

Tyrosinase Inhibition Activity and Antioxidant Capacity by Fermented Products of Some Medicinal Plants

Jae Young Cha, Hyun Ju Yang, Jae Jun Jeong, Won Seok Seo, Jun Seok Park, Min Ok¹ and Young Su Cho^{2*}

Technical Research Institute, Daesun Distilling Co., Ltd. Busan 619-934, Korea

¹MieV Fermentation Science Research Institute, MieV Co., Ltd. Gyenggi, Sunghnam, 462-807, Korea

²Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Received April 9, 2010 / Accepted May 26, 2010

The effects of fermented products from 40 medicinal herbals commonly available in Korea were examined according to concentrations of polyphenolic compound and kojic acid, and the activities of DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) free radical scavenging and tyrosinase. The polyphenolic compound concentrations were 0.24 by *Corydalis turtschaminovill* ~ 11.42% (dry matter basis) by *Syringa velutina* in the extracts and 0.18 by *Poria cocos* ~ 12.27% by *S. velutina* in the fermented products. Kojic acid concentrations were 0.02 by *Poria cocos* *Sclerotium* ~ 9.67 mM by *S. velutina* in the extracts and 0.33 by *P. cocos* ~ 10.32 mM by *S. velutina* in the fermented products. *Syringa velutina* contained the highest polyphenolic compound and kojic acid concentrations, which were higher in the fermented product than in the extract. Higher DPPH free radical scavenging activity (>60%) was observed in the extracts of *A. sessiliflorum*, *Citrus nobilliss*, and *Angelica gigas* and the fermented product of *A. sessiliflorum* compared to the other medicinal plants. Higher tyrosinase inhibition activity (>50%) was observed in the extracts of *Morus alba*, *Glycyrrhiza glabra*, and *Rubus coreanus* and the fermented products of *G. glabra*, *Cnidium officinale*, and *S. velutina*. Based on the above results, *G. glabra*, *C. officinale*, and *S. velutina* possessed high tyrosinase-inhibitive activities and kojic acid concentrations, which could be definitely enhanced by the fermentation of *Phenillus linteus* mycelium.

Key words : *Glycyrrhiza glabra*, *Cnidium officinale*, *Syringa velutina*, fermentation, tyrosinase, kojic acid, antioxidant.

서 론

국내 화장품 시장규모는 2007년 4조3600억원으로 전년 대비 2.2% 성장하였으며, 이 중 한방화장품이 22%를 차지하고 있다. 특히 기능성 미백 화장품은 우리나라를 비롯한 일본, 중국 등 동아시아 여성들에게 큰 관심을 끌고 있는 제품으로 기능성 화장품의 시장 확대와 발전을 선도하는 중추적인 역할을 수행하고 있으며, 시장규모도 매년 증가추세에 있지만 원료 제조 기술을 앞세운 서구 국가들에 의해 오히려 지배당하고 있는 실정이다. 최근 들어 피부 미백 화장품 분야에서는 tyrosinase 활성 저해, 멜라닌 생성 억제, 멜라노사이트 자극물질 조절, 멜라닌 배설촉진 등의 연구가 진행됨에 따라 이들을 제어하는 방법 및 소재 개발로 색소 변이 치유제품의 개발이 가능해 지고 있는 있지만 미백 기능성을 나타내는 자원의 한계성과 과학적 활성 검증 기술의 미비로 이에 대한 적절한 대비책이 강구되어야만 한다[13,16]. 향후 미백 기능성 제품은 제형보다 내용물의 차별화 시도가 뚜렷하여 미백 효과가 뛰어난 천연

연물 유래 소재 개발 기술이 절실히 요구되어지고 있다.

멜라닌은 피부, 머리카락, 눈동자 등 생물체에 널리 분포되어 있는 색소 성분으로 인체 내에서는 표피층의 melanocyte라는 색소세포 내의 melanosome에서 합성되는데, tyrosine을 전구물질로 tyrosinase 효소에 의해 DOPA (3,4-dihydroxy-phenylalanine) 또는 DOPA quinone으로 산화 및 중합 반응에 의해 멜라닌이 생합성 된다[30]. 이때 생성된 멜라닌이 피부색을 검게 하므로 tyrosinase의 활성을 효과적으로 저해하는 생리활성물질을 탐색하는 실험이 미백 효과를 찾아내는데 있어 매우 유용한 연구방법으로 평가받고 있다[13,16].

현재까지 천연물로부터 분리된 tyrosinase 활성 저해에 의한 멜라닌 생합성 억제 및 멜라노마 세포의 증식을 억제시키는 대표적인 것으로 phenolic compound, flavonoid, arbutin, glycolic acid, kojic acid, pentadecenoic acid 등이 제시되고 있다[3,14,19,20,24]. 한방 생약제에 관한 문헌을 근거로 한 tyrosinase 활성 저해효과는 메탄올 추출물인 갈근 25%, 후박 3%, 에탄올 추출물인 창출 14%, 갈근 10% 및 수용성 추출물인 상백피 63%, 감초 13-52%, 작약 44%, 당귀 39%, 천궁 28%, 복령 4%, 맥문동 0%로 비교적 낮은 저해 활성을 나타내었다[13]. 한편, 미백 화장품 개발 소재로 이용되고 있는 약용식물

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7586

E-mail : choys@dau.ac.kr

추출물 자체가 멜라노마 세포에 대해 독성 작용을 나타내는 경우가 종종 있어 이를 경감시키는 연구의 일환으로 미생물 또는 버섯균사체로 발효시킨 한방 발효액으로 멜라노마 세포 독성 경감, 멜라닌 색소 감소 및 tyrosinase 활성 저해 등의 효과를 증가시킨 연구 결과들이 보고되고 있다[23].

