

구아바 잎 추출물의 항산화 활성 및 항균력 분석

이정선^{1,*} · 이민혁² · 이재남^{3,†}

¹을지대학교 평생교육원, 미용학전공 교수

²건국대학교 일반대학원 생물공학과, 석사

³건국대학교 산업대학원 화장품학과, 조교수

(2020년 2월 8일 접수: 2019년 2월 24일 수정: 2020년 2월 25일 채택)

Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Psidium guajava* leaf extract

Jeong-Seon Lee¹ · Min-Huck Lee² · Jae-Nam Lee^{3,†}

¹Department of of Beauty Studies, lifelong education center, Eulji University,
Seongnam, Gyeonggi 13135, Korea

²Department of Biological Engineering, Graduate School, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

³Department of Cosmetology, Graduate School of Engineering, Konkuk University,
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

(Received February 8, 2020; Revised February 24, 2020; Accepted February 25, 2020)

요약 : 본 연구는 ABTS radical 소거 활성을 통한 항산화 활성, RAW 264.7 대식 세포에서의 세포 독성, DCF-DA assay을 통한 세포 내 ROS 생성 억제 효과, 항균력을 측정하여 구아바 잎 추출물이 화장품 소재로서의 활용 가능성을 검토하고자 하였다. 실험 결과, 구아바 잎 추출물의 우수한 ABTS radical 소거 능력을 확인하였다. RAW 264.7 대식세포에서의 세포 독성은 나타나지 않았으며 세포 내에서 ROS 생성량은 농도 의존적으로 감소하는 억제효과를 확인하였다. 또한 구아바 잎 추출물의 항균력 분석에서는 피부상재균인 *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *P. acnes* 균주들에서 항균 활성이 확인되었으며, 각 균주에 대한 최소 저해 농도(MIC)는 대체로 0.25 - 1 mg/mL의 수준으로서 *P. acnes* \approx *S. aureus* < *E. coli* < *C. albican* 순의 낮은 농도로 측정되었다. 이와 같은 결과를 통해 구아바 잎 추출물의 항산화 활성과 세포 내 ROS 생성 억제 효과, 피부에 염증을 유발하는 피부상재균에 대한 항균력이 확인됨에 따라 독성이나 부작용이 없는 기능성 화장품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

주제어 : 피부상재균, 항균력, 항산화, 염증, ROS

†Corresponding author

(E-mail: jn386@konkuk.ac.kr)

* This article is a revision of the first author's doctoral's master's thesis from University.

* 이 연구는 2019년 이정선 박사학위 논문에서 발표된 것을 수정·보완하여 작성됨

Abstract : This study attempted to review the possibility of *Psidium guajava* leaf extract as a cosmetics ingredient by measuring antioxidant activity through ABTS radical scavenging activity, cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages, ROS generation-inhibiting effects through DCF-DA assay and antimicrobial activity, and the results found the followings: The *Psidium guajava* leaf extract revealed excellent ABTS radical scavenging activity. In RAW 264.7 macrophages, no cytotoxicity was found. The ROS generation in the cells was reduced in a dose-dependent manner. The antimicrobial activities were observed in the following strains: *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* and *P. acnes*. In terms of minimum inhibitory concentration (MIC) on each strain, which ranged from 0.25 to 1 mg/mL, *C. albicans* was the lowest, followed by *E. coli*, *S. aureus* and *P. acnes*. The above results confirmed the effects of *Psidium guajava* leaf extract: antioxidant activity, inhibition of ROS generation in the cells, antimicrobial effects on skin flora which causes inflammation. Therefore, it appears that the extract would be available as a cosmetics ingredient which is free of toxins and side effects.

Keywords : Skin flora, Antimicrobial activity, Antioxidant, Inflammation, ROS

1. 서론

ROS는 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$)과 같은 산소 중심의 라디칼과 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroperoxide (ROOH)와 같은 비라디칼 종들을 포함한다[1]. 이들은 화학적인 활성 반응이 매우 높아 세포막을 이루고 있는 생체분자인 지질이나 단백질 등에 반응하여 정상적인 기능을 차단하게 된다[2, 3]. 이러한 과정에서 세포는 산화적 스트레스를 받아 DNA손상 및 사멸에 의해 암, 당뇨병, 파킨슨병, 심혈관계 질환 및 염증반응 등 여러 질병과 노화를 일으키게 되며[4] 산화적 스트레스가 지속되면 항산화 방어망이 파괴된다. 따라서 생체 내 뿐 아니라, 피부에서의 ROS 생성을 억제하거나 생성된 ROS를 적극적으로 제거할 수 있는 항산화 방어망 구축을 위한 천연 항산화제 연구가 필요하다[5].

