차가버섯 메탄올 추출물의 항산화 및 미백효과

국민희² · 김동하² · 이찬² · 정은선² · 최은재² · 이재성¹ · 이태수^{1*}

¹인천대학교 생명과학기술대학 생명과학부, ²인천산곡고등학교

Antioxidant and skin whitening effects of *Inonotus obliquus* methanol extract

Min-Hee Guk², Dong-Ha Kim², Chan Lee², Eun-Seon Jeong², Eun-Jae Choi², Jae-Seong Lee¹ and Tae-Soo Lee^{1*}

¹Division of Life Sciences, Incheon National University, Incheon 406-772

²Incheon Sangok High School, Incheon 403-020, Korea

(Received June 11, 2013. Accepted June 20, 2013)

ABSTRACT – This study was initiated to investigate the skin whitening activities of methanol extracts from fruiting bodies of *I. obliquus*. The total polyphenols and flavonoids contents of *I. obliquus* methanol extracts were 31.85 mg/g and 28.33 mg/g, respectively. The methanol extract of the mushroom treated on B16/F10 melanoma and NIH3T3 cell lines did not show cytotoxic activity. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) free radical scavenging activity and chelating activity on ferrous ions of *I. obliquus* methanol extract were lower than those of positive control, tocopherol and BHT. The tyrosinase and L-DOPA inhibitory activities of the extract were lower than those of positive control, kojic acid and ascorbic acid. The tyrosinase and melanin synthesis inhibitory activities of the melanoma cells treated with the extract were comparable with positive control, arbutin. The experimental results suggested that methanol extract of *I. obliquus* contained inhibitory activities of tyrosinase and melanin synthesis in the B16/F10 melanoma cells by dose dependent manner. High ultra-violet absorption spectra in the range of 280-350 nm showed that *I. obliquus* extract could protect skin from UV radiation damage. Therefore, fruiting bodies of *I. obliquus* can be used for developing skin whitening, anti-UV and skin care agents.

KEYWORDS – Antioxidant, *Inonotus obliquus*, Melanoma cell, Skin-whitening

서 론

최근 천연물에서 항산화제의 소재를 찾는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며 주로 생약 추출물을 이용하는 경우가 대부분을 차지하고 있어 이제까지 연구가 미흡했던 약용 식물 이외의 다른 소재에서 항산화제의 성분을 찾는 연구가 진행되고 있다. 또한 화장품의 소재 연구에서는 피부의 색소침착 원인이 되는 멜라닌의 생성을 억제하여 미백효과를 나타내는 성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 화장품의 원료로 주목을 받고 있는 소재는 피부에 문제를 일으키지 않고 자극성이 없는 성분이 포함된 천연물을 이용하여 제조된 화장품이 인기를 얻고 있다(Aburjai and Natsheh, 2003). 따라서 최근 천연물질을 이용한 미백화장품 개발의 중요성이 부각되어 식물뿐만 아니라 미생물인 버섯에서도 미백효과를 가진 신물질의 탐색이 진행되고 있다.

차가버섯(*Inonotus obliquus* (Pers.) Pilot.)은 담자균류(Basidiomycota)의 민주름버섯목(Aphyllophorales), 소나무버섯과(Hymenochaetaceae), 시루뽕버섯속(*Inonotus*)에 속하는 버섯으로, 러시아의 시베리아, 핀란드, 노르웨이, 우크라이나, 일본의 홋카이도 및 우리나라의 오대산 등 한랭 다습한 북반구에서 자작나무, 오리나무, 마가목 등의 줄기 및 그루터기에 자생하는 버섯이다. 이 버섯은 리그닌, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 등을 분해하는 백색부후균으로, 야생에서 흑색의 균핵체를 자작나무 등 기주의 줄기에 형성하면서 기생하는 것으로 알려져 있다. 1950년대 말부터 러시아에서 연구가 시작되어 차가버섯의 자실체에서 추출한 β -글루칸, 폴리페놀 및 스테롤 등의 물질이 인체에 생리활성 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Shashkina *et al.*, 2006).

