

토복령 추출물의 여드름 균에 대한 항균활성

박장순¹, 권혜진^{2*}

¹송원대학교 뷰티예술학과, ²승실대학교 화학공학과

Antimicrobial activity against *Propionibacterium acnes* bacteria of *Smilacis glabrae Rhizoma* extracts

Jang-Soon Park¹, Hye-Jin Kwon^{2*}

¹Dep. of Beauty Art, Songwon University, 73, Songamro, Nam-gu, Gwangju, Korea

²Dep. of Chemical Engineering, Soongsil University, Seoul 06978, Korea

요약 본 연구는 토복령 추출물의 여드름 균에 대한 항균활성 및 방부효과를 측정하여 최근 논란이 되고 있는 합성방부제의 대체 가능한 천연 항균 추출물의 개발을 위해 연구하였다. 토복령은 국내산으로 건조한 후 증류수와 95% EeOH 두 가지 용매를 각각 사용하여 실온에서 추출하였다. 그 결과 2종 *Propionibacterium acnes* 3314, *Propionibacterium acnes* 3320의 여드름 균에 대한 항균 효과가 매우 우수하였으며, 특히 증류수 추출물의 clear zone이 16.61 mm로 가장 높은 활성을 나타내었다. 또 피부오염 균집을 채취한 결과에서는 24.48 mm의 clear zone을 보여 토복령 추출물은 여드름균에 대한 항균 활성뿐 아니라 그 외 피부 상재균에 대한 항균 활성도 높음을 알 수 있었다. 이 상의 결과로 토복령 추출물은 항균효능 및 방부 효능을 갖는 화장품 원료로서의 가능성을 확인할 수 있었고, 향후 천연 방부제 개발을 위한 기초 연구 자료가 될 것으로 사료된다.

• 주제어 : 토복령 추출물, 항균활성, 여드름 균, 천연방부제, 피부 상재균

Abstract This study was conducted to measure the antimicrobial activity and antiseptic effect of Smilax china root extracts against *Propionibacterium acnes* and to develop natural antimicrobial extracts as an alternative for synthetic preservatives, which have recently been controversial. Extracts were obtained from dried Korean Smilax china root at room temperature using two solvents, distilled water and 95% EeOH, separately. According to the results of this study, the antimicrobial effect of *Propionibacterium acnes* 3314 and *Propionibacterium acnes* 3320 against *Propionibacterium acnes* was outstanding. In particular, the clear zone of the extract using distilled water showed the highest activity with 16.61 mm. As for the result of the collection of contaminated skin sample, the clear zone was 24.48 mm. This indicates that Smilax china root extracts show a high activity against skin flora as well as a high antimicrobial activity against *Propionibacterium acnes*. In conclusion, it is confirmed that Smilax china root extracts can be used as raw materials for cosmetics that have antimicrobial activity and antiseptic effect, and it is expected that Smilax china root extracts will be used as basic materials for the development of future natural preservatives.

• Key Words : Smilax china root extracts, antimicrobial activity, *Propionibacterium acnes*, natural preservatives, skin flora

*Corresponding Author : 권혜진 (dbstn912@naver.com)

Received October 11, 2017

Accepted December 20, 2017

Revised November 20, 2017

Published December 28, 2017

1. 서론

토복령은 우리나라 중부 이남의 모든 산기슭에서 자라는 청미래 덩굴(*Smilax china L.*)의 뿌리줄기를 말린 것으로 백합과에 해당된다. 예부터 한방에서는 해독작용이 강하여 관절질환에 주로 사용되었으며 그 외 근골격계 질환이나 경련, 동통 등에 이용되어져 왔다[1].

또, 본초 강목에는 강한 해독작용으로 만성피부질환, 매독성피부질환의 치료약으로 사용되어져 왔다고 기록하고 있다[2]. 토복령의 주성분으로는 parillin, smilacin 등의 saponin으로 우리 몸의 면역과 여러 가지 세균의 감염으로부터 방어 역할을 하여, 강력한 항염, 항균제 역할을 한다고 알려지고 있다[1]. 토복령의 잎도 항균효과가 있으며 뿌리 추출물의 항산화 효과 및 세포독성에 대한 보호효과도 보고된 바가 있다[3].

