



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

安 洪 錫 教授指導  
博士學位 請求論文

잔나비겉상 버섯 추출물의 생리활성물질  
및 기능성화장품 소재 탐색

2016

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

李 明 心

잔나비겉상 버섯 추출물의 생리활성물질  
및 기능성화장품 소재 탐색

安 洪 錫 教授指導

이 論文을 博士學位論文으로 提出함

2015年 10月

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

李 明 心

# 認 准 書

李明心の 博士學位 論文으로 認准함.

2015年 10月

審査委員長 \_\_\_\_\_ (인)

審査委員 \_\_\_\_\_ (인)

審査委員 \_\_\_\_\_ (인)

審査委員 \_\_\_\_\_ (인)

審査委員 \_\_\_\_\_ (인)

誠信女子大學校 大學院

## 논문 개요

잔나비결상 버섯은 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 분포하고 있다. 조직은 코르크질이며 잔나비결상 버섯추출물이 항당뇨와 항암, 면역증진 작용 등이 알려져 있다. 그 외에 잔나비결상 버섯추출물의 항염 작용 및 미백작용, 항균에 대해선 효능이 검증된 바 없다. 이에 본 연구에서는 잔나비결상 버섯추출물이 LPS로 유도한 염증반응에서 항염작용이 있는지 *in vitro*에서 관찰하였고 DPPH 자유라디칼 소거활성 등을 통해 항산화능을 보았으며 melanoma 세포를 이용하여 미백기능이 있는지 확인하였다. 여드름 균주세포를 통해서 항균 활성도 알아보았다. 그 결과 DPPH 자유라디칼 소거활성 결과에서 높은 항산화 활성을 나타냈다. RAW 264.7세포에서 시료를 처리한 결과 독성이 없었고 독성이 없는 농도에서 Nitric Oxide의 생성 감소, 염증 관련 cytokine의 mRNA 발현 저해를 나타내 잔나비결상 버섯추출물이 항염증 활성이 있는 것으로 나타났다. 이 결과를 토대로 잔나비결상 추출물이 염증반응에 효과적인 것을 확인하였으며 향후 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 사용할 것으로 기대된다.

피부 미백 효과 결과에서는 B16F10(melanoma cell)에서 독성이 없는 농도에서 melanin 함유량이 잔나비결상 버섯추출물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 melanin 합성에 key factor인 tyrosinase 활성도를 확인하였을 때도 감소되었다. 이에 따라 잔나비결상 버섯추출물에 미백효과 관련 유효성분이 다량 함유되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 여드름균주를 통해 잔나비결상 버섯추출물의 영향을 알아보았는데 저 농도에서부터 항균 활성 또한 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

잔나비결상 버섯은 우리나라에서는 일반적으로 약용버섯으로 알려져 있어서 민간요법으로 사용하고 있지만 정확한 생리활성효과에 대해 많은 연구가 되지

않았다. 이에 따라 잔나비결상 버섯의 항산화, 항염증 및 피부미백, 항균 효능을 검증하여 잔나비결상 버섯의 기능성화장품 소재로서 활용을 높이하고자 하였다.

# 목 차

## 논문 개요

I. 서 론 .....	1
II. 이론적배경 .....	6
1. 피부의 구조와 기능 .....	6
2. 기능성화장품 .....	14
1) 기능성화장품의 정의 .....	14
2) 기능성화장품 산업 동향 .....	15
3. 잔나비결상 버섯 .....	20
III. 재료 및 방법 .....	23
1. 시약 및 기기 .....	23
2. 시료제조 .....	24
3. 항산화효과 .....	24
1) DPPH 라디칼 소거 효과(항산화) .....	24
4. 항염증효과 .....	24
1) 세포배양 .....	24
2) MTT-assay 분석 .....	25
3) 일산화질소(Nitric Oxide) 농도의 측정 .....	25
4) mRNA 발현측정 .....	26

5) Immunoblot 분석 .....	27
5. 미백효과 평가 .....	28
1) Tyrosinase 활성억제 측정 .....	28
2) 세포주 및 세포 배양 .....	29
3) 세포의 생존을 측정을 위한 MTT-assay .....	29
4) Melanin 생성 억제 관찰 .....	30
5) 세포내 tyrosinase activity 측정 .....	30
6. 항균활성평가 .....	31
1) 사용 균주 .....	31
2) 최소저해농도시험(Minimum Inhibition Concentration: MIC) .....	32
7. 통계처리 .....	32

#### **IV. 실험 결과** .....

1. 잔나비결상 버섯의 추출 시료 수율 .....	33
2. 잔나비결상 버섯의 항산화 효과 .....	34
3. 잔나비결상 버섯의 항염증 효과 .....	37
1) 세포생존율에 미치는 영향 .....	37
2) LPS로 유도한 NO 생성억제효과 .....	40
3) 염증성 사이토카인 생성억제효과 .....	43
4) LPS로 유도된 염증성 MAP kinase 신호전달 억제 .....	48
4. 잔나비결상 버섯의 미백효과 .....	50
1) Tyrosinase 저해 활성 .....	50
2) 생존율에 미치는 영향 .....	53
3) 멜라닌 합성 억제 효과 .....	56

4) 세포내 tyrosinase 활성 억제 효과 .....	59
5. 피부 상재균주에 대한 항균 활성 .....	62
1) <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> )에 대한 항균력 .....	62
2) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ( <i>S. epidermidis</i> )에 대한 항균력 .....	64
3) <i>Propionibacterium acnes</i> ( <i>P. acnes</i> )에 대한 항균력 .....	66
4) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )에 대한 항균력 .....	68
5) <i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> )에 대한 항균력 .....	70
6) <i>Aspergillus brasiliensis</i> ( <i>A. brasiliensis</i> )에 대한 항균력 .....	72
7) <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )에 대한 항균력 .....	74

V. 고 찰 .....	76
--------------	----

## 참 고 문 헌

## ABSTRACT

## List of Tables

Table 1. List of functional cosmetic ingredients .....	18
Table 2. Taqman gene-specific probes .....	27
Table 3. List of microorganisms used for antimicrobial test .....	31
Table 4. Lyophilize yield of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) .....	33
Table 5. DPPH radical scavenging capacity of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract .....	35
Table 6. Cell viability of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract in Raw 264.7 cells .....	38
Table 7. Nitric oxide production of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract in Raw 264.7 cells .....	41
Table 8. Effect of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) on LPS-induced TNF- $\alpha$ (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$ (C) mRNA production in RAW 264.7 cells .....	44
Table 9. Mushroom tyrosinase inhibition activities of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract .....	51
Table 10. Cell viability of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract in B16F10 cells .....	54
Table 11. Melanin contents of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract in B16F10 cells .....	57
Table 12. In vitro tyrosinase inhibition activities of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract in B16F10 cells .....	60
Table 13. The anti-bacterial effects of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract for	

	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	63
Table 14.	The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	65
Table 15.	The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Propionibacterium acnes</i> .....	67
Table 16.	The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	69
Table 17.	The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Candida albicans</i> .....	71
Table 18.	The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Aspergillus brasiliensis</i> .....	73
Table 19.	The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Escherichia coli</i> .....	75

## List of Figures

Fig. 1. The melanogenic pathway .....	9
Fig. 2. Image of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) .....	20
Fig. 3. The DPPH radical scavenging activity of aqueous extract of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) .....	36
Fig. 4. Effect of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) on cell viability in RAW 264.7 cells .....	39
Fig. 5. Effect of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells .....	42
Fig. 6. Effect of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) on LPS-induced TNF- $\alpha$ (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$ (C) mRNA production in RAW 264.7 cells .....	47
Fig. 7. Effects of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract on the activation of MAP kinase on LPS-stimulated of RAW 264.7 cells .....	49
Fig. 8. Tyrosinase inhibition activities of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) and reference. ....	52
Fig. 9. Effect of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) on cell viability in B16F10 cells .....	55
Fig.10. The effect of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) on melanin contents in melanoma cells .....	58
Fig. 11. Effect of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) $\alpha$ -MSH induced tyrosinase activity in melanoma cells .....	61
Fig. 12. The anti-bacterial effects of <i>Elfvvingia applanata</i> (EA) extract for <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	63

Fig. 13. The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Staphylococcus epidermidis</i> . .....	65
Fig. 14. The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Propionibacterium acnes</i> . .....	67
Fig. 15. The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	69
Fig. 16. The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Candida albicans</i> . .....	71
Fig. 17. The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Aspergillus brasiliensis</i> . .....	73
Fig. 18. The anti-bacterial effects of <i>Elfvigia applanata</i> (EA) extract for <i>Escherichia coli</i> . .....	75

## I. 서 론

최근에 웰빙(well being)의 개념보다 더 포괄적이고 광범위한 로하스(LOHAS, Lyfestyles of Health and Sustainability)에 대한 관심이 높아지면서 건강한 아름다움을 추구하고자 하는 욕구는 사회전반에 걸쳐 매우 팽대되고 있고 이러한 사회적 여건의 조성은 뷰티산업에서도 아름다운 피부를 관리 할 수 있는 화장품 산업의 발전과 시장성이 급속하게 확대되고 있다. 또한 한방 소재나 천연 소재의 원료를 이용한 제품은 자신의 피부에 신비스러운 힘을 부여할 것으로 기대하고 있고 자아의식이 강해짐에 따라 자기 욕구실현의 한 수단으로 화장품 사용이 늘어나고 있으며 천연 소재에 대한 관심 고조, 피부안전성에 대한 욕구, 보약의 느낌 등으로 소비자의 욕구가 높아지고 있다(Jung 등, 2012). 피부미용분야에는 주름개선, 보습증가, 탄력증가 등에 영향을 미치는 생물학적 부분에 보다 특이적으로 작용하여 적은 양으로도 높은 기능을 가지는 생리활성 천연물의 발굴에 많은 관심이 집중되고 있으며 피부 친화적이고 안전한 식물추출물을 대상으로 화장품의 기능성을 확인하는 연구가 중요하다(Kim 등, 2007; Lee 등, 2007). 최근 천연물질을 이용한 선행 연구를 살펴보면 노근 추출물(오수정, 2011), 강황 추출물과 커큐민(정은진 등, 2014), 접골목에탄올추출물(이경숙, 2012), 연잎 추출물(이선숙 등, 2012), 노루발풀 추출물(유민정 등, 2012), 명아주 추출물(최민화, 2013) 등의 천연물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

염증 반응은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로서 물리적 작용이나 유해물질, 화학적 자극, 세균감염 등에 의한 손상을 수복 재생하려는 기전이며 지속적인 염증반응은 오히려 점막손상을 촉진하고 그 결과 일부에서

는 암 발생 등 각종 질환을 유도한다(Cho 등, 2009; Willoughby, 1975). 그람 음성균의 외막성분인 LPS (lipopolysaccharide)는 국소 염증, 항체 생산, 폐혈증과 같은 다양한 반응을 일으킨다(Takeda 등, 2003). 대식세포는 LPS 감염초기에 반응하고 숙주의 방어와 항상성 유지에 중추적인 역할을 하나 고농도의 LPS 자극은 대식세포에서 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL (interleukin)-1 $\beta$  및 IL-6, NO (nitric oxide)와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시켜 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있다(Kim 등, 2009; Willeaume 등, 1996). 일반적으로 NO는 대식세포가 활성화되면 iNOS (inducible NO synthase)로부터 생산되며 몇몇 바이러스나 기생충을 억제하는 항균 효과를 가지고 있지만(Moncada 등, 1991) 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(McCartney-Francis 등, 1993). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 전염증성 cytokine의 발현은 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase1/2), p38 kinases (p38), JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase)와 같은 MAPK (mitogen-activated protein kinases)와 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B)에 의해 조절 된다(Feng 등, 1999). NF- $\kappa$ B는 면역과 염증 반응에 관계된 유전자의 발현에 중요한 역할을 한다(Anest 등, 2003). NF- $\kappa$ B가 활성화되면 NF- $\kappa$ B와 결합해 있던 I $\kappa$ B- $\alpha$  (Inhibitory kappa B  $\alpha$ )가 분해되면서 NF- $\kappa$ B가 세포 원형질에서 핵으로 들어가게 되며 이후 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6와 같은 cytokine 발현의 전사 인자로서 작용 한다(Athman 등, 2004; Beinke 등, 2004).

멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 주요 인자 중 하나로서 생물체에 널리 분포되어 있는 색소이며 피부의 표피층에 존재하는 melanocyte에서 합성된다(Ando 등, 2012; Steiberg, 2002). 멜라닌 합성은 아미노산의 하나인 tyrosin을 기질로 tyrosinase, TRP-1 (Tyrosinase related protein-1), TRP-2

(Tyrosinase related protein-2)에 의해 DOPA (3, 4-dihydroxy-phenylalanine)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환되고 붉은 계열의 eumelanin과 갈색계열의 pheomelanin이 합성된다. MITF (microphthalmia-associated transcription factor)는 TRP-1, TRP-2의 eumelanin 합성을 조절하는 중요한 역할을 하는 신호전달 경로이며 멜라닌 형성에 관여하는 효소들의 발현을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다(Bentley 등, 1994; Hemesath 등, 1998; Kim 등, 2011; Olivares 등, 2009; Wu 등, 2000). 현재 arbutin, kojic acid, linoleic acid를 포함하는 많은 tyrosinase 저해제가 의약부의품과 기능성 화장품의 미백 원료로 광범위하게 사용되고 있으나 의학계나 화장품업계에서는 피부 안정성, 제형 안정성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다(Chun 등, 2002; Seo 등, 2003). 따라서 안전성이 높은 천연성분을 이용한 기능성 제품 개발이 요구되고 있으며 미백에 관한 천연물 소재로는 황칠나무 (*Dendropanax morbifera*)의 추출물의 항산화 및 미백활성(Park 등, 2013), 미역쇠 (*Endarachne binghamiae*) 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과(Jeon 등, 2013), 시설오이 4품종의 tyrosinase 억제활성(Yang 등, 2013), 한약재 174종의 methanol 추출물로부터 tyrosinase활성 억제 효과(Seo, 2001)에 관한 보고가 있다.

여드름은 사춘기와 젊은 연령대에 생성되며 다양한 인자에 의해 발생한다. 주요 인자로서는 피지생산의 증가, 선낭상피 세포의 비정상적인 각화증 및 여드름 관련된 균주의 증식에 의해 발생하고 있다(Lee 등, 2007). 대표적으로 여드름을 일으키는 균이라 알려진 *P. acnes*는 지방분해효소(lipase)를 분비하여 피지를 유리 지방산으로 지질분해하고 모낭벽을 자극하여 여드름을 유발한다고 알려져 있다. 뿐만 아니라 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* 등과 같은 여러 균이 관여한다고 알려져 있다.

버섯류는 세계적으로 약 20,000여 종이 알려져 있으며 그 중 식용으로 개발

가능한 것은 약 2,000여 종이다. 국내 분포하는 버섯류는 약 992종이 기록되어 있고 이 중 식용버섯이 100여종으로 확인되어있다(Lee, 1990).

잔나비결상버섯 (*Elfvigia applanata*)은 담자균류 민주름버섯목 불로초과 불로초속 버섯으로 우리나라에서는 전국적으로 고목이나 살아있는 활엽수에 자생하고 있으며 일본, 중국, 오스트레일리아 등 전 세계적으로 분포하고 있다. 우리나라에서는 일반적으로 약용버섯으로 알려져 있어서 바로 먹지 않고 차로 끓여 먹거나 달여서 항암목적의 민간요법에 사용되어 왔다(Park 등, 1991). 약리작용에 관한 연구로는 다당체의 항암효과(Usui T 등, 1983), 면역 조절효과(Nishitoba T 등, 1988)와 항바이러스(Jeong 등, 1999)에 대한 효과가 보고되어 있다. 잔나비결상 버섯의 주요성분으로는 ergosterol 및 ergosta-7, 22-dien-3-one, ergosta-7, 22-dien-3 $\beta$ -ol 등 isoergosterol 등과 다당류가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Miyazaki 등, 1982). 한편 잔나비결상 버섯 열수추출물의 생쥐에 대한 급성 독성시험 결과 투여 가능한 최대용량에서 치사예나 혈액생화학적, 병리조직학적 병변을 보이지 않았음을 밝혀 독성이 없는 것으로 보고되어 있다(Kim 등, 1994). 따라서 잔나비결상버섯은 민간요법으로는 사용하고 있지만 화장품산업이나 피부미용 분야에서의 항산화, 항염증, 항균, 미백에 관한 전반적인 생리활성효과에 대해 많은 연구가 되지 않았다. 이에 본 연구에서는 잔나비결상 버섯의 활용도를 높이기 위하여 잔나비결상 버섯의 피부 미백 및 노화 방지에 근간이 되는 항산화 활성을 DPPH 자유라디칼 소거활성 실험을 하였고 염증에 의해 일어나게 되는 피부트러블 (여드름 등)에 효과적이지를 위해 RAW264.7 세포주를 이용한 항염증 활성과 염증을 일으키게 되는 균의 성장능력 저해 활성을 보았으며 기능성 화장품의 주요 목적 활성 중 하나인 피부 미백에 대한 활성을 탐색하기 위해 mushroom tyrosinase와 멜라닌 세포내 tyrosinase 저해 활성, melanin 생성 저해 실험을

수행하여 기능성화장품 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

## II. 이론적 배경

### 1. 피부의 구조와 기능

피부는 전신을 덮고 있는 가장 바깥층에 존재하는 기관으로 다양한 생리적 기능을 수행하여 외부 환경으로부터 신체를 보호해 주는 중요한 역할을 한다. 피부의 두께는 연령, 성별, 부위에 따라 차이가 있으며 남자가 여자보다 두껍다. 가장 얇은 곳은 눈꺼풀이고 두꺼운 곳은 손바닥과 발바닥이다.

