

## 붉나무 캘러스 유도 및 그 추출물로부터 피부미백 효과에 관한 연구

김동명<sup>1\*</sup> · 정주영<sup>1</sup> · 이형곤<sup>1</sup> · 권용성<sup>1</sup> · 백진홍<sup>2</sup> · 이관호<sup>3</sup> · 장진훈<sup>3</sup> · 한인석<sup>4</sup>

<sup>1</sup>㈜케이제이엠바이오 바이오연구소, <sup>2</sup>㈜김정문알로에 생명과학연구소,

<sup>3</sup>한국산업기술대학교 생명화학공학과, <sup>4</sup>유타대학교 화학공학과

### Induction and Proliferation of Callus in *Rhus chinensis* Mill. and Its Effect on Skin Whitening

Dong-Myong Kim<sup>1\*</sup>, Ju-Yeong Jung<sup>1</sup>, Hyung-Kon Lee<sup>1</sup>, Yong-Seong Kwon<sup>1</sup>, Jin-Hong Baek<sup>2</sup>, Kwan-Ho Lee<sup>3</sup>, Jin-Hoon Jang<sup>3</sup>, and In Suk Han<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, KJM Bio Ltd., 17 Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Korea

<sup>2</sup>R&D Center of Aloe, Kim Jung Moon Aloe Ltd., 15 Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Korea

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering & Biotechnology, College of Engineering, Korea Polytechnic University, 237 Sangidaehak-ro, Siheung-si, Gyeonggi-do 15073, Korea

<sup>4</sup>Department of Chemical Engineering, College of Engineering, The University of Utah, Salt Lake City, UT84112, USA

**Abstract** – The objective of this study was to optimize the condition for induction and proliferation of callus from *Rhus chinensis* Mill. and investigate the skin-brightening effect of *Rhus chinensis* callus (RCC). It was confirmed that the most proper plant growth regulator (PGR) for callus induction is 1.0 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The most optimal condition of PGR, medium and additives for callus proliferation were 2,4-D (1.0 mg/L), MS medium and citric acid, respectively. Inhibitory activities of tyrosinase were higher at 50 and 100 µg/mL of RCC extracts (41.86 and 75.56%, respectively) than arbutin (27.32%). As the results of measuring melanin inhibition in B16F1 melanocyte and B16F10 melanoma cell, RCC extracts increased its inhibitory activities concentration-dependently, and were found to have higher whitening effect than arbutin at a concentration of 100 µg/mL. Therefore, it is suggested that RCC can be used as an effective material for skin-brightening cosmetics.

**Keywords** – *Rhus chinensis* Mill., Plant tissue culture, Tyrosinase, Melanin, Skin-brightening

피부는 외부 환경과 직접 접하면서 인체를 보호하며 생화학적 및 물리적인 기능을 가지고 있는 아주 중요한 조직 중 하나이다. 피부 속 기저층에는 피부색의 결정적인 요소인 멜라닌(melanin) 색소가 존재하는데, 이 멜라닌은 페놀류의 생체 고분자 물질로 멜라노솜(melanosome)에서 합성된다. 멜라노솜의 특이적 효소인 tyrosinase는 tyrosine이 L-3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine(L-DOPA)로, 이어서 dopaquinone으로 산화하는데 관여하며, 최종 산물인 indole-5,6-dihydroquinone이 바로 멜라닌이다. 멜라닌 합성은 자외선, 사이토카인(cytokine), 성장인자(growth factor) 및 호르몬 등에 의해 조절되는데, 자외선 노출 등에 의해 멜라닌이 과도

하게 생성될 경우 기미, 주근깨, 검버섯, 피부 노화 등의 인체의 부작용을 야기할 뿐만 아니라 멜라닌 전구물질의 독성으로 인해 세포의 사멸과 피부암을 유발하기도 한다.<sup>1-4)</sup> 이러한 이유로 멜라닌을 억제하기 위한 연구가 많이 진행되고 있으며, 현재 hydroquinone, kojic acid, arbutin, azelaic acid 및 ascorbic acid 등의 많은 멜라닌 생성 저해제들이 연구되었으나 피부 안전성과 제형 안정성 문제로 제한된 양만 사용되고 있는 실정이다.<sup>5-8)</sup> 이와 같은 문제점들로 인해 안전하고 효율적인 멜라닌 생성 저해제 연구의 필요성이 대두되어 식물 유래 천연물을 바탕으로 하는 화장품 유효성분과 한약재를 이용한 천연 소재에 관한 연구가 많이 진행되고 있다.<sup>9)</sup>

붉나무(*Rhus chinensis* Mill.)는 율나무과(*Anacardiaceae*)에 속하는 낙엽 소교목으로 한국, 중국, 일본을 포함하는 동

\*교신저자(E-mail): davidkim@aloe.co.kr;  
(Tel): +82-10-8164-4524

아시아에 널리 분포한다.<sup>10)</sup> 예로부터 붉나무의 줄기 껍질은 출혈을 동반한 설사나 중기, 그리고 심한 염증성 피부질환을 치료하는데 사용되기도 하였다. 붉나무에는 gallic acid, methyl gallate, orcinol 등을 포함한 다양한 페놀성 화합물, coumarin, triterpenoids와 flavonoids 등의 다양한 생리활성 물질을 가지고 있으며<sup>10-13)</sup>, 이러한 물질에 의해 항균 활성, 항산화 활성 및 항염증 활성이 있다고 밝혀져 있다.<sup>14-16)</sup> 또한 최근에는 붉나무 가지의 주름 억제와 미백에 대한 효능이 보고된 바 있다.<sup>17)</sup>

