

초임계 이산화탄소를 이용한 피트모스 추출물의 정제 및 생리활성 검증

김미향², 전명제¹, 박미라², 이승우¹, 황현정², 장혜지¹, 강민숙², 김보경², 최승태³, 박미연³, 이상현^{1*}

Purification of Peat Moss Extract Using a Supercritical CO₂ and Verification of Its Biological Activities

Mihyang Kim², Myong Je Jeon¹, Mira Park², Seung Woo Lee¹, Hyun-Jung Hwang², HyeJi Jang¹, Min Suk Kang², Bo Kyung Kim², Seung Tae Choi³, Mi Yeon Park³, and Sang-Hyeon Lee^{1*}

접수: 2011년 9월 26일 / 게재승인: 2011년 10월 24일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, the canadian peat moss extract was purified by a supercritical CO₂ using three different conditions and assessed its biological activities. Peat moss was extracted by acid-alkaline extraction method (sample 1) and purified by a supercritical CO₂ at 40°C under pressure of 100 bar (sample 2), 120 bar (sample 3) or 150 bar (sample 4). We evaluated the antioxidant activities of the samples by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging, Fe²⁺/ascorbate (FTC) and 2-thiobarbituric acid (TBA) methods. The antioxidant activities were examined by comparing the results with that of ascorbic acid as a positive control. Sample 3 showed relatively higher DPPH radical-scavenging activities than other samples. The antioxidant activity by FIC method exhibited similar results as the DPPH radical-scavenging activities. On the other hand, sample 2 showed higher antioxidant activity measured by TBA method of all. The whitening effects of the samples were examined using mushroom tyrosinase and B16F10 melanoma cells. Sample 3

exhibited overall significant whitening effects, however, other samples showed relatively lower effects. These results suggest that the peat moss extract purified by a supercritical CO₂ could be used as a cosmetic ingredient for the anti-aging and whitening effects.

Keywords: antioxidant activity, peat moss, supercritical CO₂, whitening effect

1. 서론

생체 내에서 생성되는 다양한 활성산소 (free radical oxygen)는 세포 생체막의 구성물질인 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 생체기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인질환을 유발하는 요인이라고 알려졌다 [1]. 최근에는 지질 과산화, 단백질 산화, DNA 산화, 멜라닌 생성, 결합 조직의 절단 및 비정상적인 교차결합 등의 원인으로 인한 피부노화와 성인질환의 원인이 생체 내에서 발생하는 활성산소에 의한 산화적 대사 부산물에 기인한다고 알려지고 있어 항산화제에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다 [2]. 활성산소를 제거하기 위해 지금까지 BHA 및 BHT 등의 합성 항산화제가 개발되어 식품과 화장품 등에 산화방지제로 많이 사용되어 왔으나, 안전성에 대한 논란으로 인해 허용대상 식품과 그 사용량이 엄격히 규제되고 있어 [3], 부작용을 최소화시키고 기능성을 극대화할 수 있는 천연소재의 개발이 필요하다.

급속한 산업화에 따른 환경오염으로 인해 오존층이 파괴

¹신라대학교 생명공학과

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5624, Fax: +82-51-999-5636
e-mail: slee@silla.ac.kr

²신라대학교 식품영양학과

²Department of Food and Nutrition, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