피부는 피부 상재균에 의해 염증을 비롯한 많은 피부질환이 발생할 수 있다. 피부 염증과 관련된 피부 상재균으로는 여드름 유발균인 *Propionibacterium acnes*, 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*, 효모균인 *Candida albicans* 등이 있다. 이들 중 *Staphylococcus aureus*는 항생물질이 개발되기 전에는 인간에 있어 화농성 염증을 일으키는 저항성이 강한 주요 원인균이었다[6]. 특히, *Propionibacterium acnes*

는 지질분해효소와 화학주성인자 등을 분비하여 증성지방의 가수분해를 통해 유리지방산을 생성하며, linoleic acid의 감소를 가져온다. linoleic acid의 감소는 표피장벽 기능의 이상을 초래하여 여드름(염증성)을 유발시킨다[7-11]. 여드름 및 다양한 염증이 발생하면 세포 내의 항산화 방어체계가 약화되어 항산화 효소의 활성이 감소되면서 산화적 스트레스가 심각하게 증가한다[12, 13].

현재, 미생물에 의한 피부트러블이 원인이 되어 발생하는 다양한 염증성 질환에 사용되는 약제로는 여드름 세균에 강력한 항균작용을 하는 벤조일 퍼옥사이드(benzoyl peroxide), 스테로이드와 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs) 등이 주로 사용된다. 그러나 화장품 응용이 부적합하거나 부작용에 대한 문제가 보고됨에 따라 인체에 안전하고 효과가 우수한 천연 항균제 및 방부제 개발을 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다[14, 15].

본 연구에 사용된 구아바(*Psidium guajava*)는 전 세계적으로 아열대성 기후대에 널리 분포하고 있는 도금양과(*Myrtaceae*)에 속하는 아열대성 식물이다[16]. 주요 성분으로는 과실의 경우 페놀성 화합물인 anthocyanin, myricetin, apigenin, ellagic acid등과 카로티노이드, 비타민 C가 다량 함유되어 있으며[17, 18], 잎의 경우는 alkaloid, tannin, flavonoid, sesquiterpene, triterpenoid, coumarin 등이 다량 함유되어 기능성 소재로써 활용 가치가 매우 높은 천연 식물 소재이다[19].

그러나 기능성 화장품 소재로써 구아바 잎 추출물에 대한 ROS 생성 억제 및 피부에 염증을 유발하는 피부 상재균의 항균효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 구아바 잎 추출물의 ABTS radical 소거활성을 통한 항산화 활성을 확인하고, RAW 264.7 대식세포에 대한 세포 독성, 세포 내 ROS 생성 억제 효과, 피부 상재균의 항균활성과 최소저해 농도(MIC) 등을 측정하고자 하였으며, 이를 바탕으로 인체에 무해하고 효과적인 기능성 화장품 소재로써의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

2.1.1. 재료 및 추출

본 실험에 사용한 구아바 잎은 약초명가에서 국내산으로 구입하여 믹서(FM-909W, 한일, Korea)를 이용하여 갈아준 다음, 70% ethanol에 1:10 (w/w)으로 3일간 37°C incubator에서 추출하였다. 추출물의 침전물을 원심분리(3000 rpm, 5 min)로 가라앉힌 후 상층액을 여과지(Whatman filterpaper No.2)에 filtering을 하였다. 에탄올을 제거하기 위해 감압농축기(N-1110S, EYELA, Japan)를 이용하여 농축한 후에 동결건조(DC1316, 일신, Korea)를 실시하여 건조 시료를 제조하였다.

2.1.2. 사용시약

본 실험의 사용 시약은 trolox, PBS (phosphate buffered saline), TBHP (tert-butyl hydroperoxide), DCF-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate), sodium carbonate, ABTS (2,2'-azino-

bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), NR (neutral red) solution, formaldehyde, acetic acid를 Sigma chemical (USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외의 기타시약은 특급시약을 사용하였다.

2.1.3. 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용한 세포는 단핵세포주인 RAW 264.7 대식세포를 사용하였으며, 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Korea)에서 분양하여 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)과 1% penicillin (100 IU/mL, GE Healthcare life sciences, USA), 1% streptomycin (50 µg/mL, GE Healthcare life sciences)를 High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) 배지에 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂ 인큐베이터 안에서 배양하였으며, 세포 주기는 3~4 일을 유지하며 계대배양 하였다.

