

효소(Protopectinase) 처리한 대두가 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향

유진균[†] · 이진희 · 조형용 · 김정국
차바이오 에프앤씨 기업부설 연구소

The Effects of Soybean Protopectinase on Melanin Biosynthesis

Jin-Kyoun Yoo[†], Jin-Hee Lee, Hyung-Yong Cho, and Jung-Gook Kim

Laboratory Affiliated with a CHA BIO F&C, Seoul 135-830, Korea

Abstract

This study was performed to assess the antioxidant activities and whitening effects of protopectinase enzymes and mechanical maceration from soybeans on melanin synthesis. The whitening effects of enzyme treatment and mechanical maceration were examined by an *in vitro* mushroom tyrosinase assay and by assessing markers in B16BL6 melanoma cells. We assessed inhibitory effects on the expression of melanogenic enzymes, including tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), and tyrosinase-related protein 2 (TRP-2) in B16BL6 cells. Inhibitory effects on free radical generation were determined by measuring DPPH and hydroxyl radical scavenging activities. In DPPH radical scavenging activity, enzyme treatment and mechanical maceration had a potent anti-oxidant activity in a dose-dependent manner and significantly inhibited tyrosinase activity *in vitro* and in B16BL6 melanoma cells. There was also an inhibition in the expression of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 in B16BL6 melanoma cells. Our results show that soybean protopectinase treatment inhibits melanogenesis, with the underlying mechanism possibly due to the inhibition of tyrosinase activity and tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 expression. We suggest that soybean protopectinase should be contained as natural active ingredients for antioxidant and whitening cosmetics.

Key words: enzyme, protopectinase, single cell plant, live cell, soybean

서 론

21세기의 생명공학의 발전과 생활수준의 향상으로 인간의 평균 수명이 증가된 고령화 사회로 접어들면서 아름답게 나이를 먹는 것에 대한 욕구가 강해졌다. 이러한 시대에 부흥하여 기능성 화장품 분야의 시장 규모가 확대되고, 천연물을 활용한 이 분야의 연구는 급속히 진행되고 있다(1).

외모에 대한 관심이 여성뿐만 아니라 남성들에게도 증가하고 있고 외모가 하나의 사회적 경쟁력이라는 인식이 증가됨에 따라 화장품업계의 관심이 남성 화장품과 먹을수록 피부가 고와지는 미용식품으로까지 확대되었다. 미용식품은 건강기능성 식품이나 의약품으로 분류돼 엄격한 면에서 화장품은 아니지만 Inner Beauty가 화장품 업계와 소비자들에게 깊이 인식되면서 넓은 범부의 화장품으로 인식되고 있다. Inner Beauty의 개념이 주목되면서 화장품업계에서는 식품에 대한 관심을 가지기 시작하였고, 식품영양업계는 화장품에 대한 관심이 증가하여 공동연구들이 활발하게 이루어지고 있다(2).

피부는 자외선의 영향을 받기 쉬운 기관이다. 자외선의

영향으로 활성산소가 생성되고 이에 따라 생성된 활성 산소종은 피부 세포를 손상시키며 손상 받은 세포는 식세포에 의해 제거된다. 자외선을 받으면 피부에서 색소침착이 증가되는데, 이와 같이 색소침착이 증가하는 것은 자외선흡수에 의한 피부 세포의 손상을 억제할 목적으로 멜라닌 생성이 증가된 결과이다. 때문에 이러한 활성 산소종을 제거할 수 있는 항산화제는 활성 산소종에 대항하여 피부 세포를 보호함으로써 멜라닌 생성 증가를 억제하여 색소침착을 줄여 줄 수 있을 것이다(3). 현재 butylated hydroxy anisol(BHA) 및 butylated hydroxy toluene(BHT) 등의 합성 항산화제가 개발되어 사용되고 있으나 생체 효소 및 지방의 변이원성 및 독성으로 인하여 암을 유발할 수 있다는 보고(4)가 있어 천연식물에서 보다 강하고 안전한 항산화 물질을 찾아내는 것이 중요하다.

멜라닌은 생물체에 널리 분포되어 있는 색소로 인체에서는 표피층에 있는 melanocyte에서 합성된다. 이러한 멜라닌의 생합성 과정에 작용하는 주요 효소가 tyrosinase이다. Tyrosinase는 polyphenol oxidase의 일종이며 구리를 함유한 효소로서 색소 세포에서 tyrosine을 L-3,4-dihydroxy-

[†]Corresponding author. E-mail: welcome213@chamc.co.kr
Phone: 82-10-2701-1712, Fax: 82-2-508-6497

phenylalanine(DOPA)으로 변환하고 효소적 산화 반응에 의한 단계를 거쳐 dopaquinone, dopachrome으로 변환하여 멜라닌을 생합성 한다. 멜라닌 생성은 이들 tyrosinase 효소활성뿐만 아니라 tyrosinase-related protein(TRP)-1과 TRP-2(dopachrome tautomerase, DCT)의 활성화에 의해서도 생성된다. 따라서 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2 활성 억제 실험은 유용한 일차 평가 방법으로 인정되고 있다. 세포 내 멜라닌이 과잉 생산되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소 침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하므로 멜라닌 생성을 억제하는 천연의 식물 추출물을 대상으로 미백 기능성 화장품에 이용 가능한 유효 추출물을 찾아내는 것은 중요하다(5).

