

헛개나무 추출물이 첨가된 영지버섯균사 추출물의 멜라닌 생성 억제효과

김 홍 일 · 정 용 운 · 김 종 현 · 최 인 호 · 이 준 호 · 이 창 수 · 박 영 진[†]

건국대학교 의료생명대학 의생명화학과, 의료생명연구소
(2017년 11월 13일 접수, 2017년 11월 27일 수정, 2017년 11월 30일 채택)

Anti-melanogenesis Effect of *Ganoderma lucidum* Mycelial Extract Supplemented with Oriental Raisin Tree (*Hovenia dulcis*) Extract

Hong Il Kim, Yong Un Jeong, Jong Hyun Kim, In Ho Choi, Jun Ho Lee, Chang Soo Lee, and Young Jin Park[†]

Department of Biomedical Chemistry, Research Institute for Biomedical & Health Science, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, 268 Chungwon-daero, Chungju-si, Chungbuk-do 27478, Korea

(Received November 13, 2017; Revised November 27, 2017; Accepted November 30, 2017)

요약: 본 연구에서는 영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물의 첨가가 영지버섯의 가나도마난디올의 생합성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 수행하였다. 가나도마난디올은 트리테르페노이드 계열의 물질이며 영지버섯의 주요한 생리효능을 가지는 물질 중의 하나이다. 이와 관련하여, 본 연구자들은 선행연구를 통하여 가나도마난디올이 B16F10 멜라노마 세포의 티로시나제 저해 활성 및 멜라닌 생합성 저해능에 우수한 효과가 있는 것을 확인하였다. 본 연구에서 영지버섯 균사 배양 시 15% (v/v)의 헛개나무 추출물 첨가하면 영지버섯의 가나도마난디올 생합성이 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 HPLC 분석을 통하여 확인하였다. 또한, 15% (v/v)의 헛개나무 추출물을 첨가한 영지균사 배양추출물의 B16F10 멜라노마 세포에 대한 멜라닌 생합성 억제 능력이 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였다. 또한, 영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물 첨가가 미백활성을 가지는 가나도마난디올 생합성 증가뿐 아니라, 액체 및 고체 배양시 균사의 생장도 촉진하는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 헛개나무가 영지버섯균사의 미백활성 물질인 가나도마난디올 생합성의 증가를 유도하고 이로 인한 영지버섯 균사의 미백 활성이 증가하는 유용한 소재로 사용될 수 있다는 것을 시사한다.

Abstract: The aim of this study is to investigate the effect of *Hovenia dulcis* (oriental raisin tree) extract on ganodermanondiol (GN) contents in *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*) mycelia. GN has a triterpenoid structure and is one of the major active components of *G. lucidum*. Furthermore, we previously proved its inhibitory effects on tyrosinase activity and melanin biosynthesis in B16F10 melanoma cells. In this study, we observed significantly increased GN contents in *G. lucidum* mycelial extracts supplemented with 15% (v/v) oriental raisin tree extract (ORTE) by HPLC analysis. In addition, melanogenesis was significantly inhibited by *G. lucidum* extract supplemented with 15% ORTE when compared to *G. lucidum* extract without ORTE supplementation. Furthermore, mycelial growth of *G. lucidum* was increased by ORTE supplementation in both solid and liquid cultivation. These results suggest that the oriental raisin tree is useful as natural ingredient for increasing GN biosynthesis as well as whitening effect of *G. lucidum*.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, ganodermanondiol, *Hovenia dulcis*, melanogenesis, oriental raisin tree

[†] 주 저자 (e-mail: yjpark@kku.ac.kr)
call: 043)840-3601

1. 서 론

멜라닌은 멜라노마세포에 의해 타이로신을 기질로 하여 생산되며, 피부와 모발의 색을 결정하는 중요한 인자이다[1-6]. 이와 관련하여 티로시나제효소(EC 1.14.18.1)는 다기능성 구리이온 함유 산화효소의 일종으로 멜라노마세포의 멜라닌 생합성을 총괄하는 핵심 효소로 보고되었다. 이러한 티로시나제효소는 L-티로신의 수산화(hydroxylation)와 L-도파(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)를 *o*-퀴논(dopaquinone)으로 산화시키는 효소이다[7]. 이로 인해 많은 연구자들이 멜라닌생합성과 멜라닌생합성에 중요한 역할을 하는 티로시나제 효소의 활성을 억제하는 새로운 소재를 개발하고자 경주하고 있다. 이와 관련하여, 현재까지 다양한 소재가 보고되었으며, 여기에는 하이드로퀴논(hydroquinone)[8], 레티놀(retinol)[9], 코직산(kojic acid)[10], 비타민 C[11], 그리고 알부틴(arbutin)[12] 등이 있다. 이 중 대표적인 미백 효능 물질인 하이드로퀴논(hydroquinone)은 티로시나제의 활성을 억제하여 도파(DOPA)가 멜라닌색소로 전환되는 것을 방해하는데 효과적인 물질이나[13], 세포 독성 및 돌연변이를 유발하는 부작용을 초래한다는 것이 연구자들에 의해 보고되었다[14,15]. 또한 이러한 문제를 극복할 수 있는 새로운 소재로 코직산, 비타민 C, 그리고 알부틴 등이 있으나, 이들은 안정성 문제로 인하여 그 사용이 제한적인 것으로 알려졌다[16].

