

## 각종 약용 식물로부터 피부노화 억제 관련 elastase 저해물질의 탐색 및 추출조건

곽윤진\* · 이대형\* · 김나미\*\* · 이종수\*†

\*배재대학교 유전공학과, \*\*KT & G 중앙연구원

## Screening and Extraction Condition of Anti-skin Aging Elastase Inhibitor from Medicinal Plants

Yoon Jin Kwak\*, Dae Hyung Lee\*, Na Mi Kim\*\*, and Jong Soo Lee\*†

\*Dept. of Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea.

\*\*Central Research Institute, KT & G Corporation, Daejeon 305-345, Korea.

**ABSTRACT :** To develop a new anti-skin aging cosmetics or functional foods by using elastase inhibitor, a potent elastase inhibitor was screened from various extracts of medicinal plants and its optimal extraction condition was investigated. Methanol extracts of *Rubi fructus* showed the highest elastase inhibitory activity of 85%. The elastase inhibitor of *Rubi fructus* was maximally extracted when it was treated with 80% methanol at 50 °C for 12hr and its elastase inhibitory activity (IC<sub>50</sub>) was 0.52 mg.

**Key words :** anti-skin aging cosmetics, *Rubi fructus*, elastase inhibitor

### 서 언

기능성 화장품은 일반 화장품에 약리 효능이 첨가된 화장품으로 크게 미백 제품과 주름 개선 제품 및 자외선 보호 제품 등으로 분류할 수 있다. 미백 제품은 주로 멜라닌 생성 억제와 tyrosinase 저해, 피부 각질 제거, 피부 색소 침착 방지 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있고 주름 개선 제품은 피부 탄력강화, 콜라겐 합성 촉진, 표피 신진대사 촉진 및 섬유아세포 생성 촉진 등의 효능이 알려져 있다 (Park, 1997). 이러한 기능성 화장품의 원료는 천연물 특히 약용 식물이나 허브를 중심으로 많이 개발되고 있으며 특히 노화 억제와 관련된 천연 항산화 물질에 대한 연구들이 매우 활발하게 진행되고 있다 (Wiedow *et al.*, 1990). 한편, 피부노화 현상은 여러 가지 구조적, 기능적 변화를 보이는데 특히 나이, 자외선 등 내외적인 여러 가지 스트레스는 피부의 탄력성과 윤택성을 감소시키고, 기미, 주근깨 등 피부 색소를 침착 시키며, 주름이 생기게 하는 등 피부노화 현상을 촉진한다 (Voegeli, 1996). 이러한 피부 노화 현상은 피부세포 내 생체결합물의 손실, 피부 각질층의 구조 변화, 표피세포의 분화감소, 진피내 섬유아세포에 의한 단백질 및 세포간 물질의 생체합성기능 저하 등에 의해

나타난다 (Wiedow *et al.*, 1990). 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 깨어지면서 즉, elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부 노화가 발생한다 (Lee *et al.*, 2003). 그러므로, 피부 노화의 주원인중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로써 피부노화를 억제할 수 있다 (Lee *et al.*, 1999).

Elastase [EC 3.4.4.7]는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피조직의 그물망 구조 결합을 끊어 줌으로 주름생성의 주원인 효소로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 1999a; Lee *et al.*, 2003). 이 효소는 1949년 췌장 추출물에서 처음 발견되었으며 (Yoon *et al.*, 2002), 미생물 (Manach *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 1996; Yang, 1995) 과 고등식물 (James *et al.*, 1996) 등에서도 발견되었다. 또한 다형핵 백혈구 (PMNs)와 단핵 백혈구 (monocytes), 혈소판, 평활근 세포 등에서도 확인되었다 (Lee & Choi, 1986). 이러한 elastase의 활성을 저해시켜 주름 생성을 억제시킴으로 피부노화를 방지 하려는 연구가 활발히 진행되어 지금까지  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor, mucus proteinase inhibitor,  $\alpha$ -2-macrog-

†Corresponding author: (Phone) +82-42-520-5388 (E-mail) biotech8@mail.pcu.ac.kr

Received July 20, 2005 / Accepted December 30, 2005

lobulin, inter-a-trypsin, bowman-birk inhibitor (콩에서 추출), verapamil, beta lactam, chondroitin sulfates, deoxycycline, heparin 등의 elastase 저해제들이 보고되어 있다 (Lee et al., 1999b).

