

골담초 호모 발효 추출물의 피부 미백 효능에 관한 연구

석지현[†] · 이선영 · 채은정 · 최신욱

(주)래디안

(2010년 7월 22일 접수, 2010년 8월 23일 수정, 2010년 9월 16일 채택)

Skin Whitening Effects of *Caragana sinica* Rehder Extract Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913

Ji Hyun Seok[†], Sun Young Lee, Eun Jung Chae, and Shin Wook Choi

RADIANT INC. Rm 207 Bioindustry Innovation Center, Hi-tech Venture Town,
Hupyong-dong, Chungcheon-si, Gangwon 200-957, Korea

(Received July 22, 2010; Revised August 23, 2010; Accepted September 16, 2010)

요약: 본 연구는 미생물에 의한 골담초(*Caragana sinica* Rehder) 발효 추출물의 항산화 효과 및 피부 미백 효능에 관한 연구로 골담초에 *S. cerevisiae* KCTC 7913를 첨가하여 발효를 통해 얻어진 발효 추출물을 B16F10 멜라닌 세포에 처리한 결과, 농도의존적으로 멜라닌 생성 억제 효능이 증가한 것으로 확인하였으며, 추출물 내 유효 성분인 resveratrol의 함량이 발효 전의 추출물에 비해 증가함을 확인하였다. 멜라닌 생성 과정의 주요 단백질인 tyrosinase의 활성 억제 또한 골담초 추출물에 비해 골담초 발효 추출물의 효능이 우수함을 확인하였으며, 골담초 발효 추출물의 피부 자극 또한 일어나지 않는 것으로 확인되어 피부에 안전한 화장품 원료로서의 사용이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: In this study, we evaluated antioxidative effects and skin whitening effects of extract of *Caragana sinica* fermented by *S. cerevisiae* KCTC 7913. At first, *Caragana sinica* was fermented via inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913 and then extracted for fermented *C. sinica*. It has shown that more increased of melanogenesis inhibition activity in a dose-dependent manner on B16F10 melanoma cells and elevated the amount of resveratrol contents by HPLC analysis than non-fermented. Furthermore, the extract of fermented *C. sinica* was inhibitory effects against tyrosinase, a key enzyme of melanogenesis pathway, more than non-fermented *C. sinica* extract. And it did not show the skin irritation. Therefore, fermented *C. sinica* extracts might be used as safe cosmetic ingredients.

Keywords: fermentation, whitening, antioxidant, *Caragana sinica* Rehder, resveratrol

1. 서 론

피부는 외부 환경에 직접적으로 노출되는 신체 부위로써, 일상생활에서 햇빛 노출에 의한 자외선 조사, 황사나 자동차 배연 등에 의한 대기 오염 물질 및 각종 세균 등에 노출되어 피부 트러블 및 자극이 유발되며 이로 인해 정상적인 피부 노화를 가속화시키게 된다. 이러한 피부 노화는 외관상으로 탄력을 저하시켜 주름을 형성하거나

기미 및 노인성 반점을 형성하여 색소침착을 유발하게 된다.

일반적으로 피부 노화는 체세포 돌연변이, 자유 라디칼의 과도한 생성, 자가면역반응, 독성물질의 축적, 유전자 복제 중 발생된 에러, 진피구성 단백질의 변형[1] 등 여러 가지 학설이 제기되고 있으며, 이 중에서 노화와 성인병과 같은 각종 질환의 원인이 활성산소종(reactive oxygen species)에 기인된다는 학설에 대한 각종 연구가 진행됨에 따라 산소나 질소로부터 유래되는 활성 산소종을 조절할 수 있는 천연 항산화제를 개발하려는 연구가

[†] 주 저자 (e-mail: tjrwlgus84@gmail.com)

활발히 진행되고 있다. 대표적으로, 천연 항산화제인 토코페롤, 아스코르빈산, 카로테노이드, 플라보노이드, 글루타치온 등에 대한 효능 연구 및 이들의 안정화 기술에 대한 연구와 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 등 다양한 항산화제가 알려져 있고, 그 외 많은 항산화제에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있다[2,3]. 이들 항산화제 중 토코페롤은 항산화 효과가 비교적 낮은 편이고, 효과가 우수한 BHA, BHT 등의 합성 항산화제가 의약품 및 식품분야 등에서 활용되고 있으나, 돌연변이원성 및 독성에 대한 지적이 있으며 아스코르빈산의 경우에는 안정성이 확보된 유도체 및 제형 개발이 진행되고 있지만, 다른 소재의 경우 아직 연구가 미흡하여 안정하고 효과가 우수한 천연 소재의 개발이 필요하다.

