



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



2018년 2월
석사학위 논문

오디 알코올 추출물의 항산화
및 미백기능성 분석

조선대학교 산업기술융합대학원

미용향장학과

조미래

오디 알코올 추출물의 항산화 및 미백기능성 분석

Anti-oxidative and whitening functional
analysis of *Morus alba* Pretanol A extract.

2018년 2월

조선대학교 산업기술융합대학원

미용향장학과

조 미 래

오디 알코올 추출물의 항산화 및 미백기능성 분석

지도교수 이종현

이 논문을 미용향장학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2017년 10월

조선대학교 산업기술융합대학원

미용향장학과

조미래

조미래의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 병 래 

위원 조선대학교 교수 류 은 미 

위원 조선대학교 교수 이 중 현 

2017년 11월

조선대학교 산업기술융합대학원

목 차

LIST OF FIGURES	III
List of Abbreviations	IV
ABSTRACT	VI
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
II-1. 재료 및 시약	4
II-2. 분석기기	5
II-3. 세포배양	5
II-4. 추출물제조	5
II-5. 세포독성	6
II-6. 아질산염 소거능	6
II-7. 항산화 활성 측정	7
II-7-a. 전자공여능 확인	7
II-7-b. 총 폴리페놀 함량 측정	8
II-7-c. 총 플라보노이드 함량 측정	8
II-7-d. 유사 SOD 활성 측정	9
II-8. 미백기능성 분석	9
II-8-a. 세포배양	9
II-8-b. 세포독성	10
II-8-c. Tyrosinae 저해활성 측정	10

II -8-d. Melanin 생합성 저해율 측정	11
III. 결과 및 고찰	12
III-1. 세포독성	12
III-2. 아질산염 소거능	14
III-3. 항산화 활성 측정	16
III-3-a. 전자공여능 확인	16
III-3-b. 총 폴리페놀 함량 측정	18
III-3-c. 총 플라보노이드 함량 측정	20
III-3-d. 유사 SOD 활성 측정	22
III-4. 미백기능성 분석	24
III-4-a. 세포독성	24
III-4-b. Tyrosinase 저해활성 측정	26
III-4-c. Melanin 생합성 저해율 측정	28
IV. 요약 및 제언	30
V. 참고문헌	32
VI. 감사의 글	36

LIST OF FIGURES

- Figure 1. Explanation of *M. alba*.
- Figure 2. Cytotoxicity of *M. alba* pretanol A extracts
on Raw 264.7 cells.
- Figure 3. Effect of *M. alba* pretanol A Extracts on NO production
in LPS stimulated Raw 264.7 cells.
- Figure 4. Electron donationg ability from *M. alba* pretanol A extracts.
- Figure 5. Total phenolic contents of *M. alba* pretanol A extracts.
- Figure 6. The flavonoid contents of *M. alba* pretanol A extracts.
- Figure 7. Superoxide dismutase – like activity
of *M. alba* pretanol a extracts.
- Figure 8. Cytotoxicity of *M. alba* pretanol A extracts on B16F10.
- Figure 9. Effect of *M. alba* pretanol A extracts on cellular tyrosinase
activity of B16F10 melanoma cells.
- Figure 10. Inhibitory effect of *M. alba* pretanol A extracts on
melaninogenesis of cultured B16F10 melanoma cells.

List of Abbreviations

Butylated hydroxy toluen	BHT
Butylated hydroxy anisole	BHA
Cyclooxygenase-2	COX-2
Dulbecco's modified Eagle's medium	DMEM
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Dulbecco's phosphate-buffered saline	DPBS
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical	DPPH
Ethylenediaminetetraacetic Acid	EDTA
Fetal bovine serum	FBS
Interleukin	IL
Nitric oxide synthases	iNOS
Lipopolysaccharide	LPS
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	MTT
Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	NK-κB
Nitric oxide	NO
Phosphate-buffered saline	PBS
ProstaglandinE ₂	PGE ₂
Penicillin streptomycine	P/S

Reactive oxygen species	ROS
Superoxide Dismutase	SOD
Tumor necrosis factor alpha	TNF- α

ABSTRACT

Anti-oxidative and whitening functional analysis of *Morus alba* pretanol A extract.

Mi-Rae, Jo

Advisor : Prof. Jung-Heon, Lee Ph.D.

Department of Beauty Cosmetic Industrial
Technology Convergence Graduate School
of Chosun University

Regardless of age and gender, we focus on anti-aging. There have been many studies using many physiologically active substances effective in preventing aging. Oxygen is the most abundant element on Earth and accounts for about 21% of the atmosphere. All aerobic organisms use breathing as energy to obtain oxygen, which is vital to maintaining life. Hydrogen radical (HO), Hydrogen peroxide (H_2O_2), Singlet oxygen (O_2) are various physical and chemical factors such as reactive oxygen photochemical reaction, internal factors that reduce the energy, internal enzymes, metabolism by the reaction of oxygen and nutrients, Chemical and environmental factors. These reactive oxygen species are useful for protecting microorganisms in the body, but they also have both sides that cause oxidative stress that is harmful to the body.

The skin color of a person varies according to race, environment, age, etc. The most important factor in determining this is the biomolecule material in the natural world called melanin. Melanin is known as a pigment that determines the color of human skin, and it prevents skin damage from ultraviolet rays or

free radicals. However, overproduction and accumulation may lead to various skin diseases such as melanoma, freckles, black spot, and pigmentation syndrome. Melanin is produced in the organelle called Melanosome of Melanocyte and transformed into keratinocytes in the basal layer of the epidermis in response to exposure of the skin to sunlight, stress and melanin stimulating factors. Tyrosine, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) and cyclic adenosine are two enzymes that act as tyrosine enzymes in melanin biosynthesis. Adrenocorticotropic hormone (ACTH), which is a monophosphate (cAMP) inducer, and Forskoline and α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH). Melanin is synthesized in the melanocyte of Melanocyte of the human epidermal layer. Tyrosinase oxidizes Tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and is converted to DOPA quinone by enzymatic chemical reaction. It then undergoes autoxidation and enzymatic reactions to produce dark brown melanin via DOPA chrome. Recently, inhibition of tyrosinase activity, which inhibits the formation of melanin, a dark brown complex, has been used as an effective method for the development of skin whitening agents. Recently, side effects such as BHA (Butylated Hydroxyanisole) and BHT (Butylated Hydroxytoluene) There have been many studies to develop antioxidants from natural resources. Antioxidants obtained from natural resources have been known to have anti-inflammatory properties as much as synthetic antioxidants. Natural extracts from plants have been shown to be effective against UV absorption, antiinflammatory action, antioxidant activity, inhibition of enzymes such as collagenase, inhibition of tyrosinase, (經皮) to improve the absorption of various effects such as the effect of protecting the skin may also appear. Oxidative stress has been studied together with whitening as a major factor causing skin photoaging, black spot, spots and freckles. As a result, it is possible to prevent the melanin pigment which is formed by the progress of oxidation through antioxidant and reactive oxygen scavenging. Therefore, using natural extracts extracted from plants, antioxidant and whitening function and other functions will be seen through the functional cosmetics research will be activated.

In this study, *Morus alba*, which is expected to have antioxidant and whitening function, was extracted from the macrophage cell line to decrease NO production after LPS stimulation, and to analyze the anti-inflammatory effect, DPPH radical scavenging activity, The antioxidant activity of the extracts was analyzed by the flavonoid content analysis, and the tyrosinase inhibitory activity and the inhibitory effect of melanin formation on melanoma cell line B16F10 were analyzed.

Raw 264.7 macrophage Cell viability was 90% or more and cell viability was 81% at 10 and 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ treatment. Thereafter, it was confirmed that the cell survival rate was decreased in a concentration dependent manner.

