

## Whitening Effect and Antioxidant Activity of Horseradish Subcritical Water Extracts

In-Jae Kim<sup>1</sup>, Su-Bhin Eun<sup>1</sup>, Won-Hee Kim<sup>1</sup>, Seon-Bhin Park<sup>1</sup>, Hee-Bin Ku<sup>1</sup>, Gyo-Nam Kim<sup>1</sup>, Seung-Cheol Lee<sup>1</sup>, Youngim Choi<sup>2</sup>, Sanggeun Park<sup>2</sup> and Hae-Ryong Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Kyungnam University, Changwon 51767, Korea

<sup>2</sup>DAERYEOK INCORPORATED, Gimhae 51006, Korea

Received November 28, 2023 / Revised April 9, 2024 / Accepted April 15, 2024

Melanin is a natural pigment found in most plants and animals, and it is involved in determining the color of the skin and hair. Melanogenesis is a reactive occurrence in melanocytes aiming to protect the skin from external stimuli, such as ultraviolet rays. Tyrosine is involved in the biosynthesis of the substrate tyrosine into melanin. However, melanin overproduction can lead to skin diseases, such as melasma, blotching, hyperpigmentation, and skin cancer. Although many studies have been conducted on whitening substances, such as kojic acid and arbutin, some countries have banned or refrained from using them due to their side effects. Therefore, this study assessed the potential of horseradish (HR) as a new whitening agent in cosmetic products. For efficient extraction, subcritical water extraction was conducted. The results showed that the horseradish subcritical water 200°C (SW 200) extract showed high DPPH radical scavenging ability, total phenolic contents (TPC), inhibiting tyrosinase activity and inhibiting melanin production of B16-F10 melanoma cell lines. To investigate its cytotoxicity to the B16-F10 melanoma cell lines, MTT reduction assay and morphological changes were observed. No cytotoxicity was found in horseradish methanol extract and SW 200. In conclusion, this research suggests the possibility of horseradish subcritical water may be useful as a natural whitening ingredient to be used in cosmetic products.

**Key words :** Antioxidant, B16F10 melanoma, horseradish, subcritical water, whitening

### 서 론

현대 의학 기술의 발달로 인간의 수명이 길어지고 삶의 수준이 향상됨에 따라 건강하고 아름다워지고자 하는 사람들의 소망이 증가하고 있다. 따라서 화장품산업 분야에서는 소비자들의 인식 변화에 맞춰 화장품을 단순히 피부 보호 또는 미용의 개념에서 더 나아가 항노화 및 피부 건강 개선 등의 기능성 개념으로 도입되고 있다. 특히, 아시아권에서의 하얀 피부는 예로부터 아름다움의 기준이라고 할 만큼 미백에 대한 관심이 많았던 것으로 알려져 있으며, 식물 소재의 천연물 중 사과[9], 새싹인삼, 생강[21] 등의 미백 효과가 보고된 바 있지만, 겨자무(horseradish)의 미백 관련 연구는 거의 보고된 바 없다.

겨자무는 배추과의 겨자무속 식물로 예로부터 항균효

과[16, 24]가 있다고 알려져 있으며, 이 외에도 항산화[12, 25], 항염증[26] 및 항진균[4] 효과가 입증되었다. 이러한 겨자무의 관련 연구에 사용되는 추출 용매로는 물, ethanol, methanol, acetone 등을 사용하지만, 식물 소재의 천연물 추출에 효율이 좋다고 알려진 아임계수를 이용한 연구는 부족한 실정이다. 아임계수(subcritical water)는 물의 임계점인 374°C, 22.064 MPa 이하의 고온고압수를 말한다. Ethanol, methanol, acetone 등과 같은 유기용매와 다르게 친환경적이며[3], 유기물질에 대한 높은 용해도와 ester, ether, peptide 결합 등을 가수분해할 수 있는 특이한 성질을 가져 유용 물질의 유리화에 더 용이하다[19]. 이러한 특징을 통해 미더덕[11], 어성초[10], 차가버섯[32], 수박[17] 등과 같은 식물 소재 천연물의 아임계수 추출물은 우수한 생리활성을 가진다고 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 겨자무를 150°C 와 200°C의 아임계수 및 methanol, ethanol, acetone으로 추출하여 다양한 생리활성을 비교 분석하기 위해 TPC, DPPH, tyrosinase inhibition, MTT reduction, melanin content assay 및 western blotting을 실시하여, 겨자무의 아임계수 추출물을 이용한 미백 기능성화장품으로서의 새로운 가능성을 제시하고자 한다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-249-2689, Fax : +82-505-999-2171

E-mail : parkhy@kyungnam.ac.kr

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.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 겨자무를 분말 형태로 (주)대력에서 제공받았다. 실험에 사용된 시약과 시료인 Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Gallic acid, L-tyrosine, Tyrosine from mushroom, DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), arbutin, dimethyl sulfoxide (DMSO), 및 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Thiazolyl blue tetrazolium bromide는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였고, Sodium phosphate monobasic anhydrous, Sodium hydroxide 및 Sodium phosphate dibasic anhydrous는 DaeJung Chemicals & Metals Co. (Siheung, Korea)로 부터 구입하였다. Phosphate-buffered saline, 10×는 Welgene, Inc. (Gyeongsan, Korea)로 부터 구입하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 Dullbecco's modified Eagles's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), 0.25% trypsin-EDTA 및 penicillin streptomycin은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로 부터 구입하였다.

### 세포주 배양

본 실험에 사용된 mouse 유래 흑색종 세포주 B16-F10 melanoma는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 세포배양을 위해 DMEM에 10% FBS 및 100 units/mL의 penicillin을 첨가하여 사용하였고, 95% 습도가 유지되는 37°C, CO<sub>2</sub> incubator (MCO-18-AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 세포배양과 관련된 시약류는 (주)대력에서 제공받아 사용하였다.

