

Melanin 생성 인자 억제 효과를 통한 *Mangifera indica* L. Peel의 미백효과 연구

김효민^{1†}, 유단희^{2†}, 이인철^{3*}

¹경북대학교 약학대학

²서원대학교 융복합대학

³서원대학교 바이오코스메틱학과

Received: November 1, 2021 / Revised: December 11, 2021 / Accepted: December 12, 2021

A Study on the Whitening Effect of *Mangifera indica* L. Peel Extracts through Inhibition of Melanin Synthesis Factor

Hyo-Min Kim^{1†}, Dan-Hee Yoo^{2†}, and In-Chul Lee^{3*}

¹College of Pharmacy, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

²College of Fusion and Convergence, ³Department of Bio-Cosmetic Science, Seowon University, Cheongju 28674, Republic of Korea

The purpose of this study was to investigate the whitening effects of hot water (AMPW) and ethanol (AMPE) extracts of *Mangifera indica* L. peel. To verify the whitening effects, tyrosinase inhibitory activity was measured. 9.51% inhibitory activity, and 35.98% inhibitory activity at 1,000 µg/ml. The effects of AMPW and AMPE on cell viability were measured using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay in B16-F10 melanoma cells. Greater than 95% cell viability was observed at 100 µg/ml. Thus, subsequent experiments were performed at concentrations less than 100 µg/ml. The whitening effects were confirmed by measuring the protein and mRNA expression levels of microphthalmia-associated transcription factor, tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), and TRP-2, which are factors involved in melanin synthesis. Western blotting and reverse transcription-polymerase chain reaction results confirmed that 100 µg/ml AMPW and AMPE showed superior inhibitory effects than the control treatment (alpha-melanocyte stimulating hormone only). Therefore, *Mangifera indica* L. peel extract had a whitening effect, and thus, has potential as a natural material for use in cosmetics.

Keywords: *Mangifera indica* L. peel, whitening effects, B16-F10, melanin

서 론

최근 현대인들은 건강뿐만 아니라 외모에 대한 관심도 높아지고 있어 피부를 보호하고 건강하게 유지하기 위해서 화장품의 수요가 증가하였으며, 그로 인해 화장품 산업이 활발히 발전하고 있는 추세이다. 화장품의 대량 생산을 위해 저렴한 원료인 유기합성 성분이 다량 사용되는 화장품이 늘어나고 있어 피부자극이 유발되고 피부질환 및 피부 트러블의 논란이 발생하고 있다. 이로 인해 화장품 시장에서는 피부 자극 및 인체에 무해한 천연 소재에 대한 선호도가 증가

하고 소재에 대한 안정성과 유효성을 토대로한 여러 생리학적 효능에 대한 식물성 소재를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다[1-3].

피부는 가장 바깥층부터 표피, 진피 및 피하조직으로 구성되어 있으며 표피의 기저층에 위치한 멜라노사이트(melanocyte) 내의 멜라노솜(melanosome)에서 외부자극 및 자외선에 의한 체내의 세포 및 조직 손상을 방어하기 위해 멜라닌(melanin)의 생합성이 발생하며 이렇게 생성된 멜라닌은 피부를 보호한다. 그러나 멜라닌의 생성이 과도하게 발생되면 기미, 주근깨, 색소침착, 검버섯 등의 색소질환이 발생한다[4-6]. 피부가 자외선에 노출되었을 때 각질형성세포에서는 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)의 생성이 촉진되어 세포내의 멜라닌 합성을 유발하는 mRNA 발현 조절에 중요한 전사 인자인 microphthalmia associated

*Corresponding author

Tel.: +82-43-299-8491, Fax: +82-43-299-8107

E-mail: 5229418@hanmail.net

[†]These authors contributed equally to this work.

transcription factor (MITF)를 발현시킨다. MITF는 Tyrosinase, Tyrosinase related protein 1 (TRP-1), TRP-2의 promoter에 결합하여 멜라닌 생합성을 유도하는 것으로 알려져 있다[7-9]. 멜라닌 합성은 주로 Tyrosinase 효소 작용에 의해 촉진되며, 이로 인해 발생한 멜라닌의 종류로는 밝은 적색 및 황색인 페오멜라닌(pheomelanin)과 짙은 갈색 및 검정색인 유멜라닌(eumelanin)으로 나누어진다. 이 중 유멜라닌 합성은 아미노산인 L-tyrosine이 Tyrosinase에 의해 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)에서 DOPA quinone으로 산화되어진 후 DOPA chrome, leucochrome, 5,6-dihydroxyindole (DHI)로 전환되어 발생한다. 또한 TRP-2의 작용에 의해 DOPA chrome이 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환되어진 후 TRP-1에 의해 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화되어 이는 멜라닌 중합에 의해 유멜라닌으로 합성된다[10-12]. 이러한 멜라닌 합성에 관여하는 MITF, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 등과 같은 인자들을 억제하는 연구[13, 14]를 통해 미백소재를 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다[15].