피부는 크게 표피(Epidermis), 진피(Dermis), 피하조직(Subcutaneous fat tissue) 3개 층으로 구분된다. 표피는 가장 바깥쪽에 위치하는 부분으로 편평상피세포가 중첩되어 각화되는 얇은 조직이며 표피의 두께는 부위별로 차이가 많으나 평균 두께는 0.1 ~ 0.3mm이다. 표피의 주요역할은 신체 내부를 보호해 주는 보호막 기능으로 외부로부터의 세균 등 유해물질과 자외선의 침입을 막아준다. 표피의 대부분을 차지하며 케라틴 단백질을 만드는 역할을 하는 각질형성세포(keratinocyte), 색소와 연관된 멜라닌세포(melanocyte), 면역을 담당하는 랑게르한스세포(langerhans cell), 촉각을 감지하는 역할을 하는 머켈세포(merkel cell)가 존재한다(한국피부장벽학회, 2009). 표피는 가장 바깥쪽부터 각질층(horny layer), 과립층(granular layer), 유극층(spinous layer), 기저층(basal layer)으로 이루어져 있다(김명숙, 2012).

진피는 표피와 피하지방층 사이에 위치하고 두께는 0.5 ~ 4mm 정도로 표피의 10 ~ 40배 되는 실질적인 피부라 할 수 있다. 진피는 교원섬유, 탄력섬유의 두 가지 섬유와 대식세포, 섬유아세포, 비만세포 등으로 구성되어 있다. 진피는 결합조직들의 강인성에 의해 피부를 지지하는 역할을 하고 탄력

성과 관련이 있으며 윗부분에 위치한 유두층(papillary layer)과 아랫부분에 위치한 망상층(reticular layer)으로 구분된다.

피하지방층은 진피와 근육, 골격 사이에 있는 부분이며 두께는 신체부위, 성별, 연령, 영양상태에 따라 다르다. 피하지방층의 주요역할은 체온보호기능, 물리적 보호기능, 에너지 저장기능, 여성호르몬과 관계가 있다(김명숙, 2012; 김문주 등, 2009).

피부부속기관으로는 손, 발톱과 털(모발), 땀을 분비하는 땀샘, 피지를 분비하는 피지선으로 구분된다(최광호, 2004).

이러한 피부에 영향을 미치는 환경적 요인으로는 자외선, 방사선, 공기, 온도, 습도 등이 있으며 최근에는 환경오염에 따른 오존층의 파괴로 인해 피부에 유해한 자외선이 심각한 문제가 되고 있다. 자외선이란 태양광의 스펙트럼을 사진으로 찍었을 때 가시광선의 단파장보다 바깥쪽에 나타나는 눈에 보이지 않는 빛으로 파장의 길이에 따라서 UV-A (320~400 nm), UV-B (290~320 nm), UV-C (200~290 nm)로 구분된다. 그 중 자외선의 95%에 해당하는 UV-A는 색소침착과 피부노화, UV-B는 피부 화상과 색소침착, UV-C는 피부암 등을 유발시킨다. 피부가 장시간 자외선에 노출되면 표피세포인 keratinocyte에서 melanin의 생성을 촉진시키게 됨으로써 색소침착으로 인한 기미와 주근깨 등의 피부트러블을 발생시키게 된다.

Melanin이란 피부의 색조를 결정하는 주요인자로서 검은 색소와 단백질의 복합체로 존재한다. 주로 인체의 피부에 존재하며 자외선에 대응하여 피부를 보호하고 아민, 유리기, 금속이온 등과 같은 세포 독성물질을 제거하는 역할을 수행한다. 그러나 체내, 외적인 여러 요인으로 과도하게 melanin이 생성되면 각질형성세포에 전달되고 피부 상피층에 축적되어 과색소침착을 일으키며 그로 인한 기미, 주근깨를 형성시키게 된다. melanin은 표피 기저

층의 melanocyte라고 불리는 색소세포내의 melanosome에서 생합성되며 tyrosine으로 출발하여 흑, 갈색의 eumelanin과 황, 적색의 pheomelanin으로 생성된다. eumelanin의 생성과정은 tyrosinase에 의해 tyrosine이 DOPA(3, 4-dihydroxy phenylalanin)를 거쳐 dopaquinone으로 산화되고 dopaquinone은 자발적으로 endocycle 고리를 형성하여 leucodopachrome으로 된다. leucodopachrome은 dopaquinone과의 환원적 호환작용으로 산화되어 DOPA와 dopachrome으로 되며 DOPA는 다시 tyrosinase에 의해 산화되어 dopaquinone을 형성하게 된다. 이어서 dopachrome은 CO<sub>2</sub> 이탈반응에 의해 DHI (5, 6-dihydroxyindole)로 되며 tyrosinase에 의해 빠르게 산화되어 indole-5, 6-quinone이 된다. 그러나 특정한 금속이온과 효소가 있는 경우 carboxylated intermediate인 DHICA (5, 6-dihydroxyindole carboxylic acid)가 만들어지며 DHICA oxidase의 작용을 받아 indole-5, 6-quinone-2-carboxylic acid가 되며 이후 eumelanin이 형성된다. 한편 pheomelanin은 dopaquinone이 cysteine이나 glutathione과 같은 SH 화합물을 만나 5-cysteinyl-dopa와 1, 4-benzothiazinylalanine 과정을 거쳐 결국에는 pheomelanin을 형성하게 된다(Jimenez-Cervantes 등, 1994). (Fig. 1)

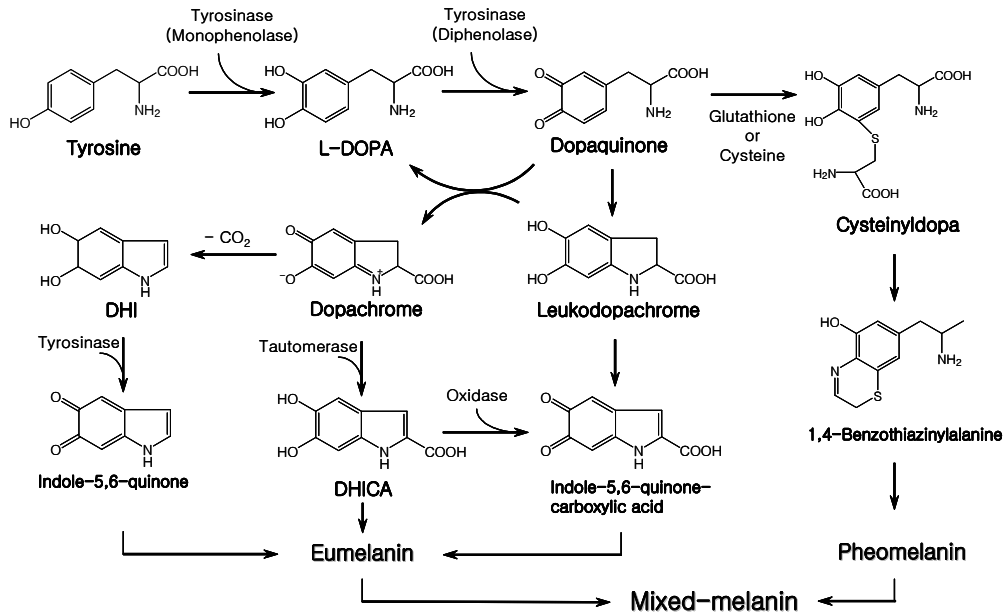


Fig. 1. The melanogenic pathway

Tyrosinase는 위와 같이 melanin 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며 melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase와 DOPA를 산화시켜 dopaquinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는데 key enzyme으로 작용한다. 따라서 tyrosinase의 활성 억제는 피부 내에서의 melanin 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있으므로 유용한 평가법으로 인정되고 있다. 현재까지 보고된 melanin 중합체의 생합성을 억제하는 미백제로는 arbutin, kojic acid 등과 같은 tyrosinase 활성 저해제, 활성 산소종 (reactive oxygen species)을 소거하는 ascorbic acid 및 유도체, coenzyme Q10 등이 미백효과가 있는 것으로 알려져 있으나 피부 안전성, 제형 안정성 등의 문제로 사용되지 않

거나 제한된 양만 사용되고 있다. 이러한 문제점을 개선시키기 위하여 최근에는 천연물로부터 미백연구가 활발히 진행되고 있으며 녹차로부터 delphinidin C-2-3, 3'-di-O-gallate, procyanidin B-2-3, 3'-digallate 등이 감초로부터 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol 등이 상백피로부터 oxyresveratol 등이 tyrosinase의 활성을 억제하는 물질로 보고된 바 있다 (Woo 등, 2009; NO 등, 1999).

피지선은 진피층의 모낭속에 연결되어 있고 얼굴(특히 T존부위)과 두피 및 가슴부분에 집중되어 있으며 손바닥과 발바닥을 제외한 전신의 피부에 존재한다. 나이, 성별, 계절, 피부온도 등에 따라 피지량이 변화하지만 일반적으로 여성보다 남성이 크고 피지량이 많은데 이는 사춘기 때부터 분비되기 시작하는 남성호르몬인 테스토스테론이 피지선을 자극하여 피지분비가 시작된다(김경영 등, 2013). 피지는 하루에 1 ~ 2g 정도 분비되며 기온이 높아지면 분비량이 증가하고 기온이 낮아지면 분비량은 감소한다. 피지의 작용으로는 각질층과 모발의 표면에 피지막을 형성해 수분이 증발하는 것을 방지하며 피부표면에 얇은 피지막을 형성하여 피부를 부드럽고 유연하게 한다. 또한 살균작용, 흡수작용 등이 있다(김문주 등, 2009). 피지선 비대로 인한 피지분비의 증가는 여드름과 밀접한 관계를 가지며(Chu, 1995) 피지선의 개구부에 피지가 정체되거나 정상적으로 피지가 배출이 되지 않아 피지에 감염되어 여드름이 발생하게 된다. 여드름은 주로 사춘기에 발생하는 모낭피지선의 만성염증성 질환으로 면포, 구진, 농포, 낭종 및 결절 형성을 특징으로 하는 질환이다(대한피부과학회, 1994). 여드름의 병인에 관여하는 주요 요인으로는 남성호르몬에 의한 피지분비의 증가, 모낭벽의 과각화, *P. acnes*의 증식 및 염증유발 그리고 피부장벽의 이상이 최근 추가적 병인으로 제시되고 있다(최용호, 2000).

피부에 염증을 유발할 수 있는 피부상재균주로는 그람양성균주인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Streptococcus pyogenes*, *Mycrococcus luteus*, *Corynebacterium xerosis*, *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 가 존재하며 그람 음성균주로는 *Escherichia coli*과 *Pseudomonas aeruginosa*가 있다. 진균류로는 Yeast에 *Candida albicans* (*C. albicans*)와 *Malassezia furfur* (*M. furfur*)가 존재하고 특히 여드름 원인균으로는 *P. acnes*가 알려져 있다(Sohn, 2006; Melish, 1982).

*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)는 그람양성의 혐기성 간균으로서 크기는  $0.3 \sim 1.3\mu\text{m} \times 1 \sim 10\mu\text{m}$  이다. 형상은 균체일부가 팽창되어 있고 균단은 뾰족하고 다형성이며 V자형 배열을 하고 있다(Petty 등, 2006; Burton 등, 2004; 이남형 등, 2003). *P. acnes*는 여드름의 주 원인균주로서 모낭 내의 피지선에 존재하며 *P. acnes*에 의해서 생산된 지방분해 효소(lipase)가 새로 분비된 피지를 정상적으로 에스테르화 하여 유리지방산을 유리시키며 모낭주위 염을 일으키게 된다(Koreck 등, 2003; Brown 등, 1998; Kim, 1995).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)는 그람양성의 호기성 황색구균으로 직경이  $0.5 \sim 1.5\mu\text{m}$  정도의 무증상의 균이며 불규칙적인 포도송이 형태(포도상구균)를 이루고 있다. 건강한 사람의 40%정도는 코, 피부, 겨드랑이나 회음부에서 존재한다. 대표적인 화농균으로 enterotoxin (변중에 의한 장독소)을 생성하는 식중독의 원인균이며 가장 침투성이 강한 종으로 피부의 상처를 통해서 화농을 일으키고 피부표면의 부스럼, 종기의 원인균이기도 하다(김현숙, 2011; 최호영, 2004).

*Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)는 그람양성의 호기성균으로 주로 외모낭이나 모낭의 중간에서 성장하며 지방친화성 미생물로서 여드름 및

염증성 피부질환을 악화시키는 병원성 균주이다. 동물(사람의 피부), 우유, 치즈, 기타 양조물 등에서 분리하며 수술 후 수술부위가 감염 될 경우 병원균으로 작용하기도 한다(김현숙, 2011; Kearney 등, 1999).

*Streptococcus pyogenes*는 화농성 연쇄상 구균은 탄수화물을 함유한 A항원을 가지고 있으며 백혈구의 식균작용을 저해하는 M단백질 항원으로 둘러싸여 있다. 감염 시 erythrogenic 독소와 연쇄상 구균에 의한 발열성 외독소 A, B, C 독소가 생성된다. 이 균은 fibronectin 수용체를 통해 세포로 들어간다(김성신, 2008).

*Pseudomonas aeruginosa* (녹농균)는 운동성이 있고 호기성이며 그람음성 간균이다. 건강한 사람의 정상 미생물에는 드물게 존재하며 물, 토양, 식물 등에 자연적으로 존재하는 미생물로서 싱크대, 배수관, 수도꼭지, 살균한지 24시간이 지난 균 등의 따뜻하고 습기 많은 환경에서 균의 증식이 이루어진다(김성신, 2008).

*Malassezia furfur* (*M. furfur*)는 병원성이 낮은 천지방성의 이상성 진균으로 정상 피부 모낭주위에서 발견되며 건강한 성인의 75 ~ 80%에서 발견된다(Janik 등, 2008; Ahn, 1998). 이 진균은 다양한 피부질환과 관계가 깊으며 특히 등, 목덜미 등의 피부에 상재하여 이상 증식 할 경우 비듬, 어루러기, 전풍, 지루성피부염, *Malassezia*모낭염, 아토피 피부염 유발 및 악화인자로 알려져 있다(위현승, 2011; Gupta 등, 2004; Gemmer 등, 2002). *Malassezia*모낭염의 경우 주로 체간에 호발하나 안면에서도 관찰되며 소양성의 면포, 구진, 농포를 형성하여 심상성 여드름과도 혼재되어 발생할 수 있다(유희준 등, 1998; Faergemann, 1997).

피부는 단순하게 외부를 보호하는 기능만 있는 것이 아니라 물리적, 화학적인 자극으로부터 보호하는 기능이 있으며 외부환경이나 기온 상태에 따라 체

온조절을 하고 노폐물이나 땀 등을 배설, 분비하는 기능을 가지고 있다. 또한 어떠한 물질들이 체액이나 세포내로 침투할 수 있도록 하며 피부에 도포되는 성분들이 모세혈관을 통해 피부에 침투하여 흡수될 수 있도록 하는 흡수 기능이 있다.

## 2. 기능성 화장품

### 1) 기능성 화장품의 정의

화장품의 어원은 그리스어 코스메티코스(cosmeticos)에서 유래되었다. 무질서와 혼돈의 의미인 카오스(chaos)의 반대 개념인 코스모스에서 유래된 것으로 질서 있는 체계와 조화로 “ 잘 정리하다 ”, “ 잘 감싼다 ”는 의미를 지닌다(안정림, 2004). 우리나라에서는 약사법에 화장품은 포함하여 다루고 있었으나 1999년 화장품법(1999. 9. 7. 법률 제6025호) 및 동법시행령(2000. 6. 27. 대통령령 제1686호)이 제정되었고 2000년 7월 1일부터 시행하게 되었다. 따라서 화장품법 제1장 총칙 제2조 1항의 화장품의 정의에서 보면 화장품을 법적으로 다음과 같이 정의하고 있다. “ 화장품 ” 이라 함은 인체를 청결, 미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부, 모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것을 말한다(화장품법, 국회법률지식정보시스템).

화장품은 「기능+a」로 효능과 효과가 강조되는 특별한 기능을 가진 “ 기능성화장품 ” 이라 함은 미백에 도움을 주는 제품, 피부주름 개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워 주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품으로 화장품법 제2조의 2항에 해당되는 것으로서 보건복지부령으로 정하는 화장품을 말한다(화장품법, 국회법률지식정보시스템). 기능성화장품은 영어로 “ 코스메디컬(Cosmedical)” 또는 “ 코스메슈티컬(Cosmeceutical) ” 등으로 불려지기도 하는데 코스메디컬이란 영어로 화장품을 의미하는 코스메틱(Cosmetic)과 의료를 의미하는 메디컬(Medical)이 합해져 만들어진 신조어이고 미국의 클리그만(Kligman)박사가 제안한 것으로 코스메슈티컬은 “ 코스메틱 ”에 약물을 의미하는 “ 파마슈티컬

(Pamaceutical) "의 합성어라 볼 수 있다(박외숙, 2010). 특별한 기능을 가진 화장품을 말하는 기능성 화장품의 정의는 국제적으로나 국내적으로 통일되어 있지는 않지만 개념을 종합하면 피부질환이 없는 건강한 사람이 피부의 상태를 건강하게 유지시켜 피부의 이상 및 노화를 지연시키거나 방지, 개선할 목적으로 사용되거나 신체의 불쾌감, 위화감 등을 방지하기 위해 사용되는 것으로 인체에 대한 작용이 완화된 화장품을 말한다(김영자, 2005).

최근의 기능성 화장품은 어느 정도 약리 작용을 가지고 피부 또는 모발의 구조나 기능에 영향을 주는 성분이 들어가는 것으로 약리 작용은 의약품에 비해서 비교적 적으면서 지속적으로 사용하여도 부작용은 없어야 한다. 국내에 출시된 기능성 화장품의 주요 성분을 보면 주로 미백과 주름 등에 역점을 두고 있으며 기능성 화장품의 원료가 되기 위한 조건으로는 피부에 대한 안전성이 보장되어야 하며 제형에 따른 안정성과 도포 후의 사용감이 우수해야 하고 제품에 대한 원료의 효능과 효과의 유효성이 우수해야 한다(장이섭, 2003).

