

초고압 추출 공정에 의한 당귀 추출물의 미백 및 자외선 차단 효과

김철희* · 권민철* · 한재건* · 나천수** · 곽형근*** · 최근표**** · 박옥연**** · 이현용*****†

*강원대학교 BT특성화학부대학, ** (주)생명의나무, *** (주)스카이007,
****강원도립대학 식품가공제과제빵과, *****강원대학교 생명공학연구소

Skin-Whitening and UV-Protective Effects of *Angelica gigas* Nakai Extracts on Ultra High Pressure Extraction Process

Cheol Hee Kim*, Min Chul Kwon*, Jae Gun Han*, Chun Su Na**, Hyeong Geun Kwak***, Geun Pyo Choi****, Uk Yeon Park*****, and Hyeon Yong Lee*****†

*College of Bioscience & Biotechnology, Kangwon Natl. Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

**Lifetree Biotech Co. Ltd., Suwon 441-853, Korea.

***SKY007 Co., Gangneung 210-340, Korea.

****Department of Food Processing & Bakery, Gangwon Provincial Univ., Gangneung 210-804, Korea.

*****Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon Natl. Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to investigate the enhancement of UV-protection activities and skin-whitening effects from *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. Extraction at 60°C treated by ultra high pressure for 15 minute and associated with ultrasofication (HPE15) was showed more than double yield, compare conventional extraction, as 12.24% (w/w) from *A. gigas*. Extracts of HPE15 reduced expression of MMP-1 on UV-irradiated CCD-986sk cells as 122.2% and revealed high inhibitory potency on tyrosinase as 69.4% by adding samples. Extracts of HPE15 from *A. gigas* showed strong inhibition effect on melanin production test by Clone M-3 cells as 82.4% by adding extracts. From the preliminary observations, we considered that the extracts from *A. gigas* could be potent natural materials for skin-whitening agent, and could be used as a potential anti-aging agent for the photo-damaged skin.

Key Words : *Angelica gigas* Nakai, Ultra High Pressure, UV Protection, Skin-Whitening

서 론

피부 노화는 내인성 노화 (intrinsic aging)와 외인성 노화 (extrinsic aging)로 구분되는데 외인성 노화는 자외선과 같은 여러 가지 환경요소의 영향을 받아 일어나기 때문에 인위적인 조작을 통한 제어가 가능하다. 피부는 자외선 등 외부의 스트레스나 내부의 산화적 손상에 의해 구성 기질 물질인 콜라겐의 분해가 진행된다. 콜라겐 분해가 진행됨에 따라 주름이 깊어지고 탄력이 감소되어 피부가 처지거나 표면이 거칠어지는 양상을 보인다 (Gilchrist, 1989). 이외에도 피부 노화가 진행됨에 따라 피부 두께가 얇아지고, 자외선 조사에 따른 기미나 검버섯 등 melanin이 각질세포로 올라오게 되므로 피부색이 칙칙하고 어두워지게 된다. 이러한 변화를 통해 피부의 연령 및 노화의 정도를 유추할 수 있으므로 피부의 생리학적 관찰을 하는데 중요한 지표가 될 수 있다 (Peter, 1994). 특히 자

외선에 심하게 노출되면 melanin 색소가 피부에 과다하게 침착되어 피부노화나 피부손상을 초래하게 된다 (Park & Kim, 1995). 최근 이러한 피부 노화 방지와 역제를 위해, 또는 손상된 피부를 회복시키기 위해 melanin 색소의 생성을 억제하는 물질에 대하여 관심이 증가되고 있다. melanin은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. Melanin은 여러 가지 외적인 요인에 의해 생성이 증가되어 다량의 melanin이 각질형성세포에 전달되고 피부 상피층에 축적되어 과색소침착 현상이 나타나게 된다. 이런 melanin의 과잉 생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부 노화를 촉진하며 피부암의 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2005). Tyrosine으로부터 melanin의 생합성에서 가장 중요한 단계는 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 일어나는 초기 반응 (Hearing & Tsukamoto, 1991)으로 tyrosine의 hydroxyl기를 부착시켜 3,4-dihydroxy phenylalanine

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received March 25, 2008 / Revised July 14, 2008 / Accepted July 31, 2008

(DOPA)을 생성하는 기작이다 (Jimenez-Cervantes *et al.*, 1994). 따라서 이 반응의 억제를 통해 melanin 생합성을 억제할 수 있다.

