

해조류 및 생약의 Tyrosinase 억제활성 검색

최병욱*, 이봉호, 강기정, 이은석, 이남호¹

대전산업대학교 공업화학과, ¹제주대학교 화학과

Screening of the Tyrosinase Inhibitors from Marine Algae and Medicinal Plants

Byoung Wook Choi*, Bong Ho Lee, Key Jung Kang,
Eun Seog Lee and Nam Ho Lee¹

Department of Industrial Chemistry, Taejon National University of Technology,
Taejon 300-717, Korea and ¹Department of Chemistry, Cheju National University,
Cheju 690-756, Korea;

Abstract – We have tested tyrosinase inhibitory activity on the methanol extracts of 23 species marine algae and 23 species traditional medicinal plant. Among them, four medicinal plants, *Ephedra sinica*, *Atractylodes japonica*, *Pinnellia ternata*, and *Citrus aurantium*, showed strong inhibition potency over 90% at concentration of 0.33 mg/mL. Also, two marine algae, *Enteromorpha compressa* and *Sargassum singgildianum* showed mild inhibition potency over 50% at concentration of 0.33 mg/mL.

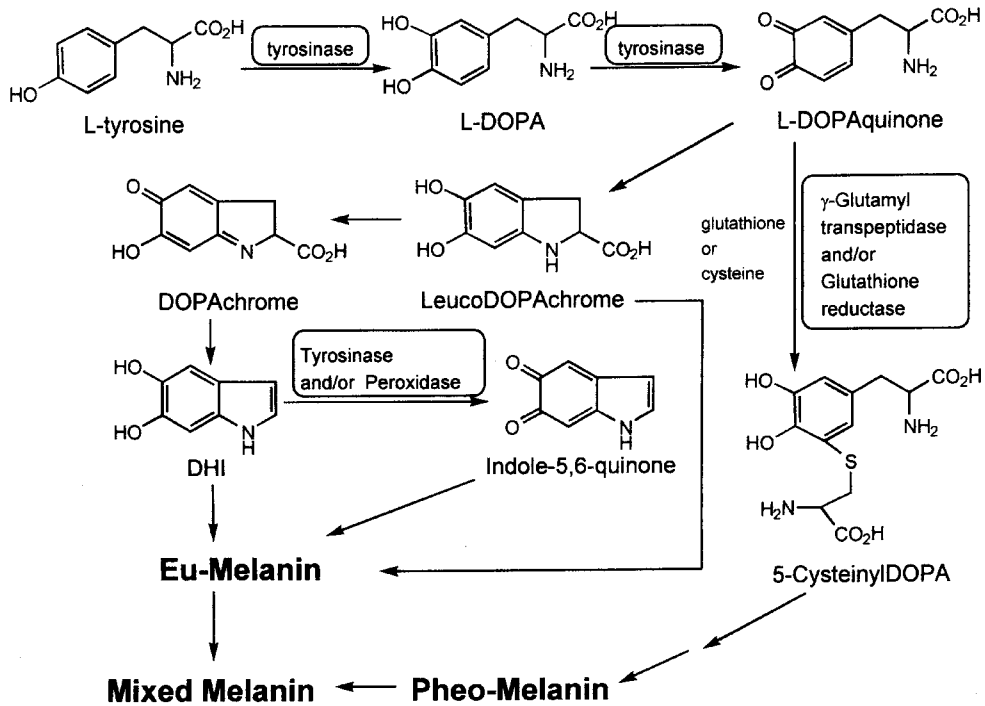
Key words – Tyrosinase; screening; inhibition; medicinal plant; sea weeds.

Tyrosine은 tyrosinase(혹은 monophenol monooxygenase라고도함)(EC 1.14.18.1)라는 효소에 의하여 quinone과 indolequinone 화합물들의 여러 중간체를 거쳐 melanin으로 변하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ Tyrosinase는 포유동물에서만뿐만 아니라 하등동물, 식물, 혹은 곰팡이 등에서도 존재하는 것으로 알려져 있다. Tyrosinase에 의하여 생성되는 melanin product는 복잡한 불균일한 biopolymer로서 많은 독특한 성질을 가지고 있다. Melanin은 대부분의 피부, 머리카락 및 눈동자의 색소화에 관여하는 물질이다. Melanin의 대표적인 작용은 (1) 생물종 사이의 성적유인(sexual attraction), (2) 광범위한 파장에 대한 흡수를 통하여 자외선 빛에 의한 세포의 파괴를 방지함, (3) 세

