

Lactobacillus plantarum M23 균주를 이용한 Tyrosinase 저해 활성 발효유 생산의 최적화

임상동* · 김기성
한국식품연구원

Optimization of Tyrosinase Inhibitory Activity in the Fermented Milk by *Lactobacillus plantarum* M23

Sang-Dong Lim* and Kee-Sung Kim

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

Abstract

The melanin pigment in human skin is a major defense mechanism against ultraviolet light to the skin, but darken skin color. Tyrosinase is mainly responsible for melanin biosynthesis (melanogenesis) in animals and enzymatic browning (melanosis) in plants. The purpose of this study was to optimize the fermented milk process for the melanin formation inhibition by using *Lactobacillus plantarum* M23 with tyrosinase inhibitory activity. We used 4-factor-3-level central composite design combining with response surface methodology. Yeast extract concentration (% , X_1), addition of grape (% , X_2), incubation temperature ($^{\circ}\text{C}$, X_3) and incubation time (h, X_4) was used as an independent factor, on the other hand, pH (pH, Y_1), overall palatability (score, Y_2) and tyrosinase inhibitory activity (% , Y_3) was used as a dependant factor. Based on the optimization for the highest tyrosinase inhibitory activity with pH 4.4, the expected data of pH, palatability and tyrosinase inhibitory activity with 14.8 h incubation at 37.1°C by the addition of 0.127% of yeast extract, 2.95% of grape was 4.42, 7.06 and 86.65%, but the real data was 4.35, 6.86 and 84.05%, respectively. Based on the previous results, fermented milk using *Lactobacillus plantarum* M23 with the tyrosinase inhibitory activity could contribute for the whitening and antiaging of human skin.

Key words: response surface methodology, tyrosinase inhibitory activity, fermented milk, *L. plantarum* M23

서 론

Melanin은 태양광선 중 유해한 자외선으로부터 생체를 보호하는 중요한 수단으로 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 물질로 자외선, 건조, 극한온도 등에 대한 생존 능력을 높여주지만, 과도한 melanin 생성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯을 형성하고 피부노화를 촉진시키며, 악성 흑색종의 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 더욱이 멜라닌은 화학적 물리적으로 매우 안정한 물질이어서, 일단 생성된 색소는 피부에 커다란 손상없이 단기간에 분해하여 제거하기가 거의 불가능하기 때문에 이를 방지 및 치료하기 위한 방법으로 피부 미백제로서 멜라닌의 합성을 저해하는 물질을 사용하고

있다. 또한, 식품에서는 채소, 과일, 생선 등의 갈변화 현상을 일으켜 품질을 저하시키는 문제점이 있다(Bell and Weeler, 1986; Chen *et al.*, 1991; Lerner and Fitzpatrick, 1950). Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte의 세포 내 melanosome에서 tyrosinase 효소의 연속적 산화반응으로 생합성 된다(Hashiguchi and Takahashi, 1976).

Tyrosinase는 melanin 생합성과정의 key enzyme으로 페놀화합물을 기질로 이용하는 구리 함유 효소이다. Tyrosine은 tyrosinase에 의하여 L-3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine(L-DOPA)로, L-DOPA를 dopaquinone으로 산화가 되고 이것이 다시 5,6-dihydroxy indole, indole 5,6-quinone으로 산화되어 최종적으로 중합에 의해 melanin이 생합성 된다(Lopez *et al.*, 1992).

Tyrosinase 저해물질로 알려진 것에는 ascorbic acid, kojic acid(Lee *et al.*, 2006), hydroquinone(Fitton and Goa, 1991; Parvez *et al.*, 2006), benzoic acid, retinoid, arbutin(Maeda and Fukuda, 1996) 등이 있는데, 특히 kojic acid와 arbutin

*Corresponding author: Sang-Dong Lim, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea. Tel: 82-31-780-9082, Fax: 82-31-780-9160, E-mail: limsd@kfri.re.kr

은 강한 미백효과를 가지고 있으나 제품 안정성 및 경제성 등의 문제로 사용에 어려움이 있다(Ando *et al.*, 1993; Masuda *et al.*, 1996).

