

쑥 추출물의 Tyrosinase 효소활성에 미치는 억제효과

¹곽 정 훈 · ²서 운 교 · †한 영 환

¹동국대학교 대학원 응용생물학과, ²동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 생물학과
(접수 : 2001. 1. 12., 게재승인 : 2001. 4. 23.)

Inhibitory Effect of Mugwort Extracts on Tyrosinase Activity

Jung-Hoon Kwak¹, Un-Kyo Seo², and Yeong-Hwan Han[†]

¹Department of Applied Biology, Graduated School, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

²Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea
Department of Biology, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

(Received : 2001. 1. 12., Accepted : 2001. 4. 23.)

To determine the inhibition of mushroom tyrosinase activity, fresh and dried mugwort, *Artemisia princeps* was extracted initially with water and ethyl alcohol, and subsequently with hexane, chloroform and ethyl acetate in that order. The highest yield was obtained from the ethyl acetate (15.2%) and hexane (15.5%) fraction of the ethanolic extract of fresh and dried mugwort, respectively. For all fractions tested, the inhibition of tyrosinase activity by fresh mugwort was higher than that of dried mugwort, and the inhibition ratio of tyrosinase activity was 98.9% in the chloroform fraction and 96.7% in the hexane fraction.

Key Words : tyrosinase, inhibition, mugwort, extraction, fraction

서 론

Melanin은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질로 이루어져 있다. 자외선, 건조, 극한 온도 등에 대한 생존능력을 높여주고, 커피, 차, 담배 등의 질을 향상시키나(1,2), 과도한 melanin 합성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯을 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 왔다. 식품에서는 채소, 과일, 생선 등의 갈변화 현상으로 품질을 저하시키는 문제점이 있다(3).

Melanin은 생물에 따라 다양한 종류가 알려져 있으며, tyrosinase(EC 1.14.18.1)에 의해 생합성된다. Tyrosinase는 tyrosine을 dihydroxyl-L-phenylalanine(L-DOPA)로, L-DOPA를 dopaquinone으로 변환시키는 작용을 한다(4,5). 현재까지 알려진 tyrosinase 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid 유도체, kojic acid, azelaic acid, corticosteroids, retinoids, arbutin 등이 있으나, 안전성과 경제성 등의 문제점으로 사용에 있어서 어려움이 있다(6,7).

본 연구는 자연 쑥을 이용해 melanin 과잉 생합성의 문제

점인 피부노화 및 갈변화에 관련된 tyrosinase 활성을 저해함으로써 미백제의 개발을 할 수 있을거라 사료되어 사용한 쑥의 건조상태, 추출 용매별 및 유기용매별 분획에 따르는 tyrosinase 활성 저해를 측정하였다.

재료 및 방법

시 약

Tyrosinase 효소 활성을 측정용 mushroom tyrosinase는 Fluka사에서, L-DOPA, 및 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 추출 및 분획에 사용된 ethyl alcohol, n-hexane, chloroform(CHCl₃) 및 ethyl acetate(EtOAc)는 국산 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

재료 및 추출

쑥은 2000년 4월 경주시 석장동 인근 야산에서 채취하여 증류수로 세척한 다음 키친 타올로 물기를 잘 닦아 쑥의 재료로 사용하였으며, 이 쑥을 105℃의 건조기에서 하루 동안 건조시켜 수분을 제거한 다음 건조 쑥의 재료로 사용하였다.

