

## 커피 은피 추출물의 항산화 효과와 엘라스타제, 콜라게나제 및 티로시나제 저해효과

이 경 은\* · 손 상 혁\*\* · 강 상 구<sup>†</sup>

영남대학교 생명응용과학대학 생명공학과, \*스텝포스(주), \*\*피앤디 코스켄  
(2018년 2월 28일 접수, 2018년 3월 23일 수정, 2018년 3월 24일 채택)

### The Coffee Silver Skin Extracts from Coffee Beans Exhibited Cosmetic Properties with Antioxidant Activity and Inhibitory Effects for Elastase, Collagenase and Tyrosinase

Kyung Eun Lee\*, Sang Hyeok Son\*\*, and Sang Gu Kang<sup>†</sup>

Department of Biotechnology, College of Life and applied Sciences, Yeungnam University,  
280 Daehak-ro, Gyeongsan-si, Gyeongbuk-do 38541, Korea

\*STEMFORCE Inc., Gyeongbuk-do 38541, Korea

\*\*PND COSCHEM, Daegu 42983, Korea

(Received February 28, 2018; Revised March 23, 2018; Accepted March 24, 2018)

**요약:** 본 연구에서는 커피생두의 로스팅 과정에서 쉽게 발견되는 커피 은피(coffee silver skin)의 열수와 에탄올 추출물을 사용하여 항산화, 미백, 주름개선, 세포독성실험을 진행하였다. 커피 은피의 열수와 에탄올 추출물은 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성이 높아졌으며, 열수 추출물보다 에탄올 추출물이 항산화력이 높게 나타났다. 특히 에탄올 추출물의 경우 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 92.26%의 ABTS 라디칼을 소거시켜 양성대조군과 비슷한 항산화 효과를 나타내었다. 미백효과의 정도를 조사하기 위하여 tyrosinase 저해효과와 DOPA 산화 저해효과를 조사한 결과 농도 의존적으로 저해효과를 나타내었다. 또한 주름개선효과의 정도를 조사하기 위해 elastase와 collagenase 저해 효과를 조사한 결과 elastase와 collagenase를 농도 의존적으로 저해 효과를 나타내었다. 각질형성세포(HaCaT)를 이용하여 세포독성 및 증식실험을 진행하였다. 커피 은피 추출물의 세포생존율은 무처리 대조군과 유사한 결과를 나타내었다. 그러므로 커피 은피는 주름개선, 미백, 항산화 효과를 나타내므로 화장품에 응용 가능한 기능성 소재로 평가된다.

**Abstract:** The coffee silver skin is a part of coffee beans. We report that the coffee silver skin extracts exhibited cosmetic properties of antioxidant, anti-winkle and whitening effects. The ethanol extracts of silver skin showed free radical scavenging activity up to 92.26% in 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , especially against DPPH radical and ABTS radical cation. The silver skin extracts showed inhibitory effects for tyrosinase activity and DOPA oxidation in a dose-dependent manner, suggesting the extracts retain for the whitening property in cosmetics. The coffee silver skin extracts effectively inhibited the elastase and collagenase. Cytotoxicity of the coffee silver skin extracts was measured by the colorimetric MTS assay. The viability of the human keratinocytes (HaCaT) treated with the coffee silver skin extracts was same as that of untreated cells, indicating the extracts are safe to human cells. Here, we suggest that the silver skin extracts of coffee bean could be a potential natural substance for anti-winkle, whitening, antioxidant properties for cosmetics.

**Keywords:** coffee silver skin, anti-oxidant, whitening effect, anti-wrinkle, cell viability

## 1. 서 론

피부는 환경적 요인인 자외선, 공해, 산업 산물의 산화제노출 등의 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있다. 외부 환경에 의해 자극되어 피부의 노화를 진행시키는 물질 중 특히 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 대사과정에서도 생성될 수 있지만 지속적인 자외선 노출로 인해 피부의 광산화적 손상을 유발할 수 있다. ROS는 산소 중심의 라디칼인 superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )과 같은 큰 산화력을 갖는 산소종과 비라디칼 종인 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ) 등을 포함한다[1-3]. 또한 ROS는 생체 내 세포를 구성하는 지질, 단백질 및 DNA의 산화 및 피부 진피 내 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) 등의 단백질 가수분해효소의 발현을 증가시킨다. 콜라겐과 엘라스틴은 세포외 매트릭스 구성 성분들이다. ROS는 이들 성분을 절단 및 비정상적인 교차결합을 유발시킴으로써 피부 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 피부의 항산화력을 강화시켜 피부노화를 지연시킬 수 있기 때문에 외부의 추가적인 항산화제 보충이 이루어져야 한다[4-8]. 하지만 현재 사용하고 있는 합성 항산화제는 독성에 대한 문제가 제기되고 있으며, 활성산소의 보다 안전한 소거를 위해 그에 따른 대안으로 천연 항산화 물질에 대한 개발 및 연구가 활발하게 이루어지고 있다[9-12].

