

멜라닌 분해능을 지닌 미백용 기능성 화장품원료의 개발

† ¹강 환 구 · ²황 선 덕 · ²김 형 식 · ¹정 종 식 · ³이 병 옥
¹한남대학교 나노생명화학공학과, ²(주)브리지 바이오, ³고신대학교 생명과학부
(접수 : 2006. 8. 23., 게재승인 : 2006. 11. 14.)

The Development of Whitening Cosmetic Ingredient Having Activity of Melanin Degradation

Whan-Koo Kang^{† 1}, Sun-Duk Hwang², Hyung-Sik Kim², Jong-Sik Jeung¹, and Bheong-Uk Lee³

¹Department of Chemical Engineering & Nano-Bio Technology, The University of Hannam, Daejeon 306-791, Korea

²Bridge Bio, Inc., Daejeon 306-800, Korea

³Department of Biological Sciences, The University of Kosin, Busan, Korea

(Received : 2006. 8. 23., Accepted : 2006. 11. 14.)

Extensive research was carried out for inhibition of melanin formation as development of whitening cosmetic ingredients. But degradation of melanin itself was not intensively pursued as development of cosmetics. In this study, novel melanin degradation enzyme was developed and characterized. Also this enzyme production process was optimized and formulation was tried using micro encapsulation technique.

Key Words : Melanin, degradation, whitening ingredients, cosmetics, encapsulation

서 론

멜라닌은 페놀류의 생체 고분자물질로서 동식물의 외피, 털 및 조직에 존재하는 갈색 또는 흑색의 색소로 보통 단백질과 굳게 결합되어 있어서, 물이나 대부분의 유기 용매에 녹지 않는다. 멜라닌의 생합성은 아미노산의 일종인 티로신(tyrosin)을 전구물질하여, tyrosine → DOPA → DOPA → quinone → indole-5,6-dihydroquinone으로 변화하고, indole-5,6-dihydroquinone의 중합체가 멜라닌이다. 멜라닌은 멜라노사이트(melanocyte) 내에서 생성되며, 멜라노솜(melanosome)이라는 과립 형태로 표피와 진피(眞皮)의 경계부로 이동하여 침착한다. 하지만 멜라닌은 검은 피부의 직접적인 원인이고, 기미, 주근깨의 형성을 촉진하는 등 미용이라는 측면에서 심각한 문제를 일으킨다. 또한 과잉 생산된 멜라닌은 피부 노화 및 피부암을 유발하는 원인이 되는 것으로 밝혀져서, 이에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다.

멜라닌 생합성 대사는 최근 집중적인 연구대상이 되어 tyrosinase (EC 1.14.18) 이외에 몇몇의 조절인자가 발견되었

으나, 아직 정확한 대사가 규명되지 못한 상태이다. 멜라닌 생합성 저해제는 의약품, 화장품, 식품 등에서 피부질환 치료제, 피부 미백제, 식품 갈변 방지제 등에 적용되고 있으며, 최근 그 수요가 증가하고 있다. 특히 삶의 질 향상과 더불어 아름다움에 대한 여성의 소망을 반영하여 새로운 기술로서 미백효과와 노화방지 기능을 함께 갖춘 복합기능의 화장품 개발 가능성이 기대되고 있다.

현재까지의 미용적 측면에서 멜라닌을 감소시키는 연구는 2종류로 집약된다. 첫째는 멜라닌 생성의 원인이 되는 자외선을 차단하는 물질을 미용용품에 첨가하는 것이다. 둘째는 멜라닌의 생합성을 차단하는 것으로, 멜라닌의 합성에 가장 중요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질을 개발하는 방향으로 연구가 집중된다. 하지만 tyrosinase 저해제들의 문제점으로는, 멜라닌 생성 억제 작용 외에, 원하지 않는 심각한 부작용들을 유발하는 것임. 예로는 피부괴사, 색소 세포의 변성, 세포 독성에 의한 피부 질환 유발, 피부 자극 유발 등을 일으킨다. 따라서 세계 각국에서는 이미 생성된 멜라닌을 직접 분해하거나, 멜라닌을 포함하는 표피의 제거 및 순환을 촉진시켜서 멜라닌을 제거하려는 연구가 활발하게 수행 중이다. 따라서 위에서도 언급하였듯이 본 연구의 목표는 기존의 많은 연구가 멜라닌 생성억제에 맞추어져 있고 멜라닌의 분해에 관하여는 거의 연구되어 있지 않은 실정이다. 따라서 연구소에서 확보한 분해능을 지닌 진균류로부터, 멜라닌 분해효

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering & Nano-Bio Technology, The University of Hannam, Daejeon 306-791, Korea

Tel : +82-42-629-7932, Fax : + 82-42-623-9489

E-mail : wkoo@hannam.ac.kr

소를 분리하여 피부 미백 화장품 원료를 개발함이 목표이다.

재료 및 방법

진균류 추출물로부터 신규 멜라닌 분해효소의 분해능 test

기본 배양 조건 중 plates 배양은 균주를 yeast extract 2%, malt extract 2% 포함된 agar plate에 1 cm × 1 cm 크기로 접종하여 1주일간 25°C에서 배양하였고 Flask 배양의 경우 Malt extract 3%가 포함된 배지가 들어있는 500 ml flask (working volume 100 ml)에 agar를 제외한 균사체를 접종하여 25°C, 200 rpm에서 5일간 배양하여 사용하였다.

효소 활성 측정 조건은 Synthetic melanin (sigma) 100 ppm solution 2 ml에 sample 0.2 ml을 첨가하여 반응을 시작한 후 460 nm에서 흡광도를 측정하여 탈색율을 구하였고, 이때 반응액은 pH 7, 반응온도는 30°C를 유지하였다.

멜라닌 분해효소의 효과적인 분리를 위한 분해능 테스트는 진균류 균사체의 배양시 균사체 세포내에 존재하는 효소와 배양 상등액에 존재하는 효소의 멜라닌 분해능을 확인하였다.

반응 pH에 대한 영향은 멜라닌 분해효소의 pH의 안정성을 실험하고자 melanin solution의 pH를 5~9로 바꾸어 효소의 활성을 측정하였다.

멜라닌 분해시 효소의 반응에 미치는 온도의 영향은 멜라닌 분해 효소의 열 안정성을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 10배 농축한 배양 상등액을 melanin solution에 첨가하여 각각 20°C부터 60°C에서 반응시켰다.

멜라닌 분해 효소의 characterization

정제된 sample을 대상으로 PROTEAN IEF Cell (BIO-RAD)을 이용하여 pI 값에 의한 단백질을 분리하여 멜라닌 분해 효소의 특성을 규명하였다.

BIO-RAD사의 readystrip 7 cm를 이용하여 50 µl sample + 75 µl rehydration buffer를 첨가하여 기포가 들어가지 않도록 주의하고, strip이 마르지 않게 충분한 양의 미네랄 오일로 덮어주고 passive rehydration 방법으로 20°C에서 12 시간동안 rehydration을 시켰다. Rehydration된 strip을 BIO-RAD사의 PROTEAN IEF Cell system을 이용하여 focusing을 행하였다.

IEF focusing 조건은 아래와 같다.

	Start voltage	End voltage	Set time	Temperature
Step 1	0 V	250 V	15분	20°C
Step 2	250 V	8,000 V	1시간	20°C
Step 3	8,000 V	8,000 V	20,000 V · hr	20°C

위의 조건으로 IPG strip을 이용하여 pI값의 차이에 의한 단백질의 1차원 분리를 끝낸 후에 12% SDS-PAGE를 이용하여 단백질 크기에 의한 2차원 분리를 실시하였다.

단백질 sequence에 의한 degenerate 프라이머 합성 및 유전자 확보는 정제된 멜라닌 분해 효소의 전체적인 단백질 및 유전자 서열을 분석하기 위하여 12% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 크기에 의해 분리한 후 Hoffer사의 탱크식 transfer system을 이용하여 PVDF membrane에 단백질을 transfer하였다. Acetic acid가 포함되지 않은 coomassie brilliant blue (CBB) 염색을 실시하였고, Acetic acid가 포함되지 않은 50% methanol 용액으로 탈색한 후에 염색된 단백질 밴드를 잘라 분석을 의뢰하였다. 한국기초과학지원연구원에서 단백질의 N-terminal 서열 분석을 하였으며, SRFQSLTFI의 결과를 얻을 수 있었다.

멜라닌 분해효소의 유전자를 얻기 위해 진균류를 배양, 수거하고 액체질소를 이용하여 파쇄하였다. RNA prep kit를 이용하여 파쇄된 cell에서 RNA를 얻었으며, RT-PCR kit를 이용하여 cDNA를 합성한 후 이를 주형으로 하여 위에서 합성된 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR의 조건은 1 X *Pfu* buffer, 0.2 µM forward primer, 0.4 µM Reverse primer, 0.2 mM dNTP, 1 µl RNA, 2.5 U *Pfu*를 전체부피가 100 µl가 되도록 혼합하였고, 94°C 5분, 25 cycles (94°C 1분, 50°C 1분, 72°C 2분), 72°C 5분으로 PCR을 수행하였다.

멜라닌 분해효소 생산을 위한 진균류의 배양방법 확립

멜라닌 분해효소의 활성에 미치는 배지종류의 영향을 알아보기 위해 복합배지를 이용하였다. 최적의 배지 조건을 선별하기 위해 균주를 여러 가지 복합배지로 배양한 후 멜라닌 분해활성을 비교하였다. Flask에서 배양 후 배양 상등액만을 취하여 10배 농축하여 melanin 분해 활성을 측정하였다.

복합배지 조건은 다음과 같다.

Potatose (potatose Dextrose broth, sigma (24 g/L))

MDP (malt extract 20 g/L, glucose 20 g/L, peptone 1 g/L)

MP (malt extract 20 g/L, peptone 10 g/L)

M (malt extract 30 g/L)

YM (yeast extract 3 g/L, malt 5 g/L, Peptone 3 g/L, glucose 10 g/L)

YPD (yeast extract 20 g/L, peptone 10 g/L, glucose 20 g/L)

YMPD (yeast extract 20 g/L, malt 10 g/L, peptone 10 g/L, glucose 20 g/L)

멜라닌 분해효소의 활성에 미치는 배지종류의 영향을 알아보기 위하여 제한배지를 이용하였다. 멜라닌 분해효소의 활성 및 정제 수율을 높이기 위하여 제한배지를 이용하여 균사체를 배양하였다. 여러 가지 조건 중 질소원 & 탄소원의 비율을 바꾸어 배지 최적화를 하였으며, 질소원으로는 ammonium tartrate를, 탄소원으로는 glucose를 사용하였다. 공통적으로 첨가해준 미량원소들은 KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, CaCl₂ · 2H₂O 0.01%, FeSO₄ · 7H₂O 0.01%, CuSO₄ · 5H₂O 0.002%, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001%, MuSO₄ · 4H₂O 0.001%, 2,2,-Dimethylsuccinate 0.4% 100 ppm Thamine-HCl Biotin 2 ml/L이었다. 10배 농축 후 멜라닌 분해 활성을 측

정하였다.

⇒ 배지 조건

- 1) ammonium tartrate 0.8% : glucose 4%
- 2) ammonium tartrate 0.4% : glucose 4%
- 3) ammonium tartrate 0.04% : glucose 4%
- 4) ammonium tartrate 0.8% : glucose 6%
- 5) ammonium tartrate 0.8% : glucose 2%
- 6) ammonium tartrate 0.4% : glucose 2%

멜라닌 분해효소의 활성에 미치는 배양시간의 영향은 배양시간에 따른 멜라닌 분해효소의 멜라닌 분해활성에 대하여 알아보기 위하여 배양시간을 48-168시간동안 배양하여 멜라닌 분해활성을 측정하였다. Flask에서 배양 후 배양 상등액을 취하여 10배 농축한 후 melanin 분해 활성을 측정하였다.