따라서 본 연구에서는 차가버섯 자실체에서 메탄올을 이용해 추출한 물질을 화장품 소재로서 이용할 수 있는 가능성에 대해 알아보기 위해 항산화활성, 미백

*Corresponding author: tslee@incheon.ac.kr

효과 및 자외선 차단효과에 대한 실험을 수행하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 차가버섯의 자실체는 인천시 연수구에서 건조한 상태로 구입하여 인천대학교 “버섯균주 및 DNA 은행”의 동정을 받은 후 실험에 사용하였다. 구입한 자실체는 45°C의 건조기에서 24시간 동안 건조하고 마쇄 후 -70°C의 저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

Shim 등(2003)의 방법에 따라 건조한 차가버섯 자실체의 분말에 80% 메탄올을 이용해 성분을 추출하여 실험에 사용하였다. 즉, 50 g의 차가버섯 자실체 분말을 80%의 메탄올 용액(덕산약품공업, Korea) 1,000 mL에 침지하여 48 시간 동안 상온에서 3회 추출한 후 이 추출액을 모으고 여과지(Avantec Toyo Co., No. 2, Japan)로 여과한 후 40°C에서 회전 감압 농축기(N-1000, EYELA Co., Japan)을 이용하여 감압 농축하고 농축액내의 수분을 제거하기 위해 동결 건조(FDU-8612, Operon Co., Korea)하여 메탄올 추출물을 얻었다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis을 변형한 Swain 등(1959)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 차가버섯의 추출물을 메탄올 1 mg/mL의 농도로 용해한 각 용매 별 추출액, Folin-Ciocalteu 시약 및 10% NaCO₃ 용액을 각각 1 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 1시간 방치 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용해 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)를 0-100 µg/mL의 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선을 이용하여 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드는 Moreno 등 (2000)의 방법에 따라 1 mg/mL 농도의 시료액에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 방치한 다음 UV/VIS Spectrophotometer(Optizen POP,

Korea)를 이용해 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 하여 얻은 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

세포배양

실험에 사용한 생쥐의 B16/F10 Melanoma 세포와 정상 섬유아 세포 NIH3T3는 서울대학교의 한국세포주은행에서 분양받았으며 이들 세포의 배양에는 DMEM 배지와 RPMI-1640배지를 각각 기본배지로 하여 10% FBS, 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 조제하였고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일 배양하였다.

세포의 생존율 측정

차가버섯 추출물의 B16/F10 melanoma와 NIH3T3 세포에 대한 생존율은 Mosmann의 방법(1983)에 따라 수행하였다. 지수기에 도달한 세포주를 RPMI-1640 배지가 분주된 96 plate well에 2×10⁵ cell/mL의 농도로 분주하고 24시간 배양한 후, 배지의 상층액을 제거하고 차가버섯 추출물을 10, 100, 500, 1,000, 2,000 µg/mL 농도로 새로운 배지에 200 µL 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 상층액을 제거하고 각각의 well에 MTT용액(5 mg/mL in PBS) 10 µL씩을 첨가하고, 다시 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하여 MTT를 환원시켰다. MTT의 환원에 의해 각각의 well에 생성된 보라색의 formazan 결정은 150 µL의 DMSO로 녹여 microplate reader(SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois(1958)의 방법으로 측정하였다. 시료를 메탄올로 녹여 최종 농도가 25, 125, 250, 500, 1,000, 1,500 µg/mL이 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100 µL를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 µL를 넣어 총량이 200 µL가 되도록 하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용해 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%) =

