한국생물공학회지 제19권 제6호
*Korean J. Biotechnol. Bioeng.*
Vol. 19, No. 6, 437-440(2004)

# 치자 열매 추출물의 Tyrosinase 효소활성 저해 및 Melanogenesis 억제 효과

곽 정 훈 · 김 용 해 · [1]장 해 룡 · [2]박 철 우 · † 한 영 환
신화제약(주) 연구소, [1]동국대학교 자연과학대학 생명과학과,
[2]동국대학교 대학원 생물학과
(접수 : 2004. 7. 20., 게재승인 : 2004. 12. 3.)

# Inhibitory Effect of Gardenia Fruit Extracts on Tyrosinase Activity and Melanogenesis

Jung-Hoon Kwak, Yong-Hae Kim, Hae-Ryong Chang[1], Chul-Woo Park[2], and Yeong-Hwan Han†
Shin Hwa Pharm. Research Inst., Gyeongju 780-921, Korea
[1]Department of Life Science, College of Natural Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea
[2]Department of Biology, Graduated School, Dongguk University, Seoul 100-714, Korea
(Received : 2004. 7. 20., Accepted : 2004. 12. 3.)

To determine the inhibition of tyrosinase activity and melanogenesis, gardenia fruit was extracted initially with 95% ethanol (w/v). The ethanol extract was fractionated subsequently with hexane, chloroform and ethyl acetate in that order. The inhibitory effect of the ethanol extract on tyrosinase activity was higher than water extract. When 10 mg/mL of ethyl acetate fraction was applied, the inhibition ratio of tyrosinase activity was much higher (99.7 ± 0.1%) than that of arbutin. The inhibition of melanogenesis using B16F10 melanoma cell, the ethanol extract also showed higher inhibitory effect than water extract. The highest inhibitory activity of melanogenesis was also shown in ethyl acetate fraction (89.1 ± 1.4% at the conc. of 100 μg/mL). These results suggests that gardenia extracts might be used to be a potential agents for whitening.

**Key Words** : *Gardenia jasminoides*, inhibition, melanogenesis, tyrosinase

## 서 론

Melanin은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 물질로 자외선, 건조, 극한 온도 등에 대한 생존능력을 높여주지만, 과도한 melanin 생성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯을 형성하고 피부노화를 촉진시키며, 악성 흑색종의 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 식품에서는 채소, 과일, 생선 등의 갈변화 현상을 일으켜 품질을 저하시키는 문제점이 있다(1-3).

Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte의 세포내 melanosome에서 tyrosinase 효소의 연속적 산화반응으로 생합성되어진다. Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1)은 melanin 생합성 과정의 key enzyme으로 페놀화합물을 기질로 이용하는 구리 함유 효소이다(4). Tyrosine은 tyrosinase에 의하여 L-3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine (L-DOPA)로, L-DOPA를 dopaquinone으로 산화가 되고 이것이 다시 5,6-dihydroxy indole, indole 5,6-quinone으로 산화되어 최종적으로 중합에 의해 melanin이 생합성된다(5, 6). 현재 의학계나 화장품업계에서는 melanin 과잉 생성을 억제하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있으며, 지금까지 알려진 tyrosinase의 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid, kojic acid, azelaic acid 등이 있으나, 피부 안전성, 제형 안정성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다(7-9). 특히, 최근에 안전성을 고려하여 상백피(10), 오배자(11), 감초(12), 녹차(13), 석이(14) 등 천연물로부터 tyrosinase 효소활성 저해연구가 활발히 이뤄지고 있으며, 그 중 일부는 제품으로 상용화 되어있다.

