

고구마에 존재하는 mushroom tyrosinase 저해제의 특성

이현주 · 이민경 · 박인식*

동아대학교 식품과학부

Received January 26, 2006 / Accepted April 20, 2006

Characterization of Mushroom Tyrosinase Inhibitor in Sweet Potato. Hyun Ju Lee, Min-Kyung Lee and Inshik Park*. Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Busan 604-714, Korea – Crude extract prepared from sweet potato possessed inhibitory activity toward mushroom tyrosinase. The inhibitory activity was dependent upon the addition amount of sweet potato extract. After heating the sweet potato extract at 95°C for 20 min, its inhibitory activity retained 37.3%. Its optimum activity was shown at pH ranges of 5.0-7.0. The tyrosinase inhibitory activity was disappeared by dialysis, which suggests the inhibitory activity of sweet potato extract is caused by some compounds of low molecular weight.

Key words – Tyrosinase, inhibitor, sweet potato extract

서 론

Melanin은 동·식물과 미생물계에 널리 존재하는 고분자의 천연 색소로 생물체에 따라 다양한 종류가 알려져 있으며, 페놀류의 효소적, 비효소적 산화 및 중합반응 등의 단계 과정을 거쳐 생성된다[1]. 피부에 존재하는 흑색색소인 melanin은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인물질로 알려져 있으며, 표피세포의 melanocyte에서 tyrosinase를 key enzyme으로 하여 tyrosine으로부터 생합성되어 피부의 국소에 melanin이 과다하게 침착되어 발생하는 주근깨, 검버섯 등의 원인이 된다[2]. 즉, 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)라는 세포에서 효소 및 비효소적 산화반응에 의해 tyrosinase로부터 생성되며 표피를 구성하고 있는 각질세포로 전이되는 것이다[3]. 멜라닌 색소의 생합성 과정에 관여하는 tyrosinase (monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine: oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 넓은 범위의 페놀 화합물을 기질로 이용하는 구리 함유 효소이고, 생체 내에서의 melanin 합성과정은 먼저 tyrosine을 기질로 하여 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)을 생성시키고 이를 다시 dopaquinone으로 전이시키는 연속된 효소의 산화(hydroxylation and oxidation)가 진행된 후 각 생성물의 중합반응 등에 의해 이루어진다(Mason-Raper pathway)[1,4,5].

현재 티로시나아제 저해제(tyrosinase inhibitor)가 미백에 관련된 화장품이나 의약품 생산의 증가에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[6]. 지금까지 알려진 티로시나아제 저해제로는 아스코르브산(ascorbic acid), 알부틴(arbutin), benzoic

acid, azelaic acid 등으로 그 중에서도 특히, arbutin은 미백 상용제로 널리 쓰이고 있다. 그러나 피부 안전성, 제형 안정성 그리고 경제성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다. 최근에는 여러 가지 안전성을 고려하여 감초[7], 치자[8], 쑥[9], 솔잎[10], 울피[11] 등 천연물로부터 tyrosinase 효소활성 저해제 개발에 대한 연구가 활성화되고 있으며, 그 중 일부는 제품으로 상용화 되어있다[7,8].

고구마는(*Ipomoea batatas* var. *edulis*)는 메꽃과의 여러해살이풀로 감저(甘藷), 조저(趙蕷)라고도 하며, 열대 및 아열대 지방에서 재배되는 작물을 재배가 용이하고 단위면적당 수확량이 많다. 식품업계나 농업계의 보고에 따르면 전 세계에서 6번째로 중요한 식용작물이다[12]. 고구마의 주요 기능성은 비타민 A의 항암작용, 비타민 E의 항산화작용, 식이섬유와 알라핀의 변비해소, 칼륨의 혈압강하, 칼슘의 출혈방지, 식물 프로게스테론의 여성 골다공증 예방치료 및 안토시아닌 색소의 간 보호기능 등이 있다[13-14].