$[1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})] \times 100$

금속이온 제거능

금속이온 제거능 실험은 Yena 등 (2002)의 방법에 준하여 수행하였다. 그 원리는 버섯 추출물의 항산화 성분에 의해 Fe_{2+} 이온이 제거되어 더 이상 ferrozine- Fe_{2+} 복합체를 형성하지 않는 것을 기본으로 하여 측정하였다. 먼저 각각의 농도별로 버섯 추출물을 준비하였다. 버섯 추출물 2.0 mL에 2 mM $FeCl_2$ (Sigma Aldrich Co., USA) 0.05 mL를 혼합한 후 5 mM의 ferrozine 0.2 mL를 첨가하여 반응시킨 뒤 메탄올 2.75 mL를 가하여 총용량이 5 mL가 되도록 하고 vortex mixer를 이용하여 강하게 진탕한 뒤 UV/VIS-spectrophotometer(Optizen POP, Korea)를 이용하여 562 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하여 아래의 계산식에 의해 금속이온 제거능을 계산하였다. 양성대조군으로는 BHT와 tocopherol을 사용하였다.

$$\text{Metal chelating effect(\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

티로시나제 활성 저해능 측정

티로시나제 활성 저해능 시험은 Ishihara 등(1991)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉, 50%의 DMSO에 251,500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 녹인 각각의 추출물 60 μL 에 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 120 μL 첨가하였다. 31 U/mL의 mushroom tyrosinase (Sigma Co., USA)액 60 μL 를 넣은 뒤 1.5 mM의 tyrosine (Sigma Co., USA) 액을 60 μL 첨가 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 475 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료액 대신 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 사용하였다. 양성대조군은 L-ascorbic acid (Sigma Co., USA)와 kojic acid (Sigma Co., USA)를 사용하였다. 티로시나제 저해능(%)은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{티로시나제 저해능(\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

DOPA 산화 저해능 측정

본 시험은 멜라닌 합성과정에서 DOPA의 산화를 촉매하는 tyrosinase에 대한 활성을 저해 하는 효과를 평가하는 시험으로 Masuda 등(2005)의 방법을 변형하여 수행하였다. 50%의 DMSO에 농도가 25~1,500 $\mu\text{g/mL}$ 되도록 녹인 추출물 각각을 60 μL 에 0.1 M의 sodium

phosphate buffer (pH 6.8)를 120 μL 첨가하였다. Mushroom tyrosinase (31 U/mL)액 60 μL 를 넣은 뒤 2.5 mM의 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, Sigma Co., USA) 액 60 μL 를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 475 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 공시 시료액으로 시료액 대신 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 사용하였다. 양성대조군은 L-ascorbic acid와 kojic acid를 사용하였다. DOPA oxidation inhibition (%)은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{DOPA 산화 저해능(\%)} = [100 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100]$$

B16/F10 melanoma 세포에서의 티로시나아제 저해 활성 측정

세포내 티로시나아제 활성 측정은 Pawelk 등 (1978)과 Pomerantz 등(1963)의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포내 티로시나아제 활성의 분석은 B16/F10 melanoma 세포 내에 존재하는 티로시나아제 효소가 작용하여 생성되는 DOPA quinone의 비색법을 이용한 방법으로 B16/F10 melanoma 세포를 6 well plate에 well 당 5×10^5 cells/2 mL의 농도로 DMEM 배지에 분주하고 37°C의 5% CO_2 배양기에서 5시간 동안 배양한 후 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석한 차가버섯 추출물을 배지에 처리하였다. 72시간 동안 37°C, 5% CO_2 의 배양기에서 배양 후 triton X-100(PBS에 1%로 희석) 1 mL를 첨가하고 5분간 진탕 후 3000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 얻은 침전물에 1 N NaOH 100 μL 와 10% DMSO 용액 200 μL 를 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 용해시켰다. 측정된 동량의 단백질 각각에 10 mM L-DOPA가 첨가된 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)을 혼합한 후, 37°C 항온기에서 20분 동안 배양한 후, microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포내 티로시나아제 활성(%)은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{티로시나아제 활성(\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