치자 (Gardniae Fructus)는 꼭두서니과 (Rubiaceae)에 속하는 치자나무 (*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로, 한방에서 소염, 해열, 이뇨, 지혈, 진정, 이담, 혈압강하제로 사용하여왔

† Corresponding Author : Department of Life Science, College of Natural Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea
Tel : +82-54-770-2213, Fax : +82-54-770-2515
E-mail : yhhan@dongguk.ac.kr

다(15). 치자의 성분은 genipin, geniposide, gardenoside 등의 iridoid 배당체, crocin, croccetin 등의 carotenoid계 성분, gardanin의 flavonoid계 성분과 그 외에 choline, ursolic acid 등을 함유하고 있다(16). 최근 치자에 관한 생리활성 연구로는 항균효과(17)를 비롯하여 항산화 효과(18), 항암효과(19, 20) 등이 밝혀져 있어 산업적 이용이 기대된다.

본 연구는 치자 열매의 추출 용매별 및 유기용매 분획별로 *in vitro* tyrosinase 효소활성 저해 및 B16F10 melanoma cell을 이용한 melanogenesis 억제 실험을 수행하였으며 미백제로의 사용 가능성에 대하여 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 치자 열매는 시중의 한약건재상에서 구입하여 사용하였고, 추출 및 분획에 사용된 ethyl alcohol, hexane, chloroform 및 ethyl acetate는 국산 일급 시약을 구입하여 사용하였다. Tyrosinase 효소활성 저해 실험을 위하여 사용된 mushroom tyrosinase는 Fluka사에서, tyrosine과 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 세포배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotics와 trypsin은 Gibco사에서 구입하여 사용하였으며, 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 추출 및 유기용매 분획

치자 열매를 증류수 또는 에탄올 용매로 사용하여 추출하였다. 증류수 추출은 치자 100 g에 증류수 1 L을 첨가한 후 121℃에서 3시간 동안 3회 반복 추출하였다. 에탄올 추출은 치자 100 g에 1 L의 95% 에탄올을 첨가한 다음 80℃에서 10시간 동안 3회 반복 추출하였다. 각 추출물을 여과지 (Toyo filter No. 1)로 여과 후 감압농축 (Eyela N-1000)하여 동결건조 (Bondiro, Ilsin)하였다. 용매 분획을 위하여 건조된 5 g의 에탄올 추출물을 500 mL의 증류수에 녹였다. Hexane 500 mL을 가하여 분획한 다음 hexane 층을 분리한 후 극성도가 높은 순서대로 chloroform, ethyl acetate를 이용하여 각각 분획한 후, 농축하여 동결 건조하였다 (Fig. 1). 각각의 건조 분획을 10 mg/mL의 농도가 되도록 DMSO에 녹여 시료로 사용하였다.

### Tyrosinase 효소활성 저해 측정

Tyrosine을 기질로 이용한 tyrosinase 효소활성의 저해는 Ishihara 등(21)의 방법을 변형시켜 사용하였다. Test tube에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 0.4 mL, 1.5 mM