생 쑥과 건조 쑥을 증류수 또는 에탄올을 용매로 사용하여 추출하였다. 열수 추출은 쑥 200 g에 증류수 600 mL을 첨가한 후 121℃에서 3시간 동안 추출하였다. 에탄올 추출은 쑥 200 g에 600 mL의 95% ethanol을 첨가한 다음 80℃에서

*Corresponding Author : Department of Biology, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Tel : +82-54-770-2213, Fax : +82-54-770-2515

E-mail : yhhan@mail.dongguk.ac.kr

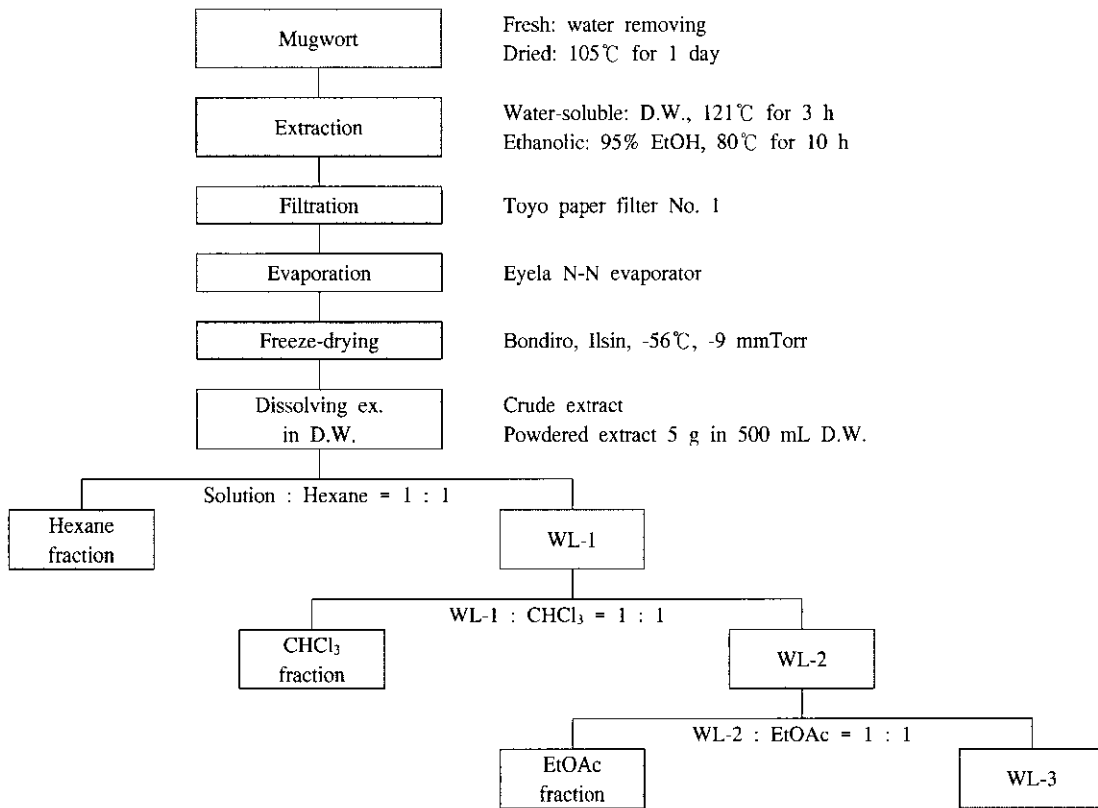


Figure 1. Procedure for extraction and fractionation of mugwort, *Artemisia princeps*. WL-1; 1st water layer extract, WL-2; 2nd water layer extract, WL-3; 3rd water layer extract, EtOAc; Ethyl acetate

10시간 동안 추출하였다. 각 추출물을 여과지(Toyo filter No. 1)로 여과 후 감압농축(Eyela N-N)하여 동결건조(Bondiro, Ilsin)하였다.

