Journal of Life Science **2009** Vol. 19. No. 1. 94~100 ©JLS / ISSN 1225-9918

피부질환 원인균에 대한 자몽종자추출물과 법제유황수의 항균 효과

하유미[1] · 이보배[1] · 배희정[1] · 제경모[2] · 김순래[2] · 최재석[1] · 최인순[1,3]*

[1]신라대학교 RIS사업단, [2](주)웰바이코리아, [3]신라대학교 생명과학과

Received October 20, 2008 / Accepted December 16, 2008

Anti-microbial Activity of Grapefruit Seed Extract and Processed Sulfur Solution against Human Skin Pathogens. Yu-Mi Ha[1], Bo-Bae Lee[1], Hee-Jung Bae[1], Kyoung Mo Je[2], Soon Rae Kim[2], Jae-Suk Choi[1] and In Soon Choi[1,3]*. [1]*RIS Center, Industry-Academic Cooperation Foundation, Silla University,* [2]*WellbuyKorea Co. Ltd,* [3]*Department of Biological Science, Silla University, Busan 617-736, South Korea* - This study was carried out to examine the antimicrobial effects of grapefruit seed extract (GSE) and processed sulfur solution (PSS) against human skin pathogens: *Malassezia furfur*, *M. restricta*, *Propionibacterium acnes*, *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*. The antimicrobial effects of GSE and PSS were tested by agar diffusion method and micro broth dilution method. As the results, the MIC values of GSE against *M. furfur*, *M. restricta*, *P. acnes*, *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* were 3.91, 3.91, 0.004, 0.024, and 0.012 μl/ml, respectively. The MIC values of PSS were 0.03, 0.03, 0.156, 0.003, and 0.012 μl/ml, respectively. Antimicrobial activity of skin care emulsion products containing 0.5% GSE and 0.5% PSS against human skin pathogens were 5.2, 4.3, 8.0, 9.5 and 12.8 mm, respectively. Refractive index, pH, viscosity and color value of skin care emulsions containing GSE and PSS were measured. According to these results, it was concluded that the GSE and PSS were the promising sources of antibacterial agent which could be useful for skin and hair care products as well as for the alternative medicine development in treatment of certain types of skin ailments.

Key words : Antimicrobial activity, grapefruit seed extract, processed sulfur solution, human skin pathogens, skin care emulsion products

서 론

피부는 외부환경과 항상 접하고 있는 기관으로, 외부로부터 인체를 보호하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나 인간의 피부에 상주하는 다양한 균들에 의해서 많은 피부질환들이 발생하고 있는데, 그 중 가장 대표적인 질환으로 비듬 및 지루성 피부염, 여드름 그리고 무좀 등을 꼽을 수 있다.

비듬은 두피의 노화 각편이 쌀겨모양으로 탈락하는 것으로 피지의 분해 산화물이 혼합된 상태로 살아있는 피부 세포에서 생겨나게 되는 신진대사의 부산물을 말한다[35]. 비듬 생성에 관여하는 두피 상주미생물은 *Malassezia* sp.이며, 주 원인균으로 알려진 *M. restricta*는 두피에 상재하여 여러 가지 환경적 요인과 생리적 요인에 의해 모낭 내에서 과다하게 증식하여 비듬을 생성하게 된다. 또한 등, 목덜미 등의 피부에 상재하는 *M. furfur*는 이상증식하여 지루성 피부염을 유발한다[12]. 여드름은 일반적으로 호르몬과 외부적 영향에 의해 피지가 모낭관 밖으로 배출되지 못하여 피부 모공이 막힌 경우, 피부 상재 세균들의 증식에 의해 야기되는 것으로 알려져 있으며 대표적인 여드름 원인균으로는 *Propionibacterium acnes*가 있다[28]. 무좀의 원인균은 *Trichophyton* sp.이며, 주 원인균으로는 *T. mentagrophytes*와 *T. rubrum*이 알려져 있다. 주로 고온 다습한 여름철에 손과 발에 발생하는 피부병이나, 생활환경, 직업, 면역상태 및 무좀균의 종류 등에 따라 신체의 어느 부위에나 발생이 가능한 것으로 알려져 있다[26].

현재 비듬 및 지루성 피부염의 치료제로는 zinc pyrithion [33], terbinafine [27] 그리고 Ketoconazole과 같은 azoles계 화합물들[13,37]이 사용되고 있다. 여드름에 대한 치료에는 tetracycline, erythromycin, clindamycin 등이 사용되고 있으며[34], 무좀의 치료에는 terbinafin, imidazole 계열의 fluconazole, ketoconazole과 itraconazole 등이 사용되고 있다[10]. 그러나 이러한 화학물질과 과도한 항생제의 사용은 부작용과 안정성[4,17,32,40]에 대한 문제를 야기 시키고 있어 이를 대체할만한 천연 항균물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[9,26,38].