본 실험에서도 우리나라에서 자생하고 있는 40종의 한방 생약재를 중심으로 천연물 유래의 미백 기능성 소재 탐색과 발효 기술의 적용으로 새로운 효능과 안전성이 뛰어난 기능성

미백 화장품 개발의 일환으로 생리활성물질, 항산화 효과, tyrosinase 활성 억제에 대한 기초연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 한방 생약재 40종은 2008년에 부산시 기장군에 소재하고 있는 혜인제약으로부터 구입하여 사용하였

Table 1. List of medicinal plants used in this study

Sample No.	Scientific name	Part used
1	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> Seeman	Bark
2	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledebour	Leaf
3	<i>Alnus japonica</i>	Whole plant
4	<i>Angelica gigas</i>	Root
5	<i>Astragalus membranaceus</i>	Root
6	<i>Atractylodes japonica</i>	Root
7	<i>Atractylodes macrocephala</i>	Root
8	<i>Broussonetia kazinoki</i>	Whole plant
9	<i>Chelidonium majus</i>	Whole plant
10	<i>Cinnamoum cassia</i> BLUME	Stem bark
11	<i>Citrus nobillis</i> Makino	Fruit hull
12	<i>Cnidium officinale</i>	Root
13	<i>Cornus officinalis</i>	Fruit
14	<i>Corydalis turtschaminovii</i>	Root
15	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Licorice)	Root
16	<i>Hovenia dulcis</i>	Whole plant
17	<i>Lespedeza cuneata</i>	Leaf, Stem
18	<i>Liriope platyphylla</i>	Fruit
19	<i>Loranthus parasiticus</i>	Aerial part
20	<i>Lycium chinensis</i> Miller	Fruit
21	<i>Morus alba</i> Bark	Root bark
22	<i>Myristica fragrans</i>	Root
23	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner	Seed
24	<i>Paeonia albiflora</i>	Root
25	<i>Panax ginseng</i>	Root
26	<i>Persea thunbergii</i>	Bark
27	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>	Leaf
28	<i>Poria cocos</i> Sclerotium	Root
29	<i>Poria cocos</i>	Root
30	<i>Psoraleae semen</i>	Fruit
31	<i>Pueraria thunbergiana</i> Bentham	Root
32	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Root
33	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	Fruit
34	<i>Saururus chinensis</i> BAILL	Leaf
35	<i>Schizandra chinensis</i> Bailon	Fruit
36	<i>Sorbus commixta</i>	Fruit
37	<i>Syringa velutina</i>	Root
38	<i>Ulmus davidiana</i>	Root bark
39	<i>Zizyphus jujuba</i>	Fruit
40	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	Seed

다. 한방 생약제는 한의학적 고전문헌이나 최근의 특허와 논문을 중심으로 피부 관련 및 생리활성물질이 많이 함유된 약용식물을 중심으로 우리 주위에서 손쉽게 구입이 가능하고 안전하게 취급될 수 있는 40종을 선택하였다.

한방 생약재 추출 및 발효액의 조제

40종의 한방 생약재 각각을 2% (w/v) 농도로 121°C, 1.2기압에서 3시간 동안 autoclave로 열수 추출한 후 여과하여 추출액 시료로 사용하였고, 일부는 발효시키는데 사용하였다. 한방 생약재 발효액은 여과된 열수 추출액에 배양 영양원을 넣고 다시 살균시킨 후 전배양 시킨 상황버섯(*Phenillus linteus*) 균사체를 접종하여 25°C에서 200 rpm으로 9일 동안 진탕배양하였다. 발효 종료 후 여과지로 1차 여과시켜 균사체를 제거시킨 후 0.2 µm membrane filter (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany)로 2차 여과하여 얻은 발효액을 냉장보관하면서 실험에 사용하였다. 발효액은 대부분 갈색을 띄었으며, 한방 특유의 향이 나는 액상의 성상을 가지고 있었다.

pH 측정

한방생약재 각 추출물과 그 균사체 발효액의 pH는 pH meter (Methrohm 691, Switzerland)로 직접 측정하였다.

코직산 농도 측정

Kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-pyrone] 농도는 Bentley의 colorimetric method [2]에 준하여 측정하였다. 즉, 시료 0.1 ml를 FeCl₃ 1% (w/v) 수용액 1 ml와 혼합하여 500 nm에서 분광광도계(HITACHI U-2900, Hitachi High-Technologies Co., Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정하였다. Kojic acid의 농도는 kojic acid (Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA)를 표준품으로 한 표준곡선으로부터 계산하였다.

