

<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2022.8.6.605>

JCCT 2022-11-74

오레가노 초임계추출물의 황색포도상구균 바이오필름 형성 억제능을 이용한 기능성 화장품 소재의 개발

Anti-Biofilm Activity of *Origanum Vulgare* Supercritical Fluid Extracts and Cosmetic Active Ingredients Development

박신성*, 이광원**, 박수인***, 신문삼****

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

요약 본 연구에서는 오레가노를 초임계유체추출법과 열수추출법으로 추출하여 항균, 항산화 *in vitro* 실험을 수행하였다. 항균실험인 Disc diffusion method 결과, 초임계추출물에 대해서만 clear zone이 나타났다. *S. aureus*에 대한 MIC는 초임계추출물에서만 관찰되었으며, 1000 µg/mL로 확인되었다. 열수추출물은 *C. acnes*에 대한 MIC가 125 µg/mL로 여드름균에 대한 항균력이 뛰어났다. 나아가 우리는 Biofilm inhibition assay를 통해 오레가노 초임계추출물이 125 µg/mL의 저농도에서도 *S. aureus*의 바이오필름을 70%이상 억제한다는 것을 발견하였다. DPPH radical 소거능, ABTS+ radical 소거능, SOD 유사활성능과 총 폴리페놀 함량 측정에서 열수추출물의 항산화력이 초임계추출물보다 우수하게 측정되었다. 나아가, 앞서 확인된 오레가노 초임계추출물의 *S. aureus* 바이오필름 억제능을 활용하여 아토피 피부에 적합한 소재를 개발하고자 하였다. 오레가노 초임계추출물의 낮은 용해도를 극복하고 안정성을 증가시키기 위하여 리포솜을 이용하였다.

주요어 : 오레가노, 초임계 유체, 바이오필름, 리포솜, 화장품

Abstract In this study, oregano was extracted by supercritical extraction and hydrothermal extraction method. *In vitro* experiments such as antimicrobial and antioxidant activity test were performed. As a result of the disc diffusion method, only the supercritical extracts formed a clear zone. The MIC for *S. aureus* was found only in the supercritical fluid extracts and it was 1000 µg/mL. The hydrothermal extract's MIC is 125 µg/mL for *C. acnes*. Through biofilm inhibition assay, we found that the supercritical fluid oregano extracts inhibit the biofilm of *S. aureus* by more than 70% even at low concentrations of 125 µg/mL. On the other hand, the antioxidant ability of the hydrothermal extract was better than that of the supercritical fluid extracts. Furthermore, we tried to make a skincare ingredient for atopic dermatitis by utilizing the *S. aureus* biofilm inhibitory ability of oregano supercritical fluid extracts. Liposome was used to overcome the low solubility of the oregano supercritical fluid extracts and increase stability.

Key words : *Origanum Vulgare*, Supercritical Fluid, Biofilm, Liposome, Cosmetic

*정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 석사과정 (제1저자)
**정회원, 을지대학교 시니어헬스케어학과 석사과정 (참여저자)
***정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 연구교수 (교신저자)
****정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 교수 (참여저자)
접수일: 2022년 8월 14일, 수정완료일: 2022년 9월 25일
게재확정일: 2022년 10월 10일

Received: August 14, 2022 / Revised: September 25, 2022
Accepted: October 10, 2022
***Corresponding Author: suinpark@eulji.ac.kr
Dept. of Beauty & Cosmetic Science, Eulji Univ, Korea

I. 서 론

바이오필름(biofilm)은 미생물 오염의 지속적인 원인으로 작용할 가능성이 있어 미생물의 역제의 중요한 요소로 여겨지고 있다[1]. 이러한 바이오필름은 미생물이 고체의 표면에 부착해서 자라나며 세포 밖으로 세포외 중합체 물질을 분비하여 형성하는 얇은 막이다[2]. 부유 상태의 세균(planktonic bacterial cells)대비 항생물질에 대한 내성을 10배에서 1,000배 이상 높아지게 만들고 큰 물리적 자극을 공급해야 균을 제거할 수 있으므로, 자극 없이 바이오필름의 형성을 억제하는 물질이 필요하다[3, 4].

바이오필름을 형성하는 것으로 알려진 균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* 등이 있으며, *Cutibacterium acnes*와 같은 혐기성균도 바이오필름을 형성한다[5,6]. 이 중 *Staphylococcus aureus*는 아토피 환자의 90%에서 감염이 발견되는 등 연관성이 알려진 바 있으며, 그 바이오필름 역시 아토피 병변 피부에서 흔히 발견된다[7, 8]. *Staphylococcus aureus*의 바이오필름은 아토피피부염의 병인화에 중요한 영향을 끼치므로, 이러한 맥락에서 바이오필름을 이해하고 형성을 억제한다면 증상의 완화를 기대할 수 있다[8].

오레가노(*Origanum vulgare*)는 고대부터 향신료로서 사용되어 왔으며, 오레가노 에센셜오일은 항균 효과가 우수한 것으로 알려져 있다[9]. 선행연구에 따르면, 항균 효과뿐만 아니라 항산화와 항염 효과를 가지며 각종 심혈관계 질환과 대사증후군에 대한 억제 효과도 대두되고 있다[10]. 오레가노 추출물의 주요물질은 carvacrol과 thymol로 여러 제조환경에서 바이오필름을 억제할 수 있다고 보고되었으며, 이는 피부에 생긴 바이오필름에도 긍정적인 효과를 보일 수 있다는 것을 시사한다[10, 11].

