

유채박 추출물의 피부미용 효과에 관한 연구

김선미, 나명순*

A Study on Skin Care Effects of Rapeseed Meal Extract

Sun Mi Kim and Myung Soon Na*

접수: 2013년 6월 5일 / 게재승인: 2013년 6월 17일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: This research was to investigate the inhibitory effects of tyrosinase, elastase and collagenase using rapeseed meal extract for the functional cosmetics. Gamma-tocopherol and alpha-tocopherol contents were 304.9 and 212.2 mg/kg, respectively. In the case of delta-tocopherol and plastocho-manol-8, they were 12.1 and 35.7 mg/kg, respectively. The total phenol content of methanol extract was the highest (49.6 mg/g) which was about 4.96 fold higher than that of water extract. The maximum nitrite scavenging activities of methanol and acetone extract at pH 1.2 were 85.2 and 80.1%, respectively, at 8.0 mg/mL. When the extract concentration of rapeseed meal increased upto 2.0 mg/mL, cell viabilities did not appear to have any significant cytotoxic effect, irrespective of extracts. Tyrosinase and elastase inhibition activities increased from 25.2 to 42.5% and 25.3 to 48.0%, respectively, as methanol extract concentration increased from 0.5 to 1.0 mg/mL. The collagenase inhibition activities of methanol and acetone extracts at 1.0 mg/mL were 67.2 and 68.0%, respectively. These results showed that the methanol and acetone extract of rapeseed meal can be used as a new source of functional cosmetic agent.

Keywords: Collagenase, Elastase, Rapeseed meal, Tyrosinase

1. 서론

유채 (*Brassica napus napobrassica*)는 십자화과에 속하며 캐나다, 아르헨티나, 인도 등에서 다량 재배되고 있는 유종실 작물이며, 국내에서는 제주도 전역과 중남부 지역에서 재배되고 있는 중요한 자원이다. 특히 유채는 일부분을 산업에 직간접적으로 활용할 수 있는 에너지 작물이며 주로 종실로부터 기름을 짜서 이용하는 유지 작물 중 하나이다. 국내에서도 이러한 유채씨로부터 유채유를 생산하고 있으며 최근 유채씨와 같은 친환경 원료를 활용한 대체에너지 또는 신재생에너지로서 바이오디젤생산에 관한 연구가 진행되면서 보다 경제적인 활용으로의 관심이 집중되고 있다 [1]. 현재 유채박의 기본적인 화학적 전처리에 대한 연구와 전처리에 관여하는 다양한 인자들에 대한 분석이 충분히 이루어지지 않았으며, 유채박 추출물을 이용하여 화장품 응용에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

피부 노화는 나이가 들어감에 따라 자연히 발생하는 시간 의존적인 내인적 노화와 주위환경, 특히 자외선 노출로 인해 발생하는 외인적 노화로 나눌 수 있다. 한편 에스트로겐의 감소는 자연노화의 주요한 원인으로 진피에 있는 섬유아세포를 자극하여 콜라겐 합성을 촉진시키며, 콜라겐 대사에 관여해 콜라겐 분해효소인 collagenase의 발현을 조절하여 콜라겐 분해를 억제한다. 나이가 들어감에 따라 에스트로겐의 생성이 중지되어 내분비성 노화가 촉진된다 [2]. 자외선에 의해 세포 사이를 채우는 성분인 교원질과 탄력질의 합성이 감소하게 되면 다양한 기질 단백질 분해 효소의 발현이 증가하게 된다. 그러므로 피부 노화의 주원인인 콜라겐과 엘라스틴 분해 효소인 collagenase와 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부 노화를 억제할 수 있다고 하였다. 콜라겐과 엘라스틴은 섬유아세포의 작용에 의해 합성되며 collagenase와 elastase에 의

조선대학교 산업대학원 미용향장학과
Department of Beauty and Cosmetology, Graduate School of Industry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel: +82-62-230-6430, Fax: +82-62-232-9065
e-mail: najieun1959@hanmail.net

해 분해된다.

자외선 노출로 인해 피부는 항산화효소와 글루타치온, 비타민 C, 비타민 E 및 유비퀴논과 같은 항산화제의 감소로 과잉의 유해한 활성산소종 (reactive oxygen species)을 생성한다. 자외선으로 생성된 활성산소 종은 실질적으로 피부의 효소 및 비효소적 항산화 방어체계를 손상시키며 산화적 스트레스는 지질과 산화, 단백질산화, 피부의 염증반응 유발, 피부면역기능 억제, 세포성분의 손상을 야기시키고 광노화를 촉진시킨다 [3]. 광노화를 유발시키는 활성산소 멜라닌생성을 촉진시키고 주름을 유발시키는 원인 물질로 받아들여지고 있다. 멜라닌은 티로신 (출발물질)로부터 티로시나제 효소에 의해 도파, 다시 도파퀴논로 산화되는 반응에 의해 합성이 개시된다. 멜라닌 색소는 멜라노사이트 (melanocyte) 내의 소기관인 멜라노솜에서 합성되며, 멜라노사이트의 수직상 돌기를 통하여 주위의 케라티노사이트로 이동한다. 따라서 피부 세포를 보호할 수 있는 항산화제, 피부를 구성하는 물질인 콜라겐을 분해하는 단백질 분해효소인 MMPs (matrix-metalloproteinases)의 생합성을 억제할 수 있는 물질을 사용하여 피부 노화를 완화할 수 있는 천연소재 개발에 대한 관심과 연구가 많이 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 유채씨로부터 유채유를 생산하는 과정에서 발생하는 부산물인 유채박의 피부 미용 효과를 알아보기 위해 여러 추출물을 이용하여 아질산염 제거 효과를 검토하였으며 또한 세포 독성, tyrosinase, collagenase 및 elastase 활성 저해 등의 실험을 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

본 실험에 사용한 시료는 2011년 전남 해남에서 채집한 유채씨앗을 제공받은 즉시 분쇄하여 유채박 100 g당 핵산 100 mL을 넣어 24시간 후에 탈지한 유채박을 시료로 사용하였다.

