

상수리나무 잎 추출물의 항균 및 항산화 활성과 활성 물질 분리

김 소 이 · 안 유 진 · 김 은 희 · 박 수 남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2009년 5월 15일 접수, 2009년 5월 28일 수정, 2009년 6월 3일 채택)

Antibacterial and Antioxidative Activities of *Quercus acutissima* Carruth Leaf Extracts and Isolation of Active Ingredients

So I Kim, You Jin Ahn, Eun Hee Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology, 172,
Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received May 15, 2009; Revised May 28, 2009; Accepted June 3, 2009)

요 약: 본 연구에서는 상수리나무 잎 추출물의 피부 상재균에 대한 항균작용과 항산화, 성분 분석 및 tyrosinase, elastase 저해 효과에 관한 조사를 수행하였다. 피부 상재균에 대한 항균활성 측정결과, *S. aureus*, *P. acnes*, *P. ovale*, *E. coli*에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC는 각각 0.13 %, 0.25 %, 0.13 %, 0.25 %로 나타났으며, *S. aureus*, *P. acnes*, *P. ovale*에서 큰 항균활성을 나타내었다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 50 % ethanol 추출물(12.13 µg/mL) < ethyl acetate 분획(7.07) < 당을 제거시킨 플라보노이드 aglycone 분획(6.20) 순으로 증가하였다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 상수리나무 잎 추출물의 총항산화능은 50 % ethanol 추출물(OSC₅₀, 1.81 µg/mL) < ethyl acetate 분획(1.70) < aglycone 분획(0.70)순으로, aglycone 분획에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 상수리나무 잎 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였다. 상수리나무 잎 추출물의 경우 농도 의존적(1 ~ 25 µg/mL)으로 광용혈을 억제하였다. 특히 당을 제거시킨 aglycone 분획은 25 µg/mL 농도에서 τ₅₀이 220.00 min으로 매우 큰 세포보호 효과를 나타내었다. 상수리나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 당 제거 반응 후 얻어진 aglycone 분획은 TLC에서 3개의 띠로 분리되었고 상수리나무 잎 추출물의 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램은 4개의 띠(QA 1 ~ QA 4)로 분리되었으며, 그 중 QA 1은 kaempferol, QA 2는 quercetin, 그리고 QA 3는 gallic acid로 확인되었다. Aglycone 분획의 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)은 65.67 µg/mL이었고, elastase 저해활성(IC₅₀)은 24.50 µg/mL이었다. 이상의 결과들은 상수리나무 잎 추출물이 ¹O₂ 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, 상수리나무 잎 성분 분석, aglycone 분획의 tyrosinase, elastase 저해활성 그리고 피부 상재균에 대한 항균 작용으로부터 항산화, 항노화 및 항균성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하였다.

Abstract: In this study, the antibacterial activity, antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase, inhibitory effects on elastase, and components of *Quercus acutissima* Carruth leaf extracts were investigated. MIC values of ethyl acetate fraction from *Q. acutissima* Carruth leaf on *P. acnes*, *S. aureus*, *P. ovale*, and *E. coli* were 0.13 %, 0.25 %, 0.13 % and 0.25 %, respectively. The results showed that the antibacterial activity of the ethyl acetate fraction was the highest in the *S. aureus*, *P. acnes*, and *P. ovale*. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀) of extract/fractions of *Q. acutissima* Carruth, leaf was in the order: 50 % ethanol extract (12.13 µg/mL) < ethyl acetate fraction (7.07 µg/mL) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (6.20 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of some *Q. acutissima* Carruth leaf extracts on ROS generated in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

order of ROS scavenging activity was 50 % ethanol extract (OSC_{50} , 1.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < ethyl acetate fraction (1.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < deglycosylated flavonoid aglycone fraction (0.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Deglycosylated flavonoid aglycone fraction showed the most prominent scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *Q. acutissima* Carruth leaf on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *Q. acutissima* Carruth leaf extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner, particularly deglycosylated flavonoid aglycone fraction exhibited the most prominent cellular protective effect (τ_{50} , 220.00 min at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Aglycone fractions obtained from the deglycosylation reaction of ethyl acetate fraction among the *Q. acutissima* Carruth leaf extracts, showed 3 bands (QA 1, QA2 and QA3) on TLC. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction of *Q. Carruth*, leaf extract revealed 4 bands (QA 1 ~ QA 4). Among them, kaempferol (QA 1), quercetin (QA 2), and gallic acid (QA 3) were identified. The inhibitory effect (IC_{50}) of aglycone fraction on tyrosinase was 65.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The inhibitory effect (IC_{50}) of aglycone fraction on elastase was 24.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These results indicate that extract/fractions of *Q. acutissima* Carruth, can functionized as antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging $^1\text{O}_2$ and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. Extract/fractions of *Q. acutissima* Carruth can be applicable to new functional cosmetics for antioxidant, antiaging, antibacterial activity.

