

효소 생전환 시스템을 이용한 기능성 화장품 개발

이강태[†]·권지연·배동준·유창선·이명희*·오세량**·장동일

(주)롯데 바이오리서치센터, *대전보건대학 화장품과학과, **한국생명공학연구원
(2005년 2월 24일 접수, 2005년 3월 4일 채택)

Development of Cosmeceutical Cosmetics Using Enzyme Bio-Conversion System

Ghang Tai Lee[†], Ji Youn Kwon, Dong Jun Bae, Chang Seon Yu, Myoung Hee Lee*,
Sei Ryang Oh**, and Dong Il Jang

CBRC, Chungnam Techno-park, 43-5, Sameun-ri, Jiksan-eup, Cheonan-si, Chungnam 330-816, Korea

*Department of Cosmetic Science Daejeon Health Sciences College

**Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology

(Received February 24, 2005; Accepted March 4, 2005)

요약: 본 논문은 효소 생전환 시스템을 적용, 안정한 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA2G)를 ascorbic acid (AA)와 glucose로 분해 하여 이 물질의 피부에서의 효과를 분석한 것에 관한 것이다. 일반적으로 AA는 높은 환원력을 가지고 있으며, 화장품에서 다양한 용도로 사용할 수 있지만 수용액 상에서 불안정하기 때문에 사용에 제약이 많이 있다. AA2G는 AA를 안정화시킨 미백 기능성 원료이지만 AA와 비교해서 효과가 낮은 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구자들은 AA2G의 안정성과 AA의 효과를 동시에 갖는 효소 생전환 시스템을 이용한 기능성 제품을 개발하였다. AA2G는 당 분해 효소인 amigase에 의해 30 min 경과 후에 약 80%가 AA로 전환되며 이 시스템의 미백 효과를 측정할 결과 같은 농도의 AA와 비교해 유사한 티로시나제 활성 억제 효과가 나타나는 것으로 확인되었다(AA2G는 타이로시나아제 활성 억제 효과가 없음). 또한 AA2G와 amigase를 함유한 제형은 인공 색소 침착 후의 미백 효과 시험에서 AA2G 만을 함유한 제형과 비교하여 높은 미백효과가 나타나는 것으로 확인되었다. 이와 같은 효소 생전환 시스템은 불안정한 AA를 보다 효과적으로 피부에 적용할 수 있는 새로운 방법이라 할 수 있다.

Abstract: This study is about the cosmeceutical products using enzyme induced bio-conversion system. In general, ascorbic acid (AA) has the higher reducing activity and can be used for various purpose in the cosmetics. But it is very unstable in the aqueous system and difficult to maintain its stability in the cosmetics product. 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA2G) is the stabilized form of AA and showed the less whitening activity than AA. In this study, we developed bio-conversion system improving the stability and efficacy of AA2G and AA, respectively. In this system, AA2G (over 80%) can be converted to AA and glucose within 30 min. The converted product showed higher anti-tyrosinase activity like AA (AA2G showed no anti tyrosinase activity) and depigmenting activity in the artificial tanning test. From these results, we could conclude this system is a brand new method to increase the activity of AA and maintain its stability.

Keywords: ascorbic acid, 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, whitening, amigase, bio-conversion system

1. 서 론

화장품은 인체를 청결 또는 보호, 미화하고 피부 또는 모발을 건강하게 유지하기 위하여 도찰, 살포, 기타 이와 유사한 방법으로 사용되는 것을 말한다. 최근 들어서는 화장품의 단순한 기능 외에 여러 가지 효능이 부가된 기

능성 화장품(피부의 노화 방지, 미백 효과, 주름 방지 효과)에 대한 인지도가 높아지고 있으며 여러 화장품 제조 회사들은 이러한 제품을 개발하기 위하여 많은 노력을 기울이고 있다. 특히, 동양권에서는 많은 여성들이 희고 깨끗한 피부를 가지기를 원하고 있으며 이를 위해 많은 노력을 기울이고 있다. 그러므로 국내 및 일본 등지에서는 피부 미백 효과 개념의 화장품들이 큰 시장을 형성하고 있으며 화장품 연구소에서 이러한 미백 제품을 개발