본 연구에서는 여러 가지 천연물을 대상으로 미백물질로 적합한 물질들을 조사하던 중 고구마(품종: 생미)에 mushroom tyrosinase의 저해활성이 존재함을 확인하여 그 특성에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 고구마(*Ipomoea batatas* var. *edulis*) 품종 “생미”는 울산광역시에서 재배·수확한 것을 사용하였고, tyrosinase 추출용 국내산 양송이버섯은 부산광역시에서 구입하였으며, L-tyrosine 과 투석막 (Cellulose membrane; molecular weight cutoff: 12,000)은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7322, Fax : +82-51-200-7535
E-mail : ispark@donga.ac.kr

Mushroom tyrosinase의 조제

양송이버섯(100 g)을 수돗물에 깨끗이 씻은 후 잘게 썰고, 100 ml 50 mM phosphate buffer (pH 6.6)를 첨가하여 믹서기로 5분간 마쇄하고 cheesecloth로 여과한 후 4°C의 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 그 상등액을 모아 5.0 ml씩 나눈 것을 냉장 보관하여 사용하였다.

고구마 추출액의 조제

고구마 품종 "생미" 100 g을 껌질을 벗기지 않은 상태에서 깨끗이 씻어 잘게 썰고, 동량의 50 mM phosphate buffer (pH 6.6)을 첨가하여 믹서기로 5분간 마쇄하고 cheesecloth로 여과한 후 4°C의 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 그 상등액을 사용하였다.

Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase의 활성 측정은 L-tyrosine을 기질로 하여 흡광도(Ultraspec 3000, Parmacia Biotech, England)를 측정하였다. 측정 방법은 우선 0.03%의 L-tyrosine, 1.0 ml에 50 mM phosphate buffer (pH 6.6), 0.9 ml를 넣고 1.0 ml의 저해제와 0.1 ml의 효소액(mushroom tyrosinase)을 첨가한 후 37°C의 교반항온수조(Stirrer Water Bath, N-Biotech, Korea)에서 반응시킨 후 흡광도 475 nm에서 시간에 따른 효소 활성을 측정하였다.

Tyrosinase 저해제 검색

다양한 식물성 식품을 1.0 ml씩 첨가하여 37°C 교반항온수조에서 20분간 반응시킨 후 대조군에 비하여 mushroom tyrosinase에 대한 저해 효과를 백분율(%)로 나타내었다. 대조군은 저해제를 첨가하지 않고 증류수 1.0 ml를 첨가하여 측정하였으며, 대조군의 효소 활성을 100.0으로 환산하여 식물성 식품의 tyrosinase 저해 효과를 백분율(%)로 나타내었다.

저해제의 열안정성

고구마 추출물을 40°C에서 95°C까지 가열기(Thermomixer 5436, Eppendorf, Germany)로 20분간 가열한 후 잔존하는 저해활성을 측정하였다. 열에 대한 안정성은 열처리전과 20분간 열처리 후의 저해활성을 비교하였다.

저해제의 pH 안정성

고구마 추출물의 pH에 대한 안정성을 검토하기 위하여 추출액을 다양한 pH(pH 2.0-10.0)에서 20분간 처리한 후 잔존하는 고구마 추출액의 mushroom tyrosinase에 대한 저해정도를 확인하였다. 저해제의 pH에 대한 안정성은 다양한 pH에 처리 전 대조군의 활성을 100.0으로 환산하여 백분율(%)로 나타낸 것이다.

고구마 추출물의 투석

Cellulose 삼투막 (molecular weight cut-off value: 12,000)에 고구마 추출물 10.0 ml을 넣고, 2.0 L의 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.8)에서 1시간 동안 투석한 후, 다시 새로운 2.0 L의 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.8)에 24시간 동안 투석하였다. 투석 후 수집한 고구마 추출액의 mushroom tyrosinase에 대한 저해활성을 tyrosinase 활성 측정법과 동일하게 수행하였다.