Keywords: *Quercus acutissima carruth*, antibacterial activity, antioxidative activity, tyrosinase, cosmetics

1. 서 론

피부는 다양한 환경적 요인과 항상 접촉하고 있기 때문에, 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 활성산소종(ROS)이 생성되며 이어서 항산화 방어계는 붕괴되고, 결과적으로 피부에 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 야기시키며, 노화를 가속화시킨다 [1-4]. 이러한 활성산소종은 반응성이 매우 큰 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 를 비롯하여 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다[5,6].

한편, 피부는 피부 상재균에 의해서 많은 피부질환이 발생되며, 여드름균, 비듬균 등이 대표적이다[7]. 여드름균은 일반적으로 호르몬과 외부적 영향에 의해 피지가 모낭관 밖으로 배출되지 못하여 모공이 막힌 경우 증식하게 되며, 이는 여드름의 원인이 된다[8]. 비듬균은 등, 목덜미와 같은 피부에서 이상적으로 증식하여 지루성 피부염을 유발시킨다[9]. 피부 상재균 이외에 기타 세균에 의한 화장품의 변질 가능성이 우려되며, 이는 피부에 악영향을 줄 수 있다. 따라서 이를 사멸하기 위해 다양한 종류의 방부제나 항균제가 사용되고 있다. 화장품에 이용되는 방부제나 항균제는 필수적이지만 기존에 사용하고 있는 합성물질들은 피부에 알러지를 유발할 수 있으므로 비교적 인체에 무해한 물질을 사용하는 것이 중요하다[10].

따라서, 산화적 스트레스에 의한 항산화 방어막의 붕

괴와 미생물로부터 피부를 보호하기 위한 항산화, 항균, 미백 및 항노화 효과를 가진 천연 소재 개발 연구가 다양하게 이루어지고 있다[11-16].

상수리나무(*Quercus acutissima* Carruth)는 참나무과에 속하는 낙엽교목으로 한국, 중국, 일본 등의 동아시아가 원산지이다. 민간에서는 뿌리껍질을 중기에, 열매는 대하증, 설사에 사용되어 왔다[17]. 또한 상수리나무는 염증, 황달, 염증에도 사용되어 왔고, 항균작용이 있다고 보고되어 있다[18-20]. 주요 성분으로는 tannin, gallic acid, (+)-catechin, (+)-galloocatechin, 3-friedelanon, β -sitosterol, β -carotene 등이 보고되어 있다[18,21,22].

상수리나무의 수피, 줄기 및 열매 추출물의 성분과 작용에 대한 연구는 보고되어 있으나 상수리나무 잎 추출물에 대하여 피부 상재균에 대한 항균 활성이나 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 등)가 생성되는 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 상수리나무 잎 추출물을 제조하여 이들 추출물(혹은 분획)의 항균 활성과 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성과 free radical 소거활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, 미백에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase 활성 저해 효과를 측정함으로써 항산화, 항노화 및 항균성 화장품 소재로서의 개발 가능성이 있는지를 검토하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek (Korea) 제품을 사용하였다.

(+)- α -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, luminol, heparin, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, trizma base, HCl 그리고 ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine, N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase (12.7 mg solid, 3,960 units/mg solid), elastase (0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 플라보노이드의 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F₂₅₄ (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였다. 비교물질로 사용한 quercetin, kaempferol, gallic acid, caffeic acid는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 상수리나무 잎은 2008년 8월 서울산업대학교 뒷산에서 채취하여 이물질을 제거하고 건조 후 사용하였다.

2.2. 상수리나무 잎의 분획 및 추출

건조된 상수리나무 잎 500 g을 잘게 자른 후 50 % ethanol 5 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % ethanol 추출물은 감압 농축한 후 물과 n-hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

Ethyl acetate 분획으로부터 aglycone 제조: ethyl acetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에 H_2SO_4 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 증탕 가열

하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

2.3. 상수리나무 잎 추출물의 항균 활성 측정

2.3.1. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ATCC6919와 비듬균인 *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) ATCC12078, 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC6538, 호기성 그람 음성 균주인 *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC23736 는 한국 미생물 보존센터에서 분양 받아 사용하였다.

2.3.2. 배지 및 배양조건

*P. acnes*의 배양 배지는 Reinforced clostridial (RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4 °C에서 보관하면서 실험 72 h 전에 활성화 시켰으며, 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system (Merck Anaerocult® Gaspack system, Germany)을 이용하여 밀봉하여 37 °C에서 72 h 동안 혐기성 배양하였다. 호기성 균주인 *S. aureus*와 *E. coli*는 Mueller-Hinton 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37 °C incubator에서 24 h 배양하면서 사용하였다. 또한 비듬균인 *P. ovale*는 Pityrosporum 배지(Malt extract agar: 6 %, ox-bile: 2 %, tween 40: 1 %, glycerol mono-oleate: 0.25 %)를 사용하였으며 균을 접종한 뒤 30 °C에서 24 h 동안 배양하여 사용하였다.