초임계유체추출법(supercritical fluid extraction)은 신속하면서도 선택적인 추출이 가능한 추출 방법이다. 용매에 임계점 이상의 압력과 온도를 가하면 액체의 용해력과 기체의 확산성을 모두 가지게 된다[12]. 특히 용매로 이산화탄소를 이용하면 비교적 저렴하고, 용매가 추출물에 거의 남지 않아 인체에 무해하며 하다는 장점을 지니기 때문에 효율적이고 경제적으로 추출이 가능하다[13].

한편, 리포솜(liposome)은 지질 분자들이 수용액에 분산될 때 스스로 형성하는 지질 분자들의 회합체이다. 내부의 수용성 공간에는 수용성 약물을, 지질막에는 친유성 약물을 캡슐화 할 수 있다. 생체막 구조와 유사한 지질이중층 구조를 가지므로 인체에 대한 독성이 경미하여 인체에 부작용 없이 약물의 투여가 가능하다. 또한, 물질의 효과적인 전달과 안정성 증가의 측면에서도 활용도가 높다[14, 15].

본 연구는 오레가노 추출물을 아토피피부염 완화 화장품의 원료로서 활용하기 위해 수행되었으며, 오레가노의 잎과 줄기를 초임계유체추출법과 열수추출법으로 추출하였다. 이러한 천연소재에 대하여 항균실험과 항산화 실험을 진행하였고, 이를 통해 다양한 생리 활성능을 검증하고자 하였다. 또한 crystal violet 염색법으로써, 오레가노의 바이오필름 형성 억제능을 측정하였다. 나아가 오레가노 추출물을 세라마이드(ceramide)와 함께 리포솜으로 제형화하여 실제 화장품에 이용가능한지 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에서 사용된 오레가노는 터키에서 채취하여, 세척과 건조 과정을 거친 오레가노 립드를 오허브에서 구매하였다. 이를 추출직전에 분쇄하여 추출을 진행하였다. 추출 후에는 4°C로 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

L-ascorbic acid(Samchun Chemicals, Korea), gallic acid(Samchun Chemicals, Korea), Na_2CO_3 (Samchun Chemicals, Korea)를 사용하였다. SOD 실험에서는 SOD Assay Kit(Biomax, Korea)를 사용하였다. MIC 실험에는 tween 20(Sigma-Aldrich, USA)이 사용되었다. 항산화실험과 항균실험에서 96well microplate(SPL Life Sciences Co., Korea)를 사용했으며, 흡광도 측정에 Multi-Mode microplate reader(BioTek, USA)가 사용되었다.

3. 시료추출

오레가노 초임계추출물(*Origanum vulgare* supercritical

fluid extract, OSE)은 초임계 이산화탄소 추출 장비 (ARI instrument, Korea)를 통해 추출하였다. 오레가노를 분쇄하여 추출조에 넣고, 추출압력은 350 bar, CO₂ 분당 60 mL, EtOH 분당 5 mL의 조건에서 150분 동안 추출하였다. 추출 온도는 35°C, 45°C, 60°C의 조건으로 나누어 진행하였다. 회수한 추출물은 모두 필터를 통해 여과한 후 감압농축기(EYELA, USA)로 50°C에서 농축하여, 녹색 반고형의 오레가노 초임계 35°C 추출물 (OSE 35), 오레가노 초임계 45°C 추출물(OSE 45), 오레가노 초임계 60°C 추출물(OSE 60)을 얻었다. 이후 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시켜 사용하였다.

오레가노 열수추출물(*Origanum vulgare* water extract, OWE)은 오레가노를 분쇄하여 비커에 원물 100 g과 정제수 1000 mL을 넣고(10%, w/v) 향온조(Changshin Science, Korea)에 정제수를 가한 후, 80°C를 유지하며 4시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 70 µm pore size의 mesh로 1차 여과하고, 원심분리기(Hamil Scientific Inc., Korea)로 2차 분리하였다. 3차 여과로는 5 µm pore size 여과지를 사용해 감압 여과하였다. 이후에 동결건조장치(Ilshin Bio Base, Korea)로 건조과정을 걸쳐 황색 분말을 얻었고, 추출물은 멸균수에 용해시켜 사용하였다.

4. 항균 실험

1) 사용 균주 및 배지

항균 실험에 사용된 균주는 모두 ATCC(American Type Culture Collection, USA)에서 분양받았다. 본 연구에는 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*, ATCC 6538), *Escherichia coli*(*E. coli*, ATCC 23726), *Bacillus subtilis*(*B. subtilis*, ATCC 19659), 그리고 *Cutibacterium acnes*(*C. acnes*, ATCC 6919)가 사용되었다. *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* 균주는 Muller-Hinton(MH) 배지를 이용하여, Shaking incubator(37°C, 500 rpm)에서 24시간동안 배양하였다. *C. acnes*는 Reinforced Clostridial(RC) 배지를 이용하고, AnaeroGen pack (Oxoid Ltd., UK)을 사용한 혐기성 환경에서 37°C에서 72시간 이상 배양하였다. 이후 실험에서도 위와 동일한 배지를 이용하였다.