당귀는 나라별로 각기 다른 종이 재배되고 있는데 우리나라에서는 참당귀 (Korean angelica; *Angelica gigas* Nakai), 중국은 중국당귀 [*A. sinensis* (Oliv.) Diels], 일본은 일당귀 (*A. actriloba* Kitagawa)를 같은 용도의 한약재로 사용하고 있다. 국내에 자생하는 참당귀는 우리나라의 전통 한약재로서 깊은 산에 자생하고 있어 야생을 채취하여 사용하다가 약재의 수요가 많아짐에 따라 재배가 확대되어 전국의 해발 300~700 m의 중부부 산간고랭지에서 재배되고 있다 (Yu *et al.*, 2004).

그중에서도 참당귀 (*Angelica gigas* Nakai)는 혈액을 보충시켜주는 보혈효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 한방에서 빈혈이나 부인병 등에 대한 보혈제로 처방된다. (Ahn *et al.*, 1996). 당귀의 약리학적 작용을 나타내는 주성분은 coumarin 유도체인 decursin이라는 물질이며, 이 외에 decursinol, umbelliferon, β -sitosterol 등이 함유되어 있다. Coumarin 유도체는 과거 지혈 시 사용된 항응고제로 급성심근경색 (acutemyocardial infarction)에 사용한 것으로 알려져 있다 (Wessler *et al.*, 1974; Ristola & Pyorala, 1972). 또한 당귀는 혈류 개선 효과가 있어 혈액 순환을 도와 노화방지, 주름 개선 및 조직재생에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 당귀의 조직재생을 통한 자외선 차단효과와 피부 미백 효과에 대해 알아보기 위하여 유용성분의 효과적 용출이 기대되는 초고압 처리 후 그 효능을 비교하였다.

초고압 처리는 최근 식품에서 영양소와 비영양성의 식물성 화학물질 섭취에 있어 가장 효율적으로 활용될 수 있는 추출 기술이다. 초고압 기술은 약용식물의 중요 구성 성분을 단시간에 추출 하는 것이 가능하며, 불순물이 거의 없어 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있는 장점을 가진다 (Deliza *et al.*, 2005).

따라서 본 연구에서는 최근 국내 식·의약품 산업에서 이용되고 있는 초고압 추출 기술을 이용하여 추출한 당귀 추출물의 자외선 차단 효과 및 피부 미백활성에 대한 증진 효과를 알아보고, 더 나아가 향장소재와 관련된 분야에 활용하기 위한 기초 자료로 이용하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 당귀는 2006년 9월 평창에서 채취한 것을 구입하여 실온에서 음건시킨 후 분쇄하여 사용하였다.

2. 추출조건

초고압 추출은 당귀 100 g을 비닐 팩에 증류수와 함께 넣어

공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출 장치 (Ilshin autoclave, Korea)를 이용하여 500 Mpa의 압력으로 각각 5분과 15분간 초고압 공정을 실시하였다. 초고압 추출이 끝난 당귀는 수직환류냉각기가 부착된 추출 flask에 넣고 각각 10배수가 되도록 증류수를 보충한 다음, 60°C에서 12시간 2회 반복 추출하고 초음파 추출공정을 30분 동안 병행하여 완료하였다 (Kim *et al.*, 2007).

