

지황 추출물 첨가 chitosan 기반 기능성 바이오 소재 제조 및 응용

이시연 · 김경중 · 김윤섭[†] · 윤순도[†]

전남대학교 화학생명공학과
(2022년 3월 2일 접수, 2022년 3월 15일 수정, 2022년 3월 16일 채택)

Preparation and Application of *Rehmannia Glutinosa* Extract Incorporated Functional Chitosan Based Biomaterials

Si-Yeon Lee, Kyeong-Jung Kim, Youn-Sop Kim[†] and Soon-Do Yoon[†]

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea
(Received March 2, 2022; Revised March 15, 2022; Accepted March 16, 2022)

초 록

본 연구에서는 지황 추출물[*Rehmannia glutinosa* extract (RE)]이 함유된 chitosan (CH) 기반 바이오 소재를 제조하고, 물리·화학적 특성, RE 방출 특성, 멜라닌 합성 억제 효과, 항산화 효과, elastase 억제 효과를 조사하였다. RE 함유 CH 기반 바이오 소재는 casting method와 UV 경화 공정을 통해 제조되었다. 제조된 바이오 소재의 표면 특성은 FE-SEM으로 분석하였고, 물리적 특성은 인장강도, 신축률을 통하여 조사하였다. 경피 약물 전달 시스템을 적용하기 위해 36.5 °C에서 pH 4.5, pH 5.5, pH 6.5 용액에서와 인공피부를 이용해 제조된 바이오 소재에서 RE의 방출 특성을 조사하였으며, 그 결과, pH 6.5에서 가소제를 첨가하지 않은 바이오 소재와 가소제[glycerol (GL)와 citric acid (CA)]를 첨가하여 제조한 RE 함유 바이오 소재에서 RE의 방출이 pH 4.5에서 보다 약 1.10배 빠르게 일어남을 알 수 있었다. 또한, 인공 피부에서 RE의 방출은 약 6 h 동안 지속적으로 방출됨을 확인하였다. Tyrosinase assay, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, elastase assay를 통해 기능성을 평가하였으며, 가소제로 CA를 첨가하고 RE가 함유된 바이오 소재에서 각각 45.12%의 tyrosinase 활성율, 89.40%의 DPPH 라디칼 소거능, 59.94%의 elastase 활성율을 나타내었다.

Abstract

The main objective of this work is to prepare *Rehmannia glutinosa* extract (RE) incorporated functional chitosan (CH) based biomaterials and evaluate their physical properties, RE release properties, inhibitory effect of melanogenesis, and antioxidant and elastase inhibitory activities. RE incorporated CH based biomaterials were synthesized by a casting method and UV curing process. The surface and cross sections of prepared biomaterials were characterized by a field emission scanning electron microscope (FE-SEM). The physical properties such as tensile strength and elongation at break were also investigated. To apply the transdermal drug delivery system, RE release properties were examined with pH 4.5, 5.5, and 6.5 buffer solutions and artificial skin test at 36.5 °C. Results indicated that RE release of RE incorporated biomaterials with/without the addition of plasticizers [glycerol (GL) and citric acid (CA)] at pH 6.5 was about 1.10 times higher than that of at pH 4.5. In addition, results of the artificial skin test verified that RE was released constantly for 6 h. To verify the applicability of the prepared biomaterials, tyrosinase, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and elastase assays were investigated. Results indicated that RE incorporated biomaterials added CA exhibited tyrosinase activation, DPPH radical scavenging activity rate, and elastase activation of 45.12, 89.40, and 59.94%, respectively.

Keywords: *Rehmannia glutinosa* extract, Transdermal drug delivery system, Tyrosinase inhibition, DPPH radical scavenging activity, Elastase inhibition.

1. 서 론

키토산(chitosan, CH)은 D-glucosamine과 N-acetyl-D-glucosamine으로 이루어진 선형 다당류이며 갑각류의 껍질이나 곤충에서 추출한 키틴을 탈아세틸화하여 얻을 수 있다. 셀룰로오스 다음으로 가장 풍부한 천연고분자인 키틴은 해양 생물에 의해 매년 약 100억톤이 생성되므로 키토산은 비용적인 측면에서 효율적이라고 할 수 있다. 또한, 무독성, 생체적합성, 생분해성, 항염증 효과 등의 특성이 있어 의공학,

[†] Corresponding Author: Chonnam National University
Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yeosu 59626, Republic of Korea
Tel: Youn-Sop Kim: +82-61-659-7293; Soon-Do Yoon: +82-61-659-7297
e-mail: Youn-Sop Kim: yskim1@chonnam.ac.kr; Soon-Do Yoon: yunsd03@chonnam.ac.kr

생체 재료, 약물 전달 제형 분야 등에 널리 응용되고 있다[1,2]. 특히, 약물 제형 소재로서 응용은 약물의 약효를 효과적으로 발현하고, 약물이 병변에 선택적으로 작용하여 치료를 도와주는 역할을 하므로 약물 전달 시스템(drug delivery system, DDS) 분야에 많은 연구가 진행 중이다[3-5]. DDS는 약물에 대한 부작용을 최소화하고, 효능 및 효과를 최대화 시켜 적정량의 약물을 전달 할 수 있게 하는 시스템이다. DDS 기술의 핵심은 경구투여, 경피투여, 주사투여등 다양한 전달 경로에 약물을 선택적으로 방출하여 치료 효과를 극대화 시키는 것이다[6-8]. DDS 기술 중, 경피 약물 전달 시스템(transdermal drug delivery system, TDDS)는 피부를 통해 약물을 전달하는 방식이며, 약물 전달 시에 통증이 없어 환자의 순응도가 높고, 간이나 위장관의 대사를 피할 수 있어 분해가 일어나지 않으므로 생체이용률이 높다. TDDS는 기존의 약물 전달 방식인 경구 및 주사 투여 제형의 근본적인 문제점을 최소화 및 해결하기에 많은 장점을 가지고 있다[9,10].

