

RESEARCH ARTICLE

불로초 군사배양 갯버들 추출물이 인간 피부 섬유아세포의 제1형 프로콜라겐 생성에 미치는 영향

정용운, 박영진*

건국대학교 의료생명대학 바이오융합과학부, 의료생명연구소

Effect of *Ganoderma lucidum* Solid-state Fermented *Salix gracilistyla* Extract on Type I Procollagen Biosynthesis in HDFn Cells

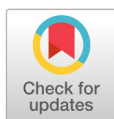
Yong-Un Jeong, Young-Jin Park*

Department of Integrated Biosciences, Research Institute for Biomedical and Health Science, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, Chungju 27478, Korea

*Corresponding author: yjpark@kku.ac.kr

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the feasibility of *Salix gracilistyla* production for cosmetic use through mycelial fermentation. The efficacy of this method was confirmed by fermentation using the mycelia of *Ganoderma lucidum* (a representative medicinal mushroom). Total polyphenol and flavonoid content and DPPH radical scavenging activity of *S. gracilistyla* extract (SGE) were found to be higher than those of *G. lucidum* fermented *S. gracilistyla* extract (GLSGE). GLSGE had relatively lower collagenase activity than SGE. However, GLSGE increased HDFn cell viability more potently than SGE, and increased the biosynthesis of type I procollagen. Thus, GLSGE could be used as an anti-aging cosmetic active ingredient. These results indicate that extract fermentation using *G. lucidum* mycelia can effectively enhance some beneficial effects of functional materials.

Keywords: Antioxidant, Collagenase, Fermentation, *Ganoderma lucidum*, Type I procollagen

OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2019 June, 47(2): 153-63
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190019>Young-Jin Park
<https://orcid.org/0000-0002-8392-4772>

Received: March 19, 2019

Revised: April 17, 2019

Accepted: April 29, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

피부노화에 의한 주름의 형성은 피부의 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 다양한 변화로 인해 발생한다. 그 중 피부에 가장 풍부하게 존재하는 섬유상 형태의 콜라겐(fibrillar type collagen)인 type I collagen은 수용성 전구체인 type I procollagen이 섬유아세포에서 합성 및 분비된 후 N-protease와 C-protease의 분해로 형성된다[1]. 세포외 기질을 구성하는 성분들은 다양한 matrix metalloproteinases (MMPs, homogeneous zinc-dependent endopeptidases)에 의해 분해되며, 그 중 콜라게나제(collagenase)는 세포외 기질에 존재하는 콜라겐 섬유를 분해한다. 이러한 이유로 콜라게나

제는 세포의 기질의 콜라겐을 분해하는데 중요한 역할을 하는 효소이며, 피부의 주름 형성에 핵심적인 역할을 하는 효소이다. 따라서 콜라게나제 억제 활성이 우수한 소재는 피부의 주름 형성을 방지할 수 있는 기능성 화장품 소재로 그 활용가능성이 매우 높다[2,3].

자연에 존재하는 많은 식물에서 활성 산소 종 (O_2 , H_2O_2 , OH)을 효과적으로 제거할 수 있는 다양한 페놀산 및 플라보노이드 등의 항산화 성분이 규명되어 보고되었다[4-6]. 또한 식물의 다양한 플라보노이드류의 피부 항노화 효과가 확인되었으며, epigallocatechin gallate (EGCG)와 epicatechin gallate (ECG) 등이 대표적인 활성 성분으로 보고되었다[7,8]. 버드나무 속(genus *Salix*)식물은 해열 및 진통 작용 등의 생리활성으로 오래전부터 사용되어온 낙엽 활엽 교목이다[9]. 또한 버드나무는 항염, 항암, 항산화 등의 작용이 있다고 보고되었다[10-12]. 버드나무에서 확인된 성분 중 가장 잘 알려진 것은 살리신(salicin)이며, 이외에도 다양한 배당체 등이 보고되었다[13]. 버드나무 속 식물에 속하는 갯버들(*Salix gracilistyla*)은 강 연안에서 분포하며, 줄기와 잎은 피부병과 상처치료, 뿌리는 관절염 치료, 나무 껍질은 진통제로 한방에서 약제로 사용되었다[14,15]. 또한 버드나무 속 식물 추출물이 항염, 항산화 및 콜라게나제 저해활성과 갯버들 추출물의 항산화 및 티로시나제 억제활성이 최근 보고되었다[16,17].