망고(*Mangifera indica* L.)는 옷나무(anacardiaceae)과에 속하며 세계 30대 주요 작물 중 하나로 열대 및 아열대 지역에서 주로 재배되어지고 있다[16]. 국내에 널리 알려진 품종으로는 노란색 망고인 카라바오 망고와 붉은색을 띠는 애플망고인 아윈(Irwin)이 대표적이다. 애플망고는 껍질이 매우 얇으며 과육에 섬유질이 없고 당도가 높아 수요가 증가되어지고 주로 대만, 태국에서 수입되어 판매되어졌다[17, 18]. 하지만 최근에는 국내 환경이 아열대성에 가까워져 열대과일인 망고, 바나나, 용과, 패션프루츠 등의 재배가 국내에서 활발히 진행되어지고 있다. 열대과일인 망고의 품종 중에서도 애플망고가 국내의 제주도, 여수 등에서 재배되어지고 국내에서 가장 안정적으로 정착하여 재배된다고 알려져 있다[19]. 망고에는 필수 비타민, 무기염류, 아미노산류 등이 포함되어져 있고 여러 종류의 polyphenol 화합물 중 mangiferin이 다량 함유되어 있으며 약용 및 생리 활성 작용으로 활용 가능성이 높고 항당뇨, 항산화, 면역 조절, 소염 등의 다양한 생물 활성을 지니고 있다고 알려져 있다[20]. 또한 망고 껍질에는 베타카로틴(β -carotene), 갈산(gallic acid), 탄닌(tannin), 카테킨(catechin) 등의 물질이 함유되어 있으며 이러한 물질은 항산화 활성 및 피부암 생성을 억제해준다고 알려져 있다. 이러한 활성을 가진 껍질은 현재 폐기물로 버려지고 있어 이를 활용하면 폐기물 처리 과정에서 생성되는 환경 오염 요소를 줄일 수 있는 효과도 나타날 것으로 기대되어진다[21, 22].

따라서 본 연구에서는 애플망고 부위 중에서도 과육을 수확한 후 폐기되어 버려지는 껍질을 활용하여 멜라닌 합성 관련 인자에 관한 효능 검증을 통해 미백 효과에 관한 활성을

확인하여 화장품의 천연 소재로서 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용된 애플망고의 껍질은 애플망고를 제주도 대동농원에서 구입하여 껍질을 수거 후 사용하였다. 시료는 세척하여 열풍건조한 후 파쇄한 것을 사용하였다. 열수 추출은 시료 100 g에 10배의 증류수를 첨가하여 100°C에서 3시간 환류 냉각 추출해 실온에서 24시간 침지한 후 부직포로 1차 여과하여 상등액과 침전물을 분리하여 위와 같이 3회 반복 추출하였다. 에탄올 추출은 시료 100 g에 10배의 에탄올을 첨가하여 24시간 동안 교반시켜 준 후 상등액과 침전물을 부직포를 이용하여 분리하고 이와 같은 방법을 3회 반복하였다. 각 추출물의 상등액은 진공펌프와 여과지(Whatman No. 5, No. 4, No. 2)를 이용하여 여과한 후 용매를 제거하기 위해 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)로 감압농축 하였다. 농축이 완료된 추출물을 동결건조하여 -20°C에 보관하며 본 실험의 시료로 사용하였으며, 애플망고 껍질의 열수 및 에탄올 추출물은 각각 21.22%, 21.57%의 수율을 얻었다.

시약 및 기기

Tyrosinase 저해 활성 측정 실험에 사용한 Tyrosinase from mushroom, L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA) 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정을 위해 사용한 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)와 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. 에서 구입하여 사용하였다. 미백 효과 측정을 위해 사용한 시약인 α -MSH, Radio-immunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer), Protease & Phosphatase Single-Use inhibitor Cocktail 100X 및 Bicinchoninic Acid (BCA) kit는 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 단백질 발현 실험에서 사용된 β -actin, MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 primary antibody와 anti-mouse, anti-rabbit인 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA)에서 구입하여 사용하였으며, enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로는 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate을 Merck Millipore (USA)에서 구입하여 사용하였다. mRNA 발현 측정 실험에 사용된 Trizol[®] reagent은 Thermo scientific ambion[®] (Logan, USA)에서 구입하였으며, Go Script[™] Reverse Transcription kits, Accupower[®] PCR PreMix는 Promega (USA)와 Bioneer (Korea)에서 구

입하였으며, GAPDH, MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2는 Bionics (Korea)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA), micro refrigerated centrifuge (Hanil Scientific Inc., Korea), microplate readers (Molecular Devices, China), nano drop (Jcbio, Korea), SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA) 등을 사용하였다.

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해 활성 측정은 DOPA chrome의 생성되는지 확인하기 위해 Yagi 등의 방법[23]에 따라 실험하였다. 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 µl에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질 액 40 µl 및 시료용액 40 µl의 혼합액에 200 U/ml Tyrosinase from mushroom 40 µl을 첨가하여 37°C에서 10분 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가구 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도}) \times 100$$

세포 주 및 세포 배양

본 실험에 세포배양을 위해 사용된 세포 주는 melanoma cell인 B16-F10을 ATCC (USA)에서 분양 받았으며, 세포 배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 80-90% 정도 자란 후 계대 배양하였다.

세포 생존율(MTT assay)

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[24]에 따라 측정하였다. B16-F10 세포를 1×10^4 cells/well을 96 well plate에 분주하고 24시간 배양하였으며, 이후 시료를 농도 별로 (5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/ml) 조절하여 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액을 2.5 mg/ml 농도로 제조하여 40 µl를 첨가하여 3-4시간 배양한 후 상층액을 제거하고 DMSO 100 µl를 각 well에 분주하여 실온에서 10분 반응시킨 뒤 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료를 첨가하지 않은 무첨가구를 대조군으로 하여 첨가군의 흡광도를 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