2.2. 열수 추출물

유채박 200 g을 정제수 200 mL에 혼합한 후 1시간 동안 가열 후 추출하여 Whatman No. 2 (USA) 여과지로 여과하고 여액을 80°C에서 감압 농축 (N-1000, EYELA, Tokyo, Japan) 후, 동결 건조하여 추출물 38 g을 시료로 사용하였다.

2.3. 메탄올 추출물

유채박 200 g을 메탄올 (95%) 200 mL에 실온에서 24시간 혼합한 후 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 2 (USA) 여과지로 여과하고 여액을 50°C에서 감압농축 후, 동결 건조하여 추출물 28.9 g을 시료로 사용하였다.

2.4. 아세톤 추출물

유채박 200 g을 아세톤 200 mL에 실온에서 24시간동안 혼합한 후 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 2 (USA) 여과지로

여과하여 30°C에서 감압농축 후 동결 건조하여 추출물 24 g을 시료로 사용하였다.

2.5. 토크페콜 분석

추출한 유지 0.1 g을 핵산 1 mL에 녹이고 hydrophobic membrane filter (polypropylene syringe filter; 0.2 μm ×13 mm, Tokyo, Japan)로 여과한 후, 20 μL 를 HPLC (9100 HPLC system, Younglin Co.)에 주입하였다. 분석컬럼은 μ -Porasil TM 컬럼 (3.9×300 mm, 10 μm , Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, 이동상으로는 n-핵산:아이소프로판올의 혼합용액(99.8:0.2, v/v)을 사용하여 분당 2.0 mL의 속도로 용출시켰다. 이때 형광검출기 (G1321A, Agilent 110 series, Bblingen, Germany)의 파장은 excitation 290 nm, emission 330 nm이었다.

2.6. 폴리페놀

추출물 1 mg/mL을 메탄올에 용해시킨 시료액 80 μL 와 Folin-Denis reagent 80 μL 를 혼합하여 3분간 반응시킨 뒤, 10% Na_2CO_3 80 μL 를 혼합하여 암실에서 60분간 반응시킨 후 상등액 120 μL 를 취하여 700 nm에서 흡광도(Power Wave X340, BIO-TEK, USA)를 측정했다.

2.7. 추출 수율

추출 수율은 초기 건조중량과 추출 후 건조중량으로 계산하였다. 추출 용매로는 정제수, 열수, 메탄올, 아세톤을 사용하였다.

2.8. 아질산염 제거 효과

NaNO_2 (1 mM) 2 mL에 각 추출물 용액 1 mL (60 mg)을 첨가하고 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응액의 pH를 각각 조정하여 다음 반응용액의 최종부피를 10 mL로 하였다. 반응액을 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 반응액을 각각 1 mL 취하고 여기에 acetic acid (2%) 5 mL, Griess 시약과 naphthylamine (1%)를 1:1 비율로 혼합한 용액 0.4 mL를 가하여 잘 혼합 시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 흡광도를 520 nm에서 측정 잔존하는 아질산염량을 구하였다.

2.9. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 생쥐 대식 세포주를 96-well plate에 8×10^4 cells/mL로 분주하여 안정화시킨 후 추출물을 농도 별로 처리하여 24시간 배양 하고 배지를 제거한 후 MTT 용액 (0.5 mg/mL)을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 CO_2 배양기에서 반응시키면 불용성의 결정이 생성되게 된다. 이렇게 생성된 불용성 결정을 dimethylsulfoxide (DMSO)로 완전히 녹인 다음, microplate reader (TECAN Austria GmbH, Austria)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정했다. 이렇게 측정된 값을 이용하여 세포독성을 확인하였다.

2.10. 멜라닌세포 배양방법

B16/F10 melanoma 세포 (CRL-6475M, ATCC, Manassas, VA, USA)는 25 mM HEPES, 25 mM sodium bicarbonate, 10% fe-

tal bovine serum, 50 units/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

2.11. 멜라닌 함량

분주한 후 10% FBS가 함유된 DMEM 용액에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 추출물에 1 µM의 α-MSH를 처리하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나고 난 후 phosphate buffered saline (PBS, 1%)로 3회 반복하여 수세하였다. 수세가 끝난 배양액은 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 물에 불용성을 나타내는 멜라닌의 액화를 일으키기 위하여 1 N NaOH 200 µL를 가하고 80°C에서 20분간 끓여 멜라닌을 완전히 녹인 후 96 well plate에 100 µL를 옮기고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 추출물을 첨가하였을 때 나타내는 melanin 합성의 상대적 변화량을 조사하였다.

2.12. Tyrosinase 활성 저해

96 well에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 tyrosinase (1100 units/mL, Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA)와 1.5 mM의 L-tyrosinase를 순서대로 넣은 다음 37°C에서 10분 동안 반응시킨 뒤 ELISA microplate reader (680, Bio-rad, Tokyo, Japan)로 475 nm에서 흡광도를 측정했다.

2.13. Elastase 활성 저해

각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.1 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 0.05 mL의 elastase, pancreatic solution (Type I: From Porcine Pancreas 유래, 0.6 units/mL) 용액을 각각 첨가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 0.1 mL의 N-succinyl-(L-Ala) 3-p-nitroanilide (1 mg/mL)을 첨가하여 30분간 반응시키고 microplate reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정했다. Elastase 활성 저해는 시료용액의 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 감소율로 나타났다.

