

비파(*Eriobotrya japonica*) 열매 추출물의 산화방지능과 미백 효과

윤민규¹ · 박기철¹ · 조운섭² · 김대옥^{1,*}
¹경희대학교 식품생명공학과, ²전라남도농업기술원

Antioxidant and whitening effects of loquat (*Eriobotrya japonica*) fruit extracts

Min-Kyu Yun¹, Gi-Cheol Park¹, Youn-Sup Cho², and Dae-Ok Kim^{1,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University
²Jeollanamdo Agricultural Research and Extension Services

Abstract The loquat (*Eriobotrya japonica*) is a fruit tree belonging to the Rosaceae family. Loquat fruit extracts from three cultivars (Tanaka, Mogi, and Jinwang) were prepared using absolute methanol and homogenization and ultrasound sonication procedures. We measured the total phenolic and flavonoid content of the fruit extracts and their antioxidant capacities. In addition, we evaluated tyrosinase activity and anti-melanogenic effects in B16F1 melanoma cells. The fruit extract from cv. Tanaka had the highest total phenolic content and showed the highest antioxidant capacity in the ABTS assay. The loquat fruit extract from cv. Jinwang had the highest total flavonoid content and showed the highest antioxidant capacity in the DPPH assay. Loquat fruit extracts from the Tanaka and Jinwang cultivars effectively inhibited mushroom tyrosinase activity. The loquat fruit extracts reduced intracellular oxidative stress in B16F1 melanoma cells. Treating B16F1 melanoma cells with loquat fruit extract from cv. Tanaka at a concentration of 125 µg/mL effectively inhibited melanin synthesis. However, treating the B16F1 melanoma cells with loquat fruit extracts from the Jinwang and Mogi cultivars did not. These results suggest that loquat fruit extracts from the Tanaka cultivar may serve as potential sources of antioxidants and act as a skin-whitening agent.

Keywords: antioxidant capacity, intracellular oxidative stress, loquat fruit, melanin, tyrosinase

서 론

활성산소종(reactive oxygen species; ROS)에는 일중항산소(singlet oxygen), 과산화수소(H₂O₂), 하이드록실라디칼(hydroxyl radical) 등이 있으며, 반응성이 높다(Fruehauf와 Meyskens, 2007). 따라서 활성산소종은 단백질, 지방, 세포막, DNA와 RNA의 산화 손상(oxidative damage)을 일으키고, 다양한 대사활동에 영향을 미쳐, 암, 당뇨병, 염증, 피부 노화를 유도한다(Kim과 Lee, 2021). 식품과 화장품의 산화(oxidation)를 방지할 목적으로 디부틸하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene), 부틸하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole)과 같은 합성 산화방지제(antioxidant)를 사용하고 있다. 천연 산화방지제에 대한 필요성의 증가와 더불어 식물체에서 유래한 추출물을 활용하여 지방과 단백질의 산화를 방지하거나 색소의 퇴색을 방지하는 연구가 이루어지고 있다(Cory 등, 2018; Masaki 등, 1995).

피부 노화(skin aging)는 내인성 요인(intrinsic factor)과 외인성 요인(extrinsic factor)이 관여하는 복잡한 생물학적 과정으로 피부

의 탄력과 기능 상실을 유도한다(Fernández와 Fraga, 2011). 내인성 피부 노화는 유전, 성별, 연령 등의 생물학적 요인에 영향을 받고 의학적으로 건강 문제와 연관이 있으며, 외인성 피부 노화는 자외선, 운동, 중력, 공해 등의 환경적 요인에 의해 발생한다(Cho, 2021). 피부 노화의 대부분은 햇빛에 의한 자외선 노출 누적과 같은 외인성 요인으로 인해 유발된다(Cho, 2021). 콜라겐(collagen)은 진피의 90% 이상을 차지하며 피부의 장력과 강도를 부여하지만, 자외선 노출 누적으로 인한 콜라겐 감소로 피부 탄력이 저하되고, 거친 피부와 주름을 형성한다(Cho, 2021; Park 등, 2010; Yoo 등, 2010).

멜라닌(melanin) 색소는 사람의 피부와 모발의 색을 결정하는 성분으로 피부 표피층의 멜라닌세포(melanocyte)에 의해 생성된다. 멜라닌 색소는 자외선으로부터 피부세포를 보호하는 역할을 하며, 자외선 노출 누적으로 인해 과도한 멜라닌 생성으로 색소 침착을 일으킨다(Eom 등, 2016; Lim 등, 2009; Park 등, 2019). 멜라닌 색소는 페오멜라닌(pheomelanin)과 유멜라닌(eumelanin)의 두 가지 형태로 주로 존재한다. 페오멜라닌은 황(sulfur)을 함유하여 적색에서 황색을 띠는 색소이며, 유멜라닌은 흑색에서 갈색을 띠는 색소다(Eom 등, 2016; Stark 등, 2003). 멜라닌 합성은 유전 및 환경적 요인, 멜라닌 생합성 촉진 신호전달 경로 등 여러 인자에 의해 영향을 받는다(Jian 등, 2011; Slominski 등, 2022).

비파(loquat; *Eriobotrya japonica*)는 장미과(Rosaceae)의 상록 소교목으로 중국이 원산지이며 한국, 중국, 일본, 스페인, 브라질 등에서 상업적으로 재배되고 있다(Badenes 등, 2000; Cho와 Kim, 2012; Lee와 Kim, 2009; Park 등, 2017). 전 세계적으로 약

*Corresponding author: Dae-Ok Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

Tel: +82-31-201-3796

Fax: +82-31-204-8116

E-mail: DOKIM05@khu.ac.kr

Received December 2, 2021; revised April 7, 2022;

accepted April 11, 2022

130,000헥타르(ha) 면적에서 재배되고 있으며, 연간 620,000톤(ton)이 생산된다(Park 등, 2017). 비파는 미네랄(mineral)과 카로티노이드(carotenoid)를 함유하고 있을 뿐만 아니라(Fu 등, 2014; Pareek 등, 2014), 페놀화합물(phenolic compound)인 클로로겐산(chlorogenic acid), 네오클로로겐산(neochlorogenic acid) 등의 하이드록시신남산(hydroxycinnamic acid)과 케세틴(querctin)과 캄페롤(kaempferol) 등의 플라보놀 배당체(flavonol glycoside)도 함유하고 있다(Ding 등, 1999; Park 등, 2017; Zhang 등, 2015). 이러한 페놀화합물은 항염증, 항당뇨, 항비만, 항암 효과 등 다양한 생리활성을 가지고 있다(Cory 등, 2018).