상기에 기술된 바와 같이 다양한 효과적인 소재가 개발되었음에도 불구하고 이들의 문제점이 발생되었고, 이를 극복하기 위한 일환으로 많은 연구자들이 현재 다양한 식물성 소재 및 약용식물을 대상으로 새로운 미백기능성 물질을 찾고자 노력하고 있다[17-19]. 이러한 식물성 소재와 더불어 이미 오래전부터 다양한 버섯이 인간의 건강 증진을 위해 사용되었기 때문에 많은 연구자들이 다양한 버섯에 대한 잠재적 효용성에 주목하고 있다[20]. 불로초라고도 알려진 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 한국, 중국, 일본을 포함한 아시아 국가 뿐 아니라 세계적으로 잘 알려진 약용버섯이며, 오래전부터 항종양, 항산화, 항염 등의 다양한 생리적 활성을 있다는 것이 보고되었다[21,22]. 또한 영지버섯은 이미 건강기능성 식품소재뿐 아니라, 화장품 소재로서의 그 이용가치가 이미 보고된바 있다[23]. 영지버섯 학명 중 속명인 '*Ganoderma*'는 그리스어로

'ganos' (밝음; brightness)와 'derma' (피부; skin)의 합성어로 이루어진 것이며, 이로 인해 몇몇 미백기능성 제품을 출시하기도 하였다. 그러나 이러한 영지버섯의 미백기능성과 관련된 유효 성분에 대한 연구는 미흡한 실정이었으며, 실제로 Chien 등[24]에 의한 영지버섯 추출물의 미백활성만 보고된 상태였다. 그러나 본 연구진에 의해 최근 영지버섯 유래 미백기능성 유효성분의 분리와 동정이 이루어졌으며, 다양한 영지버섯 유래 물질 중 가나도마난디올이 티로시나제활성 저해 뿐 아니라 멜라닌 세포 내 멜라닌색소 생합성 경로에 중요한 인자들(MITF, pCREB, ERK, JNK 등)의 조절로 멜라닌 합성을 억제하는 것을 확인하였다[25]. 이와 관련된 후속연구로 본 연구진들은 영지버섯의 미백기능성 물질인 가나도마난디올의 생합성을 촉진하는 새로운 소재를 찾고자 하였으며, 이의 일환으로 영지버섯 근사 배양 시 헛개나무(oriental rasin tree) 추출물을 첨가 하여 가나도마난디올의 생합성 증대 여부를 규명하였다. 본 연구에서는 실제로 HPLC분석을 통하여 영지버섯근사 배양 시 헛개나무(oriental rasin tree) 추출물을 첨가하면, 농도 의존적으로 영지버섯근사의 가나도마난디올 생합성이 증대되는 것을 확인하였으며, 이들의 추출물을 B16F10 세포에 처리하여 멜라닌 생합성이 감소되는 것을 확인하였다. 이러한 연구결과는 미백기능성이 증가한 영지버섯의 배양에 사용되는 새로운 고부가성 소재의 발굴도 가능할 것으로 사료되며, 향후 영지버섯의 미백기능성 화장품에 대한 이용 가능성을 확대할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주

영지버섯 근사 배양추출물의 제조를 위한 영지버섯은 농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과에서 분양 받은 영지2호를 PDA (배양액 1 L 당 agar 15 g, potato extract 4 g, glucose 20 g)배지에 접종 후 25 °C에서 5일간 배양한 것을 이용하였다.

