

## 뽕잎 추출물을 이용한 동충하초(*Paecilomyces japonica*) 균사체 배양액의 멜라닌 합성 억제 효과

박상상 · 류영배<sup>1</sup> · 이영훈 · 조용운 · 조수정 · 최영주<sup>2</sup> · 박기훈<sup>1</sup> · 갈상완\*

진주산업대학교 미생물공학과, <sup>1</sup>경상대학교 응용생명과학부, <sup>2</sup>신라대학교 식품영양학과

Received April 18, 2007 / Accepted May 17, 2007

**Inhibition of Melanin Synthesis by Mycelial Culture Broth of *Paecilomyces japonica* in the Mulberry Leaf Extract.** Sang Sang Park, Young Bae Ryu<sup>1</sup>, Young Hoon Lee, Yong Un Cho, Soo Jeong Cho, Young Ju Choi<sup>2</sup>, Ki Hoon Park<sup>1</sup> and Sang Wan Gal<sup>1\*</sup>. Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, <sup>1</sup>Department of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Department of Food and Nutrition, <sup>2</sup>Silla University Busan 617-736, Korea. – This study was carried out to investigate the whitening effect of mycelial culture broth of *P. japonica* in the mulberry leaf extract. The culture broth inhibited melanin synthesis *in vitro* in the concentration dependent manner of 10 to 50%. The mulberry leaf extract itself has a cytotoxicity to the mouse melanoma cell, B16BL6 with the value of IC<sub>50</sub> of 7% concentration. But the culture broth of *P. japonica* in the mulberry leaf extract did not show any cytotoxicity up to 50%. Therefore, we concluded the mycelial culture broth of *P. japonica* in the extract of mulberry leaf can be used as a whitening cosmetic resource.

**Key words** – *Paecilomyces japonica*, Mulberry leaf, Melanin, Tyrosinase inhibitor, B16BL6

### 서 론

멜라닌(melanin)은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질 복합체이다. 우리 주변에서 멜라닌 합성은 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기 중에 노출되었을 때 발생하는 갈변이나 동물의 외피, 깃털, 피부, 머리, 눈 등에서 관찰된다. 멜라닌의 기능은 미생물에서 자외선 조사, 전파, 건조, 극한온도 등에 대한 생존능력을 높여주며, 동물에서는 피부나 머리의 멜라닌은 자기보호를 위한 방어 기능을 한다. 또한 무척추동물이나 곰팡이에 존재하는 멜라닌은 미생물에 대한 면역체계의 역할을 수행하며, 그 밖에 커피, 차, 담배 등의 질 향상에 크게 기여한다[3]. 그러나 사람의 기미와 주근깨 등 피부에 생기는 색소침착은 표피 내에서 멜라닌색소의 이상적 생성에 기인하며, 멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte라고 불리는 색소세포 내의 melanosome에서 생합성 된다. 멜라닌의 주된 생성 과정은 아미노산의 일종인 tyrosine이 멜라닌 생성 주 효소인 tyrosinase에 의해 산화되어 DOPA (Dioxyphenylalanin), dopaquinone이 되고, 이것이 다시 5, 6-dihydroxy indole, indol 5, 6-quinone으로 자동 산화되어 최종적인 중합반응에 의해 멜라닌 중합체를 생성하는 것으로 알려져 있다[8,18].

뽕잎은 2,200 여 년 전부터 우리민족이 식용이나 약용으로 섭취하여 왔으며, 세계최초의 의약서인 신중본초경에 뽕잎과 뽕나무 뿌리껍질인 상백피가 약리작용이 뛰어나다고 기록되어 있어서 뽕나무와 뽕잎을 섭취한 역사는 매우 오래된 것을

