

아카시아꽃잎 발효액의 미백 및 항산화활성

김유근¹, 디엡느구팜², 이영훈¹, 조지중¹, 최은영¹, 이용현¹, 김성배², 김창준^{2,*}

¹KB코메틱

52840 경남 진주시 문산읍 월아산로 950번길 13-16

²경상대학교 화학공학과 및 공학연구원

52828 경남 진주시 진주대로 501

(2017년 7월 6일 접수; 2017년 7월 27일 채택)

Whitening and Antioxidant Activities of Fermentation Broth of Acacia Flower (*Robinia pseudoacacia*)

You Geun Kim¹, Diep Ngoc Pham², Yeong Hun Lee¹, Ji Joong Jo¹, Eun Yong Choe¹, Young Hyeon Lee¹, Sung Bae Kim², and Chang-Joon Kim^{2,*}

¹KB COSMETICS

13-16 Worasan-ro 950 beon-gil, Munsan-eup, Jinju-si, Gyeongsangnam-do 52840, Korea

²Department of Chemical Engineering and ERI

501 Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do 52828, Korea

(Received for review July 6, 2017; Accepted July 27, 2017)

요 약

본 연구에서 아카시아꽃잎을 기질로 미백효과와 항산화효과가 우수한 천연물질을 생산하는 플라스크 발효법을 개발하였다. 아카시아꽃잎 추출액은 tyrosinase 활성을 저해하지 않은 반면, 2년 전통발효액과 2년 전통발효액을 접종한 아카시아꽃잎 플라스크 발효액은 tyrosinase 활성을 저해하였다. 아카시아꽃잎 플라스크 발효농축액 10% 포함된 용액의 tyrosinase 활성 저해율은 40%였고 농축액 함량이 증가할수록 저해율도 증가하였다. 양성대조군인 알부틴(20 mg mL⁻¹)과 코직산(80 µg mL⁻¹)의 tyrosinase 활성 저해율은 각각 90%와 58%였다. 이는 플라스크 발효농축액 40%가 포함된 용액의 미백성능이 코직산(80 µg mL⁻¹)의 성능과 비슷함을 보여준다. 농축액이 20% 포함된 용액의 항산화활성은 56%였고 농도가 증가할수록 용액의 항산화활성도 점차 증가하여 농축액이 60% 포함된 용액의 항산화활성은 98%였다. 이는 항산화효과가 우수한 비타민 C 수용액(10 mg mL⁻¹)과 동일한 항산화능력이다. 모든 농도의 발효농축용액에서 95% 이상의 세포생존율을 나타내어 발효액은 독성이 없는 것으로 판명되었다. 실온에 보관된 아카시아꽃잎 발효상등액은 pH와 당도 변화가 없었고 분리, 변색, 및 변취 등의 관능적 성상의 변화가 없는 안정한 상태를 유지하였다. 본 결과는 아카시아꽃잎 플라스크 발효액이 안전하고 미백 및 항산화효과가 뛰어나 미백화장품 원료로 사용가능함을 보여준다. 이는 본 연구를 통하여 아카시아꽃잎 발효기간을 획기적으로 단축시킨 배양방법이 개발되었음을 시사한다.

주제어 : 아카시아꽃잎, 플라스크 발효, 미백, 항산화, 기능성 화장품

Abstract : This paper describes a shake-flask fermentation of Acacia flower producing whitening- and antioxidant- agents. Tyrosinase activity was inhibited in the presence of traditional and flask-fermentation broths whereas no inhibitory effect of flower extract was observed. Tyrosinase inhibition was 40% in the presence of solution containing 10% of extract from fermentation broth and it increased by increase in the concentration of it. Arbutin (20 mg mL⁻¹) and kojic acid (80 µg mL⁻¹) gave 90% and 58% inhibition, respectively. The result indicates that whitening activity of 40% extract solution was comparable to that of kojic acid (80 µg mL⁻¹). The comparable antioxidant activity was observed for 60% extract and 10-mg mL⁻¹ vitamin solution. No noticeable toxicity was observed with extract. The physicochemical stability of fermentation supernatant was observed at room temperature storage condition. The result clearly shows that shake-flask fermentation of Acacia flower produced whitening agent for functional cosmetics.

Keywords : *Robinia pseudo-acacia*, Fermentation, Whitening, Antioxidant, Cosmetics

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cj_kim@gnu.ac.kr; Tel: +82-55-772-1787; Fax: +82-55-772-1789

doi: 10.7464/ksct.2017.23.4.401 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

국민 생활수준의 향상으로 평균 수명이 증가되어 소비자들이 아름답게 늙는 것에 대한 소망이 강해져 기능성화장품에 대한 수요가 증가하고 있다[1]. 첨단기술을 앞세운 선진국들과 경쟁하고 부작용이 없는 기능성화장품 개발을 위해서는 우리나라 고유의 자생식물을 화장품원료로 개발하는 것이 제품을 차별화하여 경쟁력을 높일 수 있다. 국내 화장품업계는 미백효과를 갖는 천연/합성 물질 개발을 위한 연구개발에 많은 투자를 하고 있으나 이의 성공적인 상업생산에 어려움을 겪고 있다. 원료의 미백효과는 뛰어나도 부작용이 있거나 품질은 우수하나 고가이고 수입에 의존해야 하는 문제점 등으로 인하여 화장품에 적용할 수 있는 미백원료물질 발굴이 쉽지 않기 때문이다[2]. 화장품에 사용되는 미백원료로는 피부의 멜라닌색소 합성을 저해하는 것과 이미 생성된 멜라닌색소를 벗겨내는 박피제 등이 있다[3,4].

