증숙 및 초고압 증숙 공정을 통한 더덕의 항장활성 증진

김지선* · 최우석* · 정재윤** · 정희철** · 이현용***†

*강원대학교 생물소재공학과, **(주) 뉴트리, ***서원대학교 식품공학과

Enhancement of Cosmeceutical Activity from *Codonopsis lanceolata* Extracts by Stepwise Steaming Process

Ji Seon Kim*, Woo Seok Choi*, Jae Youn Chung**, Hee Chul Chung**
and Hyeon Yong Lee***†

*Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**NewTree CO., Ltd, 11F Tech center, SK n Techno Prak, Sunnam 462-120, Korea.

***Department of Food Engineering, Seowon University, Chungju 361-742, Korea.

ABSTRACT : In general, stepwise hot steaming process is known to be effective in improving its biological activities; however, not much employed in processing *Codonopsis lanceolata* due to its hardness. The complex processed *C. lanceolata* showed highest free radical scavenging activity as 45.21%. Total phenol and flavonoid content were of complex processed *C. lanceolata* higher than conventional extract and alone steaming process. It was showed the lower melanogenesis rate on melanin production test by B16F10 cells as 27.46%. High inhibitory of tyrosinase was also measured as 28.61% by adding steamed *Codonopsis lanceolata* extracts by high pressure extraction of 1.0 mg/mL. And anti-wrinkle activity were 39.08%. In comparing phenolic acids profiles in the extract, in general higher amounts of polyphenol were obtained possibly by easy release of active components during thermal processing, which results in better antioxidant activities than that of general extract. This findings can also be supported by result that the extract by steaming process showed better activities than the general extraction extract.

Key Words : Cosmeceutical Activity, Stepwise Hot Steaming Process, *Codonopsis lanceolata*

서 언

현대사회는 의학기술의 발달로 평균수명이 증가하고 고령화 사회에 접어들고 있다. 하지만, 현재 인류는 최첨단 과학과 의료기술로도 해결하지 못하는 질병들과 끝없는 싸움을 계속하고 있다. 이에 현대인들의 관심사는 건강기능에 초점을 맞추고 있으며 웰빙 (참살이)에 대한 열풍을 불러일으키고 있다. 또한 이러한 추세와 부합하는 건강 기능성 식품들의 개발이 활발히 일어나고 있으며 특히 천연물에서 유래하는 유용성분들을 포함한 건강기능성식품은 거부감 및 부작용이 없으며 합성화학물에 비해 천연에 존재하는 화합물들의 조화로 인해 부가가치가 높아져 사람들의 기호도가 높아지고 있다.

더덕은 한국, 중국, 일본의 산간지방에 널리 야생하는 다년생 초본으로 예로부터 약용 및 식용으로 섭취되어 안전성이 입증되어 있으며, 사삼이라 하여 인삼에 버금가는 효능이 있는 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*, 2010). 진해, 거담 등의 효능이 대표적으로 알려져 있으며, 혈청지질의 감소 (Han *et al.*, 1998), 면역력 증가 (Ryu, 2008), 항암 (Cho *et al.*, 2011) 등의 효능들이 보고되었다.

인체 내에서는 물질대사와 에너지 생산을 위해 필수적으로 산소를 이용하는데, 이중 일부 산소가 불완전하게 전자를 흡수하여 활성산소종이 유도되며, 과잉 생산된 활성 산소종은 신체의 불균형을 초래해 스트레스를 유발시킨다. 산화적 스트레스에 의해 신체 내에서는 free radical이 생성되어 세포와 조

†Corresponding author: (Phone) +82-43-299-8471 (E-mail) hyeonl@seowon.ac.kr

Received 2013 March 27 / 1st Revised 2013 April 5 / 2nd Revised 2013 April 19 / 3rd Revised 2013 May 1 / Accepted 2013 Revised June 3

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.

