

장수진흙버섯 메탄올 추출물의 멜라닌 생성 저해작용

이재성¹ · 신도빈¹ · 이수민¹ · 김성환¹ · 이태수¹ · 정덕채^{2*}¹인천대학교 생명과학기술대학 생명과학부, ²인천대학교 자연과학대학 화학과Melanogenesis Inhibitory and Antioxidant Activities of *Phellinus baumii* Methanol ExtractLee, J. S.¹, Shin, D. B.¹, Lee, S. M.¹, Kim S. H.¹, Lee, T. S.¹ and Jung, D. C.^{2*}¹Division of life Sciences, Incheon National University, Incheon 406-772, Korea²Department of Chemistry, Incheon National University, Incheon 406-772, Korea

ABSTRACT : *Phellinus baumii* is a medicinal mushroom used in Asian countries for a long period of time. The purpose of this study was to investigate the skin whitening activities of methanol extracts from fruiting bodies of *P. baumii*. To evaluate the antioxidant activities of the extract, polyphenol and flavonoid contents, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity and chelating activity on ferrous ions were studied. For assay of skin whitening activities, tyrosinase and DOPA inhibitory activities, and tyrosinase and melanin synthesis inhibitory activities of B16/F10 melanoma cells treated with the methanol extract were investigated. The total polyphenol content of *P. baumii* methanol extract was 4.19. DPPH scavenging ability of *P. baumii* methanol extract was 88.26% in 25 µg/mL concentration. We tested tyrosinase inhibitory activity and melanin contents in melanoma cells. The tyrosinase activity was inhibited to 65.17% at the concentration of 125 µg/mL and melanin synthesis was inhibited to 57.61% at the concentration of 25 µg/mL. Overall, the experimental results showed that *P. baumii* methanol extract had inhibitory activities of tyrosinase and melanin synthesis by dose dependent manner in B16/F10 melanoma cells. Strong ultra-violet absorption spectra in the range of 270~370 nm indicated that ethanol extract of *P. baumii* could protect the skin from UV. Therefore, *P. baumii* methanol extract might be used for development of skin whitening, anti-UV and skin care agents.

KEYWORDS : Melanin, *Phellinus baumii*, Skin-whitening, Tyrosinase

서론

체내의 대사과정에 이용되는 산소는 활성산소들을 생성하여 생체의 세포나 조직을 공격하여 손상시키기도 하지만 체내의 여러 방어기작에 의해 대부분의 세포는 정상적

인 기능을 유지한다. 그러나 흡연, 환경오염, 자외선 등에 의해 활성산소가 체내에 과도하게 축적되고 제때 제거되지 않으면 동맥경화, 고혈압, 암, 노화 등의 각종 질환이 유발될 수 있다고 보고되어 있다(Yamakoshi *et al.*, 2003). 최근 체내에 활성산소가 과도하게 생성되는 것을 억제하거나 방지하기 위한 천연 항산화제에 대한 관심이 높아지고 있다. 현재 널리 이용되는 항산화제로는 페놀 화합물, 플라보노이드, α -토코페롤, 비타민 C 등이 있으며, 식품의 항산화제로는 butylated hydroxyanisole (BHA)와 butylated hydroxytoluene(BHT) 등이 있으나 안전성 문제 등으로 이들 물질을 대체하기 위해 천연항산화제를 탐색하고 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Kang *et al.*, 1996).

최근 화장품의 원료로 주목 받고 있는 소재는 자극성이 없어 피부에 문제를 일으키지 않고 보습, 노화방지, 주름 제거, 항균 등 다양한 생리활성 효과가 있는 성분을 이용해 제조된 화장품이 인기를 얻고 있다. 특히 아시아 지역의 여성들에게는 멜라닌 생성을 억제하는 미백 성분이 기미, 주근깨 및 피부의 잡티 등을 예방하는 효과가 있어 이

Kor. J. Mycol. 2013 June 41(2): 104-111
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.2.104
pISSN 0253-651X
©The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail : dcjung@incheon.ac.kr

Received June 5, 2013

Revised June 17, 2013

Accepted June 18, 2013

Ⓢ This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

들 화장품 소재 시장은 급성장하고 있다(Aburjai and Natsheh, 2003). 과거의 미백화장품의 소재는 주로 인공 합성된 화합물을 이용해 제조하였으나 부작용으로 인해 90년대 초반부터는 천연재료에서 추출한 성분을 이용해 화장품을 개발하는 연구를 진행해 왔으며 현재도 이러한 추세는 세계로 확산되고 있다(Briganti *et al.*, 2003). 우리나라의 자생식물에서 미백 및 항산화 효과가 있다고 보고되어 미백 화장품의 소재로 개발된 식물에는 녹차, 상지, 상백 피 및 감초 등이 있으나 아직까지 버섯에서 미백 소재를 찾고자 하는 연구는 초보적인 수준에 머물고 있어 이에 대한 본격적인 연구가 필요한 시점에 있다 (Kim *et al.*, 2005).

