

Ethosome에 캡슐화된 Palmitoyl Tripeptide의 항균효과

이연정 · 이윤섭* · 진병석†

동덕여자대학교 자연과학대학 응용화학과, *미원상사(주)
(2014년 8월 1일 접수, 2014년 9월 22일 심사, 2014년 10월 1일 채택)

Antimicrobial Activities of Ethosome-Encapsulated Palmitoyl Tripeptide

Yeon-jung Lee, Yun Sub Lee*, and Byung Suk Jin†

Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

*Miwon Commercial Co., Ltd., Gyeonggi 425-100, Korea

(Received August 1, 2014; Revised September 22, 2014; Accepted October 1, 2014)

초 록

Palmitoyl tripeptide (M330)는 최소 저해농도(MIC) 결정 실험에서 기존 화장품 방부제인 메칠 파라벤, 페녹시 에탄올보다 적은 농도로도 높은 항균활성을 나타냈다. 하지만 화장품 제형에 M330을 혼합하면 점증제인 carbopol (carboxy vinyl polymer)과의 정전기적 인력 결합으로 침전이 생기면서 점도가 떨어지고 항균효과도 크게 떨어지는 현상이 일어났다. 따라서 화장품 제형에서 M330의 항균효과를 회복시키고 제형의 침전을 방지하기 위하여 ethosome 베시클로 M330의 캡슐화를 시도하였다. M330을 ethosome에 캡슐화하여 화장품 제형에 첨가한 결과 침전이 형성되지 않았고 캡슐화되지 않은 M330을 첨가했을 때보다 점도의 감소폭이 적었다. 챌린지 테스트를 시행한 결과, M330을 캡슐화하여 첨가했을 때 *E. coli*나 *P. aeruginosa* 등의 그람 음성균에서는 항균활성이 더욱 향상되었지만 그람 양성균인 *S. aureus*와 진균인 *C. albicans*에서는 캡슐화에 의한 효과가 없었고, 특히 *C. albicans*에서는 1주일 동안 생균수의 감소가 전혀 없었다. M330에 EDTA를 혼합하여 실시한 챌린지 테스트 결과 *C. albicans*에 대한 항균활성이 크게 증가함을 확인하였고, 두 성분을 함께 캡슐화 했을 때는 더욱 빠른 속도로 균이 사멸하였다.

Abstract

Palmitoyl tripeptide (M330) showed higher antimicrobial activities than methyl paraben or phenoxy ethanol through minimum inhibitory concentration (MIC) test. However, when the M330 was added into cosmetic formulation, white precipitates formed due to the electrostatic interaction between M330 and carbopol (carboxy vinyl polymer) as a thickener in cosmetics, and the viscosity of cosmetics decreased sharply. Also, the antimicrobial activities of M330 in cosmetics became lower than those of methyl paraben or phenoxy ethanol. Thus, the encapsulation of M330 in ethosome vesicle was attempted in order to recover the declined antimicrobial activities of M330 in cosmetics and prevent the precipitates from forming. When ethosome-encapsulated M330 was added into cosmetics, the precipitates did not form, and the decrease in the viscosity of cosmetics was not large compared to the addition of unencapsulated M330. Challenge tests showed that antimicrobial activities against gram negative bacteria were improved by the encapsulation of M330, but the encapsulation was not effective against gram positive bacteria and fungus. A combination of M330 with EDTA showed synergistic inhibitory potential against *C. albicans*. After coencapsulation of M330 and EDTA in ethosome, antimicrobial activities proved to be higher than those of unencapsulated M330 and EDTA.

Keywords: palmitoyl tripeptide, M330, antimicrobial activity, ethosome, challenge test

1. 서 론

화장품은 물과 더불어 미생물의 영양이 되는 각종 유기 영양성분을 함유하고 있고, 장기간 사용하면서 사용할 때마다 뚜껑을 여닫으

면서 공기, 사람 손 등에 접촉하기 때문에 세균, 곰팡이 등의 미생물이 번식하면서 부패하는 일이 발생하게 된다. 화장품이 미생물에 오염되면 향취이상, 색상, 질감 및 점도변화, 곰팡이 발생 등의 품질 저하 현상이 나타나기 때문에 미생물이 일으키는 변패, 변취 등으로부터 화장품을 장기간 보호하기 위해서 방부제를 첨가할 필요가 있다. 방부제는 외부로부터 유입된 미생물의 증식을 억제하고 사멸시켜 제품의 질 저하를 방지하는 목적으로 사용되지만 이들은 피부 자극 유발의 원인이 될 수 있고[1], 기본적으로 세포 독성을 갖고 있어 대량 사용 시 인체에 유해한 영향을 미치게 되므로 제품의 안전성 안정성을 고려하여 최소의 유효량으로 배합할 필요가 있다.

† Corresponding Author: Dongduk Women's University,
Department of Applied Chemistry, 23-1 Wolgok-dong, Sungbuk-ku, Seoul
136-714, Korea
Tel: +82-2-940-4513 e-mail: bsjin@dongduk.ac.kr

화장품에 쓰이는 대표적인 방부제인 파라옥시안식향산에스테르, 일명 파라벤(paraben)은 여러 세균 및 진균에 대해 효과적이며 냄새가 없고 변색, 경화, 혼탁 등을 일으키지 않고 독성이 비교적 낮다. 비용 또한 저렴하며 넓은 pH 영역과 고온에서도 화학적 안정성을 갖고, 메칠 파라벤과 에칠 파라벤, 부칠 파라벤 등을 혼합 사용하면 적은 양으로도 효과적인 방부효과를 올릴 수 있는 등 여러 장점으로 인하여 화장품에 널리 이용되어 왔다[2-3]. 하지만 파라벤 성분은 알러지 반응을 일으키거나 호르몬 변화를 가져오는 것은 물론 체내에 쌓여 장기적으로 암을 유발할 수 있기 때문에 그 안전성에 대한 논란이 계속되고 있다. 근래의 연구 결과에 의하면 파라벤은 여성호르몬인 에스트로겐과 유사한 구조를 가지고 있어 내분비계를 교란할 가능성이 있고[4], 남성의 경우 정자수가 감소하는 등 생식 기능에 이상이 생길 수 있으며[5], 피부에 자극을 주고 피부염이 있는 환자에게 접촉성 알러지를 발생시키는 등의 부작용도 일으킬 수 있다는 것이 보고되었다[6-7]. 또한 파라벤이 인체에 흡수되면 여성의 유방암을 발생시키는 잠재적인 원인이 될 수 있으며 실제 유방암 환자들의 종양 조직세포에서 파라벤 성분이 공통적으로 검출되었다고 보고되었다[8].