2) Disc diffusion method

오레가노의 초임계추출물과 열수추출물의 항균 활성을

평가하기 위해 Disc diffusion method를 진행하였다 [16]. *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* 균주는 계대배양하여 현탁액의 흡광도를 600 nm에서 0.5로 맞추어 실험을 진행하였다. 이후 고체배지에 현탁액을 150 µL씩 접종하였다. *C. acnes*는 계대배양하여 현탁액의 흡광도를 600 nm에서 0.5로 맞춘 뒤, 현탁액을 150 µL씩 고체배지에 접종하였다. 이후 각각에 50 µL의 시료를 적신 지름 8 mm의 paper disc를 얹었다. *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*는 호기성 환경의 37°C에서 18시간, *C. acnes*는 혐기성 환경의 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*에 대한 positive control은 methyl paraben(Daejung Chemicals & Metals, Korea)을, *C. acnes*에 대한 positive control은 salicylic acid(Daejung Chemicals & Metals, Korea)를 사용하였다. 균이 성장하지 못하는 구역인 clear zone의 지름을 통해 시료의 항균력을 평가하였다.

3) Minimum Inhibitory Concentration(MIC)

각 추출물의 MIC를 측정하기 위해 Broth dilution method가 이용되었다[17]. 0.5%의 tween 20이 포함된 40 mg/mL의 추출물 용액을 각각의 액체배지에 희석하였고, 배지에 serial dilution하여 농도의 범위를 정하였다. 각각의 균주를 계대배양하여 흡광도를 600 nm에서 0.5로 맞춘 뒤 1/100 농도로 배지에 희석하여 현탁액을 만들었다. 일정 농도로 희석한 100 µL의 시료에, 위와 같이 희석한 100 µL의 시험균 현탁액을 접종하였다. 이후 *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*는 호기성의 37°C 환경에서 24시간동안, *C. acnes*는 혐기성의 37°C 환경에서 48시간 동안 배양하였다. 육안 상, 균의 성장이 관찰되지 않는 최소 농도를 MIC로 판단하였다. *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*에 대한 positive control은 methyl paraben을, *C. acnes*에 대한 positive control은 salicylic acid를 사용하였다.

4) Biofilm inhibition assay

바이오필름 형성의 측정은 O'Toole G.A(2011)의 Biofilm formation assay를 변형하여 사용하였다[18]. *S. aureus* 균주를 계대배양하여 흡광도를 600 nm에서 0.5로 맞춘 뒤 1/100농도로 배지에 희석하여 현탁액을 만들어 사용하였다. 96-well plate에 추출물을 MIC이하의 농도범위로 희석하여 80 µL씩 준비하고 시험균의

현탁액을 80 μL 씩 접종하였다. 이것을 호기성의 37°C 환경에서 24시간 배양하여 바이오필름을 충분히 형성시켰다. 배양 후 바이오필름을 측정하기 위해 배양액을 버리고, 표면에 붙어있는 부유 상태의 세균을 제거하기 위해 well을 정제수로 2회 수세하였다. 이후 well 당 200 μL 의 0.1% crystal violet(Daejung Chemicals & Metals, Korea) 용액을 넣고 10분간 염색하였으며, 다시 정제수로 2회 수세하였다. 이를 상온에서 12시간 이상 건조하고, 250 μL 의 30% acetic acid (Samchun Chemicals, Korea) 용액을 넣은 후, 바이오필름에 염색된 crystal violet을 녹여냈다. 이 용액을 200 μL 씩 새로운 96-well plate에 옮겨 담고, microplate reader로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 바이오필름 억제능을 구하였다. positive control은 ciprofloxacin을 사용하였다.

바이오필름 억제능(%) =

$$\left\{ 1 - \frac{(\text{시료의 흡광도}) - (\text{음성대조군의 흡광도})}{(\text{대조군의 흡광도}) - (\text{음성대조군의 흡광도})} \right\} \times 100$$

5. 항산화 실험

1) DPPH radical scavenging assay

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거능의 측정은 Blois의 방법을 변형하여 실행하였다[19]. 190 μL 의 0.2 mM DPPH 용액과 일정 농도로 희석한 10 μL 의 시료와 혼합하여 암실에서 20분간 반응시켰다. 이후 반응액을 microplate reader를 사용해 520 nm의 흡광도로 측정하였다. positive control에는 L-ascorbic acid를 이용하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= (1 - \text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{시료 무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

2) ABTS+ radical scavenging assay

ABTS+ radical 소거능을 확인하기 위하여, Van den Berg의 실험방법을 응용해 ABTS(2,2'-azino-bis) assay를 수행하였다[20]. 14.8 mM의 ABTS solution과 5.28 mM potassium persulfate를 제조하여 암실에서 24시간 동안 반응시켰다. ABTS+ radical을 형성시켜, ABTS 용액의 흡광도가 0.7~0.8이 되도록 조정하여 실험에 사용하였다.

앞서 제조한 ABTS 용액 190 μL 와 일정 농도로 희석한

10 μL 의 시료와 혼합하였다. 이를 실온의 암실에서 20분간 반응시켰고, 반응액은 microplate reader를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. positive control에는 L-ascorbic acid를 이용하였다.

ABTS+ radical scavenging activity (%)

$$= (1 - \text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{시료 무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

3) SOD assay

SOD와 유사한 역할을 하는 분자가 추출물에 포함되어 있는지 알아보기 위해 Superoxide dismutase(SOD) assay를 수행하였다. 이는 Marklund와 Marklund의 방법을 활용한 OxiTec™ SOD Assay Kit를 변형하여 실행하였다[21, 22]. WST working solution 172 μL 에 일정 농도로 희석한 10 μL 의 시료를 넣은 후, enzyme working solution 18 μL 를 혼합시켜 37°C incubator에서 20분간 반응시켰다. 이후 반응액을 microplate reader로 450 nm의 흡광도로 측정하였다. positive control에는 L-ascorbic acid를 이용하였다.

