

반하에서 3,4-Dihydroxybenzaldehyde의 분리, 구조동정 및 Tyrosinase 활성 저해효과

조용권^{1*}, 신동수², 백도현¹, 윤도영³, 신동민⁴

1: 창원대학교 자연과학대학 보건위생학과 2: 창원대학교 자연과학대학 화학과
3: 건국대학교 분자생명공학과 4: 경남 마산시 석전동 국제한의원

Tyrosinase Inhibitory Effect of 3,4-Dihydroxybenzaldehyde Isolated from *Pinellia ternata*

Yong Kweon Cho^{1*}, Dong Soo Shin², Do Hyeon Paik¹, Do Young Yoon³, Dongmin Shin⁴

1: Department of Biochemistry and Health science,
2: Department of Chemistry College of Natural Sciences, Changwon National University
3: Department of Biosci. & Biotechnology, Konkuk University, Gwangjin-Gu, Seoul.
4: Kukje Oriental Medicine, Sukjun-dong, Masan, Kyungnam

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study is to isolate tyrosinase inhibitory material from *Pinellia ternata* and characterize its own structure and activity.

Methods : *Pinellia ternata* (600g) was extracted with 95% methanol (1L) at 37°C for 4 days, with shaking at 250rpm. The extract was further solvent-fractionated with n-hexane, chloroform, ethylacetate and water. The active fraction was subjected to JAI recycling prep-HPLC JAIGEL GS-320 column. The structure was identified for the active peak with NMR and GC.

Results : Tyrosinase was potently inhibited by 95% methanol extracts from *Pinellia ternata*. The IC₅₀ value of the extracts was estimated to be 0.05mg/ml. The extracts was divided into four solvent-fractions, and the most potent tyrosinase inhibition was found in ethylacetate layer. IC₅₀ value of ethylacetate fraction was 0.001mg/ml. This fraction was further purified with JAI Recycling Preparative HPLC (Model: LC 9104). The isolated compound showing inhibitory activity was characterized on its chemical structure by NMR and the compound was identified as 3,4-dihydroxybenzaldehyde. IC₅₀ was found to be 7.74 μM which is much lower than that of kojic acid (66.5μM).

Conclusions : The data suggest that 3,4-dihydroxybenzaldehyde isolated and identified from *Pinellia ternata* is very strong inhibitor to melanin biosynthesis.

Key words : *Pinellia ternata*, tyrosinase inhibitor, melanin, 3,4-dihydroxybenzaldehyde

*# 교신저자, 제1저자: 조용권, 경남 창원시 사림동 창원대학교 자연과학대학 보건위생학과
· Tel: 055-279-7661 · Fax: 055-279-7169 · E-mail: ykcho@changwon.ac.kr
· 접수: 2006년 3월 27일 · 수정: 2006년 5월 20일 · 채택: 2006년 6월 24일

서론

멜라닌(melanin)은 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 가지는 페놀류의 생물 고분자 물질로서, 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기 중에 노출될 때 발생하는 갈변 또는 동물의 외피, 깃털, 피부, 머리, 눈 등에서 관찰된다. 그러나 멜라닌이 과잉 생산되는 경우 피부에 기미, 주근깨 등이 형성되고 피부 노화도 촉진되며, 피부암도 유발될 수 있고, 또한 식품에서는 채소, 과일, 생선 등의 품질을 저하시키는 작용도 한다¹⁻³⁾.

멜라닌은 주로 티로시나제(tyrosinase)의 작용에 의하여 생합성되는 것으로 보고되어 있다. 티로시나제는 구리(Cu)와 결합한 효소로서, 동물, 식물, 미생물 및 사람 등에 넓게 분포되어 있고, 모노하이드록시 또는 디하이드록시 페닐알라닌(dihydroxy-phenylalanine, DOPA) 등의 페놀 화합물에서 호기적 산화를 촉진시키며, 자외선에 심하게 노출된 피부에 멜라닌 토스(melanin)를 침착시켜 피부의 노화나 손상을 유발시키는 작용을 한다. 또한, 야채 또는 과실류에서도 티로시나제 등과 같은 폴리페놀 옥시다제(polyphenol oxidase)가 식품의 갈변화 현상을 초래한다⁴⁻⁶⁾.

