

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2022.8.6.615

JCCT 2022-11-75

초임계 자소자추출물의 항균효과와 바이오필름, 염증매개인자 생성 억제 효능

The Effect of Anti-microbial and the Inhibitory Effect of Biofilm Formation and Inflammatory Factors Production of *Perillae semen* Supercritical Fluid Extracts

이광원*, 박신성**, 박수인***, 신문삼****

Kwang Won Lee*, Shinsung Park, Su In Park***, Moon Sam Shin******

요약 본 연구는 자소자 열수추출물과 압력은 일정하게 유지한 상태로 온도를 조절하여 추출한 3종의 자소자 초임계 추출물에 대해 항산화력, 항균활성, biofilm 형성 억제능과 염증매개물질(nitric oxide), 염증성 사이토카인(interleukin-6, interleukin-8)의 생성 억제능을 평가하였다. 자소자 열수추출물과 비교하였을 때 자소자 초임계추출물이 항산화 효과는 떨어졌으나, *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)에 대한 minimal inhibitory concentration(MIC)이 월등히 낮은 것으로 확인되었고, biofilm 형성 억제능 또한 더 우수하였다. 염증매개물질과 염증성 사이토카인의 생성도 자소자 초임계추출물이 자소자 열수추출물에 비해 현저히 감소시킬 수 있었다. 따라서 우리는 초임계추출물 중 가장 우수한 항균작용과 biofilm 형성 억제, 염증인자 생성 억제 효능을 보인 45°C로 추출한 자소자 초임계추출물이 아토피 피부염 환자의 가려움증과 경표피수분손실을 방지하기 위한 천연 기능성 소재로 적합함을 시사한다.

주요어 : 자소자, 초임계추출법, 항균, 바이오필름, 항염증

Abstract In this study, we assessed anti-oxidant activity, anti-microbial, inhibition of biofilm formation and inflammatory factors(nitric oxide, interleukin-6, interleukin-8) inhibitory effect of *Perillae semen* hydrothermal extract(PSW) and three kinds of *Perillae semen* supercritical fluid extract(PSSs) extracted by controlling temperature with no variation of pressure. Compared with PSW, PSSs had significantly lower minimal inhibitory concentrations(MICs) against *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*) and the ability of PSSs to inhibit formation of biofilm was also superior. PSSs reduce the production of inflammatory mediator and inflammatory cytokines significantly compared to PSW. We suggest, therefore, *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract which showed the best anti-microbial, inhibition of biofilm formation, and inhibition of inflammatory factors production among the supercritical fluid extracts could be used for protecting patients with atopic dermatitis from pruritus and transepidermal water loss as a functional ingredient from nature.

Key words : *Perillae Semen*, Supercritical Fluid Extraction Method, Anti-microbial, Anti-biofilm, Anti-inflammation

*정회원, 을지대학교 시니어헬스케어학과 석사과정 (제1저자) Received: August 14, 2022 / Revised: September 25, 2022

**정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 석사과정 (참여저자) Accepted: October 10, 2022

정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 연구교수 (참여저자) *Corresponding Author: msshin@eulji.ac.kr

****정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 교수 (교신저자) Dept. of Beauty & Cosmetic Science, Eulji Univ, Korea

접수일: 2022년 8월 14일, 수정완료일: 2022년 9월 25일

게재확정일: 2022년 10월 10일

I. 서 론

자소는 꿀풀과(*Labiatae*) 자소속(*Perilla*)에 속하는 들깨종이며 동아시아국가에 분포한다. 특히 씨앗을 의미하는 자소자(*Perillae semen*)는 약용으로 널리 이용되고 있다[1]. 약효를 나타내는 주성분은 perillaldehyde이며 다양한 균에 대한 탁월한 항균활성을 나타낸다. 자소자에는 불포화지방산이 높은 비율로 함유한다고 알려져 있다. 특히, 불포화지방산 중 하나인 linolenic acid는 항균활성 외에도 항염효과가 뛰어나다는 문헌이 보고된 바 있다[2-5].

이산화탄소는 초임계 유체로 사용될 수 있는 다른 용매보다 임계점(온도 31.1°C, 압력 73.8 bar)이 낮고, 불용성이며, 친환경적이고 가격도 경제적이기 때문에 이산화탄소를 이용한 초임계 유체가 가장 널리 사용된다. 또한, 이산화탄소는 비극성용매로 극성을 띠는 물과 반대로 비극성물질의 추출이 용이하다. 임계점 이상의 온도와 압력 상태의 이산화탄소는 액체와 기체의 중간 성질을 가져 밀도를 연속적으로 조절할 수 있는 장점이 있다. 그 때문에 확산계수와 용해도를 조절하여 추출하고자 하는 원물에 빠르게 침투하여 다량을 추출할 수 있는 장점을 지닌다[6-8].

아토피 피부염은 만성 염증성 피부 질환이다[9]. 일반적으로 유아에서 일시적으로 발병되고 사라지지만 유아기에서 청소년기, 성인기까지 아토피 피부염을 지속적으로 겪는 사람들도 상당하다[10]. 아토피 피부염은 각종 염증반응과 참기 힘든 가려움증을 동반하기 때문에 일상생활에서 삶의 질을 떨어뜨리는 원인이 된다[10, 11]. 한편, 아토피 피부염 환자의 피부에서 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)가 과하게 관찰되고 *S. aureus*가 생성하는 외독소가 아토피 피부염의 염증반응을 악화시킨다는 보고가 있다[12, 13]. 따라서 아토피 피부염 환자의 상태를 호전시키기 위해서는 피부 염증반응을 억제하면서 질환과 관련된 균을 억제하는 것 또한 매우 중요하게 여겨진다.

