

캄보디아인 상황버섯 추출물의 주름개선 효과 연구

천순주 · 장민정 · 장영아 · 최은영 · 전동하 · 김영훈¹ · 조우아² · 정연숙³ · 권혁범⁴ · 김태훈⁵ · 최경임⁶ · 도정룡⁷ · 이창언
이진태*

대구한의대학교 화장품약리학과, ¹(주)메디웨이코리아, ²남부대학교 향장미용학부, ³일본국립의약품식품위생연구소, ⁴바이오길드
⁵대구한의대학교 한약제약리학과, ⁶대구보건대학 뷰티코디네이션과, ⁷한국식품연구원

Received October 1, 2008 / Accepted December 24, 2008

Anti-wrinkle Effect of Cambodian *Phellinus linteus* Extracts. Soon-Ju Cheon, Min-Jung Jang, Young-Ah Jang, Eun-Young Choi, Dong-Ha Jun, Young-Hun Kim¹, Woo-A Cho², Yeon-Sook Jeong³, Hyeok-Bum Kwon⁴, Tae-Hoon Kim⁵, Kyung-Im Choi⁶, Jeong-Ryong Do⁷, Chang-Eon Lee and Jin-Tae Lee*. Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, ¹Mediway Korea Co., Ltd, ²Department of Cosmetology Science, Nambu University, ³National Institute of Health Sciences, Japan, ⁴BioGuild, ⁵Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, ⁶Department of Beauty Coordination, Daegu Health Collage, ⁷Korea Food Research Institute - The skin of human is constantly being exposed to environmental irritants such as ultraviolet, smoke and chemicals. These irritants cause free radicals and reactive oxygen species which leave serious damages on the cells of skin. The water and ethanol extracts of Cambodian *Phellinus linteus* were investigated for the activities of anti-lipid peroxidation and anti-wrinkle effects to apply as a functional ingredient for cosmetic products. As the result of evaluation of liquid oxidation rate by add Fe²⁺ and Cu²⁺ to Cambodian *Phellinus linteus* extracts, Cambodian *Phellinus linteus* ethanol extracts were higher than Cambodian *Phellinus linteus* water extracts in the chelating ability of Fe²⁺ and Cu²⁺. The Cambodian *Phellinus linteus* ethanol extracts exhibited that anti-lipid peroxidation higher than butylated hydroxytoluene (BHT) at the concentration of 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml and 1 mg/ml. Cambodian *Phellinus linteus* water and ethanol extracts showed a higher inhibitory effect on Fe²⁺-induced lipid peroxidation compared to Cu²⁺-induced lipid peroxidation. In the case of anti-wrinkle effect, the elastase inhibition activity of Cambodian *Phellinus linteus* ethanol extracts was 50.7%, and it is higher than urosolic acid at the concentration of 0.01 mg/ml. Also, in collagenase inhibition activity, Cambodian *Phellinus linteus* water extract showed low effect, but Cambodian *Phellinus linteus* ethanol extract was about 50% at a 0.1 mg/ml. concentration. These results proved that Cambodian *Phellinus linteus* had anti-lipid peroxidation and anti-wrinkle effect. Therefore, Cambodian *Phellinus linteus* could be useful as an anti-wrinkle cosmetic ingredient.

Key words : Cambodian *Phellinus linteus*, TBARS, elastase, collagenase

서론

노화란 세포와 신체 조직 전 기관에 걸쳐 일어나는 기능적, 구조적, 생화학적 변화라 할 수 있다. 인간의 피부는 시간이 지남에 따라 호르몬 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 활성이 저하되어 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되어 생기는 내인성 노화(intrinsic aging)와 외적으로 오염된 공기와 약물, 자외선에 의한 광노화(photo aging)에 의해 피부가 얇아지며, 주름이 증가되고, 탄력이 감소될 뿐만 아니라, 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하게 된다[7,9].

진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 버섯으로는 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*), 말뚝진흙버섯(*P. igniarius*), 마른진흙버섯(*P. gilvus*), 낙엽진흙버섯(*P. pini*), 참진흙버섯(*P. contiguus*), 녹슨

진흙버섯(*P. ferruginosus*), *P. baumi*, *P. hartigii*, *P. punctatus*, *P. ribis*, *P. rimosus* 등의 다수가 존재하고 있는데, *Phellinus linteus*가 이들 중 가장 항암활성이 높은 것으로 보고되고 있다[10].