대조군으로 사용된 일반 추출물은 100 g의 당귀를 수직환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 넣고 10배수의 증류수를 사용하여 60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하는 방법으로 수득하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압여과 후 농축·동결 건조를 통해 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

3. 세포 및 시약

Enzyme-linked immunosolvent assay (ELISA)를 위해 사용된 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)에 대한 1차 항체와 alkaline phosphatase가 결합된 2차 항체는 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. Human skin fibroblasts (HSFs)와 melanocyte는 각각 CCD-986sk과 Clone-M3 (KCLB No. 10053.1)를 한국세포주은행 (KCLB)으로부터 동결 상태로 구입하여 이용하였다. 한국세포주은행으로부터 구입한 HSFs와 Clone M-3세포는 각각 DMEM과 RPMI1640 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Co.)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

4. 세포주 및 세포 생육 배지

세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 방법인 mosmann법 (Mosmann, 1983)을 변형하여 실시하였다. CCD-986sk 세포를 2×10^4 cells/well의 농도로 96 well plate에 접종한 후 각 well에 시료를 투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액 (5 μ g/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상층액을 제거하고, 10 μ l acid-iso-propanol (0.04 N HCl in iso-propanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. UVA 처리를 이용한 MMP-1 발현 저해 측정 (ELISA법)

CCD-986sk를 1.5×10^5 cells/ml의 농도로 35 mm dish에 약 80% confluency에 도달할 때까지 배양하였다. UV 조사 전에 원래의 배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거한 다음 UV등 (Coralife, 35W, UV)에 필터를 이용하여 UVA (6.3 J/cm²)를 24시간 조사하였다. UVA 조사 후 배

양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에 당귀 추출물을 1 mg/ml의 농도로 투여하여 24시간 동안 배양하였다.

UVA 조사에 의해 유도되는 MMP-1 발현량 측정은 Dunsmore등이 사용한 방법 (Dunsmore *et al.*, 1996)을 이용하여 실시하였다. UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 96 well plate에 분주하고 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. TBS (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% PBS로 37°C에서 1시간 동안 blocking 한 후, 1차 항체 (monoclonal anti-MMP-1 antibody)를 blocking buffer로 사용하여 1 : 3,000으로 희석하여 처리하고 37°C에서 90분간 반응시켰다. PBS로 세척한 다음 2차 항체 (alkaline phosphatase conjugated Goat anti-mouse IgG)를 blocking buffer에 1 : 3,000으로 희석하여 처리하고, 37°C에서 90분간 반응시킨 후 PBS로 세척한 다음 alkaline phosphatase 기질용액 (1 mg/ml, p-mitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer)을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 3N NaOH로 반응을 완전히 중지시킨 후 microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Tyrosinase 억제 효과 탐색

Tyrosinase 억제 효과는 dopachrome방법을 이용하여 측정하였다. 150 µl의 mushroom tyrosinase-150 unit, 225 µl의 2.5 mM L-tyrosine, 225 µl의 0.4 M hepes buffer (pH 6.8), 그리고 300 µl의 ethanol 용액 혹은 시료 (1 mg/ml) 용액을 섞은 후 배양 전과 15분간 배양 후 각각의 흡광도를 475 nm에서 측정하여 억제되는 정도를 살펴보았다. Tyrosinase의 억제 정도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition (\%)} = \frac{(D - C) - (B - A)}{(D - C)} \times 100$$

A와 B는 각각 시료가 첨가된 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액 (기준 용액)의 배양 전과 배양 후의 흡광도이다. 이들 tyrosinase 억제 효과는 100으로 나타날 때 완전한 억제를 의미하며, 0일 때 전혀 억제를 하지 못하는 것을 의미한다.

7. Clone M-3 세포로부터 melanin 생성량 측정

쥐 유래 melanocyte인 Clone-M3 세포는 melanin을 생성한다. Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte 내의 소기관인 melanosome에서 생합성되며 이는 가시광선 영역대의 흡광도를 측정함으로써 생성량을 비교할 수 있다 (Lim *et al.*, 2006). 따라서 본 연구에서는 Clone M-3 세포 접종 후 3일간 시료를 처리하고 배지를 제거한 다음 세포를 PBS로 세척하고, 각 well 당 1 ml의 1N NaOH를 첨가한 후 교반하여 세포막을 용해함으로써 melanin 성분을 녹여 나오게 하여, 가시광선 영역대 중 가장 파장이 짧은 푸른색 가시광선 영역인,

Table 1. The extraction yields of *A. gigas* according to several extraction process.

