

## 왕겨초액의 대량생산과 항노화 및 미백 효과

황재규<sup>1</sup> · 윤종국<sup>1</sup> · 김숙경<sup>2</sup> · 이상한<sup>3</sup> · 한길환<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(재)대구테크노파크 한방산업지원센터, <sup>2</sup>(주)대원GSI, <sup>3</sup>경북대학교 식품공학부/식품생물산업연구소

Received : May 25, 2012 / Revised : July 17, 2012 / Accepted : July 31, 2012

**Mass Production of Chaff-vinegar and Its Effect of Anti-Aging and Whitening. Hwang, Jaegyul<sup>1</sup>, Jong-Kuk Yun<sup>1</sup>, Suk-kyung Kim<sup>2</sup>, Sang-Han Lee<sup>3</sup>, and Kil-Hwan Han<sup>1\*</sup>.** <sup>1</sup>Daegu Technopark Oriental Medicine Industry Support Center, Daegu 706-828, Korea, <sup>2</sup>DaeWon GSI Co. LTD., Chilgok-Gun 718-802, Korea, <sup>3</sup>Department of Food Science & Biotechnology, Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea – Chaff-vinegar is known for having a variety of useful purposes in the fields of health and lifestyles. In a previous study we isolated and identified the active fractions of the polyphenol compound 7 species as a potential biomaterial for cosmeceuticals. To further test for its potential use as a functional material, we carried out an MTT assay, collagenase inhibition assay, elastase inhibition assay, tyrosinase inhibition assay, DPPH free radical scavenging assay, SOD-like activity assay and a xanthine oxidase inhibition assay. Chaff-vinegar exhibited potent collagenase and elastase inhibitory activities in a concentration dependent manner, indicating that the agent has the potential to alleviate the skin wrinkling process. Chaff-vinegar also showed 80% tyrosinase inhibition at a concentration of 100 µL/mL. DPPH radical scavenging, xanthine oxidase inhibition, and SOD-like activity results for each activity were 80%, 80%, and 100%, respectively. Taken together, the present study suggests that chaff-vinegar is a good candidate for use as an anti-wrinkling and/or whitening agent.

**Keywords:** Chaff-vinegar, anti-wrinkle, whitening, anti-oxidation, collagenase, elastase, tyrosinase

### 서 론

피부노화는 시간이 흐름에 따라 피부의 구조적 변화와 생리적인 기능이 감소해 발생하는 자연노화(intrinsic aging, 내인성 노화)와 주위환경, 특히 오랜 시간 자외선 노출로 인해 발생하는 임상적 또는 조직학적인 피부 변화가 일어나는 광노화(photo aging, 외인성 노화)로 나눌 수 있다[5]. 자외선에 의해 세포 사이를 채우는 성분인 콜라겐(collagen)과 엘라스틴(elastin)의 합성이 감소하게 되면 다양한 기질 단백질 분해 효소의 발현이 증가 하게 된다. 이러한 기질 단백질의 결핍은 광노화에 있어 중요한 인자이다[18]. 콜라겐은 진피층의 90% 이상으로 구성되어 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하여 외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호하고 유지시킨다. 노화된 피부의 대표적 증상은 잔주름 및 주름의 발생이다. 이는 피부 진피조직의 교원질 중 주 단백질인 콜라겐의 현저한 감소에 의한 것이라 할 수 있다. 콜라겐 분해에 따른 감소는 피부 탄력을 유지하는 결합조직이 파괴되어 주름과 탄력저하, 피부 처짐의 원인으로 나타난다[19].

자외선 노출로 인해 피부는 superoxide anion, peroxide,

singlet oxygen 등의 유해한 활성산소 종(ROS ; Reactive oxygen species)을 과잉 생성한다. 자외선으로 생성된 활성산소 종은 피부의 효소 및 비효소적 항산화 방어체계를 손상시키며 산화적 스트레스는 지질과산화, 단백질산화, 피부의 염증반응 유발, 피부면역기능 억제, 세포성분의 손상을 야기시키고 광노화를 촉진시킨다[4]. 특히 단백질 분해효소(MMPs; Matrix- metalloproteinases)의 발현이 유발되어 피부에 탄력을 부여하는 콜라겐과 엘라스틴의 변성 또는 파괴로 인하여 주름을 야기시킬 수 있다. 콜라겐과 엘라스틴은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있으며, MMPs의 발현을 억제시키는 연구가 많이 진행되고 있다[17].