Polyphenolic compound 함량 측정

페놀성 화합물의 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 법[27]으로 측정하였다. 즉, 0.1%(w/v) 시료 용액 0.5 ml에 Folin-ciocalteu's phenol reagent 2.5 ml를 첨가하여 잘 혼합하고 5분간 실온에서 방치하였다. 정확히 5분 반응시킨 후 7.5% Na₂CO₃ 2 ml를 가하여 혼합하고 50°C에서 5분간 발색시킨 후 760 nm에서 분광광도계(HITACHI U-2900, Hitachi High-Technologies Co., Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 이때 페놀성 화합물의 함량은 tannic acid를 0-500 µg/ml 농도로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정한 표준곡선으로부터 계산하였다.

Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1) 활성은 Masamoto 등의 실험 방

법[20]을 약간 변형하여 측정하였다. *In vitro* mushroom tyrosinase 활성 저해 능력을 측정하기 위하여 1.5 ml plastic cuvette에 2.5 mM 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 0.3 ml, 한방 생약재 추출물 또는 발효액 0.05 ml 및 0.1 M 인산완충용액(pH 6.8)을 혼합하여 25°C에서 preincubation 시켰다. 여기에 1,380 units/ml mushroom tyrosinase (25,000 units, Sigma Chem. Co., St. Louis MO, USA) 0.05 ml를 넣은 후 25°C에서 2분간 반응시키면서 475nm 에서 분광광도계(HITACHI U-2900, Hitachi High-Technologies Co., Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정하여 계산하였다. 대조구는 시료가 들어있지 않은 용액을 사용하였다. 이때 tyrosinase 활성 저해율(%)은 다음의 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율(}\%)=100-[(A-B)/A]\times 100$$

- A: 시료가 들어있지 않은 반응액의 0.5-1분 사이의 흡광도 차이
- B: 시료가 들어있는 반응액의 0.5-1분 사이의 흡광도 차이

DPPH에 의한 항산화 활성 측정

항산화 활성 측정은 Abe 등의 방법[1]에 따라 측정하였다. 즉, 에탄올 100 ml에 α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 Whatman filter paper No. 2에 여과시켜 DPPH 반응 용액을 만들었다. 한방 생약재 추출액 또는 발효액 1 ml를 취하고, 여기에 DPPH 반응 용액 5 ml를 넣어 잘 혼합한 후 냉암소에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 분광광도계(HITACHI U-2900, Hitachi High-Technologies Co., Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정하였다. DPPH를 이용한 항산화 활성은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (}\%)=1-[\text{sample absorbance}_{528\text{nm}}/\text{control absorbance}_{528\text{nm}}]\times 100$$

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean±SE)로 표시하였다[9].

결과 및 고찰

한방 생약재 추출액 및 발효액의 pH값

우리 인간의 피부는 피지막으로 pH가 5~6 사이로 초민감성 피부의 경우는 강한 알칼리성 비누나 세안제 사용시 피부 보호막에 손상을 가져 올 수 있는데 이러한 세안의 반복에 의하여 피부 자체의 복원력이 상실되고 외부 자극에도 쉽게 반응할 수 있는 조건을 만들어 주게 된다. 초민감성 건성피부는 자극이 적고, 보습이 충분하며, 사람의 피부 pH와 비슷한 화장품이나 세안제를 사용함으로 피부도 보호하고 건강 유지에도 도움을 줄 수 있을 것이다.

한방 생약재 추출물과 그 발효액의 pH 값을 측정한 결과는

Table 2와 같다. 대부분의 한방 생약재 추출물의 pH는 약 산성을 나타내었으나, 균사체 발효 후 pH는 대부분 약간씩 높아졌으며 그 중 상기생의 경우 상당히 높은 pH 8.5까지 높아진 시료도 있었다. 이러한 이유는 시료에 따라 발효에 의해 변화되는 것이 확인되었다. 한방 생약재의 추출물 중에서 오미자 pH가 2.80으로 가장 낮았으며, 갈근이 6.33으로 가장 높은 pH 값을 보였다. 그러나 발효액의 경우 오미자 pH가 역시 가장 낮은 4.19값을 나타내었고, 상기생(겨우살이) pH는 8.65로 가장 높은 값을 나타내었지만, 대부분 중성 부근의 값을 나타내고 있었다. Cho 등[6]은 미삼 추출물의 pH가 5.9로 약산성 값을 나타내었는데, 본 실험에서는 미삼 추출물의 pH 값도 4.90으로 약산성으로 비슷한 값을 보였다. 또한 Oh 등[22]도 구기자, 당귀, 오가피, 오미자 물 추출물의 pH 값을 측정한 결과 각각 5.0, 4.6, 4.6 및 2.9로 본 실험에서 측정된 pH 값인 구기자 4.16, 당귀 4.70, 오가피 4.62 및 오미자 2.80과 비슷한 것으로 나타났다.

추출물 및 발효액의 페놀성 화합물 함량

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물로서 flavonoid, catechin, tannin 류로 크게 구분된다. 특히, 페놀성 화합물들은 전자공여능이 있어 높은 항산화 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[4,5,7,8].

