

뽕잎 추출물배지를 이용한 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*) 균사체 배양액의 여드름균(*Propionibacterium acnes*) 생육억제 효과

박상상¹⁾ · 성숙희¹⁾ · 류영배²⁾ · 조용운¹⁾ · 최영주³⁾ · 박기훈²⁾ · 갈상완¹⁾*

¹⁾진주산업대학교 미생물공학과, ²⁾경상대학교 응용생명과학부, ³⁾신라대학교 식품영양학과

Growth Inhibition of *Propionibacterium acnes* by mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mulberry leaf extract

Sang-Sang Park¹, Suk-Hee Sung¹, Young-Bae Ryu², Yong-Un Cho¹, Young-Ju Choi³,
Ki-Hoon Park² and Sang-Wan Gal¹*

¹Department of Microbiological Engineering, JinJu National University, JinJu 660-758,

²Department of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701,

³Silla University Busan 617-736, Korea..

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the growth inhibition of *Propionibacterium acnes* by mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the Mulberry leaf extract. The growth inhibition effect of *P. japonica* mycelial culture broth against *P. acnes* in various concentration of Mulberry leaf extract was the most effective in 3% Mulberry leaf extract. The inhibition effect of *P. japonica* mycelial culture broth against *P. acnes* according to the culture time was the most effective after 25 days mycelial cultivation. As the treating amount of the mycelial culture broth was increased, the growth inhibition effect against *P. acnes* was increased gradually. The growth inhibition effect of mycelial culture broth against *P. acnes* according to the time of heat treatment was active by 45min at 100°C, while it was inactive more than 60min at 100°C. This result suggested that the antibacterial materials are possible to be glycoside or peptides. Taken together *P. japonica* mycelial culture in the Mulberry leaf extract has a possibility to be an element of skin-care cosmetics regulating the acnes.

KEYWORDS : *Propionibacterium acnes*, *Paecilomyces japonica*, growth inhibition

서 론

여드름은 주로 사춘기에 발생하는 모낭피지선의 만성염증성 질환으로 면포, 구진 및 결절 형성을 특징으로 하는 질환이다 (Sohn, et al., 2006.). 여드름의 원인은 확실치 않지만 다양한 인자가 관여하는 것으로 추측된다. 피지선을 자극하는 androgen과 모낭피지에서 번식하면서 피지를 분해하여 유리지방산을 생성하는 *Propionibacterium acnes*가 가장 중요한 요인으로 생각된다 (Lryden et al., 1998, Thiboutot et al., 1999.). 남성호르몬에 의해 피지선이 비대해져 피지분비가 왕성해지고 모낭벽 세포에 이상각화가 일어나 모낭구가 막혀 피지가 배출되지 못하여 정체되면 여기서 *Propionibacterium acnes*가 번식한다 (Ahn et al., 2002, Higaki et al., 2000.). 번식한 *Propionibacterium acnes*가 분비한 lipase가 피지내의 중성지방을 분해하여 유리 지방산이 형성되어 모낭벽을 직

접 자극하고 진피 내로 들어가 염증을 일으켜서 여드름이 발생된다 (Ahn et al., 2002, Downing et al., 1969.). 여드름 관리와 치료의 목적은 반흔의 생성을 방지하며, 통증부위를 최소화하고, 심리적인 위축감과 스트레스를 감소시키는 데 있다 (Puhvel and Amirian, 1996). 경증 여드름 치료제는 환부 도포약제 (Topical treatment)를 주로 사용하는데 benzoyl peroxide, salicylic acid, sulfur복합체, azelaic acid, 및 retinol 복합제 등이 사용되고 (Bojar et al., 1996, Russeli, 2000), 항생제 연고로서는 erythromycin, clindemycin등이 주로 사용된다 (Ross et al., 1997.). 성숙 정지여드름의 경우 환부 도포약제와 구강복용약이 동시에 이용되며, benzoyl peroxide, clindamycin phosphate, erythromycin, tetracycline, tretinoin등이 주로 사용된다 (Lee and Ch, 2006.). 그러나 항생제에 대한 *Propionibacterium acnes*의 내성획득으로 인해 치료의 어려움이 많은 것으로 보고되고 있다 (Kligman et al., 1977.).