따라서 본 연구에서 사용한 커피 은피(coffee silver skin)는 체리라고 불리는 커피나무 열매의 일부 조직이다[13]. 또한 커피 은피는 생두라고 불리는 종자의 배유를 감싸고 있는 종자 외피이다. 커피 은피의 바깥에는 파치먼트(parchment)라고 불리는 내과피가 싸고 있고 그 바깥쪽은 펄프(pulp)라고 불리는 과육이 싸고 있다. 그리고 가장 바깥쪽은 스킨(outer skin)이라 불리는 외과피가 싸고 있다. 커피는 꼭두서니과에 속하는 목본이며 속명은 *Coffea*로서 아라비카 종(*Coffea arabica*)과 로부스타라고 불리는 *Coffea canephora*종이 가장 많이 재배되고 있다[13].

커피 생두에는 caffeine과 chlorogenic acid가 다량 함유되어 있으며 또한 flavonoids, caffeic acid, ferulic acid, nicotinic acid, trigonelline, quinolinic acid, tannic acid 및 pyrogallol acid 등의 생리활성 물질이 함유되어 있다. 그리고 커피 은피에도 chlorogenic acid 및 caffeine 등이

함유되어 있다[14-15].

커피 산업에서 음료로 사용되는 커피는 생두 무게의 오직 9.5%가 사용되고 나머지 90.5%는 부산물로 폐기된다[16]. 특히 커피 은피는 생두의 로스팅 과정에서 발생하는 부산물이다[17]. 커피 은피는 수용성 식이섬유(60%)가 많으며 또한 항산화 활성이 있다[18,19].

따라서 본 연구에서는 커피 은피를 화장품 소재로 활용하기 위하여 항산화, 미백 그리고 주름개선 효과와 세포독성 및 증식에 관한 생리활성 가능성을 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 추출물의 제조

본 실험에서 사용한 커피 은피는 (주)앤디스코나(경상북도, 군위군)에서 제공받아 사용하였다. 실험재료인 커피 은피를 흐르는 물에 세척한 후 수분을 제거하고 건조시켜 칭량하여 사용하였다. 실험재료는 열수 추출물의 경우 시료 무게의 10배에 해당하는 멸균된 순수정제수를 첨가하여 80 °C에서 24 h 동안 중탕하였으며, 3회 반복 추출하였다. 에탄올 추출물의 경우 시료 무게의 10배에 해당하는 70% 에탄올에 침지하여 24 h 동안 추출하였으며, 3회 반복 추출하였다. 추출 후 여과지(Advantec No.2, Tokyo, Japan)로 여과한 후 회전압압축기(N-1000, Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하고 건조하였다. 모든 실험 재료는 사용 전까지 -20 °C에 보관하였다.

### 2.2. DPPH Radical 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성능을 이용한 항산화력은 Blois의 방법[20]을 변형하여 측정하였으며 항산화능을 측정하는 방법 중에 하나로 많이 사용되고 있는 방법이다. 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical (Sigma Aldrich CO., St. Louis, MO, USA)은 라디칼 소거능은 DPPH 자유 환원력을 측정하였다. 실험방법은 각 농도별로 희석된 시료 200  $\mu L$ 에 에탄올로 용해시킨 0.2 mM DPPH용액 100  $\mu L$ 를 혼합하여 실온에서 30 min 동안 반응시킨 후 ELISA reader (Infinite™ F200, TECAN, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 DPPH 대신 에탄올을 처리하였다. 또한 양성 대조군은 ascorbic acid를

사용하였다. DPPH radical 소거 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$DPPH \text{ scavenging activity}(\%) = 1 - \left( \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.3. ABTS ·<sup>+</sup> 소거활성 측정

ABTS [2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] 라디칼 소거활성 측정은 Re 등의 방법[21]을 변형하여 측정하였다. ABTS (Sigma Aldrich CO., USA)를 7 mM 농도로 증류수에 용해한 다음 2.45 mM potassium persulfate를 가하여 1:1의 비율로 혼합하여 실온인 암실에서 24 h 동안 반응시킨 후 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 사용하였다. 라디칼이 형성된 ABTS 용액을 에탄올로 희석하여 734 nm에서 측정된 흡광도가 0.70 ± 0.02가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액 150 μL과 시료 150 μL를 혼합하여 6 min 간 반응 후 ELISA reader (Infinite™ F200, Switzerland)를 이용하여 734 nm에서 각 농도별 시료와 혼합하여 사용하였다. 또한 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하였다. ABTS ·<sup>+</sup> 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$ABTS \text{ scavenging activity}(\%) = 1 - \left( \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.4. *In Vitro* Tyrosinase Inhibition Activity