비파의 저장성 개선(Park 등, 2005), 유리당, 유기산, 지방산, 아미노산 등 성분분석(Cho 등, 1991; Lee 등, 1996; Park과 Park, 1995; Shaw와 Wilson, 1981), 항암효능(Whang 등, 1996) 연구가 이루어져 왔다. 하지만, 비파 열매를 이용한 기능성 연구가 부족한 실정으로, 본 연구에서는 비파 열매의 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능, 타이로시네이즈(tyrosinase) 활성 억제능을 측정하였다. 아울러 B16F1 흑색종(melanoma) 세포를 이용하여 세포 내 산화스트레스(oxidative stress)와 멜라닌 함량을 평가하였다.

재료 및 방법

비파 열매

실험에 사용한 비파 열매는 세 품종(전중(Tanaka), 무목(Mogi), 진왕(Jinwang))으로 전라남도 완도군 완도읍에 소재한 전라남도 농업기술원 시험포장(N34.37090, E126.72875)에서 관행 관리방식으로 재배되었다. 비파 열매는 노지 과수원에서 생산되었으며, 2013년 6월 중순에 수확되었다(Park 등, 2017). 수확 후 열매로부터 얻어진 추출물(extract)은 분석 전에 -20°C 냉동고에 보관하였다.

시약

폴린-시오칼토 페놀 시약(Folin-Ciocalteu's phenol reagent), 2,2'-아조바이스(2-메틸프로피온아마이드) 다이하이드로클로라이드(2,2'-azobis(2-methylpropanamide) dihydrochloride; AAPH), 2,2'-아지노-바이스(3-에틸벤조싸이아졸린-6-설폰산)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; ABTS), 2,2-다이페닐-1-피크릴하이드라질(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH), 아질산 소듐(sodium nitrite), 염화 알루미늄(aluminium chloride), 갈산(gallic acid), 카테킨(catechin), 바이타민 C (vitamin C), 과산화수소(hydrogen peroxide), 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO), 3-(4,5-다이메틸싸이아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT), 2',7'-다이클로로플루오레세인 다이아세테이트(2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA), α -멜라닌세포 자극 호르몬(α -melanocyte-stimulating hormone; α -MSH), 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 염색액, L-티로신(L-tyrosine), 버섯유래 타이로시네이즈(mushroom tyrosinase)는 Sigma-Aldrich Co., LLC (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 탄산 소듐(sodium carbonate; Na_2CO_3)은 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Kyoto, Japan)에서 구입하였으며, 수산화 소듐(sodium hydroxide; NaOH)은 Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. (Siheung, Korea)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), Hank's Buffered Salt Solution (HBSS), 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 페니실린-스트렙토마이신 용액(penicillin-streptomycin solution), 트립신(trypsin)은 Welgene Inc. (Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다.

시료 추출

비파 열매 50 g을 무수 메탄올(absolute methanol) 300 mL와 혼합한 후 균질기(Polytron homogenizer; PT 10/35, Kinematica, Kriens-Luzern, Switzerland)를 사용하여 15,000 rpm에서 2분간 균질화하고 20분간 초음파 추출하였다. 추출액은 흡인여과기(Büchner funnel)와 Whatman No. 4 여과지(Whatman International Ltd., Kent, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과액은 40°C 에서 회전증발 농축기(N-1000; Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 농축하였다.

총페놀 함량 측정

비파 열매 추출물의 총페놀 함량은 폴린-시오칼토 페놀 시약을 이용해 측정하였다(Kim 등, 2021). 희석한 추출물 0.2 mL를 증류수 2.6 mL와 혼합하고 폴린-시오칼토 페놀시약 0.2 mL를 첨가해 상온에서 6분 반응시킨 후, 7% (w/v) 탄산 소듐 용액 2 mL를 추가로 첨가하였다. 90분 후, 분광광도계(SPECTRONIC™ 200; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비파 열매의 총페놀 함량은 mg 갈산 당량(mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g fresh weight (FW))으로 나타내었다.

총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드 함량은 Kim 등(2021)의 방법을 사용해 측정하였다. 비파 열매 추출물 0.5 mL, 증류수 3.2 mL를 혼합한 후, 5% (w/v) 아질산 소듐 0.15 mL 첨가해 5분간 반응시키고, 10% (w/v) 염화 알루미늄 0.15 mL를 첨가해 1분간 더 반응시켰다. 1 M 수산화 소듐 용액 1 mL를 첨가해 혼합한 후, 분광광도계(SPECTRONIC™ 200; Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비파 열매의 총플라보노이드 함량은 mg 카테킨 당량(mg catechin equivalents (CE)/100 g FW)으로 나타내었다.

산화방지능 측정

산화방지능 측정은 라디칼 소거능 기반으로 한 DPPH법과 ABTS법을 이용하였다(Kim 등, 2021). DPPH 라디칼 소거능 측정을 위해서, 80% (v/v) 메탄올-물 혼합용액을 사용하여 DPPH 100 μM 용액을 제조하였다. 진한 보라색의 DPPH 라디칼 용액은 분광광도계(SPECTRONIC™ 200; Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 517 nm에서 0.650 ± 0.020 의 흡광도가 되도록 희석하였다. DPPH 라디칼 용액 2.95 mL에 0.05 mL의 비파 열매 추출물을 첨가하고, 30분 반응하여 열매 추출물의 DPPH 라디칼 소거능에 따른 흡광도 감소를 측정하였다. 비파 열매의 산화방지능은 mg 바이타민 C 당량(mg vitamin C equivalents (VCE)/100 g FW)으로 나타내었다.

ABTS 라디칼을 이용한 산화방지능을 측정하기 위해서 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 1 mM AAPH와 2.5 mM ABTS를 혼합하고, 70°C 에서 30분 동안 항온 수조(SB-1000; Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 가열하였다. 생성된 ABTS 라디칼 용액은 분광광도계(SPECTRONIC™ 200; Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 734 nm에서 0.650 ± 0.020 의 흡광도가 되도록 희석하였다. 37°C 에서 비파 열매 추출물(0.02 mL)과 ABTS 라디칼 용액(0.98 mL)을 혼합하여 10분 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비파 열매의 산화방지능은 mg 바이타민 C 당량(mg VCE/100 g FW)으로 제시하였다.

