

백년초(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*) 열매 추출물의 항산화 활성 및 B16F10 세포에서의 멜라닌 억제 효과

황수현¹ · 김교남^{2*}

¹경남대학교 대학원 건강과학과 석사과정, ²경남대학교 제약공학과 교수

Antioxidant and Inhibitory Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (Cactus) Fruit Extract on Melanin Accumulation in B16F10 Cells

Su-Hyeon Hwang¹ and Gyo-Nam Kim^{2*}

¹Master Student, Dept. of Health Science, Kyungnam University, Changwon 51767, Republic of Korea

²Professor, Dept. of Pharmaceutical Engineering, Kyungnam University, Changwon 51767, Republic of Korea

ABSTRACT

Opuntia ficus-indica var. *saboten*, commonly known as cactus, is recognized for its bioactive component, β -cyanin, which has been found to have beneficial effects on pain relief, blood circulation, and detoxification. In this study, we investigated the antioxidant and anti-melanogenic activities of the hot water extracts of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. Various *in vitro* assays were conducted, including evaluation of total phenolic content, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, and reducing potential. The total phenolic content of the hot water extract (WEC) was determined to be 1.74, 4.05, 6.77, 11.36, and 19.24 $\mu\text{g GAE/mL}$ (w/w-hot water extract) at concentrations of 10 to 400 $\mu\text{g/mL}$. The results revealed significant antioxidant activity of WEC through the effective scavenging of DPPH radicals. WEC exhibited DPPH radical scavenging activity ranging from 7.24% to 73.98% compared to the control (no treatment) at concentrations of 10 to 400 $\mu\text{g/mL}$. Additionally, the WEC demonstrated robust reducing potential comparable to the positive control (ascorbic acid) at concentrations of 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$. The cytotoxicity of WEC was evaluated using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay, and subsequent tests were conducted on B16F10 cells using WEC concentrations ranging from 10 to 400 $\mu\text{g/mL}$. Remarkably, the WEC treatment exhibited inhibitory effects on melanin accumulation in B16F10 cells, as observed through microscopic examination. These findings indicate that WEC possesses antioxidant and anti-melanogenic effects, making it a potential functional food ingredient.

Key words: *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*, antioxidant, reduction potential, melanin, whitening

서론

산업화가 진행되면서 현대사회의 사람들은 풍요로움과 편리함을 통해 삶의 질이 향상되고 평균수명이 증가하는 반면에, 산업화로 인해 발생하는 미세먼지나 환경 호르몬 등의 부작용을 초래하였다(Yoo Y 2016; Kim MK 등 2019). 이러한 부작용은 인체 내의 다양한 질병 발생 및 노화를 촉진하는 원인이 되고(Byun HS 등 2006), 이때 노화는 모든 신체변화를 의미하며, 신체 중 가장 큰 면적을 차지하는 피부의 경우에는 구조적 및 기능적 노화 현상을 시각적으로 나타낸다(Park DJ & Lee JC 2008). 또한, 이는 활성산소와 연관되기에 활성산소 제거를 위한 기능성 식품과 화장품 분야 등에서 많은 연구가 진행되고 있다(Park SH 등 2007).

항산화 효과가 뛰어난 합성 항산화제로는 butylated hydroxy anisole(BHA)와 butylated hydroxy toluene(BHT) 등이 있으며, 이들은 경제성이 우수하여 항산화제로 널리 활용되고 있다. 그러나 이와 같은 합성 항산화제의 경우 과잉 섭취 시 독성이나 다른 질병을 초래할 수 있어 안전성에 문제가 있다고 보고되었다(Shim KH 등 1995; Lee HJ & Park SN 2011). 이에 따라 천연물을 통한 항산화성 물질들이 대두되고 있으며, 항산화 성분을 지닌 천연물은 flavonoid와 phenol 계통의 화합물로 밝혀져 있다(Pratt DE & Birac PM 1979). 따라서 천연 추출물을 통한 안전한 항산화성 물질의 개발은 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다(Kim SH & Kim IC 2008).

인체에서 피부의 경우에는 표면적이 넓기에 자외선을 받기 쉬워 자외선에 의한 활성 산소종이 발생하여 피부 세포의 손상을 유발한다(Choi WS 등 2013). 이러한 손상은 피부 노

* Corresponding author : Gyo-Nam Kim, Tel: +82-55-249-6330, Fax: +82-505-999-2104, E-mail: gnkim@kyungnam.ac.kr

화 촉진을 유발하며, 이때 피부는 세포의 방어기전으로 멜라닌을 생성시킨다. 생성된 멜라닌은 사람의 색소 성분과 각질층의 두께 등에 의해 피부색을 결정하기도 하지만 과도하게 멜라닌이 합성 및 축적되면 기미, 주근깨 등의 피부의 질병을 초래하여 피부 노화의 진행을 가속화 한다(Kim DH 등 2013). 현재 사용되는 항산화 및 미백 원료는 ascorbic acid, arbutin 및 kojic acid 등이 있지만, 이는 피부의 안전성 및 미백 효능에 대한 문제점이 제기되고 있기에 최근에는 감초, 닥나무 추출물 등과 같은 안전성이 확보된 식물 추출물을 통한 항산화 및 미백 원료에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있다(Tamotsu T 등 2003; Solano F 등 2006).

