

Streptomyces sp. 20747이 생산하는 Tyrosinase-Inhibiting Isoflavonoids

이충환 · 전호곤 · 서영배 · 고영희*
KIST 유전공학연구소 미생물자원연구실

Tyrosinase-Inhibiting Isoflavonoids Produced by *Streptomyces* sp. 20747

Lee, Choong-Hwan, Hyo-Kon Chun, Young-Bae Seu and Yung-Hee Kho*

Microbial Resources Laboratory, Genetic Engineering Research Institute,
KIST, P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea

Abstract — Three isoflavonoids having tyrosinase-inhibiting activity were isolated from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. 20747. Their structures were determined by UV, EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR to be daidzein, daidzein 7-rhamnoside, and genistein 7-rhamnoside, which were competitive with substrate and had IC₅₀ value of 14, 19, and 16 µg/ml, respectively to mushroom tyrosinase and did not inhibit melanin production of *Streptomyces bikiniensis*. Soybean meal as well as peptone were found to be a good nitrogen source for tyrosinase-inhibiting isoflavonoids production, suggesting that soybean meal is not the origin of tyrosinase inhibiting isoflavonoids formation in *Streptomyces* sp. 20747 strain.

Melanin은 동물, 식물, 미생물 등에서 발견되는 검은 색소로 생육이나 발달에 필수적이진 않지만 어떤 환경에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질이며, 특히 동물에서의 melanin은 피부병과 악성 melanomas와 관계가 있으며, tyrosinase에 의해 tyrosine으로부터 생산되는 DOPA melanin 외에 DHN melanin, GDHB melanin, Catechol melanin 등이 보고되고 있다(1).

Tyrosinase(monophenol, dihydroxy-L-phenylalanin : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 구리를 함유한 효소로 melanin 합성의 초기단계인 L-tyrosine에서 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)(Cresolase activity), DOPA에서 L-dopaquinone으로의 전이(Catecholase activity)에 작용한다(2-4). Tyrosinase 저해제인 4-hydroxyanisole, hydroquinone 등은 인체의 hyper-pigmentation 치료에 사용되고 있으며,

melanoma cell의 증식억제에도 효과가 있는 것으로 보고되었다(5).

본 연구에서는 방선균으로부터 tyrosinase inhibitor를 탐색하는 과정에서 세가지의 isoflavonoid 계열의 물질을 분리정제하여 구조를 밝혔으며, 이 저해제들의 tyrosinase에 대한 저해 특성을 조사하고 발효에서 isoflavonoids 생산과 soybean meal과의 관계를 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

Streptomyces sp. 20747 균주를 한국 토양에서 분리하였고, *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049는 KCTC(Korean Collection For Type Culture)로부터 분양받아 사용하였다.

발효조건

Streptomyces sp. 20747 균주로부터 tyrosinase

Key word: Tyrosinase, inhibitor, isoflavonoid, *Streptomyces*

*Corresponding author

inhibitor를 생산하기 위하여 soluble starch 1%, glucose 2%, yeast extract 0.4%, beef extract 0.1%, soybean meal 2.5%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.025%로 구성된 배지를 pH 7.3으로 조정하여 사용하였으며, 이 배지 6l에 2일간 배양된 종균을 2%(v/v)로 접종하여 10l의 발효조(Marubishi Co.)에서 통기량 1vvm, 교반속도 250 rpm, 28°C에서 5일간 배양하였다.

또한, isoflavonoid 생산과 soybean meal과의 상관관계를 비교하기 위하여 위의 배지에 soybean meal 2.5% 대신 corn steep liquor, casamino acid, bactopeptone, soytone, fish meal을 각각 1.5%씩 첨가하여 500 ml Δ flask에서 7일간 배양하였다.