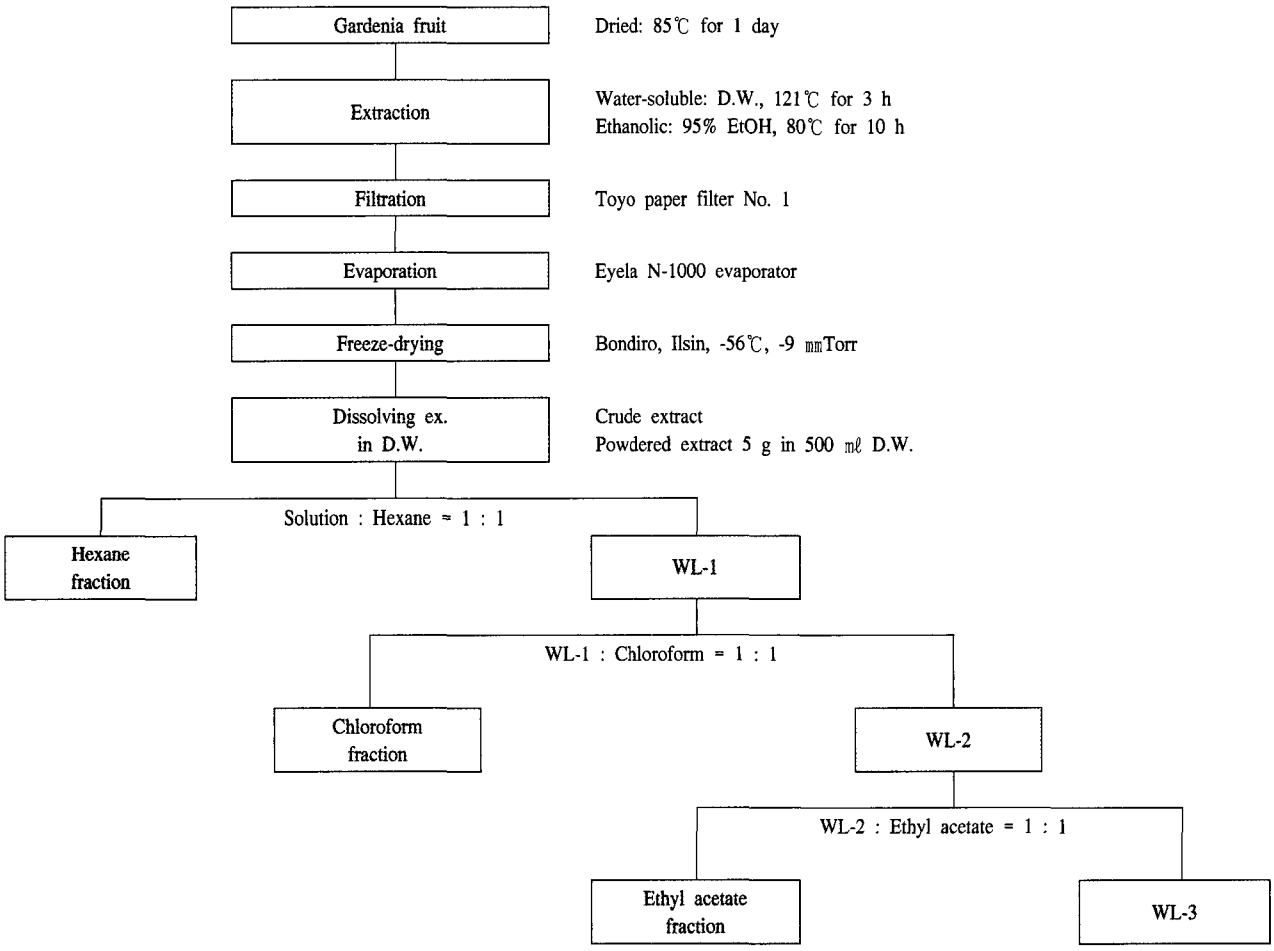


**Figure 1.** Procedure for extraction and fractionation of *Gardenia jasminoides* fruit.
(WL-1; 1st water layer extract, WL-2; 2nd water layer extract, WL-3; 3rd water layer extract)

tyrosine solution 0.4 mL, 시료용액 0.2 mL의 혼합액에 효소액 (100 units/mL) 0.1 mL를 첨가하여 30℃에서 5분간 반응시켜 475 nm에서 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 흡광도 (UV-Vis 160A, Shimadzu)를 측정한 후 다음 식에 의해 tyrosinase 효소활성 저해율을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

Inhibition of tyrosinase activity (%) = [1-(S-B)/C] × 100

S: 효소액 및 시료용액 첨가시 흡광도 변화값
B: 효소액 대신 0.1M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 첨가시의 흡광도 변화값
C: 시료용액 대신 시료를 녹인 용매 첨가시의 흡광도 변화값

