

얌빈 추출물의 항산화 효능과 멜라닌 생성 억제효과

이아름^{1#}, 김교남², 김혜옥³, 송원정⁴, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 경남대학교 식품생명학과
3 : 경남대학교 간호학과, 4 : 상주시농업기술센터

Antioxidant Activity and Melanin Inhibitory Effects of Yambean (*Pachyrhizus erosus*) Extract

AhReum Lee^{1#}, Gyo-Nam Kim², Hae-Ok Kim³, WeonJung Song⁴, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
2 : Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Republic of Korea
3 : Department of Nursing, Kyungnam University, Republic of Korea
4 : Sangju-si Agricultural Technology Center, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Yam bean (*Pachyrhizus erosus*) possess various nutrients, it has been widely used as traditional cosmetic material in Indonesia. The aim of this study was to investigate the anti-oxidant activity and the anti-melanogenic effect of Yambean (*Pachyrhizus erosus*) extract and its fractions.

Methods : The anti-oxidant activity of yam bean extract assessed based on total polyphenol, flavonoid contents, DPPH and ABTS radical scavenging assay. To evaluate anti-melanogenic effects and cytotoxicity of Yambean extract and its fractions, B16F10 melanoma cell was used.

Results : In results, total polyphenol content of yam bean water extract (YW) and Yambean 70% ethanol extract (YE) were 1.18 ± 0.03 mg/g (mg of gallic acid/g of sample), 1.16 ± 0.01 mg/g. Total flavonoid contents of YW, YE were 3.55 ± 0.06 mg/g (mg of naringin/g of sample), 1.78 ± 0.03 mg/g. Moreover, YE scavenged DPPH and ABTS effectively in 4 mg/ml compared to YW. Cytotoxicity of YE and its fractions in B16F10 melanoma cell was measured using MTT assays. It had no cytotoxicity up to 500 μ g/ml. Melanin accumulation in B16F10 melanoma cell was induced using alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). B16F10 melanoma cell treated with 10-500 μ g/ml YE and hexane, ethyl acetate, butanol, H₂O fractions for 24h. Non treated B16F10 melanoma cell (Control) markedly increased melanin contents. In contrast, YE ethylacetate fraction effectively suppressed melanin accumulation in a dose-dependent manner.

Conclusion : In conclusion, these results suggest that Yambean extract has the potential as a cosmetic material which possess anti-oxidant and anti-melanogenic activities.

Key words : Yambean, Anti-oxidant, Anti-melanogenic activity, Cytotoxicity, Cosmetic material

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Ah Reum Lee, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : rmi2222@naver.com

· Received : 14 February 2017 · Revised : 28 February 2017 · Accepted : 15 March 2017

I. 서 론

현대사회는 급속도로 발전하여 생활수준의 향상을 이루게 되었지만, 이는 오존층 파괴라는 심각한 문제를 함께 가져 오게 되었다. 이러한 결과는 피부의 과도한 멜라닌 색소 침착과 피부 노화라는 문제를 동시에 우리에게 안겨주게 되었고 이를 극복하기 위하여 항산화 및 미백 효과를 가진 의약품 및 화장품 개발의 필요성이 증가하고 있다¹⁾.

현재 주요 미백 기능 소재로는 arbutin, kojic acid, ascorbic acid가 대표적이며, 임상적으로 우수한 효과를 나타내고 있다. 그러나 arbutin은 피부 투과성이 낮아 효능이 약하고²⁾, kojic acid는 면역반응을 일으킨다는 보고가 있으며³⁾, ascorbic acid는 용액 중에서 쉽게 분해되는 불안정한 구조라는⁴⁾ 단점이 있다. 따라서 최근에는 이들을 대체할 안전하고 효능이 증가된 천연물 유래 소재에 대한 관심이 증가하고 있다.

피부의 대사과정 중 발생한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등의 산화 방지 관련 효소를 통하여 제거되어 일정수준을 유지하지만, 과량 생산된 ROS는 콜라겐, 엘라스틴, 히아루론산 등의 진피 내 기질성분을 감소시키는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 증가시킨다. MMPs는 피부 탄력저하에 문제가 될 뿐 아니라, 멜라닌 (melanin) 생성반응을 촉진시켜 피부 색소 형성의 원인이 된다⁵⁾. 또한 Wang 등의 연구 결과에 따르면 뛰어난 항산화 활성으로 알려진 페놀 화합물은 티로신과 유사한 화학적 구조를 가지고 있어 색소 형성 억제 물질로 작용한다고 보고되어 있다⁶⁾. 이처럼 건강한 피부를 유지하는 데 있어서는 산화 스트레스 억제를 통한 주름 예방 및 개선, 탄력 증가뿐 아니라 멜라닌 생성 억제 효능이 매우 중요하며 이에 따라 항산화 및 미백 효능을 가진 천연물 소재의 중요성이 부각되고 있는 실정이다⁷⁾.