### 추출물 제조 및 농축

겨자무 추출물의 생리활성을 용매별로 측정하기 위해 용매를 아임계수, methanol, ethanol 및 acetone을 사용하였고 아임계수 추출 온도는 150°C와 200°C로 설정하였다.

아임계수 추출법으로는 겨자무 분말(0.1 g)을 10 mL의 증류수와 함께 스테인리스 관(14×1 cm<sup>2</sup>)에 넣고 뚜껑을 막은 후 원하는 온도로 고온 가마(Daeil Engineering, Korea)에 방치하였다. 추출 온도는 각 150°C 및 200°C로 조절하였고 추출 시간은 30분으로 설정하였다. 추출 후 스테인리스 관을 가마에서 꺼내어 실온에 30분간 냉각 후 여과지(Advantec 125 mm, Tokyo, Japan)로 여과한 후 여과액을 4°C에 보관하면서 필요 시 꺼내어 사용하였다. Methanol, ethanol 및 acetone을 이용한 추출법은 겨자무 분말(1 g)을 용매(100 mL)와 함께 300 mL Erlenmeyer flask에 24시간 동안 방치하였다. 이후 추출물을 여과에 여과한 후 4°C에 보관하면서 필요 시 꺼내어 사용하였다.

겨자무의 미백 활성을 측정하기 위해 아임계수 200°C와 methanol 추출물을 농축하였다. 농축법은 아임계수

200°C 추출물(1 mL)과 methanol 추출물(10 mL)을 각 다른 25 mL 농축플라스크에 담아 회전진공농축기(EYLYA N-1110, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 농축한 추출물은 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 10 mg/mL 농도로 제조하여 4°C에 보관하면서 필요 시 꺼내어 희석하여 사용하였다.

### 총 페놀 함량 측정

용매 및 온도 별로 추출한 겨자무의 총 페놀 함량을 확인하기 위하여 Folin-Denis법에 따라 총 페놀 함량을 측정하였다. 추출물 200 µL에 멸균수 200 µL, Folin-Ciocalteu 시약 400 µL를 차례대로 가한 후 3분 동안 암실에 방치한 뒤 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 400 µL를 가했다. 이후 1시간 동안 암실에 방치한 후 원심분리기(3,000 rpm, 2분)에 돌린 뒤, 96-well plate에 200 µL 분주 후 microplate reader (Model 680, Bio-Rad, USA)를 이용하여 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 0-100 µg/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 감량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 구하였다. 각 온도 별 아임계수 추출물은 10배 희석하여 사용하였다.

### DPPH 라디칼 소거능

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay는 겨자무의 각 용매 및 온도 별 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위해 사용하였다. 추출물 시료를 20 µL에 0.2 mM DPPH 용액 80 µL를 가한 후 10분 동안 암실에 방치한 뒤, 96-well plate에 100 µL 분주 후 microplate reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control은 ascorbic acid를 사용하였으며, 겨자무 추출물에 사용된 용매들로 1 mg/mL의 농도로 제조하여 동일한 방식으로 DPPH assay를 진행하였다. 각 용매 및 온도 별 추출물의 DPPH 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무처리의 흡광도}}\right) \times 100$$

### Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase inhibition assay는 겨자무의 각 용매 및 온도 별 추출물의 미백 활성을 확인하기 위해 사용하였다. 96 well plate의 각 well에 시료를 20 µL, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 220 µL, 1,500 unit/mL tyrosinase from mushroom 20 µL, 1.5 mM L-tyrosine 40 µL를 첨가한 후 37°C에 15분 동안 incubation 한 뒤 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료로는 농축한 아임계수 200°C 및 methanol 추출물을 DMSO로 최종처리농도가 10 µg/mL 및 100 µg/mL 되도록 처리하여, 양성 대조군인 arbutin을 100 µg/mL로 희석한 것과 활성을 비교하였다.

### 세포 독성

겨자무 추출물이 B16-F10 melanoma 세포주 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT reduction assay를 진행하였다. B16-F10 melanoma 세포주를 96-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 100  $\mu$ L씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 다음, 시료를 농축하여 DMSO에 희석한 아임계수 200°C 및 methanol 추출물의 최종처리농도가 10  $\mu$ g/mL 및 100  $\mu$ g/mL이 되도록 처리하고 control은 1% DMSO가 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/mL) 용액을 10  $\mu$ L씩 분주하여 1시간 동안 반응시켜 formazan 형성을 확인하고, 배지를 suction 한 뒤 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 시료를 처리하지 않은 대조구의 흡광도를 기준으로 하였을 때, 각 농도별 겨자무 추출물 처리구의 흡광도를 비율로 나타내었다.

### 형태학적인 변화 관찰

겨자무 추출물에 대한 B16-F10 melanoma 세포주의 형태학적인 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 morphological analysis를 진행하였다. B16-F10 melanoma 세포주를 6-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 2 mL씩 분주 후 24시간 동안 배양하였다. 다음, 시료를 농축하여 DMSO에 희석한 아임계수 200°C 및 methanol 추출물의 최종처리농도가 10  $\mu$ g/mL 및 100  $\mu$ g/mL이 되도록 처리하고 control은 1% DMSO가 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Phase-contrast microscope (Nikon, Tokyo, Japan)를 이용하여 각 well의 B16-F10 melanoma 세포주의 형태학적 변화를 관찰하고 100배의 비율로 사진 촬영하였다.

