

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001223-01

상백피 추출물의 효소 가수분해에 의한
피부 미백제 개발

(Development of cosmetic compositions
for skin whitening from mulberry root extract
by enzymatic hydrolysis)

한국산업기술대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “상백피 추출물의 효소 가수분해에 의한 피부 미백제 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 03월 02 일

주관연구기관명 : 한국산업기술대학교

주관연구책임자 : 김 정 근

연 구 원 : 김 미 진

연 구 원 : 박 나 은

연 구 원 : 강 태 원

연 구 원 : 황 다 현

연 구 원 : 김 나 래

연 구 원 : 박 근 태

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 임 영 희

협동연구기관명 : 삼경코스텍(주)

협동연구책임자 : 김 명 규

요 약 문

I. 제 목

“상백피 추출물의 효소 가수분해에 의한 피부 미백제 개발”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서는 현재 미백제로 널리 사용중인 상백피 (뽕나무뿌리껍질) 추출물을 β -글루코시다아제 효소로 가수분해하여 10배 이상의 미백효과가 향상된 새로운 미백 화장품 원료를 개발하고자한다. 또한 새롭게 개발된 원료의 미백효능, 멜라닌 생성 효소반응 저해 기작, 급성독성시험, 피부감작 시험, 국소독성 평가를 수행하여 화장품 원료로서의 타당성을 검토하고자 한다. 또한 이를 포함하는 피부 미백 효과가 향상된 천연화장품 제품을 제조하고자함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- ◇ 상백피로부터 유효성분의 효과적인 추출방법 확립
 - ▶ 상백피 유효성분의 효과적인 추출법 개발 (주관, 협동)
 - ▶ 추출물의 분말화 및 결정화 (주관)
- ◇ 상백피 추출법과 효소에 의해 가수분해된 물질의 미백효과, 주름 개선 효과 평가
 - ▶ *In vitro* tyrosinase 활성저해시험을 이용한 피부미백 화장품의 효력평가 (주관)
 - ▶ 방선균 (*Streptomyces bikiniensis* KCTC 9172)을 이용한 melanin 생성 억제 효과 효력 평가 (주관, 세부)
 - ▶ Melanocyte 세포배양을 이용한 melanin 생성 저해 능력 평가 (세부)
 - ▶ 세포내 멜라닌 생성 저해시험을 이용한 피부미백 화장품의 효력 평가 (협동)
- ◇ 가수분해 최적 효소 (상업용 펙티나제, 탄네이즈, β -글루코시다아제 중에서)의 선정 및 효소 최적 반응 조건 확립
 - ▶ 상백피 유효 성분 분해에 최적인 상업용 효소 선정 (주관)
 - ▶ 유효 성분 분해를 위한 최적 효소 반응 조건의 확립 (주관)
- ◇ 표준원료 개발 및 원료 표준화
 - ▶ 본 연구 과제를 통하여 규명된 유효성분 및 지표성분을 토대로 표준원료 개발 (주관)
 - ▶ 대량생산/최적생산을 위한 Scale-up/시제품 생산 (협동)
 - ▶ 미백, 주름개선 보조 화장품 개발 (협동)
 - ▶ 표준원료의 효소저해 기작 규명 (세부)
- ◇ 유효성분 및 표준원료에 대한 안전성 평가
 - ▶ 급성독성시험, 피부감작 시험, 국소독성 평가 (세부, 협동)

IV. 연구개발결과

상백피는 뽕나무의 껍질로 단단하고 달며 성질이 차가운 성질의 약재로 해열, 이뇨, 혈압강하, 진해, 진정, 진통, 항균, 소염 작용등이 있다. 또한 최근 상백피 추출물은 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하고 있는 효소인 티로시나아제 활성을 억제하여 햇빛이나 멜라닌으로 인한 색소 침착등을 개선하고 방지하는 효과가 알려져 천연 화장품에 널리 사용되고 있다.

본 연구진은 상백피의 주요 미백성분이 스틸벤 계열 구조로 2개의 당을 가진 mulberroside A임을 확인하였다. 본 연구진은 1개의 당을 갖는 스틸벤 계열의 미백제인 rhapontin을 효소 가수분해하여 미백 및 항균효능이 증가한 rhapontingenin을 개발한 경험을 바탕으로 상백피 추출물도 적절한 효소를 사용하여 가수분해하면 기존의 상백피 추출물보다 미백, 항균 및 항산화 효능이 증가한 물질이 만들어 질것으로 예측하였다.

뽕나무는 다양한 품종이 알려져 있고 품종에 따라 미백 성분에도 차이가 있어 품종 선정을 위해 국내 및 중국에서 생산된 다양한 상백피를 구입하여 상백피 추출액을 제조하여 분석하였다.

분석 결과, 국내 안동산 상백피의 mulberroside A 함량이 가장 높을 뿐만 아니라 티로시나아제 억제 효과도 가장 높은 것으로 나타나 국내산 안동산 상백피를 실험 재료로 선정하였다.

또한, mulberroside A 구조에 존재하는 2개의 당을 가수분해하기 위해 β -glucosidase를 함유한 것으로 알려진 다양한 효소를 구입하여 반응한 결과, mulberroside A가 효소에 의해 쉽게 가수 분해되는 것을 HPLC에 의해 확인하였다. 본 연구자들은 화장품으로서 제품의 안전성등을 고려하여 FDA허가를 받고 오렌지 주스등의 청징화에 널리 사용하는 Novozyme사의 Pectinex를 상백피 추출물의 가수 분해 효소로 선정하였다.

Pectinex를 사용한 반응시의 최적 효소 반응을 검토한 결과, pH 4.5, 60°C로 나타났다. 효소에 의한 가수분해시 당이 2개 붙어 있는 구조인 mulberroside A는 당이 1개인 oxyresveratrol-3-O-glucoside를 거쳐 oxyresveratrol로 전환됨을 확인하였다. 또한 본 연구진은 상백피 추출물로부터 mulberroside A와 효소 가수분해액으로부터 oxyresveratrol, oxyresveratrol-3-O-glucoside를 분리정제하여 이들의 구조를 확인하였다.

따라서 본 연구자는 상백피 추출물로 효소가수분해에 의해 제조되는 스틸벤 계열의 oxyresveratrol과 oxyresveratrol-3-O-glucoside는 피부미백제, 항산화

제, 항암제로 가치가 클 것으로 판단하여 이들의 미백효능, 멜라닌 생성 효소 반응 저해 기작, 정제 공정, 급성독성시험, 안정성, 피부감작 시험, 국소독성 평가를 수행하여 화장품 원료로서의 타당성을 검토하였다.

연구 1차년도에는 제조된 oxyresveratrol를 사용하여 L-tyrosine을 기질로 mushroom tyrosinase의 IC₅₀값을 비교한 결과, 효소 가수분해로 제조된 oxyresveratrol은 mulberroside A에 비해 활성저해능이 약 109배, arbutin에 비해 약 1500배, kojic acid에 비해 43배 높았다. Oxyresveratrol을 *S. bikiniensis*를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 실험, B16F10 melanoma 세포를 이용하여 세포내 tyrosinase 활성억제 및 melanin 합성저해 실험을 수행한 결과, oxyresveratrol이 tyrosinase 활성억제 및 melanin 생성억제에 우수한 효과를 보였다. 특히, 현재 미백원료로 이용되고 있는 arbutin 및 kojic acid와의 비교에서도 월등히 우수한 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 효소 전환에 의해 그람양성균에 대한 항균력 증가효과를 나타내었고 특히 여드름의 원인균인 *P. acnes* 균에 대한 항균력이 증가를 확인하였다. 따라서 상백피 추출물을 효소 가수분해하면 미백기능이 기존 추출액보다 월등히 증가하는데 이는 새롭게 생성된 oxyresveratrol에 기인한 것으로 사료되었고 이는 새로운 천연 미백화장품 소재로 개발될 수 있을 것으로 기대되었다.

연구 2차년도에는 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside를 제조하고 brown guinea pig를 이용하여 적정량의 UV를 조사한 후에 일정량의 시료를 매일 1회 5주간 도포한 후 각 시료들의 미백효과를 검토하였다. 1% 처리군에서는 육안적으로 미백효과가 나타나지 않았으나 2%, 5% 처리군에서는 육안적으로도 시료 처리군에서 미백효과가 있음을 알 수 있었다. 특히 5% oxyresveratrol을 처리한 실험에서는 뚜렷한 미백효과가 나타남을 알 수 있었다. 객관적인 결과를 얻기 mexamer를 이용하여 멜라닌지수를 측정된 결과도 oxyresveratrol, mulberroside A, oxyresveratrol-3-O-glucoside의 경우에 2, 5% 처리군에서 멜라닌지수의 감소를 보였다. 조직학적인 결과를 보면 oxyresveratrol 처리군에서 대조군에 비해 멜라닌 색소의 침착이 현저히 감소되었음을 보였다. 또한 표피를 분리하여 tyrosinase 및 melanin함량을 측정된 결과에 있어서도 2%, 5% 시료처리군, 특히 5% oxyresveratrol 처리군에서의 효소 활성의 감소 및 멜라닌 함량이 현저히 감소되었음을 알 수 있었다.

미백효과를 보이는 원인을 규명하기 위해 실시한 멜라닌 합성에 관련된 단백질들의 발현을 측정해 본 결과에서도 시료처리군에서 멜라닌 합성과 관련된 유전자들의 발현이 대조군에 비해 현저히 감소되었음을 알 수 있었다.

본 연구의 결과들을 종합해 보면 상백피 추출물의 효소에서 정제한 mulberroside A 및 mulberroside A를 효소 전환하여 만든 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside는 모두 arbutin에 비해 우수한 tyrosinase 활성억제 및 melanin 생성 억제 효과를 보였다. Oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside는 mulberroside A보다 미백효과가 증가된 결과를 보였다. 또한 5% 처리군에서 oxyresveratrol은 모든 시료 처리군에 비해 월등히 우수한 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. Oxyresveratrol의 경우에는 유방암 세포에 대한 세포 사멸 효과도 mulberroside A에 우수한 효과를 보였다. 이는 mulberroside A에 대한 생물전환으로 oxyresveratrol의 미백효과의 증진 뿐만 아니라 oxyresveratrol의 이용분야도 확대 될 수 있는 가능성이 확인 되었다.

또한 oxyresveratrol의 안정도를 검토한 결과, 중성 및 알칼리상태에서는 불안정하였고 산성에서 안정하여 pH조건을 고려하여 약산상태로의 제조가 필요하였다. 용매 조건에서는 Ethanol, DMSO, 1,3 BG의 어떤 상태에서도 90%이상을 유지하며, 안정하였다. 원료첨가에 따른 경시변화를 살펴본 결과, 냉장상태에서는 모두 안정하였으며 안정도 유지는 HP- β -CD > Microcapsule > Nano capsule > Liposome > Silica 순이었고 HP- β -CD 에서는 온도의 영향을 받지 않으며 가장 이상적이었다. 제형제조에 따른 경시변화를 살펴본 결과, Microcapsule을 제외하고는 모든 제형제조에서 불안정하였다. Microcapsule > Nano capsule > HP- β -CD > Liposome > Silica 순으로 안정성이 좋게 나타났다. Capsule 방법 중에서도 nanocapsule 보다는 microcapsule 방법이 더욱 좋게 나타났다.

연구 3차년에는 oxyresveratrol은 추출된 상백피를 효소전환 후 SP-207 레진을 이용하여 간편하게 고순도로 분리 정제할 수 있었다. 즉, 안동산 상백피로부터 추출된 성분에 Pectinex 효소를 가하여 30°C, 6 시간 반응 후 100°C에서 5분간 증탕으로 효소 반응을 중지하여 얻어진 효소 반응물을 얻었다. 이를 SP-207 레진에 흡착한 후 10-40% 에탄올을 이용한 step-wise 용출시 40% 에탄올 분획으로부터 고순도로 얻을 수 있었다. 또한 이를 농축한 후 증류수에서 교반하면서 재결정하여 96% 이상의 고순도 oxyresveratrol을 제조하였다. 한편 oxyresveratrol-3-O-glucoside의 제조는 추출된 상백피를 효소전환 후 SP-207 레진과 Low pressure liquid chromatography system 인 Flash-40를 사용하여 C18 reverse phase column을 이용하여 고순도로 분리 정제할 수 있었다.

Oxyresveratrol과 oxyresveratrol-3-O-glucoside 농도의 항산화능력을 비교한 결과, oxyresveratrol-3-O-glucoside보다 oxyresveratrol의 항산화력이 높게 나타났다. 또한

oxyresveratrol과 ascorbic acid의 항산화력을 비교한 결과, 1 μ M의 낮은 농도에서는 oxyresveratrol이 높은 항산화능을 나타내었고, 5 μ M의 경우 두 물질의 항산화력은 유사하였으며 5 μ M농도에서는 ascorbic acid의 항산화력이 oxyresveratrol에 비해 높은 경향을 보였다. 실험 결과 oxyresveratrol의 경우 5, 10 μ M의 낮은 농도에서도 현저한 라디칼 소거능을 보여 효과적인 항산화 물질임을 증명할 수 있었다. 따라서 oxyresveratrol은 화장품의 미백제 원료로 사용할 경우 항산화 효과를 더하여 피부 노화 방지에도 효과가 있을 것으로 생각된다.

Oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside 물질을 사용하여 guinea pig에 피부 자극성 및 피부감작을 검토한 결과, 피부에서 P.I.I 0~0.08을 나타냄으로써 비자극성 물질로 판단되었고, 감작성 피부반응에서 guinea pig의 피부 감작율은 0%로 전혀 감작반응을 야기하지 않아 매우 약함 (Grade I)으로 판정되었다.

본 연구에 사용한 상백피 유래의 mulberroside A를 효소 전환시켜 제조한 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside 물질은 mulberroside A에 비하여 미백 효과가 향상된 결과를 보였으며 guinea pig를 대상으로 한 동물 시험에서 피부자극 및 감작반응을 일으키지 않는 물질로 평가되어 미백화장품의 원료로 이용 가능성이 있을 것으로 사료된다. 한편, oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside 물질은 미백제 뿐 만 아니라 좋은 항산화 물질로 건강 기능성 식품으로의 가능성도 매우 높다고 사료된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- FTA 체결에 따른 농민 소득 증대 및 농민들을 위한 고소득 대체 작목 개발
- 수입의존도가 높은 화장품 원료산업에 국내 천연자원의 활용을 통한 수입대체 및 우수원료 개발을 통한 수출 증대
- 새로운 우수한 천연원료 이용성 확대를 통하여 소비자 만족도 향상, 국내 화장품 산업 활성화 및 화장품산업과 농림산업과의 연계성 증대
- 생물 공학 기술 (생물전환기술)을 이용한 국내 우수 천연물 화장품원료의 상품화 및 기술이전

SUMMARY

(영문요약문)

Root bark of white mulberry (*Morus alba*) has been used as a traditional oriental medicine to treat fever, urination, cough, pain, wheezing, edema, and infection, and to reduce blood pressure. Recently, it has been known to protect skin pigmentation by sunlight by inhibiting tyrosinase activity which is a major enzyme in melanin synthesis; therefore, it has been used as a component of natural cosmetics.

In this study, we found that the major whitening agent of root bark of white mulberry was mulberroside A, a stilbene containing 2 glucosides. It has been reported that aglycones show enhanced biological activity (for instance, antibiotic, antioxidative, and skin whitening activities) compared with their glycosylated compounds. Biotransformation is often used to improve chemical activity. Thus, we performed biotransformation of mulberroside A to produce its aglycone, oxyresveratrol.

There are various kinds of *Morus alba* and they have different components for skin whitening. Therefore, we collected many species of mulberry cultivated in the different area of country and in China, produced the ethanol extracts, and measured their whitening activities. We choose the *Morus alba* cultivated in Andong area, because its extract contained the most amount of mulberroside A and showed the highest inhibitory activity on mushroom tyrosinase. Among various β -glycosidase, we used Pectinex obtained from Novozyme which has been proved its safety from FDA and has been widely used to clarify fruits and vegetables juices.

The optimum condition of the enzyme activity for bioconversion was pH 4.5 and 60°C. We found that mulberroside A was converted to oxyresveratrol-3-O-glucoside (OXY-3) containing one glucoside and further to oxyresveratrol (OXY), an aglycone of mulberroside A. Therefore, to evaluate a potency of these stilbenes as cosmetic agents, we performed their purification process and investigated their whitening activities, inhibitory activities of melanin synthesis, cytotoxicity, stability, and skin sensitization and irritation tests.

In the first year, mulberroside A, a glycosylated stilbene, was isolated and identified from the ethanol extract of the roots of *Morus alba*. Oxyresveratrol, an aglycone of mulberroside A, was produced by enzymatic hydrolysis of mulberroside A using the commercial enzyme Pectinex. Mulberroside A and oxyresveratrol showed inhibitory activity against mushroom tyrosinase with an IC₅₀ of 53.6 and 0.49 μ M, respectively. The tyrosinase inhibitory activity of oxyresveratrol was thus approximately 110-fold higher than that of mulberroside A, and tyrosinase inhibitory activity of

oxyresveratrol was 1500-fold and 43-fold higher than those of arbutin and kojic acid, respectively. Inhibition kinetics showed mulberroside A to be a competitive inhibitor of mushroom tyrosinase with L-tyrosine and L-DOPA as substrate. Oxyresveratrol showed mixed inhibition and noncompetitive inhibition against L-tyrosine and L-DOPA, respectively, as substrate. The results indicate that the tyrosinase inhibitory activity of mulberroside A was greatly enhanced by the bioconversion process. Oxyresveratrol and mulberroside A strongly inhibited melanin production in *Streptomyces bikiniensis* and exhibited dose-dependent inhibition of tyrosinase activity and inhibition of melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. Oxyresveratrol demonstrated a great inhibitory effect on tyrosinase activity and melanin synthesis. We evaluated the antimicrobial activity of oxyresveratrol. It showed higher antimicrobial activity than mulberroside A, which means that the antibacterial activity of mulberroside A was enhanced by biotransformation. The activity was higher against Gram positive strains than Gram negative strains.

In the second year, the enzymatic hydrolysis of mulberroside A with Pectinex[®] produced oxyresveratrol and oxyresveratrol-3-O-glucoside. We tested oxyresveratrol, oxyresveratrol-3-O-glucoside, and mulberroside A to determine whether they could inhibit ultraviolet B (UVB) irradiation-induced melanogenesis in brown guinea pig skin. Topical application of mulberroside A, oxyresveratrol, and oxyresveratrol-3-O-glucoside reduced the pigmentation in guinea pig skin. Low anti-pigmentation effects were shown in the 1% treated-samples. However, 2% and 5% treated samples showed clear depigmentation effects. These compounds suppressed the expression of melanogenic enzymes tyrosinase, tyrosinase-related protein-1, and microphthalmia transcription factor. The anti-melanogenesis effect was highest with oxyresveratrol, intermediate with oxyresveratrol-3-O-glucoside, and lowest with mulberroside A. Mulberroside A is a glycosylated stilbene of oxyresveratrol; thus, the deglycosylation of mulberroside A resulted in enhanced inhibition of melanogenesis. Histological analysis with Fontana-Masson staining confirmed that these compounds significantly reduced the melanin content in the epidermis of UVB-irradiated guinea pig skin compared to the vehicle control. In anticancer test with oxyresveratrol, it showed higher cytotoxicity effect than mulberroside A in breast cancer cells. The result means that oxyresveratrol produced by biotransformation of mulberroside A has enhanced whitening activity; moreover, we found its availability as a candidate of anticancer agent.

In the stability test of oxyresveratrol, it was stable in acidic condition but unstable in alkalic and neutral conditions. It kept its activity over 90% in ethanol and

1,3-BG. Its stability was measured according to the material forms containing oxyresveratrol and we found that it was the most stable in HP- β -CD followed by microcapsule, nano capsule, liposome, and silica. All forms were stable in cold temperature, but oxyresveratrol in HP- β -CD form was consistently stable in any tested temperature. Microcapsule form was stable after a designated time has passed.

In the third year, we carried out the mass purification of oxyresveratrol and oxyresveratrol-3-*O*-glucoside and produced significant amounts of both compounds having over 96% purity. Antioxidant activity of oxyresveratrol was higher than that of oxyresveratrol-3-*O*-glucoside. Antioxidant activity of oxyresveratrol was higher than that of ascorbic acid at 1 μ M concentration, but ascorbic acid showed higher antioxidant activity than oxyresveratrol at 5 μ M concentration. Oxyresveratrol showed a significant reactive oxygen species (ROS) scavenging activity at 5 and 10 μ M concentration. Therefore, oxyresveratrol might be suitable for a candidate for an anti-aging agent as well as a skin whitening agent.

Stilbenes are known as antioxidant and some of them show anti-pigmentation activity. We also investigated whether oxyresveratrol and oxyresveratrol-3-*O*-glucoside produced by biotransformation of the extract of *Morus alba* root show skin irritation and sensitization. In skin irritation test, 1% oxyresveratrol, and 5% oxyresveratrol, and 1% oxyresveratrol-3-*O*-glucoside showed P.I.I score 0, 0.04, and 0, respectively. Accordingly, the two stilbenes were evaluated to be practically 'non-irritant' materials. In skin sensitization study by guinea pig maximization test (GPMT), 1% oxyresveratrol, 5% oxyresveratrol, and 1% oxyresveratrol-3-*O*-glucoside did not cause edema and erythema at 24 h and 48 h after topical application and exhibit sensitization score 0 and rate 0%. Consequently, it was confirmed that oxyresveratrol and oxyresveratrol-3-*O*-glucoside had no contact allergic sensitization in GPMT.

In summary, oxyresveratrol and oxyresveratrol-3-*O*-glucoside produced by biotransformation from mulberroside A showed the enhanced whitening activity compared with mulberroside A and they did not exhibit skin sensitization and irritation. Therefore, oxyresveratrol and oxyresveratrol-3-*O*-glucoside might be potential candidates as skin-whitening agents without serious side effects.

보고서 목차

■ 연차 실적 계획서	1
■ 연구개발과제 요약서	3
■ 연도별 실적	5
■ 연구개발결과	
1. 서론	
1. 기능성화장품	
1.1. 기능성 화장품의 정의 및 유형	9
1.2. 기능성 화장품의 시장 규모	10
1.3. 기능성 화장품 원료의 종류	12
2. 미백 제품	
2.1 미백제품의 정의 및 유형.....	16
2.2. 미백 제품 원료의 작용 및 기전	16
2.3. 천연 미백원료 개발의 필요성.....	17
3. 멜라닌(melanin)	
3.1 멜라닌의 개요	18
3.2 멜라닌의 생합성 경로	20
3.3. 멜라닌 생성 억제 기작	22
3.4. Tyrosinase	23
3.5. Tyrosinase inhibitors	25
3.6. 미백원료 개발과 연구 동향	28
4. 생물전환	
4.1. 생물전환의 정의 및 연구동향	29
4.2. 생물전환의 연구 개발 필요성 및 중요성	29
4.3. 생물 전환의 연구 사례	30

5. 상백피	
5.1. 상백피의 종류 및 미백효과	31
5.2. 스틸벤의 정의 및 유도체	33
6. Oxyresveratrol	
6.1 Oxyresveratrol의 연구사례 및 효과	35
7. 연구목적	35
II. 실험 재료 및 방법	
1. 실험재료	
1.1. 시료	37
1.2. 시약	37
1.3. 기기	38
1.4. 실험 동물	39
2. 실험 방법	
2.1 HPLC 분석 조건	39
2.2. Mulberroside A와 oxyresveratrol의 TLC 분석	39
2.3. Mulberroside A와 oxyresveratrol 분자량 및 구조 분석	39
2.4. Tyrosinase 활성저해 실험	39
2.5. Mushroom tyrosinase 효소 활성억제 기작	40
2.6. <i>Streptomyces bikiniensis</i> 를 이용한 멜라닌 생성 억제 효과 측정	40
2.7. 상백피 추출물의 제조	41
2.8. 멜라닌 생성세포를 이용한 세포내 tyrosinase 활성 저해 및 melanin 생성억제	42
2.9. UV 흡수력에 대한 실험	44
2.10. 효소전환 생성물에 대한 항균활성 측정 실험	44
2.11. 항산화 실험	45
2.12 동물 실험	46

2.13. Oxyresveratrol의 안정성 실험	52
2.14. Oxyresveratrol, Oxyresveratro-3-O-glucoside의 피부자극성 및 감작성 시험	54
III. 연구 결과	
1. 상백피 추출물의 성분 분석을 위한 HPLC 분석 조건 확립 ...	64
2. 원산지별 상백피의 함량비교	65
3. 상백피로부터 유효성분의 효율적인 추출 조건 확립	67
4. 생물전환에 의한 상백피 추출물의 유효물질 변환 확인	68
5. 최적 생물전환 조건의 확립	69
6. 효소전환된 생성물의 정제 및 구조 확인	72
7. Oxyresveratrol 및 비교물질 들의 tyrosinase 활성저해 비교 결과	78
8. Mushroom tyrosinase 효소 활성억제 기작 결과	79
9. <i>Streptomyces bikiniensis</i> 에 의한 melanin 합성저해 결과	82
10. 멜라닌 생성세포를 이용한 세포내 tyrosinase 활성 저해 및 melanin 생성억제	84
11. UV 흡수력 측정 결과	94
12. 항균력 측정 결과	96
13. Oxyresveratrol의 안정도	97
14. Oxyresveratrol의 항암효과	108
15. Oxyresveratrol의 분리정제	110
16. Oxyresveratrol-3'-O-β-glucose의 분리정제	111
17. 항산화시험	112
18. 동물실험을 이용한 미백효과 측정	114
19. Oxyresveratrol, Oxyresveratro-3-O-glucoside의 피부자극성 및 감작성 시험	127
IV. 결과 요약	137

V. 참고문헌 141

■ 연구성과

1. 연구 성과
2. 구매금액이 3천만원 이상인 기자재 구매현황
3. 연구비 집행실적
4. 중요 연구 변경사항

[별지 6 호]

연 차 실 적 계 획 서

관리 번호		보안등급 분류	<input type="checkbox"/> 보안과제 <input checked="" type="checkbox"/> 일반과제		공개가능여부	<input checked="" type="checkbox"/> 가 <input type="checkbox"/> 부	
사업추진형태		<input type="checkbox"/> 기획(지정공모)과제	실용화대상여부		<input checked="" type="checkbox"/> 기술이전 <input type="checkbox"/> 자체사업화		
		<input checked="" type="checkbox"/> 일반(자유응모)과제	국가과학기술 표준분류체계				
과 제 명	국 문	상백피 추출물의 효소 가수분해에 의한 피부 미백제 개발					
	영 문	Development of cosmetic compositions for skin whitening from Mulberry root extract by enzymatic hydrolysis					
주 관 연 구 책 임 자		(소속기관 명칭) 한국산업기술대			(관리부서 팩스) 031-8041-0629		
		(이름) 김정근	(e-mail) kjkim@				
		(지역) 경기 시흥시	(전공) 생명공학		(학위) 이학박사		
세 부 (협 동) 연 구 과 제		기관명	연구책임자		연구개발비(단위: 천원)		
		고려대학교	임영희		28,000		
		(주) 삼경코스텍	김명규		47,000		
연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, 명)							
연도	정부출연 연구개발비	기업체부담금			정부의 출연금	합계	참 여 연구원수
		현금	현물	소계			
1차년도	80,000	5,000	22,000	27,000		107,000	7
2차년도	80,000	5,000	22,000	27,000		107,000	9
3차년도	80,000	5,000	22,000	27,000		107,000	10
합계	240,000	15,000	66,000	81,000		321,000	26
총연구 기간	2008.12.20. ~ 2011.12.19. (3년)			(3)차년도 연구기간	2010.12.20. ~ 2011.12.19..		
참여기업	기업체명		기업유형	소재지	연락책임자	전화번호(FAX)	
	(주) 삼경코스텍		중소기업	수원	김명규	010-	
<p>관계규정과 모든 지시사항을 준수하면서 이 연구개발과제를 성실히 수행하고자 해당과제의 연차실적계획서를 제출합니다.</p> <p style="text-align: center;">2011년 12월 19일 주관연구책임자 : 김 정 근 ㉠</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관장 : 한국산업기술대학교 직인 산학협력단장 최준영</p> <p style="text-align: center;">농림수산식품부 장관 · 농림수산식품기술기획평가원 원장 귀하</p>							

<연구개발과제 요약서>

관리번호		공개가능 여부	■가 □부
과제명	상백피 추출물의 효소 가수분해에 의한 피부 미백제 개발		
연구책임자	(성명) 김정근	(주민등록번호)	
	(소속기관명) 한국산업기술대	(전자우편)	(전화번호) 031-8041-0615
	(지역) 경기도	(전공) 생물공학	(학위) 이학박사

○ 연구목표

본 연구에서는 현재 미백제로 널리 사용중인 상백피 (뽕나무뿌리껍질) 추출물을 β -글루코시디아제 효소로 가수분해하여 약 5-10배의 미백효과가 향상된 새로운 미백 화장품 원료를 개발하고자한다. 또한 새롭게 개발된 원료의 미백효능, 멜라닌 생성 효소반응 저해 기작, 급성독성시험, 피부감작 시험, 국소독성 평가를 수행하여 화장품 원료로서의 타당성을 검토하고자 한다. 또한 이를 포함하는 피부 미백 효과가 향상된 천연화장품 제품을 제조하고자함.

○ 연구내용

- ◇ 상백피로부터 유효성분의 효과적인 추출방법 확립
 - ▶ 상백피 유효성분의 효과적인 추출법 개발 (주관, 협동)
 - ▶ 추출물의 분말화 및 결정화 (주관)
- ◇ 상백피 추출법과 효소에 의해 가수분해된 물질의 미백효과, 주름 개선 효과 평가
 - ▶ *In vitro* tyrosinase 활성저해시험을 이용한 피부미백 화장품의 효력평가 (주관)
 - ▶ 방선균 (*Streptomyces bikiniensis* KCTC 9172)을 이용한 melanin 생성 억제 효과 효력평가 (주관, 세부)
 - ▶ Melanocyte 세포배양을 이용한 melanin 생성 저해 능력 평가 (세부)
 - ▶ 세포내 멜라닌 생성 저해시험을 이용한 피부미백 화장품의 효력 평가 (협동)
- ◇ 가수분해 최적 효소 (상업용 펙티나제, 탄네이즈, β -글루코시다아제 중에서)의 선정 및 효소 최적 반응 조건 확립
 - ▶ 상백피 유효 성분 분해에 최적인 상업용 효소 선정 (주관)
 - ▶ 유효 성분 분해를 위한 최적 효소 반응 조건의 확립 (주관)
- ◇ 표준원료 개발 및 원료 표준화
 - ▶ 본 연구 과제를 통하여 규명된 유효성분 및 지표성분을 토대로 표준원료 개발 (주관)
 - ▶ 대량생산/최적생산을 위한 Scale-up/시제품 생산 (협동)
 - ▶ 미백, 주름개선 보조 화장품 개발 (협동)
 - ▶ 표준원료의 효소저해 기작 규명 (세부)
- ◇ 유효성분 및 표준원료에 대한 안전성 평가
 - ▶ 급성독성시험, 피부감작 시험, 국소독성 평가 (세부, 협동)

○ 연구개발에 따른 기대성과

- FTA 체결에 따른 농민 소득 증대 및 농민들을 위한 고소득 대체 작목 개발
- 수입의존도가 높은 화장품 원료산업에 국내 천연자원의 활용을 통한 수입대체 및 우수원료 개발을 통한 수출 증대
- 새로운 우수한 천연원료 이용성 확대를 통하여 소비자 만족도 향상, 국내 화장품 산업 활성화 및 화장품산업과 농림산업과의 연계성 증대
- 생물 공학 기술 (생물전환기술)을 이용한 국내 우수 천연물 화장품원료의 상품화 및 기술이전

색인어 (5개 내외)	한글	상백피추출물, 효소가수분해, 멀베로사이드 A, 옥시레스베라트롤, 옥시레스베라트롤-3'-O- β -glucopyranoside
	영문	Mulberry root extract, Enzyme hydrolysis, Mulberroside A, Oxyresveratrol, Oxyresveratrol- 3'-O- β -glucoside

<연 도 별 실 적>

○ 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	상백피 추출물의 효소가수분해에 의한 피부미백제 개발	상백피로부터 유효지표물질의 분석법 확립	100	Mulberroside A, HPLC 분석법 확립
		상백피로부터 지표물질의 효율적인 추출방법 확립	100	80 % 에탄올에서 2일 상온 추출시 유효성분량 최고
		상백피 산지별 유효성분량비교	100	국내 안동산 제품 우수
		효소처리 후의 미백효과 증가 확인	100	효소처리후 약 10배의 tyrosinase inhibition 저해 활성 증가 (Mulberroside A, oxyresveratrol, hydroquinone, rhapontigenin 등과 미백효과 비교)
		선정된 효소를 이용한 최적 효소반응 조건의 확립	100	효소반응 최적화
		생물전환된 물질의 분리정제 및 구조 확인	100	LC-Mass, H-NMR, C-NMR 확인 (Oxyresveratrol로 확인됨)
		제품의 미백효과 확인 실험	100	Mulberroside A, oxyresveratrol, hydroquinone, rhapontigenin 등과 미백효과 비교

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구개발 수행 내역
2차 년도 (2010)	생물전환된 상백피추출물의 제품화 연구 및 제품 안정화	- Mulberroside A와 oxyresveratrol 의 정제법 확립	100	- 경제적인 정제 공정 개발 (Flash-40이용)
		- Mulberroside A와 oxyresveratrol 정제 샘플 조제 (50g)	100	- 순도 95% 이상 Oxyresveratrol 조제
		- 생성물 A (Mulberroside A에서 당하나만 가수분해된 물질) 제조 및 구조 확인	100	- 생성물 A의 구조 구명 및 샘플제조
		- Mulberroside A와 oxyresveratrol 의 동물실험을 통한 멜라닌 생성억 제 실험	100	- 동물실험을 통한 미백효과 확인
		- 암세포에서의 oxyresveratrol의 항암 효과 시험	100	- 암세포에서의 효과 확인
		- oxyresveratrol의 피부자극성 실험	100	- 동물피부 자극성확인
		- oxyresveratrol 안정성 실험 (pH, 온도, 습도)	100	- Oxyresveratrol의 안 정성 평가
		- oxyresveratrol의 경시변화 확인	100	- Oxyresveratrol의 안 정성 평가

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
3차 년도 (2011)	생물전환된 상백피 추출물로부터 개발된 원료를 이용한 화장품 개발 및 성능 확인	- 생성물 A (Mulberroside A에서 당하나만 가수분해된 물질) 제조 및 구조 확인	100	-oxyresveratrol-3-glucoside구조 규명
		- oxyresveratrol-3-glucoside 효과측정	100	- tyrosinase 활성 억제, 멜라닌 생성 억제 시험을 수행하여 미백효과 측정
		- Oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-glucoside의 항산화 시험	100	- 항산화 test
		- Oxyresveratrol-3-glucoside 안정성 및 제품 특성 검토	100	- pH, 온도, 습도조건에 따른 안정성 측정
		- mulberroside A, oxyresveratrol, oxyresveratrol-3-glucoside를 이용한 시제품 개발	100	- 시제품 제제 개발
		- oxyresveratrol 제제 화장품의 미백효능 비교	100	- 제제 개발 및 제제의 멜라닌 합성 저해 효과측정
		- 학회투고 3편, 특허출원 1건	100	- SCI(E) 3편, - 국내 학회 발표 3편 - 특허 출원 1건
		- 최종 보고서	100	

연구 개발 결과

I. 서론

1. 기능성화장품

1.1. 기능성 화장품의 정의 및 유형

최근 우리나라는 소득이 증가하고 생활 수준의 향상에 따라 남녀노소에 상관없이 아름다움과 자신의 이미지 향상을 위하여 화장품 소비가 증가하고 있다. 더욱이 최근에는 기존의 화장품들과는 차별화된 효능, 즉 피부의 노화 예방 및 개선을 위한 화장품, 얼굴을 희게 하는 미백 화장품, 자외선을 차단하는 제품 등의 기능성 화장품에 대한 요구가 점차 커지고 있다. 이에 따라 기능성 화장품 시장은 점차 확대되고 있으나 아직 소비자의 궁극적인 욕구를 충족시킬 만한 우수한 기능성 화장품 원료의 개발은 없는 실정이다. 이러한 사회적 요구에 따라 보다 좋은 효능의 기능성 화장품 원료를 개발하는 것은 시대적으로나 산업적으로도 매우 필요하다고 사료된다. 기능성 화장품은 피부의 미백, 주름 개선에 도움을 주는 제품과 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품으로 보건복지가족부령에서 정하고 있다[1]. 기능성 화장품은 코스메디컬(cosmedical) 또는 코스메슈티컬(cosmeceutical) 등의 용어로 쓰이고 있다. 코스메디컬이란 화장품을 의미하는 코스메틱(cosmetic)과 의료를 의미하는 메디컬(medical)이 합쳐서 만들어진 말이고, 코스메슈티컬은 코스메틱과 약물을 의미하는 파마슈티컬(pharmaceutical)의 합성어이다. 기능성 화장품은 전 세계적으로 우리나라와 일본에서만 법적으로 규정되어 있는데 일본에서는 기능성 화장품이란 용어대신 약용 화장품이라고 부르고 있다. 기능성 화장품의 유형은 미백 제품, 주름 개선 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 보호하는 제품으로 3가지로 나뉘는데 3가지 유형의 효능 및 효과는 다음과 같다. 미백 제품은 멜라닌 생성 및 산화 방지, 멜라닌 색소 환원, 피부 색소 침착 방지, 피부 칙칙함 개선 등의 효능이 있고 주름 개선 제품은 피부 탄력 강화 및 콜라겐 합성 촉진, 표피 신진 대사 촉진 등의 효능이 있다. 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 보호하는 제품은 자외선 차단 및 산란, 일소 방지, 선텐닝 등의 효능 및 효과가 있다 (Table 1).

Table 1. 기능성 화장품의 효능 및 효과.

유형	효능 및 효과
미백 제품	멜라닌 생성 및 산화 방지 멜라닌 색소 환원 피부 색소 침착 방지 피부 칙칙함 개선
주름 개선 제품	피부 탄력 강화 및 콜라겐 합성 촉진 표피 신진 대사 촉진
선풀 및 자외선 차단 제품	자외선 차단 및 산란 일소 방지 선풀닝

자료: 생리활성 정밀화학 산업기술 로드맵 - 산업자원부

1.2. 기능성 화장품의 시장 규모

2007년 세계 화장품 시장의 규모는 1,515억 달러로 2006년 1,454억 달러보다 4.1% 증가하였다. 세계 화장품 시장규모는 2001년 이후 매년 꾸준한 증세를 보이고 있으며 성장률도 해마다 증가하였다. 세계 기능성 화장품 시장 규모도 해마다 증가하여 2006년 350억 달러에서 2007년에는 약 373억 달러 2008년에는 397억 달러 규모에 달하였다 (Fig. 1).

국내 화장품 시장 규모도 세계 화장품 시장 규모 증가와 비슷하게 증가하는 것으로 나타났다. 경기 침체에도 불구하고 2007년 화장품 시장은 4조 3천 6백억 원으로 전년 대비 2.2% 성장하여 향후 화장품 시장의 성장은 지속될 것으로 예상된다 (Fig. 2). 또한 국내 기능성 화장품 시장은 2004년도 7,151억 원에서 2008년 2008년에는 1조 5,252억 원의 규모로 약 2.1배 비약적인 성장을 하였다. 한편 최근 경기의 침체 속에서 기능성 화장품 시장은 2007년 약 1조 2,649억 원에서 2008년에는 1조 5,252억 원의 규모로 약 20.6% 크게 증가하였다 (Fig. 3). 이처럼 기능성 화장품의 시장 규모가 매년 증가함을 알 수 있고, 기능성 화장품 중 한방 화장품 분야의 성장으로 볼 때 한방, 천연물 원료의 사용이 증가될 것으로 예상된다.

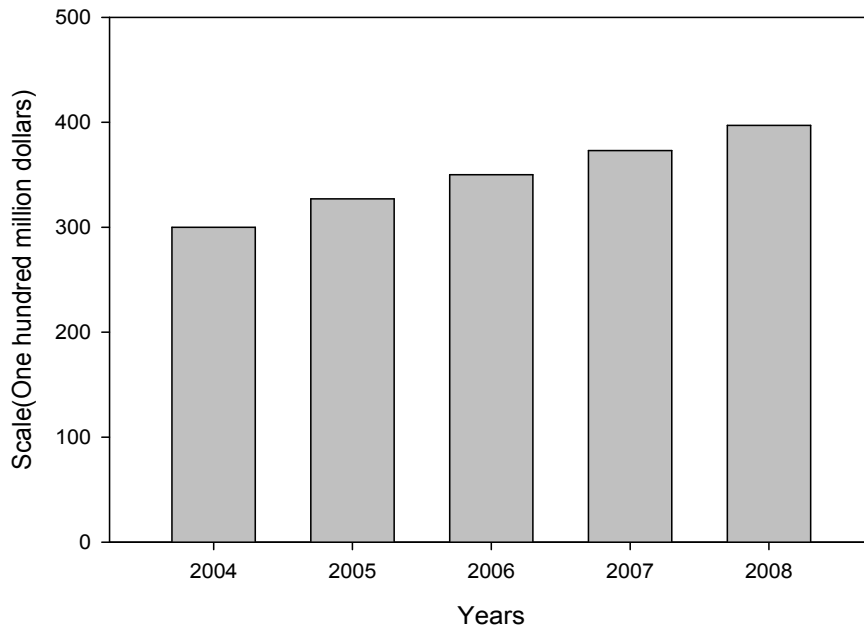


Fig. 1. 년도별 세계 화장품 시장의 변화

자료 : 의약경제보 2007. 6, 한중과학협력센터 자료 토대로 알앤디비즈 추정

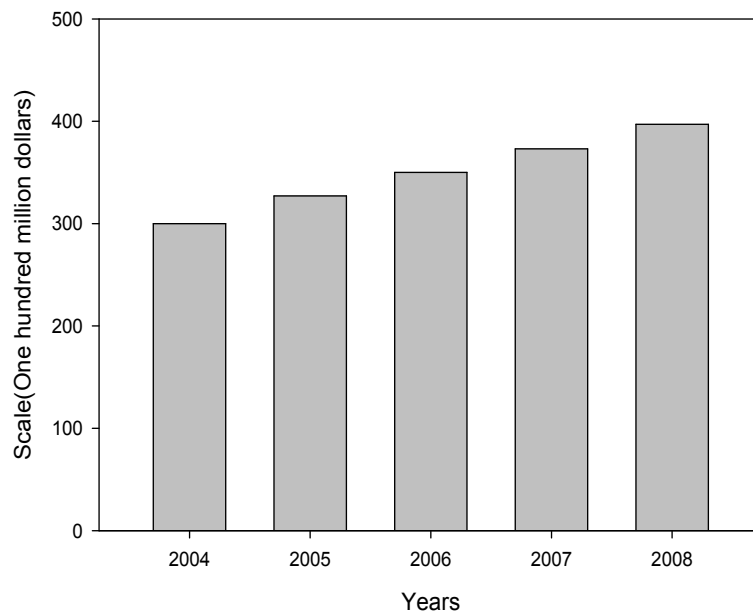


Fig. 2. 년도별 국내 화장품 시장의 변화

자료 : 대한화장품협회, 2008.

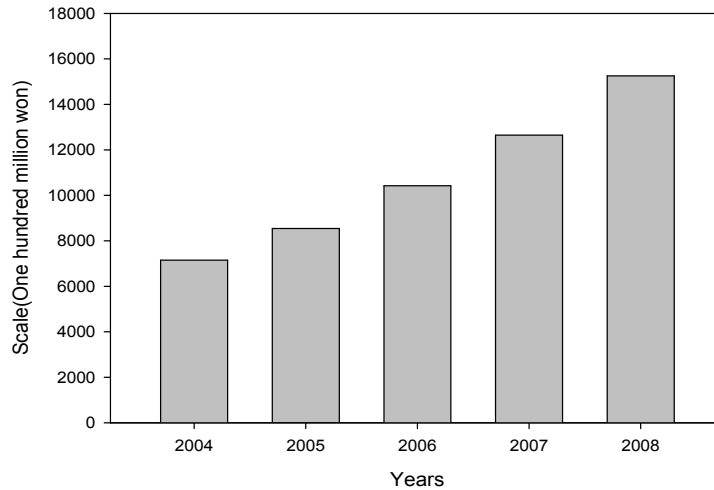


Fig. 3. 년도별 국내 기능성 화장품 시장의 변화

자료 : 의약경제보 2007.

1.3. 기능성 화장품 원료의 종류

화장품법 시행 규칙에 따라 자료 제출이 생략되는 기능성 화장품 고시 원료로는 미백 기능 성분 6종, 주름 개선 기능 성분 4종, 자외선 차단 기능 성분 28종이 명시되어 있다. 미백 기능 성분으로는 닥나무 추출물[2, 3], 알부틴 (albutin)[4, 5], 에칠아스코빌에텔 (ethyl ascoyl ether)[6, 7] 등이 있다. 주름 개선 기능 성분에는 레티놀 (retinol)[8], 아데노신 (adenosine)[9], 폴리에톡실레이트 레틴아마이드 (polychoxylated retinamied), 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)[10~12]가 있다. 자외선 차단 기능 성분에는 글리세릴 파바 (glyceryl PABA)[13, 14], 드로메트리졸 (drometrizole)[15], 디갈로일 트리올리에이트 (digalioyl trioleate) 등이 있다 (Table 2). 이처럼 기능성 화장품에 이용되는 원료는 합성 원료와 천연 원료 등이 있다. 합성 원료는 자연 원료를 화학적인 방법으로 가공하여 만든 가공 원료로서 기존 미백제로 쓰이고 있는 원료들이라 볼 수 있다. 천연 원료는 합성 원료가 아닌 자연 즉, 동식물을 가공하여 만든 원료이다. 천연 원료 중에서도 최근 천연 식물을 통한 새로운 미백 물질의 탐색은 외국 업체들도 많은 관심을 보이고 있으며 국내 업체들도 천연 추출물 성분을 이용한 미백 화장품에 관심을 두고 개발하고 있다. 1990년대 초반까지만 해도 주로 유기 화합물이 주가 되었지만, 1990년대 후반부터 지금까지 천연물을 통한 새로운 미백 성분을 집중적으로 연구하고 있는 것으로 나타났다[16]. 따라서 천연 추출물 미백 화장품 성분 연구가 세계적인 흐름으로 정착될 것으로 전망되고 있다.