일반적으로 사람의 피부에 존재하며 염증을 유발하는 세균종으로 알려진 것은 *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* 등이 있으며, 여드름을 유발하는 세균으로는 *Propionibacterium acnes*가 있다[4].

피부 상재균 중의 하나인 *P. acnes*는 주로 모낭 주변과 안쪽에 상주하며, 인체의 대부분의 지질을 분해하는 효소 중 하나인 lipase를 분비하여 피지의 주성분인 중성지방이나 트리글리세라이드를 유리 지방산으로 분해하여 염증을 유발하고 확장하여 여드름을 발생시킨다[5].

따라서 본 연구에서는 한약재의 주원료로 사용되어지고 있는 토복령을 이용하여 여드름 균과 피부 상재균에 대한 항균활성 및 방부효과를 측정하여 최근 논란이 되고 있는 합성방부제의 대체가능한 천연 항균 추출 화장품원료를 개발하고자 하였다.

2. 이론적 배경

1. 천연방부제

소비자들의 합성방부제에 대한 우려와 불신으로 국내외 관련 기관에서는 방부제의 허용한도를 규제하고 합성방부제를 대체할 만한 천연물에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 천연화장품은 기존 화학원료를 최소화하고 자연에서 얻은 원료를 대체함으로 인체와 피부에 가장 안전한 제품을 의미한다. 이러한 천연원료들은 식물의 열매인 과일이나 곡물, 한방 약초 등에서 추출되어 피부

의 생리작용을 촉진하거나 정상화 시키며, 피부를 유연하게 해주며 피부의 생체 질서의 회복에 도움을 줄 뿐만 아니라 그동안 화장품이 가졌던 여러 가지 문제를 해결해 주기도 한다. 최근 이러한 천연원료들을 첨가한 화장품의 보급이 매우 빠르게 퍼지고 있다[6].

천연 항균성질을 함유한 물질은 알카로이드, 플라보노이드, 피토알렉신 등의 펩타이드 물질로, 이들은 유기산 및 지방산에 대한 항균효과도 알려져 있어 피부의 항산화, 항균과 관련하여 중요한 연구대상의 물질들이다[4]. 이러한 효과는 pH 변화와 킬레이트 효과가 이중적으로 작용한 것으로 추정된다. 그러나 이러한 천연물질들은 대부분 냄새, 색, 안정성 저하, 좁은 항균스펙트럼, 제형상의 어려움 등 많은 문제점을 가지고 있어 상용화까지 더 많은 연구가 필요할 뿐 아니라, 물질적·경제적 문제로 인하여 상용화되기가 어렵다. 시중에 주로 사용되고 있는 천연방부제로는 라이소자임, 락토펜 등 있고 상용화된 천연방부제로는 자몽오일을 이용한 것이 있으며[7] 그 외에 다른 천연방부제들이 연구되어져 오고 있으나 여러 가지 제한적인 문제를 가지고 있어 보다 안전하고 소비자들이 믿고 사용할 수 있는 제품 개발이 시급한 현실이다.

이렇듯 대부분은 천연 식물의 한계, 즉 색, 냄새, 안전성, 좁은 항균성 스펙트럼 때문에 상업화되지 않고 있다.

2. 여드름 균

여드름은 단순한 피부 질환으로 생각하지 쉽지만 청소년기의 여드름과 같은 질환은 사람의 삶의 질에도 중요한 영향을 미친다. 이러한 여드름은 과거에는 사춘기 난 청소년기에 주로 발생하였으나, 현재는 오염, 스트레스 등으로 인하여 나이에 상관없이 발생하고 있다[8].

여드름의 일반적인 생성 원인은 일차적으로 유전적 원인을 말한다[5]. 그리고 그 외에도 육체피로와 정신적 스트레스 등의 여러 원인이 있으므로 알려져 있다. 하지만 일차적인 원인은 피지분비에 있다고 할 수 있다. 이러한 다양한 원인으로 피지가 과도하게 분비하게 되면 모공이 막히고 *P. acnes*가 증식하게 되고, 여드름 균이 분비하는 효소로 인해 염증이 발현하게 되는 것으로 알려져 있다[8].

