

## 앵두과즙과 Ethanol 추출액의 *In vitro*에서 Tyrosinase 활성 저해효과

황호선\* · 김중만 · 송영애 · 전예정  
 원광대학교 생명자원과학대학 농화학과

### Inhibitory Effect of Ethanol Extract and Juice of the Korean Cherry (*Prunus tomentosa* Thunberg) on Tyrosinase Activity *In vitro*

Ho-Sun Hwang\*, Joong-Man Kim, Young-Ae Song and Ye-Jung Jeon  
 Department of Agricultural Chemistry,  
 College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University

To develop a functional beverage from Korean cherry (*Prunus tomentosa* Thunberg), inhibition effect of ethanol extract and juice of the Korean cherry on melanin synthesis and tyrosinase activity *in vitro* was investigated. Inhibition ratio of tyrosinase activity increased as the concentration of solid of Korean cherry juice increased, and inhibition effect was high in initiation step of enzyme reaction and then gradually decreased. Inhibition ratio of tyrosinase activity was high in the 70% (v/v) ethanol extract of the cherry and the highest in the ethyl acetate fraction of the 70% (v/v) ethanol extract. Ultimately, the amounts of functional matter (melanin synthesis inhibitor) in the cherry was highest in ethyl acetate fraction of the ethanol extract.

**Key words:** Korean cherry, *Prunus tomentosa* Thunberg, tyrosinase, melanin

## 서 론

앵두(*Prunus tomentosa* Thunberg)는 장미과에 속하는 앵도(櫻桃)나무의 열매로 뿌리나 줄기, 잎 등을 약용하기도 한다.<sup>(1-4)</sup> 본초강목이나 명의별록과 같은 고문헌<sup>(5-7)</sup>에 의하면 “앵두는 항시 얼굴에 바르면 얼굴결이 아름다워지고 딱지 등을 없애 준다고 하여 미용의 성수”라고 불린다. 또한 앵두의 생즙을 오래 마시면 얼굴색이 좋아지며 여인의 미용증으로 유효하다고 나타나 있다. 그래서 한방에서는 청혈(淸血), 보혈약(補血藥)으로도 쓰이며 원기회복 등의 약리 효과에 대한 자료<sup>(8-10)</sup>가 대부분이다. 최근 앵두씨의 지방질 조성 및 단백질 패턴에 대한 연구와 amygdalin에 대한 연구 등<sup>(11,12)</sup>으로 앵두의 기능성을 뒷받침해 줄만한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다. 한편 tyrosinase에 대한 연구로는 tyrosin이 tyrosinase에 의하여 최종적으로 melanin 생성에 관여하고, melanin의 생성을 억제하는 tyrosinase 저해제의 탐색과 식물체에 대한 tyrosinase 저해 활성 탐색 등의 연구<sup>(13-18)</sup> 및 tyrosinase가 피부의 미백 작용과 노화 억제 작용에 관여 한다는 연구<sup>(19,20)</sup>

등이 있으나 앵두를 이용한 연구는 전무하다. 고문헌상의 결과로 예측할 때, 알려진 미백효과는 아마도 앵두가 tyrosinase의 작용을 저해하여 피부에서의 melanin 색소 생성을 억제하거나 여드름 등의 피부 질환을 일으킬 수 있는 미생물의 활성을 억제하는 것으로 본다. 따라서 본 연구에서는 고문헌상에서 언급한 미백효과에 영향을 주는 물질을 일차적으로 확인하기 위하여 앵두과즙 및 앵두의 ethanol 추출물의 melanoidine 색소 생성을 촉진하는 tyrosinase의 활성에 대한 억제 효과를 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에서 사용한 앵두는 6월 초순경에 수확한 조생종인 일출(日出)로서 서울 가락동 농산물 시장에서 구입하였고 과육이 쉽게 물러지는 것을 방지하기 위해 세척하지 않고 -18°C 이하에서 냉동시켜 보관하며 시료로 사용하였다.

