

## 해양균류의 Tyrosinase 저해활성 검색

XiFeng Li · Yong Li · 정지현<sup>1</sup> · 이강태<sup>1</sup> · 최흥대<sup>2</sup> · 손병화\*

부경대학교 화학과, <sup>1</sup>코리아나 화장품, <sup>2</sup>동의대학교 화학과

## Screening of Tyrosinase Inhibiting Activity from the Marine-Derived Fungus

XiFeng Li, Yong Li, Jee Hean Jeong<sup>1</sup>, Kang Tae Lee<sup>1</sup>, Hong Dae Choi<sup>2</sup>, and Byeng Wha Son\*

Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>1</sup>R&D Center, Coreana Cosmetics Co. Ltd., Chungnam 330-830, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

**Abstract** – In order to screen new tyrosinase inhibiting principle which is expected to be a new biofunctional skin whitening cosmetics, we have isolated 600 strains of the marine-derived fungi and investigated tyrosinase inhibiting activity for their acetone extracts. The significant activities (> 70% Inhibition) were observed in the extract of 10 strains of fungi (MFA7, MFA27, MFA58, MFA317, MFA318, MFA345, MFA412, MFA552, MFA562, MFA581). These active strains were cultured in SWS medium with 1 L scale and the resulting broth and mycelium were extracted to afford mycelium extract (000M) and broth extract (000B), respectively. Tyrosinase inhibiting activity for all extracts has been tested. As the results, the broth extracts of 4 strains (27B, 58B, 552B and 581B) exhibited relatively high levels of activity of IC<sub>50</sub> values of 3.0–19.0 µg/mL. The active component of 581B was purified by assay-guided isolation to yield the known kojic acid (**1**), and its structure was determined by physicochemical evidence. Kojic acid (**1**) showed the significant tyrosinase inhibitory activity with IC<sub>50</sub> values of 12.0 µM.

**Key words** – Marine-derived fungus, tyrosinase inhibiting activity, kojic acid, skin whitening, biofunctional cosmetics

바다는 지구상에 남아있는 마지막 자원의 보고로서 많은 종류의 생물이 서식하고 있으며, 50만종 이상의 풍부한 종류의 해양생물은 해수중이라는 폐쇄계의 특이한 환경(예: 높은 염류농도, 수압 그리고 체표면이 해수면에 노출되어 있어 병원미생물의 침입을 받기 쉬운 점 등)에 적응하면서 살아가기 위해서는 그 진화과정에 있어서 육상생물과는 극히 다른 대사계 혹은 생체방어계를 발전시켜왔다고 생각된다.

따라서, 해양생물이 대사·생산하는 물질에는 육상생물 유래의 천연물질과는 다른 신기하면서도 다채로운 화학구조와 다양한 생물활성 발현이 기대되며, 지금까지 1만종에 이르는 새로운 물질이 발견되었다.<sup>1)</sup>

이들 화합물 중에는 화장품 및 personal care 산업에 큰 관심을 불러일으키는 화합물도 보고되고 있다.<sup>2,3)</sup> 해조류 추출물은 오래 전부터 화장품산업에 이용되어 왔지만, 최근에는 해양생물로부터 매우 효능이 뛰어난 추출물을 피부미용에 이용하고자 하는 연구가 수행되어, 부채꼴 산호에서 pseudopterosin류가 분리되어 피부의 염증을 현저히 억제할

뿐만 아니라,<sup>4)</sup> leukocyte degranulation 과정을 억제하여 피부 손상을 치료하는 기능성 화장품으로 제품화되었다.<sup>5)</sup>

해양생물로부터 기능성 미백 화장품소재를 개발하기 위한 화학적 연구의 일환으로서,<sup>6)</sup> 600 균주의 균류를 해양숙주재료로부터 분리하고, 배양한 후 얻은 추출액을 대상으로 tyrosinase 억제활성을 검색하였으며, tyrosinase 억제활성을 지표로 유효성분의 분리정제를 행하여 강한 tyrosinase 억제활성을 나타내는 kojic acid (**1**)<sup>7)</sup>를 분리하였다.

### 재료 및 방법

**해양균류의 분리** – 2001년 울산시 골매마을, 2002년 부산 청사포 및 제주도 해안에서 해조, 해초, 유목, 폐각 및 해사를 채집하여 멸균한 봉지에 담아 실험실로 운반한 후 -20°C에서 보관하면서 균류의 분리에 이용하였다. Petri dish에 여지를 깔고, 여기에 채집한 숙주재료를 넣고, 멸균해수를 가하여 27–29°C에서 15-30일간 배양한 후 실체현미경 하에서 자낭과로부터 자낭포자를 멸균 침으로 분리하였다.