본 연구는 산업화로 인해 점점 증가하고 있는 아토피 피부염 환자들을 위한 화장품 기능성 소재로 자소자를 선택하여 실험을 진행하였다. 열수추출물과 초임계 추출물의 항산화능, 항균활성, 바이오필름 생성 억제능을 확인하고, 염증유발 인자의 분비 억제능을 확인함으로써 아토피 피부염 환자들의 증상을 호전시킬 수 있는

천연 기능성 오일 소재로의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에서 추출에 이용한 자소자는 (주)건화약품으로부터 구매하였다. 씨앗을 일차적으로 분쇄한 후에 추출을 진행하였고, 동결건조 또는 압력을 낮춰 끓는점을 낮아지게 하는 원리를 이용한 회전감압농축을 실시하였다. 추출물은 냉동보관(-20°C)하여 사용하였다.

2. 사용 시약 및 기기

본 실험에서 사용된 시약은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), phosphate buffered saline(PBS), (2,2'-azin o-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))(ABTS), potassium persulfate, folin ciocalteu's phenol reagent, dimethyl sulfoxide, ciprofloxacin는 Sigma Aldrich사에서 구매하여 사용하였다. 용매로 사용된 ethyl alcohol과 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid, methyl paraben과 실험에 이용된 Na₂CO₃, gallic acid, acetic acid는 삼진화학 제품을 사용하였다. 항균 실험에서 사용된 배지는 MB cell사의 배지를 사용하였다. crystal violet은 대정화학에서 구매하였다. 열수추출을 위해 향온조(Changshin science, Korea), 원심분리기(Hamil Scientific Inc., Korea), 동결건조기(Ilshin Bio Base, Korea)를 이용하였고, *in vitro* 실험을 위해 96 well microplate(SPL Life Sciences Co., Korea), microplate reader(BioTek, USA), pipette(Eppendorf, Germany)이 사용되었다. 항균 실험에 사용된 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였다. Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM; Samchun, Korea), Fetal Bovine Serum(FBS; Gibco, USA), FBS(Samchun, Korea)를 세포실험에 이용하였다.

3. 시료의 추출 방법

열수추출물은 원물 50 g과 정제수 1000 mL을 넣고 분쇄된 원물의 모든 표면을 정제수로 적셨다. 향온조에 정제수를 가하여 80°C로 항상 유지시키며 4시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 70 μm pore size의 mesh filter로

일차적으로 거르고, 원심분리기를 이용하여 침전시켜 2차 여과를 하고, 마지막으로 5 μm pore size 여과지로 감압 여과하였다. 이후에 동결건조하여 갈색의 분말을 얻었다.

초임계추출물은 추출조의 압력을 350 bar로 설정하고, 온도를 각각 30°C, 45°C, 60°C로 변화를 주었다. 분리조의 압력은 30 bar로 하였으며, 온도는 25°C로 일정하게 설정하였다. 이산화탄소의 유속은 60 mL/min, 보조용매인 에탄올의 유속은 5 mL/min로 하였다. 각 조건의 추출은 150분 동안 진행하였다. 추출 후 회전감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 2시간 이상 완전히 농축시켰다.

4. 수율 측정

열수추출물과 초임계추출물의 수율은 다음의 식으로 수율을 산출하였다.

$$\text{수율 (\% w/w)} \\ = (\text{최종 추출물의 무게 (g)}/\text{원물의 무게 (g)}) \times 100$$

5. 항산화 실험

1) DPPH radical scavenging assay

연속 희석법을 이용하여 일정 농도로 1/2씩 희석한 시료 10 μL 와 DPPH solution 0.2 mM을 190 μL 를 혼합하여 20분간 빛이 없는 곳에서 반응시켰다. 20분 동안 반응이 완료된 용액이 담긴 microplate를 microplate reader에 삽입하고 shaking 과정을 거친 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 실험군의 DPPH radical 소거능을 계산하여 비교하였다. 양성대조군은 일반적으로 널리 사용되는 L-ascorbic acid를 이용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ = (1 - \text{시료를 첨가한 실험군 흡광도}/\text{시료를 첨가하지 않은 대조군 흡광도}) \times 100$$

2) ABTS+ radical scavenging assay

ABTS solution을 phosphate buffered saline(PBS) solution에 농도가 14.8 mM이 되도록 제조하고, potassium persulfate 또한 PBS solution에 농도가 5.28 mM이 되도록 제조하였다. 이 두 용액을 1:1 비율로 혼합

하여 ABTS working solution 제조하였다. 이를 어두운 곳에서 20시간 동안 반응시켜 ABTS+ radical이 생성되도록 하였다.