얌빈 (*Pachyrhizus erosus*, Yambean)은 멕시코 원산의 아열대성 콩과 식물로서 비대해진 뿌리를 식용으로 사용하며⁸⁾, 인도네시아에서는 전통적으로 미백 효능을 가진 미용 소재로 널리 알려져 있다. 생리활성 성분으로는 사포닌을 함유하고 있으며, 이 성분은 자외선을 흡수하여 자유 라디칼로부터 피부 손상을 예방한다고 알려져 있다⁹⁾. 최근 연구에서는 streptozotocin으로 유발한 당뇨에서 얌빈 추출물의 혈당 저하 효과¹⁰⁾, 면역 조절활성효과¹¹⁾ 등이 보고되어 있지만 얌빈 추출물과 분획물의 항산화효능 및 미백 활성에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 얌빈의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능, 페놀, 플라보노이드 함량 및 미백 기능성을 연구하였고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

(DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, diethylene glycol, sodium hydroxide, naringin, 3, 4 Dihydroxy-L-phenyl-alanine (L-DOPA), (S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, 3-(4-Hydroxyphenyl)-L-alanine (L-tyrosine), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), L-ascorbic acid, mushroom tyrosinase, sodium carbonate, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH)는 Sigma Aldrich (St Luis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)은 WELGENE Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. FBS (fetal bovine serum)은 Gibco BRL, (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, 마우스 melanoma인 B16F10 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2. 얌빈 추출물 및 분획물 제조

본 실험에서 사용한 얌빈은 경상북도 상주에서 채취하여 실험의 재료로 사용하였다. 얌빈 열수 추출물은 건조한 얌빈 50g을 파쇄하여 증류수 500 mL에 넣고 100 °C에서 2시간 동안 가열한 후, 이를 여과지 (Whatman No.2, GE healthcare, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X, Sunilevel Co. Ltd, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 감압농축 후 동결건조하고 얻어진 분말을 -20 °C에 보관하여 사용하였다.

얌빈 70% 에탄올 추출물은 얌빈 50 g에 70% 에탄올을 10 배로 가하여 상온에서 24시간동안 추출하였다. 얻어진 얌빈 70% 에탄올 추출물을 여과지 (GE healthcare)를 사용하여 여과한 뒤, 감압농축 및 동결건조 한 후, 분말형태로 냉장 보관하여 사용하였다.

얌빈 분획 추출물은 얌빈 70% ethanol 추출물에 20배의 증류수를 가하여 녹인 후 동량의 n-Hexane을 첨가하여 5회 반복 추출하고 분획하였다. 계속하여 잔여 H₂O층에 ethyl acetate 및 butanol을 순차적으로 이용하여 5회 반복 추출하였고 이를 감압 농축하여 남은 유기용매를 휘발시킨 뒤, 동결건조하여 실험에 사용하였다.

3. 항산화 활성 평가

1) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

전자공여능 (electron donating ability)은 Blois 등¹²⁾의 방법에 의한 DPPH free radical 소거법으로 측정되었다¹²⁾. DPPH 라디칼 소거 활성 측정은 시료 중에 포함된 항산화 물질의 양을 측정하는데 사용되는 대표적인 실험법이다. 일정농도의 시료 100 μ l과 60 μ M DPPH 용액을 100 μ l 넣고 혼합한 후, 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 UV

spectrophotometer (UV1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 사용하여 측정 한 후, 전자공여능을 계산하여 산출하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데, 필요한 시료의 양을 IC₅₀ (50% inhibition concentration)으로 하여 나타내었으며 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

2) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

얌빈 추출물의 항산화 효과를 평가하기 위하여 ABTS 라디칼 소거활성을 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate를 증류수에 녹인 다음 12시간동안 차광하여 반응시킨 후, 이 반응액을 734 nm에서 ethanol을 이용하여 흡광도 0.70 ± 0.02로 보정하였다. ABTS 용액 95 μl에 시료 5 μl를 첨가하고 15분동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다¹³⁾

3) 총 페놀 함량 측정

얌빈 추출물의 총 페놀 함량 측정은 Folin-Denis법에 의해 측정하였다. 시료 20 μl에 증류수 1.58 ml, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μl를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 300 μl의 20% Na₂CO₃를 첨가하였다. 20℃에서 2시간 후 UV spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 구하고, 얌빈 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였다¹⁴⁾

4) 총 플라보노이드 함량 측정

얌빈 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Lister 등의 방법에 의해 구하였다¹⁵⁾. 1 mL의 diethylene glycol과 시료추출물 100 μl 및 1N NaOH 10 μl를 잘 혼합시켜 37 °C의 water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 얌빈 추출물의 플라보노이드 함량을 구하였다.

4. 티로시나제 억제 활성 평가

1) L-DOPA 산화 저해 활성 평가

얌빈추출물을 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 70 μl이 되게 하고 33 unit/ml 티로시나제를 30 μl 넣었다. 용액에 12 mM L-DOPA를 100 μl 넣고 37℃에서 4분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성대조군은 kojic acid를 사용하였다.

