

Original Article / 원저

상황버섯 가수분해물의 피부 항노화 효능에 대한 연구

김태준¹ · 광병문² · 김희택³

세명대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과 (¹수련의, ³교수)

세명대학교 보건바이오대학 화장품뷰티생명공학부 (²연구교수)

Studies on Skin Anti-aging Efficacy of Hydrolysate from *Phellinus igniarius*

Tae-Jun kim¹ · Byeong-mun Kwak² · Hee-Taek Kim³

^{1,3}Dept. Of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology,
College of Korean Medicine, Semyung University

²Dept. Of Cosmetic Sciences & Beauty Biotechnology, Semyung University

Abstract

Objective : The object of this study was to assess the efficacy of hydrolysate from *Phellinus igniarius*(HPI) on anti-aging activities in vitro measurement and mini clinical study performed on 5 subjects.

Methods : To evaluate skin anti-aging efficacy of HPI, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging activity, type I collagen synthesis, inhibition of nitric oxide(NO) production, inhibition of tyrosinase, hyaluronan synthase(HAS)2, 3 mRNA expression were measured in vitro. Also, mini clinical study of skin hydration was performed on 5 subjects using HPI in distilled water(DW) and 1,3-butylene glycol diluted solution(30% in DW).

Results : 1. DPPH radical scavenging activity of HPI was increased in a dose-dependant. 2. Type I collagen synthesis was increased in 50, 100 and 500 μ g/ml of HPI. 3. NO production was not inhibited in all concentrations of HPI. 4. Tyrosinase was inhibited in 500, 1000, 2500 and 5000 μ g/ml of HPI. 5. HAS2 mRNA expression was increased in 50, 100, 150 and 200 μ g/ml of HPI, HAS3 mRNA expression was increased in 100, 150, and 200 μ g/ml of HPI. 6. In the mini clinical study of 5 subjects, there was a difference in skin hydration over time for each solutions, but it was not statistically significant.

Conclusions : HPI increased DPPH radical scavenging activity, type I collagen synthesis, and HAS2, HAS3 mRNA expression. HPI also suppressed tyrosinase. The findings of this study suggest that HPI can be used as an skin anti-aging material.

Key words : Hydrolysate from *Phellinus igniarius*(HPI); Anti-aging; Antioxidant; Whitening; Moisturizing

I. 서 론

피부 노화는 生老病死 일련의 과정에서 생체 구성 단백질의 생합성 감소 등으로 발생하는 생리적 노화와 각종 오염 물질, 자외선 등 외부 요인으로 생물 연령에 비해 빠르게 진행하여 피부 건조, 탄력 감소, 기미 등이 나타나는 병리적 노화로 구분한다^{1,2)}.

피부 노화의 원인으로는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 축적과 그로 인한 산화적 스트레스가 대표적이다. ROS의 과도한 발현은 항산화 체계를 교란하여 다양한 병리적 변화와 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6)과 같은 사이토카인을 증가시켜 염증 반응을 유발하고 피부 조직을 손상시킨다³⁾.

최근 피부 노화에 사용되는 치료 목적의 연고제나 기능성 화장품의 원료는 피부 노화를 유발하는 여러 요인들을 억제하고 손상된 피부 기능 회복을 목적으로 개발되고 있다. 천연물 소재로는 노니, 울초, 비자, 초두구 등이 연구 개발되고 있으며⁴⁻⁶⁾, 이러한 천연물 중 버섯류는 항산화, 항암, 항당뇨, 항고혈압 등의 생리활성이 입증되어 건강기능 식품 소재로 사용될 뿐만 아니라 화장품 소재로서 피부 노화 개선에 활용되고 있다^{3,7,8)}.

상황버섯(*Phellinus igniarius*)은 담자균류 민주름버섯목 소나무비늘버섯과의 진흙버섯속의 버섯으로⁹⁾, 한의학에서는 桑耳라는 本草名으로 癰瘡와 같은 부인과 질환과 金瘡과 같은 피부 질환에 사용되어 왔다¹⁰⁾.

상황버섯에 대한 연구로는 열수 추출물의 체액성 면역기능¹¹⁾, 항암활성¹²⁾, 아토피 피부염 증상개선¹³⁾, 항보체 활성¹⁴⁾, 혈중 젖산 농도 감소¹⁵⁾, 콜레스테롤 수치 개선¹⁶⁾, nitric oxide(NO) 억제에 대한 연구¹⁷⁾, 메탄올 추출물의 항돌연변이원성에 대한 효과¹⁸⁾, 에탄올 추출물의 항산화, 미백, 항노화능⁹⁾, 항염증, 항알레르기, 주

름 제거능¹⁹⁾에 대한 연구가 있었으나, 상황버섯 가수분해물의 피부 항노화 효능에 대한 연구는 없었다.

저자는 상황버섯에 대해 초임계 추출법을 사용하였지만 상황버섯 자체의 비극성 물질이 초임계 추출로 나오지 않았다. 이에 단순 용매 추출이 아닌 상황버섯의 단백질만을 선택적으로 추출하고, papain, bromelain 효소로 가수분해하였다. In vitro에서 상황버섯 가수분해물의 DPPH radical 소거능, type I collagen 합성, NO 생성, tyrosinase 억제, hyaluronan synthase (HAS)2, HAS3 mRNA 발현을 관찰하였고, 사람을 대상으로 피부 수분 함유량에 대해 간이 임상 평가를 하여, 피부 항노화 효능에 대한 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 방법

1. 실험 재료

1) 상황버섯 시료 준비

상황버섯 가수분해물에 사용되는 약재인 상황버섯은 (주)정의농장(청주, Korea)에서 구매하여 사용하였다.

2) 상황버섯 초임계 추출

상황버섯의 단백질 추출 시 lysis buffer에 유지가 녹아나와 추출 포화도에 영향을 끼치지 않도록 껍²⁰⁾의 연구 방식을 이용하여 초임계 추출을 진행하였다. 초임계 추출기((주)일신오토클레이브, Korea)를 사용하였고, 상황버섯은 800-1000 μ m 크기로 파쇄하여 추출기에 400g을 넣었으며(① of Fig. 1), 이산화탄소의 추출 조건에 맞는 온도와 압력은 pre-heater(⑧ of Fig. 1)를 통과하면서 조정되며, 추출 조건에 맞게 조정된 이산화탄소는 가열된 추출기 내부로 들어가(① of Fig. 1) 초임계 상태가 된다. 초임계 이산화탄소는 상황버섯 내부의 초임계 이산화탄소에 용해되는 물질을 용해한 상태로 추출기 밖으로 나가게 된다. 초임계 이산화탄소와 추출물 혼합 상태의 유체는 back pressure regulator

Corresponding author : Hee-Taek Kim, Dept. Of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Korean Medicine, Semyung University, Jecheon, Chungbuk 27136, South Korea.

(Tel : 043-649-1817, E-mail : kht8725c@naver.com)

•Received 2021/4/6 •Revised 2021/4/17 •Accepted 2021/4/24

(BPR)를 경유하며 감압이 되고(⑪,⑫ of Fig. 1), 초임계 이산화탄소가 기체가 되는 조건을 갖춘 분리기 안에서 초임계 이산화탄소는 기체 상태의 이산화탄소와 추출물로 분리되고, 추출물은 저부로 떨어지게 된다(②,③ of Fig. 1). 기체가 된 이산화탄소는 냉각기를 경과하며 액화가 되고(⑦ of Fig. 1), 저장소로 이동하여 액체 상태로 저장된다(④ of Fig. 1). 액체 이산화탄소는 가압기를 통하여 재사용이 되는 프로세스를 사용하였고(⑤ of Fig. 1), 추출 사이클은 추출이 완전히 될 때까지 시행하였다. 추출 조건은 다음 표와 같이 설정하여 진행하였다(Table 1).

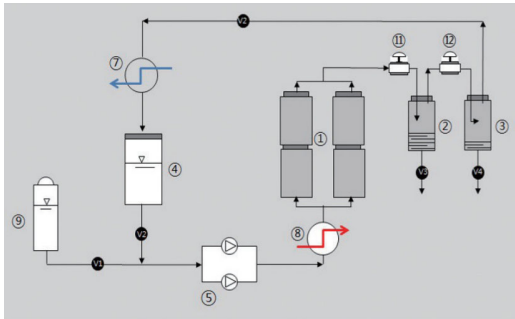


Fig. 1. Process Flow Diagram for Supercritical Extraction from *Phellinus igniarius*
(Kwak BM, 2019)

Table 1. Condition of Supercritical Extraction from *Phellinus igniarius*

Condition	
Extractor pressure	350bar
Extractor temp	60℃
CO ₂ flow	145ml/min
Particle size	800-1000 μ m

3) 상황버섯 단백질 추출

초임계 추출을 한 상황버섯의 유지 함량을 확인한 후, 한²¹⁾의 연구방식에서 이용한 lysis buffer(Sigma, USA)를 이용한 추출을 시행하였다. Lysis buffer 처리를 한 상황버섯을 셰이커(Benchmark, USA)를 이용하

여 2시간씩 300rpm으로 사용하였고, 원심분리하여 상층액 추출한 후, 남은 하부의 상황버섯을 동일한 방식으로 추출하여 총 3회 추출을 하였다. 상황버섯 단백질 함량은 다음의 공식으로 산출하였다.

$$\text{Yield of extractive protein(\%)} = \frac{\text{weight of protein}}{\text{weight of Phellinus igniarius}}$$

4) 상황버섯 단백질 가수분해

추출된 상황버섯의 단백질을 가수분해 하기 위하여 45mM ammonium bicarbonate buffer(Sigma, USA) 10ml에 상황버섯 단백질 100mg을 용해시키고, 상황단백질 용해물과 papain(1.5-5 units/mg)(Sigma, USA), bromelain(1.5-3 units/mg)(Sigma, USA)를 10:1 비율로 사용하여 효소 최적화를 진행하였고, 50℃에서 24hrs, 48hrs, 72hrs, 84hrs에 샘플링하여 시간 최적화를 진행하였다. 가수분해물은 electrospray ionization(ESI) mass spectrometer(Thermo fisher scientific, USA)를 이용한 mass 분석으로 확인하였다. 이동상으로는 50% acetonitrile(Sigma, USA) + 0.2% acetic acid(Sigma, USA)를 사용하였다.