한방 생약재 추출물 및 그 발효액의 총 폴리페놀 화합물 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 총 폴리페놀 화합물 함량은 추출물에서 정향 11.42%, 복분자 10.06%, 선학초 2.83%, 갈근 2.70% 함유되어 상당히 많은 양이 포함되어 있었다. 복령은 0.04%로 본 실험에 사용한 소재 중에서는 가장 낮았다. 국내산 식물성 천연물 중의 총 폴리페놀 화합물 함량을 분석한 결과에서 솔잎 1.6%-1.8%[28], 뽕잎 1.3% 및 꾸지뽕잎 1.3%[4], 칩뿌리 2.0%, 호두 2.1%, 해바라기씨 2.0%, 상추 1.1%, 쑥 1.1%, 생강 1.7%, 모과 4.6%, 밤 속껍질 및 감잎 5.8% 등[18]에서 다양한 범위로 함유 되어 있었고, 나머지 분석대상에서는 비교적 낮은 함량이 포함되어 있었다. 또한 Kim 등[15]은 약용식물을 소재로 한 실험에서 폴리페놀 화합물 함량을 보면 음양곽 8.12%, 가시오가피 6.59%, 갈근 5.98%, 감초 3.46%, 산수유 3.23%, 천궁 1.57%, 당귀 1.48%, 황기 1.33%, 삼백초 1.27%, 인삼 0.40% 순으로 함유되어 있었다고 하였다. 한방 생약재 발효액의 총 폴리페놀 화합물 함량에서 정향이 12.27%로 가장 높았으며, 이는 추출물의 11.42%에 비해 약간 증가된 함량이었다. 복분자 발효액 역시 3.80%로 두 번째로 높았으나, 발효에 의해 많이 감소된 것으로 나타났다. 후박도 3.33%로 추출물 보다는 발효에 의해 총 폴리페놀 화합물 함량이 증가되었다. 다나무 껍질 수용성 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 1.84%로 보고된 바 있으나[15], 본 실험에서는 다나무 자체의 수용성 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량이 0.45%에서 발효 후 0.63%로 증가하였으나, 부위에 따라 다소 차이가

있었다. 한방 생약재 중에 들어있는 폴리페놀 화합물 함량의 경우 발효에 의해 14종에서 증가하고, 나머지 26종에서는 감소하였다. Park 등[23]은 멜라닌 생성세포 B16BL6 세포에 대해 뽕잎 추출물 7% 처리에서 50%의 세포가 사멸하였고, 20% 처리 농도에서는 모두 사멸하여 독성을 보였으나, 뽕잎 추출물을 동충하초 균사체 배양한 발효액은 50% 처리 농도 까지도 세포독성이 전혀 없었다고 하였다. 이러한 결과는 화장품 소재로 사용되고 있는 대부분의 식물 추출물이 멜라노마 세포에 대해 독성작용을 가지는 반면 미생물 또는 버섯균사체를 이용한 발효액에서는 독성 경감과 함께 멜라닌 색소가 감소된다는 결과를 뒷받침 하고 있다. 본 연구의 예비실험에서도 생약재의 추출액보다는 발효액에서 세포 독성 효과가 감소하는 것으로 확인된바 있다(자료 미제출).

한방 생약재 추출물 및 발효액의 코직산 함량

한방 생약재 추출물 및 그 발효액의 코직산 함량은 정향 9.67, 복분자 7.65, 갈근 2.70, 선학초 2.69 mM 순으로 나타났으며, 발효액에서는 추출물과 동일하게 정향에서 10.32 mM로 가장 높았고, 그 다음으로 복분자 6.99, 선학초 3.68, 갈근 3.49 mM순으로 나타났다(Table 2).

멜라닌 생성성의 저해에 의한 색소 형성을 억제시키는 물질 중에 천연물 유래의 catechol과 phenol성 화합물 및 미생물 유래의 kojic acid, terrein, melanoston 등 생리활성물질이 제시되고 있다[3,19]. 특히 미생물 유래의 kojic acid는 tyrosinase의 구리 이온과 결합함으로써 활성이 저해되어 멜라닌 중합체 형성을 억제함으로써 미백효과를 나타내는 기전이 널리 알려져 있다[21]. *Aspergillus flavus* link strain S44-1은 유일한 탄소 원 으로 glucose를 사용하였을 경우 kojic acid 생산량이 25.8 g/l으로 가장 많았으며, sucrose 및 fructose의 경우 각각 23.6 및 6.4 g/l이 생산된다고 하였다[24]. 한방 생약재 추출물에 비해 발효액에서 코직산 함량이 36종에서 증가하는 것으로 나타났으나, 나머지 4종에서는 감소하였다(Table 2).

한방 생약재 추출물 및 발효액의 DPPH radical scavenging activity

DPPH는 비교적 안정한 free radical로써, ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다 [15,29].

