

Trichoderma sp. MR-93 균주가 생산하는 Isocyanide 계열의 Melanin 생성 저해물질

이충환 · 전효곤 · 정명철 · 이호재 · 배경숙 · 고영희*
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Production of the Isocyanide Inhibitor of Melanin Biosynthesis by *Trichoderma sp.* MR-93

**Choong-Hwan Lee, Hyo-Kon Chun, Myung-Chul Chung, Ho-Jae Lee,
Kyung-Sook Bae and Yung-Hee Kho***

Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Yusong Taejon 305-600, Korea

Abstract — During the screening of inhibitors of melanin biosynthesis from microbial secondary metabolites, a fungal strain MR-93 which was capable of producing high level of an inhibitor was selected from plant leaf. Based on taxonomic studies, the fungus could be classified as a strain of *Trichoderma sp.* The active compound (MR-93D) was purified from the culture broth by Diaion HP-20 column chromatography, ethylacetate extraction, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC. The inhibitor was identified as 4-hydroxy-8-isocyano-1-oxaspiro[4·4]cyclonon-8-en-2-one by spectroscopic methods of UV, ¹H-NMR, ESIMS and IR. MR-93D showed a strong tyrosinase inhibitory activity with 0.03 µg/ml of IC₅₀ value. It also inhibited melanin biosynthesis with 35 mm inhibition zone at 30 µg/paper disc in *Streptomyces bikiniensis*, a bacterium used as an indicator organism in this work.

Melanin의 생합성은 식물, 미생물 및 동물에서 주로 tyrosinase(monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)에 의해 이루어지는 것으로 보고되고 있다(1-4). 4-Hydroxyanisole 및 hydroquinone 같은 melanin 합성 저해제는 기미, 주근깨, 반점 및 임신기 melanoma와 같은 과잉 색소증 치료에 국부적으로 사용되고 있다(5). Tyrosinase 저해제로 잘 알려진 4-hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone 등은 강력한 melanin 생합성 저해활성을 보이지만 색소세포의 변성 또는 치사를 일으키고 세포 분래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타내며, kojic acid, arbutin 등은 이미 상품화되어 화장품, 식품 등에 미백제로 사용되고 있지만 활성 및 안정성에 문제점을 나타내고 있다(5). 따라서 세포독성이 낮고 tyrosinase 저해활성이 높은 melanin 생합성 저해물질의 개발이 요구되고 있다.

미생물 배양액으로부터 발견된 tyrosinase 저해제는 feldamycin, verginiamycin, tetracycline 유도체 등이

있으며(5), 1991년과 1993년에 Ishihara 등(6)과 Komiyama 등(7)은 방선균배양액으로부터 각각 melano-statin과 OH-3084 K1 등의 신규 melanin 생성 저해제를 분리하여 보고한 바 있다.

본 연구에서는 야생 식물체 잎의 병반으로부터 분리한 곰팡이 균주인 *Trichoderma sp.* MR-93 균주의 배양액으로부터 mushroom tyrosinase 저해활성 및 *Streptomyces bikiniensis*의 melanin 생합성에 대한 저해 활성을 나타내는 isocyanide 계열의 물질을 분리 정제하고 구조결정 및 저해활성을 조사하였는 바 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용 균주

전국 각지의 식물체 및 토양에서 곰팡이를 약 600여 균주 분리하였고, 이 분리균주 중에서 tyrosinase 저해효과 및 *S. bikiniensis*의 melanin 생성 저해효과를 나타내는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 제주도 지역에서 분리한 MR-93 균주였으며, 강한 melanin 생합성 저해활성을 나타내었다. Melanin 생합성 억

Key words: *Trichoderma sp.*, isocyanide tyrosinase inhibitor, melanin

*Corresponding author

제능을 시험하기 위한 시험균으로는 *S. bikiniensis* NRRL B-1049를 사용하였으며 유전공학연구소 유전자은행으로부터 분양 받아 사용하였다.

선발균주 동정

선발된 MR-93번 균주의 미생물학적 특성을 통한 균주의 분류를 위하여 형태학적 특성 및 배양학적 특성을 비교 조사하였다(8, 9).

