약학회지 제 45 권 제 5 호 522~528 (2001)
Yakhak Hoeji Vol. 45, No. 5

천연물로부터 티로시나제 활성 저해제의 검색

최상숙# · 노향순 · 조성희 · 공광훈#
중앙대학교 자연과학대학 화학과
(Received July 13, 2001; Revised August 21, 2001)

Screening of Inhibitors against Tyrosinase Activity from Natural Products

Sang-Sook Choi#, Hyang-Soon Noh, Sung-Hee Cho and Kwang-Hoon Kong#
Department of Chemistry, College of Natural Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — Tyrosinase plays an important role in the process of melanin biosynthesis, and it is a biochemical target enzyme for skin-whitening agents and the remedy for disturbances in pigmentation. We have screened 25 natural plant extracts for inhibitory effects against DOPA oxidase activity of tyrosinase. For the inhibitory effect against DOPA oxidase activity of tyrosinase, the recombinant human tyrosinase and the purified mushroom tyrosinase were used. Each of the dried plants extracted with methanol, and then the extracts were subjected to sequential fractionations with methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol and water, respectively. The methylene chloride fractions of *Angelica tenuissima, Nardostachys chinensis, Bombyx mori* and *Saposhnikovia divaricata*, and the *n*-butanol fraction of *Bombyx mori* notably inhibited the human tyrosinase activity as well as mushroom tyrosinase activity (more than 90% inhibition). This study suggests that the above extracts have a potential as whitening agents as single ingredients or in combination with other of the extracts.

Keywords □ Tyrosinase, natural products

오늘날 산업이 발달함에 따라 환경오염이 심각해지면서 이로 인해 오존층이 파괴되어 지표면에 도달하는 자외선의 양이 많아지고 있다. 오존층 파괴로 인한 자외선 증가는 피부 노화와 주름을 가속화시키고 각종 피부암 유발, 면역 체계 파괴로 저항력 약화 등 건강에 피해를 주고 있다.[1] 일광중의 자외선은 우리 몸으로 직접 감지 할 수는 없지만 자외선이 피부에 침투되면서 비타민 D가 합성되어 칼슘의 흡수를 도와 골격과 치아 발육을 촉진하고, 비타민 A의 상승 효과와 살균 소독 작용 등의 역할을 하는 반면, 피부에 화상, 기미, 주근깨 등 색소 침착, 피부 노화, 심하게는 피부암까지도 유발할 수 있다.[2] 이러한 자외선의 작용으로 피부에 생기는 기미와 주근깨 등의 색소 침착은 표피내의 멜라닌 색소의 증가에 기인한다.[3] 피부의 색소 침착은 멜라닌 합성 세포인 멜라노사이트(melanocyte)에서 멜라닌 색소의 과잉 생산에 따른 멜라닌 색소의 피부 침착에 기인한다.[1] 멜라닌 색소는 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트라는 세포에서 효소 및 비효소적 산화반응에 의해 tyrosinase로부터 생성되며 표피를 구성하고 있는 각질 세포로 전이된다. 멜라닌의 생합성은 L-tyrosine이 tyrosinase에 의해 hydroxylation 반응을 거쳐 3,4-dihydroxyindolephenyalanine(L-DOPA)로 전환되고 이것이 다시 phenylalanine-3,4-quinone(dopaquinone)으로 oxidation되며, 그런 후 dopachrome, indole-5,6-quinone 등의 여러 중간체를 거쳐 멜라닌이 합성된다.[4] 따라서, 멜라닌 색소의 생합성 과정에 관여하는 tyrosinase는 피부를 갈

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5205 (팩스) 02-825-4736

색으로 변화시키는 현상과 밀접한 관계가 있다.