2.2. 헛개나무 영지버섯 근사 배양추출물 제조

헛개나무 추출물이 첨가된 영지버섯 근사 배양추출물의 제조를 위한 헛개나무 추출물의 제조는 다음의 방법으로 제조하였다. 우선 35 g의 헛개나무를 분쇄한

후 1 L 삼각플라스크에 350 mL의 멸균 증류수와 혼합하고 환류추출장치를 이용하여 80 °C에서 3 h 동안 추출하였으며, 동일한 양의 멸균 증류수를 추가로 첨가하여 총 2회 추출하였다. 추출이 완료된 추출물은 여과지(Whatman No.2, GE Health care, UK)를 이용하여 감압 여과 후 수득된 추출물(100%)을 영지버섯 균사 배양에 사용하였다. 헛개나무 영지버섯 균사 배양을 위한 액체배양 배지의 제조는 250 mL의 삼각플라스크에 100 mL의 PDB 배지(배양액 1 L 당 potato extract 4 g, glucose 20 g)와 상기의 방법에서 준비된 헛개나무 추출물(100%)을 각각 1, 5, 10, 15%의 농도가 되도록 첨가한 후 전 배양된 영지버섯 균사체를 삼각플라스크에 넣고, 100 rpm으로 5일간 28 °C에서 진탕 배양하였다. 배양 후 헛개나무 영지버섯 균사 배양추출물을 확보하기 위하여 배양액을 제외한 영지버섯 배양균사만을 miracloth (Calbiochem, USA)를 이용하여 분리한 후 2일간 60 °C에서 열풍건조하였다. 열풍건조시킨 헛개나무 배양 영지버섯 균사체 0.2 g을 50 mL의 70% 에탄올을 첨가하여 상기에 기술된 방법과 동일하게 2회 환류추출하였다. 최종적으로 상기의 방법에 의해 수득된 추출물을 감압 농축하여 영지버섯 균사 추출물 50 mg을 본 연구에 사용하였다.

2.3. 가나도마난디올 함량 분석

가나도마난디올(ganodermanondiol) 정량은 Phenomenex Luna C18UV(2) column (4.6 × 250 mm, 5 μm, USA)을 장착한 HPLC (SPD-20A UV/VIS Deteor, LC-20AT Pumping System, Manual Injection Valve 20 μL Loop, Shimadzu Corp., Japan)를 사용하였다. 이동상은 아세토나이트릴(acetonitrile)과 0.2% 아세트산(acetic acid)으로, 유속(flow rate)은 0.8 mL/min로 하여 UV (ultraviolet-visible) 검출기 245 nm에서 측정하였다. 또한 ChemFace (China)에서 구입한 가나도마난디올(순도 99%)을 표준물질로 사용하여 영지버섯 균사체의 가나도마난디올 정량분석을 수행하였다.

2.4. 세포생존율 평가

흑색종 B16F10 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, CRL-6475)로부터 분양받아 사용하였다. 이 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Ireland)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Ireland)이

포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Ireland)을 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다(90%의 confluency). 흑색종 B16F10 세포에 대한 영지버섯 균사 추출물 및 헛개나무 추출물 첨가 배양 균사의 세포독성 유무를 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 96-well plate에 3 × 10³ cells/well로 100 μL씩 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배지로 교환하고 다양한 농도의 추출물을 각각 3회 반복 처리하여 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 72 h 배양하였다. 배양 후 시험액이 포함된 배지에 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA) 시약을 well당 0.5 mg/mL이 되게 분주한 후 96-well plate의 빛을 차단하여 3 h 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μL를 가하여 formazan crystal을 용해시키고 570 nm 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다.

세포생존율(%)

$$= (\text{대조군의 흡광도} / \text{실험군의 흡광도}) \times 100$$

2.5. B16F10 세포주의 멜라닌 생합성 저해능 분석

배양된 B16F10 세포를 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 6-well plate에 5 × 10⁵ cells/well로 2 mL씩 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배지로 교환하고 다양한 농도의 추출물과 100 nM의 α-MSH를 각 3회 반복 처리하여 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 72 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 각 well당 1 mL의 0.25% Trypsin EDTA (Gibco, Ireland)를 분주하여 세포를 회수하였다. 세포 pellet을 회수하기 위해 14,000 rpm으로 20 min 동안 원심 분리한 후 상등액을 제거하였으며, 상등액이 제거된 세포 pellet을 60 °C에서 1 h 동안 건조하였다. 건조된 세포 pellet에 10% DMSO가 함유된 1 N NaOH 150 μL를 첨가하고 추가로 1 h 동안 60 °C 항온조에서 처리하여 세포 내의 멜라닌을 용해시켰다. 처리 후 각 시료 100 μL를 96-well plate에 분주한 후 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 함량을 분석하였다. 멜라닌 함량은 멜라닌 표준액을 이용한

표준정량곡선과 비교하여 분석하였다.