색도 측정

비파 열매 추출물 색도 측정은 색도계(colorimeter; JC-801; Color Techno System Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 L*값(lightness; 명도), a*값(redness; 적색도), b*값(yellowness; 황색도)을 5회 측정하여 평균값을 산출하였다. 색도계 측정은 표준관을 사용하여 측정 기기를 보정하였으며, L*, a*, b*값은 각각 93.83, 95.67, 11.78이다.

가용성 고형분 함량 측정

비파 열매의 가용성 고형분 함량은 굴절계(refractometer; PR-101a; ATAGO Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 굴절계에 과즙을 한 방울 떨어뜨려 열매의 가용성 고형분 함량(°Bx)을 측정하였다.

타이로시네이즈 활성 억제능 측정

비파 열매 추출물의 타이로시네이즈 활성 억제능은 Jeong 등(2018)과 Lee 등(2006)의 방법을 일부 수정하여 분광학적으로 측정하였다. 사용된 기질은 L-티로시네이며 증류수에 희석하여 1.66 mM을 제조하였고, 기질 50 µL에 추출물 50 µL 첨가 후, PBS로 희석한 200 U 타이로시네이즈 50 µL를 첨가하여 혼합물을 제조하였다. 대조군에는 추출물 대신 50% (v/v) 메탄올-물 혼합용액 50 µL를 첨가하였다. 혼합물 150 µL를 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후에 475 nm에서 흡광도를 마이크로플레이트 판독기(microplate reader; Infinite M200; Tecan, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 아부틴(arbutin; 1 µg/mL)과 코지산(kojic acid; 1 µg/mL)을 양성대조군으로 사용하였다. 타이로시네이즈 활성 억제능은 아래 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{억제능(\%)} = (\Delta A_{475_{\text{대조군}}} - \Delta A_{475_{\text{추출물}}}) / \Delta A_{475_{\text{대조군}}} \times 100$$

$\Delta A_{475_{\text{대조군}}}$: 475 nm에서 대조군(50% (v/v) 메탄올-물 혼합용액) 흡광도
 $\Delta A_{475_{\text{추출물}}}$: 475 nm에서 비파 열매 추출물 흡광도

세포 배양

쥐(mouse) 피부로부터 유래한 B16F1 흑색종 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, VA, USA)에서 구입하였다. B16F1 흑색종 세포는 10% FBS, 페니실린 100 units/mL, 스트렙토마이신 100 µg/mL를 함유한 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂ 배양기(CO₂ incubator, BB 15; Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany)에서 배양하였다.

세포 독성 측정

B16F1 흑색종 세포에 대한 비파 열매 추출물의 최대 무독성 농도를 확인하기 위해 Heo 등(2001)의 MTT법을 이용하였다. 96 웰 플레이트(96-well plate)에 2×10⁴ cells/well이 되도록 분주하고 24시간 배양하고 배지를 제거하였다. 비파 열매 추출물을 다양한 농도로 처리한 B16F1 흑색종 세포를 무혈청배지(serum-free medium)에서 24시간 동안 더 배양하였다. MTT를 처리하여 3시간 동안 더 반응시키고 DMSO로 포마잔(formazan)을 용해시킨 후에 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200; Tecan)를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. B16F1 흑색종 세포의 생존율이 90% 이상을 보이는 비파 열매 추출물 농도를 무독성을 보이는 농도로 간주하였다. 세 품종의 비파 열매 추출물은 250 µg/mL 이하 농도에서 무독성을 보였다(data not shown).

세포 내 산화스트레스 측정

무독성 농도의 비파 열매 추출물을 B16F1 흑색종 세포에 처리하여 세포 내 산화스트레스에 미치는 영향을 DCFH-DA를 사용하여 평가하였다(Kim 등, 2021). MTT법과 동일하게 96 웰 플레이트에 B16F1 흑색종 세포를 2×10⁴ cells/well 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 비파 열매 추출물을 다양한 농도로 분주하고 24시간 더 배양하였다. 50 µM DCFH-DA를 분주하고 30분간 배양 후, 과산화수소 200 µM을 처리하고 1시간 더 배양하였다. 형광 분석은 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200; Tecan)를 이용하여 들뜸(excitation)은 485 nm, 방출(emission)은 530 nm에서 측정하였다. 세포 내 산화스트레스는 대조군(100%)과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

멜라닌 함량 측정

비파 열매 추출물의 처리에 따른 B16F1 흑색종 세포의 멜라닌 색소 생성에 미치는 영향은 Hong과 Kim (2009), Park 등(2013) 그리고 Kwon 등(2014)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. B16F1 세포를 1×10⁵ cells/well 농도로 24 웰 플레이트(24-well plate)에서 24시간 배양하였다. 다양한 농도의 비파 열매 추출물과 α-MSH 100 nM을 처리하여 72시간 배양하고 그 후, 각 웰(well)의 배지를 제거하고 DPBS를 이용해 웰을 세척하였다. 1 M 수산화 소듐 용액 0.2 mL를 첨가하여 멜라닌을 용해시킨 후 흡광도는 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200; Tecan)를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 멜라닌 함량은 대조군의 백분율(%)로 표현하였다.

