



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 박 사 학 위 논 문

섬기린초(*Sedum takesimense*)의 기능성

물질 규명과 특성 분석 및 바이오

소재로의 활용



2022 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

정 은 탁

공 학 박 사 학 위 논 문

섬기린초(*Sedum takesimense*)의 기능성

물질 규명과 특성 분석 및 바이오

소재로의 활용



지도교수 김영목

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함.

2022 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

정 은 탁

정은택의 공학박사 학위논문을 인준함.

2022 년 2 월 25 일

위 원 장: 농학박사 이 양 봉



위 원 : 약학박사 이 은 우



위 원 : 농학박사 이 상 길



위 원 : 농학박사 조 승 목



위 원 : 약학박사 김 영 목



목 차

제 1 장 천연물 유래 바이오 산업 소재 동향.....	1
I. 천연물 유래 소재의 용도 및 활용.....	2
1. 천연물 유래 식품첨가물.....	2
2. 천연물 유래 건강기능식품.....	10
3. 천연물 유래 화장품.....	20
II. 국내 및 해외 천연물 시장 동향.....	26
1. 국내 천연물 소재 시장 동향.....	26
2. 해외 천연물 소재 시장 동향.....	28
III. 천연물 유래 소재의 한계점 및 미래.....	32
IV. 참고문헌.....	35
제 2 장 섬기린초 추출물 유래 화합물의 분리 동정 및 항균 특성.....	39
I. 서론.....	40
1. 연구배경.....	40
2. 섬기린초(<i>Sedum takesimense</i>)의 특성.....	43
3. 주요 항생제내성세균 methicillin resistance <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	47
II. 재료 및 방법.....	53
1. 섬기린초 추출물 제조.....	53

2. 섬기린초 추출물에서 화합물의 분리 및 동정	53
3. 사용균주 및 항생제	56
4. 추출물 및 정제화합물의 항균활성 및 최소저해농도 측정	57
5. MRSA 에 대한 분리 화합물과 항생제의 상승 효과	58
III. 결과 및 고찰	60
1. 섬기린초에서 분리한 화합물의 정제 및 구조결정	60
2. 섬기린초 추출물 및 유래 화합물의 항균활성 스크리닝	67
3. 섬기린초 추출물 및 유래 화합물의 anti-MRSA 특성	72
4. MRSA 표준균주 및 임상분리주에 대한 베타 락탐계 항생제의 최소 저해 농도	76
5. 섬기린초 유래 추출물과 베타락탐계 항생제의 상승효과	80
IV. 결론	84
V. 참고문헌	86
제 3 장 섬기린초 추출물의 항염증 및 미백 활성	92
I. 서론	93
1. 여드름과 염증의 상관성	93
2. 피부 미백 연구 동향	104
II. 재료 및 방법	106
1. 섬기린초 추출물 및 분리 화합물	106

2. RAW 264.7 cell 의 세포생존을 측정	106
3. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 평가	107
4. 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-8) 생성 억제 효과.....	108
5. 여드름 유발균 <i>Cutibacterium acnes</i> 에 대한 항균 활성.....	108
6. Tyrosinase 억제 활성 측정	109
7. 통계분석	110
III. 결과 및 고찰.....	111
1. 섬기린초 추출물의 세포독성 평가 결과.....	111
2. 섬기린초 추출물 및 그 유래 화합물의 NO (nitric oxide) 저해 활성.....	113
3. 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-8) 생성 억제 효과.....	116
4. 섬기린초 유래 화합물 3 종의 여드름 원인균(<i>Cutibacterium acnes</i>)에 대한 항균 효과	121
5. 섬기린초 유래 화합물 3 종의 tyrosinase 억제 활성	124
IV. 결론	127
V. 참고문헌.....	128
제 4 장 섬기린초 추출물의 식품첨가물 활용 평가.....	137
I. 서론.....	138
II. 재료 및 방법	144
1. 섬기린초 추출물	144

2. 식품재료	144
3. 미생물 선정 및 배양	145
4. 기존의 식품 보존제와 섬기린초 추출물의 최소 저해 농도	147
5. 경시변화 측정	149
6. 관능검사	150
7. 통계분석	151
III. 결과 및 고찰.....	152
1. 섬기린초 추출물, 식품보존료의 미생물 최소 억제 농도.....	152
2. 간장의 산막효모 제어 효과	155
3. 옥수수수염차 중 오염된 <i>Bacillus cereus</i> 의 경시변화.....	160
4. 샐러드 드레싱(salad dressing)의 유산균 제어효과.....	163
5. 관능검사.....	165
IV. 결론	170
V. 참고문헌.....	171

List of Tables

Table 1-1. Classification of food additives according to usage	3
Table 1-2. Synthetic food additives (preservatives) used in South Korea.....	6
Table 1-3. Types of natural food preservatives	7
Table 1-4. Sales status by the function of health functional food as notification type	13
Table 1-5. Sales status by the function of health functional food as individual recognition type.....	18
Table 1-6. The characteristic of notified type functional cosmetic ingredient for help skin whitening	23
Table 1-7. Commercial natural antimicrobial agents in Domestic	27
Table 1-8. The production companies of imported antioxidant product and production output	30
Table 1-9. The commercialized natural antibacterial product from the overseas	31
Table 2-1. History of antimicrobial agents and emerging resistance(1940-2010)	49

Table 2-2. Chemical shifts of hydroxyl proton in p- hydroxylphenyl, galloyl and glucose in the purified compound (OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -glucose) ..	62
Table 2-3. Antibacterial activity and minimum inhibitory concentration (MIC) values of crude extract, its fraction, and pure compound from <i>Sedum takesimense</i>	70
Table 2-4. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of crude extracts, its fractions, , standard compounds, and singly purified compound against methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	73
Table 2-5. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of antibiotics (ampicillin, oxacillin, and clavulanic acid) against methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> and its clinical isolates	78
Table 2-6. Fractional inhibitory concentration (FIC) indexes (FICIs) of combined effects among major active compounds (crude extract, fraction 2, and pure compound), standard compounds (penta-galloyl-glucose and pyrogallol), and antibiotics against methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40511	81

Table 3-1. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of <i>Sedum takesimense</i> extract and its isolated 3 compounds (OGA, OGG, and TOGG) against <i>Cutibacterium acnes</i>	123
Table 3-2. Tyrosinase inhibitory efficacy of <i>Sedum takesimense</i> extract and its isolated 3 compounds (OGA, OGG, and TOGG)	126
Table 4-1. Characteristics of prepared foods and their isolated microorganism.....	146
Table 4-2. Characteristics of commercial antimicrobial agents.....	148
Table 4-3. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of commercial antimicrobial agents and <i>Sedum takesimense</i> ethanol extract (CE) in against isolated strains from Foods by MIC assay	154
Table 4-4. Inhibition effects of CE on film formation by yeasts on soy sauce incubated at 30 °C for 30 days.....	158
Table 4-5. Sensory evaluation of <i>Sedum takemense</i> extract, vitamin B1 laurylsulfate and yucca extract in soy sauce.....	167
Table 4-6. Sensory evaluation of <i>Sedum takemense</i> extract and complex herb G in corn silk tea	168
Table 4-7. Sensory evaluation of <i>Sedum takemense</i> extract and lacto-fermented powder in salad dressing.....	16

List of Figures

Fig. 1-1. Classification of Health functional food according to the function	12
Fig. 2-1. The picture of <i>Sedum takesimense</i>	46
Fig. 2-2. Schematic diagram of mechanisms for MRSA antibiotics resistance. A, PBP2a mechanisms; B, β -lactamase mechanisms.....	51
Fig. 2-3. Extraction and fractionation of <i>Sedum takesimense</i> for isolation active compound.	55
Fig. 2-4. HPLC chromatogram of 3 compounds isolated and identified from <i>Sedum takesimense</i>	61
Fig. 2-5. Chemical structure of purified single compound (OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin) derived from the aerial part of <i>Sedum takesimense</i>	64
Fig. 2-6. Chemical structure of purified single compound (OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose) derived from the aerial part of <i>Sedum takesimense</i>	65
Fig. 2-7. Chemical structure of purified single compound (TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose) derived from the aerial part of <i>Sedum takesimense</i>	66
Fig. 2-8. Results of the zone of inhibition assay using crude extract concentration 1 mg and 5 mg from <i>Sedum takesimense</i>	68

Fig. 2-9. Results of representative checkerboard assay using crude extract, its fraction, and pure compound from <i>Sedum takesimense</i>	69
Fig. 3-1. The picture of acne prone skin.	96
Fig. 3-2. The micrography picture of <i>Cutibacterium acnes</i>	98
Fig. 3-3. Schematic diagram for inflammatory reaction in human body.	101
Fig. 3-4. Pro-inflammatory signaling pathway of TLR 4 with LPS.	103
Fig. 3-5. Cytotoxic effect on <i>Sedum takesimense</i> ethanolic extracts (CE) in RAW 264.7 cell.	112
Fig. 3-6. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cell.	115
Fig. 3-7. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of TNF- α in RAW 264.7 cell.	118
Fig. 3-8. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cell.	119
Fig. 3-9. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of IL-8 in RAW 264.7 cell.	120
Fig. 4-1. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> changes in soy sauce during storage periods.	159

Fig. 4-2. *Bacillus cereus* changes in corn silk tea during storage periods. 162

Fig. 4-3. *Leuconostoc mesenteroides* changes in salad dressing during storage periods.
..... 164



Identification and characterization of functional substances of *Sedum takesimense* and their use as biomaterials

Eun-Tak Jeong

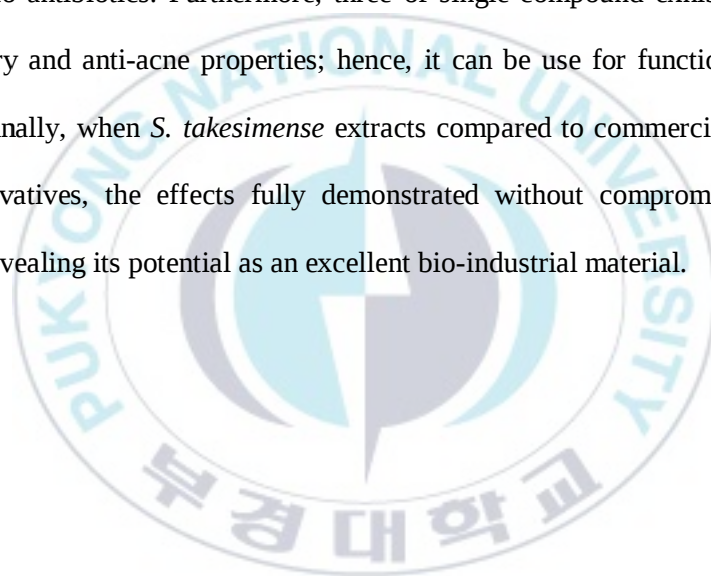
Department of Food Science and Technology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The purpose of this study was to isolate and identify useful compounds from *Sedum takesimense*, as well as to evaluate the possibility of employing the compounds as biomaterials. Three of single-compound identified and purified from *S. takesimense* in this research. The isolated three compounds were named 4,6-di-O-galloylarbutin (OGA), 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose (OGG), and 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose (TOGG). Three compounds were examined for their anti-bacterial, anti-MRSA, anti-inflammatory, and anti-acne properties for bio-material use in this study. Furthermore, during 30 storage days, a comparison examination was performed with *S. takesimense* extracts and existing preservatives. We selected three types of foods for our evaluation: soy sauce, corn silk tea, and salad dressing. As a result, these three compounds have

demonstrated anti-bacterial activity, with TOGG demonstrating particularly potent anti-bacterial activity. TOGG also shows anti-bacterial efficacy against multidrug-resistant pathogenic bacteria, such as MRSA and clinical isolates. With an FIC value of 0.281, the combination of TOGG and β -lactam antibiotic (e.g., oxacillin) indicated synergistic efficacy against MRSA. This finding suggested a novel strategy for fighting pathogenesis induced by multidrug-resistant bacteria utilizing plant materials. Furthermore, combining the active compound isolated from the plant with antibiotics has proven to be a viable way of eliminating pathogens synergistically. The ethanolic extract and isolated three components (OGA, OGG, and TOGG) significantly suppressed the production of NO and pro-inflammatory cytokines (TNF-, IL-1, and IL-8) in the anti-inflammation test. Furthermore, OGG and TOGG had MIC values for *Cutibacterium acnes* of 12.5 μ g/mL and 3.2 μ g/mL, respectively. These findings showed that *S. takesimense* extract and its isolated components had anti-inflammatory properties against LPS-induced inflammation, as well as anti-bacterial activity against *C. acnes*. To assess the potential of *S. takesimense* extracts as food preservatives, three different foods chosen: soy sauce, corn-silk tea, and salad dressing. For this evaluation, it chose various food-borne pathogens (bacteria) isolated from each food sample. Four commercially available food preservatives employed, and each was applied to a food sample appropriate for the intended usage. Consequently, a higher concentration of *S. takesimense* extract utilized than conventional food preservatives. However, this extract suppressed microbial growth in soy sauce, corn-silk tea, and salad dressing to increase shelf life. Furthermore, it observed that the sensory assessment of each food

item containing the extract did not affect overall palatability, and it demonstrated excellent sensory evaluation findings when compared to other commercial food preservatives. The three of single-compound isolated and purified from *S. takesimensis* extract examined for their potential application as biomaterials in this study. TOGG is one of them and it has excellent anti-bacterial activity, and a synergistic impact with the β -lactam antibiotics used to combat MRSA. It demonstrated the possibilities of an alternative to antibiotics. Furthermore, three of single-compound exhibit good anti-inflammatory and anti-acne properties; hence, it can be use for functional cosmetic products. Finally, when *S. takesimensis* extracts compared to commercially available food preservatives, the effects fully demonstrated without compromising sensual elements, revealing its potential as an excellent bio-industrial material.



제 1 장 천연물 유래 바이오 산업 소재 동향



I. 천연물 유래 소재의 용도 및 활용

1. 천연물 유래 식품첨가물

식품첨가물이란 식품의 제조·가공·보존 시 상품적 가치향상, 기호성 증진, 보존성 향상, 품질향상, 영양강화, 풍미 및 외관 증진 등 여러 가지의 목적으로 식품에 첨가되는 물질을 의미한다. 우리나라 식품위생법 제 2 조에서는 ‘식품의 제조, 가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가·혼합·침윤 기타 방법으로 사용되는 물질’로 규정하고 있다. 국내 식품첨가물의 기준 및 규격 체계는 1962 년 식품첨가물 217 품목을 최초 지정한 후, 1996 년에 화학적 합성품과 천연첨가물을 구분하는 분류체계를 도입하여, 현재까지 유지되고 있다(Overview of Food Labeling and Food Hazardous Substances, 2010). 국내에서 지정된 식품첨가물은 618 종으로서 2017 년까지는 화학적합성품, 천연첨가물, 혼합제제 등으로 분류되었으나 분류체계를 국제기준에 따르고 식품첨가물의 사용 목적을 명확히 하기 위해 용도를 중심으로 감미료, 발색제, 산화방지제, 향미증진제 등 32 개로 분류 체계에 맞춰 명시하고 있다(Table 1-1).

국내의 식품위생법에 따르면 화학적 합성 첨가물은 화학적 방법으로 원소 또는 화합물에 화학 반응을 일으켜서 제조하는 것이며 천연첨가물은

Table 1-1. Classification of food additives according to usage

Purpose	Definition
Sweetener	Food additives that give sweet taste to food
Anticaking agent	Food additives that reduce food particles from adhering to each other and solidifying
Foam remover	Food additives that prevent or reduce foaming in food
Gum base	A non-nutritive chewing substance with appropriate viscosity and elasticity, a food additive that is a basic raw material for gum manufacturing
Flour treatment agent	A food additive that is added to flour or dough to improve the quality or color of bread.
Coloring agent	Food additives that stabilize, maintain or enhance the color of food.
Preservative	A food additive that prolongs the shelf life of food by preventing quality deterioration caused by microorganisms.
Propellant	A gaseous food additive that releases food from its container
Acidity regulator	Food additives that control the acidity or alkalinity of food
Antioxidant	Food additives that prevent deterioration of food quality due to oxidation
Fungicide	A food additive that kills microorganisms on the surface of food in a short time.
Humectant	Food additives that prevent food from drying out
Stabilizer	A food additive that maintains two or more ingredients in a uniform dispersion
Filter aid	Food additives used to adsorb and remove impurities or fine particles
Nutrient fortifier	A food additive that restores or fortifies nutrients lost during the manufacturing process to maintain the nutritional quality of food

Table 1-1. Continued

Emulsifier	A food additive that homogeneously mixes or maintains two or more immiscible phases, such as water and oil
Releasing agent	A food additive that prevents raw materials from sticking to the container to maintain the shape of the food and makes it easier to separate
Coagulant	Food additives that bind or coagulate food ingredients or keep the tissues of fruits and vegetables hard or crisp
Manufacturing solvent	Supplementary food additives that act as catalysts, precipitation, decomposition, and clarification during food manufacturing and processing
Gel former	A food additive that forms a gel and imparts physical properties to food
Thickener	Food additives that increase the viscosity of food
Color	Food additives that give or restore color to food
Antiscales	Food additives added to prevent stones, scale formation, and corrosion in boilers that produce steam in direct contact with food
Extrace	Food additives that extract or dissolve useful ingredients
Filler	A gaseous food additive that is intentionally injected into a packaging container during the manufacture of food to protect it from oxidation or spoilage
Raising agent	Food additives that increase the volume of dough by releasing gas
Bleaching agent	Food additives used to remove color from food
Surface treatment agent	Food additives used to smooth or tidy the surface of food
Coating agent	Food additives that brighten the surface of food or form a protective film
Flavor enhancer	Food additives that enhance the taste or flavor of food
Fragrance	A food additive that imparts a unique flavor to food or reinforces the original flavor of food lost during the manufacturing process
Enzyme	Food additives that catalyze specific biochemical reactions

(Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2021-57)

동물, 식물, 광물 등으로부터 유용한 성분을 추출, 농축, 분리, 및 정제 등으로 제조하는 것으로 정의하고 있으며(Food Sanitation Act Law No. 15943), 식품 첨가물 공전에 따르면 천연첨가물과 유사한 성분을 합성하거나, 천연첨가물에 나트륨 등 염을 붙여 물에 잘 녹을 수 있도록 제조된 것은 화학적 합성품으로 분류되어 있다(Korea Food Additives Code). 또한 국가별 식품첨가물 지정현황(2019 년 기준)은 미국 554 개, 우리나라 618 개, 유럽연합 640 개, 일본 763 개, CODEX (국제식품규격위원회) 853 개이다. 우리나라에서 인정된 품목은 618 개로, 미국보다 허용된 식품첨가물 항목이 많으나 유럽연합이나 일본과 비교하여서는 국내에서 허용되어 사용 중인 식품첨가물의 품목 수는 다른나라에 비해 적다.

식품첨가물 중 보존료는 미생물에 의한 품질 저하를 방지하여 식품의 보존기간을 연장시키는 것으로 알려져 있으며 대표적인 보존료는 소브산, 안식향산, 프로피온산 등이 있다(Table 1-2). 또한 주요한 천연유래 식품 보존료의 종류는 Table 1-3 에 나타내었다.

Table 1-2. Synthetic food additives (preservatives) used in South Korea

Preservation	Acute Toxicity (LD ₅₀)	Acceptable Daily Intake (ADI)
Sorbic acid	rat 10.5g/kg p.o.	25 mg/kg.b.w.
Potassium sorbate	rat 4.2g/kg p.o.	25 mg/kg.b.w.
Calcium sorbate		
Benzoic acid	rat 2.53 g/kg p.o.	5 mg/kg.b.w.
Sodium benzoate	rat 2.7g/kg p.o.	5 mg/kg.b.w.
Potassium benzoate		5 mg/kg.b.w.
Calcium benzoate		5 mg/kg.b.w.
Sodium dehydroacetic -acid	rat 0.57g/kg p.o.	
Methyl p-hydroxy-benzoate		10 mg/kg.b.w.
Ethyl p-hydroxybenzoate	mouse 2.5g/kg p.o.	10 mg/kg.b.w..
Propionic acid	rat 2.6g/kg p.o.	Not limited
Sodium propionate	rat >0.4g/kg p.o.	Not limited
Calcium propionate	rat 5.16g/kg p.o.	Not limited

(Korea Food Additives Code, 2021)

Table 1-3. Types of natural food preservatives

Item	Natural Food preservatives	Target	Applications
Spice oil	Cinnamon, All spice, Pepper, Mustard	Fungi>yeast>bacteria	Bread, Ice cream
Organic acid	Acetic acid, Citric acid, Lactic acid, Fumaric acid, GDL, Phytic acid	Bacteria	Sausage, Fermented food, Salad , bread
Chlorine base	Sodium hypochlorite	Bacteria	Asazuke, Kimchi
Alcohol base	Ethyl alcohol	Bacteria	Surface of instruments, Noodle, Bread
Fatty acids	monolaurin, monocaprylin, monocaprin	Bacteria, Yeast, Spore foaming Bacteria	Retorted Coffee, Beverage
Amino acids	Glycine(Serine, Threonin)	Bacteria	Noodle, Gamaboko
Polypeptides	Lysozyme, Protamines	Gram(+) Spore foaming	Sake, Cheese
Microbial origin	Polylysine, Nisin	Fungi, Gram(+,-)	Sauce, Cream,,,
Others	Bacteriocin	Bacteria(Gram +)	Dairy/meat products

천연유래 식품 보존료는 식중독 균에 대한 항균성을 갖는 스파이스 오일류(겨자, 계피, 정향), 녹차 추출물, 유카 추출물 등 다양한 식물이 천연유래 소재로 연구되고 있다. 또한 겨자추출물은 isothiocyanate 에 의해 항균력을 갖는것으로 알려져 있다. Seo et al. (1996)은 겨자 추출물을 이용하여 식품에서 문제가 되는 그람 양성균 및 음성균, 젖산균, 효모, 곰팡이에 대한 우수한 항균력이 확인되었다.

Moon et al. (2004)에 따르면 약용식물인 계피 및 정향 추출물의 항균활성 조사 결과 그람 양성균, 그람 음성균 및 효모에 항균력을 나타내는 것으로 보고되었다. 또한 페놀성 화합물의 함량 조사 결과 정향 추출물은 10.31 mg/g, 계피 추출물은 8.86 mg/g 으로 다른 추출물에 비해 비교적 함량이 높은 것으로 나타나 페놀성 물질의 함량에 따라 항균활성에 영향을 준 것으로 사료된다고 보고되었다. 또한 녹차 추출물은 식중독 세균에 우수한 항균력이 확인되었으며 식품 보존료로 사용되고 있는 sodium benzoate 및 potassium sulfate 와 비교시에도 더 높은 항균력을 나타내어 녹차 추출물은 천연항균제 및 보존료로서의 이용 가능성이 확인되었다.

Lee et al. (2016)에 따르면 천연물 유래 식품첨가물의 연구동향은 지속적으로 증가해오는 추세를 보이고 있으며 2000 년대 이후 급격한 증가추세를 보이고 있다. 또한, 천연유래 식품첨가물 중 산화방지제 및 보존제에 대한 연구가 50% 이상을 차지하고 있으며 천연 유래의

산화방지제와 보존제의 개발과 발굴을 위해 항균과 항산화 기능에 대한 연구가 가장 활발하게 이루어지고 있다. 상기 내용에 서술한 바와 같이 겨자추출물 및 자몽종자추출물과 같이 천연유래 물질들을 이용한 식품첨가물의 발굴 및 이에 대한 효능 연구는 지속적으로 수행되고 있으며, 기존에 전통적으로 사용해오던 식품의 저장 증진 및 품질향상을 위해 사용되던 화학적 합성품들을 대체하고 있다. 이러한 현상은 기술의 발전으로 인해 기존에 사용되던 화학적 합성품들의 독성이 자세하게 연구되었기 때문이며 이로 인해서 인체에 부정적 영향을 미칠 수 있는 경우가 발견되고 있고 식품의 저장성 증진과 품질의 증진 등은 식품시장 전체에 긍정적인 영향을 가져올 수 있으며 이는 소비자들에게 고품질의 안전하고 위생적인 식품을 공급함과 동시에 기업의 측면에서는 이익증대와 직접적인 연관이 있기 때문에 중요성은 더욱 중시되고 이에 대한 천연물 소재의 발굴의 니즈는 지속적으로 요구되고 있다.

2. 천연물 유래 건강기능식품

인구의 고령화, 소득수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 증가하면서 건강기능식품 시장은 가파른 성장세를 이어가고 있다. 2020 년 건강기능식품 총매출액은 3 조 3,254 억 원으로 전년 대비 12.7% 증가하였고, 최근 5 년간(2016-2020 년) 연평균 성장률은 11.8%로 타 산업에 비하여 급격하게 증가하였다(Ministry of Food and Drug Safety, 2020). 건강기능식품은 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소 또는 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분(이하 기능성 원료)을 사용하여 제조한 식품으로 건강을 유지하는데 도움을 주는 식품을 의미한다. 건강기능식품은 의약품과 같이 질병의 직접적인 치료나 예방이 아닌 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선할 수 있는 식품을 의미한다(Ministry of Food and Drug Safety, 2020).

건강기능식품은 고시된 제조기준, 규격, 최종제품 등의 요건에 부합되면 별도의 인정 절차 없이 제조 가능한 고시형과 건강기능식품 기능성 원료 인정서를 발급받은 자만이 제조할 수 있는 개별인정형으로 나뉜다. 건강기능식품 기능성 내용은 32 가지로 분류되며 가장 많이 인정받은 기능성은 체지방 감소이며 관절/뼈 건강, 눈 건강, 피부건강, 기억력 순이다 (Lee, 2020). 식품의약품 안전처의 식품안전나라(www.foodsafetykorea.go.kr)에

따르면 건강기능식품의 기능별 분류는 신경계, 감각계, 소화/대사계, 심혈관계, 내분비계, 생식계, 비뇨계, 근육계, 신체방어 및 면역계 및 기타로 분류되며 각 분류에 따른 하위 항목들은 Fig. 1-1 과 같다.

식품의약품 안전처 산하 식품안전정보원의 식품 등의 생산실적에 따르면 기능성별 건강기능식품의 매출액은 고시형의 경우 혈행개선 제품이 전체 중 14.4%, 기억력개선 제품이 14.2%, 항산화 제품이 13.5%, 면역기능개선 제품이 13.2%, 피로개선 제품이 12.9%, 갱년기 여성건강 기능 제품이 12.5%을 나타내고 있다(Table 1-4) (Ministry of Food and Drug Safety, 2020). 건강기능식품 중 고시형원료 중 항산화 기능에 대해서는 매우 다양한 원료를 이용하여 연구되어 왔다. 항산화란 산화적 스트레스로부터 신체를 보호하는 것을 의미한다. 산화적 스트레스를 유발시키는 산화유발물질은 신체 내에서 에너지를 만드는 과정, 면역반응 등과 같은 대사과정에서 자연적으로 발생되나 필요 이상으로 생성 또는 축적될 경우 DNA 및 세포 손상으로 인해 노화와 만성질환을 유발하게된다.

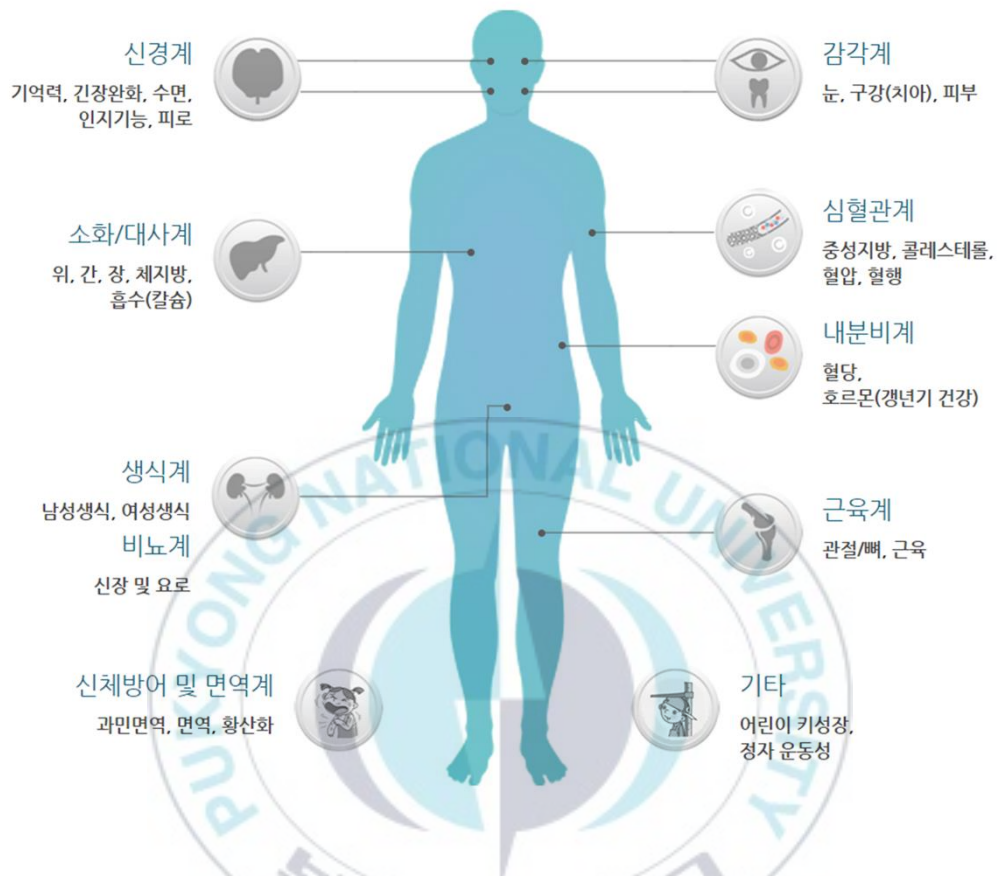


Fig. 1-1. Classification of Health functional food according to the function (Ministry of Food and Drug Safety, www.foodsafetykorea.go.kr).

Table 1-4. Sales status by the function of health functional food notification type

Functional	Sales (KRW billion)	Ratio (%)	Raw materials
Blood circulation improvement	12,242	14.4	Oil containing EPA and DHA, Oil containing gamma linolenic acid, Reishi mushroom fruit body extract, Red ginseng, Ginkgo leaf extract
Memory improvement	12,086	14.2	Oil and fat containing EPA and DHA, Red ginseng, Ginkgo leaf extract
Antioxidant	11,527	13.5	Coenzyme Q10, Tomato extract, Green tea extract, Red ginseng, chlorella, Chlorophyll-containing plants, Spirulina, Propolis extract, Squalene
Improving immune function	11,196	13.2	Phellinus Linteus Extract, Chlorella, Ginseng, Red ginseng, Shark liver oil containing alkoxyglycerol, Aloe gel
Fatigue improvement	10,178	12.9	Ginseng, Red ginseng, Prunus Mume Fruit Extract, Rhodiola Extract
Menopausal women's health	10,636	12.5	Sophora Japonica Fruit Extract, Red ginseng
Gut health	7,312	8.6	Fructooligosaccharide, guar Gum/Guar gum hydrolyzate, Raffinose, Whole aloe leaf, indigestible maltodextrin, Inulin/Chicory extract, Psyllium skin fiber, Polydextrose, Aloe gel, probiotics
Eye health	1,940	2.3	Oil and fat containing EPA and DHA, Marigold flower extract, Bilberry extract, Hematococcus extract
Improvement of blood triglycerides	1,631	1.9	Indigestible maltodextrin, Oil and fat containing EPA and DHA
Promote calcium absorption	1,100	1.3	Fructooligosaccharide, Polygamma-glutamic acid
Improving blood cholesterol	912	1.1	Spirulina, green tea extract, Chlorella, Gamma-linolenic acid-containing fats and oils, Lecithin, Guar gum/Guar gum hydrolyzate, Oat dietary fiber, Inulin/Chicory extract, Psyllium skin fiber, Chitosan/Chitooligosaccharide, Red yeast rice, Garlic
Skin health	781	0.9	Phosphatidylserine, NAG(N-Acetylglucosamine), Plants containing chlorophyll, Chlorella, spirulina, Aloe gel, Konjac potato extract, Hyaluronic acid
Body fat reduction	686	0.8	Green tea extract, Conjugated linoleic acid, Garcinia cambogia extract, Chitosan/Chitooligosaccharide

Table 1-4. continued

Joint/bone health	481	0.6	NAG(N-Acetylglucosamine), Glucosamine, Soy isoflavones, MSM (Methylsulfonylmethane), Mucopolysaccharide, Protein
Liver health	411	0.5	Milk Thistle (Cardus marianus) Extract
Oral health	352	0.4	Propolis extract
Blood sugar control	337	0.4	Indigestible maltodextrin, Banaba leaf extract, Guava leaf extract, Evening primrose seed extract, Guar gum/Guar gum hydrolyzate, Oat dietary fiber, Inulin/Chicory extract, Soybean dietary fiber, Wheat dietary fiber, Corn bran dietary fiber, Fenugreek seed two fibers
Prostate health	299	0.4	Saw Palmetto Fruit Extract
Improvement of premenstrual dysphoria	155	0.2	Oil containing gamma-linolenic acid
blood pressure control	133	0.2	Coenzyme Q10
Detente	72	0.1	Theanine, Milk protein hydrolyzate
Cognitive ability improvement	52	0.1	Phosphatidylserine
Increase endurance	35	0.0	Oil containing oxacotanol
Improving exercise performance	1	0.0	Creatine

(Production Performance of Food, etc. , Ministry of Food and Drug Safety, 2020)

이러한 산화적 스트레스는 노화, 심리적 환경적 스트레스, 질병, 체내 대사의 불균형 등으로 인해 발생하게 된다. 따라서 삶의 질 향상과 수명 극대화를 위해서는 산화적 스트레스로부터 생체를 보호해 주는 항산화 시스템이 필요하게 된다(Ministry of Food and Drug Safety, Health functional Food Functional evaluation guide). 항산화의 고시형 원재료는 코엔자임 Q10, 프로폴리스추출물 등이 있으며, 개별인정형 원재료는 포도종자추출물, 대나무잎추출물 등이 있다. 항산화의 개별인정형 원재료중 천연유래 물질인 포도 종자 추출물의 항산화 효과는 tocopherol 과 비슷한 수준의 항산화 효과를 나타내어 천연 항산화제로서 이용가치가 높은것으로 연구되어 있다(Park and Oh. 2003; Lee et al., 2002).

또한 대나무 잎 추출물은 flavone glycosides, phenolic acids, coumarin lactones, anthraquinones, amino acids 등을 함유하고 있으며 대나무 잎에는 플라보노이드 성분이 많이 함유되어 있어 항산화, 항노화 및 항균 활성을 나타냄에 따라, 약제 보조제, 미용향장소재 및 식품 첨가물 등으로 사용되고 있다. 대나무 추출물을 이용한 항산화 실험 결과 항산화 기능성 소재의 잠재력이 있는것으로 확인되었다(Choi et al., 2012; Kim et al., 2018).

