

황칠·미강 발효 추출물이 tyrosinase 활성 저해 및 항산화에 미치는 효과

최찬현·안정은·임성수¹·정현우*

동신대학교 한의과대학, 1: 빛가람 생명농업공동체 협동조합

Effects of Vinegar Fermentation of Korean Dendropanax and Rice Bran Mixture on the Activity of Tyrosinase and Anti-Oxidant in B16F10 Cell Line

Chan Hun Choi, Jeong Eun An, Song Su Lim¹, Hyun Woo Jeong*

College of Korean Medicine, Dongshin University, 1: Bitgaram ecofarm community cooperation

In this study, we used the mixture made from the Rice bran 45 kg, Dendropanax 5 kg, the sugar of the 10% of the total weight, and the enzyme of the 0.1% of the total weight. After the mixture were fermented for 90 days under 20 °C, we measured the cell viability and the inhibition rate of the melanin biosynthesis, the activity of tyrosinase and superoxide dismutase (SOD) in malignant melanoma, B16F10 cells, in order to survey the whitening effect and the mechanism of the effects on the sample. As a result, the samples significantly suppressed the cell viability of B16F10 in more than 500 µg/mL and significantly inhibited the generation of melanin induced by α-MSH in more than 1,000 µg/mL. Sample decreased the activity of tyrosinase while increased the activity of SOD in dose dependent manner. Therefore, we considered that the fermentation extract made from a Rice bran and Dendropanax will be able to produce high value-added products, if used as a commercial.

keywords : Korean Dendropanax, Rice bran, fermentation, melanin, tyrosinase, SOD

서 론

황칠은 한의학적으로 祛風濕, 活血脈하는 효능이 있어 半身不遂, 四肢麻痺, 生理不順 등에 활용되지만¹⁾ 최근에는 항당뇨, 고지혈증 저하, 간기능 개선 등의 다양한 효과가 밝혀지고 있고²⁾ 특히 황칠의 잎이 줄기보다 항산화 효과가 있다고 보고되면서³⁾ 황칠나무 잎을 이용해 멜라닌 생성 억제 및 tyrosinase 저해 활성 그리고 항산화 효능이 우수해 피부 미백에 대한 기능성 소재로서의 개발 가능성을 제시하고 있다⁴⁾.

미강은 현미를 백미로 도정할 때 얻어지는 부산물⁵⁾로 단백질, 식이섬유 및 폴리페놀 등 다양한 생리활성 물질을 갖고 있지만^{6,7)} 도정과정 중에 버려지는 부산물이라는 측면에서 산업적인 이용가치가 높다. 그러나 미강은 백미보다 호분층이나 배아 등이 많아 영양적으로 우수하지만 소화가 잘되지 않는 단점도 있어 소화력을 높이기 위한 방법으로 발효법이 시도되고 있다⁸⁾. 또한 미강은 세포독성이 없고, 항산화 효과가 우수해 피부보습성과 함께 기능성 소재로 다양하게 활용될 수 있어⁹⁾ 멜라닌 생성효소인 tyrosinase 저해능에

대한 피부 미백 및 그에 관련된 연구가 진행되고 있다¹⁰⁾.

최근, 사회가 발전하고 생활이 윤택해짐에 따라 사회전반에 걸쳐 삶의 질을 향상시키고자 많은 노력들을 하고 있다. 그러나 피부 노화는 피부질환과 달리 나이가 들어감에 따라 필연적으로 나타나는 자연스러운 현상이기는 하지만 각종 오염물질 및 태양광선 등 자외선에 의해서 피부가 얇아지고, 기미, 주근깨 및 검버섯 등이 증가해 현대인들은 많은 고민거리 중의 하나이다¹¹⁾. 이와 같은 자외선 흡수에 의한 손상 방어반응으로 멜라닌 색소가 생성되는데¹²⁾, 그 기전을 보면 자외선에 의해 생성된 산화적 스트레스가 표피나 진피세포 내 멜라닌 세포의 소기관인 멜라노솜의 활성을 증가시키고^{13,14)}, 멜라노솜의 활성은 tyrosinase의 효소 활성을 촉진시켜 더욱 더 많은 멜라닌 색소를 생성하게 된다¹⁵⁾.

이러한 산화적 스트레스를 억제할 수 있는 항산화 효과가 있고, 멜라닌의 생성을 억제할 수 있는 각종의 생약과 식용식물 추출물 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나^{16,17)}, 항산화 및 미백효과를 가지고 있는 황칠과 우수한 영양성분을 갖고 있으면서도 tyrosinase의 활성을 저해할 수 있는 미강을 혼합해 발효한 황칠·미

* Corresponding author

Hyun-Woo Jeong, College of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Republic of Korea

E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr · Tel : +82-61-330-3524

Received : 2015/05/06 · Revised : 2015/05/15 · Accepted : 2015/05/19

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.06.29.3.273>

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

강 발효 추출물에 대한 연구보고는 아직까지 접하지 못하였다.

또한 미강을 발효하게 되면 미강보다 SOD 활성이 증가한다는 보고¹⁸⁾가 있어 황칠과 미강을 혼합하여 발효한 황칠·미강 발효 추출물의 미백효과와 그 작용기전을 알아보기 위하여 인간 유래 악성 흑색종 세포주인 B16F10 세포에 본 시료를 처리한 다음 세포생존율과 멜라닌 생합성 저해율을 관찰하고, 멜라닌 생성과 관련된 기전을 확인하고자 tyrosinase 활성 저해 및 superoxide dismutase 유사활성도를 측정된 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 연구는 미강과 황칠을 다양하게 배합한 후 발효 시간, 설탕 중량, 효소 투입량 등을 달리하면서 각각의 성분을 조사한 결과 최적의 상태를 나타낸 발효 추출물 중 미강 45 kg에 황칠 5 kg을 혼합한 후 설탕을 총 중량의 10%, 효소를 총 중량의 1000:1, 발효 온도는 20°C 내외, 발효기간은 90일이었을 때가 최적의 조건이었다. 이렇게 발효된 추출물인 황칠·미강 발효 추출물 50 mL을 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고 상층액을 얻은 후 동결건조기(삼원, 한국)를 이용하여 동결건조 분말(시료, Vinegar fermentation of Korean Dendorpanax and Rice bran mixture, VDR) 6.5g을 얻었다.