포에서 생성되는 독성의 자유 라디칼을 제거해 줌, 그리고 (4) 신경전달체로서의 가능성 등이 알려져 있다.^{1,2)}

Tyrosine으로부터 melanin의 생합성에서 가장 중요한 단계는 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 일어나는 초기 반응으로서 tyrosine의 hydroxyl기를 부착시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)를 생성한다(Scheme 1).^{2,3)} 이에 따라 이 반응을 억제하게 되면 melanin 생합성을 억제할 수 있다. 이러한 이유로 tyrosinase억제제는 다음과 같이 광범위하게 사용될 수 있다. 예를 들면, 곤충에 tyrosinase 억제제를 사용하게 되면 곤충이 제대로 melanin을 합성하지 못하여 암화가 제대로 이루어지지 못하므로, tyrosinase억제제를 살충제로 사용하는 연구도 많이 진행되고 있다.^{4,6)} 더군다나 tyrosinase 억제제는 피부미백과 관련되므로 화장품 산

*교신저자 : Fax 042-622-9823



Scheme 1. The melanogenic pathway.

업에서도 점점 더 중요하게 여겨지고 있다.⁷⁾ 따라서 tyrosinase가 melanin 생합성 과정에서 중요한 역할을 하므로 tyrosinase 억제제를 피부의 melanin 색소 생성을 조절할 수 있는 물질로 사용할 수 있다.^{8,9)} Melanocyte에 발생하는 악성종양인 흑색종(melanoma) 또한 tyrosinase의 억제제에 의한 조절이 가능하다고 알려져 있다.^{10,11)}

지금까지 알려진 tyrosinase 억제제는 대부분 천연물질로 대부분 식물에서 추출되어 왔고, 최근에는 유산균 및 방선균에서도 그 추출물질이 알려지고 있다. 이들 중 대표적으로 알려진 것들이 kojic acid 및 arbutin이다.¹⁰⁾ Tyrosinase 억제제로서 현재 가장 많이 사용되고 있는 물질은 화장품 첨가제로도 알려져 있는 arbutin이다. 이 물질의 IC_{50} 은 약 1.2 mM로 알려져 있다. Arbutin은 hydroquinone- β -D-glucopyranoside의 구조를 가지는 간단한 물질로서 5×10^{-5} M의 농도에서 mouse B16 melanoma 세포 성장을 억제하여 melanogenesis를 방해하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾

Tyrosinase 억제에 대한 연구는 기존에 알려져 있는 많은 유기화합물을 이용해서도 조사되었다.

예를 들면, methimazole, minosine, tropolone, ascorbic acid 및 이들의 유도체, cysteine, 3-amino-L-tyrosine 등이 tyrosinase를 어느 정도 억제하는 것으로 알려져 있으나 이들의 활성은 arbutin에 비교하여 유사하거나 약하였다.¹¹⁾

Itokawa 등은 최근에 고등식물로부터 cyclic peptide를 얻어내는 연구를 하는 중에 *Pseudotellaria heterophylla*로부터 tyrosinase를 억제하는 여러 cyclic peptide를 얻어냈다.^{12,13)} 이들은 주로 5개 내지 8개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며 IC_{50} 값이 $50 \mu\text{M}$ 정도까지 보여주는 비교적 우수한 tyrosinase 억제제였다. 이들 중 pseudotellarin D는 B16 melanoma 세포에 대하여서도 $49 \mu\text{M}$ 정도에서 성장을 억제하여 melanogenesis를 억제하는 것으로 알려졌다. 또한 이들은 공통적으로 phenylalanine이나 tyrosine잔기를 가지는 특징을 보여주었다.

