

고전압 펄스 전기장 기술을 이용한 차가버섯 추출물의 피부 효능 증대 방법

성미경[†] · 강정욱 · 정윤주 · 김봉준 · 조항의 · 조현대

([†]코스메카코리아, *충북대학교 약학대학 약학과, 박사과정
(2020년 6월 11일 접수, 2020년 8월 20일 수정, 2020년 8월 26일 채택)

New Approaches to Increase Skin Efficacy of Chaga Mushroom Extract using High Voltage Pulsed Electric Fields Technology

Mi Kyung Sung[†], Jung Wook Kang, Yoon Ju Jeong, Bong Jun Kim, Hang Eui Cho, and Hyun Dae Cho*

COSMECCA KOREA, 6F, 323 Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea

*College of Pharmacy, Chungbuk National University

(Received June 11, 2020; Revised August 20, 2020; Accepted August 26, 2020)

요약: 본 연구에서는 고전압 펄스 전기장 기술을 사용하여 식물 내 유효성분과 피부 효능을 증대시키고자 하였다. 고전압 펄스 전기장을 전처리한 차가 버섯(*Inonotus obliquus*) 추출물을 제조한 후, 성분 측정과 피부 효능 평가를 수행하였다. 총 당과 폴리페놀 함량은 0.5 kV/cm에서 50 Hz, 25 Hz 전처리 추출물 순으로, 총 단백질 함량은 0.5 kV/cm, 25 Hz 전처리 추출물에서 상온 물 추출물과 에탄올 추출물보다 높게 측정되었다. DPPH 소거능 효과는 폴리페놀 함량 결과와 유사하게 0.5 kV/cm에서 25 Hz, 50 Hz의 전처리 추출물에서 가장 우수하였다. 피부 효능에서는 단백질 함량이 가장 높은 0.5 kV/cm, 25 Hz 전처리 추출물에서 sodium dodecyl sulfate (SDS)와 UVB에 대한 세포 보호효과가 가장 우수하였으며, 0.5k V/cm에서 50 Hz, 100 Hz 전처리 추출물에서 히알루론산 생성 촉진이 가장 우수하였다. 따라서 고전압 펄스 전기장 전처리 차가 추출물의 유효성분, 피부 효능이 증대하는 것을 확인하여 세포 보호 및 보습 효과가 있는 기능성 소재로의 개발이 가능하며, 이러한 green technology가 화장품 분야와 소재개발에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: In this study in order to develop new approaches we investigated using high voltage pulsed electric fields (PEF) technology to reduce the risks, protect the phyto-constituents and improve skin biological activities. After preparing a Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extracts pretreated with PEF, components measurement and skin efficacy evaluation were performed. As a result of the content measurement, the content of polysaccharide and polyphenol were higher in the order of extracts treated with 50 Hz and 25 Hz at 0.5 kV/cm, and the content of protein was the highest in extracts treated with 25 Hz at 0.5k V/cm. Similar to the results of the polyphenol measurements, extracts treated with 25 Hz and 50 Hz at 0.5 kV/cm showed leading DPPH scavenging ability. The cell protection effect against sodium dodecyl sulfate (SDS) and UVB was finest in extracts treated with 25 Hz at 0.5 kV/cm, which had the highest protein content. And the hyaluronic acid synthesis was leading in extracts treated with 50 Hz and 100 Hz at 0.5 kV/cm. Therefore, the active ingredient of the high-voltage PEF pre-treatment Chaga mushroom extract can be developed as a functional material with cell protection and moisturizing effect, and such green technology is expected to be used in various fields of cosmetics and material development.

Keywords: high voltage pulsed electric fields, Chaga mushroom, extraction, skin effects, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: sungmi@cosmecca.com)
call: *** - **** - ****

1. 서 론

천연물에서 추출한 유효성분에는 단백질과 당과 같은 1차 대사산물과 폴리페놀, 테르페노이드, 알칼로이드 등 2차 대사산물이 있다. 이러한 유효성분들은 화학구조에 따라 용해도가 다르기 때문에 용매에 따라 추출되는 물질의 종류 및 생리활성 능력이 달라진다[1,2]. 식물의 유효성분을 추출할 때 가장 많이 이용하는 용매는 주로 폴리페놀 화합물과 극성이 비슷한 메탄올, 에탄올, 헥산 등의 유기 용매로 추출에 용이하나 유독성 물질로 추출물에 잔류할 경우에 안전성 문제를 초래할 수 있다. 또한 고온에서 추출할 경우에 열에 의해 단백질과 같은 유효성분들이 변성, 손실, 파괴될 가능성이 높다[3].

고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF)은 동식물 세포막에 펄스에너지를 가하여 세포 내외의 전위차를 발생시켜 세포막의 붕괴를 유도하는 원리의 새로운 저온가공기술로 가열처리에 따른 영양소 손실을 방지해준다[4-6]. 고전압 펄스 전기장의 주요 기능으로는 미생물 살균 및 생육억제, 식물 및 동물의 세포벽을 파괴시켜 추출 수율과 유효 성분 증대 등이 있다[7,8]. 또한 연속적 공정으로 사용이 가능하여 식품 가공 혹은 추출 기술로서 다양한 적용이 이루어질 수 있다.

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 다른 버섯과 다르게 기생 균주의 형태로 자작나무 몸통에 침투하여 자라나 나무의 영양분을 축적하며 성장하는 특성을 가진 소나무비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*)에 속하는 버섯이다. 차가버섯은 위암, 심혈관계 질환, 당뇨 등에 처방되어 왔으며 서부 시베리아에서는 해충 억제, 복통, 폐결핵, 간이나 심장질환 등에 처방되어 왔다[9]. 차가버섯은 β -D-glucan 구조를 갖는 수용성 단백다당체와 물질 대사를 활발하게 하는 저분자 다당체를 다량 함유하고 있다. 또한 많은 양의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있어 강력한 항산화제로 작용한다[10]. 이 외에 항암, 항당뇨, 항종양, 면역력 강화 등의 효과가 보고되어 있어 기능성 식품 및 건강식품으로 주목 받고 있다[11].

