Korean J. Plant Res. 28(2):153-157(2015)
http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2015.28.2.153

Print ISSN 1226-3591
Online ISSN 2287-8203

Original Research Article

비쭈기 나무(*Cleyera japonica*) 추출물의 생리활성에 대한 연구

안정좌, 황태영, 김현수*

중원대학교 식품공학과

Study on the Physiological Activities of *Cleyera japonica* Extract

JoungJwa Ahn, Tae-Young Hwang and Hyun-Soo Kim*

Department of Food Science and Technology, Jungwon University, Goesan-gun 367-805, Korea

Abstract - In this study, we investigated the applicability of functional materials by examining a variety of physiological activities with the extract of *Cleyera japonica* leaf. *Cleyera japonica* extract showed a low cytotoxicity against murine melanoma B16F10 cells. In little or no cytotoxicity at concentrations, we showed that the treatment with *Cleyera japonica* extract resulted in a significant increase in the DPPH radical scavenging activity (IC_{50}, 22.90 ㎎/L), similar to ascorbic acid (IC_{50}, 18.65 ㎎/L) and anti-microbial activities against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*. In particular, anti-microbial activities against Gram-positive bacteria was high. These results suggest that *Cleyera japonica* extract could be used as a natural preservative. Additionally, *Cleyera japonica* extract showed the inhibition of tyrosinase activity (IC_{50}, 178.90 ㎎/L), similar to kojic acid (IC_{50}, 89.13 ㎎/L) and decreased melanin content (IC_{50}, 101.90 ㎎/L) higher than the control arbutin level (IC_{50}, 100.65 ㎎/L), especially. Therefore, these results indicate that *Cleyera japonica* extract may be an effective material for functional cosmetics such as skin whitening materials.

Key words - *Cleyera japonica*, Antioxidant, Antimicrobial activity, Melanin, Tyrosinase

서 언

현대사회에서 증가하는 건조 환경 및 사회적 스트레스 등으로 악화되고 있는 피부장벽손상(건조피부, 민감성피부, 노인성 건성피부, 아토피피부)을 개선하기 위한 천연소재 개발에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 특히, 하얀색 피부를 선호하는 아시아권 여성들을 중심으로 미백효과를 볼 수 있는 소재개발에 대한 관심이 증가하고 있다(Lee *et al.*, 2014; Sohn *et al.*, 2004). 피부색은 멜라닌 생성세포가 합성하는 멜라닌(melanin)의 양과 종류에 따라 결정되며 자외선과 같은 외부자극으로부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌 생성을 하게 된다. 그러나 피부표면에 과도한 멜라닌 합성과 축적은 기미, 주근깨와 같은 과색소 침착 증상이 나타나게 된다(Hill *et al.*, 1997). 멜라닌 생성은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2 효소에 의해 조절되며 tyrosinase는 구리를 포함한 효소로서 멜라닌 형성에 중요한 역할을 하고 있다(Kobayashi *et al.*, 1994). Tyrosinase는 멜라노좀(melanosome)내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 생성하는 tyrosine hydroxylase로서, 또한, DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는 핵심 효소로 작용한다(Kobayashi *et al.*, 1994). 따라서 멜라닌 생합성을 억제하여 미백효과를 가져올 수 있는 독성이 없는 천연소재 물질에 대한 개발이 요구되고 있다(Briganti *et al.*, 2003).

본 연구의 재료인 비쭈기 나무(*Cleyera japonica*)는 차나무과(Theaceae)의 상록 소교목으로서 높이는 10 m에 이르며 겨울눈의 모양이 비쭉해서 비쭈기 나무라고 한다. 빗죽이 나무라고도 하며 장미과식물로서 이의 수피는 적갈색의 염료로 이용하며 이의 항산화 효과, 멜라닌 생성 억제효과가 보고되어 기능성 소재로서 사용이 기대되고 있다. 우리나라 중부 이남에서 자생하며 제주도에서 흔하게 볼 수 있다. 즉, 한국이 원산이며, 해안지대의 섬에서 서식한다. 관상용으로 심기도 하며 목재는 건축재, 가구재, 참빛 제조용으로 쓰인다. 비쭈기 나무의 성분으로는 잎으로부터 탄닌화합물 등이 동정(Lee, 2014)되었다. 그러

