

버섯 배지를 이용한 tyrosinase 저해제 발효

정승원 · 한대석* · 김석중 · 전문진¹
한국식품개발연구원, ¹고려대학교 농화학과

Fermentation of Tyrosinase Inhibitor in Mushroom Media. Sung-Won Jung, Dae-Seok Han*, Seok-Joong Kim and Moon-Jin Chun¹. Korea Food Research Institute, Baekhyun, Bundang, Seongnam, Kyunggi 463-420, Korea. ¹Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Anam, Sungbuk, Seoul 136-701, Korea - Tyrosinase is an enzyme which catalyzes an enzymatic browning of some foods and *in vivo* synthesis of melanin. In order to produce natural and edible inhibitor of the enzyme which is expected to have whitening effect on melanogenesis, a microorganism was selected from fermented foods. It was named as NU-7, and cultured in mushroom (*Lentinus edodes*, Shiitake) media. Optimal media to produce tyrosinase inhibitor was formulated by varying nitrogen or carbon content. If glucose content was in a range of 3~20% and ammonium sulfate was in a range of 0~0.25%, production of inhibitor was independent of cell mass. Addition of ammonium sulfate as a nitrogen source had little effect on inhibitor production. Production of inhibitor (Y) was proportionally related to shiitake content (X) with a regression equation of $Y = -0.96X^2 + 13.07X + 14.43$ ($R = 0.96$). These results indicate that shiitake and glucose are necessary for the production of tyrosinase inhibitor. In the analysis of mycotoxin in culture broth, aflatoxin was not detected, suggesting that it would be probably edible.

기미는 사춘기 이후 여자들의 얼굴에 생기는 비정상적인 색소침착증이며 노인성검버섯은 노년기 사람의 얼굴이나 팔, 다리 등의 피부에 색소가 비정상적으로 생성되어 나타나는 현상으로 모두 원인물질은 melanin이다(1). 모든 사람이 기미나 노인성검버섯 증상을 혐오하지만 정상적인 상태에서 melanin은 사람의 피부색을 결정하는 중요한 요소로서 색소세포인 melanocyte 내의 melanosome에서 생합성된다(2). 상기 증상은 melanosome에서 melanin이 과다하게 생성될 때 나타나게 되는데, 예로부터 이를 치유하기 위하여 비타민 C를 계속 복용할 것을 권하고 있으나 실제 효과가 나타나는 경우가 별로 없어 보인다.

Melanin은 화학적, 물리적으로 매우 안정한 물질이어서 일단 생성된 색소를 파괴, 또는 분해하여 제거하기란 실로 불가능하다고 알려져 있다. 그런데, melanin의 생성과정에는 자발적 산화가 관여하기도 하지만 몇 단계에서 tyrosinase(monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)가 유일한 효소로 관여하고 있다(3). 그래서 화장품 업계에서는 melanin 생성을 억제하는 방법으로서 tyrosinase의 저해제를 사용하여 치유하는 방향으로 연구를 수행해 왔다. 약 20~30년 전에는 tyrosinase 저해제로 hydroquinone이나 hydroquinone monobenzylether가 사용되었으나 약한 피부염이나 피부의 완전탈색을 일으키는 부작용이 나타나는 문제점이 있었고 그래서 이후에는 좀더 온화한 저해제를 탐색하게 되었다. 이런

저해제는 주로 미생물을 대상으로 탐색이 이루어져 왔는데 이제까지 *Actinomyces* 속에서 melanostatin이나 albocyclin(4, 5) 등이 발견되었고 생약제에서 추출한 arbutin(6), 화학합성품으로는 kojic acid(7) 화장품 원료로 사용되고 있다.

그러나, 이들 중에는 효능이 명백하지 못한 것도 있고 안전성에도 문제가 있기 때문에 아직도 색소 이상침착증을 완벽히 치유할 방법은 없다고 판단된다. 그래서 본 연구진은 식품을 통하여 자연스럽게 상기 증상을 치유할 수 있는 방법을 모색하고자 하였다. 본 연구는 식용 가능한 tyrosinase 저해제를 생산하고자 현재 식품의 제조에 이용되고 있는 안전한 미생물을 대상으로 tyrosinase 저해능이 높은 균주를 선별하고 버섯을 주 배지원으로 발효시켜 저해제 생산의 적정 조건에 대하여 연구한 결과이다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

곰팡이 분리용 시료로 사용한 된장, 매주 및 누룩은 경기도 지역의 재래시장에서 유통중인 제품을 구입하여 사용하였으며, 발효배지원으로 사용한 표고버섯(*Lentinus edodes*, Shiitake)은 생물인 상태로 시중에서 구입하여 -20°C에서 냉동저장하면서 사용하였다. Mushroom tyrosinase(EC 1.14.18.1 : 4,400 units/mg solid) 및 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)은 Sigma사 제품을 사용하였으며, aflatoxin은 Supelco사의 aflatoxin mix kit을 사용하였고, thin-layer chromatographic (TLC) plate는 Merck사의 silica gel 60을 사용하였다.

*Corresponding author.

Key words: Tyrosinase, melanin, enzyme inhibitor, fermentation media, shiitake

공시균주 및 발효균주 분리

대조균으로 사용한 *Aspergillus oryzae* KFRI 00857 및 *Aspergillus oryzae* KFRI 00888은 한국식품개발연구원 생물공학연구부로부터 공시균주를 분양받아 사용하였다. 발효 균주 분리는 먼저 각각의 곰팡이 분리용 시료를 전체적으로 골고루 섞어준 다음 시료 10 g을 채취하고, 여기에 0.05% Tween 80이 포함된 살균수 90 ml를 넣어 5,000×g에서 7분간 균질화 시킨 후 단계적으로 희석하여 생균수가 10¹~10³/ml가 되게 하고 1 ml를 취하여 PDA(potato dextrose agar) 평판 배지에서 30°C, 5~7일간 각각 배양하였다. 이때, 세균의 번식을 억제하기 위하여 10% tartaric acid로 PDA 배지의 pH를 3.5로 조정하여 사용하였다.

발효배지 조제

Czapek-Dox liquid medium은 NaNO₃ 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, KCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, yeast extract 0.1%, glucose 10%로 조제되 배지 멸균시에 MgSO₄·7H₂O, yeast extract 및 glucose는 각각 별도로 멸균하여 혼합하였다. 버섯배지는 표고버섯과 일정량의 증류수를 혼합한 후 mixer(Samsung MC-100)로 3분간 분쇄한 액을 filter press(Seitz-filter-werke, Seitz; filter No. K900)로 여과한 여액에 NaNO₃, K₂HPO₄, KCl, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, yeast extract, glucose 및 ammonium sulfate를 사용 용도에 따라 농도별로 첨가되 MgSO₄·7H₂O, yeast extract 및 glucose는 각각 별도로 멸균한 다음 무균적으로 혼합하여 사용하였다. 한편, tyrosinase 저해활성이 높은 곰팡이 선정을 위한 표고버섯 배지조성은 Table 1에서 보는 바와 같다.

곰팡이 포자현탁액 조제 및 배양

PDA 배지에서 분리 보존 중인 각각의 곰팡이는 발효 직전에 PDA slant에서 30°C, 7일간 배양하고, 여기에 0.05% Tween 80이 포함된 살균수를 첨가하였다. 백금으로 부드럽게 긁고 천천히 흔들어서 포자현탁액을 만든 후 4점의 살균 거즈를 통과시켜 회수하였다. 포자현탁액의 포자수는 hemacytometer(Hausser Scientific Partnership; 1/400 SQ MM, 0.0200 MM DEEP)를 사용하여 1.0×10⁷ conidia/ml가 되게 조정하여 접종원으로 사용하였다(8). 용량 300 ml의 Erlenmeyer flask에 100 ml의 발효액량으로 포자현탁액 1 ml를 접종한 배지는 30±1°C의 항온 배양기에서 정차배양하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

효소의 활성저해능 측정은 35°C 수조에서 온도를 미리 조정한 0.175M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2 ml, 5 mM L-DOPA solution 0.2 ml 및 시료 용액 0.5 ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 units/ml) 0.1 ml를

첨가하여 35°C에서 반응시킨 다음 475 nm에서 단위시간당 변화된 초기흡광도의 변화값(S_{Abs})과 효소액 대신에 증류수 0.1 ml를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료 용액 대신에 증류수 0.5 ml를 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibitory effect (\%)} = \left\{ 1 - \left(\frac{S_{\text{Abs}} - B_{\text{Abs}}}{C_{\text{Abs}}} \right) \right\} \times 100$$

균체량 측정

균체량은 발효배양액을 여과지(Whatman filter paper No. 1)로 거른 다음 여과지 위의 균체를 증류수 100 ml로 3회 세척하여 다시 여과하였다. 여과된 균체를 105°C에서 3시간 건조한 후 desiccator에 넣고 방냉시켜 항량이 될 때까지 반복하여 무게를 달고 이를 건조균체량으로 결정하였다(9).