### 앵두 과즙 제조

앵두를 씨가 깨지지 않게 blander로 마쇄한 다음 압착기로 착즙하여 착즙액을 57°C에서 0.01% pectinase(Novo Nordisk Ferment Ltd.)로 2시간 동안 교반하며 반응시킨 다음 80°C 이상으로 가열하여 실활, 살균 시키고 규조토(No. 300)로 여과한 다음 감압 농축(50 Brix°) 하였다. 농축액은 -18°C 이하

\*Corresponding author: Ho-Sun Hwang, Department of Agricultural Chemistry, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, 344-2 Shinyong-Dong, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Korea  
 Tel: 82-63-653-4324  
 Fax: 82-63-653-4323  
 E-mail: hhosun@hanmail.net

에서 냉동 보관하였으며 실험에 사용할 과즙의 농도는 앵두 100% 착즙농도(8.0 Brix<sup>o</sup>)로 환산하여 10, 20, 및 30%로 희석한 과즙을 사용하였다.

**Ethanol 추출**

냉동 보관중인 앵두를 해동되기 전에 깨끗이 세척하고 수분을 제거한 다음, 해동되면서 과즙이 유실되지 않게 추출 용기에 넣고 95, 70 및 50%(v/v)의 ethanol을 각각 앵두와 1:1(v/w)의 비율로 첨가하고 실온에서 30일 동안 추출하였다. 추출된 앵두 추출액은 앵두의 과육과 추출액을 분리한 다음 과육을 압착시켜 착즙하고 추출액과 합하여 여과지(Whatman No. 2)로 여과하고 알콜 추출액으로 사용하였다.

**Ethanol 추출액의 용매 분획**

각 농도별 ethanol 추출액 1,000 mL를 감압 증발 농축시켜 ethanol을 제거한 다음 각 분획 제조에 이용하였다. 먼저 ethanol을 제거한 추출액을 분액 여두에 넣고 chloroform을 가하여 추출하고 물층을 얻는다. 물층은 다시 ether로 3회 이상 추출하여 내고 물 분획을 얻는다. 분리된 물 분획중 일부는 ethyl acetate를 가하여 추출하고 물층과 ethyl acetate 층으로 분리한 다음, ethyl acetate층을 물로 세척하여 내고 분리시켜 순수한 ethyl acetate 분획을 얻는다. 한편, ethyl acetate와 분리된 물층은 butanol을 이용하여 다시 추출하고 butanol층만을 분리한 다음 물로 세척하고 분리시켜 순수한 butanol 분획을 얻는다. 각각의 전처리별로 얻어진 추출액은 60°C에서 감압 농축 건조시켜 분석에 이용하였다.

**Tyrosinase 활성 저해효과**

앵두과즙과 ethanol 추출액 및 ethanol 추출액 분획의 tyrosinase 활성 저해율은 kubo의 방법<sup>(21)</sup>에 따라 시료 1 mL에 tyrosinase 용액(2,100 unit/mg, Sigma Co. USA) 0.1 mL(6.5 mg/10 mL)와 phosphate buffer solution(pH 6.8) 0.9 mL를 혼합하여 25°C에서 10분간 예열한 다음 0.03%의 DOPA(L-3,4-Dihydroxyphenylalanine) 용액을 1 mL 첨가하여 25°C에서 5분 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 반응을 정지시키기 위해 80°C 이상 가열하고 25°C로 냉각한 후 475 nm에서 흡광도(A)를 측정(UV-Visible Spectrophotometer HP8452)하였다. 시료 1 mL에 tyrosinase 용액 0.1 mL 및 인산염 완충용액 0.9 mL를 혼합한 용액을 80°C에서 5분간 가열하여 tyrosinase를 불활성화시킨 것을 사용한 시료의 흡광도(B)와 시료를 첨가하지 않고 시료대신 증류수를 첨가하고 측정한 흡광도(C)로 다음과 같은 식에 의하여 각각의 tyrosinase 활성 저해율(%)을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \frac{C - A}{C - B} \times 100$$

**통계처리**

실험결과는 ANOVA test를 이용하여 p<0.05수준에서 Duncan's Multiple range test로 유의성을 검증하였다.