본 연구는 아카시아꽃잎을 유용자원화하기 위한 목적에서 시작되었다. 아카시아 나무는 전 국토에 널리 분포하고 이로부터 다량의 아카시아꽃잎이 발생하고 있으나 사용처가 거의 없어 자연적으로 버려지고 있다. 아카시아꽃잎에는 수분이 86.6%이고 고형물에는 건조함량 기준으로 조단백 24.6%, 조회분 8.5% 및 총당 40.9%가 포함되어 있다. 아스코르브산, 유리당, 무기질의 함량 또한 높은 것으로 보고되었다[5]. 본 연구팀은 아카시아꽃잎에 함유된 당을 비롯한 많은 성분들을 미생물들이 효율적으로 이용하여 유용한 생리활성물질들을 생산할 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위하여 전통적인 방법으로 아카시아꽃잎을 자연발효 시킨 발효액에 대한 다양한 분석을 수행하였고, 이를 통해 발효액이 미백활성을 갖는 것을 발견하였다. 그러나 전통발효방법은 24개월 이상의 긴 발효시간을 필요로 하여 생산성이 낮고 제품의 균일한 품질 유지가 어렵다는 문제점이 있다. 본 연구는 미백활성을 갖는 아카시아꽃잎 발효액을 단기간에 획득할 수 있는 속성발효공정을 개발하는 데 목적이 있다. 피부가 자외선을 받으면 활성산소가 증가하여 피부세포가 손상을 받는데, 피부세포의 손상을 억제할 목적으로 세포 내에 멜라닌 생성이 증가하여 색소 침착이 증가하게 된다. 미백물질은 활성산소 중에 대항하여 피부 세포를 보호하는 항산화활성[6]과 tyrosinase 산화반응을 저해함으로써 멜라닌생합성을 억제하여 색소침착을 줄여준다[7]. 아카시아꽃잎을 첨가한 무기질 배지에 전통발효액을 접종하고 플라스크 배양을 실시하였다. 배양 후 발효액의 미백활성 유무를 확인하기 위하여 tyrosinase 저해율과 항산화활성을 측정하였다. 최종적으로 세포독성 유무, 보관안정성을 확인함으로써 피부자극이 적고 미백효과와 항산화활성이 뛰어난 기능성화장품 원료로의 이용가능성을 조사하였다.

2. 실험방법

2.1. 실험재료

경남 진주시 인근 야산에서 소유주의 허가를 받아 아카시아꽃잎을 채취하였고 이를 진공 비닐팩에 소분하여 포장하고

내부공기를 완전히 제거한 후 냉동 보관하였다. 발효농축액의 독성평가를 위해 사용된 세포주인 Human Keratinocyte (HaCaT) cell은 경남과학기술대학교 제약공학과 조수정 교수팀으로부터 분양받았다. 우태아혈청(Fetal Bovine serum, FBS)는 Gibco 사(USA)로부터 구입하였고, 배양용 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 페니실린, 스트렙토마이신, 무기 염류, tyrosinase 및 관련 시약들은 Sigma 사(USA)로 부터 구입하였다.

2.2. 배지 및 배양 방법

본 배양을 위하여 사용된 기준배지인 M9배지는 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12.8 gL^{-1}), KH_2PO_4 (3 gL^{-1}), NaCl (0.5 gL^{-1}), NH_4Cl (1 gL^{-1}), MgSO_4 (1 mM), CaCl_2 ($100 \mu\text{M}$) 및 소량의 미량원소를 포함하였다. 전통적방법으로 제조된 4개의 아카시아꽃잎 발효액의 tyrosinase 활성 저해율을 측정하여 가장 높은 저해율을 나타낸 발효액(#1)을 집중균으로 사용하였다. 냉동 보관된 아카시아꽃잎을 상온에서 골고루 펼쳐서 24시간 건조하고 잘게 썰어 이를 M9배지 100 mL가 포함된 500 mL 베플 삼각플라스크에 첨가(30 g/L) 하였다. 이를 고압증기멸균기(Sanyo Electric Co., Ltd., Japan)에 넣고 $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 1.2기압으로 20분간 멸균하였다. 멸균배지를 포함하는 플라스크에 10 mL의 #1 발효액을 접종하고 진탕배양기(Jeitech, Korea)에서 $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm으로 10일간 배양하였다.