Streptomyces bikiniensis melanin의 생성 저해

Streptomyces bikiniensis NRRL B-1049를 Papavizas' VDYA agar slant 배지(V-8 juice 200 ml, glucose 2 g, yeast extract 2 g, $CaCO_3$ 1 g, agar 20 g, 증류수 800 ml, pH 7.2)에서 2주간 28°C로 배양시켜 포자를 생성시킨 후 멸균수로 포자 현탁액을 만들었다. 0.2%의 yeast extract를 첨가한 ISP No. 7 배지에 포자 현탁액 0.2 ml씩을 도포한 후 배지표면에 sample을 적신 paper disc를 올리고 28°C에서 48시간 배양 후 생성된 zone으로 4-hydroxyanisole을 대조구로 하여 melanin 생성 저해여부를 관찰하였다(5).

사용기기

HPLC는 Tosoh TSK-6041 detector와 Tosoh TSK-6011 pump를, UV/Vis. spectrophotometer는 Shimadzu UV-260을 EI-mass는 HEWLETT-Packard MS-Engine-5989A를 1H -NMR 및 ^{13}C -NMR은 Varian UNITY 300을 사용하였다.

Tyrosinase 역가 측정

효소의 역가는 IC_{50} 의 경우 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 2.3 ml, 1.5 mM L-tyrosine solution 0.4 ml과 2100 u/ml mushroom tyrosinase(Sigma, 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 0.1 ml의 혼합용액에 0.2 ml의 sample 용액을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 470 nm에서 optical density를 측정하여 효소 활성의 50%를 저해하는 sample 농도를 환산하였으며, screening 과정에서는 전체 반응용액을 200 μ l로 하여 microplate reader(Bio-Rad 3550)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

