

## 노루궁뎅이버섯 균사체를 이용한 2차 발효달팽이 추출물의 항노화 활성에 관한 연구

조춘구<sup>†</sup> · 이민희

<sup>†</sup>1 숭실대학교 공과대학 화학공학과  
(2016년 2월 14일 접수; 2016년 3월 8일 수정; 2016년 3월 23일 채택)

### A Study on the Activity of Anti-Aging by Second Fermented Snail Extract with *Hericium erinaceum Mycelium*

<sup>†</sup>Zhoh Choon-Koo · Lee Min-Hee

<sup>†</sup>1 Dept. of Chemical Engineering, Soongsil University,  
369, Sangdo-ro, Dongjak-ku, Seoul Capital City, 06978, Republic of Korea  
(Received February 14, 2015; Revised March 8, 2016; Accepted March 23, 2016)

**요약** : 본 연구는 달팽이육질을 2차 발효공정을 통하여 얻어진 추출물을 개발하여, 피부미용학적 항노화 활성에 관한 것이다. 1차 발효물을 얻기 위하여 노루궁뎅이버섯균사체로 배양하였으며, 2차 유산균 발효공정을 통하여 2차 발효달팽이 추출물을 얻는 과정에 대하여 상세히 기술하였다. 이 연구에 적용된 균사체는 노루궁뎅이버섯균사체 (*Hericium erinaceum Mycelium*)와 유산균 (*Leuconostoc mesenteroides*) 발효균을 사용하여 추출하였다. 추출물의 최종 수율은 62wt%이었다. 2차 발효된 달팽이 추출물의 수분 32wt%, 아미노산 단백질류 31.5wt%, 다당체 15.7wt%, 지방산 12.3wt%, 기타성분이 8.5wt%가 함유하였다. 또한 피부미용학적 이론과 피부의 항노화에 관여하는지를 알아보기 위하여 DPPH에 의한 항산화 활성, 엘라스틴의 효소(elastase)감소효과, tyrosinase 저해율, fibroblast의 성장율, 콜라겐합성률에 대하여 평가한 결과를 하기와 같이 보고한다. 첫째; 2차 발효달팽이 추출물의 항산화 효과(DPPH, IC50%)는 7.27 mg/mL로, 비교군인 녹차추출물 11.8 mg/mL, 일반달팽이추출물 15.7 mg/mL, DL-a-토코페롤 9.25 mg/mL가 소요되었다. 둘째; 2차발효달팽이추출물의 엘라스틴 효소(elastase)의 발현억제능(IC50%)은 32.5 mg/mL로 비교군인 녹차추출물 45.9 mg/mL, 일반 달팽이추출물 67.7 mg/mL가 소요되었다. 셋째; 2차 발효달팽이 추출물의 tyrosinase의 발현억제능(IC50%)은 140.3 mg/mL로 비교군인 녹차추출물 250.7 mg/mL, 일반달팽이추출물 389.5 mg/mL, 니아신아마이드 125.9 mg/mL가 소요되었다. 넷째; 2차 발효달팽이 추출물의 fibroblast의 성장률은 125.6%로 비교군인 녹차추출물 98.9%, 일반 달팽이추출물 109.5%, DL-a-토코페롤 96.2%의 활성력을 보였다. 다섯째; 2차 발효달팽이 추출물의 collagen생합성률은 118%로 비교군인 녹차추출물 87.3%, 일반달팽이추출물 93.2%, 아데노신 127.9%의 성장률을 보였다. 결론적으로 이 연구를 바탕으로 하여 미래에는 피부미용학적 활용과 더불어 한국적 스킨케어 화장품 개발에 응용이 가능할 것으로 기대한다.

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: ckzhoh@ssu.ac.kr)

주제어 : 달팽이, 발효, 항노화, 항산화, 추출물, 화장품

**Abstract** : This study is related to develop a snail extract through a snail secondary fermentation process, getting anti-aging activity with healthy and beauty skin care scientific applications. In order to obtain a primary fermentation was incubated with *Hericium erinaceus mycelium*. Through the secondary fermentation process using *Leuconostoc mesenteroides*, was deeply described a total process of obtaining second fermented extract using snail body. Mycelium is applied in this study was extracted using *Hericium erinaceus mycelium* and *Leuconostoc mesenteroides*. The final yield of the extract was 62 wt%. Experimental results of secondary fermentation snail extract were contained with 32 wt% water, 31.5 wt% total amino acid protein, 15.7 wt% polysaccharide, 12.3 wt% fatty acid and others 8.5 wt%. In addition, in order to study about skin beauty care and anti-aging activity, we evaluated antioxidant activity with DPPH, elastin enzyme (elastase) inhibitory activity, tyrosinase inhibition rate, collagen synthetic function, fibroblast synthetic activity. First; anti-oxidative activity of secondary fermentation snail extract (IC50%) was spent with 7.27 mg/mL, control samples were spent with green tea extract was 11.8 mg/mL, common snails extract was 15.7 mg/mL, DL-a-tocopherol was 9.25 mg/mL respectively. Second; elastin enzyme inhibitory activity of secondary fermentation snail extract (IC50%) was spent with 32.5 mg/mL, control samples were also spent with green tea extract was 45.9 mg/mL, general snail extract was 67.7 mg/mL. Third; tyrosinase inhibitory activity of secondary fermentation snail extract (IC50%) was spent with 140.3 mg/mL, control samples were also spent with green tea extract was 250.7 mg/mL, general snails extract was 389.5 mg/mL, niacineamide was 125.9 mg/mL. Forth; fibroblast synthetic activity of secondary fermentation snail extract was increased with 125.6%, control samples were also spent with green tea extract was 98.9%, general snails extract was 109.5%, niacineamide was 125.9 mg/mL, DL-a-tocopherol was 96.2%. Fifth; collagen synthetic activity of secondary fermentation snail extract was increased with 118%, control samples were also spent with green tea extract was 87.3%, general snails extract was 93.2%, adenosine was 127.9%.

In conclusion, on the basis of this study, in the future it is expected to be applied to the skin beauty care application and development of Korean style cosmetic products.