자몽종자추출물(grapefruit seed extract; GSE)은 limonoid, limonoid glucoside, naringenin, naringin, quercetrin, kaempferol, hesperetin 및 apigenin 등 수종의 flavonoid와 stigmasterol, campesterol 및 β-sitosterol 등의 sterol을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 함유된 naringin 등의 flavonoid는 항균 효과, 금속 킬레이트화 효과, 항산화 효과, 유리기 봉쇄 효과, 항돌연변이 유발 효과, 항염증 효과 및 항아테롬 형성 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다[16]. GSE의 항균 효과는 *Escherichia coli, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus,*

*Corresponding author
Tel : +82-51-999-5645, Fax : +82-51-999-5644
E-mail : ischoi@silla.ac.kr

Vibrio Cholerae 및 V. parahaemoiyticus 등의 식중독균에 대한 연구가 대부분이며[5,7,8,19], 피부질환 미생물과 관련된 연구는 매우 미흡한 실정이다[1,11,21].

유황은 인체에 직접적으로 투여될 경우 독성이 강하여 부작용을 초래하는 것이 일반적이다. 따라서 독성이 있는 유황은 법제를 통하지 않고서는 약으로 쓰이지 않으며[6], 국내에서도 법제 유황의 경구투여가 실험용 쥐의 간에 있어서 특기할 만한 간 독성을 유발하지 않고 안전성이 확보된다고 보고하고 있다[36].

서양의학에서는 의약품으로 국부자극제, 피부질환, 변비, 치질 등에 이용하였고 동양에서는 그 독성을 제거 후 지혈작용, 신경마비, 냉수족 등을 치료하는 약품으로 사용하였을 뿐만 아니라[7], osteocalcin과 estrogen을 유의성 있게 증가시켜 골다공증 등의 골질환 사용가능성에 대해서도 보고하고 있다[22]. 또한 마늘과 양파 추출물에 있는 함유황유기화합물은 현대적인 항생제가 나오기 전, 티푸스, 콜레라, 이질과 같은 질병의 치료약으로 널리 사용되어 왔으며[2,3], 병원성 미생물의 생육을 억제하는 것으로 보고되고 있다[24]. 유황 자체의 독성을 제거한 법제유황의 제조방법에 대해서는 많이 보고되어 있지만[6] 피부질환 원인균에 대한 연구 결과는 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 미생물의 생육을 억제하는 것으로 알려진 GSE와 법제유황수(PSS)의 피부질환 예방 및 치료제로서의 가능성을 조사하고자, 비듬균 2종, 여드름균 1종 및 무좀균 2종에 대한 항균 효과 및 시제품의 특성과 항균 활성에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

실험 재료

실험 재료로 사용된 GSE는 시판되고 있는 천연항균제 DF-100 (Chemi Research & Manufacturing Co., Inc, USA)을 사용하였으며, GSE 70%와 glycerine 30%로 구성되어 있다. PSS는 신미산업(Busan, Korea)에서 생산한 제품을 사용하였으며, 제조 방법은 다음과 같다. 먼저 유황 20 g과 수산화칼슘 25 g을 증류수 140 ml에 함께 혼합하고, 100°C로 가열하여 용해시킨 후, 촉매로 황산나트륨 5 g과 염화칼슘 2 g을 첨가하여 130°C로 2시간 가열하여 반응시킨 후, 시트르산(citric acid) 3 g을 첨가하고 180°C로 2시간 가열하여 반응시킨 다음, 상기반응물을 침전, 여과하여 얻어진 상등액 120 ml을 PSS (유황함량: 117,000 ppm)로 하였다[15].

사용 균주 및 배지 조성

GSE와 PSS의 피부질환 미생물에 대한 항균 효과를 측정하기 위하여 사용된 균주는 *M. furfur* 7743 KCTC, *M. restricta* 7848 KCTC, *P. acnes* 3314 KCTC, *T. mentagrophytes* 6316 KCTC 및 *T. rubrum* 6345 KCTC이며, 모든 균주는 대전에 위치한 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다. *M. furfur* 및 *M. restricta*의 배지 구성 성분은 5% malt extract, 2% ox-bile, 1% tween-40, 1.2% agar이며, 37°C 배양기(VS-1203PFC-L, Vision Science Co., Ltd., Korea)에서 호기성 조건으로 배양하였다. *P. acnes*의 배지 구성 성분은 3.7% brain heart infusion (BHI), 1% glucose, 1% agar이며, 37°C 혐기성 챔버(Anaerobic chamber)인 Bactron Ⅳ Chamber (SHELLAB, USA)에서 배양하였으며, 배양을 위한 혐기조건은 5% CO_2, 10% H_2, 및 85% N_2로 유지하였다. *T. mentagrophytes* 및 *T. rubrum*의 배지 구성 성분은 1% peptone, 4% glucose, 2% agar이며, 각각 35°C 및 28°C에서 호기성 조건으로 배양하였다.