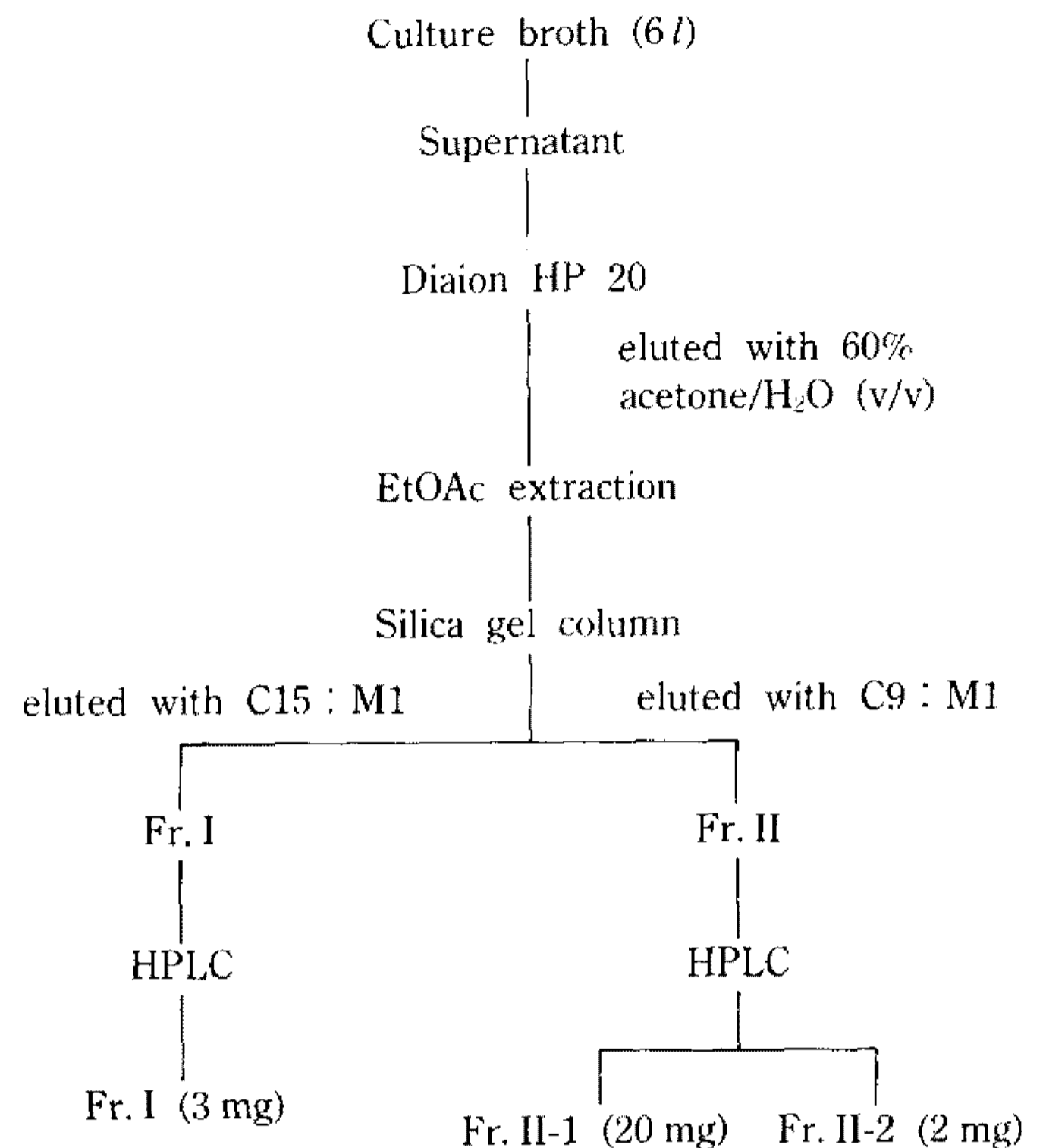


Fig. 1. Isolation of tyrosinase inhibitors from *Streptomyces* sp. 20747.

C: Chloroform M: Methanol

분리 정제

Fig. 1과 같이 배양상등액을 Diaion HP 20 column에 흡착시킨 후 증류수, methanol, 30% acetone/증류수(v/v)로 수세한 후 60% acetone/증류수(v/v)로 용출시켜 활성 분획을 농축한 후 물에 녹여 ethylacetate로 추출하였다. 이를 silica gel(Merck) column chromatography에서 chloroform : methanol (15 : 1)의 용매로 전개시켜 Fr. I을 얻었으며 chloroform : methanol(9 : 1)의 용매 조건으로 전개시켜 Fr. II를 얻었다. Fr. I은 HPLC로 정제하여 최종적으로 3 mg의 활성물질을 얻었으며, Fr. II는 HPLC를 사용하여 Fr. II-1(20 mg)과 Fr. II-2(2 mg)로 분리하였다. 이때 사용한 HPLC column은 LiChrosorb RP-18(7 μ m) 250 \times 7 mm, 용매는 30% acetonitrile/증류수(v/v), 유속은 2 ml/min, 흡수파장은 254 nm로 하여 흡수 peak를 분취한 뒤 각 peak의 활성유무를 조사하였다.

결과 및 고찰

UV 흡수 spectrum

분리 정제된 3가지 물질의 UV 흡수 spectrum은

Table 1과 같다. Fr. I은 MeOH에서 최대 파장이 248 이었고, NaOAc와 NaOH에서 shift가 일어났으며, Fr. II-1은 MeOH에서 261이던 것이 NaOH에서 shift가 있었고, Fr. II-2는 AlCl₃와 NaOH에서 shift가 있었다.

이 결과는 전형적인 isoflavonoid계의(6) UV 흡수 peak와 일치하는 것으로 Fr. I, Fr. II-1, Fr. II-2의 UV pattern은 각각 daidzein, daidzein 7-rhamnoside, genistein 7-rhamnoside의 UV shift와 일치하였다(7).

Mass spectrum

EI mass spectrum 분석 결과 Fr. I, Fr. II-1, Fr. II-2의 분자량은 각각 254, 400, 416으로 밝혀졌으며, mass spectrum에 대한 data base 탐색 결과 Fr. I은 daidzein으로 추정되었고, Fr. II-1은 daidzein(MW 254)에 MW 146의 물질이 결합되어 있는 것으로 분석되었다. Fr. II-2는 EI mass의 모든 주요 peak가 Fr. II-1의 peak 보다 각각 16씩 더 많은 것으로 나타나 genistein(MW 270)에 MW 146의 물질이 결합되어 있는 것으로 추정되었다.