2.14. Collagenase 활성 저해

반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzyl oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 0.15 mL의 collagenase (0.2 mg/mL)를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 0.5 mL의 6% citric acid를 넣어 반응을 정지시킨 후 1.5 mL의 ethylacetate를 첨가하여 상등액을

320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 활성 저해는 시료용액의 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 감소율로 나타났다.

3. 실험 결과

3.1. 토코페롤

Tocopherols은 천연 항산화제로써 BHT보다도 항산화 효과가 약 250배 증가한다고 보고되고 있다. 또한 항산화제 이외에도 비타민으로서의 역할도 수행하기 때문에 영양학적으로 중요하다. 토코페롤을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 여러 토코페롤 중에서 gamma-tocopherol (304.9 mg/kg) 와 alpha-tocopherol (212.2 mg/kg)이 가장 높게 나타났다. Delta-tocopherol 및 plastochromanol-8 농도는 각각 12.1 mg/kg와 35.7 mg/kg으로 나타났다. 그러나 beta-tocopherol은 검출되지 않았다.

3.2. 폴리페놀

천연에 존재하는 항산화제의 대부분이 페놀성 물질이라는 데 주목 되어 근래에 페놀성 화합물 (phenolic compounds)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [4,5]. 백삼과 홍삼의 주요 페놀성 성분인 cinnamic acid 및 quercetin은 tyrosinase 저해하는 효과가 있으며, 특히 tyrosinase 활성에 의한 세포내 melanin 함량을 저해시키는 효능을 가지고 있다고 보고하였다 [6]. 폴리페놀 화합물들은 식물체에 널리 분포되어 2차 대사산물의 하나로서 다양한 분자구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대분자들과 쉽게 결합하여 항산화, 항암 등 다양한 활성을 갖는다. 체내의 생체막에 존재하는 지질은 free radical과 반응하여 산화되는데 이는 생체 노화의 근원이 된다. 이러한 산화반응을 방지하기 위해 free radical scavenging을 이용하여 연쇄반응의 전파단계에서 peroxy radical 등과 탈수소 반응을 통해 수소원자를 공여함으로써 radical이 비교적 안정한 상태로 유지된다. 이러한 free radical scavenger를 항산화제라고 하는데 이중 대표적인 물질이 페놀 화합물이다. 폴리페놀 화합물의 주된 역할은 자유 라디칼을 소거하는 것이라는 연구가 보고되었다. 따라서 이러한 페놀 화합물인 플라보노이드나 페놀산 등의 총량인 총페놀 함량은 DPPH radical 소거능으로 나타내는 항산화 활성에서는 중요한 인자로 작용하며 일반적으로 항산화 활성이 증가함에 따라 총 페놀 함량도 증가했다. 식품에서 hydroxyl anisol과 butylated hydroxyl toluene 등 합성 항산화제가 있으나 이들은 50 mg/kg/day 이상 섭취하면 생체 효소 및 지방의 변화로 인체에 암을 유발할 수 있다는 보고가 있고 천연 항산화제에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 본 연구는 유채박을 추출 용매에 따른 총 페놀 함량을 검토하기 위하여 용매로서 물, 열수, 메탄올, 아세톤을 사용하였다. 유채박의 물, 열수, 에탄올, 및 아세톤 추출물의 총페놀 함량의 결과는 Fig. 1과 같다. 총 페놀 함량을 sinapic acid를 표준곡선으로 하여 측정하였다. 추출물들의 총페놀 함량 범위는 10.0~49.6 mg/g extract로 나타났다.

Table 1. Concentrations of tocopherol of rapeseed meal

Tocopherol	Content (mg/kg)
Alpha-tocopherol	212.2
Gamma-tocopherol	304.9
Delta-tocopherol	12.1
Plastochromanol-8	35.7

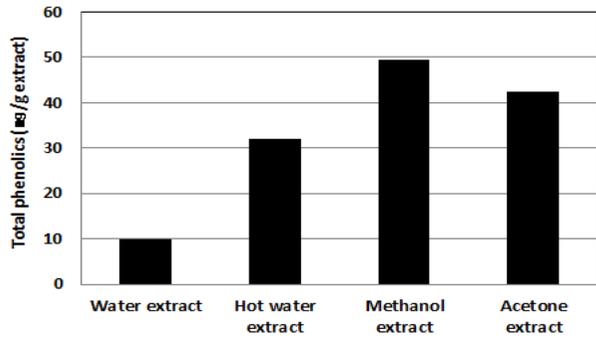


Fig. 1. Effect of extracting solvents on total phenolics in rapeseed meal.

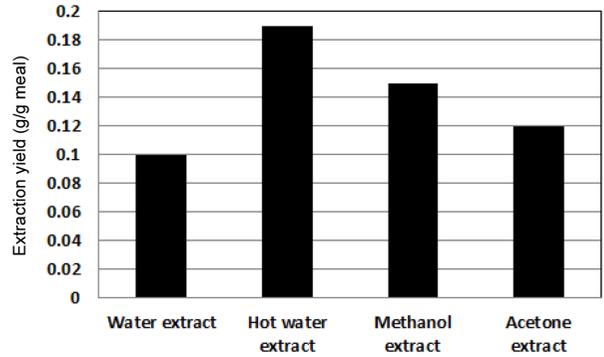


Fig. 2. Effect of extractant extracting solvents on extraction yield.