현재 고전압 펄스 전기장을 통해 식물 추출물의 유효성분 및 피부효능을 증대시키는 방법에 대한 연구는 미비한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 고전압 펄스 전기장을 통해 차가버섯 추출물의 유효성분과 효능을 증대시키는 방법을 개발하고자 하였다. 이를 위해 차가버섯 추출물의 유효성분 함량 변화와 항산화, 보습, 피부세포 보호 효과의

피부 효능을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 고전압 펄스 전기장 처리

고전압 펄스 전기장 처리 장비(ELEA[®]HVP 5, DIL Quakenbrück, Germany)는 5 kW급 펄스 발생기를 통해 세포막의 기공을 유도한다. 원물을 넣는 처리 챔버에는 5 mm 두께의 평행한 스테인리스 스틸 전극 2 개가 있어 고전압 펄스 전기장에 노출되게 된다[12-14].

건조된 차가버섯 분쇄물 300 g을 처리 용기에 넣고 원물 질량에 대하여 10 배의 증류수를 채운 다음 고전압 펄스 전기장을 처리하였다. 고전압 펄스 전기장의 고정 조건으로는 펄스 넓이 25 μ m, 처리 시간 10 s, 변경 조건으로는 전기장 세기(kV/cm), 펄스 빈도(Hz)로 지정하였다(Table 1).

Table 1. PEF treatment conditions

Electric field (kV/cm)	Pulse frequency (Hz)	Energy (kJ)	Voltage (%)
0.5	25	0.7	20
	50	1.3	20
	100	1.6	20
1	50	2.4	35
2	50	14.2	65

2.2. 추출물 제조

2.2.1. 상온 추출물(RT Water Extract)과 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물(PEF Pretreated Chaga Mushroom Extract)

고전압 펄스 전기장 처리 전 또는 후의 원물을 분리하여 처음 질량에 대하여 10 배의 증류수를 이용하여 상온 25 $^{\circ}$ C 내외의 온도에서 물 추출을 5 h 진행하였다. 이후 추출물을 1 μ m 필터지(Hyundai Micro, Korea)로 여과한 후 이를 농축하였다. 이후 동결 건조하여 각각의 조건에 대한 추출물을 제조하였다.

2.2.2. 열수 추출물(Hot Water Extract)

원물을 분리하여 처음 질량에 대하여 10 배의 증류수를 이용하여 80 $^{\circ}$ C 내외의 온도에서 물 추출을 5 h 진행하였다. 이후 추출물을 1 μ m 필터지로 여과한 후 이를 농축하였다. 이후 동결 건조하여 열수 추출물을 제조하였다.

2.2.3. 에탄올 추출물(Ethanol Extract)

원물을 분리하여 처음 질량에 대하여 10 배의 95% 에탄올(95%, Samchun Chemicals, Korea)을 이용하여 상온 25 °C 내외의 온도에서 추출을 5 h 진행하였다. 이후 추출물을 1 μm 필터지로 여과한 후 이를 농축하였다. 이후 동결 건조하여 에탄올 추출물을 제조하였다.

2.3. 함량 측정

2.3.1. 총 당 함량

총 당 함량은 황산-페놀 방법을 이용하였다[15]. 1 mg/mL의 농도로 희석한 시료액 1 mL에 5% 페놀(WAKO, Japan) 1 mL을 가하여 교반하였다. 황산(Sigma-Aldrich, USA) 5 mL을 가하여 추가 교반 후 상온에서 30 min 반응시킨 후, Microplate reader (GMB000, Promega, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종 다당체(DAEJUNG, Korea)의 함량은 포도당으로부터 얻은 표준곡선을 이용하여 결정하였다.

2.3.2. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 이용하였다[16]. 1 mg/mL의 농도로 희석한 시료액 0.1 mL에 2 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, USA) 0.2 mL과 증류수 2 mL을 가하여 상온에서 3 min간 반응시켰다. 20% 탄산나트륨(Junsei, Japan) 2 mL을 가하여 상온에서 1 h 반응시킨 후, Microplate reader를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종 폴리페놀의 함량은 갈릭산(Sigma-aldrich, USA)으로부터 얻은 표준곡선을 이용하여 결정하였다.

2.3.3. 총 단백질 함량

총 단백질의 함량은 BCA 방법을 이용하였다[17]. 1 mg/mL의 농도로 희석한 시료액 10 μL에 reagent A와 reagent B (Thermo Fisher Scientific, USA)를 50 : 1로 혼합한 용액 200 μL를 가하여 37 °C에서 30 min간 반응시켜준 후, Microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종 단백질의 함량은 소혈청알부민(Thermo Fisher Scientific, USA)으로부터 얻은 표준곡선을 이용하여 결정하였다.

2.4. DPPH소거능

96 well immunoplate에 50% 에탄올에 용해시킨 일정 농도의 시험물질을 160 μL씩 분주한 후 1 mM 2,2-diphenyl-

1-picrylhydrazyl (DPPH) (Alfa Aesar, USA) 시약을 40 μL씩 넣어 상온에서 30 min간 반응하였다. Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 소거능을 계산하였다.

2.5. 세포배양

인체각질세포(human keratinocyte)인 HaCaT 세포를 페니실린과 스트렙토마이신(WELGENE, Korea), 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, USA)를 함유하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, USA) 배지에 넣고 37 °C, 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기(FORMA STERI-CYCLE 371, Thermo Fisher Scientific, USA)내에서 배양하였다.