티로시나제에 의하여 생성이 촉매되는 동물 멜라닌은 노란색-적갈색의 페오멜라닌(pheomelanin)과 갈색-검은색의 유멜라닌(eumelanin)으로 구분된다. 이러한 멜라닌의 합성 과정은 티로시나제의 활성 정도에 따라 L-티로신에서 L-3,4-디하이드록시-페닐알라닌으로 하이드록시화되고, 다시 DOPA에서 도파퀴논(dopaquinone)으로 산화되며, 도파퀴논은 류코크롬(leucochrome)으로 산화되고, 류코크롬의 산화에 의하여 도파크롬(dopachrome)이 생성되며, 도파크롬은 다시 5, 6-디하이드록시인돌(DHI, 5,6-dihydroxyindole)로 전환되고, 이 디하이드록시인돌이 산화적으로 중합되어 단백질과 최종적으로 결합하는 것으로 구성된다. 생체 내에는 도파크롬이 DHI로 전환되는 경로 이외에도 도파크롬 토트머라제(dopachrome tautomerase)가 작용하여 5, 6-디하이드록시인돌 카르복실산(DHICA, 5,6-dihydroxyindole carboxylic acid)으로 전환되는 새로운 경로도 있음이 보고되어 있다^{7,8)}.

멜라닌의 생합성 대사는 피부암과 관련하여 최근 집중적으로 연구되고 있고, 이로부터 다양한 멜라닌 생성 저해제 등이 개발되어 의약품 산업에서 피부 질환 치료제, 화장품 산업에서 기미, 주근깨 등을 예방 및 치료하는 피부 미백제 또는 식품 산업에서 갈변 방지제 등으로 적용되고 있다. 또한, 최근에는 환경문

제와 관련하여 그 수요가 급격히 증가되고 있다.

지금까지 멜라닌 생성 저해제의 연구는 주로 티로시나제 저해제를 개발하는 방향으로 집중되어 왔고, 대표적인 티로시나제 저해제로는 티로시나제 활성부위의 구리이온에 대한 킬레이트 형성물질, 퀴논류(quinone)를 페놀류로 환원시키는 아스코빅산(ascorbic acid) 등의 환원제 그리고 티로시나제 자체를 변성시키는 비설파이트(bisulfite) 제제 등을 들 수 있다^{6,9)}. 지금까지 알려진 tyrosinase의 저해제로는 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid, kojic acid, arbutin, azelaic acid 등이 있으나, 피부 안전성, 제형 안정성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다⁷⁻⁹⁾.

이와 같이 티로시나제 저해제가 다양한 미백제 등으로 개발되어 현재 사용되고 있지만, 여러 가지 문제점도 동시에 제기되고 있다. 실제로 기미, 주근깨, 반점 및 임신기 과색소 침착(hyperpigmentation)과 같은 과잉 색소증 치료에 국부적으로 사용되고 있는 4-히이드록시아니솔(4-hydroxyanisole) 및 하이드로퀴논(hydroquinone) 등은 강력한 멜라닌 생성 저해활성은 있으나 동시에 색소세포 변성 또는 치사를 유발하고 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타낸다. 특히 하이드로퀴논 계열의 화합물을 멜라닌 생합성을 저해하는 미백용 크림으로 개발되어 사용되었으나, 세포 독성으로 인한 피부 자극 또는 피부병을 유발하는 것으로 알려져 현재 일부 국가에서만 사용이 허가되고 있는 실정이다. 따라서, 미리 안정성이 입증되어 있는 천연물을 이용하여 티로시나제 저해물질을 선별하려는 시도들이 이루어지고 있다. 특히, 최근에 안전성을 고려하여 상백피¹⁰⁾, 오배자¹¹⁾, 감초¹²⁾, 녹차¹³⁾, 석이¹⁴⁾ 등 천연물로부터 tyrosinase 효소활성 저해연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 중 일부는 제품으로 상용화 되어있다.

