

Tyrosinase 저해제를 생성하는 방선균 F-97의 분리 및 동정

방병호* · 이문수** · 김관필*** · 김진오 · †이동희

*을지대학교 식품과학부, **한국생명공학연구원, ***롯데제과, 건국대학교 미생물공학과

Isolation and Identification of Actinomycetes F-97 Producing Tyrosinase Inhibitor

Byung-Ho Bang*, Moon-Soo Rhee**, Gwan-Pil Kim***, Jin-O Kim and †Dong-Heui Yi

*Division of Food Science, Eulji University, Gyeonggi-do 461-713, Korea

**Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

***Lotte Confectionery Co., Ltd., Seoul 150-964, Korea

Dept. of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

In order to obtain a non-toxic and more active and stable microorganism-produced tyrosinase inhibitor, we isolated actinomycetes F-97, a producer of tyrosinase inhibitor, from soil. The aerial hyphae of this strain were gray in color with tree types. Under the microscopic examination, the isolate formed a spiral aerial spore mass with a smooth surface. The analysis of cell wall acid hydrolysate of the isolate revealed the presence of LL-diaminopimelic acid(LL-DAP). No specific sugar was detected. From these results and the cultural and physiological characteristics described in the Bergey's Manual, actinomycetes F-97 was identified as, or best-matched to, *Streptomyces aburaviensis*.

Key words: Actinomycetes, inhibitor, melanin, tyrosinase.

서 론

Tyrosinase의 작용으로 생합성되는 멜라닌(melanin)은 동·식물계와 미생물계에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이며, 생물체에 따라 다양한 종류가 알려져 있다^{1,2)}. 우리 주변에서 멜라닌 합성은 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기에 노출되었을 때 발생하는 갈변이나 동물의 외피, 깃털, 피부, 머리, 눈 등에서도 관찰된다³⁾.

피부에 존재하는 흑갈색 알갱이의 멜라닌 색소는 피부 외에도 털, 눈 등에도 존재한다. 사람의 피부에서는 자외선 조사 등에 의한 피부 손상에 대항하는 기작으로 생합성이 촉진된다⁴⁾. 멜라닌은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인물질로 알려져 있으며, 이의 과잉 생성이 기미, 주근깨, 피부 반점 등을 유발하며 멜라닌 전구물질의 독성으로 인

한 세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다⁵⁾. 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 dopaquinone을 거쳐 합성이 이루어지며, 이후 아미노산 혹은 단백질 중합반응에 의해 최종적으로 멜라닌이 합성된다⁶⁾.

멜라닌의 양에 따라 피부색이 결정되는데, 멜라닌의 양이 많을수록 검은 피부색을 띤다. 인종마다 피부색이 다른 것은 멜라닌 세포의 수가 다르기 때문이 아니라, 멜라닌 세포의 크기와 만들어지는 멜라닌의 양이 다르기 때문이다.

멜라닌 생합성 과정에서 한 가지 효소만이 유일하게 관여

† Corresponding author: Dong-Heui Yi, Dept. of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea.
Tel: +82-2-450-3522, Fax: +82-2-3437-8360, E-mail: dhyi@konkuk.ac.kr

하므로 멜라닌 합성을 억제하는 방법으로 주로 tyrosinase 저해제를 개발하는 방향으로 집중되어 왔으며, 대표적인 tyrosinase 저해제로는 tyrosinase 활성 부위의 구리 이온에 대한 킬레이트 형성물질, 퀴논(quinone)류를 페놀류로 환원시키는 ascorbic acid 등의 환원제 및 tyrosinase 자체를 변성시키는 bisulfite 제제 등을 들 수 있다⁷⁾. 지금까지 알려진 tyrosinase 저해제로는 ascorbic acid, arbutin, benzoic acid, azelic acid 등으로 그 중에서도 특히, arbutin은 미백상용제로 널리 쓰이고 있다¹⁶⁾. 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, 도깨비부채 뿌리, 감초, 치자, 쑥, 솔잎, 울피 등 천연물질로부터 tyrosinase 효소활성 저해제 개발에 대한 연구가 활성화되고 있다^{1,5,8~12)}.