³(주)풀앤필바이오

³Food&Feel Bio Co., Busan, Korea

되어 자외선의 조사량이 증가하고 있다 [4]. 이로 인해 기미, 주근깨, 검버섯 등 피부갈변 또는 피부 스트레스가 유발되며, 이러한 색소침착은 멜라닌 색소의 증가가 원인이다. 멜라닌은 동·식물과 미생물계에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 천연 색소로 표피 기저층에 존재하는 melanocyte 내의 melanosome에서 합성된다 [5]. 멜라닌은 tyrosinase의 연속적 산화반응으로 생합성되며, tyrosinase는 polyphenol oxidase의 일종인 구리를 함유한 효소이다. L-Tyrosine은 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)으로 전환되고, L-DOPA는 phenylalanine-3,4-quinone으로 산화되며, 중간 대사산물을 거쳐 최종적으로 멜라닌이 합성된다 [6]. 그러므로 피부 미백과 관련된 기능성 화장품의 소재로 사용하기 위해서는 tyrosinase의 활성억제 여부가 중요하다 [7]. 현재까지 알려진 tyrosinase 저해제로는 hydroquinone, ascorbic acid, 4-hydroxyanisole, kojic acid, azelaic acid, arbutin, corticosteroids 등이 보고되었으나, 안전성 및 경제성 등의 문제점으로 사용이 제한되고 있다 [8-12]. 따라서, 최근 화장품 업계에서는 안전성을 고려하여 천연소재로부터 미백효과를 가지는 기능성 화장품 소재의 개발에 대한 요구가 높아지고 있다.

Peat moss는 강우량이 많고 연평균온도가 낮은 지역에서 수생식물 또는 물이끼가 산소가 불충분한 땅속에서 오랜 시간 동안 부분적으로 분해된 것으로 주로 캐나다와 북유럽 지역에서 많이 채취된다. Peat moss는 휴믹화가 충분히 진행된 고위이탄으로서 유기물 함량이 높아 주로 농업과 원예 분야의 비료 성분으로서 널리 활용되고 있는 물질이다 [13]. 휴믹물질 (humic substances)은 동식물 구성요소들의 분해과정에서 미생물의 작용으로 자연적으로 생성되는 유기 고분자 물질로서 토양과 지하수에 널리 분포하는 대표적인 자연유기 물질이다. 토양 휴믹물질은 토양에 존재하는 총 유기탄소 (TOC)의 약 70% 이상을 차지하여 토양의 형성과정 뿐만 아니라 탄소의 생물지구화학적 순환 과정에서 탄소 저장소로서의 역할을 한다 [14]. 휴믹물질은 다양한 천연 유기물들의 불균질 혼합체로서 pH에 의한 수용액에서의 용해도에 따라 휴믹산 (humic acid), 풀빅산 (fulvic acid) 및 휴민 (humins)으로 구분된다 [15]. 이 중에서도 풀빅산 (fulvic acid)은 물에 녹아있는 유기물로 수계에 녹아있는 미량의 중금속 이온들과 착화합 반응을 하여 중금속을 제거하거나 운송하는 물리·화학적 성질을 갖고 있다 [16].

풀빅산은 약 5,000년 전부터 중국과 인도에서 각종 질병을 치료하는 전통 약품으로 사용되어 왔다. 인도에서는 실라짓트 (Shilajit), 중국에서는 우진산, 일본에서는 후무스 엑기스 및 후루보산 등으로 알려져 있으며, 최근 선진국에서는 풀빅산을 천연 유기물질로서 건강식품, 화장품, 살균제 및 방부제 등으로 개발하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 하지만 국내에서의 풀빅산에 대한 연구는 토양 속의 중금속 오염에 관한 예방책으로서의 연구가 일부 진행되고 있으며, 생리활성 규명 및 제품 개발 등에 대한 연구는 미진한 실정이다.

본 연구에서는 풀빅산을 포함하고 있는 peat moss 추출 및 정제 시료를 이용하여 항산화활성, 멜라닌생성 억제활성 및 tyrosinase 저해활성 등을 검증하여 항산화 및 피부 미백 활성을 가진 기능성 화장품소재로의 활용 가능성을 검토하

고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료의 제조

실험에 사용한 시료는 캐나다산 피트모스를 산·염기 추출법 [17]을 이용하여 추출하여 산·염기 추출시료 (sample 1)를 제조하였고, 이를 100, 120 및 150 bar의 압력조건과 40°C의 온도에서의 초임계 이산화탄소 (C-SCO₂) 추출장치를 이용한 분리정제 과정을 거쳐, 각각 sample 2, 3, 4로 명명하였다. 각각의 시료들은 500 mM NaOH 용액을 사용하여 pH 7로 중화시킨 후 동결건조 장치 (FD5525-01, Ilshin Engineering Co., Korea)로 분말화하여 생리활성 검증을 위한 시료로 사용하였다.