In this experiment, nitrite scavenging activity was 22.3, 33.1, and 53.4%, respectively, when the concentrations of *M. alba* pretanol A extracts were 5, 10 and 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively, compared to the LPS (0.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) At a concentration of at least 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 22.3% of LPS secretion was reduced and compared with previous papers, results were obtained at low concentrations.

The DPPH radical scavenging activities of *M. alba* pretanol A extracts were 48.8, 55.9 and 66.5% when treated with 5, 10 and 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively.

Total phenol content was 31.4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ tannic acid equivalent at 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ concentration of *M. alba* pretanol A extract. The total phenol content was also increased proportionally with increasing concentration of extract, and 5, 10 and 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ The total phenol contents were 8.3 ± 0.6 , 25.0 ± 0.6 and 31.4 ± 0.3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ tannic acid equivalent, respectively.

The total flavonoid content of 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of *M. alba* pretanol A extract was 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ naringin equivalent, and the content of flavonoid increased proportionally with increasing concentration of extract. As the concentration of *M. alba* pretanol A extract increased, the naringin equivalents tended to

increase.

M. alba extract showed 57.6 ± 0.006 , 62.8 ± 0.004 and $72.0 \pm 0.003\%$ scavenging activity at concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively. SOD-like activity tended to depend on the concentration, and these results show that the *M. alba* pretanol A extract is valuable for preventing skin aging by natural materials.

To determine the cytotoxicity of *M. alba* pretanol A extracts from melanoma cells, B16F10, *M. alba* pretanol A extracts were treated with 0.1, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of extracts and cultured for 24 hours. The cell survival rates of *M. alba* pretanol A extracts of 0.1, 1, 10 and 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ were 81% or more. At 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, there was no toxicity, and thereafter, the cell survival rate was decreased in a concentration-dependent manner.

The tyrosinase activity of *M. alba* pretanol A extract was decreased in a dose dependent manner. The positive control group, arbutin, showed 10% inhibition activity at 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The *M. alba* pretanol A extract showed a tyrosinase inhibitory effect of 32% at a concentration of 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Melanin production by *M. alba* pretanol A extract was 42.8% in the control group Arbutin 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$, and the amount of melanin was decreased in a concentration-dependent manner. Melanin biosynthesis at the concentration of 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ was 58.3 % Inhibition effect.

As a result of this study, the natural antioxidant and whitening function of the natural extracts extracted from *M. alba* has been proven to be active. It will also be useful as a material and functional ingredient material that is worthy of natural antioxidants in the future.

I. 서 론

기존사회와는 다른 현대사회의 향상된 생활수준으로 사람들의 관심이 연령과 성별에 관계없이 노화 방지에 집중되고 있다. 그에 맞게 노화 예방에 효과적인 많은 생리활성 물질들을 이용하는 연구가 많이 진행 중에 있다. 산소는 대기 중의 약 21%를 차지하는 지구상에 존재하는 가장 많은 원소이다. 모든 호기성 생물은 생명 유지에 절대적으로 필요한 산소를 호흡을 통해 에너지로 획득하게 되는데, 산소와 영양물질이 반응해 에너지를 만드는 대사과정, 체내 효소계, 환원대사의 내적요인, 화학약품, 공해물질, 광화학 반응 (Photochemical reaction) 등 각종 물리적 화학적, 환경적 외적 요인 등에 의해 Superoxide radical(O_2^-), Hydroxyl radical(HO), Hydrogen peroxide(H_2O_2), Singlet oxygen(O_2)의 반응성이 큰 활성산소(Reactive oxygen)로 전환된다. 이런 활성산소는 체내의 미생물에 방어적으로 유용하게 이용되지만 생체에 유해한 산화적 스트레스 (Oxidative stress)를 일으키는 양면성도 지닌다.¹⁾

사람의 피부색은 인종, 환경, 연령 등에 따라 다른데, 이를 결정하는 가장 큰 요인은 멜라닌 (Melanin)이라는 자연계에 존재하는 생체 고분자 물질이다. 멜라닌은 인간의 피부 색깔을 결정짓는 색소로 알려져 있으며, 자외선이나 활성산소(Free radical)로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는 역할을 한다.^{2,3)} 그러나 과잉 생성 및 축적이 될 시에는 흑색종, 주근깨, 검버섯 등 색소 침착 증후군과 같은 다양한 피부병 질환을 유발할 수 있다.⁴⁾ 멜라닌은 멜라닌 세포 (Melanocyte)의 멜라닌 소체 (Melanosome)라는 소기관에서 생산되어 햇빛, 스트레스 및 멜라닌 자극 인자에 대한 피부의 노출에 대한 반응으로 표피의 기저층에 있는 각질 세포로 전이된다.⁵⁾ 멜라닌의 생합성 과정에는 Tyrosine이라는 주요 효소가 작용하는데, Polyphenol oxidase의 일종으로 구리를 함유한 효소이며 Tyrosinase, Tyrosinase related protein-1 (TRP-1), Tyrosinase related protein-2 (TRP-2)과 cyclic Adenosine monophosphate (cAMP) 유도물질인 Adrenocorticotrophic hormone (ACTH), Forskoline과 α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH) 등에 의해 조절된다. 멜라닌은 인체표피층의 Melanocyte 내의 Melanosome에서 합성되는데, Tyrosinase 가 Tyrosine을 산화시켜 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)으로 변환하고

효소적 화학반응에 의해 DOPA quinone으로 전환된다. 이후 자동산화반응과 효소 반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 멜라닌을 생성시킨다.^{6,7,8)} 따라서 흑갈색의 공동합체인 멜라닌의 생성을 억제하는 Tyrosinase 활성 억제 실험은 피부 미백제 개발에 유용한 평가법으로 사용되고 있다.⁹⁾ 최근 폐놀계 합성 항산화제 BHA (Butylated Hydroxyanisole), BHT (Butylated Hydroxytoluene) 등의 부작용들이 밝혀져 천연 자원으로부터 항산화제를 개발하려는 연구가 많이 이루어지고 있다. 천연 자원에서 얻어진 항산화 물질들이 합성 항산화제만큼의 항염증 능력이 있다고 알려진 연구도 나왔으며,¹⁰⁾ 식물로부터 추출한 천연 추출물은 자외선 흡수, 항염증 작용, 항산화 작용, Collagenase와 같은 효소 억제, Tyrosinase 억제와 더불어 경피 (經皮)의 흡수력을 향상 시켜주는 등 다양한 작용을 통해 피부를 보호하는 효과를 나타내기도 한다.¹¹⁾ 피부의 광노화를 유발하고, 검버섯과 기미, 주근깨 등을 생성시키는 주요 요인으로 산화적 스트레스는 미백과 연관되어 함께 연구되고 있다.¹²⁾ 이를 통해 항산화 물질과 활성산소 소거를 통해 산화과정이 진행되면서 형성되는 멜라닌 색소를 막을 수 있다고 보인다.¹³⁾ 따라서 식물로부터 추출한 천연 추출물을 이용해 항산화와 미백기능성 등의 기능을 보고 이를 통해 기능성 화장품 연구가 활성화 될 것이다.

오디는 뽕나무의 열매로 달고 차며 독이 없고, 혈기를 통하게 한다. 꽃의 색소는 플라보노이드계에 속하는 안토시아닌으로서 주황색, 분홍색, 보라색 등을 나타내고 열매인 오디는 색소를 다량으로 함유한 과실로서 주로 안토시아닌 계통의 색소를 가지고 있으며 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside가 주성분이다.³⁸⁾

그래서 본 연구에서는 항산화 및 미백기능성을 가지고 있을 것으로 예상되는 오디 (*Morus alba*)를 추출하여 대식 세포주에서 LPS 자극 후 NO 생성량 감소를 통해 항염증 효능 분석, DPPH radical 소거능, 유사 SOD 활성 측정, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석을 통해 추출물의 항산화 효능을 분석하고 Melanoma 세포인 B16F10에서 Tyrosinase 저해 활성 및 Melanin 생성량 억제 효능을 분석하고자 한다.



