

율무의 tyrosinase 저해활성과 radical 소거효과

김종길 · 이흠숙*
서울산업대학교 식품공학과

Tyrosinase-inhibitory and Radical Scavenging Activities from the Seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* [Roman.] Stapf

Jong-Kil Kim and Heum-Sook Lee*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

Abstract

The seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen*(yullmoo) were investigated for the free radical scavenging and mushroom tyrosinase inhibitory activities. Brown yullmoo, which contains bran in the seed, has also been evaluated for comparison. After partitioning of the total methanol extracts of yullmoo and brown yullmoo, each organic layer exhibited mild or potent dose-dependent inhibition(about 20-80%) on 1,1-diphenyl picryl hydrazyl(DPPH) free radical with the concentration of 300 µg/ml to 800 µg/ml. n-Butanol fraction of yullmoo showed the most potent scavenging effect on DPPH free radical. IC₅₀ of n-butanol fraction was 423 µg/ml, about six to seven fold higher concentration than standard BHT at the same inhibition rate. As for the tyrosinase inhibitory activity, all of the fractions including the methanol extract exhibited the similar activities even after partitioning. The chloroform fraction of brown yullmoo was found to show the most potent inhibitory activity with an IC₅₀ of 321.5 µg/ml.

Key words : *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* [Roman.] Stapf, mushroom tyrosinase, DPPH free radical, brown yullmoo

서 론

율무(*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen*[Roman.] Stapf)는 화본과(Gramineae)에 속하며, 중국 원산으로 국내에서 재배하는 1년초로서⁽¹⁾ 종자를 식용으로 사용하며 특히 건강 식품으로 알려진 율무차로 상용되고 있다. 약용으로는 그 종자를 의이인(薏苡仁)이라고 부르며 이뇨, 진위, 진통 및 소염제, 폐결핵등에 사용한다⁽²⁾.

율무의 성분과 생리활성에 관한 연구로는 항암활성을 보이는 coixol(6-methoxy-benzoxazolone)의 水腫과 기관지 천식의 염증 치료작용⁽³⁾, 중추성 근이완 약으로서의 호흡흥분, 혈압강하, 장관운동의 억제, 진통해열 작용⁽⁴⁾등이 보고되어 있다. 또한, Aoki등은 spontaneous

hypertensive rat(SHR)에 율무를 투여한 결과 혈청총콜레스테롤 농도는 감소되고 HDL-콜레스테롤 농도는 증가됨을 보고하였고⁽⁵⁾, Ukita등은 항암활성을 보이는 coixenolide를 추출 분리하였으며⁽⁶⁾ Otsuka등은 여러 benzoxazinoids유도체들의 histamine 방출억제에 의한 항염증 작용을 보고 한 바 있다⁽⁷⁾. 또한, Mitsuhiro등은 율무의 유리지방산 fraction이 Sarcoma 180 cell에 대한 항암활성을⁽⁸⁾, Takahashi등은 율무의 glycans성분에 의한 혈당감소 작용을 보고하였다⁽⁹⁾. 국내에서는 율무가 건강식품으로 대두되면서 소비량이 증가하고 이에 따른 연구가 이루어졌는데, 전분에 관한 특성과 조리 과학적 특성, 지질에 관한 이화학적 성질과 조성에 관한 연구^(10,11), 고도불포화지방산을 많이 함유하는 식물성 유로서 혈중콜레스테롤 저하효과⁽¹²⁾에 관한 연구 등이 있다.

최근 고혈압, 동맥경화, 뇌졸중등 심혈관계 질환이 활성산소로 인한 생체 내의 산화적 스트레스에 기인함이 밝혀지고 이러한 질병의 예방과 치료의 목적으로 산화적 스트레스를 억제할 수 있는 항산화 작용을

Corresponding author : Heum-Sook Lee, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, 172 Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
Tel : 82-2-970-6436
Fax : 82-2-976-6460
E-mail : heum@duck.snut.ac.kr

가진 천연물의 검색에 관한 연구와 관심이 고조되고 있다⁽¹³⁾. 이러한 검색법의 일종으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 자유 라디칼에 대한 소거작용 실험이 도입되고있다.