Tyrosinase의 활성을 저해하는 정도를 측정하기 위하여 *in vitro* tyrosinase inhibition assay를 실시하였다. *in vitro* tyrosinase inhibition assay는 Mason 등의 방법[22]을 변형하여 측정하였다. 실험방법은 0.1 M 인산염 완충액(pH 6.5) 250 μL와 각 농도별로 희석된 시료 225 μL, mushroom tyrosinase (2000 U/mL)(Sigma Aldrich CO., USA) 25 μL와 1.5 mM tyrosine (Sigma Aldrich CO., USA) 225 μL를 순서대로 첨가한 후 37 °C에서 10 min 동안 반응시켰다. 반응을 완료한 후 UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 공시료액으로 시료액 대신 0.1 M 인산염완충액(pH

6.5)을 사용하였다. 또한 양성 대조군은 알부틴을 사용하였다. Tyrosinase 활성 저해율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$Tyrosinase \text{ 활성저해율}(\%) = \left[ 100 - \left( \frac{b - b'}{a - a'} \right) \times 100 \right]$$

- a: 공시료액의 반응 후 흡광도
- b: 시료액의 반응 후 흡광도
- a', b': 완충용액으로 대체하여 측정된 흡광도

2.5. *In Vitro* DOPA Oxidation Inhibition Activity

멜라닌 합성 과정의 속도 결정 단계 관여하는 티로시나제의 DOPA 산화반응에 대한 활성 저해를 측정하여 미백성분의 효과를 평가하고자 DOPA 산화 억제 효과시험을 진행하였으며 실험 방법은 다음과 같이 실시되었다[23]. 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 200 μL, 추출물 40 μL와 tyrosinase (2000 U/mL, Sigma Aldrich CO., USA) 20 μL를 혼합 후 37 °C에서 6 min 동안 반응시키고, 2 mM의 L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, Sigma Aldrich CO., USA) 40 μL를 혼합하여 25 °C에서 반응 후 ELISA reader (Infinite™ F200, Switzerland)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 알부틴을 사용하였다. Tyrosinase 활성 저해율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

2.6. *In Vitro* Elastase Inhibition Activity

Elastase는 진피 내 피부 탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastin 분해에 관여하여 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 알려져 있다. 만일 조직 중 이상조직이 있을 시에 이 효소의 활성이 높아져 조직 파괴의 직접적인 원인이 되어 피부의 주름 및 탄력성 저하 등을 초래한다. Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등의 방법[24]에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide (Sigma Aldrich CO., USA)를 사용하여 37 °C에서 30 min 동안 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 410 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 20 μL씩 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 0.2 U porcine pancreas elastase (Sigma Aldrich CO.,

USA) 용액 15  $\mu\text{L}$ 을 가한 후 기질로 0.1 M tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹인 2.9 mM N-succinyl-(L-ala)3-*p*-nitroanilide (0.5 mg/mL, Sigma Aldrich CO., USA)을 20  $\mu\text{L}$  첨가하여 30 min 동안 반응시켜 기질로부터 생성되는 *p*-nitroanilide의 생성량을 ELISA reader (Infinite™ F200, Switzerland) 410 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

### 2.7. *In Vitro* Collagenase Inhibition Activity

Collagenase 저해활성 측정은 Wunsch와 Heindrich의 방법[25]에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가하여, 0.3 mg/mL의 4-phenyl azobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Sigma Aldrich CO., USA)를 녹인 기질액 125  $\mu\text{L}$  및 시료용액 50  $\mu\text{L}$ 의 혼합액에 0.2 mg/mL의 collagenase (Sigma Aldrich CO., USA) 75  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 실온에서 20 min 동안 방치한 후 6% citric acid 250  $\mu\text{L}$ 를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하여 UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120 UV, Mecasys, Daejeon, Korea) 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

### 2.8. 세포배양

인간피부세포(human keratinocyte, HaCaT)(ATCC, Manassas, VA, USA) 세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (HyClone, Logan, UT, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, USA) 과 penicillin (100 units/mL)/streptomycin (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (HyClone, USA)을 첨가하여  $\text{CO}_2$  세포배양기(NU-4750G, NuAire, Plymouth, MN, USA)에서 5%  $\text{CO}_2$  공급 하에서 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

### 2.9. 세포독성 및 증식시험

커피 은피의 열수 추출물과 에탄올추출물을 농도별로 희석한 시료를 96-well plate에  $5 \times 10^3$  cell/well로 균일하게 분주한 다음 24 h 후 각 추출물을 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 농도별 처리에 의한 세포의 증식에 미치는 효과는 Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, Wis., USA)를 사용하였다. 배양 후 배지를 모두 제거하고 DMEM 배지 100  $\mu\text{L}$ 와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) solution 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C 암상태 조건에서 3 h 동안 반응시킨 후 ELISA reader (Infinite™ F200, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 배양액을 대조군으로 사용하였다. 세포생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Cell proliferation}(\%) = \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