Fig. 1. *M. alba*.

I. 재료 및 방법

II-1. 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 오디 (*Morus alba*)는 전라남도 담양 농협에서 판매하는 제품을 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 시약으로 dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycine, dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) 및 phosphate-buffered saline (PBS)는 welgene biotech (taiwan, china) 사의 제품, phosphoric acid, sulfanilic acid (minimum 99.00%), N-(1-Naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride, sodium nitrite, folin-denis reagent, sodium carbonate, naringin (Sigma Co., USA) 사의 제품, diethylene glycol, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 및 lipopolysaccharide (LPS)는 sigma-aldrich (yong in, korea) 사의 제품, tannic acid (Sigma Co., USA) 사의 제품, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 junsei (japan) 사의 제품, methanol, ethanol, sodium hydroxide는 duksan biotech (ansan, korea) 사의 제품, 6, 12, 24 및 96-well plate는 spl lifescience (sung nam, 4science) 사에서 구입하여 사용하였다.

II-2. 분석기기

ELISA reader (Bio Tek Instrument Inc.).

II-3. 세포 배양

본 실험에 이용한 세포주는 Macrophage 세포인 Raw 264.7과 Melanoma 세포인 B16F10을 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS과 1% p/s (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

II-4. 추출물 제조

80% 식물성 알코올을 추출 용매로 사용해 오디 100g의 10배 무게에 해당하는 1L를 넣고 빛을 차단 후 실온에서 3일 간 추출하였다. 3회 여과한 후 최소 온도 (40 - 60°C)에서 농축한 뒤 동결 건조하여 파우더 형태로 사용하였다.

II-5. 세포독성

MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인하였으며¹⁵⁾ 세포 내 소기관인 미토콘드리아의 탈수소효소에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정하는 원리이다. macrophage 세포인 Raw 264.7 세포주의 배양은 10% FBS과 1% p/s (100U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하여 사용하였다. 96-well plate에 Raw 264.7을 2 × 10⁵ cells/well으로 접종하여 24시간 배양하고, *M. alba* pretanol A 추출물을 0.1, 1, 10, 50 및 100 μg/ml의 농도로 처리한 후 20시간 동안 추가 배양하였다. 배양된 well plate에 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 시약을 20 μl/well 첨가하여 4시간 추가 배양 후 DMSO를 200 μl씩 첨가하여 빛을 차단하고 15분간 반응시켰다. 반응 후, ELISA reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회 반복 수행하여 세포 생존에 대한 통계학적 분석을 실시하였다.

II-6. 아질산염 소거능

NO 측정은 Lee 등의 방법에 따라¹⁶⁾ 세포의 상층액에서의 NO 양을 nitric and nitrate로서 측정을 하였다. nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 Griess reagent를 사용하였으며, 96-well plate에 2 × 10⁵ cells/well의 confluence가 80% 일 때, PBS로 2회 Washing 한 후 *M. alba* pretanol A 추출물을 5, 10, 20 및 40 μg/ml의 농도로 처리, 30분 후 LPS를 0.5 μg/ml을 처리하였다. NO 생성량은 24시간 후에 상층액을 모아 Griess reagent로 10 분간 반응시킨 후에 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. *M. alba* pretanol A 추출물과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 NO 양을 100%로 하여 시료가 첨가된 경우에 측정된 흡광도를 환산하여 표기하였다.

II-7. 항산화 활성 측정

II-7-a. 전자공여능 확인

전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 자체가 매우 안정한 free radical로서 알코올 등의 유기용매에 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있어 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 517 - 520 nm에서 강한 흡수띠를 보이는 보라색 분획물이다. 반응액의 색이 노란색으로 변화되는 것을 흡광도의 감소로 측정함으로써 radical 소거 활성을 알 수 있다. DPPH radical 소거 활성 실험은¹⁷⁾ 다음과 같이 실행하였다. 96-well plate에 *M. alba* pretanol A 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100, 200 및 500 µg/ml의 농도로 하여 희석액을 100 µl씩 분주한 후 여기에 DPPH 0.5 mM를 100 µl을 넣은 후 20분간 방치했다. 동일한 방법으로 Ascorbic acid (Vitamin C; Vit C)는 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 µg/ml의 농도로 처리했다. ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회 반복 측정하여 흡광도의 평균값을 도출하였다. 대조군은 시료 용액 대신 순수한 추출 용매인 식물성 알코올인 pretanol A를 사용하였으며, 전자공여 효과는 시료 첨가군과 첨가하지 않은 무첨가군의 흡광도를 아래 식에 따라 백분율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

II -7-b. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 folin-denis법에 따라¹⁸⁾ (AOAC, 1990) *Morus alba* pretanol A 추출물 0.1 g에 methanol 1 ml을 가하여 70℃에 30분 동안 반응한 후 100 mg/ml을 희석하여 사용한다. 96-well plate에 *M. alba* pretanol A 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100, 200 및 500 µg/ml의 농도로 하여 검액 50 µl에 증류수 650 µl를 넣고 folin-denis reagent 50 µl를 가한 뒤, 10% Na₂CO₃ 포화용액을 100 µl 첨가하고 증류수 120 µl를 넣어 최종 볼륨을 1 ml로 맞추고 잘 섞어준다. 37℃ 항온수조에 1 시간 반응시키고 ELISA reader를 이용해 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 methanol 액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 tannic acid 농도를 0 - 500 µg/ml이 되도록 하고 이로부터 총 폐놀함량을 구하였다.

II -7-c. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법¹⁹⁾에 따라, *M. alba* pretanol A 추출물 0.1 g에 methanol을 1 ml을 가하여 70℃에 30분 동안 추출한 후 100 mg/ml을 만들어 희석하여 사용하였다.²⁰⁾ 96-well plate에 *M. alba* pretanol A 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100, 200 및 500 µg/ml의 농도로 하여 검액 100 µl에 1 ml Diethylene glycol을 첨가하고 1 N NaOH 100 µl를 넣어 잘 혼합시켜 37℃ 항온수조에 1시간 반응시키고 ELISA reader기를 이용해 420 nm에 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 naringin 농도를 0 - 300 µg/ml이 되도록 하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

II-7-d. Superoxide anion radical 소거능 확인

SOD 유사 활성 측정은²¹⁾ 각 시료 용액 0.2 ml에 Tris - HCl 완충용액 (50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 가하고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl 1 ml로 반응을 정지시킨 후 ELISA reader기를 이용해 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 96-well plate에 *M. alba* pretanol A 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100, 200 및 500 µg/ml의 농도로 희석하여 실험하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 아래의 계산식에 따라 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample Abs.}}{\text{Control Abs.}} \right) \times 100$$

II-8. 미백 기능성 분석

II-8-a. 세포 배양

본 실험에 이용한 세포주는 Melanoma 세포인 B16F10 을 KCLB에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양은 10% FBS과 1% p/s (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양 하였다.

II-8-b. 세포독성

MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인하였으며 세포 내 소기관인 미토콘드리아의 탈수소효소에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정하는 원리이다. melanoma 세포인 B16F10 세포주의 배양은 10% FBS과 1% p/s (100U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하여 사용하였다. 96-well plate에 B16F10을 2 × 10⁵ cells/well으로 접종하여 24시간 배양하고, *M. alba* pretanol A 추출물을 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/ml의 농도로 처리한 후 20시간 동안 추가 배양하였다. 배양된 well plate에 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 시약을 20 µl/well 첨가하여 4시간 추가 배양 후 DMSO를 200 µl씩 첨가하여 빛을 차단하고 15분간 반응시켰다. 반응 후, ELISA reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회 반복 수행하여 세포 생존에 대한 통계학적 분석을 실시하였다.