키토산, 니올린, 전분, 알지네이트 등의 천연고분자들은 세포의 기질과의 유사성으로 인한 우수한 생체적합성 및 생분해성을 가지고 있어 TDDS의 약물 전달 제형으로 사용되는 기존의 합성 고분자를 대체하기에 적합하다. 그러나 천연고분자 기반의 소재는 물리적 특성이 합성 고분자 소재보다 비교적 낮다는 단점이 있다[11,12]. Yun 등의 [13] 연구에서 가소제 및 가교제 첨가와 UV 경화 공정을 이용해 키토산 기반의 소재를 제조하고 특성을 파악하였다. 이러한 결과를 통해 키토산 기반 소재의 물리적 특성이 여러 가교 방법에 따라 향상된 것을 확인할 수 있었으며 다양한 분야에서의 응용 가능성 또한 시사하였다. 이를 이용하여 본 연구에서는 한국에 널리 분포하는 현삼과 식물인 지황 추출물[*Rehmannia glutinosa* extract (RE)]을 TDDS을 위한 바이오 소재로 적용하고자 한다. 지황은 약 70가지 이상의 화합물로 구성되어 있고 많은 연구에 따르면 RE는 항골다공증, 항산화, 항염증, 당뇨병성 신장 질환의 개선, 활성산소종 및 티로시네이즈 억제에 효과가 있으며 또한, 지황이 포함된 복합약초 추출물은 엘라스테이즈를 억제해 만성폐쇄성폐질환에 효과가 있다고 보고되었다[14-19]. 지금까지의 많은 연구는 다양한 종류의 RE에 대한 이화학적 특징, 생리활성 특성, 약리 작용 등에[20] 대한 연구 결과를 보고하였으며, 다양한 응용 분야인 의공학 소재, 식품 첨가제 등에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

본 연구의 최종목적은 UV 경화 공정과 가소제로서 glycerol과 citric acid를 이용하여 다양한 효과를 지닌 지황 추출물을 첨가해 키토산 기반 소재를 제조하고, 멜라닌 합성 억제 효과, 항산화 효과, elastase 억제 효과를 조사하여 기능성을 평가하는데 있다.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

지황 추출물[*Rehmannia glutinosa* extract (RE)]을 위한 지황은 충청남도 금산군에서 재배된 것으로 광명당한약도매(Gwangju, Korea)에서 구입하였다. 키토산[chitosan, CH (viscosity: 200-600 mPa·s, 0.5% in 0.5% Acetic Acid at 20 °C, deacetylation degree of 80%, MW of 500 kDa)]은 TCI Co. Ltd (Chuo-ku, Japan)에서 구입하였으며, lactic acid (LA)는 Duksan (Pharmaceutical Co., Ltd., Korea)에서 구입하였다. Ethanol, polyvinyl alcohol (PVA, 99% hydrolyzed; number average molecular weight 89,000-98,000), 가교제로 사용한 sulfosuccinic acid (SSA), 가소제로 사용한 glycerol (GL)과 citric acid (CA), sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, 3,4-dihydroxy-L-phenyl-

Table 1. The Composition of RE Incorporated Functional CH Based Biomaterials

Sample name	CH (g)	PVA (g)	SSA (% wt)	GL (% wt)	CA (% wt)	RE (g)
CHPS	2.1	2.1	20			
CHPSGL	2.1	2.1	20	40		
CHPSCA	2.1	2.1	20		40	
CHPSRE2	2.1	2.1	20			2.0
CHPSGLRE2	2.1	2.1	20	40		2.0
CHPSCARE2	2.1	2.1	20		40	2.0

alanine (L-DOPA), tyrosinase from mushroom, N-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide (NSNA), tris-HCl 완충용액, elastase from porcine pancreas는 Sigma-Aldrich Co. (Louis, USA)에서 구입하였다. 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) solution은 Officeahn, Co. (Gyeonggi, Korea)에서 구입하였다. 본 실험에서 사용된 물(D.W)은 탈 이온화 후 재증류한 것을 사용하였다.

2.2. 지황을 이용한 RE 추출

지황에서 RE를 추출하기 위하여 열수추출법을 이용하였다[21]. 먼저, 구입한 지황을 0.3 cm로 자른 후 24 h 동안 건조하고 분쇄하였다. 지황 분말을 D.W와 ethanol이 1:3으로 혼합된 용액에 넣어 1 h 동안 실온에서 혼합하였다. 그 후 circulator를 이용해 70 °C에서 12 h 동안 혼합물을 교반시키고 교반한 혼합물을 10000 rpm, 4 °C 조건으로 원심분리하여 상등액을 취한 뒤, 감압 농축 및 동결 건조하여 RE를 추출하였다.

2.3. RE 함유 CH 기반 바이오 소재 제조

RE 첨가 CH 기반 바이오 소재는 casting 방법을 이용하여 제조하였다. CH 2.1 g, LA 2.42 g, SSA 0.84 g, RE 2.0 g을 D.W에 용해시킨 혼합 용액과 PVA를 95 °C의 D.W에 용해시킨 PVA 용액이 균일한 겔화 용액이 되도록 실온에서 mechanical stirrer를 사용하여 400 rpm으로 60 min 동안 혼합하였다. 가소제로 첨가된 GL과 CA는 CH와 PVA의 질량을 기준으로 40 wt%로 첨가하였다. 제조된 CH 기반 바이오 소재의 성분은 Table 1에 나타내었다. 겔화 용액의 기포는 aspirator로 제거한 후 glass mold에 붓고, 50 °C로 설정된 오븐에서 12 h 동안 건조하였다. 제조된 바이오 소재의 가교는 UV lamp (OSRAM ULTRA VITALUX, 300W)를 이용하여 20 min 동안 UV 경화를 통해 진행하였다.