장수진흙버섯(*Phellinus baumii* Pilat.)은 담자균류의 소나무비늘버섯목(Hymenochaetales), 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 뽕나무, 참나무, 버드나무 등의 활엽수의 껍은 줄기위에서 자라며 자실체는 다년생이고 목질로 되어있으며 우리나라에서는 발견이 어려운 약용버섯이다. 진흙버섯속에 속하는 버섯은 예전부터 항암력이 매우 우수한 버섯으로 알려져 있다(Park and Lee, 2003). Song 등(1998)은 재배된 목질진흙버섯과 자연산 목질진흙버섯의 열수추출 다당체의 항보체 활성이 비슷하여 재배된 목질진흙버섯을 이용하면 면역 기능을 향상시키는 제품을 개발할 수 있다고 보고하였다. 진흙버섯속에 속하는 버섯의 추출물은 식도, 위, 장에 대한 암에 대한 면역기능을 증진시키는 데에도 효과가 있는데 이는 산성 헤테로글루칸(acidic heteroglucan)에 의한 것으로 보고되어 있다(Ikekawa 등, 1968). 이외에도 진흙버섯속에 속하는 버섯에는 폴리페놀이나 플라보노이드 등과 같은 물질이 들어있어 항산화 효과도 높다고 보고되어 있다(Ying *et al.*, 1987).

따라서 본 연구에서는 장수진흙버섯 자실체의 추출물을 새로운 기능성 소재로 이용하기 위해 DPPH 라디칼 소거능, 환원력, 및 금속이온 제거능 등의 항산화 실험과 티로시나아제 억제, melanoma 세포내에서의 항티로시나아제 작용, melanoma 세포내에서의 멜라닌색소 생성 억제 등의 미백효과, 그리고 자외선 차단효과에 대한 실험을 수행하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 장수진흙버섯의 자실체는 서울 경동시장에서 건조한 상태로 구입하여 실험에 사용하였다. 구입한 자실체는 45°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시키고 마쇄 후 -70°C의 저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

Shim 등(2003)의 방법에 따라 건조한 장수진흙버섯 자실체의 분말에 80% 메탄올을 이용해 성분을 추출하여 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량의 측정

총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis을 변형한 Swain 등(1959)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 장수진흙버섯의 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 Spectrometer (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.

세포배양

실험에 사용한 생쥐의 B16/F10 melanoma cell과 NIH3T3 cell은 한국 세포주은행(서울대학교)에서 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 조건의 배양기에서 배양하였다.

세포독성 분석

장수진흙버섯 추출물의 B16/F10 melanoma와 NIH3T3 세포에 대한 독성은 Mosmann의 방법(1983)에 따라 수행하였다. 지수기에 도달한 세포주를 RPMI-1640배지가 분주된 96 plate well에 2 × 10⁵ cell/mL의 농도로 분주하고 24시간 배양한 후, 배지의 상층액을 제거하고 장수진흙버섯 추출물을 0.625, 12.5, 25, 50, 100 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% CO₂의 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, 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 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%) = [1 - (첨가군 흡광도 / 무첨가군 흡광도)] × 100

금속이온 제거능

금속이온 제거능 실험은 Yena 등 (2002)의 방법에 준하여 수행하였다. 그 원리는 버섯추출물의 항산화 성분에 의해 Fe^{2+} 이온이 제거되어 더 이상 ferrozine- Fe^{2+} 복합체를 형성하지 않는 것을 그 기본으로 하여 측정하였다. 각각의 장수진 흙버섯 추출물 1 mL에 2 mM의 ferrous chloride ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$), 5 mM ferrozine을 각각 100 μ L씩 가하고 흡광도의 조절을 위해 증류수를 일정량 첨가하였다. 10분간 상온에 둔 뒤 UV/VIS-spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용하여 562 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차를 백분율로 표시하여 금속이온의 제거능으로 나타냈으며 BHT와 tocopherol을 양성 대조군으로 사용하였다.

티로시나아제 활성 저해능 측정

티로시나아제 활성 저해실험은 Ishihara 등(1991)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉, 50%의 DMSO에 25~1500 μ g/mL의 농도로 녹인 각각의 추출물 60 μ L에 0.1 M의 sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 120 μ L 첨가하였다. 31 U/mL의 mushroom tyrosinase (Sigma Co., USA)액 60 μ L를 넣은 뒤 1.5 mM의 tyrosine (Sigma Co., USA) 액을 60 μ L 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. 티로시나아제 저해능(%)은 다음의 식에 따라 계산하였다.