현재 인체의 피부는 지구환경의 악화로 인한 대기권의 오존층 파괴에 의해 증가되는 자외선에 의해 큰 피해를 입고 있다. 또한 국민소득 증가에 의한 야외활동의 증가로 기미 등 피부의 색소침착이 문제가 되고 있다. 따라서 전세계적으로 미백제 개발에 꾸준한 투자를 하여 신규물질을 이용한 기능성 화장품을 시판하고 있으나, 국내의 화장품 회사들은 해외로부터 분리·정제된 미백 물질을 전량 수입하여 사용하고 있는 실정이다.

본 연구자들은 천연물로부터 티로시나제 저해활

성의 연구과정에서 반하의 90% 메탄올추출물이 티로시나제 저해활성이 매우 높은것을 확인하였다. 이전의 반하에 대한 연구로는, 반하의 물추출물은 티로시나제 저해활성이 없고 B-16 마우스 흑색종 세포의 멜라닌 생성을 억제한다는 Lee 등¹⁵⁾의 보고와 30% methanol층과 chloroform층이 티로시나제에 대한 저해효과가 있음을 밝힌 Choi 등¹⁶⁾의 보고가 있을뿐이다. 따라서, 이 연구에서는 티로시나제 억제물질을 규명하기 위하여, 용매분획에 의해 티로시나제의 활성 저해를 측정하고 멜라닌 생성 저해효과 측정을 통해 저해성분의 구조를 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 기기

본 실험에서 사용한 tyrosinase(EC 1.14.18.1)는 mushroom에서 추출된 것으로 Sigma사에서 구입하여 사용하였고, buffer 제조에 사용되는 Sodium phosphate monobasic monohydrate[CAS.10049-21-5]는 USB사의 것을 사용하였으며, 기질로 사용한 Tyrosine[CAS.45160-0410]은 Junsei사의 것을 사용하였다. 추출 및 분획에 사용된 methyl alcohol [CAS.67-56-1], n-hexane [CAS.110-54-3], chloroform[CAS.67-66-3], ethylacetate[CAS.141-78-6]는 덕산사 일급 시약을 구입하여 사용하였다. 반하(*Pinellia ternata*)는 (주)광명생약으로부터 중국산을 구입하였다. 쥐의 B-16 멜라노마 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 시약은 일급 수준의 제품을 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 Perkin-Elmer사의 UV-VIS spectrophotometer Lamda 30과 Jai사의 recycling preparative HPLC LC-9104를 이용하였다. ¹H NMR spectrum과 ¹³C NMR spectrum은 Bruker AVANCE digital 400으로 분석하였다. TLC(Thin Layer Chromatography)는 Merck사의 TLC aluminium sheets silica gel 60 F254를 적당한 크기로 잘라서 사용하였다.

2. 반하로부터 티로시나제 저해활성 성분의 분획 및 분리

2.1. 반하로부터 활성성분의 추출 및 분획

반하 600g을 methanol 1000mL를 첨가한 후 37°C에서 250rpm으로 shaking 하며(엔바이오텍사의 NB-205V) 96시간동안 추출하고, 회전식 진공농축기

로 감압 농축하여 반하의 추출물로 본 실험에 사용하였다.

반하 추출물은 Fig. 1과 같이 극성과 비극성 물질등을 선별하기 위하여 비극성층에는 n-hexane층, 약한 극성층은 chloroform층, 극성층은 ethylacetate층, 강한 극성층인 aqueous층으로 나누어 비극성에서 극성으로 계통 분획하고 각각의 분획층을 감압 농축 후 최소량의 methanol에 녹여 시료로 사용하였다.