GSE와 PSS의 항균 활성 측정

피부질환 미생물에 대한 GSE와 PSS의 항균 활성은 평판배지확산법(agar diffusion method)으로 측정하였다. 호기성 균주인 *M. furfur*, *M. restricta*, *T. mentagrophytes* 및 *T. rubrum*은 NCCLS Guide Line M2-A8 [29]에 준하여 실험하였고, 혐기성 균주인 *P. acnes*는 NCCLS Guide Line M11-A6 [30]에 준하여 실험하였다. 각 공시균주를 평판배지에 도말 접종한 다음, 직경 8 mm의 멸균된 paper disk (Adventec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 평판배지의 표면에 밀착시켰다. GSE와 PSS 각각을 10, 20, 40 µl/disk씩 또는 3, 5, 10 µl/disk씩 점적하고 37°C로 유지된 혐기성 챔버 및 28°C, 35°C 및 37°C 호기성 배양기에서 48시간 배양하면서 생성된 투명환(clear zone)의 크기를 mm 단위로 측정하여 항균 활성도를 측정하였다.

Broth Microdilution Susceptibility Test

GSE와 PSS의 최소억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하기 위하여 액체배지감수성실험법(Broth Microdilution Susceptibility Tests)을 이용하였다. 최소억제농도를 측정하기 위하여 GSE와 PSS의 농도를 2배씩 연속희석(two-fold serial dilution)하면서 MIC를 측정하는 방법으로 비듬과 지루성 피부염의 원인균인 *M. restricta*와, *M. furfur*, 여드름 원인균인 *P. acnes* 그리고 무좀 원인균인 *T. mentagrophytes*과 *T. rubrum*에 대한 MIC를 측정하였다. 각 균주들의 MIC를 측정하기 위해 *M. restricta*, *M. furfur*, *T. mentagrophytes* 및 *T. rubrum*은 NCCLS Guide Line M27-A2 [31]을, *P. acnes*는 NCCLS Guide Line M11-A6 [30]에 따라 실험하였다.

공시균주를 활성화하기 위해, 각 균주를 적합한 배지에 72시간 동안 전배양하고, *M. restricta*와 *M. furfur*은 0.5 mm Glass bead (Soda lime 0.5 mm Glass beads, BioSpec Products Inc., USA)를 이용하여 균질화 하였으며, *T. mentagrophytes*과

*T. rubrum*은 Tissue Tearor (BioSpec Products Inc., USA)를 이용하여 균질화 시켜 맥파란(Mcfarland) 0.5로 탁도를 조절한 후, 상기 균주 및 포자수가 약 1×10^6 CFU/ml가 되도록 액체배지로 희석하여 균주 현탁액을 준비하였다.

상기 2배씩 연속 희석하여 제조한 시료를 96-well U-form micro plate (Tissue culture testplate, SPL lifesciences, Korea)의 각 well에 100 µl씩 넣고, 상기 최종농도가 약 1×10^6 CFU/ml이 되도록 조정한 대상 균 액을 각 well에 100 µl씩 첨가하였다. 상기 각 시료를 첨가한 후, 각 균주의 배양조건에서 3일간 배양한 후, 균의 성장 정도를 육안 및 도립현미경 (Inverted microscope TMS, Nikon, Japan)으로 관찰하여 MIC를 결정하였고, 모든 시험은 독립적으로 3회 반복하였다.

GSE와 PSS가 함유된 스킨케어 에멀전 시제품의 제조 및 특성

스킨케어 에멀전의 시제품을 제조하기 위해 에멀전 베이스는 바이오생명공학연구소(Hanam, Gyeonggi-do, Korea)에서 제공받았으며, 제조방법은 다음과 같다. 먼저 carbomer, propylene glycol, glycerin, magnolia biondii bark extract, triethanolamine, POE(60) hydrogenated castor oil, ethanol 및 증류수를 섞은 후 70~80°C에서 25~30분간 교반하면서 가열하였다. 상기 반응물을 25~30°C로 냉각 후 90~110 mesh 여과지에 여과 후 사용하였다(Table 3.). 에멀전 시제품을 제조하기 위해 에멀전 베이스에 GSE와 PSS를 각각 0.1%, 0.25% 그리고 0.5%씩 넣어 Vortex Mixer (Vision Scientific CO., LTD. Korea)를 이용하여 혼합하였다. 시제품의 특성을 확인하고자, pH, 점도, 굴절률(Refractive Index) 및 색도를 측정하였다. pH는 Mettler-Toledo GmbH (SevenEasy pH S-20K, Mettler-Toledo GmbH, Switzerland)사의 pH meter를 사용하여 식품의약품안전청 고시 제2007-45호, 화장품 기준 및 시험방법에 따라 25°C에서 보관한 GSE, PSS 그리고 시제품 에멀전의 pH를 측정하였다[23]. 점도는 Brookfield (Brookfield programmable DV-III+RHEOMETER, USA)사의 점도계를 사용하여 25°C에서 스핀들(spindle) No. SC4-25로 1 rpm에서 1분간 측정하였다. 굴절률은 ATAGO (ABBE Refractometer DR-A1, ATAGO CO., LTD. Japan)사의 굴절계를 사용하여 25°C에서 측정하였다. 색도는 광전비색계 (Minolta, CR-200, Japan)를 사용하여 명도(lightness, *L*), 적색도(redness, *a*), 황색도(yellowness, *b*)를 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 이때 표준 백판의 *L*값 98.11, *a*값 -0.33, *b*값 +2.13을 기준으로 실시하였다.