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

DOPA 산화 억제능 측정

본 시험은 멜라닌 합성과정에서 DOPA의 산화를 촉매하는 티로시나아제에 대한 활성을 저해 하는 효과를 평가하는 시험으로 Masuda 등(2005)의 방법을 변형하여 수행하였다. 50%의 DMSO에 농도가 125~1500 μ g/mL 되도록 녹인 각각의 추출물 60 μ L에 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 120 μ L 첨가하였다. Mushroom tyrosinase (31 U/mL)액 60 μ L를 넣은 뒤 2.5 mM의 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine(L-DOPA, Sigma Co., USA) 액 60 μ L를 첨가한 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 475 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 공시 시료액으로 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 사용하였다. 양성대조군은 L-ascorbic acid와 kojic acid를 사용하였다. DOPA oxidation inhibition (%)은 다음의 식에 따라 계산하였다.

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

B16/F10 melanoma 세포내 티로시나아제 활성 측정

세포내 티로시나아제 활성 측정법은 Pawelk 등(1978)과 Pomerantz 등(1963)의 방법을 변형하여 사용하였다. 티로시나아제 활성의 분석은 melanoma 세포 내에 존재하는 티로시나아제 효소가 작용하여 생성되는 DOPA quinone의 비색법을 이용한 방법이다. 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 각각의 농도별로 희석한 장수진흙버섯 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 μ L와 10% DMSO 용액 200 μ L를 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 세포내의 멜라닌 생성 억제 측정

세포내 멜라닌 생성량 측정은 Cho 등(2005)의 방법을 변형하여 사용하였다. B16/F10 melanoma 세포를 24 well plate에 4×10^4 cells/well이 되도록 DMEM 배지로 희석하여 분주하여 24시간 배양하여 안정화 한 후 0.4 μ M의 α -melanocyte stimulating hormone (MSH, Sigma Co., USA) 과 0.5 mM의 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma Co., USA)가 첨가된 배지에 시료를 10, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 72 h 동안 37°C의 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 진탕 후 3,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 얻은 pellet에 1 N NaOH 100 μ L와 10% DMSO 용액 200 μ L를 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 용해시키고, enzyme linked immunosorbent assay microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 생성 억제능(%)는 다음의 식에 따라 계산하였다.

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

자외선 흡수량 측정

장수진흙버섯 추출물의 자외선 흡수량의 측정은 Kim과 Ryu(2012)의 방법을 사용하였다. 장수진흙버섯 추출물을 100 μ g/mL 되도록 ethanol에 희석한 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용하여 200 nm~400 nm의 UV 파장에서 흡수스펙트럼을 측정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 화합물은 활성산소의 생성을 억제하거나 제거시켜 산화에 의한 세포손상을 방지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있어서 항산화작용과 피부의 미백에 중요한 역할을 하고 있다(Rocha-Guzman *et al.*, 2009). 장수진흙버섯 자실체에서 메탄올을 이용해 추출한 물질의 총 폴리페놀 함량은 4.2 mg/g을 기록해 Yim 등(2009)이 보고한 재배 느타리 자실체의 폴리페놀 함량 5.1 mg/g과 유사하였다.

세포독성 분석

장수진흙버섯 자실체의 추출물이 B16/F10 melanoma 세포와 NIT3T3 세포에 독성을 나타내는지 알아보기 위해 장수진흙버섯 추출물을 10, 100, 1,000, 2,000 µg/mL 등의 다양한 농도로 세포에 처리하고 배양 후에 MTT 방법을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 실험결과, B16/F10 melanoma 세포의 생존율은 저농도인 10 µg/mL의 추출물에서 100% 이상 생존하였고 100 µg/mL의 농도에서는 69.0% 이상 생존하는 것으로 나타났다. NIT3T3 세포의 경우에는 10 µg/mL에서 추출물에서 97.0% 이상 생존하였고 100 µg/mL의 농도에서는 61.0% 생존하는 것으로 나타나 장수진흙버섯 메탄올 추출물의 독성은 낮은 것으로 확인되었다. 또한 장수진흙버섯의 메탄올 추출물로 처리한 B16/F10 melanoma와 NIT3T3 세포의 생존율은 처리 농도가 증가함에 따라 농도의 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1, Fig. 2).