Aflatoxin 확인

발효액을 원심분리(12,000×g, 20분)하고 상정액 10 ml를 취하여 immunoaffinity column에 통과시켰다. 발효액이 흡착된 column을 2회 반복하여 10 ml의 증류수로 천천히 세척한 다음 methanol(HPLC grade) 1 ml를 천천히 통과시켜 eluate를 회수하고 eluate를 다시 통과시켜 재회수하였다. 여기에 증류수 1 ml와 chloroform 1 ml를 가하고 부드럽게 교반한 다음 용매의 층이 분리되면 바닥부위의 chloroform 층을 회수하여 감압농축 시키고 이를 silica gel TLC plate에서 chloroform : acetone(9 : 1, V/V)을 용매로 하여 전개시켰다(10, 11). 한편, 표준물질로 aflatoxin mix(aflatoxin B₁, B₂, G, G₂=1 µg, 0.3 µg, 1 µg, 0.3 µg/ml)를 이용하여 aflatoxin의 농도가 10~50 ppm이 되게 spotting 하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해제 생산능 확인에 의한 곰팡이 분리 및 선정

전통 발효식품인 된장, 메주 및 누룩으로부터 분리된 32종의 곰팡이 중에서 형태학적 특성이 *Aspergillus* 속으로 구분되는 곰팡이 17종을 1차 선별하였다. 이들 중에서 비교적 tyrosinase 저해제 생산능이 높다고 판단되는 8종의 곰팡이(된장 곰팡이 1종, 누룩 곰팡이 3종, 메주 곰팡이 4종)와 분양받은 *Aspergillus oryzae* KFRI 00857, *Aspergillus oryzae* KFRI 00888을 대조균으로 하여 표고버섯을 이용한 배지(Table 1)에서 30°C, 7일간 배양한 다음 발효액의 tyrosinase 저해능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 메주에서 분리된 곰팡이 ME-1, ME-3, ME-4를 제외하고는 50% 이상의 tyrosinase 저

Table 1. Composition of culture medium to select microorganism which produces tyrosinase inhibitor

Ingredients	Content
NaNO ₃	0.3 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
KCl	0.05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O*	0.05 g
Glucose*	10 g
Homogenized mushroom*	5 g
Distilled Water	100 ml

*Autoclaved separately

Table 2. Tyrosinase inhibitory effect of fermented medium by each selected fungal strains after 7 days of cultivation

Strain	Strain Source	Inhibitory effect (%)*
<i>Aspergillus oryzae</i> KFRI 00857	Rice koji	69
<i>Aspergillus oryzae</i> KFRI 00888	Rice koji	2
NU-7	Nurug	91
NU-9	Nurug	86
DOEN-1	Doenjang	84
ME-2	Meju	82
NU-6	Nurug	70
ME-4	Meju	35
ME-3	Meju	33
ME-1	Meju	27

*Diluted culture broth (10⁻²) were used to analyze inhibitory effect.

해활성을 보였으며, 일반적으로 누룩에서 분리된 곰팡이가 비교적 높은 저해활성을 보이는 바, 특히 NU-7은 91% 수준의 저해활성을 보여 대조균인 *Aspergillus oryzae* KFRI 00857 및 *Aspergillus oryzae* KFRI 00888에 비해서도 월등히 저해활성이 높은 것을 알 수 있었다. 따라서 표고버섯을 기질로 한 tyrosinase 저해제 발효 균주로 누룩에서 분리된 곰팡이 NU-7을 선정하였다.

표고버섯배지에서 glucose 농도에 따른 tyrosinase 저해제 생산

표고버섯 함량이 5%인 발효배지에 탄소원으로 사용한 glucose 농도를 각각 0%, 1%, 3%, 5%, 10%, 20%로 하여 30°C에서 10일간 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Glucose 농도가 3~10% 수준에서는 tyrosinase 저해제 생산량이 큰 차이가 없었으나 3% 미만에서는 상대적으로 균체량(Fig. 2) 생산이 매우 낮았고 glucose 농도 0%에서는 저해제 생산량이 발효 10일째에도 10%

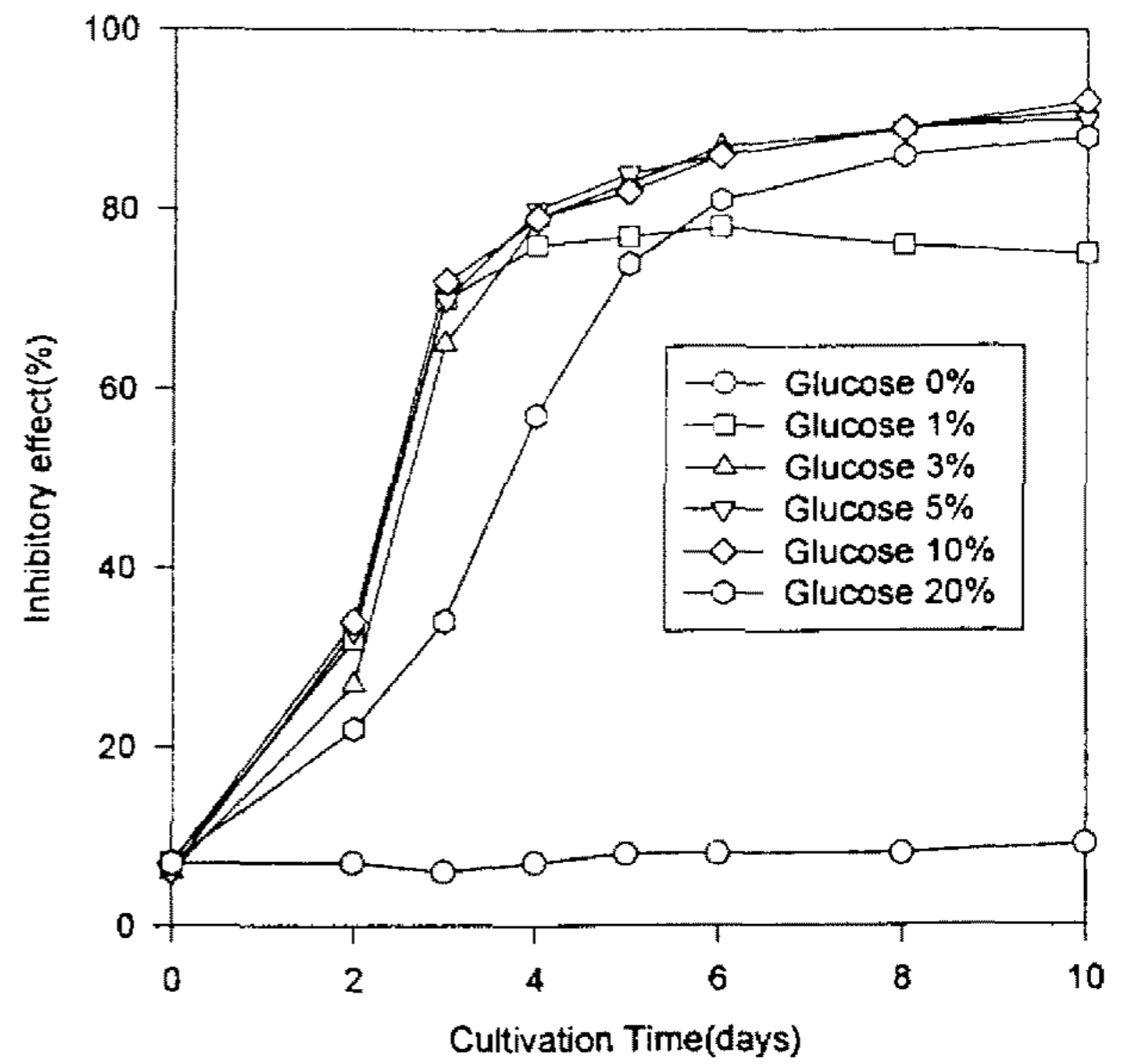


Fig. 1. Effect of glucose content on the production of tyrosinase inhibitor by *Aspergillus* sp. NU-7 in 5% shiitake media.

