

재조합 대장균 유래 베타카로틴이 함유된 기능성 화장품 제조 및 이의 임상실험을 통한 주름개선 효능 평가

김유근¹ · 이영훈¹ · 강문국² · 이병학³ · 윤준기⁴ · 김성배⁴ · 김창준^{4*}

¹KB코스메틱, ²청담화이트의원, ³화이트뷰피부클리닉, ⁴경상대학교 생명화학공학과 및 공학연구원

Preparation of Functional Cosmetics Containing β -carotene Derived from Recombinant *Escherichia coli* and Evaluation of Anti-wrinkle Efficacy by Clinical Testing. Kim, You Geun¹, Young-Hoon Lee¹, Moon-Kook Kang², Byung-Hak Lee³, Jun-Ki Yun⁴, Sung Bae Kim⁴, Chang-Joon Kim^{4*}. ¹KB Cosmetics, Jinju 660-844, Korea, ²Chungdam White Clinic, Jinju 660-300, Korea, ³Whiteview Clinic, Busan 612-010, Korea, ⁴Department of Chemical & Biological Engineering and ERI, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea - This paper described the formulation of functional cosmetics and evaluation of anti-wrinkle efficacy in clinical test. Cosmetics were formulated with highly purified β -carotene obtained from the culture broth of recombinant *E.coli* cells. Edible oil for solubilizing β -carotene, vitamine E for long-term storage, detergent/stabilizer (2.0%) for the complete formation of oil/water emulsion, dimethicone (0.35%) for good skin care, and sorbitol for skin moisturizer were also added as ingredients. Physical or chemical degradation of formulated products stored at 0°C, 25°C, or 40°C was not observed for 60-day testing period. In clinical test, 68% of applicants observed wrinkle decrease after 8-week treatment. This result indicates that newly formulated cosmetics have strong potential for improving wrinkle skin care.

Key words: Recombinant *Escherichia coli*, β -carotene, functional cosmetics, formulation, clinical test

노령 인구 및 여성들의 사회활동 증가로 인해 화장품 수요가 급증하고 있다. 특히 국민소득의 증가와 함께 소비자들은 기존의 수동적인 입장에서 피부주름개선, 피부노화방지, 자외선 차단 등의 기능이 첨가된 피부치유 개념의 고품질 화장품 구입에 적극적인 투자를 하고 있다. 2000년 7월 정부가 기능성 화장품 심사에 관한 규정을 제정함에 따라 [14], 국내화장품 제조사들이 주름개선, 노화방지 등의 기능성을 강조한 화장품을 출시하기 시작하며 적극적인 마케팅을 함에 따라 기능성 화장품 시장은 지속적으로 성장하여 명실상부하게 1조원 규모의 큰 시장을 형성하게 되었다[16].

기능성 화장품은 막대한 시간과 자금이 투자되는 의약품보다 상대적으로 적은 비용과 시간을 투자하여 세계적으로 경쟁이 가능한 신제품 개발이 가능하고 시장 성장성과 고부가가치 창출에도 상당히 긍정적인 첨단미래형 산업으로 인식되고 있다. 한편, 소비자들은 기능성화장품의 일시적 개선 효과 보다는 가시적이고 지속적인 미백 또는 주름개선 등 실질적인 효과를 요구하고 있으나, 현재까지 개발된 국내의 기능성 화장품들은 이를 충분히 만족시켜주지 못하고 있다. 이는 식약청에서 고시한 기능성화장품 원료 pool이 많지 않아 차별화된 제품 개발에 한계가 있고, 화학적으로 제조된 기

능성 화장품 원료의 부작용들이 보고되고 있기 때문이다. 이러한 부작용 사례로 인하여 최근 정부에서는 많은 화학합성 물질들을 기능성 화장품에 첨가하는 것을 금지하고 있다. 한편 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 식물체 유래 천연물에서 기능성 화장품의 원료를 탐색하는 연구가 이루어지고 있지만 생산 수율이 낮아 경제성이 떨어지는 문제점이 지적되고 있다.

