

방선균 F-97에 의한 Tyrosinase 저해제 생성 최적 배양 조건

방병호 · 이문수¹ · 김진오² · 이동희^{2*}

울지대학교 식품과학부, ¹한국생명공학연구원, ²전국대학교 미생물공학과

Received April 2, 2007 / Accepted May 28, 2007

Optimal Culture Conditions on the Tyrosinase Inhibitor Production by Actinomycetes F-97. Byung Ho Bang, Moon Soo Rhee¹, Jin O Kim² and Dong Heui Yi^{2*}. *Division of Food Science, Eulji University, 212, Yangji-dong, Sujeong-gu, Sungnam-si, Gyeonggi-do, 461-713, Korea, ¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea, ²Department of Microbial Engineering, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-Gu, Seoul 143-701, Korea* – A Actinomycetes F-97 producing tyrosinase inhibitor was isolated from soil samples. The optimum culture condition for tyrosinase inhibitor production was investigated and the results were as follows. The best carbon source for tyrosinase inhibitor production was shown as soluble starch, the optimum concentration was 3.0%. The best nitrogen source for tyrosinase inhibitor production was shown as peptone, the optimum concentration was 0.36%. As effect of metal ions on the production of tyrosinase inhibitor, K₂HPO₄ was shown the best and the optimum concentration was 0.1 mM. The optimum pH and temperature was shown 7.0 and 30°C, respectively. And the highest tyrosinase inhibitor production was observed at 70 hr cultivation under optimum conditions in jar fermentor scale.

Key words – Melanin, Tyrosinase, Tyrosinase inhibitor, Actinomycetes

서 론

멜라닌(melanin)은 동·식물계와 미생물계에 널리 존재하는 고분자의 천연 색소로 생물체에 따라 다양한 종류가 알려져 있다[6,14]. 피부에 존재하는 흑갈색 알갱이의 멜라닌 색소는 피부 외에도 털, 눈 등에도 존재한다. 사람의 피부에서는 자외선 조사 등에 의한 피부손상에 대항하는 기작으로 생합성이 촉진된다[20]. 멜라닌은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인물질로 알려져 있으며, 이의 과잉 생성이 기미, 주근깨, 피부 반점 등을 유발하며 멜라닌 전구물질의 독성으로 인한 세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다[3]. 멜라닌의 생합성은 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)라는 세포에서 효소 및 비효소적 산화반응에 의해 tyrosinase로부터 생성되며 멜라닌은 알칼리 용해도 및 발색 특성에 따라 eumelanin과 pheomelanin으로 구분하거나 물리적, 화학적으로 특성이 유사한 trichochrome을 포함하여 크게 3종류로 분류하고 있으나 생합성 경로는 모두 tyrosine으로부터 tyrosinase에 의해 촉매되는 dop-aquinone을 거쳐 합성이 이루어지며 이후 아미노산 혹은 단백질 중합반응에 의해 최종적으로 멜라닌이 합성된다[4].

멜라닌의 양에 따라 피부색이 결정되는데, 멜라닌의 양이 많을수록 검은 피부색을 띤다. 인종마다 피부색이 다른 것은 멜라닌세포의 수가 다르기 때문이 아니라, 멜라닌세포의 크

기와 만들어지는 멜라닌의 양이 다르기 때문이다.

멜라닌 생합성 과정에서 한가지 효소만이 유일하게 관여하므로 멜라닌 합성을 억제하는 방법으로 화장품 업계에서는 tyrosinase 저해제를 탐색하고 응용해 왔다. 현재 tyrosinase 저해제가 미백에 관련된 화장품이나 의약품 생산의 증가에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[7]. 지금까지 알려진 tyrosinase 저해제로는 ascorbic acid, arbutin, benzoic acid, azelic acid 등으로 그 중에서도 특히, arbutin은 미백용제로 널리 쓰이고 있다[4,14]. 그러나 피부 안정성, 제형안정성, 경제성 등을 고려하여 제한된 양만 사용되고 있다. 최근에는 여러 가지 안정성과 생활 수준 향상과 더불어 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 천연물을 이용한 미백제의 개발과 관련된 연구가 진행되고 있다. 즉, 고구마[14], 도깨비부채 뿌리[3], 감초[15], 치자[10], 쑥[9], 솔잎[17], 울피[19] 등 천연물질로부터 tyrosinase 효소활성 저해제 개발에 대한 연구가 활성화되고 있다.