2.2. DPPH 자유 라디칼 소거능 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA)은 methanol에 녹여 1.5×10^{-4} M/mL의 농도가 되게 제조하였다. 각각의 시료 4 mL와 DPPH 용액 1 mL을 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 L-ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였다. 각 시료의 항산화 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 검체의 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

2.3. Fe²⁺/ascorbate (FTC)법을 이용한 항산화 활성 측정

시료 4 mL에 2.51% linoleic acid 4.1 mL, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) buffer 8 mL, 증류수 3.9 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후, 40°C의 어두운 곳에서 항온 처리하여 과산화물을 유도시켰다. 이 혼합용액 0.1 mL에 75% ethanol 9.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL를 순서대로 첨가하고, 여기에 2×10^{-2} M ferrous chloride (3.5% HCl에 녹인 것)를 0.1 mL를 첨가한 후, 잘 혼합하여 정확히 3분후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 L-ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였다. 각 시료의 항산화 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 검체의 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

2.4. 2-Thiobarbituric acid (TBA)법을 이용한 항산화 활성 측정

시료 4 mL에 2.51% linoleic acid 4.1 mL, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) buffer 8 mL, 증류수 3.9 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후, 40°C의 어두운 곳에서 항온 처리하여 과산화물을 유도시켰다. 이 혼합용액 1 mL를 원심분리 튜브에 넣고 20% trichloroacetic acid (TCA) 2 mL와 1% 2-thiobarbituric acid (TBA) 2 mL를 첨가하여 혼합한 후, 열탕수조에서 10분간 가열처리하였다. 이를 흐르는 물에 냉각시킨 후 4°C, 3,000 xg에서 20분간 원심분리하고 상층액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 L-ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였다. 각 시료의 항산화 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 검체의 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

2.5. Mushroom tyrosinase 저해 활성 측정

50 mM Sodium phosphate (pH 6.8) buffer 155 μ L에 50 mM L-DOPA (Sigma, USA) 기질액 25 μ L와 검증시료용액 10 μ L를 첨가하고 잘 혼합한 후, mushroom tyrosinase (50 units/mL, Sigma, USA), 10 μ L를 첨가하고 25°C에서 2분간 반응시켜 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 kojic acid (Sigma, USA)와 arbutin (Sigma, USA)을 사용하였다.

2.6. 세포배양

본 연구에 사용된 생쥐의 B16F10 흑색종 (melanoma) 세포는 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. B16F10 세포를 10% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) 과 penicillin-streptomycin (100 units/mL, BioWhittaker)을 포함하는 DMEM (BioWhittaker) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

2.7. 멜라닌 생성 저해 활성 측정

배양된 B16F10 세포 (배지 2 mL)에 200 nM의 농도로 α -melanocyte stimulating hormone (MSH, Sigma, USA)를 처리하고 증류수에 녹인 시료 용액을 최종농도 0.1, 1, 10 및 100 μ g/mL가 되도록 처리한 후 48시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS) 2 mL로 2번 세척한 후, 다시 PBS 1 mL를 첨가하여 세포를 긁어내어 4°C, 1700 xg에서 5분간 원심분리하였다. 세포 침전물에 1 N NaOH (10% DMSO) 200 μ L를 첨가하여 현탁시킨 후, 96 well plate에 옮겨 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 kojic acid (Sigma, USA)와 arbutin (Sigma, USA)을 사용하였다.

