

# Lactobiocin의 피부 염증 및 여드름 저해효과에 관한 연구

김광수, 오세종<sup>1</sup>, 김기환, 홍진천, 이승화

경기도 평택시 진위면 견산리 3 나드리화장품(주) 기술연구소

<sup>1</sup>경기도 용인시 기흥읍 고매리 418-12 (주)한국야쿠르트 중앙연구소

## Inhibitory activity of Lactobiocin on the skin inflammation and acnes

KwangSoo Kim, SeJong Oh<sup>1</sup>, GiHwan Kim, JinChon Hong and SeungHwa Lee.

R & D Center, Nadri Cosmetics Co., Ltd.

3, Kyunsan-Ri, Chinwi-Myun, Pyongtaik-Si, Kyungi-Do, 451-860, KOREA

<sup>1</sup>R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd.

418-12 Komae-Ri, Kiheung-Eup, Yongin-Si, Kyunggi-Do, 449-901, KOREA

### ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate bacteriocin activity against human flora. Lactobiocin, a bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449, inhibited the growth of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Propionibacterium acnes*. When crude bacteriocin was added to indicator cells during logarithmic growth, the optical density(O.D 650nm) of cells without bacteriocin increase after 5h of incubation. Whereas in the presence of bacteriocin, the O.D of cell suspensions decreased. The similar patterns were observed for absorbance readings at 280 nm and 260

nm. The release of cellular components when cell were treated with Lactobiocin suggests some degree of membrane damage or cell lysis. Scanning electron microscopy of cells following treatments with Lactobiocin in PBS buffer revealed disruptions of cell morphology. These results indicate that bacteriocin appears to cause cell lysis of tested strains. In cytotoxicity on human fibroblast, LD<sub>50</sub> of Lactobiocin was ca. 50 mg/ml and no change was observed cell proliferation at the same concentration. Any irritation and allergic reaction did not observed when evaluated by human patch test for Lactobiocin.

Corresponding author : 이승화(shlee6914@hanmail.net)

## I. 서론

유산균이 생산하는 항균성 물질에는 젖산과 같은 유기산, 이산화탄소, diacetyl, hydrogen peroxide 그리고 박테리오신을 들수 있다. Tagg 등<sup>1)</sup>과 Klaenhammer<sup>2)</sup>는 박테리오신을 '생산 균주와 근접한 species에 항균작용을 하는 단백질성 화합물'로 정의하였으며, 이는 유전학 및 생화학적 지식의 발전에 힘입어 박테리오신의 특성이 명백히 설명된 것이었다. 그러나 몇몇 박테리오신은 생산균과 좀 더 거리가 먼 박테리아종에게도 항균효과가 있어 이 정의에 적용되지 않는 예도 있는 것이 사실이다. 현재까지 다양한 원천에서부터 많은 수의 유산균 bacteriocin이 분리 동정되어 그 특성들이 규명되었고, 이중 일부는 실제적인 식품에서도 이용이 가능한 것으로 보고되었다<sup>3~5)</sup>.

유산균의 길항작용 및 항균능력은 대부분 이들이 생산하는 대사산물인 유기산, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diacetyl, bacteriocin 등에 기인하며 특히 bacteriocin은 다른 세균의 생육을 억제하거나 사멸시키는 항균성 peptide 또는 protein을 말하며, 이는 인체에 무해하고 유산균이 생산하는 천연 생합성 물질이라는 장점 때문에 식품산업을 비롯한 다양한 방면으로의 이용이 점차 확대되고 있는 추세이며 단백질로 자체 유전자를 갖고 있어 유전 공학적으로 다양한 조작이 가능하여 산업현장의 필요에 따라 bacteriocin 분자구조 혹은 생산능력 및 조건 등을 조절 가능하다는 점이 장점이라 할 수 있다.

1951년 Hirsch등<sup>6)</sup>이 *Lactococcus lactis subsp. lactis*가 생산하는 항균물질 'Nisin' 을 발견해 상업화에 성공하면서 *Lactococcus spp.*가 생산하는 Bacteriocin인 nisin, diplococcin, lactococcin에 대해 많은 연구가 이루어져 왔다. 그 중에서도 가장 잘 알려진 nisin은 아미노산 34개로 구성된 폴리 펩타이드로 섭취되었을 때 인체내의 효소에 의해 분해되어 독성이 없으므로 식품보존제로 그 적용이 확대되어 왔다.<sup>7)</sup>

피부 상재균주중 대표적인 것으로 그람양성 박테리아로 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycrococcus luteus*, *Corynebacterium xerosis*가 존재하며, 그람음성 균주로 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas aeruginosa*가 있으며 효모로 *Candida albicans*와 *Malassezia furfur*가 존재하며, Moulds에 *Trichophyton Mentagrophytes*가 존재한다. 이런 상재균들 중 피부에 화농성 감염증이나 농피증(cellulitis) 또는 일반적 염증을 유발할 수 있는 대표적인 균주들로는 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* 및 *Streptococcus pyogenes*를 들수 있다<sup>7~15)</sup>.