식품의약품안전청의 기능성화장품 고시 품목으로 미백 기능성화장품의 경우 닥나무추출물, 알부틴(arbutin), 에칠아스코빌에틸, 유용성감초추출물, 아스코빌글루코사이드와 마그네슘아스코빌포스페이트가 있으며, 자외선차단 고시품목으로는 글리세릴파마, 벤조페논-3, 에틸헥실디메틸파마 외 28종이 있다. 주름개선 고시 품목으로는 레티놀(retinol), 레티놀팔미테이트, 아데노신(adenosine), 폴리에톡실레이트 레티나마이드가 있으며 이들 원료는 주름개선 화장품의 원료로 사용되고, 효과를 나타내고 있는 것으로 알려져 있다. 이

\*Corresponding author

Tel: +82-53-770-2309, Fax: +82-53-770-2312

E-mail: han0909@ttp.org

들 물질은 주로 콜라겐 형성을 증가시키고 콜라겐 분해를 촉진하는 효소인 콜라게나제(collagenase)를 억제시켜 주름형성을 억제하는 것으로 보고되고 있다. 이외에 탄력섬유인 엘라스틴과 엘라스틴 분해 효소인 엘라스타제(elastase)에 대한 연구도 보고되고 있다[1, 7].

최근 화장품 분야에서 자연주의 경향에 따라 많은 유기합성 소재가 천연물 소재로 대체되고 있어서 식물유래 화장품 소재 개발이 매우 활발히 진행되고 있다. 미백소재로서 닥나무, 국화, 상백피, 반하, 천문동, 상황버섯, 어성초, 맥문동 등이 식물소재로 연구되었고[15], 자외선 차단소재로는 대황 추출물, 방선균 추출물, 알로에, 우뭇가사리 등이 연구되었으며, 주름개선 소재로서는 알로에, 녹차, 감초, 산사자, 종가시나무, 로열젤리, 레몬 등이 있다[10, 11].

본 연구에서 사용되는 왕겨초액은 왕겨를 300~800°C로 탄화시킬 때 발생하는 고온의 연기를 응축한 것으로 초산, 개미산 등 약 200여종 이상의 다양한 성분으로 구성되어 있으며, pH 3 정도의 산성을 띠는 천연 향균성, 항산화성을 가지고 있는 물질로 알려져 있다.

현재까지 목초액은 항균, 항산화, 면역조절, 항암, 숙취해소와 피로회복 등의 우수한 약리 및 임상효능이 있는 것으로 알려지고 있다[9]. 항산화 효과의 경우, DPPH 라디칼 소거 활성에 관한 연구와 SOD 활성을 증강시켜주는 기능성 음료 개발 등이 있다[13]. 이러한 이용에도 불구하고 목초액의 경우 원료인 목재를 공급받는데 있어 친환경적인 면에서 한계성이 있으며 목초액의 표준화에도 어려움을 갖고 있으며 또한 원료자체도 상대적으로 고가인 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 연구는 최근 활용도가 확대되고 있는 목초액의 대체물질로서, 좀 더 원료 확보가 쉬우면서 상대적으로 원재료 가격이 저렴한 벼의 도정 시 부산물로 나오는 왕겨를 원재료로 사용하여, 이 왕겨를 훈탄으로 탄화하는 과정에서 발생하는 연기를 냉각 액화시켜 얻어지는 왕겨초액을 이용하여 항산화 효과 및 주름개선, 미백 효과를 연구하여 기능성식음료의 인증 및 화장품 소재개발로서의 사용 가능성을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료의 추출

왕겨를 이용하여 팽연화 시킨 후 탄화 및 초액 생산 원료는 다음과 같이 생산하여 사용하였다. 원료투입 왕겨(미곡 부산물은 경복 의성군에 위치한 다인 RPC에서 공급받아 사용하였다. 왕겨의 탄화 및 초액 생산은 고령공장에서 실시하였다. 초액생산은 고령농원에서 효율적으로 설비된 DCH-600 생산설비를 이용하여 생산하였다. 농업부산물인 왕겨 20톤을 일급 열분해 가스를 이용해서 왕겨숯 및 왕겨초액을 생산하였다. 생산된 초액은 PT 보관 통(1톤)에서 숙성하였다.