결과 및 고찰

고구마 추출물의 농도에 따른 tyrosinase 저해도

고구마(품종: 생미)에 존재하는 tyrosinase의 저해도를 확인하기 위하여 고구마를 추출한 후 mushroom tyrosinase에 대한 저해 실험을 실시하였다. Fig. 1은 고구마 추출물의 농도를 증가시켜 tyrosinase에 대한 저해도를 조사한 결과이다. 고구마 추출액을 0.6 ml 이상 첨가할 경우에 mushroom tyrosinase의 활성이 10분간 저해되었다. 그리고 첨가한 고구마 추출물의 농도를 증가시킬수록 mushroom tyrosinase에 대한 저해도가 높아졌다. 대조군의 반응 전과 반응 후의 흡광도 수치를 100.0으로 환산하여 백분율(%)로 나타낸 결과 고구마 껌질 추출액의 mushroom tyrosinase 활성도는 반응 후 63.3%였고, 껌질을 제거한 가식부의 mushroom tyrosinase 활성도는 49.3%였다. 그러나 고구마 전체 시료에 대한 mushroom tyrosinase의 활성이 20.8%로 고구마의 전체 시료에서 가장 강한 효소의 저해활성을 나타내었다. 고구마

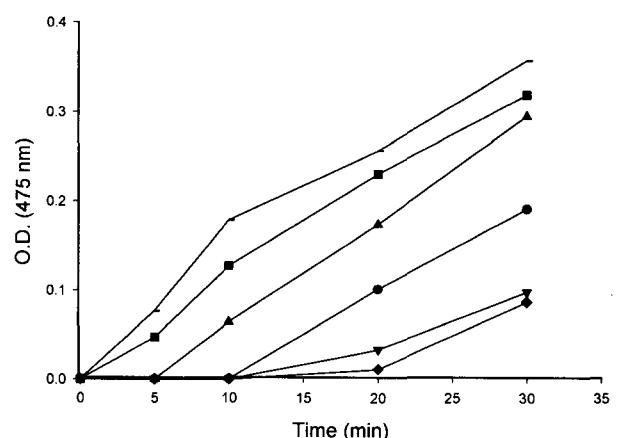


Fig. 1. The effect of sweet potato extract on inhibition of mushroom tyrosinase.

Control; (-), addition of sweet potato extract 0.2 ml; (-■-), 0.4 ml; (-▲-), 0.6 ml; (-●-), 0.8 ml; (-▼-), 1.0 ml; (-◆-)

전체 추출액을 시료로 사용할 경우 고구마에 존재하는 polyphenol oxidase가 고구마껍질에 존재하는 polyphenol을 산화시켜 생성된 갈변물질에 의하여 추가적으로 mushroom tyrosinase를 저해하기 때문으로 추정된다.

고구마 추출물의 열 안정성

Fig. 2는 고구마 추출물에 존재하는 tyrosinase 저해제의 열 안정성에 대한 조사 결과이다. 고구마 추출액을 40°C 이상 다양한 온도에서 20분간 보관 후 잔존하는 tyrosinase 저해활성이 40°C에서 69.3%, 50°C에서 63.9%, 그리고 60°C와 70°C에서 각각 55.9%, 54.6% 잔존하였고, 95°C에서 조차 37.2%의 활성이 잔존하여 고구마 추출물에 존재하는 mushroom tyrosinase 저해활성은 열에 비교적 안정한 물질로 추정된다.

고구마 추출물의 pH에 대한 안정도

Fig. 3은 고구마 추출물에 존재하는 mushroom tyrosinase의 pH 안정도를 조사한 결과이다. 고구마 추출액을 다양한 pH에서 20분간 처리한 후, pH 2.0에서 21.8%, pH 3.0에서는 30.7%, pH 4.0에서 37.6%의 tyrosinase 저해 활성이 잔존하였다. pH 5.0-pH 7.0 사이에는 고구마 추출물의 tyrosinase에 대한 상대 활성도가 pH 5.0일 때 87.4%, pH 6.0일 때 92.9% 그리고 pH 7.0일 때 89.0%로 pH 5.0-pH 7.0 사이에 가장 안정하였다.