### B16F10 melanoma cell을 이용한 Melanogenesis 저해 측정

한국 세포주 은행에서 분양받은 B16F10 mouse melanoma cell을 10% FBS, 1% antibiotics를 첨가한 DMEM에서 37℃, 5% $CO_2$ 조건에서 배양하였다(22). B16F10 melanoma cell의 melanin 생성 저해 평가는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. B16F10 melanoma cell을 1.5 × $10^3$ cells/mL의 농도로 10% FBS을 포함하는 DMEM에 현탁시켰다. 현탁세포 (5 mL)를 tissue culture flask에 넣은 후 검정 시료를 첨가한 후, 5% $CO_2$ 조건으로 37℃에서 배양하였다. 5일간 배양후 phosphate buffered saline (PBS)로 씻고 trypsinization 하였다. 세포를 corning tube에 모은 후 PBS 용액으로 씻고, 1 × $10^6$ 세포수당 1N NaOH 용액 1 mL을 넣어 세포를 녹인 다음, UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 melanogenesis 저해율을 구하였고(23), 세포독성은 MTT assay로 평가하였다(24).

Inhibition of melanogenesis (%) =
[1 - ($ABS_{490nm}$. Sample/$ABS_{490nm}$. Control)] × 100

## 결과 및 고찰

### Tyrosinase 효소활성 저해

치자 열매 추출물의 tyrosinase 효소활성 저해는 tyrosine을 기질로 이용하여 측정하였다. 치자 에탄올 및 증류수 추출물의 tyrosinase 효소활성 저해는 81.5 ± 1.6% 및 62.7 ± 0.4%로 각각 나타나 치자 에탄올 추출물의 효소저해 활성이 더욱 우수하였다. 치자 에탄올 추출물을 유기용매 hexane, chloroform 및 ethyl acetate로 분획한 치자 유기용매 분획물의 tyrosinase 효소활성 저해는 각각 72.6 ± 0.4, 59.9 ± 1.2 및 99.7 ± 0.1% 나타나 사용한 유기용매 중 ethyl acetate 분획물이 가장 우수한 저해 활성을 나타내었으며, 동일 농도의 arbutin의 97.8 ± 1.2%와 비슷한 tyrosinase 효소저해 활성을 나타내었다(Table 1). 한 등(18)의 연구에서 치자열매의 ethyl acetate 분획물이 실험에 사용한 다른 유기용매 분획물에 비해 지질과산화 작용이 우수한 결과를 나타내어 ethyl acetate 분획물이 우수한 tyrosinase 저해활성 결과와 일치하였다.

### B16F10 melanoma cell을 이용한 melanogenesis 저해 측정

B16F10 melanoma cell을 이용한 치자 추출물의 melanogenesis 저해 활성을 측정한 결과, 치자 에탄올 및 증류수 추출물의 melanogenesis 저해 활성은 34.3 ± 2.6% 및 55.9 ± 1.8%로 각각 나타내었으며, tyrosinase 효소활성 억제와 같이 치자 에탄올 추출물의 melanogenesis 억제 활성이 더욱 우수하였다. 치자 hexane, chloroform 및 ethyl acetate 분획물의 melanogenesis 저해 활성은 51.1 ± 2.8, 12.9 ± 3.1 및 89.1 ± 1.4%로 각각 나타났으며, 치자 ethyl acetate 분획물의 활성이 가장 우수하였다(Table 2). 이는 tyrosinase 효소활성 저해와 유사한 결과를 보여주었다. 동일 농도의 arbutin 경우, B16F10 melanoma cell의 melanogenesis 억제 효과가 90.9 ± 2.6%로 나타났으며, 이는 치자 ethyl acetate 분획물과 비슷한 저해 활성을 나타내었다. 치자 추출물 및 유기용매 분획

**Table 1.** Inhibition of tyrosinase activities by crude extracts and solvent fractions from *G. jasminoides* fruit

| Material | Inhibition of tyrosinase activities (%)[1] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Extract | | Fraction | | | Arbutin[2] |
| | Water | EtOH | Hexane | Chloroform | Ethyl acetate | |
| Gardenia | 62.7±0.4 | 81.5±1.6 | 72.6±0.4 | 59.9±1.2 | 99.7±0.1 | 97.8±1.2 |