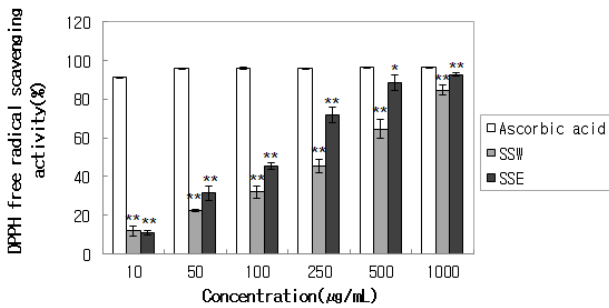
### 2.10. 통계적 분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 통계분석은 SPSS 프로그램(SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균  $\pm$  표준편차(mean  $\pm$  S.D.)로 표시하였고 각 시료 간의 유의성 검정은 one-way ANOVA를 한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 사용하여 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. DPPH Radical 소거활성 측정

산화스트레스에 의해 생체 내에서 생성되는 자유라디칼에 의해 세포손상이 발생하며 그 결과로 노화와 질병이 발생한다. DPPH는 자유라디칼 화합물로서 자유라디칼 소거능 측정에 이용되며 방향족 화합물 및 아민류인 tocopherol 및 ascorbic acid 등의 환원능을 이용하여 항산화능 측정에 사용된다[26]. 자유라디칼의 안정된 모델인 DPPH는 반응 중 DPPH의 감소를 통해 자유라디칼 소거반응이 진행된다는 것을 알 수 있다. 또한 초기 지질 과산화 반응의 억제 정도가 예측 가능하다. 활성산소는 유해산소라 불리기도 한다. 불포화



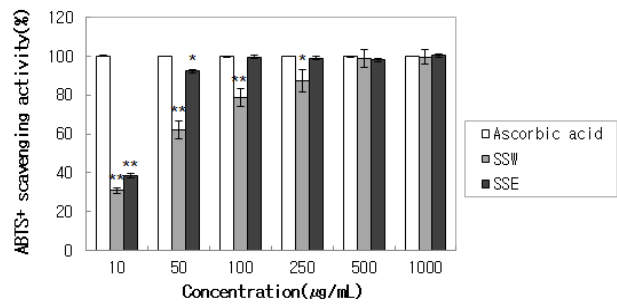
**Figure 1.** DPPH free radical scavenging activities of water extract and ethanol extraction (SSW; silver skin water extracts, SSE; silver skin ethanol extracts). Results are the means ± S.D. of three samples (\**p* < 0.05 vs. positive control, \*\**p* < 0.005 vs. positive control).

지방산은 세포 생체막의 구성성분으로 활성산소가 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 유발시켜 체내에 과산화 지질을 축적한다. 이로 인해 생체 기능이 저하됨과 동시에 노화와 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되고 있다[27,28].

본 연구에서는 DPPH를 이용하여 커피 은피 열수 추출물과 에탄올 추출물의 라디칼 소거활성을 측정하였다. 항산화 기능성을 측정한 결과 열수와 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 자유 라디칼 소거활성이 우수하였으며, 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 경우 자유 라디칼 소거 활성이 우수하였다. DPPH radical 소거능은 열수 추출물은 250, 500, 1,000 µg/mL의 시료 처리에서 45.28%, 64.61%, 84.76%를 나타내었으며, 에탄올 추출물은 250, 500, 1,000 µg/mL에서 71.83%, 88.55%, 92.81%를 나타내었다(Figure 1). DPPH radical을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub>의 경우 열수 추출물의 경우 225.0 µg/mL, 에탄올 추출물의 경우 411.7 µg/mL의 결과를 나타내었다.

### 3.2. ABTS ·<sup>+</sup> Radical 소거활성 측정

본 연구에서는 추출물들의 보다 자세한 항산화능을 조사하기 위하여 ABTS를 이용하여 라디칼 소거 활성을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성측정의 원리를 간략히 이해하면, 먼저 ABTS가 potassium persulfate에 의해 전자가 산화되어 청록색을 나타내며, 이후 추출물에 포함된 항산화 물질에 의하여 전자공여능이 환원됨에 따라 청록색이 점차 없어지는 과정을 측정하는

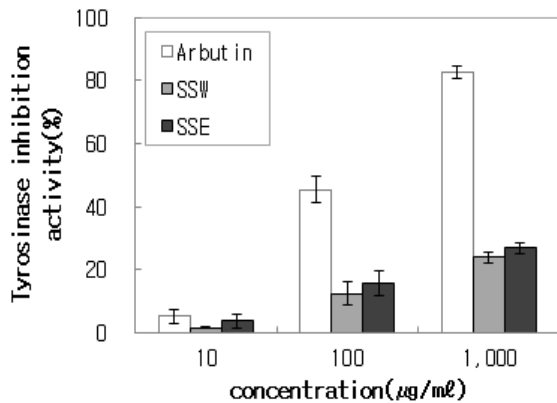


**Figure 2.** ABTS free radical scavenging activities of water extract and ethanol extraction (SSW; silver skin water extracts, SSE; silver skin ethanol extracts). Results are the means ± S.D. of three samples (\**p* < 0.05 vs. positive control, \*\**p* < 0.005 vs. positive control).

