

Biological Activity of Mixed Extracts of *Acanthopanax senticosus* and *Citrus unshiu* Fermented with *Bovista plumbea* for Inner Beauty

Eun Jeong Kim^{1†}, So Yeon Kim^{2†}, Su Yeon Kang¹, Yung Choon Yoo², Taek Joon Yoon³, Gye Won Lee^{1*} and Young Ho Cho^{1*}

¹Department of Pharmaceutics & Biotechnology, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

²Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

³R&D Center, DoGenBio Co., Ltd., Seoul 08501, Korea

Received May 18, 2023 / Revised June 30, 2023 / Accepted July 7, 2023

In this study, the anti-oxidant activity, elastase inhibitory activity, and skin moisturizing effect of mixed extracts of *Acanthopanax senticosus* and *Citrus unshiu* fermented with *Bovista plumbea* (B-MEAC) were evaluated to verify the availability as a material for inner beauty. The DPPH radical scavenging activity of B-MEAC was showed in a dose-dependent manner ($SC_{50}=156.1\pm 0.82$ $\mu\text{g/ml}$). Also, B-MEAC inhibited the elastase activity in a concentration-dependent manner ($p<0.001$). To study the effect of B-MEAC on mouse skin hydration, skin moisture content and transepidermal water loss (TEWL) measured. As a result, skin moisture content increased ($p<0.001$) and TEWL decreased ($p<0.01$) compared to the dry-induced control group. The effect on the change of collagen fibers in the dry-induced mouse skin was examined through Masson's trichrome staining. In the group administered with B-MEAC, the amount of collagen relatively increased compared to the control group, and the intensity of blue color increased. The effect on the moisturizing function of the dry-induced mouse skin was examined by Western blot method. In the group administered with B-MEAC, the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) protein decreased compared to the control group. In addition, the expression level of collagen1A1 (COL1A1), hyaluronan synthase-2 (HAS2), filaggrin, and aquaporin-3 (AQP3) recovered ($p<0.001$). Therefore, these results suggest the potential of B-MEAC as a skin hydration agent for inner beauty.

Key words : *Acanthopanax senticosus*, aquaporin, *Citrus unshiu*, filaggrin, skin hydration

서 론

이너 뷰티(inner beauty)는 종래의 바르는 화장품과 달리 피부 건강에 좋은 식품을 섭취함으로써 체내 건강증진과 함께 피부를 아름답게 만들어 주는 효능을 지닌 먹는 제품으로서 먹는 화장품이라고도 불린다[4, 8, 17, 18]. 피부를 건강하고 아름답게 유지시키기 위한 욕구가 증가하면서 피부 건강을 증진시키기 위한 이너 뷰티에 대한 소비자의 요구와 관심이 증가하고 있는 추세이다. 최근 다양한 종류의 과일, 곡류, 베리류 및 채소 등의 천연 소재를 활용한 피부 건강을 증진시킬 수 있는 효능에 대한 연구

가 활발히 진행되고 있다[15].

피부는 외부의 유해한 물리적 화학적 자극에 대한 장벽 역할과 체내의 수분 유지에 중요한 기능을 담당한다. 적절한 수분 함량은 건강한 피부 유지와 노화 방지에 있어서 중요한 핵심 인자이며, 수분이 부족하게 되면 피부 최외각인 각질층이 두꺼워지고 건조해져 정상적인 각질박리가 어려워져 칙칙한 피부가 된다. 따라서 피부 보습 효과를 가지는 천연 소재 발굴에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다[13].

생물전환기술은 미생물이 가지고 있는 효소적 기능을 활용하여 천연물 유래의 생리활성물질의 구조적 변화를 통해 원하는 물질을 제조하는 기술이다. 이를 통해 기능성 개선, 유효성분의 함량 증가, 흡수율 증진 등의 기존 소재의 활용성을 높이고 있다[33].

가시오가피(*Acanthopanax senticosus*)는 두릅나무과에 속하는 식물로 예로부터 염증과 관련된 질환 치료에 사용되어 왔으며, 민간에서는 효과가 우수하다고 알려진 대표적인 생약재이다. 또한, 가시오가피는 현재 식약처에 고시된 식품원료로 다양한 종류의 건강 보조식품에 응용되는

†Authors contributed equally.

*Corresponding authors

Tel : +82-42-600-8503, Fax : +82-42-600-8503

E-mail : pckmon@konyang.ac.kr (Gye Won Lee)

micael@konyang.ac.kr (Young Ho Cho)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

대표적 약용식물 중의 하나이며, 면역 조절 작용[9, 35, 41], 항염증 작용[12], 항산화 작용[26, 38] 및 항알러지 활성[39, 40] 등과 같은 생물학적 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

진피(*Citrus unshiu peel*)는 운향과에 속한 상록 소고목인 귤나무의 잘 익은 열매껍질을 건조한 것으로 한방에서는 각종 통증을 해소하고 응결을 풀어주기 위해 사용되었으며, 주요성분으로 hesperidin, narirutin, hesperetin 등을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[1]. 또한, 진피의 항산화 작용[24, 28], 허혈성 모델 쥐에서의 뇌 보호 효과[32], 천식 억제[21], 면역조절 기능[10] 등과 같은 생리활성에 대한 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 식용버섯인 참쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체를 발효균주로 사용하여 생물전환 가시오가피-진피 혼합 추출물을 제조하고, 추출물의 항산화 활성 및 피부보습 효과 등을 확인하여 이너뷰티 소재로서의 활용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용된 시약으로 Folin & Ciocalteu's phenol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), elastase from porcine pancreas, N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide는 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외에 사용된 시약들은 특급 및 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