생산된 왕겨초액 원액을 감압증류장치(680 mmHg 압력,

온도 40°C) 및 초액 정제 시스템을 이용하여 고품질 정제초액을 생산하였다. 또한, 왕겨 정제초액 생산 시스템을 이용하여 2차 왕겨 정제초액, 3차 왕겨 정제초액으로 정제과정을 거쳐 생산하였다.

### 효능 물질 분리 분석

정제된 왕겨초액 1 L를 흡착수지(XAD-7HD)로 처리 후에 분획을 농축하고, 왕겨초액 농축물을 Sephadex LH-20 column(Φ2.5×30 cm)을 장착한 후 이동상으로 에탄올(0%→100% gradient)을 사용하여 분당 1 mL의 속도로 10 mL씩 분취하여 측정하였다. 분취한 시료를 Sep-pak C18을 통과하여 0.45 mm membrane filter로 여과 한 후 HPLC(Waters 2695, Waters, USA)로 분석하였다. 이 때 column은 Atlantis TM dC18(4.6×250nm, 5mm, Waters, USA)를 사용하였으며, column oven 온도는 35°C, 이동상은 Mobile phase A: Formic acid(pH 2.8) 및 Mobile phase B: 50% acetonitrile (pH 2.8, with formic acid)로 gradient로 분석하였으며, 분석시 유속은 0.8 mL/min, 파장은 290 nm에서 측정하였다.

### 세포 및 시약

B16F10는 마우스의 melanoma 세포주이고, NIH3T3는 마우스의 섬유아세포주로 한국 세포 주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL)과 gentamicin (50 mg/mL)을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였다. Tyrosinase, collagenase, elastase 시약은 Sigma chemical Co.,에서 구입하여 실험에 사용하였다.

### 세포 생존율 측정

세포를 96-well plate에 8×10<sup>4</sup> cells/mL로 분주하여 안정화시킨 후 초액을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 다음 배지를 제거한 후 MTT 용액 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 0.5 mg/mL)을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시키면 불용성의 결정이 생성되게 된다. 이렇게 생성된 불용성 결정을 dimethylsulfoxide(DMSO)로 완전히 녹인 다음, microplate reader를 이용하여 570 nm의 파장에서 측정하였다. 이렇게 측정된 값을 이용하여 세포독성을 확인하였다.

### Collagenase 저해활성 측정

피부 노화 억제 효과를 확인하기 위하여 collagenase저해 활성 측정[20]은 아래와 같이 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg(0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서

20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후, ethylacetate 1.5 mL을 첨가하여, 상등액을 취한 후 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

#### Elastase 저해 활성 측정

피부 주름 개선효과를 확인하기 위한 porcine pancreas elastase 저해 활성 측정은 기질로서 *N*-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 30분간 *p*-nitroanilide의 생성량을 측정하였다[6]. 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.1 mL씩 시험관에 취하고 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 elastase, pancreatic solution, type I : porcine pancreas (0.6 units/mL)용액 0.05 mL을 가한 후 기질로 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 *N*-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide(1 mg/mL)을 0.1 mL 첨가하여 30분간 반응시켜 microplate reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

#### Tyrosinase 저해 활성 측정

피부 미백 효과를 확인하기 위하여 tyrosinase 저해활성을 다음과 같이 측정하였다[21]. 즉 시험관에 pH 6.8의 67 mM sodium phosphate buffer 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL를 넣은 혼합액에 110 Unit/mL mushroom tyrosinase 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 microplate reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

#### 전자공여(DPPH) 활성 측정

각 시료의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여 효과로써 시료의 환원력을 측정하였다[3]. 즉 각 추출물을 농도 별로 제조한 시료 1 mL에 0.4 mM DPPH 용액 0.5 mL를 가하고, 10초간 vortex mixing 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 이 반응액을 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

#### SOD-like 활성 측정

각 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer (50 mM tris[hydroxymethyl] aminomethane + 10 mM EDTA) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지 시킨 후 microplate reader를 이용하여 420 nm 에서 흡광도를 측정하여 나타내었다[14].

#### Xanthine oxidase 저해활성 측정

시료용액 0.1 mL와 pH 7.5의 0.1 M potassium phosphate buffer 0.6 mL에 2 mM xanthine을 녹인 기질액 0.2 mL를 첨가하고 0.2 unit/mL xanthine oxidase 0.1 mL를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthin oxidase 저해 활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다[16].