그러나 현재까지 개발되어 일부 이용되고 있는 피부 노화 억제제는 그 효능과 부작용이 확실히 검증되지 않았고, 비교적 가격이 비싼 문제점이 있다. 따라서, 본 연구에서는 각종 약용 식물로부터 부작용이 없고, 효능이 우수한 새로운 피부 노화 억제제를 탐색, 개발하여 이를 산업화 하고자 우선 각종 약용 식물의 유기용매 추출물에 대한 elastase 저해 활성을 측정하여 우수 시료를 선정한 후 추출 최적조건을 검토 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

노화억제에 관련된 64종의 약용식물을 (주)초당농산에서 분양 받아 분쇄하고 동결 건조한 후 분말로 하여 시료로 사용하였다. Elastase 저해 활성 측정을 위한 효소로는 porcine pancreatic elastase (Sigma Co., USA)를, 기질로는 Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNa (Sigma Co., USA)을 사용하였고 기타 일반 시약과 유기용매는 일급 또는 특급품을 사용하였다.

### 2. 추출물 제조

각각의 약용식물 분말에 증류수 (1 : 40)를 가한 후 30°C에

Table 1. Elastase inhibitory activities of some extracts from medicinal plants<sup>2)</sup>

(unit : %)

Scientific name	Part used	Water extracts	Ethanol extracts	Methanol extracts	Scientific name	Part used	Water extracts	Ethanol extracts	Methanol extracts
<i>Achyranthes japonica</i>	Radix	17	N.D.	5	<i>Chaenomeles sinensis</i>	Fruit	54	32	N.D.
<i>Acorus gramineus</i>	Radix	4	3	N.D.	<i>Cilium officinale</i>	Radix	43	N.D.	N.D.
<i>Akebia quinata</i>	Radix	N.D. <sup>1)</sup>	N.D.	10	<i>Cinnamomum loureirii</i>	Cortex	52	51	67
<i>Alisma orientale</i>	Radix	12	20	18	<i>Cistanche deserticola</i>	Fruit	N.D.	15	N.D.
<i>Alpinia officinarumi</i>	Radix	N.D.	N.D.	N.D.	<i>Citrus unshiu</i>	Cortex	N.D.	22	19
<i>Alpinia oxyphylla</i>	Fruit	25	7	26	<i>Coix lachryma jaobi</i>	Fruit	N.D.	15	N.D.
<i>Angelica dahurica</i>	Radix	N.D.	N.D.	14	<i>Coptis japonica</i>	Radix	N.D.	N.D.	23
<i>Angelica gigas</i>	Fruit	13	N.D.	N.D.	<i>Crataegus pinnatifida</i>	Fruit	28	8	13
<i>Angelica koreana</i>	Radix	N.D. <sup>1)</sup>	N.D.	N.D.	<i>Curcuma longa</i>	Radix	3	17	4
<i>Aralia continentalis</i>	Radix	N.D.	8	N.D.	<i>Cyperus rotundus</i>	Radix	N.D.	19	47
<i>Artemisia princeps</i>	Whole	41	3	16	<i>Dioscorea batatas</i>	Radix	51	58	50
<i>Astragalus membranaceus</i>	Radix	N.D.	N.D.	N.D.	<i>Eucommia ulmoides</i>	Cortex	28	15	3
<i>Atractylodes japonica</i>	Radix	19	N.D.	25	<i>Gardenia jasminoides</i>	Fruit	N.D.	N.D.	N.D.
<i>atractylodes Rhizoma</i>	Fruit	26	10	2	<i>Gleditsia sinensis</i>	Whole	45	40	48
<i>Bambusae calulis</i>	Stem	N.D.	5	18	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Radix	18	21	55
