

갯버들 추출물의 항산화 및 미백활성 연구

정용운·박영진[†]

건국대학교 의료생명대학 바이오융합과학부, 의료생명연구소
(2018년 8월 3일 접수, 2018년 9월 10일 수정, 2018년 9월 18일 채택)

Studies on Antioxidant and Whitening Activities of *Salix gracilistyla* Extracts

Yong-Un Jeong and Young-Jin Park[†]

Department of Integrated Biosciences, Research Institute for Biomedical & Health Science,
College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, 268 Chungwon-daero, Chungju-si 27478, Korea
(Received August 3, 2018; Revised September 10, 2018; Accepted September 18, 2018)

요약: 본 연구는 갯버들 추출물의 항산화 활성 및 미백활성을 평가하기 위해 수행하였다. 갯버들 줄기의 용매별 추출물의 총 폴리페놀 함량은 142.60–151.95 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량은 83.43–2.60 mg CE/g으로 확인되었다. 갯버들 줄기의 용매별 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성을 평가한 결과 30% 메탄올 추출물이 가장 높은 항산화 활성(IC₅₀; 19.68 µg/mL)을 나타내었다. Tyrosinase 억제활성은 4종류의 용매 추출물 모두 유사하게 평가되었으며, 30% 에탄올 추출물 200 µg/mL 농도가 가장 높은 억제활성(35.18%)을 나타내었다. 갯버들 추출물 중 메탄올 추출물은 B16F10 세포주의 생존율에 영향을 미치지 않은 농도에서 유의적으로 멜라닌 생합성을 저해하는 것으로 확인되었다. 결과적으로 갯버들 추출물은 항산화 및 미백활성을 가지는 효과적인 화장품 성분으로 사용 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: This study was carried out to evaluate the antioxidant and whitening activities of *Salix gracilistyla* extracts. The total polyphenol contents of the extracts were 142.60-151.95 mg GAE/g and total flavonoid contents were 83.43-92.60 mg CE/g. In 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, the 30% methanol extract showed the highest antioxidant activity (IC₅₀; 19.68 µg/mL). Tyrosinase inhibitory activity was similar in all four solvent extracts, and the highest inhibitory activity (35.18%) was obtained at a concentration of 200 µg/mL of 30% ethanol extract. In addition, methanol extracts did not affect cell viability at all treatment concentrations and were found to significantly reduce the melanin content of B16F10 cells. As a result, it is considered that *Salix gracilistyla* extracts can be used as an effective cosmetic ingredient having antioxidant and whitening activity.

Keywords: antioxidant, tyrosinase, melanin, *Salix gracilistyla*, whitening activity

1. 서 론

인간의 피부와 모발의 색을 결정하는 멜라닌은 피오멜라닌과 유멜라닌으로 구분되며, 멜라닌형성세포에 의해 생성되어 자외선으로부터 피부세포를 보호하는

역할을 한다[1,2]. 자외선에 의한 멜라닌형성세포의 멜라닌의 합성에는 cAMP, protein kinase A (PKA), cAMP response element binding protein (CREB) 등 다양한 인자가 관여하며, 전사조절인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)에 의해 발현된 tyrosinase가 tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로, 또한 L-DOPA를 L-DOPA quinone으로 전환하여 멜라닌

[†] 주 저자 (e-mail: yjpark@kku.ac.kr)
call: 043)840-3601

합성이 유도된다[3]. 그러나 과도한 멜라닌의 생성은 피부의 색소 침착을 일으키고 특히 피오멜라닌은 피부 암을 유발할 가능성이 있다고 보고되었으며[4], 피부 건강뿐만 아니라 미용적인 측면에서도 피부 미백에 대한 관심은 지속적으로 증가하고 있다. 따라서 tyrosinase 활성 및 멜라닌 생합성 경로와 관계된 인자들의 억제 활성을 가지는 미백소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[5-8]. 현재까지 tyrosinase 활성억제 및 미백활성을 가지는 소재가 많이 보고되었으며, 알부틴[9], 코직산[10], 하이드로퀴논[11] 및 비타민 C [12] 등이 대표적이다. 그러나 일부 소재는 안정성이 떨어지거나 피부에 대한 안정성 측면에서 그 사용이 제한되어 있기 때문에 이러한 단점을 극복할 수 있는 미백 소재 개발 연구가 요구되는 상황이다.