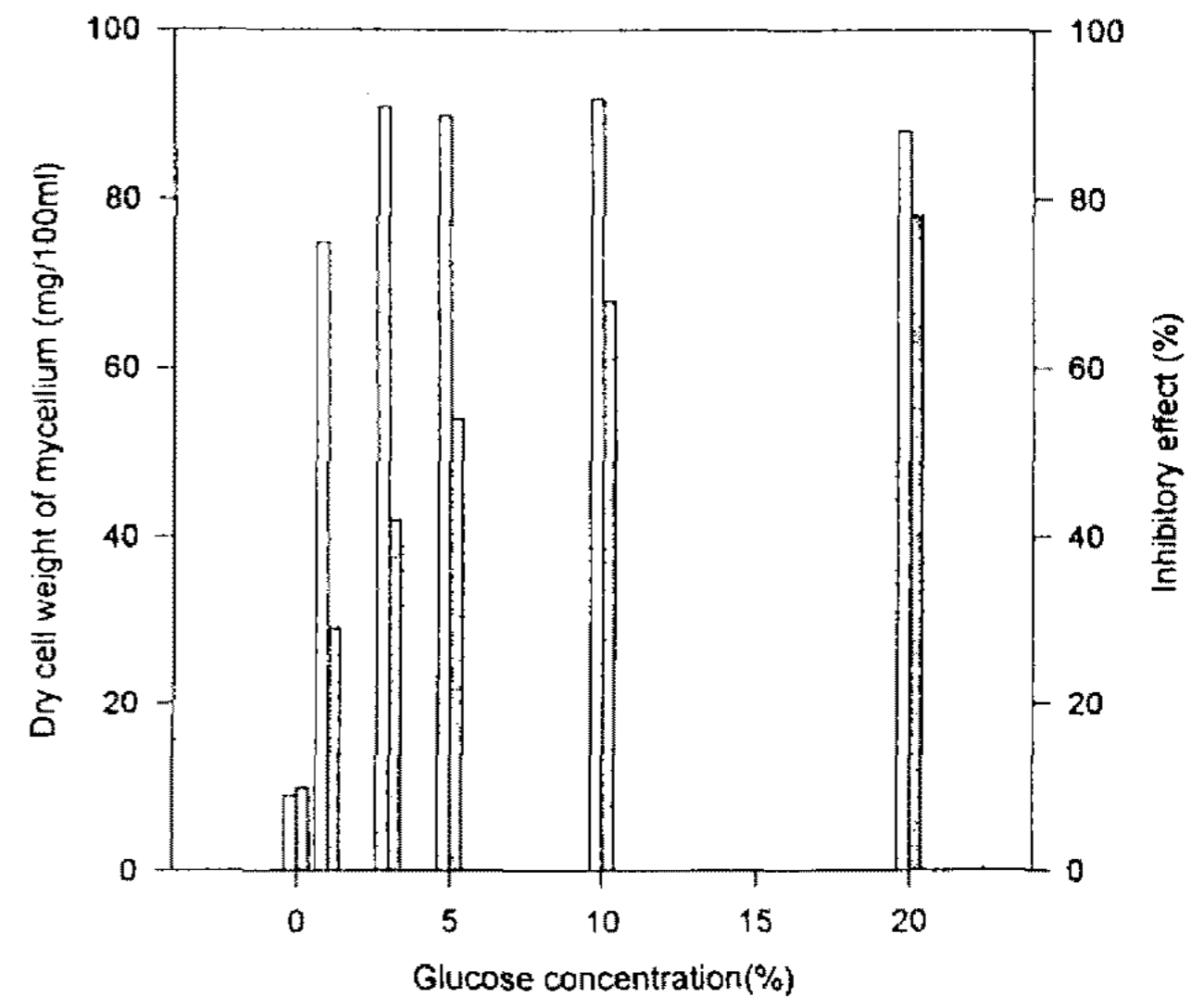


Fig. 2. Effect of glucose content on the production of tyrosinase inhibitor and dry cell weight after 10 days' cultivation of *Aspergillus* sp. NU-7 in 5% shiitake media.

□; Inhibitory effect, ▨; Dry cell weight

이하의 낮은 값을 보였다. 한편, glucose 농도가 20%일 때에는 상당한 양의 균체 증식에도 불구하고 glucose 농도가 3~10%로 낮을 때에 비해 상대적으로 낮은 저해능을 보였으며 발효 중반기인 3~5일에는 저해제 생산이 지연되는 현상을 나타내었다. 따라서 표고버섯 배지를 이용한 tyrosinase 저해제 발효에 있어 탄소원으로 사용한 glucose의 최적농도 수준은 3~10%의 범위일 것으로 판단할 수 있으나, 이 범위에서 glucose의 농도 증가에 따른 저해능 상승을 확인할 수는 없었으며 건조균체량은 증대되는 것으로 보아 사용된 glucose의 많은 부분이 균체 증식에 사용된 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 결국, 곰팡이 NU-7을 이용한 표고버섯배지에서 ty-