또한, 노화의 특징 중 하나인 노인성 반점의 경우에는 멜라닌 생합성과 연관되어 있으며, 자외선 노출에 의한 피부 흑화 현상 또한 노화를 가속화시키는 원인으로 작용한다. 멜라닌 생합성은 melanocyte의 melanosome에서 합성되며, melanosome에는 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 중 tyrosinase는 멜라닌 합성의 속도결정 단계에 작용하는 효소[4]로서 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA-quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. Tyrosinase related protein (TRP-1)은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 산화하며, dopachrome tautomerase (DCT)는 초기에 TRP-2로 불려졌던 효소로서 도파크롬을 DHICA로 이성화시키는 효소이다. 이 중, 멜라닌을 합성하는 핵심 효소로 tyrosinase가 관여하며 TRP-1, DCT의 경우에는 pheomelanin 보다 eumelanin 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다[5].

피부 미백 효능을 나타내는 유효성분은 멜라닌 색소의 생산을 돕는 tyrosinase에 직접 작용하여 멜라닌 색소의 생산을 억제하는 성분과 주로 생성된 멜라닌을 환원시키는 성분 등이 사용된다. Tyrosinase에 대한 억제 효능 성분으로는 kojic acid, arbutin[11] 및 ellagic acid[13], hydroquinone[12] 등이 있으며 생성된 멜라닌을 환원시키는 소재로는 태반 추출물[14], ascorbic acid[15] 등의 성분이 사용되는 경우가 많다. 그러나 강력한 멜라닌 생합성 저해활성을 보이는 소재 대부분이 정상세포 및 melanocyte의 변성 또는 치사를 일으키고 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 발생시킨다는 문제가 있다.

이러한 문제를 해결하기 위하여, 최근 각광받고 있는 식물화학물질(phytochemical) 중에서 상대적으로 독성이 낮고 안전하며 피부에 유효한 효능을 나타내는 추출물을 이용한 화장품 조성물에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으나 일반적인 추출 방법에 의해 수득된 성분은 그 효과가 미미한 한계점을 나타내어 효능을 극대화시킨 소재의 개발이 요구되고 있다.

기존의 연구사례에서는 이 한계점 극복을 위하여, 발효를 통해 피부 효능을 향상시키는 연구가 보고되었다. 배의 씨방 및 과피 알코올 발효 추출물을 이용하여 피부에 미치는 영향을 연구한 결과 피부 흡습성, 수분 보유능, 수분 함유량이 증가하였고, 피부 거칠기가 감소를 확인한 연구가 보고 되었다[6]. 그리고 경옥고를 발효하여 피부 효능에 관한 연구에서는 효모를 이용해 발효한 경옥고의 피부에 대한 효능이 발효하지 않았을 때보다 월등히 증가하였다[7].

골담초는 한국(경상북도, 경기도, 강원도, 황해도), 중국 등지에 분포하며 산지에서 자란다. 높이가 약 2 m이다. 꽃은 5월에 1개씩 총상꽃차례로 피며 길이 2.5 ~ 3 cm이고 나비 모양이다. 잎과 가지에 플라보노이드, 껍질에 알칼로이드, 여물지 않은 열매에 이노시톨 성분이 있다고 하였으며, 혈압강하작용도 있다. 민간에서 잎이 붙은 가지를 골담, 골습, 각기, 수면장애, 척수신경근염, 고혈압, 감기, 위장병 등에 사용한다고 보고되었다[8].