본 연구에서는 독성이 적고, 활성이 높으면서 안전한 새로운 저해제를 미생물을 대상으로 얻고자 tyrosinase 저해제를 강하게 분비하는 방선균 F-97을 분리하였으며 이 균이 생성하는 최적 조건을 검토한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균의 분리

전국 각지의 토양 시료를 채취하여 Suzuki[18], 권 등[11]이 사용한 방선균 분리 방법을 사용하여 방선균 1,000 여주를 순수분리하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-2-450-3522, Fax : +82-2-3437-8360

E-mail : dhyi@konkuk.ac.kr

Tyrosinase 저해제의 생산균주 1, 2차 선별

Tyrosinase 저해제 생산 균주의 선별을 위하여 100 ml 삼각 flask에 Table 1의 기본배지(액체배지)를 20 ml씩 분주하고 121℃에서 15분간 가압 멸균한 후 순수 분리된 균주를 1백금이 접종하여 30℃에서 4일간 180 rpm에서 진탕배양하였다. 배양 후 배양액을 거름종이(Whatman No. 2)로 거른 후 tyrosinase에 대한 저해활성을 측정하여 상대저해활성이 50% 이상인 균주 10주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주 중 고유 형질이 안정한 균주를 얻기 위하여 단세포주(monoclonal)를 분리하였다[16]. 선별된 균주를 Table 1의 균 선별용 평판배지로 3분 도말법을 이용하여 단일 콜로니를 분리한 후 각각의 콜로니를 다시 선별용 액체배지를 사용하여 30℃에서 4일간 진탕배양하였다. 배양 후 배양액을 거름종이로 거른 후 tyrosinase에 대한 저해활성을 측정하였다. 각 단세포주들의 tyrosinase에 대한 저해활성이 정규 분포를 이룰 때 까지 natural selection을 하여 저해활성이 가장 높은 균주 F-97을 최종 선별하였다.

선별 균주의 포자 현탁액 제조 및 보존

순계분리된 선별균주를 Table 1의 선별용 사면배지(Ø15 mm test tube)에서 30℃, 7일간 배양한 후 1% glycerol이 첨가된 살균수 3 ml을 넣고 백금으로 포자를 현탁한 후 약 10분간 초음파에서 처리하였다. 제조된 포자현탁액은 -60℃ deep freezer(SamWon Co.)에서 보관하였고, 이 후 실험의 접종원으로 사용하였다.

Mushroom tyrosinase에 대한 저해활성의 측정

Tyrosinase에 대한 저해활성은 검체 15 µl를 microplate(96 well)에 넣고, 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 150 µl와 3 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℃에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices, Emax)를 사용하여 490 nm에서 측정하였다. Tyrosinase에 대한 저해율(%)은 다음 식에 의하여 계산하였다[13].

Table 1. Composition of basal medium for screening and production of a microbial tyrosinase inhibitor

Composition	Concentration(%)
Soluble starch	2.0
Yeast extract	0.3
Peptone	0.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
K ₂ HPO ₄	0.01
Agar	1.8
pH	7.0±0.2

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

- A : 저해제를 넣은 것의 반응 전의 흡광도
- B : 저해제를 넣은 것의 반응 후의 흡광도
- C : 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전의 흡광도
- D : 저해제를 넣지 않은 것의 반응 후의 흡광도

Tyrosinase 저해제의 생산

플라스크 배양

Tyrosinase 저해제의 생산 조건을 검토하기 위하여 100 ml의 삼각 플라스크에 Table 1을 기본 액체배지로 하고, 여기에 포자현탁액 2 µl/ml의 농도로 접종하여 180 rpm에서 진탕배양하면서 각종 탄소원, 질소원, 무기염, 인산염의 농도 등이 tyrosinase 저해제 생산에 미치는 영향을 검토하였고, 배양 최적 초기 pH 및 온도를 조사하였다.

균체량의 측정

배양액을 거름종이(Whatman No. 2)로 거르고 증류수로 충분히 세척한 다음 105℃에서 24시간 건조 후 건조 중량을 측정하여 dry cell weight(DCW)(mg/100 ml)로 나타내었다.

생산 조건의 통계 분석

생산 조건을 분석하기 위한 통계분석은 SAS package(SAS Institute Inc. ; windows 6.12)를 사용하였다. 각종 영양원이 tyrosinase 저해제의 생산에 미치는 영향은 일원배치법을 사용하여 3반복 실험 후 최소 유의차 방법을 다중 비교하였다[20].