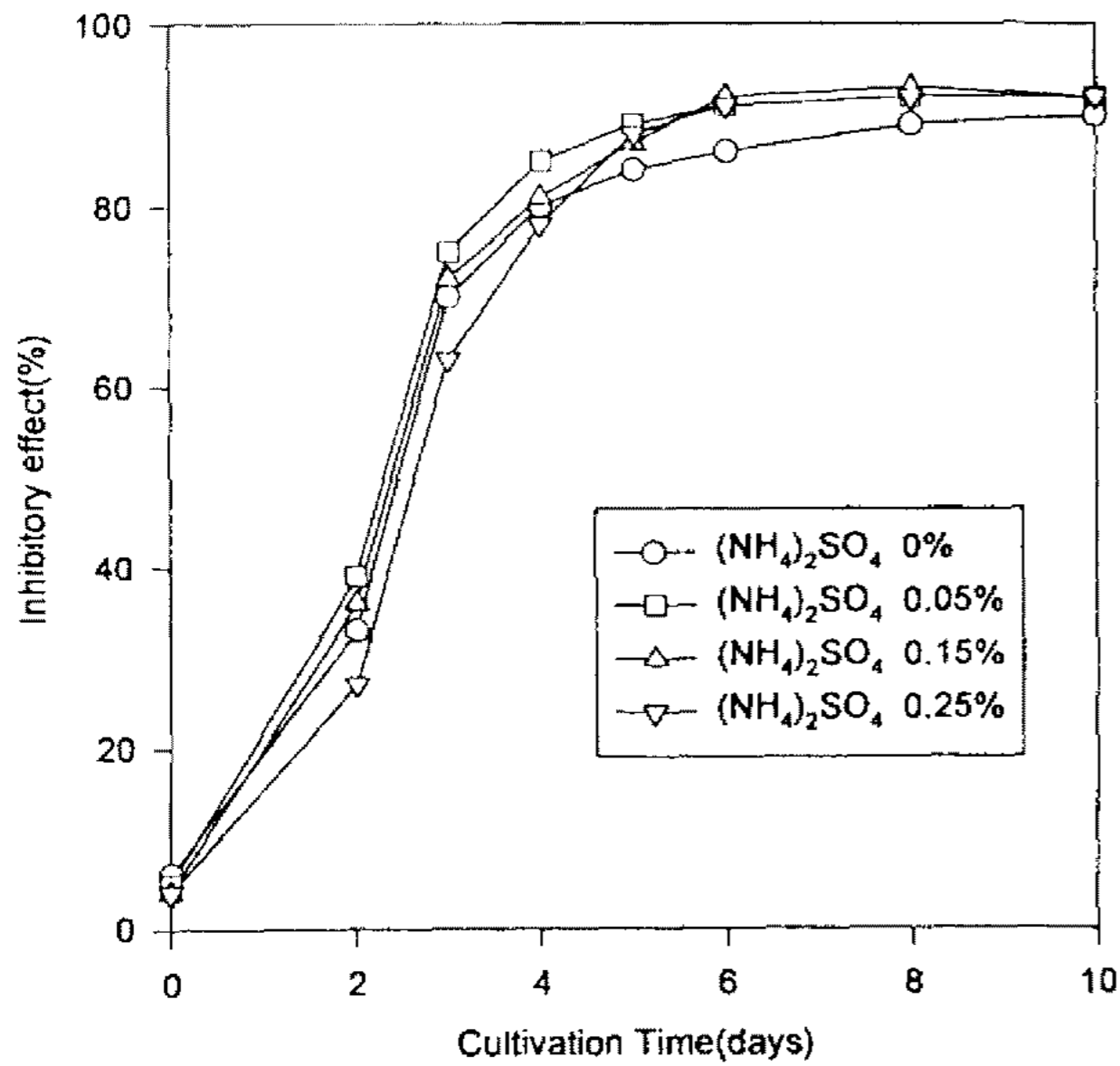


Fig. 3. Effect of ammonium sulfate content on the production of tyrosinase inhibitor by *Aspergillus* sp. NU-7 in 5% shiitake media.

rosinase 저해제 발효에 필요한 탄소원 glucose의 최소량은 3% 전후일 것으로 판단되었다.

표고버섯배지에서 ammonium sulfate 농도에 따른 tyrosinase 저해제 생산

일반적으로 곰팡이 균체량의 약 10%는 질소화합물로 구성되어 있으며, 미생물의 단백질 함량은 탄소원 제한성장(carbon-limited growth)에 비해 질소원 제한성장(nitrogen-limited growth)에 의해 더 민감하게 감소되는 것으로 보고되고 있다(12). 그래서 표고버섯 함량 5% 및 glucose 농도 5%가 함유된 발효배지에 질소원으로 ammonium sulfate를 각각 0%, 0.05%, 0.15%, 0.25%씩 첨가하여 무기질소원 농도에 따른 저해제 발효에 대한 영향을 알아 보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 ammonium sulfate 농도에 따른 저해제 생산량은 큰 차이를 확인할 수가 없었으며, 단지 질소원 첨가량이 0% 및 0.25%의 경우는 0.05% 및 0.15%에 비해 발효초기의 저해제 생산량이 상대적으로 약간 낮은 값을 보였다. 한편, 실험에서 사용한 질소량 첨가 범위는 탄소원의 농도범위에 비해 매우 낮은 농도범위임에도 불구하고 균체량의 차이를 뚜렷하게 볼 수 있어(Fig. 4) 균체 증식에 미치는 질소원의 영향이 지대함을 알 수 있었다. 그러나 tyrosinase 저해제 생산 측면에서만 본다면 표고버섯배지에 추가적인 질소원의 첨가는 배제해도 무방하나 첨가할 경우 그 최소 소요량이 0.05% 이하일 것으로 추정되었다.

표고버섯농도에 따른 tyrosinase 저해제 생산
Glucose 농도를 5%로 하고 표고버섯함량을 각각 0%,

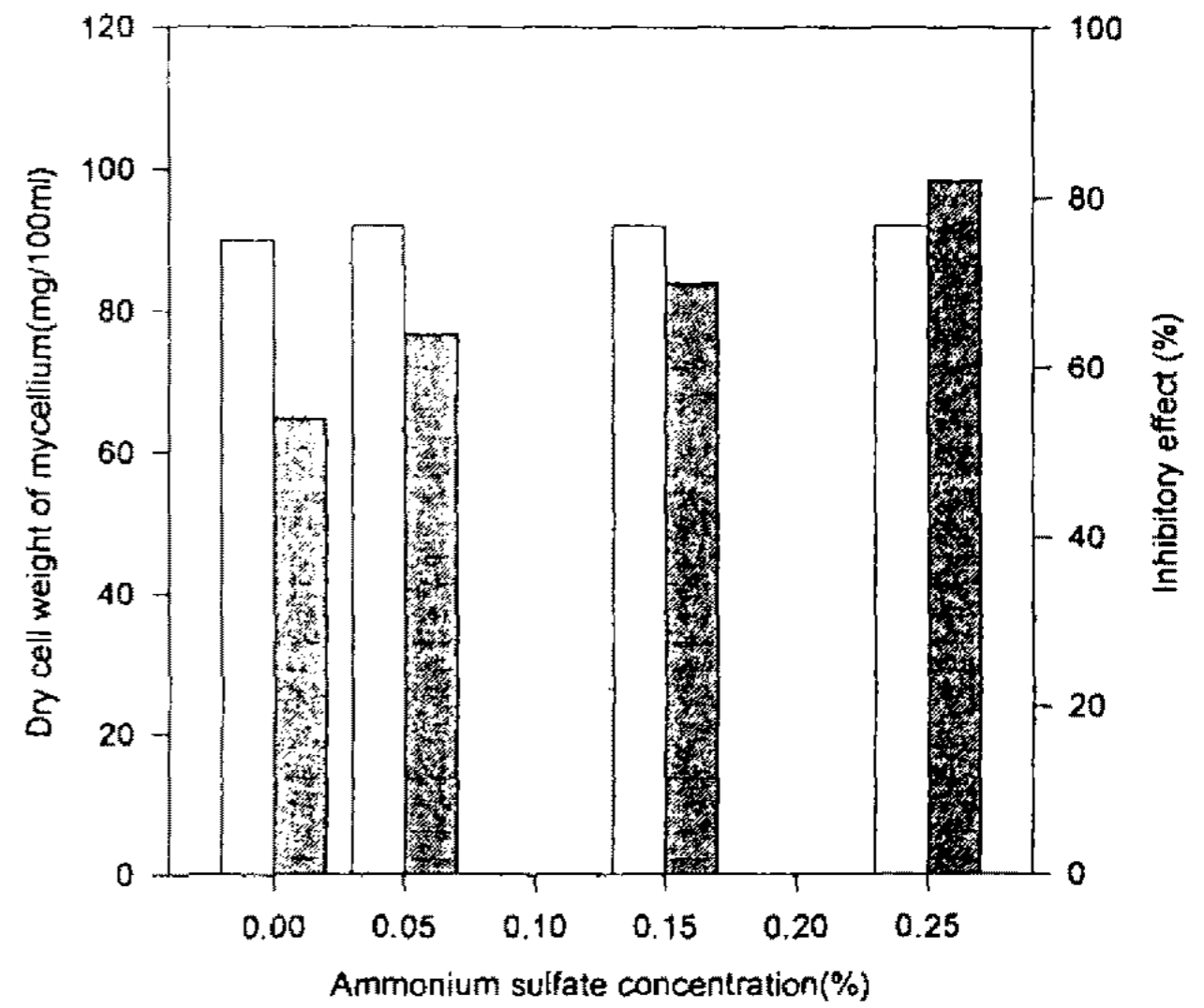


Fig. 4. Effect of ammonium sulfate content on the production of tyrosinase inhibitor and dry cell weight after 10 days' cultivation of *Aspergillus* sp. NU-7 in 5% shiitake media. □; Inhibitory effect, ▨; Dry cell weight