Table 2. 기능성화장품 원료 물질의 공시

구분	종류	함량
	닥나무 추출물	2%
	알부틴 (Albutin)	2%
미백 기능 성분	에칠 아스코빌 에텔 (Ethyl ascorbyl ether)	2%
	유용성 감초 추출물 (Oil soluble licorice extract)	0.05%
	Ascobyl glucoside	2%
	Magnesium ascorbyl phosphate	3%
	레티놀 (Retinol)	2,500IU/g
주름 개선 기능 성분	아데노신 (Adenosine)	0.04%
	폴리에톡실레이티드 레틴아마이드 (Polyethoxylated retinamied)	0.2%
	레티닐 팔미테이트 (Retinyl palmitate)	10,000IU/g

(표 계속)

자료: 화장품법 시행규칙

Table 2. 기능성화장품 원료 물질의 공시

구분	종류	함량
	글리세릴 파바 (Glyceryl PABA)	0.5~3%
	드로메트리졸 (Drometrizole)	0.5~7%
	디갈로일 트리오리에이트 (Digalioyl trioleate)	0.5~5%
	3-(4-메틸벤질리덴) 캄파 (3-(4-Methylbenzylidene) camphor)	0.5~5%
	멘칠 안트라닐레이트 (Menthyl Anthranilate)	0.5~5%
	벤조페논-3 (Benzophenon-3)	0.5~5%
자외선 차단 기능 성분	벤조페논-3 (Benzophenon-4)	0.5~5%
	벤조페논-3 (Benzophenon-8)	0.5~3%
	부틸 메톡시디벤조일 메탄 (Bytyl methoxydibenzoy imethane)	0.5~5%
	시녹세이트 (Cinoxate)	0.5~5%
	옥토크릴렌 (Octocrylene)	0.5~10%
	에칠헥실 디메칠 파바 (Ethylhexyl dimethyl PABA)	0.5~8%
	에칠헥실 메톡시신나메이트 (Ethylhexyl methoxycinnamate)	0.5~7.5%
	에칠헥실 살리실레이트 (Ethylhexyl salicylate)	0.5~5%

(표 계속)

자료: 화장품법 시행규칙

Table 2. 기능성화장품 원료 물질의 공시

구분	종류	함량
	에칠헥실 트리아존 (Ethylhexyl triazone)	0.5~5%
	파라아미노벤조익 애씨드 (p-Aminobenzoic acid)	0.5~5%
	2-페닐벤즈이미다졸-5-셀포탁애씨드 (2-Phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid)	0.5~4%
	호모살레이트 (Homesalate)	0.5~10%
	징크 옥사이드 (Zinc oxide)	25%(최대)
	티타튬 옥사이드 (Titanium oxide)	25%(최대)
자외선 차단 기능 성분	이소아밀 p-메톡시신나메이트 (Isoamyl p-methoxycinnamate)	10%(최대)
	비스에칠헥실옥시페놀 메톡시페닐 트리아진 (Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine)	10%(최대)
	디소듐 페닐 디벤지미다졸 테트라설포네이트 (Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate)	산으로10% (최대)
	드로메트리졸리 트리실록산 (Drometrizole trisiloxane)	15%(최대)
	디에칠헥실 부타미도 트리아존 (Diethylhexyl butamido triazone)	10%(최대)
	폴리실리콘-15(디메치코디에칠벤잘말로네이트)	10%(최대)
	메칠렌 비스-벤조트리아졸 일테트라메칠 부틸 페놀 (Methylene bis-benzotriazol tetramethyl butylphenol)	10%(최대)
	테레프탈리덴 디캄퍼설포닉 및 그 염류 (Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid)	산으로10% (최대)

자료: 화장품법 시행규칙

2. 미백 제품

2.1. 미백제품의 정의 및 유형

미백 제품은 멜라닌 색소의 침착을 방지하기 위한 제품이다. 현재 천연 물질을 추출하여 화장품의 원료로 사용하고 있고, 새로운 천연 물질의 개발에 활발한 연구가 진행되고 있다. 천연물이 화장품에 배합되는 목적은 크게 기제를 목적으로 한 것과 기능적인 유효성을 목적으로 한 것으로 나뉜다. 기제로는 각종의 식물유, 당류 등이 있으며, 유효 성분으로는 여러 가지 다양한 물질이 이용되고 있다.

천연 추출물 미백제는 부작용이 적으며 온화하고 지속적으로 작용한다. 그리고 생분해성이 높고 환경 친화적이다. 또한 천연 유래로 인해 이미지가 좋다. 하지만 생육지의 기후나 토양의 환경도 다르므로 산지나 수확 시기에 따라 품질의 차이가 있으며, 보존이나 품질의 향상 또는 특정 성분을 제거하거나 증가시킬 목적으로 행해지는 여러 가지 수치의 방법에 따라서도 품질의 차이가 커서 일정한 품질의 화장품으로 사용되기 위해서는 추출물의 규격 선정 등 취급에 어려움이 있다.

2.2. 미백 제품 원료의 작용 및 기전

피부의 색은 표피에 존재하는 멜라닌의 양과 분포에 의해 거의 결정된다. 멜라닌은 melanos라는 'dark'의 의미를 지닌 그리스어에서 유래되었으며, 1840년에 스웨덴의 화학자인 베르셀리우스 (Berzelius)에 의해 처음으로 사용되었다. 멜라닌은 고분자이며 흑색이나 흑갈색을 띠고 있고 방향성 아미노산인 tyrosine과 연쇄적인 결합에 의해 생성된다 (Fig. 4)[17~21]. 멜라닌은 다음과 같이 매우 다양한 기능이 있다. 멜라닌은 산화 환원 반응에 있어 전자를 주거나 받는 역할, 빛을 흡수하여 열 에너지로 변환시키는 기능, 자외선에 의한 단백질이나 핵산의 손상을 방지하여 세포를 보호하는 기능 등이 있다. 또한 멜라닌은 중금속 이온 등의 강한 이온성 물질과 결합하는 킬레이트로 작용하여 자유 라디칼과 결합하는 항산화제로도 작용한다[22, 23]. 멜라닌이 과잉 생성된 경우에는 색소 침착과 피부암이 생길 수 있다[24~27]. 반면 멜라닌이 비정상적으로 적게 생성되면 백반증과 같은 피부병이 유발된다[28]. 멜라닌 형성 과정 중에는 타이로시나제 (tyrosinase)라는 효소가 중요한 작용을 한다[29~36].

멜라닌 합성에 영향을 미치는 중요한 요인으로 선천적인 요인 외에 자외선과 호르몬이 있다. 특히 태양광선 중에 포함된 자외선 A (320~400nm)와 자외선 B (290~320nm)가 중요하다. 자외선 A는 장파장으로 피부 깊이 침투하여 색소 침착을 일으키고 콜라겐 등

을 손상시킨다. 반면 자외선 B는 파장이 짧고 에너지가 높은 자외선으로 표피와 진피의 상부까지 침투하여 색소 침착 및 일광 화상을 일으키게 한다[37].

2.3. 천연 미백원료 개발의 필요성

최근 산업의 급격한 발달로 대기가 오염되고, 오존층이 심하게 파괴됨에 따라 지표면에 강한 자외선이 조사되어 현대인들의 피부가 심한 스트레스를 받고 있다. 이에 따라 피부가 쉽게 노화되며, 피부에 멜라닌 색소가 침착되어 피부가 검게 변하거나 또는 모공이 미세한 먼지 등에 의해 막혀 기미, 주근깨, 여드름 등과 같은 피부 질환이 빈번하게 유발되고 있다. 기미, 주근깨 등과 같은 피부의 멜라닌색소 과 침착은 외관상 좋지 않을 뿐만 아니라 흰 피부를 선호하는 동양권에서는 정신적으로도 부정적인 영향을 미쳐 사회활동에 불편을 초래하기도 한다. 이러한 피부 질환의 예방과 자외선으로부터 피부를 보호하기 위하여 미백용 화장품, 의약품 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 1990년도 이후, ascorbic acid[38], 코직산(kojic acid)[39,40], 알부틴(arbutin)[41], mulberroside A[42, 43]등 다양한 멜라닌 생성 저해제가 개발되어 이를 함유한 미백화장품이 시판되고 있으나 실질적인 임상효과는 만족스럽지 못한 실정이다. 과도한 멜라닌 색소침착을 개선하기 위한 의약품으로써 하이드로퀴논(hydroquinone)[44], 아젤라인산(azelaic acid), 레티노인산(retinoic acid) 등이 사용되고 있으나 피부의 자극이 심하고, 독성을 갖고 있어 여러 가지 부작용이 유발되고 있다. 따라서 소비자들은 피부에 친화적이고 부작용이 없는 천연원료를 사용한 제품을 선호하게 되었고, 이에 대한 우수한 천연 미백원료의 개발이 시급한 실정이다.

3. 멜라닌(melanin)

3.1 멜라닌의 개요

멜라닌은 페놀류가 산화효소에 의해 산화되어 유도된 갈색 또는 흑색 고분자 색소의 총칭이다. 멜라닌은 그리스어의 "검다"라는 의미의 "mel"과 아민(amine)에서 "anin"으로 유래되었으며 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기 중에 노출될 때 발생하는 갈변 또는 동물의 외피, 깃털, 머리, 피부, 눈 등에서 관찰된다[45~51].

피부의 색은 표피에 존재하는 멜라닌의 양과 분포에 의해서 거의 결정되며 그 밖의 진피의 혈관속에 함유된 헤모글로빈(hemoglobin)과 피하조직의 카로틴(carotene)의 양과 분포에 의해서도 영향을 받는다. 카로틴의 경우는 외부적 인자이지만, 각질층의 두께, 혈관의 분포, 멜라닌 및 헤모글로빈 등은 내부적 인자이다. 이들 중 인체에서 사람의 피부색을 결정하는 가장 중요한 인자는 멜라닌 색소[52]로서, 극히 적은 양으로도 피부색이나 모발색 전체를 결정한다.

사람의 피부색을 결정하는데 가장 중요한 인자로 꼽히는 멜라닌은 자연의 동물계에 널리 분포되어 있는 화합물로서 시스테인과 글루타치온 및 Fe 함유에 따라 갈색에서 흑색의 다양한 색의 농도를 갖는 polymer이다[53]. 멜라닌은 tyrosinase라는 효소의 작용에 의해 생합성 된다. 이 효소의 작용으로 L-tyrosine을 기질로 하여 표피 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)라는 색소세포 내의 소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 생합성 된다. 멜라닌의 구조는 기본적으로 tyrosine에서 생기는 indole 화합물이 3차원 방향에 결합된 polymer이고, 멜라노솜의 효소 단백질이 나선형으로 된 거대분자의 멜라닌 단백질복합체(melanoprotein complex)로서 존재한다(Fig. 4). 이 복합체가 멜라닌 과립으로 되고, 이것이 표피세포로 전달되어 표피세포의 각화과정과 함께 피부의 상층으로 이동하여 각질층의 탈락과 함께 피부 밖으로 배출된다. 멜라노사이트는 나뭇가지 모양의 수지상 세포이며, 그 수지상 돌기는 생성된 멜라닌이 주변의 인지질이나 단백질과 결합하여 피부 밖으로 용이하게 배출되도록 해 준다[54~56]. Tyrosinase에 의하여 생성이 촉진되는 동물 멜라닌은 노란색-적갈색의 페오멜라닌(pheo-melanin)과 갈색-검은색의 유멜라닌(eu-melanin)으로 구분된다. 일반적으로 노란색-적갈색의 페오멜라닌은 가용성이고, 갈색-검은색의 유멜라닌은 불용성으로 알려져 있다. 사람의 멜라닌은 이 두가지 멜라닌의 복합체로서 페오멜라닌과 유멜라닌은 화학적, 물리적 특성에서 차이가 있다(Table 3)[57, 58]. 멜라닌은 단백질과 결합된

형태의 polymer로서 자외선을 포함한 넓은 영역의 빛을 흡수하는 기능이 있어 피부를 자외선의 조사에 의한 피해로부터 방어하고[59, 60]. 건조, 극한 온도 등에 대한 생존능력을 높여주어 피부내의 세포나 조직들을 보호하는 역할을 한다. 또한 커피, 차, 담배등의 색을 좋게 하여 품질은 향상시키기도 한다[57, 58]. 이러한 긍정적인 기능을 가지는 반면에 여러 가지 부정적인 기능도 있다. 멜라닌이 비정상적으로 적게 생성되면 백반증과 같은 피부병변이 유발된다[61]. 반대로 과잉 생성된 경우에는 기미, 주근깨와 같은 색소침착이 일어나며 피부암과도 밀접한 관련이 있다[62~65]. 또한 식품에서는 채소, 과일, 생선 등에서 갈변화 현상을 일으켜 품질을 저하시키는 문제점이 있다[66~69].

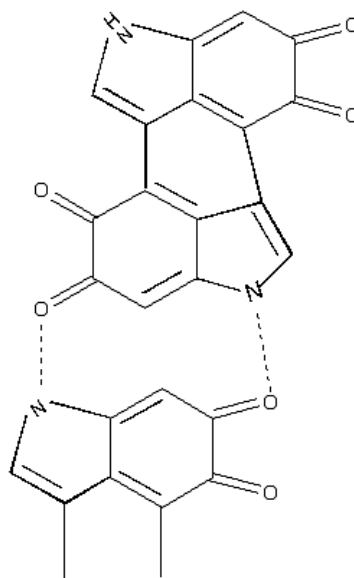


Fig. 4. 멜라닌의 구조

Table 3. Pheo-melanin과 eu-melanin의 비교

Property	Pheo-melanin	Eu-melanin	Specificity
Color of tissue	Yellow to reddish brown	Dark brown to black	Low
Solubility	Soluble in alkali	Soluble in acid and alkali	Low
Elemental composition	C, H, O, N (8~11%) S (9~12%)	C, H, O, N (6~9%)	Low
Ultimate precursor	Cys-DOPA	DOPA 5,6-DHICA	Low High
Monomer unit	Benzothiazine derivatives	5,6-DHICA	High

3.2 멜라닌의 생합성 경로

멜라닌의 생합성은 L-tyrosine을 기질로서 tyrosinase에 의해 L-DOPA로 전환되고 다시 DOPAquinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌이 된다. 이 최초의 반응이 멜라닌 합성의 속도결정 단계이다.

DOPAquinone으로 전환된 후의 반응은 pheo-melanin의 생합성 경로와 eu-melanin의 생합성 경로로 나뉜다. 먼저, pheo-melanin의 생합성 경로는 다음과 같다. DOPAquinone은 glutathione또는 cysteine과 결합하여 cysteinylDOPA로 되고, 여러 단계의 반응을 거쳐 alanyl-hydroxy-benzothiazine이 된 후 pheo-melanin이 생성된다(Fig. 5).

한편, eu-melanin의 생합성 경로는 DOPAquinone이 leuco-DOPACHROME을 거쳐 DOPACHROME을 산화시킨 다음 또 다시 두 경로로 나누어 진다. 하나는 TRP-2(tyrosinase related protein 2, DOPACHROME tautomerase)에 의해 DHICA(5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid)로 전환되고 TRP-1(tyrosinase-related protein 1, DHICA oxidase)에 의해서 Indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화된 후 중합반응에 의해 eu-melanin이 생성되는 경로이다. 또 다른 하나는 DOPACHROME에서 자동산화되어

DHI(5,6-dihydroxy-indole)을 거쳐 tyrosinase 또는 peroxidase에 의해 산화되어 indole-5,6-quinone이 되어 위 경로와 같이 중합반응을 거쳐 eu-melanin이 생성되는 경로이다(Fig. 6)[70~72]. 멜라닌의 생합성은 tyrosinase 외에도 멜라닌의 생성을 촉진하는 DOPAchrome conversion factor와 억제하는 인자인 tyrosinase blocking factor의 영향을 받는다. 또한, prostaglandin(PG), interferon(INF), melanocyte stimulating hormone(MSH), vitamin D3, histamin 등이 멜라닌 색소 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다[73~76].

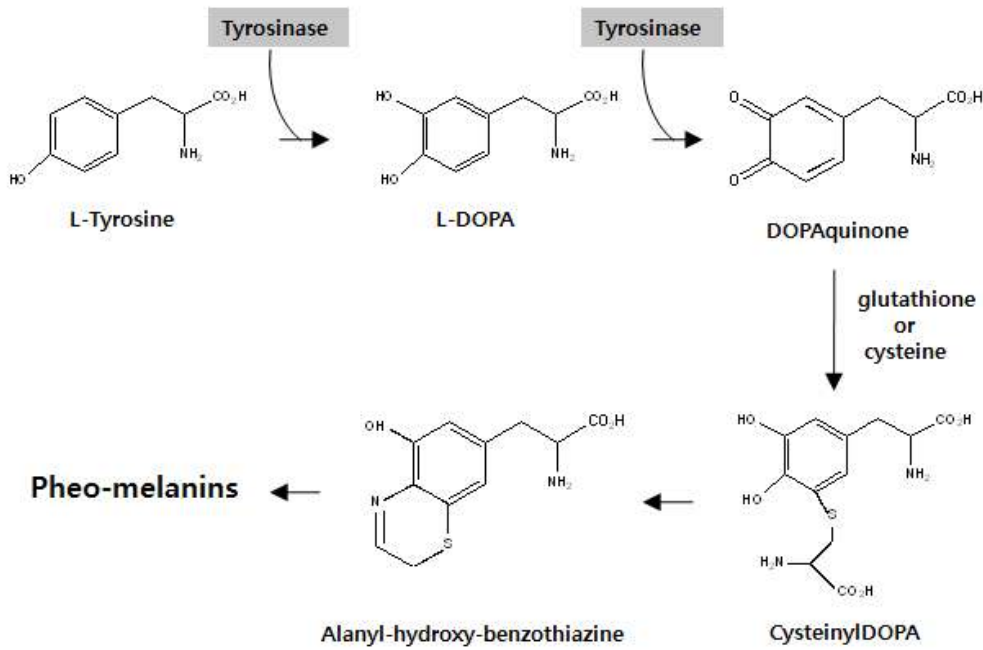


Fig. 5. Pheo-melanins의 생합성 경로.

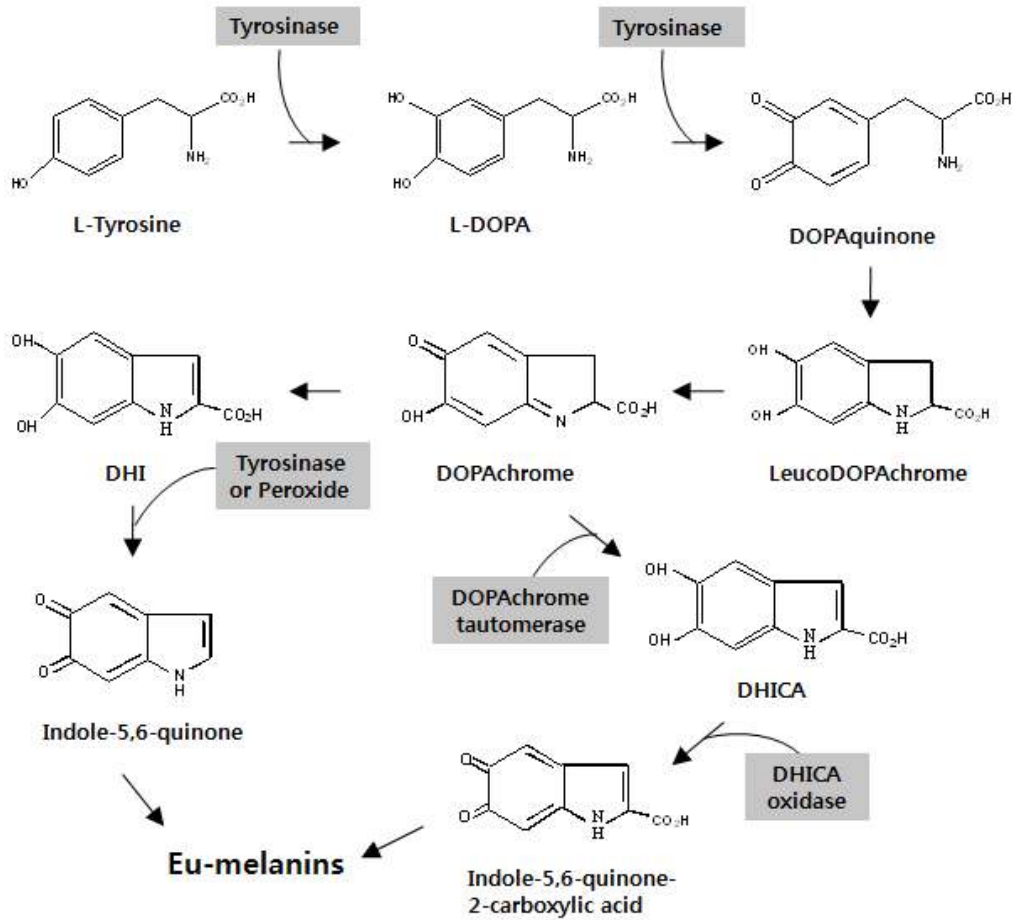


Fig. 6. Eu-melanins의 생합성 경로.

3.3. 멜라닌 생성 억제 기작

피부미백원료의 개발 목적은 자외선에 의한 기미, 주근깨 등을 완화시키고 멜라닌의 생성을 억제하기 위함이다. 피부 미백제는 멜라닌의 생합성 경로에서 작용하는 기작에 따라 구분 할 수 있다.

첫째, 자외선을 차단하여 멜라닌 생성을 억제한다. UV-A 또는 UV-B를 흡수 하거나 산란시켜 멜라닌 과다 생성에 의한 홍반과 염증 반응을 억제한다. 그러나 이러한 기능이 강조된 것은 자외선 차단 화장품에 속하며 미백화장품에서는 보조 성분으로

만 첨가되고 있다.

둘째, 사이토카인(cytokine)의 작용을 조절하여 멜라닌 생성을 억제한다. 사이토카인은 멜라닌 세포에 멜라닌의 합성을 명령하는 신호전달 물질로서 사이토카인의 작용을 억제하면 멜라닌 생성을 억제 할 수 있다.

셋째, tyrosinase의 활성을 저해하여 멜라닌 생성을 억제한다. 멜라닌 생합성 경로에서 L-tyrosine로부터 DOPAquinone으로 전환되는 산화반응을 촉매하는 tyrosinase의 활성을 저해하여 멜라닌의 생성을 억제 한다.

넷째, 자동산화 반응을 억제하여 멜라닌 생성을 억제한다. DOPAquinone이 생성된 이후의 자동산화 반응은 활성산소에 의해 촉진된다. 이때 활성산소를 제거해줌으로써 자동산화 반응을 억제하고 멜라닌의 생성을 억제 한다.

그리고 각질층을 제거하여 각질층과 함께 피부 표면으로 올라온 멜라닌을 제거하는 기작이 있다. 즉, 각질을 제거하고 재생을 촉진시켜 이미 생성된 멜라닌의 배출을 용이하게 해 준다. 멜라닌 생성 억제 실험법으로는 tyrosinase 활성저해 실험, 배양색소세포를 이용한 실험, 실험동물에서의 *in vivo* 실험, 사람피부를 대상으로 한 실험으로 실시되고 있다[77]. 그 중 tyrosinase활성저해 실험이 비교적 간단하고 안전하여 멜라닌 중합체 억제제 개발의 초기 탐색단계에서 채택되고 있다[78].

일반적으로 tyrosinase 활성저해의 메카니즘(mechanism)은 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째는 tyrosinase의 활성부위에 포함되어 있는 Cu이온에 킬레이션(chelation)되는 것이다. 이의 대표적인 물질로는 코직산이 있다. 둘째는 Cu이온과 킬레이션 되는 경우가 약하거나 없는 경우이다. 이의 대표적인 물질로는 알부틴이 있다.

3.4. Tyrosinase

Tyrosinase는 미생물, 식물 및 동물 등 거의 모든 생물 종에 분포되어 있으며, 한 쌍의 Cu이온을 함유하고 있는 금속함유 단백질(metalloprotein)이다[79].

Tyrosinase는 멜라닌의 생합성 경로에서 성질이 다른 두 가지 활성을 나타낸다[80]. 하나는 monophenol을 hydroxylation시켜 o-diphenol로 전환시키는 monophenolase 활성이고, 다른 하나는 o-diphenol을 oxidation시켜 o-quinone으로 전환시키는 diphenolase 활성이다[81, 82]. 두 가지 활성 중 monophenolase 활성은 tyrosinase의 속도조절 단계에 작용하는 활성으로 효소와 기질의 농도에 영향을 받는다[83~86].

Tyrosinase는 활성부위 안에 포함하고 있는 Cu이온의 형태와 포함하고 있는 산소에 따라 catalytic cycle에서 3가지의 form을 가진다. 활성화 된 형태인

oxy-tyrosinase(E_{oxy} , $Cu^{2+}-O_2-Cu^{2+}$)는 한 쌍의 Cu^{2+} 와 산소를 포함하고 있다. 비활성화 된 deoxy-tyrosinase(E_{deoxy} , Cu^+-Cu^+)는 Cu^{2+} 이온이 환원된 형태인 Cu^+ 이온으로 존재하며 산소를 포함하고 있지 않다. 마지막으로 met-tyrosinase(E_{met} , $Cu^{2+}-O-Cu^{2+}$)가 있다(Fig. 7)[87, 88].

L-tyrosine과 같은 monophenol은 oxy-tyrosinase의 활성부위에 접근하여 Cu^{2+} 이온과 chelation된 후 oxidation되어 물을 배출하고 diphenol로 전환된다. Diphenol은 다시 oxidation되어 멜라닌 전구물질인 o-quinone 유도체로 바뀌고 이 때 oxy-tyrosinase는 Cu^{2+} 이온이 환원되면서 비활성화 형태인 deoxy-tyrosinase로 전환된다. 비활성화 된 deoxy-tyrosinase는 호흡작용에 의해 산소를 공급받아 oxy-tyrosinase로 다시 활성화되어 monophenol과 다시 반응하게 된다[89].

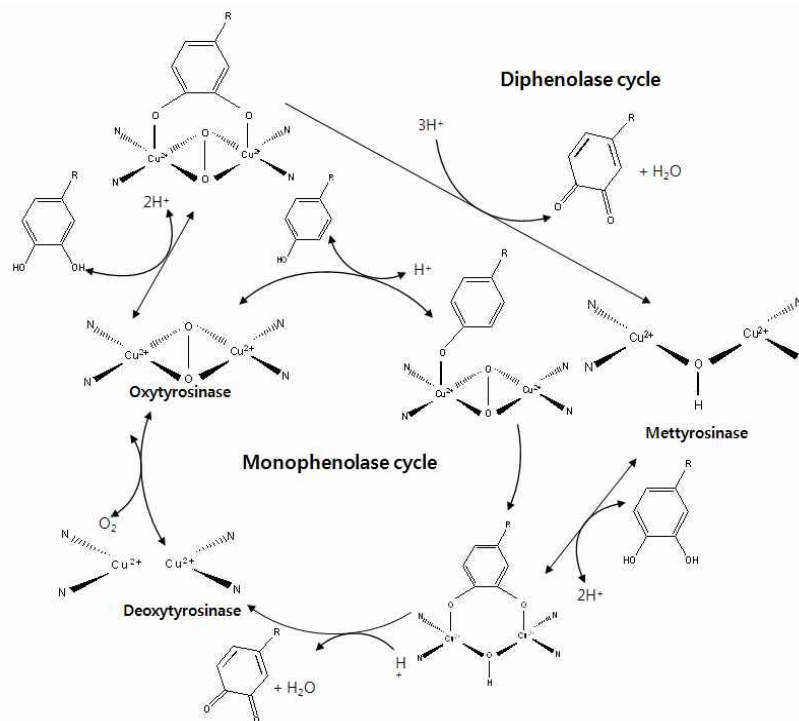


Fig. 7. Tyrosinase 활성 촉매 사이클 .

3.5. Tyrosinase inhibitors

가장 오래전부터 미백원료로 사용되어온 물질인 ascorbic acid는 tyrosinase 활성저해와 더불어 강력한 환원작용으로 이미 생성된 멜라닌을 환원형 멜라닌으로 환원시켜 색을 열게 해 준다(Fig. 8). 그러나 ascorbic acid는 유산소조건 하에서 매우 불안정하고, 친수성으로 피부를 통한 흡수가 어렵다. 이런 단점을 보완하기 위해 ascorbic acid의 OH기를 다른 물질로 치환한 유도체들이 개발되었다. 대표적으로 2번째 OH기를 치환한 ascorbyl glucoside, ascorbyl phosphate와 3번째 OH기를 치환한 ethyl ascorbyl ether가 있다. 또한 지방산과 ester form으로 형성된 ascorbyl palmitate, ascorbyl stearate가 있다. 이들은 반응기가 차단되어 있어 화학적으로 매우 안정하다(Fig. 9).

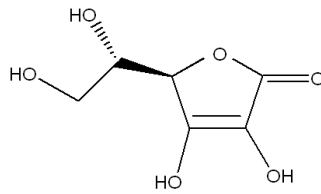


Fig. 8. Ascorbic acid 화학적 구조.

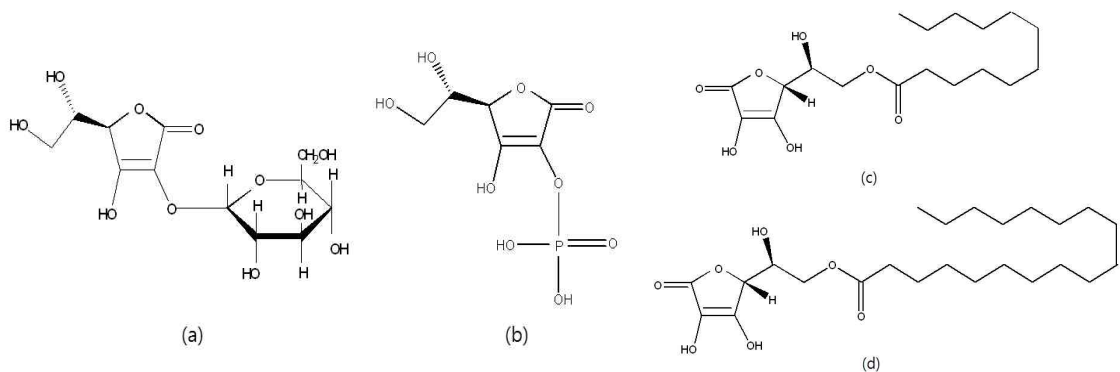


Fig. 9. Ascorbic acid's 유도체의 화학적 구조.

(a); ascorbyl glucoside, (b); ascorbyl phosphate,
(c); ascorbyl palmitate, (d); ascorbyl stearate.

멜라닌 색소를 억제하는 능력에 있어서는 하이드로퀴논과 코직산이 가장 확실한 연구결과를 가지고 있다. 하이드로퀴논은 tyrosinase의 diphenolase 활성을 저해하여 L-DOPA가 멜라닌으로 전환되는 것을 방지한다(Fig. 10). 반면, 코직산은 tyrosinase의 활성 form인 oxy-tyrosinase에 Cu^{2+} 과 킬레이션 되어 tyrosinase의 활성을 저해한다(Fig. 11). 그러나 코직산은 간암유발의 부작용 때문에 사용이 금지되었고, 하이드로퀴논은 세포내 자극이 심하여 의약품으로 5%미만 첨가가 허용되었다.

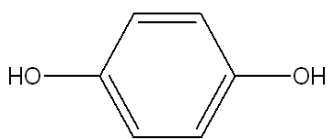


Fig. 10 Hydroquinone의 화학적 구조.

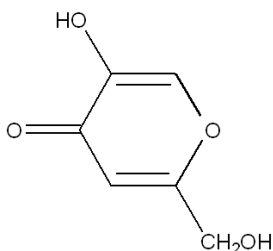


Fig. 11. Kojic acid의 화학적 구조..

하이드로퀴논과 코직산의 멜라닌 색소 억제능 보다는 떨어지지만 부작용이 없는 천연 추출 성분으로는 알부틴, 상백피 추출물, 감초 추출물 등이 있다. 알부틴은 월굴나무 (cowberry)잎, 덩굴월굴(cranberry)잎 등에서 추출한 천연 식물성분이다(Fig. 12). Tyrosinase의 monophenolase 활성을 저해하여 멜라닌의 합성을 억제한다[51]. 하이드로퀴논에 친수성 당이 붙어있는 구조로 하이드로퀴논의 자극감과 여러 가지 부작용이 소실되는 장점이 있어 식약청 미백원료로 고시되었다.

상백피는 뽕나무과(Moraceae)에 속한 뽕나무 및 동속근연식물의 뿌리를 건조한 것으로 소염, 발모촉진, 비듬, 가려움방지, 해열, 진통작용이 있어 천연 약제로도 사용되고 있다(Fig. 13). 또한, 상백피 추출물 중에 존재하는 stilbene 계열의 화합

물인 oxyresveratrol이 tyrosinase의 활성을 저해한다는 연구가 보고되었다[52~55]. 알부틴과 함께 식약청 미백원료로 고시되었다.

감초는 상백피와 마찬가지로 소염, 항바이러스 효과 등의 작용이 있어 동양과 서양에서 천연 약제로 사용되어져 왔다. 감초 추출물 중 가장 많은 양을 차지하고 있는 glabridin이 tyrosinase 활성을 저해하여 멜라닌 생성을 억제한다. 또한, 소수성 물질중의 하나로서 세포투과성이 좋다는 장점이 있다(Fig. 14).

이밖에도 대황뿌리추출물, 녹차추출물, 비타민E, coenzyme Q₁₀, α-hydroxy-acid, 아젤라인산, 레티노인산, 살리실산(salicylic acid)등이 tyrosinase 활성저해 및 여러 가지 작용으로 인한 미백효과가 있는 것으로 알려져 있다.

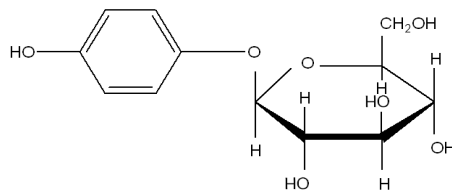


Fig. 12. Arbutin의 화학적 구조..

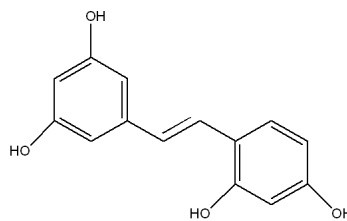


Fig. 13. Oxyresveratrol의 화학적 구조.

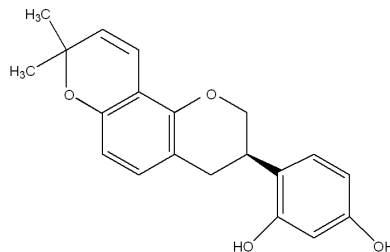


Fig. 14. Glabridin의 화학적 구조.

3.6. 미백원료 개발과 연구 동향

최근 웰빙(well-being)에 대한 관심이 높아지면서 여러 가지 분야에서 천연 소재에 관한 연구가 주목을 받고 있다. 특히, 사람이 직접 섭취하는 식품과 피부에 직접 바르는 화장품은 인체에 해를 끼치지 않는 안전한 천연성분을 원료로 하는 제품들이 인기를 끌고 있고, 이에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다. 또한, 평균수명의 증가로 인한 피부미용에 대한 관심증가와 환경오염에 따른 피부의 자외선 노출 증가로 인한 피부의 광노화 증가는 피부 미백에 대한 관심을 더욱 증가시키고 있다. 이에 따라 피부에 친화적이고 안정적인 미백원료를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 연구 개발에 의해 최근 민간에서 오랫동안 약재로 사용해 오던 식물들의 생리활성들이 피부과학적으로 입증되면서 그 식물들로부터 유효성분을 농축하거나 분리해 화장품 등에 이용하고 있다. 이와 같은 국내 우수한 방원료를 이용한 제품들은 부작용이 없는 천연 추출물로 소비자들의 욕구를 충족시키면서 그 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 현재 우리나라에서 천연 미백화장품의 미백원료로 사용되고 있는 한방 소재로는 월귤나무 유래의 알부틴[4], 상백피 추출물[5, 6], 대황뿌리 추출물[56], 감초 추출물 등이 있다.

우리나라에는 우수한 천연 소재들이 많이 있고 그 중에서도 한방 소재의 경우는 그 우수성을 세계적으로 인정받고 있다. 그러나 이러한 소재들에 대한 체계적인 연구 관리가 이루어지지 못하여 이들에 대한 과학적 기반 정도가 매우 빈약한 실정이다. 반면 미국, 유럽, 일본 등을 비롯한 과학 기술 선진국들은 이미 오래전부터 천연 자원으로부터 약리 활성을 가지는 물질들을 규명하고 이에 대한 data base를 구축하여 천연 추출물 자체를 치료용 의약품 등에 응용하거나, 이를 바탕으로 한 다양한 유도체의 합성 등에 응용하고 있다.

기초 과학적 기반 기술 및 정보화가 빈약한 우리나라는 우리 한방 소재의 포괄적이면서 체계적인 연구 관리를 통해 이를 산업에 응용 할 수 있는 기반 정보를 확보할 필요가 있다. 현재 국내외 미백원료 연구개발 방향은 세포에 독성이 없이 멜라닌을 억제 할 수 있는 천연 소재로 기울고 있다.

그러므로 미백효과나 피부질환의 예방, 치료 효과의 극대화와 부작용의 최소화를 위하여 전통적으로 안전성이 검증되어 있는 한방 소재를 중심으로 미백 및 피부질환에 효과가 있는 활성 물질의 동정과 작용기전, 치료효과의 과학적 검증이 필요하다.

4. 생물전환

4.1. 생물전환의 정의 및 연구동향

생물전환 (biotransformation 또는 bioconversion)은 미생물이 갖고 있는 효소적 기능을 이용하여 전구 물질로부터 원하는 유용 산물을 제조하는 기술을 말한다. 생물전환 공정은 기존의 발효 공정과 비교해 볼 때, 발효 공정이 상대적으로 간단한 원료 물질에서 출발하는 반면 생물전환 공정은 미생물 또는 효소의 기질에 대한 선택성을 이용하여 전구 물질에서 산물을 생산한다는 점에 차이가 있다. 최근 저공해, 저에너지의 청정 산업 기술의 시대적 요구에 따라 기존의 화학 합성 공정을 생물전환 공정으로 점차 대체되고 있다. 따라서 생물전환 기술은 유용 물질 생산을 주요 목적으로 하여 현재의 생물 공업을 구성하는 주요한 공정 과정이라 할 수 있다[38~42].

미생물을 이용한 생물전환 기술은 여러 분야에서 폭넓게 이용되고 있는데 유해한 물질을 비독성 물질로 바꾸는 생물학적 교정 (bioremediation), 정밀 화학품 제조, 식품 가공, 그리고 의약품 생산 등이 주요 응용 분야이다. 특히 의약품 개발에 있어서 생물전환 공정은 여러 가지 방법으로 이용되어 의약품의 유용성 및 효과성을 향상시키는 데 기여할 수 있다. 기존 의약품의 유도체를 만들거나 또는 유용한 특성을 갖는 새로운 물질을 개발하는데 이용되며 의약품 또는 정밀 화학품 제조 시 화학 합성 방법에 비하여 경제성 및 안전성 측면에서 유리하다.

4.2. 생물전환의 연구 개발 필요성 및 중요성

20세기 유기 합성 기술은 산업의 발전에 크게 기여하여 인간의 생활을 보다 풍요롭고 윤택하게 하였다. 그러나 유기 합성 기술은 에너지 소모형이고 환경과의 조화에 있어 여러 가지 문제점이 대두되었다. 따라서 유용 물질의 생산에 있어서 유기 합성 방식이 아닌 새로운 생산 기술의 개발이 요구되고 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위해 최근 미국 유럽 일본 등의 기술 선진국을 중심으로 개발되고 있는 청정 기술 (clean technology)의 핵심 기술로써 효소를 이용한 생물전환 기술의 개발이 집중적으로 추진되고 있다.

기존의 유기 합성은 금속 등의 촉매를 사용하여 고온 고압에서 화학 반응을 하는 것이다. 그에 반해 생물전환 기술은 생체 촉매를 사용하여 상온 상압에서 생화학 반응을 하는 것이다. 생성물의 농도는 유기 합성보다 낮지만, 에너지 이용 면에서 에너지 절약형이고 반응 특이성이 높고 생성물의 종류가 천연·비천연물이며 사용 장치의 규모가 소규모라

는 점과 환경 친화적이라는 가장 큰 장점을 가지고 있다.

생물전환 기술 연구 개발의 필요성 및 중요성으로는 기술적, 경제적·산업적, 사회 문화적 중요성으로 크게 나눌 수 있다. 먼저 기술적 중요성으로는 현재 요구되고 있는 친환경적, 청정 산업 기술의 대한 문제점을 가지고 있는 공해 유발성, 고에너지 소비형인 유기합성 공정을 신공정으로 변환하기 위해 기술의 개발이 요구된다. 현재 의약품, 의약품 원료 물질, 비타민, 유용 아미노산, 인지질 및 생물 화학 제품이 심도있게 연구되고 있다. 다음으로는 경제적·산업적 중요성으로 생물전환 기술은 고부가 가치 신생물 소재이므로 국제적 경쟁력을 가질 수 있다. 마지막으로 국민 복지와 의류, 건강 생활의 향상, 환경 보호를 위해 사회 문화적으로도 큰 중요성을 가지고 있다.

4.3. 생물 전환의 연구 사례

최근 들어 생물전환 연구 중에서 가장 각광을 받는 분야는 광학적 활성을 갖는 의약품의 생산 연구이다. 이 기술은 효소의 광학적인 반응 특이성을 이용하여 광학적인 이성질체의 혼합체인 라세믹체로부터 순수한 광학 이성질체인 chiral drug을 생산하는데 사용된다. 생물전환 기술을 이용한 광학적으로 활성이 있는 물질을 제조하거나 라세믹 혼합물을 분리하는 예로써 식품 산업 및 항생제 생산에서 중요한 역할을 하는 hydantoin, α -aminocarboxylic acid, L-carnitine, oxazolidinone, 그리고 aryloxypropionic acid 등을 들 수 있다[43].

생물 전환 기술은 미생물이나 효소를 통해 구조의 형태가 전환되어 새로운 물질을 얻기도 한다. 미생물이나 효소를 사용한 생물전환 기작에 의해 구조를 변형시킬 수 있다. 연구의 예로, 대항뿌리 추출물의 주성분인 rhapontin이 효소 가수분해를 통해 rhapontigenin을 제조하였다[44]. 다른 연구에서는 미생물 생균제를 이용하여 인삼 사포닌의 배당체 형태를 무배당체 형태로 전환시켜 새로운 물질을 얻었다. 즉, 인삼 사포닌의 ginsenoside-Rb₁ 물질을 β -glucosidase로 가수분해하여 K, Rg₃, Rh₂ 등의 저분자 사포닌으로 전환됨을 확인할 수 있었다[45]. 또한 최근 들어 그 맛과 효능을 인정받고 있는 막걸리에서 β -glucosidase 활성이 있는 유산균 (*Lactobacillus buchneri*)을 분리하여 saponin의 효소 전환 활성을 알아보고 이 유산균의 분리 및 동정하는 실험 등을 하고 있다[46]. 또한 배당체 천연 약물의 효소적 합성, 불용성 약물들을 당화시켜 용해도를 증가시킨 prodrug의 개발, 무공해 비이온계 계면 활성제 개발, 탄수화물 합성 중간체도 개발하였다. 한편, 발효한 추출 발효액의 알코올 대사 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과, 발효 전 추출물보다 추출 발효액의 ADH 및 ALDH에 대한 알코올 대사 효소 활성이 증가하여 기능성 약재로 개발 가능성을 나타내었다.

5. 상백피

5.1. 상백피의 종류 및 미백효과

상백피는 뽕나무과의 뽕나무 (*Morus alba* L.)[47-51] 또는 동속 식물의 뿌리껍질을 말린 한약재로 혈압 강하, 이뇨, 소염, 항균 및 진해, 진통, 해열 작용 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근 피부 보습과 미백에 뛰어난 효과가 밝혀져 미백제의 개발에 관심이 큰 물질이다 (Fig. 15). 지금까지 알려진 상백피 추출물 내의 주요 미백성분은 mulberroside A, asragalin, piceide 등이다. 그 중 mulberroside A는 glycosylated stilbene으로 *Morus alba* 뿌리 추출물의 주요 구성 요소 중 하나로 현재 국내에서 피부 미백 화장품의 원료로 사용되고 있다 (Fig. 16).

뽕나무 뿌리에서 유효성분만을 농축시킨 물질로서 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하고 있는 뽕나무 뿌리에서 유효성분만을 농축시킨 물질로서 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하고 있는 효소인 티로시나아제를 억제하여 햇빛이나 멜라닌으로 인한 색소 침착 등을 개선해 주고 방지해 주는데 탁월한 성분이다.

뽕나무 뿌리를 건조시켜 추출 정제한 약리성분으로 소염, 해열, 진통 작용이 있어 자극에 달아오른 피부를 진정시키고 또한 타이로시나제의 활성을 저해하여 멜라닌 세포의 생성을 억제시켜주며 활성 산소 제거 기능에 의해 과산화 지질의 형성을 막아 맑고 깨끗한 피부결로 가꾸어준다.

뽕나무 뿌리의 껍질인 상백피는 화이트닝 화장품의 성분으로 자주 언급될 정도로 미백 기능이 뛰어난 재료이다. 특허청이 발표한 “천연물 신기술 동향조사 보고서”에 따르면 기능성 화장품에 사용하기 위해 개발된 천연물의 종류는 100여 가지가 넘으며 이중 상백피를 이용한 특허출원이 현재까지 가장 많은 것으로 나타났다고 한다[49, 50]. 기능성 화장품 관련 세부기술 중 특히 미백제 관련 기술에 상백피를 많이 활용한 것으로 나타났다.