생물전환 가시오가피-진피 혼합 추출물 제조

본 실험에 사용한 가시오가피는 경동약업시장(Seoul, Korea)에서, 진피는 주식회사 일해(Jeju, Korea)에서 각각 구매하여 사용하였다. 음건하여 분쇄한 가시오가피와 진피 분말을 각각 15 g 씩 칭량하여 혼합한 분말 30 g에 70% (v/v) 에탄올 300 ml를 첨가해 환류 추출기(Universal Extraction E-800, Buchi, Switzerland)를 이용해 추출(3 cycles, 3 times)한 후에 왓만(Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 40°C 이하에서 감압농축 및 동결건조하여 가시오가피-진피 혼합 추출물을 제조하였다 (mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu*, MEAC). 탄소원으로 가시오가피-진피 혼합 추출물과 질소원으로 0.1% 효모-맥아즙이 혼합된 배지에 (주)코씨드바이오팜(Cheongju, Korea)에서 분양받은 참쌀떡버섯(*B. plumbea*) 균사체를 균질화하여 3.3%가 되도록 접종한 후에 발효조 내에서 온도 25°C, 회전수 125 rpm의 조건으로 7일간 배양하였다. 배양 후, 배양액으로부터 참쌀떡버섯 균사체를 제거한 다음에 동결건조하여 생물전환 가시오가피-진피 혼합 추출물(mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu* fermented

with *B. plumbea*, B-MEAC)을 제조하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Dennis의 방법[5]으로 측정하였으며, Folin-Ciocalteu's reagent가 폴리 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용하였다. 희석한 시료에 1 N Folin-Ciocalteu's reagent를 넣어 8분간 방치한 다음, 10% (w/v) sodium carbonate를 첨가하여 40분간 반응시킨 뒤, 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준검량곡선으로부터 환산하여 정량하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등[30]의 방법을 이용하여 측정하였다. 1.5 ml tube에 각 농도 별 시료를 첨가한 후, 99.5% ethyl alcohol 300 µl와 10% (w/v) aluminum nitrate 20 µl, 1 M potassium acetate 20 µl, 증류수 560 µl를 차례대로 넣어 교반한 후에 40분간 정치한 다음, 425 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준검량곡선으로부터 환산하여 정량하였다.

HPLC를 이용한 생물전환 전, 후 시료의 성분 변화 분석

MEAC에 존재하는 배당체 성분인 eleutheroside E와 hesperidin과 B-MEAC에 존재하는 비배당체 성분인 syringaresinol과 hesperitin의 변화를 확인하기 위하여 HPLC (Waters, MA, USA)를 실시하였다. HPLC 분석조건은 다음과 같다. 검출기는 PDA detector, 검출 파장은 280 nm, 분석 칼럼은 CAPCELL PAK C₁₈ MGII (4.6 × 250 mm, 5 µm, Shiseido, Osaka, Japan), 시료 주입량은 20 µl, 유속은 1.0 ml/min, 이동상 용매로는 아세트니트릴의 비율을 5% (0 min)에서 100% (25 min) 그리고 다시 0% (28min)로 조절하여 분석하였다.

DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능 측정은 Blois법[2]에 따라 실시하였다. 96 well plate에 추출물을 농도별로 20 µl씩 각각 채취한 다음, 실험군에는 0.1 mM DPPH 180 µl, 대조군에는 메탄올을 첨가하여 20분간 혼합한 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거능을 구하였다.

엘라스타제 억제 활성 측정

엘라스타제 억제 활성은 Cha 등[3]의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.05 M Tris-HCl buffer (pH8.0) 240 µl, 1 mM N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 기질 용액 20 µl를 첨가한 후, 농도별로 희석한 추출물을 동량으로 첨가하고 잘 혼합하였다. 반응액에 porcine pancreas elastase (0.3 unit/ml)

10 μ l를 첨가하여 25°C 배양기에서 20분간 반응시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 엘라스타제 억제 활성을 측정하였다.

실험동물

본 연구에 사용한 생후 6주령의 암컷 Balb/c mouse는 라온바이오(Yongin, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 mouse는 온도 22~24°C, 습도 5%, 12시간의 명암주기로 사육하였다. 사료는 샘타코 바이오 코리아(Osan, Korea)의 실험동물용 고형사료를 급여하였고, 음수는 자유 섭취시켰다. 동물실험은 건양대학교 동물실험윤리위원회(IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee)의 방침 및 법규에 따라 진행되었다(윤리승인번호: P-22-11-E-01). 실험이 종료된 mouse는 12-14시간 절식시킨 후, 해부하여 피부를 적출하였고, 적출한 피부 조직은 생리식염수로 세척한 후에 수분을 제거하여 다음 실험에 사용하였다.

피부 건조 모델 구축

본 연구의 실험군은 각각 정상(normal)군, 대조(control)군, B-MEAC (10 mg/mouse 투여)군으로 나누어 군당 5마리의 mouse를 사용하였다. 정상군과 대조군은 4주간 0.9% (w/v) 생리 식염수를 경구 투여하였으며, B-MEAC 시료는 피부건조 유도 전 4주간 경구투여 하였다. 피부 수분을 방출시키기 위한 방법으로 모든 mouse의 털을 면도날로 제거 후, 면도 크림으로 2차 제모하고 1주일 간 아세트산에테르를 1:1로 섞은 용액을 화장솜(2 cm × 2 cm)에 적신 후, 등에 15초간 올려놓은 뒤에 30초간 같은 부분을 증류수로 닦아내어 피부 건조 모델을 구축하였다[30].

피부 수분함량 측정

B-MEAC 시료의 처리가 건조유도된 마우스 피부 보습에 미치는 영향을 평가하기 위하여 피부 수분함량측정기(Corneometer CM 825, Courage-Khazaka Electronic, Cologne, Germany)를 이용하여 피부 수분함량을 측정하였다. 항온 항습시설(온도 25.0±2.0°C, 40.0±5.0%)에서 30분 이상 안정을 취하게 한 후에 일정 영역에 대한 피부 수분량을 3회 측정하여 평균치를 기록하였다.

경피수분손실량(transdermal water loss, TEWL) 측정

B-MEAC의 경피수분손실량을 측정하기 위하여 측정 동물들을 항온 항습시설(온도 25.0±2.0°C, 40.0±5.0%)에서 30분 이상 안정을 취하게 한 후 Tewameter TM 210 (Courage-Khazaka Electronic)을 이용하여 피부 표면으로부터 증발되는 수분 손실량을 3회 반복하여 측정하였다. 건조가 유도된 각 그룹 mouse 등의 일정 부위에 기기를 접촉하여 안정화되는 구간의 평균치를 기록하였다.

조직 병리학적 검사

피부의 조직학적 형태의 비교를 위해 피부 수분량과 경피수분손실량의 측정이 완료된 mouse의 등 피부를 1 cm × 1 cm의 크기로 일정하게 절취하였다. 적출한 피부 조직을 생리 식염수로 세척 후, 10% (w/v) 포르말린 용액에 고정하였고, 24시간 후에 수세, 탈수, 투명을 거쳐 파라핀을 침투시킨 후에 파라핀 블록을 제조하였다. 제조한 블록을 4 μ m 두께로 잘라 슬라이드를 제조한 후, Masson's trichrome kit (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 염색을 진행하였다. 광학현미경(Nikon Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 collagen의 양과 형태를 확인하였다.