5) 세포 배양

본 연구에서 사용한 세포주인 CCD-986sk cells은 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였고, RAW 264.7 cells은 한국 세포주 은행(Korea)에서 구입하여 사용하였고, HaCaT cells은 Gunma University(Japan)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양 시 배지는 10% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen, USA)와 1% penicillin/streptomycin(GenDEPOT, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, WelGENE Inc, Korea)을 사용하였으며, 37℃, 5% CO₂ incubator(MCO-17AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다.

2. 실험 방법

1) DPPH radical 소거능

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma, USA) 용액으로 상황버섯 가수분해물의 radical 소거능력을 실험하였다. 상황버섯 가수분해물을 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1000 μ g/ml의 농도로 될 수 있게 희석시켜 methanol(삼전순약, Korea)에 용해시킨 0.2mM의 DPPH 용액 150 μ l와 각각 100 μ l씩 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 빛을 차단하고 30분간 반응 후 spectrophotometer(Synergy HTX Multi-Mode Reader, USA)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) MTT assay

상황버섯 가수분해물에 의한 세포 독성과 생존율을 알아보기 위하여 MTT assay를 실행하였다. 96 well plate에 CCD-986sk cells, RAW 264.7 cells을 5 $\times$ 10³/well씩 가하여 배양한 후 배지를 제거하고 상황버섯 가수분해물을 넣어 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS, Lonza, USA)로 세척한 다음 2.0mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Bio basic, Canada) solution을 50 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 배양하였다. 이후 MTT solution을 제거하여 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide(DMSO, Bio basic, Canada)에 용해시켜 spectrophotometer를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Type I collagen 합성

CCD-986sk cells을 배양하여 96well plate에 1 $\times$ 10⁵ cell/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 무혈청 배지를 처리하여 24시간 동안 starvation하였다. 24시간 후 무혈청 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 BLX-312(Bio-Link, Germany)를 이용하여 UV 312nm 파장에서 30mj로 조사하였다. 이

후 상황버섯 가수분해물 시료를 DMEM 배지에 5, 10, 50, 100 및 500 μ g/ml 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였고, 수거한 배지를 procollagen type-I c-peptide(PIP) EIA kit(Takara Bio Inc, Japan)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) NO assay

Lipopolysaccharide(LPS, Sigma, USA)로 염증이 유도된 RAW 264.7 cells을 사용하여 상황버섯 가수분해물의 nitric oxide(NO)의 생성 억제능을 측정하였다. RAW 264.7 cells을 96 well plate에 1 $\times$ 10⁵ cells/well로 분주 한 후 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에 보관하여 안정화 시켰다. 상층액 제거 후 각각 5, 10, 50, 100 및 500 μ g/ml의 상황버섯 가수분해물과 1 μ g/ml의 LPS를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 뒤 상층액 100 μ l을 다른 96 well plate에 옮겨 준 뒤 griess 시약(Sigma, USA) 100 μ l를 혼합 해주었다. 상온에서 30분 동안 반응 후 spectrophotometer를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Tyrosinase 억제

상황버섯 가수분해물 250, 500, 1000, 2500 및 5000 μ g/ml 농도별 시료액 80 μ l을 PBS 20 μ l로 용해시킨 후 L-3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine (L-DOPA, Sigma, USA) 20 μ l를 혼합하여 반응시켰다. 반응액에 2000 unit/ml mushroom tyrosinase(Sigma, USA) 20 μ l와 1.5mM L-tyrosine (Sigma, USA) 20 μ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로 arbutin(해피콜, Korea)을 사용하였다.

6) Realtime PCR

HaCaT cells에서 상황버섯 가수분해물의 hyaluronan synthase(HAS) 2, 3 mRNA의 발현 효과를 확인하기 위해 realtime PCR 분석을 진행하였다.

HaCaT cells를 96 well plate에 6×10^5 cells/well로 분주 한 뒤 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 안정화시켰다. 24시간 뒤 배지를 DPBS로 세척 후 상황버섯 가수분해물 10, 50, 100, 150 및 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도별로 처리 후 48시간 배양하였다. 48시간 뒤 trizol reagent(Invitrogen, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 흡광도 260nm 에서 RNA 농도 $40\mu\text{g}/\text{ml}=1$ optical density(O.D)로 정량 후 reverse transcription kit(QIAGEN, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였고, 합성한 cDNA를 멸균수로 5배 희석하여 rotor-gene Q(QIAGEN, USA)에서 증폭하였다. 세부 과정으로는 95°C 의 조건에서 10분간 denaturation 시킨 뒤 95°C 에서 15초간 denaturation, 60°C 에서 10초간 annealing, 72°C 에서 10초간 extension 과정을 실시하여 모두 45 cycle 동안 반복하였다. 실험에 사용된 primer의 sequence는 아래 표와 같다(Table 2).

3. 상황버섯 가수분해물의 간이 임상 평가

상황버섯 가수분해물의 피부 상태에 미치는 영향을 알아보기 위한 간이 임상 평가는 천연물 및 천연 추출물에 과민증 또는 병력이 없고, 만성 피부 질환이 없으며, 4주 이내 지속적으로 피부 상태 개선에 영향을 미치는 건강기능식품 및 의약품(호르몬제, 경구 및 국소 스테로이드, NSAIDs, 연고제 포함) 복용하지 않으며, 민감성 과민성 피부가 아니며, 임신 및 수유의 계획이 없는 20-30대 여성 3명, 남성 2명 총 5명을 피험자로 하여 피부 수분 함유량을 평가하는 방법으로 진행하였다.

피부 측정은 실내 온도 $20-25^\circ\text{C}$, 실내 습도 40-60%의 항온-항습 조건을 유지하는 세명대학교 부속 제천한방병원 피부 진단실에서 실시되었다. 간이 임상 평가

피험자들은 최소 30분 이상 측정 부위를 노출한 다음 안정을 취해 피부 표면의 온도와 습도를 측정 장소의 온도와 습도에 적응하게 하였다.

피부 수분 함유량은 corneometer(CM825, Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)를 사용하여 측정하였다. 시험 시료는 다음과 같이 4종류의 시료를 사용하였다.

- | |
|---|
| A : 증류수 |
| B : 증류수 + 상황버섯 가수분해물 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| C : 증류수 + 30%로 희석한 1,3-butylene glycol (삼전순약, Korea) |
| D : 증류수 + 30%로 희석한 1,3-butylene glycol + 상황버섯 가수분해물 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ |

도포 방법은 피험자의 주관절 아래 2cm 간격으로 직경 2cm 의 원형 구역을 4개 설정한 후, 각 구역에 4종의 시료를 도포하는 방식으로 하였다. 피부 수분 함유량 측정은 각 시료별 구역에서 도포 전, 도포 직후, 도포 후 0.5hr, 1hr, 2hrs, 3hrs, 4hrs의 시간대별로 측정하였다.

측정값은 arbitrary unit(A.U)를 단위로 하여, 시간대별로 5회 측정된 후 측정값 중 최대값과 최소값을 제외한 3회의 평균값을 사용하였다. 측정 결과는 도포 직후부터 도포 후 4hrs까지의 측정값을 도포 전 측정값으로 나누어 나타내었다.

본 연구는 세명대학교 제천한방병원 기관생명윤리위원회의 승인을 받아 시행되었다(승인번호: SMJOH-EX-2020-07).

4. 통계 분석

실험 결과는 SPSS 15.0 version(SPSS Inc, USA) 프로그램을 이용하였다. 통계학적 유의성 검정은 student

Table 2. Realtime PCR Primer Sequences

	Forward	Reverse
HAS2	5'-TACACAGCCTTCAGAGCACTG-3'	5'-ATGAGGCTGGGTCAAGCATAG-3'
HAS3	5'-TGTCCAGATCCTCAACAAGTACGA-3'	5'-CTGGAGGAGGCTGTTGC-3'

t-test를 통하여 비교 분석하였으며, 유의수준은 $p<0.05$, $p<0.01$ 및 $p<0.001$ 로 하였다.

간이 임상 평가는 연구 대상자 수가 5명으로 정규성을 확보하지 못해 Mann-Whitney검정을 사용하여 분석하였다.

III. 결 과

1. 상황버섯 추출

1) 상황버섯 초임계 추출

초임계 separator에서 분리되는 상황버섯 초임계 이산화탄소 추출물의 양은 결과를 낼 수 없을 만큼 충분하지 않았다. 그래서 상황버섯의 유지 함량을 확인하기 위하여 polarity index 값이 0인 normal-hexane(덕산과학, Korea)을 이용하여 유지를 추출한 결과, 상황버섯 100g에서 유지는 0.21g으로 0.21%의 유지 함량을 보였다. 이를 통해 상황버섯의 추출에서는 초임계 추출이 적합한 방식이 아님을 알 수 있었다.

