

## 커피 에탄올 추출물의 항균 및 미백활성

김인혜 · 이재화<sup>†</sup>

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과  
46958 부산광역시 사상구 백양대로 700번길 140  
(2017년 8월 23일 접수, 2017년 12월 5일 수정본 접수, 2017년 12월 15일 채택)

### Antibacterial and Whitening Activities of *Coffea arabica* Ethanol Extract

In Hae Kim and Jae Hwa Lee<sup>†</sup>

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, 140, Baegyang-daero 700beon-gil, Sasang-gu, Busan, 46958, Korea

(Received 23 August 2017; Received in revised form 5 December 2017; accepted 15 December 2017)

#### 요 약

본 연구에서는 커피(*Coffea arabica*)의 에탄올 추출물을 이용하여 기능성 화장품소재로서의 가능성을 검토하였다. 미백활성으로는 tyrosinase 저해 활성과 멜라닌 함량을 측정하였으며, 항산화 활성으로는 SOD-like activity를 측정하였고, 그 결과 500 µg/mL의 농도에서 94.8 ± 6.2%의 활성을 나타내었다. CAE는 3개의 그람양성균과 6개의 그람음성균을 대상으로 항균활성을 조사하였으며, 그 결과 그람음성균에 대해서는 폭넓은 활성을 나타내었지만, 그람양성균에 대한 활성은 나타내지 않았다. 하지만 항생제내성균주인 MRSA CCARM3561에는 강한 활성을 나타내었다. 반면에 *Candida albicans*에 대한 항곰팡이 활성은 나타내지 않았다. Tyrosinase 저해활성과 DOPA 산화능은 대조군인 arbutin 보다는 낮게 나타내었고, B16-F10 melanoma cell에 대한 멜라닌 생합성 저해능은 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였으며, 100 µg/mL의 농도에서 89.2%를 나타내었다. 이러한 결과들은 커피 추출물이 천연물, 무독성 항균제 또한 천연 화장품 소재로서의 가치가 있음을 나타내는 것이다.

**Abstract** – In this study, *Coffea arabica* ethanol extract (CAE) was tested for possible functional cosmetic agent. Whitening effect was measured by tyrosinase inhibition assay, and anti-oxidant activity was checked by SOD-like activity. SOD-like activity of CAE showed 94.8 ± 6.2% at 500 µg/mL. The anti-bacterial activities CAE was evaluated against three different gram-positive bacteria and six gram-negative bacteria including MRSA strains. CAE exhibited *in vitro* broad spectrum antimicrobial activities of gram-negative bacteria without antifungal activity. CAE was strong exhibited against MRSA CCARM3561. The tyrosinase and L-DOPA inhibitory activities of the CAE lower than those positive control arbutin. CAE reduced melanin contents of B16-F10 melanoma cell in a dose dependent manner and decrease about 89.2% at a concentration 100 µg/mL. These result highlight the potential of coffee extract as a naturally active and non-toxic anti-bacterial suitable for cosmetic applications.

Key words: *Coffea arabica*, Cosmetic, MRSA, Tyrosinase, Melanin synthesis

#### 1. 서 론

커피는 세계인의 대표적인 기호음료로 오랜 기간 음용되어 왔으며, 전 세계적으로 가장 많이 교역하는 농산물 중 하나이고 경제적으로도 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 전 세계 커피 시장 규모는 2조 3,000억 달러(약 2,600조원)이며, 2014년 기준으로 국내시장은 52조 4,000억 원으로, 지난 10년간 연평균 성장률이 15.3% 증가하

고 있다. 커피란 건조한 커피생두(green coffee bean)를 가공한 것 또는 이에 식품 첨가물을 가한 기호성 식품을 지칭하며, 커피 본연의 기능인 카페인에 대한 니즈(needs) 증가에 따른 소비 증가, 사교 및 정보 교환을 위한 식후 티타임 니즈 증가, 개인 작업을 위한 공간 등 부가적인 시장이 커지면서 단순 기호 식품이 아닌 문화 소비 제품으로 변화하고 있다.

아프리카 에티오피아가 원산지인 커피나무의 식물학적 속명은 *coffea*로 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 쌍떡잎식물이며 코페아류의 커피 관목으로 분류한다[1].

2대 원종으로는 *Coffea arabica*와 *Coffea canephora*가 있고 크기는 3~7 m, 잎의 길이는 7~15 cm이며, 커피생두는 빨간 열매 중에

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jhalee@silla.ac.kr

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

있는 종자에서 외피를 벗겨 내면 2개의 씨가 들어 있고 그 성숙한 열매의 씨앗을 발효 건조한 것이 원두이다. 오늘날 커피의 분류는 커피의 품종을 기준으로 하는 식물학적 구분과 국제커피 무역 거래 시장에서 사용되는 상업적인 상품에 명명하는 것으로 통용되고 있다. 식물학적 분류에 따른 커피생두의 종은 수백 중에 이르고 현재 상업적으로 재배하는 주요 품종은 아라비카(*Arabica, Coffea arabica*)와 로브스터(*Robusta, Coffea canephora*), 리베리카(*Liberica, Coffea liberica*)로 3가지 품종으로 나뉜다. 그 중 맛과 향기가 좋아 최고의 품질을 인정받고 있는 아라비카종은 에티오피아의 원산으로부터 해발 500~1,000 m의 높은 지대와 15~25 °C의 온도에서 잘 자라며 브라질, 콜롬비아, 멕시코, 과테말라, 에티오피아 등지에서 생산되며 전 세계 커피 생산량의 70~80%를 차지하고, 로브스터종이 약 20%를 차지하고 있다[2].