방법이다. 또한 ABTS 양이온 소거 측정 방법은 연쇄 절단형 항산화제와 수소 공여 항산화제 모두를 측정할 수 있으며, 친수성과 소수성 모두에 적용이 가능하기 때문에 DPPH 방법보다 더 민감하게 항산화 능력을 알아볼 수 있는 방법으로 알려져 있다[30-33]. 본 연구에서는 ABTS를 이용하여 커피 은피의 열수 추출물과 에탄올 추출물의 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 열수와 에탄올 추출물의 ABTS ·<sup>+</sup> radical 소거능은 열수 추출물은 50, 100, 250, 500, 1,000 µg/mL의 시료 처리에 따라 62.04%, 78.78%, 87.50%, 98.93, 99.61%를 나타내었으며, 에탄올 추출물은 50, 100, 250, 500, 1,000 µg/mL에서 92.26%, 99.64%, 99.09%, 98.09% 100.34%의 우수한 항산화능을 나타내었다. 또한 에탄올 추출물의 경우 50 µg/mL에서 양성대조군인 ascorbic acid와 유사한 결과를 확인할 수 있었다(Figure 2).

### 3.3. In Vitro Tyrosinase Inhibition Activity

멜라닌은 멜라닌 세포 내의 특수한 세포소기관인 멜라노솜에서 생성되는 색소이다. 멜라닌은 멜라노솜 내에 있는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 tyrosinase-related protein 2 (TRP2) 등의 여러 효소의 복합 작용에 의해 생성된다. 특히 tyrosinase는 멜라닌 생합성의 속도 조절 단계(rate-limiting step)인 tyrosine이 DOPA로 hydroxylation 된 후 dopaquinone으로 산화되는 과정에서 작용하는 주요 조절 효소이다[34-36]. 멜라닌 합성을 조절, 저해하는 알부틴, 하이드로퀴논, 비타민 C 유도체 등의 물질이 색소 침착을 방지하고 해결하기 위해 개발되었으나 충분한 효과를 나타내지 않

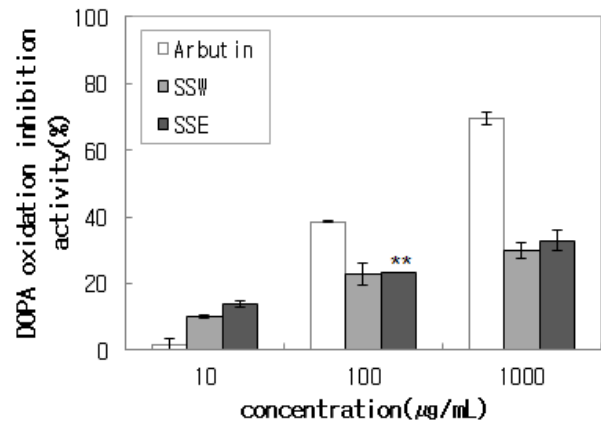


**Figure 3.** Tyrosinase inhibition of water extract and ethanol extraction (SSW; silver skin water extracts, SSE; silver skin ethanol extracts). Results are the means  $\pm$  S.D. of three samples ( $*p < 0.05$  vs. positive control,  $**p < 0.005$  vs. positive control).

거나, 피부에 대한 안전성, 제형 내 안정성 등의 한계로 인하여 화장품 제형을 제작할 때 제한적으로 처방되어 왔다[37,38]. 커피 은피의 tyrosinase 저해 효과는 열수 추출물은 100, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리에서 각각 12.39%, 26.80%를 나타내었으며, 에탄올 추출물은 100, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리에서 15.71%, 26.81%의 tyrosinase 저해 효과를 나타내었다(Figure 3).

#### 3.4. *In Vitro* DOPA Oxidation Inhibition Activity

피부에 자외선이 노출되면 표피의 기저층에 있는 melanoma cell에서 melanin이 생성되며 이를 표피의 대부분을 차지하는 각질세포에 전달하여 자외선을 흡수함으로써 피부세포가 보호된다. Melanin 생성의 첫 번째 반응은 tyrosine이 tyrosinase 효소의 도움으로 DOPA로 전환되며, 이어서 DOPA가 tyrosinase에 의해 dopamine으로 전환되는 것이 두 번째 반응이다[39]. 따라서 미백효과시험은 소재가 melanin 생성의 첫 번째 혹은 두 번째 반응을 억제하여 melanin 생성을 막음으로써 피부를 하얗게 하는 정도를 평가하는 시험법이다. 커피 은피의 DOPA 산화 저해효과의 결과는 열수 추출물은 100, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리에서 각각 22.74%, 29.75%를 나타내었으며, 에탄올 추출물은 100, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리에서 각각 23.32%, 32.84%의 DOPA 산화 저해 효과를 나타내었다(Figure 4).