뽕잎은 뽕나무과 (Muraceae)의 뽕나무속 (Murus)에 속하는 식물로서 전 세계적으로 130여 품종이 재배되고 있

*Corresponding author: <sangal@jinju.ac.kr>

다 (Lim, 2005.). 빵잎에는 무기질이 2.7 3.1%, 비타민 성분이 4.1 7.4%나 함유 되어 있고 (Rhee, 2001.), 특히 칼슘, 칼륨과 철 함량이 매우 높고, 아미노산은 메치오닌 등 21종이 함유되어 있으며 또한 kuwanon 등 유기성분을 60 종 이상 함유하고 있다 (Kondo, 1957, Lee et al., 2003.). 또한 빵잎에는 flavones, steroids, triterpenes, 다량의 무기 성분이 다량 존재 하며 (Kondo, 1957.) 이외에도 여러 생리활성에 대한 연구결과가 발표되고 있으며 (Asano et al., 1994), 따라서 다방면에서 기능성 소재로서의 이용 가치가 높을 것으로 사료 된다.

동충하초는 자낭균목(Ascomycota), 핵균강(Pyrenomycetes), 맥강균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하는 *Cordyceps* 속이 대표적이며 그 외에도 이와 관련된 불완전균류가 있다 (Alexopoulos et al., 1996.). 그중 누에 동충하초(*Paecilomyces japonica*) 품종은 국내에서 고유하게 개발된 품종으로 통상 "눈꽃 동충하초"라고 하며 면역자극 활성, 항종양 활성, 저혈당 활성 등의 여러 생리활성이 알려져 있다 (Bea et al., 2000, Shim et al., 1998.).

본 연구는 빵잎 추출물을 배지로 눈꽃 동충하초 균사체 배양시 배양 상등액의 여드름균(*Propionibacterium acnes*) 억제효과를 확인함으로써 여드름 제거 기능성 화장품 조성물로서의 이용가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 버섯 균사체는 경남농업기술원으로부터 분양받은 눈꽃 동충하초(*Paecilomyces japonica*) 균사체를 사용하였으며, 빵잎은 경남 함양군 안의면 일대의 야산에서 서식하는 야생 빵잎을 채취하여, 자연 건조후 분쇄하여 사용하였다. 여드름 균인 *Propionibacterium acnes*는 한국 미생물보존센터(KCCM. 6919)에서 분양받아 조사하였다. 균수 및 펄라닌 측정에 사용된 UV-Vis spectrophotometer는 Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotec, Swiss)을 사용하였고 기타 활성 측정 및 분석에 사용된 시약은 특급시약을 사용하였다.

Propionibacterium acnes 배양

실험에 사용된 여드름 균인 *Propionibacterium acnes*의 배양은 RC(Reinforced clostridial) 배지를 이용하였으며, -70℃에 동결 보존하여 필요시 마다 해동하여 사용하였다. 항균 활성 측정시 균주 배양은 보존중인 균을 1차 RC agar 배지에 48 시간 배양 후, 다시 RC 액체 배지에 접종하여 48 시간 배양하였으며, UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 660nm에서 O.D 1이 되게 균을 RC 액체 배지에 희석하여 사용하였다. 배양 조건은 균주를 접종한 배지를 Anaerobic jar fermenter(Anaerocult ,Mark)에 넣고

산소를 제거한 후, Incubator 넣어 37℃에서 배양 하였다.

빵잎 추출물의 농도별 동충하초 균사체 배양액 제조

동충하초 균사체를 배양하기 위하여 PDB(Potato Dextrose Broth)에 눈꽃 동충하초 균사체를 접종하여 7일간 25℃에서 정체 배양하였다. 빵잎은 앞서 준비된 건조 빵잎을 멸균증류수에 1, 3, 5, 7% 농도로 각각 혼합하고, 기질로는 약 0.5 cm 정사면체 감자 조각 5%를 첨가 하여 동충하초 균사체 액체 배양용 배지를 제조하였다. 그 후 전 배양한 동충하초 균사체 1/ 2 plate를 500 ml 동충하초 균사체 액체 배양용 배지에 접종하여 25℃, 120 rpm의 조건으로 15일 진탕배양 하였으며, 배양이 완료된 후 배양액을 회수하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 0.2 μm syringe filter (Sartorius, Germany)로 여과하여 4℃에 보관하며 빵잎 추출액 농도별 동충하초 균사체 배양액 시료로 사용하였다.