알 수 있다. 동의보감에 뽕잎은 각기와 수종을 없애주고, 대장과 소장을 이롭게 하며 통풍을 없애는 기능이 있다고 하였으며, 50 여종의 각종 무기성분이 함유되어 있음이 분석되었다[9]. 특히 칼슘, 칼륨과 철 함량이 매우 높고, 아미노산은 메치오닌 등 21종이 함유되어 있고 또한 kuwanon 등 유기성분을 60종 이상 함유하고 있음이 분석되었다[14,15]. 이들 유기성분은 뽕잎과 상백피에서 처음으로 확인된 것이 상당수에 이르고 이름은 있어도 아직 그에 대한 기능성은 밝혀지지 않은 성분이 많다. 뽕잎을 소재로 한 연구들은 현재 항 당뇨효과[1,10,13]와 항 고지혈증[4,11,12,17] 등에 집중되고 있는 실정이며 화장품소재로서의 이용에 관한 연구는 전무하다.

동충하초는 주로 살아있는 곤충의 몸에 침입하여 죽게 한 다음, 그 기주의 양분을 이용하여 자실체를 형성하는 곤충 기생균의 일종으로, 곤충이나 절지동물, 균류 또는 고등 식물의 종자에 기생하는 모든 균류를 총칭한다. 전 세계적으로 약 100 속 750 여종이 분포되어 있으며, 그 중 대표적인 동충하초 속으로는 완전세대의 유성생식 기관으로 자낭균류(Ascomycetes)의 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하는 *Cordyceps* 속과 불완전균류의 *Paecilomyces* 속, *Torrubiella* 속 및 *Podonectria* 속 등이며 자실체를 형성하는 대표적인 *Cordyceps* 속은 전 세계적으로 300 여종이 분포되어 있는 것으로 알려져 있다[2].

누에 동충하초(*Paecilomyces japonica*) 품종은 국내에서 고유하게 개발된 품종으로 통상 “눈꽃 동충하초”라고 하며, 일부 생리활성이 나타날 가능성이 높다고 국내 연구진에 의하여 제시되고 있다[7,19].

따라서 본 연구에서는 뽕잎추출물에 눈꽃 동충하초 균사체를 배양한 배양물을 멜라닌 생성 세포(B16BL6 mouse

\*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3393, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sangal@jinju.ac.kr

melanoma cell)에 처리함으로써 뽕잎 자체의 독성제거 효과와 멜라닌 생합성의 억제 기작을 확인하여 피부미백용 화장품 조성물로서의 이용가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 버섯 균사체는 경남농업기술원으로부터 분양받은 눈꽃 동충하초(*Paecilomyces japonica*) 균사체를 사용하였으며, 뽕잎은 경남 함양군 안의면 일대의 야산에서 서식하는 야생 뽕잎을 채취하여 사용하였다. 세포주인 B16BL6 mouse melanoma cell (No. 80006)은 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였으며, 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)은 Gibco 사의 것을, 배양용 배지(Minimum Essential Medium, MEM)는 Sigma 사의 것을 사용하였다.

UV-Vis spectrophotometer는 Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotec, Swiss)을 사용하였고, melanin 생합성 측정에는 ELISA reader (Synergy<sup>TM</sup> HT, Bio-tek, USA)를 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도로 측정하였다. 기타 활성 측정 및 분석에 사용된 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 배양액 제조

뽕잎 추출물에 동충하초 균사체 배양을 위하여, potato dextrose agar (PDA, Difco, USA) 배지에서 7일간 25°C에서 정지 배양한 눈꽃 동충하초 균사체를 사용하였다. 뽕잎 추출액은 천연재료인 야생뽕잎을 흐르는 물에 3번 수세한 후, 다시 증류수에 최종 수세하여 착즙기(3-8-3626, Green power, Korea)로 추출하였다. 이 추출물을 멸균증류수와 1:1 (v/v)로 혼합하고, 약 0.5 cm 크기의 정사면체 감자 조각을 2%로 첨가하여 동충하초 균사체 액체 배양용 배지를 제조하였다. 그 후 전 배양한 동충하초 균사체 1/2 plate를 1 L 액체배지에 접종하여 25°C, 120 rpm의 조건으로 15일간 진탕 배양하였다. 배양이 완료된 동충하초 균사체 배양액을 회수하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 0.2 µm syringe filter (Sartorius, Germany)로 여과하여 4°C에 보관하며 각종 활성실험에 사용하였다.