인체섬유아세포(human fibroblast)를 페니실린과 스트렙토마이신, 보조제를 함유하는 fibroblast basal medium (FBM) (LONZA, Switzerland) 배지에 넣고 37 °C, 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양하였다.

2.6. 세포 생존율 측정

96 well plate에 HaCaT 세포를 1.5 X 10⁴cells/well씩 분주한 후, 24 h 동안 세포가 plate에 잘 붙도록 37 °C, 5% CO₂ 세포 배양기에 배양하였다. 24 h 후, 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 FBS를 포함하지 않은 DMEM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어 주었다. 다음 날, 일정 농도의 시험물질을 처리하여 24 h 배양하였다. 배지에 10 배 희석시킨 WST-1 시약(Dogenbio, Korea)을 각 well에 100 μL씩 넣고 2 h 배양 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

2.7. 세포보호 효과

96 well plate에 HaCaT세포를 1.5 × 10⁴cells/well씩 분주한 후, 세포 배양조건에서 배양하였다. 24 h 후, 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 FBS를 함유하지 않은 DMEM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어주었다. 다음 날, sodium dodecyl sulfate (SDS) 15 μg/mL와 함께 일정 농도의 시험물질을 처리하여 24 h 배양하거나 UVB램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 UVB를 100 mJ/cm²조사 후에 시험물질을 처리하여 24 h 배양하였다. 배지에 10 배

희석시킨 WST-1 시약을 각 well에 100 μ L씩 넣고 2 h 배양 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. 히알루론산 생성량(Hyaluronic acid, HA) 측정

96 well plate에 HaCaT세포를 1.5×10^4 cells/well씩 분주한 후, 세포 배양조건에서 배양하였다. 24 h 후, 배양액을 버리고 PBS로 세척한 다음 FBS를 함유하지 않은 DMEM 배지를 사용하여 세포를 기아상태로 만들어주었다. 다음 날, 일정 농도의 시험물질을 처리하여 24 h 배양하였다. 히알루론산 ELISA kit (R&D System, USA)를 이용하여 실험 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종 히알루론산의 양은 일정 단백질 당 히알루론산의 양으로 환산하여 음성대조군과 비교하였다.

2.9. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과값은 평균값(Mean)과 표준편차(Standard deviation, SD)로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's t-test로 비교하였으며 p -value 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출물의 성분 함량

일반 추출물과 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물의 총 당, 폴리페놀, 단백질 함량을 측정하였다.

3.1.1 총 당 함량

고전압 펄스 전기장 전처리 추출물의 총 당 함량은 전기장 세기 0.5 kV/cm에서 펄스 빈도 50 Hz, 25 Hz 순으로 높았으며 각각 123.7 ± 3.3 mg/g, 122.7 ± 2.7 mg/g로, 가장 함량이 높은 열수 추출물의 총 당 134.5 ± 1.5 mg/g의 약 91% 정도로 측정되었다(Figure 1A). 상온 물 추출물의 총 당 96.3 ± 1.9 mg/g 대비 각각 약 28.4%, 27.4% 증가하였다.

3.1.2 총 폴리페놀 함량

고전압 펄스 전기장 전처리 추출물의 총 폴리페놀 함량은 전기장 세기 0.5 kV/cm에서 펄스 빈도 50 Hz, 25 Hz 순으로 높았으며 각각 98.0 ± 3.7 mg/g, 96.0 ± 2.1 mg/g로, 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 87.1 ± 1.7 mg/g 보다 함량이

높았으며 가장 함량이 높은 열수 추출물의 총 폴리페놀 106.8 ± 1.0 mg/g의 약 90% 정도로 측정되었다(Figure 1B). 상온 물 추출물의 총 폴리페놀 77.7 ± 2.8 mg/g 대비 각각 약 26.0%, 23.5% 증가하였다.

3.1.3 총 단백질 함량

고전압 펄스 전기장 전처리 추출물의 총 단백질 함량은 전기장 세기 0.5 kV/cm, 펄스 빈도 25 Hz에서 전처리한 추출물에서 649.3 ± 2.4 mg/g로, 에탄올 추출물의 총 단백질 574.0 ± 5.7 mg/g 보다 함량이 높았으며 가장 함량이 높은 열수 추출물의 총 단백질 771.8 ± 1.6 mg/g의 약 84% 정도로 측정되었다(Figure 1C). 상온 물 추출물의 총 단백질 556.0 ± 23.6 mg/g 대비 약 16.8% 증가하였다.

고전압 펄스 전기장 전처리 추출물이 상온 물 추출물과 에탄올 추출물과 비교하여 당, 폴리페놀, 단백질의 함량이 높게 측정되었다. 이는 고전압 펄스 전기장 처리가 차가버섯의 세포막에 영향을 주어 추출을 용이하게 한 것임을 나타낸다.

3.2. DPPH 소거능 효과

DPPH는 화학적으로 안정화된 수용성 free radical로, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되어서 고유의 색이었던 보라색이 노란색으로 변하게 된다. 이 반응을 통해 DPPH 소거능을 측정하여 간접적으로 추출물의 항산화 활성을 평가하였다[18,19].