커피는 쓴맛, 신맛, 떫은 맛 및 구수한 등의 독특한 맛과 향이 조합되어 만들어진 대표적인 기호식품의 하나이며, 원두의 종류나 날 씨 가공방법에 따라 다양한 맛과 향을 내고 향신료, 조미료, 염색소 등으로 사용된다[3].

커피생두의 주요 구성성분은 생산지, 품종, 재배 등에 따라 차이는 있으나 대부분은 수분(10~13%), 탄수화물(18~26%), 섬유소(37%), 지방(9~18%), 단백질(11~13%)의 주성분으로 구성되어 있고, 무기질(3.0~4.5%), 카페인(0.9~2.4%)과 chlorogenic acid (5.5~10%) 등이 함유 되어 있다[4,5]. 커피의 알려진 생리활성 물질로는 flavonoid, caffeic acid, ferulic acid, nicotinic acid, trigonelline, quolinic acid, tannic acid, pyrogalllic acid 및 caffeine 등이 보고되어 있다[6-9]. 일반적으로 적당한 커피 섭취는 일반 성인의 건강에 여러 긍정적인 영향을 주는 것으로 알려져 왔고 다양한 생리 활성이 보고되어 있다. 카페인에 의한 각성 작용 및 기분전환의 정신적인 효과[10], 파킨슨병과 알츠하이머 등의 산화적 스트레스로 인한 대사성 질환의 발병을 낮춘다는 보고[11,12], 제 2형 당뇨병을 낮춘다는 것[13]과 노화유발과 친식 증세 완화[14,15]와 더불어 LDL-cholesterol과 MDA (Malondialdehyde)를 줄인다는 보고도 있다[16]. 또한 커피에 함유한 폴리페놀 화합물과 chlorogenic acid, caffeine, melanoidin 등과 같은 항산화 물질의 존재로 항산화 활성이 보고되어 있고[17], 이러한 항산화 활성과 생리활성 효과는 화장품 원료로서의 유용한 특성이 있다. 현재 화장품 소재에 관한 연구는 제제의 안정성, 사용성 확보를 위해 천연물에서 유효성분 추출 등이 대체를 이루고 있다.

본 연구에서는 이미 식음료 널리 알려진 친숙한 커피생두(*Coffea arabica*) 에탄올 추출물을 대상으로 화장품 원료 또는 미용소재로써의 활용가능성을 확인하고자 유용성분의 종류와 함량을 기준으로 세포독성효과, 미백효과, 항산화 및 항균효과를 검증하였고, B16-F10 mouse melanoma cell에 대한 세포 생존율과 멜라닌 생합성 억제효과를 실시하여 기능성 화장품 소재로써의 가능성을 검토하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 재료

본 실험에 사용한 커피는 로스팅 하지 않은 커피생두(green coffee bean)를 캄보디아 (Kingdom of Cambodia)에서 수입하였으며, 2015년 경남 김해시 소재의 더 길 원두커피에서 구입하여 사용하였다. 동결 보관된 커피 원두는 시료 1.0 kg에 10 L (1 : 10, w/v%)의

증류수를 넣어 고압멸균기를 이용하여 121 °C 4시간 동안 고압추출 하였다. 그 시료는 원심분리(8,000 g × 20 min)하여 상층액을 농축하였고, 이 과정을 3번 반복 추출하였다. 침전물을 이용하여 농축한 각 시료는 시료 : EtOH = 1 : 10 (v/v%)의 비율로 에탄올을 첨가하여 원심분리(10,000 g × 20 min)하여 침전물을 제거하였으며 이 단계를 거친 상층액은 원심분리와 농축과정을 진행하였고, 각 농축한 시료는 동결건조한 후, 본 실험에 사용하였다. 동결 건조한 시료는 -70 °C에서 보관 후 실온에서 해동한 후 각 실험 단계별로 사용하였다. 시료에 대한 명칭은 커피 에탄올 추출물(*Coffea arabica* ethanol extract, CAE)로 명명하였다.

### 2-2. 항산화 측정

CAE의 항산화 활성은 Superoxide dismutase-like activity로 측정하였다. 측정은 Marklund & Marklund (1975)의 방법을 응용한 SOD assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc., USA)를 이용하여 superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 소거 활성률을 측정하였다. 적정 농도별로 희석한 시료 20 μL와 WST working solution 200 μL를 첨가한 후, enzyme working solution을 20 μL 첨가하여 37 °C, 20 분간 반응 시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정 하여 kit의 계산법에 따라 SOD 활성을 측정하였다[18]. 표준시료로는 L-Ascorbic acid (Sigma chemical Co., Louis, MO, USA)를 사용하였다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = [(\text{Exp.} - \text{Blank}) / \text{Control}] \times 100$$

### 2-3. 항균 활성

Antimicrobial activity 측정 방법은 disc method와 MIC method를 병행하여 실시하였다. Disc method [19]는 Tryptic soy broth, TSB (Merck & Co. Inc., Darmstadt, Germany) 배지에서 mid-logarithmic phase (OD<sub>570</sub> = 0.1, 5 × 10<sup>7</sup> CFU/mL)까지 배양 후, 멸균된 TSA 배지에 균 배양액 100 μL를 도말하였다. 이후 paper disc (직경 8 mm)를 plate에 놓고 500 μg/disc의 농도로 disc에 50 μL씩 흡수시키고 37 °C incubator에서 18시간 배양 후, disc 주변에 생성된 clear zone의 크기로 활성을 측정하였다.