비타민 A 전구체로서 면역기능 증강효과가 있고, 강력한 항산화제로서 인체 내 유해한 활성산소를 제거함으로써 노화예방은 물론 항암효과도 있는 것으로 알려진 베타카로틴 [1]이 전형적인 예다. 베타카로틴은 상업화된 화학합성공정에 의해 생산되고 있으나 최근 미국, 유럽 및 우리나라 정부에서는 식품 및 화장품 첨가제로 합성 베타카로틴의 사용을 법으로 엄격히 금지하고 있다[6, 17]. 당근, 토마토, 호박과 같은 녹황색 채소에서 추출·정제된 천연 베타카로틴은 가격이 매우 비싼데, 이는 식물체 재배에 상당한 기간이 소요되는 반면 생합성되는 베타카로틴의 함량은 매우 적기 때문이다. 뿐만 아니라 견고한 세포벽 때문에 이를 회수하기 위해서는 복잡한 추출 과정이 필요하고[3, 4, 8], 다른 카로테노이드 성분들도 함께 존재하기 때문에 이들로부터 순수한 베타카로틴을 얻기 위한 추가적인 분리·정제과정이 필요하다[12, 15].

최근 본 연구팀에서는 식물체에서 생산되던 베타카로틴을 재조합 대장균의 유가식 배양공정에 의하여 경제적으로 대

*Corresponding author

Tel: 82-55-751-5391, Fax: 82-55-753-1806

E-mail: cj_kim@gsnu.ac.kr

량생산할 수 있는 방법을 개발하였다[11]. 또한 저독성 용매를 이용하여 이로부터 베타카로틴을 고순도로 회수하기 위한 추출·정제 시스템을 개발하였다[10]. 또한 본 연구팀이 회수한 재조합 대장균 유래 베타카로틴을 농도별로 섬유아세포(normal human primary fibroblast) 배양액에 첨가한 후 세포에 미치는 독성 유무 및 주름개선의 지표인 콜라겐 생성량 양 증가 유무를 관찰함으로써 베타카로틴의 안전성 및 주름개선제로의 가능성 여부를 조사하였다. 그 결과 1.7 μM의 농도로 처리 시 세포에 대한 독성이 거의 나타나지 않았고 콜라겐 생성량은 베타카로틴을 첨가하지 않은 대조군(control)에 비하여 약 1.4배 증가한 것을 확인하였다[9].

이와 같은 전 임상시험 결과를 바탕으로 본 연구는 재조합 대장균으로부터 회수된 고순도 베타카로틴을 화장품에 첨가하는데 있어서 이의 활성을 극대화시키고 화장품의 안정성을 유지할 수 있는 화장품 배합기술을 개발하고 실제 지원자들을 대상으로 임상시험을 수행하여 개발된 화장품의 안전성 및 주름개선 성능을 평가하여 궁극적으로 주름개선용 신 기능성 화장품을 개발하는 데 그 목적이 있다.

베타카로틴 함유 기능성화장품 제조

주름용개선용 기능성화장품 제조를 위하여 본 연구진이 재조합 대장균 배양액으로부터 고순도(98% 이상)로 분리·정제한 베타카로틴[10]을 사용하였다. 베타카로틴을 함유한 oil in water emulsion 형태의 화장품을 제조하는 데 있어서 제형의 안정성, 소비자의 사용성, 피부에 대한 질감 등을 고려하였다. 특급 또는 1급의 원료를 사용하였고 여러 가지 오일들 중 식용 가능한 식품등급의 천연오일을 선택하였다. 안정한 oil in water emulsion 형성과 시간이 경과함에도 층분리가 일어나지 않는 안정한 제품을 제조하기 위하여 몇몇 유화제와 유화안정제들을 조합하여 사용하였다. 사용된 유화제는 cetyl alcohol과 glyceryl stearate였고, PEG-75 stearate, ceteth-20, steareth-20은 유화안정제로 사용되었다. *Olea europaea*(Olive) fruit oil과 dimethicone은 유연제로 사용되었다. 특히 dimethicone은 피부에 대한 화장품 질감을 증대시킬 수 있는 원료로서, 적절한 농도를 결정하여 첨가하였다. 그리고 보습제로서는 glycerin, sorbitol, hyaluronic acid를 사용하였고 피부컨디셔닝제로서 aloe vera gel을 사