¹H-NMR spectrum

Fr. I, Fr. II-1, Fr. II-2의 ¹H-NMR spectrum을 분석한 결과 Fr. I의 경우 daidzein의 proton 수 및 종류와 일치하였으며, Fr. II-1의 경우 daidzein의 proton peak 이외에 δ 5.5에 broad singlet, δ 3~4 사이에 5개의 proton(δ 3.9, δ 3.7, δ 3.5, δ 3.4, δ 3.2), δ 1.15(3

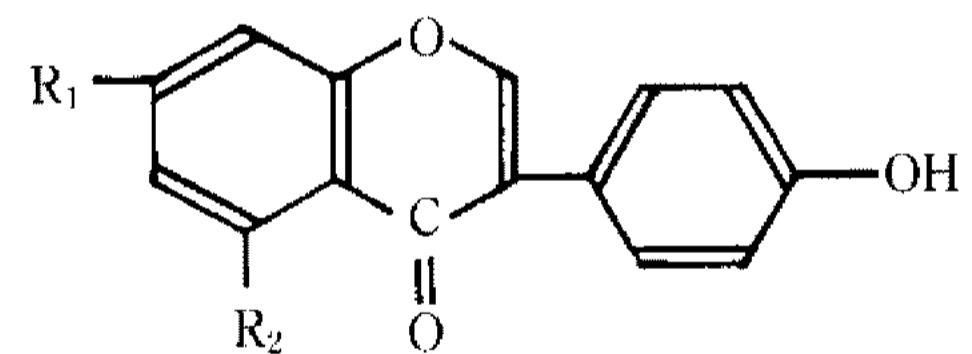
H, doublet) 부근에 -CH-CH₃기를 가지는 6-deoxyhexose의 proton peak를 보였으며 Fr. II-2의 경우 genistein의 proton pattern에 Fr. II-1과 동일한 당이 결합된 것으로 사료되었으며, 그 결합당은 rhamnose로 판단되었다.

¹³C-NMR spectrum

Fr. II-2의 ¹³C-NMR 결과 genistein의 spectrum(8)과 C⁷ 부위의 shift를 제외하고 모든 peak가 일치하였으며, rhamnose에 해당하는 6개의 carbon peak가 δ 78.4에 1개 δ 72~69 사이에 4개 δ 16.6에 1개가 나타났다. 이와같은 기기분석 결과를 바탕으로 Fr. I, Fr. II-1, Fr. II-2를 각각 daidzein, daidzein 7-rhamnoside, genistein 7-rhamnoside로 구조결정을 하였으며, 그 구조는 Fig.2와 같다. 이 구조는 Hazato 등(7)이 β-galactosidase inhibitor screening 과정에서 분리한 isoflavonoids와 일치하였다.

IC₅₀ 값과 저해양상

세개의 isoflavonoids와 genistein의 mushroom tyrosinase에 대한 IC₅₀은 Lineweaver-Burk plot 결과 Table 2와 같이 나타났으며, 모두 competitive inhibi-



	R ₁	R ₂	
Fr. I	OH	H	daidzein
Fr. II-1	O-Rha	H	daidzein 7-rhamnoside
Fr. II-2	O-Rha	OH	genistein 7-rhamnoside

Fig. 2. The structures of isoflavonoids produced by *Streptomyces* sp. 20747.

Table 1. UV absorption maxima (nm) of isoflavonoids in methanol

Compound	None	NaOAc	AlCl ₃	NaOH
Fr. I	248	254	248	258
Fr. II-1	261	260	259	280
Fr. II-2	261	261	271	268

Table 2. Inhibitory activity of isoflavonoids to mushroom tyrosinase and to melanin formation of *Streptomyces bikiniensis*

Compound	Mushroom tyrosinase		<i>S. bikiniensis</i> NRRL B-1049
	IC ₅₀ (μg/ml)	Inhibition type	Inhibition zone ^a
Daidzein	14	Competitive	NF ^c
Daidzein 7-rhamnoside	19	Competitive	NF
Genistein ^b	13	Competitive	NF
Genistein 7-rhamnoside	16	Competitive	NF

^aConcentration of 1 mg/ml, ^bICN biomedical, ^cNot formed

Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of tyrosinase inhibitor

Nitrogen source	Inhibition %		
	0 day	4 day	7 day
Corn steep liquor	45	64	65
Soytone	18	48	50
Fish meal	3	35	25
Casamino acid	34	41	70
Peptone	0	51	65
Soybean meal	12	76	41

tion pattern을 보였고, *Streptomyces bikiniensis*의 melanin 생성을 억제하지 않았다.

