

벌나무 추출물의 황색포도상구균에 대한 항균 효과와 항산화 활성

황진우 · 박찬휘 · 안해연 · 장예원 · 강현 · 이성규

Antibacterial, Antioxidant Activities of *Acer tegmentosum* Maxim Ethanol Extract Against *Staphylococcus aureus*

Jin-Woo Hwang · Chan Hwi Park · Hae-Yeon An · Ye-Won Jang · Hyun Kang · Sung-Gyu Lee

Received: 30 November 2022 / Revised: 6 December 2022 / Accepted: 6 December 2022
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study investigates the antibacterial and antioxidant activities of the ethanol extract of *Acer tegmentosum* Maxim (EATM) against *Staphylococcus aureus*. The total polyphenol and flavonoid content, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) and 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging effect, and reducing power of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method were measured to verify the antioxidant activity of the EATM. The antibacterial activity against *S. aureus* using the EATM was verified by the paper disc method, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) methods. The total polyphenol and flavonoid contents were 266.66 µg GAE/mg and 6.46 µg QE/mg, respectively. The DPPH and ABTS radical scavenging activity showed a concentration-dependent scavenging activity. The RC₅₀ values of the EATM were 21.49 and 12.81 µg/mL, respectively. A FRAP analysis was conducted for evaluating the reducing power of the EATM and an efficacy of 0.73 ± 0.19 mM FeSO₄ E/mg was observed. The antibacterial activity of EATM against *S. aureus*, determined using the paper disc method, showed an inhibitory ring of 3 mm at 2 mg. The MIC was confirmed at a concentration of ≥ 16 mg/mL, while the MBC was confirmed at 32 mg/mL. As the EATM shows antioxidant and antibacterial activities against *S.*

aureus, it can be used as an effective antidote against atopic dermatitis.

Keywords *Acer tegmentosum* Maxim, *Staphylococcus aureus*, Ethanol extract, Antibacterial, Antioxidant

서론

아토피피부염은 극심한 가려움증과 재발성 습진을 특징으로 재발과 악화가 반복되는 피부질환이다(Leung and Bieber 2003). 우리나라를 포함한 여러 개발국들의 소아와 성인에서 각각 10~20%, 1~3%의 아토피피부염 환자가 발생하며, 지속적으로 증가하는 추세를 보이고 있다(Hwang et al. 2017).

아토피피부염의 발병 원인은 아직 완전하게 밝혀지지 않았으나 유전적, 환경적, 면역학적 요인과 피부 장벽의 손상 등과 같은 요인들의 복합적인 작용에 의해 발병하는 것으로 알려져 있어서 임상적인 증상을 통하여 아토피피부염을 진단하는 실정이다(Min et al. 2013; Yun and Ko 2001). 증상으로 인설을 동반한 홍반, 구진 등을 나타내며 부종(浮腫), 미란(糜爛)과 가피(痂皮)가 종종 나타나기도 하며, 피부에서 색소침착, 태선화와 균열 등과 같은 증상이 만성적으로 발생한다(Lee and Yun 2006).

아토피피부염이 발병한 대다수의 환자에서 병변부위나 비 병변부위에서 황색포도상구균이 고밀도의 집락(colonization)을 형성하는 것이 증명되었으며, 아토피피부염 악화에 황색포도상구균이 관여하는 것으로 알려져 있다(Matsui et al. 2000; Ogawa et al. 1994). 이처럼 황색포도상구균이 아토피피부염 악화에 관련된 것이 알려지면서 황색포도상구균에 대한 치료 및 성장 억제가 아토피피부염의 치료법 중 하나로 여겨지고 있다(Adachi et al. 2002; Breuer et al. 2002).

J.-W. Hwang · C. H. Park · H.-Y. An · Y.-W. Jang · H. Kang · S.-G. Lee (✉)
Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University, Cheonan-si, Chungnam, 31116, Republic of Korea
e-mail: sung-gyu@dankook.ac.kr

자연계에 존재하는 다양한 식물에는 다양한 생리활성을 지닌 성분들이 많이 함유되어 있으며, 이런 성분들을 활용하여 약리학적 효능을 나타내는 소재를 탐색하여 인체에 유해하지 않은 기능성 향산화, 항염증, 항균 등의 소재에 관한 연구가 진행되고 있다(Hwangbo et al. 2021; Jang et al. 2021).

별나무(*Acer tegmentosum* Maxim.)는 국내 고산지대에 서식하는 단풍나무과로, 산겨릅나무, 산겨릅나무, 봉목 등으로 불린다(Lee et al. 2019). 간질환 치료를 위하여 민간에서는 사용되고 있으며, 간에 쌓인 독소 제거를 통한 간세포 회복 효능과 강한 이뇨작용으로 항신장염 효능이 알려져 있다(Hong et al. 2007). 별나무의 성분으로는 페놀성 화합물, 페놀성 글루코사이드, 이소프렌계 화합물 등을 포함하고 있으며(Hur et al. 2007), 항암, 항산화, 간 손상 억제 활성 및 간 손상 보호효과 등이 보고되어 있다(Kwon et al. 2008; Shin et al. 2006). 별나무의 다양한 생리활성이 보고되었지만, 별나무를 이용한 항균 활성에 대한 연구는 아직 저조한 실정이다.