B16/F10 melanoma 세포에서의 멜라닌 생성 저해 활성 측정

세포내 멜라닌 생성량 측정은 Cho 등(2005)의 방

법을 변형하여 사용하였다. B16/F10 melanoma 세포를 24 well plate에 4×10^4 cells/well이 되도록 DMEM 배지로 희석하여 분주하여 24시간 배양하여 안정화한 후 $0.4 \mu\text{M}$ 의 α -melanocyte stimulating hormone (MSH, Sigma Co., USA)과 0.5 mM 의 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma Co., USA)가 첨가된 배지에 시료를 10, 25, 50, $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고 72 h 동안 37°C 의 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 양성 대조군으로는 알부틴 (arbutin, Sigma Co., USA)을 사용하였다. 1% triton X-100 (Sigma Co., USA)이 포함된 PBS에서 5분간 shaking 후에 3000 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 침전물에 1 N NaOH $100 \mu\text{L}$ 와 10% DMSO 용액 $200 \mu\text{L}$ 를 첨가하여 60°C 에서 1시간 동안 용해시키고, enzyme linked immunosorbent assay microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 생성 억제능(%)는 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{멜라닌 생성 억제능 (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

추출물의 자외선 흡수 스펙트럼 측정

차가버섯 추출물의 자외선 흡수량의 측정은 Kim과 Ryu(2012)의 방법을 사용하였다. 차가버섯 추출물을 $100 \mu\text{g/mL}$ 가 되도록 ethanol에 희석 후 UV/VIS spectrometer(Optizen POP, Korea)를 이용하여 200 nm~400 nm의 UV 파장에서 흡수 스펙트럼을 측정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀과 플라보노이드 화합물은 체내의 활성산소 발생을 억제하거나 제거시켜 세포손상을 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있어서 미백과 항산화 작용에 중요한 역할을 하고 있다(Rocha-Guzman *et al.*, 2009). 차가버섯 자실체에서 메탄올을 이용해 추출한 물질의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Table 1에 표시하였다. 메탄올에 의해 추출된 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 31.85 mg/g 과 28.33 mg/g 을 기록해 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 유사하게 나타났다. 이 결과는 Kim 등(2008)이 보고한 느타리 자실체의 열수추출물 폴리페놀 함량 149.92 mg/g 에 비해서는 낮았지만 플라보노이드 함량 17.31 mg/g 에

Table 1. Total phenolic and flavonoids contents from fruiting bodies of *Inonotus obliquus* (mg/g)

mushrooms	Total phenolic compound ^a (mean $\pm$ SD)	Total flavonoid ^b (mean $\pm$ SD)
<i>Inonotus obliquus</i>	31.85 ± 1.32	28.33 ± 6.58

^aTotal phenolic compound contents were quantitatively determined by Folin-Denis method

^bTotal flavonoid contents were quantitatively determined by Davis method

Fig. 1. *In vitro* cytotoxicity^a of fractions from fruiting bodies of *Inonotus obliquus* against B16/F10 melanoma cell^b,

^aCytotoxicity was measured after 24 hours of incubation.

^bConcentration of cells was 2×10^5 cells/ml.

비해서는 높았다. 이렇게 차가버섯의 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 상황버섯에 비해 다르게 나타난 것은 추출에 사용한 용매와 버섯의 종의 차이에 의한 것으로 사료된다.

추출물의 세포 생존율

차가버섯 자실체의 메탄올 추출물이 B16/F10 melanoma 세포와 NIT3T3 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 차가버섯 추출물을 10, 100, 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 세포에 처리하고 배양 후 MTT 방법을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 실험결과, B16/F10 melanoma 세포의 생존율은 10100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도에서 100% 이상 생존하였고 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 54% 이상 생존하는 것으로 나타났다. NIT3T3 세포의 경우에는 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 추출물에서 83% 이상 생존하였고 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 67% 생존하였고 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 52%가 생존하는 것으로 나타나 차가버섯 메탄올 추출물은 10~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 범위에서 실험에 사용한 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 또한 B16/F10 melanoma 세포와 NIT3T3 세포의 생존율은 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 생존율이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1, Fig. 2).

Fig. 2. *In vitro* cytotoxicity^a of fractions from fruiting bodies of *Inonotus obliquus* against NIH-3T3 cell^b. ^aCytotoxicity was measured after 24 hours of incubation. ^bConcentration of cells was 2×10^5 cells/mL.