미백 기능성을 갖는 물질에 관한 연구는 tyrosinase의 활성을 억제하는 수준에서 대부분 이루어져 왔으며, 이러한 tyrosinase 저해제로 많이 알려진 물질로는 hydroquinone, ascorbic acid, kojic acid, azelaic acid, arbutin 등이 있지만 안정성, 경제성 등의 문제로 사용이 제한되고 있다(6). 따라서 최근 화장품 업계에서는 안전성을 고려하여 천연 소재로부터 미백 효과가 강화된 기능성 화장품에 대한 요구가 높아지고 있다. 천연물을 원료로 한 미백 기능성 소재로는 신선초(7), 마황(8), 연잎과 연꽃수술(9), 닭의장풀(10), 백강잠(11), 당귀(12), 쇠비름(13), 제비꽃(14), 복분자(15), 교맥(16), 노루궁뎅이 버섯(17), 대나무와 산삼(18), 백부자(19) 등이 있으며 이외에도 많은 연구가 진행되었다. 현재 주로 이용하고 있는 가공에서 가장 문제가 되는 것은 열처리 및 기계적 마쇄로 인한 영양 및 생리활성 성분들의 파괴, 색이나 향기와 같은 기호성분의 변화, 부유물질의 생성 등이다. 이러한 문제를 개선할 수 있는 방법 중의 하나로 식물의 단세포화이다.

Protopectinase(PP)는 식물세포에 있어 세포와 세포 간의 중엽부(middle lamella)의 주성분을 이루며 pectin의 모체가 되는 불용성 protopectin을 제한 가수분해하여 수용 pectin을 생산하는 효소로서 그 작용기작과 생산 미생물들이 보고되고 있다(20-22). 최근 식품, 의약품 산업에서의 pectin 생산, 식물성 식품소재를 위한 단세포화, 식물세포의 protoplast 생산 등에 응용성을 가진다고 보고되었으며 그 중요성은 점차 증가하고 있다.

본 연구에서는 대두의 protopectinase 효소 처리가 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 활성 변화에 대하여 관찰하였다.

재료 및 방법

실험 재료

대두는 올해(2012년) 강원도에서 재배된 것을 사용하였으며 효소는 pectinex Ultra SP-L(Nobozyne, Bagsvaerd, Denmark)을 사용하였다.

샘플 제조

우선 기계적 마쇄 가공한 대두추출물은 먼저 대두를 깨끗이 세척하여 완전히 건조한 뒤 분쇄하여 분말화 하였으며 무게당 10.7배의 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 교반하면서 유효성분을 추출한 후 감압농축(SB-1000, EYELA, Tokyo, Japan) 하였다. 그 후 동결건조(FD 5805, IIShin, Yangju, Korea) 하여 제조하였다.

효소처리 한 대두추출물은 대두 무게당 3배수의 증류수를 넣어 24시간 동안 실온에 방치하여 재수화 시킨 후 다시 무게당 3배수의 증류수를 가하였으며 구연산을 이용하여 pH 5.2를 맞춰 주었다. 그 뒤 무게당 1% 농도로 효소를 첨가한 뒤 50°C에서 8시간 교반하였다. 그 후 온도를 80°C로 올려 효소 불활성화 처리를 하였으며 감압농축(SB-1000, EYELA) 하였다. 그 후 동결건조(FD 5805, IIShin) 하여 시료로 사용하였다.

DPPH free radical 소거작용

DPPH radical 소거활성은 Blois 등(23)의 방법에 따라 측정하였다. 각 소재 추출물을 에탄올로 희석하여 농도별로 준비한 시료 600 µL에 DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 200 µL를 첨가하여 암조건에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 에탄올을 넣어 측정하였으며, 다음 계산식에 의거하여 소거활성(%)을 측정하였다.

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}(532 \text{ nm})}{\text{대조구의 흡광도}(532 \text{ nm})}\right) \times 100$$

Hydroxyl radical 소거작용

Hydroxyl radical 소거 활성은 Chung 등(24)의 방법을 응용하여 측정하였다. 각 소재 추출물을 농도별로 희석한 후 각 추출물 100 µL, 100 mM sodium phosphate(pH 7.4) 250 µL, 1 mM EDTA 100 µL, 36 mM deoxyribose 100 µL, 1 mM FeCl₃·6H₂O 100 µL, 1 mM L-ascorbic acid 100 µL, 10 mM H₂O₂ 100 µL, 증류수 150 µL를 첨가하여 38°C water bath에서 1시간 방치 후 1% thiobarbituric acid 1 mL, 10% trichloroacetic acid 1 mL를 첨가하여 100°C에서 10분간 boiling 후 532 nm에서 흡광 측정하였으며, 다음 식에 의거하여 hydroxyl radical 소거활성(%)을 구하였다.

$$\left(\frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Mushroom tyrosinase 활성 억제 작용

Tyrosinase 효소 활성은 Shin(25)의 방법을 응용하여 측정하였다. 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2 mL, 5 mM L-DOPA solution 0.2 mL 및 소재 물 추출물 0.5 mL의 혼합액에 tyrosinase(250 U/mL) 0.1 mL를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 다음 475 nm에서 측정하였다.