여드름 치료방법으로 사용되는 각질 제거제나 덤클린저는 피부의 수분을 감소시키고, 이러한 피지 분비량을 조절하기 위해 사용되는 약물은 지속적으로 사용할 경우

내성이 생기고 소양증 등의 여러 가지 부작용이 있다. 또, 피지분비 억제를 위해 사용되는 호르몬성 약제 또한 만성 비만, 색소 침착 등의 부작용을 야기한다. 그 외 방법으로는 병원에서 시술하는 박피술이 있으며, 이 또한 심한 피부자극과 건조함을 유발하게 되고, 흉터나 상처를 유발하기도 한다. 이러한 여드름 치료를 위하여 피부에 자극이 덜하며, 피부 수분감을 유지하고, 그 외 피부 상재균의 증식을 억제할 수 있는 화장품의 천연방부제 개발이 필요하며, 현재 많은 연구가 진행되어지고 있다[5].

3. 연구 방법

3.1 재료 및 추출

본 연구의 재료인 토복령은 우리나라 경상북도 영천에서 구입하여 열풍건조 후 분쇄하여 사용하였다. 추출은 증류수와 95% EtOH 두 가지 용매로 실온에서 3시간 동안 추출 후 농축한 후 동결 건조하여 준비하였다.

3.2 항균활성측정

3.2.1 사용균주 및 배지

항균활성측정에 사용된 균주는 여드름균 2종 *Propionibacterium acnes* 3314(*P. acnes* 3314), *Propionibacterium acnes* 3320(*P. acnes* 3320) *Bacillus subtilis*(*B. subtilis*) 그램 양성균과 *Pseudomonas aeruginosa*(*P. aeruginosa*), *Escherichia coli*(*E. coli*) 그램 음성균을 국내 생명공학연구원 KCTC, 생물자원센터 KCCM으로부터 구입하여 각균의 생육 조건에 따라 24시간 종균 배양하여 활성화시켰다. *P. acnes* 균주는 CO₂가 incubator에서 배양하였다. 실험에 사용된 배지를 <Table 1>에 정리하였다.

<Table 1> Composition of seed culture medium

Microorganism tested	Media Composition
<i>P. acnes</i>	Soluble starch, Distilled water, Beef extract, Yeast extract, Cysteine hydrochloride, Sodium acetate, Tryptose, Dextrose, Agar, Sodium chloride
<i>B. subtilis</i> <i>P. aeruginosa</i>	Peptone, Beef extract, Distilled water, Agar

<i>E. coli</i>	K ₂ HPO ₄ , Pancreatic Digest of Casein, Glucose, Pancreatic Digest of Soybean Meal, Agar, NaCl, Distilled water
----------------	--

3.2.2 Paper disc diffusion

5가지 균주에 대한 paper disc(Whatman AA discs, Whatman International) 측정은 각 액체배지의 균을 100 µL 취해서 spreader를 이용하여 고체 배지에 균일하게 도말한 후 멸균된 8 mm filter paper disc를 plate 표면 위에 놓는다. 0.1%의 각 추출물을 filter paper disc에 흡수시킨 후 30 °C incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 추출물에 생육억제 효과를 보인 미생물의 MIC (minimum inhibitory concentration)를 측정하여 분석하였다.

3.2.3 Agar-well diffusion assay

여드름균을 제외한 3가지 일반균에 대한 액체배지의 균을 100 µL 취해서 spreader를 이용하여 고체 배지에 균일하게 도말한 후 멸균된 6 mm metal cylinder plate 표면 위에 놓는다. 각 0.1%의 추출물을 metal cylinder안에 넣은 후 30 °C incubator에서 48시간 동안 배양한 후 metal cylinder 주위의 clear zone의 직경(mm) 크기를 측정하여 분석하였다.