생산 조건의 반응 표면 분석

1차 실험 계획은 3개의 독립변수 즉, soluble starch, peptone, K₂HPO₄를 각각 2%, 0.2%, 0.1 mM로 하는 center run 2 반복을 포함하는 Box-Behnken design을 사용하여 실험 하였다[1]. 2차 실험 계획은 soluble starch, peptone 2개의 독립변수를 각각 3.0%, 0.4%로 하는 center run 2 반복을 포함하는 총 10개의 처리조합을 사용하였다[21].

이때의 반응 변수는 tyrosinase 저해제의 생산 역가로 하였으며, 독립변수를 다음과 같이 표준화하여 사용하였다.

- ① 1차 실험계획 독립변수의 표준화

$$X1 = (\text{soluble starch} - 2)/1$$

$$X2 = (\text{peptone} - 0.2)/0.1$$

$$X3 = (\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.1)/0.1$$

- ② 2차 실험계획 독립변수의 표준화

$$X1 = (\text{soluble starch} - 3)/0.5$$

$$X2 = (\text{peptone} - 0.4)/0.1$$

실험 결과에 대한 분석은 반응 표면 분석을 사용하였으며, tyrosinase 저해제 생산이 최대로 나타나는 반응 표면식은 아래(1)과 같은 다중회귀식에 적용시켰다[21].

모든 통계분석은 SAS package(SAS Institute Inc. ; windows 6.12)를 이용하였다. 반응 표면 분석과 회귀분석은 IML procedure를 사용하였으며, model이 적합한가를 조사하기 위하여 적합결여 검정(lack-of fit test)을 수행하였다[21].

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 X_i + \sum_{i=1}^2 X_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (1)$$

Y : response variables
 β_0 : intercept
 β_i, β_j : regression coefficients
 $X_i X_j$: independent variables
 ϵ : random error

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해제의 생산 조건

플라스크 배양

① 탄소원의 영향 : 각종 탄소원의 영향을 검토하기 위해서 Table 1의 기본배지에 각 탄소원의 농도를 2%로 첨가하여 tyrosinase 저해제의 생성율을 검토하였다. 즉, 5탄당으로 xylose, arabinose, 육탄당으로 glucose, fructose, galactose, mannose, 이당류인 lactose, sucrose, maltose 그리고 다당류인 soluble starch와 cellulose를 이용하여 30℃에서 72시간 180 rpm에서 진탕배양한 결과 5탄당을 탄소원으로 했을 때는 거의 tyrosinase 저해제가 생성되지 않았으며, 6탄당과 이당류 등은 soluble starch에 비해서 상대 저해활성이 46%에서 68% 수준으로 낮게 나타났다. 균의 생육은 DCW로 sucrose, galactose 및 soluble starch가 각각 808 mg/100 ml, 766 mg/100 ml 및 741 mg/100 ml로 나타났다(not shown data).

Soluble starch의 tyrosinase 저해제 생성 최적 농도를 알아보기 위해서 1%, 2%, 3%, 4% 및 5%로 첨가하고 조사한 그 결과는 Fig. 1과 같이 3%의 soluble starch 첨가시 저해제 생산이 가장 높음을 알 수 있었다. 이는 방선균이 생산하는 tyrosinase 저해제인 melanostatin[4]과 OH-3984[8]가 glucose에서 최대 생산력을 보인 것과 상이 하였다.

② 질소원의 영향 : 각종 질소원이 균체 증식과 tyrosinase 저해제 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 질소원을 제외한 기본배지에 각종 질소원의 농도가 0.5%가 되도록 첨가하여 30℃에서 72시간 180 rpm에서 진탕배양한 결과, 유기질소 중에서 peptone이 가장 우수한 질소원으로 나타났으며, 무기질소원인 peptone을 상대저해활성을 100%로 했을 때 yeast extract-peptone(3:2) 혼용 시 81%, casein 68%, soybean meal 76%, yeast extract 24%, malt extract 15%, tryptone 12% 순이었다. 무기질소원인 경우 NaNO₂가 75%, NaNO₃ 58%, (NH₄)₂HPO₄ 35%, NH₄NO₃ 13%, (NH₄)₂SO₄