Hazato 등(7)은 *Streptomyces xanthophaeus*에서 β -galactosidase 저해물질을 탐색하는 과정에서 isoflavonoids를 발견하여, 이들 물질에 대한 특성을 조사하였으나, tyrosinase 및 melanin 생성저해에 대한 특성 연구는 보고한 바가 없다. 특히 Hazato 등이 β -galactosidase 저해제 탐색 과정에서 분리한 isoflavonoids 중 daidzein, daidzein 7-rhamnoside, genistein 7-rhamnoside 만이 tyrosinase 저해제 탐색 과정에서 발견되었는데, 이는 daidzein 4', 7-dirhamnoside와 genistein 4', 7-dirhamnoside와 같이 C^{4'} 위치에 OH 대신 rhamnose가 결합하면 기질인 tyrosin과 다른 구조를 갖게되어 tyrosinase에 대한 competitive inhibition을 못하게 됨으로 분리과정에서 배제된 것으로 사료된다.

발효특성

Isoflavonoid는 대부분 콩과 식물에서 발견되었고, 미생물이 생산하는 대부분의 isoflavonoid도 배지 성분중의 soybean meal에 기원한다는 보고(9)에 따라 soybean meal을 다른 배지성분으로 바꾸면서 tyrosinase inhibitor 생산을 조사하였다(Table 3).

Corn steep liquor, casamino acid는 자체에 tyrosinase inhibitor를 가지면서 발효생산은 미약하였으며, peptone 배지에서는 7일, soybean meal 배지에서는 4일 배양시 가장 높은 역가를 나타내었고, peptone의 경우 Fig. 3과 같이 pH 변화 및 carbon 이용성으로 보아 정상적인 생육 상태에서 tyrosinase inhibitor를 생산하였다. 그러므로 *Streptomyces* sp. 20747의 tyrosinase inhibitor는 배지중의 soybean meal에 직접 기원하지 않는 것으로 판단되었다.