통계 분석

모든 실험은 3회 반복 측정하였고, 평균±표준편차로 나타내었다. 실험결과에 따른 유의성 검증은 SAS software 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용했다. 던컨다중검정법(Duncan's multiple range test)으로 95% 신뢰구간에서 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

총페놀 및 총플라보노이드 함량

비파 열매의 총페놀 및 총플라보노이드 함량은 Table 1과 같다. 실험에 이용한 세 품종의 비파 열매의 총페놀 함량은 100.6-168.8 mg GAE/100 g FW, 총플라보노이드 함량은 45.8-75.0 mg CE/100 g FW이었다. 진중 품종이 가장 높은 총페놀 함량을 보였고, 가장 낮은 총페놀 함량을 보인 무목 품종보다 약 1.7배 정도 높았다. 클로로겐산 함량 차이로 인해 진중 품종의 페놀 함량이 무목 품종보다 높았다는 선행 연구의 결과처럼 본 연구에서도 유사한 경향을 보였다(Ding 등, 2001). 총플라보노이드 함량은 진왕 품종이 가장 높았으며, 가장 낮은 진중 품종보다 약 1.6배 정도 높았다. 페놀화합물이 플라보노이드(flavonoid)를 포함하는 큰 범주이긴 하지만, 진중 품종에서는 총페놀 함량이 높음에도 불구하고 총플라보노이드 함량이 낮게 측정되었다. 이는 플라보노이드계의 폴리페놀 함량이 상대적으로 진중 품종에서 낮은 것으로 추정되며, 이는 Kim 등(2012)의 연구 결과와 비슷한 경향을 보였다.

산화방지능

ABTS법과 DPPH법을 이용한 비파 열매의 산화방지능 결과는 Table 1과 같다. ABTS 라디칼 소거능을 이용한 산화방지능(mg

Table 1. Total phenolic and flavonoid content, and antioxidant capacity of loquat fruits from three cultivars (Tanaka, Mogi, and Jinwang)

Cultivar	Total phenolic content (mg GAE ¹⁾ /100 g)	Total flavonoid content (mg CE ¹⁾ /100 g)	Antioxidant capacity (mg VCE ¹ /100 g)	
			ABTS ²⁾	DPPH ²⁾
Tanaka	168.8±17.8 ^{a3)}	45.8±7.0 ^c	130.1±11.1 ^a	64.7±8.6 ^c
Mogi	100.6±11.1 ^c	60.9±10.2 ^b	78.0±10.4 ^b	89.3±12.0 ^b
Jinwang	113.1±8.4 ^b	75.0±4.7 ^a	78.4±2.9 ^b	99.3±5.3 ^a

¹⁾GAE, CE, and VCE stand for gallic acid equivalents, catechin equivalents, and vitamin C equivalents, respectively.

²⁾Antioxidant capacity was measured using the ABTS and DPPH radical-scavenging assays.

³⁾Data are expressed as mean±standard deviation (n=3). Significance of differences was determined using Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

Table 2. Color (L*, a*, and b* values) and soluble solids content of loquat fruits from three cultivars (Tanaka, Mogi, and Jinwang)

Cultivar	L* (lightness)	a* (redness)	b* (yellowness)	Soluble solids content (°Bx)
Tanaka	34.2±2.6 ¹⁾	20.2±3.5 ^a	33.0±2.9 ^a	11.6±1.9 ^a
Mogi	34.6±1.3 ^a	18.9±2.6 ^a	35.4±4.8 ^a	10.4±0.9 ^a
Jinwang	33.2±4.1 ^a	20.3±2.1 ^a	37.0±4.0 ^a	9.5±1.7 ^a

¹⁾Data are expressed as mean±standard deviation (n=5). Significance of differences was determined using Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

VCE/100 g FW)은 전중, 진왕, 무목 순으로 감소하였다. 반면, DPPH 라디칼 소거능을 이용한 산화방지능(mg VCE/100 g FW)은 진왕, 무목, 전중 순으로 낮아졌다. ABTS와 DPPH 라디칼 소거능으로 측정된 각각의 산화방지능은 피어슨의 상관분석(Pearson's correlation analysis)에서 상호 간에 음의 상관관계를 보였다(data not shown). ABTS 라디칼 소거능은 수용액에서 산화방지능을 측정할 반면에, DPPH 라디칼 소거능은 주로 유기용매에 녹는 물질의 산화방지능 측정에 기반하기 때문에 사용하는 라디칼 종류 및 산화방지능 분석법에 따라 산화방지능은 상이할 수 있다(Dawidowicz 등, 2013; Kim 등, 2012; Yoo 등, 2007).

색도

색도계를 사용해 비파 과육 표면 5곳에서 L*값(명도), a*값(적색도), b*값(황색도)의 평균을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 세 품종의 비파 열매의 명도, 적색도, 황색도는 상호 유의미한 차이는 없었다. 사용된 비파 열매 품종들 간에 특정 색을 띠는 색소 성분의 함량 차이가 미미하기 때문인 것으로 생각된다.

가용성 고형분 함량

비파 열매의 가용성 고형분 함량은 Table 2와 같다. 전중 품종이 가장 높은 가용성 고형분 함량을 보였지만, 세 품종의 비파 열매들 사이에서 가용성 고형분 함량은 유의미한 차이가 없었다.

타이로시네이즈 활성 억제능

진왕 열매 추출물 100 µg/mL에서 가장 높은 타이로시네이즈 활성 억제능(15.5±2.8%)을 보였다(Fig. 1). 타이로시네이즈는 폴리페놀 산화효소(polyphenol oxidase; PPO)이며 활성부위(active site)에 구리를 가지고 있으며, 촉매 구리 중심에 히스티딘(histidine) 잔기가 존재한다(García-Borrón과 Solano, 2002; Kubglomsong 등, 2018). 체내에서 L-티로신은 타이로시네이즈에 의해 L-3,4-다이하이드록시페닐알라닌(L-3,4-dihydroxyphenylalanine; L-DOPA)으로 산화된다. L-도파는 도파퀴논(dopaquinone)과 도파크롬(dopachrome)으로 전환되어 멜라닌을 형성한다(Panzella와 Napolitano, 2019). 이러한 멜라닌 합성 과정은 타이로시네이즈에 의한 산화 작용을 시작으로 일어난다. 또한, 페놀화합물은 L-티로신과 구조가 유사

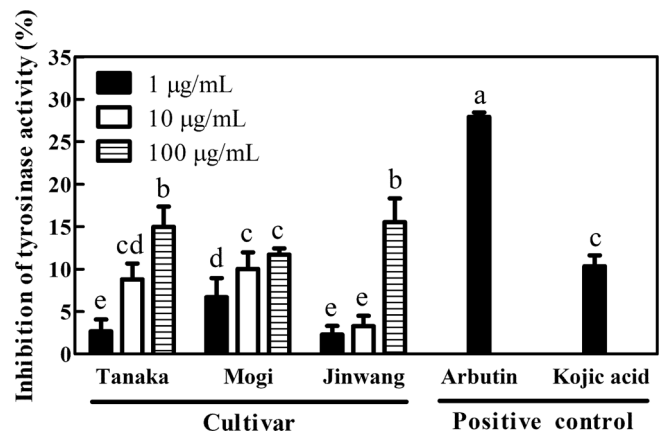


Fig. 1. Inhibitory effects of loquat fruit extracts from three cultivars (Tanaka, Mogi, and Jinwang) on tyrosinase activity. Data are expressed as mean±standard deviation (bar; n=3). The different letters on the bars indicate a significant difference determined using the Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

