

화종에 따른 국내산 벌꿀 에틸 아세테이트 분획물의 산화방지능 및 멜라닌 생성 억제 효과

정하람^{1,2} · 백영수^{1,2} · 김대옥^{1,2} · 이형재^{3,*}

¹경희대학교 식품생명공학과, ²경희대학교 피부생명공학센터, ³단국대학교 식품공학과

Antioxidative and antimelanogenic effects of ethyl acetate fractions of Korean domestic honeys from different floral sources

Ha-Ram Jeong^{1,2}, Youngsu Baek^{1,2}, Dae-Ok Kim^{1,2}, and Hyungjae Lee^{3,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University

²Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University

³Department of Food Engineering, Dankook University

Abstract Honey is known to have a variety of health-promoting effects. Ethyl acetate fractions (EAFs) of four Korean domestic honeys from basswood, Korean raisin, chestnut, and acacia as well as a New Zealand manuka honey were analyzed comparatively to evaluate their antioxidative and antimelanogenic effects. The EAFs of basswood, Korean raisin, and chestnut honey had higher antioxidant capacities and tyrosinase inhibition activities than those of manuka honey. Pretreatment of B16F1 melanoma cells with EAFs at 100 µg/mL resulted in relative retention of melanin contents as follows: acacia honey (141.0%)>basswood honey (134.3%)>manuka honey (131.5%)>Korean raisin honey (107.3%)>chestnut honey (88.0%). Intracellular tyrosinase activities of B16F1 melanoma cells were significantly ($p<0.05$) lowered by EAFs of Korean raisin and chestnut honey than by EAF of manuka honey. Consequently, these results suggest that Korean domestic honeys from different floral sources serve as good sources of antioxidative and antimelanogenic agents.

Keywords: antioxidant capacity, B16F1 melanoma cell, melanin contents, Korean domestic honey, tyrosinase inhibition

서 론

멜라닌은 진피의 기저층에 있는 멜라닌세포(melanocyte)에 의해 분비되며, 이는 포유류의 머리카락, 눈, 피부의 색소를 결정하거나 태양 광선으로부터 발생하는 자외선을 차단하여 피부를 보호하는 역할을 한다(Brenner와 Hearing, 2008). 그러나 장기간 자외선 노출에 의한 과도한 멜라닌 형성은 기미, 주근깨, 노인성 흑색점 등 피부의 색소침착을 유발할 뿐만 아니라(Breathnach와 Wyllie, 1964; Rigopoulos 등, 2007; Ünver 등, 2006), DNA 손상에 의한 흑색종(melanoma) 형성 및 비정상적 증식으로 인한 피부암을 유발한다고 알려져 있다(Pfeifer와 Besaratinia, 2012). 타이로시네이스(tyrosinase)는 아미노산인 타이로신(L-tyrosine)을 기질로 사용하여 L-DOPA, 도파퀴논(dopaquinone)을 생성하는 멜라닌 생합성 초기 단계인 가역적 산화반응에 관여한다(Sánchez-Ferrer 등, 1995). 또한 타이로시네이스는 폴리페놀 산화효소(polyphenol oxidase)의 일종으로 과일과 채소에 들어있는 페놀 화합물(phenolic compounds)을 갈변화시켜 품질 저하를 초래하기도 한다(Kim과

Uyama, 2005). 이런 이유로 타이로시네이스 억제를 위한 연구는 식품, 화장품 등 다양한 분야에서 진행되고 있다. 또한 자외선에 의해 발생하는 활성산소(reactive oxygen species)를 제거하는 산화방지제를 이용한 미백 연구가 이루어지고 있다.