본 연구에 사용하기 위한 시료는 인산 완충액(phosphate buffered saline, PBS)에 다시 녹여 0.22 µm의 필터(Syringe filter, Whatman)로 걸러 멸균을 대신하였다.

2) 세포주

인간 유래 악성 흑색종(melanoma) 세포주인 B16F10 cell lines은 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다. B16F10 세포주의 생육 배지로는 DMEM(Gibco, 11995-065)을 이용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco LOT. NO. 1006842, FBS)와 Antibiotic-Antimycotic(penicillin G sodium 10,000units/mL streptomycin sulfate 10,000µg/µL, amphotericin B 25µg/mL, Gincoc, Grand Island, NY)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 방법

1) 세포 생존율 측정

황칠·미강 발효 추출물(VDR)이 B16F10 세포에 미치는 생존율은 EZ-Cytox Assay kit를 통해 측정하였다. B16F10 세포를 배양하여 96 well plate에 각 well당 5×10⁴ cell/well의 농도로 분주하고, 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 24 시간 동안 pre-incubation시킨 후 VDR을 각 농도별(62.5~1,000 µg/mL)로 처리한 다음 24 시간 배양하였다. 그 후 EZ-Cytox(Daeil Lab Service Co., Ltd.)용액 10 µL를 각 well에 첨가한 후 1~3 시간을 배양한 다음 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다.

2) 멜라닌 생합성 저해율 측정

황칠·미강 발효 추출물(VDR)이 멜라닌 생성에 미치는 영향은

Hosei 등의 방법¹⁹⁾을 변형하여 측정하였다. B16F10 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 1×10⁵ cell/well의 농도로 분주하고, 부착 및 안정화를 위하여 24 시간을 배양하였다. 배양이 끝난 다음 VDR을 각 농도별(62.5~1,000 µg/mL)로 처리한 다음 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 24~48 시간 배양하였다. 배양한 후 각 well를 PBS로 세척한 다음 1 N NaOH 용액 400 µL를 첨가하고 60°C에서 1 시간 동안 용해시킨 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다.

α-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)으로 유도된 멜라닌 생합성 저해에 미치는 효과를 알아보기 위하여 VDR을 각 농도별(62.5~1,000 µg/mL)로 처리한 다음 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 1시간 배양한 후 α-MSH 100 nM를 처리하였다. 이후 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 24~48 시간 배양하였다. 배양한 후 각 well를 PBS로 세척한 다음 1 N NaOH 용액 400 µL를 첨가하고 60°C에서 1 시간 동안 용해시킨 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다.

3) 비세포 tyrosinase 활성 저해율 측정

황칠·미강 발효 추출물(VDR)이 tyrosinase 활성에 미치는 저해 효과는 Yagi et al. 방법²⁰⁾을 이용하여 측정하였다. 0.175M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 0.5 mL와 10 mM L-DOPA 용액 0.2 mL를 가한 후 VDR을 buffer에 녹인 후 최종농도가 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL가 되도록 0.1 mL를 가하고, mushroom tyrosinase(110 unit/mL) 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 2 분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = \{1 - \{(B-C)/(A-D)\}\} \times 100$$

- A : 효소만 첨가된 반응용액
- B : 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액
- C : 시료만 첨가된 반응 용액
- D : 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액의 475 nm에서의 흡광도 값

4) 세포 내 tyrosinase 활성 저해율 측정

황칠·미강 발효 추출물(VDR)이 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 저해 효과는 Martinez-Esparza et al. 방법²¹⁾을 이용하였다. B16F10 세포를 배양하여 pertri-dish에 각 1×10⁶ cell/dish의 농도로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위해 24 시간 동안 방치한 후 VDR 500 µg/mL로 처리한 다음 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 24 시간을 추가로 배양하였다. 이후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 µL에 현탁시킨 다음 세포를 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 이용하였다. Tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위하여 96 well plate에 효소액 40 µL를 넣고, 기질인 L-DOPA (2 mg/mL) 100 µL를 첨가한 후, 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 1 시간 동안 반응을 진행시킨 다음 Microplate Reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase의 활성 저해율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

α-MSH로 유도된 세포내 tyrosinase 활성 저해율에 미치는 효

과를 알아보기 위하여 VDR 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 arbutin 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 1시간 후 α -MSH 100 nM를 처리한 다음 5% CO_2 incubator에서 37°C를 유지하면서 24 시간 배양하였고, 24 시간 배양 후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 μL 에 현탁시킨 다음 세포를 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 이용하였다. 이후 실험방법과 저해율은 tyrosinase의 활성 저해율과 동일하게 실시하였다.

5) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성도 측정

황철-미강 발효 추출물(VDR)의 SOD 유사활성도는 Marklund와 Marklund의 방법²²⁾에 따라 활성 산소종을 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. Vitamin 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하였을 때의 SOD 유사활성을 양성대조군으로 하고, VDR 처리로 나타난 SOD 유사활성을 알아보기 위하여 각 농도별(62.5~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) VDR을 buffer에 녹여 10 μL 씩 96 well plate에 첨가한 후, Tris-HCl Buffer(50 mM Tris aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.0) 150 μL 과 7.2 mM pyrogallol 10 μL 을 첨가하여, 실온에서 10 분간 반응시키고, 1N HCl 50 μL 을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader를 사용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SODA}(\%) = (1 - A/B) \times 100$$

- A : 추출물 첨가구의 흡광도
- B : 추출물 무첨가구의 흡광도

3. 통계처리

수합된 데이터 통계처리 방법으로는 SigmaPlot 11.1 (www.systat.com)를 활용하여 one-way ANOVA 기법으로 처리하였고, 통계적으로 유의한 경우 사후검정은 Tukey 방법을 시행하였다. p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. 세포생존율에 미치는 효과

황철-미강 발효 추출물(Vinegar fermentation of Korean Dendorpanax and Rice bran mixture, VDR)이 B16F10 세포의 생존율에 미치는 효과를 알아보기 위하여 인간 유래 악성 흑색종 세포주에 VDR을 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 다음 24 시간 배양한 후 생존율을 측정하였다(Fig. 1). B16F10 세포주의 생존율은 VDR의 처리농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였고, 특히 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때가 처리하지 않았을 때보다 유의성 ($p < 0.05$) 있게 세포생존율을 억제하였다.

2. 멜라닌 생합성 저해율에 미치는 효과

황철-미강 발효 추출물(VDR)이 B16F10 세포주를 이용한 멜라닌 생성에 미치는 저해효과를 알아보기 위하여 인간 유래 악성 흑색종 세포주에 VDR을 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/$

mL)로 처리한 다음 24 시간 배양한 후 측정된 결과 멜라닌 생합성 저해율은 다음과 같았다(Fig. 2). 멜라닌 생성 저해율은 VDR의 처리농도가 증가할수록 멜라닌 생성이 감소하는 경향을 보였고, 특히 VDR 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때가 처리하지 않았을 때보다 유의성 ($p < 0.05$) 있게 10% 정도의 멜라닌 생성을 억제하였다.

또한, α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH) 유도에 의한 멜라닌 생합성 저해율을 측정된 결과 다음과 같았다(Fig. 3). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 멜라닌 생합성 저해율을 100.00 \pm 1.20%라 하였을 때, α -MSH 유도에 의한 멜라닌 생합성 저해율은 131.45 \pm 1.20%로 증가하였고, 양성대조군으로 α -MSH와 arbutin을 병용처리하였을 때는 121.38 \pm 1.58%로 α -MSH 단독처리 시보다 감소하였다. 그리고 α -MSH와 VDR 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 병용처리하였을 때 105.03 \pm 1.89%로 양성대조군보다 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다.

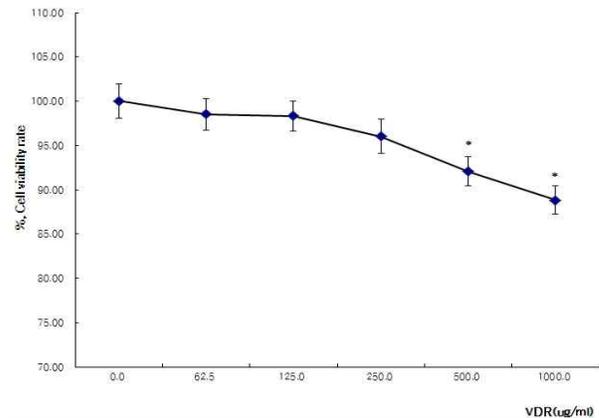


Fig. 1. Effects of VDR on cell viability rate in B16F10 cells. VDR is Vinegar by fermented Korean Dendorpanax(5 kg) and Rice bran(45 kg) mixture for 90 days, B16F10 cells were attached 96 well plate, and added VDR as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, viability of B16F10 cells was measured using EZ-Cytox Assay kit. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. non-treated group(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (n=8).

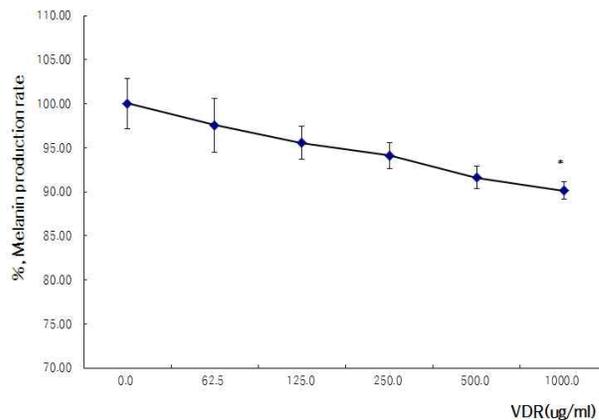


Fig. 2. Inhibitory effects of VDR on melanin production in B16F10 cells. VDR is Vinegar by fermented Korean Dendorpanax(5 kg) and Rice bran(45 kg) mixture for 90 days, B16F10 cells were attached 24 well plate, and added VDR as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, production levels of melanin were measured using Hoesli's methods. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. non-treated group(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (n=4).

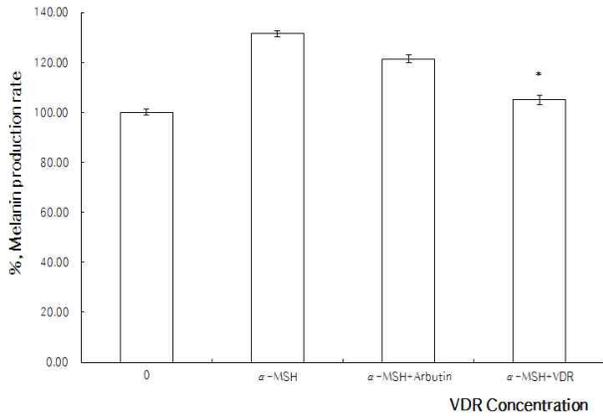


Fig. 3. VDR inhibits melanin production in α -MSH stimulated B16F10 cells. VDR is Vinegar by fermented Korean Dendorpanax(5 kg) and Rice bran(45 kg) mixture for 90 days, B16F10 cells were attached 24 well plate, and added VDR 500 μ g/ml. After 24 hr incubation, the level of melanin production were measured using Hoses's methods. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. α -MSH-treated group (n=4).