여드름은 피부과학적 용어로 심상성 좌창이라고 하는 모낭 피지선의 만성 염증성 질환으로 얼굴에 가장 큰 영향을 미치며 심한 경우 영구적인 흔적을 남길 수 있다. 이러한 여드름의 생성원인은 크게 스트레스, 초조감, 불안 등의 심리적 요인(Psychological Elements), 자극성 물질에 대한 감각반응 등의 감각적 요인(Sensual Elements), 내분비계의 변동, 특히 안드로젠(Androgen)과 에스트로젠(Estrogen) 분비의 증대가 피지선 기능 항진 또는 표피각화를 촉진시켜 면포 형성을 하는 내분비 요인(Hormonal Elements), 물리적 인자에 의한 모낭관 출구의 폐쇄에 의한 물리적요인(Physical Elements), 피부 표면의 산성도(pH)의 차이에 의한 미생물 번식에 의한 화학적요인(Chemical Elements), 모낭내에 상주하는 균중에서 특히 *Propionibacterium acnes*가 Triglyceride를 분해하여 Free fatty acid를 형성하며 이것이 모낭을 자극하고 또 Chemotactic substance를 형성하여 염증세포의 침윤을 촉진하는 생리적 요인(Physiological Elements) 등을 들 수 있으며 이들 인자가 상호 복합적으로 작용하는 것으로 추정되지만, 가장 직접적인 요인으로 간주되는 것은 testosterone 과 같은 남성 호르몬에 의해 피지선이 비대해서 피지가 과잉 분비되고 피부의 다양한 오염으로 인하여 모공이 막히면 1차적인 Microcomedones(미세면포)가 형성되고 모공의 피지 내에 존재하는 여드름 유발 균주(*Propionibacterium acne*)의 성장이 촉진되고 *P. acne*에서 분비하는 Lipase에 의해 피지가 분해되어 Free fatty acid가 생성되어 이것이 모공벽을 자극하여 구진(Papule), 농포(Pustule), 낭종(Cyst), 결절(Nodule) 등의 염증이 발생됨으로서 여드름이 생성된다.<sup>16)</sup>

항여드름 및 항염증 효능의 피부 화장품으로서 피부각질을 용해시키는 방법은 피부과민 반응을 일으키는 경우가 많으며, 각질이 용해되어 피부가 거칠어 보일 수도 있기 때문에 저자극 천연물질을 사용하여 각질이 비정상적으로 되는 것을 막아주고 *P. acnes*를 감소시키고 피지 생성을 감소시켜 염증을 줄이는 방법들이 연구되고 있다.

따라서 본 연구의 목적은 피부 여드름 생성에 직접적인 영향을 미치는 *Propionibacterium acnes* 및 기타 균주들에 의한 피부 염증 유발을 방지하고자 항생물질의

사용대신 항균 범위가 넓은 *Lactococcus* sp. HY 449의 대사산물로 bacteriocin 추출액을 분리 제조하고 이 천연 생리활성 물질의 피부 여드름 유발 균주인 *Propionibacterium acnes*를 비롯하여 피부에 상재하는 생리균총 중에서 세균 감염증(*Bacterial Infections*)이상 증식이 일어났을 때 피부의 모낭염(*Folliculitis*), 농가진(*Impetigo*), 면포(*Comedo*), 붓소염(*Cellulitis*) 등의 피부 염증 유발에 관여하는 4종의 균주(*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*와 *E.coli*, *Pseudomonas* sp. 같은 다양한 그람 음성균에 대한 항균 활성 및 저해효과를 관찰하고 이를 화장품에 응용했을 때의 여드름 저해 효과 및 제형의 방부력 증강 효과에 관하여 고찰하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 유산균의 선별 및 Lactobiocin의 제조 및 분리정제

본 실험에 사용되어진 Lactobiocin 생산 균주는 유제품에서 분리하여 동정한 (주)한국야쿠르트사의 특허 균주인 *Lactococcus* sp. HY 449(한국 종균협회 KFCC 10842 ; *Lactococcus* sp. HY449)로 하였으며, 배양 조성물은 균체의 증식이 용이하고 Lactobiocin의 활성이 높은 M17-글루코스 배지를 이용하여 전보<sup>17,20)</sup>에서 보고된 바와 같은 방법으로 제조하였다.