Fig. 3. Scavenging activity of methanol extract from fruiting bodies of *Inonotus obliquus* against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Values expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$); TOC, α -tocopherol; BHT, butylated hydroxytoluene.

추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

차가버섯 자실체의 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거활성 측정 결과, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 저 농도에서의 소거 활성이 69.29%로 나타나 동일 농도의 양성대조군으로 사용한 tocopherol이나 BHT의 94.84% 및 90.95%에 비해 낮았다. 그러나 125~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서의 소거능은 87.73~90.06%로 활성이 높았다(Fig. 3). 따라서 본 실험 결과는 Kim 등(2008)이 보고한 상황 버섯 자실체의 에탄올 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 DPPH 라디칼 소거활성 78.59%에 비해 10.07% 이상 높아서 차가버섯 추출물의 DPPH 소거활성은 이미 보고된 상황버섯에 비해 높다는 것을 확인할 수 있었다.

추출물의 금속이온 제거능

차가버섯 추출물의 금속이온 제거효과의 실험 결과, 차가버섯 메탄올 추출물은 체내 주요 물질의 산화에 촉매로 작용하는 철이온을 저농도 보다 고농도에서 효과적으로 제거하는 것으로 나타났다. 차가버섯 메

Fig. 4. Chelating effect of methanol extract from the fruiting bodies of *Inonotus obliquus*. Values expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$); TOC, α -tocopherol; BHT, butylated hydroxytoluene.

탄올 추출물의 철이온 제거능은 63~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 36.15~65.39%를 나타내 63 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 양성 대조군인 tocopherol과 BHT의 철이온 제거율 75.99%와 66.90%에 비해 낮았다(Fig. 4). 본 실험의 결과는 Xu 등(2007)이 만가닥버섯 자실체의 열수추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 보고한 철이온 제거능 35.92%와 유사했으나 Yoon 등(2011)이 잣버섯 자실체의 열수추출물 63 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 철이온 제거능 60%에 비해서 낮아서 차가버섯의 항산화효과는 비교 대상이 되는 버섯의 종류와 농도에 따라 효과가 다르게 나타났다.

추출물의 티로시나아제 활성 저해

차가버섯의 미백효과를 확인하기 위하여 멜라닌 합성에 1차적으로 작용하는 티로시나아제의 활성저해 실험을 메탄올 추출물을 이용하여 수행하였다. 기질을 L-티로신으로 하여 티로시나아제의 활성을 측정한 결과, 차가버섯 메탄올 추출물은 농도 의존적으로 타이로시나아제의 활성을 억제하였다. 차가버섯 추출물은 양성 대조군으로 이용한 kojic acid와 ascorbic acid에 비해 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도에서 티로시나아제의 저해효과는 4.24%로 kojic acid의 60.64%와 ascorbic acid의 40.06%에 비해 매우 낮았고, 1,500 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서도 차가버섯 추출물의 티로시나아제 저해효과는 40.35%로 양성대조군인 kojic acid의 98.73%와 ascorbic acid의 99.55%에 비해 매우 낮게 나타났다(Fig. 5). 본 실험 결과는 Yoon 등(2011)의 잣버섯 자실체의 메탄올 농도 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서의 저해율 56.5% 보다 낮아서 시험관내에서 차가버섯의 메탄올 추출물은 L-tyrosine을 산화하여 L-DOPA로 전환시켜 최종적으로는 멜라닌의 생합성에 관여하는 티로시나

Fig. 5. Tyrosinase inhibitory activity of methanol extract from the fruiting bodies of *Inonotus obliquus*. Values expressed as means $\pm$ SD (n = 3).

Fig. 6. DOPA oxidation inhibitory activity of methanol extract from the fruiting bodies of *Inonotus obliquus*. Values expressed as means $\pm$ SD (n = 3).

아제의 활성을 저해하는 효과가 매우 낮은 것으로 나타났다. 따라서 메탄올 추출물에는 멜라닌의 합성 초기단계를 저해하는 활성이 없는 것으로 판단된다.

