(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 36/258 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년03월28일
(11) 등록번호 10-0700911
(24) 등록일자 2007년03월22일

(21) 출원번호 10-2005-0135206
(22) 출원일자 2005년12월30일
심사청구일자 2005년12월30일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 김경현
서울 성북구 안암동 고려대학교 생명공학원 408호

이지혜
서울 성북구 안암동 고려대학교 생명공학원 408호

심진선
서울 성북구 안암동 고려대학교 생명공학원 408호

(74) 대리인 이문섭
윤여강

(56) 선행기술조사문헌
한국식품저장유통학회지 10(2), 206-212, (2003)
고려인삼학회지, 14(1), 67-73, (1990)
Carbohyrate Research, 341(9), 1154-1163, (2006)
KR 1020040024213 A
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 이민정

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 인삼 뿌리에서 분리된 산성 다당류를 함유하는 피부 여드름간균과 아토피 황색 포도상 구균의 인체 세포결합 저해 활성 조성물

(57) 요약

본 발명은 피부질환 여드름 간균인 프로피오니박테리움 액크니스(*Propionibacterium acnes*)와 아토피 피부병원균 황색 포도상 구균인 스타필로코코스 오리우스(*Staphylococcus aureus*)의 인체세포 결합을 저해하는 인삼 다당류 분획과 이를 이용한 여드름과 아토피 피부질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 고려인삼(*Panax ginseng*, C. A. Meyer)의 수용성 추출물에서 분리된 산성 다당류(acidic polysaccharide) 분획은 다른 다당류 분획에 비하여 유론산(uronic acid)의 함량이 높고, 황색 포도상 구균과 여드름 간균

에 의한 적혈구 응집반응(hemagglutination)을 저해하는 활성이 상대적으로 높다. 따라서, 여드름이나 아토피 치료를 위한 항생제 과다 사용에 따른 항생제 내성균 문제가 심각한 시점에서, 분리 정제된 다당류 분획은 여드름 간균과 황색 포도상 구균에 의하여 야기되는 여드름과 아토피 피부질환 예방 및 치료제로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 세포-세포간 부착을 저해하여 여드름, 아토피 질환을 최소화하는 비파괴적 기술이라는 점에서 매우 중요한 미래지향적인 화장품 및 의약품에의 적용성을 갖고 있다.

대표도

도 3a

특허청구의 범위

청구항 1.

인삼 뿌리를 분쇄하여 열수추출하고 에탄올 침전을 한 후, 이온교환 크로마토그래피의 염화나트륨 농도 0.2-0.4 M에서 분리되고, 젤여과 크로마토그래피의 분자량 10-15 kDa 크기(Mw)에서 분리되는 산성 다당류를 유효성분으로 함유하는 여드름, 아토피 피부 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 산성 다당류는 유론산을 20-35 중량% 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 산성 다당류는 여드름 간균과 아토피 황색 포도상 구균의 세포결합 저해활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 여드름(심상성 좌창)과 아토피 발병 원인균으로 인정되고 있는 여드름 간균(*Propionibacterium acnes*)과 황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)의 인체 상피세포 결합을 저해하는 인삼 뿌리에서 추출된 산성 다당류과 이를 함유하는 여드름 및 아토피 피부질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

여드름(심상성 좌창; Acne vulgaris, pimples)은 청소년기부터 중년에 이르기까지 가장 흔한 피부질환 중 하나이다. 의학적으로 여드름은 피부 속의 모낭(hair follicle)과 피부의 기름샘인 피지선(sebaceous gland)의 염증성 병변이다. 여드름의 내적 원인은 정신적, 신체적 스트레스에 따라 호르몬 변화 등의 내분비 작용에 의한 피지 분비와 그 성분의 이상, 과다한 피지의 분비에 따른 피지선 또는 모낭의 막힘을 들 수 있다. 스트레스로 인한 코티솔(cortisol)과 여성의 생리 기간 중의

프로제스트론(progesterone)이라는 호르몬과도 관계가 깊다 (4). 외적 원인으로는 피지의 증가로 피지선 안에 살고 있는 여드름 간균(*Propionibacterium acnes*)에 의한 자극인자가 모낭 상피벽을 자극하기 때문에, 상피내면의 각질이 두꺼워지고, 이 시기에 모낭의 이상각화로 인한 폐색이 일어나고 모낭 내로 산소유입이 감소한다. 이 현상은 여드름 발병 원인균인 혐기성 *P. acnes*에 있어서 매우 양호한 발육조건이 되어 여드름 병소에서 증식이 촉진된다 (5). 일반적으로 건강한 피부에는 여드름 간균, 포도상 구균 등 세균(bacteria)이 상재하고 있다. 사람에 따라서 피부 $1cm^2$ 중에 수십부터 수십만 개에 달하는 여드름 간균이 상재해 있으며, 세균보다 큰 모낭충(진드기의 일종)도 기생하고 있다. 모낭충에 의한 여드름은 여드름 간균에 의한 여드름보다도 붉은 기가 매우 강하고 염증도 크게 생긴다.

아토피성 피부염은 가장 흔한 피부질환의 하나로 알레르기 질환이 있거나 가족력이 있는 사람의 얼굴이나 팔다리 접히는 부분에서 발병하는 만성 염증성 피부 질환이다 (6). 피부의 병변은 환자의 연령과 질환의 급만성 정도에 따라 다양하게 나타난다. 아토피의 외적 요인은 방향제, 방부제, 소독약, 용제 등 화학물질 외에도 실내 먼지와 진드기(house dust mite), 곰팡이, 음식, 꽃가루, 애완견 등이 포함된다. 경우에 따라서는 양털 같은 모직물에 대한 불내성(intolerance)도 아토피의 징후(stigma)가 될 수 있다. 흡입된 항원은 아토피 피부염의 손상된 피부 보호막을 투과해서 접촉성 피부염의 원인이 된다. House dust의 주된 원인은 *Dermatophagoides pteronyssinus*이며, 음식에 의한 알레르기의 역할은 아직 논쟁의 대상이 되고 있지만 일반적으로 어른에서보다 아이들에게 영향이 큰 것으로 알려져 있다. 아토피성 피부염은 다른 알레르기성 질환과 공존된 경우가 흔하다. 외적 요인으로는 혈청 IgE의 양이 증가하고, 특히 세균, 바이러스, 진균에 감염되기 쉬운 면역 결핍과 관련이 있고, 생리학적으로 교감신경이나 부교감 신경 반응에 변화가 있다고 보고 되고 있다 (11). 특히 중요한 점은 아토피 환자의 90%가 피부에 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)이 집적되어 번식하고 있으며, 많은 연구 결과들을 통해서 아토피 환자의 상피세포에 포도상 구균의 감염되어 있음이 알려져 있다. 그러나 이런 아토피 환자에게 상피세포에 포도상 구균의 감염 및 번식하는 기전은 명확하지 않다. 아토피성 질환 부모의 소아에서 아토피성 피부염의 빈도가 높아 유전적인 소인이 있는 것으로 추정되고, 아토피성 피부염을 가지고 있는 모체로부터 수유기간이 증가할수록 아토피성 피부염의 발생 빈도도 증가하는 것으로 알려지고 있다 (12).