모든 균주는 -76℃의 질소 탱크에 보관하고 실험에 사용하기 직전 각각 M17G Broth(Biolife, Italy plus 1% dextrose, pH7.0)와 MRS broth(Difco, lactobacilli MRS broth)에서 2회 계대하여 사용하였으며, Lactobiocin의 조제는 M17G broth에서 16시간 배양한 것을 10,000×g에서 30분 원심분리하여(Dupont, Sorvall RC 28S, GSA rotor) cell을 제거하고 남은 상등액에 60% 포화 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 사용하여 4℃에서 overnight 시킨 후 전과 동일한 조건으로 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이것을 상등액의 1/10부피의 이온 교환수에 다시 용해시켜 MWCO 1,000 dalton의 (Spectrum, Spectra/Por) 투석막을 이용하여 24시간 투석한 후 냉동건조(SABCONCO, Freeze Dryer 18)하였다.

*Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 Lactobiocin을 유기용매 침전, ion-exchange chromatography, gel-filtration chromatography 및 reverse-phase chromatography 등을 사용하여 순수하게 정제한 후 Lactobiocin의 분자량 및 아미노산 조성 등을 조사하였다

## 2. 피부염증 및 여드름 유발 피부 상재균에 대한 항균활성 및 작용형태

### 2-1. 항균활성의 측정

정제되어진 Lactobiocin을 이용하여 연구의 목적인 여드름 및 염증유발 균주에 대한 항균작용을 관찰하기 위해 0.85% saline Sol'n에 4종의 균주 *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), *Staphylococcus aureus* (ATCC 65389), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 21059)를 각각  $1 \times 10^7$  ea/ml로 접종하고 Lactobiocin을 농도별로 처리하여 생육 시간대별로 O·D값과 생균수를 측정하였다.

억제기작을 확인하기 위해서 지시균을 M17 broth에서 37°C, 18시간 3회 계대배양한 후 신선한 100ml M17 배지에 약  $10^5$  cfu/ml 수준으로 접종하고, lactobiocin 용액을 500 AU/ml 수준으로 첨가하여 37°C 항온수조에서 배양하면서 흡광도의 변화를 관찰하였다. 또한 *Starph. epidermidis*에 대한 억제기작을 확인하기 위하여 배양중 핵산물질과 단백질성 물질의 변화를 관찰하였다

### 2-2. 항균력 측정

항균활성의 정도를 측정하기 위하여 상기 4종의 피부 염증 유발 균주의 각 배지 Table. 1로 Disc Diffusion법은 멸균된 PCA(Plate Counting Agar)배지를 이용하여 균수를 측정하여  $10^7$  ea/ml로 하고 Table. 1의 각 배지에 상기 4종의 균주를 각각 50 $\mu$ l씩 도말하고 Petri dish 중앙에 직경 8mm인 Paper disc를 올려놓은 고체배지에서 수행하고, Cylinder Diffusion법에 의한 항균 실험은 먼저 Petri dish 중앙에 직경이 8mm인 원통형의 Cylinder를 올려놓고 상기와 동일하게 균주를 도말한 후 Cylinder를 제거하여 생성된 hole에 시료를 접종하였다.

정제수로 각 농도별 시료용액을 20 $\mu$ l를 Paper disc주변과 Cylinder Hole에 골고루 적신 후 37°C, 24시간 배양 한 후, Disc와 Cylinder주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다. 비교 사용되어진 물질은 일반적으로 화장품에서 항여드름 효능이 잘 알려져 있는 Tea tree oil, Triclosan을 사용하였으며 피부 자극이 없는 농도를 기준으로 하였다.

Table. 1 Test strains and conditions for determination of antimicrobial activity

Microorganism	Growth Media	Temp & Condition
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Nutrient Agar	37°C, Aerobic
<i>Staphylococcus aureus</i>	Trypticase Soy Agar	37°C, Aerobic
<i>Staphylococcus pyogens</i>	Brain Heart Infusion agar	37°C, Aerobic
<i>Propionibacterium acne</i>	GAM Broth	37°C, Anaerobic

### 2-3. 전자현미경(SEM ; Scanning electron microscopy)의 관찰

Bacteriolysis 작용을 명확히 규명하기 위하여 Lactobiocin처리구와 원래의 Cell과의 Cell의 상태 변화를 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. SEM의 경우 MRS broth에서 4시간(대수증식기), 및 8시간(정지기) 배양한 지시균에 각각 1,000AU/ml의 Lactobiocin을 첨가하여 20시간 동안 배양한 후 Cell을 회수하고 20% Gutaraldehyde로 고정한 후 탈수하여 Gold spottering(250~300Å)하여 Philips SEM 515로 가속 전압 20KV에서 촬영하였다.

