

비타민나무열매, 아사이팜열매, 망고, 레몬, 살구 및 블루베리의 혼합 발효추출물의 효능 연구

김수창[†] · 이미래 · 조원표 · 윤여필

그린코스 주식회사 중앙연구소

(2022년 8월 19일 접수, 2022년 9월 16일 수정, 2022년 9월 27일 채택)

A Study on the Effectiveness of a Mixed Fermented Extract of Vitamin Tree Fruit, Acai Palm Fruit, Mango, Lemon, Apricot and Blueberry as an Active Ingredient

Su Chang Kim[†], Mi Rae Lee, Won Pyo Cho, and Year Pill Yoon

R&D Center, Greencos Inc., 15, Hwagok-ro 68-gil, Gangseo-gu, Seoul 07548, Korea

(Received August 19, 2022; Revised September 16, 2022; Accepted September 27, 2022)

요약: 본 연구는 비타민나무열매, 아사이팜열매, 망고, 레몬, 살구 및 블루베리의 혼합 발효물이 화장품 소재로서의 가능성을 확인하기 위하여 세포독성, 라디칼 소거 능력, 엘라스타아제, 보습, 항균 활성 측정을 수행 및 확인하였다. 혼합 발효추출물의 세 농도(0.5 / 1.5 / 2%)에서 세포독성을 보이지 않아 해당 농도로 실험을 수행하였다. 이를 바탕으로 항산화 소재의 대표적 원료인 L-ascorbic acid와 비교하는 라디칼 소거능 실험을 실시하였다. 그 결과 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능력은 혼합 발효추출물의 농도가 2%일 때, Sample 1 ~ 7은 각각 $95.1 \pm 0.6\%$, $94.3 \pm 0.7\%$, $95.3 \pm 0.6\%$, $95.1 \pm 0.7\%$, $95.1 \pm 0.3\%$, $95.5 \pm 0.3\%$, 그리고 $95.4 \pm 0.4\%$ 로 우수한 항산화 능력을 확인하였다. 세 농도(0.5 / 1.5 / 2%)에서 농도의 증가와 블루베리추출물의 함량이 증가함에 따라 sample 7은 2% 농도에서 대조제인 retinol crystal과 같은 0.9 cm로 엘라스타아제 활성이 우수함을 알 수 있었으며, 보습 활성 또한 HAS-3 증가율이 세 농도에서 각각 71.5%, 75.6%, 81.6%로 우수한 결과를 확인하였다. 항균 활성은 혼합 발효추출물의 농도가 0.5%에서 2%로 증가, 블루베리 함량의 증가에 따라서 우수한 항균 활성을 확인하였다. 특히, 혼합 발효추출물의 농도가 2%에서 sample 7에서 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*)에 대한 항균 활성 효과가 매우 우수한 것을 확인하였다. 따라서 혼합 발효추출물 2%의 농도에서 항산화, 보습, 항균성을 가지는 화장품 성분으로서 개발 가치가 충분하다고 사료된다.

Abstract: In this study, the cell viability, radical scavenging ability, elastase activity, moisturizing activity, and antimicrobial activity of mixed fermented extract of vitamin tree fruit, acai palm fruit, mango, lemon, apricot and blueberry as an active ingredient were measured. The experiment was performed at three concentrations(0.5 / 1.5 / 2%), since cytotoxicity was not shown at these three concentrations. Based on this, a radical scavenging experiment was conducted to compare with L-ascorbic acid, a representative raw material of an antioxidant material. The results showed that the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability was $95.1 \pm 0.6\%$, $94.3 \pm 0.7\%$, $95.3 \pm 0.6\%$, $95.1 \pm 0.7\%$, $95.1 \pm 0.3\%$, $95.5 \pm 0.3\%$, and $95.4 \pm 0.4\%$ respectively, when the concentration of the mixed fermentation extract was 2%. As the concentration increased at the three concentrations (0.5/1.5/2%) and the content of blueberry extracts increased, sample 7 showed excellent elastase activity at a concentration of 2% to 0.9 cm, such as retinol crystal, and moisturizing activity was also found to be 71.5%, 75.6%, and 81.6%, respectively. Particularly, at the 2% concentration of the mixed fermented extract, the antibacterial activity effect on *Propionibacterium* was very excellent in sample 7. Therefore, it is considered that it is worth developing the mixed fermented extracts of 2% concentration as a cosmetic component with antioxidant, moisturizing, and antibacterial properties.

Keywords: vitamin tree fruit extract, acai palm fruit, mango, lemon, blueberry

[†] 주 저자 (e-mail: kim9139@green-cos.com)
call: 02-6959-5767

1. 서론

인간은 시간이 지남에 따라 생리적 기능이 저하되는 노화 현상을 경험하게 된다. 피부 노화는 시간 의존성 자연 노화에 따른 내인성 노화와 외부적 요인에 의한 외인성 노화로 구분할 수 있다. 내인성 노화는 잔주름, 창백한 피부, 피부 건조증 등의 특징을 나타내는 반면, 외인성 노화는 굵고 깊은 주름, 탄력 감소, 피부 건조, 색소 침착 등 보다 급속하고 중대한 노화의 징후를 나타낸다. 이러한 생체적인 노화 정도를 판단할 수 있는 지표가 되는 것 중 하나가 피부이다. 피부는 크게 표피, 진피 및 피하조직이 순차로 적층된 3 개의 층으로 구성된다. 이는 외부로부터 물리적, 화학적 자극 및 병원균으로부터 신체를 보호하는 매우 중요한 역할을 한다. 표피의 각질층은 약 10 ~ 20%의 수분을 함유하고 인체의 최외각에 존재하여 체내로부터 수분 증발을 억제하는 한편 외부로부터의 물질 과잉 침투를 차단한다[1,2]. 그러나 피부는 외부 환경에 노출되어 있고, 냉방, 난방의 인위적인 온도, 화장 습관에 따른 잦은 세안, 자외선 등과 같은 외부적 요인들의 영향으로 노화가 진행된다. 외인성 노화의 원인 중 가장 큰 비중을 차지하는 요인은 바로 자외선이다. 자외선은 피부 내에서 활성산소의 증가를 유도하여 멜라닌 세포의 불규칙한 멜라닌 생성으로 인한 색소 침착을 유발하고 표피의 각질 형성 세포 배열을 불규칙적으로 변화시켜 피부 보습을 저하시키게 된다. 또한 진피의 섬유아세포에서 콜라겐 분해를 촉진하는 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 생성을 증가시키고 콜라겐의 전구체인 procollagen type 1 생성을 감소시켜 주름을 유발하고 탄력을 감소시켜, 결과적으로 피부 노화를 가속화하게 된다. 이러한 이유로 피부가 자외선에 지속적으로 노출되면 굵고 깊은 주름, 피부 탄력의 소실 같은 현상이 발생한다[3-5].