*교신저자(E-mail) : hyun1006@jwu.ac.kr

ⓒ 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

나 아직까지는 비쭈기 나무가 가지고 있는 다양한 생리활성의 보고에 따른 다양한 기능성 소재 응용가능성을 기대할 수 있음에도 불구하고 특히, 항균 효과를 비롯하여 기능성 소재에 활용하기 위한 필수적인 세포독성 평가 등에 대해서는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 비쭈기 나무 지상부를 추출한 시료를 가지고 안전성 시험, 미백시험, 항산화 및 항균활성을 조사하여 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

비쭈기 나무(*Cleyera japonica*) 잎에 대한 추출물은 국립원예특작과학원 인삼특작부 추출물은행에서 분양받은 시료로 실험에 이용하였다.

세포독성평가

세포독성 시험은 세포내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 water soluble tetrazolium salts (WST-1)에서 불용성의 formazan결정으로 변환되는 원리를 이용한다(Ranke *et al.*, 2004). Formazan이 많이 생성될수록 세포 활성이 커지는 것을 의미한다. Formazan은 DMSO에 녹아서 보라색 빛을 띄는데 spectrophotometer로 540 ㎚ 파장에서 OD값을 재어서 정량한다. 미국세포주 은행에(ATCC)서 분양 받은 멜라노마 세포(murine melanoma B16F10)를 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS, Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM)에서 배양하고 24 well plate에 2×10^4 cells/well 의 농도로 세포를 접종한 후, 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양한다. 이후 배양세포에 추출물을 농도별로 처리하고 72시간 배양하였다. 결과는 %로 환산하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 저해 농도(IC_{50})을 계산하여 세포 독성 정도를 표현하였다.

항산화력 측정

DPPH Radical 소거능 실험은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 의한 전자공여능(Electron donating ability, EDA)을 측정하였다(Miliauskas *et al.*, 2004). 즉, 0.2 mM의 DPPH용액 0.8 ㎖에 식물추출물 시료 0.2 ㎖를 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 항산화력은 [1-(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)] × 100의 계산식에 의해 전자공여능(%)을 구하였으며, 대조구는 시료 대신 메탄올을 첨가하였고, positive control로 CJE와 같은 농도의 *L*-ascorbic acid를 사용하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 저해 농도(IC_{50})을 계산하여 DPPH 소거 활성 정도를 표현하였다.

항균활성 측정

항균효과는 time-curve를 작성하여 확인하였다. 즉, 시간별로 항균작용이 어떤 변화를 보이는지 알아보기 위해 각각 균주 배양액에 비쭈기 나무 추출물의 처리농도가 100 ㎎/L 이 되도록 처리하여 일정 시간별로 배양액을 채취하였다. 채취한 배양액을 십진희석법으로 희석하고 각각 균주평판배지에 접종하여 배양한 후, 생성되는 군락(colony)의 수를 측정하고 cfu/㎖로 환산하였다.

Tyrosinase 저해활성측정

Melanin 합성 주요 단계에 관여하는 Tyrosinase 저해활성 측정은 효소 작용 결과 형성되는 DL-β-3,4-dihydroxyphenyl alanine (DOPA) chrome을 비색법에 의해 측정하는 Masamoto *et al.* (2003)의 방법을 변형하여 측정하였다. 기질로서 5 mM DL-DOPA 용액 0.2 ㎖, 0.1 M 인산완충용액(pH 6.8) 0.2 ㎖ 및 시료용액 0.5 ㎖의 혼합액에 Mushroom tyrosinase (Sigma, USA, 250 unit/㎖) 0.1 ㎖를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음 475 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하고 아래 식에 따라 tyrosinase 저해활성을 산출하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 저해 농도(IC_{50})을 계산하여 tyrosinase 저해 활성 정도를 표현하였다.