## 3. 피부세포에 대한 독성 및 자극도 측정

### 3-1. Cell Cytotoxicity Test

본 실험에 사용된 MTT 방법은 Mossman이 항암제의 세포독성도 연구에 처음 사용한 방법으로 살아있는 세포의 Mitochondria Dehydrogenase에 의하여 황색의 Tetrazolium염이 청색의 Formazan으로 변환 정도를 Multiwell spectrophotometer로 측정하는 방법으로 살아있는 세포의 수를 결정하여 세포독성 및 활성을 측정하는 방법이다.<sup>18)</sup>

Human Fibroblast(이하 NHF ; ATCC CCL-28)를 이용하여 Lactobiocin에 대한 세포독성 정도를 측정한다. T-75 flask에 배양되어진 NHF를 1× PBS로 2-3회 washing 하고, 1× Trypsine-EDTA을 이용하여 부착된 세포를 떨어뜨린 후, 1500rpm에서 5분간 원심분리(Heraeus, Labofuge 400R)하여 세포를 모았다. 원심분리 후 상층액은 버리고 pellet에 10ml의 DMEM (10% FBS)을 첨가하여 고르게 섞어준다. Heamacytometer를 이용하여 세포수를 측정하여 10<sup>4</sup>ea/well 정도의 세포를 96well의 각 well에 200μl씩 분주 한다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하면서 well 면적의 약 50%정도의 cell이 자라면 새로운 DMEM (10% FBS)으로

배지를 교환해 주면서, 시험물질을 농도별로 각 well에 duplicate로 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 각 시간대 별로 세포를 배양한다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma)를 PBS에 2mg/ml가 되도록 녹여 냉장고에 보관해서 사용한다. 각 well에 MTT시약(2mg/ml in PBS)을 50 $\mu$ l씩 처리하고 2시간 더 배양한 후 상등액을 버리고 150 $\mu$ l의 DMSO를 넣고 잘 섞어주거나 또는 0.04N-HCl (in acid-isopropanol)100 $\mu$ l를 넣고 shaking 한다. 모든 단계가 끝난 후 ELISA leader( $\mu$ Quant, Bio-Tek instrument INC.)를 이용해 560nm에서 측정한다. (Reference : 650nm)

### 3-2. 피부1차자극실험 (Patch-Test)

IN-VIVO patch test는 CTFA(Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) Guideline<sup>34)</sup>에 따라 20세-30세의 정상 성인여성 30명을 대상으로 Lactobiocin 농도별로 10% patch base 시료를 제조하고 이 시험물질을 Scanpor tape에 부착된 Finn Chamber를 사용하여 75% 에탄올 수용액으로 미리 세척된 등부위에 40 $\mu$ l 철포하고 48시간 후에 철포물질을 제거하고 피부를 70% ethanol Sol'n으로 세척한 30분, 24시간, 48시간, 72시간 경과후 피부반응을 판독하였다.<sup>19)</sup>

철포시험 반응의 판정은 ICDRG(International contact dermatitis research group) 기준<sup>36)</sup>에 따라 5-Point 기준을 적용하였다.

## III. 결과

### 1. Lactobiocin의 생산 및 분리 정제

*Lactococcus* sp. HY 449균주를 M17-glucose broth에 배양하여 배양 상등액으로 부터 propanol-actone 침전, ion-exchange chromatography, gel-filtration chromatography 및 reverse-phase chromatography 등을 통하여 비활성 2.56 x 10<sup>7</sup> AU/ml인 순수한 박테리오신을 정제하였다.

정제 과정 중에서 ion-exchange chromatography 단계에서는 35.3%의 회수율을 나타내었으나, gel-filtration chromatography 단계에서는 회수율이 7.3%로 감소하였다. Reverse-phase

chromatography에서는 3.25%의 회수율을 보였고 활성도는 413.5배로 증가하였다. Tricine-SDS 전기영동 결과 박테리오신은 단일 밴드로 나타났다.

박테리오신은 전기영동 결과 분자량 약 3.5 kDa를 보이는 작은 peptide로 추정되었으며, 아미노산 분석 결과에서도 Ile, Leu, Met, Gly, Lys 등이 다른 아미노산에 비하여 많이 나타났다으며, 이들의 대부분이 소수성 아미노산인 것도 박테리오신의 작용특성과 연관지어 생각하여 볼 필요가 있을 것이다. 아미노산 조성을 근거로 하여 분자량을 추정해본 결과, 본 박테리오신은 32개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 3,614Da로 계산되었다.

또한 N-말단 아미노산 서열의 결과 4개의 아미노산만 판독되었는데 이는 NH<sub>2</sub>-Ile-Leu-Pro-Gln 인 것으로 확인되어<sup>20)</sup> nisin과 다른 것으로 확인되었다. 따라서 *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 박테리오신은 신규 박테리오신으로 생각된다.