건강기능식품 소재 개별인정형은 면역기능 개선 제품이 전체 매출액 중 15.1%, 간 건강 개선 제품이 10.1%, 운동수행 능력 향상 제품이 9.7%, 피로개선 제품이 9.5%, 체지방 감소 제품이 9.2%로 전체 매출액 중

53.6%를 차지하였으며 나머지 항목이 매출액 전체의 46.3%를 차지하는 것으로 나타났다(Table 1-5). 천연물 소재에서 유래된 건강기능식품 소재는 다양하게 존재하며 이를 위한 연구도 다방면으로 수행되어 왔다. 건강기능식품 소재 중 개별인정형은 현재 천연물 유래 소재 응용분야 중 가장 활발하게 연구되어 다양한 종류의 천연물 유래 물질들이 건강기능성 식품의 원료로써 인증되었다.



Table 1-5. Sales status by the function of health functional food as individual recognition type

Functional	Sales (KRW billion)	Ratio (%)	Raw materials
Improving immune function	1,314	15.1	Complex such as guava leaf extract, Actinidia extract, Picaopreto complex powder, Perilla Frutescens Leaf Extract Shiitake mushroom mycelium, Hemohim angelica complex extract, L-glutamine, Keumsa Sanghwang mushroom, Cheongguk enterococcus culture purified product (Polygamma glutamate potassium), Cordyceps Cordyceps alcohol Extract, Yeast beta glucan, ginseng polysaccharide extract, Bio-germanium yeast, <i>Enterococcus faecalis</i> heat-treated dry powder, PLG
Liver health	877	10.1	Shiitake mushroom mycelium extract, Shiitake mushroom mycelium, Rubus Coreanus extract powder, Lactic acid bacteria fermented kelp extract, Bellflower extract, Lactic acid bacterium fermented garlic extract, Fermented turmeric, Broccoli prout powder, Gompi extract, Cypress extract powder
Improving exercise performance	843	9.7	Heotgae fruit extract powder, Maca gelatinized powder, Cordyceps fermented extract
Fatigue improvement	821	9.5	Heotgae fruit disease extract powder, Fermentation-generated amino acid complex
Body fat reduction	796	9.2	Vegetable oil and fat diglyceride, Camellia sinensis leaf extract, Lemon balm extract complex powder, Soybean germ complex extract, Green mate extract, Chitosan, Lactoferrin (milk refined protein), Seaweed complex extract (xantijen), Coleus forskohlii extract, <i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17, Seomoktae Peptide Complex, Fermented Vinegar Pomegranate Complex, Wild Mango Seed Extract, Green Coffee Bean Extract, Green Apple Extract Applephenon, Mate Hot Water Extract, L-Carnitine Tartrate, Finger Root Extract Powder, Finger Root Extract Powder (pandulatin), stone extract powder, hibiscus, etc. complex extract, green coffee bean alcohol extract
Gut health	637	7.4	Probiotics (desimone), Isomaltooligosaccharide, Soybean oligosaccharide, Liquid fructooligosaccharide, Coffee manno-oligosaccharide powder, Lactulose powder, Xylo-oligosaccharide, Indigestible maltodextrin derived from wheat starch, Galactooligosaccharide, Fig paste
Skin health	637	7.4	Complex such as pine bark extract, Red ginseng. casualties. Cornflower oil complex extract, Finger root extract powder, Finger root extract powder (pandulatin), Probiotics HY7714, Rice bran extract, Ground grass extract powder, AP collagen enzyme-decomposing peptide, Low molecular weight collagen peptide, Corn germ extract, Soybean. Barley fermentation complex, Wheat endosperm extract, Pomegranate concentrate
Eye health	600	6.9	Luteinia xanthine complex extract, Luteinizing xanthine complex, Luteinizing xanthine complex extract 20%, Zeaxanthin extract, Blueberry fruit extract

Table 1-5. Continued

Joint/bone health	485	5.6	Green-lipped mussel extract oil, Green-lipped mussel extract oil complex, N-acetylglucosamine, rosehip powder, Perilla and other complex extracts, Fatty acid complex FAC (Fatty Acid Complex), Hops extract, Beeswax alcohol, Ginseng etc. complex extract, Turmeric extract, Boswellia extract, CMO-containing FAC, Raven juniper extract, Angelica asiatica extract powder, Chicken breast cartilage powder, Spiny hornwort complex extract, Milk protein extract, Black yeast culture powder
Improving children's height growth	461	5.3	Astragalus complex extract (HT042)
Menopausal women's health	366	4.2	Baeksuo complex extract, Pomegranate concentrate, Pomegranate extract, Pycnogenol-French coast pine bark extract, Omija extract
Improvement of blood triglycerides	121	1.4	Pycnogenol-French Coast Pine Bark Extract, PME-88 Melon Extract, HK Natto Culture, Nattobacterium Culture Powder, Cacao Powder, L-Arginine
Improving blood cholesterol	119	1.4	Policosanol-sugar cane wax alcohol, Sugar cane wax alcohol, Plant stanol ester, Pu'er tea extract, Barley beta glucan extract, Changnyeong onion extract, Sea pololol Ecklonia cava alcohol extract, Red grape fermentation concentrate, Bamboo leaf extract, Aloe complex extract, Aloe extract
Blood pressure control	116	1.3	Sardine peptide, Policosanol-sugar cane wax alcohol, Katsuobushi oligopeptide, Casein hydrolyzate, Olive leaf extract, L-glutamic acid-derived GABA-containing powder, Haitai oligopeptide, Salmon peptide, Seomoktae peptide complex, Nattobacterium culture powder, Grape Seed Enzyme Decomposition Extract Powder
Proliferation of beneficial bacteria in the vagina, suppression of harmful bacteria	98	1.1	UREX Probiotics, Respecta Probiotics
Stomach Health/Fat Digestion	88	1.0	Mastic Gum, Beeswax Alcohol, Spanish Licorice Extract, Artichoke Extract
Sleep health	63	0.7	Ecklonia cava extract, Rice bran alcohol extract
Antioxidant	58	0.7	Grape seed extract, Pycnogenol-French coast pine bark extract, PME-88 melon extract, Beeswax alcohol, Bamboo leaf extract, Bokbunja extract, ubiquinol

Table 1-5. Continued

Sensitive skin condition improvement	40	0.5	<i>Lactobacillus sakei</i> Probio65, Fruit and vegetable-derived lactic acid bacteria (<i>L. plantarum</i> CJLP133), probiotics ATP
Memory improvement	39	0.5	Fibroin enzyme hydrolyzate, Polygala Tenuifolia root extract powder, Angelica root extract complex, Loquat leaf extract, Goji berry extract, Chrysanthemum extract (HX106), Green tea extract/Theanine complex, Ginseng chaff complex extract, Theanine complex extract, Lactic acid bacteria fermented kelp extract
Menopause Men's Health	29	0.3	MR-10 Dandelion and other complex extract, lacquer extract powder, maca gelatin flower powder
Improve cognitive function	19	0.2	Angelica Root Extract, Angelica Root Extract Powder, <i>Lactobacillus Helveticus</i> Fermented Product, Bellflower Extract (DRJ-AD)
Blood sugar control	16	0.2	Pine leaf distillation concentrate, Soybean fermented extract, Albumin, Nopal extract, Freeze-dried silkworm powder, Sphagnum leaf extract mixture, Seomoktae (snow bean) peptide complex, Ginseng hydrolysis concentrate, Tagatose, Hydroxypropylmethyl cellulose, Upper leaf extract, L- arabinose, Maize extract, Silk protein enzyme hydrolyzate, Pinitol, Rhododendron etc. complex extract, Cinnamon extract powder, Triliporia lock serrata mycelium culture
Urinary tract health	10	0.1	Park Cranberry Extract Powder, Cranberry Extract
Improving urination	9	0.1	Complexes such as pumpkin seed extract
Detente	4	0.0	Milk protein hydrolyzate (lactium), asyaganda extract, Gynostemma Pentaphyllum leaf extract
Dental health	2	0.0	Xylitol
Improve sperm motility	1	0.0	Maca Gelatin Powder
Improvement of blood triglycerides	-	-	Vegetable oil diglyceride, Refined squid oil, Globin hydrolyzate, Bamboo leaf extract

(Production Performance of Food, etc. , Ministry of Food and Drug Safety, 2020)

3. 천연물 유래 화장품

국내의 화장품 시장은 꾸준히 성장하고 있으며 기능성 화장품 시장은 점차 그 영역을 확대하고 있으며, 기능성 화장품 개발을 위해서는 피부과학, 약학, 생명과학 등 인접기술의 분야와 효능이 알려진 물질 또는 천연물 등으로부터 특정 효능을 가진 물질 탐색 등을 통한 새로운 효능을 발굴하여 적용하는 방법이 주로 이용되고 있다(Kyong, 2010). 또한, 화장품에 의학적 검증 성분을 함유시켜 치료의 목적을 접목하여 피부재생, 미백, 여드름, 안티에이징, 피부질환 등의 효과를 갖는 기능성을 강조하는 제품군을 화장품(cosmetic)과 의약품(pharmaceutical)의 단어를 합성하여 코스메슈티컬 칭하며 기능성이 함유된 기능성 화장품을 의미하고 있다(Cosmetics Industry Analysis Report, 2020). 기능성과 유효성에 집중하고 있는 코스메슈티컬 시장은 최근 소비자들의 수요가 급증하여 매년 빠른 속도로 성장세를 보이고 있다. 또한 기능성 화장품의 성장세 및 중요성은 화장품 시장의 분류별 시장 점유율에서도 선명하게 드러나고 있으며, Skin Care 시장이 63 억 달러(51.4%), Colour Cosmetics 25 억 달러(20.1%), Hair Care 12 억 달러(9.7%), Sun Care 7 억 달러(5.9%) 순이다. 세부 유형 중에서는 Facial Care (44.4%) 시장이 가장 크며, Facial Make-up (12.2%), Adult Sun Care (5.8%)등이 뒤를 이었다(Cosmetics Industry Analysis Report, 2020). 즉, make up 이나 colour 관련 화장품의 시장 크기보다 skin care 및 facial care 등의 피부

유지 및 개선에 대한 소비자의 관심이 크고 그것이 시장에 투영되어 나타난 결과로 사료된다. 또한, 이러한 소비자의 관심과 시장 상황은 기능성 화장품에 대한 시장의 기대와 성장가능성이 높다는 의미로 해석할 수 있으며 이로 인해 skin care 및 facial care 를 위한 기능성 물질을 발굴하여 화장품 시장에 접목하는 연구는 매우 잠재력이 높으며 시장성 또한 높은 연구라 판단할 수 있다.

천연물 소재 중 국내 화장품 원료로 등록된 항목은 총 244 개로 알려져 있으며 식물, 동물, 해조류, 미생물 및 효모류를 포함하고 있다(Foundation of Korea Cosmetic Industry Institute, 2021). 이 중 미백 기능성을 인정받은 대표 소재는 천궁, 상백피 등의 원료가 있으며 여드름 완화에 도움이 되는 대표적인 소재로는 티트리, 병풀 추출물 등이 등록되어 있다. 또한 기능성 화장품으로 등록 시 심사대상 효능을 포함한 작용기전이 포함되어야 하며 인체적용시험으로 유효성 평가가 수행되어야 한다.

미백 화장품이란 피부의 과도한 멜라닌 색소의 침착을 방지하거나 기존의 침착된 멜라닌 색소의 색을 없게 하여 기미나 주근깨의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품을 말한다. 현재 미백 제품을 개발하기 위해서는 고시 원료를 제품에 적용하거나 새로운 미백 원료를 개발하여 이를 제품에 적용하여 식약처의 인증을 거쳐야 미백 기능성 화장품이라 표기할 수 있다(Lee et al., 2004). 식약처에

고시된 피부의 미백에 도움을 주는 기능성화장품 원료로는 나이아신아마이드, 닥나무 추출물, 아스코빌글루코사이드, 아스코빌 테트라이소팔미테이트, 알부틴, 알파-비사보롤, 에칠아스코빌에텔, 유용성감초추출물 등이 있다(Table 1-6) (Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2020-132). 이중 천연물 유래 물질인 닥나무추출물의 미백 효능과 관련된 연구 결과 닥나무 뿌리추출물(*Broussonetia kazinoki* root extract) 중 iso-prenyl 기를 가진 페놀성 화합물인 kazinol 화합물들이 생성된 자유 라디칼을 제거하는 동시에 tyrosinase 활성을 저해함으로써 과도한 색소침착의 원인을 제어할 수 있는 것으로 보고되었으며 멜라닌 생성 저해 평가 결과, B16 murine melanoma 세포주에 독성을 주지 않는 농도로 처리했을 때 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 확인된다. 이 밖에 항균 및 항산화 효과, 염증 억제, 노화방지 등에도 탁월한 효과를 나타내고 있는 것으로 알려져 있다(Lim et al., 2013). 또한, Jang (2019)의 보고에서도 감초 추출물을 이용한 멜라닌 생성에 영향을 주는 enzyme 인 tyrosinase 활성 억제 실험 결과 50 $\mu\text{L/mL}$ 의 농도에서 B16 melanoma 세포에 tyrosinase 활성 억제 효과가 51%로 우수한 효능을 보여주는 것이 확인되었다.

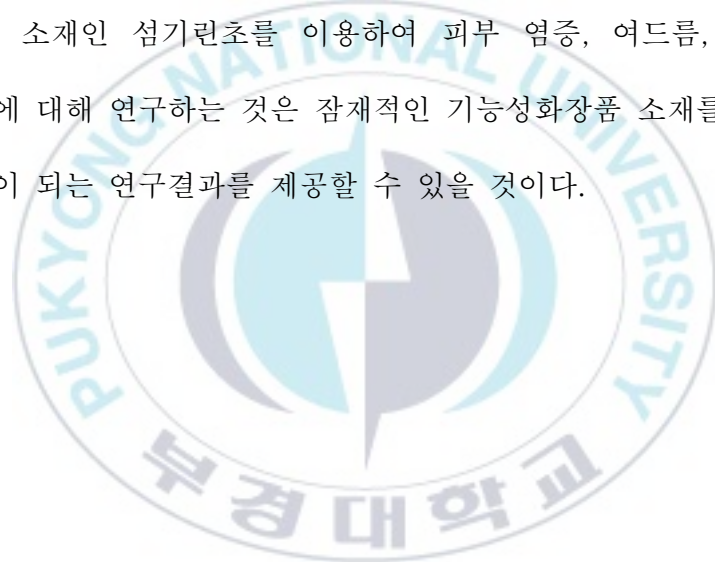
Table 1-6. The characteristic of notified type functional cosmetic ingredient for help skin whitening

Name of ingredients	Content	Characteristics	Ref.
Niacinamide	2-5%	Reinforcing skin barriers and moisturizing skin. Melanosome inhibits the movement to keratinocytes and whitening.	Lin et al., 2008
Broussonetia Extract	2% or more	‘Kazinol F’ inhibits the activity of tyrosinase and antioxidants. Helps to recover skin damage caused by UV rays and stress.	Jeon et al., 2016; Ryu et al., 2003 Lee, 1997
Ascorbyl glucoside	2% or more	Inhibition of oxidation of tyrosine and reduction of eumelanin with vitamin C derivatives	Jeon et al., 2016 Balaguer et al., 2008
Ascorbyl Tetraisopalmitate	2% or more	Inhibition of oxidation of tyrosine and reduction of eumelanin as a vitamin C derivative	Almeida et al., 2016 Balaguer et al., 2008
Arbutin	2-5%	Inhibits tyrosinase activity and melanin production with vaccinium vitis-idaea extract	Lin et al., 2008
Alpha-bisabolol	0.5% or more	Non-toxic, has high anti-inflammatory properties, and inhibits early melanogenesis during melanin synthesis	Jeon et al., 2006
Ethyl Ascorbyl Ether	1-2%	Inhibition of oxidation of tyrosine and reduction of eumelanin as a vitamin C derivative	Jeon et al., 2006
Oil Soluble Licorice (Glycyrrhiza) Extract	0.05% or more	Detoxification, anti-inflammatory and sedative effects, and has a strong tyrosinase inhibitory function.	Mun et al., 2002 Lee, 1997

(Standards and Test Methods of Functional Cosmetics, Ministry of Food and Drug Safety Notice No.2020-132)

기능성 화장품 중 여드름성 피부를 완화하는데 도움을 주는 화장품(인체세정용 제품류)의 고시된 원료는 살리실릭애씨드가 알려져 있다(Ministry of Food and Drug Safety Notice No.2020-132). 여드름 치료는 다양한 방법으로 행해지고 있으나 부작용 등이 수반되어 효과적이고 자극이 적은 천연 향균 물질과 기능성 천연소재의 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 여드름 완화에 도움을 주는것으로 알려져있는 원료는 티트리, 병풀 추출물, 녹차 추출물 등이 있다. 그 중 티트리는 박테리아, 바이러스, 곰팡이균 제거, 질염 등에 효과적이며 중기, 발진 해소, 햇볕에 그을린 피부를 진정시키는 기능과 화상, 여드름, 사마귀, 비듬 등 모든 피부과 영역에서 고르게 사용되고 있다. Kim et al. (2013)에 따르면 티트리 에센셜 오일이 여드름 피부에 미치는 효과에 대해 분석 결과 여드름 피부 개선에 효과가 있는것으로 나타났다. 또한, 병풀 추출물은 일반적으로 asiaticoside 와 madecassoside, asiatic acid (각 30-40%)가 주성분으로 함유되어 있으며, 콜라겐 생성을 촉진시켜 피부 재생에 도움을 주는 것으로 알려져 있고 현재 임상에서는 상처 치료 목적의 연고제로 사용되고 있다. Lee et al. (2010)는 병풀 추출물을 함유한 화장품은 멜라닌 지수와 모공지수 및 여드름 등급에서 통계학적 유의성이 나타나 상처치료 연고제의 식물성 성분인 병풀 추출물이 염증성 여드름 피부의 개선뿐 아니라 진정 후홍반개선과 관련된 화장품 개발에도 도움을 줄 수 있을 것으로 나타났다.

천연물 소재를 활용한 화장품 시장은 활성화되어 있고, 다양한 소재들에서부터 효능을 확인하여 제품에 접목되고 있다. 위 서술한 바와 같이 화장품은 소비자 층이 매우 두껍고 다양하며, 이로 인해서 시장의 잠재력과 크기가 매우 크다. 또한 최근 코로나 사태로 인해서 화장품을 이용한 피부의 커버력에 보다 피부 유지 및 관리에 대한 소비자의 관심이 증폭되고 있어, 색조화장품보다는 케어 제품의 잠재력이 높다고 판단된다. 천연 유래 소재인 섬기린초를 이용하여 피부 염증, 여드름, 미백 등에 대한 인자에 대해 연구하는 것은 잠재적인 기능성화장품 소재를 발굴할 수 있는 기반이 되는 연구결과를 제공할 수 있을 것이다.



II. 국내 및 해외 천연물 시장 동향

1. 국내 천연물 소재 시장 동향

라이프스타일의 변화 및 소득수준 향상으로 웰빙(well-being)에 대한 소비자의 관심이 증가되어 기능성 제품, 자연 친화적 제품 및 비건, 유기농 천연소재 제품이 선호되고 있다. 화장품, 피부의약품, 식이 소재, 기능성 식품 등의 분야는 기타 바이오산업과 마찬가지로 소재 및 원재료의 특성에 절대적으로 좌우되므로 우수한 소재 발굴 및 원재료 확보는 매우 중요하다. 건강하고 안전한 식품 및 기능성을 가진 식품의 공급을 위한 수요가 확대되고 있다. 특히 식품, 화장품, 생의약품 등 방부제 시장이 빠르게 성장 중이며 최근 인공방부제의 부작용으로 천연유래 방부제 수요가 크게 증가하고 있다(Small and Medium Business Administration, 2013). 국내 천연물 소재 생산업체로는 천연식품소재를 통한 식품 및 화장품 향균소재(다인소재, BST) 및 식품용 향산화제(다인소재)가 있으며 대부분 국외에서 수입판매에 의존하는 실정이다(Table 1-7). 천연향산화제를 국내에서 생산하는 업체 역시 2-3 곳이며 국외에서 수입된 토크페놀, 녹차추출물, 로즈마리추출물을 유통, 또는 혼합하여 판매하는 수준이다.

Table 1-7. Commercial natural antimicrobial agents in domestic

Product name	Main ingredient	Manufacturer	Characteristic
Complex Herb Extract C	Licorice extract Ginger extract Green tea extract	Dynesoze Co.	- Excellent control of heat-resistant bacteria - Usage: Preservation of beverages - Characteristics: The presence of a product-specific fragrance - Excellent control effect on bacteria and yeast
Complex Herb Extract S	Licorice extract Rosemary extract	Dynesoze Co.	- Usage: Preservation of sauces, sauces, beverages, etc. - Characteristics: The presence of a product-specific fragrance - Excellent control effect on yeast and mold
Yucca extract	Yucca extract	Dynesoze Co.	- Usage: Preservation of kimchi, noodles, etc. - Characteristics: Foaming due to saponin - Excellent control effect on yeast and mold
Vitagen-B	Mustard extract	Dynesoze Co.	- Usage: Preservation of pickled foods, sauces, etc. - Characteristics: Mustard's unique aroma and taste - Strong control effect on bacteria and fungi
Complex Herb Extract D	Licorice extract ε-Polylysine	Dynesoze Co.	- Usage: Preservation of sauces, beverages, syrups, etc. - Characteristics: pH, thermal stability, product-specific fragrance - Strong control effect on bacteria and fungi
Chito Mixed Powder	Chitooligo saccharide	Dynesoze Co.	- Usage: Preservation of butter, cheese, etc. - Characteristics: The presence of a product-specific fragrance
Curcuma Xanthorrhiza oil	Curcuma Xanthorrhiza Root Extract Scutellaria	S&D Co.	- Excellent caries control - Usage: Gum, fermented milk, etc. - Characteristics: Thermal stability
Complex Golden Extract	Baicalensis Root Extract Licorice Extract Jujube Extract Astragalus extract	BST	- Strong antibacterial effect - Usage: Preservation of sauces, beverages, etc. - Characteristics: Thermal stability, presence of peculiar odor of raw materials
Complex Green Tea Lactobacillus Powder	Green tea extract Garlic extract	BST	- Excellent control against fungi - Usage: Preservation of noodles, sauces, beverages, etc. - Characteristics: presence of peculiar odor of raw materials

Han et al. (2018) Natural antibacterial materials and nanotechnology for food industry.

2. 국외 천연물 소재 시장 동향

천연물에 대한 지속적인 관심이 높아지는 점은 각각의 산업 방향이 다르지만 소비자의 고령화에 따른 건강지향, 환경문제의 대두로 인한 오염물질에 대한 방어, 합성품에 대한 안전성 확보 부족 등이 가장 큰 문제로 기인된다. 천연항산화제 및 천연항균소재는 국외 업체의 규모가 크며 해외 상용화된 천연항산화제는 Table 1-8 천연항균소재에 대한 정보는 Table 1-9 과 같다. 주요 6 개 업체에서 로즈마리추출물과 토코페롤 국내 수입량을 살펴보면 2014 년 대비 로즈마리추출물 266%, 토코페롤 211%, 전체 217%의 성장율을 나타낸다. 토코페롤의 주요 사용처는 가공유지류(튀김유), 라면류, 스낵류에서 가장 많이 사용된다. 로즈마리는 식품뿐만 아니라 사료용으로도 사용되며 항산화의 목적과 아울러 항균소재로서도 효과가 높아 여러 목적으로 사용가능하다(Food Distribution Yearbook, 2021). 합성소재에 대한 불신으로 최근 20 년간 합성보존료, 합성항산화제 및 합성색소는 그 사용량이 줄어드는 추세이다. 국외에서도 선진국뿐만 아니라 동남아에서도 천연 식품기능성 소재에 대한 수요가 점점 늘고 있다. 특히 한류열풍이 높은 베트남에서는 한국에서와 같이 프리미엄 시장 즉, 천연소재에 대한 니즈가 날로 증가하여 천연보존료, 천연항산화제, 천연 색소에 대한 수출이 늘어가는 추세이다. 따라서

국내시장에 머물지 않고 국외시장에 대한 마케팅 및 연구 개발이
지속되어야 할 것이다.



Table 1-8. The production companies of imported antioxidant product and production output

Item	Manufacturers	Origin	Import (Ton)	
			2014	2020
Rosemary extracts	Kalsec	USA	3.0	-
	Kemin	USA	2.0	5.5
	Danisco	Denmark	1.8	4.5
	Naturex	France	-	5.7
	VITIVA. D.D	Slovenia	-	1.4
	BOS NATURAL FLAVORS	India	-	1.0
	Subtotal		6.8	18.1
Tochopherol	Cargill	USA	7.0	31.8
	Kemin	USA	-	5.4
	ADM	Argentina	21.0	3.5
	BTSA	Spain	3.0	15.0
	VITAE	Spain	-	4.0
	China	China	27.0	62.9
	Subtotal		58.0	122.5
	Grand Total		64.8	140.6

(Ministry of Food and Drug Safety, Food Safety Korea, 2020)

Table 1-9. The commercialized natural antibacterial product from the overseas

Product name	Main ingredient	Manufa- -cturer	Characteristic
BioVia YM10	green tea extract mustard oil	DuPont	- Strong antifungal activity - Characteristics: thermal and pH stability (pH2-7) - Usage: Preservation of dressings, sauces, etc.
GUARDIAN Rosemary extract	Rosemary extract	DuPont	- Strong antioxidant activity - Usage: Preservation of oil, dressing, mayonnaise, etc. - Possesses broad-spectrum antibacterial activity
TAKEX fresh	Bamboo extract	Takex Labo	- Characteristics: Thermal stability - Usage: For washing fresh vegetables - Possesses antifungal activity
Delvo Guard	<i>Lactobacilli</i> (<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sakei</i>)	DSM	- Characteristics: Formulation stability upon application - Usage: Preservation of yogurt, cheese, cream, etc. - Strong antifungal activity
Delvo Coat	Natamycin	DSM	- Characteristics: Working at various pHs (pH3-9) - Usage: Preservation of cheese, beverages, processed meat, etc. - Gram-positive bacteria target antibacterial activity (lactic acid bacteria control)
Delvo Zyme	Lysozyme	DSM	- Characteristics: Efficacy when applied to fermented food - Usage: Preservation of wine, cheese, etc. - Gram-positive bacteria target antibacterial activity
Niseen	Nisin	Siveele	- Usage: Preservation of processed cheese - Possesses antifungal activity
Chitoseen	Chitosan	Siveele	- Characteristics: Maintain product moisture - Usage: for washing fresh meat and vegetables - Gram-negative bacteria target antibacterial activity
Epsiliseen	ϵ -polylysine	Siveele	- Characteristics: heat, pH stability (pH4-10) - Usage: Confectionery, beverages, sauces, etc.

Han et al. (2018) Natural antibacterial materials and nanotechnology for food industry.

III. 천연물 유래 소재의 한계점 및 미래

천연 식물 자원의 보전을 위한 국제적인 규약에 의하여 자원 확보 측면에서 천연물 산업은 일정한 범위의 제약을 받을 수밖에 없다. 이는 식물자원이 매우 다양하고 지역적으로 자생하는 종류가 서로 다르기 때문에 자원보전 노력은 유엔을 통한 국제적 협약을 통하여 이루어지고 있다. 특히 풍부한 식물자원의 보고인 열대 우림 지역이 대부분 경제적으로 저개발 국가이기 때문에 자원 보존보다는 자원 소모가 우선되는 점을 개선하기 위한 범세계적인 보호조치를 더욱 강화하고 있다.

- 1) 생물다양성 협약(Rio Declaration on Environment and Development)
- 2) 멸종위기 동식물의 국제거래에 관한 협정(CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)
- 3) 세계보건기구 전통약물 가이드라인(W.H.O. Guideline on Traditional Medicine)
- 4) 약품 등록규정의 조화로운 통일을 위한 국제협약(ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

위와 같은 범세계적인 규약과 협약들에 의해서 천연물 활용에 대한 규제가 발생하고 있다. 또한, 자국내에서의 경쟁력은 물론이고 글로벌 수출시 해당물질의 GRAS (Generally Recognized as Safe (US FDA))인정 등 식물추출물의 규제가 많아지고 있어 식품 및 화장품에서의 원료에 3 차 원부재료까지 모두 상대국가에 밝혀야 한다. 자국내에서 문제가 없으나 SCOGS (Select Committee on GRAS Substances)을 거쳐야 미국으로 수출이 가능해져 국내시장을 넘어서기 위한 자구책이 필요하다.

천연물 산업이 빠른 적용 및 확대를 보이는 분야는 식품, 화장품 등 합성소재를 대체하는 시장이 빠르게 성장하고 있다. 안식향산나트륨 등의 합성보존료 및 합성향산화제인 BHT, BHA 에 대한 인체 위해성으로 인한 천연식품보존료 시장 성장이 예시라고 볼 수 있다. 천연물에 대한 소비자의 요구는 지속적으로 증가하고 있고, 이에 따른 연구개발과 상용화는 부족한 실정이다. 따라서 대체할 수 있는 천연물질의 탐색이 가장 우선시되어야 하고, 앞서 서술한 바와 마찬가지로 국내 소재로는 한계가 있으며 그 외 국가와는 국제적 규제가 앞을 가로막고 있다. 따라서 원료 소재의 공급망 확보가 시급하며 천연물 소재를 국내에서 생산 및 재배할 수 있어야 한다. 국내 천연물을 기반으로 하는 산업에서는 국내산을 강조하기 위하여 일정한 재배지를 만들어 안정적인 공급이 가능하도록 만들고 있다. 이를 중국, 동남아, 남미 등에서 원료를 수입하여

더 경제적인 이차대사물을 만들어 낼 수 있고 현재에도 대다수 원료를 이들 나라에 의존한다. 국토가 좁은 우리나라에서는 피할 수 없는 현실이다. 그러나 향후 바이오 산업 강국으로 가기 위해서는 이들 천연물의 직접적인 재배를 통해 고부가가치 아이템의 국산화가 이루어져야 한다. 나고야 의정서에 의해 자국의 자원에 대한 부가가치를 창출하기 위해 원료가격의 인상이 불가피하고 동시에 특허권에 대한 국가 간의 분쟁도 지소적이다. 재배지 절대 의존적인 식품소재원료는 더욱 더 빈번하다. 직접적인 천연소재의 재배에서 추출, 제조하여 고부가가치를 가져갈 수 있는 자원을 통한 국내외 수출 가능한 식품, 화장품, 의약품 과 같은 소재의 확보가 필요하다. 따라서, 합성소재에 대한 안전성이 크게 주목받지 못하던 시절에서 건강과 기능성에 대한 지속적인 개발이 필요하였으며 천연물을 이용한 대안책을 찾아오게 되었다. 식품, 화장품에서의 합성 기능성 소재는 안전성 문제가 끊이지 않았다. 천연물 소재를 이용한 천연항균제, 식품첨가물, 화장품 소재 개발 등은 합성품에서 발생하는 부작용을 대비하고 소비자의 끊임없는 안전성에 대한 니즈에 대한 대안이 될 수 있다고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 섬기린초 유래한 화합물들의 구조적 동정과 물질들의 기능적 특성에 대해 연구하여 천연물 소재로써의 활용 방안과 그 잠재력에 대해서 제시하고자 한다.

IV. 참고문헌

- Almeida M.M., Alves J.M.P., Patto D.C.S., Lima C.R.R.C., Quenca-Guillen J.S., Santoro M.I.R.M., & Kedor-Hackmann E.R.M. (2009). Determination of tocopheryl acetate and ascorbyltetraisoalmitate in cosmetic formulations by HPLC. *International journal of cosmetic science*, 31, 445-450
- Balaguer A., Chisvert A., & Salvador A. (2008). Environmentally friendly LC for the simultaneous determination of ascorbic acid and its derivatives in skin-whitening cosmetics. *Journal of separation science*, 31(2), 229-236
- Broussonetia Kazinoki Root Extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 39(2): 89-96
- Carroll, M. (2019). "Evaluating Stevia Production," NC Cooperative Extension. (<https://craven.ces.ncsu.edu/evaluating-stevia-production/>)
- Choi H.S., Kim G.C., & Shin H.J. (2012). Comparison of Antimicrobial and Antioxidant Activities by Different Extraction Methods in Korean Bamboos. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering*, 27, 131-135
- Choi J.D., Seo I.W., & Cho S.H. (1990). Studies on the Antimicrobial Activity of Grapefruit Seed Extract. *The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science*, 23(4), 297-302
- Cosmetics industry analysis report 2020. Korea Health Industry Development Institute
- FDA. 1982. No.R-0013982
- Gardner C., Wylie-Rosett J., Gidding S.S., Steffen L.M., Johnson R.K., Reader D., & Lichtenstein A.H. (2012). Nonnutritive Sweeteners: current use and health perspectives. *Circulation*, 126, 509-519
- Global Cosmetic Ingredient Information DB System (<http://cis.kcii.re.kr/>)
- Harich J. (1985). DF-100. US Patent 1,354,818
- Health functional food functional evaluation guide. (4) 'Help with antioxidants'. Ministry of Food and Drug Safety
- Heggers J.P., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox R., Zhao J. G., & Reagor L. (2002). The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity, 8(3), 325-332

- Jang H.I. (2019). Study for Whitening Activity of Mixture of Arbutin and Oil Soluble Licorice Extract. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 36(2), 635-644
- Jeon J.S., Kim H.T., Kim M.G., Oh M.S., Hong S.R., Yoon M.H., Shin H.C., Shim J.H., Afifi N.A., Hacımüftüoğlu A., & Abd El-Aty A.M. (2016). Simultaneous Detection of Glabridin, (-)- α -Bisabolol, and Ascorbyl Tetraisopalmitate in Whitening Cosmetic Creams Using HPLC-PAD. *Chromatographia*, 79(13), 851-860
- Kim D.S., Choi M.H., & Shin H.J. (2018). Polyphenol contents and antioxidant activities of domestic bamboo leaves with different extraction solvents. *J. of Advanced Engineering and Technology*, 11(1), 7-13
- Kim M.K., Park M.S., Choi S.U., Park H.R., & Hwang Y.I. (2005). Antimicrobial Effect of Grapefruit Seed Extract on Preservation for Carrot and Spinach. *Journal of Life Science*, 15(1), 66-70
- Kim S.H., Lee S.Y., & Li S.H. (2013). The Effect of Essential Oils from Tea-tree and Palmarosa on the Acne Skin. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology, Cosmetol*, 11(6), 1083-1090
- Kim S.H., & Kim I.C. (2008). Antioxidative Properties and Whitening Effects of the *Eucommiae cortex*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Cnidii rhizome*. *Journal of the East Asian Society of Dietary Life*, 18(4), 618-623
- Kim S.J. (2007). Domestic technology trends in the field of natural dyes. *Bulletin of food technology*, 20(1), 38-68.
- Kim Y.K., Lee H.Y., & Oh D.H. (2004). Changes in Antioxidative Activity and Total Polyphenols of Crude and Defatted Grape Seed Extract by Extraction Condition and Storage. *Korean Journal of Food Preservation*, 11(4), 455-460
- Kyoun K.Y. (2010). R&D Trends of Functional Cosmetics. *Korean Industrial Chemistry News*, 13(4), 1-10
- Lee H.H. (1997). Current Trends on the Development of Whitening Products. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 23(1), 43-56
- Lee H.Y. (2020). Status of Approval of Functional Ingredients for Health Functional Foods and Technical Support for Research and Development. *Food Industry and Nutrition*, 25(2), 1-8

- Lee S.J., Lee H.J., Kim H.S., Kim J.R., & An S.K. (2010). The Effect of Cosmetics Included *Centella Asiatica* Extracts on the Improvement of Erythema of Inflammatory 20's Acne. Journal of The Korean Society of cosmetology, 16(1), 176-184
- Lim H.J., Lee J.Y., Kim H.B., Kim D.H., & Shin S.S. (2013). Preparation and Evaluation of Polymer Microspheres Containing *Broussonetia Kazinoki* Root Extract. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 39(2), 89-96
- Ministry of Food and Drug Safety (<https://www.foodsafetykorea.go.kr>)
- Ministry of Food and Drug Safety. (2020). Production performance of food, etc. 11-14700000-001922-10,
- Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2021-57. Standards and Specifications of Food Additives [Attached Table 4] Regulations on Recognition of Naturally Originated Food Additives
- Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2021-57. Standards and specifications of food additives.
- Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2020-132, Functional Cosmetics Standards and Test Methods
- Mun Y.J., Kim J., Lim N.Y., Lee S.Y., Seop L.G., Hwang C.Y., & Woo W.H. (2002). Inhibitory Effect of Melanogenesis of Radix Glycyrrhizae Water Extract. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine, 16(6): 1230-1235
- Overview of Food Labeling and Food Hazardous Substances. (2010), Korea Consumer Agency
- Park H.K., & Kim S.B. (2006). Antimicrobial Activity of Grapefruit Seed Extract. The Korean Journal of Food And Nutrition, 19(4), 526-531
- Park H.Y., Choi H.D., & Kim Y.S. (2016). Research trend in sugar alternatives. Food science and industry, 49(3), 40-54
- Park S.J., & Oh D.H. (2003). Free Radical Scavenging Effect of Seed and Skin Extracts of Black Olympia Grape (*Vitis labruscana* L.). Korean Journal of Food Science and Technology, 35(1), 121-124
- Ryu J.H., Ahn H., & Lee H.J. (2003). Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. Fitoterapia. 74, 350-354

- Sakamoto S., Sato K., Maitani T., & Yamada T. (1996). Analysis of components in natural food additive "grapefruit seed extract" by HPLC and LC/MS. *Eisei Shikenjo Hokoku*, 114, 38-42
- Small and Medium Business Administration. (2013). Bio industry [market] analysis
- Statistics Korea. (2019). National Health and Nutrition Survey
- Struck S., Jaros D., Brennan C.S., & Rohm H. (2014). *Sugar replacement in sweetened bakery goods*. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 1963-1976
- University of Texas Health Science Center at San Antonio. (2016). Related studies point to the illusion of the artificial. Accessed. Aug. 10 (<https://www.sciencedaily.com/releases/2011/06/110627183944.htm>).