*Keywords* : snail, fermentation, anti-aging, anti-oxidation, extract, cosmetics

## 1. 서론

고령화 인구가 증가하면서 건강한 생활과 더불어 웰빙(well-being)사회로 발전되어 피부노화를 예방하고 피부미용에 대한 관심도 급격히 증가하고 있다[1]. 노화에 따른 신체 변화는 다양한 현상으로 나타나지만, 피부노화(Skin aging)는 외관으로 관찰이 편리하여 더욱 많은 사람들이 관심을 갖고 있다[1,2]. 노화는 생체에 필요한 면역체계와 생체를 구성하는 단백질들의 생합성에 증감에 따라 발생하는 내인성 노화(intrinsic aging)와, 외부로부터의 영향, 오염물질과 자외선에 의한 광노화, 멜라닌 색소의 증가, 주름증가, 피부건조성,

탄력감소, 기미, 주근깨, 김버섯 등이 생성되는 외인성 노화(extrinsic aging)로 나뉘어진다[1~3].

피부노화의 대표적 요인은 주름, 탄력의 감소와 멜라닌 생성에 의한 광노화이다. 주름은 특히 이마, 눈 부근의 미간, 입 주위의 팔자주름 등의 안면이나 두피, 목덜미, 손발 등의 여러 신체 부위에 생기며 20대 중반부터 발생하여 나이가 들어감에 따라 그 수와 깊이, 범위가 넓어진다[1,2,4]. 피부주름은 각질층 수분량의 저하, 각질층의 두께, 표피의 일그러짐, 진피의 교원섬유와 탄력섬유의 변성 등에 의해 피부구조의 변화를 유발시켜 탄력성이나 신축성이 저하됨에 따라 발생한다고 밝히고 있다[5]. 주름에 기인한 피부노

화는 장기간에 걸쳐 일어나고 미세하게 축적되기 때문에 평상 시 피부가 받고 있는 자극을 막기 위하여 꾸준한 관리와 주의가 요구된다. 이로 인해 피부관리에 도움을 줄 수 있는 기능성화장품의 요구가 증가하여 다양한 원료가 함유된 주름 개선화장품이 개발되고 있는 추세이다[6~8].

최근, 달팽이 점액성분을 함유한 화장품이 인기를 끌고 있다. 현재 시중에 판매중인 달팽이 추출물은 달팽이의 점액질 추출물로 다양한 효과를 가지는 화장품들이 많이 상품화되고 있다[9]. 일각에서는 고보습 소재로 각광받는 달팽이 점액이 기존에 보습 소재로 널리 사용되는 하이알루론산에 비해 얼마나 효과적으로 피부 보습을 향상시켜 아토피 피부염으로 손상된 피부장벽을 회복하는지를 평가하기도 하였다[3,10]. 한편, 달팽이는 특유의 끈적한 점액질인 뮤신(mucin)의 신비한 효과가 알려지며 화장품 원료로 각광을 받고 있다. 특히 뮤신의 주성분인 ‘콘드로이친설페이트’는 피부 세포를 젊게 만들고 세포재생인자를 자극하여 탄력성 매끄럽고 윤기를 증가시키며 가려움이나 진정효과를 가지는 것으로 알려졌다. 건조해지는 토양과 유해물질에 의한 오염 등 외부 환경으로부터 달팽이가 자신의 몸체를 보호할 수 있는 것도 바로 뮤신때문인 것으로 밝혀졌다[10,11]. 식품산업의 경우 달팽이 요리가 발달한 유럽미주지역에서는 달팽이 사육사들이 상처가 있는 피부에 점액질을 발라, 빠르게 치료되고 손이 유난히 부드러워지는 점에 착안, 일찌감치 달팽이 화장품을 개발해왔다[5,8,12].

따라서 본 연구는 달팽이육질을 2차 발효공정을 통하여 얻어진 추출물을 개발하여, 피부미용학적 항노화 활성에 대하여 연구하였다. 1차 발효물을 얻기 위하여 노루궁뎅이버섯균사체(*Hericium erinaceum Mycelium*)로 배양하였으며, 유산균(*Leuconostoc mesenteroides*) 발효균으로 2차 발효공정을 통하여 달팽이 발효추출물을 얻는 과정에 대하여 상세하게 기술하였다. 2차 발효달팽이 추출물의 피부미용학적인 연구로써 DPPH에 의한 항산화 활성, 엘라스틴의 효소감소효과, tyrosinase 저해율, fibroblast의 성장율, 콜라겐 합성률에 대하여 평가한 결과를 보고한다. 이 연구를 바탕으로 하여 미래에는 피부미용학적 활용과 더불어 한국적 스킨케어 화장료 개발에 응용이 가능하도록 하였다.

## 2. 재료 및 실험방법

### 2.1. 재료

달팽이의 주재료는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 바이오부텍에서 2년간 사육한 것을 사용하였다. 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceum*; 이하HE) 균사체는 충북농업기술원(Chungbuk, Korea) 으로부터 분양 받아 potato dextrose agar (PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C, 10일간 배양한 후 4°C에 보존하면서 4주마다 계대배양하여 사용하였다. 2차 배양은 유산균의 일종인 *Leuconostoc mesenteroides* (Cosys-Bio, Korea) 로부터 받아서 사용하였다. 영양물질로 설탕(CJ생활건강, 한국)을 사용하였다. 그 밖의 항산화 활성을 평가하기 위해 사용된 시약은 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, USA; DPPH)의 원료를 사용하였고, 각질층의 피부세포의 활성을 측정하기 위하여 human fibroblast를 사용하여 합성물을 시험하였다. 본 연구에 사용된 모든 시약은 식품, 의약품 및 화장품용 등급을 별도의 정제 없이 그대로 사용하였다.



Fig. 1. Photograph of snail (*Fruticiola sieboldiana*).

### 2.2. 기기

달팽이의 육질을 HE균사체에 배양하기 위하여 온도와 습도가 조절되는 BOD 인큐베이터(동서과학, 한국)를 사용하였고, 저온멸균기 (HP-5012T, 한신메디칼, 한국), 원심분리기 (CD-810, 동림과학, 한국)를 사용하여 추출 정제하였다. 고체배양기는 한성테크의 100Kg용 장비를 사용하였다. BOD배양기 (GBI-150, 글로브 박스 코리아, 한국)를 사용하여 배양하는데 사용하였다. 진탕배양기(SI-4100R, 제오텍, 한국)는 통상 사용하고 있는 장비를 그대로 사용하였다. 추출을 위하여 사용된 기기는 Homomixer(HY-0001A, 한양기계, 한국)와 디스퍼믹서 (Disper mixer, HY-110,

한성ENG, 한국)를 사용하였다. 항산화 활성의 측정을 위하여 UV분광광도기(Hidachi F-450, 동진과학, 일본)를 사용하였고 pH meter는 동림과학의 기기를 사용하였다.