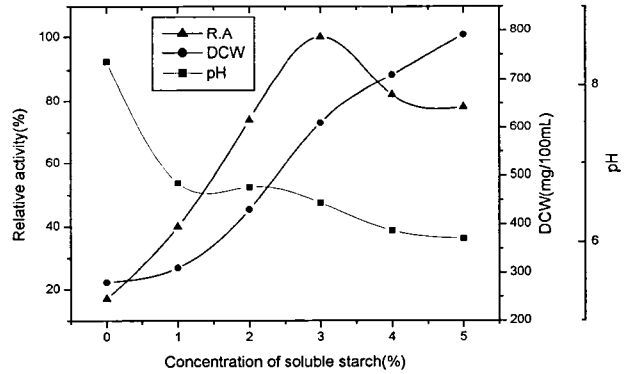


Fig. 1. Effect of soluble starch concentrations on the production of a tyrosinase inhibitor by Actinomycetes F-97. Each concentration of soluble starch was added to basal medium. The cell growth was shown as dried cell weight(mg/100 ml). The tyrosinase inhibition activity ratio was estimated when the maximal activity was set 100. Each point the average of three time.

12%, NH₄Cl 7% 등의 순이었다. 균의 생육은 DCW로 yeast extract, yeast extract-peptone 및 peptone이 각각 553 mg/100 ml, 459 mg/100 ml 및 445 mg/100 ml로 나타났다(not shown data).

Tyrosinase 저해제 생산력이 가장 좋은 peptone의 농도에 따른 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같이 0.4% peptone 첨가시 저해제 생산이 가장 높음을 알 수 있었다. 최소 유의차 검정 결과는 다른 농도와 유의차가 인정되지는 않지만 0.2%에서 0.6% peptone 농도에서 완만한 생산력의 변화를 보였다.

이 등[12]의 Streptomyces sp. 20747이 생성하는 tyrosinase 저해제 생성 시 peptone을 질소원으로 했을 때 7일 후에 최

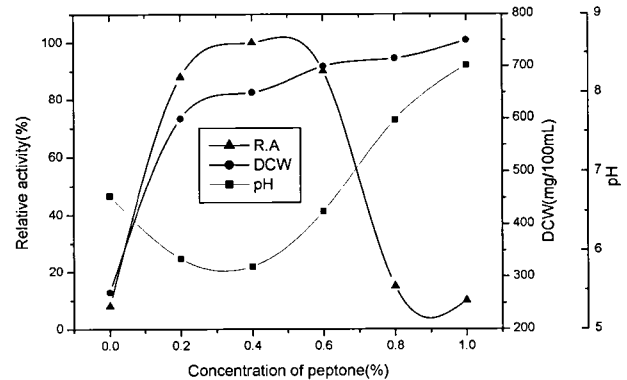


Fig. 2. Effect of peptone concentrations on the production of a tyrosinase inhibitor by Actinomycetes F-97. Each concentration of peptone was added to basal medium. The cell growth was shown as dried cell weight(mg/100 ml). The tyrosinase inhibition activity ratio was estimated when the maximal activity was set 100. Each point the average of three time.

고에 달했다는 보고와 달리, 본 연구에서는 4일이나 빠른 3일 후 최고에 달하였다.

③ 금속염의 영향 : 금속염의 첨가가 균체 증식과 tyrosinase 저해제 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 금속염을 제외한 기본배지에 각종 금속이온 농도가 1.0 mM이 되도록 첨가하여 30°C에서 72시간 180 rpm에서 진탕배양한 결과는 K₂HPO₄ 첨가시 상대저해활성이 100%로 최고 였으며, 그 다음이 CaCl₂, KH₂PO₄, AgNO₃, MgSO₄ · 7H₂O 등이 각각 91%, 89%, 88%, 84%로 tyrosinase 저해활성 생산력을 보였다. Pb(NO₃)₂, MnSO₄ · 4H₂O, Li₂SO₄ · 7H₂O, FeSO₄ · 7H₂O 및 BaCl₂ · 2H₂O는 57%에서 64% 정도의 tyrosinase 저해활성을 나타내었으며, 균의 생육도 K₂HPO₄가 제일 좋았다. MgSO₄ · 7H₂O와 CaCl₂는 유의차가 인정되었으나 KH₂PO₄와 AgNO₃는 유의차가 인정되지 않았다. Komiyama 등[8]과 이 등[13]이 0.5% NaCl을 첨가하여 tyrosinase 저해제를 생산한 것과 달리 F-97 균주는 미량의 NaCl에서도 저해제를 거의 생산하지 않았다(not shown data).