본 연구에서는 다양한 식물유래 추출물 중 황색포도상구균에 대한 항균 활성을 나타낸 별나무의 폴리페놀, 플라보노이드 함량, DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성과 FRAP 활성 측정을 통한 항산화 효능 검증 및 황색포도상구균에 대한 항균 활성을 검증하여 아토피피부염에 대한 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

Aluminium nitrate, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Folin 시약, Na_2CO_3 , gallic acid, potassium acetate, quercetin, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), potassium persulfate, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Iron(II) sulfate heptahydrate (FeSO_4)와 Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 균 배양에 사용된 시약으로 Nutrient broth, Nutrient agar 배지는 BD DIFCO Co. (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

별나무 추출물의 제조

본 연구는 충북 제천에서 별나무를 구매하여 추출물 제조 시료로 사용하였다. 구매한 별나무를 분쇄기를 사용하여 분말화하고, 70% 에탄올 1 L에 분말화된 별나무 100 g을 첨가하여 시료와 70%의 에탄올의 비율이 1 : 10으로, 각 24시간 동안 실온에서 3회 추출하였다. Whatman No. 3 filter paper (Whatman Ltd, Maidstone, Kent, UK)를 사용하여 추출물을 여과한 후 감압농축기(Rotavapor R-100, Buchi, Flawil, Switzerland)를 사용

하여 농축을 진행하였다. 농축된 추출물은 동결건조기(Freeze drying, Vision, Daejeon, Korea)에서 동결 건조하여 분말화한 후 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

별나무 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

Folin과 Denis (1912)의 방법을 변형하여 별나무 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 별나무 추출물을 농도별로 희석한 후 희석한 용액과 50% Folin 시약을 동량 혼합한 후 3분간 반응시킨다. 반응시킨 혼합액에 혼합액과 같은 양의 10% Na_2CO_3 를 추가하여 1시간 동안 추가 반응시켜 반응이 잘 일어나게 한 후 Microplate Spectrophotometer (xMARK, BIO-RAD Co., California, USA) 장비를 이용하여 700 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 별나무 추출물의 총 폴리페놀 함량을 구하기 위한 표준곡선은 농도별로 희석된 gallic acid를 사용하여 동일한 방법으로 진행한 값을 사용하였다.

별나무 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(2000)의 실험 방법을 응용하여 진행하였다. 20 μL 의 농도별로 희석된 별나무 추출물과 172 μL 의 80% 에탄올을 혼합한 후 4 μL 의 10% aluminium nitrate와 4 μL 의 1 M potassium acetate를 각각 추가하여 적절한 반응이 진행되도록 40분간 실온에서 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선을 위한 표준물질로는 quercetin을 사용하였으며, 이를 사용하여 별나무 추출물의 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

별나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 측정

별나무 추출물의 라디칼 소거 활성 중 DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois (1958)의 방법을 응용하여 검증하였다. 메탄올에 희석한 농도별 별나무 추출물 160 μL 를 517 nm에서 측정하여 초기 흡광도 수치를 확인하고 메탄올을 사용하여 제조한 0.15 mM DPPH 용액 40 μL 를 흡광도 수치를 확인한 추출물에 추가하여 실온에서 30분간 반응시켜 반응이 잘 이루어지도록 한다. 반응시킨 반응액을 517 nm에서 흡광도를 측정하여 반응 후 흡광도 수치를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 다음 계산식으로 계산하였으며, 대조군으로는 메탄올을 사용하였다.

$$\text{DPPH의 radical scavenging activity (\%)} = [100 - (S/C \times 100)]$$

S : 추출물 반응 후 흡광도 - 추출물 반응 전 흡광도

C : 대조군 반응 후 흡광도 - 대조군 반응 전 흡광도

별나무 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성 측정

별나무 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성은 Re 등(1999)의 ABTS^{•+} cation decolorization assay를 응용한 방법으로 측정하

였다. 실험에 사용한 ABTS 라디칼 용액은 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 동일한 양으로 혼합하여 실온 암실에서 24시간 동안 반응시켜 $ABTS^{+}$ 을 생성시킨다. 생성된 ABTS 라디칼 용액은 732 nm에서 $0.70 (\pm 0.02)$ 의 흡광도 값이 되도록 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)로 희석하여 필요량만큼 제조하였다. PBS를 사용하여 농도별로 희석한 벌나무 추출물 20 μ L에 흡광도 값이 0.70로 제조된 ABTS 라디칼 용액 180 μ L를 가한 후 1분간의 반응시간이 지난 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