제 2 장 섬기린초 추출물 유래 화합물의 분리 동정 및 항균 특성



제 2 장은 Journal of Microbiology and Biotechnology 에 게재된 Eun-Tak Jeong 등의
“Synergistic antibacterial activity of an active compound derived from *Sedum
takesimense* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its clinical isolates”
제목의 논문을 바탕으로 작성되었습니다

I. 서론

1. 연구배경

미생물 감염에 의한 질병을 치료하기 위해 오랜기간 동안 다양한 형태의 항생제가 개발 및 사용되어 왔다. 그러나 Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 질병통제예방센터) 및 Food and Drug Administration (FDA, 미국식품의약국)을 비롯한 여러 국제 기구에서는 이러한 약물의 남용에 대해 지속적으로 경고하고 있다(Ventola, 2015). 또한 질병을 치료하기 위해 사용되는 항생제는 결과적으로 항생제 내성 박테리아의 발생을 초래하였고 이는 전세계 공중 보건의 큰 문제로 대두되었다. CDC 보고서에 따르면, 미국에서 매년 최소 200 만명이 감염되고 23,000 명이 항생제 다제내성 병원균에 감염되어 사망하였다(Center for Disease Control, 2015). 전세계적으로 해마다 항생제 내성 박테리아, 특히, MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) 감염 사례가 증가하고 있으며, 이는 인류 전체 공중 보건 및 건강에 심각한 위협이 되고 있다(Tong et al., 2015). MRSA 는 반코마이신 및 테이코플라닌과 같은 글리코펩티드 형태를 제외하고 메티실린 그룹을 갖는 모든 항생제에 대해 내성을 갖고 있다(Kaur and Chate, 2015). MRSA 치료를 위해 반코마이신 등이 유용하게 사용되고 있지만, 이로 인해 반코마이신 내성 황색포도상구균(VRSA, vancomycin resistant *Staphylococcus aerues*)의

발생을 초래하였다(French 2010). 또한 MRSA 표준 균주뿐 아니라 임상 시료에서 분리된 MRSA 균주들에서도 다양한 항생제에 대한 내성을 보이는 것으로 나타났다(Pai et al., 2010). 따라서 항생제 내성 균주에 의한 감염을 제어하기 위한 다양한 연구들이 수행되고 있으며, 항생제 사용량을 줄이기 위하여 합성 의약품 연구뿐만 아니라 천연소재 또는 천연유래 소재 추출물 등 과 기존 항생제의 조합을 통해 항균 효과의 상승을 모색하고 있다(Okwu et al., 2018; Compean and Ynalyez, 2014). 천연소재들 중 가장 다양하게 연구되고 있는 물질은 식물유래의 phytochemical 이며, 천연 치료제 및 항균제로써 각광받고 있으며 항균효과를 갖는 다양한 물질들과 그 응용방법에 대해서 보고되고 있다. 또한 이러한 식물유래 항균 화합물과 기존 항생제와의 병용 사용 및 그 시너지 효과에 대해서도 다양하게 연구되고 있다(Choi et al., 2010; Aqil et al., 2005; Aqil et al., 2006). Choi et al. (2010) 에 따르면 감태에서 추출한 화합물인 eckol 은 MRSA 에 대해 항균효과를 가지며, β -lactam 계 항생제와 병용 시 상승효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한, *Camellia sinensis*, *Delonix regia* 및 *Holarhena antidysenterica* 식물의 추출물들은 MRSA 와 MSSA (methicillin susceptible *S. aureus*) 및 임상분리 항생제 내성 균주에 있어도 살균효과를 나타내었으며, 테트라사이클린, 클로람페니콜 및 암피실린과 같은 항생제와 병용 사용하였을 때 상승효과를 나타내었다고 보고되었다(Aqil et al., 2005; Aqil et

al., 2006). 또한, *Salvia miltiorrhiza* 에서 분리 정제된 cryptotanshinone 화합물이 MRSA, VRSA 및 MSSA 에 대해 항균활성을 나타내었으며, oxacillin, ampicillin 및 vancomycin 과 같은 β -lactam 계 항생제와 병용 사용시에 상승효과를 나타내는 것으로 보고 된 바 있다(Cha et al., 2014). 이와 같이, 다양한 식물 및 그 유래 추출물들이 항생제와 병용 사용하여 그 상승효과를 탐색하고 항생제의 남용을 줄이기 위한 연구는 활발히 진행되고 있다. 이러한 연구 결과들은 다양한 결과를 도출해내고 물질들을 탐색하여 항생제 사용을 감소시키면서 효과적으로 항생제 내성균에 대비할 수 있는 대책이 될 잠재력이 높다고 판단된다.

따라서, 본 연구에서는 국내 자생 식물 중 하나인, 섬기린초를 이용하여 생리활성 물질을 분리하고 이를 이용하여 항균효과에 대해 검토하고 항생제와의 상승 효과 등을 보고하고자 한다. 섬기린초(*Sedum takesimense*)는 돌나물과(*Crassulaceae*) 돌나물속(*Sedum* L.)에 속하는 다년생 초본으로 한국의 울릉도와 독도에 주로 분포하는 특산식물이다(Chung and Kim, 1989; Nakai, 1919). 국내에서 돌나물속의 일부 종은 민간요법으로 사용되어 왔으며 혈액순환 개선에 효과가 있다는 일부 보고가 있으며(Bae, 2000; Kim et al., 2004) 섬기린초 및 그 추출물이 나타내는 효능 및 효과에 대한 연구는 국내외 모두 부족한 실정이다. 섬기린초 추출물이 갖는 효능에 대해서는 일부 연구가 수행되었지만, 섬기린초에서 추출된

생리활성 물질이나 그 물질들이 갖는 효능에 대해서도 매우 연구가 부족한 실정이다. Vu et al. (2013)에 따르면 섬기린초에서 gallotannin 계열의 물질들을 분리 정제하여 토마토 풋 마름병(Tomato bacterial wilt)에 효과에 대해 보고하였으며, Jang et al. (2016)에 따르면 섬기린초 물 추출물을 이용하여 마우스 대식세포에서 항염증 효능에 대해 보고된 바가 있다. 따라서 본 연구에서는 섬기린초로부터 active compound 를 분리 및 동정하여 항균특성과 항생제 대체 천연제재로서의 잠재력에 대해서 보고하고자 한다.

2. 섬기린초(*Sedum takesimnense*)의 특성

세계보건기구(WHO)에 따르면 현대의약품 중 일부는 전통적으로 사용되던 약용 식물로부터 만들어지며 의약품 중 대다수의 물질은 식물로부터 추출 및 분리되어 사용된다. 전세계적으로 효과적인 생리활성 물질과 의약품 소재를 개발하기 위한 많은 연구들이 수행되고 있다. 또한 이런 소재 개발을 위한 연구 및 화합물의 분리는 전통적으로 사용되던 약용 식물을 사용할 때 더욱 효과적이고 성공률이 높다. 특히, 한국에서 돌나물 속(*Sedum*)의 일부 종은 민간요법으로 소염제로써의 역할을 하고 있다(Bae, 1999). 섬기린초는 한국 토종의 야생화로 동해의 섬인 울릉도와 독도에서 주로 서식하며 두꺼운 줄기에 연한 녹색잎을 띠는 잎이 줄기의

움푹 들어간 위치에서 2 단으로 발생하며 잎과 줄기 아랫부분은 붉은 색을 띤다(Fig. 2-1). 여름인 8 월경에는 노란색의 꽃이 주로 피는 것으로 알려져 있다(Kim, 2004). 섬기린초는 한국과 일본을 제외한 국가에서는 많이 알려지지 않아, 다양한 연구가 수행되고 있지 않으며 그로부터 분리된 물질에 대한 연구도 매우 미미하다. 대부분의 연구는 돌나물 속의 생태학적 특성과 성장 패턴등에 대한 연구가 주를 이루고 있다(Moon and Jang, 2020; Go et al., 2009).

하지만, 전통적으로 돌나물속은 소염제로써의 역할을 수행해 오는 등의 기능적인 부분이 알려져 있어, 돌나물 속에 속하는 섬기린초로부터 추출 및 분리 정제된 화합물의 기능성이 기대된다. 섬기린초가 속해있는 돌나물속(*Sedum*)은 돌나물과의 가장 대표적이며 많은 종류의 식물이 이에 속하고 있으며 많은 종류의 돌나물속이 약학적으로 사용되고 있다. 주로 알려진 돌나물 속의 주요 종들은 *Sedum acre*, *Sedum album*, *Sedum telephium*, *Sedum dasyphyllum* 및 *Sedum reflexum* 이다(*Sedum* genus, www.Wikipedia.org). 이들 중 일부종은 독성이 있는 알칼로이드계열 물질을 함유하고 있으며 또 다른 일부의 종들은 항염증 효과가 보고되어 있으며 잎에서 분리 동정된 다당류가 항염 활성을 나타낸 경우도 있었다(Mulinacci et al., 1995; De Melo et al., 2005). 또한 Stevens et al. (199)에 따르면 돌나물 종은 다양한 종류의 알칼로이드, 플라보노이드, 탄닌 및 시아노겐 화합물을 함유하는 것으로

보고되어 있으며 돌나물 29 종으로부터 10 종류의 플라보노이드가 분리되었다고 보고하였다. 이러한 다양한 보고에 따르면 돌나물 속의 식물들은 다양한 종류의 활성 물질을 함유하고 있으며 전통적으로 약용 식물로써 전세계적으로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 한국의 자생 식물인 섬기린초로부터 활성 물질을 분리하고 그에 대한 기능 및 특성에 대해서 연구하여 보고하고자 한다.





Fig. 2-1. The picture of *Sedum takesimense*.

3. 주요 항생제내성세균 **methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Staphylococcus aureus 는 황색포도상구균의 학명이며 그람 양성의 구형의 박테리아로 인체의 비강, 피부 및 호흡기 등에서 공생하고 있는 일반적인 미생물 종류중 하나이다. 그러나, 특수한 상황 및 환경의 변화에 따라서 내열성을 갖는 **exotoxins** 를 생성하여 구토, 설사 및 복통을 일으킬 수 있으며 **toxic shock syndrome** 의 원인이 될 수 있고, 피부나 모공에 발생한 상처를 통해 감염되어 화농성 피부질환, 봉와직염, 고열, 호흡기 감염, 폐렴 및 패혈증 등 매우 다양하고 심각한 증상을 발생시킬 수 있는 원인이 될 수 있다(Kluytmans et al., 1997; Kadariva et al., 2014; Becker and Bubeck, 2015; Mehrai et al., 2016; Aman, 2017). *S. aureus* 에 의한 감염은 1927 년 최초의 항생제인 페니실린(**penicillin**)이 발견되기 전까지는 사람의 생명을 위협할 수도 있는 사망의 원인이었으며(Table 2-1), 1940 년대 초 페니실린이 상용화된 후 20 년 뒤인 1959 년에 페니실린의 저항성을 가진 *S. aureus* (**Penicillin resistant *S. aureus*, PRSA**)가 발견되었다. Penicillin 과 **cephalosporin** 등의 1 세대 항생제는 세균의 세포벽에 존재하는 **transpeptidase** 나 **transglycosylase** 등 **peptidoglycan** 즉 세포벽의 주요 물질의 합성효소를 경쟁적으로 억제하여 세포벽 구성성분을 합성할 수 없게끔하며 이로 인해 세균 세포벽이 약화되어 용균작용에 의해 세균을 사멸시키며 PRSA 는

이러한 기작을 약화시킬 수 있는 β -lactamase 를 합성할 수 있지만, methicillin, oxacillin 및 β -lactamase inhibitor 를 첨가한 clavulate 등에 의해서 효과적으로 치료될 수 있었다(Rayner and Munckhof, 2005). 하지만 2 년 뒤인 1961 년 메티실린에 내성을 지닌 *S. aureus* 가 발견되었으며 이를 methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* 즉, MRSA 라 칭하였다. 현재까지도 MRSA 에 의한 감염은 큰 문제가 되고 있으며 여러가지 항생제와 치료법들이 제시되고 있지만 근본적인 해결책은 제시되지 않고 있다(Enright et al., 2002; Abdulgader et al., 2015). MRSA 는 한 종류의 항생제에만 저항성을 갖는데 그치지 않고 β -lactam 계열의 항생제에 대해 모두 저항성을 갖는다. 또한 MRSA 에 의해 병원균으로써 감염되었을 시 전립선염, 모세 혈관염, 패혈증, 균혈증, 괴사성 폐렴, 골수염 및 심내막염 등의 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다(Hau et al., 2018). 감염되어 발생하는 질환과 증상에 문제에 그치지 않고, 기존에 존재하는 항생제에 대해서 다제내성을 지니고 있기 때문에 처방과 투약을 매우 신중히 진행되어야 하며 MRSA 의 내성 이상의 용량의 항생제를 투여하거나, 더 강한 항생제를 투여하는 방법이 있지만, 이로 인해 부작용을 일으켜 신체에 위협을 줄 수 있으며 더 강한 내성을 지닌 병원균의 출현을 야기할 수 있기 때문에 신중하게 치료되어야 한다(Eggers et al., 2017; Norouzi et al., 2018). MRSA 의 주요 항생제 내성 기전은 PBP2a 와 β -lactamase, 및 efflux pump (Fig. 2-2) 등이 있으며 이러한

Table 2-1. History of antimicrobial agents and emerging resistance (1940-2010)

Period	Antibiotic	Antimicrobial resistance
1940s	Penicillin Streptomycin Chloramphenicol Tetracycline	Penicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
1950s	Erythromycin Isoniazid Vancomycin Rifamycin	Multidrug-resistant <i>Shigella</i> (Japan, 1953)
1960s	Methicillin Ampicillin Nalidixic acid Cephalosporin	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (1961) β -lactamase (TEM-1) (1965) Penicillin-intermediate <i>Streptococcus pneumoniae</i> (1967)
1970s	Tobramycin Ethambutol	MRSA epidemics (1 st wave) β -lactamase-producing <i>H. influenzae</i> (1974)
1980s	Cefotaxime Aztreonam Imipenem Ciprofloxacin	MRSA epidemics (2 nd wave) Aminoglycoside high-level resistant enterococci ESBL-producing <i>Klebsiella</i> (1985) Carbapenem-resistant <i>Pseudomonas</i>
1990s	Meropenem Clarithromycin Cefepime	Vancomycin-resistant <i>Enterococci</i> Community-associated MRSA Vancomycin-intermediate <i>S. aureus</i> (VISA, 1997)
2000	Linezolid Daptomycin Tigecycline	Vancomycin-resistant <i>S. aureus</i> (VRSA, 2002) Multidrug-resistant <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> NMD-1-producing <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> (2010)

내성 기전들은 각각 일련의 메커니즘에 의해서 발현된다(Blázquez et al., 2014). PBP2a 를 이용한 항생제 내성 기전의 경우 PBP2a 는 PBP (penicillin binding protein)에 비해 β -lactam 계 항생제에 대한 결합 친화도가 낮아 항생제에 대하여 방해받지 않으며, MRSA 의 peptidoglycan 합성 및 형성에 기여할 수 있다. Peptidoglycan 은 그람 양성균의 세포벽을 이루는 주요 물질로써 peptidoglycan 의 생합성은 미생물의 번식과 생장에 매우 중요한 요소로서 작용하게 된다. 또한 β -lactamase 는 β -lactam 계열 항생제의 β -lactam ring 을 가수분해하여 항생제의 활성 자체를 비활성시키는 기전으로 작동하는 방어기작이다(Cha et al., 2007; Llarrull et al., 2009; Llarrull and Mobashery, 2012; Gonzales et al., 2015). Efflux pump 는 세포막을 관통하고 있으며 세포내 유해물질을 세포 외부로 배출하는 역할을 하며 MRSA 는 이것을 이용하여 β -lactam 계열, macrolide 계열, aminoglycoside 계열, quinolone 계열, tetracycline, rifampicin, vancomycin 까지 매우 다양한 항생제들이 세포내로 침입하였을 때 세포외로 배출함으로써 항생제에 대한 내성기작을 작동시킨다(Pourmand et al., 2014; de Araújo et al., 2016; Jennings et al., 2017; Wang et al., 2018). 이러한 방어기전을 이용하여 MRSA 는 항생제에 대해 강한 내성을 나타내며 이로 인해 MRSA 감염에 대한 치료는 상당히 어려운 실정에 놓여있다. MRSA 에 의한 감염은 지속적으로 증가하는 추세이며 기존에 개발된 항생제 사용에 있어서도 한계에 부딪힌 상황이며, 기존의

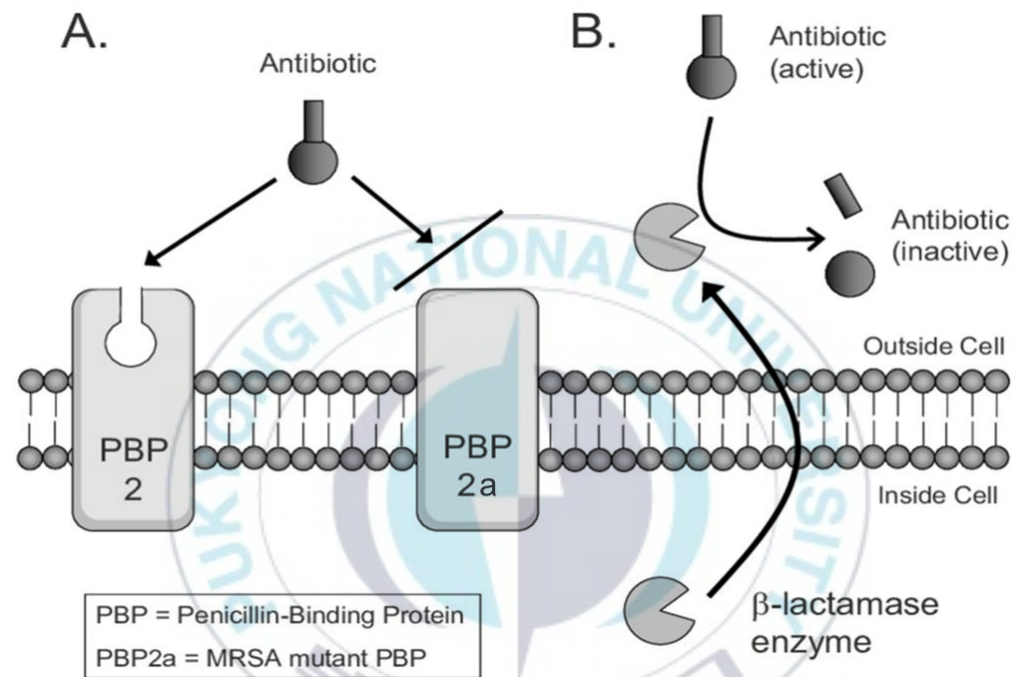


Fig. 2-2. Schematic diagram of mechanisms for MRSA antibiotics resistance. A, PBP2a mechanisms; B, β -lactamase mechanisms

항생제를 대체하는 강력한 vancomycin 이 개발되어 해결책으로 여겨졌었지만, 이 역시 남용되어 결과적으로 VRSA (vancomycin resistance staphylococcus aureus)의 출현으로 이어지게 되었다. 최근에는 MRSA 의 감염에 의한 치료의 목적으로 천연물을 활용한 연구가 각광받으며 활발히 이루어지고 있다(Yamawaki et al., 2018). 하지만, 천연물이 갖는 항균활성만으로 MRSA 및 세균에 대한 항균활성은 충분한 효과를 발휘할 수 없는 경우가 있어, 기존에 사용되는 항생제와의 병용 사용시 발생하는 상승효과에 대한 연구가 필요하다. 천연물과 항생제와의 병용 사용은 반드시 기존에 사용되던 항생제의 사용량을 줄일 수 있는 효과적인 방법일 수 있으며 이를 통해 MRSA 와 같은 항생제 내성 균주에 대해 효과적인 항균효과를 나타낼 수 있다. 따라서 본 장에서는 섬기린초에서 분리된 화합물의 항균 특성을 확인하고 MRSA 에 표준균주와 임상 분리 균주를 이용하여 항생제와의 병용 사용시의 상승 효과에 대해서 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 섬기린초 추출물 제조

본 연구에 사용된 섬기린초(*S. takesimense*)는 경북의 전통시장에서 구매하였다. 섬기린초는 추출전에 80°C에서 4 일동안 건조되었다. 건조된 섬기린초를 이 용에 40% (v/v) 의 주정을 10 배로 첨가하여 30 시간 동안 상온에서 추출하였으며 이후 여과하여 감압 농축한 다음 동결건조하여 그 분말을 사용하였다. 추출 및 농축된 추출물의 수율은 약 15% (w/w)으로 확인되었다.

2. 섬기린초 추출물에서 화합물의 분리 및 동정

추출물 중 화합물의 분리는 실리카겔 컬럼(3.5 by 60.0 cm; Kiesel gel 60, 150 g, 230 to 400 mesh; E. Merck)을 이용하여 1 차적으로 분리하였으며 추출 고형분 10 g 이 포함된 농축 추출물을 실리카겔 컬럼 충전재 150 g 과 혼합하고 감압 농축하여 용매를 완전히 제거하였다. 그 이후 농축시료에 클로로포름, 메탄올, 증류수 및 아세트산을 부피비율로 55:36:8:1 (v/v/v/v)로 혼합한 용매를 흘려 1 차 분취하였다. 1 차 분취를 통해 수득한 분액을 Shephadex LH-20 (3.5 x 60 cm, 130 g, 70-100 μ m, Sigma-Aldrich) 수지 150 g 이

담긴 오픈 컬럼을 이용하여 메탄올로 용리하여 2 차 분취하였다. 2 차 분취액을 YMC-ODS-A (reverse phase C18, 250 x 20 mm, 5 μ m, Waters Co., Ltd) 컬럼이 장착된 HPLC (high performance liquid chromatography)에 적용하여 이동상 아세트나이트릴 및 물(20:80, v/v; 15 mL/min)을 이용하여 용리하였다. 용리된 물질은 270 nm 파장으로 검출하였으며 컬럼과 반응하여 chromatogram에서 peak를 형성하는 시간을 기준으로 분취하여 구조 분석을 진행하였으며 이를 통해 정제된 단일 물질을 수득하였다(Fig. 2-3). 섬기린초 유래의 추출 분획물의 구조 동정은 Vu et al. (2013)의 방법에 따라 수행하였다. 분취물들의 화학 구조 동정을 위해 ^1H -NMR 을 수행하였다. ^1H -NMR 은 분리 및 정제된 화합물을 중수소화 메탄올(CD_3OD , Merck)에 용해시켜 500 MHz 에서 1 시간동안 Bruker AMX-500 (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Bruker Co. Ltd, USA) 분광기를 사용하여 분석하였다. 내부 표준 물질은 테트라메틸실란으로 사용되었으며 커플링 상수는 Hertz 가 사용되었다(Yoon et al., 2011). 정제된 화합물의 구조는 LC-MS 및 ^1H -NMR 데이터를 문헌과 비교하여 결정하였다.

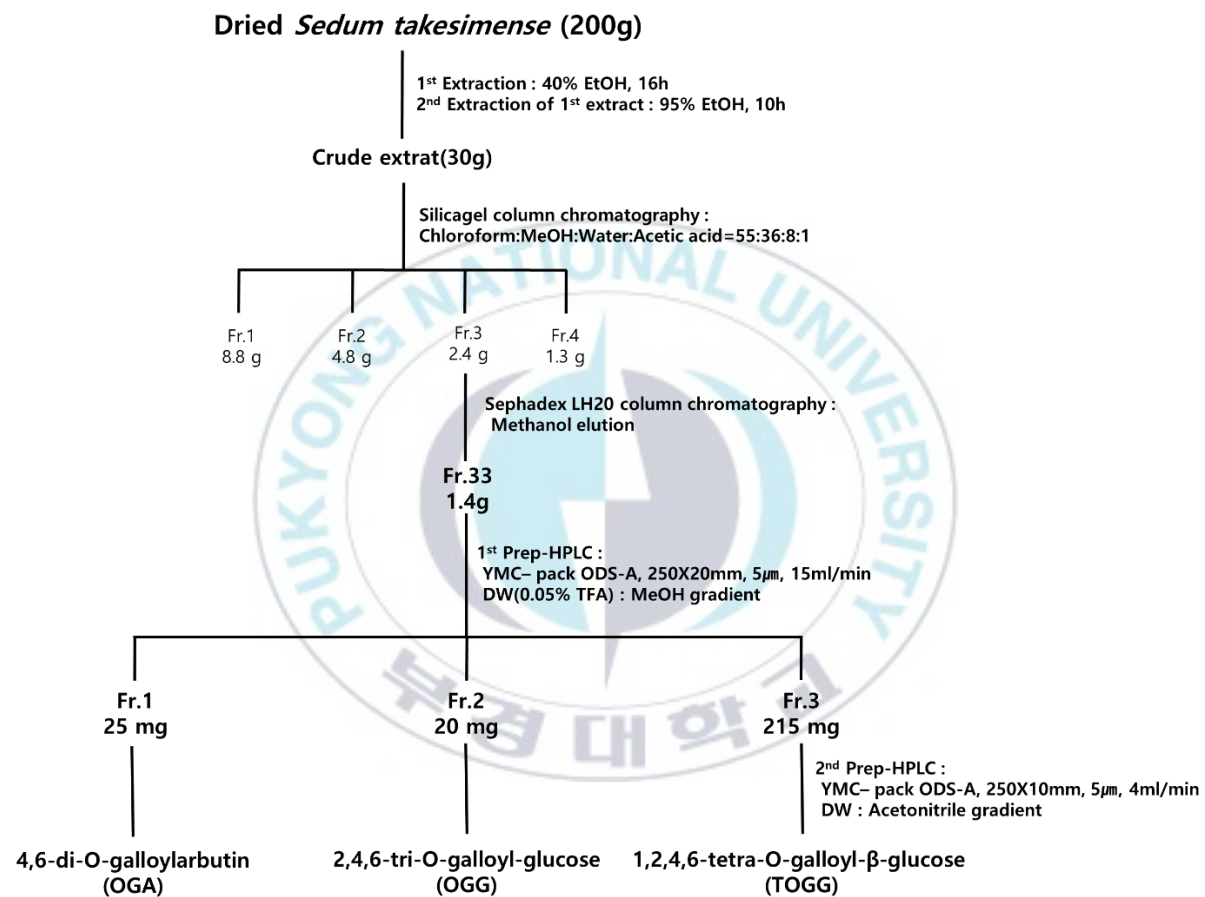


Fig. 2-3. Extraction and fractionation of *Sedum takesimense* for isolation active compound.

3. 사용 균주 및 항생제

섬기린초로부터 분리 및 정제된 물질들의 항균 특성을 확인하기 위하여 *Escherichia coli* (EC, KCTC 1682), *Pseudomonas aeruginosa* (PA, KCTC 4562), *Salmonella typhimurium* (ST, KCTC 1925), *Vibrio parahaemolyticus* (VP, NCTC 11344), *Bacillus cereus* (BC, KCTC 3624), *Listeria monocytogenes* (LM, KCTC 3569), *Staphylococcus aureus* (SA, KCTC 1927), *Staphylococcus epidermidis* (SE, KCTC 3958), 및 *Cutibacterium acnes* (CA, KCTC 3314) 와 같은 표준 병원성 박테리아를 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)로부터 구입하여 사용하였다. 또한 특이적으로 MRSA 및 그 분리균주들에 대해 항균특성을 연구하기 위해 표준균주 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, KCCM 40511)를 한국미생물 보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM) 에서 구입하였으며 7 개의 MRSA 임상분리주는 동아대학교병원에서 제공받았다. 모든 균주는 Mueller-Hinton 액체 배지(MHB, Difco, USA) 또는 Tryptic Soy 액체배지(TSB, Difco, USA) 에서 37℃에서 호기적으로 배양하였다. 본 연구에서 사용된 모든 항생제 및 표준화합물은 분석등급 이상이었으며 Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. MRSA 표준 균주 및 분리균주들의 항생제 내성을 확인하기 위하여 ampicillin, oxacillin, 및 clavulanic acid 가 사용되었으며

분리정제된 화합물의 효과를 검증하기 위해 표준물질 penta galloyl glucose 및 pyrogallol 이 사용되었다.

4. 추출물 및 정제화합물의 항균활성 및 최소저해농도 측정

섬기린초의 조추출물의 항균활성은 Dickson et al. (2006)의 한천확산법을 변형하여 사용하여 억제영역(clear zone)의 지름을 기반으로 하여 평가하였다. 조추출물의 농도는 1 mg 및 5 mg 에 대해 검토되었으며 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, USA) 에서 추출물과 병원균을 함께 24 시간 동안 배양한 후 억제영역을 기록하였다. 실험에는 DMSO 가 음성대조군으로 사용되었으며 이는 모든 균주에 대한 실험에 함께 수행되었다. 추출물과 각각의 분획물들의 표준병원균주들에 대한 최소저해농도를 평가하기 위해 National Committee for Clinical Laboratory Standards (USA)에서 제시하는 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 평가를 수행하였으며, MIC 는 two-fold serial dilution 을 통해 수행되었다. 최소저해농도 평가를 위해 시험에 사용된 모든 표준 균주들은 TSA 에서 37°C, 24-48 시간 동안 전배양되었으며, 이를 10^5 - 10^6 CFU/mL 의 농도로 희석하여 접종균액으로 사용하였다. 섬기린초로부터 추출 및 분리된 물질을 96 well plate 에 two-fold serial dilution 으로 희석하여 접종한 뒤 37°C, 24 시간동안 incubator 에서

배양하였으며 배양 후 microplate reader 를 이용하여 600 nm 에서 흡광도를 측정하여 대조군과 측정된 흡광도 값의 차이로 최소저해농도를 도출하였다.

5. MRSA 에 대한 분리 화합물과 항생제의 상승 효과

섬기린초로부터 추출한 분리 화합물의 항생제와의 병용 사용에 있어 상승 효과를 평가하기 위해 fractional inhibitory concentration (FIC) (Hsieh et al., 1993; Meletiadiis et al., 2010)을 사용하여 checkerboard method (Norden et al., 1979)에 따라서 평가하였다. FICs (ΣFIC)의 값은 다음 방정식에 따라 계산되었다.

$$\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = (C_A / MIC_A) + (C_B / MIC_B)$$

MIC_A 와 MIC_B 는 각각의 물질을 이용하여 평가된 미생물 저해를 위해 필요한 최소저해농도 값이며, C_A 와 C_B 는 물질 A와 물질 B를 병용 사용 시 나타나는 최소생육저해농도를 의미한다. 두 가지 물질의 병용 사용 시 상승효과를 평가하기 위해서는 FIC index (FICI) 값에 의해 평가를 수행하며(Choi et al., 2010) FICI 값은 ΣFIC_{min} 과 ΣFIC_{max} 값을 고려하여 평가하게 되는데 두 물질간의 병용 사용 시 최대의 상승효과를 나타낼 수 있는 값을 ΣFIC_{min} 으로 나타내며 이 값을 나타내는 경우 C_A 와 C_B 물질의 각 농도는 병용 사용시 가장 최대의 생육저해 효과를 나타내는 농도를 의미한다. ΣFIC_{max} 는 상승효과를 나타내는 가장 높은 ΣFIC 값을

의미하며 $\Sigma FIC_{\min}$ 과 함께 상승효과의 범위를 결정할 수 있다. FICI index 값이 0.5 이하일 경우 synergistic, 0.5 - ≤ 1.0 일 경우 weak synergy, $> 1.0 - \leq 2.0$ 일 경우 independent 마지막으로 > 2.0 일 경우 antagonistic 으로 평가한다(Yu et al., 2005).