추출물의 DOPA 산화 저해능

L-DOPA를 티로시나아제의 반응기질로 이용해 차가버섯 메탄올 추출물의 L-DOPA의 산화 저해능을 조사한 결과, 25~1,500 µg/mL 농도에서의 저해능이 4.24~40.35%로 나타나 L-티로신을 기질로 사용했을 때에 비해 모든 실험 농도에서 저해능이 매우 낮게 나타났다. 또한 추출물의 농도가 높아짐에 따라 L-DOPA의 산화 저해능도 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으나 동일 농도 범위 내에서의 양성 대조군인 kojic acid와 ascorbic acid의 저해능에는 크게 미치지 못하였다(Fig. 6). 따라서 차가버섯 메탄올 추출물은 멜라닌 생합성 과정의 제 1단계인 L-tyrosine의 티로시나아제에 의한 산화과정과 제 2 단계인 L-DOPA의 DOPA quinone으로의 산화 과정을 효율적으로 저해하지 못하는 것으로 추정된다.

Fig. 7. Inhibitory effect of tyrosinase by methanol extract of the fruiting bodies of *Inonotus obliquus* in B16/F10 Melanoma cell. Values expressed as means $\pm$ SD (n = 3).

추출물의 B16/F10 melanoma 세포에서의 티로시나아제 저해 활성

B16/F10 Melanoma 세포에 차가버섯 메탄올 추출물 처리 후 티로시나아제의 활성을 조사한 결과, 양성대조군인 arbutin은 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도에서 티로시나아제의 활성이 각각 87.27, 82.31, 77.98, 41.64%로 나타났고, 차가버섯 메탄올 추출물은 동일 농도에서 각각 65.82, 56.16, 51.23, 31.41%로 나타나 차가버섯 메탄올 추출물의 티로시나아제 활성이 양성대조군으로 사용한 arbutin에 비해 전 농도의 범위에서 낮게 나타났으며 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 세포내 티로시나아제의 저해활성도 증가하였다(Fig. 7). 앞의 실험에서 차가버섯 메탄올 추출물을 직접 티로시나아제에 작용시킨 후 저해 활성을 조사한 결과, 250 µg/mL의 추출물 농도에서 저해효과가 11.20%로 양성대조군인 kojic acid의 94.07%와 arbutin의 98.59%에 크게 미치지 못하였다(Fig. 5). Arbutin은 티로시나아제의 경쟁적 저해제이고, kojic acid는 티로시나아제의 활성부위에 있는 구리를 chelating하여 티로시나아제가 L-tyrosine을 DOPA, 그리고 DOPA를 DOPA quinone을 전환하는 과정에 관여하여 멜라닌의 생성을 억제하는 것으로 보고되었다(Maeda, et al., 1996). 따라서 차가버섯 메탄올 추출물은 L-tyrosinase에 직접 작용하여 활성을 저해하기 보다는 B16/F19 melanoma 세포내 L-tyrosinase의 활성을 저해하여 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 작용 기작을 갖고 있는 것으로 판단되어, arbutin이나 kojic acid와는 전혀 다른 경로의 티로시나아제 활성 저해 기작을 갖고 있는 것으로 추정되어 이에 대한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

Fig. 8. Inhibitory effect of methanol extract from the fruiting bodies of *Inonotus obliquus* on melanin production in B16/F10 Melanoma cells. Values expressed as means $\pm$ SD (n = 3).