꿀은 꿀벌(*Apis mellifera* L.)이 식물체의 꽃 등에서 채집한 물질을 벌집에 옮겨 축적하여 생산하는 자연 식품이다. 꿀의 단맛은 과당, 포도당, 설탕, 엿당과 같은 당에 기인한다(Bogdanov 등, 2008; Eteraf-Oskouei와 Najafi, 2013; Ullah 등, 2018). 꿀은 예로부터 고대 중국인, 이집트인, 그리스인, 로마인, 아시아인들이 내장질환을 치료하는데 사용하는 등 전 세계적으로 오랫동안 사용되어 왔다(Zumla와 Lulat, 1989). 꿀에는 페놀산(phenolic acid), 플라보노이드(flavonoids), 포도당 산화효소(glucose oxidase), 카탈라이스(catalase), 유기산(organic acids), 아미노산(amino acids) 등이 함유되어 있다(Eteraf-Oskouei와 Najafi, 2013). 꿀은 종류에 따라 특징적인 색, 맛의 차이가 있으며, 이는 각각 다른 종류의 화분과 지리적 차이로 인한 환경조건에 의해 기인된다(Anklam, 1998). 국내에서는 양봉이 기원전 37년에서 19년 사이에 시작되어 현재까지 진행되어 왔지만(Jung, 2014), 2013년 기준 국내 꿀 수출량이 77,000 kg인 것에 비해 꿀 수입량은 689,000 kg으로 수입 의존도가 훨씬 더 높았다(Kohsaka 등, 2017). 국내 양봉산업은 현재 신기술연구 및 산업화를 위한 노력이 미진하여 꿀에 대한 국가경쟁력이 매우 낮은 실정이다.

꿀은 산화방지능, 항균, 미백, 화상치료, 항염증 효과 등 생리활성을 나타낸다고 보고되었으며(EI-Kased 등, 2017; Jantakee와 Tragoolpua, 2015; Kassim 등, 2010), 뉴질랜드에서 생산되는 마누

*Corresponding author: Hyungjae Lee, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan, Chungnam 31116, Republic of Korea

Tel: +82-41-550-3561

Fax: +82-41-559-7868

E-mail: lee252@dankook.ac.kr

Received August 30, 2019; revised October 31, 2018;

accepted November 12, 2018

카 꿀은 피부상처에 의한 만성 피부질환에 대한 효과를 갖고 있다고 보고되었다(Visavadia 등, 2008). 최근에는 국내에서 생산되는 꿀 분획물의 산화방지능과 항균활성이 화종 및 지역에 따라 다르다고 보고되었다(Baek 등, 2015; Lee와 Lee, 2016). 이러한 연구들이 보고되고 있음에도 불구하고, 국내산 꿀 분획물에 대한 미백활성 연구는 미미하다.

본 연구의 목적은 국내에서 생산된 4가지 화종 유래 꿀(피나무 꿀, 헛개나무 꿀, 밤나무 꿀, 아카시아 꿀)과 뉴질랜드에서 생산된 마누카 꿀의 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 분획물의 산화방지능, 타이로시네이스 억제능, 마우스 흑색종인 B16F1 세포 내 멜라닌 합성 억제능과 타이로시네이스 억제능을 비교 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 꿀들은 2011년에 구입하였다. 피나무(basswood) 꿀, 헛개나무(Korean raisin) 꿀, 밤나무(chestnut) 꿀, 아카시아(acacia) 꿀은 강원도 양양에서 생산되었고, 마누카(manuka) 꿀은 뉴질랜드에서 생산되었다. 꿀은 실험 전까지 빛이 차단된 실온에서 보관하였다.

시약

비타민 C (vitamin C), 플루오레세인 소듐(fluorescein sodium salt), 2,2'-아조바이스(2-메틸프로피온아마이드) 다이하이드로클로라이드(2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, AAPH), 고지산(kojic acid), 레보-도파(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA), 버섯 타이로시네이스(mushroom tyrosinase), 3-(4,5-다이메틸싸이아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT), 멜라닌세포 자극 호르몬(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH), 트리톤 X-100 (Triton X-100), 페닐메탄설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 다이메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 인산 수소 다이포타슘(potassium phosphate dibasic), 인산 이수소 포타슘(potassium phosphate monobasic)은 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd. (Ansan, Korea)에서 구입하였다. 노말-헥세인(*n*-hexane, 95%), 클로로폼(chloroform, 99.5%), 에틸 아세테이트(ethyl acetate, 99%), 노말-부탄올(*n*-butanol, 99%), 수산화 소듐(sodium hydroxide)은 Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. (Siheung, Korea)에서 구입하였다. 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 돌베코의 인산완충 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS), 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin)은 Welgene Inc. (Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다.