인체는 노화되면서 건조한 피부가 증가하는 경향을 보이며, 환경 및 생활 패턴 변화 등의 원인으로 인하여 각질층의 수분이 감소하여 피부가 건조해지고 표면이 거칠게 되며, 피부가 축축함을 잃고 푸석거리며, 생기가 없어 보이는 등의 내인성 노화 현상이 발생한다. 건조한 피부는 면역 기능이 약화되어 아토피 피부염뿐만 아니라 피부 홍반, 가려움증, 따가움 등의 알레르기가 유발되기 쉬워진다[6]. 따라서 활성 산소를 제거하여 노화를 막아주고 피부 보습력까지 개선해 주는 안전한 물질로 피부를 보호해 주는 것이 필요하다. 더불어 피부의 노화가 진행될수록 피부

에서 생성된 활성 산소를 제거하는 능력이 점점 감소하고 염증 반응이 증가한다[1-9]. 이를 위해 노화로 인한 활성 산소 감소, 피부 건조함, 탄력 저하 등을 완화하고 피부를 보호하기 위해 천연 소재를 이용한 화장품의 개발이 이루어지고 있다.

비타민나무는 일명 산자나무라고도 하며, 유라시아 대륙에 널리 재배하고 있다. 특히 히말라야 산맥에서 많이 자생한다. 비타민나무 열매가 처음 주목을 받게 된 것은 영양가가 매우 높아 비타민 A, B₁, B₂, C, E, K, P 외에도 플라보노이드, 라이코펜, 카로티노이드, 피토스테롤 등의 효과가 강력한 항산화제를 다량 함유하고 있는 사실에서 비롯되었다. 이 열매는 페놀성 화합물인 갈릭 애씨드가 다량으로 함유되어 있다. 비타민나무 열매 추출물이 갖는 항산화력은 다량 함유되어 있는 페놀성 화합물과 폴리페놀과 크게 관련이 있다. 비타민나무 열매 추출물은 높은 항산화력으로 세포 원형질을 산화에 의한 손상으로부터 보호해준다고 한다[7-9]. 이러한 높은 항산화력 때문에 비타민나무 열매 추출물은 항노화 화장품에도 이용될 수 있다.

아사이팜은 아사이베리, 아사이 야자라고 불리는데 브라질 북부 아마존 열대 우림 지역에서 자라는 야자나무과에 속하는 아사이 야자나무 열매이고 망고는 열대 히말라야에서 재배되는 열매나무과 나무 과일이다. 아사이팜과 망고에는 폴리페놀, 안토시아닌, 파이토스테롤, 알파 토크페롤, 무기질, 섬유질, 단백질, 글루코사민, 비타민 A, C, E, K, 아미노산, 필수지방산 등이 풍부하게 함유되어 있다. 현재는 슈퍼 푸드로 잘 알려져 있을 뿐만 아니라, 항산화 효과가 뛰어나 화장품 원료로도 많이 사용되고 있다[10-13]. 레몬은 상록수 교목으로, 살구는 낙엽 소교목인 살구나무의 열매이다. 레몬과 살구에는 각종 비타민이 풍부하게 함유되어 있다. 특히 비타민 C가 풍부하게 함유되어 있다. 이런 성분은 우리 몸에서 산화 스트레스로 인한 염증과 세포 노화 및 변질에 대응한다[14-18]. 블루베리는 진달래과의 앵두나무의 열매이며, 비타민 C, K, 망간, 안토시아닌, 폴리페놀, 플라보노이드 등 많은 영양분들 및 미네랄이 함유되어 있다. 블루베리 추출물의 대표 함유 성분들의 대표적인 효과는 직접적 항산화 능력을 가지고 있는데 직접 활성 산소를 제거하는 방식으로 인한 항산화 효과이다[19-20].

많은 사람들이 좋은 효능을 가지고 있는 추출물들을 고 함량으로 넣는다고 좋다고 생각하고 있지만 실은 그렇지 않은 경우가 많다. 원료의 효능이 좋은 원료들을 잘 배합하여 추출물을 만들었을 때, 시너지 효과가 일어날 수도 있겠

지만 여러 가지가 합쳐져 1인당 공헌도가 떨어지는 링겔만 효과가 일어날 수도 있다. 이는 원료의 고유의 효능의 한계 점이 존재하기 때문이다. 또한, 부작용도 일어날 수 있다. 따라서 이를 극복하기 위하여 본 연구는 비타민나무 열매, 아사이팜 열매, 망고, 레몬, 살구 및 블루베리의 혼합 발효물이 화장품 소재로서의 가능성을 확인하기 위하여 혼합하여 발효 추출하여 제조한 다음 세포 독성 측정, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 분석, 엘라스타제 억제 활성 분석, 보습 관련 인자 발현 효과 분석, 항균활성 시험 분석 등을 통해 항산화, 보습, 항균에 효과적인 화장품 소재로의 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 혼합추출물의 제조