Tyrosinase(monophenol monooxygenase, EC 1.14. 18.1)는 거의 모든 생물 종에 분포되어 있으며,[5] 활성부위에 한 쌍의 구리이온을 함유하고 있는 금속함유 단백질(metalloprotein)이다.[6] 이 효소는 monohydroxyphenol을 *o*-dihydroxyphenol로 hydroxylation시키는 반응(tyrosine hydroxylase activity)과 *o*-dihydroxyphenol을 *o*-quinone으로 oxidation시키는 반응(DOPA oxidase activity)을 촉매한다.[7] Tyrosinase의 생체내 주요 기능은 앞에서 설명한 바와 같이 멜라닌 생합성에 있어 속도결정 단계를 조절하는 효소이다.[4] 이 기능은 질병과 밀접한 관련성이 있다. 동물에 있어서 멜라닌(melanin)합성의 이상에 따라 백반과 색소침착 과도와 같은 비정상적인 멜라닌 착색을 유발하며, 나아가서 피부암을 유발하기도 한다.[8] 이러한 이유로 멜라닌 착색의 이상을 치료하기 위한 새로운 의약품과 미백 효과를 목표로 하는 기능성 화장품의 개발을 위해 tyrosinase 저해제의 연구는 핵심요소이다.

본 연구에서는 천연물로부터 tyrosinase의 효소 활성을 억제하는 기능이 있는 미백 물질을 확인 · 분리하고자 동의보감과 한국민간요법대전 및 민간의약 등에서 미백 효과가 있는 것으로 알려진 전통의 천연물 25종을 대상으로 tyrosinase에 대한 억제 활성을 검색하였다. 특히 본 연구에서는 억제 활성 검색에 mushroom tyrosinase만을 사용하는 이전의 방법과는 달리 human tyrosinase에 대한 억제 활성을 조사하고, human tyrosinase와 mushroom tyrosinase에 대한 억제 활성을 비교 · 검토함으로써 유력한 후보물질을 찾고자 하였다.

실험방법

실험재료 – 검색에 사용한 25종의 천연물은 한국수출입협회 백완숙 박사로부터 감정을 받아 사용하였고, 천연물의 학명과 사용한 부위를 Table I에 나타내었다. 천연물시료 약 100 g을 80% methanol 200 ml로 실온에서 24시간 침적하여 추출한 후 여과하였다. 위와 같은 방법을 1회 더 실시한 후 여과액을 합하여 감압농축하였다. 각 추출물들을 methylene chloride, ethyl

Table I – Natural plants and part of use used in this study

	이 름	학 명	사용한 부분
1.	백부자	*Aconitum koreanum* Raymond	덩이 뿌리
2.	사인	*Amomum xanthioides* Wallich	과실
3.	백렴	*Ampelopsis japonica* Makino	덩이 뿌리
4.	백지	*Angelica dahurica* Bentham. et Hooke	뿌리
5.	고본	*Angelica tenuissima* Nakai	뿌리 줄기 및 뿌리
6.	감송향	*Nardostachys chinensis* Batal	뿌리줄기 및 뿌리
7.	천문동	*Asparagus cochinchinensis* Merrill	코르크 층을 벗긴 덩이 뿌리
8.	동과자	*Benincasa hispida* Cogniaux	씨
9.	백급	*Bletilla striata* Reichenbach fil.	덩이 줄기
10.	백강잠	*Bombyx mori* Linne	유충이 백강병으로 경직사한 충체
11.	저실자	*Broussonetia kazinoki* Siebold	여문 열매
12.	승마	*Cimicifuga heracleifolia* Komarov	뿌리 줄기
13.	원화	*Daphne genkwa* Siebold et Zuccarini	꽃봉오리
14.	진교	*Gentiana macrophylla* Pallas	뿌리
15.	조협(조각)	*Gleditsia japonica* Miquel var. koriensis Nakai	열매
16.	방풍	*Saposhnikovia divaricata* Schiskin	뿌리 및 뿌리 줄기
17.	익모초	*Leonurus sibiricus* Linne	꽃 지상부
18.	영릉향	*Lysimachia foenum-graecum* Hance	전초
19.	반하	*Pinellia temata* Breitenbach	코르크층을 제거한 덩이 줄기
20.	복령	*Poria cocos* Wolf	균핵
21.	도인	*Prunus persica* Batsch	씨
22.	과루근	*Trichosanthes kiriowii* Maximowicz	뿌리
23.	과루인	*Trichosanthes kiriowii* Maximowicz	씨
24.	하엽	*Nelumbo nucifera* Gaertner	잎
25.	산내	*Kaempferia galanga* L.	뿌리 줄기