벌나무 추출물의 ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

벌나무 추출물의 환원력 평가는 Benzie와 Strain의 방법 (1996)을 변형한 FRAP법을 사용하여 측정하였다. 측정에 사용되는 FRAP 시약은 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 녹인 10 mM TPTZ 및 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 제조한 것을 사용하였다. 벌나무 추출물 10 μ L와 FRAP 시약 200 μ L를 혼합하고 5분간 37°C에서 반응시킨 후 593 nm에서 반응 용액의 흡광도 수치를 측정하였다. 결과 정리를 위한 표준물질은 $FeSO_4$ 를 사용하였고, 농도별 $FeSO_4$ 의 표준곡선을 이용하여 mM $FeSO_4$ equivalent/mg extract로 결과값을 도출하였다.

균주 배양

본 연구에는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538) 균주를 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였다. 배양 배지는 Nutrient broth와 agar 배지를 사용하였으며 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 균주 배양은 37°C 배양기에서 배양하여 사용하였다.

Paper disc법을 이용한 벌나무 추출물의 항균력 측정

멸균된 petri dish (87 × 15 mm)를 이용하여 황색포도상구균 균주의 배양용으로 제조된 평판배지에 균주를 100 μ L씩 도말하고, dish에 멸균된 paper disc (8 mm, Advantec 社)를 균등한 위치에 올려놓은 다음, 벌나무 추출물 25, 50, 100 mg/mL 용액을 20 μ L를 분주하여 사용하였으며, 이를 37°C incubator에서 24시간 배양하여 paper disc 주위의 저해환(mm)의 크기로 항균력을 측정하였다.

벌나무 추출물의 최소저해농도(MIC: minimum inhibitory concentration)와 최소살균농도(MBC: minimum bactericidal concentration) 측정

벌나무 추출물의 최소저해농도를 확인하기 위하여 Soares

등의 방법(2011)을 응용하여 측정하였다. 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg/mL로 Nutrient broth 배지에 희석된 벌나무 추출물 180 μ L를 96 well plate의 3열부터 12열까지 넣고, 1열에는 Nutrient broth 200 μ L, 2열에는 180 μ L를 넣는다. 그 후 Nutrient broth 배지에 배양된 황색포도상구균을 Nutrient broth 배지에 희석하여 OD_{600} 에서 $0.1 (\pm 0.005)$ 의 흡광도 수치가 되도록 맞춘 후, 96 well plate의 2열에서 12열까지 20 μ L씩 추가한다. 37°C incubator에서 배양하면서 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간마다 600 nm에서 흡광도를 찍어 균의 배양 여부를 확인하여 MIC 값을 결정한다.

MIC 값을 확인하기 위하여 진행한 96 well plate를 사용하여 MBC 값을 결정하는 연구를 진행하였다. 24시간 측정으로 결정된 균 성장 억제가 확인된 농도의 실험 결과물을 각 농도별로 100 μ L씩 사용하여 멸균하여 만든 Nutrient agar 배지에 도말하여 MBC 값을 확인하였다. 37°C incubator에서 48시간 배양 후 균의 Colony 형성 여부를 확인하여 MBC 값을 결정하였다.

통계학적 분석

대조군과 추출물 처리군의 결과에 대한 통계처리는 Student's t-test로 비교하였으며, 통계처리 후 P 값이 0.05 미만일 경우 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

총 폴리페놀 화합물과 총 플라보노이드 함량

벌나무 추출물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다. 벌나무 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량의 측정 결과 각각 266.66 μ g GAE/mg 과 6.46 ± 0.84 μ g QE/mg의 함량 값을 얻을 수 있었다.

라디칼 소거 활성

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 통하여 벌나무 추출물의 항산화 활성을 확인하였다. 벌나무 추출물의 ABTS, DPPH 라디칼 저해능 결과는 Table 2에 백분율로 나타내었다. 벌나무 추출물은 50 mg/mL의 농도까지 농도의존적으로 증가하는 DPPH 라디칼 소거 활성을 보여주었으며, 50 mg/mL 농도 이상부터는 소거 활성이 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 50% 억제 농도인 RC_{50} 값은 21.49 ± 1.36 μ g/mL이었다. 벌나무 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 50 μ g/mL 이상의 농도에서 90% 이상의 ABTS 라디칼 소거 활성을 보여주었으며, 12.81 ± 0.99 μ g/mL의 RC_{50} 값을 보여주었다.

Table 1 Total polyphenols and flavonoids of ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim

Total polyphenols ($\mu\text{g GAE}^1/\text{mg}$)	Total flavonoids ($\mu\text{g QE}^2/\text{mg}$)
266.66.47	6.46.84

¹Total phenolic content is expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ gallic acid equivalent.

²Total flavonoid content is expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ quercetin equivalent.

³Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

Table 2 DPPH and ABTS radical scavenging activities of ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim

Sample		Radical scavenging activity (%)	
Name	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DPPH radical	ABTS radical
<i>Acer tegmentosum</i> Maxim	5	17.74 \pm 0.65	-
	10	36.23 \pm 2.36	46.62 \pm 1.25
	50	84.91 \pm 0.65	93.98 \pm 0.14
	100	84.53 \pm 0.65	93.93 \pm 0.08
	RC50	21.49 \pm 1.36	12.81 \pm 0.99
	Ascorbic acid	0.5	26.79 \pm 1.73
0.75		42.26 \pm 1.96	-
1		54.34 \pm 2.36	9.53 \pm 0.28
2.5		87.92 \pm 0.65	24.82 \pm 0.27
5		88.68 \pm 0.00	50.50 \pm 0.05
7.5		-	74.82 \pm 4.55
10		-	94.02 \pm 0.22
RC50		0.91 \pm 0.04	5.12 \pm 0.10

¹Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

Table 3 Reducing power of ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim

FRAP value ($\text{mM FeSO}_4 \text{ E}^1/\text{mg}$)
0.730.19

¹FRAP value is expressed as mM/mg FeSO_4 equivalent.

²Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

FRAP법에 의한 벌나무 추출물의 환원력 측정

항산화력을 평가 방법 중 FRAP법을 이용하여 벌나무 추출물의 환원력을 측정한 결과 $0.73 \pm 0.19 \text{ mM FeSO}_4 \text{ E}/\text{mg}$ 의 값을 확인하였다(Table 3).

Paper disc법을 이용한 황색포도상구균에 대한 벌나무 추출물의 항균 활성

벌나무 추출물의 황색포도상구균에 대한 항균력을 확인하기 위하여 Paper disc법으로 확인한 결과 0.5, 1, 2 mg에서 각각 1, 2, 3 mm의 저해환을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

벌나무 추출물의 최소저해농도와 최소살균농도 측정

벌나무 추출물의 최소저해농도를 측정하기 위하여 MIC를 수행한 결과 1 ~ 32 mg/mL에서 80% 이상의 균 성장 억제 활

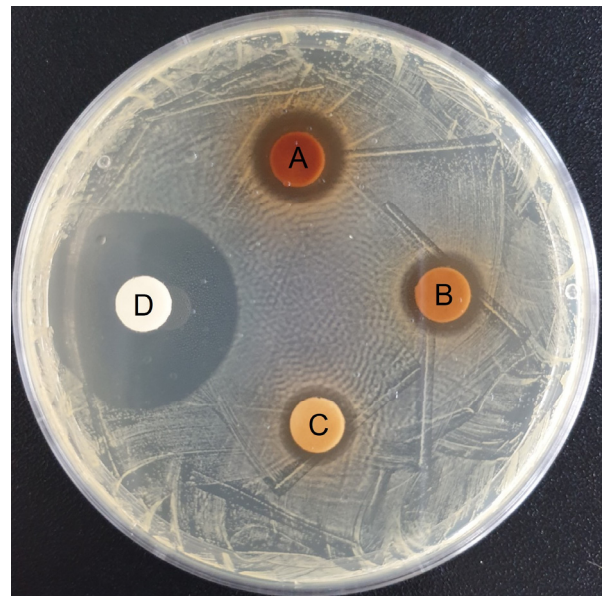


Fig. 1 Antibacterial activity of the extract of *Acer tegmentosum* Maxim against *Staphylococcus aureus*. (A) 2 mg, (B) 1 mg, and (C) 0.5 mg of the extract of *Acer tegmentosum* Maxim; 100 ng of penicillin G (D). Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$) of three replicates

성을 확인할 수 있었고, 16 mg/mL 이상에서 균 성장이 억제되어 MIC 값은 16 mg/mL이었다(Fig. 2). MIC 측정 결과물을 활용한 최소살균농도의 확인을 위하여 균 성장 억제 활성이