MIC 측정은 broth dilution method를 사용하였다[20]. 각각의 균주는 Muller-Hinton broth (Merck & Co. Inc., Darmstadt, Germany)에 흡광도 1.0 mL (OD<sub>570</sub> = 0.1, 5 × 10<sup>7</sup> CFU/mL)로 조절한 후 실험에 사용하였고 96 well plate에 균 배양액 Muller-Hinton broth 100 μL와 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μL를 차례대로 첨가하여 37 °C, 18시간 배양 후, ELISA Multiscan Reader (Thermo scientific, Finland)를 이용하여 630 nm에서 측정하였다. 어병 세균인 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC2471는 30 °C에서 배양하여 실험에 적용하였다. 실험에 사용한 gram-positive bacteria와 gram-negative bacteria는 한국미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양 받아 사용하였고, 항생제내성 균주인 Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) CCARM3561, CCARM3115, CCARM3089 등은 항생제내성 균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM)에서 분양 받아 사용하였다. 곰팡이가 활성 측정은 liquid growth assay method로 측정하였으며, *Candida albicans* KCTC7965를 Potato dextrose broth (Merck & Co. Inc., Darmstadt, Germany)를 이용하여 30 °C에서 48시간 배양하였다. 곰팡이의 농도는 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL이 되도록 희석하여 96 well plate에 곰팡이

배양액과 각 시료를 혼합 한 후 30 °C에서 48시간 배양 후, ELISA Multiscan Reader (Thermo scientific, Finland)를 이용하여 630 nm에서 측정하였다[21]. Positive control로는 ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 비교하였다.

#### 2-4. 안전성 시험

미백, 기능성 소재로서의 안전성을 검토하기 위하여 B16-F10 mouse melanoma cell에 대한 세포 생존율을 조사하였다. B16-F10 mouse melanoma cell은 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였으며, 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM (Gibco, USA) 배지에서 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator로 배양하여 cell viability assay를 CCK-8 assay로 실험하였다[22]. 먼저, 100 µL (5,000 cells/well)의 세포 부유액을 96 well plate에 분주 후, CO<sub>2</sub> incubator 안에서 24시간 동안 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 10 µL 처리, 12시간 배양 후 CCK-8 용액(Enzo Life Sciences, New York, USA)을 첨가하여 2시간 배양한 다음 ELISA Multiscan Reader (Thermo scientific, Finland)을 이용하여 450 nm에서 흡광도 측정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = [(\text{Exp.-Blank})/\text{Control}] \times 100$$

#### 2-5. 미백 활성

CAE의 미백활성은 L-tyrosine과 L-DOPA *in vitro* tyrosinase 저해 활성으로 측정하였다[23]. L-Tyrosine inhibition assay는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 200 µL, 추출물 시료 20 µL, tyrosinase (1,000~1,500 U/mL) 20 µL에 1.5 mM L-tyrosine 20 µL를 혼합하여 37 °C 15분간 반응 시킨 후, ELISA Multiscan Reader (Thermo scientific, Finland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-DOPA에 대한 tyrosinase inhibition assay는 다음과 같이 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 100 µL, 시료 20 µL, tyrosinase (1,000~1,500 U/mL) 20 µL에 1.5 mM L-DOPA 20 µL를 혼합하여 37 °C 10분간 반응 시킨 후, ELISA Multiscan Reader (Thermo scientific, Finland)을 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 arbutin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition ratio (\%)} = [(\text{Exp.-Blank})/\text{Control}] \times 100$$

세포내의 멜라닌 생합성 저해 효과를 측정하기 위하여 6 well plate에 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하고 1시간 후에 200 nM의  $\alpha$ -MSH를 각 세포에 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 세척한 뒤 10% DMSO가 포함된 1 N NaOH 용액을 처리하여 60 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후 ELISA Multiscan Reader (Thermo scientific, Finland)을 이용하여 490 nm에서 흡광도 측정하였다[24].

#### 2-6. 통계처리

본 연구에 대한 실험결과는 3회 반복 실험에 의한 평균값으로 나타내었고, 대조군과 실험군의 통계학적 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하였으며 표준편차( $p$ -value < 0.05) 수준에서 평가하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 항산화 효과

활성산소는 superoxide anion, peroxide, hydroxy radical 등의 형태로 피부조직과의 결합을 통해 피부조직 파괴, 주름 형성 등을 야기하는 원인이 된다. 이러한 활성 산소를 제거하는 물질로는 Vitamin C, E와 SOD-catalase 등 많은 항산화 물질들이 알려져 있고, 항산화제의 역할은 피부 노화의 주범인 자유전자기의 활동을 방해하는 것이다. SOD (Superoxide dismutase)란 superoxide radical을 산소로 산화시켜 활성산소를 안전한 물질로 만들어 활성산소가 야기하는 생체내의 손상을 보호하는 작용기전을 지니고 있는 효소이며, 이 효소의 작용으로 인해 산화방지, 주름방지, 나아가 anti-aging에도 관여하는 것으로 알려져 있어서 화장품 관련 실험으로 폭 넓게 사용하고 있는 방법이다. 또한, 식물 유래의 항산화 물질은 다수의 phenyl hydroxyl기를 가지고 있어 유리라디칼과 결합하여 세포의 산화손상에 대한 화학적 예방효과가 있다고 알려져 있다[25]. 농도에 따른 CAE의 SOD-like activity를 보면, 각 농도별 500, 250, 125, 62.5 µg/mL에서  $94.8 \pm 6.2$ ,  $55.0 \pm 5.7$ ,  $44.8 \pm 3.9$ ,  $36.8 \pm 9.4$ 의 높은 SOD-like activity를 나타내었다(Fig. 1). 본 실험결과를 통해 CAE의 항산화물질 함량을 확인하였으며, 이는 천연 항산화제 화장품 소재로의 매우 적합함을 확인 할 수 있었다.