고구마 추출물의 투석 후 결과

Fig. 4는 고구마 추출물을 분자량의 cut-off 값이 12,000인 투석막에서 투석한 후 tyrosinase에 대한 저해도를 조사한 결과이다. Mushroom tyrosinase의 활성도는 투석전의 고구마 추출액의 존재 하에서는 14.3%였으나, 투석 후 고구마 추출액을 첨가한 경우에는 94.1%로 투석 후 고구마 추출물의

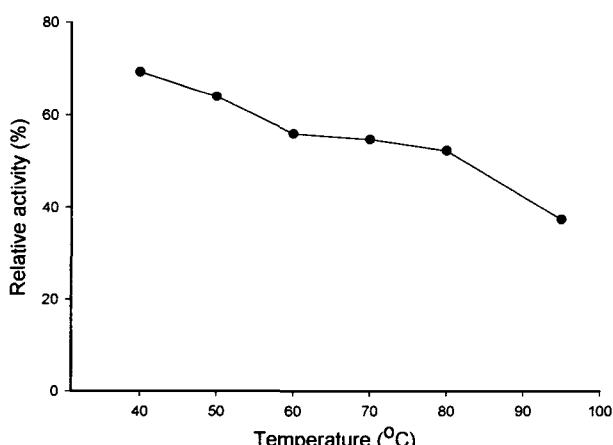


Fig. 2. The heat stability of tyrosinase inhibitor in sweet potato extract. The sweet potato extract was heated for 20 min at various temperature.

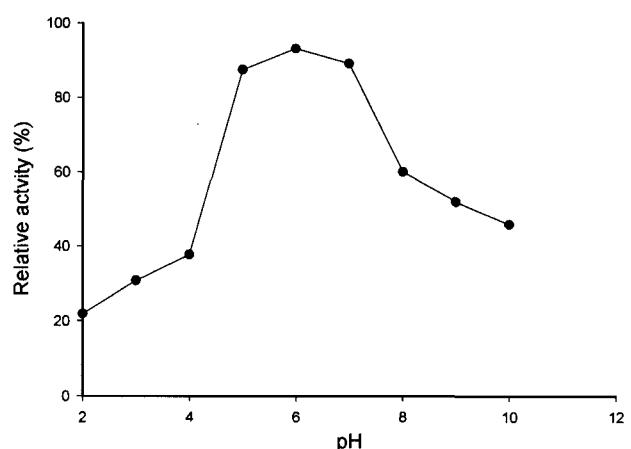


Fig. 3. The pH stability of tyrosinase inhibitor in sweet potato extract.

The sweet potato extract was incubated at various pH values for 20 min at 20°C, and the residual tyrosinase inhibitory activity was measured. The buffers used to adjust pH were as follow; pH 2.0-3.5 (glycine); pH 4.0-5.5 (acetate); pH 6.0-7.0 (phosphate); pH 7.5-8.5 (Tris-HCl); pH 9.0-10.0 (glycine).

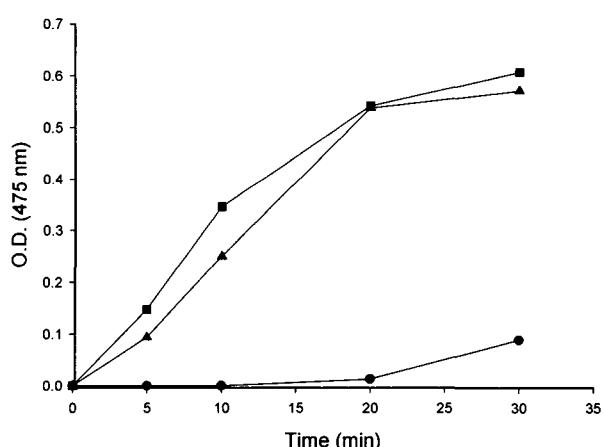


Fig. 4. The inhibitory effect of dialyzed sweet potato extract on mushroom tyrosinase.