1차 배양(10 mL scale), 추출 및 표준시료 – 분리한 균

\*교신저자(E-mail) : sonbw@pknu.ac.kr  
(FAX) : 051-628-8147

주를 각각 YPM배지 (10 mL) (0.2% yeast extract, 0.2% peptone, 0.4% mannitol, 100% seawater)에서 27–29°C, 15 일간 배양한 후, 배양액에 같은 양의 아세톤(10 mL)을 가하여 추출하고, 탈지면 여과하여 얻은 아세톤 추출물 (MFA 000ac)을 표준시료로 이용하여 효능검색을 시행하였다.

**Tyrosinase 저해활성** – 아세톤추출물 (MFA000ac) (40  $\mu$ L)을 96-well microtiter tray에 취한 다음, 여기에 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) (80  $\mu$ L) 및 0.05 M tyrosine (40  $\mu$ L)을 각각 가하고 분광광도계 (microplate reader)를 이용하여 475 nm에서 색소보정용 흡광도 ( $CC_{abs}$ )를 측정 후, 여기에 tyrosinase (250 unit/mL) (40  $\mu$ L)을 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도 ( $T_{abs}$ )를 측정하였다. 그리고, tyrosinase 대신에 buffer (40  $\mu$ L)를 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 Blank 값 ( $B_{abs}$ ), 시료용액 대신에 buffer (40  $\mu$ L)를 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 Control 값 ( $C_{abs}$ )으로부터 다음의 식에 의해 저해활성을 계산하였다.

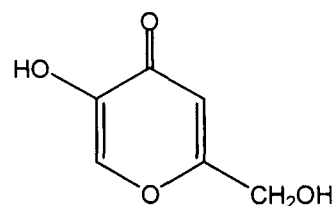
$$\text{Inhibitory effect (\%)} = [1 - \{(T_{abs} - CC_{abs} - B_{abs}) / C_{abs}\}] \times 100$$

**2차 배양, 수확 및 추출** – 아세톤추출물 (MFA000ac)에서 유의성 있는 tyrosinase 억제활성이 관찰된 10 균주 (MFA 7, 27, 58, 317, 318, 345, 412, 552, 562, 581) (> 70% Inhibition)를 YPG+F 배지 (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 1.0% glucose, 0.2% fish meal, 100% seawater)에서 27°C, 30일간 1 L 규모로 배양한 후, 배양된 균사체를 가아제 여과하여 균사체 (mycelium)와 배양액 (broth)으로 분리하였다.

균사체는 동결건조 후  $CH_2Cl_2$ -MeOH (1:1)로 추출하고, 배양액은 EtOAc 로 추출하여, 균사체 엑스 (000M) 및 배양액 엑스 (000B)를 각각 얻었다.

**Tyrosinase 억제활성 성분의 분리정제** – 배양액 엑스 (581B, 300 mg)를 silica gel column에 주입한 다음,  $CH_2Cl_2$ -MeOH (100%  $\rightarrow$  0%) 용매를 순차적으로 용출시켜 581B1-581B3의 3개 분획을 얻었다. 이 분획을 대상으로 tyrosinase 억제활성을 조사한 결과, 581B3에서 강한 억제활성이 관찰되어, 581B3 분획 (130 mg)을 소량의 MeOH (1.0 mL)에 용해시킨 용액에 대량의  $CH_2Cl_2$  (40 mL)를 가하고 12시간 방치한 후에 석출된 침전물을 여별하여 침전물 (581B3P) (25 mg)과 상등액 (581B3S) (95 mg)으로 분리하고 tyrosinase 억제활성을 위의 방법과 같이 검색한 결과, 침전물 581B3P에서 강한 억제활성이 관찰되었다.