하여 타이로시네이즈 활성을 억제하거나 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다(Chang, 2009). 비파 열매 추출물에 함유된 하이드록시신남산(클로로겐산과 그 유도체)과 플라보놀(퀘세틴과 캄페롤 그리고 이들 유도체)이 주요한 페놀화합물로 알려져 있다(Ding 등, 2001; Zhang 등, 2015). 클로로겐산, 퀘세틴 등과 같은 페놀화합물이 타이로시네이즈 활성을 억제한다고 보고되었다(Fan 등, 2017; Iwai 등, 2004; Li 등, 2014). 본 연구에서 비파 열매 추출물의 처리에 의한 타이로시네이즈 효소 활성의 억제는 페놀화합물에 의한 것으로 판단된다.

세포 내 산화스트레스

비파 열매 추출물의 여러 농도(31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL)에서 측정된 세포 내 산화스트레스의 결과는 Fig. 2와 같다. 과산화수소(200 µM)에 노출된 B16F1 흑색종 세포의 세포 내 산화스트레스는 대조군(100%) 대비 173.5±19.6%로 증가하였지만, 전중 열매 추출물을 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL의 농도로 B16F1 흑

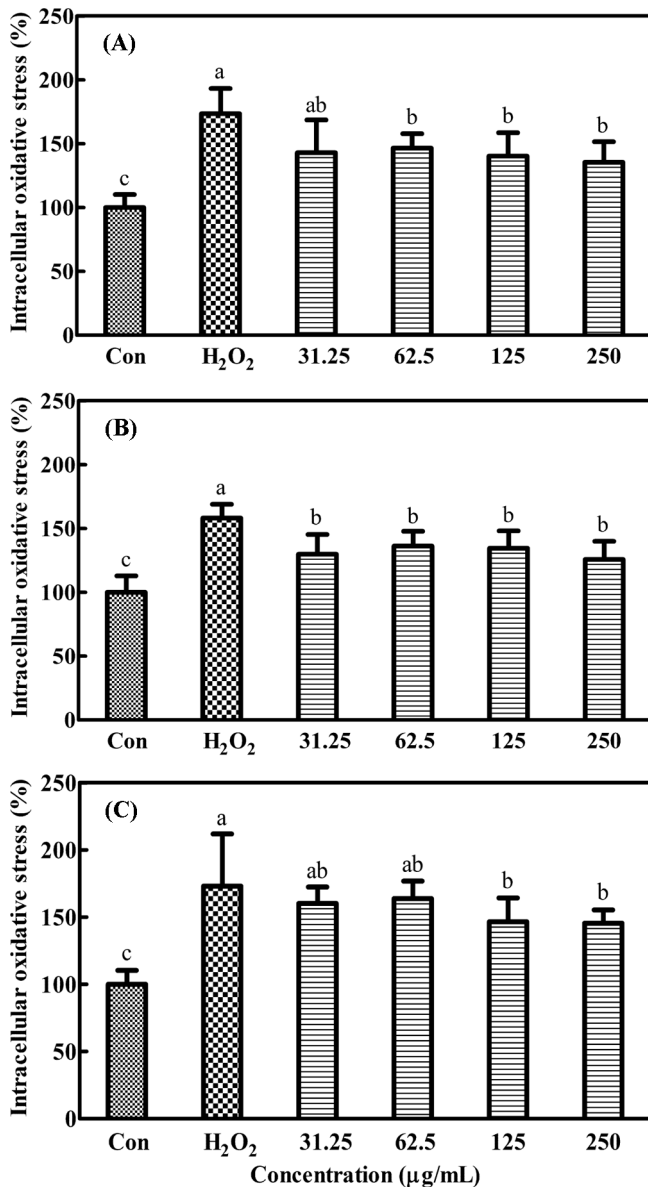


Fig. 2. Effects of loquat fruit extracts from three cultivars ((A) Tanaka, (B) Mogi, and (C) Jinwang) on intracellular oxidative stress in B16F1 melanoma cells. Data are expressed as mean± standard deviation (bar; n=3). The different letters on the bars indicate a significant difference determined using the Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

색종 세포에 처리하였을 때 142.9 ± 25.7 , 146.5 ± 11.3 , 140.3 ± 18.3 , $135.5 \pm 16.1\%$ 로 각각 세포 내 산화스트레스가 감소하였다(Fig. 2A). B16F1 흑색종 세포에 무목 열매 추출물을 31.25, 62.5, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 각각 129.7 ± 15.5 , 136.2 ± 11.6 , 134.5 ± 13.7 , $125.7 \pm 14.2\%$ 로 세포 내 산화스트레스가 과산화수소 스트레스군($158.2 \pm 10.7\%$) 대비 모든 처리 농도에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 2B). 진왕 열매 추출물은 125와 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 스트레스군 대비 유의적으로 세포 내 산화스트레스를 감소시켰다(Fig. 2C).

과산화수소에 의해 증가된 B16F1 흑색종 세포 내 산화스트레스는 비파 열매 추출물을 처리 시 유의적으로 감소하는 경향을 보였으나, 각기 다른 농도의 추출물 처리에 따른 처리군 간의 유

의적 차이는 보이지 않았다. 세포에 축적된 산화스트레스는 세포막에서 과산화작용을 일으켜 세포사를 유도한다(Sim과 Lee, 2019; Valencia와 Morán, 2004). 비파 열매가 B16F1 흑색종 세포에서 세포 내 산화스트레스를 완화시켜 세포 사멸에 대한 보호작용의 가능성을 확인할 수 있었다.