스킨케어 에멀전 시제품의 항균 활성 측정

제조된 스킨케어 에멀전 시제품의 항균 활성을 측정하기 위해 균주별로 상기의 평판배지확산법을 이용하여 측정하였다. 각 공시균주를 평판배지에 도말 접종한 다음, 직경 8 mm의 멸균된 paper disk를 평판배지의 표면에 밀착시켰다. GSE와 PSS가 각각 0.1%, 0.25% 및 0.5%씩 함유된 에멀전 시제품 각각을 40 µl/disk씩 점적하고 각 균주별로 배양조건을 조정한 배양기에서 48시간 배양한 후, 형성된 투명환의 크기를 mm 단위로 측정하여 항균 활성정도를 측정하였다.

결 과

비듬균, 여드름균 및 무좀균에 대한 GSE와 PSS의 항균 활성

비듬균(*M. furfur*, *M. ristricta*), 여드름균(*P. acnes*) 및 무좀균(*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*)에 대한 GSE와 PSS의 항균 활성을 평가하였다(Table 1). GSE의 농도가 높을수록 투명환의 크기가 유의적으로 증가하였으며, 투명환의 크기는 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *P. acnes*, *M. furfur*, *M. restricta* 순으로 높았다. 10 µl/disk의 농도로 GSE를 처리하였을 때 *T. rubrum*에 대한 투명환은 15.0 mm로 나타났다. 동일한 병원성을 유발하는 균들 간의 활성의 크기는 같거나 비슷한 것으로 나타났다.

PSS에 대해서도 농도가 높을수록 투명환의 크기가 유의적으로 증가하였으며 활성의 크기는 *M. furfur*, *M. restricta*, *T. mentagrophytes*, *P. acnes* 그리고 *T. rubrum*의 순으로 나타났다. *M. furfur*의 경우 PSS 10 µl/disk에 대하여 투명환 영역이 7.3 mm였다. 비듬균의 경우 *M. furfur*와 *M. restricta*은 서

Table 1. Anti-microbial activities of GSE and PSS against human skin pathogens (unit: mm)

Strains	GSE (µl/disk)			PSS (µl/disk)		
	10	20	40	10	20	40
Malassezia furfur	1.0±0.1	2.7±0.6	4.3±0.6	7.3±0.6	8.7±0.6	10.3±0.6
Malassezia rstricta	1.0±0.1	2.7±0.6	4.3±0.6	5.7±0.6	9.0±0.1	9.3±0.6
Propionibacterium acnes	12.0±0.0	13.5±0.0	15.0±0.0	-	2.0±0.0	3.0±0.0
	3	5	10	10	20	40
Trichophyton mentagrophytes	9.0±0.0	12.0±0.0	15.0±0.0	2.0±0.5	4.0±0.3	8.0±0.5
Trichophyton rubrum	10.0±0.0	12.0±0.0	15.0±0.0	-	-	3.0±0.2

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.
Differences were considered significant at $p<0.05$.

로 비슷한 활성크기를 보였으나 무좀균의 경우 *T. mentagrophytes*와 *T. rubrum*은 크기에 있어서 PSS 10 µl/disk일 때 *T. mentagrophytes*은 2.0 mm인 반면 *T. rubrum*은 10 µl/disk 및 20 µl/disk에서도 활성을 보이지 않았다.

GSE와 PSS의 최소억제농도(MIC)

M. furfur, *M. restricta*, *P. acnes* 및 *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*에 대한 GSE와 PSS의 MIC 값을 Table 2에 나타내었다. 실험에 사용한 모든 균주에 대하여 GSE와 PSS 모두 항균 활성을 보였으며, GSE의 MIC 값은 *P. acnes*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. restricta* 그리고 *M. furfur* 순으로 높았으며 *P. acnes*의 MIC 값은 0.004 µl/ml로 나타났다.

각 균주에 대한 PSS의 MIC 값은 *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. restricta*, *M. furfur* 그리고 *P. acnes* 순으로 높게 나타났으며 *T. mentagrophytes*의 MIC는 0.003 µl/ml로 나타났다.