지금까지 melanin의 생성을 억제하는 tyrosinase 저해제의 탐색과 식물체에 대한 tyrosinase 저해 활성 탐색 등의 연구(Jung *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997a, 1997b; Seok *et al.*, 1996) 및 tyrosinase가 피부의 미백 작용과 노화 억제 작용에 관여 한다는 연구(Cho *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997c), 항산화 및 미백활성 연구(Hyun *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2011) 등이 있으나 tyrosinase 억제 활성이 있는 젖산균을 이용한 발효유에 대한 연구는 전무하다.

본 연구는 tyrosinase 활성 저해효과가 있는 젖산균인 *Lactobacillus plantarum* M23 균주를 이용하여 멜라닌 형성을 억제하기 위한 최적 발효유 제조조건을 설정하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

공시시료

원유는 서울우유에서 지원 받았고, 탈지분유는 서울우유, 액상과당은 삼양제넥스, 올리고당은 대상(주), yeast extract는 아이씨푸드(주), 포도농축액(65 brix)은 건우 에프피(주)에서 각각 구입하여 사용하였다. 발효유 제조에 사용한 *L. plantarum* M23 균주는 Heo 등(2007)이 원유에서 분리하였고, tyrosinase 활성 저해효과는 mushroom에서 추출한 tyrosinase에서는 52.1%, Melanoma B16에서 추출한 tyrosinase에서는 32.0%이었다.

발효유 제조

원유 95.56-96.04%, 탈지분유 3.85%와 yeast extract를 0.12-0.60% 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 90°C에서 30분간 살균하였으며, 40°C로 냉각시킨 다음 *L. plantarum* M23 균주를 1%(v/v)로 접종하고, 배양온도 및 시간 별로 최종 pH가 4.4로 감소할 때까지 배양하였다. 발효가 완료된 발효액 84%에 올리고당 5%, 과당 4%, 포도농축액 1-3% 및 정제수 4-6%를 첨가하여 호상발효유를 제조한 다음 관능검사를 실시하였다.

멜라닌 생성억제 젖산균 최적 배양조건 설정

조건설정

멜라닌 활성 저해능이 우수한 균으로 선정된 *L. plantarum* M23의 배양조건을 최적화하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. Yeast extract의 농도(yeast extract con.), 포도 첨가량(grape con.), 배양온도(incubation temp.), 배양시

간(incubation time)의 4가지 독립변수와 수준을 설정하였으며, 종속변수로는 tyrosinase inhibitory activity(TIA)와 pH 그리고 종합적 기호도를 설정하였다. 통계처리는 MINITAB statistical software(Version 13, Minitab Inc., USA)를 사용하였다.

배양조건의 최적화를 위한 반응표면실험법

실험계획은 중심합성계획(Central composite design, Box and Wilson, 1951)을 적용하였다. 독립변수로는 예비실험과 마찬가지로 yeast extract 농도(%), 포도첨가량(%), 배양온도(°C), 배양시간(h)을 설정하였다. 독립변수의 중심값과 범위는 예비실험을 바탕으로 설정되었으며, -2, -1, 0, 1, 2의 5가지 수준으로 부호화하였다(Table 1). 종속변수로는 pH(pH, Y_1), 종합적 기호도(score, Y_2)와 tyrosinase inhibitory activity(%), Y_3)를 설정하였으며, tyrosinase inhibitory activity가 가장 높고 pH는 4.4를 동시에 만족하는 최적화를 실시하였다. 통계 분석 결과를 바탕으로 반응표면 모델식을 구하고 반응표면 그래프(Response surface plots)는 Maple software(Version 7, Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원으로 나타내었다.