추출 및 분획

꿀 40 g과 무수 메탄올(absolute methanol) 300 mL을 혼합하여, 2분간 균질기(Polytron RT-2100; Kinematica AG, Littau-Luzern, Switzerland)로 15,000 rpm으로 균질화 후 Whatman No. 1 거름종이(Whatman International Limited, Kent, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과된 추출물을 진공감압회전농축기(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 통해 항온수조 40°C에서 농축하였다. 농축된 추출물에 증류수 1 L를 가한 후, 1:1 비율로 노말-헥세인, 클로로폼, 에틸 아세테이트, 노말-부탄올, 물 순으로 섞어 액체-액체 추출(liquid-liquid extraction)법을 이용하여 분획물을 얻었다. 이 분획물 중에

서 에틸 아세테이트 분획물(ethyl acetate fraction, EAF)을 본 실험에 이용하였다.

산화방지능 측정

산화방지능은 페록실(peroxy) 라디칼의 생성과 소멸 과정을 통해 나온 형광의 감소율을 측정하는 산소라디칼 흡수능(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)법을 사용하였다(Huang 등, 2002). ORAC법에 이용된 시약은 인산 수소 다이포타슘과 인산 이수소 포타슘을 혼합하여 만든 75 mM 인산 완충용액(pH 7.4)으로 희석하였다. EAF 25 μ L와 플루오레세인 소듐(81.6 nM) 150 μ L를 혼합하고 37°C에서 10분간 교반하였다. 이 혼합용액에 AAPH (153 mM) 25 μ L를 넣은 후, 형광측정 마이크로플레이트 판독기(microplate reader, Infinite M200; Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 이용하였으며, 들뜸(excitation)은 485 nm, 방출(emission)은 520 nm로 설정하여 90분 동안 매 1분 간격으로 측정하였다. 시간에 따른 플루오레세인 소듐의 형광 감소량은 곡선하면적(area under curve)으로 계산하고, 산화방지능은 표준물질인 비타민 C를 이용하여 mg 비타민 C 당량(mg VCE)/g fraction으로 나타내었다.

버섯 타이로시네이스 억제능 측정

타이로시네이스 억제능 평가는 L-DOPA를 기질로 이용하였으며 Masamoto 등(2003)의 방법을 수정하여 실험하였다. 먼저 EAF 40 μ L와 증류수에 용해된 8.3 mM L-DOPA 120 μ L를 혼합하였다. 이어 인산 수소 다이포타슘과 인산 이수소 포타슘을 혼합하여 만든 100 mM 인산 완충용액(pH 6.5)에 타이로시네이스(125 U/mL) 40 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다. 고지산을 양성대조군으로 이용하였으며, 타이로시네이스 억제능은 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{효소활성 억제능(\%)} = [(A-B) - (C-D)] / (A-B) \times 100$$

위 식에서, A는 시료 무첨가, 효소 및 기질 첨가, B는 시료, 효소 및 기질 무첨가, C는 시료, 효소 및 기질 첨가, D는 시료 첨가, 효소 및 기질 무첨가를 의미한다.

세포 배양

생쥐의 악성 흑색종 세포주인 B16F1 멜라노마 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위하여 DMEM 배지에 10% FBS, 페니실린(100 units/mL), 스트렙토마이신(100 μ g/mL)을 첨가하였으며, 37°C, 5% CO₂를 유지하는 배양기(CO₂ incubator, BB 15; Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Germany)를 이용하여 배양하였다.

멜라노마 세포 생존율 측정

B16F1 세포에 대한 EAF의 최대 무독성 농도를 확인하기 위해 Heo 등(2001)의 방법에 근거하여 MTT법을 실행하였다. B16F1 세포를 96-well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 배양하였으며, EAF로 세포를 전처리 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 well에 MTT 용액을 첨가하여 3시간 동안 반응시킨 후 50 μ L의 DMSO를 첨가하여 보라색의 포마잔(formazan)을 용해시키고, 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

멜라닌 함량 측정

세포 내 멜라닌 함량 측정은 Chung 등(2009)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. B16F1 세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 EAF와 FBS가 포함된 DMEM 배지를 공급하여 24시간 동안 추가로 배양하였다. 다시 배지를 제거 후 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지를 이용하여 각 well에 EAF와 $1 \mu\text{M}$ α -MSH를 처리한 후 48시간 동안 추가 배양하였다. 배양을 마친 후 4°C DPBS로 2회 세척 후 80°C 의 1 N 수산화 소듐을 이용하여 30분 동안 용해시켰다. 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 405 nm에서 용해된 멜라닌의 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 함량은 대조군(control) 대비 백분율(%)로 나타내었다.