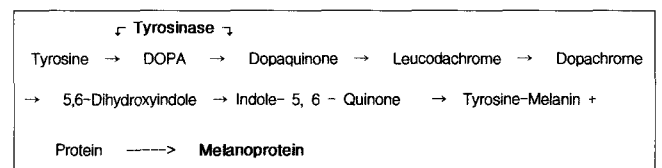
**결과 및 고찰**

**앵두과즙의 tyrosinase 활성 저해효과**

앵두과즙이 나타내는 기능성은 서론에서 볼 수 있는 것과 같이 고문헌이나 경험방(經驗方)에 의한 내용 중 피부미용에 대한 효능 효과가 매우 강조되고 있다. 따라서 본 연구는 피부미용에 직접적인 영향을 끼치는 melanin 색소 생성 억제 효과를 앵두과즙을 이용하여 실험하였다. Melanin 색소는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 tyrosine이 tyrosinase의 작용에 의하여 최종적으로 melanin 생합성까지 이어지는 경로에 의하여 생성된다<sup>(22,23)</sup>. 따라서 melanin 색소는 tyrosinase에 의한 작용으로 생성이 좌우되므로 그의 작용을 저해하기 위한 방법인 tyrosinase 활성 저해 능력을 앵두 과즙 10, 20 및 30%의 농도로 하여 실험하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 앵두 과즙의 농도가 높을수록 그 저해율이 증가하였으며, 반응시간이 지날수록 점차 감소하는 경향을 보였다. 반응시간 초기에 가장 높은 저해율을 보였다가 반응이 끝나는 시간인 5분이 경과한 후에는 과즙농도가 10%, 20%, 30%에서 각각 34.15%, 52.10%, 65.97%로 과즙의 농도가 높을수록 높은 tyrosinase 활성 저해율을 나타냈다. 따라서 tyrosinase가 피부의 미백작용과 노화 억제작용에 관여 한다는 조, 이 등<sup>(19,20)</sup>의 보고에 따라 앵두가 미백 및 melanin 색소 침착방지 등으로 인한 피부노화 방지 효과에 효과가 있을 것으로 판단된다.

**앵두 ethanol 추출액**

앵두 과즙의 tyrosinase 활성 저해효과 결과에 따라 그 기능성을 나타내는 주요 성분이 가장 효과적으로 추출될 수 있도록 최적 추출조건을 확인하기 위해 50, 70 및 95%(v/v)



**Fig. 1. Biosynthesis of dihydroxyphenylalanine (DOPA) melanin from tyrosine.**

**Table 1. Effect of juice of korean cherry on the tyrosinase activity inhibition rate (%)**

Juice concentration (%)	Reaction time (min.)				
	1	2	3	4	5
10	67.97 ± 0.55 <sup>a</sup>	58.03 ± 0.20 <sup>a</sup>	45.10 ± 0.27 <sup>a</sup>	40.00 ± 0.20 <sup>a</sup>	34.15 ± 0.35 <sup>a</sup>
20	80.03 ± 0.45 <sup>b</sup>	68.03 ± 0.35 <sup>b</sup>	63.70 ± 0.82 <sup>b</sup>	55.03 ± 0.25 <sup>b</sup>	52.10 ± 1.40 <sup>b</sup>
30	82.20 ± 0.46 <sup>a</sup>	73.00 ± 0.20 <sup>a</sup>	65.07 ± 0.59 <sup>a</sup>	65.23 ± 0.50 <sup>a</sup>	65.97 ± 0.45 <sup>a</sup>

Values are Mean ± SD of triplicate plates.

Values within the same column with different alphabets are significantly different(p<0.05) among groups by Duncan's multiple range test.

**Table 2. Effect of alcohol extract of korean cherry on the tyrosinase activity inhibition rate (%)**

Ethanol concentration (%)	Extract concentration (Brix <sup>o</sup> )					
	1	2	4	6	8	10
50	31.70±0.96 <sup>c</sup>	37.10±0.17 <sup>c</sup>	54.93±0.38 <sup>c</sup>	77.07±0.45 <sup>c</sup>	85.13±0.38 <sup>c</sup>	88.07±0.51 <sup>c</sup>
70	64.90±0.25 <sup>a</sup>	71.87±0.32 <sup>a</sup>	89.00±0.20 <sup>a</sup>	93.00±0.62 <sup>a</sup>	97.07±0.40 <sup>a</sup>	99.90±0.10 <sup>a</sup>
95	42.90±0.36 <sup>b</sup>	59.03±0.42 <sup>b</sup>	75.03±0.42 <sup>b</sup>	84.03±0.45 <sup>b</sup>	90.03±0.25 <sup>b</sup>	95.03±0.45 <sup>b</sup>

Values are Mean±SD of triplicate plates.