Tyrosinase 활성 저해효과

균을 1% 접종하여 pH 4.4에 도달하는 10% 환원탈지유를 4°C, 27,216 g(15,000 rpm)에서 10분간 원심 분리하였다. 얻어진 상등액을 0.45 µm PVDF syringe filter(whatman Co.)로 여과한 후 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였다. Masuda 등(1996)의 방법에 준하여 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 8.0 mM L-Dopa 120 µL와 시료 40 µL를 96-well microplate에 넣고 490 nm에서 흡광도(S_1)를 측정 한 후 tyrosinase mushroom(125 unit/mL)용액을 40 µL 첨가하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 생성된 dopachrome의 양을 microplate reader(Emax, Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도(S_2)를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않고 시료대신 10% 환원탈지유에 lactic acid를 첨가하여 pH 4.4로 맞춘 후 원심분리하여 얻어진 상등액을 첨가하고 측정한 흡광도(C_2 , C_1)로 다음과 같은 식에 의하여 각각의 tyrosinase 활성 저해율(%)을 다음과 같이 구하였다.

Table 1. Independent variables and their levels in the 4-factor, 5-level central composite rotatable design optimizing the incubation condition of selected lactic acid bacteria

Independent variables	Symbol		Levels				
	Coded	Uncoded	-2	-1	0	+1	+2
Yeast extract con. (%)	x_1	X_1	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Grape con. (%)	x_2	X_2	1	1.5	2	2.5	3
Incubation temp. (°C)	x_3	X_3	30	33	36	39	42
Incubation time (h)	x_4	X_4	6	10.5	15	19.5	24

$$\text{활성저해율(\%)} = \frac{(C_2 - C_1) - (S_2 - S_1)}{(C_2 - C_1)} \times 100$$

관능검사

제품의 관능검사는 한국식품연구원내의 연구원들로 실시하였으며, 제품의 색, 맛, 조직감, 종합적 기호도를 9점 기호척도법으로 실시하여 그 결과를 통계처리에 의한 유의성 검정을 하였다.

결과 및 고찰

모두 27개의 구간에서 실험이 행해졌으며, 각각의 구간에 따른 종속변수(Y_1 , Y_2 , Y_3)를 Table 2에 나타내었다. 배양조건을 최적화하기 위하여 4가지 독립변수들의 조합에 대한 종속변수의 반응값을 Table 3에 나타내었다. 독립변수가 4개로써 변수들의 조합이 많기 때문에 2개의 수준에서만 통계분석을 하여 유의성을 알아보았다. 그 결과 pH의 경우 일차항(X_1 , X_2 , X_3 , X_4)에서 X_3 과 X_4 가 유의수준 (P value) 0.05보다 낮게 나와 통계적으로 유의성을 나타내었으며 종속 변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타났다. Regression(교차항)은 X_3X_3 이외에는 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다. Acceptability의 경우는 X_2 와 X_3 이 유의성을 나타내었으며 종속변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타났다. 교차항은 X_4X_4 , X_3X_4 이외에는 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다. tyrosinase inhibitory activity의 경우는 X_3 을 제외한 대부분이 일차항에서 유의성을 나타내었으며 종속변수에 대한 영향이 큰 것으로 나타난 반면 교차항은 X_3X_3 를 제외하고 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다.

Table 2. Central composite design and responses of dependent variables for yogurt with *L. plantarum* M23 to independent variables

Run No.	Coded levels of variables				Response		
	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1 (pH)	Y_2 (Acceptability)	Y_3 (Tyrosinase inhibitory activity)
1	-1	-1	-1	-1	5.00	4.5	26.56
2	1	-1	-1	-1	5.00	4.2	38.71
3	-1	1	-1	-1	4.80	5.2	37.76
4	1	1	-1	-1	4.50	4.7	66.14
5	-1	-1	1	-1	4.37	5.9	28.83
6	1	-1	1	-1	4.37	5.6	36.35
7	-1	1	1	-1	4.34	7.2	61.85
8	1	1	1	-1	4.34	6.6	67.21
9	-1	-1	-1	1	4.12	4.6	48.98
10	1	-1	-1	1	5.05	4.3	57.86
11	-1	1	-1	1	4.11	5.3	82.65
12	1	1	-1	1	4.08	4.8	83.17
13	-1	-1	1	1	4.16	4.6	46.25
14	1	-1	1	1	4.12	5.0	58.67
15	-1	1	1	1	4.15	5.4	77.80
16	1	1	1	1	4.11	5.5	79.03
17	-2	0	0	0	4.50	6.0	66.92
18	2	0	0	0	4.25	5.0	66.73
19	0	-2	0	0	4.35	5.0	36.91
20	0	2	0	0	4.28	6.8	86.05
21	0	0	-2	0	5.50	5.5	37.70
22	0	0	2	0	4.21	4.5	50.20
23	0	0	0	-2	5.00	4.7	37.70
24	0	0	0	2	4.07	4.0	70.49
25	0	0	0	0	4.28	5.8	65.24
26	0	0	0	0	4.29	5.5	58.80
27	0	0	0	0	4.28	6.0	58.80