세포 내 타이로시네이스 활성 측정

세포 내 타이로시네이스 활성은 Kim 등(2015)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. B16F1 세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 EAF와 FBS가 포함된 DMEM 배지를 공급하여 24시간 동안 추가로 배양하였다. 다시 배지를 제거 후 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지를 이용하여 각 well에 EAF와 $1 \mu\text{M}$ α -MSH를 처리한 후 48시간 동안 추가 배양하였다. 배양을 마친 후 4°C DPBS로 2회 세척하고 1% 트리톤 X-100과 2 mM PMSF가 포함된 100 mM 인산 완충용액으로 세포를 용해시켰다. 용해물은 원심분리기(Smart R17; Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)로 4°C 에서 10분 동안 $15,814 \times g$ 조건으로 원심분리하여 상층액 얻었다. 96-well plate에 상층액 70 μL 를 분주하고 8.3 mM L-DOPA 30 μL 를 첨가하여 37°C 에서 30분 동안 배양한 후 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 내 타이로시네이스 활성은 대조군 대비 백분율(%)로 나타내었다.

통계처리

본 실험은 모두 3회 반복한 결과를 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. SAS 프로그램(version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 일원분산분석법(one-way ANOVA)을 통해 통계학적 분석을 실시하였다. 각 평균값의 유의적 차이는 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 통해 95%의 신뢰구간에서 사후 검증하였다.

결과 및 고찰

산화방지능

ORAC법을 이용한 5가지 화종별 EAF의 산화방지능은 Fig. 1과 같다. 각 화종별 EAF의 산화방지능은 밤나무 꿀(335.5 mg VCE/g) > 헛개나무 꿀(326.2 mg VCE/g) > 피나무 꿀(296.8 mg VCE/g) > 마누카 꿀(174.6 mg VCE/g) > 아카시아 꿀(67.3 mg VCE/g) 순으로 낮아졌다. Baek 등(2015)은 여러 분획물 중에서 총페놀 함량 및 산화방지능은 EAF가 가장 높았으며, 여러 종류의 꿀 중에서 헛개나무 꿀에서 얻어진 EAF가 ABTS법과 DPPH법을 이용하여 측정된 산화방지능은 가장 높게 나왔다고 보고하였다. 본 연구에서 ORAC법을 이용하여 측정된 산화방지능은 국외산 마누카 꿀 및 국내산 아카시아 꿀과 유의적인 차이를 보이며, 밤나무 꿀의 EAF에서 가장 높게 나왔다. 이와 같이 각 꿀간의 상이한 산화방지능은 서로 다른 산화방지능 측정법의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

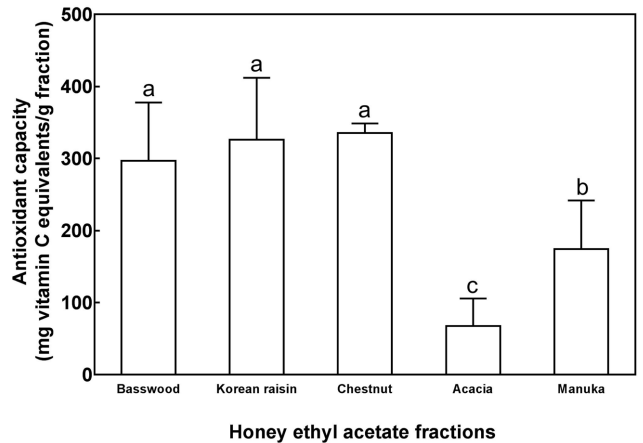


Fig. 1. Antioxidant capacities of the ethyl acetate fractions from five different varieties of honey using oxygen radical absorbance capacity assay. Different letters on the bars mean significant differences by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