붉나무 잎에 오배자면충(*Scheichtendalia chinensis*)이 기생하여 이루어진 벌레혹(충영)을 오배자라고 일컫으며, 이는 지혈, 해독 및 항균 작용이 있어 이질, 설사 등의 수렴제 사제로 사용하였다.<sup>18)</sup> 이러한 오배자는 tannin 원료 자원으로 유명하지만 약용부위가 벌레혹이기 때문에 자연에서 채취하거나 붉나무 재배를 통해 오배자를 즉각적으로 수득이 불가하다는 점에서 수급성이 불안정하다.<sup>19)</sup>

식물조직배양(plant tissue culture)은 식물의 세포 및 기관을 연중 균일하게 대량 생산하는 가장 보편적인 방법으로, 식물체로부터 기관, 조직 및 세포를 적출 분리하여 기내에서 영양분이 함유되어 있는 배지를 이용해 무균 배양함으로써 캘러스(callus)를 단세포의 집단으로 유기하거나 완전한 기능을 가진 식물체로 재생시키는 기술을 말한다.<sup>20)</sup> 최근에는 식물조직배양기술을 이용하여 생리활성이 우수한 기능성 천연소재를 기능성 화장품 분야에 활용하는 연구가 이루어지고 있는데, 이를 이용할 경우 특정 cell line의 유지 및 보존, 주기적인 계대배양으로 인한 오염방지, 인건비 등 경비절감이 가능한 장점이 있다.<sup>21,22)</sup> 현재 화장품 분야에 있어서 식물의 캘러스 소재가 새로운 소재로 활용되고 있으나 다양한 식물줄기세포 소재가 개발되지 못한 상황이며, 특히 오배자로부터 유도된 붉나무 캘러스에 관한 연구는 수행된 바 없었다.

본 연구는 붉나무 잎에 형성된 오배자의 조직 절편으로부터 붉나무 캘러스를 유도 및 증식시키기 위한 적합한 조건을 확립하고, 이러한 조건에서 생성된 붉나무 캘러스 추출물의 피부 미백 효과를 확인하기 위한 목적으로 진행되었다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 연구에서 사용된 오배자는 충북 괴산군 청천면 거봉리에서 수령이 11~15년 경과된 붉나무의 엽축날개에 형성된 오배자의 조직절편을 채취하여 사용하였다. 또한 캘러스 유도용 배지는 MS배지<sup>23)</sup>를 기본으로 하였으며 그 외 배지와 실험에 사용된 물질은 모두 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

**오배자로부터 캘러스 유도** - 캘러스를 유도하기 위해 간모가 완전히 제거된 오배자 조직절편을 70% 에탄올에 30 sec

침지한 후 2%(w/v) NaOCl에서 조직절편의 표면을 15 min 살균하고 멸균수로 3회 세척하였다. 표면이 살균된 오배자 조직절편을 5×5 mm 크기로 절단 후 30.0 g/L의 sucrose와 2.3 g/L의 gelrite를 처리한 MS배지에 치상하였다. 이때 식물 성장조절제가 캘러스 유도에 미치는 영향을 확인하기 위해 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) 단일 사용, 2,4-D 및 1-naphthaleneacetic acid(NAA) 혼용 또는 2,4-D, NAA 및 6-benzyl adenin(BA) 혼용으로 나누어 첨가하였다. 배지는 pH 5.8로 조절하였고 121°C에서 25 min 고압으로 멸균 후 petri dish에 분주하여 사용하였다. petri dish 당 조직 절편은 5개씩 치상하였고 4주 후 생존율 및 캘러스 유도율을 관찰하였다.

**식물 성장조절제, 배지 종류 및 배지 내 첨가물에 따른 캘러스 증식** - 식물 성장조절제가 캘러스 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MS배지에 30.0 g/L의 sucrose와 2.3 g/L의 gelrite를 첨가하고 식물 성장조절제인 2,4-D, NAA, BA, kinetin을 단독 또는 혼용하여 배지에 첨가하여 사용하였다. 캘러스는 petri dish 당 9개씩 치상하고 암조건 배양실에서 3주간 배양한 후 friable 캘러스 유도율, 캘러스 지름 및 갈변율을 관찰하였다.

캘러스 증식에 적합한 배지를 선정하기 위해 배지 종류를 MS, WPM, B5 또는 SH 기본배지를 변형하여 사용하였다.<sup>24-26)</sup> 그 후 모든 배지에 1.0 mg/L의 2,4-D, 30.0 g/L의 sucrose 및 2.3 g/L의 gelrite를 첨가하였다. 캘러스는 petri dish 당 5개씩 치상하였고 3주 경과 후 friable 캘러스 유도율, 캘러스 지름, 갈변율을 관찰하였다.

배지 내 첨가물에 따른 캘러스의 증식을 확인하기 위한 실험으로 배지에 시트르산(citric acid), 아스코르브산(ascorbic acid), 카제인 가수분해물(casein hydrolysate) 및 이노시톨(inositol)을 각각 1.0 g/L 처리하였다. 이때 배지는 1.0 mg/L의 2,4-D, 30.0 g/L의 sucrose와 2.3 g/L의 gelrite가 첨가된 MS 배지를 사용하였다. 캘러스는 petri dish 당 5개씩 치상하였고 암배양 조건에서 3주간 배양 후 friable 캘러스 유도율, 캘러스 지름, 갈변율을 관찰하였다.

**캘러스 유효성분 추출** - 캘러스의 유효성분 추출은 캘러스를 분쇄한 후 캘러스 분말 500 g을 1 L의 70%(v/v) 메탄올을 용매로 하여 상온에서 24 hr 총 3회 추출하였다. 그 후 여과 및 농축시킨 추출물은 증류수에 현탁시킨 후 헥산(n-hexane), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 부탄올(n-butanol)로 분획하여 각 용매 별 분획물을 얻었다. 그리고 각 분획물 중 에틸아세테이트 분획물을 -85°C에서 24 hr 동안 동결 건조(FD8512, ilShinBioBase, Dongduchoen, Korea)하여 본 실험에 사용하였다.