[1] Concentration for measuring the inhibition ratio of mushroom tyrosinase activity was 10 ㎎/㎖.
[2] Positive control

**Table 2.** Inhibition of melanogenesis using B16F10 melanoma cell by crude extracts and solvent fractions from *G. jasminoides* fruit

| Material | Inhibition of tyrosinase activities (%)[1] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Extract | | Fraction | | | Arbutin[2] |
| | Water | EtOH | Hexane | Chloroform | Ethyl acetate | |
| Gardenia | 34.3±2.6 | 55.9±1.8 | 51.1±2.8 | 12.9±3.1 | 89.1±1.4 | 90.9±2.6 |

[1] Concentration for measuring the inhibition ratio of melanogenesis was 10 ㎍/㎖.
[2] Positive control

물이 첨가된 B16F10 cell의 생육을 측정한 결과, 추출물 및 유기용매 분획물이 첨가되지 않은 대조군과 비슷한 생육정도를 나타내어, 치자 추출물 및 유기용매 분획물의 B16F10 melanoma cell에 대한 세포 독성은 나타내지 않았다.

이상의 결과로서 치자 ethyl acetate 분획물이 양성 대조군으로 사용한 arbutin과 비슷한 tyrosinase 효소활성 저해 및 B16F10 melanoma cell의 melanogenesis 저해를 나타내어, 추후 치자 성분의 분리·정제 및 임상실험의 유효성 시험을 통해 치자를 이용한 새로운 미백원료 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## 요 약

치자 열매 추출물로부터 미백제 개발을 위해 항산화, 항균, 항암 등 생리활성을 가지는 치자로부터 tyrosinase 효소활성 저해와 B16F10 melanoma cell을 이용한 melanogenesis 억제 효과를 실험하였다. Tyrosine을 기질로 사용하여 ethanol, hexane, chloroform, ethyl acetate 용매 및 증류수 추출물에 대한 tyrosinase 효소 저해활성을 실험한 결과 에탄올 추출물 (81.5 ± 1.6%)이 증류수 추출물 (62.7 ± 0.4%)보다 더 우수한 효과를 보여주었다. Ethyl acetate 분획물의 tyrosinase 효소활성 저해율은 다른 유기용매 분획물보다 현저히 우수한 99.7 ± 0.1%나타내었으며, 현재 tyrosinase 저해제로 개발된 arbutin (97.8 ± 1.2%)과 유사한 저해활성을 보였다. B16F10 melanoma cell을 이용한 melanogenesis 억제 효과에서도 에탄올 추출물이 증류수 추출물보다 우수한 억제활성을 보여 주었다. Ethyl acetate 분획물을 사용하였을 경우, melanogenesis 억제 효과가 다른 분획물보다 현저히 우수하였다. 이상의 실험결과는 치자 추출물의 미백원료로서 사용 가능성을 보여주었다.