상백피 추출물은 멜라닌 생성억제, 미백효과와 함께 보습효과까지 뛰어나다. 더불어 피부에 산화작용을 막아주고 예민한 피부를 진정시켜주는 작용도 한다. 상백피 추출물은 항균작용과 항염작용이 있는데 피부화농균인 황색포도상구균과 피부 상재균으로 여드름을 발생시키는 *propionibacterium acnes*에 우수한 효과가 있다고 한다. 상백피 추출물에는 천연보습인자 (NMF)를 구성하는 성분 중 그 함량이 가장 많은 아미노산류가 풍부하게 함유되어 있어 피부보습 특히, 항상성 (homeostasis) 유지에 중요한 역할을 담당하고 있으며 따라서 건성피부 와 아토피성 피부염 등의 다양한 피부 트러블에 효과적인 작용을 한다고 한다[52-55].



Fig. 15. 상백피(*Morus alba* L. root)의 사진

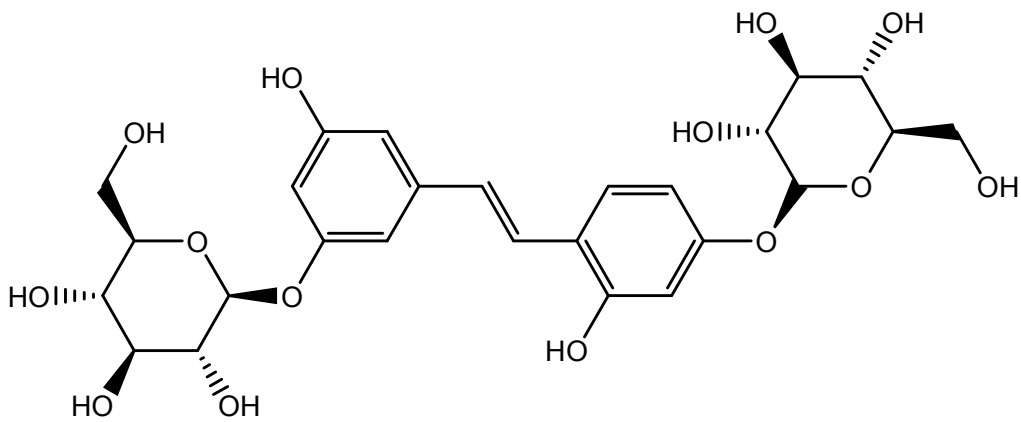


Fig. 16. Mulberroside A의 화학적 구조.

5.2. 스틸벤의 정의 및 유도체

스틸벤 (stibene)이란 화학식이 $C_{14}H_{12}$ 인 방향족 탄화수소로 시스형과 트랜스형 두 가지 이성질체가 있는데 방향족 화합물로서는 가장 오래 전부터 알려진 것의 하나이다 (Fig. 7, 8). 1,2-다이페닐에틸렌이라고도 하며 시스형은 아이소스틸벤이라고하고 액체이지만 쉽게 자리 옮김하여 스틸벤이 된다. 트랜스형을 접촉 환원시켜 합성한다. 트랜스형은 흰색 가루로, 물에는 잘 녹지 않지만 유기용매에는 비교적 잘 녹는다. α -페닐신남산의 탈탄산에 의해서 합성된다.

이성질체의 성질에도 다소 차이가 나는데 시스형보다 트랜스형이 안전하다. 열이나 할로젠화수소의 존재로 시스형이 트랜스형으로 변하는데 자외선을 조사하면 반대로 트랜스형이 시스형으로 변한다. 스틸벤 유도체의 주요 효능은 지방 과산화 억제 및 라디칼소거능 등의 항산화 작용, 혈당 저하 효과에 의한 항당뇨 작용, cyclooxygenase 저해에 의한 항염증 작용, 암세포 성장 억제 및 암 예방 효능 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다[56].

스틸벤은 주로 고등식물의 잎, 나무껍질, 목질 부분에 존재하며 생물학적으로 활성을 가지는 이차적 부산물로서 식물체내에서는 resveratrol과 같은 유도체의 형태로 존재한다 [57]. phytoalexin이란 식물체내에서 다양한 스트레스에 반응하여 합성되는 물질인데 식물체에 존재하는 스틸벤 유도체 (stilbene derivatives)는 바로 이의 일종이라 할 수 있다 [58]. 변재 (heartwood)에 스틸벤 유도체의 축적은 썩는 과정에 저항하는 메카니즘의 과정으로 설명된다. 이러한 화합물들은 또한 미생물 병원체 (microbial pathogen)에 의한 손상이나 집락 형성 (colonization)에 대한 반응으로 만들어지기도 하는데, 다양한 종류의 곰팡이의 침입, 특히 집락 형성 조직과 살아있는 조직 사이의 상호작용을 하는 동안 스틸벤 유도체들이 많이 축적되는 것을 볼 때 이것들이 식물체에 있어 죽음에 저항하는데에 중요한 잠재적인 역할을 함을 추측해 볼 수 있다.

트랜스형의 스틸벤 유도체들은 다음과 같다 (Fig. 17). 트랜스형의 스틸벤 기본구조에서 서로 다른 작용기 위치와 종류에 따라 물질이 바뀔 수 있다. oxyresveratrol과 resveratrol은 R_3 의 작용기에 따라 결정이 된다. R_3 의 작용기가 OH일 경우는 oxyresveratrol이지만 H일 경우는 resveratrol이 된다. 또한 rhapontigenin과 rhaponticin의 경우도 R_4 의 작용기에 따라 결정이 됨을 알 수 있다. rhaponticin의 R_4 자리에 붙어있던 당이 떨어진 위치에 H가 붙으면서 rhapontigenin이 된다. 이런 구조적 유사점을 이용하여 유기합성을 통해 물질을 만들어 내고 있다.

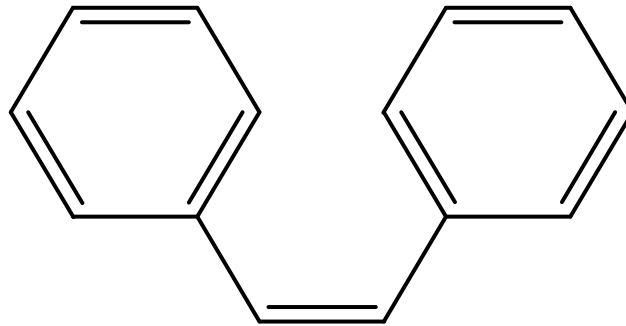


Fig. 17. (Z)-stilbene (cis-1,2-Diphenylethylene)의 화학적 구조.

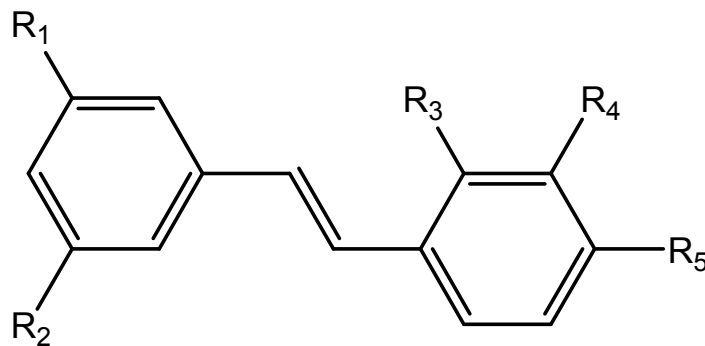


Fig. 18. Stilbene derivatives의 화학적 구조..

Table 4. Stilbene derivatives의 화학적 구조 차이..

Compound	Substituent				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Oxyresveratrol	OH	OH	OH	H	OH
Resveratrol	OH	OH	H	H	OH
3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilbene	OH	OH	H	H	OCH ₃
3,4'-Dimethoxy-5-hydroxystilbene	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃
Trimethylresveratrol	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃
Piceid	OGlc	OH	H	H	OH
Rhapontigenin	OH	OH	H	OH	OCH ₃
Rhaponticin	OH	OH	H	OGlc	OCH ₃

6. Oxyresveratrol

6.1 Oxyresveratrol의 연구사례 및 효과

Oxyresveratrol은 2',3,4',5-tetrahydroxystilbene으로 mulberroside A의 aglycone이다 (Fig. 19). Oxyresveratrol은 resveratrol과 유사한 구조로 되어 있어 합성시 이 물질을 원료하여 제조하기도 한다[59].

Oxyresveratrol은 항산화 작용이 있어 radical을 가지고 있는 reactive oxygen species (ROS)-와 reactive nitrogen species (RNS)- 속성을 제거하여 ROS와 RNS의 잠재적인 보호제로 제안되었다[60]. Oxyresveratrol은 산화 방지 및 antinitrosative 활동을 통해 일시적 뇌 국소 빈혈에 neuroprotective 효과를 보이고 mitochondria에서 사이토크롬과 caspase-3 활성화를 제한하여 apoptotic 세포의 죽음을 막았다[61]. 또 다른 연구에서는 oxyresveratrol의 항염증 활동을 보고했다[62]. 최근 resveratrol 보다 뛰어난 tyrosinase 저해 활성, 항산화 활성을 갖는 것으로 보고되어져 피부 미백제로 사용되고 있다[63~66].

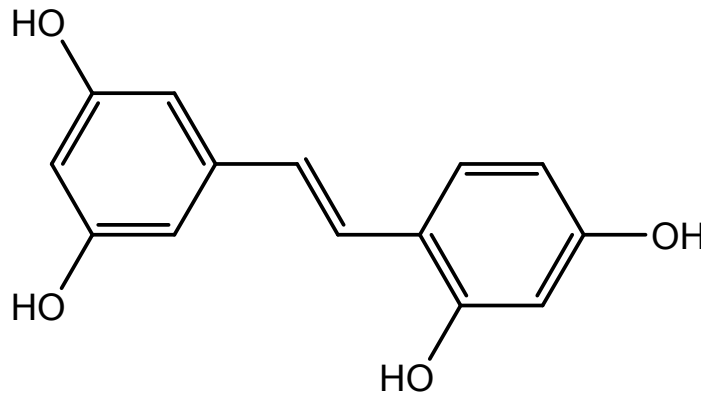


Fig. 19. Oxyresveratrol의 화학적 구조...

7. 연구목적

현재까지 알려진 뛰어난 tyrosinase 저해제로는 arbutin, hydroquinone[67], kojic acid[68, 69] 등이 있다. 그러나 현재 kojic acid는 발암 가능성 때문에 사용이 금지되었고 hydroquinone은 자극성과 안전성 때문에 그 사용이 제한적이며 arbutin은 미백 효과가 매우 낮은 문제점 등이 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 높은 tyrosinase 저해 활성과 안전성 및 경제성이 있는 새로운 저해제 개발이 요구되고 있다.

최근 천연물인 상백피 추출물이 tyrosinase 저해 활성이 우수하고 자극성이 낮고 안전성이 있다고 연구 발표되었다. 따라서 상백피 추출물은 미백제로 현재 다양한 화장품에 첨가되고 있으며 미백 효과의 주성분은 mulberroside A로 밝혀졌다.

또한 mulberroside A는 2개의 당을 함유하고 있어 β -glucosidase를 이용하여 가수 분해하면 oxyresveratrol이 될 것으로 추정하였다 (Fig. 20). 이에 따라 상백피 추출물을 효소로 가수 분해하여 기존의 물질보다 우수한 미백 화장품 원료를 개발하고자 하였다. 생물 전환 시킨 후 새롭게 생성된 물질의 분리 정제를 실시하고 이의 분석을 통해 물질 구조를 규명하였다. 또한 생물 전환 전, 후의 tyrosinase 저해 활성과 멜라닌 색소 생성 저해 실험 및 정제된 mulberroside A와 oxyresveratrol에 tyrosinase 저해 활성, 멜라닌 색소 생성 저해, 항균 효과 등의 실험을 실시하여 기능성 화장품으로써의 개발 가능성을 검토하였다.

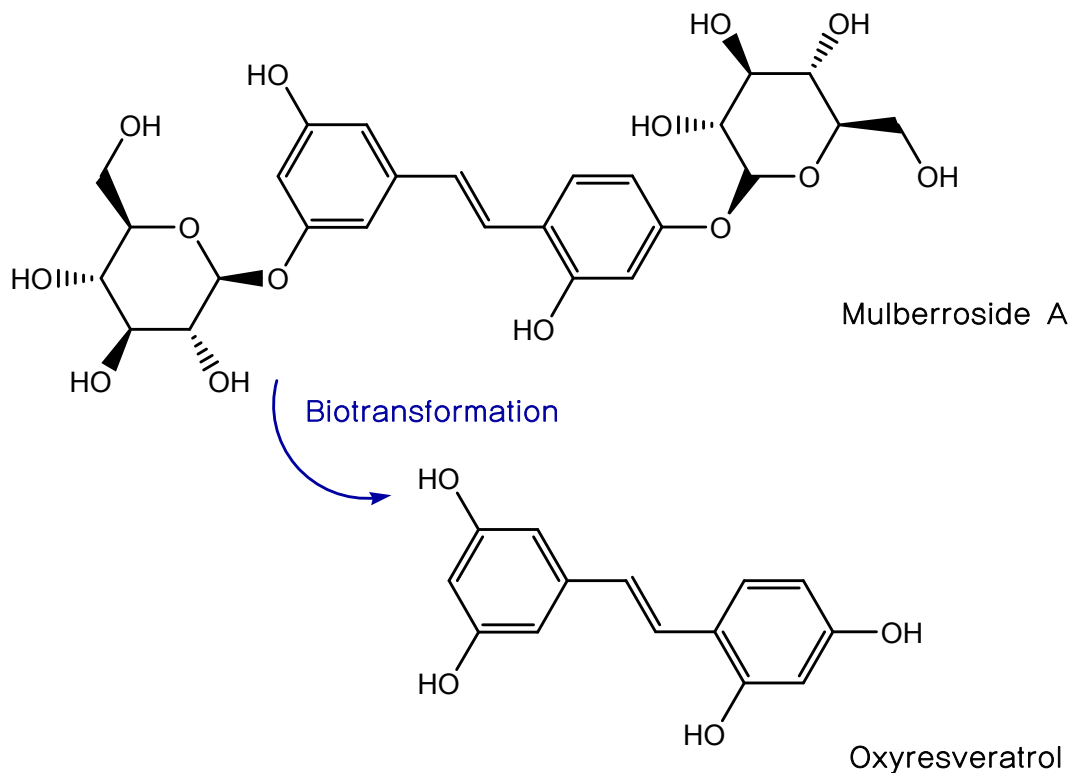


Fig. 20. 생물전환에 의한 Mulberroside A로부터 oxyresveratrol의 제조

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1 시료

본 실험에 사용한 상백피는 국내 5개 지역(안동, 제주, 제천, 의성, 오래 보관된 의성 제품(2년))과 중국산 1종 등 총 6종을 구입하여 사용하였다.



Fig. 21. 구입된 6종의 원료 상백피 사진

1.2 시약

본 실험에는 효소로는 Pectinex[®] (Novozymes, DENMARK)를 사용하였고 mulberroside A과 oxyesveratrol, oxyresveratrol-3-O-glucoside 과의 미백 활성 비교를 arbutin, resveratrol, kojic acid, rhapontin 및 rhapontigenin을 사용하여 비교 측정하였다. Tyrosinase 저해활성 측정에 사용된 L-tyrosine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA),

mushroom tyrosinase, resveratrol, kojic acid 및 arbutin은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. Rhapontin 및 rhapontigenin은 본 실험실에서 대황뿌리로부터 추출한 rhapontin과 이를 효소전환에 의해 aglycone으로 만든 rhapontigenin을 사용하였다 [61]. 또한, buffer 제조에 사용된 sodium phosphate monobasic anhydrous, sodium phosphate dibasic anhydrous와 추출 및 분석에 사용된 DMSO, ethanol, methanol, acetonitrile, phosphoric acid 및 그 외의 시약들은 일급 및 특급 시약을 사용하였다. Goat polyclonal IgG tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, Actin, anti-rabbit IgG HRP conjugated antibody는 Santa Cruz(CA, USA)사 제품을, ECL nitrocellulose membrane, western blotting detection reagent은 Perkin Elmer(USA)제품을, western blotting에 사용되는 시약일체와 단백질 정량 시약은 Bio-Rad(CA, USA)사 제품을, Total RNA extraction은 Pure Link RNA mini kit(Invitrogen, USA)제품을, cDNA 합성은 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit(Fermentas, Germany)제품을, Real time RT-PCR은 SYBR qPCR premix(Finnzyme, Philipin)을 사용하였으며, oligonucleotide 합성은 Bioneer (Bioneer, Korea)제품을 사용하였다.

1.3 기기

Mulberroside A와 oxyresveratrol의 정량분석에 사용한 기기는 Thermo Electron(USA)사의 HPLC LCQ Advantage MAX를 사용하였으며, tyrosinase 저해활성 측정과 enzyme kinetic assay에서 사용한 UV-Vis spectrophotometer는 Cecil Instrument(ENGLAND)사의 CE 9020을 사용하였다.

또한, MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)-Mass는 서울대학교 농생명과학공동기기원에서 보유하고 있는 Applied Biosystems Inc.(USA)의 Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation을 사용하였으며, ¹H NMR와 C-NMR은 한양대학교 공동장비센터에서 보유하고 있는 Varian Inc.(USA)의 Varian 400-MR(500 MHz)를 사용하였다. 원심분리기는 Gyro1730 MR(Gyrogen, Korea), 멜라닌 측정은 microplate reader SpectraMax 430PC(Molecular device, USA), electrophoresis power supply와 유전자 증폭기는 MJ mini thermal cycler, image analysis는 ChemiDoc (Bio-Rad, CA, USA), 조직파쇄기는 MP fastprep(MP, USA), UV 조사는 UV irradiation chamber(THREE-SHINE, Korea) 및 UVB lamp (SANIKYO, Japan), melanin 지수 및 홍반지수의 측정은 Mexameter(R600, Germany)를, RNA 정량은 UV/visible spectrophotometer(Nanometer ND 1000, USA)를 사용하였다.

1.4 실험 동물

본 실험에 사용된 약 350g의 female brown guinea pig는 하나 바이오(수원, 경기도)에서 분양 받아 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

2.1 HPLC 분석 조건

Mulberroside A와 oxyresveratrol의 정량 분석은 HPLC (LCQ Advantage MA X, Thermo Electron, USA)로 수행되었다. 이들 물질의 분석에 사용된 HPLC 조건은 다음과 같다 (검출기 PDA detector, 검출 파장 325 nm, 분석 칼럼 Luna 5u C₁₈(2) 100Å (5 µm, 4.6 mm × 250 mm, Phenomenex[®]), 시료 주입량 10 µl, 유량 1.0 ml/min, 전개 용매 CH₃CN : 10 mM H₃PO₄ = 35 : 65).

2.2. Mulberroside A와 oxyresveratrol의 TLC 분석

TLC 분석에는 HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ (25 glass plates 10 × 10 cm, Merck) 를 사용하였다. 전개 용매는 chloroform : methanol = 2.5 : 1을 사용하였으며, UV 및 anisaldehyde 황산액으로 확인하였다.

2.3. Mulberroside A와 oxyresveratrol의 분자량 및 구조 분석

생물전환 후 분리 정제된 oxyresveratrol의 분자량 확인은 유한양행의 Hewlett Packard LC-Mass를 사용하였다. 또한 분자 구조의 확인에는 한양대학교 공동 장비센터에 보유하고 있는 Varian 400-MR (500 MHz, Varian Inc., USA)를 사용하여 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 행하였다.

2.4 Tyrosinase 활성저해 실험

추출물의 tyrosinase 저해활성은 Tomita (4) 등을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. Tyrosinase는 L-tyrosine을 L-DOPA로 전환하는 monophenolase활성 및 L-DOPA로부터

dopaquinone을 생성하는 diphenolase활성을 통해 melanin 합성을 유도한다. 따라서 본 연구의 tyrosinase활성저해 실험의 경우에는 monophenolase 및 diphenolase활성 저해에 대한 실험을 병행하였다. 효소반응을 위해 96 well plate를 사용하였으며 반응액은 각 well에 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 150 μ l, 2 mM L-tyrosine (또는 L-DOPA) 30 μ l, DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹인 시료 10 μ l, 증류수 100 μ l의 반응액을 만든 후 mushroom tyrosinase (2,000 U/ml) 10 μ l를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 Microplate reader (Spectramax 340pc, Molecular Devices)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료대신 DMSO 10 μ l를 사용하였으며, 비교물질로 kojic acid 및 arbutin을 사용하였다. 또한 tyrosinase 대신 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 10 μ l를 가하여 blank로 하였다. 이때의 효소 활성 저해율 (%)은 아래와 같이 계산하고, 효소의 활성을 50% 저해하는 농도를 내삽법으로 구하여 이를 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율 (\%)} = \{[(A-B)-(C-D)]/(A-B)\} \times 100$$

A, OD at 470 nm without the test substance but with tyrosinase

B, OD at 470 nm without the test substance and without tyrosinase

C, OD at 470 nm with the test substance and with tyrosinase

D, OD at 470 nm with the test substance but without tyrosinase

2.5 Mushroom tyrosinase 효소 활성억제 기작

Enzyme kinetic assay는 기본적으로 tyrosinase 저해활성 측정방법과 동일한 조건 하에서 수행되었다. 단, L-tyrosine (또는 L-DOPA)의 농도는 각각 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mM로 변화시켜 각각의 시료에 적용하였다. Mulberroside A의 경우는 각각 0, 10, 50, 100 μ M로 변화시켜 적용하였으며, oxyresveratrol의 경우는 0, 0.1, 0.5, 1.0 μ M 로 변환시켜 적용하였다. 25°C에서 10분간 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과는 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 분석하였다.

2.6 *Streptomyces bikiniensis*를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 측정

Tyrosinase 저해활성과 마찬가지로 Tomita [62] 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 실험하였다. 멜라닌 생산균주인 *Streptomyces bikiniensis* KCTC 9172는 KCTC (Korean

Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea)로부터 확보하였다. 본 균주는 -70°C 에서 동결보관하고 그것을 ISP No. 7 medium (Difco)에 도말하여 28°C 에서 48시간 배양하였다. V-8 juice (Campbell Soup Company, USA) 200 ml, glucose 2 g, yeast extract 2 g (Difco), CaCO_3 1 g, agar 20 g을 증류수 800 ml에 용해시켜 제조한 Papavizas' VDYA agar에 *S. bikiniensis*를 계대하여 28°C 에서 2주간 배양하였다. 회색의 포자가 형성되면 멸균증류수 2 ml에 적당한 농도로 포자를 현탁시키고, Bacto-yeast extract (Difco)를 0.2% 포함하는 ISP No. 7 medium에 0.1 ml를 도말하여 배지에 흡수시킨다. 배지표면이 완벽히 마르면 시료 용액 20 μl 를 8 mm paper disc (ADVANTEC, Toyo Roshi kasha, Ltd., JAPAN)에 흡수시킨 후 배지의 중앙에 올리고, 28°C 에서 48시간 배양하였다. 이때 시료의 농도는 20 μl 내에 100 μg , 500 μg , 1,000 μg 이 되도록 하였고, control은 DMSO를 사용하였다. 배양 후 나타나는 inhibition zone의 크기는 vernier calipers (Digimatic caliper 500-182, Mitutoyo Corporation, JAPAN)를 사용하여 측정하였다.

2.7 상백피 추출물의 제조

2.7.1 상백피 추출물의 획득

상백피(안동,건화약품) 3.6kg을 물 18kg에 넣고 80°C 로 가온하여 4시간동안 1차 추출하였다. 냉각후 추출액을 분리하여 1차 추출액 15Kg을 얻었다. 다시 남은 잔사에 물 15Kg을 사용하여 동일조건으로 2차 추출하여 추출액 15kg을 얻었다. 1, 2차 추출액에 규조토를 처리한 후 여과(Filter press, SA 955) 하여 맑은액의 상백피 추출물을 얻었다.

2.7.2 상백피 추출물의 흡착수지에 의한 회수

상기의 방법으로 얻은 상백피 추출물을 합성흡착수지(SP 207, DIAION) 3L를 사용하여 유속 20 ml/min 으로 통과시켜 흡착시킨 후 물 8L를 사용하여 세척하였다. 흡착된 물질을 분리하기 위해 Methanol 6L를 통과시켜 얻은액을 진공증류 및 건조하여 상백피 추출 Powder 80g을 얻었다.

2.7.3 Mulberroside A 의 분리 정제

MPLC(FLASH 40M, Biotage) 및 Silica 수지(Silicagel si 60, WATCHERS)100g 를 이용하여 상기 방법으로 얻은 Powder 3g을 메탄올에 용해하여 여과하고 loding한다. Loading한후

이동상(Chloroform : Methanol = 2.5 : 1)을 사용하여 10ml/min으로 분리하였다. TLC확인(Chloroform 2.5 : Methanol 1, UV및 Anisaldehyde 황산액) 후 #26 ~ #35 분획을 수집하고 증류, 건조하여 0.18g의 Mulberroside A를 얻었다.

2.8 멜라닌 생성세포를 이용한 세포내 tyrosinase 활성 저해 및 melanin 생성억제

2.8.1 세포 및 시약

B16F10 (CRL 6323)은 쥐의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국세포주은행에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin)는 Gibco BRL (NY, USA)에서 구입하였다. Synthetic melanin, arbutin, resveratrol, α-melanocyte stimulating hormone (MSH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), DMSO (dimethyl sulfoxide)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.8.2 세포배양

B16F10 세포는 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin-50 µg/ml streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 접종 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 모든 실험은 동일 passage의 세포를 이용하여 수행하였다. 대조군을 제외한 시료 처리군에는 100 nM α-melanocyte stimulating hormone (MSH)를 첨가하여 배양하였다.

2.8.3 세포독성시험

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 정량은 Mosmann[67]의 방법을 변형하여 실시하였다. B16 melanoma 세포를 1×10^5 cells/well 농도로 24 well plate에 분주한 세포에 시료를 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 aspiration하여 제거한 후 MTT 용액 (1 mg/ml)을 첨가하고 37°C, 3시간 배양 하였다. 10% SDS (in 1N HCl)[68]를 첨가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 미처리군의 생존율을 control로 하여 시료처리군의 상대적인 생존율을 계산하였다.

2.8.4 세포내 tyrosinase활성 측정

세포내 tyrosinase 활성 측정법은 Wu et al.[64] 방법을 사용하였다. 배양접시 (60 mm)에 B16/F10세포를 2×10^4 cells/well로 농도로 분주하고 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 시료별로 세포독성이 나타나지 않은 농도 범위 내에서 3가지 다른 농도별로 시료를 처리하였으며 양성대조군으로 arbutin을 50 μ M을 사용하였다. 각 시료에 100 nM α -melanocyte stimulating hormone (MSH)를 첨가하여 배양하였다. 3일간 배양 후 trypsin처리하여 세포를 3000 rpm/min에서 10분간 원심 분리하여 수집한 후 ice-cold 생리식염수 (PBS)로 두 번 세척하였다. 세척한 세포에 1% triton X-100 과 0.1 mM PMSF (in PBS)를 첨가하여 30분간 세포를 용해시킨 후 4°C, $10,000 \times g$ 에서 25분 원심 분리하여 상층액을 효소활성 측정에 사용하였다. 반응액은 PBS에 함유된 세포추출 단백질 (30 μ g)에 0.05% L-DOPA가 첨가된 반응액을 37°C에서 1시간 동안 배양하면서 매 10분 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포추출물내의 단백질 함량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하여 Bio-Rad protein assay법을 사용하였다.

2.8.5 세포내 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Tsuboi [65] 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양접시 (60 mm)에 B16/F10세포를 2×10^4 cells/well로 세포를 분주하고 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 시료별로 세포독성이 나타나지 않은 농도 범위 내에서 3가지 다른 농도별로 시료를 처리하였으며 양성대조군으로 arbutin을 50 μ M을 사용하였다. 각 시료에 100 nM α -melanocyte stimulating hormone (MSH)를 첨가하여 배양하였다. 3일간 배양 후 trypsin처리하여 세포를 3000 rpm/min에서 10분간 원심 분리하여 수집한 후 PBS로 두 번 세척하였다. 회수된 세포를 건조시킨 후 10% DMSO를 함유한 1N NaOH 250 μ l를 첨가하여 80°C에서 1시간 용해시킨 후 $16,000 \times g$ 에서 30분 원심 분리하여 상층액을 회수한다. 상층액 중의 멜라닌 함량은 405 nm에서 OD405 값을 측정하고 표준 합성 멜라닌을 이용한 표준 검량 곡선값으로부터 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌 함량은 세포침전물중의 단백질 농도에 따른 멜라닌 농도로 표기 하여 시료 처리군별 멜라닌 생성량을 비교하였다.

2.8.6 자료 통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계처리는 SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific, San Rafael, CA. USA)를 이용하였다. 통계적 유의성은 one-way analysis of

variance (ANOVA)와 Duncan's multiple range tests로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

2.9 UV 흡수력에 대한 실험

자외선은 피부노화 및 기미 주근깨 등 피부 변색의 주요인이며 피부암을 유발하는 원인으로도 알려져 있다. 따라서 자외선 차단효과를 보이는 물질은 매우 효과적인 기능성 화장품원료로 이용될 수 있다. 따라서 본 연구에서 UV-A (400-320 nm) 및 UV-B (320-280 nm) 차단효과를 측정하였다.

Table 5. UV-A 및 UV-B의 노출과 관련된 피부노화

UV-A	400nm-320nm	aging, wrinkle, weak carcinogenic
UV-B	320nm-280nm	erythema, burns, skin cancer

2.9.1 UV 흡수력 측정

DMSO에 용해된 2.5 mM의 시료 3 μ l를 147 μ l의 methanol에 용해시켜 최종농도가 50 μ M이 되도록 조정 후 250-500 nm 범위 내에서 JASCO V-630 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Resveratrol의 경우에는 50 μ M 농도에서 흡광도가 최고 측정치를 초과하였으므로 25 μ M로 조정하여 측정하였다.

2.10 효소전환 생성물에 대한 항균활성 측정 실험

2.10.1 사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 Gram negative bacteria인 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 그리고 Gram positive bacteria인 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33592, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 990428, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 및 한국내성균주은행에서 분양받은 clindamycin 내성균주인 *Propionibacterium acnes* CCARM 9010을 사용하였다. 진균류에 대한 항균력 측정을 위해 *Candida albican* ATCC 90028을 사용하였다. *P. acnes*균주는

GAM broth (Nissui, Tokyo, Japan)를 사용하여 37°C에서 anaerobic gas generating pouch (GasPak EZ; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 내에 48시간 배양한 후 항균성 시험에 사용하였으며, 그 외의 균주들은 Muller-Hinton broth (Difco, USA)에 37°C에서 18-24시간 배양 후 항균성 시험에 사용하였다.

2.10.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 측정

Mulberroside A, oxyresveratrol, retinol (Sigma) 및 rhapontigenin의 MIC측정을 위해 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)의 microbroth dilution method를 이용하였다. 96 well plate의 각 well에 단계별로 희석된 시료 (0.5 µg/ml - 2048 µg/ml)를 함유한 배지 200 µl에 시험균주를 10⁵ cfu/ml의 농도로 접종하고 37°C에서 *P. acnes* 균주들은 48시간 그리고 그 외 균주들은 18-24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 Microplate reader Spectramax 340pc (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 측정하였다. 독립적인 시험을 3회 반복하여 MIC를 결정하였다.

2.11 항산화 실험

2.11.1 DPPH assay

하이드록시스티벤계 화합물은 항산화 작용이 뛰어난 것으로 보고되고 있으며 산화스트레스를 제거하는 작용이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 개발한 상백피 추출물 유래 성분인 mulberroside A, oxyresveratrol-3-O-glucoside 및 oxyresveratrol의 항산화력을 측정하였다. 항산화 물질의 가장 큰 특징적인 기작은 자유 라디칼 (free radical)과 반응하는 것이며, 이 기작을 이용하여 항산화 활성이 있다고 생각되는 물질의 항산화능을 측정한다. 항산화 물질은 자유 라디칼에 전자를 공여하여 이를 전자적으로 안정하게 만들어 자유 라디칼이 가지고 있는 독성을 감소시키게 된다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 화학적으로 안정화된 수용성 라디칼이며 보라색을 띠는 화합물이다. 이 라디칼은 알코올 등 유기용매에서 안정하며, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 자유 라디칼이 소멸되어 노란색으로 변한다. 그러므로 항산화능이 있다고 생각되는 물질을 안정한 자유 라디칼인 DPPH와 반응시켜 DPPH 라디칼이 감소되는 정도를 spectrophotometer로 측정하여 간접적으로 시료의 항산화 능력을 측정한다. 본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 mulberroside A, oxyresveratrol-3-O-glucoside, oxyresveratrol이며 물질은 1, 5, 10 µM로 DMSO에 녹여 사용했고, DPPH를 1 mM 농도

로 ethanol에 녹여 만들어 냉암소에 보관하여 stock으로 하면서 이를 실험 전에 100 μM 농도로 희석하여 사용하였다. 96-well plate에 1, 5, 10 μM 의 시료 100 μl 를 분주하였다. 양성 대조군으로 항산화능이 있다고 알려진 물질인 ascorbic acid를 선택했고 증류수에 녹여 동일 농도로 사용했다. 항산화 물질을 처리하지 않은 영점을 잡기 위해서는 시료의 용매인 DMSO와 증류수 100 μl 를 분주했다. 여기에 100 μM DPPH를 100 μl 를 더하고 차광했다. 이를 37°C에서 20분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정했다.

2.12 동물 실험

2.12.1 동물실험 및 시료도포

동물실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 허가(승인번호: KUIACUC-2010-130)를 획득한 후에 규정에 따라 수행하였다. 모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 “Guide for the Care and Use of Laboratory Animal” (1996, USA)에 준하여 취급하였다. 실험동물은 분양받은 후 바로 동물실험실로 옮겨 1주일간 적응을 시켰다. 동물 실험실의 환경은 $22\pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였고, 실험 전 기간 동안 사료 (vitamin C deficient Guinea Pig Diet, TestDiet, USA)와 정수된 물을 자유롭게 공급하였다. Brown guinea pig의 등 부위를 animal clipper(A-plus, Korea)를 이용하여 털을 깎고, 전기면도기 (Panasonic, Japan)로 깨끗이 면도하였다. UVB 조사 부위는 2cm의 정사각형모양을 5개를 뚫은, 검은색 두꺼운 천을 이용하여 실험동물에 입힐 수 있도록 옷을 제작하였다 (그림 22). UVB조사 동안 실험부위에 고르게 조사하기 위해 움직이지 못하도록 고정틀을 제작하여 guinea pig가 움직이지 못하도록 고정한 후 UV를 조사하여 오차를 최소화하였다 (그림 23a). UVB 조사는 THREE-SHINE (Korea)에서 주문제작한 UVB irradiation chamber를 이용하여 일정한 높이에서 일정한 시간동안 UV를 조사하였다. 302nm의 UVB를 방출하는 lamp(SANIKYO, Japan)를 사용하였고, 1회 $450\text{mJ}/\text{cm}^2$ 광량으로 3일간 연속으로 하여 총 $1,350\text{mJ}/\text{cm}^2$ 조사하였다 (그림 23b). 1회 Guinea pig의 UVB조사량 minimum effective dose(MED)는 200~300mJ이므로, 약 두 배(2MED)가량의 조사량을 조사하였다. UVB 조사에 의해 유발된 인공 색소반에 미백물질을 도포하는 시점은 4일째로 UVB 조사 후 다음 날부터 실험군은 각각 1%, 2%, 5%의 Mulberroside A, Oxyresveratrol, Oxyresveratrol-3을, 양성대조군은 1%, 2%, 5% Arbutin을 사용하였다. 용매대조군은 시험물질을 녹여 사용한 용매[propylene glycol: ethanol (9:1)]를 도포하였다. 미백물질 도포는 매회 10ul (1%-0.025mg/cm²/d, 2%-0.05mg/cm²/d, 5%-0.125mg/cm²/d)씩 1일 1회, 5주간 도포하였다 (71).



Fig. 22. UV 조사 부위 지정

(a)



(b)



Fig. 23. 실험동물에 UV 조사사진

(a) 균일한 조사를 위해 실험동물의 위치를 고정한 모양

(b) UV 조사에 이용한 UVB irradiation chamber

2.12.2 표피 진피 분리

멜라닌과 그 외 멜라닌 합성에 필요한 여러 단백질들은 피부표피의 basal layer에 분포해 있다. 따라서 표피만을 진피로부터 분리하여 실험에 사용하였다. 분리방법은 2M NaBr (in PBS)에 4°C, 2시간동안 incubation하여 진피로부터 표피를 분리하여 얻었다 (72).

2.12.3 멜라닌지수 및 홍반지수 측정을 위한 기기분석

피부의 멜라닌 지수(melanin index)와 홍반 지수 (erythema index)는 Mexameter (MPA 5, CK, Germany) (그림 24)를 사용하여 비침습적 방법으로 색소침착 변화를 측정하였다 (73, 74). Mexameter는 피부색조분석에 가장 적합한 멜라닌과 혈색소에 대응하는 서로 다른 3종의 파장대를 갖는 광원 16개가 원형으로 배치된 센서 probe를 특징으로 하는 측정기법(narrow-band reflectance spectrophotometric measurement)을 사용한다. Guinea pig 피부의 색소반 부위에 probe를 접촉시킨 후 3회 반복 측정하여 평균값을 구하여 색소침착 정도 및 홍반의 개선도를 객관적으로 비교, 분석하였다 (75). 피부표면 색소침착 정도는 디지털 카메라 (FinePix F450, Japan)로 촬영하여 비교하였다.



Fig. 24. Mexameter

2.12.4 피부조직의 조직학적 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후, 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 5 mM 두께로 section한 후 일반적인 피부 조직을 관찰하기 위하여 Hematoxylin-Eosin (H&E) 염색을 하였으며, 멜라닌 색소의 생성변화를 관찰하기 위해 Fontana-Masson's silver (F-M) 염색을 수행하였다 (76, 77).

2.12.5 Tyrosinase 활성 측정

2M NaBr을 이용하여 진피로부터 표피를 분리한 후, 분리한 표피조직은 조직용 homogenization tube Matrix D (PM, USA)에 넣고 1 mL의 lysis buffer (0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)가 포함된 1% Triton X-100)를 첨가한 후 Fastprep (MP, USA) (그림 25)을 이용하여 균질화 하였다. 4°C에서 1,000 ×g 로 5분간 원심분리하여 상층액을 회수한 후 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 Protein assay kit (Bio-Rad)를 이용하여 Bradford법으로 측정하였다. Bovine serum albumin을 이용하여 standard curve를 작성하고 이를 이용하여 각 시료의 단백질 양을 측정하였다. Tyrosinase 활성을 측정하기 위한 반응액은 단백질 30 ug을 5 mM L-DOPA가 포함된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣고, 총 부피가 0.2 mL가 되도록 하여 제조하였다. 효소 반응에 의한 Dopachrome 형성은 microplate reader SpectraMax 430PC(Molecular device, USA)로 37°C에서 10분 간격으로 1시간동안 475nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다(71).



Fig. 25. 조직으로부터 단백질을 회수하기 위한 조직 파쇄용 기구 (Fastprep)

2.12.6 Melanin 생성량의 측정

Melanin 생성량의 측정에 사용될 조직 부분을 10% DMSO가 포함된 1N NaOH 용액에 넣어서 80°C에서 1시간 동안 처리한 후 16,000 ×g 에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 회수하여 측정에 사용하였다. Synthetic melanin (Sigma)을 이용하여 standard curve를 작성한 후 이를 이용하여 시료처리군에 대한 melanin 생성량을 계산하였다 (72). Melanin 생성량의 결과 값은 $\mu\text{g melanin}/\mu\text{g protein}$ 으로 계산하여 비교하였다.

2.12.7 Real-Time quantitative Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Real-Time RT-PCR)

2M NaBr solution에 조직을 넣고 37°C에서 4시간 방치하여 진피로부터 표피를 분리하였다. 분리한 표피의 일정부분을 Trizol과 Pure Link RNA mini kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 UV/visible spectrophotometer (Nanodrop ND 1000, USA)로 정량한 후 1 μg 의 RNA를 RevertAid First Strand cDNA Synthesis

kit(Fermentas, Germany)를 사용하여 oligo dT primer, 5× reaction buffer, RNase inhibitor, 10 mM dNTP, M-MuLV reverse transcriptase, DEPC (diethylene polycarbonate)가 처리된 물과 혼합하여 최종 부피가 20 ul가 되게 한 후 cDNA를 합성하였다. RT-PCR 조건은 25°C에서 5분, 42°C에서 한 시간 반응하였다. 합성한 cDNA 10 ug을 사용하여 PCR을 수행하였다. Tyrosinase primer (476bp)의 염기서열은 forward; (5') - GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT - (3')과 reverse; (5') - TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC - (3'), TRP-1 primer(246bp)의 염기서열은 forward; (5') - GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC - (3')과 reverse; (5') - AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT - (3'), TRP-2 primer(1,043bp)의 염기서열은 forward; (5') - GGA TGA CCG TGA GCA ATG GCC - (3')과 reverse; (5') - CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC - (3'), MITF primer(330bp)의 염기서열은 forward; (5') - CAG AGG CAC CAG GTA AAG CA - (3')과 reverse; (5') - GGA TCC ATC AAG CCC AAA AT - (3'), Actin primer (350bp)의 염기서열은 forward; (5') -TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C - (3')과 reverse; (5') - TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G - (3')이다(78). 각각의 forward 1 ul (10pmole)와 reverse 1 ul (10pmole)를 SYBR qPCR premix(Finnzyme, Philipin)와 mixture를 만들어 Real-time thermal cycler (Bio-rad, USA)를 사용하여 real-time PCR 반응을 수행하였다. DNA 증폭 조건은 95°C에서 15분 preheating 한 후, 95°C에서 20초, 56°C에서 20초, 72°C에서 40초간 반응을 40회 반복하였다. mRNA 정량 분석은 대조군으로 사용한 actin의 발현량을 기준으로 증폭커브의 cT값을 정하여, actin의 cT값 대비로 나머지 측정하고자 하는 유전자의 mRNA 발현을 정량적으로 계산하였다.

2.12.8. Western blot

Tyrosinase 및 tyrosinase-related proteins의 발현을 측정하기 위해 Western blot을 실시하였다. Soluble protein을 배양세포로부터 그리고 Guinea pig 표피로부터 분리하여 사용하였다. 1mMEDTA, 1mMPMSF, 1mM Pepstatin A, 1 mM Leupeptin, and 0.1 mM Aprotinin이 함유된 protein extraction solution (PRO-PREP™, Intron, Korea)을 이용하여 soluble protein을 추출하고 10,000 g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. Soluble proteins (20 µg)을 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하고 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 blotting 한 후 5% non-fat skim milk in phosphate-buffered saline/Tween 20 buffer (PBS-T)를 이

용하여 4°C에서 하룻밤 blocking을 실시하였다. Membrane을 PBS-T로 3회 수세하고 primary antibodies를 처리 후 5시간 실온에서 방치하였다. 일차 항체로는 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, actin을 검출하기 위해 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입한 rabbit polyclonal anti-tyrosinase antibody (dilution 1:1,000), rabbit polyclonal anti-TRP-1 antibody (dilution 1:1,000), rabbit polyclonal anti TRP-2 antibody (dilution 1:500)를 각각 사용하였다. Membrane을 PSB-T로 3회 수세 후 secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody at a 1:5,000 dilution from Santa Cruz Biotechnology)를 1시간 실온에서 반응 시킨 후 enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Perkin Elmer, USA)을 이용하여 단백질을 검출하였다.

2.13. Oxyresveratrol의 안정성 실험

2.13.1 안정성 실험 재료

Oxyresveratrol은 자사에서 제조한 상백피(안동)추출물을 효소반응하여 정제한 물질을 사용하였다. 즉, 상백피 1kg을 70%에탄올을 6L를 사용하여 상온(25도)에서 24시간, 2회 추출하였다. 추출하여 얻은 여과액을 감압 농축하여 powder 150g을 얻었다. 얻은 powder를 물에 용해하여 Pextinex AFPL-4를 사용하여 분해 한 뒤, 합성흡착수지 SP 207을 사용하여 정제하였다. 감압 농축하여 얻은 oxyresveratrol 함량이 약 30%였으며, 이를 silica 컬럼정제를 통하여 95%이상의 oxyresveratrol을 얻었다.

2.13.2 안정성 실험에 사용된 기구

안정도 실험에 사용한 인큐베이터는 JISICO에서 구입한 J-IB1을 사용하였고, rotary evaporator는 EYELA사의 SB-1000모델을 사용하였다. HPLC 분석기기는 영린기기의 SP930D pump와 UV730D detector을 사용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다.

파장 : 310nm, 컬럼 : Phenomenex Luna 5uM C18 (SIZE 250x4.60mm),
용출 용매 : Acetonitril(35) + H₃PO₄(10mM, 65), Flow rate : 1ml/min,
Analysis time : 10min, Injection Volume: 20ul

2.13.3 안정도 실험 샘플 제조 방법

2.13.3.1 pH에 따른 안정도 실험

Oxyresveratrol을 30% dimethylsulfoxide(DMSO)에 자체함량 0.5%가 되게 용해 후, 인산염완충액과 초산염완충액을 사용하여 pH조정 후 각각의 병에 담아 냉장(10도), 상온차광(23~28도), 40도에서 경시관찰 하였다.

2.13.3.2 용매에 따른 안정도 실험

Oxyresveratrol을 각 용매 ethanol, 50% ethanol, dimethylsulfoxide, 50% dimethylsulfoxide, 50% 1,3 buthylene glycol에 0.5%가 되도록 용해 후, 각각의 병에 담아 냉장(10도), 상온차광(23~28도), 40도에서 경시관찰 하였다.

2.13.3.3 원료첨가에 따른 안정도 실험

(1) Silica 흡착 경시

Oxyresveratrol 0.05g을 에탄올 3g에 용해 후 Teose silica 20g에 분사하여 흡착시켰다. 이를 40도 에서 건조 후 경시관찰을 하였다.