III. 결과 및 고찰

1. 섬기린초에서 분리한 화합물의 정제 및 구조결정

섬기린초의 에탄올 추출물은 실리카겔 컬럼, Sephadex LH-20 컬럼, 및 prep-HPLC 분석 시스템을 이용하여 정제되었으며, 재료 및 방법에서 서술한 대로 $^1\text{H-NMR}$ 을 수행하여 구조를 결정하였다. 에탄올을 이용한 섬기린초 추출물의 추출수율은 15% (w/w)으로 나타났으며 건조된 원료 200 g 으로부터 30 g 의 고형분의 추출물을 획득하였다. 이후 Sephadex LH 20 컬럼을 이용하여 1.4 g 의 추출물을 회수하였으며 이 분액을 이용하여 270 nm 로 검출한 결과 화합물 1, 2, 3 이 각각 36.53 분, 46.67 분 및 56.12 분에 용리되는 것을 확인하고 분취하여 각각 25 mg, 20 mg, 및 215 mg 의 단일화합물을 확보하였다(Fig. 2-4). 확보된 물질들의 구조 동정은 LC-MS 와 $^1\text{H-NMR}$ 이 수행되었으며 기존의 연구결과 (Vu et al., 2013; Gangadhar et al., 2011; Hisham et al., 2011; Tanaka et al., 1983; Tanaka et al., 1985; Thuong et al., 2007; Wang et al., 2007; Xin-Min et al., 1987; Yang et al., 2007; Yuan et al., 2012)와 비교하여 구조를 결정하였다(Table 2-2). Vu et al. (2013)이 보고한 바와 같이, 섬기린초에서 분리된 물질들은 gallic acid 와 그 유도체로서 가수분해 가능한 tannin 류에 속하며, 유도체는 2-4 개가 galloylation 된 galloyarbutin 로 구성된 것을 확인하였다. 분리된 화합물 1 은 4,6-di-O-galloylarbutin (OGA),

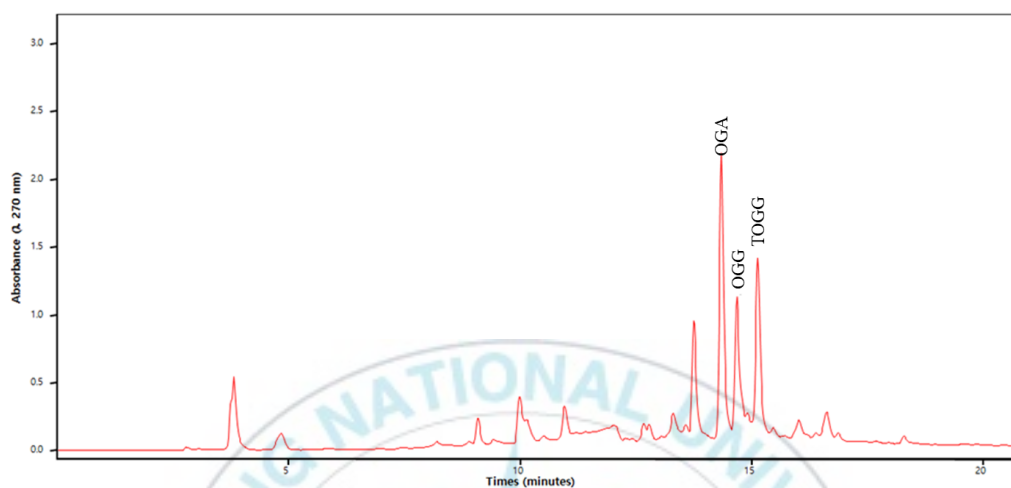
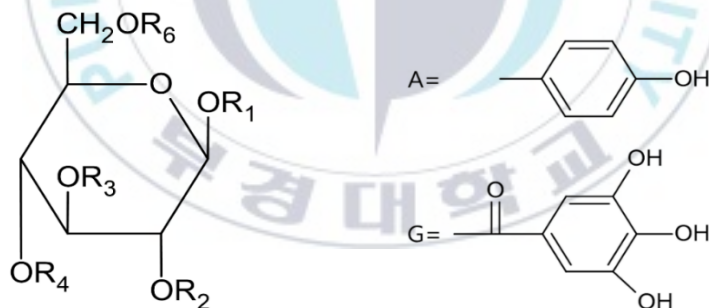


Fig. 2-4. HPLC chromatogram of 3 compounds isolated and identified from *Sedum takesimense*.

Table 2-2. Chemical shifts of hydroxyl proton in p-hydroxylphenyl, galloyl and glucose in the purified compound (OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -glucose)

Position	Compounds		
	OGA	OGG	TOGG
p-hydroxylphenyl			
2',6'	6.93(1H, dd, 9.0)		
3',5'	6.61(1H, dd, 9.1)		
Galloyl			
2', 6'			7.10(2H, s)
2'', 6''	7.14(2H, s)	7.14(2H, s)	7.09(2H, s)
2''', 6'''	7.12(2H, s)	7.11(4H, s)	7.05(2H, s)
2''', 6'''			7.03(2H, s)
Glucose			
1	4.87(1H, d, 7.9)	4.85(1H, d, 7.9)	6.04(1H, d, 8.4)
2	3.69(1H, dd, 8.1, 9.5)	5.13(1H, dd, 8.1, 9.5)	5.35(1H, dd, 8.3, 9.6)
3	3.70(1H, t, 9.0)	3.75(1H, t, 9.2)	4.18(1H, t, 9.5)
4	5.22(1H, t, 9.5)	3.59(1H, t, 9.4)	5.37(1H, t, 9.7)
5	3.83(1H, m)	3.79(1H, m)	4.19(1H, m)
6	4.58(1H, dd, 2.3, 12.0)	4.62(1H, dd, 2.0, 11.9)	4.47(1H, dd, 2.2, 12.3)
7	4.47(1H, dd, 6.7, 12.2)	4.48(1H, dd, 6.6, 11.9)	4.27(1H, dd, 2.2, 12.3)



Compound	R_1	R_2	R_3	R_4	R_6
4,6-di-O-galloylarbutin	A	H	H	G	G
2,4,6-tri-O-galloyl-glucose	H	G	H	G	G
1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -glucose	G	G	H	G	G

화합물 2 는 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose (OGG), 화합물 3 은 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -glucose (TOGG)로 동정되었다(Fig. 2-4). 본 장에서는 이 중 화합물 3(TOGG)을 이용하여 항균 및 MRSA 와 그 분리균주들에 대한 제어 가능성에 대해서 연구하였다. 항균 특성 평가를 위해 TOGG 와 유사한 구조를 갖는 penta galloyl glucose (PGG)와 pyrogallol (PG)를 선택하였으며 TOGG 와의 항균특성을 비교 평가하였다. 또한, PGG 및 PG 는 MRSA 및 임상분리주에 대한 베타 락탐계열 항생제와의 상승 효과 평가에서도 사용되었다.



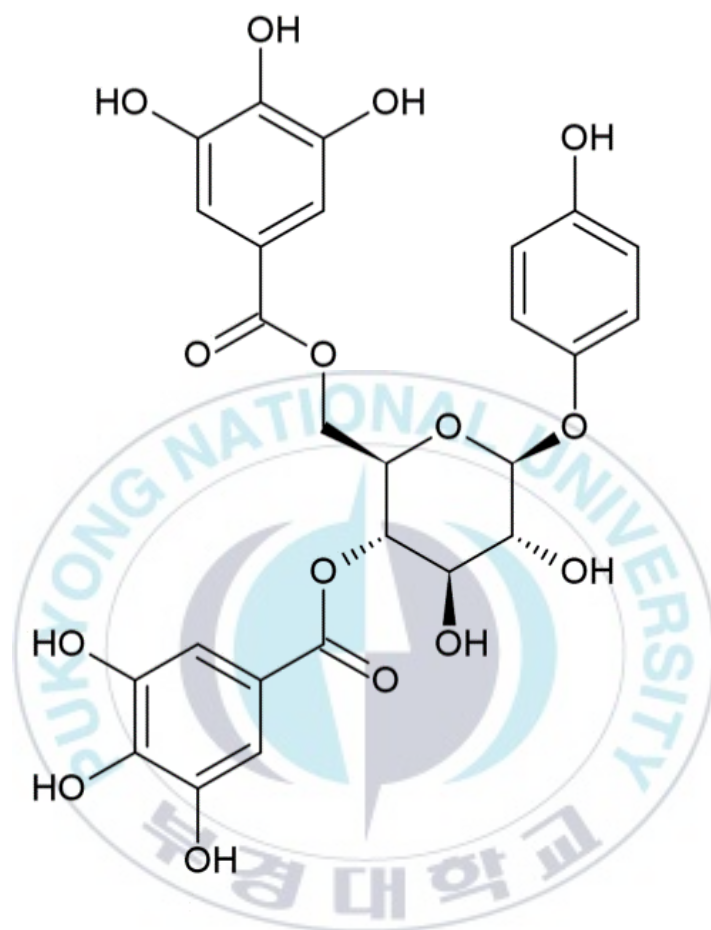


Fig. 2-5. Chemical structure of purified single compound (OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin) derived from the aerial part of *Sedum takesimense*.

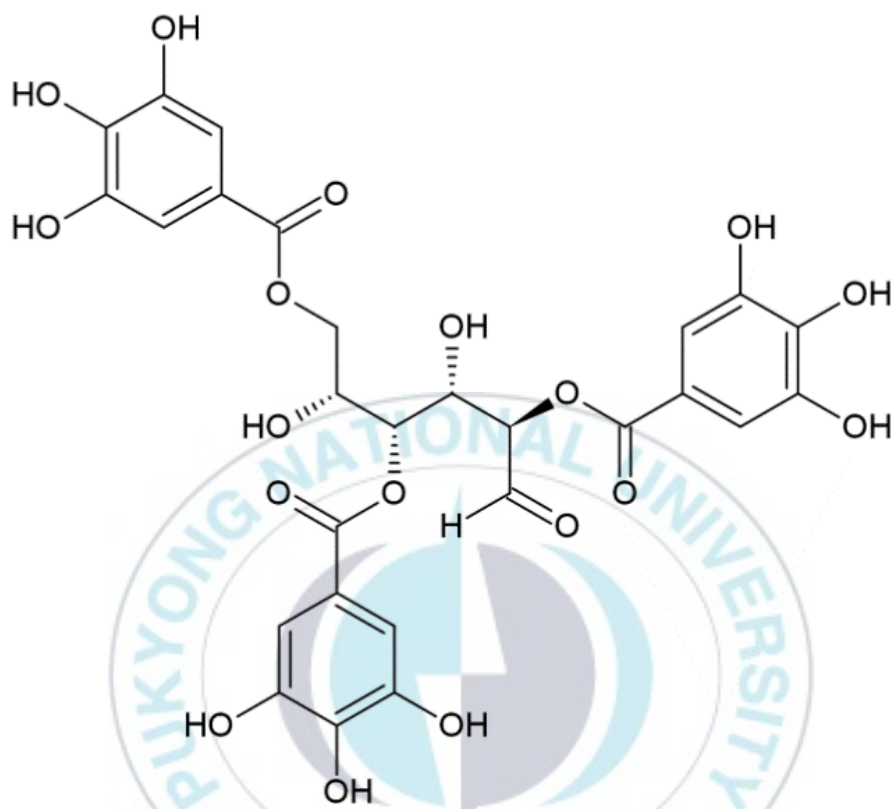


Fig. 2-6. Chemical structure of purified single compound (OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose) derived from the aerial part of *Sedum takesimense*.

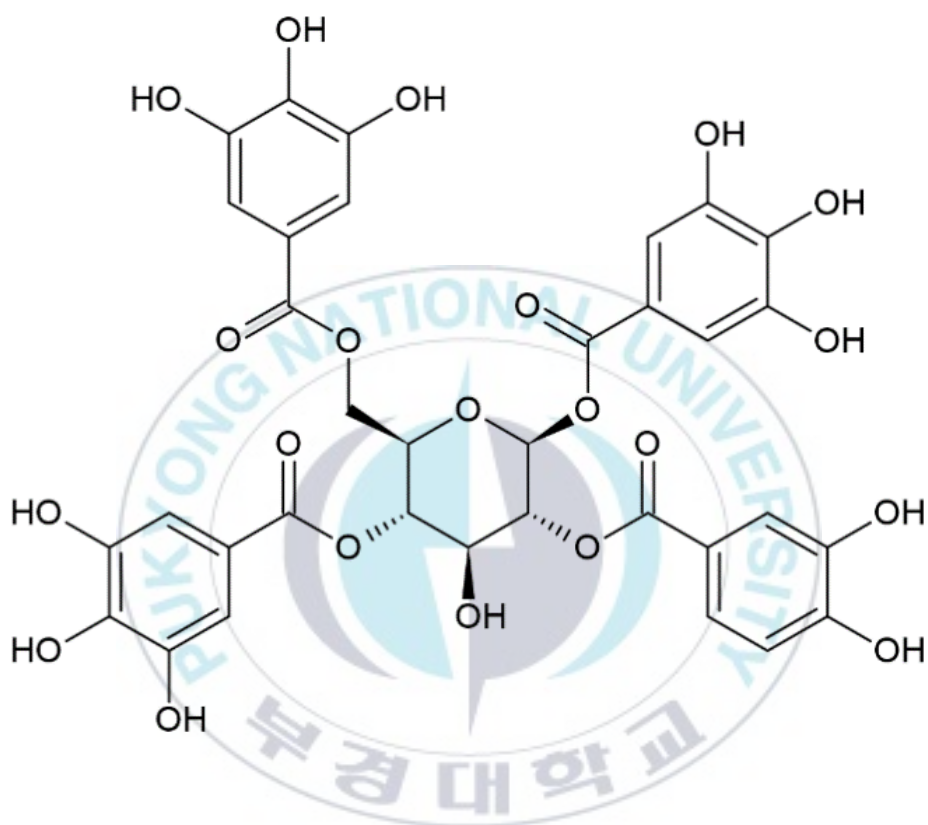


Fig. 2-7. Chemical structure of purified single compound (TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose) derived from the aerial part of *Sedum takesimense*.

2. 섬기린초 추출물 및 유래 화합물의 항균활성 스크리닝

섬기린초 에탄올 추출물의 항균활성 스크리닝은 먼저 한천 확산법과 최소저해농도(MIC)를 이용하여 평가되었으며, 결과는 Table 2-3 에 나타내었다. 한천확산법은 억제영역의 면적의 지름을 길이 단위(mm)로 측정하여 나타내었으며(Fig. 2-8), MIC 는 해당 병원균주의 성장을 저해하는 농도단위($\mu\text{g/mL}$)로 표시하였다(Fig. 2-9). 총 9 종의 병원성 균주에 대해 한천 확산법을 이용하여 억제영역을 측정한 결과 억제 영역의 크기는 $\text{SE} > \text{VP} > \text{ST} > \text{PA} = \text{BC} > \text{EC} > \text{CA} > \text{SA} > \text{LM}$ 의 순서로 나타났으며(Fig. 2-8), SA 와 LM 과 같은 그람양성세균에 대해서는 다른 그람음성 병원성 세균에 비하여 낮은 억제영역이 나타났다. 또한 그람음성균 중에서는 CA 에 대한 억제영역이 가장 낮게 나타났다. 이러한 결과는 같은 돌나무속의 조추출물에 대해 연구된 Odontuya et al. (2016) 에 의해 보고된 바에 따르면 *Sedum hybridum* 의 조추출물이 CA 에 대하여 가장 낮은 억제 영역을 나타내었으며 본 연구결과의 결과와 같은 경향을 나타내었다. 항균 활성 스크리닝을 위한 MIC 결과는 Table 2-3 과 같으며 한천확산법에 사용된 병원성 균주와 같은 9 종의 균주를 사용하였고 섬기린초 조추출물(CE), 분획 1, 2, 3 (F1, F2, F3) 및 TOGG 를 사용하여 수행하였다(Table 2-3). 분획 2 의 경우 병원성 박테리아 저해를 위해 필요한 농도는 EC 에 대해 256

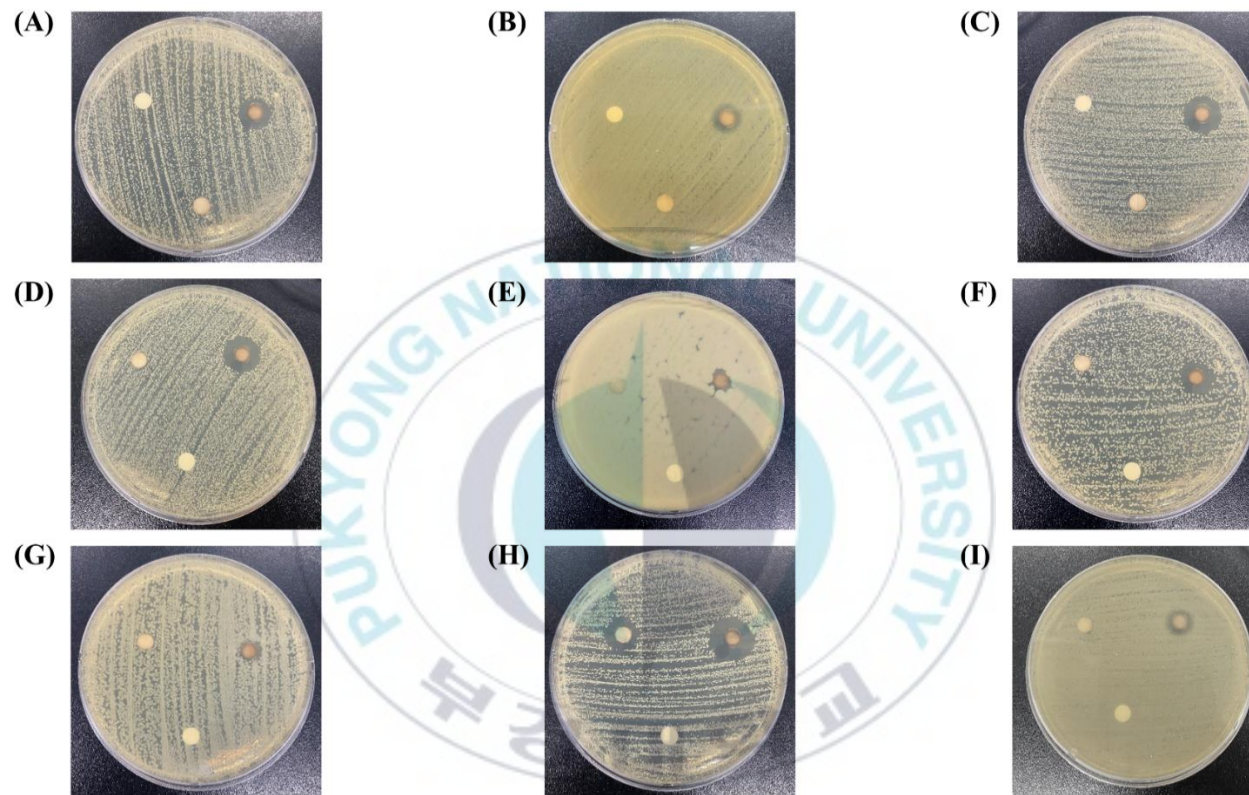


Fig. 2-8. Results of the zone of inhibition assay using crude extract concentration 1 mg and 5 mg from *Sedum takesimense* (A), *Escherichia coli*; (B), *Pseudomonas aeruginosa*; (C), *Salmonella typhimurium*; (D), *Vibrio parahaemolyticus*; (E), *Bacillus cereus*; (F), *Listeria monocytogenes*; (G), *Staphylococcus aureus*; (H), *Staphylococcus epidermidis*; and (I), *Cutibacterium acnes*.

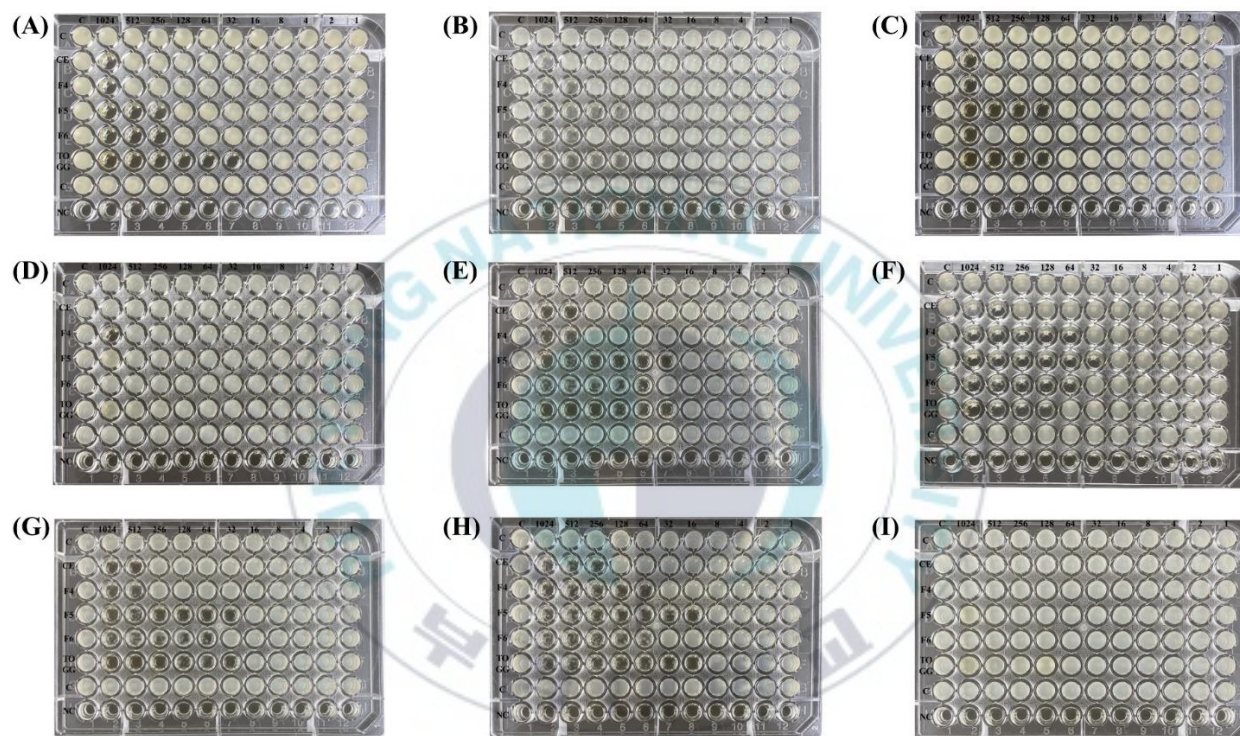


Fig. 2-9. Results of representative checkerboard assay using crude extract, its fraction, and pure compound from *Sedum takesimense* (A), *Escherichia coli*; (B), *Pseudomonas aeruginosa*; (C), *Salmonella typhimurium*; (D), *Vibrio parahaemolyticus*; (E), *Bacillus cereus*; (F), *Listeria monocytogenes*; (G), *Staphylococcus aureus*; (H), *Staphylococcus epidermidis*; and (I), *Cutibacterium acnes*.

Table 2-3. Antibacterial activity and minimum inhibitory concentration (MIC) values of crude extract, its fraction, and pure compound from *Sedum takesimense*

Strain	Antimicrobial activity of 40% ethanolic extract						
	Zone of inhibition (mm)			MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	CE		CE	F1	F2	F3	TOGG
	1 mg	5 mg					
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682	-	9.0 $\pm$ 0.5	1024	1024	256	256	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 4562	-	9.7 $\pm$ 0.5	1024	512	128	512	128
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925	-	11.3 $\pm$ 0.5	1024	1024	128	512	128
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NCTC 11344	-	11.7 $\pm$ 0.5	-	1024	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	-	9.7 $\pm$ 0.5	512	512	32	64	32
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	-	2.7 $\pm$ 0.8	512	64	32	64	128
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	-	7.3 $\pm$ 0.5	512	256	16	256	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 3958	8.3 $\pm$ 0.5	15 $\pm$ 0.8	256	64	16	64	16
<i>Cutibacterium acnes</i> KCTC 3314	-	7.7 $\pm$ 0.5	-	-	-	-	-

* CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% Ethanol; F1, fraction 1; F2, fraction 2; F3, fraction 3; TOGG, single compound (1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -glucose)

$\mu\text{g/mL}$, PA 및 ST 의 경우 $128 \mu\text{g/mL}$, BC 및 LM 은 $32 \mu\text{g/mL}$, SA 및 SE 에 대해서는 $16 \mu\text{g/mL}$ 인것으로 나타났다. 조추출물을 포함한 다른 분획들 보다는 항균활성이 높은 것으로 보이지만, 분리 정제 화합물인 TOGG 에 비교하였을 경우에는 항균 특성이 낮은 것으로 보여진다. 또한, TOGG 는 다른 분획과 비교 시 더 낮은 농도를 요구하여 가장 높은 항균특성을 가진 것으로 나타났다. TOGG 의 각 병원균을 제어하기 위하여 요구되는 최소농도는 EC 및 BC 의 경우 $32 \mu\text{g/mL}$, PA, ST 및 LM 의 경우 $128 \mu\text{g/mL}$, SA 및 SE 의 경우 $16 \mu\text{g/mL}$ 농도로 나타났다. 특히, TOGG 는 포도상구균(*Staphylococci*) 종과 같은 그람 양성균의 성장을 억제하는데 더 높은 활성을 보였다. 이 결과는 이전의 여러 연구에서 보고된 결과와 매우 유사한 경향을 나타내었다(Lee et al., 2008; Lee et al., 2014; Odontuya, 2016; Bensouici et al., 2016). 이전 연구들에서는 식물에서 추출한 정제 화합물이 그람 양성균의 억제에 효과적이라고 보고했다. 따라서 조추출물, 분획물(F1, F2, F3) 및 정제 화합물(TOGG)을 사용하여 MRSA 및 이의 임상적 분리주에 대한 억제 활성 및 기존 항생제와의 병용사용 시 상승 효과에 대해 평가였다.

3. 섬기린초 추출물 및 유래 화합물의 anti-MRSA 특성

섬기린초 조추출물, 분획물(F1, F2, F3), 정제 화합물(TOGG) 및 표준물질(PGG, PG)의 MRSA 및 MRSA 임상 분리주에 대한 항균특성은 MIC 로 수행되었으며 그 결과는 Table 2-4 에 나타내었다. 실험에 사용된 모든 물질들은 MRSA 표준 균주 및 임상분리주에 대해서 생육 저해 활성을 나타내었다. 저해 활성은 추출물과 화합물의 종류에 따라 다른 것으로 나타났다. 조추출물과 F1 의 경우에 최소저해농도가 높게 나타나 anti-MRSA 활성이 낮은 것으로 판단된다. 조추출물과 F1 는 MRSA 표준 균주에 대해서만 각각 256 및 64 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 저해 활성을 보였으며 유사한 경향으로 분리주 12 번에 대해서도 512 및 32 $\mu\text{g/mL}$ 의 활성을 나타내었다. 그 외 분리주에 대해서는 1024 또는 512 $\mu\text{g/mL}$ 로 최소저해농도가 높게 측정되어 anti-MRSA 활성이 낮은 것으로 판단된다. F2 및 F3 의 경우 최소저해농도가 512 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 일정 수준 이상의 항 MRSA 결과가 나타났다. MRSA 표준균주에 대해서는 각각 16 및 32 $\mu\text{g/mL}$ 의 최소저해농도를 나타내었으며 F2 의 경우 분리주 14 번을 제외하고는 모두 64 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 최소저해를 나타내었다. 또한 F3 의 경우 모든 임상분리주에 대해서 64 $\mu\text{g/mL}$ 의 최소저해 농도를 나타내어 F2 및 F3 는 항 MRSA 활성을 나타내는 것으로 판단된다. 시험된 모든 화합물 중에서 TOGG 는 16-256 $\mu\text{g/mL}$ 범위의 최소저해 값을

Table 2-4. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of crude extracts, its fractions, standard compounds, and singly purified compound against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Strain*	Source or Reference	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)**						
		CE	F1	F2	F3	TOGG	PGG	PG
MRSA KCCM 40511	Standard strain	256	64	16	32	16	128	128
Isolated 6		1024	1024	64	64	16	64	64
Isolated 8		1024	1024	64	64	16	64	128
Isolated10		1024	1024	32	64	16	64	128
Isolated12	Clinical isolate**	512	32	16	64	16	128	64
Isolated13		1024	512	16, 32	64	32	64	256
Isolated14		1024	512	512	64	256	64	128
Isolated18		1024	1024	32	64	32	64	512

* MRSA KCCM 40511 were standard strain purchased from KCCM, Isolated strains were provided by the Dong-A University Hospital

** CE, Crude extract of *Sedum takesimense* with 40% Ethanol; F1, fraction 1; F2, fraction 2; F3, fraction 3; TOGG, single compound (1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose); PGG, penta-galloyl-glucose (standard compound 1); PG, pyrogallol (standard compound 2)

나타내었으며 MRSA 표준 균주 및 임상 분리주에 대해 가장 강력한 항균 활성이 나타났다.

특히, MRSA 표준 균주와 임상분리주 6, 8, 10, 12 에 대한 TOGG 의 최소저해농도 값은 16 $\mu\text{g/mL}$ 인 것으로 나타났다. 또한, 임상분리주 13 및 18 에 대해서도 TOGG 의 최소저해농도값은 32 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 우수한 anti-MRSA 특성을 나타낸 것으로 판단된다. 섬기린초에서 분리된 이 단일 정제 화합물은 구조적으로 유사한 PGG 및 PG 와 같은 표준 화합물에 비해 MRSA 세포 성장에 대한 더 높은 억제 효과를 나타냈다. 여러 연구에 따르면 식물이나 해조류와 같은 천연 원료로부터의 추출물은 항균 활성이 높다는 보고가 있으며(Lee et al., 2008; Bensouici et al., 2016), Bensouici et al. (2016)에 따르면, *Sedum caeruleum* 에서 분리한 화합물을 각각 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* 및 *S. aureus* 와 같이 임상적으로 분리된 병원성 세균에 대해 높은 항균 활성을 나타내었다. 또한 Lee et al. (2008)는 *Ecklonia stolonifera* algae 에서 분리한 dieckol 은 MRSA 에 대한 β -lactam 계 항생물질과 조합하여 항균활성 및 상승작용을 나타낸다고 보고하였다. 따라서 선행연구와 현재 연구의 결과를 통해 식물에서 분리한 화합물은 강력한 항균활성을 나타 낼 수 있으며 β -lactam 계 항생물질과 병용투여시 상승효과를 나타낼 수 있다고 판단하였다. 따라서 본 연구는 섬기린초 유래 화합물의 MRSA 표준 균주 및 임상 분리주에 대한 항균특성을

확인하였으며 또한, β -lactam 계열 항생제와의 병용 사용시 상승 효과에 대한 연구를 수행하였다.



4. MRSA 표준균주 및 임상분리주에 대한 베타 락탐계 항생제의 최소 저해 농도

MRSA 표준 균주 및 임상분리주들은 β -lactam 계열 항생제인 ampicillin 및 oxacillin 에 대하여 최소저해농도 값이 64 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 β -lactam 계열 항생제에 대해 높은 내성을 나타내었다(Table 2-5). 그러나 β -lactamase 의 inhibitor로 작용하는 clavulanic acid 에 대해서는 낮은 내성을 나타내었다. Clavulanic acid 는 항생제로써 효과적이지는 않지만, 페니실린계열의 항생제와 병용 사용 시 상승효과를 나타내어 항생제 내성 박테리아에 대해 효과적으로 알려져 있다(Cantoni et al., 1989; Côté et al., 2019). Clavulanic acid 가 MRSA 및 임상분리주에 대해 나타낸 최소저해농도는 최소 8 $\mu\text{g/mL}$ 에서 최대 64 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 특히 임상분리주 12 번에 대해서는 최소저해농도가 8 $\mu\text{g/mL}$ 으로 매우 높은 항균 활성을 나타내었다. 여러 연구에서 MRSA 의 임상 분리주가 다양한 범위의 최소저해농도값을 나타내는 것으로 보고되었다(Lee et al., 2014; Cantoni et al., 1989; Côté et al., 2019). 또한 이러한 연구들에서는 clavulanic acid 가 MRSA 에 대한 항균효과가 있으며 특히 amoxicillin 과 같은 다른 항생제와 병용 사용 시 더 효과적이며 상승효과가 나타난다라고 보고하였다(Cantoni et al., 1989; Côté et al., 2019). 본 연구에서는 MRSA 및 그 임상 분리주에 대해 ampicillin 및

oxacillin 보다 clavulanic acid 가 효과적으로 나타났으며 여러 이전 연구들과 유사한 경향을 나타내었으며 섬기린초로부터 분리된 물질과의 병용 사용 시 상승 효과를 기대할 수 있다고 판단하였다.



Table 2-5. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of antibiotics (ampicillin, oxacillin, and clavulanic acid) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its clinical isolates

Strain [*]	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)		
	Ampicillin	Oxacillin	Clavulanic acid
MRSA KCCM 40511	256	128	32
Isolated 6	128	128	32
Isolated 8	256	64	64
Isolated10	128	64	64
Isolated12	128	256	8
Isolated13	64	64	16
Isolated14	64	64	16
Isolated18	128	64	32

* MRSA KCCM 40511 were standard strain purchased from KCCM, Isolated strains were provided by the Dong-A University Hospital

섬기린초에서 분리한 TOGG 의 MRSA 에 대한 최소저해농도값은 MRSA 표준 균주 및 분리주 14 번을 제외한 모든 임상 분리주에 대해 16-32 $\mu\text{g/mL}$ 범위에 있는 것으로 나타났으며 이는 효과적으로 MRSA 의 생육을 제어할 수 있음을 의미한다(Table 2-4). 순수 화합물인 TOGG 의 MRSA 에 대한 최소저해농도값은 β -lactams 계열 항생제들이 MRSA 및 그 임상분리주에 대해 나타낸 최소저해농도값보다 낮게 나타났으며 이는 TOGG 가 기존의 항생제보다 더 효과적으로 MRSA 를 제어할 수 있음을 의미한다. MRSA 및 그 임상분리주에 대한 항생제의 최소저해농도 측정 결과 임상분리주 12 번은 ampicillin, oxacillin 등의 다른 항생제에 비해 clavulanic acid 에 대한 감수성이 높은 것으로 나타났으며 MRSA KCCM 40511 및 임상분리주 6번도 유사한 경향의 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 β -lactam계 항생제 중 ampicillin 과 oxacillin 에 높은 저항성을 가진 균주가 clavulanic acid 에 의해서 제어될 수 있음을 의미하고, 항균 특성을 가진 물질과의 상승 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되며 이를 위해 항생제와 섬기린초 유래 분리물질들과의 병용 사용 시 상승 효과에 대해 검토하였다.