3. 비세포 tyrosinase 활성 저해율에 미치는 효과

황칠·미강 발효 추출물(VDR)이 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 알아보기 위하여 VDR을 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml)로 처리한 다음 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였다(Fig. 4). Tyrosinase 활성 저해율은 VDR의 처리농도가 증가할수록 tyrosinase 활성 저해율이 증가하는 경향을 보였고, 특히 500 μ g/ml 이상을 처리하였을 때가 처리하지 않았을 때보다 유의성 ($p < 0.05$) 있게 나타났다.

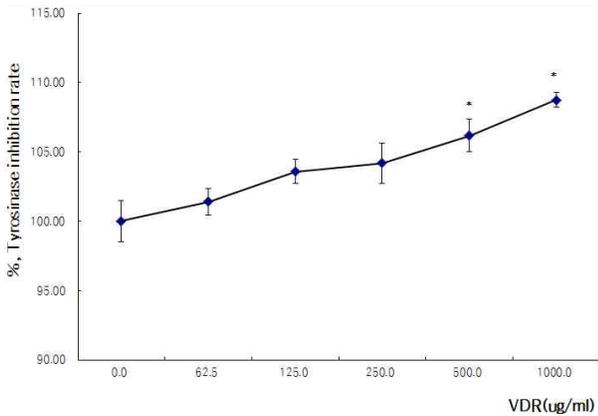


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory effects of VDR in vitro. VDR is Vinegar by fermented Korean Dendorpanax(5 kg) and Rice bran(45 kg) mixture for 90 days, B16F10 cells were attached 24 well plate, and added VDR as indicated concentrations respectively. After 24 hr of incubation, inhibitory effects of tyrosinase was measured using Yagi's methods. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. non-treated group(0 μ g/ml) (n=4).

4. 세포 내 tyrosinase 활성 저해율에 미치는 효과

황칠·미강 발효 추출물(VDR)이 세포 내 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에 VDR 500 μ g/ml로 처리한 다음 tyrosinase 활성 저해율을 측정된 결과 다음과 같았다. 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 tyrosinase 활성 저해율을 100.00 \pm 1.79%라 하였을 때, VDR를 처리하였을 때의 tyrosinase 활

성 저해율은 74.17 \pm 0.94%로 유의성($p < 0.05$) 있게 나타났다(Fig. 5).

황칠·미강 발효 추출물(VDR)이 α -MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에 α -MSH와 함께 VDR 500 μ g/ml를 병용처리한 다음 tyrosinase 활성 저해율을 측정된 결과 다음과 같았다(Fig. 6). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 tyrosinase 활성 저해율을 100.00 \pm 1.23%라 하였을 때, α -MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성 저해율을 161.54 \pm 2.89%로 증가하였고, 양성대조군으로 α -MSH와 arbutin을 병용처리하였을 때는 133.70 \pm 5.81%로 α -MSH 단독처리 시보다 감소하였다. 또한 α -MSH와 VDR 500 μ g/ml를 병용처리하였을 때의 tyrosinase 활성 저해율은 105.03 \pm 1.89%로 α -MSH 단독 처리군과 양성대조군보다 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다.

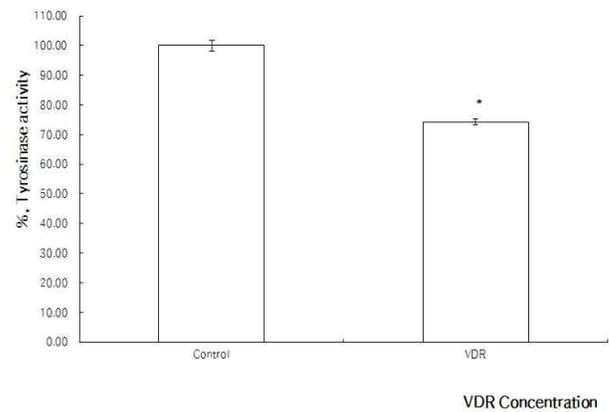


Fig. 5. Inhibitory effects of VDR on tyrosinase activity in B16F10 cells. VDR is Vinegar by fermented Korean Dendorpanax(5 kg) and Rice bran(45 kg) mixture for 90 days, B16F10 cells were attached petri dish, and added VDR 500 μ g/ml. After 24 hr incubation, tyrosinase activity was measured using Martinez-Esparza's methods. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Control group (n=6).

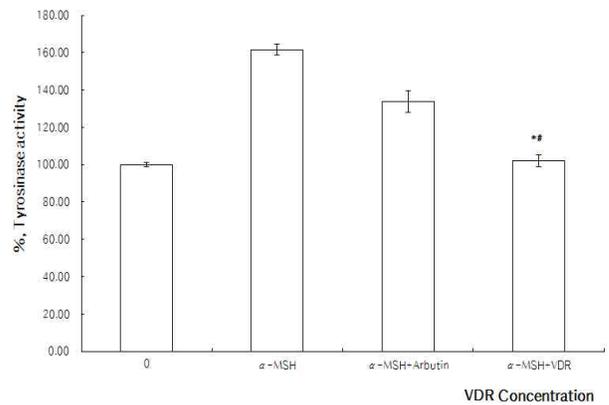


Fig. 6. Inhibitory effects of VDR and α -MSH on tyrosinase activity in B16F10 cells. VDR is Vinegar by fermented Korean Dendorpanax(5 kg) and Rice bran(45 kg) mixture for 90 days, B16F10 cells were attached petri dish, and added VDR 500 μ g/ml. After 24 hr incubation, tyrosinase activity was measured using Martinez-Esparza's methods. Results are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. α -MSH-treated group (n=8). # $p < 0.05$ vs. α -MSH-treated and arbutin treated group (n=8).

6. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성에 미치는 효과

황칠·미강 발효 추출물(VDR)이 SOD 유사활성에 미치는 효과를

알아보기 위하여 VDR을 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 다음 SOD 유사활성도를 측정한 결과 다음과 같았다 (Fig. 7). VDR이 SOD 유사활성에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 양성대조군으로 vitamin C로 처리한 SOD 유사활성도를 $100.00 \pm 1.99\%$ 라 하였을 때, VDR을 농도별을 처리하였을 때의 SOD 유사활성도는 양성대조군보다는 낮았지만 처리농도가 증가할수록 SOD 유사활성도가 증가하였고, 특히 VDR 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때의 SOD 유사활성도는 저농도 처리시보다 유의성 ($p < 0.001$) 있게 증가하였다.

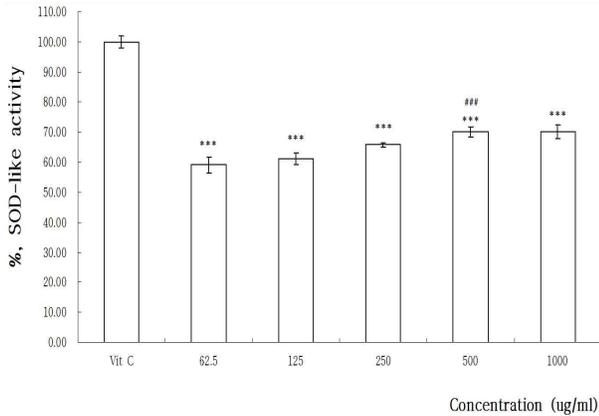


Fig. 7. Superoxide dismutase-like activity of VDR depending on concentration. VDR is Vinegar by fermented Korean Dendorpanax(5 kg) and Rice bran(45 kg) mixture for 90 days, B16F10 cells were attached 96 well plate, and added VDR as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, SOD-like activity was measured using methods of Marklund and Marklund. Results are presented as mean \pm SD. *** $p < 0.001$ vs. Vit C treated group ($n=8$). ### $p < 0.001$ vs. 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treated group ($n=8$).

고찰

최근, 사회가 발전하고 생활이 윤택해짐에 따라 사회전반에 걸쳐 삶의 질을 향상시키고자 많은 노력들을 하고 있지만 피부의 노화는 나이가 들어감에 따라 필연적으로 발생하는 현상으로, 요인에 따라 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 구분한다. 그 중 외인적 노화는 태양광선 등 누적된 외부 스트레스에 의해 나타나는 것으로, 특히 자외선 노출 등에 의해서 피부가 얇아지고, 기미, 주근깨 및 검버섯 등이 증가하게 된다¹⁾. 또한, 퇴행성 변화나 햇빛에 의한 손상으로 콜라겐과 엘라스틴의 새로운 합성이 저하되어 피부탄력과 수분 보유량이 떨어지며, 피부 주름과 함께 색소침착이 일어나게 된다. 이러한 피부노화를 지연시키고 억제하기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서 과잉 생산되는 활성산소종을 억제하고, 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어시스템이 필요하다²³⁾.

식물계에 존재하는 천연 항산화 물질은 식품, 의약품, 화장품 등에 널리 이용되고 있는데, 특히 과일과 채소에 많은 phenolic 화합물, flavone 유도체, 토코페놀, 아스코르빈산, 셀레늄과 같은 항산화 물질들은 지방의 산화를 지연시키거나 방지하며 노화 방지도 중요한 역할을 한다²⁴⁾. 특히, 비타민 E, flavonoid, phenolic acid,

carotenoid 등 많은 항산화성 물질이 천연식물에서 발견됨에 따라 천연물질을 이용한 미백제 개발 및 항산화제 탐색 활동이 활발히 진행되고 있고²⁵⁾, 각종 생약과 식용식물 추출물 등에서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다^{16,17)}.

황칠(Dandropanax morbifera Lev)은 두릅나무과 황칠나무속에 속하는 상록활엽수로 楓荷梨라는 異名을 갖고 있으며, 祛風濕, 活血脈하는 效能이 있어 半身不遂, 四肢麻痺, 月經不利 등에 사용한다^{1,26)}. 황칠을 이용한 항산화 연구들을 살펴보면, 안²⁷⁾ 등³⁾은 황칠나무 줄기보다는 잎에서, 그리고 에탄올 추출물보다 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 높게 나타나 항산화 효과가 있음을 보고하였고, 미백에 관련된 연구를 살펴보면, 이 등²⁸⁾은 황칠수액이 tyrosinase 발현량을 전사단계에서 억제하는 효과를 가지고 있어서 멜라닌 합성 과정 중에서도 tyrosinase 발현량을 감소시켜 최종산물인 멜라닌 생합성을 억제시키는 연관성이 있음을, 모 등⁴⁾은 황칠나무 잎 추출물의 ethyl acetate 분획이 항산화 및 tyrosinase 활성 저해, 멜라닌 생성 억제가 뛰어나 피부 미백 화장품의 기능성 소재로서 개발 가능성이 있다고 보고하였다.

미강은 현미를 백미로 도정할 때 얻어지는 부산물로 쌀이 갖고 있는 영양분의 95%를 가지고 있고⁵⁾, 그 구성을 보면 12~16%의 단백질과 20~25%의 셀룰로스, 그리고 헤미셀룰로스 등의 식이섬유와 16~22%의 지방을 함유하고 있으며, 인체에 유효한 폴리페놀 등의 성분도 풍부하게 함유되어 있어 영양학적으로 매우 가치가 높은 것으로 알려져 있어 암 뿐만 아니라 여러 가지 질병에 대한 예방 및 치료효과가 기대^{6,7)}되지만 소량(약 20%)만이 미강유 생산 및 사료제조에 활용될 뿐 나머지는 폐기되고 있어 산업적인 이용가치가 높을 것으로 기대되고 있다²⁹⁾. 미강과 관련된 연구 보고들을 보면, 김⁹⁾은 미강이 세포독성이 없고, 우수한 항산화 효과를 보여주고 있으며, LPS로 유도된 염증모델에서 항염 효과가 있는 것으로 나타나 화장품 개발에 응용할 시 우수한 피부보습성과 함께 기능성 소재로 다양하게 활용될 수 있음을, 전 등¹⁰⁾은 미강 에탄올 추출물이 DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 효과가 우수하고, human dermal fibroblast(HDF) 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 소거능을 나타내 농도의존적인 산화 손상 억제 효과를 보였으며, 멜라닌 생성효소인 tyrosinase에 대한 저해능을 보여 천연물질로서의 피부 미백 효과가 있음을 보고하였다.