2.8. 세포내 tyrosinase 저해 활성 측정

배양된 B16F10 세포 (배지 2 mL)에 200 nM의 농도로 α -MSH를 처리하고 증류수에 녹인 시료 용액을 최종농도 0.1, 1, 10 및 100 μ g/mL가 되도록 처리한 후 48시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 PBS 2 mL로 2번 세척한 후, 다시 PBS 1 mL를 첨가하여 세포를 긁어내어 4°C, 1700 xg에서 5분간 원심분리하였다. 세포 침전물에 lysis buffer (50 mM sodium phosphate (pH 6.8) buffer, 1% Triton X-100, 0.1 mM PMSF) 55 μ L를 첨가하여 세포를 용해시킨 후, 얼음에 30분간 방치하고 4°C, 1700 xg에서 5분간 원심분리하고 상층액을 회수하였다. 상층액 50 μ L에 50 mM sodium phosphate (pH 6.8) buffer 125 μ L와 기질용액인 50 mM L-DOPA (Sigma, USA) 25 μ L를 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 kojic acid (Sigma, USA)와 arbutin (Sigma, USA)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료의 제조

Peat moss로부터 산염기 추출법을 이용하여 추출한 산·염기

추출시료 (sample 1) 50 mL 및 초임계 이산화탄소 (C-SCO₂) 추출장치를 이용하여 분리정제 과정을 거친 각 시료 (sample 2~4) 50 mL를 NaOH로 중화시키고 동결건조한 결과, 각각 0.7 g, 0.6 g, 0.6 g 및 0.7 g의 분말시료를 획득하였다.

3.2. DPPH 자유 라디칼 소거능

피부는 외부 환경에 노출되어 있는 신체 기관으로서 자외선에 의한 영향을 직접 받는다. 자외선은 피부에 활성산소종을 유발시키고 그 결과 피부세포의 손상, 색소 침착을 증가시키게 되며 이는 직접적인 피부 노화로 이어진다 [18]. DPPH는 화합물 내 질소 중심의 라디칼로 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정한 구조의 라디칼로 존재한다. DPPH는 517 nm에서 최대 흡수를 나타내며, 환원되면 517 nm에서 흡수가 없어지므로 DPPH의 환원정도는 환원제의 환원력에 달려있다 [19].

Peat moss 추출 및 정제 시료의 항산화 활성을 검증하기 위하여 양성대조군인 L-ascorbic acid와 비교하여 DPPH의 수소 공여능을 측정하였다 (Table 1). 그 결과, sample 3의 IC₅₀ 값이 12.35 mg/mL로 가장 높은 라디칼 소거능을 나타냈으며, 다음으로 sample 4, 2, 1의 순으로 나타났다 (Table 1). Sample 3의 IC₅₀ 값은 양성 대조군인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값보다는 높은 수치를 나타냈으나, sample 1, 2 및 4에 비해 유의적으로 낮은 IC₅₀ 값을 나타내어 항산화 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

3.3. Fe²⁺/ascorbate (FTC)법을 이용한 항산화 활성

FTC법을 이용한 항산화 활성 측정에서 sample 3의 IC₅₀ 값이 23.72 mg/mL로 가장 높게 나타났으며, DPPH 자유 라디칼 소거능 측정의 결과 (Table 1)와 유사한 경향을 나타냈다 (Table 2). 또한, sample 3의 IC₅₀ 값은 양성 대조군인 L-ascorbic acid의 56.29 mg/mL 보다 낮게 나타났으며, sample 1 역시 IC₅₀ 값이 46.20 mg/mL로 양성 대조군인 L-ascorbic acid 보다 낮은 IC₅₀ 값을 나타내어, 항산화 활성

Table 1. DPPH radical-scavenging activities of the samples

Sample	IC ₅₀ (mg/mL)
Sample 1	16.61 ± 0.46 ^d
Sample 2	16.21 ± 0.17 ^d
Sample 3	12.35 ± 1.10 ^b
Sample 4	15.62 ± 0.05 ^c
L-Ascorbic acid	7.44 ± 1.14 ^a