직에 손상을 가하는 동시에 지속적인 DNA 손상을 일으켜서 피부 및 신체 내의 암, 노화, 괴사 등을 유발시킨다 (Lee and Min, 2006; Fang *et al.*, 2002). 또한 활성산소가 다량 생성 되면 체내에서는 멜라닌 색소를 분비하여 자외선에 의한 활성산소의 생성을 막는데 (Park, 1997), 자외선의 영향을 받기 쉬운 피부는 자외선을 받으면 피부에서 색소침착이 증가되는데, 이는 자외선 흡수에 대한 피부세포의 손상을 억제할 목적으로 melanin 생성이 증가된 결과이다. 자외선에 의한 광노화는 주름살, 색소탈색, 피부건조, 탄력성 감소 및 색소 침착 등의 변화를 나타나게 한다 (Park *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2002).

본 연구에서는 상품가치가 없어 약용으로 쓰이지 않는 더덕 하품인 초리를 사용하여 향장 활성의 증진에 대한 연구를 하였다. 더덕의 향장 활성 물질의 용출을 증가시키기 위한 방법으로 초고압, 증숙, 발효 등이 알려져 있다 (Park *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2012). 증숙 공정은 증숙을 사용해 열처리를 하여 작물의 구성성분의 변화를 야기하거나 새로운 화합물을 만들어내고 작물의 조직을 파괴하여 유용성분의 용출을 극대화한다. 기존 연구에서 인삼에 증숙 공정을 적용하여 ginsenoside-Rg3, ginsenoside-Rh2 같은 새로운 사포닌의 생성과 phenolic acid가 증가된 것을 증명하였다 (Nam, 2005; Kang *et al.*, 2006). 인삼의 ginsenoside와 비슷한 codonopsin이라는 사포닌이 더덕에 존재하지만 인삼에 비해 그 연구가 미비하여, 그 역할과 효능이 명확하게 규명되어 있지 않은 실정이다. 증숙 가공과 더불어 초고압 공정은 단시간 내에 작물의 유효성분을 용출시킬 수 있으며, 순도가 높은 단일 성분과 불순물이 거의 없는 추출물을 얻을 수 있는 장점이 있다. 초고압공정의 작용 메커니즘은 증숙 가공공정과 유사하며 작물의 세포막을 초고압을 가해 파괴시켜 세포 안으로 용매가 침투할 수 있도록 하여, 보다 많은 유효성분이 세포 밖으로 쉽게 용출될 수 있도록 한다 (Bennet *et al.*, 1998).

증숙 가공 공정 및 초고압 공정은 구근 류와 같이 단단한 천연물의 추출 시, 활성성분의 추출 수율을 극대화시키고자 많이 사용되는 방법으로, 인삼 및 다양한 천연물의 전처리 및 추출공정으로 많이 이용되고 있다. 그러나 더덕에 적용한 경우는 미미하므로 이러한 공정을 통하여 향장활성의 증진을 확인하고, 향후 화장품용 소재로서의 사용가능성을 확인하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 증숙더덕 및 초고압 더덕의 제조

시료는 강원도 횡성지역에서 2012년 8월에 채취한 것을 사용하였다. 사용된 더덕은 상품가치가 없는 초리 (저가 더덕)를 사용하였으며, 깨끗하게 세정한 후 실온 건조된 더덕을 세절하여

시료를 제조하였다. 마하스팀기 (Daechang stainless. Seoul, Korea)를 사용하여 50, 60, 90℃로 2시간씩 단계별 증숙가공을 실시하고, 추가로 100℃로 3시간 증숙가공하였다. 증숙가공을 거친 더덕은 다시 12시간 건조시킨 후 위와 같은 증숙가공 공정을 5번 반복 실시하였다. 증숙가공 더덕의 유효성분 보존기간을 늘리기 위해 20~30℃상태로 음건하여 시료로 사용하였다.

초고압 공정은 더덕 100 g을 비닐 팩에 70% 에탄올 200 ml와 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출장치 (Ilshin Autoclave, Korea)를 이용하여 3,000 bar 압력으로 25℃에서 30분간 초고압 추출을 실행하였다.

