Journal of the Korea Convergence Society
Vol. 10. No. 2, pp. 285-292, 2019
ISSN 2233-4890
https://doi.org/10.15207/JKCS.2019.10.2.285

자연삼 발효 추출물의 미백 활성에 대한 연구

이효성
서원대학교 제약식품공학부 교수

Skin lightening effect of fermented *Panax ginseng* extract

Hyosung Lee
Assistant Professor, School of Food and Pharmaceutical Science & Engineering, Seowon University

요 약 인삼은 다양한 약리학적 활성을 나타내며 이러한 활성은 사포닌에 기인한 것으로 알려져 있다. 사포닌 중 주사포닌이 분해된 부사포닌이 주사포닌보다 높은 활성을 나타내며 부사포닌의 함량은 발효를 통하여 증가시킬 수 있다. 본 연구에서는 인삼의 발효 추출물의 미백 활성을 측정하여 화장품 원료로서의 개발 가능성을 타진하고자 하였다. 자연삼을 발효하고 추출물을 제조하였고 멜라닌 합성효소에 대한 저해 활성과 세포 내 멜라닌 합성 억제능을 평가하였다. 아울러 세포독성을 측정하여 안전성을 평가하였고 임상시험을 통하여 자외선에 의한 색소침착 억제능을 평가하였다. 기존 미백 원료인 Kojic acid나 Arbutin과 비교하여 자연삼 발효 추출물은 멜라닌 합성 억제능이 더 높은 것으로 측정되었고 세포 독성도 낮게 나타났으며 임상평가를 통하여 자외선에 의한 색소침착도 억제하는 것으로 나타났다. 본 연구는 천연물의 세포생물학과 임상학적 융합연구이며 이를 통하여 개발된 자연삼 발효 추출물은 안전하며 우수한 미백효과를 가지는 미백 화장품 원료로 평가된다.

주제어 : 자연삼 발효 추출물, 미백활성, 멜라닌 합성 억제, 색소침착 억제, 천연물의 세포생물학과 임상학적 융합연구

Abstract *Panax ginseng* is known for various pharmacological activities mainly due to saponins. Since minor saponins, generated by the decomposition of major saponins, generally exert higher activities than major saponins, the fermentation may increase the minor saponin contents in ginseng products. In this study, we tested fermented ginseng extract whether or not provide a safe cosmetic ingredient for whitening purpose. In this regard, fermented Ginseng extract was prepared and evaluated the inhibitory activity toward tyrosinase and the melanin synthesis suppression. The safety was tested via cell viability and toxicity test. The skin lightening effect was also evaluated by clinical study. The fermented Ginseng extract exerted higher activities in tyrosine inhibition and in suppressing melanin synthesis compared to Kojic acid and arbutin. In the clinical test, skin lightening effecte of the sample was clearly higher than vehicle or Vitamin C. We thus concluded that the fermented Ginseng extract may provide a safe cosmetic ingredient for skin lightening purpose.

Key Words : fermented ginseng extract, Skin lightening, melanin synthesis, pigmentation

1. 서론

피부의 멜라닌세포에서 생성되는 멜라닌은 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 갖는 페놀계 고분자 물질로서, 태양으로부터 조사되는 자외선을 차단하여 진피 이하의 피부기관을 보호해주는 동시에 피부 생체 내에 생겨난 자유 라디칼 등을 잡아주는 등 피부 내 단백질과 유전자들을 보호해주는 유용한 역할을 담당한다. 피부 내에 생성된 멜라닌(Melanin)은 피부 각질화를 통해서 외부로 배출되기 전까지는 없어지지 않는 안정한 물질이다 [1]. 그러나 멜라닌이 필요 이상으로 많이 생성되면 기미나 주근깨, 점 등과 같은 과색소 침착을 유발하여 미용상

*Corresponding Author : Hyosung Lee(hyosunglee@ymail.com)
Received December 21, 2018 Revised February 7, 2019
Accepted February 20, 2019 Published February 28, 2019

바람직하지 않은 결과를 야기한다.

현재까지의 멜라닌 과생성 및 침착 저해를 통한 피부 미백 및 피부암 예방을 위한 연구의 대부분이 tyrosinase의 활성 저해에 초점을 맞추고 있다. 현재까지 개발된 tyrosinase 활성 저해제로는 tyrosinase 활성자리의 구리 이온에 대한 킬레이트 형성 물질인 퀴논류를 페놀류로 환원시키는 비타민C나 누룩산(Kojic acid) 등의 환원제, 그리고 글루타치온(glutathione) 등이 알려져 있다[2].