2.4. RE 함유 CH 기반 바이오 소재 물리적 특성

제조된 CH 기반 바이오 소재의 물리적 특성은 21 °C, 상대습도 50%에서 일주일 동안 보관 후 측정하였다. 제조된 바이오 소재의 인장강도(tensile strength, TS)와 신축률(elongation at break, %E)은 Instron 6012 testing machine (Norwood, MA, USA)를 사용하였으며, 각 소재는 ASTM D-421 규격으로 사용하였다. 또한, 소재의 두께는 mechanical scanner (digital thickness gauge, "Mitutoyo" Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 주변의 12지점의 두께를 측정하여 평균값을 사용하였다. 소재들의 평균 두께는 약 0.10 mm이었으며, gauge length와 grip distance는 모두 52.0 mm이었다. Crosshead는 20 mm/min, load cell은 250 kg이었다.

2.5. FE-SEM 분석

제조된 바이오 소재의 표면과 단면적 특성은 전계 방사 주사현미경 (field emission scanning electron microscope, S-4700, Hitachi, Tokyo, Japan, FE-SEM)을 사용하여 5.0 kV의 가속 전압에서 분석하였다.

2.6. RE 방출 특성

RE 첨가 CH 기반 바이오 소재의 TDDS 응용 가능성을 확인하기 위해 사람의 체온인 36.5 °C에서 pH 변화에 따른 'in vitro' 약물 방출 실험을 수행하였다. 사람 피부의 pH는 4.5-6.5 정도의 약산성을 띠므로 0.1 g ± 0.005 g의 제조된 바이오 소재를 각각 pH 4.5, 5.5, 6.5의 완충용액 90 mL에 넣은 후, 36.5 °C에서 50 rpm으로 shaking incubator (DS-210SF, Daewon Science, Inc. Korea)를 사용하여 RE 방출을 진행하였다. 각각의 pH는 아세테이트 완충용액(pH 4.0-5.5)과 인산염 완충용액(pH 6.0-7.5)을 이용하여 제조하였다[22]. 방출 시간에 따른 용액의 상등액을 2 mL 취하여 UV-vis spectrophotometer (OPTIZEN 2120UV, Neogen Co., Ltd, Korea)를 이용해 방출된 RE의 농도를 측정하였다. 측정 시 지황의 주요성분인 acteoside의 흡광도 330 nm를 이용하였다[23]. 또한, Agar-based gel (pH 5.8) 위에 놓여진 인공피부 (Neoderm®-ED, Tego Science, Inc. Korea)를 이용하여 36.5 °C, RH 60%에서 방출 실험을 수행하여 제조된 바이오 소재에 대해 TDDS로서의 응용 가능성을 확인하였다.

2.7. RE 함유 CH 기반 바이오 소재의 미백 기능 평가

RE 첨가 CH 기반 바이오 소재의 tyrosinase 활성 억제 능력은 L-DOPA를 기질로 이용하는 dopachrome 방법에 의해 분석되었다[24]. pH 6.9, 0.1 M 인산나트륨 완충용액 2.0 mL, 10 mM L-DOPA 0.3 mL와 제조된 바이오 소재 0.1 g을 혼합한 후 110 units/mL tyrosinase 0.3 mL 첨가하여 shaking incubator에서 36.5 °C, 50 rpm으로 미리 지정한 시간에 동안 방치하였다. 다음 용액은 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. RE 첨가 바이오 소재의 tyrosinase 활성률(%)은 식 (1)로 계산되었다.

$$\text{Tyrosinase activity rate}(\%) = \frac{(A_{eb} - A_{enon})}{(A_e - A_{ebnon})} \times 100 \quad (1)$$

여기서 A_e 는 tyrosinase 존재 시 흡광도, A_{eb} 는 tyrosinase 및 RE 첨가 바이오 소재 존재 시 흡광도, A_{enon} 은 RE 첨가 바이오 소재 존재 시 흡광도, A_{ebnon} 는 tyrosinase 및 RE 첨가 바이오 소재 부재 시 흡광도이다.

2.8. RE 함유 CH 기반 바이오 소재의 항산화 기능 평가

RE 첨가 CH 기반 바이오 소재가 자유라디칼을 제거하여 항산화 효과를 발휘하는지 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 분석하였다[25]. D.W 2.0 mL와 제조된 바이오 소재 0.1 g을 혼합한 후 0.2 mM DPPH 용액 1.0 mL를 첨가하여 shaking incubator에서 25 °C, 50 rpm으로 미리 지정한 시간 동안 방치하였다. 다음 용액은 UV-vis spectrophotometer를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. RE 첨가 바이오 소재의 DPPH-라디칼 소거 활성률(%)은 식 (2)로 계산되었다.

$$\text{DPPH-radical scavenging activity rate}(\%) = \left(1 - \frac{(B_{eb} - B_{enon})}{(B_e - B_{ebnon})}\right) \times 100 \quad (2)$$

여기서 B_e 는 RE 첨가 바이오 소재 부재 시 흡광도, B_{eb} 는 RE 첨가 바

Table 2. Tensile Strength & Elongation at Break of Prepared Functional CH Based Biomaterials

Sample name	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%E)
CHPS	76.3 ± 1.47	34.7 ± 1.32
CHPSGL	48.2 ± 1.05	94.6 ± 1.28
CHPSCA	62.4 ± 1.39	83.8 ± 1.04
CHPSRE2	72.2 ± 0.94	37.8 ± 1.52
CHPSGLRE2	45.7 ± 1.35	98.3 ± 1.16
CHPSCARE2	60.4 ± 1.16	87.4 ± 1.29

이오 소재 존재 시 흡광도, B_{enon} 는 D.W의 흡광도, B_{ebnon} 는 D.W와 ethanol의 흡광도이다.