Western Blot을 통한 단백질 발현

미백 효과를 확인하기 위해 B16-F10 세포를 이용하여 멜

라닌 합성에 관여된 인자인 MITF, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2을 통해 확인하였다. B16-F10 세포를 1×10^6 cells/well을 seeding한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포에 α-MSH를 1 µg/ml 농도로 처리하여 2시간 후 농도별로 (10, 50, 100 µg/ml) 추출물을 처리하여 24시간 배양한 후 배지를 제거하여 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하였다. 그 후, RIPA buffer 10 ml에 Protease & Phosphatase Single-Use inhibitor Cocktail 100X 100 µl를 가하여 제조한 lysis buffer로 세포를 용해하고 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상등액을 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질을 정량 하였으며, 20 µl의 단백질을 10% acrylamide gel에서 전기영동을 통해 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel을 transfer 기기를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 단백질을 옮긴 후 실온에서 1시간 동안 5% skim milk를 tris-buffered saline & tween 20 (TBST)에 녹여 blocking하였다. Primary antibody를 첨가하여 4°C에서 overnight한 다음 TBST로 10분 3회 세척하였다. 이 후 secondary antibody를 첨가하여 실온에서 2시간 반응시킨 다음 TBST로 10분 3회 세척한 다음 ChemiDoc™ MP Imaging System을 통해 밴드를 확인하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

B16-F10 세포를 1×10^6 cells/well을 100 mm tissue culture dish에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. Stimulator로 B16-F10 세포에 α-MSH 1 µg/ml 농도로 처리하여 2시간 후 농도별로 시료를 처리하여 24시간 배양하였다. RNA 분리를 위하여 시료를 처리한 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척하였으며 trizol reagent 1 ml을 첨가해 scraping하여 세포를 lysis 하였다. Chloroform 200 µl 첨가 후 흔들어 혼합한 후 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심분리가 완료된 후 상층액 500 µl를 취하여 isopropanol 500 µl와 혼합한 다음 흔들어주었다. 이후 4°C, 13,200 rpm 조건에서 20분간 원심 분리하여 pellet을 제외한 상층액을 제거해주어 diethylpyrocarbonate (DEPC) water로 희석한 75% 에탄올로 세척하였다. 액체를 모두 제거해준 후 DEPC water 50 µl를 분주하여 tapping한다. Nano drop으로 total RNA량을 측정하여 Oligo (dT) 15 primer (500 mg/ml) 1 µl, 추출된 RNA (2 µg)을 섞어준 후 nuclease free water (NW)로 total 10 µl로 맞추어 주었다. 75°C에서 5분, 4°C에서 5분 반응 후 5X reaction buffer, MgCl₂, polymerase chain reaction (PCR) nucleotide mix, reverse transcriptase, rnasin inhibitor, NW를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분, 4°C에서 10분 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR.

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	Anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
MITF	Sense	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Anti-sense	TAG CTC CTT AAT GCC GTC GT
Tyrosinase	Sense	GAC GGT CAC TGC AGA CTT TG
	Anti-sense	GCC ATG ACC AGG ATG AC
TRP-1	Sense	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Anti-sense	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Sense	GGC CAA GTG GCT GTA GAC C
	Anti-sense	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC

AMPE : Apple mango peel extracted with ethanol at room temperature.

Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

미백 효과를 mRNA 발현으로 확인하기 위해 B16-F10 세포를 이용하여 RT-PCR로 측정하였다. PCR PreMix에 합성한 cDNA와 primer sequences를 충분히 섞어 준 후 실험을 진행하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. GAPDH는 96°C에서 2분, 96°C에서 10초, 64°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(30 cycles), MITF는 96°C에서 2분, 94°C에서 10초, 57°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(35 cycles), Tyrosinase는 96°C에서 2분, 96°C에서 10초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(35 cycles), TRP-1은 96°C에서 2분, 94°C에서 10초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(35 cycles), TRP-2은 96°C에서 2분, 94°C에서 10초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(35 cycles)을 실행하였다. 1% midori green을 첨가한 1.5% agarose gel을 100 V에서 30분간 전기영동 한 후 UV를 조사하여 밴드를 확인하였다.

통계 처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 Mean ± SD (Standard deviation)로 나타내었으며, 실험 데이터는 대조군과 각 시료에 대한 실험 자료로부터 ANOVA를 실시하여 유의성에 대하여 post-hoc test로 Tukey tange test를 실시하여 95% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해활성

사람의 피부색을 결정하는 주요 인자 중 하나로 멜라닌 색

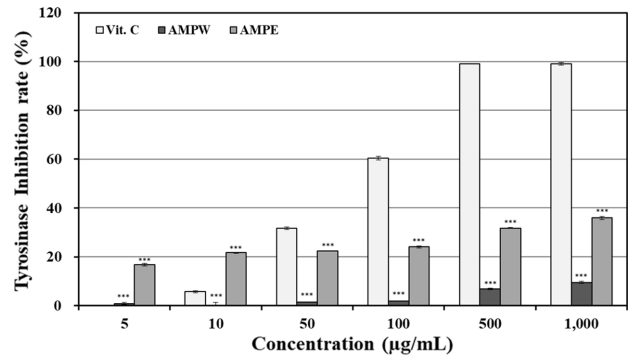


Fig. 1. Tyrosinase inhibition activity of extracts from *Mangifera indica L. peel*. ■ AMPW: Apple mango peel extracted with distilled water at 100°C, ▒ AMPE: Apple mango peel extracted with 70% ethanol at room temperature, □ Vit. C: L-ascorbic acid. Results are means ± SD from triplicate experiments.

소가 알려져 있으며 이는 멜라닌 생성 세포 내에서 합성이 일어나 각질형성세포로 전달되어 피부의 바깥층으로 이동하여 피부색을 결정한다. Tyrosinase는 구리를 함유한 효소로 멜라닌 생합성에서 중요한 역할을 하고 있다. 추출물이 멜라닌 합성을 효과적으로 억제하는지 확인하기 위해 mushroom 유래의 Tyrosinase 저해 활성 측정이 유용한 방법으로 알려져 있다[25, 26].