### 세포 배양 및 수확

B16BL6 mouse melanoma cell (No. 80006)은 CO<sub>2</sub> 세포배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% fetal bovine serum (Gibco, Co.)이 포함된 MEM 배지를 사용하여 배양하였다. 여기에 penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U.-100 µg/ml를 첨가하였으며, 약 24시간 주기로 MEM 배지를 교체하였다. 세포 수확에 있어서는 trypsin-EDTA (Gibco, Co.)를 cell이 부착되어 있는 dish에 5분간 처리한 후 trypsin-EDTA를 완전히 제거하고, MEM 배지를 이용하여

수확하는 방법을 사용하였다[20].

### In vitro tyrosinase 활성억제

뽕잎추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액의 tyrosinase 활성 억제율을 측정하기 위하여, 96 well plate (SPL, Korea)에 10 mM L-tyrosine 25 µl를 첨가한 후, 뽕잎추출물과 뽕잎추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액을 각각 0, 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50%씩 각각 첨가하여, mushroom tyrosinase (2,500 unit, Sigma Chemical Co., USA) 3 µl를 넣고 50 mM 인산완충용액으로 최종 200 µl가 되게 조절하여 반응시켰다. 그 후 30°C에서 30분 동안 1분 간격으로 ELISA reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 활성억제율을 다음의 식에서 구할 수 있었다.

\* tyrosinase 활성억제율(IC rate %)

$$= 100 - [\text{시료용액의 반응 후 흡광도} / \text{대조군(시료무첨가)}] \times 100$$

IC rate은 inhibition concentration rate의 약어이다.

### 세포독성측정

뽕잎추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액의 세포 생존에 미치는 영향을 측정하기 위하여, crystal violet assay법[5]을 응용하여 사용하였다. MEM 배지를 사용하여 6 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml을 각각 5 ml씩 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 배양 후에는 1% FBS가 첨가된 MEM 배지로 교환하였다. 뽕잎 추출물과 동충하초 균사체 배양액을 0, 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50% 농도로 각각 처리하여 24시간동안 배양한 후, 배양 상등액을 제거하였다. 그 후 PBS buffer (pH 7.2)로 세척하여 0.1% crystal violet (in 10% ethanol)용액으로 5분 동안 상온에서 염색하였다. 염색 되지 않은 crystal violet을 완전히 제거하기 위하여 PBS buffer (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 염색된 세포로부터 crystal violet의 추출은 95% ethanol을 1시간 동안 상온에서 처리하였으며, 추출액을 540 nm 파장에서 측정된 흡광도를 통하여 세포의 생존율을 비교하였다.

### 멜라닌 생합성 억제

뽕잎추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액의 멜라닌 생합성 억제 효능을 평가하기 위하여 B16BL6 mouse melanoma cell ( $5 \times 10^4$  cells/ml)을 6 well plate에 각각 5 ml씩 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후 1% FBS가 첨가된 MEM 배지로 교환한 후, 뽕잎추출물과 뽕잎추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액을 각각 0, 1, 3, 5, 7, 10, 20%의 농도로 처리하였다. 시료처리 4일 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확한 후, 원심분리하여 cell pellet의 색을 육안으로 판정하였다. 그 후 1 N NaOH 용액 0.5 ml을 넣고 세포를 100°C, 2시간 처리하여 세포 내 멜라닌을 녹인 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하여[6], 배양액을 처리하지 않은