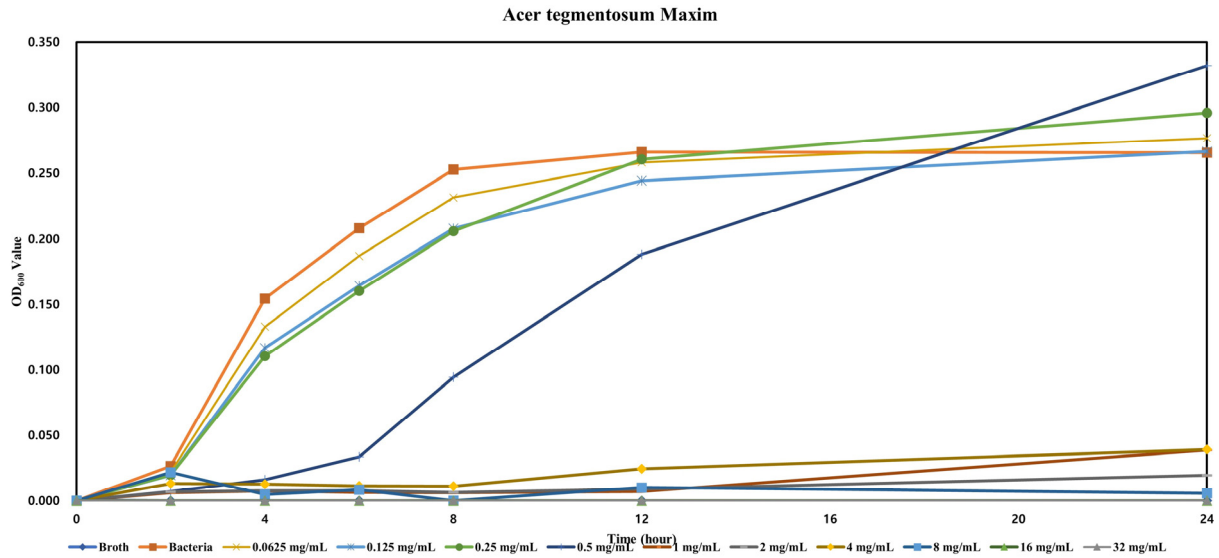


Fig. 2 Determination of MIC of *Acer tegmentosum* Maxim against *Staphylococcus aureus*. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$) of three replicates

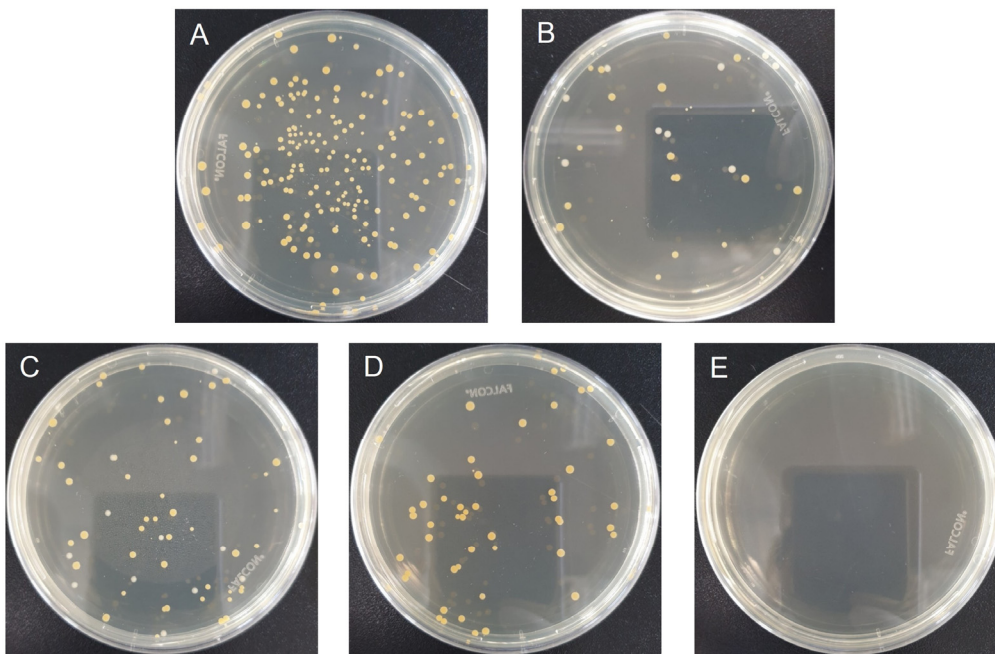


Fig. 3 Determination of MBC of *Acer tegmentosum* Maxim against *Staphylococcus aureus*. (A) 2 mg/mL, (B) 4 mg/mL, (C) 8 mg/mL, (D) 16 mg/mL, and (E) 32 mg/mL of the extract of *Acer tegmentosum* Maxim. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$) of three replicates

확인된 2 mg/mL 이상의 농도 시료 100 μ L를 agar 배지에 도말하여 확인한 결과, 32 mg/mL의 농도에서 균이 검출되지 않았다(Fig. 3).

고 찰

식물성 천연소재의 2차 대사산물 중 폴리페놀 화합물은 구조와 분자량이 다양하며, hydroxyl기를 가진 방향족 화합물

로 단백질 같은 큰 분자들과 결합하는 성질을 가지고 있고 항산화, 항균, 항염증 등 다양한 활성의 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Kang and Lee 2021; Lee and Kim 2020). Park 등(2016)의 벌나무 잎 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량 측정 결과를 보면 116.35 ± 1.4 GAE mg/g의 결과를 보여주었고, Lee 등(2019)의 벌나무 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량 측정 결과를 보면 168.60 ± 12.47 catechin mg/g의 함량으로 본 연구의 벌나무 에탄올 추출물의 266.66 ± 8.47 GAE μ g/mg 보다 적은 함량을 보여주었다. 이는 본 연구에서 기존 연구보