(2) Hydrophobic β -cyclodextrin(HP- β -CD) 포접 실험

Oxyresveratrol 0.3g이 용해된 에탄올 10g을 HP- β -CD 10g이 용해되어있는 물40g에 혼합하여 제조하였다.

(3) Nano capsule 제조실험

Oxyresveratrol 0.2g과 Poly caprolactone 0.4g을 Acetone 40g에 용해 후 H₂O 40g에 서서히 혼합하면서 10분간 교반하였다. 혼합액 중 Acetone만 증류하여 제조하였다.

(4) Liposome 제조실험

Oxyresveratrol 0.5g, Lipoid S 75-3 0.3g, Alkolex-L oil 0.5g을 에탄올 6g에 용해 후, H₂O에 서서히 투입하면서 교반하여 100g을 제조하였다.

(5) Micro capsule 제조실험(액중 희석법)

본 실험은 안정제 존재하에 용액상태에서 희석시키는 방법으로 제조하였다. 안정제인 PVA 0.5%액1L를 교반하면서 여기에 Alkolex-L oil 1.56g과 Butylated hydroxytoluene(BHT) 0.4g을 에탄올 3g에 용해한액과 Oxyresveratrol 2.6g을 Ethyl acetate 60g에 용해한액, PMMA 48g을 Ethyl acetate 200g에 용해한액을 혼합 후 서서히 첨가하여 20분동안 분산시

켜주었다. 그 다음 냉장에서 1일간 침전시켜 여과한 뒤 40도에서 진공건조하여 수거하였다.

2.13.3.4 제형제조에 따른 실험

위의 3)에서 제조한 모든 실험군을 10%로 하여 Base cream에 혼합, 제조하였다.

2.14. Oxyresveratrol, Oxyresveratro-3-O-glucoside의 피부자극성 및 감각성 시험

2.14.1. 재료

2.14.1.1 약재

상백피 에탄올 추출물로부터 mulberroside A를 분리하고 Pectinex를 처리하여 효소 전환하여 aglycone인 Oxyresveratrol (OXY), oxyresveratrol-3-O-glucoside(OXY-3)를 제조하고 본 시험에 사용하였다. 양성대조군으로 사용한 DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)와 면역증강 물질인 Freund's complete adjuvant(FCA)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다.

2.14.1.2 사용 기기

피부 자극실험에 사용한 압박봉대는 Coban™ 1583 (3M, USA), 감각 실험에 사용한 주사기는 0.3 mL Ultra-Fine™II (BD, USA), 폐색척보를 위한 패치는 Tegaderm™ Film (3M, USA)을 사용하였다. 동물사육에 사용한 깔집은 Bedding (나라바이오텍, 한국)을, 사료는 퓨리나 사료(퓨리나, 한국)를 사용하였다.

2.14.1.3 실험 동물

본 실험에 사용된 약 420g의 White guinea pig는 나라바이오텍에서 24마리를 분양받았다.

2.14.2 실험 방법

2.14.2.1 실험 동물 사육

약 420g의 White guinea pig를 분양받은 후 바로 동물실험실로 옮겨 1주일간 적응을 시켰다. 동물 실험실의 환경은 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 환기회수 15회/h, 조도 150~300Lux, 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였고, 실험 전 기간 동안 사료와 물을 자유롭게 공급하였다. 사료는 표준 식이사료를 사용하였고, 멸균된 깔짚과 polycarbonate재질의 투명한 케이지를 사용하여 바깥에서 동물의 상태를 살피기에 용이하게 하였다. 물통은 실리콘 재질의 뚜껑을 사용하여 누수를 방지하고, 500mL부피에 정수된 물을 공급하였다(Fig. 26). Guinea pig의 등 부위를 animal clipper (A-plus, Korea)를 이용하여 털을 깎고, 전기면도기(Panasonic, Japan)로 깨끗이 제모하였다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리위원회의 승인 (승인번호: KUIACUC-2011-146) 하에 수행되었다.



Fig. 26. Breeding facilities and feed. Normal diet of rodent, fat 12%, carbohydrate 63%, protein 25% are composed(a), autoclaved woodshaving bedding(b), polycarbonated cage and water bottle(c).

2.14.2.2 피부자극 실험

White guinea pig를 사용한 피부자극 실험은 실험 시작 24시간 전에 clipper와 전기면도기를 이용하여 제모하였고, 제모에 의한 피부자극을 안정화 한 후에 실험을 하였다. 제모

한 3마리의 White guinea pig를 이용하여 등에 여덟 개의 구획(2cm × 2cm)을 척추를 중심으로 왼쪽 비찰과 피부 4개소와 오른쪽 찰과 피부 4개소를 1cm의 간격을 두고 선택하였다. 양쪽 부위 중 오른쪽 부위를 주사기 바늘을 이용하여 대각선 방향으로 각질층만 손상되고 진피는 손상되지 않으며 피가 나지 않을 정도의 찰과상을 내었다 (Fig. 27). 음성 대조군(ethanol:propyleneglycol (1:9), v/v), 1% OXY, 5% OXY, 1% OXY-3를 ethanol:propyleneglycol (1:9), v/v)에 녹여 각각 왼쪽과 오른쪽 구획에 0.5 mL씩 골고루 도포하였다. 시험 부위 전체를 3겹의 거즈로 덮고, 탄력붕대로 감싼 다음 3M 종이테이프로 가장자리부터 몸 전체를 돌려서 반대편 가장자리까지 고정하였다. 시험 물질 도포 24시간 후 거즈를 제거하고 피부에 영향을 미치지 않도록 잔류 시험물질을 미온수로 깨끗이 씻어내었다. 실험기간 동안 매일 오후 1시에 도포하고, 다음날 관찰하였다. 시험 물질 도포 부위를 세정한 후 4~5시간, 24시간 및 72시간 후에 나타난 피부 반응을 “의약품 등의 독성시험기준” 상의 “피부자극반응 평가표” (Table 6)에 따라 홍반 및 부종에 대해 적절하게 평가하여 채점을 한 후, 1차 피부 자극지수(primary irritation index, P.I.I) (Table 7)를 산출하여 자극성을 평가하였다 (참고: 식품의약품 안전청 2006, 제 1999-61호).

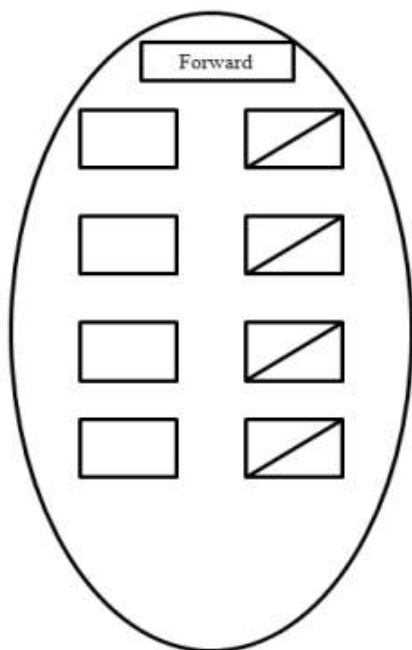


Fig. 27. Normal (left) and abraded (right) areas for topical application of the samples for skin irritation test. From the top, the boxes indicate the areas for ethanol:propyleneglycol (1:9, v/v), 1% OXY, 5% OXY, and 1% OXY-3 application, respectively.

Table 6. Score of skin irritation

skin reaction (피부반응)	Score
Erythema and eschar formation (홍반(erythma) 및 가피(scab))	
No erythma (홍반이 전혀 없음)	0
Very slight erythema (barely perceptible) (아주 가벼운 홍반, 육안으로 겨우 식별할 정도)	1
Well-defined erythema (분명한 홍반)	2
Moderate to severe erythema (약간 심한 홍반)	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth) (심한 홍반 - 홍당무색 발적과 가벼운 정도의 가피)	4
Edema (부종)	
No edema (부종이 전혀 없음)	0
Very slight edema (barely perceptible) (아주 가벼운 부종 - 육안으로 겨우 식별 가능)	1
Slight edema (edge of area well defined by definite raising) (가벼운 부종 - 뚜렷하게 부어올라서 변연부가 분명히 구별되는 경우)	2
Moderate edema (raised approximately 1mm) (보통의 부종 - 약 1mm 정도 부어올랐을 경우)	3
Severe edema (raised more than 1mm and extending beyond the area of exposure) (심한 부종 - 1mm이상 부어오르고 노출 부위 밖에서까지 확장된 상태)	4

Table 7. Primary irritation index (P.I.I) according to Draize method

Classification (자극의 분류)	P.I.I
Practically non-irritation (비자극성)	0.0 ~ 0.5
Slight irritation (약자극성)	0.6 ~ 2.0
Moderate irritation (중등도 자극성)	2.1 ~ 5.0
Severe irritation (강자극성)	5.1 ~ 8.0

2.14.2.3 피부 감작성 실험

Guinea pig를 이용한 피부 감작성 시험에서는 ISO 시험법에 준하여 white guinea pig를 사용하였다. White guinea pig를 사용하여 1군당 5마리씩을 실험에 이용하였다. 음성 대조군은 생리식염수를, 양성대조군은 0.1% 1-chloro-2,4-nitrobenzene (DNCB)를, 시험물질은 1% OXY, 5% OXY, 1% OXY-3를 사용하였으며, 감작 유발 물질로는 Freund's complete adjuvant를 사용하였다. 실험 시작 전 guinea pig의 등을 상처가 나지 않도록 4cm × 6cm의 크기로 clipper와 전기면도기를 이용하여 제모하였고, 제모에 의한 피부 자극을 안정화 한 후에 Fig. 28과 같이 시험 물질을 처리하였다.

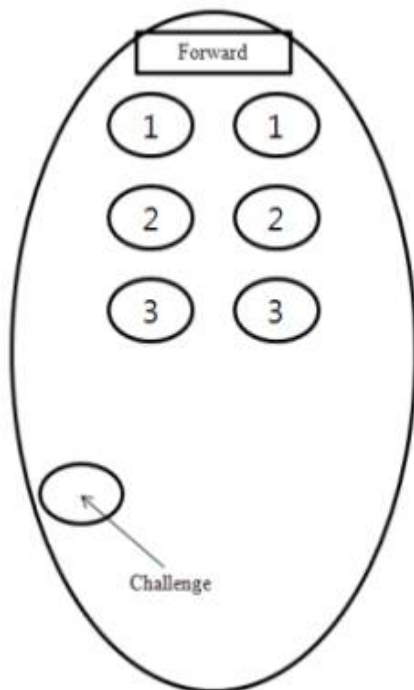


Fig. 28. Induction of skin sensitization and skin reaction in guinea pig. ①, intradermal injection of 0.1mL saline and Freund's complete adjuvant emulsion (1:1); ②, intradermal injection of 0.1mL test sample; ③, intradermal injection of 0.1mL sample and Freund's complete adjuvant emulsion (1:1).

2.14.2.3.1. 감작 I (피내투여)

1차 감작 노출을 위해, 제모한 guinea pig의 상배부 피부(2cm × 4cm)에 Fig. 28과 같이 시료를 좌우 대칭으로 0.1 mL씩 피내주사 하였다. 피내투여는 0.25 mm의 31gauge 당뇨주사기를 사용하여 피부 10°-15°의 각도로 주사하였다. 피내주사 직후 음성대조군인 saline을 투여한 부분에서는 약 0.3mm 높이로 돌출되었으나, 양성대조군인 DNCB를 주사한 부위에서는 선명한 노란색의 색깔변화를 보였다. 1% OXY와 5% OXY 투여 부위에서도 약간의 색깔변화를 보였으나, 이는 시험물질의 고유색깔이기 때문이다 (Fig. 29). 하지만 24시간이 이후의 변화는 DNCB 주사부위에서만 빨강게 피사가 일어나기 시작했고, 그 외 나머지 부위에서는 피내투여로 인해 생긴 돌출부위가 가라앉았을 뿐 별다른 변화가 일어나지 않았다 (Fig. 30).



Fig. 29. Guinea pig dorsal skin changes right after intradermal injection with saline (negative control, a), 0.1% DNCB (positive control, b), 1% OXY (c), 5% OXY (d), and 1% OXY-3 (e)



Fig. 30 Guinea pig dorsal skin changes 24 hr after intradermal injection with saline (negative control, a), 0.1% DNCB (positive control, b), 1% OXY (c), 5% OXY (d), and 1% OXY-3 (e)

2.14.2.3.2. 감작Ⅱ(국소적용)

감작 I 으로부터 7일 후 미리 전날에 4cm × 6cm의 크기로 제모한 상배부에, 시험물질을 피내주사 했던 부위 위에 시험 물질을 filter paper(2cm × 4cm)에 적셔 붙이고 그 위에 패치(patch, 4cm × 6cm)를 붙여 48시간 동안 폐색 첩포하였다. 48시간 첩포를 하기 때문에 그 위에 의료용 반창고를 가볍게 붙여 패치가 떨어지지 않게 하였다 (Fig. 31).



Fig. 31. Secondary sensitization on Guinea pig dorsal skin patch test.

2.14.2.3.3. 반응유도

패치를 제거한 뒤 2주 후 실시하였다. Guinea pig의 왼쪽 측복부를 4cm × 4cm 면적으로 제모한 후 2cm × 2cm 의 filter paper에 각각의 시험물질을 적셔 패치를 붙인 후 24시간 고정시켰다 (Fig. 32). 패치를 제거하고 피부감작성 평가 3시간 전에 미온수로 피부에 남아있는 시험물질을 깨끗이 닦아냈다. 감작 야기 후 24시간과 48시간에 "피부감작반응 평가표" (Table 8)에 따라 반응을 평가하고, 반응이 나타난 개체를 양성동물수로 하여 감작률을 구하고 피부감작 등급 (Table 9)을 판정하였다. 각 군에서 반응을 보이는 개체에 대한 양성반응의 비는 [(양성 동물수/전체 동물수) × 100(%)]로 나타내었다.



Fig. 32. The animals were challenged topically 2 weeks after the induction. It was performed on the left flank of all animals at a shaved 4cm² skin site to which a 24hr occlusive 'patch units' were applied.

Table 8. Score of sensitization

Erythma reaction state	Edema formation	Score
No reaction (무반응)	No edema	0
Scattered mild redness (홍반이 적용부위에서 흩어져 나타남)	Slight edema	1
Moderate & diffuse redness (홍반이 적용부위 전체에 나타남)	Moderate edema	2
Intense redness & swelling (전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타남)	Severe edema	3

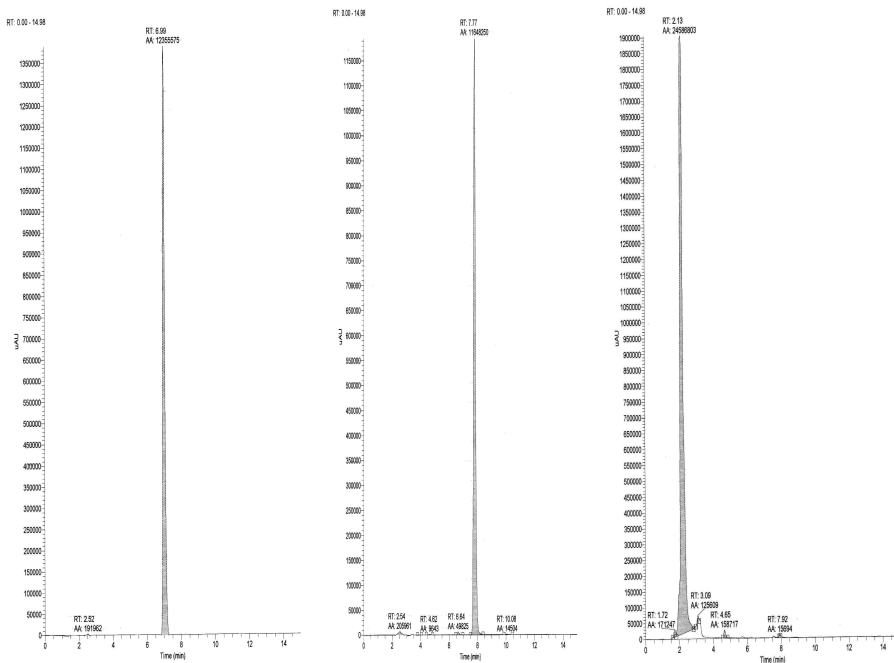
Table 9. Rate and grade of sensitization

Rate (감작률, %)	Grade (등급)	Classification (분류)
0 ~ 8	I	weak (매우 약함)
9 ~ 28	II	mild (약함)
29 ~ 64	III	moderate (보통)
65 ~ 80	IV	strong (강함)
81 ~ 100	V	extreme (매우 강함)

III. 연구 결과

1. 상백피 추출물의 성분 분석을 위한 HPLC 분석 조건 확립

예비 조사를 통하여 상백피 추출물내의 미백 유효 성분은 mulberroside A, resveratrol, oxyresveratrol, rhapontin, 혹은 rhapontigenin 등의 stilbene 계열의 물질일 것으로 예측되어 stilbene 계열 물질을 정량하는 HPLC 조건으로 분석을 행하였다. 따라서 표품으로 구입이 가능한 resveratrol, rhapontigenin 등을 사용하여 HPLC 분석을 한 결과, resveratrol은 6.99분, rhapontigenin은 7.77분에서 용출되었으며 10-100 ug/ml의 농도 범위에서 이들 물질에 대한 정량성($r=0.99$ 이상)을 확인할 수 있었다(Fig. 26). 또한 상백피를 에탄올과 물로 각각 추출한 후 상백피 추출물의 성분을 HPLC로 확인한 결과, 상백피 추출물은 2.1분대의 물질(mulberroside A 추정)이 주된 성분임을 확인할 수 있었다.



(A)

(B)

(C)

(A) 표품 resveratrol의 HPLC profile

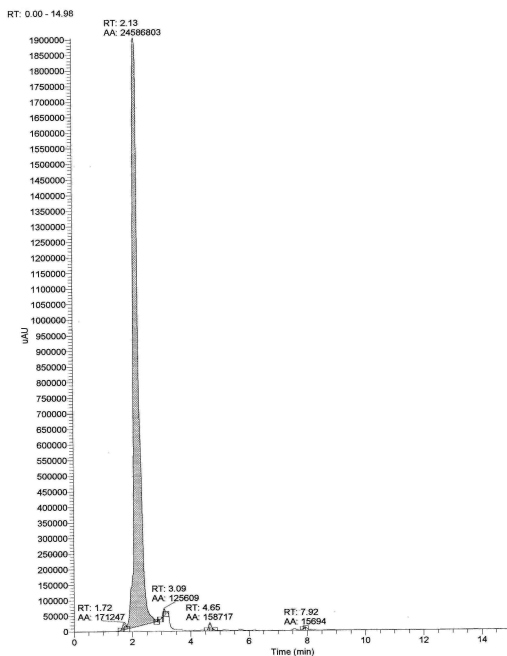
(B) 표품 rhapontigenin의 HPLC profile

(C) 상백피 추출물의 HPLC profile

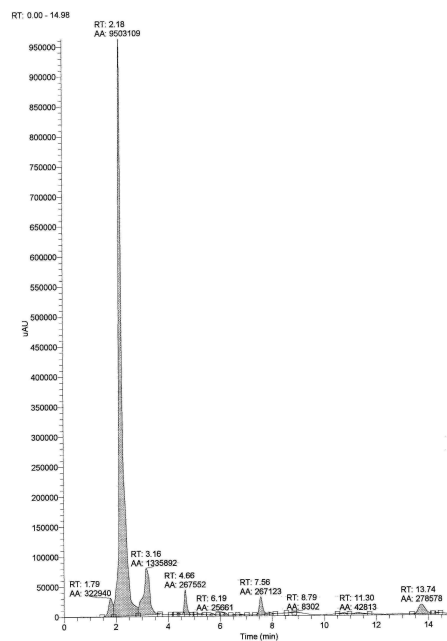
Fig. 26. Stilbene 계열 물질에 의한 HPLC 분석 조건 확립

2. 원산지별 상백피의 함량비교

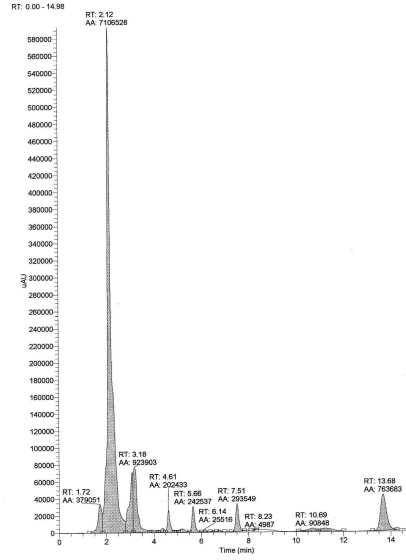
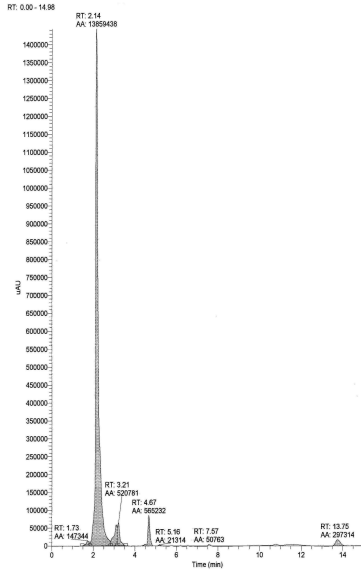
상백피의 미백성분은 원산지별로 유효성분 함량에 큰 차이를 보일 것으로 예측되어 산지별 원료에 대한 함량 비교를 검토하였다. 국내산 5종(안동, 제주, 제천, 의성, 오래 보관된 의성제품(2년))과 중국산 1종에 대하여 추출시의 HPLC profile을 비교 검토한 결과, 경상북도 안동에서 재배(대한약전 제품)된 상백피의 유효 성분의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 27). 또한 유효성분으로 예상되는 2.1분대 물질의 량과 tyrosinase inhibition assay와의 관계성을 검토하기 위하여 원산지별 상백피 추출물(5배 희석)에 대한 tyrosinase inhibition assay 실시한 결과, 안동제품이 tyrosinase inhibition 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다(Fig. 28). 본 실험 결과, 2.1분대(Melberroside A 추정물질) 물질의 량이 높을 시 tyrosinase inhibition 활성도 높게 나타나 2.1분대 물질이 미백성분과 깊은 상관 관계가 있다고 추정할 수 있었다. 한편 오래된 상백피 제품(의성)은 산패된 냄새를 느낄 수 있었으며 중국산 상백피 제품도 국내산과는 다른 냄새가 났으며 HPLC 분석시 2.1분대의 유효물질이라고 사료되는 물질 이외에 다양한 성분이 다량 존재하였다. 따라서 본 실험으로 원산지별, 품종별 미백 유효성분의 차이가 큼을 확인할 수 있었으며 특히 중국산 상백피는 추출시 국내산 상백피와는 상당히 다른 성분 패턴을 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 경상북도 안동에서 생산된 원료를 사용하여 연구를 수행하였다.



(A) 안동산 상백피 추출물 HPLC

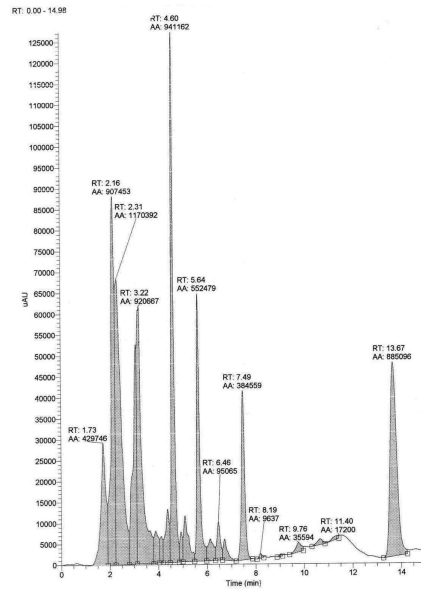
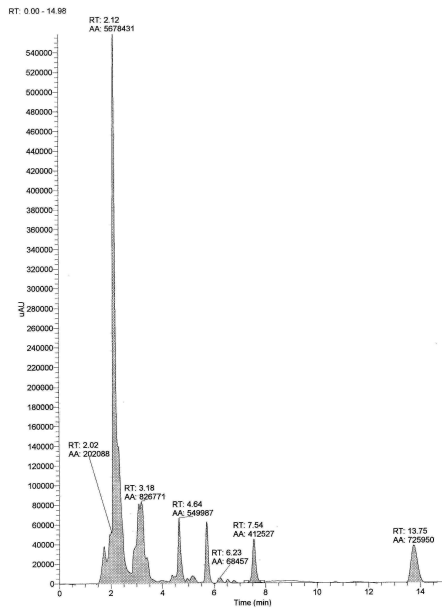


(B) 의성산 상백피 추출물 HPLC



(C) 제천산 상백피 추출물 HPLC

(D) 제주산 상백피 추출물 HPLC



(E) 오래된 의성산 상백피 추출물 HPLC

(F) 중국산 상백피 추출물 HPLC

Fig. 27. 산지별 상백피 원료 추출물의 HPLC profile 비교

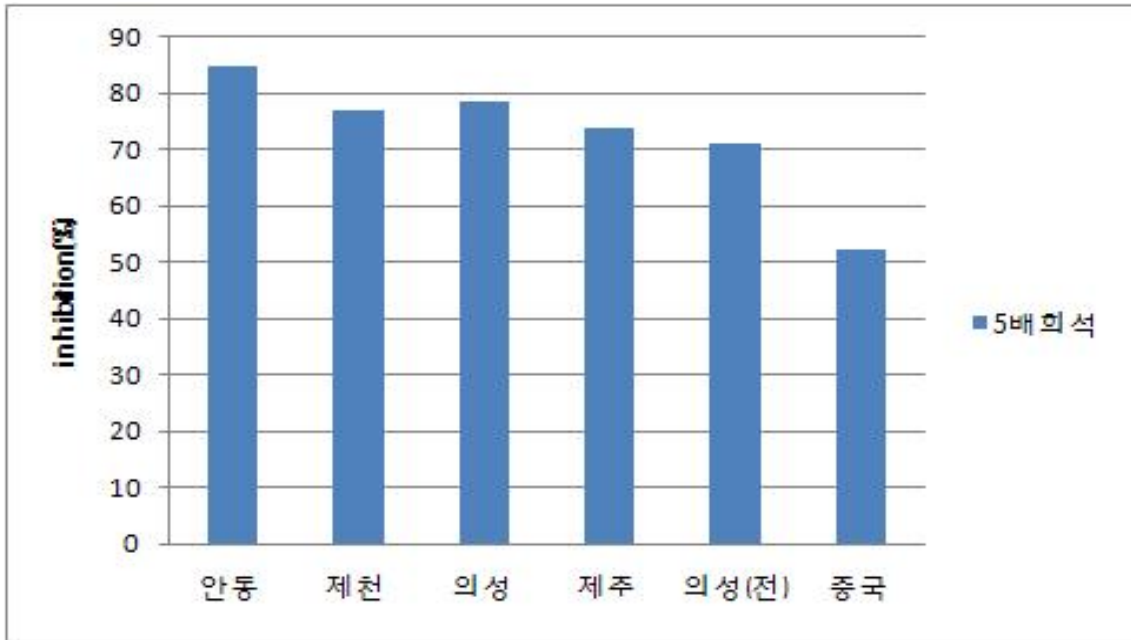


Fig. 28. 산지별 상백피추출물(5배 희석)의 Tyrosinase 활성 억제 효과

3. 상백피로부터 유효성분의 효율적인 추출 조건 확립

앞선 실험을 통하여 선정된 경상북도 안동에서 재배(대한약전 제품)된 원료를 사용하여 열수 추출 혹은 용매추출(에탄올)에 따른 미백 유효성분의 추출을 HPLC로 실험한 결과, 열수추출보다는 에탄올을 이용한 추출시에 유효성분의 함량이 높은 것으로 나타났다(Fig. 29). 따라서 상백피로부터 유효 미백성분성분의 추출은 에탄올에 의한 추출로 결정하였다.

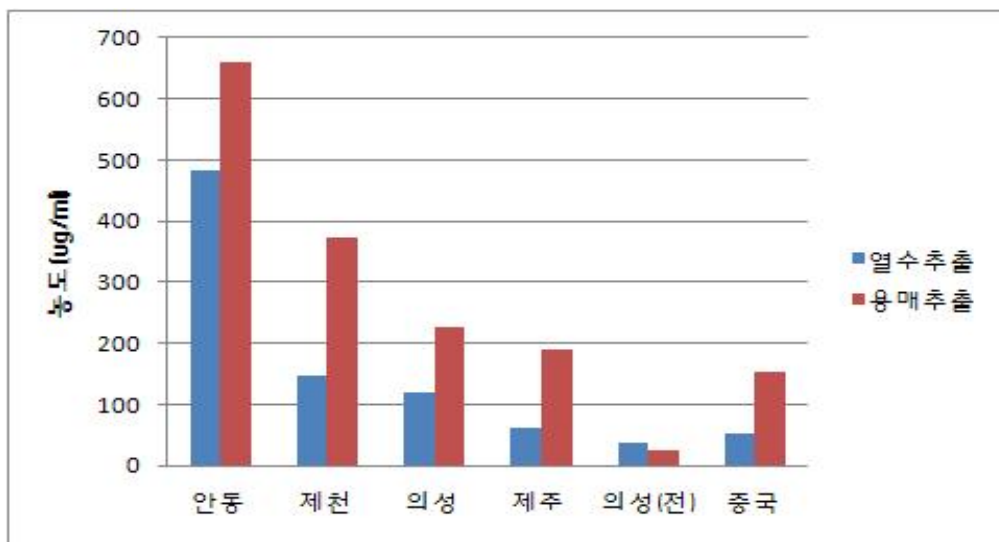


Fig. 29. 산지별 상백피의 추출(열수 및 에탄올)조건에 따른 유효물질의 량

4. 생물전환에 의한 상백피 추출물의 유효물질 변환 확인

상백피 추출물을 β -glucosidase를 다량 함유한 것으로 알려진 Pectinex[®] (Novozymes, DENMARK) 효소를 사용하여 가수분해한 후 유효 물질의 변화를 HPLC로 확인하였다. 본 실험은 앞서 본 실험실에서 수행하였던 생물전환에 의한 rhapontin으로부터 rhapontigenin 제조 연구에서와 같이 효소량은 반응액량 대비 1%, 반응 온도 55도씨, pH 4.5, 반응시간 4시간으로 반응하면서 상백피 추출물로부터 생성물의 변화를 확인한 결과, mulberroside A로 추정되는 2.1분 물질은 감소하고 4.5분대(oxyresveratrol로 추정)의 물질이 새롭게 생성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 30). 본 연구에 사용된 Novozyme사의 Pectinex[®]는 FDA로부터 안전성, 안정성을 인정받아 오렌즈 주스 청징화등 식품용으로 널리 사용중인 효소이기 때문에 화장품 원료 제조에도 문제가 없다고 사료되었다. 따라서 본 연구에서는 Novozyme사의 Pectinex[®]를 이용하여 상백피 추출물의 효소 가수분해를 수행하였다.

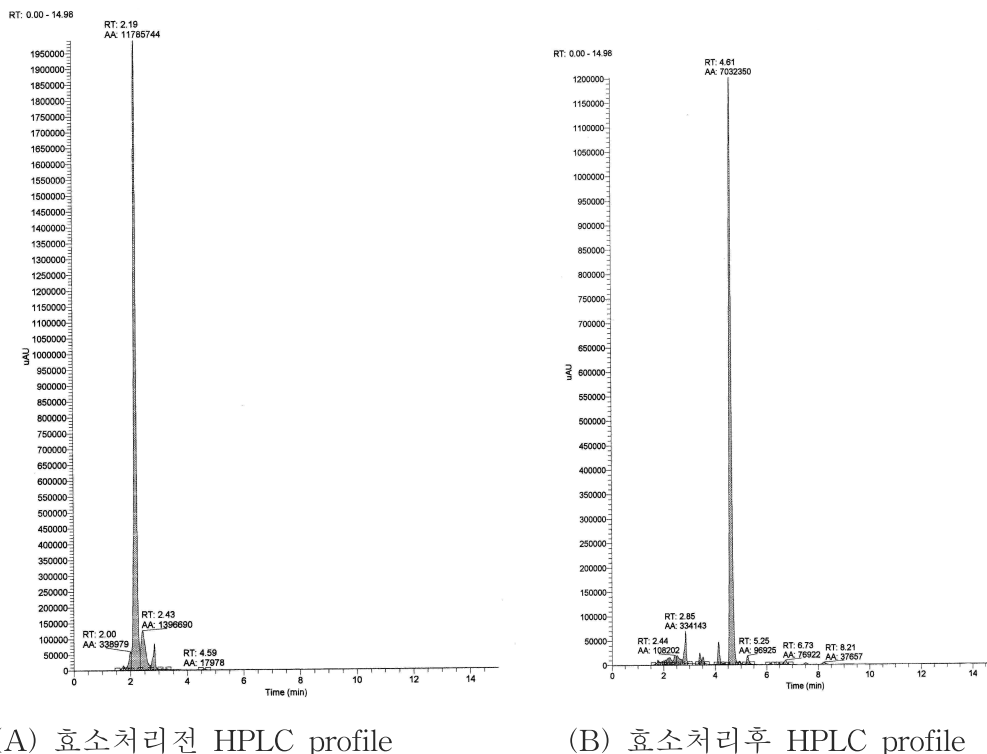


Fig. 30. 효소 처리 전후의 상백피 추출물의 HPLC 변화

5. 최적 생물전환 조건의 확립

Novozyme사의 Pectinex[®]를 이용하여 상백피 추출물의 유효성분(mulberroside A 추정)에 대한 최적 가수분해를 위한 효소 반응 조건 실험을 행하였다. 최적의 효소 반응 조건 설정을 위해, 온도, pH 및 반응 시간에 따른 생성물(oxyresveratrol 추정물질)의 양을 비교 검토하였다. 온도에 따른 2.1분대물질(mulberroside A 추정물질)의 감소율과 생성물의 양을 비교한 결과, 65°C가 가장 높게 나타났으나 효소의 온도에 따른 불안정성등을 고려하여 최적 반응 온도를 60°C로 결정하였다(Fig. 31). 또한 최적 pH실험 결과, pH 4.5에서 반응시 생성물의 양이 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 32). 그러나 본 실험을 통하여 효소 반응 초기에는 2.1분대 물질로부터 2.8분대 물질(생성물 A)이 생성됨을 확인할 수 있었고 효소반응 시간이 길어짐에 따라 2.8분대 물질이 감소하면서 4.5분대 물질(생성물 B)이 생성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 33). 2.8분대 물질(생성물 A)은 mulberroside A로부터 당이 하나 분해된 것으로 예상되며 4.5분대 물질(생성물 B)은 mulberroside A부터 당이 2개 분해되어 생성된 oxyresveratrol로 추정된다. 따라서 효소의 가수분해에 의해 oxyresveratrol을 제조는 mulberroside A로부터 생성물 A를 거쳐 생성되는 것으로 사료되었다. Mulberroside A로부터 당이 하나 가수분해된 산물인 생성물 A도 미백 화장품 원료로서 매우 큰 의미가 있을 것으로 사료되어 생성물 A의 제조와 물질 특성에 관한 것을 2차년 연구에서 수행할 예정이다.

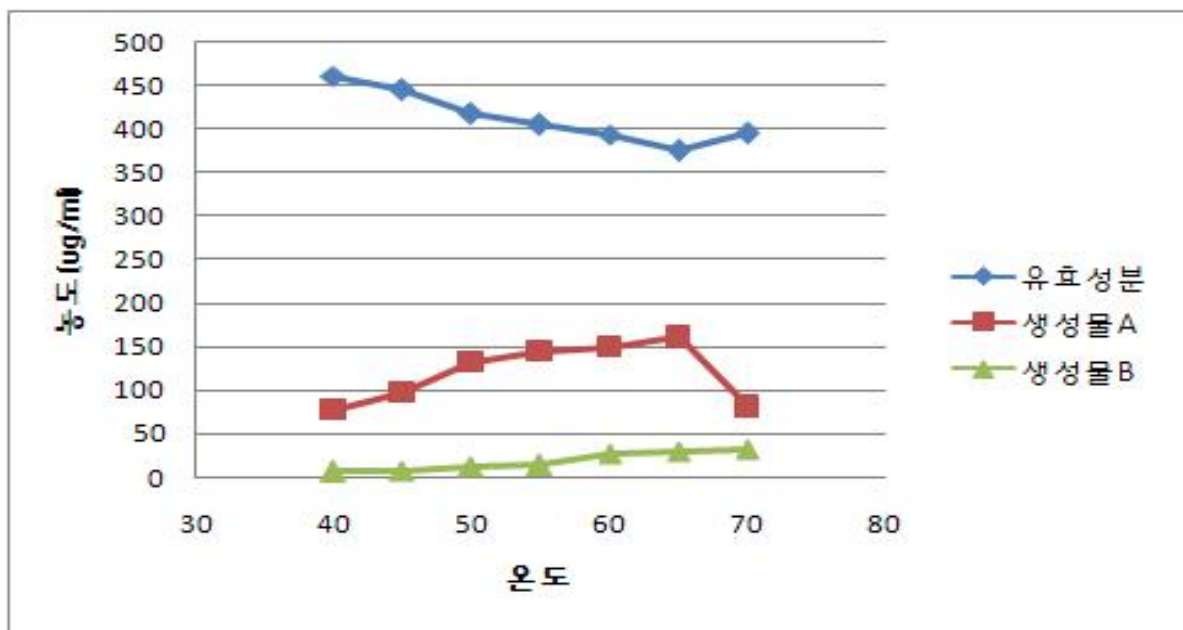


Fig. 31. 온도조건에 따른 상백피 생성물의 변화 (pH 4.5, 반응시간 30분)

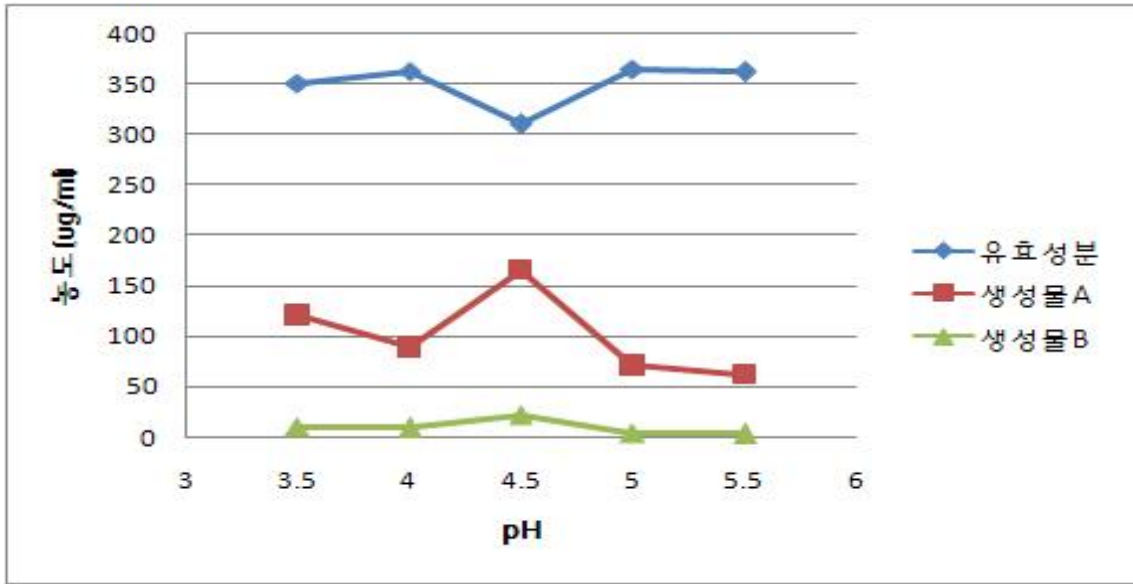
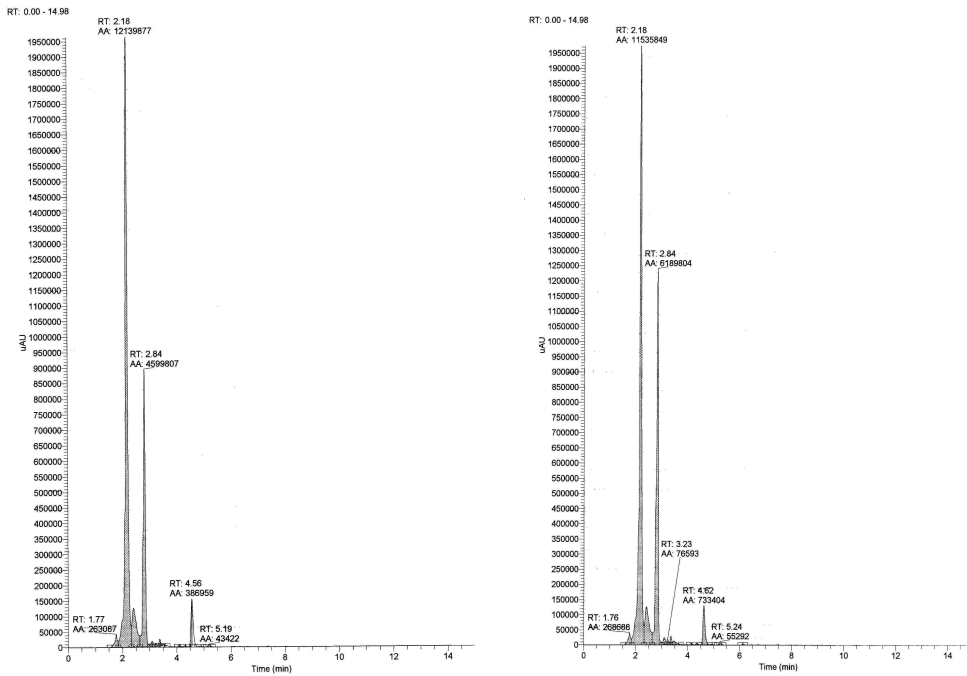


Fig. 32. pH에 따른 상백피 생성물의 변화 (온도 55°C, 반응시간 30분)

(A)

(B)



(A) 60°C, 30분 효소반응시 생성된 생성물

(B) pH 4.5, 30분 효소반응시 생성된 생성물

Fig. 33. 반응온도, pH, 배양시간에 따른 생성물의 변화

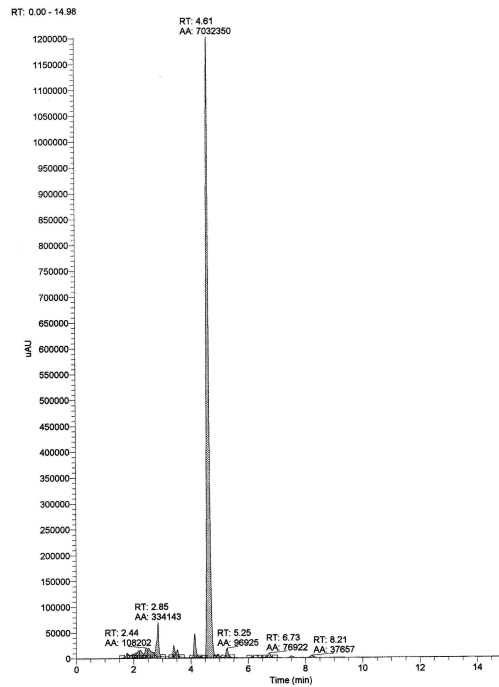


Fig. 34. 60 °C, pH 4.5, 4시간 반응시의 HPLC profile

6. 효소전환된 생성물의 정제 및 구조 확인

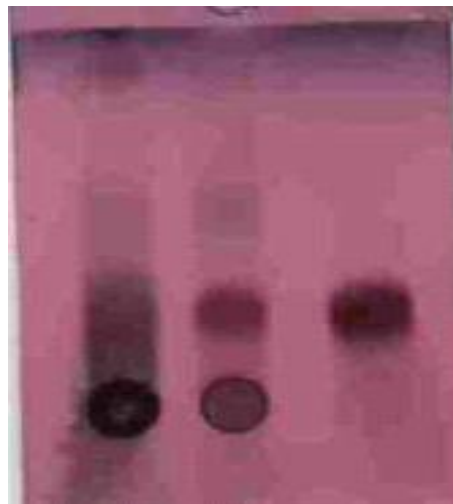
6.1 효소전환 조건 및 정제

상백피 추출물 40 mL에 acetate buffer (pH 4.0) 4 mL와 Pectinex[®] 0.88 mL를 넣어 60 °C, 120 rpm으로 4시간 반응하였다. 반응완료 후 95 °C에서 2분간 효소반응을 정지시켰다. 효소 반응액을 SP-207 흡착레진을 사용하여 흡착 시킨후 물로 충분히 세척하였다. 세척된 레진을 100% acetone으로 용출시킨 후 용출된 용액을 50도씨에서 감압 농축했다. 이때 얻어진 상백피추출물 powder 3g을 메탄올에 용해하여 여과한 후 silicagel 컬럼에 loading하였다. Loading후 이동상(Chloroform : Methanol = 2.5 : 1)을 사용하여 10 ml/min으로 분리하였다. 분리된 분획을 TLC확인(Chloroform 2.5 : Methanol 1, UV및 Anisaldehyde 황산액) 후 Mulberroside A와 oxyresveratrol 샘플을 얻었다. 분획된 정제 용액을 모아 50 °C에서 감압 농축한 후 재차 진공건조하여 정제된 샘플을 제조하였다.