The sweet potato extract (10 ml) was dialyzed with a cellulose membrane (molecular weight cut-off: 12,000) for 24 hours. Control; (-■-), after dialysis; (-▲-), before dialysis; (-●-)

저해 활성이 유의적으로 감소하였다. 따라서 고구마 추출액에 존재하는 tyrosinase 저해제는 저분자 물질로 사료된다.

요약

고구마(품종: 생미)추출액에 tyrosinase의 활성을 저해하는 저해 물질이 존재함을 확인하였으며, 고구마 추출물의 첨가 농도를 증가시킬수록 tyrosinase 활성의 저해도가 증가하였

다. 그리고 고구마 추출물에 존재하는 tyrosinase 저해제는 95°C에서 20분간 열처리에 의하여 37.3%의 활성이 잔존하여 열에 비교적 안정하였으며, pH 5.0-7.0에서 가장 안정하였다. 그리고 고구마 추출물은 투석에 의하여 tyrosinase에 대한 저해활성이 유의적으로 감소하였으며, 따라서 고구마 추출물에 존재하는 tyrosinase의 저해활성은 저분자 물질로 추정된다.

참 고 문 헌

- Jung, S. W., N. K. Lee, S. J. Kim, and D. S. Han. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Tech.* **27**, 891-896.
- Kim, J. A., Y. Choi, A. R. Son, S. H. Park, G. H. Xu, J. G. Lee, I. S. Oh, J. J. Kim, H. W. Chang, S. R. Chung, T. S. Jang, S. H. Lee. 2004. Inhibitory effect of some natural polyphenols isolated from Euphorbiaceae plants on melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**, 157-163.
- Choi, S. S., H. S. Noh, S. H. Cho, K. H. Kong. 2001. Screening of inhibitors against tyrosinase activity from natural products. *Yakhak Hoeji* **45**, 522-528.
- Kim, S. J., M. Y. Heo, K. H. Son, H. P. Kim. 2003. Tyrosinase inhibitory activity of 80 plants extract(II). *J. Applied Pharmacol.* **11**, 5-7.
- Park, K. C., H. K. Kim. 1995. Sequence analysis of the human tyrosinase gene in Korean. *Ann. Dermatol.* **7**, 34-38.
- Kang, H. S., H. R. Kim, D. S. Byun, H. J. Park, J. S. Choi. 2004. Rosmarinic acid as a tyrosinase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Natural Product Sciences* **10**, 80-84.
- Lee, J. S., J. A. Kim, S. H. Cho, A. R. Son, T. S. Jang, M. S. So, S. R. Chung, S. H. Lee. 2003. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra L.* *Kor. J. Pharmacogn.* **34**, 33-39.
- Kwak, J. H., Y. H. Kim, H. R. Chang, C. W. Park, Y. H. Han. 2004. Inhibitory effect of Gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 437-440.
- Kwak, J. H., U. K. Seo, Y. H. Han. 2001. Inhibitory effect of Mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 220-223.
- Sung, K. C., K. J. Kim. 2005. Tyrosinase activated inhibition effect & analysis of Pine-Needles extract. *J. Kor. Oil. Chem. Soc.* **22**, 71-76.
- Yang, M. J., J. S. Lim, H. S. Ahn, M. A. Kim, R. M. Ahn. 1999. Inhibitory effect of Chestnut Bark extracts on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Kor. J. Env. Health Soc.* **25**: 37-43.
- Huang, Y. C., Y. H. Chang, Y. Y. Shao. 2005. Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chem.* (In press)
- Jeong, B. C., Y. S. Ahn, M. N. Chung, J. S. Lee, Y. H. Oh. 2002. Current status and prospect of quality evaluation in sweetpotato. *Korean J. Crop. Sci.* **47**, 124-134.
- Han, J. S., 2004. Preparation of mixed beverages for breakfast made primarily with the hydrolysate of sweet potato and its quality characteristics. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* **20**, 271-278.