2) 상황버섯 단백질 추출

상황버섯 단백질의 추출은 lysis buffer를 이용하여 시행하였다. 상황버섯의 단백질을 최대한 추출하기 위하여 3회 추출을 진행하였다. 1회 차에 대략 4.5%이 추출되었고 2회 차에 대략 5.6%, 3회 차에 대략 5.8%로 추출되었고, 단백질 추출물은 밝은 갈색 형상을 보였다(Fig. 2, 3).

3) 상황버섯 단백질 가수분해

① 효소별 시간 최적화

a. Papain

Papain(1.5-5 units/mg)을 사용하여 50℃에서 ESI-MS로 24hrs, 48hrs, 72hrs 시간별 mass 분석을 시행하였다. 상황버섯 단백질의 papain에 의한 가수분해물을 200-2000m/z, amu에서 확인한 결과 24hrs에 비해서 48hrs에서 고분자

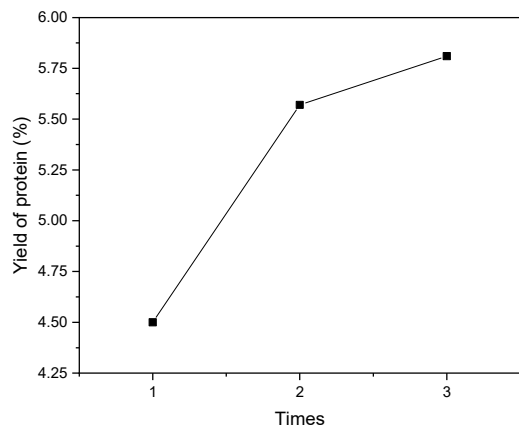


Fig. 2. Accumulation of Extracted Protein Yield from *Phellinus igniarius*.

Yield of protein from *Phellinus igniarius* depends on the extraction times. First time yield of protein is about 4.5%. Second time yield of protein is about 5.6%. Third time yield of protein is about 5.8%.

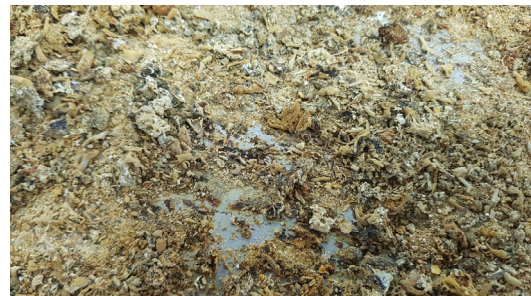


Fig. 3. Protein from *Phellinus igniarius* Light Brown Protein Products

intensity가 낮아졌다. 또한 48hrs에 비해서 72hrs에서 고분자 intensity가 더 낮아졌다. 특히 400-1300m/z, amu에서 24hrs, 48hrs, 72hrs 중 72hrs에서 고분자 intensity가 가장 낮게 나왔으며, 이를 통해 시간이 경과할수록 고분자 물질 중 많은 부분이 저분자 물질로 변화됨을 확인하였다(Fig. 4).

b. Bromelain

Bromelain(1.5-3 units/mg)을 사용하여 papain과 동일하게 50℃에서 ESI-MS로 24hrs, 48hrs, 72hrs 시간별 mass 분석을 시행하였으나, 큰 차이를 보이지 않았다. 이에 추가적으로

84hrs mass 분석을 시행하였다. 상황버섯 단백질의 bromelain에 의한 가수분해물을 200-2000m/z, amu에서 확인한 결과, 72hrs에 비해서 84hrs에서 고분자 intensity가 낮아졌다. 이를 통해 72hrs을 경과한 마지막 12hrs에서 전제적으로 가수분해 된 것을 확인하였다 (Fig. 5).

c. Mixture (Papain + Bromelain (1:1))

Papain과 bromelain을 1:1로 함께 사용하여 50℃에서 ESI-MS로 24hrs, 48hrs, 72hrs 시간

별 mass 분석을 시행하였다. 상황버섯 단백질의 papain과 bromelain에 의한 가수분해물을 200-2000m/z, amu에서 확인한 결과, 24hrs에 비해서 48hrs에서 고분자 intensity가 낮아졌다. 또한 48hrs에 비해서 72hrs에서 고분자 intensity가 더 낮아졌다. 24hrs, 48hrs, 72hrs 중 72hrs에서 고분자 intensity가 가장 낮게 나왔으며, 이를 통해 시간이 경과할수록 고분자 물질 중 많은 부분이 저분자 물질로 변화됨을 확인하였다(Fig. 6).

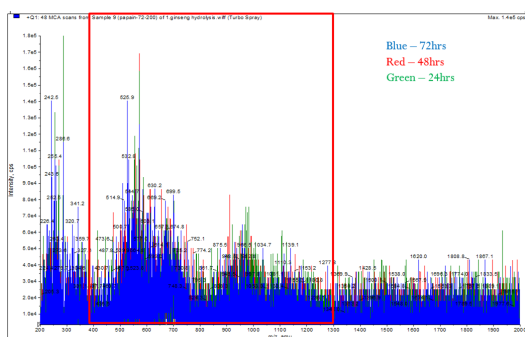


Fig. 4. Chromatography of Hydrolysate by Papain Over Time on ESI-MS.

ESI-mass spectrometer focused on 200-2000m/z, amu. Green indicates 24hrs, Red indicates 48hrs, Blue indicates 72hrs. As time passed, the intensity of high molecular compound decreased.

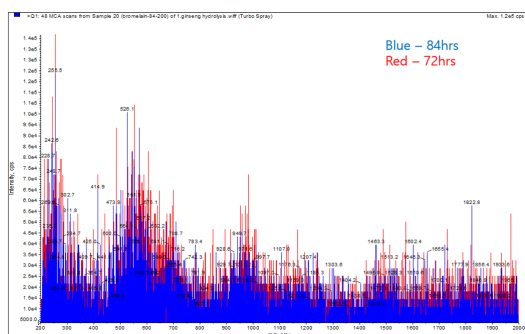


Fig. 5. Chromatography of Hydrolysate by Bromelain Over Time on ESI-MS.

ESI-mass spectrometer focused on 200-2000m/z, amu. Red indicates 72hrs, Blue indicates 84hrs. During the last 12hrs, the intensity of high molecular compound decreased.

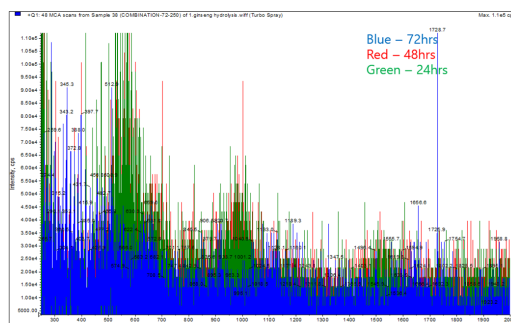
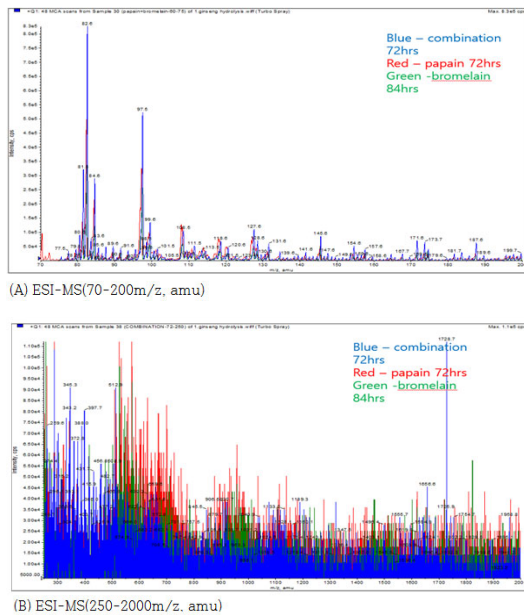


Fig. 6. Chromatography of Hydrolysate by Enzyme Mixture Over Time on ESI-MS.

ESI-mass spectrometer focused on 200-2000m/z, amu. Green indicates 24hrs, Red indicates 48hrs, Blue indicates 72hrs. As time passed, the intensity of high molecular compound decreased.

② 효소별 최적 시간별 가수분해 효율 비교

Papain, bromelain, mixture의 3가지 효소별 고분자 intensity가 가장 낮게 나온 최적 시간별 mass 분석을 비교하여 효소별 가수분해 효율을 비교하였다. Papain 단독 72hrs와 bromelain 단독 84hrs에 비해 papain과 bromelain을 1:1로 함께 사용한 mixture 72hrs에서 가장 많은 고분자 물질이 저분자로 변화된 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 mixture를 이용하여 가수분해를 진행하였다(Fig. 7, 8).



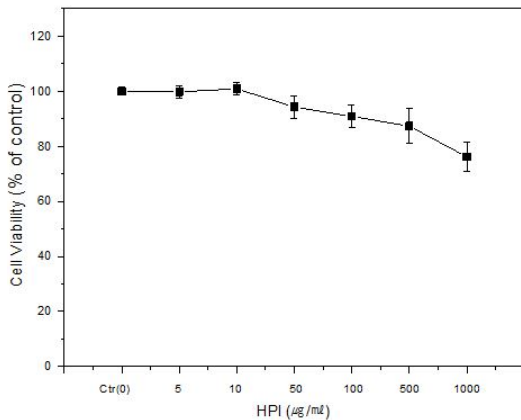


Fig. 10. Effect of Hydrolysate from *Phellinus igniarius* on Cell Viability.