비타민나무 열매, 아사이팜 열매, 망고, 레몬, 살구 및 블루베리는 쥬더마랩(Korea)에서 구입하였다. 드라이 오븐(HB-101-4, Hanbaek, Korea)에서 80 °C, 2 h 완전히 건조된 비타민나무 열매, 아사이팜 열매, 망고, 레몬, 살구 및 블루베리를 Table 1과 같은 중량 배합비로 분말을 혼합하였다. 그 후, 비닐 파우치에 넣어 밀봉하고 초고압 처리기(TFS-10L, Toyo Koatsu Co., Japan)를 사용하여 40 ~ 50 °C, 50 ~ 100 MPa의 물로 120 min 동안 초고압 처리하였다. 이후 비닐 파우치를 제거한 후 초고압 전 처리된 비타민나무 열매, 아사이팜 열매, 망고, 레몬, 살구 및 블루베리 복합물에 정제수를 10 배 중량을 넣고 아임 계수 조건인 120 ~ 200 °C, 압력 0.1 ~ 15 MPa에서 15 min 간 추출하였다. 멸균 방법으로는 물리적 방법으로 드라이 오븐에서 80 °C, 2 h 동안 건조시켜, 유효성분을 최대한 손상시키지 않으면서 멸균하였다. 멸균 단계를 거친 복합 추출물에 발효 균

주인 백국균을 접종하고 24 ~ 25 °C에서 3 ~ 5 일 발효시켰다. 발효된 혼합추출물을 다시 물리적 멸균과정을 거친 후 3 일간 실온에서 방치한 후에 침전물을 300 mesh 여과지로 여과하고, 이 침전물을 filter paper (No.5, 55 mm, Advantec, Japan)와 filter paper (No.131, 185 mm, Advantec, Japan)로 2 번 여과하였다. 그리고 감압 농축기(Coolace CCA-1100, EYELA, Japna)를 이용하여 40 ~ 50 °C의 온도에서 농축한 후 스프레이 드라이어(B-290, BuCHI, Switzerland)를 이용하여 인렛(inlet) 온도 180 °C, 흡입기(aspirator) 효율 100%(35 cm³/h), 펌프(pump) 효율 25%(7.5 mL/min), 노즐 클리너 4 (nozzle cleaner 4) 및 유량계(rotameter) 30 mm (357 L/h)의 조건으로 건조해 혼합 발효추출물 분말을 제조하였다.

2.2. 세포 배양

L929 세포와 CCD-986sk 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 분양받았으며, L929 세포는 Minimum Essential Medium Alpha Eedium (GIBCO, USA)에 10%의 fetal bovine serum (FBS)와 fungizone (3 μm) 및 antibiotics (10 μ/mm)를 첨가해 사용하였다. 세포배양은 배지(Biowest, USA)에 일정 양의 배양액을 넣어 37 °C, 5% CO₂로 조정된 CO₂ 항온기(Forma Co. USA)에서 배양하였다. L929 세포와 CCD-986Sk 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)배지를 사용하였으며, 배양 조건은 37°C 5% CO₂로 조정된 CO₂ 항온기(Forma Co. USA)에서 배양하였다[21-22].

2.3. 세포 독성 측정

세포독성은 3-(4,5-dimethylthazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium

Table 1. Batch Composition

	The fruit of a vitamin tree	Acai palm fruit	Mango	Lemon	Apricot	Blueberry
Sample 1	2	1	1	1	1	1
Sample 2	2	1	1	1	1	2
Sample 3	2	1	1	1	1	3
Sample 4	2	1	1	1	1	4
Sample 5	2	1	1	1	1	5
Sample 6	2	1	1	1	1	6
Sample 7	2	1	1	1	1	7

bromide (MTT, Sigma, USA) 시약을 이용한 세포 생존율로 측정하였다. 96 well plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 세포(L929, fibroblast cell line)를 분주한 다음, Table 1과 같이 각 sample의 원액을 농도별(1 ~ 10%)로 각 well에 첨가하였다. 그 후 시험물질이 충분히 노출될 수 있도록 plate를 37 °C, 5%, CO₂ 인큐베이터에 24 h 동안 배양하였다. 배양한 plate에 2 ~ 5 mg/mL MTT 용액을 첨가한 다음, 37 °C, 5%, CO₂ 인큐베이터에 추가로 4 h 방치하였다. 방치한 plate에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)를 분주한 다음, 차광 상태에서 plate를 20 min 동안 충분히 흔들어 준 후, enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader, SpectraMax[®] ABS plus, Molecular devices, USA)를 사용하여 570 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 측정 후 가로축 값을 시료의 종류, 세로축 값을 가로축에 해당하는 시료의 흡광도 ÷ 혼합 발효 추출물을 첨가하지 않은 시료의 흡광도 × 100 으로 하는 막대그래프를 그렸다[19].

2.4. DPPH 라디칼 소거능 측정

선행연구와 동일하게[19] 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)라디칼 소거능은 Blois의 방법[19,20]을 변경하여 측정하였다. L-ascorbic acid (Daejung, Korea)를 ethanol에 용해시켜 100, 50, 25 ppm L-ascorbic acid 용액을 제조하였다. DPPH (Sigma, USA) 1.5772 mg을 10 mL 정제수에 용해시켜 DPPH 시약을 제조하였다. 96 well plate에 Table 1과 같이 각각 100 μ L와 DPPH 시약 100 μ L을 투입 후 혼합하여 sample 시료를 제조하였다. 96 well plate에 각기 다른 농도의 L-ascorbic acid 용액 100 μ L와 DPPH 시약 100 μ L을 투입 후 혼합하여 standard 시료들을 제조하였다. 96 well plate에 정제수 100 μ L와 DPPH 시약 100 μ L을 투입 후 혼합하여 control 시료를 제조하였다. 96 well plate에 정제수를 투입하여 blank 시료를 제조하였다. 제조한 시료들이 담긴 96 well plate를 실온에서 30 min 방치하였다. 방치한 96 well plate를 ELISA reader를 사용하여 520 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 측정 후 가로축 값을 시료의 종류, 세로축 값을(control의 흡광도 - 가로축에 해당하는 시료의 흡광도) ÷ control × 100의 흡광도로 하는 막대그래프를 그렸다[19,20].