단백질 발현 수준 분석

B-MEAC가 보습 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 적출한 피부조직을 50 mM Tris-HCl buffer (pH7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, protease 및 phosphatase inhibitor cocktail로 구성된 lysis buffer에 넣고 균질기로 파쇄한 후에 원심분리하여 상등액을 회수하였다. BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 단백질 농도를 정량한 후, 30 μ g의 lysate를 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전개시켰다. 분리한 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, CA, USA)에 2시간 동안 전사시켰다. 이후 5% (w/v) skim milk 용액으로 상온에서 1시간 동안 blocking하고, 1차 항체인 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), collagen 1A1 (COL1A1), hyaluronan synthase-2 (HAS2), aquaporin-3 (AQP3), filaggrin (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) 를 처리하였다. 세척한 후에 2시간 동안 실온에서 horse radish peroxidase (HRP)가 컨쥬레이션된 2차 항체와 반응시켰다. 이 때 단백질 발현은 Amersham Image Quant 800 (Cytiva, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였으며, β -actin으로 보정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 각 군간의 통계적 유의성 검증은 SPSS 18.0 (SPSS Inc., IL, USA)을 이용한 one-way ANOVA로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

생물전환을 통한 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 증가 식물에 존재하는 폴리페놀 화합물은 외부로부터 자신을 보호하기 위해 생성되는 2차 대사산물들 중의 하나로 페놀성 화합물에 존재하는 hydroxyl기는 단백질 등의 분자와 결합하여 항산화 활성, 면역증강 효과, 자외선 차단

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of B-MEAC and MEAC

| Sample | Contents (mg/g) | |
|--------|--------------------------------|-------------------------------|
| | Total polyphenol ¹⁾ | Total flavonoid ²⁾ |
| B-MEAC | 64.53±3.95 | 11.88±0.61 |
| MEAC | 45.33±2.49 | 5.85±0.65 |

The values are mean ± SD (n=3).

B-MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu* fermented with *B. plumbea*, MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu*.

¹⁾A standard compound was tannic acid for total polyphenol assay.

²⁾A standard compound was quercetin for total flavonoid assay.

등의 생리 활성을 가지는 것으로 알려져 있다[22, 25, 32]. 또한, 폴리페놀과 같이 식물에 널리 분포되어 있는 플라보노이드 성분도 활성산소 소거와 같은 항산화 활성을 포함하여 여러가지 생리 활성 작용을 가진다는 것이 많은 연구를 통해 확인되었다[6, 11, 16]. 따라서 B-MEAC의 항산화 활성을 예측하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 그 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 B-MEAC와 MEAC의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 측정한 결과 64.53±3.95 mgGAE/g과 45.33 ±2.49 mgGAE/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 하여 측정한 결과, 11.88±0.61 mgQE/g과 5.85±0.65 mgQE/g로 나타났다. 즉, 생물전환을 통해 총 폴리페놀 함량이 생물전환전 시료에 비하여 약 1.4배, 총 플라보노이드 함량이 약 2배 정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Lee 등[20]은 영지버섯 균사체로 생물전환할 경우에 생물전환전의 추출물에 비하여 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 증가한다고 보고하였다.

생물전환을 통한 비배당체 함량의 증가

Marotti 등의 연구에 따르면 생물전환을 통해 배당체를 비배당체로 전환하면 생물학적 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다[27]. 따라서 본 연구에서는 B-MEAC 내의 비배당체 성분인 syringaresinol과 hesperetin의 함량 변화를 확인하기 위하여 HPLC로 분석하였다. Eleutheroside E, hesperidin, syringaresinol 및 hesperetin을 80% 메탄올에 용해 후, 표준 원액으로 하여 이를 메탄올로 적당히 희석하여 표준액으로 하였다. 검체는 0.45 µm syringe filter로 여과하여 80% 메탄올로 50배 희석하여 검액으로 하였다. 표준액 및 검액을 HPLC로 분석한 후, 각각의 피크 면적을 미리 작성한 검량선식에 대입하여 검액 중 eleutheroside E, hesperidin, syringaresinol 및 hesperetin의 양을 구하였다. Eleutheroside E, hesperidin, syringaresinol 및 hesperetin의 검량선은 모두 5~100 µg/ml의 농도범위에서 상관계수(R²)가 0.9999 이상의 양호한 직선성을 나타내었다(data not shown). 또한, Eleutheroside E, hesperidin, syringaresinol 및 hesperetin은 이동상 조건에서 8.741분, 10696분, 12.876분, 14.657분에 각각 검출되었다(Fig. 1). 찹쌀떡버섯 균사체로 MEAC를 생물전환시킨 결과, 생물전환전에 비해 배당체인 eleutheroside E와 hesperidin의 함량은 175.13±5.88 µg/ml과 889.27±55.40 µg/ml에서 0 µg/ml과 574.5±1.93 µg/ml으로 감소하였으며, 비배당체인 syringaresinol과 hesperetin은 0 µg/ml에서 185.95±0.20 µg/ml과 33.1±0.10 µg/ml로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과는 본 연구진의 이전 연구에서 지실 추출물을 영지버섯 균사체로 생물전환할 경우 배당체의 함량은 감소하고 비배당체의 함량이 증가하는 결과와 유사한 결과로 확인되었다[20].

B-MEAC의 DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거활성 측정은 화학적으로 안정화된 radical인 DPPH의 전자 주개 능력을 이용하여 환원력을