Values within the same column with different alphabets are significantly different(p<0.05) among groups by Duncan's multiple range test.

**Table 3. Effect of 70%(v/v) organic solvent fraction from ethanol extracts of korean cherry on the tyrosinase activity inhibition rate**

Sample	I <sup>1)</sup>	II <sup>2)</sup>	III <sup>3)</sup>
Inhibition rate (%)	10.3	73.8	43.2

<sup>1)</sup>Water fraction

<sup>2)</sup>Ethyl acetate fraction

<sup>3)</sup>Butanol fraction

ethanol 추출을 하였다. 각 농도별 ethanol 추출액은 감압 증발 농축시켜 ethanol 만을 제거한 다음 정제수로 1~10 brix<sup>o</sup>로 각 농도에 따라 희석하고 ethanol 추출물로 하였다. Table 2에서 보는 바와같이 각 농도별 ethanol 추출물의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 저해효과도 증가하는 경향을 보였으며 이중 70%(v/v) ethanol 추출액에서 얻어진 ethanol 추출물의 경우 그 농도가 1 brix<sup>o</sup>일 때 tyrosinase 활성 저해율이 50%가 넘는 64.90%로 가장 높았다. 또한 추출액의 농도가 증가함에 따라 71.87%, 89.00%, 93.0%, 99.90%로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 앵두의 주요 성분<sup>(24)</sup>중 수분이 일반적인 과일과 같이 88%이상으로 과육의 대부분을 대부분 차지하기 때문에 앵두를 ethanol 추출하는 과정에서 95%(v/v) 이상의 높은 농도일 경우, 앵두 과육의 수분이 초기에 너무 급격하게 용출 되고 그의 조직이 변형됨으로 추출 효율이 떨어진 것으로 예상되며 50%(v/v) 농도의 ethanol 농도에서는 너무 낮은 용출 속도로 추출이 이루어진 것으로 판단된다. 따라서 앵두의 ethanol 추출액에 대한 tyrosinase 활성 저해효과로 볼 때 70%(v/v) ethanol 추출에서 앵두의 기능성 성분이 가장 효과적으로 추출된 것으로 판단된다.

### 앵두 ethanol 추출액 분획

앵두에 함유되어 있을 것으로 예상되는 기능성 물질의 성질을 알아보기 위하여 앵두의 ethanol 추출액에 대한 tyrosinase 활성 저해효과가 가장 높았던 70%(v/v) ethanol 추출액을 전처리하고 물, ethyl acetate 및 butanol 분획의 각 단계별 시료를 이용하여 tyrosinase 활성을 측정된 결과 Table 3에서 보는 바와같이 물분획에서 10.3%, butanol 분획에서 43.2%이었으나 ethyl acetate 분획에서는 73.8%로 가장 높게 나타났다. 이는 앵두에 함유되어있는 tyrosinase 활성 저해물질이 대부분 ethyl acetate의 유기용매에 추출됨을 예상할 수 있고 지금까지의 천연물에서 유래한 tyrosinase 활성 저해제로 알려진 물질인 aloesin, hinokitol, quercetin 등<sup>(14)</sup>이 앵두에도 함유

되어 있을 것으로 예상되어 앵두의 기능성을 나타내는 물질에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## 요 약

본 연구는 앵두 과즙과 ethanol 추출액의 tyrosinase 활성 저해효과를 조사하였다. 앵두과즙에 대한 tyrosinase 활성 저해효과는 반응 초기에 가장 높았으나 점차 감소하는 경향을 보였으며 앵두과즙의 농도가 높을수록 높은 저해율을 보였다. 앵두 ethanol 추출액의 tyrosinase 활성 저해효과는 ethanol 추출액에서 얻어진 추출물의 농도가 높을수록 증가하였으며 70%(v/v) ethanol 추출액에서 가장 높았다. 한편 70%(v/v) ethanol 추출액의 전처리 시료중 ethyl acetate층이 73.8%의 높은 tyrosinase 활성 저해율을 보였다. 이는 앵두의 특정성분이 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 판단되어 기능성을 나타내는 물질에 대한 정성 및 정량의 추가적인 연구가 필요하다.