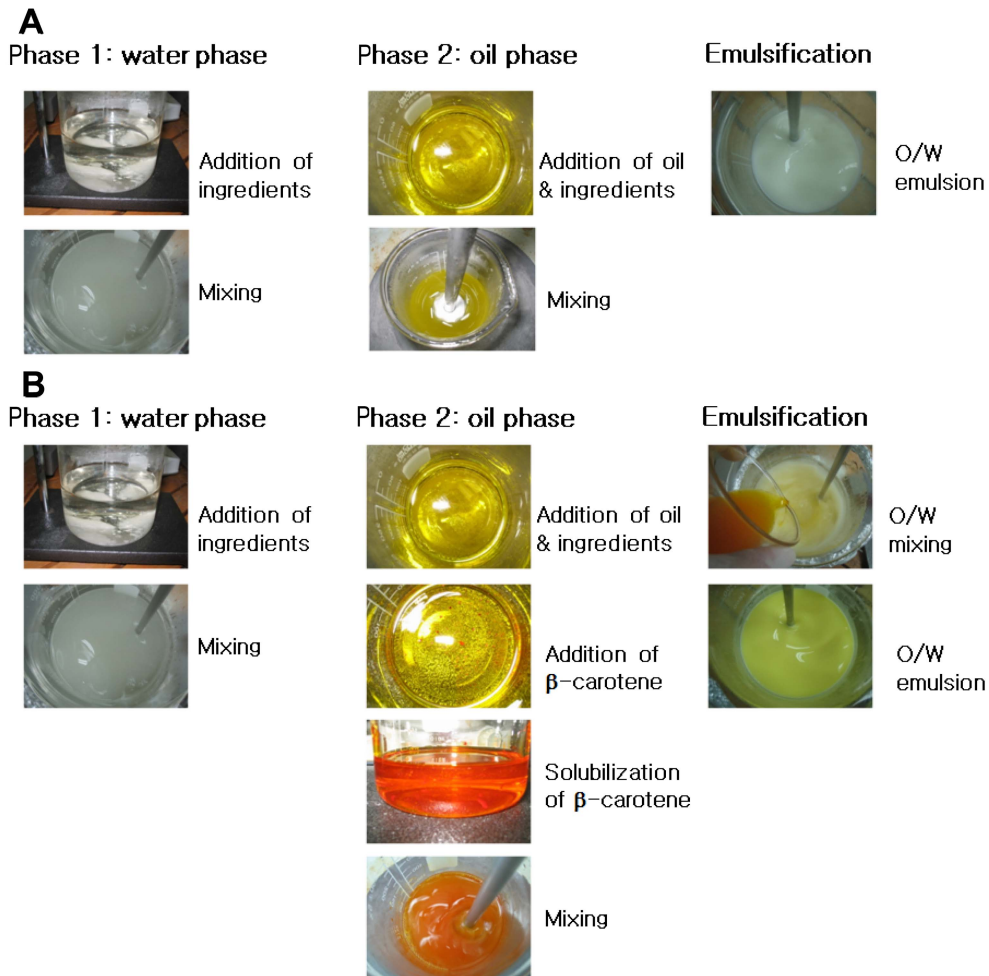


Fig. 1. Preparation process of functional cosmetics without (A) or with (B) β-carotene.

용하였으며, 원료들의 제형에 있어서의 적합한 농도를 결정하기 위하여 각 원료의 농도를 달리하여 최종 제품에 적용하였다.

Fig. 1은 화장품의 조제과정을 나타낸다. 각 성분의 적절한 함량으로 유상(베타카로틴 제외)과 수상을 각각 정확히 칭량하여 70~75°C까지 가온 용해하였다. 유상을 완전히 용해시킨 후 유효활성성분인 베타카로틴을 첨가하였고 기계적 교반기(DMS 3040, MTOPS, Korea)를 사용하여 1,500 rpm으로 약 10분간 교반하여 예비유화를 실시하였다. 그 후 수상에 베타카로틴이 포함된 유상을 서서히 투입하면서 3,000 rpm으로 20~30분간 고속으로 교반시켜 완전한 제형이 될 때까지 충분히 분산시켰다. 이 화장품을 약 30°C정도까지 냉각하여 제조를 완료하였다. 베타카로틴이 포함되지 않은 대조군(control)의 제조에서도 나머지 조건과 동일한 방법으로 조제하였다.