2.9. RE 함유 CH 기반 바이오 소재의 주름개선 기능 평가

피부 주름개선 기능 평가를 위한 elastase 활성 억제 능력 분석은 N. Azmi 등의 방법을 변형하여 elastase 저해 활성에 대해 측정하였다[26]. pH 8.3, 0.2 M tris-HCl 완충용액 2.0 mL, 5 mM NSNA 0.1 mL, 제조된 바이오 소재 0.1 g을 혼합한 후 0.15 units/mL elastase 0.1 mL를 첨가하여 shaking incubator에서 36.5 °C, 50 rpm으로 미리 지정한 시간 동안 방치하였다. 다음 용액은 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였고 바이오 소재의 elastase 활성률(%)은 식 (3)으로 계산하였다.

$$\text{Elastase activity rate}(\%) = \frac{(C_{eb} - C_{enon})}{(C_e - C_{ebnon})} \times 100 \quad (3)$$

여기서 C_e 는 elastase 존재 시 흡광도, C_{eb} 는 elastase 및 RE 첨가 바이오 소재 존재 시 흡광도, C_{enon} 은 RE 첨가 바이오 소재 존재 시 흡광도, C_{ebnon} 는 elastase 및 RE 첨가 바이오 소재 부재 시 흡광도이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. RE 함유 CH 기반 바이오 소재의 물리적 특성

천연고분자 기반 바이오 소재의 물리적 특성 평가는 바이오 소재의 응용 및 활용을 위해 필수적이다. Table 2는 제조된 바이오 소재의 인장강도 (tensile strength, TS)와 신축율 (elongation at break, %E)를 나타낸 결과로 가소제인 glycerol (GL)과 citric acid (CA)가 첨가되지 않은 바이오 소재의 TS는 가소제가 첨가된 바이오 소재보다 높은 값을 가지며, %E는 가소제가 첨가된 바이오 소재보다 낮은 값을 가진다. RE가 첨가된 바이오 소재의 TS와 %E는 RE와 가소제가 첨가되지 않은 바이오 소재와 유사한 값을 나타낸 것을 확인하였다. 이전 보고한 연구 결과에서 가소제는 바이오 소재의 물리적 특성과 응용에서 많은 영향을 미쳤음을 확인하였다[13]. 본 연구에서도 역시 가소제인 GL과 CA를 첨가한 바이오 소재의 물리적 특성의 차이를 확인하였다. 결과에서 가소제의 종류에 따라 물리적 특성에 차이가 있지만 RE 첨가 유·무에 따른 물리적 특성에 차이는 크지 않았다.

3.2. CH 기반 바이오 소재의 FE-SEM 분석

제조된 CH 기반 바이오 소재의 표면과 단면적에 대한 FE-SEM image는 Figure 1에 나타내었다. FE-SEM 분석 결과로부터 제조된 CH

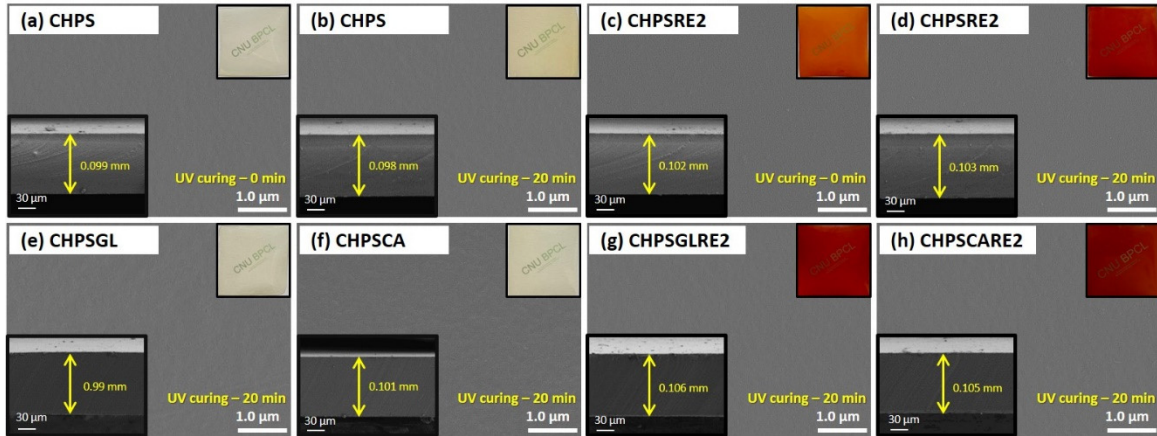


Figure 1. FE-SEM image of the surface and cross-section of prepared functional CH based biomaterials. (a) CH based biomaterials without UV curing. (b) Crosslinked CH based biomaterials. (c) RE incorporated functional CH based biomaterials without UV curing. (d) Crosslinked RE incorporated functional CH based biomaterials. (e) Crosslinked CH based biomaterials with the addition of GL. (f) Crosslinked CH based biomaterials with the addition of CA. (g) Crosslinked RE incorporated functional CH based biomaterials with the addition of GL. (h) Crosslinked RE incorporated functional CH based biomaterials with the addition of CA.