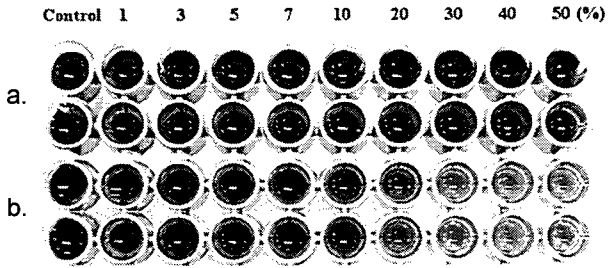


Fig. 1. Photograph of *in vitro* tyrosinase inhibition activity according to mycelial culture broth of *P. japonica* in the mulberry leaf extract. a : mulberry leaf extract. b : mycelial culture broth of *P. japonica* in the mulberry leaf extract.

세포의 멜라닌 양과 비교하여 배양액이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보았다.

### 결과 및 고찰

#### Tyrosinase 활성억제

뽕잎 추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액의 tyrosinase 활성 억제를 조사한 결과 시료의 처리 농도가 높아 질수록 멜라닌 생성 억제율이 증가하는 것을 관찰하였다.

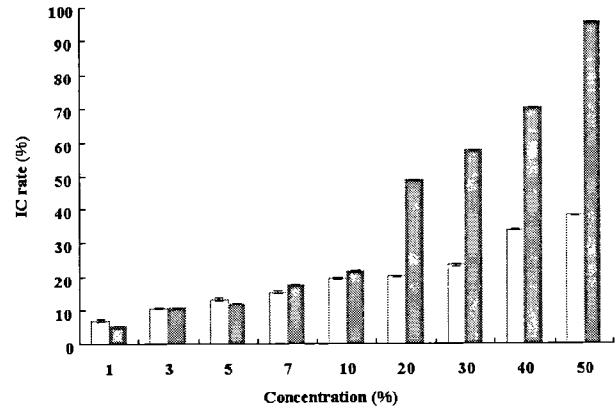


Fig. 2. *In vitro* tyrosinase inhibition activity according to mycelial culture broth of *P. japonica* in the mulberry leaf extract. Each bar is the mean values  $\pm$  standard error ( $P < 0.05$ ) □ : mulberry leaf extract, ■ : mycelial culture broth of *P. japonica* in the mulberry leaf extract.

Fig. 1, 2에서 보는 바와 같이 배양액을 20% 첨가 시 50%의 멜라닌생성관련 효소의 활성 억제효과를 보였으며, 최종 50% 농도에서는 tyrosinase 활성을 100% 억제시키는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 뽕잎 추출물만으로는 20% 첨가 시 거의 억제율을 보이지 않았으며, 최종 50% 농도에서도 20%의 억

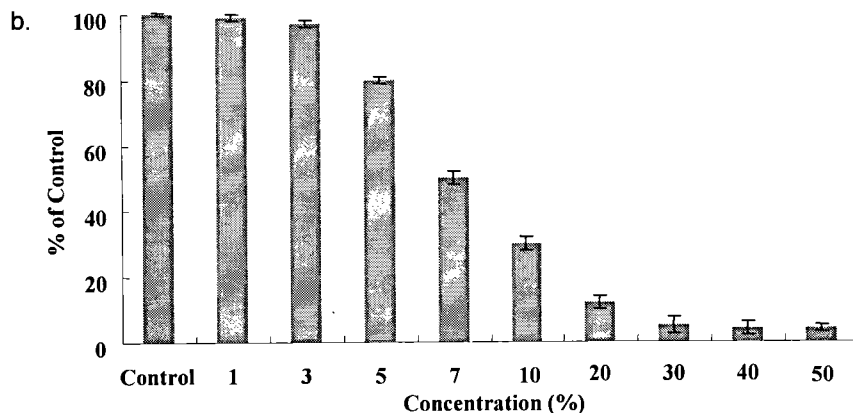
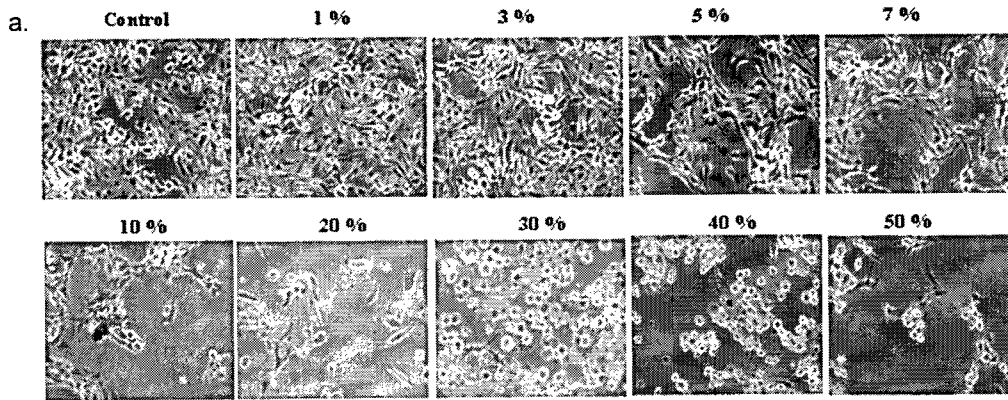