전기장 세기 0.5 kV/cm, 펄스 빈도 25 Hz, 50 Hz 처리한 각각의 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물이 상온 물 추출물과 비교하여 DPPH 소거능이 더 우수한 것으로 나타났으며, 에탄올 추출물과 열수 추출물과 비교하면 농도가 낮아질수록 DPPH 소거능이 유사해지는 것을 확인하였다(Figure 2). 농도 100 μ g/mL과 200 μ g/mL에서 상온 물 추출물의 DPPH 소거능이 36.4%, 49.7%일 때에 전기장 세기 0.5 kV/cm, 펄스 빈도 25 Hz 전처리 추출물은 50.1%, 58.4%, 50Hz 전처리 추출물은 51.9%, 44.7%의 DPPH 소거능을 보여주었다. 이는 폴리페놀 함량과 유사한 경향성으로 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물이 상온 물 추출물보다 항산화 효과가 우수하며 고전압 펄스 전기장 처리로 인해 상온에서 추출을 진행하여도 유기용매 또는 고온 추출을 하였을 만큼의 효과를 가지고 있음을 나타낸다.

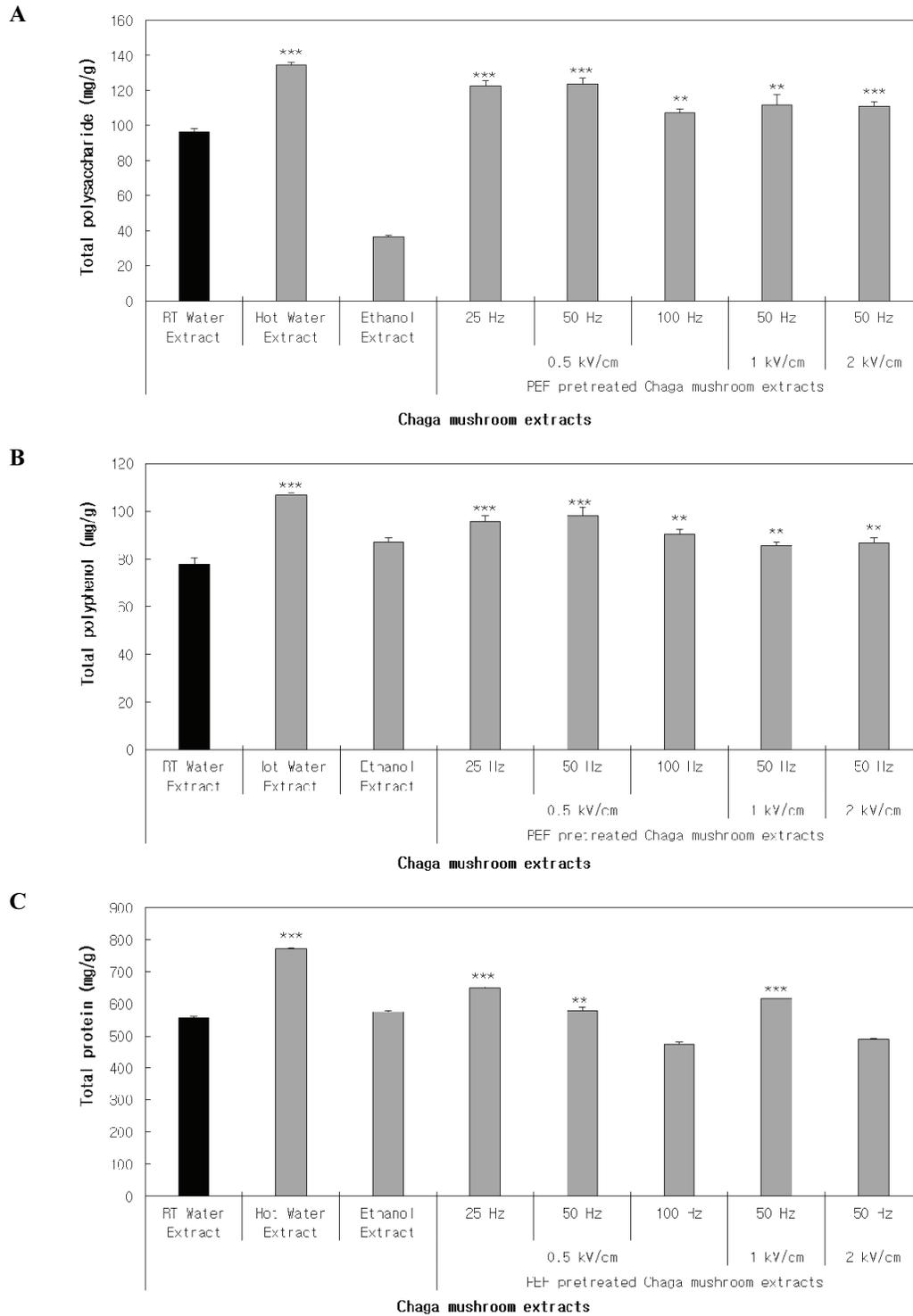


Figure 1. Components content of Chaga mushroom extracts. (A) Total polysaccharide, (b) Total polyphenol, (C) Total protein. The results were expressed as the mean \pm standard deviation. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with RT water extract.