Table 3. Estimated effects and coefficients for pH, acceptability and tyrosinase inhibitory activity (coded units) about *Lactobacillus plantarum* M23

Variable and interaction	pH		Acceptability		Tyrosinase inhibitory activity	
	Coef	P value	Coef	P value	Coef	P value
Intercept	4.28333	0.00000	5.76667	0.00000	60.94670	0.00000
X_1	0.00083	0.98500	-0.16667	0.16100	3.17000	0.02800
X_2	-0.07917	0.09800	0.40000	0.00400	12.98670	0.00000
X_3	-0.22000	0.00000	0.25833	0.03900	1.63170	0.22200
X_4	-0.19500	0.00100	-0.24167	0.05100	9.85750	0.00000
X_1X_1	0.00521	0.91300	-0.06250	0.60700	1.39060	0.32100
X_2X_2	-0.00979	0.83800	0.03750	0.75700	0.05400	0.96800
X_3X_3	0.12521	0.02000	-0.18750	0.13900	-4.32810	0.00700
X_4X_4	0.04521	0.35300	-0.35000	0.01200	-1.79190	0.20700
X_1X_2	-0.07875	0.17000	-0.06250	0.65600	-0.34250	0.82900
X_1X_3	-0.04250	0.44600	0.07500	0.59300	-1.46250	0.36400
X_1X_4	0.07000	0.21900	0.08750	0.53400	-1.89750	0.24500
X_2X_3	0.10000	0.08900	0.07500	0.59300	1.13620	0.47800
X_2X_4	-0.01500	0.07860	-0.06250	0.65600	0.52370	0.74100
X_3X_4	0.06625	0.24300	-0.32500	0.03500	-2.24870	0.17300

Table 4는 pH, 종합적 기호도 및 tyrosinase inhibitory activity에 대한 ANOVA(Analysis of variance) 결과를 나타낸 것이다. pH의 경우 Main effects(X_1, X_2, X_3, X_4) 유의수준이 0.000으로써 매우 유의성이 높게 나타난 반면에 Square와 2-Way interactions는 각각 0.121과 0.237로서 0.05% 수준에서 유의성이 없는 것으로 나타났다. 종합적 기호도의 경우 역시 Main effects 유의수준이 0.006으로써 유의성이 높게 나타난 반면에 Square와 2-Way interactions (교차항)는 각각 0.065와 0.378을 나타내 유의성이 없는 것으로 나타났다. Tyrosinase inhibitory activity는 pH의 경우와 마찬가지로 Main effects 유의수준이 0.000으로써 매우 유의성이 높게 나타났다. Square는 0.023으로 0.05% 수준에서 유의성이 있었으나 2-Way interactions은 0.547로서 유의성이 없는 것으로 나타났다. 본 디자인에 있어서는 교차항 보다 일차항에 대한 영향이 큰 것으로 나타났다.

상기에서 얻어진 결과를 바탕으로 구한 반응식은 Table 5와 같다. 실험 결과 얻어진 data를 Minitab software를 이용하여 반응표면분석 한 결과를 바탕으로 적합한 2차 다

항식의 모델식을 구하였다. 각각의 독립변수에 대한 각각의 식은 위 모델식과 같으며, 독립변수인 Y_3 의 결정계수 (R^2)는 0.942로 나타났으며, $p=0.000$ 으로 나타났다. 높은 결정계수 및 유의성이 나타난 것은 예비실험을 통해 중심 값 및 범위를 정했기 때문인 것으로 여겨진다.

