

피부 바이오색소인 Melanin 생합성을 억제하는 식물추출물 저해제의 탐색

김진희*, 이준원**

요약

멜라닌 과잉생산으로 인한 피부노화나 손상을 방지, 억제하기 위한 멜라닌 생합성 저해물질을 탐색하고자, 최근 여러 가지 기능 및 효능으로 주목 받고 있는 식물 추출물들을 가지고 멜라닌 생합성에 key enzyme인 mushroom tyrosinase 활성 저해효과를 검색하였다. 식물의 methanol추출물을 Hexane, CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O로 용매 분획하여 각각 농축하고 이를 10 mg/ml의 MeOH 에 녹여 100 µg/ml의 농도로 활성을 검색한 결과, 꿀(꿀)풀의 CHCl₃층, 등골나무 (줄기, 잎)의 H₂O층, 박새의 BuOH층, 이팝나무의 Hexane층과 회화나무의 BuOH층 5종은 mushroom tyrosinase activity에 대해서 가장 강한 활성 (>80%)을 나타내었으며, 그중 박새 butanol층과 회화나무 hexane층의 활성이 우수한 것으로 나타났다. 본 실험을 통해 식물추출물로부터 기존의 미백제를 대체할 수 있는 인체에 안정한 화합물을 발견할 수 있을 것이라 사료된다.

Inhibitory Activity of Plant Extracts on biosynthesis of Melanin as the biological pigment on skin

Jin-Hee Kim*, Jun-Won Lee**

ABSTRACT

The inhibitory effects of solvent extracts of 75 plants on melanin biosynthesis were investigated. Amongst the plant extracts, CHCl₃ fraction of *Juncus effusus*, H₂O fraction of *Eupatorium chinensis*, BuOH fraction of *Veratrum patulum*, Hexane fraction of *Chionanthus retusa*, and Hexane fraction of *Sophora japonica* showed a significant mushroom tyrosinase inhibitory effects with above 80% at 100 µg/ml. Among these, BuOH fraction of *Veratrum patulum* will be studied further to elucidate the structure and chemical properties of the active compound responsible for melanin biosynthesis inhibitory action.

Key Words : Melanin biosynthesis, mushroom tyrosinase, solvent extracts, *Juncus effusus*, *Eupatorium chinensis*

* 대구한의대학교 한방피부미용학과

** 배재대학교 생명유전공학과

· 제1저자(First Author) : 김진희 · 교신저자(Correspondent Author) : 이준원

· 접수일(2010년 3월 23일), 수정일(1차 : 2010년 4월 26일), 게재확정일(2010년 4월 30일)

I. 서 론

Melanin은 자연계에 널리 분포하는 페놀계의 생체 고분자물질로서, 보통 사과나 감자의 갈변작용이나 동물의 외피나 깃털, 인체의 피부, 머리, 눈 등에서 멜라닌합성이 이루어지는 것을 쉽게 관찰할 수가 있다. 멜라닌은 자외선을 흡수, 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하여 피부의 광노화나 일광각화증을 억제하는 역할을 하는 긍정적인 기능을 가지는 반면[1, 2], 미용적인 측면에서의 색소 침착뿐만 아니라 멜라닌 전구물질 등에 의한 독성으로 인한 세포사멸 등 부정적인 기능도 가지고 있다[3, 4]. 따라서 최근에 이러한 피부 노화의 방지나 억제를 위해 멜라닌 색소의 생성을 억제시키는 물질에 대한 관심이 증가되고 있다[5, 6].

기미, 주근깨 등 피부에 생기는 색소 침착은 표피 내에서의 melanin 색소의 이상적 증가에 기인하며, 표피 기저층에 존재하는 melanocyte라고 불리는 색소 세포내의 melanosome에서 생합성 된다. Melanin 생합성에 key enzyme으로 알려진 tyrosinase는 melanosome내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa, indole-5, 6-quinone으로 자동 산화되고 최종적으로 중합에 의해 melanin polymer를 생성한다[7, 8].