빵잎 추출물에 동충하초 균사체 배양일수별 배양액 제조

빵잎 추출물 배지에 접종할 액체 배양용 동충하초 균사체를 배양하기 위하여 PDA(Potato Dextrose agar)에 눈꽃 동충하초 균사체를 접종하여 7일간 25℃에서 정체 배양하여 사용하였다. 빵잎은 앞서 준비된 건조 빵잎을 멸균증류수에 3% 농도로 혼합하고, 기질로는 약 0.5 cm 정사면체 감자 조각 5%를 첨가 하여 동충하초 균사체 액체 배양용 배지를 제조하였다. 그 후 전 배양한 동충하초 균사체 1/ 2 plate를 500 ml 동충하초 균사체 액체 배양용 배지에 접종하여 25℃, 120 rpm의 조건으로 진탕배양 하였으며, 배양일을 5, 10, 15, 20, 25, 30일 간격으로 각각 배양후 배양액을 회수하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 0.2 μm syringe filter (Sartorius, Germany)로 여과하여 4℃에 보관하며, 3% 빵잎 추출액에 동충하초 균사체 배양일수별 활성 측정 시료로 사용하였다.

배양일수별 단백질 패턴 확인

빵잎 추출물에 동충하초 균사체 배양 날짜별 단백질 패턴을 확인하기 위하여, 앞서 배양일수별 배양된 배양액을 12% acrylamide gel에 각 배양액 100 μl를 전기 영동 하였다. 그 후, Coomassie blue 염색법에 의하여 염색하여 protein 발현 양상을 확인하였다.

디스크법(Disk Diffusion test)에 의한 항여드름균 활성 측정

앞서 배양된 배양액의 여드름균에 대한 항균 활성을 측정하기 위하여 배양된 *P. acnes*를 RC 고체배지에 100 l 놓은 후, glass bead (5.0 mm)를 이용하여 도말 하였다. 그 후, 준비된 시료를 각각의 농도별로 paper disk에 농축시켜서 처리 하였다. 이때 시료의 농축은 Dry oven을 이용하여 37℃에서 농축하여 사용하였다. 배양은 Anaerobic jar

를 이용하여 혐기적 상태를 만들어준 후 37°C에서 2일간 배양하였다.

배지별 동충하초 균사체 배양액 제조

여러 배지에서 동충하초 균사체를 배양했을 때와 뽕잎 추출물에 배양했을 때의 차이점을 조사하기 위하여, 배지별 동충하초 균사체 배양액제조를 위하여 기질로 쓰이는 5% 감자만으로 만든 배지와 합성 배지인 PD broth와 3% 뽕잎 추출물 배지를 500 ml 씩 제조하였다. 그 후 액체 배양용 동충하초 균사체를 사용하기 위하여 PD agar 배지에 눈꽃 동충하초 균사체를 접종하여 7일간 25°C에서 정체 배양한 것을 사용하였다. 앞서 준비된 각 배지에 PD agar에 배양된 동충하초 균사체를 1/2 plate를 접종하여 25°C, 120 rpm 의 조건으로 25일간 배양하였다. 그 후 배양이 완료된 배양액을 회수하여 13,000 rpm 에서 10분간 원심 분리 후 상등액을 0.2 µm syringe filter (Sartorius, Germany)로 여과하여 4°C에 보관하며 배양 뽕잎 추출액에 배지별 균사체 배양액 시료로 사용하였다.

뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 배양액의 열 안정성 평가

열에 의한 활성도 변화를 관찰하기 위하여 앞서 배양된 3% 뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 25일 배양액을 E-tube에 넣고, 100°C의 온도에서 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 씩 각각 처리한 후 각 시료 350 µl를 paper disk에 농축하여 여드름균 생육활성 억제 효과를 조사하였다.