2) L-Tyrosine 산화 저해 활성 평가

얌빈추출물을 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 120 μl이 되게 하고 333 unit/ml 티로시나제를 30 μl 첨가한다. 용액에 1.5 mM tyrosine을 50 μl 넣고 37℃에서 5분간 반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡

광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 L-DOPA 산화 저해 활성 평가 실험과 동일하게 kojic acid를 사용하였다.

5. 멜라닌 생합성 억제 활성 평가

1) B16F10 세포 생존율

마우스 melanoma 세포인 B16F10에 대한 얌빈 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 세포 생존율을 평가하였다. 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 B16F10세포를 배양 한 후, 세포를 취하여 96well microplate에 각 well에 세포수가 5×10³이 되도록 100 μl씩 분주하였다. 24시간동안 37℃, 5% CO₂에서 배양한 후, 배지를 제거하고, 여러 농도의 각 시료가 포함된 새로운 배지를 넣었다. 24시간 배양 후, 배지 교환없이 MTT를 PBS에 5 mg/ml이 되도록 녹인 용액을 각 well에 20 μl씩 넣은 후, 3시간 더 배양하였다. 배지를 제거하고, 각 well에 DMSO를 100 μl씩 넣어 생성된 formazan을 녹인 후, microplate reader (Tecan, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2) B16F10 세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과

B16F10 melanoma 세포를 이용하여 얌빈 추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 측정하였다. 1 μm α-MSH와 100 μm IBMX를 처리하여 멜라닌 생성을 유도한 후, 얌빈 추출물을 농도 별로 72시간 동안 처리하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 200 μl trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 용해한 후 18,472 ×g에서 10분간 원심 분리하였다. 생성된 pellet을 200 μl NaOH와 10% DMSO에 용해하여 100℃에서 10분간 고정 하였다. 405 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 생합성 억제효과를 확인하였다.

6. 통계분석

데이터는 평균±표준편차로 표현하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 Student's t-test방법에 의하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다 (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Ⅲ. 결 과

1. 항산화 활성 평가

얌빈 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 및 페놀, 플라보노이드 함량을 측정하였다. 얌빈 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정 한 결과, 얌빈 열수 추출물의 IC₅₀값은 1215.65 ± 65.99 μg/ml로 나타났고, 얌빈 70%에탄올추출물의 IC₅₀ 값은 998.10±117.71 μg/ml로 L-ascorbic acid (0.96 ± 0.02 μg/ml)보다는 낮은 효과를 나타내었지만, 얌빈을 열수 추출하였을 때보다 70% 에탄올으로 추출하였을 때 DPPH 라

디칼 소거능이 증가하였음을 확인하였다. ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과, 압빈 열수 추출물의 IC₅₀값은 1825.16 ± 22.87 µg/ml로 나타났고, 압빈 70%에탄올추출물의 IC₅₀값은

1711.71±58.09 µg/ml로 나타나 DPPH 라디칼 소거능 결과와 일치하게 압빈 열수 추출물에 비교하였을 때 압빈 70%에탄올 추출물의 뛰어난 라디칼 소거능을 확인하였다 (Table 1).

Table 1. Scavenging activity of Yambean extract on DPPH and ABTS radical

Sample	Scavenging activity on DPPH free radical (IC ₅₀)	Scavenging activity on ABTS radical (IC ₅₀)
Yambean water extract	1215.65±65.99 µg/ml	1825.16±22.87 µg/ml
Yambean 70% ethanol extract	998.10±117.71 µg/ml	1711.71±58.09 µg/ml
L-ascorbic acid	0.96±0.02 µg/ml	3.66±0.18 µg/ml

압빈 열수 추출물의 총 페놀함량은 1.18±0.03 mg/g으로 나타났으며, 플라보노이드 함량은 3.55±0.06 mg/g으로 나타났다. 압빈 70% 에탄올 추출물의 페놀함량은 1.16±0.01 mg/g으로 나타났으며, 플라보노이드 함량은 1.78±0.03 mg/g으로 나타났다. 압빈 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 페놀 함량은 유사하게 나타났으나 플라보노이드 함량은 압빈을 열

수 추출하였을 때 더 증가하는 것으로 나타났다 (Table 2). 이와 같은 결과로 미루어 보아 압빈 70% 에탄올 추출물이 압빈 열수 추출물 보다 높은 라디칼 소거능을 가지는 것을 확인하였으며, 페놀 및 플라보노이드 함량이 라디칼 소거능을 증가시키는 것에 기인하지 않은 것으로 나타나 추후 연구가 필요한 부분으로 판단하였다.