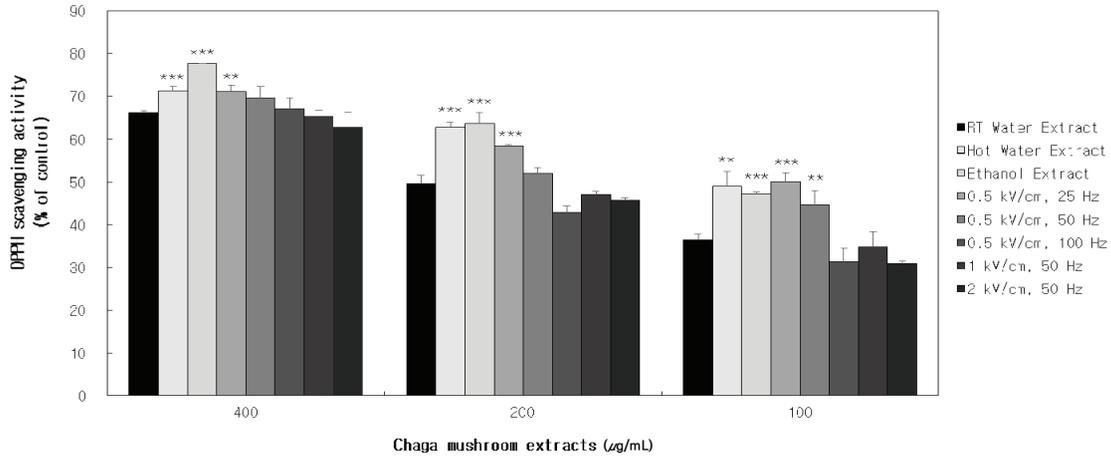


Figure 2. DPPH radical scavenging activities of Chaga mushroom extracts. The results were expressed as the mean ± standard deviation. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared with RT water extract.

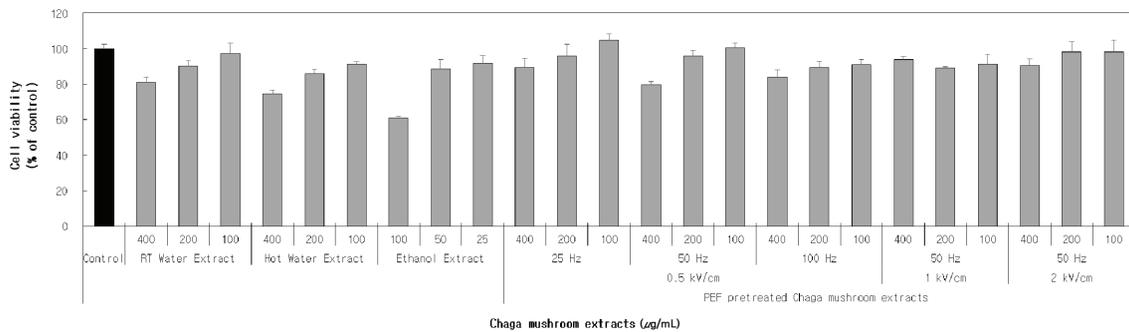


Figure 3. Cell viability of Chaga mushroom extracts in HaCaT cells. The results were expressed as the mean ± standard deviation.

3.3. 세포독성

WST-1 assay는 세포 생존능을 확인하는 시험법 중 하나로, 기질인 WST-1이 살아있는 세포와 반응하여 수용성 formazan을 생성한다. 세포 생존과 직선 상관관계를 가지는 formazan의 생성을 통해 추출물의 세포 생존을 평가하였다[20,21].

고전압 펄스 전기장 전처리 추출물에 대한 피부 효능을 확인하기에 앞서, 세포 독성 여부를 확인하고자 HaCaT 세포에 차가버섯의 물 추출물들을 100, 200, 400 µg/mL, 에탄올 추출물은 세포 독성이 예상되어 저농도인 25, 50, 100 µg/mL로 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. HaCaT 세포에서 90% 이상의 세포생존율이 나타나는 추출물들의 공통 농도는 최고 20 µg/mL, 물 추출물들만의 공통 농도는 100 µg/mL인 것으로 나타났다(Figure 3). 공통적으로 세포 독성이 없

는 농도인 20 µg/mL이하의 농도에서 효능 시험을 진행하였다.

고전압 펄스 전기장 전처리 추출물들이 에탄올 추출물과 비교하여 세포 독성이 적은 것을 확인할 수 있었으며 보다 안전한 기능성 소재로 활용될 수 있음을 확인하였다.

3.4. 세포보호 효과

3.4.1. SDS에 대한 세포보호 효과

SDS는 음이온 계면 활성제로, 세포막에 결합하여 세포 대사를 억제하고 세포막을 파괴하여 피부 이상 반응을 유발하는 대표적인 피부 자극물질이다. 이러한 자극물질로 인해 발생하는 세포 사멸이 감소되는 정도를 통해 세포보호 효과를 평가하였다[22].