세포 배양

Mouse melanoma cells(B16BL6 melanoma cells)와 hu-

man skin cells(CCD-986sk)를 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받은 뒤 25 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, minimum essential(MEM) 90%와 heat inactivated fetal bovine serum(FBS) 10%를 배양액으로 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포 생존율

배양이 끝난 세포 생존율은 Chung 등(26)이 사용한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 세포를 96-well plates에 1×10⁶ cells/mL 농도로 150 µL씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 목단피 물 추출물을 농도별로 제조한 후 세포에 처리하였고, 처리 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 MEM의 10분의 1에 해당하는 MTT 용액(5 mg/mL)을 가하여 주고 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시킨 후 상층액을 제거하였다. 그런 다음 암 조건에서 30분간 건조한 후 DMSO를 100 µL씩 분주하여 1시간 동안 shaking 한 후 570 nm에서 흡광 측정하였다.

세포내 tyrosinase 활성 측정

세포를 24-well plates에 1×10⁵ cells/mL으로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 목단피 물 추출물을 농도별로 제조하여 세포에 처리하였고 24시간 동안 더 배양하였다. 시료 처리 배지를 제거한 뒤 pH 6.8의 phosphate-buffer saline(PBS)으로 세척하였고, 1% Triton X-100가 함유된 PBS를 wells에 첨가한 뒤 cell scraper로 wells에 붙어 있는 세포를 떼어내어 1.5 mL 튜브에 모아 -70°C에 급속 냉동시킨 후 해동시켰으며 이와 같은 방법을 3번 반복하여 세포막을 파괴하였다. 10,000×g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 tyrosinase 활성 측정을 위한 효소원과 단백질 측정을 위한 시료로 사용하였다. Bradford reagent(Sigma-Aldrich Korea, Goyang, Korea)으로 단백질 정량을 하였으며, tyrosinase 활성 측정은 10 mM L-dopa 200 µL와 0.1 M PBS(pH 6.8) 500 µL, tyrosinase 효소원(세포로부터 얻은 상층액) 300 µL를 첨가한 후 35°C에서 1시간 배양한 다음 475 nm에서 흡광 측정하였다.

멜라닌 함량 측정

Mouse melanoma B16BL6 세포를 24-well plates에 1×

10⁶ cells/mL으로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 소제 추출물을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지에 함유된 소제 추출물을 제거한 후 1 N NaOH를 500 µL 분주하여 24시간 동안 세포를 녹인 후 100°C에서 30분간 가열한 다음 450 nm에서 흡광 측정하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 6-well plates에 1×10⁶ cells/mL로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 소제 물 추출물을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지에 함유된 소제 추출물을 제거한 후 QIAzol lysis buffer를 각 wells에 500 µL씩 분주하여 세포를 lysis한 후 -70°C에 보관하였다. 보관된 시료를 실온에서 녹인 후 chloroform 200 µL를 분주하여 15초간 섞었다. 그 후 12,000×g 15분간 원심분리 하여 상층액을 isopropanol 500 µL가 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000×g 10분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% ethanol과 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 75:25로 섞어 만든 75% ethanol을 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 12,000×g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water 40 µL씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 µL에 0.1% DEPC 955 µL를 첨가하여 260 nm에서 흡광 측정하여 total RNA 양을 정량하였다. Oligo(dT)₁₅ primer (500 µg/mL) 1 µL, dNTP mix(10 mM) 1 µL, 추출한 RNA(2 µg)와 RNase free water로 11 µL를 맞추고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 5×first-stand 완충용액 4 µL, nuclease free water 1 µL, DTT(100 mM) 2 µL, Super Script III Reverse Transcriptase 1 µL를 섞어 9 µL씩 각 PCR tube에 더한 후 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

PCR

Tyrosinase 및 TRP-1과 TRP-2의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 Table 2와 같다. PCR tube에 Go Tag Green Master 10 µL, forward primer(15 µM)와 reverse primer(15 µM)를 각각 0.5 µL, nuclease free water 8 µL, 합성한 first-stand cDNA 1 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. Tyrosinase PCR 조건은 94°C에서 4분(1 cycle), 94°C에서 30초, 62°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초(21 cycles), 72°C에서 5분(1 cycle)이었고, GAPDH PCR 조건은 94°C에서 4분(1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 30초,

Table 1. The sequences of the primers of the tyrosinase (TYR), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2, and GAPDH for mouse melanoma cells

Gene	Forward primer ¹⁾	Reverse primer
TYR	GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGT	TGGTGCYYCATGGGCAAAATC
TRP-1	GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC	AAGACGCTGCACTGCTGGTCT
TRP-2	GGATGACCGTGAGCAATGGCC	CGGTTGTGACCAATGGGTGCC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

¹⁾Primers are shown 5'→3'.

Table 2. The sequences of the primers of the tyrosinase (TYR), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2, and GAPDH for human skin cells

Gene	Forward primer ¹⁾	Reverse primer
TYR	CATTCTTCTCCTCTTGGCAGA	CCGCTATCCCAGTAAGTGGA
TRP-1	GCTTTTCYCACAYGGCACAG	GGCTCTTGCAACATTTCTCTG
TRP-2	CGACTCTGATTAGTCGGAACCA	GGTGGTTGTAGTCATCCAAGC
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCAATACGACCAAATCC

¹⁾Primers are shown 5'→3'.