불로초 (영지버섯, *Ganoderma lucidum*)는 아시아, 유럽, 북미 등 전 세계적으로 널리 분포하며, 항염, 항종양, 항암, 당뇨, 고혈압 등에 효과가 있어 한국, 중국, 일본 등의 아시아 지역에서 오래전부터 사용된 대표적인 약용버섯이다[18-20]. 또한 불로초는 질병의 예방 및 치료를 위한 소재뿐 아니라 효과적인 기능성 화장품 소재로 활용 가능하다는 것이 보고되었다[21]. 최근 불로초에서 분리된 활성 성분 중 가노더마난디올(ganodermanondiol)이 멜라닌 생성세포의 멜라닌 생합성을 효과적으로 억제하고, 식물 소재의 불로초 균사배양이 미백활성을 나타내는 가노더마난디올의 생합성을 촉진한다고 보고되었다[22-24]. 그러나 미생물 중 버섯의 배양을 통한 기능성 화장품 소재 개발에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다.

본 연구는 갯버들 및 불로초의 기능성 화장품 소재로의 활용가능성을 제고하고 다양한 기능성 소재의 효과를 더욱 증진시키기 위한 방안으로 불로초 균사의 배양이 효과적이라는 것을 제안하고자 수행하였다. 이를 위해 갯버들 추출물과 갯버들에 불로초 균사를 배양한 추출물의 항산화 활성, 총 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, 콜라게나제 활성 억제율 및 인간 피부 섬유아 세포(human dermal fibroblast)의 type I procollagen 생성 유도능을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

불로초 균사 배양 및 추출물 제조

불로초 균사배양을 위해 농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과에서 분양받은 영지2호를 PDA (배지 1 L 당 agar 15 g, potato extract 4 g, glucose 20 g) 고체배지에 접종 후 25°C에서 5일간 배양하였다. 배양된 균사를 50 mL의 PDB 액체배지에 접종하고 28°C, 130 rpm조건으로 7일간 진탕배양하여 액체 종균으로 사용하였다.

갯버들은 JW 파마켄에서 제공받아 사용하였으며, 분쇄된 갯버들을 증류수와 혼합하고 121°C 조건에서 2시간 가압 멸균하여 갯버들 고체 배지를 제조하였다. 불로초 균사 액체종균을 10%

(v/w) 접종하고 28°C에서 30일 동안 배양하였다. 배양이 완료된 갯버들을 40배의 70% 에탄올로 75°C에서 2시간, 2회 환류 추출하였다. 추출물을 여과지(Whatman No.2, GE Health care, UK)로 여과한 후 감압농축하여 추출물을 확보하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 평가

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 Falcone et al. [25]에 의해 기술된 방법에 의해 분석하였다. 총 폴리페놀 함량은 20 µL (1 mg/mL) 시료 추출물을 20 µL의 Folin-Ciocalteu (FC) 및 1% Na₂CO₃ 160 µL와 혼합하여 1시간 동안 반응하고, 700 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

총 플라보노이드 함량은 25 µL (1 mg/mL) 시료 추출물을 125 µL의 멸균증류수와 5% NaNO₂ 8 µL와 혼합하여 5 분간 반응한 후 10% AlCl₃ 15 µL를 첨가하고, 6 분간 추가 반응하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 페놀 함량은 gallic acid를 표준시료로 사용하여 건조 추출물 무게 (g)에 대한 Gallic Acid Equivalents (GAE)의 무게 (mg)로 표현하였으며, 총 플라보노이드 함량은 Catechin을 표준시료로 사용하여 건조 추출물 무게 (g)에 대한 Catechin Equivalents (CE)의 무게 (mg)로 표현하였다.

DPPH radical 소거능 평가

블로초 균사배양 갯버들 추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능 분석을 위해 100 µL의 DPPH 용액 (0.2 mM in methanol, Santacruz Co.)과 메탄올에 희석된 다양한 농도의 시료 100 µL를 혼합하고 10분간 반응시킨 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 소거 활성은 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$\text{DPPH radical 소거능 (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{실험군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

In vitro 콜라게나제 저해 활성 평가

콜라게나제 저해활성 분석을 위한 기질액 및 효소액은 0.3 mg/mL의 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg 기질과 0.2 mg/mL의 콜라게나제를 4 mM의 CaCl₂이 함유된 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)에 각각 혼합하여 준비하였다. 농도별 시료 50 µL를 75 µL의 효소액 및 125 µL의 기질액과 혼합한 후 37°C에서 20분간 반응하였다. 반응 후 250 µL의 정지액(6% citric acid) 및 750 µL의 에틸아세테이트를 첨가하고 200 µL의 상층액을 320 nm에서 흡광도를 측정하여 콜라게나아제 저해활성을 평가하였다. 콜라게나제 저해활성은 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$\text{콜라게나제저해율 (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