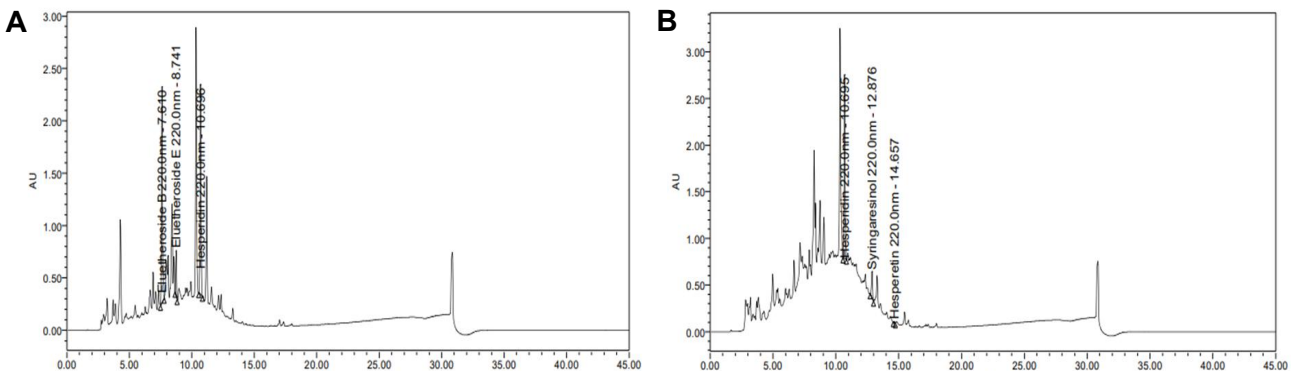


Fig. 1. HPLC profile of eleutheroside B, hesperidin, syringaresinol, and hesperetin in B-MEAC and MEAC. The chromatogram of (A) and (B) showed change of eleutheroside B, hesperidin, syringaresinol, and hesperetin in MEAC and B-MEAC, respectively. B-MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu* fermented with *B. plumbea*, MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu*.

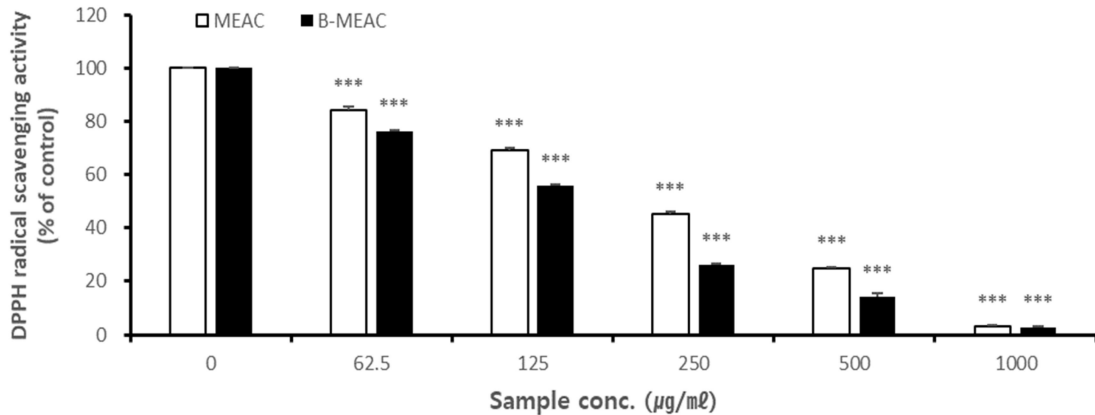


Fig. 2. Effect of B-MEAC and MEAC on DPPH radical scavenging activity. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments. Significance was determined by one-way ANOVA. ****p*<0.001 vs control. B-MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu* fermented with *B. plumbea*, MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu*.

측정하는 방법으로 다양한 천연소재의 항산화 효능을 알아보기 위해 많이 이용하는 실험법이다[32]. B-MEAC의 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과, Fig. 2에 나타낸 바와 같이 처리 농도 의존적으로 소거 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 즉, 62.5 µg/ml 농도에서 23.60±0.45%, 125 µg/ml 농도에서 44.18±0.27%, 250 µg/ml의 농도에서 74.09±0.59%, 500 µg/ml의 농도에서 85.84±1.27%, 1,000 µg/ml의 농도에서 97.13±0.5%의 DPPH radical을 소거하여 B-MEAC의 SC₅₀ (radical을 50% 소거하는 시료의 농도)은 156.1±0.82 µg/ml로 나타났다. 이에 비해 MEAC의 SC₅₀은 224.98±0.01 µg/ml로 나타나 생물전환한 경우 DPPH radical 소거 활성이 약 30% 정도 증가하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Lee 등[20]의 연구에서 지실 추출물을 영지버섯 균사체로 생물전환할 경우 생물전환전의 추출물에 비하여 DPPH radical 소거활성이 증가한다는 보고와

일치하였다. B-MEAC의 DPPH radical 소거 활성은 생물전환에 의해 증가된 폴리페놀과 플라보노이드의 작용에 의한 것으로 사료된다.

B-MEAC의 엘라스타제 억제 활성

엘라스타제 억제 활성 측정은 식약처 건강기능식품 기능성 평가 가이드라인의 ‘피부 건강에 도움을 줄 수 있음’ 편에 피부보습 기능성 확인을 위한 바이오 마커들 중의 하나로 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 B-MEAC의 피부 보습 효능의 측정을 위한 동물실험에 선행하여 엘라스타제 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 처리 농도 의존적으로 엘라스타제 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 즉, 125 µg/ml 농도에서 14.03±2.85%, 250 µg/ml 농도에서 16.82±1.50%, 500 µg/ml 농도에서 26.60±0.82%, 1,000 µg/ml 농도에서 45.06±2.02%의

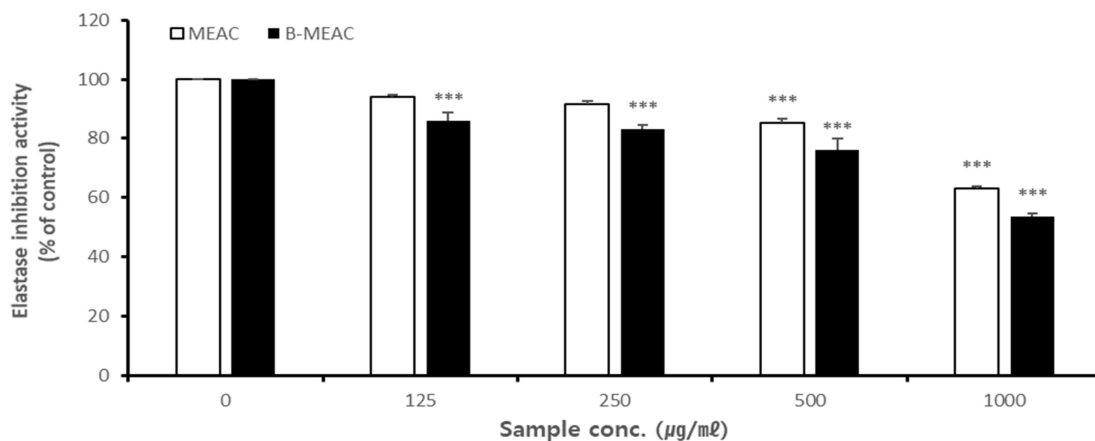


Fig. 3. Inhibitory effect of B-MEAC and MEAC on elastase activity. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments. Significance was determined by one-way ANOVA. ****p*<0.001 vs control. B-MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu* fermented with *B. plumbea*, MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu*.