<Mulberroside A와 oxyresveratrol 분리정제에 사용한 MPLC 장치>

Mulberroside A



A) B) C)

A) 상백피 열수 추출물

B) 흡착수지로 회수된 상백피 추출물

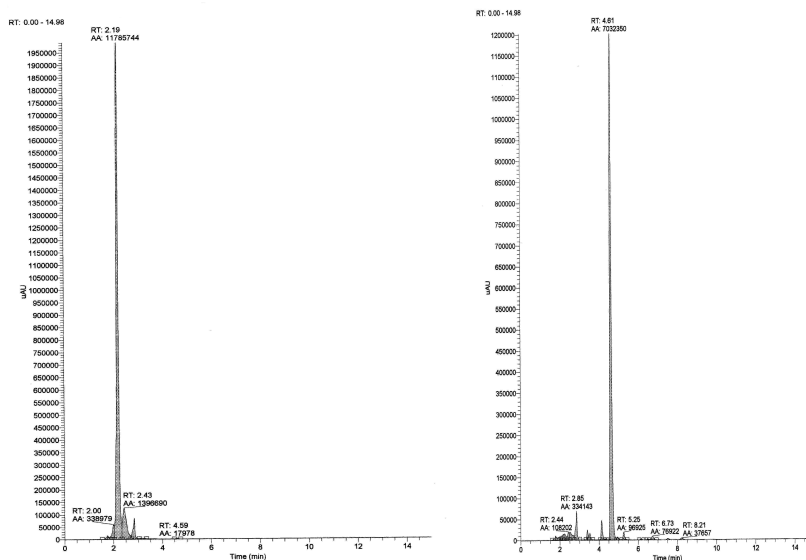
C) 분리정제한 Mulberroside A

Fig. 35. MPLC를 이용하여 정제된 Mulberroside A

6.2 순도 및 구조분석

상백피 추출물 및 효소전환 후 정제한 물질은 HPLC 분석결과 순도가 매우 높은 결과를 나타내었다 (Fig. 36). 정제물질의 분자구조 확인을 위해 $^1\text{H-NMR}$ 과 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 한 결과 효소전환 후 생성된 물질은 상백피의 주성분인 mulberroside A의 aglycone 형태인 oxyresveratrol로 확인 되었으며 (Fig. 37, 38, 39 ,40), Mass-Spectrum (negative mode)을 사용하여 분자량을 측정된 결과도 oxyresveratrol의 분자량인 224로 확인되었다 (Fig. 41).

HPLC 분석 및 NMR, Mass 분석결과로 부터 상백피 추출물로 부터는 mulberroside A가 주성분을 이루고 있음을 알 수 있었고, 따라서 mulberroside A로부터 효소전환 후 정제된 oxyresveratrol의 순도는 표준품인 resveratrol을 기준으로 환산한 결과 98% 이상의 순도를 나타내었다.



(A) 정제된 mulberroside A

(B) 정제된 oxyresveratrol

Fig. 36. 정제된 Mulberroside A 와 oxyresveratrol의 HPLC 결과.

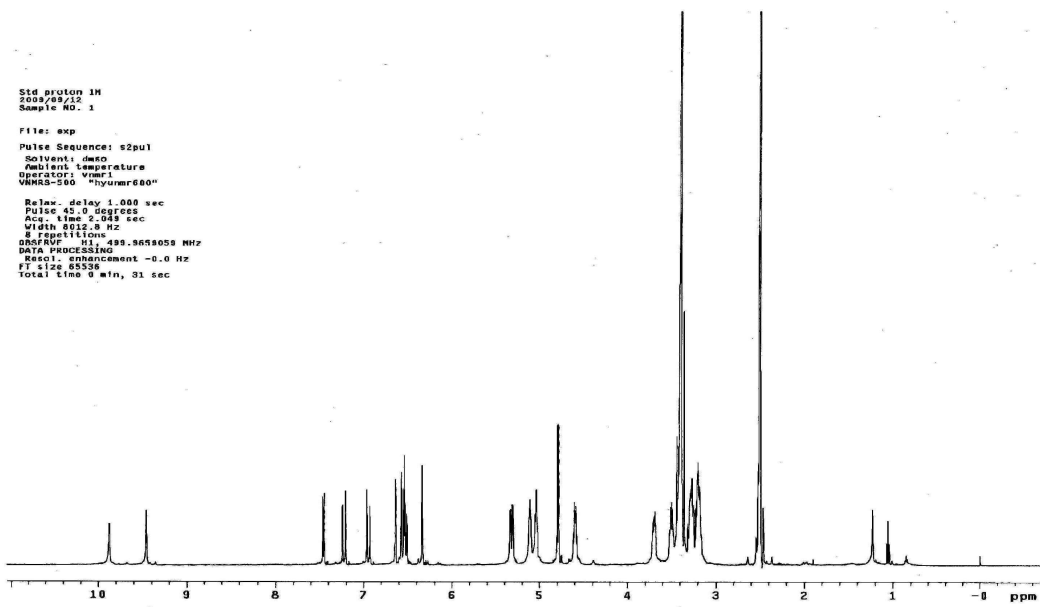


Fig. 37. 정제된 상백피 추출물(Mulberroside A)의 ¹H-NMR spectrum.

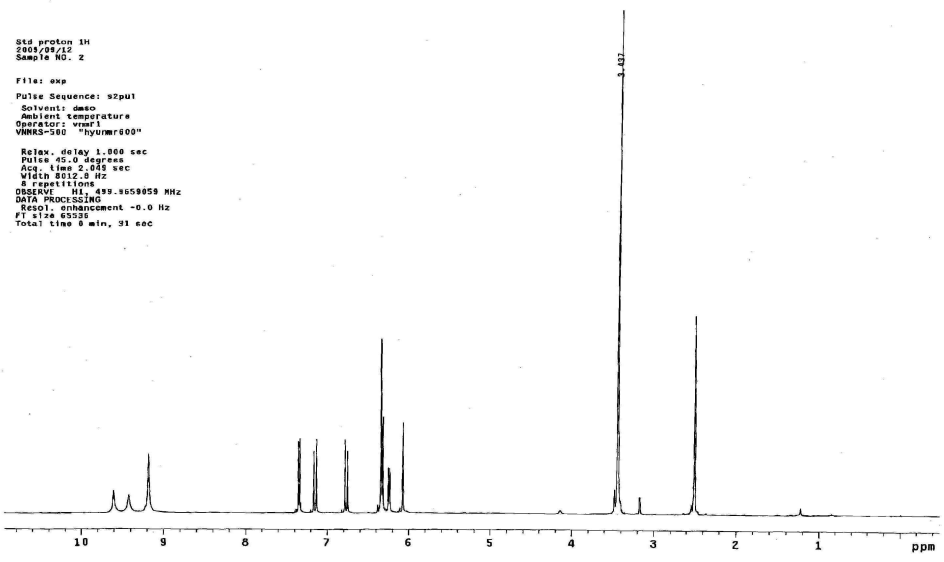


Fig. 38. 효소전환 후의 정제물(oxyresveratrol)의 ¹H-NMR spectrum.

Std carbon 13C
DATE : 2009.09.14
Sample NO. 1

File: exp
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: dmsc
Ambient temperature
Operator: vnmr1
VNMRS-200 "hysumr600"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.300 sec
Width 36487.8 Hz
22400 repetitions
OBSERVE C13, 125.7165278 MHz
DECOUPLE H1, 499.9684050 MHz
Power 46 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 131072
Total time 19 hr, 14 min, 43 sec

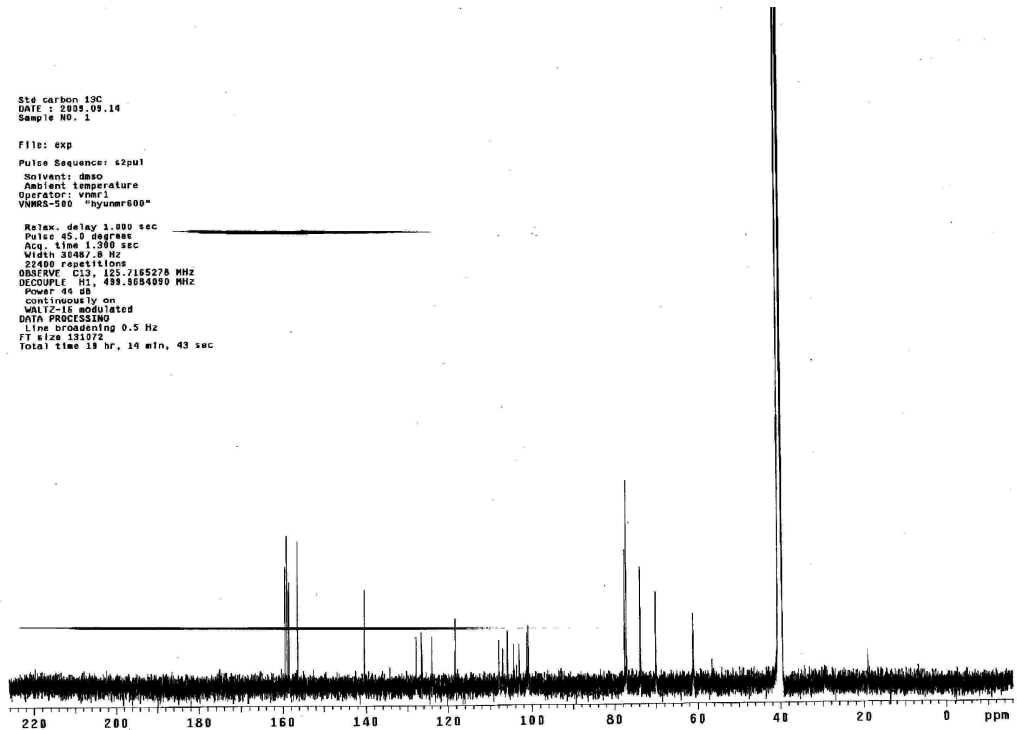


Fig. 39. 상백피추출물로부터 정제된 효소전환전 물질(Mulberroside A)의 C^{14} -NMR spectrum.

Std carbon 13C
DATE : 2009.09.16
Sample NO. 2

File: exp
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: dmsc
Ambient temperature
Operator: vnmr1
VNMRS-200 "hysumr600"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.300 sec
Width 36487.8 Hz
21800 repetitions
OBSERVE C13, 125.7165278 MHz
DECOUPLE H1, 499.9684050 MHz
Power 44 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 131072
Total time 19 hr, 14 min, 43 sec

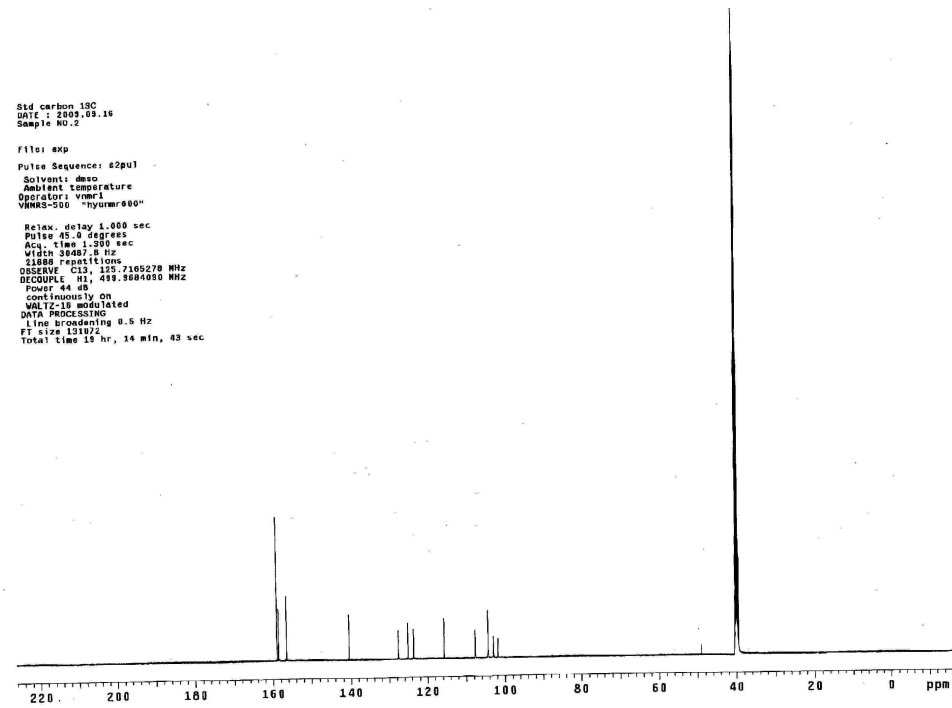


Fig. 40. 효소전된 물질(oxyresveratrol)의 정제후 C^{14} -NMR spectrum.

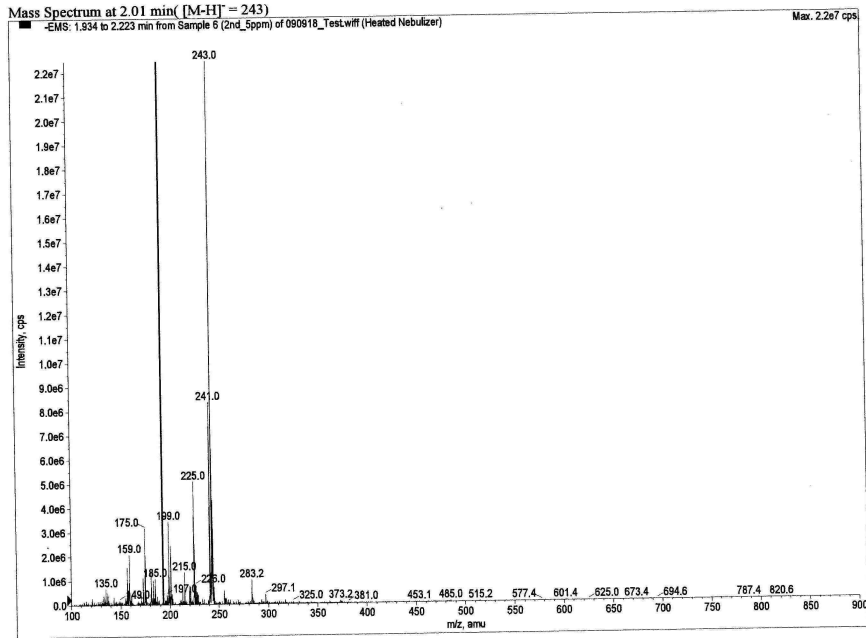


Fig. 41. 효소전환 후 정제된 물질(oxyresveratrol)의 Mass spectrum.

위의 결과로부터 상백피로부터 주성분인 mulberroside A가 추출되었고, mulberroside A로부터 효소전환에 의해 aglycone인 oxyresveratrol이 생성되었음이 확인되었다 (Fig. 42).

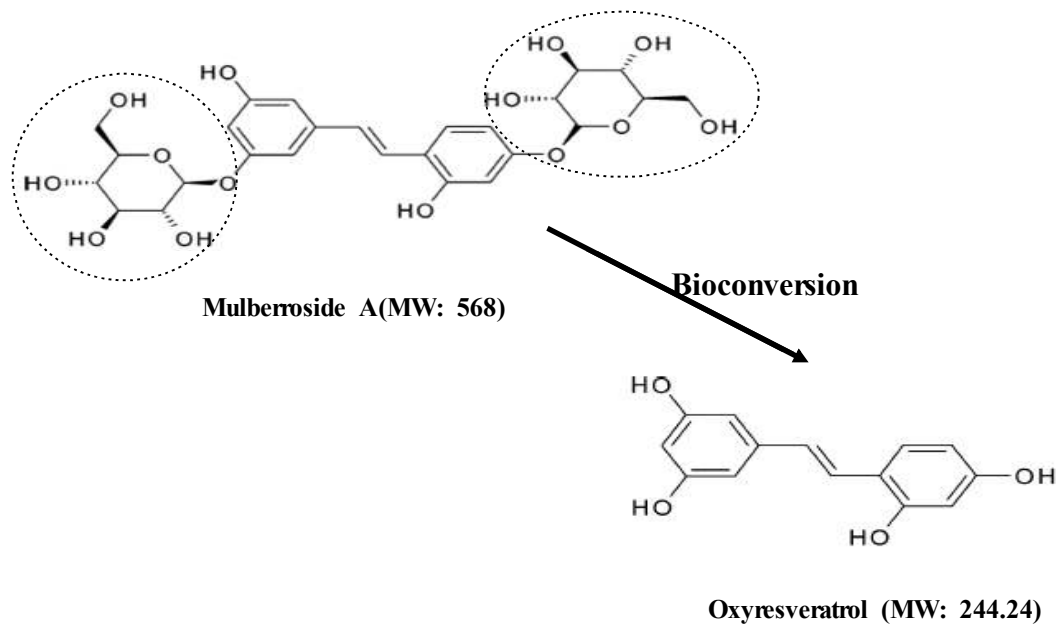


Fig. 42. Mulberroside A로부터 oxyresveratrol로의 생물 전환.

7. Oxyresveratrol 및 비교물질 들의 tyrosinase 활성저해 비교 결과

Tyrosinase활성 저해를 L-tyrosine을 기질로 하여 시료들의 농도별로 측정해본 결과 oxyresveratrol의 경우 mulberroside A에 비해 효소활성저해효과가 크게 향상되었으며 비교물질로 사용한 kojic acid 및 arbutin에 비해서도 월등히 우수한 효소활성저해효과를 보였다 (Fig. 43). Mushroom tyrosinase의 활성 저해효과를 효소의 활성을 50% 감소시키는 IC₅₀값을 기준으로 비교해 보면 L-tyrosine을 기질로 한 monophenolase 활성억제의 경우 효소처리전의 mulberroside A에 비해 생물 전환시킨 후의 생성물 oxyresveratrol에 의한 활성저해가 약 100배 이상 증가하였다 (Table 8). 또한 미백 효과가 큰 것으로 알려져 미백제의 원료로 널리 사용되어온 kojic acid의 효소 활성 저해율 보다 43배가 증가한 것으로 나타났다. Arbutin은 피부의 미백에 도움을 주는 기능성화장품의 원료로 식품의약품 안전청에서 지정한 물질이다. Arbutin과 oxyresveratrol의 활성저해효과를 비교해 보면 oxyresveratrol의 경우 1500배 이상의 활성 저해 효과를 보였다. L-DOPA를 기질로 사용한 diphenolase활성 저해는 oxyresveratrol의 경우 kojic acid에 비해 약 33배의 활성저해 증가를 보였다. Mulberroside A 및 arbutin의 경우 3000 μ M이상에서도 diphenolase활성 저해를 보이지 않았다. 따라서 상백피 추출물중의 mulberroside A와 같은 배당체를 생물전환에 의해 당을 제거함으로써 tyrosinase 저해활성을 월등히 증가시킬 수 있음을 알 수 있다. Oxyresveratrol의 경우 L-tyrosine을 L-DOPA로 전환하는 단계에서의 효소 활성을 2.5 μ M의 낮은 농도에서 거의 100% 억제할 뿐만 아니라 L-DOPA를 dopaquinone으로 전환하는 단계에서의 효소활성도 억제하는 효과를 나타내었다.

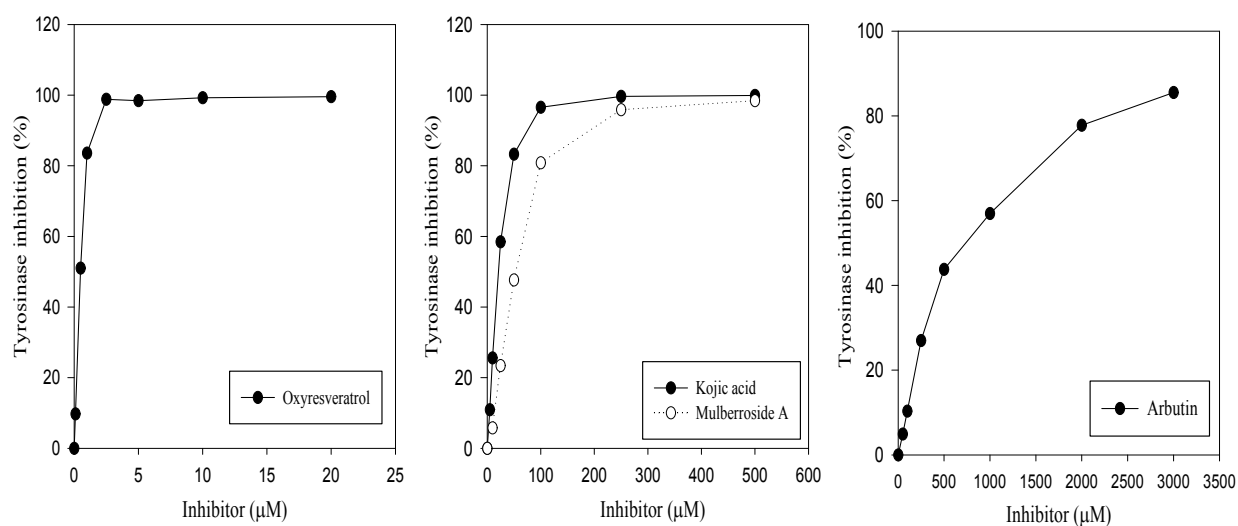


Fig. 43. Oxyresveratrol, Mulberroside A, kojic acid 및 arbutin의 tyrosinase 활성저해.

Table 8. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by Mulberroside A, oxyresveratrol, kojic acid, and arbutin

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	L-Tyrosine	L-DOPA
Arbutin	736.5	-
Kojic acid	21.1	387.9
Mulberroside A	53.6	-
Oxyresveratrol	0.49	11.9

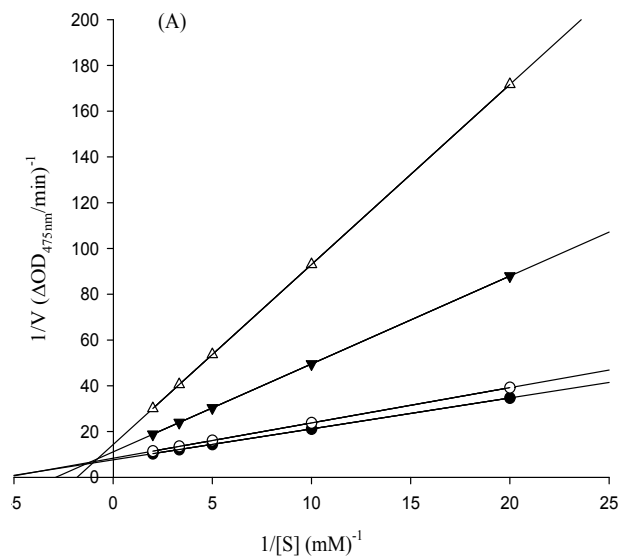
8. Mushroom tyrosinase 효소 활성억제 기작 결과

Tyrosinase inhibition mode에 대한 실험결과 oxyresveratrol의 경우 L-tyrosine을 기질로 한 monophenolase의 경우 mixed-type inhibition (혼합형 저해)의 양상을 나타내었고 L-DOPA를 기질로 사용한 diphenolase의 noncompetitive inhibition (비경쟁적 저해)을 보였다 (Fig. 44 및 45). Mulberroside A의 경우는 L-tyrosine 또는 L-DOPA를 기질로 사용한 경우 모두 tyrosinase의 active site에 기질과 경쟁적으로 결합하여 효소 활성을 저해하는 competitive inhibition (경쟁적 저해)을 보였다. L-Tyrosine을 기질로 oxyresveratrol을 저해제로 사용한 경우 경쟁적 저해의 inhibition constant (K_i)와 비경쟁적 저해의 inhibition constant (K_i') 값으로 나누어 나타내었다 (Table 9).

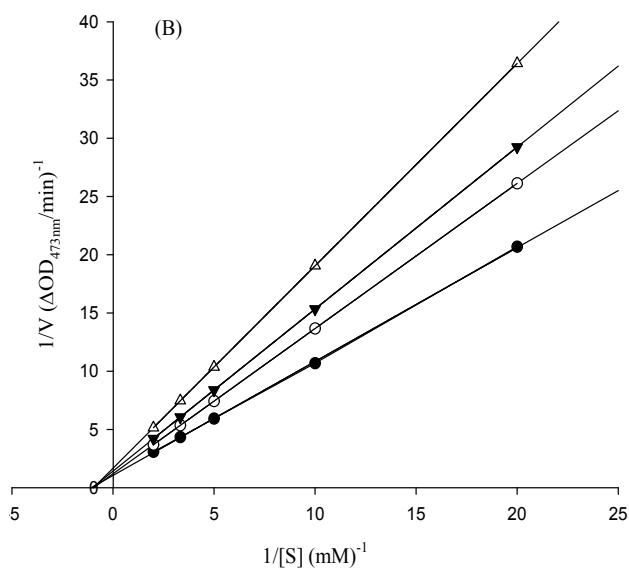
Table 9. K_i values for the monophenolase and diphenolase activities of mushroom tyrosinase in the presence of oxyresveratrol and mulberroside A.

Inhibitory agent	Substrate	K_i (μM)	Mode of inhibition
Oxyresveratrol	L-Tyrosine	1.093±0.052 (K_i) ^a	mixed ^b
		0.521±0.172 (K_i')	
	L-DOPA	1.272±0.026	noncompetitive
Mulberroside A	L-Tyrosine	49.821±0.637	competitive
	L-DOPA	124.764±1.771	competitive

^a $K_i = [E][I]/[EI]$, $K_i' = [ES][I]/[ESI]$, ^b competitive-noncompetitive

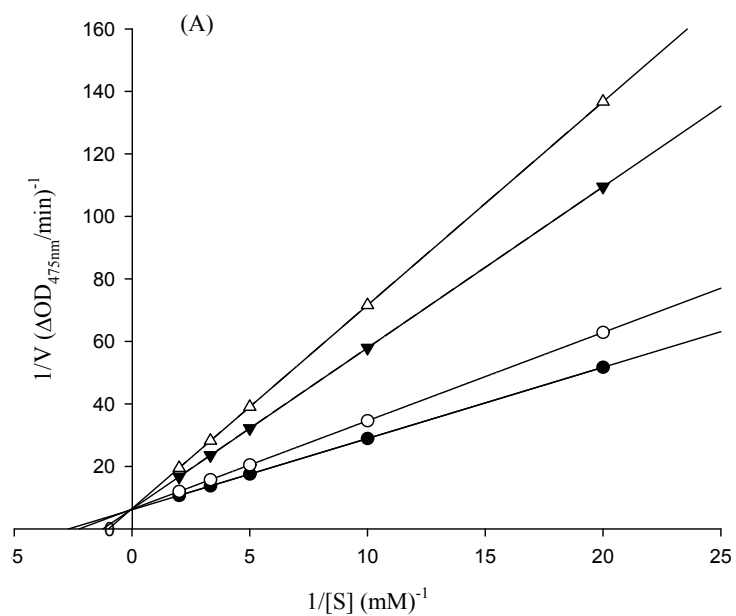


(A) L-tyrosine

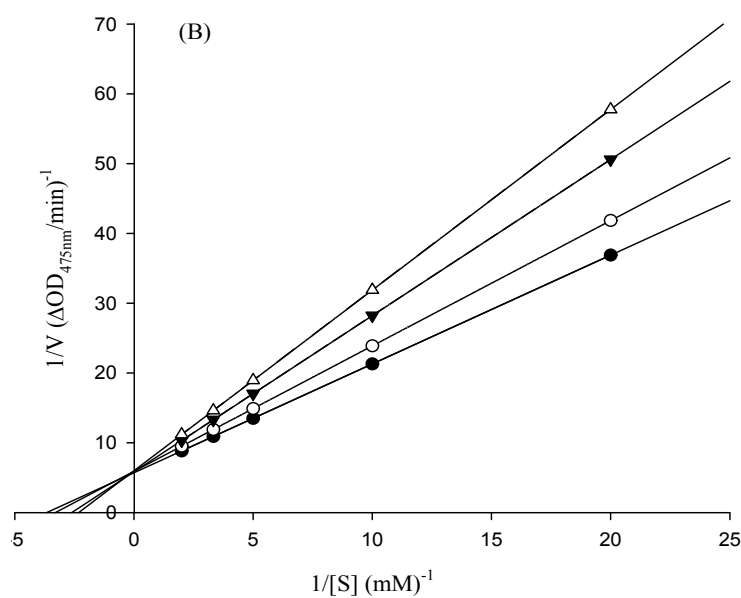


(B) L-DOPA

Fig. 44. Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase and L-tyrosine (A) or L-DOPA (B) with oxyresveratrol. The symbols represent without (●) and with (○) 0.1 μM , (▼) 0.5 μM , and (Δ) 1.0 μM oxyresveratrol.



(A) L-tyrosine



(B) L-DOPA

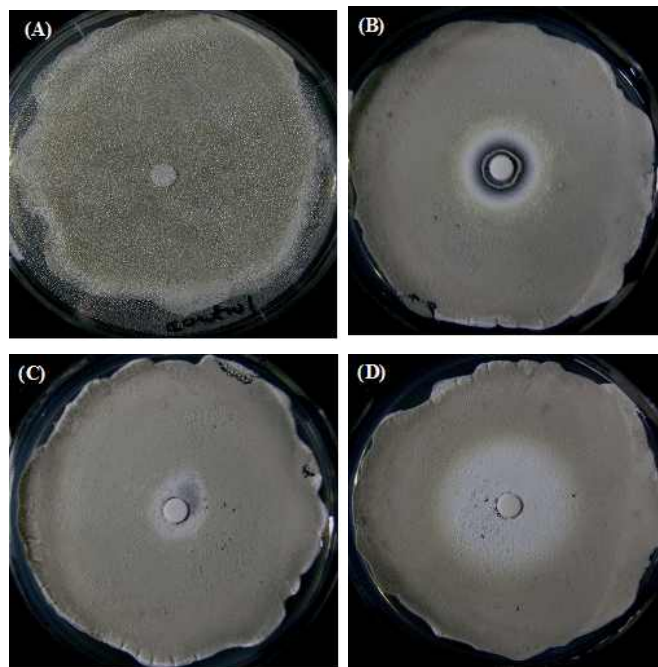
Fig. 45. Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase and L-tyrosine (A) or L-DOPA (B) with mulberroside A. The symbols represent without (●) and with (○) 10 μM , (▼) 50 μM , and (Δ) 100 μM mulberroside A.

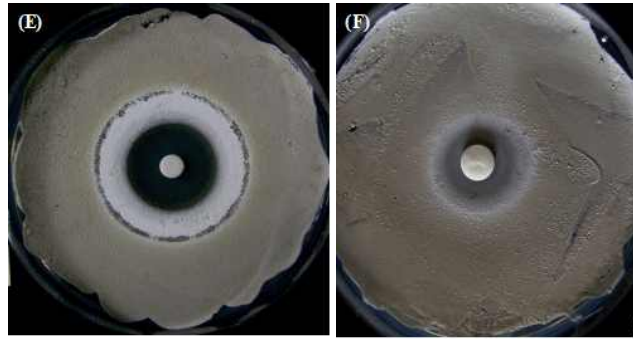
9. *Streptomyces bikiniensis*에 의한 melanin 합성저해 결과

Streptomyces bikiniensis KCTC 9172를 이용한 멜라닌 생성 억제효과를 검토한 결과, 1000 μg 의 농도에서는 시험에 사용한 oxyresveratrol, mulberroside A, arbutin, resveratrol 및 kojic acid 모두에서 inhibition zone이 나타났다 (Fig. 46).

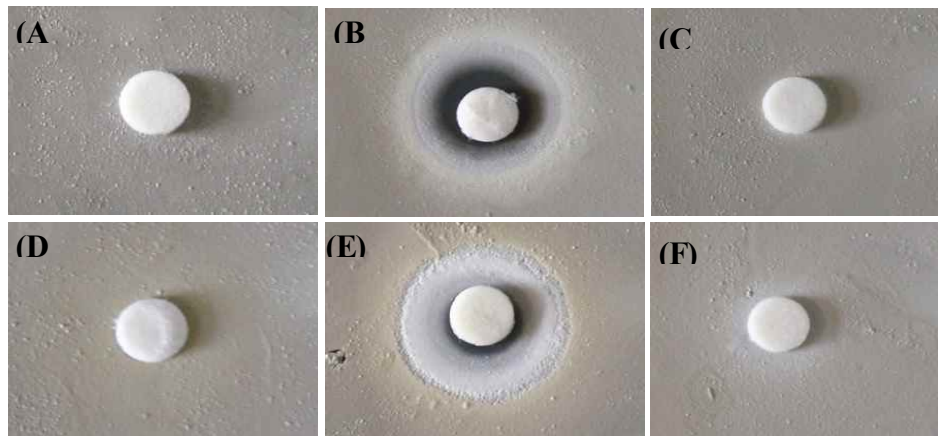
시료를 용해시키는데 사용된 DMSO를 negative control로 이용한 경우에는 inhibition zone이 나타나지 않았다. Inhibition zone의 크기는 농도 의존적으로 증가 하였으며, oxyresveratrol의 멜라닌 생성 억제효과가 mulberroside A 보다 뛰어남을 알 수 있었다 (Table 10). 비교물질로 사용한 arbutin, resveratrol 및 kojic acid와 비교하여도 우수한 멜라닌 생성 억제효과를 보였다. 이 결과를 tyrosinase inhibition 측정 결과와 비교해 보면, 두 결과가 매우 유사하여 높은 상관성을 나타내었다. 본 실험에서 관찰된 inhibition zone은 시료에 따라 *S. bikiniensis*의 증식이 억제되어 투명하게 보이는 부분과 균이 증식은 되었으나 멜라닌 색소를 생성하지 못하여 흰색을 띠는 부분이 동시에 관찰되는 결과를 보였다. 이것은 oxyresveratrol과 resveratrol이 멜라닌의 생성을 억제함과 동시에 *S. bikiniensis*의 증식 또한 억제한다는 의미로 해석할 수 있다. 따라서 oxyresveratrol 및 resveratrol은 멜라닌 생성 억제효과 뿐만 아니라 항균제로써의 이용 가능성도 있을 것으로 기대된다.

(1)





(2)



(3)

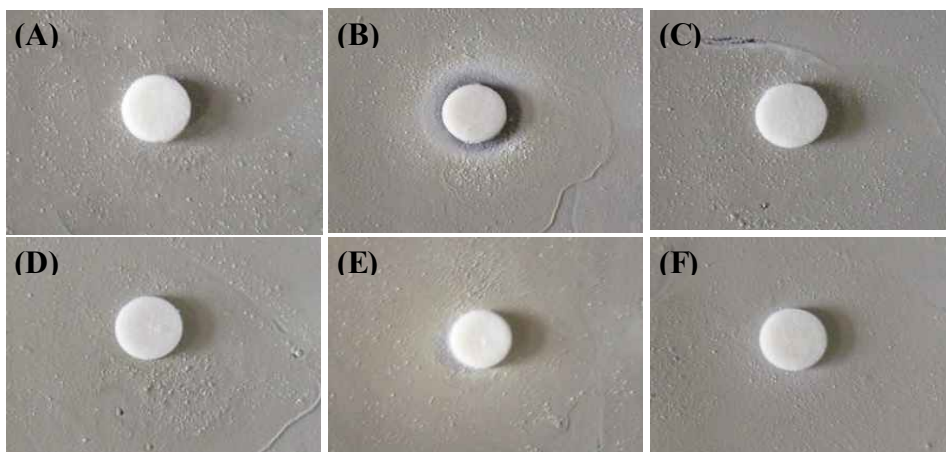


Fig. 46. Inhibition of melanin synthesis of resveratrol, arbutin, mulberroside A, oxyresveratrol, and kojic acid by *Streptomyces bikiniensis*. The disk contained 1000 μg (1), 500 μg (2), and 100 μg (3) of each compound and the control contained DMSO only. A, control; B, resveratrol; C, arbutin; D, mulberroside A; E, oxyresveratrol; F, kojic acid

Table 10. Inhibitory activity of the compounds on melanin synthesis and growth in *Streptomyces bikiniensis* KCTC 9172.

Compound (1 mg)	Inhibition zone of melanin synthesis (mm)	Growth inhibition zone (mm)
Oxyresveratrol	41.2±0.0	24.1±0.14
Mulberroside A	33.5±0.21	-
Arbutin	16.0±0.28	-
Resveratrol	21±0.0	14.3±0.14
Kojic acid	30.0±0.01	-

10. 멜라닌 생성세포를 이용한 세포내 tyrosinase 활성 저해 및 melanin 생성억제

10.1 멜라닌 생성세포에 대한 세포 독성 실험 결과

Mulberroside A, oxyresveratrol, rhapontin, rhapontigenin, resveratrol 및 arbutin이 세포 독성에 미치는 농도를 조사하여 미백실험치는 농될 농도범위를 결정하기 위해 MTT assay법을 이용하여 melanoma세포에 대한 시료물질의 세포독성시험을 실시하였다. 세포 생존율이 90% 이상을 보이는 농도는 Mulberroside A, oxyresveratrol, rhapontin, rhapontigenin, resveratrol 및 arbutin이 각각 약 40, 20, 40, 60, 20, 60 μ M을 나타내었다 (Fig. 47). Oxyresveratrol 및 resveratrol의 경우 20 μ M이상이 되면 세포독성이 저하되었다(Table 11). 이 결과는 *S. bikiniensis*에서 두 화합물이 melanin합성 저해뿐만 아니라 균의 생육도 억제하는 결과를 보였던 것과 상관성이 있음을 나타내었다.

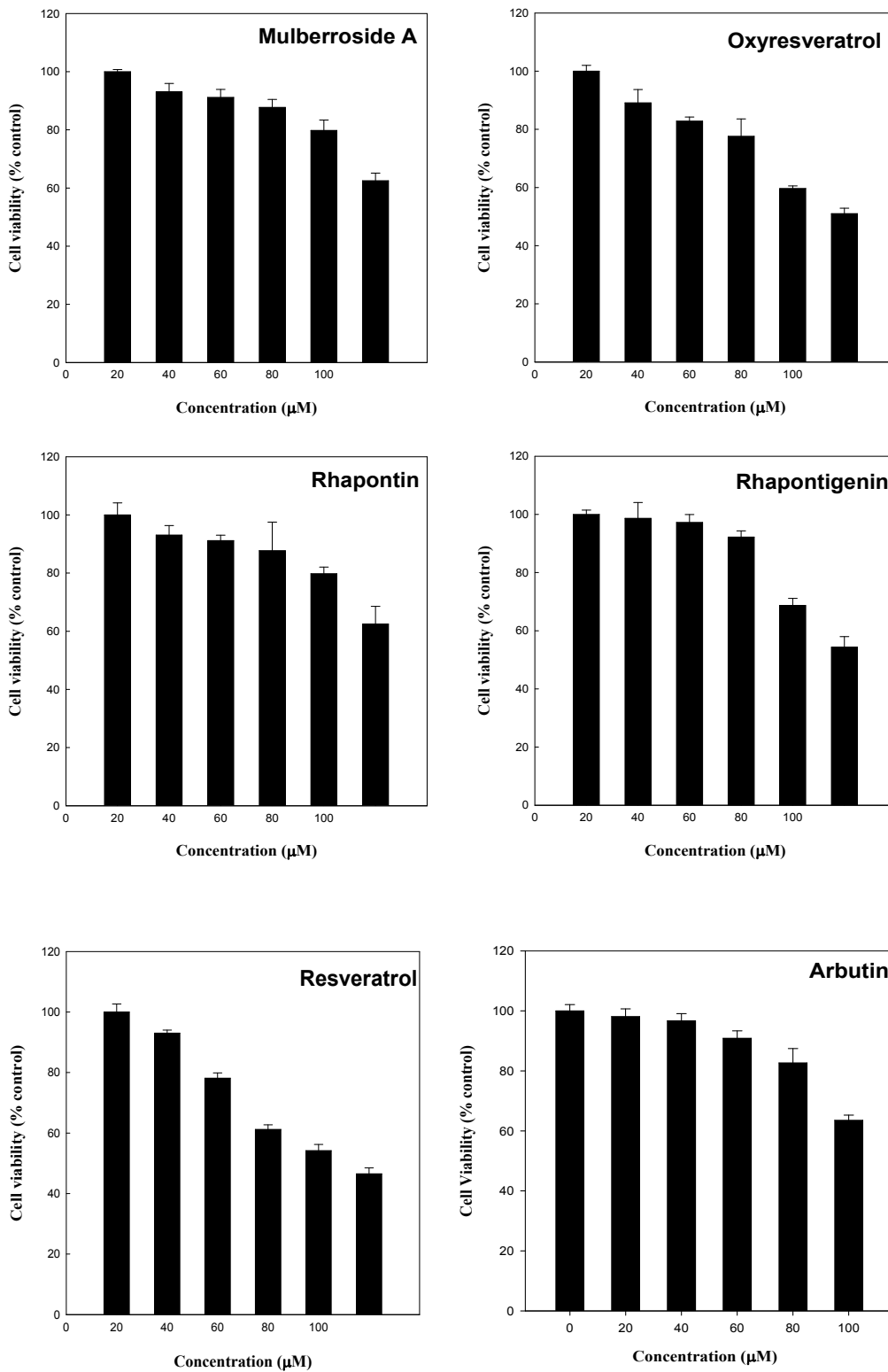


Fig. 47. The viability of B16/F10 melanoma cells measured by MTT assay.

Table 11. Relative cell viability of B16F10 after treating each compound.

Compound	Concentration (μM)					
	0	20	40	60	80	100
Mulberroside A	100	93.1 \pm 2.9	91.1 \pm 2.7	87.7 \pm 2.7	79.8 \pm 3.6	62.5 \pm 2.6
Oxyresveratrol	100	89.1 \pm 4.5	82.8 \pm 1.4	77.6 \pm 6.0	59.7 \pm 0.9	51.0 \pm 1.9
Rhapontin	100	93.6 \pm 3.3	92.7 \pm 1.9	87.4 \pm 9.8	72.4 \pm 2.3	61.8 \pm 6.1
Rhapontigenin	100	98.6 \pm 5.4	97.3 \pm 2.7	92.2 \pm 2.2	68.6 \pm 2.5	54.3 \pm 3.7
Resveratrol	100	93.0 \pm 1.0	78.1 \pm 1.8	61.2 \pm 1.5	54.2 \pm 2.0	46.5 \pm 2.0
Arbutin	100	98.1 \pm 2.6	96.7 \pm 2.4	90.9 \pm 2.5	82.7 \pm 4.6	63.5 \pm 1.7

10.2 멜라닌 생성 세포내의 tyrosinase 활성 억제 실험 결과

멜라닌 합성은 세포내에서 여러 단계의 반응을 거쳐 L-tyrosine으로부터 합성된다. 따라서 실제 세포내에서의 melanin 합성은 여러 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려졌다. 세포내에서의 멜라닌 합성저해를 측정하기 전에 멜라닌 합성에 관여하는 효소활성의 저해를 측정하기 위해 멜라닌 생성을 촉진하는 melanin stimulating hormone을 처리한 melanoma cell에서의 세포내 tyrosinase 활성을 측정하였다. 처리한 시료의 농도는 세포독성 결과를 참고하여 oxyresveratrol 및 mulberroside A의 경우 독성이 없는 농도범위(0-5 μM) 내에서 시료를 처리하였으며 rhapontigenin 및 rhapontin의 경우는 0-50 μM 범위내에서 측정하였다. 멜라닌 생성을 촉진하는 MSH를 동시에 처리한 후 tyrosinase 활성을 측정하였다. 시료 처리군에서 시료 비처리군에 비해 세포내 tyrosinase 활성이 크게 감소하였다 (Fig. 48). MSH만을 처리한 시험군의 활성을 100%로 하여 상대적인 효소활성을 보면 MSH 비처리군의 경우 56% 정도의 활성을 보였으며, oxyresveratrol 또는 mulberroside A를 각각 5 μM 농도로 처리한 경우 각각 61%와 63%의 효소 활성을 보였다. 비교물질로 사용한 arbutin의 경우에는 50 μM 처리시 73.6%의 효소 활성을 보였다. Mulberroside A 및 oxyresveratrol의 경우 arbutin에 비해 효소 활성억제 효과가 크게 증가 하였다. 또한 Oxyresveratrol 및 mulberroside A의 경우 rhapontin 및 rhapontigenin에 비해서도 활성 감소가 더 크게 나타났다. 세포내 tyrosinase 활성 저해효과는 측정 조건이 MSH를 처리한 조건에서 차이를 보이기는 하나 세포내 tyrosinase 활성저해 효과는 mushroom tyrosinase

활성저해 결과와 마찬가지로 큰 폭으로 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 확인되었다. 그러나 mulberroside A와 oxyresveratrol간의 세포내 효소 활성 억제에 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

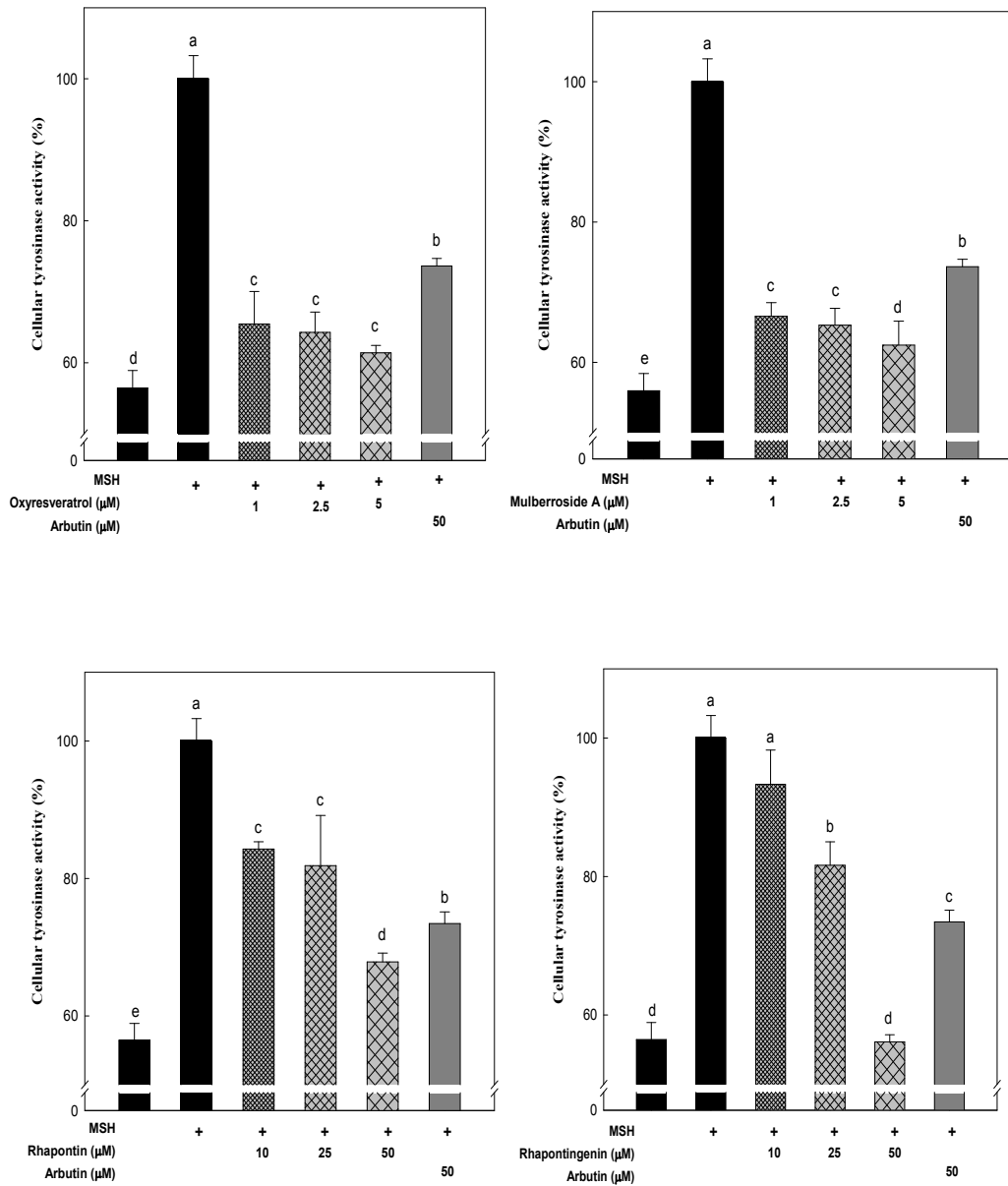


Fig. 48. Inhibitory effect of cellular tyrosinase in B16F10 melanoma cell for 36 hours. The cell were harvested and measured tyrosinase activity at 492 nm. Results were expressed % control of only 100 μM MSH treated group and expressed mean±SD (n=3). Means with the different letters are significantly different (p<0.05).