2.3.3. 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

최소억제농도(MIC)는 한천배지 확산법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 각각의 분획물들을 2 mL씩 함유한 배지 20 mL를 petri dish에 주입하였고, 시험균을 평판 배지 위에 0.1 mL 접종하였다. *P. acnes*는 37 °C에서 72 h 후에, *S. aureus*와 *E. coli*는 37 °C에서 24 h 후에, *P. ovale*는 30 °C에서 48 h 후에 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

2.4. 상수리나무 잎 추출물의 항산화 효과 측정

2.4.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 상수리나무 잎 추출물에 대한 이러한 free radical 소거활성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 ethanol 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, $\mu\text{g/mL}$)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[\frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

2.4.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 각종 ROS (O₂^{·-}, $\cdot\text{OH}$ 그리고 H₂O₂)를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μL 를 가한 후 35 mM luminol 80 μL 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 μL 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정한 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 %

감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, $\mu\text{g/mL}$)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

2.5. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 따라서 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

2.5.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.5.2. 상수리나무 잎 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μL 씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 라벤더 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된

그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ_{50} 이 31 min으로 오차범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다. 상대적인 광용혈 보호 효과는 아래와 같이 나타내었다.

$$\text{Relative protective effects} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}}$$

2.6. Tyrosinase 저해활성 측정

멜라닌은 L-tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase가 핵심 효소로 작용하여 생성되기 때문에 tyrosinase의 활성을 저해하는 능력을 측정하였다. L-tyrosine (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로 표기하였다.

2.7. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinases (MMPs: collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 대단히 중요하다.

Tris-Cl (pH 8.0) 0.13 M에 elastase 기질인 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300 μL 에 측정시료용액 7.5 μL 와 buffer 92.5 μL 를 첨가하여 25 °C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 μL 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25 °C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 μL 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.13 M Tris-Cl buffer 1,300 μL 를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

Table 1. HPLC Conditions for Separation of Ethyl Acetate and Deglycosylated Fractions from *Q. acutissima* Carruth Leaf

Column	Luna 5 μ C18 (L: 250 mm, LD: 4.6 mm)
Detector	UVD 170S Dionex
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	2 % Acetic acid : 0.5 % Acetic acid in H ₂ O in 50 % acetonitrile solution (70 : 30 ~ 10 : 90, Gradient) for ethyl acetate fraction (50 : 50 ~ 0 : 100, Gradient) for aglycone fraction (deglycosylated)

2.8. TLC 및 HPLC를 이용한 상수리나무 잎 추출물의 플라보노이드 분석

상수리나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획을 100 % ethanol에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 μm)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다. TLC 분석에서 전개용매는 ethyl acetate 분획의 경우 ethyl acetate : acetic acid : formic acid : water = 100 : 11 : 11 : 10 (v/v)을, aglycone 분획은 chloroform : acetone : formic acid = 50 : 16.5 : 8.5 (v/v)를 사용하여 분석하였다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R_f 값과 자외선 및 발색법을 이용한 분리된 띠의 색상 등으로 확인하였다. HPLC 분석은 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이 때 HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다.

2.9. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 상수리나무 잎 추출물

건조한 상수리나무 잎 500 g을 잘게 잘라 50 % ethanol 5 L에 일주일 동안 침적시킨 후 여과·감압하여 파우더를 얻었다. 이 때의 수득률은 24.50 %이었다. Ethyl acetate 분획은 50 % ethanol로 추출한 것을 *n*-hexane으로 비극성 물질을 제거한 뒤 ethyl acetate 분획을 추출하여 감압·농축하였고 수득률이 약 1.20 %이었으며, ethyl acetate 분획을 산 가수분해 시켜서 당을 제거한

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, w/v%) of Ethyl Acetate Fraction from *Q. acutissima* Carruth Leaf Against Various Bacteria

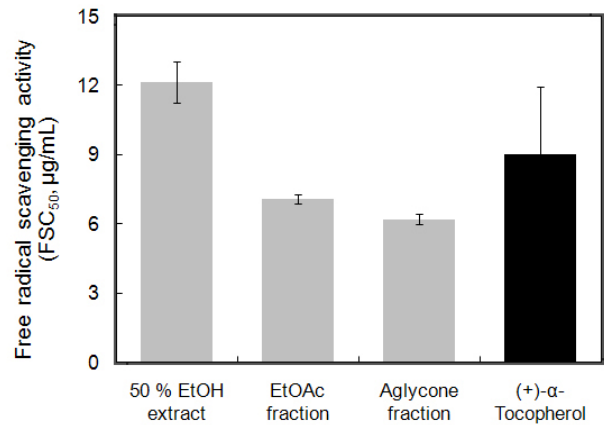
Strains	<i>Q. acutissima</i> Carruth leaf extract (50 % EtOH)	<i>Q. acutissima</i> Carruth leaf extract (EtOAc fraction)	Methyl paraben	Quercetin
<i>E. coli</i>	0.50	0.25	0.13	0.06
<i>P. ovale</i>	0.25	0.13	0.13	0.15
<i>P. acnes</i>	0.50	0.25	0.25	0.30
<i>S. aureus</i>	0.25	0.13	0.25	0.15