일반적으로 여드름은 피부 진피 층에 존재하는 피지선이 항진되어 피지분비가 증가하여 모공이 막히거나, 여드름 원인균 *P. acnes*나 화농성 세균 *S. aureus* 혹은 모낭충 등의 원인균에 의해 염증이 발생된다. 사춘기 때는 안드로젠의 호르몬 자극에 의해 피지선이 성숙되면서 여드름이 시작하지만 성인이 된 후에는 화장에 의해서 피지 배출이 잘 되지 않거나, 스트레스, 수면 부족 등에 의하여 부신피질 호르몬이 증가하면서 피지선을 자극하여 여드름이 발생하기도 한다. 또한 자외선, 화학성 물질과 같은 외부자극 요인이나 열, 건조, 습기, 황사바람 등 기후 변화가 주어지거나 생활이 불규칙하여 내부 장기 기능이 떨어지게 되면 2차적인 병변을 일으키게 된다. *P. acnes*가 생성하는 lipase 효소는 피지를 중성지방(트리글리셀리드)과 유리 지방산으로 가수 분해하고, 유리지방산은 모낭에 comedogenic한 작용을 하는 것으로 보인다. *P. acnes*의 균수는 미소면포(micro comedo), 폐쇄면포(closed comedo), 개방면포(opencomedo)의 순으로 많으며 미소면포내의 세균은 거의가 *P. acnes*이다. 특히 여드름 초기의 구진형성에는 *P. acnes*의 관여가 크다고 보고 있다. 따라서 여드름 치료는 박테리아균의 증식을 억제하기 위한 clindamycin, erythromycin, tetracycline과 같은 항생제나, 피부를 제거하기 위한 benzoyl peroxide, 혹은 피지생성을 억제하는 vitamin A 제재 화합물 등이 이용되고 있다.

아토피성 피부염의 원인과 병태생리에 관한 많은 연구가 있지만 정확한 작용기전에 대해서는 아직 규명되지 않고 있다. 아토피성 피부염을 악화시키는 일반적인 요인으로는 고온, 습기, 심한 운동, 화학섬유 의류, 자극성이 강한 비누, 화학적 자극, 스트레스, 진드기, 먼지 등으로 알려져 있다. 악화 요인의 제거만으로도 아토피성 피부염 증상의 감소에 도움을 줄 수 있다. 아토피성 피부염 환자는 혈청 항체 IgE 양의 증가, 세포성 면역계의 억제, 혈중 호중구(neutrophil) 양의 증가, IL-4 (interleukin-4)의 생성증가 등이 흔히 관찰된다 (8, 12). IL-4는 IgE 생합성을 자극하고 interferon-gamma(INF-ɣ)는 지연성 과민반응(delayed hypersensitivity reaction)을 매개하고 다른 interleukin(IL-3, IL-13)도 아토피성 피부염의 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다 (6). 아토피성 피부염 환자는 말초 혈액 중의 단핵구가 자극에 대해 생성하는 INF-ɣ 양이 정상인에 비해 상대적으로 적다. 실제로 몇몇 연구에서 기존의 치료법으로 효과가 없는 심한 아토피성 피부염에 INF-ɣ가 효과가 있다는 연구가 있다 (11). 외부의 알레르기성 항원에 노출되면 알레르기 항원 특이적 IgE의 생성이 증가하고 이 IgE는 비만세포와 결합하여 비만세포의 염증성 물질의 유리를 일으킨다. 이 때 유리된 히스타민은 가려움증을 일으키는 수용체를 직접 자극하고 뉴로펩타이드(neuropeptide), 프로티에이스(protease), 사이토카인(cytokine)은 간접적인 작용에 의해 가려움증을 일으킨다 (10). 특히 황색 포도상 구균과 같은 세균유전자 핵산 물질(CpG)과 세포막 물질(LPS)이 알레르기를 일으키는 것으로 알려져 있다. 아토피성 피부염환자의 피부는 정상인의 피부에 비해 환부나 환부이외의 부위 모두에서 포도상 구균의 검출 빈도가 현저하게 높다. 정상적인 사람에게서 발견된 것에 비해 아토피성 피부염을 가지고 있는 환자에게서 분리된 포도상 구균이 항생제 메치실린(methicillin)내성 균주와 후시딘(fusidic acid)내성 균주의 발생비율도 현저히 높다. 또한 포도상 구균은 아토피의 급성 악화기에 주요 악화 원인이 된다.

아토피성 피부염을 치료하는 전신요법의 제제는 항히스타민제, 항생제, 부신피질 호르몬제가 있다. 항히스타민제는 장기 연용시 효과가 갑자기 소실되는 경우(tachyphylaxis)가 흔하고, 경구용 부신피질 호르몬 제제는 외용제가 효과 없는 경우를 제외하고는 거의 사용하지 않는 것이 원칙이다. 아토피성 피부염으로 인한 2차 감염의 치료에는 외용 항생제만 사용하는 것보다 경구 치료를 병행하고 있다. 포도상구균을 치료할 수 있는 dicloxacillin, erythromycin, cephalexin 등을 사용한다 (8, 11).

이와 같이 피부질환 병원균 특히 여드름과 아토피 치료와 보호를 목적으로 항생제가 주로 사용되고 있지만, 항생제 오용과 남용에 따라 많은 병원균이 항생제에 대하여 내성을 갖고 있고, 항생제의 수명 또한 짧아지고 있다. 항생제 내성균의 출현과 병행하여 중요한 점은 항생제를 투여하였을 때의 피부 미생물의 발란스가 무너진다는 사실이다. 그람 음성균은 피부와 같이 건조한 조건에 잘 적응하는 그람 양성균과의 경쟁에서 생존하지 못하기 때문에, 항생제로 피부의 그람 양성균을 제거하면 병원성이 강한 그람 음성균이 늘어나기 시작한다. 따라서 항생제를 대체하기 위한 노력이 필요하며, 국내에서 피부과에서 사용하고 있는 여드름과 아토피 치료용 항생제 남용에 따른 내성균은 향후 소아 및 사춘기 세대의 건강에 위협적인 인자가 될 수 있다. 최근에는 병원균의 치료와 방지를 위한 probiotics, phages, phytomedicines 등의 비항생제 요법이 개발되고 있다. 특히 식물에서 추출된 phytochemical은 항균 작용의 적용은 앞으로 항생제의 역할을 대신할 것이라 기대하고 있다.

이에, 본 발명자들은 종래 피부질환에 이용되고 있는 항생제의 내성균 유발과 피부 유익균 까지도 파괴하는 문제점을 인식하고, 여드름 간균, 포도상 구균의 인체피부 세포 부착에는 현저한 저해를 하면서 다른 피부상재균에는 저해효과가 없는 특이적 효과를 갖는 천연 생리활성물질을 탐색하던 중, 고려인삼 생리활성 물질 중에서 탄수화물 분획을 분리하게 되었고, 특히 산성 다당류 당배합체 분획의 생리활성을 측정한 결과, 밀리몰(millimolar) 이하의 수준에서 여드름 간균(*P. acnes*)과 황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)에 의한 적혈구 응집반응에 강한 저해효과를, 또한 인체 유익균에는 저해효과 보이지 않음으로써 여드름, 아토피 피부질환 예방 및 치료제로서 높은 가능성이 입증되어, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 주된 목적은 여드름 간균, 포도상 구균의 인체피부 세포 부착에는 현저한 저해를 하면서 다른 피부상재균에는 저해효과가 없는 특이적 효과를 갖는 산성 다당류를 함유하는 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 산성 다당류를 함유하는 여드름, 아토피 피부질환 예방 및 치료에 유용한 조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성