피부에서의 melanin 생합성에는 필수 효소인 tyrosinase를 비롯하여 TRP-1 (tyrosinase related protein-1) 및 TRP-2 (dopachrome tautomerase)가 관련되는 것으로 알려져 있다[9]. 또한 자외선이나 estrogen, testosterone, glucocorticoid, prostaglandin 등과 같은 다양한 호르몬에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으며[10, 11], 이외에도 dopachrome conversion factor, interferon (IFN), cyclic AMP 또는 melanocyte stimulation hormone (MSH), Vit D30, hitamine 등이 melanin 생합성에 관여하는 것으로 보고되어 있다[12, 13, 14].

현재 tyrosinase 저해제로서 kojic acid와 arbutin이

미백제로 많이 사용되나 세포독성, 돌연변이 유발 등의 부작용 등이 보고되고 있다.[15] 따라서, 이러한 부작용이 없으면서 tyrosinase저해활성이 높은 멜라닌 생합성 저해물질의 개발이 요구되고 있다.

본 연구에서는 다양한 식물 추출물을 가지고 tyrosinase 저해 활성 및 멜라닌 생합성 저해 활성을 나타내는 물질을 찾고자 멜라닌 생성의 key enzyme인 tyrosinase을 통한 측정방법을 확립하여 이를 이용한 저해활성을 검색하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

2.1 시약

실험에 사용한 무기염류 및 일반용매는 시약특급을 사용하였고, MeOH, Hexane, EtOAc, BuOH 등의 용매는 일반시약을 사용하였으며, tyrosinase assay에 사용된 기질 및 효소 등은 Sigma제품을 사용하였다.

2.2 식물재료

실험에 사용한 75종의 시료는 전국의 산야에 자생하는 식물을 채취, 음건, 쇄절 후 메탄올에 냉침하여 그의 추출물을 농축한 것이다. 이들 각 시료들은 농축 후, Hexane, EtOAc, BuOH, H₂O로 각각 용매 분획하여, 각 시료들을 methanol에 10mg/ml로 희석하여 tyrosine 저해활성을 측정하였다.

2.3 Mushroom Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase에 대한 저해활성은 96 well plate (SPL, Korea)에 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 150 μ l, 1.5 mM L-tyrosine solution 25 μ l와 2100 unit/ μ l mushroom tyrosinase(Sigma, 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 7 μ l을 넣은 후, sample을 15 μ l 처리하여 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후, microplate reader (Bio-Rad 3550)를 사용하여 optical density를 490 nm

에서 측정하였다. Tyrosinase에 대한 저해율 (%)은 다음 식에 의하여 계산하였으며, IC50 값은 저해물질 효소 활성의 50 %를 저해하는 sample 농도를 환산하였다(16).

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

- A: 저해제를 넣은 것의 반응 전 흡광도
- B: 저해제를 넣은 것의 반응 후 흡광도
- C: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전 흡광도
- D: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 후 흡광도

III. 결과 및 고찰

Tyrosinase 로 인한 멜라닌 생성 저해 역가는 75 종 식물을 대상으로 실온에서 methanol로 2회 추출하고, 여과한 methanol 추출액을 감압농축한 후 증류수에 현탁하여 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water로 각각 추출하여 mushroom tyrosinase 활성을 측정하였다. (Table 1) 37°C에서 30분간 방치한 후 control 보다 저해역가가 다른 활성분획에 비해 높은 값들을 선택하였다. Table 2를 보면 Inhibition 비율이 60%이상인 것들로는 고들빼기 ethylacetate층, water층, 노루오줌 hexane층, 누리장 나무 hexane층, chloroform층, 떡쭈 chloroform층, 매듭풀 chloroform층, 명아주 chloroform층, 산오이풀 ethylacetate층, 철쭉 chloroform층, 회화 나무 butanol층이었다. 그리고 Inhibition 비율이 80%이상의 높은 값을 보이는 것들로는 꿀풀 chloroform층, 등골나무 (줄기와 잎) water층, 박새 butanol층, 이팝나무 hexane층, 회화 나무 butanol층이 우수한 활성을 보였다. (Table 2) 이들을 가지고 2차 screening을 한 결과 박새 butanol층, 회화 나무 hexane층이 tyrosinase inhibitory activity가 높은 것으로 나타났다.