#### 통계 처리

본 연구는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 실험한 결과로 모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며, *p*값이 0.05 미만 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 결과 및 고찰

#### 왕겨초액의 생산분리

정제 왕겨초액을 생산하기 위해 왕겨 약 2,530 Kg을 투입한 후 왕겨초액 생산시스템(DCH-600)에서 초액 생산을 실시하였다. 왕겨로부터 왕겨초액 생산은 1차로 가스에 의한 열분해가 이루어진다. 이 단계는 왕겨를 열분해 하는 단계로 800°C 내외에서 왕겨를 직접 탄화하는 장치에 의해 왕겨의 탄화가 이루어진다. 왕겨 2,530 Kg을 8시간 동안 탄화시켜 열분해 하여 생성된 가스를 수냉식의 냉각기를 이용하여 30°C로 냉각하여 조 왕겨초액을 생산시키는 단계로 초액을 생산하게 된다. 초액과 탄화 숯의 생산량을 분석한 결과 초액 15.8%가 생산되었으며 탄화 숯의 경우 22.4%가 생산되었다. 왕겨초액으로부터 타르 분리는 비중 분리법에 의해 이루어졌으며, PT탱크에 생산된 조 왕겨초액을 6개월 이상 숙성 시켜 왕겨초액을 장시간 탱크에 저장해 넣어두면 상, 중, 하의 세층으로 분리되며 하층의 타르 부분을 제거하기 위하여 마이크로 필터를 처리 하였다. 처리된 왕겨초액을 감압증류 장치에 의한 감압 증류하였으며 이를 활성탄 여과 필터과정을 거쳐 정제된 왕겨초액을 얻었다. 정제된 왕겨초액의 기능성물질을 분리하기위해 분취하여 항산화 실험을 추진하여 활성이 높은 부분을 취하여 HPLC에 의해 분석을 하여 본 결과 Polyphenol 성분이 포함된 부분에서 항산화 효능이 높게 나타났음을 확인 하였으며(Data를 나타내지 않았음) 이 효능이 높은 부분을 분취하여 HPLC 기기 분석한 결과 Table 1과 같이 정제된 왕겨초액 100 mL당 caffeic acid 445.16 mg, phoridzin 52.25 mg, coumaric acid 12.2 mg, ferulic acid 7.93 mg, pHPPA(*p*-hydroxyphenylpyruvic acid) 2.98 mg, epicatechin 2.77 mg 등이 함유되어 있는 것으로 확인하였다.

**Table 1. HPLC analysis of effective material for antioxidant activity from chaff vinegar.**

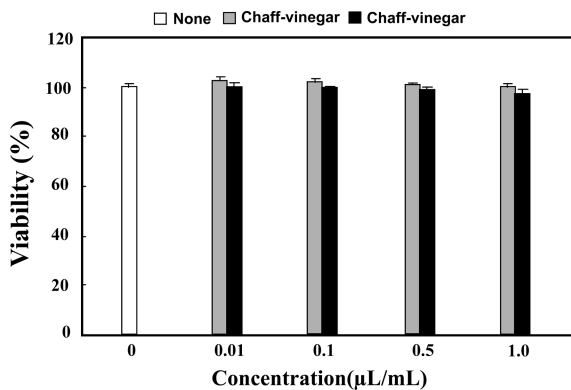
Materials	Contents (mg/100mL)
Protocatecuic acid	0.37
Caffeic acid	445.16
Epicatechin	2.77
pHPPA	2.98
Coumeric acid	12.2
Ferulic acid	7.93
Phoridzin	52.25

**세포 생존율 측정확인**

왕겨초액의 세포 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 왕겨초액을 0.01, 0.1, 0.5, 1 µL/mL의 농도로 배지에 첨가한 후 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다. B16F10과 NIH3T3 세포에 대한 왕겨초액의 세포 독성을 측정된 결과 세포 주 모두 1 µL/mL의 농도에서 100%에 가까운 세포 생존율을 나타내었다. 이와 같이 세포독성 실험결과를 바탕으로 왕겨초액의 독성에 대하여 어느 정도 안전성을 갖고 있음을 확인 할 수 있었으며 이러한 결과는 목초액에 대한 안전성과 비슷하게 나타났다(Fig. 1).