2.1.4. 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주와 배지는 아래의 Table 1에 나타내었다. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P는 미국 미생물 보존센터에서, *Escherichia coli* KCTC 1682 *Candida albicans* KCTC 7270 및 *Propionibacterium acnes* KCTC 3320은 한국 생명공학 연구원 생명 자원 센터에서 분양받아 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. ABTS radical 소거활성을 통한 항산화력 측정

본 실험은 TEAC assay를 이용하여 ABTS radical 소거활성을 통한 항산화 활성 측정을 위하여 Re et al.[20]의 방법을 변형하여 측정하였다. TEAC assay는 DPPH assay처럼 ET

Table 1. Culture Conditions of the Strain Used in the Experiment

Strain	Strain NO	Medium	Incubating condition
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538P	Nutrient broth	37°C
<i>E. coli</i>	KCTC 1682	Nutrient broth	37°C
<i>C. albicans</i>	KCTC 7270	Potato dextrose broth	37°C
<i>P. acnes</i>	KCTC 3320	Brain heart infusion broth	37°C CO ₂ incubator

(electron transfer)기반의 검정방법이다. ABTS radical을 형성하도록 실온인 암소에서 24시간 반응하여 2.45 mM potassium persulfate에 용해시킨 7.4 mM ABTS 용액을 제조하였다. 이후 만들어진 ABTS 용액을 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 0.70 ± 0.02 로 희석시켜 ABTS working solution을 제조하였다. ABTS Working solution 180 μ L와 시료 20 μ L를 혼합하여 암실에서 20 min 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS radical 소거율을 측정하였다. 표준물질로 trolox를 이용하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = 100 - \{(\text{첨가군의 흡광도}/\text{무첨가군의 흡광도}) \times 100\}$$

2.2.2. Neutral Red assay를 통한 세포 독성 측정

구아바 잎 추출물의 세포 독성을 확인하고자 neutral red (NR) assay를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 well 당 3×10^4 cells/well의 농도로 RAW 264.7 대식세포를 분주하여, 24 h 동안 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 구아바 잎 추출물을 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 희석하여 처리한 후 48 h 동안 배양하였다. 배양된 세포 배양액을 NR solution이 1% 포함된 무 혈청배지로 교환하여, 3 h 배양 후 현미경하에서 NR의 결정화 유무를 결정하였다. phosphate buffered saline (PBS)에 10% formaldehyde 용액을 첨가하여 각 well에 100 μ L씩 분주하여 20 min 동안 고정될 수 있도록 처리한 후, NR desorb solution (50% distilled water, 49% ethanol, 1% glacial acetic acid)을 각 well에 100 μ L로 분주하여 세포 내의 NR을 추출하였다. microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 본 실험의 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

2.2.3. DCF-DA assay를 통한 세포 내 ROS 측정

DCF-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate) 방법을 이용하여 세포 내 ROS 생성량 측정은 Eruslanov *et al.*[21]의 방법을 변형하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 이용하여 3×10^4 cells/well로 96 well black plate에 분주 한 후 24 h 배양하였다. 24 h 후 ROS생성을 위해 tert-butyl hydroperoxide가 함유된 배지로 교환 후 구아바 잎 추출물을 농도별로 희석하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 24 h 동안 배양하였다. DCF-DA 10 μ M 첨가하여 30 min 어두운 곳에서 배양 한 후 Fluorescence plate reader를 이용하여 485 nm / 530 nm (excitation / emission)에서 ROS 생성량을 측정하였다.

$$\text{ROS 생성량(\%)} = (\text{첨가군의 형광값}/\text{무첨가군의 형광값}) \times 100$$

2.2.4. 구아바 잎 추출물의 항균력 분석

2.2.4.1. 균주에 대한 항균 활성

구아바 잎 추출물의 항균 활성을 측정하기 위해 paper disc assay[22]를 변형하여 측정하였다. 1일간 배양시킨 균주들이 함유된 액체배지를 고체배지 위에 1 mL씩 도말한 후, 구아바 잎 추출물을 농도별로 희석하여 담은 paper disc를 그 위에 올려놓고 1일간 추가 배양하였다. 배양 후 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다. 이때 구아바 잎 추출물을 농도는 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 g/mL이 되도록 6 mm paper disc에 50 μ L씩 흡수 시켰고 control로 추출물을 흡수시키지 않은 paper disc를 올려두었다.

2.2.4.2. 최소 저해 농도 측정

최소 저해 농도(MIC, minimum inhibitory concentration)의 측정은 broth micro dilution method[23]를 변형하여 측정하였다. 1일간 배양된 세균 배양액을 650 nm에서 흡광도 0.3으로 희석하여 96 well plate에 각각의 시험군 배양액을 100 μ L씩 분주하고, 구아바 잎 추출물을 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL의 농도로 100 μ L

씩 처리한 후 1일간 추가 배양하였다. 구아바 잎 추출물이 세균의 증식에 미치는 영향을 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA) 를 통해 650 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. MIC의 판정은 멸균된 배양액을 넣은 각각의 control과 비교하여 판단하였다.