Fig. 3. Effect of mulberry leaf extract on the cytotoxicity. Each bar is the mean values  $\pm$  standard error ( $P < 0.05$ ) a : microscopic views of B16BL6 mouse melanoma cells, b : graphs of cell viability

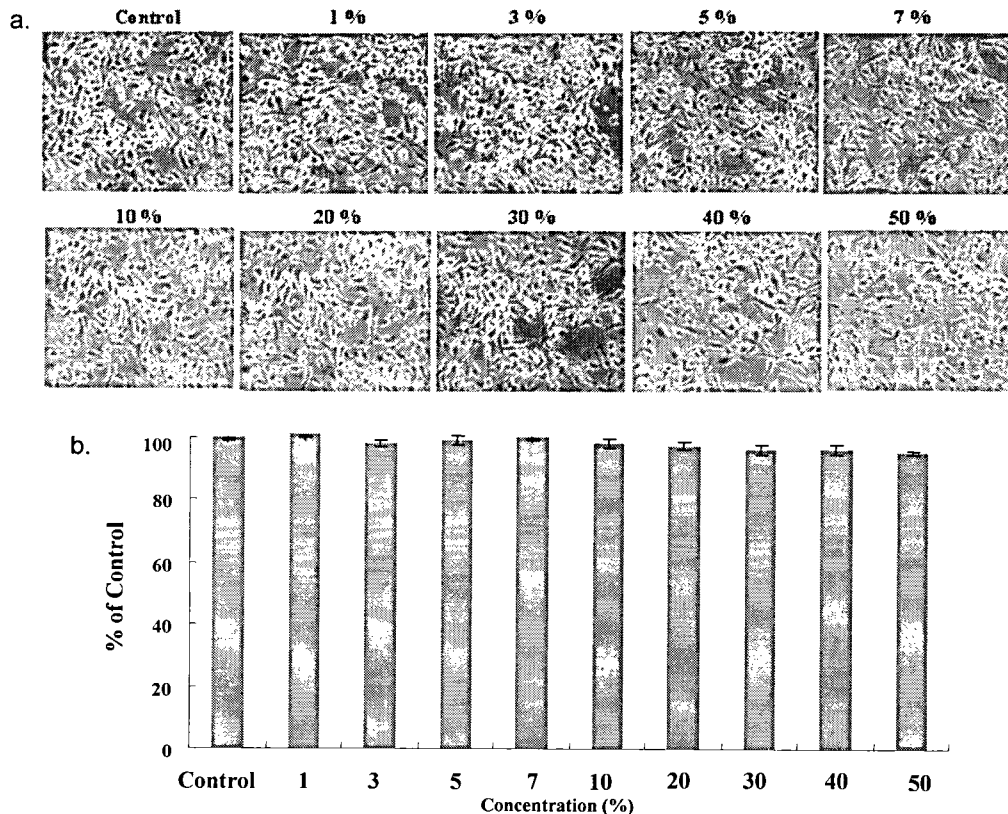


Fig. 4. Effect of mycelial culture broth of *P. japonica* in the mulberry leaf extract on cytotoxicity. Each bar is the mean values  $\pm$  standard error ( $P < 0.05$ ). a : microscopic views of B16BL6 mouse melanoma cells, b : graphs of cell viability.