**Collagenase 저해활성 측정**

피부의 진피 교원질 중 주 단백질인 collagen은 진피층의 90% 이상으로 진피 층의 collagen 분해에 따른 감소는 피부 탄력을 유지하는 결합조직이 파괴되어 주름과 탄력저하, 피부 처짐의 원인이 된다. 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 활성산소 및 자외선 등에 의해 유발되며 피부노화와 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 collagenase의 활성 감소는 매우 중요하다. 그러므로 왕

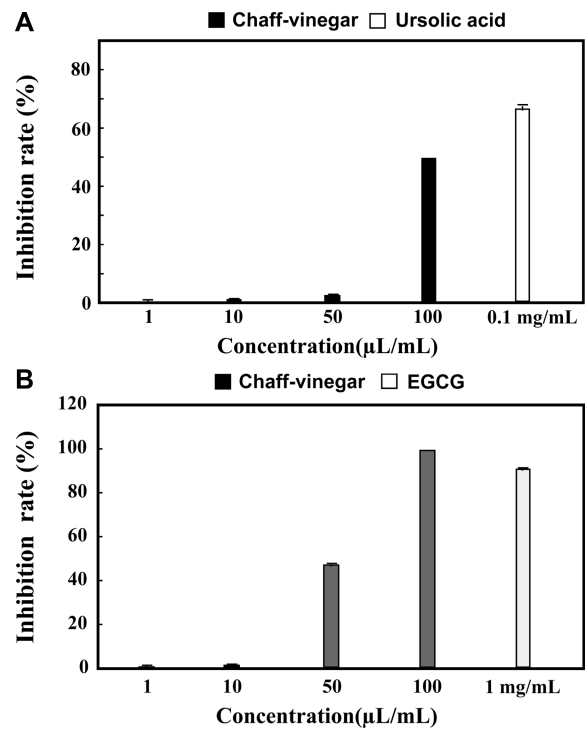


**Fig. 1. Viability test of chaff-vinegar against cell line.** ■: NIH3T3 mouse fibroblast cell line, ■: B16F10 mouse fibroblast cell line. The data were expressed as the mean ± S.D (n=3). Results are representatives of more than three independent experiments (p<0.05).

겨초액의 collagenase 저해활성에 대해 확인해 보았다. 그 결과 100 µL/mL의 농도에서 100%의 높은 collagenase 저해 활성 효과를 나타내었으며, 50 µL/mL의 농도에서는 50%의 농도 의존성 collagenase 저해 활성 효과를 나타내었다. 특히 대조군으로 사용된 녹차 추출물 유래의 단일 물질인 epigallocatechin gallate(EGCG)에 가까운 높은 저해활성을 나타내어 왕겨초액의 collagenase의 저해율이 높게 나타났음을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 왕겨초액 내의 항산화에 효과적인 caffeic acid, phoridzin, ferulic acid 등이 높은 농도로 함유되어 있어 collagenase 저해에 관여하는 것으로 추정하며 특히 왕겨초액 내에 함유된 caffeic acid, phoridzin[7]은 collagen의 분해를 막아 피부의 주름을 개선하는데 관여 하는 것으로 사료된다(Fig. 2).

**Elastase 저해활성 측정**

Elastin은 피부 세포외기질 (ECM; Extracellular matrix)을 구성하는 성분 중의 하나이며, 피부 탄력성 저하와 주름 형성에 collagen의 감소뿐 아니라 피부탄력섬유의 구성성분인 elastin 저하도 관여한다. Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는데 중요한 기질 단백질인 elastin을 분해하는 효소이며, UV 노출로 발생하는 노화 과정과 주름 형성 작용에 관여한다. 그러므로 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는



**Fig. 2. Effect of anti-aging of collagenase (A), elastase (B) inhibition activity for chaff-vinegar concentration.** A: Chaff-vinegar (■), EGCG (□) B: Chaff-vinegar (■), Ursolic acid (■). The data were expressed as the mean ± S.D (n=3). Results are representatives of more than three independent experiments (p<0.05).