## 2) 기능성 화장품산업 동향

우리나라 화장품산업은 2013년 화장품 시장규모는 7조 6,242억원으로 전년대비 8.6% 증가했으며 국내화장품 총생산액은 7조 9,721억원으로 전년대비 11.9%, 연평균 11.4% 증가했다. 수출은 1조 4,122억원으로 전년대비 17.5% 증가한 반면 수입은 1조 643억원으로 전년대비 3.4% 감소했다. 화장품 수출입 시장에서 뚜렷한 수출 성장세가 지속되었으며 소폭 감소한 수입이 맞물려 2013년 무역수지는 2012년 흑자전환 이후 3배 이상 증가했다. 이 수치는 최근 5년간 연평균 증가율인 11.4%를 웃도는 것으로 국내외에서 모두 양호한 성적을 거둔 결과로 분석된다. 화장품 유형별로는 기초화장용

제품류가 4조 5,180억원(56.7%)으로 1위를 차지하고 두발용 제품류가 1조 2,227억원(15.3%)으로 2위를 차지했다. 2013년 기능성화장품 생산액은 2조 5,638억원으로 전년대비 19.3% 증가했으며 전년대비 증가율이 가장 큰 유형은 복합유형으로 57.1% 증가했고 주름개선이 3.6% 증가했다. 반면 자외선차단 및 미백은 전년대비 각각 5.4%, 10.7% 감소한 것으로 나타났다. 2009년과 비교해서 복합유형 비중이 22.2% 증가했으며 연평균 증가율 또한 40.1%로 가장 높았다. 이는 각각의 기능성 제품을 따로 바르는 시간을 절약할 수 있어 바쁜 현대인에게 복합유형이 각광받고 있는 것으로 풀이된다(한국보건산업진흥원, 2014).

기능성 화장품의 심사제도의 도입은 기존의 약사법 적용 대상이었던 화장품이 2000년 7월 1일 화장품법이 재정되면서 기능성화장품 심사는 시작되었다. 식품의약품 안전처에서 발표한 2014년 기능성 화장품 심사 및 보고 현황을 살펴보면 복합기능성 화장품 품목 6,531건(51.5%), 주름개선 품목 1,142건(9.6%), 자외선차단 품목 1,060건(8.4%), 미백 품목 858건(6.8%)이다. 복합기능성 화장품의 증가는 최근 바쁜 현대인들의 수요가 증가하고 이중, 다중의 기능을 동시에 만족시키려는 소비자의 니즈(needs)가 반영된 것이라 할 수 있다. 다기능성 제품 중에서 미백, 주름개선, 자외선차단 등의 3가지 기능을 모두 가진 제품은 급증하여 2가지 기능을 가진 제품 개발 증가를 크게 앞질렀다. 이는 미백, 주름, 자외선차단 제품을 각각 따로 바르는 시간을 단축시킬 목적으로 개발된 “비비크림”이 기초화장품용도 뿐 아니라 색조화장품으로도 같이 사용할 수 있어 바쁜 현대인들에게 각광받고 있는데 따른 것으로 풀이된다(식품의약품안전처, 2014; 김 솔, 2012).

맑고 투명한 피부가 기준이 되면서 고기능성의 선호를 반영하는 제품 중 가장 활발하게 개발되고 있는 미백 소재 개발 동향을 살펴보면 미백원료는

흑화의 원인인 멜라닌의 생성경로에 따라 많은 연구가 진행되고 있으며 이의 기작별로 서로 다른 원료가 개발되고 있다. 즉 메커니즘별로 멜라닌 합성에 기여하는 tyrosinase의 활성을 억제하는 알부틴, 감초추출물, 닥나무추출물, LG106W, tyrosinase의 발현을 억제하는 malasoly, 멜라닌 합성 차단 기작을 하는 비타민C 및 그 유도체, coenzyme Q10, 생성된 멜라노솜이 각질 형성 세포로 이동되는 것을 차단하는 원료 등이 개발되었다. 미백 기능성 화장품에 응용되는 고시된 미백 기능성 소재로는 알부틴, 유용성 감초추출물, 닥나무 추출물 분말, 에틸아스코빌에텔, AA2G (Ascorbic Acid 2-Glucoside) 등이 대표적이다. 이외에도 국내 각사에서 독창적으로 개발된 기능성 미백 신소재로는 melanin swiching agent인 MS-135, 계피산 유도체인 멜라졸브, 속수자 추출물의 주성분을 이용한 피토클리어 EL-1을 개발했고 천연자원인 뽕나무의 어린가지인 상지를 이용해 제품화하고 있다. 최근 외국계 선진국에서는 thyramine을 이용한 칼슘신호 전달 방해와 타이로시나아제 저해 물질로 새로운 신호 전달 차단 경로의 미백 소재를 개발했다.

Table 1. List of functional cosmetic ingredients

원료명	특징	비고
알부틴(고시원료)	Tyrosinas활성 저해	
유용성감초(고시원료)	Tyrosinas활성 저해, 천연식물성 원료	항균, 항염, 면역증진
3-ethoxy-vitC (고시원료)	비타민C의 안정성, 피부흡수율 향상	보습
닥나무 추출물 (고시원료)	유효성분 Kazinol-F	태평양
피토클리어EL-1	멜라닌 합성 발현 유전자 발현 억제, 속수자추출물	LG생활건강
AA-2G	비타민C안정화	일본약용 화장품 원료
루시놀	전나무 성분 레조르신 유도체 Tyrosine과 Tyrosinas결합을 방해	Pola
멜라솔브	Tyrosinas발현억제	태평양
뽕나무추출물	유효성분 멀베린	코리아나
기타	젯산, 반하추출물 천궁추출물, 알로하이트, kojyl caffeate, 비타민 C-PMG, 상지추출물, 단풍나무 추출물	

출처 : 기능성화장품 기준 및 시험방법(식품의약품안전처고시 제2015-15호)

약용식물로부터 미백활성 소재를 탐색하고자 하는 연구결과는 국내의 많은 연구자들에 의해서 진행되고 있다. 그 결과 ellagic acid 및 flavonoid 계열의 화합물 이외에도 cinnamaldehyde, p-hydroxy benzoic acid, p-anicic acid 등도 활성이 있음이 확인되고 있다. 이들 화합물들은 tyrosinase 저해 활성 뿐만 아니라 온화한 자외선 흡수효과와 함께 항산화 활성 등이 강하여 종합적으로 미백활성을 나타내는 것으로 판단된다. 또한 최근에는 백출(Atractylodis rhizoma)로부터 selina란 물질을 분리하여 미백화장품 개발에 성공한 예가 있다(Kim 등, 2005).

최근에는 tyrosinase와 관련된 유전자 발현기작이 밝혀지면서 멜라노사이트 내에서의 특이적 유전자의 발현 조절과 관련된 미백소재의 연구가 급속히 발전하고 있다. 그중에서도 특히 TRP-1 (tyrosinase related protein-1, TRP-2 및 전사인자인 MITF (microphthalmia-associated transcription factor)를 조절하는 소재 개발이 활발히 전개되고 있다(유익동 등, 2005).

경기 침체로 다수의 소비재 시장이 어려움을 겪었음에도 국내화장품 시장은 성장세를 이어갔다. 이는 화장품이 필수 소비재로서 자리 잡고 있으며 소비자들의 가치 소비가 확대됨에 따른 것으로 분석 된다. 특히 투자 대비 고부가가치를 창출함으로써 향후 지속성장 가능한 산업분야로 손꼽히고 있다. 한편 기능성화장품들에 대한 소비자의 안전성 요구도가 커짐에 따라 천연에서 유래한 원료들을 이용한 각종 기능성화장품이 각광을 받고 있으며 향후 남녀노소에 무관하게 가격에 구애받지 않고 친환경 화장품에 대한 수요가 크게 증가할 것으로 전망한다(한국보건산업진흥원, 2014).

### 3. 잔나비결상버섯



Fig. 2. Image of *Elfvigia applanata* (EA)

잔나비결상은 다공균과 (Polyporaceae) 잔나비결상속 (*Elfvigia applanata*)에 속하는 담자균류이며 *Elfvigia applanata* (Per.) Karst는 기문종으로 우리나라에서는 전국적으로 고목이나 살아있는 활엽수에 자생하고 일본, 중국, 오스트레일리아 등 전 세계적으로 분포하고 있다.

형태는 갓은 너비 5 ~ 50cm 두께 5 ~ 15cm로 매년 성장하여 60cm에 달하는 것도 있으며 반원형 또는 말굽형 이다. 갓 표면은 각피로 덮여 있고

평활하나 환문과 방사상의 주름이 있고 회갈색과 회백색이며 종종 적갈색의 포자에 덮여 있다. 갓 둘레는 성장하는 동안은 백색이고 성숙하면 회갈색이 된다. 조직은 두께 1 ~ 5cm로 자흑색이고 코르크질이다. 자실층은 황백색과 백색이나 접촉하면 갈색으로 변한다. 관공은 여러 층이며 각 층의 두께는 1cm이다. 포자는 8 ~ 9×5 ~ 6 $\mu$ m로 난형이며 구조는 불로초형이고 포자문은 담황갈색이다(박완희, 한국약용버섯도감).

주로 여름에서 가을에 생육하는 고온성 다년생 버섯이며 민간에서는 주로 자실체를 말린 후 잘게 썰어 차로 음용하고 있다.

중국본초도록에서는 생약명을 수설(樹舌)이라 하여 맛은 약간 쓰고 성질은 평하다. 효능은 淸熱(청열), 消積(소적), 化痰(화담), 止痛(지통), 抗癌(항암) 효능이 있어 주로 인후암, 식도암 등의 치료에 사용된다. 하루 10~30g 물로 달여서 복용한다고 되어있다(중국본초도록).

주요 성분으로는 ganoderic acid, furano ganoderic acid 및 ganoderic acid 유도체인 methylganoderic A, P, ganoderic acid F, G, H, I(Nishitoba T 등, 1989)이 분리되었고 friedelin, alnusenone, ergosta-7, 22-dien-3-one, ergosta-7, 22-dien-3 $\beta$ -ol, fried oolean-5-en-3-one, ergosterol 및 palmitic acid(Protiva J 등, 1980)가 분리되었다.

잔나비결상 버섯을 이용한 선행 연구를 살펴보면 잔나비 결상버섯과 재배 영지버섯의 생리활성 기능의 탐색과 비교(김성훈, 1999), 잔나비결상 버섯 수용물질의 항바이러스 효과(임교환 등, 1999), 잔나비 결상 버섯 균사체의 항당뇨 효능 연구(김갑호 등, 2013), 한국산 잔나비결상 버섯추출물의 항종양 작용(임웅규 등, 1994) 등이 보고되어 있다. 대표적인 효능인 항종양성 관련 연구결과로는 Sarcoma 180 등의 동물 이식암에 탁월한 항종양활성을 나타낸 것으로 보고되어 있으며 64.9%의 종양저해률을 나타내었고 여기에

분리된 대표적인 다당류는 D-glucose만을 생성하는  $\beta$ -glucan (F1-1b-1) 으로 밝혀졌다(Miyazaki 등, 1982).

따라서 미생물인 버섯에서도 천연화장품의 원료로서의 생리활성을 가진 특정 물질의 탐색이 진행되고 있다. 버섯을 이용한 선행 연구로는 팽이버섯 추출물의 항산화 및 항염증 활성(강현우, 2012), 차가버섯 메탄올 추출물의 항산화 및 미백효과(국민희 등, 2013), 장수진흙버섯 균사체 배양 유색미의 이학적 특성 및 미백, 항산화 효과(김솔, 2012), 약용버섯 중 노루궁뎅이 버섯 열추출물의 항염증 효과(이춘복, 2012), 버섯류의 여드름균 항균활성에 관한 연구(이호영, 2012) 등의 생리활성물질에 대한 보고가 있다.

본 연구에서는 잔나비결상버섯이 민간요법으로는 사용하고 있지만 화장품산업이나 피부미용 분야에서의 연구는 미비한 실정으로 잔나비 결상 버섯의 각종 생리활성에 대하여 탐색하고 기능성 화장품소재 개발 및 화장품 산업화 기여에 도움을 주고자 항산화, 항염증, 미백, 항균 등의 생리활성을 평가하여 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성에 대하여 연구하였다.

### Ⅲ. 재료 및 방법

#### 1. 시약 및 기기

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)과 Phosphate-Buffered Saline (PBS), RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, Low Serum Growth Supplement는 Gibco/BRL (Eggenstein-Leopoldshafen, Germany)에서 구입하였고 MTT (CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide), Griess reagent system은 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide (LPS)와 2propanol, dimethyl sulfoxide (DMSO),  $\alpha$ -MSH, L-DOPA, arbutin, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu reagent은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 Real-time PCR을 위해 Applied Biosystems사에서 판매하는 Taqman Gene Expression Assay를 구입하여 유전자 발현을 확인하였다. p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, I $\kappa$ B- $\alpha$ , actin antibodies는 Cell Signaling Technology, Inc. (MA, USA)에서 구입하였다. Real-time PCR은 ABI7500 Applied Biosystems (Foster city, CA, USA)을 사용하였고 ELISA plate reader (Infinite® 200 PRO NanoQuant)는 Tecan (Mannedorf, Switzerland), 발광영상분석기 (Odyssey Fc) LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA)을 사용하였다.

## 2. 시료 제조

전남에서 수집된 시료를 구례 재래시장에서 구입하여 버섯 전문가인 전라남도 산림자원연구소 오득실박사의 자원 동정을 받아 사용하였다.

3차 증류수 300 ml에 잔나비 결상 버섯 시료 300 g을 넣고 2 시간 30 분 동안 2회 추출한 액을  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 건조시켜서 분말을 얻었다. 얻어진 분말의 무게를 확인하여 수율을 측정하였다.

## 3. 항산화 효과

### 1) DPPH 라디칼 소거 효과(항산화)

잔나비결상 버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거 효과 측정을 위해 control에는 추출물의 용매를 실험군에는 실험재료를 농도별 (0.001, 0.01, 0.05, 1, 5, 10 mg/ml)로 100  $\mu\text{l}$ 씩 각각 6개씩 spotting 했다. Control군과 실험군에는 각각 60  $\mu\text{M}$  DPPH를 첨가하고 blank에는 60  $\mu\text{M}$  DPPH대신 EtOH를 넣고 약 3초 정도 흔들어서 섞은 후 실온에서 30분간 방치하고 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정했다.

## 4. 항염증 효과

### 1) 세포배양

대식세포 계열인 RAW 264.7 세포를 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  incubator 조건하에서 10%

FBS, penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI-1640 배지에 배양하였으며 10 cm dish에 2 일 마다 분주하였다.

## 2) MTT-assay 분석

대식세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 하는 방법을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하자면 지수성장을 하는 세포들은 DMEM 배지에서  $2 \times 10^5$ /well의 밀도로 현탁 하였고 0, 0.01, 0.05, 0.1, 1 mg/ml의 농도로 잔나비결상 버섯을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

## 3) 일산화질소 (Nitric Oxide) 농도의 측정

Nitric Oxide는 유해물질, 화학적 자극, 세균감염 등과 같은 외부자극에 대해 생체조직의 방어반응의 하나로써 대식세포에 의해 활성화된다. 흔히 염증 반응이 일어났을 때 확인하는 지표로 사용된다. NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치한다. 세포들은 DMEM배지에서  $2 \times 10^5$ /well의 밀도로 분주하였다. 1시간 동안 잔나비결상 버섯을 전처리한 뒤 LPS를 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 세포 상층액을 따서 96-well plate에 loading한 후 100  $\mu$ l의 그리스 시약을 첨가하고 그 혼합물을

흡광도를 측정하였다. 흡광도는 스펙트로포토메터 (MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

#### 4) mRNA 발현측정

염증이 유발되게 되면 세포간 신호전달을 위해 pro-inflammatory cytokine을 분비하게 되는데 이러한 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6)의 발현을 유전자 레벨을 통해 확인하였다.

##### ① RNA추출

Total RNA는 TRIzol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 잔나비결상 버섯을 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후 원심분리를 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 TRIzol (invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100  $\mu$ l의 chloroform 용액을 가하고 두 세 번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 처리한 증류수를 15  $\mu$ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량 한다.

##### ② 정량적 중합효소반응

TRIzol로 추출한 RNA는 MML-V (Moloney murine leukemia virus) reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg)에 0.5 mg of oligo-(dT)을 넣고 70°C 에서 10

분간 변성시켰다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit MMLV reverse transcriptase을 첨가하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 증합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 ml, TaqMan Universal PCR Master Mix 10 ml (applied bio systems), Taqman gene (20X)- 1  $\mu$ l를 넣고 DEPC water로 최종 볼륨을 20  $\mu$ l로 맞추는 다음 PCR 조건으로 반응 시켰다.

PCR 조건은 92°C에서 30초, 60°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초를 40cycle로 하였다. 정량 증합 효소 반응에 쓰인 TaqMan gene은 <http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genomic-products/gene-expression.html>에서 검색하여 주문 후 사용하였다. 이용한 gene은 다음과 같다.

**Table 2. Taqman gene-specific probes**

gene name	assay ID	reporter dye
TNF	Mm00443258_m1	FAM
IL- $\beta$	Mm01336189_m1	FAM
IL-6	Mm00446190_m1	FAM
Hprt1	Mm00446968_m1	VIC-limited

### 5) Immunoblot 분석

잔나비결상버섯의 항염증 효과를 확인하기 위해 Western blot을 이용하여 세포내 염증신호전달 관련 MAP kinase 단백질들의 발현 정도를 분석하였다. 시료를 처리한 실험군과 대조군을 15분, 30분 배양 후 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, protease inhibitors (complete<sup>TM</sup>, Roche, Mannheim, Germany), 1

mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 50 mM NaF과 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)을 함유하는 완충제를 사용하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액을  $15,000 \times g$ 로  $4^\circ\text{C}$ 에서 30 분간 원심 분리하여 단백질만 포함하고 있는 상층액을 얻었다. 정량한 단백질 20  $\mu\text{g}$ 을 10% SDS-PAGE에 전기 영동시킨 후 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)으로 옮겼다. 그리고 membrane의 blocking은 5% BSA (bovine serum albumin)이 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS) 용액을 상온에서 2시간 동안 실시한 다음 1차 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG를 반응시키고 ECL (enhanced chemiluminescence) detection reagents (Millipore, MA, USA)를 사용하여 단백질의 발현정도를 확인하였다.

