

누에 속잠 혈림프의 멜라닌 생성 억제 효과

문지영 · 이희삼 · 이광길 · 권해용 · 조유영 · 여주홍*
국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과

Effects of matured silkworm hemolymph on suppressing melanin synthesis

Ji-Young Mun, Heui-Sam Lee, Kwang-Gill Lee, HaeYong Kweon, You-Young Jo and Joo-Hong Yeo*
Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Korea

(Received September 28, 2013, Accepted October 23, 2013)

ABSTRACT

In this study, matured silkworm hemolymph was studied for inhibitory effect on melanin formation, tyrosinase activities. A matured silkworm hemolymph mass purification method was developed and some of suppressing melanin formation effects were investigated, too. As a result, the advanced purification method was higher in yield rate than existing one by 53%. A free radical scavenging activity of hemolymph was higher than sericin on the market (IC_{50} , 202.9 ± 33.1) and lower than vitamin C (0.57 ± 0.02) by $6.4 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$. An inhibitory effect on melanin synthesis was higher in hemolymph compared to *Morus* bark and arbutin by 9.15% and 11.56%, respectively. An inhibitory effect on tyrosinase activity was higher in hemolymph than *Morus* bark and lower than arbutin. Effect of hemolymph $45 \mu\text{g}/\text{mL}$ on suppressing of tyrosinase was almost 90%. Thus, these results suggest that hemolymph of matured silkworm may have beneficial properties as a material for cosmetics.

Key words : Matured silkworm hemolymph, Antioxidant, Melanin synthesis, Tyrosinase activity

서 론

현재 화장품에 사용되는 원료 성분은 대부분 인공으로 합성한 조성을 많이 사용하고 있어서 민감한 피부일 경우 피부발진이나 알레르기 등의 부작용이 발생할 수 있다(Berne et al. 1996). 이와 같은 부작용을 완화시키기 위한 방편으로 친환경 소재 개발 연구가 진행되고 있으며 특히, 여러 천연 물질들의 미백, 항산화, 항균, 보습 효과 등이 과학적으로 입증되면서 이들에 대한 연구가 확대되고 있다(Mukherjee et al. 2011, Choi et al. 2010). 그러나 이러한 노력에도 불구하고 현재까지 알려진 천연물들은 피부 미백 효과가 그리 만족할 만한 효과를 나타내지 못하는 실정이다.

누에는 다른 곤충과 달리 사육시의 청결상태와 농약 등에 매우 민감하여 안전을 위한 검정용 실험곤충으로 활용되어질 수 있으며, 그 이유는 사육단계에서부터 친환경적이라고 생각되어지기 때문이다. 누에로부터 생산되는

누에고치의 성분 중, 세리신(sericin)과 피브로인(fibroin) 단백질은 이용한 소재가 화장품 재료로 이미 사용되고 있고, 피부 보습, 항산화, 피부친화 등의 효과가 보고되고 있다(Yeo et al. 2000, Dash et al. 2008, Lee et al. 2001). 한편, 누에 체액은 곤충세포배양을 위한 배지의 첨가물 정도로만 사용될 뿐 화장품 원료 조성물의 주성분으로 사용된 적은 없다. 누에 체액은 누에 자신에게 영양을 공급하는 용액으로써, 일명 누에 혈림프(hemolymph)라고 한다. 혈림프는 곤충세포를 비롯한 동물세포의 성장에 필요한 영양성분을 가지고 있으며, 악티노마이신(actinomycin), 캄토테신(camptothecin), 스타우로스포르린(staurosporine)과 같은 물질들에 의한 세포 자가사멸을 억제함으로써 세포 수명을 연장시키는 효과가 있음이 보고되어 있다(Zhang et al. 2011, Kim et al. 2003, Rhee et al. 2002, Choi et al. 2002).

본 연구에서는 이러한 누에 체액의 효과에 착안하여, 누에 유래 혈림프의 효과적인 정제법을 개발하고 멜라닌 생

*Corresponding author. E-mail: naasyeo@korea.kr

성 억제효과의 유무를 검정함으로써 이를 이용한 다양한 소재개발 가능성을 확인하였다. 이는 금후 누에 혈림프를 유허자원으로 활용하여 잠사 농가의 소득증대 효과를 도출해 낼 수 있을 것으로 기대되어진다.