백년초 열매(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)는 선인장과(*Cactaceae*)에 속하는 손바닥 선인장으로 우리나라의 제주도 와 거제도 등 남해안 일부 지역에 자생하고 있다. 백년초 열매는 예로부터 변비, 고혈압, 기관지천식 및 화상 치료 등의 민간 약재로 사용되었으며(Kim IY 등 2007), 최근에는 연구를 통해 항알레르기, 진통 및 항염증 효과 등의 약리작용, 인체 내 지질 농도의 저하 및 혈당 강하 효과 등의 생리 활성 작용에 대한 효과가 입증되면서 이를 이용한 식품 및 약품 등의 다양한 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다(Saleem M 등 2006). 또한, 백년초 열매는 betanine이라는 적색 색소를 함유하고 있어 식품의 가공 분야에서 이를 식품의 식용색소로 사용하기 위해 천연 색소에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으며(Chung MS & Kim KH 1996), 열과 산성 조건에서 안정적이며(Lee SP 등 1998), 초콜릿과 같은 가공제품에 사용되고 있다(Kim MJ 등 2014).

손바닥 선인장과 백년초 및 천년초에 관한 항염 및 신경 보호 효과 등에 관한 보고는 있지만(Kim DG 등 2018; Kim JY & Lim MK 2019), 백년초 열매의 항산화 활성과 미백 활성 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 백년초 열매 추출물의 총 폴리페놀 함량, 항산화 활성 및 B16F10 세포모델에서의 멜라닌 생합성 저해 효과가 있는지 확인하고, 이의 기능성 식품 소재로서의 발전 가능성을 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 백년초 열매분말은 제주백년초(Jeju, Korea)에서 구매하였다. 환원력 측정에 필요한 potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic anhydrous 는 Daejung Chemicals & Metal Co., Ltd.(Siheung, Korea)에서 구입하였고, 항산화 활성 측정에 사용한 Folin-Ciocalteu phenol reagent(FCP), Na₂CO₃, gallic acid, copper(II) chloride,

neocuproine, 2,2-phenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH)와 ascorbic acid와 세포 독성 측정에 사용한 thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT)와 멜라닌 합성 유도를 위한 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 B16F10 세포는 한국 세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)은 WELGENE Inc.(Daegu, Korea)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL.(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Chuo-ku, Tokyo)에서 구입하였다.

2. 백년초 열매 물 추출물(WEC)의 제조

건조된 백년초 열매 분말에 10배수의 증류수를 가하여 잘 섞어준 뒤 autoclave에서 121°C에서 15 min 동안 열수 추출 후 Whatman No.1 여과지로 여과해 동결건조하여(LP30, IlshinBioBase, Dongducheon, Korea) -20°C에서 보관하면서 이후 분석에 사용하였다. 백년초 열매 물 추출물은 이후 WEC(water extract of cactus)로 명명하였다(Table 1).

3. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량 실험은 Gutfinger T(1981)의 실험방법을 일부 변형 후 분석하여 진행하였다. WEC 200 µL, 에탄올 200 µL을 넣은 후 1,000 µL의 증류수를 가한 후, 각각의 혼합시료에 50%(v/v) FCP 100 µL을 가하여 5 min 동안 반응시켰다. 이후 200 µL 5%(w/v) Na₂CO₃를 추가로 가하고 1 hr 동안 암반응 시킨 후, 혼합시료를 vortexing 다음 최종 반응물은 200 µL씩 96-well plate에 분주하여 microplate reader (VersaMax, Molecular Devices, BaneBio, Sunnyvale, CA, USA) 725 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 총 폴리페놀 함량은 에탄올에 용해한 gallic acid(GA)를 이용하여 표준 검량 곡선 $y=0.471x-0.0465$ 를 나타내어 이에 대입하여 환산 후 GA 당량(µg GAE/mL)으로 나타냈으며, 이때 표준 곡선의 R² 값은 R²=0.9948의 결과값을 나타냈다.

4. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능을 통해 WEC의 항산화 활성 평가를 측정하였으며, 양성대조군으로 ascorbic acid를 사용하여 비교하였다. 에탄올에 용해시킨 200 µM의 DPPH를 96-well plate 190 µL 분주 후 WEC를 10, 50, 100, 200 및 400 µg/mL로 각각 희석하여 10 µL를 넣고 어두운 곳에서 30 min 동안 반응을 시킨 후, microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, BaneBio, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 517 nm의 흡광도를 측정하였다. 대조군은 WEC 대신 DMSO 10 µL를

Table 1. The extraction yield of WEC

Name	Part	Extraction solvent	Extraction yield (% w/w-dry weight)
<i>Opuntia ficus-indica</i> var. <i>saboten</i>	Fruit	Water	9.43

WEC: Water extract of a *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (cactus) fruit.