하이드로퀴논(hydroquinone)은 대표적인 미백제로 사용되지만 tyrosinase에 대해 강한 저해 효과를 나타내는 반면 멜라닌 세포의 변성 또는 치사를 유발하는 등 세포 독성으로 인한 피부자극이나 피부염증을 유발하므로 그 이용이 제한적이고 누룩산(Kojic acid)과 알부틴(Arbutin)은 강한 미백효과를 가지고 있음에도 불구하고 세포독성과 돌연변이 유발 가능성이 있는 등 안전성 문제와 더불어 활성이 낮거나 피부 투과성이 좋지 않은 등 사용에 어려움이 있는 것으로 보고되었다[3,4]. 따라서 피부에 직접 사용하는 화장품의 특성상 화장료 조성물로서 안전성에 문제가 없으면서 피부 투과성이 좋은 미백용 화장료 조성물이 요구되고 있다.

인삼(*Panax ginseng C. A. Meyer*)은 오가피과(Araliaceae) 인삼속(Panax) 식물에 속하는 다년생 반음지성 숙근초로서 다양한 약리학적 활성을 나타내며 이러한 활성은 사포닌에 기인한 것으로 알려져 있다[5]. 사포닌 중 주사포닌이 분해된 부사포닌이 주사포닌보다 높은 활성을 나타내는 것으로 보고되었는데[6] 특히 발효를 통하여 부사포닌의 함량을 더 높일 수 있는 것으로 알려져 있다[7].

본 연구에서는 미백 화장품의 수요가 높아질 것으로 예상되는 가운데[8] 현재 사용되는 미백 화장품 원료가 가지는 독성 문제를 해결하고자 천연물이며 식품으로서 그 안전성이 이미 검증된 자연삼(*Panax ginseng*)의 발효 추출물을 활용하여 인체에 안전하면서도 우수한 미백 효과를 가지는 미백 화장품 원료를 개발하고자 하였다.

2. 방법

2.1 원료 제조

지리산에서 재배된 2년생 자연삼을 수확하고 뿌리를 채취하여 세척 건조한 후 파쇄하고 70% 에탄올(Duksan, Korea)로 65 ℃에서 4 시간 동안 추출하였고 이 추출 혼합물을 50 ℃에서 감압 농축하였다. 이 추출 농축물에 Lactobacillus plantarum MRS 배양액을 10대1의 부피비로 혼합하여 접종하고 4 ℃에서 100 일 동안 발효하였다. 발효액을 5μm 필터를 이용하여 여과하고 고형분 함량이 10%가 되도록 감압농축한 후 사포닌을 용출하기 위해 95% 에탄올(Duksan, Korea)로 희석하고 상온에서 2시간 동안 교반하고 5μm 필터로 여과한 후 감압 농축하였다. 이 농축물을 40% 부틸렌글리콜(Samchun, Korea)로 1대1로 희석하고 감압농축한 후 95% 에탄올로 희석하고 다시 감압 농축한 후 동결 건조하여 분말 형태의 추출물을 제조하였다[9].

2.2 Mushroom tyrosinase (mTyr) 활성 억제능

0.175 M sodium phosphate buffer (*p*H 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine, Sigma -aldrich, USA)를 녹인 기질(tyrosine, Sigma-aldrich, USA) 0.2 mL 용액 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL을 첨가하여 25 ℃에서 2 분 간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome의 양을 475 nm에서의 흡광도를 이용하여 측정하였고 Kojic acid (20000 ppm, Sigma-aldrich, USA)를 양성대조물질로 사용하였다[10].