2.3. 분석용시료 제조

배양 완료 후 발효액 10 mL를 채취하였다. 이를 원심분리기에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 고형물이 제거된 상등액을 회수하였다. 상등액에 20 mL 증류수와 60 mL 에틸아세테이트를 첨가한 후 5분간 교반하였다. 에틸아세테이트 층을 회수하여 이를 진공농축기에서 감압 하에 에틸아세테이트를 제거하였다. 잔류고형물에 1 mL 증류수를 첨가하여 10배 농축액을 제조하였고, 이를 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 에 냉동보관하며 분석에 사용하였다. 분석 시 발효 농축액을 10%부터 원액까지 10% 단위의 농도범위로 희석한 후 이를 측정용 시료로 사용하였다. 발효 전·후 시료의 각종 활성을 확인하기 위하여 아카시아 꽃잎추출액을 대조군으로 이용하였다. 즉, 건조된 30 g 아카시아 꽃잎을 소량의 증류수와 혼합하여 hand blender (HR1372, Philips, USA)에 넣고 일정시간 분쇄하여 꽃잎즙을 제조하였다. 주스에 100 mL의 70% 에탄올을 첨가하여 교반한 후 혼합액을 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 3시간 집속시켜 꽃잎으로부터 유효성분이 추출되도록 유도하였다. 감압증류 하에 에탄올을 제거하고 20 mL의 증류수를 첨가하여 꽃잎추출액을 제조하였다.

2.4. 분석 방법

2.4.1. Tyrosinase 저해활성 측정

발효액이 미백효과를 갖는지 여부를 조사하기 위하여 식품의약품안전처에서 제시한 시험법[8]을 사용하였다. 본 방법은 Ishihara 등[9]이 제안한 것으로 tyrosinase 활성 저해율을 측정하여 미백성분의 효과를 평가하는 시험법이다. 시험관에

0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 220 μL 와 발효농축액 20 μL 그리고 반응효소로 작용하는 mushroom tyrosinase ($1,500 \text{ U mL}^{-1}$) 20 μL 를 순서대로 첨가하고 이 용액에 1.5 mM 타이로신용액 40 μL 를 첨가하였다. 혼합용액을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 반응시킨 후, ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 490 nm 파장에서 반응혼합물의 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해율은 Equation 1에 의해 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성저해율 (\%)} = 100 - \frac{b - b'}{a - a'} \times 100 \quad (1)$$

- a : 공시료액의 흡광도
- a' : tyrosinase를 완충액으로 대체한 공시료 혼합용액의 흡광도
- b : 발효농축액이 첨가된 혼합용액의 흡광도
- b' : tyrosinase를 완충액으로 대체한 발효농축액 혼합용액의 흡광도

Equation 1에서 공시료액은 시료액을 0.1 M 인산염완충액 (pH 6.5)으로 대체한 혼합용액이다.

2.4.2. Pyrogallol을 이용한 SOD 유사활성 측정

발효액의 항산화활성을 평가하기 위하여 pyrogallol을 이용하여 발효액의 SOD (superoxide dismutase) 유사활성을 측정하였다. SOD는 인체 내에서 과산화물(superoxide)를 과산화수소(H_2O_2)와 정상상태의 O_2 로 전환시키는 역할을 한다. SOD 유사활성물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자물질로 과산화물을 제거하는 역할을 한다[10]. SOD 유사활성 반응에서 pyrogallol은 물에 존재하는 과산화물라디칼에 의해 자동산화가 일어나 갈색물질을 형성하여 이를 분광광도계(spectrophotometer)로 분석하고, 과산화물 포착활성이 있는 물질이 존재 시 pyrogallol의 산화속도가 낮아지는 원리를 이용하여 과산화물 포착활성을 간접적으로 측정할 수 있다. 본 연구에서는 Marklund 등[11]이 제안한 방법을 따라 SOD 유사활성을 측정하였다. 시험관에 발효농축액 10 μL , Tris-HCl 버퍼(pH 8.5, 50 mM Tris와 10 mM EDTA) 150 μL , 및 7.2 mM pyrogallol 10 μL 를 혼합하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응시킨 후, 1N HCl 50 μL 를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 반응 후, ELISA reader기를 이용하여 420 nm에서 반응 혼합액의 흡광도를 측정하였다. 동일 시료를 3회 측정하여 얻은 값의 평균치를 사용하고 Equation 3을 이용하여 시료의 SOD 유사활성을 계산하였다. 계산식에서 음성대조군은 발효농축액 대신 Tris-HCl 버퍼를 첨가한 혼합용액이다.

$$\text{SOD 유사활성 (\%)} = \{100 - [(A - A')/B]\} \times 100 \quad (3)$$

- A : 발효농축액이 첨가된 혼합용액의 반응 후 흡광도
- B : 음성대조군의 반응 후 흡광도
- A' : pyrogallol 대신 Tris-HCl 버퍼를 첨가한 혼합용액의 반응 후 흡광도

2.4.3. MTT 에세이를 이용한 세포독성 평가

MTT 에세이는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 황색의 수용성 기질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 불용성인 보라색의 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하여 세포수의 변화를 추정하는 시험법이다. 따라서 살아있는 세포의 양이 많을수록 MTT에 의해 생성된 보라색의 색깔이 진해진다[12,13].