DPPH 라디칼 소거활성

장수진흙버섯 자실체 추출물의 DPPH radical 소거활성 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 장수진흙버섯 메탄올 추출물의 DPPH 소거활성은 25 µg/mL의 낮은 농도에서 88.3%로 높게 나타나 동일 농도의 양성대조군으로 사용한 tocopherol이나 BHT의 94.8% 및 91.0%와 매우 유사한 효과를 보였다. 또한 본 실험 결과, 장수진흙버섯의 추출물은 100 µg/mL의 농도에서 88.3%의 소거활성을 나타내 Xu 등(2007)이 동일한 농도에서 보고한 *Hypsizygus mamoreus* 자실체 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 33.3%에 비해 55.0% 높게 나타났다. 따라서 장수진흙버섯 자실체 추출물의 DPPH 소거활성은 이미 보고된 다른 식용버섯에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다.

금속이온 제거능

장수진흙버섯 추출물의 금속이온 제거능을 실험한 결과 장수진흙버섯 메탄올 추출물은 체내 주요 물질의 산화에 촉매로 작용하는 철이온을 보다 효과적으로 제거하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 메탄올 추출물은 63~1,000 µg/mL 농도의 모든 범위에서 양성대조군인 tocopherol과 BHT에 비해서 철이온 제거능이 낮았다. 63 µg/mL의 농도에서

양성대조군인 tocopherol과 BHT가 각각 76.0%와 66.9%인 것에 비해 장수진흙버섯 메탄올 추출물의 철이온 제거능은 30.9%로 나타나 양성대조군 보다 낮은 것으로 나타났다(Fig. 3). 본 실험에서 나타난 장수진흙버섯의 철이온 제거능은 Xu 등(2007)이 해송이 자실체 열수추출물을 100 µg/mL 농도의 실험에서 보고한 35.9%의 철이온 제거능과 유사했

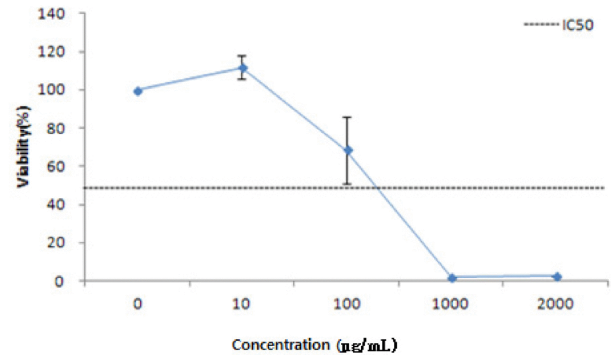


Fig. 1. *In vitro* cytotoxicity^a of methanol extract obtained from fruiting bodies of *Phellinus baumii* against B16/F10 melanoma cell^b. ^aCytotoxicity was measured after 24 hours of incubation. ^bConcentration of cells was 2×10^5 cells/mL

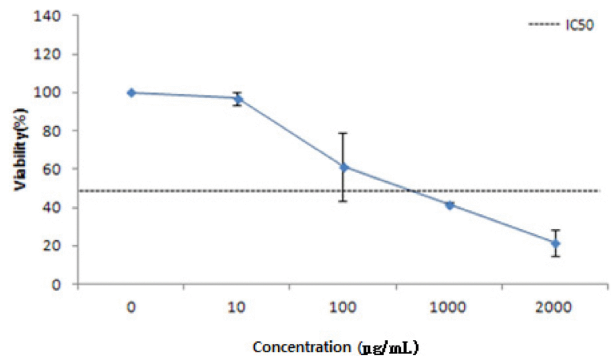


Fig. 2. *In vitro* cytotoxicity^a of methanol extract obtained from fruiting bodies of *P. baumii* against NIH-3T3^b. ^aCytotoxicity was measured after 24 hours of incubation. ^bConcentration of cells was 2×10^5 cells/mL

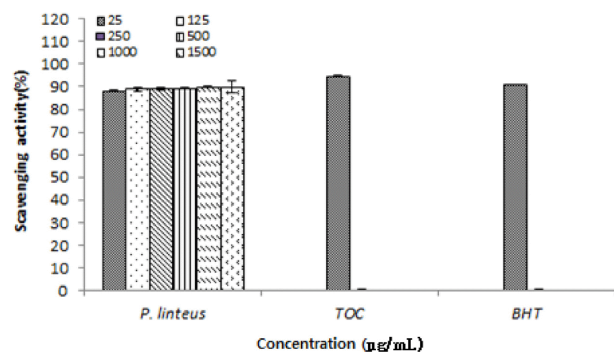


Fig. 3. DPPH scavenging activities of methanol extract obtained from fruiting bodies of *P. baumii*. Values are expressed as means $\pm$ 2 SD (n = 3). TOC, α -tocopherol; BHT, butylated hydroxytoluene.