II-8-c. Tyrosinase 저해활성 측정

B16F10 세포주의 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법²²⁾을 사용하였다. 6-well plate에 각 well 당 세포를 1 × 10⁵ cells/well로 배양하고, *M. alba* pretanol A 추출물을 24시간, 48시간, 72시간 배양한 후 각 well을 10mM PBS로 세척하였으며, 1% Triton X-100을 함유한 10mM PBS 100µl에 혼탁시켰다. 혼탁된 이 액을 vortexing 한 후 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 사용하였다. 6-well plate에 이 효소액을 40 µl 넣고 기질인 L-dopa (2mg/ml) 100µl를 첨가하였다. 37°C에서 1시간 동안 반응을 진행시킨 뒤, ELISA reader를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. tyrosinase의 활성도는 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

II-8-d. Melanin 생합성 저해율 측정

Melanin 생성량 측정은 Hosei 등의 방법²³⁾을 변형하여 사용하였다. B16F10 세포를 배양하여 6-well plate에 각 well 당 세포를 1×10^5 cells/well로 접종하고, *M. alba* pretanol A 추출물을 처리한 후 24, 48, 72시간 배양하였다. 24, 48, 72시간 배양한 후 각 well을 PBS로 세척하고, 1% Triton X-100을 함유한 PBS 200μl에 혼탁시켰다. 혼탁시킨 세포를 13,000 rpm에서 10분 간 원심분리한 후 얇은 펠렛에 1 N NaOH 용액 150 μl를 첨가하고 55°C에서 1 시간 용해하였으며, ELISA reader기를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

II. 결과 및 고찰

II-1. 세포독성

Raw 264.7 macrophage 세포주에서 *M. alba* pretanol A 추출물의 세포독성 확인을 위해 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/ml의 농도별로 처리한 후 24 시간 배양 하였다. *M. alba* 0.1, 1 µg/ml 처리 시 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었고 10, 50 µg/ml 처리 시 81%의 세포 생존율을 나타내었다. 이후에는 농도 의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였다 (Fig. 2). 본 연구에서는 세포 생존율이 81% 이상을 기록하는 *M. alba* 추출물 50 µg/ml 농도 이하를 최대 농도로 적용하였다.

Raw 264.7 세포에서 상심자 crude extract (25 – 150 µg/ml), ethyl acetate (EA) (1 – 20 µg/ml), Butanol (BuOH) (10 – 100 µg/ml), Hexane (Hx) (1 – 20 µg/ml), Methyl chloride (MC) (1 – 30 µg/ml) 각각의 농도에서 모두 99% 이상 생존율을 보였는데²⁴⁾ *M. alba* pretanol A 추출물은 50 µg/ml 농도 이하 처리시에 세포독성이 거의 없음을 보인다.

따라서 본 연구에서는 세포 생존율 81 % 이상을 나타내는 *M. alba* pretanol A 추출물 50 µg/ml 농도 이하로 최대 농도를 적정하게 보았다.

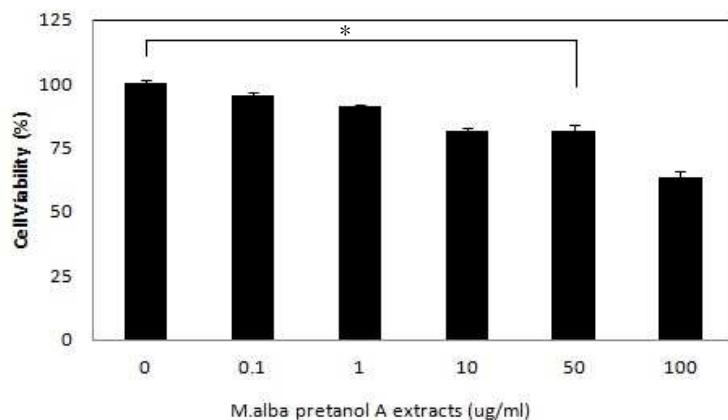


Fig. 2. Cytotoxicity of *M. alba* pretanol A extracts on Raw 264.7 cells. The cellular toxicity of *M. alba* pretanol A extracts on Raw 264.7 (2×10^5 cells). The cells were seeded on 96-well plates and incubated for 24 h. The cells were treated with 0.1, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations *M. alba* pretanol A extracts. After further incubation for 20 h, cell viability was determined using the MTT assay. Value is expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with other concentrations.

III-2. 아질산염 소거능

아질산염 소거능은 항산화 효능을 알아보는 실험으로, nitrite는 라디칼류 중 하나인데 griss reagent와 반응해 보라색 아조염을 형성한다. nitrite 농도와 비례하여 측정하기 때문에 시료의 nitrite 제거능력을 비교해서 알 수 있다. Fig. 3에 *M. alba* pretanol A 추출물의 아질산염 소거능 평가에 대한 결과를 나타내었다.²⁵⁾

이전 연구에 따르면 병꽃나무 꽃 에탄올 추출물을 농도별로 (0.16, 0.8, 4, 20 및 100 µg/ml)로 처리하였을 때, 8.98, 8.15, 7.42, 6.48, 4.71 µM로 투여 농도의 존적으로 NO의 생성을 억제하였다.²⁶⁾

본 실험에서는 *M. alba* pretanol A 추출물의 농도를 5, 10 및 20 µg/ml로 처리하였을 때 LPS (0.5 µg/ml) 처리군에 비해 아질산염 소거능은 각각 22.3, 33.1, 53.4%로 나타났다. 최소 5 µg/ml 농도에서 22.3% LPS 분비량 감소를 보였고 전의 논문들과 비교하여 저농도에서 결과를 보인다.

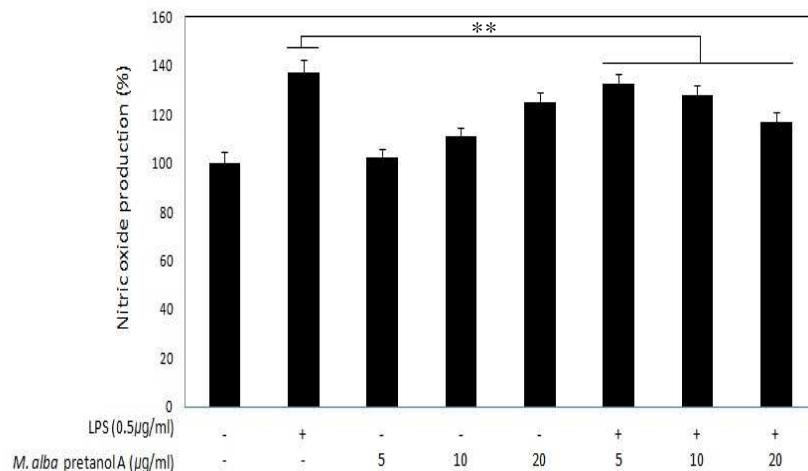


Fig. 3. Effect of *M. alba* pretanol A Extracts on NO production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were stimulated with 0.5 μ g/ml of LPS. NO production from these cells was significantly decreased in dose-dependent manner up to 20 μ g/ml. Various concentration of *M. alba* pretanol A extracts were produce NO production in dose-dependent manner. Values are expressed as the mean \pm SD. **p < 0.05 as compared with the LPS-induced cells by LPS.

III-3. 항산화 활성 측정

III-3-a. 전자공여능 확인

M. alba pretanol A 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 각각의 농도 별로 실험을 진행하였다. 양성 대조군으로 사용한 Ascorbic acid는 7.8125, 15.625 및 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 44.6, 50.4 및 63.1%의 소거능을 나타냈다 (Fig. 4).

이전에 진행된 연구에 따르면 미션나무 미성숙 종자의 DPPH 라디칼 소거활성을 평가한 결과, 각 추출물 농도 200, 40, 8, 1.6, 0.32 $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서 각각 $86.0 \pm 12.18\%$, $77.60 \pm 2.04\%$, $41.52 \pm 0.55\%$, $10.81 \pm 3.99\%$, $2.80 \pm 1.41\%$ 의 소거활성을 나타냈으며, 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다.²⁷⁾

본 실험에서 *M. alba* pretanol A 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 각각 48.8, 55.9 및 66.5%의 소거능을 보였다 (Fig. 4). DPPH radical 소거능을 비교 분석한 결과, *M. alba* pretanol A 추출물이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이상에서 양성대조군인 Ascorbic acid의 소거능과 유사한 소거활성을 나타냄을 확인하였다.