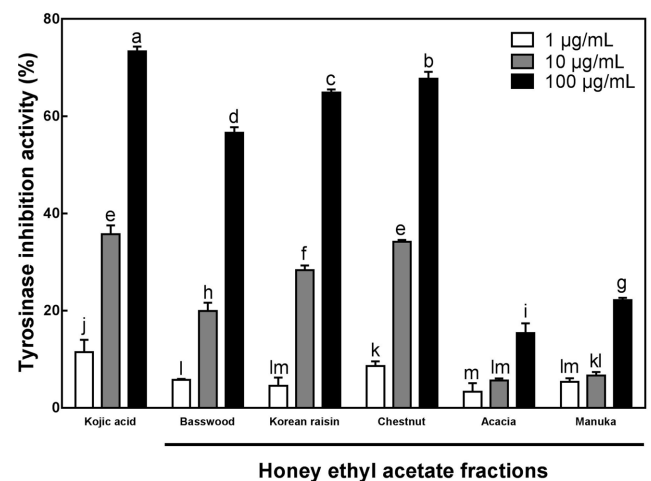


Fig. 2. Tyrosinase inhibition of the ethyl acetate fractions from five different varieties of honey. Different letters on the bars mean significant differences by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

버섯 타이로시네이스 억제능

L-DOPA를 기질로 이용한 5가지 화종별 EAF의 타이로시네이스 억제능 측정 결과는 Fig. 2와 같다. 각 화종별 EAF의 타이로시네이스 억제능은 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 양성대조군인 고지산(100 $\mu\text{g/mL}$)은 73.3%의 타이로시네이스 억제능을 보였으며, 화종별 꿀 EAF의 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 타이로시네이스 억제능은 밤나무 꿀(67.7%) > 헛개나무 꿀(64.9%) > 피나무 꿀(56.6%) > 마누카 꿀(22.2%) > 아카시아 꿀(15.4%) 순으로 낮아졌다. 페놀 화합물은 타이로신 및 L-DOPA와 구조가 유사하여 기질 유사체의 역할을 하여 타이로시네이스 활성을 억제하거나, 초기 멜라닌 생합성의 가역적 산화반응에서 페놀 화합물이 산화방지제로 작용하여 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 알려져 있다(Chang, 2009). 본 연구에서의 타이로시네이스 억제능 또한 EAF에 존재하는 생리활성 페놀 화합물에 의해서 가역적 산화반응 산물의 환원 또는 효소활성 억제 등에 의한 것으로 판단된다.

멜라닌 생성 억제능

멜라노마 흑색종 세포인 B16F1 세포를 이용하여 EAF에 대한

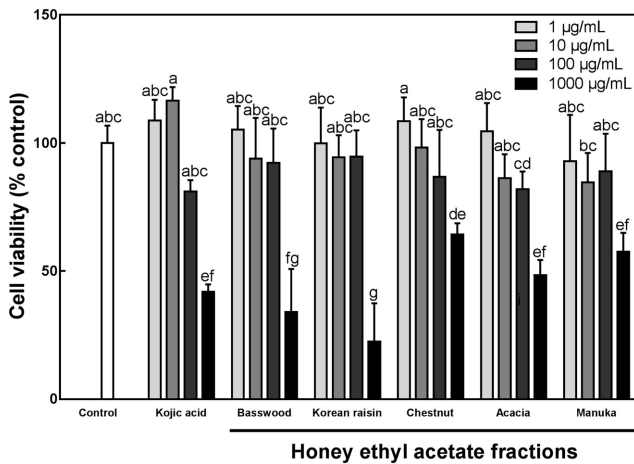


Fig. 3. Cytotoxic effects of the ethyl acetate fractions from five different varieties of honey on B16F1 melanoma cells. Different letters on the bars mean significant differences by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

세포 독성을 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. EAF의 최대 무독성 농도는 대조군 대비 80% 이상의 세포생존율을 보인 농도로 설정하였다. 5가지 화종별 EAF 모두 100 µg/mL 농도까지 80% 이상의 세포 생존율을 보였으며, 이후 실험은 각 EAF의 최대 무독성 농도인 100 µg/mL를 최대 농도로 하여 진행하였다.