진균류의 성장에 미치는 배양온도의 영향은 최적의 배양온도를 선별하기 위하여 배지의 조성은 위의 실험에서 최적화된 배지로 배양하였다. 배지의 조성은 질소원과 탄소원은 ammonium tartrate 0.4%: glucose 2% 사용하였고, 미량원소 (KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 2,2-Dimethylsuccinate 0.4% 100 ppm Thamine-HCl Biotin 2 ml/L)를 첨가하고 여기에 yeast extract를 0.1% 첨가한 배지를 이용하여 여러 가지 온도에서 배양한 후 진균류의 성장을 비교하였다. Flask에서 배양 후 20,000 ×g에서 30분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 진균류의 DCW (dry cell weight, 건조균체중량)를 측정하였다.

진균류의 성장에 미치는 배양배지의 pH 영향에 대하여 알아보기 위하여 균사체를 여러 가지 pH에서 배양한 후 진균류의 건조균체중량을 비교하였다. 배지의 조성은 질소원과 탄소원은 ammonium tartrate 0.4%: glucose 2% 사용하였고, 미량원소 (KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 2,2-Dimethylsuccinate 0.4% 100 ppm Thamine-HCl Biotin 2 ml/L)를 첨가하고 여기에 yeast extract를 0.1% 첨가한 배지를 이용하였다. pH control을 위하여 5 L fermenter에서 배양 후 배양액을 취하여 건조균체중량 (DCW)을 측정하였다.

멜라닌 분해효소의 정제과정 최적화

멜라닌 분해효소 정제 과정은 멜라닌 분해효소의 활성을 측정하기 위하여 0.1 M의 sodium acetate buffer (pH 5.0) 600 μl 에 상등액 100 μl 을 혼합한 후, 5 mM의 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) 100 μl 을 첨가하고 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

우선 세포 배양액을 4°C 20,000 ×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 농축의 목적으로 원심분리하여 취한 상등액을 10,000 molecular weight cut-off membrane을 이용하여 10배 농축하였다. 그 후 멜라닌 분해효소 정제를

위하여 Amersham bioscience사의 Sephadex G-50을 충전한 column (5 × 50 cm)을 이용하여 유속 4 5ml/h로 4°C에서 gel filtration chromatography를 수행하였다. 첫 번째 단계인 gel filtration chromatography의 buffer로는 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4를 사용하여 fraction 별로 수집하였다. 이렇게 수집한 fraction별로 ABTS 산화 발색법에 의해 멜라닌 분해효소의 활성을 측정하였고, 멜라닌 분해 활성이 있는 fraction을 모두 수집하였다. 그 후 염색에 의한 단백질의 회수를 하였는데 gel filtration chromatography에서 멜라닌 분해활성이 확인된 sample을 수집하여 4°C cold chamber에서 최종 포화 농도가 45% (27.7 g/100 ml)가 되게 Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)를 막자사발로 곱게 분쇄시켜 Ammonium sulfate를 30분간 천천히 가하고 천천히 교반을 하면서 염색을 행하였다. 이후 1시간 동안 천천히 교반하여 단백질을 침전 시킨 후 4°C 20,000 ×g에서 30분간 원심분리 하여 침전된 단백질을 제거하고 상등액을 취하여 최종 포화농도가 65%가 되게 Ammonium sulfate를 13.4 g/100 ml의 비율로 30분간 천천히 첨가하였다. 이후 1시간 동안 천천히 교반하여 단백질을 침전시킨 후 4°C 20,000 ×g에서 30분간 원심분리 하여 침전된 단백질을 수거하였다. 침전된 단백질을 소량의 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4에 단백질을 완전히 녹였다.

이렇게 얻어진 시료중의 염을 제거하기 위하여 Cell-Sep사의 T1 dialysis membrane MWCO 3,500을 이용하여 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4로 4°C cold chamber에서 교반하면서 buffer를 2회 교환하여 주면서 overnight 탈염하였다. 그리고 Ion exchange chromatography를 진행하였는데 1st DEAE Column chromatography는 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4로 평형화된 HiPrep 16/10 DEAE FF column을 이용하여 유속 3 ml/min에서 정제를 수행하였다. Elution buffer로 상기의 buffer에 0.3 M의 NaCl이 포함된 buffer를 Elution buffer로 이용하였다. 이렇게 얻어진 시료중의 염의 제거하기 위하여 Cell-Sep사의 T1 dialysis membrane MWCO 3,500을 이용하여 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4로 4°C cold chamber에서 교반하면서 buffer를 2회 교환하여 주면서 overnight 탈염하였다. 그 후 Molecular weight cut-off membrane를 진행하였다. 탈염 후 얻어진 멜라닌 분해 활성이 있는 sample을 VIVA science사의 원심형 membrane 농축기를 이용하여 3000 ×g에서 원심분리하여 농축 및 molecular weight cut-off를 수행하였다. 다음으로 Ion exchange chromatography를 진행하였는데 CM Column chromatography를 이용하여 HiPrep 16/10 CM Column chromatography - 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4로 평형화된 CM FF column을 이용하여 유속 3 ml/min에서 정제를 수행하였다. CM column에 흡착하지 않고 흘러나온 sample에 대하여 2nd DEAE chromatography를 수행하였다. 다음으로 Ion exchange chromatography 중 2nd DEAE Column chromatography를 진행하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4로 평형화된 HiPrep 16/10 DEAE FF column을 이용하여 유속 3 ml/min에서 정제를 수행하였다. Elution buffer로 상기의 buffer에 0-0.3 M의 NaCl이 포함된 buffer를 농도구배 용출 buffer로 이용하였

다. 0-0.3 M로 농도구배 용출하여 ABTS 산화 발색법으로 멜라닌 분해효소 활성을 측정하고 활성이 보인 fraction을 수집하였다. 이렇게 얻어진 시료중의 염을 제거하기 위하여 Cell-Sep사의 T1 dialysis membrane MWCO 3,500을 이용하여 0.1 M potassium phosphate, pH 7.4로 4°C cold chamber에서 교반하면서 buffer를 2회 교환하여 주면서 overnight 탈염하였다.

Scale-up

5 L fermenter는 플라스크 배양을 통해 최적화된 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 질소원과 탄소원은 ammonium tartrate 0.4%: glucose 2% 사용하였고, 미량원소 (KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 2,2-Dimethylsuccinate 0.4% 100 ppm Thamine-HCl Biotin 2 ml/L)를 첨가하고 여기에 yeast extract를 0.1%첨가한 배지를 5 L fermenter에 적용하여 멜라닌 분해효소의 활성을 보고자 하였다. 최적배지를 working volume 3 L로 배양하였으며, 플라스크에서 5일간 배양 후 seed접종하였다. 균주의 pH는 앞선 실험에서 최적 pH로 선정된 pH 5.0 - 5.5를 유지하였고, 3 N NaOH, 3 N HCl을 이용하여 조절하였으며, 교반속도는 120 rpm이었다. 온도는 앞선 최적화 실험에 의해 얻어진 24-26°C에서 건조균체중량이 큰 차이가 없었으므로 중간 값인 25°C를 유지하였다.

Main fermentation이 시작된 시점으로부터 96시간이 경과한 시점에서 20배로 농축한 멸균 배지를 5 L fermenter에 dump하여 진균류의 고농도 배양을 실시하였고, 이때 산소공급의 효과를 알아보기 위하여 고농도 산소가스를 공급하여 배양하였다. 본 실험의 조건 및 위의 배지 조건들을 응용하여 500 L fermenter로의 Scale up 실험에 적용하였다.

다음으로는 500 L fermenter 실험을 진행하였다. 500 L fermenter의 배양은 (주)대덕바이오 (장비: ko biotech, 500 L)에서 실험을 하였으며 기본적인 배지조건 및 배양조건은 5 L fermenter 배양을 통해 최적화된 data를 사용하여 진행하였다. 배지의 조성은 질소원과 탄소원은 ammonium tartrate 0.4%: glucose 2% 사용하였고, 미량원소 (KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 2,2-Dimethylsuccinate 0.4% 100 ppm Thamine-HCl Biotin 2 ml/L)를 첨가하고 여기에 yeast extract를 0.1% 첨가한 배지를 500 L fermenter에 적용하여 멜라닌 분해효소의 대량 생산을 도모하고자 하였다. 최적 배지로 working volume 300 L로 배양하였으며, 50 L fermenter에서 working volume 30 L로 5일간 배양 후 seed 접종하였다. 균주의 pH 5.0 - 5.5는 3 N NaOH, 3 N HCl을 이용하여 유지하였으며, 교반속도는 100 rpm이고, 온도는 25°C에서 배양하였다. 5 L fermenter에서 최적화 된 공정을 도입하여 main fermentation이 시작된 시점으로부터 4일 (96 시간)이 지난 시점에서 20배로 농축한 멸균 배지 15 L를 500 L fermenter에 dump 하여 진균류의 고농도 배양을 실시하였다.

멜라닌 분해효소의 formulation

멜라닌 분해효소를 효율적으로 피부로 전달시키기 위하여 50-100 nm 크기로 encapsulation을 실시하였다.

멜라닌 분해효소의 Solubility test (DMSO, Acetone, Ethyl Acetate, Ethanol, DDI Water, MC)는 중에서 DMSO와 MC에 비교적 많은 양이 녹았다. MC나 DMSO에 녹였을 때도 불순물이 많이 보였다. MC와 DMSO에 녹으므로 유화확산법과 micelle formation을 이용해서 Encapsulation 진행하였다. 유화확산법은 1%의 mPEG5K-PLGA2K 20 ml을 water phase로 사용하고 PLGA 0.2 g과 멜라닌 분해효소를 녹인 10 ml의 MC를 Oil Phase로 사용하여 유화한 후 500 ml의 water를 넣어주고 확산시켰다.

Micelle Formation은 mPEG5K-PLGA25K를 이용하여 1. DMSO 10 ml + DMF 10 ml + mPEG5K-PLGA25K 0.015 g + 멜라닌분해효소, 2. DMSO 10 ml + DMF 10 ml + mPEG5K-PLGA25K 0.045 g + 멜라닌분해효소, Dialysis membrane에 넣고 투석을 통해 micelle formation을 진행하였다.

결과 및 고찰

진균류 추출물로부터 신규 멜라닌 분해효소의 분리 및 분해능 test

멜라닌 분해능을 확인하기 위하여 탈색율을 비교하였을 때 균사체를 파쇄 하여 얻은 효소에 비해 상등액의 멜라닌 분해 활성이 3~5배 더 높음을 확인하였다. 이를 재확인 하고자 샘플을 동결 건조하여 10배 농축한 후 탈색정도를 더 높여 테스트하였다. 이 결과도 균사체 파쇄의 경우보다 배양 상등액에서 약 5배 높은 탈색율을 보였다.