Sample	Extraction process	Yields (% w/w)
<i>A. gigas</i>	WE	5.98
	UE	8.31
	HPE5	11.49
	HPE15	12.24

WE: extraction with water solvent at 60°C, control

UE: extraction with ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent

HPE5: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 5 minutes

HPE15: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 15 minutes

400 nm에서 흡광도를 측정함으로써 생성량을 비교하였다.

8. 통계처리

당귀 추출물의 자외선 차단 효과 및 피부 미백효과는 Microsoft excel의 student *t*-test에 의해 유의성을 검정하였다. 또한 각 활성 실험 등에 대한 각 실험결과는 triplicate determinations에 의한 Mean ± SD로 표시했으며 각 평균치 간의 차이는 student *t*-test에 의해 p = 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 추출 수율

당귀의 추출 수율은 Table 1에 나타내었다. 모든 조건 중 15분간 초고압 처리한 것이 12.24%로 5.98%를 나타낸 일반 60°C 추출에 비해 2배 이상 높은 추출 수율을 나타내었으며, 초고압을 5분 처리한 것이 11.49%의 추출 수율을 보이며 15분 초고압 처리와 근사한 수치를 나타내었다. 이는 초고압 처리를 통해 시료의 조직과 세포막 변형이 일어나고 용매의 세포 내 침투가 용이해지면서 이에 따른 기존 성분의 용출량 증가 및 기존의 일반 추출법으로는 용출되지 않았던 새로운 성분이 용출되기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 초고압 공정을 이용하면 천연물의 효율적 추출을 통한 수율 증진 및 신물질의 용출을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 세포 독성 측정

당귀 추출물을 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml의 농도로 처리하여 48시간 배양한 후 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 1에 나타낸 결과를 통해 모든 조건에서 세포 독성이 농도의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 초음파를 병행한 60°C 추출물이 21.27%로 가장 낮은 세포독성을 나타내었고, 15분간 초고압 처리한

60°C 초음파 병행 추출물이 23.49%로 가장 높은 세포독성을 나타내었다. 이는 식용으로 널리 사용되는 복분자 추출물이 나타낸 세포독성 수치 (Kwon *et al.*, 2007)와 비슷한 결과로 당귀의 추출물이 세포수준에서 안전성을 가지는 것으로 사료된다.

3. UVA 처리를 이용한 MMP-1 발현 저해 효과

피부의 광손상에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호전달 경로를 통해 발현이 증가되어 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다 (Fisher *et al.*, 1997). 이러한 UVA에 의해증가되는 MMP-1 발현에 미치는 당귀 추출물의 영향을 알아보고자 HSFs에 UVA를 조사하고 시료를 첨가하여 24시간 배양한 후

MMP-1 발현 저해 효과를 ELISA로 측정하였다. 1.0 mg/ml의 농도에서 측정된 결과, 양성대조군인 ascorbic acid가 121.3%를 나타내어 가장 억제된 발현률을 보였고, 15분간 초고압 처리한 60°C 초음파 병행 추출물이 ascorbic acid와 근사한 122.2%를 나타내어 시료 중에서 가장 낮은 발현률을 나타내었다. 그 외의 다른 시료들도 134.5% 이하의 값을 나타내 비교적 낮은 발현률을 보임에 따라 당귀 추출물에 UVA에 대한 MMP-1 발현 저해 효과가 있음을 나타내었다. 이는 교원질 파괴에 관여하는 외부적 스트레스인 UVA에 의해 발생된 유해 인자를 효과적으로 제거함으로써 MMP-1의 발현을 효과적으로 조절한 것이라 사료된다. 현재까지 밝혀진 MMP 저해제는 tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)가 있는데, 이는 기질 세포에서 분비되며 기능은 MMP 수용체에 경쟁적으로 결합하여 MMP의 활성화를 막음으로서 단백 분해능을 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과는 향후 피부 교원질 층 붕괴로 인한 주름살의 치료제로서 항장소재 연구에 중요한 실마리를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