#### 3-2. 항균 활성

커피는 다양한 생리활성과 산화적 스트레스로 인한 대사성 질환에 효과적이며, 풍부한 폴리페놀 화합물과 chlorogenic acid, caffeine 등 항산화 물질로 인해 다양한 균주에 대한 항균활성 등이 보고되어 있다. 특히, *Streptococcus sp.*에 대한 활성이 보고되어 있고[26], *Staphylococcus aureus*에 대한 활성과 gram-negative bacteria인 *E. coli*, *Enterococcus sp.*에 대한 활성들도 보고되어 있다. 하지만 커피는 로스팅 과정 중에 탄수화물, 단백질, 아미노산, 특히 페놀화합물의 구성 변화로 인해 정확한 항균 활성에 대한 메커니즘은 밝혀지지 않고 있다[27,28].

본 연구에서는 항생제 내성 균주에 대한 활성을 조사하였는데 그

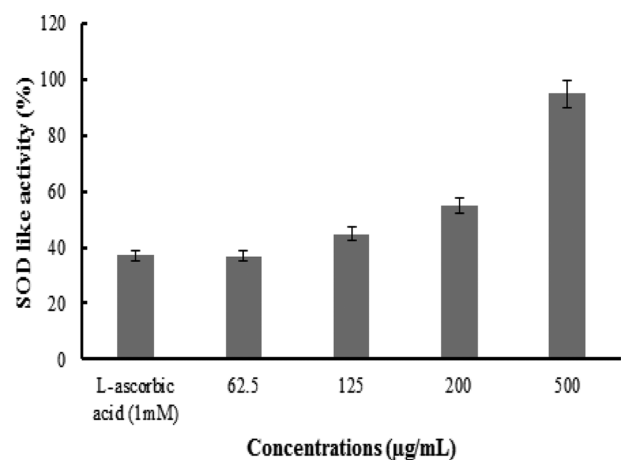
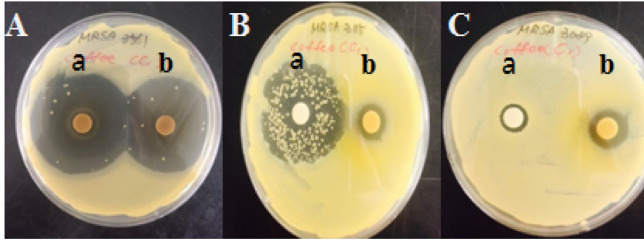


Fig. 1. Superoxide dismutase (SOD) like activity of *Coffea arabica* ethanol extract (CAE). L-ascorbic acid concentration was 1 mM. Results are expressed as percentages of control and data are presented as mean  $\pm$  SD. for independent triplicate experiments ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Anti-microbial activities of *Coffea arabica* ethanol extract (CAE). A 50  $\mu$ L aliquots of each extracts was applied to filter paper and the paper lown placed on a MRSA CCARM3561 (A), MRSA CCARM3115 (B) and MRSA CCARM3089. a: Ampicillin, b: CAE. Sample concentrations were 500  $\mu$ g/mL.

결과는 다음과 같다. CAE의 항생제 내성 균주인 MRSA CCARM3089에 대한 활성은 clear zone의 크기가 18 mm이며 MRSA CCARM3115는 12 mm로 나타났고 특히 MRSA CCARM3561에 대한 활성은 42 mm로 clear zone의 크기가 가장 크게 나타난 것으로 미루어볼 때에 대조군으로 사용한 ampicillin 보다 더 큰 활성을 나타내었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 커피의 항산화 능력과 더불어 커피의 항균 능력 또한 우수하며 특히, 항생제 내성 균주에 강력한 활성을 지니는 것은 기능성 식품으로만 인식되는 커피 추출물이 천연 항노화 화장품, 기능성 화장품 소재로서의 강력한 후보군임을 확인할 수 있었다.

다음으로는 CAE의 최소억제농도(MIC)와 항 곰팡이 활성을 살펴보면 gram-positive bacteria에 대한 활성은 나타내지 않았고, *Staphylococcus aureus*에 대한 활성은 > 250  $\mu$ g/mL의 높은 농도에서 미미한 활성을 보였다. Gram-negative bacteria에 대해 모든 농도에서 활성이 있음을 확인할 수 있었다(Table 1). 먼저, *E. coli* D31에서는 62.5  $\mu$ g/mL의 농도에서 *Enterobacter aerogens*는 250  $\mu$ g/mL, *Klesiella pnunoniae*는 250  $\mu$ g/mL, *Pseudomonas aeriginos*는 62.5  $\mu$ g/mL, *Salmonella typhium*은 250  $\mu$ g/mL의 농도에서 활성을 나타내었고 어병세균인 *Vibrio parahemolyticus*은 125  $\mu$ g/mL의 농도에서 고르게 활성을 나타냄을 확인하였다. Gram-positive bacteria에 대한 활성은 항생제 내성 균주에만 특이적으로 활성을 나타내었고

