



## Effects of Luteolin-7-*O*-glucoside on melanin synthesis

Byeong Min Choi · Hye Hyun Hong · Taejin Park · Seung-Young Kim

### Luteolin-7-*O*-glucoside가 멜라닌 합성에 미치는 영향

최병민 · 홍혜현 · 박태진 · 김승영

Received: 12 July 2022 / Accepted: 14 September 2022 / Published Online: 30 September 2022  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

**Abstract** Biorenovation is a method that converts existing compounds into new compounds through the enzymatic action of microorganisms. Biorenovation has expected effects such as reducing toxicity of compounds and increasing their activity. In this study, we successfully synthesized Luteolin-7-*O*-glucoside (L7G) through biorenovation and investigated its inhibitory effect on melanin production in  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone induced B16F10 mouse melanoma cells. We confirmed that Luteolin was toxic at 50, 100 and 200  $\mu$ M, but our L7G in same concentration was not toxic for B16F10 mouse melanoma cells and also showed significant reduction in melanin production and tyrosinase activity. In addition, while investigating the effect of L7G on factors involved in melanin synthesis through western blotting, we were able to confirm that the MITF and tyrosinase protein synthesis was inhibited in treatment with L7G, however, tyrosinase related protein-1 (TRP-1) and dopachrome tautomerase (TRP-2) expression was not affected. So we derived a conclusion that through biorenovation we could produce compounds like L7G with improved activity and reduced toxicity for possible use as an active ingredient with whitening functionality in cosmetics. It also suggests that the application of biorenovation has potential usefulness in developing anti-inflammatory materials. It also suggests that the application of bio-renovation has potential

usefulness in the development of inflammatory material. We applied Biorenovation technology to *Distylium racemosum* extract (DR) to generate *Distylium racemosum* biorenovation product (DRB), and investigated the anti-inflammatory properties of DRB in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW264.7 macrophages. We are applying technology to Biorenovation *Distylium racemosum* extract (DR) *Distylium racemosum* was to create a biorenovation product (DRB), lipopolysaccharide (LPS) investigated the anti-inflammatory properties of DRB in RAW264.7 macrophages treated for.

**Keywords** Biorenovation · Melanogenesis · Luteolin-7-*O*-glucoside ·  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone

## 서론

멜라닌(Melanin)은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생체 고분자 물질로 자외선 등 외부적인 요인에 의한 피부의 노화나 일광 각화증을 억제하며 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있다[1,2]. 그러나 비정상적으로 많은 멜라닌의 축적은 사람에게 있어 기미, 주근깨, 색소침착 등 미적 요인을 감소시키는 원인이 될 뿐 아니라 melanin 전구물질들에 의한 독성으로 세포사멸을 촉진하거나 피부 노화 촉진, 피부암을 유발 하는 것으로도 알려져 있다[3,4]. 멜라닌의 합성(Melanogenesis)은 자외선, 스트레스 등 외부 자극을 비롯하여  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone (MSH)와 같은 호르몬에 의해 피부 표피 기저층에 존재하는 melanocyte에서 유도되는데 UV와 같은 자극에 의한 melanocyte 활성화는 extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, p38을 포함하는 스트레스 반응성 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달 경로를 거

Seung-Young Kim (✉)  
E-mail: sykim01@sunmoon.ac.kr

Department of Pharmaceutical Engineering & Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, Republic of Korea

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.

처 MITF, tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP)-1, dopachrome tautomerase (TRP-2) 등의 합성을 촉진함으로써 최종적으로 색소 침착을 유발한다[5-7]. 이들 중 tyrosinase는 melanin 합성에 깊게 관여하는 효소로 tyrosine을 DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine)로의 산화를 유발하여 최종적으로 5,6-dihydroxy indole (DHI)을 형성하는데 이렇게 형성된 DHI는 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)와 함께 흑갈색을 띠는 eumelanin의 전구체로써 작용한다[8-10]. 또한 tyrosinase는 흑 갈색의 eumelanin 뿐만 아니라 적갈색의 pheomelanin을 포함한 두 타입의 멜라닌의 합성에 관여하는 것으로 알려져 있으며 다른 미백 관련 인자인 TRP-1 및 TRP-2는 eumelanin의 합성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[11]. 결론적으로 tyrosinase의 작용 억제 및 melanocyte의 기능 저하, 멜라닌의 환원과 분해를 촉진함으로써 미백 활성을 유도할 수 있음을 의미한다. 최근 자외선이 강해지면서 멜라닌 색소 침착에 의한 기미와 주근깨 같은 피부질환의 증가로 미백에 효과가 있는 기능성 화장품들의 소비가 증가하고 있으나 hydroquinone, kojic acid, arbutin을 포함한 기존의 미백 기능성 소재에서 부작용 및 안전성에 대한 문제가 제시되면서 친환경 소재를 발굴하기 위한 연구의 필요성이 대두되고 있다[12,13].