파라벤류 방부제를 대체하여 사용하는 이소프로필 알콜 역시 점막에 자극을 주고 피부 알러지를 유발할 수 있고 이외에도 이미다졸리딘 유래아, 디아졸리딘 유래아, 페녹시 에탄올 등 기존 방부제들에 대해서도 여러 부작용이 보고되고 있다[9-12]. 이러한 여러 부작용에도 불구하고 화장품의 장기간 사용에 따른 안전성 문제로 인하여 방부제를 안 넣을 수는 없기 때문에 상대적으로 안전하고 자극이 적은 대체 방부제로서 펩타이드의 항균활성에 대한 관심이 증가하고 있다. 항균 펩타이드는 적용범위가 넓고 환경 친화적이며 잔류 독성이 없고 병원균에 대한 내성의 문제가 없다고 알려져 왔다. Poly cationic 펩타이드 화합물은 원핵 및 진핵 미생물에 항균활성을 보였고[13-14], 성장인자로부터 유래된 펩타이드는 곰팡이뿐만 아니라 그람 음성 및 양성 세균에도 항균효과가 있었다[15]. 벌의 독으로부터 분리된 멜리틴(Melittin)은 우수한 항균활성을 가짐에도 불구하고 인간의 적혈구를 비롯한 다양한 세포에 대해서 독성을 가지기 때문에 이 항균 펩타이드를 방부제로 적용하는데 있어서 많은 제약이 있다[16].

본 연구에서는 펩타이드 항균제를 화장품 방부제로 활용 가능성을 살펴본 것으로 미원상사(주)(안산, 경기도)에서 새롭게 합성 개발한 펩타이드인 palmitoyl tripeptide (M330)를 사용하여 연구를 진행하였다. M330은 기존의 화장품 방부제인 메칠 파라벤, 페녹시 에탄올보다 항균력이 우수하지만 화장품에 적용할 경우 방부효과가 저하되고 침전이 생기며 점도가 떨어지는 등 제품의 질을 떨어뜨리는 문제가 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 수용성 물질인 M330을 ethosome 베시클에 포집시켜 캡슐화를 시도하였다. 다양한 조성으로 M330을 캡슐화하는 과정을 통해 최적 조성의 베시클을 만들고 이를 화장품에 적용했을 때 방부효과를 챌린지 테스트(Challenge test)를 통해 확인해 보았다. 또한 킬레이트제인 EDTA를 M330과 함께 ethosome에 포집시켜 캡슐화를 했을 때 화장품 제형에서의 항균효과도 살펴보았다.

2. 실험

2.1. 재료

본 연구에서 사용한 palmitoyl tripeptide (M330) 항균 펩타이드는 미원상사에서 새롭게 합성 개발한 제품으로 합성하는 방법은 간략하게 설명하면 다음과 같다. 고체상 반응을 위하여 Rink amide resin에 N-말단이 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐기(Fmoc)로 그리고 측쇄가

부틸옥시카르보닐(Boc)로 보호된 첫 번째 아미노산(lysine)을 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)와 첨가보조제인 1-히드록시벤조트리아졸(HOBT)을 사용하여 커플링 하였으며 N-말단의 보호기를 피페리딘(piperidine)을 이용하여 제거한 후 같은 방법으로 두 번째, 세 번째 lysine과 커플링 하였다. 이어서 같은 방법으로 palmitic acid를 커플링 한 후 트리플루오로아세트산(TFA)를 포함하는 절단용액을 이용하여 고체 수지로부터 분리한 후 디에틸에테르(diethyl ether)를 이용하여 석출 분리하여 M330을 얻었다[17].

인지질은 soybean에서 추출한 지질을 수소첨가 반응시켜 불포화 성분을 없앤 레시틴(lecithin)으로 PC (Phosphatidyl Choline) 성분이 95% 이상인 Emulmetik950 (Lucas Meyer사)을 사용하였으며 편의상 명칭을 HPC (Hydrogenated Phosphatidyl Choline)로 나타내었다. 콜레스테롤(Chol.)은 Sigma, 에탄올은 대정화학 제품을 사용하였다. 이밖에도 화장품 제조에 필요한 유성원료, 보습제, 계면활성제, 점증제 등은 화장품용으로 허가된 원료들을 사용하였다.

MIC 및 Challenge Test에 사용된 균은 진균에 *C. albicans* (효모균, ATCC 10231), 세균으로 그람 음성균에 *P. aeruginosa* (녹농균, ATCC 27853)와 *E. coli* (대장균, ATCC 8739), 그람 양성균에 *S. aureus* (황색 포도상균, ATCC 6538p) 등으로 모두 미생물자원센터(KCTC)에서 분양받았다. 균 배양에 쓰인 배지는 세균에는 PCA (plate count agar), 진균에는 PDA (plate dextrose agar)를 사용하였고 액체배지는 MHB (Mueller Hinton broth)를 사용하였으며 모두 Becton, Dickinson and Company 제품이다.

2.2. M330을 포함한 ethosome 제조

M330의 농도별, HPC와 콜레스테롤의 혼합 비율을 달리하여 여러 ethosome을 다음과 같이 제조하였다. HPC와 콜레스테롤 혼합물 1 g 과 에탄올 0.8 g을 등근바닥 플라스크에 넣고 60 °C로 고정된 항온조에서 용해시켜 투명한 용액상태로 만든다. 여기에 M330 (또는 M330 과 EDTA의 혼합)을 녹인 수용액을 1 g을 넣은 뒤 5 min 정도 자석 교반시키면 용액은 겔 상태로 변하면서 백색의 수화 액정상(hydrated liquid crystalline phase)이 형성된다. 다음은 수화 액정상의 분산단계로 교반기를 가동한 상태에서 정량용액 펌프를 이용하여 총량이 10 g이 되도록 증류수를 서서히 첨가하면 수화 액정상은 베시클 형태의 입자로 물속에 분산되는데 이 베시클 입자가 M330을 포집한 ethosome이 된다. 완성된 ethosome을 계속 교반시키면서 상온에서 서서히 식힌다.