GSE와 PSS가 함유된 스킨케어 에멀전 시제품의 물리화학적 특성

에멀전 타입의 로션에 GSE와 PSS를 첨가했을 때의 물리화학적 특성의 변화를 확인하기 위해, 함유량에 따른 pH, 굴절률, 점도 및 색도 변화를 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. GSE와 PSS를 첨가한 에멀전 시제품의 경우 pH가 7.58~7.33으로 에멀전 베이스의 pH 7.71보다 낮았다. 이는 GSE와 PSS 자체의 pH가 각각 산성인 2.32와 알칼리성인 11.31이었고 에멀전 베이스와 함께 섞이면서 중성인 에멀전 베이스의 pH보다 조금 낮아졌기 때문인 것으로 판단된다. 또한, 에멀전 베이스에 GSE와 PSS가 농도별로 첨가된 에멀전 시제품의 굴절률을 측정한 결과 에멀전 베이스의 경우 1.3554의 값을 보였으나 GSE와 PSS가 첨가된 경우 1.3556~1.3562의 값을 나타내어 GSE와 PSS의 함유에 따른 유의적인 차이는 없었다. 또한 함유물의 함유량에 따른 점도를 측정한 결과 9,598~47,930 cps로 에멀전 베이스의 76,784 cps보다 낮아 GSE와 PSS의 함유량이 증가할수록 점도가 다소 감소하는 경향을 보였다. 또한 농도에 따른 색도 변화를 측정한 결과 명도 *L*값은 에멀전 베이스의 경우 85.9의 값을 보였으나 GSE와 PSS가 첨가된 경우 82.8~75.4로 함유량의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 적색도 *a* 값도 0.1~-0.8로 에멀전 베이스 값인 0.1과 같거나 다소 감소하였고, 황색도를 나타내는 *b* 값도 9.2~8.2으로 에멀전 베이스의 값인 11.2보다 다소 감소하는 경향을 보였으나 현저한 차이를 나타내지는 않았다.

Table 2. The MIC values of GSE and PSS on human skin pathogens

Strains	GSE (µl/ml)	PSS (µl/ml)
Malassezia furfur	3.91	0.03
Malassezia restricta	3.91	0.03
Propionibacterium acnes	0.004	0.156
Trichophyton mentagrophytes	0.024	0.003
Trichophyton rubrum	0.012	0.012

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.
Differences were considered significant at $p<0.05$.

Table 3. Ingredients of test emulsion product

Ingredient	% (w/w)
Carbomer	0.25
Propylene glycol	5
glycerin	5
magnolia biondii bark extract	2
Triethanolamine	0.25
POE(60) hydrogenated castor oil	0.4
Ethanol	3
Water	84.1

Table 4. Characteristics of skin care emulsion products made by GSE and PSS

		Test emulsion products			
		a	b	c	d
pH		7.71	7.58	7.45	7.33
Refractive index (nD)		1.3554	1.3556	1.3559	1.3562
Viscosity (cps)		76,784	47,930	21,115	9,598
Color value	(lightness, *L*)	85.9	82.8	77.1	75.4
	(redness, *a*)	0.1	0.1	0.0	-0.8
	(yellowness, *b*)	11.2	9.2	8.5	8.2

a; emulsion products without GSE and PSS. b, c and d; emulsion products with mixtures of GSE and PSS, 0.1, 0.25 and 0.5%, respectively.
All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.
Differences were considered significant at $p<0.05$.

GSE와 PSS가 함유된 에멀전 시제품의 항균 활성

M. furfur, *M. restricta*, *P. acnes* 및 *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*에 대한 GSE와 PSS가 함유된 에멀전 시제품의 항균 활성 결과를 Table 5에 나타내었다. *M. furfur*와 *M. restricta*는 GSE와 PSS의 함유 농도가 0.1%에서는 활성을 보이지 않은 반면, *P. acnes*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*은 0.1%에서도 활성이 있었다. 에멀전 시제품에 대하여 GSE와 PSS의 농도가 높을수록 투명환의 크기가 유의적으로 증가하였다. GSE와 PSS를 각각 0.5%씩 함유했을 때 각 균들에 대한 항균 활성 크기는 *T. rubrum*은 12.8 mm, *T. mentagrophytes*는 9.5 mm, *P. acnes*는 8.0 mm, *M. furfur*는 5.2 mm, *M. restricta*는 4.3 mm로 *T. rubrum*에 대한 항균 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 동일한 병원성을 유발하는 균들 간의 활성의 크기는

Table 5. Anti-microbial activities of skin care emulsion products made by GSE and PSS

Strains	Antimicrobial activity of test emulsion products (mm)			
	a	b	c	d
Malassezia furfur	-	-	1.7±0.3	5.2±0.3
Malassezia restricta	-	-	1.3±0.3	4.3±0.6
Propionibacterium acnes	-	2.0±0.0	4.3±0.6	8.0±1.0
Trichophyton mentagrophytes	-	4.7±0.5	6.4±0.6	9.5±2.5
Trichophyton rubrum	-	5.9±0.4	6.7±0.2	12.8±0.3

a; emulsion product without GSE and PSS. b, c and d; emulsion products with mixtures of GSE and PSS, 0.1, 0.25 and 0.5%, respectively.

비슷하였으며 대조군으로 에멀전만 사용한 것은 모든 균주에서 활성을 보이지 않았다.

고 찰

피부질환 원인균인 비듬균, 여드름균 및 무좀균에 대한 GSE와 PSS의 항균 효과를 평가한 결과, GSE와 PSS가 실험 대상 균주에 대하여 모두 항균력을 가지고 있었으며 비듬균인 *M. furfur*와 *M. restricta*는 GSE보다는 PSS에서 더 강한 항균력을 보였으며 여드름균인 *P. acnes*와 무좀균인 *T. mentagrophytese* 및 *T. rubrum*은 PSS 보다는 GSE에서 더 강한 항균활성을 보였다. 그러므로 GSE와 PSS의 각각에 효과적인 균주별 피부질환 외용제 뿐만 아니라 GSE와 PSS를 함께 적용한 광범위한 피부질환 외용제의 응용개발이 가능하리라 사료된다.