## 2. Lactobiocin의 항균활성 특성

*Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 Lactobiocin 농축액을 100배 dilution하여 control은 0ml, 10unit는 0.08ml, 50unit는 0.4ml, 100unit는 0.8ml을 처리하고, 각 접종 균의 균수는  $1 \times 10^6$  ea/ml 정도로 실시하였으며, 0, 30min, 1hr, 2hr, 3hr, 5hr의 시간대별 OD값(650nm)과 균수를 측정하였다. *Propionibacterium acnes*의 경우 균주의 생육이 느린 점을 감안하여, 성장도중 4시간 지점에서 Lactobiocin을 첨가하여 OD값과 균수를 측정하였다.

Fig. 1은 Lactobiocin을 첨가 후 시간대별로 Optical Density (650nm)를 측정한 결과를 나타내었다. A, B, C, D 모두 유의성 있게 bacteriocin의 첨가 농도에 따라 균의 성장 저해가 이루어짐을 볼 수 있다. 배양 후 3시간 이후부터 균의 성장 저해가 뚜렷해지기 시작하며, 5시간 후에는 육안으로 판별 가능한 정도의 흡광도 차이를 보였다. *P. acnes*의 경우 4시간 배양 후 Lactobiocin을 첨가하여 배양한 결과, Lactobiocin 첨가 20시간 경과 후 대조군과 현저한 차이를 나타냈으며, 적용되어진 균주 모두 최소 10unit의 처리에도 확실한 성장억제 효과를 얻을 수 있었다.

*Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 Lactobiocin에 대한 여드름 및 피부 염증 유발균주의 항균력을 측정한 결과 Fig. 1과 Fig 2., Table. 2.에서 볼 수 있듯이 여드름 생성에 가장 직접적인 영향을 미치는 *Propionibacterium acne*에서 각 처리농도에 따라 Lactobiocin의 처리시 Tea tree oil, Triclosan보다 억제효능이 가장 우수하게 나타났으며, Lactobiocin의 경우 기타 피부 염증 유발에 관여하는 피부상재균 *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* 모두에서 양호한 억제 효과를 나타내는 반면에 Tea tree oil은



*Propionibacterium acnes*에서, Triclosan의 경우 *Staphylococcus epidermidis*와 *Propionibacterium acnes*에서 억제 효과를 보였으며 *Streptococcus pyogenes*의 경우도 약하게나마 억제효과를 나타내었다.

Table. 2. Growth inhibition clear-zone forming the sample efficacy.

Sample	Microorganism tested ( $1 \times 10^7$ cfu)	Inhibition Zone(mm)		Inhibition Zone(mm)		Inhibition Zone(mm)	
		2.5% Sol'n		5.0% Sol'n		10.0% Sol'n	
		Paper disc	Cylinder	Paper disc	Cylinder	Paper disc	Cylinder
Lactobiocin	<i>S.epidermidis</i>	+	13	++	15	+++	16
	<i>S.aureus</i>	+/-	10	+	13	++	15
	<i>S.pyogenes</i>	+	14	++	15	++++	22
	<i>P.acne</i>	+	14	+++	15	+++++	25
Tea tree oil	<i>S.epidermidis</i>	+/-	0	+	0	+	12
	<i>S.aureus</i>	+/-	0	+	0	+	13
	<i>S.pyogenes</i>	-	0	+/-	0	+/-	0
	<i>P.acne</i>	+/-	10	+	14	++	16
Triclosan	<i>S.epidermidis</i>	+	0	++	12	+++	15
	<i>S.aureus</i>	-	0	+/-	0	+/-	0
	<i>S.pyogenes</i>	+/-	0	+	10	++	13
	<i>P.acne</i>	+	11	++	14	++++	20

- : 저지환 생성 못함, +/- : 저지환생성후 균주 성장, +,++ :약한 저지환생성, +++,++++ : 강한 저지환생성

또한 각 피부 상재균의 억제효과 성장 저지환에서 볼 수 있듯이 투명환의 저해 경계선이 뚜렷하게 나타남으로써 피부 염증 유발균의 저해양상이 Bacteriocidal effect 뿐만 아니라 Bacteriolysis 역할을 하는 것으로 추측할 수 있다.

Bacteriocidal action 및 bacteriolytic action을 확인하기 위하여 Lactobiocin 처리균과 미처리균의 SEM사진을 비교하여 보았다.

Fig. 3에서 볼 수 있듯이 Lactobiocin을 처리하지 않은 Cell들은 세포막의 표면이 매끄러워 보였으나(A, B, C), 대수증식기에서 Lactobiocin을 처리한 Cell들은 표면이 손상되어 구멍이 형성되고 심한 경우에는 용균 현상까지도 관찰되었다.(A-1, B-1, C-1)

Lactobiocin의 억제기작을 조사하기 위하여 핵산물질의 측정은 260nm에서, 단백질성 물질의 측정은 280nm에서 각각 측정하였다. 260/280nm에서 배양 9시간까지 관찰 한 결과, lactobiocin 처리구(500AU)에서는 DNA물질과 단백질성 물질이 유리되는 것으로 나타났다. 이와같은 결과는 Fig 4.에서 보인 결과와 일치하는 것으로 lactobiocin은 세포벽

또는 세포막에 작용을 하는 bacteriolytic action을 하는 것으로 확인되었다.