ABTS working solution 190 μL 와 연속 희석법을 이용하여 일정 농도로 희석한 시료 10 μL 을 혼합 후 실온, 빛이 없는 곳에서 20분간 반응시켰다. 20분 동안 반응이 완료된 용액이 담긴 microplate를 microplate reader에 삽입하여 shaking 과정을 거친 후에 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료를 첨가한 실험군의 ABTS+ radical 소거능을 계산하여 비교하였다. 양성대조군은 일반적으로 널리 쓰이는 L-ascorbic acid를 이용하였다.

$$\text{ABTS+ radical scavenging activity (\%)} \\ = (1 - \text{시료를 첨가한 실험군 흡광도}/\text{시료를 첨가하지 않은 대조군 흡광도}) \times 100$$

3) Total polyphenol content assay

연속 희석법을 이용하여 일정한 농도로 희석한 시료를 각 well에 시료 10 μL 와 folin ciocalteu's phenol reagent를 40 μL 혼합한 뒤에 3분 동안 반응하도록 두었다. 그 후 20% Na_2CO_3 150 μL 를 첨가하여 전체 용액을 알칼리 조건으로 만들어주었다. 이 반응액을 microplate reader를 이용하여 shaking을 해주고 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하여 gallic acid standard curve를 작성하였으며, 시료와 반응한 용액의 측정값을 standard curve로 산출하였다. 총 폴리페놀의 함량은 mg gallic acid equivalents(GAE)/g extract로 나타내었다.

6. Minimum inhibitory concentration(MIC) 측정

Broth dilution method를 응용하여 96 well microplate를 이용하여 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*) 균주에 대한 MIC를 측정하였다. Muller-Hinton medium(MH)에 글리세롤에 저장된 *S. aureus* 균주를 접종하여 shaking incubator(37°C, 500 rpm)에서 24시간 배양하였다. 실험을 진행하기 전 1회 계대배양하고 spectrophotometer로 600 nm에서 optical density(OD_{600}) 값을 0.5로 맞춘 뒤 실험을 진행하였다. 모든 시료들은 연속 희석법으로 1/2 씩 희석하여 일정한 농도로 준비하였고, OD_{600} 값을 0.5로 맞춘 균 현탁액을 MH에 1%가 되도록 희석

하였다. 시료 100 μL 와 균 현탁액 100 μL 를 혼합한 후, 37°C incubator에서 12시간 동안 배양시켰다. 균의 생육이 억제되는 최소 농도를 MIC로 판단하였다. 양성대조균은 화장품에서 사용되는 방부제로 methyl paraben을 사용하였다. 일차적으로 연속 희석법을 이용하여 MIC를 알아내고, 시료의 농도를 세분화하여 더 낮은 농도의 MIC를 확인하였다.

7. Biofilm inhibition assay

글리세롤에 저장된 *S. aureus* 균주를 MH에 24시간 배양 후에 균주를 shaking incubator(37°C, 500 rpm)에서 24시간 배양 후에, 1회 계대배양하고 OD₆₀₀ 값을 0.5로 맞춘 뒤 실험을 진행하였다. 모든 시료들은 연속 희석법으로 1/2 씩 희석하여 일정한 농도로 준비하였고, OD₆₀₀ 값을 0.5로 맞춘 균 현탁액을 MH에 1%가 되도록 희석하였다.

96 well microplate에 시료 80 μL 와 균 현탁액을 80 μL 를 혼합한 뒤 37°C incubator에서 24시간 동안 배양시켜 biofilm을 형성하도록 하였다. 정제수로 두 번 wash를 시행한 뒤 건조시키고 0.1%(w/v) crystal violet을 200 μL 를 첨가하여 10분 동안 염색시켰다. 그 후 두 번 wash하고 상온에서 overnight 하였다. 30% acetic acid로 용해시킨 후에 microplate reader에 plate를 삽입하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조균으로 ciprofloxacin을 사용하였다.

Biofilm inhibition activity (%)
= (1-시료를 첨가한 실험군 흡광도/시료를 첨가하지 않은 대조군 흡광도) × 100

8. 세포실험

1) Cell culture

마우스 대식세포주인 Raw 264.7 cell은 Korea cell line bank(KCLB; Seoul National University, Seoul, Korea)에서 분양받았으며, human keratinocyte cell line(HaCaT)은 Amore Pacific Company(Gyeonggi-do, Korea)에서 분양받아서 배양하였다. 10% FBS를 함유한 DMEM을 사용하여 5% 농도의 CO₂와 37°C를 유지하는 incubator에서 세포가 적절한 밀도를 보일 때까지 배양하였다. 배양 플라스크에 정착된 세포들은 각각 scraper 또는 trypsin 처리를 하여 실험에 사용하였다.

2) Cell viability

자소자 추출물의 농도에 따른 Raw 264.7 cell의 세포 생존율을 파악하기 위해 cell viability assay를 진행하였다. cell viability를 측정하기 위해 Quanti-Max™ water-soluble tetrazolium salt(WST)-8 assay kit (Biomax Co., Korea)의 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well씩 분주하고 24시간 동안 incubator(5% CO₂, 37°C)에서 배양시켰다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 자소자 열수추출물, 초임계추출물을 48시간 처리한 실험군의 배양액을 제거한 후 10% WST-8 reagent를 2시간 처리하고 450 nm에서 formazan의 흡광도를 측정하였다.

자소자 추출물의 HaCaT cell의 세포 생존율을 파악하기 위해 cell viability assay를 진행하였다. 96 well plate에 2×10^4 cells/well씩 분주하고 24시간 동안 incubator(5% CO₂, 37°C)에서 배양시켰다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 자소자 열수추출물, 초임계추출물을 48시간 처리한 실험군의 배양액을 제거한 후 10% WST-8 reagent를 2시간 처리하고 450 nm로 formazan의 흡광도를 측정하였다.