acetate, *n*-butanol로 용매 추출하여 4가지 분획으로 나누었다. 먼저, methanol 추출물을 물에 현탁시킨 후 동량의 methylene chloride로 진탕 추출하여 methylene chloride 가용 분획을 얻었다. 물층은 다시 동량의 ethyl acetate로 추출하여 ethyl acetate 가용 분획을 얻었고, 다시 물층을 취하여 동량의 *n*-butanol로 추출하여 *n*-butanol 가용 분획을 얻고 나머지를 물 가용 분획으로 하였다. 각 분획을 감압 · 농축한 다음 95% ethanol에 녹여 각각의 시험액을 만들고, tyrosinase 효소 활성 억제의 검색에 사용하였다.

시약 및 기기 – L-dihydroxyphenylalanine(L-Dopa)과 Tris[hydroxymethy]aminomethane은 Sigma 제품을 사용하였다. Methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol은 Duksan Pure Chemical 제품을 사용하였다. Spectrophotometer는 JASCO V-550 UV/VIS를, 냉동원심분리기는 한일HMVC-250 IV를, 초음파 파쇄기는 Ultrasonic사의 High Intensity Ultrasonic Processor를 사용하였다.

재조합 Human tyrosinase의 발현 및 정제 – 본 연구에서는 human tyrosinase cDNA를 이용하여 polyhistidine sequence와 융합단백질로 발현시켜 metal binding resin에 의해 간단히 정제 가능한 발현벡터 pTrcHis에 재조합시킨 대장균 발현벡터 pHis-hTyr[9]를 이용하여 대장균에서 발현하였다. Expression vector pTrcHis와 human tyrosinase 유전자를 재조합시킨 발현벡터 pHis-hTyr로 형질 전환시킨 대장균을 ampicillin이 포함된 LB broth배지에서 약 2시간정도 37°C에서 배양한 후, OD_{600}이 0.4~0.5정도 되었을 때 발현유도체인 isopropyl β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 투여하였다. 계속해서 8~10시간 정도 배양한 후, 8000 g로 10분간 원심분리하여 균을 집균하였다. 20 mM potassium phosphate buffer (pH7.0)로 균을 균질화하고 초음파 파쇄기로 균을 파괴하고 20000 g로 60분간 원심분리시킨 상층액에 대해 metal binding resin을 가한 후, 4°C에서 30분간 흔들어 주면서 metal binding resin에 발현된 polyhistidine배열을 포함하는 융합단백질을 흡착시켰다. 원심분리를 하여 흡착된 겔을 모은 다음, 불필요한 단백질을 제거하기 위해 native wash buffer로 세척하고 cleavage buffer로 다시 세척하였다. Resin을 enterokinase cleavage buffer에 균질화 시킨 다음, enterokinase을 가하여 융합 단백질을 절단하였다. 원심분리를 통해 상층액을 취하여 정제된 재조합 human tyrosinase를 대량으로 얻었다. 이렇게 정제된 효소들은 순수도의 정도는 SDS-PAGE에 의해 확인하였다.

Mushroom tyrosinase 추출 및 정제 – 버섯으로부터 tyrosinase를 추출하고 정제하는 방법은 저자 등이 이미 확립한 방법을 혼합하여 사용하였다.[10-12] 양송이 버섯(*Agaricus bitorquis*)을 polyethyene glycol 6000을 포함한 20 mM potassium phosphate buffer (pH7.0) buffer에서 안정화시킨 후, 믹서기와 homogenizer를 이용하여 세포를 파괴하고 여과하였다. 여과액을 100000 g 60분동안 원심분리하고 상층액을 DEAE-Sephacel column chromatography와 Mono Q column chromatography를 이용하여 정제한 후, 이것을 효소 활성 억제 측정에 사용하였다.