### 멜라닌 생합성 억제 활성 평가

멜라닌 정량 실험은 겨자무의 용매 별 추출물의 B16-F10 melanoma 세포주에 대한 멜라닌 생성 억제 효과를 평가하기 위해 사용하였다. 6-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL이 되도록 2 mL씩 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 다음, IBMX를 최종처리농도 1 mM이 되도록 첨가하여 멜라닌 생성을 유도하였고, 시료를 농축하여 DMSO에 희석한 아임계수 200°C 및 methanol 추출물의 최종처리농도가 10  $\mu$ g/mL 및 100  $\mu$ g/mL이 되도록 처리하여 5일 동안 배양하였다. Control로는 IBMX만 처리한 cell을 이용하였다. 멜라닌 생성량을 측정하기 위해 배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 수확한 후 원심분리(3,000 rpm)를 5분간 실시한 뒤, cell pellet에 1 N NaOH (10% DMSO)를 넣고, heating block으로 100°C에서 10분간 세포와 세포 내 멜라닌 색소를 녹여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### B16-F10 melanoma 단백질 발현

겨자무 추출물이 B16-F10 melanoma 세포주의 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다. B16-F10 melanoma 세포주를 6-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 24시간 동안 배양하였다. 단백질 시간을 알아보기 위해 IBMX를 1 mM이 되도록 처리하여 12, 24, 48 및 72시간 동안 처리하였다. 이후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 4°C PBS로 harvest 하였다. Cell을 원심분리하여(5,000 rpm, 4°C, 5 minutes) 상층액을 제거한 뒤, Bradford protein assay로 단백질 정량을 진행하였다. 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE)을 실시하여, 단백질을 분리하였고, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore)에 blotting 하였다. 1차 antibody는 goat polyclonal tyrosinase (1:500) 및 mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (1:2,000)을 처리하였다. 2차 antibody는 anti-goat immunoglobulin antibody (1:500) 및 anti-mouse immunoglobulin (1:2,000)을 처리하여, Luminograph 및 CS Analyzer 4 program으로 분석하였다. 단백질의 발현 억제를 확인하기 위해서는 시료를 농축하여 DMSO에 희석한 아임계수 200°C 및 methanol 추출물의 최종처리농도가 10  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL 및 100  $\mu$ g/mL, 그리고 IBMX는 1 mM이 되도록 처리하고 control은 1% DMSO가 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 방법은 위와 같다.

### 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치  $\pm$  표준편차(SD)를 구하였다. 겨자무 추출물의 tyrosinase 저해 활성 및 멜라닌 생합성 억제 활성의 정도를 비교하기 위해서 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 scheffe's test를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

## 결 과

### 총 페놀 함량 측정

일반적으로 식물 성분의 항산화 활성은 페놀성 화합물이 원인 물질로 관련 되어있는 것으로 알려져 있어 겨자무의 총 페놀 함량을 측정하였다. 각 다른 용매 및 온도로 (아임계수 150°C, 200°C; methanol; ethanol; acetone) 추출한 겨자무 추출물의 총 페놀 함량은 Table 1에 나타내었다. 전체적으로 다른 용매에 비해 아임계수 추출물(150°C, 200°C)의 총 페놀 함량이 평균적으로 가장 높게 나타났다. 아임계수 추출물 중 아임계수 200°C 추출물이 가장 높은 총 페놀 함량(1682.3  $\mu$ g GAE/mL)을 나타내었으며, 아임계수 150°C 추출물이 가장 낮은 총 페놀 함량(1490.7  $\mu$ g GAE/mL)을 나타내었다. Methanol, ethanol 그리고 acetone 추출

Table 1. Contents of total phenols of horseradish extracts

Sample <sup>1)</sup>	Total phenol content (µg GAE/mL) <sup>2)</sup>
SW 150	1490.7±7.62 <sup>3)</sup>
SW 200	1682.3±33.3
MeOH	43.5±3.2
EtOH	31.1±0
Acetone	23.2±0.8

<sup>1)</sup>SW 150: subcritical water 150°C extracts, SW 200: subcritical water 200°C extracts, MeOH: methanol extracts, EtOH: ethanol extracts.

<sup>2)</sup>µg GAE/mL: µg gallic acid equivalent per sample g.

<sup>3)</sup>Values are average of three measurements.

물 중 methanol 추출물이 가장 높은 총 페놀 함량(43.5 µg GAE/mL)을 나타내었지만, 아임계수 150°C 추출물이 methanol 추출물보다 34.2배 높은 총 페놀 함량을 나타내었다.

**DPPH 라디칼 소거능**

겨자무의 용매별 추출물의 항산화 활성을 DPPH radical 소거능으로 측정하여 Table 2에 나타내었다. 아임계수 200°C 추출물을 제외하고 다른 온도와 용매의 추출물들은 비교적 낮은 활성을 나타내었다. 아임계수 200°C 추출물이 가장 높은 활성(33.4%)을 나타내었으며, 다른 용매 중 acetone 추출물이 가장 낮은 활성(1.5%)을 나타내었다. 서로 비슷하게 나타난 methanol 추출물(6.3%)과 ethanol 추출물의 활성(6.1%)은 아임계수 200°C에 비해 항산화 활성이 약 6배 낮게 나타났지만, 아임계수 150°C 추출물(4.2%)보다 높은 활성을 나타내었다. 아임계수 200°C 추출물과 아임계수 control (69.6%)의 활성을 비교해 보았을 때, 아임계수 200°C로 추출한 겨자무 추출물의 항산화 활성이 비교적 높은 것을 알 수 있다.

**Tyrosinase 저해 활성**

멜라닌 색소생성의 중요한 단계를 촉매하는 효소인 tyrosinase의 저해 활성을 알아보기 위해 tyrosinase inhibition

Table 2. DPPH radical scavenging activity of horseradish extracts (Unit: %)

Sample <sup>1)</sup>	DPPH	Vit C <sup>2)</sup> (1 mg/mL)
SW 150 <sup>3)</sup>	4.2±0.2	69.6±1
SW 200	33.4±2	69.6±1
MeOH	6.3±0.5	74.7±1.5
EtOH	6.1±0.3	77.4±1.8
Acetone	1.5±1	76.9±2.5

<sup>1)</sup>Samples are the sample as Table 1.