결과 및 고찰

뽕잎의 농도별 여드름균 항균 활성 측정

각각의 농도의 뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 배양 후 그 배양액을 이용한 *P. acnes* 생육 억제 활성을 측정된 결과 1% 농도에서는 직경 1 cm, 3% 농도에서는 직경 1.8 cm, 5% 농도에서는 직경 1.6 cm, 7% 농도에서는 직경 1cm의 생육 억제 활성 환을 관찰 할 수 있었다 (그림. 1). 하지만 동충하초 균사체를 배양하지 않은 control의 경우 아무 활성도 관찰되지 않았다. 이의 결과로 볼 때 뽕잎의 농도가 3%일 때 가장 높은 활성을 나타냈으며 그 이상의 농도에서는 활성의 크기가 낮아지는 것을 확인 하였으며, 이는 뽕잎 3%의 농도가 동충하초 균사체의 여드름 생육 억제 활성 물질의 분비가 가장 높은 농도이며, 이후 농도에서는 동충하초의 생육이 뽕잎 추출물의 높은 농도에 의하여 저해되어서 활성물질의 분비가 감소된 것으로 판단된다.

동충하초 균사체의 배양 날짜별 여드름균 항균 활성 측정

3%의 뽕잎 농도에 동충하초 균사체를 날짜별 배양시 배양액의 여드름균 생육 억제 활성을 측정된 결과 그림 2에서와 같이 배양 10일 이후 배양일수가 증가 될수록 활성의 크기가 증가됨을 확인 할 수 있었다. 그러나 배양 25일 이

Legend of figure

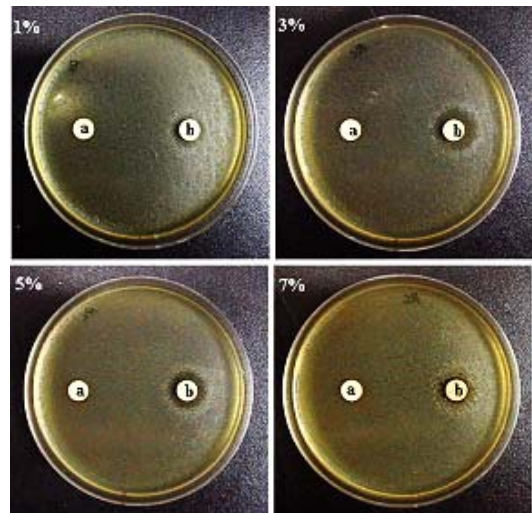
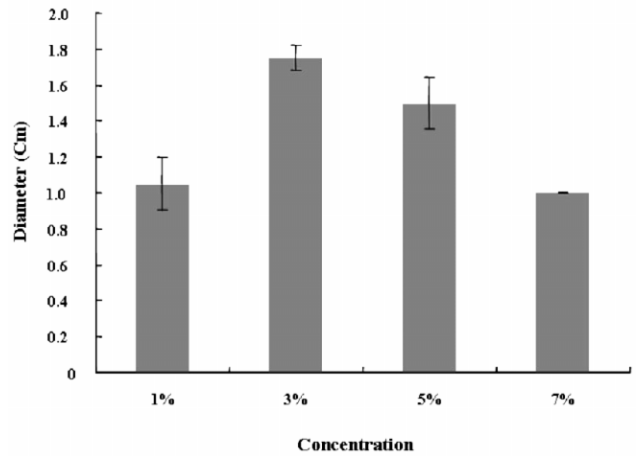


Fig. 1. Growth inhibition of *P. acnes* by treatment of mycelial culture broth of *P. japonica* in each concentration of Mulberry leaf extract for 15 days.