5. 섬기린초 유래 추출물과 베타락탐계 항생제의 상승효과

본 연구는 섬기린초에서 분리된 화합물을 이용하여 ampicillin, oxacillin 및 clavulanic acid 와 같은 베타 락탐계열 항생제와 함께 병용사용하여 MRSA 표준균주 및 임상분리주에 대해 상승 효과를 확인하였다(Table 2-6). Table 2-6 에 나타난 바와 같이 조추출물, F2, 및 TOGG 와 함께 ampicillin 을 병용사용 시 FICI 값이 1.031 로 나타났으며, 1.0 초과 2.0 이하일 경우 독립적으로 상승효과가 없는 것으로 판단할 수 있으며, PGG 의 경우 FICI 값이 0.844 로 1.0 이하로 나타나 가산적 효과를 기대할 수 있으며, PG 의 경우 FICI 값이 0.262 로 0.5 이하로 나타나 상승효과가 있는 것으로 판단된다. Clavulanic acid 의 경우에도 ampicillin 과 유사한 경향의 결과가 나타났으며 섬기린초 유래 물질 3 가지(조추출물, F2, TOGG)의 경우 상승효과가 전혀 나타나지 않았으며 TOGG의 경우 FICI 값이 0.5 이하로써, 상승효과가 나타났다. PG 의 경우 표준물질과 clavulanic acid 간의 상승 효과 등의 관계가 전혀 없는 것으로 나타났다. 하지만, oxacillin 의 경우 MRSA 균주(KCCM 40511)에 대하여 조추출물과 병용사용 시 최소저해농도가 256 에서 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 로 급격하게 감소하였다. 또한, oxacillin 과 병용사용 된 F2 및 TOGG 의 최소저해농도는 각각 16 에서 4 $\mu\text{g/mL}$ 및 6 에서 2 $\mu\text{g/mL}$ 로 감소하였다. 조추출물, F2, 및 TOGG 의 FICI 는 ampicillin 과 병용 사용 했을 때 1.031 로 동일한 값을 나타내었으며 모든

Table 2-6. Fractional inhibitory concentration (FIC) indexes (FICIs) of combined effects among major active compounds (crude extract, fraction 2, and pure compound), standard compounds (penta-galloyl-glucose and pyrogallol), and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* KCCM 40511

Strain	Antibiotics	Compound**	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		$\Sigma\text{FIC}_{\text{max}}^{\text{a)}$	$\Sigma\text{FIC}_{\text{min}}^{\text{b)}$	FICI ^{c)}
			Alone	Combination			
MRSA KCCM 40511*	Ampicillin (AMP)	CE	256	32	2.250	0.625	1.031
		AMP	256	128			
		F2	16	0.016	1.250	0.750	1.031
		AMP	256	256			
		TOGG	16	2	1.250	0.625	1.031
		AMP	256	256			
		PGG	128	64	1.063	0.625	0.844
		AMP	256	128			
		PG	128	2	1.000	0.125	0.262
		AMP	256	64			
	Oxacillin (OXA)	CE	256	0.25	1.500	0.501	0.531
		OXA	128	64			
		F2	16	4	0.625	0.500	0.562
		OXA	128	32			
		TOGG	16	2	0.313	0.188	0.281
		OXA	128	8			
		PGG	128	1	0.125	0.064	0.070
		OXA	128	8			
		PG	128	4	2.000	0.250	0.773
		OXA	128	64			
	Clavulanic acid (CLA)	CE	256	256	2.000	2.000	2.000
		CLA	32	32			
		F2	16	8	2.000	1.500	1.750
		CLA	32	32			
		TOGG	16	8	2.000	1.500	1.750
		CLA	32	32			
		PGG	128	32	1.125	0.281	0.434
		CLA	32	8			
		PG	128	-	-	-	-
		CLA	32	-			

^{a)} $\sum FIC_{\max}$, maximum FIC value; ^{b)} $\sum FIC_{\min}$, minimum FIC value; ^{c)} FICI, The FIC index indicated synergistic effect: <0.5, marked synergy; 0.5 to <1.0, weak synergy; 1.0, additive; >1.0 to <2.0, subadditive; 2.0, indifferent; >2.0, antagonistic.

* MRSA KCCM 40511 were standard strain purchased from KCCM

**CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; F2, fraction 2; TOGG, single compound (1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -glucose); PGG, penta-galloyl-glucose (standard compound 1); PG, pyrogallol (standard compound 2)



FICI 는 1.0 이상이였다. 그러나 oxacillin 과 병용사용한 섬기린초 유래 물질들은 모두 0.281-0.562 범위에 있는 것으로 나타났다(Table 2-6). 즉 섬기린초 유래 화합물들이 oxacillin 과 병용하여 사용 시 상승효과를 나타낼 수 있다는 것을 의미하며 특히, oxacillin 과 TOGG 의 병용사용은 FICI 값이 0.281 로 MRSA 에 생육 저해효과가 높았으며 병용사용으로 인한 상승효과 또한 우수한 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 TOGG 와 oxacillin 의 병용사용이 MRSA 세포 성장을 상승적으로 억제함을 시사한다. 또한 감태 등에서 추출 및 분리하여 동정한 dieckol 과 epigallocatechin gallate (EGCg)의 경우에도 마찬가지로 β -lactam 계열의 항생제와 병용사용에 의해 MRSA 세포 성장 억제에 대한 상승효과가 보고된 바 있다(Lee et al., 2014; Lee et al., 2008).

IV. 결론

본 연구에서는 섬기린초로부터 유래한 추출물을 이용하여 활성 화합물을 분리 및 정제하였고, 그 중 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose (TOGG) 라는 물질을 이용하여 섬기린초 유래 추출물과 화합물의 항균 특성에 대해서 연구하였다. 섬기린초 유래 추출물과 화합물은 병원성 세균에 대해서 높은 항균활성을 보이며, 특히 MRSA 및 그 임상분리주들에 대해서 효과적으로 생육을 저해하고 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 또한, 이 화합물은 베타락탐계열의 항생제와의 병용 사용 시에 상승효과가 발생하여 효과가 강화되며 그 결과 MRSA 및 그 임상분리주를 제어할 수 있으며 상승효과도 나타낼 수 있는 방법을 제안하였다. 최근 항생제 내성균주에 대한 문제는 지속적으로 발생하고 있으며 항생제 내성 균주에 대하여 vancomycin 처방이 증가함에 따라, VRSA 가 새롭게 등장하는 등 내성균주에 대한 문제는 계속 심화되고 있으며 vancomycin 에 대한 MRSA 등의 내성균주의 감수성도 이에 따라 지속적으로 감소하고 있다(Lee et al., 2008). 따라서 항생제 내성 균주를 제어하기 위해 새로운 약물 또는 다른 대체 요법의 개발이 지속적으로 요구되고 있으며 항생제의 남용은 계속된 항생제 내성균주를 발생시킬 우려가 있다. 본 연구는 식물 유래 생리활성 화합물을 이용하여 병원균을 제어하는 방법을 제시하는 연구논문으로써, 특히, MRSA 와 그 임상분리주들과 같은 항생제 내성균주들에 있어 소량의

베타락탐계열 항생제와 사용 시 상승효과를 발생시켜 효과적으로 제어할 수 있는 새로운 전략을 제시하고 있다. 하지만 섬기린초로부터 분리된 TOGG 의 병원성균의 제어 및 살균효과에 대한 메커니즘에 대해서는 향후 지속적인 연구가 필요할 수 있으며 기존 베타락탐계열의 항생제와의 병용 사용시 발생하는 상승효과에 대한 메커니즘 역시 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.



V. 참고문헌

- Abdulgader S.M., Shittu A.O., Nicol M.P., & Kaba M. (2015). Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review. *Frontiers in microbiology*, 6, 348.
- Aqil F, Khan MSA, Owais M, & Ahmad I. (2005). Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of β -lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 106-114.
- Aqil F., Ahmad I., & Owais M. (2006). Evaluation of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity and synergy of some bioactive plant extracts. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1, 1093-1102.
- Bae K.H. (2000). The medicinal plants of Korea. Kyohak Publishing Co. Seoul, Korea, 202.
- Bensouici C., Kabouche A., Karioti A., Öztürk M., Duru M.E., Bilal A.R., & Kabouche Z. (2016). Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. *Pharmaceutical biology*, 54, 174-179.
- Blázquez B., Llarrull L.I., Luque-Ortega J.R., Alfonso C., Boggess B., & Mobashery S. (2014). Regulation of the expression of the β -lactam antibiotic-resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biochemistry*, 53(10), 1548-1550.
- Cantoni L.A.M.J., Wenger A., Glauser M.P., & Bille J. (1989). Comparative efficacy of amoxicillin-clavulanate, cloxacillin, and vancomycin against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats. *The Journal of infectious diseases*, 159, 989-993.
- Center for Disease Control (CDC). 2015. Antibiotic Resistance Threats in the United States. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>. Accessed Jan 23.
- Compean K.L., & Ynalvez R.A. (2014). Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 8, 204-213.
- Côté H., Pichette A., Simard F., Ouellette M.E., Ripoll L., Mihoub M., Grimard D., & Legault J. (2019). Balsacone C, a New Antibiotic Targeting Bacterial Cell Membranes, Inhibits Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Without Inducing Resistance. *Frontiers in microbiology*, 10, 2341.

- Cha J.D., Lee J.H., Choi K.M., Choi S.M., & Park J.H. (2014). Synergistic effect between cryptotanshinone and antibiotics against clinic methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-16.
- Cha J., Vakulenko S.B., & Mobashery S. (2007). Characterization of the beta-lactam antibiotic sensor domain of the MecR1 signal sensor/transducer protein from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biochemistry, 46(26), 7822-7831.
- Choi J.G., Kang O.H., Brice O.O., Lee Y.S., Chae H.S., Oh Y.C., Sohn D.H., Park H., Choi H.G., Kim S.G., Shin D.W., & Kwon D.Y. (2010). Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp.. Foodborne Pathogens and Disease, 7, 435-441.
- Chung Y.H., & Kim J.H. (1989). A taxonomic study of Sedum section Aizoon in Korea. Korean Journal of Plant Taxonomy, 19, 189-227.
- de Araújo R.S.A., Barbosa-Filho J.M., Scotti M.T., Scotti L., da Cruz R.M.D., Falcão-Silva V.D.S., de Siqueira-Júnior J.P., & Mendonça-Junior F.J.B. (2016). Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. Scientifica (Cairo), 2016
- De Melo, Giany O., Malvar D. C., Vanderlinde F. A., Pires P. A., Côrtes W. S., Filho P.G., Muzitano M. F., Kaiser C. R., & Costa S. S. (2005). Phytochemical and pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice. Journal of ethnopharmacology, 102(2), 217-220.
- Dickson R.A., Houghton P.J., Hyhinds P.J., & Gibbon S. (2006). Antimicrobial, resistance-modifying effects, antioxidant and free radical scavenging activities of *Mezoneuron benthamianum* Bail., *Securinega virosa* Roxb. and Willd. and *Microglossa pyrifolia* Lam. Phytotherapy Research, 20, 41-45.
- Eggers S., Barker A., Valentine S., Hess T., Duster M., & Safdar N. (2017). Impact of Probiotics for Reducing Infections in Veterans (IMPROVE): Study protocol for a double-blind, randomized controlled trial to reduce carriage of *Staphylococcus aureus*. Contemporary clinical trials, 52, 39-45.
- Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., & Spratt B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(11), 7687-7692.
- French G.L. (2010). The continuing crisis in antibiotic resistance. International journal of antimicrobial agents, 36, S3-S7.

- Gangadhar M., Bhavana P., Sunil Y., & Datta S. (2011). Isolation and characterisation of gallic acid from *Terminalia bellerica* and its effect on carbohydrate regulatory system in vitro. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2, 559-562.
- Go A.R., Jang H.G., & Lee E.H. (2009). Analysis of Growth Pattern of *Sedum* genus in Roof Garden for Derivation of Planting Density. In *Proceedings of the Korean Society of Environment and Ecology Conference*. Korean Society of Environment and Ecology, 149-151.
- Gonzales P.R., Pesesky M.W., Bouley R., Ballard A., Biddy B.A., Suckow M.A., Wolter W.R., Schroeder V.A., Burnham C.A., Mobashery S., Chang M., & Dantas G. (2015). Synergistic, collaterally sensitive β -lactam combinations suppress resistance in MRSA. *Nature chemical biology*, 11(11), 855-861.
- Hau S.J., Haan J.S., Davies P.R., Frana T., & Nicholson T.L. (2018). Antimicrobial Resistance Distribution Differs Among Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type (ST) 5 Isolates From Health Care and Agricultural Sources. *Frontiers in microbiology*, 9, 2102.
- Hisham D.M.N., Lip J.M., Noh J.M., Normah A., & Nabilah M.N. (2011). Identification and isolation of methyl gallate as a polar chemical marker for *Labisia pumila* Benth. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 39, 279-284.
- Hsieh M.H., Yu C.M., Yu V.L., & Chow J.W. (1993). Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 16, 343-349.
- Stevens J.F., Hart H., Elema E.T., & Bolck A. (1996). Flavonoid variation in Eurasian *Sedum* and *Sempervivum*. *Phytochemistry*, 41(2), 503-512.
- Jang J.H., Jung H.K., Ko J.H., Sim M.O., Woo K.W., Kim T.M., Lee K.H., Ahn B.K., Cho H.W., Cho J.H., & Jung W.S. (2016). Anti-inflammatory effect of *Sedum takesimense* Nakai water extract in RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 24(3), 228-236.
- Jennings M.C., Forman M.E., Duggan S.M., Minbiole K.P.C., & Wuest W.M. (2017). Efflux Pumps Might Not Be the Major Drivers of QAC Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *ChemBioChem*, 18(16), 1573-1577.
- Kaur D.C., & Chate S.S. (2015). Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to newer antibiotic. *Journal of global infectious diseases*, 7, 78.

- Kim D.W., Son K.H., Chang H.W., Bae K.H., Kang S.S., & Kim H.P. (2004). Anti-inflammatory activity of *Sedum kamtshaticum*. *Journal of ethnopharmacology*, 90, 409-414.
- Kim M.Y. (2004). The endemic plants of Korea. Sol Science Pub. Co.
- Lee D.S., Kang M.S., Hwang H.J., Eom S.H., Yang J.Y., Lee M.S., Lee W.J., Jeon Y.J., Choi J.S., & Kim Y.M. (2008). Synergistic effect between dieckol from *Ecklonia stolonifera* and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 13, 758-764.
- Lee D.S., Eom S.H., Kim Y.M., Kim H.S., Yim M.J., Lee S.H., Kim D.H., & Je J.Y. (2014). Antibacterial and synergic effects of gallic acid-grafted-chitosan with β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Canadian journal of microbiology*, 60, 629-638.
- Llarrull L.I., Fisher J.F., & Mobashery S. (2009). Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and insights into new beta-lactams that meet the challenge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4051-4063.
- Llarrull L.I., & Mobashery S. (2012). Dissection of events in the resistance to β -lactam antibiotics mediated by the protein BlaR1 from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 51(23), 4642-4629.
- Meletiadiis J., Pournaras S., Roilides E., & Walsh T.J. (2010). Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54, 602-609.
- Moon A.R., & Jang C.G. (2020). Taxonomic study of genus *Sedum* and *Phedimus* (*Crassulaceae*) in Korea based on external morphology. *Korean Journal of Plant Resources*, 33(2), 116-129.
- Mulinacci N., Vincieri, F.F., Baldi, A., Bambagiotti-Alberti M., & Wagner H. (1995). Flavonol glycosides from *Sedum telephium* sub. Maximum leaves. *Phytochemistry*, 38(2), 531-533.
- Nakai T. (1919). The vegetation of Dagelet island: Its formation and floral relationship with Korea and Japan. *Proceeding of the Third Pan-Pacific Science Congress*, 1, 911-914.

- Norden C.W., Wentzel H., & Keleti E. (1979). Comparison of techniques for measurement of in vitro antibiotic synergism. *Journal of Infectious Diseases*, 140, 629-633.
- Norouzi H., Danesh A., Mohseni M., & Rabbani Khorasgani M. (2018). Marine Actinomycetes with Probiotic Potential and Bioactivity against Multidrug-resistant Bacteria. *International journal of molecular and cellular medicine*, 7(1), 44-52.
- Odontuya, G. (2016). Anti-oxidative, acetylcholinesterase and pancreatic lipase inhibitory activities of compounds from *Dasiphora fruticosa*, *Myricaria alopecuroides* and *Sedum hybridum*. *Mongolian. Journal. Of. Chemistry*, 17, 42-49.
- Okwu M.U., Olley M., Akpoka A.O., & Izevbuwa O.E. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review. *AIMS Microbiology*, 5, 117-137.
- Pai V., Rao V.I., & Rao S.P. (2010). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] isolates at a tertiary care hospital in Mangalore, South India. *Journal of laboratory physicians*, 2, 82-84.
- Pourmand M.R., Yousefi M., Salami S.A., & Amini M. (2014). Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. *Acta Medica Iranica*, 52(6), 424-429.
- Sedum* genus. retrieved from "<http://en.wikipedia.org/wiki/Sedum>"
- Tanaka T., Nonaka G.I., & Nishioka I. (1983). 7-O-Galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry*, 22, 2575-2578.
- Tanaka T., Nonaka G.I., & Nishioka I. (1985). Punicafolin, an ellagitannin from the leaves of *Punica grantum*. *Phytochemistry*, 24, 2075-2078.
- Thuong P.T., Kang J.H., Na K.M., Jin Y.W., Youn J.U., Seong H.Y., Song K.S., Min B.S., & Bae K.H. (2007). Anti-oxidant constituents from *Sedum takesimense*. *Phytochemistry*, 68, 2432-2438.
- Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., & Fowler V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28, 603-661.
- Ventola C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40, 277-283.

- Vu T.T., Kim J.C., Choi Y.H., Choi G.J., Jang K.S., Choi T.H., Yoon T.M., & Lee S.W. (2013). Effect of gallotannins derived from *Sedum takesimense* on tomato bacterial wilt. *Plant disease*, 97(12), 1593-1598.
- Wang K.J., Yang C.R., & Zhang Y.J. (2007). Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*). *Food. Chemistry*, 101, 365-371.
- Wang D., Xie K., Zou D., Meng M., & Xie M. (2018). Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular medicine reports*, 18(1), 827-833.
- Xin-Min C., Yoshida T., Hatano T., Fukushima M., & Okuda T. (1987). Galloylarbutin and other polyphenols from *Bergenia purpurascens*. *Phytochemistry*, 26, 515-517.
- Yang C.M., Cheng H.Y., Lin T.C., Chinag L.C., & Lin C.C. (2007). The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl- β -D-flucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. *Journal of ethnopharmacology*, 110, 555-558.
- Yamawaki C., Oyama M., Yamaguchi Y., Ogita A., Tanaka T., & Fujita K.I. (2019). Curcumin potentiates the fungicidal effect of dodecanol by inhibiting drug efflux in wild-type budding yeast. *Letters in applied microbiology*, 68(1), 17-23.
- Yoon M.Y., Choi N.H., Min B.S., Choi G.J., Choi Y.H., Jang K.S., Han S.S., Cha B., & Kim J.C. (2011). Potent in vivo antifungal activity against powdery mildews of pregnane glycosides from the roots of *Cynanchum wilfordii*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 12210-12216.
- Yuan G.Q., Li Q.Q., & Qin J. (2012). Isolation of methyl gallate from *Toxicodendron sylvestre* and its effect on tomato bacterial wilt. *Plant. Disease*, 96, 1143-1147.

제 3 장 섬기린초 추출물의 항염증 및 미백 활성



제 3 장은 한국 수산과학회지에 게재된 정은탁 등의 “Anti-inflammatory and Anti-bacterial activity on *Cutibacterium acnes* of *Sedum takesimense* extract and its isolated compound” 제목의 논문을 바탕으로 작성되었습니다

I. 서론

1. 여드름과 염증의 상관성

염증반응은 체내에서 발생하는 방어기전 중 하나이지만 과도한 염증반응은 만성 면역질환을 일으킬 수 있으며 이 과정 중에는 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)과 인플라마좀(inflammasome)등의 다양한 물질이 관여하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2015). 흔히 염증성 사이토카인의 억제 활성을 탐색하기 위해 마우스에서 유래한 대식세포(RAW 264.7)가 사용되며 이는 단핵세포의 형태로 염증반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있고, lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 tumor necrosis factor (TNF)- α 및 interleukin (IL)-1 β 와 같은 사이토카인들의 분비를 촉진한다(Kang et al., 2015). 본 연구에서는 RAW 264.7 cell 을 LPS 로 염증을 유도하여 섬기린초 추출물 및 분리된 화합물을 처리하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-8 과 같은 염증성 사이토카인의 발현 억제 효과에 대해 연구하였다. 또한, 여드름은 염증 반응에서 유래되는 만성염증 질환으로 과도한 피지 생성으로 인한 모공 막힘과 피지선에서의 염증반응으로 발생하는 흔한 질병이다(Omer et al., 2017; Wang et al., 2017). 여드름은 농포, 낭종 및 면포 등을 형성하고 심각한 경우 흉터를 남길 수 있는 만성 염증성 피부질환으로 알려져 있다(Korean

Dermatological Association Textbook Compilation Committee, 2008). 그 중 여드름을 유발하는 미생물인 *Cutibacterium acnes* 는 모낭 내에 상주하여 피지의 중성지방을 분해하고 모낭 내 염증을 유발하며 피부 중 피지의 생성 증가는 *C. acnes* 의 증식에 좋은 영향을 줄 수 있다고 알려져 있다 (Lee et al., 2016). 특히 여드름 치료에는 주로 스테로이드 또는 항생제 및 비타민 A 유도체가 사용되고 있으나(Kim et al., 2006), 주로 항생제가 많이 사용되고 있고 이로 인한 부작용에 대한 문제가 대두되고 있다. 수많은 연구에서 항생제의 남용과 잦은 사용은 문제를 유발할 수 있음을 경고하고 있으며 특히, doxycycline, tetracycline, clindamycin 및 erythromycin 과 같은 항생제에 장기간 노출되면 내성균의 생성과 기관의 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다(Swanson, 2003; Tan, 2003; Park et al., 2004). 최근에는 항생제의 남용을 막고 사용량을 최소화하기 위하여 대체 항생제 역할을 할 수 있는 천연물 유래 물질 탐색에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.

여드름 발생에 대한 정확한 원인은 밝혀져 있지 않고, 여러 인자의 상호작용에 의해서 유발된다고 알려져 있다(Fig. 3-1). 여드름의 발생 원인은 남성호르몬에 의한 피지 분비량의 증가, 과각화된 모낭벽의 증가, *Cutibacterium acnes* 의 과도한 증식에 의한 염증 유발, 피부 장벽 이상, 환경적 요인 등 다양한 인자가 제시되고 있으며 여드름 발생 피부는 정상적인 경우보다 피지 분비량이 많아 피지 분비량과 밀접한 관계가 있는

것으로 판단된다. 피지선이 이상 자극으로 인해 피지 세포의 분열을 촉진시켜 피지 분비를 증가시키게 되고, 이로 인해 모공의 각질 형성 세포가 활성화되어 모공 폐쇄가 되어 피지가 축적될 수 있으며, 이렇게 축적된 피지 성분이 피지 형성의 증가 등의 원인으로 하여 모공 폐쇄가 더욱 심화되어 발생할 수 있다. 정상적인 피지의 지질 성분은 피지 세포의 세포막을 구성하는 지질(cholesterol, cholesterol ester, linoleic acid, free fatty acid 등)과 피지 세포 내에서 새롭게 형성되는 지질(wax ester, triglyceride)로 구성될 수 있다. 여드름 피부의 피지 분비가 증가하게 되면 피지의 지질 성분 중 linoleic acid 와 cholesterol 의 함량이 감소하게 되고 squalene 과 triglyceride 및 free fatty acid 의 함량은 증가하게 된다(Smolinsk and Yan, 2004). 이러한 지질 조성의 변화는 모낭 내의 cholesterol 간의 불균형을 초래하고 모낭 정체와 과각화증을 유발할 수 있고 이로 인해 여드름이 발생할 수 있다. 이 외에도 호르몬과 관련하여 많은 다양한 인자들에 의해서 여드름은 발생할 수 있다. 그 외 여드름 발생과 관련있는 피부 상재균에는 그람 양성 및 호기성 구균인 *Staphylococcus aureus* 와 *S. epidermidis* 그리고 그람 양성의 비운동성 간균인 *C. acnes* 가 있다(Fig. 3-2). 이 중 임상연구를 통해 여드름 발생에 가장 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 미생물은 *C. acnes* 이다(Holland et al., 1981). Kearney et al. (1984) 에 따르면, *C. acnes* 는



Fig. 3-1. The picture of acne-prone skin.

피부 상재균으로 혐기성이며 미호기성에서 성장할 수도 있으며 모낭의 안쪽에서 주로 성장할 수 있다고 알려져 있다. 두꺼운 세포벽을 가지고 적정 생육 pH 범위는 5.0-6.5 이며 생육온도는 30-37°C로 알려져 있으며 또한 pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL- β , IL-8, TNF- α 등)의 생성을 촉진하여 염증 유발할 수 있고 이로 인해 면포, 구진, 농포, 낭종 등을 형성할 수 있다(Vowels et al., 1995; Basal et al., 2004). *C. acnes* 는 증식하여 polysaccharides 로 구성된 부위에서 저분자의 chemotactic 들을 분비하고 이로 인해 다형핵 백혈구는 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-8, TNF- α 등) 생성 및 발현이 활성화된다(Graham et al., 2004; Grange et al., 2009). *C. acnes* 가 체내에 침입 후 대식세포의 식균작용 등에 의해서 포식되어도 neutrophil, lysosomal enzyme 및 ROS 를 생성하여 염증반응을 촉진시킬 수 있다. *C. acnes* 의 증식과 pro-inflammatory cytokines 의 발현은 관계가 깊으며 이로 인해 여드름 유발의 원인으로 작용할 수 있다. 또한 *C. acnes* 의 면역학적인 기전을 알아보기 위한 연구에서도 여드름 병변 유무에 관계없이 *C. acnes* 에 관한 항체가 존재하였으나 중증의 여드름 피부는 *C. acnes* 에 대한 항체가 경증의 여드름 피부 또는 정상 피부군에 비하여 더 높게 나타났으며 항체의 역가도 여드름의 중증도와 비례하게 나타났다(Kersey et al., 1980). 즉, 여드름 발생은 *C. acnes* 와 밀접한 관계를 갖고 있으며 이로 인해 발생할 수 있는 pro-inflammatory cytokines 의 발현과의 매우 밀접한 관계를 형성하고

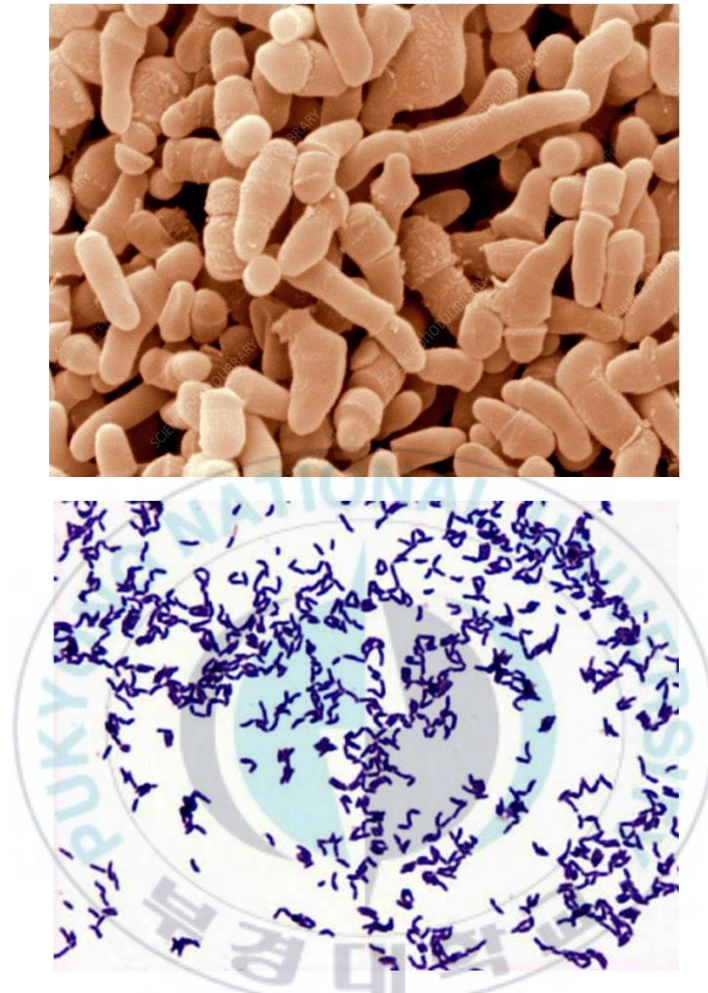
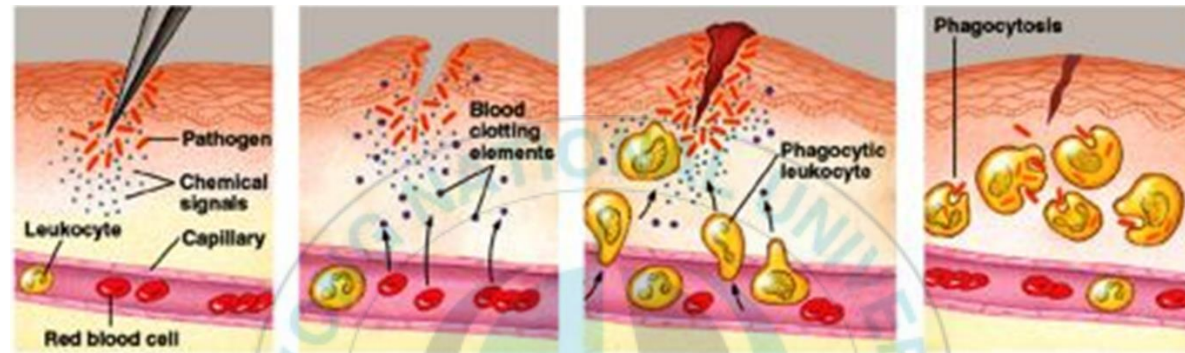


Fig. 3-2. The micrography picture of *Cutibacterium acnes*.

있다. 따라서 피부 여드름과 관련된 소재로의 활용을 위해서는 *C. acnes* 에 대한 항균효과뿐만 아니라 pro-inflammatory cytokines 들의 감소효과까지 함께 필요하며 본 연구에서는 섬기린초에서 유래된 화합물들의 여드름성 피부에 대한 방제 및 제어 잠재력에 대해서 평가하였다.

염증반응은 세균 및 바이러스를 포함하는 외부 항원 침입에 대항하여 인체에서 작동 시키는 자가면역반응의 일환이며 이를 통해 외부에서 침입한 물질로부터 인체를 보호하는 역할과 같은 형태의 물질이 다시 침입하였을 때 방어할 수 있는 면역학적 반응의 일부를 담당하고 있다(Fig. 3-3). 염증 반응은 상처 등에 의해 침입한 외부 항원에 대해 macrophage 를 포함한 면역세포들을 이용하여 침입한 항원의 제거와 조직의 구조 기능 회복 그리고 조직 손상을 최소화하기 위한 과정을 모두 포함한다(Lawrencd et al., 2002; Khatami, 2009). 염증 반응으로써 열이 발생하거나 붓거나 하는 등의 증상이 나타날 수 있으며 체내에서 일어나는 일련의 반응 체계는 인산화와 탈인산화를 통해 조절되고 염증 신호 체계는 신호전달 연쇄 반응을 유도하며 핵 중 존재하는 여러 전사 인자를 이용하여 염증반응을 조절할 수 있다(Abul et al., 2013). 염증반응의 복합적 상호 작용은 대식세포, 수지상세포, 섬유아세포, 혈관내피 세포 등에서 분비하는 pro-inflammatory cytokine 에 해당하는 $TNF-\alpha$, IL-1, IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-6, IFN- α , IFN- β 등에 의해서 매개되고 사이토카인들은 서로 상호작용하는 세포들에게 작용하여

세포성, 체액성 면역반응의 발달과 염증 반응의 유도 및 조절, 조혈작용의 조절 및 세포 증식, 분화 및 사멸 등에 대해서 관여한다(Murabe and Sano, 1982; Storck et al., 1994; Lundberg, 2000). 특히 이런 염증반응 중 세균 감염에 의한 경우 LPS (Lipopolysaccharide)로 인해 inflammatory signaling 이 시작되며 LPS 는 세균 세포벽의 구성 성분 중 일부이며 transmembrane protein 인 TLR-4 (Toll-like receptor)과 결합하여 염증반응 activation 이 시작된다(Fig. 3-4). 따라서 미생물 감염에 의한 염증반응에 의한 세포 실험 시에는 LPS 를 이용하여 RAW 264.7 cell 등에 염증 반응을 유도한 뒤 염증반응 억제 활성을 평가한다. 일산화질소(NO, nitric oxide)는 세포의 염증 반응이 일어나면 발생하는 물질로써 NO 와 같은 물질들은 염증을 더욱 촉진시키고, 인체 내에서 세포들은 항상성 유지를 위해 생체 효소를 생성하지만, 과도한 생체 효소의 발현은 생체 효소의 고갈로 이어지게 되며 이로 인해 염증반응은 더욱 심화되는 경우가 있다(Lee, 2014). 염증 조절 및 항염증제로 가장 많이 사용되는 의약품 종류는 스테로이드이며 이는 강력한 효과를 나타낼 수 있지만, 면역반응과 호르몬계를 교란하여 면역기능 자체를 저하시킬 수 있으며 병원체의 감염 빈도를 상승시킬 수 있는 위험이 초래될 수 있으며 비스테로이드 계열은 스테로이드와 같은 부작용은 없지만 스테로이드 계열에 비하여 효과가 미미하여 새로운 항염증 제제의 개발 및 발굴은 항상 요구되어 왔다(Lee et al., 1999).



1. Histamine & prostaglandins released

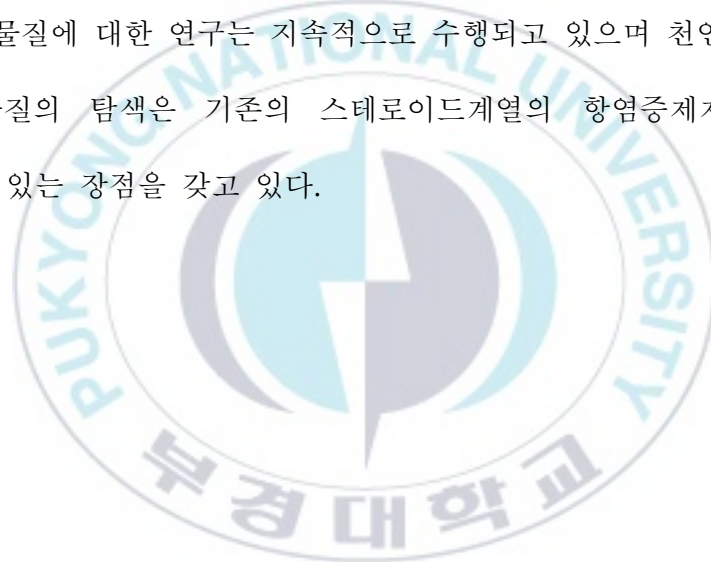
2. Capillaries dilate Clotting begins

3. Chemotactic factors attract phagocytic cells

4. Phagocytes consume pathogens & cell debris

Fig. 3-3. Schematic diagram for inflammatory reaction in human body.

이러한 요구에 따라 다양한 소재의 천연물로부터 항염증 활성에 대한 연구가 지속되어 왔으며 그 중 자귀나무 추출물은 xanthine oxidase 를 저해하고 약 80%의 NO 를 소거하는 역할을 하였으며(Lee et al., 2014), 양배추 추출물을 이용하여 인체 위암세포(AGC, Advanced Gastic Cancer)의 성장억제와 염증 인자의 발현의 억제가 연구되기도 하였다(Hong et al., 2013). 그 외에도 식물 소재를 활용한 phytochemical 로부터 항염증 활성을 나타내는 물질에 대한 연구는 지속적으로 수행되고 있으며 천연물로부터의 항염증 물질의 탐색은 기존의 스테로이드계열의 항염증제재의 단점을 보완할 수 있는 장점을 갖고 있다.