Tyrosinase의 효소 억제 활성 측정(Dopa oxidase 억제 활성) – 효소의 활성도는 *L*-Dopa의 갈변 생성물인 dopachrome이 생성되는 것을 475 nm에서 측정하였다.[9,10] 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 720 μl을 시험관에 넣어 37°C를 유지시키고 20 mM L-Dopa 190 μl와 효소액 50 μl, plant 추출물 40 μl(최종농도 100 μg/ml)을 가하고 잘 혼합하여 475 nm에서 3분 동안 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 plant 추출물을 넣지 않고 측정한 것을 control로 하였다. 그런 후 control의 효소 활성을 100으로 보았을 때 control과 비교하여 각각의 효소 활성을 %로 나타내었다.

$$\text{Relative 활성도(\%)} = \frac{\text{Sample의 활성도}}{\text{Control의 활성도}} \times 100$$

실험결과 및 고찰

재조합 human tyrosinase의 대량발현 및 정제

발현벡터 pHis-hTyr로 형질전환시킨 대장균을 ampicillin이 포함된 LB broth배지에서 약 2시간정도 37°C에서 배양하였고, OD_{600}이 0.4에서 유도제인 IPTG를 1 mM 투여하였을 때 단백질이 가장 많이 유도되었다. 또한 IPTG를 투여한 후, 3시간 정도 배양하였을 때가 목적 단백질의 발현 양이 가장 적절하였다. 재조합 human tyrosinase는 세포질 단백질의 약 5% 정도로 대량 발현을 하였으나, 불행하게도 대부분이 불활성체로 발현되었다. 이를 해결하기 위해 각종 배양 조건을 검토한 결과, 30°C에서 1 mM IPTG로

유도하였을 때, 활성형 효소를 최대한 얻을 수 있었다. 한편 DEAE-Sephacel chromatography와 immobilized metal affinity chromatography를 이용하여 정제한 결과, SDS-PAGE에서 문헌[13]에서 보고한 크기와 일치하는 분자량 66000의 단일 밴드를 확인 할 수 있었다. 정제된 재조합 human tyrosinase의 기질 L-DOPA에 대한 비활성(specific activity)은 25 units/mg이었다.

Mushroom tyrosinase의 정제

*Agaricus bitorquis*로부터 DEAE-Sephacel과 Mono Q column chromatography를 사용하여 mushroom tyrosinase를 정제하였다. 정제된 mushroom tyrosinase는 분자량 27000의 subunit로 구성된 homotetramer이었다. 이 정제된 효소의 활성은 pH7.0에서 가장 높았으며, L-DOPA를 비롯한 catechin, catechol, resorcinol 및 pyrogallol에 대해 높은 기질 특이성을 보였다. 정제된 mushroom tyrosinase의 기질 L-DOPA에 대한 비활성은 85 units/mg이었으며, 이 정제된 재조합 효소는 저해 활성 실험에 사용하였다.

Tyrosinase 억제 활성 연구

백부자 등 25종의 천연물의 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol 및 물 가용 분획 추출물에 대하여 앞에서 정제한 재조합 human tyrosinase와 mushroom tyrosinase의 효소 활성 억제 효과에 대하여 검색하였다.

Human tyrosinase의 효소 활성 억제 효과 시험에서는 control을 100으로 보았을 때 methylene chloride 가용 분획의 경우 고본, 감송향, 백강잠, 승마, 방풍, 복령, 과루근 및 과루인은 50% 이상의 저해 활성을 나타내었다(Table II). 특히 이들 중 고본, 감송향, 백강잠 및 방풍의 추출물은 90% 이상의 저해 활성을 보

Table II – Inhibitory activities of solvent extracts on the human tyrosinase *in vitro*