[†] 주 저자 (e-mail: leektt@cotde.co.kr)

하는데 많은 연구를 수행하고 있다. 가장 대표적인 원료로서 L-ascorbic acid (AA)을 들 수 있다. AA는 항산화 효과가 매우 높아 멜라닌의 산화를 억제하여 피부 색소 침착을 막아주는 미백제로서 많이 이용되며[1], 콜라겐 합성, 항산화, 철의 장내 흡수와 몇몇 아미노산의 메타볼리즘과 같은 많은 생물학적 프로세스에 작용한다. 그러나 AA는 열이나 빛 산소 등에 매우 불안정하고 특히 수용액 중에서 쉽게 산화하여 변색 및 변취가 일어나 안정성과 안전성의 문제가 발생하고 역가가 떨어져 제품에서 제대로 효과를 발휘할 수 없는 문제점이 있다[2]. 이에 많은 연구자들이 AA를 안정화시키기 위하여 여러 가지 방법들을 사용하고 있다. Vitamin C의 불안정성이 화학구조적으로 enediol ring에서 기인하는데 착안하여 이 위치에 인산, 당, 지방산, 알킬기 등을 결합하여 유도체로 하거나 물과의 접촉을 피하기 위해 제형적으로 캡슐화하거나 무수 제형을 하거나 하는 방법으로 많은 연구를 진행하여 왔다. 가장 대표적인 예로서 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA2G)를 들 수 있다. AA2G는 일본 하야시바라 연구소에서 개발한 미백원료로서 불안정한 AA를 안정화시키기 위하여 2번 위치에 glucose를 결합시켜 만든 안정화한 비타민 C 유도체이다[3]. 이와 같이 안정화된 유도체는 여러 가지 조건에서 안정한 형태를 갖고 있지만 활성 부위가 되는 곳이 blocking되어 있으므로 피부에서의 효과는 AA에 비해 떨어진다고 생각된다[4]. 이에 본 연구자들은 enzymatic bio-conversion system을 이용하여 수용액상에서 안정한 형태로 존재하는 AA2G를 AA로 전환시켜주는 효소 시스템을 개발하였다. 이 시스템은 안정한 AA2G가 시간이 경과함에 따라 AA로 전환되며 실제적으로 피부에 사용할 때에는 AA2G가 AA로 전환되어 효과가 나타날 수 있게 한 원리를 적용한 것이다. 위와 같은 방법을 이용하여 실험한 결과 *in vitro*와 *in vivo*에서 매우 우수한 효과가 나타나는 것으로 확인되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. Ascorbic Acid와 AA2G의 안정성 비교

본 실험에 사용된 AA2G (2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid)는 일본 하야시바라 생화학 연구소(Hayashibara Bio-chemical Labs)에서 구입하였으며, ascorbic acid (AA)는 시그마(Sigma, U.S.A)사에서 구입하여 사용하였다. 두 물질의 안정성 비교를 위해 두 물질을 각각 2%로 buffer에 녹인 후 45°C에서 30일간 분해되는 정도를 HPLC (Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. 용매는 0.1 M PBS buffer (KH₂PO₄, Sigma, USA)를 사용하였으며, flow rate: 0.6 mL/min이었고, 240 nm에서 측정하였다. AA-2G, AA의 정량을 위하여 0.1 M PBS

buffer (KH₂PO₄, Sigma, USA)를 사용하여 HPLC로 표준 곡선을 작성하였다.