특히 메탄올 추출물을 이용할 경우 총페놀 함량은 49.6 mg/g 으로 가장 높았고 그 다음으로 아세톤 추출물이 40.1 mg/g extract로 나타났다. 물 추출물의 총페놀 함량은 10.0 mg/g extract로 나타났고 그러나 열수 추출물의 경우는 32.1 mg/g extract로 나타났다. 공액 방향족환에 수산기 (-OH)가 결합된 페놀계 화합물들은 수소 공여 작용에 따른 환원 활성에 의하여 지질의 산화를 억제 시키기거나 지연시키는 것으로 알려졌다 [6,7]. 그러나 물추출물에서는 항산화력이 낮거나 산패를 촉진하는 특성을 나타내었는데, 이는 수용액추출물의 성분들이 다양한 성분들로 구성되어 있어 이들 성분들의 일부는 상당한 환원성을 갖는다. 식물체의 가장 주된 성분들인 동시에 대표적인 수용성성분인 당류와 아미노산, 펩타이드 및 단백질에 대한 항산화 작용의 연구 결과들을 종합해보면 대체적으로 당류 및 탄수화물은 산패를 촉진하는 반면 아미노산, 펩타이드 및 단백질은 산패를 억제한다는 보고가 있다 [8]. 유채박의 수용성 추출물에서 항산화 효과가 낮고 그리고 산패가 촉진된 것은 질소화합물에 비하여 당류 및 탄수화물을 상당히 높게 함유된 것으로 사료된다. 페놀성 화합물인 플라보노이드나 페놀산 등의 총량인 총페놀 함량은 항산화 활성에 중요한 인자로 작용한다. 이는 천연식품 자원에 존재하는 다양한 페놀성 화합물들이 미백 활성을 유도하는 것으로 판단되며, 채종박의 메탄올 및 아세톤 추출물의 탁월한 항산화활성은 추후 화장품과 같은 미용 산업 분야에서 기능성 소재로서 가치가 있다고 사료되며 향장 관련 산업소재로서의 활용 가능성이 기대된다.

3.3. 추출 수율

유채박 추출수율은 Fig. 2와 같다. 추출 수율은 초기 건조중량과 추출 후 건조중량으로 계산하였다. 유채박의 추출수율은 추출용매에 의해 각각 다르게 나타났고 유채박의 추출수율 범위는 0.1~0.19 mg/g meal로 나타났다. 특히 여러 추출용매에서 열수를 이용할 경우 가장 높은 수율이 나타났다 (0.19 g/mg meal).

3.4. 세포 생존율

MTT assay는 살아 있는 세포에서 탈수소 효소 작용에 의하여

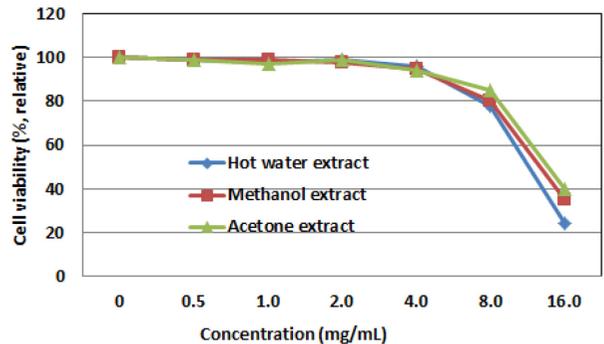


Fig. 3. Effect of rapeseed meal extract on cell viability.

노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium이 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 3은 세포생존율의 결과이다. 세포독성 실험 결과 추출물은 추출용매에 상관없이 2.0 mg/mL 까지 독성이 없는 것으로 나타났다.

3.5. 추출물 pH 변화에 따른 아질산염 제거 효과

발암성 물질인 N-nitroso 화합물의 전구체의 하나인 아질산염은 미량이지만 하나 야채, 곡류를 비롯한 각종 농산물에 널리 함유되어 있고, 육제품이나 기타 식품의 보존과 발색 안정을 위해 식품 첨가물로도 사용되고 있다. 식품의 안전성 측면에서 니트로사민 (nitrosamines)은 식품 성분 간의 상호 반응으로 식품 내에서 뿐만 아니라 nitrosation이 인체의 위내 pH조건과 유사하며, 위내에서도 쉽게 생성될 수 있다 [9]. 특히 아질산염은 그 자체가 지니는 독성 때문에 일정 농도 이상 섭취하게 되면 혈중 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 mremthoglobinia 등과 같은 각종 중독 증상을 일으킨다고 보고되었다 [10]. 그러므로 유채박 추출물 pH 변화에 따른 아질산 소거능을 검토 했고 그 결과는 Fig. 4에 나타났다. 열수, 메탄올 및 아세톤 추출물의 아질산 소거능은 pH 1.2에서 약간의 차이는 있으나 75~80% 범위로 나타났다. 그러나 pH가 증가함에 따라 추출용매에 관계없이 모두 감소했다. 특히 pH가 8.0으로 증가할 경우 열수, 추출물의

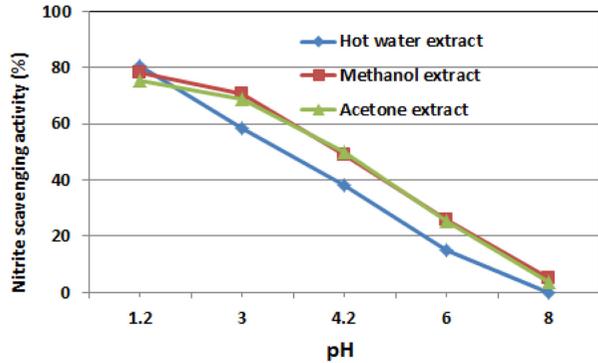


Fig. 4. Effect of pH on nitrite scavenging activity.