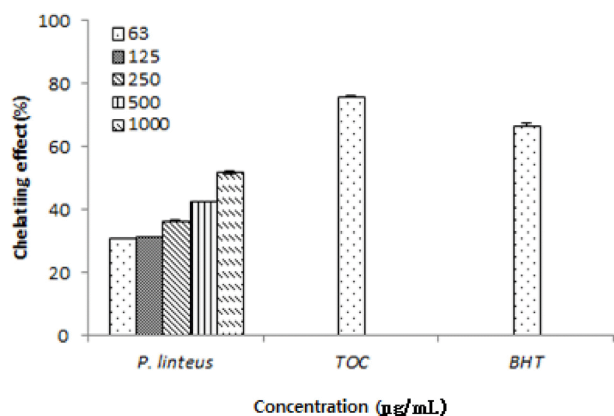


Fig. 4. Chelating activities on ferrous ions of methanol extract obtained from fruiting bodies of *P. baumii*. Values are expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$). TOC, α -tocopherol; BHT, butylated hydroxytoluene.

으나 Lee 등(2007)이 *Hypsizigus mamoreus* 자실체의 열수추출물 5 mg/mL 농도에서의 75.6% 철이온 제거능에 비해서 낮게 나타나서 장수진흙버섯의 항산화효과는 비교 대상이 되는 버섯에 따라 효과가 높거나 낮게 나타났다.

티로시나아제 활성 저해능 측정

장수진흙버섯의 미백효과를 확인하기 위하여 장수진흙버섯 메탄올 추출물이 멜라닌 합성에 1차적으로 작용하는 티로시나아제의 활성 저해실험을 수행하였다. 티로시나아제의 기질을 L-티로신을 이용하여 활성을 측정할 결과, 장수진흙버섯 메탄올 추출물은 농도 의존적으로 티로시나아제의 활성을 억제하였다. 장수진흙버섯 추출물은 양성 대조군으로 이용한 kojic acid와 ascorbic acid에 비해 25 µg/mL의 낮은 농도에서 티로시나아제 활성 저해효과는 26.2%로 kojic acid의 60.6%와 ascorbic acid의 40.1%에 비해 낮았으나 1,500 µg/mL의 고농도에서 장수진흙버섯 추출물의 티로시나아제 저해효과는 95.0%로 양성대조군인 kojic acid의 98.7%와 ascorbic acid의 99.5%에 유사하게 나타나서 티로시나아제 활성 저해효과가 낮은 농도의 추출물에서 보다는 고농도에서 높았다(Fig. 5). 본 실험 결과는 Nam 등(2010)의 *Cordyceps militaris* 자실체의 열수추출물 농도 5,000 µg/mL에서의 저해율 71.0%와 Ahn 등(2011)이 보고한 *Salicornia bigelovii*의 ethylacetate 추출물 농도 2,000 µg/mL의 저해율 15.2% 보다 높아서 장수진흙버섯의 메탄올 추출물은 멜라닌 합성에 관여하는 티로시나아제의 활성을 초기 단계에 억제하여 멜라닌의 생성을 차단하는 효과가 큰 것으로 사료된다.

DOPA 산화 억제능 측정

장수진흙버섯 메탄올 추출물의 멜라닌 합성 2 단계 저해효과를 규명하기 위하여 L-DOPA 산화 억제능을 조사할 결과, 25 µg/mL의 저농도에서 양성대조군인 kojic acid와 ascorbic acid에 비해 산화 억제능이 낮게 나왔으나 고농도

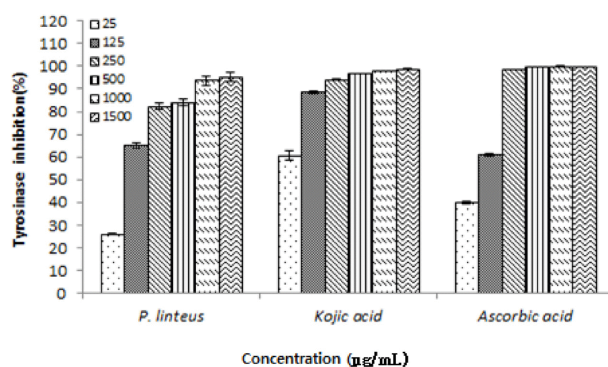


Fig. 5. Tyrosinase inhibitory activity of methanol extract obtained from fruiting bodies of *P. baumii*. Values are expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$).