2.2. 효소 반응에 의한 AA2G의 AA로의 전환 실험

본 실험에 사용된 AA2G (2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid)는 일본 하야시바라 생화학 연구소(Hayashibara Bio-chemical Labs)에서 구입했으며, AA-2G를 ascorbic acid와 glucose로 분해하는데 사용된 효소로서는 amigase (Sigma, U.S.A)를 사용하였다. Ascorbic acid의 생성량 조사는 4%의 AA-2G (250 μ L)와 4%의 효소액 (250 μ L)을 vial에 넣고 33°C 항온 수조에서 5, 10, 20, 30 min간 반응시킨 후 5% H₃PO₄ (500 μ L)를 동량 넣어 주어 반응을 정지시켰으며 생성된 AA 및 AA2G의 함량은 2.1의 분석 조건으로 분석하였다.

2.3. AA2G에서 효소반응에 의해 AA로 전환된 시료의 미백 효과 티로시나제 활성 억제효과

실험 2-2의 방법에 따라 생성된 시료(AA2G가 효소 반응에 의해 AA로 전환된 시료)를 이용하여 타이로시나제 활성 억제 효과를 평가하였다. 시료는 반응 개시 후 0, 5, 10, 20, 30 min 간격으로 채취한 후 96 well plate에 0.1 M 인산염 완충액(pH 6.5) 220 μ L와 시료액 20 μ L 그리고 머쉬룸 타이로시나제(1500 U/mL)를 20 μ L를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM 타이로신 액 40 μ L를 넣고 37°C 에서 10 min 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 방법으로 AA 및 AA2G의 타이로시나제 활성 억제효과를 확인하기 위하여 AA와 AA2G의 농도를 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0%로 조정하여 실험하였다. 공시료액으로 시료액 대신 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5)을 넣었으며 타이로시나제 저해율은 다음의 식에 따라 구하였다.

$$\text{티로시나제 저해율(\%)} = 100 - [(B - b)/(A - a)] \times 100$$

A : 공시료액의 반응 후의 흡광도

B : 시료액의 반응 후의 흡광도

a, b : 타이로시나제 대신 완충액으로 대체하여 측정 한 흡광도

2.4. AA2G와 효소가 함유된 제품의 미백 효과

-Artificial Tanning Depigmentation효과

미백시험 선정기준에 적합하다고 판정된 총 10명의 피검자를 대상으로 AA2G와 효소가 각각 4%씩 함유된 이중 용기를 이용하여 피부 미백 효과에 대한 효능성과 안전성을 평가하였다. 또한 대조군은 AA2G를 같은 양 함유하였으며 효소가 들어가지 않은 제품과, AA2G와 효소

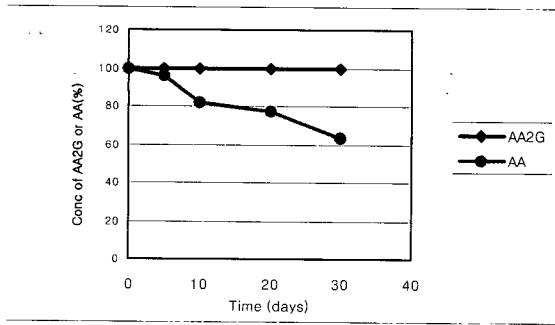


Figure 1. Stability of AA-2G & AA in the condition of 45°C.

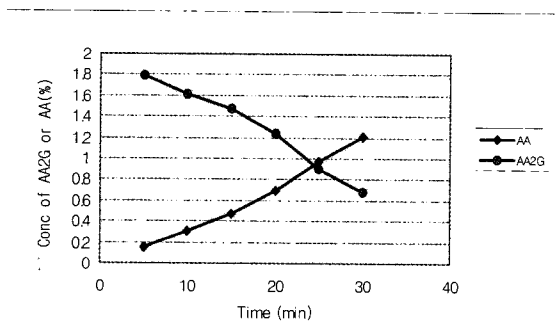


Figure 2. Bioconversion of AA2G to AA by amigase.