GSE의 DISK 항균 활성 측정에서는 *T. rubrum*이 가장 높게 나온 반면, GSE의 MIC 측정에서는 *P. acnes*이 가장 높게 나왔다. 또한 PSS의 DISK 항균 활성 측정에서는 *M. furfur*이 가장 높게 나온 반면, PSS의 MIC 측정에서는 *T. mentagrophytes*이 가장 높게 나왔다. 이렇게 실험 방법에 따라 항균활성이 가장 높은 균주가 다르게 나타나는 것은 MIC 측정법의 경우 항균 활성물질이 균주와 혼합된 상태로 항균작용을 나타내는 반면에 DISK 실험의 경우 항균 활성을 가지는 물질이 확산에 의해 고체 배지 위에서 자라는 균들의 성장을 저해하기 때문으로 사료된다.

결과적으로 GSE와 PSS가 비듬균, 여드름균 및 무좀균에 대한 생육 억제효과가 있음을 확인하였고 이를 통해 GSE와 PSS가 gram 양성균 및 곰팡이 등의 넓은 범위에 있어서 항균 활성을 가지는 것을 알 수 있었다. 이러한 항균력은 GSE와 PSS가 균의 세포벽 및 세포막의 기능을 약화시켜 합성을 저해하고, 균체 내에 작용하는 효소력을 약화시켜 유전정보 기작을 파괴함으로써 세포증식을 억제하여 항균력이 나타나는 것으로 생각되어진다.

각각의 세균들의 생육저해에 관한 많은 연구가 진행되어져야 하겠지만 GSE의 경우 이러한 항균 효과는 주로 flavonoid 성분 때문인 것으로 알려져 있으며 flavonoid는 저분자량의 천연 benzo-γ-pyrone 유도체로서 항균작용을 비롯하여 다양한 효과를 가진 것으로 알려져 있고 GSE는 독성을 나타내지 않을 정도의 저농도에서도 항균 효과가 나타난다고 보고되어 있다. GSE에 함유된 flavonoid에는 naringenin, naringin, quercetrin, kaempferol, hesperetin 및 apigenin 등이 있으며 이중 주된 성분인 naringin, naringenin이 특히 관심의 대상이 되고 있다[14]. 본 실험에서 사용한 에멀전 시제품의 GSE에 있어서는 어떤 성분이 항균 활성에 주된 역할을 하는지 앞으로 보다 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

또한 PSS는 예로부터 양기 부족, 십이지장궤양과 방광염, 냉증, 두통 등 민간요법에서 쓰여 왔으며 무좀, 옴, 종창 등에는 법제하지 않은 유황가루를 돈지(豚脂)나 송진 등에 개어서 바르거나 태워서 연기를 쐬기도 했다. 근래에는 항생제를 투여하지 않고 법제유황을 이용한 친환경 축산 및 수산물의 개발과 유황의 살균작용을 이용한 친환경 영농뿐만 아니라 의약품 및 기능성 건강식품에도 법제유황이 활용되고 있다[18,20,25,39]. 이처럼 PSS의 우수한 항균 활성능력은 본 실험에 있어서도 비듬균, 여드름균 및 무좀균에 대하여 항균작용을 보였고 PSS를 함유한 에멀전 시제품에서도 활성을 보임으로써 기능성을 가진 화장품 외용제의 제조에 있어서 그 가능성을 검증하였으나 항균작용 기작을 밝히는데 있어서는 앞으로도 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

에멀전 시제품의 물성을 분석한 결과 에멀전 시제품의 pH는 중성으로 화장품법 제9조의 규정에 의한 '화장품 기준 및 시험방법'의 범위(pH 3.0~9.0)[23] 안에 허용되는 수치였으며 GSE와 PSS의 함유 농도에 따른 pH, 점도, 굴절 및 색도 변화에 있어서 안정성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 이를 이용한 항여드름, 항비듬, 항무좀과 같은 기능성 외용 화장품 제조에 있어서 사용가능하리라 생각되어 진다. 또한 화장품 제조에 있어서 살리신산(Salicylic acid), 파라벤류(Methylparaben, Propylparaben, Isobutylparaben, Ethylparaben, Butylparaben, Isopropylparaben), 트리클로산(Triclosan), 페녹시에탄올(Phenoxyethanol) 및 이미다졸리디닐우레아(Inidazolinidyl Urea) 등이 일반세균 및 진균 등의 미생물 발육억제를 위한 방부제로 사용되어지고 있으나, GSE와 PSS 같은 천연물을 이용한다면 항여드름, 항비듬, 항무좀균과 같은 항균제 기능뿐만 아니라 화장품 장기보존을 위한 보존료로써의 이용 가치도 있는 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 GSE와 PSS를 이용하여 제조한 시제품 모두에서 비듬균, 여드름균 및 무좀균에 대한 항균 활성이 검증되었고 pH 등의 물리화학적 특성에 대해서도 비교적 안정하였으므로 이를 이용하는 화장품과 같은 피부외용제 개발에 있어서 산업적 가치가 우수할 것으로 사료된다.