Luteolin은 과일, 야채 등의 식물에 많이 함유되어 있는 플라보노이드 성분 중 하나로 항산화, 항염, 항알러지 효과가 매우 우수하여 의약품, 식품, 화장품 분야에서 활발하게 연구가 진행되고 있으며 melanin과 tyrosinase 저해 활성 또한 보고되어 있지만 강한 독성으로 인해 추가적인 미백 활성에 대한 연구가 어려운 실정이다[14-16]. 또한 Luteolin과 같은 플라보노이드는 수용액에 거의 녹지 않는 소수성 물질이며 산화 안정성이 낮아 다양한 분야에서 널리 활용하는데 한계를 가지고 있는데 많은 경우 이러한 문제점은 유도체를 생산함으로써 개선될 수 있다. 특히 최근에는 소재의 기능성이 특히 강조됨에 따라 기존에 이미 알려진 소재로부터 다양한 유도체를 합성함으로써 문제점을 보완하고 효능을 증대 시키는 연구가 활발하게 진행됨에 따라 그 기술에 대한 필요성도 더욱 높아지고 있다[17]. 그 중 biorenovation은 미생물의 효소 작용을 이용하여 기존의 성분이 가진 독성을 감소시키거나 다양한 생리 활성을 증진시키는 친환경 생물전환 기법으로 다양한 천연물 및 화합물에 적용되어 유효성을 입증한 바 있다[18-21]. 이에 본 연구에서는 Luteolin의 기능성을 증대 시키고자 biorenovation을 적용하였으며 생성된 유도체의 미백 활성을 평가하기 위하여  $\alpha$ -MSH로 자극된 B16F10 mouse melanoma cell에서 melanin, tyrosinase의 억제 활성 및 미백 관련 인자인 TRP-1, TRP-2, tyrosinase, MITF의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 미생물 배양 및 biorenovation 반응

Biorenovation 생물 전환 기법에 사용된 *Bacillus sp.* JD3-7는 genistein을 기질로 하는 생물 전환 기반 스크리닝 방법을 통해 선발되었다[22]. 균주의 배양은 Luria-Bertani (LB, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지에서 30 °C, 200 rpm으로 18시

간 동안 수행하였으며 원심 분리(4000 rpm, 15 min)하여 회수한 pellet을 PG buffer (50 mM Phosphate buffer, 2% Glycerin)로 2회 세척하여 실험에 사용하였다. 이후 pellet을 PG buffer 100 mL에 재 현탁 한 뒤 Luteolin 100 mg을 첨가하여 30 °C, 200 rpm에서 72시간 동안 유도체의 생성을 유도하였으며 동일한 조건에서 시료를 첨가하지 않은 pellet 현탁액을 대조군(JD3-7)으로 표기하였다. 반응 종료 후 원심 분리(4000 rpm, 15 min)하여 회수한 상등액을 -110 °C에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

### Biorenovation 전환물의 분석 및 정제

HPLC 분석을 위해 Shimadzu Spectro-Monitor 3200 digital UV/Vis detector와 Shim-pack GIS C18 column (5  $\mu$ m ODS, 250×4.6 mm id)을 사용하였으며 이동상은 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, SAMCHUN, Pyeongtaek, Korea)가 함유된 H<sub>2</sub>O (solvent A)와 acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, solvent B)를 사용하였다. 각 시료는 solvent B의 조성을 10%에서 50%가 되도록 설정하여 30분간 gradient 조건으로 분석하였으며 이동상의 유속을 1.0 mL/min, column의 온도를 40 °C, 파장은 254 nm로 하였다. LC-MS의 분석에는 HR-QTOF ESI/MS in Positive ion mode ACQUITY (UPLC, Waters Corp. Milford, MA, USA)와 SYNAPT G2-si column (Waters Corp)을 사용하였으며 정제에는 동일한 분석 조건하에 Shimadzu Prominence SPD-20A UV/VIS Absorbance detector와 Luna<sup>®</sup> 5  $\mu$ m C18 (2) 100 Å, LC Column 250×10 mm을 사용하였다.

### 실험 재료 및 세포 배양

본 연구에 사용된 B16F10 mouse melanoma cell은 American type cell culture (ATCC, Manassas, VA, USA) 으로부터 분양 받았으며 배양에는 10% fetal bovine serum (FBS, welgene, Gyeongsan, Korea)와 100  $\mu$ g/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin 이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Welgene)을 사용하였다. 세포는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3일을 주기로 계대 배양을 실시하여 안정화 한 뒤 실험에 사용하였으며 세포의 자극에 사용된  $\alpha$ -MSH은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

### 세포 독성 측정

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)는 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 mitochondrial reductase에 의하여 보라색의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)을 형성하는 원리를 이용하여 세포의 생존율을 측정하는 방법이다[23,24]. 본 연구에서는 Luteolin 및 Luteolin 유도체가  $\alpha$ -MSH로 자극된 B16F10 mouse melanoma cell의 생존에 미치는 영향을 조사하고자 세포를 24-well plate에 1.0×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 전 배양한 뒤  $\alpha$ -MSH (200 nM)와 시료(50, 100, 200  $\mu$ M)를 동시에 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 이후 각 well 에 MTT 시약을 첨가한 뒤 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 동안 반응하여 formazan blue를 형성시킨 다음 ELISA reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Melanin contents 측정

$\alpha$ -MSH로 자극된 B16F10 mouse melanoma cell에서 Luteolin 유도체가 melanin의 합성에 미치는 영향을 조사하고자 B16F10 mouse melanoma cell를 6-well plate에  $4.0 \times 10^4$  cells/well 농도로 분주하여 incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 전 배양 한 후  $\alpha$ -MSH (200 nM)와 시료(50, 100, 200  $\mu$ M)를 동시 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 이후 회수한 세포는 radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer, with 1% protease inhibitor, 1 mM PMSF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>)로 처리하여 lysis한 뒤 원심 분리(13,000 rpm, 30 min, 4 °C)과정을 거쳐 pellet을 회수하였으며 회수한 pellet은 1 N NaOH를 500  $\mu$ L 첨가한 뒤 90 °C heating block에서 1시간 동안 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 함량을 조사하였다.