2.5. 엘라스타제 활성 측정

0.1% elastin-congo red (Sigma, USA)가 포함된 2.5% agar에 시험 시료 및 엘라스테이즈 효소 용액(1,000 units/mL

Sigma, USA)을 혼합하고 상온에서 10 min 간 반응시킨 용액 10 μ L 씩 주입 후 37 °C에서 18 h 배양하였다. 배양 종료 후 엘라스테이즈의 활성에 의해 elastin-congo red agar 주변에 투명대가 형성되면 그 헤일로(halo)의 직경을 측정하여 엘라스테이즈 활성 저해 효과를 측정하였다. 엘라스틴을 포함하는 한천 배지에 엘라스타제만을 적가하는 한편, Table 1과 같이 혼합 발효 추출물의 농도가 0.5, 1.5 및 2.0%가 되는 용액을 시료로 하여 엘라스타제와 함께 적가하여 배지 상에 나타나는 헤일로(halo)의 직경을 측정하여 시료의 엘라스타제 저해 활성을 측정하였으며, 대조 예로서 retinol crystal을 엘라스타제와 함께 적가하여 비교하였다.

2.6. 보습 관련 인자 측정

CCD-986Sk 세포를 10% FBS IMDM (Isocove's modified dulbecco's medium) 배지를 이용하여 5×10^5 cell/well로 조절한 후 12 well plate에 접종하고 18 h 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 추출하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통해 hyaluronan synthase-3 (HAS-3)의 발현 증가율을 확인하였다. HAS-3 발현 증가율은 하기 식에 의해 산출되었고, 그 결과는 Tabel 2에 나타내었다. 대조군으로는 히알루론산 (hyaluronic acid)을 사용하였다.

HAS-3 발현 증가율 (%)

$$= (\text{시료 HAS-3 발현양} / \text{대조군 HAS-3 발현양}) \times 100$$

2.7. 항균활성 측정

항균활성 측정으로는 평판 배지 확산법(agar diffusion method)을 이용하여 프로피오니 박테리움(*Propionibacterium*)에 대한 항균활성을 측정하였다. 본 시험에 사용된 프로피오니 박테리움(*P. acnes* 3314) 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korea)에서 분양받아 사용하였다. Plate에 brain heart infusion agar를 멸균하여 plate당 25 mL씩 분주시키고 균주 도말 각각의 균주의 수를 10⁶으로 맞춰 1,000 μ L 도말한다. Table 1의 각각의 혼합 발효 추출물을 10% ethanol에 녹이고, 혼합 발효추출물을 0.5, 1.5, 2.0% 농도로 맞춘 후 40 μ L 씩 disc (paper disk, 10 mm, Advantec, Japan)에 loading 한다. 양성 대조군으로 salicylic acid를 사용하였으며, 10% ethanol에 녹인 salicylic acid를 1.0% 농도로 맞춘 후 40 μ L 씩 위와 같은 규격의 disc에 loading 한다. 멸균된 핀셋으로 loading된 disc를 집어서 균이 도말된 plate에 심

는다. 산소를 차단하는 anaerobic jar에 plate를 넣은 상태로 37 °C에 배양한다. Paper disk 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기(mm 단위)를 측정하였으며, 모든 시험은 독립적으로 3 회 반복하여 평균값을 구하였다.

2.8. 통계 분석

본 연구 데이터는 3 회 반복 실험하였으며 SPSS 12.0 version (SPSS Inc, USA) 프로그램을 사용하였다. 데이터는 student *t*-test를 통하여 비교 분석하였고, 모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 통계적 유의수준은 5%로 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성 측정

Table 1과 같이 혼합 발효추출물을 각각 세포에 첨가하여 배양한 결과, 모든 혼합 발효추출물이 L929 세포에 대해 99% 이상의 세포생존율을 나타내었다. MTT 분석에서는 0.5% 농도에서 sample 1이 가장 높은 $109.7 \pm 1.2\%$, 1.5% 농도에서는 sample 4가 $105.6 \pm 1.8\%$, 2% 농도에서는 sample 5가 가장 높은 $101.7 \pm 1.8\%$ 의 세포생존율을 나타내었다(Figure 1). 이러한 결과를 토대로 발효 추출물을 제조할 때 원액의 농도가 증가함에 따라 항산화 효능의 과다로 활성 산소가 필요 이상으로 감소하여, 생명 현상을 둔화시킨 것으로 인해 측정할 수 있는 생존율 또한 낮아진다고 유추할 수 있다. 해당 결과를 바탕으로 추가 실험은 Table 1과 같이 각각의 추출물의 함량을 고정시키고 세포 독성이 나타나지 않은 최대 농도인 혼합 발효추출물원액 2% 용액에 대해 진행하였다. 비교하기 위하여 세 농도(0.5, 1.5, 2%)를 사용하여 비교하였다.

3.2. DPPH 라디칼 소거능 측정

세 농도의(25, 50, 100 ppm) L-ascorbic acid와 혼합 발효추출물의 농도가 2% 용액의 흡광도를 측정한 결과를 바탕으로 계산한 DPPH 라디칼 소거율은 다음과 같다(Figure 2). L-ascorbic acid 용액의 경우 100 ppm에서 $97.4 \pm 0.7\%$ 의 매우 높은 소거 활성을 보였고, 50 ppm에서도 $94.7 \pm 0.1\%$ 로 100 ppm과 유사한 높은 소거 활성을 보였다. 그러나 25 ppm에서는 $53.1 \pm 1.4\%$ 의 소거 활성을 보여 라디칼 소거율이 급격히 떨어지는 모습을 보였다. Sample 1은 $95.1 \pm 0.6\%$, sample 2는 $94.3 \pm 0.7\%$, sample 3은 $95.3 \pm 0.6\%$,

sample 4는 $95.1 \pm 0.7\%$, sample 5는 $95.1 \pm 0.3\%$, sample 6은 $95.5 \pm 0.3\%$, sample 7은 $95.4 \pm 0.4\%$ 의 소거 활성을 보였다. 혼합 발효추출물의 농도가 2% 용액의 DPPH 라디칼 소거율은 항산화 능력이 우수하다고 알려진 L-ascorbic acid

