며, 50°C 추출물은 70%, 100°C 추출물은 72%로 비슷한 억제율을 나타내었다. 75°C 추출물에서는 91%로 가장 큰 억제 효과를 나타내었다. 더 낮은 농도인 2.5mg/L의 결과에서는 25°C 추출물은 11%, 50°C 추출물은 2%, 100°C는 19%의 억제율을 나타내었으나 75°C에서는 62%로 가장 큰 억제 효과를 나타내었다. 따라서 온도를 75°C로 추출한 추출물에서 효과가 가장 우수한 것을 알 수 있다.

## 라. 결론

정향 추출물의 경우 파쇄 입자에 따른 결과는 파쇄 입자가 작을수록 성장 억제가 좋은 것으로 나타났으며, 용매 비율에 따라서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 추출물 생산 시 사용되는 용매의 비용을 고려하여 용매 비율을 선정해야 할 것이다.

추출 시간에 따른 성장 억제 효과는 3시간 일 때 가장 큰 억제 효과를 나타내었고, 온도별 결과에서는 100℃의 결과가 낮은 농도에서 우수한 억제 효과를 나타내었다.

전체적인 결과를 종합해 보았을 때 정향은 믹서로 파쇄하여 입자를 작게하고, 용매 비율은 1:5, 추출 시간은 3시간, 온도는 100℃에서 추출하는 조건이 가장 이상적이라고 할 수 있다.

장미꽃 추출물의 경우 파쇄 전 추출물은 성장 억제 효과를 나타내지 않았으나 파쇄한 추출물에서는 성장 억제 효과를 나타내었다. 따라서 장미꽃의 경우 파쇄하지 않은 것보다 파쇄하였을 때의 추출물의 효과가 높은 것을 알 수 있다.

용매 비율에 따라서는 1:5 추출물의 경우 1:10 추출물이나 1:20 추출물에 비해 낮은 효과를 나타내었으며 1:10 추출물이 같은 농도에서 가장 우수한 효과를 나타내었다.

추출 시간에 따른 성장 억제 효과는 3시간 일 때 가장 큰 억제 효과를 나타내었고, 온도별 결과에서는 100℃의 결과가 낮은 농도에서 우수한 억제 효과를 나타내었다.

전체적인 결과를 종합해 보았을 때 장미꽃은 파쇄하여, 용매 비율은 1:10, 추출 시간은 3시간, 온도는 100℃에서 추출하는 조건이 가장 이상적이라고 할 수 있다.

지유 추출물의 경우 파쇄 입자에 따른 결과는 파쇄 입자가 작을수록 성장 억제 효과가 좋으며 용매 비율이 높을수록 균의 성장 억제 효과가 큰 것으로 나타났다.

추출 시간에 따른 성장 억제 효과는 3시간일 때 가장 큰 억제 효과를 나타내었고, 온도별 결과에서는 75℃의 결과가 낮은 농도에서 가장 우수한 억제 효과를 나타내었다.

전체적인 결과를 종합해 보았을 때 지유는 믹서로 파쇄하여 입자를 작게하고, 용매 비율은 1:20, 추출 시간은 3시간, 온도는 75℃에서 추출하는 조건이 가장 이상적이라고 할 수 있다.

## 6. 현장 적용 살균력 측정

### 가. 연구 목적

농림축산검역본부 고시 제 2017-29호 소독제 효력시험법을 따라 추출물의 현장적용 가능 여부를 판단한다.

### 나. 실험방법 및 재료

농림축산검역본부 고시 제 2017-29호 소독제 효력시험법을 *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter johnsonii* 균주에 대하여 6가지 한약재의 메탄올 추출물의 살균력을 평가한다.