CCD-986sk cells were treated with concentrations of sample 5, 10, 50, 100, 500 and 1000 µg/ml of hydrolysate from *Phellinus igniarius*. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. Cell viability are presented as a percentage of the control group. HPI: Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

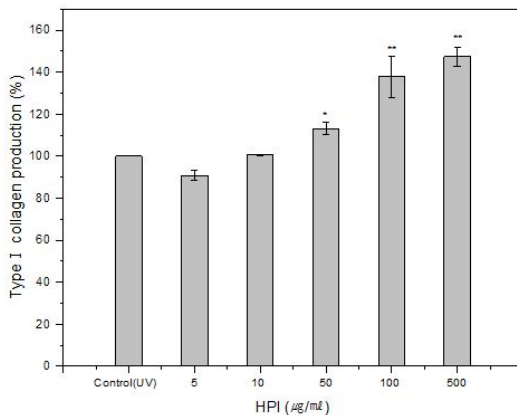


Fig. 11. Expression of Type I Collagen on CCD-986sk Cells by Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

The concentrations of sample were 5, 10, 100 and 500 µg/ml of hydrolysate from *Phellinus igniarius*. Incubated time of CCD-986sk cells was 24hrs. * p<0.05, ** p<0.01 vs control. The data was obtained from 3 independent experiments. HPI: Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

② 상황버섯 가수분해물의 Type I collagen 합성에 미치는 영향

CCD-986sk cells에서의 type I collagen 합성

에 대한 상황버섯 가수분해물의 효과를 측정하였다. 상황버섯 가수분해물을 5, 10, 50, 100 및 500 µg/ml로 처리하였을 때 type I collagen 합성율은 대조군에 비하여 $90.8 \pm 2.5\%$, $100.5 \pm 0.3\%$, $113.1 \pm 2.8\%$, $137.7 \pm 9.8\%$ 및 $147.3 \pm 4.7\%$ 로 50, 100 및 500 µg/ml 농도에서 상황버섯 가수분해물이 통계적으로 유의하게 (*p<0.05, **p<0.01) type I collagen 합성을 증가시켰다(Fig. 11).

3) NO assay

① 상황버섯 가수분해물의 세포 생존율에 미치는 영향

상황버섯 가수분해물의 NO 생성 억제에 안전하게 이용할 수 있는 농도 범위를 확인하기 위하여 RAW 264.7 cells을 이용하여 세포 독성을 평가하였다.

상황버섯 가수분해물을 5, 10, 50, 100, 500 및 1000 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 대조군에 비해서 5-500 µg/ml 농도에서는 세포 생존율이 90%로 나타났다지만, 1000 µg/ml 농도에서는 60%대로 세포 생존율이 감소하였다. 이에 차후 실험에서 1000 µg/ml 농도는 제외하였다(Fig. 12).

② 상황버섯 가수분해물의 NO 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 cells에서의 NO 생성에 대한 상황버섯 가수분해물의 억제 효과를 측정하였다. 상황버섯 가수분해물을 5, 10, 50, 100 및 500 µg/ml로 처리하였을 때 NO 생성율은 대조군에 비하여 $110.6 \pm 4.9\%$, $98.2 \pm 0.6\%$, $97.3 \pm 3.8\%$, $91.7 \pm 1.1\%$, $87.4 \pm 5.8\%$ 로 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 13).

4) 상황버섯 가수분해물의 Tyrosinase 억제에 미치는 영향

상황버섯 가수분해물의 tyrosinase 억제 효과를 측정한 결과, 250, 500, 1000, 2500 및 5000 µg/ml로 처리하였을 때 tyrosinase 억제율은 대조군에 비하여 5.6

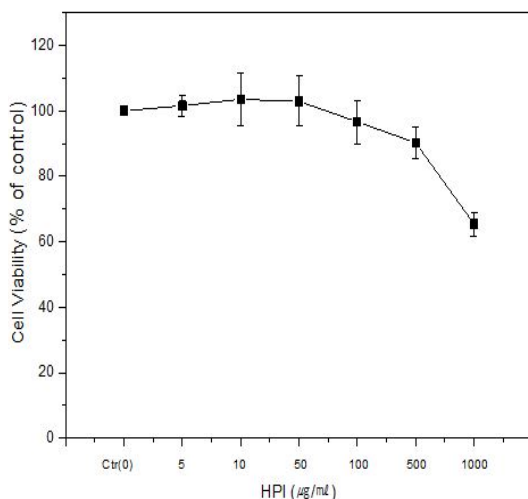


Fig. 12. Effect of Hydrolysate from *Phellinus igniarius* on Cell Viability.

RAW 264.7 cells were treated with concentrations of sample 5, 10, 50, 100, 500 and 1000 µg/ml of hydrolysate from *Phellinus igniarius*. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. Cell viability are presented as a percentage of the control group. HPI: Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

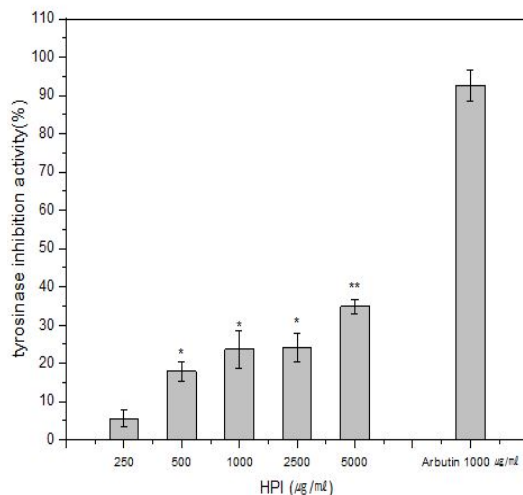


Fig. 14. Inhibition of Tyrosinase by Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

The concentrations of sample were 250, 500, 1000, 2500 and 5000 µg/ml of hydrolysate from *Phellinus igniarius*. Arbutin was used as positive control. Activities were determined by measurement of absorbance at 490nm. * p<0.05, ** p<0.01 vs 250 µg/ml. The data was obtained from 3 independent experiments. HPI: Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

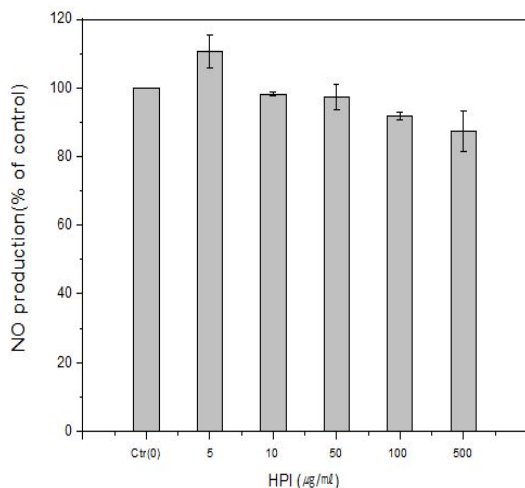


Fig. 13. Inhibition of Nitric Oxide Production on RAW 264.7 Cells by Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

NO production was measured by the griess reaction assay. The concentrations of sample were 5, 10, 50, 100 and 500 µg/ml of hydrolysate from *Phellinus igniarius*. Incubated time of RAW 264.7 cell was 24hrs. HPI: Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

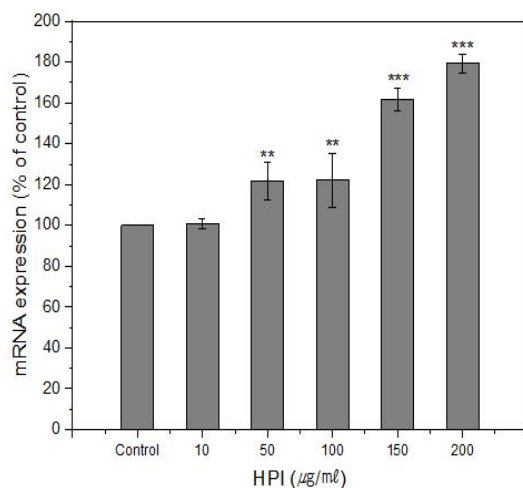


Fig. 15. Effect of Hydrolysate from *Phellinus igniarius* on HAS2 mRNA Expression in HaCat Cells.

HaCat cells were treated with concentrations of sample 10, 50, 100, 150 and 200 µg/ml of hydrolysate from *Phellinus igniarius* for 24hrs. HAS2 mRNA expression was measured by real time PCR. ** p<0.01, *** p<0.001 vs control. The data was obtained from 3 independent experiments. HPI: Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

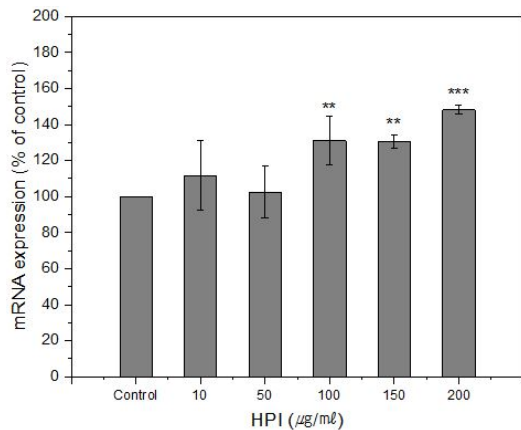


Fig. 16. Effect of Hydrolysate from *Phellinus igniarius* on HAS3 mRNA Expression in HaCat Cells.