Kawagishi 등은 유산균인 *Lactobacillus helveticus*에서 tyrosinase 억제효과를 갖는 cyclic peptide를 발견하였다. 이 화합물은 tyrosine을 포함하여 4개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며

IC₅₀ 값이 1.5 mM 정도였다.¹⁴⁾

Kubo 등은 중남미에 서식하는 여러 식물체에서 많은 tyrosinase 억제제를 찾아냈는데 이들도 약 70 μM 정도의 억제 효과를 보이는 것으로 알려졌다. 이들의 공통적인 구조는 L-DOPA와 공통되는 부분을 함유하고 있다.^{4,6)}

이에 따라 본 연구진도 새로운 tyrosinase 억제제의 개발을 위하여 해양식물인 해조류 및 생약의 검색을 실시하였으며, 그 결과를 여기에 보고한다.

재료 및 방법

해조류 - 해조류들은 96년도 3월에서 8월 사이에 제주 및 남해안 연안에서 채취하여 제주대학교에서 동결하였고, 수돗물을 이용하여 잘 세척한 후 통풍이 잘되는 그늘에서 건조하고 믹서를 이용하여 잘게 부순 후 사용하기 전까지 -20℃의 냉동고에 보관하였다. 또한 이들의 증거표본은 대전산업대학교 공업화학학과 생약표본실에 보관되어 있다(Table I).

생약 - 본 실험에 사용한 생약들은 유진약농, 일원약업사, 그리고 안성농협에서 구입하여 감별한 후

사용하였으며, 증거표본은 대전산업대학교 공업화학학과 생약표본실에 보관되어 있다(Table II).

해조류 및 생약의 MeOH 추출물 제조 - 채취한 해조류 및 생약들의 활성을 측정하기 위한 시료로 만들기 위하여 수돗물을 이용하여 소금기를 제거하는 세척을 하였다. 이후 이 시료들은 그늘에서 통풍이 잘되는 곳에서 건조하였으며 그 기간은 일주일 넘지 않게 하였다. 건조한 해조류들을 대상으로 극성이 비교적 강한 MeOH 용매를 이용하여 MeOH 추출액을 제조하였다. 이 때 시료 8g 정도에 MeOH 120 mL로 12시간 shaker로 흔들어서 추출하였으며, 추출된 MeOH 용액은 Büchner 깔대기를 이용하여 걸러냈고, 남은 해조류는 2회 더 같은 양의 MeOH 및 같은 시간동안 반복 추출하였고, 이후 3번의 추출에 걸쳐 얻은 모든 MeOH 용액은 합쳐서 상온에서 refrigerated bath circulator가 연결된 rotary evaporator를 이용하여 감압건조하여 농축하였으며, 이 시료들은 사용할 때까지 냉동고에서 -20℃에서 보관하였다.

Tyrosinase 억제 효과의 검색 - Tyrosinase 억제 효과는 dopachrome 방법¹⁾ 이용하여 측정하

Table I. Tyrosinase inhibition by methanol extracts of sea weeds

Species	Collection site	Inhibition %	Voucher Specimen
<i>Enteromorpha compressa</i> (납작파래)	보길도	53	BG-01
<i>Sargassum fulvescens</i> (모자반)	"	4	BG-02
<i>Enteromorpha linza</i> (잎파래)	"	30	BG-03
<i>Codium fragile</i> (청각)	"	11	BG-05
<i>Hizikia fusiformis</i> (뚝)	"	24	BG-06
<i>Scytosiphon lomentaria</i> (고리매)	고흥	11	GH-01
<i>Enteromorpha intestinalis</i> (창자파래)	"	0	GH-02
<i>Ishige sinicola</i> (넙패)	완도	7	WD-01
<i>Capsosiphon fulvescens</i> (매생이)	"	21	WD-02
<i>Gloiopeltis tenax</i> (참불가사리)	"	18	WD-03
<i>Carpopeltis affinis</i> (까막살)	제주 귀덕	0	GD-02
<i>Gracilaria arcuata</i> (꼬시래기)	"	5	GD-03
<i>Sargassum siliquastrum</i> (파배기모자반)	"	4	GD-04
<i>Sargassum horneri</i> (팽생이모자반)	"	0	GD-05
<i>Undaria pinnatifida</i> (미역)	"	7	GD-21
<i>Laurencia nipponica</i> (큰서실)	"	8	GD-22
<i>Corallina officinalis</i> (작은구슬산호말)	"	0	GD-23
<i>Sargassum singgildianum</i> (큰잎모자반)	제주 성산	50	SS-10
<i>Codium contractum</i> (몽우리청각)	"	0	SS-04
<i>Podium contractum</i> (부챗말)	"	0	SS-05
<i>Phyllymrnia oparia</i> (명주도말)	제주시	0	CH-02
<i>Amphiroa brevianiceps</i> (부채게말)	"	0	CH-07
<i>Carpopeltis angusta</i> (붉은뺨까막살)	"	0	CH-06