Each value is expressed as mean ± SD. Values were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 2. Antioxidant activities of the samples by Fe²⁺/ascorbate (FTC) method

Sample	IC ₅₀ (mg/mL)
sample 1	46.20 ± 4.12 ^c
sample 2	68.46 ± 0.12 ^b
Sample 3	23.72 ± 2.01 ^d
Sample 4	107.00 ± 0.18 ^a
L-Ascorbic acid	56.29 ± 6.11 ^c

Each value is expressed as mean ± SD. Values were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

이 뛰어난 것으로 검토되었다 (Table 3). 생체 내에서 지질의 산화로 발생하는 과산화 생성물들은 우리 몸에서 암을 유발하거나 DNA를 손상시키기도 하며, 세포의 노화에도 관여를 하고 있는 것으로 알려져 있다 [20]. 이와 같은 지질의 산화를 억제하기 위하여 보편적으로 사용되고 있는 것이 항산화제를 이용하는 방법이므로, 피부 노화방지를 위한 미용소재로 화장품 등의 첨가제로 사용 가능할 것으로 기대된다.

3.4. 2-Thiobarbituric acid (TBA)법을 이용한 항산화 활성

지질의 과산화 정도를 측정하기 위한 알데히드류 측정법의 하나인 TBA 분석법은 다가불포화지방산의 산화로 2차적으로 생성된 carbonyl compounds 중 대표적인 MDA와 TBA가 반응한 결과로 나타나는 붉은색의 정도를 비색 정량하여 유지의 산패 정도를 측정하는 방법이다 [21].

TBA 분석법을 이용한 항산화 활성 측정 결과는 sample 2가 가장 높게 나타났으나, sample 3 및 4와 거의 비슷한 수치로 유의성은 나타나지 않았다 (Table 4). 한편 시료 모두에서 양성 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid 보다 낮은 IC₅₀ 값을 나타내어 (Table 3) 합성 항산화제를 대체할 수 있는 천연 항산화제로서의 활용 가능성을 확인하였다.

Table 3. Antioxidative activities of the samples by 2-thiobarbituric acid (TBA) method

Sample	IC50 (mg/mL)
Sample 1	10.35 ± 1.15 ^{ab}
Sample 2	7.97 ± 0.93 ^c
Sample 3	8.67 ± 0.56 ^{bc}
Sample 4	7.98 ± 1.23 ^{bc}
L-Ascorbic acid	10.85 ± 0.02 ^a

Each value is expressed as mean ± SD. Values were significantly different at *p* < 0.05 by Duncan's multiple range test.

3.5. Mushroom tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 저해

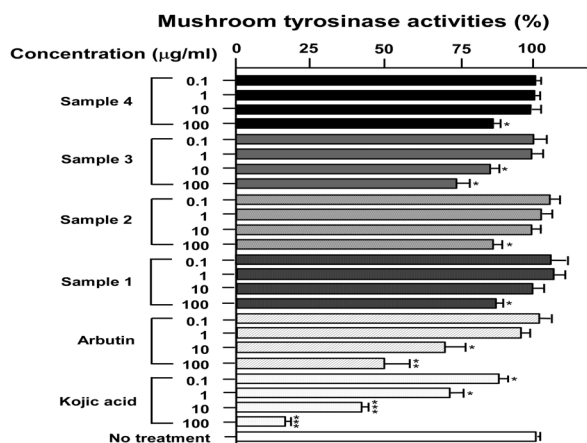


Fig. 1. Mushroom tyrosinase inhibitory activities of the samples. Means ± SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001 compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