SDS에 의해 세포 사멸이 발생하는 농도를 확인하고자

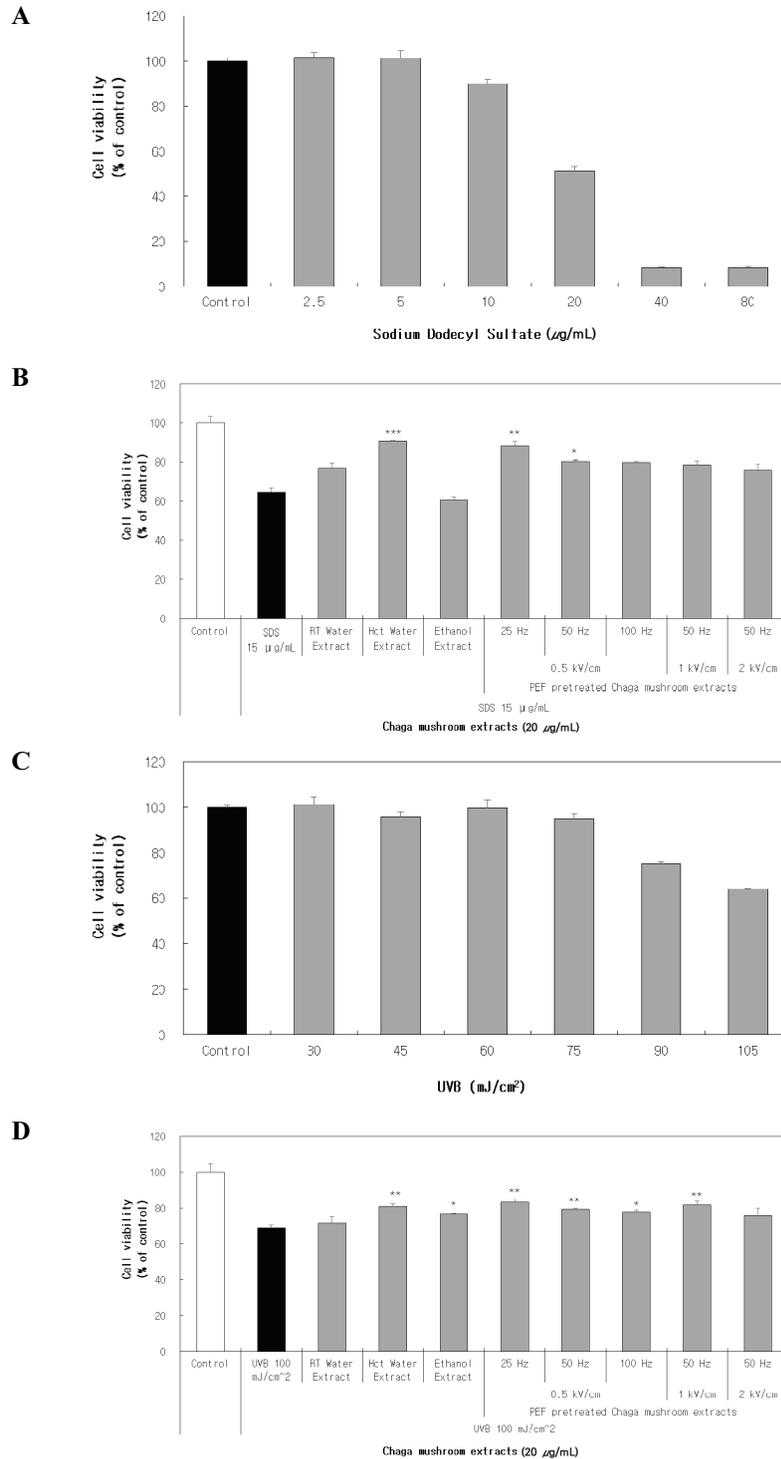


Figure 4. Cell protection effects of Chaga mushroom extracts. (A) Cell viability of SDS, (B) Cell protection effect against SDS, (C) Cell viability of UVB, (D) Cell protection effect against UVB. The results were expressed as the mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with RT water extract.

24 h 동안 다양한 농도의 SDS를 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 (Figure 4A), SDS에 의한 세포 사멸이 약 30%를 나타내는 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 기준으로 추출물들의 세포 보호 효과를 확인하였다.

SDS에 의해 35.6% 감소한 세포 생존율이 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물 중 전기장 세기 0.5 kV/cm, 펄스 빈도 25 Hz인 추출물에서 약 23.9% 세포 생존율이 증가하였으며, 이는 상온 물 추출물과 에탄올 추출물보다 우수하며 열수 추출물과 유사한 세포보호 효과임을 확인하였다 (Figure 4B).

3.4.2. UVB에 대한 세포보호 효과

UVB(280 ~ 320 nm)를 포함한 자외선에서의 피부 노출은 피부에서 광노화 뿐만 아니라 피부 암까지도 유발하는

자극원으로, 엘라스틴, 피브릴린, 콜라겐을 분해하여 피부 노화를 유발한다[23,24]. UVB로 인해 발생하는 세포 사멸이 감소되는 정도를 통해 세포보호 효과를 평가하였다.

UVB에 의해 세포 사멸이 발생하는 조사량을 확인하고자 24 h 동안 다양한 조사량으로 UVB를 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며(Figure 4C), UVB에 의한 세포 사멸이 약 30%를 나타내는 100 mJ/cm^2 농도를 기준으로 추출물들의 세포 보호 효과를 확인하였다.

UVB에 의해 31.1% 감소한 세포 생존율이 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물 중 전기장 세기 0.5 kV/cm, 펄스 빈도 25 Hz인 추출물에서 약 14.2% 세포 생존율이 증가하였으며, 이는 상온 물 추출물과 에탄올 추출물보다 우수하며 열수 추출물과 유사한 세포보호 효과임을 확인하였다 (Figure 4D).