HDFn 세포 배양 및 생존율 평가

인간피부섬유아 (HDFn) 세포 (PCS-201-010, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA)는 10% FBS 및 1% 항생제 (페니실린 및 스트렙토마이신)를 함유하는 DMEM (Thermo

Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)배지를 사용하여 37°C (5% CO₂)에서 배양하여 사용하였다.

HDFn 세포 생존율은 In Vitro Toxicology Assay Kit (Sigma, Korea)를 사용하여 평가하였다. 다양한 농도의 시료가 처리된 세포를 37°C (5% CO₂)조건에서 24시간 배양하고 neutral red를 처리한 후 암상태에서 1시간 반응하였다. 배지가 제거된 세포를 고정액으로 처리한 후 500 µL의 용해액으로 neutral red crystal을 용해시키고, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다. 세포 생존율은 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$\text{세포생존율 (\%)} = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

제1형 프로콜라겐 함량 평가

제1형 프로콜라겐 함량은 Procollagen Type I C- 펩티드 EIA 키트 (Takara, Korea)를 이용하여 분석하였다. HDFn 세포를 6-well plate에서 7×10^5 cells/well로 접종하고 37°C (5% CO₂)에서 24시간 동안 부착시켰다. HDFn 세포를 FBS를 첨가하지 않은 DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)배지로 교환하고 갯버들 및 갯버들 불로초 균사 배양 추출물을 각 50 및 100 µg/mL를 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다.

배양 후 세포를 PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4)로 세척하고 10,000 ×g에서 5분간 원심 분리한 후, 상층 액을 antibody-horseradish peroxidase (POD) conjugate 100 µL와 혼합하여 37°C에서 3시간 동안 반응하였다. 세포를 PBS (pH 7.4)로 4회 세척하고 기질용액 (H₂O₂ 및 tetramethylbenzidine)에서 15분간 반응하였다. 100 µL H₂SO₄로 반응을 멈추고 450 nm에서 흡광도를 측정했다. 표준 Procollagen I 형 C-Peptide의 혈청 농도를 기준으로 제1형 procollagen 함량을 µg/mL로 표시하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균값 ± 표준편차로 나타내었으며, Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) 프로그램을 사용하여 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA) 및 Tukey's test에 의한 사후검정을 통해 통계 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

불로초 균사 배양 한 갯버들 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 DPPH 라디칼 소거능 평가

갯버들 불로초 균사 배양에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 우선 Folin-Ciocalteu 시약을 사용하여 분석한 갯버들 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 136.02 mg GAE/g으로, AlCl₃방법을 이용한 갯버들 70% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 110.06 mg CE/g으로 확인되었다. 그러나 흥미롭게도 갯버들을 불로초 균사로 배양 후 추출된 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 10.1 mg GAE/g으로 분석되었으며, 총 플라보노이드 함량은 검출되지 않았다.

또한 갯버들 및 불로초 균사배양 갯버들 추출물의 다양한 농도를 처리하여 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과, 갯버들 추출물은 농도 의존적으로 소거능이 증가하여 125 µg/mL의 농도부터는 거의 모든 DPPH 라디칼을 소거하는 것으로 평가되었다 (Fig. 2). 그러나 불로초 균사배양 갯버들 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 결과와 유사하게 DPPH 라디칼 소거능은 갯버들 추출물 보다 상대적으로 매우 낮게 평가되었다(Fig. 2).

불로초 균사 배양에 의한 갯버들의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 소거능 감소는 다음과 같이 설명될 수 있다. 자연에 존재하는 다양한 식물은 다양한 생리활성을 가지는 성분을 함유하고 있으며, 이 중 플라보노이드는 두 개의 페닐 고리와 헤테로 사이클릭 고리로 구성된 15개의 탄소 골격의 일반적인 구조를 가지고 있으며[26], 폴리페놀(polyphenol)은 분자 하나에 페놀 그룹이 두 개 이상 있는 것이 특징이다. 폴리페놀은 일반적으로 타닌, 페닐프로파노이드(플라보노이드, 리그닌 등)으로 분류된다[27]. 또한 식물을 구성하는 주된 성분으로 셀룰로오스(cellulose), 헤미셀룰로오스(hemicellulose) 및 펙틴(pectin)이 있으며, 방향족인 리그닌(lignin)과 함