Table 1은 유효성분의 유효성, 각종 피부흡수 및 사용성, 질감 등을 고려하여 제조된 화장품의 최종처방을 나타낸다. 이 제형에 첨가되는 유효활성성분인 베타카로틴의 적정량을 결정하기 위하여 몇 가지 사항들을 고려하였다. 즉, 세포에 독성을 나타내지 않고 콜라겐생합성 촉진효과가 우수하며 화장품에 첨가하여 사용할 경우 베타카로틴 자체의 특유한 붉은 색소가 피부에 묻어나오지 않아야 한다. 이를 검토하여 최종 첨가량을 화장품 kg 당 베타카로틴 1 mg으로 결

Table 1. Formulation of functional cosmetics containing purified β -carotene.

Phase	Ingredients	Content (g)	
		Control	FCB ¹
Activator (β -Carotene)			
	Cetyl Alcohol		
	Glyceryl Stearate		
	PEG-75 Stearate	2.00	2.00
	Ceteth-20		
	Stearth-20		
Oil phase	<i>Olea Europaea</i> (Olive) Fruit Oil,	2.50	2.50
	Tocopheryl Acetate		
	Dimethicone	0.35	0.35
	Cyclopentasiloxane,		
	Cyclohexasiloxane	0.60	0.60
	Glycerin	7.00	7.00
	1,3-Butylene Glycol	7.00	7.00
	Carbomer	0.50	0.50
Water phase (B)	Methylparaben	0.20	0.20
	Phenoxyethanol	0.20	0.20
	Aloe Vera gel	3.00	3.00
	Sorbitol, Hyaluronic acid	0.51	0.51
	Triethanolamine	1.00	1.00
	Purified water	Up to 100	Up to 100

¹Functional cosmetics containing β -carotene

정하였다. 한편 베타카로틴은 성분 자체가 지용성 물질이므로 이를 용해시키기 위하여 피부에 트러블이 적으면서 식품으로서 섭취가 가능한 식용오일을 사용함으로써 베타카로틴을 함유하는 안정한 제형의 화장품을 제조하였다. 또한 항산화물질인 vitamin E(tocopheryl acetate)를 천연 오일인 *europaeva*(olive) fruit oil에 첨가함으로써 제품의 장기간 보관 시 베타카로틴의 안정성과 유효성에 도움을 주게 하였다. 그리고 화장품제형에서의 중요한 단계인 유화에 필요한 유화제 및 유화안정제의 적정 첨가량을 결정하기 위하여 0.50~2.50%의 범위에서 그 영향을 검토한 결과 2.0% 첨가 시 유상과 수상이 분리되지 않는 가장 우수한 결과를 나타내었다. 또한 유연제인 dimethicone을 0.10~0.50% 농도 범위에서 제품의 사용성 및 질감을 조사한 결과, 0.30% 이하에서는 제품의 피부에 대한 질감이 다소 떨어진 반면, 0.40% 이상 첨가 시에는 피부에 대한 흡수력이 다소 저하되는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 이의 최종 첨가량을 0.35%로 결정하였다. 뿐만 아니라 적절한 농도의 dimethicone을 첨가함으로써 현재까지 화장품 제조에 있어서 가장 큰 문제점으로 부각되었던 백탁현상을 제거할 수 있었으며, 피부에 대한 사용감 또한 아주 우수한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 기존의 화장품제조기술과 비교할 때, 기술적인 부분에서의 개선효과가 크다고 할 수 있다. 그 외에 각종 보습제를 첨가함으로써 유효성분의 흡수와 동시에 피부보습력을 증진시켰다. 특히 겨울철과 같이 습도가 매우 낮은 저 보습 조건에서 특징적으로 보습작용을 보이는 sorbitol을 첨가함으로써, 건조한 환경에 대한 피부트러블을 최소화하게 하였다. 제조된 화장품의 pH는 피부에 대한 트러블이 거의 없는 피부 pH와 거의 유사한 5.5(± 0.2 , n=3)를 나타내었으며 임상실험에 적용하기 위한 제형으로서 아주 적합함을 확인 하였다.

베타카로틴 함유 기능성화장품의 안정성 검토

화장품제품은 외부환경요인 등에 의한 변질, 변색, 변취, 미생물 오염 등이 없어야 한다. 제품의 안정성은 화장품 개발에서 중요한 부분을 차지하는 바, 이와 관련하여 실온에서의 보관기간동안 제품의 pH 변화, 온도변화 및 광 노출에 따른 제품의 변질여부를 조사하였다.