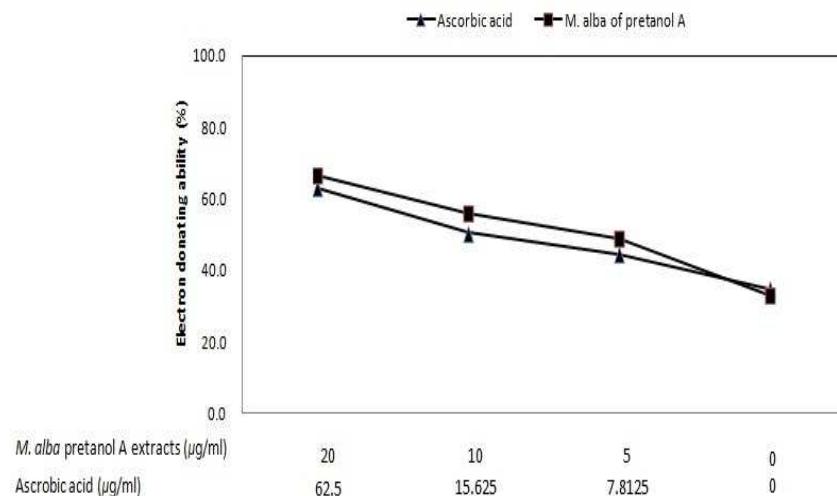


Fig. 4. Electron donationg ability from *M. alba* pretanol A extracts.
Free radical scavenging capacity (%) of ascorbic acid and *M. alba* pretanol A extracts by the DPPH method. At the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, expressed as 55.9% of electron donating ability. as well the pattern is similar to 15.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ascorbic acid.

III-3-b. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 folin-denis법에 따라 추출물 0.1 g에 methanol 10 ml을 가하여 70℃에 30분 동안 반응 한 후 1 mg/ml로 희석하여 사용한다. 검액 50 μl에 증류수 650 μl를 넣고 folin-denis reagent 50 μl를 가하여 3분 동안 실온에서 반응시킨다. 3분 후, 10 % Na₂CO₃ 포화용액을 100 μl 첨가하고 최종 볼륨을 1 ml로 맞추기 위해 증류수 120 μl를 넣어 잘 섞는다. 37 °C 항온수조에서 1시간 반응 후 ELISA reader기를 이용하여 흡광도 725 nm에서 측정하였다. 공시험은 methanol 액을 동일하게 처리하였고, 표준곡선은 tannic acid로 하여 농도 (0 - 500 μM)로 하여 이로부터 총 폐놀 함량을 구하였다.

Fig. 5에 *M. alba* pretanol A 추출물의 농도별 총 폐놀 함량을 나타냈다. *M. alba* pretanol A 추출물 20 μg/ml 농도에서 총 폐놀 함량은 31.4 μg/ml tannic acid equivalent이었으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 총 폐놀 함량도 비례적으로 증가하여, 5, 10 및 20 μg/ml 농도에서 총 폐놀 함량이 각각 8.3 ± 0.6, 25.0 ± 0.6 및 31.4 ± 0.3 μg/ml tannic acid equivalent로 나타났다.

Kim 등²⁸⁾의 연구에 의하면 감초 에탄올과 열수 추출물에서 1 mg/ml의 농도로 용해한 용매별 추출액의 폐놀 함량이 각각 77.46 ± 1.03, 65.15 ± 1.23 μg/mL으로 측정된 결론 보아, 비교 논문들의 실험상 농도보다 낮으나 효과가 좋으므로 훌륭한 항산화력을 가지고 있다고 알 있다.

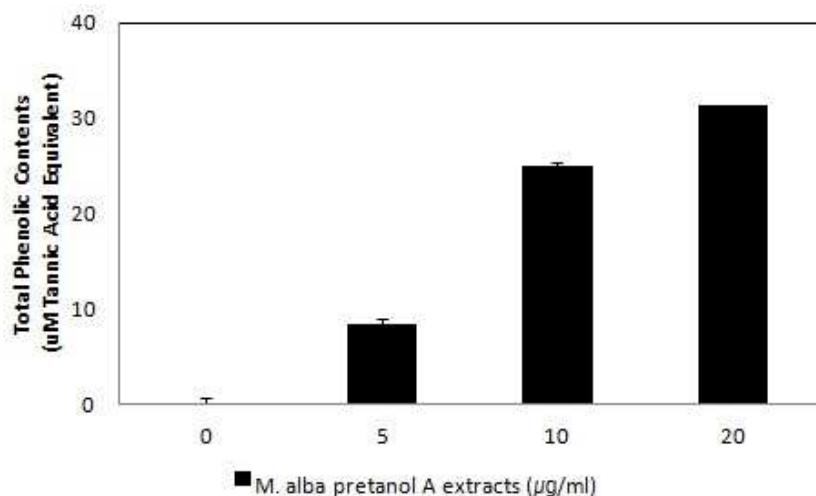


Fig. 5. Total phenolic content of *M. alba* pretanol A extracts. Total polyphenolic compounds of the different concentrations of *M. alba* pretanol A extracts. concentration of extracts were 5, 10 and 20 µg/ml. Results were expressed as tannin acid equivalent. The polyphenolic content has been enhanced by concentration.

III-3-c. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법에 따라, 추출물 0.1 g에 methanol 10 ml 을 더하여 70°C에 30분 동안 추출 하고, 1 mg/ml을 만들어 사용하였다.²⁵⁾ 검액 100 μl에 1 ml Diethylene glycol을 첨가하고 1 N NaOH 100 μl를 넣어 잘 혼합시켜 37°C 항온수조에 1시간 반응시킨 후 420 nm에 흡광도를 측정하였다. 공시험은 methanol 용액을 동일하게 처리하고, 표준곡선은 naringin 농도 (0-200 μM) 으로 하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다. Fig. 6에 *M. alba* pretanol A 추출물의 농도별 총 플라보노이드 함량을 나타냈다.

자생식물과 생약자원 추출물의 플라보노이드를 측정한 결과 비수리가 90.15 mg/g extract로 가장 높았고, 다음으로 비쑥(77.65 mg/g extract)이 높은 것으로 나타났다. 귀리, 각시동글레, 개구리밥의 총 플라보이드 함량은 각각 71.60, 65.56, 63.27 mg/g extract 순이었다. 사상자와 흑두에서는 플라보노이드가 검출되지 않았다.²⁹⁾

M. alba pretanol A 추출물 20 μg/ml 농도의 총 플라보노이드 함량은 25 μg/ml naringin equivalent였으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 플라보노이드 함량도 비례적으로 증가하였다. *M. alba* pretanol A 추출물의 농도가 증가할수록 naringin equivalents이 증가하는 경향이 나타났으며, 이는 *M. alba* pretanol A 추출물에 플라보노이드가 포함되어 있음을 말해 준다.