첨가하였고, 아래의 방법과 같이 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다. 또한, 양성대조군 ascorbic acid를 10, 50, 100, 200 및 400 µg/mL의 농도로 단계 희석하여 비교하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{WEC 처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

5. 환원력

Cu²⁺이온을 Cu¹⁺로 전환시키는 정도를 측정하여 WEC의 환원력을 측정하였다. WEC를 10, 50, 100, 200 및 400 µg/mL의 농도로 희석하여 각각 40 µL씩 넣어 주었으며, 증류수에 녹인 CuCl₂ 100 µM의 용액 20 µL, neocuproine 0.625 mM의 용액 80 µL 및 potassium phosphate buffer(pH 7.4) 10 mM을 60 µL를 96-well plate에 분주한 후 1 hr 동안 25°C에서 반응시켰다. 이후 microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, BaneBio, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 454 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 WEC 대신 DMSO 40 µL를 첨가하였고, 양성대조군 ascorbic acid를 사용하여 WEC와 같은 10, 50, 100, 200 및 400 µg/mL 농도로 희석하여 비교하였다. 환원력의 결과값은 Cu¹⁺/neocuproine의 extinction coefficient(7.95 × 10³ M⁻¹cm⁻¹)를 통해 454 nm의 흡광도에서 계산된 Cu¹⁺이온의 농도로 나타내었다.

6. 백년초 열매 추출물 WEC의 세포독성

WEC에 의한 B16F10 세포에서의 생존율을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다. WEC를 포함한 FBS-DMEM을 24 hr 동안 처리한 후 FBS-DMEM을 완전히 제거 후 MTT-media를 200 µg/mL 첨가 후 1 hr 동안 처리하였다. MTT-media를 제거하고 각 well에 DMSO를 500 µL씩 넣어 생성된 formazan을 녹인 후, 100 µL씩 96-well plate에 분주한 후 570 nm의 흡광도를 microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, BaneBio, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

7. B16F10 세포에서 멜라닌 생합성 억제 활성

WEC의 멜라닌 생합성 억제 활성을 B16F10 세포를 이용하여 측정하였다. 1 mM IBMX를 처리하여 멜라닌 생성을 유도한 후 WEC를 50, 100, 200 및 400 µg/mL 농도별로 72

hr 동안 처리하였다. 배지 제거 후 PBS로 세척 후, trypsin-EDTA 200 µL를 사용하여 세포를 용해시킨 후 1,008 ×g에서 20 min 동안 원심분리하여 얻은 pellet을 1N NaOH와 10% DMSO에 용해시킨 다음 100°C에서 10 min 동안 고정 후에 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 내의 백년초 추출물에 의한 멜라닌 축적 억제 정도를 현미경을 통해 관찰하였다 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

8. 통계분석

모든 실험은 3회 반복하여 나타냈고, 본 실험의 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 표현하였다. 통계처리는 SPSS software(Ver. 18, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 그룹 간의 유의성 평가는 일원 배치 분산분석(one-way ANOVA)을 통해 진행하였고, Duncan's test 및 t-test 방법의 사후검증을 통하여 각 구간의 유의성 차이 95%(p<0.05) 및 99%(p<0.01)로 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 함량

페놀은 페닐기가 수산기를 가지는 방향족 화합물을 의미하며, flavonoid, tannin 및 lignan 등의 화합물이 있다(Crespy V & Williamson G 2004). 이는 수소 원자를 라디칼에 제공함으로써 안정화하며 산소와 반응을 어렵게 하여 안정한 유리 라디칼을 형성시킨다(Ahn SI 등 2007). 또한, 식물의 총 폴리페놀 함량은 전자공여능과 밀접한 상관관계가 존재하여 총 폴리페놀 함량이 높아짐에 따라 전자공여능이 높아지며, 그 효능이 높게 나타나는 경향이 있다고 보고되었다(Kim HK 등 2002; Seog HM 등 2002). 본 실험에서는 백년초 열매 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 함량에 대해 gallic acid를 기준물질로 하여 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 1에 나타내었다. WEC의 총 폴리페놀 함량을 10, 50, 100, 200 및 400 µg/mL의 농도로 실험하였을 때 1.74, 4.05, 6.77, 11.36 및 19.24 µg GAE/mL의 결과를 나타내었다. Kim JY 등(2021)은 70% 에탄올의 손바닥 선인장 줄기와 열매 추출물을 통해 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 줄기와 열매의 각각의 총 폴리페놀 함량은 8.00과 9.46 mg GAE/g의 결과를 나타냈다. 또한, WEC와 같이 천연물에서 얻어지는 폴리페놀은 다양한 생리