SOD-like activity (%)

$$= (1 - \text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{시료 무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

4) Total polyphenol content assay(TPC assay)

시료를 희석하여 일정 농도로 제조한 후, 각 well에 40 μL 의 folin ciocalteu's reagent와 10 μL 의 시료를 넣고 3분 동안 반응시켰다. 그 후 150 μL 의 20% Na_2CO_3 를 첨가하여 반응액을 알칼리 조건으로 만들었다. 이후 microplate reader를 통해 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 gallic acid를 사용하여 gallic acid standard curve를 얻었으며, 폴리페놀의 함량은 mg gallic acid equivalents(GAE)/g extract로 표현하였다.

6. 리포솜 제조

1) 리포솜의 제조

리포솜 제형을 만드는데 필요한 재료들을 각각 80°C 까지 가온하여 완전 용해한 후, 30분간 충분히 교반하였다. 그 후 High pressure homogenizer(Micronox, Seongnam, Korea)를 이용하여 1200 bar에서 3회 통과시켰다. 이러한 과정을 통해 세라마이드(DS-Y30 ceramide, Doosan, Korea) 8%, 추출물 0.1%를 함유한 리포솜을 얻었다.

표 1. 오레가노 추출물의 clear zone 지름 측정 결과

Table 1. The result of clear zone diameter of OWE, OSE

Strain	clear zone (mm)					
	CTL	PC	OWE	OSE 35	OSE 45	OSE 60
		40 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL
<i>S. aureus</i>	-	10.63 ± 0.37 ^a	-	9.63 ± 0.37	9.88 ± 0.62	10.17 ± 0.33
<i>E. coli</i>	-	14.5 ± 1.5 ^a	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	9.5 ± 0.5 ^a	-	10.13 ± 0.37	10.13 ± 0.37	9.38 ± 0.62
<i>C. acnes</i>	-	17.25 ± 0.25 ^b	-	-	-	-

Values represent the mean ± SD of three independent experiments, Conc: Concentration(mg/mL), CTL: Control, sample untreated group, PC: Positive control, a: Methyl paraben, b: Salicylic acid, OWE: *Origanum vulgare* water extract, OSE: *Origanum vulgare* supercritical fluid extract.

2) Particle size 및 Zeta potential

Particle size 및 Zeta potential 측정은 Particlenetrix (Stabino® Particle Charge Mapping, DREAM Co., Suwon, Korea)를 사용하였고, 3회 반복 측정하였다.

7. 통계처리

각각의 실험은 모두 3회의 실험을 실행하였다. 이를 통해 Mean ± SD로 얻어진 결과 값들을 나타내었다. Disc diffusion method와 MIC외의 모든 실험은 SPSS 프로그램 18.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용해 t-test를 실시하였으며, p의 값이 0.05 미만일 때 값이 유의하다고 해석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 오레가노 추출물의 항균 실험 결과

1) Disc diffusion method

Disc diffusion method는 항균력을 가지는 추출물이 disc 주변의 배지로 확산하면서 그 부위에 균이 자라지 못하는 구역의 지름을 측정하는 방법이다. 상대적으로 간편하게 다양한 균의 항균 활성을 확인할 수 있다[23]. *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* 와 *C. acnes* 균주의 Disc diffusion method 결과는 아래의 Table 1에 자세히 나타내었다.

OSE는 *S. aureus*, *B. subtilis*에서 clear zone이 관찰되었다. 온도에 따라 상이한 결과를 보여주었는데, 유의미한 차이는 발견할 수 없었다. OWE의 경우, 모든 균에 대해서 clear zone이 나타나지 않았다. *E. coli*와 *C. acnes*에 대해서는 OSE와 OWE 모두 항균 활성을 보이지 않았다.

2) Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

MIC는 최소(발육)저해농도를 뜻하며, 미생물의 성장을 저지하는 데에 요구되는 항 미생물 물질의 최소농도를 말한다. 값이 작을수록 뛰어난 항균력을 가지는 것으로 해석한다[24]. OWE는 앞선 Disc diffusion method에서 항균 활성을 보이지 않았으나, 물질의 확산성에 따라 Disc diffusion method에서는 항균활성이 나타나지 않을 수 있다고 추정된다. 이에 따라 OWE도 OSE와 동일하게 2000µg/mL부터 일정농도로 MIC를 측정하였고, 그 결과는 Table 2과 같다.

표 2. 오레가노 추출물의 MIC 측정 결과

Table 2. MIC of OWE, OSE

Strain	Conc(µg/mL)			
	OWE	OSE 35	OSE 45	OSE 60
<i>S. aureus</i>	-	1000	1000	2000
<i>E. coli</i>	-	2000	2000	2000
<i>B. subtilis</i>	-	500	500	1000
<i>C. acnes</i>	125	500	500	1000

Conc: Concentration(µg/mL), OWE: *Origanum vulgare* water extract, OSE: *Origanum vulgare* supercritical fluid extract.

OSE는 *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *C. acnes*, 다시 말해 실험에 사용한 모든 균주에 대하여 MIC값이 도출되었다. 특히 초임계추출물 내에서는 OSE 35, OSE 45가 비교적 효과적이었는데, 이는 온도와 압력조건에 따라 선택적으로 추출되는 초임계 추출의 특성으로 해석할 수 있다[12]. OWE는 *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*에서는 미생물을 제어하지 못하였다. 그러나 *C. acnes*에 대해서는 MIC가 125 µg/mL로 여드름균에 강력한 항균력을 보였다. OSE는 *C. acnes*에 대해서는 OWE보다 항균력이 부족한 편이나, 보다 다양한 균에서

효과를 나타내기 때문에 보편적인 항균 제제로써 사용이 가능할 것으로 사료된다.