상황버섯은 항암력이 뛰어난 버섯으로 소비자의 관심이 고조되고 있다. Ji 등[11]은 상황버섯 추출물의 항돌연변이원성과 암세포에 대한 세포독성 효과를 규명 및 대장암과 방광암 등의 원인효소인 장내세균 유해효소 저해효과[13] 등 상황버섯의 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 상황버섯의 열수 추출물이 B세포기능을 증가시키고[15], 상황버섯에서 추출된 다당체가 체액성 및 세포성 면역반응을 항진시킨다[14]는 연구 보고도 있어 민간에서 많이 사용되고 있다. 현재까지 상황버섯에 대한 항암활성, 항산화 미백활성에 관한보고는 많이 있으나 피부주름개선에 대한보고는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 캄보디아인 상황버섯을 이용하여 지방산패도 억제 및 주름개선 효과를 살펴보기 위하여 화장품 산업에의 기능성소재로 개발하기 위한 기초자료로 이용하고자 한다.

*Corresponding author

Tel : +82-53-819-1430, Fax : +82-53-819-1430

E-mail : jtlee@dhu.ac.kr

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 상황버섯은 캄보디아산으로 (주)바이오길드로부터 구입하여 사용하였다.

시료 추출

시료의 추출은 다음과 같이 추출하였다. 즉, 열수 추출물의 경우, 상황버섯에 10배 양의 증류수를 첨가하여 80°C에서 3시간 환류 냉각 추출하였으며, 에탄올 추출물의 경우 70% 에탄올에 침지하여 상온에서 24시간 방치하여 추출하였다. 각 추출물을 원심 분리하여 상층액을 취하는 과정을 3회 반복하였으며, 상층액을 감압 농축하여 동결 건조 후 본 실험의 시료로 사용하였다.

Fish oil emulsion 조제

지방산패 억제능 실험에 사용하는 oil emulsion은 실험직전에 만들었으며, 미리 pH 6.5로 보정한 0.1 M maleic acid buffer 8 ml를 넣은 다음 0.05 ml의 유화제인 tween-20 0.05 ml와 0.25 ml의 fish oil을 넣고 15분간 교반하였다. 이 후 KOH 2 g을 넣고 150 ml까지 정제수를 가한 후 교반하면서 2 N HCl로 pH 6.5가 되도록 조제하여 사용하였다.

Fe²⁺ 또는 Cu²⁺의 첨가에 따른 지방산패 억제능 측정

산화 촉진제인 Fe²⁺ 또는 Cu²⁺의 첨가에 따른 지방산패 억제능 측정은 Buege와 Aust의 방법[2]에 따라 측정하였다. Oil emulsion 0.5 ml와 시료 0.1 ml 및 50 ppm의 Fe²⁺ 또는 Cu²⁺ 이온용액 0.1 ml가 포함된 혼합물이 채워진 시험관을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 2 ml의 TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 끓인 다음 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 상층액을 흡광도 531 nm 에서 측정하였다. Fe²⁺ 또는 Cu²⁺의 첨가에 따른 지방산패 억제능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Elastase 저해 활성 측정

Porcine pancreas elastase 저해 활성 측정은 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 30분간 p-nitroanilide의 생성량을 측정하였다[3]. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.1 ml씩 시험관에 취하고 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 elastase, pancreatic solution, Type I : From Porcine Pancreas (0.6 units/ml)용액 0.05 ml를 가한 후 기질로 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide (1 mg/ml)을 0.1 ml 첨가하여 30분간 반응시켜 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 Wūnsh [19] 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg (0.3 mg/ml)를 녹인 기질액 0.25 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/ml) 0.15 ml를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 ml을 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 ml을 첨가하여 상등액을 320 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

통계 처리

본 연구는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 실험한 결과로 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중 검증법(DMRT: Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

지방산패 억제능 측정 확인

TBARS (2-thiobarbituric acid reactive substance)는 불포화 지방산이 자동산화하는 과정 중 지방산화의 2차 산물인 malonaldehyde (MDA)가 발생하며, 이는 높은 반응성을 가지고 있다. 이러한 malonaldehyde (MDA)는 2-thiobarbituric acid (TBA)시약과 반응하는 주된 물질이며, 531 nm에서 분홍빛광을 갖는 물질을 만든다. 생체 내에서 세포막에 존재하는 인지질 및 당지질과 혈관에 존재하는 지질은 산소와 결합하여 과산화물을 만들고 이들의 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성하여 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발하기도 하며, 세포의 노화와도 관련이 있는 것으로 알려져 있다[4,17].