## 2.3. 달팽이 2차발효 추출물의 제조방법

### 2.3.1 달팽이1차 발효물의 제조방법

1차 달팽이발효물의 제조방법은 Fig. 2에 상세하게 나타내었다. 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceum*, HE) 균사체는 충북농업기술원(Chungbuk, Korea)으로부터 분양 받아 potato dextrose agar (PDA, Difco, Detroit, MI, USA) 사면배지에서 25°C, 10일간 배양한 후 4°C에 보존하면서 4주마다 계대배양 하여 사용하였다. 1차 발효물의 제조방법은 우선 100g의 달팽이육질을 깨끗하게 씻은 다음, 120°C에서 2시간동안 멸균하였다. 여기에 10g의 HE를 넣어 혼합하여, 20~30°C에서 30일간 고체상태배양(solid-state culture)하였다. 이

렇게 하면 달팽이의 육질로부터 흰색의 버섯이 발생된다. 잔류물을 건어내고 60~70°C로 12시간 동안 건조하여 1차 조제물을 획득하였다[13].

### 2.3.2 달팽이2차 발효물의 제조방법

2단계 발효를 위하여, 1차 발효한 조제물에 1L 배의 증류수를 넣고, 10%(v/v)의 유산균(*Leuconostoc mesenteroides*)을 균사체가 배양된 배지와 혼합한다. 이것을 BOD배양기를 사용하여 25~40°C에서 5일 동안 2차 발효(최종 pH 4.0)시켰다. 이것을 120°C에서 10분간 멸균한 후에 30°C이하로 냉각하였다. 잔류물을 제거하고 400meh의 여과장치로 여과하여 2차 발효물을 얻었다. 이렇게 하여 얻은 추출물을 얇은 항색의 액체이었으며, 이것을 더 농축시키기 위하여 증류장치를 사용하여 수분을 제거하여 최종추출물을 얻었다[14]. 1차 발효와 2차 발효과정을 통하여 달팽이의 육질을 분해하여 생성되는 물질을 피부 미용학적으로 응용하기 위함이다.

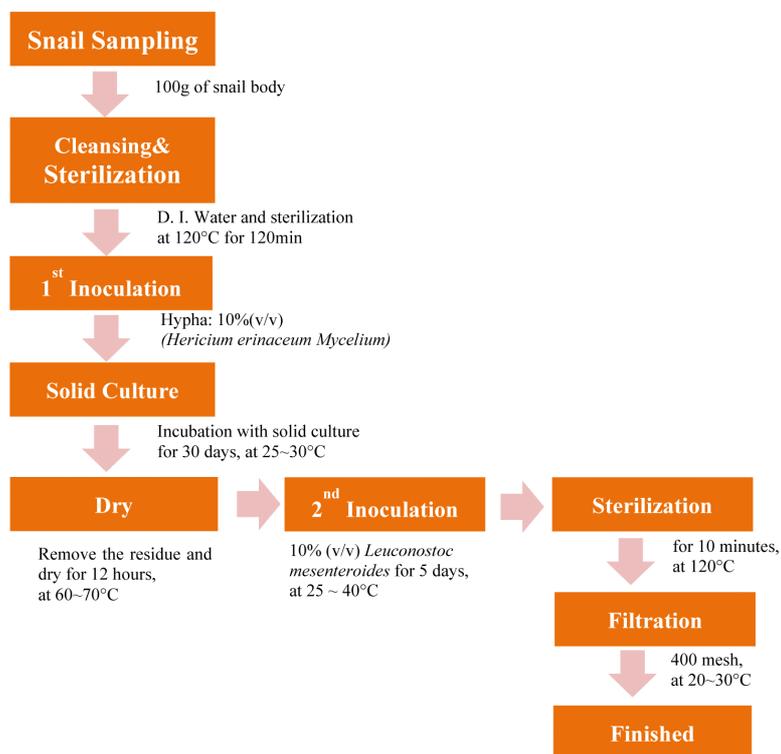


Fig. 2. Manufacturing method of 2<sup>nd</sup> fermenting extract of snail body; first fermentation: *Hericium erinaceum Mycelium*, second fermentation; *Leuconostoc mesenteroides*.

본 연구에 사용된 비교군(control)은 녹차추출물과 용매추출공법의 일반달팽이추출이며 가능한 실험오차를 줄이기 위하여 동일한 양을 기준으로 하였다. 추출방법은 에탄올 30%수용액에 추출원물을 담아 40~50℃에 15rpm으로 4시간 동안 담가 두었다가, 400mesh로 여과한 다음, 증류기로 물과 알코올을 증류하여 남은 여액을 시료로 하여 사용하였다.

#### 2.4. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

DPPH법은 시료의 라디칼 소거 능력을 통하여 항산화활성을 확인할 수 있는 실험법으로서, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자 이동 통하여 시료의 환원력을 측정한다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 1 mL에 에탄올 1 mL를 100 µg/mL농도의 2차 발효추출물 1 mL 첨가하여 섞은 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨 다음 UV spectrophotometer를 이용하여 519 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 녹차추출물과 용매추출하여 얻은 일반달팽이추출물과 DL- $\alpha$ -tocopherol을 사용하였고, 기기의 캘레브레이션을 잡기 위한 공시험(blank)은 DPPH를 첨가하지 않고, 측정하여 시료의 영향을 보정하여 측정에 임했다. 자유라디칼의 소거력은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 소요되는 시료의 농도를 가지고 비교하여 측정하였다[15].