제율을 관찰하였다. 이러한 결과는 빙잎 자체에서도 어느 정도의 멜라닌 합성 억제제를 보이지만 동충하초 균사체를 배양함으로써, 합성 억제율이 크게 증가함을 관찰할 수 있었다.

#### 세포독성 측정

빙잎 추출물과 빙잎추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액이 멜라닌 생성세포에 대한 세포독성을 조사한 결과를 Fig. 3과 4에서와 같이 나타내었다. 그 결과 빙잎 추출물 7% 처리 시 50%의 세포가 사멸하는 것을 보였으며, 20% 이상 처리 시에는 세포가 모두 사멸됨을 확인하였다. 그러나 빙잎 추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액은 50% 처리 시까지 세포독성이 전혀 나타나지 않는 것을 관찰하였다(Fig. 4). 이 결과에서 볼 때 빙잎 추출물 자체의 세포독성을 동충하초 균사체가 배양됨에 따라 점진적으로 제거되어 배양 최종일에는 완전히 제거 되었을 것으로 판단된다. 그리고 세포에 대한 독성이 없는 것으로 보아 차후 화장품소재로 이용하였을 때, 피부에 자극적인 부작용이 없을 것으로 사료되며, 동충하초 균사체 배양액의 피부자극실험은 이 등[16]이 앞서 보고 한 바 있어 화장품 소재로서의 부작용은 없을 것으로 판단된다.

#### 멜라닌 생성 억제

빙잎 추출액과 빙잎추출물을 이용한 동충하초 균사체 배

양액의 멜라닌 생합성 억제율을 B16BL6 mouse melanoma cell을 이용한 결과 Fig. 5A에서와 같이 빙잎 추출물은 10% 이상 처리 시에 멜라닌 생합성의 억제가 관찰되었다. 또한 빙잎 추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액의 경우 Fig. 5B와 같이 3% 처리부터 육안으로 세포의 멜라닌 생합성이 억제됨을 관찰하였고, 더욱더 정확한 억제율을 확인하기 위하여 흡광도를 측정한 결과 10% 처리에서 60%, 20%에는 80%의 멜라닌 생합성이 억제됨을 확인 할 수 있었다. 이 결과에서 볼 때 빙잎 추출물 자체의 멜라닌 합성 억제 활성은 아주 약하며, 이러한 효과 역시 앞의 자료 (Fig. 3)에서 보여 주었듯이 세포독성으로 세포가 생육하지 못한 결과로 측정된다. 따라서 동충하초 균사체가 빙잎 추출물을 기질로 하여 대사 하는 과정에서 미백활성은 점진적으로 증가 시키는 반면 독성은 감소시킨 것으로 판단된다.

#### 요 약

본 연구는 빙잎 추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액의 *in vivo*, *in vitro* 멜라닌 생성 억제 효과를 조사한 것이다. 빙잎 추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액은 10~50%의 농도 의존적으로 시험관 내에서 멜라닌 합성관련 효소활성의 저해를 나타냈다. 빙잎 추출물 자체는 mouse melanoma