### 3. Cell cytotoxicity실험 및 인체 첩포실험

*Lactococcus sp.* HY449가 생산하는 Lactobiocin의 in vitro 안전성 실험은 사람 섬유소 세포(Human Fibroblasts HNF ; ATCC CCL-28)에 대한 세포독성(Cytotoxicity)을 측정한 결과 Lactobiocin의 LD<sub>50</sub>은 약 50mg/ml를 나타내었으며 이 농도에서 세포증식 촉진 효과(Cell proliferation effects)는 관찰되지 않았다.

*Lactococcus sp.* HY449가 생산하는 Lactobiocin의 피부 일차자극에 대한 Human Patch 실험을 실시한 결과 및 각각의 시험 물질에 대한 피부일차 자극 첩포(Patch test)시험결과 Table. 3.과 같이 Lactobiocin의 경우 24시간 경과 후 30명의 피험자 중에서 1명의 피험자에게서 의심되는 홍반이 관찰되었으나 1시간 경과 후 곧바로 사라져 자극이 없으므로 판정하였으며, Tea tree oil의 경우 10%의 Patch Base를 첩포한 2명의 피험자에게서 홍반이 관찰되었으며 48시간 지연반응을 나타내지 않아 미세자극으로 판정하였다. Triclosan의 경우 5%와 10% Patch base를 첩포한 5명의 피험자에게서 홍반이 관찰되었으며 3명의 경우 48시간 지연반응도 관찰되어 약한 정도의 피부자극을 유발 할 수 있는 것으로 판정하였다.

Table. 3. 피부 1차 자극 인체 첩포 실험 결과

Sample		0.5hrs	48hrs	72hrs
Lactobiocin	2.5%patch base sol'n	-	-	-
	5.0%patch base sol'n	-	-	-
	10.0%patch base sol'n	-	-	-
Tea tree oil	2.5%patch base sol'n	-	-	-
	5.0%patch base sol'n	-	-	-
	10.0%patch base sol'n	+	?	-
Triclosan	2.5%patch base sol'n	-	-	-
	5.0%patch base sol'n	+	-	-
	10.0%patch base sol'n	++	+	-
Control		-	-	-

<ICDRG 판정기준>

- ① ? (doubtful reaction) : faint macular erythema only , ② + (약양성) : erythema, infiltration, possibly papules  
 ③ ++ (강양성) : erythema, infiltration, papules, vesicles , ④ +++ (초강양성) : bullous  
 ⑤ - (음성) , ⑥ IR (자극성)