581B3P (kojic acid) (1) : colorless needles ( $CH_2Cl_2$ -MeOH); mp 154–155°C; IR (KBr)  $\nu_{max}$  3436, 3271,



kojic acid (1)

3179, 1660, 1630, 1611, 1582, 1228, 1143, 1074, 943, 864  $cm^{-1}$ ; UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 218 (4.23), 269 (4.01) nm;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.33 (1H, s, H-3), 9.06 (1H, s, 5-OH), 8.02 (1H, s, H-6), 4.28 (2H, s, H<sub>2</sub>-7), 5.67 (1H, s, 7-OH);  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.0 (s, C-2), 109.8 (d, C-3), 173.9 (s, C-4), 145.7 (s, C-5), 139.2 (d, C-6), 59.4 (t, C-7); LREIMS  $m/z$  142  $[M]^+$  (100), 113 (56), 69 (54), 57 (47), 39 (50).

## 결과 및 고찰

해수중이나 해안의 목재, 해조, 해초 및 망그로브 등의 다양한 재료를 기질로 하여, 공생, 기생, 혹은 부생적으로 서식하고 있는 균류를 해양균류라 칭하며, 지금까지 약 600종의 해양균류가 알려져 있다.<sup>8)</sup>

부산의 청사포, 울산의 골매 마을 및 제주도 해안에서 채집한 숙주재료로부터 600 균주의 미 동정 해양균류를 분리하였다. 이들 해양균류를 YPM 배지 (10 mL)에 접종하여 29°C에서 14 일간 배양 한 후, 같은 양의 acetone (10 mL)으로 추출하여 각 균류의 acetone 추출액을 얻었다. 이들 추출액을 시료로 하여 tyrosinase 억제활성을 검색한 결과, 10 종류 (MFA7, MFA27, MFA58, MFA317, MFA318, MFA345, MFA412, MFA552, MFA562, MFA581)의 균류에서 tyrosinase 활성을 70% 이상 억제하는 유의성 있는 활성이 관찰되었다 (Table I).

이들 10균주를 2차 배양 (1 L)하여 얻은 균사체 엑스 (000M) 및 배양액 엑스 (000B)를 대상으로 tyrosinase 억제활성을 조사한 결과, 균사체 엑스 (000M)에서는 유의성 있는 tyrosinase 억제활성이 관찰되지 않았으나, 27B, 58B, 552B 및 581B의 4종의 배양액 엑스에서 비교적 강한 tyrosinase 억제활성이 관찰되었다 ( $IC_{50}$ : 3.0–19.0  $\mu$ g/mL) (Table II). 이 결과로부터 tyrosinase 억제활성 성분은 주로 배양액 엑스에 존재한다는 것이 판명되었다. 따라서, tyrosinase 억제활성 성분은 균류 자신이 체내에서 생합성하는 2차 대사성분이 아니라 균류의 배양과정에서 배양액에 용출된 수용성 성분이 균류의 체외효소에 의해 2차적으로

**Table I.** Tyrosinase inhibiting activity for the extracts of the marine-derived fungus

Sample	Activity		Activity	
	Inhibition	%	Inhibition	%
MFA007ae <sup>1</sup>	80		MFA345ae	86
007M <sup>2</sup>	- <sup>3</sup>		345M	-
007B <sup>2</sup>	-		345B	-
027ae	87		412ae	91
027M	-		412M	-
027B	72		412B	-
058ae	72		552ae	92
058M	-		552M	-
058B	84		552B	84
317ae	95		562ae	92
317M	-		562M	-
317B	-		562B	81
318ae	93		581ae	97
318M	-		581M	-
318B	-		581B	95
Kojic acid <sup>4</sup>	72			

1. Concentration of acetone extract: 40  $\mu$ L.

2. Concentrations of mycelium (M) and broth (B) extracts: 1 mg/mL.

3. % I: < 50.

4. Concentration as positive control: 10.0  $\mu$ g/mL.

**Table II.** Tyrosinase inhibiting activity of the broth extracts and compound 1

Sample	Activity (IC <sub>50</sub> )	
	$\mu$ g/mL	$\mu$ M
27B	19.0	
58B	3.0	
552B	8.0	
562B	> 100	
581B	3.0	
581B3P (1)	0.5	12.0

변화된 화합물이라고 추정된다. 한편, 본 실험에서 사용한 소량의 acetone 추출물을 이용한 tyrosinase 억제활성 검색법은 매우 짧은 시간에 많은 종류의 시료를 제조하고 검색할 수 있을 뿐 만 아니라, tyrosinase 억제활성 균주 및 지표성분의 선정에도 매우 효과적이고 유용한 방법이라고 생각된다.

강한 tyrosinase 억제활성이 관찰된 581B (IC<sub>50</sub>: 3.0  $\mu$ g/mL)를 대상으로 tyrosinase 억제활성을 발현하는 2차 대사성분의 화학적 연구를 행하였다.