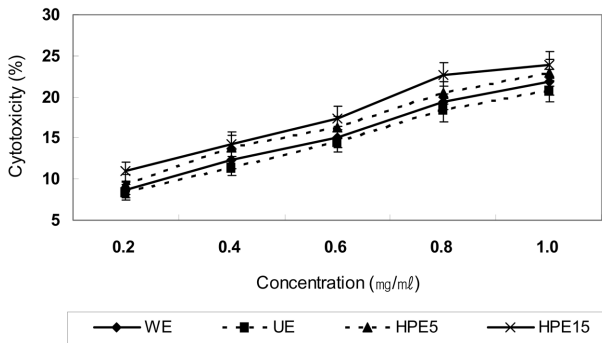


Fig. 1. Cytotoxicity of the crude extracts from *A. gigas* on human skin fibroblast (CCD-986sk). Each value were compared with control at P < 0.05 by Student t-test.

WE: extraction with water solvent at 60°C, control
UE: extraction with ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent
HPE5: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 5 minutes
HPE15: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 15 minutes

4. Tyrosinase 억제 효과

Melanin은 피부에서 세포내의 tyrosinase라는 효소의 생합성 과정에서 만들어지며 (Invergar & McEvily, 1992) 자외선, 건조, 극한 온도 등에 대한 피부의 저항력을 높여주지만, 과도한 melanin 생성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯 등과 같은 색소 침착을 일으키고, 피부의 손상을 촉진시킨다. 그러므로 화장품 산업에서 피부 미백효과를 측정하는데 매우 중요한 부분이 된다.

본 연구에서는 당귀 추출물의 tyrosinase에 대한 작용을 알아보고자 시료를 1.0 mg/ml 농도로 첨가 했을 때의 저해율을 비교하여 Table 2에 나타내었다. 모든 시료에서 저해율이 농도의존적으로 점차 증가하는 것을 확인하였으며, 양성대조군인 ascorbic acid가 1.0 mg/ml의 농도에서 70.8%로 가장 높은 저해율을 나타낸 것을 확인할 수 있다. 당귀 시료 중에서는

Table 2. Inhibitory effects of extracts from *A. gigas* against the *in vitro* melanin synthesis by tyrosinase.

Samples	Inhibition ratio (%)				
	0.2 mg/ml	0.4 mg/ml	0.6 mg/ml	0.8 mg/ml	1.0 mg/ml
WE	38.4±1.3	42.4±2.3	50.2±1.8	52.8±1.7	56.4±2.5
UE	40.7±1.8	46.6±1.5	51.9±2.2	55.4±2.8	61.7±1.7
HPE5	43.2±1.6	49.4±1.8	55.1±1.4	59.7±2.0	67.5±2.4
HPE15	45.8±1.1	51.4±2.5	58.4±2.0	61.8±1.8	69.4±1.7
Ascorbic acid [†]	68.1±1.3	68.7±2.2	69.4±1.6	70.1±2.3	70.8±1.5

[†]Used as a positive control

[‡]Each value were compared with control at P < 0.05 by Student t-test

WE: extraction with water solvent at 60°C, control

UE: extraction with ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent

HPE5: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 5 minutes

HPE15: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 15 minutes

Table 3. Production of melanin by adding extracts from *A. gigas* on Clone M-3 cell.

Samples	Concentrations (mg/ml)	Melanin production (%) [†]
WE	0.2	99.6±0.7
	0.4	94.3±1.2
	0.6	92.4±2.5
	0.8	89.5±2.9
	1.0	88.9±0.7
UE	0.2	97.4±0.4
	0.4	94.5±0.9
	0.6	90.3±1.7
	0.8	86.4±2.1
	1.0	85.6±1.8
HPE5	0.2	93.2±1.2
	0.4	90.3±1.8
	0.6	88.5±2.1
	0.8	85.1±1.3
	1.0	84.2±1.7
HPE15	0.2	92.4±0.8
	0.4	89.3±1.2
	0.6	86.4±2.2
	0.8	84.6±1.8
	1.0	82.4±1.4
Ascorbic acid [‡]	0.2	90.7±0.6
	0.4	90.0±2.5
	0.6	87.5±3.0
	0.8	86.7±2.1
	1.0	86.7±1.8