2.6. 영지버섯 균사 생장률 분석

영지버섯 균사 생장에 대한 헛개나무 추출물의 영향 분석을 위해 우선 100 mL의 PDB 배지(배양액 1 L 당 potato extract 4 g, glucose 20 g)에 상기의 방법에서 준비된 헛개나무 추출물(100%)을 각각 1, 5, 10, 15%의 농도가 되도록 첨가한 후 전 배양된 영지버섯 균사체를 접종하고, 100 rpm으로 5일간 25 °C에서 진탕 배양하였다. 배양 후 배지가 제거된 균사를 60 °C에서 1일간 건조하고 균사의 건조중량을 측정하였다. 또한 헛개나무 추출물이 각각 1, 5, 10, 15%의 농도로 첨가된 PDA배지에 준비된 영지버섯 균사를 접종하고 25 °C에서 총 8일 동안 배양하며, 2일 마다 균사의 생장 직경을 측정하여 고체배지상의 균사 성장률을 측정하였다.

2.7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고 결과는 평균값 ± 표준편차로 나타냈다. 통계분석은 Prism (GraphPad Software Inc., USA) 프로그램을 사용하였다. 처리구간간의 유의성 검증은 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 이용하여 분석 후 Tukey's test에 의한 사후검정을 통해 통계분석을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 헛개나무 영지버섯 균사 배양추출물의 가나도마난디올 함량

영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물 첨가로 영지버섯 유래 미백 기능성 물질인 가나도마난디올의 생합성이 증대되었는지를 HPLC분석을 통해 분석한 결과, 영지균사 배양추출물 중 가나도마난디올의 함량은 헛개나무 추출물 첨가 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(Figure 1). Figure 2에 나타낸 바와 같이 영지버섯 균사 배양 시 1, 5, 10, 15% 헛개나무 추출물을 첨가한 시료는 영지버섯 균사 1 g 당 각 1.14 ± 0.09 , 1.51 ± 0.04 , 2.19 ± 0.11 , 2.81 ± 0.15 mg의 가나도마난디올 함량이 측정되었으며, 이 중 15% 헛개나무 추출물을 첨가한 시료는 헛개나무 추출물이 첨가되지 않은 대조 시료의 가나도마난디올 함량인 1.02 ± 0.05 보다 약 175% 증가한 수치이다. 상기의 결

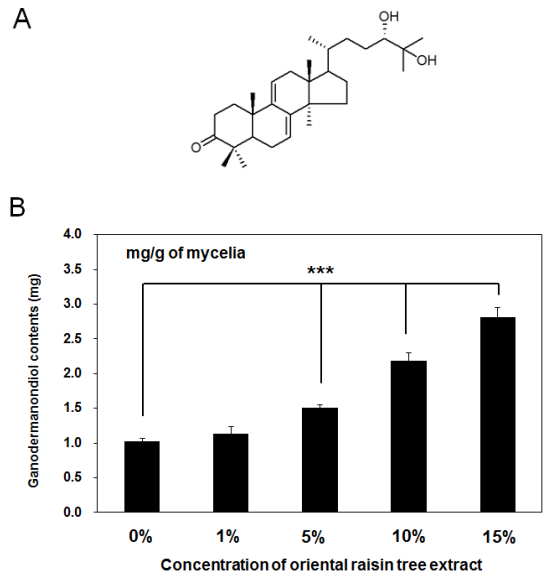


Figure 1. Chemical structure of ganodermanondiol (GN) (A) and GN contents from cultured *Ganoderma lucidum* mycelial extract supplemented with oriental raisin tree extract (ORTE) (B). Values are means ± standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. *** $p < 0.001$ versus GN content without ORTE.

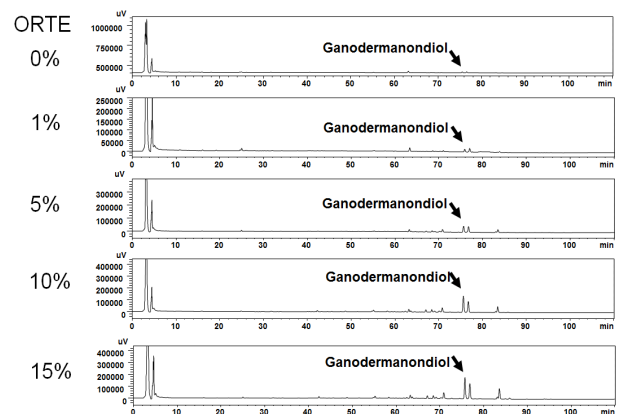


Figure 2. HPLC chromatogram of ganodermanondiol (GN) from cultured *Ganoderma lucidum* mycelial extract supplemented with oriental raisin tree extract (ORTE).