2.3. 화장품 제조

화장품은 에센스와 로션 두 가지 제형으로 만들었고 각각의 처방을 Tables 1과 2에 나타내었다. 에센스 제조는 다음과 같이 진행되었다. 수상물질인 글리세린(glycerine), 프로필렌글리콜(propylene glycol), 히아루론산(sodium hyaluronate, 1%), carbopol 940 (carboxy vinyl polymer, 점증제 2%), 증류수 등을 비이커에 넣고 70 °C의 온도에서 잘 섞고 다른 비이커에는 유상물질인 실리콘오일(silicone oil), Tween 80 (polyoxy ethylene sorbitan monooleate) 등을 에탄올과 함께 넣고 60 °C의 온도에서 모두 녹인다. 두 상이 모두 투명한 상태에서 수상 물질의 비이커에 유상 물질을 서서히 첨가하면서 아주 믹서로 균일하게 교반시켜 가용화를 시킨 다음, 트리에탄올아민(triethanolamine, TEA)을 넣고 10 min간 더 교반을 한 후 상온에서 서서히 식힌다.

로션 제형은 다음과 같이 제조되었다. 수상 물질인 글리세린, 부틸렌글리콜(butylene glycol), 히아루론산(1%), carbopol 940 (2%), 증류

Table 1. Composition of Essence

Ingredient	contents (g)
glycerine	8.5
propylene glycol	7.5
sodium hyaluronate (1%)	8.0
triethanolamine	0.12
carbopol 940 (2%)	6.0
ethanol	8.0
silicone oil	0.1
Tween 80	0.4
D.W.	up to 100

Table 2. Composition of Lotion

Ingredient	contents(g)
glycerine	3.0
butylene glycol	2.0
sodium hyaluronate (1%)	1.0
triethanolamine	0.1
carbopol 940 (2%)	5.0
stearic acid	1.0
cetostearyl alcohol	1.9
cetyl ethylhexanoate	7.0
olive oil	2.0
Arlacel 60	0.7
Tween 80	2.8
D.W.	up to 100

수 등을 비이커에 넣고 70 °C의 온도에서 잘 섞는다. 유상 물질인 스테아린산(stearic acid), 올리브 오일(olive oil), 세토스테아릴알콜(cetostearyl alcohol), 세틸에틸헥사노이트(cetyl ethylhexanoate, CEH), Arlacel 60 (sorbitan monostearate), Tween 80 역시 비커에 넣고 70 °C의 온도에서 모두 녹인다. 두 상 모두 투명한 상태의 용액이 되면 수 상 물질을 호모믹서로 잘 섞어주며 유상 물질을 서서히 첨가하여 유화시킨 후 TEA를 넣어 중화시킨다.

2.4. MIC 및 챌린지 테스트

최소 저해농도(MIC)의 결정은 2배-연속희석법(two-fold serial dilution method)으로 진행되었다. 각 균들을 액체 배지에 접종하여 각각 적당한 온도와 일정 시간동안 배양한 후, 균액 농도가 2×10^6 CFU/mL가 되도록 희석하였다. 96-well plate의 모든 열에 50 µL씩 액체배지를 넣은 후, 8% 농도로 항균제가 녹아있는 용액을 96-well plate의 제1열에 50 µL를 넣고 잘 혼합한다. 혼합 후 제1열에서 50 µL를 취해 그 다음 2열에 넣고 혼합하는 방식으로 같은 과정을 계속 반복해서 모든 열에 대해 1/2배씩 희석과정을 거치고 난 후, 액체 배지에서 배양된 균액을 50 µL씩 모든 열에 첨가한다. 96-well plate를 37 °C 인큐베이터에서 하루 동안 보관 배양하고 ELISA reader (Synergy HT, Bio-Tek)을 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주의 MIC 값을 결정하였다.

챌린지 테스트(challenge test)는 식약청의 ‘미생물 한도 기준 및 시

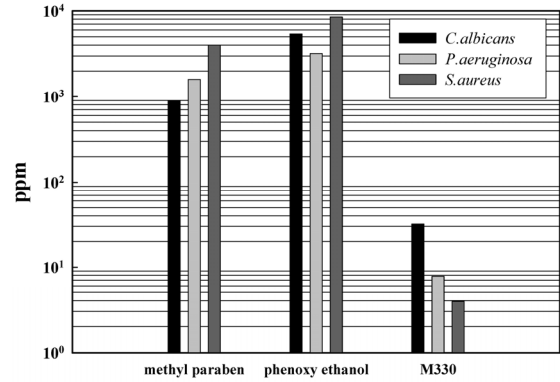


Figure 1. MIC of methyl paraben, phenoxy ethanol and M330.

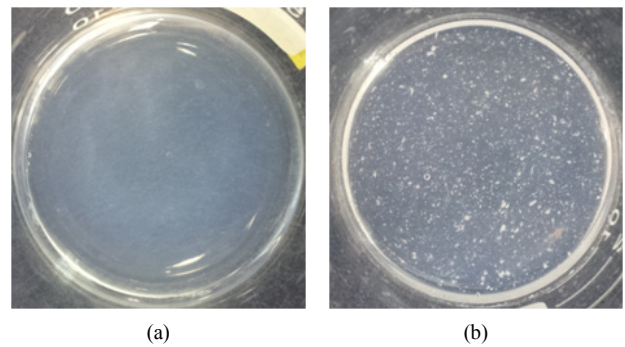


Figure 2. Change in appearance of essence after addition of M330 (a) before (b) after.