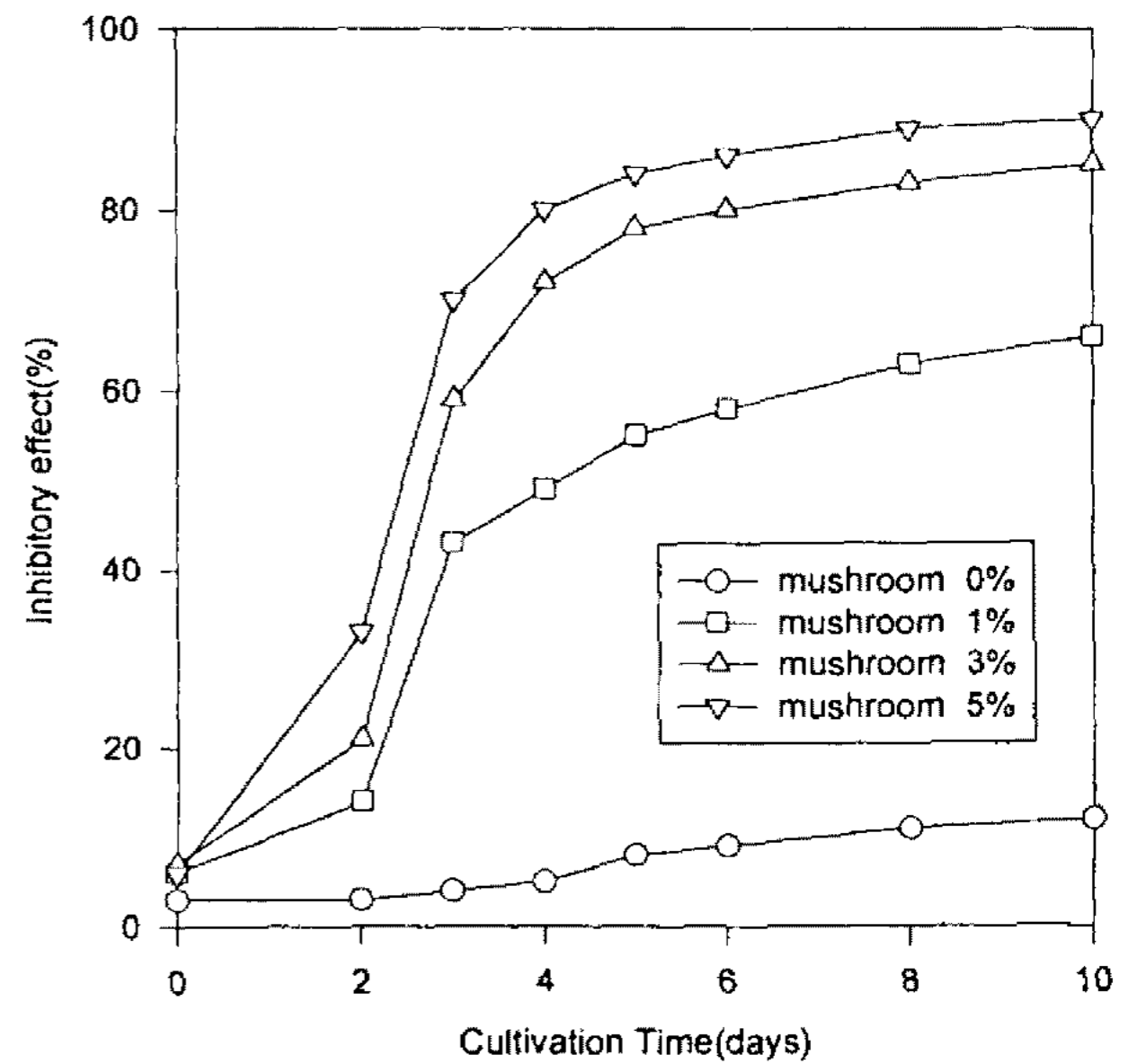


Fig. 5. Effect of mushroom content on the production of tyrosinase inhibitor by *Aspergillus* sp. NU-7.

1%, 3%, 5%로 하여 30°C에서 10일간 발효시킨 결과를 Fig. 5, 6, 7에 나타내었다. 버섯함량의 증가에 따른 저해제 생산량 및 균체량 증가 현상이 뚜렷하게 나타나 Gauss-Newton 방식에 의한 비선형 회귀분석(nonlinear regression analysis)으로 버섯농도, 저해제 생산량 및 건조균체량의 상관식을 구하였다. 버섯농도(X)에 따른 저해제 생산량(Y)은 $Y = -0.96X^2 + 13.07X + 14.43$ 의 상관식을 보였고 R value는 0.96으로 높은 상관관계를 나타내었으며, 버섯농도(X)에 따른 건조균체량(Y1)은 $Y1 = -5.50X^2 + 41.35X + 18.31$ 의 상관식을 보였고 R value는 0.94로 역시 높은 상관관계를 나타내었다(Fig.

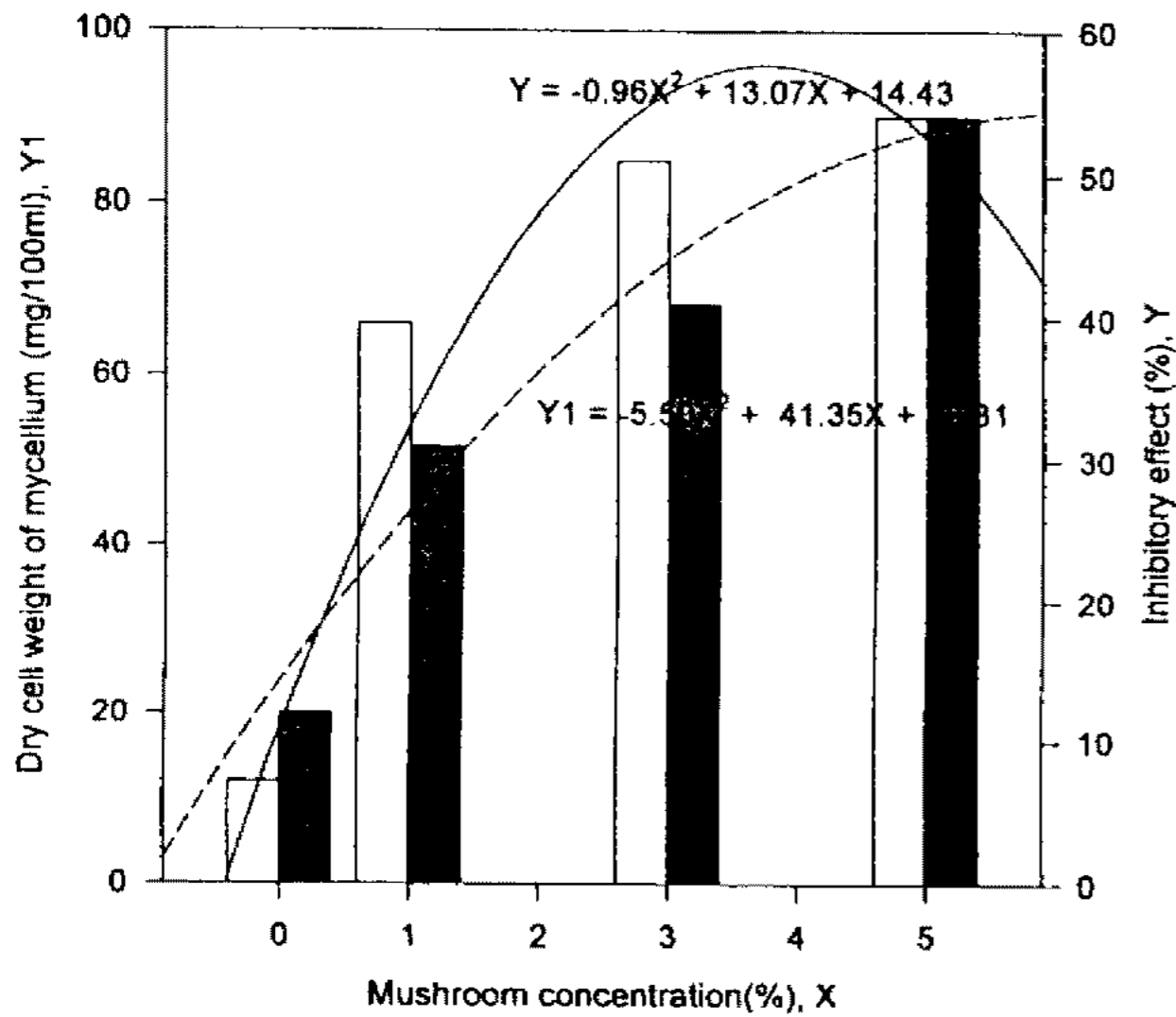


Fig. 6. Effect of mushroom content on the production of tyrosinase inhibitor and dry cell weight after 10 days' cultivation of *Aspergillus* sp. NU-7.