본 연구에서는 독성이 적고, 활성이 높으면서 안정한 새로운 tyrosinase 저해제를 미생물을 대상으로 얻고자 tyrosinase 저해제를 강하게 분비하는 방선균 F-97을 분리하였으며, 이 균이 저해제를 생산하는 최적 배양 조건을 검토한 결과를 이미 전보에서 보고하였으며¹³⁾, 본 연구에서는 F-97을 동정한 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균의 분리

전국 각지의 토양 시료를 채취하여 Suzuki¹⁴⁾, 권 등¹⁵⁾이 사용한 방선균 분리 방법을 사용하여 방선균 1,000 여주를 순수 분리하고, 이들 균으로부터 저해활성이 높은 균을 전보¹³⁾의 방법에 따라 tyrosinase에 대한 저해활성을 측정하여 상대활성이 50% 이상인 균주 10주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주 중 고유 형질이 안정한 균주를 얻기 위하여 단세포주(monoculture)를 분리하였다¹⁶⁾. 선별된 균주를 균 선별용 평판배지¹³⁾로 3분도말법을 이용하여 단일 콜로니를 분리한 후 각각의 콜로니를 다시 선별용 액체배지를 사용하여 30°C에서 4일간 진탕배양하였다. 배양 후 배양액을 거름종이로 거른 후 tyrosinase에 대한 저해활성을 측정하였다. 각 단세포주들의 tyrosinase에 대한 저해활성이 정규 분포를 이룰 때까지 natural selection을 하여 저해활성이 가장 높은 균주 F-97을 최종 선별하였다.

2. 선별 균주의 포자 현탁액 제조 및 보존

순계분리된 선별균주를 선별용 사면배지¹³⁾(ϕ 15 mm test tube)에서 30°C, 7일간 배양한 후 1% glycerol이 첨가된 살균수 3 ml를 넣고 백금이로 포자를 현탁한 후 약 10분간 초음

파(20 kHz)에서 처리하였다. 제조된 포자현탁액은 -60°C deep freezer(SamWon Co.)에서 보관하였고, 이 후 실험의 접종원으로 사용하였다. 그리고 본 저장 균의 tyrosinase에 대한 저해활성은 Lee 등¹⁷⁾의 방법에 따라 필요시 확인하였다.

3. Tyrosinase 저해제 생산균의 동정

형태학적, 배양학적 특징은 Shirling과 Gottlieb의 방법¹⁸⁾, The Prokaryotes¹⁹⁾와 Bergey's manual of systematic bacteriology²⁰⁾에 기술된 방법에 따라 관찰하였다. 선별균주의 생리적 특징은 Method for general and molecular bacteriology²¹⁾ 및 Bergey's manual of systematic bacteriology²⁰⁾에 기술된 방법으로 조사하였다. 즉, 포자의 형태 및 연쇄 구조는 주사현미경(Hitachi S-570)을 사용하여 확인하였다. 배양상 특성은 콜로니의 형태, 성장도, 기균사색, 표면의 색 등을 International Streptomyces Project(ISP) system에 준하였다¹⁸⁾. 그리고 생리적 특성은 Nitrate 환원 시험, H_2S 생성 시험, xanthine, hypoxanthine, tyrosine 분해 시험, 항생물질 감수성 시험 등은 Bergey's manual of systematic bacteriology²⁰⁾ 및 Method for general and molecular bacteriology²¹⁾에 따라 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 형태학적 특징

재료 및 방법에 따라 분리 저장 중인 방선균 F-97을 oatmeal 평판배지에서 접종하여 30°C에서 14일간 배양한 후 포자의 연결상태(spore chain)를 관찰한 결과, 기균사의 길이는 긴 편

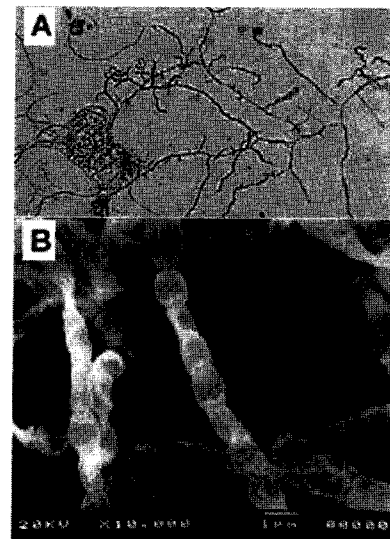


Fig. 1. The light and scanning electron microscopic photograph of F-97. A: Light microscopic photograph($\times 400$), B: Scanning electron microscopic photograph($\times 10,000$).

으로 균사의 연결형은 나뭇가지형(tree type)이며, 포자의 끝부분이 유선형으로 회전되어 있었다(Fig. 1A). 포자의 상태에 따른 분류에서 본 균주는 곧거나(straight) 구불구불한(flexuous) 형태인 *rectiflexibilis*(RF) 그룹에 속하며, 포자의 표면의 형태에 따른 분류에서는 구형의 형태인 smooth형으로 분류되었다(Fig. 1B).