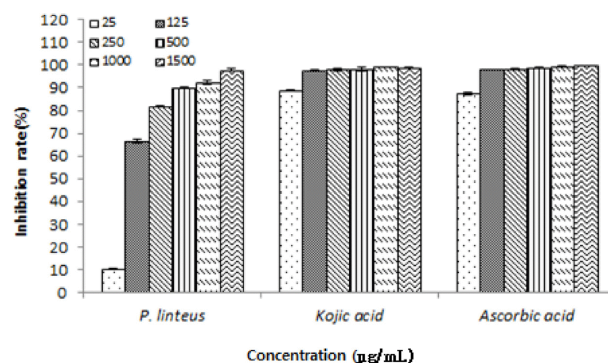


Fig. 6. DOPA oxidation inhibitory activities of methanol extract obtained from fruiting bodies of *P. baumii* on B16/F10 melanoma cells. Values are expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$).

인 1,500 µg/mL에서 장수진흙버섯 추출물은 97.7%의 억제능을 보여 각각 98.9%와 99.6%의 억제능을 보인 kojic acid와 ascorbic acid와 유사한 산화 억제능을 나타내었다(Fig. 6). 따라서 장수진흙버섯 추출물은 저농도 보다 고농도에서 티로시나아제의 억제능과 L-DOPA 산화 억제능이 양성 대조군과 대등해지는 경향을 나타냈다. 따라서 장수진흙버섯 메탄올 추출물은 멜라닌 색소 합성의 1단계인 티로시나아제의 활성억제는 물론 2단계인 L-DOPA의 산화 과정도 억제하는 효과가 큰 것으로 판단된다.

B16/F10 melanoma 세포내 티로시나아제 활성 측정

티로시나아제의 저해제는 화장품의 중요 미백 성분의 하나로 피부암과 과색소 침착에 관련되는 피부병의 치료에 사용된다(Yang *et al.*, 2008). B16/F10 melanoma 세포에 장수진흙버섯 메탄올 추출물을 처리한 후 측정된 티로시나아제의 저해능을 조사한 결과, 양성대조군인 arbutin은 10, 25, 50, 100 µg/mL에서 항티로시나아제의 활성이 각각, 12.7%, 17.7%, 22.0%, 58.4% 등으로 나타났고, 장수진흙버섯 메탄올추출물은 같은 농도에서 각각 48.4%, 52.7%, 74.9%, 81.9% 등으로 나타나 장수진흙버섯 메탄올

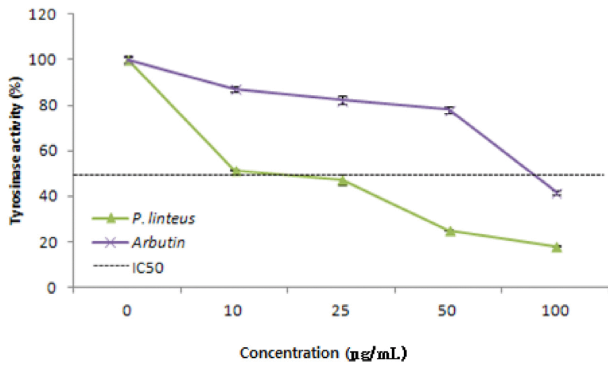


Fig. 7. Tyrosinase inhibitory activity of methanol extract obtained from fruiting bodies of *P. baumii* on B16/F10 melanoma cells. Values are expressed as means $\pm$ SD (n = 3).

추출물의 melanoma 세포내의 티로시나아제 저해활성이 arbutin 보다 우수한 것을 확인할 수 있었다. 또한 장수진흙버섯 메탄올 추출물의 티로시나아제 저해능은 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 저해효과가 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 7). Ko와 Kim (2010)은 삼릉의 에탄올추출물을 B16 melanoma 세포에 처리하여 티로시나아제 활성 저해능을 측정한 결과 농도 의존적으로 티로시나아제의 활성이 저해 되었으며 200 ppm에서 47.0%의 저해 효과를 나타냈다고 보고하였다. 따라서 장수진흙버섯 메탄올 추출물을 B16/F10 melanoma 세포에 처리해 티로시나아제의 활성이 억제되었다는 연구 결과는 장수진흙버섯 추출물이 melanoma 세포의 안과 밖에서 모두 티로시나아제의 활성을 효과적으로 저해한다는 것을 나타낸 것으로 판단되어 이를 분자 수준에서 규명하기 위해서는 B16/F10 melanoma 세포 내에서 멜라닌의 생성에 관여하는 TRP-과 TRP-2 단백질의 발현과 관련된 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