이러한 지방산패의 억제능을 측정하기위해 산화촉진제인 Fe²⁺, Cu²⁺이온첨가에 따른 지방산패 억제능 측정 결과를 Fig. 1과 2에 나타내었다. 상황버섯 열수 추출물의 경우 산화촉진제인 Fe²⁺에 대한 지방산패 억제능을 측정한 결과 0.5 mg/ml의 농도에서 57%를 나타내었으며, 상황버섯 에탄올 추출물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 85%의 지방산패 억제능을 나타내었다. 또한, Cu²⁺이온첨가에 의한 지방산패 억제능을 측정한 결과 0.1 mg/ml의 농도에서 상황버섯 열수 추출물이 10% 미만의 낮은 지방산패 억제능을 나타내었으나 상황버섯 에탄올 추출물 0.1 mg/ml 농도에서 69.4%의 높은 억제능을 나타내었다.

이는 대조군 butylated hydroxytoluene (BHT)와 비교하였을 때 매우 우수한 결과를 나타내었다. 산화촉진제인 Fe²⁺ 또

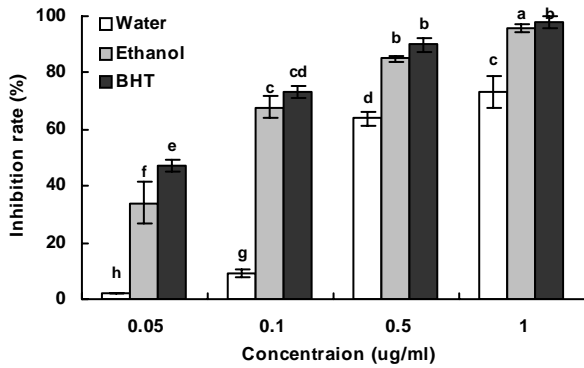


Fig. 1. Effect of Cambodian *Phellinus linteus* extracts on lipid oxidation in the presence of ferrous ion (Fe²⁺). Water: Cambodian *Phellinus linteus* with water extract, Ethanol: Cambodian *Phellinus linteus* with ethanol extract, BHT: Butylated hydroxytoluene. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

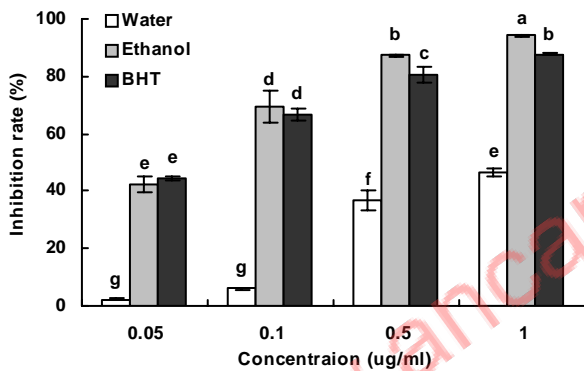


Fig. 2. Effect of Cambodian *Phellinus linteus* extracts on lipid oxidation in the presence of copper ion (Cu²⁺). Water: Cambodian *Phellinus linteus* with water extract, Ethanol: Cambodian *Phellinus linteus* with ethanol extract, BHT: Butylated hydroxytoluene. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

는 Cu²⁺이온첨가에 따른 지방산패 억제능을 측정된 결과, Cu²⁺이온보다는 Fe²⁺에 대한 지방산패 억제능이 더 우수했으며 상황버섯 열수 추출물보다 상황버섯 에탄올 추출물의 지방산패 억제능이 우수함을 알 수 있었다.

Elastase 저해 활성 측정 확인

인체의 중성구 과립구 내에 존재하는 elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는데 중요한 기질 단백질인 elastin을 분해하는 효소이며, 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 따라서 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내며[18], urosolic acid 등이 elastase 저해제로 이용되고 있다[1]. 또한 체내의 elastin

을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에는 그 효소 활성이 극히 높아 조직 파괴에 직접적인 원인이 되어 피부의 주름 및 탄력성 소실을 유발한다[5,16].

상황버섯 추출물을 이용한 elastase 저해 활성 측정 결과는 Fig. 3과 같다. 상황버섯 열수 추출물은 모든 농도에서 10% 미만의 매우 낮은 저해 활성을 나타내었지만, 상황버섯 에탄올 추출물은 0.01 mg/ml의 농도에서 50.7%의 저해활성을 나타내었으며, 통계적으로 유의적인 차이를 보였고 농도 의존적으로 저해율이 증가하였다. 특히 에탄올 추출물의 elastase 저해활성은 0.5 mg/ml 농도에서 대조군으로 사용된 urosolic acid 보다 20% 높은 elastase 저해활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 주름개선효과에는 상황버섯 열수 추출물 보다 에탄올 추출물에서 elastase 저해 활성이 우수함을 알 수 있었다.