버드나무는 버드나무 속(*Salix Genus*)에 속하는 낙엽 활엽 교목으로 약 400여 종이 전 세계에 분포한다[13]. 한국에서는 일반적으로 버드나무(*S. koreensis*)가 가장 대표적인 종이며, 그 외에도 수양버들(*S. babylonica*)과 갯버들(*S. gracilistyla*) 등 총 30여 종이 분포하여 자생한다. 그 외 유럽에서는 일반적으로 *S. alba* (white willow)가 흔히 분포한다[14]. *S. alba*의 껍질(white willow bark)은 예로부터 약용으로 사용되었으며, 해열·진통 작용을 한다는 것이 오래전부터 잘 알려져 있다[15,16]. 주요 성분으로는 아스피린의 전구체인 살리신이 대표적인 활성 성분이며, 이외에도 다양한 배당체와 탄닌 및 방향족 알데히드류가 확인되었다[17]. 버드나무는 항산화능[18], 항염[19], 항비만[20], 항암[21] 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되었으며, 특히 버드나무 가지는 식품의약품 안전처의 식품공전에 등록되어 다양한 분야에 그 활용 가능성이 커지고 있다. 갯버들은 버드나무의 일종으로 한국, 일본, 중국의 강 연안에서 분포하는 식물이다. 갯버들의 높이는 1-2 m이고 뿌리 근처에서 가지가 많이 나오며 어린 가지는 노란빛이 도는 녹색으로 털이 있으며, 잎은 양 끝이 뾰족하고 톱니가 있으며, 잎자루의 길이는 3-10 mm이다[22]. 갯버들 나무껍질은 오래전부터 한방에서는 진통제로 사용되었다. 또한, 줄기와 잎은 피부병과 상처치료를 위한 약재로 사용되었으며, 뿌리는 관절염에 효능이 있는 것으로 알려져 있다[22,23]. 그러나 국내의 다양한 지역에 널리 분포하고 있는 갯버들에 대한 연구는 미흡한 실정이며, 특히 피부 기능 개선을 위한 생리활성 연

구도 거의 이루어지지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 갯버들의 새로운 화장품 소재로서의 가능성을 확인하기 위하여 갯버들 줄기 용매별 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석, DPPH radical 소거능 분석을 통한 항산화 효과, tyrosinase 억제활성 및 B16F10세포주의 멜라닌 생합성 억제능 평가를 통한 미백 효과를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 갯버들 줄기 추출물 제조

본 연구에 사용된 갯버들은 JW 과마켄에서 공급받아 사용하였다. 추출 용매는 30% 에탄올, 70% 에탄올, 30% 메탄올, 70% 메탄올 4종류로 달리하여 사용하였으며, 분쇄된 2 g의 갯버들 줄기를 각 4종류의 용매 50 mL와 혼합하고 75 °C에서 2 h 동안 2회 환류 추출하였다. 여과지(Whatman No.2, GE Health care, UK)를 이용하여 각 용매별 추출물을 여과하고 감압농축기를 이용하여 30% 에탄올, 70% 에탄올, 30% 메탄올 및 70% 메탄올 추출 농축액을 각각 확보하였다.

2.2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 평가

총 폴리페놀 함량은 Dewanto et al.[24]에 의해 기술된 Folin-Ciocalteu (FC) 방법에 의해 분석하였다. 40 μ L (1 mg/mL) 시료 추출물을 20 μ L의 FC 시약 및 20% 탄산나트륨(Na_2CO_3) 수용액 60 μ L와 혼합하여 10 min간 반응하고, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준시료로 사용하였고, 총 페놀 함량은 건조 추출물 무게(g)에 대한 gallic acid equivalents (GAE)의 무게(mg)로 표현하였다. 총 플라보노이드 함량은 Dewanto et al.[24]에 의해 기술된 방법을 변형하여 분석하였다. 25 μ L (1 mg/mL) 시료 추출물을 125 μ L의 멸균증류수와 5% NaNO_2 용액 8 μ L와 혼합하여 5 min간 반응하였다. 반응 후 10% AlCl_3 15 μ L를 첨가하고, 6 min 추가 반응한 후, 시마즈 UV-1800 분광기를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 표준시료로 사용하였고, 총 플라보노이드 함량은 건조 추출물 무게(g)에 대한 catechin equivalents (CE)의 무게(mg)로 표현하였다.

2.3. DPPH 소거능 평가

갯버들 추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거 활성을 평가하였다. 100 μ L의 DPPH 용액(0.2 mM in methanol, Santa cruz Biotechnology, USA)과 메탄올에 희석된 농도별 시료 100 μ L를 각각 혼합 후, 암소에서 10 min간 반응시킨 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 SC₅₀ (DPPH radical이 50% 소거되는 농도)으로 항산화 효과를 나타내었다. 또한 각 용매별 갯버들 추출물의 농도를 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μ g/mL로 달리하여 DPPH radical 소거활성을 분석하였다.

$$DPPH\ radical\ 소거능\ (%) = [1 - (\frac{\text{실험군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}})] \times 100$$