또한, tyrosinase는 피부 멜라닌 생성에서 중요한 역할을 하며 tyrosinase활성억제 작용은 피부미백제 및 피부노화 방지제 개발과 식품의 갈변 방지제 개발의 유용한 검색 평가법으로 활용되고 있다⁽¹⁴⁾. Tyrosinase 저해제로 알려진 4-hydroxyanisole 과 hydroquinone 등은 강력한 멜라닌 생합성 저해 활성을 보이나 색소세포의 변성과 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타내고, kojic acid, arbutin 등은 활성 및 안전성에 문제점이 있어⁽¹⁵⁾, 세포 독성이 낮으면서 멜라닌 생합성 저해 활성이 높은 저해물질의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 울무로부터 활성산소의 제거작용을 검색하기 위하여 울무의 total methanol 추출물을 순차적으로 분획 추출하고 각 분획의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 free radical 소거작용을 검색 비교함과 동시에, 피부미백효과 및 식품 갈변방지제의 검색방법으로서 tyrosinase활성저해실험을 행한 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

재료

울무는 (주)한약 유통을 통하여 구입하였으며 도정하지 않은 현울무는 충북 청주의 울무생산농가에서 구입하였다. 식물추출용 용매는 공업용 용매를 증류하여 사용하였으며, 그 외의 시약은 일반 1급 시약을 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), mushroom tyrosinase, 기질인 L-tyrosine은 Sigma사 제품을 사용하였으며 대조실험에 쓰인 butylated hydroxy toluene(BHT), *p*-coumaric acid는 Sigma사 제품을 사용하였다. 흡광도 측정에는 UV2101PC UV-Vis Scanning spectro-photometer(Shimadzu, Japan)를 사용하였다.

추출 및 분획

울무와 현울무 각각 150 g을 40°C 수욕에서 80% methanol(MeOH)로 6시간씩 3회 추출하여 여과하고 그 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거시켜 울무로부터 12.28 g, 현울무로부터 10.50 g의 extract를 얻었다. 이 MeOH extract를 증류수에 현탁시키고 CHCl₃과 butanol(BuOH)을 이용하여 순차적으로

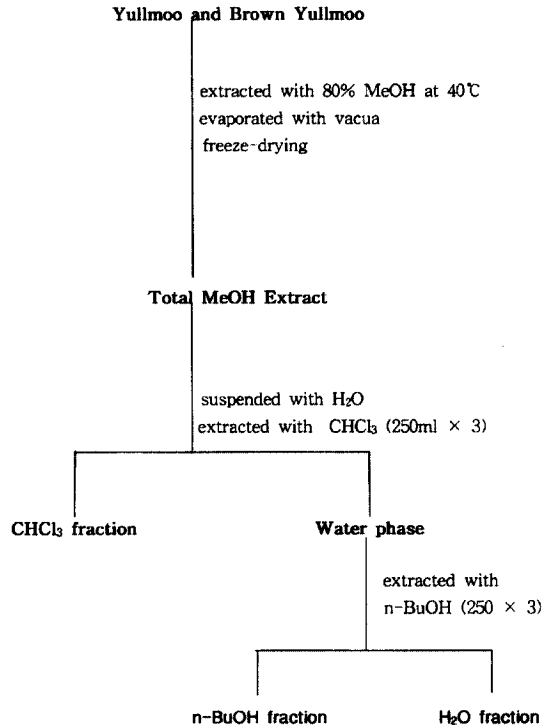


Fig. 1. Fractionation of Yullmoo and Brown Yullmoo.

추출하여 Fig 1.과 같이 각 분획을 제조한 후 실험재료로 사용하였다. 울무에서는 CHCl₃분획 5.09 g, n-BuOH분획 3.93 g, H₂O분획 2.50 g을 얻었고, 현울무에서는 CHCl₃분획 0.92 g, n-BuOH 분획 1.26 g, H₂O분획 0.80 g을 얻었다.