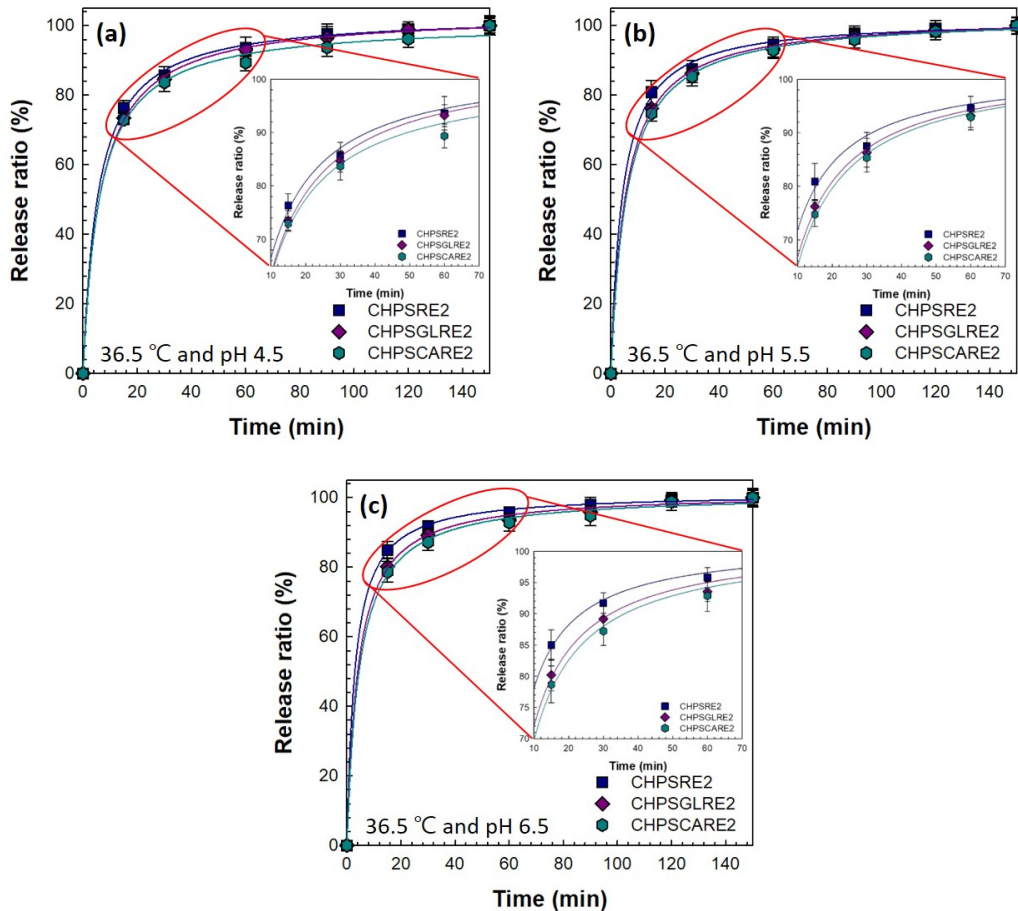


Figure 2. RE release ratio(%) from RE incorporated functional CH based biomaterials at various pHs and 36.5 °C. (a) RE release ratio(%) at pH 4.5 and 36.5 °C. (b) RE release ratio(%) at pH 5.5 and 36.5 °C. (c) RE release ratio(%) at pH 6.5 and 36.5 °C.

기반 바이오 소재의 표면은 응집이나 균열없이 대체적으로 균일하게 제조되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 각 바이오 소재의 단면 이미지

를 통해 가소제와 RE의 첨가에 관계없이 모든 바이오 소재의 두께는 비교적 일정하였음을 확인하였다.

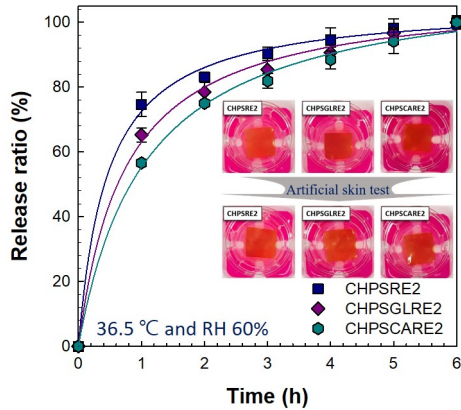


Figure 3. RE release ratio(%) from RE incorporated functional CH based biomaterials using artificial skin at 36.5 °C and RH 60%.

3.3. RE 방출 특성

RE 첨가 CH 기반 기능성 바이오 소재의 TDDS 응용 가능성 확인하기 위해 36.5 °C에서 다양한 pH 완충용액과 인공피부를 이용하여 약물 방출 특성을 평가하였다. Figure 2는 제조된 RE 첨가 바이오 소재들의 RE 방출률을 pH 4.5, 5.5, 6.5 완충용액에서 시간에 따라 나타낸 결과이다. 모든 바이오 소재에서 150 min 내에 100%의 RE가 방출되었으며, pH에 따라 큰 차이가 없었으나, 비교적 높은 pH 6.5에서 RE의 방출이 빠르게 일어남을 확인하였다. 첨가한 가소제의 종류에 따라 다른 방출 속도를 나타냈으며 CHPSRE2 > CHPSGLRE2 > CHPSCARE2 순으로 빠른 방출 속도를 보였다. 이는 첨가한 가소제들의 작용기와 관련이 있으며 하이드록실기만 존재하는 GL과 다르게 CA는 하이드록실기와 카르복실기가 존재하므로 RE와 수소결합이 더 강하게 이루어져 방출 속도가 느려졌다고 판단된다.

Figure 3은 사람의 피부 조건을 고려하여 36.5 °C, RH 60%에서 제조된 RE 첨가 바이오 소재를 인공피부에 적용했을 때, RE의 방출 특성을 나타낸 결과이다. 모든 바이오 소재에서 6 h 내에 100 %의 RE가 방출되었으며, CHPSRE2 > CHPSGLRE2 > CHPSCARE2 순으로 빠른 방출 속도를 나타냈다. 이는 pH 완충용액에서의 방출특성과 같은 경향을 나타내며, 방출 속도의 차이는 가소제의 작용기에 따라 RE와 결합의 세기에 차이가 나타났기 때문이다. 이러한 결과로부터 제조된 바이오 소재는 피부를 통한 약물 전달이 가능할 것이라 판단된다.

3.4. RE 함유 CH 기반 바이오 소재의 미백 기능 평가

Tyrosinase는 멜라닌 생합성에 관여하는 주요 효소로 tyrosine과 L-DOPA를 Dopa quinone으로 산화시켜 멜라닌으로 전환하는 것을 촉매한다. 멜라닌은 많은 외부 요인으로부터 피부를 보호하기도 하지만 비정상적으로 멜라닌이 축적되면 심미적인 문제가 발생한다. 따라서, 멜라닌의 비정상적인 축적을 막기 위해서는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 중요하다[27]. 제조된 바이오 소재의 미백 기능을 평가하기 위해 tyrosinase 활성 억제 실험을 진행하였다. Figure 4는 가소제 GL 또는 CA 및 RE가 첨가된 바이오 소재의 시간에 따른 tyrosinase 활성률을 나타낸 결과이다. 모든 바이오 소재에서 tyrosinase 활성률은 시간이 경과함에 따라 급격하게 감소하였고 5 min이 지난 후에는 비교적 일정하게 유지되었다. RE가 첨가된 바이오 소재들은 공통적으로 tyrosinase 활성률이 큰 폭으로 감소하였으며, 가소제가 첨가되지 않은 경우에 tyrosinase 활성률은 61.94%, GL이 함유된 RE 첨가 바이오 소