□; Inhibitory effect, —; Regression with inhibitory effect, ▨; Dry cell weight, ---; Regression with dry cell weight

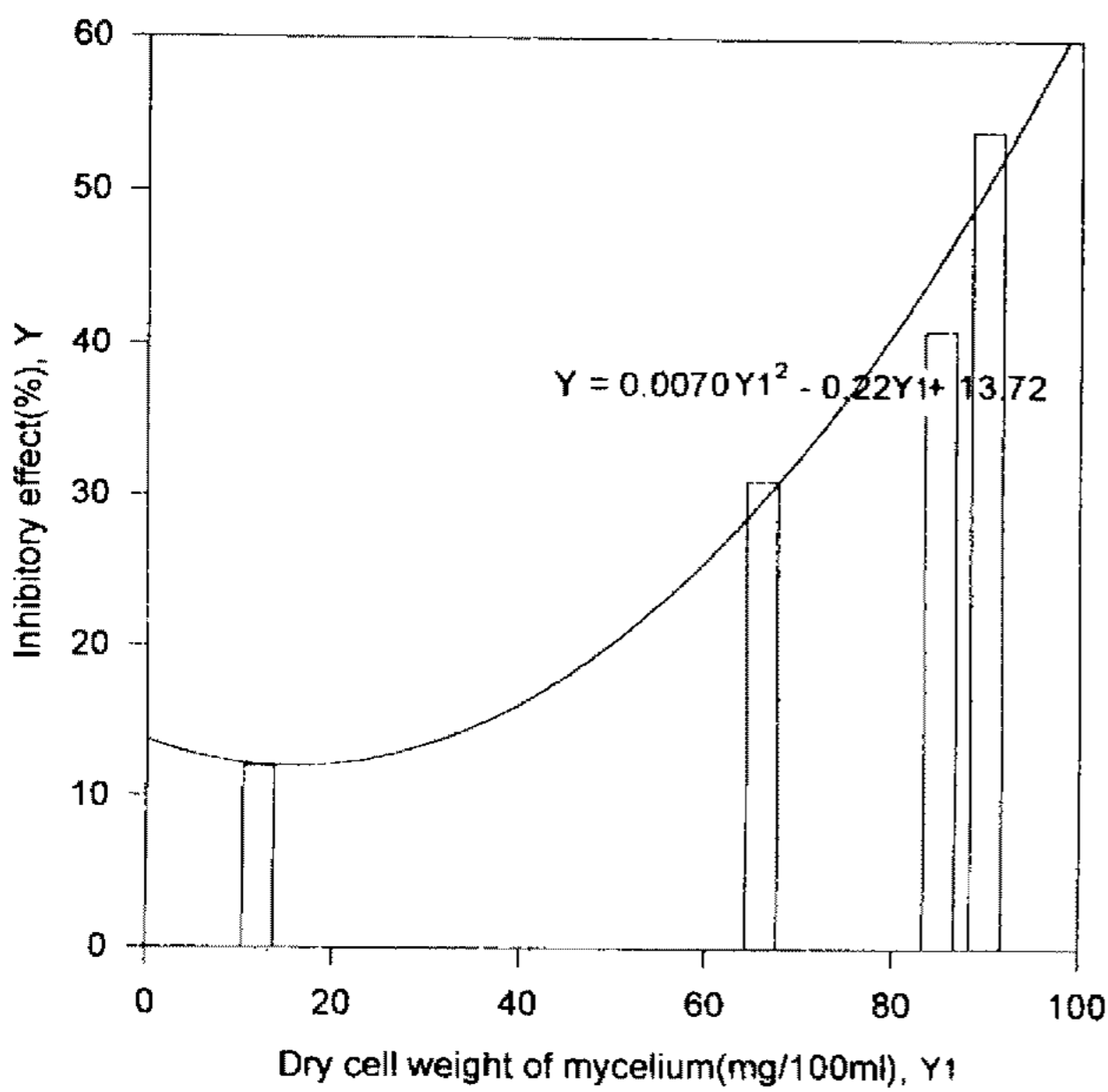


Fig. 7. Inhibitory effect of culture broth according to dry cell weight of mycelium after 10 days' cultivation of *Aspergillus* sp. NU-7.

6). 한편, 건조균체량(Y1)에 따른 저해제 생산량(Y)은 $Y=0.0070Y1^2-0.22Y1+13.72$ 의 상관식을 보였고 R value는 0.96으로 나타났다(Fig. 7). 결국, 곰팡이 NU-7을 이용한 tyrosinase 저해제 발효에 있어서 표고버섯은 복합적 기능의 기질특성을 가진 것으로 추정되어 표고버섯을 주배지원으로 사용할 경우 탄소원만을 추가적으로 첨가함에 따라 저해제 발효에 필요한 최소한의 조건을 충족시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

표고버섯배지와 Czapek-Dox 배지 비교

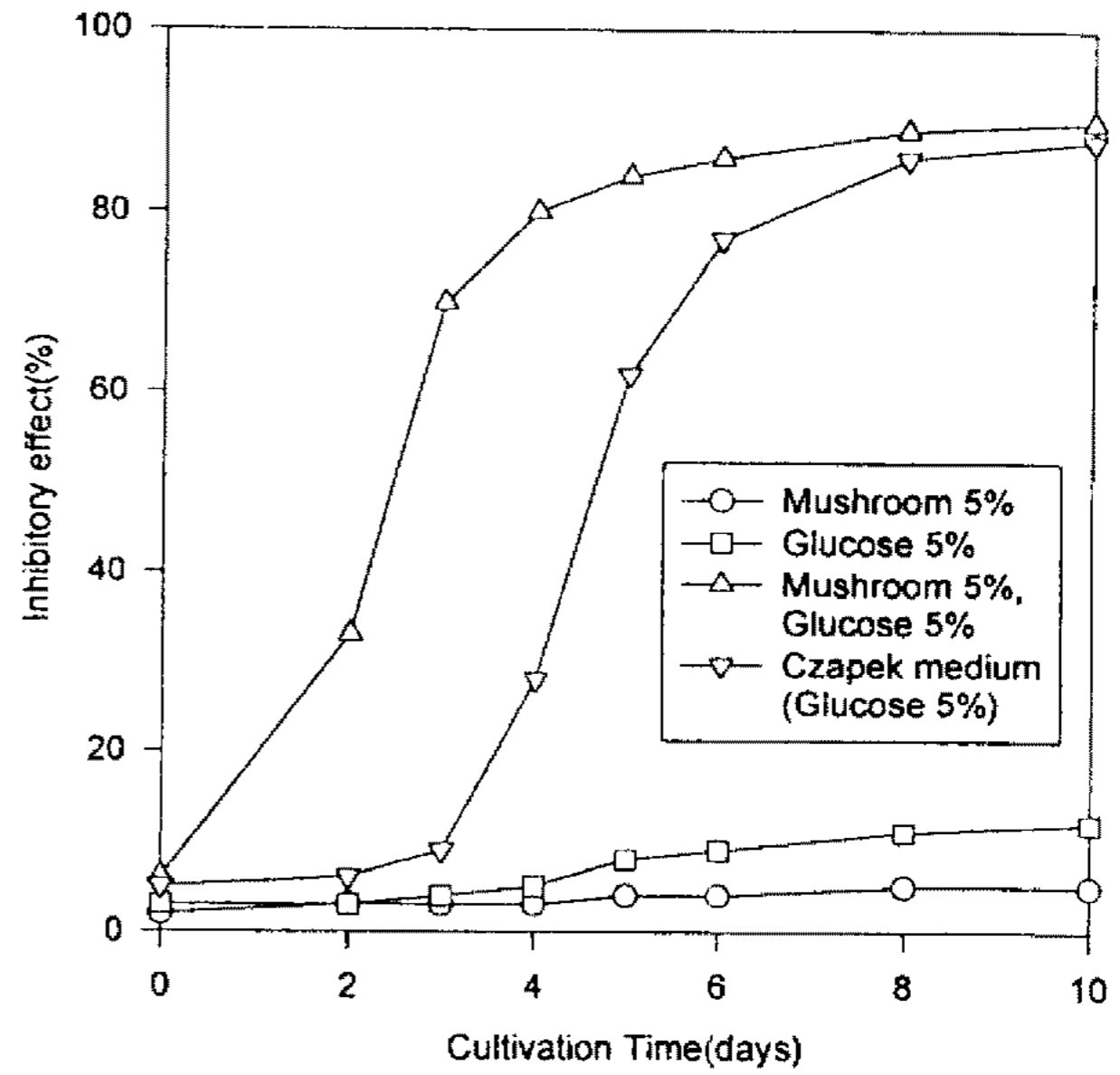


Fig. 8. Time-related changes in the production of tyrosinase inhibitor during 10 days' cultivation of *Aspergillus* sp. NU-7 in various culture media.