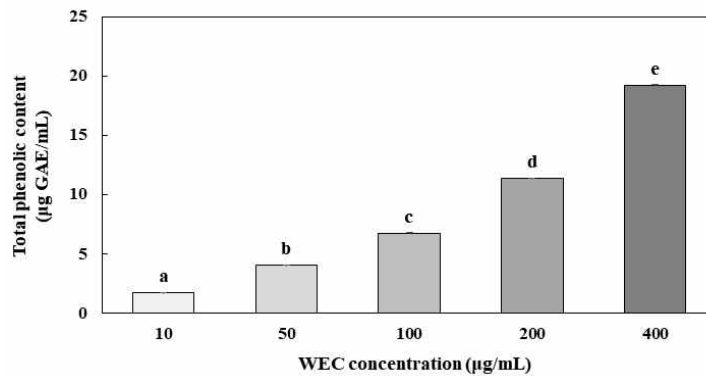


Fig. 1. Total phenolic content of WEC.

The total phenolic of WEC was analyzed at 10, 50, 100, 200 and 400 µg/mL in this test. Each value was displayed as mean±S.D. Values with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$. WEC: Water extract of a *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (cactus).

활성을 가지고 항산화 작용을 나타내며(Bravo L 1998), 항산화 활성에 대한 효과는 같은 종이라도 부위에 따라 나타내는 활성이 다를 수 있다. 또한, Yoon JA 등(2009)은 백년초와 같은 선인장과의 천년초 선인장의 각 부위별 메탄올 추출물을 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 그 결과 천년초 선인장의 열매 추출물의 경우 4.49 g/100 g 수준을 나타내었다. WEC는 같은 선인장과 추출물과 비교하였을 때 총 폴리페놀 함량이 높은 수준으로 나타났다. 이처럼 총 폴리페놀 함량이 높을수록 폴리페놀 내 다수의 수산기는 여러 화합물과 결합하여 우수한 항산화 효능을 나타낸다(Lu Y & Foo LY 2000). 따라서 WEC는 항산화 작용에 있어 높은 활성을 나타낼 것이라고 사료된다.

2. DPPH 라디칼 소거능

인체 내의 활성산소는 세포 내 세포막을 공격하여 인체의 노화와 질병을 유발하며, 이러한 자유라디칼에 의해 발생하는 노화와 질병을 억제하기 위해 전자공여능을 이용하여 항산화 활성을 측정한다(Lim SY 등 2007). 특히 천연물의 항산화능 측정은 전자공여능을 지표로 사용하며(Lee GD 등 1997), 본 실험에서는 DPPH 라디칼 소거능을 통해 전자공여능 측정을 진행하였으며 결과는 Fig. 2와 같다. DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 백년초 열매 추출물 WEC의 10, 50, 100, 200 및 400 µg/mL 농도에서 대조군과 비교하여 7.24%, 18.45%, 30.02%, 47.96% 및 73.98%로 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가함을 확인하였다. 양성대조군

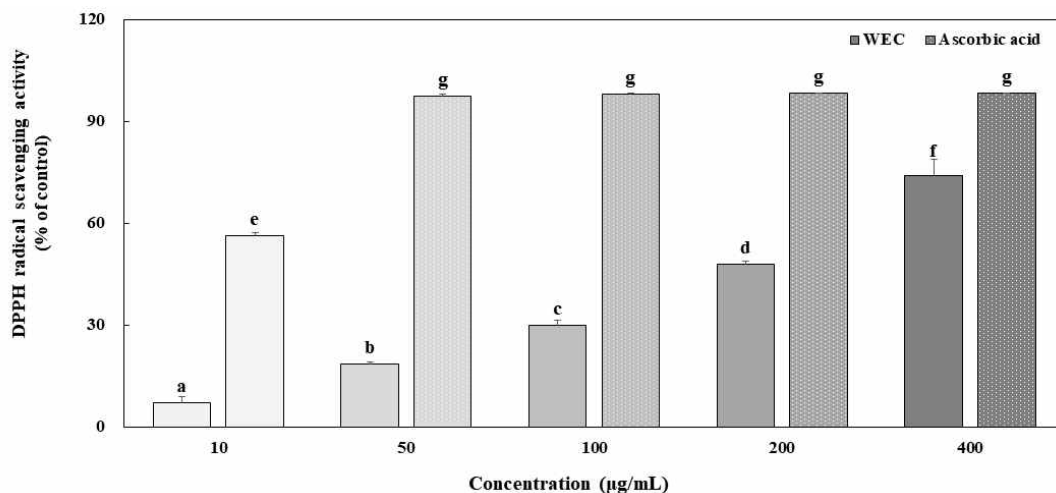


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of WEC.