본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 인삼 뿌리를 분쇄하여 열수추출한 후 에탄올 침전을 하여 얻어진 산성 다당류를 유효성분으로 함유하는 여드름 간균과 아토피 황색 포도상 구균의 세포결합 저해활성 조성물을 제공한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 산성 다당류는 상기 에탄올 침전물을 인산 완충용액에 용해, 투석한 후 이온교환 크로마토그래피 및 젤 여과 크로마토크래피에 의하여 분리된 분획인 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 분획은 이온교환 크로마토그래피의 염화나트륨 농도 0.2-0.4 M에서 분리되고, 젤 여과 크로마토그래피의 분자량 10-15kDa 크기(Mw)에서 분리되는 것을 특징으로 한다. 상기 수치범위의 분획에서 유론산을 20-35 중량% 함유하였으며 본 발명의 세포 결합 저해활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 산성 다당류를 유효성분으로 함유하는 여드름, 아토피 피부 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 산성 다당류는 인체 세포세포결합 저해활성으로 인하여, 여드름 간균 또는 아토피 황색 포도상 구균의 인체 상피세포 결합에 의해 발생하는 여드름, 아토피등 각종 피부 질환의 예방 및 치료에 효과가 있을 것으로 이해된다. 인체의 피부세포의 탄수화물과 적혈구의 탄수화물 조성이 동일 내지 유사하므로, 본 발명의 실시예에서는 본 발명의 산성 다당류가 *P. acnes*와 *S. aureus*에 의해 유발되는 적혈구 응집반응을 저해하는 효과를 시험하였다.

본 발명의 산성 다당류는 상기와 같은 예방 및 치료용 조성물로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다.

본 발명에 따른 산성 다당류를 유효성분으로서 투여하는 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 100-500mg의 산성 다당류 추출물 및 그 분말로 투여될 수 있다.

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

본 발명은 피부질환 여드름 간균(*P. acnes*)과 황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)에 의하여 야기되는 적혈구 응집반응을 저해하는 산성 다당류와 이를 고려인삼의 수용성 추출물 중에서 이온교환 크로마토그래피, 젤 여과 크로마토그래피로 분리하는 제조방법으로 구성되어 있다. 우선, 1) 당배합체의 분리를 위하여 고려인삼의 일반적인 섭취 및 추출방식에 따라 뜨거운 증류수로 추출한다. 이는 기존의 천연 생리 활성물질 추출을 주로 화장품 및 약품에 적용하기 어려운 유기용매를 이용하여 추출하는 방식과는 대조적으로, 생리활성 물질 탐색에 좀 더 실제적인 접근이며 인체 친화적이라고 할 수 있다. 2) 분리된 산성 다당류는 유론산(uronic acid)의 함량이 높으며, *P. acnes*와 *S. aureus*의 인체 피부세포 인식을 저해하는데 매우 특이적(specific)이다. 따라서 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 고려인삼 뿌리 부분을 뜨거운 증류수로 추출하는 단계와, 최신 탄수화물 공학적 기술을 이용하여 이온교환 및 젤 여과 크로마토그래피로 생리활성 산성다당류를 분리하는 단계, 그리고 *P. acnes, S. aureus, S. epidermidis, E. coli, L. acidophilus*등에 의한 적혈구 응집반응을 저해하는 활성측정 단계로 이루어져 있다.

기존의 인삼 생리활성물질 추출은 주로 유기용매 추출법에 의존하고 있는데, 이는 우리가 인삼을 물에 끓여서 섭취하는 것과 대치되는 것이다. 본 발명에서 뜨거운 증류수(60-100 ^{o}C)에 의하여 추출되는 수용성 분획은 인삼 생리활성 물질 탐색에 좀 더 실제적인 접근이라고 할 수 있다. 유론산은 중성 단당류의 C_6 알코올기 탄소가 카르복실기로 치환되어 중성 pH에서 음전하를 띠고 있는 특징을 갖고 있다. 특히 분리된 산성 다당류 분획은 유론산 함량이 20-30%에 달하며, 주어진 조건에서 분리 추출된 다른 다당류 분획에 비하여 유론산 함량이 제일 높았다. 인삼뿌리에서 추출 분리 정제된 산성 다당류의 탄수화물 조성을 보면 글루구론산이 전체 당의 20%에 가까운 조성을 보여주고 있다. 또한 *P. acnes*와 *S. aureus*에 의한 적혈구 응집반응을 저해하는 산성 다당류의 최소 유효량은 높은 분자량에 근거하였을 때 낮은 농도 0.5 mg/ml로서 효과적인 저해활성을 보여주고 있다. 더욱이 피부질환에 대한 세포 인식을 저해하는데 특이적인 탄수화물의 적용은 친환경적이면서 새로운 접근 방법이기 때문에 산성다당류의 특성을 분자수준에서 연구함으로써 산업적으로 효과적인 당배합체를 개발 및 디자인할 수 있다.

여드름 간균(*P. acnes*)은 그람 양성균으로 spore를 형성하지 않으며, rod 형태의 혐기성 박테리아 로서 여드름 간균으로 불리고 있다 (13). *Corynebacterium*과 형태학적으로 매우 유사하며 일반적으로 non-toxigenic 하다. 혐기성이지만 제한적으로 호기성(microaerobic) 증식도 가능하며, 여드름을 유발하는 피부와 모낭의 대표적인 상재균(skin flora)이다.

황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)는 화농성 피부질환에 관여하며, 피부의 상처를 통해서 화농을 일으키며, 피부 표면의 부스럼, 종기 원인균이다. 특히 *S. aureus*는 아토피 피부염의 1차 요인일 뿐만 아니라 2차 요인으로서 피부 모공이 감염되거나, 땀샘이 막힌 상태에서 감염하거나 상처에 침입하여 발병하기도 한다 (7). 정상인은 10% 이내인 반면, 아토피 환자의 90%가 피부에 황색 포도상 구균이 발견되고 있다. 뿐만 아니라 아토피 피부염이 발생하면 포도상 구균 감염이 합병한다.

일반적으로 땀과 피지를 섞어주는 역할을 하고 있는 피부 상재균은 이로운 상재균으로 피부에 도움을 주는 반면, 여드름 간균이나 포도상 구균 등 해로운 상재균이 너무 늘어나면 피부의 발란스가 무너지는 원인이 된다.

세포 표면의 당단백질 혹은 당지질 같은 탄수화물은 단백질을 인식하는 ligand의 기능을 갖고 있어 세포와 세포의 상호 인식작용 외에도, 외부 병원균, 바이러스, 독성물질, 호르몬의 부착 장소를 제공한다 (21). 병원균이 인체 세포를 침투하여 증식을 하게 되면, 염증을 일으키고, 질환이 야기되기 때문에, 병원균의 인체세포 부착을 초기에 원천적으로 봉쇄하게 되면 질환예방의 역할을 하게 된다. 인체 병원균 감염의 초기과정에서 중요한 역할을 하고 있는 인체 세포표면 탄수화물을 이용하여 항 부착 치료제로 개발된다면 병원균의 초기 감염을 차단할 수 있다. 따라서 항 부착 치료와 예방은 감염 매개체의 부착을 제거하거나 방지하여 인체 조직과 병원균 사이의 접촉을 선택적으로 감소시키고, 유익균의 부착은 선택적으로 허용함으로써 피부의 미생물 발란스를 유지하는 생물환경 친화적 요법으로 개발 가능하다.