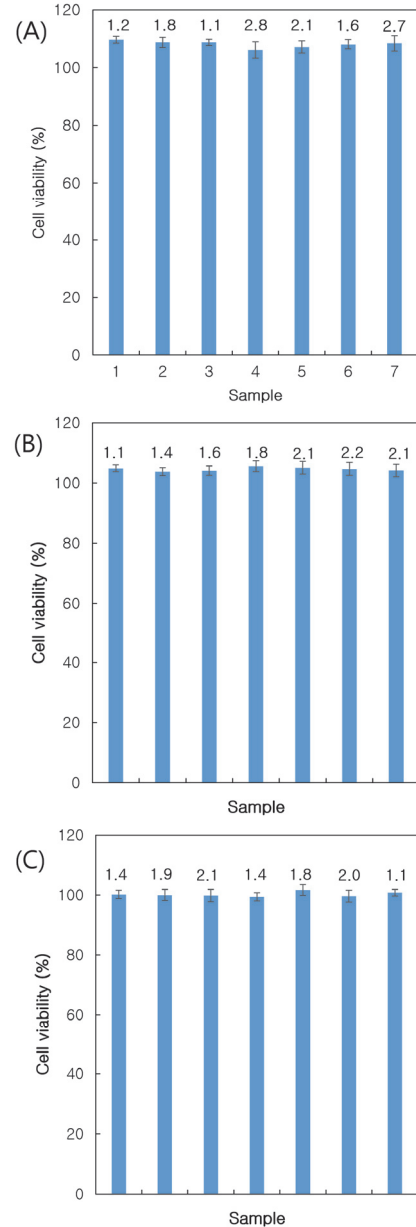


Figure 1. (A) Cell viability of various concentration of sample 1 ~ 7 on L929 cells by MTT assay at 0.5%, (B) 1.5%, and (C) 2% concentration. Values are expressed as mean ± SD. Statistically significant from the control ($p < 0.05$). Sample 1 ~ 7; MTT, 3-(4,5-dimethylthazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide.

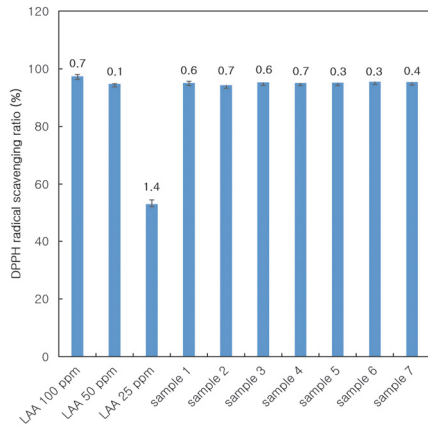


Figure 2. DPPH radical scavenging ratio of LAA and sample 1 ~ 7 solution at 2% concentration. Values are expressed as mean ± SD. Statistically significant from the control ($p < 0.05$). DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; LAA, L-Ascorbic Acid.

50 ppm에 비해 통계적으로 유의하다고 할 만큼 비교우위에 있다고 할 수 있으며, L-ascorbic acid의 경우 특유의 높은 항산화 활성으로 인한 불안정성 때문에 범용적인 화장품 소재로 쓰이기 어려운 만큼 혼합 발효추출물은 항산화 활성을 가지는 효과적인 화장품 소재로 사용될 가능성이 충분하다고 할 수 있다.

3.3 엘라스타제 활성 측정

세 농도의(0.5, 1.5, 2%) 혼합 발효 추출물의 헤일로 직경(halo diameter)을 측정 한 결과는 다음과 같다(Figure 3A). 대조예로서 retinol crystal의 헤일로 직경은 0.9 cm를 나타냈다. 대조예로서 retinol crystal의 헤일로 직경은 0.9 cm, 엘라스타제는 1.8 cm인 반면, Figure 5와 같이 세 농도의(0.5, 1.5, 2%) 혼합 발효추출물에서 sample 1 ~ 7이 모두 헤일로 직경이 줄어들음을 확인하였다. 그 중, sample 7에서 0.9