The DPPH radical scavenging activities of WEC and ascorbic acid were analyzed at concentrations of 10, 50, 100, 200 and 400 µg/mL in this test. Each value was displayed as mean±S.D. Values with different letters mean significant differences between WEC and ascorbic acid by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$. WEC: Water extract of a *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (cactus).

ascorbic acid는 10, 50, 100, 200 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 56.58%, 97.34%, 98.12%, 98.20% 및 98.21%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다. 항산화 능력이 뛰어나다고 알려진 양성대조군 ascorbic acid와 WEC를 비교하였을 때, WEC의 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도와 ascorbic acid의 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 DPPH 라디칼 소거능 활성이 유사하게 나타났다. Kim DG 등(2018)은 손바닥 선인장과에 속하는 백년초와 천년초 열매의 75% 에탄올 추출물을 통한 DPPH 라디칼 소거능을 평가하였는데, 그 결과 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 백년초 추출물은 12.68%, 220.06% 및 36.62%를 나타냈으며, 천년초 추출물은 10.12%, 13.01% 및 21.20%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. Park CM 등(2013)은 전남과 제주도 지역에서 자생하는 손바닥 선인장 줄기 80% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 활성을 비교하였으며, 100, 250 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 전남 손바닥 선인장 줄기 추출물은 6.17%, 16.37% 및 28.75%를 나타내었고, 제주도 손바닥 선인장 줄기 추출물은 9.67%, 26.46% 및 37.34%로 전남 선인장 줄기 추출물보다 제주도 선인장 줄기 추출물이 더 높은 DPPH 라디칼 활성을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 WEC와 백년초 열매의 75% 에탄올 추출물을 비교하였을 때 추출 용매에 따른 차이가 있음을 확인하였고, 같은 선인장과인 천년초 열매의 75% 에탄올 추출물과 선인장 줄기 80% 에탄올 추출물을 비교하였을 때, WEC가 높은 수준의 DPPH 라디칼 소거능을 나타냄으로 높은 항산화 효과를 가진다고 사료된다.

3. 환원력

환원력이란 활성 산소종 및 유리기에 전자는 공여하는 능

력으로서 항산화 활성의 기작이며, 이는 항산화 작용에 있어 중요한 요소이다(Siddhuraju P 등 2002). 본 실험에서는 Cu^{2+} 이온을 통한 WEC의 reduction power assay 결과를 나타내었으며(Fig. 3), WEC의 10, 50, 100, 200 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 4.08, 17.52, 29.43, 41.25 및 42.11 μM 농도로 Cu^{2+} 이온을 Cu^{+} 이온으로 농도 의존적으로 환원하였다. 양성대조군 ascorbic acid 또한 같은 농도에서 각각 4.47, 19.38, 41.18, 40.57 및 41.63으로 Cu^{2+} 을 Cu^{+} 로 농도 의존적으로 환원시키는 경향을 보였다. WEC와 ascorbic acid를 동일한 농도에서 각각 비교하였을 때, 각 농도에서 환원시킨 Cu^{+} 이온의 유의적인 차이가 없었으며, 가장 높은 농도인 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 WEC가 양성대조군 ascorbic acid보다 높은 환원력을 나타냈으며, 이는 천연 항산화 물질과 WEC가 유의한 항산화 활성을 가지고 있음을 나타낸다. 백년초 열매 추출물의 환원력에 관한 기존 연구 결과는 매우 미미하였으며, Kim DJ 등(2011)은 백년초와 같은 손바닥 선인장과에 속하는 천년초의 열수 및 80% 에탄올 추출물에 대한 Fe^{2+} 이온의 환원력을 측정하여 결과값을 Optical density(OD) 700 nm의 값으로 나타내었다. 그 결과 80% 에탄올 추출물과 열수 추출물이 각각 농도 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 0.157(OD700 nm), 0.069(OD700 nm)로 나타났다. 이와 같이 WEC은 Cu^{2+} 이온을 Cu^{+} 이온으로 변환하는 과정에 있어 높은 환원력 가지는 WEC은 천연 항산화 물질로서 중요하게 작용할 것이라 판단된다.