험방법 가이드라인’을 참고하여 시행하였다. 항균제가 들어있는 화장품 로션 제형에 실험할 균의 농도가 대략 $10^6 - 10^7$ CFU/mL가 되도록 균액 일정량을 첨가하여 잘 혼합한 후 35 °C 인큐베이터에 보관하였다. 일정한 시간 간격마다 보관된 로션 중 100 µL를 E-tube에 털어서 10배수의 증류수로 잘 분산시킨 뒤, 그중 100 µL를 멸균된 고체 배지에 도말한 후 35 °C의 인큐베이터에서 하루 동안 배양하였다. 자라난 colony의 수를 희석 배수로 환산하여 CFU/mL 단위로 표시하였다. 시간이 경과에 따른 접종 균의 사멸 정도를 비교하는 방법으로 방부력을 확인하였으며 1주일 내 처음 균의 99.9%가 사멸하면 방부효과가 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. M330의 화장품 적용 및 캡슐화

Figure 1은 썬타이드 방부제인 M330과 기존에 화장품에 쓰이던 방부제인 메칠 파라벤, 페녹시 에탄올과의 항균효과를 비교한 것으로 *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 등 3가지 균에 대한 최소 저해 농도(MIC) 결정 실험결과들이다. M330은 기존 화장품 방부제에 비해 적은 농도에서도 3가지 균 모두를 더 잘 억제할 수 있는 강력한 항균 특성이 있음을 알 수가 있다. 특히 M330은 *P. aeruginosa*, *S. aureus*와 같은 세균을 억제하는데 필요한 최소저해 농도가 수 ppm 정도로, 메칠 파라벤, 페녹시 에탄올의 수천 ppm에 비해서 대략 1000배 가까이 적은 농도로도 세균 증식을 억제하는 강력한 항균효과를 보여주었다. 이와 같이 M330은 뛰어난 항균 특성을 보유하고 있어 화장품 방부제로 적극 활용을 기대했지만 화장품 제형에 적용했을 때 여러 문제가 발생하였다. 그

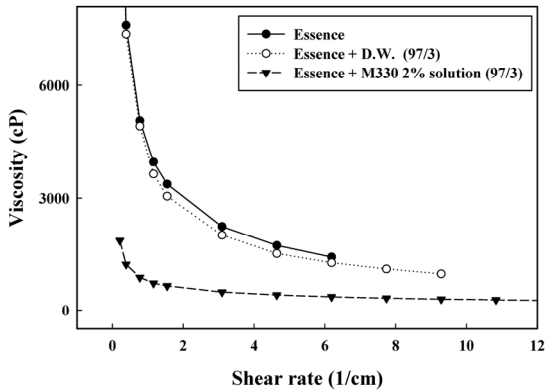


Figure 3. Changes in viscosity after addition of M330 or water into essence.

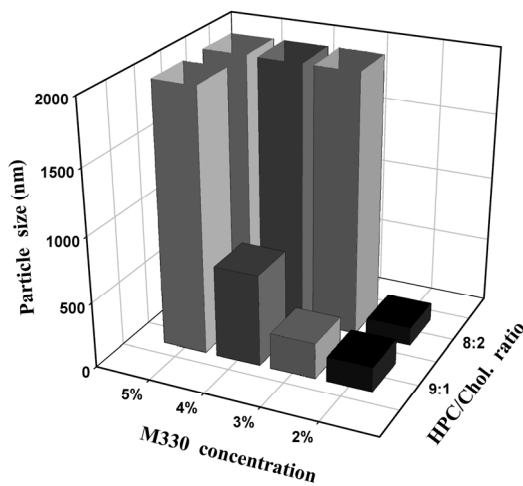


Figure 4. Variations of the particle size of ethosome vesicle as a function of M330 concentration and HPC/Cholesterol ratio.

중 하나가 Figure 2와 같이 투명한 화장품 에센스 제형 (a)에 M330을 첨가한 결과 외관상 (b)와 같은 하얀 침전물 형성을 확인할 수가 있었다. M330을 첨가했을 때 제형에서 나타나는 또 다른 현상은 점도의 감소이다. Figure 3에서와 같이 에센스에 증류수를 3% 비율로 혼합했을 때는 점도 변화는 거의 없지만 M330 수용액(2% 농도)을 3% 비율로 혼합했을 때는 점도는 크게 떨어지고 shear thinning 특성도 아주 작은 전단속도 영역에서만 약간 보일뿐 점도 값이 거의 일정한 뉴턴 유체(newtonian fluid)의 특성을 보였다. 이는 에센스 제형에서 점도를 높여주던 carbopol이 M330 첨가에 의해 점증제로서의 기능을 잃고 침전되었기 때문이다.

화장품에 쓰이는 대표적 점증제인 carbopol은 폴리아크릴산 (polyacrylic acid) 성분이기 때문에 중성 상태의 물에서는 카르복실산기에서 수소이온이 떨어져 나와 음전하를 띠면서 물에 용해되고 유체역학적 부피(hydrodynamic volume)가 크게 확장되면서 제형의 점도가 증가하게 된다. M330은 펩타이드 구조 상에 lysine 성분의 아미노기가 존재하기 때문에 물에서 양전하를 띤다. 따라서 에센스에 M330을 첨가하면 에센스 속 carbopol의 음전하와 M330의 양전하 간 정전기적 결합에 의해 침전이 발생하고 이로 인해 carbopol의 유체역학적 부피가 축소되면서 에센스의 점도가 크게 감소하는 것이다.

M330 첨가에 따른 화장품 내 침전을 방지하고자 수화 액정형 베시클인 ethosome으로 M330 캡슐화를 시도하였다. 먼저 최적의 etho-

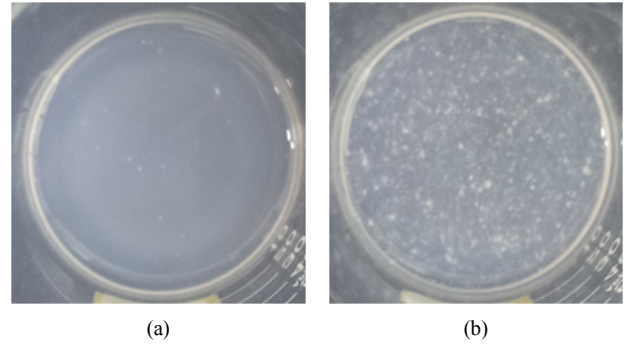


Figure 5. Comparison of appearance when ethosomes with different M330 concentration were added into essence (a) 2% M330 (b) 5% M330.