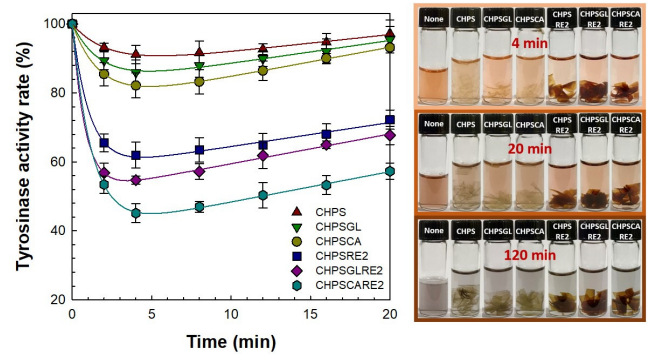


Figure 4. Tyrosinase activity rate(%) of prepared RE incorporated functional CH based biomaterials.

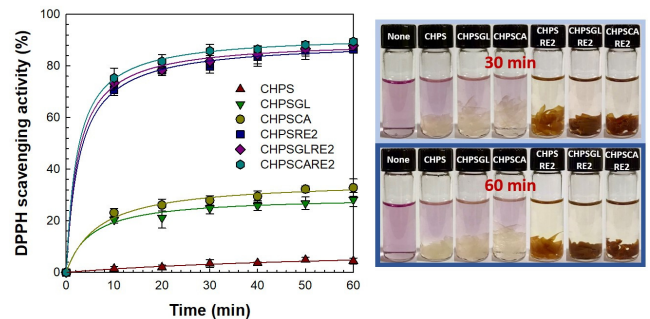


Figure 5. DPPH radical scavenging activity rate(%) of prepared RE incorporated functional CH based biomaterials.

제의 tyrosinase 활성률은 54.69%, CA가 함유된 RE 첨가 바이오 소재의 tyrosinase 활성률은 45.12%로 나타났다. 이렇게 함유된 가소제의 종류에 따른 차이는 tyrosinase 활성 억제제에 하이드록실기 또는 카르복실기와 같이 수소 결합이 가능한 작용기가 많을수록 tyrosinase와 결합하여 효소의 활성을 억제하기 때문이다[28,29]. 이 결과를 통해 제조된 바이오 소재의 tyrosinase 활성 억제 능력이 확인되었으며, 미백 기능성을 갖고 있다고 판단하였다.

3.5. RE 함유 CH 기반 바이오 소재의 항산화 기능 평가

오염 물질, 자외선 조사 등으로 인해 인체는 내부에서 자유라디칼을 지닌 활성산소종을 생성한다. 과도한 자유라디칼은 산화스트레스를 유발하여 발암, 염증의 원인이 되며, 나아가 멜라닌 합성, elastase의 과도한 생산, 콜라겐 감소 및 변성을 유도하므로 피부 노화에 주된 원인이 된다[30,31]. 따라서, 제조된 바이오 소재가 자유 라디칼을 제거함으로써 항산화 기능을 갖는지 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. Figure 5는 가소제 GL 또는 CA 및 RE가 첨가된 바이오 소재의 시간에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 결과이다. 모든 바이오 소재에서 DPPH 라디칼 소거능은 시간이 경과함에 따라 급격하게 증가했으며 10 min이 지난 후에는 비교적 일정하게 유지되었다. RE가 첨가된 바이오 소재들은 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈으며, 가소제가 첨가되지 않은 경우는 86.36%, GL이 함유된 RE 첨가 바이오 소재는 87.88%, CA가 함유된 RE 첨가 바이오 소재는 89.40%로 확인되었다. 가소제의 종류에 따라 다른 결과를 보이는 이유는 DPPH 라디칼 소거 활성이 하이드록실기와 카르복실기의 결합에 따라 달라지기 때문이다[32,33]. 이러한 라디칼 소거능 결과로 제조된 바이오 소재가 항산화 효과를 발휘한다고 판단하였다.

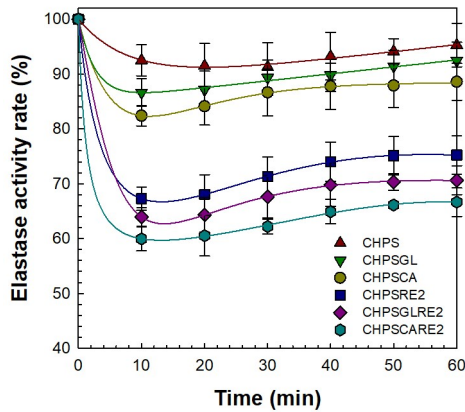


Figure 6. Elastase activity rate(%) of prepared RE incorporated functional CH based biomaterials.