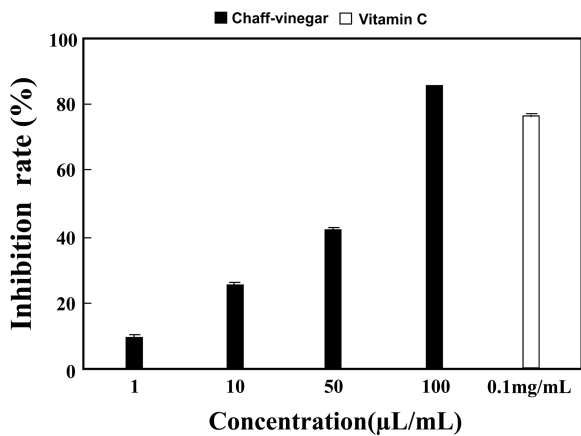
작용이 있는 것으로 알려져 있다. 정제된 왕겨초액을 이용한 elastase 저해 활성 측정을 확인 한 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 의 농도에서 50% 이상의 elastase 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 왕겨초액 내에 함유된 성분 중 epicatechin, ferulic acid, caffeic acid 등이 항산화 및 항노화에 관여하는 것으로 사료된다[1].

**Tyrosinase 저해활성 측정**

Tyrosine에서 멜라닌을 형성하는 연속적인 효소적 산화 반응에서 tyrosinase는 처음 tyrosine이 dopa로 산화되는 과정과 다음 단계인 dopa가 dopaquinone으로 산화되는 두 가지 단계의 반응을 촉진하는 효소이다. 왕겨초액은 이 미백에 관여하는 tyrosinase를 저해함으로써 미백에 효과적으로 작용하는지 확인하기 위해 활성을 측정한 결과 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 의 농도에서 80% 이상의 tyrosinase 저해활성을 나타내었으며 농도 의존적으로 저해활성이 높게 나타났다. 이 결과로 왕겨초액 내에 구성물질인 ferulic acid[15, 21]의 경우 자외선차단 효과 및 미백제에 관련된 tyrosinase에 저해기능을 갖는 것으로 사료된다(Fig. 3).

**전자공여(DPPH) 활성 측정**

DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)는 free radical의 안정화된 물질로 반응 중 DPPH의 저하는 free radical의 소거반응이 진행되고 있음을 알 수 있다. 유해산소라 불리는 활성산소(ROS; Reactive oxygen species)는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과 산화 반응을 일으켜 체내에 과산화 지질을 축적하여 인체 기능을 저하시키고 색소침착, 노화 및 성인병 등의 여러 가지 질환을 유발한다고 알려져 있다[8]. 왕겨초액이 이러한 항산화 작용을 확인하기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진

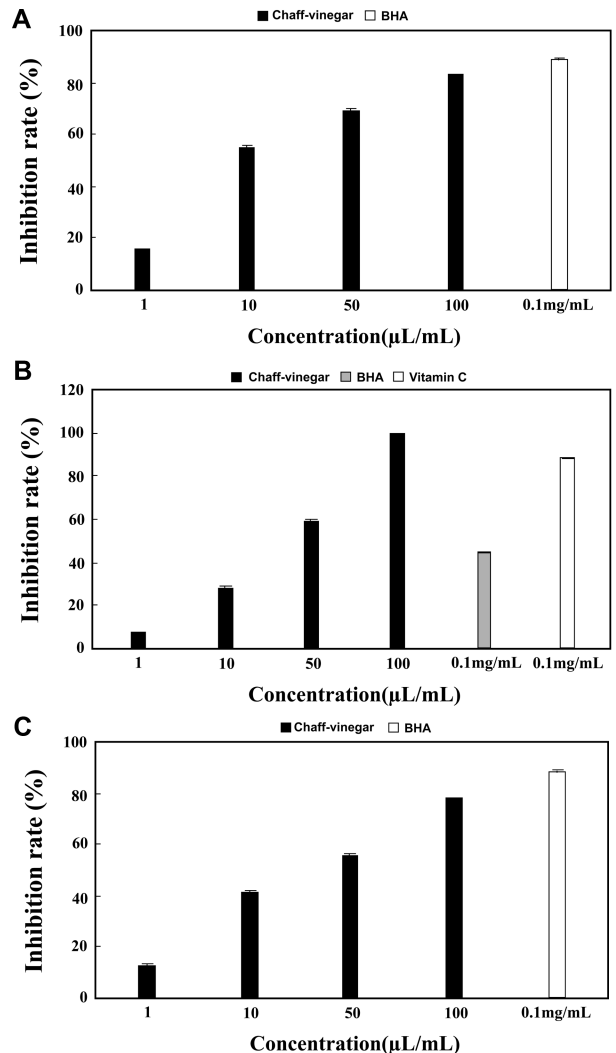


**Fig. 3.** Effect of tyrosinase inhibition activity for chaff-vinegar concentration. ■: Chaff-vinegar, □: Vitamin C. The data were expressed as the mean  $\pm$  S.D (n=3). Results are representatives of more than three independent experiments ( $p < 0.05$ ).