DPPH 라디칼 소거작용에 의한 항산화활성 실험

각 분획을 Fujita 등^(16,17)의 방법에 의한 DPPH 라디칼 소거법에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 ethanol(EtOH)에 녹여 2 ml가 되게하고, 2 × 10⁻⁴ M DPPH/EtOH 1 ml에 첨가한 후, 30분간 실온에 방치 후 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 전체 3 ml 내에서 시료의 농도는 100 µg/ml에서 1000 µg/ml 까지 되도록 제조하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 농도를 IC₅₀으로 나타내었으며, 소거율의 계산은 [(A_{blank} - A_{sample})/A_{blank}] × 100으로 계산하였다. 모든 시료는 동일 농도에서 3회 반복 실험하여 평균값을 산출하였다. standard로서 BHT 1, 5, 10, 50, 60, 80, 100 µg/ml 농도를 사용하여 각 농도에서의 활성을 구하여 IC₅₀값을 산출하였다.

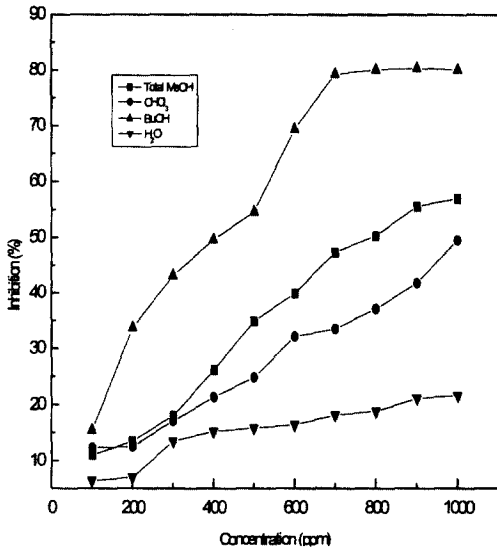


Fig. 2. Scavenging activities of various fractions from Yullmoo on DPPH free radical.
 radical scavenging activity (%) = $[(A_{blank} - A_{sample}) / (A_{blank})] \times 100$

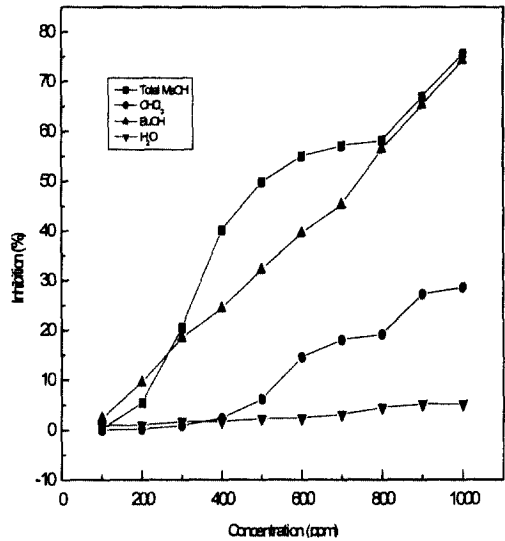


Fig. 3. Scavenging activities of various fractions from Brown Yullmoo on DPPH free radical.

Tyrosinase 저해 활성 측정

각 분획은 Kubo 등^(18,19)의 방법에 의한 tyrosinase 저해 활성 측정법에 의하여 실험하였다. 각각 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/ml 농도의 시료와 기질 L-tyrosine(0.03%), tyrosinase(200 units), phosphate buffer (PH 6.8)용액을 가하여 전체가 3 ml가 되게하여 37°C에서 20분간 반응시키고 ice bath에서 효소반응을 정지 시키고 약 10분후 실온에서 475 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 농도를 IC₅₀으로 나타내었다. 저해율 계산은 $1 - [(A_{sample} - A_{control}) / A_{blank}] \times 100$ 으로 하였으며, 동일 농도로 3회 반복 시험한후 평균값을 산출 하여 Origin 프로그램에 의하여 정확한 IC₅₀값을 결정하였다. Control은 tyrosinase가 없는 상태에서의 흡광도로 하였다. Standard로서는 Kubo에 의한 문헌⁽²⁰⁾을 참고로 하여 활성이 확인된 *trans-p-coumaric acid*를 사용하였다.