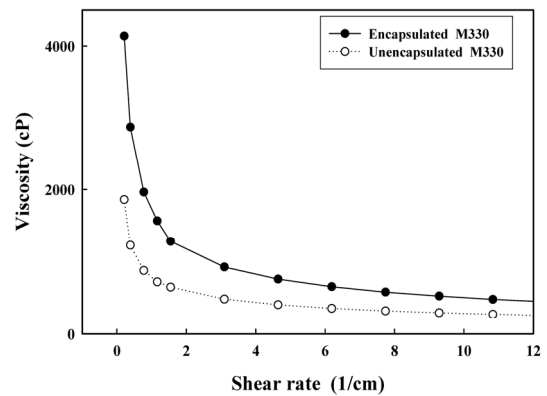


Figure 6. Effect of ethosome encapsulation on the viscosity of essence (M330 2%).

some 베시클을 만들기 위하여 구성 성분의 비율을 달리하면서 ethosome 입자 크기변화를 살펴보았다. 베시클 막을 구성하는 지질의 함량은 1 g, 에탄올은 0.8 g으로 고정하고 M330 농도와 지질 중 콜레스테롤의 혼합비율을 각각 달리하여 ethosome을 제조하였을 때 형성된 베시클 입자의 크기를 입도분석기(PSS, Nicomp 380)로 측정하여 Figure 4에 나타내었다. 그림에서는 나타나지 않았지만 콜레스테롤 없이 HPC 단독으로 베시클을 만들 경우 겔(gel) 상태가 되거나 입자 크기가 수 μm 가 넘는 불안정한 상태의 베시클이 만들어진다. M330을 2%의 농도로 ethosome을 제조하는 경우 콜레스테롤 혼합비율 10%, 20%에 상관없이 200 nm 이하의 안정한 베시클이 만들어졌다. 그러나 M330 3% 이상의 농도에서는 콜레스테롤을 10% 혼합했을 때는 수백 나노크기의 비교적 안정된 크기의 베시클이 만들어지지만 20%를 혼합하면 베시클 입자크기가 마이크로 사이즈로 급격하게 커진다. 10% 정도의 콜레스테롤 혼합은 HPC에 약간의 소수성을 부가하면서 안정한 베시클막 형성에 도움을 주지만 혼합비율이 어느 정도 이상이 되면 HPC와의 얽힌 구조를 형성하면서 HPC의 액정 배열에 방해가 되므로 콜레스테롤 혼합비율은 10% 정도가 적당하다. M330의 농도가 5% 이상이 되면 구성 성분 간 혼합성(miscibility)이 급격히 떨어지면서 베시클이 제대로 형성되지 않았다. Figure 5는 M330을 포집시킨 ethosome 용액을 에센스에 혼합했을 때 외관 사진인데 M330을 직접 첨가한 경우와는 달리 ethosome으로 캡슐화하여 에센스에 첨가한 경우에는 침전이 관측되지 않았다(a). 하지만 M330 농도를 높여 5%로 만든 ethosome 수용액을 혼합했을 때는 침전이 많이 생기는 것을 볼 수 있다(b). M330을 5% 농도로 만들 경우 베시클이 제대로 만들어

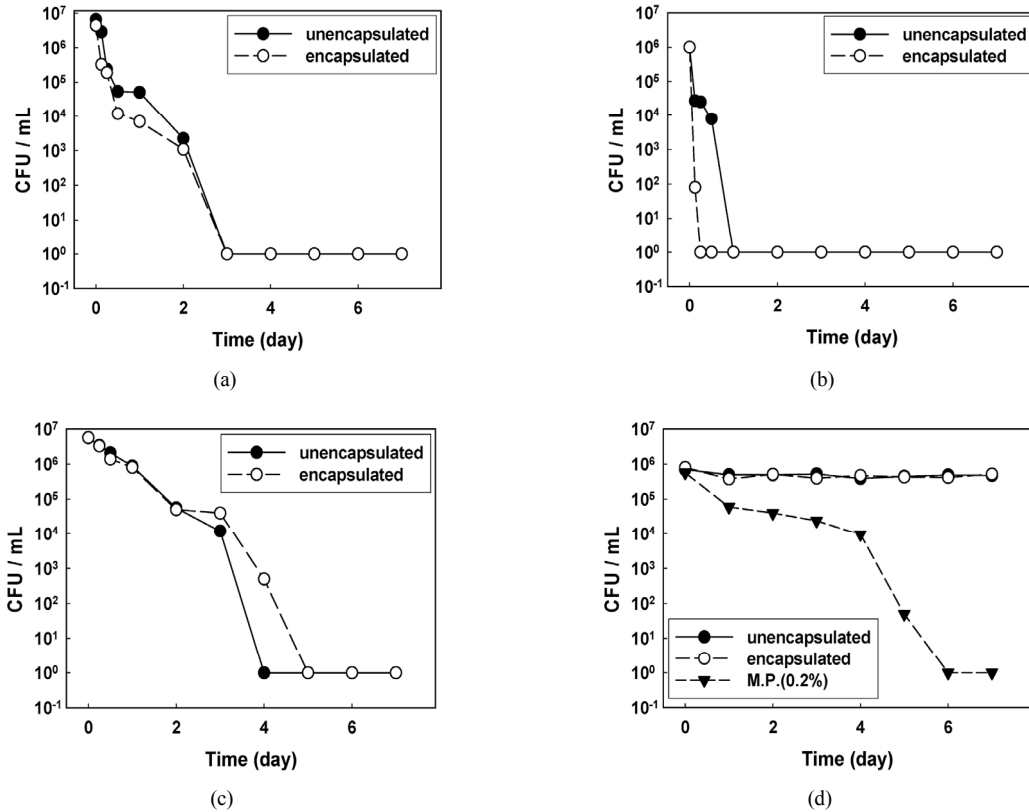


Figure 7. Changes in viable cell count with time during challenge test. (a) *E. coli* (b) *P. aeruginosa*, (c) *S. aureus*, (d) *C. albicans*.