Table II. Tyrosinase inhibition by the methanol extracts of herbal plants

Species	Herbal Medicine	Inhibition %	Voucher specimen
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (지모)	Anemarrhenae Rhizoma	4	HS-218
<i>Anthriscus sylvestris</i> (전호)	Peucedani Radix	0	HS-220
<i>Asparagus cochinchinensis</i> (천문동)	Asparagi Radix	12	HS-226
<i>Atractylodes japonica</i> (창출)	Atractylis Rhizoma	100	HS-228
<i>Cinnamomum japonicum</i> (계피)	Cinnamomi Cortex	47	HS-235
<i>Citrus aurantium</i> (진피)	Auranti Pericarpium	100	HS-310
<i>Coptis japonica</i> (황련)	Coptidis Rhizoma	40	HS-240
<i>Cornus officinalis</i> (산수유)	Corni Fructus	28	HS-311
<i>Cyperus rotundus</i> (향부자)	Cyperi Rhizoma	11	HS-244
<i>Ephedra sinica</i> (마황)	Ephedrae Herba	96	HS-247
<i>Forsythia suspensa</i> (연교)	Forsythiae Fructus	54	HS-252
<i>Gardenia jasminoides</i> (치자)	Gardeniae Fructus	36	HS-253
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (감초)	Glycyrrhizae Radix	52	HS-258
<i>Magnolia obovata</i> (후박)	Magnoliae Cortex	3	HS-266
<i>Ophiopogon japonicus</i> (백문동)	Opiopogonis Tuber	0	HS-312
<i>Panax ginseng</i> (인삼)	Ginseng Radix	27	HS-272
<i>Phellodendron amurense</i> (황백)	Phellodendri Cortex	41	HS-274
<i>Pinnelia ternata</i> (반하)	Pinnelliae Tuber	100	HS-276
<i>Poncirus trifoliata</i> (지실)	Poncri Fructus	15	HS-282
<i>Prunus armeniaca</i> (행인)	Armeniaca Semen	33	HS-313
<i>Pueraria thunbergiana</i> (갈근)	Puerariae Radix	25	HS-287
<i>Scripus fluviatilis</i> (삼릉)	Scirpus Rhizoma	26	HS-297
<i>Tricosanthes kirilowii</i> (팔루근)	Trichosanthis Radix	13	HS-302

였다. 150 μ l의 mushroom tyrosinase(150 unit) (Sigma Chemical Co.), 225 μ l(2.5 mM)의 L-tyrosine, 225 μ l의 0.4 M HEPES buffer(pH 6.8), 그리고 300 μ l의 ethanol 용액 혹은 시료(1 mg/ml) 용액을 섞은 후 배양 전과 15분간 배양을 한 후 475 nm에서 흡광도를 각각 측정하여 억제되는 정도를 살폈다. 이 때 사용한 분광광도계는 Hewlett Packard사의 Model HP8452 diode array spectrophotometer였다. Tyrosinase의 억제정도는 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition(\%)} \\ = (D - C) - (B - A) / (D - C) \times 100$$

A와 B는 각각 시료를 가지는 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액(기준 용액)의 배양 전과 배양 후의 흡광도이다. 이들 tyrosinase억제효과는 100으로 나타날 때 완전한 억제를 의미하며, 0일 때 전혀 억제를 하지 못하는 것을 의미한다.