2.3 Human tyrosinase (hTyr) 활성 억제능

human epidermic melanoma 세포(HEMa, ATCC, USA)를 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Hyclon, USA) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum, Hyclon, USA)를 첨가한 배양액으로 37 ℃ CO_2 조건에서 배양하였다. 배양된 세포에 lysis buffer를 100 μL를 첨가하고 얼음 속에 정치하여 세포를 파괴하고 세포를 수집하여 초음파 파쇄한 후 1 시간 동안 정치하고 13,000 rpm으로 20 분 동안 원심 분리하여 얻어진 상등액을 human tyrosinase 효소 용액으로 사용하였다. 이것을 67 mM sodium phosphate buffer (*p*H 6.8)에 녹인 8 mM의 L-DOPA 120 μL와 시료 용액 40 μL를 96 well plate에 분주한 후 67 mM phosphate buffer에 녹인 효소 용액 40 μL를 첨가하여 37 ℃에서 30 분 동안 배양한 후 생성된 DOPA chrome의 양을 475 nm에서의 흡광도를 이용하여 측정하였고 Kojic acid (20000 ppm)를 양성대조물질로 사용하였다[11].

2.4 세포 내 멜라닌 생합성 억제능

HEDa 세포를 DMEM 배지에 10% FBS를 첨가한 배양액으로 37 ℃ CO_2 조건에서 배양한 후 6-well plate에 7.5×10^4 cells/well로 분주하여 16 시간동안 배양한 후 멜라닌 생성을 유도하기 위하여 Glycyrrhizin (Sigma-aldrich, USA)를 처리하고 배양하면서 시료와 양성대조군을 3 일 동안 처리하였다. 배양된 세포를 1 mL의 5% trichloroacetic acid (Sigma- aldrich, USA)로 처리하고 2,500 rpm으로 2회 원심분리하여 melanin을 분리한 후 이를 0.175 M sodium phosphate buffer (*p*H 6.8) 1 mL로 세척한 뒤 ether:ethanol (1:3) 1 mL를 처리하여 2회 원심 분리하고 ether 1mL로 세척하고 건조하였다. 건조된 melanin에 1 N NaOH를 1 mL 가하여 80 ℃에서 1 시간 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였고 arbutin (50 ppm, Sigma-aldrich, USA)을 양성 대조물질로 사용하였다[12].

2.5 세포 생존력 평가

세포의 생존력은 RAW264.7 세포에서 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)법으로 측정하였다. 세포를 15% FBS를 포함한 MEM 배지 (ThermoFisher Scientific, USA)에 현탁한 후 96 well plate (SPL, Korea)에 2×10^4 cells/well 의 세포수가 되도록 분주하여 37 ℃, 5% CO_2 배양기에서 12 시간 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 처리하고 8 시간 동안 반응시킨 후 배양액을 제거 하고 0.5 mg/mL의 MTT (Sigma-aldrich, USA)를 각 well에 넣고 37 ℃ 배양기에서 2 시간 배양한 후 상등액을 제거 하고, DMSO를 100 μL씩 분주하여 충분히 섞은 후 micro plate reader (SpectraMax, Molecular Devices Corp, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[12].

2.6 세포 독성

시료 처리에 따른 세포의 손상 정도를 RAW264.7 세포를 이용하여 LDH (lactate dehydrogenase)법으로 측정하였다. LDH assay kit (Biovision, USA)를 이용하였고 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 측정하였고 lysis buffer를 처리하여 세포가 완전히 파괴된 cell lysis 상태를 양성 대조군으로 비교하였다[13].

2.7 색소침착 억제력 임상시험

건강한 10명의 여성 자원자에게 참여의사 확인서를 받은 후 교내 임상윤리심의위원회(IRB, international review board)의 허가를 득하여 총 5일에 걸쳐 시험을 수행하였다.

시험 전 1개월 전에 비스테로이드성 항염증제 및 기타 스테로이드 제제를 복용한 경력이 없는 10명의 여성 자원자를 대상으로 시료의 자외선(Ultraviolet B, UV B)에 의한 색소침착 억제 효과를 측정하였다. 시험 참가자의 상박부에 직경 1. 5cm의 구멍 6개가 뚫린 불투명 테이프를 부착하고 자외선 램프(SE Lamp, Toshiba, Japan)를 이용하여 각 피검자의 최소 홍반량(Minimal Erythema Dose) 의 약 2배의 자외선(UVB, 파장 290 nm~320 nm)을 조사하여 색소 침착을 유도하였다. 각 실험 제형들은 Table 1의 처방에 따라 제조하여 자외선을 조사하기 1시간 전과 자외선 조사 직후 도포하였다. 나타난 피부색은 자외선 조사 후 48 시간 및 96 시간에 Spectrophotometer (CM-2500d, Minolta, Japan)를 이용하여 측정하였고 Vitamin C를 양성대조 물질로 사용하였다[14].