#### 2.5. 엘라스틴 분해효소(Elastase)의 활성 저해력 측정

2차 발효달팽이 추출물의 엘라스틴 분해효소 저해력은 이전에 보고된 방법에 의하여 측정하였다[3]. 돼지의 췌장 엘라스틴 분해 효소 (porcine pancreatic elastase; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)의 활성은 기질로써 N-Suc-(Ala)<sub>3</sub>-nitroanilide를 사용하였고, 측정파장은 410 nm에서 p-nitroanilin의 방출량을 측정하였다. 먼저 5 mM N-Suc-(Ala)<sub>3</sub>-nitroanilide를 포함하는 200 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)와 10 µg/mL elastase를 혼합하고, 2차발효 달팽이추출물을 최종농도 각각 10, 20, 50, 100, 500 µg/mL가 되도록 혼합하여 25℃에서 10 min 동안 반응시켰다. 그 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비교군은 실험의 오차를 줄이기 위하여 동일한 양을 기준으로 하였으며, 녹차추출물과 용매추출공

법의 일반달팽이추출물을 선정하여 엘라스테이즈의 발현 억제율을 측정하였다. 효능평가는 50% 저해 농도(50% inhibitory concentration, IC50)는 dose-response curves에 의해 산출하였고 비교군도 같은 방법으로 산출하여 활성도를 측정하였다[16].

저해율(%) =

$$\left[ \frac{(\text{OD}_{\text{Control}} - \text{OD}_{\text{Sample}})}{\text{OD}_{\text{Control}}} \right] \times 100$$

#### 2.6. Mushroom Tyrosinase 저해 활성 측정

화장품산업에서 미백효과를 측정하는 척도로서 tyrosinase는 멜라닌 생성과정에서 중요한 효소로 tyrosinase의 활성을 저해하는지의 여부에 따라 화이트닝 효과를 측정하고 있다. L-Tyrosine (0.3 mg/mL) 1 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 2 mL, 시료 0.1 mL 및 tyrosinase 용액(1,250 unit/mL) 0.1 mL 혼합한 후 37℃에서 10 분 동안 배양한 다음, 반응 혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 478 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-tyrosine을 첨가하지 않은 것을 공시험으로 하여 효소활성 저해를 측정하였다[17].

#### 2.7. Fibroblast 성장률 측정

세포를 2x10<sup>6</sup> cells/well 농도로 6-well plate에 접종한 후, 각 well에 오미자 발효물을 1~5 µg/mL의 농도로 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 배양한 다음 TNF- $\alpha$ 를 10 ng/mL의 농도로 첨가하였다. 이렇게 처리된 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였다. Gross B. E. 등의 방법에 따라 matrix metalloproteinase-1 biotrack activity assay kit (Amersham Bioscience)을 이용하여 plate reader로 흡광도를 측정하고 표준곡선을 통해 계산식을 구하여 세포 배양액 내 MMP-1 활성을 수치화하였다[18].

#### 2.8. 콜라겐의 생합성 측정

섬유아세포 2.5 × 10<sup>3</sup>개를 96 black well plate에 well마다 2차발효달팽이추출물을 접종한 후 24 시간 후 10분, 30 분 동안 광처리를 하고, 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 배양 후, 배양액을 모아서 실험에 사용하였다. Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA kit (Takara Bio, Japan)을 각 well에 첨가하여 3 시간 반응시킨 뒤, 사용법에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하

여 프로펩타이드의 양을 측정하였다[19].

## 2.9. 통계처리

본 연구에 사용된 모든 결과는 합리적인 결과 분석을 위하여 엑셀 Student t-test를 통하여 검정하였고, 신뢰구간 95%이상의 범위에서 유의성이 있는지 여부를 판단하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 피부미용산업에서의 달팽이 발효추출물의 특징

달팽이 화장품은 달팽이의 점액질이 피부에 우수한 보습효과가 있는 것으로부터 사용되기 시작하였다. 특히 점액질에는 뮤신이라는 성분인 것으로 밝혀졌고, 여러 가지의 화장품에 사용하기 위하여 단순한 용매추출법을 이용하여 사용하고 있는 것이 대부분이다. 본 연구에 사용된 달팽이는 복종류의 연체동물 가운데 나선형의 껍질을 가진 동물을 말한다. 크기는 10~20cm의 크기의 성체를 사용하였으며, 2단계 발효과정을 통하여 육질에 함유된 콜라겐이나 단백질을 발효과정을 거쳐서 분해공정을 통하여 화장품 용도로 측정하기 위함이다. 달팽이육질을 사용하여 1차 발효물은 노루궁뎅이버섯 균사체를, 2차 발효물은 유산균 발효공정을 적용한 것이 차별 점이라 할 수 있다. 본 연구를 통하여 보다 높은 효능을 가지는 피부미용학적 바이오 발효화장품을 개발하여 한국적인 화장품을 발전시키기 위함이다. 높은 효능으로써 고보습작용, 피부개선효과, 항산화작용, 피부탄력에 영향을 주는 인자인 엘라스테이즈의 발현억제효과에 관여하는지의 여부를 평가하고,

콜라겐의 생합성률을 측정함으로써 효능을 극대화할 수 있도록 하였다. 아울러 tyrosinase억제효과를 측정하였다. 스킨토너, 로션, 에센스, 크림의 보습작용으로 상용되고 있는데, 이번 연구에서는 마스크시트에 활용하여 부착성이 우수한 작용으로 상품화하기 위함이 주목적이라 할 수 있다.

### 3.2. 달팽이 2차 발효추출물의 개발 및 물성

2차 발효추출공법을 적용하는 목적은 우선 화장품 시장에서 달팽이 화장품을 이용한 제품이 크게 인기를 얻고 있고 있으나, 그 효능이 검증된 소재는 그다지 없는 실정이다. 따라서 더욱 진보된 발효기술이 응용된 새로운 높은 효능을 가진 발효달팽이추출물을 개발하는 것이고, 이를 사용하여 피부미용분야에 공업화하는 것이다. 발효과정을 적용한 이유는 달팽이육질을 분해하여 아미노산, 단백질 펩타이드류의 영양성분을 고 효율적으로 얻기 위함이며, 피부과학적인 효능을 높이기 위하여 발효기술을 도입하였다.