## IV. 결론

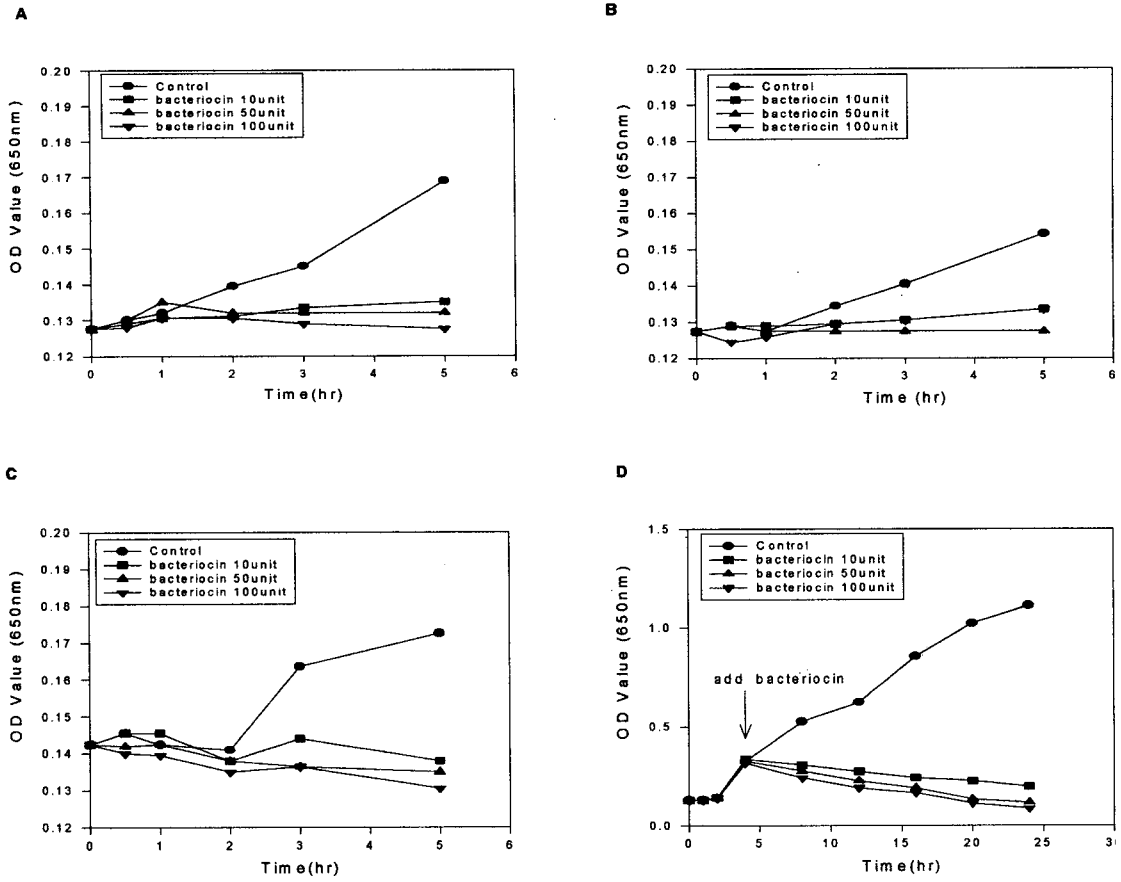
본 연구의 결과는 피부 염증 및 여드름의 치료 또는 예방의 목적을 위해 *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 Bacteriocin의 일종인 Lactobiocin이라는 항생물질을 분리해 내고, 이를 함유한 화장료가 피부에 상재하는 염증 및 여드름 유발 균총의 증식을 억제할 뿐만 아니라 용균 작용을 가지며, 제품의 방부력 증강 시너지 효과를 가질 수 있는 장점을 알 수 있었다. 또한, 일반 합성 항생제와 달리 천연 발효액을 이용함으로써 피부세포 독성 및 피부자극도가 낮은 항 여드름 효과와 피부염증 억제 효능을 지닌 피부 화장료의 개발에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 인용문헌

1. Tagg, J. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:722-756.
2. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:39-86.
3. Kim, W. J. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Their potentials as food biopreservative. *Food Rev. Intl.* 9:299-313.
4. Montville, T. J. and A. L. Kaiser. 1993. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature diversity, and relationship to bacteriocins, p. 1-22. *In* D. G. Hoover and L. R. Steenson (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press, New York.4.
5. Oh, S. 2001. Characteristics of class II bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Kor. Dairy Technol. & Sci.* vol 19 (in printing).
6. Hirsch. A. 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 5; 208-221
7. kim, S. K., S. J. Oh, S. J. Lee, Y. J. Baek, and Y. H. Park. 1994. Isolation of bacteriocin-producing *Lactococcus* sp. HY 449 and its antimicrobial characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22;259-265
8. Holo, H., O. Nilssen, and I. Nes. 1991. Lactococcin A. a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol* 173: 3879-3887
9. Peter G, Smith AL, Group A Streptococcal infections of the skin and pharynx. *N Engl J. Med* 297: 311, 1977
10. Steele RW, Recurrent Staphylococcal infection in families. *Arch Dermatol* 116:189, 1980
11. Melish ME, Staphylococci, Streptococci and the skin. *Semin Dermatol* 1:101, 1982
12. Leyden JJ, McGinley KJ, Cavalieri S, et al, *Propionibacterium acnes* resistance to antibiotics in acne patients. *J. Am Acad Dermatol*, 8:41, 1983
13. Feibleman CE, Rasmusaen JE, Gram-negative acne. *Cutis* 25:194, 1980
14. Yuzuru Hashimoto. *Fragrance Journal*. Bacterial flora of the scalp. No.39. vol.7. (1979) p14-20