그리고 72°C에서 30초(21 cycles), 72°C에서 5분(1 cycle)이었다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.2% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 자외선광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 Sigma-Plot(Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 각 농도의 평균치의 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

DPPH radical 소거작용

식물의 항산화 활성은 free radical에 전자를 공여하는 능력이므로 비교적 안정한 DPPH radical을 환원시키는 원리를 이용한 방법으로 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 환원되어 색이 탈색되는데 이것은 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다(27). Choe 등(28)은 7종의 한약재 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 알아본 결과 산수유와 목단피 물 추출물은 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 유사한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었으나 1,000 ppm의 백복령과 숙지황 물 추출물은 50% 이하의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다고 보고한바 있다. 대두의 DPPH radical 소거능을 측정된 결과 Fig. 1과 같다. 효소처리군과 기계적 마쇄군 모두 농도 의존적으로 유의적 상승을 보였으며 1,000 ppm 기준으로 효소처리군이 71%, 마쇄군이 52%로 약 20%의 차이를 보였다. 이는 효소처리에 의하여 세포막이 보호됨으로써 추출효율이 더 높아졌다고 사료된다. 또한 본 실험에 사용한 대두의 효소처리군이 백복령과 숙지황에 비하여 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다.

Hydroxyl radical 소거작용

Hydroxyl radical은 DAN의 핵산과 결합함으로써 DNA 손상을 일으키므로 돌연변이와 암을 유발하는 것으로 알려져 있고 지질 산화를 일으켜 세포막을 손상시키므로 세포독성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 대두의 hydroxyl radical 소거능을 효소처리군과 마쇄군으로 비교해보았을 때 Fig. 2와 같다. 10,000 ppm 기준에서 각각 31%와 21%로 약 10%

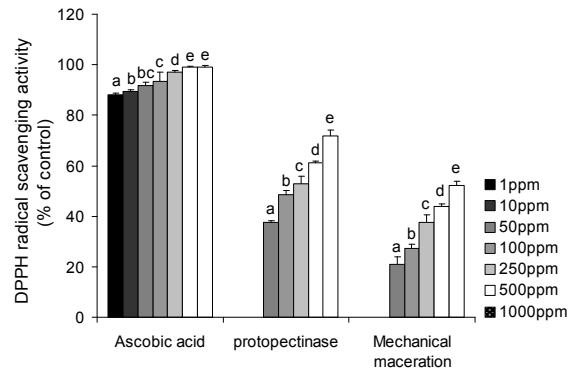


Fig. 1. Effect of soybean suspension with treatment of protopectinase and mechanical maceration on DPPH radical scavenging activity. The values shown are means \pm SD (n=3). Within the same kind of wild vegetables, values with different superscripts are significantly different from each other ($p < 0.05$), as determined by Duncan's multiple range test.

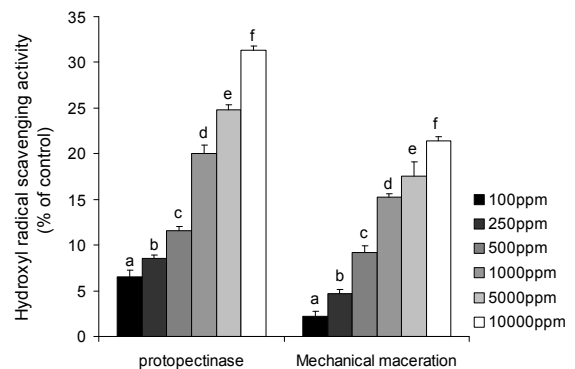


Fig. 2. Effect of soybean suspension with treatment of protopectinase and mechanical maceration on hydroxyl radical scavenging activity. The values shown are means \pm SD (n=3). Within the same kind of wild vegetables, values with different superscripts are significantly different from each other ($p < 0.05$), as determined by Duncan's multiple range test.

의 hydroxyl radical 소거능 차이를 보였다. Shin 등(29)은 hydroxyl radical 소거작용이 물 추출물에서보다 에탄올 추출물에서 월등히 높았고, 생마늘과 쯤마늘 열수 추출물 20,000 ppm 농도에서 각각 10.22%와 11.09%의 활성을 나타내었으며, 흑마늘은 같은 농도에서 45.33% hydroxyl radical 소거작용을 나타내었으나 1,000 ppm 농도에서는 소거활성이 나타나지 않았다고 보고하여 본 실험에서 사용된 대두 효소 처리군은 일반 마늘 및 흑마늘보다 높은 hydroxyl radical 소거작용을 나타내었다. 두 항산화 실험 결과 대두의 효소처리군이 기계적 마쇄군보다 항산화력이 높았다. 이는

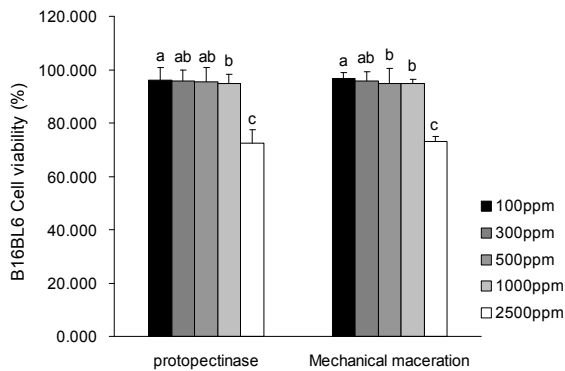


Fig. 3. Effect of soybean suspension with treatment of pro-
topectinase and mechanical maceration on the viability of
B16BL6 cells. The values shown are means±SD (n=3). Within
the same kind of wild vegetables, values with different super-
scripts are significantly different from each other (p<0.05), as
determined by Duncan's multiple range test.