Tyrosinase 저해제 생산성이 가장 좋은 K₂HPO₄의 첨가 농도에 따른 저해제 생산은 Fig. 3과 같이 0.1 mM에서 가장 좋은 생산력을 보였다. 조사한 모든 농도에서 유의차가 인정되고, Fig. 3과 같은 형태의 급격한 저해제 생산력의 변화를 보이는 것으로 보아 미량의 K₂HPO₄ 변화가 저해제 생산력을 급격히 감소시키는 것으로 생각된다.

④ 초기 pH의 영향 : Tyrosinase 저해제 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위해서 기본배지의 pH를 3부터 11까지 조절한 후 30°C에서 72시간 180 rpm에서 진탕배양한 결과는 Fig. 4와 같다. 최소유의차 검정 결과 pH 7과 8의 유의차가 인정되지 않고 pH 8과 pH 6, pH 9의 유의차가 인정되지 않는 것으로 볼 때 최적 pH는 7.0이고 pH 6~9까지는 저해제

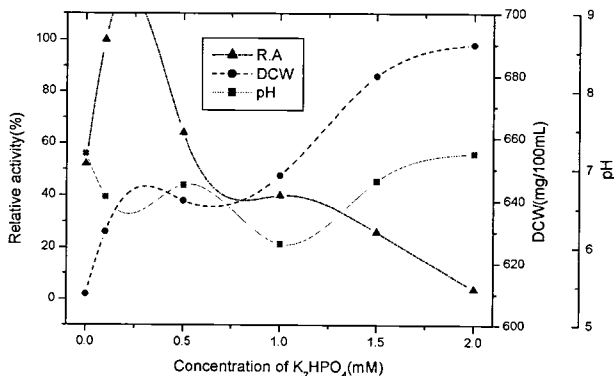


Fig. 3. Effect of K₂HPO₄ concentrations on the production of a tyrosinase inhibitor by Actinomycetes F-97. Each concentration of K₂HPO₄ was added to basal medium. The cell growth was shown as dried cell weight(mg/100 ml). The tyrosinase inhibition activity ratio was estimated when the maximal activity was set 100. Each point the average of three time.

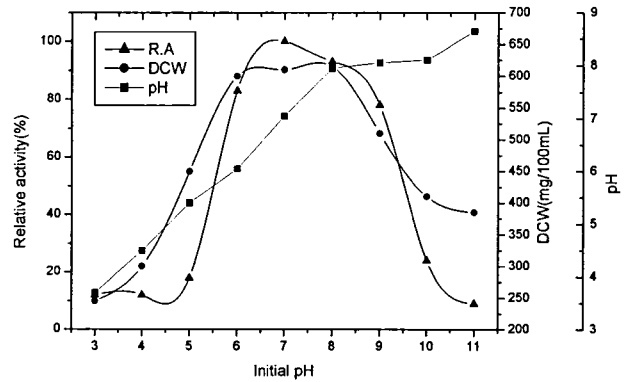


Fig. 4. Effect of initial pH on the production of a tyrosinase inhibitor by Actinomycetes F-97. The cell growth was shown as dried cell weight(mg/100 ml). The tyrosinase inhibition activity ratio was estimated when the maximal activity was set 100. Each point the average of three time.

의 생산력에서 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 대부분의 미생물성 tyrosinase 저해제 생산 최적 pH와 유사하였다[8,13].

⑤ 배양 온도의 영향 : Tyrosinase 저해제 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위해서 기본배지를 10°C에서 40°C까지 각 온도별로 72시간 180 rpm에서 진탕배양한 결과는 Fig. 5와 같다. 최소유의차 검정결과 30°C에서 최고 생산력을 보였고, 그 이상의 온도에서는 급격한 생산력의 감소를 보였다. 이같은 결과는 Ishihara 등[5]이 보고한 melanostatin을 생산하는 *Streptomyces clavifer* No. N924-2가 28°C, Komiyama[8] 등이 보고한 *Streptomyces* sp.가 27°C인 경우와 유사하였다.