- A : graphs of growth inhibition effect of *P. acnes*
- B : photographs of petri-dish
- a : treated with mulberry leaft extract of each concentration
- b : treated with mycelial culture broth of *P. japonica* in each concentration of Mulberry leaf extract

후에는 활성의 증가가 나타나지 않으며, 가장 높은 여드름균 생육 억제 활성을 나타내는 적절한 배양 일수는 25일임을 확인 할 수 있었다. 또한 10일 이후에 활성이 나타나는 것을 볼 때, 뽕잎추출물에 동충하초 균사체 배양액의 여드름균 생육 억제 물질은 동충하초 균사체의 1차 대사산물이 아닌 2차 대사산물인 것으로 판단된다.

배양일수별 단백질 패턴 확인

3%의 뽕잎 농도에 동충하초 균사체 배양일수별 단백질

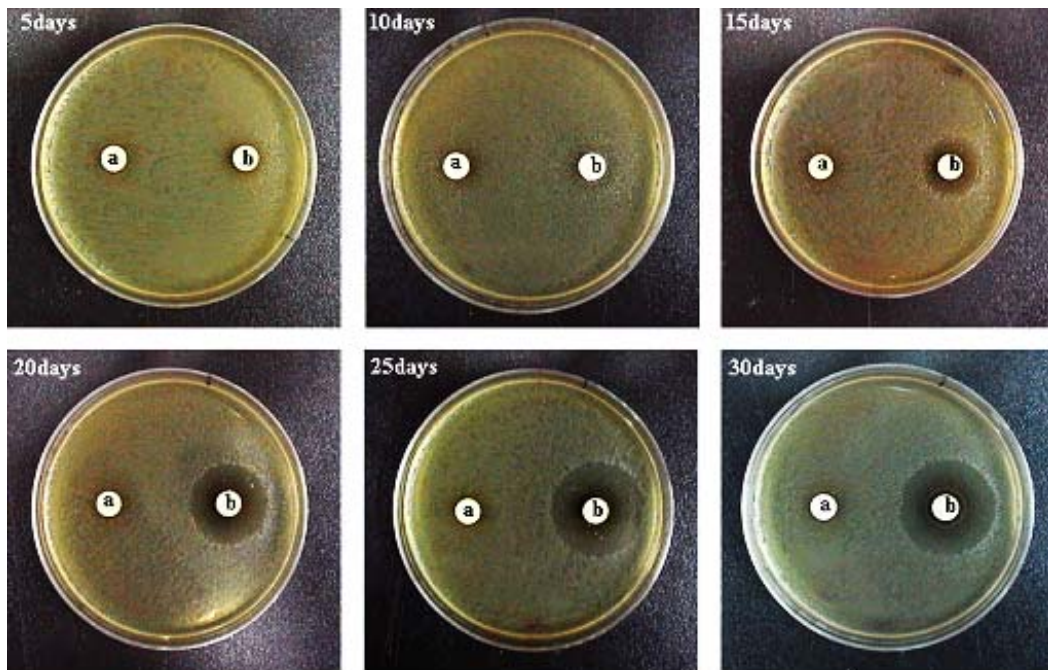


Fig. 2. Growth inhibition of *P. acnes* by treatment of the time-course mycelial culture broth of *P. japonica* in 3% Mulberry leaf extract.
 a : control
 b : treated with mycelial culture broth of *P. japonica* in 3% Mulberry leaf extract

패턴을 확인한 결과 그림 3과 같이 날짜가 증가 될수록 단백질 발현량이 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 배양 15일 이후에 뚜렷한 단백질 발현을 확인 하였으며, 배양 25일과 30일의 단백질 발현 차이는 거의 없음을 확인하였다. 이 결과로 볼 때 배양 15일 이후에 동충하초 균사체 배양으로 단백질이 발현되었으며, 이로 인하여 여드름균 생육 억제 활성이 나오는 것으로 사료된다. 또한 배양 25일과 30일의 단백질 생성 차가 별로 없는 것으로 보아 최적 배양일수는 25일인 것을 다시 한 번 확인 할 수 있었다.