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 소거법에 의한 울무 및 현울무의 항산화 활성

울무의 total MeOH 추출물은 300 µg/ml 농도부터 서서히 라디칼 소거 작용을 보이다가 795 µg/ml에서 50%의 저해율을 보였으며 그 이상의 농도에서는 저해율

이 크게 증가하지 않았다. Total MeOH추출물을 순차적으로 분획하여 얻은 CHCl₃ 분획은 소거작용이 매우 완만하여 1000 µg/ml 이상의 높은 농도에서 50% 저해율을 보였으나 n-BuOH 분획은 423 µg/ml에서 50%의 저해율을 보이면서 600 µg/ml까지 급격히 소거작용이 증가하여 600 µg/ml에서 70% 정도의 저해율을 보여 standard로 사용한 BHT의 같은 농도에서의 저해율 87.45%와 거의 동등한 작용을 보였으나 그 이상의 농도에서는 소거작용이 크게 증가하지 않았다(Fig 2). 현울무의 total MeOH 추출물은 300 µg/ml의 농도에서 20.5% 저해율을 보이기 시작하여 그 작용이 서서히 증가, 525 µg/ml에서 50%의 저해율을 보였으며 1000 µg/ml까지 꾸준히 저해율이 증가하여 1000 µg/ml에서는 75.6%의 저해율을 보였다. 현울무의 CHCl₃ 분획은 전반적으로 매우 낮은 소거작용을 보여 분획에 따른 활성의 뚜렷한 편재화를 가져오지 못했으나 n-BuOH 분획은 754 µg/ml 정도에서 50%의 저해율을 보였다. 울

Table 1. IC₅₀ values of various fractions on DPPH free radical*

Fraction	Sample	
	Yullmoo	Brown Yullmoo
Total MeOH	795	525
CHCl ₃	<1000	<1000
BuOH	423	754
H ₂ O	<1000	<1000

*Values represent the concentration(µg/ml) required for 50% reduction of DPPH free radical.

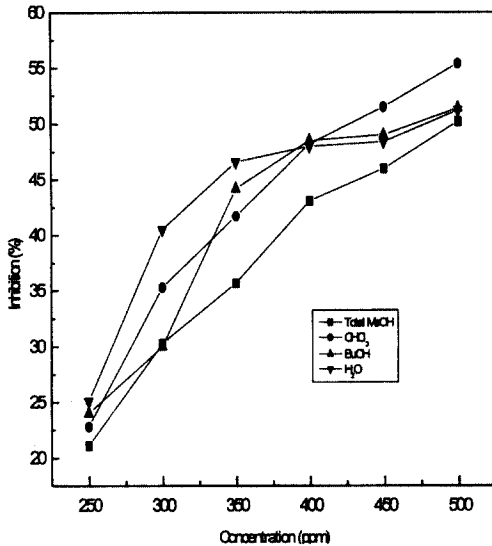


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory activities of various fractions from Yullmoo.

$$\text{inhibition(\%)} = 1 - [(A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

무와 현율무 모두 수층은 거의 소거효과를 보이지 않았다(Fig 3). Standard로 BHT를 사용하여 산출한 IC₅₀ 값은 63 µg/ml이었으며 각 분획의 IC₅₀값과 비교한 결과 율무의 n-BuOH 분획의 IC₅₀값이 423 µg/ml으로 분획 자체로서는 비교적 그 소거작용이 높았다(Table 1).