가 들어가지 않은 제품으로 나누어서 효과를 분석하였다. 실험은 인공 색소 침착법을 이용하였으며 인위적으로 색소 침착된 상박에 본 제품을 도포하여 6주 후의 L값의 변화를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. AA2G와 AA의 안정성 비교 시험

두 원료의 안정성 비교를 위하여 45°C에서 1개월간 보존하면서 각각 10일 간격으로 함량의 변화를 측정하였다. 그 결과 그림에서 보는 바와 같이 AA2G는 함량의 변화가 없었지만 AA는 약 35%의 감소가 나타나는 것으로 확인되었다.

3.2. AA2G의 효소 반응에 의한 AA로의 전환시험

Amigase는 AA2G를 AA와 glucose로 분해시키는 효소로서 AA2G는 시간이 경과함에 따라 AA로 전환이 되며 30 min이 경과한 시점에서 약 80%의 AA2G가 AA로 전환되는 것을 Figure 2에서 확인할 수 있었다. 이 결과는 AA2G를 제품에 적용하여 AA로 전환시켜줌으로써 피부에 보다 효과적으로 적용할 수 있다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다.

Table 1. Anti-tyrosinase Activity of AA and AA2G

Sample (%)	Anti-tyrosinase activity (%)	
	AA	AA2G
0.01	17.15	-
0.02	45.58	-
0.05	94.39	-
0.1	93.95	-
0.2	94.00	-
0.5	90.62	-
1.0	95.34	-
2.0	97.21	-

Table 2. Anti-tyrosinase Activity of Enzyme Mediated Bio-conversion Sample

Reaction time (min)	Anti-tyrosinase activity (%)
0	-
5	67.81
10	92.40
20	94.24
30	93.98

3.3. AA2G로부터 전환된 AA를 함유한 시료의 미백효과

효소반응에 의해 전환된 AA 및 AA2G를 함유한 시료의 미백효과를 확인하기 위하여 타이로시나아제 활성 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 AA자체의 타이로시나아제 활성 억제효과는 매우 높았으며, AA2G의 타이로시나아제 활성 억제효과는 매우 낮은 것으로 확인되었다. 한편 AA2G를 효소를 통해 AA로 전환시킨 시료들의 타이로시나아제 활성 억제효과는 매우 높게 나타났다. 이러한 결과는 AA2G가 효율적으로 AA로 전환되며, 이 물질은 AA와 같은 타이로시나아제 활성 억제효과가 있는 것을 보여주는 것으로서, 효소 생전환 시스템을 이용하여 제품으로 개발하였을 때 AA효과를 가지면서 안정성이 확보되는 제품이 개발될 수 있다는 것을 보여주는 것이라 할 수 있다.

3.4. AA2G로부터 전환된 AA를 함유한 시료의 미백효과(Artificial Tanning)

AA2G와 amigase를 함유하는 제품을 만들어 이중용기에 각각을 충전한 후 이 시료를 이용하여 10명의 피검자를 대상으로 인공 흑화 후 미백 효과를 측정, 평가하였다. 그 결과, 6주 후 L값은 AA2G와 효소를 동시에 함유한 제품군(group B)이 AA2G를 함유한 제품군(group C)에 비해 높은 미백 효과를 보였으며 이 결과는 통계적으로 유의하였다. 또한 두 제품군 모두 대조군에 비해서도 높은