#### (1) 배지 준비

##### (가) 세균 배지 조제

- *Salmonella typhimurium*: Nutrient broth(BD) 0.8g + 2차 증류수 100mL (37°C 에서 배양)
- *Acinetobacter johnsonii*: Nutrient broth(BD) 0.8g + 2차 증류수 100mL (30°C 에서 배양)
- *Staphylococcus aureus*: TSB (37°C 에서 배양)

##### (나) 진균 배지 조제

- *Candida albicans* : YPD

#### (2) 경수 조제

- CaCl<sub>2</sub>(Jusei) 0.305g + MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O(YAKURI) 0.139g + 2차 증류수 1L (W/V)
- Autoclave를 이용하여 121°C 에서 15분 동안 멸균한다.

#### (3) 유기물 희석액(5% Yeast extract pH7.0) 조제

- Yeast extract(BD) 25g + 경수 400mL
- 교반기를 이용하여 완전히 녹인다.
- 10M NaOH를 이용하여 25°C 에서 pH 7.0으로 조정한다.
- 경수를 첨가하여 최종 용량을 500 mL 에 맞춘다.
- Autoclave를 이용하여 121°C 에서 15분 동안 멸균한다.

#### (4) 약품 성분 중화배지 조제

##### (가) 비동화 말혈청 조제

- -20°C 에 보관된 말혈청 세럼을 미리 꺼내두어 냉장고 4°C 에서 녹인다.
- 일정량을 코니칼 튜브에 분배한다.
- 비동화: 56°C water bath에 말혈청이 담긴 코니칼 튜브가 충분히 잠기도록 하고 30분간 넣어 둔다.

##### (나) 5% 비동화 말혈청 영양배지 조제

- Nutrient broth(BD) 2.4g + 2차 증류수 300 mL
- Autoclave를 이용하여 121°C 에서 15분 동안 멸균한다.
- 비동화 처리한 말혈청 15mL 첨가하고 흔들어 혼합한다.

(5) 미생물 배양 준비

(가) Streaking

- -80°C 에 보관된 stock 균주로부터 배지에 3단 도말한다.
- 37°C 인큐베이터에서 배양한다.
- 단일 콜로니 확인 후 냉장 보관하여 사용한다.

(나) Inoculation

- 멸균된 test tube를 2개 준비한다.
- 각 균의 성장 배지 5mL씩 test tube에 분배한다.
- 앞서 streaking 해둔 배지에서 단일 콜로니를 멸균봉으로 취한 후 broth 배지에 접종한다.
- 37°C 인큐베이터에서 250rpm으로 shaking 하며 22~24시간 배양한다.

(6) 소독제 희석

(가) 측정하고자 하는 소독제 농도의 2배 농도로 준비

- 본 실험에서 균과 1:1(동량)로 혼합되기 때문에 실제로 측정되는 소독제의 농도는 2배 희석된 농도로 측정된다. 따라서 확인하고자 하는 소독제 농도의 2배로 준비해야 한다.

(나) 소독제 희석은 경수로 희석한 소독제와 유기물 희석액으로 희석한 소독제 각각 준비하고, 경수로 희석한 소독제의 대조군은 경수 처리, 유기물 희석액으로 희석한 소독제의 대조군은 유기물 희석액을 처리한다.

(7) 미생물 접종 및 소독제 효력 시험

(가) 소독제 희석액 준비

- 재료 및 장비 : 경수, 유기물 희석액, 소독제 원액, 코니칼 튜브, test tube

경수 Control	소독제 원액	1/2	1/4	1/8	1/16
2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL

유기물희석액 Control	소독제 원액	1/2	1/4	1/8	1/16
2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL

- 위의 조건과 같이 test tube에 2.5ml 씩 분배한 후 4°C 냉장고에 보관한다. (3반복)

(나) 균 측정 및 희석

측정 재료 및 장비: Spectrophotometer, cuvette, nutrient broth배지, 22-24시간 동안 배양한 균

- Spectrophotometer 전원을 켜다. (self test 시간이 있으므로 측정 전 미리 켜둔다.)
- 큐벳을 2개 준비한다.
- 큐벳에 nutrient 배지 900mL을 분배한다. (전날 키운 균의 배양 배지)
- 전날 22-24시간 동안 배양해 둔 균을 꺼낸다.
- 균을 키워둔 test tube를 vortexing 한 후 100µl를 취한다.