재료 및 방법

1. 누에 속잠 혈림프 정제

누에는 동결건조한 후, 실샘을 제거한 나머지 누에조직을 분쇄하였다. 분쇄한 누에의 중량을 기준으로 20배의 증류수를 넣고 잘 섞은 뒤 60°C에서 30분간 열처리 하였다. 열처리로 티로시나아제를 불활성화한 후 14,000 rpm, 20°C 조건에서 10분 간 원심분리하여 그 정제액을 분무 건조기(Mini Spray Dryer B-191, BUCHI)로 분말화 하였다.

2. 항산화 효과 측정

누에 속잠 혈림프의 항산화 효과는 DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼 소거능과 활성산소(ROS) 억제효과로 확인하였다. 메탄올로 용해시킨 0.2 mM DPPH 160 μ l에 정제된 혈림프를 40 μ l 넣고 섞은 다음 빛을 차단하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료된 시료를 원심분리하여 그 상등액을 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조군으로는 비타민 C(L-Ascorbic acid, Sigma-Aldrich)와 세리신 단일 물질(Sericin *Bombyx mori* (silkworm), Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

활성산소 억제 효과는 세포내 활성산소 함량을 CM-H₂DCFDA 염료와 유세포분류기(Flow cytometry, Becton Dickinson)를 이용하여 측정하였다. 시료는 분리 전 혈림프 단백질(상등액)과 이온 교환 크로마토그래피로 30 kDa, 70 kDa 단백질을 각각 상등액에서 분리하여 준비하였다. 음전하를 갖는 Q컬럼을 이용하였고 20 mM 트리스(Tris)로 제조된 버퍼의 pH를 조정하였다. 20 mM 트리스와 1 M NaCl 버퍼를 흘러보내 흡착된 단백질의 전하 차이에 따라 분리되어 나오는 30 kDa, 70 kDa 단백질을 회수하였다. 줄기세포 배양 중 콜라게나아제(collagenase, 10 U/ml)를 4 일 동안 처리하여 활성산소를 유발하고 여기에 분리 전 상등액(30 kDa와 70 kDa이 혼합된 상태)과 분리된 30 kDa, 70 kDa 단백질을 각각 0.5 mg/ml 처리하였다. 세포를 트립신/EDTA(트립신 0.25%/EDTA 1 mM)로 배양접시에서 떼어내고 인산완충용액(PBS)으로 현탁시킨 후 1,300 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 세포를 다시 배양배지에 현탁시킨 후 원심분리 및 현탁과정을 반복하였다. 세포 현탁액에 5 M의 CM-H₂DCFDA 염료를 가하고 차광하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 30분간 반응시켰다. 발생하는 형광을 유세포분석기로 측정하여 10,000개의 세포 내에서 활성산

소에 의해 산화된 DCF-DA가 나타내는 형광도(excitation: 485 nm, emission: 535 nm)의 평균값을 계산하였다.

3. 멜라닌 생성 억제 효과 측정

세포배양을 이용한 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하였고, 세포는 BL6 멜라노사이트를 사용하였다. 96 well plate에 5 x 10³/well의 BL6 멜라노사이트를 분주하고, 24시간 후에 정제된 혈림프를 농도 별로 처리하였다. 72시간 후에 475 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 생성량을 측정하였다. 대조군은 세포를 제외한 시료와 배지로 하여 동시에 측정하였고 비교물질로는 알부틴(Arbutin, Sigma-Aldrich)과 상백피를 사용하였다.

4. 티로시나아제 활성 억제 효과 측정

Manson의 실험법(Manson 1947)을 바탕으로 하여 속잠 혈림프의 티로시나아제 활성 억제율을 측정하였다. 96 well plate에 120 μ l L-DOPA를 분주하고 정제된 혈림프와 대조군을 40 μ l씩 넣었다. Mushroom tyrosinase를 40 μ l 넣고 37°C 인큐베이터에서 30분간 방치 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비교물질로는 알부틴과 상백피를 사용하였고, 억제율은 아래의 식에 의거하여 계산하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{\text{시료의 반응 후 흡광도}}{(1-\text{대조군의 반응 후 흡광도})} \times 100$$

5. 통계처리

본 연구의 실험 결과들은 3회 반복하였고 자료의 통계 분석은 SPSS 18.0을 사용하여 실시하였다. 분산분석은 ANOVA test를 하였고 평균 차이에 대한 유의성 검정은 Duncan's multiple range test로 P < 0.05 수준일 때 유의적 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

1. 누에 속잠 혈림프 정제법 개선

누에 속잠 혈림프의 대량 정제 시 원심분리와 여과 공정의 수율을 개선하고자 연속식 원심분리기를 대량 정제법에 적용한 결과, 수율은 53% 향상되었고 정제 기간은 5일 단축되었다(Table 1).