멜라닌 함량

세 가지 품종의 비파 열매 추출물의 농도 처리에 따른 B16F1 흑색종 세포 내 멜라닌 생성 저해 효과는 Fig. 3과 같다. α -MSH를 처리하지 않은 대조군(100%) 대비 α -MSH만을 처리한 B16F1 흑색종 세포의 세포 내 멜라닌 함량은 $137.6 \pm 1.3\%$ 로 증가하였지만, 전중 열매 추출물(125 $\mu\text{g/mL}$)을 처리 시 유의적으로 멜라닌 함량($126.3 \pm 21.8\%$)을 감소시켰다(Fig. 3A). 반면, 무목 열매 추출물을 여러 농도에서 처리하였을 때, B16F1 흑색종 세포에서 멜라닌 생성은 154.7-161.0%를 보여 α -MSH만을 처리한 B16F1 흑색종 세포보다 더 높았다(Fig. 3B). α -MSH만을 처리한 B16F1 흑색종 세포($150.6 \pm 2.8\%$)에 진왕 열매 추출물을 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때, 세포 내 멜라닌 함량은 대조군(100%) 대비 각각 149.2 ± 14.8 , $145.3 \pm 24.2\%$ 로 멜라닌 생성 저해 효과를 보였지만 유의적인 감소는 보이지 않았다(Fig. 3C).

전중 열매 추출물 125 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리군에서만 α -MSH만을 처리한 B16F1 흑색종 세포와 비교하여 멜라닌 생성이 유의적으로 감소하였다(Fig. 3A). 멜라닌 생성의 초기 단계에 관여하는 타이로시네이즈 활성을 억제하거나 산화방지제로 타이로시네이즈에 의해서 생성된 산화물을 환원시킬 경우에 세포 내에서 멜라닌 생성을 저해할 수 있다(Obaid 등, 2021; Panzella와 Napolitano, 2019). 타이로시네이즈는 페오멜라닌과 유멜라닌 합성에 모두 관여하며, tyrosinase-related protein (TRP)-1과 TRP-2는 유멜라닌 합성에 더 많은 관여를 하는 것으로 알려졌다(Chang, 2009). 이들 멜라닌 생성 효소들이 관여하는 세포 내 신호전달 기전에 의해 멜라닌은 합성되고 그 중 cyclic AMP (cAMP)-protein kinase A (PKA) 신호전달 경로가 멜라닌 합성의 주요한 경로다(Jian 등, 2011). 피부가 ultraviolet B에 노출되면 멜라닌 세포의 cAMP 증가는 PKA에 의한 cAMP 반응 요소 결합단백질(cAMP-response element binding protein)의 인산화와 활성화 과정을 통해 소안구 증 관련 전사 인자(microphthalmia-associated transcription factor; MITF) 발현을 증가시킨다(Jian 등, 2011). MITF는 멜라닌 합성에서 중요한 전사 조절 인자로서 타이로시네이즈, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다(Jian 등, 2011).

산화방지제로 작용하는 클로로겐산은 비파 열매의 주요한 페놀화합물이다(Ding 등, 1999; Zhang 등, 2015). 클로로겐산은 폴리페놀 산화효소인 타이로시네이즈에 의해 퀴논(quinone) 유도체로 산화되고 이들이 중합하여 반응을 통해 멜라닌 생성의 전구체로 이용될 수 있다. 하지만, 클로로겐산은 타이로시네이즈의 활성을 억제한다는 보고도 있다(Iwai 등, 2004). 또한 클로로겐산을 처리한 B16 흑색종 세포에서 세포 내 타이로시네이즈 활성은 감소하였으나 멜라닌 생성은 증가하였다(Li 등, 2014). 이는 페놀화합물이 타이로시네이즈 활성을 억제할 수도 있지만, 멜라닌 형성의 전구체로 사용되거나 신호전달 경로에 영향을 미쳐 멜라닌 생성을 촉진하는 역할을 할 수도 있다는 것을 의미한다(Jian 등, 2011; Li 등, 2014). 비파 열매 추출물이 타이로시네이즈 활성을 억제하였지만(Fig. 1), B16F1 흑색종 세포에서 전중 열매 추출물(125 $\mu\text{g/mL}$) 처리를 제외하고는 멜라닌 합성을 억제하지는 못하였다(Fig. 3). 본 연구에서 B16F1 흑색종 세포에서 신호전달 기전을 확인하지 못하였을지라도, 비파 열매 추출물이 멜라닌 생성