MFA581을 YPM 배지 (10 mL)에서 1차 배양하고, 이어 YPG 배지 (20 L)에 계대 배양 한 후, 수확하여 균사체 엑스 (581M, 2.2 g)와 배양액 엑스 (581B, 0.6 g)를 얻었다. 매우 강한 tyrosinase 억제활성이 관찰된 배양액 엑스 (581B)로부

터 tyrosinase 억제활성을 지표로 활성성분의 분리정제를 행하여, 581B3P (1)를 분리하였다.

581B3P (1)는 무색 고체로서, LREIMS에서  $m/z$  142 [M]<sup>+</sup>의 분자이온이 관찰되었으며, IR 스펙트럼에서 수산기 (3436  $\text{cm}^{-1}$ ) 및 r-pyrone (1660, 1630, 1582  $\text{cm}^{-1}$ ) 유래의 signal이 관찰되었다. <sup>1</sup>H NMR에서 aromatic alcohol [ $\delta$  9.06 (1H, s, 5-OH)], hydroxymethyl [4.28 (2H, s, H<sub>2</sub>-7), 5.67 (1H, s, 7-OH)] 및 2개의 aromatic proton [6.33 (1H, s, H-3), 8.02 (1H, s, H-6)]의 존재가 추정되었다. 그리고, <sup>13</sup>C NMR에서 1,4-이치환 r-pyrone [ $\delta$  168.0 (s, C-2), 109.8 (d, C-3), 173.9 (s, C-4), 145.7 (s, C-5), 139.2 (d, C-6)] 및 aromatic hydroxymethyl [59.4 (t, C-7)]유래의 signal이 관찰되어, 2D NMR (DEPT, COSY, HMQC 및 HMBC)의 상세한 검토에 의해 581B3P의 구조를 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one (kojic acid) (1)로 결정하였다.

Kojic acid (1)는 화장품 미백제, 갑각류 선도유지제, 항균 및 항진균제, 소염제, 진통제, 농업제초제, 사진 감광제 원료, 기타 철 검출용 시약 등 여러 분야에서 이용되고 있다.<sup>9)</sup>

## 사 사

NMR 및 Mass spectral data 는 한국기초과학지원연구원 (대전)의 지원으로 측정되었습니다. 그리고, 본 연구는 보건복지부 2002년도 보건의료기술연구개발사업 (02-PJ1-PG4-PT05-0002)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## 인용문헌

1. D. J. Faulkner, D. J. (2002) Marine natural products. *Nat. Prod. Report* **19**(1): 1-48.
2. Lindquist, N. L. (Nov. 14, 1996) Sunscreen compositions comprising natural products of a marine hydroid, and derivatives thereof, *US Pat.* 96-749930.
3. Lindquist, N. L. and Loo, G. (Mar 2, 1998) Antioxidant compositions for topical application to the skin. *US Pat.* 98-33543.
4. Look, S. A., Fenical, W., Jacobs, R. S. and Clardy, J. (1986) The pseudopterogens; antiinflammatory and analgesic natural products from sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 6238-6240.
5. Mayer, A. M. S., Jacobson, P. B., Fenical, W., Jacobs, R. S. and Glaser, K. B. (1998) Pharmacological characterization of the pseudopterogens: novel antiinflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Life Sciences Pharmacology Letters* **62**(26): 401-407.

6. Li, Y., Li, X. F., Kim, D. S., Choi, H. D. and Son, B. W. (2003) Indolyl alkaloid derivatives, *N*<sub>6</sub>-acetyltryptamine and oxaline from a marine-derived fungus. *Arch. Pharm. Res.* **26**(1): 21-23.
7. Buckingham, J., Macdonald, F. M. and Bradley, H. M. (ed.) (1994) Dictionary of Natural Products. Vol. **5**: 3037, Chapman & Hall, London, U. K.
8. Tubaki, K. (1992) Marine Microorganism as Drug Resources.

- In Yajima, H., Shioiri, T., and Ohizumi, Y. (ed.), *Marine Resources for Drug Discovery*, 313-334. Hirokawa Publishing Co. Tokyo, Japan.
9. 광무영 (2001), 연속생물반응기를 이용한 kojic acid 생산기술개발. *청정생산 Newsletter* **4**(2): 9-12.

(2003년 1월 29일 접수)