3) Biofilm inhibition assay

바이오필름 형성 및 억제능에 대한 측정은 아토피 피부염에 관여하는 *S. aureus*에 대하여 진행하였다. MIC를 선행하여 항균력이 나타나지 않는 농도를 확인하였고, 항균력이 나타나지 않는 농도에서 30%이상의 바이오필름 억제가 나타날 때 바이오필름을 억제하는 것으로 판단하였다.

OSE는 MIC인 1000 µg/mL이하인 500 µg/mL부터 진행하였으며, OWE는 MIC에서 *S. aureus*에 대한 항균력을 확인하지 못하였으므로 농도 2000 µg/mL부터 실험하였다. *S. aureus*의 바이오필름 형성 억제 결과를 methyl paraben과 비교하여 Figure 1으로 나타내었다.

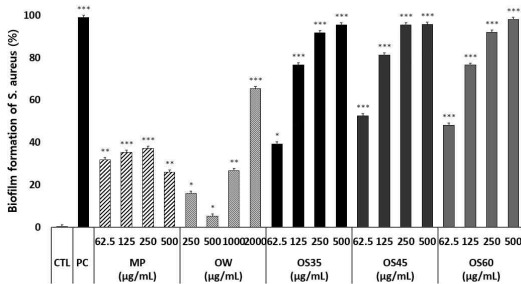


그림 1. 오레가노 추출물의 바이오필름 형성 억제능(%)
Figure 1. Biofilm inhibition activity of OWE, OSE.

Positive control: Ciprofloxacin, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs control, CTL: control, sample untreated group, PC: Positive control, MP: Methyl paraben OWE: *Origanum vulgare* water extract, OSE: *Origanum vulgare* supercritical fluid extract.

화장품의 방부제로 사용되는 methyl paraben은 40% 이하의 억제능을 보이는데 반해, OSE는 250 µg/mL까지도 *S. aureus*의 바이오 필름을 90%이상 억제하였다. 125 µg/mL에서는 OSE 35 76.57 ± 2.07%, OSE 45 81.16 ± 1.9%, OSE 60 76.45 ± 1.51%의 억제 효과를 보이며 비교적 저농도에서도 바이오필름을 탁월하게 억제하였다. methyl paraben과 비교하였을 때, OSE가 훨씬 우수한 바이오필름 억제능을 가진 것으로 보인다. 반면, OWE는 2000 µg/mL에서 약 66%의 억제능이 측정되었다. 그 이하의 농도에서는 모두 30%이하의 바이오필름 억제능을 보여 그 억제 효과가 미미하였다.

Crystal violet 염색을 통해 형성된 바이오필름을 측정함으로써, 오레가노 추출물이 바이오필름 형성 억제에 미치는 영향을 확인하였다. 특히 오레가노 초임계 추출물의 경우 매우 우수한 *S. aureus*의 바이오필름 형성 억제를 보여주었는데, 이를 통한 아토피 피부염의 병인화 억제 또한 예상해볼 수 있다. 차후 기능성 성분 분석에 대한 연구도 이어져야 할 것으로 보인다.

2. 오레가노 추출물의 항산화 실험 결과

1) DPPH radical scavenging assay

DPPH radical은 일반적으로 free radical과 반응을 잘하는 물질일수록 쉽게 소거된다고 알려져 있다[25]. 이러한 특성을 이용해 항산화력을 평가하여 Figure 2로 나타내었다. OWE는 200 µg/mL 농도에서 87.96 ± 0.21%의 소거능을 보였다. OSE 35, OSE 45, OSE 60은 2000 µg/mL 농도에서 각각 94.34 ± 0.24%, 92.83 ± 0.22%, 91.54 ± 1.6%였으며, 추출온도 간 차이는 3%내외로 미미하였다. IC50(half maximal inhibitory concentration)값은 OWE가 93.61 µg/mL, OSE 35은 453.17 µg/mL, OSE 45는 440.56 µg/mL, OSE 60은 469.64 µg/mL로 OWE의 항산화력이 좋았다. OSE내에서는 IC50의 차이가 미미하였으나, OSE 45, OSE 35, OSE 60 순의 항산화력 경향성을 보였다.

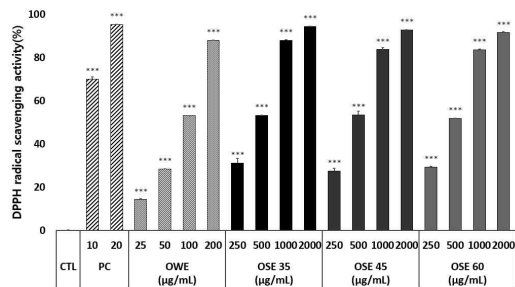


그림 2. 오레가노 추출물의 DPPH radical 소거능(%)
Figure 2. DPPH radical scavenging activity of OWE, OSE.

Positive control: L-ascorbic acid 69.99 ± 1.38% (radical scavenging activity) at a concentration of 10 µg/mL, ***P<0.001 vs control, CTL: control, sample untreated group, PC: Positive control, OWE: *Origanum vulgare* water extract, OSE: *Origanum vulgare* supercritical fluid extract.