본 실험을 위하여 사람 섬유아세포 일차세포주(primary cell line) HaCaT (Human Adult low Calcium high Temperature) cell을 배양접시 바닥에 점종하고 페니실린(100 IU mL^{-1}), 스트렙토마이신($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), 및 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 첨가한 후 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하며 24시간 배양하였다. 배양된 HaCaT 세포주를 96-well plate에 2×10^4 /well로 분주하여 세포가 잘 부착될 때까지 24시간 배양하였다. 배양 후 1% FBS가 첨가된 DMEM 배지로 교환한 후, 다른 농도의 발효농축액을 각각 100 μL 를 첨가하고 24시간 추가 배양을 실시하였다. 각 well plate의 배지를 제거한 후 0.5 mg mL^{-1} MTT 용액을 well plate에 30 μL 씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 각 plate에 100 μL 의 DMSO를 첨가하여 formazan 결정을 용해시키고 ELISA reader기를 이용하여 540 nm에서 용액의 흡광도를 측정하였다. 발효농축액이 첨가되지 않은 배지에서 배양된 세포주를 대조군으로 사용하였고 세포독성은 대조군의 세포생존률에 대한 백분율로 나타내었다.

2.4.4. 발효액의 안정성 평가

화장품 원료로 사용하기 위해서는 원료의 안정성 평가가 반드시 필요하다. 아카시아꽃잎 발효상등액을 투명한 30 mL 유리용기에 넣어 마개로 밀봉한 후, 실온에 보관하면서 8주 동안 매주 1회씩 pH, 당도의 변화를 측정하였다. 시료의 pH를 측정하기 위하여 pH meter (Orion 2 Star, Thermoco, USA)를 사용하여 3회 반복 측정하였고, 측정하기 전 유리전극은 미리 염기성 완충용액이나 증류수에 담그고 pH meter를 전원에 연결한 후 10분 이상 두었다가 사용하였으며, 검출부는 물로 잘 씻어 가볍게 닦아 낸 다음 사용하였다. 당도의 변화를 조사하기 위하여 매번 당도계(Master Refractometer, Atago, Japan)에 시료 100 μL 를 주입하여 3회 반복하여 당도를 측정하였다.

발효상등액 시료의 장기보존 시 분리, 변색, 변취 가능성을 조사하기 위하여 5주 동안 매주 동일한 장소에서 육안평가 및 냄새 확인 등의 관능검사를 실시하였다. 시료의 변화 정도를 비교하기 위하여 최초 시험 시 동일한 발효상등액을 표준품으로 하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 냉장보관하면서 매 평가시마다 비교, 평가하였다. 평가기간 중에는 보관 장소의 온·습도를 25 $^{\circ}\text{C}$, 습도 50 \pm 5%의 조건을 유지하였으며 모든 측정은 동일한 온도, 향은 및 향습 조건에서 실시되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 아카시아 꽃잎 전통발효액과 플라스크 발효액의 tyrosinase 저해활성 비교

인체 내에서 멜라닌색소의 생성으로 피부가 검게 되는데, 미백작용이란 이러한 멜라닌생합성을 효과적으로 억제하는 대사작용을 의미한다[3,4]. 멜라닌생합성에서 tyrosinase가 타이로신을 L-DOPA로 전환시키고 이를 다시 L-DOPA quinone으로 산화시키는 중요한 역할을 한다[14,15]. 일반적으로 미백효과가 뛰어난 천연 생리활성물질들은 멜라닌생합성 단계에서 tyrosinase의 활성을 저해하여 타이로신이 L-DOPA로 전환되는 반응 또는 L-DOPA가 L-DOPA quinone으로 전환되는 반응이 억제된다[14-18].

본 실험에서는 아카시아꽃잎 발효액의 미백효과를 알아보기 위하여 타이로신을 기질로 사용하여 효소반응시험(*in vitro* tyrosinase inhibition assay)을 수행하였다. 발효기간이 다른 아카시아꽃잎 발효액들의 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였고 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 시료 #1, #2, #3, 및 #4는 각각 24개월, 30개월, 31개월, 32개월 간 발효가 진행된 시료들이다. Tyrosinase 활성 저해율은 #1이 45%였고 #2는 30%였으며 #3는 10%였고 #4는 8%인 반면 아카시아꽃잎 추출물에서는 tyrosinase 활성저해가 관찰되지 않았다. 이는 아카시아꽃잎에는 tyrosinase 활성저해 물질(미백물질)이 없으나 꽃잎 발효과정에서 미백활성을 갖는 물질이 생합성 됨을 보여준다. 본 결과로부터 tyrosinase 활성 저해율은 2년 발효액(#1)이 가장 높았고 발효기간이 증가할수록 감소함을 알 수 있다. 이는 2년 발효액에 가장 많은 양의 미백물질이 존재하는 것을 의미하고 2년 이상 발효 시 생합성 된 미백물질이 발효액에 존재하는 미생물에 의하여 분해되기 때문인 것으로 판단된다.