반응표면 분석 결과 나타난 최적 조건에서의 coded 값과 uncoded 값을 Table 6에 나타내었다. Tyrosinase inhibitory activity가 우수한 발효유 제조 시 최적 조건일 때의 code 값은 $X_1=-1.7293, X_2=1.8923, X_3=0.3647$ 그리고 $X_4=-0.0438$ 로 나타났다. 즉 yeast extract 농도(X_1)는 0.12707%, 포도 첨가량(X_2)은 2.94615%, 배양 온도(X_3)는 37.0941°C, 배양 시간(X_4)은 14.8029 h일 때 최적 pH와 종합적 기호도 그리고 tyrosinase inhibitory activity를 보이는 것으로 나타났으며 각각의 그 결과 값은 Table 7과 같다. 예상되는 pH는 4.42, 기호도는 7.06, tyrosinase inhibitory activity는 86.65%이었으며, 실제 실험 결과 pH는 4.35, 기호도는 6.86, tyrosinase inhibitory activity는 84.05%로서 큰 차이를 나타내지 않았다. 반면 Heo 등(2007)은 10% 환원탈지

Table 4. Analysis of variance for pH, acceptability and tyrosinase inhibitory activity (coded units) about *Lactobacillus plantarum* M23

	Source of variation	DF	SS	MS	F value	P value
pH	Main effects	4	2.22463	0.556158	11.93	0.000
	Square	4	0.42434	0.106084	2.28	0.121
	2-way interactions	6	0.44035	0.073392	1.57	0.237
	Residual error	12	0.55947	0.046622		
	Total	26	3.64879			
Acceptability	Main effects	4	7.5100	1.87750	6.28	0.006
	Square	4	3.5275	0.88188	2.95	0.065
	2-way interactions	6	2.1175	0.35292	1.18	0.378
	Residual error	12	3.5850	0.29875		
	Total	26	16.7400			
Tyrosinase inhibitory activity	Main effects	4	6684.84	1671.21	43.44	0.000
	Square	4	647.61	161.90	4.21	0.023
	2-way interactions	6	199.66	33.28	0.87	0.547
	Residual error	12	461.62	38.47		
	Total	26	7993.73			

DF, Degree of freedom; SS, Sum of squares; MS, Mean square ($MS=SS/DF$)

Table 5. Response surface model for making condition

Responses	Quadratic polynomial model	R^2	p-value
Y_1	$Y_1 = 4.2833 + 0.00083X_1 - 0.07917X_2 - 0.22000X_3 - 0.19500X_4 + 0.00521X_1X_1 - 0.00979X_2X_2 + 0.12521X_3X_3 + 0.04521X_4X_4 - 0.07875X_1X_2 - 0.04250X_1X_3 + 0.07000X_1X_4 + 0.10000X_2X_3 - 0.01500X_2X_4 + 0.06625X_3X_4$	0.847	0.000
Y_2	$Y_2 = 5.76667 - 0.16667X_1 + 0.40000X_2 + 0.25833X_3 - 0.24167X_4 - 0.06250X_1X_1 + 0.03750X_2X_2 - 0.18750X_3X_3 - 0.35000X_4X_4 - 0.06250X_1X_2 + 0.07500X_1X_3 + 0.08750X_1X_4 + 0.07500X_2X_3 - 0.06250X_2X_4 - 0.32500X_3X_4$	0.886	0.000
Y_3	$Y_3 = 60.94670 + 3.17000X_1 + 12.98670X_2 + 1.63170X_3 + 9.85750X_4 + 1.39060X_1X_1 + 0.05440X_2X_2 - 4.32810X_3X_3 - 1.79190X_4X_4 - 0.34250X_1X_2 - 1.46250X_1X_3 - 1.89750X_1X_4 + 1.13620X_2X_3 + 0.52370X_2X_4 - 2.24870X_3X_4$	0.942	0.000