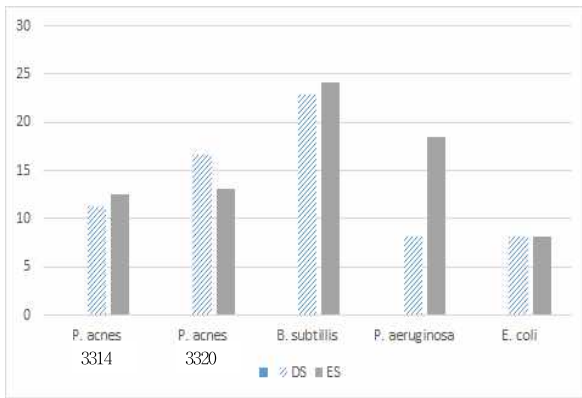
3.2.4 피부오염 균집변화

사람의 피부에 존재하는 상재균에 대한 항균활성을 측정하고자 특별한 피부질환이 없고, 관련 약을 복용하지 않은 남, 여 각각 2명씩을 선정하여 살균 면봉을 이용하여 안면을 닦아낸 후 준비한 평판배지에 전체적으로 고르게 접종하였다. 피부 상재균을 접종한 후 멸균된 8 mm filter paper disc를 plate 표면 위에 놓고 0.1%의 추출물을 평판배지 위에 접종 후 30°C에서 48시간 동안 배양하여 clear zone을 확인 후 분석에 사용하였다. 모든 측정값은 3회 반복 실험한 결과의 평균값으로 분석하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1 Paper disc diffusion

그램 양성균 *P. acnes* 3314, *P. acnes* 3320, *B. subtilis*와 그램 음성균 *P. aeruginosa*, *E. coli* 5가지 균주에 대한 0.1%의 농도 추출물의 MIC를 확인하였다. 추출물의 결과를 균주별로 [Fig. 1]에 도시하였다.



[Fig. 1] Determination of antimicrobial activity by the disc diffusion

DS : solvents distilled water
ES : solvents 95% EeOH

두 추출물 모두 *B. subtilis*에 대한 항균활성이 다른 균주에 비해 가장 높았다. 증류수를 용매로 한 DS추출물의 경우 다른 일반균주에 비해 여드름 균(*p.acnes*)에 대한 항균 활성이 더 높게 나타났고 *P. acnes* 3320에 대한 항균활성도 에탄올 추출물 보다 높게 나타나 여드름피부 타입에 적합한 화장품 원료로서의 가능성이 있음을 보여 주고 있다.

송창호(2013)[9]의 연구보고에 의하면 한약재 43종 중 1차 7가지를 선별 후 재분석하여 최종 선별된 황련과 본 연구의 토복령의 효능이 유사한 결과를 보여 토복령 물 추출물의 여드름 균에 대한 효능을 입증할 수 있다.

또, 지레원(2013)[10]의 연구보고에서는 59종의 상록성 목본식물에 대한 여드름 균의 활성 결과에서 가장 넓은 억제환(27.90 mm)을 보인 참나무과에 속한 구실잣밤나무의 잎 추출물보다 낮은 활성을 보였지만 12종의 우수식물과는 유사한 항균활성을 보였다.

4.2 Agar-well diffusion assay

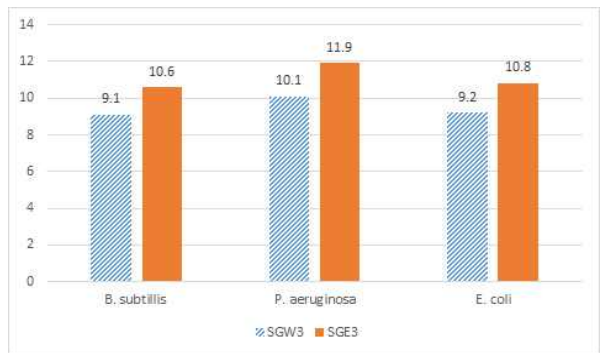
서현선(2014)[11], 김은정(2013)[12] 등 다수의 연구에서 항균활성 측정 방법으로 사용된 Agar-well diffusion assay 으로 여드름 균을 제외한 3가지 일반 피부 상재균에 대한 0.1%의 농도 추출물의 MIC를 확인하여 결과를 <Table 2>, [Fig. 2]에 도시하였다.

3가지 균주에 대한 각각 추출물의 clear zone의 직경 (mm) 크기가 모두 3 mm이상으로 나타나 모두 우수한 항균 활성을 보였다. 그 중 *P. aeruginosa*에 대한 물 추출물의 clear zone이 11.9 mm로 가장 큰 효과를 나타냈다.