Melanin 생성 저해물질의 발효조건

Trichoderma sp. MR-93 균주로부터 활성물질 생산은 sucrose(20 g/l), lactose(10 g/l), peptone(3 g/l), NaCl(5 g/l), corn steep liquor(3 g/l), KNO₃(2.3 g/l)와 mineral solution(1 ml/l)으로 구성된 배지를 pH 6.0으로 조정하여 사용하였으며, 1 l shake flask에 200 ml 씩 배지를 첨가하여 25°C, 200 rpm으로 3일간 배양한 종균을 35 l의 배지를 함유한 50 l 발효조에 3%(v/v)로 접종하여, 통기량 1 vvm, 교반속도 200 rpm, 25°C에서 7일간 배양하였다.

Melanin 생성 저해물질의 분리정제

7일간 배양한 *Trichoderma* sp. MR93 배양액을 여과하여 얻은 상등액을 Diaion HP-20(600×60 mm, Mitsubishi Kasei Co.) column에 통과, 흡착시키고, 동량의 증류수로 수세한 후 30% methanol/증류수(v/v)로 용출시켜 활성분획을 농축한 후 ethylacetate로 추출하였다. 이를 농축하여 Sephadex LH-20(Pharmacia LKB) column에서 50% methanol/증류수(v/v)로 용출시킨 후 농축하였다. 그 후 MCI gel(250×25 mm, Mitsubishi Kasei Co.) column 상에서 증류수로부터 100% methanol까지의 농도구배 조건으로 용출시켜서 얻은 활성분획을 최종적으로 HPLC(PLRP-S column, 300×7.5 mm, Phenomenex, 10% acetonitrile, UV 220 nm, 1.5 ml/min)를 통해 순수 분리하였고, MR-93D라 하였다.

Melanin 생성 저해물질 MR-93D의 구조분석 및 이화학적 특성조사

MR-93D의 구조분석을 위한 NMR 분석은 Varian UNITY 300을 이용하였으며, 용매는 D₂O를 이용하여 측정하였다. 분자량 결정은 ESIMS(electrospray ionization mass spectroscopy, VG Quattro 400 mass spectrometer)로 측정하였으며, UV spectrum(Shimadzu UV-260)은 증류수를 용매로 측정하였고, IR 특성은 FT-IR(Laser Precision Analytical, IFX-65s)를 사용하여 측정하였다.

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, CaCO₃ 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 평판배지에 포자현탁액 0.2 ml 씩을 도포한 후 배지표면에 sample을 적신 paper disc를 올리고 28°C에서 48시간 배양 후 생성된 저해환으로 4-hydroxyanisole을 대조구로 하여 melanin 생성 저해여부를 관찰하였다(10).

Mushroom tyrosinase 활성 저해역가

Tyrosinase 활성에 대한 저해역가는 검체 15 μl microplate(96 well)에 넣고, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 150 μl와 1.5 mM L-tyrosine 용액 25 μl를 넣은 후, 2100 unit/ml mushroom tyrosinase(Sigma, 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 7 μl를 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(Bio-Rad 3550)를 사용하여 490 nm에서 측정하였다. Tyrosinase에 대한 저해율(%)은 다음 식에 의하여 계산하였으며, IC₅₀ 값은 효소활성 저해율 50%에 달하는 저해물질의 농도로 결정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(D - C) - (B - A)}{D - C} \times 100$$

- A : 저해제를 넣은 것의 반응 전 흡광도
- B : 저해제를 넣은 것의 반응 후 흡광도
- C : 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전 흡광도
- D : 저해제를 넣지 않은 것의 반응 후 흡광도

결과 및 고찰

균주의 동정

선발된 MR-93 균주의 생육상태는 MEA(malt extract agar) 배지에서 5일 배양시 직경이 5 cm 정도로 신속하게 생육하였으며, 집락은 배지표면에 녹색으로 낮고 넓게 형성하였고, 밝고 흐릿한 황록색 분생자를 가진 흰색 균사체를 형성하였다. 집락의 배면 색은 옅은 황색을 나타내었다. 생육온도는 25~30°C에서 생육이 최대였으며, 5°C와 37°C에서는 생육하지 못하였다. 또한 형태적 관찰에 의하면 균사는 격막이 있고 무색투명하였다. 분생자병은 분절 분지가 많이 되어 있으며 피라미드 모양을 이루고, 분생자병에 수직으로 나선형의 무성포자를 형성하였다. 무성포자는 flask 모양의 단지형으로 투명하였으며, 크기는 5~