aglycone의 수득률은 0.08 %였다. Ethyl acetate 분획은 플라보노이드를 많이 함유하고 있으며, aglycone 분획에는 ethyl acetate 분획 플라보노이드에서 당을 제거한 플라보노이드가 존재한다. 본 연구에서는 50 % ethanol 추출물, ethyl acetate 분획, aglycone 분획을 실험에 사용하였다.

3.2. 상수리나무 잎 추출물의 항균 활성 측정

3.2.1. 균에 대한 MIC 평가

비듬균인 *P. ovale*에 대한 상수리나무 잎 분획물 중 50 % extract 추출물의 MIC는 0.25 %이고, ethyl acetate 분획의 MIC는 0.13 %로 나타났다. ethyl acetate 분획은 화장품에서 방부제로 사용하고 있는 methyl paraben (MP, 0.13 %)과 천연 플라보노이드 성분인 quercetin (0.15 %)과 비교하였을 때 비슷한 항균활성을 나타내었다. 여드름균인 *P. acnes*에 대한 상수리나무 잎 분획물 중 50 % extract 추출물의 MIC는 0.5 %, ethyl acetate 분획은 0.25 %로 나타났다. ethyl acetate 분획의 경우 MP (0.25 %)과 비교하여 동일한 항여드름균 활성을 나타내었고, 천연 플라보노이드 성분인 quercetin (0.3 %)과 비교하였을 경우 큰 항여드름균 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 상수리나무 잎 분획물이 여드름에 유효한 소재 및 화장품 개발에 응용가능성이 높음을 시사한다(Table 2). 여드름 균처럼 특정 세균의 기능이나 생리활동을 약화 또는 억제시키거나 세균자체를 사멸시키기 위한 목적의 항균제 이외에도, 화장품에서는 제품의 변질이나 오염을 막기 위해 다양한 종류의 방부제나 항균제가 사용되고 있다. 일반적으로 세균의 세포막을 파괴하여 세균을 사멸시키는 기작을 응용하여 화장품에 응용되고 있는 방부제나 항균제들은 직접적으로 인체 피부와 접촉하여 반응하게 되므로 인체 피부에 영향을 주지 않는 가능한 한 최소량을 사용하여 최대의 효과를 얻을 수 있는 물질을 선택 사용하는 것이 중요하다. 이런 관점에서 살펴보면 본 실험

**Figure 1.** Free radical scavenging activity of extracts and fraction of *Q. acutissima* Carruth leaf extracts and (+)- α -tocopherol.

험에 대조균으로 사용된 호기성 균주인 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 상수리나무 잎의 항균활성 측정 결과, *E. coli*에 대해서는 비교물질에 비하여 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 *S. aureus*에 대한 상수리나무 잎 분획물 중 50 % extract 추출물의 MIC는 0.25 %로 MP (MIC: 0.25 %)와 비교하여 동일한 항균활성을 나타내었고, ethyl acetate 분획의 경우 MIC가 0.13 %로 MP (MIC: 0.25 %), quercetin (0.15 %)과 비교하여 큰 항균활성을 나타내고 있음을 알 수 있다. 현재 사용되고 있는 방부제나 항균제가 평균적으로 0.2 ~ 0.4 % 정도의 농도 범위 내에서 사용하고 있는 것을 감안하면 상수리나무 잎 분획물은 훨씬 낮은 농도에서도 천연 방부제, 항균제로서 역할이 충분히 기대된다.

3.3. 상수리나무 잎 추출물의 항산화 활성

3.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개

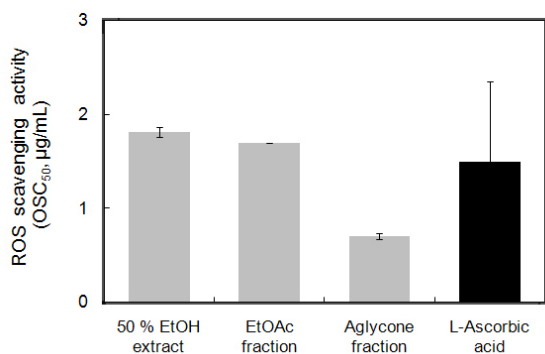


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activity of *Q. acutissima* Carruth Leaf extract and L-ascorbic acid in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