반응표면 분석법을 이용한 생산배지 조성 최적화

1차 실험 계획에서 soluble starch, peptone, K₂HPO₄ 3개의 독립변수에 대한 실험 결과 K₂HPO₄의 전체 tyrosinase 저

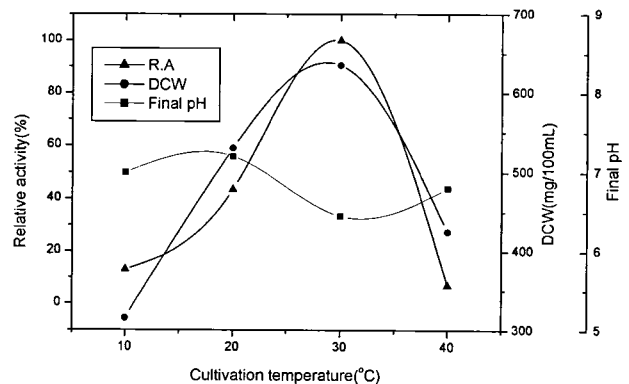


Fig. 5. Effect of temperature on the production of a tyrosinase inhibitor by Actinomycetes F-97. The cell growth was shown as dried cell weight(mg/100 ml). The tyrosinase inhibition activity ratio was estimated when the maximal activity was set 100. Each point the average of three trials.

해제의 생산성에 대한 효과가 인정되지 않았다(Table 2).

K₂HPO₄를 제외한 soluble starch, peptone을 각각 2%, 0.2%로 하는 두 요인의 예비 실험을 기초로 최대경사방향(path of steepest ascent)으로 새로운 중심점을 탐색하였다. 그 결과 soluble starch 3%, peptone 0.4%를 새로운 중심점으로 하는 모형을 설정하였다(Table 3). 실험 모형에 대한 유의성은 P<0.01로 나타났으며, 1차항(linear term), 2차항(quadratic term)에서 P-value가 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모형을 매우 적합함을 알 수 있었다(Table 4). 또한 결정계수가 0.95로 모형에 대한 설명력이 좋았다. Tyrosinase 저해제 생산은 soluble starch의 농도보다는 peptone에 의해서 영향을 크게 받는 것으로 나타났다.

2차 실험계획에 의해서 얻은 반응표면식은 다음과 같다.

$$y = 99.4 + 0.96X_1 - 7.83X_2 + 0.27X_1X_2 - 7.69X_1^2 - 9.07X_2^2$$

SAS IML procedure에 의해서 구한 최대 생산점은 X₁, X₂가 각각 0.07과 -0.43으로 soluble starch 3.035%, peptone 0.128%로 나타났다(Fig. 6).

Table 2. Parameter estimates for first experimental design

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for HO: Parameter=0	Prob> T
INTERCEPT	1	64.81	8.282	7.826	0.0005
X1	1	27.08	5.071	5.340	0.0031
X2	1	2.500	5.071	0.492	0.6429
X3	1	-27.63	5.071	-5.450	0.0028
X1X2	1	2.222	7.172	0.310	0.7692
X1X3	1	-9.722	7.172	-1.355	0.2333
X2X3	1	-1.111	7.172	-0.155	0.8830
X1X1	1	-25.04	7.465	-3.355	0.0202
X2X2	1	1.342	7.465	0.180	0.8643
X3X3	1	-7.268	7.465	-0.974	0.3750

X1 : soluble starch, X2 : K₂HPO₄, X3 : peptone

Table 3. Input data for second experimental design

No.	Code value		Raw data		Yield(%)
	X1	X2	Soluble starch(%)	Peptone (%)	
1	-1	-1	2.5	0.34	91
2	-1	1	2.5	0.40	73
3	1	-1	3.5	0.30	95
4	1	1	3.5	0.50	76
5	-1.4142	0	2.3	0.40	82
6	1.4142	0	3.7	0.40	82
7	0	-1.4142	3.0	0.08	89
8	0	1.4142	3.0	0.26	70
9	0	0	3.0	0.40	100
10	0	0	3.0	0.40	98

X1 : soluble starch, X2 : peptone

Table 4. Parameter estimates for second experimental design

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for HO: Parameter=0	Prob> T
INTERCEPT	1	99.45	2.286	43.49	0.0001
X1	1	0.962	1.143	0.842	0.4473
X2	1	-7.836	1.143	-6.854	0.0024
X1X2	1	0.275	1.616	0.170	0.8732
X1X1	1	-7.698	1.512	-5.090	0.0070
X2X2	1	-9.070	1.512	-5.997	0.0039

X1 : soluble starch, X2 : peptone

Jar fermentor 배양

Tyrosinase 저해제 생산에 있어서 기본배지와 최적 생산 배지와 의 시간에 따른 영향을 조사하였다. 최적 생산 배지의 경우 균체량의 변화는 없었지만 tyrosinase 저해제 생산은 기본배지에 비해서 8시간 정도 빠르며 20% 정도의 역가가 증가하였다. 이는 Komiyama 등[8]이 보고한 방선균이 생산하는 OH-3984 K1, K2가 96시간에 최대 생산점을 보이는 것보다 24시간 정도가 빨랐다(Fig. 7).