**Figure 4.** DOPA oxidation inhibition of water extract and ethanol extraction (SSW; silver skin water extracts, SSE; silver skin ethanol extracts). Results are the means  $\pm$  S.D. of three samples ( $*p < 0.05$  vs. positive control,  $**p < 0.005$  vs. positive control).

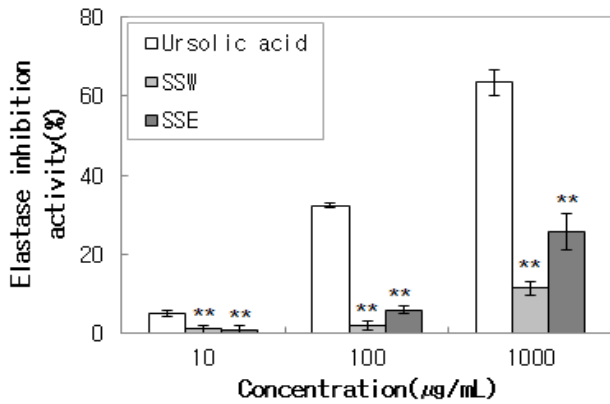
#### 3.5. *In Vitro* Elastase Inhibition Activity

Elastase는 피부의 탄력을 유지하는 역할로 엘라스틴을 분해하는 효소이며, 피부 진피에 존재한다. Elastase의 활성을 저해시켜 주름 생성을 억제시킴으로써 피부 노화를 방지하려는 연구가 활발히 진행되어 지금까지 ursolic acid,  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor, mucus proteinase inhibitor,  $\alpha$ -2-macroglobulin, inter-atrypsin, bowman-birk inhibitor, verapamil, beta lactam, chondroitin sulfates, deoxycycline, heparin 등의 elastase 저해제들이 보고되고 있다[40].

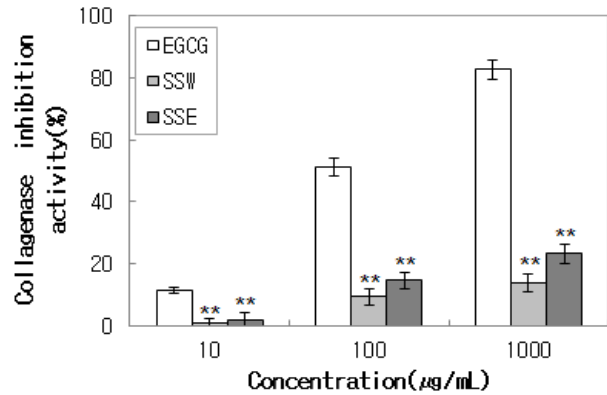
커피 은피의 피부주름 개선 물질로서의 사용 가능성을 알아보기 위하여 elastase 저해 물질로 알려진 ursolic acid를 양성대조군으로 사용하여 커피 은피 열수 및 에탄올 추출물의 elastase 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Figure 5와 같이 열수 추출물 10, 100, 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 은 각각 농도별로 1.07%, 1.83%, 11.39%의 elastase 저해효과를 나타내었으며, 에탄올 추출물은 0.85%, 5.93%, 25.59%의 결과를 나타내어 농도 의존적으로 elastase 저해효과를 나타내었다.

#### 3.6. *In Vitro* Collagenase Inhibition Activity

Collagen을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 matrix metalloproteinase I (MMP-1, collagenase)으로 피부노화에 있어 MMP-1의 저해는 중요한 요인으로 평



**Figure 5.** Elastase inhibition activities of coffee silver skin water extract and ethanol extraction (SSW; silver skin water extracts, SSE; silver skin ethanol extracts). Results are the means  $\pm$  S.D. of three samples ( $*p < 0.05$  vs. positive control,  $**p < 0.005$  vs. positive control).



**Figure 6.** Collagenase inhibition activities of coffee silver skin water extract and ethanol extraction (SSW; silver skin water extracts, SSE; silver skin ethanol extracts, EGCG: Epigallocatechin gallate). Results are the means  $\pm$  S.D. of three samples ( $*p < 0.05$  vs. positive control,  $**p < 0.005$  vs. positive control).

가되어 지고 있다[41]. 커피 은피 추출물의 collagenase의 저해활성을 측정한 결과 Figure 6과 같이 나타났다. 커피 은피 열수 추출물의 저해활성은 10, 100, 1,000 µg/mL은 각각 농도별로 0.86%, 9.48%, 13.79%를 나타내었으며, 에탄올 추출물의 경우 각 농도별로 1.72%, 14.66%, 23.28%로 collagenase 저해 효과를 나타내었다 (Figure 6).