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid contents of Yambean extract

Sample	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
Yambean water extract	1.18±0.03 mg/g	3.55±0.06 mg/g
Yambean 70% ethanol extract	1.16±0.01 mg/g	1.78±0.03 mg/g

2. 티로시나제 억제 활성

압빈의 미백활성을 평가하기 위하여 버섯에서 유래한 티로시나제에 기질로 L-tyrosine과 L-DOPA를 사용하여 티로시나제 억제활성을 평가하였다. L-DOPA 산화 저해 활성은 압빈 열수 추출물 8 mg/ml에서 46.3 ± 0.58%의 활성이 나타났고 압빈 70% 에탄올 추출물은 61.87 ± 0.76%의 활성을 보였다 (Fig. 1B).

압빈 열수 추출물, 압빈 70% 에탄올 추출물의 tyrosine 산화 저해 활성을 확인한 결과, 양성대조군인 kojic acid는 4 mg/ml에서 100.01 ± 0.05%라는 높은 tyrosinase 억제활성을 보였고 압빈 열수 추출물은 8 mg/ml에서 63.33 ± 0.42%의 활

성을 나타낸 반면 압빈 70% 에탄올 추출물은 94.87 ± 0.14%의 활성을 보였다 (Fig. 1A). 따라서 tyrosine 산화저해 활성 결과는 L-DOPA 산화 활성 저해 실험 결과와 일치하게 압빈을 70% 에탄올에 추출하였을 때 높은 티로시나제 억제활성을 나타냈다. 압빈 70% 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비교하여 우수한 라디칼 소거능을 나타냈을 뿐 아니라, L-tyrosine, L-DOPA 모두에서 뛰어난 티로시나제 억제활성을 보여 이후 B16F10 세포를 활용한 멜라닌 생합성 효능 평가 실험에서는 압빈 70% 에탄올 추출물 및 분획물을 시료로 하여 실험을 진행하였다.

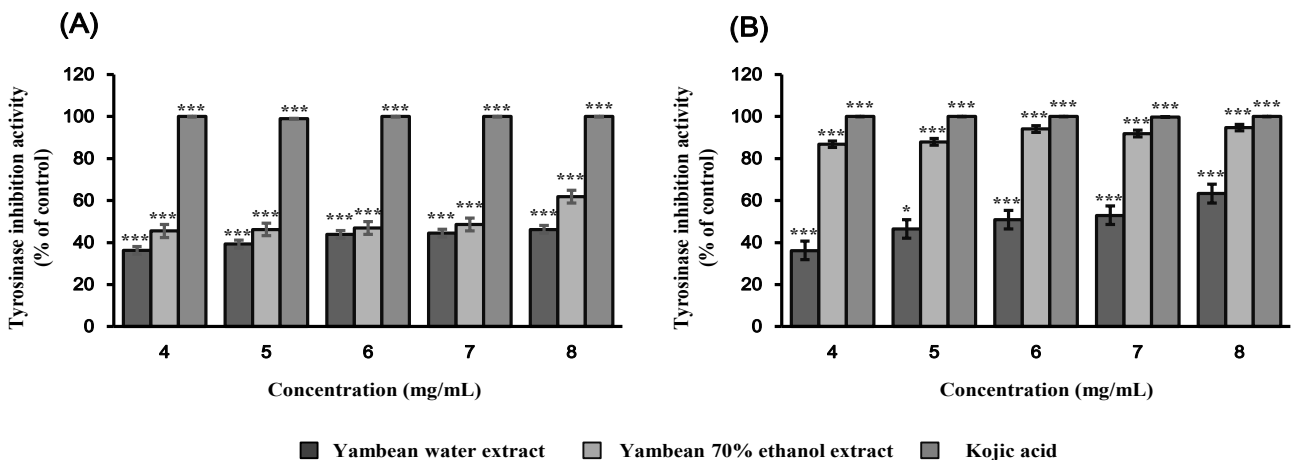


Fig. 1. Inhibitory effects of Yambean extract against mushroom tyrosinase. Tyrosinase inhibitory effects on L-DOPA ; (A), tyrosinase inhibitory effects on L-tyrosine ; (B). Significance: *p <.05, ***p <.001 compared to control without the extract.

3. B16F10 세포 생존율 평가

얌빈 70% 에탄올 추출물 및 H₂O, butanol, hexane, ethyl acetate 분획물의 B16F10 세포에서의 독성을 평가한 결과, 얌빈 70% 에탄올추출물 및 H₂O, butanol 분획물에서는 1000 µg/ml 농도에서 세포독성을 보이지 않는 것을 확인하였다.

하지만, hexane 분획물은 1000 µg/ml 농도에서 77.34 ± 2.86 세포 생존율을 보였으며, ethyl acetate 분획물 또한 1000 µg/ml 농도에서도 60.65 ± 3.46의 비교적 낮은 세포 생존율을 보여 멜라닌 생합성 억제 효과 실험에서는 500 µg/ml 의 농도로 사용하였다 (Fig. 2).

