

추출방법에 따른 잣나무(*Pinus koraiensis*) 구과피 추출물의 항산화, 주름개선 및 미백 효능 비교

채정우¹ · 김정유¹ · 조희선¹ · 이진영^{1,2*}

¹경기도산림환경연구소, ²호서대학교 화장품생명공학부

Comparison of Antioxidant, Wrinkle Improvement, and Whitening Efficacies of Extracts from *Pinus koraiensis* Cone Scale Using Extraction Methods

Jungwoo Chae¹, Jeongyou Kim¹, Huiseon Jo¹ and Jin-young Lee^{1,2*}

¹Gyeonggido Forest Environment Research Center, Osan 18118, Korea

²Division of Cosmetics and Biotechnology, Hoseo University, Asan 31499, Korea

요약: 본 연구에서 잣 구과피의 3가지 추출법(에탄올 추출, 초임계 추출, 에탄올과 초임계 추출물의 혼합)에 따른 항산화 활성, 주름개선 그리고 미백활성의 차이를 확인하였다. 그 결과, 총 폴리페놀 함량은 초임계 추출물이 11.03 mg/g GAE, 70% 에탄올 추출물이 33.79 mg/g GAE이었다. 전자공여능의 경우 1,000 µg/mL 농도에서 초임계 추출물은 13.60%, 70% 에탄올 추출물은 91.37%, 혼합물은 71.62%이었다. SOD 유사활성은 100 µg/mL 농도에서 초임계 추출물은 16.49%, 에탄올 추출물은 21.84%, 혼합물은 10.7%이었다. ABTS⁺ radical 소거능은 1,000 µg/mL 농도에서 초임계 추출물은 38.19%, 70% 에탄올 추출물은 80.23%, 혼합물은 78.72% 이었다. Tyrosinase 저해활성은 1,000 µg/mL 농도에서 초임계 추출물은 24.54%, 70% 에탄올 추출물은 36.55%, 혼합물은 15.23%이었다. Elastase 저해활성 측정은 1,000 µg/mL 농도에서 초임계 추출물은 15.62%, 70% 에탄올 추출물은 22.56%, 혼합물은 26.64%이었다. 피부수렴활성 결과는 70% 에탄올 추출물이 5000 µg/mL에서 81.23%이었고, 초임계 추출물과 혼합물은 활성을 나타내지 않았다. 본 연구에서 분석한 활성 결과는 잣 구과피 70% 에탄올 추출물, 혼합물, 초임계 추출물 순으로 우수하게 측정되어 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성 모두 초임계 추출물이 높을 것으로 판단한 가설과 정반대의 결과를 나타내었다.

Abstract: The present study evaluated the antioxidant activity, skin wrinkle reduction, and whitening activity of *Pinus koraiensis* cone scale extracts made with three different solvents (ethanol, supercritical fluid, and a mixture of both). Total polyphenol content was 11.03 mg/g GAE in the supercritical fluid extract and 33.79 mg/g GAE in the 70% ethanol extract. Electron donating ability of 1,000 µg/mL extract was 13.60% in the supercritical fluid extract, 91.37% in 70% ethanol extract, and 71.62% in mixed solvent extract. SOD-like activities in 100 µg/mL extract using supercritical fluid, 70% ethanol, and mixed solvents were 16.49%, 21.84%, and 10.7%, respectively. The ABTS⁺ radical scavenging activities of 1,000 µg/mL extract were 38.19%, 80.23%, and 78.72% for supercritical fluid extract, 70% ethanol extract, and mixed solvent extract, respectively. Tyrosinase inhibitory activities in 1,000 µg/mL extract were 24.54%, 36.55%, and 15.23% for supercritical fluid extract, 70% ethanol extract, and mixed solvent extract, respectively. Elastase inhibitory activities in 1,000 µg/mL extract were 15.62%, 22.56%, and 26.64% for supercritical fluid extract, 70% ethanol extract, and mixed solvent extract, respectively. Skin astringent activity (81.23% with 5000 µg/mL extract) was only detected in the 70% ethanol extract. Supercritical fluid and mixed solvent extracts showed no such activity. Our analysis of *Pinus koraiensis* cone scale extracts show that the highest aggregate activity was found in the 70% ethanol extract, followed by mixed solvent and supercritical fluid extracts. Therefore, our results oppose the hypothesis stating supercritical extract has the highest total polyphenol content and antioxidant activity.

Key words: *Pinus koraiensis*, functional cosmetics, antioxidant, anti-wrinkle, skin whitening

* Corresponding author
E-mail: jylee@hoseo.edu

ORCID
Jin-young Lee  <https://orcid.org/0000-0001-5002-9870>

서론

세포 내 대사 과정이나 자외선 노출 등으로 인하여 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species)은 강한 반응성으로 인하여 당질, 지질, 단백질, 핵산과 같은 세포 내 구성 성분을 손상시키는 것으로 알려져 있다(Halliwell and Gutteridge, 1986; Beckman and Ames, 1998). 활성산소는 elastin, collagen과 같은 세포 외 기질(extracellular matrix)을 구성하는 단백질을 직접적으로 손상시키며 elastase, matrix metalloproteinases (MMPs) 등의 발현을 유도하여 피부 탄력을 저해하고 melanin 합성과정을 촉진시킴으로써 피부 색소침착을 유도하는 등 피부 노화를 촉진하므로 활성산소의 소거는 피부 노화 과정의 지연에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다(Janssen et al., 1993; Thbin and Thody, 1994; Garg et al., 2017).