$$\text{Tyrosinase 저해 활성 (\%)} = 1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

멜라닌 생성 저해 측정

멜라닌 정량은 Hosoi *et al.* (1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. 24 well plate에 2×10^4 cells/well로 멜라노마 세포(murine melanoma B16F10)를 분주하였고, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)으로 멜라닌 생성을 유도한 후, 상기 세포독성 실험에서 관찰된 비쭈기 나무 추출물시료 농도를 처리하고 48시간 동안 37℃ CO_2 배양기에서 배양하였다. 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 ㎖ homogenization buffer (50 mM Sodium

phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH (10% DMSO) 200 μl를 첨가하고 vortex 후 405 ㎚에서 흡광도값을 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 시료군을 대조군으로 하고 미백제로 알려진 합성물질인 arbutin을 표준시료로 사용하였으며 결과는 %로 환산하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 멜라닌 생성 저해 농도(IC_{50})를 계산하여 멜라닌 생성 저해 활성을 표현하였다.

통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 반복 시행하고 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

비쭈기 나무 추출물의 세포독성시험

멜라노마 세포에 비쭈기 나무 추출물(*Cleyera japonica* extract: CJE) 10 ㎎/L, 50 ㎎/L, 100 ㎎/L의 농도로 처리한 후, WST-1 분석법(Ranke *et al.*, 2004)을 이용하여 세포독성을 측정하였다(Fig. 1). 대조군 대비하여 10 ㎎/L, 50 ㎎/L, 100 ㎎/L의 CJE 농도에서 각각 0%, 21.90%, 52.85% 세포독성을 나타냈으며, 50% 세포독성을 나타내는 농도(IC_{50})는 95.40 ㎎/L로 나타났다.

비쭈기 나무 추출물의 항산화 활성

CJE에 대해서 DPPH 라디칼 소거 활성법(Miliauskas *et al.*, 2004)으로 대조구로 아스코르브산(ascorbic acid)를 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 추출물 시료와 대조구 시료를 각각 10 ㎎/L, 50 ㎎/L, 100 ㎎/L의 농도로 제조하여 DPPH 소거활성을 측정한 결과(Fig. 2), CJE 농도 10 ㎎/L, 50 ㎎/L 경우 37.5%, 75.3%의 소거능 활성을 보였으며 따라서 추출물 시료의 농도가 증가할수록 라디칼 소거능 활성이 증가하였다. CJE 각각에 대한 같은 시료농도 대조구인 아스코르브산과 비교 하였을 때는 소거활성이 다소 낮았으나, 100 ㎎/L의 추출물 농도에서는 대조구와 거의 같은 라디칼 소거활성을 보였다(99.4%). 또한, CJE의 경우, 50% 라디칼 소거활성 농도는 22.90 ㎎/L였으며, 대조군 표준시료인 비타민 C (ascorbic acid)의 경우는 18.65 ㎎/L임을 고려하면 항산화 효과가 뛰어남을 알 수 있다. 따라서 CJE에는 항산화 활성을 나타내는 물질이 함유되어 있음을 의미하며 항산화 소재로서의 가능성을 지니고 있음을 확인할 수 있다.

비쭈기 나무 추출물의 항균 활성

CJE에 대한 항균활성 측정은 추출물 시료를 최종농도가 100 ㎎/L가 되도록 처리한 후, 시간별로 각각 시험군에 대한 time curve를 작성하였다(Fig. 3). 대조군의 경우 시간이 경과함에 따라 균의 증식에 변함이 없었으나 추출물 시료처리 경우는 배양 12시간 경과 후, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*각각 대조군에 대하여 65.9%, 50.5%, 30.7%의 증식 억제가 확인되었다. 즉, 모든 시험균의 증식이 억제됨을 확인 할 수 있었으며 그람양성균인 *Bacillus subtilis*에 대한 증식억제