- 미리 준비해 둔 배지가 담긴 큐벳에 넣고 피펫팅으로 충분히 혼합한다.
- OD. 600nm에서 측정하여 값을 기록한다.

(다) 시험을 위한 시료의 제조

멸균된 삼각플라스크, 5% 유기물 희석액 (5% Yeast extract), 22-24시간 동안 배양한 균

- 멸균된 삼각플라스크에 5% Yeast extract 96mL을 분배한다.
- 22-24시간 동안 배양한 균을 4mL 넣는다.
- 흔들어 혼합한다.

(라) 균 접종 및 소독제 반응

- 냉장보관한 소독제가 담긴 test tube를 꺼낸다.
- Test tube 당 2.5mL씩 균을 접종한다. 이때 균 접종은 각 시험관 처리마다 차례대로 1분의 간격으로 실시하고 vortexing한 후 냉장 4°C 보관한다.
- 4°C에서 30분간 반응 시키되 10분 간격으로 꺼내어 vortexing하여 혼합한다.

(마) 중화 단계 준비

- Test tube 개수만큼 E-tube를 준비하고 라벨링한다.
- 각 E-tube에 중화배지 900µl씩 분배한다.
- Test tube 개수만큼 새로운 test tube를 준비한다.
- 각 test tube에 영양배지를 5mL씩 분배하여 준비한다.

(바) 중화반응 및 증식

- 정확히 30분간의 반응이 끝나면 test tube를 꺼내고, 소독제의 효능을 중화하기 위하여 100 µl씩 취한 후 준비한 900µl 중화배지 E-tube에 분배한다.
- vortexing하여 혼합한다.
- 100µl를 취한 후 준비해둔 영양배지가 들어있는 test tube에 분배한다.
- vortexing 하여 혼합한다.
- 37°C 인큐베이터에서 48시간 배양한다.

(사) 증식 여부 판정

- 세균의 경우는 5개의 동일 소독제 희석배수의 영양배지에서 4개 이상 증식되지 않는 최종 소독 희석 단계를 유효 농도로 한다.

표 . 시험한 시료의 목록

O	Organic water (유기물)
H	Hard water (경수)
M	메탄올 대조군
110	정향
147	고분
160	급성자
218	석창포
297	황백
298	후박