지지 않았기 때문에 베시클에 캡슐화되지 못한 M330의 양이 많아져 carbopol과의 반응으로 침전이 형성된 것이다. Ethosome으로 캡슐화된 M330과 캡슐화되지 않은 M330을 에센스 제형에 각각 혼합하였을 때 점도를 비교하였다. Figure 6에서 보듯이 ethosome으로 캡슐화하여 혼합하였을 때 캡슐화하지 않고 혼합하였을 때보다 점도 값이 비교적 높게 나타났다. M330을 캡슐화하면 M330과 carbopol 간의 직접적인 접촉을 제한하여 침전형성을 억제하기 때문에 carbopol의 유체역학적 부피가 유지될 수 있고 따라서 점도 값들이 상대적으로 높게 나타났다.

3.2. 화장품 제형에서의 M330의 항균효과

화장품 제형에서 여러 미생물에 대한 M330의 항균력 비교를 위해 켈린지 테스트를 실시하였다. 화장품은 로션 제형으로 만들고 여기에 M330을 3%의 농도로 ethosome 캡슐화 형태로 만든 것과 캡슐화 없이 그냥 물에 녹인 수용액 상태를 각각 만들어 화장품 총 중량 대비 3% 비율로 첨가하였다. 이 경우 M330은 화장품 총 중량 대비 0.09%의 비율로 첨가된 것이고 4가지 균에 대한 항균효과를 켈린지 테스트를 통해 생균수 변화로 살펴보았다(Figure 7).

그람 음성균인 *E. coli*를 접종한 로션(a)에서는 3일 안에 접종한 균의 99.9%가 사멸하였으며, 균이 줄어드는 과정에서 M330을 ethosome으로 캡슐화 했을 때 균수가 약간 더 빨리 감소하였다. *P. aeruginosa*가 접종된 로션(b)에서는 하루만에 접종한 균의 99.9%가 사멸하는 결과가 나타났다 특히 M330을 캡슐화 했을 때에는 캡슐화하지 않은 수용액 상태보다 균수가 눈에 띄게 줄어들었으며 6 h만에 접종한 균의 99.9%가 사멸하였다. 그람 양성균인 *S. aureus*가 접종된 로션의 생균수 측정 결과 (c)에서는 4일에서 5일 사이에 접종한 균의 대부분이 사멸하였지만 *S.*

*aureus*균이 줄어드는 과정에서는 M330을 캡슐화한 효과는 전혀 없었고 오히려 수용액일 때보다 캡슐화 했을 때 최대 1000배 가까이 균수가 더 많이 남아 있는 경우도 있었다. 진균인 *C. albicans* 경우(d)는 접종 후 7일이 지난 후에도 균이 줄어드는 것이 관찰되지 않았고 수용액 상태에서나 베시클로 캡슐화 했을 때나 어떤 유의적인 차이가 없었다. 비교를 위해 화장품에 통상 처방되는 메칠 파라벤 0.2% 농도를 테스트해보니 6일이 경과하면 모든 균이 사멸되는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해보면 M330은 화장품 제형 내에서도 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 등의 세균에 대해서는 강력한 항균효과를 나타내지만 진균인 *C. albicans*에 대해서는 항균효과가 없었다. 또한 세균 중에도 그람 음성균에 대해서는 M330을 캡슐화 했을 때 균의 사멸속도가 더 빨라지는 등 항균력이 더 높게 나타나지만 그람 양성균에 대해서는 반대로 캡슐화 했을 때 항균효과가 더 약화되는 현상이 나타났다.

M330의 캡슐화에 의해 항균효과가 상승되는 원인에 대해서는 다음과 같이 설명될 수 있다. 화장품 제형에서 M330은 점증제와의 강력한 상호인력으로 인하여 항균력을 잃게 되지만 M330을 캡슐화하면 외부 물질과 접촉이 차단되므로 항균력 저하가 어느 정도 방지되고, 또한 ethosome 베시클막과 세균 세포의 외벽은 같은 인지질로 구성되어 있기 때문에 M330의 세균에 접근 및 세포막 내 침투를 도와 항균력 상승에 기여할 수 있을 것으로 예측된다. 이와 비슷한 사례로 항균제를 리포솜으로 캡슐화하여 식품에 적용했을 때 항균효과가 향상되었다는 몇몇의 연구 결과가 발표되었다[18-21]. 세포 외벽이 인지질로 되어 있는 그람 음성균과는 달리 양성균의 세포벽의 두께는 20-80nm 정도로 펩티도글리칸 층이 견고하게 발달되어 있고 테이코산(teichoic acid)과 공유결합을 이루면서 세포벽의 물리적 강도가 강하기 때문에 인지질

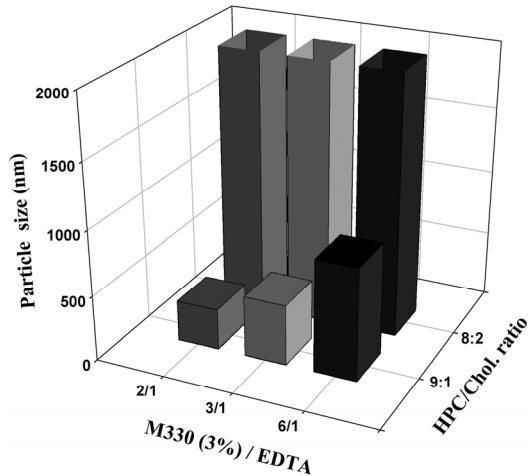


Figure 8. Variations of the particle size of ethosome vesicle as a function of M330/EDTA and HPC/Cholesterol ratio.