Table 1. Formulation for the assessment of whitening effect.

Ingredient	content (weight%)		
	vehicle	sample	(+) Ctrl
Fermented ginseng extract	-	1.00	-
VitaminC	-	-	1.00
Beewax	4.00		
Sorbitan sesquioleate	1.50		
Liquid paraffin	0.70		
Caprylic/Capric triglyceride	5.00		
Glycerin	3.00		
Carboxyvinyl polymer	0.10		
Triethanolamine	0.20		
Antiseptic/ Pigment/perfume	adequate		
Distilled water	to 100		

2.8 통계 처리

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복한 평균값으로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's paired t-test 또는 ANOVA를 적용하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 결정하였다.

3. 결과

3.1 Mushroom tyrosinase (mTyr) 활성 억제능

mTyr에 대한 본 시료의 저해 활성은 IC_{50} 값이 50 ppm과 100 ppm 사이로 평가되며 100 ppm 이상의 농도에서는 양성 대조군인 kojic acid (20000 ppm)의 80% 수준의 억제능을 나타났다(Fig. 1).

Kojic acid는 mTyr와 hTyr에 대한 IC_{50}가 각각 약 6.0 μM (852.66 ppm)이고 hTyr에 대한 IC_{50}가 약 500 μM (71055 ppm)으로 보고된 바 있다[14]. 그러나 세포독성시험에서 30000 ppm 이상에서 RAW264.7 세포에 대하여 심각한 독성이 발견됨에 따라 hTyr 저해 시험 시 처리할 농도는 독성을 나타내지 않는 범위에서 최대의 억제능을 구현하기 위한 농도를 채택하였다. 두 tyrosinase에 활성 억제능 평가를 위한 조건을 동일하게 적용하기 위하여 Kojic acid의 농도를 20000 ppm으로 결정하였다.

본 시료는 100 ppm 이상에서는 더 이상 활성이 증가하지 않아 양성 대조군과 동일한 농도로 처리하지는 않았으나 양성대조군과의 농도 차이를 고려하면 본 시료의 활성이 더 높은 것으로 추정할 수 있다.

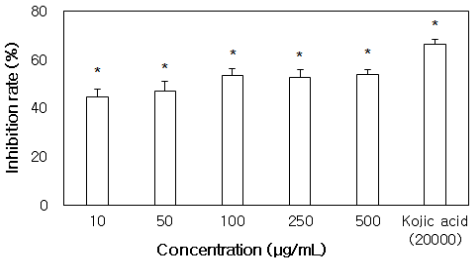

Fig. 1. Inhibitory activity of fermented Ginseng extract on cell-free tyrosinase (Error bar: S. D., Student's paired t-test, $*p < 0.05$ versus control, n = 3).

3.2 Human tyrosinase (hTyr) 활성 억제능

hTyr에 대한 본 시료의 저해 활성은 mTyr에 대한 저해 활성과는 달리 비교적 높은 농도(500 ppm)에서도 양성 대조군(Kojic acid, 20000 ppm)의 억제능의 30% 수준의 억제능을 나타냈다(Fig. 2). 이는 두 효소의 기원이 다른 종의 생물이기 때문에 효소 사이의 구조적 차이에 기인한다고 판단된다. 본 시료는 mTyr와의 비교를 위하여 500 ppm 까지의 농도를 처리하였다. 효소 저해활성이 농도에 따라 증가하는 양상이 관찰되고 양성대조군의 높은 농도를 고려하면 본 시료의 활성은 상당히 높은 것으로 추정할 수 있다. 시료의 농도를 20000 ppm으로 높여 양성대조군과 동일한 농도를 적용한다고 해도 동일한 저해 활성을 나타낸다는 결론은 낼 수 없으나 기존 연구를 참조하면 Kojic acid의 농도를 1/200로 낮추어 적용하면 본 시료의 활성과 비교할만한 수준임은 추정할 수 있다[15].

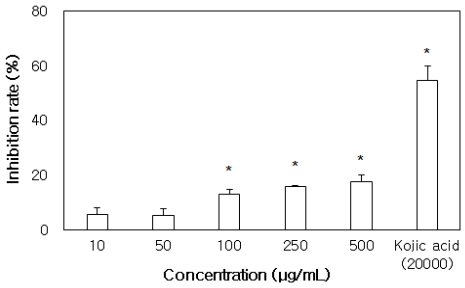

Fig. 2. Inhibitory activity of fermented Ginseng extract on cellular tyrosinase (Error bar: S. D., Student's paired t-test, $*p < 0.05$ versus control, n = 3).