10.3 멜라닌 생성 세포를 이용한 melanin 생성 억제 실험 결과

B16F10세포에 시료를 세포독성이 없는 농도내에서 농도별로 처리 후 세포내에 생성된 멜라닌의 양을 측정하였다. 처리한 시료의 농도는 세포독성 결과를 참고하여 oxyresveratrol 및 mulberroside A의 경우 0-5 μM 농도범위 내에서 시료를 처리하였으며 rhapontigenin 및 rhapontin의 경우는 0-50 μM 범위내에서 측정하였다. 처리군별로 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해되었다(Fig. 49). MSH 비처리군의 경우 33 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein 농도의 melanin이 생성되었다. MSH만을 처리한 세포의 경우 88.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein 농도의 melanin이 생성되었으며 oxyresveratrol 및 mulberroside A의 경우 각 시료 5 μM 처리시 두 시료 처리군 모두 38.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein 농도의 melanin이 생성되었다. 비교물질로 사용한 arbutin의 경우에는 50 μM 처리시 64.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein 농도의 melanin이 생성되었다. Mulberroside A 및 oxyresveratrol의 경우 arbutin에 비해 멜라닌 생성억제 효과가 크게 증가 하였으며 rhapontin 및 rhapontigenin과 비교하여도 멜라닌 생성억제 효과가 큰 것으로 나타났다. 그러나 세포내 tyrosinase활성 저해의 경우와 같이 mulberroside A 및 oxyresveratrol 간에 멜라닌 합성 억제 효과에 차이가 거의 나타나지 않았다. 멜라닌 생성억제 효과를 육안적으로 관찰하여 Fig. 50에 나타내었다. 대조군으로 사용한 MSH 처리군에서 멜라닌 색소 형성이 크게 증가하였음을 확인할 수 있었다. 시료처리군에서는 대조군보다 멜라닌 색소 농도가 크게 감소하였고 특히 5 μM 농도에서는 MSH 비처리군과 큰 차이가 없을 정도로 멜라닌 색소가 현저히 감소하였다. Oxyresveratrol 및 mulberroside A처리군의 세포를 자세히 관찰 해본 결과 oxyresveratrol 처리군에서 특히 하얀 반점이 생성된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 51). 하얀 반점이 생성된 이유를 본 연구에서는 밝힐 수 없었으나 melanin 합성저해에 의한 효과보다 다른 원인에 의한 미백효과를 나타내는 것으로 생각되어 이 현상에 대한 기작을 밝히는 연구 또한 필요할 것으로 생각된다. 멜라닌 합성에 관련된 유전들의 발현에 대한 실험 결과를 보면 oxyresveratrol의 경우가 melanin 합성에 관련된 유전자의 발현을 억제함으로써 melanin합성이 감소된 것임을 알 수 있었다 (Fig. 52, 53). Mulberroside A와 oxyresveratrol의 미백효과를 확인 해 본 결과를 종합해 보면 Mulberroside A로부터 효소전환에 의해 배당체인 oxyresveratrol를 만든 경우 Mushroom tyrosinase 활성 저해효과가 100배 정도 월등히 증가하는 것을 알 수 있었다. 실제 세포를 이용한 경우 oxyresveratrol 및 mulberroside A의 tyrosinase 활성 저해 및 melanin 생성억제 효과가 대조군 및 비교물질 arbutin, rhapontin 및 rhapontigenin에 비해 크게 나타났다. 그러나

oxyresveratrol과 mulberroside A간의 차이는 mushroom tyrosinase활성 억제효과에서 확인되었던 것과 같은 차이를 보이지 않았다. 이는 oxyresveratrol의 구조를 고려하면 안정성이 크지 않은 때문이거나 세포내로의 침투성에 문제가 있을 수 있으며 또한 두 요인에 더하여 세포내에서의 대사 등 여러 가지 원인이 복합적으로 관여하여 나타난 결과일 것으로 생각된다.

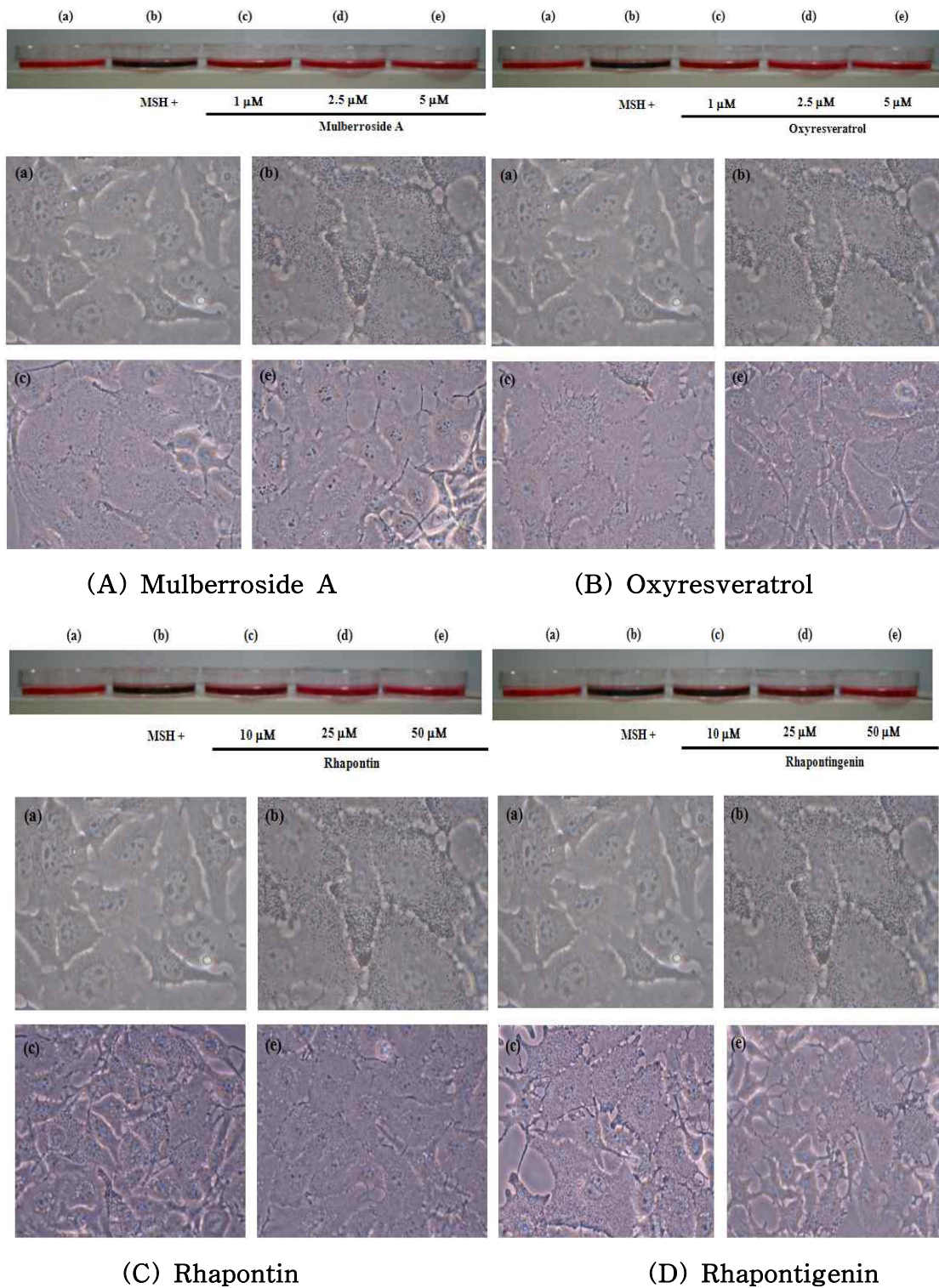
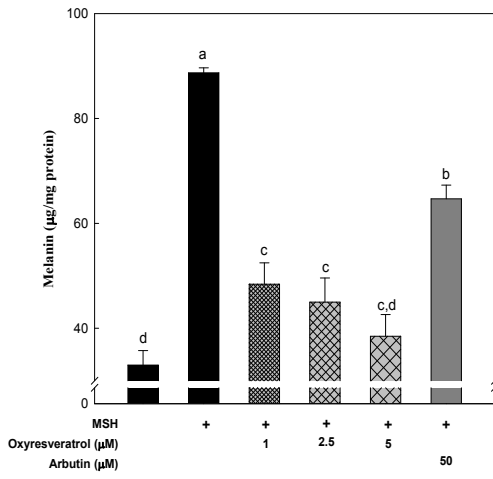
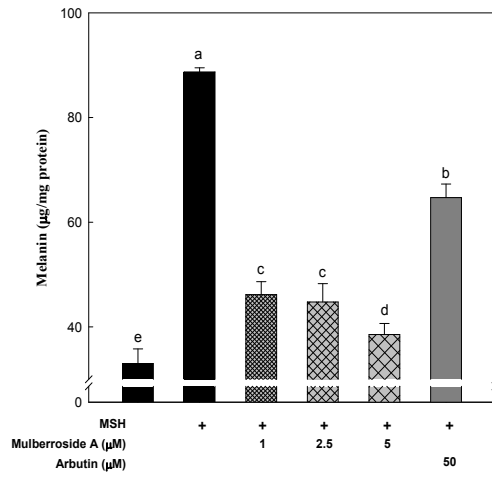


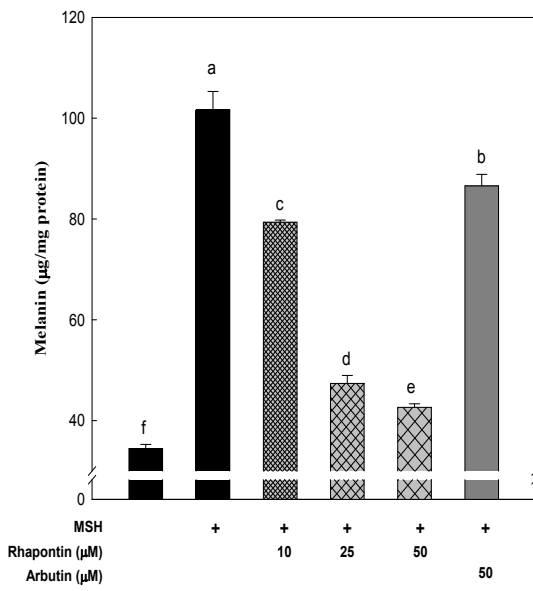
Fig. 49. Inhibitory effect of melanin biosynthesis in B16F10 melanoma cell for 36 hours. Melanin content were measured at 405 nm. Results were expressed μ g/mg protein expressed mean \pm SD (n=3). Means with the different letters are significantly different (p<0.05).



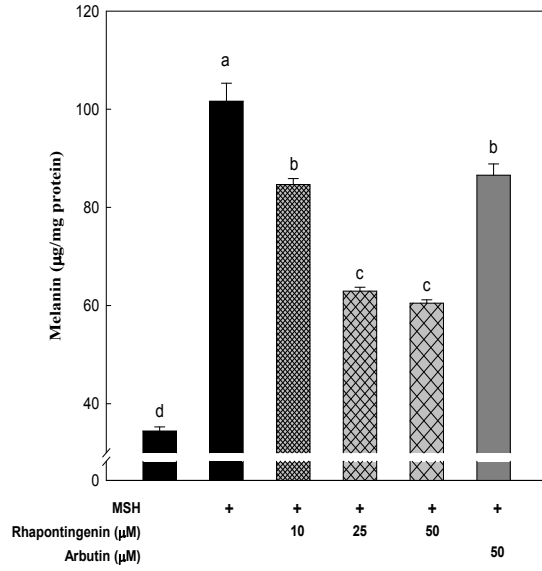
(A) Oxyresvratrol



(B) Mulberroside A



(C) Rhapontin



(D) Rhapontigenin

Fig. 50. Melanin synthesis in B16/F10 melanoma cells.

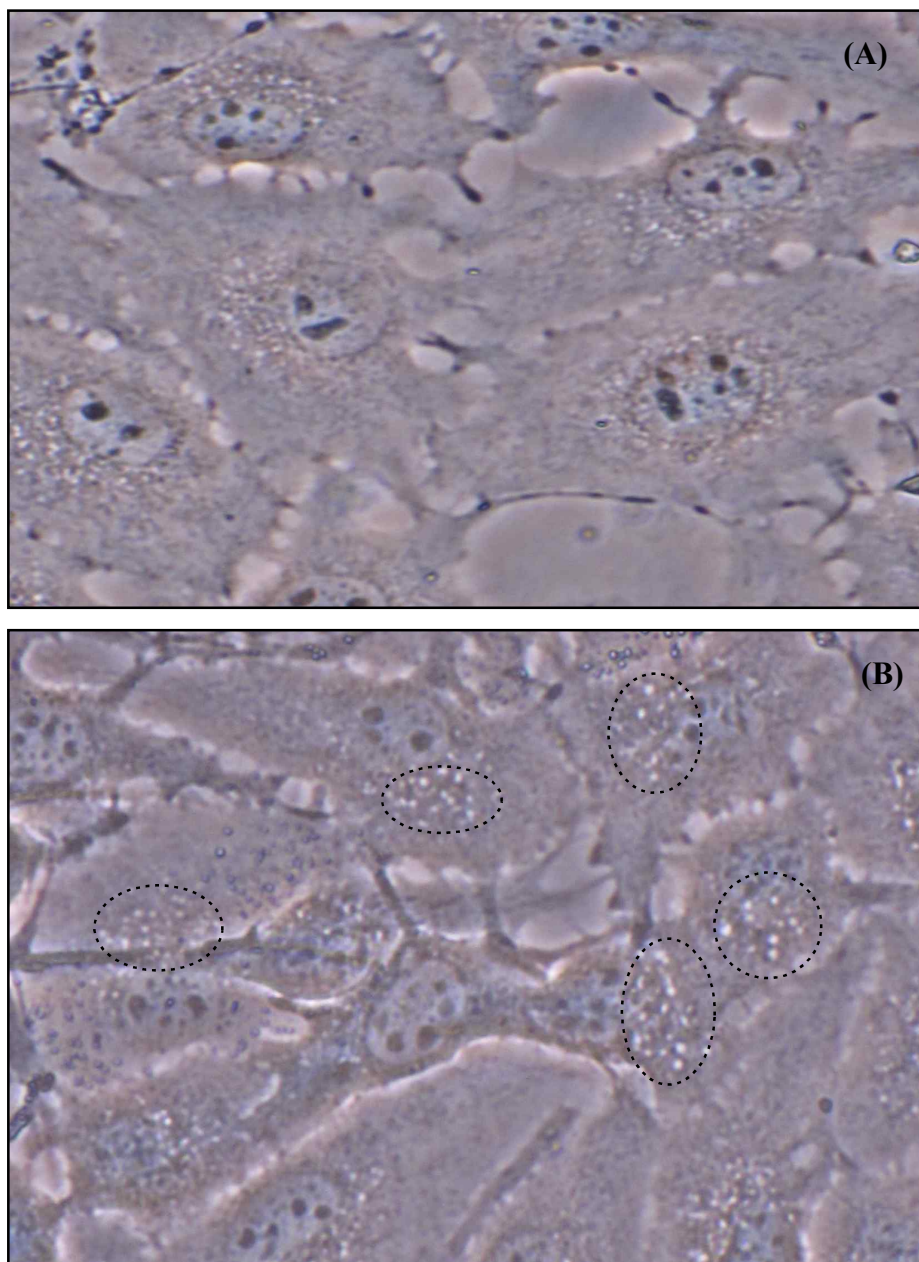


Fig. 51. Comparison of whitening effect of mulberroside A (A) and oxyresveratrol (B) in B16F10 cell. White spots in cells treated with oxyresveratrol are shown in circles.

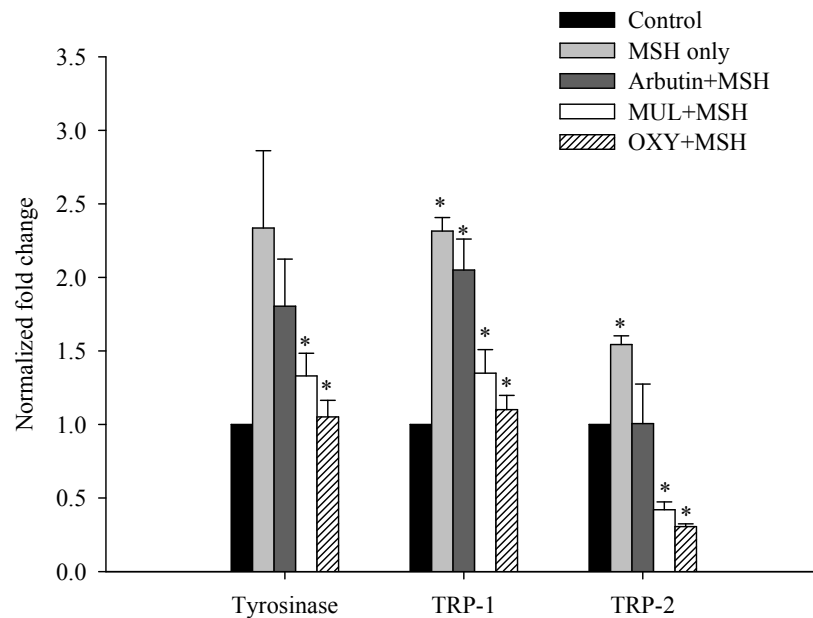


Fig. 52. Quantitative real-time RT-PCR of melanogenic enzymes. The cells were treated with α -MSH (100 nM) and arbutin (50 μ M), mulberroside A (MUL, 5 μ M), or oxyresveratrol (OXY, 5 μ M). Data were normalized by using actin as a control. The values of normalized fold expression were determined from three independent experiments and expressed as mean values \pm SD. The asterisks denote the statistic significance of $p < 0.05$, in comparison with the control which was normalized to 1.

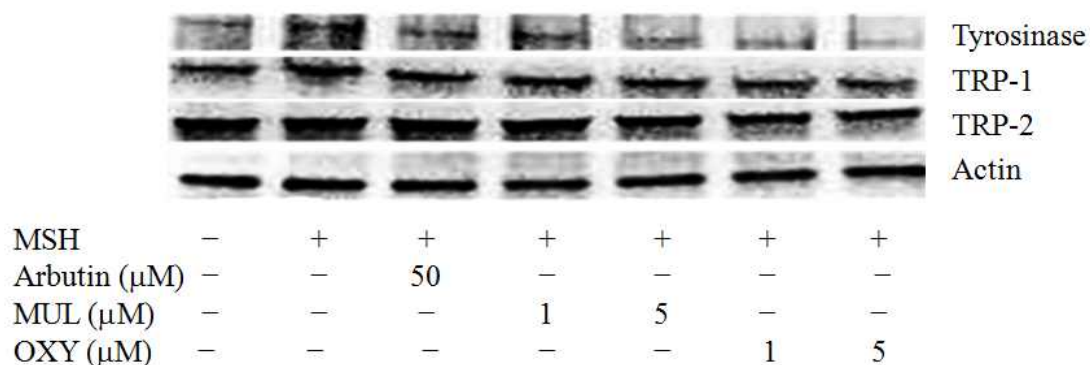


Fig. 53. Western blotting of melanogenic enzymes. The cells were treated with α -MSH (100 nM) and each chemical of designated concentration.

11. UV 흡수력 측정 결과

Arbutin 및 kojic acid의 경우 최대 흡수영역이 280 nm 영역이었으며, mulberroside A 및 oxyresveratrol의 경우에는 305 nm 전후 및 320 nm 전후에서 흡수력을 보였다(Fig. 54). Resveratrol, rhapontin 및 rhapontigenin의 경우에도 oxyresveratrol과 유사한 흡수영역을 보였다. Kojic acid 및 arbutin에는 한 개의 벤젠 고리가 있으며, resveratrol, oxyresveratrol, mulberroside A, rhapontin 및 rhapontigenin은 두 개의 벤젠 고리를 갖는 화합물의 구조적인 차이에 의해 최대 흡수영역에 차이를 보인 것으로 생각된다. 흡수력을 OD값으로 비교해 보면 25 μ M resveratrol의 경우 흡수력이 50 μ M mulberroside A 및 oxyresveratrol과 유사한 흡수력을 보였다. Kojic acid의 경우 arbutin 보다 약 3배 높은 흡수력을 보였다. Oxyresveratrol 및 mulberroside A를 비롯한 시험물질들은 UV 흡수 영역은 다르나 모두 뛰어난 UV 흡수력을 보여 시험 물질들이 UV 차단효과가 있음을 확인하였다.

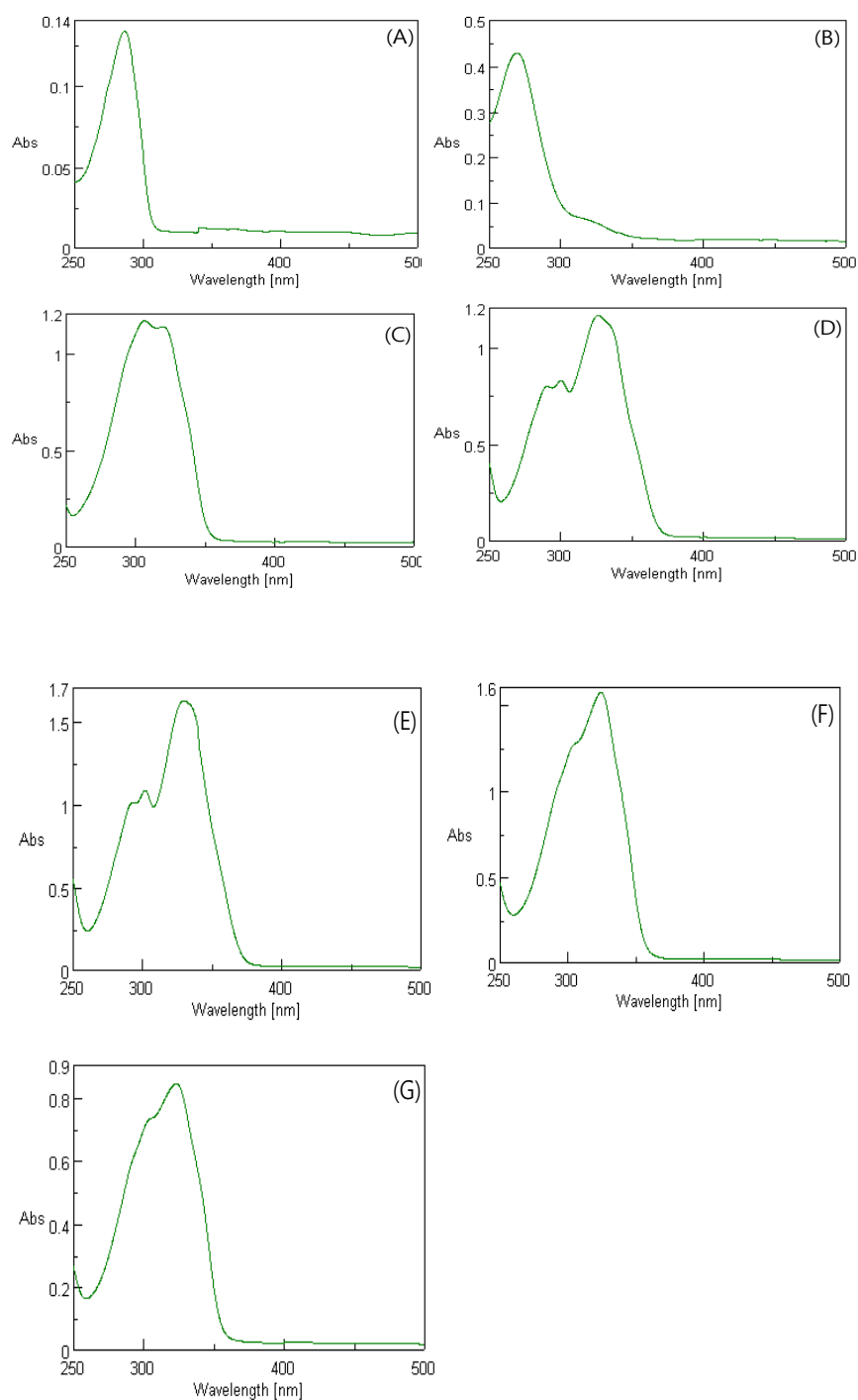


Fig. 54. Absorption of UV-A and UV-B of arbutin, kojic acid, resveratrol, mulberroside A, oxyresveratrol, rhapontin, and rhapontigenin. The concentration of each compound was 50 μM except resveratrol (25 μM). A, arbutin; B, kojic acid; C, resveratrol; D, mulberroside E; oxyresveratrol; F, rhapontin; G, rhapontigenin

12. 항균력 측정 결과

시험 물질에 대해 항균력을 측정한 결과는 Table 12와 같다. Oxyresveratrol의 경우는 mulberroside A에 비해 대체로 2-8배의 항균 활성을 보여 주었다. 또한 mulberroside A의 경우는 그람 양성 및 그람 음성균간의 항균력의 차이가 없었으나 oxyresveratrol의 경우는 그람양성균의 경우 그람 음성균에 비해 대체로 더 높은 항균력을 보였다. 진균에 대해서는 mulberroside A 및 oxyresveratrol 모두 항균효과를 나타내지 않았다. 항균효과를 보인 oxyresveratrol의 경우 *S. aureus* 균은 내성균과 감수성균간의 항균력에 차이가 없었으나, *E. faecalis* 및 여드름의 원인균으로 알려진 *P. acnes* 경우는 내성균과 감수성균간에 항균력의 차이를 보였으며 내성균이 감수성균에 비해 2배의 MIC 농도를 나타내었다. 이 결과에 의하면 oxyresveratrol 단독으로는 항균제로서의 효과가 뛰어나지 않으나 기존의 항생제와의 병행 사용에 의해 시너지 효과를 가져 올 수 있을 것으로 생각되므로 기존의 항생제와의 병용 효과에 대한 확인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

Table 12. Minimum inhibitory concentration of rhapontigenin, retinol, mulberroside A, and oxyresveratrol against various bacteria.

	Rhapontigenin	Retinol	Mulberroside A	Oxyresveratrol
Gram positive				
<i>S. aureus</i>	≤256	≤16	>1024	≤512
MRSA ¹	≤256	≤8	>1024	≤512
<i>E. faecalis</i>	≤256	≤16	>1024	≤128
VRE ²	≤512	≤16	>1024	≤256
<i>P. acnes</i>	≤128	≤4	>1024	≤128
<i>P. acnes</i> (R) ³	≤128	≤4	>1024	≤256
Gram negative				
<i>E. coli</i>	≤512	>1024	>1024	≤1024
<i>P. aeruginosa</i>	>1024	>1024	>1024	>1024
Fungi				
<i>C. albicans</i>	≤256	>1024	>1024	>1024

¹methicillin-resistant *S. aureus*

²vancomycin-resistant *E. faecalis*

³clindamycin-resistant

13. Oxyresveratrol의 안정도

13.1 Oxyresveratrol의 pH에 따른 경시 변화

13.1.1 냉장(10℃) 조건하에서 pH에 따른 경시

10℃의 냉장하에서 oxyresveratrol의 pH에 따른 경시 변화를 검토한 결과, pH 3.8의 산성 조건하에서 37일 보존할 시 oxyresveratrol의 잔존율은 95.9%를 나타내었다. 반면에 pH 7.5에서는 23일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 약 51.0%, 37일 보존시 42.8% 나타내어 산성 조건 보다 불안정한 것으로 나타났다. pH 8.6의 약 알카리 조건하에서는 8일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 5% 미만을 나타내어 oxyresveratrol은 보존시 pH가 매우 중요한 것으로 나타났다.

Table 13. pH에 따른 oxyresveratrol의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		23일		37일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
pH 3.8	0.49	100.00	0.46	93.88	0.46	93.88	0.47	95.92
pH 7.5	0.49	100.00	0.40	81.63	0.25	51.02	0.21	42.86
pH 8.6	0.32	100.00	0.015	4.60	0.00	0.00	0.00	0.00

13.1.2 상온차광(23~28도)에서 pH에 따른 경시 변화

상온 차광 조건하에서 oxyresveratrol의 pH에 따른 경시 변화를 검토한 결과, pH 3.8의 산성 조건하에서 37일 보존할 시 oxyresveratrol의 잔존율은 91.8%를 나타내었다. 반면에 pH 7.5에서는 37일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 약 6.1%를 나타내어 냉장 조건보다 잔존율이 낮게 나타났다. pH 8.6의 약 알카리 조건하에서는 8일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 0% 미만을 나타내어 oxyresveratrol은 보존시 pH가 매우 중요한 것으로 나타났다.

Table 14. 상온차광(23~28도)에서 pH에 따른 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		23일		37일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
pH 3.8	0.49	100.0	0.46	93.88	0.45	91.84	0.45	91.84
pH 7.5	0.49	100.0	0.30	61.22	0.03	6.12	0.03	6.12
pH 8.6	0.32	100.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

13.1.3 40℃에서의 pH에 따른 경시 변화

40℃ 차광 조건하에서 oxyresveratrol의 pH에 따른 경시 변화를 검토한 결과, pH 3.8의 산성 조건하에서 37일 보존할 시 oxyresveratrol의 잔존율은 89.8%를 나타내었다. 반면에 pH 7.5에서는 8일 보존시 6.1%, 23일, 37일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 약 0%를 나타내어 냉장 조건보다 잔존율이 낮게 나타났다. pH 8.6의 약 알카리 조건하에서는 8일 존시 oxyresveratrol의 잔존율이 0% 미만을 나타내어 oxyresveratrol은 보존시 pH 뿐만 아니라 온도도 중요한 요인임을 알 수 있었다.

Table 15. 40℃에서의 pH에 따른 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		23일		37일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
PH 3.8	0.49	100.00	0.45	91.83	0.43	87.75	0.44	89.79
PH 7.5	0.49	100.00	0.03	6.12	0.00	0.00	0.00	0.00
PH 8.6	0.49	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

13.2 Oxyresveratrol의 용매조건에 따른 경시 변화

13.2.1 냉장(10℃)에서의 용매조건에 따른 경시 변화

Oxyresveratrol을 에탄올, DMSO등의 유기 용매에 용해하여 냉장 조건하에서 경시 변화를 살펴 본 결과, 에탄올과 DMSO에 용해하여 56일 보존시에도 98% 이상의 잔존율을 나타내어 유기용매에 보존시 안정한 것으로 나타났다.

Table 16. 냉장(10℃)에서의 용매조건에 따른 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Ethanol	0.52	100.00	0.52	100.00	0.51	98.07	0.51	98.07
50% Ethanol	0.51	100.00	0.51	100.00	0.50	98.03	0.50	98.03
DMSO	0.51	100.00	0.51	100.00	0.50	98.03	0.50	98.03
50% DMSO	0.50	100.00	0.49	98.00	0.48	96.00	0.48	96.00
50% 1,3 BG	0.48	100.00	0.47	97.90	0.47	97.90	0.46	95.83

13.2.1 상온차광에서 용매조건에 따른 경시 변화

Oxyresveratrol을 에탄올, DMSO등의 유기 용매에 용해하여 상온차광 조건하에서 경시 변화를 살펴 본 결과, 에탄올과 DMSO에 용해하여 56일 보존시에도 98% 이상의 잔존율을 나타내어 유기용매 보존시에는 상온하에서도 안정한 것으로 나타났다.

Table 17. 상온차광, 용매조건하에서 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Ethanol	0.52	100.00	0.51	98.07	0.51	98.07	0.51	98.07
50% Ethanol	0.51	100.00	0.51	100.00	0.51	100.00	0.50	98.03
DMSO	0.51	100.00	0.51	100.00	0.50	98.03	0.50	98.03
50% DMSO	0.50	100.00	0.50	100.00	0.50	100.00	0.48	96.00
50% 1,3 BG	0.48	100.00	0.46	95.83	0.46	97.90	0.45	93.75

13.2.3 40℃에서 용기 용매하에서 경시 변화

Oxyresveratrol을 에탄올, DMSO등의 유기 용매에 용해하여 40℃에서 경시 변화를 살펴본 결과, 에탄올과 DMSO에 용해하여 56일 보존시에도 96% 이상의 잔존율을 나타내어 유기용매 보존시에는 40℃의 고온에서도 안정한 것으로 나타났다.

Table 18. 40℃에서 용기 용매하에서 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Ethanol	0.52	100.0	0.51	98.07	0.50	96.15	0.50	96.15
50% Ethanol	0.51	100.0	0.51	100.00	0.50	98.03	0.49	96.08
DMSO	0.51	100.0	0.51	100.00	0.50	98.03	0.50	98.03
50% DMSO	0.50	100.0	0.50	100.00	0.48	96.00	0.48	96.00
50% 1,3 BG	0.48	100.0	0.45	93.75	0.45	93.75	0.44	91.67

13.3. 원료첨가에 따른 안정도 실험

13.3.1 냉장(10℃)에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 냉장 조건하에서 원료 첨가에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, HP-β-CD 하에서는 56일 보존시에도 97.6% 이상의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다. 또한 Liposome 하에는 56일 보존시 93.6%를 나타내어 비교적 안정한 것으로 나타났다.

Table 19. 냉장(10℃)에서 원료첨가에 따른 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.25	100.0	0.24	96.00	0.23	92.00	0.22	88.00	0.21	84.00	0.20	80.00
HP-β-CD	0.42	100.0	0.42	100.0	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62
Nano capsule	0.30	100.0	0.30	100.0	0.30	100.0	0.26	86.67	0.26	86.67	0.25	83.33
Liposome	0.63	100.0	0.60	95.24	0.62	100.0	0.60	95.23	0.59	93.65	0.59	93.65
Micro capsule	2.42	100.0	2.42	100.0	2.41	99.59	2.24	92.56	2.20	90.90	2.13	88.01

13.3.2 상온차광(23~28℃)에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 상온차광하에서 원료 첨가에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, HP-β-CD 하에서는 56일 보존시에도 97.6% 이상의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났으나 Liposome 하에는 56일 보존시 65.1%를 나타내어 불안정한 것으로 나타났다.

Table 20. 상온차광(23~28℃)에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.25	100.0	0.20	80.00	0.17	70.83	0.16	64.00	0.15	60.00	0.10	40.00
HP-β-CD	0.42	100.0	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62
Nano capsule	0.30	100.0	0.30	100.0	0.26	86.67	0.26	86.67	0.26	86.67	0.24	80.00
Liposome	0.63	100.0	0.58	92.06	0.53	84.13	0.51	80.95	0.50	79.36	0.41	65.08
Micro capsule	2.42	100.0	2.42	100.0	2.41	99.59	2.24	92.56	2.09	86.50	1.96	81.00

13.3. 40℃에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 40℃에서 원료 첨가에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, HP-β-CD 하에서는 56일 보존시에도 97.6% 이상의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다으나 다른 물질들은 불안정하게 나타났다.

Table 21. 40℃에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.25	100.0	0.17	68.00	0.15	60.00	0.13	52.00	0.11	60.00	0.07	28.00
HP-β-CD	0.42	100.0	0.42	100.0	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62
Nano capsule	0.30	100.0	0.30	100.0	0.26	86.67	0.24	80.00	0.24	80.00	0.23	76.67
Liposome	0.63	100.0	0.55	98.73	0.49	77.78	0.44	69.84	0.37	58.73	0.27	42.86
Micro capsule	2.42	100.0	2.42	100.0	2.36	97.52	2.31	95.45	2.01	83.05	1.89	78.09

13.4. 제형제조에 따른 안정도 실험

13.4.1 냉장(10℃)에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 냉장 조건하에서 제형제조에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, microcapsule 제형 제조시 56일 보존시에 87.5% 이상의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다.

Table 22. 냉장(10℃)에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.025	100.0	0.023	92.00	0.018	72.00	0.013	52.00	0.012	48.00	0.006	24.00
HP- β-CD	0.040	100.0	0.038	95.00	0.035	87.50	0.029	72.50	0.024	60.00	0.024	60.00
Nano capsule	0.025	100.0	0.023	92.00	0.022	88.00	0.020	80.00	0.017	68.00	0.017	68.00
Liposome	0.12	100.0	0.10	83.33	0.05	41.67	0.04	33.33	0.04	33.33	0.03	25.00
Micro capsule	0.24	100.0	0.23	95.83	0.23	95.83	0.22	92.92	0.22	91.60	0.21	87.50

13.4.1 상온 차광에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 상온 차광하에서 제형제조에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, microcapsule 제형 제조시 56일 보존시에 70.8%의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다.

Table 23. 상온 차광에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.025	100.0	0.010	40.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HP- β-CD	0.040	100.0	0.031	77.50	0.018	45.00	0.010	25.00	0.006	15.00	0.003	7.50
Nano capsule	0.025	100.0	0.021	84.00	0.017	68.00	0.013	52.00	0.010	40.00	0.009	36.00
Liposome	0.12	100.0	0.05	41.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Micro capsule	0.24	100.0	0.23	95.83	0.20	83.33	0.21	82.66	0.18	75.00	0.17	70.80

13.4.2 40℃에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 40℃에서 제형제조에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, microcapsule 제형 제조시 56일 보존시에 62.58%의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다.

Table 24. 40℃에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.025	100.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HP-β-CD	0.040	100.0	0.017	42.50	0.002	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Nano capsule	0.025	100.0	0.016	64.00	0.006	24.00	0.004	16.00	0.002	8.00	0.00	0.00
Liposome	0.12	100.0	0.007	5.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Micro capsule	0.24	100.0	0.23	95.83	0.17	70.83	0.17	70.83	0.16	66.70	0.15	62.50

13.5 Oxyresveratrol의 안정도 실험 결론

- 1) Oxyresveratrol은 중성 및 알칼리상태에서는 불안정하며, 산성에서 안정하여 pH조건을 고려하여 약산상태로의 제조가 필요하다.
- 2) 용매조건에서는 Ethanol, DMSO, 1,3 BG의 어떤 상태에서도 90%이상을 유지하며, 안정하다
- 3) 원료첨가에 따른 경시변화를 살펴본 결과, 냉장상태에서는 모두 안정하였으며 안정도 유지는 HP- β -CD > Microcapsule > Nano capsule > Liposome > Silica 순이었고 HP- β -CD에서는 온도의 영향을 받지 않으며 가장 이상적이었다.
- 4) 제형제조에 따른 경시변화를 살펴본 결과, Microcapsule을 제외하고는 모든 제형제조에서 불안정하였다. Microcapsule > Nano capsule > HP- β -CD > Liposome > Silica 순으로 안정성이 좋게 나타났다. Capsule 방법이 제형에서는 가장 좋으며, Nanocapsule보다는 Microcapsule방법이 더욱 좋게 나타났다.

14. Oxyresveratrol의 항암효과

14.1 Oxyresveratrol과 그 밖의 stilbene계열 물질의 breast cancer cell에 대한 효과

Oxyresveratrol, resveratrol, rhapontigenin, rhapontin등의 물질을 첨가하여 breast cancer cell인 MCF 7 cell에서의 death효과를 비교 확인하였다. 실험 결과, oxyreveratrol 보다 rhapontigenin이 cancer cell에 대한 death 효과가 높게 나타났다. Oxyresveratrol은 구조적으로 흡사한 anticancer effector인 resveratrol 보다 breast cancer에 더 높은 death 효과를 보였으나, 대항 추출물의 생물전환 생성물인 rhapontigenin 보다는 낮은 효과를 나타내었다 (Fig. 55).

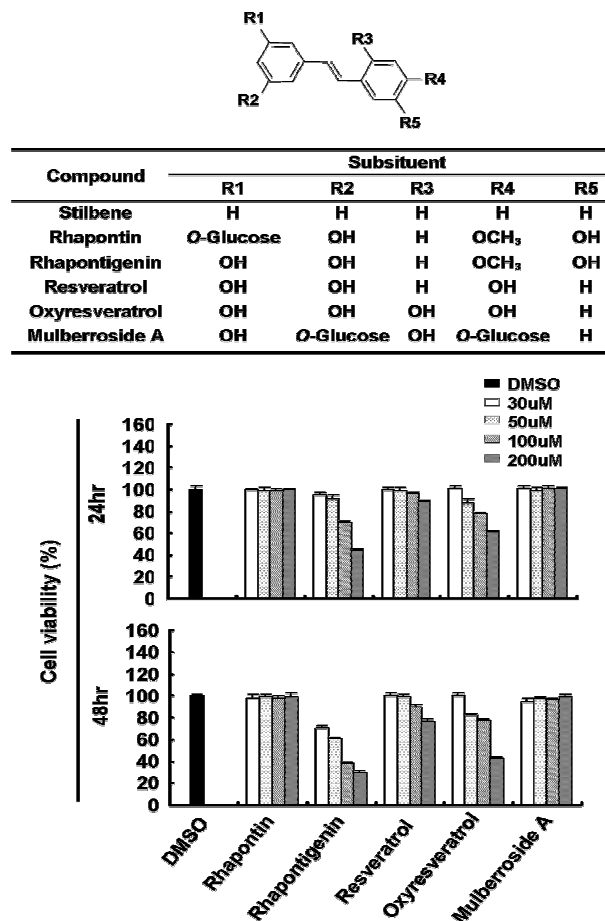


Fig 55. Oxyresveratrol과 그 밖의 stilbene계열 물질의 breast cancer cell인 MCF 7 cell에 대한 사멸효과

14.2 Normal cell line에서의 효과 측정

Rhapontigenin이 MCF 7 세포에서만 특이적으로 apoptosis를 일으키는지 확인하기 위해 breast normal cell인 MCF 10A 와 human HaCaT cell에서 rhapontigenin을 동일한 농도와 시간으로 처리하여 sub G1 event를 확인했다. 그 결과 rhapontigenin은 MCF 7 세포에서 특이적으로 apoptosis를 일으킨다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 56-A).

14.3 Rhapontigenin의 MCF 7 세포에서의 apoptotic cell death 유발 확인

이전 실험에서 rhapontin과 rhapontigenin가 cell viability에 미치는 영향을 확인한 결과, rhapontigenin 처리시 70%이상 생존률이 떨어진 200uM 농도에서도 rhapontin은 MCF 7 cell에 영향을 주지 않았다. 이와 같은 결과를 확인하기 위해 sub G1 event를 확인 해본 결과, 생존률 실험 결과와 동일한 경향을 얻을 수 있었다 (그림 56-B). 또한 western blotting 실험기법을 이용해 PARP와 caspase8 및 caspase9이 cleavage 된 것을 확인할 수 있었다 (그림 56-C).

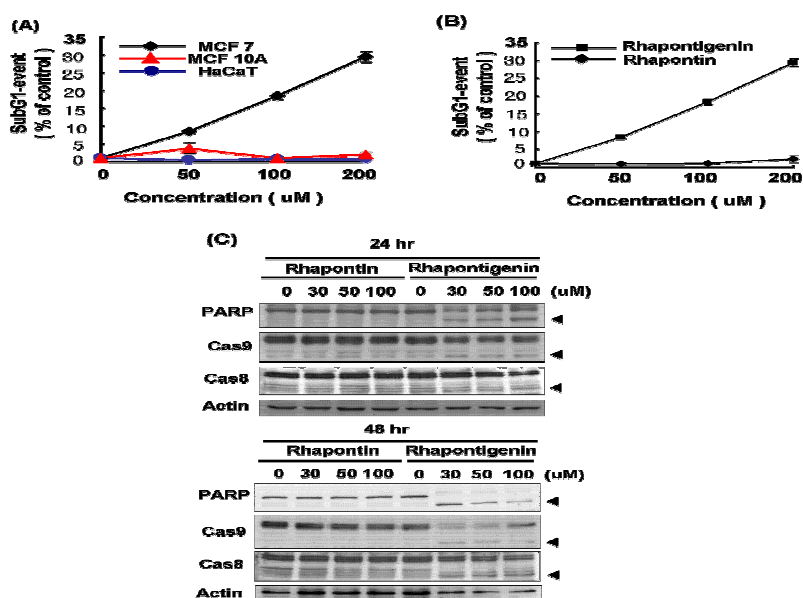


Fig. 56. Breast cancer MCF 7 세포와 normal cell line들에서 rhapontigenin의 Sub G1-event 비교(A). MCF 7 cell에서 rhapontin과 rhapontigenin의 Sub G1-event 비교(B). MCF 7 cell에서 western blot을 이용한 PARP와 Caspase의 cleavage 확인(C).