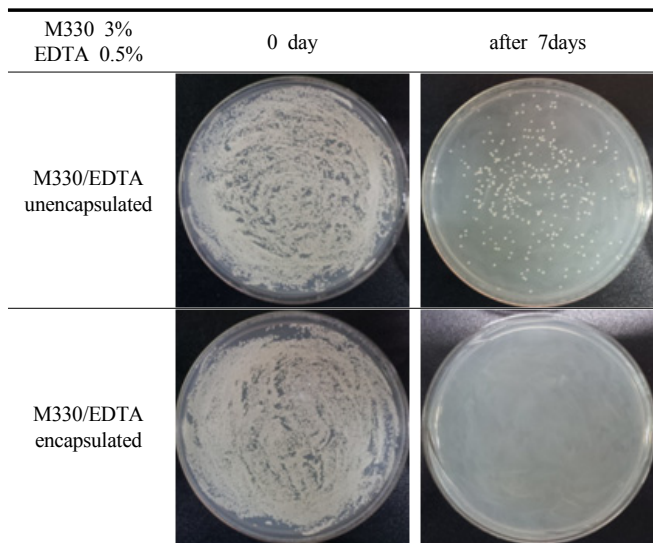
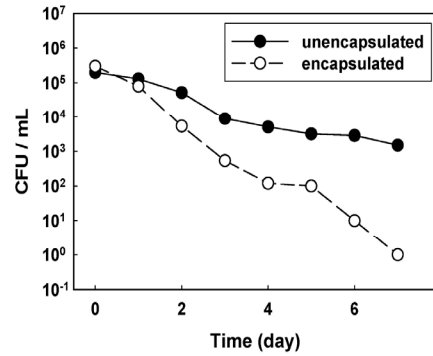


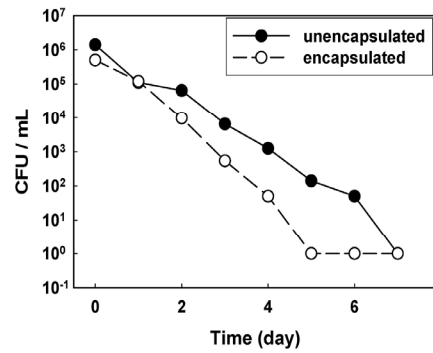
Figure 9. Comparison of antimicrobial activities between unencapsulated and encapsulated M330/EDTA (*C. albicans*).

이중층으로 이루어져 있는 ethosome 베시클이 물리적으로 침투하기 어렵다. 따라서 그람 양성균인 *S. aureus*에 대해서는 캡슐화한 효과가 크게 나타나지 않는 것으로 보이고 오히려 베시클 막 성분인 인지질 및 콜레스테롤이 세균이 자라는데 필요한 영양성분이 되어 오히려 항균효과를 감소시킬 수 있는 것으로 볼 수 있다. 효모와 같은 진균인 *C. albicans*도 두껍고 견고한 섬유질의 세포벽을 구성하고 있으며 캡슐화 여부에 상관없이 M330 자체로는 항균력이 부족하다.

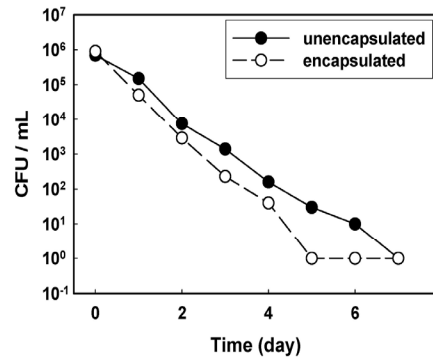
*C. albicans*에 대한 M330의 부족한 항균력 보강을 위하여 M330과 함께 EDTA의 혼합을 시도하였다. EDTA는 화장품 제형에서 금속성분의 이온 활동을 봉쇄함으로써 화장품의 변질, 변색 등을 막아 안정한 상을 유지하는데 도움을 주며 또한 세균의 세포막 구성 성분인 S, P, Mg, Ca, Fe, Mn, Cu, Zn 등의 금속염의 농도를 감소시킴으로써 세균의 성장과 증식에 영향을 끼치게 된다. EDTA의 첨가비율을 달리하여 다양한 조성의 ethosome을 제조하였는데, 3%의 농도의 M330에 EDTA를 각각 0.5, 1, 1.5%로 M330 양 대비 1/6, 1/3, 1/2 비율로 첨가



(a)



(b)



(c)

Figure 10. Changes in viable cell count with time during *C. albicans* challenge test. M330/EDTA (a) 6/1, (b) 3/1, (c) 2/1.

하였다. Figure 8은 M330과 EDTA를 모두 캡슐화한 베시클 입자크기를 측정된 결과로 콜레스테롤의 첨가량이 10%였을 때에는 EDTA의 첨가비율이 높아질수록 베시클 입자가 작아지는 경향을 보였고, 콜레스테롤의 첨가량이 20%였을 때는 EDTA 첨가비율에 상관없이 모두 2 μm 를 넘는 등 불안정한 입자가 형성되었다.

M330/EDTA 혼합물을 베시클로 캡슐화한 것과 캡슐화하지 않고 그냥 수용액에 녹인 것을 로션 제형에 각각 3% 비율로 첨가하고 진균인 *C. albicans*에 대해서만 챌린지 테스트를 실행하였다. Figure 9는 *C. albicans*를 접종한 로션으로 실시한 챌린지 테스트 결과를 비교한 사진이다. M330과 EDTA를 캡슐화하지 않고 첨가했을 때에는 7일 후에도 여전히 균이 남아 있지만 이 혼합물을 ethosome으로 캡슐화하여 첨가한 경우에는 균이 완전히 사멸되어 관찰되지 않았다. Figure 10은

C. albicans 켈린지 테스트에서 EDTA 첨가 비율에 따른 생균수 변화를 살펴본 결과이다. M330/EDTA (6 : 1)를 캡슐화하지 않은 수용액의 경우 7일째에도 균이 많이 남아있지만, 같은 농도의 베시클 수용액에서는 7일째에 접종한 균의 99.9%가 사멸하였으며 항균효과가 더 우수하게 나타났다(a). EDTA를 더 높은 농도비율로 첨가하면 캡슐화하지 않은 수용액의 경우에도 *C. albicans*균 대부분이 7일 안에 사멸하지만 캡슐화를 한 경우에는 5일만에 균 대부분이 사멸되는 등 0.2%의 메칠 파라벤(Figure 7(d))보다도 더 빠른 시일 내에 균이 사멸되며 우수한 항균효과를 보였다(b, c). EDTA 단독 자체로는 항균력이 강하지 않기 때문에 화장품 방부제로 인정되지 않고 있지만 EDTA를 다른 항균제와 혼합 첨가 시 EDTA는 세포막을 견고하게 유지시키는 Ca^{+2} , Mg^{+2} 등의 무기염류를 포착하여 균의 세포막 구조를 약화시키고 항균제의 균 세포막 내 침투를 용이하게 만들기 때문에 항균력의 시너지 효과가 발휘할 수 있게 된다[22-23].