특히 노루궁뎅이버섯 균사체를 선정한 이유는 식용가능 하도록 하기 위함이며, 달팽이 발효에 대한 연구가 그다지 많지 않기 때문에 선정하였다. 2차 발효에 사용된 유산균인 *Leuconostoc mesenteroides*은 한국적 김치문화에 착안하여 편리하게 사용할 수 있는 것이 그 이유이다. 2차 발효공정을 통하여 얻어진 발효액은 Table 1에 정리하여 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이, 100g의 달팽이육질을 이용하여 1차 발효한 후 잔류물을 제거한 획득 물은 대략 70g이었으며, 이를 유산균에 접종하여 일정량 수분을 증발한 2차로 얻은 최종 발효물을 62wt%의 수율을 획득하였다. 2차 발효된 달팽이추출물의 수분 32wt%, 아미노산 단백질류 31.5wt%, 다당체

Table 1. Total Compositions of the Second Fermented Snail Extract: Origin 100g Snail Body by Fermenting Reaction

Major Ingredients	Total content (wt%)	Remarks
Yield	62.0	Finished sample
Water content	32.0	Carl fish method
Total amino acid proteins	31.5	HPLC
Total fatty acids	12.3	
Total sucrose	15.7	
Others	8.5	

15.7wt%, 지방산 12.3wt%, 기타성분이 8.5wt%가 함유하였다. 특별히 총아미노산계의 성분이 가장 많이 획득되었는데 그 이유는 아마도 발효물의 특성상 2차 발효를 하였기 때문인 것으로 예측하고 있다. 한편 총 다당체류가 많이 획득되었는데 이것은 1차 발효물의 첨가제로 슈가형 물질이 혼합되어 다당체형태로 분해된 결과로 고찰하였다. 이 연구에서는 2차 발효공정을 통한 발효물을 얻기 위함이 핵심 연구로 잡았기 때문에 1차 발효물로만 추출한 경우에는 특별히 검토하지 않았음을 밝혀둔다.

2차 발효공정을 통하여 얻어진 획득 물에 대하여 물성 및 시험 결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 외관은 혼탁한 옅은 노란색의 점액상이었으며, 특이한 발효된 고유 취를 가지고 있었다. pH는 3.8으로 산도가 높았다. 비중은 1.01 g/mol로 정제수에 비하여 약간 높은 정도였다. 수분을 제외한 나머지의 증발잔량은 7.8wt%로 많은 양의 유효성분을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 그 밖의 중금속과 미생물들은 검출되지 않았고, 미용학적인 성능시험을 위하여 미생물의 감염상태는 양호하였다. 특별히 산도가 아주 낮은 산성으로 된 이유는 김치 유산균을 사용하여 발효과정 중 다양한 효소의 생성에 의하여 낮은 pH로 전환된 것으로 고찰하였다. 비중은 다당체와 단백질류가 많이 생성되었기 때문인 것으로 예측하고 있다.

따라서 이 발효물의 원액을 가지고 여러 가지 효능에 대하여 평가하였으며, 대조군은 녹차추출물과 시중에 판매되고 있는 일반용매추출물 공법의 하여 만들어진 달팽이 추출물을 가지고 평

가하였다.

### 3.3. DPPH 시험을 이용한 항산화 효과

항산화 작용에 대하여 가장 많이 사용되고 있는 것이 DPPH법이다. 일반적으로 활성산소에는 하이드록실 라디칼( $\cdot\text{OH}$ )과 수퍼옥사이드 음이온 라디칼( $\text{O}_2\cdot^-$ )와 같은 산화되기 쉬운 라디칼 종이 있다. 이 라디칼은 홀수 전자를 가지고 있어 에너지가 높고 불안정한 상태로 존재하여 다른 물질과의 높은 반응성을 가지고 있기 때문에 생체 내에서도 연쇄적인 산화반응을 일으킴에 따라 세포와 조직들에게 큰 손상을 일으킬 수 있다. 연쇄 라디칼 반응에 의하여 과산화지질과 피부노화를 가속화시키는 주요원인으로 알려져 있다. 이러한 항산화제의 라디칼의 소거력을 통해 확인할 수 있다. 이 실험에서는 2단계 발효 달팽이추출물의 라디칼 소거력을 DPPH 라디칼을 이용하여 측정하였다. Fig. 3은 2단계 발효 달팽이추출물, 비교군으로 녹차추출물과 일반적인 달팽이추출물 그리고 대표적으로 알려진 DL- $\alpha$ -tocopherol을 비교군으로 하여 항산화 활성을 측정하였다. 이 연구에서는 DPPH라디칼이 50%감소될 때의 각 추출물이 사용된 양으로 시험하였다. 이렇게 하여 얻어진 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 2차 발효달팽이 추출물은 7.27mg/mL이었으며, 일반용매추출로 얻어진 일반 달팽이추출물은 15.7 mg/mL로 2차 발효달팽이 추출물이 약 2배이상 적게 사용되는 것으로 보아, 항산화 활성이 2배이상 높다고 할 수 있다.

Table 2. Experimental Results of Compositions of the Second Fermented Snail Extract: Origin 100g Snail Body by Fermenting Reaction

Major Ingredients	Total content (wt %)	Result
Appearance	Hazy yellowish liquid	Standard
Odor	Odorless or specific order	Standard
pH	3.5 ~ 4.5	3.8
Specific gravity	0.995 ~ 1.050	1.010
Evaporative Residue	4.0 ~ 10.0	7.8
Purity		
Heavy metal (Pb)	Max 20ppm	None
Heavy metal (As)	Max. 2ppm	None
Biological result	Max. 100cfu/mL	None

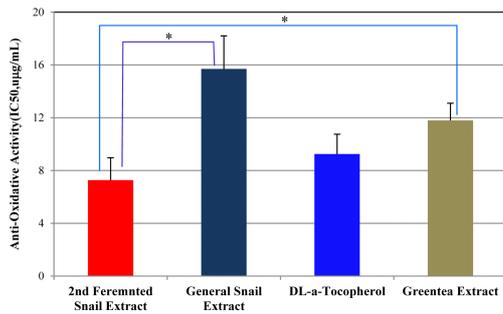


Fig. 3. Anti-oxidative activity of 2<sup>nd</sup> fermented snail extract. This data is indicated as the concentration required for 50% scavenging of free radical. \* Statistical significance compared 2<sup>nd</sup> fermented snail extract with general snail extract, DL-a-tocopherol, green tea extract;  $P < 0.05$ .