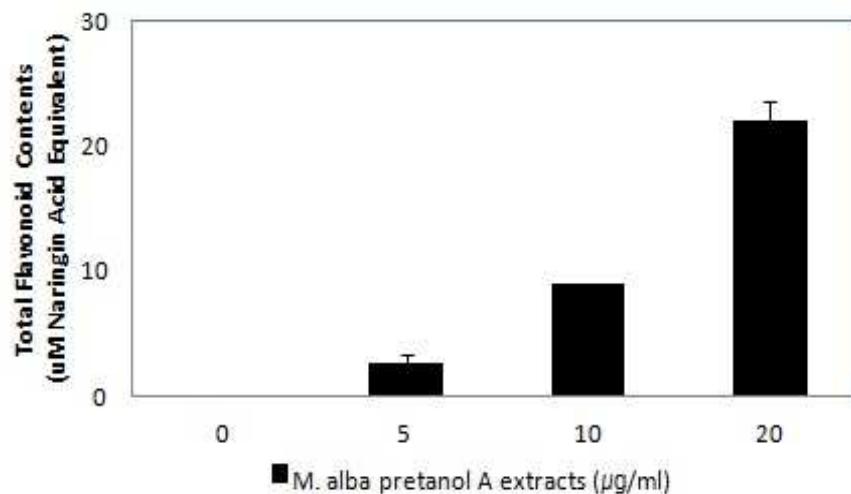


Fig. 6. The flavonoid contents of *M. alba* pretanol A extracts. Total flavonoid compounds of the different concentrations of *M. alba* pretanol A extracts. The concentration of the extract were 5, 10 and 20 µg/ml. Results were expressed as naringin equivalent. The flavonoid content has been enhanced by concentration.

III-3-d. Superoxide anion radical 소거능 확인

생체 내 생성된 활성 산소는 체내에서 산화적 이상을 일으키는데 SOD(superoxide dismuted)는 이때 생체 내에서 O_2^- 의 소거에 관여하는 효소이며, 독성이 강한 hydroxy radical 생성을 예방하여 피부 노화 방지를 위한 미용 소재로 화장품 등에 첨가제로 사용된다.³⁰⁾ 이런 피부 노화 방지와 관련이 있는 SOD 유사 활성을 측정한 결과 Fig. 7과 같이 나타내었다.

Han 등은 꽃을 한약재료로 사용하는 선복화, 감국, 홍화의 에탄올추출물에 대한 SOD 유사활성능을 측정한 결과, 2.0 mg/mL에서 선복화는 90.82 %로 대조군인 ascorbic acid (95.56%)보다는 낮았으나 감국(14.60%)보다는 6.2배, 홍화 (21.36%)와 비교하여도 약 4.2배 이상 높은 SOD 유사활성을 나타낸 결과와 비교하면 저농도에서도 높은 SOD 유사활성을 나타내었다.³¹⁾

M. alba 추출물의 경우 5, 10 및 20 μ g/ml의 농도에서 각각 57.6 ± 0.006 , 62.8 ± 0.004 및 $72.0 \pm 0.003\%$ 의 소거능을 나타내었다. SOD 유사활성은 농도에 의존하는 경향을 보였고, 이러한 결과는 *M. alba* pretanol A 추출물이 천연소재로 피부노화 방지에 이용가치가 있음을 보여준다.

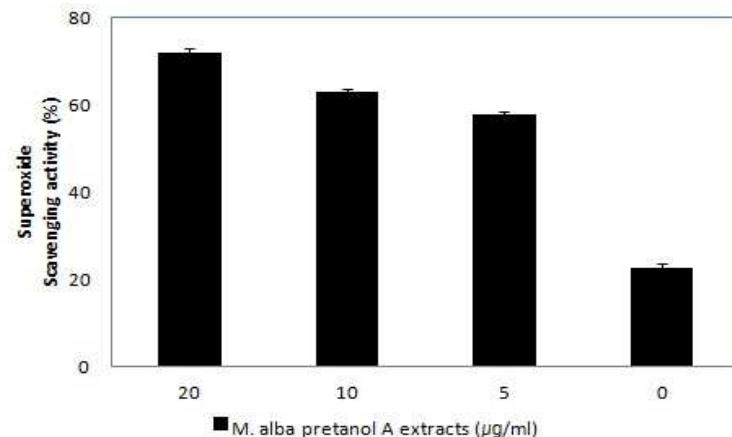


Fig. 7. Superoxide dismutase - like activity of *M. alba* pretanol A extracts. SOD levels depends on the concentration of the *M. alba* pretanol A extract. At the concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, expressed as 72% of scavenging activity. Data results were expressed as % inhibition of the scavenging activity.

III-4. 미백 기능성 분석

III-4-a. 세포독성

Melanoma 세포인 B16F10에서 *M. alba* pretanol A 추출물의 세포독성 확인을 위해 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/ml 의 농도별로 *M. alba* pretanol A 추출물을 처리한 후 24시간 배양하였다. *M. alba* pretanol A 추출물 0.1, 1, 10 and 50 µg/ml 처리 시 81% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 50 µg/ml 농도에서 독성이 없음을 나타내었으며 이후에는 농도 의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였다 (Fig. 8).

지구자 추출물의 경우 100 µg/ml 이하의 농도에서 세포 독성이 없는 것을 확인하고³²⁾ 본 연구에서는 세포 생존율이 81% 이상을 기록하는 *M. alba* pretanol A 추출물 50 µg/ml 농도를 최대 농도로 적용하여 그 이하의 농도를 연구에 적용하였다.

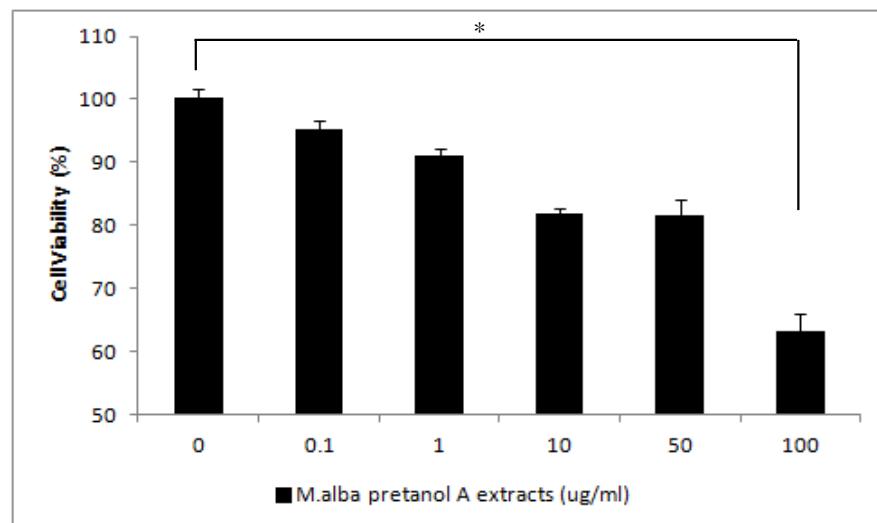


Fig. 8. Cytotoxicity of *M. alba* pretanol A extracts on B16F10. The cellular toxicity of *M. alba* pretanol A extracts on B16F10 (1×10^5 cells). The cells were seeded on 96-well plates and incubated for 24 h. The cells were treated with 0, 0.1, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations of *M. alba* pretanol A extracts. After further incubation for 20 h, cell viability was determined using the MTT assay. Value is expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with other concentrations.

III-4-b. Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 효소는 melanin 합성 과정에서 melanin 생성 속도가 결정되는 초기 반응에 관여하는 효소로 Tyrosin을 DOPA로 전환하는 DOPAquinone으로 산화하는 DOPAoxidase 활성을 가지며, melanin의 활성을 효과적으로 억제할 수 있는 물질은 피부의 melanin 생성을 억제할 수 있기 때문에 피부미백을 목적으로 하는 기능성 화장품의 첨가제로 이용할 수 있다.^{33,34)} *M. alba* pretanol A 추출물이 B16F10 세포 내의 tyrosinase 활성도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포독성이 없는 1, 10, 20 및 50 µg/ml 농도로 처리한 후 확인하였다.

M. alba pretanol A 추출물의 tyrosinase 효소 활성이 미치는 영향을 조사한 결과 tyrosinase의 활성이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 양성대조군인 arbutin의 경우 20 µg/ml 에서 10 %의 저해 활성을 보였다. *M. alba* pretanol A 추출물의 경우 20 µg/ml 의 농도에서 32 %의 tyrosinase 저해 효과를 나타내었다 (Fig. 9). 유 등³⁵⁾의 지난 연구에 의하면 참깨 추출물의 경우 농도별로 증가하는 것으로 보였고, 1,000 µg/ml에서는 42%의 활성을 나타낸 결과와 비교하면 낮은 농도에서 *M. alba* pretanol A 추출물의 tyrosinase 저해 활성이 우수함을 알 수 있다.