식물에 함유된 폴리페놀, 플라보노이드 등의 페놀성 화합물의 phenolic hydroxyl기는 효소 단백질과 결합하여 항산화력을 비롯한 다양한 약리활성을 나타내며(Ahn et al., 1996; Panzella and Napolitano, 2019), 특히 항산화 활성은 추출물의 폴리페놀 함량과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다(Husain et al., 1987; Choi et al., 2005; Choi et al., 2006) 따라서 폴리페놀의 함량이 높은 식물일수록 생리활성이 높을 것이라 기대할 수 있다. 또한 단일 식물 추출물만을 사용하는 것보다 몇 가지 식물을 혼합하여 추출하거나 단일 식물 추출물을 적절한 비율로 혼합하여 사용하면 항산화, 항염증 등의 활성이 증가한다는 여러 연구 결과(Bae et al., 2005; Lee et al., 2011; Cho et al., 2014; Lee et al., 2014; Lee et al., 2015)를 통하여 서로 다른 성분을 함유한 천연물을 혼합하면 각 천연물의 성분이 시너지 효과를 내어 생리활성에 변화가 생기는 것으로 추측할 수 있다.

식물 추출물을 연구하고 산업화에 활용하기 위한 추출에는 다양한 방법들이 활용되고 있다. 일반적으로 이용되고 있는 에탄올 또는 열수추출과 함께 최근 산업분야에서는 초임계 추출이 시도되고 있다. 초임계 추출법은 초임계 유체를 사용하는 추출조작으로 초임계 유체 추출이라고도 한다. 초임계 유체로서 이산화탄소와 펜탄 등이 사용되며 식품 및 생리활성물질 추출 분야에서 주로 사용되며 초임계 이산화탄소는 임계점(31.1°C, 73.8 atm)이 낮아 열로 인한 물질 파괴 및 변성의 위험이 적고 독성이 없으며 일반적인 조건에서는 기화되어 추출물에 남지 않는 특성이 있어 유용 물질의 효과적인 추출 및 분리가 기대되고 있는 방법이다. 초임계 추출에 관한 여러 연구에서 초임계 추출은 용매 추출에 비하여 높은 추출 수율을 나타내며 추출물의 총 폴리페놀 함량 또한 높게 나타나는 것으로 보고되었으며(Lim et al., 2014; Kim et al., 2015; Kim et

al., 2018), 초임계 추출로 얻은 편백 정유와 기존 방식으로 얻은 편백 정유에서 구성 성분의 차이가 나타났으며 초임계 추출조건에 의해서도 구성 성분 및 비율이 다르게 나타났다고 보고된 바 있다(Kim et al., 2015).

잣나무(*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc.)는 소나무과에 속하는 상록침엽교목으로 국내에서는 해발고도 1,000 m 이상에서 자생하거나 식재되며 높이는 30 m, 지름 1 m 정도에 달하고 약 500년 가까이 생육하기도 한다. 꽃은 1가화로써 5월에 피며 다음 해 10월에 구과 형태로 익는다(Lee, 2003). 잣나무 구과는 구과피(구과 실편) 사이에 외종피로 둘러싸인 종자(잣)가 있는 형태이다. 종자인 잣은 해송자(海松子)라 하여 식용됐으며 거풍, 마른기침, 변비 등에 약이 되어 왔다(Ahn, 2003). 그러나 종자를 둘러싸고 있는 외종피와 구과피의 경우 특별한 사용처가 기록된 것이 없으며, 현재 단순 연료재로 소비되거나 폐기가 될 뿐 해당 재료를 이용한 응용제품 양산은 이루어지지 않고 있다. Kang (2013)은 잣 구과피 추출물의 염증억제효과를 확인한 논문에서 5, 10, 25 µg/mL 농도별로 처리하였을 때, 25 µg/mL 처리군에서 50% ethanol 추출물이 60%로 대조군에 비해 NO 생성이 크게 억제되었고, 합성 효소인 iNOS와 PGE2의 생합성 효소인 COX-2 단백질 발현 또한 농도 의존적으로 감소시킴을 확인할 수 있었으며, iNOS와 COX-2 단백질 발현을 효과적으로 억제함으로써 NO와 PGE2 생성도 현저히 억제하는 것을 확인하였다. 또한 염증성 cytokine인 PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성 억제효과도 25 µg/mL 처리군에서 대조군에 비해 우수하여 50% ethanol 추출물은 염증매개물질의 발현과 분비를 감소시킴으로써 염증 반응을 억제, 항염증제 활용 가능성을 확인하였다(Kang, 2013).

이에 본 연구에서는 잣 수확 시 함께 발생하나 활용도가 낮은 잣 구과피를 초임계 이산화탄소와 70% 에탄올로 추출한 두 가지 추출물 및 그 혼합물의 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성, 피부 미백활성 및 주름개선 활성을 가진 천연물 스크리닝에 사용되는 tyrosinase와 elastase 저해활성, 피부 단백질 수렴활성을 측정·비교함으로써 기능성 화장품과 바이오 제품의 기능성 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

실험에 사용한 초임계 추출물은 경기지역 잣나무에서 채취한 재료를 Kim 등의 방법(Kim et al., 2018)으로 45°C, 250 bar, 12시간 조건으로 CO₂ 초임계 추출하였으며, 70% 에탄올 추출물은 가을 수확 철에 채취한 잣구과피를 70%

에탄올에 24시간 침지추출한 것을 사용하였다. 생리활성 실험에 사용된 시약은 Folin-ciocalteu's reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Tris-base, pyrogallol, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, potassium persulfate, L-DOPA, mushroom tyrosinase, elastase, N-succinyl-(L-ala)₃-p-nitroanilide, hemoglobin from bovine blood 등으로 Sigma-Aldrich에서 구매하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 총 폴리페놀 함량 측정

시료 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 변형하여 측정하였다(Folin and Denis, 1912; Smeriglio et al., 2016). 5,000 µg/mL로 희석한 추출물 10 µL를 취하여 10% sodium carbonate (Na₂CO₃) 200 µL와 1N Folin-ciocalteu's reagent 10 µL와 혼합하여 상온에서 30분 반응 후 750 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 한 표준곡선을 통해 계산하였다.