<sup>2)</sup>Vit C: Ascorbic acid was used as positive control.

<sup>3)</sup>Values are average of three measurements.

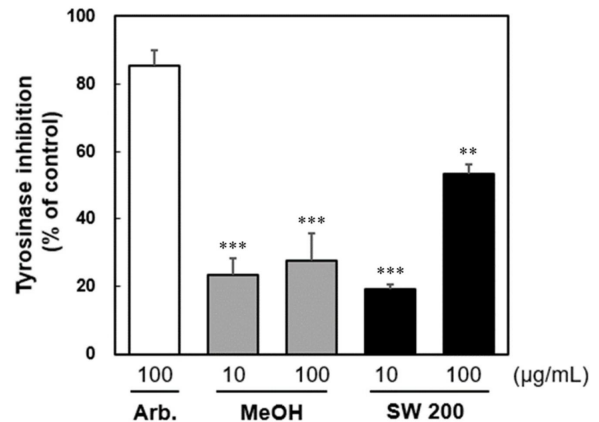


Fig. 1. Tyrosinase inhibition effects of horseradish methanol (MeOH) and subcritical water 200°C (SW 200) extracts. Arbutin (Arb) was used for positive control. Data are presented as mean ± SD of three measurements. Samples are same as Table 1. \*\*\*significantly different from arbutin-treated control group ( $p < 0.001$ ).

assay를 실시하였고, 최종처리농도는 각 용매 별로 10 µg/mL 및 100 µg/mL이다. 각 용매 및 농도 별로 처리한 tyrosinase 저해 활성은 Fig. 1에 나타내었다. 아임계수 200°C 추출물 100 µg/mL (17.57%)에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, methanol 추출물 10 µg/mL (5.71%)에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. Methanol 추출물 100 µg/mL (9.87%)보다 아임계수 200°C 추출물 10 µg/mL (11.68%)의 활성이 더 높은 것으로 보아, 대체적으로 아임계수 추출물의 tyrosinase 저해 활성이 methanol 추출물보다 높다고 볼 수 있다. 아임계수 200°C 추출물 100 µg/mL와 동일한 농도로 제조된 양성대조군인 arbutin 100 µg/mL (26.02%)를 비교해 보았을 때, 아임계수 200°C 추출물이 어느 정도 tyrosinase 저해 활성을 가진다고 볼 수 있다.

**겨자무의 B16-F10 melanoma 세포주에 대한 세포독성 평가**

피부에 접촉하는 화장품의 원료로서 안전성을 확인하기 위해 겨자무의 세포독성 평가를 하였다. 멜라닌 색소를 형성하는 B16-F10 melanoma 세포주의 cell growth에 대해 겨자무가 영향을 미치는지 알아보기 위해 MTT reduction assay와 Morphological analysis를 실시하여 세포독성을 측정하였다. 겨자무의 아임계수 200°C 및 methanol 추출물을 각각 10, 100 µg/mL의 최종처리농도가 되도록 처리하였다. 각 용매 및 농도 별로 처리한 MTT reduction 활성과 phase-contrast microscope으로 B16-F10 melanoma 세포주의 형태학적 변화를 관찰하여 촬영한 사진은 Fig. 2에 나타내었다.

MTT reduction assay 결과는 추출물 처리를 하지 않은 대조군과 비교하여 나타난 세포독성을 분석하였을 때,

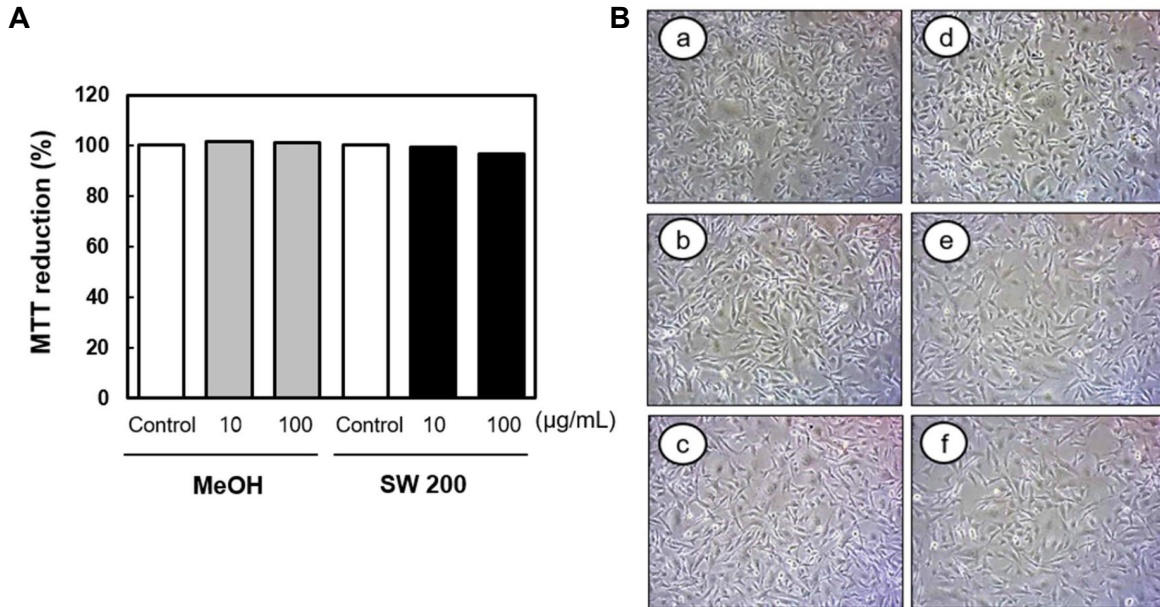


Fig. 2. Cell viability of horseradish extracts in B16-F10 melanoma cells. (A) MTT reduction assay of B16-F10 melanoma cells with horseradish methanol (MeOH) and subcritical water 200°C (SW 200) extracts at doses of 10 and 100 µg/mL. Cells were incubated for 24 hr before treated with horseradish extracts. (B) Morphological assay of B16-F10 melanoma cells with horseradish methanol (MeOH) and subcritical water 200°C (SW 200) extracts. a, MeOH-control; b, MeOH-10 µg/mL; c, MeOH-100 µg/mL; d, SW 200°C-control; e, SW 200°C-10 µg/mL; f, SW 200°C-100 µg/mL. Samples are same as Table 1.