본 실험 사용된 소재 중에서 항산화 활성이 비교적 높은 것은 후박 70.36%, 지구목 65.30%, 당귀 61.39%, 정공동 59.02% 등 이었다(Table 3). 한편 한방소재 추출물을 발효시킨 발효액에서는 후박이 67.62%로 가장 높았으며, 그 다음으로 정향 51.61%, 진피 51.12%, 지구목 40.57%, 작약 40.20% 순으로

Table 2. The pH, total polyphenolic and kojic acid concentrations of the extracts and fermented products of traditional herbal medicines

Sample No.	pH		Total polyphenolics (%)		Kojic acid (mM)	
	Extract	Fermentation	Extract	Fermentation	Extract	Fermentation
1	4.62	8.30	2.26±0.03	0.69±0.01	1.35±0.02	1.38±0.03
2	5.09	8.23	2.83±0.01	1.86±0.00	2.69±0.01	3.68±0.08
3	4.35	6.44	1.10±0.02	0.59±0.01	0.39±0.03	1.40±0.13
4	4.70	8.39	0.72±0.01	0.70±0.01	0.47±0.04	1.26±0.04
5	4.67	8.25	0.37±0.01	0.56±0.01	0.53±0.01	0.74±0.01
6	4.39	8.26	0.52±0.01	0.48±0.02	0.30±0.11	1.08±0.05
7	4.43	8.35	0.48±0.01	0.73±0.01	0.21±0.02	1.46±0.03
8	4.97	8.49	0.45±0.01	0.63±0.01	0.31±0.01	0.91±0.11
9	5.31	8.38	0.93±0.01	0.76±0.02	1.01±0.01	1.53±0.05
10	4.57	5.87	0.45±0.01	0.47±0.00	0.26±0.01	0.54±0.04
11	4.18	7.85	1.60±0.02	1.07±0.03	1.82±0.07	0.88±0.05
12	4.41	8.15	0.62±0.01	0.61±0.01	0.32±0.01	1.53±0.02
13	5.94	7.05	2.02±0.01	0.50±0.01	1.15±0.03	1.48±0.09
14	4.49	8.40	0.24±0.00	0.55±0.01	0.11±0.01	0.93±0.02
15	5.44	8.30	0.76±0.02	0.96±0.01	0.92±0.04	1.70±0.11
16	5.30	8.34	0.82±0.01	0.94±0.02	0.72±0.02	1.82±0.02
17	4.86	7.01	1.51±0.03	0.47±0.02	1.36±0.09	1.89±0.05
18	4.37	7.85	0.37±0.00	0.90±0.02	0.24±0.01	1.57±0.03
19	5.29	8.65	0.68±0.05	0.61±0.01	0.65±0.02	1.15±0.02
20	4.16	7.22	1.22±0.01	0.69±0.01	0.94±0.08	2.33±0.07
21	5.84	8.42	0.49±0.00	0.57±0.01	0.51±0.05	0.97±0.07
22	4.57	6.86	0.46±0.01	0.74±0.02	0.23±0.02	2.38±0.19
23	5.57	7.75	0.63±0.03	0.62±0.02	0.56±0.04	1.95±0.15
24	4.50	8.17	1.17±0.03	1.09±0.02	0.94±0.06	1.44±0.07
25	4.90	8.21	0.44±0.00	0.50±0.01	0.31±0.02	1.56±0.09
26	5.01	6.09	2.34±0.03	3.33±0.04	1.73±0.01	1.08±0.02
27	6.01	8.45	1.12±0.03	0.85±0.02	1.74±0.05	1.94±0.03
28	4.24	8.51	0.04±0.00	0.40±0.01	0.02±0.05	0.89±0.05
29	4.24	7.91	1.11±0.01	0.18±0.00	0.03±0.01	0.33±0.02
30	5.67	7.37	0.84±0.01	0.60±0.01	1.24±0.05	1.65±0.12
31	6.33	8.14	2.70±0.05	2.64±0.05	2.70±0.07	3.49±0.08
32	3.71	6.92	1.37±0.01	0.71±0.01	1.85±0.04	2.55±0.13
33	4.38	4.69	10.06±0.22	3.80±0.05	7.65±0.41	6.99±0.40
34	4.83	8.54	1.14±0.02	0.85±0.01	1.21±0.04	1.66±0.05
35	2.82	4.10	0.45±0.01	0.48±0.01	0.14±0.01	0.80±0.05
36	3.79	8.47	1.80±0.03	1.17±0.01	1.08±0.02	1.98±0.04
37	4.01	4.69	11.42±0.19	12.27±0.14	9.67±0.09	10.32±0.08
38	5.58	8.28	1.02±0.01	0.67±0.01	0.61±0.03	1.51±0.05
39	3.97	6.74	1.20±0.04	0.81±0.01	0.50±0.02	1.47±0.08
40	5.26	7.09	0.56±0.02	0.52±0.01	0.38±0.05	1.47±0.02

로 높은 항산화 활성을 보였다. 또한 추출물 보다 발효액에서 항산화 활성이 증가한 소재로는 복령, 작약, 천궁, 황기, 복분자, 연자육, 육두구가 있었다. Kim 등[15]은 약용식물의 수용성 추출물에서 전자공여능에 의한 항산화 활성을 측정한 결과 1.0 mg/ml (0.1%) 농도에서 당귀 15.8% 및 감초 13.3%의 항산화 활성이 있다고 하였는데, 본 실험에서는 당귀 추출물

61.39% 및 감초 추출물 45.60%로 이들 보다 높은 활성을 보였다. 그러나 이들 추출물을 균사체로 발효시킨 발효액에서는 각각 31.64% 및 30.27%로 발효에 의해 낮아지는 경향을 보였다. Shon [25]도 후박과 복령 추출물에서 전자공여능에 의한 항산화 활성이 각각 21.2-24.7% 및 45.5-49.6%라고 하였으나, 동충하초, 큰느타리버섯, 팽이버섯 균사체로 발효시킨 발효액

의 항산화 활성은 20.4-29.0% 및 18.2-20.0%로 오히려 발효에 의해 떨어진다고 하였다. 인삼 수용성 추출물 2 mg/ml을 첨가하여 DPPH법으로 *in vitro* 항산화 활성을 측정 한 실험에서 radical scavenging 활성이 거의 없는 것으로 보고된 바 있으며[17], 본 실험에서도 미삼 추출물 및 그 발효액에서는 항산화 활성이 없는 것으로 나타났다.