다. 결과 및 고찰

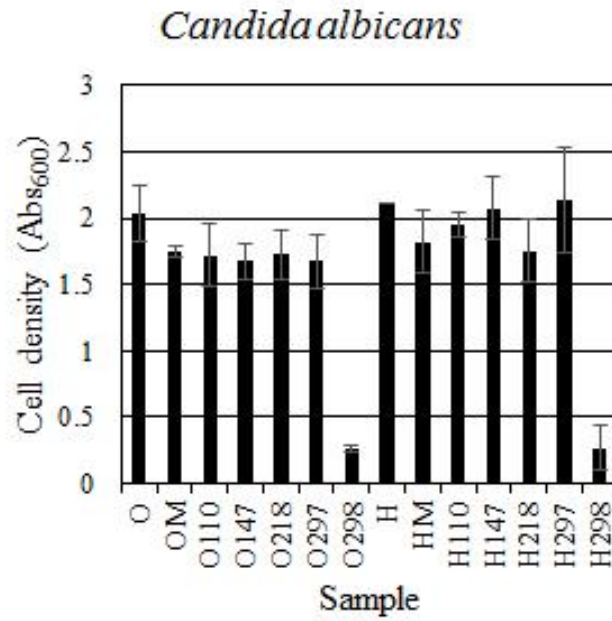


그림 147. *C. albicans*에 대한 6개 메탄올 추출물의 살균력 평가

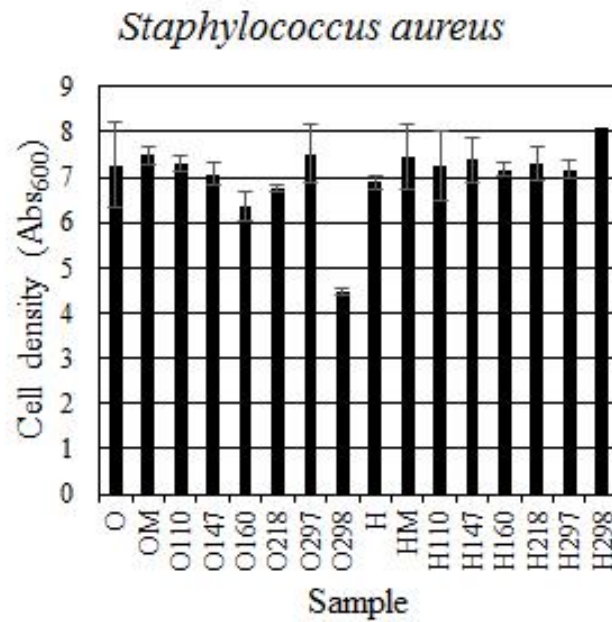


그림 148. *S. aureus*에 대한 6개 메탄올 추출물의 살균력 평가

### *Acinetobacter johnsonii*

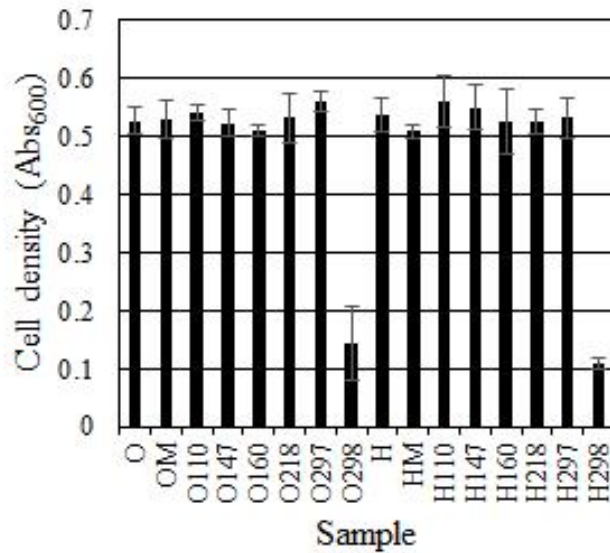


그림 149. *A. johnsonii*에 대한 6개 메탄올 추출물의 살균력 평가

#### 라. 결론

농림축산검역본부 고시 제 2017-29호 소독제 효력시험법에 따라 시험한 6개의 시료 중에 후박만이 곰팡이와 세균에 대한 강한 살균 활성을 나타내었다. 일반적인 미생물 배양조건에서의 살균력 특정과는 달리 살균력의 효과가 다르게 측정되었으며 후박을 중심으로 제품을 개발하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

#### 7. 원가계산

제품개발을 위해 최종 사용하려는 추출이 결정되지는 않았으나, 전반적인 연구결과가 1g/L 이하의 추출물을 이용하므로 일반적인 화장품의 제조원가를 고려한다면 100mL의 생산에 50원 이하의 원가비용이 발생하며 살균 티슈의 경우 1개당 1mL의 화장품 성분을 이용한다고 고려하면 티슈 한 장당 0.5원의 원가가 발생한다. 30장 제품을 1,000원에 판다면 15원이하의 원가로 가격 경쟁력은 충분히 유지함.

# 제 3 절 연구개발 성과

## 1. 특허 출원 (5건)

가. 정향 추출물 및 황백 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물 (2018)

출원번호통지서

페이지 1 / 4

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2018.11.13  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2018-0139460 (접수번호 1-1-2018-1129128-29)  
 출원인명칭 국민대학교산학협력단(2-2004-046890-2)  
 대리인성명 특허법인 피씨알(9-2014-100081-1)  
 발명자성명 김태종 함영석 이자민 윤지민 나현정  
 발명의명칭 정향 추출물 및 황백 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.