아질산 소거능은 전혀 일어나지 않았고 메탄올 및 아세톤 추출물의 아질산 소거능은 5.3%와 3.0%로 감소했다. 본 실험에서의 결과를 볼 때 추출물을 아질산염이 존재할 수 있는 가공식품과 함께 섭취할 경우 각종 중독증상 및 암 발생과 같은 질병을 다소 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 여러 종의 Herb 추출물에서 물, 메탄올 추출물의 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 56.9~86.7%를 나타냈고, pH가 증가함에 따라 점차 감소하여 pH 4.2에서는 0~1.7%로 특히 apple mint와 thyme은 소거능이 없는 것으로 나타났다. 각종 페놀성 화합물의 농도를 수용액으로 조제 후 아질산염 소거율을 여러 pH 조건 하에서 측정한 결과 pH 1.2에서 가장 높게 나타났고 pH 6.0에서 대부분 상실되었다고 보고하였다 [11,12]. 신선초, 케일, 당근, 녹즙의 수용성 추출물 아질산염 분해능을 측정한 결과 pH 1.2에서 가장 효과가 좋았고 pH 6.0에서는 큰 차이가 없다고 보고하였다 [13]. 녹차 추출물의 수용성은 pH 1.2에서 90%의 아질산 소거능을 나타냈고 메탄올 추출물은 거의 100%에 가까운 활성을 나타냈다고 하였다 [14]. 또한 대추 잎의 경우는 에탄올 추출물을 pH 1.2에서 반응 시킨 결과 40% 이상 분해능을 나타냈다고 보고하였다 [15].

3.6. 추출물 농도에 따른 아질산 제거 효과

추출물 pH 1.2에서 유채박 추출물 농도에 따른 아질산 제거 효과 검토하기 위해 추출물 농도 0.5 mg/mL에서 8.0 mg/mL 까지 농도를 이용하여 측정하였고 그 결과는 Fig. 5에 나타났다. 아질산 제거 효과는 열수, 메탄올 및 아세톤 추출물과 관계없이 농도에 의존적으로 증가했다. 추출물 농도가 0.5 mg/mL에서 8.0 mg/mL로 증가할 경우 열수 추출물의 아질산 제거 효과는 30.5%에서 70.6%로 증가했다. 메탄올 추출물의 아질산 제거 효과는 35.8%에서 80.2%로 증가했다. 그리고 아세톤 추출물의 아질산 제거 효과는 34.9%에서 75.1%로 증가했다.

3.7. 멜라닌 합성 억제

멜라닌 (melanin)은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생물 고분자로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 사람의 피부색을 결정하는 가장 중요한 요인인 멜라닌은 자외선 등으로부

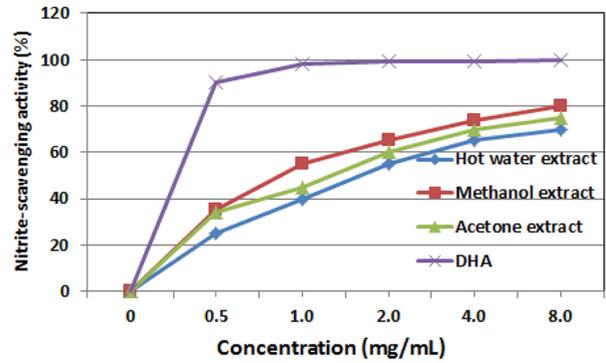


Fig. 5. Effect of rapeseed meal extract on nitrite scavenging activity.

터 피부를 보호하는 역할을 하지만 이의 과다 생성은 기미, 주근깨, 검버섯, 피부암 등의 질환을 유발한다. 멜라닌은 표피 기저층 melanocyte의 수지상 돌기를 통하여 주위의 keratinocyte로 전달되고, 피부의 각질층으로 이행한다. 멜라닌 생성은 멜라닌 생성 세포의 melanosome이라는 소기관에서 이루어진다 [16]. 본 연구에서는 멜라닌 생성세포인 B16/F10 melanoma cell line을 이용하여 유채박 추출물이 세포 수준에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였다. B16/F10 melanoma 세포 배양에서 기본배지만을 사용한 것을 control로 하였다. 그리고 추출물을 농도별로 첨가하였을 때 멜라닌 합성의 저해 정도를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 유채박의 추출물을 0.5, 1.0 mg/mL를 농도별로 처리하여 멜라닌 합성 억제 효과를 확인한 결과 농도 의존적인 멜라닌 색소 생성 저해가 나타났다. 여러 추출물 중에서 메탄올 추출물이 멜라닌 생성 저해가 가장 높게 나타났다. 특히 메탄올 추출물 1.0 mg/mL의 경우 control에 비교해서 약 52% 저해 효과를 보여주었다. 이러한 결과는 다양한 생리활성을 나타내는 항산화 물질이 연속적인 산화과정에 의해 생성되는 멜라닌 색소 형성을 막을 수 있을 뿐만 아니라 활성산소 소거를 통해서도 멜라닌 색소 형성을 막을 수 있는 미백 물질로 사료되고 페놀성 물질이 멜라닌의 합성을 억제하는데 효과가 있다고 보고하였다 [17]. 최근 들어 phenolic acid, vitamin E, flavonoid, carotenoid 등 많은 항산화성 물질이 천연식물에서 발견됨에 따라 천연 물질을 이용한 미백제 및 항산화제 탐색이 활발히 진행되고

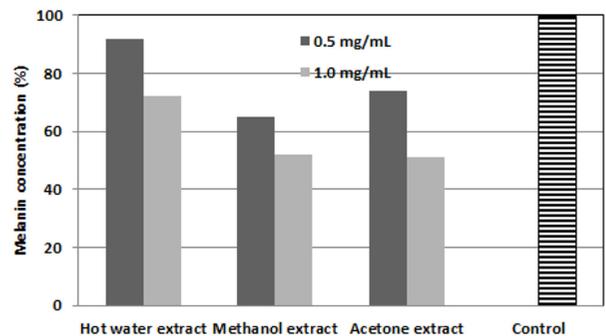


Fig. 6. Effect of rapeseed meal extract on melanin concentration.