BHA(Butylated hydroxyanisole)를 이용하여 왕겨초액의 항산화 효과를 비교하였다. 왕겨초액 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈고 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 caffeic acid, phoridzin, coumaric acid, ferulic acid, pHPPA 및 epicatechin 등의 왕겨초액에 함유된 물질에서 항산화 작용이 높게 나타났으며 이러한 물질을 통하여 왕겨초액은 피부에서 흔히 일어나는 활성산소에 대한 노화를 방지하는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다[3](Fig. 4).

**SOD 유사 활성 측정**

Superoxide dismutase (SOD)는 항산화 효소로서 세포에



**Fig. 4.** Effect of antioxidant of DPPH (A), superoxide dismutase (SOD)-like (B) and xanthine inhibition (C) activity for chaff-vinegar concentration. A: Chaff-vinegar (■), BHA (□), B: Chaff-vinegar (■), BHA (■), Vitamin C (□), C: Chaff-vinegar (■), BHA (□). The data were expressed as the mean  $\pm$  S.D (n=3). Results are representatives of more than three independent experiments ( $p < 0.05$ ).

유해한 oxygen radical을 과산화수소로 전환시키고 다시 catalase에 의하여 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능을 한다고 알려져 있다[2]. 산화방지와 노화 억제에 밀접한 관계가 있는 SOD 유사활성 측정을 위해 산화 효소인 pyrogallo와 함께 왕겨초액을 반응시켜 측정하였다. 왕겨초액 모두 농도 의존적으로 SOD 유사활성 소거작용을 나타내었고, 100 µL/mL에서는 100%에 가까운 저해 활성을 나타내었다(Fig. 5). 이러한 결과로 caffeic acid, phoridzin, coumaric acid, ferulic acid, pHPPA 및 epicatechin 등의 항산화제 물질들이 SOD 활성을 증가 시키는 것으로 사료된다[8].

**Xanthine oxidase 저해활성 측정**

Xanthine oxidase는 xanthine을 기질로 하여 uric acid를 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소이다. Xanthine/ xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다[12]. 양성 대조군으로 BHA를 이용하여 왕겨초액의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 또한 caffeic acid, phoridzin, coumaric acid, ferulic acid, pHPPA 및 epicatechin 등의 항산화에 효과적인 물질들에 의해서 왕겨초액에 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타낸 것으로 사료되며, 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 저해 활성을 나타내어 우수한 superoxide radical 소거효과[10]를 나타내었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

**요 약**

본 연구는 왕겨를 이용한 항산화, 항노화에 효과적인 초액을 대량생산하여 기능성을 검증하고 왕겨초액 내의 기능성물질을 분석하여 사업화의 가능성을 타진하고자 하였다. 정제된 왕겨초액을 분획하여 기능성이 확인된 부분을 HPLC 기기를 이용하여 확인한 결과 caffeic acid 외에 7종의 polyphenol 유래물질에서 기능성을 확인하였다. 기능성 화장품소재 시험으로는 세포 생존율 측정(MTT assay), 주름개선(collagenase inhibition assay, elastase inhibition assay), 미백(tyrosinase inhibition assay), 항산화 시험(DPPH free radical scavenging assay, SOD-like activity, xanthine oxidase inhibition assay)이 실시하였다. 피부주름형성은 콜라겐의 합성과 분해가 중요한 원인으로 작용한다고 알려져 있지만, 최근 많은 연구에서 엘라스틴의 재형성과 분해 또한 주름형성 기전에서 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 왕겨초액은 100 µL/mL의 농도에서 collagenase 저해효과가 100%, elastase 저해효과가 55% 이상으로 주름개선 효과가 우수하였다. 왕겨초액은 100 µL/mL의 농도에서 tyrosinase에 대한 tyrosinase 저해효과가 80% 이상으로 미백효과가 우수