다 추출 시간이 증가함에 따라 폴리페놀의 추출량이 증가한 것으로 판단할 수 있다. 플라보노이드는 폴리페놀의 한 그룹이며 식물성 천연소재 및 채소류에 함유되어 있는 색소 화합물로, 항산화, 항균, 항염증 등 다양한 약리학적, 생화학적 효능에 관여하는 것으로 알려져 있다(Hertog et al. 1993; Kim et al. 2014). 특히, 특정 플라보노이드는 독성을 거의 없으며, 항산화, 항균, 항염증 및 항노화 등과 같은 생리적 기능을 나타낸 연구들이 보고되고 있다(Choi and Ohk 2017; Rice-Evans et al. 1995). Park 등(2016)과 Lee 등(2019)의 플라보노이드 함량을 보면, 20.30 ± 1.2 RE mg/g와 45.78 ± 3.85 QE mg/g의 함량을 확인할 수 있었으며, Choi 등(2013)의 벌나무 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량을 보면 5.01 ± 0.83 QE μ g/mg을 나타내었다. 본 연구에서 벌나무 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량은 6.46 ± 0.84 QE μ g/mg으로 추출 기간이 늘어남에 따라 상대적으로 플라보노이드 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

DPPH 라디칼은 타 라디칼보다 안정한 라디칼로, 정색성을 상실하는 특성을 사용하여 항산화력을 검증할 수 있고(Lee and Cho 2016), ABTS 라디칼 소거 활성은 potassium persulfate 반응을 이용하여 ABTS 라디칼을 생성하고, 생성된 ABTS 라디칼과 시료를 반응시켜 ABTS 라디칼의 특유 색인 청록색의 희석되는 정도로 항산화력을 측정하는 방법이다(Hwang et al. 2021). 합성 라디칼인 DPPH와 ABTS 라디칼은 물과 유기용매에 용해성이 높고, 극성 및 비극성 시료를 사용한 항산화 활성 측정에 이용하는 것이 가능하다(Awika et al. 2003). 본 연구에서 벌나무 추출물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성은 각각 21.49 ± 1.36 , 12.81 ± 0.99 μ g/mL의 RC_{50} 값으로 ABTS 라디칼 소거 활성이 높은 것으로 나타났으며, 동일한 농도에서도 ABTS 라디칼 소거능이 DPPH 라디칼 소거능보다 높은 소거능을 보여주었다. 벌나무 추출물의 ABTS와 DPPH 라디칼 소거능에서 차이가 나타나는 것은 소거 활성을 일으키는 기질의 결합 정도에서 차이가 발생하고, 라디칼 소거 기전에서 다른점이 존재하여 소거능에서 활성 차이가 발생하는 것으로 판단할 수 있다(Kwon and Youn 2014). Choi 등(2013)의 벌나무 추출물을 사용한 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 측정 결과를 보면 본 연구와 같이 ABTS 라디칼 소거능이 DPPH 라디칼 소거능 보다 더 높은 소거율을 보인다는 것을 확인할 수 있었지만, Lee 등(2019)의 연구 결과에서는 DPPH 라디칼 소거 활성이 ABTS 라디칼 소거 활성보다 뛰어난 소거 활성을 보여주었다. 이는 추출 방법의 차이로, 두 연구의 추출 방법을 비교하여 보면 추출 초기에는 DPPH 라디칼 소거 활성이 높은 성분이 더 많이 추출되고 그 이후에 ABTS 라디칼 소거 활성이 높은 성분이 추출되는 것으로 판단할 수 있다.

FRAP법은 항산화력을 평가하는 방법 중 하나로 산화 및 환원 반응을 측정 방법으로 사용하여 시료가 Fe^{3+} 을 Fe^{2+} 로 환원시키는 원리를 이용하며, 반응 과정에서 Fe^{2+} 가 청색을

나타내고 이 흡광도 수치를 측정하여 항산화력을 측정하는 방법이다. 환원 원리를 사용한 항산화력 측정 방법은 항산화제가 수소 원자를 제공하여 라디칼의 연쇄적 반응을 억제하는 것을 이용한 항산화 활성 측정 방법이다(Duh et al. 1999; Ku et al. 2009). 벌나무 추출물은 환원력을 측정하는 FRAP assay에서도 항산화력을 보여주어 기능성 항산화 소재로서의 가능성을 보여주었다.