추출물의 B16/F10 melanoma 세포에서의 멜라닌 생성 저해 활성

차가버섯 메탄올 추출물이 melanoma 세포내 멜라닌의 생성 저해 여부를 확인하기 위하여 B16/F10 melanoma 세포를 이용하여 세포내 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다. 차가버섯의 추출물을 10, 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리한 실험군에서 멜라닌의 생성은 14.15, 29.61, 46.18, 55.15% 저해되었고 arbutin도 동일한 농도에서 각각 19.11, 23.45, 33.10, 56.11%의 멜라닌 생성이 저해되어 차가버섯 추출물과 양성대조군인 arbutin의 멜라닌 생성 저해효과가 유사하게 나타났으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 멜라닌의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 본 실험에서 melanoma 세포에 차가버섯 메탄올 추출물을 처리 후 멜라닌의 생성이 저해된 것은 앞서의 실험에서 메탄올 추출물이 melanoma 세포내 tyrosinase의 활성을 크게 저해한 것과 연관이 있는 것으로 사료된다. Nam 등(2010)이 번데기 동충하초의 열수 추출물을 5,000 µg/mL 농도를 melanoma 세포에 처리해 측정한 티로시나아제의 저해 효과와 멜라닌 생성량의 감소에도 정의 상관관계가 존재하는 것이 확인되어 melanoma 세포내에서 티로시나아제 효소의 활성이 저해되면 이어서 멜라닌의 생성량도 저해를 받는 것으로 나타났다. 따라서 B16/F10 Melanoma 세포에서 멜라닌 생성의 저해 효과가 높은 차가버섯의 추출물은 앞으로 새로운 미백 소재로의 개발 가능성이 있다고 사료된다.

추출물의 자외선 흡수 스펙트럼

차가버섯 메탄올 추출물의 200-400 nm에서의 흡수 스펙트럼을 분광광도계로 측정한 결과 270-290 nm

Fig. 9. UV absorbency of methanol extract from the fruiting bodies of *Inonotus obliquus*.

의 UV-B부터 350-370 nm의 UV-A까지 흡수 스펙트럼의 피크가 높게 나타났다(Fig. 9). 중파장 자외선인 UV-B는 피부에 침투하여 지연성 색소 침착을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 장파장 자외선인 UV-A는 피부의 진피층까지 침투하여 빠른 시간 내에 색소의 침착을 유도하고, 진피의 결합조직인 콜라겐 등의 단백질을 분해하여 주름의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Kim and Ryu, 2012). 따라서 차가버섯의 메탄올 추출물은 중파장과 장파장 영역의 자외선을 흡수하여 자외선에 의해 피부에 멜라닌이 침착되고 손상되는 것을 막아 줄 수 있을 것으로 사료된다. 앞으로 차가버섯 추출물의 어떤 성분이 자외선의 흡수에 관여하는지 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구에서는 항암제와 면역 조절제로 널리 사용되는 차가버섯을 피부 미백제로 이용할 수 있는지 가능성을 알아보기 위해 멜라닌생성 저해 효과와 자외선 차단 작용과 관련된 여러 실험을 수행하였다. 메탄올을 이용해 차가버섯의 자실체에서 추출한 물질의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 각각 31.85 mg/g과 28.33 mg/g으로 측정되었다. B16/F10 melanoma와 NIH3T3 세포주에 추출물의 농도를 10~500 µg/mL로 처리한 세포생존을 시험에서 시험 세포주의 52% 이상이 생존하여 세포독성은 없는 것으로 확인되었다. DPPH 라디칼 소거 활성과 금속이온 제거능 등의 항산화 시험에서 추출물의 항산화 활성은 양성대조군인 tocopherol이나 BHT에 비해 낮았으나 추출물의 농도가 높아짐에 따라 항산화 활성은 비례적으로 증가하였다. 멜라닌 합성의 초기단계에 관여하는 티로시나아제와 L-DOPA에 차가버섯