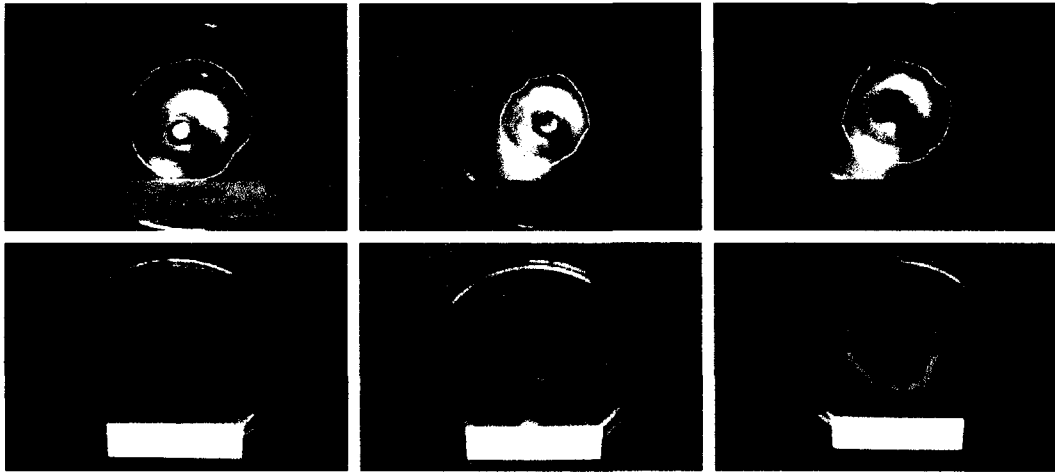
15. Marples P., The microflora of the face and acne lesions, *J. Invest. Dermatol.*, 62, 326-332 (1974)
16. Arnold HL. Odom RB. and James WD., *Andrew's Diseases of the skin, Clinical dermatology*, 8th Ed. WB Saunders Co. Philadelphia. 1990, pp250-258
17. Kim, S. K., S. J. Lee, Y. J. Baek, and Y. H. Park. 1994. Mode of Action of Bacteriocin Produced by *Lactococcus* sp. HY 449 against *Lactobacillus fermentum* IFO 3023. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 3, 266-270
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63
19. CTFA safety testing guideline, The Cosmetics, Toiletry, and Fragrance Association Inc, Washington D. C., 20023, (1991).
20. Oh, S., S. J. Lee, G. T. Kim, S. K. Kim, Y. H. Park., Y. J. Baek. Purification and partial amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:155-161 (2001)

Fig. 1 Inhibition effect of four kinds bacteria by Lactobioicin.



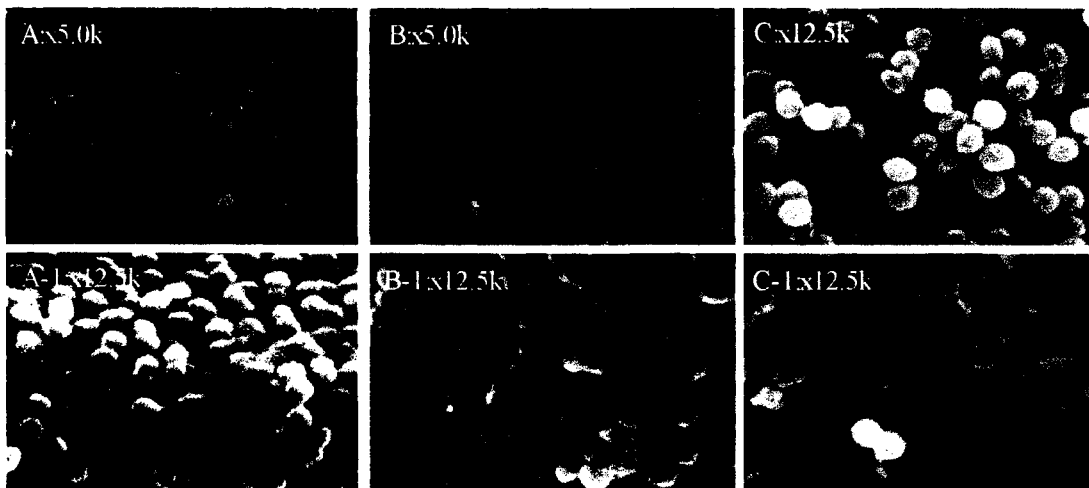
A: *Streptococcus pyogenes*, B: *Staphylococcus aureus*,  
C: *Staphylococcus epidermidis*, D: *Propionibacterium acnes*.

Fig. 2 Growth inhibition of each bacteria by Lactobiocin, tee tree oil, triclosan.



A:*Propionibacterium acnes* treated with 10.0% Lactobiocin. B:*Propionibacterium acnes* treated with 10.0% Tea tree oil. C:*Propionibacterium acnes* treated with 10.0% Triclosan. D:*Staphylococcus aureus* treated with 10.0% Lactobiocin. E:*Staphylococcus epidermidis* treated with 10.0% Lactobiocin. F:*Streptococcus pyogenes* treated with 10.0% Lactobiocin.

Fig. 3 Scanning electron micrographs of skin floral microorganism treated with Lactobiocin produced by Lactococcus sp. HY 449.



(A) *Streptococcus pyogenes* untreated control, (B) *Streptococcus aureus* untreated control, (C) *Staphylococcus epidermidis* untreated control, (A-1) Exponential phase *S. pyogenes* treated Lactobiocin, (B-1) Exponential phase *Streptococcus aureus* treated Lactobiocin, (C-1) Exponential phase *S. epidermidis* treated Lactobiocin.

Fig. 4. Changes of U.V absorbances (260nm/280nm) of *Starphylococcus epidermidis* after treatment with lactobiocin(500 AU/ml).