엘라스타제 활성을 억제하는 것으로 확인되었다. 반면에 생물전환전 시료인 MEAC의 경우 125 µg/ml 농도에서 6.08±0.88%, 250 µg/ml 농도에서 8.37±0.86%, 500 µg/ml 농도에서 14.91±1.54%, 1,000 µg/ml 농도에서 36.97±0.72%의 엘라스타제 활성을 억제하는 것으로 나타나 생물전환에 의해 시료의 엘라스타제 억제 활성이 증가하는 것으로 확인되었다. Lee [19]의 연구에서 대추 추출물을 붉은덕다 리버섯 균사체로 생물전환할 경우 생물전환전 추출물에 비하여 항산화 활성, 항노화 활성, 미백 활성, 항염증 활성 등이 증가한다는 보고에서 알 수 있듯이 생물전환을 통해 다양한 생리활성물질들이 생성되어 일반 추출물보다 활성이 증가되는 것으로 사료된다.

B-MEAC처리에 따른 in vivo 피부 보습 효과

경구투여한 B-MEAC가 마우스 피부 보습에 미치는 영향을 확인하기 위하여 피부 수분량과 경피수분손실량을 측정하였다. 각질층의 수분량은 표피에서 생성되는 지질과 천연보습인자(natural moisturizing factor, NMF)에 의해 결정되며, 표피의 수분증발은 각질층의 세라마이드와 NMF의 함량 변화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다[7, 37]. 또한, 피부 표면으로부터 증발되는 수분의 양을 측정하는 경피수분손실량은 측정값이 낮을수록 피부 표면의 수분 손실량이 적다는 것을 의미한다. 건조유도된 마우스 피부에 미치는 B-MEAC의 보습 효과를 확인하기 위하여 피부 수분량과 경피수분손실량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 4A에 나타난 바와 같이 정상군의 수분량은 변화가 없었으나, 건조유도된 대조군과 B-MEAC군에서는 건조유도 전에 비해 수분량이 감소하였다. 대조군과 B-MEAC군을 비교할 경우 B-MEAC군에서는 대조군에 비하여 수분량이 유의적으로 증가하였다($p<0.001$). 또한, Fig. 4B에 나타난 바와 같이 정상군의 TEWL은 변화가 없었으나, 건조유도된 대조군과 B-MEAC군에서는 건조유도 전에 비해 TEWL이 증가하였다. 대조군과 B-MEAC군을 비교할 경우 B-MEAC군에서는 대조군에 비하여 TEWL이 유의적으로 감소하였다($p<0.01$). 따라서 B-MEAC의 경우 건조유도된 피부의 수분량은 증가시키고 TEWL은 감소시켜 피부 보습 기능을 회복시키는 것으로 사료된다.

B-MEAC 처리에 따른 마우스 피부의 조직 변화

아세트산과 에테르에 의해 건조유도된 마우스에 B-MEAC를 경구투여 하였을 때 피부의 교원섬유 변화에 미치는 영향을 Masson's trichrome 염색을 통해 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 대조군은 건조유도에 의해 진피 내 콜라겐이 정상군에 비하여 줄어든 것이 관찰되었으나, 시료를 4주간 처리한 B-MEAC군의 경우 콜라겐의 양이 대조군과 비교하였을 때 상대적으로 증가하여 푸른색으로 보다 진하게 염색되었다. 이는 B-MEAC를

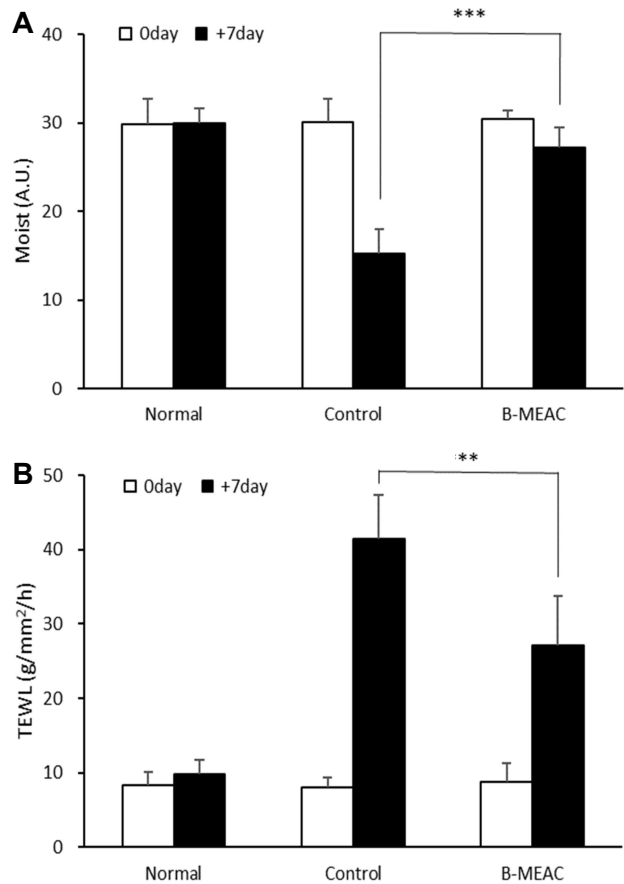


Fig. 4. Effect of oral administrated B-MEAC on moist (A) and TEWL (B) in Balb/c mouse skin. All data are shown as the mean ± SD for groups of five experiments. Significance was determined by one-way ANOVA. ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs control. TEWL: Transepidermal water loss, B-MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu* fermented with *B. plumbea* (10 mg/mouse).

경구투여함으로써 건조유도된 마우스의 피부 조직 내 콜라겐 층을 유지시키고 피부 건조를 차단하여 교원 섬유 구조 형태를 조밀하게 유지시킬 수 있음을 의미한다.