2) ABTS+ radical scavenging assay

ABTS+ radical 소거능을 측정한 결과 OWE는 50

µg/mL 농도에서 $98.95 \pm 0.13\%$ 의 소거능을 나타냈다. OSE 35, OSE 45, OSE 60은 50 µg/mL 농도에서 각각 $87.93 \pm 0.13\%$, $77.17 \pm 0.12\%$, $53.46 \pm 1.01\%$ 의 소거능을 보였다. IC50값은 OWE가 21.45 µg/mL, OSE 35은 27.44 µg/mL, OSE 45는 34.33 µg/mL, OSE 60은 46.13 µg/mL로 OWE의 항산화력이 뛰어났다. IC50은 OSE 45, OSE 35, OSE 60 순의 항산화력 경향성을 확인하였고, 이러한 경향성은 DPPH의 경향성과도 일치한다. 상세한 측정 결과는 figure 3에 제시하였다.

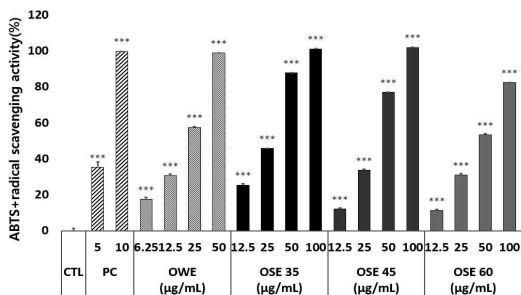


그림 3. 오레가노 추출물의 ABTS+ radical 소거능(%)
 Figure 3. ABTS+ radical scavenging activity of OWE, OSE.

Positive control: L-ascorbic acid $99.91 \pm 0.09\%$ (radical scavenging activity) at a concentration of 10 µg/mL, $***P < 0.001$ vs control, CTL: Control, sample untreated group, PC: Positive control, OWE: *Origanum vulgare* water extract, OSE: *Origanum vulgare* supercritical fluid extract.

3) SOD assay

SOD는 촉매 역할을 하여 free radical 중 하나인 superoxide를 반응성이 비교적 낮은 O_2 와 H_2O_2 로 바꾸어주는 효소이다[26]. 추출물 내에 SOD와 유사한 기능을 하는 물질이 존재하는지 알아보기 위하여 SOD assay를 진행하였다. Figure 4에서 OWE는 50 µg/mL 농도에서 $71.96 \pm 1.52\%$ 의 유사활성능을 나타냈다. OSE 35, OSE 45, OSE 60은 50 µg/mL 농도에서 각각 $56.84 \pm 3.46\%$, $64.11 \pm 3.9\%$, $58.24 \pm 3.76\%$ 의 유사활성능을 보였다. IC50값은 OWE가 20.02 µg/mL, OSE 35은 34.79 µg/mL, OSE 45는 22.86 µg/mL, OSE 60은 30.77 µg/mL로 OWE의 항산화력이 조금 더 우수했다. OSE에서는 OSE 45의 유사활성능이 가장 좋았다

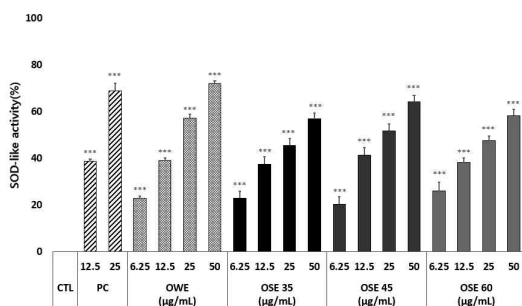


그림 4. 오레가노 추출물의 SOD 유사활성능(%)
 Figure 4. SOD-like activity of OWE, OSE.

Positive control: L-ascorbic acid $68.93 \pm 4.67\%$ (SOD-like activity) at a concentration of 25 µg/mL, $***P < 0.001$ vs control, CTL: Control, sample untreated group, PC: Positive control, OWE: *Origanum vulgare* water extract, OSE: *Origanum vulgare* supercritical fluid extract.

4) Total polyphenol content assay

식물체에 널리 존재하는 폴리페놀은 항산화력의 대표적인 지표로 알려져 있다. 폴리페놀 함량의 정량은 간접적으로 항산화력을 평가할 수 있는 방법이다[13]. 각 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. OWE는 100.51 ± 0.88 mg GAE/g extract를 함유하고 있었다. OSE35 에서 48.42 ± 1.29 mg GAE/g extract, OSE 45에서 61.85 ± 1.96 mg GAE/g extract, OSE 60에서 42.24 ± 1.62 mg GAE/g extract의 폴리페놀 함유를 확인하였다. OWE에서 가장 많은 폴리페놀 함량을 볼 수 있었고, OSE내에서는 OSE 45에서 가장 높은 폴리페놀 함량이 정량되었다.

표 3. 오레가노 추출물에 함유된 총 폴리페놀 함량
 Table 3. Total polyphenols of OWE, OSE

Sample	Total polyphenol content (mg GAE/g extract)
OWE	100.51 ± 0.88
OSW 35	48.42 ± 1.29
OSW 45	61.85 ± 1.96
OSW 60	42.24 ± 1.62

Values represent the mean \pm SD of three independent experiments. OWE: *Origanum vulgare* water extract, OSE: *Origanum vulgare* supercritical fluid extract.

3. Particle size 및 Zeta potential 측정

선행된 실험에서 OSE는 *S. aureus*에 대한 항균력과 바이오필름 억제능이 우수하였다. 또한, 세라미이드는

사람의 각질 세포 간 지질성분 중 40% 정도를 구성하고 있으며 피부장벽강화에 효과적이라고 알려져 있다 [27]. 이에 근거하여 OSE와 세라마이드를 함께 사용한 리포솜을 제조하였고, *S. aureus*와 그 바이오필름을 억제하면서 피부장벽을 강화하여 아토피 피부의 완화에 도움을 줄 수 있는 기능성 화장품 소재를 개발하였다. 소재 개발에는 항산화력과 항균력을 모두 고려하여 OSE 45를 이용하였다.