<i>Cartharus tinctorius</i>	Flower	N.D.	49	49	<i>Hordeum vulgare</i>	Seed	29	5	N.D.
<i>Cassia obtusifolia</i>	Fruit	19	15	19	<i>Leonurus sibiricus</i>	Whole	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Lindera strychnifolia</i>	Radix	N.D.	N.D.	N.D.	<i>Polyporus umbellatus</i>	Radix	57	N.D.	N.D.
<i>Lonicera japonica</i>	Herba	44	9	N.D.	<i>Poncirus trifoliata</i>	Fruit	33	N.D.	N.D.
<i>Lycium chinense</i>	Fruit	56	N.D.	N.D.	<i>Poria cocos Wolf</i>	Whole	N.D.	N.D.	26
<i>Magnolia denudata</i>	Radix	N.D.	7	N.D.	<i>Prunus persica</i>	Seed	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Magnolia obovata</i>	Cortex	N.D.	N.D.	29	<i>Pueraria thunbergiana</i>	Radix	N.D.	14	N.D.
<i>Makino agastache</i>	Herba	11	15	25	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Radix	N.D.	16	N.D.
<i>Morus alba</i>	Stem	18.5	18	36.8	<i>Rheum palmatum</i>	Radix	75	N.D.	77
<i>Morus alba</i>	Leave	19	6	10.6	<i>Rubus coreanus</i>	Fruit	25	46	85
<i>Paeonia lactiflora</i>	Radix	N.D.	30	N.D.	<i>Schizandra chinensis</i>	Fruit	N.D.	23	29
<i>Paeonia suffruticosa</i>	Cortex	29	11	N.D.	<i>Scrophularia buergeriana</i>	Radix	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Perilla frutescens</i>	Seed	N.D.	21	N.D.	<i>Siegesbeckia pubescens</i>	Radix	N.D.	N.D.	39
<i>Phellodendron amurense</i>	Cortex	N.D.	22	N.D.	<i>Taraxacum platycarpum</i>	Whole	N.D.	4	N.D.
<i>Platycodon grandiflorum</i>	Radix	8	N.D.	N.D.	<i>Torilis japonica</i>	Fruit	N.D.	15	N.D.
<i>Polygala tenuifolia</i>	Whole	N.D.	N.D.	N.D.	<i>Ulmus macrocarpa</i>	Cortex	N.D.	59	70
<i>Polygonatum sibiricum</i>	Radix	N.D.	N.D.	N.D.	<i>Xanthium strumarium</i>	Fruit	N.D.	N.D.	4

<sup>1)</sup> N.D. : Not determined

<sup>2)</sup> sample 1 mg/ml performed

서 200 rpm으로 진탕 항온 수조에서 12시간 동안 추출하였다. 이 추출액을 16,000×g로 원심 분리하여 상등액을 취하고 이를 Whatman filter paper (No. 2)로 여과한 후 동결 건조하여 물 추출 시료로 사용 하였다. 또한 분말시료에 70%의 에탄올과 메탄올을 가하여 (1:20) 섞은 후 30℃에서 200 rpm으로 진탕항온수조에서 12시간 동안 추출하였다. 이 추출액을 16,000×g로 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하고 이를 Whatman filter paper (No. 2)로 여과 한 후 회전농축기로 유기용매를 제거한 다음 동결 건조하여 에탄올과 메탄올 추출 시료로 사용하였다.