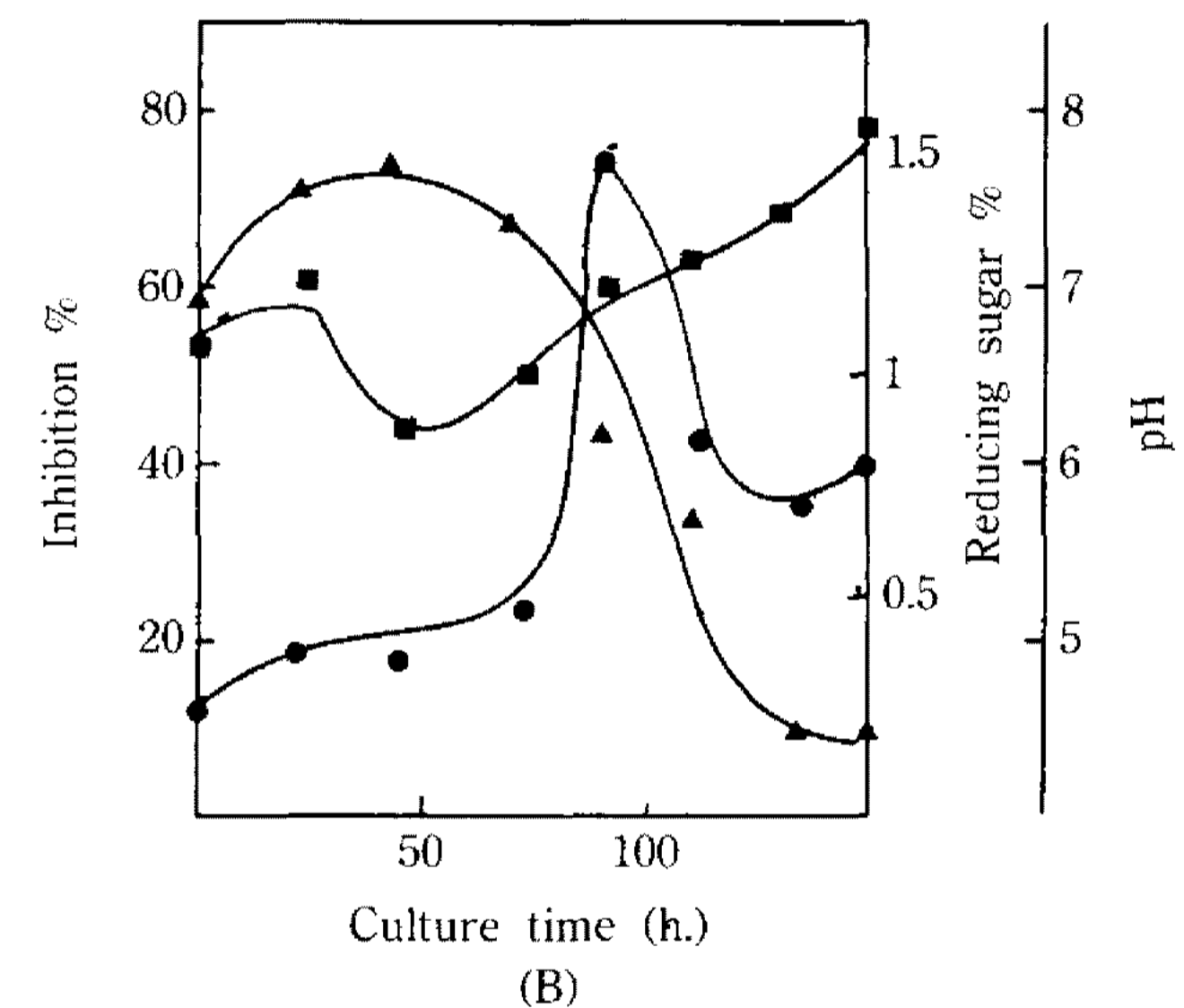
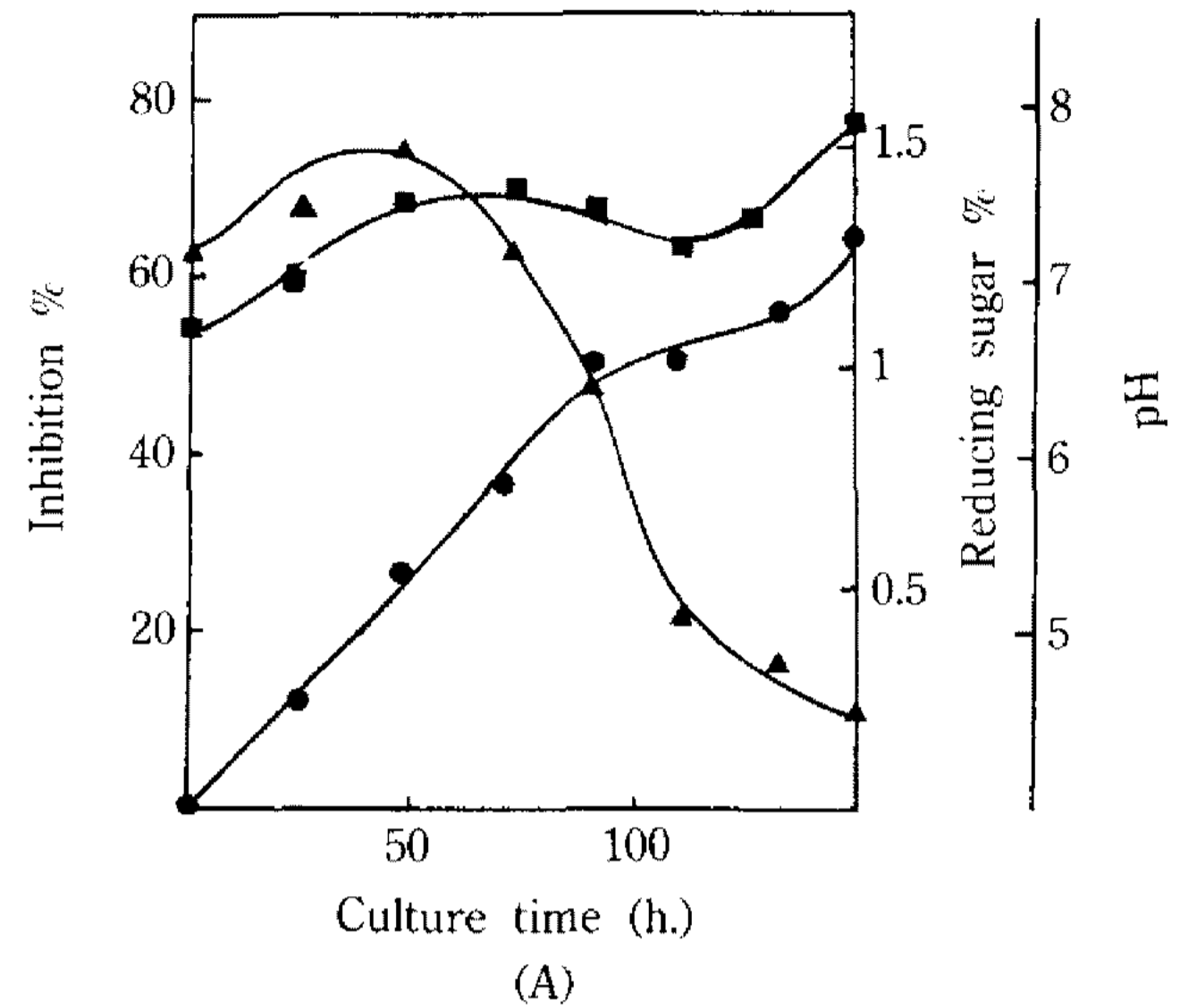