### Tyrosinase activity 측정

$\alpha$ -MSH로 자극된 B16F10 mouse melanoma cell에서 Luteolin 유도체가 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 조사하고자 B16F10 mouse melanoma cell를 6-well plate에  $4.0 \times 10^4$  cells/well 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 전 배양한 뒤  $\alpha$ -MSH (200 nM)와 시료(50, 100, 200  $\mu$ M)를 동시에 처리하여 72시간 동안 배양하였다. Melanin contents와 동일한 방법으로 세포를 lysis한 뒤 원심 분리(13,000 rpm, 30 min, 4 °C)하여 회수한 상등액은 Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA kit, Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 정량 하였으며 정량 된 단백질 20  $\mu$ L에 2 mg/mL의 L-DOPA (Sigma-Aldrich) 80  $\mu$ L를 첨가하여 37 °C에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Western blot analysis

$\alpha$ -MSH로 유도된 B16F10 mouse melanoma cell에서 Luteolin 유도체가 멜라닌 합성에 관여하는 인자들의 발현에 미치는 영향을 조사하고자 세포를 6-well plate에  $4 \times 10^4$  cells/well 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 동안 전 배양 한 뒤  $\alpha$ -MSH (200 nM)와 시료(50, 100, 200  $\mu$ M)를 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 60분 동안 lysis한 뒤 원심 분리(13,000 rpm, 30 min, 4 °C)하여 상등액을 회수하였으며 상등액의 단백질은 BCA kit (Bio-rad)를 사용하여 정량 하였다. 이후 정량 한 단백질 20  $\mu$ g을 10%의 polyacrylamide gel를 함유한 SDS-PAGE에서 전기 영동 한 후 polyvinylidene difluoride membrane (Milipore, Burlington, MA, USA)에 transfer 하였다. Transfer된 membrane은 1X TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20)를 용매로 하여 제조된 5% skim milk를 사용하여 상온에서 2시간 동안 blocking 하였으며 이후 TBST를 사용하여 membrane을 10분 간격으로 4회 세척 하였다. 세척 된 membrane은 4 °C에서 overnight동안 1차 항체 반응을 진행하였으며 항체 반응에는 TRP-1 antibody (1:1,000, Santa cruz biotechnology, Dallax, TX, USA), TRP-2 antibody (1:500, Santa cruz biotechnology), tyrosinase antibody (1:500, Santa cruz biotechnology), MITF antibody (1:500, Cell Signaling technology, Denvers, MA, USA)를 사용하였다. 반응 후 1X TBST를 사용하여 membrane을 10분 간격으로 4회 세척하였으며 2차 항체 반응은 anti-mouse IgG HRP와

anti-rabbit IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)를 1X TBST에 1:10,000 비율로 희석하여 상온에서 2시간 동안 진행하였다. 이후 TBST를 사용하여 10분 간격으로 membrane을 4회 세척하였으며 세척한 membrane은 ECL (Bio-rad)과 반응하여 imaging densitometer (model GS-700, Bio-rad)로 현상하였다. 단백질 발현량의 면적은 imageJ program (NIH, Bethesda, MD, USA)를 통해 수치화하여 그래프로 나타내었다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며 그 결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타냈다. 통계적 분석은 각 처리 구간의 유의성 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )을 검증을 위해 분산분석 (analysis of variance, ANOVA)후 student's t-test로 다중 비교를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### Biorenovation 전환물의 HPLC 및 LC-MS 분석