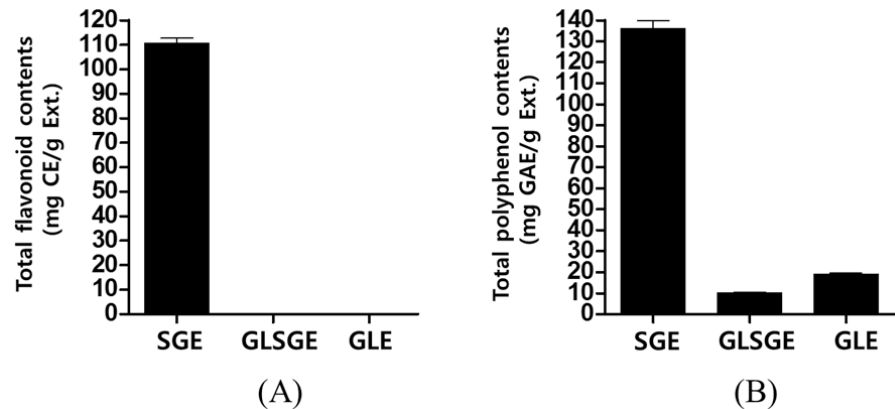


Fig. 1. Total polyphenol (A) and flavonoid (B) contents. SGE, *Salix gracilistyla* 70% EtOH extract. GLSGE, *Ganoderma lucidum* fermented *S. gracilistyla* 70% EtOH extract. CE, catechin equivalent. GAE, gallic acid equivalent.

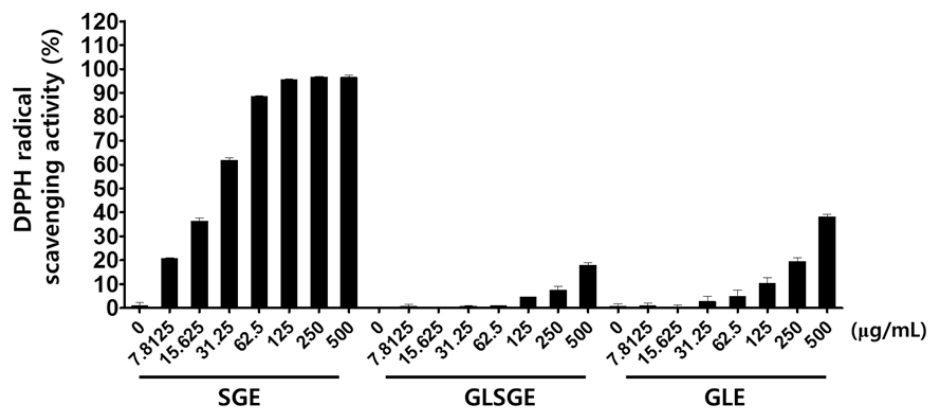


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities. SGE, *Salix gracilistyla* 70% EtOH extract. GLSGE, *Ganoderma lucidum* fermented *S. gracilistyla* 70% EtOH extract.

계 이들은 식물에 강성과 구조를 제공하고 세포를 미생물 공격으로부터 보호하는 분해 저항성 및 기능성 복합체를 형성한다[28].

많은 버섯이 담자균(Basidiomycete)에 속하며 자연에 존재하는 다양한 식물의 성분을 영양분으로 이용하여 성장한다. 버섯은 이러한 식물의 성분을 효율적으로 분해할 수 있는 cellulase 및 laccase 등의 CAZyme으로 불리는 다양한 효소를 높은 수준으로 생산하는 것이 잘 알려져 있다 [29]. 일반적으로 버섯을 인공적으로 생산하기 위한 재배에서 다양한 식물 소재를 영양원으로 사용하며, 이는 이러한 버섯의 특징을 활용하는 방법이다. 특히 다양한 버섯이 생산하는 효소 중 laccase (EC 1.10.3.2, oxygen oxidoreductase)는 diphenols, polyphenols, diamines 및 aromatic amine을 포함하여 다양한 유기 및 무기 화합물의 산화를 촉매하는 효소로 알려져 있다[30].