식약청에서 고시한 방법을 따라 화장품의 pH를 측정하였다. 액상 시료의 pH는 직접 측정이 가능하나 고상 시료인 경우 시료 2 g에 정제수를 첨가하여 총 30 g으로 맞추고 혼합한 후 용액의 pH를 측정한다[5]. pH meter(Orion 2 Star, Thermoco, USA)를 사용하여 25 \pm 1.0°C에서 3회 반복 측정하였고, 측정하기 전 유리전극은 미리 염기성 완충액이나 증류수에 수 시간 담그고 pH meter를 전원에 연결한 후 10분 이상 두었다가 사용하였으며, 검출부는 물로 잘 씻어 가볍게 닦아 낸 다음 사용하였다. Fig. 2는 실온(25°C)에 60일 동안 보관하며 매일 측정된 베타카로틴 함유 화장품의 pH

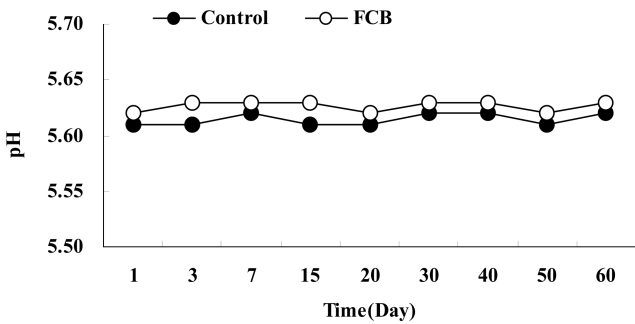


Fig. 2. Time profiles of pH of functional cosmetics containing β -carotene stored at room temperature. Control: cosmetics without β -carotene, FCB: functional cosmetics with β -carotene.

를 나타낸다. 피부의 pH와 유사한 약산성인 $5.5(\pm 0.2, n=3)$ 부근을 나타내었고, 실험 전 기간 동안 거의 변화가 일어나지 않음을 알 수 있다. 제품의 pH 변화는 제품 내에 미생물의 증식이나 원료성분의 이상이 발생하는 것을 의미한다. 그러나 실험 전 기간 동안 제품의 pH 변화가 거의 없는 안정한 상태를 유지하는 것으로 보아 제품 내에 미생물의 오염이나 유효성분들의 변질이 없는 것으로 판단된다.

온도에 따른 제품의 안정성을 알아보기 위하여 정해진 온도 조건(0, 25, 40°C)에 제조된 화장품을 보관하며 경시적 변화에 따른 상태변화를 육안으로 관찰하여 평가하였다. Table 2에 나타내었듯이, 0, 25, 40°C의 온도에 보관된 베타카로틴함유 화장품은 60일 동안 모든 온도 조건에서 안정적이었다. 화장품제조가 잘못 되었을 경우, 고온(40°C)에 보관 시 외관의 산패, 변패, 변취, 점도변화, 상분리, 증발, 부유, 탁도(투명도)가 관찰되고, 저온(0°C)에 보관 시 침전, 응고, 결정 석출, 탁도, 분리 등의 물리·화학적 변화가 관찰될 수 있다. 이와 같은 현상들은 사용성에 영향을 줄뿐만 아니라 화장품이 갖는 외관이나 이미지의 손실에도 커다란 영향을 미친다. 일반적으로 화장품의 품질수명은 소비자가 사용을 다할 때까지 보증해야 하므로 안정성을 체크해야 하는데, 본 연구에서 개발한 화장품은 세 보관 온도에서 전 실험기간 동안 아무런 변화 없이 안정한 상태를 나타내었다.

화장품은 출시 후 직·간접적으로 태양광 또는 형광등 빛에 노출 시 변색되는 등 물리·화학적으로 품질의 특성이 변할 수 있으므로 이를 사전에 조사하여 미연에 방지하기 위하여 광안정성 실험을 실시한다. 화장품 매장의 화장품 진열

Table 2. Stability of functional cosmetics containing β -carotene stored at different temperature.

Temp.(°C)	Time (Day)					
	1	3	7	15	30	60
0	○	○	○	○	○	○
25	○	○	○	○	○	○
40	○	○	○	○	○	○

The symbol indicates stable (○) or unstable (×) if it is marked.

Table 3. Sun stability of functional cosmetics containing β -carotene.