**Tyrosinase 억제 활성** - 수득한 캘러스 추출물의 미백효과를 확인하기 위해 tyrosinase 억제 활성 분석을 진행하였다.<sup>27)</sup> 각각의 시료 15 μL를 96-well plate에 첨가하였고,

50 mM 인산 완충액(pH 6.5) 150  $\mu$ L 및 1.5 mM의 L-티로신 용액 25  $\mu$ L를 분주하였다. 그 후, tyrosinase 10  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 20 min 반응시킨 후에 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 생성된 도파크롬(dopachrome)의 양을 평가하여 tyrosinase에 대한 저해율을 측정하였다. Tyrosinase 억제 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 절반으로 전환시키는데 필요한 시료의 농도인 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.

**세포 독성 평가** - 켈러스 추출물이 B16F1 멜라노사이트 및 B16F10 흑색종 세포 각각에 미치는 독성을 확인하기 위한 실험으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 실시하였다.<sup>28)</sup> 96-well plate에, 10% Fetal bovine serum(FBS)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에 희석한 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/well 씩 분주하여 24 hr 부착한 후 각 well에 실험에서 수득한 켈러스 추출물을 적절한 농도로 희석하여 처리하여 24 hr 동안 배양하였다. 24 hr 후 배지를 제거하고 각 well 당 2.5 mg/mL의 MTT 용액이 함유된 세포배양 배지 200  $\mu$ L를 넣어 2 hr 동안 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 이 후 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 100  $\mu$ L씩 넣고 5 min 진탕하여 세포를 용해시킨 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**B16F1 멜라노사이트를 이용한 멜라닌 합성 저해 활성** - 세포 내 멜라닌 정량을 통한 멜라닌 합성 억제 활성 분석은 Lotan의 방법을 변형하여 실시하였다.<sup>29)</sup> ATCC(American Type Culture Collection, VA, USA)에서 구매한 마우스 유래 세포 B16F1 멜라노사이트를 6-well plate에 2×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 접종한 후 독성을 유발하지 않는 농도로 시료를 처리하여 72 hr 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 그 후 세포를 trypsin-EDTA로 분리한 후 세포수를 측정하고 5 min 원심분리하여 회수한 세포 침전물을 1 mL 균질화 완충액(50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 1% triton X-100, 2 mM phenyl methane sulphonyl fluoride)에 용해하였다. 이후 3000 rpm에서 10 min 원심분리 하여 얻은 pellet에 1N NaOH(10% DMSO 포함)를 첨가 후 추출된 멜라닌

을 용해하였고 405 nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정하여 시료의 멜라닌 생성 저해율(%)을 구하였다.

**B16F10 흑색종 세포를 이용한 멜라닌 생성량** - 켈러스 추출물이 멜라닌세포자극호르몬( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH)에 의해 유도된 멜라닌 생성에 미치는 영향은 B16F10 세포를 이용하여 분석하였으며, Hosoi 등의 방법을 수정하여 진행하였다.<sup>30)</sup> B16F10 흑색종 세포(B16F10 melanoma cell)는 10% FBS, 1% penicillin 및 streptomycin이 처리된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 지름 100 mm 배양 접시에서 1×10<sup>6</sup> cells/mL로 배양된 B16F10 흑색종 세포는 10 mM 농도의  $\alpha$ -MSH로 처리하였고, 그로부터 4 hr 후에 켈러스 추출물을 처리하였다. 켈러스 추출물 처리 24 hr 후에 B16F10 흑색종 세포는 Dulbecco's phosphate-buffered saline으로 2회 수세 후 수거하였다. 여기에 1 mL의 lysis buffer(0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.8, 1%(v/v) triton X-100)를 첨가하여 4°C에서 30 min 반응시킨 후 13,000 rpm에서 10 min 원심분리하고 상등액은 bicinchoninic acid(BCA) 단백질 정량법으로 정량하였다. 침전물은 1 N의 NaOH 용액 1 mL을 첨가한 후 90°C에서 1 hr 반응시키고 단백질 양에 맞춰 희석한 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 생성량을 산출하였다.

**통계처리** - 각 시료 간의 차이를 비교하기 위해 통계처리를 실시하였다. 모든 시료에 대해서는 3회 반복 실험을 진행하였으며 각 자료는 평균값과 표준오차로 나타내었다. 통계 분석은 SPSS(IBM SPSS Statistics, NY USA)를 사용하였고 95% 유의수준에서 던컨(Duncan)의 일원배치 다중검정 시험으로 각 처리 간의 유의적인 차이를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

**켈러스 유도에 대한 식물 생장조절제 영향** - 켈러스 유도에 대한 식물 생장조절제의 영향 분석 결과는 Table I에 나타내었다. 절편체의 생존율과 켈러스 유도율 모두 2,4-D, NAA, BA 혼용처리에서 각각 100.00%, 96.91%으로 가장

**Table I.** Effects of plant growth regulators on callus induction

Plant growth regulators (mg/L)			Survival rate (%)	Callus inductivity (%)
2,4-D*	NAA**	BA***		
1	0	0	89.31 ± 2.51 <sup>b</sup>	51.53 ± 9.72 <sup>b</sup>
0.5	0.5	0.5	65.26 ± 4.53 <sup>c</sup>	27.39 ± 5.21 <sup>c</sup>
0.5	0.5	0.1	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	96.91 ± 3.17 <sup>a</sup>

Data represent the mean±S.D. with three separate experiments. Values with different alphabetical letters are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA with post-hoc by Duncan test).