활성물질의 용매 분획 - 활성을 가지는 MeOH 추출물은 MeOH-hexane(1:2) 용매를 이용하여 hex-

ane에 녹는 비극성 물질을 제거한다. MeOH에 잘 녹는 물질들은 다시 30% MeOH-chloroform(1:1)의 용매 분획을 이용하여 분리하고 이들 두 용매 층에 분리된 물질들의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

해조류 추출물의 tyrosinase 억제효과 - 제주도 및 남해안 연근해에서 채취한 23종의 해조류들의 methanol 추출물들에 대하여 tyrosinase의 억제 활성을 알아보았다. Table I에 나타난 바와 같이 보길도에서 채취한 납작파래(*Enteromorpha compressa*)와 제주도 성산에서 채취한 큰잎모자반(*Sargassum singgildianum*)이 비교적 강한 tyrosinase 억제활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이외에는 잎파래(*Enteromorpha linza*), 툯(*Hizikia fusiformis*), 매생이(*Capsosiphon fulvescens*) 그리고 참불가사리(*Gloiopeltis tenax*) 등이 비교적 미약한 활성을 보였다. 이외의 해조류들은 큰 활성을 보여주지 못하였다.

생약원료 추출물의 tyrosinase 억제효과 - 생약의

methanol 추출물들에 tyrosinase의 억제활성을 알아보았다. Table II에서 알 수 있듯이 마황(*Ephedra sinica*), 반하(*Pinnelia ternata*), 창출(*Atractylodes japonica*), 진피(*Citrus aurantium*) 등이 아주 강력한 tyrosinase 억제효과를 보여주었다. 이외에도 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 계피(*Cinnamomum japonicum*), 연교(*Forsythia suspensa*), 황련(*Coptis japonica*), 황백(*Phellodendron amurense*), 치자(*Gardenia jasminoides*) 등이 어느 정도의 활성을 보여주었으며, 나머지 생약원료들은 큰 활성을 보여주지 못하였다.

용매분획의 활성 - 강력한 활성을 가지는 몇 가지의 해조류 및 생약원료들에 대하여 MeOH 추출물질을 다시 MeOH와 Hex(1:2)의 용매를 이용하여 hexane에 녹는 지방산 등의 비극성물질을 제거하고 MeOH에 녹는 물질들 다시 30% MeOH 용매와 chloroform(1:1)을 이용하여 분획을 하여 활성을 비교하였다(Table III). Table III에서 보는 바와 같이 해조류인 납작파래와 큰잎모자반의 경우에는 극성이 다른 용매를 이용하여 나누어 보아도 그리 우수한 tyrosinase 억제물질의 존재를 알수 없었다. 반면에 마황, 창출, 반하, 질피 등은 모두 비교적 극성이 셀 30% MeOH 용매로 활성물질이 분배되는

Table III. Tyrosinase inhibition of some medicinal plants by the chloroform fraction and aqueous 30% methanol fraction

Species	Fraction or compound	Inhibition %
<i>Enteromorpha compressa</i> (납작파래)	30% MeOH	40
	chloroform	36
<i>Sargassum singgildianum</i> (큰잎모자반)	30% MeOH	34
	chloroform	20
<i>Ephedra sinica</i> (마황)	30% MeOH	100
	chloroform	20
	ephedrin	3
<i>Atractylodes japonica</i> (창출)	adrenalin	2
	30% MeOH	100
	chloroform	31
<i>Pinnelia ternata</i> (반하)	eudesmol	0
	30% MeOH	86
<i>Citrus aurantium</i> (진피)	chloroform	12
	homogentisic acid	0
<i>Citrus aurantium</i> (진피)	30% MeOH	75
	chloroform	2

것을 알 수 있었다. 또한 마황의 주성분으로 알려진 ephedrin, 창출의 주성분 중의 하나인 eudesmol, 반하의 주성분 중의 하나인 homogentisic acid, 그리고 진피의 주성분으로 알려진 hesperetin등이 모두 tyrosinase 억제활성을 보여주지 못하는 것을 보았을 때 이들에 함유되어 있는 tyrosinase 억제제는 기존에 알려져 있는 주성분들과는 다른 새로운 물질일 가능성이 높다고 판단된다.

결론

해조류들을 대상으로 tyrosinase 억제효과를 살펴본 바에 의하면 이들이 아주 강력한 tyrosinase 억제활성을 보이는 것을 찾을 수는 없었으나 tyrosinase를 비교적 억제한다고 볼 수 있는 물질들은 납작파래와 큰잎모자반이었다. 이들 두 종류의 해조류들은 tyrosinase를 억제하는 물질들이 알려진 것이 전혀 없는 상태인데 활성물질을 분리하기 위하여 용매로 분획을 얻어 보았으나 활성이 나누어지는 경향을 보였다. 이는 이들 해조류들이 두 가지 성분 이상의 활성물질을 가지고 있는 것이 아닌가 추측된다. 이에 따라 활성성분의 분리 및 정제는 좀 더 구체적으로 연구되어야 하겠다.