Fig. 1을 보면 이들은 농도가 증가함에 따라 tyrosinase inhibitory activity가 농도 의존적으로 증가하고 있다. 이들 각각의 IC50값을 보면, 박새 butanol층은

15.32 $\mu\text{g/ml}$, 회화나무 hexane층은 56.96 $\mu\text{g/ml}$ 이다. 문헌에 보고된 바에 의하면 박새 추출물에는 alkaloids 성분 및 hydroxystilbene 성분들이 존재한다고 보고되어 있으며[17], 회화나무 추출물에는 isoflavonoid 화합물, glycoprotein 및 polysaccharide 들이 다량 존재한다고 보고되어 있다.[18][19] 즉, 박새 butanol층과 회화나무 hexane층 추출물에도 tyrosinase를 저해하는 활성을 가진 화합물이 다량 존재할 것으로 판단된다.

따라서 기존의 알려진 arbutin, kojic acid등과 같이 독성을 동반한 미백제를 대신할 수 있는 강력한 미백제 개발이 가능할 것이라 사료되며, 여러 가지 식물 추출물중 박새 와 회화나무의 미백성분에 대한 보다 깊은 연구가 수반되어야 할 것이라 사료된다.

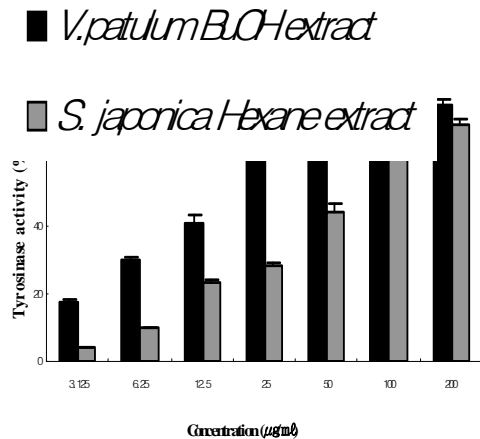


그림 1. 박새의 BuOH extract와 회화나무의 Hexane extract에 대한 tyrosinase 저해 활성
 Fig. 1. Tyrosinase inhibitory activity of *V. patulum* BuOH extract and *S. japonica* Hexane extract

표 1. 멜라닌생합성에 대한 메탄올 식물추출물
Table 1. methanol extracts from plants on melanin biosynthesis