3.6. RE 함유 CH 기반 바이오 소재의 주름개선 기능 평가

Elastase는 결합 조직의 탄성 섬유 주성분인 elastin을 분해할 수 있는 유일한 효소이다. 피부에서 탄성 섬유는 콜라겐 섬유와 함께 표피 아래에서 네트워크를 형성하므로 elastin이 분해되면 네트워크가 파괴되어 피부 탄력을 감소시키고 피부 노화를 가속화한다. 따라서, elastase의 활성 저해는 피부 노화 억제에 있어 중요하다[34]. Figure 6는 가소제 GL 또는 CA 및 RE 첨가 바이오 소재의 시간에 따른 elastase 활성률을 나타낸 결과이다. 모든 바이오 소재에서 elastase 활성률은 시간이 경과함에 따라 급격한 감소를 보였으며 10 min이 지난 후에는 비교적 일정하게 유지되었다. RE가 첨가된 경우 비교적 큰 폭의 elastase 활성 저해 효과를 확인할 수 있었다. RE 첨가 바이오 소재는 67.26%, GL이 함유된 RE 첨가 바이오 소재는 63.94%, CA이 함유된 RE 첨가 바이오 소재는 59.94%의 elastase 활성율을 나타냈다. 또한, 가소제의 종류에 따라 elastase 활성에 차이가 확인되었는데 이는 미백 기능 평가 결과에서 설명하였듯이 효소 활성 억제제의 작용기와 관련이 있다. 이러한 결과를 통해 제조된 바이오 소재가 elastase 활성 저해 능력을 가지는 것이 확인되었으며, 복합 추출물이 아닌 RE만으로도 elastase 활성이 억제된다는 것이 확인되었다. 이를 토대로 제조된 바이오 소재의 피부 노화 억제의 가능성을 판단하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 chitosan (CH), PVA, sulfosuccinic acid (SSA), 가소제로 glycerol (GL) 또는 citric acid (CA)를 이용하여 지황 추출물 [*Rehmannia glutinosa* extract (RE)]이 함유된 바이오 소재를 성공적으로 제조하였다. CH 기반 바이오 소재의 물리적 특성은 UV 경화 공정을 이용하여 제조한 후, 물리적 특성인 인장강도와 신축률을 조사하여 평가하였으며, 그 결과 가소제 종류에 따라 물리적 특성은 다소 차이가 있었으나, RE의 첨가에 따른 물리적 특성은 거의 없었다. 또한, FE-SEM 분석으로 표면 특성을 분석하였다. 그 결과 제조된 모든 바이오 소재들의 표면과 단면에서 균열이 거의 없음을 확인할 수 있었다. RE의 방출 특성은 피부 조건인 36.5 °C, pH 4.5, 5.5, 6.5 완충용액에서 확인하였고, 그 결과 제조된 바이오 소재들에서 RE는 150 min 내에 빠르게 방출되었다. 또한, pH 6.5에서 RE의 방출은 pH 4.5에서 보다 약 1.10배 높았음을 확인하였다. 인공피부에서의 RE 방출은 완충용액에서의 방출에 비해 느린 속도로 6 h 동안 지속적으로 방출되

었음을 확인하였다. 제조된 바이오 소재들은 가소제의 종류 및 유무에 따라 다른 방출 속도를 보였으며, 이는 가소제로 사용한 glycerol (GL)과 citric acid (CA)의 작용기와 관련이 있다고 판단된다. 제조된 RE 함유 CH 기반 바이오 소재의 기능성은 tyrosinase 활성 억제능, DPPH 라디칼 소거능, elastase 활성 억제능으로 평가하였으며 RE가 첨가될 시 효소 활성 억제능과 라디칼 소거능이 우수하였다. 특히, 가소제로 CA를 첨가하고 RE가 함유된 바이오 소재에서 비교적 높은 45.12%의 tyrosinase 활성율, 89.40%의 DPPH 라디칼 소거능, 59.94%의 elastase 활성율을 나타내었다. 따라서, RE 함유 CH 기반 바이오 소재는 다양한 기능성을 있는 것으로 평가되었으며, 다양한 응용 분야에 적용할 수 있다고 판단된다.

감 사

이 논문은 2019년 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(Grant No. NRF-2019R111A3A01061508)에 의해 수행하였음.

References

- L. J. R. Foster, S. Ho, J. Hook, M. Basuki, and H. Marçal, Chitosan as a Biomaterial: Influence of degree of deacetylation on its physicochemical, material and biological properties, *Plos One*, **10**, e0135153 (2015).
- K. Subramanian, B. Sadaippan, W. Aruni, A. Kumarappan, R. Thirunavukarasu, G. P. Srinivasan, S. Bharathi, P. Nainangu, P. S. Renuga, A. Elamaran, D. Balaraman, and M. Subramanian, Bio-conversion of chitin and concomitant production of chitinase and N-acetylglucosamine by novel *Achromobacter xylosoxidans* isolated from shrimp waste disposal area, *Sci. Rep. UK.*, **10**, 1-14 (2020).
- X. Sun, D. Yu, Z. Ying, C. Pan, N. Wang, F. Huang, J. Ling, and X. Ouyang, Fabrication of ion-crosslinking aminochitosan nanoparticles for encapsulation and slow release of curcumin, *Pharmaceutics*, **11**, 584 (2019).
- W. Lai, C. Hu, G. Deng, K. Lui, X. Wang, T. Tsoi, S. Wang, and W. Wong, A biocompatible and easy-to-make polyelectrolyte dressing with tunable drug delivery properties for wound care, *Int. J. Pharm.*, **566**, 101-110 (2019).
- S. Hafeez, A. Islam, N. Gull, A. Ali, S. M. Khan, S. Zia, K. anwar, S. U. Khan, and T. Jamil, γ -Irradiated chitosan based injectable hydrogels for controlled release of drug (Montelukast sodium), *Int. J. Biol. Macromol.*, **114**, 890-897 (2018).
- J. L. Frandsen, and H. Ghandehari, Recombinant protein-based polymers for advanced drug delivery, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2696-2706 (2012).
- C. Berkland, E. Pollauf, D. W. Pack, and K. Kim, Uniform double-walled polymer microspheres of controllable shell thickness, *J. Control. Release*, **96**, 101-111 (2004).
- T. M. Allen, and P. R. Cullis, Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, **303**, 1818-1822 (2004).
- H. Marwah, T. Garg, A. K. Goyal, and G. Rath, Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery, *Drug Deliv.*, **23**, 564-578 (2016).
- H. Y. Tak, Y. H. Yun, C. M. Lee, and S. D. Yoon, Sulindac imprinted mungbean starch/PVA biomaterial films as a transdermal