요 약

GSE와 PSS를 이용한 피부 외용제를 개발하기 위해, 평판배지확산법 및 액체배지감수성실험을 이용하여 GSE와 PSS의 비듬균(*Malassezia furfur, M. restricta*), 여드름균(*Propionibacterium acnes*) 및 무좀균(*Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum*)에 대한 항균 활성을 측정하였다. 평판배지확산법의 경우 GSE가 10 μl/disk일 때 *M. furfur, M. restricta, P. acnes, T. mentagrophytes* 및 *T. rubrum*은 각각 1.0, 1.0, 12.0, 15.0, 15.0 mm 였으며, PSS가 10 μl/disk일 때에는 각각 7.3, 5.7, 2.0, 0 mm 이었다. 또한 액체배지감수성실험에서 GSE에 대한 MIC 값은 각각 3.91, 3.91, 0.004, 0.024, 0.012 μl/ml이었으며 PSS에 대한 MIC 값은 각각 0.03, 0.03, 0.156, 0.003, 0.012 μl/ml이었다. 또한 GSE와 PSS가 함유된 에멀전 시제품을 제조하여 농도별 평판배지확산법을 수행한 결과 그 결과 값은 0.5% 농도에서 각각 5.2, 4.3, 8.0, 9.5, 12.8 mm의 값을 나타내었다. GSE와 PSS가 실험 대상 균주에 대하여 모두 항균력을 가지고 있었으며 비듬균인 *M. furfur*와 *M. restricta*는 GSE보다는 PSS에서 더 강한 항균력을 보였으며 여드름균인 *P. acnes*와 무좀균인 *T. mentagrophytese* 및 *T. rubrum*은 PSS 보다는 GSE에서 더 강한 항균 활성을 보였다. 그러므로 GSE와 PSS의 각각에 효과적인 균주별 피부질환 외용제 뿐만 아니라 GSE와 PSS를 함께 적용한 광범위한 피부질환 외용제의 응용개발이 가능하리라 사료된다. 또한 에멀전 로션 시제품의 물리화학적 특성을 분석한 결과 pH, 점도, 굴절 및 색도 변화에 있어서 모두 안정성을 보였고 이상의 연구결과를 바탕으로 기능성 화장품과 같은 피부 외용제 제품의 개발 가능성을 확인하였다.

References

1. Bae, K. H., S. H. Noh and H. S. Moon. 2002. A study on the halitosis reduction by dentifrice containing triclosan, GFSE, eucalyptus oil and flavonoid. *J. Korean Acad. Dent. Health* **26**, 251-257.
2. Block, E. 1986. The art and science. In folk medicine. pp. 125-137, Steiner, R. P. (ed.), American Chemical Society, Washinton, DC.
3. Block, E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus allium-Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Fd. Engi.* **31**, 1135-1178.
4. Cetkovská, P. and K. Pizinger. 2006. Coexisting subacute and systemic lupus erythematosus after terbinafine administration: successful treatment with mycophenolate mofetil. *Int. J. Dermatol.* **45**, 320-322.
5. Choi, J. D., I. W. Seo and S. H. Cho. 1990. Studies on the antimicrobial activity of grapefruit seed extract. *Bull. Korean Fish Soc.* **23**, 297-302.
6. Choi, K. H. and C. H. Kim. 2002. Growth inhibition of extract from sulfur fed duck carcass against various cancer cell lines. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **22**, 348-351.
7. Cho, J. H., B. J. Min, O. S. Kwon, K. S. Shon, Y. G. Jin, H. J. Kim and I. H. Kim. 2005. Effects of MSM (Methyl sulfonyl methane) supplementation on growth performance and digestibility of Ca and N in pigs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 361-365.
8. Cho, S. H., I. W. Seo, J. D. Choi and I. S. Joo. 1990. Antimicrobial and antioxidant activity of grapefruit and seed extract on fishery products. *Bull. Korean Fish Soc.* **23**, 289-296.
9. Chomnawang, M. T., S. Surassmo, V. S. Nukoolkarn and W. Gritsanapan. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 330-333.
10. Favre, B., B. Hofbauer, K. S. Hildering and N. S. Ryder. 2003. Comparison of *in vitro* activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4817-4819.
11. Filoche, S. K., K. Soma and C. H. Sissons. 2005. Antimcrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**, 221-225.
12. Gemmer, C. M., Y. M. DeAngelis, B. Theelen, T. Boekhout and T. L. Dawson. 2002. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3350-3357.
13. Gupta, A. K., Y. Kohli, A. Li, J. Faergemann and R. C. Summerbell. 2000. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br. J. Dermatol.* **142**, 758-765.
14. Heggers, J. P., J. Cottingham, J. Gusman, L. Reagor, L. McCoy, E. Carino, R. Cox and J. G. Zhao. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and In Vitro toxicity. *J. Altern. Complement Med.* **8**, 333-340.
15. Jang, Y. I. and T. R. Song. 2007. Sulphur solution containing sulphur and method for manufacturing the same. Korea patent 10-2007-0000628.
16. Jin, M. S., Y. J. Yu, B. G. Choe, H. Y. Lee, M. J. Kim, H. J. No, J. S. Park, G. S. Jo, J. G. Kim and S. H. Choe. 2003. Antimicrobial and anti-gingivitis effect of chewing gum containing grapefruit seed extract and xylitol. *J. Korean Acad. Periodontol.* **33**, 485-497.
17. Jo, J. H., H. S. Jang, H. C. Ko, M. B. Kim, C. K. Oh, Y. W. Kwon and K. S. Kwon. 2005. Pustular psoriasis and the Köbner phenomenon caused by allergic contact dermatitis from zinc pyrithione-containing shampoo. *Contact Dermatitis* **52**, 142-144.
18. Jung, S. J. and H. Y. Kim. 2000. Process for purifying sulfur usable for Health care. Korea patent 10-2000-0018316.
19. Kang, D. H., S. S. Chun, D. H. Chung and S. H. Cho. 1994. Antimicrobial effect of grapefruit seed extract on *vibrio parahaemolyticus* isolated from the southern adjacent sea of korea. *J. Fd. Hyg. Safety* **9**, 141-149.