## 5. 미백효과 평가

### 1) Tyrosinase 활성억제 측정

Tyrosinase 활성억제 측정은 Martinez & Esparza (1998)의 방법을 사용하였다. 96 Well Microplate에 0.1M KPB ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.87 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.68 g in 3. DW 100 ml, pH 8.0) 50  $\mu\text{l}$ 씩을 Blank, Control, 양성대조물질인 KOJIC Acid와 잔나비결상 버섯추출물의 색보정을 위한 각각 4개의 Well에 넣고 기질액인 tyrosine (3 mg/10ml in 3. DW)을 50  $\mu\text{l}$ 를 가하였다. 그 후 Blank Well에 40  $\mu\text{l}$ 의 3차 증류수, Control Well에 20  $\mu\text{l}$ 의 3차 증류수, 색보정 Well에 각각 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 1 mg/ml 으로 희석시킨 시료 20  $\mu\text{l}$ 를 넣고 20  $\mu\text{l}$  (1 unit/ $\mu\text{l}$  in KPB)의 tyrosinase를 가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 10분간 반응시킨 다음 Ice Bath에서 반응을 중지시켰다. 그런 다음 ELISA (enzyme-linked

immunosorbent assay) Reader로 490 nm에서 OD값을 측정하여 tyrosinase 억제율(%)을 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 억제율(\%)} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100$$

- A : blank 시험액에서 얻은 흡광도
- B : 검액에서 얻은 흡광도
- C : 색보정액에서 얻은 흡광도

## 2) 세포주 및 세포 배양

B16F10 (KCLB 8008, Mouse Melanoma)는 한국 세포주 은행(Korean Cell Lines Bank)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 10% FBS와 1% 항생제 (Gentamycin)를 가한 DMEM 배지를 사용하였고 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 37°C로 배양하였다.

## 3) 세포의 생존을 측정을 위한 MTT-assay

Doyle et al.(1993)의 방법을 이용하여 다음과 같이 시행하였다. 일차적으로 배양한 B16F10 세포를  $4 \times 10^4$  cell/ml로 DMEM 배지에 희석한 다음 96 Well Microplate에 0.2 ml/well씩 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 37°C로 24시간 배양하였다.

그리고 B16F10에 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 mg/ml으로 희석하여 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양 후 배양액을 제거하고 2.5% Formazan 용액 50  $\mu$ l씩을 각 well에 분주하여 4시간 동안 반응시켜 제거한 다음 100  $\mu$ l의 DMSO를 가하여 Formazan 결정을 용해시켜서 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도 (Optical Density: OD)를 측정하여 세포생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{Absorbance of sample} - \text{blank}}{\text{Absorbance of control} - \text{blank}} \times 100$$

#### 4) Melanin 생성 억제 관찰

Melanin 생성억제 측정은 Hosei et al.(1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. 직경 6cm Petri Dish에  $1 \times 10^5$  Cell/Well로 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 잔나비결상 버섯추출물을 농도별로 처리하였고 양성대조물질로 KOJIC acid를 0.12 mg/ml를 가하여 3일간 배양하였다. 각 군당  $2 \times 10^6$  Cell/Well로 수거하여 Lysis Buffer (5 mM EDTA, 0.1 M PBS(pH 6.8), 0.1% Triton X-100)로 세포를 용해하였다. 원심 분리하여 얻은 세포 침전물은 알코올로 세척한 후 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액으로 90°C에서 1시간 용해하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) 세포내 tyrosinase activity 측정

B16F10 세포를 6 well plate에  $3 \times 10^4$  cells/well로 세포를 분주하여 24시간 동안 세포를 안정화 시킨 뒤에 KOJIC acid를 0.12 mg/ml과 잔나비결상 버섯을 농도별로 0.03, 0.06, 0.12, 0.25 mg/ml 처리를 하였고 1시간 뒤에  $\alpha$ -MSH를 100 nM이 되게 처리를 한 뒤에 72시간 동안 배양을 하였다. PBS로 2회 세척을 하고 RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) protein lysis buffer을 처리를 한 후에 4°C에서 30분 동안 incubation을 하였다. 그 후에 4°C에서 13000 rpm으로 30분 동안 원심분리를 통해 단백질이 든 상층액만을 가지고 tyrosinase activity를 측정하였다. 단백질 양을 Bradford 정량법을 통해 595 nm로 ELISA를 측정을 하고 동일한 단백질을 이용해서 L-DOPA를 처리를 하여 540 nm 흡광도로 세포내 tyrosinase activity를 측정하였다.

## 6. 항균활성 평가

### 1) 사용 균주

잔나비결상버섯 추출물을 7종의 동결 건조된 미생물 균주를 KCTC (Korean Collection for Type Cultures) 또는 ATCC (America Type Culture Collection)로 부터 분양 받아 Nutrient Agar (NA, Difco, USA) 또는 Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco, USA), Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, USA)에 접종하였다. 그 후 세균은 37℃, 진균은 25℃에서 균체의 집락이 보일 정도로 배양한 후 항균력 시험에 사용하였다. *Propionibacterium acnes*를 제외한 나머지 균주는 호기성 조건에서 배양하였으며 *Propionibacterium acnes*의 배양을 위하여 혐기성 파우치 (Anaerobic pouch, Difco, USA)를 사용하였다(Table 3).

**Table 3. List of microorganisms used for antimicrobial test**

사용 균주명	사용배지
<i>Escherichia coli</i> (KCTC2571)	Nutrient Agar
<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC1916)	Nutrient Agar
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	Nutrient Agar
<i>Propionibacterium acne</i> (ATCC 29399)	Brain Heart Infusion Agar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KCTC2513)	Nutrient Agar
<i>Candida albicans</i> (ATCC10231)	Potato Dextrose Agar
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC16404)	Potato Dextrose Agar

## 2) 최소저해농도시험 (Minimum Inhibition Concentration: MIC)

7종의 세균을 3가지의 액체배지에 접종하여 37°C 진탕배양기에서 18시간 배양하고 균체를 회수하여 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 후 균주 1 ml을 고체배지에 도말을 하고 37°C에 6시간배양을 하였다. 이 균주를 멸균한 지름 6.0 mm 원형 parper disc에 잔나비결상 버섯추출물을 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$ 으로 희석하여 흡수 시킨 후 petridish를 뒤집어 다른 균들의 침입을 막고 37°C에서 incubator에 18시간 배양을 하였다. 그 후 disc주위 inhibition 되는 농도를 확인하고 사진촬영을 수행하였다.

## 7. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균  $\pm$  표준편차 (mean  $\pm$  S.D.)로 나타내었으며 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용하여 일원변량분석 (One way ANOVA)을 실시하였다. 유의성이 있는 경우  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## IV. 실험 결과

### 1. 잔나비결상 버섯의 추출 시료 수율

추출 전 건조 시료와 동결건조가 완전히 진행된 시료를 대상으로 수득율을 비교한 결과 약 3.76%의 수득율을 보였다.

Table 4. Lyophilize yield of *Elfvigia applanata* (EA)

건조시료량(g)	동결건조 시료량(g)	수득율(%)
300.0	11.275	3.76

## 2. 잔나비결상 버섯의 항산화 효과

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는데 이것은 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 잔나비결상 버섯 추출물 시료의 항산화 효과를 검증하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 그 결과 0.001 mg/ml 농도에서  $10.6 \pm 6.4\%$ , 0.01 mg/ml 농도에서  $31.3 \pm 5.9\%$ , 0.05 mg/ml 농도에서  $47.3 \pm 3.7\%$ , 1 mg/ml 농도에서  $68.3 \pm 8.1\%$ , 5 mg/ml 농도에서  $81.6 \pm 5.3\%$ , 10 mg/ml 농도에서  $84.9 \pm 3.4\%$ 의 소거 활성이 있는 것을 확인할 수 있었으며 전체적으로 유의성 있게 농도 의존적으로 항산화효과가 나타났다 (Table 5, Fig. 3).

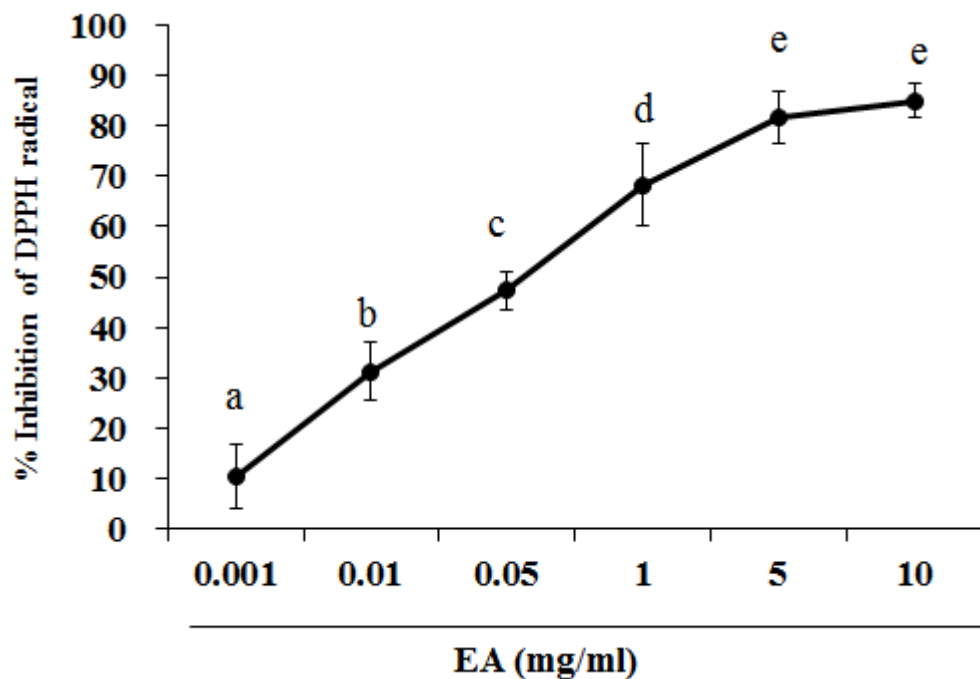
**Table 5. DPPH radical scavenging capacity of *Elfvigia applanata* (EA) extract**

**(A)**

	0.001 (mg/ml)	0.01 (mg/ml)	0.05 (mg/ml)	1 (mg/ml)	5 (mg/ml)	10 (mg/ml)
<i>EA</i> (inhibition %)	10.6±6.4	31.3±5.9	47.3±3.7	68.3±8.1	81.6±5.3	84.9±3.4

Extracts dissolved in ethanol was added to the reaction mixture containing DPPH radical at specific concentrations. After 30min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 517 nm respectively. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

(B)



**Fig 3.** The DPPH radical scavenging activity of aqueous extract of *Elfvincia applanata* (EA). Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

### 3. 잔나비겉상 버섯의 항염증 효과

#### 1) 세포생존율에 미치는 영향

어떤 화합물이나 혹은 식물에서 추출한 물질의 생명 활동을 조사하기 위한 전제조건으로서 세포 대사에 영향을 주지 않는지를 조사해보아야 한다. 잔나비겉상 버섯 추출물이 세포 생존율에 영향을 주는지를 검사하기 위해서 RAW 264.7 대식 세포에 잔나비겉상 버섯 추출물을 처리하고 세포 MTT 방법으로 생존율을 측정하였다.

잔나비겉상 버섯은 0.01 mg/ml 농도에서  $98.50 \pm 4.81\%$ , 0.05 mg/ml 농도에서  $99.19 \pm 2.97\%$ , 0.1 mg/ml 농도에서  $98.21 \pm 4.17\%$ , 1 mg/ml 농도에서  $99.42 \pm 4.13\%$ 의 생존율을 보였으며 세포 독성에 영향을 주지 않았다 (Table 6, Fig. 4).

**Table 6. Cell viability of *Elfvigia applanata* (EA) extract in Raw 264.7 cells**

(A)

	0 (mg/ml)	0.01 (mg/ml)	0.05 (mg/ml)	0.1 (mg/ml)	1 (mg/ml)
<i>EA</i> (% of control)	100±3.72	98.50±4.81	99.19±2.97	98.21±4.17	99.42±4.13

RAW 264.7 cells were incubated for 24 hrs in the presence or absence of *Elfvigia applanata* (EA) at indicated dose. Cell viability was evaluated by MTT assay as described in materials and methods. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

(B)

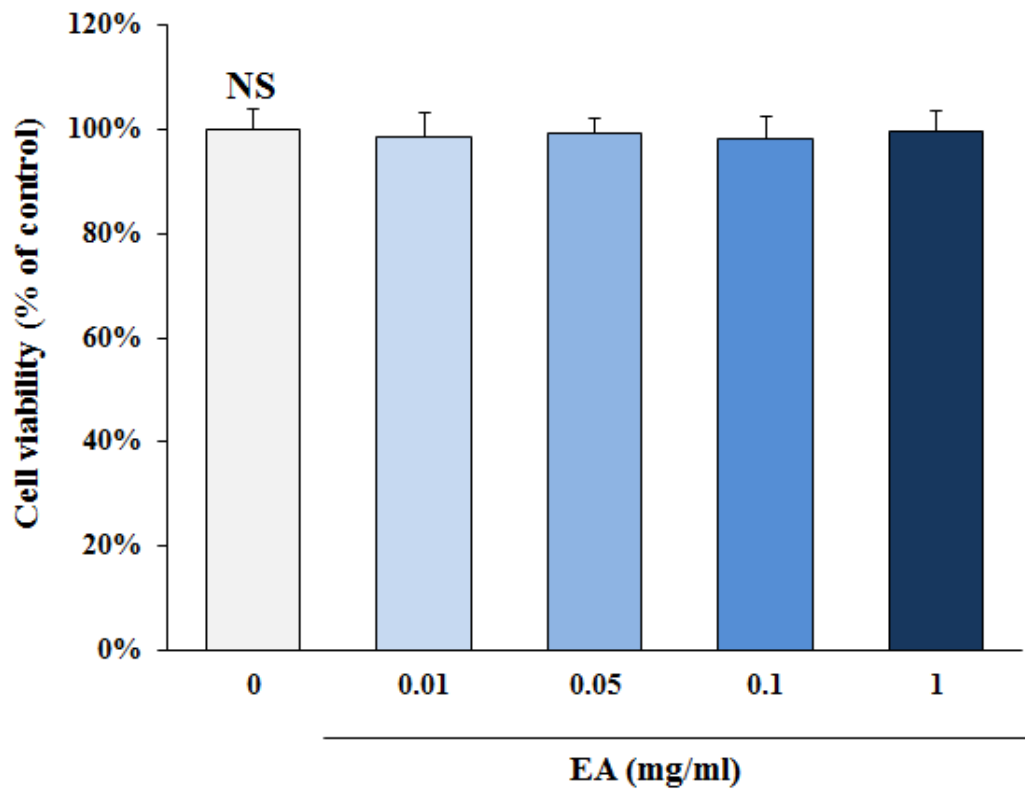


Fig. 4. Effect of *Elfvigia applanata* (EA) on cell viability in RAW 264.7 cells. NS : nonsignificant.

## 2) LPS로 유도한 NO 생성 억제 효과

Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로써 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포매개성 면역반응에 관여하는데 특히 대식세포가 LPS로 자극될 때 iNOS가 발현되어 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 한다고 알려져 있어 LPS로 유도한 NO생산에 있어서 잔나비결상 버섯 추출물의 효과를 검사하였다.

잔나비결상 버섯추출물을 전 처리한 군에서는 0.01 mg/ml 농도에서  $26.86 \pm 0.5\%$ , 0.05 mg/ml 농도에서  $22.74 \pm 0.2\%$ , 0.1 mg/ml 농도에서  $15.54 \pm 0.5\%$ , 1 mg/ml 농도에서  $8.26 \pm 0.2\%$ 로 나타났으며 LPS로 유도한 NO 생성량을 대부분 농도 의존적으로 억제하여 잔나비결상 버섯추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 저해함을 확인하였다(Table 7, Fig. 5).

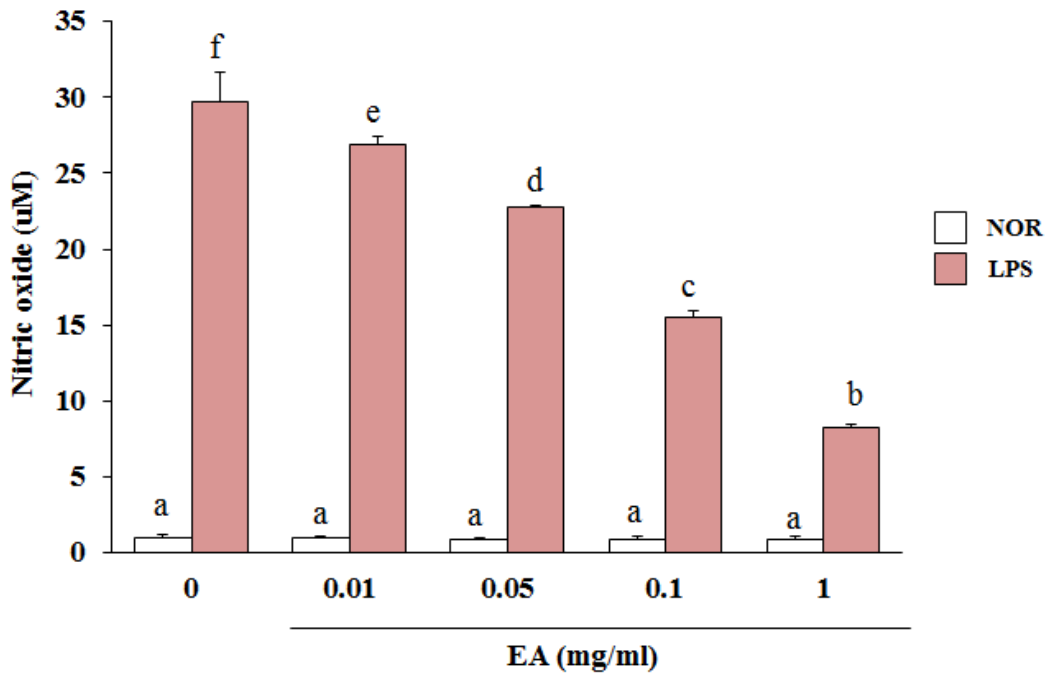
**Table 7. Nitric oxide production of *Elfvincia applanata* (EA) extract in Raw 264.7 cells**

(A)

	<i>Elfvincia applanata</i> (EA) extract				
	0 (mg/ml)	0.01 (mg/ml)	0.05 (mg/ml)	0.1 (mg/ml)	1 (mg/ml)
NOR	1.02±0.2	0.94±0.2	0.83±0.1	0.93±0.1	0.90±0.2
LPS	29.68±1.9	26.86±0.5	22.74±0.2	15.54±0.5	8.26±0.2

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of *Elfvincia applanata* (EA) for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

(B)



**Fig. 5.** Effect of *Elfvigia applanata* (EA) on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

### 3) 염증성 사이토카인 생성 억제 효과

활성화된 대식세포는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산하게 된다. 염증매개물질이 과량 생산되면 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다.