2.3. 통계처리

본 실험은 모두 동일한 조건에서 독립적으로 3 회 이상 측정한 후 실험 결과를 얻어 사용하였으며, 평균 ± 표준편차(Mean ± SD)로 표기하였다. 통계 처리는 SPSS Window Version 17.0 (SPSS Inc., Illinois, USA)을 이용하여 분석하였고, 유의성 검증은 Student t-test로 실시하였다. 실험 결과 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하여 표기하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ABTS radical 소거활성을 통한 항산화 활성 측정

구아바 잎 추출물의 ABTS radical 소거 활성을 통한 항산화 활성을 Fig. 1에 나타내었다. 실험 결과, 구아바 잎 추출물을 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL 농도로 처리하였을 때 ABTS radical 소거능은 각각 64.2%, 76.3%, 92.1%, 94.8%로 확인되었다. 또한 trolox를 positive control로 이용하여 구아바 잎 추출물과 항산화 활성을 비교한 결과는 1 mg/mL 농도에서 trolox는 97.7%, 구아바 잎 추출물은 94.8%의 ABTS radical 소거 활성이 나타나 trolox와 유사한 radical 소거 활성을 확인하였다.

선행연구에서는 구아바 잎 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 SOD 유사 활성이 낮은 농도에서도 강한 활성을 나타냈는데, 이는 구아바 잎에 플라보노이드(flavonoid)와 탄닌(tannin)계의 페놀성 화합물들이 다량 함유되어 있어 항산화 활성이 나타난 것으로 보고하였다 [19]. 본 연구의 TEAC assay를 이용한 ABTS radical 소거 활성은 DPPH assay radical 소거 활성처럼 ET (electron transfer)기반의 검정방법이다.

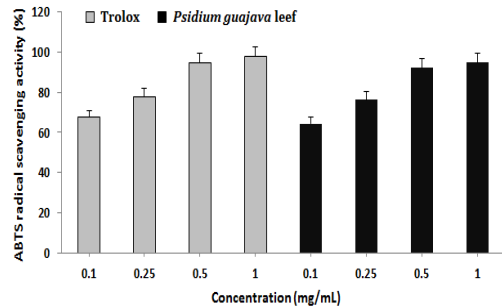


Fig. 1. ABTS Radical Scavenging Activity of *Psidium guajava* leaf extract. Three independent trials of experiment were performed, and the results were stated in mean ± standard deviation.

3.2. Neutral red assay를 통한 세포 독성 측정

구아바 잎 추출물의 세포 독성을 확인하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도를 처리하여 세포 독성을 확인하였으며 Fig. 2에 나타내었다. 실험 결과, RAW 264.7 대식세포에 구아바 잎 추출물을 처리한 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았고, 무처리군인 control 생존을 100%와 비교하면 각각의 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도에서 생존율이 98.12%, 98.05%, 96.87, 95.94%로의 세포 생존율을 보였다. 이와 같은 결과를 통하여 구아바 잎 추출물의 세포 독성은 나타나지 않은 것으로 확인되었으며, 추후 최고 농도 100 µg/mL으로 희석하여 다음 실험을 진행하였다.

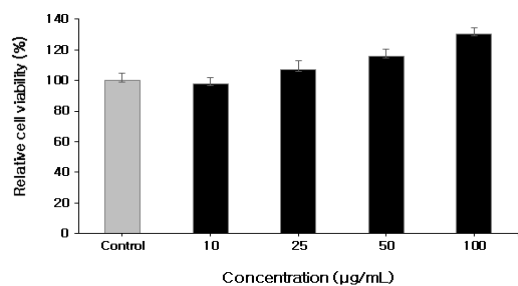


Fig. 2. Cytotoxicity in RAW 264.7 cells. The cytotoxicity of *Psidium guajava* leaf extract was measured in RAW 264.7 cells. The results are presented as the mean ± S.D. of three independent experiments.

3.3. DCF-DA assay을 통한 세포 내 ROS 측정

구아바 잎 추출물의 세포 내 ROS 생성 효과를 측정하여 결과를 Fig. 3에 나타내었다. RAW 264.7 대식세포에서 ROS 생성량은 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 120.5%, 110.8%, 100.4%, 89.7%로 나타나 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서부터 ROS의 생성량이 유의미하게 억제되었다($p < .01$).

인체에서 발생하는 염증 및 노화의 발생과 진행 과정은 산화적 스트레스와 활성산소가 관여하며, 특히 피부 세포의 유전적 변형에 중요한 병리적 요소로도 알려져 있다[24, 6]. Satyamoorthy *et al.*[25]의 연구에서는 ROS 생성량 증가를 통하여 mitogen activated protein kinase pathway (MAPK pathway)를 활성화 시키며, Huang *et al.*[26]의 연구에서는 MAPK가 활성화 되면 세포의 활성화와 분화를 증가시키게 되는데, 염증에 의한 암 발생에 관여하기도 한다고 보고하였다. 따라서 구아바 잎 추출물이 피부 염증 질환을 유발하는 ROS를 억제함으로써 노화예방 등의 화장품 소재로서의 가능성을 보여준다.