따라서 갯버들을 불로초 군사로 배양 시 갯버들에 함유된 다양한 폴리페놀과 플라보노이드 성분이 불로초가 생산하는 다양한 분해 효소 등에 의해 분해되어 그 함량이 감소하였으며, 이러한 결과로 DPPH 소거능도 함께 감소하였다고 사료된다.

불로초 군사 배양 갯버들 추출물이 콜라게나제 활성에 미치는 영향

불로초 군사배양 갯버들 추출물이 콜라게나제 활성에 미치는 영향을 분석하기 위해 각 추출물의 50, 100 및 200 µg/mL 농도로 콜라게나제 저해 활성을 분석하였다(Fig. 3). 우선 갯버들 추출물을 처리한 결과에서는 농도 의존적인 콜라게나제 저해 활성이 확인되었으며, 200 µg/mL 처리 농도에서는 대조구인 epigallocatechin gallate (EGCG)보다 높은 수준인 21.19%로 콜라게나제 활성을 저해하는 것으로 확인되었다.

그러나 총 폴리페놀, 플라보노이드 및 DPPH 라디칼 소거능 평가 결과와 유사하게 불로초 군사 배양 갯버들 추출물 처리는 효과적으로 콜라게나제 활성을 저해하지 않는 것이 확인되어 갯버들 추출물 성분 중 콜라게나제 활성을 저해하는 성분이 불로초 군사의 다양한 효소 등의 작용에 의해 분해되거나, 전환되었다고 판단된다.

따라서 갯버들의 불로초 군사 배양은 갯버들의 콜라게나제 저해활성을 효과적으로 상승시키

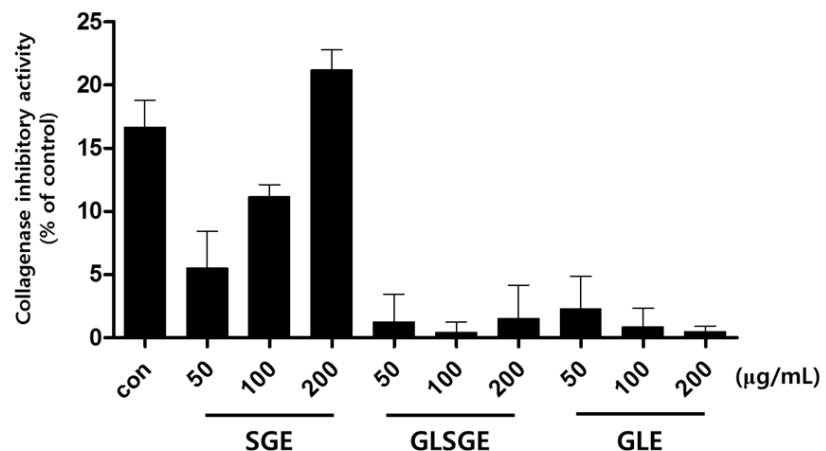


Fig. 3. Effects of extracts on collagenase inhibitory activities. SGE, *Salix gracilistyla* 70% EtOH extract. GLSGE, *Ganoderma lucidum* fermented *S. gracilistyla* 70% EtOH extract. EGCG, epigallocatechin gallate (200 µM).

지 못하며, 오히려 감소시키는 것이 확인되었다.

불로초 균사 배양 갯버들 추출물이 HDFn 세포의 생존율 및 제1형 프로콜라겐 생합성에 미치는 영향

불로초 균사배양 갯버들 추출물의 HDFn 세포의 제1형 프로콜라겐 생합성에 미치는 영향을 평가에 앞서, 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 4). 우선 갯버들 추출물을 농도별 (50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$)로 처리 시 HDFn 세포의 생존율이 비 처리구보다 유의적인 수준에서 농도 의존적으로 감소함이 확인되었다. 불로초 균사배양 갯버들 추출물의 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리는 HDFn 세포의 생존율을 유의적으로 감소시키는 것이 확인되었다.

그러나 흥미롭게도 불로초 균사배양 갯버들 추출물의 처리는 갯버들 추출물의 동일 처리 농도와 비교하여 유의적으로 증가시키는 것이 확인되었다. 갯버들 추출물 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리 시 HDFn 세포의 생존율은 65.95%이었으며, 동일 농도의 불로초 균사배양 갯버들 추출물의 처리는 105.39%로 확인되었다. 또한 갯버들 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리 시 HDFn 세포의 생존율 더욱 감소하여 37.31%로 확인되었으나, 동일 농도의 불로초 균사배양 갯버들 추출물의 처리는 107.36%로 약 3배 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 갯버들이 함유하고 있는 성분 중 HDFn 세포의 생존율 감소에 영향을 미치는 활성성분이 불로초 균사의 배양으로 인하여 감소되었다는 것을 의미하는 것이다.