Table 6. Optimal conditions of pH, acceptability, tyrosinase inhibitory activity

Dependent	Independent variables	Critical value		Predicted value	Stationary point
		Coded	Uncoded		
Y ₁ (pH)	X ₁	-0.85705	0.214	4.40	Target
	X ₂	1.31038	2.655		
	X ₃	0.89366	38.681		
	X ₄	-0.39686	13.214		
Y ₂ (Acceptability)	X ₁	-2	0.1	7.80	Maximum
	X ₂	2	3		
	X ₃	2	42		
	X ₄	-2	6		
Y ₃ (Tyrosinase inhibitory activity)	X ₁	-2	0.1	87.99	Maximum
	X ₂	2	3		
	X ₃	-2	30		
	X ₄	2	24		
Multiple response optimization	X ₁	-1.7293	0.12707		
	X ₂	1.8923	2.94615		
	X ₃	0.3647	37.0941		
	X ₄	-0.0438	14.8029		

Table 7. Predicted results of verification under optimized conditions

Dependent	Predicted value	Experimental value
Y ₁ (pH)	4.42	4.35±0.1
Y ₂ (Acceptability)	7.06	6.86±1.21
Y ₃ (Tyrosinase inhibitory activity)	86.65	84.05±2.03

tyrosinase inhibitory activity 52.1%라고 보고한 결과보다 매우 높은 저해효과를 보였다. 이는 젓산이 tyrosinase 저해활성에 농도의존성을 보였다(Usuki *et al.*, 2003)고 한 것과 관련이 있는 것으로 여겨진다.

한편, 독립변수(X₁, X₂, X₃, X₄)가 종속변수(Y₁, Y₂, Y₃)에 미치는 영향을 Maple software(Maple 7. Waterloo Maple Inc., Canada)를 이용하여 3차원 그래프로 나타내었다(Fig. 1). 반응표면 그래프는 독립변수에 대해 영향을 미치는 두 가지 요인 이외의 최적 값을 적용시켜 서로간의 상호관계를 나타내었다. 한편, tyrosinase inhibitory activity가 우수한 발효유 제조조건 중 pH(Y₁)에 중요한 영향을 미치는 요인으로는 배양 온도와 배양 시간 두 가지로 여겨지며 관능평가(Y₂)는 포도 농축액의 첨가량, 배양 온도 및 배양