	Plants		Relative activity (%)			
			M.C.	EtOAc	*n*-BuOH	H_2O
		Control	100	100	100	100
1.	백부자	*Aconitum koreanum*	-44 ± 3	79 ± 8	37 ± 2	24 ± 1
2.	사인	*Amomum xanthioides*	-37 ± 2	227 ± 17	37 ± 2	120 ± 7
3.	백렴	*Ampelopsis japonica*	64 ± 4	223 ± 5	49 ± 3	273 ± 18
4.	백지	*Angelica dahurica*	-44 ± 3	82 ± 3	72 ± 7	13 ± 3
5.	고본	*Angelica tenuissima*	0.3 ± 0.1	15 ± 1	105 ± 6	68 ± 8
6.	감송향	*Nardostachys chinensis*	7 ± 1	279 ± 19	268 ± 5	184 ± 5
7.	천문동	*Asparagus cochinchinensis*	303 ± 12	241 ± 19	190 ± 5	209 ± 10
8.	동과자	*Benincasa hispida*	87 ± 5	76 ± 3	61 ± 5	45 ± 2
9.	백급	*Bletilla striata*	-5 ± 2	15 ± 2	95 ± 9	145 ± 5
10.	백강잠	*Bombyx mori*	6 ± 1	17 ± 3	4 ± 0.1	13 ± 1
11.	저실자	*Broussonetia kazinoki*	83 ± 3	218 ± 18	195 ± 2	167 ± 10
12.	승마	*Cimicifuga heracleifolia*	32 ± 1	-37 ± 3	45 ± 1	218 ± 15
13.	원화	*Daphne genkwa*	176 ± 9	8 ± 1	106 ± 3	45 ± 5
14.	진교	*Gentiana macrophylla*	N.D.	42 ± 3	93 ± 12	72 ± 3
15.	조협(조각)	*Gleditsia japonica*	88 ± 7	-14 ± 2	91 ± 9	71 ± 8
16.	방풍	*Saposhnikovia divaricata*	0.4 ± 0.1	370 ± 28	279 ± 17	8 ± 1
17.	익모초	*Leonurus sibiricus*	252 ± 10	218 ± 4	253 ± 13	97 ± 4
18.	영릉향	*Lysimachia foenum-graecum*	241 ± 8	76 ± 2	123 ± 2	108 ± 6
19.	반하	*Pinellia temata*	345 ± 19	254 ± 9	279 ± 7	128 ± 10
20.	복령	*Poria cocos*	19 ± 2	57 ± 2	101 ± 2	718 ± 16
21.	도인	*Prunus persica*	-99 ± 5	-7 ± 0.1	410 ± 22	430 ± 18
22.	과루근	*Trichosanthes kiriowii*	48 ± 3	67 ± 4	70 ± 3	6 ± 1
23.	과루인	*Trichosanthes kiriowii*	15 ± 2	90 ± 6	83 ± 6	69 ± 7
24.	하엽	*Nelumbo nucifera*	146 ± 4	45 ± 5	42 ± 2	176 ± 14
25.	산내	*Kaempferia galanga*	-13 ± 1	125 ± 3	227 ± 19	45 ± 1

N.D., Not determined. Values are Means ± S.D., generally based on n ≥ 5.

였다. 반면에 천문동, 익모초, 영릉향 및 반하 등은 전혀 저해 활성이 없었다. 오히려 이들 추출물의 첨가는 human tyrosinase 효소 활성의 큰 증가(250% 이상)를 초래하였다. 이러한 효소 활성의 증가 현상은 천연물의 추출물에 기질인 L-DOPA와 그의 유도체들이 농축에 기인하는 것 같다.

Ethyl acetate 가용 분획에서는 고본, 백급, 백강잠 및 원화의 추출물에서 약 80% 이상의 저해 활성을 나타내었다. 반면에 사인, 백렴, 감송향, 천문동, 저실자, 방풍, 익모초 및 반하의 추출물은 저해 활성은 없으며, 오히려 약 2~3배 효소 활성을 증가시켰다.

또한, *n*-butanol 가용 분획에서는 감송향, 천문동, 저실자, 방풍, 익모초, 반하, 도인 및 삼내자는 활성이 없었다(Table II). 그러나 백부자, 사인, 백렴, 승마 및 하엽의 추출물은 약 50% 이상의 저해 활성을 나타내었다. 특히 백강잠의 추출물은 96%의 강한 저해 활성을 보였다. 물 가용 분획에서는 백부자, 백지, 백강잠, 방풍 및 과루근의 추출물은 약 80% 이상의 저해 활성을 보인 반면에 동과자, 원화 및 삼내자는 약 55%의 저해 활성을 나타내었다. 그러나 백렴, 감송향 ,천문동, 저실자, 승마, 복령, 도인 및 하엽은 활성이 없었고, 특히 복령과 도인의 추출물은 효소 활성을 약 4~7배 크게 증가시켰다.