활성은 mushroom tyrosinase를 효소원으로 하여 기질인 L-DOPA와의 반응으로 생성된 L-dopaquinone의 흡광도를 측정하였다 [22]. 측정 결과, sample 1~4 모두가 100 µg/mL의 농도에서는 음성 대조군에 비해 각각 16%, 16%, 27%, 16%의 효소활성을 유의적으로 억제하였고, sample 3의 경우는 10 µg/mL의 농도에서도 음성 대조군에 비해 16%의 효소활성을 유의적으로 억제하였다 (Fig. 1). 가장 높은 저해활성을 나타낸 sample 3은 10 µg/mL 농도에서 arbutin의 1 µg/mL 농도에서의 저해활성보다 높게 나타났다 (Fig. 1). Kim 등은 정공피 추출물의 100 µg/mL 농도에서 14.9% [23], Shin의 연구결과로 100 µg/mL에서 홍경천 (19%), 인삼 (13%), 갈근 (10%), 오미자 (20%), 연교 (19%), 홍화씨 (18%), 창출 (14%) 등이 mushroom tyrosinase에 대한 저해활성을 보여 본 연구결과와 유사하였다 [24].

3.6. 세포내 멜라닌 생성 저해 활성

B16F10 세포에 각 시료를 처리한 후, 멜라닌 생성 저해 활성을 측정한 결과, 100 µg/mL 농도에서는 sample 2와 3이 음성 대조군에 비해 멜라닌 생성을 각각 14%, 16% 저해하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 가장 높은 활성을 나타낸 sample 3은 100 µg/mL의 농도에서 양성 대조군인 arbutin 및 kojic acid의 1 µg/mL 농도에서의 활성보다 높은 활성이거나 유사한 활성을 나타냈고, arbutin 및 kojic acid의 10 µg/mL 농도에서의 활성보다 약간 낮은 활성을 나타냈다 (Fig. 2).

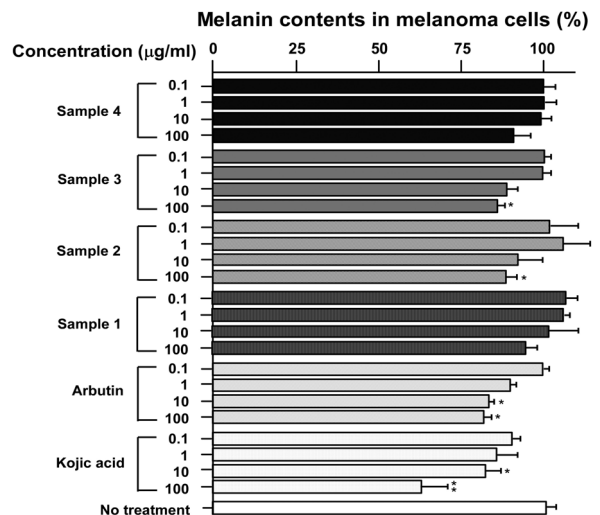


Fig. 2. Whitening effects of the samples in B16F10 cells. Means ± SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001 compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

3.7. 세포내 tyrosinase 저해 활성

B16F10 cell의 세포내 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과, sample 3의 경우는 100 µg/mL의 농도에서는 음성 대조군에 비해 35%의 저해 활성을 나타냈으며, 10 µg/mL의 농도에서도 30%의 저해활성을 나타내었다 (Fig. 3). Sample 3의 경우는 10 µg/mL의 농도에서는 kojic acid 및 arbutin의 1 µg/mL

의 농도에서의 활성보다 높은 저해 활성을 나타냈다 (Fig. 3). 한편, sample 1, 2, 4의 경우는 100 µg/mL의 농도에서만 통계적으로 유의하게 활성을 억제하는 결과를 나타냈다 (Fig. 3). Ha 등의 연구결과로 찔레 잎과 찔레 뿌리 에탄올 추출물이 100 µg/mL의 농도에서 각각 26%, 29%의 저해활성을 나타냈고 [25], Jeong 등의 우산고로쇠나무의 수피 추출물이 200 µg/mL의 농도에서 37%의 저해활성을 보인 연구결과와 유사한 결과를 나타냈다 [26].