따라서, 본 연구는, Antioxidant로 알려져 있는 성분인 resveratrol의 dimer, trimer, tetramer를 함유하고 있는 것으로 알려져 있는 원료 중 현재까지 많은 연구가 진행되지 않은, 골담초를 추출하여 세포 내 melanogenesis inhibition assay와 tyrosinase inhibition assay를 통해 미백 효능을 확인하고, 이러한 골담초를 발효한 후, 피부 효능 변화를 확인하여 미백 효능 화장품 소재로서 적용 가능성을 보고하고자 한다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

골담초 발효 추출물을 제조하는 과정에서 사용된 미생물은 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913으로 한국 생명공학연구원 생물자원센터에서 분양 받아 사용하였다. 발효를 위한 미생물 배양을 위하여 사용된 배지 조성으로 yeast extract (acumedia, USA) malt extract (merck, Germany), Bacto™peptone (BD, France), dextrose anhydrous (Junsei, Japan), agar (Junsei, Japan)를 사용

하였다.

실험에 사용한 시약은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA), alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH, Sigma, USA), tyrosine (Sigma, USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA), butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma, USA), arbutin (Sigma, USA), Kojic acid (Sigma, USA), melanin (Sigma, USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 세포주인 B16F10 (Melanoma mouse, 58078645)는 American type culture collection (ATCC, USA)에서 구입하였으며, 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone®, USA), fetal bovine serum (FBS, HyClone®, USA), antibiotics (penicillin 100 unit/mL, streptomycin 100 unit/mL, HyClone®, USA)를 구입하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 효소는 mushroom tyrosinase (Sigma, USA)를 사용하였다. Finn Chamber (Alpharma AS, Norway)를 사용하였고, 흡광 측정을 위해 ELISA reader (VICTOR3®, PerkinElmer)를 사용하였다.

2.2. 골담초 발효 추출물 제조

건조된 골담초는 강원도 춘천시 대광 약업사로부터 구입하여 분쇄하여 분말화한 후, 300 g의 골담초 분말에 미생물의 생장을 위하여 1.2 L의 YM 액체 배지를 첨가하였다. 상온에서 2 h 정치하여 골담초 분말에 액체배지가 충분히 흡습될 수 있도록 하였다.

S. cerevisiae KCTC 7913는 10^6 CFU/mL로 희석하여 준비된 골담초에 접종하였다. 미생물이 접종된 골담초는 25 °C로 온도를 유지하면서 72 h 동안 발효하였다. 발효에 사용한 미생물인 *S. cerevisiae* KCTC 7913는 접종 24 h 전에 35 °C에서 YM액체배양하여 준비하였으며, 이를 희석하여 발효의 접종균으로 사용하였다. 발효가 완료된 골담초 발효물에 70 % 에탄올을 5 L를 가하고, 3 h 동안 발효물 내의 유효성분을 추출하였다. 1 μ m pore size의 paper filter를 이용하여 고분자 침전물 및 균체를 제거하여 회전감압농축기로 용매를 모두 휘발시킨 후, 최종적으로 골담초 발효 추출물을 회수하였다.

2.3. 골담초 추출물 제조

2.2와 같은 증량의 골담초를 건조 및 세절한 후, 추출 용매로 70 % ethanol을 넣어 골담초 추출물이 5 wt%가 되도록 하였다. 이를 골담초 발효 추출물과 같은 방법으로 추출, 여과하여 최종 골담초 추출물을 제조하였다.

2.4. 골담초 발효 추출물의 항산화 효능 측정

골담초 발효 추출물에 대한 자유라디칼 소거능을 DPPH 방법을 변형하여 측정하였다[9]. 간단히 기술하면, 골담초 발효 추출물과 골담초 추출물 및 BHT를 24 well plate의 각 well에 500 μ L씩 넣은 후, 메탄올에 0.1 mM 농도로 녹인 DPPH 용액을 1 mL씩 첨가하여 상온에서 15 min 동안 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 565 nm에서 흡광을 측정하였다. 이때 대조군으로는 추출물 대신 메틸 알코올을 사용하였다.