효소처리로 인하여 세포막이 보호되어 대두가 가지고 있는
항산화력의 손실이 적은 것이라 사료된다.

세포 생존률

대두의 효소처리균 및 마쇄처리균이 mouse melanoma
B16BL6 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여
시료를 다양한 농도로 처리하여 배양한 후에 MTT 방법으
로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 3과 같이 B16BL6 세
포에 대하여 각 농도별(100, 300, 500, 1,000, 2,500 ppm)로 처
리하였을 때 100 ppm부터 1,000 ppm 농도까지 90% 이
상의 세포 생존율을 유지하였으며 저 농도일수록 세포의 생
존율이 높았다. 최고 농도인 2,500 ppm에서는 70% 정
도의 생존율을 나타내었다. 세포의 생존율에 영향을 미치지
않는 범위 내에서 실험을 진행하기 위하여 세포내 tyrosinase
활성 및 TRP-1, TRP-2 mRNA 발현에 대한 실험에서는 100,
300, 500, 1,000 ppm 농도 범위에서 진행하였다.

Mushroom tyrosinase 활성 억제

멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase의
억제 활성은 mushroom tyrosinase를 효소원으로 하여 기
질인 L-DOPA와의 반응으로 생성된 L-dopaquinone의 흡광
도를 측정하였다. *In vitro* mushroom tyrosinase 억제 효
능을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. Control균을 100% 활
성을 띠었을 때 효소처리균에서는 각 농도별 95.82%, 84.98%,
77.55%, 72.84%의 활성을 보였으며 마쇄처리균에서는 98.13
, 90.50%, 88.96%, 81.36%의 활성을 보였다. 효소처리균이 마
쇄처리균에 비하여 약 10% 정도 tyrosinase의 활성을 억제하
는 것으로 관찰되었다. 멜라닌 생성을 억제하는 피부 미백제
개발에는 멜라닌 생성의 key enzyme인 tyrosinase의 활성
을 억제하는 것이 필수적이다. 결과적으로 대두는 tyrosinase
의 억제 활성을 보였으며 특히 효소처리균에서 더욱 뛰어난
억제활성을 보였다. Shin(25)의 연구결과 100 ppm에서 홍경
천(81%), 인삼(87%), 갈근(90%), 오미자(80%), 연교(81%),

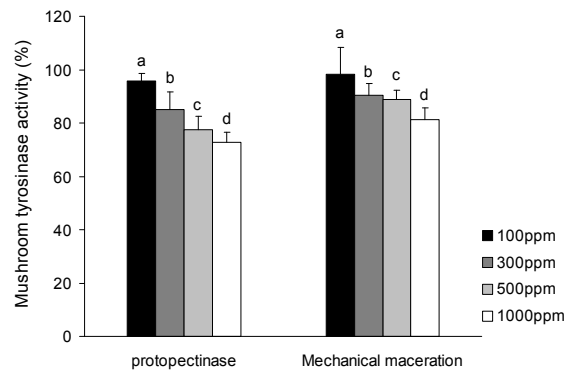


Fig. 4. Effect of soybean suspension with treatment of pro-
topectinase and mechanical maceration on mushroom ty-
rosinase activity *in vitro*. The values shown are means±SD
(n=3). Within the same kind of wild vegetables, values with dif-
ferent superscripts are significantly different from each other
(p<0.05), as determined by Duncan's multiple range test.

홍화씨(82%), 창출(86%)의 mushroom tyrosinase의 활성을
보여 본 연구 결과와 유사하였고, 상지(26%), 느타리버섯
(60%), 약쭈(52%) 추출물은 60% 이하의 활성을 나타냈다고
보고하였다.

B16BL6 melanoma를 이용한 tyrosinase 활성 억제

세포 독성이 없는 농도 범위에서 대두의 효소처리균과 마
쇄처리균의 B16BL6 mouse melanoma의 세포내 tyrosinase
활성 저해 효과를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 1,000 ppm을
기준으로 하였을 때 효소처리균은 70.48%의 활성을 보여
약 30%의 활성 억제율을 보였으며 마쇄처리균은 79.24%로
약 20%의 활성 억제율을 보였다. 두 균 모두 농도 의존적으
로 유의하게 세포내 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내었
다. Yoo 등(8)은 알부틴의 0.5% 농도에서 78.1%의 멜라닌
생성 억제율을 나타냈다고 보고하였고, No 등(16)은 교맥
에탄올 추출물 50, 100 µg/mL 농도에서 각각 대조군에 비해
81%, 50%로 tyrosinase의 활성이 감소하였다고 보고하였다.
대두의 두 처리균 경우 효소처리균에서 더 많은 tyrosinase

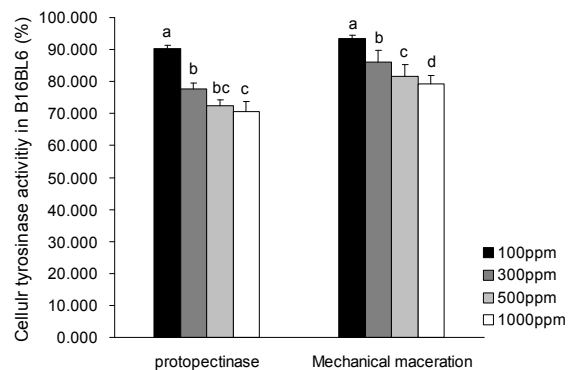


Fig. 5. Effect of soybean suspension with treatment of pro-
topectinase and mechanical maceration on the tyrosinase ac-
tivity in B16BL6 cells. The values shown are means±SD (n=3).
Within the same kind of wild vegetables, values with different
superscripts are significantly different from each other (p<0.05),
as determined by Duncan's multiple range test.