### 3. Elastase 저해 활성

0.2 M Tris-Cl buffer (pH 8.0)에 elastase 1 unit와 suc-ala-ala-ala-*p*-nitroanilide 0.8 mM을 넣어 25℃에서 20분간 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하여 기질로부터 생성되는 *p*-nitroanilide의 양을 정량하였다. Elastase 활성 1 unit은 분당 1 μmol의 *p*-nitroanilide을 생성하는 elastase의 효소의 양으로 하였다. 또한, 저해 활성은 다음의 식으로 부터 계산하였다 (Park, 1997).

$$\text{Elastase inhibitory activity (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

A : Elastase activity without sample

B : Elastase activity with sample

### 4. Elastase 저해 물질의 추출조건

우수시료로 최종 선발된 복분자 메탄올 추출물을 추출온도 30~60℃, 추출시간을 6~24시간으로 다양하게 구분하여 추출물을 제조한 후 이들의 elastase 저해 활성을 측정하여 추출 최적 조건을 검토 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 약용식물 추출물 들의 Elastase 저해 활성

노화억제에 관련이 있다고 추정되는 각종 약용식물들의 유기용매 추출물에 대한 elastase 저해 활성을 조사한 결과, 복분자 (*Rubi fructus*, 복분자말기 *Rubus coreanus Miquel*의 열매)의 메탄올 추출물이 85%의 elastase 저해 활성을 보여 가장 우수하였다 (Table 1). 그리고 대황 (*Rheum palmatum Linne*)의 물 추출물은 75%, 메탄올 추출물은 77%의 elastase 저해 활성을 보여 지금까지 알려진 콩 등의 elastase 저해활성보다 대체로 10~15% 더 높은 결과를 나타냈다. 최종 시료로 선정 한 복분자의 생리기능성으로는 주로 안토시아닌 계열의 색소에 의한 항산화 활성 등 (Yoon *et al.*, 2002)이 알려져 있으며 최근 리쿠르트 형태의 술이 개발되어 시판되고 있으나 아직까지 복분자의 elastase 저해에 관한 연구나 이를 이용한 제품 개발 연구는 실시된바 없다. 따라서 본 연구의 복분자로부터 피부노화 억제물질의 생산과 특성 연구 자료는 새로운

기능성 피부 노화 억제용 화장품 개발에 매우 유용하게 활용 될 것으로 사료된다.

한편 선정된 복분자의 일반성분을 AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) (Kenneth, 1995)로 조사한 결과 수분 9.4%, 조단백질 8.2%, 조지방 1.4%, 회분 5.3%, 탄수화물 75.6%이었다.

### 2. Elastase 저해물질의 추출조건

가장 높은 elastase 저해 활성을 보인 복분자로 부터 elastase 저해물질을 대량으로 얻기 위해 추출 최적조건을 검토한 결과, elastase 저해 물질은 복분자 동결 건조 분말을 물에 1:20으로 현탁시킨 후 50℃에서 12시간 추출하였을 때 가장 많

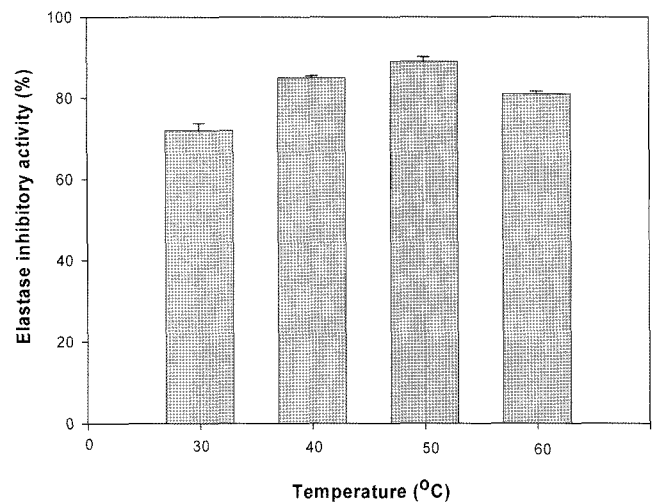


Fig. 1. Effect of extraction temperature on the extraction of elastase inhibitor from *Rubi fructus*.