관인생략

출원번호통지서

출원일자 2018.11.13  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2018-0139461 (접수번호 1-1-2018-1129141-13)  
 출원인명칭 국민대학교산학협력단(2-2004-046890-2)  
 대리인성명 특허법인 피씨알(9-2014-100081-1)  
 발명자성명 김대중 함영석 이자민 윤지민 나현정  
 발명의명칭 정향 추출물 및 후박 추출물을 유효성분으로 포함하는 향균용 조성물

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2018.11.14  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2018-0140336 (접수번호 1-1-2018-1134641-58)  
 출원인명칭 국민대학교산학협력단(2-2004-046890-2)  
 대리인성명 특허법인 피씨알(9-2014-100081-1)  
 발명자성명 김태종 함영석 이자민 윤지민 나현정  
 발명의명칭 고분 추출물 및 후박 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2018.11.14  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2018-0140337 (접수번호 1-1-2018-1134652-50)  
 출원인명칭 국민대학교산학협력단(2-2004-046890-2)  
 대리인성명 특허법인 피씨알(9-2014-100081-1)  
 발명자성명 김대중 함영석 이자민 윤지민 나현정  
 발명의명칭 석창포 추출물 및 황백 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2018.11.14  
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(2)  
 출원번호 10-2018-0140256 (접수번호 1-1-2018-1134307-13)  
 출원인명칭 국민대학교산학협력단(2-2004-046890-2)  
 대리인성명 특허법인 피씨알(9-2014-100081-1)  
 발명자성명 김태종 함영석 이자민 윤지민 나현정  
 발명의명칭 생약재 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

## 2. 기술이전

### 기술양도 계약서

국민대학교 산학협력단(이하 “甲”이라 한다)과 ㈜케이바이오랩 (이하 “乙”이라 한다)은 “甲”이 보유한 “천연 추출물을 이용한 항균용 조성물”에 관한 특허를 “乙”에게 이전하고자 다음과 같이 계약을 체결한다.

#### 제1조 (계약의 목적)

본 계약은 “甲”이 “乙”에게 자신이 개발한 해당 기술을 양도하는 데 있어 필요한 제반 사항을 정함을 그 목적으로 한다.

#### 제2조 (해당 기술의 표시)

계약의 목적이 되는 해당기술의 내용은 다음과 같다.

계약명 : 천연 추출물을 이용한 항균용 조성물

연번	발명의 명칭	출원번호 및 출원일
1	정향 추출물 및 황백 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	10-2018-0139460 (2018.11.13.출원)
2	정향 추출물과 후박 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	10-2018-0139461 (2018.11.13.출원)
3	생약재 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	10-2018-0139445 (2018.11.13.출원)
4	석창포 추출물 및 계피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	10-2018-0139457 (2018.11.13.출원)
5	석창포 추출물 및 천궁 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	10-2018-0139458 (2018.11.13.출원)

#### 제3조(양도의 범위)

- ① “甲”은 “乙”에게 해당기술 일체를 양도한다.
- ② 이후 “甲”은 해당기술에 대해 어떠한 권리도 행사하지 아니한다.

#### 제4조(해당기술의 이전 등록)

“甲”은 “乙”이 “乙”의 비용으로 본 계약에 의한 해당기술을 권리화하는 것에 동의한다. 따라서 “甲”은 “乙”의 청구에 따라 이에 필요한 협조를 하여야 한다.

#### 제5조(해당기술의 권리변동 사항)

- ① “甲”은 본 계약체결일 이후 본 해당기술의 일부 또는 전부를 양도, 이용 허락 등을 다른 제 3자에 허락해서는 안 되며, 이로 인해 “乙”에게 손해가 발생하였을 경우 “甲”은 “乙”에게 그 손해를 배상하여야 한다.
- ② “乙” 또한 해당 기술을 직접 사용 및 실시 외에 제3자에 양도 할 수 없다.