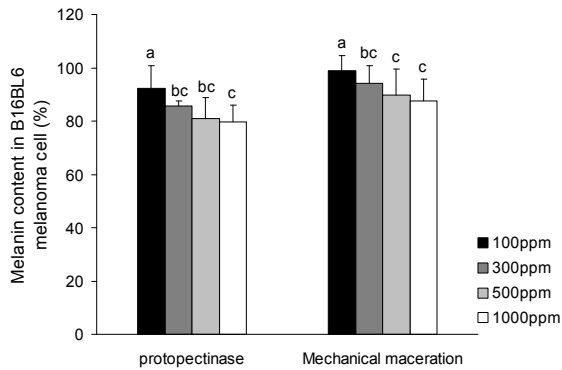


Fig. 6. Effect of soybean suspension with treatment of protopectinase and mechanical maceration on melanin content in B16BL6 cells. The values shown are means \pm SD (n=3). Within the same kind of wild vegetables, values with different superscripts are significantly different from each other ($p < 0.05$), as determined by Duncan's multiple range test.

억제 활성을 보였으며 피부 색소 침착 등을 방어할 수 있는 미백 기능성 화장품의 기존의 가공법보다 더 뛰어난 소재로 개발될 것으로 사료된다.

멜라닌 함량 측정

대두의 효소처리군과 마쇄처리군의 B16BL6 mouse melanoma 세포의 멜라닌 함량을 측정해본 결과 Fig. 6과 같다. Control군을 100%로 하였을 때 효소처리군에서는 79.54%의 멜라닌 함량을 보였으며 마쇄처리군에서는 87.54%의 멜라닌 함량을 보여 약 10%의 멜라닌 함량 차이를 보였다. 이는 tyrosinase 활성 결과와 일치하는 경향을 보였으며, 이는 멜라닌 합성에 관여하는 key enzyme인 tyrosinase 활성 억제로 인하여 멜라닌 함량 또한 감소된 것으로 판단된다. Park 등(10)은 신선채 추출물의 핵산 및 에틸아세트 분획물이 알부틴보다 낮은 농도에서 IC₅₀을 넘었다고 보고하였으며, 이는 멜라닌 생합성 과정의 upstream에 작용하는 tyrosinase 단백질의 활성을 저해함으로써 downstream으로의 진행을 저지하여 B16BL6 melanoma 세포의 멜라닌 합성 억제 효과에 직접적으로 관여하기 때문이라고 보고하였다. 피부는 자외선에 노출되면 tyrosine에서 출발하여 일련에 산화 중합 반응을 거쳐 생성된 멜라닌에 의해 기미, 노인성 홍반 등을 유발하며 피부 노화가 촉진된다. 이 과정에서 중요하게 작용하는 효소가 tyrosinase이며, tyrosinase의 활성을 억제시킴으로써 멜라닌 생합성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다.

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현에 미치는 영향

멜라닌 합성은 melanosome 내에 존재하는 tyrosinase의 작용을 통하여 이루어진다. 따라서 tyrosinase 발현을 억제하면 멜라닌 합성을 억제할 수 있다. 본 실험에서는 대두의 효소처리군과 마쇄처리군이 멜라닌 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 대두

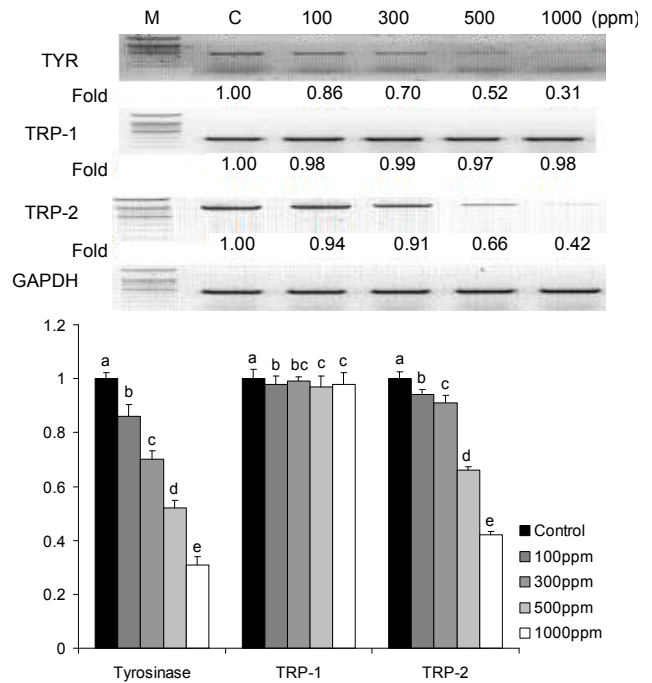


Fig. 7. Effect of soybean suspension with treatment of protopectinase on tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA expression in B16BL6 cells. The tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA levels in each sample was normalized to the quantity of GAPDH. The fold induction of tyrosinase mRNA in treated cells was calculated as ratio of the corresponding mean value of the control cells. The values shown are means \pm SD (n=3). Within the same kind of wild vegetables, values with different superscripts are significantly different from each other ($p < 0.05$), as determined by Duncan's multiple range test.