*P. acnes*는 피부 모낭의 피지선에 주로 발생하며 생존하는데, 제놈 서열 연구결과, surface-associated 단백질, 4-7개의 proline-threonine repetitive protein (PTRP) 단백질 등이 인체 세포와의 상호작용에 관여하는 것으로 보고되었다 (3). 최근 *P. acnes*가 hyaluronate lyase 효소를 만들어 피부 연결조직(connective tissue) 세포 밖 matrix의 주요 구성분인 hyaluronan 다당류를 분해하며, 이러한 작용이 박테리아의 피부세포 부착에 도움을 주고 있다고 보고되었다 (22). 특히 PTRP 단백질은 *P. acnes*의 세포 표면 단백질로서 인체 세포 상호작용하는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (3). 따라서 인체세포의 탄수화물과 이를 인식하는 박테리아 표면 단백질간의 상호작용 및 결합에 대한 연구는 이들 박테리아의 인체 피부세포 부착 기작을 이해하는데 공헌할 것이다. 박테리아 세포는 일반적으로 혈구응집 반응을 보이는데, 이는 박테리아 표면에 존재하는 단백질 부착 수용체(adhesin)가 적혈구와 같은 인체세포 표면의 탄수화물 혹은 단백질을 인식함으로써 일어나는 반응이다. 특히 *P. acnes*와 *S. aureus*는 철을 비롯한 중요한 영양분을 위하여 햄(heme), 헤모글로빈의 공급이 세포성장에 필수적이다. 따라서 혈구 인식반응은 *P. acnes*와 *S. aureus*의 인체 내 기생을 위한 세포성장에 필요한 작용 기작이며, 이를 통하여 햄의 공급을 확보하게 된다 (23-25). 세포와 세포 간 인식작용에 이용되어온 적혈구 응집반응은, 적혈구 세포의 표면이 인체 상피세포와 같거나 비슷한 탄수화물 조성을 보유하고 있는 특성 때문에, 세포-세포간 인식작용에 광범위하게 적용되어 왔다. 따라서 *P. acnes*와 *S. aureus*의 적혈구 응집반응을 통하여 박테리아 표면 단백질과 인체 세포간의 상호 인식작용에 대하여 연구가 가능하다. 중요한 점은 피부세포의 탄수화물과 적혈구의 탄수화물 조성이 동일 내지 유사하므로, 상호작용에 의한 결합을 저해하면 *P. acnes*와 *S. aureus*에 의해 유발되는 피부질환 특히 여드름과 아토피 치료 및 예방에 이용할 수 있는 것이다.

따라서 박테리아 표면 단백질 수용체(adhesin)가 인식하는 탄수화물을 이용하여 당배합체를 개발하는 것은 중요한 발명대상에 속한다. 피부질환 치료를 목적으로 개발된 항생제 혹은 화학약품이 매우 제한적이고, 항생제 남용에 따른 내성 박테리아의 출현, 인체 내 유익균/무익균의 조화로운 발란스가 무너지기 때문에, 새로운 기술 혹은 약품의 개발이 필요한 시점이다. 기존의 항생제나 화학약품을 이용하면 부작용 뿐만 아니라 개발기술이 세포 파괴적인 반면, 인체세포 표면의 탄수화물 인식 및 상호작용을 저해하는 신물질은 세포 간 결합을 저해하여 피부질환 세포에 공생하는 것을 원천적으로 차단하여 여드름과 같은 피부질환 병증을 최소화하는 비 파괴적 기술이라는 점에서 또한 중요한 의미를 갖고 있다. 따라서 인체세포의 인식 혹은 부착을 저해하는 탄수화물의 개발은 21세기 친생물환경적 신물질을 창출할 것으로 판단된다. 이러한 비파괴적 기술이 적용되는 대표적인 예로 모유나 침을 들 수 있다. 즉, 모유나 침에는 생리 당배합체가 함유되어 있기 때문에, 인체에서의 무익하고 혹은 병원성 균의 부착을 억제함으로써 소화기관내에서 씻어 내려주는 역할(clearance mechanism)을 근본적으로 수행하고 있는 것이다. 본 발명은 *P. acnes*와 *S. aureus*의 피부 세포부착, 증식 및 활동을 저해하면서 상재균이나 유익균은 선택적으로 저해하지 않는 생리활성 물질을 천연자원에서 탐색하여 분리한 기술로서, 특히 생명공학 분야에서 새롭게 인식되고 있는 탄수화물 공학적 연구방법을 이용하는 기술이다.

종래에는 고려인삼에서 다당류 혹은 탄수화물을 포함하는 조추출물 분획(crude fraction)으로 생리활성 측정이 이루어져 왔다. 따라서 분획 중에서 어느 특정 성분이 활성을 갖고 있는지에 대한 분자적 수준에서의 연구가 기술적 한계에 부딪쳐 왔지만, 현재 개발되고 있는 탄수화물 공학적 기술을 이용하여 다당류의 분리, 정제, 동정 및 구조적 분석을 이룸으로써 고부가가치 상품으로의 개발이 가능해지고 있다. *P. acnes*와 *S. aureus*가 적혈구 세포와 결합하여 응집반응을 유도하는데, 고려인삼의 수용성 추출물 중에서 이온교환 수지 및 젤 여과 수지로 분리된 산성 다당류(acidic polysaccharide) 분획이 여드름 간균 뿐만 아니라 황색포도상 구균(*S. aureus*)에 의한 적혈구 응집반응을 억제하며 저해 효과가 다른 다당류 분획에 비하여 상대적으로 높은 특징을 갖고 있다. 인삼은 오랫동안 생약 및 식용으로 쓰여 왔던 약재로서 본 발명의 인삼뿌리로부터 추출된 산성다당류는 동물실험을 통하여 독성이 없음도 아울러 밝혀졌다.

본 발명에 이용된 Q Sepharose Fast Flow 이온교환 수지는 아마샴-파마시아 바이오텍(Amersham Phamacia Biotech, Sweden)에서 구입하였다.

본 발명에 사용된 효소 펙티네이스(pectinase), 트립신(trypsin), 글루구론산(glucuronic acid), 갈락튜론산(galacturonic acid), 람노스(rhamnose), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xylose), 포도당(glucose), 갈락토스(galactose) 등은 시그마(Sigma, USA)에서 구입하였다.

본 발명에 이용된 적혈구 응집 반응에 필요한 O형 적혈구는 고려대 의대에서 확보하였으며, 항응고제와 트립신 효소 처리를 한 다음 이용하였다. 본 발명에 이용한 *P. acnes* (ATCC 11828)는 brain-heart infusion 배지에서 혐기적 조건으로 2일 이상 배양하였으며, *S. aureus* 및 *S. epidermidis* 박테리아는 고려대 의대 병원에서 분양 받아서 brain-heart infusion 배지에 호기적 조건으로 액체 배양하였다. 모든 균체는 6,000g에서 30분동안 원심 분리하여 사용하고 170 °C 액체 질소에 보관하여 실험에 사용하였다.