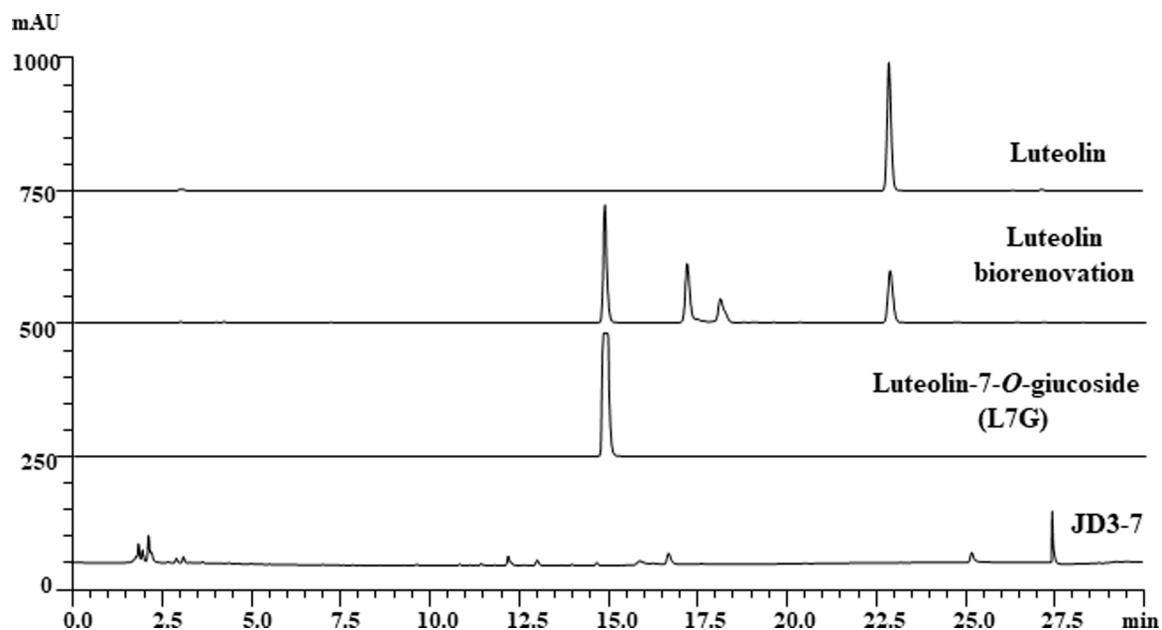
Luteolin과 Luteolin의 biorenovation 전환물 및 대조군인 JD3-7을 HPLC를 통하여 분석한 결과 Luteolin의 biorenovation 전환물에서 신규 peak가 검출되었다(Fig. 1). 이전 연구에 따르면 biorenovation을 적용한 15 min에 검출된 가장 큰 peak를 정제하여 HPLC 및 LC-MS 분석을 진행한 결과 Luteolin-7-O-glucoside (L7G)와 동일한 것으로 나타났다(Fig. 2). 최종적으로 biorenovation 통해 합성된 Luteolin의 유도체는 L7G인 것으로 확인되었으며 이후 L7G의 미백활성을 평가하고자 melanin 합성 및 tyrosinase 생성 억제 활성을 조사하였다.

### 세포 독성 평가

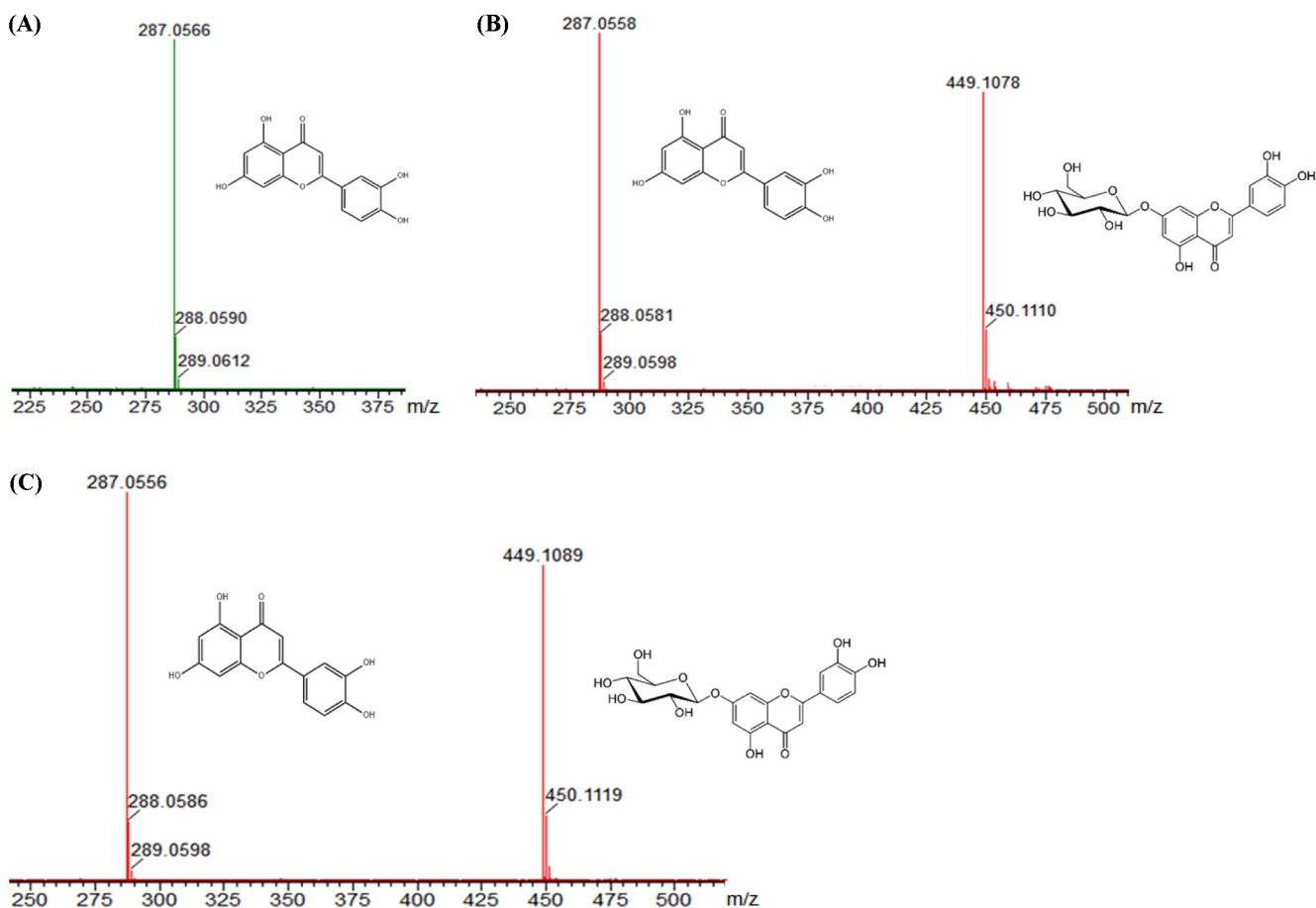
본 실험에서는 Luteolin과 L7G가 B16F10 mouse melanoma cell의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여  $\alpha$ -MSH (200 nM)와 시료(50, 100, 200  $\mu$ M)를 동시에 처리한 뒤 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, Luteolin은 모든 측정 농도에서 25% 이하의 세포 생존율을 보인 반면 L7G는 모든 측정 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 L7G이 Luteolin의 높은 독성을 개선하였음을 시사하며 세포 독성 측정 결과를 바탕으로 L7G의 미백기능성을 평가하고자 melanin 합성 및 tyrosinase의 억제 활성을 조사하였다.