한약재로 쓰이는 많은 생약원료들에 대하여서도 tyrosinase 억제활성을 검색하여 보았다. 이들의 경우에는 해조류들보다 비교적 억제 활성이 우수한 물질들이 많이 존재하였으며, 이들 중에도 특히 마황, 반하, 창출, 진피 등이 아주 강력한 활성을 보여주었다. 이들의 경우에도 활성성분을 찾아내기 위한 분리 및 정제를 시도하였으나 아직까지 완벽한 활성물질의 분리가 이루어지지 않는 상태이다. 현재 진행 중이다. 활성물질이 기존에 이들 한약재에 존재하는 물질들 인지를 확인하기 위하여 몇 가지 알려진 표준물질들을 이용하여 tyrosinase 억제활성을 검색하여 보았으나 모든 표준물질이 전혀 활성을 보이지 않는 것을 알 수 있었다. 이에 따라서 활성을 보이는 물질은 새로운 물질일 가능성이 높으며 용매분획(solvent partition) 연구결과 이들 모두는 chloroform 정도의 극성을 가지는 유기용매 보다는 methanol과 같은 극성이 강한 용매에 잘 녹는 비교적 극성이 강한 물질이라고 여겨진다.

사 사

본 논문은 1995년도 과학재단 연구기시험연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드리며, 해조류의 동정을 도와주신 제주대학교 생물학과의 이용필 교수님에게도 감사드립니다.

인용문헌

- Hearing Jr., V. J. (1987) Mammalian monophenol monooxygenase (Tyrosinase): purification, properties, and reaction catalyzed. *Method in Enzymology* 142: 154-165 and references therein.
- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5: 2902-2909.
- Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V., Lezano, J. and Garcia-Gorreni, J. C. (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 17993-18001.
- Kubo, I. and Yokokawa, Y. *Phytochemistry* (1992) Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*. 31: 1075-1077.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Ishiguro, K., Chaudhuri, S. K., Sanchez, Y. and Ogura, T. (1994) Tyrosinase inhibitory flavonoids from *Heterotheca inuloides* and their structural functions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 1443-1446.
- Kubo, I., Yokokawa, Y. and Kinst-Hori, I. (1995) Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. *J. Nat. Prod.* 58: 739-743.
- Ohyama, Y. and Mishima, Y. (1993) Isolation and characterization of high molecular weight melanogenic inhibitors naturally occurring in melanoma cells. *Pigm. Cell Res.* 6: 7-12.
- Imokawa, G. and Mishima, Y. (1981) Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br. J. Dermatol.* 104: 531-539.
- Imokawa, G. and Mishima, Y. (1980) Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors and their differential action on melanogenic subcellular compartments in amelanotic and melanotic melanomas. *Br. J. Dermatol.* 103: 625-633.
- Akiu, S., Suzuki, Y., Asahara, T., Fujinuma, Y. and Fukuda, M. (1991) Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis-biochemical study using cultured B16 melanoma cells. *Jpn. J. Dermatol.* 101: 609.
- Kumar, M. and Flurkey, W. H. (1991) Activity, isoenzymes and purity of mushroom tyrosinase in commercial preparations. *Phytochemistry* 30: 3899-3902.
- Morita, H., Kayashita, T., Kobata, H., Gonda, A., Takeya, K. and Itokawa, H. (1994) Pseudostellarin D-F, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*. *Tetrahedron* 50: 9975-9982.
- Morita, H., Kayashita, T., Takeya, K. and Itokawa, H. (1995) Pseudostellarin H, A new cyclic octapeptide from *Pseudostellaria heterophylla*. *J. Nat. Prod.* 58: 934-947 and the references therein.
- Kawagishi, H., Somoto, A., Kuranari, J., Kimura, A. and Chiba, S. (1993) A novel cyclo-tetrapeptide produced by *Lactobacillus helveticus* as a tyrosinase inhibitor. *Tetrahedron Lett.* 34: 3439-3440.

(1998년 7월 28일 접수)