4. 멜라닌 생합성 억제 효과

마우스 유래 melanoma인 B16F10 세포에서 얌빈 70% 에

탄올 추출물과 분획물의 멜라닌 생성량을 살펴본 결과, 얌빈 70% 에탄올추출물은 100 µg/ml에서 80.52 ± 3.96 (% of control)의 멜라닌 생성량을 보인데 비하여 H₂O 분획물에서는 73.35 ± 2.27으로 멜라닌 생성이 감소함을 확인하였다. 특히 ethyl acetate 분획물은 100 µg/ml 농도에서 18.16 ± 2.54의 멜라닌 생성량을 보여 뛰어난 멜라닌 생성억제효과를 나타내었다. 반면, hexane 분획물과 butanol 분획물은 100 µg/ml 농도에서 각각 87.55 ± 5.90, 97.65 ± 5.17의 멜라닌 생성량을 보여 ethyl acetate 분획물에 비해 다소 떨어지는 효능을 나타내었다(Fig. 3,4).

본 결과를 종합해보았을 때, 얌빈 70% 에탄올 추출물 분획물 중 ethyl acetate 분획물은 100 µg/ml 농도에서 B16F10 세포에 세포 독성 없이 멜라닌 합성을 억제함으로써 미백활성을 가지는 것으로 사료된다.

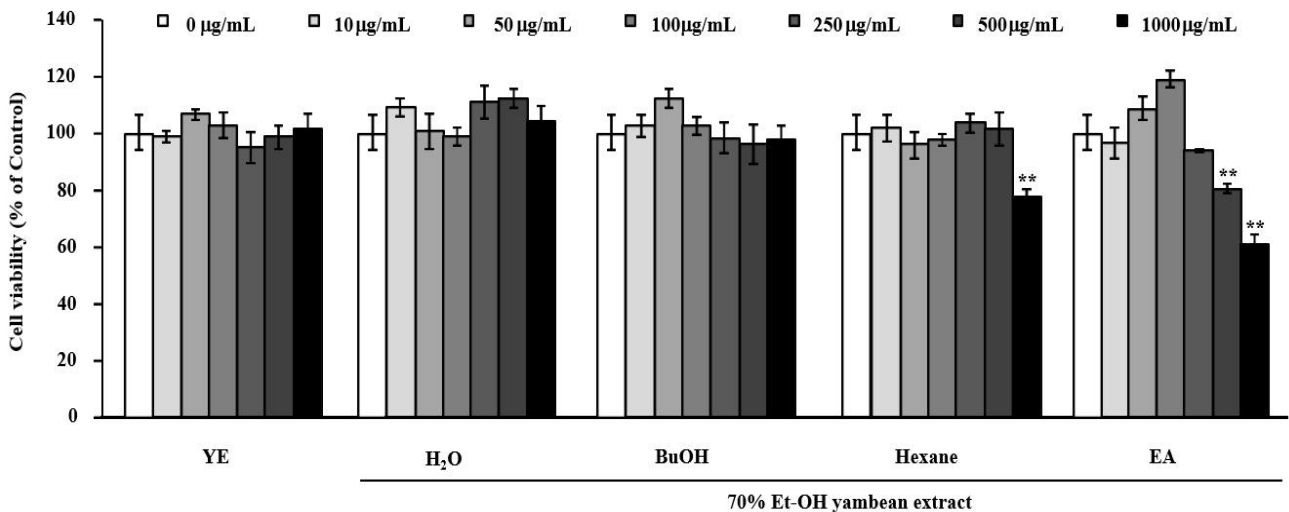


Fig. 2. Effects of Yambean 70% ethanol extract and its fractions on the cell viability. 70% ethanol extract of Yambean ; YE, water fraction of Yambean 70% ethanol extract ; H₂O, butanol fraction of Yambean 70% ethanol extract ; BuOH, n-hexane fraction of Yambean 70% ethanol extract Hexane, ethyl acetate fraction of Yambean 70% ethanol extract EA. Significance: **p* <.05, ****p* <.001 compared with non treated B16F10 melanoma cell (Control).