Collagenase 저해활성 측정 확인

세포 외 기질의 주요 구성 성분인 collagen은 피부의 섬유아 세포에서 생성되는 주요 기질 단백질이다. Collagen의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도 등이 알려져 있다[12]. Collagen은 피부, 골, 인대, 연골 및 치아 등에 높은 농도로 존재하며, 이러한 collagen은 트립신 등의 단백질 분해효소의 작용을 받지 않으나 collagenase에 의해 분해된다는 보고[6,8]가 있어, 상황버섯 열수 및 에탄올 추출물의 collagenase 저해활성을 Fig. 4와 같이 나타내었다.

열수 추출물은 0.05 mg/ml~1 mg/ml 농도에서 3.4%~6.8%로 collagenase 저해활성 효과가 나타나지 않았으나, 에탄올 추출물은 33.4%~89.6%로 통계적으로 유의적인 차이를 보였으며, 농도 의존적으로 저해활성이 높게 나타났다. 특히 에탄올 추출물의 경우 collagenase 저해활성에서 대조군으로 사용된 epigallocatechin gallate (EGCG)보다 0.5 mg/ml 농

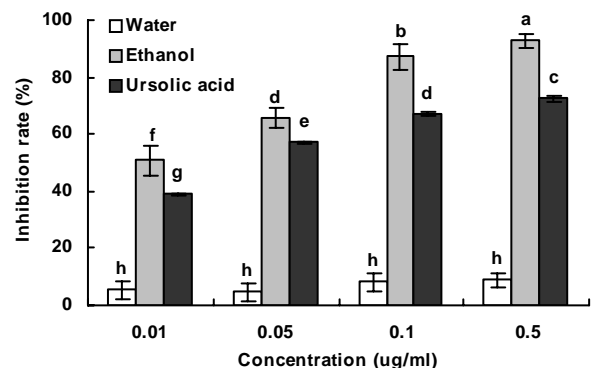


Fig. 3. Inhibition rate of Cambodian *Phellinus linteus* extract on elastase. Water: Cambodian *Phellinus linteus* with water extract, Ethanol: Cambodian *Phellinus linteus* with ethanol extract, Ursolic acid: positive control. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

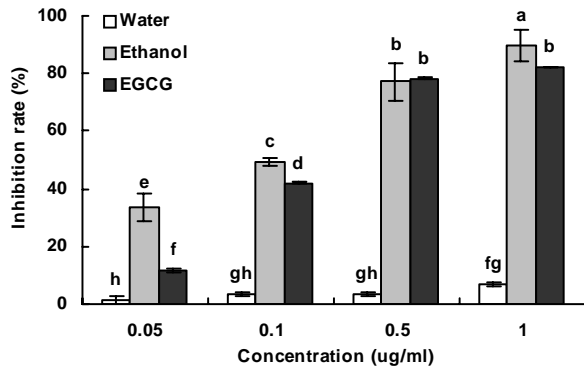


Fig. 4. Inhibition rate of Cambodian *Phellinus linteus* extract on collagenase. Water: Cambodian *Phellinus linteus* with water extract, Ethanol: Cambodian *Phellinus linteus* with ethanol extract, EGCG: Epigallocatechin Gallate. Values are means of 3 replicates and those with different alpha letters are significantly different at $p < 0.05$.

도를 제외하고는 약 10% 높은 저해활성을 나타내어 상황버섯 열수 추출물 보다 에탄올 추출물이 collagenase의 활성을 저해함으로써 collagen의 분해를 막아 피부의 주름을 개선할 것으로 사료된다. 현재까지 개발되어 일부 이용되고 있는 피부노화 억제제는 그 효능과 부작용이 확실치 않음으로 알려져 있다. 캄보디아 상황버섯 추출물은 항산화 활성은 물론 피부 주름개선에 우수한 효과를 나타내고 있으므로 이러한 효능이 우수한 기능성 화장품 소재로서 이용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

요 약

사람의 피부는 자외선, 오염된 공기, 화학 제품 등 환경에 끊임없이 노출된다. 이로 인한 자유라디칼과 활성 산소는 피부세포에 큰 손상을 끼치게 된다. 캄보디아 상황버섯 열수, 에탄올 추출물의 기능성 화장품 소재로 활용하기 위하여 지방산패 억제능 측정과 주름개선 효과 측정을 하였다.