HaCat cells were treated with concentrations of sample 10, 50, 100, 150 and 200 µg/ml of hydrolysate from *Phellinus igniarius* for 24hrs. HAS3 mRNA expression was measured by real time PCR. ** p<0.01, *** p<0.001 vs control. The data was obtained from 3 independent experiments. HPI: Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

± 2.2%, 17.9 ± 2.5%, 23.6 ± 5.0%, 24.2 ± 3.7% 및 34.9 ± 2.0%로 500, 1000, 2500 및 5000 µg/ml 농도에서 상황버섯 가수분해물이 통계적으로 유의하게 (p<0.05, ** p<0.01) tyrosinase를 억제시켰다(Fig. 14).

5) HAS2, 3 mRNA 발현에 미치는 영향

상황버섯 가수분해물을 10, 50, 100, 150 및 200 µg/ml 농도로 처리하였을 때 HAS2 mRNA의 발현은 대조군에 비하여 100.8 ± 2.5%, 121.5 ± 9.3%, 122.1 ± 13.8%, 161.7 ± 5.8% 및 179.3 ± 4.7%로 50, 100, 150 및 200 µg/ml 농도에서 상황버섯 가수분해물이 통계적으로 유의하게(** p<0.01, *** p<0.001) HAS2 mRNA 발현을 증가시켰다(Fig. 15).

HAS3 mRNA의 발현에서는 대조군에 비하여 111.8 ± 19.5%, 102.5 ± 14.3%, 131.1 ± 13.8%, 130.7 ± 3.8% 및 148.3 ± 2.7%로 100, 150 및 200 µg/ml 농도에서 상황버섯 가수분해물이 통계적으로 유의하게(** p<0.01, *** p<0.001) HAS3 mRNA 발현을 증가시켰다(Fig. 16).

3. 상황버섯 가수분해물의 간이 임상 평가

5명의 피험자를 대상으로 간이 임상 평가를 시행하여 상황버섯 가수분해물의 도포 전과 시간별 피부 수분 함유량의 변화를 관찰하였다. 피험자 5명 모두 도포 전/후 비교 시 시험 물질 도포에 의한 피부 이상 반응은 관찰되지 않았다.

간이 임상 평가에 다음과 같이 4종의 시료를 사용하였다.

- A : 증류수
- B : 증류수 + 상황버섯 가수분해물 1000 µg/ml
- C : 증류수 + 30%로 희석한 1,3-butylene glycol
- D : 증류수 + 30%로 희석한 1,3-butylene glycol + 상황버섯 가수분해물 1000 µg/ml

A와 B 시료 도포 직후, 도포 후 0.5hr, 1hr, 2hrs, 3hrs, 4hrs의 시간별 변화를 관찰한 결과 통계적으로 유의한 차이(p>0.05)가 없었다(Table 3). 또한 C와 D 시료 도포 직후, 도포 후 0.5hr, 1hr, 2hrs, 3hrs, 4hrs의 시간별 변화에서도 통계적으로 유의한 차이(p>0.05)가 없었다(Table 4).

피부 수분 함유량의 군간 비교는 작은 표본으로 인하여 통계적 유의성은 없었지만, 각 피험자에 있어서 시료별 시간 경과에 따른 피부 수분 함유량에는 차이가 있었지만 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 17-21).

IV. 고 찰

피부는 인체의 최외곽에 위치한 기관으로 세균 침입, 기계적 자극, 열 손실, 수분 증발, 자외선 등으로부터 신체를 보호하는 역할을 한다²²⁾. 노화는 성체가 된 후 시간의 흐름과 함께 진행되는 인체의 구조적, 기능적, 생화학적 쇠퇴 현상으로 체내에서 동시 다발적으로 발생한다²⁾.

특히 피부 노화는 다양한 요인에 의해 진행되며, 이를 생리적 노화와 병리적 노화로 구분할 수 있다. 생리적 노화는 시간의 경과에 따라 진행되는 자연 노화로

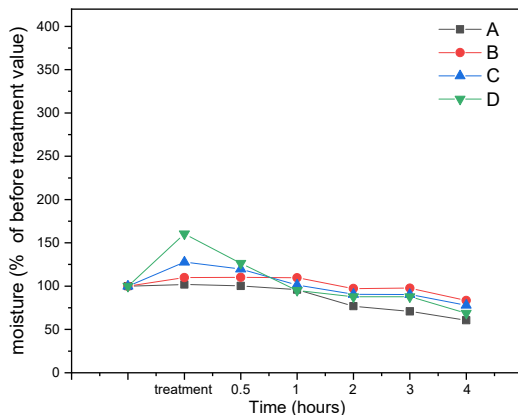


Fig. 17. Moisturizing Ability on Skin of Subject 1 by Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

A: Distilled water, B: Hydrolysate 1000 μ g/ml in distilled water, C: 1,3-butylene glycol, D: Hydrolysate 1000 μ g/ml in 1,3-butylene glycol.

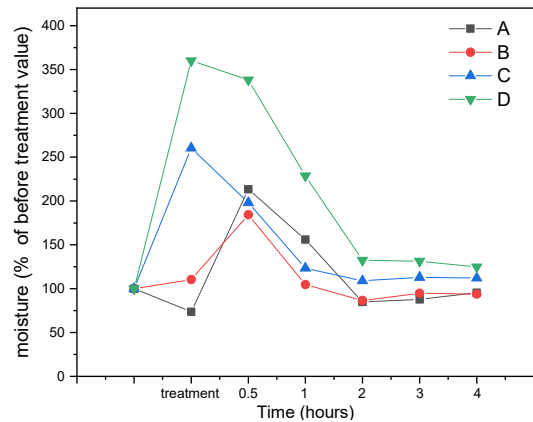


Fig. 18. Moisturizing Ability on Skin of Subject 2 by Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

A: Distilled water, B: Hydrolysate 1000 μ g/ml in distilled water, C: 1,3-butylene glycol, D: Hydrolysate 1000 μ g/ml in 1,3-butylene glycol.

Table 3. Inter-group Comparison Test Statistics (A Versus B)

	Treatment	Test statistics ^a				
		0.5hr	1hr	2hrs	3hrs	4hrs
Mann-Whitney's U	11.000	4.000	4.000	9.000	10.000	9.000
Wilcoxon's W	26.000	19.000	19.000	24.000	25.000	24.000
Z	-0.313	-1.776	-1.776	-0.731	-0.522	-0.731
Asymp.Sig. (2-tailed)	0.754	0.076	0.076	0.465	0.602	0.465
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0.841 ^b	0.095 ^b	0.095 ^b	0.548 ^b	0.690 ^b	0.548 ^b

A: Distilled water B: Hydrolysate 1000 μ g/ml in distilled water

a: Group variable:specimen b: Not corrected for ties

Table 4. Inter-group Comparison Test Statistics (C Versus D)

	Treatment	Test statistics ^a				
		0.5hr	1hr	2hrs	3hrs	4hrs
Mann-Whitney's U	3.000	9.000	9.000	12.000	10.000	12.500
Wilcoxon's W	18.000	24.000	24.000	27.000	25.000	27.500
Z	-1.984	-0.733	-0.731	-0.104	-0.522	0.000
Asymp.Sig. (2-tailed)	0.047	0.463	0.465	0.917	0.602	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0.56 ^b	0.548 ^b	0.548 ^b	1.000 ^b	0.690 ^b	1.000 ^b

C: 1,3-butylene glycol D: Hydrolysate 1000 μ g/ml in 1,3-butylene glycol

a: Group variable:specimen b: Not corrected for ties

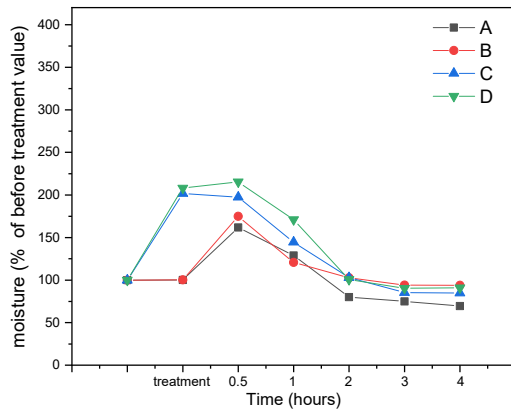


Fig. 19. Moisturizing Ability on Skin of Subject 3 by Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

A: Distilled water, B: Hydrolysate 1000µg/ml in distilled water, C: 1,3-butylene glycol, D: Hydrolysate 1000µg/ml in 1,3-butylene glycol.

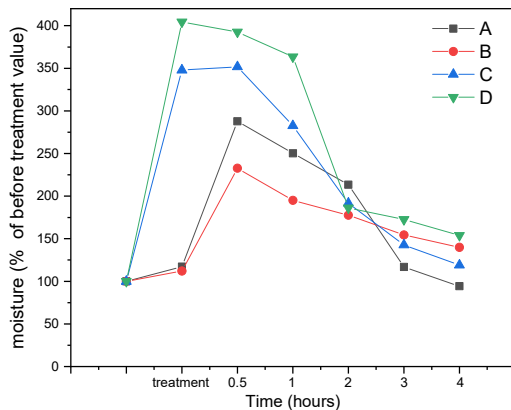


Fig. 20. Moisturizing Ability on Skin of Subject 4 by Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

A: Distilled water, B: Hydrolysate 1000µg/ml in distilled water, C: 1,3-butylene glycol, D: Hydrolysate 1000µg/ml in 1,3-butylene glycol.