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the strain MR-93

Examined	Morphological and cultural characteristics
colony	color-green low spread rapidly on MEA - 9 cm diameter in 5 days white mycelium with bright to dull yellow green conidia reverse - pale at 5°C - no growth
hyphae	septate, hyaline
Conidiophores	hyaline. highly branched bearing whorls of phialides borne perpendicular to the conidiophores (all approximately at right angles) to form a pyramidal shape
Phialides	ampulliform (flask-shaped), hyaline, size - 5~7.0×2.0~3.5 μm accumulating in a slimy ball at the tip of each phialide
Conidia	often adhering in small cluster shape - smooth color - light yellow to green chlamydospore - intercalary and terminal, spherical or subspherical

7×2.0~3.5 μm 정도였다. 각 무성포자의 끝에는 끈적끈적한 구 모양의 집적체가 관찰되었다. 한편 분생자는 종종 작은 덩어리로 집착된 상태로 그 모양은 타원체 내지 약간 타원체였으며, 분생자의 벽은 매끄러운 형이었다. 색상은 밝은 황색 내지 녹색이었으며, 후막포자는 사이에 삽입되기도 하고 말단에 형성되기도 하며 그 형태는 구형이나 반구형이었다 (Table 1). 이상의 특성을 근거로 하여 MR-93 균주는 *Trichoderma* sp.로 동정되었다(8, 9). MR-93 균주는 한국과학기술연구원 유전공학연구소 유전자원센터에 1994년 6월 9일 보관위탁 신청하였으며, 그 수탁번호는 KCTC 0114BP이다.

Melanin 생성 저해물질의 발효 및 분리정제

MR-93 균주의 발효시간에 따른 melanin 생성 저해물질의 생산을 조사하여 Fig. 1에 나타내었다. 배양액 중의 tyrosinase 저해활성은 배양 2일째부터 증가하기 시작하여 배양 6일에 가장 높은 활성을 나타내었고, 그 후로는 약간 감소하는 경향이었다. pH의 변화는 배양 초기에는 상승하다가 배양 3일째부터 저하하기 시작하여 pH 4까지 떨어진 후 다시 상승하는 양상을 나타내었다. 한편 재료 및 방법에서 기술한