α-MSH로 B16F1 세포에서 멜라닌 형성을 유도하였을 때, 멜라닌 함량은 대조군(100%) 대비 약 157.7%를 보였다(Fig. 4). 양성대조군인 고지산(100 µg/mL)을 전처리한 B16F1 세포에서 무처리군(100%) 대비 약 73.0%의 멜라닌 함량을 보였다. B16F1 세포를 5종류 꿀의 EAF 100 µg/mL 농도로 전처리 하였을 때, 멜라닌 함량은 아카시아 꿀(141.0%) > 피나무 꿀(134.3%) > 마누카 꿀(131.5%) > 헛개나무 꿀(107.3%) > 밤나무 꿀(88.0%) 순으로 감소하였다. 밤나무 꿀 EAF 100 µg/mL 농도로 전처리한 B16F1 세포에서 멜라닌 생성 억제는 양성대조군인 고지산 100 µg/mL 전처리의 결과와 유의적 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

Han 등(2010)은 국내산 밤나무 꿀과 헛개나무 꿀이 아카시아 꿀보다 높은 멜라닌 합성 억제 효과를 보였다고 보고하였으며, Sapkota 등(2010)은 밤나무 꽃 추출물이 멜라닌 합성 억제능을 보였다고 보고하였다. Andrade 등(1997)은 꿀에는 갈산(gallic acid), 파라-하이드록시벤조산(*p*-hydroxybenzoic acid), 바닐산(vanillic acid), 클로로겐산(chlorogenic acid), 카페산(caffeic acid), 시링산(syringic acid), 파라-쿠마르산(*p*-coumaric acid), 페룰산(ferulic acid), 엘라그산(ellagic acid) 등과 같은 다양한 페놀 화합물이 존재한다고 보고하였다. Yoshioka 등(2011)은 갈산, 엘라그산의 B16 멜라노마 세포의 멜라닌 합성 저해는 타이로시네이스 활성 억제와 도파민 생성 저해에 기인된다고 보고하였다. Nithitanakool 등(2009)은 갈산 같은 페놀 화합물이 타이로시네이스의 소수성 결합부위(binding pocket)에 자리잡아 촉매작용에 필요한 구리를 킬레이팅(chelating)함으로써 타이로시네이스의 활성을 억제한다고 보고하였다. 그러므로 본 연구의 B16F1 세포에서 멜라닌 합성 억제능은 다양한 꽃에서 유래한 꿀의 페놀 화합물과 같은 생리 활성물질들에 의한 것으로 생각된다.

세포 내 타이로시네이스 억제능

5가지 화종별 EAF의 B16F1 세포 내 타이로시네이스 억제능 결과는 Fig. 5와 같다. α-MSH를 처리하지 않은 대조군(100%) 대비,

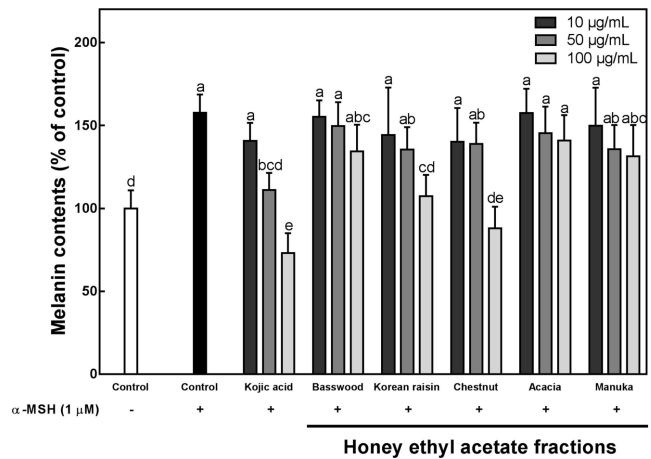


Fig. 4. Antimelanogenic effects of the ethyl acetate fractions from five different varieties of honey on B16F1 melanoma cells. Different letters on the bars mean significant differences by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

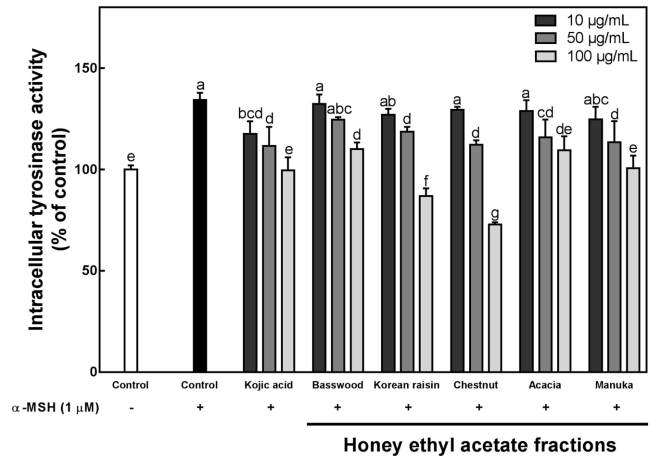


Fig. 5. Effects of the ethyl acetate fractions from five different varieties of honey on intracellular tyrosinase activity in B16F1 melanoma cells. Different letters on the bars mean significant differences by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