과는 영지균사 배양 시 헛개나무 추출물을 첨가하면 영지버섯의 미백 기능성 물질인 가나도마난디올의 함량을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있는 결과이다. 그러나 본 결과가 헛개나무 추출물이 영지버섯의 가나도

마난디올만을 특이적으로 증가시키는 것을 뒷받침한다고 볼 수 없으며, 이는 HPLC분석 결과에 의해 확인되었다(Figure 1). HPLC분석 결과에 의하면 헛개나무 추출물을 영지버섯 균사 배양 시 첨가하면 다른 물질의 뚜렷한 증가도 관찰되었기 때문이다. 향후 추가적인 연구를 통하여 가나도마난디올 외에 헛개나무 추출물이 영지버섯의 다른 물질의 생합성에 미치는 영향을 규명하고자 하며 이러한 연구를 통하여 화장품 소재로 이용될 수 있는 추가적인 기능성 물질의 발견이 가능할 것으로 사료된다.

트리테르페노이드 류(triterpenoids)는 영지버섯의 다양한 생리활성 물질의 주요 그룹이며, 현재까지 약 150종 이상이 분리되었다. 이러한 영지버섯의 트리테르페노이드 류는 mevalonic acid pathway를 통하여 생합성된다고 보고되었다[26]. 우선 2,3-oxidosualence가 lanosterol synthase (LSS)에 의해 lanosterol (cyclic intermediate)로 전환된 후 고리화(cyclization), 산화(oxidation), 환원(reduction), 아세틸화(acetylation)반응 등에 의해 다양한 트리테르페노이드로 생합성 된다[26]. 또한 Chen 등[26]의 보고에 따르면, lanosterol이 다양한 트리테르페노이드로 전환되는 정확한 반응 과정은 아직 잘 알려져 있지 않았지만, 이 중 산화(oxidation) 과정에는 cytochrome P450 superfamily (CYPs)가 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 이들의 보고에 의하면 영지버섯의 발달단계 중 균사(mycelia)와 자실체(fruit body)에서 보다 원기(primordia)단계에서 가장 많은 트리테르페노이드가 생합성 되었으며, 영지버섯의 유전체 중 78개의 CYPs 유전자가 원기(primordia)단계에서 발현이 많이 됨을 확인하였다. 따라서 본 연구에 의해 확인된 헛개나무 추출물이 영지버섯의 트리테르페노이드의 일종인 가나도마난디올의 생합성을 촉진하는 것은 이러한 CYPs 유전자와 관계되었을 것으로 사료되나, 이는 추가적인 연구를 통하여 규명되어야 한다고 판단된다.

3.2. 헛개나무 영지버섯 균사 배양추출물처리에 따른 세포 생존율 분석

영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물 첨가로 B16F10 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 분석한 결과 1, 5, 10, 15%의 헛개나무 추출물을 첨가한 영지버섯 균사 배양추출물은 세포생존율에는 영향을 미치지

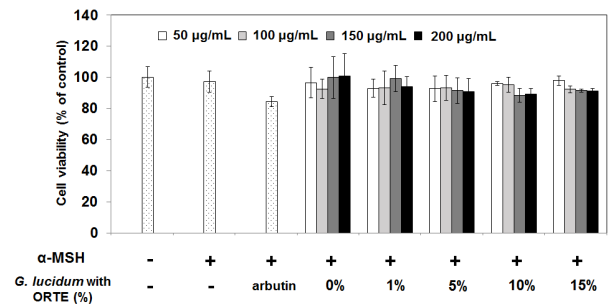


Figure 3. Cytotoxic effects of cultured *Ganoderma lucidum* mycelial extract (GLME) supplemented with oriental raisin tree extract (ORTE) on B16F10 melanoma cells. B16F10 cells were treated with various concentrations of GLME (50, 100, 150, and 200 µg/mL) for 24 h. Values are means ± standard error of the mean (SEM) of three independent experiments and relative to percentages of control cells.

지 않은 것을 확인하였다(Figure 3). 또한 헛개나무 추출물 첨가 영지버섯 균사 배양추출물의 농도를 50, 100, 150, 200 µg/mL로 달리 하여 처리한 결과 역시 B16F10 세포의 세포생존율에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. Figure 3과 같이 1-15% 농도의 헛개나무 추출물을 첨가한 영지버섯 균사 배양추출물이 세포생존율에 영향을 미치지 않았고, 또한 HPLC분석에 의해 가나도마난디올이 헛개나무 추출물 첨가농도에 의존적으로 증가 하였으므로, 보다 더 높은 농도의 헛개나무 추출물 첨가도 가능할 것으로 사료된다. 이러한 세포생존율 분석결과는 향후 헛개나무 추출물 첨가 영지버섯 균사 배양추출물이 실제 미백 기능성 화장품 소재로 이용될 가능성을 높다는 것을 의미하는 것이다.