유에 *L. plantarum* M23 균주를 1% 접종 배양한 후 얻어진 상등액이 mushroom에서 추출한 tyrosinase에 대해

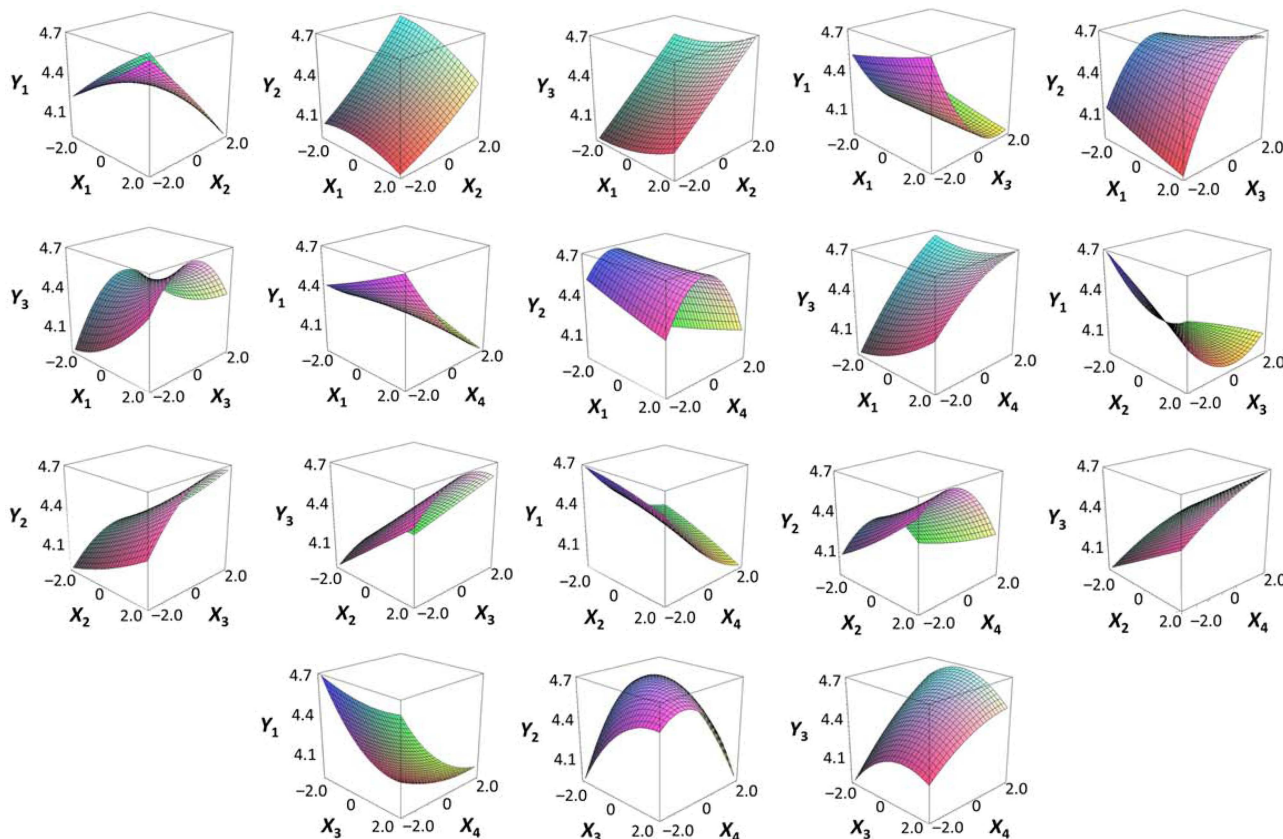


Fig. 1. Response surface plots for the effect of independent variables on dependent (pH, acceptability, tyrosinase inhibitory activity). X₁, yeast extract con.; X₂, grape con.; X₃, incubation temp.; X₄, incubation time; Y₁, pH; Y₂, acceptability; Y₃, tyrosinase inhibitory activity

시간 그리고 tyrosinase inhibitory activity(Y_3)는 포도농축액의 첨가량과 배양 시간으로 여겨진다.