### Melanin 합성 억제 활성 평가

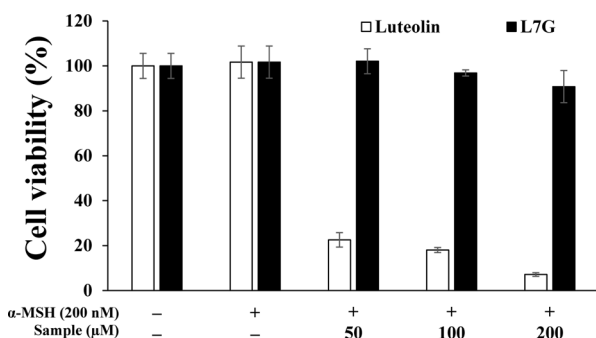
$\alpha$ -MSH로 자극된 B16F10 mouse melanoma cell에서 L7G가 melanin 합성에 미치는 영향을 조사하고자  $\alpha$ -MSH (200 nM)와 L7G (50, 100, 200  $\mu$ M)를 동시에 처리하여 배양하였다. 이후 최종적으로 생성된 melanin의 양을 측정한 결과, L7G는 50, 100, 200  $\mu$ M 농도에서 melanin의 합성을 각각 16.2, 35.4, 47.8% 억제하였다(Fig. 4). 이는 L7G가 세포 내에서 다양한 melanin 합성 효소들의 작용을 하향조절 함으로써 최종적으로 melanin의 합성을 저해한다는 것을 시사하며 이후 melanin의 합성을 저해하는 인자와 그 조절 기작을 조사하고자 초기 melanin



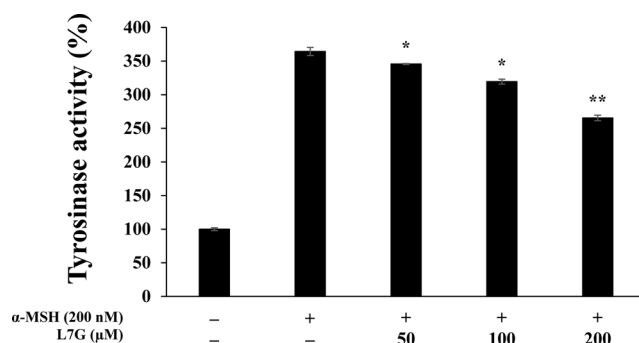
**Fig. 1** HPLC analysis of Luteolin, Luteolin biorenovation, Luteolin 7-*O*-glucoside (L7G), JD3-7. (A) Luteolin, (B) Luteolin biorenovation, (C) Luteolin 7-*O*-glucoside (L7G), (D) *Bacillus* sp. JD3-7 (JD3-7)



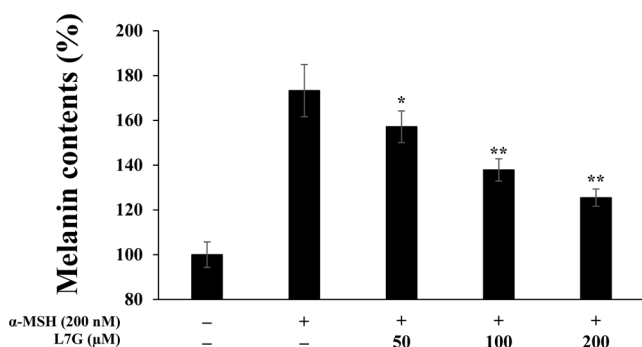
**Fig. 2** Mass spectrometry of Luteolin, Luteolin biorenovation and L7G (A) Luteolin, (B) Luteolin biorenovation and (C) L7G



**Fig. 3** Cell viability of Luteolin and L7G on  $\alpha$ -MSH induced B16F10 mouse melanoma cells. The cytotoxicity was measured by MTT assay of cells stimulated  $\alpha$ -MSH (200 nM) in the presence of Luteolin and L7G (50, 100 and 200  $\mu$ M). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control



**Fig. 5** Effect of L7G on tyrosinase activity of B16F10 melanoma cells. The cells were stimulated  $\alpha$ -MSH (200 nM) for 72 h in the presence of L7G (50, 100 and 200  $\mu$ M). Effect of L7G on tyrosinase activity was measured by absorbance at 490 nm. Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



**Fig. 4** Effect of L7G on melanin synthesis of B16F10 melanoma cells. The production of melanin contents was assayed in the cell pellets of cells stimulated with  $\alpha$ -MSH (200 nM) for 72 h in the presence of L7G (50, 100 and 200  $\mu$ M). Result is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

합성에 큰 영향을 미치는 tyrosinase의 생성 억제 활성 평가를 진행하였다.