Kor. name	Scientific name	Family name	Used part
고들빼기	<i>Ixeris sonchifolia</i>	Chrythantaceae	Whole
고추나무	<i>Hypericum erectum</i>	Guttiferae	Whole
곰취 (뿌리)	<i>Ligularia fischeri</i>	Compositae	Root
곰취 (잎)	<i>Ligularia fischeri</i>	Compositae	Leaf
광대싸리 (열매)	<i>Laminum barbatum</i>	Labiatae	Fruit
광대싸리 (잎)	<i>Laminum barbatum</i>	Labiatae	Leaf
궁궁이	<i>Angelica polymorpha</i>	Umbelliferaeaceae	Whole
금목서	<i>Osmanthus fragrans var.</i>	Oleaceae	Whole
꽃향유	<i>Elsholtzia splendens</i>	Labiatae	Whole
꿀(꿀)풀	<i>Juncus effusus</i>	Juncaceae	Whole
평의비름	<i>Sedum erythrostichum</i>	Crassulaceae	Leaf
낙우송	<i>Taxodium distichum</i>	Taxodicaceae	Aerial part
노루오줌	<i>Astilbe chinensis</i>	Saxifragaceae	Aerial part
노린재나무	<i>Symplocos chinensis</i>	Symplocaceae	Whole
등근잎평의비름	<i>Sedum rotundifolium</i>	Crassulaceae	Leaf
등골나무 (줄기, 잎)	<i>Eupatorium chinensis</i>	Compositae	Stem,Leaf
등골나무뿌리	<i>Eupatorium chinensis</i>	Compositae	Root
매죽나무 (열매)	<i>Styrax japonica</i>	Styracaceae	Fruit
매죽나무잎	<i>Styrax japonica</i>	Styracaceae	Leaf
떡쑥	<i>Gnaphalium affine</i>	Compositae	Whole
매듭풀	<i>Kummerowia striata</i>	Leguminosa	Stem, Leaf
메꽃	<i>Calystegia japonica</i>	Convolvulaceae	Whole
명아주	<i>Chenopodium album</i>	Leguminosa	Leaf
무궁화	<i>Hibiscus syriacus</i>	Malvaceae	Whole
문주란잎	<i>Crinum asiaticum</i>	Amaryllidaceae	Leaf
물매화	<i>Parnassia palustris</i>	Saxifragaceae	Whole
미국가막사리	<i>Bidens frondosa</i>	Compositae	Whole
바랭이	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Graminales	Whole
박새	<i>Veratrum patulum</i>	Liliaceae	Root
박주가리	<i>Metaplexis japonica</i>	Asclepiadaceae	Whole
배롱나무	<i>Lagerstroemia india</i>	Lythraceae	Aerial part
벗나무	<i>Prunus serrulata</i>	Rosaceae	Aerial part
보리장나무	<i>Elaeagnus globra</i>	Elaeagnaceae	Aerial part
산오이풀	<i>Sanguisorba hakusanensis</i>	Rosaceae	Whole
생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	Lauraceae	Stem,Leaf
송이풀	<i>Pedicularis resupinata</i>	Scrophulariaceae	Whole
쇠무릅	<i>Achyranthes japonica</i>	Amaranthaceae	Whole
아그배나무	<i>Malus sieboldii</i>	Rosaceae	Aerial part
애기동백	<i>Camellia japonica</i>	Ternstroemiaceae	Flora
웃나무	<i>Rhus verniciflua</i>	Anacardiaceae	Whole

왕괴불나무	<i>Lonicera vidalii</i>	Caprifoliaceae	Aerial part
왕모시풀	<i>Boechmeria pannosa</i>	Urticaceae	Whole
이질풀	<i>Geranium thunbergii</i>	Geraniaceae	Whole
이팝나무	<i>Chionanthus retusa</i>	Oleaceae	Oleaceae
일본백목련	<i>Magnolia denudata</i>	Magnoliaceae	Fruit
조개나물	<i>Ajaga multiflora</i>	Labiatae	Whole
조릿대	<i>Sasaborealis</i>	Graminales	Whole
중국단풍	<i>Acerbuengerianum</i>	Aceraceae	Leaf
취뽕나무	<i>Ligustrum obtusifolium</i>	Oleaceae	Aerial part
지리바꽃	<i>Aconitum Chiisanense</i>	Ranunculaceae	Whole
지리터리풀	<i>Filipendula formosa</i>	Rosaceae	Whole
진득찰	<i>Siegesbeckia glabrescens</i>	Compositae	Stem, Leaf
철쭉	<i>Rhododendron Schlippenbachii</i>	Ericaceae	Whole
코스모스	<i>Cosmos bipinnatus</i>	Compositae	Whole
큰까치수염	<i>Lysimachia chlethroides</i>	Primulaceae	Whole
팔손이	<i>Fatsia japonica</i>	Araliaceae	Stem
포도줄기	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	Stem
협죽도	<i>Nerium indicum</i>	Apocynaceae	Whole
호랑가시나무	<i>Ilex cornuta</i>	Aquifoliaceae	Aerial part
회화나무	<i>Sophora japonica</i>	Leguminosa	Aerial part

표 2. 식물추출물의 용매분획에 대한 tyrosinase 저해 활성
Table 2. Tyrosinase inhibitory activity of solvent fractions of plant extracts