씩추출물의 용매분획

용매 분획을 위하여 건조된 5 g의 수용성 및 에탄올 조추출물을 500 mL의 증류수에 녹였다. n-Hexane 500 mL을 가하여 용매 분획한 다음 농축 후 동결건조하였다. 남아있는 수용성 층을 상기와 같은 방법으로 chloroform을 첨가하여 chloroform 분획을 얻었다. 남아 있는 수용성 층에 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 ethyl acetate 분획을 얻었다. 각각의 용매 분획과 남은 수용성층을 농축한 다음 동결건조하였다(Figure 1). 각각의 건조 분획을 농도가 10 mg/mL이 되도록 DMSO에 녹여 tyrosinase 활성을 억제하는 시료로 사용하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 효소 활성의 억제제는 Jung 등(6)의 방법을 변형하여 사용하였다. L-DOPA 용액(0.7 mL) 및 시료 용액(0.2 mL)의 혼합액에 효소액(0.1 mL, 15.7 units/ml)를 첨가하여 30°C에서 1분간 반응시켜 475 nm에서 흡광도(UV-Vis 160A spectrophotometer, Shimadzu)를 측정 후 다음의 식에 의해 tyrosinase 효소 활성 억제율을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

$$\text{Inhibition of tyrosinase activity (\%)} = [1 - (S-B)/C] \times 100$$

S : 효소액 및 시료용액 첨가시 흡광도 변화값

B : 효소액 대신 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0) 첨가시의 흡광도 변화값

C : 시료용액 대신 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0) 첨가시의 흡광도 변화값

결과 및 고찰

경주시 인근 야산에서 채취한 쑥을 열수 추출과 ethanol 추출하여 감압·농축하고 동결건조시켰다. Hexane, chloroform, ethyl acetate의 용매 순서로 분획하여 얻은 용매별 회수율은 Table 1에 보는 바와 같다. 생 쑥의 열수 추출에서 용매 분획별로 회수율에 있어서 큰 차이가 없었으나, 에탄올 추출의 경우 hexane 및 ethyl acetate 분획이 chloroform 분획보다 더 큰 회수율을 나타내었다. 건조 쑥의 열수 추출에서 ethyl acetate 분획의 회수율이 가장 우수하였으나, 에탄올 추출물의 경우 hexane 분획에서 가장 우수한 회수율을 나타내었다. 생 쑥과 건조 쑥의 경우 용매 분획별로 tyrosinase 효소활성의 저해를 측정한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 전반적으로 생 쑥이 건조 쑥에 비하여 조추출물 및 각 용매 분획에서 tyrosinase 활성이 더 많이 저해되었다. 생 쑥의 열수 추출물과 각 용매 분획에서 tyrosinase 효소활성 저해는 크게 차이가 없었으나, 에탄올 추출물의 경우 hexane 및 chloroform

Table 1. Recovery yields of solvent fractions from the extracts of mugwort, *Artemisia princeps*.

Material	Extraction with	Weight (g) of fractions recovered (%)				
		Extract	Fraction			
			Crude	Hexane	CHCl ₃	EtOAc ¹⁾
Fresh mugwort	D.W.	5.0	0.44 (8.8)	0.35 (7.0)	0.28 (5.6)	3.61 (72.2)
	EtOH ²⁾	5.0	0.53 (10.6)	0.19 (3.8)	0.76 (15.2)	2.80 (56.0)
Dried mugwort	D.W.	5.0	0.11 (2.2)	0.06 (1.2)	0.32 (6.4)	4.20 (84.0)
	EtOH	2.0	0.31 (15.5)	0.15 (7.5)	0.10 (5.0)	1.32 (66.0)

¹⁾ EtOAc; ethyl acetate, EtOH; ethyl alcohol

²⁾ WL-3; the water layer extract after ethyl acetate fractionation

Table 2. Inhibition of tyrosinase activity by crude extracts and solvent fractions from mugwort, *Artemisia princeps*.

Material	Extraction with	Inhibition of tyrosinase activity (%)				
		Extract	Fraction			
			Crude ¹⁾	Hexane	CHCl ₃	EtOAc
Fresh mugwort	D.W.	55.8±0.4	55.8±1.6	57.5±1.1	60.2±1.4	71.6±0.5
	EtOH	80.6±1.7	96.7±0.6	98.9±0.4	68.5±1.9	80.6±0.6
Dried mugwort	D.W.	49.4±2.8	35.7±2.5	43.9±1.3	56.9±1.6	44.7±0.6
	EtOH	62.6±6.4	72.9±0.6	37.6±4.1	62.1±0.3	48.0±0.6

¹⁾ 10 mg/mL of fractions was added for measuring the inhibition ratio of mushroom tyrosinase activity.