있다. 그러므로 유채박 추출물의 항산화 효과에 대한 폴리페놀 함량이 중요하다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 총 페놀성 화합물 함량 및 항산화 활성은 멜라닌 생성 억제와 높은 연관성이 있는 것으로 사료되며, 이는 유채박에 존재하고 있는 페놀성 생리활성 물질들로부터 기인한 것으로 판단된다.

3.8. Tyrosinase 활성 저해능

용매에 따른 유채박 추출물의 기능성 화장품 소재로 이용 가능성을 검토하기 위해 갈변색소 melanin의 생합성에 관여하는 tyrosinase의 저해 활성을 조사했다. Tyrosinase는 tyrosin으로부터 3,4-dihydroxy-L-phenylalanin (DOPA)과 DOPA-quinone을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 melanin색소 생성에 관여하는 효소로 자외선에 의하여 melanocyte의 유사분열이 일어나고 이어서 melanocyte가 활성화 된다. 활성화된 melanocyte에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 melanin의 생성이 되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 되어 기미, 주근깨와 같은 색소 침착이 일어나게 된다. 활성산소와 같은 유해 인자를 제거하는 것은 자외선에 의한 피부색소 형성을 막을 수 있으며, 항산화 효과를 가지는 식물은 미백에 관련한 tyrosinase 효소를 억제할 수 있는 유효 성분이 다량 포함되어 있을 것으로 보고하였다 [18]. 그러므로 tyrosinase 활성 억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제 실험은 유용한 평가법으로 인정되어 진다고 하였다 [19]. Fig. 7은 채종박 추출물의 농도에 따른 tyrosinase 활성의 저해도를 나타낸 결과이다. Tyrosinase 활성의 저해도는 유채박 추출물의 농도에 의존적으로 증가하였고 메탄올 추출물을 이용할 때 tyrosinase 활성의 저해도가 가장 높게 나타났다. 특히 메탄올 추출물농도가 0.5 mg/mL에서 1.0 mg/mL으로 증가할 경우 tyrosinase 활성 저해도는 25.2%에서 42.5%으로 증가했다. 그러나 표준물질인 arbutin (0.5 mg/mL)은 76.3%였다. 이것은 tyrosinase 활성 저해에 유효한 물질로 알려진 페놀 성분이 메탄올 추출물을 통해 증가함에 따른 것으로 사료된다. 쥘레 잎 및 뿌리 추출물은 농도 200 µg/mL에서 30% 및 32%의 tyrosinase 저해효과가 나타났다고 보고하였다 [20]. 미백효과와 관련된 다양한 연구 결과들을 고려해볼 때 식물자원 유래 phenolics 함량 및 구성에 따라 tyrosinase 저해효과가 상대적으로

나타나고 있으며, chlorogenic acid를 포함한 수종의 phenolics를 함유하는 물질이 tyrosinase 저해효과를 가진다는 연구결과 [21]를 바탕으로 chlorogenic acid 성분을 함유한 경우 미백향장산업 소재로서 가능성을 제시하는 것으로 판단된다.

3.9. Elastase 저해 활성

피부노화 현상은 피부세포 내 생체결합의 손실, 피부 각질층의 구조변화, 표피 세포의 분화 감소, 진피 내의 섬유아세포에 의한 단백질 및 세포간 물질의 생체합성기능 저하 등에 의해 나타난다. 피부노화의 주원인 중의 하나인 elastin 분해 효소인 elastase 활성을 저하시킴으로써 피부조직의 기계적 특성을 유지 시켜 탄력을 유지하고 피부가 늘어지는 것을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다 [22]. Elastase는 단백질인 엘라스틴을 분해하는 효소로 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비 특이적 가수분해 효소이다. 피부의 진피조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부의 그물망 구조 결합이 끊어짐으로, elastase가 주름생성의 주원인 효소로 알려져 있다. Elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내고, ursolic acid 등이 elastase 저해제로 이용되고 있다. 그리고 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 효소의 활성이 극히 높아 조직 파괴에 직접적인 원인이 되어 피부의 주름 및 탄력성 소실을 유발한다. 따라서 채종박 추출물이 elastase 저해 활성에 미치는 영향을 검토하였다. 유채박 추출물 농도에 대한 elastase 저해 활성은 Fig. 8에 나타났다. Elastase 저해활성은 추출물의 농도 의존적으로 증가되었다. 특히 메탄올 및 아세톤 추출물 농도가 0.5 mg/mL에서 1.0 mg/mL 증가할 경우 elastase 저해 활성은 25.3~26.0에서 47.2~48%로 증가되었다. 이 수치들은 대조군인 ursolic acid (0.5 mg/mL)에 비해서 약 55% 저해 활성이 나타났다. 이에 따라 메탄올 및 아세톤 추출물을 첨가한 화장품의 제조는 피부 각질층의 elastin을 분해하여 피부의 탄력성을 소실시켜 피부의 노화를 야기하는 elastase의 작용을 저해함으로써 이와 관련한 피부 개선 능력을 가질 것으로 사료된다. 따라서 화장품 소재로서의 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

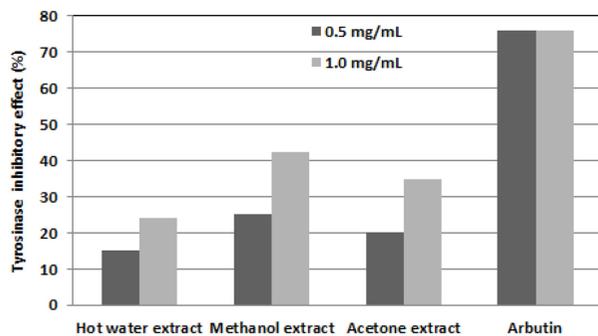


Fig. 7. Effect of rapeseed meal extract on tyrosinase activity.