율무 및 현율무의 Tyrosinase 저해활성

일반적으로 율무의 total MeOH 추출물을 비롯한 모든 분획이 300 µg/ml까지는 급격하게 저해율이 증가하다가 그 보다 높은 농도에서는 완만한 증가율을 보이고 있다(Fig 4). IC₅₀값도 모든 분획이 420-500 µg/ml 사이에 있어 분획에 따른 활성의 편재화가 이루어지지 않았음을 알 수 있었다. 현율무도 율무와 유사한 양상을 보였으나 율무와는 달리 CHCl₃ 분획에서 다른 분획에 비하여 높은 활성을 보이고 있었다(Fig 5). Standard 로서 *trans-p-coumaric acid*를 사용한 결과의 IC₅₀값은 25 µg/ml 정도이었으며 각 분획의 IC₅₀값과 비교한 결과 현율무의 CHCl₃ 분획의 IC₅₀값이 321.5 µg/ml이므로서 가장 저해활성이 높았다(Table 2). 또한, 본 연구와 같은 system에서 tyrosinase의 강력한 저해활성을 보인 다니무 뿌리껍질⁽²¹⁾에서 분리된 Kazinol E의 IC₅₀값이 111.3 µg/ml임을 참조할 때 현율무의 CHCl₃ 분획은 비교적 높은 저해활성을 보였다고 할 수 있겠다. 율무와 현율무간의 현저한 차이는 없었으나 분획 자체로 비교적 높은 활성을 보였으며, 그 섭취량에 아

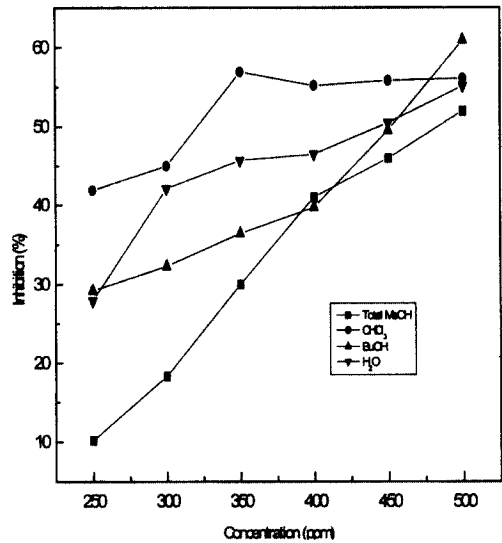


Fig. 5. Tyrosinase inhibitory activities of various fractions from Brown Yullmoo.

Table 2. IC₅₀ values of various fractions in tyrosinase inhibitory activity*

Fraction	Sample	
	Yullmoo	Brown Yullmoo
Total MeOH	495	480
CHCl ₃	427.5	321.5
n-BuOH	456	448
H ₂ O	465	439

*Values represent the concentration(µg/ml) required for 50% decrease of tyrosinase activity.

무런 제한을 받지 않고 항시 다량으로도 섭취 사용할 수 있는 곡식이므로 고농도로는 사용할 수 없는 합성 항산화제와는 달리 여러가지 생리활성 기능을 가진 식품 자체로서, 식품의 갈변방지제 또는 항산화제로의 이용가치가 높다고 사료된다. 율무의 chloroform 분획과 n-butanol 분획에 대하여는 대량 추출과 column chromatography를 통하여 계속하여 그 작용물질의 분리를 위한 추적 연구를 수행중이다.

요 약

율무와 현율무의 total methanol 추출물과 분획 후의 각 획분에서의 DPPH 라디칼 소거작용 및 tyrosinase 저해작용을 검색 비교하여 그 함량-작용간의 dose-dependent한 결과를 얻었다. 라디칼 소거작용은 율무의 n-butanol 분획이 가장 활성이 높아 standard로 사용한 BHT의 6.7배 정도의 농도에서 같은 IC₅₀값을 나

타내었으며 600 µg/ml 이상의 고농도에서는 BHT와 거의 동등한 저해율을 보였다.

그러나 현울무에서는 total methanol 추출물을 분획한 후의 모든 획분이 total methanol 추출물의 활성보다 작아 분획에 따른 작용의 편재화를 이루지 못했다.

Tyrosinase 저해작용도 모든 분획이 거의 유사한 저해율을 보여 역시 분획에 따른 activity의 편재화가 이루어지지 않았음을 알 수 있었으나 현울무의 chloroform 분획이 비교적 높은 활성을 보여 IC₅₀값이 321.5 µg/ml 이었다. 이는 활성이 확인된 trans-p-coumaric acid의 IC₅₀값이 25 µg/ml, Kazinol E의 IC₅₀값이 111.3 µg/ml 임을 참조 할 때 분획으로서는 좋은 활성을 보였음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 서울산업대학교 교내 학술연구비에 의하여 연구되었음을 감사드립니다.