애플망고 껍질의 열수 및 에탄올 추출물의 Tyrosinase 저해 활성 측정 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 애플망고 껍질의 Tyrosinase 저해 활성은 1,000 µg/ml에서 열수 추출물은 9.51%, 70% 에탄올 추출물에서는 35.98%의 저해 활성을 확인하였다. 열수 추출물에 비해 70% 에탄올 추출물이 더 높은 tyrosinase 저해활성을 보였다.

MTT Assay에 의한 세포 생존율

세포 생존율을 측정하는 방법으로 담황색 기질인 MTT가 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 redoxase의 효소 작용으로 인해 환원되어 보라색의 formazan을 생성하는데 이를 용해액으로 용해시킨 후 살아있는 세포의 수를 흡광도로 측정하는 방법이다[27].

애플망고 껍질의 열수 및 에탄올 추출물에 대한 멜라노마 세포인 B16-F10의 세포 생존율을 MTT assay를 활용하여 측정된 결과 Fig. 2와 같이 확인하였다. 애플망고 껍질의 열수 및 에탄올 추출물은 100 µg/ml 농도에서 각각 95.64%, 103.36% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 따라서 이후 B16-F10에서의 세포실험은 95% 이상의 세포생존율을 나타낸 농도 이하인 5, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 설정하여 실험을 진행하였다.

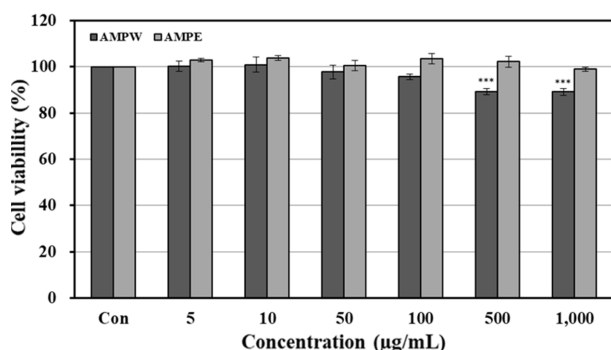


Fig. 2. Effects of extracts from *Mangifera indica* L. peel on B16-F10 cell viability. B16-F10 cells (1×10^4 cells/well) were treated with various concentration (5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml) of *Mangifera indica* L. peel extracts prior to the determination of cellular viability through MTT assay. Results are means \pm SD from triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control). ■ AMPW : Apple mango peel extracted with distilled water at 100 °C, ▒ AMPE : Apple mango peel extracted with ethanol at room temperature.

Western blot을 통한 MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질 발현 억제 효과

멜라닌 세포에서 멜라닌 생합성 단계에 관여하는 효소로 MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 인자가 알려져 있으며, 이러한 효소들은 α -MSH에 의해 유도된다. 이 중 Tyrosinase는 멜라닌 생성에 있어 가장 중요한 역할을 하며 이는 DOPA와 L-tyrosine을 기질로 하여 DOPA quinone으로 산화시켜 멜라닌의 생성을 증가시키는 원인이다. 또한 DHICA를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화시키는 TRP-1과 DOPA chrome을 DHICA로 전환시키는 TRP-2에 의해 멜라닌 종류 중 유멜라닌이 생성된다. 이러한 Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 주요 전사 조절인자로 MITF가 보고되어져 있으며, 이러한 멜라닌 생성과 관련된 기전을 억제하는 것이 중요하다[28, 29].

애플망고 껍질의 열수 및 에탄올 추출물에 의한 멜라노마 세포인 B16-F10 세포를 사용하여 미백 관련 인자인 MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현을 western