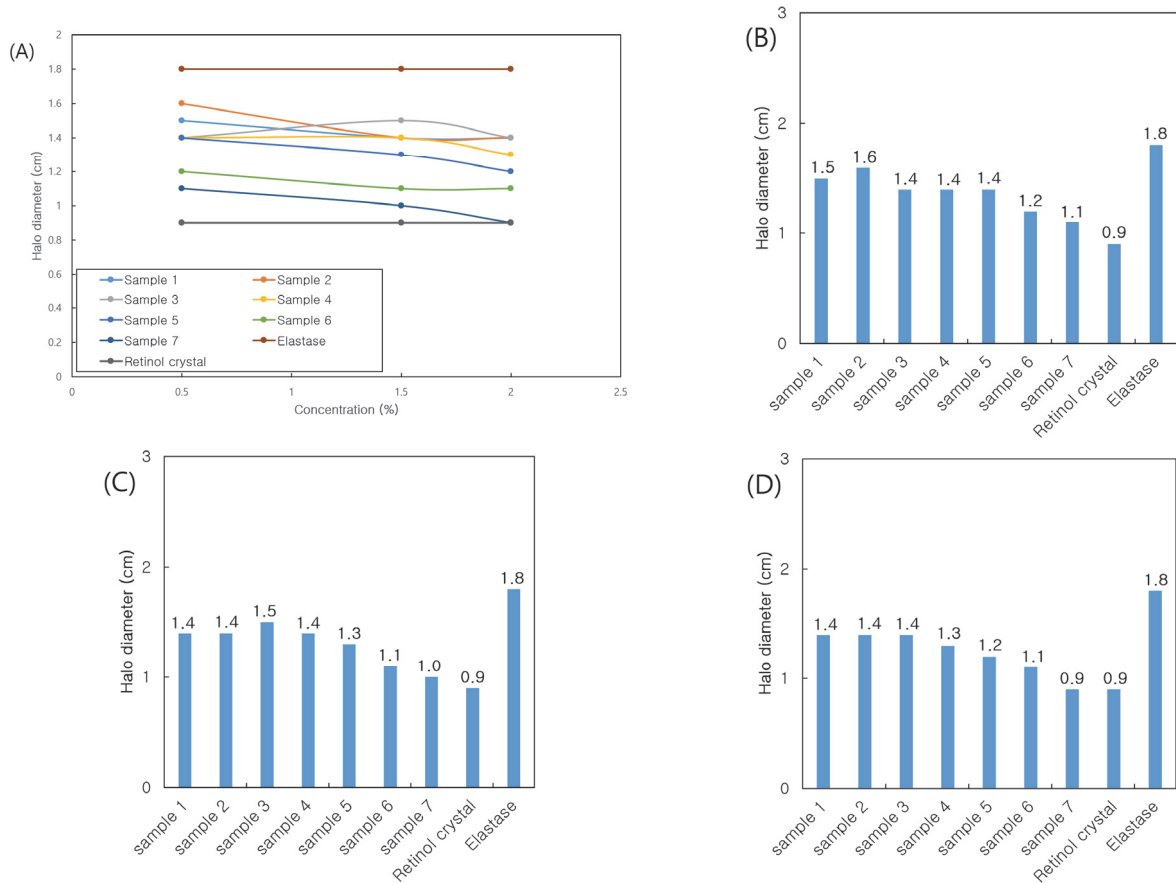


Figure 3. (A) Elastase activity by halo diameter of sample 1 ~ 7 at 0.5, 1.5 and 2% concentration. Elastase activity by halo diameter of sample 1 ~ 7. (B) Retinol crystal, and elastase at 0.5% concentration. (C) Retinol crystal, and elastase at 1.5% concentration. (D) Retinol crystal, and elastase at 2% concentration.

cm 로 헤일로 직경이 가장 낮은 것을 확인하였다. 헤일로 직경이 클수록 엘라스틴의 분해가 많이 된 것인데 sample 7 은 2% 농도에서 대조예인 retinol crystal과 같은 0.9 cm 가 측정되었다. 이를 통해서 sample 7이 엘라스타제 억제가 가장 우수한 것을 확인하였다. 블루베리 추출물의 함량이 증가함에 따라서 sample 6과 sample 7은 통계적으로 유의하게 다른 sample에 비해 비교우위에 있어 엘라스타제 억제에 효율적인 결과를 나타냈다. 각 함량에 따라서 대조예인 retinol crystal과 같이 나타내었다(Figure 3B ~ D).

3.4. 보습 관련 인자 측정

세 농도의(0.5, 1.5, 2%) 혼합 발효 추출물의 hyaluronan synthase-3 (HAS-3) 측정된 결과는 다음과 같다(Figure 4A). 대조 예로써 hyaluronic acid의 HAS-3 증가율은 세 농도(0.5, 1.5, 2%) 서 각 각 72.2, 73.7, 79.8%로 확인하였다.

세 농도에서 블루베리의 함량이 높아짐에 따라 HAS-3 증가율이 높아짐을 확인하였으며, 블루베리가 가장 많이 들어가는 sample 7에서 HAS-3 증가율이 세 농도에서 각각 71.5%, 75.6%, 81.6%을 나타내었다. 대조 예인 hyaluronic acid와 비교했을 때 통계적으로 다른 sample에 비해 HAS-3 증가율이 우위에 있어 우수한 보습 활성을 확인하였다. 블루베리의 함량이 계속 증가함에 따라 보습 활성이 계속 좋아진다고 할 수는 없지만 sample 6 ~ 7과 같은 함량으로 사용하여 보습 화장품의 성분으로서 개발 가치가 높다고 사료된다. 각 함량에 따라서 대조예인 hyaluronic acid와 같이 나타내었다(Figure 4B ~ D).

3.5. 항균 활성 측정

세 농도의(0.5, 1.5, 2%) 혼합 발효 추출물의 항균 활성 효과를 측정된 결과는 다음과 같다(Figure 5A). 대조 예로

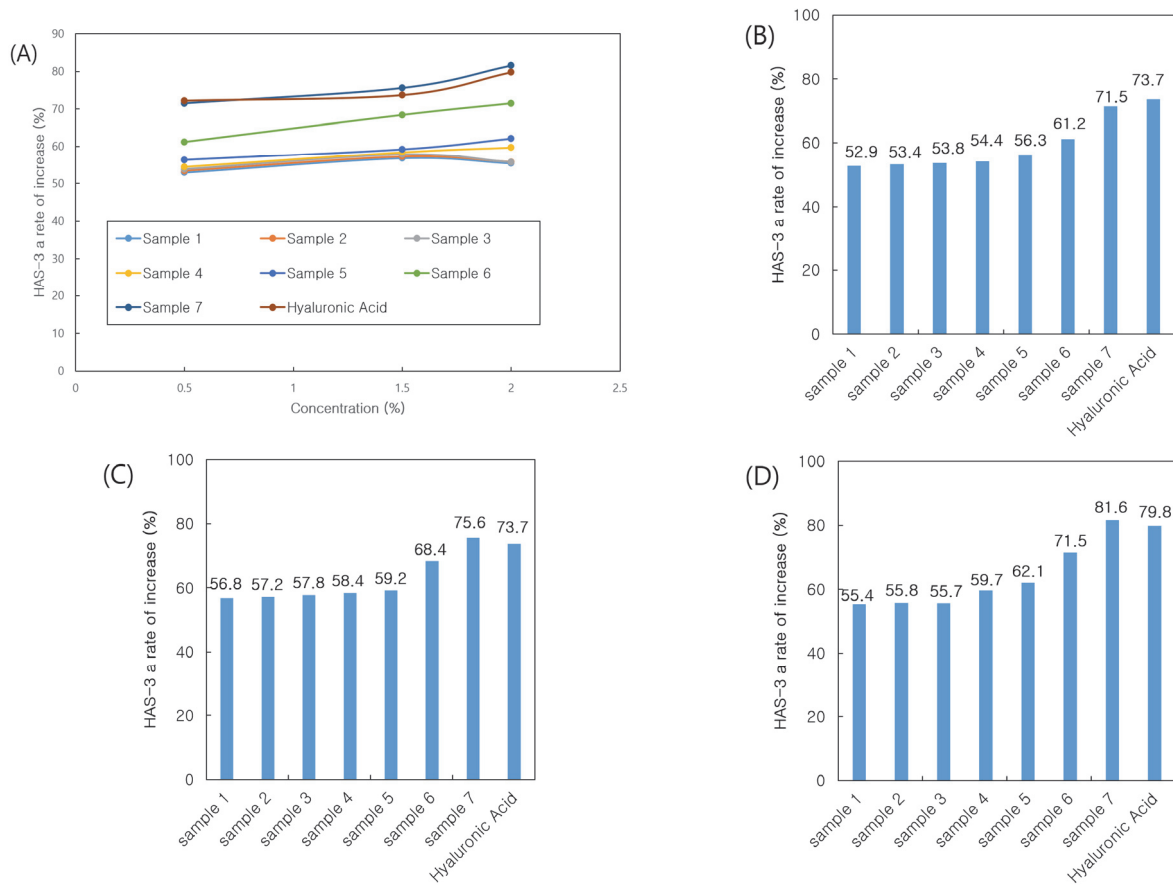


Figure 4. (A) Moisturizing activity of hyaluronan synthase-3(HAS-3) of sample 1 ~ 7 at 0.5, 1.5 and 2% concentration. (B) Hyaluronan and synthase-3 (HAS-3) at 0.5% concentration. (C) Hyaluronan and synthase-3 (HAS-3) at 1.5% concentration. (D) Hyaluronan and synthase-3 (HAS-3) at 2% concentration.