Kor. name	Tyrosinase Inhibitory Activity				
	Hexane	CHCl ₃	EtOAc	BuOH	H ₂ O
고들빼기	-	-	++	-	++
고추나무	-	-	-	-	-
곰취 (뿌리)	-	-	-	-	-
곰취 (잎)	-	-	-	-	-
광대싸리 (열매)	-	-	-	-	-
광대싸리 (잎)	-	-	-	-	-
궁궁이	-	-	-	-	-
금목서	-	-	-	+	-
꽃향유	-	+	-	-	-
꿀(꿀)풀	-	-	-	-	-
평의비름	+	+++	-	-	+
낙우송	-	-	-	-	-
노루오줌	-	-	-	-	-
노린재나무	++	-	-	-	-
노린재나무 (열매)	-	-	-	-	-
누리장나무	-	-	-	-	-
박주가리	++	++	-	-	-
누운개비자나무	-	-	-	-	-

느티나무	-	-	-	-	-
단풍취	-	-	-	-	-
당단풍	-	-	-	-	-
도꼬마리	-	-	-	-	-
도꼬마리 (지상)	-	-	-	-	-
돈나무 (잎, 가지)	-	-	-	-	+
등근잎깽의비름	-	-	-	-	-
등골나무 (줄기, 잎)	-	-	-	-	+++
등골나무뿌리	-	-	-	-	-
매죽나무 (열매)	-	-	-	+	-
매죽나무 (잎)	-	-	-	-	-
떡쑥	-	++	+	+	-
매듭풀	-	++	-	-	-
매꽃	-	-	-	-	+
명아주	+	++	-	-	-
무궁화	-	-	-	-	-
문주란잎	-	-	-	-	-
물매화	-	-	-	-	-
미국가막사리	-	-	-	-	-
바랭이	-	-	-	-	-
박새	-	-	-	+++	-
방동사니(숙)	-	-	-	-	-
배롱나무	-	-	-	-	-
벗나무	-	-	-	-	-
보리장나무	-	-	-	-	-
비목나무 (열매)	+	-	-	-	+
비목나무 (잎)	+	-	-	-	+
비비추	-	-	-	+	+
비수리	-	-	-	-	-
산딸나무 (열매)	-	-	-	-	-
산수국	-	-	-	-	-
산오이풀	-	-	++	-	-
생강나무	-	-	-	-	-
송이풀	-	-	-	-	+
쇠무릅	-	-	-	-	+
아그배나무	-	-	-	-	-
애기동백	-	-	-	-	-
웃나무	-	-	-	-	-
왕괴불나무	-	-	-	-	-
왕모시풀	-	-	+	-	-
원추리	-	-	-	-	-
이질풀	-	-	-	-	-

이팝나무	+++	-	-	-	-
일본백목련	-	-	-	-	+
조개나물	-	-	-	-	-
조릿대	-	-	-	-	-
중국단풍	-	-	-	-	-
취뽕나무	+	+	-	-	-
지리바꽃	-	-	-	-	-
지리터리풀	-	+	-	-	-
진득찰	-	-	-	-	-
철쭉	-	++	-	-	-
코스모스	-	-	-	-	-
큰까치수염	-	-	-	-	-
팔손이	-	-	-	-	-
포도줄기	-	-	-	-	-
혈죽도	-	-	-	+	-
호랑가시나무	+	-	-	-	+
회화나무	+++	-	-	++	-

Each sample was treated 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and results are mean of triplicate. The symbols are represented as follows:+++>80% inhibition occurred, ++: 80-60%, +: 60-40%, -: <40%