### Tyrosinase 생성 억제 활성 평가

Tyrosinase는 melanin 초기 합성 단계의 속도 결정에 작용하는 핵심 효소로 tyrosine을 dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)로, L-DOPA를 DOPAquinone으로 변환시키는 작용을 한다[25,26]. 이러한 tyrosinase의 효소활성은 tyrosinase 단독으로도 melanin의 합성을 가능하게 하기 때문에 tyrosinase의 활성 저해는 현재 많은 미백소재 개발 연구에서 큰 비중을 차지하고 있다. 이에 본 실험에서는 L7G가 B16F10 mouse melanoma cell에서 tyrosinase의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었으며  $\alpha$ -MSH (200 nM)와 L7G (50, 100, 200  $\mu$ M)를 동시 처리하여 배양한 후 tyrosinase의 생성량을 측정하였다. 측정 결과, L7G는 B16F10 mouse melanoma cell에서  $\alpha$ -MSH로 인해 증가된 tyrosinase의 생성을 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 5). 이는 melanin 합성 억제와 상응하는 결과로 이후 melanin의 합성에 관련된 유전자의 발현을 확인하고자 western blot을 수행하였다.

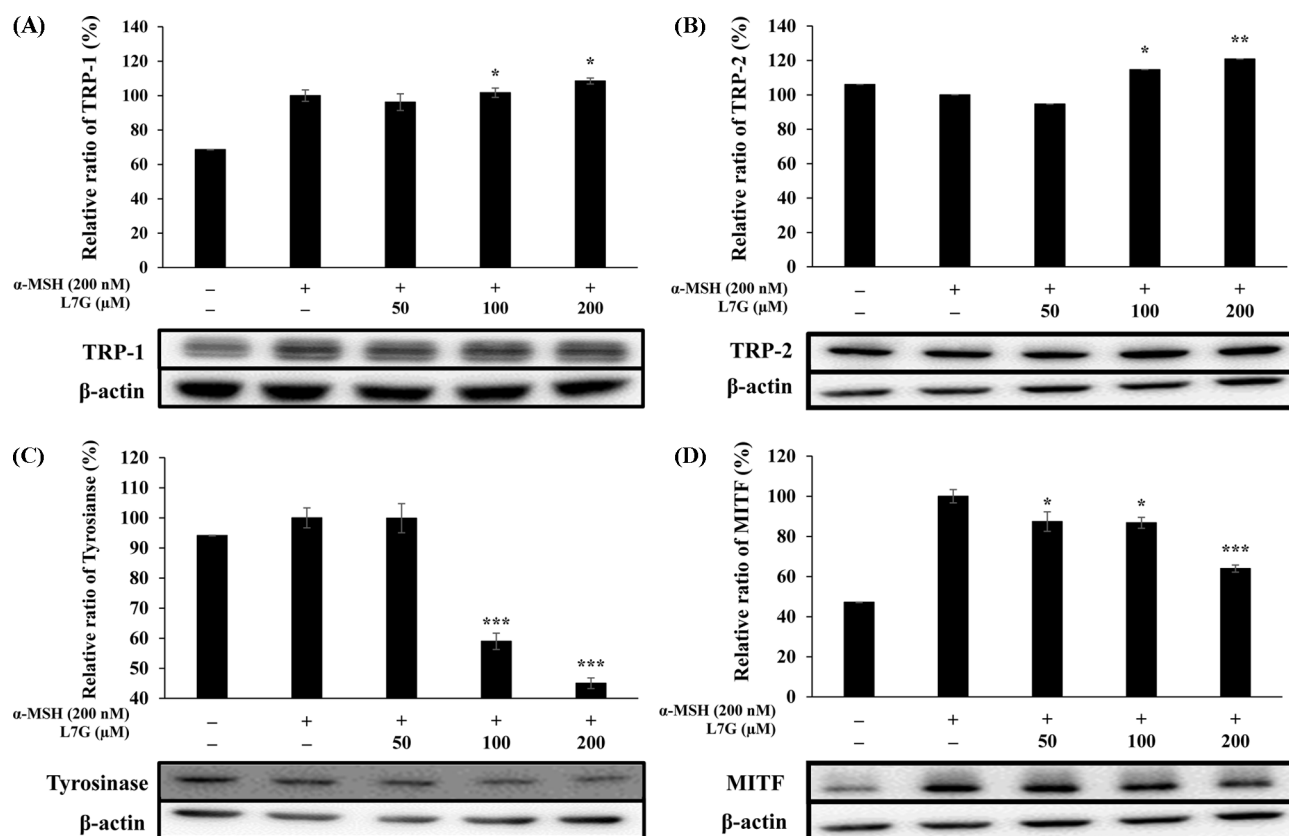
### Western blot

본 연구에서는 L7G가  $\alpha$ -MSH로 자극된 B16F10 mouse melanoma cell에서 TRP-1, TRP-2, tyrosinase, MITF의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 실험 결과 50, 100, 200  $\mu$ M 농도에서 TRP-1과 TRP-2의 발현에는 유의한 억제경향이 나타나지 않았으나 tyrosinase와 MITF의 발현에는 유의한 억제 활성을 보였다(Fig. 6). 이는 L7G가 MITF와 tyrosinase의 발현을 억제하여 최종적으로 melanin의 합성을 저해하는 미백 기능성 소재로써 사용될 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 Luteolin 기질로 biorenovation 생물전환 반응을 수행하여 유도체의 합성을 유도하였으며 HPLC 및 LC-MS 분석을 통해 생성된 유도체가 Luteolin-7-O-giucoside (L7G)임을 확인하였다. 이후 L7G의 미백 활성을 평가하고자 진행된 실험 결과 L7G는  $\alpha$ -MSH로 유도된 B16F10 mouse melanoma cell에 대하여 Luteolin의 높은 세포독성을 개선하였으며 독성을 보이지 않는 농도에서 멜라닌과 tyrosinase의 합성을 유의하게 억제하였다. 반면 TRP-1과 TRP-2에 대해서는 유의한 억제 효능이 확인되지 않았는데 이는 미백 기능성 성분으로 알려진 arbutin이 TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하지 않으나 melanin, tyrosinase에 대하여 저해 활성을 나타내는 것과 상응하는 결과로 L7G 또한 p-extracellular signal-regulated kinase, p-Jun N-terminal kinase, p-p38를 포함한 스트레스 반응성 MAPK 신호 전달 경로 또는 여타 멜라닌 합성 관련 기전을 억제함으로써 미백 활성을 나타내는 것으로 판단된다 [27-29]. 이러한 결과를 근거로 L7G가 미백 기능성 화장품 원료로서 활용될 수 있는 가능성을 입증하였으며 추후 활용 가치를 더욱 높이기 위하여 추가적인 기전에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

### 초 록

Biorenovation은 미생물의 효소 작용을 통해 기존의 화합물을 새로운 화합물로 전환시키는 방법이다. 본 연구에서는 biorenovation을 Luteolin에 적용하여 Luteolin-7-O-giucoside