서 salicylic acid를 사용하였으며 세 농도에서 0.5%, 1.5%는 측정되지 않았다. 2%에서 지름이 50 mm로 확인되었다. 전반적으로 sample 1 ~ 7 은 농도에 의존하는 것을 확인할 수 있는데 clean zone의 지름이 농도에 비례한다는 것을 알 수 있다. 이는 항산화 성분을 많이 가지고 있는 혼합 발효 추출물들의 효과이며, 블루베리 함량이 증가함에 따라 일반적으로 clean zone의 지름이 증가하는 사실을 확인할 수 있다. 모든 농도에서 Sample 7의 프로피오니 박테리움 (*Propionibacterium*)에 대한 항균 활성 효과가 매우 우수한 것을 알 수 있다. 그러나 1.5% 농도에서 sample 7의 변화 추이의 해석은 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 함량에 따라서 대조제인 salicylic acid와 같이 나타내었다 (Figure 5B ~ D).

4. 결 론

본 연구에서는 항산화 활성, 보습, 엘라스타제 억제, 항균 활성 등에 효과적인 화장품 소재로의 비타민나무 열매, 아사이팜 열매, 망고, 레몬, 살구 및 블루베리 혼합 발효물을 발굴하였다. 세 농도(0.5, 1.5, 2%)에 따라 적용 가능성을 확인하고자 하였다. 비타민나무 열매, 아사이팜 열매, 망고, 레몬, 살구 및 블루베리 외에 다른 성분들을 혼합하여 발효 추출하여 세포 독성 측정, DPPH 라디칼 소거능 분석, 엘라스타제 억제 활성 분석, 보습 관련 인자 발현 효과 분석, 항균활성 시험 분석 등을 통해 항산화, 보습, 항균에 효과적인 화장품 소재로의 적용 가능성을 확인하고자 하였다. 실험 결과 혼합 발효 추출물의 농도가 2% 일

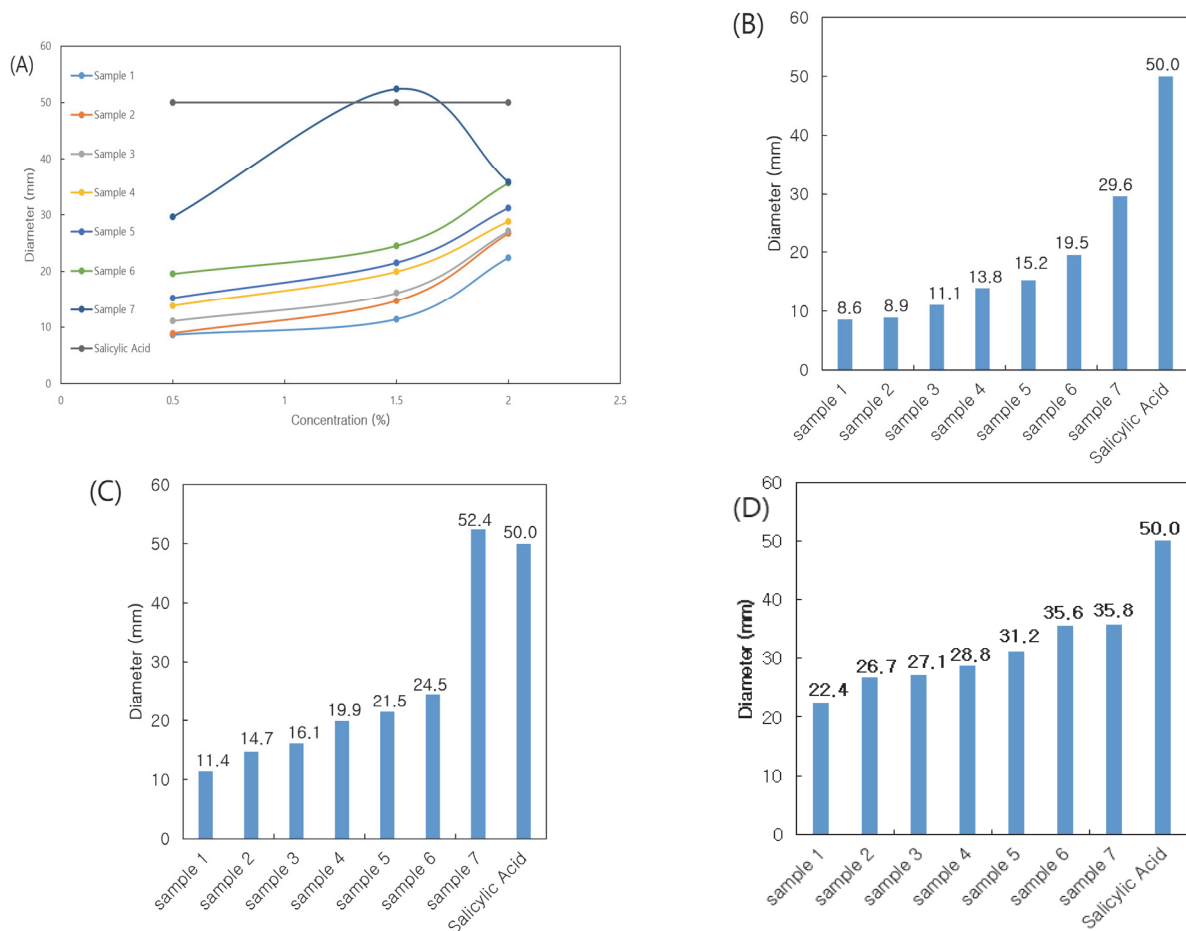


Figure 5. (A) Antimicrobial activity test for propionibacterium of sample 1 ~ 7 at 0.5, 1.5 and 2% concentration. (B) Salicylic acid and diameter at 0.5% concentration. (C) Salicylic acid and diameter at 1.5% concentration. (D) Salicylic acid and diameter at 2% concentration.