3.3. 헛개나무 영지버섯 균사 배양추출물처리에 따른 멜라닌 생합성 저해능

HPLC분석을 통하여 영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물 첨가로 가나도마난디올의 생합성량이 증가하는 것을 확인하였고, 이러한 가나도마난디올의 생합성 증가가 실제 B16F10 세포 내의 멜라닌 생합성을 억제하는지를 확인하였다(Figure 4). B16F10 세포 내의 멜라닌 생합성분석결과 영지버섯 균사 배양 시 1, 5, 10, 15%의 농도로 헛개나무 추출물을 첨가한 경우 모든 처리농도(50, 100, 150, 200 µg/mL)에서 헛개나무 영지버섯 균사 배양추출물을 첨가하지 않은 대조군 보다

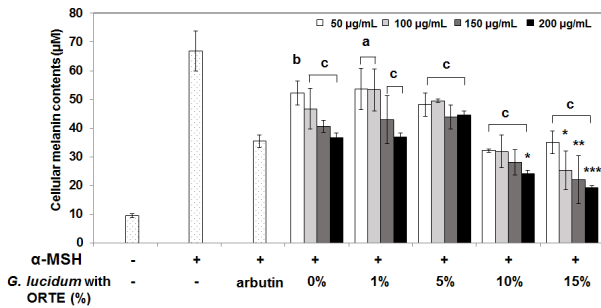


Figure 4. Effects of cultured *Ganoderma lucidum* mycelial extract (GLME) supplemented with oriental raisin tree extract (ORTE) on melanin production of B16F10 cells. GLME inhibits melanin production in B16F10 cells treated with various concentrations of GLME (50, 100, 150, and 200 µg/mL) for 72 h. Values are means ± standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus B16F10 cells with 0.5 mM arbutin treatment. a. $p < 0.05$, b. $p < 0.01$, and c. $p < 0.001$ versus B16F10 cells without ORTE treatment.

유의적으로 멜라닌 생합성량이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 헛개나무 추출물을 첨가하지 않은 영지버섯 균사 배양추출물도 처리농도 의존적으로 멜라닌 생합성량이 감소함을 확인하였다. 이것은 영지버섯 균사 추출물 자체가 미백활성이 있음을 뒷받침하는 결과이다. 뿐만 아니라, 영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물을 10%로 첨가하고 추출물 200 µg/mL로, 15%로 첨가한 후 추출물 100, 150, 200 µg/mL를 처리하였을 때는 arbutin (0.5 mM)처리구 보다 유의적으로 B16F10 세포의 멜라닌 합성량이 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물을 첨가하면 영지버섯 균사의 가나도마난디올의 생합성량이 증가하고, 이러한 증가로 영지버섯 균사 배양추출물이 B16F10 세포의 멜라닌 생합성량 감소를 유도한다고 사료된다. Kim 등[25]은 영지버섯 유래 미백기능성 물질인 가나도마난디올이 B16F10 세포의 티로시나제활성을 억제할 뿐만 아니라, 세포 내 멜라닌 생합성 경로(MAPK)에 포함된 ERK, CREP, JNK 단백질의 활성을 억제하고 티로시나제(TYR, TRP1, TRP2)유전자의 전사인자인 MITF의 발현을 억제하여 결과적으로 B16F10 세포의 멜라닌 생합성을 억제한다고 보고하였다. 본 연구를 통하여 확인된 가나도마난디올의 생합

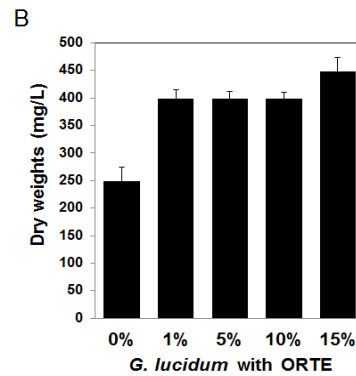
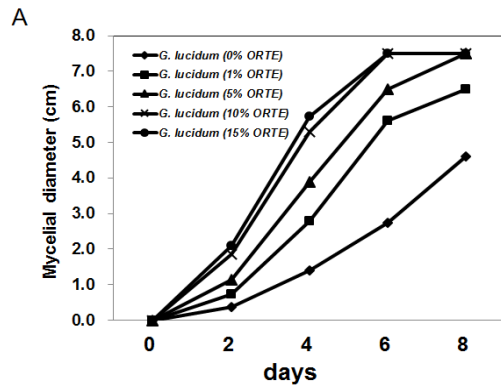


Figure 5. Effects of oriental raisin tree extract (ORTE) on *Ganoderma lucidum* mycelial growth in solid (A) and liquid cultivation (B).