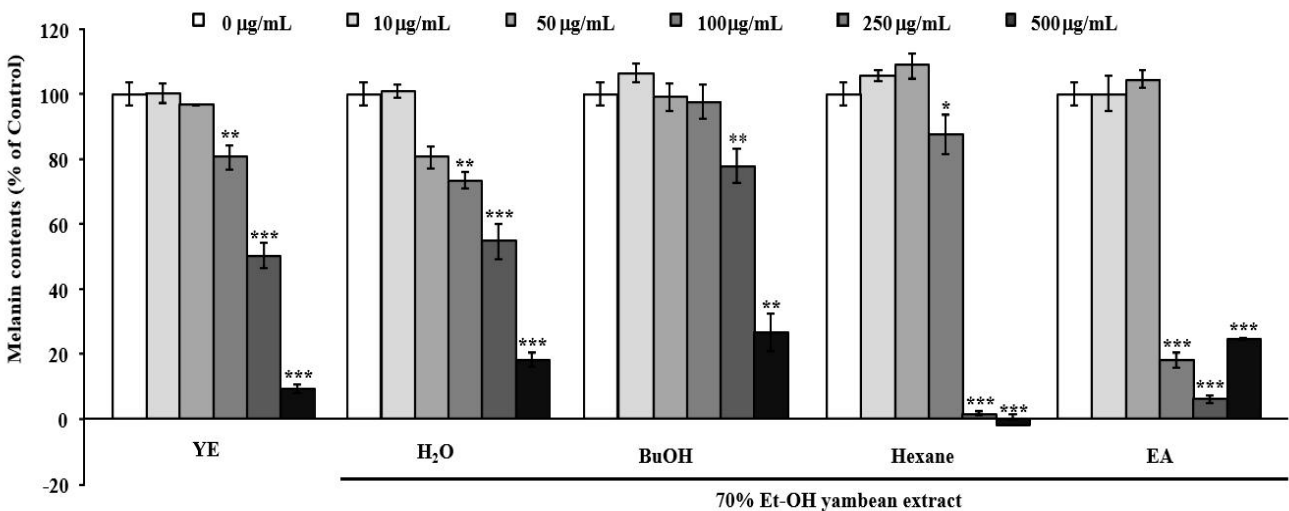


Fig. 3. Inhibitory effects of Yambean extract and its fractions on the melanin content of B16F10 cell. 70% ethanol extract of Yambean ; YE, water fraction of Yambean 70% ethanol extract ; H₂O, butanol fraction of Yambean 70% ethanol extract ; BuOH, n-hexane fraction of Yambean 70% ethanol extract ; Hexane, ethyl acetate fraction of Yambean 70% ethanol extract ; EA. Significance: **p* <.05, ****p* <.001 compared with non treated B16F10 melanoma cell (Control).

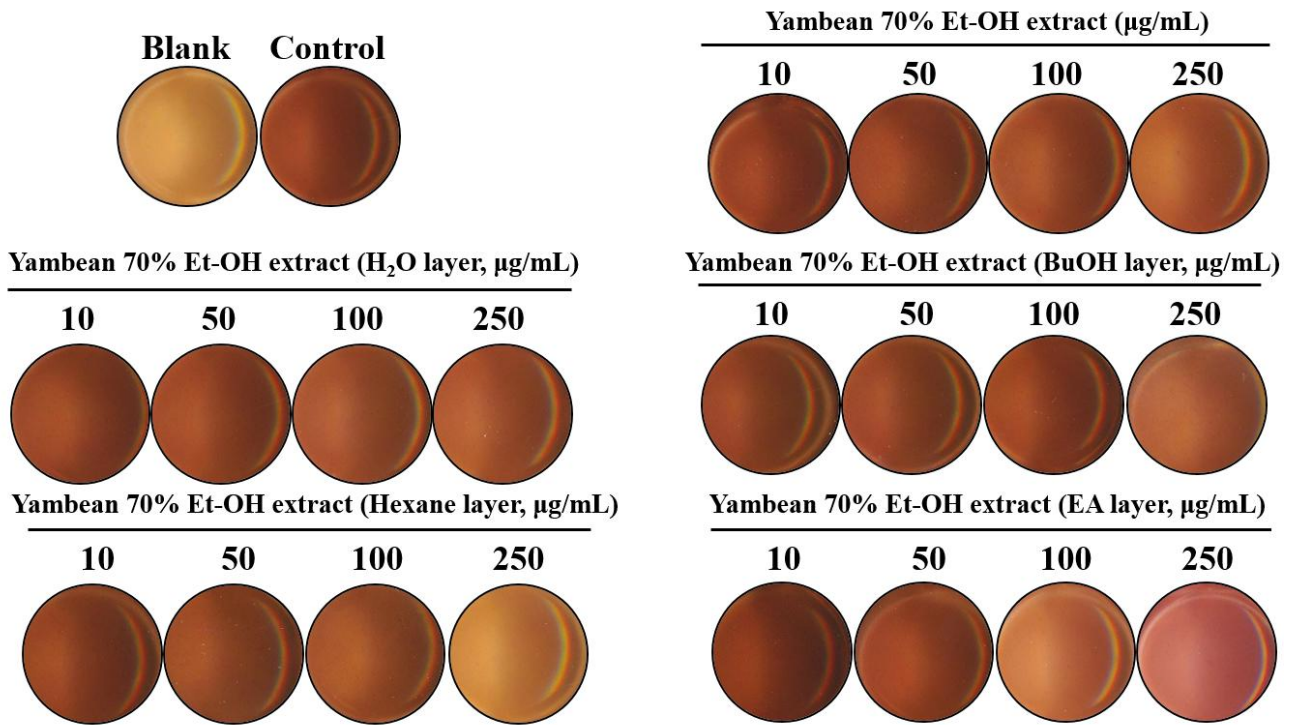


Fig. 4. Inhibitory effects of Yambean extract and its fractions on melanin production in B16F10 cell.