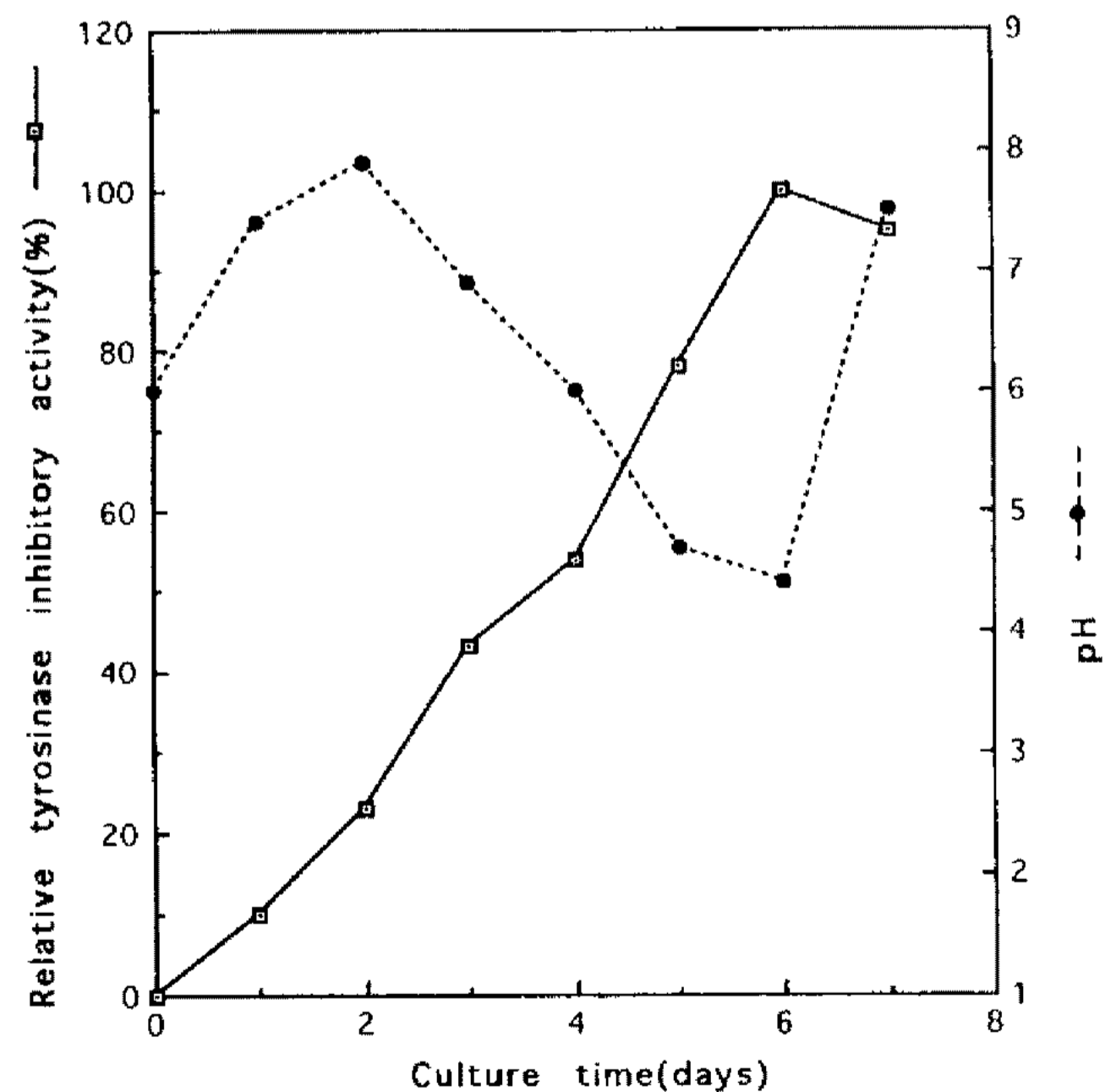


Fig. 1. Time course of MR-93D production in a jar fermenter.

정제과정을 거쳐 배양액 35 l로부터 최종적으로 1 mg의 정제된 melanin 생성 저해물질 MR-93D 얻었다.

Melanin 생성 저해물질 MR-93D의 구조분석 및 이화학적 특성

MR-93 균주가 생산하는 melanin 생합성 저해물질 MR-93D의 이화학적 특성은 Table 2와 같다. 즉, 본 물질은 갈색분말로 UV λ max (H₂O) 229 nm에서 최대 흡수 peak를 보였으며, ESIMS 분석결과 202 m/z에서 (M+Na)⁺ peak가 관찰되어 분자량 179로 확인되었다. IR spectrum에서 2100 cm⁻¹ 부근에서 isocyanide 기의 특이적 peak를 보였고, 1600 cm⁻¹ 부근에서 lactone ring의 peak를 나타냈다. 또한 NMR에 의한 구조분석 결과 분자식은 C₉H₉NO₃로 결정되었다.

Table 2. Physico-chemical properties of the compound MR-93D

Examined	Characteristics
Appearance	brown powder
UV λ max(H ₂ O)nm	229
ESIMS(m/z)	202(M+Na) ⁺
Molecular formula	C ₉ H ₉ NO ₃
IR ν max(KBr) cm ⁻¹	1402, 1585, 1676, 2121, 3442

Fig. 2의 ¹H-NMR spectrum, ¹H-¹H cosy spectrum, ¹H decoupling spectrum 등에 의하여, 3-CH₂는 3.10 ppm(dd, J=6, 18), 2.60 ppm(dd, J=3, 18)에서, 6-CH는 6.19 ppm(s)에서 확인되었고, 8-CH₂와 9-CH₂는 2.1~2.8 ppm 부근에서 관찰되었다. 이상과 같은 이화학적 특성 및 기기분석을 통한 구조분석 결과들을 종합하여 MR-93D는 Boyd 등(11)이 분리한 4-hydroxy-8-isocyano-1-oxaspiro[4.4]cyclonon-8-en-2-one으로 동정되었다(Fig. 3).