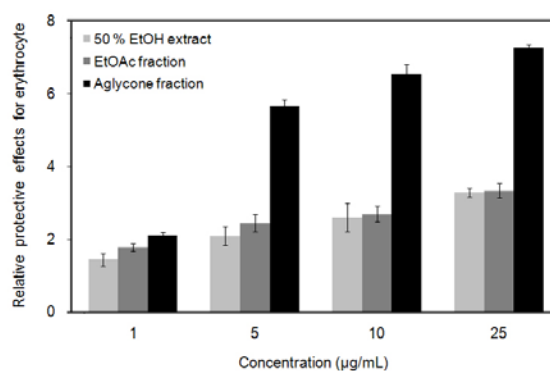


Figure 3. Cellular protective effects of *Q. acutissima* Carruth leaf extracts against ¹O₂-induced photohemolysis of human erythrocytes (control = 31.0 ± 1.0 min). Relative protective effect = sample τ₅₀/control τ₅₀.

Table 3. Effects of Extract from *Q. acutissima* Carruth Leaf Extracts and (+)-α-Tocopherol on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, µg/mL	τ ₅₀ (half time of hemolysis ¹⁾)			
	1	5	10	25
<i>Q. acutissima</i> Carruth leaf extract (50% EtOH)	43.20 ± 5.39	63.32 ± 8.17	78.63 ± 12.11	99.52 ± 3.73
<i>Q. acutissima</i> Carruth leaf extract (EtOAc fraction)	53.80 ± 3.15	74.00 ± 7.38	81.50 ± 6.52	101.00 ± 5.79
Deglycosylated fraction from <i>Q. acutissima</i> Carruth leaf extract (EtOAc fraction)	63.80 ± 2.58	172.00 ± 4.73	198.00 ± 8.49	220.00 ± 2.93
(+)-α-Tocopherol	-	-	38.00 ± 1.80	74.33 ± 6.35
L-Ascorbic acid	-	-	-	31.00 ± 1.50

¹⁾Control, τ₅₀ = 31.0 ± 1.0 min

시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. (+)-α-Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이 때 수소 주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다. 상수리나무(*Q. acutissima* Carruth) 잎 추출물과 비교물질인 (+)-α-tocopherol의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Figure 1에 나타내었다. 상수리나무 잎 추출물의 50 % extract 추출물의 경우 FSC₅₀가 12.13 µg/mL, ethyl acetate 분획은 7.07 µg/mL, aglycone 분획은 6.20 µg/mL로 나타났다. 그 외에 비교 물질로 사용한 (+)-α-tocopherol은 8.98 µg/mL로 나타났다.

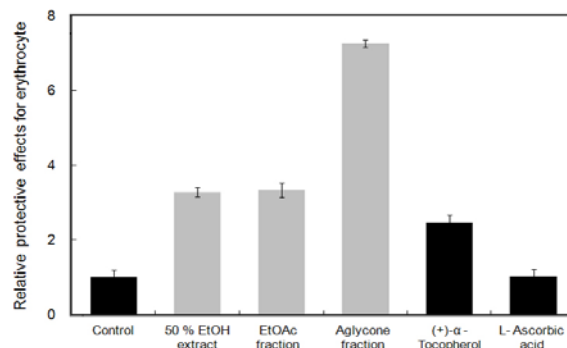


Figure 4. The effect of extracts and fractions from *Q. acutissima* Carruth leaf extracts and (+)-α-tocopherol at 25 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Relative protective effect = sample τ₅₀/control τ₅₀.

3.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 ROS 소거 활성은 상수리나무 잎 추출물은 화학발광을 감소시킴을 Figure 2에서 알 수 있다. 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC₅₀)은 상수리나무 50 % ethanol 추출물이 1.81 µg/mL, ethyl acetate 분획이 1.70 µg/mL, aglycone 분획이 0.70 µg/mL로 나타났다. 따라서 총항산화능은 당을 제거시킨 aglycone 분획이 50 % ethanol 추출물 및 ethyl acetate 추출물보다 활성산소 소거활성이 크을 알 수 있다. 당을 제거시킨 aglycone 분

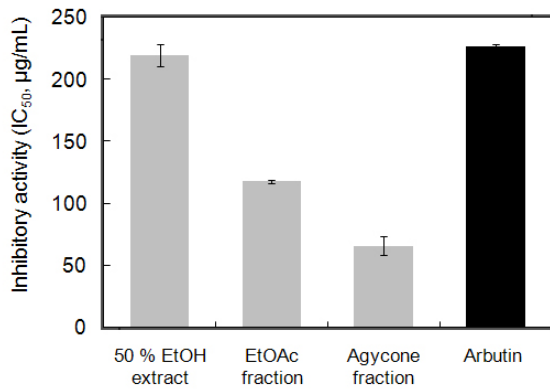


Figure 5. The effect of extract and fractions from *Q. acutissima* Carruth leaf extracts and reference on tyrosinase.