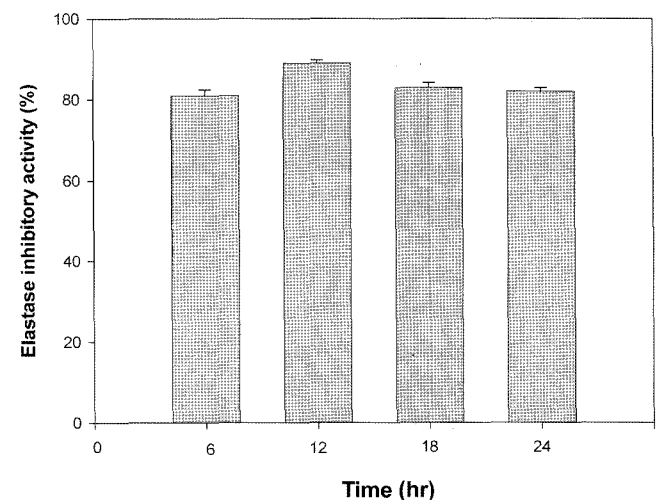


Fig. 2. Effect of extraction time on the extraction of elastase inhibitor from *Rubi fructus*.

이 추출되었고 이 추출물의 elastase 저해 활성은 89%였고 IC<sub>50</sub>값이 0.52 mg으로 매우 높았다 (Fig. 1, 2).

## 적 요

본 연구에서는 비교적 가격이 저렴하고 부작용이 없으면서 효능이 우수한 피부 노화 억제 제품을 개발하고자 먼저 다양한 종류의 약용식물을 대상으로 각종 유기용매 추출물을 제조한 후 이들의 elastase 저해 활성을 측정하여 우수 식물을 선발하고 이들로 부터 elastase 저해제 추출 최적조건을 검토하였다. 64종의 약용식물에 대한 다양한 추출물 가운데 복분자 메탄올 추출물의 elastase 저해 활성이 85%로 가장 높았고 이 저해물질은 메탄올로 50°C에서 12시간 진탕 시켰을 때 가장 많이 추출 되었다.

## LITERATURE CITED

- James AE, Timothy DW, Gordon L** (1996) Inhibition of human leucocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitors. *Biochemistry*. 35:9090-9096.
- Kenneth H** (1995) AOAC; Official methods of analysis. 15th edition, Association of Official Analysis Chemist, Virginia, U.S.A.
- Lee KK, Kim JH, Cho JJ, Choi JD** (1999a) Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. *Inter. J. Cosm. Sci.* 21(2):71-82.
- Lee SH, Shin DJ, Kim DW, Jun JB, Kim JC, Chung SL** (1999b) Level of Plasma Elastase- $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor in Patients with Behcet's Disease. *Annals of Dermatology*. 11(1):9-12.
- Lee SY, An JH, Cho HY** (2003) Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida bunge* in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechno.* 46(1):60-65.
- Lee KK, Choi JD.** (1986) Inactivation of Spinach Glycolat Oxidase by Arginine-Specific Reagent. *Kor. Biochem. J.* 119 (1):86-92.
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C** (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivative which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 426:331-336.
- Park SN** (1997) Skin aging and antioxidants. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* 23(1):75-132.
- Rice-Evants CA, Miller NJ, Paganga G** (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 20:933-956.
- Voegeli R** (1996) Elastase and tryptase determination on human skin surface. *Cosmetic & Toiletries* 111:51-58
- Wiedow OJ, Schroder M, Christophers E** (1990) Elafin : An elastase specific inhibition of human skin. *J. Biol. Chem.* 265(25):14791-14801.
- Yoon IJ, Cho Y, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH** (2002) Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34(5):898-904.
- Yang HC** (1995) *Food New Biomaterials*. Hanlimnon, Seoul, Korea. p. 3-149.