Cell viability(%) = (약물 처리군 흡광도/약물 미처리군 흡광도) × 100

3) Nitric Oxide(NO) assay

Raw 264.7 cell을 2×10^4 cells/well씩 분주한 뒤에 24시간 동안 incubator(5% CO₂, 37°C)에서 배양시켰다. 그 후 lipopolysaccharide(LPS)와 약물을 동시에 처리하여 48시간 동안 배양시켰다. 세포배양액의 상층액을 취해 Griess Reagent System(Promega, USA)을 사용하여 NO 생성량을 정량하였다.

4) Interleukin-6(IL-6), Interleukin-8(IL-8) enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

HaCaT cell을 4×10^4 cells/well씩 24well plate에 분주한 뒤에 24시간 동안 incubator(5% CO₂, 37°C)에서 배양시켰다. 그 후에 2% FBS를 함유한 DMEM으로 4시간 동안 starvation 과정을 거치고, 3시간 동안 확인하고자 하는 약물을 pre-treated 하였다. 그 후 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 약물을 동시에 처리하여 48시간 동안 배양시켰다. 세포배양액의 상층액을 취해

IL-6, IL-8 생성 수준을 판단하기 위해 human IL-8/CXCL8 and IL-6 DuoSet ELISA kits(R&D Systems, USA)를 사용하여 측정하였다.

9. 통계처리

모든 실험은 n=3으로 실험을 진행하였고, 실험에 의해 얻어진 세 번의 결과 값들을 Mean ± SD로 나타내었다. p-value가 0.05 미만일 때 값이 유의성을 띠는 것으로 판단하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. 추출법에 따른 수율

자소자의 열수추출물(*Perillae semen* hydrothermal extract, PSW), 자소자 초임계추출물(*Perillae semen* supercritical fluid extract, PSS)의 수율을 다음의 Table 1에 나타내었다.

추출 온도를 올려 추출했을 경우 점점 수율이 증가하는 경향이 나타났고, 열수추출법보다 초임계추출법에서 높은 수율을 보였다. 열수추출물의 최종 추출물의 형태는 갈색 분말이었고, 초임계추출물의 최종 추출물의 형태는 오일이었으며, 녹황색을 띠었다.

자소자는 불포화 지방산인 linolenic acid, linoleic acid, oleic acid 순서로 다량 함유하고 있다고 알려져 있다[4]. linolenic acid는 염증성 사이토카인의 분비를 억제하는 효과로 아토피 피부염 개선에 효과가 있을 것으로 추측되며[5], 오일형태로 화장품에서 경표피수분 손실을 방지하기 위한 밀폐제로써 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

표 1. 자소자 추출물의 수율
 Table 1. Yield of *Perillae semen* extracts

Sample	Yield(%)
PSW	4.52
PSS30	23.73
PSS45	23.89
PSS60	25.18

PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30°C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60°C extract.

2. 자소자 추출물의 항산화 실험 결과

1) DPPH 라디칼 소거능

자소자 열수추출물은 half maximal inhibitory concentration (IC50)이 297.18 µg/mL로 나타났으며, 30°C, 45°C, 60°C로 추출한 자소자 초임계추출물은 최고 농도에서 각각 15.76 ± 2.59%, 28.20 ± 2.02%, 27.10 ± 2.68%로 나타났다. 자소자 초임계추출물은 추출 방법에 따라 소거능 차이를 보였으며, 30°C로 추출한 초임계추출물은 45°C와 60°C로 추출한 초임계추출물과 비교하였을 때 상당한 차이를 보였다. 45°C와 60°C로 추출한 초임계추출물 비교하면 큰 차이를 보이지 않았다(Figure 1). 따라서 초임계추출물 중에 DPPH 라디칼 소거능이 뛰어난 추출물의 추출방법은 45°C와 60°C로 추출하는 것으로 생각된다.

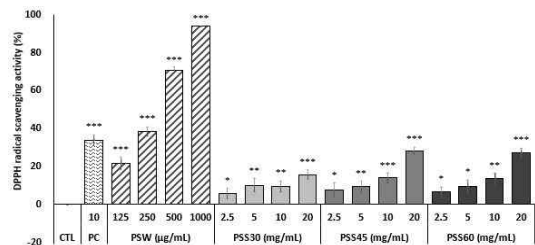


그림 1. 자소자 추출물의 DPPH radical 소거능(%)
 Figure 1. DPPH radical scavenging activity of *Perillae semen* extract

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. control, PC: positive control; L-ascorbic acid, 10 µg/mL; 81.77 ± 0.80%, CTL: control, sample untreated group, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30°C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60°C extract.

2) ABTS+ 라디칼 소거능

자소자 열수추출물은 IC50이 19.52 µg/mL로 나타났으며, 30°C, 45°C, 60°C 추출한 자소자 초임계추출물은 실험상의 최고 농도에서 각각 32.67 ± 3.16%, 61.06 ± 3.76%, 60.89 ± 3.34%의 ABTS 양이온성 라디칼 소거능이 나타났다. 자소자 초임계추출물은 추출 방법에 따라 라디칼 소거능 차이를 보였으며, 30°C로 추출한 초임계추출물은 45°C와 60°C로 추출한 초임계추출물과 비교하였을 때 상당한 소거능 차이를 보였다. 45°C와 60°C로 추출한 초임계추출물을 비교하면 큰 차이가 나타나지 않았다(Figure 2). DPPH 라디칼 소거능 실험과 ABTS+ 라디칼 소거능 실험결과는 유사한 경향을 띠었다.