효소처리군은(Fig. 7) 100, 300, 500, 1,000 ppm 농도에서 tyrosinase 단백질 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였고 1,000 ppm에서 현저한 억제율을 보였으며, TRP-1에는 별다른 영향을 미치지 못하였고 TRP-2의 발현은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 발현을 억제하는 것을 관찰하였다. 대두 마쇄처리군(Fig. 8) 또한 농도 의존적으로 tyrosinase와 TRP-2의 발현을 억제하였으며 TRP-1에서는 별다른 영향을 미치지 못하였다. 또한 효소처리군에 비하여 약 10~15% 정도 낮은 mRNA 발현을 보였다. TRP-1은 TRP-2에 의해 생성된 DHICA를 산화시켜 IQCA를 생성하는데 이는 흑갈색을 나타낸다. 따라서 TRP-1 및 TRP-2 발현을 억제하면 미백 효과를 기대할 수 있다. 최근 미백 물질의 탐색 방법으로 멜라닌 생성 기전에 관련된 단백질 발현을 조절하는 물질 melanosome 이동을 억제하는 물질, α -melanocyte 자극 호르몬(α -MSH)과 같은 melanogenesis 기전을 방해하여 미백 효과를 나타내는 물질 연구도 많이 진행되고 있다(31-33). 또한 가공 중 파괴되는 영양소의 손실을 줄이고자 하는 연구도 많이 진행되고 있다. 본 연구 결과 대두에는 멜라닌 생성에 관여하는 단백질을 억제시키는 능력이 있는 것을 확인할 수 있었다. 특히 효소처리 기법을 통하여 기존의 마쇄처리 기법에 의한 영양소의 손실이 멜라닌 생성에

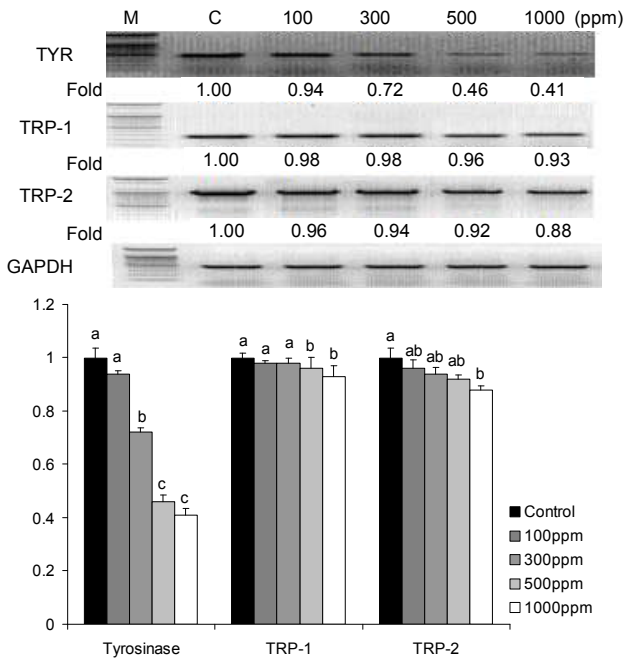


Fig. 8. Effect of soybean suspension with mechanical maceration on tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA expression in B16BL6 cells. The tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA levels in each sample was normalized to the quantity of GAPDH. The fold induction of tyrosinase mRNA in treated cells was calculated as ratio of the corresponding mean value of the control cells. The values shown are means±SD (n=3). Within the same kind of wild vegetables, values with different superscripts are significantly different from each other (p<0.05), as determined by Duncan's multiple range test.

관여하는 성분의 손실을 줄이고 있다는 것을 확인하였다. 추후 효소처리 기법이 대두의 영양 성분 변화 대한 추가적 연구와 미백 효과에 작용하는 유전자 발현에 대한 추가 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 효소처리 한 대두추출물의 항산화 및 미백 효과를 확인하기 위하여 DPPH 및 hydroxyl radical 포착활성을 측정하였고, 멜라닌 생성의 첫 단계인 tyrosinase 활성, mouse melanoma B16BL6 세포 생존을 및 TRP-1, TRP-2 발현 저해활성을 측정하였다. 또한 기존의 기계적 마쇄 가공한 대두추출물과 효소처리 가공한 대두추출물의 항산화 및 미백효과를 비교 조사하였다. 효소처리 한 대두추출물의 DPPH radical 소거능과 hydroxyl radical 소거능이 마쇄처리 한 추출물보다 높았으며, 특히 효소처리군이 마쇄군에 비하여 20% 이상 높은 항산화력을 나타내었다. 또한 마쇄군에 비하여 효소처리군이 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 더 높은 활성 억제능을 보였다. 이는 대두가 B16BL6 melanoma 세포의 tyrosinase 단백질의 활성을 저해시킴으로써 멜라닌 생성을 억제하는데 효과적임을 의미하는 동시에 효소처리에 의하여 대두의 영양소의 손실이 더 적었음을 나타낸다.