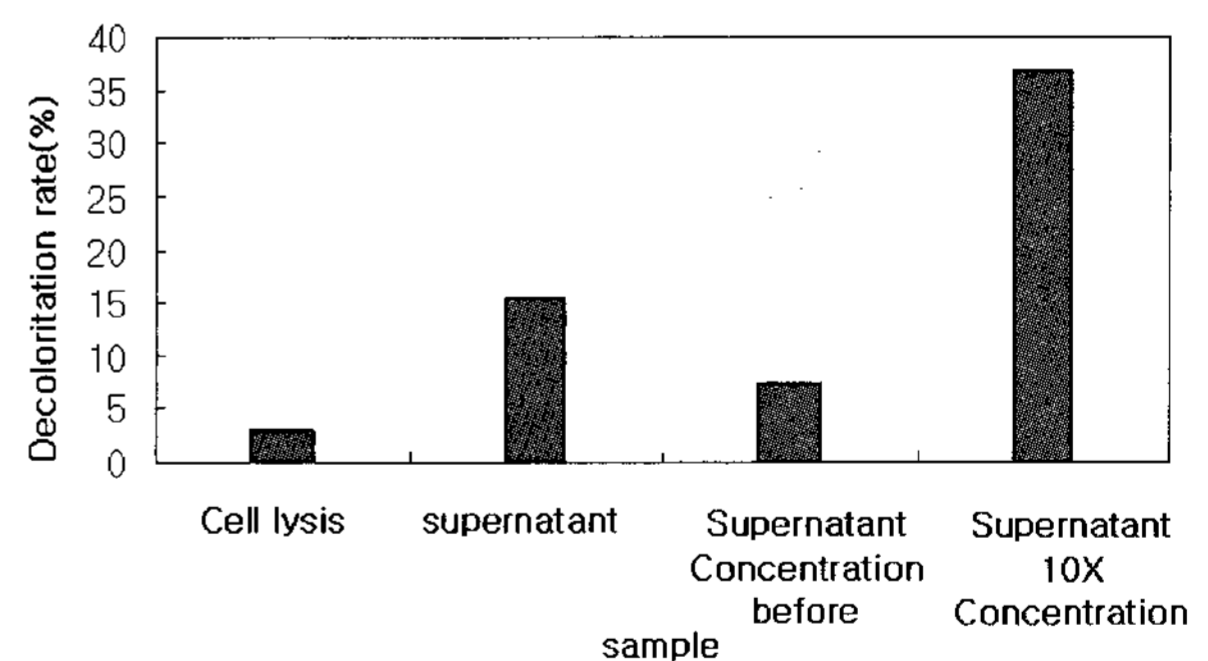


Figure 1. The resolution test for the crisis of the melanin breakdown enzyme.

pH별 활성은 pH 9 < pH 8 < pH 5 < pH 6 < pH 7 순으로 분해활성이 높았다.

멜라닌 분해시 효소의 반응에 미치는 온도의 영향은 멜라닌 분해효소는 30°C에서 가장 안정하였고, 40°C 이상부터는 분해능이 감소하기 시작하여 60°C에서는 30°C에서 반응시킨 경우의 15% 수준까지 급격하게 감소함을 확인하였다. 이 결과로 진균류 배양을 통하여 상등액으로부터 분리된 멜라닌 분해효소는 열에 약함을 알 수 있다.

Standard melanin의 종류에 따른 탈색율 비교해 본 결과 멜라닌의 탈색율을 측정하기 위한 표준물질을 결정하기 위하여 sepia melanin과 synthetic melanin을 기질로 하여 탈색율을 확인하였다. 두 가지 멜라닌에 대한 분해 효소의 분해활성의 차이는 거의 없는 것으로 확인되었으며 실험에서의 표준물질은 synthetic melanin을 이용하였다.

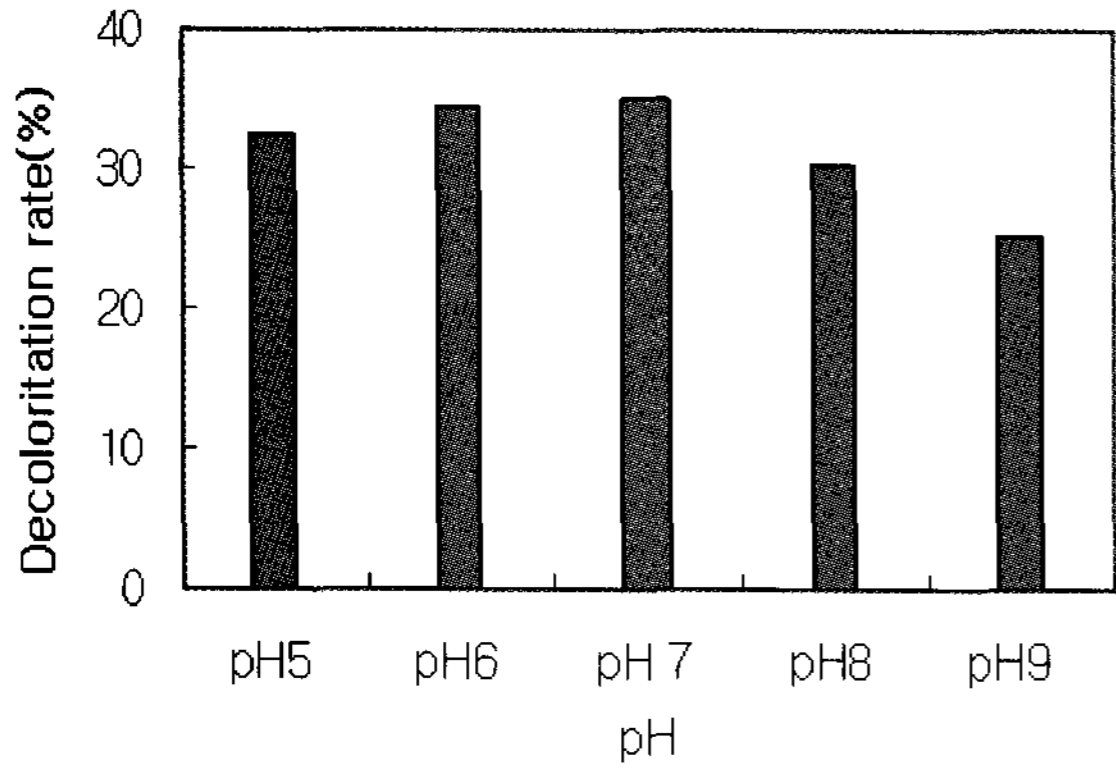


Figure 2. Stability test of melanin breakdown enzyme pH.

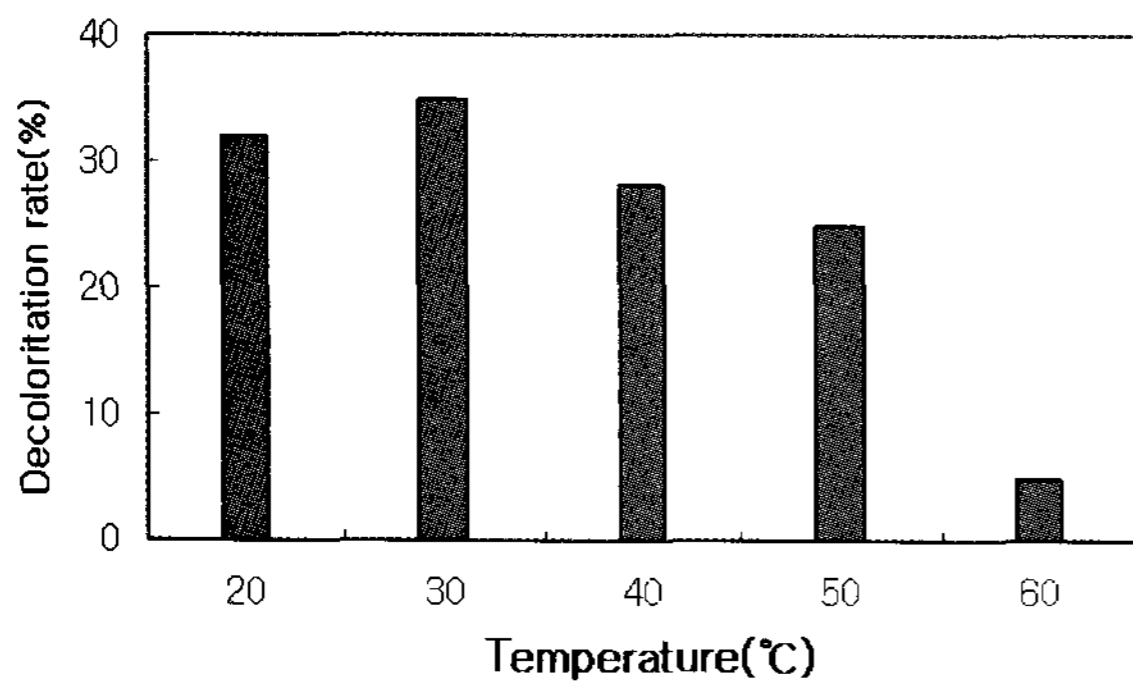


Figure 3. Temperature stability test of melanin breakdown enzyme.

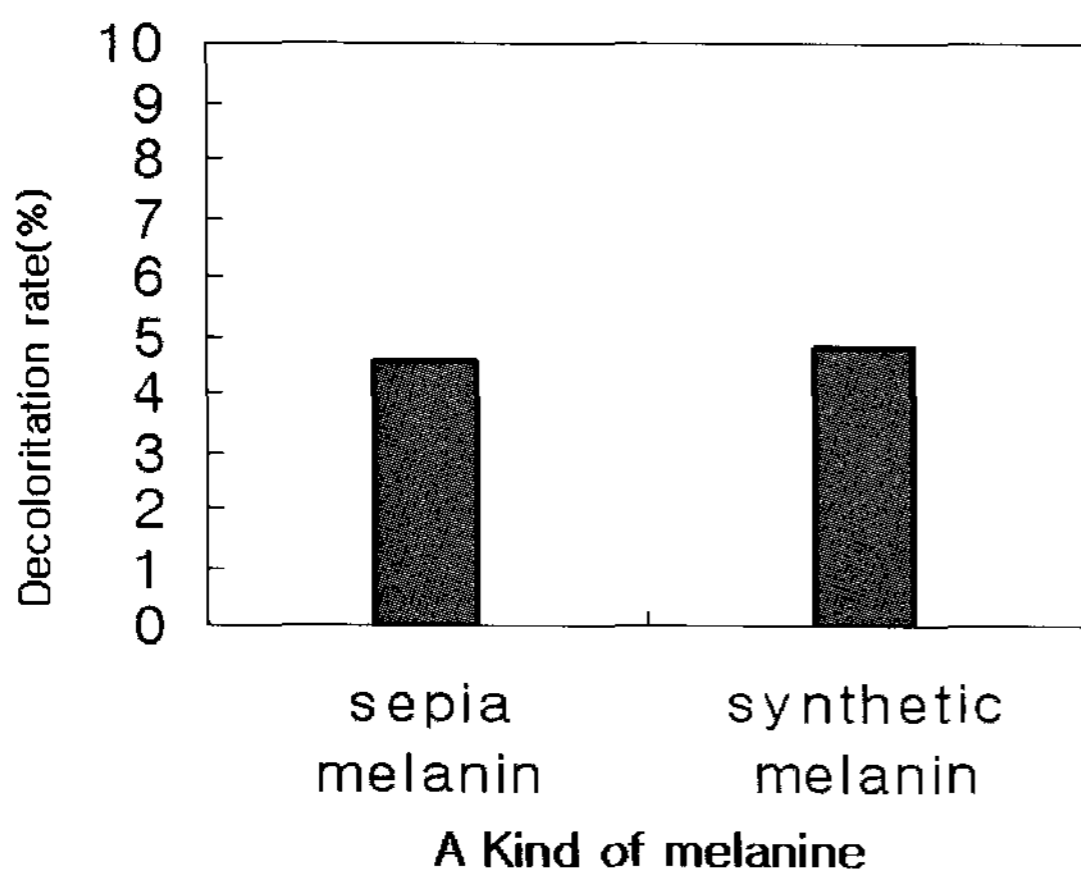


Figure 4. Decoloration rate comparison test of the kind of standard melanine.

melanin농도를 달리하여 멜라닌 분해활성 측정 결과는 효소의 양을 고정하고 melanin의 농도를 변화시켜 탈색율

을 측정하였다. melanin의 농도 10 ppm에서 200 ppm으로 높아질수록 탈색율이 증가하였다.