이러한 결과를 바탕으로 불로초 균사배양 갯버들 추출물의 HDFn 세포의 제1형 프로콜라겐 생합성에 미치는 영향을 평가하였다(Fig. 5). HDFn 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 불로초 균사배양 갯버들 추출물의 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 HDFn 세포에 처리하여 제1형 프로콜라겐 생합성에 미치는 영향을 분석한 결과, 두 농도 모두 HDFn 세포의 제1형 프로콜라겐 생합성이 증가하는 것이 확인되었다. 그러나 동일한 농도의 갯버들 추출물 처리시 모든 농도에서 HDFn

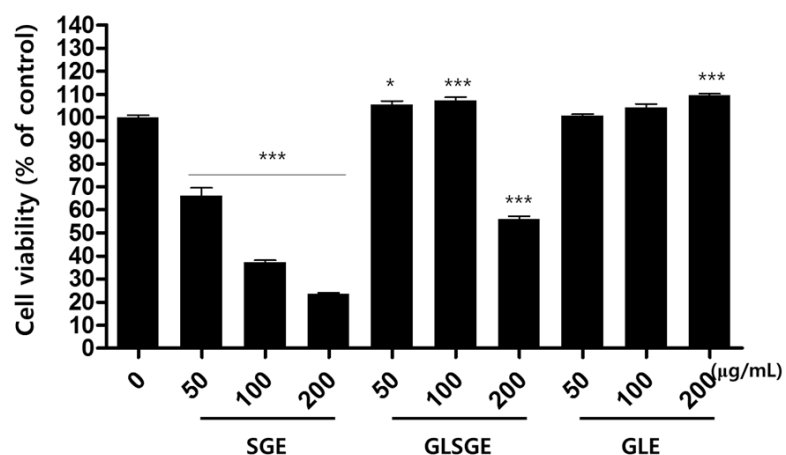


Fig. 4. Effects of extracts on HDFn cell viability. SGE, *Salix gracilistyla* 70% EtOH extract. GLSGE, *Ganoderma lucidum* fermented *S. gracilistyla* 70% EtOH extract. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. a, $p < 0.001$ versus non-treatment. b, $p < 0.001$ versus 50 $\mu\text{g/mL}$ of SGE. c, $p < 0.001$ versus 100 $\mu\text{g/mL}$ of SGE. d, $p < 0.001$ versus 200 $\mu\text{g/mL}$ of SGE.

세포의 제1형 프로콜라겐 생합성이 크게 감소하는 것이 확인되었다. 갯버들 추출물 50 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 HDFn 세포의 제1형 프로콜라겐 생합성이 각 28.15 및 23.16%로 감소하였고, 동일 농도의 불로초 군사배양 갯버들 추출물 처리는 각 117.43 및 124.52% 유의적인 수준에서 4배 이상 증가하는 것이 확인되었다. 또한 불로초 군사배양 갯버들 추출물 50 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리는 비 처리 구 보다 각 17.43% 및 24.52%로 HDFn 세포의 제1형 프로콜라겐 생합성이 증가하는 것이 확인되었다.

이러한 결과는 갯버들의 불로초 군사 배양이 갯버들의 HDFn 세포의 생존율에 영향을 미치는 성분을 효과적으로 제거하고 이를 통하여 세포의 증식 및 제1형 프로콜라겐의 생합성을 효과적으로 증가시킨다는 것을 의미하는 것이다.

피부에 가장 풍부한 제1형 콜라겐 (fibrillar type collagen)은 세포외기질 (ECM)의 주요 구조 성분이다. 제1형 콜라겐의 수용성 전구체인 1형 프로콜라겐은 섬유아 세포 (fibroblast)에서 합성 및 분비되고 procollagen N- 및 C- 프로테아제에 의해 절단되어 콜라겐 섬유를 형성한다[1]. 비록 불로초 군사배양 갯버들 추출물이 콜라게나제 활성을 효과적으로 억제하지는 못하였으나, 실제 피부의 콜라겐 생합성에 중요한 역할을 담당하는 HDFn 세포의 생존율 및 제1형 프로콜라겐의 생합성을 증가시킨다는 것은 불로초 군사배양 갯버들 추출물이 향후 피부 노화방지 등에 효과적으로 활용