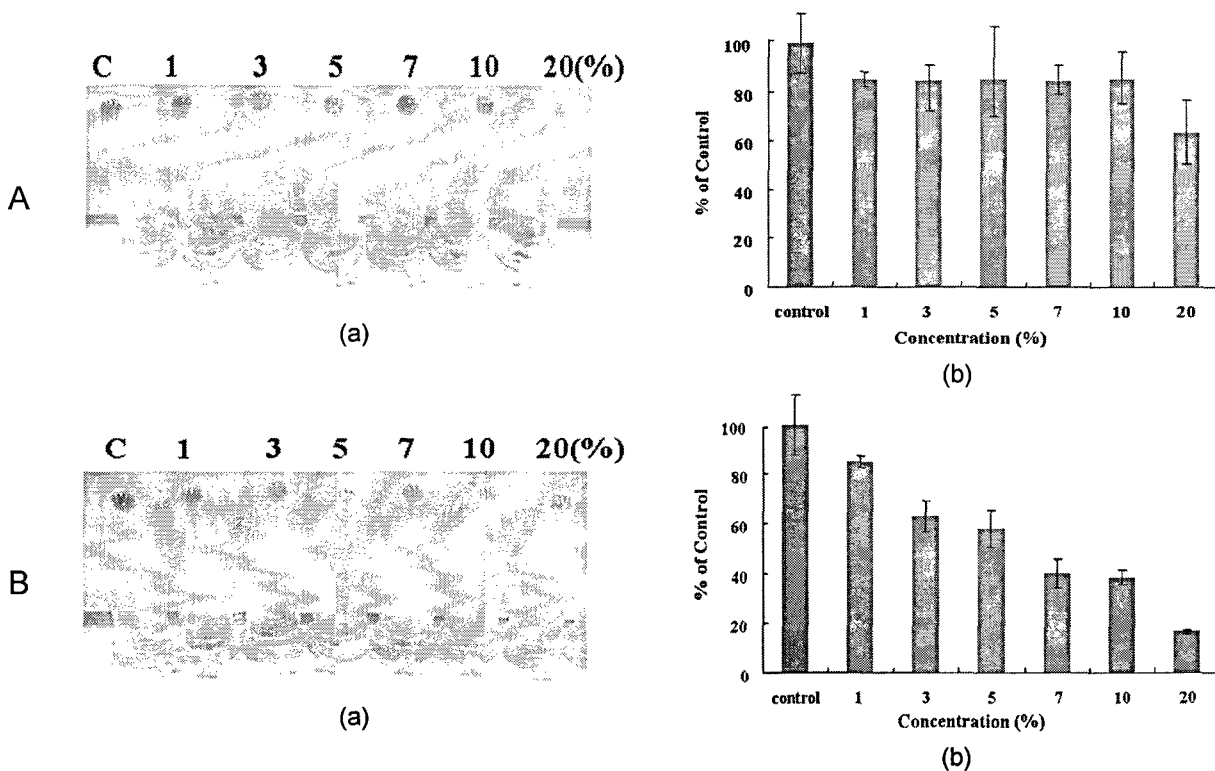


Fig. 5. Effect of the mulberry leaf extract and mycelial culture broth of *P. japonica* on the melanogenesis of B16BL6 mouse melanoma cells treated with the mulberry leaf extract. A : treated with the mulberry leaf extract, B : treated with the mycelial culture broth of *P. japonica* in the mulberry leaf extract, a : photographs of B16BL6 mouse melanoma cells, b : graphs of melanogenesis of cells.

cell (B16BL6)에 대한 세포독성을 보였으며 IC<sub>50</sub>값이 약 7% 농도로 나타난 반면, 팽잎 추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액은 50% 농도에서도 어떠한 세포독성도 관찰되지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 B16BL6 mouse melanoma cell의 세포 내 멜라닌 생합성 억제에 대해서도 높은 활성을 나타내었다.

따라서, 팽잎 추출물을 이용한 동충하초 균사체 배양액은 세포에 대한 독성이 전혀 없으며, 멜라닌 생합성 저해 작용이 우수하여 피부 미백용 화장품 조성물로서의 이용 가능성이 확인 되었다.

### 감사의 글

본 연구는 2006-2007년 농림부 농림기술개발과제(관리번호 : 105100-3)로 수행중이며, 이 지원에 감사드립니다.