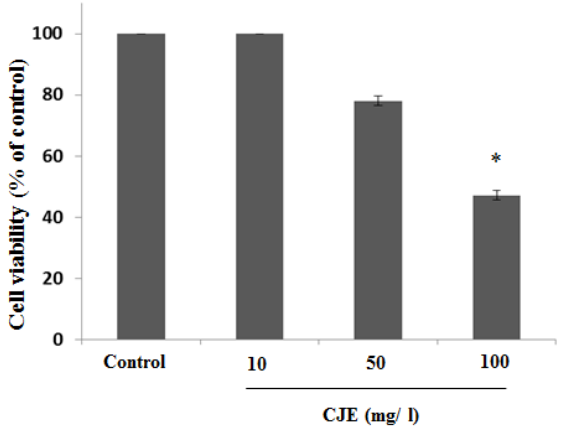

Fig. 1. Cell viability of *Cleyera japonica* extract (CJE) on murine melanoma B16F10 cell. Values are presented as mean ± SEM. *p < 0.05 compared to the control group.

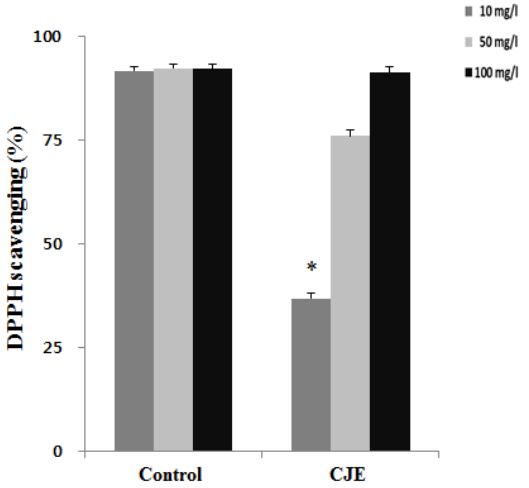

Fig. 2. Anti-oxidant effects of *Cleyera japonica* extract (CJE). Ascorbic acid was used as a positive control. Values are presented as mean ± SEM. *p < 0.05 compared to the control group.

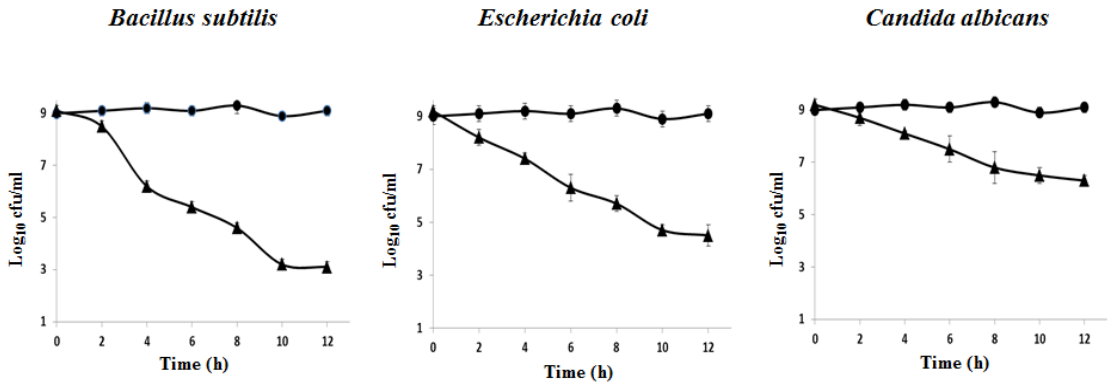

Fig. 3. Time-curve of CJE against *B. subtilis*, *E. coli* and *C. albicans*. 10% DMSO was used as a negative control (●) and CJE was dissolved in 10% DMSO to a final concentration of 100 ㎎/L (▲).