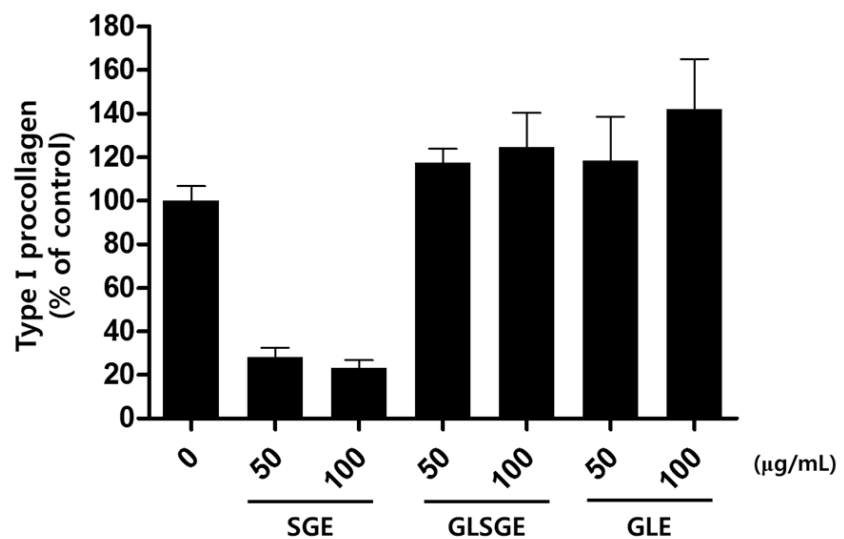


Fig. 5. Effects of extracts on cellular type I procollagen content of HDFn cells. SGE, *Salix gracilistyla* 70% EtOH extract. GLSGE, *Ganoderma lucidum* fermented *S. gracilistyla* 70% EtOH extract. a, $p < 0.001$ versus 50 $\mu\text{g/mL}$ of SGE. b, $p < 0.001$ versus 100 $\mu\text{g/mL}$ of SGE. c, $p < 0.05$ versus non-treatment.

될 가능성이 크다는 것을 의미하는 것이다. 나아가 개발되거나 개발 중에 있는 기능성 소재의 효과를 증진시키기 위한 방안으로 버섯을 포함한 다양한 미생물의 활용이 효과적일 것이라고 사료된다.

적요

본 연구는 갯버들(*Salix gracilistyla*)의 화장품 소재로의 활용가능성을 판단하기 위해, 기존 일반적인 방법이 아닌 균사배양 방법을 통해 가능성을 확인하였고, 구체적으로는 대표적인 약용버섯인 불로초(*Ganoderma lucidum*) 균사의 배양을 통하여 그 효능을 확인하였다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼소거능 분석결과에서는, 갯버들 추출물(SGE)이 불로초 균사배양 갯버들 추출물(GLSGE) 보다 높게 평가되었으나, 콜라게나제 활성 억제 평가에서는 불로초 균사배양 갯버들 추출물(GLSGE)이 갯버들 추출물(SGE)과 비교하여 상대적으로 낮게 평가되었다. 그럼에도 불구하고, 불로초 균사배양 갯버들 추출물(GLSGE)은 갯버들 추출물(SGE)을 처리한 경우보다, HDFn 세포의 생존율을 높은 수준으로 증가시켰으며, HDFn 세포의 제1형 프로콜라겐의 생합성 또한 매우 높은 수준으로 증가시키는 것이 확인되었다. 결과적으로 앞선 실험을 통해, 불로초 균사배양 갯버들 추출물이 항노화 활성을 가지는 기능성 화장품 소재로 활용 가능성이 있다고 사료되며, 기능성 소재의 효과를 더욱 증진시키기 위한 방안으로 불로초 균사의 배양이 효과적이라는 것을 의미한다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Technology development Program (S2447548) funded by the Ministry of SMEs and Startups (MSS, Korea)

REFERENCES

1. Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol* 2004; 165:741-51.
2. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem* 2003;253:269-85.
3. Shingleton WD, Cawston TE, Hodges DJ, Brick P. Collagenase: A key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol* 1996;74:759-75.
4. Cao YH, Cao RH. Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature* 1999;398:381.
5. Madsen HL, Bertelsen G. Spices as antioxidants, *Trends Food Sci Technol* 1995;6:271-7.
6. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 1999;47:3954-62.
7. Makimura M, Hirasawa M, Kobayashi K, Indo J, Sakanaka S, Taguchi T, Otake S. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol* 1993;64:630-6.
8. Liu Z, Li F, Zhang L, Yu H, Yu F, Chen J. The effect of active components from citrus fruits on