## 감사의 글

이 논문은 2001년 원광대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사를 드립니다.

## 문 헌

- China Bonchodogam Purbulishing Committee. Chinabonchodogam. pp. 171 Vol. 1, Inminwisang Purblishers, Chaina (1994)
- Kang, B.H. and Sim, S.I. Dictionary of korea natural plant name. pp. 631 Korea university laboratory of nation culture, Korea (1997)
- Kim, T.J. Plant of korea. pp. 570-571 Gukilmedia, Korea (1994)
- Motsuru H., Ken O., Aya N., Kiyochika H.a, Munetami Y. and Kouu Y. Useful plant of the world. pp. 866 Heibonsha LTD. Publishers, Japan (1989)
- Hyun, Y.H., Goo, B.S., Song, J.E. and Kim, D.S. Meteriology of foods. pp. 158-159 Hyungsul Publishers Korea (2000)
- Sim, S.Y. Natural food to be drugs. pp. 220-221 Changjosa, Korea (1983)
- Sim, S.Y. Juice and drug tea. pp. 372-373 Changjosa, Korea (1983)
- Han, S.H. Hanbangmiyongsun. pp. 32-33 Gilim Publishers, Korea (1975)
- Lee, S.J. Bonchogangmok. pp. 1799-1800 Inminwisang Publishers, Chaina (1982)
- Kangosine Medical Academy. Dictionary of Chinese Drugs. pp. 3577-3578 Jungdam Publishers, Chaina (1998)
- Yoon, H.S. and Park, J.S. Lipid composition and protein pattern

- of prunus tomentosa thunberg seed. Korean J. Food Sci. Technol. 17: 248-252 (1985)
12. Hong, I.H. Study of amygdalin in seed of korean cherry(*Prunus tomentosa* T.). Master's Dissertation, Dep. of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Korea (1981)
  13. Jeong, S.W., Lee, N.K., Kim, S.J. and Han, D.S. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 891-896 (1995)
  14. Kim, J.K., Cha, W.S., Park, J.H., Oh, S.L., Cho, Y.J., Chun, S.S. and Cheong Choi. Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from korean green tea. Korean J. Food. Sci. Technol. 29: 173-177 (1997)
  15. Lee, C.H., Chung, M.C., Lee, H.J., Lee, K.H. and Kho, Y.H. MR304-1, A melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 641-646 (1995)
  16. Jeong, S.W., Han, D.S., Kim, S.J. and Jeun, M.J. Fermentation of tyrosinase inhibitor in mushroom media. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 227-233 (1996)
  17. Seok, C.H., Won, I.I., Kim, J.H., Kim, B.J., Kim, M.Y. and Kim, H.P. Biological of 100 plant extracts for cosmetic use(II) inhibitory activities of tyrosinase and DOPA autooxidation. Korean Cosmetic Sci. Technol. 22: 193-200 (1996)
  18. Lee, G.T., Shin, B.S., Kim, B.J., Kim, J.H. and Jo, B.K. Inhibitory effects of ramulus mori extracts on melanogenesis. Korean Cosmetic Sci. Technol. 23: 63-70 (1997)
  19. Cho, J.H., Lee, K.M., Kim, N.S. and Kang, W.H. The effects of whitening components on human melanocytes in vitro. Korean Cosmetic Sci. Technol. 23: 115-121 (1997)
  20. Lee, S.H., Kim, J.J., Kim, H.J., Lee, J.T. and Kang, S.H. Effects of banha extract on the melanin biosynthesis and tyrosinase mRNA level in B16 mouse melanoma cells. Korean Cosmetic Sci. Technol. 23: 23-32 (1997)
  21. Michinori, K. Application of crude browings with antityrosinase, activity to cosmetics. Fragrance J. 6: 210-213 (1986)
  22. Pawelek, J.M. and Korner, A.M. The biosynthesis of mammalian melanin. Am. Science 70: 91-126 (1982)
  23. Swan, G.A. Structure chemistry and biosynthesis of the melanins. Fortscr. Chem. Org. Naturst, 31: 521-582 (1974)
  24. National Rural Living Science Institute, R.D.A. pp. 156-157 Food composition table. Fifth Revision. Korea (1996)
- 
- (2001년 4월 26일 접수)