효과가 가장 높게 나타났다. 따라서 CJE는 항균력이 우수하며, 특히 포자를 형성하여 살균이 상대적으로 어려운 그람양성균에 항균력이 탁월함을 보임으로써 천연방부제로서의 소재개발 가능성을 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

비쭈기 나무 추출물의 tyrosinase 저해활성

Tyrosinase는 구리를 포함한 효소로서 멜라닌 형성에 중요한 역할을 하고 있다. 멜라노좀(melanosome)내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 생성하는 tyrosine hydroxylase로서, 또한, DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는 핵심 효소로 작용한다(Kobayashi *et al.*, 1994). 이러한 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해하기 위한 tyrosinase 저해활성을 측정하기 위하여 CJE에 대한 mushroom 유래의 tyrosinase 저해활성을 관찰하였다(Fig. 4). 추출물시료 50 ㎎/L, 100 ㎎/L의 경우, 각각 14.7%, 33.6%의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 또한, 미백활성의 표준시료로서 kojic acid 100 ㎎/L의 경우 60.8%의 저해활성을 나타내었다. 또한, CJE의 경우, 50% tyrosinase 저해활성 농도는 178.90 ㎎/L였으며 대조군 표준시료인 kojic acid의 경우는 89.13 ㎎/L임을 고려하면, 추출물시료가 kojic acid에 비해서는 tyrosinase 저해활성이 낮았지만 향후 미백 기능성 소재로서의 활용 가능성은 있다고 생각된다.

비쭈기 나무 추출물의 멜라닌 생성 저해활성

CJE에 대한 세포독성 실험 측정 농도에서 멜라닌 생성 저해활성을 측정하였다(Fig. 5). 대조군 대비하여 10 ㎎/L, 50 ㎎/L, 100 ㎎/L의 CJE 농도에서 각각 2.18%, 32.55%, 49.66%의 멜라닌 생성 억제 활성을 확인하였다. 또한, CJE의 경우, 50% 멜라

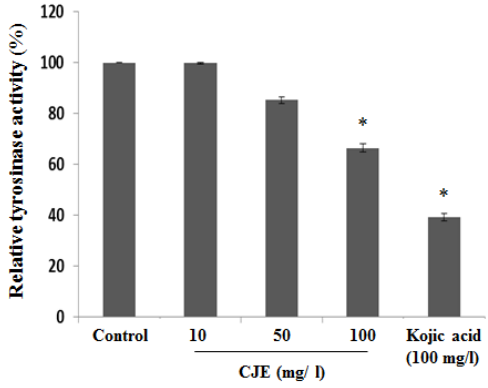

Fig. 4. Inhibitory effect on tyrosinase of *Cleyera japonica* extract (CJE). The tyrosinase activity assay was performed with mushroom tyrosinase. Values are presented as mean ± SEM. *p < 0.05 compared to the control group.

닌 저해활성 농도는 101.90 ㎎/L였으며 대조군 표준시료인 arbutin의 경우는 100.65 ㎎/L임을 고려하면 멜라닌 생성 저해활성이 우수함을 의미한다. 멜라닌 생성은 멜라노좀에서 일어나며 멜라노좀 발달과정 중에 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)가 생성되고, 이중 tyrosinase는 멜라닌 합성에 핵심효소이다(Kobayashi *et al.*, 1994). 또한, arbutin은 tyrosinase의 경쟁적 저해제로 작용한다고 알려져 있다(Briganti *et al.*, 2003). 즉, 시험재료에 있어서 피부미백효과는 멜라닌 생성 저해에 따른 tyrosinase 저해효과가 나타나야 한다. 본 연구의 CJE의 경우는 멜라닌 저해 활성이 우수하였지만 tyrosinase 저해활성은 높지 않았다. 따라서, CJE의 경우는 직접적인 tyrosinase 활성 저해와는 다른 기작으로 멜라닌 생성을 억제할 것으로 사료되며 멜라닌 생성 저해에 대한 자세한 매카니즘 등 이에 대한 추가