**Table 1.** Anti-microbial activities of *Coffea arabica* ethanol extract (CAE)

Micro-organisms	Minimal inhibitory concentration ( $\mu$ g/mL)*	
	CAE	Ampicillin
<i>Gram positive bacteria</i>		
<i>Bacillus subtilis</i> PM125	NA**	15.6
<i>Micrococcus luteus</i> KCTC1056	NA	15.6
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1916	>250	31.2
<i>Gram negative bacteria</i>		
<i>Esherichia coli</i> D31	62.5	31.2
<i>Enterobacter aerogense</i> KCTC2190	250	15.6
<i>Klesiella pnunoniae</i> KCTC2208	250	15.6
<i>Pseudomonas aeriginosa</i> KCTC2004	62.5	15.6
<i>Salmonella typhium</i> KCTC1925	250	62.5
<i>Vibrio parahemolyticus</i> KCTC2471	125	15.6
<i>Fungus</i>		
<i>Candia albicans</i> KCTC7965	NA	NA

\*Results are representative of three independent experiments.

\*\*ND: Not activity.

이러한 결과는 항생제 내성 균주의 세포벽과는 특이적으로 결합하여 활성을 나타내는 것으로 판단되어 지며, 이러한 항생제 내성 균주 MRSA에 대한 활성 메커니즘은 항산화 활성과 관련하여 좀 더 심도 있게 연구할 주제로 삼아야 할 것으로 생각된다. 또한 *Candida albicans*에 대한 활성은 나타내지 않았다.

### 3-3. 미백활성

사람의 피부색은 표피에 존재하는 멜라닌과 혈관 속에 존재하는 헤모글로빈, 피하조직에 존재하는  $\beta$ -카로틴 등의 색소에 의해 결정되며 멜라닌 색소의 양과 분포에 의해 외관상 피부색이 결정된다. 멜라닌은 자외선이 조사되면 멜라닌 형성세포 (melanocyte)의 멜라닌 생성 반응과정(melanogenesis)을 통해 피부색을 검게 변화시켜 자외선으로부터 피부색을 보호하는 역할을 하며, 멜라닌에는 흑색의 불용성 중합체인 유멜라닌(eumelanin)과 적갈색의 수용체 중합체인 피오멜라닌 (pheomelanin)이 존재한다. 멜라닌의 합성은 L-tyrosine이라는 아미노산을 기질로 하여 tyrosinase를 주효소로 하고 tyrosinase related protein I (TRP1), TRP2에 의해 L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환 된 후 최종적으로 멜라닌이 생성되며, 이 중 tyrosinase는 멜라닌 생성 반응을 조절하는 중요한 효소로 알려져 있다. 미백소재인 arbutin, kijoic acid 등은 tyrosinase 활성 억제제를 하는 대표적인 물질로 알려져 있다. 특히 본 연구의 표준시료인 arbutin은 멜라닌 전구체인 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용하는 저해제 역할을 하며 kojic acid는 tyrosinase 활성부위를 킬레이팅하여 L-DOPA와 DOPA quinone이 생성되는 것을 억제하는 것으로 알려져 있다[29].

CAE에 의한 tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위하여 mushroom tyrosinase에 의한 L-tyrosine의 산화 정도를 측정하였다. L-tyrosine을 DOPA로 바꾸는데 관여하는 tyrosinase의 저해 활성은 표준물질인 arbutin을 이용해 비교하였다. 실험한 결과, 농도 의존적으로 활성을 억제하였다. 농도별 tyrosinase 저해 활성 결과는 CAE 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL에서 각각 10.5%, 11.2%, 13.4%, 17.8%, 20.0% 그리고 32.4%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다(Fig. 3(a)). DOPA를 DOPA quinone으로 바꾸는 oxylation 반응에 관여하는 tyrosinase의 저해 활성 결과도 농도 의존적으로 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 그 결과는 200  $\mu$ g/mL에서 25.0%, 100  $\mu$ g/mL에서 16.9%, 50  $\mu$ g/mL에서 16.8%, 25  $\mu$ g/mL에서는 13.6%로 12.5  $\mu$ g/mL에는 8.1% 그리고 6.25  $\mu$ g/mL에서는 5.7%로 저해활성을 나타내었다(Fig. 3(b)). 결과적으로 CAE는 기질로서 L-DOPA가 관여하는 반응보다 L-tyrosine 관여 반응에서 효소 활성 억제 능력을 더 크게 보여주었으며, 이는 멜라닌 생성에 있어 초기 속도결정 단계를 늦추는 것으로 알려져 있는 L-tyrosine을 DOPA로 변환하는 과정에 작용하여 미백활성을 결정하는 것으로 판단되어 진다.

CAE의 mouse B16-F10 melanoma cell에서의 세포 생존 능력을 발색측정으로 정량화하기 위해 WST [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetra zolium, monosodium salt] 분석을 통한 CCK-8 assay 시행하였다. WST 분석은 tetrazolium 성분을 배양액에 첨가한 후 발색을 정량화하여 세포의 수, 증식 정도 등을 알 수 있는데, 이는 tetrazolium 성분이 세포 내의 미토콘드리아가 가진 탈수소효소에 의해 특정 색으로 변하게 되어 발색 정도에 따라서 세포 내의 미토콘드리아의 활성도 확인 가능하다고 알려져 있다 [30]. CAE의 농도 변화에 따른 세포의 생존율을 확인한 결과, 100