보습 관련 인자의 발현에 미치는 B-MEAC의 영향

아세트산과 에테르에 의해 건조유도된 마우스에 B-MEAC를 경구투여 하였을 때 피부 보습 기능에 미치는 영향을 확인하기 위하여 보습 관련 인자들의 발현을 Western blot 기법으로 확인하였다. 먼저 MMP-1과 collagen의 단백질 발현량을 확인한 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 피부 건조를 유발한 대조군에서는 MMP-1 단백질의 발현량은 증가하였고, collagen 단백질의 발현량은 감소한 반면에, 시료를 경구투여한 B-MEAC군에서는 대조군에 비하여 MMP-1 단백질의 발현량은 감소하였고, collagen 단백질의 발현량은 증가하였다($p<0.001$). 이는 피부 건조로 줄어든 콜라겐 양이 회복된 것으로 Masson's trichrome

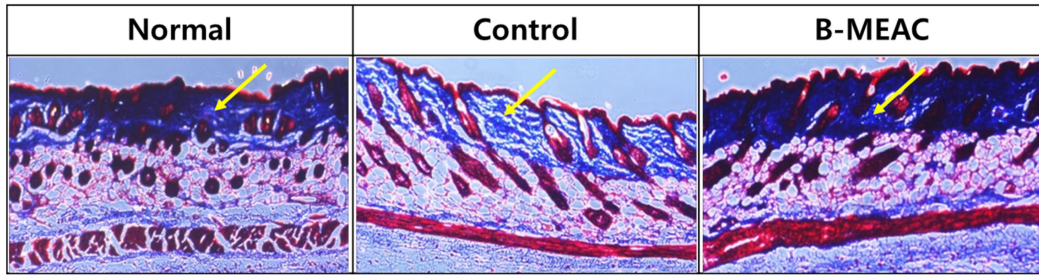


Fig. 5. Effect of oral administrated B-MEAC on collagen density in Balb/c mouse skin by Masson's trichrome staining (X100). B-MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu* fermented with *B. plumbea* (10 mg/mouse), Yellow arrows indicate collagen positions.

염색 결과와도 일치하며, MMP-1 단백질 발현 감소에 의한 collagen 단백질의 발현량에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

또한, 피부는 적절한 보습 상태를 유지하기 위하여 히알루론산을 생성하는 효소인 HAS2와 외부의 수분을 세포막에서 세포 내로 수송하는 막 단백질 역할을 하는

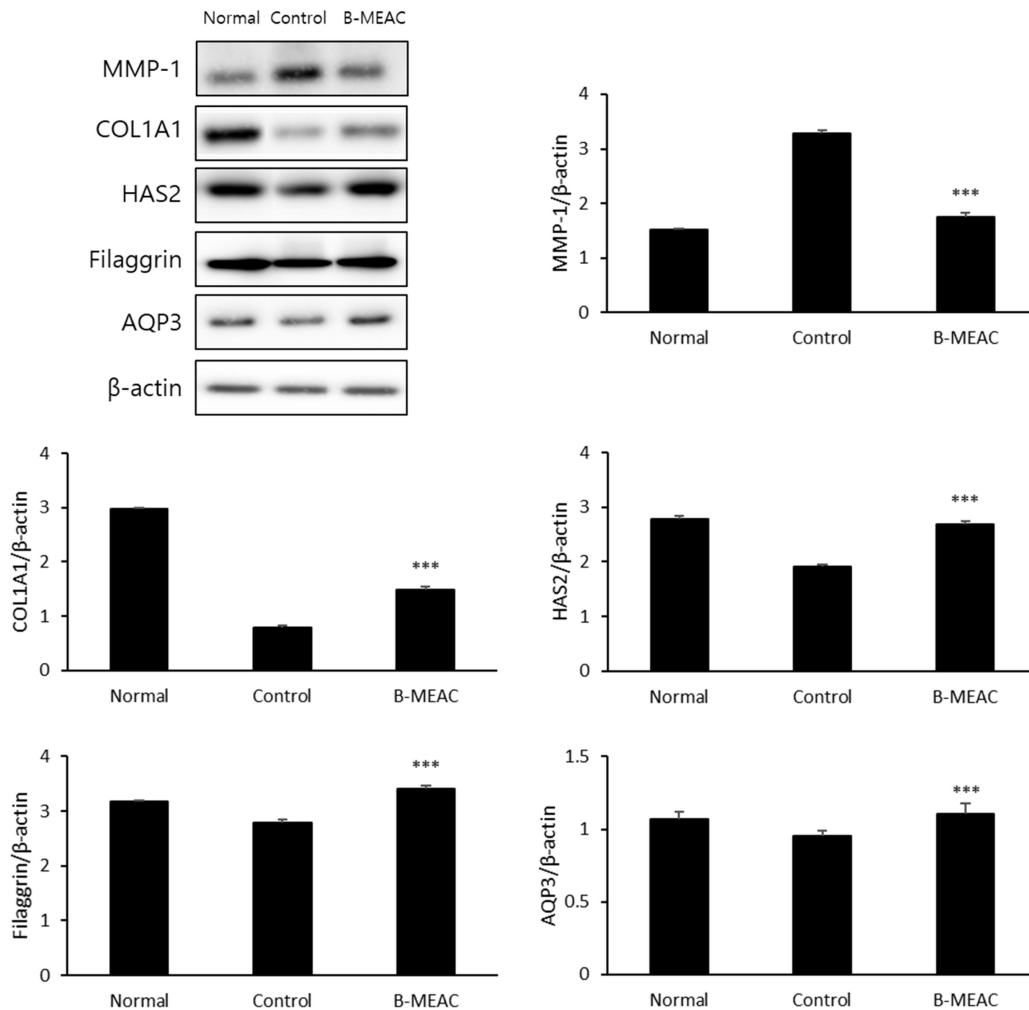


Fig. 6. Effect of oral administrated B-MEAC on protein expression of skin hydration-related factors in Balb/c mouse skin by Western blot analysis. All data are shown as the mean±SD for groups of five experiments. Significance was determined by one-way ANOVA. *** $p < 0.001$ vs control. B-MEAC: Mixed extracts of *A. senticosus* and *C. unshiu* fermented with *B. plumbea* (10 mg/mouse), MMP-1: Matrix metalloproteinase-1, COL1A1: Collagen1A1, HAS2: Hyaluronan synthase-2, AQP3: Aquaporin-3.

AQP3의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[23, 36]. 따라서 B-MEAC 경구투여에 의하여 피부 보습에 관련된 HAS2와 AQP3 단백질 발현에 미치는 영향을 측정된 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 대조군의 경우 건조 유도로 인해 정상군에 비하여 HAS2와 AQP3 단백질의 발현이 감소하였으나, B-MEAC군에서는 건조 유도에 의해 감소된 이들 단백질이 회복된 것으로 나타났다($p < 0.001$).