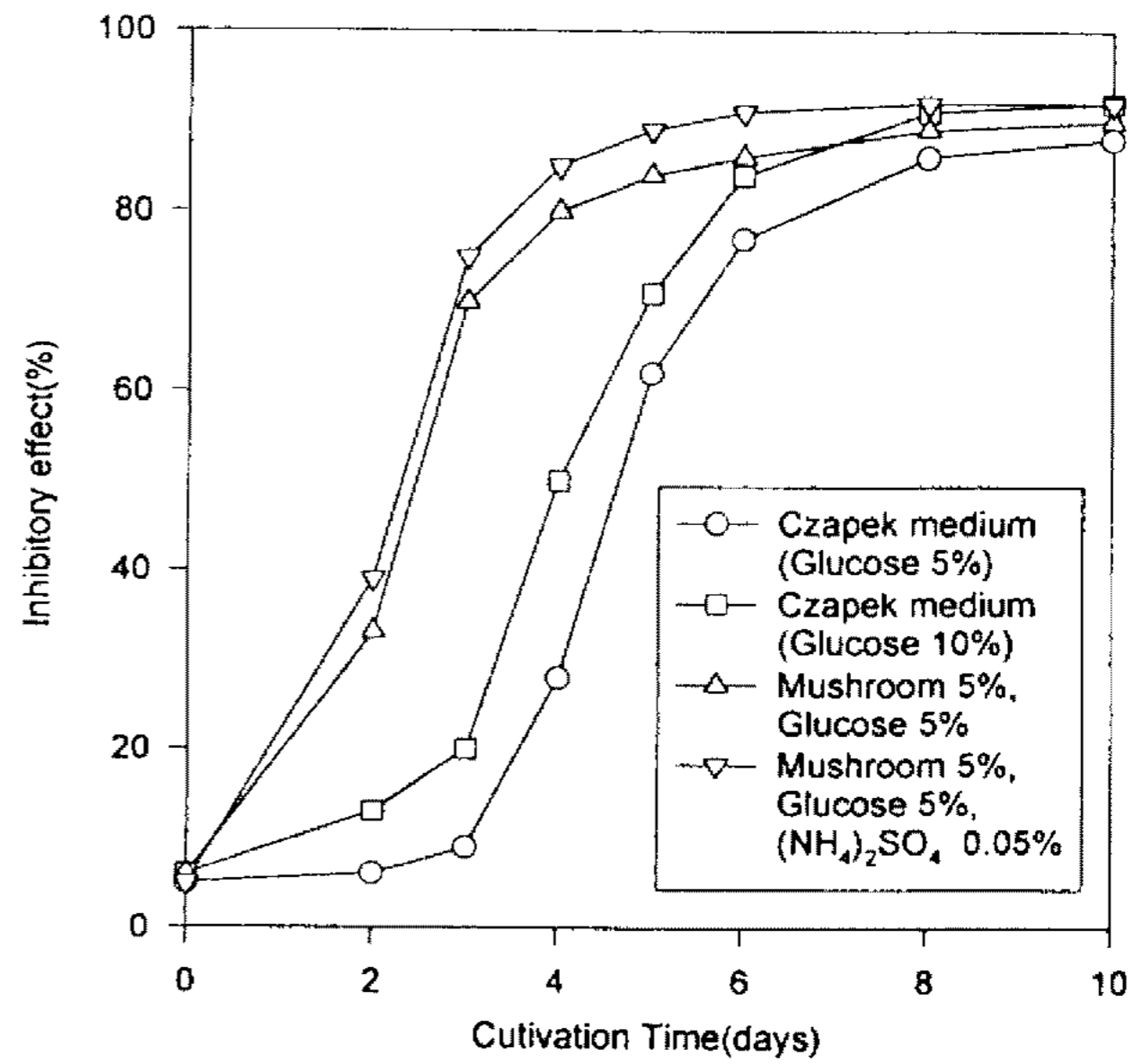


Fig. 9. Comparison shiitake media with Czapek media on the production of tyrosinase inhibitor during 10 days' cultivation of *Aspergillus* sp. NU-7.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 곰팡이 NU-7을 발효균으로 이용할 경우 발효배지 구성에 따라 tyrosinase 저해제 생산 양상이 상이함을 알 수 있는 바, 여러가지 배지를 조성하여 10일간 저해제 발효를 진행하면서 발효배지 종류에 따른 발효액의 저해능을 비교하였다(Fig. 8, 9). 표고버섯 혹은 glucose 만을 단독으로 발효배지로 사용했을 경우 발효기간 내내 큰 변화가 없이 저해제 생산이 미미하였으나 표고버섯에 glucose를 첨가한 표고버섯배지에서는 발효 2~4일째에 저해제 발효생산이 급격하게 증가되는 양상을 볼 수 있었으며(Fig. 8), 또한 기존의 Czapek-Dox 배지에 비해서 저해

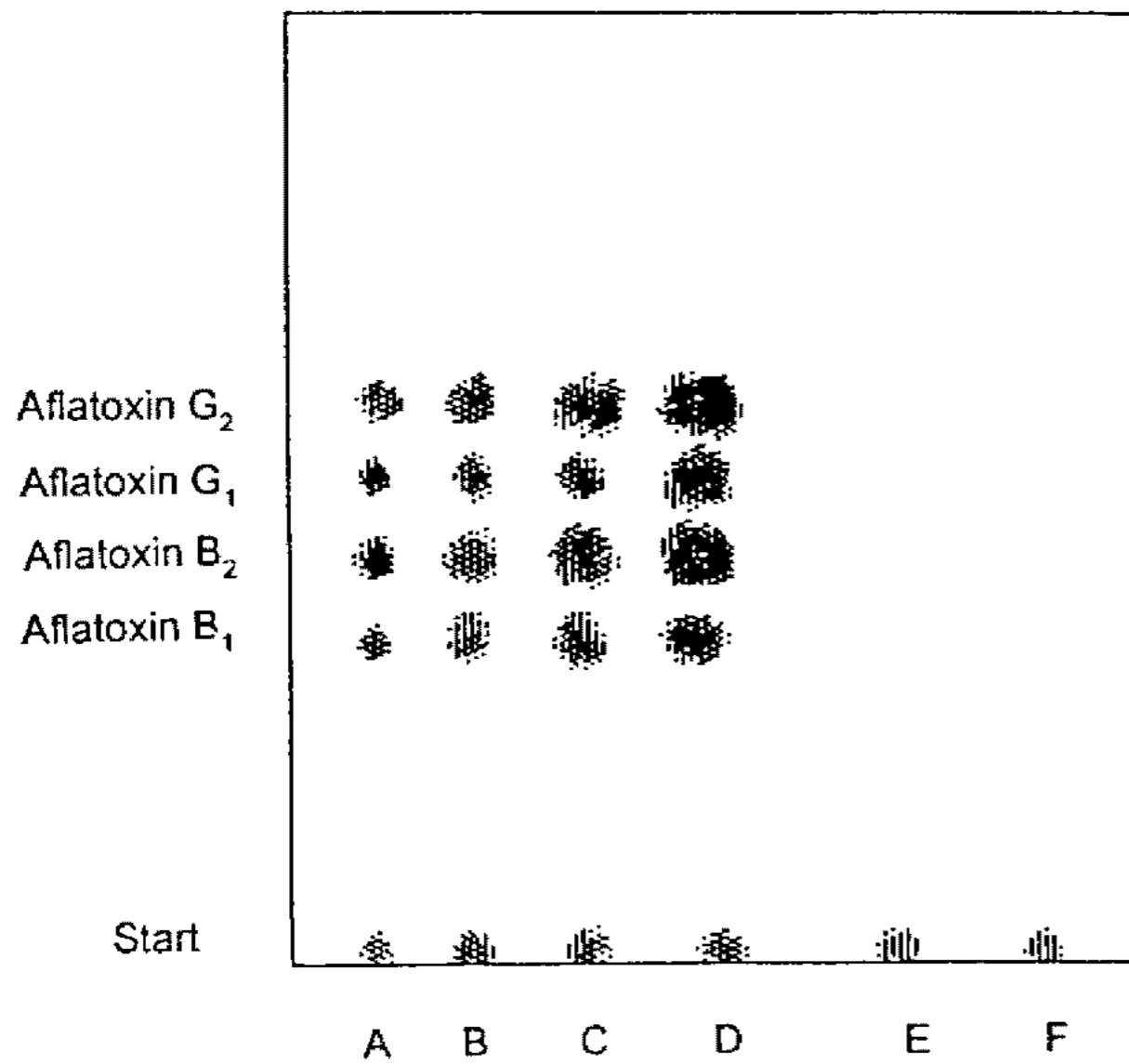


Fig. 10. Thin-layer chromatogram of culture broth and standard aflatoxin mix.