#### 제6조(기술료)

### 3. 사업화 계획

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1년			
	소요예산(백만원)	200			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		2	20	50	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	10	40
		국외	0	1	5
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		반려동물용 세정제, 샴푸, 린스, 스프레이			

#### - 사업화 제품의 핵심경쟁요인

- 새로운 이전 기술을 활용한 반려동물에게 안전한 피부 항균 소재의 위생용품
- 사람과 반려동물에 무해한 안전한 식물 추출물 소재
- 이전기술의 소재를 이용하여 반려동물용 위생용품의 개발기술 확보
- 치료가 아닌 예방 개념의 미생물 억제 효과로 시장 규모가 클 것으로 예상
- 미생물의 바이오필름형성억제로 미생물 제거가 용이
- 곰팡이와 세균을 동시에 살균
- 식물 추출물 혼합으로 살균효과의 상승
- 증강된 살균효과로 추출물의 사용량의 최소화
- 효과 추출물의 사용량 감소로 원가의 절감 및 제품의 가격경쟁력 확보

## 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표

- 병원성 세균과 곰팡이의 생장을 동시에 억제하는 동물 위생용 다중효용 식물 추출물 소재 제시 및 그의 활용 가이드라인 제시
- 특허 3건 출원
- 동물위생 적정기술의 산업화를 위한 기술이전

## 제 2 절 목표 달성 여부

### 1. 연구개발 성과 및 평가방법

#### 가. 정성적 평가

목표	평가기준	결과물	가중치	달성도
병원성 세균과 곰팡이의 생장을 동시에 억제하는 동물 위생용 다중효용 식물 추출물 소재 제시 및 그의 활용 가이드라인 제시	병원성 세균과 곰팡이의 생장을 동시에 억제하는 천연소재 특허출원	다중효용 추출물 15건 제시 및 조합에 의한 곰팡이 살균효과 상승을 위한 가이드라인 제시 (특허출원)	33	100
특허 3건 출원	특허출원	특허 5건 출원	33	100
동물위생 적정기술의 산업화를 위한 기술이전	기술이전	기술이전 완료(1건/745.8만원)	34	100

- 정성적 목표를 초과 달성한 것으로 판단됩니다.

#### 나. 정량적 평가

목표	평가기준	결과물	가중치	달성도
특허출원	3건	5건의 국내 특허 출원 완료	40	100
기술이전	1건/500만원	기술이전 완료(1건/745.8만원)	40	100
학술발표	2건	학술발표 6건 완료	10	100
인력양성	2명	2명의 석사 졸업생 배출	10	100

- 정량적 목표를 초과 달성한 것으로 판단됩니다.



### 제 3 절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

목표 초과 달성

## 제 4 장 연구결과의 활용 계획

### 제 1 절 연구개발 결과의 활용방안

- 본 연구과제의 결과는 특허를 신청하여 권리를 확보하고 사업화를 위해 기업체에 기술이전
- 2019년도에 반려동물용 살균 티슈 제품화 예정
  - 기업에서 제품화하는 과정에서 추출물 생산하는 업체를 섭외하고 추출물의 안전성과 안정성을 확인한 후에 제품의 생산에 이용
  - 기술을 이전받은 기업에서 제품을 개발하는 과정에서 본 연구사업에서 제안된 소재를 기존의 화합물, 추출물 또는 제품과 비교하여 어느 정도의 비교 우위가 있는지도 추가로 평가하여 제품의 경쟁력을 평가할 계획임
- 기술을 이전받은 업체에서는 추가적인 제품개발을 통해 다양한 위생용품을 개발할 계획
- 천연 식물 추출물의 살균력 작용기작에 대한 추가 연구를 통해 위생적인 미생물 조절을 위한 기반 지식을 확보할 계획
- 동물 위생관련 사업에 새로운 제품을 개발하기 위한 기초 연구 자료 제공
- 본 연구 과제에서 개발된 기술은 축산업을 포함한 동물관련 산업에 항생제와 항진균제의 사용을 최소화하여 건강한 먹거리 확보에 기여