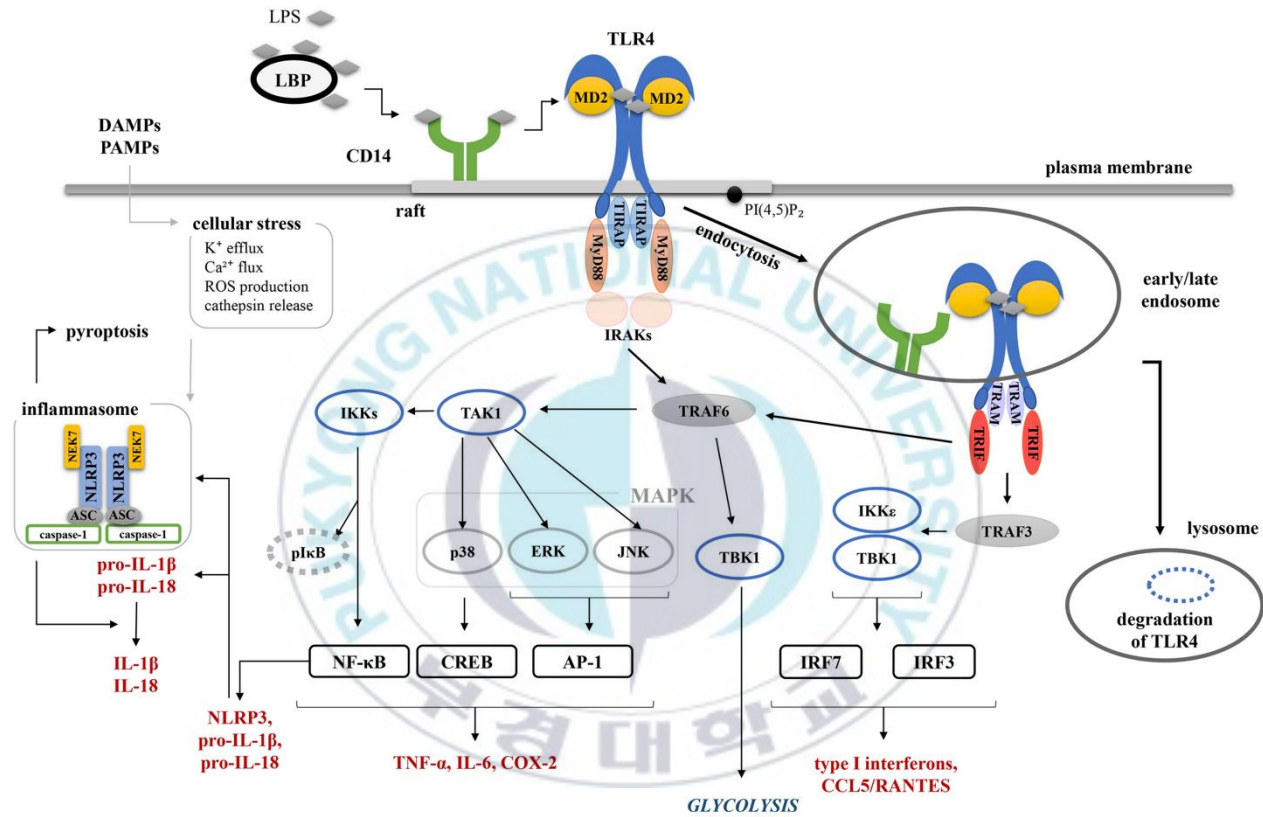


Fig. 3-4. Pro-inflammatory signaling pathway of TLR 4 with LPS (Ciesielska et al., 2020).

2. 피부 미백 연구 동향

사람의 피부는 다양한 외부 환경 조건과 자극으로부터 생리적 및 물리적인 보호기능을 유지하는 기본적인 인체조직이며 피부의 색은 피부 세포 속 멜라닌에 의해 결정된다. 멜라닌은 자외선 A, B 및 C 를 흡수하여 다른 세포의 자외선에 의한 손상을 방어하고 멜라닌 색소의 비정상적인 합성은 피부 이상색소 침착으로 야기될 수 있다. 멜라닌의 결여는 피부 탈색 증상을 유발할 수 있고, 과다생성은 기미와 주근깨를 형성하는 원인이 되기도 한다. 또한, 멜라닌의 과다생산은 주로 tyrosinase 의 비특이적 과발현에 의해서 발생하며 피부 흑화를 유발할 수 있으며 기미와 주근깨 등의 질환으로 이어질 가능성도 있다. 일반적인 피부 미백제는 tyrosinase 저해 활성을 갖는 ascorbic acid, hydroquinone, kojic acid, albutin 및 일부 phytochemical 이 주로 사용되고 있으며 이들 중에는 화학적 안정성이 높지 않아 자연분해되거나 약취유발과 효능 감소 등의 부작용이 발생하기도 한다. 따라서 천연 추출물을 이용하여 종래의 미백제의 단점을 보완할 수 있으며 안정적인 효과를 갖는 물질을 찾는 연구들이 활발히 진행되고 있으며 본 연구에서는 항염증 효과와 더불어 피부 미백 효과에 대해서도 함께 검토하였다.

천연물 유래 추출물의 미백 효능에 대한 연구는 다양하게 진행되어 왔다. Yoon et al. (2009)에 따르면 *E. cava* 에서 분리된 7-phloroeckol 에 의한

tyrosinase 저해 활성 실험 결과 IC_{50} 값이 $0.85\ \mu\text{M}$ 으로 대조군인 arbutin ($243.16\ \mu\text{M}$), kojic acid ($40.28\ \mu\text{M}$)에 비해 우수한 것으로 확인되어 멜라닌 형성 억제 효과를 확인하였다. 또한 *S. kamtschaticum* Fisch.의 70% EtOH 추출물의 멜라닌 생성 저해능 측정 결과 줄기 분획물에서는 49.3%, 뿌리 분획물에서는 52.5%로 positive control 인 kojic acid (69.9%) 비슷한 정도의 활성이 확인되었다(Yoon et al., 2020). 이외에도 돌나물(*Sedum sarmentosum*) 추출물 $100\ \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 tyrosinase 활성 51% 저해, 멜라닌 생성 46% 저해효과가 확인되었으며 이는 대조군인 알부틴($100\ \mu\text{g/mL}$) 35%의 저해효과보다 우수하였으며 향후 미백제로의 응용 가능성을 확인할 수 있었다(Sim et al., 2007).

이에 본 연구는 섬기린초 추출물과 그로부터 분리, 동정된 화합물 3종에 대해서 염증성 여드름 및 미생물에 의한 여드름 발생을 예방 및 관리할 수 있는 가능성을 검토하기 위해 RAW 264.7 cell에서 유도된 염증성 사이토카인의 발현 억제와 여드름 원인균인 *C. acnes*에 대한 항균 효과에 대해 연구하였다. 또한, 피부 미백 관련인자인 tyrosinase 및 melanin 형성 억제 효과에 대해서 검토하여 섬기린초 추출물 및 그로부터 분리된 활성 화합물이 피부 제재로써 활용될 수 있는 잠재력에 대해서 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 섬기린초 추출물 및 분리 화합물

본 장에서는 제 2 장의 재료 및 방법에서 서술한 바와 같은 방법으로 추출, 정제 및 동정한 물질 3 가지를 사용하였다. 섬기린초로부터 분리된 3 가지 화합물 중 화합물 1 은 4,6-di-O-galloylarbutin (OGA), 화합물 2 는 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose (OGG), 화합물 3 은 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -glucose (TOGG)로 동정되었으며(Fig. 2-4) 이를 이용하여 항염증 효과와 미백활성에 대해서 연구하였다.

2. RAW 264.7 cell 의 세포생존율 측정

섬기린초 추출물의 세포 독성은 formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) 시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하는 Mosmann (1983)의 방법을 변형하여 수행하였다. 쥐의 대식세포에서 유래한 RAW 264.7 cell line 을 사용하였으며 96-well plate 에 3×10^6 cell/dish 로 접종한 후 10% fetal bovine serum (FBS)를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 24 시간 배양 후

실험에 사용하였다. 세포 배양액 중 섬기린초 에탄올 추출물을 농도별로 첨가한 뒤 MTT 시약을 5 mg/mL 로 첨가하여 4 시간 동안 반응시켰다. 이후 생성된 formazan 을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)를 100 μ L 첨가하고 1 시간 반응 후 microplate reader 를 이용하여 517 nm 에서 흡광도를 측정하고, 대조구의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

3. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 평가

RAW 264.7 cell 을 10% FBS 가 포함된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL 로 희석하여 24 well plate 에 접종하고 섬기린초 추출물(40% 주정)과 분리 및 동정된 화합물 그리고 LPS (1 μ g/mL)를 처리하여 24 시간 배양하였다. 섬기린초 추출물과 분리 및 동정된 화합물은 100 μ g/mL 로 well 에 처리되었다. 생성된 Nitric Oxide (NO)의 양은 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylenediamine dihydrochloride, and 2.5% phosphoric acid)을 처리하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO 의 양은 sodium nitrite (NaNO_2)를 이용하여 표준곡선을 작성하여 도출하였다.

4. 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-8) 생성 억제 효과

염증성 사이토카인 억제 생성 시험은 Masuki et al. (2016)의 방법을 약간 변형하여 ELISA kit (Abcam Co., Cambridge, UK)를 사용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell 을 24 시간 동안 전 배양 후 배지를 제거하고 0.1 mg/mL 의 농도로 섬기린초 추출물과 분리 및 동정된 화합물을 처리하여 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 이후 1 μ g/mL 의 LPS 를 첨가하여 6 시간 동안 염증반응을 유도하고, ELISA kit 공급사에서 제공하는 매뉴얼에 따라 시험을 수행하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-8 과 같은 사이토카인 생성 억제 효과를 측정하였다.

5. 여드름 유발균 *Cutibacterium acnes* 에 대한 항균 활성

여드름 유발균인 *C. acnes* KCTC 3314 는 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받아 사용하였다. *C. acnes* 에 대한 섬기린초 추출물의 항균 활성 평가를 위해 National Committee for Clinical Laboratory Standards (USA)에서 제시하는 최소저해농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 평가를 수행하였으며, MIC 는 two-fold serial dilution 을 통해 수행되었다. 최소저해농도 평가를 위해 *C. acnes* 는 Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, Detroit, MI, USA)에서 37°C, 72 시간동안 5% CO₂

incubator 에서 전배양되었으며, 이를 10^5 - 10^6 CFU/mL 의 농도로 희석하여
접종균액으로 사용하였다. 섬기린초로부터 추출 및 분리된 물질을 96 well
plate 에 two-fold serial dilution 으로 희석하여 접종한 뒤 37°C, 72 시간동안 5%
CO₂ incubator 에서 배양하였으며 배양 후 microplate reader 를 이용하여 600
nm 에서 흡광도를 측정하여 대조군과 측정된 흡광도 값의 차이로
최소저해농도를 도출하였다.

6. Tyrosinase 억제 활성 측정

Tyrosinase 억제 활성은 Moon et al. (2010)의 방법을 약간 변형하여
측정하였다. 섬기린초 조추출물 및 분리화합물들은 다양한 농도에서
tyrosinase 억제활성을 측정하였으며, 양성대조군으로 kojic acid 를
사용하였다. Tyrosinase 억제 활성을 측정하기 위해 0.1 M PBS (pH 6.5) 200
μL 에 추출물 및 분리화합물 20 μL, mushroom tyrosinase (Sigma Aldrich, St. Louis,
MO, USA, 1500-2000 Unit/mL)를 혼합하였다. 그리고 혼합액에 Tyrosine (1.5
mM) 40 μL 를 첨가하고 37°C에서 15 분간 반응시켰다. 그 후, 혼합물의
흡광도를 490 nm 에서 측정하고, tyrosinase 억제 활성을 다음 식에 의해
계산하였다:

$$\text{Tyrosinase inhibition activity (\%)} = \left(1 - \frac{b-b'}{a-a'}\right) \times 100$$

위 반응액은 ELISA reader 를 이용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정한 뒤 계산식에 따라 tyrosinase 억제 활성을 측정하였고, 라인위버-버크식(Lineweaver-Burk's equation)에 따라 시험물질들의 고유 해리상수(K_m) 값을 산출하여 mushroom tyrosinase 와의 친화력을 측정하였다. 또한, 대조군 결과값과 비교하여 tyrosinase 활성 저해율이 50% 일때의 시료 농도(IC_{50})를 산출하여 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다.

7. 통계분석

모든 실험의 측정값은 3 회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차(means $\pm$ SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 각 시험군 간의 측정값 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 수행하여 분석하였으며, 유의성은 신뢰구간 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan 의 다중검정법(Duncan's multiple range test)으로 사후 검정하여 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 섬기린초 추출물의 세포독성 평가 결과

섬기린초 추출물의 세포독성 평가는 에탄올을 이용한 조추출물(CE)로 수행되었으며 그 결과는 Fig. 3-5 와 같다. CE 는 1 mg/mL 이상의 농도에서 유의적인 세포독성을 RAW 264.7 cell 에 대하여 나타내었다. 하지만, 1 mg/mL 의 농도에서 세포 독성은 7.07%로 나타났으며 세포 생존률은 92.93%로 높게 측정되어 1 mg/mL 이하의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다. 세포 독성 평가는 추출물 농도에 대하여 세포의 생존률을 분석하여 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 농도를 도출한다. 또한, Jang et al. (2016)은 본 연구에서와 같이 섬기린초 추출물이 RAW 264.7 cell 에 대한 1 mg/mL 미만의 농도에서는 독성을 나타내지 않아 본 연구와 유사한 경향의 결과를 보고한 바 있다. 따라서 이를 바탕으로 이후 진행된 실험의 추출물 농도는 RAW 264.7 cell 에 대해 독성을 나타내지 않는 100 µg/mL 로 결정하여 수행하였다.

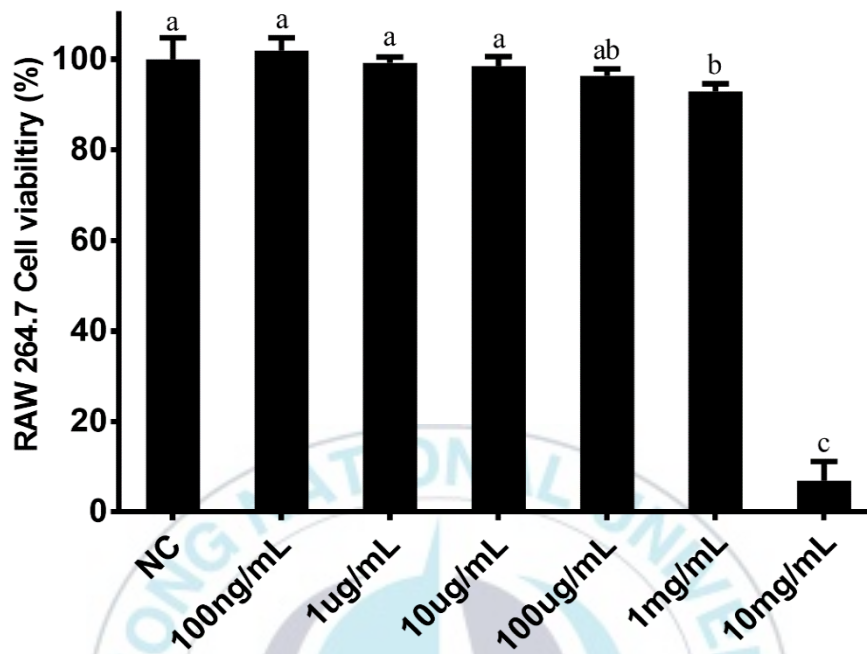


Fig. 3-5. Cytotoxic effect on *Sedum takesimense* ethanolic extracts (CE) in RAW 264.7 cell. CE were treated at a concentration of 100 ng/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1 mg/mL, 10 mg/mL, and NC, negative control. Values with different letters above the bars mean that significantly different ($P < 0.05$).

2. 섬기린초 추출물 및 그 유래 화합물의 NO (nitric oxide)

저해 활성

상처 및 염증과 같은 면역방어기전의 다양한 메커니즘을 매개하는 IL-1 또는 TNF 등에 의해 유도된 inducible nitric oxide (i-NOS)에 의해 생성되는 NO 는 생체 내에서 다양한 역할을 수행하지만 염증과 같은 원인으로 인해 과량 존재할 경우 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키고 만성 염증 질환 및 자가 면역질환 등을 초래하는 것으로 알려져 있다(Yang et al., 2016). 세포 등은 염증 유래 인자 또는 ultra violet 등에 노출되었을 때 NO 생성 수준이 높아지고 이후 염증을 일으키는 사이토카인의 생성이 유도되는 것으로 알려져 있다(Vicentini et al., 2011). 섬기린초에서 유래한 추출물 및 분리된 화합물(CE, OGA, OGG 및 TOGG)는 LPS 처리로 인하여 NO 가 유도된 RAW 264.7 cell 에 100 µg/mL 로 처리되었을 때 NO production 을 저해하는 효과를 나타내었으며 결과는 Fig. 3-6 에 나타내었다. Fig. 3-6 에 따르면 섬기린초 조추출물은 LPS 에 의해 유도된 NO 의 생성량을 약 81% 감소시켰으며 분리된 화합물 OGA, OGG 및 TOGG 는 NO 생성을 각각 85%, 93% 및 95% 감소시키는 것으로 나타났다. 섬기린초와 같은 식물 유래 추출물들의 항염증 활성은 다양하게 보고되어 있으며(Kim et al., 2017; Cho et al., 2017; Chang et al., 2018; Jang et al., 2016; Yang et al., 2016), 많은 종류의 식물

유래 추출물 및 그 유래 화합물들은 효과적으로 NO 생성을 억제하는 것으로 나타난다.

Kim et al. (2017)에 따르면 누리장나무잎 추출물 중 폴리페놀 함량이 가장 높은 EtOAc (ethyl acetate) 분획물이 항산화 활성이 높게 측정되었으며 LPS 로 유도된 RAW 264.7 cell 의 NO 생성도 효과적으로 억제한다고 보고되었다. 식물 유래 추출물의 경우 폴리페놀을 포함하는 항산화물질 또는 다양한 종류의 생리활성 물질의 함량에 의존하여 NO 생성능이 저해되는 것으로 판단된다. 따라서 섬기린초 추출물과 그 유래 단일 물질들은 염증 반응의 결과로 발생하는 NO 의 생성을 효과적으로 저해할 수 있는 것으로 판단된다.

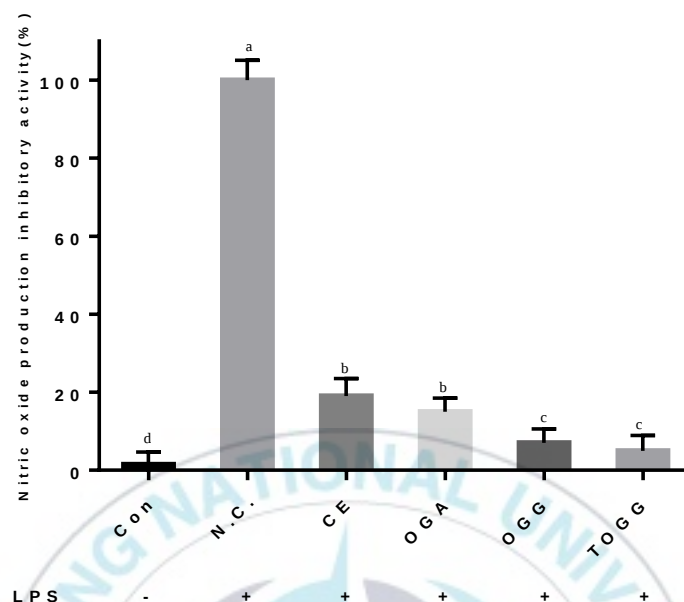


Fig. 3-6. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cell. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, then extract and compounds treated at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. Values with different letters above the bars mean that significantly different ($P < 0.05$). NC, negative control; CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose.

3. 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-8) 생성 억제 효과

섬기린초 유래의 조추출물(CE)와 분리 및 동정된 화합물(OGA, OGG 및 TOGG)에 의해 LPS 로 유도된 NO 감소 활성을 나타냈기 때문에 이를 이용하여 전염증 사이토카인에 해당하는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-8 의 생성에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 3-7, 3-8, 3-9). 그 결과 양성대조군으로 RAW 264.7 cell 에 LPS 를 처리한 경우 각 염증성 사이토카인들은 발현되었으며 섬기린초 유래의 CE, OGA, OGG, 및 TOGG 를 처리한 처리군은 사이토카인 발현이 감소한 것으로 확인되었다. TNF- α 는 양성대조군 대비 CE 를 100 μ g/mL 으로 처리하였을 때 약 75%의 발현이 감소하였으며, OGA, OGG 및 TOGG 를 같은 농도로 처리한 경우 약 87%, 89% 및 90%의 발현량이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3-7). 또한 IL-1 β 도 마찬가지로 유의적인 감소값을 나타내었는데, CE 의 경우 약 82%, OGA 의 경우 약 86%, OGG 및 TOGG 의 경우 각각 약 87%가 감소하여 효과적으로 IL-1 β 의 발현을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3-8). IL-8도 CE, OGA, OGG 및 TOGG 에 의해 효과적으로 감소되어 양성대조군 대비 발현량이 약 80%, 85%, 88%, 및 86%가 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3-9). 정상조직에서도 발현되는 전염증 사이토카인들은 병변 과정에서 발현 정도가 증가하며 류마티스성

관절염 및 암 발생 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2011).

TNF- α , IL-1 β 및 IL-8 과 같은 전염증성 사이토카인들은 식물 유래 추출물들에 의해 발현량이 감소되는 효과에 대해 다양한 연구가 수행되어왔다. 누리장나무 ethanol 과 ethyl acetate 추출물이 효과적으로 NO 생성을 억제하였으며 이후 수행된 전염증 사이토카인 발현 저해 활성 시험에서도 TNF- α , IL-6, iNOS 및 COX-2 와 같은 염증성 사이토카인들을 농도의존적으로 발현량을 감소시켰다(Kim et al., 2017). 또한 그라비올라 잎을 에탄올을 이용하여 추출한 추출물도 NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS 및 COX-2 와 같은 다양한 사이토카인을 농도의존적으로 감소시키는 것으로 보고되었다(Cho et al., 2017). 따라서, 본 연구에서 사용된 섬기린초 조추출물과 그로부터 분리 및 동정된 3가지 화합물은(OGA, OGG 및 TOGG) NO와 염증성 사이토카인들(TNF- α , IL-1 β 및 IL-8)을 효과적으로 감소시키는 활성을 나타내어 항염증제로서의 가능성을 나타내었다.

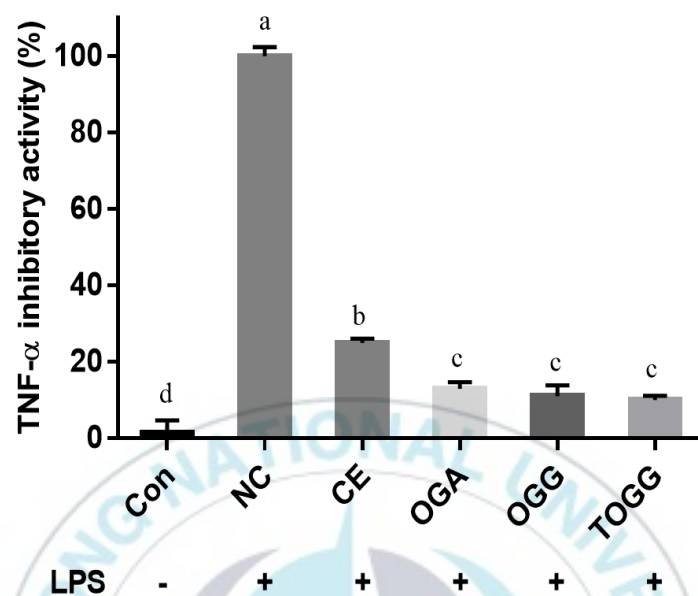


Fig. 3-7. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of TNF- α in RAW 264.7 cell. Cells were treated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h, then extract and compounds treated at a concentration of 100 μ g/mL. Values with different letters above the bars mean that significantly different ($P < 0.05$). NC, negative control; CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose.

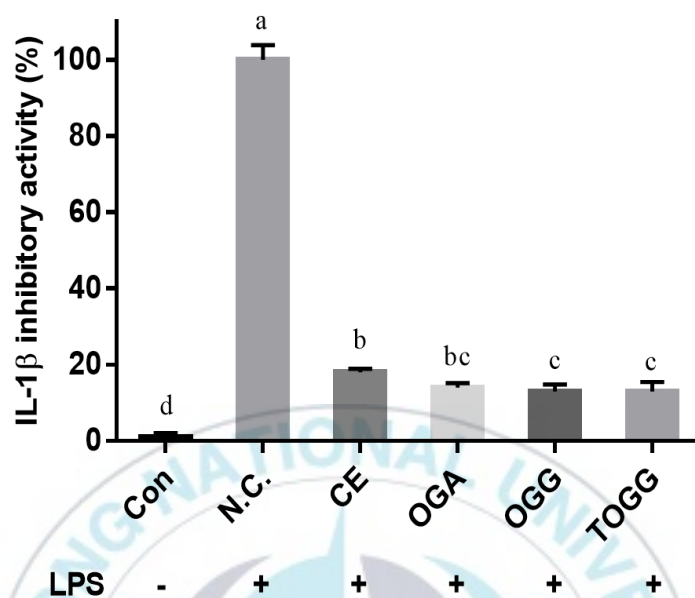


Fig. 3-8. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cell. Cells were treated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h, then extract and compounds treated at a concentration of 100 μ g/mL. Values with different letters above the bars mean that significantly different ($P < 0.05$). NC, negative control; CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose.

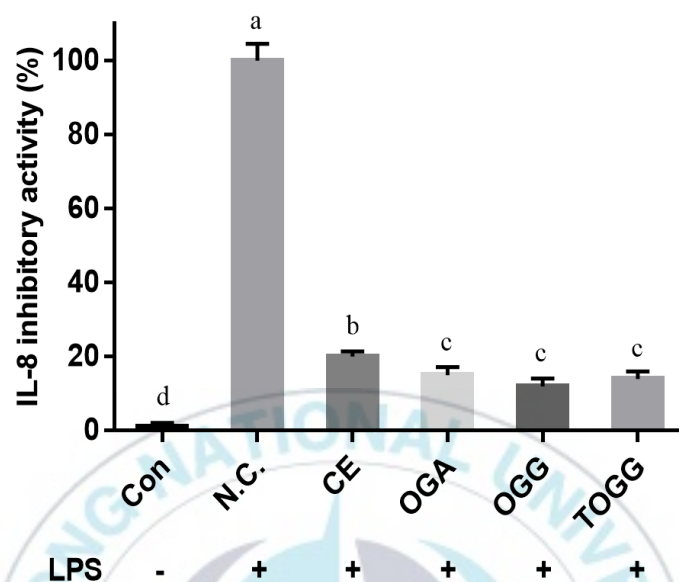


Fig. 3-9. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of IL-8 in RAW 264.7 cell. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, then extract and compounds treated at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. Values with different letters above the bars mean that significantly different ($P < 0.05$). NC, negative control; CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose.

4. 섬기린초 유래 화합물 3 종의 여드름 원인균 (*Cutibacterium acnes*)에 대한 항균 효과

피부질환 중 대표적인 여드름은 일반적으로 피지생산의 증가와 *C. acnes* 등 염증유발 균주의 증식 등 다양한 주요인자가 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다(Cunliffe et al., 2004). 미생물학적인 관점에서는 *C. acnes* 외 다양한 피부상재균이 관여하는 것으로 알려져 있으며(Jang and Park, 2014) *C. acnes* 는 모낭에 상주하며 피부 중 생성된 피지를 이용하여 증식하여 모낭 내 염증을 유발한다고 알려져 있다(Lee et al., 2016). 본 연구에서는 섬기린초 유래의 추출물과 분리된 화합물을 이용하여 *C. acnes* 에 대한 항균활성을 확인하기 위해 재료 및 방법에 서술된 방법대로 MIC 를 수행하였다(Table 3-1). 그 결과 섬기린초 추출물 및 그 화합물 중 OGA 를 제외한 CE, OGG 및 TOGG 모두 높은 항균 활성을 나타내었다. OGA 의 경우 1,000 µg/mL 의 MIC 농도를 나타내어 여드름 원인균인 *C. acnes* 에 대하여 항균 활성이 없는 것으로 나타났으며, CE 는 150 µg/mL 의 농도에서 최소 생육저해가 나타났다. OGG 및 TOGG 는 12.5 µg/mL 및 3.2 µg/mL 의 농도에서 최소 생육저해를 나타내어 여드름 원인균에 대한 높은 항균활성을 나타내었다. Yang et al. (2016)에 따르면 산벚나무 가지 추출물 및

용매분획물을 이용하여 disc diffusion assay 를 수행하였을 때 여드름 원인균에 대한 항균효과를 나타냈다고 보고하였다.

또한 Sohn et al. (2006)은 335 중 식물의 각 부위별 추출물을 이용하여 여드름균에 대한 항균활성을 disc paper 법을 이용하여 보고하였다. 그 결과 25 종의 식물 유래 추출물에서 clear zone 이 관찰되었으며 같은 종류의 식물도 부위에 따라 활성이 달리 나타났다(Sohn et al., 2006). Seong et al. (2003)은 오미자와 솔잎을 이용하여 여드름 원인균의 성장에 미치는 효과를 연구하였으며 그 결과에서 *C. acnes* 의 MIC 값은 75 $\mu\text{g/mL}$ 로 보고되어 있다. 또한 Vu et al. (2013)에 따르면 섬기린초 유래에서 분리된 OGA, OGG 및 TOGG 등을 포함하는 gallotanin 계열의 단일물질들은 토마토 풋마름병 원인 세균들에 대해서 항균효과를 나타내었다. OGA 는 토마토 풋마름병을 유발하는 9 개의 세균에 대해서 0.10-1.00 g/L 최소저해농도를 나타내었으며, OGG는 0.04-0.50 g/L, TOGG는 0.03-1.78 g/L 의 최소저해농도를 나타내었다. 이 중 TOGG 는 다른 단일물질들과의 FIC (Fractional inhibitory concentration) 결과에서 토마토 풋마름병 유발 세균 저해에 대한 시너지 효과를 나타내었다(Vu et al., 2013). 이와 같이 본 연구결과에서 분리된 화합물 2 종인 OGG 와 TOGG 는 매우 낮은 농도에서 MIC 값을 나타내어 여드름 원인균을 효과적으로 생육저해를 할 수 있는 물질로써 잠재력을 나타내었다.

Table 3-1. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of *Sedum takesimense* extract and its isolated 3 compounds (OGA, OGG and TOGG) against *Cutibacterium acnes*

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	CE	OGA	OGG	TOGG
<i>C. acnes</i> KCTC 3314	150.0	1,000.0	12.5	3.2

CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose.



5. 섬기린초 유래 화합물 3 종의 tyrosinase 억제 활성

Tyrosinase 억제 활성에 대한 섬기린초 추출물 및 분리화합물의 억제 효과는 Table 3-2 에 나타내었다. Tyrosinase 는 피부 표피에 존재하는 멜라닌 세포로부터 tyrosin 을 산화시켜 멜라닌 생성을 촉진하는 효소이며 tyrosinase 의 억제는 피부 미백 및 항노화 효과를 나타낼 수 있다 (Moon et al., 2010). 섬기린초 추출물 및 분리화합물의 tyrosinase 활성을 50% 억제하는 각 물질의 농도 값은 IC_{50} 으로 표현하였으며 조추출물의 억제 활성은 측정되지 않았다. 하지만, OGA, OGG 및 TOGG 의 IC_{50} 값은 110.4 μM , 155.2 μM 및 25.3 μM 이었다. 양성대조군인 kojic acid 의 IC_{50} 값은 136.3 μM 로 나타났으며, 섬기린초 조추출물을 제외한 모든 화합물에 비해 활성이 낮은 것으로 측정되었다. 이에 비해 OGA 와 TOGG 가 더 높은 활성을 보였다. 기질친화력을 나타내는 K_m 값은 낮을수록 효소와 기질의 친화도가 높음을 의미하며 본 실험에서는 친화도가 높을수록 mushroom tyrosinase 와의 결합력이 높아 억제활성이 높다는 것을 의미한다. Kojic acid 의 경우 mushroom tyrosinase 와의 K_m 값이 242 μM 로 나타났으며 OGA, OGG 및 TOGG 의 경우 각각 52.7 μM , 29.5 μM 및 11.9 μM 로 나타났다. 결과적으로 양성대조군에 비하여 mushroom tyrosinase 와의 높은 친화력을 갖고 섬기린초로부터 분리된 화합물은 모두 tyrosinase 저해 활성이 우수한

것으로 나타나 피부 미백에 효과를 줄 수 있는 잠재력을 갖고 있다고 판단하였다.

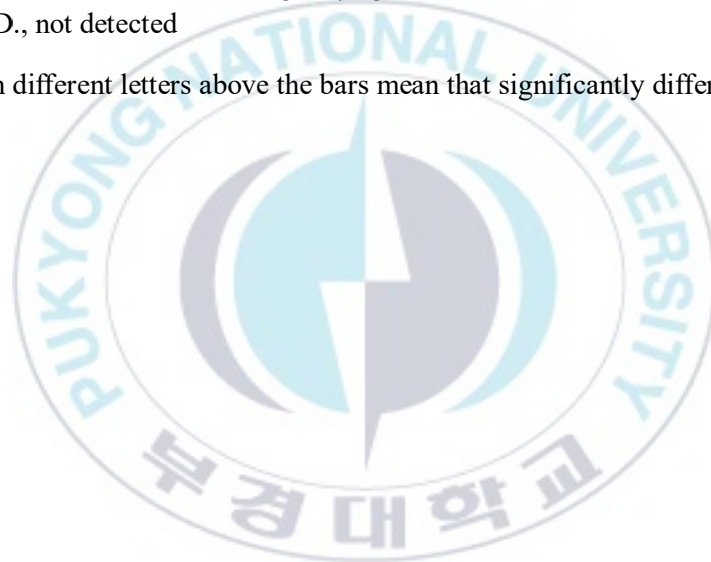


Table 3-2. Tyrosinase inhibitory efficacy of *Sedum takesimense* extract and its isolated 3 compounds (OGA, OGG and TOGG)

	Kojic acid	CE	OGA	OGG	TOGG
IC₅₀	136.3 $\mu\text{M}^{\text{b}*}$	N.D.	110.4 μM^{c}	155.2 μM^{a}	25.3 μM^{d}
K_m	242.0 μM^{A}	N.D.	52.7 μM^{B}	29.5 μM^{C}	11.9 μM^{D}

CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose; N.D., not detected

*Values with different letters above the bars mean that significantly different ($P < 0.05$).



IV. 결론

본 연구는 섬기린초 유래의 조추출물과 분리 및 동정된 화합물 3 종의 항염증 활성과 여드름 원인균에 대한 항균활성에 대해 연구하였다. 그 결과 RAW 264.7 cell 에 대해 세포독성은 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하에서 나타나지 않았으며 염증반응에서 발생하는 산물인 NO 를 효과적으로 감소시켰다. 또한 전염증 사이토카인에 해당하는 $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β 및 IL-8 에 대해서도 발현량을 현저히 감소시키는 활성을 나타내었으며, 마지막으로 여드름 원인균인 *C. acnes* 에 대한 항균활성도 높게 나타났다. 이 중 OGG 와 TOGG 는 여드름 원인균에 대해 최소저해농도가 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 및 3.2 $\mu\text{g/mL}$ 로 매우 강력한 항균 활성을 나타내었다. 섬기린초에서 유래한 단일물질들은 세포독성을 나타내지 않는 최대농도인 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 항염증 활성과 항균활성 효과를 기대할 수 있다. 따라서 섬기린초 추출물에서 분리 및 동정된 3 가지 화합물은 염증 인자를 효과적으로 감소시키며, 관련된 사이토카인 발현을 저해하고 여드름 원인균에 대해 높은 항균활성을 가져 피부에서 발생하는 염증 반응과 여드름 등의 트러블을 제어할 수 있는 제재로써의 잠재력을 확인하였다.