\*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

\*\*1-Naphthaleneacetic acid

\*\*\*6-Benzyl adenine

높았다. 또한 2,4-D, NAA, BA 혼용처리의 경우가 유도된 캘러스의 부피가 가장 컸다. 그러나 2,4-D 단독 처리와 2,4-D, BA 혼용 처리의 경우에는 캘러스 유도율이 각각 51.53%, 27.39%로 2,4-D, NAA, BA 혼용 처리에 비해 낮은 값을 보여 캘러스 유도에 효율적이지 않았다. 따라서 캘러스 유도에 가장 적합한 식물 성장조절제 처리 조건은 2,4-D, NAA, BA 혼용처리인 것으로 확인하였다.

**캘러스 증식에 대한 식물 성장조절제, 배지 종류 및 배지 내 첨가물 영향** - 캘러스 증식에 대한 식물 성장조절제의 영향 분석 결과는 Table II에 나타내었다. 먼저 식물 성장조절제를 첨가하지 않은 대조군에서는 friable 캘러스 유도율이 0%, 캘러스 지름이 0.52 cm, 그리고 갈변율이 31.25%로 가장 좋지 못한 성장 상태를 보였다. 반면, NAA, BA 및 kinetin 처리 없이 1.0 mg/L의 2,4-D 만 처리한 시험군에서는 friable 캘러스 유도율이 52.73%로 가장 높아-분화력이 우수함을 알 수 있었다. 또한, 캘러스의 지름이 2.18 cm 부피가 크게 증가한 상태였고 갈변율은 7.21%로 처리군 중에서 가장 낮았다. 그 외의 처리군에서는 friable 캘

러스 유도율과 캘러스 지름이 낮거나 갈변율이 높은 모습을 보여 적합하지 않은 상태로 보였다. 따라서 캘러스 증식에 가장 적합한 식물 성장조절제 처리 조건은 1.0 mg/L의 2,4-D 단독 처리한 것으로 확인할 수 있었다.

배지 종류에 따른 캘러스 증식 결과는 Table III에 나타내었다. MS 배지에서는 friable 캘러스 유도율 및 캘러스 지름이 각각 7.89% 및 2.21 cm로 처리된 배지 중에서 가장 높은 값을 보였고 갈변율은 11.00%로 가장 낮아 캘러스 배양에는 가장 적합한 것으로 사료되었다. 반면, WPM 배지의 경우 캘러스의 지름이 0.32 cm로 가장 낮았고 BS 배지의 경우 갈변율이 61.16%로 처리군 중에서 가장 높아 캘러스 배양에는 적합하지 않은 것으로 사료되었다. 또한 SH 배지도 friable 캘러스 유도율이 0%로 나타나 적합하지 않았다.

배지 내 첨가물에 따른 캘러스 증식 결과는 Table IV에 나타내었다. Citric acid 처리군에서 friable 캘러스 유도율 및 캘러스 지름이 각각 37.98% 및 2.57 cm로 가장 높았으며 갈변율은 5.12%로 가장 낮아 캘러스 배양에 가장 적합한 것으로 사료되었다. Ascorbic acid 처리군은 friable 캘러

**Table II.** Effects of plant growth regulators on callus proliferation

Plant growth regulators (mg/L)				Friable callus inductivity (%)	Callus diameter (cm)	Browning rate (%)
2,4-D*	NAA**	BA***	Kinetin			
0	0	0	0	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.52 ± 0.17 <sup>c</sup>	31.25 ± 17.09 <sup>f</sup>
1.0	0	0	0	52.73 ± 5.46 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.23 <sup>a</sup>	7.21 ± 2.28 <sup>a</sup>
2.0	0	0	0	2.92 ± 2.17 <sup>de</sup>	0.97 ± 0.02 <sup>b</sup>	15.76 ± 3.12 <sup>cd</sup>
1.0	0	0.1	0	26.03 ± 12.19 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.03 <sup>c</sup>	8.93 ± 1.65 <sup>ab</sup>
1.0	0	0	0.1	3.41 ± 3.63 <sup>de</sup>	0.92 ± 0.03 <sup>bc</sup>	12.25 ± 5.17 <sup>c</sup>
0	1.0	0	0	0.25 ± 1.39 <sup>e</sup>	0.92 ± 0.03 <sup>bc</sup>	9.28 ± 3.29 <sup>b</sup>
0	2.0	0	0	0.34 ± 1.37 <sup>e</sup>	0.97 ± 0.03 <sup>b</sup>	13.22 ± 4.32 <sup>c</sup>
0	2.0	0.1	0	28.54 ± 11.63 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.03 <sup>c</sup>	15.72 ± 5.20 <sup>cd</sup>
0	2.0	0	0.1	15.23 ± 3.18 <sup>bc</sup>	0.71 ± 0.05 <sup>d</sup>	9.57 ± 10.29 <sup>b</sup>
0	0.5	0.1	0	13.56 ± 5.78 <sup>c</sup>	0.72 ± 0.03 <sup>d</sup>	12.89 ± 9.28 <sup>c</sup>
0	0.5	0	0.1	6.74 ± 3.53 <sup>d</sup>	0.72 ± 0.03 <sup>d</sup>	28.17 ± 7.16 <sup>e</sup>

Data represent the mean±S.D. with three separate experiments. Values with different alphabetical letters are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA with post-hoc by Duncan test).

\*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

\*\*1-Naphthaleneacetic acid

\*\*\*6-Benzyl adenine

**Table III.** Effect of medium on callus proliferation

Medium	Friable callus inductivity (%)	Callus diameter (cm)	Browning rate (%)
MS	7.89 ± 3.37 <sup>a</sup>	2.21 ± 0.03 <sup>a</sup>	11.00 ± 3.23 <sup>a</sup>
WPM	7.12 ± 2.10 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>c</sup>	33.20 ± 6.75 <sup>b</sup>
B5	7.53 ± 2.18 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.04 <sup>b</sup>	61.16 ± 12.31 <sup>c</sup>
SH	0 <sup>d</sup>	1.15 ± 0.03 <sup>b</sup>	31.07 ± 3.72 <sup>b</sup>

Data represent the mean±S.D. with three separate experiments. Values with different alphabetical letters are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA with post-hoc by Duncan test).