2.4. *In vitro* Tyrosinase 활성 저해능 평가

Tyrosinase 활성 측정은 mushroom tyrosinase (Sigma, Korea)와 기질인 L-tyrosine (Sigma, Korea)을 사용하였다. 다양한 농도의 갯버들 용매별 추출물이 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 40 μ L와 2 mM L-tyrosine 35 μ L를 혼합하고 250 U/mL의 mushroom tyrosinase 5 μ L를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10 min간 반응하였다. 반응 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 저해활성을 평가하였다. 상대적 tyrosinase 저해활성을 양성대조군(arbutin)과 비교하였으며, 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$Tyrosinase\ 저해율\ (%) = [1 - (\frac{C - D}{A - B})] \times 100$$

- A: 티로시나아제를 처리하여 반응한 시료 무처리군의 흡광도
- B: 티로시나아제를 처리하지 않은 시료 무처리군의 흡광도
- C: 티로시나아제를 처리하여 반응한 시료 처리군의 흡광도
- D: 티로시나아제를 처리하지 않은 시료 처리군의 흡광도

2.5. 세포 생존율 평가

세포 생존율 평가는 American type culture collection (ATCC, CRL-6475)로부터 분양받은 B16F10 세포주를 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Korea)과 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Korea)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (Thermo Fisher Scientific, Korea)으로 37 $^{\circ}$ C (5%

CO₂)에서 배양하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 위한 세포는 DMEM (10% FBS)배지가 포함된 96-well plate에 100 μ L씩(3 \times 10³ cells/well) 분주하여 24 h 동안 배양하였다(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂). 새로운 배지로 교환한 후 다양한 농도의 추출물을 3반복 처리하고 72 h 동안 배양하였다(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂). 배양 후 0.5 mg/mL의 MTT (Sigma, USA)를 첨가하여 암조건에서 3 h 동안 추가 배양한 후 배지를 제거하였다. 배양이 완료되면 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, 100 μ L의 dimethyl sulf-oxide (DMSO)를 첨가하여 MTT formazan crystal을 용해시키고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음의 공식으로 나타내었다.

$$세포\ 생존율\ (%) = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.6. B16F10 세포주의 멜라닌 생합성 저해능 분석

DMEM 배지(10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)가 분주된 6-well plate에 B16F10 세포를 2 mL (5 \times 10⁵ cells/well)씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 새로운 배지로 교환된 세포에 다양한 농도의 추출물과 100 nM의 α -MSH를 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건으로 72 h 동안 배양하였다. 배양 후 PBS로 2회 세척하고 0.25%의 trypsin EDTA (Thermo Fisher Scientific, Korea)를 1 mL/well로 처리하였다. 14,000 rpm으로 20 min 동안 원심 분리하여 회수된 세포에 1 N NaOH 150 μ L (10% DMSO)를 첨가하여 1 h 동안 60 $^{\circ}$ C에서 반응하고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 함량을 분석하였다.

2.7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하고 평균값 \pm 표준편 차로 결과를 나타내었다. 통계분석은 Prism (GraphPad Software Inc., USA) 프로그램을 사용하였으며, 처리구 간 간의 유의성 검증은 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA) 및 Tukey's test에 의한 사후검정을 통해 수행하였다.

Table 1. Total Polyphenol, Flavonoid Contents and DPPH Radical Scavenging Rate of *S. gracilistyla* Extracts

Solvent	<i>S. gracilistyla</i> extracts			
	30% MeOH	70% MeOH	30% EtOH	70% EtOH
Yield (%)	8.95	6.85	8.2	8.7
Total polyphenol concentrations (mgGAE/gExt.)*	151.95 ± 0.98	142.60 ± 0.85	151.03 ± 3.09	150.94 ± 4.52
Total flavonoid concentrations (mgCE/gExt.)**	86.27 ± 0.94	83.43 ± 1.03	87.43 ± 0.24	92.60 ± 0.00
DPPH radical SC ₅₀ (μg/mL)***	19.68 ± 0.57	21.69 ± 0.37	22.03 ± 0.03	20.89 ± 0.18

* Expressed as milligram gallic acid equivalents (GAE) per gram extract.