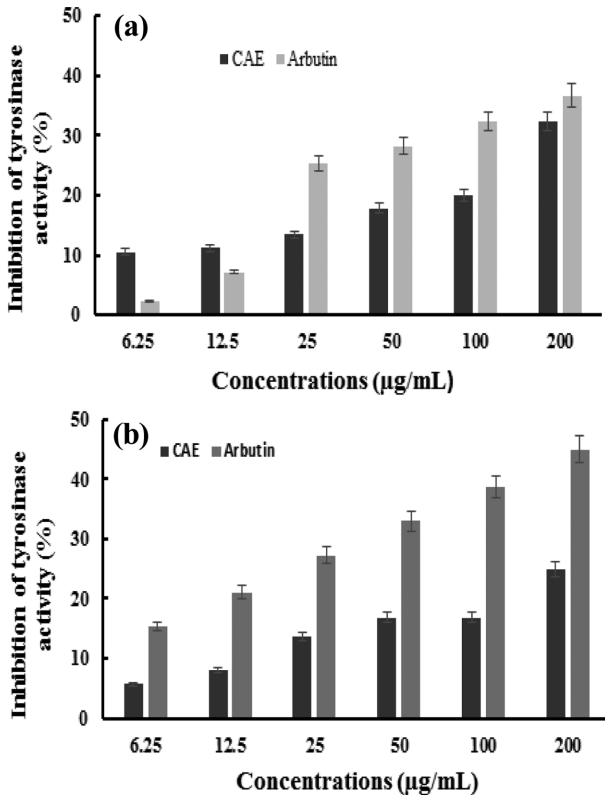


Fig. 3. Inhibitory effect of *Coffea arabica* ethanol extract (CAE) against mushroom tyrosinase activity. (a) The activity of mushroom tyrosinase which is involved hydroxylation reaction from L-tyrosine to DOPA was measured by the change in absorption at 490 nm after incubation with various concentration of CAE. (b) The activity of mushroom tyrosinase which is involved oxylation reaction from DOPA to DOPA quinone was measured by the change in absorption at 490 nm after incubation with various concentration of CAE. Results are expressed as percentages of control and data are presented as mean  $\pm$  SD. for independent triplicate experiments ( $p < 0.05$ ).

µg/mL의 농도까지는 94.4% 이상의 세포 생존율을 확인하였으나 그 이상의 농도에서 세포 독성 확인을 할 수 있었다. 반면 200 µg/mL의 농도에서 86.6%, 500 µg/mL의 농도에서 77.7%까지 감소하여 세포에 독성을 보이지므로, 세포를 이용한 이후 추가 실험에서는 CAE가 독성을 보이지 않는 100 µg/mL 이하의 농도에서 실험을 진행하였다(Fig. 4).

CAE 처리 시 세포 내에서 멜라닌의 생성 정도를 확인하기 위해 mouse melanoma cell에 CAE 추출물 처리 후 세포 내 생성된 멜라닌 함량을 측정하였다. 그 결과 CAE는 농도 의존적으로 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었으며, 시료를 처리하지 않은 control을 100%의 melanin contents (%)로 나타내었고, 시료의 농도 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL에서 각각 98.1%, 94.4%, 92.0% 그리고 세포 독성을 보이지 않는 최고 농도인 100 µg/mL에서 89.2%의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인 하였으며, 대조군인 arbutin의 100 µg/mL의 농도에서 76.7%의 멜라닌 생성 억제를 확인할 수 있었다(Fig. 5). Arbutin과 비교하여 B16-F10 mouse melanoma cell 내의 멜라닌 생성 억제력은 낮지만 우수한 항산화 능력, 항생제 내성 균주에 대한 항균 활성과 더불어 tyrosinase 저해 활성 등으로 미루어 볼 때, 기능성 식품으로서만 인식되는 커피의 소재적 특성에 천연 화장품

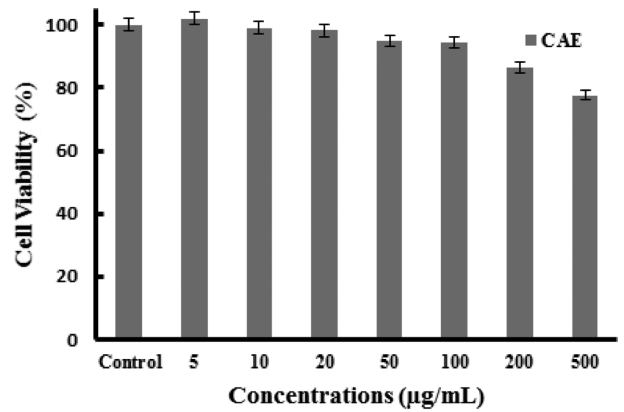


Fig. 4. Effect of *Coffea arabica* ethanol extract (CAE) on cell viability of mouse B16-F10 melanoma cell. After incubation of B16-F10 mouse melanoma cells with various concentration of the CAE in a 96 well plate for 24 h, cell viability was determined by WST assay. Results are expressed as percentages of control and data are presented as mean  $\pm$  SD. for independent triplicate experiments ( $p < 0.05$ ).