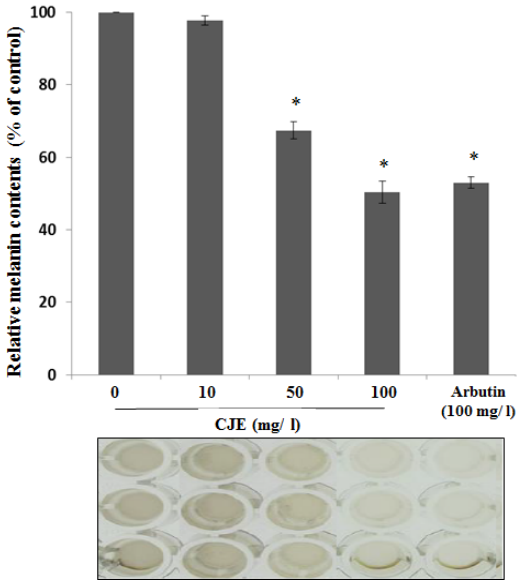

Fig. 5. Anti-melanogenic effects of *Cleyera japonica* extract (CJE). Arbutin was used as a positive control. Values are presented as mean ± SEM. *p < 0.05 compared to the control group.

적인 연구가 필요할 것이다.

적 요

본 연구에서 비쭈기 나무의 잎 부분에 대한 다양한 생리활성을 조사하여 기능성소재 응용가능성을 검토하였다. 비쭈기 나무 잎 추출물은 멜라노마 세포에 대하여 낮은 세포독성을 나타냈다. 비쭈기 나무 추출물 처리 시 항산화(IC_{50}, 22.90 ㎎/L) 및 항균활성이 매우 우수하게 나타났으며 특히 그람양성세균에 대한 항균활성이 높았다. 또한, 비쭈기 나무 추출물 처리시 tyrosinase 활성저해 및 멜라닌 함량 저하(IC_{50}, 101.90 ㎎/L)를 보여주었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 비쭈기 나무 추출물은 피부미백 소재 등 피부개선 효과를 비롯한 기능성 화장품에 활용하기 위한 매우 효과적인 재료가 될 수 있다고 판단된다.

사 사

본 연구는 2014년도 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성사업(R&D)의 지원(R-0002327)에 의해 수행되었으며, 국립원예특작과학원 인삼특작부 추출물은행(과제번호 PJ009629)으로부터 제공받은 추출물을 재료로 사용하였음으로 이에 감사드립니다.

References

Briganti, S., E. Camera and M. Picardo. 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. Pigment Cell. Res. 16:101-110.

Hill, H.Z., W. Li, P. Xin and D.L. Michell. 1997. Melanin: a two edged sword?. Pigment Cell. Res. 10:158-161.

Hosoi, J., E. Abe, T. Suda and T. Kuroki. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 45(4):1474-1478.

Kobayashi, T., K. Urabe, A.J. Winder, C. Jimenez-Cervantes, G. Imokawa, T. Brewington, F. Solano, J.C. Garcia-Borron and V.J. Hearing. 1994. Tyrosinase related protein-1 (TRP-1) function as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. EMBO J. 3:5818-5825.

Lee, B.G., J.H. Kim, S.G. Ham and C.E. Lee. 2014. Study on biological activities of extracts for cosmeceutical development from *Lagerstroemia indica* L. Branch. Korean J. Plant Res. 27(1):29-34.

Lee, M.W. and M.H. Oh. 2014. Novel hydrolysable tannis isolated from the leaves of *Cleyera japonica* thunberg and anti-oxidative use thereof. Korean patent No. 10-2014-0008694.

Masamoto, Y., H. Ando, Y. Murata, Y. Shimoishi, M. Tada and K. Takahata. 2003. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(3):631-634.

Miliauskas, G., P.R. Venskutonis and T.A. van Beek. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 85(2):231-237.

Ranke, J., K. Mölter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser and B. Jastorff. 2004. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58(3):396-404.

Sohn, E.S., S.W. Kim, J.S. Kang and S.P. Lee. 2004. Technology trend patent information analysis of cosmetic materials derived from natural products. Appl. Chem. 8:466-469.

(Received 17 December 2014 ; Revised 11 February 2015 ; Accepted 11 March 2015)