2. 추출물 제조

수직 환류냉각기가 부착된 추출 flask를 사용하여 일반 생더덕과 증숙 더덕, 초고압 미증숙 더덕, 초고압 증숙 더덕을 100 g씩 10배수 70% 에탄올 용매를 사용하여 각각 80℃에서 24시간 추출하였으며, 감압여과기를 이용하여 여과하였다. 불순물이 제거된 여액을 회전식 진공농축기 (EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Japan)를 이용하여 농축한 후 동결건조기 (PVTEFA 10AT, ILSIN, Korea)를 사용하여 분말 상태로 만들어 실험에 사용하였다.

3. 세포주 및 생육 배지

Human fibroblasts CCD-986sk, melanocyte Clone-M3 는 한국세포주은행으로부터 동결세포주로 구입하였다. 구입한 CCD-986sk와 Clone-M3를 각각 DMEM과 RPMI1640 배지에 fetal bovine serum (FBS, Hyclone) 10%와 1%의 penicillin-streptomycin을 첨가하여 CO₂ 5%, 37℃의 조건하에서 배양한 후 사용하였다. 그 외 실험에 사용한 모든 시약들은 Sigma사에서 구입하였다.

4. 세포 독성 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)를 사용하여 Mosmann방법을 변형시켜 세포 생존율을 측정하였다 (Mosmann, 1983). CCD-986sk 세포를 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well 농도로 접종한 후, 80% 정도의 배양시점에서 각 well에 200 μ l 씩 시료를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml의 농도로 투여하고 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 5 μ g/ml 농도의 MTT 용액을 100 μ l씩 각 well에 첨가하고 4시간 후 상층액을 제거한 다음, 10 μ l의 acid-isopropanol (0.04N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 microplate reader (Tecan, USA)로 565 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. DPPH 소거활성 측정

DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) radical에 대한 소거활성은 Dietz 등 (Dietz *et al.*, 2005)의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. 96 well plate에 용매를 ethanol로 하여 제조한 0.1 mM DPPH용액 200 μ l와 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml의 농도로 조절된 샘플 80 μ l을 혼합하여 25°C에서 20분동안 암실에 방치한 후 525 nm에서 흡광도 측정하였다. 측정값은 DPPH radical scavenging activity (%), 즉 라디칼 소거능과 무 처리군의 흡광도를 100%로 보았을 때 50%의 흡광도를 나타내는 시료의 양을 측정하여 ED₅₀값으로 나타내었다.

6. 총 페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Denis법에 따라 추출물 1 ml에 Folin-Ciocalteu 시약 및 10% Na₂OH₃ 용액을 각 1 ml씩 차례로 가한 다음 실온에서 1시간 정치한 후 UV-vis spectrophotometer (852A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Swain *et al.*, 1959). Caffeic acid를 0~100 μ g/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 측정하였다 (Singleton and Rossi, 1966).

7. HPLC 측정

각 공정별 더덕 추출물의 gallic acid의 함량변화를 알아보기 위하여 HPLC를 이용해 각 시료를 분석하였다. 시료를 분석용 ethanol에 녹여 0.45 μ m 여과막으로 여과하여 추출물을 1.0 mg/ml의 농도로 조제하여 injection volume 20 μ l로 측정하였다. HPLC 기기는 Agilent 1260 series를 사용하였으며, column은 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m)를 이용하였다. 이동상으로는 distilled water와 acetonitrile을 9:1 (v/v)로 혼합한 용액에 0.1% formic acid를 넣은 이동상 A와 methanol, acetonitrile, distilled water를 각각 4:4:2 (v/v)의 비율로 혼합하고 0.1% formic acid를 첨가한 이동상 B를 사용하였다. 이동상의 농도기울기는 Table 1에 나타내었다. 유속은 1.0 ml/min, 280 nm의 파장으로 측정하였다.

8. Tyrosinase 억제 효과 탐색

Dopachrome법을 이용하여 tyrosinase 억제 효과를 측정하였다 (Pomerantz, 1963). Mushroom tyrosinase-150 unit 150 μ l와 2.5 mM L-tyrosine 225 μ l, 0.4 M hepes buffer (pH 6.8) 225 μ l, ethanol 용액 또는 1 mg/ml 농도의 시료 300 μ l를

Table 1. HPLC analysis gradient.

Time (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
15	95	5
23	60	40
33	60	40
42	0	100
45	95	5
50	95	5

A; distilled water:acetonitrile (9:1(v/v)), B; methanol:acetonitrile: distilled water (4:4:2(v/v)).