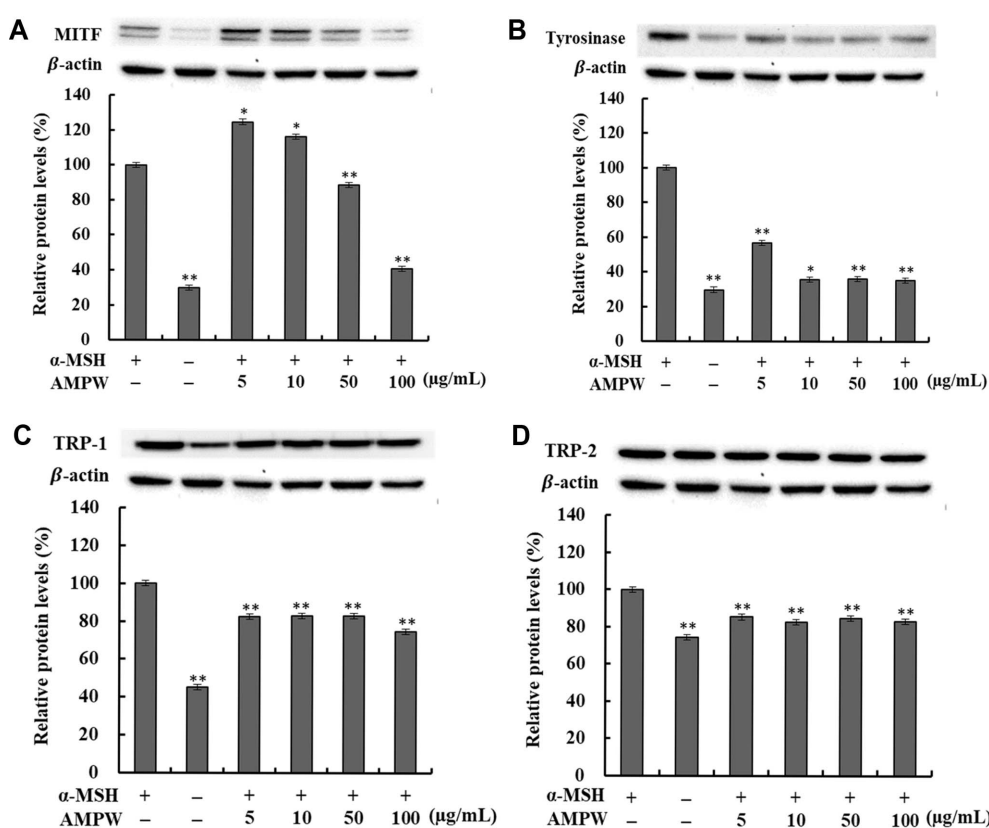


Fig. 3. MITF, Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expression levels of water extracts from *Mangifera indica* L. peel in B16-F10 cells. B16-F10 cells (1×10^6 cells/well) were pretreated with α -MSH (1 µg/ml) for 2 h and then treated water extracts from *Mangifera indica* L. peel at an appropriate concentration (5, 10, 50 and 100 µg/ml) for 24 h. It was confirmed that the protein expression level of melanogenesis factors was lower in the α -MSH untreated group than in the α -MSH alone treatment group. MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 protein expression was determined in B16-F10 cells treated with AMPW. Results are means \pm SD from triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone-treated group).

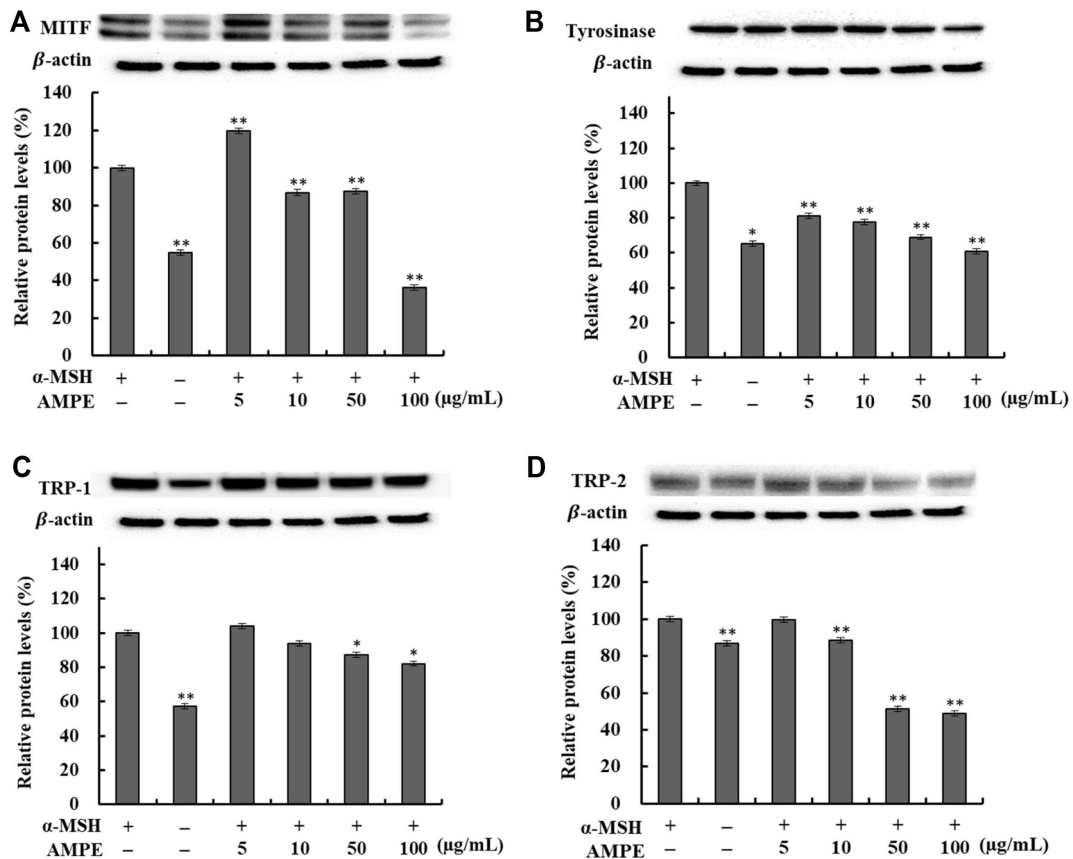


Fig. 4. MITF, Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expression levels of ethanol extracts from *Mangifera indica* L. peel in B16-F10 cells. B16-F10 cells (1×10^6 cells/well) were pretreated with α -MSH (1 μ g/ml) for 2 h and then treated ethanol extracts from *Mangifera indica* L. peel at an appropriate concentration (5, 10, 50 and 100 μ g/ml) for 24 h. It was confirmed that the protein expression level of melanogenesis factors was lower in the α -MSH untreated group than in the α -MSH alone treatment group. MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 protein expression was determined in B16-F10 cells treated with AMPE. Results are means \pm SD from triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone-treated group).

blot을 통해 확인하였으며, Fig. 3과 4에 나타내었다. B16-F10 세포에 자극제인 α -MSH를 1 μ g/ml 농도로 단독 처리군 및 시료군에 처리하였으며, α -MSH와 시료를 처리한 구간을 실험군으로 사용하였다. 또한, α -MSH 및 시료를 처리하지 않은 군을 무처리군으로 하여, α -MSH 단독 처리군과 비교하여 결과를 나타내었다. 이때, positive control로는 발현이 일정하게 발생하는 housekeeping gene인 β -actin을 사용하여 인자와 비교하였으며, α -MSH 단독 처리군에 비해 α -MSH 무처리군에서 멜라닌 생성 인자들의 단백질 발현량이 저해되는 것을 확인하였다. MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현량 측정 결과, α -MSH 처리군에 비해 100 μ g/ml에서 열수 추출물은 각각 59%, 65%, 26%, 18%가 나타났고, 에탄올 추출물은 각각 64%, 40%, 18%, 52%의 억제 효과를 나타내었다.