2. 배양상의 특징

멜라닌 생성 저해제를 생산하는 방선균 F-97의 배양학적 특성은 Shirling과 Gottlieb의 방법¹⁸⁾과 Bergey's manual of systematic bacteriology²⁰⁾ 및 The Procarvates¹⁹⁾ 등에 기술된 방법에 따라 조사한 결과는 Table 1 및 2와 같았다.

Table 1. Colony morphology of F-97

Media	Colony morphology	Sporulation (colony surface)
Yeast extract-malt extract agar	Wrinkled	Excellent
Oatmeal agar	Powdery	Good
Inorganic salts-starch agar	Wrinkled	Good
Glycerol asparagine agar	Powdery	Good
Peptone yeast-extract iron agar	Wrinkled	Poor
Tyrosine agar	Powdery	Moderate

The strain F-97 was cultured on ISP media at 30°C for 14 or 21 days.

Table 2. Cultural characteristics of F-97

Media	Aerial mass color	Reverse side color	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar	Pale gray	Dark brown	None
Oatmeal agar	Gray	Light brown	None
Inorganic salts-starch agar	Gray	Light brown	None
Glycerol asparagine agar	Gray	Light yellow	None
Peptone yeast-extract iron agar	Gray	Light yellow	None
Tyrosine agar	Dark gray	Dark brown	None

The strain F-97 was cultured on ISP media at 30°C for 14 or 21 days.

Table 3. Carbon utilization of F-97

Carbon source	Utilization ^a
Carbon free control	—
D-Glucose	+
D-Fructose	+
L-Arabinose	+
D-Xylose	+
L-Rhamnose	—
Sucrose	+
Raffinose	±
D-Mannitol	+
meso-Inositol	±
Cellulose	+

The strain F-97 was cultivated in carbon utilization basal salt agar supplemented with 1% of each carbon source at 30°C for 3 weeks.

^a Symbols : +, carbon compound utilized; —, not utilized; ±, very slight utilized.

그 결과, yeast extract-malt extract agar(ISP 2), inorganic salts-starch agar(ISP 4), peptone yeast-extract iron agar(ISP 6)에서 집락의 형태는 주름진 형태(wrinkled)였으며, oatmeal agar(ISP 3), glycerol asparagine agar(ISP 5), tyrosine agar(ISP 7) 배지에서 집락 표면의 형태는 가루모양(powdery)이었다. 포자 형성은 peptone yeast-extract iron agar(ISP 6), tyrosine agar(ISP 7)에서 잘 형성되지 않았으나, yeast extract-malt extract agar(ISP 2), oatmeal agar(ISP 3), inorganic salts-starch agar(ISP 4), glycerol asparagine agar(ISP 5) 배지에서는 모두 잘 형성되었다. 기균사의 색상은 회색(gray)이었으며 배면색은 황갈색(yellow-brown)이었다. 그리고 멜라닌 색소 및 기타의 가용성 색소는 실험배지 모두에서 관찰되지 않았다. 당 이용성은 Shirling과 Gottlieb의 방법¹⁸⁾에 따라 탄소원 이용성 시험 기본 배지에 당을 1% 농도로 첨가한 배지에 F-97 균주의 포자를 접종하여 30°C에서 3주간 배양하면서 그 이용성 여부를 조사한 결과, D-glucose, D-fructose, L-arabinose, D-xylose, sucrose, D-mannitol 및 cellulose는 이용하였으나, raffinose, meso-inositol에서는 잘 증식하지 못하였고, L-rhamnose에서는 증식하지 못하였다(Table 3).

3. 생리적 특징

생리적 특징은 Bergey's manual of systematic bacteriology²⁰⁾ 및 Method for general and molecular bacteriology²¹⁾에 기술된 방법으로 조사한 결과는 Table 4와 같다. 본 균주는 nitrate 환원력은 있으나 H₂S를 생성하지 않았다. *Bacillus subtilis*에 대한 항균력은 없으며, elastin은 분해하나 xanthine은 분해하지 못

Table 4. The physiological characteristics of F-97

Characteristics	Results
Nitrate reduction	+
H ₂ S production	-
Antibiosis against <i>Bacillus subtilis</i>	-
Degradation of	
elastin	+
xanthine	-
Resistance to	
neomycin(50 µg/ml)	-
rifampicin(50 µg/ml)	-
streptomycin(50 µg/ml)	-
Growth at 45 °C	+
Growth with(% w/v)	
NaCl(7.0)	+
sodium azide(0.01)	+
phenol(0.1)	+
Utilization of	
L-aminobutylic acid	+
L-phenylalanine	+
L-histidine	+
L-hydroxyproline	+

하였다. Neomycin, rifampicin 및 streptomycin 첨가 배지에서 생육하지 못하였으나, 45°C와 7% NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% phenol 첨가 배지에서는 생육하였다. 본 균주는 L-aminobutylic acid, L-phenylalanine, L-histidine 및 L-hydroxyproline을 이용하여 증식하였다.