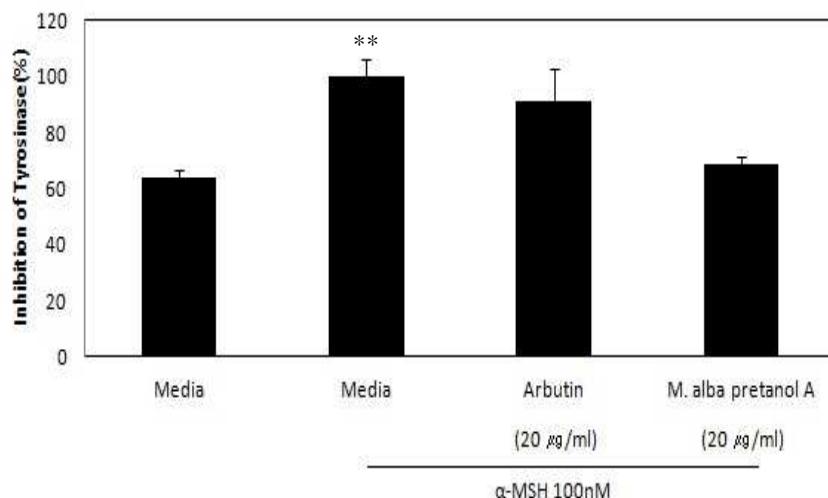


Fig. 9. Effect of *M. alba* pretanol A extracts on cellular tyrosinase activity of B16F10 melanoma cells. B16F10 cells were treated with *M. alba* pretanol A extracts 10, 20 and 50 µg/ml for 1 days, harvested, and tyrosinase extracted from the treated cells. The cellular tyrosinase was then incubated with 40 µl of L-dopa (2 mg/ml) 100 µl at 37°C for 1h and the contents measured at 475 nm. Each value is expressed as mean ± SD of at least three independent experiments. **p < 0.05, compared with arbutin (20 µg/ml) and *M. alba* pretanol A extracts (20 µg/ml).

III-4-c. Melanin 생합성 저해율 측정

세포 내 소기관인 ribosome에서 tyrosinase라는 효소의 생합성에서 Melanin은 합성되기 시작한다. tyrosinase의 작용으로 아미노산의 일종인 tyrosine에서 몇 단계의 합성을 거쳐, 기저층의 melanin 세포 melanoma site라는 흑색소포 표면에 침착하여 검고 갈색의 작은 melanin 입자가 만들어진다.³⁶⁾

M. alba pretanol A 추출물의 농도별 Melanin 생성량 측정 결과 양성대조군인 Arbutin 20 µg/ml 처리시 42.8 %로 나타났고, Melanin 생성량이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 20 µg/ml 농도에서 Melanin 생합성 58.3 %의 저해 효과를 나타내었다 (Fig. 10). 등이 보고한 감꼭지 추출물의 경우 5 µg/ml의 농도에서 B16F10 세포 내 멜라닌 생성을 무첨가군에 비해 13.2% 저해한 결과와 비교하면 비슷한 수준에서 활성을 나타내어 피부 색소 침착에 효능이 있는 미백 소제로 이용가능 할 것이라 사료된다.³⁷⁾

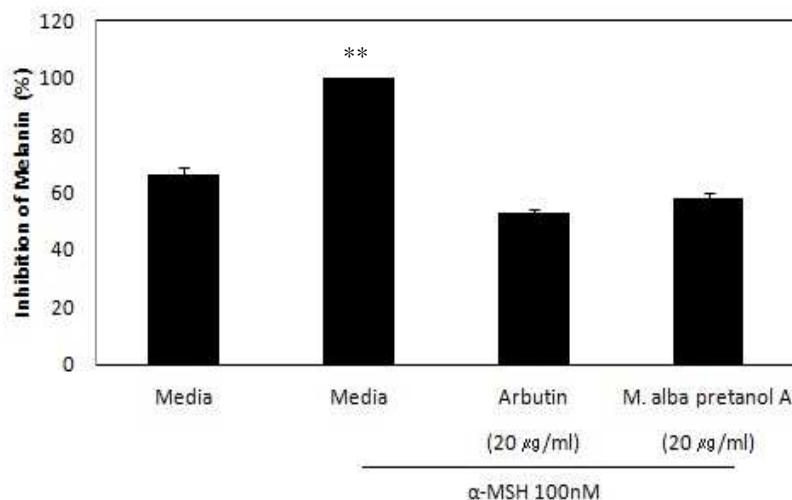


Fig. 10. Inhibitory effect of *M. alba* pretanol A extracts on cellular tyrosinase activity of B16F10 melanoma cells. B16F10 cells were treated with *M. alba* pretanol A extracts 20 µg/ml for 1 days, harvested, and tyrosinase extracted from the treated cells. The cellular tyrosinase was then incubated with 40 µl of L-dopa (2 mg/ml) 100 µl at 37°C for 1 h and the contents measured at 475 nm. Each value is expressed as mean ± SD of at least three independent experiments. **p < 0.05, compared with arbutin (20 µg/ml) and *M. alba* pretanol A extracts (20 µg/ml).

IV. 요약 및 제언

본 연구에서는 이전에 보고된 연구에서 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside, 비타민 C, 폴리페놀 및 플라보노이드등과 같은 생리활성물질을 다량 함유하고 있으며 높은 항산화 효능, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 알려진 오디를 활용하여 항산화 효능 및 항염증, 미백 기능성을 분석하였다. 식물유래 천연 추출물을 이용한 기능성 제제로서 가능성을 분석 하고자 실험적 연구를 수행하였고 오디에 산화적 스트레스와 염증반응에 탁월한 효능이 있음이 연구되었다. 본 연구에서는 오디를 80 % 주정 알코올로 추출하여 Macrophage 세포인 Raw 264.7에서 아질산염 소거능을 통해 항염증 활성을 확인하였으며 Melanoma 세포인 B16F10에서 Tyrosinase 저해 활성 및 Melanin 생합성 저해 활성을 분석하였고, 항산화능은 DPPH 라디칼 소거능, 총 폐놀 함량, 총 플라보노이드 함량, SOD 유사활성을 측정함으로써 천연 항산화 소재로 써의 활용 가능성을 검증하였다. DPPH 라디칼 소거능은 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 각각 48.8, 55.9 및 66.5 %의 소거능을 보였으며 총 폴리페놀 함량의 경우 *Morus alba* 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 $31.4 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ Tannic acid equivalent로 나타났고 총 플라보노이드 함량의 경우 *Morus alba* 추출물 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Naringin equivalent로 나타났다. SOD 유사활성 분석 결과 *Morus alba* 추출물의 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 57.6, 62.8 및 72.0 %의 소거능을 보였다. Raw 264.7 세포에서 세포독성 실험 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 81 %의 생존율을 가지며 이후 농도 의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였고 아질산염 소거능 분석 결과 추출물을 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였을 때 LPS(500 ng/ml) 처리군에 비해 각각 22.3, 33.1 및 53.4 %의 소거능을 나타냈다. B16F10 세포에서 세포독성 실험 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 세포독성이 거의 없었고 이후 농도 의존적으로 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였다. Arbutin의 경우 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각 10 %의 저해 활성을 보였고 추출물의 경우 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 32 %의 Tyrosinase 저해 효과를 나타내었고 melanin 생합성 저해율 측정 결과 양성대조군인 Arbutin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 42.8 %로 나타났고, *Morus alba* pretanol A 추출물의 경우 Melanin 생성량이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 Melanin 생합성 58.3

%의 저해 효과를 확인 하였다.