3.3 세포 내 멜라닌 생합성 억제능

Tyrosinase 활성 저해 실험에서 Kojic acid는 hTyr에 대한 IC_{50} 가 높고 세포독성도 나타났기 때문에 세포에 직접 처리하는 실험에서는 적절하지 않다고 판단하여 양성 대조물질로 arbutin을 채택하였다. 예비시험에서 arbutin은 100 ppm 이상에서 세포의 생장을 증식시키는 경향이 나타나 처리 용량을 50 ppm로 결정하였다. 시료가 세포의 사멸을 유도하여 멜라닌의 총량이 낮게 나타날 수 있어 세포 배양 시에 MTT법으로 배양된 세포의 생존력을 평가하였으나 시료가 세포 생존에 미치는 영향은 발견되지 않았다. 형태학적 관찰에서도 배양된 세포에 특이사항은 발견되지 않았다. 이에 따라 측정된 멜라닌의 양을 멜라닌 생합성 양으로 그대로 인정하여 평가하였다.

시료의 IC_{50}는 100 ppm과 250 ppm 사이로 평가되며 대조군(무처리군)에 비하여 비교적 낮은 농도(10 ppm)에서도 통계적으로 유의성있게 멜라닌 생합성을 억제하였고 양성 대조군인 arbutin과 동일한 농도(50 ppm)에서도 2배 이상의 억제능을 나타냈다. 이는 tyrosinase 저해 활성 실험의 결과와 일치하는 결과이기도 하다(Fig. 3).

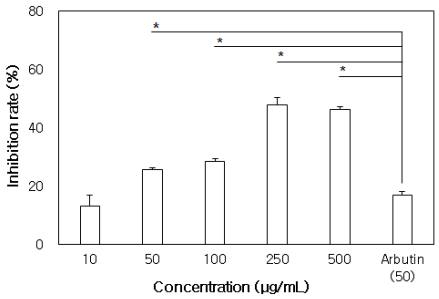

Fig. 3. Inhibitory activity of fermented Ginseng extract on melanin synthesis in melanoma cells (Error bar: S. D., Student's paired t-test, $*p < 0.05$ versus arbutin, n = 3).

3.4 세포 생존력 측정

멜라닌 생합성 억제능 평가시에 50 ppm에서 양성대조물질인 arbutin보다 본 시료의 활성이 확연히 높게 나타남에 따라 세포 생존력 시험에서는 100 ppm의 농도를 사용하여 RAW264.7 (macrophage), RBL-2H3 (mast cell), 그리고 J774A.1 (macrophage) 등 3개의 세포주에 대하여 생존력을 시험하였다.

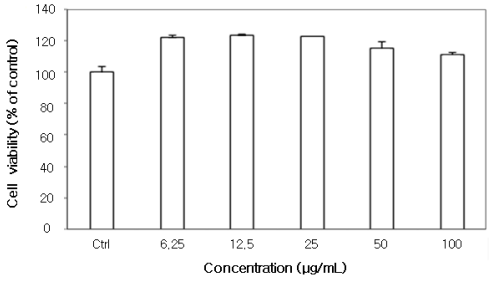

Fig. 4. Viability of RAW264.7 cells upon treatment of fermented Ginseng extract.

RAW264.7 세포에서 6.25 ppm부터 100 ppm까지의 농도 범위에서 시료가 생존에 영향을 나타내지 않았다(Fig. 4). 따라서 다른 두 세포 주는 낮은 농도에서의 영향을 배제하고 25 ppm부터 100 ppm까지의 농도 범위에서만 실험하였다. 이 결과 다른 두 세포주에서도 100 ppm 까지의 농도에서 세포생존에 미치는 영향은 발견되지 않았다 (Fig. 5).

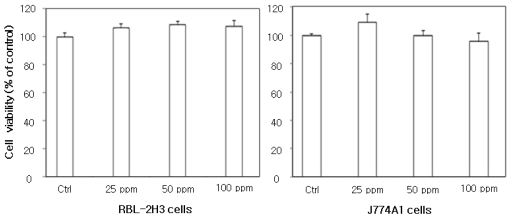

Fig. 5. Viabilities of RBL-2H3 cells and J774A1 cells upon treatment of fermented Ginseng extract.