실험군과 대조군에 대한 흡광을 측정 후, DPPH 라디칼 소거 효능을 환산하여 그 결과를 나타내었다.

$$\text{자유라디칼 소거활성(\%)} = (1 - \text{실험군 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) \times 100$$

2.5. 골담초 발효 추출물의 세포 생존율 평가

골담초 발효 추출물의 세포 생존율을 측정하기 위하여 쥐 유래의 멜라닌 세포(mouse melanocyte)를 96 well plate에 10^5 cells/mL의 농도로 접종하고 배양한 후, 골담초 발효 추출물 및 골담초 추출물을 무혈청 배지를 이용하여 각각 10, 20, 50, 100, 200 μ g/mL의 농도로 희석한 후, 24 h 동안 배양하였다. MTT 시약을 이용하여 세포의 생존율을 평가하였으며 대조군으로는 추출물을 함유하지 않은 무혈청 배지를 사용하였다.

2.6. 골담초 발효 추출물의 Tyrosinase 효소 활성 저해 효과

골담초 발효 추출물의 tyrosinase 효소 활성 저해 효과 측정 방법은 식품의약품안전청에 고시된 “기능성 화장품 효능 평가법” 가이드라인을 참고하였다.

Tyrosine을 기질로 사용하여 1.5 mM의 tyrosine 용액과 100 U/mL tyrosinase 용액을 준비하였다. 반응의 완충 용액으로 0.1 M의 인산염 완충용액을 사용하였다. 96 well plate에 준비한 tyrosine 용액을 100 μ L씩 넣고 골담초 발효 추출물과 골담초 추출물, kojic acid를 시료로 사용하였다. 추출물의 최종 농도 10, 20, 50, 100 μ g/mL이 되도록 20 μ L씩 처리한 후, 마지막으로 준비한 tyrosinase를 80 μ L씩 넣은 후, 혼합하여 37 °C에서 15 min 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 plate는 490 nm에서 흡광을 측정하였다. 대조군으로는 0.1 M의 인산염 완충 용액을 사용하였다.

2.7. 골담초 발효 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

골담초 발효 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과 측정은

식품의약품안전청에 고시된 “기능성 화장품 효능 평가법” 가이드라인을 참고하였다. 실험에 사용된 세포주는 쥐 유래의 멜라닌세포를 이용하였으며, 세포를 6 well plate에 10^5 cells/mL의 농도로 접종하여 24 h 동안 37 °C의 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양된 세포에 골담초 발효 추출물과 골담초 추출물을 적용하기 위하여 혈청과 세포의 멜라닌 생성을 유도하는 것으로 알려진 α -MSH를 함께 처리하여 10, 50, 100 μ g/mL의 농도로 희석하였다.

양성 대조군으로 arbutin을 사용하였으며 대조군은 α -MSH만 함유된 배지를 처리하였다. 48 h 배양된 세포를 회수하여 10,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 1 M 수산화나트륨 수용액에 세포를 녹여 490 nm에서 흡광을 측정하였다. 이때, 단백질 양을 함께 확인하여 생성된 멜라닌의 함량을 보정해주었다.

2.8. 골담초 발효 추출물의 Resveratrol 성분 변화 분석

골담초 발효 추출물은 골담초 추출물에 대비하여 미생물의 발효를 통해 당 및 중합체의 형태로 존재하던 성분이 발효과정에 의해 분해되면서 나타날 수 있는 유효 성분의 변화 유무를 확인하기 위하여 골담초 내에 함유되어 있는 것으로 보고되어 있는 resveratrol을 HPLC 기기를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 Agilent Technologies의 1200 series HPLC, 칼럼은 Agilent Eclipse plus C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm id \times 250 mm), 검출기는 UV detector, 파장은 306 nm로 하였다. 유속은 1 mL/min이며, 이동상은 100 % acetonitrile을 사용하여 분석을 실시하였다.

2.9. 골담초 발효 추출물의 피부 자극 유발 여부 평가

골담초 발효 추출물의 피부 자극 유발 여부를 평가하기 위하여 인체 첩포 시험(Human patch test)을 통하여 인체에 대한 1차 자극 시험 및 누적 자극 시험을 수행하였다.

건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 CTFA 가이드라인(The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington, D.C., 20036, 1991)에 따라 실시하였다. Finn chamber에 시료 20 μ L를 적하시킨 후, 이를 시험 부위인 인체의 팔 한쪽에 첩포하고 테이프로 고정시켰다.