성량 증가에 따른 B16F10 세포의 멜라닌 생합성 억제 또한 Kim 등[25]에 의해 보고된 결과와 동일한 작용을 통하여 발생된 것으로 사료된다.

3.4. 헛개나무 추출물 첨가가 영지버섯 균사 생장에 미치는 영향

영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물 첨가가 영지버섯의 가나도마난디올의 생합성을 증가시키고 결과적으로 잠재적 미백 기능성 제품으로써의 이용가능성을 증진시킬 수 있을 것이라는 가설에서 과연 영지버섯의 가나도마난디올의 생합성만을 증가시키는지 아니면 영지버섯의 생장에도 영향을 미치는지를 규명하기 위해 헛개나무 추출물 첨가에 따른 영지버섯 균사의 성장률을 조사하였다. Figure 5에서 헛개나무 추출물 첨가 농도가 증가할수록 영지버섯 균사의 성장이 증가함을 확인하였다. 특히, 헛개나무 추출물 15%가 첨가된 고체배지상의 영지버섯 균사는 2일차에서 균사 직경이 2.1 cm로 헛개나무 추출물이 첨가되지 않은

배지의 균사성장 직경인 0.4 cm 보다 최고 5.25배 정도 성장이 빨랐으며, 전체 배양기간에서 평균 3.4배 빠른 성장을 보였다. 또한 15%의 헛개나무 추출물이 첨가된 영지버섯 균사의 액체 배양시 영지버섯 균사 건조 중량은 448 ± 25.7 mg/L로 헛개나무 추출물이 첨가되지 않은 대조군의 건조 중량인 249 ± 25 mg/L보다 약 1.8 배 더 많은 균체량이 측정되었다. 이러한 결과는 영지버섯 균사발효 시 헛개나무 추출물을 첨가하면 영지버섯 균사의 성장이 촉진된다는 것을 나타내며, 이러한 균체의 신속한 증가는 향후 영지버섯 유래 미백기능성 물질인 가나도마난디올의 생산을 증가시킬 수 있음을 의미한다. 그러나 이러한 헛개나무 추출물 첨가가 단순히 균사의 성장만을 촉진하는 것이 아니라 앞서 확인한 영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물 첨가가 균체 중량 당 가나도마난디올의 생합성량이 증가한다는 결과에서처럼 영지버섯 균사의 성장뿐만 아니라 가나도마난디올의 생합성량도 증가시킨다는 것이다. 이러한 결과를 바탕으로 향후 영지버섯 균사의 신속한 배양 및 증대된 균체의 확보로 영지버섯 유래 미백 기능성 물질인 가나도마난디올의 생산도 증대시킬 수 있으며, 미백 기능성 화장품 소재의 보다 신속한 확보가 가능할 것으로 사료된다.

4. 결 론

자연에서 유래한 소재를 이용한 천연 제품은 건강한 피부를 위해 오랜 기간 사용되었으며, 최근 합성 제제에 대한 소비자들의 우려로 인하여 이들을 대체할 수 있는 천연소재의 발굴 및 연구가 활발히 수행되고 있는 실정이다. 따라서 이러한 천연소재 및 이를 이용한 제품 시장은 더욱더 확대되고 있는 상황이다. 그러나 이러한 천연소재의 발굴에는 부작용의 최소화를 위한 생물학적 활성 화합물의 동정 및 이들의 생리학적 기능을 과학적으로 규명해야 하는 중요한 도전이 따른다. 이에 본 연구에서는 천연물 유래 기능성 화장품 소재를 발굴하고자 헛개나무 추출물 및 영지버섯 균사를 그 대상으로 이들의 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다. HPLC분석에 의해 영지버섯 균사 배양 시 헛개나무 추출물을 첨가하면 영지버섯의 미백 기능성 물질인 가나도마난디올의 생합성량이 증가함을 확인하였고, 실제 헛개나무 추출물을 첨가한 영지

버섯 균사 배양추출물이 B16F10 세포의 멜라닌 생합성을 유의적으로 저해함을 확인하였다. 또한 영지버섯 균사 생장률 분석을 통하여 헛개나무 추출물 첨가가 영지버섯 균사의 성장을 촉진하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 향후 영지버섯의 미백 기능성 소재로서의 잠재적 이용가능성을 입증하는 결과이며, 헛개나무 또한 영지버섯 유래 미백 기능성 물질인 가나도마난디올의 생합성 증가를 위해 활용 가능한 유용한 천연소재라는 것을 확인하였다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업 육성사업으로 수행된 연구 결과입니다(R0002899).