체내 단백질 특성 변화 및 생합성 감소 등이 발생한다. 병리적 노화는 공해, 바람, 온도, 자외선 등 인체 외부 인자로 인해 생물 연령에 비해 빠르게 진행되는 노화로 피부 건조, 과색소 침착 등이 발생한다¹⁻³⁾. 생리적, 병리적 노화로 축적된 ROS와 산화적 스트레스는 피부 주요 성분들에 다양한 기능 저하를 초래한다. 피부 탄력,

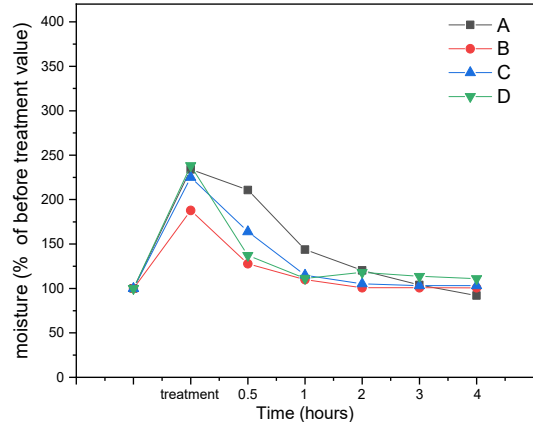


Fig. 21. Moisturizing Ability on Skin of Subject 5 by Hydrolysate from *Phellinus igniarius*.

A: Distilled water, B: Hydrolysate 1000µg/ml in distilled water, C: 1,3-butylene glycol, D: Hydrolysate 1000µg/ml in 1,3-butylene glycol.

주름에 영향을 주는 collagen은 ROS에 의해 증가된 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 사이토카인에 의해 pro-collagen이 감소되며, 산화적 스트레스로 활성화된 세포 외 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)로 인해 collagen 분해가 촉진된다²³⁾. ROS는 nitric oxide synthase(NOS)을 자극하여 NO를 생산하며, 과량 생성된 NO는 염증 반응으로 피부 조직을 파괴한다²⁴⁾. 기미, 검버섯 등과 같은 과색소 침착에 관여하는 tyrosinase은 ROS에 의해 mRNA 수준에서 상향 조절되어 melanin을 과잉 생산하게 된다²⁵⁾. 수분 보유, 영양분 저장 역할을 하는 hyaluronic acid(HA)는 HAS에 의해 합성되며, ROS의 증가로 중합 해체 반응 발생 시 그 양이 감소한다²⁶⁾. 노화로 야기된 피부 주요 성분의 기능 저하는 피부 건조, 위축, 탄력 감소, 주름, 기미, 주근깨, 가려움증과 같은 증상을 유발한다¹⁻³⁾.

외모를 중요한 개인 경쟁력으로 보는 현대 사회에서 피부 노화로 인한 피부 건조, 주름, 기미 등을 치료하기 위해 최근 피부의 항노화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{23,27-29)}. 과거 항노화 소재 연구는 arbutin, kojic acid, azelaic acid 등의 소재들을 이용하였으나, 부작용 사례들이 보고됨에 따라 안전성이 담보되는

천연물 소재로 연구 동향이 변화하고 있다²⁸⁾.

천연물 소재 중 버섯류는 세계적으로 20,000종이 알려져 있으며 자실체 및 균사체의 추출물과 배양물이 여러 분야에서 사용되고 있다. 버섯은 식품으로써 안정성이 확보되어 있기 때문에 다른 천연물 소재와 달리 빠르게 각종 산업에서 이용되고 있으며³⁰⁾, 다양한 버섯들이 피부 항노화 소재로 연구가 진행되고 있다^{3,8,31-34)}.

상황버섯은 담자균류(basidiomycotina) 민주름버섯목(Aphyllphorales) 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 진흙버섯속(Phellinus)에 속하며 뽕나무 줄기에 자생하는 버섯으로³⁵⁾, 약리학에서는 위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암 등의 소화기계 암과 간암 수술 후 면역기능 증진, 장 출혈, 자궁 출혈 및 대하, 월경 불순에 효과가 있는 것으로 알려져 있다³⁶⁾.

상황버섯의 本草名은 桑耳로 상황버섯이 기생하는 뽕나무를 지칭하는 “뽕나무 桑”과 곡식 등의 싹을 지칭하는 “싹 耳”를 조합한 이름으로^{37,38)}, 한의학 原典에서는 桑黃 보다는 桑耳로 표기하고 있다. 역대 문헌에서 상황버섯은 痔血, 瘡證과 같은 외과와 피부 질환^{10,39,40)}, 腸風瀉血, 腹痛과 같은 내과 질환^{10,41)} 女人崩漏, 帶下, 陰痛^{10,39-41)}과 같은 부인과 질환에 사용되어 왔다. 瘡證은 체표 피부에서 각종 원인에 의해 정상적인 피부 생리 기능이 파괴되어 구진, 포진, 미란, 부종, 화농 및 피부 조직의 파괴와 같은 증상이 발생하는 질환을 포괄하는 개념이다. 瘡證의 원인으로는 情志內傷, 飲食不節, 房室損傷, 勞力傷, 虛損病, 慢性病 등과 같은 내부적 원인과 外感淫邪, 漆毒, 植物毒, 藥毒, 沸水傷 등과 같은 외부적 요인으로 구분할 수 있다⁴²⁾. 역대 문헌에서 瘡證에 사용되어진 상황버섯은 구진, 포진, 미란, 화농과 같은 체표의 피부 손상을 회복시킬 뿐만 아니라 손상된 피부 조직을 재생시키는 효능이 있을 것으로 판단하여 피부 항노화 소재로 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

상황버섯에 대한 연구로는 에탄올 추출물의 항산화, 미백, 항노화, 항염증, 항알레르기, 주름개선에 대한 선행 연구^{9,19)}가 있었지만, 상황버섯 가수분해물을 이용한 피부 항노화 효능에 대한 연구는 없었다.

본 연구는 상황버섯의 초임계 추출물을 이용하여 피부 항노화 효능을 관찰하려고 하였지만 상황버섯 자체의 비극성 물질이 초임계 추출법으로는 추출되지 않았다. 이에 단순 용매 추출이 아닌 상황버섯 단백질만 선택적으로 추출하고 papain, bromelain 효소로 가수분해하였다. 이와 같은 과정을 통해 얻은 상황버섯 가수분해물을 이용하여 DPPH radical 소거능, type I collagen 합성, tyrosinase 억제, NO 생성, tyrosinase 억제, HAS2, HAS3 mRNA 발현과 피부 수분 함유량에 대해 간이 임상 평가를 진행하여 피부 항노화 효능을 살펴보았다.

초임계 추출은 압력과 온도 조절만으로 물성 조절이 쉽게 되는 유체를 이용한 추출로, 본 연구에서는 이산화탄소를 유체로 사용하였다. 이산화탄소는 추출 후 상온에서 모두 기화되어 날아가기 때문에 잔존 용매에 대한 걱정이 없으므로 천연 소재 추출에 많이 사용된다⁴³⁾. 그러나 본 연구에서 상황버섯 초임계 이산화탄소 추출물의 양은 실험을 진행하기에 충분하지 않았다. 또한 상황버섯에서 초임계 추출 방법이 적합한 방법인지 확인하기 위하여 polarity index 값이 0인 normal-hexane을 이용하여 유지 함량을 확인하였다. 그 결과 상황버섯 100g에 유지는 0.21g으로 초임계 추출 방법은 본 연구에서 적합한 방법이 아님을 확인하였다.

상황버섯 단백질 추출은 에탄올을 이용한 단순 용매 추출이 아닌 한²¹⁾의 연구방법에서 이용한 lysis buffer를 사용하였다. 상황버섯의 단백질 추출물은 맑은 갈색의 형상으로 1회 차에 대략 4.5%, 2회 차에 대략 5.6%, 3회 차에 대략 5.8%로 산출되었다.

추출된 단백질은 papain과 bromelain을 이용하여 가수분해를 시행하였다. Papain은 papaya의 잎, 미성숙 과실, 과즙에서 추출한 시스테인 단백질 분해효소로⁴⁴⁾, 50℃에서 24hrs, 48hrs, 72hrs 시간별 mass 분석을 시행했을 때 72hrs에서 가수분해 효율이 최적임을 확인하였다. Bromelain은 파인애플에서 분리한 시스테인 단백질 분해효소로⁴⁵⁾, 50℃에서 24hrs, 48hrs, 72hrs, 84hrs 시간별 mass 분석을 시행했을 때 84hrs

에서 가수분해 효율이 최적임을 확인하였다. Papain과 bromelain을 1:1로 함께 사용한 mixture를 24hrs, 48hrs, 72hrs 시간별 mass 분석을 시행했을 때 72hrs에서 가수분해 효율이 최적임을 확인하였다. 효소별 시간 최적화 후 각 효소별 최적 시간인 papain 72hrs, bromelain 84hrs, mixture 72hrs를 mass 분석으로 비교하니 mixture 72hrs가 가장 효율이 좋았고, 이를 이용하여 상황버섯 가수분해물을 제작하였다.

ROS는 미토콘드리아의 호흡과 면역반응에 의한 산화·환원 과정을 통해 생성된다. 균형 상태에서 ROS는 체내의 항산화 체계에 의하여 관리되며 항상성을 유지하는데 피부 표면에 상처가 발생하여 세포막이 공기에 노출되면, 산소가 활성산소로 바뀌는 oxidative stress가 발생하게 되어 세포의 기능과 구조는 파괴 된다^{46,47}.

본 연구에서는 상황버섯 가수분해물을 DPPH를 사용하여 radical 소거율을 측정한 결과, 상황버섯 가수분해물 50 μ g/ml 농도에서부터 농도 의존적으로 radical 소거능이 증가함을 확인하였다.