2) 전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다(Blois, 1958). 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 60 µL와 농도별 추출물을 120 µL씩 넣고 혼합한 후 15분간 방치하였다. 이후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) SOD 유사활성 측정

추출물의 SOD 유사활성은 Marklund 등의 방법을 변형하여 측정하였다(Marklund and Marklund, 1974). 농도별 시료 용액 20 µL에 Tris-HCl 완충용액(50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5) 130 µL와 7.2 mM pyrogallol 20 µL를 넣어 혼합한 후 37°C에서 10분 반응시켰다. 이후 산화된 pyrogallol 양을 microplate reader를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

4) ABTS⁺ radical 소거능 측정

추출물의 ABTS⁺ radical 소거능은 Pellegrin 등의 방법을 변형하여 측정하였다(Pellegrin et al., 1998). 2.45 mM potassium persulfate와 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazolin e-6-sulfonic acid)를 혼합한 후 실온에서 24시간 방치하여 ABTS⁺ radical을 형성시킨 용액을 100% ethanol로 희석한 용액 100 µL에 농도별 추출물 100 µL를 혼합하여 735 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

5) Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법에 따라 측

정하였다(Yagi et al., 1987). 시료 용액 40 µL에 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 µL와 10 mM L-DOPA 40 µL 및 mushroom tyrosinase (200 U/ml) 40 µL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 이후 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 490 nm에서 측정하였다.

6) Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등의 방법을 변형하여 측정하였다(Cannell et al., 1988). 기질로서 N-succinyl-(L-ala)₃-p-nitroanilide를 사용하였으며 37°C에서 30분간 생성된 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 40 µL를 취한 뒤 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (0.5 U/ml) 용액 40 µL와 0.4 M tris-HCl buffer (pH 8.6) 40 µL를 첨가하여 37°C에서 2분 가열한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-ala)₃-p-nitroanilide (3.2 mM)을 80 µL 첨가하여 30분간 반응시켜 측정하였다.

7) 피부수렴 활성 측정

피부수렴 활성은 Lee 등의 방법에 따라 측정하였다(Lee et al., 2002). 일정 농도가 되도록 조제한 시료용액 0.5 mL에 1X PBS에 녹인 0.5% hemoglobin 용액 0.5 mL를 첨가하여 1분간 진탕혼합한 후 1500 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 이후 상등액 150 µL를 취하여 575 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 잣구과피 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정

잣구과피 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 잣구과피 초임계 추출물의 총 폴리페놀 함량은 11.03 mg/g GAE으로 나타났으며, 잣구과피 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 33.79 mg/g GAE으로 70% 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량이 더 우수함을 확인할 수 있었다 (Table 1). 초임계 추출물과 용매 추출물의 비교 연구에서

Table 1. The content of total phenolic compounds from *Pinus koraiensis* cone scale extracts.

Sample	Phenolic content (mg/g GAE)	
	Supercritical extract	70% ethanol extract
<i>Pinus koraiensis</i> cone scale	11.03±0.14	33.79±0.4

Result are means ±S.D. of triplicate data.

초임계 추출물이 열수 및 에탄올 추출물에 비하여 높은 총 폴리페놀 함량을 나타낸 것과 달리(An et al., 2018; Kim et al., 2019) 잣구과피 추출물은 초임계 추출물이 에탄올 추출물에 비하여 낮은 폴리페놀 함량을 나타내었는데 이는 초임계 추출물의 낮은 용해도에서 기인한 것으로 추측된다. 솔잎 초임계 추출물에 관한 연구에서 낮은 압력에서 추출하였을 때 추출물의 성상은 액체이었고 높은 압력에서 추출하였을 때 추출물의 성상이 고체 상태였다고 보고하였는데 이에 대하여 이산화탄소의 밀도가 높아짐에 따라 이산화탄소의 용해력이 높아지며 wax류가 추출되어 성상에 차이를 보인 것이 아닌가 추측한 바 있다(Woo et al., 1999). 잣구과피 초임계 추출물은 고체 상태였으며 용매인 70% 에탄올에 완전히 용해되지 않고 콜로이드로 용해되었는데 이러한 불완전한 용해가 초임계 추출물의 폴리페놀 함량에 영향을 주었을 것으로 추측된다. 또한 최적의 초임계 추출조건을 정립하기 위한 연구에서 이산화탄소만을 용매로 사용하였을 때 극성을 띠는 성분은 추출이 되지 않았으나 에탄올이나 메탄올 등의 극성 용매를 일부 첨가하여 추출하였을 때 추출물의 총 폴리페놀 함량이 최대로 나타났다고 보고하였다(Lin et al., 1999; Chui et al., 2002). 이를 종합하여 보았을 때 잣구과피 초임계 추출 시의 압력 및 온도가 높아 폴리페놀 및 플라보노이드 등의 유효 성분보다 반응성이 낮은 wax류의 추출이 더 많이 이루어졌으며, 용매로 비극성 분자인 이산화탄소만을 사용하여 높은 극성을 갖는 성분의 경우 거의 추출되지 않았다고 추측할 수 있다. 용매 추출물로만 한정하여 비교하면 Ryu 등의 연구에서 솔방울의 열수 추출물이 185.24 mg GAE/g, 70% 에탄올 추출물이 232.99 mg GAE/g의 폴리페놀 함량을 나타낸다고 보고하였으며(Ryu et al., 2017), 측백나무 열매 에탄올 추출물의 폴리페놀 함유율이 7.65% (=70.5 mg/g TAE)로 나타난 연구 결과(Ahn et al., 2011) 등과 비추어 보아 잣구과피 추출물의 폴리페놀 함량은 다른 소나무과 식물에 비하여 낮은 것으로 판단된다.

