

송이버섯 배양 균사체의 멜라닌 생성억제효과

최상윤* · 김나나¹ · 김영언 · 이연미 · 김순정¹ · 김재호

한국식품연구원, ¹양양군 농업기술센터

Inhibitory Effects of Cultured *Tricholoma matsutake* Mycelia on Melanin Biosynthesis

Sang Yoon Choi*, Na-Na Kim¹, Young-Eon Kim, Yeonmi Lee, Soon-Jung Kim¹, and Jae-ho Kim

Korea Food Research Institute

¹Yangyang Agricultural Development & Technology Center

Abstract In this study, liquid culture of *Tricholoma matsutake* mycelia was performed via biomass production, and its inhibitory effects on melanin biosynthesis were evaluated. The *Tricholoma matsutake* mycelia extract inhibited 38.6% of tyrosinase activity at 100 ppm, which is higher than that of extracellular medium at same dose. In addition, when 100 ppm of *Tricholoma matsutake* mycelia extract was treated to melan-a cells for 3 days, 19% of melanin production was reduced without cell toxicity. These results suggested that cultured *Tricholoma matsutake* mycelia might be useful as a skin depigmenting material.

Keywords: melanin, mycelia, *Tricholoma matsutake*, tyrosinase

서 론

사람의 피부에서는 자외선 조사 등에 의한 피부손상에 대항하는 방어수단으로 표피의 기저층에 주로 존재하는 melanocyte에서 멜라닌 생합성이 촉진된다(1,2). 멜라닌은 피부를 보호하는 역할을 하나 이의 과생성은 기미, 주근깨, 검은반점 등의 피부질환을 일으킨다. 멜라닌 생합성에 관여하는 주요효소는 tyrosinase이며 이밖에 tyrosinase-related protein 1(TRP-1)과 dopachrome tautomerase(TRP-2)가 있다(3-5). 따라서 tyrosinase 활성 억제제를 찾는 연구는 피부 색소 저해제의 개발에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있다(6,7). 현재까지 피부색소 저해제로 kojic acid, vitamin 유도체, arbutin 등이 개발 되어졌으나 부작용 및 안정성 등의 문제로 인해 최근에는 이의 대체 소재로써 천연자원을 이용한 피부색소 억제소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

송이버섯은 한국, 일본, 중국 등지의 소나무 숲에서 발생하며 담자균아문(*Basidiomycotina*), 송이과(*Tricholomataceae*)에 속한다. 송이버섯은 독특한 향과 뛰어난 맛으로 인해 최고급의 버섯으로 취급되고 있으며 항암활성, 면역강화, 항산화 활성을 나타낸다고 보고된 바 있으나 아직까지 인공재배가 불가능하여 생산량이 절대적으로 부족한 실정으로 이를 대량생산하기 위한 배양방법에 대한 연구가 진행되고 있다(8-16). 또한 최근에는 송이버섯균사 배양액이 tyrosinase 억제활성을 나타낸다는 보고가 있었으나(17)

아직까지 균사체 및 melanocyte에 대한 효과를 검증한 연구보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 송이버섯 균사체를 액체배양하여 대량생산하고 melanocyte에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하여 피부미백소재로서의 활용가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험시약

Tyrosinase, L-dopa, phobol 12-myristate 13-acetate(TPA), kojic acid 는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고 fetal bovine serum(FBS), RPMI 1640, penicillin-streptomycin(PS)는 Gibco BRL(Gland Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

송이버섯 배양

송이버섯 균사체를 액체배양하기 위해, 양양군 농업기술센터에서 분리하여 보관중인 송이버섯 균주를 PDA 평판배지(Potato 200 g/L, dextrose 20 g/L, and agar 20 g/L)에 배양한 후 5 mm cork borer로 잘라 TMM 배지(20 g/L glucose, 1.5 g/L yeast extract, and 1.5 g/L soybean flour)에 접종하여 25°C의 배양실에서 120일간 배양하였다(산소공급속도 1.5 L/min). 배양액 300 mL을 8L의 송이버섯 종균 배양용 액체배지(160 g/L glucose, 12 g/L yeast extract, and 12 g/L soybean flour)에 접종하고, 25°C의 배양실에서 60일간 배양하여 백색 구슬형태의 송이버섯균사체를 얻었다(Fig. 1).