α-MSH만을 처리한 B16F1 세포에서 타이로시네이스 활성은 약 134.3%를 보였다. 5가지 화종별 EAF를 처리하였을 때 세포 내 타이로시네이스 활성은 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5). EAF 100 µg/mL 농도에서 밤나무 꿀(72.9%)과 헛개나무 꿀(87.0%)이 양성대조군인 동일 농도의 고지산(99.6%)보다 더 높은 세포 내 타이로시네이스 억제능을 보였다. 일반적으로 세포 내의 멜라닌 생성은 타이로시네이스에 의한 초기 생합성 이후에도, tyrosinase related-1 (TRP-1) 효소와 tyrosinase related-2 (TRP-2) 효소가 관여한다(Bertolotto 등, 1998). 이러한 효소들은 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현량에 따라 조절되며, MITF 발현 증가로 인해 타이로시네이스, TRP-1, TRP-2의 전사를 유도하여 멜라닌 생성을 촉진시키는 것으로 알려졌다(Levy 등, 2006). Kim 등(2004)은 Mel-Ab 멜라닌 세포에 고지산을 처리하였을 때 MITF 발현 억제 효과는 없었다고 보고하였다. 본 연구에서 고지산이 밤나무 꿀과 헛개나무 꿀의 EAF보다 세포 내 타이로시네이스 억제능이 낮았던 이유는 α-MSH 처리 이후 B16F1 세포에서 MITF 발현 상승에 대한 억제 효과가 없었기 때문으로 여겨진다.

향후 꿀의 미백활성 효과를 보다 명확하게 밝히기 위해서 꿀에 존재하는 개별 생리활성물질들의 정량적 분석이 요구된다. 또한 세포 내에서 각 생리활성물질들의 미백활성 효과에 대한 분자생물학적 메커니즘 규명 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서 이용한 피나무 꿀, 헛개나무 꿀, 밤나무 꿀의 EAF는 마누카 꿀 EAF 보다 높은 산화방지능 및 타이로시네이스 억제능을 보였다. 특히 밤나무 꿀의 EAF는 양성대조군인 고지산에 버금가는 타이로시네이스 억제능을 보였다. 5가지 화종 유래 꿀의 EAF (100 µg/mL) 처리시 B16F1 세포에서 멜라닌 생성 억제능은 밤나무 꿀>헛개나무 꿀>마누카 꿀>피나무 꿀>아카시아 꿀의 순서대로 낮아졌다. B16F1 세포 내 타이로시네이스의 효소활성 억제의 경우 5종류 꿀 EAF 중에서 밤나무 꿀 EAF (100 µg/mL) 처리시 가장 높았다. 본 연구에서는 다양한 화종의 국내산 꿀에 대한 생리활성소재 탐색을 통하여 산화방지능 및 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였으며, 이를 통해 미백활성 소재로서 기능성 식품 및 화장품 산업으로의 적용 가능성을 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2011-0012786).