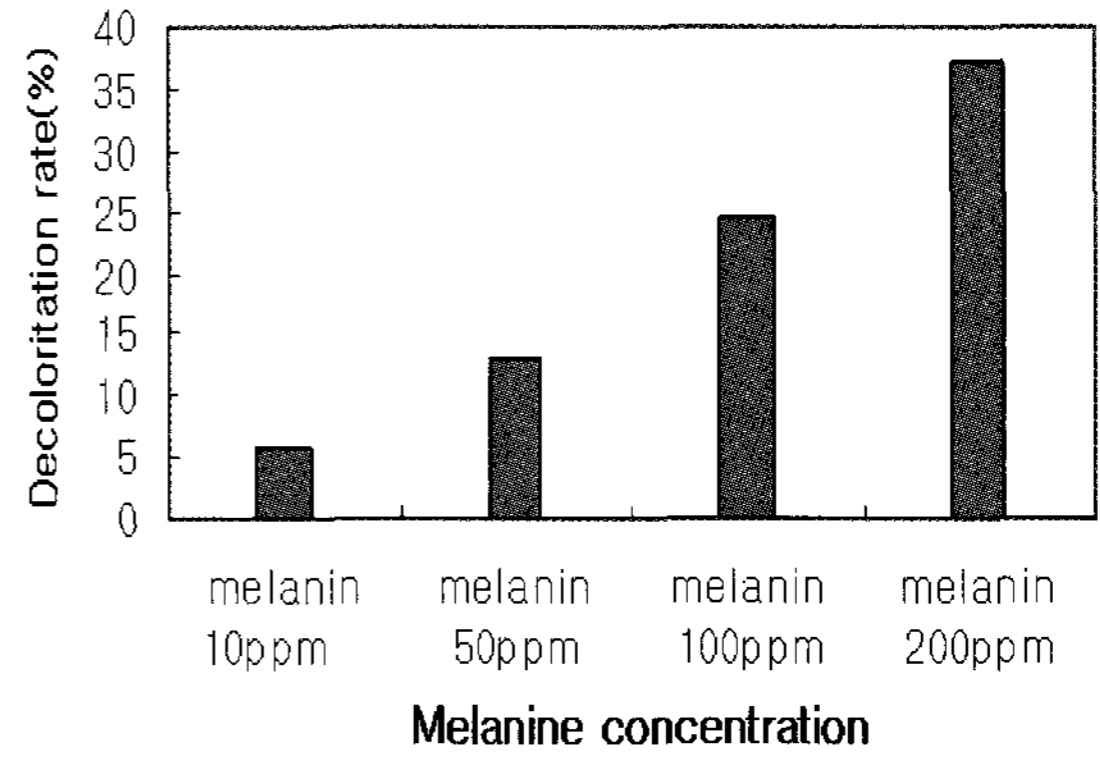


Figure 5. The breakdown enzyme active measurement test which melanine follows concentration.

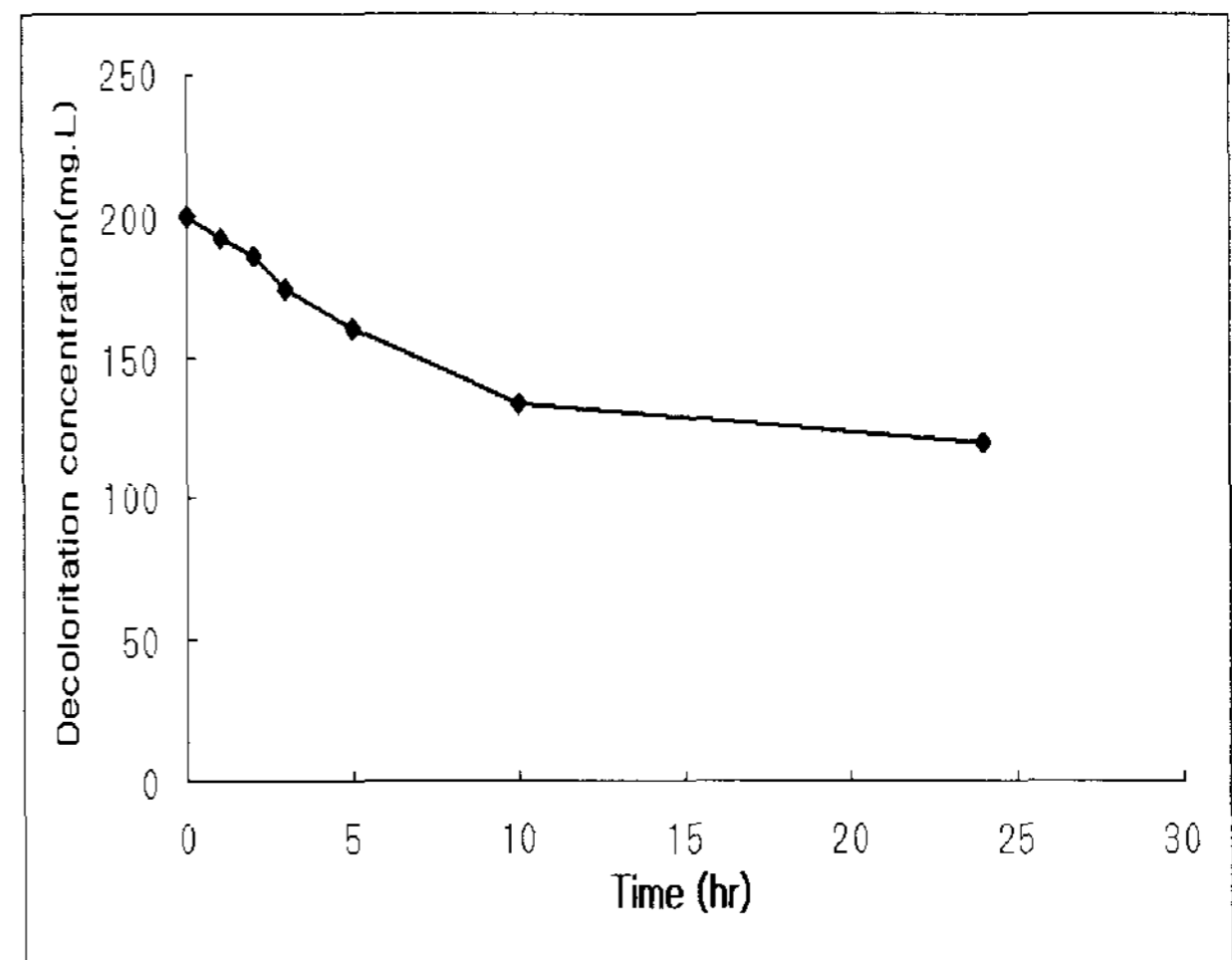


Figure 6. The breakdown enzyme active measurement test which melanine follows at hour.

진균류 배양 상등액에서 얻어진 멜라닌 분해효소는 반응 시작 후 10시간까지 멜라닌을 최대 7 mg/h의 속도로 멜라닌을 분해하였다.

멜라닌 분해효소의 분리는 멜라닌 분해효소 정제를 위하여 Amersham bioscience사의 Sephadex G-50을 충전한 column을 이용하여 gel filtration chromatography를 수행하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer를 사용하여 fraction별로 수집하였고, 이렇게 수집한 상등액을 fraction별로 멜라닌 분해 활성을 측정하였다. 멜라닌 분해 활성이 있는 가장 좋은 fraction을 수집하여 (NH₄)₂SO₄를 이용하여 단백질을 침전시킨 후 소량의 potassium phosphate buffer에 녹인 후 Cell-Sep사의 T1 투석막을 이용하여 overnight하여 탈염하였다.

멜라닌 분해 효소의 characterization

2D-gel을 이용한 pI 등 멜라닌 분해효소의 특성 분석을 하였다. 정제된 sample을 대상으로 PROTEAN IEF Cell

(BIO-RAD)을 이용하여 pI 값에 의한 단백질을 분리하여 멜라닌 분해 효소의 특성을 규명한 결과 멜라닌 분해효소들을 발견할 수 있었고, 이 중 한가지멜라닌 분해효소의 pI 값은 약 6.5이고 Molecular weight 은 약 54-57 kDa임을 확인할 수 있었다.

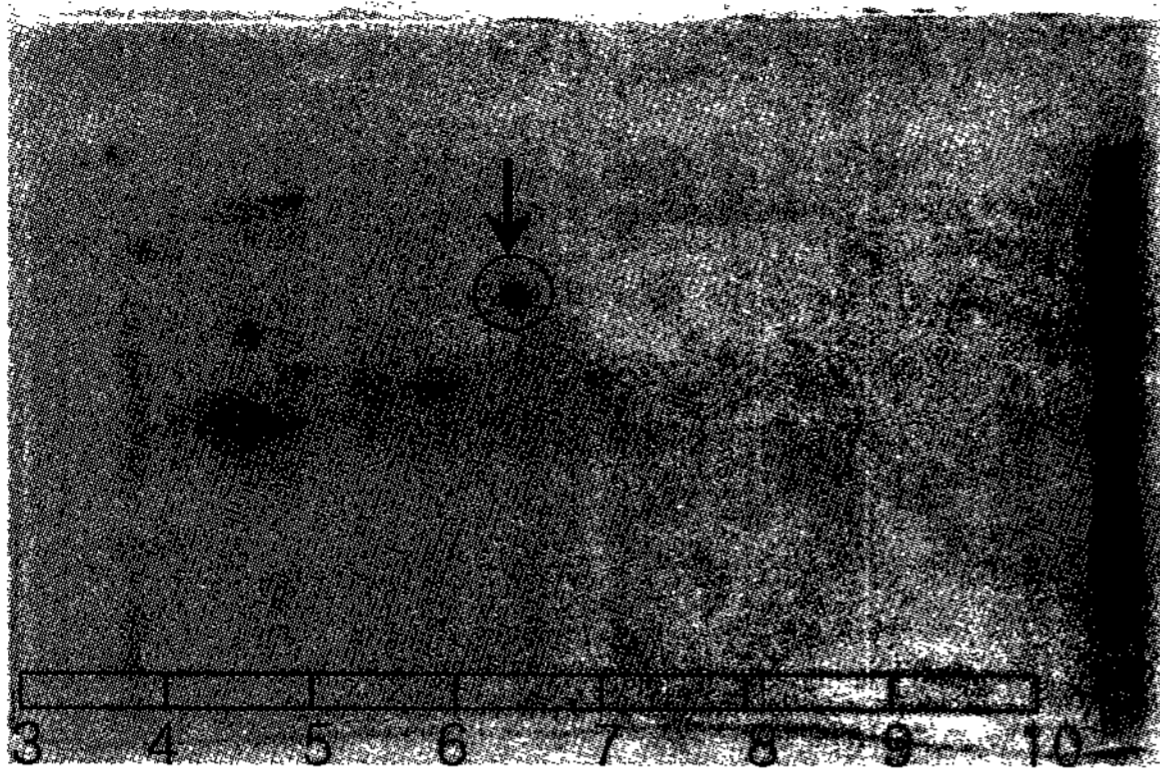


Figure 7. pI estimate measurement test of the melanin breakdown enzyme which 2D-gel uses.