4. 세포 독성

B16F10 세포에서 WEC에 대한 세포 독성을 확인하고자 MTT assay를 실시하였다. B16F10 세포가 70% 이상 찬 상태

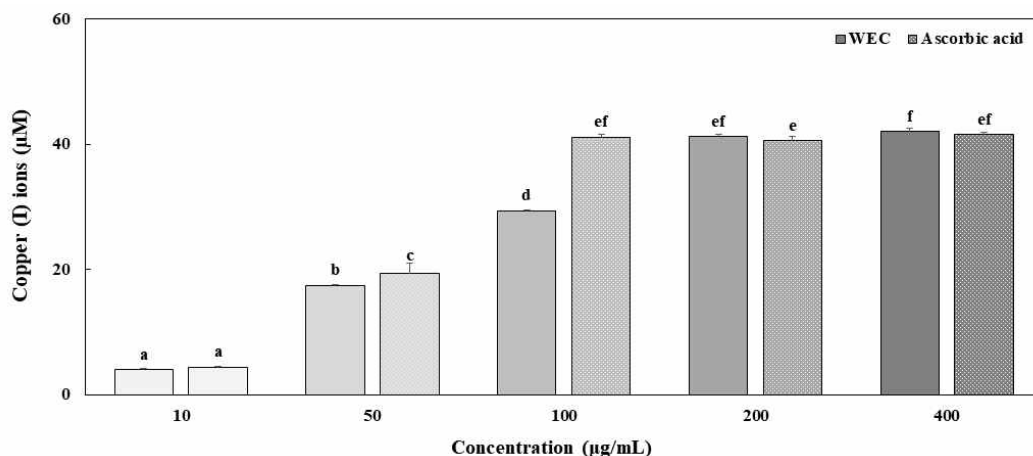


Fig. 3. The reduction power of WEC.

The reduction power of WEC and ascorbic acid were analyzed at concentrations of 10, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$ in this experiment. Each value was displayed as mean \pm S.D. Each value is mean \pm S.D. Values with different letters are significantly difference between WEC and ascorbic acid by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$. WEC: Water extract of a *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (cactus).

에서 10, 50, 100, 200, 400, 800 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 WEC를 24 hr 동안 처리한 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 각각 104.20%, 108.01%, 111.33%, 100.44%, 93.16%, 87.67% 및 89.49%의 결과를 나타내었으며, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적인 세포 독성이 발견되었다(Fig. 4). 이후 실험에서는 유의적인 세포 독성을 나타낸 800 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도를 제외하고 50, 100, 200 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 통해 실험을 진행하였다.

5. 멜라닌 생합성 억제 활성

B16F10 세포에서 WEC이 멜라닌 생합성을 억제하는지 알아보기 위해 B16F10 세포에 1 mM IBMX를 처리하여 멜라닌 생성을 유도하고, WEC를 10, 50, 100, 200 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 72 hr 동안 처리하였다. 그 결과 B16F10 세포 내 및 세포 외의 멜라닌을 측정하여 평가하였고, B16F10 세포에서 WEC를 처리하였을 때 세포 외로 분비되는 멜라닌 양을 관

찰하였다(Fig. 5A). 또한, B16F10 세포 내에서 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 WEC는 각각 91.69%, 50.41%, 11.94% 및 13.90%로 농도 의존적으로 B16F10 세포에서 유의적인 멜라닌 형성 억제 효과를 나타내었으며(Fig. 5B), 이는 멜라닌 축적을 효과적으로 감소시킬 수 있다. 멜라닌은 세포 내의 리보솜에서 tyrosinase 효소에 의해 여러 단계를 거쳐 합성하는 핵심 효소로 작용하며, 이 외에도 멜라닌 생합성 과정에서 주요한 인자로는 tyrosinase related protein-1(TRP-1), tyrosinase related protein-2(TRP-2) 및 microphthalmia-associated transcription factor(MITF) 등이 알려져 있다(Kwon OJ 2016). 백년초 열매 추출물의 멜라닌 억제에 관한 기존 연구 결과는 매우 미미한 실정이며, Ha MJ & You SH(2016)은 백년초와 같은 손바닥 선인장과인 천년초를 70% 에탄올로 추출하여 멜라닌 억제 실험을 진행하였다. 그 결과 3, 6, 12, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 79.7%로

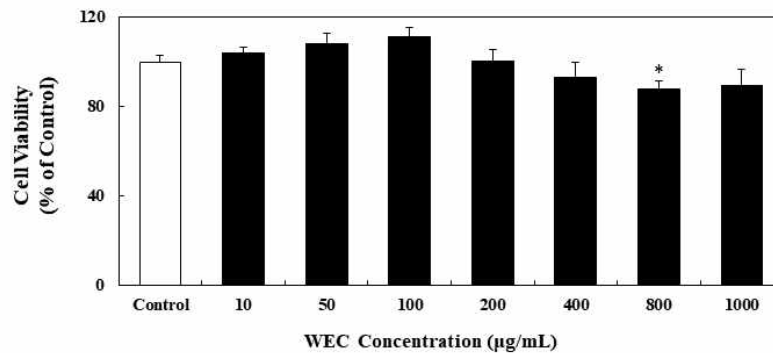


Fig. 4. Effect of WEC on the viabilities of B16F10 cells.

The cell viability of WEC was analyzed at 10, 50, 100, 200, 400, 800 and 1,000 $\mu\text{g/mL}$ in this experiment. Corresponding letters show significant differences by *t*-test (* $p < 0.05$). Control: IBMX 1 mM, WEC: Water extract of a *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (cactus).