LPS로 유도한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성에 있어서 잔나비결상 버섯추출물의 억제 효과를 검증하기 위해 Real-Time PCR (ABI-7500)을 이용하여 염증 매개물질의 유전자 발현을 측정하였다. 먼저 대식세포에 잔나비결상 버섯을 농도별로 전 처리 한 뒤 LPS (500ng/ml)로 자극하여 16시간 뒤에 Trizol로 용해시켜 RNA를 추출하여 cDNA로 역전사 시켜 mRNA를 정량적 증합 효소 반응 방법을 이용하여 측정하였다.

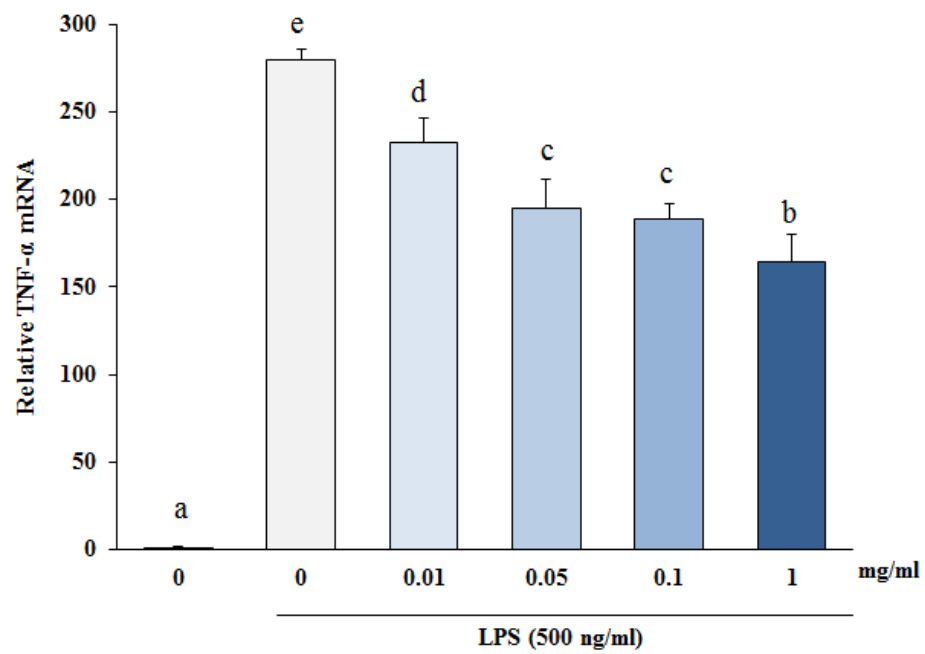
그 결과 0.01, 0.05, 0.1, 1 mg/ml 모든 농도에서 염증성 사이토카인 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6)들의 유전자 발현이 억제되는 것을 확인하였으며 잔나비결상 버섯추출물은 우수한 염증억제 효과를 기대할 수 있다(Table 8, Fig. 6).

**Table 8. Effect of *Elfvigia applanata* (EA) on LPS-induced TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$  (C) mRNA production in RAW 264.7 cells**

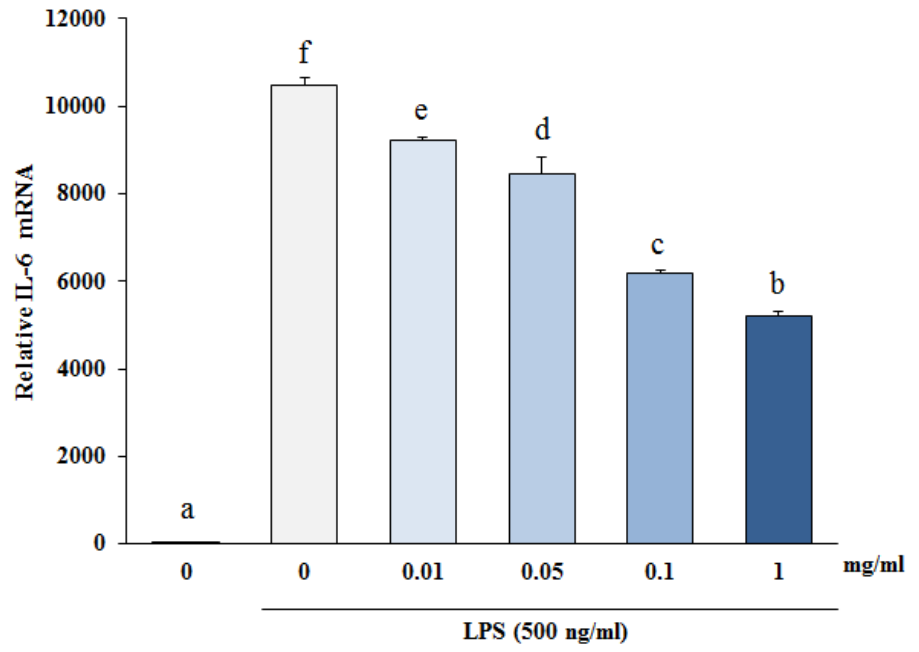
<i>EA</i>	LPS (500 ng/ml)					
	0 (mg/ml)	0 (mg/ml)	0.01 (mg/ml)	0.05 (mg/ml)	0.1 (mg/ml)	1 (mg/ml)
TNF- $\alpha$	1 $\pm$ 0.6	279 $\pm$ 6	232 $\pm$ 15	195 $\pm$ 17	189 $\pm$ 8	164 $\pm$ 15
IL-6	1 $\pm$ 0.2	10475 $\pm$ 177	9220 $\pm$ 56	8459 $\pm$ 368	6187 $\pm$ 60	5192 $\pm$ 122
IL-1 $\beta$	1.0 $\pm$ 0.2	5181 $\pm$ 95	3315 $\pm$ 138	3283 $\pm$ 188	3206 $\pm$ 211	1991 $\pm$ 84

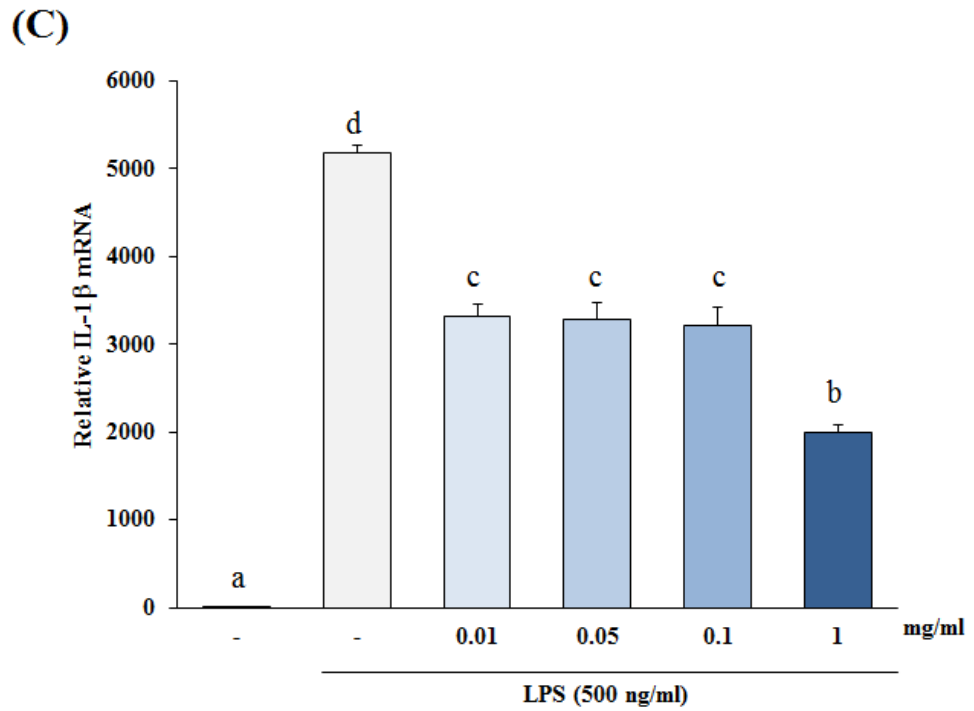
Cells were pretreated with indicated dose of *EA* for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 16 hours. Production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA was measured by Realtime-PCR. Data represent the mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

**(A)**



**(B)**

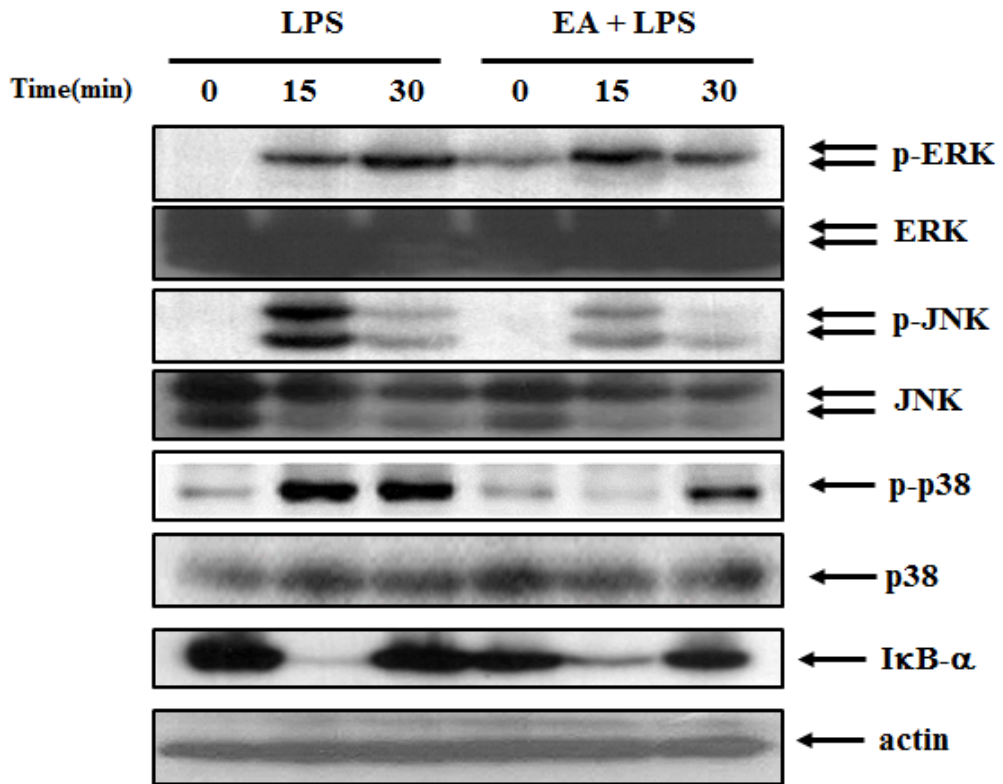




**Fig. 6. Effect of *Elfvigia applanata* (EA) on LPS-induced TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-1 $\beta$  (C) mRNA production in RAW 264.7 cells. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.**

#### 4) LPS로 유도된 염증성 MAP kinase 신호전달 억제

LPS는 MAP kinase를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비 한다. 잔나비겉상버섯이 MAP kinase 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 시료를 전처리하고 LPS로 자극한 대식세포에서 ERK, JNK, p38의 활성화 (phosphorylation)된 정도를 그리고 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해 정도를 조사하였다. NF- $\kappa$ B는 자극이 없는 상태에는 세포질에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 결합되어 존재한다. 하지만 활성화시킬수 있는 신호(ex LPS)가 존재하면 먼저 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 분해되고 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여 다양한 cytokine을 생산하게 된다. 따라서 NF- $\kappa$ B의 활성화는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해에 의존하게 된다. 그 결과 p-JNK, p-p38의 양이 잔나비겉상추 출물에서 15분, 30분 후에 감소되는 것을 확인할 수 있었고 p-ERK는 대조군보다 일찍 발현하였지만 시간이 지날수록 더욱더 감소되는 것을 확인할 수 있었다. I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 증가되어 LPS에 의한 염증성 신호전달을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).



**Fig. 7.** Effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract on the activation of MAP kinase on LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated of EA for 30 minutes before being incubated with LPS (500 ng/mL) for 15, 30 min. Equal amounts of protein (20  $\mu$ g) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with MAP kinase antibodies.

## 4. 잔나비겉상 버섯의 미백효과

### 1) Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase는 위와 같이 melanin 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며 melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase와 DOPA를 산화시켜 dopaquinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는데 key enzyme으로 작용한다. 따라서 tyrosinase의 활성 억제는 피부 내에서의 melanin 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있으므로 유용한 평가법으로 인정되고 있다. 이 때문에 잔나비겉상 버섯추출물의 미백 개선 효과를 평가하기 위하여 tyrosinase 활성 억제 효능을 평가하였다.

그 결과 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/ml 농도의 잔나비겉상 버섯추출물에서 동량의 KOJIC acid보다는 낮지만 tyrosinase 활성 억제 효과가 나타났다(Fig. 8). 수치는 Table 9에서 정리하였다.

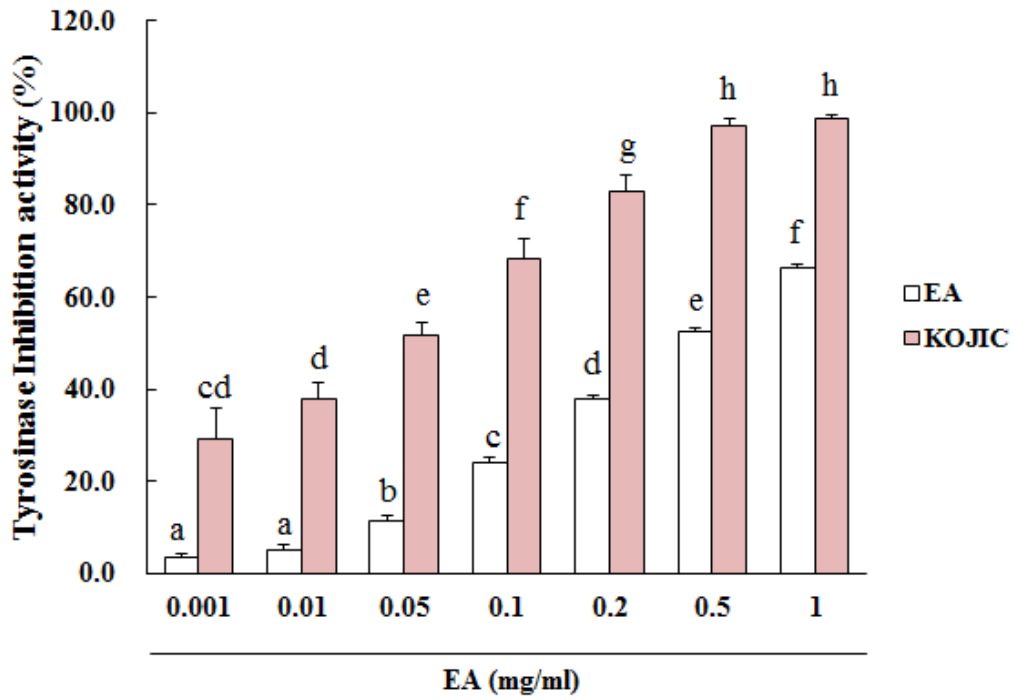
**Table 9. Mushroom tyrosinase inhibition activities of *Elfvigia applanata* (EA) extract**

(A)

	0.001 (mg/ml)	0.01 (mg/ml)	0.05 (mg/ml)	0.1 (mg/ml)	0.2 (mg/ml)	0.5 (mg/ml)	1 (mg/ml)
<i>EA</i> (inhibition %)	3.5±0.9	4.9±1.2	11.5±1.1	24.1±1.1	38.0±0.9	52.5±0.9	66.4±0.7
KOJIC acid (inhibition %)	29.1±6.7	37.7±3.6	51.7±2.8	68.1±4.6	82.8±3.7	97.1±1.5	98.7±0.9

Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

(B)



**Fig. 8.** Tyrosinase inhibition activities of *Elfvigia appplanata* (EA) and reference. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

## 2) 생존율에 미치는 영향

B16F10 세포에 잔나비결상 버섯추출물을 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 mg/ml으로 각각 처리한 결과 다음과 같은 세포생존율이 관찰되었다.

잔나비결상 버섯추출물의 세포생존율은 0.06 mg/ml 농도에서  $99\pm 0.94\%$ , 0.12 농도에서  $98\pm 2.57\%$ , 0.25 mg/ml 농도에서  $99\pm 2.48\%$ 로 세포독성이 관찰되지 않았지만 0.5 mg/ml 농도에서  $89\pm 2.06\%$ , 1 mg/ml 농도에서  $80\pm 0.50\%$ 로 세포독성이 나타나서 추후 미백기능실험은 0.25 mg/ml이하 농도에서 진행하였다(Table 10, Fig. 9).