<Table 2> Determination of antimicrobial activity

Sample	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
DS	+++	+++	+++
ES	+++	+++	+++

DS : solvents distilled water
ES : solvents 95% EeOH
Growth inhibition size of clear zone
- : not detected, + : less than 1.5 mm
++ : 1.5~3 mm, +++: more than 3 mm



[Fig. 2] Determination of antimicrobial activity by the disc diffusion

DS : solvents distilled water
ES : solvents 95% EeOH

4.3 피부오염 상재균에 대한 항균활성

4명의 임상 대상자의 평균 clear zone 크기는 18.8 mm로 항균활성이 매우 높았으며, *Staphylococcus sp.* and *Bacillus sp.* 세균이 감염되어 있음을 확인하였다. 황색포도상구균은 사람에게 염증을 동반한 다양한 형태의 국소적 또는 전신적 감염을 일으키는 주요 병원균으로, 황색포도상구균에서 풍부하게 발현되는 Staphylococcal protein A (SPA)는 염증의 활성화나 면역 반응의 회피와 관련된 균력 인자로서 작용할 수 있다[13]. 또, *Bacillus cereus*는 1949년 처음으로 식품유해세균으로 인식되었고, 그람양성균 포자형성 통성혐기성균으로 자연에 널리 분포하며 구토형 독소와 장독소를 생성하여 식중독의 원인된다[14].

사람의 피부에는 1cm²=10⁶ 마리의 세균 총이 존재한다고 한다. 그 중 가장 일반적인 피부 상재균은 *Corynebacteria*, *Propionibacteria* and *Staphylococci*로 알려져 있지만, 개개인의 유전적 특성에 따라 발현정도가 매우 다양하다[15]. 화장품은 제품의 특성상 유통과정과, 사용기간 동안의 오염이 되며, 반복적으로 공기 또는

피부표면과 접하여 미생물에 의한 오염 및 품질 저하, 나아가 인체 질병을 유발할 수도 있다. 따라서 제조 시 방부제의 사용을 금할 수는 없다.

2011년 가슴기 살균제 사태 이후 최근 피프로닐에 오염된 계란과 난제품의 유통 및 20여 가지 화학성분이 검출된 생리대 사건으로 생활용품의 안전성에 대한 소비자들의 경각심이 높아지면서 화장품의 방부효과 및 방부제에 대한 소비자들의 관심도 급증하고 있다. 따라서 기존의 합성 방부제보다 천연물의 방부효과를 기대하게 되고 이러한 천연 한약 추출물의 항균효과는 화장품 원료로서의 매우 중요한 역할을 할 수가 있다.

4. 결론

본 연구는 최근 논란이 되고 있는 합성방부제를 대체할 천연방부제를 한방식물에서 찾고자 토복령 추출물을 이용하여 물과 에탄올로 추출한 후 항균 및 여드름균에 대한 활성을 분석하였다. 그 결과 실험에 사용된 2종 *Propionibacterium acnes* 3314, *Propionibacterium acnes* 3320의 여드름균에 대한 항균효과가 매우 우수하였으며, 특히 증류수 추출물의 효과가 더욱 우수하였다. 또, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* 피부 상재균에 대한 활성도 높음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 토복령은 여드름과 같은 문제성 피부를 위한 기능성화장품 원료 및 화장품 자체의 오염방지를 위한 방부제 원료로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과를 바탕으로 농도별 항균효과에 대한 검토, 다른 미생물에 대해 꾸준한 항균실험의 연구가 이루어진다면 경제적이며 효과적으로 활용범위를 넓일 수 있을 뿐만 아니라, 안전성을 확보하여 천연소재로서 다양하게 이용될 것으로 판단된다.