** Expressed as milligram catechin equivalents (CE) per gram extract.

*** SC₅₀; the effective concentration at which the DPPH radicals were scavenged by 50%

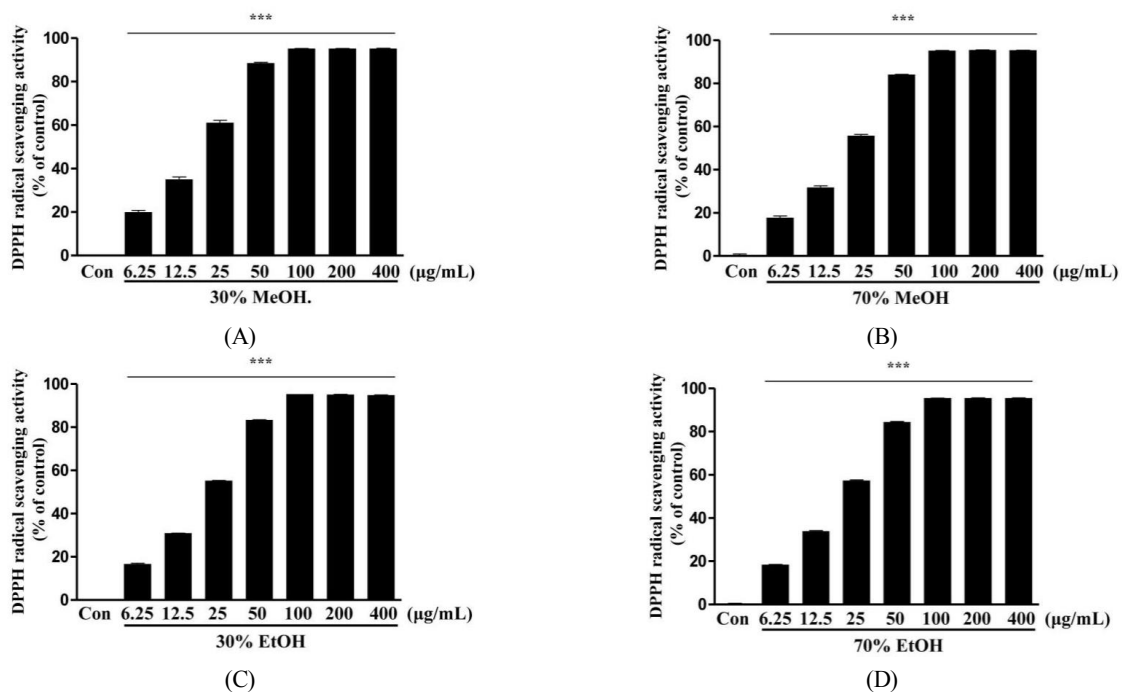


Figure 1. DPPH radical scavenging activities of *S. gracilistyla* extracts. *** $p < 0.001$. Con, non-treated control.

3. 결과 및 고찰

3.1. 갯버들 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

용매에 따른 갯버들 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 Table 1에 나타내었다. 우선 Folin-Ciocalteu 시약을 사용하여 분석한 갯버들의 30% 메탄올, 70% 메탄올, 30% 에탄올 및 70% 에탄올 추출물의 총 페놀 함량은 순서대로 151.95, 142.60, 151.03 및 150.94 mg GAE/g로 분석되었다. 또한 AlCl₃ 방법을 이용한 총 플라보노이드 분석에서 30% 메탄올

추출물 86.27, 70% 메탄올 추출물 83.43, 30% 에탄올 추출물 87.43 및 70% 에탄올 추출물 92.60 mg CE/g으로 70% 에탄올 추출물에서 총 플라보노이드 함량이 가장 높은 것으로 확인되었다(Table 1). 특히, 총 페놀 함량은 갯버들과 근연종인 흰버들의 에탄올 추출물에서 확인된 162.00 mg GAE/g과 유사한 함량임이 확인되었다[25].

일반적으로 새로운 약용 식물의 평가에서 녹차 (*Camellia sinensis* L.)와 같은 잘 알려져 널리 사용되고 있는 약용 식물과 그들의 화학적 특성을 비교하는데