2. 누에 속잠 혈림프의 항산화 효과

누에 속잠 혈림프의 DPPH 자유라디칼 소거능을 Table 2에 나타내었다. 평균 6.4 ± 0.3 μ g/ml로 나타난 반면, 항산화 효과를 나타내는 화장품 소재로 통상 쓰이는 15% 비타민 C는 0.57 ± 0.02 μ g/ml로 나타났다. 세리신은 누에

Table 1. Comparison of hemolymph purification in existing and advanced method

	Existing method (centrifuge+filtration)	Advanced method (continuous centrifuge)
Yield	15%	68%
Refinement period	7 days	2 days

Table 2. Effect of matured silkworm hemolymph on DPPH free radical scavenging activity

Materials	IC ₅₀ (μg/ml)
Silkworm hemolymph	6.4 ± 0.3 ^b
Sericin(Sigma-aldrich)	202.9 ± 33.1 ^a
Vitamin C	0.57 ± 0.02 ^c

실샘에서 분리한 단백질로 누에 자원 중에서 항산화능이 있다고 알려져 있다. 본 실험에서 혈림프와 비교할 수 있는 항산화력을 지닌 다른 누에 자원으로 세리신 단일 물질을 선택하여 비타민 C와 함께 대조군으로 사용하였다. 숙잠 혈림프는 비타민 C 보다는 약하나, 세리신 단일 물질보다 항산화 효과가 30배 이상 탁월함을 알 수 있었다.

숙잠 혈림프의 활성산소 생성 억제 효과는 Fig. 1에 나타내었다. 혈림프 단백질과 분리된 30 kDa, 70 kDa 단백질을 확인할 수 있었고(Fig. 1. A), 이들을 이용한 활성산소 생성 억제 효과에 있어서도 모두 대조군보다 억제 효과가 뛰어난 결과를 나타내었다. 혈림프 단백질이 대조군보다 약 2배, 70 kDa 단백질이 30 kDa 단백질에 비해 약 1.7 배 활성산소 생성 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(Fig. 1. B).

3. 누에 숙잠 혈림프의 멜라닌 생성 억제 효과

숙잠 정제 혈림프의 멜라닌 생성 억제 효과를 상백피와 알부틴을 대조로 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에 나타나 있는 것과 같이 대조인 상백피와 알부틴보다 누에 숙잠 혈림프의 멜라닌 생성 억제 효과가 우수하게 나타남을 확인하였는데 숙잠 혈림프의 농도가 1% 시에 21.3%로 상백피 12.15%, 알부틴 9.74%보다 각각 9.15%, 11.56% 효과가 더 좋았다. 이러한 경향은 혈림프의 농도가 5%와 10%일 때에도 동일하게 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때 누에 숙잠 혈림프는 미백효과가 뛰어난 화장품 원료 조성물로 사용 가능할 것으로 생각되어진다.

4. 누에 숙잠 혈림프의 티로시나아제 활성 억제 효과

누에 숙잠 혈림프의 농도를 30 ~ 450 μg/ml로 제조하여 티로시나아제 활성 억제 효과를 측정하였다(Fig. 3). 대조인 상백피보다 숙잠 혈림프의 티로시나아제 활성 억제 효

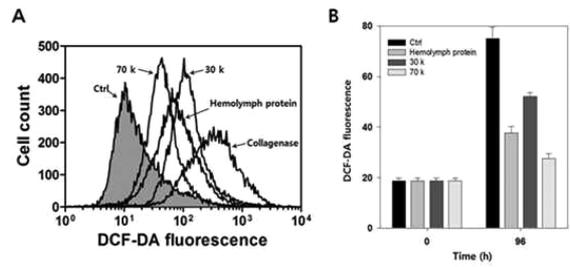


Fig. 1. Effect of matured silkworm hemolymph on suppressing of ROS production.

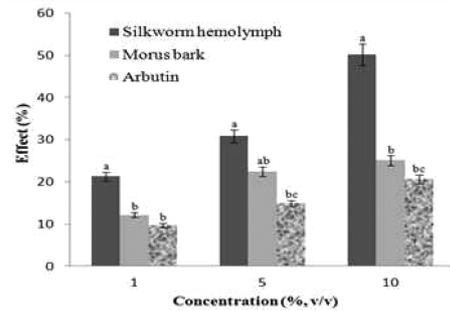


Fig. 2. Effect of matured silkworm hemolymph on suppressing of melanin synthesis.