한편, 아카시아꽃잎을 함유하는 무기물 배지에 2년 발효액을 접종(10%, v/v)하여 8일간 플라스크에서 발효된 발효액은 전통적인 방법으로 제조된 2년 발효액보다 약간 높은 tyrosinase 활성 저해율(58%)을 나타내었다. 본 결과는 탄소원과 질소원의 추가 공급 없이 꽃잎과 무기물로만 구성된 합성 배지를 이용한 플라스크 발효에서 8일 만에 2년 전통발효액의 역가에 상당하는 미백물질을 생산할 수 있음을 보여준다. 이는 미백물질의 생산기간을 획기적으로 단축시킬 수 있고 정확한 배양조건의 제어를 통하여 일관성 있는 품질관리가 가능하다는

것을 시사한다. 흥미로운 결과로 인하여 플라스크 발효액에 대한 구체적인 검토를 실시하였다.

3.2. Tyrosinase 활성 저해율에 미치는 아카시아 꽃잎 발효농축액 농도 영향

플라스크 발효에서 얻은 아카시아꽃잎 발효액의 tyrosinase 활성 저해효과를 자세히 알아보기 위하여 아카시아꽃잎 발효농축액을 증류수에 일정비율로 희석하여 발효농축액의 농도별 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였다. 아카시아꽃잎 추출액을 음성대조군으로 사용하였고 식약처 미백고시 원료인 알부틴과 미백효과가 우수한 코직산을 양성대조군으로 사용하였다. Figure 1에 나타내었듯이, 발효 전의 꽃잎추출액(음성대조군)에서는 활성저해가 관찰되지 않았는데, 이는 상기에서 측정된 것과 동일한 결과이다. 농축액이 10% 포함된 용액의 tyrosinase 활성 저해율이 40%였고 농축액 농도가 증가할수록

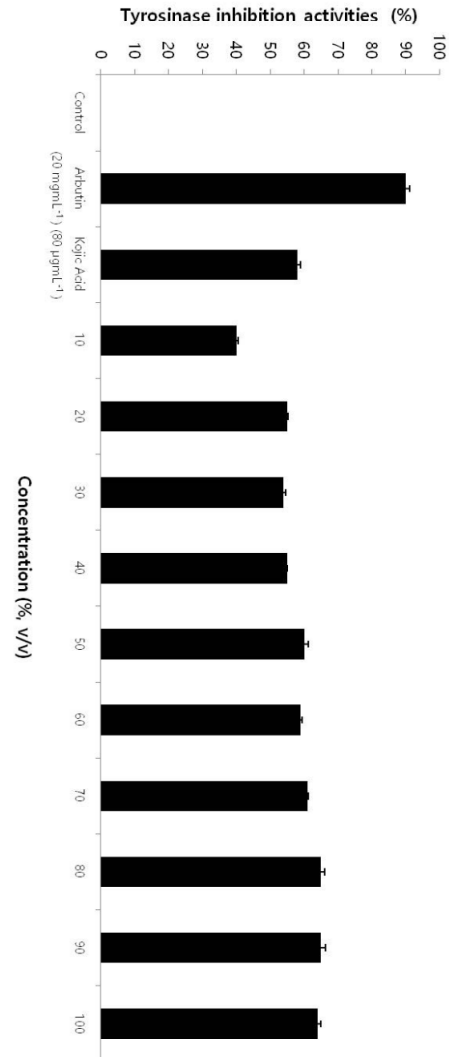


Figure 1. Tyrosinase inhibitions by extracts obtained from fermentation broth of Acacia flower with different concentrations. Control is flower extract and others are solutions containing extracts from fermentation broth.

Table 1. Tyrosinase inhibitory activity of fermentation broths of Acacia flowers

Fermentation broth	Fermentation time (d)	Tyrosinase inhibition (%)
Traditional (#1)	720	45
Traditional (#2)	900	30
Traditional (#3)	930	10
Traditional (#4)	960	8
Flask	8	58
Flower extract	-	-

저해율도 증가하여 농축액이 50% 포함된 용액의 tyrosinase 활성 저해율은 60%였다. 이후 첨가 농도의 증가에도 뚜렷한 저해율 증가가 관찰되지 않았고 농축원액의 tyrosinase 활성 저해율은 64%였다. 한편 양성대조군으로 사용된 알부틴(20 mg mL⁻¹)의 활성 저해율은 90%였고 코직산(80 µg mL⁻¹)은 58%의 활성 저해율을 나타내었다. 이는 미백제로 널리 알려진 코직산(80 µg mL⁻¹)의 활성 저해율이 플라스크 발효농축액 40%가 포함된 용액의 그것과 거의 비슷함을 보여준다. 그러나 발효농축액의 저해효과는 알부틴보다는 미약하였다. 본 결과로부터 미백화장품 제조에 투여되는 아카시아꽃잎 발효농축액의 적정량을 결정할 수 있다.