한방 생약재 추출물 및 발효액의 mushroom tyrosinase 저해 활성

멜라닌은 피부, 머리카락, 눈동자 등 생물체에 널리 분포되어 있는 색소 성분으로 인체 표피층의 melanocyte 색소세포 내의 melanosome에서 합성되는데, tyrosinase 효소에 의해 tyrosine을 시발 물질로 하여 DOPA (3,4-dihydroxy-phenyl-

Table 3. DPPH radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities of the extracts and fermented products of traditional herbal medicines

Sample No.	DPPH radical scavenging activity (%)		Tyrosinase inhibitory activity (%)	
	Extract	Fermentation	Extract	Fermentation
1	70.36±3.67	67.62±6.49	46.33±7.66	42.65±8.87
2	50.89±7.53	28.16±4.74	34.42±4.75	45.17±4.56
3	ND	16.11±0.32	4.97±1.45	4.97±0.62
4	61.39±4.39	31.64±1.93	44.49±4.83	43.27±7.80
5	15.03±3.09	32.26±15.09	40.20±6.57	42.04±4.10
6	53.83±0.00	51.12±1.40	42.31±7.11	41.22±6.37
7	39.79±9.83	34.62±7.54	36.05±4.20	44.08±1.95
8	42.90±10.88	27.79±2.81	45.65±9.81	43.95±5.67
9	ND	ND	42.04±6.37	41.77±7.49
10	ND	ND	ND	ND
11	65.30±1.16	40.57±1.23	41.90±8.95	38.71±6.95
12	47.81±14.68	19.73±10.70	27.96±6.42	57.82±9.84
13	ND	ND	ND	ND
14	26.91±7.92	33.75±2.81	46.60±11.13	47.48±4.70
15	45.60±19.25	30.27±4.91	67.29±4.03	84.69±4.11
16	57.92±9.27	51.61±2.11	46.94±8.51	44.83±6.87
17	12.32±0.49	9.91±0.16	37.01±0.85	ND
18	ND	ND	45.85±3.68	45.78±4.73
19	54.44±12.13	28.04±4.21	35.31±6.79	44.08±7.78
20	11.74±1.62	7.84±2.60	ND	ND
21	43.34±8.58	28.78±2.46	68.23±4.21	41.63±7.10
22	8.01±0.08	ND	ND	ND
23	29.36±0.24	ND	ND	22.59±1.85
24	23.96±12.97	40.20±4.56	40.68±5.53	44.90±6.55
25	7.04±0.32	5.66±0.97	ND	ND
26	25.14±10.82	31.76±8.07	42.24±6.74	41.09±7.55
27	ND	ND	41.43±9.97	41.63±4.42
28	ND	19.35±8.07	36.67±8.13	41.56±6.21
29	1.53±0.65	ND	4.82±3.09	ND
30	20.12±0.16	28.39±0.32	ND	ND
31	ND	ND	46.33±8.31	46.87±7.44
32	4.11±1.87	ND	ND	12.72±5.24
33	ND	ND	65.37±1.33	23.67±1.34
34	ND	ND	40.75±10.98	42.59±5.66
35	27.93±0.97	ND	ND	ND
36	ND	ND	44.22±9.84	43.95±5.72
37	59.02±1.55	31.14±6.84	48.71±8.91	50.82±6.68
38	41.72±2.93	31.51±2.81	36.19±14.15	39.32±8.31
39	13.75±4.14	8.13±0.24	ND	ND
40	30.51±0.57	1.64±0.16	ND	3.61±4.20

ND: Absorbance was not detected by turbidity in the reaction solution.

alanine) 또는 DOPA quinone으로 산화 및 중합 반응으로 멜라닌이 생합성 된다[13,26]. 생합성 된 멜라닌은 자외선과 같은 피부자극에 대해 저항력을 높여주지만, 과도한 멜라닌 합성은 기미, 주근깨, 검버섯과 같은 색소 침착을 일으키기 때문에 tyrosinase 활성 측정은 피부 미백효과를 나타내는 하나의 중요한 지표로 받아들여지고 있다[13,16].