식물로부터 추출한 천연 추출물을 이용해 항산화와 미백기능성 등의 기능 연구가 활성화되고 있는데, 본 연구 결과 오디는 우수한 항산화 및 항염활성, 미백 기능성을 가지고 있으므로 향후 천연 항산화제로써의 가치가 있는 소재 및 기능성 성분 제제로도 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 참고 문헌

1. 강명화 외, Current Research Activities of Antioxidative Compound in Plants The Journal of the Korean Society of International Agriculture 11(2), 207-215, 1999.
2. Bo Yeon Shin 외, B16F10 Melanoma 세포에서 낙과 배 물 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과 Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 46(3), 320-326, 2007.
3. Ju-Young Hwang 외, Effects of Doinsenggitang on Melanin Synthesis and Gene Expression Inhibition in B16F10 Melanoma Cells Journal of Life Science 22(3), 318-323, 2012.
4. Kyong-Suk Jin 외, Vitis amurensis Ruprecht root inhibited α -melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in B16F10 cells Nutrition Research and Practice 8(5), 509-515, 2014.
5. Eugene Shim 외, Inhibitory effect of Gastrodia elata Blume extract on alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in murine B16F10 melanoma Nutrition Research and Practice, 11(3), 173-179, 2017.
6. Soo-Yeon Lee 외, Inhibitory Efficacy of Angelica gigas Nakai on Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF), Tyrosinase Related Protein-1 (TRP-1), Tyrosinase Related Protein-2 (TRP-2), and Tyrosinase mRNA Expression in Melanoma Cells (B16F10) Journal of Life Science Vol. 23. No. 11. 1336-1341, 2013.
7. Soo-Yeon Lee 외, Down-regulation of Tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 Expressions by Juniperus rigida Sieb. in Murine B16F10 Melanoma Journal of Life Science Volume 23 Issue 12, 1445-1453, 2013.
8. 김향숙 외, 바위수염 메탄올 추출물이 B16F10 흑색종 세포에서의 멜라닌합성에 미치는 영향 한국식품영양과학회지 46(1), 34-38, 2017.
9. 유단희 외, 연잎 추출물의 항산화 활성 및 멜라노마 세포(B16F10)에서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 발현 저해 효과 생명과학회지 25(10), 1115-1123, 2015.

10. Shahidi, F. 외, Antioxidants in food and food antioxidants Nahrung 44(3), 158–163, 2000.
11. 한영숙 외, 천연식물추출물의 항산화력과 미백작의 상관관계연구 대한피부미교육 학술지 제1권 제1호, 11–22, 2003.
12. Lo, A.H. 외, Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages Carcinogenesis 23(6), 983–991, 2002.
13. 장혜인 외, Inhibitory effect of 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone on Melanogenesis Kor. J. Aesthet. Cosmetol. Vol. 10 No. 4, 921–928, 2012.
14. <http://cfile23.uf.tistory.com/image/215C404F55A207F33ABE0B>
15. Hee Kee Kim 외, Effects of Naturally Occurring Flavonoids on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell Line RAW 264.7 and Their Structure - Activity Relationships Biochemical Pharmacology Volume 58 Issue 5, 759 - 765, 1999.
16. Seung-Jae Lee 외, Purification and characterization of a nitric oxide inhibitory peptide from Ruditapes philippinarum Food and Chemical Toxicology Volume 50 Issue 5, 1660–1666, 2012.
17. Blois 외, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical Nature Volume 181 Issue 4617, 1199–1200, 1958.
18. AOAC, 1990.
19. María I.Nieva Moreno 외, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina Journal of Ethnopharmacology Volume 71 Issue 1–2, 109–114, 2000.
20. T. Swain 외, The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents Journal of the Science of Food and Agriculture Volume 10 Issue 1, 63–68, 1959.
21. STEFAN L. MARKLUND 등, Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight Proc Natl Acad. Sci. USA Vol. 79, 7634–7638, 1982.

22. Celia Jiménez-Cervantes 외, Molecular Interactions within the Melanogenic Complex: Formation of Heterodimers of Tyrosinase and TRP1 from B16 Mouse Melanoma Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 253 Issue 3, 761–767, 1998.
23. Junichi Hosoi 외, Regulation of Melanin Synthesis of B16 Mouse Melanoma Cells by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid Cancer Research Volume 45 Issue 4, 1474–1478, 1985.
24. 추윤경, Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Morus alba* L. (Mulberry) Extract on LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages 동국대학교 대학원, 13–15, 2017.
25. Seok-Yeong Yu 외, Antioxidant Effects and Nitrite Scavenging Ability of Extract from *Acanthopanax cortex* Shoot The Korean Society of Food and Nutrition Volume 25 Issue 4, 793–799, 2012.
26. Yung Choon Yoo 외, Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Extracts from the Flowers of *Weigela subsessilis* on RAW 264.7 Macrophages Journal of Life Science Vol. 26. No. 3., 338–345, 2016.
27. Tae Won Jang 외, Antioxidative Activities and Whitening Effects of Ethyl Acetate Fractions from The Immature Seeds of *Abeliophyllum distichum* Jornal of Life Science Vol. 27. No. 5., 536–544, 2017.
28. Kye Soon Kim 외, Phsiological Activity of the *Glycyrrhiza uralensis* Extracts as a Cosmetic Product Asian J Beauty Cosmetol 15(1), 11–22, 2017.
29. Eun Jin Kim 외, Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants The Korean Journal of FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY Vol. 44 No. 3., 337–342, 2012.
30. Tae-Young Kim 외, Antimicrobial, Antioxidant and SOD-Like Activity Effect of *Jubak* Extracts The Korean Journal of FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY Vol. 23 No. 3., 299–305, 2010.
31. Mi Ra Han 외, Anti-wrinkle and Antioxidative Effects of Ethanolic Extracts of *Inula Flos*, *Chrysanthemi Flos* and *Carthami Flos* Journal of Investigative

- Cosmetology 9(4), 361–369, 2013.
- 32. Jun Ho Kim 외, Effect of Hovenia dulcis Thunb. Ethanol Extract on the Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cell Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine 23(2), 337–342, 2009.
 - 33. Min-jung Kim 외, Inhibition of Melanogenesis and Anti-UV properties Reynoutria elliptica 대한피부미용학회지 Vol. 10 No. 4, 961–968, 2012.
 - 34. Han-Hyuk Ki 외, Antimelanogenic Effect of Purpurogallin in Murine Melanoma Cells J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 44(12), 1905–1911, 2015.
 - 35. Dan-Hee Yoo 외, Anti-oxidant Function and Inhibitory Effects of the Expression of MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase of Sesamum indicum L. in B16F10 Melanoma Cells Journal of Life Science 27(3), 318–324, 2017.
 - 36. Eun-Young Hwang 외, A Study on the Depigmenting Effect of Carthamus tinctorius Seed, Cyperus rotundus and Schizonepeta tenuifolia Extracts Korean journal of food science and technology 44(1), 76–81, 2012.
 - 37. Ju-Young Hwang 외, Whitening Effect of Extracts and Fractions from Diospyros kaki calyx Journal of Life Science 23(3), 383–388, 2013.
 - 38. Kwang-Woo Lee 외, Natural Dyeing of Sangju Silk with Mulberry Extract Solution Textile Coloration and Finishing Vol. 22 No. 3, 2010.

저작물 이용 허락서

학 과	미용향장학과	학 번	20168405	과 정	석사
성 명	한글 조 미 래 한문 趙 美 來 영문 Rae-mi Jo				
논문 제목	한 글 : 오디 알코올 추출물의 항산화 및 미백기능성 분석				
	영 문 : Anti-oxidative and whitening functional analysis of <i>Morus alba</i> Pretanol A extract.				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

- 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
- 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
- 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
- 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
- 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
- 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
- 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2018년 2 월

저작자: 조 미 래 (인)

조선대학교 총장 귀하