**Table IV.** Effects of additives on callus proliferation

Additives	Friable callus inductivity (%)	Callus diameter (cm)	Browning rate (%)
Citric acid	37.98 ± 12.56 <sup>a</sup>	2.57 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.12 ± 2.31 <sup>a</sup>
Inositol	7.57 ± 2.58 <sup>c</sup>	1.18 ± 0.02 <sup>b</sup>	32.26 ± 3.31 <sup>c</sup>
Ascorbic acid	14.69 ± 5.27 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.02 <sup>c</sup>	19.23 ± 4.29 <sup>b</sup>
Casein hydrolysate	3.39 ± 2.75 <sup>d</sup>	0.85 ± 0.02 <sup>d</sup>	38.16 ± 15.32 <sup>cd</sup>

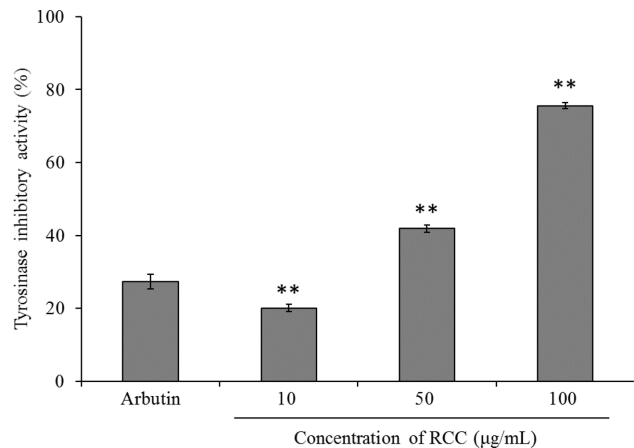
Data represent the mean±S.D. with three separate experiments. Values with different alphabetical letters are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA with post-hoc by Duncan test).

스 유도율, 캘러스 지름 및 갈변율이 각각 14.69%, 1.18 cm 및 19.23%로 citric acid 처리군 다음으로 캘러스 증식에 적합하였다. Inositol과 카제인 가수분해물 처리군은 갈변율이 각각 32.26%, 38.16%로 캘러스 증식에는 적합하지 않았다.

결론적으로 증식에 가장 적합한 처리 조건은 식물 성장조절제 2,4-D 1.0 mg/L와 첨가물 citric acid 1.0 g/L를 첨가한 MS 배지인 것으로 확인되었고 이 조건에 맞추어 배양한 캘러스를 공시재료로 사용하여 후속 실험을 진행하였다.

**Tyrosinase 억제 활성** - Tyrosinase는 멜라닌 색소가 형성되는 산화반응 단계 중 melanogenesis의 속도 결정단계인 초기반응에 관여하는 요인들 중에서 tyrosine을 기질로 이용하는 구리 함유 효소이다.<sup>3)</sup> Tyrosine은 tyrosinase에 의하여 L-DOPA로, L-DOPA는 dopaquinone으로 산화되어 최종적으로는 중합에 의해 멜라닌이 생성된다. 따라서 tyrosinase의 활성 억제는 피부 내에서의 멜라닌 생합성을 효과적으로 저해할 수 있기 때문에 유용한 효능 검증법으로 사용되고 있다.<sup>31)</sup> 본 연구에서는 캘러스 추출물의 멜라닌 합성 억제 및 미백 효과를 확인하기 위해 tyrosinase 저해 활성을 분석하였다. 대조군으로는 멜라닌 합성 억제를 통한 피부 미백 효과가 있는 것으로 알려져 있는 물질 중 하나인 arbutin을 이용하였고, 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과, 10, 50 및 100 µg/mL에서 각각 20.09, 41.86 및 75.56%로, 50 및 100 µg/mL 농도의 추출물은 arbutin(27.32%)보다 우수한 tyrosinase 저해 활성을 보였다. 이를 통해 캘러스 추출물은 50 µg/mL 이상의 농도에서 기존의 피부 미백제와 유사하거나 그 이상의 tyrosinase 저해 활성을 가지는 것이 확인되었다. An 등의 연구에서는 붉나무 줄기의 tyrosinase 저해 활성을 분석하였다.<sup>19)</sup> 그 결과, 1.0 mg/mL 농도의 물 추출물 및 에탄올 추출물에서 각각 22.30 및 23.30%의 tyrosinase 저해 활성 보였다. 반면에 본 연구의 붉나무 캘러스 추출물이 100 µg/mL 농도에서 75.56%의 저해 활성을 가진다는 점에서 붉나무 캘러스는 일반 붉나무 줄기에 비해 높은 피부 미백 효과를 가지는 것으로 사료되었다.