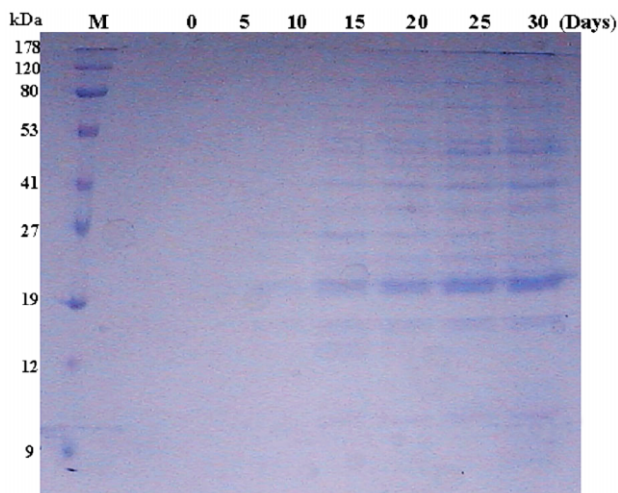


Fig. 3. Protein patterns in the time-course mycelial culture broth of *P. japonica* in 3% Mulberry leaf extract.

배지별 동충하초 균사체의 항 여드름균 활성 비교

각기 다른 종류의 배지를 이용한 동충하초 균사체 배양액의 여드름균 생육 억제 활성을 확인 한 결과 그림 4와 같이 뽕잎이 첨가되지 않은 5% 감자 배지의 경우 여드름균 생육 억제 활성을 확인 할 수 없었으며, 합성 배지인 PDB에 배양결과 직경 1.8 Cm 정도의 여드름균 생육 억제 활성이 나타났으나 3% 뽕잎이 첨가된 배지에서는 직경 2.4 Cm로 가장 큰 여드름균 생육 억제 활성을 확인 할 수 있었다. 이 결과로 볼 때 동충하초 균사체가 기질인 5% 감자 배지

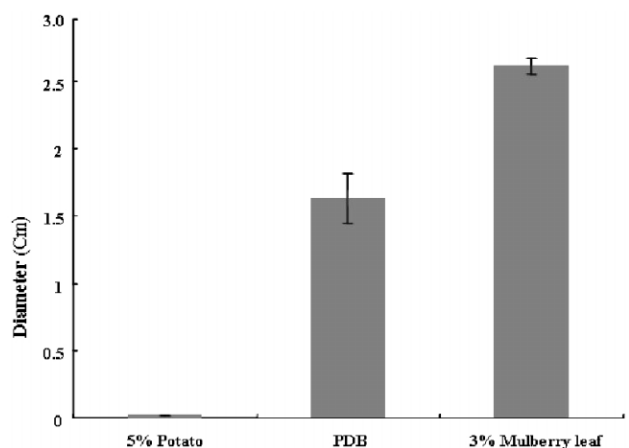


Fig. 4. Growth inhibition of *P. acnes* by treatment of the mycelial culture broth of *P. japonica* in each media for 25days.

에 배양시 여드름균 생육 억제 활성은 나타나지 않았으며, 합성 배지인 PD broth에서 여드름균 생육 억제 활성을 나타내지만, 3% 뽕잎 추출물이 첨가된 천연 배지의 배양액이 여드름균 생육 억제 활성이 가장 높음을 확인 할 수 있었다. 이는 동충하초 균사체가 뽕잎의 여러 가지 물질을 이용하여 여드름균 항균 물질을 생성하는 것으로 판단되며 이를 이용한 천연 여드름균 생육 억제 화장품 제재로서 이용가능성을 확인할 수 있었다. 또한 뽕잎을 이용한 동충하초 균사체 배양액의 미백 활성 (Park et al., 2007.), 동충하초 균사체 배양액의 피부 독성 실험 (Lee et al., 2006.)은 보고된 바가 있어 피부에 부작용이 없는 여드름 치료 화장품 소재로 이용 가능한 것으로 판단된다.

뽕잎추출물에 동충하초 균사체 배양액의 농도별 여드름균 생육 억제 활성 측정

3% 뽕잎 추출물에 25일간 동충하초 균사체 배양액의 농도별 여드름균 생육 억제 활성을 측정한 결과 그림 5와 같이 50 μ l에서 약한 활성을 관찰하였으며 처리 농도가 증가될수록 여드름균 생육 억제 활성이 증가됨을 확인 할 수 있었다.