피부는 자외선에 노출되면 tyrosine에서 출발하여 일련의 산화 중합 반응을 거쳐 생성된 melanin에 의해 기미, 노인성 홍반 등을 유발하며 피부 노화가 촉진된다. 이 과정에서 중요하게 작용하는 효소가 tyrosinase이며, tyrosinase 효소의 억제는 멜라닌 생성성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 sample 3은 tyrosinase 활성을 억제시킴으로서 피부 색소 침착 등을 방어할 수 있는 미백 기능성 화장품의 소재로 이용 가능할 것으로 기대된다 (Fig. 3).

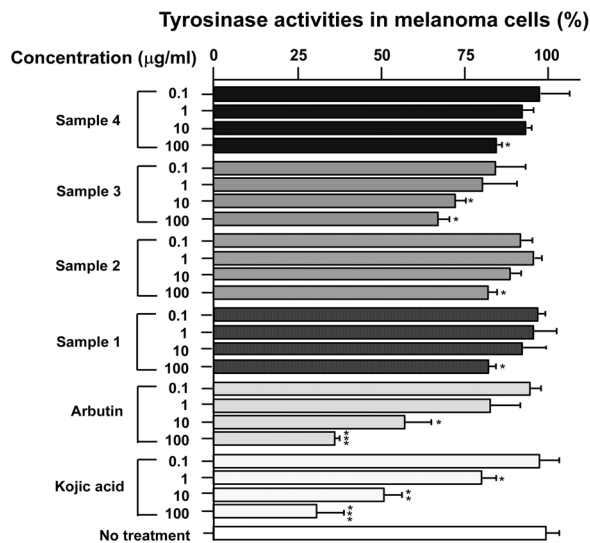


Fig. 3. Tyrosinase inhibitory activities of the samples in B16F10 cells. Means \pm SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

4. 결론

본 연구에서는 캐나다산 peat moss 추출물을 초임계 이산화탄소 추출장치를 이용하여 3가지의 다른 조건에서 정제하였고, 시료들의 생리활성을 검증하였다. Peat moss를 산-염기 추출법으로 추출하였고 (sample 1), 이를 초임계 이산화탄소 추출장치를 이용하여 40°C의 온도에서 압력을 각각 100 bar (sample 2), 120 bar (sample 3) 혹은 150 bar (sample 4)로 설정하여 정제하였다. 시료들의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능, Fe^{2+} /ascorbate (FTC) 법 및 2-thiobarbituric acid (TBA)법으로 측정하였다. 항산화 활성은 L-ascorbic acid를 양성 대조군으로 하여 수치를 비교

하여 나타냈다. Sample 3의 DPPH 라디칼 소거활성은 다른 시료들보다 비교적 높게 나타났다. FTC법으로 측정된 항산화 활성도 DPPH 라디칼 소거활성과 유사한 결과를 나타냈다. 한편, TBA법으로 측정된 항산화 활성의 경우는 sample 2가 높은 활성을 나타냈다. 시료들의 미백효과는 mushroom tyrosinase와 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 측정하였다. Sample 3은 전반적으로 유의적인 미백효과를 나타냈으나, 다른 시료들은 비교적 낮은 미백효과를 나타냈다. 이러한 결과들로 초임계 이산화탄소 추출장치를 이용하여 정제된 peat moss 추출물은 항노화 및 미백효과를 가진 화장품 첨가물로 사용이 가능할 것으로 기대된다.