한편, 항산화 효과 IC50에 사용된 비교군의 대표성분인 DL-a-토코페롤은 9.25 mg/mL, 녹차 추출물은 11.8 mg/mL의 추출물이 소모한 것으로 나타났다. 이것은 시료를 동일한 농도로 추출한 용액에 있어서 동일한 농도로 시험하였을 때, 2차 발효달팽이 추출물이 엑셀 student t-test의 유의차 검정결과 2가지의 비교군에서  $p < 0.05$ 보다 작은 값이었으므로, 95%의 범위에서 유의차 있는 효능을 가진 것으로 해석하였다. 대표적인 DL-a-토코페롤은 2차 발효 달팽이 추출물과 유의차는 없는 것으로 나타나 효능의 차이를 보이지 않았다.

### 3.4. 엘라스틴 분해 효소(Elastase)의 저해 활성도

피부의 항노화 작용에 있어서 엘라스틴의 분해 효소의 저해작용은 피부의 탄력을 유지시켜주는 데 중요한 인자이기 때문에 화장품의 원료소재를 발굴하는데 중요한 지표자료로 많이 활용되고 있다. 엘라스틴은 2차 발효달팽이 추출물의 엘라스틴 분해효소 저해력에 대한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 2차 발효달팽이 추출물의 첨가한 경우 엘라스틴 분해하여 효소의 50%까지 저해하는 농도(IC50)를 측정하여 활성도를 수치화하여 나타내었다. IC50까지 감소하는 농도는 2차 발효달팽이 추출물 32.5 µg/mL로 나타났고, 대조군인 녹차추출물의 50% 저해농도는 45.9 µg/mL이

소모되었다. 용매추출에 의한 일반 달팽이 추출물의 50% 저해농도는 67.7 µg/mL이 소모되었다. 이결과로 볼 때 녹차추출물, 일반 달팽이 추출물은 2차 발효달팽이 추출물보다 낮은 엘라스테이즈의 발현억제력을 보였다. 따라서 2차 발효달팽이 추출물은 녹차추출물보다 약 29%의 효과를 보였으며, 일반달팽이 추출물 보다는 2배이상 우수한 감소효과를 보였다고 할 수 있다. 이러한 현상은 일반용매추출법에서 추출되는 아미노산계의 성분들이, 2차 발효에 의하여 얻어지는 달팽이추출물에서 많은 양이 얻어지기 때문인 것으로 고찰할 수 있었다. 이는 발효물에서 얻어지는 복합적인 성분에 의하여 나타나기 때문에 정확한 요인은 좀 더 세부적으로 연구할 가치가 있다고 사료된다. 따라서 2차발효달팽이추출물의 엘라스틴 분해효소에 대한 활성은 일반달팽이추출물과 녹차추출물보다 통계적으로 유의차 있는 결과 ( $p < 0.05$ )를 얻을 수 있었으며, 이 결과를 바탕으로 피부의 탄력도를 개선하는데 기여할 것으로 사료된다.

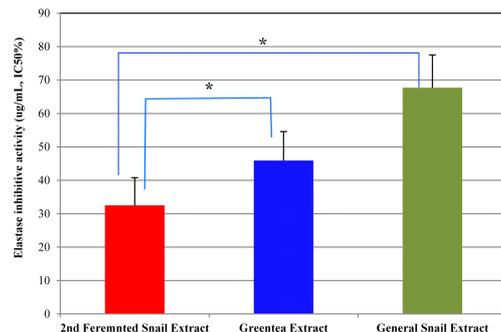


Fig. 4. Elastase-inhibitory activity of 2<sup>nd</sup> fermented snail extract. This data is indicated as the concentration required for 50% inhibitory concentration of elastase action. \* Statistical significance compared 2<sup>nd</sup> fermented snail extract with general snail extract, Green tea extract;  $P < 0.05$ .

### 3.5. Tyrosinase 저해 활성

피부의 색소침착은 자기를 방어하기 위하여 태양의 자외선, 활성산소로부터 발생된 멜라닌 생성에 의해 피부가 검게 나타난다. Tyrosinase라는 효소는 멜라닌 생성에서 가장 중요한 효소로서

기질인 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로, DOPA는 DOPA-quinone으로 그리고 DHI (dihydroxyindole)을 산화시켜 최종적으로 eumelanin을 생성하여 피부에 색소를 침착시킨다. 이 방법을 통하여 피부미용분야에서는 피부가 깨끗한지의 화이트닝 효과를 측정하고 있다. Tyrosinase의 활성을 저해하는 것은 멜라닌 생성을 억제하는데 있어 매우 중요하다. 2차 발효달팽이 추출물의 tyrosinase 저해활성 (IC50)은 140.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다 (Fig. 5). 비교군으로 사용한 녹차추출물은 250.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 일반달팽이추출물은 389.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 소요되었다. 2차 발효달팽이 추출물은 녹차추출물과 일반 달팽이추출물보다 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 우수한 tyrosinase의 활성을 억제하고 있는데 이는 2차 발효를 통하여 얻어지는 성분이 활성에 관여하는 것으로 고찰하였다. 또한, 미백화장료의 대표성분을 별도로 시험하였는데, 나이아신아마이드의 tyrosinase 저해활성 (IC50)은 125.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 유의차는 없었으며 그다지 높은 활성은 보이지 않았다. 피부미용학에서 화이트닝 소재가 실제 임상시험에서는 높은 효과를 보이고 있으나, *in-vitro* 시험에서는 효과가 높지 않은 것을 많이 볼 수 있다. 따라서 2차 발효달팽이 추출물의 다양한 효과는 보다 폭넓게 연구되어야 할 것으로 사료된다.

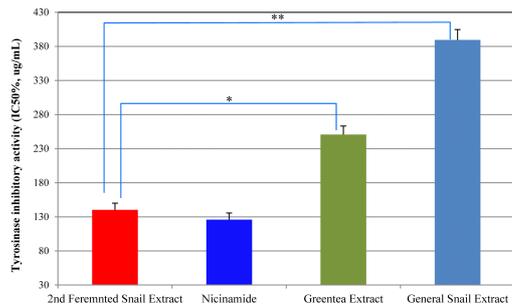


Fig. 5. Tyrosinase inhibitory activity of 2<sup>nd</sup> fermented snail extract. This data is indicated as the concentration required for 50% inhibitory concentration of elastase action. \* Statistical significance compared 2<sup>nd</sup> fermented snail extract with niacinamide, general snail extract, green tea extract;  $P < 0.05$ .