- dentin MMPs. Arch Oral Biol 2017;83:111-7.
9. Freischmidt A, Jrgenliemk G, Kraus B, Okpanyi SN, Miller J, Kelber O, Weiser D, Heilmann J. Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised willow bark extract. Phytomedicine 2012;19:245-52.
 10. Li X, Liu Z, Zhang XF, Wang LJ, Zheng YN, Yuan CC, Sun GZ. Isolation and characterization of phenolic compounds from the leaves of *Salix matsudana*. Molecules 2008;13:1530-7.
 11. Sultana S, Saleem M. *Salix caprea* inhibits skin carcinogenesis in murine skin: inhibition of oxidative stress, ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis. J Ethnopharmacol 2003;91:267-76.
 12. Alam MS, Kaur G, Jabbar Z, Javed K, Athar M. Evaluation of antioxidant activity of *Salix caprea* flowers. Phytother Res 2006;20:479-83.
 13. Shivatare RS, Phopase ML, Nagore DH, Nipanikar SU, Chitlange SS. Development and validation of HPLC analytical protocol for quantification of salicin from *Salix alba* L.. Inventi Impact: Pharm Anal Qual Assur 2015;2015: 1-6.
 14. Kim KS. A study on development of functional scalp cosmetics materials *Salix gracilistyla* extract [dissertation]. Gwangju: Nambu University; 2017.
 15. Seo JH. Studies on the flavonoid constituents isolated from the leaves of *Salix gracilistyla* Miquel [dissertation]. Andong: Andong National University; 2001.
 16. Jeong YU, Park YJ. Studies on antioxidant, anti-inflammation, and collagenase inhibitory effects of extracts from plants of the genus *Salix*. J Soc Cosmet Sci Korea 2018;44:335-41.
 17. Jeong YU, Park YJ. Studies on antioxidant and whitening activities of *Salix gracilistyla* extracts. J Soc Cosmet Sci Korea 2018;44:317-25.
 18. Chen JH, Jiang RL. A pharmacological study of the Chinese drug lingzhi (*Ganoderma*). Acta Pharm Sin B 1980;15:234-44.
 19. Furusawa E, Chou SC, Furusawa S, Hirazumi A, Dang Y. Antitumour activity of *Ganoderma lucidum*, an edible mushroom, on intraperitoneally implanted lewis lung carcinoma in syngenic mice. Phytother Res 1992;6:300-4.
 20. Shiao MS, Lee KR, Lin JJ, Wang CT. Natural products and biological activities of the Chinese medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. In: Ho CT, Osawa T, Huang T, Rosen RT editors. Food phytochemicals for cancer prevention II: Teas, spices and herbs. Washington, USA: American Chemical Society; 1994. p. 342-54.
 21. Chien CC, Tsai ML, Chen CC, Chang SJ, Tseng CH. Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms. Mycopathologia 2008;166:117-20.
 22. Kim JW, Kim HI, Kim JH, Kwon O, Son ES, Lee CS, Park YJ. Effects of ganodermanondiol, a new melanogenesis inhibitor from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Int J Mol Sci 2016;17:e1798.
 23. Jeong YU, Kim HI, Kim JH, Park YJ. Enhancement of ganodermanondiol and anti-melanogenesis effect of *Ganoderma lucidum* by *Rhus verniciflua* extract supplementation. J Soc Cosmet Sci Korea 2017;43:365-71.
 24. Kim HI, Jeong YU, Kim JH, Choi IH, Lee JH, Lee CS, Park YJ. Anti-melanogenesis effect of *Ganoderma lucidum* mycelial extract supplemented with oriental raisin tree (*Hovenia dulcis*) extract. J Soc Cosmet Sci Korea 2017;43:357-64.
 25. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front Plant Sci 2012;3:e222.
 26. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev 2009;2:270-8.

27. Rytioja J, Hilden K, Yuzon J, Hatakka A, de Vries RP, Makela MR. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78:614-49.
28. Park YJ, Jeong YU, Kong WS. Genome sequencing and carbohydrate-active enzyme (CAZyme) repertoire of the white rot fungus *Flammulina elastica*. *Int J Mol Sci* 2018;19:e2379.
29. Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed J* 1999;3:1-16.
30. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2002;50:3010-4.