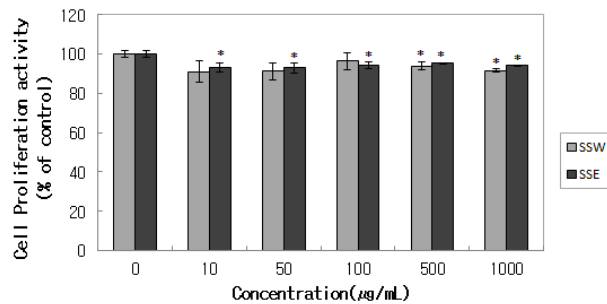
### 3.7. 세포독성 및 증식률

커피 은피 열수 추출물과 에탄올 추출물의 혼합물을 농도별로 세포증식률을 측정한 결과 대조군과 비교하였을 때 세포증식률이 Figure 7과 같이 나타났다. 커피 은피의 열수 추출물의 경우 100 µg/mL에서 96.39%, 에탄올 추출물의 경우 500 µg/mL에서 95.23%로 가장 우수한 결과를 나타내었으며, 시료 처리한 모든 농도에서 무처리 대조군과 유사한 결과를 나타내었다.

## 4. 고 찰

본 연구에서는 커피 은피 열수와 에탄올 추출물 대한 항산화능, 미백효과, 주름개선 효과를 조사하였으며, 이들 추출물에 대한 세포독성 및 증식실험을 진행하였다.

항산화 실험인 DPPH radical 소거 활성능에 대한 측정은 커피 은피 열수 및 에탄올 추출물을 각각 처리했



**Figure 7.** Cell Proliferation activities of coffee silver skin water extract and ethanol extraction (SSW; silver skin water extracts, SSE; silver skin ethanol extracts). Results are the means  $\pm$  S.D. of three samples ( $*p < 0.05$  vs. control,  $**p < 0.005$  vs. control). Control is 0 µg/mL.

을 때 농도 의존적으로 증가하였다. ABTS radical 소거 활성능 또한 농도 의존적으로 항산화능이 증가하였으며, 커피 은피 열수 및 에탄올 추출물의 경우 50 µg/mL에서 각각 62.04%, 92.26%로 매우 우수한 항산화능을 나타내었다. 특히 에탄올 추출물의 경우 50 µg/mL 이상에서 대조군인 ascorbic acid과 유사한 결과인 90% 이상의 항산화능을 나타내었다. 선행 연구와 유사하게 본 연구에서도 커피 은피의 에탄올 추출물은 열수 추출물보다 우수한 항산화 기능을 보였다[17,29]. 미백 효과와 관련 있는 tyrosinase 저해와 DOPA oxidation 저해 실험 결과 커피 은피의 추출물은 농도 의존적으로

저해 결과가 증가된 것으로 나타났다. 또한 주름개선 효과와 관련 있는 elastase 저해와 collagenase 저해 실험을 진행한 결과 커피 은피 추출물은 농도 의존적으로 저해 결과가 증가되었다. 커피 은피 에탄올 추출물의 경우 최대 25.59%의 elastase 저해 결과를 보였으며 23.28%의 collagenase 저해 결과를 나타내었다. 세포 독성 및 증식에 관하여 조사한 결과 커피 은피의 열수 추출물의 경우 100  $\mu\text{g/mL}$ , 에탄올 추출물의 경우 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포생존능이 가장 우수한 결과를 나타내었으며, 또한 시료 처리군의 모든 농도에서 무처리 대조군과 유사한 결과를 나타내었다.

종합하면 우수한 항산화 효과와 미백 및 주름개선의 효능을 가진 커피 은피는 화장품의 생리활성 소재로 사용이 가능하다.