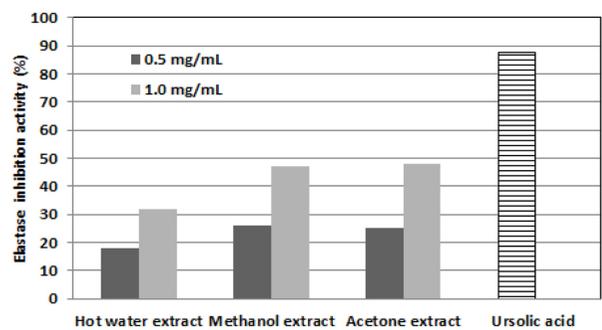


Fig. 8. Effect of rapeseed meal extract on elastase activity.

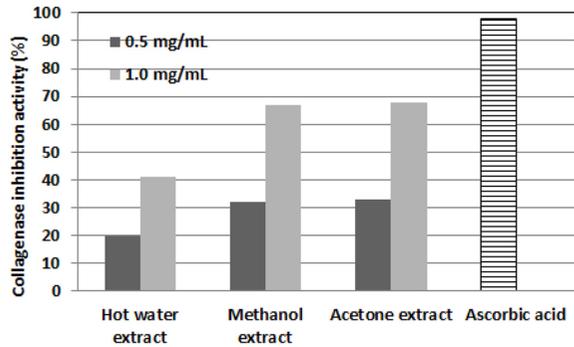


Fig. 9. Effect of rapeseed meal extract on collagenase activity.

3.10. Collagenase 저해 활성

세포외기질의 주요 구성 성분인 콜라겐은 피부 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로 피부, 뼈 및 치아의 유기물질의 대부분을 형성하며 피부건고성, 결합조직결합력, 세포 접착성, 세포 분화유도 등의 기능을 가지고 있다. 콜라겐은 진피층의 90% 이상으로 구성되어 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하여 외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호하고 유지시킨다. 노화된 피부의 대표적 증상은 잔주름 및 주름의 발생이다. 이는 피부 진피조직의 교원질 중 주 단백질인 콜라겐의 현저한 감소에 의한 것이라 할 수 있다. 콜라겐 분해에 따른 감소는 피부 탄력을 유지하는 결합조직이 파괴되어 주름과 탄력저하, 피부 처짐의 원인으로 나타난다. Collagen의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포분화와 분화의 유도 등이 알려져 있다. 이러한 collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 또한 collagen은 트립신 등의 단백질 분해효소의 작용을 받지 않으나, collagenase에 의해 분해된다는 보고가 있었다 [23]. 유채박 추출물을 이용하여 collagenase 저해활성을 측정하였다. 유채박의 추출물의 collagenase 활성저해를 측정한 결과는 Fig. 9에 나타났다. Collagenase 활성저해는 유채박 추출물의 농도의존적 증가하였다. 열수 추출물이 0.5 mg/mL에서 1.0 mg/mL로 증가할 경우 collagenase 활성저해는 20.1%에서 41.3%로 증가하였다. 그러나 메탄올 및 아세톤 추출물이 0.5 mg/mL에서 1.0 mg/mL로 증가할 경우 collagenase 활성저해는 32.3~33.5%에서 67.2~68.0%로 증가하였다. 이 수치들은 대조군인 ascorbic acid (0.5 mg/mL)에 비해서 약간 높은 활성저해가 나타났다. 메탄올 및 아세톤 추출물은 collagen의 분해를 막아 피부의 주름을 개선할 것으로 사료된다.

4. 결론

유채박 추출물의 피부 미용 효과를 검토하기 위해, 토코페롤과 폴리페놀 함량을 분석하였고 또한 아질산염 제거 효과, tyrosinase 활성 저해, 멜라닌 합성 억제, elastase 활성 저해,