요 약

본 연구는 tyrosinase 활성 저해효과가 있는 젖산균인 *L. plantarum* M23 균주를 이용하여 멜라닌 형성을 억제하기 위한 최적 발효유 제조조건을 설정하는데 그 목적이 있다. 3수준 4인자 중심합성 계획법을 통해 실험설계하여 반응표면분석법을 사용하였다. 독립변수로는 yeast extract 농도(%), X_1), 포도첨가량(%), X_2), 배양온도($^{\circ}\text{C}$), X_3), 배양시간(h), X_4)을 설정하였고, 종속변수로는 pH(pH, Y_1), 종합적 기호도(score, Y_2)와 tyrosinase inhibitory activity(%), Y_3)를 설정하였으며, tyrosinase inhibitory activity가 가장 높고 pH는 4.4를 동시에 만족하는 최적화를 실시한 결과 yeast extract 농도는 0.13%, 포도 첨가량은 2.95%, 배양 온도는 37.1°C , 배양 시간은 14.8 h일 때 예상되는 pH는 4.42, 기호도는 7.06, tyrosinase inhibitory activity은 86.65%이었으며, 실제 실험 결과 pH는 4.35, 기호도는 6.86, tyrosinase inhibitory activity은 84.05%로서 큰 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과를 토대로 melanin 생합성과정의 key enzyme인 tyrosinase을 활성억제하는 *L. plantarum* M23을 이용한 발효유는 피부의 미백 작용과 노화 억제 작용에 기여할 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Ando, S. O., Ando, Y. S., and Mishima, Y. (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 150-155.
- Bell, A. A. and Weeler, M. H. (1986) Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 411-451.
- Box, G. E. P. and Wilson, K. B. (1951) On the experimental attainment of optimum condition. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B*, Vol. 13, pp 1-38.
- Chen, J. S., Wei, C., and Marshall, M. R. (1991) Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.
- Cho, J. H., Lee, K. M., Kim, N. S., and Kang, W. H. (1997) The effects of whitening components on human melanocytes in vitro. *Kor. Cosmetic Sci. Technol.* **23**, 115-121.
- Fitton, A. and Goa, K. L. (1991) Azelaic acid. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and hyperpigmentary skin disorders. *Drugs* **41**, 780-798.
- Hashiguchi, H. and Takahashi, H. (1976) Inhibition of copper containing enzymes, tyrosinase and dopamin β -hydroxylase, by L-Mimosine. *Mol. Pharmacol.* **13**, 362-367.
- Heo, I. S., Kim, K. S., Yang, S. Y., Lee, N. H., and Lim, S. D. (2007) Physiological characteristics and tyrosinase inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* M23 isolated from raw milk. *Kor. J. Food Sci. An.* **27**, 501-508.
- Hyun, S. H., Jung, S. K., Jwa, M. K., Song, C. K., Kim, J. H., and Lim, S. B. (2007) Screening of antioxidants and cosmetics from natural plant resources in Jeju island. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 200-208.
- Jung, S. W., Han, D. S., Kim, S. J., and Jeun, M. J. (1996) Fermentation of tyrosinase inhibitor in mushroom media. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 227-233.
- Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J., and Han, D. S. (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 891-896.
- Kim, J. K., Cha, W. S., Park, J. H., Oh, S. L., Cho, Y. J., Chun, S. S., and Choi, C. (1997) Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from korean green tea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 173-177.
- Kim, S. S., Hyun, C. G., Lee, J. S., Lim, J. H., Kim, J. Y., and Park, D. H. (2007) In vitro screening of Jeju medicinal plants for cosmeceutical materials. *J. Appl. Biol. Chem.* **50**, 215-220.
- Lee, C. H., Chung, M. C., Lee, H. J., Lee, K. H., and Kho, Y. H. (1995) MR304-1, A melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 641-646.
- Lee, G. T., Shin, B. S., Kim, B. J., Kim, J. H., and Jo, B. K. (1997a) Inhibitory effects of ramulus mori extracts on melanogenesis. *Kor. Cosmetic Sci. Technol.* **23**, 60-70.
- Lee, K. T., Kim, B. J., and Kim, J. H. (1997b) Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I) : inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *Intl. J. Cosmetic Sci.* **19**, 291-298.
- Lee, S. H., Kim, J. J., Kim, H. J., Lee, J. T., and Kang, S. H. (1997c) Effects of banha extract on the melanin biosynthesis and tyrosinase mRNA level in B16 mouse melanoma cells. *Kor. Cosmetic Sci. Technol.* **23**, 23-32.
- Lee, Y. S., Park, J. H., Kim, M. H., and Kim, H. J. (2006) Synthesis of tyrosinase inhibitory kojic acid derivative. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **339**, 111-114.
- Lerner, A. B. and Fitzpatrick, T. B. (1950) Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**, 91-126.
- Lopez, J. N. R., Tudela, J., Varon, R., Carmona, F. G., and Canovas, F. G. (1992) Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 3901-3810.
- Maeda, K. and Fukuda, M. (1996) Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 765-769.
- Masuda, M., Tejima, T., and Suzuki, T. (1996) Skin lighteners. *Cosmet. Toiletries* **111**, 65-77.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., Cho, C., Hong, M. C., Shin, M. K., and Bae, H. (2006) Survey and mechanism of

- skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* **20**, 921-934.
24. Seok, C. H., Won, I. I., Kim, J. H., Kim, B. J., Kim, M. Y., and Kim, H. P. (1996) Biological of 100 plant extracts for cosmetic use(II) inhibitory activities of tyrosinase and DOPA autooxidation. *Kor. Cosmetic Sci. Technol.* **22**, 193-200.
25. Usuki, A., Ohashi, A., Sato, H., Ochiai, Y., Ichihashi, M., and Funasaka, Y. (2003) The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. *Exp. Dermatol.* **2**, 43-50.
26. Woo, Y. M., Kim, A. J., Kim, J. Y., and Lee, C. H. (2011) Tyrosinase inhibitory compounds isolated from *Persicaria tinctoria* flower. *J. Appl. Biol. Chem.* **54**, 47-50.

(Received 2012.4.3/Revised 1st 2012.8.10, 2nd 2012.9.17/
Accepted 2012.10.10)