15. Oxyresveratrol의 분리정제

안동산 상백피 3 kg에 증류수 10 L를 가하여 autoclave에서 121 °C, 3시간동안 유효 성분을 추출하였다. 추출된 성분을 냉각한 후 증류수를 가하여 총 10 L로 맞춘 후 이에 1 L의 acetate buffer (pH 4.5)와 200 ml의 Pectinase효소를 가하여 30 °C, 6 시간 반응하여 mulberoside로부터 oxyresveratrol을 제조하였다. Pectinase의 효소 반응을 정지하기 위하여 100 °C에서 5분간 중탕하였다. 이를 냉각한 후 Toyo paper를 이용하여 여과하고 이를 1000 ml SP-207레진에 흡착하였다. SP-207에 흡착된 물질은 10% 에탄올, 20% 에탄올, 30% 에탄올, 40% 에탄올 각각 3 L로 용출하였다, 용출결과, oxyresveratrol은 에탄올 40%의 분획에서 얻을 수 있었다. 한편 일부 잔존 mulberoside A는 에탄올 20% 분획, oxyresveratrol-3'-O-β-glucopyranoside는 30% 분획으로 얻을 수 있었다. 40% 분획을 HPLC 분석 후 고농도 oxyresveratrol 분획을 감압 농축 후 동결 건조한 결과, 이로부터 50g의 oxyresveratrol을 획득하였고 순도는 85%를 나타내었다. 획득된 50g oxyresveratrol을 100ml 에탄올에 용해 후 이를 0.2 um 비극성 용매 filter로 여과한 후 1L 증류수에 교반하면서 첨가한 후 4 °C 냉장고에서 일야 방치하여 재결정을 얻었다, 얻어진 재결정을 Toyo filter paper로 여과하고 60 °C에서 24시간 건조하였다. 이 때 얻어진 oxyresveratrol의 양은 20g 이었고 HPLC 분석결과 순도는 96% 이었다.

16. Oxyresveratrol-3'-O-β-glucose의 분리정제

안동산 상백피 3 kg에 증류수 10 L를 가하여 autoclave에서 121°C, 3시간동안 유효 성분을 추출하였다. 추출된 성분을 냉각한 후 증류수를 가하여 총 10 L로 맞춘 후 이에 1 L의 acetate buffer (pH 4.5)와 50 ml의 Pectinase효소를 가하여 30°C, 2 시간 반응하여 mulberoside로부터 oxyresveratrol과 Oxyresveratrol-3'-O-β-glucopyranoside을 제조하였다. Pectinase의 효소 반응을 정지하기 위하여 100°C에서 5분간 중탕하였다. 이를 냉각한 후 Toyo paper를 이용하여 여과하고 이를 1000 ml SP-207레진에 흡착하였다. SP-207에 흡착된 물질은 10% 에탄올, 20% 에탄올, 30% 에탄올, 40% 에탄올 각각 3 L로 용출하였다, 용출결과, oxyresveratrol-3'-O-β-glucopyranosideoxyresveratrol은 에탄올 30%의 분획에서 얻을 수 있었다. 30% 에탄올 분획에 oxyresveratrol-3'-O-β-glucopyranosideoxyresveratrol 이외의 다른 물질이 있어 low pressure liquid chromatography system인 Flash-40에 C18 컬럼하에서 에탄올 15%, 에탄올 20%, 에탄올 25%, 에탄올 30%, 에탄올 35%로 용출한 결과, 에탄올 25% 분획에서 oxyresveratrol-3'-O-β-glucopyranosideoxyresveratrol을 얻을 수 있었다. 얻어진 고농도 분획을 감압 농축 후 동결 건조한 결과, 이로부터 10g의 oxyresveratrol-3'-O-β-glucopyranosideoxyresveratrol을 획득하였고 순도는 90%를 나타내었다.

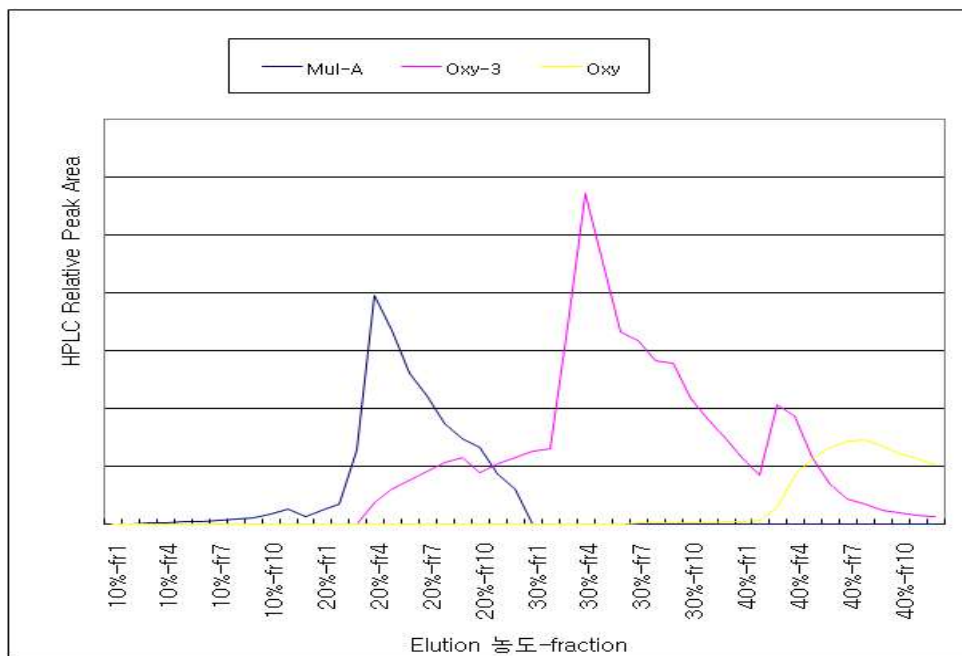


Fig. 57. SP-207 resin에 의한 oxyresveratrol-3'-O-β-glucose의 분리정제

17. 항산화시험

본 실험의 목표는 mulberroside A (Mul)와 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside (Oxy3), oxyresveratrol (Oxy)가 자유 라디칼을 소거하는 항산화능을 얼마나 가지고 있는지 알아보는 것이고 양성 대조군인 ascorbic acid (Asc)와 비교해보았다. Mulberroside A는 glucoside를 두 개 가지고 있는 물질인데 여기에서 glucoside를 하나 제거한 물질이 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside, glucoside를 두 개 다 제거한 물질이 oxyresveratrol이며 glucoside를 제거함에 따라 hydroxyl group이 증가한다. 시료물질의 자유 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 58과 같이 glucoside를 모두 제거한 oxyresveratrol의 항산화능이 가장 높았으며 glucoside를 제거하지 않은 mulberroside의 항산화능은 세 물질 중 가장 낮았다. 이는 물질의 구조가 항산화능과 관련이 있다는 것을 나타낸 것이며 다른 연구자들의 논문에서도 glucoside를 제거한 aglycone 형태의 물질이 더욱 높은 생활성 (bioactivity)을 보인다는 결과와 일치하였다. 농도가 1 μ M로 낮은 경우 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 보다 oxyresveratrol이 높은 항산화능을 보였으나 5 μ M의 경우 두 물질의 항산화력이 유사하였으며 농도가 증가함에 따라 ascorbic acid의 항산화력이 oxyresveratrol에 비해 증가하는 경향을 보였다. 실험 결과 oxyresveratrol의 경우 5, 10 μ M의 낮은 농도에서도 현저한 라디칼 소거능을 보여 효과적인 항산화 물질임을 증명할 수 있었다. 그리고 본 연구에서 실시한 미백 효과에 대한 실험은 5 μ M이하의 농도에서 수행한 결과로 5 μ M 처리에서 뛰어난 미백효과를 보인 결과와 함께 oxyresveratrol을 화장품의 미백제 원료로 사용할 경우 항산화 효과를 더하여 피부 노화 방지에도 효과가 있을 것으로 생각된다.

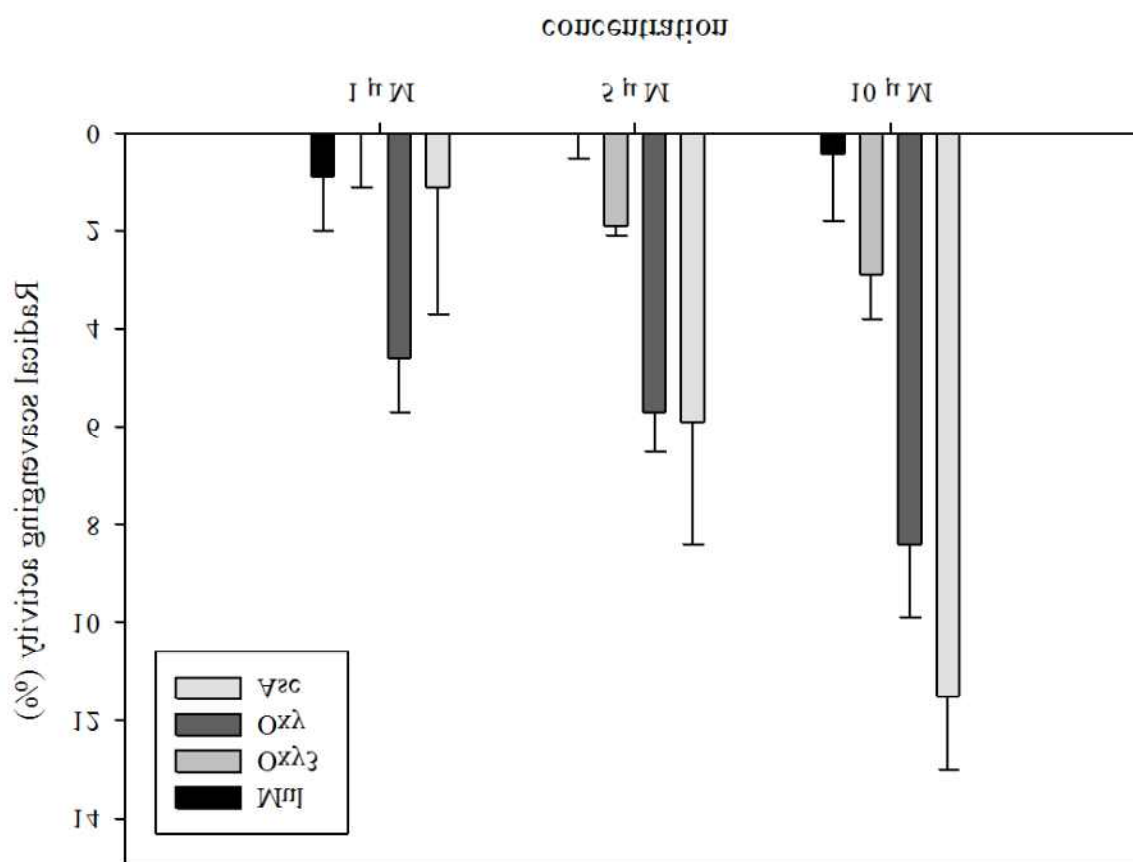


Fig. 58. Effect of mulberroside A, oxy-3-glucoside, oxyresveratrol and ascorbic acid on free radical scavenging activity. Results are expressed as percentages compared to control, and data are the means±S.E.M. of at least three determinations. Significantly different from the control group (*p<0.05, **p<0.01).

18. 동물실험을 이용한 미백효과 측정

18.1 멜라닌색소 침착의 육안적 변화

Brown guinea pig는 사람의 피부에서와 같이 표피에 멜라닌 세포가 존재하여 자외선에 의해 색소침착이 유도된다. UVB 조사로 멜라닌 색소침착이 유도된 brown guinea pig 피부에 대한 mulberrosida A, oxyresveratrol, oxyresveratrol-3-O-glucoside 및 대조군으로 arbutin을 도포한 후 상대적인 미백 효과를 육안적으로 비교한 결과, 시료 도포 3주까지는 색소침착의 변화가 관찰되지 않았다. 시료 도포 4주 후에는 arbutin 대조군과 실험군에서 색소침착 정도가 부분적으로 줄어드는 것을 관찰하였고, 5주 후에 대조군 및 시료 도포군에서 멜라닌 색소 침착이 전반적으로 줄어들었음을 확인 할 수 있었다 (그림 59). 따라서 모든 실험은 5주 도포 후의 표피를 대상으로 하여 분석하였다. 1% 시료 도포군에서는 대조군 및 시료 처리군간에 상대적인 미백효과는 크게 관찰 되지 않았다. 2% 처리군의 경우 모든 시료 처리군이 용매 대조군에 비해 미백효과를 보이는 것으로 나타났으며, 5% 처리군의 경우에 미백효과가 현저히 증가하였다. 특히 5% oxyresveratrol을 도포한 부위에서의 미백 작용이 용매대조군과 비교하여 현저히 증가되었음을 알 수 있었다 (그림 59 C, d).

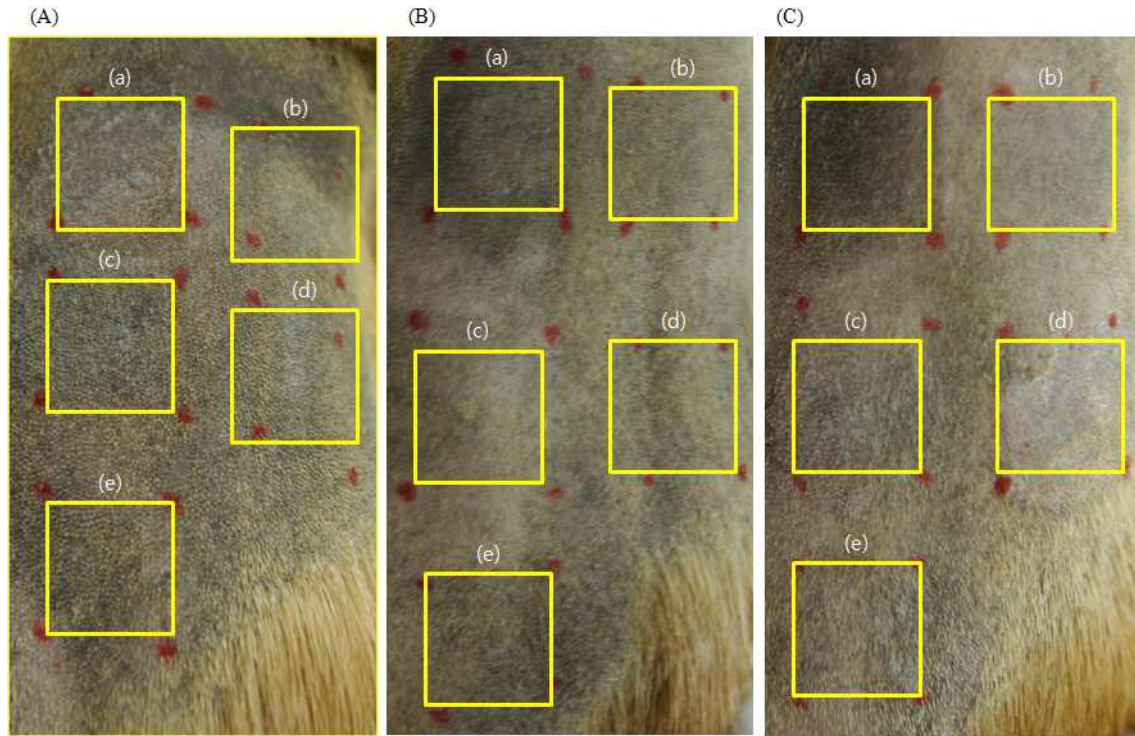


Fig. 59. 5주간 시료 처리 후 멜라닌 색소 침착 변화

시료 도포 농도: (A), 1%; (B), 2%; (C), 5%

도포 시료: (a), 음성 대조군(용매 도포); (b), 양성 대조군 (arbutin 도포); (c), mulberroside A 도포군; (d), oxyresveratrol 도포군; (e), oxyresveratrol-3-O-glucoside 도포군

18.2 멜라닌 색소 및 홍반 지수 변화

18.2.1 멜라닌 색소 변화

피부에서 반사되는 세 가지 특이파장을 측정하는 mexameter는 녹색광과 적색광을 피부에 5mm 크기로 방출한 후 반사되는 광선을 감지하여 멜라닌 색소와 홍반 지수를 측정한다. Mexameter를 사용하여 비침습적 방법으로 멜라닌 지수를 측정된 결과 5%와 2%에서 전체적으로 감소하는 경향이 있었으나, 1%에서는 특이할 만한 감소경향을 확인 할 수 없었다. 5% 도포군의 경우 oxyresveratrol 도포군에서 가장 효과 적인 멜라닌 색소 침착 억제 효과가 있었다. 이는 육안적으로 관찰한 미백효과와도 일치하는 결과를 보였다. 이 결과로부터 mulberroside A, oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside 에 의한 미백효과를 확인 할 수 있었다 (그림 60).

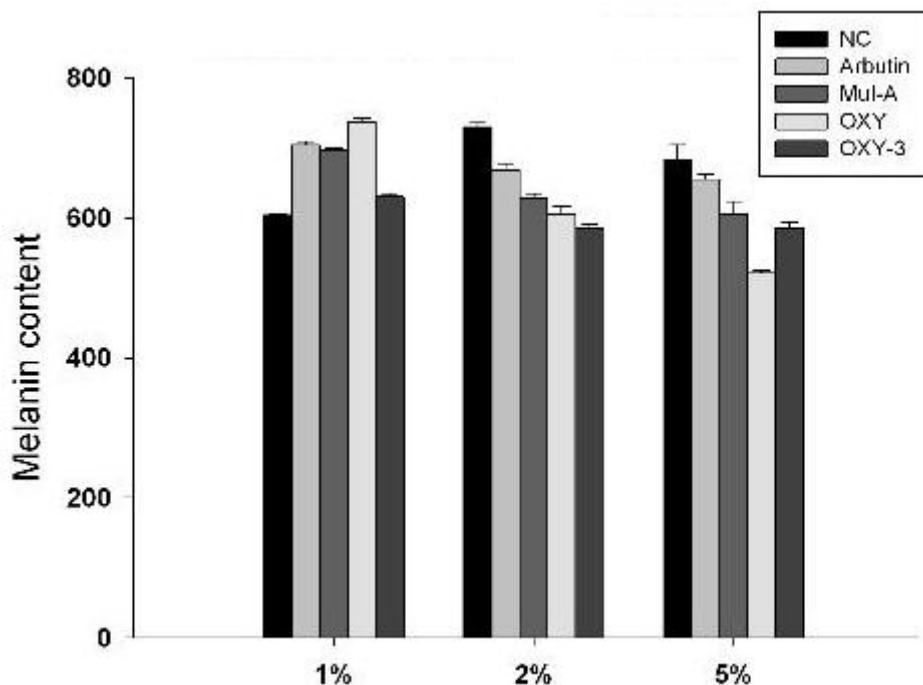


Fig 60. 시료 도포에 의한 멜라닌 색소 침착 억제 효과

18.2.2. 홍반 지수 변화

일정량의 시료를 매일 5주간 도포한 후 guinea pig 피부의 홍반 지수 변화를 그림 61에 나타내었다. 용매만 도포한 대조군과 비교해 보면 1% 시료를 도포한 경우 mulberroside A를 도포한 경우에 15% 감소하였으며, 그 외의 시료군에서는 6~8%의 홍반지수가 감소하였다. 2% 처리군에서는 mulberroside A에서 약 5% 감소하였으나 그 외의 시료 처리군에서는 별 차이를 보이지 않았다. 5% 도포군에서는 oxyresveratrol을 도포한 경우에 대조군에 비해 30% 정도의 홍반 지수가 감소하였다. 전체적인 결과를 분석해 보면 oxyresveratrol을 5% 처리한 경우 큰 홍반지수 감소 효과를 보였으나 그 외의 시료에서는 홍반 감소효과를 보이지 않거나 홍반지수가 감소되었어도 큰 효과를 나타내지 않는 결과를 얻었다.

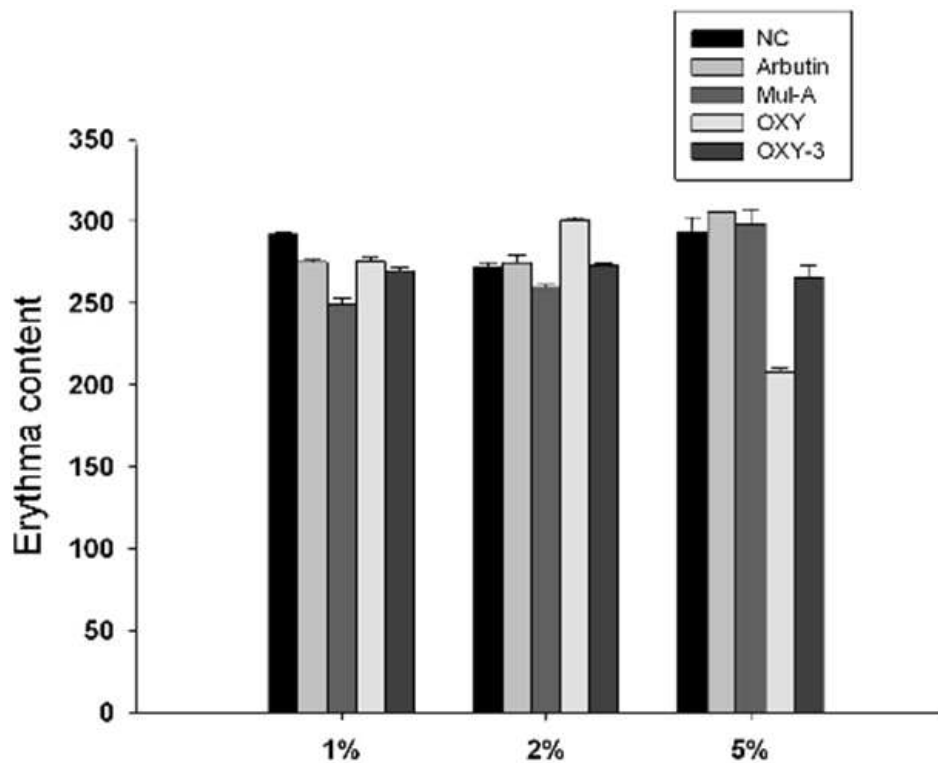


Fig. 61. 시료 도포에 의한 홍반 지수 변화

18.3. 조직학적 평가 결과

18.3.1. Fontana Masson 염색 결과

피부 조직내의 멜라닌 색소 생성 변화를 Fontana Masson 염색을 통하여 분석한 결과 용매 대조군은 실험군에 비해 멜라닌 세포가 주로 기저층에 밀집되는 경향이 있었다. Arbutin과 Oxyresveratrol-3-O-glucoside 도포군의 경우에는 기저부 위에 멜라닌 생성이 관찰 되었으나, mulberroside-A와 oxyresveratrol을 5% 도포한 부위의 멜라닌 생성이 대조군에 비해 현저하게 감소하였음을 확인 할 수 있었다 (그림 62, c와 d). 이와 같이 피부 조직학적 실험에서도 oxyresveratrol가 대조군 및 다른 시료 처리군에 비해 현저히 증가된 미백효과를 보이는 것으로 나타났다 (그림 62 c).

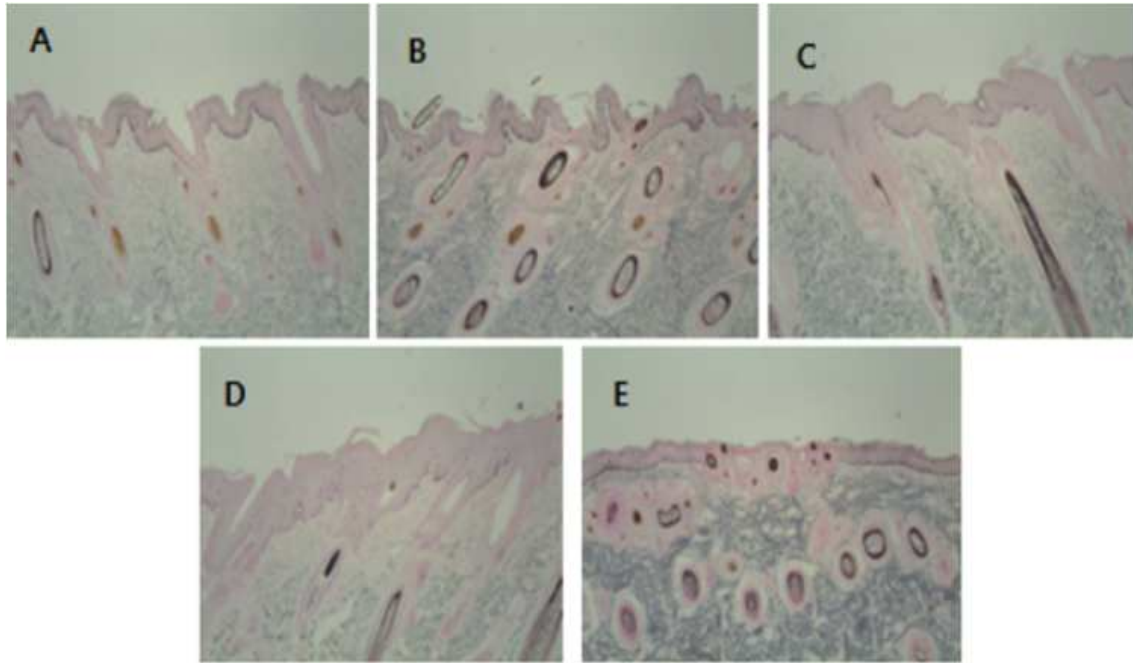


Fig. 62. Fontana Masson 염색에 의한 시료 (각 5%) 도포군의 멜라닌 색소 생성 (×40)

A, 용매 도포 대조군; B, arbutin 도포군; C, mulberroside A 도포군; D, oxyresveratrol 도포군; E, oxyresveratrol-3-O-glucoside 도포군

18.3.2. Hematoxylin-Eosin 염색 결과

시료 도포에 따른 일반적인 피부조직의 변화를 관찰하기 위해 Hematoxylin-Eosin 염색을 수행한 결과 대조군과 arbutin 및 mulberroside A처리군에서는 큰 차이를 보이지 않은 반면 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside도포군의 경우 기저부의 표면이 대조군에 비해 좀 더 매끈한 모양을 이루고 있는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 63 d와 e).

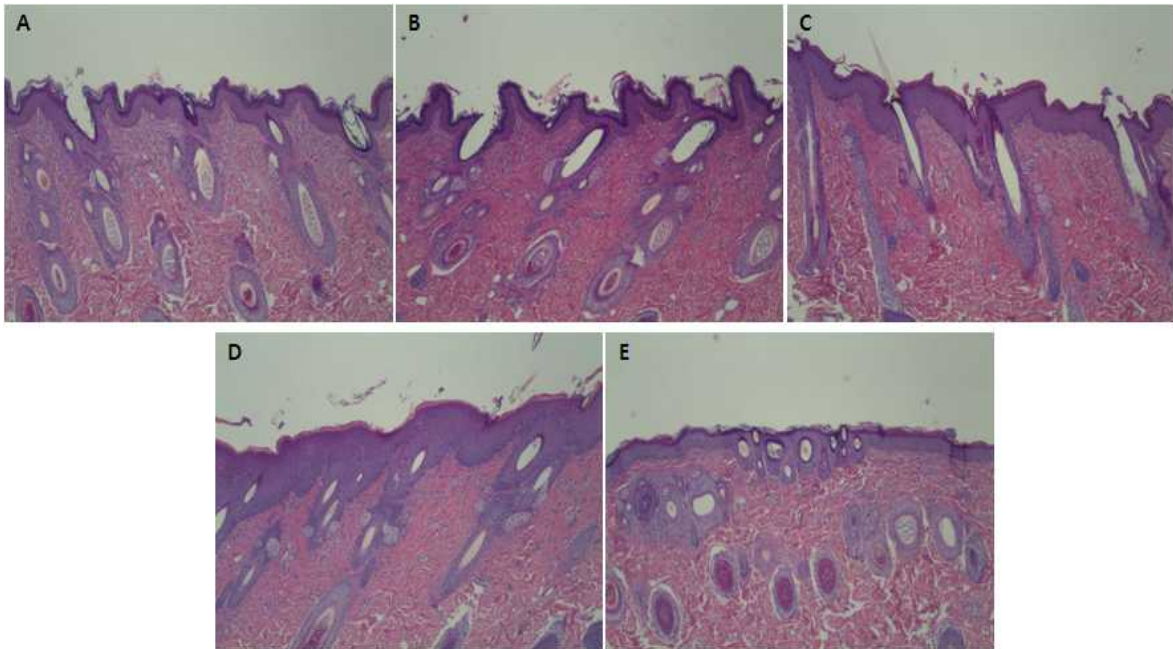
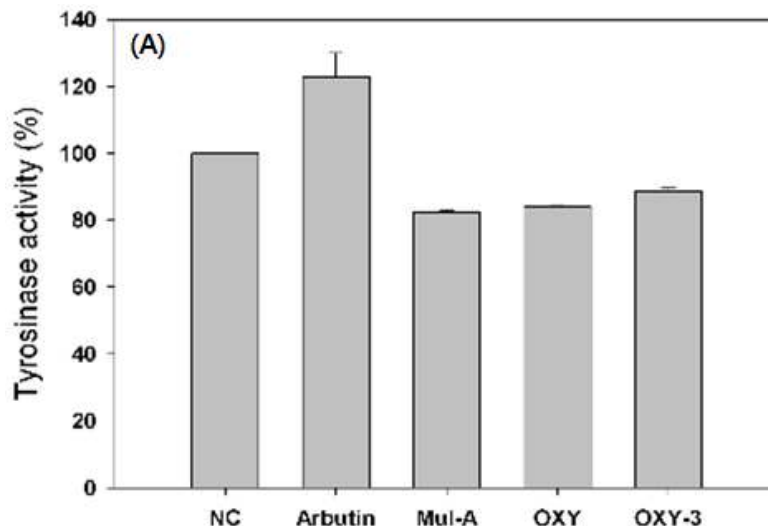


Fig. 63. Hematoxylin-Eosin 염색에 의한 시료 (5%) 도포군의 조직 변화 (×40)

A, 용매 도포 대조군; B, arbutin 도포군; C, mulberroside A 도포군; D, oxyresveratrol 도포군; E, oxyresveratrol-3-O-glucoside 도포군

18.4. Tyrosinase 활성

멜라닌 합성은 tyrosine을 DOPA로 전환 시키는 tyrosinase hydroxylase와 DOPA를 DOPAquinone으로 전환시키는 DOPA oxidase로 적용하는 처음 두 단계의 반응을 촉매하는 tyrosinase의 작용에 의해 시작된다. 따라서 시료의 미백효과를 확인하기 위해서 각 시료를 매일 1, 2, 5% 씩 5주간 도포한 후, 피부조직을 적출하여 tyrosinase 활성을 측정하였다 (그림 64). 대조군을 기준으로 시료 처리군의 tyrosinase 활성을 비교한 결과 5%에서 arbutin 이 $89.3 \pm 2.7\%$, mulberroside A가 $81.5 \pm 0.48\%$, oxyresveratrol이 $55.7 \pm 3.1\%$, oxyresveratrol-3-O-glucoside가 $61.2 \pm 1.6\%$ 의 감소치를 보였다. 2%에서는 arbutin이 $79.7 \pm 1.9\%$, mulberroside-A에서 $76.7 \pm 1.4\%$, oxyresveratrol에서 $75.4 \pm 1.9\%$, oxyresveratrol-3-O-glucoside에서 $83.3 \pm 3.4\%$ 의 감소치를 보였다. 1%에서 arbutin이 $122.9 \pm 5.8\%$, mulberroside-A에서 $82.4 \pm 0.7\%$, oxyresveratrol에서 $84.1 \pm 0.4\%$, oxyresveratrol-3-O-glucoside에서 $88.8 \pm 1.4\%$ 의 활성을 보였다. 1% 도포군의 경우 arbutin이 대조군에 비해 높은 tyrosinase 활성을 보였으나 그 외의 시료 처리군에서는 tyrosinase 활성이 감소되었음을 확인 할 수 있었다. 각각의 처리 농도에서 oxyresveratrol의 경우가 가장 효과적인 tyrosinase 활성 억제 효과를 보였다. 특히 5% 처리군에서 oxyresveratrol 처리군의 tyrosinase 활성 저해 효과가 용매대조군에 비해 45% 정도의 뛰어난 억제효과를 나타내었다 (그림 64C). 표피조직내의 tyrosinase 활성 억제 효과의 결과는 oxyresveratrol이 가장 효과적인 미백작용을 나타낸 위의 결과들과 일치하는 결과를 보였다.



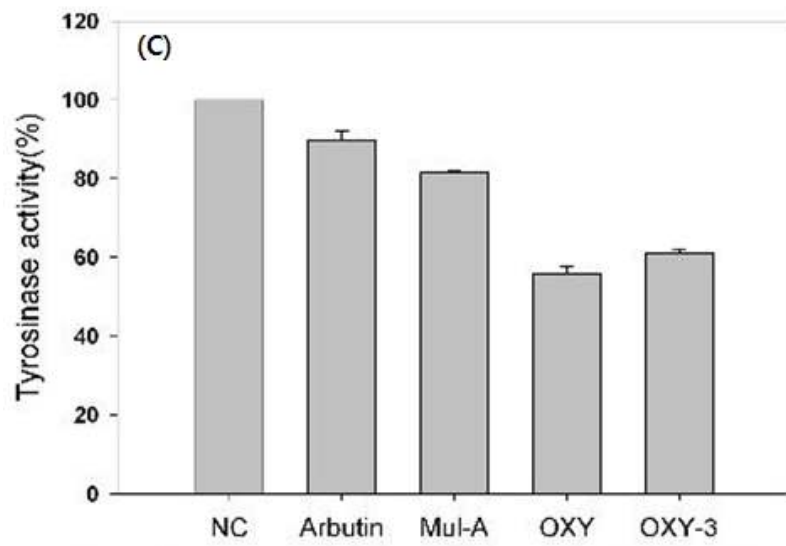
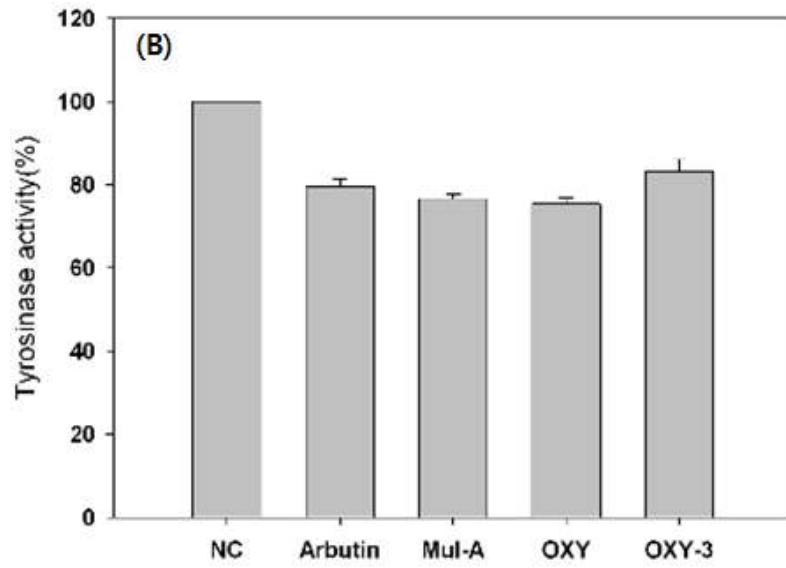


Fig. 64. 시료 도포후의 표피내 tyrosinase 활성 변화
 A, 1% 시료 도포군; B, 2% 시료 도포군; C, 5% 시료 도포군

18.5. 조직내의 멜라닌 생성량의 변화

각각의 시료 도포 부위의 표피 조직내에 존재하는 멜라닌 함량을 정량하여 용매 대조군 비교한 결과를 그림 65에 나타내었다. 1% 처리군의 경우 대조군에 비해 시료처리군의 멜라닌 함량이 높은 것으로 나타났으나 2% 및 5% 시료 도포군의 경우 용매대조군에 비해 각 시료 도포군에서 멜라닌 함량이 감소 한 것을 알 수 있었다. 특히 5% 시료 도포군의 경우 oxyresveratrol 도포군에서 가장 낮은 멜라닌 함량이 검출되어 위의 미백효과 측정 결과와 상관성이 있는 결과를 보였다.

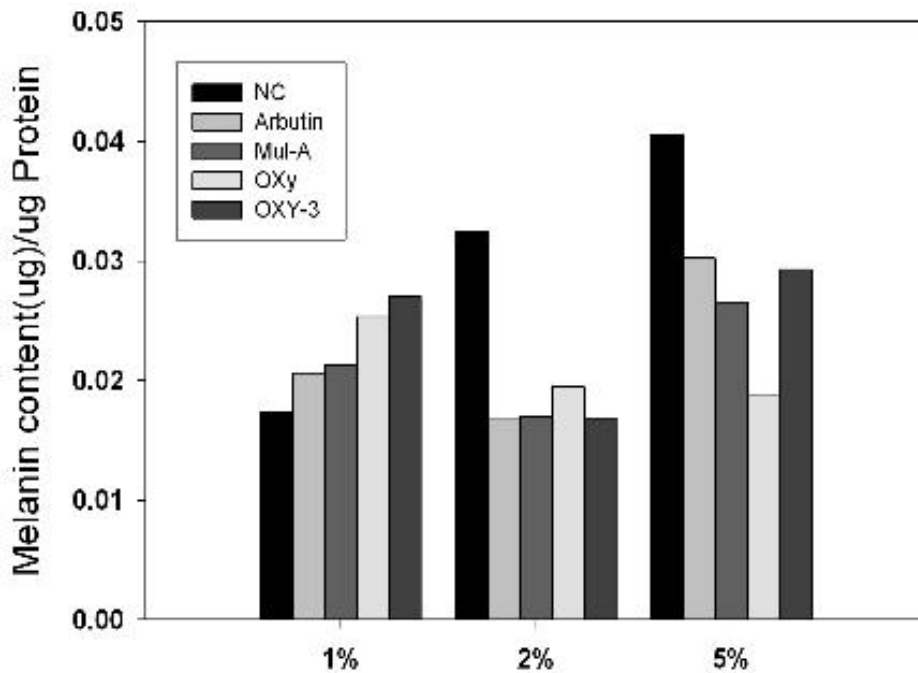


Fig. 65. 시료 도포후의 표피 조직내의 멜라닌 함량

18.6 Real-Time RT-PCR 및 Western blot

멜라닌 합성 반응은 melanosome 관련 단백질에 의해 제어 된다 (그림 66). 따라서 oxyresveratrol, mulberroside A 등의 시료가 이들 단백질에 영향을 미쳐서 멜라닌 생성억제 효과를 보이는데 대한 억제기전을 연구하기 위해 멜라닌 생성과 관련된 특이적 mRNA의 발현정도를 정량하였다 이를 위해 tyrosinase, TRP-1(tyrosinase-related protein 1, DHICA oxidase), TRP-2 (tyrosinase-related protein 2, DOPA chrome tautomerase), 그리고 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2를 조절하는 MITF (microphthalmia transcription factor)에 대해 시료 첨가에 따른 유전자의 발현 양상을 검토하였다.

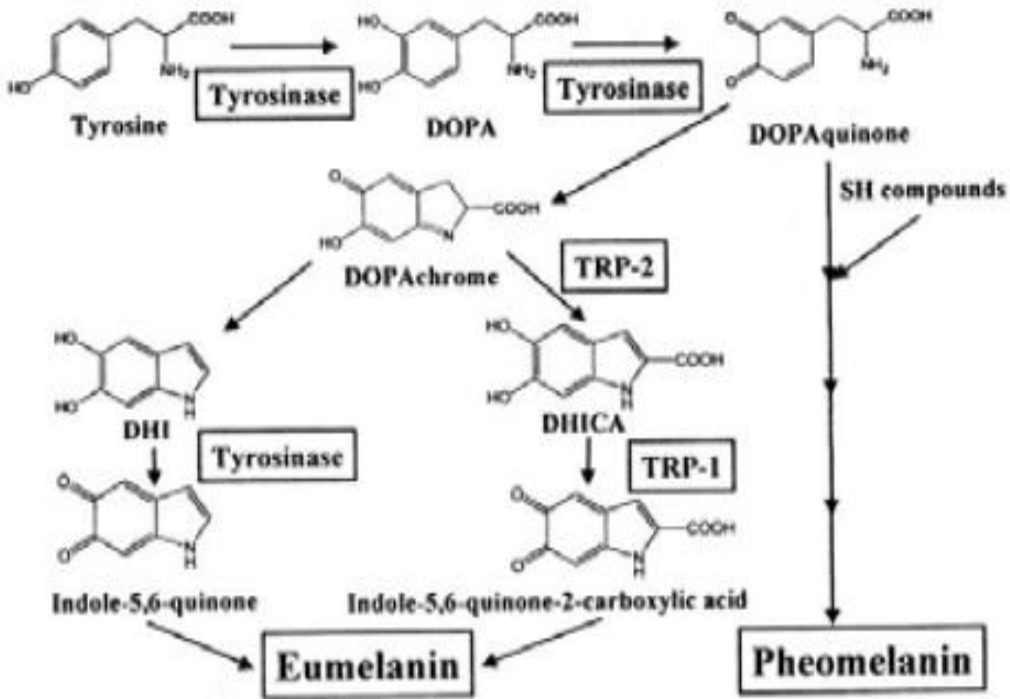


Fig. 66. 멜라닌 합성 경로 및 관련 효소 단백질

5% 시료 도포군에서는 용매대조군에 비해 각 유전자 mRNA의 발현을 크게 억제하는 효과를 보였다 (그림 67). Tyrosinase mRNA 발현에서는 용매대조군에 비해 arbutin과 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside에서 각각 약 25%와 50%의 감소치를 보였으나, mulberroside A와 oxyresveratrol에서 약 90%정도의 큰 감소치를 나타내었다. TRP-1, TRP-2, MITF mRNA 발현에서 모두 유사한 경향을 보이며 30~85%의 감소치를 나타내었다. 5% 시료처리군의 결과, 멜라닌생성 관련 효소와 transcription factor mRNA 발현에서 놀라운 억제효과를 확인할 수 있었다. 2% 시료 처리군에서 멜라닌 생성관련 인자의 mRNA 발현에서도 5% 처리군과 유사한 양상을 보였다. 2% 처리군에서는 5% 처리군보다도 tyrosinase mRNA 발현이 모든 시료군에 더 큰 억제 현상을 보였다. 양성대조군인 arbutin과 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside에서 더욱 뚜렷한 감소가 나타났다. TRP-1과 TRP-2에서는 5% 처리군과 유사한 양상을 나타내었다. 그러나 MITF에서는 2% 처리군에서 arbutin과 oxyresveratrol이 용매대조군보다 다소 높게 발현되었다. Mulberroside A와 oxyreveratrol-3-*O*-glucoside는 낮은 수치를 유지하였다. 이 결과를 종합해 보면 상백피 추출물에서 정제한 시료물질들의 자외선에 의한 색소 침착에 대한 미백효과가 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2 및 이 단백질들의 기능을 조절하는 MITF 유전자 발현의 억제와 관련되어 있음을 알 수 있다. 이의 결과로 관련 단백질의 발현이 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 68).

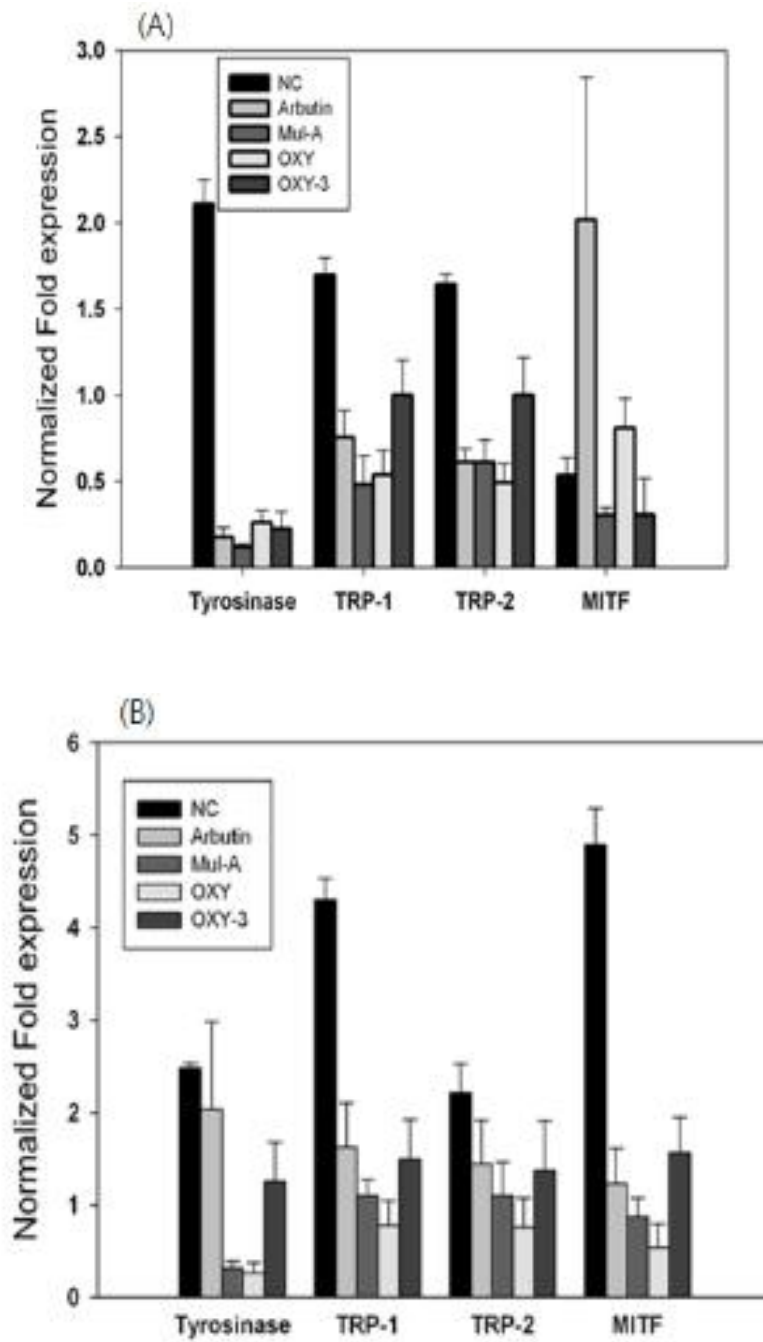


Fig. 67. 멜라닌 합성 반응과 관련된 melanosome 단백질 유전자의 발현 변화
 A, 2% 시료 도포군; B, 5% 시료 도포군

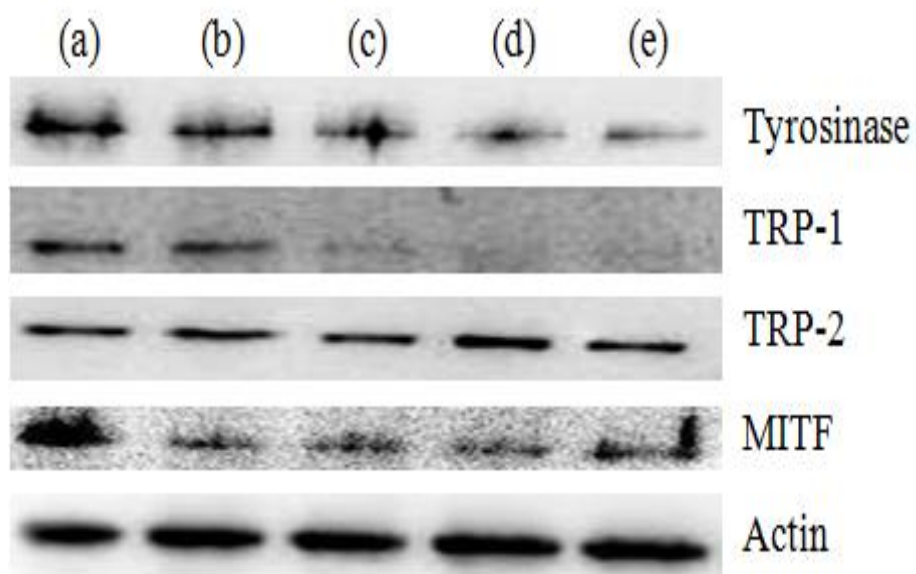


Fig. 68. Effects of different inhibitors on melanogenic enzyme expression. Levels of protein expression are shown for (a) control treatment, (b) arbutin, (c) mulberroside A, (d) oxyresveratrol, (e) oxyresveratrol-3-*O*-glucoside in UVB-irradiated skin tissues of brown guinea pigs. The samples were treated with 5% of each compound.