입자크기의 측정 결과, OSE 45 0.1%와 세라마이드 8%를 함유한 리포솜(Formulation 1)의 입자 크기는 311.33 ± 7.33 nm 로, OSE 45 0.1%를 에탄올 수용액에 분산시킨 제형(Formulation 0)대비 크기를 약 41%를 감소시켰다. 육안으로 관찰하였을 때에도 Formulation 0는 입자가 고르게 용해되지 못하고 침전물이 생겼지만, Formulation 1은 침전물 없이 고르게 제형화되었다.(Figure 5, Figure 6).

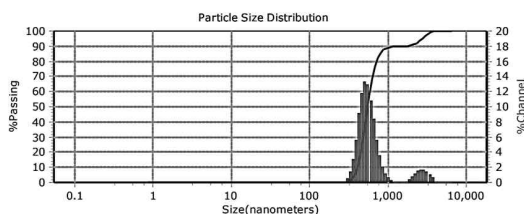


그림 5. Formulation 0의 입자 크기 분포
Figure 5. Particle Size Distribution of Formulation 0

Formulation 0: OSE 45 0.1% in Water and Ethanol(1:1).
OSE 45: *Origanum vulgare* supercritical fluid 45°C extract.

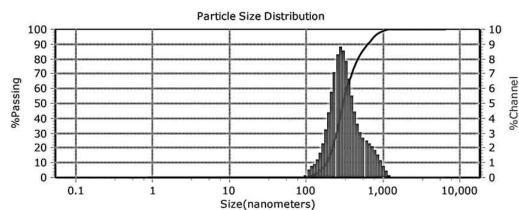


그림 6. Formulation 1의 입자 크기 분포.
Figure 6. Particle Size Distribution of Formulation 1

Formulation 1: OSE 45 0.1% and Ceramide 8% in Liposome.
OSE 45: *Origanum vulgare* supercritical fluid 45°C extract.

Zeta potential의 측정 결과는 Table 4와 같다. OSE 45 0.1%와 세라마이드 8%를 함유한 Formulation 1은 -101.8 ± 0.1 mV으로 측정되었다. Formulation 0과 비교

하였을 때 제타전위의 절댓값이 82.73 ± 0.47 mV 증가한 것이다. 이것은 리포솜 형성을 통해 안정도가 매우 향상된 것으로, 오레가노 초임계추출물이 실제 화장품 소재로서 사용가능하다고 사료된다.

표 4. 오레가노 초임계추출물 함유 제형의 제타전위
Table 4. Zeta potential of formulation with OSE

Formulation	Zeta potential
Formulation 0	19.07 ± 0.43 mV
Formulation 1	-101.8 ± 0.1 mV

Values represent the mean \pm SD of three independent experiments.

Formulation 0: OSE 45 0.1% in Water and Ethanol(1:1).

Formulation 1: OSE 45 0.1% and Ceramide 8% in Liposome.
OSE 45: *Origanum vulgare* supercritical fluid 45°C extract.

V. 결 론

본 연구에서는 오레가노의 열수추출물과 초임계추출물의 항균, 항산화 실험을 진행하여 다양한 생리활성능을 측정하였다. 이를 통해 오레가노 초임계추출물로부터 아토피피부염 완화 천연소재로서의 가능성을 확인하였다. 화장품에 활용하기 위하여 리포솜으로 제형화하였고, 이것이 화장품에 적용 가능하다고 판단하였다.

항균실험 결과, 오레가노 초임계추출물은 *S. aureus*를 포함한 다양한 균주에 대한 항균활성을 보였다. 반면, 열수추출물은 *C. acnes*에 대해서만 효과를 보였다. 특히, 우리는 오레가노 초임계추출물에서 *S. aureus*의 바이오필름 억제에 탁월한 효과를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 아토피 피부염의 병인화 억제도 예상해볼 수 있다.

DPPH radical, ABTS+ radical 소거능 실험, SOD 유사활성능 평가와 총 폴리페놀 함량 측정에서 오레가노 열수추출물이 전반적으로 뛰어난 항산화력을 가진 것을 확인하였다. 초임계추출물 역시 상당한 항산화력이 측정되었다. *S. aureus*에 대한 항균력과 항산화력을 모두 고려하였을 때 오레가노 초임계추출물이 아토피 피부염 환자에게 보다 적절하다고 사료된다.

이에 더하여, 오레가노 초임계추출물을 세라마이드와 함께 리포솜으로 제조하여 화장품 소재로서 활용하고자 하였다. 우리는 이를 리포솜으로 제조함으로써, 안정성은 물론 용해성까지 개선하였다. 오레가노의 *S. aureus* 바이오필름 억제 효과와 항균활성, 그리고 세라마이드의 장벽강화 효과로 아토피피부염 완화에 긍정적인

영향을 줄 것으로 기대된다.