시료추출

송이 균사체 배양물을 균사체와 배양액으로 나누어 실험을 진행하였다. 균사체 100 g을 파쇄 후 1L의 80% 에탄올을 가하여

*Corresponding author: Sang Yoon Choi, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea

Tel: 82-31-780-9307

Fax: 82-31-709-9876

E-mail: sychoi@kfri.re.kr

Received October 4, 2010; revised November 18, 2010;

accepted January 25, 2011

1시간씩 3회 반복하여 교반 추출하고 얻어진 상등액을 여과지로 여과하여 감압농축기로 완전농축하여 4.2 g의 균사체 추출물을 얻었다. 또한 배양액 1 kg을 여과지로 여과 후 감압농축기로 완전농축하여 28.6 g의 배양액 농축물을 제조하였다.

세포 배양

Melan-a cell은 10% FBS와 200 nM TPA가 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양시켰다. 약 5×10⁵개의 세포가 포함된 세포현탁액을 24 well plate에 접종 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. Well 당 990 μL의 배지를 매일 갈아주면서 10 μL의 검색시료를 3일간 처리한 후 24시간 더 배양하였다(18).

세포생존율 측정

각 well의 배지를 제거한 후 0.1% crystal violet 용액을 200 μL씩 첨가하였다. 5분간 상온에서 배양한 후 증류수로 세척하고 에탄올 1 mL를 첨가하여 10분간 shaking하였다. 590 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 측정하였다.

멜라닌 생성량 측정

각 well의 배지를 제거한 후 증류수로 세척하고 1 N NaOH 1 mL를 가하였다. 30분간 shaking하여 멜라닌을 녹인 후 400 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌의 양을 측정하였다.

Melan-a 세포로부터 Tyrosinase의 추출

Melan-a 세포를 각 culture dish에 가득 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 각 dish에 lysis buffer(67 mM sodium phosphate buffer, 1% Triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonylfluoride)를 100 mL 첨가하고 세포를 모아 ultrasonication하였다. 이를 1시간 동안 방치한 후 12,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 단백질 정량하여 효소용액으로 사용하였다(19).

Tyrosinase 활성 억제도 측정

PBS에 녹인 8 mM L-dopa 120 μL에 검색시료 40 μL를 혼합한 후 125 U mushroom tyrosinase 혹은 melan-a 효소용액(단백질 함량 50 mg/mL) 40 μL를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 생성된 dopachrome의 양을 492 nm에서의 흡광도를 측정하여 tyrosinase 억제활성을 계산하였다(20).

통계분석

모든 실험결과는 3회 반복실험하여 평균과 표준편차를 구하여 표시하였고 유의성검정은 Student's t-test를 이용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

추출물제조

물과 에탄올 20/80 혼합용매를 사용하여 교반추출 후 감압농축하여 송이버섯 균사체 추출물을 제조하였고 배양액은 그대로 감압농축하였다. 제조된 송이 균사체의 추출수율은 4.2%(w/w), 배양액의 농축 후 수율은 2.9%로 나타나 송이균사체의 수율이 높았다.

Tyrosinase 활성억제효과

송이균사체 추출물과 배양액 농축물의 tyrosinase 억제도를 측정한 결과 두 시료 모두 농도 의존적인 억제활성을 나타내었으나 송이균사체 추출물의 억제활성이 배양액 농축물에 비하여 월등히 높았다. 송이균사체 추출물은 100 ppm에서 38.6%의 mush-



Fig. 1. Photograph of cultured *Tricholoma matsutake* mycelia. Scale bar represents 1 cm.