1차 피부 자극시험은 24 h 동안 첩포한 후, 첩포를 제거하고 다시 4, 24 h 경과한 후의 시험부위의 피부 반응을 확인하였다. 누적첩포 시험은 피부 질환 병력이 없는 성인 20명을 대상으로 하여 Finn Chamber에 골담초 발

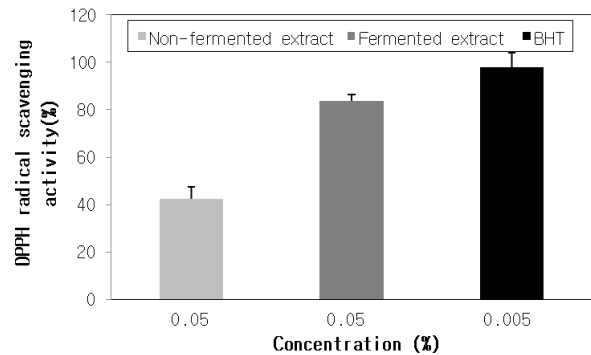


Figure 1. Free radical scavenging activity of fermented *C. sinica* extract and non-fermented extract. Antioxidative activity measured by DPPH radical scavenging assay as described in materials and methods.

효 추출물 20 μ L를 적하시킨 후, 이것을 시험 부위인 양쪽 팔 안쪽에 Scanpor tape로 고정하고 24 h 적용 후 patch를 제거시키고, 24 h 경과한 후, 동일한 부위에 동일한 방법으로 총 9번의 반복적인 적용을 수행하여 피부의 자극 발생 여부를 육안으로 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 골담초 발효 추출물의 항산화 효능 측정

활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 노질 환과 심장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 보고되었다. 불안정한 자유 라디칼의 특성에도 불구하고 다소 안정한 특성을 지닌 DPPH와의 반응을 통하여 시료의 항산화 효능을 알아볼 수 있다.

각각의 추출물을 0.05 wt% 농도로 처리하였을 때, 골담초 추출물은 42.21 %, 골담초 발효 추출물은 83.78 %의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 이는, 골담초 추출물에 비해 골담초 발효 추출물의 항산화 활성이 증가하였음을 의미한다. 양성 대조군으로 사용한 BHT는 0.005 %의 농도에서 97.92 %의 우수한 DPPH 라디칼 소거 효능을 나타냈다(Figure 1). 양성대조군으로 사용된 BHT에 비해 다소 효능은 낮으나, BHT의 경우에는 단일 성분임을 감안할 때에 골담초 발효 추출물의 항산화 효능을 통한 원료 개발이 가능할 것으로 사료된다.

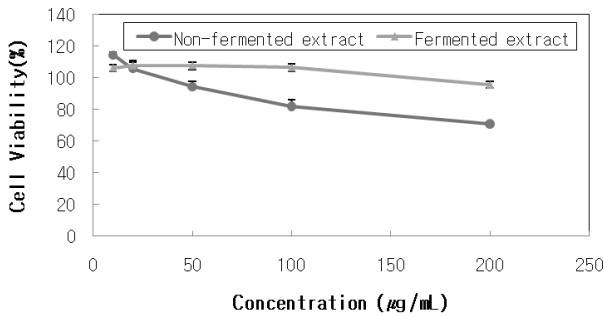


Figure 2. Cell viability of fermented *C. sinica* extract and non-fermented extract on the B16F10 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentrations of *C. sinica* Rehder extracts for 24 h.

3.2. 골담초 발효 추출물의 세포 생존율 평가

골담초 추출물과 발효 추출물의 B16F10 멜라닌 세포에 대한 세포 독성을 평가한 결과, 골담초 추출물 50 µg/mL 이상의 농도에서 대조군(시료무처리군)과 비교하였을 때 농도 의존적으로 세포 독성 또한 증가하였다. 골담초 발효 추출물의 경우 200 µg/mL의 농도에서 독성이 거의 확인되지 않았다. 이는, 골담초 추출물과 비교하였을 때, 세포에 독성을 미칠 수 있는 성분이 발효 공정을 통해 저감되었을 것으로 사료된다(Figure 2). 따라서, 발효 공정을 통해 피부 세포에 보다 안전한 소재를 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