각질형성세포의 분화를 촉진하는 involucrin, loricrin 및 filaggrin과 같은 분화촉진인자들은 피부 장벽기능에 중요한 역할을 하는 각질세포막 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다[14]. 특히 filaggrin은 분해과정을 통해 피부 보습기능에 중요한 역할을 하는 NMF를 형성한다[28]. 따라서 건조유도된 마우스에 B-MEAC를 경구투여 하였을 때 피부 장벽기능의 회복에 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 각질세포막 형성에 관여하는 분화 촉진인자 중 하나인 filaggrin의 발현량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 대조군에서는 정상군에 비하여 filaggrin 단백질의 발현이 감소한 반면에 B-MEAC 처리에 의해 filaggrin 단백질 발현이 회복되는 것으로 나타났다($p < 0.001$). 이러한 결과는 B-MEAC 경구투여로 피부 보습 및 장벽과 관련된 단백질의 발현을 조절하여 건조 유도에 의하여 손상된 피부를 회복시키는 효과가 있음을 의미한다.

따라서 본 연구에서 B-MEAC의 보습효과는 엘라스타제 억제 활성, MMP-1 발현 감소, 콜라겐 생성 촉진, 피부 보습 관련 단백질인 HAS2 및 AQP3 발현 증가, 피부 장벽기능의 중요인자인 filaggrin 발현 증가를 통한 수분량 증가와 TEWL 감소에 의해 나타나는 것으로 이너뷰티 소재로서의 개발 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부의 재원으로 한국산업단지공단의 산업집적지 경쟁력 강화사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다(IRSU2204).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Baik, S. O., Bock, J. Y., Chun, H. J., Jeong, S. I., Baek, S. H., Oh, H. B. and Kim, I. K. 2001. Analysis and quantitative distribution of glycosided flavonoids in citrus and Korean Chung-pi. *Anal. Sci. Technol.* **14**, 340-348.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1203.
- Cha, B. C. and Lee, E. H. 2013. Ingredients of tyrosinase and elastase inhibitory activity from calyx of *Diospyros kaki* Thunberg. *Kor. J. Pharmacogn.* **44**, 182-187.
- Choi, M. H., Sel, Y. J. and Shin, H. J. 2017. Application of domestic bamboo stems mainly for inner beauty product development: A review. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **32**, 1-8.
- Folin, A. D. and Denis, W. 1915. A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *J. Biol. Chem.* **22**, 305-308.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572-584.
- Jacobi, O. T. 1959. About the mechanism of moisture regulation in the horny layer of the skin. *Pro. Sci. Sect. Good Assoc.* **31**, 22-24.
- Jang, S. S., Kim, M. J. and Kim, A. J. 2014. Quality characteristics and preparation of Dasik using roasted mung bean. *Kor. J. Hum. Eco.* **23**, 357-366.
- Jeong, H. J., Koo, H. N., Myung, N. I., Shin, M. K., Kim, J. W., Kim, D. K., Kim, K. S., Kim, H. M. and Lee, Y. M. 2001. Inhibitory effects of mast cell-mediated allergic reactions by cell cultured Siberian Ginseng. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **23**, 107-117.
- Jeong, H. Y., Oh, C. H. and Eun, J. S. 1998. Effect of Citri reticulatae viride pericardium water extract on immunocytes in mice. *Kor. J. Orient. Med. Pathol.* **12**, 55-62.
- Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on super-oxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
- Jung, S. M., Schumacher, H. R., Kim, H. C., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Pessler, F. 2007. Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants: Elevation of prostaglandin D2 levels. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R64.
- Kim, A. H., Kim, Y. S., Piao, Z., Shin, Y. C. and Ha, M. W. 2018. Cutaneous hydration effect of collagen hydrolysate containing collagen tripeptides. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **50**, 420-429.
- Kim, B., Choi, Y. E. and Kim, H. S. 2014. *Eruca sativa* and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function (PPAR)- α and suppression of inflammatory cytokines. *Phytother. Res.* **28**, 1359-1366.
- Kim, D. Y. and Kim, M. K. 2019. Anti-inflammatory effect of *Paeonia japonica* extracts in HaCaT cells. *J. Invest. Cosmetol.* **15**, 247-254.
- Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Lee, B. H. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 337-342.
- Kim, J. Y., Kim, H. Y., Park, K. H. and Cho, Y. H. 2004. Understanding of functional foods for nutritional skin care. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* **30**, 313-320.
- Kim, M. K. 2018. The utilization of spinach ethanol extract as a beauty food material. *J. Kor. Soc. Beauty Art* **19**, 215-229.