V. 참고문헌

- Abul K.A., Andrew H.L., & Shiv P. (2013). Cellular and Molecular Immunology, 7th Edit. Elsevier, 84-95.
- Bae K.H.. (2000). The medicinal plants of Korea. Kyohak Publishing Co. Seoul, Korea, 202.
- Basal E., Kaushal G.P., & Agarwal S.K. (2002). Anti-inflammatory effects of erythromycin and tetracycline on *Propionibacterium acnes* induced production of chemotactic factors and reactive oxygen species by human neutrophils. Dermatol Online Journal, 8(2), 2.
- Chung Y.H., & Kim J.H. (1989). A taxonomic study of Sedum section Aizoon in Korea. Korean Journal of Plant Taxonomy, 19, 189-227.
- Ciesielska A., Matyjek M., & Kwiatkowska K. (2020). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling, Cellular and Molecular Life Sciences, 1-29.
- Cho E.J., Lee J.H., Sung N.Y., & Byun E.H. (2017). Anti-inflammatory effects of *Annona muricata* leaf ethanol extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 46, 681-687.
- Chang S.J., Jeon N.B., Park J.W., Jang T.W., Jeong J.B., & Park J.H. (2018). Antioxidant activities and anti-inflammatory effects of fresh and air-dried *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves, Korean Journal of Food Preservation, 25, 27-35.

- Cunliffe W.J., Holland D.B., & Jeremy A. (2004). Comedone formation: Etiology, clinical presentation and treatment, *Clinics in Dermatology*, 22, 367-374.
- Grange P.A., Chereau C., Raingeaud J., Nicco C., Weill B., Dupin N., & Batteux F. (2009). Production of superoxide anions by keratinocytes initiates *P. acnes* - induced inflammation of the skin, *Plos Pathogens*, 5(7), 1-14.
- Graham G.M., Farrar M.D., Cruse-Sawyer J.E., Holland K.T., & Ingham E. (2004). Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium* and *P. acnes* GroEL. *British Journal of Dermatology*, 150(3), 421-428.
- Holland K.T., Ingham E., & Cunliffe W.J. (1981). A review : the microbiology of acne. *Journal of Applied Bacteriology*, 51, 195.
- Hong Y.J., Kim S.Y., Han J., Lim Y.I., & Park K.Y. (2013). Inhibitory effects of cabbage juice and cabbage-mixed juice on the growth of AGS human gastric cancer cells and on HCl-ethanol induced gastritis in rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(5), 682-689.
- Hisham D.M.N., Lip J.M., Noh J.M., Normah A., & Nabilah M.N. (2011). Identification and isolation of methyl gallate as a polar chemical marker for *Labisia pumila* Benth. *Journal of tropical agriculture and food science*, 39, 279-284.
- Jang J.H., Jung H.K., Ko J.H., Sim M.O., Woo K.W., Kim T.M., Lee K.H., Ahn B.K., Cho H.W., Cho J.H. & Jung W.S. (2016). Anti-inflammatory effect of *Sedum takesimense* Nakai water extract in RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 24, 228-236.

- Jang H.N. & Park S.N. (2014). Antimicrobial Activity of Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) Leaf Extracts against Skin Flora. Journal of the Society of Cosmetic Scientists Korea, 40, 313-320.
- Kang B.K., Kim K.B.W.R., Kim M.J., Park S.W., Park W.M., Ahn N.K., Choi Y.U., Bae N.Y., Park J.H., & Ahn D.H. (2015). Antiinflammatory effect of *Sargassum coreanum* ethanolic extract through suppression of NF- κ B pathway in LPS induced RAW264.7 cells in mice. Microbiology and Biotechnology Letters, 43, 112-119.
- Kearney J.K., Harnby D., Gowland G., & Holland K.T. (1984). The follicular distribution and abundance of resident bacteria on human skin. Journal of General Microbiology, 130, 797-801.
- Kersey P., Sussman M., & Dahl M. (1980). Delayed skin test reactivity to *Propionibacterium acnes* correlates with severity of inflammation in acne vulgaris. British Journal of Dermatology, 103, 651-655.
- Khatami M. (2009). Inflammation, aging, and cancer: tumoricidal versus tumorigenesis of immunity. Cell biochemistry and biophysics, 55(2), 55-79.
- Kim D.W., Son K.H., Chang H.W., Bae K.H., Kang S.S., & Kim H.P. (2004). Anti-inflammatory activity of *Sedum kamtshaticum*. Journal of Ethnopharmacology, 90, 409-414.
- Kim H.J., Lim H.W., Kim B.H., Kim H.S., Choi S.W., & Yoon C.S. (2006). Studies on the anti-acne effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 3, 53-58.

- Kim J.H., Song H., Ko H.C., Lee J.Y., Jang M.G., & Kim S.J. (2017). Anti-oxidant and anti-inflammatory properties of *Clerodendrum trichotomum* leaf extracts. *Journal of Life Science*, 27, 640-645.
- Korean Dermatological Association Textbook Compilation Committee. 2008. *Dermatology*, 5th ed., Ryo Moon Gak, Seoul, Korea. 446-454.
- Lawrencd T., Willoughby D., & Gilroy D. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 787-795.
- Lee H.N., Lim D.Y., Lim S.S., Kim J.D., & Yoon J.H. (2011). Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Eupatorium japonicum*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 43, 65-71.
- Lee J.R., Kim Y.W., Byun S.H., Kim S.C., & Park S.J. (2015). Anti-inflammatory effects of the fermentation extracts consisting of soybean, red ginseng and *Citrus Unshiu* Peel. *The Korea Journal of Herbology*, 30, 59-65.
- Lee J.H. (2014). Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of *Diospyros kaki* Thumb leaves extracts. *Asian Journal of Beauty & Cosmetology*, 12(5), 719-724.
- Lee J.S., Jung W., Choi Y.R., & Kim Y.S. (1999). The effects of steroids and nonsteroidal antiinflammatory agents on proliferation of human ocular fibroblast. *Journal of the Korean Ophthalmological Society*, 40(6), 1496-1502.
- Lee S.J., Lee E.H., Shin J.H., Kim S.S., Kim N.K., Choi E., & Seo S.R. (2016). *Eucalyptus globulus* extracts inhibit *Propionibacterium acnes*-induced inflammation signaling. *Korean Journal of Microbiology*, 52, 421-427.

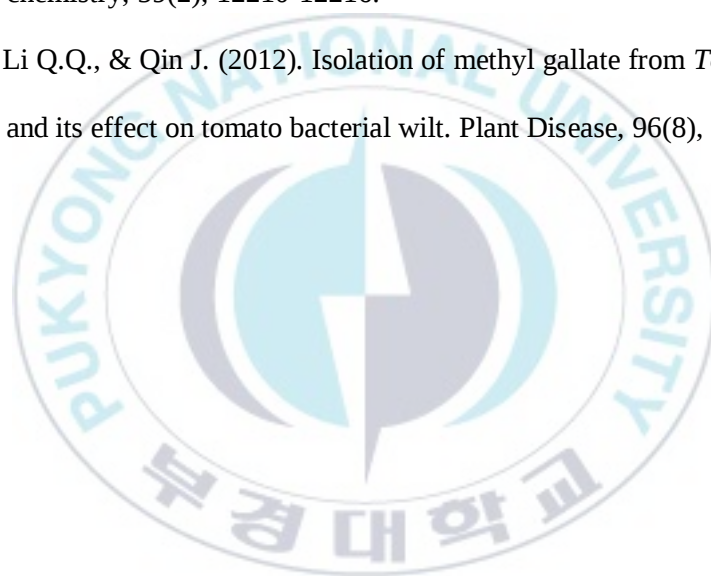
- Lee Y.S., Kim B.O., & Kim N.W. (2014). Anti-wrinkle and antioxidant activity of the extract of *Albizzia julibrissin* leaves. *Journal of Investigative Cosmetology*, 10, 317-326.
- Lundberg I.E. (2000). The role of cytokines, chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Reports*, 2, 216-224.
- Masuki H., Okudera T., Watanebe T., Suzuki M., Nishiyama K., Okudera H., Nakata K., Uematsu K., Su C.Y., & Kawase T. (2016). Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International Journal of Implant Dentistry*, 2(1), 1-6.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- Moon J.Y., Yim E.Y., Song G., Lee N.H., & Hyun C.G. (2010). Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *Eurasian journal of biosciences*, 4.
- Murabe Y., & Sano Y. (1982). Morphological studies on neuralgia. VI. Postnatal development microglia cell. *Cell and tissue research*, 225, 469-485.
- Nakai T. (1919). The vegetation of Dagelet island: Its formation and floral relationship with Korea and Japan. *Proceeding of the Third Pan-Pacific Science Congress*, 1, 911-914.

- Omer H., McDowell A., & Alexeyev O.A. (2017). Understanding the role of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris: The critical importance of skin sampling methodologies. *Clinics in dermatology*, 35, 118-129.
- Park J., Lee J., Jung E, Park Y, Kim K, Park B, Jung K, Park E, Kim J., & Park D. (2004). *In vitro* antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp. *European journal of pharmacology*, 496, 189-195.
- Seong J.M., Park N.Y., & Lee S.H. (2003). Effect of *Schizandra chinensis* and pine needle on growth of pathogens relate to acne. *Journal of microbiology and biotechnology*, 31, 69-74.
- Sim G.S., Kim J.H., Lee B.C., Lee D.H., Lee G.S., & Pyo H.B. (2008). Inhibitory Effects on Melanin Production in B16 Melanoma Cells of *Sedum sarmentosum*. *Journal of the Pharmaceutical Society of Korea*, 52(3), 165-171
- Sohn H.Y., Kim Y.S., Kum E.J., Kwon Y.S., & Son K.H. (2006). Screening of anti-acne activity of natural products against *Propionibacterium acnes*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 34, 265-272.
- Smolinsk K.N., & Yan A.C. (2004). Acne update. *Dermatology. Current Opinion in pediatrics*, 16, 385-391.
- Swanson J.K. (2003). Antibiotic resistance of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris. *Dermatology nursing*, 15, 359-363.

- Storck M., Schilling M., Burkhardt K., Prestel R., Abendroth D., & Hammer C. (1994). Production molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transplant international*, 7(1), 647-649.
- Tan H.H. (2003). Antibacterial therapy for acne. *American journal of clinical dermatology*, 4, 307-314.
- Tanaka T., Nonaka G.I., & Nishioka I. (1983). 7-O-Galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry*, 22, 2575-2578.
- Tanaka T., Nonaka G.I., & Nishioka I. (1985). Punicafofin, an ellagitannin from the leaves of *Punica grantum*. *Phytochemistry*, 24, 2075-2078.
- Thuong P.T., Kang J.H., Na K.M., Jin Y.W., Youn J.U., Seong H.Y., Song K.S., Min B.S., & Bae K.H. (2007). Anti-oxidant constituents from *Sedum takesimense*. *Phytochemistry*, 68, 2432-2438.
- Vicentini F.T., He T., Shao Y., Fonseca M.J., Verri Jr W.A., Fisher G.J., & Xu Y. (2011). Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *Journal of dermatological science*, 61, 162-168.
- Vowels B.R., Yang S., & Leyden J.J. (1995). Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes* : implications for chronic inflammatory acne. *Infection and immunity*, 63(8), 3158-3165.

- Vu T.T., Kim J.C., Choi Y.H., Choi G.J., Jang K.S., Choi T.H., Yoon T.M., & Lee S.W. (2013). Effect of gallotannins derived from *Sedum takesimense* on tomato bacterial wilt. *Plant Disease*, 97, 1593-1598.
- Wang Y.Y., Ryu A.R., Jin S., Jeon Y.M., & Lee M.Y. (2017). Chlorin e6-mediated photodynamic therapy suppresses *P. acnes*-induced inflammatory response via NFκB and MAPKs signaling pathway. *PLoS One*. 12(1): e0170599.
- Wang K.J., Yang C.R., & Zhang Y.J. (2017). Phenolic antioxidants from *Chinese toon* (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*). *Food Chemistry*, 101, 365-371.
- Xin-Min C., Yoshida T., Hatano T., Fukushima M., & Okuda T. (1987). Galloylarbutin and other polyphenols from *Bergenia purpurascens*. *Phytochemistry*, 26, 515-517.
- Yang C.M., Cheng H.Y., Lin T.C., Chinag L.C., & Lin C.C. (2007). The *in vitro* activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl-β-D-flucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. *Journal of ethnopharmacology*, 110(3), 555-558.
- Yoon J.H., Park J.H., & Kim B.R. (2020). Skin Whitening Effect of *Sedum kamtschaticum* Fisch. Solvent Fractions. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 37(5), 1239-1249
- Yoon N.Y., Eom T.K, Kim M.M., & Kim S.K. (2009). Inhibitory Effect of Phlorotannins Isolated from *Ecklonia cava* on Mushroom Tyrosinase Activity and Melanin Formation in Mouse B16F10 Melanoma Cells. *Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4124-4129

- Yang S.A., Pyo B.S., & Kim S.M. (2016). Antibacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Prunus sargentii* branches extract and its fractions against pathogens of acne. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 24(2), 129-135.
- Yoon M.Y., Choi N.H., Min B.S., Choi G.J., Choi Y.H., Jang K.S., Han S.S., Cha B., & Kim J.C. (2011). Potent *in vivo* antifungal activity against powdery mildews of pregnane glycosides from the roots of *Cynanchum wilfordii*. Journal of agricultural and food chemistry, 59(2), 12210-12216.
- Yuan G.Q., Li Q.Q., & Qin J. (2012). Isolation of methyl gallate from *Toxicodendron sylvestre* and its effect on tomato bacterial wilt. Plant Disease, 96(8), 1143-1147.



제 4 장 섬기린초 추출물의 식품첨가물 활용 평가



I. 서론

전세계적으로 천연물에 대한 산업적 요구가 증가하고 있음에 따라 화학적 합성소재가 아닌 천연소재에 대한 수요가 식품산업분야에서도 증가하고 있으며(Yu et al., 2020), 특히 국내의 간장, 샐러드 드레싱, 차 음료 등 제조업체는 인위적인 살균과 합성 보존료의 첨가를 감소시키고 유통기한을 유지 또는 향상시키기 위해 다양한 연구를 수행하고 있다. 따라서 본 장에서는 섬기린초 유래 추출물을 이용하여 간장, 차 및 샐러드 드레싱에 첨가하여 식품 보존료로써의 잠재력에 대한 평가를 목적으로 한다.

전통발효식품 중 하나인 간장은 미생물들의 효소로 대두 단백질 및 탄수화물의 분해가 일어나는 발효공정에 의해 제조되며, 전통방식은 *Bacillus subtilis* 와 같은 세균류와 각종 효모 및 곰팡이 등에 의해 발효과정이 수행되며, 개량식에서는 *Aspergillus oryzae* 와 같은 황국균 등이 제품의 품질을 결정하는데 영향을 미친다(Lee et al., 1997). 이와 같이 상업적으로 생산된 간장제품은 제조 이후 잘못된 보관 방법, 불충분한 살균, 낮은 염도 및 산도 등에 의해 산막형성 미생물이 증식하여 산막이 형성되어 제품의 품질을 저하시키는 요인으로 작용하기도 한다(Kim et al., 1997). 간장 제품에서의 산막 형성은 산막효모균에 의해서 형성되며

대표적인 산막효모균으로는 *Hansenula anomala*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Torulopsis* sp., *Saccharomyces* sp., *Trichosporon* sp. 등이 있으며, 이들 효모들은 발효를 통해 산막형성과 함께 CO₂ 가스를 생성하여 이취발생 및 용기파손 등의 품질을 저하시키는 문제를 일으킨다고 보고되어 있다(Yang et al., 2016). 이러한 산막효모를 억제하기 위해 소르브산칼륨 및 안식향산나트륨과 같은 합성 보존료들이 사용되고 있었으나, 최근 소비자의 요구와 합성 소재들에 대한 부작용 등에 대한 연구가 지속되면서 대체소재로서 천연소재 관련 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 이러한 천연소재 중 향효모 활성화에 대한 연구보고는 식물 정유 성분이 대부분인데, 향산화 및 향균 작용은 우수한 것으로 확인되고 있지만, 용해도가 낮고 구성성분 대부분이 특유의 냄새를 갖는 휘발성 물질들로 이루어져 있기 때문에 식품 산업에서의 적용이 매우 어렵다는 한계점을 가지고 있다(Burt, 2004). 또한 셀러드 드레싱은 1 인가구 증가에 따른 HMR (Home Meal Replacement)과 같은 간편식에 대한 수요가 높아짐에 따라 증가하고 있으며, 드레싱은 식품을 제조·가공·조리함에 있어 식품의 풍미를 돋우기 위한 목적으로 사용되는 것으로 식용유, 식초 등을 주원료로 하여 식염, 당류, 향신료, 알류 또는 식품첨가물을 가하고 유화시키거나 분리액상으로 제조한 것을 말한다(Korean Food Code, 2021). 이러한 드레싱류 제품들은 pH 가 3.5-4.5 로 산성 식품이지만 내열성을

가지는 저산성 유산균의 증식으로 제품변질의 문제를 야기시킨다(Jo et al., 2010). 최근 샐러드 드레싱에 대한 소비가 증가하고 소비자의 니즈 등에 따라 유통기한 확보와 더불어 관능적인 맛과 향의 손실을 최소화하기 위해 비열처리하는 제품들에 대해서 화학적 합성 보존료의 첨가보다 천연첨가물의 사용 등이 빈번하게 요구되고 있다.

최근 소비자들의 웰빙과 건강에 대한 관심이 높아지면서 차 음료 시장도 성장하고 있으며 옥수수 수염차의 경우 원료인 옥수수 수염의 이담작용 및 이뇨작용에 대한 효과로 인하여 주로 한약재로 소비되었지만, 옥수수 수염에 함유된 여러 성분들의 약리적인 기작과 기능 성분들이 연구됨에 따라 그 가치가 재인식되어 옥수수 수염차 등 음료 형태로 소비가 늘고 있는 추세이다(Yu et al., 2011). 이러한 차음료는 주로 상온으로 유통하며 섭취하게 되는데, 제조공정상 135°C의 열교환기에서 1 분가량 UHT (Ultra-High-Temperature) 살균을 하게 되어 일반세균과 진균 그리고 내열성 포자까지 사멸되나 이후 용기에 주입하고 캡핑(capping) 공정 중에 내열성 포자 및 공중 낙하균으로 인한 제품오염 확률이 발생하여 이를 방지하기 위한 보존료에 대한 수요가 발생한다(Yu et al., 2011).

일반적으로 식품에 사용되는 화학적 합성 보존료에는 안식향산(benzoic acid), 파라옥시안식향산메틸(methyl para-hydroxybenzoate) 및 소르브산칼륨(potassium sorbate) 등이 있으나, 이들 합성 보존료는 인체 유해성 논란

등의 안정성에 대한 우려로 인하여 법적으로 사용량이 제한되어 있다. 예를 들어, 간장의 경우 안식향산과 파라옥시안식향산메틸을 병용해서 사용할 경우 0.60 g/kg 이하로 검출되어야 하며 그 중 파라옥시안식향산으로서의 사용량은 0.25 g/kg 이하로 사용해야 하는 것으로 국내 법규에 명시되어 있다(Korean Food Code, 2021). 또한, 최근 국내에서는 합성 보존료로 분류되지 않은 화학적 합성소재와 천연물 소재의 사용 사례가 늘어나고 있는 추세이며 관련된 연구들이 지속적으로 수행되고 있다(Seow, 2014). 기존의 안식향산, 파라옥시안식향산메틸 및 소르브산칼륨 등의 화학적 합성 보존료를 대체할 수 있는 합성 소재 중 대표적인 물질은 비타민 B1 라우릴황산염(thiamine dilaurylsulfate, TLS) 이 있다. 이는 간장, 김치, 절임 등에 널리 사용되며 효모가 생성하는 가스에 의한 팽창, 산막 형성 방지 등에 대한 효과가 있는 것으로 확인되어 있다. 비타민 B1 라우릴황산염은 다른 비타민류 및 유도체들과는 다르게 세균, 효모, 곰팡이, 유산균 등 넓은 항균 스펙트럼 및 높은 항균력을 가지고 있다. 하지만 비타민 B1 라우릴황산염의 전구체인 비타민 B1 은 수용액상에서 안전성이 낮고, 열처리 공정에서 손실될 가능성 등의 단점이 있기 때문에 높은 안정성을 부여하기 위해 비타민 B1 유도체를 만들어서 사용하고 있으며, 이는 항진균성과 항균활성에 대해서도 보고되어 있다(Seo et al., 2011).

하지만 일본, 한국 및 대만에서만 사용이 가능하여 수출용 제품 등에는 사용을 하지 못하는 실정이다.

대표적인 천연소재 보존료는 유카 추출물 및 감초 추출물이 있으며, 유카 추출물은 용설란과인 유카(*Yucca brevifolia*)의 뿌리를 물로 추출하는 것으로 주요 성분인 스테로이드성 사포닌 성분이 진균류 특히 효모 및 곰팡이에 대해 저해효과를 가지고 있어 품질 보존 등을 위하여 식품첨가물로 사용할 수 있다(Simmons-Boyce et al., 2007). 유카는 주로 미국, 멕시코에서 생육하며(Patel, 2012) 천연물로서 간장, 제면 등 다양한 식품에 사용되고 있다. 감초는 콩과(*Legumiosae*) 다년생 초본으로 주요성분으로는 glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin 등이 있으며(Park et al., 2011), 항산화, 항염증 작용 등 약리학적 특성을 가지고 있어 아시아에서는 한약재로 널리 이용되고 있는 약용식물이다(Ahn et al., 1998; Yoon et al., 2010). 감초는 항산화(Woo et al., 2006) 및 항균 활성(Kim et al., 2013)을 가지고 있는데, 특히 그람 양성균 중 통성 혐기성 내열성 포자형성 균에 대한 항균력이 높은 것으로 보고되어 있다.

따라서 본 연구에서는 합성보존료를 많이 사용하고 있는 양조간장, 옥수수 수염차 및 샐러드 드레싱에 대하여 오염 미생물을 선정하고 이를 시료에 오염시켜 표준 오염시료를 제조하고, 섬기린초 조추출물과 기존의

상업화된 보존료를 첨가하여 저장기간 동안의 경시변화를 비교하여
섬기린초 조추출물의 식품산업에서의 활용 잠재력에 대하여 연구하였다.



II. 재료 및 방법

1. 섬기린초 추출물

본 장에서는 제 2 장 재료 및 방법에서 서술한 바와 같은 방법으로 물질을 추출 후 여과하여 동결건조한 분말을 시료로 사용하였다. 본 장에서는 섬기린초 조추출물(CE)을 각 식품 시료에 첨가하여 상용화된 보존료와 비교분석하였다.

2. 식품재료

섬기린초 조추출물의 첨가에 의한 영향을 평가하기 위하여 국내 제조사의 가공식품 중 양조간장, 옥수수 수염차 및 샐러드 드레싱을 선정하였다. 본 연구에 사용된 시료의 유형과 정보는 Table 4-1 과 같다. 본 연구에 사용된 식품원료들은 모두 국내 기업으로부터 공급받았으며 보존처리가 되지 않고 보존료가 첨가되지 않은 제품을 제공받아 연구에 사용하였다.

3. 미생물 선정 및 배양

본 연구에 사용된 미생물은 각 식품의 유형에서 오염될 가능성이 높은 미생물로 선정하였으며 모두 식품 원료로부터 분리 동정하여 (주) 다인소재에서 glycerol 20% stock solution 으로 -80℃에서 보관한 미생물을 배양하여 식품원료에 접종하여 사용하였다. 간장에서부터 분리한 *Zygosaccharomyces rouxii* 및 *C. versatilis*, 샐러드 드레싱에서 분리한 *Lactobacillus casei* 및 *L. mesenteroides*, 옥수수 수염차에서 분리한 *B. cereus*, *B. subtilis* 및 *S. aureus* 를 각각 사용하였다. *B. cereus* 및 *B. subtilis*, *S. aureus* 는 Plate count agar(PCA, Difco, USA)에서 37℃, 24 시간 배양하였고, *L. casei* 및 *L. mesenteroides* 는 de Man Rogosa Sharpe agar (MRS, Difco, USA)에서 37℃, 24 시간 배양하였다. *Z. rouxii* 및 *C. versatilis* 는 Potato Dextrose agar (PDA, Difco, USA)에 주석산을 이용하여 pH 3.5 로 조정하여 사용하였으며 간장의 염도를 고려하여 8% NaCl (w/v)을 추가로 첨가하였고 30℃, 48 시간 배양하였다.

Table 4-1. Characteristics of prepared foods and their isolated microorganism

Food material ¹⁾	Characteristic	Isolated strains ³⁾
Soy sauce	TN (w/v, %) 1.7 ²⁾ .	<i>Zygossharomyces rouxii</i>
	Salinity 14%	<i>Candida versatilis</i>
Corn silk Tea	UHT 130°C 30-60sec.	<i>Bacillus cereus</i>
	pH 6.0	<i>Bacillus subtilis</i>
	Brix 3-5	<i>Staphylococcus aureus</i>
Salad dressing	pH <4.0	<i>Lactobacillus casei</i>
	Aw 0.91	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Plant-origin Soy oil 30%	

¹⁾ Preservatives is not included in Foods (Soy sauce, S CO. Ltd. Corn silk tea, W CO. Ltd., Dressing D CO. Ltd.)

²⁾ TN, Total nitrogen

³⁾ Isolated strains were provided by the Dynesozo CO. Ltd. A representative strain in each sample was selected.

4. 기존의 식품 보존제와 섬기린초 추출물의 최소 저해 농도

섬기린초의 천연 보존료로서의 산업적 사용 가능성을 판단하기 위하여 현재 시판되고 있는 식품보존료 4 종과 최소저해 농도를 비교하였다(Table 4-2). 식품에서의 경시변화 측정에 적합한 농도를 설정하기 위하여 제 2 장 재료 및 방법에서 서술한 바와 같은 방법으로 최소저해농도 평가를 수행하였으며, 시판 중인 식품보존료 4 종과 각각 비교 평가하였다. 양조간장에서는 비타민 B1 라우릴황산염(TLS, Dynesoz, Korea), 유카 추출물(Yucca extract, Dynesoz, Korea) 2 종과 섬기린초 조추출물(CE)을 비교하였으며, 옥수수 수염차에서는 복합허브분말 G (Complex Herb extract G, Dynesoz, Korea)와 비교하였고 셀러드드레싱에서는 유산균발효분말 S (Fermented Lacto Powder S, Dynesoz, Korea)와 효능을 각각 비교하였다. 섬기린초 조추출물(CE)과 연구에 사용된 모든 보존료들은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 최소저해농도를 확인하였다.

Table 4-2. Characteristics of commercial antimicrobial agents

Characteristics	Antimicrobial agents				
	TLS ¹⁾	Yucca Extract	Complex herb Powder -G	Fermented lacto powder	CE ²⁾
Type	Powder	Powder	Yellowish powder	Yellowish powder	Yellowish powder
Sensory characteristics	White Bitter, stirring	Dark yellow Bitter	Sweet	Light yellow Sour flavor	Dark yellow Bitter
Solubility (in water)	- Insoluble <300ppm	++ Soluble	+++ Soluble	+++ Soluble	+++ Soluble
Legally used country	Korea, Japan	All except	All	All	All

1) TLS, vitamin B1 lauryl sulfate

2) CE, *Sedum takesimense* crude extract

5. 경시변화 측정

경시변화측정에 사용되는 섬기린초 추출물과 시판 보존료의 농도는 최소저해 농도의 결과에 따라 결정하였다. 섬기린초 조추출물, 비타민 B1 라우릴황산염과 유카 추출물은 발효주정(95% ethanol w/v)에 용해시킨 후 최소억제 농도측정에서 스크리닝한 농도로 양조간장, 옥수수 수염차 및 샐러드 드레싱에 첨가하였다. 이후 미리 선정한 오염 미생물은 모두 약 4 log CFU/mL 의 수준으로 식품시료에 인위적으로 접종하였다. 각 시료를 저장기간 동안 표준평판법을 이용하여 생균수(CFU/mL)를 측정하여 시판 보존료 대비한 섬기린초 추출물의 미생물 억제 활성을 측정하였다.

간장 100 mL 에 각각 비타민 B1 라우릴황산염 250 µg/mL 및 500 µg/mL, 유카 추출물 500 µg/mL 및 1,000 µg/mL 그리고 섬기린초 추출물 1,000 µg/mL 및 2,000 µg/mL 를 첨가한 후 5 분간 균질화하여 배양된 분리균주 *Z. rouxii* 를 접종하여 30°C에서 30 일간 저장하면서 산막 형성 여부를 육안으로 확인하고 3 일 간격으로 PDA (pH 3.5, 8% NaCl)에서 생균수를 측정하였다. 옥수수 수염차에는 복합허브분말 G 와 섬기린초 조추출물을 비교하였다. 복합허브분말 G 250 µg/mL 및 500 µg/mL 와 섬기린초 조추출물 500 µg/mL 및 1,000 µg/mL 의 농도로 각각 옥수수 수염차 100 mL 에 첨가한 후 5 분간 균질화 하였고 *B. cereus* 를 접종하였으며 25°C에서 30 일간 저장하면서 3 일

간격으로 PCA 에서 생균수 변화를 측정하였다. 쉐러드 드레싱에서는 유산균발효분말과 섬기린초 조추출물을 각각 500 $\mu\text{g/mL}$ 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 쉐러드 드레싱 100 mL 에 첨가하였다. 이후 *L. mesentroides* 를 접종 후 균질화 하여 15°C에서 30 일간 저장하면서 3 일 간격으로 MRS 배지에서 생균수의 변화를 측정하였다.

6. 관능검사

관능검사는 3 가지 식품유형(간장, 옥수수 수염차 및 쉐러드 드레싱)에 적용하여 훈련된 12 명을 선별하여 실시하였다. 간장은 섬기린초 조추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$, 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 와 TLS 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 및 유카 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 과 비교하였고, 옥수수수염차는 섬기린초 조추출물 500 $\mu\text{g/mL}$, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 과 복합허브분말 G 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 과 비교하여 전반적인 기호도, 이취, 맛, 쓴맛, 색에 대한 관능 평가를 실시하였다. 쉐러드 드레싱은 섬기린초 조추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$, 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 과 유산균발효분말 1,000 $\mu\text{g/mL}$, 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하여 전반적인 기호도, 이취, 맛, 신맛, 색에 대한 관능을 실시하였다.

7. 통계분석

모든 실험의 측정값은 3 회 이상 반복 실험한 결과를 평균값과 표준편차 (means±SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 각 시험군 간의 측정값 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 수행하여 분석하였으며, 유의성은 신뢰구간 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan 의 다중검정법(Duncan's multiple range test)으로 사후 검정하였다.



III. 결과 및 고찰

1. 섬기린초 추출물, 식품보존료의 미생물 최소 억제 농도

섬기린초 조추출물 및 식품 보존료 4 종을 시판제품에서 분리한 총 7 종의 균주에 대하여 최소저해농도(MIC)를 측정한 결과는 Table 4-3 과 같다. 간장에서 분리한 *Z. rouxii* 는 섬기린초 조추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 최소억제농도를 보여 비타민 B1 라우릴황산염(250 $\mu\text{g/mL}$)보다는 감수성이 낮지만, 천연유래소재인 유카 추출물(500 $\mu\text{g/mL}$)과는 유사한 활성을 보였다. 또한, 시판 복합제제인 복합허브분말 G (>4000 $\mu\text{g/mL}$) 및 유산균 발효 분말(>4000 $\mu\text{g/mL}$)은 항균특성이 낮게 나타났다. 또한 *C. versatilis* 에서도 *Z. rouxii* 와 유사한 감수성을 나타내었다. 옥수수 수염차에서 분리한 *B. cereus* 에 대하여 섬기린초 조추출물은 제 2 장 Table 2-3 에서 확인된 바 *B. cereus* KCTC 3624 에 대하여 512 $\mu\text{g/mL}$ 와 유사한 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 항균활성이 확인되었다. 복합허브분말 G (250 $\mu\text{g/mL}$) 보다 낮은 감수성을 보였으나, 유카 추출물(500 $\mu\text{g/mL}$) 및 유산균발효분말 (2,500 $\mu\text{g/mL}$) 보다는 유사하거나 높은 항균효과를 보였다. 쉐러드 드레싱에서 분리한 *L. mesenteroides* 에 대해서는 섬기린초 조추출물과 유산균발효분말이 동등한 항균활성(1,000 $\mu\text{g/mL}$)을 보였다. 또한, TLS (500 $\mu\text{g/mL}$)은 가장 높은

항균활성을 나타내었으며 유카 추출물(4,000 $\mu\text{g/mL}$) 및 복합허브분말 G (4,000 $\mu\text{g/mL}$)은 매우 낮은 항균활성을 나타내었다.



Table 4-3. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of commercial antimicrobial agents and *Sedum takesimense* crude extract (CE) in against isolated strains from Foods by MIC assay

Isolated Microorganisms	Antimicrobial agents				
	TLS ¹⁾	Yucca Extract	Complex herb powder-G TM	Fermented lacto powder TM	CE ²⁾
<i>Bacillus cereus</i>	<125	<500	< 250	< 2,500	<500
<i>Bacillus subtilis</i>	< 125	<500	< 250	<2,500	<500
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 125	<4,000	<250	<2,500	<500
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<250	<4,000	<4,000	<1,000	<1,000
<i>Lactobacillus casei</i>	<500	<4,000	<4,000	<1,000	<1,000
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	< 250	<500	<4,000	<4,000	<1,000
<i>Candida versatilis</i>	< 250	<500	<4,000	<4,000	<1,000

(unit : µg/mL)

1) TLS, vitamin B1 lauryl sulfate.

2) CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol.

2. 간장의 산막효모 제어 효과

Z. rouxii 는 대표적인 간장 표면에서 산막을 형성하는 산막형성효모(film-forming yeast) 로서 일부 팽창을 일으키기도 한다(Kim et al., 1997). 각 실험군의 적용 함량은 섬기린초 조추출물 1,000 및 2,000 $\mu\text{g/mL}$, 비타민 B1 라우릴황산염 250 및 500 $\mu\text{g/mL}$, 유카 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 및 대조군과 비교하여 저장 중 산막형성 및 해당 균주의 변화를 확인하였다. 산막형성을 확인한 결과, 대조구는 저장 8 일, 섬기린초 조추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 및 유카 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$ 적용할 경우에는 15 일에 산막형성이 확인되었고, TLS 처리군 2 개와 섬기린초 조추출물 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 및 유카 추출물 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리한 실험군에서는 저장 30 일차까지 산막형성이 확인되지 않았다. 무처리구는 초기균수가 4.76 log CFU/mL 에서 2 일차에 2.95 log CFU/mL 로 감소하다가 계속 증가하여 30 일차에서는 4.53 log CFU/mL 로 증가하는 경향을 보였다. 산업적으로 많이 사용하고 있는 TLS 는 모든 실험구에서 2 일차 이후 사멸되어 30 일간 <1.00 log CFU/mL 이하로 나타나 균의 증식이 관찰되지 않았다. 유카 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$ 적용 시 0 일차 3.18 log CFU/mL, 2 일차 2.40 log CFU/mL 유지 후 15 일차 <1.00 log CFU/mL 까지 감소하였으며 30 일차에 다시 2.60 log CFU/mL 증가하였고, 유카 추출물 1000 $\mu\text{g/mL}$ 적용할 경우에는 0 일차 3.24 log CFU/mL, 2 일차 1.40 log CFU/mL, 5 일차 이후 30 일까지 <1.00 log CFU/mL

이하를 나타내었다. Yeon et al. (2009)에 따르면 효모에 의한 변패가 문제시 되고 있는 기능성음료의 저장성을 향상시키고자 유카 추출물 항균력을 평가한 결과 *Z. baili*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans* 에 대한 MIC 가 각각 700, 200 및 400 ppm 으로 기능성음료의 저장성을 향상할 수 있다고 보고하였다. 섬기린초 조추출물은 1,000 µg/mL 적용시 0 일차 3.39 log CFU/mL 에서 15 일차까지 1.60 log CFU/mL 으로 감소한 후 다시 증가하여 30 일 차에는 2.9 log CFU/mL 를 보였고, 섬기린초 조추출물 2,000 µg/mL 에서는 저장 0 일차 3.24 log CFU/mL, 5 일차 1.95 log CFU/mL 로 감소하다가 8 일차 이후로 <1.00 log CFU/mL 이하로 확인되어 저장시 높은 항균효과를 나타내었다.