### 3.6. 파이프로그래스트(Fibroblast) 성장률

피부섬유아세포의 성장률 평가에 따라 피부의 표피와 진피를 연결해 주는 주름개선에 관여하는 중요한 인자임으로 대표적으로 많이 평가하는 시험항목이다. 2차 발효 달팽이 추출물의 파이프로그래스트의 성장률은 125.6%로 통상 100%를 기준으로 했을 때 25.6%의 높은 성장률을 보였다. 비교군으로 사용한 DL-a-tocopherol은 96.2%, 녹차추출물은 98.9%, 일반달팽이추출물은 109.5%로 파이프로그래스트 세포가 성장하였다. 특히 2차 발효 달팽이 추출물이 일반 달팽이추출물보다 유의차 있는 성장률을 보이고 있는데, 이는 2단계 발효과정을 통하여 달팽이보디에 존재하는 단백질류가 분해되어 아미노산, 당의 폴리사카라이드, 펩타이드로 변화되어 나타나는 것이라 고찰하였다 (Fig. 6,  $p < 0.05$ ). 녹차 추출물과 DL-a-tocopherol은 파이프로그래스트 성장시키는 데는 영향을 주지 못했으나, 감소하지 않는 것으로 보아 세포의 독성에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

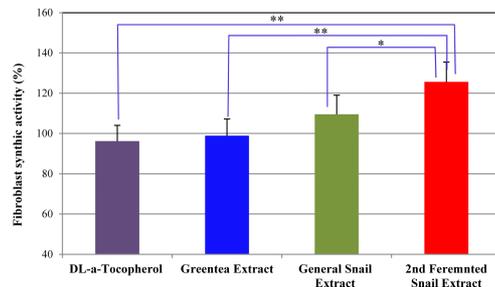


Fig. 6. Fibroblast synthetic activity of 2<sup>nd</sup> fermented snail extract. This data is indicated as the concentration required for 50% inhibitory concentration of elastase action. \* Statistical significance compared 2<sup>nd</sup> fermented snail extract with DL-a-tocopherol, general snail extract, green tea extract;  $P < 0.05$ .

### 3.7. 콜라겐 생합성능

피부섬유아세포에 2차 발효달팽이 추출물을 처리하여 배양한 후 type 1 프로콜라겐 생합성량을 조사한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같다. 2차 발효달팽이 추출물의 Type 1 프로콜라겐 생합성량이 118%이었다. 대조군(control)인 녹차추출물은 87.3%, 일반 달팽이추출물은 93.2%이었다.

주름개선에 도움을 주는 이미 알려진 성분인 아데노신의 콜라겐생합성은 127.9%로 2차 발효달팽이 추출물 보다 높은 수준의 생합성 능력이 있는 것으로 나타났다 (Fig. 7,  $p < 0.05$ ). 한편 비교군인 녹차추출물과 일반달팽이추출물은 100%를 기준으로 하여 생합성량이 약간 낮아지는 현상을 보였다. 따라서 2차 발효달팽이 추출물은 2개의 비교군 보다 유의성 있게 콜라겐 생합성량이 우수하다는 것을 알 수 있었다.

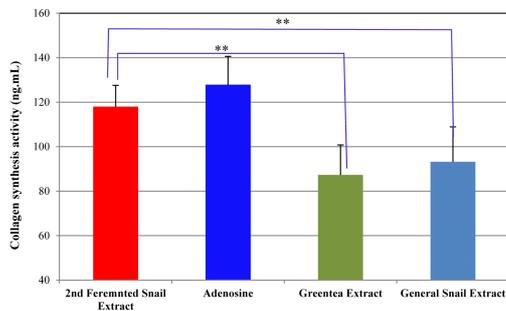


Fig. 7. Collagen synthesis activity of 2<sup>nd</sup> fermented snail extract. This data is indicated as the concentration required for 50% inhibitory concentration of elastase action. \* Statistical significance compared 2<sup>nd</sup> fermented snail extract with general snail extract, green tea extract, adenosine;  $P < 0.05$ .

프로콜라겐은 amino의 말단기와 carboxyl기의 말단에 프로펩티드라는 펩티드 염기서열과 함께, 기능을 소포체 내에서 프로콜라겐 분자의 folding을 행상시켜 콜라겐 중합이 일어나 콜라겐분자로부터 절단되고 분리된다는 보고가 있으며, 이 과정에서 분리된 프로펩타이드의 양을 측정함으로써, 세포 내에서의 콜라겐 생합성력을 파악할 수 있다.

2차 발효달팽이추출물을 이용하여 콜라겐 생합성력을 측정한 연구자들은 아직까지 없으며, 일반용매추출법으로 얻어진 달팽이 추출물의 콜라겐 생합성능이 있는 것으로 보고하고 있다. 따라서 본 실험에서 2차 발효달팽이추출물이 type-1 프로콜라겐 생합성을 대조군보다 더 증가시켰으며, 이에 대한 연구가 심도 있게 더 진행되어야 할 것으로 생각된다

#### 4. 결론

본 연구는 달팽이육질을 2차 발효공정을 통하여 얻어진 추출물을 개발하여, 피부미용학적 항노화 활성에 관하여 연구하였다. 1차 발효물을 얻기 위하여 노루궁뎅이버섯균사체로 배양하였으며, 유산균 발효공법으로 2차 발효공정을 통하여 최종 달팽이2차발효추출물을 얻는 과정에 대하여 상세하게 기술하였다. 1차 발효물은 노루궁뎅이버섯균사체 (*Hericium erinaceum Mycelium*)로 배양하였으며, 2차 발효물은 유산균 (*Leuconostoc mesenteroides*) 발효균으로 하여 2단계 발효과정을 거쳐서 추출하였다. 최종수율은 62%이었다. 2차 발효달팽이 추출물의 수분 32wt%, 아미노산 단백질류 31.5wt%, 다당체 15.7wt%, 지방산 12.3wt%, 기타성분이 8.5wt%가 함유하였다. 또한 피부미용학적 이론과 피부의 항노화에 관여하는지를 알아보기 위하여 DPPH에 의한 항산화 활성, 엘라스틴의 효소(elastase)감소효과, tyrosinase저해율, fibroblast의 성장율, 콜라겐합성률에 대하여 평가한 결과를 하기와 같이 보고한다.