이상의 결과로부터 human tyrosinase에 대한 좋은 저해 활성은 감송향, 고본, 방풍 및 백강잠의 methylene chloride 가용 분획에서, 원화의 ethy acetate 가용 분획에서, 백강잠의 *n*-butanol 가용 분획에서, 과루근과 방풍의 물 가용 분획에서 나타내었다.

한편, mushroom tyrosinase의 효소 활성 억제 효과 시험에서도 human tyrosinase에서와 마찬가지로 control을 100으로 보았을 때 각각의 억제 효과를 검색해 보았다(Table III). Methylene chloride 가용 분

Table III – Inhibitory activities of solvent extracts on the mushroom tyrosinase *in vitro*

	Plants		Relative activity (%)			
			M.C.	EtOAc	*n*-BuOH	H_2O
		Control	100	100	100	100
1.	백부자	*Aconitum koreanum*	131 ± 13	81 ± 6	92 ± 2	125 ± 5
2.	사인	*Amomum xanthioides*	8 ± 1	95 ± 8	71 ± 3	107 ± 6
3.	백렴	*Ampelopsis japonica*	120 ± 11	51 ± 3	44 ± 2	71 ± 7
4.	백지	*Angelica dahurica*	-4 ± 1	26 ± 2	100 ± 13	95 ± 6
5.	고본	*Angelica tenuissima*	4 ± 1	10 ± 1	128 ± 12	14 ± 1
6.	감송향	*Nardostachys chinensis*	10 ± 2	91 ± 4	80 ± 9	102 ± 12
7.	천문동	*Asparagus cochinchinensis*	88 ± 5	88 ± 3	85 ± 6	155 ± 4
8.	동과자	*Benincasa hispida*	18 ± 3	139 ± 18	77 ± 8	118 ± 7
9.	백급	*Bletilla striata*	37 ± 4	6 ± 4	89 ± 6	117 ± 7
10.	백강잠	*Bombyx mori*	3 ± 1	0.6 ± 0.1	3 ± 1	0.6 ± 0.1
11.	저실자	*Broussonetia kazinoki*	86 ± 6	148 ± 7	20 ± 1	190 ± 8
12.	승마	*Cimicifuga heracleifolia*	4 ± 1	63 ± 7	18 ± 3	157 ± 7
13.	원화	*Daphne genkwa*	42 ± 4	53 ± 2	117 ± 6	113 ± 4
14.	진교	*Gentiana macrophylla*	N.D.	118 ± 4	133 ± 10	143 ± 9
15.	조협(조각)	*Gleditsia japonica*	37 ± 5	16 ± 2	149 ± 15	29 ± 6
16.	방풍	*Saposhnikovia divaricata*	6 ± 2	101 ± 6	77 ± 3	81 ± 3
17.	익모초	*Leonurus sibiricus*	78 ± 8	91 ± 3	80 ± 3	95 ± 5
18.	영릉향	*Lysimachia foenum-graecum*	82 ± 6	191 ± 5	71 ± 5	207 ± 8
19.	반하	*Pinellia temata*	66 ± 4	88 ± 7	90 ± 8	82 ± 1
20.	복령	*Poria cocos*	12 ± 2	77 ± 6	162 ± 7	208 ± 17
21.	도인	*Prunus persica*	-78 ± 7	2 ± 1	24 ± 6	24 ± 1
22.	과루근	*Trichosanthes kiriowii*	107 ± 9	126 ± 19	118 ± 9	107 ± 4
23.	과루인	*Trichosanthes kiriowii*	74 ± 3	88 ± 3	67 ± 2	70 ± 9
24.	하엽	*Nelumbo nucifera*	56 ± 2	106 ± 7	106 ± 3	103 ± 3
25.	산내	*Kaempferia galanga*	18 ± 1	86 ± 3	85 ± 3	106 ± 10

N.D., Not determined. Values are Means ± S.D., generally based on n ≥ 5.