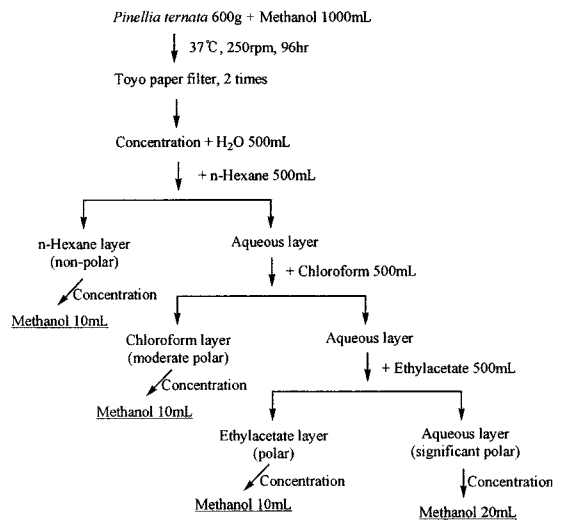


Figure 1. Procedure of extract and fractionation of *Pinellia ternata*

2.2. 반하 추출물에서 유효물질 분리

반하의 각각의 분획층을 tyrosinase저해 활성을 갖는 층을 선택하여 recycling preparative HPLC를 이용하여 단일물질로 분리하였다. 분석조건은 Table 1과 같다. ¹H NMR spectrum과 ¹³C NMR spectrum을 이용하여 구조를 동정하고, UV-Vis 200nm~600nm scanning을 이용하여 표준물질과의 구조가 동일한지를 확인하였다.

Table 2. Conditions for recycling preparative HPLC

Instrument	JAI LC-9104
Column	GS310(20X500mm)
Column temp.	25°C
Detector	A 280nm B RI
Injection volume	30mg/3ml~100mg/10ml
Flow rate	5ml/min
Mobile phase	Methanol

3. 티로시나제 저해활성 측정

티로시나제 역가 및 저해활성 측정은 Baurin 등¹⁷⁾의 방법에 의거하여 측정하였다. 효소반응물(1ml)은 50mM 인산완충용액(pH 6.8), L-티로신 1.5mM을 포함하며 버섯 티로시나제 30mU를 첨가함으로써 반응(25℃)을 시작하여 340nm에서의 효소의 흡광도 증가로부터 효소의 역가를 구한다. 효소의 저해실험은 위 조건에, 첨가하는 본 발명의 화합물의 농도를 달리함으로써 수행한다. IC₅₀값은 효소 활성저해율이 50%에 달하는 저해제의 농도로 표시하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{\text{저해제가 첨가된 경우의 반응속도}}{(1 - \frac{\text{저해제가 첨가되지 않은 경우의 반응속도}}{\text{저해제가 첨가된 경우의 반응속도}})} \times 100$$

4. 멜라닌 생성 저해효과 측정

B-16 멜라노마 세포를 배지에서 10⁶ (cells/dish-35mm)의 농도로 배양한 후 서로 다른 농도의 본 발명의 저해물질을 첨가하여 3일간 배양하였다. 그 다음 트립신을 처리하여 세포를 배양용기에서 떼어내어 원심분리하여 멜라닌을 추출하였다 (과염소산 2N 사용). 여기에 1N NaOH 1ml를 가하고 15분간 끓여 멜라닌을 녹여 상온으로 식힌 다음 400nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 멜라닌의 양 (10⁵세포수당 흡광도)을 구하였다.

결과 및 고찰

1. 반하 추출물에서 유효물질의 분리 및 구조동정

현재까지 반하의 티로시나제 억제에 대한 연구결과는 Choi 등¹⁶⁾에 의해 이뤄졌는데, 30% methanol층과 chloroform층이 저해효과가 있음을 보고하였을 뿐이다. 본 실험의 반하추출물 분획층 중에서 tyrosinase 저해효과가 ethylacetate layer, aqueous layer, chloroform layer, n-hexane layer의 순서로 나타났다. 이중 가장 저해효과가 좋은 ethylacetate layer를 recycling preparative HPLC를 이용하여 단일 peak의 tyrosinase저해활성이 뛰어난 유효한 단일물질로 분리하였다.