획은 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL) 보다 큰 활성을 보였다.

3.4. ¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

상수리나무 잎 추출물을 비롯한 몇 가지 항산화제들의 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과를 Table 3 및 Figures 3, 4에 나타내었다.

적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간 (τ_{50})은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 상수리나무 잎의 aglycone 분획은 1, 5, 10, 25 µg/mL의 농도 범위에서 농도 의존적(τ_{50} 이 각각 63.80, 172.00, 198.00, 220.00 min)으로 세포보호 효과를 나타냈다. Ethlyl acetate 분획의 경우 53.80, 74.00, 81.50, 101.00 min, 50 % ethanol 추출물의 경우 43.20, 63.32, 78.63, 99.52 min으로 농도의존적으로 세포보호 효과를 나타내었지만, aglycone 분획에 비해 낮은 효과를 나타내었다. 따라서 세포보호 효과는 25 µg/mL에서 50 % ethanol 추출물(99.52) < ethyl acetate 분획(101.00) < aglycone 분획(220.00) 순으로 나타났고, 이는 지용성 항산화제이며 비타민 E 성분인 (+)- α -tocopherol과 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid에 비해 매우 큰 세포보호 활성을 보여주었다. 세포막은 지질로 이루어져 있기 때문에 수용성의 L-ascorbic acid는 25 µg/mL 농도에서 활성산소에 대한 세포막 보호활성을 거의 나타내지 않았다. 만약 당이 제거된 aglycone 분획을 화장품 등에 사용하면 피부세포보호 활성에 크게 기여할 것으로 생각된다.

3.5. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이

Table 4. Inhibitory Activity of Deglycosylated Fraction, Ethyl Acetate Fraction of *Q. acutissima* Carruth Leaf Extract and Oleanolic Acid on Elastase

Compounds	Inhibition
	(IC ₅₀ , µg/mL)
<i>Q. acutissima</i> Carruth leaf extract (50 % EtOH)	92.50 ± 4.50
<i>Q. acutissima</i> Carruth leaf extract (EtOAc fraction)	22.25 ± 4.25
Deglycosylated fraction from <i>Q. acutissima</i> Carruth leaf extract (EtOAc fraction)	24.50 ± 4.95
Oleanolic acid	13.70 ± 1.03

효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중, tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA), DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 dihydroxyindole (DHI)로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는데 관여한다.

상수리나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획에서 당을 제거한 aglycone 분획은 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 65.67 µg/mL, ethyl acetate 층은 117.67 µg/mL로 aglycone 분획이 ethyl acetate 층에 비해 훨씬 큰 저해활성을 보였다. 이는 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성 226.88 µg/mL에 비해서도 큰 tyrosinase 저해활성을 보였다. 따라서 aglycone 분획과 ethyl acetate 분획을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다(Figure 5).

3.6. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되는 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부 노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

상수리나무 잎 추출물은 50 % ethanol 추출물인 경우 elastase 저해활성(IC₅₀)이 92.50 µg/mL, ethyl acetate 분획은 22.25 µg/mL, aglycone 분획은 24.50 µg/mL을 나타냈다. 특히 ethyl acetate 분획의 경우 비교물질로 사용한 oleanolic acid의 저해활성(13.70 µg/mL)보다는 낮은 활성을 보였지만, 피부 탄력 및 주름생성에 관여하는 elastase를 충분히 저해할 수 있다고 사료된다(Table 4).

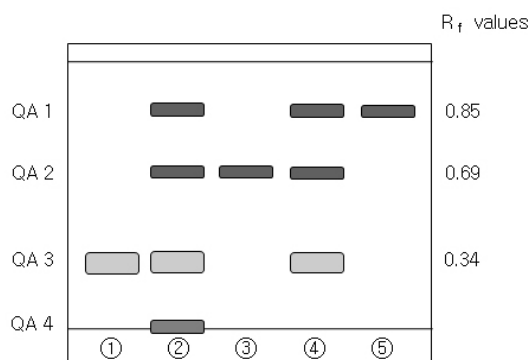


Figure 6. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *Q. acutissima* Carruth leaf and references. Eluent system: chloroform : acetone : formic acid = 50 : 16.5 : 8.5 (v/v). ①: kaempferol, ②: ethyl acetate fraction, ③: quercetin, ④: deglycosylated fraction, ⑤: gallic acid.