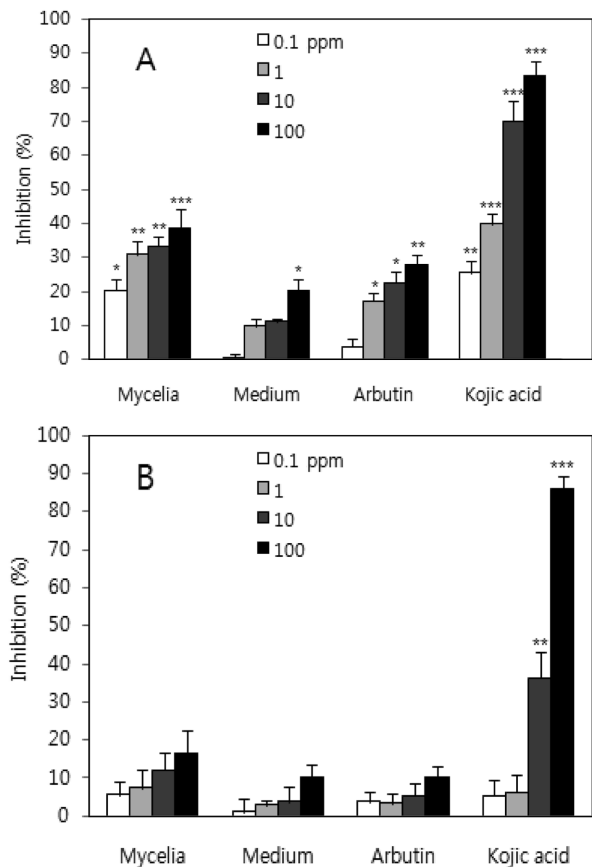


Fig. 2. Inhibitory effects of cultured *Tricholoma matsutake* mycelia on tyrosinase. (A) mushroom tyrosinase and (B) melan-a crude tyrosinase. The data were obtained from triplicate experiments (mean±SD). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. control

room tyrosinase 활성을 억제시켰으며 이는 기존의 미백활성물질인 kojic acid 보다는 낮으나 arbutin에 비하여 높아 정제되지 않은 천연추출물임을 감안할 때 뛰어난 tyrosinase 억제활성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 2). 또한 melan-a crude tyrosinase 억제활성 측정 결과 역시 송이균사체 추출물이 배양액 농축물에 비하여 높은 억제도를 나타내었다. 한편 Woo와 Yang(17)이 액체배양된 송이버섯 균사 배양액이 높은 tyrosinase 억제활성을 나타낸다고 보고한 바에 비하여 본 연구에서 균사체 추출물의 tyrosinase 억제활성이 배양액에 비하여 월등히 높게 나타난 것은 기존 연구에서 균사체를 100°C(열수추출) 및 80°C(에탄올추출)에서 추출한 것에 비해 상온에서 추출하여 균사체에 함유된 활성성분의 변화가 적었기 때문으로 추측된다.

Table 1. Effect on cell viability and melanin contents in melan-a cells

Samples	Concentrations (ppm)	Cell viability ¹⁾ (%)	Melanin contents ¹⁾ (%)
Mycelia	1	99.9±4.1	94.7±5.1
	10	98.9±3.3	92.6±3.9
	100	93.3±3.1	74.3±4.4
Extracellular medium	1	100.2±4.1	96.0±4.5
	10	97.9±3.2	95.9±2.9
	100	92.5±3.4	87.9±5.0
Arbutin	1	104.4±2.6	94.0±5.5
	10	102.8±3.3	89.3±1.4
	100	99.4±4.7	71.1±2.0
Kojic acid	1	99.4±2.8	97.3±2.9
	10	98.5±2.5	94.1±1.8
	100	90.4±3.5	84.7±4.6

The data were obtained from triplicate experiments (mean±SD).

¹⁾Cell viability and melanin contents of vehicle group were set to 100%.

Melan-a 세포에서의 멜라닌 생성 억제 효과

마우스 유래의 멜라닌 생성 세포인 melan-a 세포에 송이버섯 균사체 추출물과 배양액 농축물을 1, 10 및 100 ppm의 농도로 3일간 처리시 두 시료 모두 유의적인 세포사멸이 나타나지 않아 세포 독성이 낮음을 확인 할 수 있었다. 동시에 송이버섯 배양액 농축물은 멜라닌 억제활성을 나타내지 못하였으나 송이버섯 균사체 추출물은 100 ppm에서 세포생존을 대비 19%의 멜라닌 억제활성을 보였고 이는 기존 미백활성물질인 알부틴의 28.3% 보다는 낮았으나 정제되지 않은 천연 추출물로서 우수한 멜라닌 억제작용을 나타내었다고 판단된다(Table 1). 이러한 결과는 균사체 추출물이 배양액에 비하여 높은 tyrosinase 억제활성을 나타낸 결과와 일치하는 경향을 나타내었고 따라서 송이버섯 균사체 추출물의 멜라닌 생성억제효과는 tyrosinase 활성억제효과가 하나의 주요한 원인으로 판단된다. 향후 연구에서는 송이버섯 균사체 추출물이 melan-a 세포내 tyrosinase 단백질 발현량에 미치는 영향을 측정하여 추가적인 기전을 규명하고 *in vivo* 상의 피부색소조절 활성을 검증하고자 한다.