19. Lee, G. H. 2014. Ph.D. dissertation, A study on the effects of extract jujube and extract of fermented jujube on the biological and physiological activation of skin. Daejeon University, Daejeon, Korea.
20. Lee, G. W., Park, S. M., Yoo, Y. C. and Cho, Y. H. 2013. Effect of *Ponciri fructus* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* on the collagen synthesis and expression of matrix metalloproteinase-1. *KSBB J.* **28**, 1-9.
21. Lee, H. J. 2006. Effects of *Citri reticulatae* viride pericarpium on the vascular endothelial growth factor (VEGF) in the bronchial asthma mouse model. *J. Pediatr. Kor. Med.* **4**, 181-194.
22. Lee, Y. S., Jang, M. J. and Seo, S. J. 2019. Antioxidant and anti-aging activity of extracts from *Chionanthus retusus* flower. *J. Invest. Cosmetol.* **15**, 229-237.
23. Li, J., Tang, H., Hu, X., Chen, M. and Xie, H. 2010. Aquaporin-3 gene and protein expression in sun-protected human skin decreases with skin ageing. *Australas J. Dermatol.* **51**, 106-112.
24. Li, X., Huang, Y. and Chen, D. 2013. Protective effect against hydroxyl-induced DNA damage and antioxidant activity of *Citri reticulatae* pericarpium. *Adv. Pharm. Bull.* **3**, 175-181.
25. Lim, J. M., Lee, J. S. and Lee, J. H. 2020. Evaluation of physiological activity of soybean extract for cosmetic material development. *J. Invest. Cosmetol.* **16**, 11-22.
26. Lin, Q. Y., Jin, L. J., Cao, Z. H., Lu, Y. N., Xue, H. Y. and Xu, Y. P. 2008. *Acanthopanax senticosus* suppresses reactive oxygen species production by mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Phytother. Res.* **22**, 740-745.
27. Marotti, I., Bonetti, A., Biavati, B., Catizone, P. and Dinelli, G. 2007. Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flavonoid glycosides by bifidobacterium species from human intestinal origin. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3913-3919.
28. McAleer, M. A., Jakasa, I., Raj, N., O'Donnell, C. P., Lane, M. E., Rawlings, A. V., Voegeli, R., McLean, W. H. I., Kezic, S. and Irvine, A. D. 2018. Early-life regional and temporal variation in filaggrin-derived natural moisturizing factor, filaggrin-processing enzyme activity, corneocyte phenotypes and plasmin activity: implications for atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **179**, 431-441.
29. Min, S. S., Yuan, T. S. and Po, J. C. 2008. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chem.* **111**, 892-896.
30. Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampeietro, A. R. and Vatuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 109-114.
31. Okawa, T., Yamaguchi, Y., Takada, S., Sakai, Y., Numata, N., Nakamura, F., Nagashima, Y. and Ikezawa, Z. 2018. Oral administration of collagen tripeptide improves dryness and pruritus in the acetone-induced dry skin model. *J. Dermatol. Sci.* **66**, 136-143.
32. Park, J. S., Lee, J. S. and Lee, J. H. 2020. Antioxidative and antimutagenic effects of *Panicum miliaceum* L. *Kor. J. Food Preserv.* **27**, 261-269.
33. Poojary, M. M., Dellarosa, N., Roohinejad, S., Koubaa, M., Tylewicz, U., Gómez-Galindo, F., Saraiva, J. A., Rosa, M. D. and Barba, F. J. 2017. Influence of innovative processing on γ -aminobutyric acid (GABA) contents in plant food materials. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 895-905.
34. Rho, Y. H., Jeong, H. W. and Lee, W. S. 2002. Experimental study of fraction of *Citri reticulatae* viride pericarpium extract on the brain damage in cerebral ischemia. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **16**, 893-898.
35. Schmolz, M. W., Sacher, F. and Aicher, B. 2001. The synthesis of Rantes, G-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 and IL-13 in human whole-blood cultures in modulated by an extract from *Eleutherococcus senticosus* L. roots. *Phytother. Res.* **15**, 268-270.
36. So, Y., Hwang, J. Y., Kim, H. W., Jo, H. N. and Lee, T. B. 2019. Skin hydration and skin barrier effects of *Cymbopogon citratus* and *Perilla frutescens* extracts. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **45**, 225-235.
37. Spencer, T. S. 1976. Water and the horny layer. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **27**, 63-72.
38. Wang, X., Hai, C. X., Liang, X., Yu, S. X., Zhang, W. and Li, Y. L. 2010. The protective effects of *Acanthopanax senticosus* Hams aqueous extracts against oxidative stress: Role of Nrf2 and antioxidant enzymes. *J. Ethnopharmacol.* **127**, 424-432.
39. Yi, J. M., Kim, M. S., Seo, S. W., Lee, K. N., Yook, C. S. and Kim, H. M. 2001. *Acanthopanax senticosus* root inhibits mast cell-dependent anaphylaxis. *Clin. Chim. Acta.* **312**, 163-168.
40. Yoon, T. J., Lee, S. W., Shin, K. S., Choi, W. H., Hwang, S. H., Seo, S. H., Kim, S. H. and Park, W. M. 2002. Effect of hot water extracts from *Acanthopanax senticosus* on systemic anaphylaxis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**, 518-523.
41. Yoon, T. J., Yoo, S. C., Lee, S. W., Shin, K. S., Choi, W. H., Hwang, S. H., Ha, E. S., Jo, S. K., Kim, S. H. and Park, W. M. 2004. Anti-metastatic activity of *Acanthopanax senticosus* extract and its possible immunological mechanism of action. *J. Ethnopharmacol.* **93**, 247-253.

초록 : 이너뷰티 소재로서의 생물전환된 가시오가피-진피 혼합 추출물의 생물학적 활성

김은정^{1*} · 김소연^{2†} · 강수연¹ · 유영춘² · 윤택준³ · 이계원^{1*} · 조영호^{1*}

(¹건양대학교 제약생명공학과, ²건양대학교 의과대학 미생물학교실, ³㈜두젠바이오)

본 연구에서는 이너뷰티용 소재로서의 활용가능성을 확인하기 위하여 생물전환 가시오가피-진피 혼합 추출물(B-MEAC)의 항산화 활성, 엘라스타제 억제활성 및 피부보습 효과 등을 평가하였다. B-MEAC의 항산화 활성을 측정한 결과 DPPH radical을 농도의존적으로 소거하여 SC₅₀이 156.1±0.82 µg/ml로 나타났다. 또한, 엘라스타제 억제활성을 측정한 결과 B-MEAC 처리 농도 의존적으로 엘라스타제 활성을 억제하는 것으로 확인되었다($p < 0.001$). 경구투여한 B-MEAC가 마우스 피부 보습에 미치는 영향을 확인하기 위하여 피부 수분량과 경피수분손실량을 측정한 결과 건조유도 된 대조군에 비하여 피부 수분량은 증가하고 ($p < 0.001$), 경피수분손실량은 감소하는 것으로 나타났다($p < 0.01$). 또한, 건조유도 된 마우스 피부의 교원섬유 변화에 미치는 영향을 Masson's trichrome 염색을 통해 관찰한 결과 B-MEAC를 투여한 군에서 콜라겐의 양이 대조군에 비해 상대적으로 증가하여 푸른색으로 보다 진하게 염색되었다. 또한, 건조유도 된 마우스 피부의 보습 기능에 미치는 영향을 확인하기 위하여 보습 관련 인자들의 발현을 Western blot 기법으로 확인한 결과 B-MEAC를 투여한 군에서 대조군에 비하여 MMP-1 단백질의 발현량은 감소하였고, COL1A1, HAS2, filaggrin, AQP3 단백질 발현량은 회복되는 것으로 나타났다($p < 0.001$). 따라서 B-MEAC의 보습효과는 엘라스타제 활성 억제, MMP-1 발현 감소, 콜라겐 생성 촉진, 피부 보습 관련 단백질인 HAS2 및 AQP3 발현 증가, 피부 장벽기능의 중요인자인 filaggrin 발현 증가를 통한 수분량 증가와 TEWL 감소에 의해 나타나는 것으로 이너뷰티 소재로서의 개발 가능성을 제시한다.