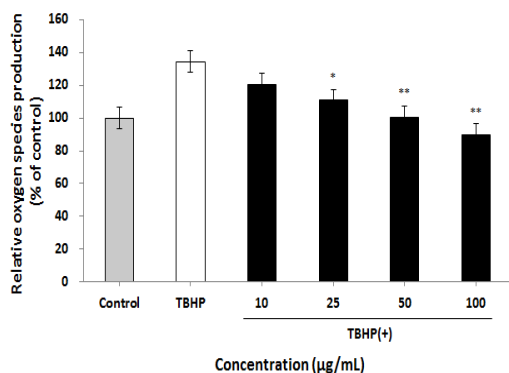


Fig. 3. The Reactive Oxidant Species (ROS) Generation-inhibiting Effects of *Psidium guajava* leaf extract in RAW 264.7 Macrophages cells. Three independent trials of experiment were performed, and the results were stated in mean \pm standard deviation (* $p < .05$, ** $p < .01$).

3.4. 구아바 잎 추출물의 항균력 분석

3.4.1. *Staphylococcus aureus* 균에 대한 항균 활성

피부에 염증을 유발하는 피부 상재균 *S. aureus*에 대한 구아바 잎 추출물의 항균 활성을 확인하기 위해 paper disc assay[22]를 변형하여 측정된 결과, *S. aureus*에 대한 구아바 잎 추출물의 항균 활성은 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 g/mL의 농도에서 각각의 clear zone 직경이 9, 10, 11, 13 mm로 나타났다(Fig. 4).

*S. aureus*는 황색포도상구균으로 항생물질이 개발되기 전에는 인간에 있어 화농성 염증을 일으키는 주요원인 균으로 저항성이 강하다. 사람 및 동물의 피부 등에도 상재하고 있으며[27], 일차적으로 피부와 연부조직에 감염을 일으켜 농피증(pyoderma)의 원인이 되고 골수염, 심내막염, 패혈증과 균열증 등 생명을 위협하는 중한 전신 감염증을 유발할 수 있다[28, 29]. 따라서 구아바 잎 추출물이 *S. aureus*에 대해 높은 항균활성을 보였으므로 화농성 염증을 유발하는 균주에 대한 항균 화장품소재로서의 가능성을 보여준다.

3.4.2. *Escherichia coli* 균에 대한 항균 활성

피부에 염증을 유발하는 피부 상재균인 *E. coli*에 대한 구아바 잎 추출물의 항균 활성을 확인하기 위해 paper disc assay[22]를 변형하여 측정된 결과, *E. coli*에 대한 구아바 잎 추출물의 항균 활성은 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 g/mL의 농도에서 각각의 clear zone 직경이 9, 9, 10, 12 mm로 나타났다(Fig. 4).

*E. coli*는 gram negative의 통성혐기성 간균으로 포도당의 분해를 통해 산을 생성한다[27]. 또한 대장균인 *E. coli*는 면역력이 저하되어 있거나 허약한 경우 혹은 위장관이 손상되어 있는 경우 비병원성 대장균에 감염될 수 있으며, 동물이나 사람의 분변에 존재하는 균주이므로 식품변질에 의한 오염을 측정하는 지표가 된다[30]. 따라서 구아바 잎 추출물이 *E. coli*에 대해 항균활성을 보였으므로 화장품의 변질을 저해하는 천연방부제로써 화장품 소재로의 활용 가능성을 보여준다.

3.4.3. *Candida albicans* 균에 대한 항균 활성

피부에 염증을 유발하는 피부 상재균인 *C. albicans*에 대한 구아바 잎 추출물의 항균활성을 확인하기 위해 paper disc assay[22]를 변형하여 측정한 결과, *C. albicans*에 대한 구아바 잎 추출물의 항균 활성은 0.5 g/mL의 농도에서부터 clear zone 직경이 10 mm로 나타나기 시작했다 (Fig. 4).

*C. albicans*는 효모와 곰팡이로 자랄 수 있는 이배체 곰팡이로 구강 내에 병을 유발하거나 생식기에 감염된다[31]. 또한 *C. albicans*는 가장 많은 질병을 야기시키는 것으로 알려졌으며, 면역력이 크게 저하되어 있을 때 감염된다[32]. 따라서 구아바 잎 추출물이 *C. albicans*에 대해 높은 항균활성을 보였으므로 화장품 소재에 있어 천연 항진균제로써의 활용 가능성을 보여준다.

3.4.4. *Propionibacterium acnes* 균에 대한 항균 활성

피부에 염증을 유발하는 피부 상재균인 *P. acnes*에 대한 구아바 잎 추출물의 항균 활성을

측정하기 paper disc assay[22]를 변형하여 측정 한 결과, 구아바 잎 추출물의 항균 활성은 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 g/mL의 농도에서 각각의 clear zone 직경이 10, 11, 13, 14 mm로 나타났다 (Fig. 4).