캄보디아 상황버섯 열수, 에탄올 추출물에 금속이온을 첨가하여 지방산패 억제능을 측정한 결과 캄보디아 상황버섯 열수 추출물 보다 에탄올 추출물이 Fe^{2+} 와 Cu^{2+} chelating 능력이 우수하였다. 캄보디아 상황버섯 에탄올 추출물의 경우 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml의 농도에서 대조군인 butylated hydroxytoluene (BHT)보다 높은 지방산패 억제를 나타내었다.

캄보디아 상황버섯 열수, 에탄올 추출물은 산화 촉매제인 Fe^{2+} 를 함유한 지방 산패 억제능이 Cu^{2+} 를 이용한 지방산패 억제능 보다 우수하였다.

주름개선 효과 측정으로 elastase 저해활성을 측정한 결과 캄보디아 상황버섯 에탄올 추출물은 0.01 mg/ml의 농도에서 50.7%의 저해활성을 나타내어, 대조군인 urosolic acid보다 높

은 elastase 저해활성을 나타내었다. 또한 에탄올 추출물의 경우 0.1 mg/ml의 농도에서 약 50%의 저해활성을 나타내어 캄보디아 상황버섯 열수 추출물 보다 에탄올 추출물이 collagenase에 대해 높은 저해활성을 나타내었다.

이상의 결과에서 캄보디아 상황버섯의 에탄올 추출물은 지방산패 억제능이 우수할 뿐만 아니라 주름 개선 효과가 있음을 확인할 수 있었고, 주름 개선 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

References

1. A physiology active minuteness chemical technique development road map. 2002. Ministry of Commerce. *Industry and Energy* 229-322.
2. Buege, J. A. and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**, 302-310.
3. Cannell, R. J. P., S. J. Kellan, A. M. Owsianks and J. M. Walker. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**, 10-14.
4. Cojocar, I. M., M. Cojocar, C. Musuroi, M. Botezat and L. Lazar, A. Druta. 2004. Lipid peroxidation and catalase in diabetes mellitus with and without ischemic stroke. *Rom. J. Intern. Med.* **42**, 423-429.
5. DeWitt, D. L., T. E. Rollins, J. S. Day, J. A. Gauger and W. L. Smith. 1981. Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **256**, 10375-10382.
6. Demina, N. S. and S. V. Lysenko. 1996. Collagenolytic enzymes synthesized by microorganisms. *Mikrobiologiya.* **65**, 293-304.
7. Gilchrist, B. A. 1990. Skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.* **2**, 79-82.
8. Grant, N. H. and H. E. Alburn. 1959. Studies on the collagenases of *Clostridium histolyticum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 245-255.
9. Ha, T. Y. 2006. Development of functional food materials for healthy life. *Korean J. Crop. Sci.* **51**, 26-39.
10. Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara and F. Fukuoka. 1968. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**, 155-157.
11. Ji, J. H., M. N. Kim, C. K. Chung and S. S. Ham. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nut.* **29**, 322-328.
12. Jeroma, S. P., L. Gabrielle and F. Raul. 1998. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.* **90**, 48-54.
13. Kim, D. H., H. J. Choi and E. A. Bae. 1998. Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal α -glucosidases. *J. Fd. Hyg. Safety.* **13**, 20-23.
14. Kim, H. M., S. B. Han, G. T. Oh, Y. H. Kim, D. H. Hong,

- N. D. Hong and I. D. Yoo. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmac.* **18**, 295-303.
15. Oh, G. T., S. B. Han, H. M. Kim, M. W. Han and I. D. Yoo. 1992. Immunostimulating activity of *Phellinus linteus* extracts to B-lymphocyte. *Arch. Pharm. Res.* **15**, 379-381.
16. Roth, G. J., C. J. Sioka and J. Ozols. 1980. Structural characteristics of prostaglan din synthetase from sheep vesicular gland. *J. Biol. Chem.* **255**, 1301-1304.
17. Saito, M., H. Sakagami and S. Fujisawa. 2003. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Res.* **23**, 4693-4701.
18. Tsuji, N., S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema and G. Imokawa. 2001. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.* **74**, 283-290.
19. Wünsch, E. and H. G. Heindrich. 1963. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem.* **333**, 149-151.