[†]Melanin content of vehicle was set to 100%

[‡]Used as a positive control

[§]Each value were compared with control at P < 0.05 by Student t-test

WE: extraction with water solvent at 60°C, control

UE: extraction with ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent

HPE5: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 5 minutes

HPE15: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 15 minutes

초고압을 15분간 처리한 60°C 초음파 추출물이 ascorbic acid에 근사한 수치인 69.4%로 가장 높은 저해율을 나타내었다. 다른 시료들도 55% 이상의 높은 저해율을 나타냄에 따라 당귀가 피부 미백활성에 효과를 갖고 있으며, 초고압 처리를 통해 활성의 증진이 가능함을 확인할 수 있었다.

5. Melanin 생성량 측정

Clone M-3 세포주의 melanin 생성 세포로서 추출물 투여 시 melanin 생합성과 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml의 농도로 3일간 처리하여 melanin 생성량을 측정하였다. 실험 결과 melanin 생

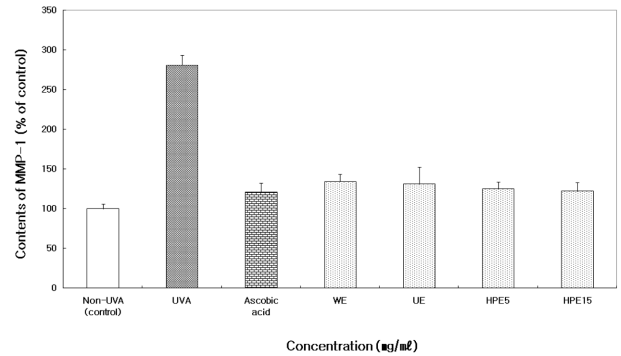


Fig. 2. Production of MMP-1 by adding extracts from *A. gigas* on UVA-irradiated human skin fibroblast (CCD-986sk). Each value were compared with control at P < 0.05 by Student t-test.

WE: extraction with water solvent at 60°C, control

UE: extraction with ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent

HPE5: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 5 minutes

HPE15: ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent after holding high pressure for 15 minutes

성률은 세포생존율과 형태학적 변화 없이 15분간 초고압 처리한 60 초음파 추출물의 경우 0.2~1.0 mg/ml의 농도까지 각각 92.4%, 89.3%, 86.4%, 84.6%, 82.4%의 생성량을 나타내었다. 최고농도인 1.0 mg/ml에서 초음파 병행 60°C 추출물과 5분 초고압 처리 60°C 초음파 추출물이 각각 85.6%와 84.2%의 생성량을 나타냄에 따라 일반 60°C 추출물을 제외한 당귀 추출물이 모두 86.7%의 생성량을 나타낸 양성대조군인 ascorbic acid에 비해 높은 생성 저해율을 나타내었다. 이를 통해 당귀가 melanin 생성량 억제에 효과가 있음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 통해 melanin 생성은 줄어들면서 세포독성은 낮아야 하는 향장미백제로서 당귀의 활용 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 초고압 추출 공정의 활성 증진 효과를 알아보기 위해 당귀의 자외선 차단 효과 및 피부 미백활성 실험을 실시하였다. 인간의 섬유아세포인 CCD-986sk를 이용한 세포독성 실험에서 1.0 mg/ml 농도의 시료 첨가를 통해 초음파 병행 60°C 추출물이 21.27%로 가장 낮은 세포독성을 나타내었으며, 15분간 초고압 처리한 60°C 초음파 병행 추출물이 23.49%로 가장 높은 세포독성을 나타내었다. UVA 처리에 따른 MMP-1 발현 저해 효과 측정에서 1.0 mg/ml 첨가를 통해 15분간 초고압 처리한 60°C 초음파 추출물이 UV를 조사하지 않은 대조군과 비교하여 122.2%를 나타내며 양성대조군인 ascorbic acid의 121.3%와 근사한 수치의 발현 억제 효과를