- drug delivery patch, *Carbohydr. Polym.*, **208**, 261-268 (2019).
11. L. S. Nair, and C. T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 762-798 (2007).
 12. J. K. Kim, H. J. Kim, J. Y. Chung, J. H. Lee, S. B. Young, and Y. H. Kim, Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery, *Arch. Pharm. Res.*, **37**, 60-68 (2014).
 13. Y. H. Yun, C. M. Lee, Y. S. Kim, and S. D. Yoon, Preparation of chitosan/polyvinyl alcohol blended films containing sulfosuccinic acid as the crosslinking agent using UV curing process, *Food Res. Int.*, **100**, 377-386 (2017).
 14. K. O. Oh, S. W. Kim, J. Y. Kim, S. Y. Ko, H. M. Kim, J. H. Baek, H. M. Ryoo, and J. K. Kim, Effect of *Rehmannia glutinosa* Libosch extracts on bone metabolism, *Clin. Chim. Acta.*, **334**, 185-195 (2003).
 15. H. H. Yu, S. J. Seo, Y. H. Kim, H. Y. Lee, R. K. Park, H. S. So, S. I. Jang, and Y. O. You, Protective effect of *Rehmannia glutinosa* on the cisplatin-induced damage of HEI-OC1 auditory cells through scavenging free radicals, *J. Ethnopharmacol.*, **107**, 383-388 (2006).
 16. C. L. Liu, L. Cheng, C. H. Ko, C. W. Wong, W. H. Cheng, D. W. S. Cheung, P. C. Leung, K. P. Fung, and C. B. S. Lau, Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory components from the root of *Rehmannia glutinosa* and its underlying mechanism via inhibition of iNOS pathway, *J. Ethnopharmacol.*, **143**, 867-875 (2012).
 17. T. Yokozawa, H. Y. Kim, and N. Tamabe, Amelioration of diabetic nephropathy by dried *Rehmanniae Radix* (Di Huang) extract, *Am. J. Chin. Med.*, **32**, 829-839 (2004).
 18. Y. O. Son, S. A. Lee, S. S. Kim, Y. S. Jang, J. C. Chun, and J. C. Lee, Acteoside inhibits melanogenesis in B16F10 cells through ERK activation and tyrosinase down-regulation, *J. Pharm. Pharmacol.*, **63**, 1309-1319 (2011).
 19. H. Lee, Y. Kim, H. J. Kim, S. Park, Y. P. Jang, S. Jung, H. Jung, and H. Bae, Herbal formula, PM014, attenuates lung inflammation in a murine model of chronic obstructive pulmonary disease, *Evid. based. Compl. Alt.*, **2012**, 1-10 (2012).
 20. R. X. Zhang, M. X. Li, and Z. P. Jia, *Rehmannia glutinosa*: review of botany, chemistry and pharmacology, *J. Ethnopharmacol.*, **117**, 199-214 (2008).
 21. H. S. Kim, K. J. Kim, M. W. Lee, S. Y. Lee, Y. H. Yun, W. G. Shim, and S. D. Yoon, Preparation and release properties of arbutin imprinted inulin/polyvinyl alcohol biomaterials, *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 763-770 (2020).
 22. X. Y. Liu, S. Jeshycka, and H. J. Lee, Electrochemical study on transfer reaction of ionizable cefotiam across a water/1,2-dichloroethane interface and drug sensing applications, *Appl. Chem. Eng.*, **29**, 581-588 (2018).
 23. M. Q. Zhang, X. Ren, Q. Zhao, S. J. Yue, X. M. Fu, X. Li, K. X. Chen, Y. W. Guo, C. L. Shao, and C. Y. Wang, Hepatoprotective effects of total phenylethanoid glycosides from *Acanthus ilicifolius* L. against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, *J. Ethnopharmacol.*, **256**, 112795 (2020).
 24. E. W. C Chan, Y. Y. Lim, L. F. Wong, F. S. Lianto, S. K. Wong, K. K. Lim, C. E. Joe, and T. Y. Lim, Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species, *Food Chem.*, **109**, 477-483 (2008).
 25. G. Miliauskas, P. R. Venskutonis, and T. A. Van Beek, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chem.*, **85**, 231-237 (2004).
 26. N. Azmi, P. Hashim, D. M. Hashim, N. Halimoon, and N. M. N. Majid, Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **4**, S348-S352 (2014).
 27. T. Pillaiyar, M. Manickam, and V. Namasivayam, Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **32**, 403-425 (2017).
 28. A. L. N. Pagning, J. D. D. Tamokou, M. Lateef. L. A. Tapondjou, J. R. Kuate, D. Ngnokam, and M. S. Ali, New triterpene and new flavone glucoside from *Rhynchospora corymbosa* (Cyperaceae) with their antimicrobial, tyrosinase and butyrylcholinesterase inhibitory activities, *Phytochem. Lett.*, **16**, 121-128 (2016).
 29. B. Madhan, G. Krishnamoorthy, J. R. Rao, and B. U. Nair, Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **41**, 16-22 (2007).
 30. M. A. Birch-Machin, and A. Bowman, Oxidative stress and ageing, *Brit. J. Dermatol.*, **175**, 26-29 (2016).
 31. G. D. Liyanaarachchi, J. K. R. R. Samarasekera, K. R. R. Mahanama, and K. D. P. Hemalal, Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals, *Ind. Crop. Prod.*, **111**, 597-605 (2018).
 32. S. A. Rafiee, R. Farhoosh, and A. Sharif, Antioxidant activity of gallic acid as affected by an extra carboxyl group than pyrogallol in various oxidative environments, *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.*, **120**, 1800319 (2018).
 33. K. Mishra, H. Ojha, and N. K. Chaudhury, Estimation of anti-radical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results, *Food Chem.*, **130**, 1036-1043 (2012).
 34. K. K. Lee, J. H. Kim, J. J. Cho, and J. D. Choi, Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects, *Int. J. Cosmetic Sci.*, **21**, 71-82 (1999).

Authors

Si-Yeon Lee; B.Sc., Researcher, Department of Biomolecular and Chemical Engineering, Chonnam National University, Jeonnam 59626, Korea; totolo2009@nate.com

Kyeong-Jung Kim; B.Sc., Researcher, Department of Biomolecular and Chemical Engineering, Chonnam National University, Jeonnam 59626, Korea; kimkj124@nate.com

Youn-Sop Kim; Ph.D., Professor, Department of Biomolecular and Chemical Engineering, Chonnam National University, Jeonnam 59626, Korea; yskim1@chonnam.ac.kr

Soon-Do Yoon; Ph.D., Professor, Department of Biomolecular and Chemical Engineering, Chonnam National University, Jeonnam 59626, Korea; yunsd03@chonnam.ac.kr