References

- Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge, and C. E. Cross (1992) Free radicals, antioxidants and human disease. *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620.
- Wiseman, H. (1996) Dietary influences on membrane function; Important in protection against oxidative damage and disease. *J. Nutr. Biochem.* 7: 2-15.
- Choi, S. Y. and K. H. Yang (1992) Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Kor. J. Food Sci. Technol.* 12: 283-288.
- Yoo, Y. G., M. S. Joung, J. W. Choi, and J. H. Kim (2005) The study on the whitening effect of *Ephedra sinica* extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* 31: 153-159.
- Seo, S. Y. (2001) Screening of tyrosinase inhibitors from oriental herbs. *Kor. J. Plant Res.* 14: 32-37.
- Solano, F., S. Briganti, M. Picardo, and G. Ghanem (2006) Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res.* 19: 550-571.
- Han, J. Y., J. H. Sung, D. J. Kim, H. S. Jeong, and J. S. Lee (2008) Inhibitory effect of methanol extract and its fractions from grape seeds on mushroom tyrosinase. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 37: 1679-1683.
- Lee, H. B., S. Bai, and J. E. Chin (2005) Inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* 34: 1325-1329.
- Kwak, J. H., Y. H. Kim, H. R. Chang, C. W. Park, and Y. H. Han (2004) Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 437-440.
- Tomita, K., N. Oda, M. Kamel, T. Miyaki, and T. Oki (1990) A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics* 12: 1601-1605.
- Cabanes, J., S. Chazara, and C. F. Garcia (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 982-985.
- Jung, S. W., N. K. Lee, S. J. Kim, and D. Han (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 27: 891-896.
- MacCharthy, P. (1995) A proposal to establish a reference collection of humic materials from inter-laboratory comparisons. *Geoderma* 16: 179-181.
- Aiken, G. R., D. M. MaKnight, and R. L. Wershaw (1985) Humic substances in soil, sediment and water. pp. 1-12. *Geochemistry, isolation and characterization*, John Wiley and Sons, USA.

15. Campbell, C. D., M. Hird, D. G. Lumsdon, and J. C. Meeussen (2000) The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of *Escherichia coli*. *Chemosphere* 40: 319-325.
16. Christi, I., C. J. Milne, D. G. Kinniburgh, and R. Kretzschmar (2001) Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 2. Metal binding. *Environ. Sci. Technol.* 35: 2512-2517.
17. Lee, C. H., H. S. Shin, and K. H. Kang (2004) Chemical and spectroscopic Characterization of Peat moss and its different humic fraction (humin, humic acid and fulvic acid). *J. KoSSGE* 9: 42-51.
18. Wendel, A. and S. Feuerstein (1981) Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. Pharmacol.* 30: 2513-2530.
19. Lee, S. M. (2011) Effects of *Angelica gigantis* herbal acupuncture extracts on the elastase activity and DPPH and NO scavenging activities. *Thesis*, University of Daegu Haany, Daegu, Korea.
20. Keun, J. J. (1993) The study for antioxidation activity and polyphenol contents of Korean sweet potatoes. *Thesis*, University of Uiduk, Gueongju, Korea.
21. Park, G. B., T. S. Shin, J. S. Kim, and S. K. Jin (1993) Changes in total moisture, TBA, soluble protein and minerals of ham cured with replaced levels of sodium chloride. *Kor. J. Animal Sci.* 35: 145-150.
22. Lee, H. S., H. J. Cho, K. W. Lee, S. S. Park, H. C. Seo, and H. J. Suh (2010) Antioxidant activities and melanogenesis inhibitory effects of *Terminalia chebula* in B16/F10 melanoma cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 15: 213-220.
23. Kim, T. K., J. K. You, J. M. Kim, J. M. Baek, H. S. Kim, J. H. Park, and M. Choe (2010) Antioxidant and whitening effects of *Sorbus commixta* HEDL cortex extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1418-1424.
24. Shin, J. Y. (2001) Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Kor. J. Food Nutr.* 14: 568-572.
25. Ha, S. E., H. D. Kim, J. K. Park, Y. O. Chung, H. J. Kim, and N. B. Park (2009) Melanogenesis inhibition effect of *Rosa multiflora* extracts in B16 melanoma cells. *Kor. J. Plant Res.* 22: 317-322.
26. Jeong, M. H., S. S. Kim, J. S. Kim, H. J. Lee, G. P. Choi, and H. Y. Lee (2010) Skin whitening and skin immune activities of different parts of *Acer mono* and *Acer okamotoanum*. *J. Kor. For. Soc.* 99: 470-478.