2. 잣구과피 추출물의 전자공여능 및 ABTS⁺ radical 소거능 측정

특유의 색을 나타내는 radical이 추출물의 항산화 물질과 반응하여 소거되는 반응을 이용한 전자공여능 및 ABTS⁺ radical 소거능을 측정한 결과 추출물의 농도가 높아짐에 따라 항산화 능력 또한 높아지는 경향을 나타내었으며 에탄올 추출물은 고농도에서 대조구인 vitamin C와 유사한 활성을 나타내었다.

잣구과피 70% 에탄올 추출물은 10 µg/mL 농도에서 2.89%, 1,000 µg/mL 농도에서 91.37%의 전자공여능을 나타내어 모든 농도 구간에서 가장 높은 전자공여능을 나타

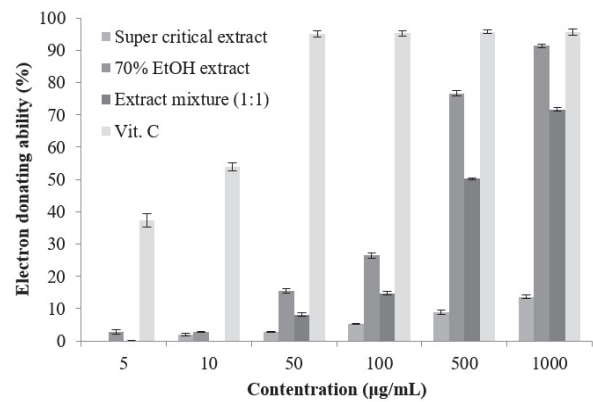


Figure 1. Electron donating ability of *Pinus koraiensis* cone scale extracts.

Result are means ±S.D. of triplicate data.

내었으나, 초임계 추출물의 전자공여능은 10 µg/mL 농도에서 1.87%, 1,000 µg/mL 농도에서 13.60%로 가장 낮은 전자공여능을 나타내었으며 농도에 따른 활성 증가 폭 역시 미미하였다. 초임계 추출물과 에탄올 추출물의 1:1 혼합물(이하 혼합물)은 1,000 µg/mL 농도에서 71.62%의 전자공여능을 나타내어 에탄올 추출물과 초임계 추출물의 중간 정도의 전자공여능을 나타내었다(Figure 1).

잣구과피 70% 에탄올 추출물은 5 µg/mL 농도에서 10.97%, 100 µg/mL 농도에서 55.5%, 1,000 µg/mL 농도에서 80.23%의 ABTS⁺ radical 소거능을 나타내었으며, 초임계 추출물의 소거능은 5 µg/mL 농도에서 4.29%, 100 µg/mL 농도에서 13.32%, 1,000 µg/mL 농도에서 38.19%로 나타났다. 혼합물은 5 µg/mL 농도에서 11.52%, 100 µg/mL 농도에서 38.26%, 1,000 µg/mL 농도에서 78.72%의 소거능을 나타내었다. 잣구과피 70% 에탄올 추출물과 혼합물은 500 µg/mL 농도에서 최대 소거능에 비슷한 소거능을 나타내었다(Figure 2). 전자공여능 측정 결과와 종합하여 보았

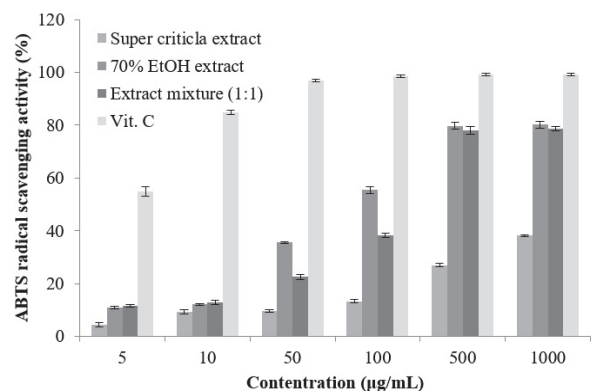


Figure 2. ABTS⁺ radical scavenging activity of *Pinus koraiensis* cone scale extracts.

Result are means ±S.D. of triplicate data.

을 때 잣구과피 초임계 추출물은 수용성 물질에 대한 항산화 활성이 총 폴리페놀 함량에 비해 낮은 편인데, 이는 총 폴리페놀 함량 측정에서 고찰한 바와 같이 잣구과피 초임계 추출물은 극성을 띠는 성분의 함유량이 적으며 그에 따라 수용액 내에서의 radical 소거 능력 또한 낮다고 판단할 수 있다.