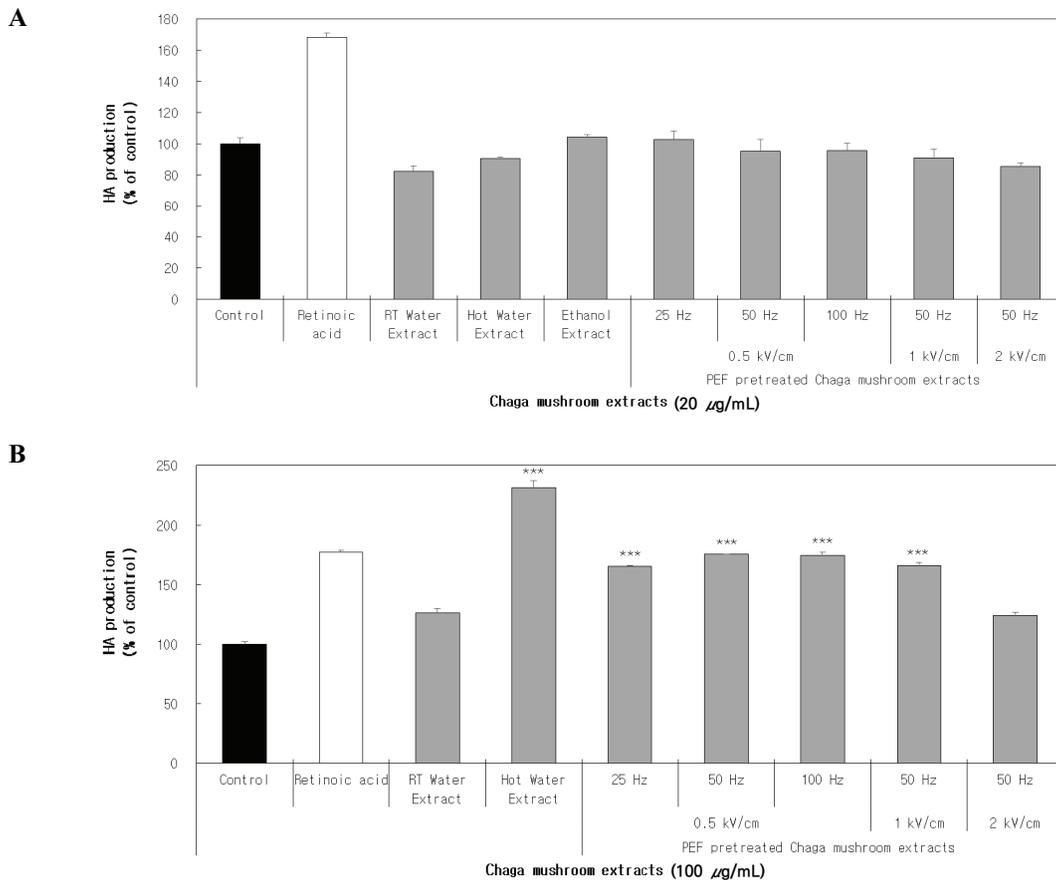


Figure 5. Hyaluronic acid synthesis effects of Chaga mushroom extracts. (A) Treatment of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of extracts, (B) Treatment of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of extracts. The results were expressed as the mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with RT water extract.

고전압 펄스 전기장 전처리 추출물은 자외선 및 외부 자극에 의해 발생할 수 있는 피부 손상에 대하여 우수한 완화효과가 있는 것으로 생각된다.

3.5. 히알루론산 생성 촉진 효과

히알루론산은 천연 보습제라 부를 수 있을 정도로 친수성이 매우 뛰어난 물질로 피부의 보습력 증진, 피부 탄력 유지 및 피부 손상 시에 피부 하층부의 손상을 줄여주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[25,26]. 히알루론산의 생성량 확인을 통해 추출물의 보습 효능을 평가하였다.

히알루론산 측정 결과, 모든 추출물의 세포 독성이 없는 공통 농도인 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 히알루론산 생성 촉진 효과가 없는 것으로 나타났다(Figure 5A). 세포 독성이 있는 에탄올 추출물을 제외한 물 추출물을 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시에는 전기장 세기 0.5 kV/cm, 펄스 빈도 50 Hz, 100 Hz인 추출물에서 음성대조군 대비 약 74~75% 히알루론산 생성이 증가하였으며, 이는 26% 증가한 상온 물 추출물보다 49% 우수한 히알루론산 생성 촉진능을 보여주었다(Figure 5). 이는 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물의 증가한 히알루론산 생성으로 우수한 보습효과를 가지고 있는 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구는 고전압 펄스 전기장을 통한 유효성분 및 피부 효능 증대를 확인하기 위하여 성분 분석 및 피부 효능 평가를 진행하였다.

일반 추출물과 비교하여 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물의 총 당, 폴리페놀 함량은 전기장세기 0.5 kV/cm에서 펄스 빈도 50 Hz, 25 Hz에서 처리한 추출물에서 유의하게 높았으며, 총 단백질 함량은 0.5 kV/cm, 25 Hz에서 처리한 추출물에서 유의하게 높았다. 이를 토대로 다양한 피부 효능을 평가한 결과, 고전압 펄스 전기장 전처리 추출물이 일반 추출물보다 DPPH 소거능 효과, 계면활성제와 UVB에 대한 세포보호효과와 히알루론산 생성 촉진효과가 우수한 것으로 나타났다. 이는 고전압 펄스 전기장 처리가 차가버섯의 세포막에 영향을 주어 식물 유효성분, 피부 효능이 증가한 것으로 생각된다. 특히 자외선 및 외부자극에 의한 피부 손상 완화와 히알루론산 생성 증가는 피부 장벽 강화 및 피부 노화 억제에도 긍정적인 영향을 미칠 것으로 판단된다.

고전압 펄스 전기장 세기가 강할수록 전처리 추출물의 유효성분 증대와 피부 효능이 증가하지 않았으며 전기장의 도체로 사용한 상수가 원물 추출에 의해 점차 진해지는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 이는 세포막의 붕괴로 인해 발생한 기공으로 짧은 시간 내에 추출이 진행된 것으로 예측하여 고전압 펄스 전기장 추출 기술로서의 추가 연구를 진행할 예정이며 고전압 펄스 전기장 세기를 약하게 전처리 하였을 때의 추출물에 대한 연구도 추가 진행할 예정이다. 이를 통해 고전압 펄스 전기장의 세기 조절을 통해 전처리 또는 추출 단계에서 선택적으로 사용가능 할 것으로 기대된다.

본 연구결과는 천연물이 함유하고 있는 다양한 유효성분을 유기용매를 사용하거나 고온 조건에서 추출하지 않은 상황에서 고전압 펄스 전기장 처리만으로 유효성분 증대, 우수한 피부 효능을 가지고 있음을 보여주었다.

이러한 green technology를 이용한 친자연주의 소재를 개발하여 추출물에 대한 안전성, 생체 이용률의 증가를 통해 화장품 분야와 소재에 활용될 수 있는 가능성을 제시한 결과로 판단된다.

Acknowledgment

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 월드클래스300프로젝트R&D(S2525362)지원사업을 통해 수행된 연구결과입니다.