Solvent system; chloroform:acetone (9:1, v/v)

Abbreviation; A, aflatoxin mix 20 ppm; B, aflatoxin mix 20 ppm; C, aflatoxin mix 35 ppm; D, aflatoxin mix 50 ppm; E, F, culture broth

제의 최대 생산에 소요되는 배양기간이 2~3일 단축되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 9). 이로 보아 미백식품 개발과 관련된 melanin 합성 저해제 생산을 목적으로 하는 곰팡이균을 이용한 발효생산에서는 기존의 곰팡이 배지로 많이 사용되고 있는 Czapek-Dox 배지를 표고버섯배지로 대체할 수 있을 것으로 판단되며, 또한 버섯배지를 사용함으로써 저해제 생산을 위한 발효기간을 2~3일간 단축시킬 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 천연물인 버섯을 이용한 미백식품을 제조할 경우에는 합성배지(synthetic media) 사용에 대한 소비자의 불신을 극복할 수 있으며, 버섯 자체가 가지는 다양한 기능성을 강점으로 할 수 있고, 제조공정의 단축을 기할 수 있어 버섯배지를 이용한 미백식품의 개발이 기대된다고 하겠다.

표고버섯 발효액에 대한 곰팡이 독소(aflatoxin) 확인

식품의 독성 물질 중에서 대표적인 곰팡이 독소로 알려진 아플라톡신은 암유발 등 매우 높은 위험성을 가진 독성물질로 밝혀져 있다. 본 연구가 널리 상용되는 식품에서 분리한 곰팡이를 이용했다는 유리한 특성을 가지고는 있으나 보다 확고한 안전성 확보를 위해서는 최종 발효액에 대한 아플라톡신 확인이 필요할 것으로 판단되었다. 만약 버섯발효를 통한 미백식품이 실용화된다면 현행 국내 식품공전상의 '식물추출물 발효식품'에 속할 것으로 예상되며, 이에 따르면 아플라톡신의 허용기준이 설정되어 있지 않고 다만 "발효에 사용되는

미생물은 안전성이 인정된 것이어야 한다."라고 규정하고 있다(13). 따라서 국내 위생법에서 그 기준치가 설정되어 있는 곡류, 두류, 견과류 등을 참고로 하면 아플라톡신 잠정허용 기준이 10 ppm(10 µg/kg) 이하로 되어 있으며(14), 국제보건기구인 FAO에서는 15 ppm(15 µg/kg) 이하로 규정(15)하고 있고, 국제규격인 CODEX의 곡류및 콩류 분과위원회(CCCPL; Codex Committee on Cereals, Pulses and Legumes)에서는 '95년 현재 FAO 규정을 따를 것으로 예상되고 있다. 이들 규격 기준을 참고로 하여 표준 아플라톡신 농도를 10~50 ppm으로 한 대조구에 대한 최종발효액의 아플라톡신을 확인한 결과 Fig. 10에서 보는 바와 같이 대조구로 사용한 표준물질 aflatoxin mix는 Rf 값이 상이한 4개의 spot(aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂)으로 분리되어 나타났으나 발효액에서는 아플라톡신이 검출되지 않았다.

요 약

Tyrosinase는 식품의 효소적 갈변과 생체내에서 melanin 합성을 촉매하는 효소이다. 식용 가능한 tyrosinase 저해제의 발효생산을 통하여 melanin 합성을 저해하는 효과를 가지는 미백식품 소재를 개발하고자 현재 식품의 제조에 이용되고 있는 안전한 미생물을 대상으로 tyrosinase 저해능이 높은 균주를 선발하고 표고버섯을 주 배지원으로 발효시켜 저해제 생산의 적정 조건에 대하여 연구하였다. 발효식품으로부터 분리된 NU-7을 tyrosinase 저해제 생산을 위한 발효균으로 선정하여 tyrosinase 저해제 생산 최적배지 조건을 확인한 결과 glucose가 3~20% 및 ammonium sulfate가 0~0.25%인 범위에서 균체량 증가에 따른 tyrosinase 저해제 생산능의 차이는 나타나지 않았으며, 무기질소 원으로 첨가한 ammonium sulfate의 영향은 비교적 낮았다. 한편, 표고버섯(*Lentinus edodes*, Shiitake) 함량은 저해제 생산과 밀접한 관계를 나타내어 버섯함량(X)에 대한 저해제 생산량(Y)이 $Y = -0.96X^2 + 13.07X + 14.43$ 의 상관식을 보였고, R value는 0.96으로 나타나 최적발효 조건을 위한 최소한의 배지는 표고버섯과 glucose 만으로도 가능한 것으로 판단되었다. 표고버섯을 이용한 발효액에서 곰팡이 독소로 알려진 아플라톡신은 검출되지 않았으며 따라서 이를 식용할 수 있는 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업의 지원으로 이루어진 연구결과물의 일부이며, 이에 사의를 표합니다.

참고문헌

1. Lerner, A.B. and T.B. Fitzpatrick. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 91-126.
2. Pawelek, J.M. and A.M. Korner. 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* **70**: 136-145.
3. Prota, G. and R.H. Thompson. 1976. Melanin pigmentation in mammals. *Endeavor.* **35**: 32-38.
4. Ishihara, Y., M. Oka, M. Tsunakawa, K. Tomota, M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaki, M. Konish, and T. Oki. 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiot.* **44**: 25-32.
5. Takamatsu, S., M.C. Rho, M. Hayashi, K. Komiyama, H. Tanaka, and S. Omura. 1993. New inhibitors of melanogenesis, OH-3984 K1 and K2, II, physico-chemical properties and structural elucidation. *J. Antibiot.* **46**: 1526-1529.
6. Akiu, S., Y. Suzuki, T. Asahara, Y. Fujinuma, and M. Fukuda. 1991. Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis. *Jpn. J. Dermatol.* **101**: 609-613.
7. Chen, J.S., C. Wei, and M.R. Marshall. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1897-1901.
8. Park, K.Y. and L.B. Bullerman. 1983. Effect of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J. Food Protection.* **46**: 178-184.
9. Jackson, M.A., P.J. Slininger, and R.J. Bothast. 1989. Effect zinc, iron, cobalt, and manganese on *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 growth and *Fusarium C* biosynthesis in submerged culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 649-655.
10. 보건사회부. 1994. 식품공전, Pp. 803-805.
11. Wei, C.I., T.S. Huang, J.S. Chen, M.R. Marshall, and K.T. Chung. 1991. Production of kojic acid by *Aspergillus candidus* in three culture media. *J. Food Protection.* **54**: 546-548.
12. Pirt, S.J. 1975. *Principles of microbe and cell cultivation*, Pp. 119-121. Halsted Press, John Wiley & Sons, New York.
13. 보건사회부. 1994. 식품공전, Pp. 439-441.
14. 보건사회부. 1994. 식품공전, Pp. 71.
15. Food and Agricultural Organization of the United Nations. 1995. *Codex Alimentarius Commission*, Report of the Ninth Session of the Codex Committee on Cereals, Pulses and Legumes, ALINORM 95/29.

(Received 18 November 1995)