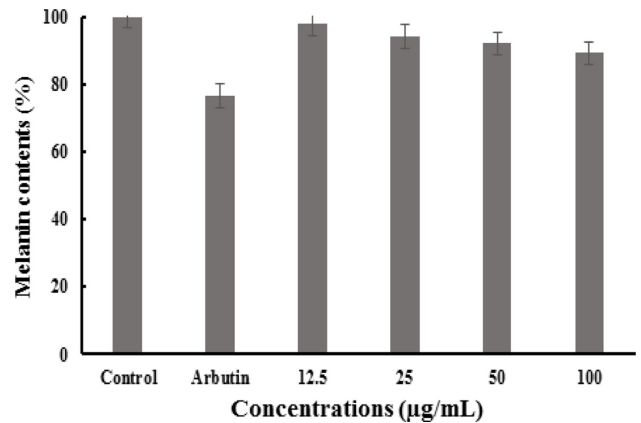


Fig. 5. Inhibitory effect of *Coffea arabica* ethanol extract (CAE) on  $\alpha$ -MSH stimulated melanogenesis of mouse B16-F10 melanoma cells. Melanin content in CAE-treated B16-F10 cells at day 3. Cells were cultured at 37 °C for 72 h in DMEM supplemented with  $\alpha$ -MSH (200 nM) with the extract in a concentration dependent manner. Arbutin concentration was 100 µg/mL. Results are expressed as percentages of control and data are presented as mean  $\pm$  SD. for independent triplicate experiments ( $p < 0.05$ ).

소재로서의 특성을 확인 할 수 있었으며 차후의 화장품 제형에 적용 시 많은 참고 자료가 될 것으로 생각되어 진다[31,32].

#### 4. 결 론

본 연구에서는 로스팅 하지 않은 커피생두(green coffee bean)의 에탄올 추출물(*Coffea arabica* ethanol extract, CAE)에 대하여 기능성 화장품 소재로서의 특성을 분석하고자 *in vitro* 상에서 항산화, 항균, 미백활성을 측정하였으며, B16-F10 mouse melanoma cell에 대하여 세포 생존율 및 멜라닌 생성 억제 효과를 조사하였다. 항산화 활성인 SOD-like activity는 500 µg/mL의 농도에서  $94.8 \pm 6.2\%$ 의 활성을 나타내었고, 항생제 내성 균주인 MRSA CCARM3561에 대하여 clear zone의 크기가 42 mm로 나타났으며 대조군으로 사용

한 ampicillin 보다 더 큰 활성을 나타내었다. 또한 gram-positive bacteria 보다 gram-negative bacteria에 대하여 활성을 나타내었고, 항 곰팡이 활성은 나타내지 않았다. 미백활성으로 tyrosinase 저해 활성은 200 µg/mL의 농도에서 기질이 L-tyrosine인 경우, 25.0%의 억제 활성을 나타냈으며 기질로서 L-DOPA가 관여하는 반응보다 L-tyrosine 관여 반응에서 효소활성 억제 능력을 더 크게 보여주었다. B16-F10 mouse melanoma cell에 대한 세포 생존율을 확인한 결과, CAE 100 µg/mL의 농도까지는 94.4% 이상의 세포 생존율을 보였고, 500 µg/mL의 농도에서 77.7%의 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 멜라닌 생성억제 효과는 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었고, 세포 독성을 보이지 않는 최대 농도인 100 µg/mL에서 89.2%의 멜라닌 생성억제 효과를 보여주었다. 기존의 기능성 식품으로만 인식되는 커피의 항산화, 미백활성, 그리고 항생제 내성 균주에 대한 항균 활성을 확인하였고, 천연화장품, 기능성 화장품 소재로서의 가치를 확인할 수 있었다.