REFERENCES

- [1] J. Y. Park, J. S. Jin, H. Y. Kang, E. H. Jeong, J. C. Lee, Y. C. Lee, S. Y. Seol, D. T. Cho, J. Kim, "A comparison of adult and pediatric methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from patients at a university hospital", *J. of the Microbiol.*, Vol. 45, No. 5, pp. 447-452, 2007.
- [2] S. H. Eom, J. H. Park, D. U. Yu, J. L. Choi, J. D. Choi, M. S. Lee and Y.M. Kim, "Antimicrobial activity of brown alga *Eisenia bicyclis* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *J. of the ish Aquat. Sci.* Vol. 14, No. 4, pp. 251-256, 2011.
- [3] J. W. Bae, "Recent Methodological Approaches to Human Microbiome Applied Korean J. Bacteriol and Virology", Vol. 41, No. 1 pp. 1-7, 2011.
- [4] T. S. Lee, E. H. Han, "Volatile flavor components in mash of takju prepared by using *Rhizopus japonicus* nuruk Applied Korean J. Food Sci. Technol", Vol. 151, No. 3 pp. 691-698. 2000.
- [5] S. J. Wang, H. J. Lee, J. Y. Cho, K. H. Park, J. H. Moon, "Isolation and Identification of Antioxidants from Makgeolli Applied Korean J Food Sci Technol", Vol. 44, No. 1 pp. 14-20, 2012.
- [6] E. H. Han, T. S. Lee, B. S. Noh, D. S. Lee, "Quality characteristics in mash of Takju prepared by using different Nuruk during fermentation Applied Korean J Food Sci Technol", Vol. 29, No. 3 pp. 555-562, 1997.
- [7] M. J. Kim, "The research about Scalp treatments by self-recognition of adult's losing hair", *J. of the Korea Convergence Society.* Vol. 3, No. 3, pp. 21-27, 2012.
- [8] H. J. Jeon, H. J. Kwon, "Anti-inflammation Effect of *Gynura Procumbens* extract Applied Journal of Digital Convergence", Vol. 14, No. 10, pp. 515-520, 2016.
- [9] C. H. Song, Y. H. Lim, M. K. Choe, H. J. Kim, "Screening of Antimicrobial Activity and Bioactivity Effects are Herbal Medicine Extracts of Acne", *J. of the Korea Immuno Yakchim Society.* Vol. 3, No. 2, pp. 9-17, 2014.
- [10] L. W. Chi, C. H. Lee, "Anti-microbial Activities of Fifty-nine Evergreen Woody Species against *Propionibacterium acnes*", *Korean Journal of Plant Research.* Vol. 3, No. 2, p. 239, 2013.
- [11] H. S. Seo, S. H. Kim, J. S. Kim, J. J. Han, J. H. Ryu, "Control of Kimchi Fermentation by the Addition of Natural Antimicrobial Agents

- Originated from Plants”, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 45, No. 5, pp. 583-589, 2013.
- [12] E. J. Kim, Y. J. Jeon, "In-vitro Cytotoxicity Testing of Polyethylene and Polystyrene Cup Noodle Containers", Master's Thesis Chosun Univ. 2014.
- [13] H. J. Kwon, Y. J. Kim, S. H. Jang, B. K. Bae, H. Y. Youn, H. W. Lee, "Stimulatory Effect of Staphylococcal Protein A on Inflammatory Response in Human HaCaT Keratinocytes", The Korean journal of microbiology Vol. 47, No. 4, pp. 384-355, 2011.
- [14] H. J. Kim, "Antimicrobial effects of extracts of Teraxacum officinale H. on acne strains. MS", Master's Thesis Kyonggi Univ. 2011.
- [15] H. K. Cho, J. Y. Lee, W. T. Seo, M. K. Kim, K. M. Cho, "Quality characteristics and antioxidant effects during Makgeolli fermentation by purple sweet potato-rice nuruk Applied Korean J Food Sci Technol", Vol. 44, No. 6, pp. 728-735, 2012.

저자소개

박 장 순(Jang-Soon Park) [정회원]



- 2013년 2월 : 광주여자대학교 미용과학과(미용학박사)
- 2015년 3월 ~ 현재 : 송원대학교 뷰티예술학과 교수
- E-mail : anima2929@songwon.ac.kr

<관심분야> : 헤어미용, 미용경영

권 혜 진(Jang-Soon Park) [정회원]



- 2011년 2월 : 숭실대학교 화학공학(공학박사)
- 2015년 9월 1일 ~ 현재 : 숭실대학교 화학공학과 교수
- E-mail : dbstr912@naver.com

<관심분야> : 향장, 피부미용