B16/F10 melanoma 세포내의 멜라닌 생성 억제 측정

장수진흙버섯 메탄올 추출물이 세포내 멜라닌의 합성 저해 여부를 확인하기 위하여 B16/F10 melanoma 세포를 이용하여 세포내 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다. 실험 결과 처리한 장수진흙버섯 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 멜라닌의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 장수진흙버섯의 멜라닌 생성 저해 효과가 양성대조군인 arbutin에 비해서 높은 것이 확인되었다. 장수진흙버섯의 메탄올 추출물 10 µg/mL를 처리한 melanoma 세포에서 생성된 멜라닌의 양은 대조군이 51.8%이었으나 arbutin을 처리한 양성대조군인 melanoma 세포의 멜라닌 생성량은 대조군의 80.9%에 달해 arbutin의 멜라닌 생성 저해효과가 장수진흙버섯에 비해 낮았으며 100 µg/mL 농도에서 장수진흙버섯 메탄올 추출물을 처리한 melanoma 세포내에 생성된 멜라닌의 양은 대조군의 31.3%로 arbutin을 처리한 melanoma 세포내에 생성된 멜라닌 양 44.0%(대조군과의 비교)에 비해 낮아 멜라닌 생성 저해 효과가 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). Nam 등(2010)이

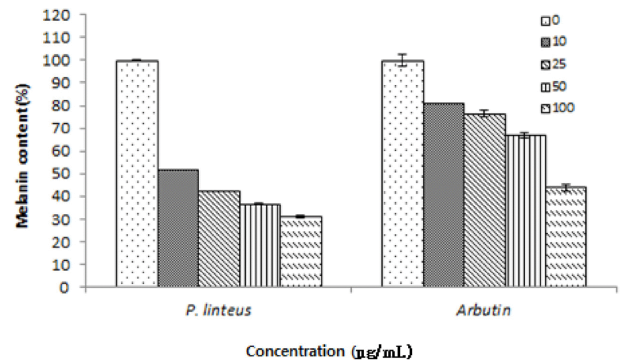


Fig. 8. Inhibitory activity of methanol extract obtained from fruiting bodies of *P. baumii* on melanin production in B16/F10 melanoma cells. Values are expressed as means $\pm$ SD (n = 3).

변데기 동충하초의 열수 추출물을 이용해 수행한 멜라닌 저해 실험에서는 5,000 µg/mL 농도에서 melanoma 세포내에 생성된 멜라닌의 양이 대조군의 46.0%로 보고하여 본 실험의 결과에 비해 멜라닌 생성을 저해하는 효과가 낮게 나타났다. 따라서 B16/F10 Melanoma 세포의 안과 밖에서멜라닌 생성 저해 효과는 양성대조군으로 사용한 arbutin과 비교해 높게 나타나 장수진흙버섯 메탄올 추출물은 앞으로 새로운 미백 소재로의 개발 가능성이 높다고 사료된다.

자외선 흡수량 측정

장수진흙버섯 메탄올 추출물을 200~400 nm 영역의 자외선 파장에서 흡수파장을 측정한 결과 중파장 자외선인 UV-B (270~290 nm) 영역부터 장파장인 UV-A (350~370 nm)까지 흡수 피크가 높게 나타났다(Fig. 9). 자외선 UV-A는 파장이 길어 피부의 진피층까지 침투하여 빠른 시간에 색소의 침착을 일으키고, 진피의 결합조직인 콜라겐 등의 단백질을 파괴하여 주름의 생성을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 자외선 UV-B (270~290 nm)는 피부에 손상을 주면서 동시에 지연성 색소 침착을 유발하는 것으로 알려져 있다(Kim and Ryu, 2012). 따라서 장수진흙버섯의 메탄올 추출물은 중파장과 장파장의 자외선이 진피층에 도달하는 것을 막아 피부의 손상과 멜라닌 색소의 침착을 감소시킬

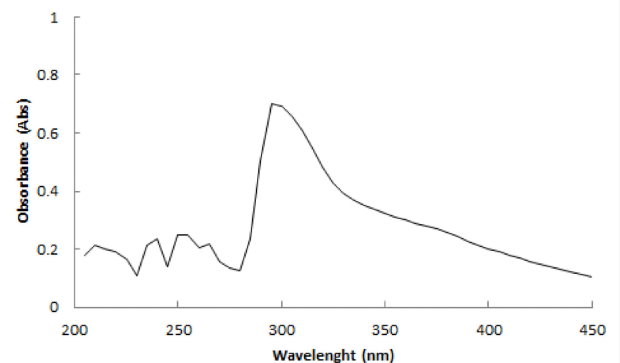


Fig. 9. UV absorbency of methanol extract obtained from fruiting bodies of *P. baumii*.