최근에 안전하고 유용한 저해제인 4-hexylresorcinol(4HR)이 발견되었는데, 4HR은 새우, 감자, 사과, 아보카드(열대과일), 포도 주스의 tyrosinase를 저해하며, 이 4HR은 이미 음식 첨가물로서의 안전성이 입증되고 있다[2]. 그러나 피부암 발생 증가에 따라 멜라닌 대사에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 지금까지의 연구 결과로는 안정된 치료제가 개발되지 못하였고, 포유동물의 멜라닌 생성 경로 및 작용 기작에 대한 연구도 진행 중인 상황이다. 그러므로 독성이 적고, 활성이 높으면서, 안전한 새로운 저해제를 탐색하는 일은 미백 효과제, 피부암 치료제 개발이라는 효과와 더불어 멜라닌 생합성 및 저해제의 작용기작 규명이라는 측면에서도 미생물에 의한 tyrosinase 저해제의 생성에 관한 연구는 중요한 과제라 할 수 있다.

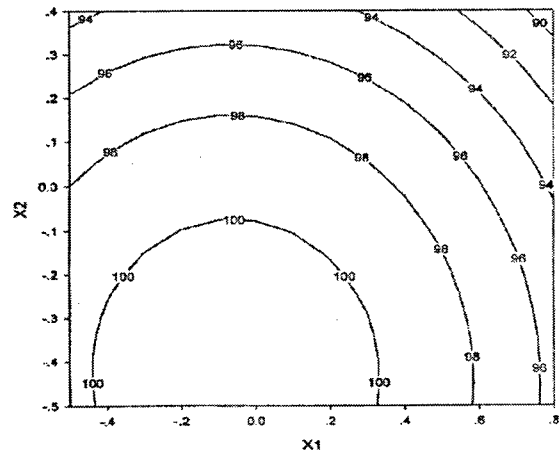


Fig. 6. Contour plot of soluble starch and peptone code value. X1 : soluble starch, X2 : peptone

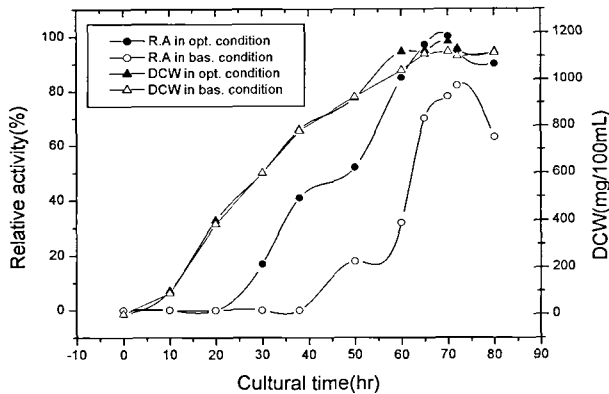


Fig. 7. Time course on the production of a tyrosinase inhibitor in jar fermentor. One frozen stock vial(1 ml of spore suspension in 10% glycerol, -60°C) of F-97 was inoculated into a 500 l flask containing 100 ml seed medium(2.0% soluble starch, 0.2% peptone, 0.3% yeast extract, 0.05% $MgSO_4$, 0.01% K_2HPO_4 , pH 7.0) The seed culture was incubated at 30°C for 24 hr on a rotary shaker at 180 rpm. A 100 ml of the seed culture was inoculated into a 2 l fermentor containing 1 l of optimum production medium(3.0% soluble starch, 0.36% peptone, 0.1 mM K_2HPO_4 , pH 7.0). The culture condition was 200 rpm agitation speed and 2.0 vvm aeration at 30°C. The cell growth was shown as dried cell weight(mg/100 ml). The tyrosinase inhibition activity ratio was estimated when maximal activity was set 100.