단백질 sequence에 의한 degenerate 프라이머 합성 및 유전자 확보는 한국기초과학지원연구원에서 단백질의 N-terminal 서열 분석의 결과를 토대로 하여 degenerate primer를 합성하였으며, 합성한 primer의 서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. The synthesis order sequence due to degenerate primer protein qualities

Forward primer	① TCN CGN TTY CAR TCN CTN CTN ACN TTY ATH ② AGY CGN TTY CAR TCN CTN CTN ACN TTY ATH ③ AGY AGR TTY CAR TCN CTN CTN ACN TTY ATH ④ AGY AGR TTY CAR AGY CTN CTN ACN TTY ATH ⑤ AGY AGR TTY CAR AGY TTR CTN ACN TTY ATH ⑥ AGY AGR TTY CAR AGY TTR TTR ACN TTY ATH ⑦ AGY AGR TTY CAR AGY TTR TTR ACN TTY ATH ⑧ WSN MGN TTY CAR WSN YTN YTN ACN TTY ATH
Reverse primer	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT

** R=A+G, Y=C+T, M=A+C, S=G+C, W=A+T, H=A+T+C, N=A+G+C+T

Table 2. Gene sequence of the melanin breakdown enzyme

TCGAGGTTCCAGTCGTTGCTTACCTTCATCACCATCTCCCTCGTCGCGGTTGCTCATGCGGCGGTTGGCCCTGTCGCCGACCTCACCATCACCGACGCGGCGGTCAGCCCTGACGGTTCTCTCGCCAGGCTGTTGTGGTGAACGGCGTCACCCCTGGACCGCTCGTTGCGGGCAACATTGGGGACCGCTTCCAGCTCAACGTCATTGACAACTTGACGAACCATACCATGCTCAAGTCGACCAAGTATCCACTGGCACGGCTTCTTCCAGCATGGCACGAACTGGGCTGATGGTCCGGCGTTCATTAACCAGTGCCCTATCTCTCTGGGCACTCGTTCTTGTACGACTTCCAGGTACCTGACCAAGCCGGTACCTTCTGGTACCACAGTCACTTGTGCGACCCAGTACTGTGATGGTTTGGGGGCCCCCTTCGTTGTCTACGACCCGAAACGATCCCCATGCCAGCCGCTACGACGTCGACAACGACGACCGGTCATTACTCTGGCCGACTGGTATCATAACCGTGCACAGGTACGGTCCCGGTTCCCGTGGTTCGCCGACGCGCTACATCAACGGCAAGGGCCGCTTCCAGTGACACTACCGCCGAGCTGTCGGTTGATCAAGGTACGAAGGGCAAACGCTACCGTTTCCGCTTGGTCTCGCTGTCATGCGTCCCCAACCATACCTTCAGCATTGATGGTCACTTACTGACTATCATCGAGGTCGACAGTGTCAACTCCAGCCGCTGGAGGTTGACTCCATCCAGATCTTCGCGGCGCCACGTAACCTCTTCGTGCTGGATGCCAACCAGCCGTCGACAACACTGATGATCGGGCCAAACCCAACTTCGAAATGTTGGATTTCGACGGGGGTATCAACTCGGCCATCTGCGCTATGACGGCCGCGCCGCTGTCGAGCCACCACGAACCAGACTACCTCCGTTAAGCCGCTGAACGAGGTCGACCTGCACCCTCTTGTCTTACCCCGGTGCGCCGCAAGTCTTTCGTCGCGGAGCGTGACAAGGCGATCAACATGGCTTTCAACTTAAATGGCTCCAACCTTCTTCATCAACGGCGCCAGTCGTCGCCGCCACCCTGCCTGCTCCTCCAGATTCTCAGTGGTGCACGACGGCGCAGGACCTCCTGCCCTCCGGCAGTGATACGTCCTTCCGTCGAACCGGTCATTGAGATCTCGTTCCCCGCTACCGCCGCCGCCCCGGTGGTGTCCCCATCCCTTCCACTTGCACGGTACACTTTCGCTGTTGTGCGCAGCGCCGCGCAGCACCGTGTACAACACTACGACAATCCCATCTCCGTTGGCGTGTGAGCCCCAGGTACCCCTGCAGCGGAGACGTCACCATCCGCTTCGACACCAACCAACCCGGCCCGTGGTTCCTCCACTGCCACATCGACTTTCACTTGGAGGGTGGCTTTCGCGTGTGATGGCTGAGGATACTCCGGACGTACAGGCTGCAACCCGTTCTCAGGCGTGGTCCGACCTGTGCCGACCTACGACGCGCTCGACCCCAACGACCAG

Table 3. Protein sequence of the melanin breakdown enzyme

SRFQSLTFTISLVAVAHAAVGPVADLTITDAAVSPDGFSRQAVVVNGVTPGPLVAGNIGDRFQLNVIDNLNHTMLKSTSIHWHGFFQHGTNWADGPAFINQCPISPGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVYVDPNDPHASRYDVDNDDTVITLADWYHTAAKVRSPVPPVADAVYINGKGRFPVTLPPSCRLIKVTKGKRYRFRLVLSLSCVPNHTFSIDGHNLTIEVDSVNSQPLEVDSIQIFAAPRNSFVLDANQAVDNYWIRANPNFNGVFDGGINSAILRYDGRPAVEPTTNTQTSVKPLNEVDLHPLVSTPVRRKSFVRSVTRRSTWLSLMAPTSSSTAPVVPPTVPVLLQILSGAQTADLLPSGSVYVLPNSASIEISFPATAAAPGAPHPFHLHGHTFAVVRSAAGSTVYNYDNPIFRGVVSPGTPAARDVTIRFDTNQPGPWFLHCHIDFHLEGGFAVVMMAEDTPDVQAVNPVPQAWSDLCPYDALDPNDQ

멜라닌 분해효소의 유전자 획득을 위한 PCR 산물을 1% agarose gel에 전기영동 결과 유전자를 획득할 수 있었다.

pBluescript II KS+벡터의 Sma I 제한효소를 처리하여 PCR 산물을 클로닝하였다.

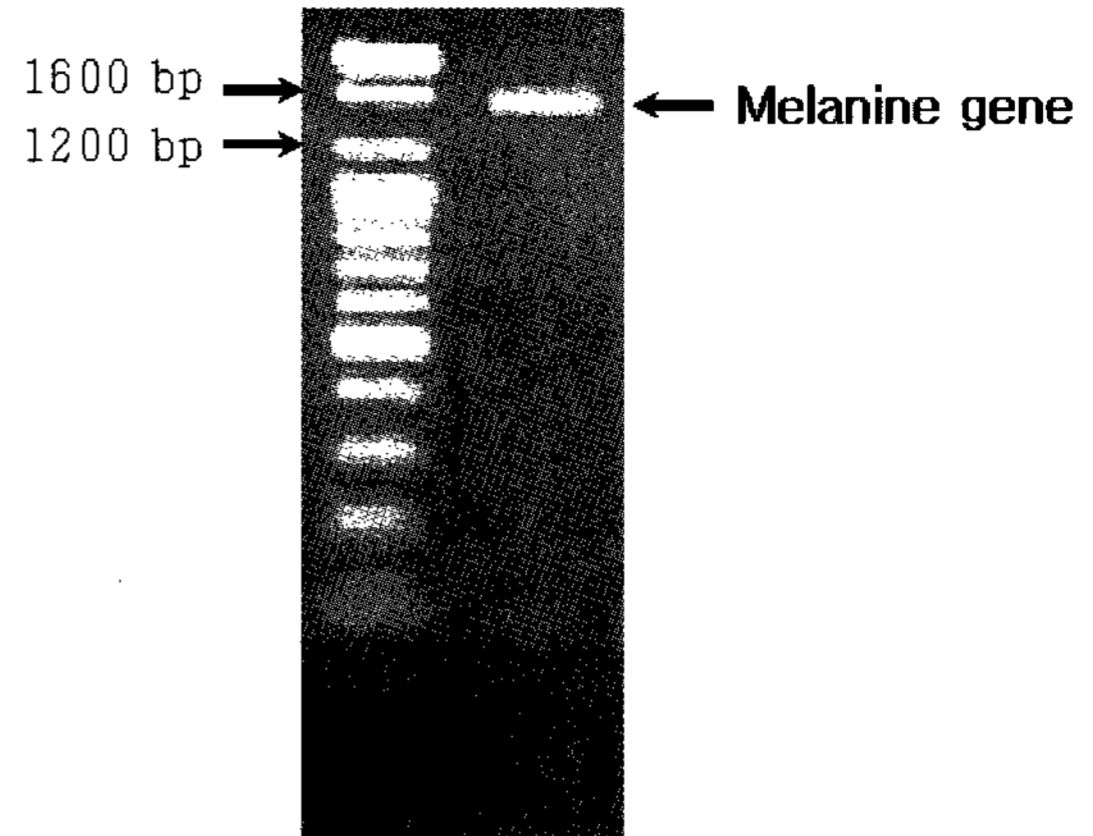


Figure 8. Capillary electrophoresis outcome goods of melanin breakdown enzyme relation gene.

확인된 멜라닌 분해효소의 sequence 확보를 위하여 클로닝된 벡터를 T7 primer binding site와 KS primer binding site의 univerisal primer를 이용하여 유전자 서열을 분석하였으며, 이 결과로 단백질의 서열을 알 수 있었다. 분석된 유전자 서열과 단백질 서열을 Table 2, 3에 나타내었다.

멜라닌 분해효소 생산을 위한 진균류의 배양방법 확립

멜라닌 분해효소의 활성에 미치는 배지종류 중 복합 배지 영향에 대한 실험 결과 복합배지 중 malt extract 3% 배지 (M 배지)에서 분해효소활성이 가장 좋은 것으로 나타났다.

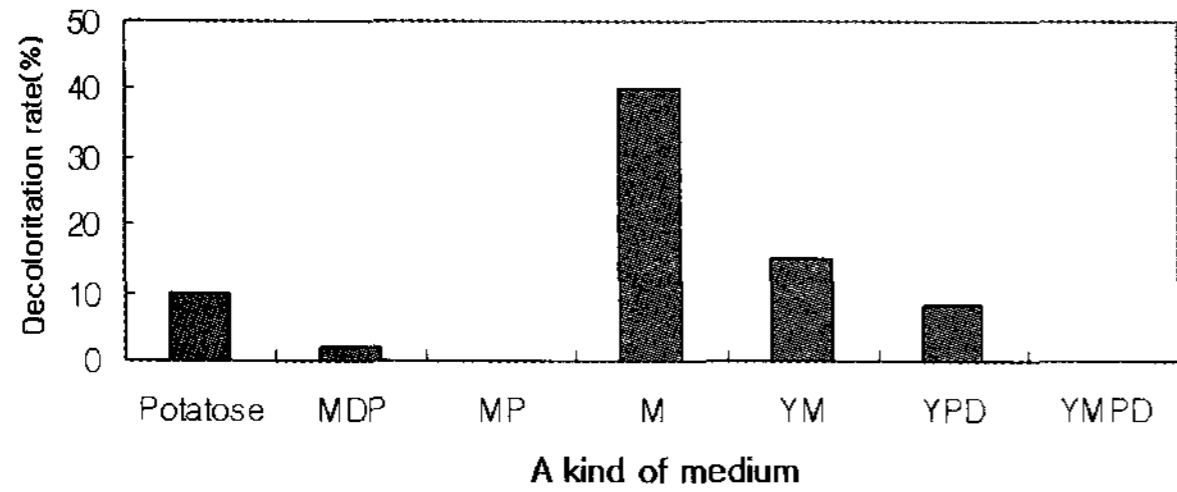


Figure 9. Activity of the melanin breakdown enzyme test which it follows in composition medium type.

멜라닌 분해효소의 활성에 미치는 배지종류 중 제한 배지 영향에 대한 실험 결과 ammonium tartrate 0.4% : glucose 2%에서 가장 분해 활성이 높았고 malt extract 30 g/L에서 배양한 것에 비해 약 60%의 활성을 보였다.