3. 잣구과피 추출물의 SOD 유사활성 측정

잣구과피 70% 에탄올 추출물은 5 µg/mL 농도에서 11.39%, 100 µg/mL 농도에서 21.84%, 1,000 µg/mL 농도에서 27.41%의 SOD 유사 활성을 나타내었으며, 초임계 추출물의 활성은 5 µg/mL 농도에서 10.72%, 100 µg/mL 농도에서 16.49%, 1,000 µg/mL 농도에서 21.28%로 나타났다. 혼합물은 5 µg/mL 농도에서 7.12%, 100 µg/mL 농도에서 10.7%, 1,000 µg/mL 농도에서 14.77%의 활성을 나타내었다. 모든 시료에서 농도에 따른 활성 증가는 미미하였으며 70% 에탄올 추출물, 초임계 추출물, 혼합물 순으로 활성이 크게 나타났다(Figure 3). Hong 등의 연구에서 여러 과일 및 채소 착즙액의 SOD 유사 활성 중 브로콜리 착즙액의 활성이 41.7%로 가장 높게 나타났으며 케일 농축액, 키위, 무 착즙액 등이 20%대의 활성을 나타내어 잣구과피 추출물과 비슷한 활성을 나타내었다고 보고되었다(Hong et al., 1998). 초임계 추출물은 총 폴리페놀 함량에 비하여 높은 SOD 유사활성을 나타내었는데 이를 통하여 SOD 유사활성을 나타내는 성분은 극성을 띠기보다는 비극성일 가능성이 크다고 판단하였다. 또한 혼합물은 전자공여능 및 ABTS⁺ radical 소거능과 달리 초임계 추출물보다 낮은 활성을 나타내었는데, Kim 등의 연구 결과에서 초임계 추출한 정유와 수증기 증류법을 이용한 정유의 구성 성분이 다르다고 보고한 바 있으며(Kim et al., 2015), 총 폴리페놀 함량 측정에서 고찰한 바와 같이 잣구과피

추출물 또한 추출 방법에 따라 구성 성분이 다를 가능성이 크다. 따라서 두 추출물의 성분이 서로 반응하여 활성이 감소하였을 가능성이 있다고 판단되며 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

4. 잣구과피 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정

잣구과피 70% 에탄올 추출물은 100 µg/mL 이하 농도에서 활성을 나타내지 않았으며 500 µg/mL 농도에서 10.65%, 1,000 µg/mL 농도에서 36.55%의 활성을 나타내었으며, 초임계 추출물의 활성은 5 µg/mL 농도에서 1.13%, 100 µg/mL 농도에서 5.63%, 1,000 µg/mL 농도에서 24.54%로 나타났다. 잣구과피 추출물 혼합물은 10 µg/mL 농도에서 1.46%, 100 µg/mL 농도에서 7.32%, 1,000 µg/mL 농도에서 15.23%의 활성을 나타내었다. 추출물의 활성을 비교하였을 때 저농도에서는 에탄올 추출물의 활성이 나타나지 않아 혼합물의 활성이 가장 높게 나타났으나 고농도에서는 에탄올 추출물의 활성이 가장 높게 나타나는 경향을 보였다(Figure 4). Tyrosinase 저해활성을 가진 천연물을 탐색하기 위한 연구에서 한약재 대다수는 잣구과피 추출물과 비슷한 10~40%대의 저해활성을 나타내었다고 보고되었는데(Seo, 2001) 이를 통하여 잣구과피 추출물은 일반적인 식물 추출물과 비슷한 저해활성을 가진 것으로 보인다. 다만 대조구인 kojic acid에 비하여 낮은 활성을 나타내므로 용매 분획법을 이용하여 tyrosinase의 활성을 증가시킨 사례를 참고하여(Choi et al., 2011; Yang et al., 2019) 추후 연구를 진행할 필요가 있다고 판단된다. 또한 SOD 유사활성과 비슷하게 최고 농도에서 에탄올 추출물, 초임계 추출물, 혼합물 순으로 활성이 높게 나타났는데 이 또한 SOD와 비슷한 작용으로 유사한 경향이 나타난 것으로 추측된다.

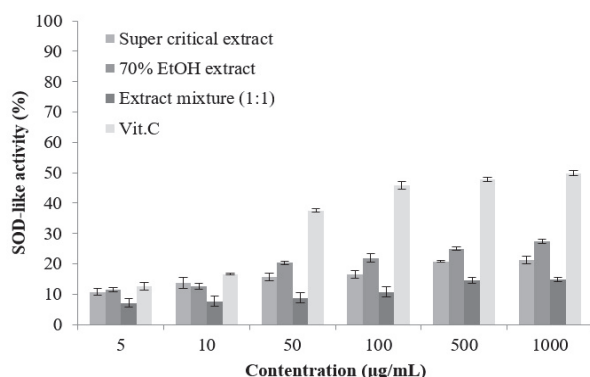


Figure 3. SOD-like activity of *Pinus koraiensis* cone scale extracts.

Result are means ±S.D. of triplicate data.

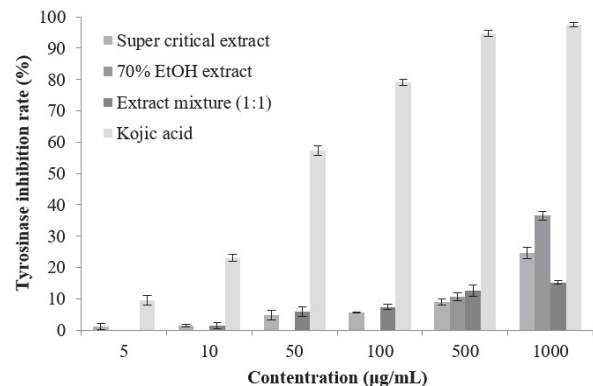


Figure 4. Tyrosinase inhibition rate of *Pinus koraiensis* cone scale extracts.