*P. acnes*는 혐기성의 여드름 균으로 lipase를 분비하여 피지의 주성분인 triglyceride를 free fatty acid로 분해하여 모공 및 모낭벽 주위의 세포에 염증을 일으킨다[33]. 특히, 피지분비가 왕성해지는 시기인 사춘기에 많이 증식하고 모낭 말단 누두부(acroinfundibulum)에 존재하며 심상성 여드름에 영향을 미친다[34]. 따라서 구아바 잎 추출물이 여드름을 유발하는 *P. acnes*에 대해 높은 항균 활성을 보였으므로 화장품 소재에 있어 천연 항균제로써의 활용 가능성을 보여준다.

3.5. 최소 저해 농도(MIC)

구아바 잎 추출물의 여드름 관련 균주에 대한 최소 저해 농도(MIC)는 Table 2에 나타내었다. 각 균주에 대한 MIC는 대체로 0.25 - 1 mg/mL의 수준으로 나타났으며, *P. acnes* \approx *S.*

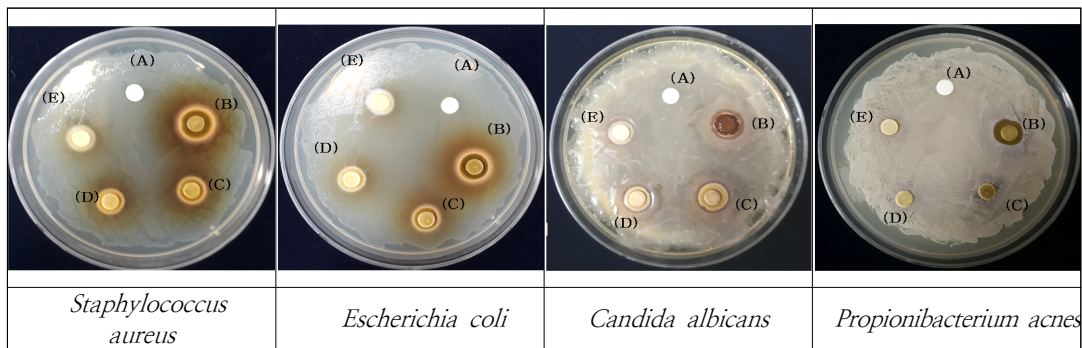


Fig. 4. Antimicrobial activity of the extract of *Psidium guajava* leaf on *Staphylococcus aureus*. (A) : control, (B) : 0.5 g/mL, (C) : 0.25 g/mL, (D) : 0.1 g/mL, (E) : 0.05 g/mL

Table 2. *Psidium guajava* leaf of extract minimum inhibitory concentration (MIC)

Strains	Growth of various concentration (mg/mL)						MIC (mg/mL)
	0	0.25	0.5	1	2.5	5	
<i>S. aureus</i>	+ ¹⁾	± ²⁾	- ³⁾	-	-	-	0.25 - 0.5
<i>E. coli</i>	+	+	±	-	-	-	0.5 - 1
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	-	-	0.5
<i>P. acnes</i>	+	±	-	-	-	-	0.25 - 0.5

¹⁾Growth, ²⁾Uncertain growth, ³⁾No growth.

aureus < *E. coli* < *C. albican* 순으로 구아바 잎 추출물의 MIC가 낮은 농도로 측정되었다.

Mahfuzul *et al.*[35]에 따르면 구아바 잎 추출물은 gram negative bacteria보다 gram positive bacteria에 더 높은 항균력을 보인다고 하였으며, Arima & Danno[36]은 이와 같이 항균력을 나타내는 데는 4가지의 플라보노이드 화합물(morin-3-O- α -L-lyxopyranoside, morin-3-O- α -L-arabopyranoside, guaijavarin, quercetin)이 있다고 보고하였다. 따라서 이와 같은 결과 값은 gram positive bacteria인 *S. aureus*와 *P. acnes*에 생육을 효과적으로 저해하였고, gram negative bacteria인 *E. coli*에도 gram positive bacteria에 대한 항균활성 만큼 낮은 농도에서 강한 활성을 보이지 않았지만 충분히 낮은 농도에서도 효과적으로 생육을 저해하였다. 이는 구아바 잎 추출물의 플라보노이드 성분이 gram positive bacteria에 대해 높은 항균활성을 가지고 있어 화장품의 천연 방부제로써의 가치를 확인할 수 있었다.