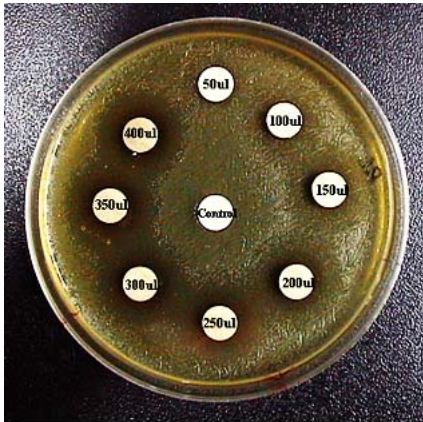


Fig. 5. Growth inhibition of *P. acnes* according to treatment concentration of mycelial culture broth of *P. japonica* in 3% Mulberry leaf extract for 25days.

뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 배양액의 열 안정성 조사

뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 배양액의 열에 의한 안정성을 조사한 결과 그림 6과 같이 100°C에서 각 시간대 별로 처리 하였을 때 열을 처리하지 않은 control에 비하여 처리 시간이 증가 될수록 여드름균 생육 억제 활성은 감소되긴 하지만, 여드름균 생육 억제 활성이 100°C의 열에도 45분까지 그 활성을 유지하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과로 볼 때 여드름균 생육 억제 물질이 상당히 열에 안정한 것으로 판단되며 이것을 이용한 화장품 제조 시 가해지는 열에도 활성이 실활되지 않을 것으로 사료 된다.

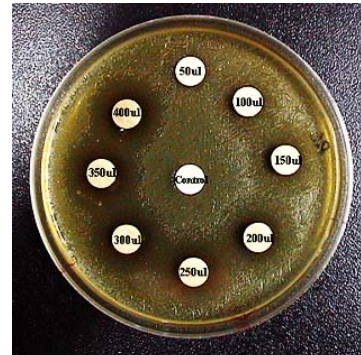


Fig. 6. Growth inhibition of *P. acnes* after heating at 100°C for 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min of mycelial culture broth of *P. japonica* in 3% Mulberry leaf extract for 25days.

요 약

본 연구는 뽕잎 추출물에 눈꽃 동충하초 균사체(*Paecilomyces japonica*) 배양액의 *Propionibacterium acnes*에 대한 생육 억제 활성을 조사한 것이다. 배양 배지내의 뽕잎 추출물 농도는 3%일 때 가장 높은 여드름 균 생육 억제 활성이 나타났으며, 3% 농도의 뽕잎 추출물을 이용한 균사체 배양 날짜별 활성은 25일 배양시 가장 높은 여드름 균 생육 억제 활성을 확인할 수 있었다. 또한 여드름 균에 생육 억제 활성을 가지는 물질은 동충하초 균사체의 2차 대사산물로 판단 할 수 있었다. 뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 배양액의 처리농도별 여드름 활성은 처리 농도가 상승할수록 증가하였다. 그리고 5% 감자만을 넣고 배양하였을 경우 여드름 균의 활성이 나타나지 않았으며, 합성 배지인 PDB를 사용 시 뽕잎 추출물을 이용해 배양하였을 때보다 낮은 활성을 나타내었다. 또한 뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 배양액의 여드름균 생육 억제 활성의 열 안정성을 확인하기 위한 열처리 결과, 100°C에서 45분 까지 열에 안정함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 뽕잎 추출물에 동충하초 배양액의 여드름균 생육 억제 물질은 배당체 또는 peptide 인 것으로 판단된다.

따라서, 뽕잎 추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액은 여드름균 생육 억제 활성이 뛰어나며, 열에 안정한 천연 여드름 억제 화장품료 조성물로서의 이용가능성이 확인 하였다.