3.3. 골담초 발효 추출물의 Tyrosinase 효소 활성 저해 효과

Tyrosinase는 melanogenesis의 주요 단백질로서 피부 색소 조절 과정 연구에 중요한 지표로 여겨져 미백 효능 탐색에 중요한 인자이다. 골담초 추출물의 경우, 농도별로 희석하여 mushroom tyrosinase 활성 저해 효능을 확인한 결과, 효소 저해 활성이 거의 없거나 미미한 것으로 나타난 반면, 골담초 발효 추출물은 tyrosinase 활성 저해 효능이 최대 시험농도인 100 µg/mL의 농도에서 대조군(시료무처리군) 대비 40%까지 증가하는 것으로 확인되었으며 이는 농도 의존적인 효능을 나타냈다. 따라서, 본 실험 결과를 미루어 볼 때, 골담초 발효 추출물은 발효 전의 골담초 추출물 보다 효소 수준에서 피부 미백 효능이 있음을 의미한다(Figure 3).

3.4. 골담초 발효 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

골담초 추출물과 발효 추출물에 대한 미백효능 평가를 위해, 쥐 유래의 멜라닌 세포인 B16F10에 농도별로 추출물을 처리한 결과, 골담초 발효 추출물의 경우에는 골담

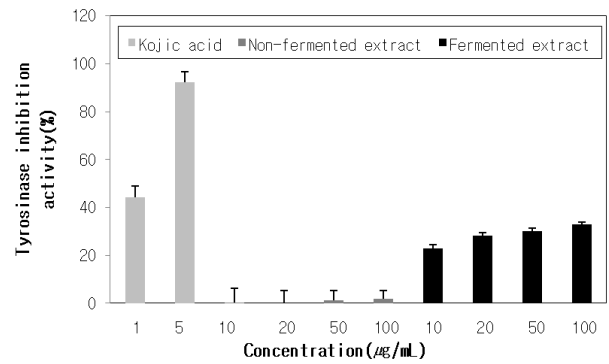


Figure 3. Inhibitory effects of fermented *C. sinica* extract and non-fermented extract on mushroom tyrosinase activity.

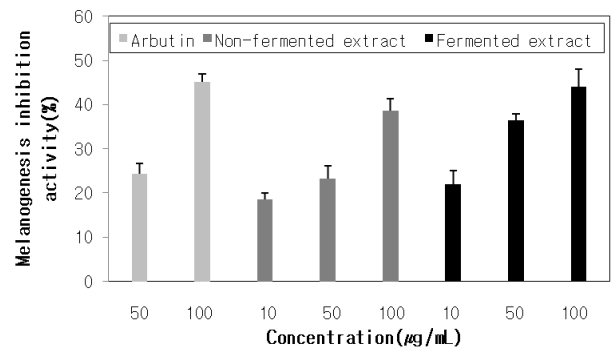


Figure 4. Inhibitory effects of fermented *C. sinica* extract and non-fermented extract on melanogenesis of B16F10 melanoma cells.

초 추출물에 비하여 동일한 농도를 처리하였을 때, 세포 내 멜라닌 생성 억제 효과가 농도별로 약 5 ~ 10%씩 증가함을 확인 할 수 있었다. 이는 큰 폭의 효능 증가는 아니지만, 위에서 언급한 바와 같이 골담초 추출물의 경우에 세포 독성이 나타나, 보다 안전하고 우수한 미백 효능 소재로 골담초 발효 추출물이 적용 가능할 것으로 사료된다(Figure 4).

3.5. 골담초 발효 추출물의 Resveratrol 성분 변화 분석

이미 다양한 연구를 통해, 골담초 내에 존재하는 다양한 resveratrol oligomer가 알려져 있으며[16], Park 등의 연구 결과[17]에 의하면, 골담초 추출물의 아질산염 소거능과 전자공여능이 있음이 보고되었다. 따라서, 본 연구에서 확인된 미백 효능에 대하여 발효여부에 따른 유효 성분의 변화 유무를 확인하기 위하여 골담초 내에 함유되어 있는 것으로 보고되어 있는 resveratrol의 함량을 확인하였다. HPLC 함량 분석 결과 표준품의 정량 곡선

Table 1. Resveratrol Contents of Fermented *C. sinica* Extracts and non- Fermented Extracts by HPLC Analysis. Resultes were Means \pm S.D. of 3 Independent Experiments

	Non-fermented extract	Fermented extract
Resveratrol (ppm)	830 \pm 100	1333 \pm 100

은 0.997 이상으로 양호하였다(data not shown). 동일한 기기분석 조건으로 추출물을 3번의 반복실험 결과 Table 1과 같이 나타났다. 골담초 발효 추출물은 골담초 추출물과 비교하여 resveratrol의 추출율이 다소 증가함을 확인할 수 있었으며, 이는 발효 공정을 이용할 경우, 추출물 내의 resveratrol 추출 수율 증가를 가져올 수 있음을 의미한다.