섬기린초 조추출물은 2,000 µg/mL 적용농도에서 식품산업에 사용되는 TLS 250 µg/mL, 천연보존료인 유카 추출물 1,000 µg/mL 과 비교 시 높은 농도이지만 간장에서의 항균효과를 확인할 수 있어 식품산업에 적용 가능성이 제시된다. 겨자정유 20 ppm 을 생간장에 첨가하여 30 일 이상의 산막형성 저해효과에 대한 연구결과도 보고된 바 있으나(Kim et al., 2000) 겨자정유의 주성분인 allyl isothiocyanates (AITC)는 휘발성이 매우 높고 특유의 자극성 냄새를 갖고 있어 한계점이 있다(Kim et al., 2000). 또한, 비타민 B1 라우릴황산염은 식품 유형에 따라 차이는 있지만 500 ppm 이상 사용 시 금속맛과 같은 이미 및 황산에서 기인하는 이취 때문에 식품에

첨가하기 어려운 소재이다(Delompre et al., 2019). 유카 추출물은 천연계면활성제로 사용될 정도로 사포닌 함량이 높기 때문에 천연보존제로서의 효능이 높은 반면에 제조 시 거품이 생기는 단점이 있다(Jiménze et al., 2021). 기존의 겨자 정유, TLS 및 유카 추출물의 단점을 감안한다면 섬기린초 조추출물은 간장에서 1,000 µg/mL 이상 사용시 높은 저장안전성을 보여주어 천연 보존료로써의 잠재력이 높다고 판단된다(Fig. 4-1).

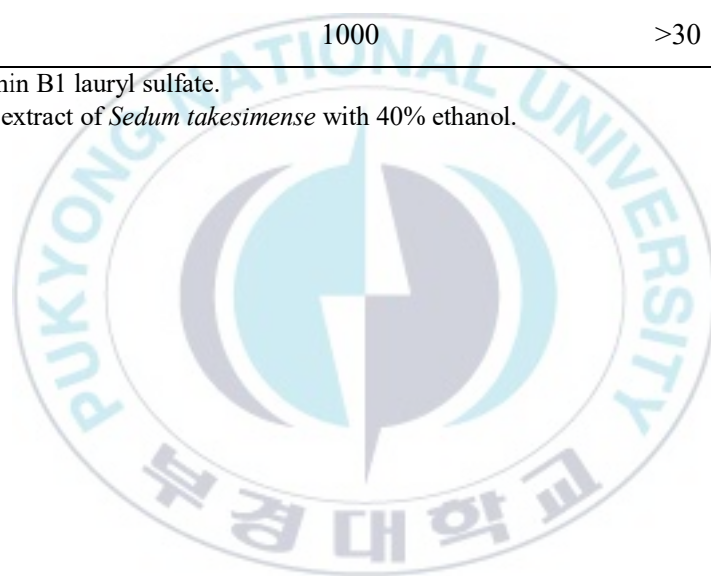


Table 4-4. Inhibition effects of CE on film formation by yeasts on soy sauce incubated at 30 °C for 30 days

Antimicrobial agents	Concentration, µg/mL	Day of film formation
Control	-	8
TLS ¹⁾	250	>30
	500	>30
CE ²⁾	1000	15
	2000	>30
Yucca extract	500	15
	1000	>30

1) TLS, vitamin B1 lauryl sulfate.

2) CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol.



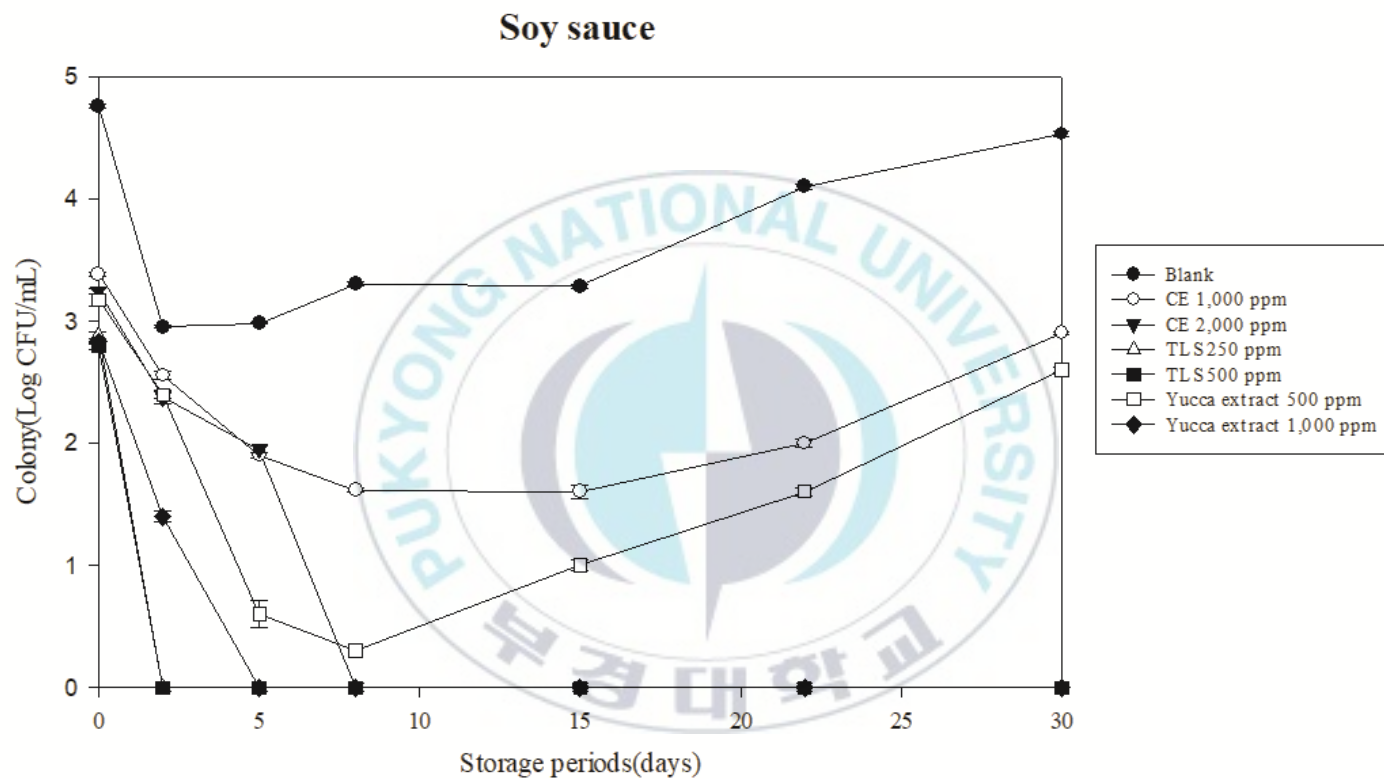


Fig. 4-1. *Leuconostoc mesenteroides* changes in soy sauce during storage periods. TLS, vitamin B1 lauryl sulfate; CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol.

3. 옥수수수염차 중 오염된 *Bacillus cereus* 의 경시변화

옥수수수염차에서 분리된 *B. cereus* 에 대해 복합허브분말 G 250 µg/mL, 500 µg/mL 와 섬기린초 조추출물 500 µg/mL, 1,000 µg/mL 에 적용하여 30°C에서 30 일동안 경시변화를 측정하였다. 무처리구는 0 일차 1.99 log CFU/mL 에서 3 일 이후 5.96 log CFU/mL 까지 급격한 상승을 보인후 30 일에 6.37 log CFU/mL 를 보여 항균효과를 보이지 않았으나 섬기린초 조추출물은 500 µg/mL 처리시 0 일차 1.79 log CFU/mL 로 시작하여 10 일차까지 1.67 log CFU/mL 로 유지하는 경향을 보이다가 다시 증가하여 15 일차 이후 2.57 log CFU/mL, 30 일차에는 4.00 log CFU/mL 로 증식을 보였다. 그러나, 1,000 µg/mL 는 0 일차 1.71 log CFU/mL 로 시작하여 30 일차까지 1.30 log CFU/mL 이하로 측정되어 높은 항균력을 보여주었다. 시중 판매되는 복합허브분말 G 는 250 µg/mL 적용한 경우 0 일차 1.63 log CFU/mL, 15 일차 1.41 log CFU/mL, 20 일차 2.30 log CFU/mL, 30 일차 3.90 log CFU/mL 로 약간의 증가경향을 보여 섬기린초 조추출물 500 µg/mL 과 유사한 경향의 균수변화를 보였다. 복합허브분말 G 500 µg/mL 농도에서는 0 일차 1.63 log CFU/mL 에서 20 일 1.18 log CFU/mL, 30 일에는 <1.00 log CFU/mL 을 나타내어 항균효과를 보였다.

실제 음료 중 미생물의 검출정도는 1 log CFU/mL 미만이며 외부 오염 및 실링 불량에 의하여 간혹 발생되어 소비자 클레임으로 이어진다(Yu et al., 2011). 따라서 섬기린초 조추출물은 시판 음료용 보존료인 복합허브분말 G 와 유사한 농도에서 옥수수수염차를 미생물의 오염으로 인한 제품의 변질을 충분히 제어 가능할 수 있을 것으로 보이며, 또한 각종 중성차 음료에도 적용범위가 넓어 그 활용범위가 클 것으로 판단된다(Fig. 4-2).



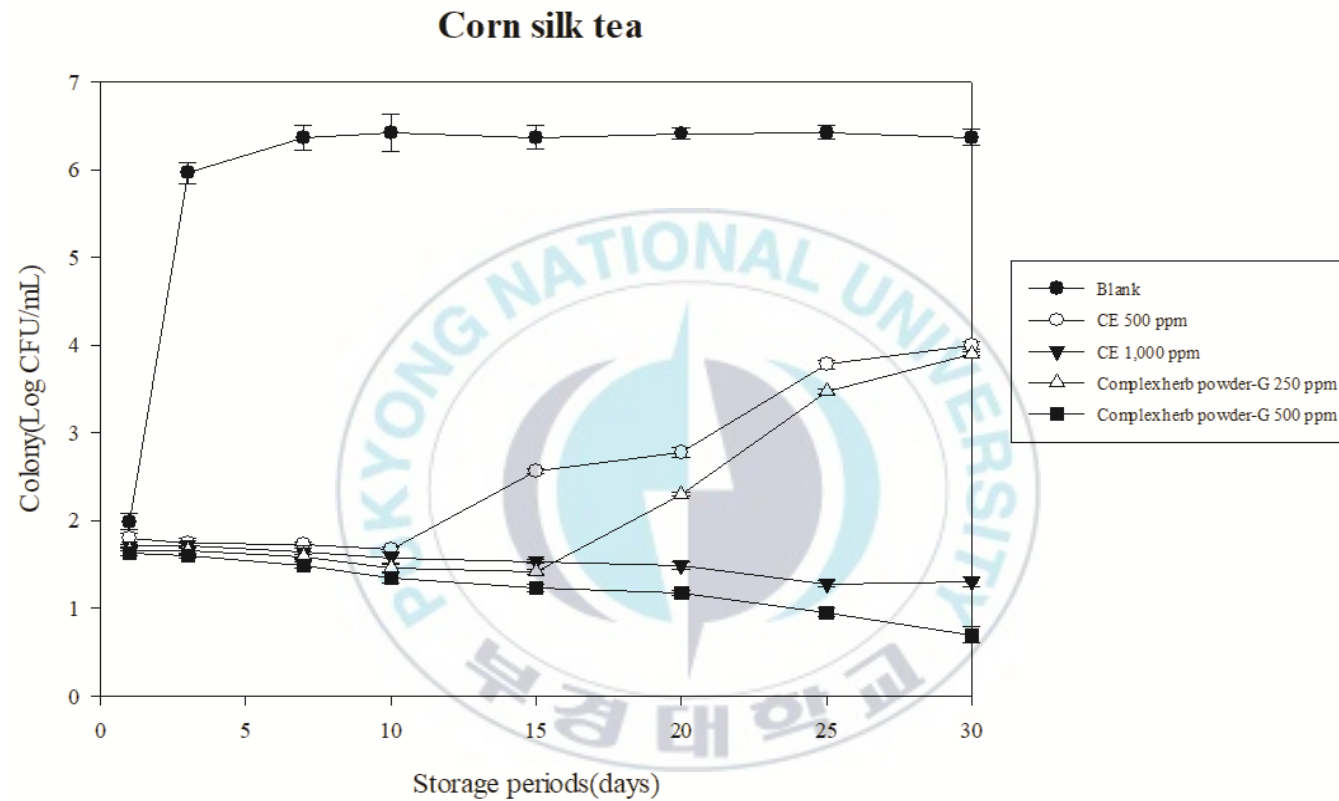


Fig. 4-2. *Bacillus cereus* changes in corn silk tea during storage periods. CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol.

4. 샐러드 드레싱(salad dressing)의 유산균 제어효과

본 연구에 사용된 샐러드 드레싱은 제조 공정 중 80-90℃ 원료를 살균하는 공정이 있으나 냉각 후 다시 마요네즈를 주입하여 균질화한다. 샐러드 드레싱은 pH 4.0 이하, water activity (A_w)는 0.896-0.924 로 일반 세균이나 내열성 포자세균이 증식이 어렵다(Bing et al., 2015). 섬기린초 조추출물과 유산균발효분말은 각각 1,000, 2,000 ppm 적용하여 경시변화를 수행하였다. 무처리구는 저장 0 일차에서 2.94 log CFU/mL 에서 21 일차에서 3.15 log CFU/mL 및 저장 28 일차에서 3.51 log CFU/mL 로 증가하였고, 유산균발효분말 1,000 µg/mL 농도에서는 저장 0 일차 2.58 log CFU/ml, 저장 14 일차 1.61 log CFU/mL 및 저장 21 일차 이후 <1.00 log CFU/mL 를 나타내었고, 유산균발효분말 2,000 µg/mL 농도에서는 7 일차 이후 <1.00 log CFU/mL 을 보여 높은 항균력을 보였다. 섬기린초 조추출물은 1,000 µg/mL 농도에서 저장 0 일차 2.72 log CFU/mL, 저장 14 일차 1.84 log CFU/mL 로 나타났으며, 저장 21 일 이후 <1.00 log CFU/mL 를 나타내어 높은 항균활성을 보였다. 섬기린초 조추출물 2,000 µg/mL 에서는 저장 0 일차 2.30 log CFU/mL, 저장 7 일차 1.18 log CFU/mL 이후 저장 28 일 이후부터는 <1.00 log CFU/mL 의 항균력을 나타내었다(Fig. 4-3).

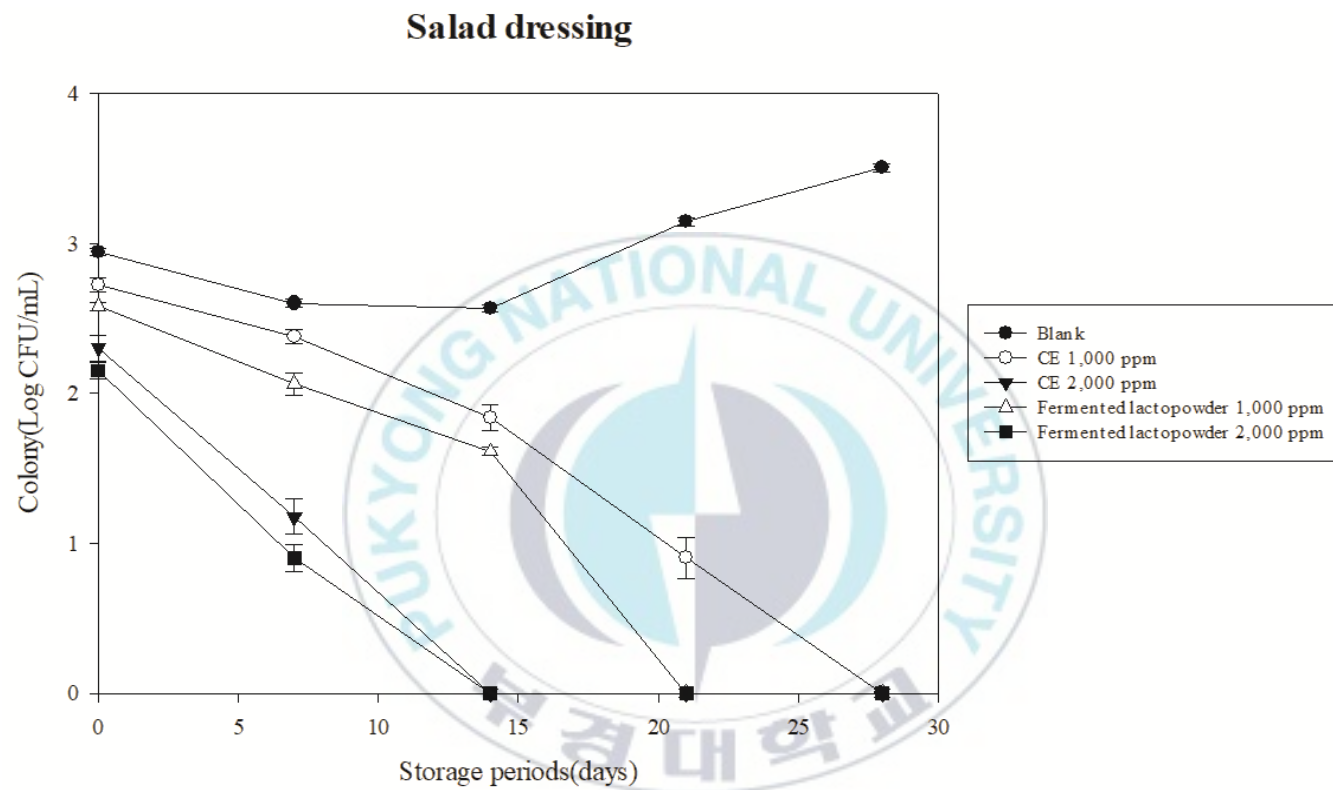


Fig. 4-3. *Leuconostoc mesenteroides* changes in salad dressing during storage periods. CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol.

Kim et al. (2017)의 연구에 따르면 셀러드 드레싱에 유채박 추출물을 100-500 ppm 처리 후 8 주 저장하는 동안 초기($3.73-4.04 \log \text{CFU/mL}$)대비 모든 실험군의 총균수가 증가하는 경향을 보였으나, 농도가 높아짐에 따라 증가속도가 감소하는 경향을 보여 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

5. 관능검사

간장에 섬기린초 조추출물($1,000 \mu\text{g/mL}$, $2,000 \mu\text{g/mL}$)과 TLS($250 \mu\text{g/mL}$, $500 \mu\text{g/mL}$) 및 유카 추출물($500 \mu\text{g/mL}$, $1,000 \mu\text{g/mL}$)을 처리한 후 관능검사를 실시하였다. 그 결과, 섬기린초 조추출물 첨가는 전반적인 기호도를 비롯한 모든 측정 항목에서 무처리군 대비 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다($P < 0.05$). TLS 및 유카 추출물은 색을 제외한 나머지 항목에서 무처리군 대비 관능점수가 낮은 것으로 확인되었다. 특히, TLS 는 비타민 B1 의 유도체로서 특유의 금속맛 및 황산기에서 유래하는 이취때문에 관능이 좋지 않게 측정된 것으로 추정된다(Delompre et al., 2019). 또한, 유카 추출물도 천연소재이지만, 고유의 이미 및 이취로 인하여 TLS 보다는 높지만, 무처리군 및 섬기린초 조추출물 처리군보다 낮은 점수를 나타내었다(Table 4-5). 옥수수 수염차에 섬기린초 조추출물($500 \mu\text{g/mL}$, $1,000 \mu\text{g/mL}$)을 처리하여 복합허브분말 G ($250 \mu\text{g/mL}$, $500 \mu\text{g/mL}$)과

관능검사를 통해 비교한 결과, 무처리군 및 복합허브분말 G 250 $\mu\text{g/mL}$ 처리군과는 전반적인 기호도를 비롯한 냄새, 맛, 감미도, 색에서 유의적으로 큰 차이를 보이지 않았으나, 복합허브분말 G 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리군과 비교시 전반적인 기호도 및 맛 항목에 있어서 유의적으로 우수한 결과를 보였다($P<0.05$). (Table 4-6). 셀러드 드레싱에서 섬기린초 조추출물(1,000 $\mu\text{g/mL}$, 2,000 $\mu\text{g/mL}$)과 유산균발효분말(1,000 $\mu\text{g/mL}$, 2,000 $\mu\text{g/mL}$)과 비교하여 관능검사를 실시한 결과, 섬기린초 조추출물은 대조군 및 유산균발효분말 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 처리군과 유의적인 차이가 거의 없는 것으로 확인되었으나, 유산균발효분말 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 처리군과는 색을 제외한 항목에서 관능적으로 우수한 것으로 확인되었다(Table 4-7). 따라서, 섬기린초 조추출물은 국내, 일본 및 중국에서만 사용이 허가되어 있는 TLS 나 천연소재이지만 관능적으로 사용량에 제한이 있는 유카 추출물을 비롯한 천연소재들을 대체하여 국내를 비롯한 수출용 식품유형에 적용이 가능할 것으로 사료된다.

Table 4-5. Sensory evaluation of *Sedum takemense* extract, vitamin B1 laurylsulfate and yucca extract in soy sauce

Sample (g/mL)	Overall acceptability	Odor	Taste	Bitter	Color
Not-treated	4.08 ^a ±0.67	4.08 ^a ±0.79	4.17 ^a ±0.39	3.75 ^a ±0.45	3.58 ^a ±0.51
TLS250 ¹⁾	2.58 ^{de} ±0.51	3.25 ^{bcd} ±0.45	2.50 ^d ±0.52	2.42 ^c ±0.67	3.42 ^a ±0.51
TLS500	2.17 ^e ±0.58	2.92 ^d ±0.67	2.33 ^d ±0.49	1.67 ^d ±0.65	3.25 ^a ±0.45
CE 1,000 ²⁾	3.67 ^{ab} ±0.49	3.92 ^{ab} ±0.67	3.92 ^{ab} ±0.51	3.50 ^{ab} ±0.52	3.42 ^a ±0.51
CE 2,000	3.42 ^{abc} ±0.51	3.83 ^{abc} ±0.58	3.58 ^{bc} ±0.51	3.33 ^{ab} ±0.49	3.58 ^a ±0.51
YE 500 ³⁾	3.17 ^{bcd} ±0.58	3.50 ^{abc} ±0.52	3.25 ^c ±0.45	2.92 ^{bc} ±0.51	3.36 ^a ±0.49
YE 1,000	2.83 ^{cde} ±0.39	3.17 ^{cd} ±0.39	3.17 ^c ±0.39	2.58 ^c ±0.51	3.33 ^a ±0.49

Figures followed different letters in the same column indicate significant differences ($\alpha=0.05$) score 5 (highly preferred) to a score of 1 (not preferred). ¹⁾CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; ²⁾TLS, vitamin B1 lauryl sulfate; ³⁾YE, yucca extract.

Table 4-6. Sensory evaluation of *Sedum takemense* extract and complex herb G in corn silk tea

Sample (g/mL)	Overall acceptability	Odor	Taste	Sweetness	Color
Not-treated	4.17 ^a ±0.72	3.83 ^a ±0.58	3.58 ^a ±0.67	3.58 ^a ±0.51	3.42 ^a ±0.67
CE 500 ¹⁾	3.58 ^{ab} ±0.51	3.75 ^a ±0.62	3.58 ^a ±0.90	3.42 ^a ±0.51	3.33 ^a ±0.49
CE 1,000	3.50 ^b ±0.52	3.58 ^a ±0.51	3.25 ^{ab} ±0.45	3.25 ^a ±0.97	3.50 ^a ±0.52
CH-G 250 ²⁾	3.83 ^{ab} ±0.58	3.92 ^a ±0.51	3.17 ^{ab} ±0.39	3.75 ^a ±0.45	3.42 ^a ±0.51
CH-G 500	3.42 ^b ±0.51	3.75 ^a ±0.62	2.58 ^b ±0.67	3.58 ^a ±0.51	3.17 ^a ±0.72

Figures followed different letters in the same column indicate significant differences ($\alpha=0.05$) score 5 (highly preferred) to a score of 1 (not preferred). ¹⁾CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; ²⁾ CH-G, complex herb powder G.

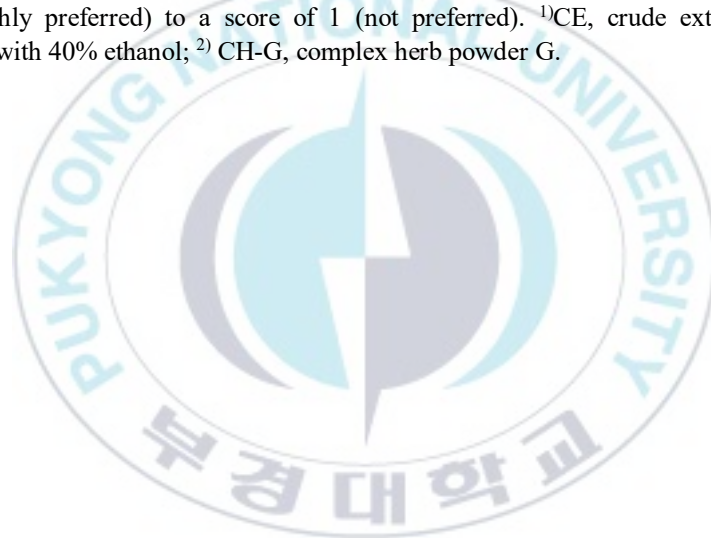
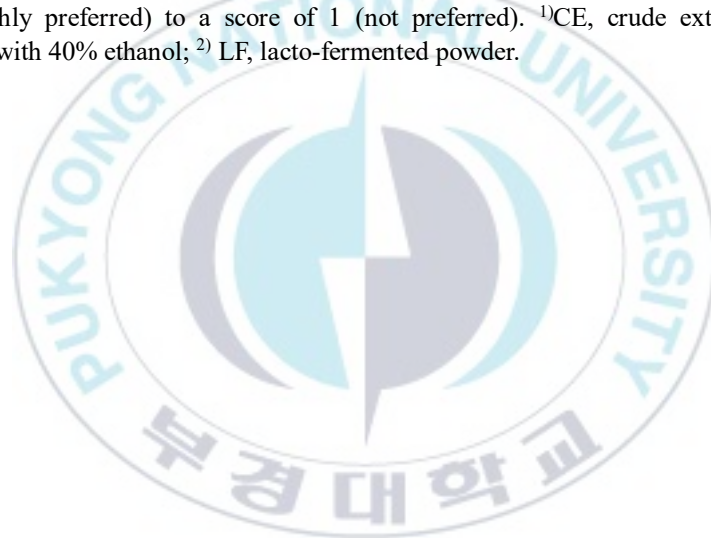


Table 4-7. Sensory evaluation of *Sedum takemense* extract and Lacto-fermented powder in salad dressing

Sample (g/mL)	Overall acceptability	Odor	Taste	Sourness	Color
Not-treated	4.00 ^a ±0.60	3.67 ^a ±0.98	3.83 ^a ±0.72	3.58 ^a ±0.51	3.83 ^a ±0.58
CE 1,000 ¹⁾	3.75 ^a ±0.45	3.75 ^a ±0.97	3.58 ^a ±0.51	3.25 ^{ab} ±0.62	3.50 ^a ±0.52
CE 2,000	3.50 ^{ab} ±0.80	3.50 ^a ±0.80	3.17 ^{ab} ±0.58	3.17 ^{ab} ±0.83	3.42 ^a ±0.51
LF 1,000 ²⁾	2.83 ^{bc} ±0.58	2.92 ^{ab} ±0.51	3.17 ^{ab} ±0.72	2.92 ^{ab} ±0.67	3.83 ^a ±1.03
LF 2,000	2.58 ^c ±0.67	2.42 ^b ±0.67	2.58 ^b ±0.67	2.67 ^b ±0.65	3.67 ^a ±0.78

Figures followed different letters in the same column indicate significant differences ($\alpha=0.05$) score 5 (highly preferred) to a score of 1 (not preferred). ¹⁾CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; ²⁾ LF, lacto-fermented powder.



IV. 결론

본 연구에서는 간장, 옥수수수염차 및 샐러드 드레싱에서 오염 가능성이 높은 미생물을 선정하여 이를 식품에 인위적으로 오염시킨 후 섬기린초 조추출물과 시판 보존료 4 종을 첨가하여 저장기간 동안의 경시변화를 비교함으로써 섬기린초 조추출물의 식품산업에 활용 가능성을 확인하였다. 그 결과, 섬기린초 조추출물은 간장에 첨가되어서 화학적 합성소재인 TLS 보다는 항균활성이 낮게 나타난 반면 관능평가에서 이미와 이취에 대한 평가값이 낮게 나타나서 관능적인 부분에서 우수할 것으로 예상된다. 또한, 유카 추출물과는 산막형성을 억제 활성을 나타내어 간장보존료로서의 가능성이 확인되었다. 섬기린초 조추출물은 옥수수수염차에 500 µg/mL 농도로 첨가되어 *B. cereus* 에 대하여 저해활성 나타내었으며 시판 보존료 제품과 비교시 산업화 가능성을 보였으며, 샐러드드레싱에 첨가되어 *L. mesenteroides* 를 1,000-2,000 µg/mL 농도에서 저해효과를 나타내어 시판 제품과 동등한 효과를 나타내었다. 최근 식품산업에서 클린라벨 및 천연에 대한 소비자의 니즈가 계속 높아지고 있는 가운데, 천연물에 대한 식품보존료의 개발이 계속 요구되고 있다. 따라서 본 장에서는 식품유래 세균 및 진균류에 대한 천연물 유래 식품보존료로서의 산업화 가능성을 제시하는 연구논문으로서 섬기린초 조추출물의 잠재력을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

- Ahn E.Y., Shin D.H., Baek N.I., & Oh J.A. (1998). Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis*. Korean Journal of Food Science and Technology, 30, 680-687
- Bing D.J., Lee J.H., & Chun S.S. (2015). Quality characteristics and antioxidant activity of salad dressings prepared with wild grape powder during storage. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 44(2), 250-259
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International journal of food microbiology, 94, 223-253
- Delompré T., Guichard E., Briand L., & Salles C. (2019). Taste Perception of Nutrients Found in Nutritional Supplements: A Review. Nutrients, 11, 20-50.
- Jiménez G.G., Durán A.G., Macías F.A., & Simonet A.M. (2021). Structure, Bioactivity and Analytical Methods for the Determination of Yucca Saponins. Molecules, 26(17), 5251
- Jo H.A., Kim H.Y., & Ko S.H. (2010). Qualitative Evaluation of the salad dressing added with prunus mume extracts. J. East Asian Soc Dietary life, 20(4), 551-559
- Kim H.J., Jeong Y.B., Jang H.N., & Park S.N. (2013). Comparative Study on the Antimicrobial Activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* Extracts with Various Countries of Origin as Natural Antiseptics. Microbiology and Biotechnology Letters, 41(3), 358-366

- Kim H.S., Han J.H., & Lee M.H. (2019). Changes in physicochemical properties of sponge cake produced by addition of xylitol and yucca extract. *Culinary Science & Hospitality Research*, 25(5), 86-98.
- Kim J.S., Park J.M., Kim T.J., Kim B.S., Kim Y.M., Kim H.R., & Han N.S. (2010). Inhibition of microbial growth in cabbage-kimchi by heat treatment and nisin-yucca extract. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39(11), 1678-1683
- Kim Y.S., & Lee J.H. (2017). Effect of hydrolyzed rapeseed cake extract on quality characteristics of mayonnaise dressing. *Journal of food science*, 82(12), 2847-2856.
- Kim Y.S., & Kyung K.H. (1997). Isolation and identification of yeasts occurred in inflated commercial soy sauce. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 10, 97-101
- Lee S.C., Kim S.K., Lee S.G., & Hwang Y.I. (2012). Production of soy sauce with *Monascus* sp.. *Applied Biological Chemistry*, 23, 569-577
- Park J.H., Wu Q., Yoo K.H., Yong H.I., Cho S.M., Chung I.S., & Baek N.I. (2011). Cytotoxic effect of flavonoids from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* on human cancer cell lines. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 54, 67-70
- Patel, S. (2012). Yucca: A medicinally significant genus with manifold therapeutic attributes. *Natural products and bioprospecting*, 2, 231-234

- Seo Y.C., Cho J.S., Jeong H.Y., Yim T.B., Cho K.S., Lee T.W., Jeong M.H., Lee G.H., Kim S.I., Yoon W.B., & Lee H.Y. (2011). Enhance of antifungal activity of anthracnose in pepper by nanoparticles of thiamine di-lauryl sulfate. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 19(3), 198-204
- Seow Y.X., Yeo C.R., Chung H.L., & Yuk H.G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. Critical reviews in food science and nutrition, 54, 625-644.
- Simmons-Boyce J.L., & Tinto W.F. (2007). Steroidal Saponins and Sapogenins from the Agavaceae Family. Natural Product Communications, 2, 99-114.
- Woo K.S., Jang K.I., Kim K.Y., Lee H.B., & Jeong H.S. (2006). Antioxidative activity of heat treated licorice(*Glycyrrhiza uralensis fisch*) extracts. Korean Journal of Food Science and Technology, 38(3), 355-360
- Yang E.J., & Seo Y.S. (2017). Stability of anti-yeast activities and inhibitory effects of defatted green tea seed extracts on yeast film formation. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 46(3), 327-334
- Yeon J.H., Lee J.Y., Lee H.S., Ha S.H., Park C.S., Woo M.J., Lee S.H., Kim J.S., & Lee C. (2009). Evaluation of the Natural Antimicrobials against Yeast in Functional Beverages to Control Quality Loss. Journal of Food Hygiene and Safety, 24(3), 273-276

- Yoon T.S., Cheon M.S., Kim S.J., Lee A.Y., Moon B.C., Chun J.M., Choo B.K., & Kim H.K. (2010). Evaluation of solvent extraction on the anti-inflammatory efficacy of *Glycyrrhiza uralensis*. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 18, 28-33
- Yu D.J., Choi D.W., Shin Y.J., Song H.Y., & Song K.B. (2011). Inactivation of Foodborne Pathogenic bacteria in corn silk tea using a microwave plasma sterilization system. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 40(8), 1195-1199
- Yu J., Kim Y.H., & Choi S.J. (2020). Usage- and daily intake-based cytotoxicity study of frequently used natural food additives in South Korea. Korean Journal of Food Science and Technology, 52(5), 546-554