감사의 글

본 연구는 2006-2007년 농림부 농림기술개발과제(관리번호 : 105100-3)와 진주산업대학교 기성회 연구비로 수행중이며, 이 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, B. K., Choi, E. H. and Lee, S. H. 2002. The pathogenesis of acne. JSBR, 4 : 62-70.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. and Blackwell, M. 1996. Introductory mycology. Fourth edition. Jone Wiley and Sons, INC, pp.307
- Asano, N., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. 1994. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the *Morus bombycis*. Carbohydr. Res. 253 : 235-253.
- Bea, J. T., Shina, J., Park, J. P., Song, C. H. and Yun, J. W. 2000. Optimization of submerged cultures condirions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. J. Microbiol. Biotechnol. 10 : 482-487.
- Bojar, R. A., Cunliffe, W. J. and Holland, K. T. 1995. The short-term treatment of acne vulgaris with benzoyl peroxide: effects on the surface and follicular cutaneous microflora. British Journal of Dermatology. 132 : 204-208.
- Downing, D. T., Strauss, J. S. and Pochi, P. E. 1969. Variability in the chemical composition of human skin surface lipids. J. Invest Dermatol. 53 : 322-327.
- Higaki, S., Kitagawa, T., Kegoura, M., Morohasi, M. and Yamagishi, T. 2000. Correlation between *Propionibacterium acnes* biotype, lipase activity and rash degree in acne patients. J. Dermatol. 27(8) : 519-522.
- Kligman, A. M., Leyden, J. J. and Stewart, R. 1977. New uses for benzoylperoxide: a broad-spectrum antimicrobial agent. Int. J. Dermatol. 167 : 413-417.
- Kondo, Y. 1957. Trace constituents of mulberry leaces. Nippon Sanshigaku Zasshi, 26 : 349-353.
- Lee, K. S. and Choi, J. S. 2006. Biochemical properties, isolation & identification of *Propionibacterium acnes* picked from acne lesion. J. Kor. Soc. Cloth. Ind. 8(5) : 571-576.
- Lee, W. C., Kim, A. J. and Kim, S. Y. 2003. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. Food Science and Industry. 36 : 2-14.
- Lee, Y. H., Choi, U. S., Park, K. H., Choi, Y. J. and Gal, S. W. 2006. Anti-wrinkle effect of mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts. Kor. J. Lif Science. 16(3) : 516-521.
- Lim, M. J. 2005. Physiological activity and physicochemical properties of *Morus alba* leaf tea. Ms. Thesis. Jinju National University. pp. 1. Jinju, Korea
- Lryden, J. J., McGinley, K. J. and Vowels, B. 1998. *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. Bermatology. 196 : 55-58.
- Park, S. S., Ryu, Y. B., Lee, Y. H., Cho, Y. U., Cho, S. J., Choi, T. J., Park, K. H. and Gal, S. W. 2007. Inhibition of melanin synthesis by mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mulberry leaf extract. Kor. J. Life Science. 17(6) : 816-821.
- Puhvel, S. M. and Amirian, D. A. 1996. Bacterial flora of comedones. British Jounal Dermatology. 101 : 543-548.
- Rhee, S. K. 2001. Varietal comparison of composition characteristics in several mulbarry leaves produced in korea. J. Korean Prof. Emgeeners. Association, 34(3) : 68-73.
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., Jones, C. E., Ratyal, A. H., Miller, Y. W., Vyakrnam, S. and Cunliffe, W. J. 1997. Clinical Resistance to Erythromycin and Clindamycin in Cutaneous *Propionibacteria* Isolated from Acne Patients Is Associated with Mutations in 23S rRNA. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 41(5) : 1162-1165.
- Russeli, J. J. 2000. Topical therapy for acne. American family physician, 61(2) : 357-360.
- Shim, J. O., Son, S. G., Yoon, S. O., Lee, Y. S., Lee, T. S., lee, S. S. Lee, K. D. and Lee, M. D. 1998. The optimal factors for the mycelial growth of *Sparassis crispa*. Kor. J. Mycol. 26 : 36-46.
- Sohn, H. Y., Kim, Y. S., Kum, E. J., Kwon, Y. S. and Kun, H. S. 2006. Screening of anti-acne of natural products against *Propionibacterium acnes*. Kor. J. Microbiol Biotechnol. 34(3) : 265-272.
- Thiboutot, D., Gilliland, K., Light, J. and Lookingbill, D. 1999. Androgen metabolism in sebaceous glands from subjects with and without acne. Arch Dermatol. 135 : 1041-1045.