RT-PCR을 통한 MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 mRNA 발현 억제 효과

멜라닌 생성 반응은 자외선에 의해 자극받은 멜라닌 형성 세포가 피부를 보호하기 위해 피부색을 검게 변화시키는 반응을 말하며, 불용성 중합체인 흑색의 eumelanin이 발생한다. 멜라닌 형성 세포의 세포막의 melanocortin 1 receptor (Mc1R)가 멜라닌 합성을 유도하며, 멜라닌 형성 조절 인자인 MITF가 세포 핵으로 이동하여 멜라닌 합성 관련 유전자 발현을 증가시키고 tyrosinase에 결합하여 멜라닌 생성을 발생시킨다. 따라서 미백 관련 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 활성을 조절하고, MITF의 발현을 억제하는 소재에 대한 연구 결과를 통해 미백 소재로서의 가능성이 있음을 확인할 수 있다[30, 31].

미백효과를 확인하기 위해 미백 관련 인자인 MITF,

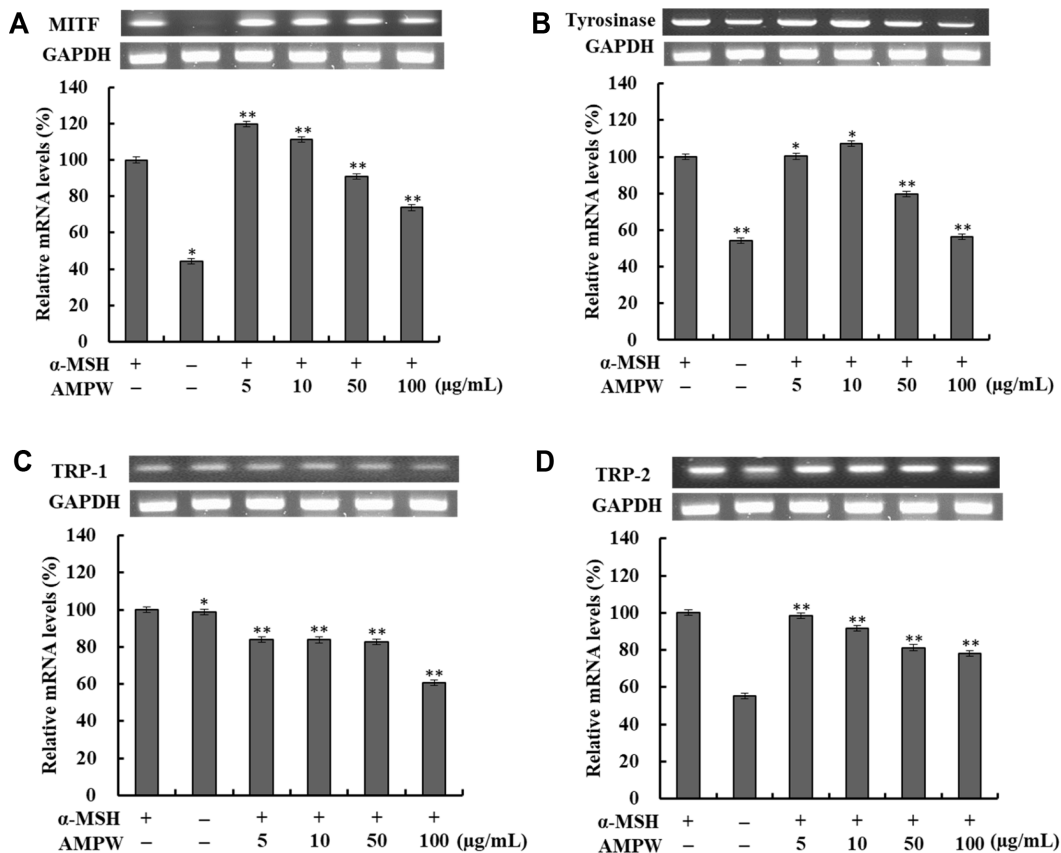


Fig. 5. MITF, Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression levels of water extracts from *Mangifera indica* L. peel in B16-F10 cells. B16-F10 cells (1×10^6 cells/well) were pretreated with α -MSH (1 μ g/ml) for 2 h and then treated water extracts from *Mangifera indica* L. peel at an appropriate concentration (5, 10, 50 and 100 μ g/ml) for 24 h. It was confirmed that the mRNA expression level of melanogenesis factors was lower in the α -MSH untreated group than in the α -MSH alone treatment group. MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA expression was determined in B16-F10 cells treated with AMPW. Results are means \pm SD from triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone-treated group).

Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 mRNA 발현 억제 효과를 측정하기 위해 B16-F10 세포를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. B16-F10 세포에 자극제인 α -MSH를 1 μ g/ml 농도로 단독 처리군 및 시료군에 처리하였으며, α -MSH와 시료를 처리한 구간을 실험군으로 사용하였다. 또한, α -MSH 및 시료를 처리하지 않은 군을 무처리군으로 하여, α -MSH 단독 처리군과 비교하여 결과를 나타내었다. mRNA의 발현량을 측정된 결과는 Fig. 5와 6에 나타내었다. 이때, positive control로는 발현이 일정하게 발생하는 housekeeping gene인 GAPDH을 사용하여 인자와 비교하였으며, α -MSH 단독 처리군에 비해 α -MSH 무처리군에서 멜라닌 생성 인자들의 mRNA 발현량이 낮은 것을 확인하였다. MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 mRNA 발현량은 100 μ g/ml에서 열수 추출물은 각각 27%, 44%, 40%, 22% 억제 효과를 나타내었고, 에탄올 추출물은 각각 9%, 51%, 11%, 52%의 억제 효과를 나

타내었다.