3.5 세포 독성 측정

앞선 실험에서 시료가 세포의 성장에 미치는 부정적인 영향은 관찰되지 않았으나 이는 세포군 전체에 대한 평가이며 시료의 독성이 개별 세포의 손상에 미치는 영향은 파악할 수는 없다. 이에 개별 세포의 손상을 파악하기 위하여 LDH법으로 시료가 세포에 미치는 독성을 평가하였다. 세포 사멸이나 손상 시에 유출되는 LDH의 양을 측정하여 세포의 손상을 평가한 결과 세포 용해 시 유출되는 LDH의 양에 비하여 현격하게 낮았으며 100 ppm의 농도에서도 무처리 대조군과 통계적 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 6). 이에 따라 본 시료는 세포수준에서 100 ppm까지의 농도 범위에서는 멜라닌 합성을 억제하는 안전한 물질이라고 평가할 수 있다. 화장료 제형으로 제조되어 인체에 적용되었을 때에도 미백활성이 있는지를 판단하는 것이 필요하였다.

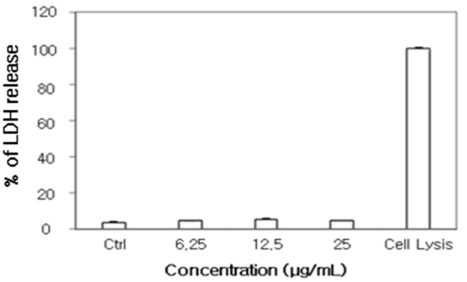

Fig. 6. Toxicity of fermented Ginseng extract on RAW264.7 cells.

3.6 색소침착 억제력 임상시험

세포 주순에서의 멜라닌 생합성 억제 활성과 안전성은 일정 정도 확인되었으나 화장품의 원료로서 미백기능성은 화장품 제형으로 제조되어 인체에 적용시에도 활성이 확인되어야 평가가 가능하다.

이를 위해 자외선으로 색소 침착을 유도하고 시료를 포함한 제형을 도포한 후 총 5일에 걸쳐 밝기지수를 측정한 결과 VitaminC를 처리한 양성 대조군은 대조군(무처리군)과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으나 본 시료를 포함한 제형은 통계적으로 유의성있게 L-Value가 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 7). 따라서 본 시료는 피부에서 색소 침착을 억제하는 효과적인 미백 기능성 물질이라고 평가할 수 있다.

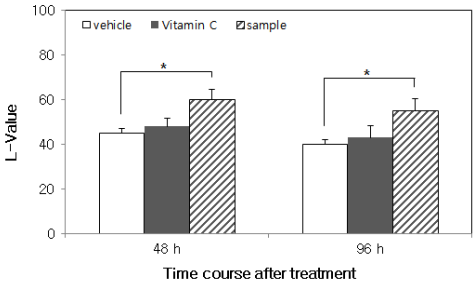

Fig. 7. Whitening index (L value) of fetmented ginseng extract (t-test, *p < 0.05 versus vehicle, n = 10).

4. 논의

본 연구에서는 유산균(*L. plantarum*)을 이용한 자연삼(*P. ginseng*)의 발효 추출물을 활용하여 안전한 미백 화장품의 원료를 개발하고자 미백 기능성과 안전성을 시험하였고 임상시험을 통하여 자외선에 의해 유도되는 피부 색소 침착에 미치는 영향을 연구하였다.

실험 결과 자연삼 발효 추출물이 멜라닌 합성 과정에서 핵심역할을 하는 tyrosinase의 활성을 저해하고 세포 내 멜라닌 생합성을 억제하는 것이 확인되었다. Tyrosine 활성 억제능을 평가한 *in vitro* 실험에서 양성 대조군인 Kojic acid (20000 ppm)와 비교하였을때 1/20의 농도(500 ppm)에서 mTyr에 대하여는 약 80%의 활성을 나타냈고 hTyr에 대하여는 약 30%의 활성을 나타냈다. 일반적으로 미백 기능성 평가를 위한 *in vitro* 실험에서는 mushroom tyrosinase (mTyr)를 이용하여 실험하는데 Kojic acid, arbutin 포함한 기존 미백 기능성 원료들은 mTyr에 대한 활성과 human tyrosinase (hTyr)에 대하여 활성이 다르므로 hTyr에 대한 활성 평가가 필요하다[15]. 본 시료 역시 hTyr에 대한 활성이 mTyr에 대한 활성보다 낮은 것으로 나타났으나 무처리군에 비하여 낮은 농도(10 ppm)에서도 통계적으로 유의있게 효소 활성을 저해함에 따라 세포 내에서의 멜라닌 생합성에 미치는 영향 평가로 이행하였다.