Table 3. Change of L Value after Sample Treatment

피검자	L-value (0 week)			L-value (6 weeks)			Δ L-value		
	C0	B0	D0	C6	B6	D6	Δ C	Δ B	Δ D
#1	59.09	60.44	60.26	61.07	63.31	61.61	1.98	2.87	1.35
#2	61.33	60.09	60.80	63.57	62.92	62.45	2.24	2.83	1.64
#3	60.05	61.15	61.53	62.44	64.68	62.62	2.39	3.53	1.09
#4	58.92	58.41	60.03	62.88	63.40	63.46	3.96	4.99	3.43
#5	60.93	60.88	61.35	63.85	64.65	64.90	2.93	3.78	3.55
#6	58.04	58.19	58.04	60.74	61.03	59.74	2.70	2.84	1.70
#7	55.61	54.98	55.61	58.17	58.91	58.17	2.57	3.93	2.57
#8	61.05	59.75	61.05	62.74	63.60	61.74	1.69	3.85	0.69
#9	61.09	61.78	61.09	63.38	63.23	62.38	2.29	1.45	1.29
#10	61.16	61.26	61.16	62.12	64.45	62.23	0.96	3.19	1.07
Average	59.43	59.80	60.09	62.30	62.57	62.52	2.87	3.33	1.84

*B: AA2G + 효소 함유, C: AA2G함유, D: 대조군(AA2G 및 효소 미함유)

Δ L-value = L-value (6 weeks) - L-value (0 week), *각 그룹간의 유의성 비교(unpaired t-test): $P < 0.05$

미백 효과가 있는 것으로 나타났으며(Table 3) 각 그룹 사이의 통계 분석에서도 모두, 통계적으로 유의한 것으로 나타났다($p < 0.05$).

인 안정성 문제를 극복하면서 AA의 효과를 부여시킬 수 있는 기능성 제품(cosmeceutical products) 개발에 효과적으로 이용할 수 있는 방법이라고 할 수 있다.

4. 결 론

AA2G는 AA를 안정화시키기 위하여 AA에 glucose를 결합시킨 원료로서 최근 들어 많이 이용되고 있는 기능성 원료이다. 본 연구자들은 AA2G의 안정성과 AA의 효과를 동시에 얻고자 효소를 이용한 bio conversion 시스템을 개발하였다. 이 시스템은 수용액상에서는 AA2G와 효소 상태로 존재하다가 피부에 도포하기 위해 사용할 때 효소 반응을 통해 AA2G가 AA로 전환하게 되어 피부에서 AA의 효능이 나타날 수 있게 해 준 시스템이다. AA2G는 타이로시나아제 활성 억제 효과가 없지만 효소 반응을 통해 AA로 전환되면서 타이로시나아제 활성억제 효과를 갖게 되는 것으로 나타났다. 이 결과는 AA2G가 효과적으로 AA로 전환된다는 것을 보여주며, 이 시스템을 이용하여 제품을 개발하는 경우 AA와 같은 효과를 기대할 수 있다는 것을 보여준다. 이에 본 연구자들이 사람을 대상으로 하는 임상 시험을 한 결과 임상 시험에서도 이 시스템을 이용한 제품에서의 미백효과가 AA2G를 함유한 제품과도 유의한 차이($p < 0.05$)를 보이면서 미백 효과가 나타나는 것으로 확인되었다. 결과적으로 효소를 이용한 bio-conversion 시스템은 AA의 문제점

참 고 문 헌

1. K. Kameyama, C. Sakai, S. Kondoh, K. Yonemoto, S. Nishiyama, M. Tagawa, T. Murata, T. Ohnuma, J. Quigley, A. Dorsky, D. Bucks, and K. Blanock, Inhibitory effect of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate (VC-PMG) on melanogenesis *in vitro* and *in vivo*, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **34**(1), 29 (1996).
2. M. P. Lupo, Antioxidants and vitamins in cosmetics, *Clin. Dermatol.*, **19**(4), 467 (2001).
3. H. Watanabe, T. Higashiyama, H. Aga, T. Nishimoto, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka, Enzymatic synthesis of a 2-O- α -D-glucopyranosyl cyclic tetrasaccharide by kojibiose phosphorylase, *Carbohydr Res.*, **340**(3), 449 (2005).
4. Y. Kumano, T. Sakamoto, M. Egawa, I. Iwai, M. Tanaka, and I. Yamamoto, *In vitro* and *in vivo* prolonged biological activities of novel vitamin C derivative, 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G), in cosmetic fields. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*, **44**(3), 345 (1998).