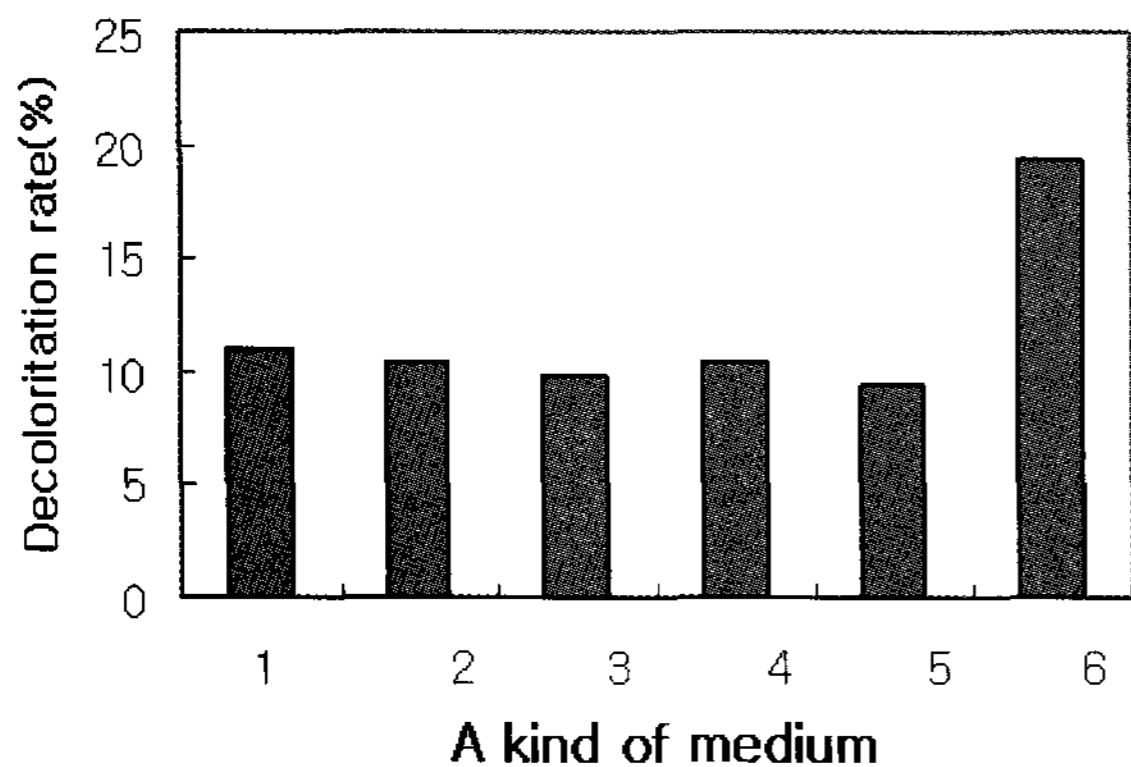


Figure 10. Activity of the melanin breakdown enzyme which it follows in restricted medium type test. Medium condition (1) ammonium tartrate 0.8% : glucose 4%, 2) ammonium tartrate 0.4% : glucose 4%, 3) ammonium tartrate 0.04% : glucose 4%, 4) ammonium tartrate 0.8% : glucose 6%, 5) ammonium tartrate 0.8% : glucose 2%, 6) ammonium tartrate 0.4% : glucose 2%.

멜라닌 분해활성에 미치는 Yeast extract의 영향을 알아보기 위하여 선별된 최적 제한배지에 yeast extract를 소량 첨가하여 효소 활성을 높이려고 하였다. 10배 농축 후 분해 활성을 측정 한 결과 yeast extract를 0.1%첨가한 배양배지의 경우가 첨가하지 않은 배지보다 약 280%의 활성 증가를 보였고, malt extract 30 g/L 배지 (상기 M배지)에서 배양한 것에 비해 활성이 약 150% 높았다.

멜라닌 분해효소의 활성에 미치는 배양시간의 영향은 48-120시간 동안의 배양에는 멜라닌 분해활성이 균체의 DCW (dry cell weight, 건조균체중량)에 비례하게 증가하여 cell의 농도에 비례하게 활성이 보였으나 120시간 이후에는 오히려 단위 DCW대 멜라닌 분해 활성의 비가 감소함을

알 수 있었다. 멜라닌 분해효소의 활성에 미치는 최적의 배양시간의 영향을 실험한 결과 단위 배양액의 멜라닌 분해활성은 120시간에서 멜라닌 분해활성이 가장 좋은 것으로 나타났다. 120시간에서는 건조균체농도가 최대값인 6 g/L을 나타내었고, 이때 효소의 활성 또한 최대값을 나타내었다.

단위배양 부피당 균체의 생산량을 늘리는 것에 초점을 두고 batch 방법으로 배양할 경우 단위 배양액 당 멜라닌 분해효소가 최대 활성을 보이고 균체의 농도 또한 최대값을 갖는 120시간을 최적의 배양 시간으로 구하였다.

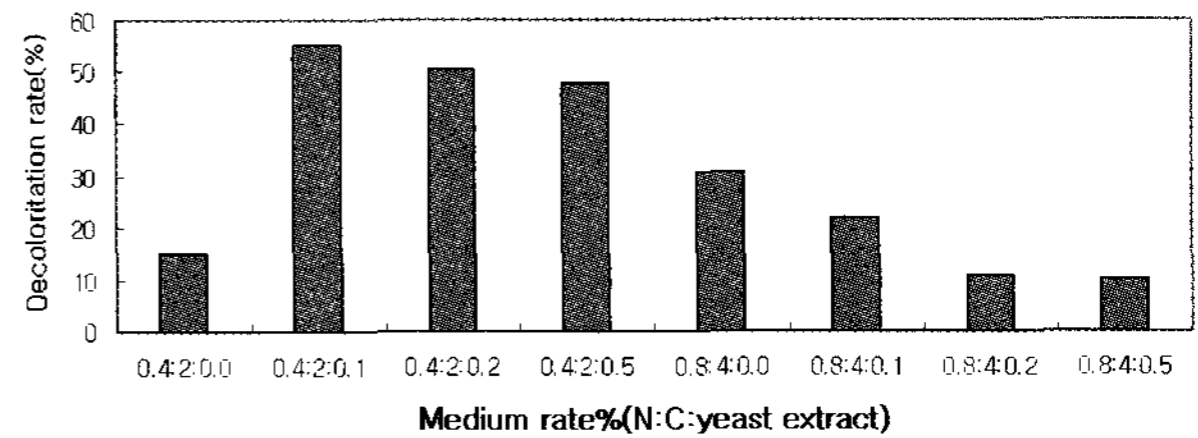


Figure 11. It followed in melanin breakdown activity yeast extract effect test.

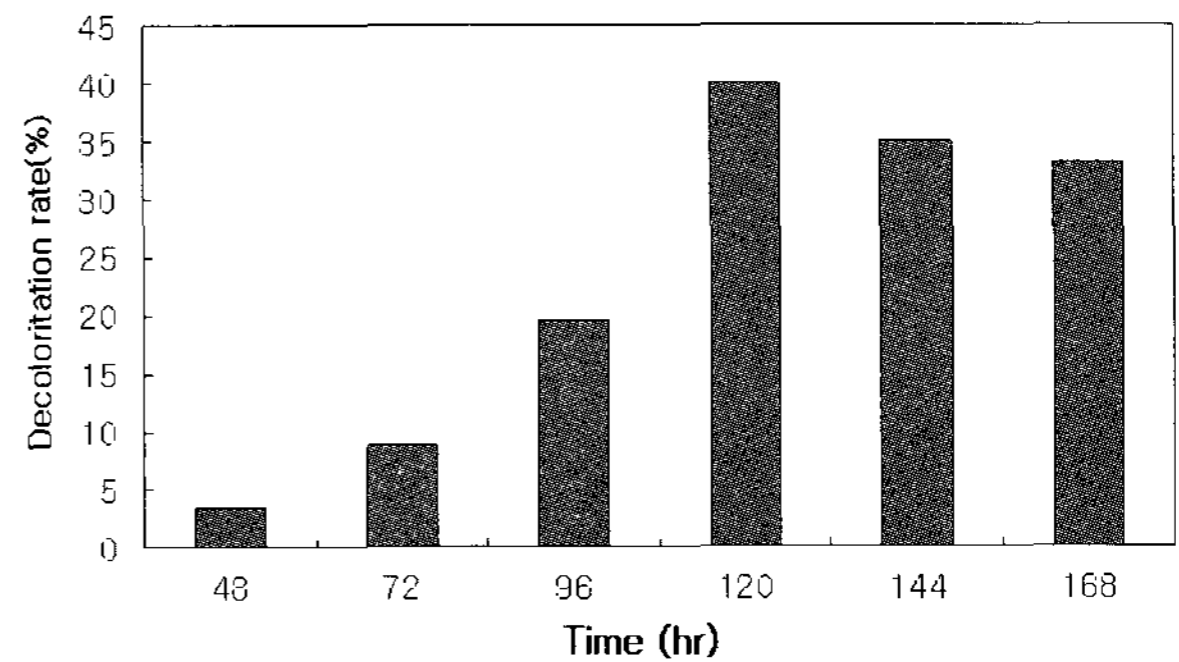


Figure 12. The cultivation hour test which it follows in activity of the melanin breakdown enzyme.

진균류의 성장에 미치는 배양온도의 영향은 실험한 온도 중 24℃에서 배양한 경우 120시간대에 건조균체중량이 최대값을 보이며 이때 DCW가 약 6 g/L였다. 26℃에서 배양한 경우에는 24℃에서 배양한 경우와 거의 비슷한 경향을 보였다. 반면 20℃에서 배양한 경우는 4.7 g/L의 건조균체중량을 보이며 24-26℃에서 보인 최대 건조균체중량의 약 78% 수준이었고, 30℃에서 배양한 경우는 약 4 g/L의 건조균체 중량을 보이며 24-26℃에서 보인 최대 건조균체 중량의 약 67% 수준이었다.

이로써 멜라닌 분해효소를 생산하는 진균류의 최적 배양온도는 24-26℃ 사이의 중간값이 25℃로 정하였다.

24-26℃에서는 진균류의 DCW가 차이가 거의 없음을 확인하였으며 24℃ 이하에서 배양하거나 26℃ 이상에서 배양한 경우에는 24-26℃에서 배양한 경우에 비해 진균류의 성장이 늦어지는 것을 확인할 수 있었다.

진균류의 성장에 미치는 배양배지의 pH 영향에 대한 실험 결과 pH 5.0에서 배양한 경우 120시간대에 최대 건조균체 중량을 최대값을 보이며 이때 DCW가 약 6.6 g/L였다.

pH 5.5에서 배양한 경우도 pH 5에서 배양한 경우와 거의 비슷한 수준으로 성장하는 것을 알 수 있었다. 그러나 pH 4.5에서 배양한 경우의 건조균체농도는 4.5 g/L로 pH 5.0 ~ 5.5에서 배양한 최대치의 약 68% 수준이었고 pH 6에서 배양한 경우의 건조균체농도는 5 g/L로 pH 5.0 ~ 5.5에서 배양한 최대건조균체농도의 약 76% 수준임을 보였다.

이 결과 배양 배지의 pH가 5.0 ~ 5.5의 경우에서 배양한 경우 진균류 성장에 최적의 배양조건임을 확인할 수 있었다.