획의 경우 사인, 고본 감송향, 동과자, 백강잠, 승마, 방풍, 복령 및 삼내자의 추출물은 약 80% 이상의 저해 활성을 나타내었다. 반면에 백부자, 백렴 및 과루근 등은 전혀 저해 활성이 없었다. Ethyl acetate 가용 분획에서는 고본, 백급, 백강잠, 조협 및 도인의 추출물에서 약 85% 이상의 저해 활성을 나타내었다. 반면에 동과자, 저실자, 진교, 방풍, 영릉향, 과루근 및 과루인 등의 추출물은 저해 활성은 없었다.

또한, *n*-butanol 가용 분획에서는 백지, 고본, 원화, 진교, 조협, 복령, 과루근 및 하엽 등의 추출물은 활성이 없었다. 그러나 저실자, 승마 및 도인의 추출물은 약 75% 이상의 저해 활성을 나타내었다. 특히 백강잠의 추출물은 97%의 강한 저해 활성을 보였다. 물 가용 분획에서는 고본, 백강잠, 조협 및 도인의 추출물에서 좋은 저해 활성을 나타내었다.

이상의 결과로부터 mushroom tyrosinase에 대한 좋은 저해 활성은 감송향, 고본, 방풍, 백강잠, 사인 및 승마의 methylene chloride 가용 분획에서, 고본, 백강잠 및 백급의 ethy acetate 가용 분획에서, 백강잠의 n-butanol과 물 가용 분획에서 나타내었다.

결 론

천연물에서 human tyrosinase와 mushroom tyrosinase의 활성 억제 물질을 검색한 실험 결과를 종합해 보면 다음과 같다.

1. 고본, 감송향, 백강잠 및 방풍의 methylene chloride 가용 분획과 백강잠의 *n*-butanol 가용 분획은 human tyrosinase와 mushroom tyrosinase의 활성을 90% 이상 억제하였다.

2. 백강잠은 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol, 물 가용분획 모두에서 human tyrosinase와 mushroo tyrosinase에 대해 가장 좋은 결과를 나타내었다.

이상으로 미백 활성물질을 검색할 대상 천연물로는 고본, 백급, 백강잠, 원화, 승마, 도인, 사인 및 방풍으로 축소되었으며 현재 이들 천연물의 세포독성 및 단일 물질 분리 등에 대한 연구를 진행 중에 있다.

감사의 말씀

이 연구는 한국학술진흥재단의 00년도 기초과학 연구지원 과제(DP0278) 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1) Pavel, S. : Dynamics of melanogenesis intermediate. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 162S (1993).
2) Gilcherst, B. A., Zhai, S., Eller, M. S., Yarosh, D. B. and Yaa, R. M.: Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 666 (1993).
3) Iwata, M., Corn, T., Iwata, S., Evertte, M. and Fuller, B. B. : The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.* **195**, 9 (1990).
4) Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. : Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902 (1991).
5) Lerch, K. : Amino acid sequence of tyrosinase from *Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3635 (1978).
6) Beltramini, M., Salvato, B., Santamaria, M. and Lerch, K. : The reaction of CN-with the binuclear copper site of Neurospora tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active sites. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 365 (1990).
7) Garcia-Cannona, F., Garcia-Canovas, F., Iborra, J. L. and Lozano, J. A. : Kinetic study of melanization between L-dopa and dopachrome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **717**, 124 (1982).
8) Hearing, V. J. and Jiménez, M. : Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level. *Pigment Cell Res.* **2**, 75 (1989).
9) Kong, K. H., Park, S. Y., Hong, M. P. and Cho, S. H. : Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system. *Comp. Biochem. Phys. B* **43**, 287 (2000).
10) Kong, K. H., Hong, M. P., Choi, S. S., Kim, Y. T. and Cho, S. H. : Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum. Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 113 (2000).
11) Kong, K. H., Lee, J. L., Park, H. J. and Cho, S. H.: Purification and characterization of the tyrosinase

isozymes of pine needles. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**, 717 (1998).

12) Lee, J. L., Kong, K. H. and Cho, S. H. : Purification and characterization of tyrosinase from *Solanum melongena*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 150 (1997).

13) Wittbjer, A., Dahlback, B., Odh, G., Rosengren, A. M., Rosengren, E. and Rorsman, H. : Isolation of human tyrosinase from cultured melanoma cells. *Acta Derm.-Venereol.* (Stockholm) **69**, 125 (1989).