3.7. 상수리나무 잎 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

3.7.1. 상수리나무 잎 추출물의 TLC 성분 분석

상수리나무 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 6에 나타내었다. Figure 6은 50 % ethanol로 추출한 상수리나무 잎 추출물로부터 얻은 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램이며, 플라보노이드 배당체들을 분리할 수 있는 조건에서 상수리나무 잎의 ethyl acetate 분획은 4개의 띠(QA 1, QA 2, QA 3, QA 4)로 분리되었다. 본 TLC 조건에서 플라보노이드 aglycone은 3개의 띠로 분리되었으며, 이는 ethyl acetate 분획의 3개의 띠(QA 1, QA 2, QA 3)와 동일하였다. Figure 6에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 각각 끊어서 추출·여과하고 용매를 감압·건조시켜 얻은 띠별 파우더를 당 제거반응시킨 후 ethanol 용액으로 만들고 이들을 HPLC 분석에 사용함으로써 Figure 6에 있는 각 띠들이 어떤 플라보노이드인가를 알아보려고 하였다. 이와 함께 UV/Vis 흡수 스펙트럼과 플라보노이드 발색법 등의 분광학적 데이터들과 표준물질을 이용하여 확인하여 확인한 결과 QA 1는 kaempferol, QA 2는 quercetin, QA 3는 gallic acid로 확인되었다. 이 중 QA 1 (R_f 0.85)과 QA 2 (R_f 0.69)가 자외선 및 플라보노이드 발색법으로 확인한 결과 농도가 가장 진한 것으로 나타났다.

3.7.2. 상수리나무 잎 추출물의 HPLC 성분분석 비교

상수리나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획에서 당이 제거된 분획의 HPLC 크로마토그램을 Figure 7에 나타내었다. 크로마토그램은 3개의 피크를 나타내었다. 표

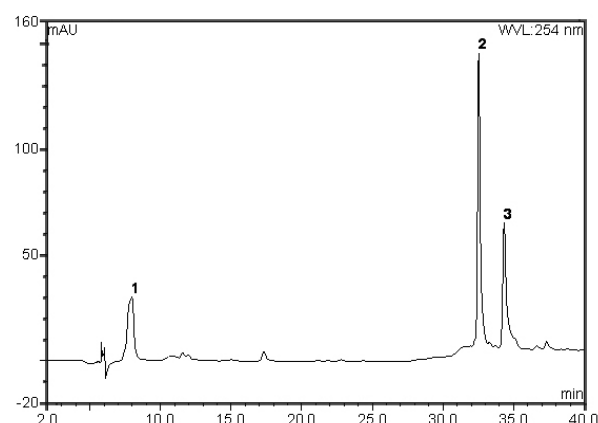


Figure 7. HPLC chromatogram of deglycosylated fraction from *Q. acutissima* Carruth leaf extract at $\lambda = 254$ nm. 1: gallic acid, 2: quercetin, 3: kaempferol.

준물질을 사용하여 peak 1, peak 2 및 peak 3은 각각 gallic acid, quercetin, kaempferol임을 확인하였고, 3가지 물질의 조성비는 gallic acid (peak 1) 32.27 %, quercetin (peak 2) 45.15 %, kaempferol (peak 3) 22.58 %로 나타났다.

4. 결 론

1) 상수리나무 잎 각각 추출 수율은 50 % ethanol 추출물은 24.50 %, ethyl acetate 분획의 경우 1.20 %, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone 분획은 0.08 % 이었다.

2) 상수리나무 잎의 항균활성 측정결과, *P. ovale*, *S. aureus*, *P. acnes*, *E. coli*에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC는 각각 0.13 %, 0.13 %, 0.25 %, 0.25 %로 나타났으며, *P. ovale*, *S. aureus*, *P. acnes*에서 큰 항균활성을 나타내었으며, 천연 방부제, 항균제로서 역할이 충분히 기대된다.

3) 상수리나무 잎 추출물의 free radical 소거능력 (FSC_{50})은 50 % ethanol 추출물 12.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ethyl acetate 분획 7.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone 분획은 6.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

4) 상수리나무 잎 추출물의 활성산소 소거활성 (OSC_{50})은 50 % ethanol 추출물 1.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ethyl acetate 분획 1.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ethyl acetate 분획의 당 제거한 aglycone 분획은 0.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 aglycone 추출물이 가장 큰 활성을 나타냈다.

5) $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 상수리나무 잎 추출물은 농도 범위(1 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 농도-의존적으로 광용혈을 억제하였다. 특히 상수리나무 잎 ethyl acetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone 분획은 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 220.00 min으로 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다.

6) Tyrosinase 저해활성(IC_{50})은 상수리나무 잎 추출물 중 aglycone 분획은 65.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 기준 물질인 arbutin (226.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 보다 큰 활성을 나타내었고, elastase 저해활성(IC_{50})은 aglycone 분획은 52.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

7) Elastase 저해활성(IC_{50})은 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획에서 각각 22.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났으며, 피부 탈력 및 주름생성에 관여하는 elastase를 충분히 저해하는 것으로 확인되었다.