분리된 단일물질을 ¹H NMR spectrum과 ¹³C NMR spectrum을 이용하여 구조를 동정한 결과를

Fig. 2-4에 나타내었다. 89.745에서 관찰된 ¹H singlet resonance는 방향족 알데히드 프로톤을, 87.30-7.32에서의 multiplet은 C-5와 C-6 프로톤을 각각 나타낸다 (Fig. 2). 그리고 86.975에서 관찰된 doublet은 C-2 프로톤을 나타낸다(Fig. 3). ¹³C NMR spectrum에서 δ 191.07은 aldehydic carbon을, δ152는 C-4, δ145는 C-3, δ128은 C-1, δ124는 C-6, δ115는 C-2, δ114는 C-5를 각각 나타낸다(Fig. 4). Fig. 5와 같이 GC mass 스펙트럼은 28분의 retention 시간과 m/z 138을 나타내었다. 따라서 데이터를 종합해본 결과 신규 분리된 물질의 구조는 Fig. 6과 같이 3,4-dihydroxybenzaldehyde로 동정되었다. 한편, UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 standard로 구입한 3,4-dihydroxybenzaldehyde와 반하에서 분리된 물질을 scanning한 결과, 두 물질 모두 206nm, 231nm, 280nm, 314nm에서 peak가 나타나므로 같은 물질임을 재차 확인할 수 있었다(Fig. 7).

2. 분리된 물질 및 기타 티로시나제 저해제의 저해활성 비교

반하에서 분리된 3,4-dihydroxybenzaldehyde와 다른 compound와의 티로시나제 저해실험으로부터 IC₅₀을 구하고 비교해본 결과, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, thionicotinamide, kojic acid, ethyl-4-nitrobenzoylacetate, 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid, 4-hydroxyacetophenone, 4-hydroxycinnamic acid, 2,5-dihydroxybenzaldehyde, trans-4-hydroxycinnamic acid, 4-hydroxybenzoic acid, arbutin, 2,5-dihydroxybenzoic acid, ethyl-4-nitrophenylglyoxylate, 2,4-dihydroxybenzoic acid의 순서로 저해효과를 나타내는 것을 Table 2에서 알 수 있다. 3,4-Dihydroxybenzaldehyde의 IC₅₀은 7.74μM로서 Kubo¹⁸⁾ 등의 최근 각광을 받고 있는 플라보노이드에 대한 결과보다 월등히 우수한 저해제로 판단된다. 예로서 Quercetin의 IC₅₀은 0.07mM, Kaempferol 0.23mM, Luteolin 0.19mM, Morin 2.32mM 등이었다. 기타 물질의 IC₅₀를 보면, aloesin¹⁹⁾ 10mM, cuminaldehyde²⁰⁾ 0.05mM, curic acid²⁰⁾ 0.26mM, 3,4-dihydroxycinnamic acid²¹⁾ 0.97mM, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid²¹⁾ 0.33mM, anisaldehyde²¹⁾ 0.38mM, ECG²²⁾ 0.035mM, GCG²²⁾ 0.017mM, ECG²²⁾ 0.034mM 등이었다.

한편, Ley 등²³⁾은 benzaldehyde유도체의, L-Dopa를 기질로 한 티로시나제 억제실험에서 3,4-Dihydroxybenzaldehyde의 IC₅₀이 620μM이었다고 보고하였다. 이는 티로시나제의 첫 번째 반응을 분석하지 않았기 때문으로 분석된다. 대부분의 티로시나제 억제실험이 분석방법이 편리한 두 번째 반응인 L-Dopa의 산화반응에 초점을 맞추는데, 이는 자칫 저해능이

우수한 물질을 농축 우려가 높다 하겠다. 그리고, 첫 번째 반응을 억제하는 물질이 생체대사의 조절메커니즘과 비교하여 볼때 더 효과적인 저해제라 할수 있을 것이다. 또한 티로신을 기질로 한 저해반응은 lag time이 상당한 시간 지속되기 때문에 end-point 분석이나 초기반응곡선으로부터 반응속도를 구하는 경우가 상당히 많이 있어 주의가 요구된다.