때, sample 1은 $95.1 \pm 0.6\%$, sample 2는 $94.3 \pm 0.7\%$, sample 3은 $95.3 \pm 0.6\%$, sample 4는 $95.1 \pm 0.7\%$, sample 5는 $95.1 \pm 0.3\%$, sample 6은 $95.5 \pm 0.3\%$, sample 7은 $95.4 \pm 0.4\%$ 로 항산화 능력이 우수하다고 알려진 L-ascorbic acid 50 ppm에 비해 통계적으로 유의하다고 할 만큼 비교우위에 있다고 할 수 있는 항산화 효과를 확인할 수 있었다. 세 농도(0.5, 1.5, 2%)에서 농도의 증가와 블루베리 추출물의 함량의 증가에 따라 엘라스타제 활성 및 보습 활성에서 sample 7은 2% 농도에서 대조 예인 retinol crystal과 같은 0.9 cm로 우수하였으며, 2%에서 Sample 7에서 HAS-3 증가율이 세 농도에서 각각 71.5%, 75.6%, 81.6%을 각각 확인할 수 있었다. 항균 활성에서는 sample 1 ~ 7 은 농도에 의존하는 것과 블루베리 함량이 증가함에 따라 일반적으로 clean zone의 지름이 증가하는 사실을 확인할 수 있었다. 특히 sample 7에서 프로피오니 박테리움(*Propionibacterium*)에 대한 항균 활성 효과가 매우 우수한 것을 확인하였다. 이상의 결과에서 Table 1과 같이 혼합 발효 추출물은 2% 농도에서 항산화, 보습, 항균성을 가지는 화장품 성분으로서 개발 가치가 충분하다고 사료된다.

References

1. D. H. Yoo, D. H. Joo, and J. Y. Lee, Antioxidant effect of *Nelumbo nucifer* G. leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line, *J. Life. Sci.*, **25**(10), 1115 (2015).
2. U. D. Son, J. S. Hwang, and I. S. Chang, Approach of antiaging care in cosmetics, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **31**(3), 213 (2005).
3. J. M. Kim, S. W. Jeon, W. G. Lee, H. J. Nam, and Y. B. Kim, Study of preventing methods for skin aging and wrinkles, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **24**(4), 533 (2010).
4. H. Y. Chung and Y. K. Kim, Age-associated alteration in the hepatic superoxide generation and antioxidant activities in the senescence-accelerated mice, *Yakhak Hoeji*, **36**(5), 460 (1992).
5. R. Pandel, B. Polissak, A. Godic, and R. Dahmane, Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention, *ISRN Dermatoloty*, doi: 10.1155/2013/930164 (2013).
6. J. S. Kim and K. H. Jung, Cytotoxic effects of 1,2-hexanediol and 1,2-hexanediol galactoside on HaCaT cell, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(3), 343 (2018).
7. M. S. Ko, H. J. Lee, and M. J. Kang, Antioxidant activities and whitening effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* L, *The East Asian Society of Dietary Life*, **22**(6), 812 (2012).
8. J. M. Lee, S. K. An, and H. H. Jang, Effects of *Hippophae rhamnoides* extracts on skin conditions, *Asian. J. Beauty. Cosmetol.*, **19**(1), 35 (2021).
9. J. S. Lee and J. M. Kim, Quality characteristics and antioxidant properties of white pan bread added with sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry powder, *Korean J. Food Nutr.*, **33**(5), 473 (2020).
10. K. Rambabu, G. Bharath, F. Banat, P. L. Show, and H. H. Cocolletzi, *Mango leaf* extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging, *Int. J. Biol. Macromol.*, **126**(1), 1234 (2019).
11. M. K. Kim, Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of pulp and Peel extracts of mango, *J. Invest Cosmetol*, **13**(2), 113 (2017).
12. Korea Patent 10. 2042960 (2019).
13. H. J. Chung, Physiological activity of acai berry (*Euterpe oleracea* Mart.) extracted with different solvents, *The Korea Society of Food Culture*, **27**(1), 75 (2012)
14. Y. K. So, J. Y. Hwang, H. W. Kim, H. N. Jo, and T. B. Lee, Skin hydration and skin barrier effects of *Cymbopogon citratus* and *Perilla frutescens* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(3), 225 (2019).
15. Y. U. Jeong, H. Lee, H. Park, K. M. Kim, S. Y. Kim, and Y. J. Park, Studies on Antioxidant, anti-inflammation and tyrosinase inhibitory activities of *Melissa officinalis* extracts and their fractions, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(4), 465 (2018).
16. H. J. Yang, E. H. Kim, J. O. Park, J. E. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of fermented *Melissa officinalis* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**(1), 47 (2009).
17. Korea Patent 10. 1134703 (2012).
18. J. S. Kim and J. S. Moon, Effects of apricot kernel oil on the improvement hair texture, *Journal of the Korean*

- Applied Science and Technology*, **38**(3), 700 (2021).
19. K. K. Park and Y. P. Yoon, Studies on the phenolic compound content and antioxidant efficacy of *Rubus idaeus* (Raspberry) cultivar 'Willamette' fruit extract using n-hexane and ethyl acetate, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **46**(4), 329 (2020).
 20. Korea Patent 10-2159577 (2020).
 21. D. H. Joo, D. H. Yoo, and J. Y. Lee, A study on the anti-wrinkle activities of *sesamum indicum* L. ethanol extracts on CCD-986sk, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**(4), 377 (2016).
 22. M. K. Im, J. H. Ji, and S. S. Kim, Cytotoxicity of dentin bonding system on L929 cells, *The Korean Academy of Conservative Dentistry*, **22**(1), 209 (1997).
 23. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**(4617), 1199 (1958)