Paper disc법을 이용한 황색포도상구균에 대한 벌나무 추출물의 항균 활성은 0.5, 1, 2 mg에서 각각 약 1, 2, 3 mm의 저해환을 보여주었다. 최소저해농도 연구에서는 1 mg/mL 이상의 농도에서 80% 이상의 균 성장 억제력을 보여주었고, 16 mg/mL 이상의 농도에서는 균이 자라지 않아 최소저해농도 값은 16 mg/mL였다. 최소저해농도 연구 결과물 중 2, 4, 8, 16, 32 mg/mL의 농도의 배양용액을 사용한 최소살균농도 연구에서는 2, 4, 8, 16 mg/mL에서 균이 자라는 것을 확인할 수 있었고, 32 mg/mL에서는 균이 자라지 않아 최소살균농도는 32 mg/mL라는 것을 확인할 수 있었다. 아토피피부염 치료제인 tacrolimus의 치료로 인한 황색포도상구균 집락의 변화를 본 Lee 등(2004)의 논문을 보면 tacrolimus의 치료로 황색포도상구균 집락의 감소를 확인할 수 있었다. 또한, Yim 등(2002)의 연구 결과에서 아토피피부염 환자의 중증도 정도와 아토피피부염 환자의 피부에서 황색포도상구균 집락의 정도가 상관관계를 이룬다고 보고하였다. 이런 연구 결과들을 보았을 때, 황색포도상구균에 대한 항균 활성을 나타내는 추출물은 아토피피부염 개선에 유효한 후보 물질로서의 가능성을 가진다고 판단할 수 있다.

벌나무 추출물을 사용한 항산화 및 황색포도상구균에 대한 항균 활성을 확인한 결과 벌나무 추출물의 아토피피부염에 유효한 물질로서의 가능성을 확인할 수 있었고, 앞으로 벌나무 추출물에서 황색포도상구균에 대한 항균 활성을 나타내는 성분을 탐색하는 연구와 그 성분에 대한 안전성 및 안정성에 대한 연구를 추가하여 아토피피부염에 유효한 성분을 찾는 연구가 이루어져야 할 것이다.

적 요

본 연구는 벌나무 에탄올 추출물의 황색포도상구균에 대한 항균 및 항산화 활성을 검증하였다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH와 ABTS 라디칼 소거효능과 FRAP법을 사용한 환원력을 측정하여 벌나무 에탄올 추출물의 항산화 활성을 검증하였고, Paper disc법, MIC 및 MBC법을 통하여 황색포도상구균에 대한 벌나무 에탄올 추출물의 항균 활성을 검증하였다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 266.66 μ g GAE/mg와 6.46 μ g QE/mg이었다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 농도 의존적 소거능을 보였고, 벌나무 에탄올 추출물의 RC_{50} 값은 각각 21.49 , 12.81 μ g/mL이었다. 환원

력을 평가하기 위해 수행된 FRAP 분석에서 벌나무 추출물은 0.73 ± 0.19 mM FeSO₄ E/mg의 효능을 보여주었다. Paper disc법을 이용한 황색포도상구균에 대한 벌나무 추출물의 항균 활성은 2 mg에서 3 mm의 저해환을 보여주었으며, 최소 저해농도 연구에서는 1 mg/mL 이상의 농도에서 80% 이상의 억제력을 보여주었고, 16 mg/mL 이상의 농도에서 최소저해농도를 확인할 수 있었다. 또한, 최소살균농도 연구에서는 32 mg/mL에서 최소살균농도를 확인할 수 있었다. 벌나무 추출물을 사용한 항산화 및 황색포도상구균에 대한 항균 활성을 확인한 결과 벌나무 추출물의 아토피피부염에 유효한 물질로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

사 사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2021R1F1A1063617).