70% ethanol extract of Yambean ;YE, water fraction of Yambean 70% ethanol extract ; H₂O, butanol fraction of Yambean 70% ethanol extract ; BuOH, n-hexane fraction of Yambean 70% ethanol extract ; Hexane, ethyl acetate fraction of Yambean 70% ethanol extract ; EA.

IV. 고찰

본 연구에서는 양빈 열수 추출물의 항산화 및 미백소재로서의 가능성을 알아보기 위하여 DPPH, ABTS radical 소거 활성 및 mushroom tyrosinase 저해활성, B16F10 세포 생존율, melanin 생합성 억제 효능을 평가 하였다.

먼저, 양빈 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. ABTS 라디칼은 극성과 비극성 시료의 소거활동 모두를 측정할 수 있어 DPPH 라디칼 소거법보다 적용범위가 넓다고 알려져 있다. 뿐만 아니라, DPPH 라디칼은 자유라디칼이며, ABTS는 양이온 라디칼이라는 점에서 두 실험법 모두 라디칼 소거능 측정법이라 할지라도 추출물의 특성에 따라 소거능이 다르게 나타날 수 있다¹⁶⁾. 양빈 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 양빈 열수 추출물과 양빈 70% 에탄올 추출물의 IC₅₀값은 각각 $1215.65 \pm 65.99 \mu\text{g/ml}$, $998.10 \pm 117.71 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났고, ABTS 라디칼 소거능은 각각 $1825.16 \pm 22.87 \mu\text{g/ml}$, $1711.71 \pm 58.09 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 따라서 양빈을 열수 추출하였을 때보다 70% 에탄올로 추출하였을 때 라디칼 소거능이 증가하였음을 확인하였다.

식물에 존재하는 페놀은 산화방지제로 작용하며 hydroxyl 라디칼, superoxide 라디칼 소거능과 연관이 있다고 보고되어 있으며, 플라보노이드는 alkyl peroxy 라디칼을 소거하여 산화적 스트레스를 억제함으로써 항산화 효능의 지표로 활용되고 있다¹⁷⁾. 양빈 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 총 페놀함량은 각각 $1.18 \pm 0.03 \text{ mg/g}$, $1.16 \pm 0.01 \text{ mg/g}$ 로 나타났고, 플라보노이드 함량은 $3.55 \pm 0.06 \text{ mg/g}$, $1.78 \pm$

0.03 mg/g 으로 나타나 페놀 함량은 유사한 것으로 확인하였고 플라보노이드 함량은 양빈을 열수 추출하였을 때 더 높은 것으로 나타났다.

티로시나제는 멜라닌 형성 과정 중 두 가지 화학반응을 촉매한다. 첫번째 반응은 기질로서 L-tyrosine을 수산화하여 L-DOPA를 생성하며, 다음은 L-DOPA를 도파퀴논으로 산화시킨다. 이후 도파퀴논은 효소의 촉매작용 없이 세포 내의 pH 조건에 의해 멜라닌을 생성한다¹⁸⁾. 본 연구에서는 2가지 기질 모두에서 티로시나제 저해활성을 평가하였다. L-DOPA를 기질로 하였을 때 양빈 열수 추출물은 8 mg/ml 에서 $46.3 \pm 0.58\%$ 의 저해 활성이 나타났고 양빈 70% 에탄올 추출물은 $61.87 \pm 0.76\%$ 의 저해 활성을 보였다. 티로신 산화 저해 활성 평가는 티로신이 티로시나제를 촉매로 하여 L-DOPA로 산화되는 과정에 양빈 추출물을 첨가하여 산화 저해 활성을 평가하는 실험법이다. 티로신을 기질로 하여 티로시나제 억제활성을 평가한 결과, 양빈 열수 추출물 8 mg/ml 에서 $63.33 \pm 0.42\%$ 의 활성을 나타낸 반면 양빈 70% 에탄올 추출물에서는 $94.87 \pm 0.14\%$ 의 활성을 보였다. 따라서 티로신 저해 활성 결과는 L-DOPA 산화 활성 저해 실험 결과와 일치하게 양빈을 70% 에탄올에 추출하였을 때 티로시나제 억제활성이 뛰어난 것으로 확인되었다.

티로시나제 실험 결과를 토대로 양빈 70% 에탄올 추출물의 분획물을 제조하여 B16F10세포에 처리하여 멜라닌 생합성 억제 활성을 측정하였다. 버섯에서 유래한 티로시나제는 인간의 티로시나제와 아미노산 서열이 23% 동일하며, 마우스에서 유래한 티로시나제는 서열동일성(identity)이 인간의 티로시나제와 82%에 이를 만큼 유사하기 때문에 실험의 정확성이 더

높다¹⁹⁾. 실험에 앞서 B16F10 세포에 얌빈 70% 에탄올 추출물 및 분획물을 24시간 동안 처리하였을 때의 세포독성을 측정 한 결과, 500 µg/ml 이하에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. 따라서 추후의 연구는 500 µg/ml 이하의 농도에서 진행되었다. 멜라닌 생합성 억제 효능을 평가하기 위하여 B16F10세포를 IBMX 및 α-MSH로 자극하였을 때 control 군에서는 멜라닌 함량이 유의하게 증가하였으나, 얌빈 70% 에탄올 추출물 처리 시 감소하였으며 특히 에틸 아세테이트층에서 뛰어난 멜라닌 생성 억제 효능을 나타내었다.