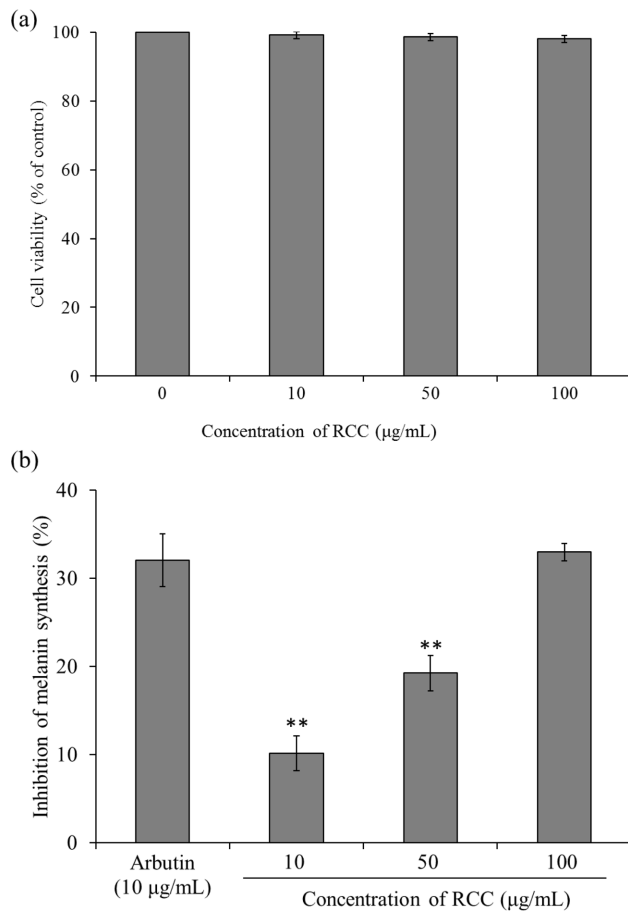
**B16F1 멜라노사이트를 이용한 멜라닌 합성 저해 활성** - 캘러스 추출물이 세포에 노출되었을 때 세포에 미치는 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 통해 B16F1 멜라노사



**Fig. 1.** Tyrosinase inhibitory activity of *Rhus chinensis* callus (RCC) extract. The values of IC<sub>50</sub> represent the concentration (µg/mL) required for 50% decrease of tyrosinase activity. Arbutin was used as a positive control. Data represent the mean±S.D. with three separate experiments. Differences between groups were statistically analyzed by ANOVA with post-hoc by Duncan test. \*\* $p < 0.05$  compared to arbutin-treated group.

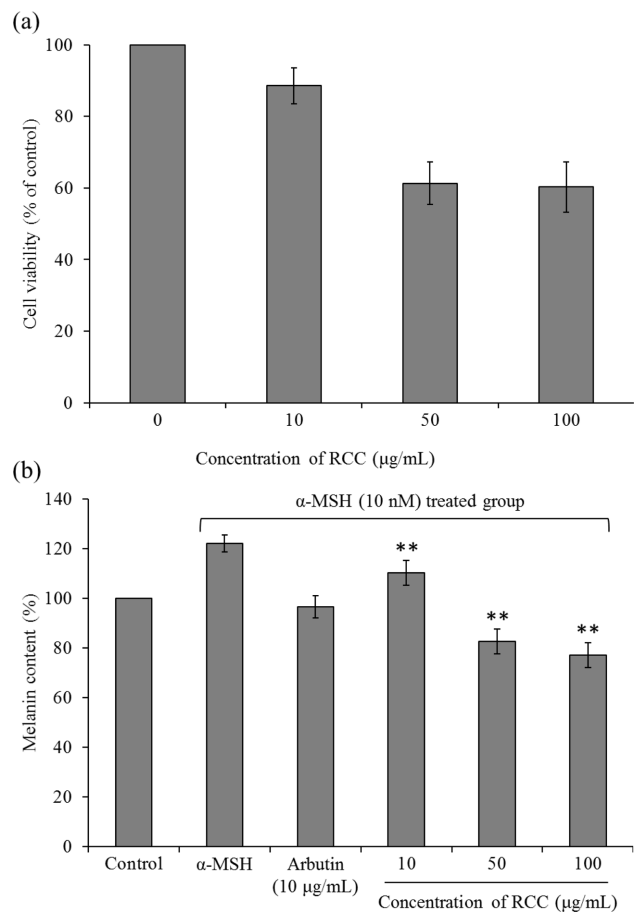
이트에 대한 세포 독성을 평가하였다(Fig. 2(a)). 캘러스 추출물의 10, 50, 100 µg/mL 농도에서의 cell viability는 각각 99.10, 98.56 및 98.01%로 시료를 첨가하지 않은 대조군의 cell viability(100%)와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이를 통해 캘러스 추출물은 B16F1 멜라노사이트에 세포 독성을 보이지 않는 것으로 확인되었다. B16F1 멜라노사이트를 이용한 캘러스 추출물의 멜라닌 합성 저해 활성 분석 결과는 Fig. 2(b)에 나타내었다. 대조군으로 사용한 10 µg/mL 농도의 arbutin의 멜라닌 합성 저해 활성은 32.01%였으며, 각 시료를 10, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 활성은 각각 10.13, 19.24, 32.92%로 나타났다. 따라서 캘러스 추출물은 농도 의존적으로 멜라닌 합성 저해 활성이 증가하는 경향을 보였으며 100 µg/mL 농도로 처리했을 때 arbutin과 유사한 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

**B16F10 흑색종 세포를 이용한 멜라닌 생성량** - MSH는 pro-opiomelanocortin의 유도체로 주로 뇌하수체에서 생성되



**Fig. 2.** Effects of *Rhus chinensis* callus (RCC) extract in B16F1 melanocyte. (a) Cell viability decided by MTT assay (b) Inhibition of melanin synthesis. Data represent the mean±S.D. with three separate experiments. Differences between groups were statistically analyzed by ANOVA with post-hoc by Duncan test. \*\* $p < 0.05$  compared to arbutin-treated group.