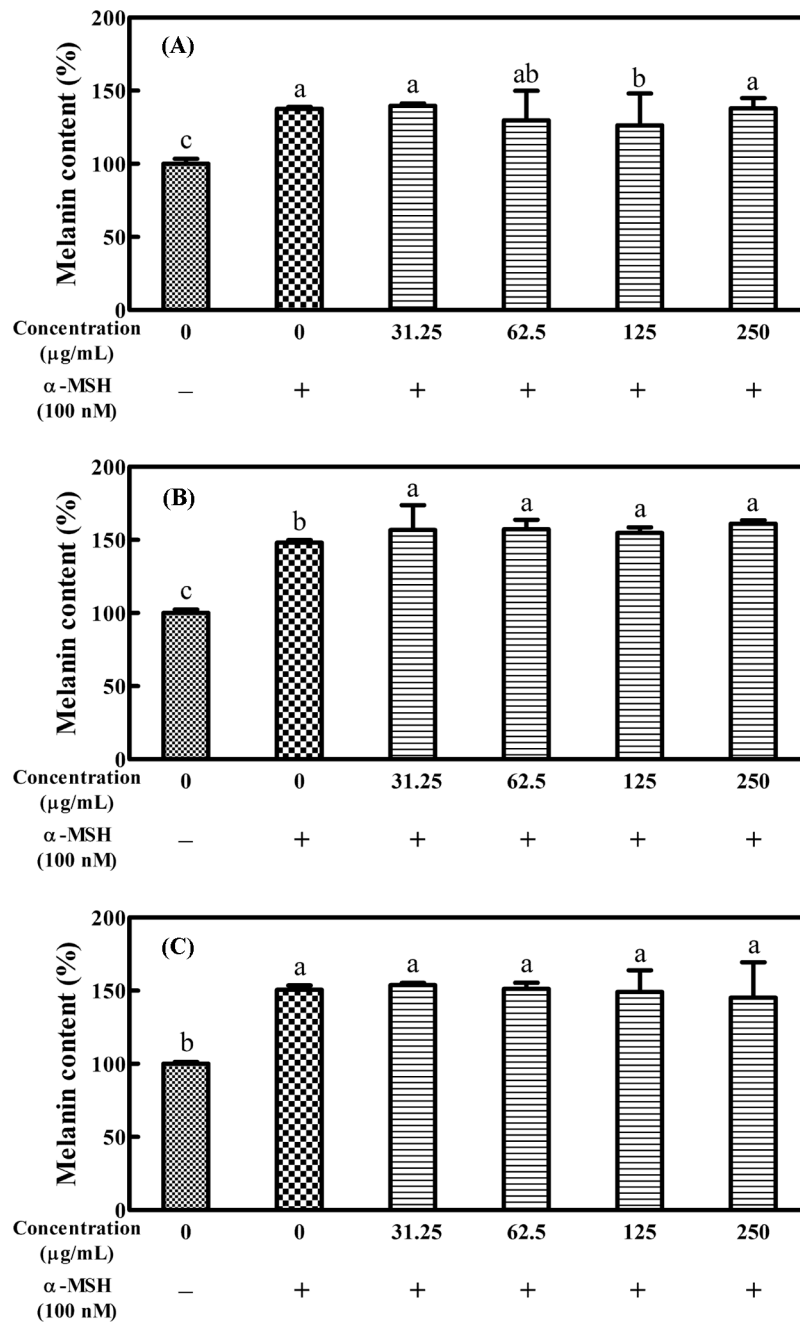


Fig. 3. Anti-melanogenic effects of loquat fruit extracts from three cultivars ((A) Tanaka, (B) Mogi, and (C) Jinwang) in B16F1 melanoma cells. Positive control: cell stimulated using α -MSH. Data are expressed as mean \pm standard deviation (bar; n=3). The different letters on the bars indicate a significant difference determined using the Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

효소(타이로시네이즈, TRP-1, TRP-2)의 발현과 관련한 cAMP-PKA 신호전달 경로에 영향을 미치지 못한 것으로 추측한다.

B16F1 흑색종 세포 내에서 멜라닌 생성 억제는 비파 열매(특히 전중 열매)에 내재하는 주요 생리활성성분인 페놀화합물의 산화방지 작용 또는 타이로시네이즈 활성 억제에 의한 것으로 여겨진다. 향후 국내에서 재배되는 비파 열매에 존재하는 개별 페놀화합물의 정량적·정성적 분석이 요구된다. 또한, 비파 열매에서 확인된 각 페놀화합물이 타이로시네이즈 활성과 멜라닌 생성에 미치는 영향을 평가하기 위해서는 세포실험과 동물실험, 그리고 분자생물학적 메커니즘 규명을 위한 연구가 더 필요할 것으로 생각한다.

요 약

비파 열매 추출물의 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능을 확인한 결과 전중 열매에서 가장 높은 총페놀 함량과 산화방지능(ABTS법)을 보였다. 진왕 열매는 전중 열매와 비교하여 총페놀 함량은 유의적으로 낮았지만, 가장 높은 총플라보노이드 함량과 산화방지능(DPPH법)을 보여주었다. 세 품종의 비파 열매 추출물은 B16F1 흑색종 세포 내 산화스트레스를 감소시켰으며, 특히 전중과 진왕 열매 추출물은 멜라닌 합성에 관여하는 타이로시네이즈 활성을 효과적으로 감소시켰다. 하지만 전중 열매 추출물(125 µg/mL)을 제외한 모든 처리군에서 멜라닌 생성을 효과

적으로 저해시키지는 못하였다. 본 연구 결과를 바탕으로 전중 품종의 열매 추출물은 천연 산화방지제 및 피부미백 소재로의 활용 가치가 있는 것으로 판단된다.