## 제 2 절 기대성과 및 파급효과

### 1. 기대성과

- 가격 경쟁력이 있는 저렴한 친환경 동물 위생 개선 방법 제시
- 곰팡이와 세균을 동시에 억제하는 다중효용 방법에 의한 현장 적용성이 높은 방법 제시
- 안전한 천연 식물 살균제의 확보를 통한 다양한 제품에 응용개발 가능
- 위생적인 생활환경을 제공하는 안전한 천연소재 제공
- 농산물의 활용을 통한 농산물 산업화 및 시장 확대

### 2. 파급효과

#### 가. 기술적 측면

- 곰팡이에 대한 살균력 상승을 위한 추출물 조합 제조기술 확보
- 세계 최초의 기술이며 지적 소유권(특허) 출원
- 안전한 천연 식물출물을 이용한 최소한의 사용을 통한 최대의 살균력을 확보
- 새로운 곰팡이, 세균 생장(오염) 억제 방안 제시
- 동물위생 관련 친환경, 건강한 기술의 제안
- 항생제, 항진균제의 남용감소에 따른 내성균주의 출현 감소

#### 나. 경제적·산업적 측면

- 안전한 천연 식물 살균제의 확보를 통한 다양한 제품에 응용개발 가능
- 위생적인 생활환경을 제공하는 안전한 천연소재 제공
- 농산물의 활용을 통한 농산물 산업화 및 시장 확대
- 비용이 저렴한 친환경 방법의 제안으로 축산업의 경쟁력 확대
- 항생제, 항진균제의 남용감소에 따른 건강한 먹거리 확대
- 선정 식물의 재배 농가 소득 증대

## 붙임. 참고문헌

- Mounyr Balouiri, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016 Apr;6(2):71-79.
- Sasitorn Chusri. Synergistic effects of ethnomedicinal plants of Apocynaceae family and antibiotics against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2014 Jun;7(6):456-461.
- Supreetha. S, Antifungal activity of Ginger extract on *Candida albicans* : An in-vitro study, Journal of Dental Sciences and Research, 2011 Sep;2(2):1-5.
- M Chandrasekaran, Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds, Journal of Ethnopharmacology, 2004 Mar;91(1):105-108.
- Su-Hyun Mun, Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Phytomedicine, 2013 Jun;20(8-9):714-718.
- Pinto E, Antifungal Activity of *Thapsia villosa* Essential Oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species, Molecules, 2017 Sep;22(10):1-11.
- YuJie Fu, Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination, Phytotherapy research, 2007 Oct;21(10):989-994.
- Pina-Vaz C, Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2004 Jan;18(1):73-78.
- Cavalcanti Filho JR, Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions, Pharmaceutical biology, 2017 Dec;55(1):1521-1527.
- Fernanda Gomes, Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen, Industrial Crops and Products, 2018 Feb;112:515-520.
- Haiqing Ye, Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria, Food Control, 2013 Dec;34(2):619-623.
- Mayram Hacıoglu, Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: an *in vitro* study, PeerJ. 2017 Jul
- Nabil Adrar, Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination, Industrial Crops and Products, 2016 Oct;88:112-119.
- Cristina Anamaria Semeniuc, Antibacterial activity and interactions of plant essential oil

combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Journal of Food and Drug Analysis*, 2017 Apr;25(2):403-408.

Ce Shi, Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk, *Food Control*, 2017 Jan;71:10-16.

Mohammad Abu Basma Rajeh, Assessment of *Euphorbia hirta* L. leaf, flower, stem and root extracts for their antibacterial and antifungal activity and brine shrimp lethality, *Molecules*, 2010 Aug;15(9):6008-6018.

Olgica D. Stefanović, Synergistic Activity of Antibiotics and Bioactive Plant Extracts: A Study Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control*, 2017:23-48.

Fadila Moussaoui, Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2016 Jan;6(1):32-37.

Polly Soo Xi Yap, Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria, *Phytomedicine*, 2013 Jun 15;20(8-9):710-713.

Freitas E, Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of *Escherichia coli* from clinical and animal source, *Letters in Applied Microbiology*, 2013 Oct;57(4):266-273.

Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition M27-A2, CLSI, Vol. 22 No. 15, ISBN 1-56238-469-4

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.