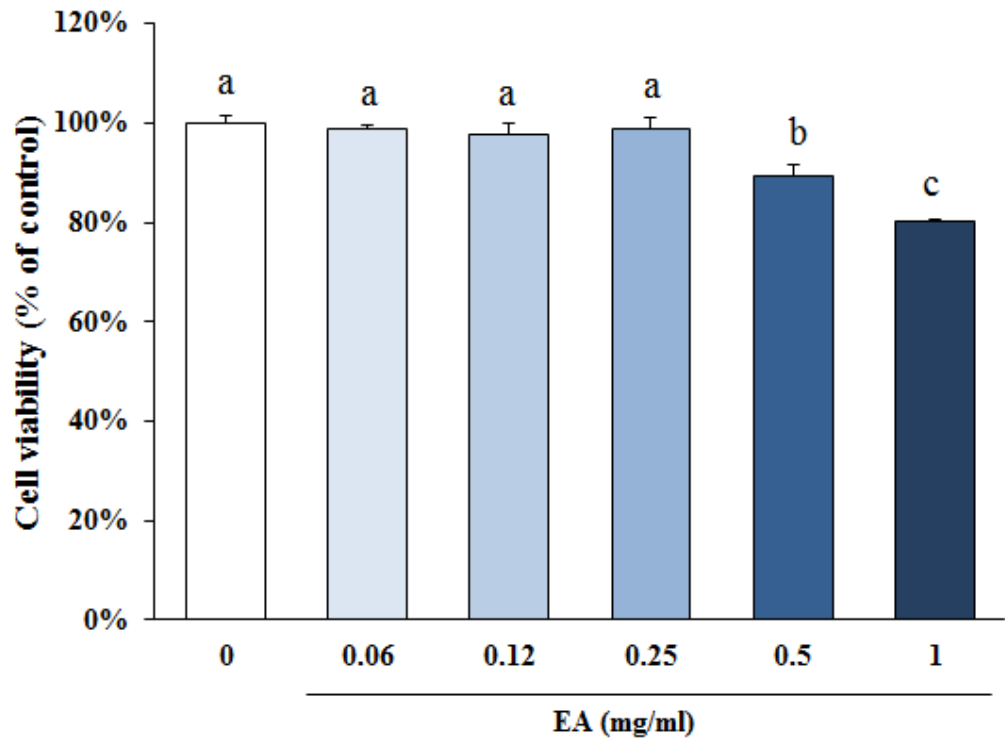
**Table 10. Cell viability of *Elfvincia applanata* (EA) extract in B16F10 cells**

(A)

	0 (mg/ml)	0.06 (mg/ml)	0.12 (mg/ml)	0.25 (mg/ml)	0.5 (mg/ml)	1 (mg/ml)
<i>EA</i> (% of control)	100±1.6	99±0.94	98±2.57	99±2.48	89±2.06	80±0.50

Cell viability was evaluated with the MTT assay. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

(B)



**Fig. 9.** Effect of *Elfvigia applanata* (EA) on cell viability in B16F10 cells. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

### 3) 멜라닌 합성 억제 효과

잔나비결상 버섯추출물의 멜라닌 합성량은  $\alpha$ -MSH를 단독으로 처리하였을 때 아무것도 처리하지 않은 군과 2.5배 정도 차이가 났다. 양성대조물질 KOJIC acid를 처리한 군에서는 많은 감소가 있었고 잔나비결상 버섯추출물은 0.03 mg/ml 농도에서 206 $\pm$ 3%, 0.06 mg/ml 농도에서 168 $\pm$ 1%, 0.12 mg/ml 농도에서 157 $\pm$ 6%, 0.25 mg/ml 농도에서 140 $\pm$ 1로 나타났다. 그 결과 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해되는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 KOJIC acid 0.12 mg/ml 농도에서 139 $\pm$ 1%와 잔나비결상 버섯추출물 0.12 mg/ml 농도에서 157 $\pm$ 6%를 비교하여서는 잔나비결상 버섯추출물이 덜 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Table 11, Fig. 10).

**Table 11. Melanin contents of *Elfvigia applanata* (EA) extract in B16F10 cells**

(A)

	-		$\alpha$ -MSH(100nM)				
	Con	$\alpha$ -MSH	KOJIC (0.12 mg/ml)	EA			
				0.03 (mg/ml)	0.06 (mg/ml)	0.12 (mg/ml)	0.25 (mg/ml)
% of control	100±2	263±2	139±1	206±3	168±1	157±6	140±1

Cells were treated with several concentrations of EA, KOJIC 100  $\mu$ g/ml and  $\alpha$ -MSH (100 nM) cultured for 72 hours. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

(B)

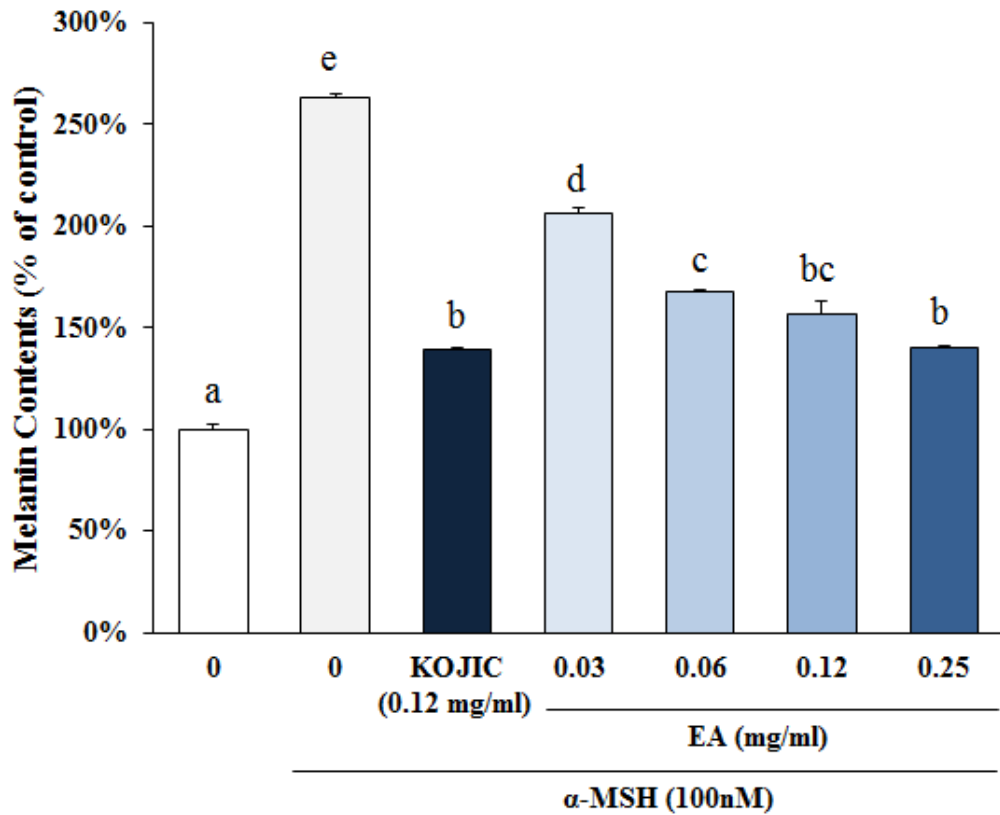


Fig. 10. The effect of *Elfvindingia applanata* (EA) on melanin contents in melanoma cells. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### 4) 세포내 tyrosinase 활성 억제 효과

Melanin 합성에는 tyrosinase가 결정적으로 관여한다고 알려져 있는데 melanoma 세포에서 잔나비결상 버섯이 tyrosinase의 활성을 저해시키는지 확인하여 보았다. 그 결과 0.03 mg/ml 농도에서  $135 \pm 0.01\%$ , 0.06 mg/ml 농도에서  $129 \pm 0.01\%$ , 0.12 mg/ml 농도에서  $126 \pm 0.01\%$ , 0.25 mg/ml 농도에서  $116 \pm 0.04$ 로 나타났다. melanin 함량과 비슷하게 잔나비결상 버섯추출물에서는 tyrosinase 활성억제효과를 볼 수 있었지만 양성대조군 KOJIC acid와 비교하여 tyrosinase 저해효과는 잔나비결상 버섯추출물이 덜 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Table 12, Fig. 11).

**Table 12. In vitro tyrosinase inhibition activities of *Elfvigia applanata* (EA) extract in B16F10 cells**

(A)

	α-MSH(100nM)						
	-						
	Con	α-MSH	KOJIC (0.12 mg/ml)	EA			
			0.03 (mg/ml)	0.06 (mg/ml)	0.12 (mg/ml)	0.25 (mg/ml)	
% of control	100±0.02	149±0.01	108±0.11	135±0.01	129±0.01	126±0.01	116±0.04

Cells were treated with several concentrations of EA, KOJIC acid 120 μg/ml and α-MSH (100 nM) cultured for 72 hours. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

(B)

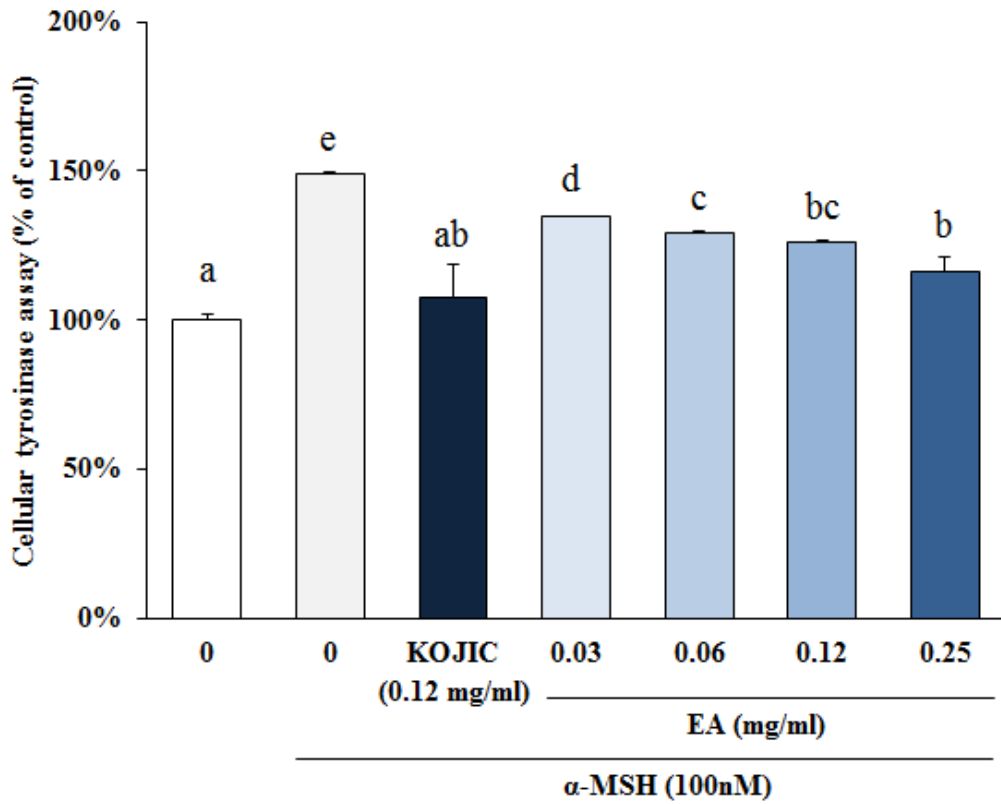


Fig. 11. Effect of *Elfvincia applanata* (EA)  $\alpha$ -MSH induced tyrosinase activity in melanoma cells. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

## 5. 피부 상재균주에 대한 항균 활성

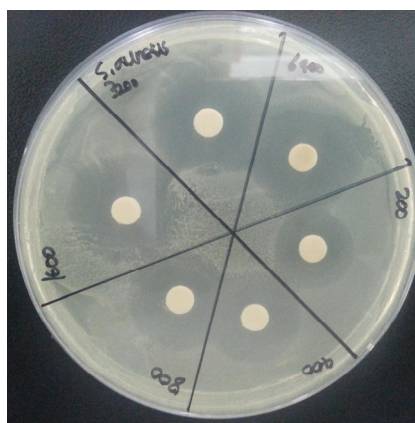
### 1) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)에 대한 항균력

대표적인 화농균으로 잔나비결상 버섯추출물을 배지에 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  으로 처리하였을 때 모든 농도에서 clear zone을 형성하였으며 균주의 성장을 억제하였다. 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 저 농도에서 항균활성이 관찰되었을 뿐만 아니라 농도가 증가 할수록 항균활성이 증가하는 것으로 나타나 *S. aureus* 균주에 대해 우수한 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다(Table 13, Fig. 12).

**Table 13. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Staphylococcus aureus***

Name of Microorganisms	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	200	400	800	1600	3200	6400
<i>S. aureus</i> (KCTC1916)	+	+	+	+	+	+

Data represent the mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.



**Fig. 12. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Staphylococcus aureus*.**

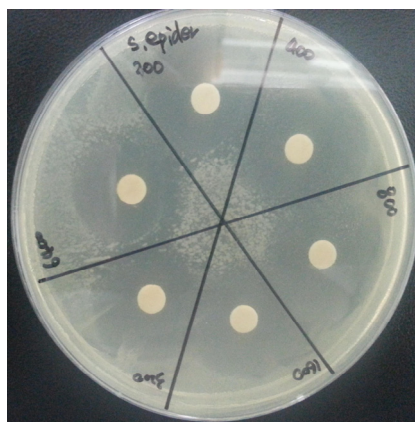
## 2) *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)에 대한 항균력

여드름 및 염증성 피부질환을 악화시키는 병원성 균주로 잔나비겉상 버섯추출물을 배지에 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  으로 처리하였을 때 모든 농도에서 clear zone을 형성하였으며 균주의 성장을 억제하였다. 200  $\mu\text{g/ml}$  의 저 농도에서 항균활성이 관찰되었을 뿐만 아니라 농도가 증가 할수록 항균 활성이 증가하는 것으로 나타나 *S. epidermidis* 균주에 대해 우수한 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다(Table 14, Fig. 13).

**Table 14. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Staphylococcus epidermidis***

Name of Microorganisms	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	200	400	800	1600	3200	6400
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	+	+	+	+	+	+

Data represent the mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.



**Fig. 13. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Staphylococcus epidermidis*.**

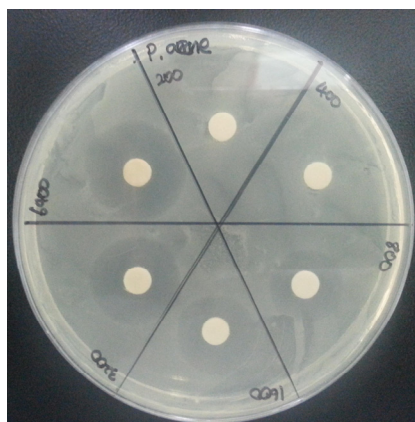
### 3) *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)에 대한 항균력

여드름 발생을 일으키는 대표적인 균주로 잔나비겉상 버섯추출물을 배지에 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  으로 처리하였을 때 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 clear zone을 형성하였으며 균주의 성장을 억제하였다. 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 항균활성이 관찰되었을 뿐만 아니라 농도가 증가 할수록 항균활성이 증가하는 것으로 나타나 *P. acnes* 균주에 대해 우수한 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다(Table 15, Fig. 14).

**Table 15. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Propionibacterium acnes***

Name of Microorganisms	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	200	400	800	1600	3200	6400
<i>P. acne</i> (ATCC 29399)	-	-	+	+	+	+

Data represent the mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.



**Fig. 14. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Propionibacterium acnes*.**

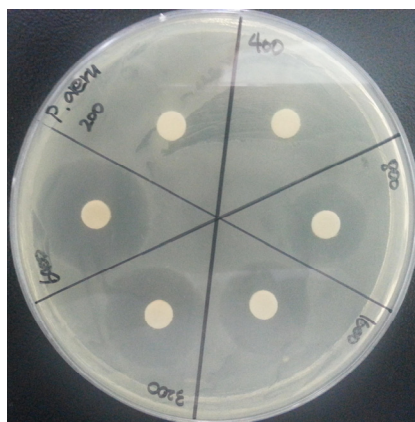
#### 4) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)에 대한 항균력

녹농균은 건강한 사람의 정상 미생물에는 드물게 존재하며, 자연적으로 존재하는 미생물로서 잔나비결상 버섯추출물을 배지에 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  으로 처리하였을 때 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 clear zone을 형성하였으며 균주의 성장을 억제하였다. 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 항균활성이 관찰되었을 뿐만 아니라 농도가 증가 할수록 항균활성이 증가하는 것으로 나타나 *P. aeruginosa* 균주에 대해 우수한 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다(Table 16, Fig. 15).

**Table 16. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Pseudomonas aeruginosa***

Name of Microorganisms	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	200	400	800	1600	3200	6400
<i>P. aeruginosa</i> (KCTC2513)	-	-	+	+	+	+

Data represent the mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.



**Fig. 15. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Pseudomonas aeruginosa*.**

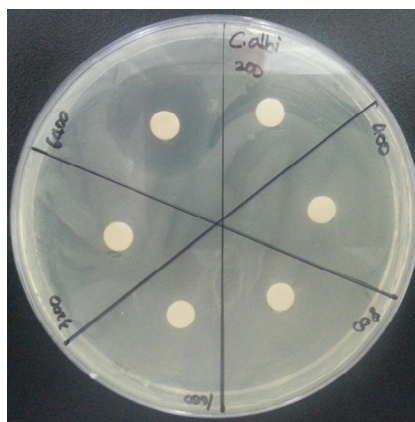
##### 5) *Candida albicans* (*C. albicans*)에 대한 항균력

점막에 관련이 있는 진균으로 잔나비결상 버섯추출물을 배지에 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  으로 처리하였을 때 6400  $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 clear zone을 형성하여 균주의 성장을 억제하였다. *C. albicans* 균주에서 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다(Table 17, Fig. 16).

**Table 17. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Candida albicans***

Name of Microorganisms	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	200	400	800	1600	3200	6400
<i>C. albicans</i> (ATCC10231)	-	-	-	-	-	+

Data represent the mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.



**Fig. 16. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Candida albicans*.**

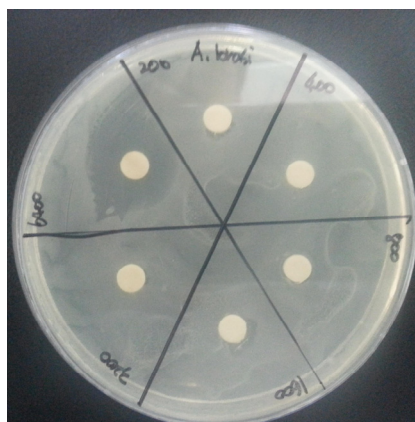
#### 6) *Aspergillus brasiliensis* (*A. brasiliensis*)에 대한 항균력

각막염의 발병에 관련이 있는 진균으로 잔나비결상 버섯추출물을 배지에 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  으로 처리하였을 때 6400  $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 clear zone을 형성하여 균주의 성장을 억제하였다. 이로써 *A. brasiliensis* 균주에 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다(Table 18, Fig. 17).

**Table 18. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Aspergillus brasiliensis***

Name of Microorganisms	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	200	400	800	1600	3200	6400
<i>A. brasiliensis</i> (ATCC16404)	-	-	-	-	-	+

Data represent the mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.