References

- Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llácer G. Analysis of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Euphytica* 114: 187-194 (2000)
- Chang T-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440-2475 (2009)
- Cho S. Pathogenesis and prevention of skin aging. *J. Korean Med. Assoc.* 64: 438-446 (2021)
- Cho H-S, Kim K-H. Quality characteristics of *Maejalgwa* containing various levels of *Eriobotrya japonica* leaf powder. *J. East Asian Soc. Diet. Life* 8: 550-557 (2012)
- Cho Y-S, Park S-K, Lee H-Y. Composition of free sugars, organic acids and free amino acids in loquat flesh. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20: 89-93 (1991)
- Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Front. Nutr.* 5: 87 (2018)
- Dawidowicz, L. A, Olszowy, Małgorzata. The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *Eur. Food Res. Technol.* 236: 1099-1105 (2013)
- Ding C-K, Chachin K, Ueda Y, Imahori Y, Kurooka H. Effects of high CO₂ concentration on browning injury and phenolic metabolism in loquat fruits. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 68: 275-282 (1999)
- Ding C-K, Chachin K, Ueda Y, Imahori Y, Wang CY. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2883-2888 (2001)
- Eom T, Woo K, Shim BS. Melanin: A naturally existing multifunctional material. *Appl. Chem. Eng.* 27: 115-122 (2016)
- Fan M, Zhang G, Hu X, Xu X, Gong D. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Res. Int.* 100: 226-233 (2017)
- Fernández AF, Fraga MF. The effects of the dietary polyphenol resveratrol on human healthy aging and lifespan. *Epigenetics* 6: 870-874 (2011)
- Fruehauf J, Meyskens F. Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clin. Cancer Res.* 13: 789-794 (2007)
- Fu X, Feng C, Wang C, Yin X, Lu P, Grierson D, Xu C, Chen K. Involvement of multiple phytoene synthase genes in tissue- and cultivar-specific accumulation of carotenoids in loquat. *J. Exp. Bot.* 65: 4679-4689 (2014)
- García-Borrón JC, Solano F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigm. Cell Res.* 15: 162-173 (2002)
- Heo H-j, Cho H-Y, Hong B, Kim H-K, Kim E-K, Kim B-G, Shin D-H. Protective effect of 4',5'-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid-J. Protein Fold. Disord.* 8: 194-201 (2001)
- Hong S-J, Kim K-J. *Scutellaria baicalensis* Georgi (SBG) inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* 22: 104-117 (2009)
- Iwai K, Kishimoto N, Kakino Y, Mochida K, Fujita T. *In vitro* anti-oxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4893-4898 (2004)
- Jeong H-R, Baek Y, Kim D-O, Lee H. Antioxidative and antimelanogenic effects of ethyl acetate fractions of Korean domestic honeys from different floral sources. *Korean J. Food Sci. Technol.* 50: 660-664 (2018)
- Jian D, Jiang D, Su J, Chen W, Hud X, Kuang Y, Xie H, Li J, Chen X. Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediated up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells. *Steroids* 76: 1297-1304 (2011)
- Kim EJ, Choi JY, Yu M, Kim MY, Lee S, Lee B-H. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 337-3425 (2012)
- Kim KJ, Jung YS, You DM, Lee SH, Lee G, Kwon K-B, Kim D-O. Neuroprotective effects of ethanolic extract from dry *Rhodiola rosea* L. rhizomes. *Food Sci. Biotechnol.* 30: 287-297 (2021)
- Kim D-O, Lee CY. Considerations for the effects of antioxidant phytochemicals on human health. *Korean J. Food Sci. Technol.* 53: 111-114 (2021)
- Kubglomsong S, Theerakulkait C, Reed RL, Yang L, Maier CS, Stevens JF. Isolation and identification of tyrosinase-inhibitory and copper-chelating peptides from hydrolyzed rice-bran-derived albumin. *J. Agric. Food Chem.* 66: 8346-8354 (2018)
- Kwon E-J, Park H-J, Kim M-M, Lee KR, Hong I, Lee DG, Oh Y. Effect of *Ulmus macrocapa* ethanolic extracts on anti-oxidant activity and melanin synthesis in B16F1 cells. *J. Life Sci.* 24: 946-951 (2014)
- Lee K-I, Kim S-M. Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts. *J. Korean Soc. Food Sci.* 38: 267-273 (2009)
- Lee H-J, Lee M-K, Park I-S. Characterization of mushroom tyrosinase inhibitor in sweet potato. *J. Life Sci.* 16: 369-399 (2006)
- Lee B-Y, Park E-M, Kim E-J, Choi H-D, Kim I-H, Hwang J-B. Analysis of chemical components of Korean loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 428-432 (1996)
- Li H-R, Habasi M, Xie L-Z, Aisa HA. Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B16 melanoma cells. *Molecules* 19: 12940-12948 (2014)
- Lim Y-J, Lee EH, Kang TH, Ha SK, Oh MS, Kim SM, Yoon T-J, Kang C, Park J-H, Kim SY. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of α -melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. *Arch. Pharm. Res.* 32: 367-373 (2009)
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 162-166 (1995)
- Obaid RJ, Mughal EU, Naem N, Sadiq A, Alsantali RI, Jassas RS, Moussa Z, Ahmed SA. Natural and synthetic flavonoid derivatives as new potential tyrosinase inhibitors: A systematic review. *RSC Adv.* 11: 22159-22198 (2021)
- Panzella L, Napolitano A. Natural and bioinspired phenolic compounds as tyrosinase inhibitors for the treatment of skin hyperpigmentation: Recent advances. *Cosmetics* 6: 57 (2019)
- Pareek S, Benkeblia N, Janick J, Cao S, Yahia EM. Postharvest physiology and technology of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. *J. Sci. Food. Agric.* 94: 1495-1504 (2014)
- Park M-Y, Lee S-M, Cho H-S, Park J-O, Kim B-S, Cho K-C, Jeong H-J, Jeong B-J, Cho Y-S, Lee J-H, Choi D-S, Ma K-C, Ko S-J. Loquat Cultivation Manual. Fruit Research institute, Jeollanamdo Agricultural Research and Extension Services, Wando, South Korea (2017)
- Park YS, Park HS. Changes in cold injury and contents of chemical compounds as related the different growth stage of immature loquat fruit. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 36: 522-534 (1995)
- Park Y-S, Park M-Y, Jo Y-S. Storability of loquat fruits as influenced by harvest date and storage temperature. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 23: 64-70 (2005)
- Park KJ, Park SH, Kim JK. Anti-wrinkle activity of *Acanthopanax senticosus* extract in ultraviolet B (UVB)-induced photoaging. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* 39: 42-46 (2010)
- Park CH, Park JH, Min SY, Kim K, Kim S, Park YJ. Studies on antioxidant, anti-inflammation and whitening activities of *Hordeum vulgare* L. extracts and their fractions. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 45: 287-297 (2019)
- Park SA, Park J, Park CI, Jie YJ, Hwang YC, Kim YH, Jeon SH, Lee HM, Ha JH, Kim KJ, Park SN. Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 41: 407-415 (2013)
- Shaw PE, Wilson CW. Determination of organic acids and sugars in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by high-pressure liquid chromatography. *J. Sci. Food. Agric.* 32: 1242-1246 (1981)
- Sim JY, Lee J-H. A possible protective role of *Ginkgo biloba* outer seed coat methanol extracts on DNA damage induced by H₂O₂ in HaCaT human skin keratinocytes. *J. Life Sci.* 29: 1164-1170

- (2019)
- Slominski RM, Sarna T, Plonka PM, Raman C, Brożyna AA, Slominski AT. Melanoma, melanin, and melanogenesis: The Yin and Yang relationship. *Front. Oncol.* 12: 842496 (2022)
- Stark KB, Gallas JM, Zajac GW, Eisner M, Golab JT. Spectroscopic study and simulation from recent structural models for eumelanin: I. Monomer, dimers. *J. Phys. Chem.* 107: 3061-3067 (2003)
- Valencia A, Morán J. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1112-1125 (2004)
- Whang T-E, Lim H-O, Lee J-W. Anticancer effect of *Eriobotrya japonica* Lindl by specificity test with several cancer cell lines. *Korean J. Med. Crop Sci.* 4: 310-320 (1996)
- Yoo J-M, Kang Y-J, Pyo H-B, Choung ES, Park SY, Choi JH, Han G-J, Lee CH, Ki T-J. Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast. *J. Life Sci.* 20: 1838-1843 (2010)
- Yoo KM, Kim D-O, Lee CY. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 177-182 (2007)
- Zhang W, Zhao X, Sun C, Li X, Chen K. Phenolic composition from different loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars grown in China and their antioxidant properties. *Molecules* 20: 542-555 (2015)