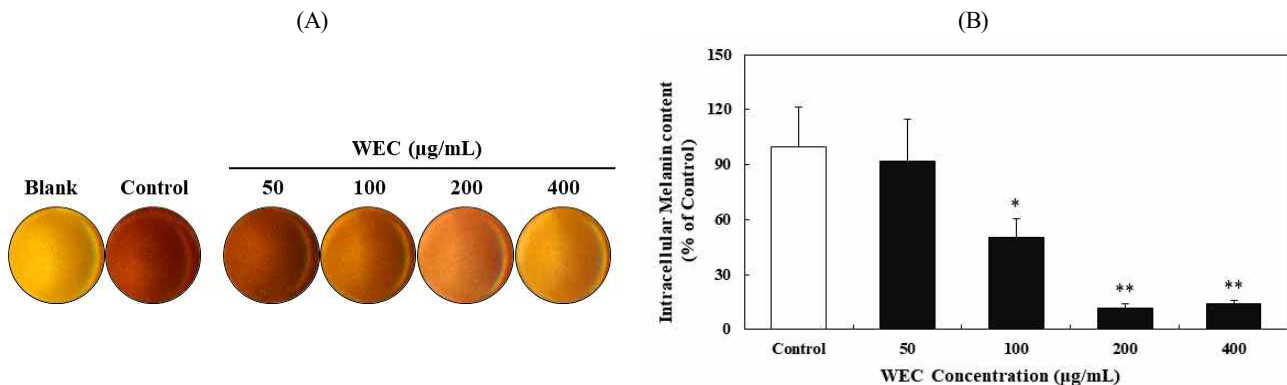


Fig. 5. Effect of WEC treatment on melanin accumulation of B16F10 cells.

(A) Accumulated melanin levels were analyzed by microscopic observation. (B) Melanin content of B16F10 cells. Each value is mean \pm S.D. Values with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Control: IBMX 1 mM, WEC: Water extract of a *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (cactus).

높은 감소율을 나타내었다. 본 실험에서 나타난 멜라닌 생합성 억제 효과에 대한 정확한 기전을 파악하기 위해서 멜라닌 생합성 억제에 영향을 미치는 주요 인자에 관한 추후 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서 WEC를 제조하고 이의 항산화 활성과 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하였다. 항산화 활성으로는 DPPH 라디칼 소거능, 환원력 및 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, DPPH 라디칼 소거능에서 73.98%의 높은 소거능을 나타냈으며, WEC의 환원력은 42.11 μM 으로 Cu^{2+} 을 Cu^{1+} 이온으로 환원하였고, 이는 항산화 활성이 높은 ascorbic acid와 유사한 수준을 나타냈다. 또한, WEC의 총 폴리페놀 함량은 1.74, 4.05, 6.77, 11.36 및 19.24 $\mu\text{g GAE/mL}$ 로 농도가 증가함에 따라 증가하였고, 이는 DPPH 라디칼 소거능과 환원력과의 연관성이 있음을 확인하였다. 게다가 B16F10 세포에서 WEC의 멜라닌 생합성 억제 활성은 농도가 증가함에 따라 유의적으로 저해하였다. 본 연구 결과를 종합해 볼 때, 백년초 열매의 항산화 효과를 증명하였으며, 멜라닌 형성 억제 소재로서의 가능성이 있음을 시사하였다.

REFERENCES

- Ahn SI, Bok JH, Son JY (2007) Antioxidative activity and nitrite-scavenging abilities of some phenolic compounds. *Korean J Food Cook Sci* 23(1): 19-24.
- Bravo L (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56(11): 317-333.
- Byun HS, Um YS, Hur IH, Sim SY, Kim KJ (2006) The quality of life of skin disease patients, particularly acne patients. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 19(1): 65-78.
- Choi WS, Kwon HS, Lim HW, No RW, Lee HY (2013) Whitening effects of *Lactobacillus rhamnosus* associated with its antioxidative activities. *Microbiol Biotechnol Lett* 41(2): 183-189.
- Chung MS, Kim KH (1996) Stability of betanine extracted from *Opuntia ficus-indica* var. *Sabolen*. *Korean J Food Cook Sci* 12(4): 506-510.
- Crespy V, Williamson G (2004) A review of the health effects of green tea catechins in *in vivo* animal models. *J Nutr* 134(12): 3431s-3440s.
- Gutfinger T (1981) Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
- Ha MJ, You SH (2016) Bioactive characteristics of extracts of *Opuntia humifusa* fruit as functional cosmetic ingredients. *Asian J Beauty Cosmetol* 14(4): 463-472.
- Kim DG, Shin JH, Kang MJ (2018) Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia humifusa* fruits ethanol extracts. *Korean J Food Preserv* 25(5): 586-594.
- Kim DH, Moon YS, Park TS, Hwang JY, Son JH (2013) Potent whitening activity of *Aruncus dioicus* extract in B16F10 melanoma cell by suppression of melanin biosynthesis. *Korean J Horticult Sci Technol* 31(6): 813-820.
- Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, Lee BY, Lee OH (2011) Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv* 18(3): 366-373.
- Kim HK, Choi YJ, Kim KH (2002) Functional activities of microwave-assisted extracts from *Flammulina velutipes*. *Korean J Food Sci Technol* 34(6): 1013-1017.
- Kim IY, Lee SH, Song WS (2007) The dyeability of extract from *Opuntia Ficusindica* var. *Saboten* fruits. *Text Color and Finish* 19(6): 1-6.
- Kim JY, Hwang BS, Jang M, Kwon SH, Kim GC, Kang HJ, Hwang IG (2021) Physiological activities of *Opuntia monacantha* Haw. Fruit and Stem. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 50(5): 456-463.
- Kim JY, Lim MK (2019) Anti-inflammatory and neuroprotective effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* alone or combined with vitamin C. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48(6): 613-621.
- Kim MJ, Hong SH, Chung LN, Choe EO, Song YO (2014) Development of lotus root bugak with plasma lipid reduction capacity by addition of *Opuntia ficus -indica* var. *saboten* or green tea as a coloring agent. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(3): 333-340.
- Kim MK, Park SI, An GM, Heo SH, Shin MS (2019) Physiological activity of supercritical *Poria cocos* back extract and its skin delivery application using epidermal penetrating peptide. *J Korean Oil Chem Soc* 36(3): 766-778.
- Kim SH, Kim IC (2008) Antioxidative properties and whitening effects of the *Eucommiae cortex*, *Salviae miltiorrhizae*