본 발명에 이용된 대장균(BL21(DE3), BL21(DE3)/pLysS)은 Luria-Bertani (LB) agar 배지에서 항생제 처리없이 37 °C에서 6시간 배양하였으며, 배양된 대장균은 원심분리후 -70 °C에 보관하여 실험에 이용하였으며, *L. acidophilus*는 한국미생물보존센터에서 액체배양액을 분양 받아 바로 액체질소에 stock 을 만들어 보관 후 사용 하였다.

본 발명에서, 전체 탄수화물, 유론산 및 단백질의 양은 페놀-황산 방법, 카바졸(carbazole), 및 로우리(Lowry) 방법을 각각 포도당, 갈락튜론산(galacturonic acid), 소혈청 알부민을 표준으로 사용하여 결정하였다 (26, 27).

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예 1: 인삼뿌리로부터 산성다당류의 분리

산성 다당류의 제조방법은 6년근 고려인삼의 뿌리를 50 mM 인산(phosphate) 완충용액 (pH 7.2) 혹은 물로 80℃에서 3시간 열수추출 및 균질화 시킨 다음, 강하게 원심 분리하여 침전물을 제거하고 얻은 상등액을 4배 부피의 에탄올로 침전시켰다. 에탄올 침전물을 건조시킨 후, 이를 최소부피의 10 mM 인산 완충용액 (pH 7.5, 10mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$)에 녹여 Rnase 및 Dnase를 37 °C에서 2시간 처리한 후 효소 활성을 중단시켰다. 효소처리 한 반응액을 20,000g에서 30 분이상 강하게 원심 분리한 후 상등액을 취하고, 이 상등액에 약 4배 부피의 냉각된 에탄올을 가하여 에탄올 농도 최종 80%로 처리 한 후, 20,000g로 30분 원심 분리하여 얻은 침전물을 조추출물로 하였다. 인삼 다당 조추출물을 물에 투석 한 후 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 분리하였다. 산성다당류는 이 때 0-1 M 염화나트륨 용액 농도기울기를 이용하였으며, 유출된 분획을 받아서 각각 총당 및 산성당 정량을 하고, *P. acnes* 및 *S. aureus*에 대한 적혈구 응집 저해 활성을 지니는 분획이 염화나트륨 농도 0.3 M에서 분리되어 유출됨을 확인하였다. 분리된 다당류는 투석 후 동결 건조한 다음, sephacryl S200 젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 다당류 크기별로 분리하여 이중 가장 크고 활성이 제일 높은 분획을 얻었다 (도 2). 도 1는 Q sepharose 이온교환 및 Sephacryl S200 젤 여과 크로마토그래피를 이용한 고려 인삼뿌리 유래 산성다당류의 유출 프로필을 나타낸다. (A) Q 이온교환 크로마토그래피. 파란색 선은 UV 226nm를, 빨간색 선은 소금(NaCl) 농도변화를 나타냄. 주황색 선은 각 분획의 총 당량 프로필. (B) Sephacryl S-200 FPLC를 이용한 젤 여과 크로마토그래피. 파란색 선은 UV 226nm를, 주황색 선은 총 당량, 자주색 선은 산성당량의 프로필을 나타냄. 인삼뿌리 시료로부터 젤 여과 크로마토그래피로 분리되는 전체적인 분리 정제과정을 나타내면 도 1과 같다. 분리된 산성다당류 분획에서는 단백질이 검출되지 않았다. 또한 비결합성 분획은 주로 중성 다당류로 이루어져 있음을 확인하였고, 결합성 분획에서는 산성다당류, 특히 활성이 있는 분획임을 확인하였다. 겔여과 크로마토그래피에 의해 정제된 활성 단일 피크는 10-15kDa 크기임을 확인하였다.

실시예 2: 산성다당류의 단당류 탄수화물 분석

가) 가수분해: 3M 트라이플로로 초산(trifluoroacetic acid)에 시료를 녹여 밀폐된 screw cap reacti tube에서 120 °C 조건으로 2시간동안 가수분해를 수행하였다. 가수 분해 후 약 50 °C 온도로 식힌 후, 농축, 건조 방법으로 트리플로로 초산을 제거하였고, 완전한 제거를 위하여 0.5 ml의 메탄올을 첨가한 후 최종 농축, 건조하였다.

나) 환원반응: 시료와 표준시료에 10 mg의 소듐보로하이드라이드($NaBH_4$)를 포함하는 1 M의 암모니아수를 각각 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 환원 반응 후 남은 소듐보로하이드라이드 및 boric acid를 제거하기 위하여 빙초산을 가하였으며, 농축 건조과정에서 10% acetic acid를 포함하는 메탄올 용액을 계속해서 가해주면서 농축, 건조시켰다.

다) 산성당 및 중성당의 분리 : 환원된 시료의 단당류 중 산성당과 중성당을 ion exchange column을 이용하여 분리하였다. 즉 환원된 시료를 증류수에 녹여서 ion exchange column을 통하여 non binding 분획을 중성당으로 하였고, binding 되었다가 1 N HCl에 의해서 유출되는 분획을 산성당으로 하였다. 중성당 및 산성당 시료는 각각 물 및 염산을 농축, 감압건조의 과정을 거쳐서 제거하였다. 건조된 산성당 시료는 다시 한번 환원과정을 거친 후 농축, 건조시켰다.

라) 아세틸화 반응: 환원된 단당류는 피리딘(pyridine) 과 아세틱 안하이드라이드(acetic anhydride)를 동량으로 가하여 밀봉한 후 약 95 °C 조건에서 한 시간 동안 아세틸화 시켰다. 실온에서 시료가 건조상태가 될 때까지 농축하고, 톨루엔 용

액을 첨가하여 시료에 피리딘이 남아 있지 않도록 완전히 증발, 농축하였다. 아세틸 화 후 용매를 완전히 제거하고 남은 잔사는 에틸아세테이트/물에 녹여 vortex 하고 난 다음, 1,000g에서 원심분리를 하여 유기 용매 층과 수용액 층으로 분리하였다. 이 중 유기 용매 층을 취하여 진공에서 다시 농축하여 GC 분석 용 시료로 사용하였다.

마) 가스 크로마토그래피에 의한 분석: 시료는 가스 크로마토그래피를 이용하여 측정하였다. 시료는 DB-225 융합 실리카 미세관 컬럼(fused silica capillary column)을 이용하여 분리하였으며, 단당류 유도체를 프래임-이온 측정기(flame-ionization detector)을 이용하여 측정하였다. 오븐온도는 220 °C 조건으로 분석하였다. 시료와 함께 전처리를 수행한 표준시료와의 retention time을 비교하여 시료의 단당류를 동정하였으며, 단당류의 mol %는 peak area 및 분자량(Mw)로부터 구하였다.

사) 매스 스펙트라 측정(mass spectra): 단당류의 동정은 가스크로마토그래피/매스 스펙트라로 동정 확인하였다.

분리된 산성다당류 분획은 유론산의 함량이 높을 뿐만 아니라 다른 당배합체 분획에 비하여 아라비노스(arabinose)와 갈락토스(galactose)의 함량이 매우 높았다 (표 1). 이에 반하여 비결합성 분획에서 얻어진 중성다당류 분획은 유론산의 함량이 상대적으로 매우 적고, 단당류의 조성비도 대부분 포도당임을 확인하였다. 특히 갈락튜론산, 글루구론산으로 대변되는 유론산의 함량이 다른 다당류 분획에 비하여 상대적으로 매우 높은 것을 발견하였으며, 이 중에서도 글루구론산의 함량은 특이당으로서 약 18%에 달하는 것으로 나타났다. 인삼뿌리에서 정제된 산성다당류는 이미 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 위장질환 병원균과 포피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 구강질환에 대한 세포부착 저해활성이 높다는 연구결과를 얻은 바 있으며 (28, 29), 인삼 뿌리 산성 다당류에 대한 병원균 세포 부착 저해 활성에 대해서는 보고된 바 없다.