본 연구에서는 부산물인 애플망고 껍질을 활용하여 화장품의 천연 소재로서의 미백 효과에 대한 효능을 검증하고자 하였다. 최근 열대과일인 애플망고가 국내 재배가 가능해져 수요가 많아지고 있다. 하지만 과육이 제거된 껍질은 부산물로 버려지고 있으며 이에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 본 연구 결과를 토대로 애플망고 껍질 열수 및 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성과 멜라닌 생성 관련 인자인 MITF, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 및 mRNA 발현 측정 결과 우수한 저해 효과를 확인하여 미백 관련 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있는 것으로 판단된다.

요약

본 연구의 목적은 애플망고 껍질의 열수 및 70% 에탄올

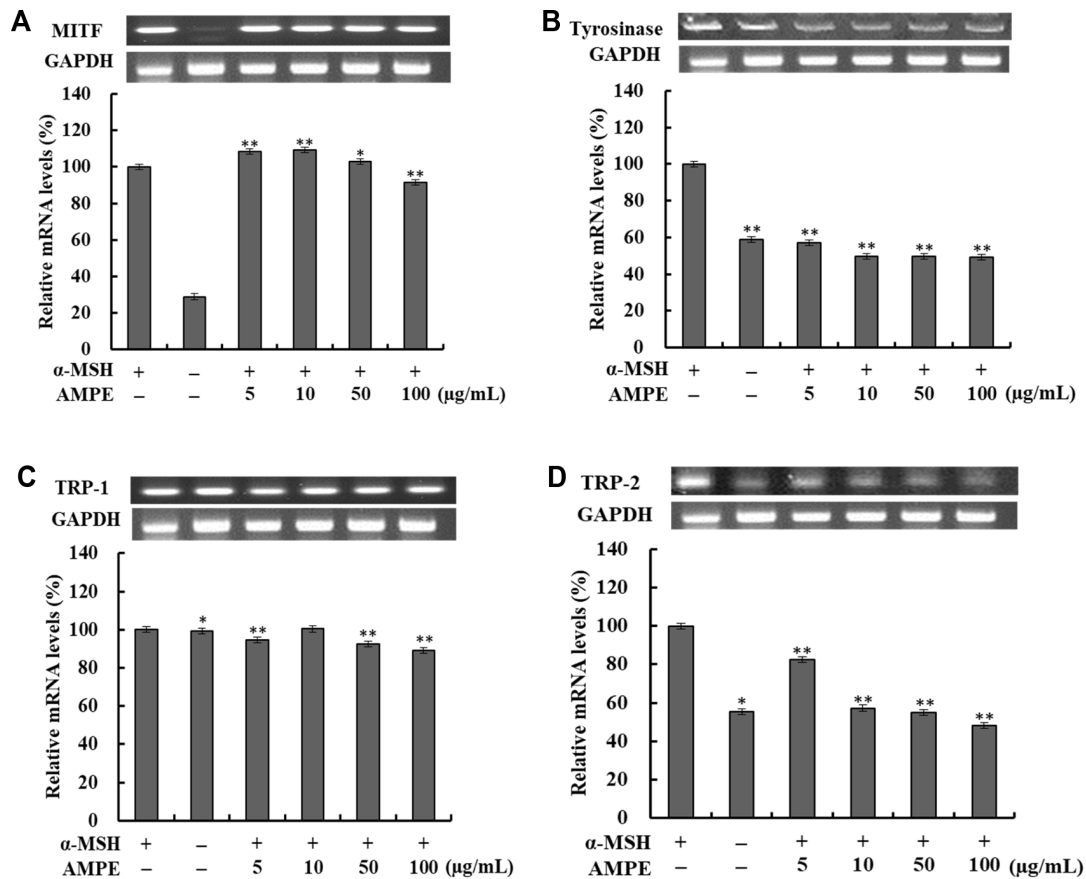


Fig. 6. MITF, Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression levels of ethanol extracts from *Mangifera indica* L. peel in B16-F10 cells. B16-F10 cells (1×10^6 cells/well) were pretreated with α -MSH (1 μ g/ml) for 2 h and then treated ethanol extracts from *Mangifera indica* L. peel at an appropriate concentration (5, 10, 50 and 100 μ g/ml) for 24 h. It was confirmed that the mRNA expression level of melanogenesis factors was lower in the α -MSH untreated group than in the α -MSH alone treatment group. MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA expression was determined in B16-F10 cells treated with AMPE. Results are means \pm SD from triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone-treated group).

추출물의 미백 효과를 검증하고자 하였다. 애플망고 껍질의 열수 및 에탄올 추출물의 미백 효과를 측정하기 위해 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과, 최종 농도인 1,000 μ g/ml에서 열수 추출물은 9%, 에탄올 추출물은 35%의 저해 효과를 보였다. 세포를 통해 미백효과를 측정하고자 멜라노마 세포인 B16-F10을 이용해 세포 생존율을 MTT assay를 사용하여 측정하였다. 세포 생존율 측정 결과, 100 μ g/ml 농도에서 각각 95.64%, 103.36%의 세포 생존율을 나타내었다. 이후 실험은 세포 생존율이 95% 이상 나타난 농도인 100 μ g/ml 이하의 농도에서 실험을 수행하였다. 미백 효과는 멜라닌 합성에 관여하는 인자의 단백질 및 mRNA 발현을 측정하여 결정하였다. 단백질 발현은 western blot을 이용하여 측정하였으며, 그 결과 MITF, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2에 대한 단백질 발현은 100 μ g/ml 농도에서 열수 추출물에 의해 59%, 65%, 26%, 18% 감소하였고, 에탄올 추출물에 의해

64%, 40%, 18%, 52% 감소하였다. MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 mRNA 발현은 RT-PCR을 통해 확인하였으며, 그 결과 100 μ g/ml에서 열수 추출물에 의해 27%, 44%, 40%, 22% 감소하였고, 에탄올 추출물에 의해 9%, 51%, 11%, 52% 감소하였다. 따라서 애플망고 껍질 추출물이 미백 효과가 있음을 확인하였고, 천연물 소재로서의 이용 가치가 높을 것으로 사료되어진다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Kim DH, Park TS, Kim SG. 2019. Whitening and anti-wrinkle effect of *Spirodela polyrhiza* extracts. *J. Appl Biol. Chem.* **62**: 391-398.