Result are means ±S.D. of triplicate data.

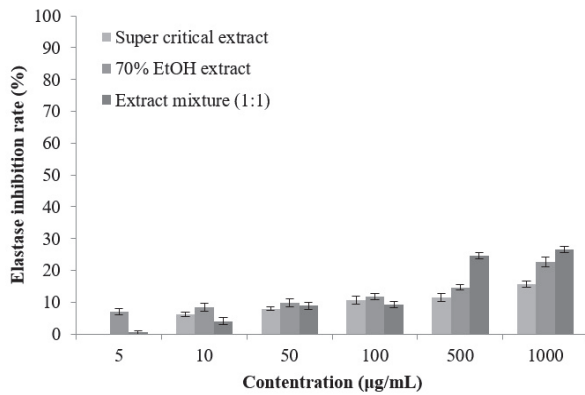


Figure 5. Elastase inhibition rate of *Pinus koraiensis* cone scale extracts.

Result are means \pm S.D. of triplicate data.

5. 잣구과피 추출물의 elastase 저해활성 측정

잣구과피 70% 에탄올 추출물은 5 μ g/mL 농도에서 7.05%, 100 μ g/mL 농도에서 11.72%, 1,000 μ g/mL 농도에서 22.56%의 활성을 나타내었으며, 초임계 추출물의 활성은 10 μ g/mL 농도에서 6.15%, 100 μ g/mL 농도에서 10.62%, 1,000 μ g/mL 농도에서 15.62%로 나타났다. 잣구과피 추출물 혼합물은 5 μ g/mL 농도에서 0.44%, 100 μ g/mL 농도에서 9.19%, 1,000 μ g/mL 농도에서 26.64%의 활성을 나타내었다. 혼합물의 경우 고농도에서 초임계 추출물과 70% 에탄올 추출물에 비해 높은 활성을 보였다(Figure 5). Kwak 등의 연구에서 약용식물 대부분은 10~20%대의 elastase 저해활성을 나타낸 것으로 보고되어(Kwak et al., 2005) 잣구과피 추출물의 저해활성은 다른 식물 추출물과 비슷한 활성을 나타내었다. 다만 elastase 저해제로 사용되는 ursolic acid보다 낮은 활성을 나타내었으므로(Park and Kim, 2010; Jo et al., 2017) 당질제거 등의 가공을 통하여 효소 저해 활성을 증가시키는 등의 추가 연구가 필요할 것으로 보인다(Yang et al., 2007). 또한 잣구과피 추출물의 혼합물은 다른 실험과 달리 추출물 중 가장 높은 활성을 나타내었는데 이에 관하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

6. 잣구과피 추출물의 피부수렴활성 측정

70% 에탄올 추출물은 50 μ g/mL에서 11.93%, 500 μ g/mL에서 14.57%, 5000 μ g/mL에서 81.23%의 활성을 나타내어 대조구인 tannic acid와 비슷한 활성을 나타내었으나 초임계 추출물과 혼합물은 활성을 나타내지 않았다(Figure 6). 에탄올 추출물은 모든 농도에서 활성을 나타낸 것과 달리 초임계 추출물과 혼합물은 활성을 나타내지 않았는데, 이를 통하여 수렴활성을 나타내는 것은 극성 성분이며, 비극성 성분은 피부 수렴작용을 방해할 것으로 추측

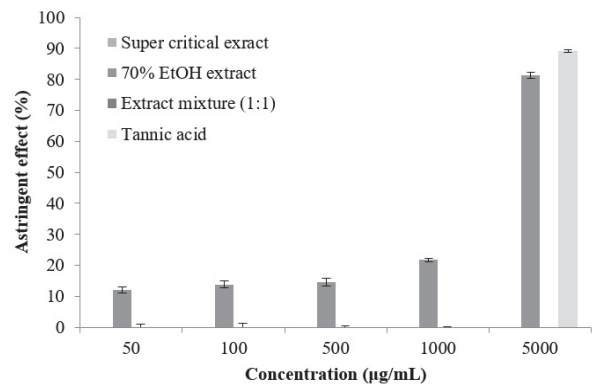


Figure 6. Astringent effect of *Pinus koraiensis* cone scale extracts.

Result are means \pm S.D. of triplicate data.

할 수 있다. 소나무 뿌리 추출물에 관한 연구(Lee et al., 2017)에서 열수 추출물이 매우 낮은 수렴활성을 나타낸 것과 달리 에탄올 추출물의 경우 저농도인 50 μ g/mL phenolic 농도에서 80% 이상의 수렴활성을 나타낸 것과 달리 잣구과피 에탄올 추출물은 최고 농도인 5,000 μ g/mL에서 비슷한 활성을 나타내어 상당히 낮은 수렴활성을 나타내었다.