나타내었다. 그 외 다른 시료들도 134.5% 이하로 발현하며 높은 저해율을 나타냄에 따라 당귀가 UVA에 대한 MMP-1 발현 저해 효과가 있음을 나타내었다. Tyrosinase 억제효과에서는 양성대조군인 ascorbic acid가 1.0 mg/ml의 농도에서 70.8%로 가장 높은 저해율을 나타내었다. 당귀 시료 중에서는 초고압을 15분간 처리한 60℃ 초음파 추출물이 ascorbic acid에 근사한 수치인 69.4%로 가장 높은 저해율을 나타내었고, 그 외의 시료들도 모두 55% 이상의 높은 저해율을 나타내었다. 시료 첨가를 통한 Clone M-3 세포주의 melanin 생성 억제 실험에서 1.0 mg/ml 농도 첨가를 통해 15분간 초고압 처리한 60℃ 초음파 추출물이 82.4%를 나타내어 양성대조군인 ascorbic acid에 비해 더 높은 활성을 나타내었다. 이상의 결과를 통하여 당귀가 자외선 차단 및 피부 미백 관련 항산화제의 활용 가능성이 있으며, 초고압 처리를 통해 항산화활성의 증가가 가능함을 확인하였다.

사 사

본 연구논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업(과제번호: 20070401034013)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Ahn KS, Sim WS, Kim HM, Han SB, Kim IH** (1996) Immunostimulating components from the root of *Angelica gigas* Nakai. Korean J. Pharmacogn. 27(3):254-261.
- Deliza R, Rosenthal A, Abadio FBD, Silva CHO, Castillo C** (2005) Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. J. Food Eng. 67:241-246.
- Dunsmore SE, Rubin JS, Kovacs SO, Chedid M, Parks WC, Welgus HG** (1996) Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. J. Biol. Chem. 271(40): 24576-24582.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ** (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. N. Engl. J. Med. 337:1419-1428.
- Gilchrest BA** (1989) Skin aging and photoaging. J. Am. Acad. Dermatol. 21(3):610-613.
- Hearing VJ, Tsukamoto K** (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. FASEB J. 5(14):2902-2909.
- Invergar R, McEvily AJ** (1992) Studies on biological activity from extract of *Crataegi fructus*. Korean J. Herbology. 17(1):29-38.
- Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing V, Lezano J, Garcia-Gorreni JC** (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. J. Biol. Chem. 269(27):17993-18000.
- Kim CH, Kwon MC, Qadir SA, Hwang B, Nam JH, Lee HY** (2007) Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola sacchalinensis* A. Bor by ultra high pressure extracts process. Korean J. Medicinal Crop Sci. 15(6):411-416.
- Kim EC, Ahn SY, Hong ES, Li GH, Kim EK, Row KH** (2005) Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. J. Korean Ind. Eng. Chem. 16(3):348-353.
- Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC, Lee HY** (2007) Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. Korean J. Medicinal Crop Sci. 15(6):398-404.
- Lim E, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Cebon JS** (2006) Desmoplastic melanoma: comparison of expression of differentiation antigens and cancer testis antigens. Melanoma Res. 16(4):347-355.
- Mosmann T** (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. J. Immunol. Methods 65:55-63.
- Park YH, Kim MR** (1995) A study on the tyrosinase inhibitor from mushroom phellinus ribis. Soonchunhyang J. Nat. Sci. 1(2):183-188.
- Peter TP** (1994) Physiology of the skin II: 2nd edition. Allured Publishing Corporation. 1:34-39.
- Ristola P, Pyorala K** (1972) Determinants of the response to coumarin anticoagulants in patients with acute myocardial infarction. Acta. Med. Scand. 192:183-188.
- Wessler S, Kleiger RE, Cornfield J, Teitelbaum SL** (1974) Coumarin therapy in acute myocardial infarction. A Hobson's choice. Arch. Intern. Med. 134:774-779.
- Yu HS, Park CH, Park CG, Kim YG, Park HW, Seong NS** (2004) Growth characteristics and yield of the three species of genus *Angelica*. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12(1):43-46.