- radix, Aurantii nobilis pericarpium* and *Cnidii rhizoma*. J East Asian Soc Diet Life 18(4): 618-623.
- Kwon OJ (2016) Effect of *Mori Follium* extract on the melanogenesis and skin fibril matrix. Kor J Herbol 31(5): 41-46.
- Lee GD, Chang HK, Kim HK (1997) Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. Korean J Food Sci Technol 29(3): 432-436.
- Lee HJ, Park SN (2011) Antioxidative effect and active component analysis of *Quercus salicina* blume extracts. J Soc Cosmet Sci Korea 37(2): 143-152.
- Lee SP, Whang K, Ha YD (1998) Functional properties of mucilage and pigment extracted from *Opuntia ficus-indica*. J Korean Soc Food Sci Nutr 27(5): 821-826.
- Lim SY, Leem JY, Lee CS, Jang YJ, Park JW, Yoon S (2007) Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. Korean J Food Sci Technol 39(6): 694-700.
- Lu Y, Foo LY (2000) Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chem 68(1): 81-85.
- Park CM, Kwak BH, Park SH, Kim H, Rhyu DY (2013) Comparison of biological activities of *Opuntia humifusa* and *Opuntia ficus-indica*. Korean J Plant Res 26(5): 519-525.
- Park DJ, Lee JC (2008) A study on the antioxidative and depigmentation activities of the ethanol extract of saururus herba. Kor J Herbology 23(2): 193-202.
- Park SH, Cho CH, Ahn BY (2007) A study on the application of *Gastrodiae rhizoma* for food stuffs -Effects of *Gastrodiae rhizoma* on the regional cerebral blood flow and blood pressure-. J East Asian Soc Diet Life 17(4): 554-562.
- Pratt DE, Birac PM (1979) Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. J Food Sci 44(6): 1720-1722.
- Saleem M, Kim HJ, Han CK, Jin C, Lee YS (2006) Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. Phytochemistry 67(13): 1390-1394.
- Seog HM, Seo MS, Kim SR, Park YK, Lee YT (2002) Characteristics of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. Korean J Food Sci Technol 34(5): 775-779.
- Shim KH, Young HS, Lee TW, Choi JS (1995) Studies on the chemical components and antioxidative effect of *Solanum lyratum* Thunb. Kor J Pharmacogn 26(2): 130-138.
- Siddhuraju P, Mohan PS, Becker K (2002) Studies on the antioxidant activity of Indian laburnum (*Cassia fistula* L.): A preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. Food Chem 79(1): 61-67.
- Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G (2006) Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects. Pigment Cell Res 19(6): 550-571.
- Tamotsu T, Kunitoshi M, Toru T, Mashhiro N, Makoto U, Toshio I, Masao H (2003) Hepatocellular tumor induction in heterozygous p53-deficient cba mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. Toxicol Sci 73(2): 287-293.
- Yoo Y (2016) Air pollution and childhood allergic disease. Allergy Asthma Respir Dis 4(4): 248-256.
- Yoon JA, Hahm SW, Park JE, Son YS (2009) Total polyphenol and flavonoid of fruit extract of *Opuntia humifusa* and its inhibitory effect on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 38(12): 1679-1684.

Date Received	Jul. 13, 2023
Date Revised	Jul. 24, 2023
Date Accepted	Jul. 26, 2023