현재까지 천연물로부터 분리된 tyrosinase 활성 억제물질의 대표적인 화합물로 phenolic compound, flavonoid, arbutin, glycolic acid, kojic acid, ferulic acid, isoflavonoids 등이 알려져 있다[3,13]. 국내에서 자생하고 있는 한방 생약재 중에서 수용성 추출물인 함초 42%, 상백피 63%, 감초 13-52%, 작약 44%, 천궁 28%, 복령 4%의 tyrosinase 활성 저해효과가 보고되었다[13]. Kim 등[14]도 초고압으로 추출한 당귀 추출물 1 mg/ml 농도에서 69.4%로 처리 농도 의존적으로 활성 저해 효과가 있었으며, 이 때 동일 농도로 처리한 ascorbic acid에 의해서는 70.8%의 저해 효과가 있었다고 하였고, Jung 등[13]도 당귀 수용성 추출물에 tyrosinase 저해 활성이 39%라고 보고하였다.

본 실험에서 감초, 복분자 및 상백피 추출물은 각각 67.29%, 65.37% 및 68.23%의 tyrosinase 활성 저해효과가 있었으며, 특히 감초 발효액에서는 추출물 보다 높은 84.69%의 tyrosinase 활성 저해효과가 있었다(Table 3). 감초 뿌리에 피부미백과 항산화물질로 알려진 glabridin 성분이 HPLC 분석 결과 1,260 mg/kg 함유되어 있었으며, 최근에는 유용성 감초 추출물이 기능성 미백 화장품 원료로 인정되어 많이 사용되고 있다[12]. Jee는 상백피 열수추출물 1 mg/ml 농도에서 tyrosinase 활성이 79.6% 저해되었고, 에탄올 추출물에서는 93.3%의 높은 저해활성이 있었다[11]. Jung 등[13]도 상백피 및 갈근 추출물 20 mg/ml에서 각각 63% 및 59%씩 tyrosinase 활성이 저해되었다고 하였다. 한편 홍삼 및 백삼의 ethyl acetate 분획물 200 µg/ml에서 tyrosinase 활성이 13.7% 및 10.5%의 낮은 저해활성을 보였다[10]. 돌나물의 70% 에탄올 추출물 100 µg/ml 농도에서 tyrosinase 활성이 약 51% 저해되었으며, tyrosinase 및 TRP-1 발현량은 각각 29% 및 13% 감소되어 멜라닌이 감소되었다고 하였다[26]. 복령, 작약, 천궁의 경우 추출물 보다는 그 발효액에서 높은 tyrosinase 활성 저해효과를 나타내었고, 천궁의 경우 207%의 tyrosinase 활성 저해효과가 증가 되어 발효에 의한 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 그러나 계피, 미삼, 산조인, 숙지향의 경우 tyrosinase 활성 저해효과가 전혀 없었으며, 산조인과 숙지향의 경우는 발효액에서 tyrosinase 활성 저해효과가 다소 있는 것으로 나타났다. 이상의 실험에서 tyrosinase 활성 저해효과가 가장 높았던 감초, 천궁, 정향의 경우 추출물 보다는 발효액에서 더 효과가 높아짐으로서 향후 미백제 화장품 원료로 사용될 때는 발효과정을 거치는 것이 좋은 것으로 사료되어 진다.

감사의 글

본 연구는 동아대학교 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

1. Abe, N., T. Murata, and A. Hirota. 1998. Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 661-666.
2. Bentley, R. 1957. Preparation and analysis of kojic acid. *Meth. Enzymol.* **3**, 238-241.
3. Cabanes, J., S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 982-985.
4. Cha, J. Y., H. J. Kim, C. H. Chung, and Y. S. Cho. 1999. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1310-1315.
5. Cha, J. Y., H. Y. Ahn, K. E. Eom, B. K. Park, B. S. Jun, and Y. S. Cho. 2009. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. *J. Life Sci.* **19**, 652-658.
6. Cho, H. O., J. H. Lee, S. H. Cho, and Y. H. Choi. 1976. Approach to the extraction method on minerals of ginseng extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* **8**, 95-106.
7. Choi, U. D., H. Shin, Y. S. Chang, and J. I. Shin. 1992. Screening of natural antioxidant from plant and antioxidant effect. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 142-148.
8. Choi, Y. M., J. B. Gu, M. H. Kim, and J. S. Lee. 2008. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from thirty Korean medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 1235-1239.
9. Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
10. Hwang, E. Y., Y. H. Kang, Y. C. Lee, Y. C. Kim, Y. C. Kim, K. M. Yoo, Y. O. Jo, and S. Y. Choi. 2006. Comparison of phenolic compounds contents between white and red ginseng and their inhibitory effect on melanin biosynthesis. *J. Ginseng Res.* **30**, 82-87.
11. Jee, S. O. 2009. Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Korean J. Plant Res.* **22**, 145-151.
12. Jung, A. Y., K. G. Lee, M. J. Kwun, and K. H. Row. 2003. Separation of glabridin from Licorice by RP-HPLC. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 408-411.
13. Jung, S. W., N. K. Lee, S. J. Kim, and D. S. Han. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 891-896.
14. Kim, C. H., M. C. Kwon, H. G. Han, C. S. Na, H. G. Kwak, G. P. Choi, U. Y. Park, and H. Y. Lee. 2008. Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **16**, 255-260.
15. Kim, E. Y., I. H. Baik, J. H. Kim, S. R. Kim, and M. R. Rhyu.