문헌

1. Lee, T. B. Illustrated Flora of Korea, Hyang moon sa (1982)
2. Handbook of Choongyak, Vol. 4, pp. 5342. Sohakgwan (1985)
3. Hirai, H., Takase, H., Kobayashi, H., Yamamoto, M., Fujioka, N., Kohda, H., Yamasaki, K., Yasuhara, T. and Nakajima, T. Screening test for anti-inflammatory crude drugs based on inhibition effect of histamine release from mast cell. Shoyakugaku Zasshi. 37(4): 374 (1983)
4. Gomita, Y., Ichimaru, Y., Moriyama, M., Fukamachi, K., Uchikado, A., Araki, Y., Fukuda, T. and Koyama, T. Behavioral and EEG effects of coixol(6-methoxy benzoxazolone), one of the components in *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf. Folia Pharm. Japan 77: 245 (1981)
5. Aoki, M. and Tuzihara, N. Effects of Hatomugi (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen*) on the blood pressure cholesterol absorption and serum lipids level. Japan. J. Home Economics 35: 89-96 (1984)
6. Ukita, T. and Tanimura, A. Studies on the antitumor components in the seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen*. Chem. Pharm. Bull. 9: 43 (1961)
7. Otsuka, H., Hirai, Y., Nagao, T. and Yamasaki, K. Anti-inflammatory activity of benzoxazinoids from roots of *Coix Lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen*. J. of Nat. Prod. 51(1): 74 (1988)

8. Mitsuhiro, N., Akihiko, Y., Atsuko, M. and Hiromi, Y. Antitumor components isolated from the chinese herbal medicine *Coix lachryma-jobi*. Planta Med. 60: 357 (1994)
9. Takahashi, M., Konno, C. and Hikino, H. Isolation and hypoglycemic activity of coixans A, B and C, glycans of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* seeds. Planta Medica. 52: 64 (1986)
10. Woo, J. W., Lee, M. S., Lee, H. J. and Kim, H. S. Comparative studies on the dietary fiber, amino acids and lipid components of Yullmoo and Yeomjoo. Korean J. Food Sci. Technol. 21(2): 269 (1989)
11. Lee, H. J., Cho, K. Y., Bae, J. S. and Jang, S. W. Studies on the triglyceride composition of Job's tears. Korean J. Food Sci. Technol. 6(4): 27 (1990)
12. Park, Y. J., Lee, Y. S. and Suzuki, H. Effect of coix on plasma cholesterol and lipid metabolism in rats. Korean J. Nutr. 21(2): 88 (1988)
13. Cha, B. C., Lee, H. W. and Choi, M. Y. Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. Kor. J. Pharmacogn. 29(1): 28 (1998)
14. Lee, K. T., Kim, B. J., Kim, J. H., Heo, M. Y. and Kim, H. P. Inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. International Journal of Cosmetic Science 19(6): 291 (1997)
15. Maeda, K. and Fukuda, M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. J. Soc. Cosmet. Chem. 42: 361 (1991)
16. Fujita, Y., Uehara, I., Morimoto, Y., Nakashima, M., Hatano, T. and Okuda T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. II. inhibition mechanism of caffeetannin isolated from leaves of Artemisia species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation. Yakugaku Zasshi. 108: 129 (1988)
17. Tako, T. F., Kitatani, N., Watanabe, A. and Yagi, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. Biosci. Biotech. Biochem. 58: 1780 (1994)
18. Kubo, I., Yokkawa, Y. and Kinst-Hori, I. Tyrosinase inhibitors from bolivian medicinal plants. J. Nat. Prod. 58: 739 (1995)
19. Kubo, I., Kinst-Hori, I. and Yokkawa, Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. J. Nat. Prod. 57: 739 (1994)
20. Lim, J. Y., Ishiguro, I. and Kubo, I. Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves. Phytother. Res. 13: 371 (1999)
21. Lee, H. J., Park, J. H., Jang, D. I. and Ryu, J. H. Antioxidant components from *Broussonetia kazinoki*. Yakhak Hoeji 41(4): 439 (1997)