3.3. 아카시아꽃잎 발효농축액의 농도별 항산화활성

프리라디칼(free radical) 또는 유리분자라 일컫는 활성산소 등은 우리 몸의 세포를 손상 또는 파괴시켜 각종 질병을 야기하거나 피부의 노화를 촉진시킨다. 많은 연구자들이 기능성화장품 또는 식품을 개발하기 위하여 천연물에서 항산화활성을 갖는 물질들을 발굴하기 위한 연구들을 수행해 오고 있다[19]. 본 연구에서도 아카시아꽃잎의 플라스크 발효에서 얻어진 발효액의 항산화활성 유무를 조사하였다. 발효농축액을 농도별로 제조하여 용액의 SOD 유사활성을 측정하였고 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 발효 전의 꽃잎추출액(음성대조군)은

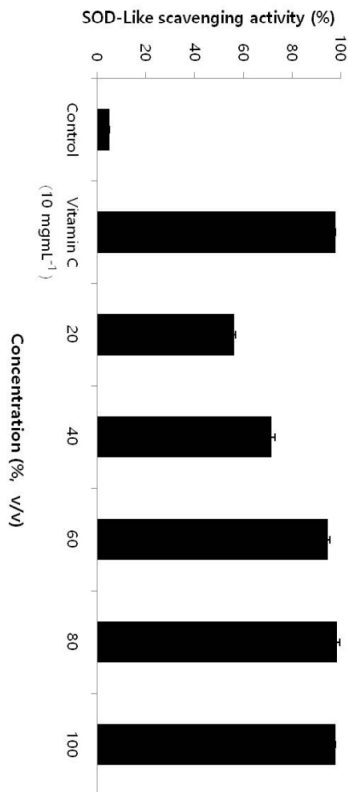


Figure 2. SOD-like activity of extracts obtained from fermentation broth of Acacia flower with different concentrations. Control is flower extract and others are solutions containing extracts from fermentation broth.

낮은 활성(5%)을 나타내었으나 발효 후 얻은 발효액은 높은 항산화활성을 나타내었다. 즉, 농축액이 20% 포함된 용액의 항산화활성은 56%였고 농축액 농도가 증가함에 따라 용액의 항산화활성도 점차 증가하여 농축액이 60% 포함된 용액의 항산화활성은 98%였다. 한편 양성대조군으로 항산화효과가 우수하다고 알려진 비타민 C 수용액(10 mg mL⁻¹)의 항산화활성은 98%였다. 본 결과는 꽃잎 발효에서 항산화활성을 갖는 물질이 생합성 되었으며, 발효 농축액 60%가 포함된 수용액은 10 mg mL⁻¹ 비타민 C 수용액과 동일한 항산화 능력이 있음을 보여준다. 본 결과는 아카시아꽃잎의 발효에 의해 생합성된 물질이 활성산소를 제거하여 피부세포를 보호하고 활성산소로 인한 색소 침착을 억제할 수 있음을 보여준다. 뿐만 아니라 플라스크 발효액이 천연 항산화제로도 사용 가능하여 그 산업적 파급효과가 매우 클 것으로 여겨진다.

3.4. 아카시아꽃잎 발효액의 세포독성 평가

언급한 바와 같이 아카시아꽃잎 발효액은 미백 및 항산화활성이 높아 기능성화장품 원료로 사용가능성이 높다. 그러나 인체에 사용 가능여부를 판단하기 위해서 세포에 대한 독성유무를 평가해야 한다. 발효농축액을 적절히 희석하여 농도가 다른 용액을 제조한 후, HaCaT 세포에 이들 용액으로 처리하여 세포생존율을 조사하였다. Figure 3(A)에서 보듯이, 모든 농도의 용액에서 세포생존율이 95% 이상을 나타내었다. Figure 3(B)는

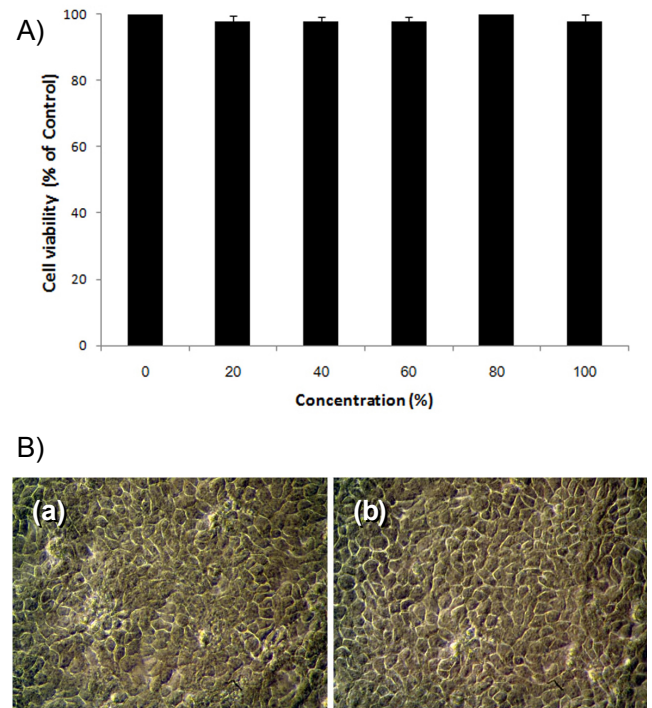


Figure 3. (A) Effect of various concentration of extracts of fermentation broth on cell viability in MTT assay. (B) Morphological characterization of HaCaT cells: a, untreated cells; b, cells treated with 100% extracts of fermentation broth. Images were captured in NI-100 Trinocular inverted microscope (NEO Science, Korea) at 100X magnification.