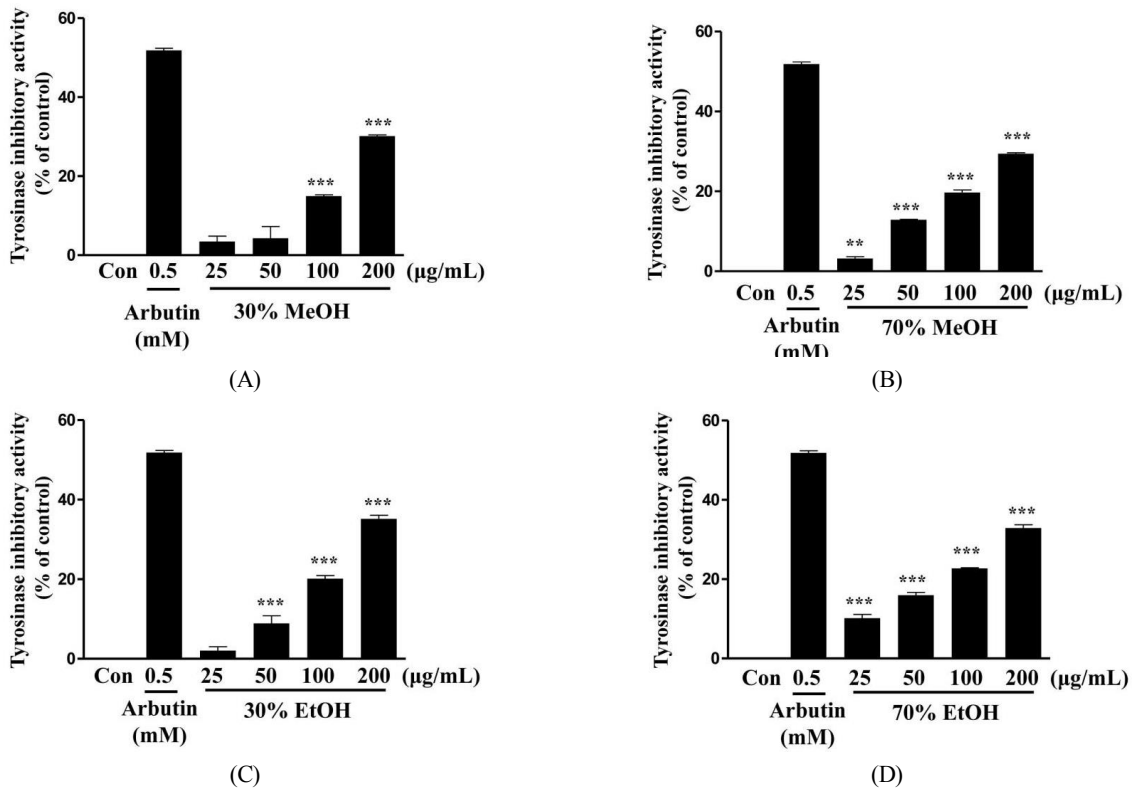


Figure 2. Tyrosinase inhibitory activities of *S. gracilistyla* extracts. *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$. Con, non-treated control.

[26], Stankovic et al.[27]의 보고에 의하면 추출 용매에 따라 16.02-233.68 mg GAE/g의 총 페놀 함량이 녹차에서 분석되었다. 또한 Tsai et al.[28]에 의하면 녹차 열수 추출물에서 237 mg GAE/g의 총 페놀함량 및 44.9 mg CE/g의 총 플라보노이드 함량이 분석되었다. 본 연구에서 확인된 갯버들 추출물의 총 플라보노이드 함량은 녹차 열수 추출물의 총 플라보노이드 함량 보다 약 2 배 정도 많음이 확인되었다.

3.2. 갯버들 추출물의 DPPH Radical 소거활성

갯버들의 용매별 추출물의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능을 통하여 분석하였다. DPPH는 매우 안정한 자유라디칼이며, 일반적으로 항산화제의 DPPH에 대한 수소공여능 또는 라디칼 소거능을 통하여 항산화능을 측정한다[29].

갯버들의 용매별 추출물의 항산화 활성은 IC₅₀ (μg/mL) 값으로 Table 1에 나타내었다. IC₅₀ 값이 낮을 수록 높은 항산화 활성을 의미하며, 4종류의 용매(30% 메탄올 추출물, 70% 메탄올 추출물, 30% 에탄올 추출

물, 70% 에탄올 추출물)를 사용하여 추출한 갯버들 추출물 중 30% 메탄올 추출물이 가장 낮은 IC₅₀ 값(19.68 μg/mL)을 나타내어 가장 높은 항산화 활성이 있음이 확인되었다. 또한 용매별 추출물의 농도를 달리하여 분석한 결과, 4종류의 용매 모두 100 μg/mL 농도에서 95% 이상의 DPPH radical 소거활성을 나타내었다 (Figure 1).

자연에 존재하는 많은 식물은 그들이 가지고 있는 다양한 페놀화합물과 플라보노이드에 의해 항산화 활성이 있는 것으로 보고되고 있다[30]. 이러한 폴리페놀은 활성산소를 제거하고, 플라보노이드는 free radical 소거효과로 다양한 질병을 예방하거나 개선할 수 있다고 보고되었다[31,32]. 따라서 갯버들 추출물의 DPPH radical 소거활성은 다양한 폴리페놀 및 플라보노이드에 의한 항산화 작용과 관련이 있을 것으로 사료된다.