2. Ha MJ. 2017. An evaluation of the physiological activities of *Opuntia humi fusa* fruit extract as cosmetic ingredients for acne. Konkuk University. Seoul, Korea.
3. Lee SM. 2020. A Study of the Pharmacological Activity of Extracts from *Thymus magnus* and *Thymus quinquecostatus* on Skin. Sungshin Women's University. Seoul, Korea.
4. Han NK, Park CM, Gwon JC, Joung MS, Choi JW. 2014. Whitening effect of *Fagopyrum tataricum* extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **40**: 179-186.
5. Park TS, Kim DH, Son JH. 2015. Whitening effect of *Salvia miltorrhiza* bunge water extract in human epidermal melanocyte. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**: 333-338.
6. Zhoh CK, Lee MH, Kim IY, Shin JY. 2016. Skin improvement effect of mask pack with snail fermented extract. *J. Korean Oil Chemists' Soc.* **33**: 30-40.
7. Ann YH, Choi JS. 2006. The whitening effect by water extracts of *Bombyx Mori* linne. *J. Korean Soc. Fashion Beauty* **4**: 81-86.
8. Hida T, Kamiya T, Kawakami A, Ogino J, Sohma H, Uhara H, et al. 2020. Elucidation of melanogenesis cascade for identifying pathophysiology and therapeutic approach of pigmentary disorders and melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 6129.
9. Jo JB, Kim MU, Lee EH, Kim YJ, Cho EB, Kang IK, et al. 2018. Whitening effect of extracts from *Matricaria chamomilla* L. with B16F10 melanoma cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **61**: 267-273.
10. Gillbro JM, Olsson MJ. 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - existing and new approaches. *Int. J. Cosmet. Sci.* **33**: 210-221.
11. Hwang HS, Yoo DS, Shim JH. 2016. Whitening effect of banana leaf extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **42**: 37-43.
12. Kim PS. 2011. Whitening effects of *Angelica dahurica* radix ethanol extract. *J. Acad.-Ind. Technol.* **12**: 4038-4045.
13. Yoo DH, Joo DH, Lee SY, Lee JY. 2015. Antioxidant effect of *Nelumbo nucifera* G. leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line. *J. Life Sci.* **25**: 1115-1123.
14. Jin KS, Oh YN, Park JA, Lee JY, Jin SJ, Hyun SK, et al. 2012. Antioxidant, anti-melanogenic, and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* extract and its solvent fractions. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 371-379.
15. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 1171-1185.
16. Jung DH, Shin JH, Cho YY, Son JE. 2015. Development of a two-variable spatial leaf photosynthetic model of irwin mango grown in greenhouse. *Protected Horticulture Plant Factory* **24**: 161-166.
17. An MR, Keum YS, Lee SK. 2015. Comparative analysis of volatile flavor compounds in Taiwan apple mango and Philippines carabao mango. *Korean J. Food Sci. Technol.* **47**: 191-197.
18. Naef R, Velluz A, Jaquier A. 2006. The perfume of carabao mangoes (*Mangifera indica* L.): Identification of uncommon unsaturated fatty acid esters in the SPME of the intact fruit. *Eur. Food Res. Technol.* **222**: 554-558.
19. Ji ST, Youm JW, Yoo JY. 2018. A feasibility study on the cultivation of tropical fruit in Korea: Focused on nango. *J. Korean Acad.-Ind. Cooperation Soc.* **19**: 252-263.
20. Han SH, Kim JS, Teruya T, Teruya Y, Moromizato I, Lim CK. 2016. Comparison of the fruit qualities, the free radical scavenging activities and mangiferin content of the mango, cv. irwin cultivated in Jeju and Okinawa. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* **34**: 634-643.
21. Jung ES. 2007. Antioxidant and antibacterial activity of extracts from *Mangifera indica*. Sunchon National University. Sunchon, Korea.
22. Sivakumar D, Jiang Y, Yahia EM. 2011. Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. *Food Res. Int.* **44**: 1254-1263.
23. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* **53**: 515-517.
24. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
25. Kwak JH, Seo UK, Han YH. 2001. Inhibitory effect of *Mugwort* extracts on tyrosinase activity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 220-223.
26. Song HY, Sung NY, Jung PM, Kang MS, Park WJ, Byun EH. 2015. Whitening effect of green tea seed shell ethanol extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 1470-1475.
27. Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* sing. (Pine Mushroom). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 555-560.
28. Del Marmol V, Beermann F. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**: 165-168.
29. Kim DS. 2003. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.* **116**: 1699-1706.
30. Joo DH, Yoo DH, Lee JY. 2019. A study on the whitening effect of *Erigeron annuus* (L.) Pers. ethanol extract on melanoma cell (B16F10). *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**: 148-157.
31. Kim IH, Lee JH. 2018. Antibacterial and whitening activities of *Coffea arabica* ethanol extract. *Korean Chem. Eng. Res.* **56**: 245-251.