혼합한 후 배양 전, 15분간 배양 후의 각각의 흡광도를 475 nm의 파장에서 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition (\%)} = (D - C) - (B - A) / (D - C) \times 100$$

A와 B는 각각 시료가 첨가된 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이다. 이들 tyrosinase 억제 효과는 100%로 나타날 때 완전한 억제를 의미하며, 0일 때 전혀 억제를 하지 못하는 것을 의미한다.

9. Melanocyte를 이용한 melanin 생성저해율 측정

Melanin을 생성하는 쥐 유래 melanocyte인 Clone-M3를 이용하여 melanin 생성저해율을 측정하여 각 시료의 미백활성을 측정하였다. Clone-M3를 96well에 접종하고 24시간 후에 3일간 각 시료를 처리하였다. 3일 후에 각 well의 배지를 제거한 후에 PBS로 세척하고, 각 well 당 1 ml의 1 N NaOH를 가한 다음 교반시켜 melanin 성분이 용출되도록 하였다. 용출된 melanin의 함량을 측정하기 위하여 microplate reader를 이용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 ascorbic acid를 사용하였으며 추출물과 동일 농도로 처리하여 측정하였다 (Kim *et al.*, 2008).

10. UV A 처리를 이용한 주름 발현 저해 측정

CCD-986sk를 1.5×10^5 cells/ml의 농도로 35 mm dish에 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양하였다. UV 조사 전에 배지를 제거한 후 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거한 다음, LUX meter (DM-28, Takemura, Japan)을 이용하여 6.3 J/cm²으로 맞추어 조사하였다. UV A 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에 분자량별로 모아진 분획물을 1 mg/ml의 농도로 투여하여 24시간 동안 배양하였다.

UV A 조사에 의해 유도되는 MMP-1 발현량 측정은 Dunsmore 등 (1998)의 방법에 의하여 UV A를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4℃에서 24시간 동안 coating하였다. TBS (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% PBS로 37℃에서 1시간 동안 blocking 한 후, 1차 항체 (monoclonal anti-MMP-1)를 blocking buffer로 1:3,000으로 희석하여 처리하고 37℃에서 90분간 반응시켰다. PBS로 세척한 다음 2차 항체 (alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG)를 blocking buffer에 1:3,000으로 희석하여 처리하고, 37℃에서 90분간 반응시킨 후 PBS로 세척한 다음 alkaline phosphatase 기질 용액 (1 mg/ml, p-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer)을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 3 N NaOH로 반응을 완전히 중지시킨 후 microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11. 통계처리

SAS (Statistical Analysis System) 프로그램을 사용하여 평균과 표준편차를 구하여 처리하였다. 또한 각 활성 실험 등에 대한 각 실험결과는 triplicate determinations에 의한 Mean $\pm$ standard deviation (SD)로 표시했으며, 평균값의 차이는 $P < 0.05$ 의 조건에서 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

1. 세포독성 측정

인간섬유아세포 CCD-986sk를 이용하여 더덕추출물의 세포독성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 각 공정별 더덕추출물은 모두 농도 의존적으로 세포독성이 증가하는 경향을 보였으며, 1.0 mg/ml의 농도에서 모든 추출물이 20% 이하의 세포독성을 보였다. 1.0 mg/ml의 농도에서 일반 미증숙 더덕추출물 (FC)은 18.12%의 가장 높은 세포독성을 나타내었으며, 초고압 처리 증숙가공 더덕추출물 (SHC)의 경우 15.82%의 수치를 나타내 가장 낮은 세포독성을 보였다. 초고압처리 미증숙추출물 (HC)과 증숙가공 추출물 (SC)도 각각 16.89%, 16.04%의 세포독성을 보여, 일반 미증숙 더덕추출물 (FC)보다는 낮은 세포독성을 나타내었다. 이 결과로 각 공정처리에 따른 세포독성의 감소를 확인하였으며, 또한 농도가 증가함에 따라서 급격한 독성의 증가없이 완만한 상승패턴을 보여줌에 따라 항후 기능성 소재로서 사용 시 더덕추출물의 고농도 첨가를 가능하게 해, 효과적인 활성을 나타낼 수 있을 것이라 사료된다.