4. 균체 성분의 분석

1) Diaminopimelic Acid(DAP) 분석

방선균 세포벽의 DAP 성분을 분석하기 위하여 영양액체배지(nutrient agar, Difco)에 방선균을 접종하고 30°C에서 4일간 진탕배양한 균체를 거름종이로 걸러 회수하고 동결건조한 후 0.2 g의 균체를 6N HCl을 1 ml 가하여 121°C에서 15분간 가수분해하였다. 가수분해물을 박층크로마토그래피(silica gel 60 F₂₅₄, Merck)로 분석하였다. Methanol : water : 6 N HCl : pyridine(8 : 4 : 0.4 : 0.1, v/v/v/v)을 혼합한 용매로 전개시킨 후 평판에 0.2% ninhydrin 용액을 분무하고 100°C에서 발색시켜 DL-α, ε-diaminopimelic acid(DAP, Sigma Co.)와 비교하였다.

DAP형 조사 결과 본 균주는 LL-DAP이었으며(Fig. 2), LL-DAP는 Nocardioidaceae 과의 *Nocardioides* 속 및 Streptomy-

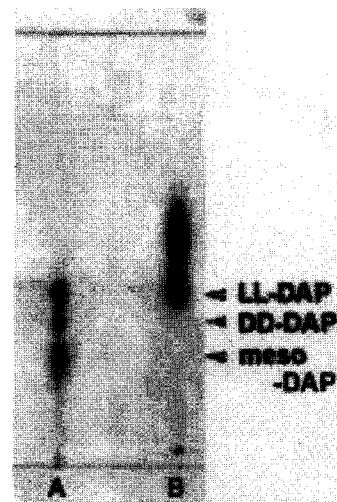


Fig. 2. The diaminopimelic acid type of F-97. A: DL-α, ε-diaminopimelic acid, B: Actinomycetes F-97.

cetaceae 과에 속하는 *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Sporichthya*, *Kinesporia*, *Intrasporangium* 속의 균주 등과 그 외에 *Kitasatosporia* 속 등에서 관찰되는 것으로 알려져 있다²⁰⁾.

2) 균체의 당 성분

박층크로마토그래피(TLC)로 균체의 당 성분을 조사한 결과 방선균속 분류에 지표가 되는 arabinose, galactose, glucose, xylose 등의 당을 가지고 있지 않았으며, 그 외의 당 성분도 검출되지 않았다(Fig. 3).

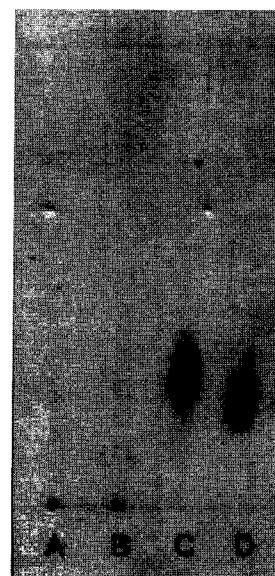


Fig. 3. The whole cell sugar pattern in cell wall of F-97. A: Actinomycetes F-97, B: *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049 hydrolysate, C: arabinose, D: galactose.

Actinomyces 속에 속하는 대부분의 속들과 Nocardioideaceae 과 및 Streptomycetaceae 과에 속하는 방선균들은 균체 당 조성에서 당이 전혀 검출되지 않는 특성이 있다²⁰⁾. 이는 형태학적, 배양학적 특성 및 DAP 분석 결과 *Streptomyces* 속 균주로 추정되는 사실을 뒷받침하고 있다.

5. 생산균주의 동정

본 균주의 배양학적, 형태적 및 생리적 특성을 조사하여 종합한 결과, Table 5에서와 같이 *Streptomyces aburaviensis* 또는 근연균으로 추정된다²⁰⁾.