4. 결 론

새로운 항균제인 palmitoyl tripeptide M330은 최소 저해농도(MIC) 결정 실험에서는 기존 화장품 방부제인 메칠 파라벤, 페녹시 에탄올보다 더 뛰어난 항균활성을 보이지만, 이를 화장품 제형에 방부제로 적용했을 때는 침전이 발생하면서 점도가 떨어지고 또 항균력도 크게 떨어져 화장품 방부제로 부적합하였다. M330을 화장품에 적용하기 위하여 콜레스테롤 10%가 혼합된 ethosome 베시클로 캡슐화를 시도한 결과 2-4% 농도까지 M330을 포집할 수 있었고 이를 화장품 제형에 혼합한 결과 침전을 방지할 수 있었다. 화장품 제형에서 켈린지 테스트를 실시한 결과 그람 음성균인 *E. coli*나 *P. aeruginosa*에서는 캡슐화하지 않고 수용액상태로 첨가했을 때보다 캡슐화하여 첨가했을 때 M330의 항균특성이 더욱 향상되었지만 그람 양성균인 *S. aureus*, 진균인 *C. albicans*에서는 캡슐화에 의한 효과가 없었다. M330과 함께 EDTA를 혼합하여 화장품 제형에서 켈린지 테스트한 결과 진균인 *C. albicans*는 1주일 안에 대부분의 균이 사멸하였고, 두 성분을 함께 캡슐화 했을 때는 더욱 빠른 속도로 균이 사멸하는 등 캡슐화에 의한 항균효과의 상승을 확인하였다.

감 사

본 연구는 미원상사(주)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. D. S. Orth and J. J. Kabara, Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: application of hurdle technology, *Cosmet. Toiletr.*, **113**, 51-58 (1998).
2. D. S. Orth, Use of parabens as cosmetic preservatives, *Int. J. Dermatol.*, **19**, 504-505 (1980).
3. D. Steinberg, Z. Hirschfeld, I. Tayeb, S. Ben-Yosef, A. David, and M. Friedman, The effect of parabens in a mouthwash and incorporated into a sustained release varnish on salivary bacteria, *J. Dent.*, **27**, 101-106 (1999).
4. E. J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter, Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **153**, 12-19 (1998).

5. S. Oishi, Effects of propyl paraben on the male reproductive system, *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1807-1813 (2002).
6. W. F. Schorr, Paraben allergy: A cause of intractable dermatitis, *JAMA*, **204**, 859-862 (1968).
7. I. L. Schamberg, Allergic contact dermatitis to methyl and propyl paraben, *Arch Dermatol.*, **95**, 626-628 (1967).
8. P. D. Darbre1, A. Aljarrah, W. R. Miller, N. G. Coldham, M. J. Sauer, and G. S. Pope, Concentrations of parabens in human breast tumours, *J. Appl. Toxicol.*, **24**, 5-13 (2004).
9. J. Garcia-Gavin, R. Lissens, A. Timmermans, and A. Goossens, Allergic contact dermatitis caused by isopropyl alcohol: a missed allergen?, *Contact Dermatitis.*, **65**, 101-106 (2011).
10. D. Lujan, B. Hernandez-Machin, Y. Penate, and L. Borrego, Contact urticaria due to phenoxy ethanol in an aftershave, *Dermatitis.*, **20**, E10 (2009).
11. S. Pfuhrer and H. U. Wolf, Effects of the formaldehyde releasing preservatives dimethylol urea and diazolidinyl urea in several short-term genotoxicity tests, *Mutation Res.*, **514**, 133-146 (2002).
12. S. H. Mandy, Contact dermatitis to substituted imidazolidinyl urea-a common preservative in cosmetics, *Archs Derm.*, **110**, 463 (1974).
13. A. Giacomettia et al., Antimicrobial activity of polycationic peptides, *Peptides.*, **20**, 1265-1273 (1999).
14. A. Giacomettia, O. Cironia, M. S. Del Pretea, F. Barchiesia, A. Mataloni Paggia, E. Petrellib, and G. Scalisea, Comparative activities of polycationic peptides and clinically used antimicrobial agents against multidrug-resistant nosocomial isolates of acinetobacter baumannii, *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**, 807-810 (2000).
15. M. Malmsten et al, Antimicrobial peptides derived from growth factors, *Growth Factors*, **25**, 60-70 (2007).
16. S. Maher and S. McClean, Melittin exhibits necrotic cytotoxicity in gastrointestinal cells which is attenuated by cholesterol, *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 1104-1114 (2008).
17. 이윤섭 and 최혜정, 지방산 트리펩타이드염 및 이를 함유하는 항균 조성물, 특허 10-1151878 (2012).
18. T. M. Taylor, S. Gaysinsky, P. M. Davison, B. D. Bruce, and J. Weiss, Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by zeta-potential, vesicle size, and encapsulation efficiency, *Food Biophysics*, **2**, 1-9 (2007).
19. O. Gortzi, S. Lalas, I. Chinou, and J. Tsaknis, Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes, *Molecules*, **12**, 932-945 (2007).
20. P. S. Malheiros, V. Sant'Anna, M. S. Barbosa, A. Brandeli, and B. D. G. Melo Franco, Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese, *Int. J. Food Microbiol.*, **156**, 272-277 (2012).
21. P. S. Malheiros, D. J. Daroit, and A. Brandeli, Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides, *Trends in Food Science & Tech.*, **21**, 284-292 (2010).
22. T. M. Taylor, B. D. Bruce, J. Weiss, and P. M. Davidson, *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid, *J. Food Safety*, **28**, 183-197 (2008).
23. J. K. Branen and P. M. Davison, Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylene diaminetetraacetic acid and lactoferrin, *Int. J. Food Microbiol.*, **90**, 63-74 (2004).