3.3. 갯버들 추출물의 Tyrosinase 억제활성

Tyrosinase 효소는 멜라닌 생합성과 관련된 효소이며, 멜라닌 생합성 경로를 조절하는 중요한 역할은 한

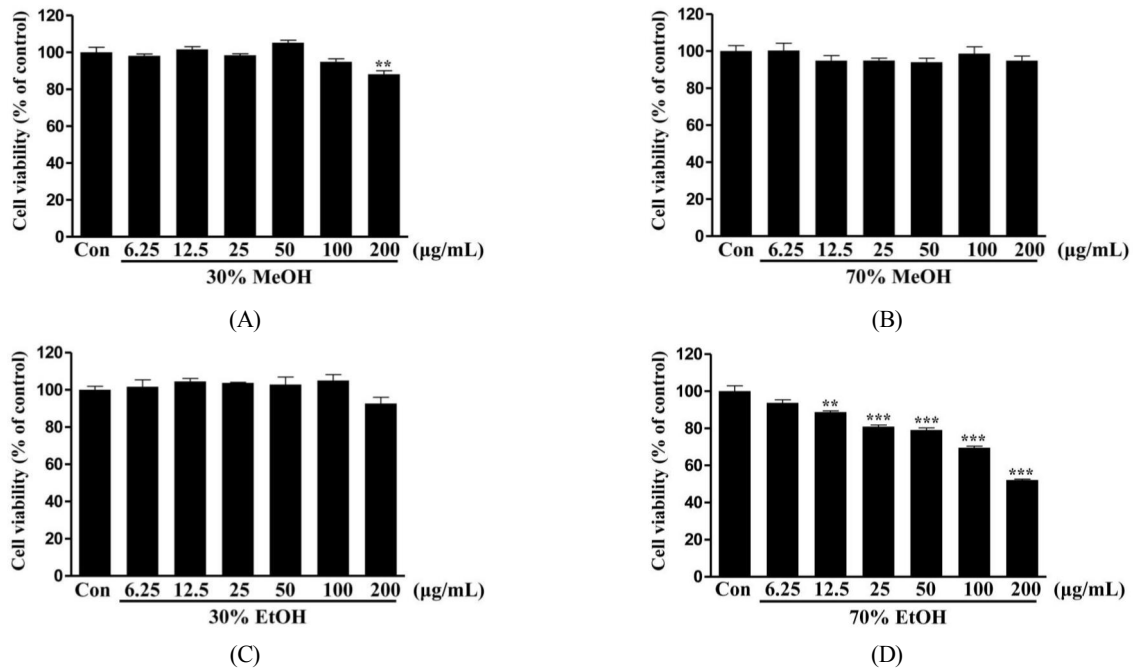


Figure 3. Effects of *S. gracilistyla* extracts on B16F10 cell viability. *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$. Con, non-treated control.

다. 따라서 tyrosinase 활성 억제능을 평가함으로써 다양한 잠재적 미백소재의 발굴이 가능하다[33]. 갯버들 용매별 추출물의 tyrosinase 억제활성을 평가한 결과, 각 용매별 갯버들 추출물의 처리 농도(25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)에 따라 tyrosinase 활성이 억제됨을 확인하였다 (Figure 2). Tyrosinase 억제활성은 4종류의 용매 추출물 모두 유사하게 평가되었다. 그중 30% 에탄올 추출물은 25 $\mu\text{g/mL}$ 를 제외한 모든 농도에서 유의적으로 억제활성을 나타내었고, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 가장 높은 억제활성(35.18%)이 있는 것으로 확인되었다(Figure 2C). 이것은 양성 대조군인 arbutin (0.5 mM)의 억제활성인 51.85%의 약 67.8%의 상대 억제활성을 나타내는 것이다. 이러한 결과는 갯버들 추출물 중 tyrosinase 억제활성이 있는 성분이 있다는 것을 의미하며, 향후 추가적인 분석을 통하여 미백활성이 있는 신규 물질의 발굴이 가능할 것으로 사료된다.

3.4. 갯버들 추출물이 B16F10 세포주의 생존율 및 멜라닌 합성에 미치는 영향

Tyrosinase 저해 활성이 확인된 갯버들 용매별 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 분석하기 위해 B16F10 세포주에 대한 MTT 분석을 수행하였다(Figure

3). 세포 생존율 분석결과, 70% 메탄올 및 30% 에탄올 추출물은 처리된 모든 농도(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)에서 B16F10 세포에 대한 생존율에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다(Figure 3B, C). 그러나 30% 메탄올 추출물 중 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포 생존율에 영향을 주는 것이 확인되었으며(Figure 3A), 70% 에탄올 추출물의 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 를 제외한 모든 처리 농도에서 B16F10 세포에 대한 생존율이 감소하는 것으로 확인되었다(Figure 3D). 30% 에탄올 추출물은 통계 분석에 의해 세포 생존율에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었으나, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포 생존율이 다소 감소하는 것이 확인되었다(Figure 3C). 70% 메탄올 추출물은 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며(Figure 3B), tyrosinase 저해 활성 분석 결과를 통하여 200 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서도 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 범위에서 더욱 효과적인 tyrosinase 저해능이 나타날 것으로 사료된다. 또한, 갯버들 용매별 추출물 처리로 인한 tyrosinase 활성 억제가 멜라닌 함량 감소에도 영향을 미치는가를 평가하기 위해 B16F10 세포의 멜라닌 함량을 분석하였다. 그 결과, 갯버들 용매별 추출물 중 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 30% 메탄올 추출물을 제외한 모든 용매별 추출물 처리는 B16F10