References

- Andrade P, Ferreres F, Amaral MT. Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20: 2281-2288 (1997)
- Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 63: 549-562 (1998)
- Baek Y, Kim YJ, Baik M-Y, Kim D-O, Lee H. Total phenolic contents and antioxidant activities of Korean domestic honey from different floral sources. *Food Sci. Biotechnol.* 24: 1453-1457 (2015)
- Bertolotto C, Buscà R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne J-P, Ballotti R. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol. Cell. Biol.* 18: 694-702 (1998)
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 27: 677-689 (2008)
- Breathnach AS, Wyllie LM. Electron microscopy of melanocytes and melanosomes in freckled human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 42: 389-394 (1964)
- Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem. Photobiol.* 84: 539-549 (2008)
- Chang T-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440-2475 (2009)
- Chung S-Y, Seo Y-K, Park J-M, Seo M-J, Park J-K, Kim J-W, Park C-S. Fermented rice bran downregulates MITF expression and leads to inhibition of α -MSH-induced melanogenesis in B16F1 melanoma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1704-1710 (2009)
- El-Kased RF, Amer RI, Attia D, Elmazar MM. Honey-based hydrogel: *in vitro* and comparative *in vivo* evaluation for burn wound healing. *Sci. Rep.* 7: 9692 (2017)
- Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 16: 731-742 (2013)
- Han S, Lee K, Yeo J, Woo S, Kweon H, Nam S, Ho Y, Kim W. Whitening effect of the honey from Korea. *Korean J. Apic.* 25: 39-43 (2010)
- Heo H-J, Cho H-Y, Hong B, Kim H-K, Kim E-K, Kim B-G, Shin D-H. Protective effect of 4,5-dihydroxy-3,6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid-J. Protein Fold. Disord.* 8: 194-201 (2001)
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4437-4444 (2002)
- Jantakee K, Tragoolpua Y. Activities of different types of Thai honey on pathogenic bacteria causing skin diseases, tyrosinase enzyme and generating free radicals. *Biol. Res.* 48: 4 (2015)
- Jung C. A note on the early publication of beekeeping of Western honeybee, *Apis mellifera* in Korea: Yangbong Yoji (Abriss Bienenzucht) by P. Canisius Kugelgen. *J. Apic.* 29: 73-77 (2014)
- Kassim M, Achoui M, Mustafa MR, Mohd MA, Yusoff KM. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate *in vitro* anti-inflammatory activity. *Nutr. Res.* 30: 650-659 (2010)
- Kim HR, Kim H, Jung BJ, You GE, Jang S, Chung DK. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Mol. Cells* 38: 163-170 (2015)
- Kim D-S, Park S-H, Kwon S-B, Li K, Youn S-W, Park K-C. (-)-Epigallocatechin-3-gallate and hinokitiol reduce melanin synthesis via decreased MITF production. *Arch. Pharm. Res.* 27: 334-339 (2004)
- Kim Y-J, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1707-1723 (2005)
- Kohsaka R, Park MS, Uchiyama Y. Beekeeping and honey production in Japan and South Korea: past and present. *J. Ethnic Foods* 4: 72-79 (2017)
- Lee SK, Lee H. Antimicrobial activity of solvent fractions and bacterial isolates of Korean domestic honey from different floral sources. *Food Sci. Biotechnol.* 25: 1507-1512 (2016)
- Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* 12: 406-414 (2006)
- Masamoto Y, Ando H, Murata Y, Shimoishi Y, Tada M, Takahata K. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 631-634 (2003)
- Nithitanakool S, Pithayanukul P, Bavovada R, Sarpapakorn P. Molecular docking studies and anti-tyrosinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules* 14: 257-265 (2009)
- Pfeifer GP, Besaratinia A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11: 90-97 (2012)
- Rigopoulos D, Gregoriou S, Katsambas A. Hyperpigmentation and melasma. *J. Cosmet. Dermatol.* 6: 195-202 (2007)
- Sánchez-Ferrer Á, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, García-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1247: 1-11 (1995)
- Sapkota K, Park S-E, Kim J-E, Kim S, Choi H-S, Chun H-S, Kim S-J. Antioxidant and antimelanogenic properties of chestnut flower extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1527-1533 (2010)
- Ullah S, Khan SU, Saleh TA, Fahad S. Mad honey: uses, intoxicating/poisoning effects, diagnosis, and treatment. *RSC Adv.* 8: 18635-18646 (2018)
- Ünver N, Freyschmidt-Paul P, Hörster S, Wenck H, Stäb F, Blatt T, Elsässer HP. Alterations in the epidermal-dermal melanin axis and factor XIIIa melanophages in senile lentigo and ageing skin. *Br. J. Dermatol.* 155: 119-128 (2006)
- Visavadia BG, Honeysett J, Danford MH. Manuka honey dressing: an effective treatment for chronic wound infections. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 46: 55-56 (2008)
- Yoshioka S, Terashita T, Yoshizumi H, Shirasaka N. Inhibitory effects of whisky polyphenols on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 2278-2282 (2011)
- Zumla A, Lulat A. Honey-a remedy rediscovered. *J. R. Soc. Med.* 82: 384-385 (1989)