Collagen은 extracellular matrix(ECM)의 주요 구조 성분으로 인체 유기 물질 대부분을 구성하며, 진피에 대량으로 존재하는데 세부적으로 type I, II, III, IV, V으로 구분하고, 이중 type I이 성인 진피의 80-90%를 차지한다. Collagen의 기능은 자외선으로부터 피부 손상을 방어하고 유수분 균형, 피부 탄력을 유지하는데 피부 노화로 collagen이 부족해지면 주름이 발생한다⁴⁸⁻⁵⁰.

상황버섯 가수분해물의 type I collagen 합성능을 확인하기 전, CCD-986sk cells에서 농도별로 상황버섯 가수분해물을 처리하여 세포 생존율을 살펴본 결과, 500 μ g/ml 이하의 농도에서 90%의 세포 생존율을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다. 상황버섯 가수분해물의 type I collagen 합성에 대한 효과를 확인한 결과 50, 100 및 500 μ g/ml 농도에서 통계적으로 유의하게 type I collagen 합성이 증가하였다.

NO는 reactive nitrogen species(RNS)의 일종인 NOS에 의해 L-arginine으로부터 citrulline으로 산화

될 때 생성되는 자유라디칼이다. 체내의 균형 상태에서 신경 전달, 병원체 세포 파괴, endothelium-derived relaxing factor(EDRF)로서 혈관 내피 평활근 이완 등의 생리적 기능을 담당한다. 그러나 inducible NOS(iNOS)에 의해 과다 생성된 NO는 세포 조직 손상을 유발하며 NO의 파생물인 peroxynitrite와 nitrogen dioxide도 염증 반응을 일으키는 등 염증 반응에 중요한 역할을 한다⁵¹⁻⁵³.

상황버섯 가수분해물의 NO 생성에 대한 저해 효과를 확인하기 전, RAW 264.7 cells에서 농도별로 상황버섯 가수분해물을 처리하여 세포 생존율을 살펴본 결과, 500 μ g/ml 이하의 농도에서 90%의 세포 생존율이 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다. 상황버섯 가수분해물의 NO 생성에 대한 저해 효과를 확인한 결과 모든 농도에서 NO 저해 효과가 없었다.

Tyrosinase는 glycoprotein으로 tyrosine을 산화시켜 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로, L-DOPA를 DOPA quinone으로 산화시키는 속도 제한 효소와 같이 작용함과 동시에 DOPA quinone이 DOPA chrome과 DOPA chrome에서 유도된 5,6-dihydroxyindole(DHI)이 indole-5,6-quinone으로 변환되는 과정에도 관여하며, 최종적으로 melanin 합성에 중요한 역할을 한다. Tyrosinase 억제제는 피부 미백의 기전인 melanin 생성 억제, melanocyte 자극 물질 조절, melanin 배설 촉진 중 melanin 생성 억제의 측면에서 피부 미백에 영향을 준다⁵⁴⁻⁵⁶.

상황버섯 가수분해물의 tyrosinase 억제에 대한 효과를 확인한 결과 500, 1000, 2500 및 5000 μ g/ml 농도에서 통계적으로 유의하게 tyrosinase 억제능이 증가되었다.

HA는 N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucuronic acid가 교대로 결합한 disaccharide 반복 단위의 중합체로, 분자량이 20-40만에 달하는 직쇄상 고분자 화합물이다. HA는 피부 수분 유지에 필수적인 천연 보습 인자로 HA의 50%는 피부에, 25%는 골관절에 분포하며, 이 외에 뇌, 신장, 폐장, 근육 등에 분포한다. HA는

HAS에 의해 합성되는데 HAS1은 uridine diphosphate N-acetylglucosamine을 가장 많이 필요로 하지만 HA 합성에서 활동성은 가장 낮으며, HAS2는 배아 조직과 성체 조직 모두에서 HA 합성에 가장 큰 역할을 한다. 또한 HAS3는 성체 조직에서 주로 발현되며 작은 분자 단위의 HA를 합성한다^{26,57,58}).

상황버섯 가수분해물의 HAS2, HAS3 mRNA의 발현에 대한 효과를 확인한 결과, HAS2는 50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서, HAS3는 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 통계적으로 유의하게 mRNA 발현량 증가가 관찰되었다.

5명의 피험자를 대상으로 간이 임상 평가를 시행하여 상황버섯 가수분해물의 도포 전과 시간별 피부 수분 함유량의 변화를 관찰하였다. 피부 수분은 각질층의 탄력성을 유지하는 필수 조건으로 노화된 피부는 조직의 수분 함량이 낮아지면서 건조하고 거칠어지기에 피부 수분 함유량은 피부 상태 측정의 지표로서 의의가 있다⁵⁹. 피부 수분 함유량은 corneometer의 probe을 통해 각질층 하방 30-40 μm 수분 함량을 정전부하용량을 통해 측정하였고⁶⁰, 증류수(A), 증류수에 상황버섯 가수분해물 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용해시킨 것(B), 증류수에 30%로 희석한 1,3-butylene glycol(C), 증류수에 30%로 희석한 1,3-butylene glycol에 상황버섯 가수분해물 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용해시킨 것(D), 총 4종의 시료에서 상황버섯 가수분해물 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 유무를 기준으로 A와 B군, C와 D군으로 구분하였다. 피부 수분 함유량의 군간 비교는 비모수 Mann-Whitney 검정을 사용하여 도포 시간별로 비교하였다.

A와 B 시료 도포 직후, 도포 후 0.5hr, 1hr, 2hrs, 3hrs, 4hrs의 시간별 변화를 관찰한 결과 통계적으로 유의한 차이가 없었고, C와 D 시료의 시간별 변화에서도 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 또한 각 피험자에 있어서 시료별 시간 경과에 따른 피부 수분 함유량에는 차이가 있었지만 통계적으로 유의하지 않았다. 이러한 결과는 작은 표본으로 인하여 통계적 유의성이 없었던 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 상황버섯 가수분해물은 DPPH radical 소거능을 증가시켰고, type I collagen 생성 증가, tyrosinase 억제, HAS2 HAS3 mRNA 발현량을 증가시켜 피부 항노화 소재로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결 론

상황버섯 가수분해물의 피부 항노화 효능을 알아보기 위해 DPPH radical 소거능, type I collagen 합성, NO 생성 억제, tyrosinase 억제, HAS2, HAS3 mRNA 발현, 피부 수분 함유량에 대한 간이 임상 평가 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 상황버섯 가수분해물은 DPPH radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시켰다.
2. 상황버섯 가수분해물은 50, 100 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 type I collagen 생성을 증가시켰다.
3. 상황버섯 가수분해물은 모든 농도에서 NO 생성을 유의하게 억제시키지 못했다.
4. 상황버섯 가수분해물은 500, 1000, 2500 및 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 tyrosinase를 억제시켰다.
5. 상황버섯 가수분해물은 50, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 HAS2 mRNA 발현량을, 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 HAS3 mRNA 발현량을 증가시켰다.
6. 5명의 피험자를 대상으로 진행한 간이 임상 평가에서 시료별 시간 경과에 따른 피부수분함유량에는 차이가 있었지만, 작은 표본으로 인하여 통계적 유의성은 없었다.

ORCID

Tae-Jun Kim

(<https://orcid.org/0000-0001-8976-1399>)

Byeong-Mun Kwak
(<https://orcid.org/0000-0002-9375-9029>)

Hee-Taek Kim
(<https://orcid.org/0000-0002-5581-3733>)

References

1. Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ. Supercritical Extraction of Oriental Herb : Anti-aging and Anti-wrinkle Effects. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 2008;23(6):529-34.
2. Nam HJ, Kim YB. Aging and skin aging. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2004;17(1):16-33.
3. Song H, Kim MS. Anti-aging & Skin Hydration Effects of Spore oil Extracted from Ganoderma lucidum. Journal of Convergence for Information Technology. 2020;10(5):232-8.
4. Kim SH, Jang HJ. Effect of the Cosmetics Products Containing Morinda citrifolia on the 30-50 Middle-aged Women's Skin. The Korean Beauty Management Society. 2016; 4(1):1-7.
5. Park HS, Kim YM, Kim HT. A Clinical Study for the Efficacy and Safety of Functional Cosmetics Containing Humulus japonicus Extract in Patients with Dry Skin due to Mild Atopic Dermatitis. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2019;32(2):24-58.
6. Soh SY, Chun YJ. Cosmeceutical Properties of Extracts of Torreya nucifera and Alpinia henryi and Formulation Characteristics of Mask Pack Containing Extracts of These. Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society. 2020;21(8):36-43.
7. Kim GY, Jung HW, Jung DJ, Song HB, Lee HG. Effects of Shiitake Mushroom on Anti-platelet Aggregation and Anti-thrombotic. J. Oriental Physiology & Pathology. 2013; 27(2):239-45.
8. Seo MS, Jang YA, Lee JT. The Study of Cosmeceutical Activities from Lentinula edodes extracts and Application a Natural Cosmetic Material. Journal of Oil & Applied Science. 2018;35(4):1003-12.
9. Kim AR, Kim JE, Park SN. Antioxidative Activity and Component Analysis of Phellinus linteus Extracts. J. Soc. Cosmet. Sci. Korea. 2011;37(4):309-18.
10. Lee SJ. Dohae Bonchogangmok. Seoul: Komoonsa. 1975:500-5.
11. Pyo MY, Hyun SM, Yang KS. Effects of phellinus linteus extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. The Journal of Applied Pharmacology. 2001;9(3):194-200.
12. Rhee YK, Han MJ, Park SY, Kim DH. In vitro and in vivo Antitumor Activity of the Fruit Body of Phellinus linteus. Korean J. Food Sci. Technol. 2000;32(2):477-80.
13. Lee YH. Effect of Phellinus Linteus Grown in Germinated Brown Rice on Atopic Dermatitis. J. Kor. Soc. Cosm. 2007;13(2):514-9.
14. Song CH, Ra KS, Yang BK, Jeon YJ. Immuno-stimulating activity of phellinus linteus. The Korean Journal of Mycology. 1998;26(1):86-90.
15. Seo JH. The effects of phellinus linteus extract administration on aerobic exercise