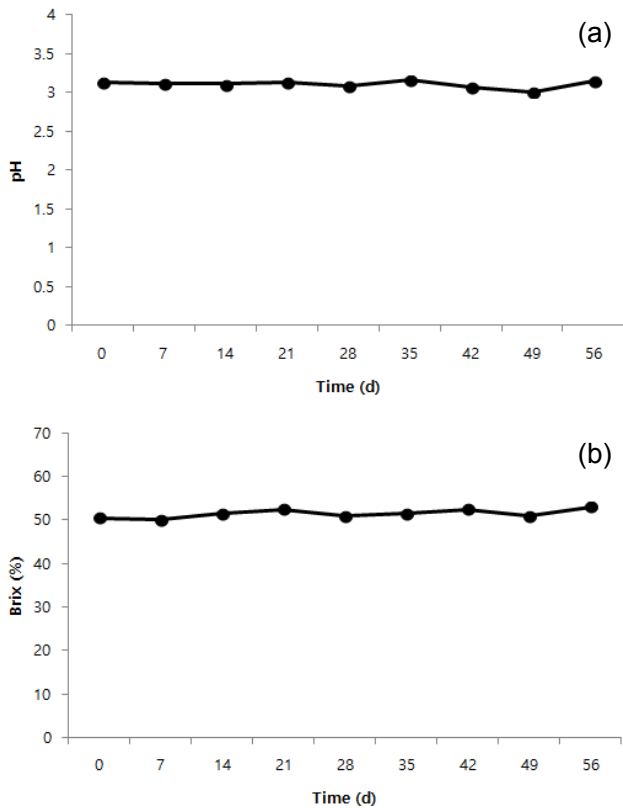


Figure 4. The changes in (a) pH and (b) Brix of extract of fermentation broth during storage.

발효액이 포함 또는 포함되지 않은 용액으로 처리된 HaCaT 세포의 현미경사진이다. 두 경우에 세포의 형태학적모양(morphology)의 차이를 발견할 수 없었다. 일반적으로, 생리활성물질이 세포에 미치는 독성유무를 검사할 경우 세포의 생존도가 80% 이상이 되는 범위를 안전한 농도범위로 인정한다[13]. 저 농도는 물론 고농축 아카시아꽃잎 발효액에서 세포생존율이 95% 이상인 것을 고려한다면, 아카시아꽃잎 발효액은 세포에 독성을 나타내지 않는 안전한 물질로 여겨진다.

3.5. 발효액의 안정성 평가

실온에 보관된 아카시아꽃잎 발효 상등액 시료의 pH와 당도의 변화를 측정된 결과 측정값의 변화가 거의 관찰되지 않았다. 즉, 보관기간 중 pH는 3.10 ± 0.10 범위를 나타내었다(Figure 4). 또한 보관 기간 중 발효액을 관찰한 결과, 분리, 변색, 변취 등의 관능적 성상의 변화가 전혀 없는 안정한 상태를 확인하였다. 본 실험결과로부터 아카시아꽃잎 발효액은 보관안정성이 우수하여 화장품 원료로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

4. 결론

아카시아꽃잎 전통발효액은 미백물질이 함유되어 화장품 소재로 사용될 수 있다. 그러나 제품의 품질 유지가 어렵고 발효기간이 2년 이상 소요되어 생산성이 낮다는 문제점이 있다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 품질 제어

가 가능하고 발효시간을 단축시킨 플라스크 배양방법을 개발하였다. 전통발효액을 접종균으로 사용한 플라스크배양에서 아카시아꽃잎 발효액은 미백활성을 나타내었다. 아카시아꽃잎 플라스크 발효농축액 40% 포함된 용액의 tyrosinase 활성 저해율은 55%로 $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 코직산을 포함한 용액과 비슷한 미백성능을 나타내었다. 농축액이 60% 포함된 용액의 항산화활성은 98%로 10 mg mL^{-1} 비타민 C 수용액과 동일한 항산화능력을 나타내었다. 이는 생합성된 미백물질이 tyrosinase 활성을 저해할 뿐만 아니라 자외선조사에 의해 생성되는 활성산소를 제거함으로써 궁극적으로 멜라닌생합성을 억제하는 것으로 여겨진다. 아카시아꽃잎 발효액은 독성이 없었고 실온 보관 시 시료의 pH와 당도의 변화가 없었으며 분리, 변색, 변취 등의 관능적 성상의 변화가 없었다. 본 연구는 플라스크를 이용하여 짧은 기간 안에 아카시아 꽃잎을 발효하여 안전하고 미백 및 항산화효과가 뛰어난 미백화장품 원료를 생산할 수 있음을 보여준다. 이는 아카시아 꽃잎 발효 기간을 획기적으로 단축시키고 품질관리가 가능한 배양방법이 개발되었음을 시사한다. 향후 발효미생물 및 미백물질의 분리 및 동정 등의 추가적인 연구가 필요하다.