### Reference

- Yang, I., Lee, K. H. and Oh, S. C., "Manufacture and Performance Evaluation of Medium-density Fiberboard Made with Coffee bean Residues-Wood Fiber," *J. Korean Wood Sci. & Tech.*, **41**(4), 293-301(2013).
- Seo, H. S., Kang, H. J., Jung, E. H. and Hwang, I. K., "Application of GC-SAW(Surface Acoustic Wave) Electronic Nose Classification of Origins and Blended Commercial Brands in Roasted Ground Coffee Beans," *Korean J Food Cookery Sci.*, **22**(3), 299-306(2006).
- Choi, Y. H., Kim, S. E., Huh, J., Han, Y. H. and Lee, M. J., "Antibacterial Antioxidative Activity of Roasted Coffee and Red Ginseng Mixture Extracts," *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(3), 320-326(2012).
- Schwartz, J. and Weiss, S. T., "Caffeine Intake and Asthma Symptoms," *Ann. Epidemiol.*, **2**(5), 627-635(1992).
- Esquivel, P. and Jimenez, V., "Functional Properties of Coffee and Coffee by-Products," *Food Res. Internal.*, **46**(2), 488-495(2012).
- Cornelis, M. C. and Ahmed, E. S., "Coffee, Caffeine, and Coronary Heart Disease," *Curr. Opin. Clin. Nutr. & Metab. Care*, **10**(6), 745-751(2007).
- Lee, W. J. and Zhu, B. T., "Inhibition of DNA Methylation by Caffeic Acid and Chlorogenic Acid, Two Common Catechol-Containing Coffee Polyphenols," *Carcinogenesis*, **27**(2), 269-277(2006).
- Casal, S., Oliveira, M. B. P. P., Alves, M. R., and Ferreira, M. A., "Discriminate Analysis of Roasted Coffee Varieties for Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine Content," *J. Agric. Food Chem.*, **48**(8), 3420-3424(2000).
- Minamisawa, M., Yoshida, S. and Takai, N., "Determination of Biologically Active Substances in Roasted Coffees Using a Diode-Array HPLC System," *Analytic. Sci.*, **20**(2), 325-328(2004).
- Dorea, J. G. and Helina, T., "Is Coffee a Functional Food?" *Brit. J. Nutr.*, **93**(6), 773-782(2005).
- Higdon J. V. and Balz, F., "Coffee and Health: A Review Recent Human Research," *Crit. Rev. Food Sci.*, **46**(2), 101-123(2007).
- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hebert R., Hill, G. B. and McDowell, I., "Risk Factors for Alzheimer's Disease: a Prospective Analysis from the Canadian Study of Health and Aging," *Am. J. Epidemiol.*, **156**(5), 445-453(2002).
- Salazar, M. E., Willett, W. C., Ascherio, A., Manson, J. E., Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J. and Hu, F. B., "Coffee Consumption and Risk for Type 2 Diabetes Mellitus," *Ann. Intern. Med.*, **140**, 1-8(2004).
- Nakanshi, N., Nakamura K., Nakajima, K., Suzuki. K. and Tatara, K., "Coffee Consumption and Decreased Serum Gamma-glutamyl-transferase: a Study of Middle-aged Japanese Man," *Eur. J. Epidemiol.*, **16**(5), 419-423(2000).
- Schwartz, J. and Weiss, S. T., "Caffeine Intake and Asthma Symptoms," *Ann. Epidemiol.*, **2**(5), 627-635(1992).
- Yukawa, G. S., Mune, M., Otani, H., Tone, Y., Liang, X. M., Iwahashi, H. and Sakamoto, W., "Effects of Coffee Consumption on Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoproteins and Serum Lipid Levels in Humans," *Biochemistry*, **69**(1), 70-74(2004).
- Daglia, M., Papetti, A., Grisoli, P., Aceti, C., Spini, V. and Dacarro, C., "Isolation, Identification, and Quantification of Roasted Coffee Antibacterial Compounds," *J. Agri. Food Chem.*, **55**(25), 10208-10213(2007).
- Marklund, S. and Marklund, G., "Involvement of Superoxide Anion Radical in the Oxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase," *Eur. J. Biochem.*, **4**(3), 469-474(1974).
- Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S., Jackson, R. and Eisenhauer, P., "Ultrasensitive Assays for Endogenous Antimicrobial Polypeptides," *J. Immuno. Methods*, **137**(2), 167-173(1991).
- Kim, I. H., Lee, D. G., Lee, S. H., Ha, J. M., Ha, B. J., Kim, S. K. and Lee, J. H., "Antibacterial Activity of *Ulva lactuca* Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **12**(5), 579-582(2007).
- Gibson, B. W., Tang, D., Mandrell, R., Kelly, M. and Spindel, E. R., "Bombinin-like Peptides with Antimicrobial Activity from Skin Secretions of Asian Toad, *Bombina orientalis*," *J. Biol. Chem.*, **266**, 23103-23111(1991).
- Chang, Y., Yang, S. T., Liu, J. H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Liu, Y. and Wang, H., "In Vitro toxicity Evaluation of Graphene Oxide on A549 Cells," *Toxicology Lett.*, **200**(3), 201-210(2011).
- Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomita, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M. and Oki, T., "Melanostatin, a New Melanin Synthesis Inhibitor. Production, Isolation, Chemical Properties, Structure Biological Activity," *J. Antibiot.*, **44**(1), 25-32(1991).
- Nakajima, H., Wakabayashi, Y., Wakamatsu, K. and Imokawa, G., "An Extract of *Withania somnifera* Attenuates Endothelin-1-stimulated Pigmentation in Human Epidermal Equivalents Through the Interruption of PKC Activity within Melanocytes," *Phytother. Res.*, **25**(9), 1398-141(2011).
- Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S. and Allen, R. D., "Overexpression of Superoxide Dismutase Protects Plants from Oxidative Stress," *Plant Physiol.*, **103**, 1067-1073(1993).
- Daglia, M., Cuzzoni, M. T., and Dacarro, C., "Antibacterial Activity of Coffee," *J. Agri. Food Chem.*, **42**(10), 2270-2272(1994).
- Runti, G., Pacor, S., Colomban, S., Gennaro, R., Navarini, L. and Scocchi, M., "Arabica Coffee Extract Shows Antibacterial Activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and Low Toxicity towards a Human Cell Line," *LWT-Food Sci. Technol.*, **62**(1), 108-114(2015).
- Almeida, A. A., Farah, A., Silva, D. A., Nunan, E. A. and Gloria,

- M. B., "Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria," *J. Agri. Food Chem.*, **54**(23), 8738-8743(2006).
29. Lin, J. Y. and Fisher, D. E., "Melanocyte Biology and Skin Pigmentation," *Nature*, **445**, 843-850(2007).
30. Lee, S. K., Hong, H. K., Kim, S. J., Kim, Y. K. Son, Y. S. Ha, Y., Lee, D. W. and Khang, G. S., "The Comparison of Sponges and PLGA Scaffolds Impregnated with DBP on Growth Behaviors of Human Intervertebral Disc Cells," *Polymer (Korea)*, **34**(5), 398-404(2010).
31. Kim, H. W., Shin, H.J., Hwang, D. B., Lee, J. E., Jung, H. L. and Kim, D. U., "Functional Cosmetic Characteristics of *Momordica charantia* Fruit Extract," *Korean Chem. Eng. Res.*, **53**(3), 289-294 (2015).
32. Cha, S. H., Ahn, W. A., Lee, J. S., Kim, Y. S., Kim, D. U., Byun, T. G. and Park K. P., "The Effect of Fcoidan Molecular Weight on Cosmetic Function," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(4), 604-609 (2012).