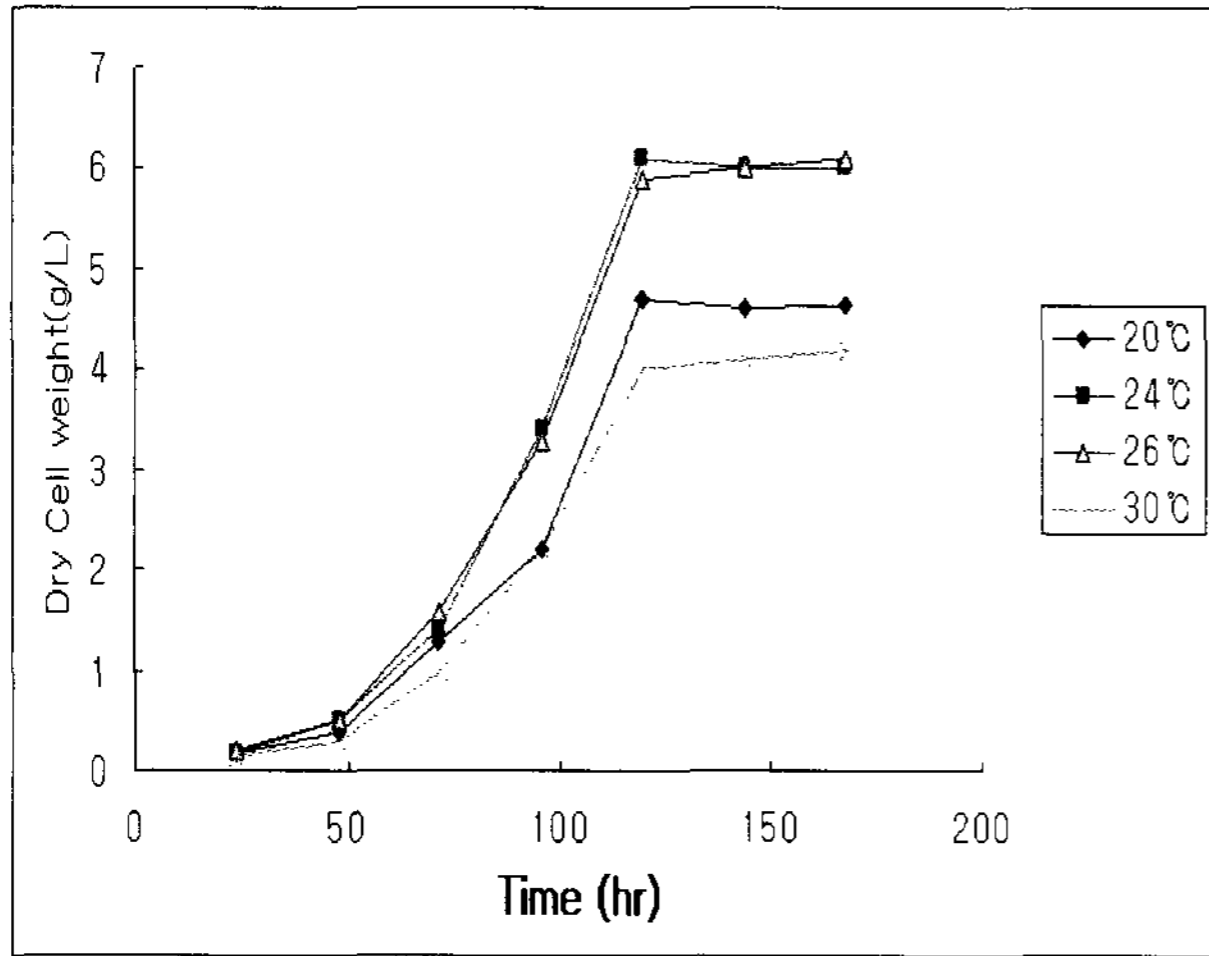


Figure 13. The optimum cultivation temperature test which it follows in eumycetes growth.

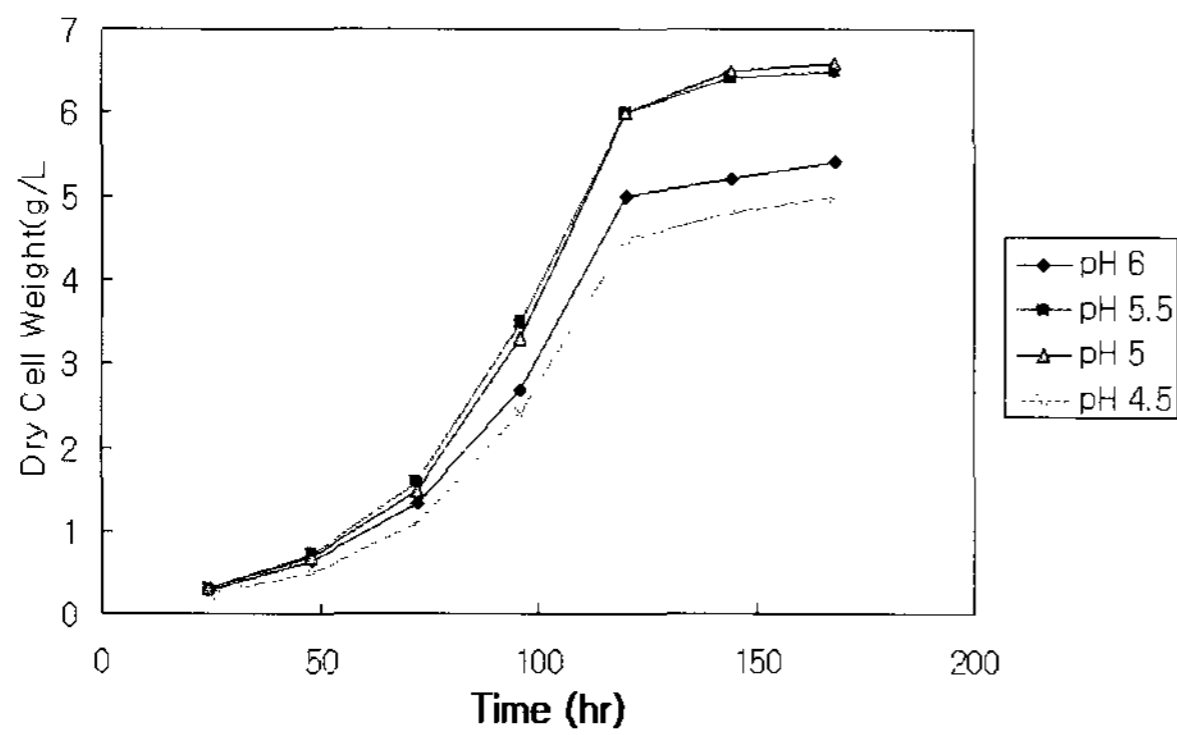


Figure 14. The cultivation medium test which it follows in eumycetes growth optimum pH.

멜라닌 분해효소의 정제과정 최적화

Fig. 15에 보여지는 사진은 ABTS 산화 발색법에 의해 멜라닌 분해효소의 활성을 발색반응에 의해 확인한 사진이다.

1번 sample은 Ammonium sulfate 포화농도 45% 이하에서 침전된 단백질을 ABTS 산화 발색 반응의 발색반응 사진이고, 2번 sample은 Ammonium sulfate 포화농도 45% 이상 65% 이하에서 침전된 단백질을 같은 방법으로 발색반응시킨 사진이다. 그리고 3번 sample은 Ammonium sulfate 65%에서 침전되지 않고 남은 단백질에 대한 ABTS 산화 발색 반응을 확인하였다. 2번 sample에서 보여지는 바와 같이

멜라닌 분해효소의 활성을 확인하면서 염색에 의한 단백질을 회수하였다.

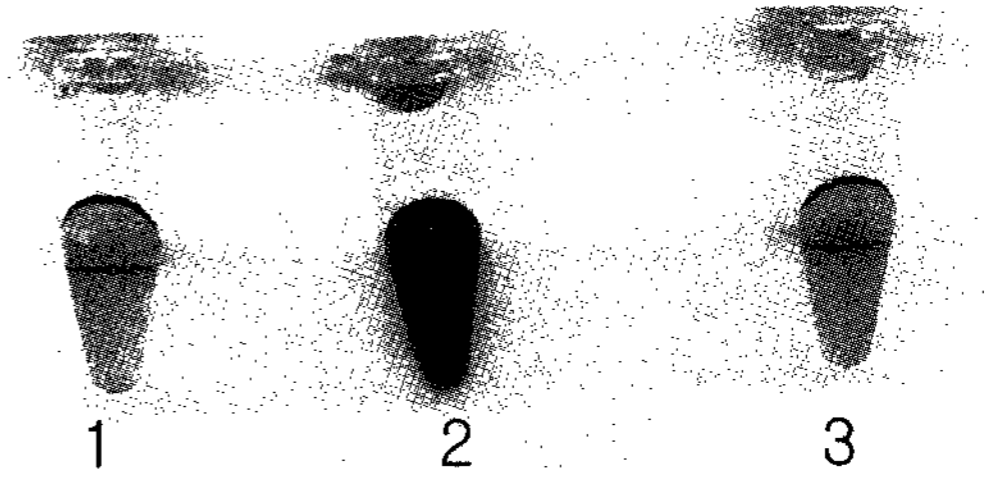


Figure 15. Active color reaction of melanin breakdown enzyme test.

정제 후 단백질 분석을 위하여 12% SDS-PAGE를 이용하여 정제된 멜라닌 분해효소의 분석 결과는 Fig. 16과 같다.

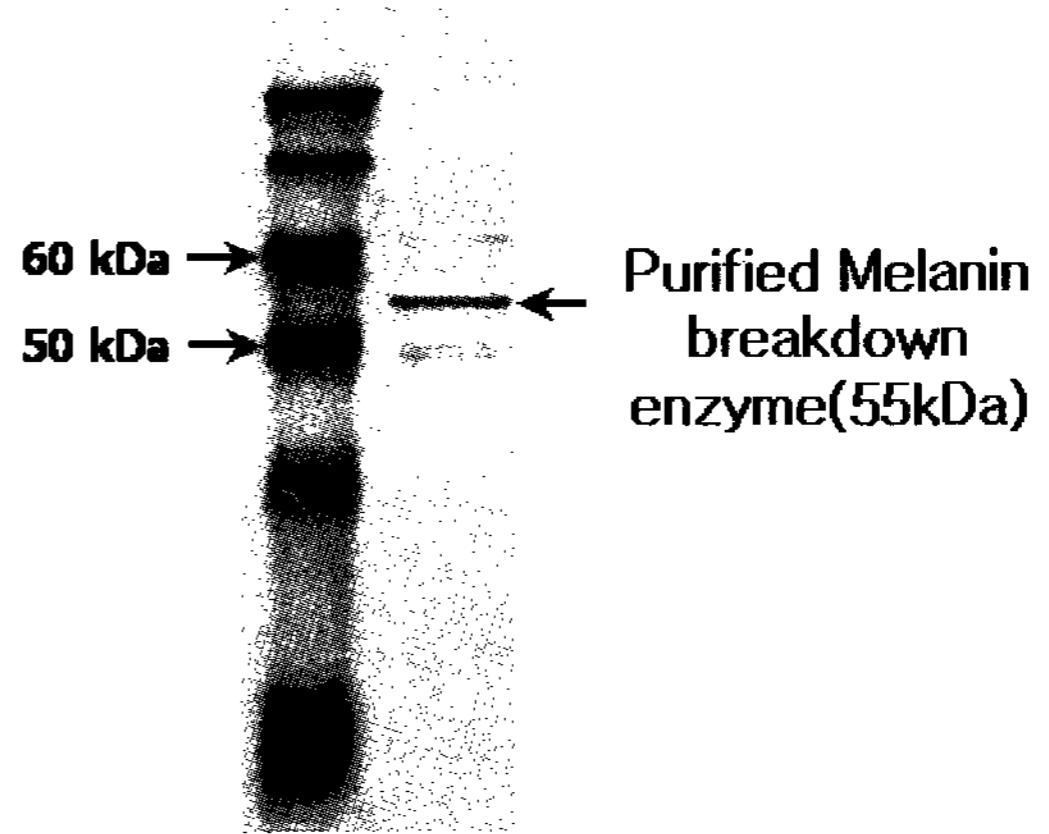


Figure 16. The purified Melanin breakdown enzyme analysis that used 12% SDS-PAGE.