그러나 항산화 및 미백효과를 가지고 있는 황칠과 우수한 영양 성분과 함께 tyrosinase 활성 억제효과가 있는 미강을 혼합하여 발효한 발효 추출물에 대한 연구보고는 아직까지 접하지 못하였고, 또한 남¹⁸⁾은 미강을 발효하게 되면 총 폴리페놀 함량이 미강보다 현저히 증가하여 Superoxide dismutase(SOD) 활성과 함께 아질산염 소거능 등의 항산화 활성이 증가하였다는 보고하고 있어 미강(45 kg)과 황칠(5 kg)을 배합한 후 설탕(총 중량의 10%)과 발효 효소액을 적정량(총 중량의 0.1%) 투입한 다음 90일간 발효를 하였다. 이후 황칠-미강 발효 추출물(시료, Vinegar fermentation of Korean Dendorpanax and Rice bran mixture, VDR)의 미백효과 및 그 기전을 알아보기 위하여 인간 유래 악성 흑색종 세포주인 B16F10 세포를 이용해 세포생존율, 멜라닌 생합성 저해율, tyrosinase 활성

저해율 및 SOD 유사활성도를 측정하였다.

본 시료가 B16F10 세포의 생존율에 미치는 효과를 관찰한 결과 VDR 500 µg/ml 이상을 처리하였을 때 B16F10 세포의 생존율을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 1).

일반적으로 사람의 피부색은 여러 요소 중 멜라닌이 가장 결정적인 작용을 하는데³⁰⁾, 피부착색의 경우, 자외선에 대한 과다한 노출이나 α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH)에 의하여 나타날 수도 있다³¹⁾. 특히, 자외선에 피부가 노출될 경우 색소 침착이 증가하는 이유는 피부세포가 자외선 흡수에 의한 손상을 방어하기 위한 목적으로 멜라닌 색소를 생성하기 때문이다¹²⁾. 멜라닌은 기저층에 있는 멜라노사이트로부터 생성되고, 외부자극에 의해 그 생성이 촉진되는 것으로 알려져 있어 외부의 자극을 줄이거나 그 신호 전달을 차단하는 방법을 통해 멜라닌의 생성을 줄일 수 있다³²⁾.

본 시료가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 B16F10 세포에 VDR 1,000 µg/ml을 처리한 결과 아무런 처리하지 않았을 때보다 유의성 있게 멜라닌 생성을 억제하였고(Fig. 2), 또한 α-MSH 유도에 의한 멜라닌 생합성 저해율에서도 α-MSH 처리 시 증가되었던 멜라닌 생성이 α-MSH와 arbutin을 병용처리하였을 때 약간 감소하는 경향을 나타내었고, α-MSH와 VDR 500 µg/ml을 병용처리하였을 때가 α-MSH를 단독 처리하였을 때보다 멜라닌 생성이 유의성 있게 억제되었다(Fig. 3). 이는 본 시료가 자외선이나 호르몬 변화에 의해 나타나는 모든 멜라닌 생성 기전에 관여한다는 것을 시사하는 것으로 본 시료가 천연 미백물질로 사용할 수 있음을 보여주는 결과라 생각된다.

또한, 멜라닌 생성과정은 tyrosine이 tyrosinase의 작용에 의해 DOPA, DOPA quinone으로 산화되고, 이들은 효소의 작용 및 자동산화 반응에 의해 DOPA chrome, indole, carboxylic acid, indole quinone류 등으로 대사되어 최종적으로 melanin을 합성하기 때문에³³⁾ 멜라닌의 생성을 감소시키기 위해서는 멜라닌의 생성효소인 tyrosinase의 합성을 억제하거나 그 활성을 저해하면 된다³⁴⁾.

본 시료가 비세포 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 관찰한 결과, 처리농도가 고농도일 때 tyrosinase 활성 저해율이 유의성 있게 증가하였고(Fig. 4), 본 시료를 처리한 세포 내 tyrosinase 활성 저해율도 아무런 처리를 하지 않은 처리군보다 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

다양한 식물 추출물이 미백 기능성 원료 물질로 개발되고 있으나 미백효과를 나타내는 천연물질의 경우 멜라닌 감소 경로를 정확하게 밝히지 못한 경우가 많아 천연물질이 멜라닌 합성 속도를 조절한다고 알려져 있는 tyrosinase 활성 저해와 밀접한 관련이 있을 것으로 예상하고 있다³⁵⁾. 지금까지 알려진 tyrosinase inhibitor로는 resorcinol, hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid와 그 유도체 등이 있으나 피부 안전성과 제형의 안정성 등의 문제로 arbutin과 kojic acid가 미백 첨가제로 제한된 양만 사용되고 있다³⁶⁾.

본 시료가 α-MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 알아본 결과(Fig. 6), α-MSH와 arbutin을 병용처리한 양성대조군의 tyrosinase 활성 저해율은 α-MSH 단독처리시보다 감소하였고, α-MSH와 VDR 500 µg/ml을 병용처리하였을 때의

tyrosinase 활성 저해율은 α-MSH 단독처리 시와 α-MSH와 arbutin을 병용처리하였을 때보다 유의성 있게 억제되었다. 이는 본 시료가 비세포 내와 세포 내에서 tyrosinase의 활성을 저해하여 멜라닌의 생성을 감소시킨 것으로 판단되고, 또한 미백 첨가제로 사용되는 arbutin보다도 tyrosinase의 활성을 저해하여 본 시료가 미백 첨가제로써의 산업적 가치도 있다고 생각된다.