References

- [1] R.V. Houdt and C. W. Michiels, “Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface,” *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 109, No. 4, pp. 1117–1131, October 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>
- [2] R. Donlan, “Biofilms: Microbial life on surfaces”, *Emerg Infect Dis*, Vol. 8, No. 9, pp. 881 - 890, September 2002. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- [3] T.B. Rasmussen, and M. Givskov, “Quorum-sensing inhibitors as antipathogenic drugs,” *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 296, No. 23, pp. 149–161, February 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>
- [4] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections,” *Science*, Vol. 284, No. 5418, pp. 1318–1322, May 1999. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- [5] J. L. Del Pozo, “Biofilm-related disease,” *Expert Rev Anti Infect Ther*, Vol. 16, No. 1, pp. 51–65 December 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
- [6] S. H. Song, B. W. Hwang, S. Son, and N. G. Kang, “A Study on Inhibition of Bacterial Membrane Formation in Biofilm formed by Acne Bacteria in Valine through Property Analysis,” *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 47, No. 2 pp. 163–170, June 2021. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2021.47.2.163>
- [7] J. A. Geoghegan, A. D. Irvine, and T. J. Foster, “Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship,” *Trends in microbiology*, Vol. 26, No. 6, pp. 484 - 497, December 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.008>
- [8] H. B. Allen, N. D. Vaze, C. Choi, T. Hailu, B. H. Tulpert, C. A. Cusack, and S. G. Joshi, “The presence and impact of biofilm-producing staphylococci in atopic dermatitis,” *JAMA dermatology*, Vol. 150, No. 3, pp. 260 - 265, March, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.8627>
- [9] H. Sakkas, and C. Papadopoulou, “Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils,” *Journal of microbiology and biotechnology*, Vol. 27, No. 3, pp. 429 - 438, March 2017. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>
- [10] N. Leyva-López, E. P. Gutiérrez-Grijalva, G. Vazquez-Olivo, and J. B. Heredia, “Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties,” *Molecules*, Vol. 22, No. 6, pp. 989–1013, June 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>
- [11] M. Walczak, M. Michalska-Sionkowska, D. Olkiewicz, P. Tarnawska, and O. Warzyńska, “Potential of Carvacrol and Thymol in Reducing Biofilm Formation on Technical Surfaces,” *Molecules*, Vol. 26, No. 9, pp. 2723–2735, May 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26092723>
- [12] S. I. Park, S. H. Heo, J. Lee, and M. S. Shin, “Extraction of Active Compounds from *Angelica gigas* using Supercritical Carbon Dioxide and its Physiological Activity,” *Journal of Convergence for Information Technology*, Vol. 11, No. 6, pp. 206–212, June 2021. DOI: <https://doi.org/10.22156/CS4SMB.2021.11.06.206>
- [13] 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,” *Journal of the convergence on culture technology*, Vol. 7, No.4, pp. 683–691, November, 2021. DOI: <https://doi.org/10.17703/JCCT.2021.7.4.683>
- [14] S. H. Park, and M. H. Kim, “Physical Property and Stability of Liposome Prepared from Egg Yolk Phospholipids at Various Storage Conditions,” *Korean Society for Food Science of Animal Resources*, Vol. 28, No. 5, pp. 549–554. December, 2008. DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2008.28.5.549>
- [15] J. Lee, S. I. Park, S. H. Heo, M. Kim, and M. S. Shin, “Enhancing the Moisturizing Ability of the Skin Softener using Nanoemulsion Based on Phospholipid Liposome,” *International Journal of Advanced Culture Technology*, Vol. 8, No. 1, pp. 236 - 242, March 2020. DOI: <https://doi.org/10.17703/IJACT.2020.8.1.236>
- [16] M. O. Ko, H. J. Kang, J. H. Hwang, and K. W. Yang, “Screening of the antibacterial effects by ethanol extracts from natural plant in Jeju against *Propionibacterium acnes*,” *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 44, No. 1, pp. 59–66, March 2018. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2018.44.1.59>
- [17] P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R.H. Tenover, *Manual of clinical*

- microbiology, Mosby Year Book, 1995.
- [18]G. A. O'Toole, "Microtiter dish biofilm formation assay," *Journal of visualized experiments*, No. 47, 2437, January 2011. DOI: <https://doi.org/10.15230/10.3791/2437>
- [19]M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical," *Nature*, Vol. 181, No. 4617 pp. 1199-1200, April 1958. DOI: <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- [20]R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Riceevans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, No. 9-10, pp. 1231-1237, May 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- [21]S. Marklund, G. Marklund, "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase," *European Journal of Biochemistry*, Vol. 47, No. 3, pp. 469-474, September 1974. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- [22]S. I. Park, A. R. Kim, S. H. Kim, G. M. An, M. G. Kim, and M. S. Shin, "Antioxidant, Anti-wrinkle and Antimicrobial Effects of Coffee Grounds Extract from Dutch Coffee," *Journal of Oil & Applied Science*, Vol. 35, No. 4, pp. 1038-1047, December 2018. DOI: <https://doi.org/10.12925/jkocs.2018.35.4.1038>
- [23]J. J. BIEME, "Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method," *Annals of Clinical and Laboratory Science*, Vol. 3, No. 2, pp.135-140, March 1973.
- [24]I. Wiegand, K. Hilpert, and R. Hancock, "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances," *Nature Protocol*, Vol. 3, No. 2, pp. 163-175, February 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- [25]P. A. Uwineza, and A. Wańkiewicz, "Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials," *Molecules*, Vol. 25, No. 17, 3847, September 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25173847>
- [26]A. K. Lim, J. O. Kim, M. J. Jung, H. K. Jung, J. H. Hong, and D. I. Kim. "Functional biological activity of hot water and ethanol extracts from Taraxaci Herba," *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 37, No. 10, pp. 1231-1237, October 2008. DOI : <https://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.10.1231>
- [27]M. J. Choi, and H. I. Maibach, "Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin," *American Journal of Clinical Dermatology*, Vol. 6, No. 4, pp. 215-223, January 2005. DOI: <https://doi.org/10.2165/00128071-200506040-00002>