[표 1] 인삼뿌리로부터 분리정제된 산성다당류 최종분획 F2의 탄수화물 조성

	아라비노스 (arabinose)	자일로스 (xylose)	람노스 (rhamnose)	만노스 (mannose)	갈락토스 (galactose)	글루코스 (glucose)	갈락튜론산 (galacturonic acid)	글루구론산 (glucuronic acid)
다당류 최종분획	28.0	3.2	4.7	2.6	26.3	7.9	7.9	18.4

주) 각 수치는 상대 몰퍼센트(mol%)임.

실시예 3: 여드름 간균과 황색포도상 구균에 의한 적혈구 응집반응 저해

배양된 *P. acnes*와 *S. aureus*를 인산 완충용액으로 묽게 만든 후 동량의 적혈구 용액과 혼합하여 실온에서 30분-3시간 약하게 교반하여 반응시키거나, 혹은 밤새도록 반응시켜, 이를 양성 적혈구 응집반응으로 하였다. 분리된 다당류 분획들을 이용하여 응집반응에 대한 저해활성을 위해서, *P. acnes*와 *S. aureus* 용액과 당배합체 용액을 각각 혼합하여, 실온에서 반응시킨 다음, 다시 적혈구 용액을 혼합하여 반응시킨 후 응집반응을 현미경을 이용하여 측정하였다.

*P. acnes*와 *S. aureus*에 의한 적혈구 응집반응을 저해하는 활성측정 결과, 인삼뿌리에서 정제된 여러 분획 중에서도 산성다당류 최종 분획은 각각 0.5 mg/ml의 낮은 농도에서 저해 활성을 나타내었다. 일반적으로 특이 단당류, 예를 들면 사이알릭산(N-acetylneuraminic acid), 글루구론산(glucuronic acid)은 약 5 mg/ml 이상의 농도, 즉 25 mM 이상의 높은 농도에서 세포 부착 저해활성을 보이고 있다. 본 발명의 대상인 산성 다당류는 이에 반하여, 상대적으로 높은 활성을 지닌 것을 확인할 수 있다 (분자량 약 10 kDa에 근거하여 약 25 μM 수준에서 저해활성을 보이고 있다)(도 3). 도 3은 여드름 간균(A) 및 황색 포도상 구균(B)에 의한 적혈구 응집반응 저해활성의 현미경사진(100배 확대)이다. 고려 인삼 뿌리에서 분리, 정제한 약 12kDa 크기의 산성다당류 분획 PG F2는 여드름 간균 및 황색 포도상 구균에 대해서 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 저해활성을 보임. 음성 응집반응(NC; 적혈구만 있을 때의 결과) 및 양성 응집반응(PC; 적혈구와 여드름 간균 또는 황색 포도상 구균만 있을 때의 결과).

실시예 4: *S. epidermidis*, 대장균, *Lactobacillus* 균에 의한 적혈구 응집반응 저해

배양된 피부균 *S. epidermidis*, 대장균, *Lactobacillus* 균을 완충용액으로 묽게 만든 후 동량의 적혈구 용액과 혼합하여 실온에서 30분-3시간 약하게 교반하여 반응시키거나, 혹은 밤새도록 반응시켜, 이를 양성 적혈구 응집반응으로 하였다. 분리된 다당류 분획들을 이용하여 응집반응에 대한 저해활성을 위해서, 균 용액과 당배합체 용액을 혼합하여, 실온에서 반응

시킨 다음, 다시 적혈구 용액을 혼합하여 반응시킨 후 응집반응을 현미경을 이용하여 측정하였다. 피부 상재균인 *S. epidermidis*균은 인삼뿌리에서 정제된 산성 다당류 최종 분획 2.0 mg/ml의 고농도에서도 적혈구의 응집 저해 활성을 보이지 않았다 (도 4). *L. acidophilus* 균 또한 다당류 분획 0.5 mg/ml의 농도에서도 저해 활성을 보이지 않았다 (도 4). 대장균의 경우에도 적혈구 응집반응을 저해하는 활성측정 결과, 인삼뿌리에서 정제된 산성 다당류 최종 분획은 2.0 mg/ml의 높은 농도를 이용하였을 경우에도 저해활성을 보이지 않았다 (도 4). 도 4는 *Lactobacillus* 균(LA), 대장균(EC), *S. epidermidis* 균(SE)에 의한 적혈구 응집반응 저해활성의 현미경사진(100배 확대)이다. 고려인삼뿌리에서 분리, 정제한 산성다당류 분획 PG F2 (0.5-2.0 mg/ml)로부터 저해활성을 보이지 않음. 음성 응집반응(NC; 적혈구만 있을 때의 결과는 도면 3과 동일함.) 및 양성 응집반응(PC; 적혈구와 균이 같이 있을 때의 결과). 따라서 본 발명 대상인 산성다당류는 *P. acnes*와 *S. aureus* 균에 의하여 유도되는 혈구 응집반응에 대해서는 높은 저해작용을 보이는 반면, 피부상재균 *S. epidermidis*, 대장균, *Lactobacillus* 균 등에 의한 혈구 응집반응에는 아무런 저해효과를 보이지 않음으로써, *P. acnes*와 *S. aureus* 균의 인체 세포부착에 특이적인 활성임을 알 수 있었다. 발명 대상인 산성다당류는 앞서 기술한 바와 같이 글루구론산의 함량이 높은 특이 다당류로 판단된다. 아직까지 *P. acnes*와 *S. aureus* 균 혈구 응집반응을 저해하는 정제된 다당류에 대하여 보고된 바가 없다. 따라서 고려인삼이라는 고유 자생식물 자원으로부터 특이 유론산 당의 함량이 높은 산성 다당류를 정제하였고, 정제된 산성 다당류를 이용하여 *P. acnes*와 *S. aureus* 균에 의한 피부질환 원인균에 의한 인체 세포 결합을 저해하는 활성을 확인함으로써 본 발명을 이루게 되었다.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 1) 피부질환 발병 원인균인 *P. acnes*와 *S. aureus* 균과 인체 적혈구 세포와의 응집반응을 저해하는 산성 다당류 분획, 2) 고려인삼의 수용성 추출물 중에서 이온교환 및 젤 여과 크로마토그래피로 산성 다당류 분획을 분리하는 제조방법에 대한 발명을 이루었다. 본 발명을 통하여 여드름과 아토피 피부질환 예방 및 치료제 선도물질의 개발 효과를 거두어들일 것으로 판단된다. 특히 기존의 항생제나 화학 의약품의 경우 부작용 뿐만 아니라 개발기술이 세포 파괴적인 반면, 인체 세포 표면의 탄수화물 인식 및 상호작용을 저해하는 신물질은 세포-세포 간 부착 및 결합을 저해하여 피부질환을 최소화하는 비 파괴적 기술이라는 점에서 매우 중요한 미래지향적인 화장품 및 의약품의 의미를 갖고 있다. 특히 피부의 발란스가 중요한 의미를 갖고 있는 화장품 산업에 피부에서의 미생물 발란스라는 새로운 개념으로의 전환은 향후 인체 내 세균의 침입에 따른 감염을 예방 혹은 치료하는데 당배합체의 친환경적 우수성을 이용함으로써 넓은 시장성 확대가 가능하다고 판단된다. 마지막으로 천연자원의 으뜸인 우리 고려인삼으로부터 분리된 산성 다당류는 천연소재로서 독성이 없으며, 부작용을 최소한으로 줄일 수 있는 효과를 갖고 있다. 천연 신물질의 상대적 농도에 따른 저해활성의 뛰어난 효과가 있으므로 화장품 및 의약 산업에 있어서 매우 뛰어난 발명인 것이다.