Fig. 1. Cytotoxicity of *Codonopsis lanceolata* from steam and high pressure extract processes. FC; fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HC; high pressure processed *C. lanceolata* extract. SHC; steamed and high pressure processed *C. lanceolata* extract. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown.

Fig. 2. DPPH radical scavenging ability of *Codonopsis lanceolata* from several processes. FC; fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HC; high pressure processed *C. lanceolata* extract. SHC; steamed and high pressure processed *C. lanceolata* extract. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

2. DPPH 소거활성 측정

더덕의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH free radical 소거능을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. DPPH는 안정된 자유 라디칼로서 천연물의 항산화 활성을 알아보기 위해 많이 쓰이고 있는 시약이다. 517 nm에서 최대 흡광도를 나타내며, 환원을 하게 되면 517 nm에서 흡광도가 감소하게 된다.

더덕추출물들의 DPPH free radical 소거능을 측정한 결과 1.0 mg/ml의 농도에서 일반 미증숙 더덕추출물 (FC)은

19.22%, 증숙가공 더덕 (SC)은 50.22%, 초고압처리더덕 (HC)는 29.66%, 초고압 처리 증숙가공 더덕 (SHC)의 경우 52.18%의 자유라디칼 소거능을 나타내었다. 일반 더덕과 증숙가공 더덕의 자유라디칼 소거능은 대략 30% 이상의 차이를 보였으며, 초고압처리 미증숙 더덕의 경우에도 일반 미증숙 더덕 추출물에 비해 10%가량 높은 소거능을 확인할 수 있었다. 초고압 전처리와 증숙가공을 동시에 처리한 더덕 추출물이 52.182%의 가장 높은 자유라디칼 소거능을 보였다. 일반 미증숙 더덕 추출물의 자유라디칼 소거능은 녹차 (64.3%), 작약 (57.1%), 생강 (48.3%) (Jung *et al.*, 2004)보다 낮은 수치를 나타내었으나 증숙가공으로 인한 항산화능의 증가가 뚜렷해진 것으로 확인하였다. 이는 증숙과정 간에 증숙의 영향으로 세포벽의 조직이 확장과 수축을 반복하고 그 결과 느슨해진 세포벽으로 유용 물질이 많이 용출된 후에도 더덕 내에 남아있는 잔류 유용성분이 초고압 증숙 복합 공정을 통해 추가적으로 용출이 된 것으로 사료된다. 초고압 공정 추출물에 비해서 증숙가공 추출물의 활성이 높게 측정되고, 초고압과 증숙가공 공정을 복합처리한 추출물의 경우, 증숙가공 추출물보다는 소폭 증진된 활성을 보였으나, 공정상 드는 에너지와 비용을 계산한다면, 증숙가공을 단독으로 처리하는 것이 환경과 경제적인 면에서 더 나은 결과를 도출할 수 있을 것이라 생각된다.

3. 총 페놀 함량 분석

공정별 더덕 추출물의 총 페놀 함량을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 추출물들의 총 페놀 함량은 초고압 및 증숙가공 복합처리 된 더덕 추출물에서 14.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 높은 함량을 나타내었고, 초고압 추출물에서 9.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 함량을 나타내었다. 이는 더덕 추출물에 페놀성 화합물이 함유되어 있으며, 증숙가공 처리에 의하여 더덕의 유용활성물질이 더 효과적으로 용출되는 것을 알 수 있었다. 이러한 페놀성 화합물은 가용성 식물에 널리 분포하여 항산화능을 포함해 다양한 생물학적 효능을 나타내는데, 이들의 효능은 주로 산화환원력에 의한 것이라고 밝혀져 있다 (Osawa, 1994). 이와 같은 결과로 보았을 때 페놀성 화합물을 함유하고 있는 더덕 추출물은 항산화 효능을 가진다고 생각된다.