4. 결론

본 연구에서는 구아바 잎 추출물을 70% 에탄올로 추출하여 ABTS radical 소거 활성을 통한 항산화 활성을 확인하고, RAW 264.7 대식 세포에서의 세포 독성과 DCF-DA assay을 통한 세포 내 ROS 생성 억제 효과, Paper disc assay을 통한 피부상재균의 항균력을 측정하여 구아바 잎 추출물이 화장품 소재로써의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

본 실험 결과, 구아바 잎 추출물의 우수한 ABTS radical 소거능을 확인하였으며, trolox를 positive control로 비교하였을 때는 trolox와 유사한 radical 소거 활성을 확인하였다. 대식세포인 RAW 264.7 세포에서의 세포 생존율을 통한 세포 독성을 확인한 결과 추출물의 농도가 증가할수록 세포 증식의 효과가 확인되었으며 세포 독성이 나타나지 않았다. 구아바 잎 추출물의 세포 내 ROS를 억제하는 효과를 측정한 결과 RAW 264.7 세포주에서 ROS 생성량은 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 50 μ g/mL 농도에서부터 ROS의 생성량이 유의미하게 억제되었다 ($p < .01$). 또한 구아바 잎 추출물의 항균효과를 각 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 g/mL 농도에 따라 확인한 결과 *S. aureus* 균의 항균 활성은 농도별 각각의

clear zone 직경이 9, 10, 11, 13 mm로 나타났으며, *E. coli* 균의 항균 활성은 농도별 각각의 clear zone 직경이 9, 9, 10, 12 mm로 나타났다. 그리고, *C. albicans* 균의 항균 활성은 0.5 g/mL의 농도에서부터 clear zone 직경이 10 mm로 나타나기 시작했다. *P. acnes* 균의 항균 활성은 농도별 각각의 clear zone 직경이 10, 11, 13, 14 mm로 나타났다. 구아바 잎 추출물의 피부 상재균에 대한 최소 저해 농도(MIC)는 대체로 0.25 - 1mg/mL의 수준으로 나타났으며 *P. acnes* \approx *S. aureus* < *E. coli* < *C. albicans* 균주의 순으로 구아바 잎 추출물의 MIC가 낮은 농도로 측정되었다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때, 구아바 잎 추출물의 ABTS radical 소거활성을 통한 항산화 활성과 세포 내 ROS 생성 억제 효과, 피부에 염증을 유발하는 피부상재균에 대한 항균효과 및 낮은 농도의 최소저해 농도(MIC)가 확인됨에 따라 독성이나 부작용이 없는 기능성 화장품 소재로써의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

References

1. M. H. Gordon, "Dietary antioxidants in disease prevention", *Nat. Prod. Rep.* Vol.13, pp. 265-273, (1996).
2. O. I. Aruoma, H. Kaur, B. Halliwell, "Oxygen free radicals and human diseases", *J. R. Soc. Health*, Vol.111, pp. 172-177, (1991).
3. S. H. Seo, H. Lee, M. O. Choi, "The Anti-inflammatory Actions and Dermal Bioactive Effects of *Coreopsis lanceolata* extracts", *J. Kor. Soc. Cosmetolo*, Vol.24, No.3 pp. 472-481, (2018).
4. F. Anwat, N. Shaheen, G. Shavir, M. Ashraf, K. M. Alkharfu, A. H. Gilani, "Variation in antioxidant activity and phenolic and flavonoid contents the flowers and leaves of *Ghaneri*(*Lantana camara* L.) as affected by different extraction solvents", *Int. J. Pharmacol*, Vol.9, pp. 442-453, (2013).
5. M. J. Kim, J. N. Lee, "A Study on *Peucedanum Japonicum* Thunberg Extract