3.6. 골담초 발효 추출물의 피부 자극 유발 여부 평가

피부 질환 및 기타 질환을 나타내지 않은 건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 인체에 대한 피부 자극 시험을 평가한 결과, patch를 첩포하지 않은 부위와 비교하여 골담초 발효 추출물을 처리한 부위에 자극이 유발되지 않았으며 피부에 적용하기에 안전한 소재임을 확인할 수 있었다(Table 2). 또한, 이러한 효능은 단회 첩포 뿐 아니라, 누적 첩포 후, 72 h 후에도 역시 자극 유발을 확인할 수 없었다(Table 3). 이는 골담초 발효 추출물이 피부에

직접적으로 첩포하는 화장품 소재로 적용하기에 안전한 소재일 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구는, 최근 천연 추출물에 대한 피부 및 인체 효능에 대한 관심이 고조되면서, 천연 추출물 제조 시 인체에 유해한 유기용매를 사용한다는 문제점을 해결하여 비자극적이고, 피부 질환 유발에 영향을 주지 않는 원료를 개발하고, 멜라닌 생성 억제 효능이 우수하여 항산화 효과 및 피부 미백 효과를 나타내는 화장품 천연 원료로서 골담초 발효 추출물을 적용할 수 있는지에 대한 효능 실험을 수행하였다. 골담초 추출물에 대한 항산화 효능은 이미 보고된 바 있으나, 이를 효모를 통해 발효한 골담초 추출물의 항산화 효능이 증가하였으며, 멜라닌 생성 억제 효능 실험 결과 농도 의존적으로 그 효능이 상승하였고, 양성 대조군으로 처리한 농도의 arbutin과 유사한 효능의 멜라닌 생성 억제 효능을 나타냈다. 또한, 멜라닌 생성의 주요한 단백질인 tyrosinase의 활성 억제 효능 실험 결과, 골담초 추출물 보다 현저하게 높은 효소 활성 억제 효능이 확인 되었다. 본 연구자들은 골담초 내에 존재하는 대표적인 항산화 성분인 resveratrol에 따른 영향을 확인하기 위하여 HPLC 기기분석을 수행한 결과, 유

Table 2. Patch Test of Fermented *C. sinica* Extract on Human Inner-arm for 24 h

시료	피 시험자수	판정결과				자극도
		++	+	±	-	
시험군	20	-	-	-	20	0
대조군	20	-	-	-	20	0

(판정기준)

- : 홍반이나 특이한 현상 없음

+ : 주위보다 현저히 붉어짐

± : 주위보다 약간 붉어짐

++ : 주위보다 심하게 붉어지고 부풀어 오름

(자극도 계산식) 자극도 = [(±) 수 \times 1]+((+)수 \times 2)+((++)수 \times 3)]/피시험자 수

Table 3. Repeated Insult Patch Test of Fermented *C. sinica* Extract on Human Inner-arm for 24 h. Ten to 21 Days after Application of the Final Induction Patch, Challenge Patches are Applied to Previously Unpatched Sites, Adjacent to the Original Induction Patch Sites. The Challenge Sites 24 ~ 72 h after Application 20

시료	피시험자수		유도단계							도전단계			자극도	
	20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24 h	48 h		72 h
시험군	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
대조군		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