19. Oxyresveratrol, Oxyresveratro-3-O-glucoside의 피부자극성 및 감작성 시험

19.1. 일반 중독 증상

시험물질을 처리한 그룹의 동물에서는 어떠한 특이적인 증상도 관찰되지 않았으며, 치사한 동물도 발견되지 않았고 양성대조 물질을 투여한 그룹에서는 중등도 이상의 흥반과 부종이 관찰되었으나, 다른 임상 증상은 관찰되지 않았다. 시험 물질 도포군의 체중 역시 대조군에 비해 변화가 나타나지 않았다.

19.2. 피부자극 시험결과 평가

본 시험은 White guinea pig의 찰과와 비찰과 피부에 시료의 접촉을 통한 피부자극성을 평가하기 위하여 실시하였다. 적용 부위의 관찰은 시료 적용 후 5시간, 24시간 및 72시간에 피부자극성을 검사하고, 피부반응 평가표에 따라 점수를 산출하였다. 피부반응 평가는 본 실험에 대해 지식이 없고, 적용한 시험물질을 모르는 5인의 평가단으로 구성하여 평가표를 참고로 평가하도록 하고, 결과의 평균을 내어 시험물질 도포에 따른 피부 자극에 대한 평가를 하였다 (Table 25). 정상피부와 찰과상 피부 모두에서 음성대조군으로 사용된 ethanol:propyleneglycol(1:9) mixture 도포에 의해서는 찰과피부 한 부위에서 육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 흥반이 관찰되었는데, 이는 찰과부위에 고농도의 ethanol이 직접 접촉됨으로써 야기된 것으로 보인다. 음성대조군에 의한 피부자극성은 1차 피부자극지수(P.II)가 0.25로 확인되었다. 이에 비해 1% OXY, 1% OXY-3를 도포한 경우에는 흥반 및 가피, 부종이 전혀 형성되지 않아 P.II 수치가 0으로 확인되었다. 5% OXY를 도포한 찰과 피부 중 한 부위에서 육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 흥반 및 가피가 형성되었지만, 일시적인 현상으로 24시간 이후에는 소멸되었다 (Fig. 69). 따라서 5% OXY의 P.II는 0.08로 매우 낮은 수준을 보여 피부자극성 평가표에 따라 P.II 0.5이하에 해당하는 비자극성으로 판정되었다 (Table 26). 피부자극 시험 결과 시험물질 적용 부위에 흥반, 가피형성, 부종등의 자극은 거의 관찰되지 않았으며 P.II 값이 1% OXY, 5% OXY, 1% OXY-3 처리군에서 각각 0, 0.08, 0으로 판정되어 비자극성 물질로 평가되었다. 특히 OXY는 5%의 고농도로 적용해도 피부자극성이 거의 상승하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 실제로 화장품원료로 첨가 되는 경우에는 이보다 낮은 농도에서 적용할거라 예상되기 때문에 피부자극에 대한 안전성은 신뢰할 수 있다고 판단된다.

Table 25. 피부자극시험 평가 결과 (NC, 음성대조군)

(1) 5시간 후

No. of animals		홍반, 가피		부종	
		비찰과	찰과	비찰과	찰과
1	NC	0	0	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	0	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0
2	NC	0	1	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	0	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0
3	NC	0	0	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	1	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0

(2) 24 시간 후

No. of animals		홍반, 가피		부종	
		비찰과	찰과	비찰과	찰과
1	NC	0	0	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	0	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0
2	NC	0	1	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	0	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0
3	NC	0	0	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	0	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0

(3) 72 시간 후

No. of animals		홍반, 가피		부종	
		비찰과	찰과	비찰과	찰과
1	NC	0	0	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	0	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0
2	NC	0	1	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	0	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0
3	NC	0	0	0	0
	1% OXY	0	0	0	0
	5% OXY	0	0	0	0
	1% OXY-3	0	0	0	0

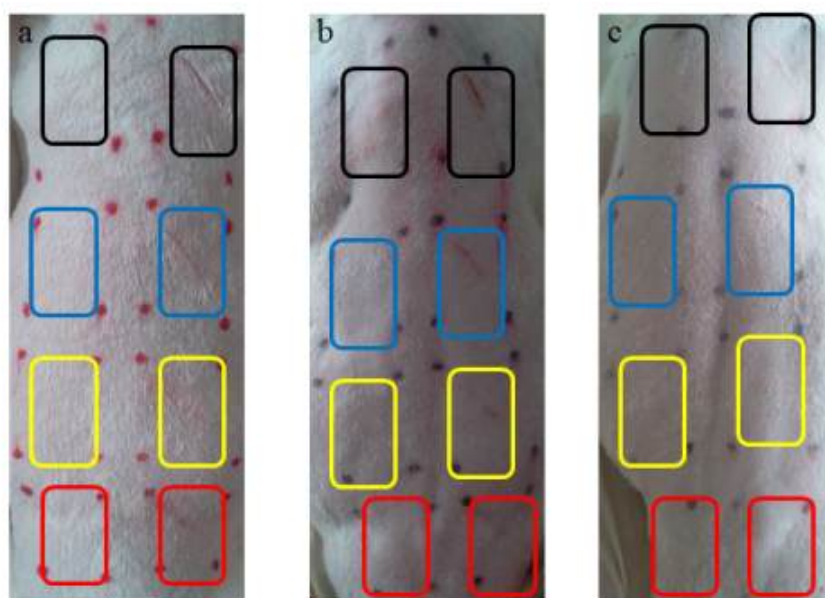


Fig. 69. Representative area of skin irritation by OXY and OXYre treated with vehicle as negative control(black box), 1% OXY(blue box), 5% OXY(yellow box), and 1% OXY-3(red box) on normal(left) and braded(right) skin region. The photos show the skin before topical application(b), and after 72h of application (c).

Table 26. Score of skin irritation

시험 항목	시험 물질명	시험 결과
	1% OXY	P.I.I = 0 (비자극성)
피부 자극 시험	5% OXY	P.I.I = 0.08 (비자극성)
	1% OXY-3	P.I.I = 0 (비자극성)

시험 방법 : 식약청고시 제2005-60호 의약품등의 독성시험기준

19.3. 피부감작 실험결과 평가

피부감작 실험은 화장품 등의 원료를 목적으로 만들어진 물질, 화학물질과 기타 피부 피부자극에 대한 독성이 알려져 있지 않은 물질을 생산할 때는 접촉자극을 일으키는 알러지 유발가능성을 검토할 필요가 있다. 피부 접촉자극을 시험하기 위해서는 토끼와 guinea pig를 주로 사용하며, Draize method, Guinea pig maximization test (GPMT), Buehler method, Local lymphnode assay (LLNA) 등이 많이 사용되었으나, 특별한 경우에 사용되는 방법들이며 최근에 개정된 OECD guideline No.406(1992)에 따른 GPMT가 가장 널리 사용되고 있다. 또한 GPMT는 자극성이 약한 물질도 검출할 수 있어 다른 방법에 비해 선호되고 있다. GPMT에 대한 결과의 평가는 양적평가(quantitative assessment)와 질적평가(qualitative assessment)로 나눌 수 있다. 양적평가는 Draize에 의하여 작성된 기준에 따라 각 개체에서 나타나는 병변의 정도를 0에서 3까지로 등급을 정하여 채점하여 평가한다 (Table 8). 이것은 guinea pig에서의 시험결과와 사람에서의 반응에 대한 근거를 제시해 줄 수 있다. 질적 평가는 시험동물에서 양성반응을 나타낸 개체수를 백분율로 나타내는 방법으로 Draize에 의해 작성된 기준에 따라 등급을 정한다 (Table 9). 질적평가에 있어서는 실험동물 중에서 어느 한 개체라도 반응의 강도와 관계없이 양성반응이 나타나면 그 물질이 알러지 유발능을 가지고 있는 것으로 생각한다. 시험동물에서 시험물질에 의한 자극을 나타낸 개체수가 아무리 적더라도 물질이 생산된 후 노출될 수 있는 사람의 수는 막대하여 상당한 수의 사람들이 손상을 입을 수도 있기 때문에 GPMT에 있어 양적평가보다는 질적평가에 더 큰 의미를 부여할 수 있다. 모든 동물의 처리 부위 관찰은 시험물질 처리 후 24, 48시간째에 실시한 결과 DNCB를 처리한 양성대조군에서는 24시간째부터 매우 심한 홍반과 부종 등의 증상이 관찰되었으나, 1% OXY, 5% OXY,

1% OXY-3를 처리한 군에서는 발적, 홍반, 부종 등이 전혀 관찰되지 않았고 (Fig. 70, 71), 반응의 빈도도 0%로 나타나 매우 약함(Grade I)으로 판정되었다 (Table 27-30).

본 연구로부터 1% OXY, 5% OXY, 1% OXY-3는 guinea pig 피부에 P.I.I 0~0.08을 나타냄으로써 비자극성 물질로 판단되었고, 감작성 피부반응에서 guinea pig의 피부 감작율은 0%로 전혀 감작반응을 야기하지 않아 매우 약함 (Grade I)으로 판정됨으로써 본 연구에 사용한 상백피 유래의 mulberroside A를 효소 전환시켜 당을 1개 및 2개 제거하여 제조한 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3 *O*-glucoside 물질은 미백효과가 향상된 결과를 보였는데 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside 물질은 guinea pig를 대상으로 한 동물 시험에서 피부자극 및 감작반응을 일으키지 않는 물질로 평가되어 미백화장품의 원료로 이용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

Table 27. Skin sensitization score and rate at 24 h after topical application of OXY and OXY-3 in guinea pig maximization test

Treatment	Animal No.	Sensitization score (%)	Sensitization rate (%)	Grade (classification)
Saline (negative control)	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/4)	
	4	0		
0.1% DNCB (positive control)	1	3		IV
	2	3	100	
	3	3	(4/4)	
	4	2		
1% OXY	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		
5% OXY	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		
1% OXY-3	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		

Table 28. Skin sensitization score and rate at 48 h after topical application of OXY and OXY-3 in guinea pig maximization test

Treatment	Animal No.	Sensitization score (%)	Sensitization rate (%)	Grade (classification)
Saline (negative control)	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/4)	
	4	0		
0.1% DNCB (positive control)	1	3		IV
	2	3	100	
	3	3	(4/4)	
	4	2		
1% OXY	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		
5% OXY	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		
1% OXY-3	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		

Table 29. Skin edema score and rate at 24 h after topical application of OXY and OXY-3 in guinea pig maximization test

Treatment	Animal No.	Sensitization score (%)	Sensitization rate (%)	Grade (classification)
Saline (negative control)	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/4)	
	4	0		
0.1% DNCB (positive control)	1	2		IV
	2	2	100	
	3	2	(4/4)	
	4	2		
1% OXY	1	0		I
	2	0		
	3	0	0	
	4	0	(0/5)	
	5	0		
5% OXY	1	0		I
	2	0		
	3	0	0	
	4	0	(0/5)	
	5	0		
1% OXY-3	1	0		I
	2	0		
	3	0	0	
	4	0	(0/5)	
	5	0		

Table 30. Skin edema score and rate at 48 h after topical application of OXY and OXY-3 in guinea pig maximization test

Treatment	Animal No.	Sensitization score (%)	Sensitization rate (%)	Grade (classification)
Saline (negative control)	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/4)	
	4	0		
0.1% DNCB (positive control)	1	3		IV
	2	3	100	
	3	3	(4/4)	
	4	2		
1% OXY	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		
5% OXY	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		
1% OXY-3	1	0		I
	2	0	0	
	3	0	(0/5)	
	4	0		
	5	0		

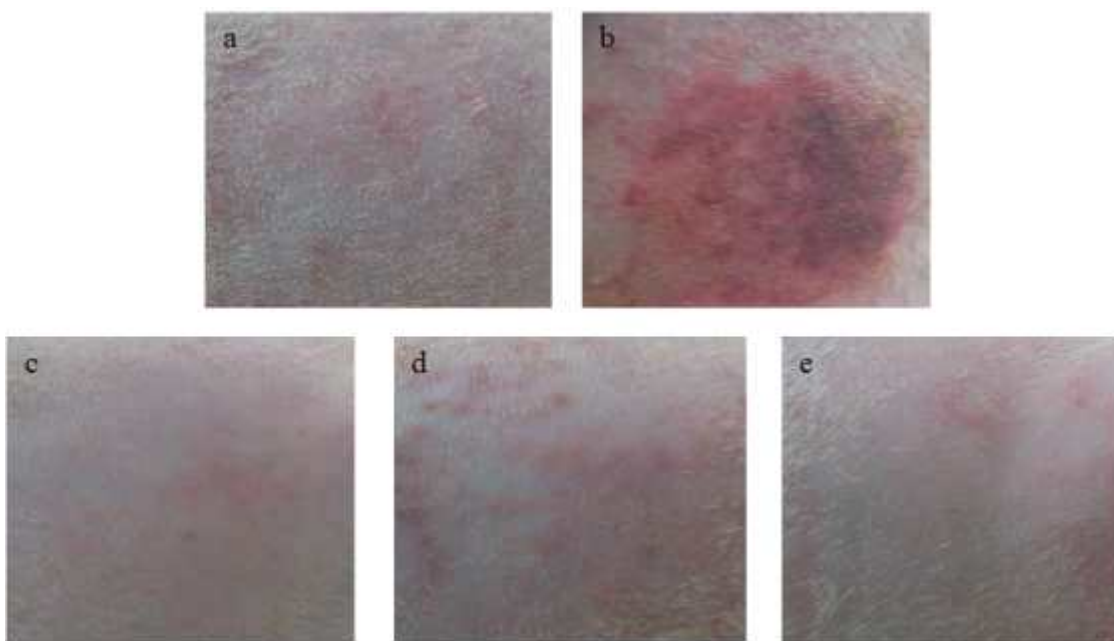


Fig. 70. Representative area of skin maximization test after 24h of treatment with saline(negative control, a), 0.1% DNCB(positive control, b), 1% OXY(c), 5% OXY(d), and 1% OXY-3(e)



Fig. 71. Representative area of skin maximization test after 48h of treatment with saline(negative control, a), 0.1% DNCB(positive control, b), 1% OXY(c), 5% OXY(d), and 1% OXY-3(e)

IV. 결과 요약

상백피는 뽕나무의 껍질로 바깥쪽 껍질을 긁어내고 흰 속살만을 말린 것이다. 상백피는 단단하고 달며 성질이 차가운 성질의 약재로 해열, 이뇨, 혈압강하, 진해, 진정, 진통, 항균, 소염 작용등이 있다. 또한 최근 상백피 추출물은 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하고 있는 효소인 티로시나아제 활성을 억제하여 햇빛이나 멜라닌으로 인한 색소 침착등을 개선하고 방지하는 효과가 알려져 천연 화장품에 널리 사용되고 있다.

본 연구진은 상백피의 주요 미백성분이 스틸벤 계열 구조로 2개의 당을 가진 mulberroside A임을 확인하였다. 본 연구진은 1개의 당을 갖는 스틸벤 계열의 미백제인 rhapontin을 효소 가수분해하여 미백 및 항균효능이 증가한 rhapontingenin을 개발한 경험을 바탕으로 상백피 추출물도 적절한 효소를 사용하여 가수분해하면 기존의 상백피 추출물보다 미백, 항균 및 항산화 효능이 증가한 물질이 만들어 질것으로 예측하였다.

뽕나무는 다양한 품종이 알려져 있고 품종에 따라 미백 성분에도 차이가 있어 품종 선정을 위해 국내 및 중국에서 생산된 다양한 상백피를 구입하여 상백피 추출액을 제조하여 분석하였다.

분석 결과, 국내 안동산 상백피의 mulberroside A 함량이 가장 높을 뿐만 아니라 티로시나아제 억제 효과도 가장 높은 것으로 나타나 국내산 안동산 상백피를 실험 재료로 선정하였다.

또한, mulberroside A 구조에 존재하는 2개의 당을 가수분해하기 위해 β -glucosidase를 함유한 것으로 알려진 다양한 효소를 구입하여 반응한 결과, mulberroside A가 효소에 의해 쉽게 가수 분해되는 것을 HPLC에 의해 확인하였다. 본 연구자들은 화장품으로서 제품의 안전성등을 고려하여 FDA허가를 받고 오렌지 주스등의 청징화에 널리 사용하는 Novozyme사의 Pectinex를 상백피 추출물의 가수 분해효소로 선정하였다.

Pectinex를 사용한 반응시의 최적 효소 반응을 검토한 결과, pH 4.5, 60°C로 나타났다. 효소에 의한 가수분해시 당이 2개 붙어 있는 구조인 mulberroside A는 당이 1개인 oxyresveratrol-3-O-glucoside를 거쳐 oxyresveratrol로 전환됨을 확인하였다. 또한 본 연구진은 상백피 추출물로부터 mulberroside A와 효소 가수 분해액으로부터 oxyresveratrol, oxyresveratrol-3-O-glucoside를 분리정제하여 이들의 구조를 확인하였다.

따라서 본 연구자는 상백피 추출물로 효소가수분해에 의해 제조되는 스틸벤 계열의 oxyresveratrol과 oxyresveratrol-3-O-glucoside는 피부미백제, 항산화제,

항암제로 가치가 클 것으로 판단하여 이들의 미백효능, 멜라닌 생성 효소반응 저해 기작, 정제 공정, 급성독성시험, 안정성, 피부감작 시험, 국소독성 평가를 수행하여 화장품 원료로서의 타당성을 검토하였다.

연구 1차년도에는 제조된 oxyresveratrol를 사용하여 L-tyrosine을 기질로 mushroom tyrosinase의 IC₅₀값을 비교한 결과, 효소 가수분해로 제조된 oxyresveratrol은 mulberroside A에 비해 활성저해능이 약 109배, arbutin에 비해 약 1500배, kojic acid에 비해 43배 높았다. Oxyresveratrol을 *S. bikiniensis*를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 실험, B16F10 melanoma 세포를 이용하여 세포내 tyrosinase 활성억제 및 melanin 합성저해 실험을 수행한 결과, oxyresveratrol이 tyrosinase 활성억제 및 melanin 생성억제에 우수한 효과를 보였다. 특히, 현재 미백원료로 이용되고 있는 arbutin 및 kojic acid와의 비교에서도 월등히 우수한 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 효소 전환에 의해 그람양성균에 대한 항균력 증가효과를 나타내었고 특히 여드름의 원인균인 *P. acnes*균에 대한 항균력이 증가를 확인하였다. 따라서 상백피 추출물을 효소 가수분해하면 미백기능이 기존 추출액보다 월등히 증가하는데 이는 새롭게 생성된 oxyresveratrol에 기인한 것으로 사료되었고 이는 새로운 천연 미백화장품소재로 개발될 수 있을 것으로 기대되었다.

연구 2차년도에는 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-O-glucoside를 제조하고 brown guinea pig를 이용하여 적정량의 UV를 조사한 후에 일정량의 시료를 매일 1회 5주간 도포한 후 각 시료들의 미백효과를 검토하였다. 1% 처리군에서는 육안적으로 미백효과가 나타나지 않았으나 2%, 5% 처리군에서는 육안적으로도 시료 처리군에서 미백효과가 있음을 알 수 있었다. 특히 5% oxyresveratrol을 처리한 실험에서는 뚜렷한 미백효과가 나타남을 알 수 있었다. 객관적인 결과를 얻기 mexamer를 이용하여 멜라닌지수를 측정 한 결과도 oxyresveratrol, mulberroside A, oxyresveratrol-3-O-glucoside의 경우에 2, 5% 처리군에서 멜라닌지수의 감소를 보였다. 조직학적인 결과를 보면 oxyresveratrol 처리군에서 대조군에 비해 멜라닌 색소의 침착이 현저히 감소되었음을 보였다. 또한 표피를 분리하여 tyrosinase 및 melanin함량을 측정 한 결과에 있어서도 2%, 5% 시료처리군, 특히 5% oxyresveratrol 처리군에서의 효소 활성의 감소 및 멜라닌 함량이 현저히 감소되었음을 알 수 있었다.

미백효과를 보이는 원인을 규명하기 위해 실시한 멜라닌 합성에 관련된 단백질들의 발현을 측정해 본 결과에서도 시료처리군에서 멜라닌 합성과 관련된 유전자들의 발현이 대조군에 비해 현저히 감소되었음을 알 수 있었다.

본 연구의 결과들을 종합해 보면 상백피 추출물의 효소에서 정제한 mulberroside A 및 mulberroside A를 효소 전환하여 만든 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside는 모두 arbutin에 비해 우수한 tyrosinase 활성 억제 및 melanin 생성 억제 효과를 보였다. Oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside는 mulberroside A보다 미백효과가 증가된 결과를 보였다. 또한 5% 처리군에서 oxyresveratrol은 모든 시료 처리군에 비해 월등히 우수한 효과가 있음을 확인할 수 있었다. Oxyresveratrol의 경우에는 유방암 세포에 대한 세포 사멸 효과도 mulberroside A에 우수한 효과를 보였다. 이는 mulberroside A에 대한 생물전환으로 oxyresveratrol의 미백효과의 증진 뿐만 아니라 oxyresveratrol의 이용분야도 확대 될 수 있는 가능성이 확인 되었다.

또한 oxyresveratrol의 안정도를 검토한 결과, 중성 및 알칼리상태에서는 불안정하였고 산성에서 안정하여 pH조건을 고려하여 약산상태로의 제조가 필요하였다. 용매조건에서는 Ethanol, DMSO, 1,3 BG의 어떤 상태에서도 90%이상을 유지하며, 안정하였다. 원료첨가에 따른 경시변화를 살펴본 결과, 냉장상태에서는 모두 안정하였으며 안정도 유지하는 HP- β -CD > Microcapsule > Nano capsule > Liposome > Silica 순이었고 HP- β -CD에서는 온도의 영향을 받지 않으며 가장 이상적이었다. 제형제조에 따른 경시변화를 살펴본 결과, Microcapsule을 제외하고는 모든 제형제조에서 불안정하였다. Microcapsule > Nano capsule > HP- β -CD > Liposome > Silica 순으로 안정성이 좋게 나타났다. Capsule 방법 중에서도 nanocapsule 보다는 microcapsule 방법이 더욱 좋게 나타났다.

연구 3차년에는 oxyresveratrol는 추출된 상백피를 효소전환 후 SP-207 레진을 이용하여 간편하게 고순도로 분리 정제할 수 있었다. 즉, 안동산 상백피로부터 추출된 성분에 Pectinex 효소를 가하여 30°C, 6 시간 반응 후 100°C에서 5분간 증탕으로 효소 반응을 중지하여 얻어진 효소 반응물을 얻었다. 이를 SP-207 레진에 흡착한 후 10-40% 에탄올을 이용한 step-wise 용출시 40% 에탄올 분획으로부터 고순도로 얻을 수 있었다. 또한 이를 농축한 후 증류수에서 교반하면서 재결정하여 96% 이상의 고순도 oxyresveratrol을 제조하였다. 한편 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside의 제조는 추출된 상백피를 효소전환 후 SP-207 레진과 Low pressure liquid chromatography system인 Flash-40를 사용하여 C18 reverse phase column을 이용하여 고순도로 분리 정제할 수 있었다.

Oxyresveratrol과 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside 농도의 항산화능력을 비교한 결과, oxyresveratrol-3-*O*-glucoside보다 oxyresveratrol의 항산화력이 높게 나타났다. 또한 oxyresveratrol과 ascorbic acid의 항산화력을 비교한 결과, 1 μ M의 낮은 농도에서는

oxyresveratrol이 높은 항산화능을 나타내었고, 5 μ M의 경우 두 물질의 항산화력은 유사하였으며 5 μ M농도에서는 ascorbic acid의 항산화력이 oxyresveratrol에 비해 높은 경향을 보였다. 실험 결과 oxyresveratrol의 경우 5, 10 μ M의 낮은 농도에서도 현저한 라디칼 소거능을 보여 효과적인 항산화 물질임을 증명할 수 있었다. 따라서 oxyresveratrol은 화장품의 미백제 원료로 사용할 경우 항산화 효과를 더하여 피부 노화 방지에도 효과가 있을 것으로 생각된다.

Oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside 물질을 사용하여 guinea pig에 피부자극성 및 피부감작을 검토한 결과, 피부에서 P.I.I 0~0.08을 나타냄으로써 비자극성 물질로 판단되었고, 감작성 피부반응에서 guinea pig의 피부 감작율은 0%로 전혀 감작 반응을 야기하지 않아 매우 약함 (Grade I)으로 판정되었다.

본 연구에 사용한 상백피 유래의 mulberroside A를 효소 전환시켜 제조한 oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside 물질은 mulberroside A에 비하여 미백효과가 향상된 결과를 보였으며 guinea pig를 대상으로 한 동물 시험에서 피부자극 및 감작반응을 일으키지 않는 물질로 평가되어 미백화장품의 원료로 이용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

한편, oxyresveratrol 및 oxyresveratrol-3-*O*-glucoside 물질은 미백제 뿐 만 아니라 좋은 항산화 물질로 건강 기능성 식품으로의 가능성도 매우 높다고 사료된다.

V. 참고문헌

1. 화장품법 제 2조 2항, 보건복지부.
2. Baek, Y. S., Y. B. Ryn, M. J. Curtis-Long, T. J. Ha, R. Rengasamy, M. S. Yang, and K. H. Park. 2009. Tyrosinase inhibitory effects of 1,3-diphenylpropanes from *Broussonetia kazinoki*. *Bioorg. Med. Chem.* **17(1)**: 35-41.
3. Lee, H. J., J. H. Park, D. I. Jang, and J. H. Ryu. 1997. Antioxidant components from *Broussonetia kazinoki*. *Yakhak Hoeji* **41(4)**: 439.
4. Maeda, K., and M. Fukuda. 1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharm. Exp. Therap.* **276**: 765-769.
5. Hori, I., K. Nihei, and I. Kubo. 2004. Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytother. Res.* **18**: 475-479.
6. Golan-Goldhirsh, A., D. T. Osuga, A. O. Chen, and J. R. Whitaker. 1992. Effect of ascorbic acid and copper on proteins. In: V.T. D'Souza and J. Feder editors, *The bioorganic chemistry of enzymatic catalysis*. pp. 61-76. Boca Raton, Florida.
7. Golan-Goldhirsh, A., and J. R. Whitaker. 1985. k_{cat} inactivation of mushroom polyphenol oxidase. *J. Mol. Catal.* **32**: 141-147.
8. Bailly, J., M. Crettaz, M. H. Schifflers, and J. P. Marty. 1998. In vitro metabolism by human skin and fibroblasts of retinol, retinal and retinoic acid. *Exp. Dermatol.* **7**: 27-34.
9. Stone, T. W. 1985. In *Purines: pharmacology and physiological roles* physiological roles. pp. 1-4. Macmillan, London.
10. Mei, N., Q. Xia, L. Chen, M. M. Moore, P. P. Fu, and T. Chen. 2005. Photo-mutagenicity of retinyl palmitate by ultraviolet A irradiation in mouse lymphoma cells. *Toxicol. Sci.* **88(1)**: 142-149.
11. Mei, N., Q. Xia, L. Chen, M. M. Moore, T. Chen, and P. P. Fu. 2006. Photo-mutagenicity of anhydroretinol and 5,6-epoxiretinyl palmitate in mouse lymphoma cells. *Chem. Res. Toxicol.* **19**: 1435-1440.
12. Yan, J., Q. Xia, S. H. Cherng, W. G. Wamer, P. C. Howard, H. Yu, and P. P. Fu. 2005. Photo-induced DNA damage and photocytotoxicity of retinyl

- palmitate and its photodecomposition products. *Toxicol. Ind. Health* **21**: 167-175.
13. Mackie, B. S., and L. E. Mackie. 1999. The PABA story. *Aust. J. Dermatol.* **40(1)**: 51-53.
 14. Dromgoole, S. H., and H. I. Maibach. 1990. Sunscreening agent intolerance: contact and photocontact sensitization and contact urticaria. *J. Am. Acad. Dermatol.* **22**: 1068-78.
 15. Fournier, T., S. Pommeret, J.-C. Mialocq, A. Deflandre, and R. Rozot. 2000. Femtosecond laser studies of excited state intramolecular proton transfer in an ultraviolet-filter molecule. *Chem. Phys. Lett.* **325(2000)**: 171-175.
 16. 박장서. 2007. (특별기획) 화장품 산업과 화학공학. *News & Information for chemical engineers.* **25(2)**: 138-143.
 17. Pawelke, J. M., and A. M. Korner. 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* 70: 136-149.
 18. Bell, A. A., and M. H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.
 19. Lerner, A. B., and T. B. Fitzpatrick. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* 30: 91-126.
 20. Marmol, V. D., and F. Beermann. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS. Lett.* 381: 165-168.
 21. Hearing, V. J. 1999. Biochemecal control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 4: 24028.
 22. Matubara, H. 1998. Ihibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells. *Natural Product Sciences* 4(3): 161-169.
 23. Mishima, Y., S. Hatta, and Y. Ohyama. 1998. Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* 1: 367-374.
 24. Choi, B. W., B. H. Lee, K. J. Kang, E. S. Lee, and N. H. Lee. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Parm.* 29(3): 237-242.
 25. Dooley, T. P., R. C. Gadwood, K. Kilgore, and L. M. Thomasco. 1994. Developmnet of an in vitro primary screen for skin depimentation and

- antimelanoma agent. *Skin Pharmacol.* 7(4): 188-200.
26. Kubo, M., and H. Matsuda. 1995. Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis. *Fragrance J.* 8: 48-55.
 27. Matsusukami, M. 1995. Evaluation of antimelanogenic effects. *Fragrance J.* 19(1):
 28. Oetting, W. S, and R. A. King. 1999. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum. Mutat.* 13: 99-115.
 29. Beltramini, M., B. Slavato, M. Santamarian, and K. Lerch. 1990. The reaction of CN^- with the binuclear copper site of neurospora tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active sites. *Biochem. Biophys. Acta.* 1040(3): 365-372.
 30. Kubo, I., and I. Kinst-Hori. 1999. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4121-4125.
 31. Kuriyama, T., M. Fujinaga, T. Koda, and J. Nishihara. 1998. Cloning of the mouse gene for D-dopachrome tautomerase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1388: 506-512.
 32. Ros, J. R., J. N. Rodriguez-Lopez, and F. Garcia-Canovas. 1993. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* 295: 309-312.
 33. Wilcox, D. E., A. G. Porras, Y. T. Hwang, K. Lerch, M. E. Winkler, and E. I. Solomon. 1985. Substrate analog binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 4015-4027.
 34. Mason, H. S. 1956. Structure and functions of the phenolase complex. *Nature* 177: 79-81.
 35. Pomerantz, S. H., and V. Murphy. 1974. Purification and properties of tyrosinase from vibrio tyrosinaticus. *Arch. Biochem. Biophys.* 160: 73-82.
 36. Hearing, V. J., and J. M. Ekel. 1976. Mammalian tyrosinase: a comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.* 157: 549-557.
 37. Menter, J. M., L. M. Cornelison, L. Cannick, A. M. Patta, J. C. Dowdy, R. M. Sayre, I. K. Abukhalaf, N. S. Silvestrov, and I. Willis. Effect of UV on the

- susceptibility of acid-soluble Skh-1 hairless mouse collagen to collagenase. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **19(1)**: 28-34.
38. Kertesz, D. 1951. Copper, polyphenol oxidase (tyrosinase), catechol and ascorbic acid. *Bull. Soc. Chim. Biol.(Paris)*. **33**: 1400-1405.
 39. Battaini, G., E. Monzani, L. Casella, L. Santagostini, and R. Pagliarin. 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**: 262-268.
 40. Canabas, J., S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**: 982-985.
 41. Hori, I., K. Nihei, and I. Kubo. 2004. Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytother. Res.* **18(6)**: 475-479.
 42. Ikeda, T., and T. Tsutsumi. 1990. Function and skin depigmental activity of crude drugs. *Fragrance J.* **18**: 59-66.
 43. Kim, Y. M., J. Yun, C. K. Lee, H. H. Lee, K. R. Min, and Y. S. Kim. 2002. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds: Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **277(18)**: 16340-16344.
 44. Peter, E, and I. H. Maibach. 2000. Cosmeceuticals: Drugs vs. Cosmetics. pp. 123-145. Marcel Dekker, New York.
 45. Pawelke, J. M, and A. M. Korner. 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* **70**: 136-149.
 46. Iyengar, R, and A. J. Mcevely. 1992. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci.* **3**: 60-64.
 47. Vamons-Vigyazo, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **15**: 49-127.
 48. Mills, A. A. 2001. Changing colors in mice: an inducible system that delivers. *Genes Dev.* **15**: 1461-1467.
 49. Perez-Bernal, A., M. A. Munoz-perez, and F. Camacho. 2000. Management of facial hyperpigmentation. *Am. J. Clin. Dermatol.* **1**: 261-268.
 50. Strurm, R. A., N. F. Box, and M. Ramsay. 1998. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* **20**: 712-721.
 51. Busca, R, and R. Ballotti. 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**: 60-69.

52. Findly, G. H. 1982. Ochronosis following skin bleaching with hydroquinone. *J. Am. Acad. Dermatol.* **6(6)**: 1092-1093.
53. Hiil, H. Z., W. Li, P. Xin, and D. L. Mitchell. 1997. Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10(3)**: 158-161.
54. Hearing, V. J, and M. Jimenez. 1987. Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigment. *Int. J. Biochem.* **19**: 1141-1147.
55. Prota, G. 1980. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* **75**: 122-127.
56. Pavelm, S, and F. A. Muskiet. 1983. Eumelanin(precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect. Prev.* **6**: 311-316.
57. Bell, A. A, and M. H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phyrophathol.* **24**: 411-451.
58. Lerner, A. B, and T. B. Fitzpatrick. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 91-126.
59. Mishima, Y., S. Hatta, and Y. Ohyama. 1988. Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* **1**: 367-374.
60. Matubara, H. 1998. Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse mealnoma cells. *Natural Product Sciences* **4(3)**: 161-169.
61. Oetting, W. S, and R. A. King. 1999. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum. Mutat.* **13**: 99-115.
62. Choi, B. W., B. H. Lee, K. J. Kang, E. S. Lee, and N. H. Lee. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharm.* **29(3)**: 237-242.
63. Matsusukami, M. 1995. Evaluation of antimelanogenic effects. *Fragrance J.* **19(1)**: 14.
64. Kubo, M., and H. Matsuda. 1995. Development studies of cuticle and medicainal drugs from natural sources on melanin biosynthesis. *Fragrance J.* **8**: 48-55.

65. Dooley, T. P., R. C. Gadwood, K. Kilgore, and L. M. Thomasco. 1994. Development of an in vitro primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agent. *Skin Pharmacol.* **7(4)**: 188-200.
66. Chen, J. S., C. Wei, and M. R. Marshall. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1897-1901.
67. Galeazzi, M. A. 1984. Behavior of polyphenoloxidases in food. *Arch. Latinoam. Nutr.* **34**: 269-289.
68. Perez-Gilabert, M, and F. Garcia-Carmona. 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 695-700.
69. Hearing, V. J. 1999. Biochemecal control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **4**: 24028.
70. Takeshi, K., U. Kazunori, W. Alion, J. C. Celia, L. Genji, B. Timothy, S. Francisco, G. B. Jose carlos, and V. J. Hearing. 1994. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO. J.* **13(24)**: 5818-5825.
71. Yoshida M, Horotsu S, Nakahara M, Uchiwa H, and Tomita Y. 2002. Histamine is involved in ultraviolet B-induced pigmentation of guinea pig skin. *J. Invest. Dermatol.* 118, 255-260.
72. Yoshida Y, Hachiya A, Sriwiriyanont P, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y, Visscher M, and Boissy RE. 2007. Functional analysis of keratinocyte in skin color using a human substitute model composed of cells derived from different skin pigmentation types. *FASEB J.* 21, 2829-2839.
73. Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Li JH, Jin D, Deung YK, and Lee KJ. 2009. Effects of *Bambusae caulis* in liquamen on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in hairless mice. *J. Ethnopharmacol.* 123, 195-200.
74. Hurley ME Guevara IL, Gonzales RM, and Pandya AG. 2002. Efficacy of glycolic acid peels in the treatment of melasma. *Arch. Dermatol.* 138, 1578-1582.
75. Barbosa-Barros L, Barba C, Cocera M, Coderch L, Lopez-Iglesias C, de la Maza A, and Lopez O. 2008. Effect of systems on skin properties. *Int. J. Pharmaceut.* 352, 263-272.
76. Lim Yj, Lee EH, Kang TH, Ha SK, Oh MS, Kim SM, Yoon TJ, Kang C, Park

- JH, and Kim SY. 2009. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of α -melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured Brownish guinea pig skin tissue. *Arch. Pharm Res.* 32, 367-373.
77. Tobiishi M, Haratake A, Kaminaga H, Nakahara M, Komiya A, Koishikawa H, Uchiwa H, Kawa Y, and Mozoguchi M. 2004. Pigmentation in intrinsically aged of A1 guinea pigs. *Pigment Cell Res.* 17, 651-658.
78. Cho HS, Kwak DH, Choi IS, Park HK, Kang SJ, Yoo HS, Lee MS, Oh KW, and Hong JT. 2009. Inhibitory effect of proanthocyanidin on ultraviolet B irradiation-induced melanogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health part A.* 72, 1475-1483.
79. Beltramini, M., B. Slavato, M. Santamaria, and K. Lerch. 1990. The reaction of CN^- with the binuclear copper site of neurospora tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active sites. *Biochem. Biophys. Acta.* 1040(3): 365-372.
80. Kubo, I, and I. Kinst-Hori. 1999. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4121-4125.
81. Kuriyama, T., M. Fujinaga, T. Koda, and J. Nishihara. 1998. Cloning of the mouse gene for D-dopachrome tautomerase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1388: 506-502.
82. Ros, J. R., J. N. Rodriguez-Lopez, and F. Garcia-Canovas. 1993. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* 295: 309-312.
83. Wilcox, D. E., A. G. Porras, Y. T. Hwang, K. Lerch, M. E. Winkler, and E. I. Solomon. 1985. Substrate analog binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 4015-4027.
84. Mason, H. S. 1956. Structure and functions of the phenolase complex. *Nature* 177: 79-81.
85. Pomerantz, S. H, and V. Murphy. 1974. Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 160: 73-82.
86. Hearing, V. J, and J. M. Ekel. 1976. Mammalian tyrosinase: A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.* 157: 549-557.
87. Kubo, I., I. Kinst-Hori, S. K. Chaudhuri, and Y. Kubo. 2000. Flavonols from

- Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* **8(7)**: 1749–1755.
88. Yong, G., G. Leone, and K. G. Stroth. 1990. *Agaricus bisporus* metapotyrosinase: Preparation, characterization, and conversion to mixed-metal derivatives of the binuclear site. *Biochemistry* **29(41)**: 9684–9690.
89. Wang, G., J. J. Xu, L. H. Ye, J. J. Zhu, and H. Y. Chen. 2002. Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan. *Bioelectrochemistry* **57**: 33–38.

연구 성과

1. 연구 성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전 자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품명 명칭	중등 등록	품수 중입 신고	생산 판매		품종보호		
									출원	등록	
1차 년도	목표	1							1		
	달성	1						0	1	학회발표 1	
2차 년도	목표	1						1	1		
	달성	2						1	1	학회발표 3	
3차 년도	목표							1			
	달성							2		학회발표 1	
계	목표	2	1					2	2		
	달성	3						3	2		

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용 건수	목표	1	2			2	
	달성		2		2		

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내 외 구분	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2009 년	생물전환에 의한 rhapontigenin생산 및 멜라닌 합성저해	전민	김정근	임영희	한국미생물 생명공학 회지.	37(1) 49-54	국내	비SCI
2010 년	Evaluation of the Antibacterial Activity of Rhapontigenin Produced from Rhapontin by Biotransformation against <i>Propionibacterium acnes</i>	김정근	임영희		J. Microbiol. Biotechnol	20(1) 82-87	국내	SCIE
2010 년	Biotransformation of mulberroside A from <i>Morus alba</i> results in enhancement of tyrosinase inhibition	김정근	임영희		J. Ind. Microbiol. Biotechnol.	37, 631-637	국제	SCI
2011 년	Inhibitory effect of mulberroside A and its derivatives on melanogenesis induced by ultraviolet B irradiation	박근태	임영희	김정근	Food and Chemical Toxicolog y	49, 3038-3045	국제	SCI
2011 년	Evaluation of the inhibition of mushroom tyrosinase and cellular tyrosinase activities of oxyresveratrol: comparison with mulberroside A	김정근	임영희	박근태	Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry	In press (DOI: 10.3109/ 14756366 .2011.598 866)	국제	SCI

다. 학회발표 성과

발표 연도	논문명	저자			학회명
		주저자	교신 저자	공동 저자	
2009 년	Evaluation of the antibacterial activity of rhapontigenin produced from rhapontin by biotransformation against <i>Propionibacterium acnes</i>	김나래	임영희	김정근	한국미생물 생명공학회 (2009년 6월)
2010 년	Evaluation of the Inhibition of Melanin Synthesis of the Extract from <i>Morus alba</i> by Biotransformation	임영희	임영희	김정근	한국미생물 생명공학회 (2010년 6월)
2010 년	Biotransformation enhances rhapontin antimicrobial activity and provides clues to its mechanism of action	임영희	임영희	김정근	한국미생물 생명공학회 (2010년 6월)
2010 년	Biotransformation of Rhapontin from <i>Rheum undulatum</i> Enhances its Inhibition of Melanin Synthesis	이현순	임영희	김정근	한국식품과학회 (2010년 6월)
2011년	Inhibitory effect of mulberroside A and its derivatives on ultraviolet B irradiation-induced melanogenesis	박근태	임영희	김정근	한국미생물생명공 학회 (2011년 6월)

라. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원 국가	출원 번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호
2008. 11.19	효소에 의해 가수분해된 상백피 추출물을 함유하는 피부미백용 화장품조성물	김정근 이강문 정영호	대한 민국	10-2008- 0115097					
2009. 11.19	효소에 의해 가수분해된 상백피 추출물을 함유하는 피부미백용 화장품조성물	김정근 임영희 김미진	대한 민국	10-2009- 0112222					
2009. 11.19	라폰티게닌 화합물을 유효성분으로 하는 유방암 예방 또는 치료용 조성물	조쌍구 김정근 외 3인	대한 민국	10-2009- 0112092					

라. 기술료 징수 현황

- (1) 1차년도 기술료 징수 없음
- (2) 2차년도 기술료 징수 없음

마. 사업화 현황

- (1) 1차년도 : 사업화 현황 없음
- (2) 2차년도 : Mulberroside A 제품화 (삼경코스텍)
- (3) 3차년도 : Oxyresveratrol 제품화 예정(삼경코스텍)
Oxyresveratrol-glucose 제품화 예정(삼경코스텍)

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타 지역
12		4	5	3	5	7	■		

(2) 장·단기 연수지원 성과

없음

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
Oxyresveratrol의 기능성 식품 및 의약품 개발	세미나	대웅제약	1	4	20
바이오산학 워크샵	효소가수분해에 의한 천연미백제 개발	서울대 국제백신 연구소	1	1	50

사. 경제사회 파급효과

- 3차년도말에 사업지원 성과가 나타날 것으로 예상됨.
현재 두산 바이오등과 생산 및 수출에 대하여 협의중

2. 구매금액이 3천만원 이상인 기자재 구매현황

구매 없음.

3. 연구비 집행실적

(단위 : 천원)

비목	금액		계획금액	사용액	잔액	비고
	세목					
인건비	내부인건비	미지급용	48,000	48,000	0	
		지급용	-	-		
	외부인건비	현금	20,400	20,400	0	
		현물	22,000	22,000	0	
	소 계		90,400	90,400	0	
직접비	연구장비·재료비	현금	38,001	38,001	0	
		현물	-	-		
	연구활동비		9,000	9,000	0	
	연구수당		8,599	8,599	0	
	소 계		55,600	55,600	0	
위탁연구개발비			-	-	-	
간 접 비			9,000	9,000	0	
연구사업비 총액			155,000	155,000	0	

4. 중요 연구 변경사항

중요 연구 변경 사항 없음