methanol 추출물 10 µg/mL (101.3%), methanol 추출물 100 µg/mL (110.6%)은 세포 독성이 확인되지 않지만, 아임계수 200°C 추출물 10 µg/mL (93.2%) 및 아임계수 200°C 추출물 100 µg/mL (86.2%)에서 낮은 세포 독성을 관찰할 수 있었다. 세포는 외부 환경에 민감하게 자극을 받으면 상해를 입는 것과 동시에 세포사가 유도되어 형태학적인 변화가 일어나는데, B16-F10 melanoma 세포주의 형태학적인 변화를 관찰한 결과, methanol 추출물 10 µg/mL, 100 µg/mL 및 아임계수 200°C 추출물 10 µg/mL, 100 µg/mL 모두 용매 별 control과 유의적인 차이가 없음을 알 수 있다. 따라서 겨자무의 아임계수 200°C 및 methanol 추출물 모두 세포독성이 적다고 볼 수 있다.

**멜라닌 생합성 억제 활성 평가**

멜라닌 색소를 생성하는 B16-F10 melanoma 세포주의 멜라닌 생성 억제 효과를 알아보기 위해 멜라닌 정량 실험을 진행하였고, 최종처리농도는 각 용매 별로 10 µg/mL 및 100 µg/mL이 되도록 처리하였다. 각 용매 및 농도 별로 처리한 멜라닌 content는 Fig. 3에 나타내었다. 그 중 아임계수 200°C 추출물 100 µg/mL (7.3%)에서 가장 낮은 멜라닌 함량을 나타내었으며, 아임계수 200°C 추출물 10 µg/mL (25.61%)에서 가장 높은 멜라닌 함량을 나타내었다. Methanol 추출물 10 µg/mL (24.18%)는 아임계수 200°C 추출물 10 µg/mL보다 낮은 멜라닌 함량을 나타내었지만,

Methanol 추출물 100 µg/mL (18.94%)는 아임계수 200°C 추출물 100 µg/mL보다 높은 멜라닌 함량인 것을 보았을

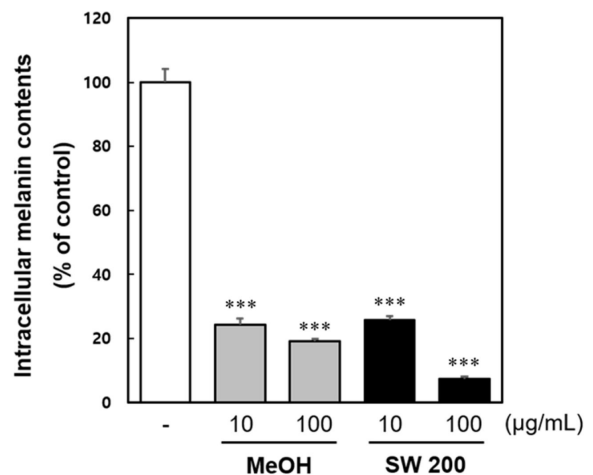


Fig. 3. Effects of melanin inhibition in B16-F10 melanoma cells treated with horseradish methanol (MeOH) and subcritical water 200°C (SW 200) extracts at doses of 10 and 100 µg/mL. Cells were incubated for 24 hr before treated with horseradish extracts and melanin was induced by IBMX 1 mM. Data are presented as mean ± SD of three measurements. Samples are same as Table 1. Significant vs. IBMX-treated control group (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

때, 아임계수 200°C 추출물이 methanol 추출물보다 농도의존적으로 높은 멜라닌 생성 억제 효과를 가진다고 볼 수 있다.

**겨자무의 B16-F10 melanoma 세포주에 대한 단백질 발현 평가**

IBMX 처리 후 단백질의 발현 시간과 아임계수 200°C 추출물의 단백질 발현 억제 활성을 알아보기 위해 western blotting을 실시하여, Fig. 4와 Fig. 5와 같이 나타내었다. IBMX를 B16-F10 melanoma 세포주에 처리한 결과, 시간의존적으로 tyrosinase 발현이 증가하였고, 72시간 처리하였을 때 가장 높게 나타났다. 이후, 아임계수 200°C 추출물을 처리 후 IBMX를 72시간 처리하였을 때, 농도의존적으로 tyrosinase는 억제되었다. 이를 통해, 아임계수 200°C 추출물은 tyrosinase의 활성뿐만 아니라, tyrosinase의 발현을 억제하는 것을 알 수 있다.

**고 찰**

멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할도 하

지만 과한 자외선이나, 스트레스 등의 원인으로 활성산소 종이 생성되면 tyrosinase가 활성화되어 멜라닌 합성 과정을 통해 흑갈색의 멜라닌이 생성된다[18]. 시중에 사용되는 미백활성 물질들의 원리는 크게 3 가지로 tyrosinase의 활성을 억제하거나, tyrosinase의 산화를 억제하거나, 멜라닌이 melanocyte로 이동하는 것을 막는 것이 있다. 대표적으로 이러한 원리를 가진 미백 원료로는 닥나무추출물[8], arbutin [33], 감초추출물[5], ascorbyl glucoside [7], alpha-bi-sabolol [22], niacinamide [6] 등이 있다. 이 외에도 효과적인 미백 원료를 탐구하기 위해 여러 연구들이 진행되고 있다.