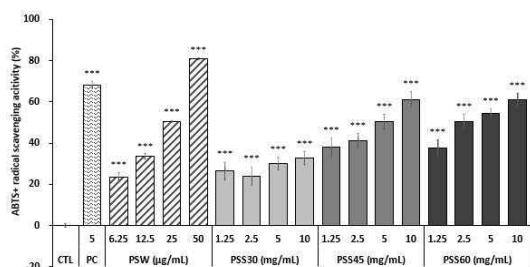


그림 2. 자소자 추출물의 ABTS+ radical 소거능(%)
Figure 2. ABTS+ radical scavenging activity of *Perillae semen* extract

***P<0.001 vs. control, PC: positive control; L-ascorbic acid, 5 µg/mL; 68.12 ± 1.95%, CTL: control, sample untreated group, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30°C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60°C extract.

3) 총 폴리페놀 함량 정량

자소자 열수추출물의 총 폴리페놀 함량은 163.12 ± 22.81 mg GAE/g로, 30°C로 추출한 자소자 초임계추출물의 총 폴리페놀 함량은 3.82 ± 0.00 mg GAE/g로, 45°C로 추출한 자소자 초임계추출물의 총 폴리페놀 함량은 9.90 ± 3.39 mg GAE/g로, 60°C로 추출한 자소자 초임계추출물의 총 폴리페놀 함량은 19.03 ± 2.61 mg GAE/g만큼 추출된 것으로 정량되었다.

3. MIC 측정

MIC를 측정된 결과, *S. aureus*에 대한 최소생육저해 농도가 30°C로 추출한 자소자 초임계추출물과 45°C로 추출한 자소자 초임계추출물에서 모두 400 µg/mL로 나타났고 60°C로 추출한 자소자 초임계추출물에서 500 µg/mL 농도로 측정되었다. 자세한 실험결과는 다음의 Table 2에 나타났다. 이러한 결과는 선행연구에서 항균 효과가 있다고 밝혀진 자소자의 linolenic acid와 perillaldehyde가 함유되어 항균효과를 나타내는 것으로 추측된다[2, 3]. monoterpene 구조를 지닌 perillaldehyde는 오일에 용해가 가능하며, 물에는 잘 용해되지 않는 특성을 지닌다. 따라서 물에는 난용성 성분인 perillaldehyde가 일반적인 열수 추출방법으로는 추출이 어렵고 [14], 비극성을 띠는 이산화탄소 초임계 유체를 이용한 추출방법에서 오일과 함께 perillaldehyde가 추출된 것으로 추측된다[15]. 또한 *S. aureus*에 노출되었을 때 NO의 생성이 증가한다는 보고도 존재한다. 따라서

자소자 초임계추출물의 *S. aureus*에 대한 항균효과로 인해 염증매개물질의 발생을 억제할 수 있을 것으로 사료된다[16].

표 2. 황색포도상구균에 대한 자소자 추출물의 항균활성
Table 2. Anti-microbial activity of *Perillae semen* extracts on *staphylococcus aureus*.

		MIC (µg/mL)				
Sample	Strain	PC	PSW	PSS30	PSS45	PSS60
	<i>S. aureus</i>	2500	>2000	400	400	500

All experiments are conducted in triplicate. PC: positive control; methyl paraben, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30°C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60°C extract.

4. Biofilm inhibition 평가

biofilm은 미생물이 특정 표면에 부착하면서 extracellular polymeric substances(EPS), 다가 양이온, 콜로이드 화합물 등이 축적되어 만들어진 일종의 막이다[17, 18]. biofilm은 균의 항생제에 대한 강력한 내성을 갖게 하며 미생물의 감염을 촉진하는 역할을 한다[19]. 그렇기 때문에 biofilm을 억제하는 것은 특정 항생 물질에 대한 내성을 저하시키고 미생물 증식을 억제할 수 있는 방법이다.

자소자 열수추출물은 biofilm의 생성을 억제하기는 하나, 농도의존적으로 biofilm 생성을 억제능이 감소하는 경향을 보였다. 반면에 자소자 초임계추출물은 농도의존적으로 biofilm의 생성을 억제하는 결과가 나타났다(Figure 3). 초임계추출물 중에서도 45°C로 추출한 자소자 초임계추출물의 biofilm 억제능이 저농도부터 고농도까지 모든 농도에서 가장 크게 나타났다.

5. Cell viability

다음의 Figure 4는 자소자 열수추출물과 초임계추출물을 각각 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 Raw 264.7 cell에 대해 cell viability assay를 실시한 결과이다. WST-8 kit를 사용하여 도출한 결과, 모두 세포생존율이 대조군에 대비하여 80% 이상으로 독성이 없는 농도임을 확인하였다. 따라서 50-200 µg/mL 농도로 NO assay를 진행하였다.

다음의 Figure 5는 자소자 열수추출물과 초임계추출물을 각각 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 HaCaT cell

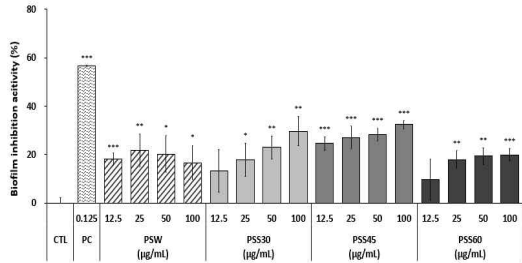


그림 3. 자소자 추출물의 biofilm 억제 활성(%)
 Figure 3. Biofilm inhibition activity of *Perillae semen* extracts

PC: positive control; ciprofloxacin, 0.125 µg/mL; 56.63 ± 0.32%, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. control, CTL: control, sample untreated group, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30°C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60°C extract.