**Fig. 6** Western blot analysis of the protein level of TRP-1, TRP-2, tyrosinase, MITF in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 melanoma cells. (A) TRP-1, (B) TRP-2, (C) tyrosinase, (D) MITF. Cells were pre-incubated for 48 h, and then treated with  $\alpha$ -MSH (200 nM) and L7G (50, 100 and 200  $\mu$ M) for 24 h. The protein levels of TRP-1, TRP-2, tyrosinase and MITF were analyzed by western blot.  $\beta$ -actin was used as the control. Data represent the means  $\pm$  SD with three separate experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001

(L7G)를 합성하였으며 L7G의 미백 기능성을 평가하고자  $\alpha$ -MSH로 유도된 B16F10 mouse melanoma 세포에서 실험을 진행하였다. L7G는 Luteolin의 높은 세포독성을 개선하였으며 세포 독성이 나타나지 않는 농도에서 melanin 합성 및 tyrosinase 생성을 유의하게 억제하였다. 또한 western blot을 통해 멜라닌의 합성 인자들의 발현을 조사한 결과 tyrosinase와 MITF의 발현이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. 결론적으로 우리는 L7G가 멜라닌의 합성을 억제함으로써 피부 미백에 긍정적인 영향을 나타낼 수 있음을 확인하였으며 이러한 결과를 근거로 L7G가 미백 기능성 원료로서 활용 가능성을 제안한다.

**Keywords** 멜라닌 생성 · Biorenovation · Luteolin-7-*O*-glucoside ·  $\alpha$ -MSH

**감사의 글** 본 논문은 중소벤처기업부와 중소기업기술정보진흥원이 지원하는 전략형창업과제로 수행된 연구결과입니다 (S2870640).

## References

- Hill HZ, Hill GJ (2003) UVA, Pheomelanin and the Carcinogenesis of Melanoma. *Pigment Cell Res* 13(Supplement 8): 140–144. doi: 10.1034/j.1600-0749.13.s8.25.x
- Jung SH, Ku MJ, Moon HJ, Yu BC, Jeon MJ, Lee YH (2009) Inhibitory Effect of Fucoidan on Melanin Synthesis and Tyrosinase Activity. *J Life Sci* 19(1): 75–80. doi: 10.5352/JLS.2009.19.1.075
- Ferguson CA, Kidson SH (1997) The regulation of tyrosinase gene transcription. *Pigment Cell Res* 10(3): 127–138. doi: 10.1111/j.1600-0749.1997.tb00474.x
- Tsukamoto K, Jackson JJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *The EMBO Journal* 11(2): 519–526. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05082.x
- Boissy RE, Sakai C, Zhao H, Kobayashi T, Hearing VJ (1998) Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp Dermatol* 7(4): 198–204. doi:10.1111/j.1600-0625.1998.tb00324.x
- Hearing VJ, Jiménez M (1987) Mammalian tyrosinase—The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* 19(12): 1141–1147. doi: 10.1016/0020-711X(87)90095-4
- Fernandez A (2015) Dermatology update: The dawn of targeted treatment. *Cleve Clin J Med* 82(5): 309–320. doi: 10.3949/ccjm.82gr.15002
- Kim H, Kim H, Choi YS (2014) Recent Advances in Tyrosinase Research as An Industrial Enzyme. *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering*. 29(1): 1–8. doi:10.7841/ksbbj.2014.29.1.1
- D'Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A, Briganti S, Garcia-Borrón JC, Kovacs D, Ito S (2013) Melanin and melanogenesis: methods, standards, protocols. *PCMR* 26(5): 616–633. doi: 10.1111/pcmr.12121

10. Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, García-Borrón JC, Hearing VJ (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *The EMBO Journal*. 13(24): 5818–5825. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06925.x
11. Vachtenheim J, Borovanský J (2010) “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp Dermatol* 19(7): 617–627. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.01053.x
12. Iyengar R, McEvily AJ (1992) Anti-browning agent: alternatives to the use of sulfites in food. *Trends in Food Science & Technology*. 3: 60–64. doi: 10.1016/0924-2244(92)90131-F
13. Lozano-De-Gonzalez PG, Barrett DM, Wrolstad RE, Durst RW (1993) Enzymatic Browning Inhibited in Fresh and Dried Apple Rings by Pineapple Juice. *J Food Sci* 58(2): 399–404. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb04284.x
14. Lee SM, Choi MJ, Lee YM, Suk JB (2010) Preparation and Characterization of Ethosome Containing Hydrophobic Flavonoid Luteolin. *Appl Chem Eng* 21(1): 40–45
15. Park SI, Yoon HR, Shin JH, Lee SJ, Kim DY and Lee HM (2021) Tyrosinase Inhibitory Activity and Melanin Production Inhibitory Activity of Taraxinic Acid from *Taraxacum coreanum*. *Korean J Plant Res* 34(4): 368–376. doi: 10.7732/kjpr.2021.34.4.368
16. Lee SW, Kim JH, Song H, Seok JK, Hong SS, Boo YC (2019) Luteolin 7-Sulfate Attenuates Melanin Synthesis through Inhibition of CREB- and MITF-Mediated Tyrosinase Expression. *Antioxidants* 8(4): 87. doi: 10.3390/antiox8040087
17. KF De Polo (1998) *A Short Textbook of Cosmetology* Augsburg, Germany
18. Kim MS, Park JS, Chung YC, Jang S, Hyun CG, Kim SY (2019) Anti-Inflammatory Effects of Formononetin 7-O-phosphate, a Novel Biorenovation Product, on LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells. *Molecules* 24(21): 3910. doi: 10.3390/molecules24213910
19. Choi H, Park JS, Kim KM, Kim M, Ko KW, Hyun CG, Ahn JW, Seo JH, Kim SY (2018) Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. *J Ind Eng Chem* 63(25): 255–261. doi: 10.1016/j.jiec.2018.02.023
20. Kim JH, Park TJ, Park JS, Kim MS, Chi WJ, Kim SY (2021) Luteolin-3'-O-Phosphate Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses by Regulating NF-κB/MAPK Cascade Signaling in RAW 264.7 Cells. *Molecules* 26(23): 7393. doi: 10.3390/molecules26237393
21. Hong H, Park TJ, Jang S, Kim MS, Park JS, Chi WJ, Kim SY (2022) Anti-inflammatory activity of 6-O-phospho-7-hydroxycoumarin in LPS-induced RAW 264.7 Cells. *J Appl Biol Chem*. 65(1): 33–41. doi: 10.3839/jabc.2022.005
22. Choi HR, Park JS, Kim KM, Kim MS, Ko KW, Hyun CG, Ahn JW, Seo JH, Kim SY (2018) Enhancing the antimicrobial effect of genistein by biotransformation in microbial system. *J Ind Eng Chem* 63: 255–261. doi: 10.1016/j.jiec.2018.02.023
23. Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J (2011) Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture* 237–245. doi:10.1007/978-1-61779-080-5\_20
24. Morgan DML (1998) Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. *Polyamine Protocols* 179–184. doi:10.1385/0-89603-448-8:179
25. Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, García-Borrón JC, Hearing VJ (1994) Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *The EMBO Journal*. 13(24): 5818–5825. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06925.x
26. Vachtenheim J, Borovanský J (2010) “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp Dermatol* 19(7): 617–627. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.01053.x
27. Ckarakorty AK, Funasaka Y, Momoto M, Ichinashi M (1998) Effect of Arbutin on Melanogenic Proteins in Human Melanocytes. *Pigment Cell Res* 11(4): 206–212. doi:10.1111/j.1600-0749.1998.tb00731.x
28. Lim YJ, Lee EH, Kang TH, Ha SK, Oh MS, Kim SM, Kim SY (2009) Inhibitory Effects of Arbutin on Melanin Biosynthesis of α-Melanocyte Stimulating Hormone-induced Hyperpigmentation in Cultured Brownish Guinea Pig Skin Tissues. *Arch Pharm Res* 32(3): 367–373. doi: 10.1007/s12272-009-1309-8
29. Chung YC, Lee JN, Kim BS, Hyun CG (2021) Anti-Melanogenic Effects of *Paederia foetida* L. Extract via MAPK Signalling-Mediated MITF Downregulation. *Cosmetics* 8(1): 22. doi:10.3390/cosmetics8010022