[참고문헌]

(1) Farrar, M. D. and Ingham, E. Acne: inflammation (2004) Clin Dermatol. 22(5): 380-4.
(2) Zouboulis, C. C. Acne and sebaceous gland function (2004) Clin Dermatol. 22(5): 360-6.
(3) Bruggemann, H., Henne, A., Hoster, F., Liesegand, H., Wiezer, A., Strittmatter, A., Hujer, S., Durre, P., and Gottschalk, G. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin (2004) Science 305, 671-673.
(4) Chiu, A., Chon, S. Y., Kimball, A. B. The response of skin disease to stress (2003) Archives of Dermatology 139: 897-900.
(5) Bojar, R. A., Holland KT. Acne and *Propionibacterium acnes* (2004) Clin Dermatol. 22(5): 375-9.
(6) Mosby's medical, nursing, & allied health dictionary. 15th ed. A Harcourt Health Science Company (1998) Atopic dermatitis; pp. 143-144.
(7) Raimer, S. S. Managing pediatric atopic dermatitis (2000) Clin Pediatr. 39: 1-14.
(8) Mcnally, N. J., Philips, D. R., Williams, H. C. The problem of atopic eczema: aetiological clue from the environment and lifestyle (1998) Soc. Sci. Med. 46(6): 729-741.
(9) Ellis, C. N., Drake, L. A., Predergast , M. M., Abramovitis, W., Boguniewicz, M., Daniel, C. R., et al. Cost of atopic dermatitis and eczema in the United States (2002) J. Am. Acad. Dermatol. 46(3): 361-370.
(10) Amerson, A. B. Allergic and drug induced skin disease. In: Herfindal ET, Gourley DR. editor. (2000) Text book of therapeutics-Drug and disease management. 7th ed. Baltimore(MD): Lippincott Williams & Wilkins; pp. 973-988.
(11) Stander, S., and Steinhoff, M. Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview (2002) Exp. Dermatol. 11(1): 12-24.
(12) Chang, T. T. and Stevens, S. R. Atopic dermatitis: the role of recombinant interferone-gammar therapy (2002) Am. J. Clin. Dermatol. 3(3): 175-183.
(13) McGinley, K. J., Webster, G. F., Ruggieri, M. R., Leyden, J. J. Regional variations in density of cutaneous propionibacteria: correlation of *Propionibacterium acnes* populations with sebaceous secretion (1980) J. Clin. Microbiol. 12: 672-675.
(14) Today's Online Textbook of Bacteriology http://textbook-ofbacteriology.net/staph.html.
(15) Kloos, W. E., Bannerman, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative *staphylococci* (1994) Clin Microbiol Rev. 7: 117 - 140.
(16) Rupp, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections: an update regarding recognition management (1997) Curr. Clin. Top. Infect. Dis. 17: 51 - 87.
(17) Finegold, S. M., Sutter, V. L., and Mathisen, G. E. Human Intestinal Microflora in Health and Disease (1983) ed. Hentges, D. J. (Academic, New York), pp.3 - 31.
(18) Casas, I. A. and Dobrogosz, W. J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals (2000) Microbial. Ecol. Health Dis. 12: 247 - 285
(19) Walker, A. W. and Duffy, L. C. Diet and bacterial colonisation: Role of probiotics and prebiotics: Review (1998) J. Nutr. Biochem. 9: 668 - 675.
(20) Paton, A. W., Voss, E., Manning, P. A., and Paton, J. C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells (1997) Infect. Immun. 65: 3799-3805.
(21) Itzhak Ofek, David L. Hasty, Ron J. Doyle (2003) Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues. p.23
(22) Makris, G. Wright, J. D., Ingham, E., Holland, K. T. (2004) The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus* - a virulence factor? Microbiology 150, 2005-2013.

(23) Ferguson, D. A. Jr. and Cummins, C. S. Nutritional requirements of anaerobic coryneforms (1987) J. Bacteriol. 135; 858-867.
(24) Holland, K. T., Aldana, O., Bojar, R. A., Cunliffe, W. J., Eady, E. A., Holland, D. B., Ingham, E., McGeown, C., Till, A., and Walters, C. *Propionibacterium acnes* and acne (1998) Dermatology 196, 67-68.
(25) Rouault, T. A. Pathogenic bacteria prefer heme (2004) 305, 1577-1578.
(26) Chaplin, M. F. Monosaccharides, 1. Carbohydrate analysis.(1986) In: Chaplin MF, Kennedy JF, editors. Oxford. IRL PRESS. pp. 1-36
(27) Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing theprinciple of protein-dye binding. Anal Chem 72, 248-54.
(28) Lee J, Park EK, Uhm C, Chung M, Kim KH. (2004) Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Panax ginseng*. Planta Medica. 70, 615-619.
(29) Ji-Hye Lee, Jung Sun Lee, Mi-Sook Chung, and Kyung Hyun Kim. In Vitro Anti-Adhesive Activity of Acidic Polysaccharide from *Panax ginseng* on *Porphyromonas gingivalis* Binding to Erythorocyte. Planta Medica. (2004) 70, 566-568.

도면의 간단한 설명

도 1은 인삼뿌리로부터 본 발명 산성다당류의 분리 및 정제과정을 나타낸 모식도이다.

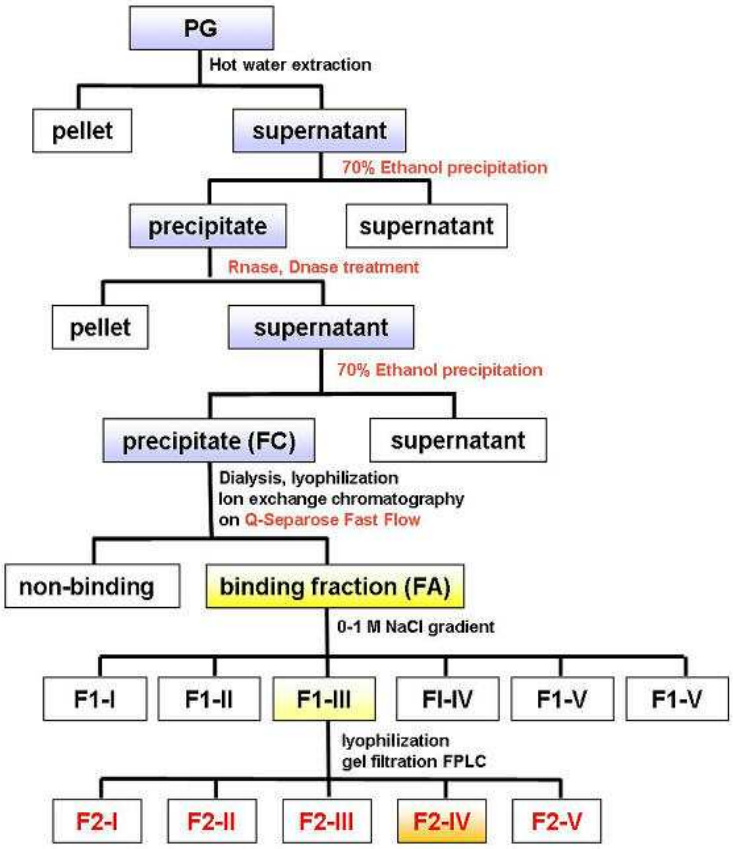
도 2는 본 발명 산성 다당류의 이온 교환, 젤 여과 크로마토그래피 유출 프로필을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명 산성 다당류의 저해활성을 나타낸 것이다. 여드름 간균(*P. acnes*)과 황색포도상 구균(*S. aureus*)에 의한 적혈구 응집반응(hemagglutination)을 농도에 따라 저해하는 활성을 나타낸 것이다.