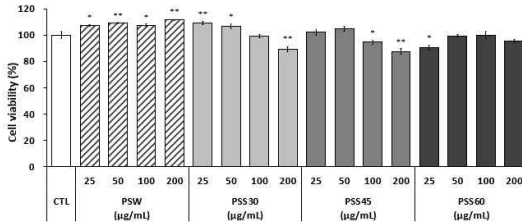


그림 4. Raw 264.7 세포에 대한 세포 생존율(%)
 Figure 4. Raw 264.7 cell cytotoxicity results over 48 h *Perillae semen* extracts treated at the concentration of 25–200 µg/mL

*P<0.05, **P<0.01 vs. control, CTL: control, sample untreated group, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30°C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60°C extract.

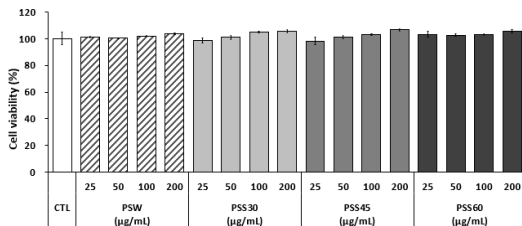


그림 5. HaCaT 세포에 대한 세포 생존율(%)
 Figure 5. HaCaT cell cytotoxicity results over 48 h *Perillae semen* extracts treated at the concentration of 25–200 µg/mL

CTL: control, sample untreated group, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30°C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60°C extract.

대해 cell viability assay를 실시한 결과이다. WST-8 kit를 이용하여 도출한 결과, 모두 세포 생존율이 대조군에 비교하였을 때 비슷한 수준을 나타내 독성이 전혀 없는 농도임을 확인하였다. 따라서 50–200 µg/mL 농도로 IL-6, IL-8 생성량을 측정하였다.

6. 세포실험

1) 자소자 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

염증매개물질 중 하나인 NO가 체내에서 과도하게 발생된다면 염증반응을 유발하여 조직의 손상 등 병리적 현상을 유도한다[16, 20, 21]. 따라서 과도한 NO의 생성을 억제하는 것은 정상적으로 조직을 유지하는 데 중요하다.

LPS로 Raw 264.7 cell에 염증반응을 유도한 뒤 추출물 4종을 처리하여 NO 생성량 실험을 진행하였으며, 결과는 다음의 Figure 6에 나타났다. 자소자 열수추출물의 NO 생성 억제능이 자소자 초임계추출물보다 떨어짐을 확인하였다. 50, 100 µg/mL 농도에서 60°C로 추출한 자소자 초임계추출물이 NO 생성을 더 억제하였지만, 200 µg/mL 농도에서 자소자 초임계추출물은 모두 5.00% 대 이하로 LPS를 처리하지 않은 대조군과 비슷하게 NO 생성을 완전히 억제하였다. 한편 자소자 열수추출물은 200 µg/mL 농도에서 34.61 ± 2.28%의 NO가 생성되는 것으로 계산되었다.

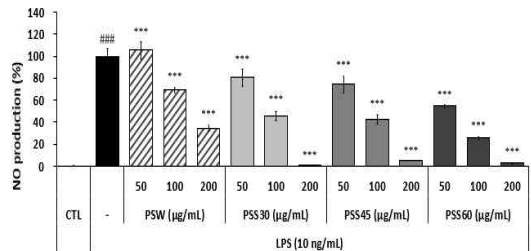


그림 6. Raw 264.7 세포에서의 NO 생성량
 Figure 6. The inhibitory effect of *Perillae semen* extracts on NO production in HaCaT cell

###P<0.001 vs. control, ***P<0.001 vs. LPS treated group, CTL: control, sample untreated group, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30°C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45°C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60°C extract.

2) 자소자 추출물이 IL-6 생성에 미치는 영향

TNF- α 로 HaCaT cell에 염증반응을 유도한 뒤 추출물 4종의 IL-6 생성 실험결과를 다음의 Figure 7에 나타냈다. 자소자 열수추출물은 농도의존적으로 IL-6의 생성량을 증가시키는데 반해, 자소자 초임계추출물은 농도의존적으로 IL-6의 생성량을 감소시키는 경향을 보였다. 특히, 자소자 초임계추출물 중에서는 45 $^{\circ}$ C로 추출한 초임계추출물의 IL-6 생성 억제능이 다른 초임계추출물보다 우수하였다. 자소자 초임계추출물의 IL-6 생성에 대한 본 연구의 실험결과는 linolenic acid의 TNF- α , NO, IL-6의 생성을 농도의존적으로 저해한다는 선행연구와 일치하는 결과를 보였다[5].

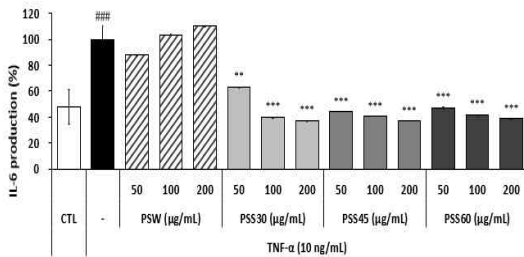


그림 7. HaCaT 세포에서의 IL-6 생성량
Figure 7. The inhibitory effect of *Perillae semen* extracts on IL-6 production in HaCaT cell

###P<0.01 vs. control, **P<0.01, ***P<0.001 vs. TNF- α treated group, CTL: control, sample untreated group, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30 $^{\circ}$ C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45 $^{\circ}$ C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60 $^{\circ}$ C extract.