Reference

1. A. Slominski, D. J. Tobin, S. Shibahara, and J. Wortsman, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiol. Rev.*, 2004, **84**, 1155 (2004).
2. A. Slominski, J. Wortsman, P. M. Plonka, K. U. Schallreuter, R. Paus, and D. J. Tobin, Hair follicle pigmentation, *J. Investig. Dermatol.*, **124**, 13 (2005).
3. G. E. Costin and V. J. Hearing, Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress, *FASEB J.*, **21**, 976 (2007).
4. A. Slominski, M. A. Zmijewski, and J. Pawelek, L-Tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions., *Pigment Cell Melanoma Res*, **25**, 14 (2012).
5. I. F. Videira, D. F. Moura, and S. Magina, Mechanisms regulating melanogenesis, *An. Bras. Dermatol.*, **88**, 76 (2013).
6. R. M. Slominski, M. A. Zmijewski, and A. T. Slominski, The role of melanin pigment in melanoma, *Exp. Dermatol.*, **24**, 258 (2015).
7. A. Sanchez-Ferrer, J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Canovas, and F. Garcia-Carmona, Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism, *Biochem.*

- Biophys. Acta*, **1247**, 1 (1995).
8. K. Jimbow, H. Obata, M. A. Pathak, and T. B. Fitzpatrick, Mechanism of depigmentation by hydroquinone, *J. Invest. Dermatol.*, **62**, 436 (1974).
 9. M. A. Pathak, T. B. Fitzpatrick, and E. W. Kraus, Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **15**, 894 (1986).
 10. J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 982 (1994).
 11. T. S. Chang, An updated review of tyrosinase inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 2440 (2009).
 12. K. Maeda and M. Fukuda, Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765 (1996).
 13. A. Palumbo, M. d'Ischia, G. Misuraca, and G. Prota, Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone, *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 85 (1991).
 14. A. P. Decaprio, The toxicology of hydroquinone—Relevance to occupational and environmental exposure, *Crit. Rev. Toxicol.*, **29**, 283 (1999).
 15. D. McGregor, Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties, *Crit. Rev. Toxicol.*, **37**, 887 (2007).
 16. S. Parvez, M. Kang, H. S. Chung, and H. S. Bae, Naturally occurring tyrosinase inhibitors: Mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries, *Phytother. Res.*, **21**, 805 (2007).
 17. T. Aburjai and F. M. Natsheh, Plants used in cosmetics, *Phytother. Res.*, **17**, 987 (2003).
 18. K. H. Wang, R. D. Lin, F. L. Hsu, Y. H. Huang, H. C. Chang, C. Y. Huang, and M. H. Lee, Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines, *J. Ethnopharmacol.*, **106**, 353 (2006).
 19. L. S. Joshi and H. A. Pawar, Herbal cosmetics and cosmeceuticals: an overview, *Nat. Prod. Chem. Res.*, **3**, 170 (2015).
 20. S. T. Chang and P. G. Miles, Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact, **11**, CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2003).
 21. S. Wachtel-Galor, J. Yuen, J. A. Buswell, and I. F. F. Benzie, *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi), eds. I. F. F. Benzie, and S. Watchel-Galor, Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects, **1**, CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2011).
 22. B. Boh, M. Berovic, J. Zhang, and L. Zhi-Bin, *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds, *Biotechnol. Annu. Rev.*, **13**, 265 (2007).
 23. B. S. Sanodiya, G. S. Thakur, R. K. Baghel, G. B. Prasad, and P. S. Bisen, *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **10**, 717 (2009).
 24. C. C. Chien, M. L. Tsai, C. C. Chen, S. J. Chang, and C. H. Tseng, Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms, *Mycopathologia*, **166**, 117 (2008).
 25. J. W. Kim, H. I. Kim, J. H. Kim, O. C. Kwon, E. S. Son, C. S. Lee, and Y. J. Park, Effects of ganodermanondiol, a new melanogenesis inhibitor from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1798 (2016).
 26. S. Chen, J. Xu, C. Liu, Y. Zhu, D. R. Nelson, S. Zhou, C. Li, L. Wang, X. Guo, Y. Sun, H. Luo, Y. Li, J. Song, B. Henrissat, A. Levasseur, J. Qian, J. Li, X. Luo, L. Shi, L. He, L. Xiang, X. Xu, Y. Niu, Q. Li, M. V. Han, H. Yan, J. Zhang, H. Chen, A. Lv, Z. Wang, M. Liu, D. C. Schwartz, and C. Sun, Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, *Nat. Commun.*, **3**, 913 (2012).