MR-93D의 Mushroom Tyrosinase 활성 저해역가

MR-93D의 mushroom tyrosinase 활성에 대한 저해역가를 조사한 결과는 Table 3과 같다. 그 결과 MR-93D의 IC₅₀ 값이 0.03 μ g/ml로 현재 미백 효과제로 사용중인 kojic acid나 강력한 tyrosinase 저해제 중에 하나인 tropolone보다 더 강한 저해역가를 나타내었다.

MR-93D의 *S. bikiniensis* melanin 생성 저해활성

MR-93D의 *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049

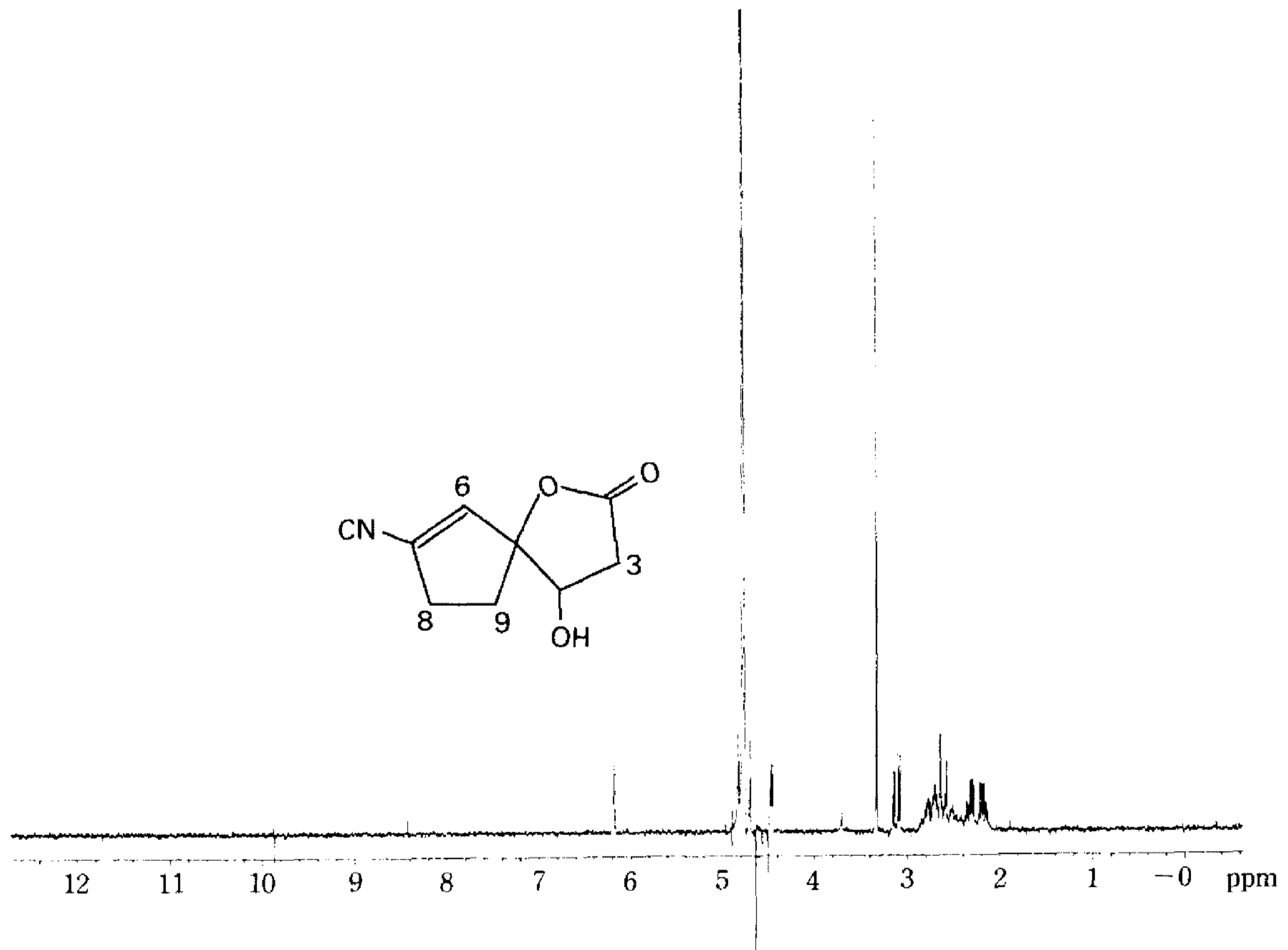


Fig. 2. ¹H-NMR spectrum of MR-93D from strain *Trichoderma* sp. MR-93 (300 MHz, D₂O).