(계산식) 자극도 = [(±)수 \times 1]+((+)수 \times 2)+ ((++)수 \times 3)]/피시험자 수

효성분인 resveratrol의 함량이 골담초 추출물에 비해 다소 증가함을 확인하였다. 그러나, 이러한 결과가 발효를 통한 resveratrol의 함량을 증가에 기인하는 것인지에 대한 기전 연구는 더 이루어져야 할 것으로 사료된다. 이러한 골담초 발효 추출물의 항산화 및 미백 효능과 더불어, 피부 자극 임상 실험 결과를 미루어 볼 때, 시료 첩포 부위에 피부 자극이 일어나지 않아 골담초 발효 추출물은 피부에 문제가 없는 것으로 확인되었다. 따라서, 골담초 발효 추출물의 경우 골담초 추출물에 비해 항산화, 멜라닌 생성 억제 효능이 우수하여 피부 노화 및 미백 효능 원료로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. M. Rieger, Intrinsic aging, *Cosmetics & toiletries*, **110**, 94 (1994).
2. E. A. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, and M. D. del Castillo, Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements, *Free Radic. Biol. Med.*, **18**(2), 153 (1995).
3. A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, and A. Ferro-Luzzi, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Radic. Biol. Med.*, **18**(1), 29 (1995).
4. C. Jimenez-Cervantes, F. Solano, T. Kobayashi, K. Urade, V. J. Hearing, J. A. Lozano, and J. C. Garcia-borron, A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1), *J. Biol. Chem.*, **269**, 17993 (1994).
5. V. J. Hearing, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *Proceeding of symposium of Soc. Invest. Dermatol.*, **4**(1), 24 (1999).
6. H. W. Kim, K. Y. Kim, B. J. Kim, S. Y. Chiang, Y. H. Do, N. L. NAM, H. W. Jeong, J. S. Choi, and S. I. Cho, Effects of alcoholic fermentation extracts from ovary and rind of pear on human skin, *Kor. J. Herbology*, **24**(1), 133 (2009).
7. J. H. Choi, H. M. Kim, Y. S. Song, S. G. Park, J. Kim, and C. K. Lee, Anti-aging effects saccharomyces fermented modified kyungohkgo extract on skin, *Kor. J. Herbology*, **22**(4), 219 (2007).
8. S. D. Lim, K. S. Kim, H. S. Kim, and Y. K. Park, A study on effect of medical herbs extract on the growth of lactic acid bacteria 2. effect of deachoo, goldamcho, jiwchang water extracts on the growth of lactic acid bacteria, *Korean J. Dairy Sci.*, **20**(1), 53 (1998).
9. Blois MS, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1190 (1958).
10. D. Y. Ma, H. F. Luo, and C. Q. Hu, Three Stilbene Tetramers from the Roots of *Caragana sinica*, *Chinese Journal of Chemistry*, **22**, 207 (2004).
11. S. T. Kim, K. S. Seo, Y. S. Chae, and S. C. Um, Arbutin, glycolic acid, kojic acid 및 pentadecenoic acid가 *in vitro* 및 *in vivo*에서 UVB 조사에 의한 색소형성에 미치는 영향, *Korean J. Dermatology*, **32**(6), 977 (1994).
12. Y. J. Lee, S. I. Yoon, D. D. Kim, and J. S. Kim, Structure-activity relationship of 2-substituted hydroquinones as tyrosinase inhibitors for topical delivery, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **36**(2), 103 (2006).
13. H. Shimogaki, Y. Tanaka, H. Tamai, and M. Masuda, *In vitro* and *in vivo* evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition, *International Journal of Cosmetic Science*, **22**, 291 (2000).
14. H. J. Kim, J. W. Lee, Y. I. Kim, and M. H. Lee, The effect of placental extract on the expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in SK30 melanoma cells, *Kor. J. Dermatol.*, **41**(12), 1612 (2003).
15. Y. Shimada, H. Tai, A. Tanaka, I. Ikezawa-Suzuki, K. Takagi, Y. Yoshida, and H. Yoshie, Effects of ascorbic acid on gingival melanin pigmentation *in vitro* and *in vivo*, *J. Periodontol.*, **80**, 317 (2009).
16. H. F. Luo, L. P. Zhang C. and Q. Hu, Five novel oligostilbenes from the roots of *Caragana sinica*, *Tetrahedron*, **57**(23), 4849 (2001).
17. C. S. Park, Antioxidative and nitrite scavenging abilities of medicinal plant extracts, *Korean J. Food Preserv.* **12**(6), 631 (2005).