결론

본 연구에서는 잣 구과피를 활용하여 추출한 3가지 추출물의 항산화 활성과 주름개선 및 미백활성을 비교·분석하였다. 잣구과피 추출물의 총 폴리페놀 함량은 초임계 추출물이 11.03 mg/g GAE, 70% 에탄올 추출물이 33.79 mg/g GAE로 나타났으며, 전자공여능, ABTS⁺ radical 소거능, SOD 유사활성 측정 모두 70% 에탄올 추출물의 활성이 초임계 추출물에 비하여 높게 나타나 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성 모두 초임계 추출물이 높을 것으로 판단한 가설과 정반대의 결과를 나타내었다. 기존 연구와 달리 잣구과피 초임계 추출물의 총 폴리페놀 함량이 에탄올 추출물에 비하여 낮은 이유로는 고압의 조건에서 초임계 추출을 진행하여 wax류 등 용해도가 낮은 성분 위주로 추출되었으며 극성 보조 용매 추가 없이 비극성 분자인 이산화탄소만을 용매로 사용하여 극성을 갖는 폴리페놀의 추출이 적었기 때문으로 추측된다. 또한 전자공여능 및 ABTS⁺ radical 소거능 측정에서 에탄올 추출물, 추출물 혼합물, 초임계 추출물 순으로 활성이 나타나 추출물의 총 폴리페놀 함량과 비슷하게 나타났으나, SOD 유사활성 및 tyrosinase 저해활성은 에탄올 추출물, 초임계 추출물, 추출물 혼합물 순으로 나타나 혼합물의 활성이 개별 추출물에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 추출물의 elastase 저해활성은 혼합물의 활성이 추출물 혼합물, 에탄

을 추출물, 초임계 추출물 순으로 나타나 혼합물의 활성이 개별 추출물보다 높게 나타났는데 이에 관하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 잣구과피 추출물의 피부 수렴활성을 측정된 결과 에탄올 추출물은 대조구인 tannic acid와 비슷한 활성을 나타내었으나 초임계 추출물과 혼합물은 활성을 나타내지 않았다. 이를 종합하였을 때 radical 소거 실험에서 대조구 vitamin C와 비슷한 활성을 나타낸 잣구과피 70% 에탄올 추출물은 천연 항산화제로 사용할 수 있을 것으로 보이며, tyrosinase와 elastase의 활성은 일반적인 식물 추출물과 비슷하게 나타났으나 당질 제거 및 분획 등 유효물질을 정제하여 추출물의 효소 저해 활성을 증가시킨 여러 사례가 있는 만큼 이후 가공 방법에 따라 기능성 화장품 소재로써 사용할 수 있다고 판단되므로(Yang et al., 2007; Choi et al., 2011; Yang et al., 2019) 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 잣구과피 초임계 추출물은 항산화 활성과 효소 저해 활성 모두 70% 에탄올 추출물에 비하여 낮게 나타났으며 실험 사용 용매인 70% 에탄올에 용해하기 어려웠는데 이는 추출조건을 재조정하여 잣 구과피에 대한 최적 추출법을 적립하는 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 산업단지공단 2020년도 생산기술사업화 지원사업(이전기술사업화)으로 지원받아 수행되었음(과제번호 RCC19010).

References

- Ahn, D.K. 2003. Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. 6th Ed. Kyo-Hak Publoshig Co., Seoul, Korea. pp. 297.
- Ahn, H.Y., Heo, S.J., Kang, M.J., Lee, J.H., Cha, J.Y. and Cho, Y.S. 2011. Antioxidative activity and chemical characteristics of leaf and fruit extracts from *Thuja orientalis*. Journal of Life Science 21(5): 746-752.
- Ahn, Y.J., Lee, S.H., Ro, J.S., Lee, K.S., Kang, S.J., Hwang, B.Y., Park, W.Y. and Ahn B.T. 1996. The phenolic components of *Sapium japonicum*. Yakhak Hoeji 40(2): 183-192.
- An, G.M., Park, S.I., Kim, M.G. and Shin, M.S. 2018. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects of *Anemarrhena asphodeloides* extracts using supercritical extraction. Journal of Investigative Cosmetology 14(4): 455-462.
- Bae, J.H., Lee, M.J. and Lee, S.M. 2005. Antimicrobial effect of *Cutellaria baicalensis* George extracts on food-borne pathogens. The Korean Journal of Microbiology and Biotechnology 33(1): 35-40.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. 1998. The free radical theory of aging matures. Physiological Reviews 78(2): 547-581.
- Blios, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181(4617): 1199-1200.
- Cannell, R.J.P., Kellan, S.J., Owsianks, A.M. and Walker, J.M. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Medica 54(1): 10-14.
- Chiu, K.L., Cheng, Y.C., Chang, L.H. and Yang, P.W. 2002. Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids. The Journal of Supercritical Fluids 24(1): 77-87.
- Choi, S.J., Cho, E.A., Cho, E.H., Jeong, Y.J., Ku, C.S., Ha, B.J. and Chae, H.J. 2011. Screening of functional materials from solvent fractions of apple flower leaf extract. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 26(2): 165-171.
- Choi, S.Y., Cho, H.S. and Sung, N.J. 2006. The antioxidative and nitrite scavenging ability of solvent extracts from wild grape (*Vitis Coignetiea*) skin. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 35(8): 961-966.
- Cho, H.S., Kang, S.W., Kim, J.H., Choi, M.J., Yu, H.W., Park, E. and Chun, H.S. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of combined extracts of *Galla rhois*, *Achyranthes japonica* Nakai, *Terminalia chebula* Retz and *Glycyrrhiza uralensis*. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 29(1): 29-35.
- Folin, O. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybetic compounds as color reagents. Journal of Biological Chemistry 12(2): 239-249.
- Garg, C., Khurana, P. and Garg, M. 2017. Molecular mechanisms of skin photoaging and plant inhibitors. International Journal of Green Pharmacy 11(2): 217-232.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Archives of Biochemistry and Biophysics 246(2): 501-514.
- Husain, S.R., Gillard, J. and Cullard, P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. Phytochemistry 26(9): 2489-2491.
- Janssen, Y.M., Houten, B.V., Borm, P.J. and Mossman, B.T. 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology 69(3): 261-274.
- Jo, E.H., Kim, I.H. and Lee, J.H. 2017. Antioxidant and skin whitening effect of graviola (*Annona muricata*) leaf ex-