- on Anti-oxidation and Cell Activities as Cosmetic Additive”, *J. Kor. Soc. Cosmetol.*, Vol.22, No.6 pp. 1135–1143, (2016).
6. V. Atanassova, A. Meindl, C. Ring, “Prevalence of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR”, *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.68, No.1–2 pp. 105–113, (2001).
 7. K. S. Lee, J. C. Lee, K. H. Han, M. J. Oh, “Antimicrobial activities of extract of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo on food spoilage or food borne disease microorganism”, *J. Kor. Soc. Food Preserv.* Vol.6, pp. 239–244, (1999).
 8. E. J. Lee, S. Y. Bae, K. W. Nam, Y. H. Lee, “Antibacterial and anti-inflammatory effects of medicinal plants against acne-inducing bacteria”, *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* Vol.36, pp. 57–63, (2010).
 9. M. S. Seo, K. Y. Kim, “Effects of lithospermum erythrorhizon extracts on P. acnes induced cytokin gene expression in human monocytes”, *Kor. J. Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, Vol.23, pp. 57–68, (2010).
 10. K. Yoshitama, M. Hisada, N. Ishikura, “Distribution pattern of anthocyanins in the Polygonaceae”, *Bot. Mag. Tokyo*, Vol.97, pp. 31–38, (1984).
 11. H. G. Yang, H. J. Kim, H. S. Kim, S. N. Park, “Antioxidative and Antibacterial Activities of *Artemisia princeps* Pampanini Extracts”, *Kor. J. Microbiol Biotechnol.* Vol.40, No.3 pp. 250–260, (2012).
 12. B. Fubini, A. Hubbard, “Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis”, USA, *J. Free Radical Biology & Medicine*, Vol.34, No.12 pp. 1507–1516, (2003).
 13. T. Hemnani, M. Parihar, “Reactive oxygen species and oxidative DNA damage”, *Ind. J. Physiology and Pharmacology*, Vol.42, No.4 pp. 440–452, (1998).
 14. H. J. You, S. U. Hong, “A Case of Urticarial Drug Eruption Assumed to be Caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)”, *Kor. J. Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. Vol.20, No.1 pp. 256–264, (2007).
 15. J. S. Lee, C. D. Kim, “Total phenolic compound, Total flavonoid compound and Anti-inflammatory Inhibitory Effects of *Psidium guajava* leaf extract”, *J. Kor. Applied Science and Technology*, Vol.35, No.1 pp. 254–262, (2018).
 16. S. Begum, S. I. Hassa, B. S. Siddiqui, F. Shaheen, M. N. Ghayur, A. H. Gilani, “Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*”, *Phytochemistry*, Vol.61, No.4 pp. 399–403, (2002).
 17. A. Z. Mercadante, A. Steck, H. Pfander, “Carotenoids from *Psidium guajava* L. (*Psidium guajava* L.) : isolation and structure elucidation”, *J. Agric. Food Chem.* Vol.47, No.1 pp. 145–151, (1999).
 18. M. Meckes, F. Calzada, J. Tortoriello, J. L. Gonzalez, M. Martinez, “Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system”, *Phytother Res.* Vol.10, No.7 pp. 600–603, (1996).
 19. S. H. You, “Antioxidant Activity and Whitening activity of *Psidium guajava* left extract”, *J. Kor. Applied Science and Technology*, Vol.34, No.2. pp. 296–304, (2017)
 20. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, R. Evans, “C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *J. Free Radic Biol Med.* Vol.26, pp. 1231–1237, (1999).
 21. E. Eruslanov, S. Kusmartsev, “Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry, In Advanced protocols in oxidative stress II”, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 57–72, (2010).
 22. S. Voravuthikunchai, A. Lortheeranuwat,

- W. Jeeju, T. Sririrak, S. Phongpaichit, T. Supawita, "Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7", *J. Ethnopharmacolo*, Vol.94, No.1 pp. 49-54, (2004).
23. A. Reuben, E. Anaissie, P. E. Nelson, R. Hashem, C. Legrand, D. H. Ho, G. P. Bodey, "Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol.33, No.9, pp. 1647-1649, (1989).
24. C. S. Sander, H. Chang, S. Salzmann, C. S. Muller, M. S. Ekanayake, P. Elsner, J. J. Thiele, "Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*", *J. Invest Dermatol*. Vol.118, pp. 618-625, (2002).
25. K. Satyamoorthy, G. Li, M. R. Gerrero, M. S. Brose, P. Volpe, B. L. Weber, M. Herlyn "Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation", *J. Cancer research*, Vol.63, No.4, pp. 756-759, (2003).
26. P. Huang, J. Han, L. Hui, "MAPK signaling in inflammation-associated cancer development" *Protein cell*, Vol.1, No.3 pp. 218-226, (2010).
27. P. Singleton, (Ed. 6). *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*. pp. 1-570, United Kingdom : Chichester, (2004).
28. Y. J. Kim, "A study of prevalence and antibioticsu sceptibilities of *Staphylococcus aureus* in the bacterial skin infection of dermatology outpatients", *Kor. J. Dermatol*, Vol.39, No.8 pp. 866-871, (2001).
29. E. Y. Bae, J. D. Lee, S. H. Cho, "Isolation ofcausative microorganism andantimicrobial susceptibility in impetigo", *Kor. J. Dermatol*, Vol.40, pp. 1278-1285, (2003).
30. B. S. Drasar, M. J. Hill, *Human intestinal flora*, pp. 1-263, London : Academic Press, (1974).
31. B. Hube, (Ed.). *Candida : comparative and functional genomics*, pp. 1-428, United Kingdom : Horizon Scientific Press, (2007).
32. Grayer, J. B. Harborne, "A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993", *Phytochemistry*, Vol.37, No.1 pp. 19-42, (1994).
33. G. Peter, A. L. Smith, "Group A streptococcal infections of the skin and pharynx". *N. Engl. J. Medicine*, Vol.297, No.7 pp. 365-370, (1977).
34. J. Faergemann, T. Fredriksson, "Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin", *Acta Derm Venereol*, Vol.60, No.6 pp. 531-533, (1980).
35. Mahfuzul, M. D. Hoque, M. L. Bari, Y. Inatsu, V. K. Juneja, S. Kawamoto, "Antibacterial activity of *Psidium guajava* L. (*Psidium guajava* L.) and neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) extracts against foodborne pathogens and spoilage bacteria", *Food borne pathogens and disease*, Vol.4, No.4, pp. 481-488, (2007).
36. H. Arima, G. I. Danno, "Isolation of antimicrobial compounds from *Psidium guajava* L. (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, Vol.66, No.8, pp. 1727-1730, (2002).