참고문헌

- [1] Y. Mishima, S. Hatta, and Y. Ohyama, "Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action", *Pigment Cell Res.* Vol. 1, pp. 367-374, 1988.
- [2] H. Matubara, "Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells", *Natural Product Sciences.* Vol. 4, No. 3, pp. 161-169, 1998.
- [3] B. W. Choi, "Screening of the tyrosinase inhibition from marine algae and medicinal plants", *Kor. J. Pharmacogn.* Vol. 29, No. 3, pp. 237-242, 1998.
- [4] M. Matsusukami, "Evaluation of antimelanogenic effects", *Frangance.* Vol. 19, No. 1, pp. 14, 1995.
- [5] A. A. Bell, and M. H. Weeler, "Biosynthesis and function of fungal melanin", *Ann. Rev. Phytopathol.* Vol. 24, pp. 411-451, 1986.
- [6] C. J. Kim., H. K. Lee., Y. H. Kim., K. S. Kim., Y. B. Seo., H. S. Lee. and B. S. Yun., "신물질탐색", *자유아카데미*, 1996.
- [7] V. J. Hearing, and T. M. Ekel, "Mammalian tyrosinase", *Biochem. J.* Vol. 157, pp. 549-557, 1976.
- [8] G. Prota., "Melanin and melanogenesis", *Academic Press*, New York, 1992.
- [9] K. Kameyama, T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, and S. Nishi-yama, "Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor", *J. Invest. Dermatol.* Vol. 100, pp. 126-132, 1993.
- [10] T. W. Lim, J. W. Lee, and M. H. Lee, "Effects of Licorice extract on proliferation and melanization in cultured normal human melanocytes", *동서의학연구소 논문집*, Vol, 2000, pp. 247-254, 2001.
- [11] B. Roserand, and B. Robert, "Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation", *Pigment Cell Res.* Vol. 13, pp. 60-69, 2000.
- [12] S. H. Lee, J. S. Park, S. Y. Kim, and S. R. Chung,

- "The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product", *Yakhak Hoeji* Vol. 41, pp. 456-461, 1997.
- [13] A. Pilar, U. Kazunor, K. Takeshi, T. Katsuhiko, and V. J. Hearing, "Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation", *J. Biol. Chem.* Vol. 268, pp. 25650-25655, 1993.
- [14] K. U. Schallreuter, J. Moore, D. J. Tobin, N. J. Gibbons, H. S. Marshall, T. Jenner, W. D. Beazley, and J. M. Wood, "α-MSH can control the essential cofactor 6-terahydrobiopterin in melanogenesis", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. 885, pp. 329-341, 1999.
- [15] C. L. Duncan, and E. M. Foster, "Effect of sodium nitrite, sodium chloride, and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores", *Appl Microbiol.* Vol. 16, No. 2, pp. 406-11, 1968.
- [16] S. H. Baek, J. H. Kim, H. J. Kim, S. M. Lee, Y. H. Kho, and C. H. Lee, "Melanin biosynthesis inhibitory activities of coumarins isolated from *Angelica polymorpha* MAXIM", *Kor. J. Microbial. Biotechnol.* Vol. 31, No. 2, pp. 135-139, 2003.
- [17] D. H. Kim, J. H. Kim, S. H. Bae, J. H. Seo, Y. H. Kho, and C. H. Lee, "Enhancement of tyrosinase inhibition of the extract of *Veratrum patulum* using cellulase", *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 87, No. 7, pp. 849-54, 2004.
- [18] Y. Tezuka, T. Kikuchi, W. Zhao, J. Chen, and Y. Guo, "Two new steroidal alkaloids, 20-isoveratramine and verapatuline, from the roots and rhizomes of *veratrum patulum*", *J. Nat. Prod.* Vol. 61, No. 9, pp. 1078-81, 1998.
- [19] C. S. Yook, and Y. K. Yoo, "Studies of the constituents and the antibacterial activity of the deferent organs of *Sophora japonica*", *경희약대논문집*, Vol. 17, pp. 75-87, 1989.



김진희(Jin-Hee Kim)

1999 충남대학교 식품영양학과
(가정학석사)
2004 충남대학교 식품영양학과
(이학박사)

2010년~ 현재 대구한의대 교수
※ 관심분야: 생리활성대사산물, 기능대사체학



이준원 (Jun-Won Lee)

1996 배재대학교 유전공학과(이학석사)
2001 연세대학교 생명공학과(공학박사)
2006 전남대학교 의과대학 연구교수

2008년~ 현재 배재대학교 생명유전공학과 교수
※ 관심분야: 생리활성대사산물, 골질병 약제 개발,

감사의 글

본 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입(No.2010-0004620).