## REFERENCES

1. Bell, A. A. and M. H. Weeler (1986), Biosynthesis and function of fungal melanin, *Ann. Rev. Phytophathol.* **24,** 411-451.
2. Lerner, A. B. and T. B. Fitzpatrick (1950), Biochemistry of melanin formation, *Physiol. Rev.* **30,** 91-126.
3. Chen, J. S., C. Wei, and M. R. Marshall (1991), Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.* **39,** 1897-1901.
4. Hashiguchi, H. and H. Takahashi (1976), Inhibition of two copper containing enzymes, tyrosinase and dopamin β-hydroxylase, by L-Mimosine. *Molecular Pharmacology* **13,** 362-367.
5. Prota, G. (1992), Melanin and melanogenesis, Academic Press, New York.
6. Lopez, J. N. R., J. Tudela, R. Varon, F. G. Carmona, and F. G. Canovas (1992), Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway, *J. Biol. Chem.* **267,** 3901-3810.
7. Ando, S., O. Ando, Y. Suemoto, and Y. Mishima (1993), Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor, *J. Invest Dermatol.* **100,** 150-155.
8. Imokawa, G. and Y. Mishima (1982), Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosilation inhibitors within malignant melanoma cells, *Cancer Res.* **42,** 1994-2002.
9. Masuda, M., T. Tejima, and T. Suzuki (1996), Skin lighteners, *Cosmetics & Toiletries* **111,** 65-77.
10. Lee, K. T., B. J. Kim and J. H. Kim (1997), Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I) : inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation, *International J. Cosmetic Science* **19,** 291-298.
11. Kim, H. J., G. M. Sapers, and S. W. Choi (1998), Isolation and identification of tyrosinase inhibitor from Galla rhois, *Food Sci. & Biotech.* **7,** 56-59.
12. Lee, J. S., J. A. Kim, S. H. Cho, A. R. Son, T. S. Jang, M. S. So, S. R. Chung, S. H. Lee (2003), Tyrosinase Inhibitors isolated from the Roots of *Glycyrrhiza glabra* L, *Kor. J. Pharmacogn.* **45,** 33-39.
13. No, J. K., D. Y. Soung, Y. J. Kim, K. H. Shim, Y. S. Jun, S. H. Rhee, T. Yokozawa, and H. Y. Chung (1999), Inhibition of tyrosinase by green tea components, *Life Sciences* **65**(21), 241-246.
14. Park, Y. H. and S. K. Chang (1997), Screening of inhibitory effect of edible mushrooms on tyrosinase and isolation of active component, *J. Fd Hyg. Safety* **12,** 195-199.
15. Kim, J. B., M. H. Cho, T. R. Hahn, and Y. S. Beak (1996), Efficient purification and chemical structure identification from *Carthamus tinctorius. Agric. Chem. Biotech.* **39,** 501-505.
16. Jeong, H. S. and K. H. Park (1998), Characteristics of the conversion pigment from *Gardenia jasminoides* yellow pigment, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30,** 319-323.
17. Yim, C. K., J. H. Moon, and K. H. Park (1999), Isolation of 3,4-Dihydroxybenzoic acid, which exhibits antimicrobial activity, from fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31,** 1386-1391.
18. Han, Y. N., H. K. Oh, K. H. Hwang, and M. S. Lee (1994), Antioxidant components of gardenia fruit, *Kor. J. Pharmacogn.* **25,** 226-232.
19. Abdullaev, F. I. (1994), Inhibitory effect of crocetin on intracellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cells, *Toxicology Letter* **70,** 243-251.
20. Konoshima, T., M. Takasaki, H. Tokuda, S. Morimoto, H. Tanaka, E. Kawata, L. J. Xuan, H. Saito, M. Sugiura, J. Molnar, and Y. Shoyama (1998), Crocin and crocetin derivatives inhibit skin tumour promotion in mice, *Phytother. Res.* **12,** 400-4041.
21. Ishihara, K., T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, S. Nishiyama, K. Urabe, and J. Hearing (1993), Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2) and a melanogenic inhibitor, *J. Invest. Dermatol.* **2,** 126-131.
22. Anna, M. M. and M. Elizabeth (1989), Differential radiosensitivity in cultured B16 melanoma cells following interrupted melanogenesis induced by glucosamine, *Pigment Cell Res.* **2,** 167-170.
23. Komiyama K., S. Takamatsu, Y. Yakahashi, M. Shinose, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Iwai, and S. Omura (1993), New inhibitors of melanogenesis, OH-3084 K1 and K2, *J. Antibiotics* **46,** 1520-1525.
24. Shim, J. S., H. R. Chang, E. G. Min, Y. H. Kim, and Y. H. Han (2001), Cytotoxicity of *Paecilomyces tenuipes* against human carcinoma cell, HepG2 and MCF-7 *in vitro, Kor. J. Mycol.* **29,** 170-172.