본 연구는 항산화 효과가 보고되었지만, 미백 활성이 보고되어 있지 않은 겨자무를 선별하여 실험을 진행하였다. 보통 이러한 천연물 기반의 실험은 추출을 위해 유기용매를 이용하게 된다. 흔히 methanol, ethanol, acetone, hexane, chloroform 등을 사용하지만, 환경과 인체에 유해하다는 단점이 있다. 하지만 추출하기 편하다는 점과 용매의 극성에 따라 추출효율이 용이[28]하여 아직도 많이 사용되고 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하고 극성 및 비극성 물질 추출을 할 수 있는 아임계수 추출법을 도입

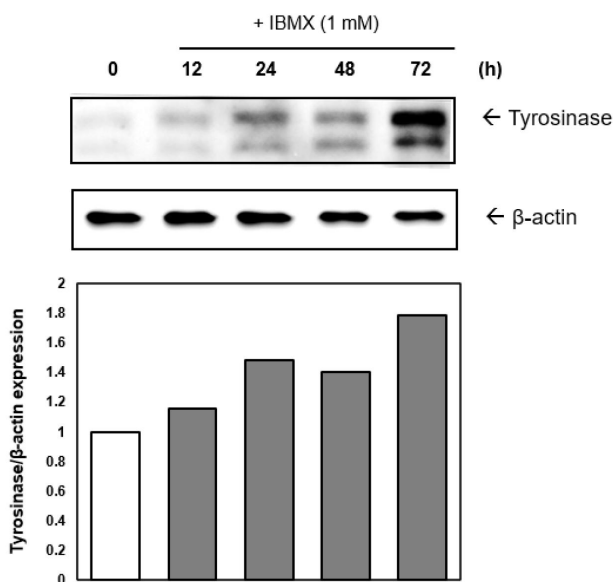


Fig. 4. Expression of proteins from B16F10 melanoma cells treated with IBMX. IBMX expressed tyrosinase and values of tyrosinase expression treated with IBMX. Cells were with treated IBMX at a concentration of 1 mM for 12, 24, 48, and 72 hr. Primary antibodies, goat polyclonal tyrosinase (1:500) and mouse monoclonal anti-β-actin (1:2,000) were reacted for 2 hr. Then, secondary antibodies of anti-goat immunoglobulin antibody (1:500) and anti-mouse immunoglobulin antibody (1:2,000) were added at room temperature for 1 hr.

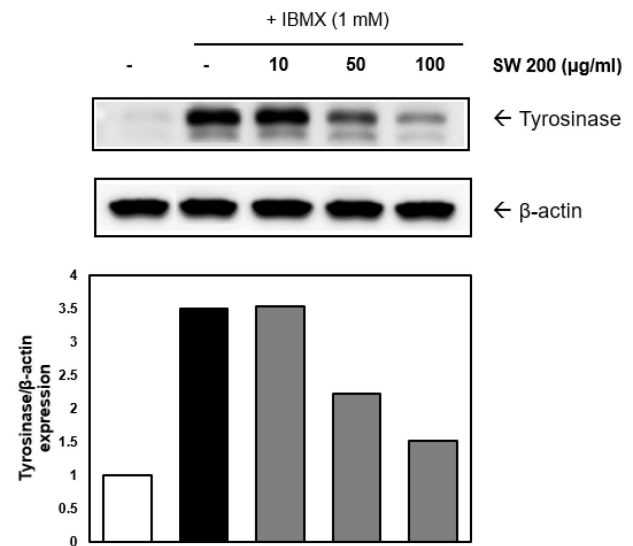


Fig. 5. Expression of proteins from B16F10 melanoma cells treated with horseradish subcritical water 200°C (SW 200) extracts. SW 200 suppressed tyrosinase expression and values of tyrosinase expression treated with horseradish subcritical water 200°C (SW 200) extracts. Cells were treated with horseradish subcritical water 200°C (SW 200) extracts at concentrations of 10, 50, 100 μg/mL, and 1 mM IBMX for 72 hr. Primary antibodies, goat polyclonal tyrosinase (1:500) and mouse monoclonal anti-β-actin (1:2,000) reacted for 2 hr. Secondary antibodies of anti-goat immunoglobulin antibody (1:500) and anti-mouse immunoglobulin antibody (1:2,000) were added for 1 hr.



하였다.

겨자무의 유기용매 및 아임계수 추출물의 항산화 효과를 우선적으로 비교하기 위해 DPPH assay 및 총 페놀 함량을 구하였다. 그 결과 평균적으로 약 6%의 DPPH 라디칼 소거능을 보여주었던 유기용매 추출물에 비해, 아임계수 200°C 추출물에서 33.4%로 상대적으로 높은 항산화 활성을 확인할 수 있었다. 또한, 아임계수 200°C 추출물이 1,682.3 µg GAE/mL의 높은 총 페놀 함량을 보여주었다. 이 후 겨자무의 유기용매 및 아임계수 추출물의 미백활성 및 B16-F10에 대한 세포독성을 비교하기 위해 실험에 사용된 유기용매 중 비교적 높은 항산화 효과를 지닌 methanol 추출물을 선별하여 실험을 진행하였다.