Sample	Time (day)		
	7	15	30
Funtional cosmetics containing β -carotene.	○	○	○

The symbol indicates stable and color unchange (○) or unstable and color change (×) if it is marked.

대에 전시된 화장품은 다양한 종류의 광에 영향을 받는데, 직접 일광 하에 진열되기도 하고, 쇼케이스 내에 장시간 두는 경우도 있다. 대부분의 제품은 화장품 케이스 내에 들어있어서 광에 직접적인 영향을 받지 않으나 만일의 경우를 대비하여 광안정성 평가는 반드시 실시해야 정확한 제품을 출시할 수가 있다. 따라서 본 연구에서 광안정성 시험을 위하여 자연광 노출시험을 수행하였다. 온도가 상승되는 시점의 태양 하에서, 투명용기에 화장품을 충전한 후 햇빛이 잘 드는 실외에 보관하면서 7, 15, 30일 동안 변색, 발색, 변취 산패 등의 변화를 육안으로 관찰하였다. Table 3에 나타낸 바와 같이 이기간 동안 모든 제품에서 색조변화 및 냄새변화 없이 안정함을 보여 제품에 대한 용기의 제한적인 요소와 사용 및 보관 장소에 대한 문제점이 배제될 것으로 판단된다.

베타카로틴 함유 기능성화장품의 주름개선 성능 평가를 위한 임상시험

본 연구팀이 개발한 기능성화장품의 주름개선 성능을 평가하기 위하여 식품의약품안전청에서 제시한 평가지침[7]에 따라 피부과 병원에서 화장품의 인체적용시험을 실시하였다. 피험자 30세~65세의 성인 남녀들 중에서 외견상 전신적인 질환이 없는 건강한 사람 20명을 선발하여 이들의 눈 주변 미세 주름 부위에 매일 아침, 저녁으로 2회에 걸쳐서 총 8주간 도포하도록 하였고 시험기간 동안 다른 제품의 사용을 엄격히 금하도록 하였다. 임상시험 시작 전 사진촬영을 실시하고 임상시험을 진행하면서 얇은 주름들의 변화들을 관찰하였다. 4등급(0=worse, 1=no change, 2=slightly improved, 3=improved)으로 나눈 평가기준 하에 제품 사용 후 4주째와 8주째 피시험자와 시험자 모두에 의해 평가되었다. 20명의 피시험자들 중 중간에 탈락한 2명을 제외하고는 모두 임상시험을 마쳤다. 8주간의 시험 진행 중 4주째와 8주째에 피시험자와 시험자에 의한 주름변화의 육안적 관찰과 피시험자의 자가 진단을 통한 평가에서 모두 유의하게 주름이 감소됨을 확인하였다. 화장품을 사용하기 전과 비교하여 4주 후 평가에서 피시험자들은 약 45% 이상, 시험자들은 약 38% 정도 개선되었다고 보고하였다. 임상시험을 마친 8주 후 평가에서는 피시험자들은 주름의 상태가 호전(71% 향상)되었다고 답하였고, 시험자는 사진자료(Fig. 3)를 비교한 후 68% 개선되었다고 평가하였다. 또한 시험 전 기간 동안 모