나 피부를 포함한 체내 다른 부위에서도 생성되는 것으로 알려져 있으며, 특히 피부에서는 각질형성세포와 멜라닌세포에서 생성된다. 태양 광선이 표피의 각질형성세포(keratinocyte)를 자극하면  $\alpha$ -MSH가 방출되고 이는 멜라노사이트를 자극하여 멜라닌 생성성을 증가시킨다.<sup>32,33)</sup> 따라서 B16F10 흑색종 세포에  $\alpha$ -MSH를 처리하였을 때의 멜라닌 합성 저해 활성 분석을 통해 켈러스 추출물의 피부 미백 활성을 확인하였다. 또한, 켈러스 추출물이 세포에 노출되었을 때 세포에 미치는 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 통해 B16F10 흑색종 세포에 대한 세포 독성을 평가하였다(Fig. 3(a)). 시료를 첨가하지 않은 대조군의 cell viability를 100% 기준으로 두었을 때 켈러스 추출물의 10, 50, 100 µg/mL 농도에서의 cell viability는 각각 88.54, 61.33 및 60.28%로 나타났다. 대조군과 시료 10 µg/mL 농도에서는



**Fig. 3.** Effects of *Rhus chinensis* callus (RCC) extract in B16F10 melanoma cell (a) Cell viability decided by MTT assay (b) Melanin content synthesized by inducing with  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH). Control group was treated nothing;  $\alpha$ -MSH group was treated 10 nM of  $\alpha$ -MSH only; Arbutin group was treated 10 nM of  $\alpha$ -MSH with 10 mg/mL of arbutin; 10, 50, and 100 groups were treated 10 nM of  $\alpha$ -MSH with 10, 50, and 100 µg/mL of RCC extract, respectively. Data represent the mean±S.D. with three separate experiments. Differences between groups were statistically analyzed by ANOVA with post-hoc by Duncan test. \*\*  $p < 0.05$  compared to arbutin-treated group.

99% 유의수준에서 50 및 100 µg/mL에서는 95% 유의수준에서 차이가 있어 켈러스 추출물은 B16F10 흑색종 세포에 약간의 독성을 가지는 것으로 확인되었다. B16F10 흑색종 세포에  $\alpha$ -MSH를 처리하여 멜라닌 합성을 유도한 후 켈러스 추출물을 처리하여 총 멜라닌 생성량을 분석한 결과는 Fig. 3(b)에 나타내었다. 아무것도 처리하지 않은 대조군을 100% 기준으로 두었을 때  $\alpha$ -MSH를 단독으로 처리한 시험군에서 멜라닌 합량은 122.07%로 대조군에 비해 값이 증가하였다. 반면에  $\alpha$ -MSH 처리와 함께 대조군으로 10 µg/mL 농도의 arbutin을 처리한 군은 96.51%로 멜라닌 생성량이

감소하였으며 시료를 10, 50, 100 µg/mL로 처리한 시험군에서는 각각 110.33, 82.74, 77.21%의 멜라닌 생성량을 나타내었다. 이 결과로부터 켈러스 추출물을 10 µg/mL 농도(11.74%)로 처리할 경우에는 약간의 멜라닌 합성을 저해할 수 있지만 50 및 100 µg/mL 농도(39.33, 44.86%)로 처리할 경우 arbutin(25.56%)보다 유의적으로 높은 멜라닌 합성 저해 활성을 가지는 것으로 확인할 수 있었다. Kim 등<sup>34)</sup>의 보고에 따르면, B16F10 세포에 400 nM의 α-MSH를 처리한 후 5 µg/mL 농도의 에틸아세테이트 분획물을 처리할 경우 멜라닌 합성 저해율이 약 9%이었다. 본 연구 결과와 비교해 보면 400 nM의 25배인 10 mM의 α-MSH를 처리했을 때 10 µg/mL의 켈러스 추출물이 약 12%의 멜라닌 합성 저해율을 보였으므로 일반 오배자보다 켈러스 추출물이 훨씬 우수한 피부 미백 효과를 가지는 것으로 확인할 수 있었다.

## 결 론

본 연구에서는 붉나무 켈러스를 유도 및 증식시키기 위한 적합한 조건을 확립하고, 이러한 조건에서 생성된 켈러스 추출물의 피부 미백 효과를 확인하였다. 켈러스 유도에 가장 적합한 식물 성장조절제는 1.0 mg/L의 2,4-D이였으며 유도된 켈러스의 분화 및 증식에 가장 적합한 식물 성장조절제, 배지 종류, 배지 내 첨가물 조건은 각각 2,4-D(1.0 mg/L), MS 배지 및 citric acid인 것으로 확인되었다. 또한 tyrosinase 저해 활성 분석 결과, 50 및 100 µg/mL에서 각각 41.86 및 75.56%로, 대조군인 arbutin(27.32%)보다 높은 수치를 보였다. B16F1 멜라노사이트 및 B16F10 흑색종 세포에서의 멜라닌 합성 저해 활성 분석을 통해 피부 미백 효과를 확인한 결과, 켈러스 추출물은 농도 의존적으로 저해 활성이 증가하였으며 100 µg/mL 농도에서 대조군인 arbutin보다 높은 미백 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

이러한 결과로부터 각종 기능성 식물들에 대한 조직배양 기술의 적용은 보다 효율적이고 효과적인 천연 신소재의 확보를 위한 적용가능성을 제시하였다. 특히, 붉나무 오배자는 자연상태에서 대량으로 채취 및 공급하는데 어려움이 있는데 반해 본 연구에서는 기내배양을 통해 손쉽게 대량으로 확보가 가능하다는 점에서 의의를 찾을 수 있었다. 따라서 본 연구는 생약 소재의 공급과 관련한 기능성 화장품 분야에 중요한 기초자료로 활용될 것으로 사료되었다. 추후 후속 연구를 통해 일반 오배자와 오배자로부터 유도된 켈러스 간의 생리활성을 비교하여 오배자 유도 켈러스의 장점을 명확히 하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