요 약

토양으로부터 tyrosinase 저해제를 생산하는 방선균 F-97을 분리하여 이 균주로부터 tyrosinase 저해제 생산을 위한 최적 조건을 검토하였다. 그 결과는 다음과 같다. 탄소원으로는 soluble starch가 가장 좋았으며, 그 최적 농도는 3.0%였다. 질소원으로는 유기질소원인 peptone이 가장 좋았으며 최적 농도는 0.36%로 나타났다. 무기염으로 K_2HPO_4 가 가장 좋았으며 최적농도는 0.1 mM이었다. 최적온도 30°C와 70시간의 jar fermentor 내에서 배양 시 최고의 tyrosinase 저해제 생산성을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Box, G. E. P. and D. W. Behnken. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2, 455-475.
- Cabanes, R. S. 1988. Toxicology and carcinogenesis studies of 4HR in F344/N rats and B6C3F1 mice. National toxicology program, NIH publication, No. 88.
- Choi, S. Y., N. J. Kang and H. C. Kim. 2006. Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* a. Gray. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14, 27-30.
- Han, D. S., S. W. Jung, S. J. Kim, S. H. Kim and B. H. Ahn. 1996. Effect of tyrosinase inhibitors on the melanogenesis. *Korean J. food Sci. Technol.* 28, 1089-1094.
- Ishihara, Y., M. Oka, M. Tsunakawa, K. Tomita, M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaka, M. Komish and T. Oki. 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. *J. antibiotics* 44, 25-32.
- Jung, S. W., N. K. Lee, S. J. Kim and D. S. Han. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Tech.* 27, 891-896.
- Kang, H. S., H. R. Kim, D. S. Byum, H. J. Park and J. S. Choi. 2004. Rosmarinic acid as a tyrosinase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Natural Product Sciences* 10, 80-84.
- Komiyama, K., S. Takamatsu, Y. Takahashi, M. Shinose, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Iwai and S. Omura. 1993. New inhibitors of melanogenesis, OH-3984 K1 and K2. *J. antibiotics* 6, 1520-1525.
- Kwak, J. H., U. K. Seo and Y. H. Han. 2001. Inhibitory effect of Mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16, 220-223.
- Kwak, J. H., Y. H. Kim, H. R. Chang, C. W. Park and Y. H. Han. 2004. Inhibitory effect of Gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19, 437-440.
- Kwon, O. S., D. J. Park, C. Y. Lee and C. J. Kim. 1996. Distribution pattern of soil actinomycetes at Cheju. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 4, 399-403.
- Lee, C. H., H. K. Chun, Y. B. Seu and Y. H. Koh. 1993. Tyrosinase inhibitor isoflavonoids produced by *Streptomyces* sp. 20747. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 139-143.
- Lee, C. H., M. C. Chung, H. J. Lee, K. H. Lee and Y. H. Kho. 1995. MR304-1, A melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 641-646.
- Lee, H. J., M. K. Lee and I. S. Park. 2006. Characterization of mushroom tyrosinase inhibitor in sweet potato. *J. Life Sci.* 16, 396-399.
- Lee, J. S., J. A. Kim, S. H. Cho, A. R. Son, T. S. Jang, M. S. So, S. R. Chung and S. H. Lee. 2003. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra*. *L. Kor. J. Pharmacogn.* 34, 33-39.
- Shear, M. C. 1967. Actinomycetes; permanent preservation. In workshop on preservation of microorganism by freezing and freeze-drying. Society for Industrial Microbiology, Arlington, Va.
- Sung, K. C. and K. J. Kim. 2005. Tyrosinase activated inhibition effect & analysis of Pine-Needles extract. *J. Kor. Oil. Chem. Soc.* 22, 71-76.
- Suzuki, K. 1993. Search and discovery of soil microorganism which produce new bioactive substances : Selective isolation of microorganism and their fermentation products. *J. Actinomycetol.* 7, 107-109.
- Yang, M. J., J. S. Lim, H. S. Ahn, M. A. Kim and R. M. Ahn. 1999. Inhibitory effect of Chestnut Bark extracts on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Kor. J. Env. Health Soc.* 25, 37-43.

20. Yoneta, A, T. Yamashita, H. Y. Jin, S. Kondo and K. Jimbow. 2004. Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma(FAMMM) patients. *Melanoma Res.* **14**, 387-394.
21. Hong, J. S. 1996. Analysis of SAS and statistics data. Tamjin Publishing Co.