수 있을 것으로 사료된다. 앞으로 장수진흙버섯 추출물의 어떤 성분이 자외선의 흡수에 관여하여 피부를 보호하는지에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

장수진흙버섯 자실체에서 메탄올을 이용해 추출한 물질의 폴리페놀 함량을 측정한 결과 4.2 mg/g으로 확인되었다. 장수진흙버섯 추출물의 B16/F10 melanoma와 NIH3T3 세포주에 대한 독성시험에서 이들 공시세포는 200 µg/mL 농도에서 50% 이상 생존하여 세포독성은 없는 것으로 확인되었다. DPPH 전자공여능 시험에서 장수진흙버섯 추출물의 항산화 효과는 농도 의존적으로 나타났으며 양성대조군인 BHT에 비해 우수하였다. 장수진흙버섯 추출물을 B16/F10 melanoma 세포에 150 mg/mL 처리하여 세포내 티로시나아제의 저해능을 조사한 결과, 양성대조군인 arbutin은 31.2%의 저해능을 보인 반면, 같은 농도의 장수진흙버섯 추출물 처리군의 저해능은 46.0%로 나타나 장수진흙버섯 추출물의 티로시나아제의 저해능이 양성대조군 보다 높았다. 또한 장수진흙버섯 메탄올 추출물을 B16/F10 melanoma 세포에 처리하여 멜라닌 생성량을 조사한 결과 100 µg/mL 농도 처리군의 멜라닌 생성량은 대조군의 31.3%로 같은 농도의 arbutin을 처리한 군의 43.9%에 비해 효과가 높았으며, 투여한 추출물의 농도가 증가함에 따라 멜라닌의 생성량은 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 장수진흙버섯 메탄올 추출물을 분광광도계를 이용하여 자외선 영역에서의 흡수 스펙트럼을 조사한 결과 270-370 nm의 자외선 파장에서 흡광도가 높아 자외선 차단효과가 우수하였다. 따라서 장수진흙버섯의 메탄올 추출물은 피부미백이나 자외선차단 기능성 화장품으로 개발의 가능성이 높다고 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 인천대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Aburjai, T. and Natsheh, F. M. 2003. Plants used in cosmetics. *Phytother. Res.* 17:987-1000.
- Ahn, B. K., Kim, R., Choi, D. B. and Kim, Y. D. 2011. Effect of *Salicornia bigelovii* extract on the activities of whitening and anti-wrinkle. *Appl. Chem. Eng.* 22:56-60.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181:1199-1200.
- Briganti, S., Camera, E. and Picardo, M. 2003. Chemical instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pig. Cell Res.* 16:101-108.
- 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.
- Ikekawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann.* 59:155-157.
- Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomita, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M. and Oki, T. 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiotics.* 44:25.
- Kang, Y. H., Park, Y. K. and Lee, G. D. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenol compounds. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28:232-239.
- 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.
- Kim, Y. J. and Uyama, H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1707-1716.
- Ko, J. Y. and Kim, Y. C. 2010. Effectiveness of *Scirpi rhizoma* ethanol extract on skin whitening using *in vitro* test. *J. Environ. Toxicol.* 25:69-77.
- Lee, Y. L., Yen, M. and Mau, J. L. 2007. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizygus marmoreus*. *Food Chem.* 104:1-9.
- 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.
- Park, W. H. and Lee, H. D. 2003. Illustrated book of Korean medicinal mushrooms. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul.
- Pawelk, 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., García-Gasca, T., Rodríguez-Muoz, M. E., Guzmán-Maldonado, S. H., Medina-Torres, L. and Luján-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.
- 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.
- Song, C. H., Ra, K. S., Yang, B. K. and Jeon, Y. J. 1998. Immuno-stimulating activity of *Phellinus baumii*. *Kor. J. Mycol.* 26:86-90.
- Swain, T., Hillis, W. E. and Ortga, 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 (*Hypsizigus mamoreus*) hot water extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 36:1351-1357.
- Yamakoshi, J., Otsuka, F., Sano, A., Tokutake, S., Saito, M., Kikuchi, M. and Kubota, Y. 2003. Lightening effect on ultraviolet induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pig. Cell Res.* 16:629-638.
- Yang, B., Zhao, M. and Jiang, Y. 2008. Optimization of tyrosinase inhibition activity of ultrasonic-extracted polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chem.* 110:294-300.
- 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.
- Yim, H. S., Chye, F. Y., Ho, S. K. and Ho, W. C. 2009. Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *As. J. Food Ag-Ind.* 2:392-401.
- Ying, J. Z., Mao, X. L., Ma, Q. M., Zong, Y. C. and Wen, H. A. 1987. *Icones of medicinal fungi from China*. Science Press, Beijing.