- tracts. Applied Chemistry for Engineering 28(2): 198-205.
- Kang, S.A. 2013. Anti-inflammatory effect of *Pinus koraiensis* Zieb et Eucc cone peel extracts. Deagu. Kyungpook National University.
- Kim J.W., Choi, W.S., Lee, S.S. and Park, M.J. 2015. Comparative study on the composition of essential oil by supercritical carbon dioxide extraction and hydro-distillation from *Chamaecyparis obtusa* leaves. Journal of the Korean Wood Science and Technology 43(4): 494-503.
- Kim, M.G., Park, S.I., An, G.M., Heo, S.H. and Shin, M.S. 2019. Antioxidant, whitening, anti-inflammatory effect of supercritical *Centella asiatica* extract and enhancement of skin permeation using epidermal penetrating peptide. Journal of Investigative Cosmetology 15(3): 263-273.
- Kim, Y.J., Imm, J.Y. and Kim, S.J. 2018. Characterization of *Platycodon grandiflorum* seeds oil extracted by supercritical carbon dioxide. Journal of Oil & Applied Science 35(1): 99-110.
- Kwak, Y. J., Lee, D. H., Kim, N. M. and Lee, J. S. 2005. Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. Korean Journal of Medicinal Crop Science 13(6): 213-216.
- Lee, E.H., Park, K.T., Park, H.J., Jo, J.B., Lee, J.E., Lim, S.B., Kim, Y.J., Ahn, D.H. and Cho, Y.J. 2017. Beauty food activities of extracts from *Pinus densiflora* root. Journal of Applied Biological Chemistry 60(2): 119-124.
- Lee, J.T., Jeong, Y.S., and An, B.J. 2002. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and Its application for Cosmetic materials. The Korea Journal of Herbology 17(2): 51-60.
- Lee, S.G., Jeong, H.J., Lee, E.J., Kim, J.B. and Choi, S.W. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from medicinal herb Mixtures. Korean Journal of Food Science and Technology 43(2): 200-205.
- Lee, S.I., Lee, Y.K., Kim, S.D., Shim, S.M., Yang, S.H., Cheng, J., and Suh, J.W. 2014. Enhanced anti-oxidant activity effects of *Smilax china* L. Rhizome water extracts added with its fermented leaf water extracts. Journal of Applied Biological Chemistry 57(2): 145-152.
- Lee, T.B. 2003. Coloured Flora of Korea. Hyangmoon Publishing Co. Seoul, Korea.
- Lee, Y.S., Jung, M., Lim, K.S. and Yun, Y.G. 2015. Study on the anti-inflammatory effects of the remedy prescribed with *Lonicera japonica* and *Scutellaria baicalensis* Radix in U937 cells. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 28(3): 1-13.
- Lim, D.J., Chun, B.S. and Oh, D.H. 2014. On study antioxidant effect and aroma component of natural citrus by SC-CO₂ extraction. Journal of the Korean Oil Chemists' Society 31(2): 285-295.
- Lin, M.C., Tsai, M.J. and Wen, K.C. 1999. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae radix*. Journal of Chromatography A 830(2): 387-395.
- Marklund, S., and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry 47(3): 469-474.
- Panzella, L. and Napolitano, A. 2019. Natural and bioinspired phenolic compounds as tyrosinase inhibitors for the treatment of skin hyperpigmentation: Recent advances. Cosmetics 6(4): 57.
- Park, J.M. and Kim, K.J. 2010. The anti-wrinkle effects and whitening effects of *Galla Rhois*. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 23(1): 135-148.
- Pellegrin, N., Re, R, Yang, M. and Rice-Evans, C. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. Method in Enzymology 299: 379-389.
- Ryu, B.S., Choi, H.E., Choi, W.S., Lee, N.H. and Choi, U.K. 2017. Antioxidant activities of extracts from different parts of the pine tree. The Korean Journal of Food and Nutrition 30(6): 1133-1139.
- Seo, S.Y. 2001. Screening of tyrosinase inhibitors from oriental herbs. Korean Journal of Plant Resources 14(1): 32-37.
- Smeriglio, A., Galati, E.M., Monforte, M.T., Lanuzza, F., D'angelo, V. and Circosta, C. 2016. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of cold pressed seed oil from finola cultivar of *Cannabis sativa* L. Phytotherapy Research 30(8): 1298-1307.
- Thbin, D. and Thody, A.J. 1994. The superoxide anion may mediate short but not long term effects of ultraviolet on melanogenesis. Experimental Dermatology 3(3): 99-105.
- Woo, G.Y., Kim, K.H., Lee, M.J., Lee, Y.B. and Yoon, J.R. 1999. A comparison of volatile compounds in pine extracts obtained by supercritical fluid extraction with those by simultaneous steam distillation and solvent extraction. Korean Society of Food Science and Technology 31(5): 1268-1274.
- Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. Planta Medica 53(6): 517-519.

Yang, H.J. and Park, S.N. 2007. Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum arvense* extracts (II). Journal of Society of cosmetic scientists of Korea 33(3): 139-144.

Yang, S.A., Kim, A.Y., Pyo, B.S. and Kim, S.M. 2019. Physiological activity of extracts of bark from *Ulmus davidiana* var. japonica and its fractions. Korean Journal of Pharmacognosy 50(2): 112-117.

Yoon, C.J. 2017. Chemical terminology dictionary. Iljinsa. Seoul, Korea.

Manuscript Received : March 12, 2021

First Revision : June 4, 2021

Second Revision : June 24, 2021

Accepted : June 25, 2021