감사

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2015년 산학연협력 기술개발사업 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다(과제번호: C0298823).

References

1. Cho, W. G., "Comparison of Drug Delivery Using Hairless and Pig Skin," *J. Korean Oil Chemists' Soc.*, **24**(4), 410-415 (2007).
2. Lee, Y. H, Park, S. S, Lee, S. w, Lee, S. H, Park, K. H, Choi, Y. J., and Gal, S. W., "Whitening Effect of Mycelial Culture Broth of *Paecilomyces Japonica* in the Mixture of Cucumber and Grape Extract," *J. Life Sci.*, **16**(5), 870-875 (2006).
3. Smit, N., Vicanova, J., and Pavel, S., "The Hunt for Natural Skin Whitening Agents," *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 5326-5349 (2009).
4. Maeda, K., and Fukuda, M., "In Vitro Effectiveness of Several Whitening Cosmetic Components in Human Melanocytes," *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361-368 (1991).
5. Kwon, J.-H., Byun, M.-W, and Kim, Y.-H., "Chemical Composition of Acacia Flower (*Robinia pseudo-acacia*)," *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(5), 789-793(1995).
6. Shin, J. Y., "Screening of Natural Products That Have Activities Against Skin-aging," *Korean J. Food Nutr.*, **14**(6), 568-572 (2001).
7. Ra, K. S, Shu, H. J., Chung, S. H., and Son, J. Y., "Antioxidant Activity of Solvent Extract from Onion Skin," *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(3), 595-601 (1997).

8. "Guideline for Efficacy Evaluation of Functional Cosmetics," Korean Food & Drug Administration (2005).
9. Ishihara Y., Oka M., Tsunakawa M., Tomita K., Hatori M., Yamamoto H., Kamei H., Miyaki T., Konishi M., and Oki T., "Melanostatin. A new melanin synthesis inhibitor: Production, Isolation, Chemical properties, Structure and Biological Activity," *J. Antibiot.*, **44**(1), 25-31 (1991).
10. Chung, S. H., Moon, Y. J., Kim, S. G., Kim, K. Y., Lee, K. T., Kim, H. K., and Whang, W. K., "Isolation of Flavonoides from Carthami Flos and Their Antibiotic Activity," *Yakhak Hoeji.*, **52**(4), 241-251 (2008).
11. Marklund, S., and Marklund, G., "Involvement of Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase," *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469-474 (1974).
12. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., and Watanabe, M., "A water-soluble Tetrazolium Salt Useful for Colorimetric Cell Viability Assay," *Anal. Commun.*, **36**, 47-50 (1999).
13. Jo, J. S., Ku, B. M., Kang, S. S., Lee, J. R., Kim, Y. G., Lee, H., Kim, S. B., Kim, S.-W., Kim, C.-J., and Chung, I.-Y., "Anti-wrinkle Activity of β -carotene Extracted & Purified from Recombinant *Escherichia coli*," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**(6), 513-518 (2008).
14. Chang, T.-S., "An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors," *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 2440-2475 (2009).
15. Yang, E.-S., Hwang, J.-S., Choi, H.-C., Hong, R.-H., and Kang, S.-M., "The Effect of Genistein on Melanin Synthesis and *In vivo* Whitening," *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **36**(1), 72-81 (2008).
16. Woo, Y. M., Kim, A. J., Kim, J., and Lee, C. H., "Tyrosinase Inhibitory Compounds Isolated from *Persicaria tinctoria* Flower," *J. Appl. Biol. Chem.*, **54**(1), 47-50 (2011).
17. Son, H.-U., Lee, S. H., Kim, M.-A., Park, H.-J., and Lee, S.-H., "Comparison of Melanogenesis-Inhibiting Activity by Extracts of *Prunus persica* Flower and Calyx," *Korean J. Food Preserv.*, **19**(6), 946-950 (2012).
18. Kwak, J.-H., and Han, Y.-H., "Tyrosinase Inhibitory Activity of *Macrolepiota procera*," *Korean J. Mycol.*, **38**(2), 202-204 (2010).
19. Song, H. S., Moon, H. J., Park, B. E., Choi, B. S., Lee, D. J., Lee, J. Y., Kim, C. J., and Sim, S. S., "Anti-oxidant Activity and Whitening Activity of Bamboo Extracts," *Yakhak Hoeji.*, **51**(6), 500-507 (2007).