3. 분리된 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 저해형태

저해형태를 알아보기 위하여 다양한 L-tyrosine의 농도 별로 서로 다른 농도의 저해제를 넣고 활성도를 구하여 "Sigma Enzyme Kinetics module" 프로그램을 이용하였다. 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 저해패턴은 mixed type의 noncompetitive 저해였으며 K_m 는 $3.677e^{-7}mM$ 로 나타났다. 한편 L-dopa를 기질로 한 경우 kojic acid²⁴⁾는 mixed type이었으며 arbutin²⁵⁾은 competitive type을 나타내었다. 따라서 이 두 물질과 저해패턴 및 K_i 를 상대적으로 비교할 수 없다. 본 실험에서의 저해패턴을 볼때, 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 티로신의 결합부위가 아닌 부위에 결합하는 것을 알수 있으며 다음절의 결과에도 있듯이 구리이온의 농도를 높이면 3,4-dihydroxybenzaldehyde에 의한 저해가 감소된다. 이는 3,4-dihydroxybenzaldehyde가 결합한뒤 구리이온과 킬레이트를 형성한다는 것을 나타낸다.

4. 3,4-dihydroxybenzaldehyde에 의한 멜라닌 생성억제

Table 3에서 보듯이, 쥐의 멜라닌생성 저해활성에서도 신규분리된 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 0.01% 농도에서의 저해율이 55.3%로서 대표적인 저해제인 코지산 48.7%, 알부틴 17.0%보다 높은 저해활성을 보여 기미, 주근깨 등 피부미백에 효과적으로 사용될 수 있음을 알수 있다. 물론 물농도 기준에서도 같은 패턴이 유지된다.

5. 저해제와 구리이온의 관계

Tyrosinase는 활성부위에 구리이온 한 쌍을 가지고 있는데 구리이온의 형태와 포함하고 있는 산소에 따라서 세 가지로 구분할 수 있다. 활성화된 형태인 oxy-tyrosinase($E_{oxy}, Cu^{2+}-O_2-Cu^{2+}$)는 한 쌍의 Cu 2가 이온과 산소를 포함하고 있다. 비활성화 된 deoxy-tyrosinase(E_{deoxy}, Cu^+-Cu^+)는 Cu 이온이 환원된 형태인 1가 이온으로 존재하며 산소를 포함하고 있지 않다. 마지막으로 met-tyrosinase($E_{met}, Cu^{2+}-O-Cu^{2+}$)가

있다.

구리이온이 저해제와 활성사이에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 저해제만 넣은 것과 일정한 저해제의 농도에 $CuCl_2$ 의 농도를 증가시켜 넣은 것과 비교해 보았다. $CuCl_2$ 를 넣은 것이 넣지 않은 것보다 월등히 활성정도가 높게 나타나는 것을 Fig. 7에서 확인할 수 있다. 이것으로 보아 저해효과가 효소의 활성부위에 있는 구리와와의 작용으로 저해효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

Lerch 등²⁶⁾은 티로시나제의 활성부위에 있는 6개의 히스티딘은 헤모시아닌에 있는 6개의 히스티딘과 비슷하며, 이중 2개의 히스티딘은 2개의 구리이온과 배위결합을 하고 있다고 보고하였다. 이에 근거하여 Fig. 8에 3,4-dihydroxybenzaldehyde와 히스티딘과의 결합을 가상적으로 나타내었다.