3) 자소자 추출물이 IL-8 생성에 미치는 영향

TNF- α 로 HaCaT cell에 염증반응을 유도한 뒤 추출물 4종의 IL-8 발생 실험 결과를 다음의 Figure 8에 나타냈다. IL-6의 실험결과와 비슷한 결과가 도출되었으나, 자소자 초임계추출물의 IL-8에 대한 생성 억제 효과가 더 뛰어났다. 자소자 열수추출물은 농도의존적으로 IL-8의 생성량을 증가시키는데 반면, 자소자 초임계추출물은 농도의존적으로 IL-8의 생성량을 감소시키는 경향을 보였다. 30 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C 자소자 초임계추출물의 IL-8 생성에 대한 IC50은 각각 107.61 μ g/mL, 55.58 μ g/mL, 69.91 μ g/mL로 계산되었다. 따라서 자소자 초임계추출물 중에서는 45 $^{\circ}$ C로 추출한 초임계추출물의 IL-8 생성 억제능이 30 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C로 추출한 초임계추출물

보다 뛰어난 것으로 판단하였다.

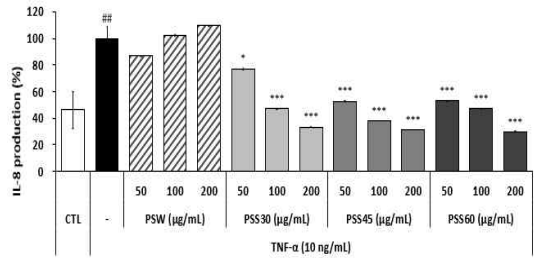


그림 8. HaCaT 세포에서의 IL-8 생성량
Figure 8. The inhibitory effect of *Perillae semen* extracts on IL-8 production in HaCaT cell

##P<0.01 vs. control, *P<0.05, ***P<0.001 vs. TNF- α treated group, CTL: control, sample untreated group, PSW: *Perillae semen* hydrothermal extract, PSS30: *Perillae semen* supercritical fluid 30 $^{\circ}$ C extract, PSS45: *Perillae semen* supercritical fluid 45 $^{\circ}$ C extract, PSS60: *Perillae semen* supercritical fluid 60 $^{\circ}$ C extract.

IV. 결 론

자소자는 불포화지방산 특히, linolenic acid가 풍부하고, 주성분으로 perillaldehyde도 함유하고 있다고 알려져 있다. linolenic acid는 항염효과와 항균효과, perillaldehyde는 항균효과가 뛰어나다는 보고도 존재한다. 본 연구에서 자소자 추출물 4종을 *in vitro* 실험을 진행한 결과, 자소자 초임계추출물의 효능이 linolenic acid와 perillaldehyde의 효능과 유사한 것을 확인하였다.

자소자 열수추출물은 *S. aureus*에 대한 MIC를 실험을 진행한 농도범위 내에서 관찰할 수 없었고, 자소자 초임계추출물은 *S. aureus*에 대한 MIC를 확인할 수 있었다. 이로써 초임계추출물의 항균활성이 열수추출물보다 더 뛰어난 것을 파악하였다. 초임계추출물의 균의 생육을 저해하는 MIC를 확인한 후 biofilm 생성 억제능을 확인하여 항균 소재에 대한 내성 방지 가능성 또한 확인하였다. 또한 염증매개인자인 NO와 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-8의 생성을 억제하는 항염효과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 자소자 열수추출물보다 3종의 자소자 초임계추출물이 모두 항균, 항염증 효과가 더 우수하다는 것을 알 수 있었다. 그중에서도 350 bar, 45 $^{\circ}$ C로 추출한 초임계추출물의 효능이 전반적으로 뛰어났다.

따라서 우리는 45 $^{\circ}$ C로 추출한 자소자 초임계추출물을

화장품 제형에 추가한다면, 아토피 피부염 환자의 피부에서 많이 발견되는 *S. aureus*에 대한 항균효과를 통해 균주가 분비하는 외독소로부터 피부를 보호할 수 있다고 시사한다. 또한 각종 항염증 작용으로 피부에서 발생되고 있는 염증반응을 완화시키며, 동시에 오일형태의 추출물은 피부에 친연으로부터 유래한 보습막을 형성시켜 줌으로써 아토피 피부염 환자의 피부건조증 완화에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