Fig. 3. Time course of tyrosinase inhibitor production by *Streptomyces* sp. 20747 in peptone (A) and soybean meal (B) containing medium.

●; Inhibition, ■; pH, ▲; Reducing sugar

요 약

Streptomyces sp. 20747의 배양 상등액에서 tyrosinase를 저해하는 세개의 isoflavonoid 물질을 분리하였다. 이들의 구조는 UV, EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 분석결과 daidzein, daidzein 7-rhamnoside 그리고 genistein 7-rhamnoside로 결정되었다. 이 물질들은 mushroom tyrosinase를 기질과 경쟁적으로 저해하였으며, 각각 14, 19, 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC₅₀ 값을 나타내었고, *Streptomyces bikiniensis*의 melanin 생성은 억제하지 않았다. Soybean meal 뿐만 아니고 bacto-peptone도 tyrosinase를 저해하는 isoflavonoid 생산에 효과적이

라는 사실은 soybean meal이 *Streptomyces* sp. 20747이 생산하는 isoflavonoids의 기원물질이 아니라는 것을 보여준다.

참고문헌

1. Bell, A.A. and M.H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
2. Lerner, A.B. and I.B. Fitzpatrick. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 91-126.
3. Korner, A. and J. Pawelek. 1982. Mammalian tyrosinase catalases three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**: 1163-1165.
4. Swan, G.A. 1974. Structure, chemistry and biosynthesis of the melanins. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **31**: 521-582.
5. Tomit, K.N., N. Oda., M. Kamel., T. Miyaki and T. Oki. 1990. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. of Antibiot.* **12**: 1601-1605.
6. Markham, K.R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Pp. 15-50. Academic Press, New York.
7. Hazato, T., H. Naganawa, M. Kumagai, T. Aoyagi and H. Umezawa. 1979. β -Galactosidase-inhibiting new isoflavonoids produced by Actinomycetes. *J. of Antibiot.* **32**: 217-222.
8. Agrawal, P.K. 1989. *Carbon-13-NMR of Flavonoids*. Pp. 196-197. Elsevier, New York.
9. Harbone, J.B. 1988. *The Flavonoids*. Pp. 125-126. Champoman and Hill Ltd, London.

(Received Febuary 8, 1993)