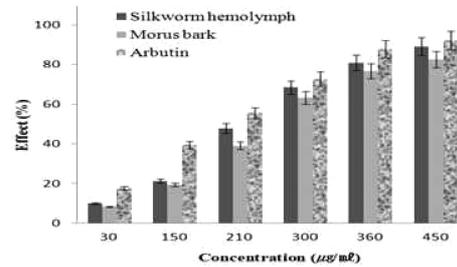


Fig. 3. Effect of matured silkworm hemolymph on suppressing of tyrosinase activity.

과가 450 μg/ml 농도에서 약 90%로 우수하였으나 단일 물질인 알부틴보다는 억제 효과가 약간 떨어지는 결과를 보였다. 이러한 경향은 모든 실험 농도에서 동일하게 나타났다.

적 요

본 연구는 누에 숙잠 혈림프의 멜라닌 생성 억제 효과에 대해 알아보기 위해 수행되었다. 실샘을 제거한 누에 숙잠에서 혈림프를 정제하였고, 이의 항산화, 멜라닌 생성 억제, 티로시나아제 활성 억제 효과 여부를 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 숙잠의 실샘을 제거한 후, 나머지 누에조직을 분쇄하여 원심분리 후 여과하였던 기존의 방식에서 연속식 원심분리로 정제 방법을 개선한 결과, 수율은 53% 증가하였고 정제기간은 5일 단축되었다.

2. 누에 숙잠 혈림프의 DPPH 자유라디칼 소거능을 측정한 결과 비타민 C 보다는 효과가 떨어졌지만 세리신 단일 물질보다 높은 효과를 나타내었다.
3. 숙잠 혈림프 단백질을 음이온 교환 크로마토그래피로 분리하여 활성산소 억제 효과를 측정한 결과, 70 kDa 과 30 kDa 단백질이 모두 포함되어 있는 혈림프 단백질(상등액)이 대조군보다 2배, 70 kDa 단백질이 30 kDa 단백질에 비해 약 1.7배 활성산소 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.
4. 누에 숙잠 혈림프의 멜라닌 생성 억제 효과는 미백 화장품 소재로 널리 사용되는 상백피와 알부틴보다 각각 9.15%, 11.56% 더 우수함을 확인하였다(혈림프 1% 농도 기준).
5. 티로시나아제 활성 억제 효과는 대조인 상백피보다 누에 숙잠 혈림프의 티로시나아제 활성 억제 효과가 우수하였으나 단일 물질인 알부틴보다는 억제 효과가 떨어지는 결과를 나타내었다. 하지만 정제 혈림프 농도 450 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 90%에 이르는 티로시나아제 활성 억제 효과를 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 기관고유과제(과제번호: PJ008559)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

Berne B, Bostrom A, Grahnen AF, Tammela M (1996) Adverse effects of cosmetics and toiletries reported to the Swedish medical products agency 1989-1994. Contact Dermatitis

- 34(5), 359-62.
- Choi HK, Kim DH, Kim JW, Ngadiran S, Sarmidi MR, Park CS. (2010) *Labisia pumila* extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. J Bioscience and Bioengineering **109**(3), 291-296.
- Choi SS, Rhee WJ, Park TH (2002) Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. Biotechnology progress **18**(4), 874-878.
- Dash R, Acharya C, Bindu PC, Kundu SC (2008) Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. BMB Rep **41**(3), 236-241.
- Kim EJ, Park HJ, Park TH (2003) Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph. Biochemical and Biophysical Research **308**(3), 523-528.
- Lee KG, Yeo JH, Lee YW, Kweon HY, Kim JH (2001) Bioactive and skin-compatible properties of silk sericin. Korean J Seric Sci **43**(2), 109-115.
- Manson HS (1947) The Chemistry of Melanin. J. Biol. Chem **172**, 83.
- Mukherjee PK, Maity N, Nema NK, Sarkar BK (2011) Bioactive compounds from natural resources against skin aging. Phytomedicine **19**(1), 64-73.
- Rhee WJ, Kim EJ, Park TH (2002) Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells. Biochemical and Biophysical Research **295**(4), 779-783.
- Yeo JH, Lee KG, Kim HC, Oh YL, Kim AJ, Kim SY (2000) The effect of PVA/chitosan/fibroin (PCF)-blended sponge on wound healing in rats. Biol Pharm Bull **23**(10), 1220-1223.
- Zhang R, Li J, Liu K, Li A, Peng J, Hong H (2011) Apoptosis induced by actinomycin D in *Spodoptera litura* cells and the effect of two insect hemolymph on apoptosis. Bioinformatics and Biomedical Engineering pp.1-4. (iCBBE) 5th International conference.