요 약

액체배양한 송이버섯 균사체와 배양액의 tyrosinase 억제활성과 melanocyte에서의 세포독성 및 멜라닌 생성억제효과를 검증한 결과 배양액 농축물은 큰 효과가 없었으나 송이버섯 균사체 추출물은 100 ppm에서 38.6%의 tyrosinase 억제활성을 나타내었을 뿐만 아니라 melan-a 세포에서 세포독성 없이 세포생존을 대비 19%의 멜라닌 생성량을 감소시켰다. 따라서 배양된 송이버섯균사체는 피부색소조절을 위한 소재로써 사용되어질 수 있는 큰 가능성을 가지고 있다고 판단된다.

감사의 글

본 연구논문은 양양군의 지원에 의한 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 84: 1155-1228 (2004)
- Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 455: 843-850 (2007)
- Iozumi K, Hoganson GE, Pemella R, Everett MA, Fuller BB. Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 100: 806-811 (1993)
- Marmol V, Beermann F. Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* 381: 165-168 (1996)
- Fang J, Han Q, Johnson JK, Christensen BM, Li J. Functional expression and characterization of aegypti dopachrome conversion enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 290: 287-293 (2002)
- Kim KS, Kim JA, Eom SY, Lee SH, Min KR, Kim Y. Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cell line by downregulation of tyrosinase expression. *Pigm. Cell Res.* 19: 90-98 (2005)
- Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK, Bae H. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* 20: 921-934 (2006)
- Ishihara Y, Iijima H, Yagi Y, Hoshi H. Inhibition of decrease in natural killer cell activity in repeatedly restraint-stressed mice by a biological response modifier derived from cultured mycelia of the basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Neuroimmunomodulat.* 11: 41-48 (2004)
- Kim MU, Cho YJ. Culture condition for biomass of *Tricholoma matsutake*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 266-269 (2006)
- Lim HW, Yoon JH, Kim YS, Lee MW, Park SY, Choi HK. Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom. *Food Chem.* 103: 1337-1342 (2007)
- Hur H, Choi YI, Lee TS. Antitumor and immuno-potentiating activity against mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake*. *J. Life Sci.* 18: 1290-1298 (2008)
- Kim SS, Lee JS, Cho JY, Kim YE, Hong EK. Process development for mycelial growth and polysaccharide production in *Tricholoma matsutake* culture. *J. Biosci. Bioeng.* 4: 351-355 (2010)
- Kim YE, Kwon EK, Han D, Kim IH, Ku KH. Antioxidative activity, fibrinolysis and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of pine mushroom juice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 535-541 (2008)
- Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* Sing. (Pine mushroom). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 555-560 (2009)
- Yang S, Ren X, Sheng J, Lu J, Li T, Tang F, Wang Y, Meng L, Meng Q, Teng L. Preparation and the antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from *Tricholoma matsutake*. *World J. Microb. Biot.* 26: 497-503 (2010)
- Kim JY, Byeon SE, Lee YG, Lee JY, Park J, Hong EK, Cho JY. Immunostimulatory activities of polysaccharides from liquid culture of pine-mushroom *Tricholoma matsutake*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 95-103 (2008)
- Woo HJ, Yang DC. Inhibitory effect of the extracts of *Tricholoma matsutake* mycelia on tyrosinase activity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 18: 45-50 (2003)
- Kong YH, Lee P, Choi SY. Action of *Rodgersia podophylla* root extract on melanin biosynthesis in skin. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 15: 434-436 (2007)
- Fuller BB, Drake MA, Spaulding DT, Chaudhry F. Downregulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell culture by yohimbine. *J. Invest. Dermatol.* 114: 268-276 (2000)
- Choi SY, Kang NJ, Kim HC. Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gary. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14: 27-30 (2006)