Reference

1. R. Abarca-Vargas, C. F. Peña Malacara, and V. L. Petricevich, Characterization of chemical compounds with antioxidant and cytotoxic activities in *Bougainvillea x buttiana holttum* and *Standl.* (var. *Rose*) extracts, *Antioxidants (Basel)*, **5**(4), 45 (2016).
2. Q. E. Do, A. E. Angkawijaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji, and Y. H. Ju, Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*, *J Food Drug Anal.*, **22**(3), 296 (2014).
3. M. D L. de Castro and L. E. García-Ayuso, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique

- with a promising innovative future, *Anal. Chim. Acta*, **369**(1-2), 1 (1998).
4. D. Zhao, X. A. Zeng, D. W. Sun, and D. Liu, Effects of pulsed electric field treatment on (+)-catechin-acetaldehyde condensation, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **20**, 100 (2013).
 5. J. H. Lim, J. M. Shim, D. U. Lee, Y. H. Kim, and K. J. Park, Pulsed electric fields effects on drying of white ginseng and extraction of soluble components, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(6), 704 (2012).
 6. S. Ho and G. S. Mittal, High voltage pulsed electrical field for liquid food pasteurization, *Food Rev. Int.*, **16**(4), 395 (2000).
 7. H. N. Rajha, A. M. Abi-Khattar, S. E. Kantar, N. Boussetta, N. Lebovka, R. G. Maroun, N. Louka, and E. Vorobiev, Comparison of aqueous extraction efficiency and biological activities of polyphenols from pomegranate peels assisted by infrared, ultrasound, pulsed electric fields and high-voltage electrical discharges, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **58**, 102212 (2019).
 8. E. Bozinou, I. Karageorgou, G. Batra, V. G. Dourtoglou, and S. I. Lalas, Pulsed electric field extraction and antioxidant activity determination of *Moringa oleifera* dry leaves: a comparative study with other extraction techniques, *Beverages*, **5**(1), 8 (2019).
 9. L. Ma, H. Chen, W. Zhu, and Z. Wang, Effect of different drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from mushroom *Inonotus obliquus*, *Food Res. Int.*, **50**(2), 633 (2013).
 10. H. K. Ju, H. W. Chung, S. S. Hong, J. H. Park, J. Lee, and S. W. Kwon, Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the chaga mushroom (*Inonotus obliquus*), *Food Chem.*, **119**(2), 619 (2010).
 11. J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Nikolić, Â. Fernandes, L. Barros, R. C. Calhelha, I. C. F. R. Ferreira, M. Soković, and L. J. L. D. V. Griensven, Chemical characterization and biological activity of chaga (*Inonotus obliquus*) a medicinal “mushroom”, *J. Ethnopharmacol.*, **162**, 323 (2015).
 12. S. J. Lee, H. J. Choi, and S. C. Min, Pulsed electric field pasteurization of mandarin and carrot juices, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **49**(4), 408 (2017).
 13. A. Boulaaba, S. Toepfl, M. Kiessling, N. Egen, and G. Klein, Effect of pulsed electric fields on the endogenous microflora and physico-chemical properties of porcine blood plasma, *Arch. Lebensmittelhyg.*, **69**(6), 164 (2018).
 14. S. Y. Leong, L. K. Richter, D. Knorr, and I. Oey, Feasibility of using pulsed electric field processing to inactivate enzymes and reduce the cutting force of carrot (*Daucus carota* var. *Nantes*), *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **26**, 159 (2014).
 15. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**(3), 350 (1956).
 16. K. Slinkard and V. L. Singleton, Total phenol analysis: automation and comparison with manual method, *Am. J. Enol. Viticult.*, **28**, 49 (1977).
 17. P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**(1), 76 (1985).
 18. Y. J. Kim, Evaluation of antioxidant activity and thermal stability of plant polyphenols, *Biomater. Res.*, **13**(1), 30 (2009).
 19. C. Liu, C. Chen, H. Mo, H. Ma, E. Yuan, and Q. Li, Characterization and DPPH radical scavenging activity of gallic acid-lecithin complex, *Trop. J. Pharm. Res.*, **13**(8), 1333 (2014).
 20. D. Alotto, S. Ariotti, S. Graziano, R. Verrua, M. Stella, G. Magliacani, and C. Castagnoli, The role of quality control in a skin bank: tissue viability determination, *Cell Tissue Bank*, **3**(1), 3 (2002).
 21. P. Ngamwongsatit, P. P. Banada, W. Panbangred, and A. K. Bhunia, WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line, *J.*

- Microbiol. Methods*, **73**(3), 211 (2008).
22. S. R. Park, Y. M. Kim, B. B. Choi, and J. Y. Kim, The effect of the cytotoxicity of sodium lauryl sulfate containing toothpaste on HaCaT and NIH-3T3 cells, *J. Korean Soc. Dent. Hyg.*, **15**(4), 719 (2015).
23. D. Kulms and T. Schwarz, Molecular mechanisms of UV induced apoptosis, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **16**(5), 195 (2000).
24. M. Ichihashi, M. Ueda, A. Budiyanto, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru, and T. Horikawa, UV-induced skin damage, *Toxicology*, **189**(1), 21 (2003).
25. C. R. Harding, A. Watkinson, A. V. Rawlings, and I. R. Scott, Dry skin, moisturization and corneodesmolysis, *Int. J. Cosmet. Sci.*, February, **22**(1), 21 (2000).
26. H. Y. Yu, I. J. Yang, V. R. Lincha, I. S. Park, D. U. Lee, and H. M. Shin, The effects of the fruits of *Foeniculum vulgare* on skin barrier function and hyaluronic acid production in HaCaT keratinocytes, *Journal of Life Science*, **25**(8), 880 (2015).