요 약

본 연구에서는 독성이 적고, 활성이 높으면서 안정한 새로운 tyrosinase 저해제를 미생물을 대상으로 얻고자 tyrosinase

Table 5. Comprision of strain Actinomycetes F-97 with *Streptomyces aburaviensis*^a

Characters	F-97	<i>Streptomyces aburaviensis</i>
Spore chain	Rectiflexibiles	Rectiflexibiles
Spore surface	Smooth	Smooth
Aerial mass color	Grey	Grey
Melanin pigment	None	None
Degradation of		
elastin	+	d
xanthine	+	+
Resistance to rifampicin (50 µg/ml)	—	d
Growth at 45°C	+	—
Growth with(% w/v)		
NaCl(7.0)	+	+
sodium azide(0.01)	+	+
phenol(0.1)	+	d
Utilization of		
L-phenylalanine	+	d
L-histidine	+	+
sucrose	+	+
meso-inositol	±	+
L-rhamnose	—	d
raffinose	±	d

^a Symbols: +, 90% or more of strains are positive; —, 10% or less of strains are positive; not utilized; ±, very slight utilization; d, 11~89% of strains are positive.

저해제를 강하게 분비하는 방선균 F-97을 토양으로부터 분리하였다. 이 균의 기균사는 회색의 나뭇가지형(tree type)이며, 포자의 끝부분이 유선형으로 회전되어 있고, 포자 표면은 구형의 smooth형으로 분류되었다. 세포벽의 DAP 성분은 LL-DAP이었으며, 세포균체의 당 성분은 검출되지 않았다. 기타 배양학적 및 생리적 특성을 종합한 결과 *Streptomyces aburaviensis* 또는 근연균으로 추정된다.

참고문헌

1. Lee, HJ, Lee, MK and Park, IS. Characterization of mushroom tyrosinase inhibitor in sweet potato. *J. Life Sci.* 16: 396-399. 2006
2. Jung, SW, Lee, NK, Kim, SJ and Han, DS. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 27: 891-896. 1995
3. Yoneta, AT, Yamashita, HY, Jin, S, Kondo and Jimbow, K. 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. 2004
4. Park, SS, Ryu, YB, Lee, YH, Cho, YU, Cho, SJ, Choi, YJ, Park, KH and Gal, SW. Inhibition of melanin synthesis by mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mulberry leaf extract. *J. Life Sci.* 17:816-821. 2007
5. Choi, SY, Kang, NJ and Kim, HC. Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* Gray. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 14:27-30. 2006
6. Han, DS, Jung, SJ, Kim, SH and Ahn, BH. Effect of tyrosinase inhibitors on the melanogenesis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28:1089-1094. 1996
7. Chen, JS, Wei, C and Marshall, MR. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 39:1897-1901. 1991
8. Lee, JS, Kim, JA, Cho, SH, Son, AR, Jang, TS, So, MS, Chung, SR and Lee, SH. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra*. L. *Kor. J. Pharmacogn.* 34:33-39. 2003
9. Kwak, JH, Kim, YH, Chang, HR, Park, CW and Han, YH. Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 437-440. 2004
10. Kwak, JH, Seo, UK and Han, YH. Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*

- 16:220-223. 2001
11. Sung, KC and Kim, KJ. Tyrosinase activated inhibition effect & analysis of pine-needles extract. *J. Kor. Oil. Chem. Soc.* 22:71-76. 2005
 12. Yang, MJ, Lim, JS, Ahn, HS, Kim, MA and Ahn, RM. Inhibitory effect of chestnut bark extracts on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Kor. J. Env. Health Soc.* 25:37-43. 1999
 13. Bang, BH, Rhee, MS, Kim, JO and Yi, DH. A study on the tyrosinase inhibitor produced with Actinomycetes F-97. *J. Life Sci.* 17:798-804. 2007
 14. Suzuki, K. Search and discovery of soil microorganism which produce new bioactive substances: Selective isolation of microorganism and their fermentation products. *J. Actinomycetol.* 7:107-109. 1993
 15. Kwon, OS, Park, DJ, Lee, CY and Kim, CJ. Distribution pattern of soil Actinomycetes at Cheju. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 4:399-403. 1996
 16. Shear, MC. Actinomycetes; permanent preservation. In workshop on preservation of microorganism by freezing and freeze-drying. Society for Industrial Microbiology, Arlington, Va. 1967
 17. Lee, CH, Chung, MC, Lee, HJ, Lee, KH and Kho, YH. MR304-1, A melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6:641-646. 1995
 18. Shirling, EB and Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. System. Bacteriol.* 16:313-340. 1996
 19. Ballows, AH, Truper, G, Dworkin, M, Hander, W and Schlerifer, KS. The procaryotes. Vol. 1, 2nd ed., pp.67-80. Springer-Verlag. 1992
 20. Willims, S, Sharp, TME and Holt, JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. 4, pp.101-130. Williams and Wilkins, 1989
 21. Gerhardt, P, Murray, RGE, Wood, WA and Krieg, NR. Methods for general and molecular bacteriology, pp.123-150. American Society for Microbiology, 1994

(2009년 2월 16일 접수; 2009년 2월 29일 채택)