아임계수 및 methanol 추출물을 비교해 보았을 때, methanol 추출물 100 µg/mL (9.87%)보다 아임계수 200°C 추출물 100 µg/mL (17.57%)에서 높은 tyrosinase 저해 활성을 확인할 수 있었다. B16-F10 melanoma 세포주 내에서도 methanol 추출물 100 µg/mL (18.94%)보다 아임계수 200°C 추출물 100 µg/mL (7.3%)에서 멜라닌 생성 억제 효능을 관찰할 수 있었다. 뿐만 아니라, western blotting을 통해 tyrosinase 단백질 발현도 억제시킨다는 것을 알 수 있었다. 겨자무 추출물의 미백 활성에 관한 연구는 아직 보고되어 있지 않지만, 사과, 감초[27], 새싹인삼[15], 양빈[20], 울금[13]의 미백 활성 연구결과와 비교해 보았을 때, 비교적 높은 미백 활성을 가지는 것을 알 수 있다.

겨자무에 함유되어 있는 대표적인 화합물로는 sinigrin [30]이 있으며 부산물은 allyl isothiocyanate [2, 29, 34]이다. Allyl isothiocyanate는 항균효과[23] 및 항염증효과의 효능이 보고가 되어 있지만, 미백관련 효과는 보고된 바 없다. 최근 연구에 따르면 isothiocyanate 화합물 중 7-methylsulfanylheptyl isothiocyanate (7-MSI)의 B16-F1 murine cell에 대한 멜라닌 생성억제[14]가 보고된 바 있다. 7-methylsulfanylheptyl isothiocyanate는 glucosinolate의 종류 중 하나인 glucoibarin의 부산물이다[1, 31]. Glucoibarin은 겨자무에 함유되어 있지만, 7-MSI는 매우 극소량만 함유되어 있고 한다. 따라서 아직 겨자무의 아임계수 추출물의 미백 활성을 지니는 화합물을 규명하기에는 아직 어렵다고 볼 수 있다. 앞으로 미백의 활성을 가지는 물질을 겨자무에서 분리 및 정제하고, 세포 및 RNA 단위에서의 멜라닌 생성 억제 기전 연구 및 안정성 평가를 진행한다면 겨자무 아임계수 추출물은 기능성화장품으로서의 가능성을 기대하는 바이다.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

1. Agneta, R., Rivelli, A. R., Ventrella, E., Lelario, F., Sarli, G., & Bufo, S. A. 2012. Investigation of glucosinolate profile and qualitative aspects in sprouts and roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) using LC-ESI-hybrid linear ion trap with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 7474-7482.
2. Bertóti, R., Böszörményi, A., Alberti, Á., Béni, S., M-Hamvas, M., Szóke, É. and Gonda, S. 2019. Variability of bioactive glucosinolates, isothiocyanates and enzyme patterns in horseradish hairy root cultures initiated from different organs. *Molecules*, **24**, 2828.
3. Carr, A. G., Mammucari, R., and Foster, N.R. 2011. A review of subcritical water as a solvent and its utilization for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chem. Eng. J.* **172**, 1-17.
4. Choi, K. D., Kim, H. Y., and Shin, I. S. 2017. Antifungal activity of isothiocyanates extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against pathogenic dermal fungi. *Food Sci. and Biotechnol.* **26**, 847-852.
5. Damle, M. 2014. Glycyrrhiza glabra (Liquorice)-a potent medicinal herb. *Int. J. Herb. Med.* **2**, 132-136.
6. Hakozaki, T., Minwalla, L., Zhuang, J., Chhoa, M., Matsu- bara, A., Miyamoto, K. and Boissy, R. E. 2002. The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br. J. Dermatol.* **147**, 20-31.
7. Huang, S. C., Lin, C. C., Huang, M. C., and Wen, K. C. 2004. Simultaneous determination of magnesium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside, kojic acid, arbutin and hydroquinone in skin whitening cosmetics by HPLC. *J. Food Drug Anal.* **12**, 1.
8. Hwang, J. H., and Lee, B. M. 2007. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J. Toxicol. Environ. Health* **70**, 393-407.
9. Jeong, H. R., Jo, N.Y., Jeong, J. H., Jin, D. E., Song, B. G., and Heo, H. J. 2011. Whitening and anti-wrinkle effects of apple extracts. *Food Sci. Preserv.* **18**, 597-603.
10. Jo, E. K. and Lee, S. C. 2011. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of subcritical water extracts from *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1391-1396.
11. Jo, M. J., Han, J. K., Sung, S. C., and Lee, S. C. 2018. Preparation of subcritical water extract with improved physiological activity of *Styela clava*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **47**, 1112-1117.
12. Jo, Y. J. 2008. A study on the antioxidative and antimicrobial activities of wasabi (*Wasabia koreana*, cruciferae) extracts. Dissertation. Sungshin Women's University, Seoul, Korea.
13. Ju, H. J., Lee, S. A., Kim, R. H., Park, B. D., and Kim, G. N. 2017. Evaluation of *Curcuma longa* L. water extracts as beauty food materials in B16F10 and human skin fibroblasts. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **15**, 214-222.