결론적으로 효소처리에 의한 대두 추출물은 항산화 활성과 미백 효과가 우수하여 기능성 화장품의 천연 소재로서 활용 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

문 헌

1. Cho WG. 2007. Comparison of drug delivery using hairless and pig skin. *J Korean Oil Chemists Soc* 24: 410-415.
2. Ryu SH, Jeon YS, Moon JW, Lee JW, Lee YS, Moon GS. 1997. Effect of kimchi extracts to reactive oxygen species in skin cell cytotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 814-821.
3. Shin JY. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korea J Food Nutr* 14: 568-572.
4. Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J Oil Chem Soc* 52: 59-62.
5. Jee SO. 2009. Antioxidant activities and whitening effect of the mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Korean J Plant Res* 22: 145-151.
6. Han JY, Sung JH, Kim DJ, Jeong HS, Lee JS. 2008. Inhibitory effect of methanol extract and its fractions from grape seeds on mushroom tyrosinase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1679-1683.
7. Park SH, Lee BY, Lee SH, Han CS, Kim JG, Kim KT, Kim KH, Kim YH. 2009. Whitening effect of dayflower (*Com-melina communis* L.) extract by inhibition of N-linked gly-cosylation process and melanogenesis. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 35: 73-78.
8. Yoo YG, Joung MS, Choi JW, Kim JH. 2005. The study on the whitening effect of *Ephedra sinica* extract. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 31: 153-159.
9. Chang MS, Kim HM, Yang WM, Kim DR, Park EH, Ko EB, Choi MJ, Kim HY, Oh JH, Shim KJ, Yoon JW, Park SK. 2007. Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* on tyrosinase activity and melanogenesis in clone M-3 melano-cyte cells. *Kor J Herbology* 22: 87-94.
10. Park SH, Lee BY, Han CS, Kim JG, Kim KT, Kim KH, Kim YH. 2008. Whitening effect of *Angelica keiskei* Koid-zumi extract by inhibition of endothelin-1 production and melanogenesis. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 34: 101-107.
11. Oh HC, Lim KS, Hwang CY, Youn IH, Kim NK. 2007. A study on the melanin synthesis inhibition and whitening ef-fect of *Bombysis corpus*. *J Korean Oriental Med Ophthal-mology Otolaryngology Dermatology* 20: 1-13.
12. Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY, Lee HY. 2008. Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pres-sure extraction process. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16: 255-260.
13. Zhang R, Lee HJ, Yoon YG, Kim SM, Kim HS, Li SH, An SK. 2009. The melanin inhibition, anti-aging and anti-in-flammation effects of *Portulaca oleracea* extracts on cells. *KSBB J* 24: 397-402.
14. Kim KM, Kim KS, Kwak YJ, Cho CW, Soh HA, Chung ES, Lee YC, Lee JH. 2009. Antioxidant activity and whiten-ing effects of the fermented extract of *Viola mandshurica*. Proceedings of the Korean Society of Medical Crop Science. p 207-208.
15. Jeong HS, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jin L, Jeong MH, Oh SH, Kim SS, Lee HY. 2009. Enhancement of immuno-modulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel extracts

- by nano-encapsulation process. Proceedings of the Korean Society of Medical Crop Science. p 209-210.
16. No ST, Kim DS, Lee SJ, Park DJ, Lee JC, Lim KS, Woo WH, Mun YJ. 2007. Study of skin depigmenting mechanism of the ethanol extract of *Fagopyrum esculentum*. *Korean J Oriental Physiology Pathology* 21: 1243-4249.
 17. Kim HS, Kim CH, Kwon MC, Lee HY. 2007. Whitening effect of aqueous extracts of *Hericium erinaceus* using ultrasonication process. Proceedings of the Korean Society of Medical Crop Science. p 155-156.
 18. Jeong JH, Kim YS. 2007. Whitening effects for extracts of bamboo and wild ginseng adventitious roots. Proceedings of the Korean Society of Medical Crop Science. p 209-210.
 19. Lee SB, Park DI, Kim H, Gil YG, Choi BT. 2008. Effects of aqueous extract from *Aconitum Koreanum* on the expression of tyrosinase-related proteins by ultraviolet B irradiation in guinea pig skin. *Korean J Oriental Physiology Pathology* 22: 346-349.
 20. DH Lee, Lee SC, Hwang YI. 2000. Processing properties of kiwifruit treated with protopectinase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 401-406.
 21. Sakai T, Okushima M. 1982. Purification and crystallization of a protopectin solubilizing enzyme from *Trichosporon pernicillatum*. *Agric Biol Chem* 46: 667-676.
 22. Sakai T, Sakamoto T. 1990. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme that has potent activity of sugar beet protopectin. *Agric Biol Chem* 54: 879-889.
 23. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
 24. Chung MJ, Sung NJ, Park CS, Kweon DK, Mantovani A, Moon TW, Lee SJ, Park KH. 2008. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice. *Eur J Pharmacol* 578: 159-170.
 25. Shin JY. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J Food & Nutr* 14: 568-572.
 26. Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. 2005. Zinc-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 205: 225-236.
 27. Lee KI, Kim SM. 2009. Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 267-273.
 28. Choe M, Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH, Chung MJ. 2008. A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 542-547.
 29. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Sung NJ. 2008. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 965-971.

(2012년 11월 5일 접수; 2012년 11월 21일 채택)