References

- [1] Y. J. Kim, C. K. Kim, and Y. J. Kwon, "Isolation of antioxidative components of *Perillae semen*," *Korean Journal of Food Science and Technology (KJFST)*, Vol. 29, No. 1, pp. 38-43, February 1997.
- [2] Y. S. Ahn, D. H. Shin, N. I. Baek, R. S. Seong, and G. J. Woo, "Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Mallotus japonicus* Muell on *Listeria monocytogenes*," *Korean Journal of Food Science and Technology (KJFST)*, Vol. 33, No. 2, pp. 271-277, April 2001.
- [3] R. Kang, R. Helms, M. J. Stout, H. Jaber, Z. Chen, and T. Nakatsu, "Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial," *Journal of agricultural and food chemistry (J. Agric. Food Chem.)*, Vol. 40, No. 11, pp. 2328-2330, November 1992. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00023a054>
- [4] C. K. Kim, Y. J. Kim, and Y. J. Kwon, "Amino acid and fatty acid compositions of *Perillae semen*," *The Korean Society of Food Science and Nutrition (J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.)*, Vol. 27, No. 3, pp. 381-385, June 1998.
- [5] A. L. Jeon, J. E. Kim, and N. H. Lee, "Whitening and anti-inflammatory constituents from the extract of *Citrullus lanatus* vines," *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea (J Soc. Cosmet. Sci. Korea)*, Vol. 43, No. 1 pp. 53-60, March 2017. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2017.43.1.53>
- [6] A. R. Hwang, I. I. Jung, G. B. Lim, and J. H. Ryu, "Extraction of oil from canola seeds with supercritical carbon dioxide," *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal (KSBB Journal)*, Vol. 24, No. 4, pp. 367-376, August 2009.
- [7] R. L. Mendes, B. P. Nobre, M. T. Cardoso, A. P. Pereira, A. F. Palavra, "Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae," *Inorganica Chimica Acta (Inorganica Chim. Acta)*, Vol. 356, No. 3, pp. 328-334, December 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00363-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00363-3)
- [8] K. W. Lee, S. Park, S. I. Park, and M. S. Shin, "Cosmetic Efficacy of Supercritical Cannabis sativa Seed Extracts and Enhancement of Skin Permeation," *The Journal of the Convergence on Culture Technology (JCCT)*, Vol. 7, No. 4, pp. 683-691, November 2021. DOI: <https://doi.org/10.17703/JCCT.2021.7.4.683>
- [9] D. Y. Leung, "Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases," *Journal of Allergy and Clinical Immunology (J. Allergy Clin. Immunol.)*, Vol. 96, No. 3, pp. 302-319, September 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(95\)70049-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(95)70049-8)
- [10] S. P. DaVeiga, "Epidemiology of atopic dermatitis: a review," *In Allergy & Asthma Proceedings (Allergy Asthma Proc.)*, Vol. 33, No. 3, pp. 227-234, May-June 2012. DOI: <https://doi.org/10.2500/aap.2012.33.3569>
- [11] N. K. Mollanazar, P. K. Smith, and G. Yosipovitch, "Mediators of chronic pruritus in atopic dermatitis: getting the itch out?," *Clinical reviews in allergy and immunology (Clin. Rev. Allergy Immunol.)*, Vol. 51, No. 3, pp. 263-292, December 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8488-5>
- [12] J. J. LEYDEN, R. R. MARPLES, and A. M. KLIGMAN, "*Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis," *British Journal of Dermatology (Br. J. Dermatol.)*, Vol. 90, No. 5, pp. 525-525, May 1974. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1974.tb06447.x>
- [13] R. Bunikowski, M. E. Mielke, H. Skarabis, M. Worm, I. Anagnostopoulos, G. Kolde, U. Wahn, and H. Renz, "Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis," *Journal of Allergy and Clinical Immunology (J. Allergy Clin. Immunol.)*, Vol. 105, No. 4, pp. 814-819, April 2000. DOI: <https://doi.org/10.1067/mai.2000.105528>
- [14] L. Tao and M. A. Pereira, "Quantification of carvone, cineole, perillaldehyde, perillyl alcohol and sobrerol by isocratic high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography A (J. Chromatogr. A)*, Vol. 793, No. 1, pp. 71-76, January

1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)00867-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00867-4)
- [15]M. C. Wei, C. S. Wang, D. H. Wei, and Y. C. Yang, "Insights into the supercritical CO₂ extraction of perilla oil and its theoretical solubility," *Processes*, Vol. 9, No. 2, pp. 239, January 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr9020239>
- [16]K. I. Park, "Variation of nitric oxide concentrations in response to shaking stress in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*," *The Korean Journal of Malacology(Korean J. Malaco.)*, Vol. 29 No. 1 pp. 1-6, March 2013. DOI: <https://doi.org/10.9710/kjm.2013.29.1.1>
- [17]J. Wingender, T. R. Neu, and H. C. Flemming, "What are bacterial extracellular polymeric substances?," *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer, pp. 1-19, 1999. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_1
- [18]Z. Xu, Y. Liang, S. Lin, D. Chen, B. Li, L. Li, and Y. Deng, "Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification," *Current microbiology(Curr. Microbiol.)*, Vol. 73, No. 4, pp. 474-482, June 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1>
- [19]H. S. Lee and Y. Kim, "Growth of *Candida albicans* Biofilm is Inhibited by *Salvia miltiorrhiza*," *Microbiology and Biotechnology Letters(MBL)*, Vol. 47, No. 3, pp. 465-472, September 2019. DOI: <https://doi.org/10.4014/mbl.1901.01007>
- [20]S. C. Park and D. Y. Son, "Inhibitory Effects of *Euphorbia supina* Rafin on the Production of Pro-Inflammatory Mediator by LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages," *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition (J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.)*, Vol. 40, No. 4, pp. 486-492, April 2011. DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.4.486>
- [21]H. K. Kim, "Effects of Korean Radish on DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice," *International Journal of Advanced Culture Technology (IJACT)*, Vol. 6, No. 4, pp. 97-108, December 2018. DOI: <https://doi.org/10.17703/IJACT2018.6.4.97>