정제된 멜라닌 분해효소를 이용하여 멜라닌 분해속도를 측정한 결과 최대 7 mg/h의 속도로 멜라닌이 분해됨을 알 수 있었다.

Scale-up

5 L fermenter에서의 산소공급의 효과는 main fermentation이 시작된 지 7일이 지난 시점에서 DCW 18 g/L의 진균류를 배양할 수 있었다. 이후 5 L fermenter 조건을 응용하여 500 L fermenter로의 Scale up 실험에 적용하였다. 산소를 이용하지 않는 경우 16 g/L의 건조균체중량을 보였는데 이 결과로 미루어 상업적으로 사용하기에 고순도 산소를 사용하는 방법은 경제성이 없는 것으로 판단하였고, scale-up 실험에서는 air를 사용하여 배양하였다. 500 L fermenter 진균류의 고농도 배양 결과 main fermentation이 시작된 지 7일이 지난 시점에서 DCW 14.5 g/L의 진균류를 배양할 수 있었다. 이때 배지 중에 분비 생산된 melanin 분해효소의 양은 300 mg/L에 달하였다.

멜라닌 분해효소의 formulation

멜라닌 분해효소를 효율적으로 피부로 전달시키기 위하여 50-100 nm 크기로 encapsulation을 실시하였다. 멜라닌 분해효소의 Solubility test 및 Micelle Formation 결과 Size (PCS)는 1. 70 nm, 2. 100 nm를 측정하였다. 이러한 실험으로 현재 70-100 nm size의 멜라닌 분해효소 encapsulation된 bead를 얻을 수 있었다.

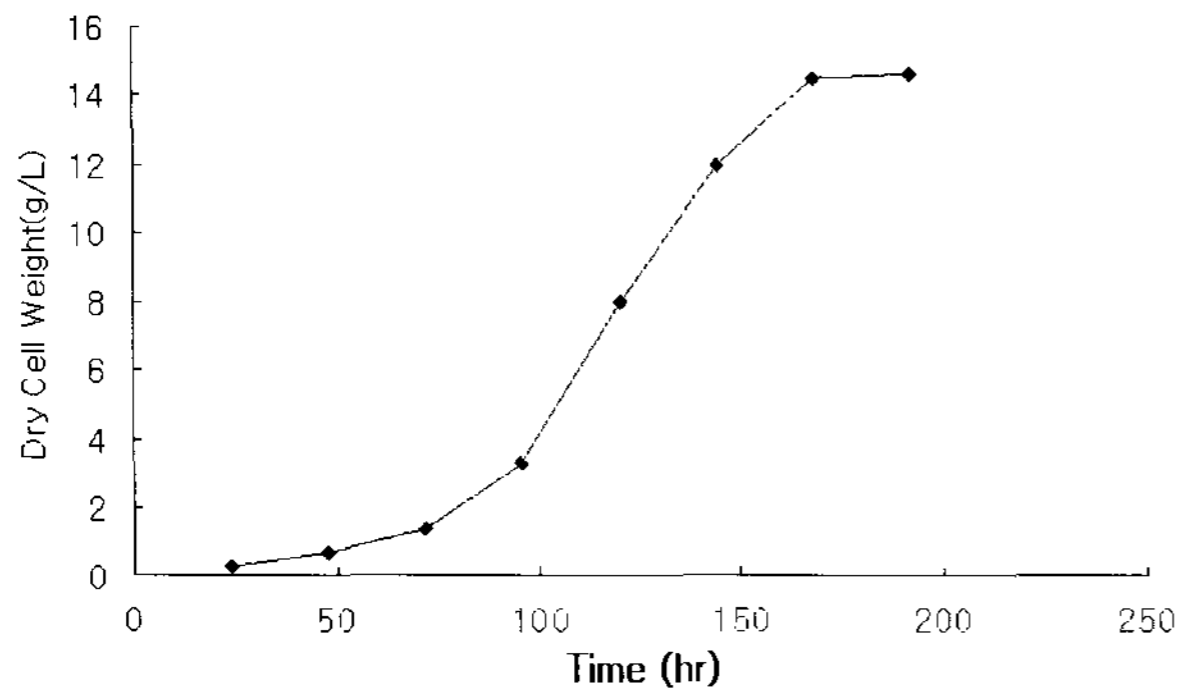


Figure 17. Eumycetes peak concentration cultivation test which it follows at hour.

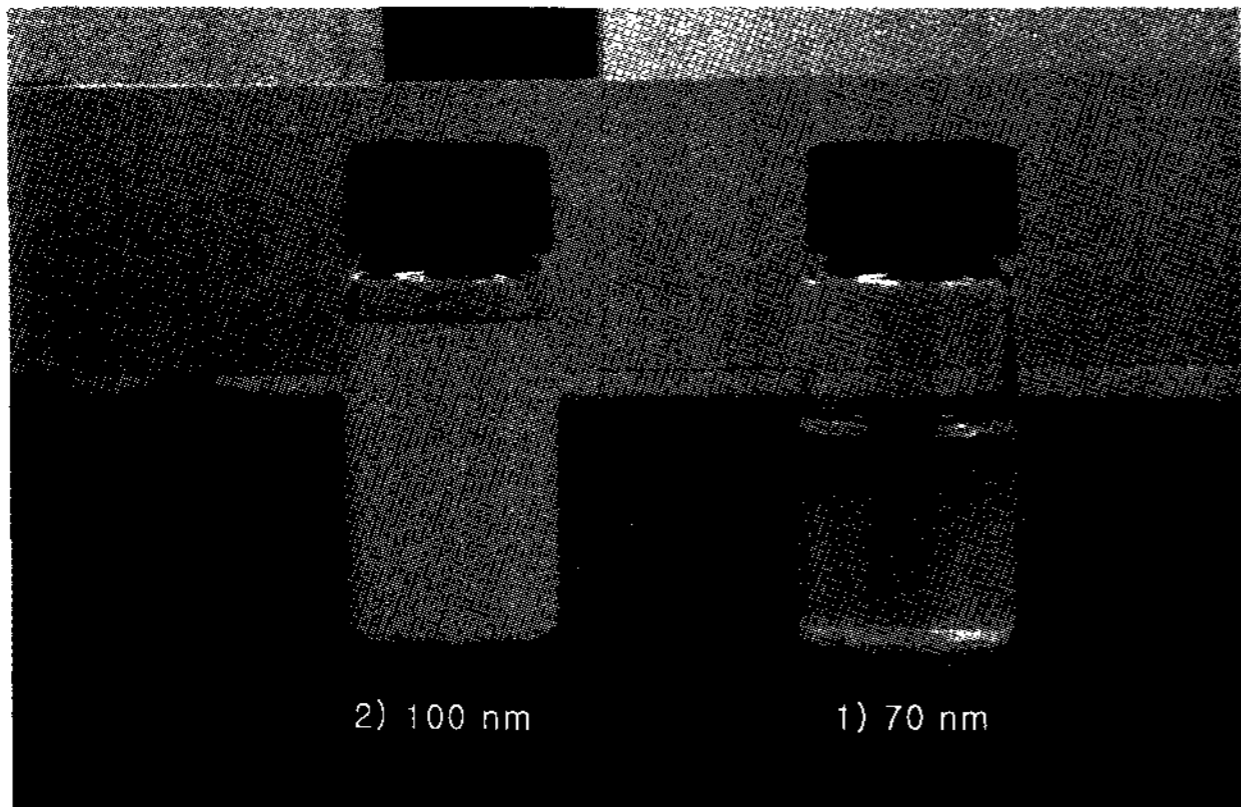


Figure 18. Encapsulation test of Melanin breakdown enzyme.

요 약

진균류 추출물로부터 신규 멜라닌 분해효소의 분리 및 분해능 test는 멜라닌 분해효소의 균사체 배양 상등액으로 분비 생산됨을 분해능 테스트를 통하여 확인하였고, 이 분해효소에 의한 멜라닌 분해반응은 pH 7에서 가장 높고, 30℃에서 가장 안정함을 확인하였다. 멜라닌 분해 효소의 characterization은 2D-gel을 이용하여 멜라닌 분해효소 중 한 가지 효소의 pI값이 약 6.5이고 Molecular weight는 약 54-57 kDa임을 알 수 있었고, 정제된 멜라닌 분해 효소의 전체적인 단백질 및 유전자 서열을 분석하여 degenerate primer를 합성하였으며, RT-PCR 법을 이용하여 유전자를 확보하였다. 멜라닌 분해효소 생산을 위한 진균류의 배양 방법 확립은 멜라닌 분해효소가 최대 활성을 갖는 배지 조건은 ammonium tartrate 0.4% : glucose 2% 배지에 yeast

extract를 0.1%를 첨가한 배지임을 확인하였고, 진균류의 최적 배양온도는 24-26℃였으며, 이 때 건조 균체 중량으로 약 6 g/L의 균체를 얻을 수 있었다. 또한 진균류 성장의 최적 pH는 약 5.5로서 이 경우 건조균체중량이 약 6.6 g/L였다. 정제공정은 최적화를 통하여 멜라닌 분해효소의 정제 순도 90% 이상의 정제공정을 확립하였다. Scale-up은 5 L fermenter를 이용한 기초 배양공정을 확립하여 500 L fermenter로의 경제성 있는 scale up에 성공하였고, 이 때 건조균체중량 약 14.5 g/L의 진균류를 얻었으며, 배지 중에 분비 생산된 melanin 분해효소의 양이 300 mg/L에 달하였다. 멜라닌 분해효소의 formulation은 멜라닌 분해효소를 효율적으로 피부로 전달시키기 위하여 50-100 nm 크기로 encapsulation을 실시하여 70 nm, 100 nm size의 nano capsule을 얻었다.

본 연구는 tyrosinase 저해제가 갖는 부작용이 없어 생체 친화적 물질에 의한 부작용 감소 효과가 기대되며, 독자적 기술에 의한 고부가 미백용 화장품 원료 확보로 새로운 기능에 의한 신규시장 창출이 가능하여 미백용 기능성 화장품 원료로서 고부가 화장품에 사용되어 수입대체효과 및 기업의 매출증대 효과가 있을 것으로 기대되어진다.

감 사

본 연구는 “[멜라닌 분해능을 지닌 미백용 기능성 화장품 원료의 개발]에 관한 중소기업 기술 혁신 개발 사업” 및 “2004년도 한남대학교 학술연구 조성비” 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Swamy, J. and J. A. Ramsay (1999), The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes, *Enzyme Microbe Technol.* **24**, 130-137.
- Ratto, M., M. Chatani, A.-C. Ritschkoff, and L. Viikari (2001), Screening of micro-organisms for decolorization of melanins produced by bluestain fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 210-213.
- Chinshuh, C., Jan-Lin Chen, and Tse-Yang Lin (1996), Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production, *Enzyme and Microbial Technology* **21**, 91-96.
- 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.
- Hurd, R. E. and B. K. John (1991), Gradient-enhanced proton-detected heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **91**, 648-653.
- 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.
- Willker, W., D. Leibfritz, R. Kerssebaum, and W. Berml (1993), Gradient selection in inverse heteronuclear collection spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.* **31**, 287-292.