**Fig. 17. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Aspergillus brasiliensis*.**

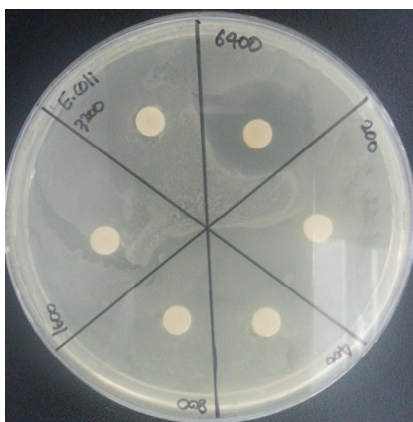
### 7) *Escherichia coli* (*E. coli*)에 대한 항균력

잔나비결상 버섯추출물을 배지에 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  으로 처리하였을 때 6400  $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 clear zone을 형성하여 균주의 성장을 억제하였다. 이로써 *E. coli* 균주에 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다 (Table 19, Fig. 18).

**Table 19. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Escherichia coli***

Name of Microorganisms	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	200	400	800	1600	3200	6400
<i>E. coli</i> (KCTC2571)	-	-	-	-	-	+

Data represent the mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.



**Fig. 18. The anti-bacterial effects of *Elfvigia applanata* (EA) extract for *Escherichia coli*.**

## VI. 고찰

최근 화장품의 원료로 주목을 받고 있는 소재는 피부에 문제를 일으키지 않고 자극성이 없는 성분이 포함된 한방소재나 천연물질을 이용하여 제조된 화장품이 인기를 얻고 있다(Aburjai T 등, 2003). 따라서 최근 천연물질을 이용한 화장품 개발의 중요성이 부각되어 식물뿐만 아니라 미생물인 버섯에서도 (국민희 등, 2013) 생리활성을 가진 특정 물질의 탐색이 진행되고 있다.

본 연구에서는 우리나라 뿐 만 아니라 전 세계적으로 분포하고 있는 잔나비겉상 버섯의 각종 생리활성에 대하여 탐색하고 잔나비겉상 버섯의 기능성 화장품소재 개발 및 화장품 산업화 기여에 도움을 주고자 항산화, 항염증, 미백, 항균 등의 생리활성을 평가하여 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성에 대하여 연구하였다.

일반적으로 자외선에 노출되거나 흡연, 정신적인 스트레스 또는 시간의 경과에 따라 우리 피부는 주름이 생기거나 탄력이 없어지며 피부가 느슨해지고 수분 보유량이 떨어지는 등의 현상을 겪게 된다. 피부가 이러한 현상을 겪게 되는 이유는 매우 다양하며 복잡하지만 대표적인 원인으로 자외선 등의 외부 영향 또는 자연적인 노화로 인한 피부 세포의 손상을 들 수 있다. 이 손상의 주 원인이 되는 물질이 프리라디칼 (Free radical)로 알려져 있고 잔나비겉상버섯 추출물이 프리라디칼에 미치는 영향을 확인하는 것이 피부 노화방지에 도움을 줄 것이라 항산화 효능을 탐색하였다. DPPH는 잘 알려진 항산화제 Marker로써 깊은 보라색으로 항산화력을 통해 분해되면 노란색으로 색깔이 변한다고 알려져 있다(Mark 등, 1997). 이러한 빛의 모니터링을 이용하여 산화능을 확인한 결과 잔나비겉상

버섯추출물의 농도 의존적으로 나타났으며 1 mg/ml 농도에서 약 68.3±8.1%, 5 mg/ml 농도에서 약 81.6±5.3%, 10 mg/ml 농도에서 약 84.9±3.4%의 소거 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험결과 국민희 등(2012) 차가버섯 메탄올 추출물은 고농도에서 소거 활성이 높았고 김솔(2012) 장수진흙버섯 균사체 배양 유색미의 이화학적 특성 및 미백, 항산화 효과, 강현우(2012) 팽이버섯 추출물의 항산화 및 항염증 활성 등은 본 실험결과와 유사하게 농도가 증가할수록 소거활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

면역학에서 염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응으로 면역세포가 세균이나 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식하면 면역세포가 활성화되고 활성화된 면역세포에서 염증의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다(Kundu 등, 2008). 또한 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로써 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데 특히 대식세포에 LPS로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다(Lee 등, 2000; Seo 등, 2000; Chiou 등, 2001; Seo 등, 2001). 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다.

대식세포는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 하며 NO, 염증관련 cytokines을 포함한 다양한 염증 매개물질을 조절한다(Iontcheva 등, 2004). 이 중 NO 형성은 외부 인자와 암세포를 죽이는데 효과적이지만 과도한 NO형성은 각종 염증 관련된 병의 유도과 조직의 손상, 유전자 변이를 통해 암의 발전에도 기여하는 것으로 알려져 있다(Stuehr 등, 1991; McCartney-Francis 등, 1993; Weisz 등, 1996). 이러한 사실에 기초하여 본 연구결과 잔나비결상 버섯 추출물이 세포 생존율에 영향을 주는지를 검사하기 위해서 RAW 264.7 대식 세포에 잔나비결상 버섯 추출물을 처리하고 세포 MTT 방법으로 생존율을 측정하였

다. 잔나비결상 버섯은 0.01 ~ 1 mg/ml 모든 농도에서 98% 이상의 생존율을 보였으며 세포 독성에 영향을 주지 않았다. 따라서 이춘복(2012) 약용버섯 중 노루궁뎅이 버섯 열수추출물의 항염증 효과에서는 90%이상, 강현우(2012) 팽이버섯 추출물의 항산화 및 항염증 활성에서는 1.0 mg/ml 이상에서 잔나비결상 버섯추출물과 유사한 결과를 보여 잔나비결상 버섯추출물의 안전성을 확인하여 여드름 피부, 예민피부 등의 기능성화장품 성분으로써 사용 가능성을 보였다.

Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로써 NO synthase (NOS)에 의해 L-argine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포매개성 면역반응에 관여하는데 특히 대식세포가 LPS로 자극될 때 iNOS가 발현되어 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 한다고 알려져 있어 LPS로 유도한 NO생산에 있어서 잔나비결상 버섯추출물의 효과를 검사하였다. 대식세포에 잔나비결상 버섯을 0.01 mg/ml ~ 1 mg/ml 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 각각에 LPS를 처리하였다. 잔나비결상 버섯추출물을 전 처리한 군에서는 LPS로 유도한 NO 생성량을 대부분 농도 의존적으로 억제하여 잔나비결상 버섯추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 저해함을 확인하였다. 따라서 강현우(2012) 팽이버섯추출물에서도 본 결과와 유사하게 농도 의존적으로 증가하여 NO의 생성 저해 활성을 확인하였다.

활성화된 대식세포는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산하게 된다. 염증매개물질이 과량 생산되면 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다. LPS로 유도한 TNF-

$\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성에 있어서 잔나비결상 버섯추출물의 억제 효과를 검증하기 위해 Real-Time PCR (ABI-7500)을 이용하여 염증 매개물질의 유전자 발현을 측정하였다. 먼저 대식세포에 잔나비결상 버섯을 농도별로 전처리 한 뒤 LPS로 자극하여 16시간 뒤에 Trizol로 용해시켜 RNA를 추출하여 cDNA로 역전사 시켜 mRNA를 정량적 증합 효소 반응 방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 염증성 사이토카인들의 유전자 발현이 억제되는 것을 확인하였으며 그 결과를 종합해 보면 잔나비결상 버섯추출물은 우수한 염증억제 효과를 기대할 수 있다. 잔나비결상 버섯추출물에 의한 염증관련 cytokine의 발현 억제는 NO 형성 억제와 유사한 경향을 나타냈다. 잔나비결상버섯 추출물은 대식세포에서 NO와 염증관련 cytokine의 생성 억제에 큰 효과가 있었으므로 이 결과를 토대로 LPS로 유도된 염증성 질환에 효과적으로 보일 것으로 보인다. LPS는 MAP kinase를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비 한다. 잔나비결상 버섯이 MAP kinase 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 시료를 전 처리하고 LPS로 자극한 대식세포에서 ERK, JNK, p38의 활성화(phosphorylation)된 정도를 그리고 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해 정도를 조사하였다. NF- $\kappa$ B는 자극이 없는 상태에는 세포질에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 결합되어 존재한다. 하지만 활성화 시킬 수 있는 신호(ex LPS)가 존재하면 먼저 I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 분해되고 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여 다양한 cytokine을 생산하게 된다. 따라서 NF- $\kappa$ B의 활성화는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해에 의존하게 된다. 그 결과 p-JNK, p-p38의 양이 잔나비결상추출물에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고 p-ERK는 대조군보다 일찍 발현하였지만 시간이 지날수록 더욱더 감소되는 것을 확인할 수 있었다. I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 증가되어 LPS에 의한 염증성 신호전달을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

잔나비결상 버섯추출물의 melanin 생성 억제효능 및 tyrosinase activity, cellular tyrosinase activity 측정하여 잔나비결상버섯이 미백효과가 있는지 확인

할 결과 B16F10 세포에 잔나비결상 버섯추출물을 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 mg/ml으로 각각 독성이 없는 농도에서 처리한 결과 잔나비결상 버섯추출물의 세포생존율은 0.25 mg/ml에서  $99\pm 2.48\%$ 로 세포독성이 관찰되지 않았지만 0.5 mg/ml에서  $89\pm 2.06\%$ , 1 mg/ml에서  $80\pm 0.50\%$ 로 세포독성이 나타나서 추후 미백기능실험은 0.25 mg/ml이하 농도에서 진행하였다.

멜라닌 합성이 0.03, 0.06, 0.12, 0.25 mg/ml 농도에서 유의성 있게 감소되는 것을 양성대조군인 KOJIC acid과 비교하여 확인할 수 있었으며 잔나비결상 버섯추출물에서 기존 미백효과가 잘 알려진 KOJIC acid와 비교하여 확인한 결과 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험 결과는 국민회 등 (2012) 차가버섯 메탄올 추출물과 유사하게 양성대조군인 KOJIC acid 보다는 덜 감소하였지만 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인 하였다.

잔나비결상 버섯추출물의 멜라닌 합성량은  $\alpha$ -MSH를 단독으로 처리하였을 때 아무것도 처리하지 않은 군과 2.5배 정도 차이가 났다. 양성대조물질을 처리한 군에서는 많은 감소가 있었고 잔나비결상 버섯추출물을 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해되는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 양성대조군과 비교하여서는 덜 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

Melanin 합성에는 tyrosinase가 결정적으로 관여한다고 알려져 있는데 melanoma 세포에서 잔나비결상 버섯이 tyrosinase의 활성을 저해시키는지를 확인하여 보았다. melanin 함량과 비슷하게 잔나비결상 버섯추출물에서는 tyrosinase 활성억제효과를 볼 수 있었지만 양성대조군과 비교하여 tyrosinase 저해효과는 잔나비결상 버섯추출물이 덜 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 현재 arbutin, kojic acid를 포함하는 많은 tyrosinase 저해제가 의약부외품과 기능성 화장품의 미백 원료로 광범위하게 사용되고 있으나 피부 안정성, 제형 안정성, 독성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다(Chun 등, 2002; Seo 등,

2003). 따라서 안전성이 높은 천연성분을 이용한 기능성 제품 개발이 요구되고 있으며(Park 등, 2013), 잔나비결상 버섯추출물이 이의 대안으로 사용할 수 있을 지 확인하였다.

이에 따라 잔나비결상 버섯추출물이 멜라닌 합성을 저해하는 것을 확인하였고 멜라닌 합성에 가장 중요한 단백질인 tyrosinase의 활성도가 잔나비결상 버섯 추출물을 처리함에 따라 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

화장품은 다양한 재료를 혼합하여 제조하는 특성이 있기 때문에 미생물로부터 오염이 되기 쉽다. 이를 예방하기 위해서 대부분 화장품에서는 합성 방부제를 사용하는데 파라벤류, 퀴터늄-15, 이미다졸리디닐우레아, 페녹시에탄올 등이 주로 사용되는 합성방부제이다(Yang 등, 2012; Lee 등, 2012; Kim 등, 2010). 그 중 파라옥시안식향산 에스테르인 파라벤은 진균류에 효과적이며 세균류에 대해서도 매우 넓은 항균스펙트럼을 갖고 있어 사용량 및 빈도가 가장 높다(Esposito 등, 2003; Steinberg 등, 1999; Steinberg, 2002). 하지만 합성방부제의 대부분은 피부에 자극을 줄 뿐만 아니라 알레르기과 같은 부작용을 유발, 환경호르몬으로서의 가능성, 내성균 유발 등과 같은 다양한 문제를 갖고 있다(Esposito 등, 2003; Vilaplana 등, 2000; Cooper 등, 1998; Bonnevie, 1940; Sarkany, 1960; Fisher, 1973). 본 연구를 통하여 실험에 사용된 균주는 공기 중에 흔히 존재하며 화장품의 주요 오염원이 될 수 있다.

여드름 발생의 주요 인자로서는 피지생성의 증가, 선낭상피 세포의 비정상적인 각화증 등의 원인으로 알려져 있다. 하지만 가장 결정적인 원인으로서는 만성 염증성 질환으로 세균에 의해 일어난다고 한다.

피부에 상재하며 기회병원성을 일으키는 대표적인 균주인 *Escherichia coli* (대장균, 그람음성균)와 *Pseudomonas aeruginosa* (녹농균, 그람음성균), *Staphylococcus aureus* (포도상구균, 그람양성균), *Staphylococcus epidermidis*

(표피포도상구균, 그람양성균), *Candida albicans* (효모, 진균) 및 *Aspergillus brasiliensis* (곰팡이균, 진균)를 사용하여 잔나비겉상 버섯추출물을 배지에 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  으로 처리하여 항균력을 확인하였다.

대표적인 화농균인 *S. aureus*와 여드름 및 염증성 피부질환을 악화시키는 병원성 균주인 *S. epidermidis*는 모든 농도에서 clear zone을 형성하였으며 균주의 성장을 억제하였다. 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 저 농도에서 항균활성이 관찰되었을 뿐만 아니라 농도가 증가 할수록 항균활성이 증가하는 것으로 나타나 *S. aureus*, *S. epidermidis* 균주에 대해 우수한 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다. 여드름 발생을 일으키는 대표적인 균주인 *P. acnes*, 녹농균으로 건강한 사람의 정상 미생물에는 드물게 존재하며 자연적으로 존재하는 미생물인 *P. aeruginosa*는 800, 1600, 3200, 6400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 clear zone을 형성하였으며 균주의 성장을 억제하였다. 800  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 항균활성이 관찰되었을 뿐만 아니라 농도가 증가 할수록 항균활성이 증가하는 것으로 나타나 *P. acnes* 균주에 대해 우수한 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다. *E. coli*, *C. albicans* 및 *A. brasiliensis*에서도 고농도 농도에서 항균활성을 나타내었다. 이는 잔나비겉상버섯 추출물이 천연 방부제로써 사용 가능성이 있음을 나타낸다.

버섯류는 대부분 항균활성을 가지고 있으며 많은 연구가 되어 있다. 특히 노루궁뎅이 버섯, 누에동충하초, 아가리쿠스버섯, 영지버섯 물 및 에탄올 추출물은 *P. acne* 균에 대한 항균력을 나타낸다고 이호영(2012)이 보고 하였으며 다른 버섯 중 항균활성 물질에 관한 연구로는 민태진 등(1995)이 국내산 버섯류 32종의 항진균활성 물질을 검색한 연구결과 수원그물버섯, 거친겉겉이그물버섯, 나팔버섯, 해면버섯, 주걱간버섯 및 석이버섯의 에탄올 추출물 그리고 큰낙엽버섯의 석유에테르 추출물이 효모에 대하여 활성을 보였다고 보고하였으며 애광대버섯, 거친겉겉이그물버섯, 나팔버섯, 해면버섯, 주걱간버섯, 큰낙엽버섯 및 석이버섯의 에탄

을 추출물과 석유에테르 추출물은 곰팡이에 대하여 항균활성을 나타냈다고 밝혔다. 이에 본 연구에서는 잔나비결상 버섯추출물은 피부상재 균주에서 저농도에서 부터 우수한 항균력이 있어 화장품 소재로서 지속적으로 연구를 진행할 필요성이 있다.

상기의 전반적인 생리활성 탐색 결과 잔나비결상 버섯추출물은 다양한 생리활성 효과가 있음을 확인할 수 있었으며 잔나비결상 버섯추출물은 항산화, 항염증, 미백, 항균효과를 가지는 것으로 확인되어 기능성화장품소재로서 가능성이 있음을 알 수 있었다. 향후 잔나비결상 버섯추출물의 어떠한 성분이 이런 특정 생리활성에 작용하는지에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 하겠다.