Fig. 3. Total phenol contents of *Codonopsis lanceolata* from several processes. FC; fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HC; high pressure processed *C. lanceolata* extract, SHC; steamed and high pressure processed *C. lanceolata* extract. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

4. HPLC 측정

각 공정별 더덕 추출물 내에 들어있는 폴리페놀을 함량을 HPLC 측정을 통하여 peak로 나타내었다 (Fig. 4). 더덕에 함유되어 있는 폴리페놀 중 gallic acid를 표준물질로 하여 각 공정별 더덕 추출물의 폴리페놀 함량의 변화를 관찰하였다. 앞서 관찰한 DPPH free radical 소거활성 결과와 비슷하게 초고압 및 증숙가공 복합처리 더덕 추출물에 gallic acid 함량이 가장 많은 것으로 나타났으며, 일반 더덕 추출물이 네가지 실험군 중 가장 낮은 함량을 나타내었다. Gallic acid 함량의 차이는 증숙가공 여부에 따라 그 수치가 현저하게 차이가 나는 것을 확인 할 수 있으며, 이것으로 증숙가공 처리를 거치면서 섬유질로 이루어진 더덕의 질긴 세포벽이 손상되어, 더덕에 함유되어 있는 폴리페놀물질의 용출이 증가된 것으로 보인다.

피부에서 일어나는 멜라닌 색소의 분비는 피부 층에 활성산소가 다량 존재 시, 자외선으로 인해 발생하는 활성산소의 생성의 예방하기 위하여 일어나기도 한다 (Park, 1997). 본 연구진은 이러한 기존 연구결과를 통하여 항산화활성의 증진이 피부 미백에 상당한 영향을 미칠 것이라 사료되어 다음 실험을

Table 2. Comparison of phenolic acid in the extracts of *Codonopsis lanceolata* from HPLC analysis.

Phenolic acid content ($\mu\text{g}/\text{g}$)	FC	SC	HC	SHC
Gallic acid	101.0 $\pm$ 10.2 ^A	402.0 $\pm$ 7.8 ^B	412.0 $\pm$ 9.8 ^B	453.0 $\pm$ 13.4 ^{C**}
Caffeic acid	141.0 $\pm$ 11.1 ^A	21.0 $\pm$ 7.4 ^B	26.0 $\pm$ 7.1 ^B	45.0 $\pm$ 8.5 ^C
Vanillic acid	37.0 $\pm$ 10.7 ^A	51.0 $\pm$ 4.7 ^B	52.0 $\pm$ 2.2 ^B	70.0 $\pm$ 3.9 ^C
trans-Ferulic acid	79.0 $\pm$ 5.6 ^A	260.0 $\pm$ 10.2 ^B	271.0 $\pm$ 8.9 ^B	299.0 $\pm$ 7.8 ^C

FC; fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HC; high pressure processed *C. lanceolata* extract, SHC; steamed and high pressure processed *C. lanceolata* extract. *Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. **Mean with difference letter within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

Fig. 4. HPLC peaks of *Codonopsis lanceolata* from several processes. (A); Gallic acid, (B); fresh *Codonopsis lanceolata* extract, (C); steamed *C. lanceolata* extract, (D); high pressure processed *C. lanceolata* extract, (E); steamed and high pressure processed *C. lanceolata* extract.

Fig. 5. Tyrosinase inhibitory activity of *Codonopsis lanceolata* from several processes. FC; fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HC; high pressure processed *C. lanceolata* extract, SHC; steamed and high pressure processed *C. lanceolata* extract. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

진행하여 각 공정별 더덕추출물의 미백활성을 측정함으로써 더덕의 또 다른 항장활성 증진을 확인하고자 하였다.