본 시료가 mTyr과 hTyr 두가지 tyrosinase 에 대하여 직접적인 저해활성을 나타냈기 때문에 시료가 세포 내에서 tyrosinase의 발현에 미치는 영향은 파악할 필요가 없다고 판단하였고 따라서 분자생물학적 접근은 배제하고 세포 내 멜라닌 총량을 직접 측정하였다.

세포가 시료 처리에 의해 사멸하면 멜라닌 측정량이 줄어 오차를 야기하므로 MTT법으로 human epiderimal melanocyte (HEM) 세포에 대한 독성을 평가하였고 세포성장에 미치는 영향이 관찰되지 않아 세포를 멜라닌 측정량을 그대로 수용하여 평가한 결과 양성 대조군인 arbutin과 동일한 농도(50 ppm)에서 멜라닌 생합성을 2배 이상 억제하였으며 이는 tyrosinase 활성 저해 실험과 일치하는 결과이므로 본 시료가 세포 수준에서 tyrosinase 활성 저해를 통하여 멜라닌 생합성을 억제하는 물질임이 확인되었다.

본 시료가 HEMa 세포의 생존에 미치는 영향은 발견되지 않았고 피부에 국소 처리하는 화장료의 특성상 전신의 모든 세포에 대한 실험은 필요하지 않다. 그러나 피부 진피층에 존재하는 면역세포인 macrophage나 mast cell는 성장에 영향을 받을 경우 전신에 영향이 파급될 수 있으므로 시료에 의한 독성을 평가할 필요가 있다고 판단하여 세가지 세포에 대하여 시료가 생존에 미치는 영향을 실험하였다. 100 ppm까지의 농도를 적용하였을 때 세가지 세포주 모두에서 독성이 발견되지 않아 안전성이 실험적으로 확인되었다. 이에 자연삼 발효 추출물은 세포수준에서 안전성과 미백 기능성을 모두 갖춘 조성물로 평가할 수 있다. 자연삼은 식품으로 오랜 기간 사용되어 이미 그 안전성이 검증되었고 본 시료는 자연삼의 발효물이며 실험적으로 세포독성이 나타나지 않았으나 장기 반복투여에 의한 독성이 없다고 판단할 수는 없으며 장기 독성은 신중하게 시험하여 결론내야 할 것이다.

실제 피부에서의 색소침착에 대한 억제능력을 판단하기 위하여 수행한 임상시험에서는 시료를 단순한 피부 외용제 제형으로 제조하여 자외선(UVB) 조사로 멜라닌 색소 침착을 유도한 후 총 5일간에 걸쳐 피험자의 상박부에 도포하며 밝기지수를 측정한 결과 시료처리군이 대조군에 비하여 통계적으로 유의성있게 밝기지수(whitening

index, L-Value)가 높게 나타났고 이에 따라 본 시료의 미백 기능성이 확인되었다. 그러나 본 시료를 화장품 원료로 적용하기 위해서는 적합한 제형 설계에 대한 연구를 통하여 제형을 결정한 후 중장기에 걸친 임상 시험을 통하여 미백기능성을 확인하여야 할 것이다.

5. 결론 및 제언

천연물과학, 세포생물학, 임상연구를 아우르는 융합연구를 수행한 본 연구의 결과 자연삼(*P. ginseng*)의 유산균(*L. plantarum*)발효 추출물은 세포수준의 안전성이 확보되어있고 멜라닌 생합성 억제 활성을 가지는 천연 조성물을 개발하였다. 본 시료는 자외선으로부터 피부를 보호하는 미백 기능을 수행하는 우수한 화장품 원료로서 제안될 수 있다.