## 참 고 문 헌

1. 2014년 기능성화장품 심사 및 보고현황 통계, 식품의약품안전처
2. 2014년 화장품산업분석보고서, 한국보건산업진흥원
3. Aburjai T and Natsheh FM(2003). Plants used in cosmetics. *Phytother. Res*, 17:987-1000
4. Ahn YG, Kim SK, Shin CS and Min JH(2002). Inhibitory effects of wax gourd extract on melanin formation and acne-forming bacterial growth. *Korean Journal of Food And Nutrition*, 15:137-143
5. Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB and Ichihashi M(2012). Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *Journal of Investigative Dermatology*, 132:1222-1229
6. Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD and Balcwin AS(2003). A nucleosomal function for I kappa B kinase-alpha in NF-kappaB-dependunt gene expression. *Nature*, 423:659-663
7. Athman R and Rhilpott D(2004). Innate immunity via toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol*, 7:32-25
8. Balk RA(2000). Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin* 16:179 - 192
9. Beinke S and Ley SC(2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J*, 382:409-393
10. Bentley NJ, Eisen T and Goding CR(1994). Melanocyte-specific

expression of the human tyrosinase promoter: Activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Molecular and Cellular Biology*, 14:7996-8006

11. Bonnevie P(1940). Overfølsomhed for acetylparaoxybenzoat (Mycoten), *Nordisk Medicin*, 6:684
12. Bradford MM(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254
13. Brown SK, Shalita AR(1998). Acne vulgaris, *Lancet*, 351:1871-1876
14. Brun-Buisson C(2000). The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 26(Suppl 1):S64 - S74
15. Burton JL and Shuster S(1971). The relationship between seborrhea and acne vulgaris. *The British journal of dermatology*, 84:600-604
16. Burton JL, Shuster S(2004). The relationship between seborrhea and acne vulgaris. *Br J Dermatol*, 84:600-601
17. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF(2001). Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*, 69: 625-635
18. Cho W, Nam JW, Kang HJ, Windono T, Seo EK and Lee KT(2009). Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- $\kappa$ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *International immunopharmacology*, 9:1049-1057
19. Choi GP, Chung BH, Lee DI, Lee HY, Lee JH and Kim JD(2002). Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme

- from medicinal plants. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 10:399-402
20. Chu AC(1995). Sebum excretion retinoid, 41:2-5
  21. Chun HJ, Choi WH, Baek SH and Woo WH(2002). Effect of quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte cells. Korean Journal of Pharmacognosy, 33:245-251
  22. Cooper SM and Shaw S(1998). Allergic contact dermatitis from parabens in a tar shampoo. Contact Dermatitis, 39(3):140
  23. Cunliffe WJ, Holland DB and Jeremy A(2004). Comedone formation: Etiology, clinical presentation and treatment. Clinics in Dermatology, 22:367-374
  24. Esposito E, Bortolotti F, Nastruzzi C, Menegatti E, Cortesi R(2003). Diffusion of preservatives from topical dosage forms: A comparative study. J. Cosmet. Sci, 54:239-50
  25. Faergemann J(1997). Pityrosporum yeasts-what's new? Mycoses, 40(1):24-32
  26. Feldmann M, Brennan FM and Maini RN(1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annual review of immunology, 14:397-440
  27. Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP and Liew FY(1999). Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages : Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. Journal of

immunology, 163:6403-6412

28. Fisher AA(1973). The paraben paradox. *Cutis*, 12:830
29. Gemmer CM, DeAngelis YM, Theelen B, Boekhout T, Dawson TL(2002). Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J Clin Microbiol*, 40:3350-3357
30. Glauser MP(1996). The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs* 52(Suppl 2):9 - 17
31. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr(2004). Skin disease associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol*, 51:785-798
32. Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T and Fisher DE(1998). MAP kinase links the transcription factor microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, 391:298-301
33. Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A and Van Dyke TE(2004). Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infection and immunity*, 72:2312-2320
34. Ito S and Wakamatsu K(2003). Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice and other animals: A comparative review. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 16:523-531
35. Jeon YS, Jung YJ, Youm JK, Kim YK and Kim SN(2013). Inhibitory effect of *Endarachne binghamiae* extract on melanin synthesis. *Korean*

Journal of Plant Resources, 26:526–532

36. Jeong KH, Park WB, Kim HW, Choi EC and Kim BK(1992). Studies on antitumor components of the cultured mycelia of interspecific protoplast fusant F-2 of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma applanatum*. *The Korean Journal of Mycology*, 20(4):324–336
37. Jeong SS, Eo SK, Kim YS, Han SS(1999). Anti-influenza virus activity of water soluble substance from *Elfvigia applanata* alone and in combinations with interferons. *Yakhak Hoeji*, 43(4):469–473
38. Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano JA, Garcia-Borron JC(1994). A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J Biol Chem*, 269(27):17993–8000
39. Jung HK, Jang JH, Ko JH, Kang BM, Yeo JH, Cho JH, Cho HW, Bean CG, Kim SC and Jung WS(2014). Whitening and anti-wrinkle effects of Korean native *Dendrobium moniliforme* methanol extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 22:331–338
40. Jung SK and Lee KW(2012). Industrial Status of Oriental Medicine Cosmetics. *Food Science and Industry*(Vol.45 No.2)
41. Kearney JK, Harnby D, Gowland G(1999). The follicular distribution and abundance of resident bacteria on human skin. *J Gen Microbiol*, 130:797–801
42. Ki HG, Yun SJ, Lee JB, Kim SJ, Lee SC and Won YH(2005). Microorganism isolated from acne and their antibiotic susceptibility.

Korean Journal of Dermatology, 43:871-875

43. Kim CT, Chang YH, Lee SH, Kang SJ and Cho WG(2005) New whitening agent : Selina-4(14), 7(11)-dien-8-one. J Soc. Cosmet Scientists Korea, 31(1):17-23
44. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC and Byun SH(2009). Antiinflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. Korea Journal of Herbology, 24:47-39
45. Kim JD(1999). A study of the treatment and prevention of acne and skin care. Kor Soci Cosmet, 1:101-118
46. Kim KD, Kim SJ(2007). Studies on the antimicrobial effects of herbal extracts and it's cosmetic application. J. Kor Soc Cosmet, 13:221-227
47. Kim KH, Son DH, Lee JS, Lee JW, Kim HS, Lee JH, Lee MC, Kim NS and Song SW(2013). Anti-Diabetic Studies of Mass Cultured Mycelia from Ganoderma applanatum in db/db Mice and Human. Korean Journal of Food and Nutrition, 26(3):366-374
48. Kim NY and Lee HY(2015). Effect of antioxidant and skin whitening of ethanol extracts from ultrasonic pretreated *Abeliophyllum distichum* Nakai. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 23:155-160
49. Kim SY, Won DH and Park SN(2010). Antibacterial activity and component analysis of *Persicaria perfoliata* extracts. Kor.J. Microbiol. Biotechnol, 38:278-82
50. Kim TH, Kim JM, Baek JM, Kim TW, Kim DJ, Park JH and Choe M(2011). Antioxidant and whitening effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb

- water extract. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 19:177-184
51. Kim YS, Kang JK, Lee CK and Han SS(1994). Effect of *Elfvina* *applanata* extract on the acute toxicity in mice. *Yakhak Hoeji*, 38(6): 756-762
  52. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P and Kubler W(1999). Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 19:1623-1629
  53. Kundu JK, Surh YJ(2008). Inflammation: gearing the journey to cancer, *Mutat Res*, 659:15 - 30
  54. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW(2000). Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol*, 406: 301-309
  55. Lee JY, Lee JN, Lee GT and Lee KK(2012). Development of antimicrobial plant extracts and its application to cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 38:171-9
  56. Lee SY and Seo HS(2007). The Effects of Sulfur extract on Anti-Inflammation and Anti-Propionibacterium acnes. *The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, 20(2):68-76
  57. Lee TS(1990). The full list of recoded mushroom in korea. *kor. J. Mycol*, 18:223-259
  58. Li P, Sun M, Wohland T, Ho B, Ding JL(2006). The molecular

- mechanism of interaction between sushi peptide and *Pseudomonas* endotoxin. *Cell Mol Immunol*, 3:21-28
59. Liu JJ and Fisher DE(2010). Lighting a path to pigmentation: Mechanisms of MITF induction by UV. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23:741-745
  60. Mark SM Alger(1997). *polymer science dictionary*. Springer, p.152
  61. Masferrer J, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isacson PC and Seibert K(1994). Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:3228-3232
  62. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF and Wahl SM(1993). Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*, 178:749-754
  63. Melish ME(1982). Staphylococci, streptococci and the skin. *Semin Dermatol*, 1:101
  64. Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R, Miller SA, Wankamatsu K, Zmudzka BZ, Ito S, Smuda C, Passeron T, Choi W, Batzer J, Yamaguchi Y, Beer JZ and Hearing VJ(2006). Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 20:2-13
  65. Miyazaki T and Nishijima M(1982). Structural examination of an alkali-extracted, water-soluble heteroglycan of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr. Res*, 109: 290

66. Moncada S and Higgs EA(1991). Endogenous nitric oxide : physiology pathology and clinical relevance. European journal of clinical investigation, 21:361-374
67. Nishitoba T, Goto S, Sato H and Sakamura S(1988). Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. Phytochemistry, 28(1):193
68. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY(1999). Inhibition of tyrosinase by green tea components. Journal of Life Sciences, 65:241-246
69. Olivares C and Solano F(2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. Pigment Cell and Melanoma Research, 22:750-760
70. Park EY, Lee SH and Kim YC(2013). Whitening efficacy of water-soluble extracts from *Prunophora salicina*'s (*Daeseokjosaeng*, Purplekin, Formosa) peel. Journal of Investigative Cosmetology, 9:27-32
71. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M and Gilchrest BA(2009). Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. Cellular and Molecular Life Sciences, 66:1493-1506
72. Park WH(1991). Colored fungi of Korea. 374. Kyohak Publishing Co. Seoul
73. Perry AL, Lambert PA(2006). *Propionibacterium acnes*. Lett Appl Microbiol, 42(3):185-8
74. Rym KH, Eo SK, Kim YS, Lee CK and Han SS(1999). Antiviral activity of water soluble substance from *Elfvigia applanata*. Anti-influenza virus activity of water soluble substance from E. Korean

Journal pharmacognosy, 43(4):469-473

75. Sarkany L(1960). Contact dermatitis from pafaben, J. Dermatol, 72(10):345
76. Schiaffino MV(2010). Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 42:1094-1104
77. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC(1998). Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. Exp dermatol, 7:81-96
78. Seiberg M(2001). Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. Pigment Cell and Melanoma Research, 14:236-242
79. Seo SY, Sharma VK and Sharma N(2003). Mushroom tyrosinase: Recent prospects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:2837-2853
80. Seo SY(2001). Screeing of tyrosinase inhibitors from oriental herbs. Korean Journal of Plant Resources, 14:32-37
81. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT(2001). The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophage. J Ethnopharmacol, 76: 119-123
82. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT (2000). Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- and lipopolysaccharide.

Gen Pharmacol, 35: 21-28

83. Seong KY and Park TS(2012). Weed occurrence according to the density of water foxtail in No-tillage seeding rice paddy fields. Korean Journal Weed Science, 32(3):280-284
84. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S and Wortsman J(2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Physiological Reviews, 84:1155-1228
85. Sohn HY, kim YS, Kum EJ, Kwon YS, Son KH(2006). Screening of anti-acne activity of natural products against Propionibacterium acnes. Kor J Microbial Biotechnol, 34(3):265-272
86. Steinberg D et al(1999). The effect of parabens in a mouthwash and incorporated into a sustained release varnish on salivary bacteria, J. Dentistry, 27(2):101
87. Steinberg D(2002). Frequency of use of preservatives 2001. Cosmet. Toil, 117(4):41
88. Stuehr HJ, Kwon NS, Weise M and Nathan C(1991). Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN- containing flavoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88:7773-7777
89. Takeda K, Kaisho T and Akira S(2003). Toll-like receptors. Annual Review of Immunology, 21:335-376
90. Thody AJ and Graham A(1998). Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? Pigment Cell and Melanoma Research, 11:265-274

91. Usui T, Iwasaki Y, Mizuno T, Tanaka M, Shinkai. K. and Arakawa, M(1983). Isolation and characterization of antitumor active  $\beta$ -D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. Carbohydrate research, 115(1):273
92. Vilaplana J and Romaguera C(2000). Contact dermatitis from parabens used as preservatives in eyedrops, Contact Dermatiti, 43(4):248
93. Weisz A, Cicatiello I and Esumi H(1996). Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. Biochemistry Journal, 316:209-215
94. Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T and Huez G(1996). Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. Journal of Inflammation, 46:1-12
95. Willoughby DA(1975). Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. Annals of the Rheumatic Diseases, 34:471-478
96. Woo HS, Choi HJ, Han HS, Park JH, Son JH, An BJ, Son GM and Choi C(2009). Isolation of polyphenol from Green Tea by HPLC and its physiological activities. Korean Journal of Food Science Technology, 35: 1199-1203.
97. Wu M, Hemesath TJ, Takemoto CM, Horstmann MA, Wells AG, Price ER, Fisher DZ and Fisher DE(2000). C-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the

- essential melanocyte factor *Mi*. *Genes Dev*, 14(3):301-312
98. Yamaguchi Y, Brenner M and Hearing VJ(2007). The regulation of skin pigmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 282:27557-27561
99. Yang HG, Kim HJ, Kim HS and Park SN(2012). Antioxidative and antibacterial activities of *Artemisia princeps* Pampanini extracts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*, 40:250-60
100. Yang SY and Boo HO(2013). Phenolic compounds, antimicrobial effects and tyrosinase inhibition activities of cucumber grown greenhouse according to cultivars and growth stages. *Korean Journal of Plant Resources*, 26:645-651
101. 강현우(2012). 팽이버섯 추출물의 항산화 및 항염증 활성. *한국식품영양과학회지*, 41(8),1072-1078
102. 고희정, 권대순, 김근형, 김봉인, 박상진, 이근광, 전연숙, 한경아(2002). 화장품학. 정문각
103. 국민희, 김동하, 이찬, 정은선, 최은재, 이재성, 이태수(2013). 차가버섯 메탄올 추출물의 항산화 및 미백효과. *한국버섯학회지*, 11(2):00-106
104. 기능성화장품 기준 및 시험방법. *식품의약품안전처고시 제2015-15호*
105. 김갑호, 손달훈, 이준석, 이정운, 김학수, 이재현, 이문철, 김남식, 송시환 (2013). 잔나비결상 버섯 균사체의 항당뇨 효능 연구. *한국식품영양과학회지*, 26(3), 366-374
106. 김경영, 배유경, 이은주, 김수미, 김은애, 안선례(2013). 에센스 화장품학. 메디시언
107. 김명숙(2012). 피부관리학. 현문사
108. 김문주, 김윤정, 이연희, 이화정, 최성임, 최숙경, 황해정(2009). 미용인을

위한 피부과학. 도서출판 예림

109. 김성훈(1999). 잔나비결상 버섯과 재배 영지버섯의 생리활성 기능의 탐색 및 비교. 강원대학교 대학원 박사학위논문
110. 김솔(2012). 장수진흙버섯 균사체 배양 유색미의 이학적 특성 및 미백, 항산화 효과. 전남대학교 대학원 식품공학과 석사학위 논문
111. 김영자(2005). 기능성화장품 사용에 따른 만족도와 제품에 대한 신뢰성 연구-다기능성 화장품을 중심으로-. 중앙대학교 의약식품대학원 석사학위논문
112. 김현숙(2011). 마누카 오일의 항균활성과 여드름 개선 효과, 건국대학교 산업대학원 석사학위논문
113. 대한피부과학회지(1994). 교과서 편찬회. 여문각
114. 민태진, 김은미, 이선정, 배강규(1995). 버섯 중 항균물질의 검색 및 개발에 관한 연구. 한국균학회지, 23(1):14-27
115. 박완희(1999). 한국약용버섯도감. 교학사. 429
116. 박외숙(2010). 화장품과학. 자유아카데미
117. 안정림(2004). 기능성화장품의 정의와 동향. 대한화장품학회 5차 심포지움. 대한화장품학회, 23(1), p39
118. 오수정(2011). 노근 추출물의 생리활성물질 탐색 및 피부미백개선효과. 광주여자대학교 대학원 박사학위논문
119. 위현승(2011). 말라세지아 효모균에 대한 light emitting diode의 항진균 효과. 전남대학교 대학원 의학과 석사학위논문, p3
120. 유민정, 이숙영, 차영주(2012). 노루발풀 추출물의 In vitro에서의 항산화, 항염증 및 항히스타민 활성. 한국미용학회지, 제18권 제3호, pp538-544
121. 유익동, 김종평, 김원곤, 윤봉식, 유연자(2005). 천연물 유래 항산화 기능

- 성 화장품 신소재 개발. 대한화장품학회지, 31(4) : 349-357
122. 유희준, 김윤석, 양홍윤(1998). 스테로이드 여드름과 여드름양 발진에서 *Malassezia(Pityrosporum)* 호모균의 출현빈도. 대한의진균학회지, 3:24-32
  123. 이선숙, 임지영, 한영숙(2012). 연잎 추출물의 여드름 피부 개선 효과. 대한피부미용학회지, 10(2), 405-413
  124. 이정숙(2012) 접골목 에탄올추출물의 항산화, 항균 및 미백 효과 탐색. 원광대학교 대학원 박사학위논문
  125. 이춘복(2012) 약용버섯 중 노루궁뎅이 버섯 열추출물의 항염증효과. 한국조리학회지, 19(4); 233-242
  126. 이호영(2012). 버섯류의 여드름균 항균활성에 관한 연구. 대구한의대학교 한방산업대학원. 석사학위논문
  127. 임교환, 어성국, 김영소, 이종길, 한성순(1999). 잔나비겉상 버섯 수용물질의 항바이러스 효과. 생약학회지, 30(1); 25-33
  128. 임응규, 이창규(1994). 한국산 잔나비겉상 버섯 추출물의 항종양 작용. 서울대농학연구지, 19(1); pp1-13
  129. 장이섭(2003). 기능성화장품연구동향. KFDA 심포지움. 태평양기술연구원
  130. 정은진, 최태부(2014). 화장품소재로서 강황 추출물과 커큐민의 생리활성 특성 연구. 대한피부미용학회지, 12(3); 425-433
  131. 중국본초도록. 상무인서관. 3권 17면; 1008
  132. 최광호(2004). 피부와 피부미용. 신원문화사
  133. 최민화(2013). 기능성화장품소재로서 명아주 추출물의 미백효과탐색. 원광대학교 대학원 박사학위논문
  134. 최응호(2000). The Journal of skin Barrier Research: 여드름과 피부장벽. 피부장벽학회, 42

135. 최호영(2004). 미생물학. 아카데미서적, pp496-498
136. 표피의 구조와 분화(2009). 한국피부장벽학회, 11권. 1호; pp3-12
137. 하병조(2010). 화장품학. 수문사
138. 화장품법 제2조 2항. 국회법률지식정보시스템, <http://likmsassembly.go.kr>

# ABSTRACT

## Bioactive compounds and functional cosmetic ingredients of *Elfvincia applanata*

Lee, Myeong Sim

Department of Food & Nutrition

The Graduate School of

Sungshin Women's University

*Elfvincia applanata* (*EA*) is widely distributed around the world, including in Korea. Recent studies have reported anti-cancer, anti-diabetic activity, and is also known immuno-modulating effect of *EA*, but other biological activities are unknown.

In this study, we identified biological activities of *EA*, such as anti-inflammatory, antioxidant, whitening and antimicrobial effects. Firstly, *EA* reduced the LPS-induced nitric oxide (NO) production in the macrophage cell line RAW 264.7. Expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  were reduced at the mRNA levels in a concentration-dependent manner of *EA*. DPPH free radical scavenging activity of *EA* has also showed the antioxidant effects. In comparison to untreated group, Melanin contents and tyrosinase activity have been inhibited by *EA* in a dose-dependent manner.

Microorganisms (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acne*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) were treated with water extract of *EA* and showed strong antimicrobial effect in *S. aureus*, *S. epidermidis*.

These results indicated that antioxidant, whitening, anti-inflammatory, anti-microbial effects of *EA* and suggest its applicability to functional cosmetic ingredients.