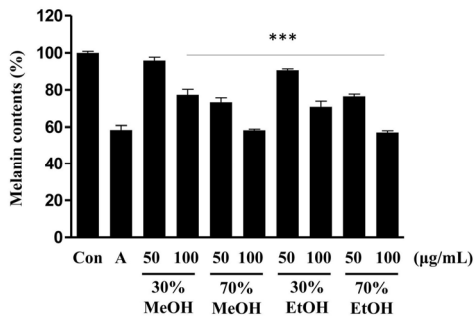


Figure 4. Effects of *S. gracilistyla* extracts on melanin production of B16F10 cells. ****p* < 0.001. Con, non-treated control. A, arbutin (0.5 mM).

세포의 멜라닌 함량을 감소시키는 것이 확인되었다 (Figure 4). 또한 100 µg/mL 농도의 70% 메탄올 및 70% 에탄올 추출물은 각각 58.33% 및 57.10%로 알부틴 처리(0.5 mM)에 따른 감소율인 58.42%와 유사한 결과로 확인되었다. 세포 생존율 분석에서 70% 에탄올 추출물은 모든 처리 농도에서 B16F10 세포의 생존율을 감소하는 것으로 확인되었으며(Figure 3), 메탄올 추출물은 모든 처리농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것이 확인되어, 갯버들 메탄올 추출물이 보다 효과적이며 안전한 미백소재로 활용 가능할 것으로 사료된다. 멜라닌 세포의 멜라닌 생성에는 대표적으로 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 및 cAMP 의존적 멜라닌 생합성 경로가 존재하며, 이러한 경로에는 extracellular signal-regulated kinases (ERKs), p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 CREB 등 다양한 인자들이 관여하는 것으로 보고되었다[3]. 결과적으로 추가적인 연구를 통하여 갯버들 메탄올 추출물에 함유된 tyrosinase 저해 활성을 가지는 활성 성분 및 멜라닌 생합성 경로에 관여된 인자들에 대한 작용 기작 규명이 필요하며, 이를 통해 새로운 미백 기능성 소재의 발굴이 가능할 것으로 사료된다.

4. 결 론

많은 식물유래 소재에는 잘 알려진 비타민 C, 비타민 E 및 카로티노이드 이외의 다량의 페놀계 산화 방지제가 함유되어있는 것으로 알려져 있다. 이러한 페놀계 항산화제는 주로 페놀산[34]과 플라보노이드[35]

및 카테킨[36]이 알려져 있다. 식물유래 소재에 많이 함유되어 있는 몇몇 페놀 화합물은 지질 과산화를 막고 DNA 산화 손상을 방지하며, 대사과정 중 생성되는 활성 산소 종(¹O₂, H₂O₂, OH)을 제거하는 능력이 있다고 보고되었다[34,37]. 특히 버드나무는 항산화능[18], 항염[19], 항비만[20], 항암[21] 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되어 본 연구에서는 갯버들(*S. gracilistyla*)을 대상으로 항산화 및 미백 효과를 규명하고자 하였다. 갯버들 줄기의 용매별 추출물 또한 DPPH radical을 소거하는 항산화 효능을 나타내었으며, tyrosinase 활성이 추출물 처리 농도에 의존적으로 저해되는 것을 확인하였다. 또한 B16F10 세포의 멜라닌 생합성이 갯버들 추출물 처리로 유의적으로 감소하는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 갯버들 추출물이 항산화 및 미백 활성을 갖는 기능성 화장품 소재로 활용이 가능하다는 것으로 시사한다.

Acknowledgement

본 연구는 중소벤처기업부의 기술혁신개발사업의 일환으로 수행하였음[S2447548, 영지버섯 균사체를 이용한 발효 갯버들 함유 항노화 화장품 개발 및 사업화].

Reference

1. S. Ito and K. Wakamatsu, Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review, *Pigment cell res.*, **16**, 523 (2003).
2. Y. M. Yoon, S. H. Bae, S. K. An, Y. B. Choe, K. J. Ahn, and I. S. An, Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **11**, 417 (2013).
3. J. W. Kim, H. I. Kim, J. H. Kim, O. C. Kwon, E. S. Son, C. S. Lee, and Y. J. Park, Effects of ganodermanondiol, a new melanogenesis inhibitor from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1798 (2016).
4. M. Brenner and V. J. Hearing, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 539 (2008).