첫째; 2차발효달팽이 추출물의 항노화 효과 (IC50%)는 7.27 mg/mL로 비교군인 녹차추출물 11.8 mg/mL, 일반달팽이추출물 15.7 mg/mL, DL-a-토코페롤 9.25 mg/mL가 소요되었다.

둘째; 2차발효달팽이추출물의 엘라스틴 효소 (elastase)의 발현억제능(IC50%)은 32.5 mg/mL로 비교군인 녹차추출물 45.9 mg/mL, 일반달팽이추출물 67.7 mg/mL가 소요되었다.

셋째; 2차발효달팽이추출물의 tyrosinase의 발현억제능(IC50%)은 140.3 mg/mL로 비교군인 녹차추출물 250.7 mg/mL, 일반달팽이추출물 389.5 mg/mL, 니아신아마이드 125.9 mg/mL가 소요되었다.

넷째; 2차발효달팽이추출물의 fibroblast의 성장률은 125.6%로 비교군인 녹차추출물 98.9%, 일반달팽이추출물 109.5%, DL-a-토코페롤 96.2%의 활성력을 보였다.

다섯째; 2차발효달팽이추출물의 collagen 생합성률은 118%로 비교군인 녹차추출물 87.3%, 일반달팽이추출물 93.2%, 아데노신 127.9%의 성장률을 보였다.

따라서, 이 연구를 바탕으로 하여 미래에는 피부미용학적 활용과 더불어 한국적 스킨케어 화장품 개발 및 2차 발효달팽이 추출물을 사용한 고

기능성의 한국적 마스크시트의 개발에 응용이 가능할 것으로 기대하고 있다.

### References

1. J. H. Sung, J. Y. Shin, H. Kim, G. H. Baik, K.W. Yu, J. Y. Yeon, and J. S. Lee, Anti-obesity and anti-hyperlipidemic activities of fermented coffee with *Monascusruber* mycelium by solid-state culture of green coffee beans, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **43**(3), 341~348 (2014).
2. H. Kim, J. H. Jeong, J. Y. Shin, D. G. Kim, K.W. Yu, Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of mulberry (*morusalba*) leaves fermented with *Hericiumerinaceum* mycelium by solid-state culture, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**(9), 1333-1339 (2011).
3. J. H. Cho, G. H. Choi, I. J. Park, S. O. Baik, H. H. Kim, C. S. Kim, Development of functional food materials from *acanthopanax senticosus*-fermented mushroom mycelia, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **43**(3), 411-418 (2014).
4. C. K. Park, H. Kim, Q. Tu, K.W. Yu, H.S. Jeong, H. Y. Lee, J. H. Jeong, Chemical composition and immunostimulating activity of the fermented Korean ginseng (*panax ginseng* C.A. meyer) with mushroom mycelium by solid culture, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **38**(9), 1145-1152 (2009).
5. H. Kim, K. S. Ra, J. H. Hwang and K. W. Yu, Immune enhancement of *Hericiumerinaceum* mycelium cultured in submerged medium supplemented with ginseng extract, *Korean J. Food & Nutr.* **25**(4), 737~746 (2012).
6. J. H. Lee, J. I. Kim, H. J. Choi, and J. H. Lee, Anti-wrinkle effect of *Schizandra chinensis baillon* fermented with *Lactobacillus plantarum*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **40**(4), 365-371 (2014).
7. J. H. Jang, K. H. Noh, J. N. Choi, K. S. Jin, J. H. Shin, J. H. On, C. W. Cho, W. S. Jeong, M.J. Kim, and Y.S. Song, Effect of *hericium erinaceus* mycelia supplementation on the oxidative stress and inflammation processes stimulated by LPS and their mechanisms in BALB/C mice, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**(2), 227-236 (2010).
8. S. K. Choi, K. D. Park, D. A. Kim, D. W. Lee, and Y. J. Kim, Preparation of camel milk liposome and its anti-aging effects, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**(2), 155-161 (2014).
9. A. M. Parfitt, L. S. Simon, A. R. Villanueva, and S.M. Krane, Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase, *J. Bone Miner. Res.*, **2**, 427 (1987).
10. I. Y. Kim, C. K. Zhoh, S. R. Han, Y. B. Bang, R.Y. Li, Anti-oxidative activity and moisturizing effect of fermented puer tea extract, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **30**(2), 272~279 (2013).
11. H. J. Choi, C. T. Kim, M. Y. Do, M. J. Rang, Physiological activities of *Cudrania tricuspidata* extracts on the skin, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **32**(2), 260~274 (2015).
12. J. H. Kim, J. Y. Shin, S. J. Hwang, Y. S. Kim, Effect of *Halophilic bacterium, Haloarcula vallismortis*, extract on UV-induced skin change, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(4), 341-350 (2015).
13. B. Gross and C. Lapiere, Collagenolytic activity in amphibian tissue a tissue culture assay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1197 (1962).
14. J. Y. Moon, E. Y. Yim, G. P. Song, N. H. Lee, and C. G. Hyun, Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju island plants, *EurAsia J. BioSci.*, **4**, 41 (2010).

15. T. S. Thring, P. Hili, and D. P. Naughton, Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants, *BMC Complement, Altern.Med.*, **9**, 27 (2009).
16. M. J. Lee, N. H.N. Jeong, Preparation and availability analysis of collagen peptides obtained in fish scale, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **26**(4) 457~466 (2009).
17. S. J. Joo, H. S. Kim, J. K. Lee, M. H. Lee, I. Y. Kim, Effectiveness and preparation of nano-emulsion of a rapeseed oil extract originated from Jeju with PIT emulsifying system, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, 29(3) 486~494 (2012).
18. J. H. Kim, Y. J. Ahn, S. N. Park, Anti-oxidative activity of secerinega suffruticosa extract, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **26**(3) 269~278 (2009).
19. D. S. Kim, M. E. Park, So. Y. Yoo, Stabilization of lactobacillus with double matrix capsulation, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **30**(4) 656~663(2013).