산화적 스트레스는 피부세포를 공격함으로써 피부의 광노화를 유발할 뿐만 아니라³⁷⁾, 기미나 주근깨와 같은 색소침착³⁸⁾을 야기시키는 것으로 피부세포 내 SOD를 비롯한 catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 기능을 저해함으로써 피부세포의 생존율을 크게 떨어뜨리고³⁹⁾, 멜라닌 세포의 소기관인 멜라노좀(melanosome)의 활성을 더욱 증가시키게 된다^{13,14)}. 그럼으로써 멜라노좀의 활성은 tyrosinase의 효소활성을 촉진시켜 더욱 더 많은 멜라닌 색소를 생성하게 된다¹⁵⁾.

이러한 이유로 본 시료가 SOD에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 유사활성도를 측정한 결과, VDR을 처리한 군의 SOD 유사활성도는 비록 vitamin C를 처리하였을 때보다는 감소하였지만 처리농도에 의존해 SOD 유사활성도가 유의성 있게 증가하였고, 저농도 처리시보다 고농도를 처리하였을 때 SOD 유사활성도가 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 서 등⁴⁰⁾이 SOD와 같은 항산화제가 H₂O₂의 산화적 스트레스에 대한 세포생존율을 증가시키는 물론 tyrosinase의 활성을 감소시켜 활성산소의 산화적 스트레스에 대한 방어효과가 있음을 보고한 내용과 일맥상통한 것으로 본 시료는 자외선 등의 산화적 스트레스에 의한 색소침착에도 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 판단되었다.

이상과 같이 미강과 황칠을 배합하여 90일 동안 발효한 추출물을 이용하여 미강의 산업적 가치와 함께 미백에 관련된 효능을 관찰한 결과 본 발효 추출물은 tyrosinase의 활성을 저해해 멜라닌의 생성을 억제하였으며, 또한 자외선 등의 산화적 스트레스에 대해서도 방어적인 효과를 나타냈다.

결 론

황칠과 미강을 배합한 후 90일간 발효한 추출물이 미백효과 및 그 작용기전을 알아보기 위하여 흑색종 세포주인 B16F10 세포를 이용하여 세포생존율, 멜라닌 생합성 저해율, tyrosinase 활성 저해율 및 superoxide dismutase 유사활성도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

본 시료는 처리농도 500 µg/ml 이상일 때 B16F10 세포의 생존율을 유의성 있게 억제하였다.

본 시료는 처리농도 1,000 µg/ml 이상일 때 멜라닌 생성을 유의성 있게 억제하였고, α-MSH와 병용처리하였을 때는 α-MSH와 arbutin을 병용처리하였을 때보다도 감소하였으며, α-MSH를 단독 처리하였을 때보다는 유의성 있게 억제하였다.

본 시료는 비세포 내 tyrosinase의 활성을 유의성 있게 저해하였고, 세포 내에서도 아무런 처리를 하지 않았을 때보다 유의성 있게 억제하였다. 또한 α-MSH와 병용처리하였을 때의 세포 내 tyrosinase 활성 저해율은 α-MSH 단독처리 시와 α-MSH와

albutin을 병용처리하였을 때보다도 유의성 있게 억제되었다.

본 시료는 vitamin C를 처리하였을 때보다는 감소하였지만 처리농도에 의존해 SOD 활성도가 유의성 있게 증가하였다.

이상과 같이 황철·미강 발효 추출물은 tyrosinase의 활성을 저해함으로써 멜라닌의 생성을 억제하였고, 또한 자외선 등의 산화적 스트레스에 대한 방어적인 효과도 나타내어 이를 산업적으로 활용할 수 있는 것으로 기대되며, 또한 기능성이 강화된 식품으로도 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2014년 중소기업청 지원 산학연협력기술개발사업의 일환으로 이루어졌음.