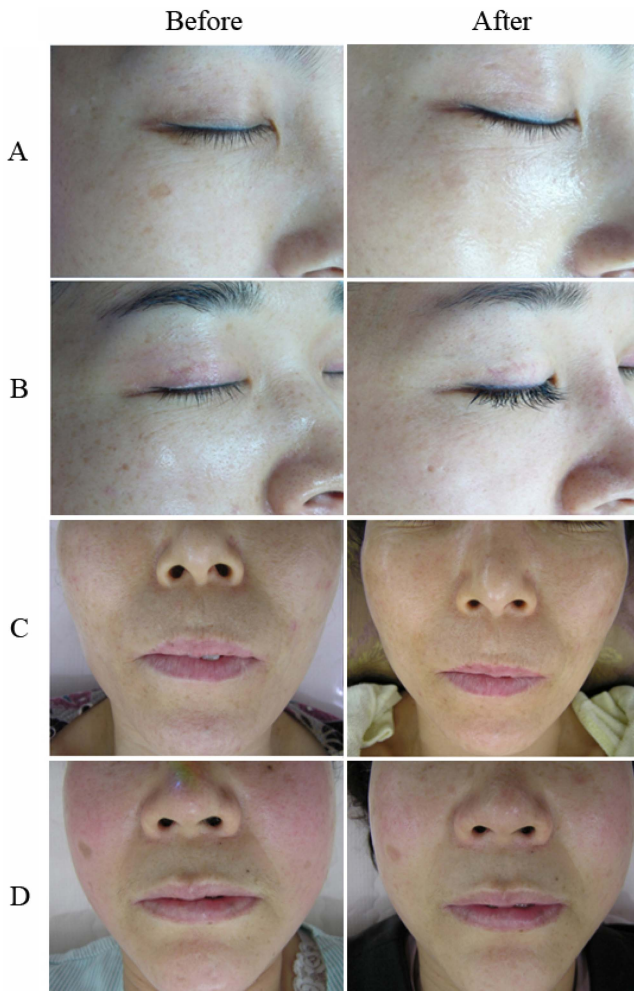


Fig. 3. Comparison of the extent of wrinkle on the face before(initial control) and after 2-month treatment with prepared functional cosmetics containing β -carotene. (A), young volunteer1; (B), young volunteer2; (C), old volunteer 1; (D), old volunteer2.

든 피시험자에 대하여 홍반, 작열감, 포피박탈, 알리지 등과 같은 자외선에 의한 광독성은 발견되지 않았다.

본 연구팀이 개발한 화장품에 의한 주름 개선효능이 4주 후 평가에서는 높지 않고 두 그룹간의 견해 차이를 보인 반면, 8주 후 평가에서는 높고 그룹간의 견해차가 거의 없는 것으로 보아 주름개선이 이루어지기 위해서는 최소 8주 이상 화장품을 사용해야 할 것으로 판단된다. 기존의 레티놀과 같은 비타민 A는 자외선에 불안정하여, 피부에 광자극성이므로 부작용에 유의하여야 하였다[2, 13]. 따라서 낮에는 자외선차단제를 병행하거나 또는 저녁에만 제품을 사용하여야 하는 문제점이 있었다. 반면 본 연구팀이 개발한 제품은 아침, 저녁으로 도포 후 자외선차단제를 이용하지 않아도, 실외생활 시 특별한 광독성과 같은 피부자극이 없었다. 이는 본 제품에 함유되어 있는 베타카로틴이 비타민 A의 전구체로서 인체에 축적되어 필요에 의해 비타민 A로 전환되

기 때문인 것으로 사료된다.

본 연구과정에서 축적된 베타카로틴함유 기능성 화장품 제조 기술과 이의 임상시험을 통한 평가 기술은 다른 기능성 화장품 제조에도 적용 가능한 기반기술이다. 또한 본 논문을 통하여 발표된 내용을 각종 피부과학에 접목시킨다면 사용하고자 하는 유용성분과 피부친화력에 대한 기초자료로 활용될 뿐만 아니라 미용학적인 측면에서도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

재조합 대장균으로부터 회수된 고순도 베타카로틴을 첨가한 기능성 화장품의 제조방법을 개발하고 이의 임상시험을 수행하여 개발된 화장품의 주름개선 성능을 평가하였다. 베타카로틴의 유효성, 각종 피부흡수 및 사용성, 질감 등을 고려하여 화장품을 처방하였다. 베타카로틴의 첨가량은 피부에 독성을 나타내지 않고 콜라겐생합성 촉진효과가 우수하며 베타카로틴 자체의 특유한 붉은 색소가 피부에 묻어나오지 않을 정도의 화장품 kg 당 1 mg으로 결정하였다. 베타카로틴을 용해시키기 위하여 식용오일을 사용하였고 항산화물질인 vitamin E(tocopheryl acetate)를 첨가함으로써 제품의 장기간 보관 시 베타카로틴의 안정성과 유효성에 도움을 주게 하였다. 유화제 및 유화안정제는 2.0% 첨가함으로써 유상과 수상이 분리되지 않도록 하였다. 유연제인 dimethicone을 0.35% 첨가함으로써 백탁 현상을 제거하고 피부에 대한 사용감을 좋게 하였다. 보습작용을 보이는 sorbitol을 첨가함으로써, 건조한 환경에 대한 피부트러블을 최소화하게 하였다. 제품의 안정도를 조사하였다. 60일간의 실험에서 상온에 보관된 제품의 pH는 변화가 거의 없었고 0, 25, 40°C의 온도에서 물리·화학적 변화가 없는 안정한 상태를 유지하였다. 뿐만 아니라 광제품의 주름개선 성능을 평가하기 위하여 20명의 피시험자를 대상으로 화장품의 인체적용시험을 실시하였다. 시험자의 평가결과 4주 후 피험자의 38%가 주름이 감소하였고 8주 후에는 68%가 주름이 개선되었다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 중소기업청 산학연 컨소시엄 사업과 교육과학기술부와 지식경제부의 출연금으로 출연한 산학협력중심대학육성사업의 지원금으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Burri, B. J. 1997. Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutri. Res.* 17: 547-580.
- Cannell, J. J., R. Vieth, W. Willett, M. Zasloff, J. N. Hathcock, J. H. White, S. A. Tanumihardjo, D. E. Larson-