결 론

반하 추출물 분획층 중에서 tyrosinase 저해효과는 ethylacetate layer > aqueous layer > chloroform layer > n-hexane layer 순서로 나타났다. 이 중에서 가장 저해효과가 뛰어난 ethylacetate layer를 이용하여 recycling preparative HPLC로 반복적으로 recycling하여 단일 peak의 tyrosinase저해활성이 뛰어난 단일물질을 분리하였다. 분리된 단일물질을 NMR 및 GC을 이용하여 구조를 동정한 결과 3,4-dihydroxybenzaldehyde로 밝혀졌다. 일반적으로 사용되고 있는 arbutin 및 현재는 간암유발 가능물질로 발표된 후 사용되고 있지는 않지만 이전에 널리 사용된 kojic acid와 비교한 결과, 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 IC_{50} 이 7.74 μM , kojic acid의 IC_{50} 은 66.5 μM , arbutin의 IC_{50} 이 1.17mM로 kojic acid보다는 거의 9배정도, arbutin보다는 거의 150배정도 저해활성도가 높음을 알 수 있다. 그의 알려진 11가지의 저해제와의 IC_{50} 비교에서도 가장 저해효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. Tyrosinase는 활성 부위에 2개의 구리 이온을 포함하는 효소인데, 일정 저해제의 농도에 다양한 농도의 $CuCl_2$ 를 첨가하였을 때 첨가하지 않은 것의 활성도에 비하여 첨가한 것이 높은 활성을 나타내는데, 이것은 구리이온이 저해제를 chelate함으로써 기질이 tyrosinase에 잘 결합되도록 하는 것을 나타낸다. 현재 환경오염으로 인한 피부질환이 많이 대두되면서 미백에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 특히 천연물에서 유래한 성분에 대한 연구가 많이 진행되고 있는 상황에서 반하에서 분리된 3,4-dihydroxybenzaldehyde와 같은 성분이 좋은 미백제의 원료로 사용될 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 창원대학교 경남남방연구소 및 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-01-01) 지원으로 수행되었으며 연구지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Pawelek JM, Korner AM. The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* 1982;70:136-149.
- Iyengar R, McEvily AJ. Anri-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci. Technol.* 1992;3:60-64.
- Vamons-Vigyazo L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1981;15: 49-127.
- Sapers GM, Miller RL, Cooke PH, San won C. Enzymatic browning control in minimally processed mushrooms. *J. Food Sci.* 1994;59:1042-1048.
- Walker JRL. Enzymic browning in food. *Enzyme Technol. Dig.* 1975;4(3):89-99.
- Haisman DR. The effect of sulphur dioxide on oxidising enzyme systems in plant tissues. *J. Sci. Food Agric.* 1974;25:803-809.
- Bell AA, Weeler MH. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1986;24:411-451.
- Lerner AB, Fitzpatrick TB. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* 1950;30:91-126.
- Chen JS, Wei C, Marshall MR. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 1991;39:1897-1901.
- Lee DT, Kim BJ, Kim JH. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I) : inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International J. Cosmetic Sci.* 1997;19:291-298.
- Kim HJ, Sapers GM, Choi SW. Isolation and identification of tyrosinase inhibitor from *Galla rhois*. *Food Sci. & Biotech.* 1998;7:56-59.
- Lee JS., Kim JA, Cho SH, Son AR, Jang TS, So MS, Chung SR, Lee SH. Tyrosinase inhibitors isolated from the Roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *Kor. J. Pharmacogn.* 2003;45:33-39.
- No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* 1999;65(21):241-246.
- Park YH, Chang SK. Screening of inhibitory effect of edible mushrooms on tyrosinase and isolation of active component. *J. Fd Hyg. Safety* 1997;12:195-199.
- Lee SH, Kim JJ, Kim HJ, Lee JT, Kang SH. Effects of Banha extract on the melanin biosynthesis and tyrosinase mRNA level in B16 mouse melanoma cells. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* 1997;23(2):23-32.
- Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH. Screening of the Tyrosinase Inhibitors from Marine Algae and Medicinal Plants. *Kor. J. Pharmacogen.* 1998;29(3):237-242.
- Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacol.* 2002;82:155-158.
- Kubo I, Kinst-Hori I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteria. *Bioorganic & Medicinal Chem.* 2000;8:1749-1755.
- Fujita Y, Uruga Y, Ichisimara E. Molecular cloning and nucleotide sequence of the protyrosinase gene from *Aspergillus oryzae* and expression of the gene in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1995;1261:151-154.
- Kubo I, Kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from cumin. *J. Agric. Food Chem.* 1988;46:5338-5341.
- Lee HS. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived material. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1400-1403.
- No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life sci.* 1999;65:241-246.
- Ley JP, Bertram HJ. Hydroxy- or

methoxy-substituted benzaldoximes and benzaldehyde-O-alkyloximes as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chem.* 2001;9:1879-1885.

24. Ha TJ, Yang MS, Jang DS, Choi SU, Park KH. Inhibitory activities of flavonone derivatives isolated from *Sophora flavescens* for melanogenesis. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2001;22:97-99.
25. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. Inhibition of mushroom tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* 1987;53:515-517.
26. Lerch K, Protein and active-site structure of tyrosinase. In: *Advances in Pigment Cell Research* (Ed. Bagnara JT). New York:Alan R. Liss. 1988;85-98.