20. Kim, C. H. 2002. Anticancer effect of extracts from sulfur fed duck carcass against various cancer cell lines. Korea patent 10-2002-0051999.
21. Kim, J. B., H. S. Moon, D. I. Paik, D. Y. Park, S. H. Jung and K. H. Bae. 1998. Effects of mouth spray containing GSE, tea extract & UDCA on antimicrobial effect of *Streptococcus mutans*, reducing of oral malodor and reduction of gingivitis. *J. Korean Acad. Dent. Health* **22**, 37-46.
22. Kim, S. H. and Y. B. Seo. 1996. Effect of processed sulphur on experimental bone disease. *Korean J. Oriental Medical Pathology* **10**, 79-87.
23. Korea Food & Drug Administration. 2007. Cosmetic standard and experimental method. No. 2007-45.
24. Kumar, M. and J. S. Berwal. 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *J. Appl. Microbiol.* **84**, 213-215.
25. Lee, J. S. 2005. Method of manufacturing process of food additives usingeliminated noxious ingredient hydrargyrum and sulfur. Korea patent 10-2005-0017093.
26. Lee, S. G. 2003. Antimicrobial effect of Bamboo (*Phyllosrachys bambusoides*) essential oil on *Trichophyton* and *Pityrosporum*. *J. Fd. Hyg. Safety* **18**, 113-117.
27. Leeming, J. P., J. E. Sansom and J. L. Burton. 1997. Susceptibility of *Malassezia furfur* subgroups to terbinafine. *Br. J. Dermatol.* **137**, 764-767.
28. Marples, R. R. 1974. The microflora of the face and acne lesions. *J. Invest. Dermatol.* **62**, 326-331.
29. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standards-8th eds., Vol. **23**, NCCLS Document M2-A8. Pennsylvania.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard-6th eds., Vol. **24**, NCCLS Document M11-A6. Pennsylvania.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard-2nd eds., Vol.22, NCCLS Document M27-A2. Pennsylvania.
32. Nielsen, N. H. and T. Menné. 1997. Allergic contact dermatitis caused by zinc pyrithione associated with pustular psoriasis. *Am. J. Contact Dermat.* **8**, 170-171.
33. Piérard, G. E., J. E. Arrese, C. Piérard-Franchimont and P. de Doncker. 1997. Prolonged effects of antidandruff shampoos-time to recurrence of *Malassezia ovalis* colonization of skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **19**, 111-117.
34. Ross, J. I., A. M. Snelling, E. Carnegie, P. Coates, W. J. Cunliffe, V. Bettoli, G. Tosti, A. Katsambas, J. I. Galvan Peréz Del Pulgar, O. Rollman, L. Török, E. A. Eady and J. H. Cove. 2003. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br. J. Dermatol.* **148**, 467-478.
35. Roverts, S. B. 1969. *Pityrosporum orbiculare* incidence and distribution in clinically normal skin. *Br. J. Dermatol.* **81**, 264-269.
36. Song, I. S., D. H. Youn and S. Y. Hwa., 2007. Effect of oral administration of processed sulphur on hepatotoxicity. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* **21**, 898-906.
37. Sugita, T., M. Tajima, T. Ito, M. Saito, R. Tsuboi and A. Nishikawa. 2005. Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against the eleven currently accepted *Malassezia* species. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2824-2829.
38. Takahashi, T., R. Kokubo and M. Sakaino. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 60-64.
39. Youm, J. L. 2000. Inhibitor contained sulfur for a lawn-disease. Korea patent 10-2000-0075780.
40. White, T., K. Marr and R. Bowden. 1998. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 382-402.