### 참고 문헌

- Asano, N., K. Oseki, E. Tomioka, H. Kizu and K. Matsui. 1994. N-containing sugar from the *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* **259**, 243-255.

- Bao, Z. D., Z. G. Wu and F. Zheng. 1994. Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity by *Cordyceps sinensis* in old patient. *Chin. J. Integr. Med.* **14**, 271-273.
- Bell, A. A. and M. H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Amm. Rev. Phytopathol.* **240**, 411-451
- Dietschy, J. M. and J. D. Wilson. 1970. Regulation of cholesterol metabolism. *N Engl J Med.* **282(21)**, 1179-83.
- Dooley, T. P., R. C. Gadwood, K. Kilgore and L. M. Thomasco. 1994. Development of an in vitro primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents. *Skin Pharmacol.* **7(4)**, 188-200.
- Gordon, P. R., C. P. Mansur and B. A. Gilcrest. 1989. Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 566-572.
- Han D. S., N. H. Soung and Y. U. Kim, 1999. The present condition of Dong-Chong-Ha-Cho, issue and research plan. *Korean Society of Food Science and Trchnology* **32(4)**, 67-71.
- Hearing, V. J. and T. M. Ekel. 1976. Mammalian tyrosinase. *Biochem. J.* **157**, 549-557.
- Katai, K. 1942. Trace components in mulberry leaves. *J. Chem. Soc. Jph.* **18**, 379-383.
- Khaw, K. T. and C. E. Barret. 1987. Dietary fiber and reduced ischemic heart disease mortality in men and women. *Am J. Epidemiol.* **126**, 1093-1095.

11. Kim, S. K., Y. C. Kim and S. Y. Kim. 1999. Antihyperlipidemic effects of mulberry leaves in adult females. *Soonchunhyang J. Nat. Sci.* **5**, 167-171.
12. Kim, S. Y., W. C. Lee, H. B. Kim, A. J. Kim and S. K. Kim. 1998. Antihyperlipidemic effect of methanol extracts from mulberry leaves in cholesterol-induced hyperlipidemia rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 1217-1222.
13. Kimura, M., F. Chen, N. Nakashima, I. Kimura, N. Asano and S. Koya. 1995. Antihyperglycemic effect of N-containing sugar derived from mulberry leaves in STZ-induced diabetic mice. *J. Trad. Med.* **12**, 214-216.
14. Kondo, Y. 1957 Trace constituents of mulberry leaves. *Nippon Sanshigaku Zasshi.* **26**, 349-353.
15. Lee, W. C., A. J. Kim and S. Y. Kim. 2003. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Science and Industry* **36**, 2-14.
16. Lee, Y. H., U. S. Choi, K. H. Park Y. J. Choi and S. W. Gal. 2006. Anti-wrinkle effect of mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts. *Korean J. Life Science*, **16(3)**, 516-521.
17. Mahley, R. W., K. H. Weisgraber and T. L. Innerarity. 1974. Characterization of the plasma lipoprotein associated with atherogenic and nonatherogenic hyperlipoproteinemia. *Circ. Rev.* **35**, 722-723.
18. Nita, A. and A. R. Young. 2005. Melanogenesis: a photo-protective response to DNA damage? *Mutation Research* **571**, 121-132.
19. Shim, J. Y., Y. S. Lee, S. S. Lim, K. H. Shin, J. E. Hyun, S. Y. Kim and E. B. Lee. 2000. Pharmacological Activities of *Paecilomyces japonica*, A New Type *Cordyceps* sp. *Korean Journal of Pharmacognosy.* **31(2)**, 163-167.
20. Tajima S., A. Ura-Ishiko and A. Hayashi. 1996. Melanogenesis, biosynthetic phenotype of fibronectin and collagen and migrating activity in cloned B16 mouse melanoma cells. *J. Dermatological Science* **12(1)**, 24-30.