Table 3. Inhibitory activity of the compound MR-93D against mushroom tyrosinase and melanin formation of *Streptomyces bikiniensis*

Compounds	Mushroom tyrosinase IC ₅₀ (µg/ml)	<i>S. bikiniensis</i> (inhibition zone diameter)*		
		10 µg	20 µg	30 µg
MR-93D	0.03	15	25	35
p-hydroxyanisole	15	15	25	30
Kojic acid	10	0	0	0
Tropolone	0.1	—	—	—
Genistein	13	0	0	0

—: not determined, *: zone diameter in mm

에 대한 melanin 생성 저해활성은 Table 3에 나타내었다. 그 결과 MR-93D는 강력한 melanin 생성 저해제로서 피부암 환자에 대한 임상 실험을 시도한 바 있는 4-hydroxyanisole과 비슷한 활성을 나타내었다.

MR-93D는 isocyanide와 lactone ring을 포함하는 구조로서, 1991년 *Trichoderma hamatum*으로부터 isocyanide 계열 물질을 탐색하는 과정에서 분리되었다고 보고된 적이 있다(11). 그러나 그 발견은 $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)SCN]_2$ 와의 complex 상태로 분리되었고, 활성에 관한 보고는 없었던 바, 본 보고가 MR-93D의 순수분리에 의한 구조동정 및 활성에 대한 최초의 보고이다.

요 약

미생물로부터 멜라닌 생성 저해물질을 탐색하던 중 mushroom tyrosinase 및 *Streptomyces bikiniensis*의 melanin 생성을 억제하는 균주를 선발하고, 그 균주가 생산하는 활성물질을 분리정제한 후 구조를 결정하였고 정제된 물질에 대한 활성을 조사하였다. 선발된 MR-93 균주의 형태적, 배양적 특성 등을 조사한 결과 본 균주는 *Trichoderma* sp.로 분류되어 본 균주를 *Trichoderma* sp. MR93(KCTC 0114BP)로 명명하였다. 또한 균 배양액으로부터 Diaion HP-20 column chromatography, ethylacetate extraction, Sephadex LH-20 column chromatography 및 HPLC 등을 통하여 melanin 생합성 저해물질 MR-93D를 정제한 후 UV, ¹H-NMR, ESIMS, IR 등의 기기분석을 한 결과 본 물질은 4-hydroxy-8-isocyano-1-oxaspiro[4.4]cyclonon-8-en-2-one로 동정되었다. MR-93D의 mushroom tyrosinase에 대한 IC₅₀은 0.03 µg/ml이었고 *S. bikiniensis*의 melanin 생산에 대한 저해는 30 µg/paper disc 투여시 35 mm 지름의 저해환을 나타내었다.

참고문헌

- Bell, A.A. and M.H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
- Lerner, A.B. and I.B. Fitzpatrick. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 91-126.
- Korner, A. and J. Pawelek. 1982. Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**: 1163-1165.
- Aroca, P., F. Solano, C. Salinas, J.C. Gracia-Borron and J.A. Lozano. 1992. Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur. J. Biochem.* **208**: 155-163.
- 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. Antibiotics* **12**: 1601-1605.
- Ishihara, Y., M. Oka, M. Tsumakawa, K. Yomita, M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaki, M. Komish and T. Oki. 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. *J. Antibiotics* **44**: 25-32.
- Komiyama K., S. Takamatsu, Y. Yakahashi, M. Shinose, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Iwai and S. Omura. 1993. New inhibitors of melanogenesis, OH-3084 K1 and K2. *J. Antibiotics* **46**: 1520-1525.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* **116**: 1-54.
- Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1980. *Composition of soil fungi*, Pp. 814-820. Academic press, London.
- 이충환, 전효곤, 서영배, 고영희. 1993. *Streptomyces* sp. 20747 균주가 생산하는 tyrosinase-inhibiting isoflavonoids. *산업미생물학회지* **21**: 139-143.
- Boyd, R.K., A.J. McAlees, A. Taylor and J.A. Walter. 1991. Isolation of new isocyanide metabolites. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 1461-1465.

(Received 5 August 1994)