collagenase 활성 저해를 측정하였다. 여러 토코페롤 중에서 gamma-tocopherol이 304.9 mg/kg, alpha-tocopherol이 212.2 mg/kg로 가장 높게 나타났다. Delta-tocopherol 및 plastochromanol-8 농도는 각각 12.1 mg/kg와 35.7 mg/kg으로 나타났다. 여러 추출물 중에서 메탄올 추출물을 이용할 경우 총페놀 함량이 49.6 mg/g로 가장 높았고 그 다음으로 아세톤 추출물이 40.1 mg/g로 나타났다. 그러나 열수 추출물의 경우는 32.1 mg/g로 나타났다. 열수, 메탄올 및 아세톤 추출물의 아질산소거능은 pH 1.2에서 약간의 차이는 있으나 75~80% 범위로 나타났다. 추출물 농도가 0.5 mg/mL에서 8.0 mg/mL로 증가할 경우 메탄올 추출물의 아질산 제거 효과는 35.8%에서 85.2%로 증가했다. 그리고 아세톤 추출물의 아질산 제거 효과는 34.9%에서 80.1%로 증가했다. Tyrosinase 활성의 저해도는 추출물의 농도에 의존적으로 증가했고 메탄올 추출물을 이용할 때 tyrosinase 활성의 저해도가 가장 높게 나타났다. 특히 메탄올 추출물 농도가 0.5 mg/mL에서 1.0 mg/mL로 증가할 경우 tyrosinase 활성 저해도는 25.2%에서 42.5%로 증가했다. 멜라닌 합성 억제는 여러 추출물 중에서 methanol 추출물이 가장 높게 나타났다. 특히 메탄올 추출물 1.0 mg/mL의 경우 control에 비교해서 약 52% 저해 효과가 나타났다. Elastase 활성 저해는 메탄올 및 아세톤 추출물 농도가 0.5 mg/mL에서 1.0 mg/mL 증가할 경우 elastase 활성 저해는 25.3~26.0에서 47.2~48%로 증가했다. Collagenase 활성 저해는 열수 추출물이 0.5 mg/mL에서 1.0 mg/mL로 증가할 경우 collagenase 저해활성은 20.1%에서 41.3%로 증가했다. 그러나 메탄올 및 아세톤 추출물이 0.5 mg/mL에서 1.0 mg/mL로 증가할 경우 collagenase 활성 저해는 32.3~33.5%에서 67.2~68.0%로 증가했다. 결론적으로 유채박의 메탄올 및 아세톤 추출물은 우수한 피부 생리활성 효과를 지니고 있어 기능성 화장품 원료로서 가치가 높을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Westbrook, C. K., C. V. Naik, O. Herbinet, W. J. Pitz, M. Mehl, S. M. Sarathy, and H. J. Curran (2002) Detailed chemical kinetic reaction mechanisms for soy and rapeseed biodiesel fuels. *Comb. Flame.* 158: 742-755.
- Lee, K. K., J. H. Kim, J. J. Cho, and J. D. Choi (1999) Inhibitory effect of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. *Int. J. Cosmet. Sci.* 21: 71-82.
- Garrel, C. and M. Fontecave (1995) *Nitric Oxide Chemistry and Biology Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, pp. 21-35.
- Aranjit, C., H., Kaur, and H. C. Kapoor (2002) Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Tech.* 37: 153-161.
- Miloslav, šulc, M., J. Lachman, K. Hamouz, and P. Dvůrák (2008) Impact of phenolic content on antioxidant activity in yellow and purple-fleshed potatoes grown in the Czech Republic. *Biol. Agric. Hortic.: Int. J. Sustain. Prod. Sys.* 26: 45-54.

6. Hwang, E. Y., Y. H. Kong, Y. C. Lee, Y. C. Kim, K. M. Yoo, Y. O. Jo, and S. Y. Choi (2006) Comparison of phenolic compound contents between white and red ginseng and their inhibitory effect on melanin biosynthesis. *J. Ginseng Res.* 30: 82-87.
7. Ando, S., O. Ando, Y. Suemoto, and Y. Mishima (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* 100: 150S-155S.
8. Kim, J. Y., H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park (2003) Antioxidative and antiaging effects of Jeju native plant extracts(II). *J. Soc. Cosmet. Sci. Korean* 33: 165-173.
9. Jeon, T. W., C. H. Jo, K. H. Kim, and M. W. Byun (2002) Inhibitory effect on tyrosinase and xanthine oxidase and nitrite scavenging activities of Schizandrae Fructus extract gamma irradiation. *Korean J. Food Preser.* 9: 369-374.
10. Swann, P. F. (1975) The toxicology of nitrite, nitrate, and N-nitroso compounds. *J. Sci. Food Agr.* 26: 1761-1764.
11. Chung, H. J., and K. L. Noh (2000) Screening of electron donating ability, antibacterial activity and nitrite scavenging effect of some herbal extracts. *Korean J. Food Sci.* 16: 372-377.
12. Kang, Y. H., Y. K. Park, and G. D. Lee (1996) The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean Food Sci. Tech.* 28: 232-239.
13. Chung, S. Y., N. K. Kim and S. Yoon (1999) Nitrite scavenging effect of methanol fraction obtained from green yellow vegetable juices. *J. Korean Soc. Food Sci. Nut.* 28: 342-347.
14. Yeo, S. G., D. M. Yeum, D. H. Lee, C. W. Ahn, S. B. Kim, and Y. H. Park (1994) The nitrite scavenging effects by component of green tea extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nut.* 23: 287-292.
15. Jin, Q., J. R. Park, J. B. Kim, and M. H. Cha (1999) Physiological activity of *Zizyphus jujuba* leaf extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nut.* 28: 593-598
16. Bennett, D. C., P. J. Cooper, and I. R. Hart (1987) A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int. J. Cancer* 39: 414-418.
17. Sung, J. H., S. H. Park, D. H. Seo, J. H. Lee, S. W. Hong, and S. S. Hong (2009) Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 73: 552-556.
18. Kazuya, I., K. Noriaki, K. Yukari, M. Kyo, and F. Andtkio (2004) In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J. Agr. Food Chem.* 52: 4893-4898.
19. Sim, G. S., J. H. Kim, B. C. Lee, D. H. Lee, G. S. Lee, and H. Bae (2008) Inhibitory effects on melanin production in B16 melanoma. *Yakhak Hoeji.* 52: 165-171
20. Ha, S. E., H. D. Kim, J. K. Park, Y. O. Chung, H. J. Kim, and N. B. Park (2009) Melanogenesis inhibition effect of *Rosa multiflora* extracts in B16 melanoma cells. *Korean J. Plant Res.* 22: 317-322.
21. Han, Y. S., and E. S. Jung (2003) A study of correlation between antioxidant activity and whitening effect of plant extract. *Korean Aesthetic. Soc.* 1: 11-22.
22. Roth, G. J., C. J. Siok, and J. Ozols (1980) Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. *J. Biol. Chem.* 255: 1301-1304.
23. Grant, N. H., and H. E. Alburn (1959) Studies on the collagenases of *Clostridium histolyticum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 245-255.