References

- Adachi Y, Akamatsu H, Horio T (2002) The effect of antibiotics on the production of superantigen from *staphylococcus* isolated from atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science* 28: 76-83
- Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L (2003) Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6657-6666
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70-76
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Breuer K, HAussler S, Kapp A, Werfel T (2002) *Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 147:55-61
- Choi JH, Lee SH, Park YH, Lee SG, Jung YT, Lee IS, Park JH, Kim HJ (2013) Antioxidant and Alcohol Degradation Activities of Extracts from *Acer tegmentosum* Maxim. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 42(3):378-383
- Choi JH, Ohk SH (2017) Evaluations on Antioxidant Effect of Water Extract from *Graviola* Leaves. *J Korea Academia-Industrial cooperation Society* 18(6):129-135
- Duh PD, Du PC, Yen GC (1999) Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology* 37(11):1055-1061
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry* 12(2):239-243
- Hertog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:1242-1246
- Hong BK, Eom SH, Lee CO, Lee JW, Jeong JH, Kim JK, Cho DH, Yu CY, Kwon YS, Kim MJ (2007) Biological activities and bioactive compounds in the extract of *Acer tegmentosum* Maxim. stem. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 15:296-303
- Hur JM, Jun M, Yang EJ, Choi SH, Park JC, Song KS (2007) Isolation of isoprenoidal compounds from the stems of *Acer tegmentosum* Max. *Korean Journal of Pharmacognosy* 38: 67-70
- Hwang JW, Choi JH, Kang SM, Lee SG, Kang H (2021) Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Hot Water and Ethanol Extracts from Endemic Plants in Indonesia. *Biomedical Science Letters* 27:161-169
- Hwang YH, Kang JS, Kim BK, Kim SW (2017) Colonization of *Staphylococcus aureus* and sensitivity to antibiotics in children with atopic dermatitis. *Allergy, Asthma & Respiratory Disease* 5:21-26
- Hwangbo H, Jeung JS, Kim MY, Ji SY, Yoon SH, Kim TH, Kim SO, Choi YH (2021) A Study on Antioxidant and Anti-inflammatory Effects Based on Analysis of Functional Components of *Cornus officinalis* Siebold & Zucc. *Journal of Life Science* 31(3):287-297
- Jang MJ, Seo SJ, Lee YS (2021) Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-aging Activities of *Elaeagnus multiflora* Fruit Extracts as a Cosmetic Material. *Journal of Investigative Cosmetology* 17(2):159-167
- Kang H, Lee SG (2021) Antioxidant Capacity of Ethanol Extracts and Fractions from *Rubus coreanus* Miq.. *Journal of Plant Biotechnology* 48:264-270
- Kim JY, Cho JY, Moon JK, Choi GC, Lee KD, Ham KS, Kim SJ (2014) Change of phenylpropanoic acid and flavonol contents at different growth stage of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Food Science and Biotechnology* 23:685-691
- Ku KM, Kim SK, Kang YH (2009) Antioxidant Activity and Functional Components of Corn Silk (*Zea mays* L.). *Korean Journal of Plant Resources* 22(4):323-329
- Kwon HN, Park JR, Jeon JR (2008) Antioxidative and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 37: 1389-1394
- Kwon YR, Youn KS (2014) Antioxidant activity and physiological properties of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves extracts with different solvents. *Korean Journal of Food Preservation* 21(6):831-837
- Lee BH, Park CW, Lee CH (2004) A Study of the Effect of Tacrolimus Ointment on the Staphylococcal Colonization in Atopic Dermatitis Patients. *Korean Journal of Dermatology* 42(10):1294-1303
- Lee GW, Cho YH (2016) Antioxidant Activity of Leaf Extract from *Annona muricata*. *Review of Korea Contents Association* 14(3):43-46

- Lee JE, Kim AJ (2020) Antioxidant Activity, Whitening and Anti-wrinkle Effects of Leaf and Seed Extracts of *Brassica juncea* L. Czern. Asian Journal of Beauty and Cosmetology 18(3):283-295
- Lee SH, Yun YG (2006) Study for Treatment of Atopic Dermatitis in Oriental Medical Prescription. Journal of Korean Medicine 15:56-69
- Lee SJ, Cho HH, Song YO, Jang SH, Cho JH (2019) Antioxidant activity and improvement effect of *Acer tegmentosum* Maxim of dietary fatty liver in rat fed on a high-fat die. Korean Journal of Veterinary Service 42(2):43-51
- Leung DYM, Bieber T (2003) Atopic dermatitis. The Lancet 361: 151-160
- Matsui K, Nishikawa A, Suto H, Tsuboi R, Ogawa H (2000) Comparative study of *staphylococcus aureus* isolated from lesional and non-lesional skin of atopic dermatitis patients. Microbiology and Immunology 44:945-947
- Min TK, Yang HJ, Lee HW, Pyun BY (2013) Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* skin colonization in atopic dermatitis. Allergy, Asthma & Respiratory Disease 1(2):138-143
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology 71(1-2):109-114
- Ogawa T, Katsuoka K, Kawano K, Nishiyama S (1994) Comparative study of staphylococcal flora on the skin surface of atopic dermatitis patients and healthy subjects. The Journal of Dermatology 21:453-460
- Park SJ, Shin EH, Kim DH, Rha YA (2016) Nutrition Components and Physicochemical Properties of *Acer termentosum* Maxim. Leaf. Culinary science and hospitality research 22(8):27-38
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evansa C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine 26(9-10):1231-1237
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free radical research 22(4):375-383
- Shin IC, Sa JH, Shim TH, Lee JH (2006) The physical and chemical properties and cytotoxic effects of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts. The Korean Society for Applied Biological Chemistry 49:322-327.
- Soares T, Ferreira FRB, Gomes FS, Coelho LCBB, Torquato RJS, Napoleão TH, Cavalcanti MSM, Tanaka AS, Paivaa PMG (2011) The first serine protease inhibitor from *Lasiadora* sp. (Araneae: Theraphosidae) hemocytes. Process Biochemistry 46:2317-2321
- Yim YS, Park CW, Lee CH, Song WK (2002) A Study on the Evaluation of the Staphylococcal Exotoxins and Staphylococcal Enterotoxin A-specific IgE Antibody in Childhood Atopic Dermatitis. Korean Journal of Dermatology 40(6):607-615
- Yun HJ, Ko WS (2001) Clinical Study of Atopic Dermatitis; the Classification of Oriental Medical Clinical type and Treatment. Journal of Korean Oriental Medicine 22(2):10-21