최근 노동시간이 단축되어 야외활동시간이 늘어나 태양광에 노출되는 시간이 늘어나며 이에 따라 피부가 자외선에 의해 자극되는 시간도 함께 늘어남에 따라 미백 화장품의 수요가 늘어날 것으로 예상된다. 한국사회가 고령사회에 진입함에 따라 고령자를 위한 화장품 원료 역시 수요가 커질 것으로 예상되며 역시 안전한 미백 화장품 원료가 필요한 실정이다.

기존의 미백 기능성 조성물은 독성에 의해 사용량이 제한되므로 저독성, 무독성 미백 기능성원료의 개발이 필요하고 아울러 식품의약품안전처를 비록한 관련 기관들은 기존 미백 화장품 원료들의 장기 반복투여 독성을 평가하여 안전성을 확보하기 위한 정책적 노력이 있어야 할 것이다.

REFERENCES

[1] S. Del Bino, C. Duval, F. Bernerd. (2018). Clinical and biological characterization of skin pigmentation diversity and its consequences on UV impact International journal of Molecular Sciences, 19(9), 2668-2712.

[2] T. Pillaiyar, M. Manickam, V. Namasivayam. (2017). Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. Journal of Enzyme inhibition and Medicinal Chemistry, 32(1), 403-425.

[3] B. Desmedt et al. (2016). In vitro Dermal Absorption of Hydroquinone: Protocol Validation and applicability on illegal skin-whitening cosmetics. Skin Pharmacoogy and Physiology, 29(6), 300-308.

[4] S. Sonthalia, D. Daulatabad, R. Sarkar. (2016). Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, evidence and controversies. Indian journal of dermatology, venereology and leprology, 82(2), 262-72.

[5] J. Kim. (2018). Pharmacological and medical applications of *Panax ginseng* and ginsenosides: a review for use in cardiovascular diseases. Journal of Ginseng Reseach, 42(3), 264-269.

[6] D. Tam et al. (2018). Ginsenoside Rh1: A systematic review of its pharmacological properties. Planta Medica, 84(3), 139-152.

[7] S. J. Lee, N. Ha, Y. Kim, M. G. Kim. (2016). Changes in the ginsenoside content during fermentation using an appliance for the preparation of red ginseng. American Journal of Chinese Medicine, 44(8), 1595-1606.

[8] E. Kim. (2006). A Study of Whitening Cosmetics from natural products. Korean Journal of Aesthetics and Cosmetics Society, 4(2), 195-203.

[9] S. W. Hwang et al. (2018). Fermentation-mediated enhancement of ginseng's anti-allergic activity against IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis *in vivo* and *in vitro*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(10), 1626-1634.

[10] A. Di Petrillo et al. (2016). Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16(1), 453-461.

[11] H. B. Kim, K. C. Park, J. H. Park, C. G. Lee, S. K. Ye, J. Y. Park. (2016). Inhibition of tyrosinase activity and melanin production by the chalcone derivative 1-(2-cyclohexylmethoxy-6 - hydroxy-phenyl)-3-(4-hydroxymethyl-phenyl)-propenone. Biochemical and Biophysical Research Communications, 480(4), 648-654.

[12] F. Angius, A. Floris. (2015). Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. Toxicology In Vitro, 29(2), 314-319.

[13] G. Fotakis, J. A. Timbrell. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology letter, 160(2), 171-177.

[14] Y. Tian, T. Hoshino, C. J. Chen, Y. E, S. Yabe, W. Liu. (2009). The evaluation of whitening efficacy of cosmetic products using a human skin pigmentation spot model. Skin Research and Technology, 15(2), 218-223.

[15] E. V. Curto et al. (1999). Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl

esters of gentisic acid with other putative inhibitors. Biochemical Pharmacology, 57(6), 663-672.

이 효 성(Hyosung Lee) [정회원]

- 2000년 2월 : 연세대학교 대학원 생명공학과(공학석사)
- 2010년 5월 : 켄터키대 대학원 약학대학(약학박사)
- 2010년 5월 ~ 2011년 10월 : 시카고대 화학과 연구원
- 2011년 11월 ~ 2013년 1월 : UNC-CH 약학대학 연구원
- 2013년 3월 ~ 2014년 5월 : GIST 생명과학과 연구교수
- 2015년 3월 ~ 현재 : 서원대학교 제약공학과 교수
- 관심분야 : 의약화학, 약물설계, 화학생물학