8) 상수리나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획의 TLC는 4개의 띠(QA 1 ~ QA 4)로 분리되었고, 그 중에서 R_f 0.69인 QA 2 (quercetin)의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다. 상수리나무 잎 추출물 중 ethyl acetate 분획에 대하여 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 TLC는 3개의 띠를 나타내었고, 이는 ethyl acetate 분획의 QA 1, QA 2, QA 3과 동일하였다. 각 띠는 kaempferol, quercetin, gallic acid로 확인되었다.

9) Aglycone 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 3개의 피크를 나타냈고, 그 용리 순서는 gallic acid, quercetin, kaempferol이었으며 조성비는 gallic acid 32.27 %, quercetin 45.15 %, kaempferol 22.58 %로 quercetin의 함량이 가장 많았다.

이상의 결과들로부터 상수리나무 잎 추출물의 피부 상재균에 대한 항균활성과 항산화 작용 및 성분 분석 그리고 ethyl acetate 분획의 당 제거 실험 후 얻어진 aglycone 분획의 tyrosinase, elastase의 저해활성으로부터 항균성, 항산화 및 항노화 화장품 소재로서의 응용 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. S. N. Park, Skin aging and antioxidants, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **29**(1), 75 (2003).
2. B. A. Jukiewicz, D. L. Bissett, and G. R. Buettner, Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 484 (1995).
3. D. L. Black, R. Chatterjee, and D. P. Hannon, Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators, *Photochemistry and Photobiology*, **54**(2), 215 (2008).
4. M. Kubo and H. Matsuda, Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis, *Fragrance J.*, **8**, 48 (1995).
5. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
6. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
7. Y. M. Ha, B. B. Lee, H. J. Bae, K. M. Je, S. R. Kim, J. S. Choi, and I. S. Choi, Anti-microbial activity of grapefruit seed extract and processed sulfur solution against human skin pathogens, *J. Life Science*, **19**(1), 94 (2009).
8. R. R. Marples, The microflora of the face and acne lesions, *J. Invest. Dermatol.*, **62**, 326 (1974).
9. C. M. Gemmer, Y. M. DeAngelis, B. Theelen, T. Boekhout, and T. L. Dawson, Fast, non-invasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3350 (2002).
10. C. K. Zhoh, B. N. Kim, S. H. Hong, and C. G. Han, The antimicrobial effects of natural aromas for substitution of parabens, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **28**(1), 166 (2002).
11. Korea Dermatological Association, Dermatological Science, 325, Yeomungak, Seoul (2001).
12. S. S. Ham, D. H. Oh, J. K. Hong, and J. H. Lee, Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs, *J. Food Sci. Nutr.*, **2**, 155 (1997).
13. S. Jun, K. Goto, F. Nanjo, S. Kawai, and K. Murata, Antifungal activity of plant extract against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 442 (2000).
14. S. T. Kim, K. T. Lee, and T. J. Min, Characteristics

- of antimicrobial activities for the human pathogenic microorganism by extracts from Korean mushrooms, *Kor. J. Mycol.*, **31**, 67 (2003).
15. K. S. Lee, J. C. Lee, K. H. Han, and M. J. Oh, Antimicrobial activities of extract of *Perilla frutescens Briton var. acuta* Kudo on food spoilage or foodborne disease microorganism, *Kor. Soc. Food Preserv.*, **6**, 239 (1999).
 16. M. H. Oh and H. J. Whang, Chemical composition of server herb plant, *Kor. J. Food Sci. Techol.*, **35**, 1 (2003).
 17. D. H. Shin, J. S. Cho, and S. T. Jung, Study on antioxidant effects of acorn (*Quercus acutissima* Carruth) components, *Korean J. Oil Chemists' Society*, **10**(1), 93 (1993).
 18. J. Y. Moon and S. H. Cho, Studies on the distribution of polyphenols in the parts of *Quercus acutissima*, *Analytical science & technology*, **11**(6), 478 (1998).
 19. K. W. Kim, J. K. Baek, Y. W. Tang, E. J. Kum, Y. S. Kwon, H. J. Kim, and H. Y. Sohn, Screening of antibacterial agent against *Streptococcus mutans* from natural and medicinal plants, *J. Life Science*, **15**(5), 72 (2005).
 20. J. W. Yoon, M. Y. Yoo, B. G. Park, M. G. Lee, and D. H. Oh, Antimicrobial effect of ethanol extracts of *Quercus spp.* against foodborne pathogens, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutrition*, **33**(3), 463 (2004).
 21. J. K. Kim, S. G. Lee, Y. H. Ham, and Y. S. Bae, Extractives from the barks of *Quercus acutissima* and *Quercus variabilis*, *J. Korea Forestry Energy*, **21**(1), 41 (2002).
 22. S. M. Guo, Studies on extraction process of β -carotene in leaves of *Quercus acutissima*, *Food and machinery*, **22**(4), 42 (2006).