하게 나타났다. DPPH radical 소거율, xanthine oxidase 저해와 SOD-like 활성을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 왕겨초액 100 µL/mL의 농도에서 DPPH radical 소거율이 80%, xanthine oxidase 저해효과가 80%, 그리고 SOD-like 활성이 100%를 나타내었다. 따라서 본 연구를 통하여 정제 왕겨초액을 이용한 산업화를 위한 가능성을 타진하여 효과가 좋음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 왕겨초액을 이용한 기능성 화장품의 소재로 뿐만 아니라, 식품 및 의약품의 품목허가를 통하여 고부가가치의 상품화소재로의 가능성이 있다고 사료됩니다.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by Regional Industrial Technology Development business (70006506) of the Ministry of Knowledge Economy.

**REFERENCES**

1. Antonicelli, F., G. Bellon, L. Debelle, and W. Hornebeck. 2007. Elastin-elastases and inflamm-aging. *Curr. Top Dev. Biol.* **79**: 99-155.
2. Bannister, J. V., W. H. Bannister, and G. Rotilio. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**: 111-180.
3. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
4. Cimino, F., M. Cristani, A. Saija, F. P. Bonina, and F. Virgili. 2007. Protective effects of a red orange extract on UVB-induced damage in human keratinocytes. *Biofactors.* **30**: 129-138.
5. Chung, J. H., V. N. Hanft, and S. Kang. 2003. Aging and photoaging. *J. American Acad. Dermatol.* **49**: 690-697.
6. Cannell, R. J. P., S. J. Kellan, A. M. Owsiansks, and J. M. Walker. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**: 10-14.
7. Ghersetich, I., P. Teofoli, M. Benci, and T. Lotti. 1994. Ultrastructural study of hyaluronic acid before and after the use of a pulsed electromagnetic field, electrolysis, in the treatment of wrinkles. *Int. J. Dermatol.* **33**: 661-663.
8. Kitahara, A., U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Uchida. 1992. Are markable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of g-irradiated methyl linolate. *Chern. Pharm. Bull.* **40**: 2208-2015.
9. Kim, D. H., J. S. Choi, J. H. Choo, H. C. Song, E. O. Lee, I. C. Kang, J. W. Choi, and S. H. Kim. 2001. Study on immunomodulatory and antitumor activity of holtyessing. *Korean J. Orient. Med. Physiol. Pathol.* **15**: 881-886.
10. Kim, H. S., C. W. Lee, D. H. Kim, G. O. Kim, S. J. Kim, and I. S. Chang. 2007. The study on the whitening effects

- and antioxidant activity of various citrus fruits. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **33**: 69-77.
11. Kim, J. Y., H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park. 2007. Antioxidative and Antiaging Effects of Jeju Native Plant Extracts(II). *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **33**: 165-173.
  12. Kuppusamy P. and J. L. Zweier. 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**: 9880-9884.
  13. Lee, K. M., G. T. Jeong, and D. H. Park. 2004. Study of antimicrobial and DPPH radical scavenger activity of wood vinegar. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**: 381-384.
  14. Marklund, S. and G. Marklund. 1975. Involvement of superoxide amino radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47** : 468-474.
  15. Park, J. H., Y. G. Shin, S. K. Baek, U. K. Lee, H. Chung, and Y. I. Park. 1997. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji* **41**: 518-523.
  16. Stirpe, F. and Della Corte E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase(type D) to oxidase(type O). *J. Biol. Chem.* **244**: 3855-3863.
  17. Sim, G. S., J. H. Kim, D. H. Lee, B. C. Lee, G. S. Lee, and H. B. Pyo. 2007. The inhibition of UVA-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and the improvement of skin elasticity by *Cirsium setidens* extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **33**: 181-187.
  18. Shin, M. H. 2005. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **125**: 221-229.
  19. Sorg, O., C. Antille, G. Kaya, and J. H. Saurat. 2006. Retinoids in cosmeceuticals. *Dermatol. Ther.* **19**: 289-296.
  20. Wunsch, E. and H. G. Heindrich. 1963. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* **333**: 149-151.
  21. Yagi A., T. Kanbara, and N. Morinoby. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica.* **3981**: 517-519.