용매 분획의 tyrosinase 효소활성은 각각 96.7%와 98.9%로 매우 우수하였다.

쑥은 우리나라 전국 지역에 자생하는 다년생 식물로 지혈, 위장병, 구충, 천식, 부인병, 약취제거 등의 식용 및 약용으로 널리 사용되어 왔다. 현재까지 쑥에 관한 연구는 항균력에 관한 보고(8,9)와 암세포 증식을 억제하는 효과와 항돌연변이 활성이 있다는 보고(10,11)가 있으나, tyrosinase의 효소 활성을 억제한다는 보고는 없었다. 쑥이 tyrosinase 효소활성을 억제한다는 본 연구 결과가 사람의 melanin 색소 형성에 관련되는 tyrosinase 효소 활성을 억제할 경우, 미용제(미백제)로의 사용이 가능하리라 판단되어 추후 계속적으로 연구를 수행할 예정이다.

요 약

Melanin 생합성에 관련된 tyrosinase 저해활성을 생 쑥과 건조 쑥 용매 추출물로부터 검색하였다. 쑥은 ethanol, hexane, chloroform, ethyl acetate 용매 및 열수 추출을 하였고, 생 쑥의 ethanol 추출물의 ethyl acetate 분획과 건조 쑥의 ethanol 추출물의 hexane 분획에서 회수율은 각각 15.2%와 15.5%로 가장 높았다. 각 용매 추출물의 tyrosinase 활성 저해율은 건조 쑥 추출물보다 생 쑥 추출물이 더 높았고, 생 쑥의 ethanol 추출물의 chloroform 분획과 hexane 분획에서 각각 98.9%와 96.7%로 큰 저해활성을 가졌다.

감 사

본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며 연구비를 지원하여준 동국대학교에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bell, A. A. and M. H. Weeler (1986), Biosynthesis and function of fungal melanin, *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 411-451.
- Lerner, A. B. and T. B. Fitzpatrick (1950), Biochemistry of melanin formation, *Physiol. Rev.* **30**, 91-126.
- Chen, J. S., C. Wei, and M. R. Marshall (1991), Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.
- Mason, H. S. (1959), Structure of melanins, In *Pigment Cell Biology*, M. Gorden, ed., p.563, Academic Press, New York.
- Pawelek, J. M. and A. M. Komer (1982), The biosynthesis of mammalian melanin, *Am. Sci.* **70**, 136-145.
- Jung, S.-W., N.-K. Lee, S. J. Kim, and D. Han (1995), Screening of tyrosinase inhibitor from plants, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 891-896.
- Tomita, K., N. Oda, M. Kamel, T. Miyaki, and T. Oki. (1990), A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*, *J. Antibiotics.*

- 12, 1601-1605.
8. Kim, Y.-S., M.-N. Kim, J.-O. Kim, and J.-H. Lee (1994), The effect of hot water-extract and flavor compounds of mugwort on microbial growth, *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**, 994-1000.
 9. Park, S. K. and J. C. Park (1994), Antimicrobial activity of extracts and coumaric acid isolated from *Artemisia princeps* var. *orientalis*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 506-511.
 10. Hwang, Y. K., D. C. Kim, W. I. Hwang, and Y. B. Han. (1998), Inhibitory effect of *Artemisia princeps* Pampan extract on growth of cancer cell lines, *Kor. J. Nutr.* **31**, 799-808.
 11. Lee, S. D., J. Kwon, J. Y. Yoo, and D. H. Chung (1996), Effect of mugwort extract on the *in vitro* mutagenicity, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 105-110.