## 사 사

본 논문의 연구는 2018년도 한국산업기술진흥원의 지원

으로 기술개발 지원사업(과제번호: N0001395)과 2020년도 중소벤처기업부의 재원으로 기획 지원사업(과제번호: S2953529)을 받아 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Bell, A. A. and Wheeler, M. H. (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
- Chen, J. S., Wei, C. I. and Marshall, M. R. (1991) Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1897-1901.
- Lerner, A. B. and Fitzpatrick, T. B. (1950) Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 91-126.
- Iwata, M., Corn, T., Iwata, S., Everett, M. A. and Fuller, B. B. (1990) The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.* **95**: 9-15.
- Hwang, S. W., Nam, S. H., Lee, J., Kwon, H.S., Lee, K.D., Park, K. H. and Yang, M. S. (2005) Comparison of tyrosinase inhibitory effect of the natural antioxidants from *Cedrela sinensis*. *Agric. Chem. Biotechnol.* **48**: 144-147.
- Kwak, J. H., Kim, Y. H., Chang, H. R., Park, C. W. and Han, Y. H. (2004) Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *KSBB Journal.* **19**: 437-440.
- Ahn, J. H. and Min, Y. H. (2014) Inhibitory effects of apricot seed essential oil on melanogenesis. *AJBC.* **12**: 677-683.
- Maeda, K. A. and Fukuda, M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**: 361-368.
- Cho, Y. J., An, B. J. and Kim, J. H. (2011) Application of isolated tyrosinase inhibitory compounds from persimmon leaves. *J. Life Sci.* **21**: 976-984.
- Lee, I. S., Oh, S. R., Ahn, K. S. and Lee, H. K. (2001) Semi-lactone, isofouquierone peroxide and fouquierone, three new dammarane triterpenes from *Rhus javanica*. *Chem. Pharm. Bull.* **49**: 1024-1026.
- Wang, R. R., Gu, Q., Wang, Y. H., Zhang, X. M., Yang, L. M., Zhou, J., Chen, J. J. and Zheng, Y. T. (2008) Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis*. *J. Ethnopharmacol.* **117**: 249-256.
- Oh, J. Y., Choi, U., Kim, Y. S. and Shin, D. H. (2003) Isolation and identification of antioxidative components from bark of *Rhus javanica* Linne. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 726-732.
- Chung, S. C., Hwang, B. Y., Oh, G. J., Kang, S. J., Kim, M. J., Choi, W. H., Lee, K. S. and Ro, J. S. (1999) Chemical Components from the stem bark of *Rhus javanica* L. *Korean J. Pharmacogn.* **30**: 295-300.
- Kim, S. H., Park, H. H., Lee, S. Y., Jun, C. D., Choi, B. J., Kim, S. Y., Kim, S. H., Kim, D.K., Park, J. S. and Chae, B.

- S. (2005) The anti-anaphylactic effect of the gall of *Rhus javanica* is mediated through inhibition of histamine release and inflammatory cytokine secretion. *Int. Immunopharmacol.* **5**: 1820-1829.
15. Lin, C. N., Chen, H. L. and Yen, M. H. (2008) Flavonoids with DNA strand-scission activity from *Rhus javanica* var. *roxburghiana*. *Fitoterapia.* **79**: 32-36.
  16. Chun, C. S., Kim, J. H., Lim, H., Sohn, H. Y., Son, K. H., Kim, Y. K., Kim, J. S. and Kwon, C. S. (2004) Antioxidative effect of *Rhus javanica* Linne extract against hydrogen peroxide or menadione induced oxidative stress and DNA damage in HepG 2 cells. *Prev Nutr Food Sci.* **9**: 150-155.
  17. An, D. S., Seo, S. J., Kim, N. W. and Lee, Y. S. (2017) Anti-aging and anti-inflammatory activity of *Rhus javanica* branches extracts. *J. Invest. Cosmetol.* **13**: 103-111.
  18. Lee, Y. (1996) A colored book of the Korean plants. Kyo-Hak Pub, Seoul, Korea.
  19. Yoo, S. J. (1972) Domestic resources of oriental drugs. *Korean J. Pharmacogn.* **3**: 165-168.
  20. Oh, S. T., Jung, H. S., Cho, M. J., Song, M. Y., Moh, S. H. and Seo, H. H. (2014) Effect of *Artemisia annua* Linne callus induced by plant cell culture technology on wound healing. *J Korea Acad Industr Coop Soc.* **15**: 5628-5636.
  21. Lee, N. N., Choi, Y. E. and Moon, H. K. (2015) Somatic embryo induction and plant regeneration from cold-stored embryogenic callus of *K. septemlobus*. *J Plant Biotech.* **42**: 388-395.
  22. Chenshu, A., Wang, X., Yuan, X., Zhao, B. and Wang, Y. (2003) Optimization of cryopreservation of *Artemisia annua* L. callus. *Biotechnol. Lett.* **25**: 35-38.
  23. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
  24. Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot.* **50**: 199-204.
  25. Gamborg, O. L. C., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158.
  26. Lloyd, G. and McCown, B. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* **30**: 421-427.
  27. Pomerantz, S. H. (1966) The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **241**: 161-168.
  28. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
  29. Lotan, R. and Lotan, D. (1980) Stimulation of melanogenesis in a human melanoma cell line by retinoids. *Cancer Res.* **40**: 3345-3350.
  30. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
  31. Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A. and Garcia-Borron, J. C. (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* **269**: 17993-18000.
  32. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* **75**: 122-127.
  33. De Leeuw, S. M., Smit, N. P., Van Veldhoven, M., Pennings, E. M., Pavel, S., Simons, J. W. and Schothorst, A. A. (2001) Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J. Photochem. Photobiol.* **61**: 106-113.
  34. Kim, K. Y., Lee, S. J., Bak, E. Y., Jang, G. S. and Hwang, W. G. (2009) Effects of *Galla rhois* extracts and fractions on anti-oxidative activity and inhibition of melanin synthesis by melanoma cell. *J. Kor. Soc. Cosm.* **15**: 1051-1058.

(2020. 9. 28 접수; 2020. 11. 5 심사;  
2020. 11. 18 게재확정)