V. 결 론

얌빈 추출물과 분획물의 항산화 효과와 멜라닌 생성 억제 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 얌빈 열수 추출물 및 70% 에탄올 추출물은 항산화 효과를 나타내었다.
2. 얌빈 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물은 유사한 페놀 함량을 나타내고 열수 추출하였을 때 플라보노이드 함량이 다소 증가하였다.
3. 티로신 억제 활성은 L-tyrosine, L-DOPA를 기질로 하였을 때 얌빈 열수 추출물보다 얌빈 70% 에탄올추출물이 우수한 효과를 나타내었다.
4. B16F10 세포에 얌빈 70% 에탄올 추출물 및 분획물을 처리하였을 때 500 µg/ml 이하에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다.
5. B16F10 세포를 IBMX 및 α-MSH로 자극하였을 때, 얌빈 70%에탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 층에서 우수한 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과들로 얌빈 추출물은 항산화효과를 가지고 있고, 얌빈 70% 에탄올 추출물 및 분획물은 티로시나제 억제효과 및 B16F10 세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과가 뛰어나 항산화 및 미백용 소재로서의 활용가능성이 높다고 사료된다.

참고문헌

1. Yoo DH, Joo DH, Lee SY, Lee JY. Antioxidant effect of nelumbo nucifera G. Leaf extract and Inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line. *Journal of Life Science*. 2015 ; 25(10) : 1115-23.
2. Cheng SL, Liu RH, Sheu JN, Chen ST, Sinchaikul S, Tsay GJ. Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *Journal of biomedical science*. 2007 ; 14(1) : 87-105.

3. Nakagawa M, Kawai K, Kawai K. Contact allergy to kojic acid in skin care products. *Contact Dermatitis*, 1995 ; 32(1) : 9-13.
4. Curto EV, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing VJ, Dooley TP. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical pharmacology*. 1999 ; 57(6) : 663-72.
5. Ko MS, Lee HJ, Kang MJ. Antioxidant activities and whitening effects of extracts from Hippophae rhamnoides L., *Journal of east Asian society of dietary life*, 2012 ; 22 : 812-7.
6. Wang KH, Lin RD, Hsu FL, Huang YH, Chang HC, Huang CY, Lee MH. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*. 20016 ; 106(3) : 353-59.
7. Jang YA, Lee JT. The evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging of extract solvent and Poria cocos by parts. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*. 2015 ; 13(3) : 377-83.
8. Uhm MJ, Kim CS, Jin SY, Kim EJ, Kim JM, Song YJ. Comparison on tuber characteristics and yield of Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*) by the different cultivation types: direct seeding vs transplanting. *Korean journal of horticultural science & technology*. 2016 ; 34(5) : 73-4.
9. Lukitaningsih E, Holzgrabe U. Bioactive compounds in bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) as antioxidant and tyrosinase inhibiting agents. *Indonesian journal of pharmacy*. 2014 ; 25(2) : 68-75.
10. Park CJ, Han JS. Hypoglycemic Effect of Jicama (*Pachyrhizus erosus*) Extract on Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Preventive nutrition and food science*. 2015 ; 20(2) : 88-93.
11. Kumalasari ID, Nishi K, Harmayani E, Raharjo S, Sugahara T. Immunomodulatory activity of Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) fiber extract *in vitro* and *in vivo*. *Cytotechnology*. 2014 ; 66(1) : 75-85.
12. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958 ; 181(4617) : 1199-1200.
13. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999 ; 26(9) : 1231-37.
14. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagent. *Journal of biological chemistry*. 1912 ; 12(2) : 239-43.
15. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and

- composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the science of food and agriculture*, 1994 ; 64(2) : 155-61.
16. Shin SL, Lee CH. Antioxidant effects of the methanol extracts obtained from aerial part and rhizomes of ferns native to Korea. *Korean journal of plant resources*, 2010 ; 23(1) : 38-46.
 17. Jeon HY, Kim MH, Kim MR. Antioxidative and antimutagenin activity of ethanol extracts from *Cuscutae semen*. *Korean journal of food and cookery science*, 2008 ; 24(1) : 46-51.
 18. Korner A, Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 1982 ; 217(4565) : 1163-65.
 19. Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K, Kuriki T. Syntheses of arbutin- α -glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of α -arbutin and arbutin on human tyrosinase. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 2003 ; 51(7) : 798-801.