References

- Ahn, D.K., Illustrated book of Korean Medicinal Herbs, Seoul, Kyohak, p 349, 1998.
- Moon, H. Antidiabetic Effects of Dendropanoxide from Leaves of Dendropanax morbifera in normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Human & Experimental Toxicology* 30(8):870-875, 2011.
- Moon, C.G. Antioxidant Activity of Dendropanax morbifera Lev. The Graduate School of Advanced Industrial Technology, Inje Univ. 2007.
- Mo, J.H., Oh, S.J. Tyrosinase Inhibitory Activity and Melanin Production Inhibitory Activity of the Methanol Extract and Fractions from Dendropanax morbifera Lev. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 11(2):275-280, 2013.
- Shin, H.G. Development and Research Trends of Functional Food. *Food Science and Industry, Korean Soc. Food. Sci. Technol.* 30: 2-52, 1997.
- Aoe, S., Oda, T., Tatsumi, T., Yamauchi, M., Ayano, Y. Extraction of soluble dietary fibers from defatted rice bran. *Cereal Chem.* 70(4):423-425, 1993.
- Saunders, R.M. The properties of rice bran as a food stuff. *Cereal Foods Worlds* 35(7):632-635, 1990.
- Kim, K.Y., Kim, H.G., Song, B.C., Cha, C.J. Screening for Fermentative Microorganisms that Grow on Brown Rice with High Amylase and Pretense Activities. *Korean Journal of Microbiology* 42: 160-163, 2006.
- Kim, M.H. Antioxidative, Anti-inflammatory Effects of Rice Bran Extracts and Its Cosmetic Application. Department of Cosmetic Science Nambu University, 2012.
- Jeon, S.B., Jeon, J.A., Jeong, B.G. Anti-oxidative Activities and Tyrosinase Inhibition Ability of Rice Bran Ethanol Extract. *J. Kor. Soc. Cosm.* 16(2):602-606, 2010.
- Gilchrest, B.A. Skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.* 2: 79-82, 1990.
- Wang, K.H., Lin, R.D., Hsu, F.L., Huang, Y.H., Chang, H.C., Huang, C.Y., Lee, M.H. Cosmetic application of selected traditional Chinese herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.* 106: 353-359, 2006.
- Kikuchi, H., Hara, S., Ishiguro, S., Tamai, M., Watanabe, M. Detection of point mutation in the tyrosinase of a Japanese albino patient by a direct sequencing of amplified DNA. *Hum. Genet.* 85: 123-124, 1990.
- Oetting, W.S., King, R.A. Molecular basis for type I (tyrosinase-related) oculocutaneous albinism: Mutations and polymorphism of the human tyrosinase gene. *Human Mutation* 2(1):1-6, 1993.
- Shibahara, S., Tomita, Y., Tagani, H., Muller, R.M., Cohen, T. Molecular basis for the heterogeneity of human tyrosinase. *Tohoku J. Expmed.* 156: 403-414, 1988.
- Kim, H.K., Kim, Y.E., Do, J.R., Lee, Y.C., Lee, B.Y. Antioxidative Activity and Physiological Sctivity of Some Korean Medicinal Plants. *Korean J. Food Sci., Technol.* 27: 80-85, 1995.
- Lim, D.K., Choi, U., Shin, D.H. Antioxidative Activity of Ethanol Extract from Korean Mediciinal Plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 83-89, 1996.
- Nam, Y.H. Preparation and Quality Characteristics of Fermented rice bran using Lactic acid bacteria, Department of Food Science and Technology. The Graduate School, Catholic University of Daegu, 2011.
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α . 25-Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid. *Cancer Res.* 45(4):1474-1478, 1985.
- Yagi, A., Kanbara, T., Morinobu, N. The effects of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med.* 3981: 517-519, 1986.
- Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., Garcia-Borron, J.C. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 255: 139-146, 1998.
- Marklund, S., Marklund, G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biol. Chem.* 47: 468-474, 1974.
- Ryu, I.S., Lee, S.J., Lee, S.W., Mun, Y.J., Woo, W.H., Kim, Y.M., Lee, J.C., Lim, K.S. Dermal Bioactive Properties of the Ethanol Extract from Flowers of

- Lespedeza bicolor. The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 20(2):1-9, 2007.
24. Block, G., Langseth, L. Antioxidant Vitamins and Disease Prevention. Food Technology 48: 80-85, 1994.
25. Park, E.Y., Kim, Y.C. Effectiveness of White Tea Water Extract on Skin Whitening Using in vitro Test. J. Kor. Soc. Cosm. 15(2):611-617, 2009.
26. Jeong, B.S., Jo, J.S., Pyo, B.S., Hwang, B. Studies on the Distribution of Dendropanax morbifere and Component Analysis of the Golden Lacquer. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering 10(4):393-400, 1995.
27. An, N.Y. Antidiabetic and Antioxidative Effects of Dendropanax morbifera in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Department of Food and Nutrition The Graduate School, Pusan National University, 2004.
28. Lee, M.K., Lee, I.S., Lee, J.S. For the Utilization of Native Plant Resources as High-value Materials: Evaluation on Demelanizing Activity of Dendropanax Morbifera in Bogildo. The journal of Korean Island. 25(4):227-240, 2013.
29. Park, K.Y., Kang, C.S., Lee, Y.S. Tocotrienol and tocopherol contents of rice bran by milling recovery. Korean J. Crop. Sci. 49: 468-471, 2004.
30. Lee, H.S., Yoon, J.A. Inhibitory Activity of Advanced Glycation Endproducts(AGE) Formation of Edible Plants for Development of Anti-Wrinkle Ingredients. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39(2):186-192, 2010.
31. Sulaimon, S., Kitchell B, The Biology of Melanocytes. Veterinary Dermatology 14(2):57-65, 2003.
32. Baek, H.S., Ahn, S.M., Woo, B.Y., Cho, Y.S., Choi, S.J., Rho, H.S., Byoun, K.H., Shin, S.S., Park, Y.H., and Joo, Y.H. Whitening Effects of Adamantyl Benzamide Derivatives. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea 39(2):127-132, 2013.
33. Lee, J.Y., An, B.J. Whitening and Anti-wrinkling Effects of Fractions from Prunus persica Flos. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 40(4):364-370, 2012.
34. Gupta, A.K., Gover, M.D., Nouri, K., Taylor, S. The treatment of melasma ; a review of clinical trials. J. Am. Acad. Dermatol. 55(6):1048-1065, 2006.
35. Cho, Y., Lee B., Kim J., Kim J., Pyo H., Zhang Y., Park H., Effect of Aetemisias Anomala S. Moore on Antioxidant Activity and Melanogenesis. Korean Journal of Pharmacognosy 36: 273-279, 2005.
36. Ando, S.O., Ando, Y.S., Mishima, Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. J. Invest. Dermatol. 100: 150-155, 1993.
37. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., Amers, B.N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4337-4341, 1995.
38. Won, Y.H., Hur, S.G., Lee, S.C., Chunn, I.K., Kim, Y.P. Clinical and Histopathologic Study of Malignant Melanoma(1980-1990.4). Korean Journal of Dermatology 29(2):193-202, 1991.
39. Liu, T.H., Beckman, J.S., Freeman, B.A., Hogan, E.L., Hsu, C.Y. Polyethylene glycolconjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. Am J. Physiol. 256: H589-H593, 1990.
40. Seo, Y.M., Kim, N. Effects of Superoxide Dismutase on Oxidative Stress of Reactive Oxygen Species in Cultured Human Skin Melanocyte. J. Korean Soc. Occup. Environ Hyg. 19(3):261-269, 2009.