- ability and blood lactate concentration the during the supramaximal progressive loaded exercise by athletes. The Korean Journal of Physical Education. 2008;47(2):499-505.
16. Jung ME, Ham SS, Nam SM, Kang IJ, Kim SJ, Chung CK. Biochemical and Histological Effects of *Phellinus linteus* Methanol Extract on Liver Lipid Metabolism of Rats Fed CCl₄ and High Fat. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2001;30(2):331-7.
17. Jeoung YJ, Choi SY, An CS, Jeon YH, Park DK, Lim BO. Comparative Effect on Anti-Inflammatory Activity of the *Phellinus linteus* and *Phellinus linteus* Grown in Germinated Brown Rice Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2009;17(2):97-101.
18. Ji JH, Kim MN, Chung CK, Ham SS. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of *Phellinus linteus* Extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2000;29(2):322-8.
19. Yun WS, Jung HA, Roh SS. Effect of *Phellinus igniarius* Quel Extract on the Anti-inflammatory, Anti allergy, Anti-oxidant, Anti-wrinkle. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2010; 23(1):75-93.
20. Kwak BM, Kim EH, Kim YM, Kim HT. Component analysis of four-part extracts from *Chamaecyparis obtusa* Endl. by supercritical fluid extraction anti-inflammatory effect on RAW 264.7cells. Journal of Exercise Rehabilitation. 2019;15(5):723-30.
21. Han LL. Studies on skin moisturizing and anti-inflammatory efficacy of peptide and amino acid hydrolysate from ginseng seed. [master's thesis] Suwon:Ajou University. 2017:1-66.
22. KDA Textbook Editing Board. Dermatology 6th edition. Seoul:Medbook. 2014:2-51.
23. Kim JE, Choi YS, Kim HK, Jang YA. Collagen synthesis ability and inhibitory effect of MMPs in keratinocytes of *Lysimachia christinae* Hance Extract. Journal of the Korean Applied Science and Technology. 2020;37(4):820-9.
24. Kim TJ, Kim YM, Kim HT. Effects of *Naetakcheongeum-san* on Anti-inflammatory Activities in RAW 264.7 cells. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2018; 31(1):12-21.
25. Chen CY, Kuo PL, Chen YH, Huang JC, Ho ML, Lin RJ, et al. Tyrosinase inhibition free radical scavenging antimicroorganism and anticancer proliferation activities of *sapindus mukorossi* extracts. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2010;41(2):129-35.
26. Triggs-Raine B, Natowicz MR. Biology of hyaluronan: Insights from genetic disorders of hyaluronan metabolism. World J Biol Chem. 2015;6(3):110-20.
27. Kim HS, Ko KS. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Ginseng Berry Ethanol Extracts as a Cosmetic Ingredient. Asian J Beauty Cosmetol. 2020;18(3):389-97.
28. Yoon JH, Park JH, Kim BR. Skin Whitening Effect of *Sedum kamtschaticum* Fisch. Solvent Fractions. Journal of the Korean Applied Science and Technology. 2020; 37(5):1239-47.
29. Shim JH. Anti-aging Effect of Sulfuretin in

- UVA-irradiated Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2020;18(3):265-72.
30. Sohn EH, Roh HS, Par YS, Sohn ES, Kang SC, Kang NS, et al. Phellinus linteus: Market and Technology Trends Analysis. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*. 2008;23(2):109-17.
31. Kang MY, Kim S, Yun HJ, Nam SH. Antioxidative activity of the extracts from browned oak mushroom(*Lentinula edodes*) with unmarketable quality. *Korean J. Food Sci. Technol*. 2004;36(4):648-54.
32. Kim MS, Park TJ, Lim JS, Kim SY. Effect of *Agaricus biorenovate* Extract on Collagen Synthesis and Matrix Metalloproteinase-1 Production in Human Dermal Fibroblast. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. 2019;34(1):49-53.
33. Kim JE, Lee SY, Chang YH, Jim MH. Effect of Glucosylceramides and Sterols Isolated from *Agaricus Blazei* Extract on Improvement of Skin Cell. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*. 2020;46(2):105-17.
34. Jang HL, Park SY, Nam JS. Effect of Extraction Solvent on the Antioxidant Activity of *Lentinula edodes* GNA01 Extract. *Korean J. Food Nutr*. 2017;30(1):51-8.
35. Hong WK, Shin JH, Lee YH, Park DK, Choi GS. The Clinical Effect of *Phellinus linteus* Grown on Germinated Brown Rice in the Treatment of Atopic Dermatitis. *Kor. J. Herbology*. 2008;23(1):103-8.
36. Shon MY, Seo KI, Choi SY, Sung NJ, Lee SW, Park SK. Chemical Compounds and Biological Activity of *Phellinus baumii*. *J. Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006;35(5):524-9.
37. Choi CH. *Saengtaeboncho*. Paju:Fishwood. 2018:366-80.
38. Dong-A Editing Board. *Dong-A Chinese character Korean Dictionary* 5th edition. Seoul:Dong-A Publishing. 1989:1443-4.
39. Choo J. *Bongyeongsojeung*. Seoul:Medibook. 2001:657-8.
40. Ko BS. *Sinpyeongyagdaesajeon*. Taipei: Sinmunpung Publisher. 1982:1479-80.
41. Heo J. *Donguibogam*. Hadong:Donguibogam Publisher. 2006:2139-40.
42. Ko WS, Kim KJ, Kim NK, Kim YB, Kim JH, Kim HT, et al. *Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery*. Busan:Seonu. 2007:27-142.
43. Kwak BM. Studies on the anti-inflammatory effect of the supercritical fluid extraction from *Chamaecyparis obtusa* Endl. [doctor's thesis] Suwon:Ajou University. 2019:1-106.
44. Rachmawati D, Hutabarat J, Samidjan I, Windarto S. Utilization of papain as feed additive in the fish feed on activity of digestive enzymes, contents of nutrient and minerals of Sangkuriang catfish. *AACL Bioflux*. 2020;13(5):2738-44.
45. Choi C, Son GM, Cho YJ, Chun SS, Lim SI, Seok YR. Purification and characteristics of bromelain from korean pineapple. *J. Korean Agric. Chem. Soc*. 1992;35(1):23-9.
46. Kim SJ, Kim TJ, Kim EH, Kim YM. Anti-inflammatory and Anti-oxidant Studies of Osung-tang Extracts in LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2020;33(1):1-11.
47. Choi KH, Seo HS. The Experimental Study of Jeondo-san on Antioxidant Effects.

- Journal of Pharmacopuncture. 2008;11(1): 143-7.
48. Yang B, Ji C, Kang J, Chen W, Bi Z, Wan Y. Trans-Zeatin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAP kinase signaling in human skin fibroblasts. Int J Mol Med. 2009;23(4):555-60.
49. Tsuji-Naito K, Ishikura S, Akagawa M, Saeki H. α -Lipoic acid induces collagen biosynthesis involving prolyl hydroxylase expression via activation of TGF- β -Smad signaling in human dermal fibroblasts. Connect Tissue Res. 2010;51(5):378-87.
50. Huang C, Ma WY, Dawson MI, Rincon M, Flavell RA, Dong Z. Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(11):5826-30.
51. Jeon SH, Seol GH, Suh SH, Park SH. Nitric Oxide-Induced Intracellular Ca²⁺ Modulation in Macrovascular Endothelial Cells. Korean Circulation J. 2004;34(6): 600-9.
52. Lee HJ, Kim JS, Jin CB, Ryu JH. Inhibitory activity of medicinal herbs on nitric oxide synthesis in activated macrophages. Natural Product Sciences. 2005;11(1):16-21.
53. Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, et al. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Gene Expression by blocking NF-kappa B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. Mol. Cells. 2007;23(3):398-404.
54. Kim CH, Jung HA, Roh SS, Hong SH. Effects of Aloe and *Viola* herba Extract on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2010;23(1):23-43.
55. Mo JH, Oh SJ. Tyrosinase Inhibitory Activity and Melanin Production Inhibitory Activity of the Methanol Extract and Fractions from *Dendropanax morbifera* Lev. Kor. J. Aesthet. Cosmetol. 2013;11(2):275-80.
56. Zolghadri S, Bahrani AR, Hassan Khan MT, Munoz-munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. J Enzyme Inhib Med Chem. 2019;34(1):279-309.
57. Park HS, Ha HY, Kim HT. An Experimental Study on the Effect of *Angelica gigas* Ethanol Extract on Hyaluronic Acid Synthesis. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2018;31(1):32-41.
58. Ahn SY, Gil SY, Kwon OS, Chang YH, Jin MH. Skin Hydration Effect of *Brasenia schreberi* Mucilage Polysaccharide Extract. J. Soc. Cosmet. Sci. Korea. 2017;43(3):223-30.
59. Kligman AM, Dogadkina D, Lavker RM. Effects of topical tretinoin on non-sun-exposed protected skin of the elderly. J AM Acad Dermatol. 1993;29(1):25-33.
60. So BH. Device evaluation of skin effect. The Journal of Skin Barrier Research. 2006; 8(1):68-75.