5. Tyrosinase 억제 효과 탐색

더덕 추출물의 미백 활성을 확인하기 위한 실험으로 tyrosinase 저해 활성을 확인하여 Fig. 5에 나타내었다. 0.21.0 mg/mL의 농도에서 일반 더덕 추출물의 경우 1.4110.21%의 낮은 tyrosinase 저해활성을 나타냈으며 초고압 더덕의 경우 같은 농도 범위에서 3.2012.22%, 증숙가공 더덕의 경우

5.2827.32%, 초고압 처리 증숙가공 추출물의 경우 5.4428.61%의 tyrosinase 저해 활성을 나타낸 것을 확인하였다. 미백 활성으로 잘 알려진 가래나무 추출물 (300 μ g/mL 농도 대비 60%) (Lee *et al.*, 2010)보다 미미한 활성이지만 증숙 및 초고압 복합공정으로 인해 tyrosinase 저해 활성이 22.5배 상승하여 미백 활성에 대한 가능성을 확인할 수 있었다. 이는 앞서 측정된 더덕의 항산화 활성물질의 용출로 인하여 활성산소의 생성을 차단되어 멜라닌 생성 효소의 활성이 억제된 것으로 보인다. Tyrosinase는 기질인 L-tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로 합성하고 이는 phenylalanine-3,4-quinone으로 산화

초고압 및 증숙공정을 통한 더덕의 항장활성

Fig. 6. Melanogenesis inhibitory activity of *Codonopsis lanceolata* from several processes. FC; fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HC; high pressure processed *C. lanceolata* extract, SHC; steamed and high pressure processed *C. lanceolata* extract. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

Fig. 7. MMP-1 synthesis inhibitory activity of *Codonopsis lanceolata* from several processes. FC; fresh *Codonopsis lanceolata* extract, SC; steamed *C. lanceolata* extract, HC; high pressure processed *C. lanceolata* extract, SHC; steamed and high pressure processed *C. lanceolata* extract. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

되어 최종 멜라닌으로 합성된다 (Solano *et al.*, 2006). 이러한 멜라닌 생성단계의 필수 효소인 tyrosinase의 저해 증진을 통해 초고압 및 증숙더덕 추출물의 미백활성 증진을 확인하였으며, 이에 대한 추가적 실험을 위해 멜라닌 합성 저해 활성을 통한 미백활성 증가에 대해 확인해 보았다.

6. Melanoma를 이용한 melanin 생성 저해율 측정

더덕 추출물의 멜라닌 합성 저해능을 측정하기 위해 melanoma cell인 B16F10을 이용하였다 (Fig. 6). Positive

control로 hydroquinone을 사용하였으며, 0.2 mg/mL의 hydroquinone을 가하였을 때, 멜라닌 생성 저해율은 44.25%로 측정되었다. 1.0 mg/mL의 추출물을 처리하였을 때, 멜라닌 합성 저해율을 보면 일반 더덕 추출물의 경우 18.45%, 증숙가공 추출물 28.49%, 초고압 공정 추출물 20.47%, 초고압 전처리 증숙가공 추출물 27.46%이었다. 앞서 실시한 tyrosinase 저해 활성 실험과 비슷한 양상의 결과를 나타내었으며, positive control인 hydroquinone에 비해 낮은 활성을 나타내었지만, 증숙가공을 통하여 미백활성이 증진되는 결과를 확인할 수 있었다. 더덕의 항산화물질이 피부의 활성산소의 생성을 차단하여 자외선에 의

한 피부손상의 위험이 줄어들었기 때문에, 앞의 tyrosinase 저해 활성과 함께 melanogenesis 저해활성이 높아진 것으로 생각된다.