메탄올 추출물과 양성대조군인 kojic acid와 arbutin을 각각 직접 처리하고 저해 효과를 측정한 결과 추출물은 양성 대조군인 kojic acid 및 arbutin에 비해 저해 효과가 매우 낮았다. B16/F10 Melanoma 세포에 추출물과 arbutin을 처리하고 세포내 티로시나아제의 저해 활성을 조사한 결과, 100 µg/mL의 농도에서 추출물은 68.59%, arbutin은 58.36%의 활성이 저해되어 메탄올 추출물이 arbutin에 비해 티로시나아제 저해 활성이 약 10% 높았다. 또한, B16/F10 melanoma 세포에 차가버섯 추출물과 arbutin을 처리하여 생성된 멜라닌의 양을 측정한 결과, 추출물과 arbutin을 처리한 모든 군에서 생성된 멜라닌의 양은 유사하였으며, 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 생성된 멜라닌의 양은 감소하였다. 따라서 차가버섯 메탄올 추출물은 세포 밖에서 직접 티로시나아제를 저해하는 작용은 양성 대조군에 비해 매우 낮았으나 melanoma 세포내에서 티로시나아제와 멜라닌의 생성을 양성 대조군과 대등하게 저해하여 피부에 미백효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 또한 차가버섯 메탄올 추출물을 200-400 nm 파장에서 분광광도계를 이용하여 흡수스펙트럼을 측정한 결과, 280-350 nm의 자외선 영역에서 흡광도가 높아 자외선을 효율적으로 차단하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 인천 산곡고등학교의 R&E 프로그램 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Aburjai, T. and Natsheh, F. M. 2003. Plants used in cosmetics. *Phytother. Res.* **17** : 987-1000.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. **181** : 1199-1200.
- Cho, Y. H., Lee, B. C., Kim, J. H., Kim, J. H., Pyo, H. B., Zhang, Y. H. and Park, H. D. 2005. Effect of *Artemisia anomala* S. Moore on antioxidant activity and melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.* **36** : 273-277.
- Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomita, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M., Oki, T. 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiotics*. **44** : 25.
- Kim, J. O., Jung, M. J., Choi, H. J., Lee, J. T., Lim, A. K., Hong, J. H. and Kim, D. I. 2008. Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37** : 684-690.
- Kim, M. J. and Ryu, M. J. 2012. Inhibition of melanogenesis and anti-UV properties of *Reynoutria elliptica*. *K. J. Aesthet. Cosmetol.* **10** : 961-968.
- Maeda, K. and M. Fukuda. 1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276** : 765-769.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y. and Yonemori, S. 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69** : 197-201.
- Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J. Ethnopharm.* **71** : 109-114.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol. Meth.* **65** : 55.
- Nam, B. H., Jo, W. S., Choi, Y. J., Lee, J. Y., Kang, E. Y., Jeong, M. H. and Lee J. D. 2010. Inhibitory effects of melanin secretion on B16 melanoma cell of *Cordyceps militaris* water extract. *Kor. J. Mycol.* **38** : 167-171.
- Pawwelk, J. 1978. Melanoma cells in culture. *Methods in Enzymol.* **58** : 564-568.
- Pomerantz, S. H. 1963. Separation, purification and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *J. Biol. Chem.* **238** : 2351-2354.
- Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, J. A., Conzalez-Laredo, R. F., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gmez, M., Garcia-Gasca, T., Rodríguez-Muoz, M. E., Guzmán-Maldonado, S. H., Medina-Torres, L. and Lujan-García, B. A. 2009. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chem.* **115** : 1320-1325.
- Shashkina, M. Y., Shashkin, P. N. and Sergeev, A. V. 2006. Chemical and medicobiological properties of Chaga (review). *Pharm. Chem. J.* **40**(10) : 37-44.
- Shim, S. M., Im, K. H., Kim, J. W., Shim, M. J., Lee, M. W. and Lee, T. S. 2003. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. *Kor. J. Mycol.* **31** : 155-160.
- Swain, T., Hillis, W. E. and Ortega, M. 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10** : 83-88.
- Xu, X. M., Jun, J. Y. and Jeong, I. H. 2007. A study on the antioxidant activity of Hae-Songi mushroom (*Hypsizygus marmoreus*) hot water extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36** : 1351-1357.
- Yena, G. C., Duhb, P. D. and Tsaia, L. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* **79** : 307-313.
- Yoon, K. N., Alam, N., Lee, K. R., Shin, P. G., Cheong, J. C., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2011. Antioxidant and antityrosinase activities of various extracts from the fruiting bodies of *Lentinus lepideus*. *Molecules.* **16** : 2334-2347.