14. Kim, A. J., Park, J. E., Cho, Y. H., Lim, D. S., and Lee, J. S. 2021. Effect of 7-methylsulfinylheptyl isothiocyanate on the inhibition of melanogenesis in B16-F1 cells. *Life*, **11**, 162.
15. Kim, G. W., Choi, Y. H., Kim, B. L., Kim, Y.G., Seong, R. S., Han, M. H., et al. 2018. Determination of anti-oxidative and whitening effects of complex extracts obtained from sprout panax ginseng C.A. Meyer and Cassia nomame (Sieb.) Honda on skin. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **16**, 309-320.
16. Kim, H. Y., Phan-a-God, S., and Shin, I. S. 2015. Antibacterial activities of isothiocyanates extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against antibiotic-resistant bacteria. *Food Sci. and Biotechnol.* **24**, 1029-1034.
17. Kim, S. J., Matsushita, Y., Fukushima, K., Aoki, D., Yagami, S., Yuk, H. G., et al. 2014. Antioxidant activity of a hydrothermal extract from watermelons. *LWT – Food Sci. Technol.* **59**, 361-368.
18. Kim, Y. J., and Uyama, H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1707-1723.
19. Lapornik, B., Prošek, M., and Wondra, A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **71**, 214-222.
20. Lee, A. R., Kim, G. N., Kim, H. O., Song, W. J., and Roh, S. S. 2017. Antioxidant activity and melanin inhibitory effects of Yambean (*Pachyrhizus erosus*) extract. *Korean J. Herb.* **32**, 57-64.
21. Lee, D. U., Ku, H. B., Lee, Y. L., Kim, G. N., and Lee, S. C. 2019. Antioxidant and antimelanogenic activities of Panax ginseng sprout extract. *J. Korean Sci. Food Sci. Nutr.* **48**, 699-703.
22. Lee, J., Jun, H., Jung, E., Ha, J., and Park, D. 2010. Whitening effect of  $\alpha$ -bisabolol in Asian women subjects. *Inter. J. Cosm. Sci.* **32**, 299-303.
23. Lin, C. M., Preston III, J. F., and Wei, C. I. 2000. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *J. Food Prot.* **63**, 727-734.
24. Lu, Z., Dockery, C., Crosby, M., Chavarria, K., Patterson, B., and Geidd, M. 2016. Antibacterial activities of wasabi against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **7**, 1403.
25. Manuguerra, S., Caccamo, L., Mancuso, M., Arena, R., Rappazzo, A. C., Genovese, L., and Maricchiolo, G. 2020. The antioxidant power of horseradish, *Armoracia rusticana*, underlies antimicrobial and antiradical effects, exerted *in vitro*. *Nat. Prod. Res.* **34**, 1567-1570.
26. Marzocco, S., Calabrone, L., Adesso, S., Larocca, M., Franceschelli, S., Autore, G., Rossano, R. 2015. Anti-inflammatory activity of horseradish (*Armoracia rusticana*) root extracts in LPS-stimulated macrophages. *Food Funct.* **6**, 3778-3788.
27. Mun, Y. J., Kim, J., Lim, N. Y., Lee, S. Y., Seop, G., Hwang, C. Y., et al. 2002. Inhibitory effect on melanogenesis of Radix glycyrrhizae water extract. *J. Physiol. & Pathol. Korean Med.* **16**, 1230-1235.
28. Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H., and Ullah, N. 2020. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Braz. J. Pharm. Sci.* **56**, e17129.
29. Nguyen, N. M., Gonda, S., and Vasas, G. 2013. A review on the phytochemical composition and potential medicinal uses of horseradish (*Armoracia rusticana*) root. *Food Rev. Int.* **29**, 261-275.
30. Park, S. J., and Lee, H. Y. 2015. Component analysis and antioxidant activity of Wasabi japonica Matsum Leaves. *Korean J. Med. Crop Sci.* **23**, 207-213.
31. Qin, H., King, G. J., Borpatragohain, P., & Zou, J. 2023. Developing multifunctional crops by engineering Brassicaceae glucosinolate pathways. *Plant Commun.* **4**, 100565.
32. Seo, H. K. and Lee, S. C. 2010. Antioxidant activity of subcritical water extracts from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Sep. Sci. Technol.* **45**, 198-203.
33. Thongchai, W., Liawruangrath, B., and Liawruangrath, S. 2007. High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts. *J. Cosmet. Sci.* **58**, 35-44.
34. Wu, H., Zhang, G. A., Zeng, S., and Lin, K. C. 2009. Extraction of allyl isothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) and its fumigant insecticidal activity on four stored-product pests of paddy. *Pest Manag. Sci.* **65**, 1003-1008.



---

**초록 : 겨자무 아임계수 추출물의 항산화활성 및 미백효과**

김인재<sup>1</sup> · 은수빈<sup>1</sup> · 김원희<sup>1</sup> · 박선빈<sup>1</sup> · 구희빈<sup>1</sup> · 김교남<sup>1</sup> · 이승철<sup>1</sup> · 최영임<sup>2</sup> · 박상근<sup>2</sup> · 박해룡<sup>1\*</sup>  
(<sup>1</sup>경남대학교 제약공학과, <sup>2</sup>(주)대력)

Melanin은 대부분의 식물과 동물에서 발견되는 자연 색소로, 피부와 모발의 색을 결정하는 게 관여한다. Melanogenesis는 일반적으로 피부를 자외선과 같은 외부 자극으로부터 보호하기 위한 반응으로 melanocyte에서 수행한다. Tyrosinase는 기질인 tyrosine을 melanin으로 생합성 하는데 관여한다. 그러나 melanin의 과다 생성은 melasma, blotch, hyperpigmentation, 그리고 피부암과 같은 피부질환으로 이어질 수 있다. Kojic acid 및 arbutin과 같은 미백 물질에 대한 연구가 수행되었지만, 부작용으로 인해 일부 국가에서는 사용을 금지하거나 제한하고 있다. 따라서 본 연구에서는 기능성화장품의 새로운 미백재료로서 잠재력을 연구하기 위해 겨자무(horseradish)를 선택하였다. 더 나아가 효율적인 추출을 위해 아임계수 추출을 사용하였다. 연구 결과, 아임계수 200℃ 추출물은 높은 DPPH 라디칼 소거능, 총 페놀 함량, tyrosinase 저해능 그리고 B16-F10 melanoma 세포주의 melanin 생성 억제 효과를 나타내었다. B16-F10 melanoma 세포주에 대한 세포 독성을 조사하기 위해 MTT reduction assay 및 형태학적 변화를 관찰하였으며, 그 결과, 겨자무 methanol 추출물 및 아임계수 200℃에서는 세포독성이 확인되지 않았다. 결론적으로, 이 연구는 화장품의 천연 미백 기능성소재로서 가능성을 제안하는 바이다.