7. UV A 처리를 이용한 주름 발현 저해 측정

피부의 광노화에 의한 피부주름생성에 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UV A에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호전달 경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래 한다고 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2000). 이러한 UV A에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 더덕 추출물의 영향을 알아보기 위하여 HDFs에 UV A를 조사하고 시료를 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 MMP-1 발현 저해 효과를 ELISA로 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. 모든 시료군에서 농도 의존적으로 저해율이 증가하였으며, 최고농도 1.0 mg/ml 에서 증숙더덕 추출물이 39.08%의 저해율을 나타내어 가장 높은 활성을 나타내었고 초고압 처리 미증숙 더덕 추출물과 일반 미증숙 더덕 추출물의 경우 25.21%, 25.39%의 저해율을 기록하였다. 증숙공정에 의한 MMP-1의 저해율이 증가함을 확인하였다. 이는 UV A 조사 시 발생한 자유 라디칼의 제거와 관계가 있다고 생각되며, 증숙 공정을 통해 항산화 활성이 증가되어 MMP-1의 발현에 영향을 준 것으로 보인다. 이러한 결과는 더덕추출물이 외부 스트레스인 UV에 의해 발생된 교원질 파괴를 담당하는 유해인자를 효과적으로 제거함으로써 MMP-1발현을 효과적으로 조절하는 것이라 생각되며, 향후 피부의 교원질층의 파괴로 인한 주름살을 개선하는 항장소 재개발에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012년 농촌진흥청 농업공동연구과제(농업현장실용화기술개발, 과제번호 PJ009001)의 연구지원으로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Bennett PB, Marquis RE and Demchenko I. (1998). High pressure biology and medicine. University of Rochester Press. New York, USA. p.1-428.
- Cho YR, Kim SH, Yoon HJ, Hong SY, Ko HY, Park EH, Kim MD and Seo DW. (2011). Anti-tumor effects of *Codonopsis lanceolata* extracts on human lung and ovarian cancer. Food Engineering Progress. 15:1-5.
- Dunsmore SE, Sarialho-kere UK, Roky JD, Wilson CL, Matsian LM, Welgus HG and Parts WC. (1998). Matrilysin expression and function in airway epithelism. Journal of Clinical Investigation. 102:1321-1331.
- Fang YZ, Yang S and Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 18:872-879.
- Han EG, Sung IS, Moon HG and Cho SY. (1998). Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the levels of lipid in rats fed high fat diet. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 27:940-944.
- Jung LS, Yoon WB, Park SJ, Park DS and Ahn JH. (2012). Evaluation of physicochemical properties and biological activities of steamed and fermented deodeok(*Codonopsis lanceolata*). Korean Journal of Food Science and Technology. 44:135-139.
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE and Baek NI. (2004). Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 47:135-140.
- Kang KS, Kim HY, Pyo JS and Yokozawa T. (2006). Increase in the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29:750-754.
- Kim JS, Kim JD, Kang MJ, Ahn HY and Kim DJ. (2000). Collagen-induced activation of MMPs(membrane-type matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2) in ovarian cancer cell lines in vitro. Korean Journal of Obstetrics & Gynecology. 43:1972-1978.
- Kim SS, Jeong MH, Seo YC, Kim JS, Kim NS, Ahn JH, Hwang B and Lee HY. (2010). Comparison of antioxidant activity by high pressure extraction of *Codonopsis lanceolata* from different production areas. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:248-245.
- Lee GW, Lee JY and Cho YH. (2010). Whitening effect of the extracts from *Juglans mandshurica*. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 25:18-24.
- Lee JH and Min DB. (2006). Nutraceuticals, aging, and food oxidation. In Handbook of functional lipids. CRC Press-Taylor & Francis Group LLC. Boca Raton. Florida, USA. p.325-350.
- Lim SW, Ryoo HC and Lee SH. (2002). Understanding of skin aging and its prevention and care. The Journal of Skin Barrier Research. 4:71-80.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 65:55-63.
- Nam KY. (2005). The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs(*Panax ginseng* C. A. Meyer). Journal of Ginseng Research. 29:1-18.
- Osawa T. (1944). Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In Uritani I. *et al.* (eds.). Postharvest biochemistry of plant food materials in the tropics. Japan Scientific Societies Press. Tokyo, Japan. p.241-251.
- Park JM, Lee JY, Park TS, Hyun SJ, Kim HH, Cho YJ, Kwon OJ, Son AR, Kim DS and An BJ. (2008). A study on the cosmeceutical activities of *Prunus sargentii* R. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 51:70-78.
- Park SJ, Park DS, Lee SB, He X, Ahn JH, Yoon WB and Lee HY. (2010). Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 39:1898-1902.
- Park SN. (1997). Skin aging and antioxidants. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 23:75-132.

- Ryu HS.** (2008). Effects of *Codonopsis lanceolata* extracts on mouse immune cell activation. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 21:263-268.
- Singleton VL and Rossi JA.** (1966). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16:144-158.
- Solano F, Briganti S, Picardo M and Ghanem G.** (2006). Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects. Pigment Cell Research. 19:550-571.
- Swain T, Hillis WE and Ortega M.** (1959). Phenolic constituents of *Pinus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture. 10:83-88.