- Meyer, H. A. Bischoff-Ferrari, C. J. Lamberg-Allardt, J. M. Lappe, A. W. Norman, A. Zittermann, S. J. Whiting, W. B. Grant, B. W. Hollis, and E. Giovannucci. 2008. Cod liver oil, vitamin A toxicity, frequent respiratory infections, and the vitamin D deficiency epidemic. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **117**(11): 864-870.
3. Choudhari, S. M., and L. Ananthanarayan. 2007. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chem.* **102**: 77-81.
 4. Cinar I. 2004. Storage stability of enzyme extracted carotenoid pigments from carrots. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **3**: 609-616.
 5. Criterion and Test methods of cosmetics (2007-45). 2007. *Korea Food and Drug Administration*.
 6. Food Hygiene law of 2003, Korea Food Industry Association.
 7. Guideline for efficacy evaluation of functional cosmetics. 2005. *Korea Food and Drug Administration*, No. 11-147000-000863-01.
 8. Jaramillo-Flores, M. E., J. J. Lugo-Martinez, E. Ramfrez-Sanjuan, Montellano-Rosales, L. Dorantes-Alvarez, and H. Hernandez-Sanchez. 2005. Effect of sodium chloride, acetic acid, and enzymes on carotene extraction in carrots (*Daucus carota L.*), *J. Food. Sci.* **70**: E136-E142.
 9. Jo, J. S., B. M. Ku, S. S. Kang, J. R. Lee, Y. G. Kim, S. B. Kim, S.-W. Kim, C.-J. Kim, and I.-Y. Chung. 2008. Anti-wrinkle activity of β -carotene extracted and purified from recombinant *Escherichia coli*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **23**(6): 513-518.
 10. Jo, J. S., D. Q. A. Nguyen, J.-K. Yun, Y.-N. Kim, Y. G. Kim, S. B. Kim, Y.-G. Seo, B.-H. Lee, M.-K. Kang, and C.-J. Kim. 2009. Extraction & purification of β -carotene from recombinant *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 231-237.
 11. Kim, J. H., S.-W. Kim, D. Q. A. Nguyen, H. Li, S. B. Kim, Y.-G. Seo, J.-K. Yang, I.-Y. Chung, D. H. Kim, and C.-J. Kim. 2009. Production of β -carotene by recombinant *Escherichia coli* with engineered whole mevalonate pathway in batch and fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **14**: 559-564.
 12. Ladislav, F., P. Vera, S. Karel, and V. Karel. 2005. Reliability of carotenoid analysis: a review. *Curr. Anal. Chem.* **1**: 93-102.
 13. Mei, N., T. Chen, D. E. Godar, M. M. Moore. 2009. UVA-induced photomutagenicity of retinyl palmitate. *Mutat. Res.* **677**(1-2): 105-106.
 14. Regulations for prescription of functional cosmetics (2000-33). 2000. *Korea Food and Drug Administration*.
 15. Shibata S., C. Ishihara, and K. Matsumoto. 2004. Improved separation method for highly purified lutein from *Chlorella* powder using jet mill and flash column chromatography on silica gel. *J. Agric. Food. Chem.* **52**: 6283-6286.
 16. 2008 performance of cosmetic products. 2009. *Korea Cosmetic Association*.
 17. Yamane, Y.-I., K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kakizono, and N. Nishio. 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(9): 4471-4478.

(Received Oct. 14, 2009/Accepted Nov. 10, 2009)