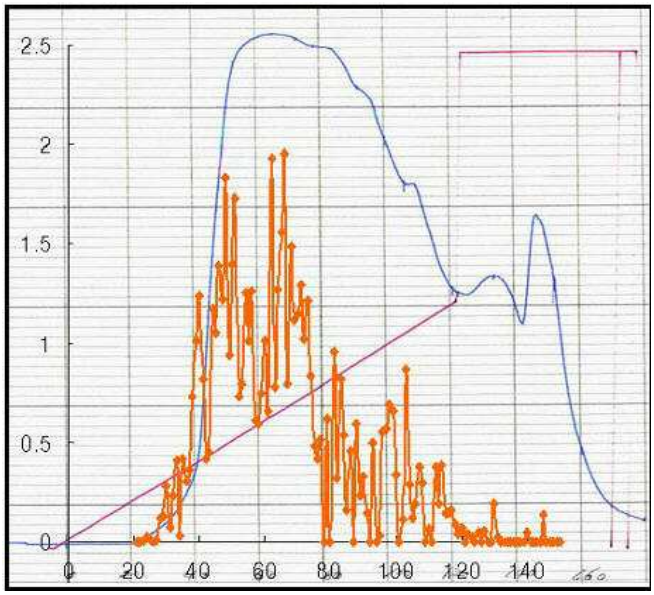
도 4는 본 발명 산성다당류가 피부 상재균 스타필로코코스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis),* 대장균(*Escherichia coli*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)에 의한 응집반응과는 저해활성이 없음을 보여줌으로써, 여드름 간균(*P. acnes*)와 황색포도상 구균(*S. aureus*)에 특이적임을 나타내는 것이다.

도면

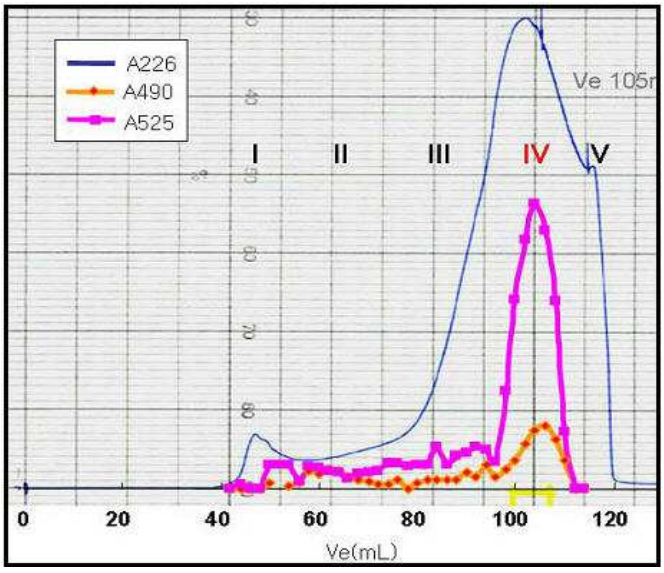
도면1



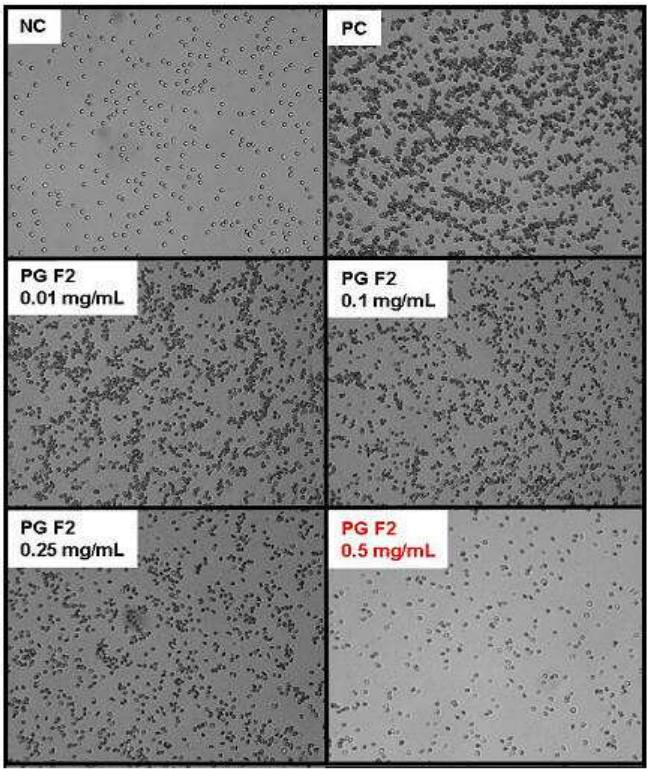
도면2a


2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
20
40
60
80
100
120
140

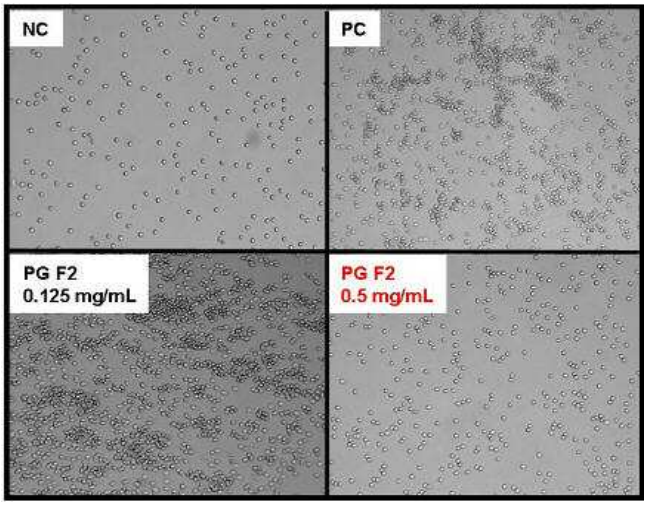
도면2b


A226
A490
A525
I
II
III
IV
V
Ve 105r
0
20
40
60
80
100
120
Ve(mL)

도면3a


NC
PC
PG F2
0.01 mg/mL
PG F2
0.1 mg/mL
PG F2
0.25 mg/mL
PG F2
0.5 mg/mL

도면3b


NC
PC
PG F2
0.125 mg/mL
PG F2
0.5 mg/mL

도면4