5. S. Parvez, M. Kang, H. S. Chung, C. Cho, M. C. Hong, M. K. Shin, and H. Bae, Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents, *Phytother. Res.*, **20**, 921 (2006).
6. N. Baurin, E. Arnoult, T. Scior, Q. T. Do, and P. Bernard, Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity, *J. Ethnopham.*, **82**, 155 (2002).
7. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**, 2902 (1991).
8. G. Prota, The chemistry of melanins and melanogenesis, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **64**, 93 (1995).
9. K. Maeda and M. Fukuda, Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765 (1996).
10. J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 982 (1994).
11. A. Palumbo, M. d'Ischia, G. Misuraca, and G. Prota, Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone, *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 85 (1991).
12. T. S. Chang, An updated review of tyrosinase inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 2440 (2009).
13. D. Mabberley, Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses, Cambridge University Press, Cambridge (2017).
14. M. H. Kim, Antioxidant activity and anti-inflammatory effects of *Salix koreensis* Andersson branches extracts, *J. Korean Soc. Food Cult.*, **33**, 104 (2018).
15. Q. Du, G. Jerz, L. Shen, L. Xiu, and P. Winterhalter, Isolation and structure determination of a lignan from the bark of *Salix alba*, *Nat. Prod. Res.*, **21**, 451 (2007).
16. A. Freischmidt, G. Jrgenliemk, B. Kraus, S. N. Okpanyi, J. Mller, O. Kelber, D. Weiser, and J. Heilmann, Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised willow bark extract, *Phytomedicine*, **19**, 245 (2012).
17. R. S. Shivatare, M. L. Phopase, D. H. Nagore, S. U. Nipanikar, and S. S. Chitlange, Development and validation of HPLC analytical protocol for quantification of salicin from *Salix alba* L., *Inventi Rapid: Pharm Analysis Quality Assurance*, **2015**, 61 (2015).
18. M. S. Alam, G. Kaur, Z. Jabbar, K. Javed, and M. Athar, Evaluation of antioxidant activity of *Salix caprea* flowers, *Phytother. Res.*, **20**, 479 (2006).
19. X. Li, Z. Liu, X. F. Zhang, L. J. Wang, Y. N. Zheng, C. C. Yuan, and G. Z. Sun, Isolation and characterization of phenolic compounds from the leaves of *Salix matsudana*, *Molecules*, **13**, 1530 (2008).
20. L. K. Han, M. Sumiyoshi, J. Zhang, M. X. Liu, X. F. Zhang, Y. N. Zheng, H. Okuda, and Y. Kimura, Anti-obesity action by polyphenols of *Salix matsudana* in high fat-diet treated rodent animals, *Phytother. Res.*, **17**, 1188 (2003).
21. S. Sultana and M. Saleem, *Salix caprea* inhibits skin carcinogenesis in murine skin: inhibition of oxidative stress, ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis, *J. Ethnopharmacol.*, **91**, 267 (2003).
22. S. K. Kim, Ph. D. Dissertation, Nambu Univ., Gwangju, Korea (2017).
23. J. H. Seo, Master's Thesis, Andong National Univ., Andong, Korea (2001)
24. V. Dewanto, X. Wu, K. K. Adom, and R. H. Liu, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3010 (2002).
25. G. M. Sulaiman, N. N. Hussien, T. R. Marzoog, and H. A. Awad, Phenolic content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanolic extract of *Salix alba*, *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, **9**, 41 (2013).
26. R. M. Costa, A. S. Magalhaes, J. A. Pereira, P. B. Andrade, P. Valentao, M. Carvalho, and B. M. Silva, Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: a comparative study with green tea (*Camellia sinensis*), *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 860 (2009).
27. M. S. Stankovic, N. Niciforovic, M. Topuzovic, and

- S. Solujic, Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **25**, 2222 (2011).
28. P. J. Tsai, T. H. Tsai, C. H. Yu, and S. C. Ho, Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea, *Food Chem.*, **103**, 181 (2007).
29. C. C. Wei, C. W. Yu, P. L. Yen, H. Y. Lin, S. T. Chang F. L. Hsu, and V. H. Liao, Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- β toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia*, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 10701 (2014).
30. Y. S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4113 (1998).
31. N. Nakatani, Recent advances in the study on natural antioxidants, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 569 (1990).
32. K. Nozaki, Current aspect and future condition of phytogetic antioxidants, *Fragrance Journal*, **6**, 99 (1986).
33. A. Slominski, D. J. Tobin, S. Shibahara, and J. Wortsman, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiol. Rev.*, **84**, 1155 (2004).
34. Y. H. Cao and R. H. Cao, Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature*, **398**, 381 (1999).
35. H. L. Madsen and G. Bertelsen, Spices as antioxidants, *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 271 (1995).
36. F. Shahidi, P. K. Janitha, and P. D. Wanasundara, Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 67 (1992).
37. M. P. Kahkonen, A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala, and M. Heinonen, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954 (1999).