2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 333-338.
16. Kim, S. J., M. Y. Heo, K. H. Bae, S. S. Kang, and H. P. Kim. 2003. Tyrosinase inhibitory activity of plant extract (III): Fifty Korean indigenous plants. *J. Applied Pharmacol.* **11**, 245-248.
17. Kim, Y. K., Q. Guo, and L. Packer. 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* **172**, 149-156.
18. Lee, J. H. and S. R. Lee. 1994. Analysis of phenolic substances content on Korea plant foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**, 310-316.
19. Lee, S., W. G. Kim, E. Kim, I. J. Ryoo, H. K. Lee, J. N. Kim, S. H. Jung, and I. D. Yoo. 2005. Synthesis and melanin biosynthesis inhibitory activity of (+/-)-terrein produced by *Penicillium* sp. 20135. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 471-473.
20. Masamoto, Y., H. Ando, Y. Murata, Y. Shimoishi, M. Tada, and K. Takahata. 2003. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculentin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 631-634.
21. Mishima, Y., S. Hata, Y. Ohyama, and M. Inazu. 1988. Induction of melanomagenesis suppression cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* **1**, 367-374.
22. Oh, S. L., S. S. Kim, B. Y. Min, and D. H. Chung. 1990. Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic acids and tannins in the extracts of *L. chinensis* M., *A. acutiloba* K., *S. chinensis* B. and *A. sessiliflorum* S. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**, 76-81.
23. Park, S. S., Y. B. Ryu, Y. H. Lee, Y. U. Cho, S. J. Cho, Y. J. Choi, K. H. Park, and S. W. Gal. 2007. Inhibition of melanin synthesis by mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mulberry leaf extract. *J. Life Sci.* **17**, 816-821.
24. Rosfarizan, M. and A. S. Ariff. 2006. Kinetics kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* link S44-1 using sucrose as a carbon source under different pH conditions. *Biotech. Bioprocess Eng.* **11**, 72-79.
25. Shon, M. Y. 2007. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. *Food Indus. Nutr.* **12**, 51-57.
26. Sim, G. S., J. H. Kim, B. C. Lee, D. H. Lee, G. S. Lee, and H. B. Pyo. 2008. Inhibitory effects on melanin production in B16 melanoma cells of *Sedum sarmentosum*. *Yakhak Hoeji* **52**, 165-171.
27. Swain, T., W. E. Hillis, and M. Oritega. 1959. Phenolic constituents of *Ptunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 83-88.
28. Yoo, J. H., J. Y. Cha, Y. K. Jeong, K. T. Chung, and Y. S. Cho. 2004. Antioxidative effects of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts. *J. Life Sci.* **14**, 863-867.
29. You, J. K., M. J. Chung, D. J. Kim, D. J. Seo, J. H. Park, T. W. Kim, and M. Choi. 2009. Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Paeonia suffruticosa* water extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 292-296.
30. Vile, G. F. and R. M. Tyrrell. 1995. UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblast is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radical Biol. Med.* **18**, 721-725.

초록 : 한방 생약재 발효액의 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성

차재영 · 양현주 · 정재준 · 서원석 · 박준석 · 옥민¹ · 조영수^{2*}

(대전주조(주) 기술연구소, ¹(주)미에부 발효과학연구소, ²동아대학교 생명공학과)

국내에서 자생하고 있는 한방 생약재의 생리활성 물질을 이용한 기능성 미백 화장품 소재 개발을 위한 기초연구의 일환으로 40종의 한방 생약재 열수 추출물을 상향버섯 균사체로 발효시켜 얻은 발효 한방액의 phenolics, flavonoids, minerals, decursin 및 decursinol angelate 함량과 항산화 및 tyrosinase 저해 활성을 측정 하였다. 페놀성 화합물 함량은 추출물에서 *Corydalis turtschaminovill* 0.24%~*Syringa velutina* 11.42% (건물기준) 범위 였으며, 발효 한방액에서는 *Poria cocos* 0.18%~*S. velutina* 12.27% 범위였다. 한방 생약재 추출물의 코직산 함량은 *Poria cocos* Sclerotium 0.02~*S. velutina* 9.67 mM 범위였으며, 발효액에서는 *P. cocos* 0.33~*S. velutina* 10.32 mM 범위였다. 특히 *Syringa velutina*은 높은 농도의 페놀성 화합물과 코직산을 함유하고 있었는데 추출물 보다는 발효액에서 더 높았다. 높은 항산화 활성(>60%)은 *A. sessiliflorum*, *Citrus nobillis* 및 *Angelica gigas*의 추출물과 *A. sessiliflorum*의 발효액에서 다른 한방 생약재 보다 높게 나타났다. Tyrosinase의 높은 저해 활성(>50%)은 *Morus alba*, *Glycyrrhiza glabra* 및 *Rubus coreanus* 추출물과 *G. glabra*, *Cnidium officinale* 및 *S. velutina* 발효액에서 높았다. 이상의 실험 결과 40종의 한방 생약재 중에서 *G. glabra*, *C. officinale* 및 *S. velutina* 3종은 발효에 의해 tyrosinase 저해 활성과 코직산이 증가함으로서 이를 활용한 기능성 미백 화장품 개발에 적용할 수 있는 기초 자료를 제공해주는 데 유용하게 사용될 것이다.