## 감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부의 지원사업으로 수행된 결과입니다(과제번호C0511761).

## Reference

1. S. N. Park, Effect of natural products on skin cells: action and suppression of reactive oxygen species, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **25**(2), 77 (1999).
2. J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, and S. J. Weiss, Singlet oxygen production by human eosinophils, *J. Biol. Chem.*, **263**, 9692 (1988).
3. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
4. S. N. Park, Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions, Ph.D. Thesis, Seoul National University (1989).
5. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**, 324 (2007).
6. M. J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Amer. Heart J.*, **23**, 2382 (1998).
7. D. Bagchi, M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**, 129 (1995).
8. S. B. Berman and T. G. Hastings, Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species, *J. Neurochem.*, **69**(3), 1185 (1997).
9. A. L. Branen, Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59 (1991).
10. S. M. Barlow, Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In *Food Antioxidant*. ed. B.J.F. Hudson, 253, Elsevier, Amsterdam (1990).
11. S. J. Yang, K. S. Youn, H. K. No, S. H. Lee, and J. H. Hong, Optimization of extraction conditions for mate (*Ilex paraguarensis*) ethanolic extracts, *Korean J. Food*, **18**, 319 (2011).
12. S. J. Lee, J. H. Kim, M. J. Kim, S. M. Yoon, J. C. Jeong, and N. J. Sung, Effect of garlic and medicinal plants composites on antioxidant activity and lipid levels of liver in hypercholesterolemic rats, *J. Life Sci.*, **19**, 1769 (2009).
13. D. W. Yeo and G. H. Hyeon, Coffee, Personally printed book, 39 (2009).
14. M. Minamisawa, S. Yoshida, and Takai, Determination of biologically active substances in roasted coffees using a diode-array HPLC system, Analytical sciences, *Analytical Chemistry*, **20**(2), 325 (2004).
15. N. M. Saez, M. Ullate, M. A. M. Cabrejas, P. Martorell, S. Genoves, D. Ramon, and M. D. Castillo. A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin, *Food Chemistry*, **150**, 227 (2014).
16. P. S. Murthy and H. K. Manonmani, Bioconversion of coffee industry wastes with white rot fungus *pleurotus florida*, *J. Environmental Sci.*, **2**(2), 145-150



- (2008).
17. M. Saenger, E. U. Hartge, J. Werther, T. Ogada, and Z. Siagi, Combustion of coffee husks, *Renewable Energy*, **23**(1), 103-121 (2001).
  18. R. C. Borrelli, F. Esposito, A. Napolitano, A. Ritieni, and V. Fogliano, Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silver skin. *J. Agric. Food Chem.*, **52**(5), 1338-1343 (2004).
  19. A. Napolitano, V. Fogliano, A. Tafuri, and A. Ritieni, Natural occurrence of ochratoxin a and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. *J. Agric. Food Chem.*, **55**(25), 10499-10504 (2007).
  20. M. L. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
  21. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231 (1999).
  22. H. S. Mason and E. W. Peterson, Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **111**, 134 (1965).
  23. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and antiaging effects of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 165 (2007).
  24. R. J. Cannell, S. J. Kellam, A. M. Owsianka, and J. M. Walker, Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.*, **54**(1), 10 (1988).
  25. E. Wunsch, H. G. Heidrich, Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Z. Physiol. Chem.*, **333**(1), 149 (1963).
  26. C. C. Wei, C. W. Yu, P. L. Yen, H. Y. Lin, S. T. Chang, F. L. Hsu, and V. H. Liao, Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- $\beta$  toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia*, *J. Agric. Food Chem.*, **62**(44), 10701 (2014).
  27. A. Kitahara, U. Matsumoto, H. Ueda, and R. Ueoka, A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of r-irradiated methyl linolate, *chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2208 (1992).
  28. T. Hatano, Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-Tannins and related polyphenols, *Natural Medicines*, **49**, 357 (1995).
  29. F. Rodrigues, A. Palmeira-de-Oliveira, J. das Neves, B. Sarmento, M. H. Amaral, and M. B. P. P. Oliveira, *Pharmaceutical Biology*, **53**(3), 386 (2015).
  30. S. Y. Qusti, A. N. Abo-khatwa, and M. A. Bin Lahwa, Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran, *Eur. J. Biol. Sci.*, **2**, 40 (2010).
  31. Y. M. Choi, M. H. Kim, J. J. Shin, J. M. Park, and J. S. Lee, The antioxidant activities of the some commercial teas, *J. Kor. Soc. Nutr.*, **32**, 723 (2003).
  32. L. Milne, P. Nicotera, S. Orrenius, and M. J. Burkitt, Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Prooxidant and antioxidant properties of glutathione, *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**, 102 (1993).
  33. B. S. Wolfenden and R. L. Willson, Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2**, 805 (1982).
  34. V. J. Hearing and M. Jimenez, Mammalian tyrosinase-The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, **19**(12), 1141 (1987).
  35. T. Kuzumaki, A. Matsuda, K. Wakamatsu, S. Ito, and K. Ishikawa, Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes, *Exp. Cell Res.*, **207**(1), 33 (1993).
  36. V. del Marmol and F. Beermann, Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Lett.*, **381**(3), 165 (1996).
  37. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical

- and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment, Cell Res.*, **16**(2), 101 (2003).
38. F. Solano, S. Briganti, M. Picardo, and G. Ghanem, Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects, *Pigment, Cell Res.*, **19**(6), 550 (2006).
39. R. M. Gak, *Dermatology*, 5, KDA Textbook Editiong Board, Seoul (2008).
40. D. J. Shin, S. H. Lee, D. W. Kim, J. B. Jun, S. L. Chung, and J. C. Kim, Level of plasma elastase- $\alpha$  1-proteinase inhibitor in patients with Behcet's disease. *Annals of Dermatology*, **11**(1), 9-12 (1999).
41. J. H. Chung, S. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, **115**(2), 117-182 (2000).