

Clitocybe aurantiaca 균주가 생산하는 주름개선소재 clitocybin A의 대량 발효생산 및 MMP-1 발현저해활성

김관철^{1,2}, 이혁원³, 이홍원³, 추수진³, 유익동^{2,3}, 하병조^{1*}

¹을지대학교 대학원 보건학과

²이노스킨주식회사 피부과학연구소

³한국생명공학연구원 바이오상용화센터

Received: May 21, 2014 / Revised: May 28, 2014 / Accepted: May 28, 2014

Fermentation Process for Mass Production of Clitocybin A, a New Anti-Wrinkle Agent from *Clitocybe aurantiaca* and Evaluation of Inhibitory Activity on Matrix Metalloproteinase-1 Expression

Kwan-Chul Kim^{1,2}, Hyeok-Won Lee³, Hong-Won Lee³, Soo-Jin Choo³, Ick-Dong Yoo^{2,3}, and Byung-Jo Ha^{1*}

¹Department of Public Health, Graduate School of Science, Eulji University, Seongnam 461-832, Republic of Korea

²Innoskin Co., Ltd. BVC 209, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Republic of Korea

³Biotechnology Process Engineering Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Republic of Korea

Clitocybin A is a novel anti-wrinkle cosmetic agent produced by the strain from a Korean native mushroom *Clitocybe aurantiaca*. In this study, fermentation, extraction, and purification conditions for a large scale production of clitocybin A were optimized, and its cytotoxicity and inhibition activity on the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) were characterized. The mass production of anti-wrinkle agent was achieved according to the 300 L fermentation process with a fed-batch cultivation using the modified yeast-maltose (YM) broth, and a total of 12.5 kg of cell mass was obtained in a 120 L culture broth for 14 days. After extraction and purification, clitocybin A was identified by HPLC. The cytotoxicity of clitocybin A was examined by the MTT assay. When assayed at 100 and 200 µg/ml concentrations, clitocybin A showed no cytotoxicity, demonstrating safety. The inhibition activity of clitocybin A on the expression of MMP-1 was examined against UV irradiation. Oleanolic acid (control group) showed a relatively low MMP-1 inhibiting activity (ca. 16.7%) at 10 µg/ml and showed increased cytotoxicity at higher concentrations. In contrast, clitocybin A showed no cytotoxicity at 100 µg/ml, and exhibited a relatively high MMP-1-inhibiting activity (33.1%). These findings indicate that clitocybin A may be a safe and effective anti-wrinkle agent for use in functional cosmetics.

Keywords: *Clitocybe aurantiaca*, clitocybin A, anti-aging, anti-wrinkle, MMP-1

*Clitocybe aurantiaca*는 일명 피꼬리큰버섯으로 불리는 국내 자생버섯의 일종으로 그물버섯목, 피꼬리큰버섯과에 속하는 *Hygrophoropsis aurantiaca*로 명명되다가 주름버섯목, 송이버섯과로 재 분류된 담자균류이다. 최근 국립수목원에서 편찬한 버섯생태도감[2]에 의하면 국내에는 *C. candicans*, *C. dealbata*, *C. fragrans*, *C. gibba*, *C. lateritia*, *C. nebularis*, *C. odora*, *C. phyllophila* 등 8종이 자생하고 있다고 보고되

었으나, *C. aurantiaca* 균주를 포함한다면 총 9종의 *Clitocybe* 속 균주가 자생하고 있다고 할 수 있다. *C. aurantiaca* (= *Hygrophoropsis aurantiaca*) 버섯은 가을에 침엽수림 내 땅 위나 그루터기에 무리 지어 군생하고 있으며 형태적 특징으로 균모는 지름 2-9 cm로 둥근 산 모양, 편평형을 거쳐 깔때기 모양으로 된다. 표면은 등적황색-갈등황색이고 가는 털로 덮여 있고, 주변부는 안쪽으로 구부러지고 물결모양을 이룬다. 주름살은 내린 주름살로 등색이며 3-5회 분지한다. 자루는 길이 4-7 cm로 상하 크기가 같고 황적갈색이다. 포자는 9-10 × 4-7 µm로 타원형을 이루고 매끄러우며 포자분은 백색을 이루는 특색이 있다[8].

*Corresponding author

Tel: +82-31-740-7246, Fax: +82-31-740-7358

E-mail: bjha@eulji.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

C. aurantiaca 균주가 생산하는 제이차 대사산물 중 항노화 및 주름개선 관련 연구는 필자들의 연구결과가 대부분이다. Kim 등[4]은 *Clitocybe aurantiaca* KCTC 11143BP 배양액으로부터 $C_{14}H_{11}NO_4$ 의 분자식을 갖는 iso-indolinone계 신규 항노화 활성물질인 4,6-dihydroxy-2-p-hydroxyphenyl-isoindol-1-one을 순수하게 추출 정제하여 clitocybin A라 명명하고 superoxide 및 ABTS 라디칼을 각각 IC_{50} 10.3 및 $6.4 \mu M$ 농도에서 소거하며, 특히 H_2O_2 에 의해 유도되는 DNA 분해를 매우 효과적으로 억제한다고 보고하였다. 또 Moon 등[10]은 clitocybin A 화합물이 free 라디칼을 소거함에 따라 세포노화 및 apoptotic 세포사멸을 강력하게 억제함을 확인하고 그 작용기전을 규명하였다. 한편, Yoo 등[12, 20]은 혈관평활근세포의 이상증식을 억제한다는 결과를 보고하였으며 이는 혈관평활근세포의 과도한 증식에 의해 유발되는 혈관협착증이나 심혈관 질환 치료효과가 예상된다고 하였다. 또 Kim 등[5]은 *Clitocybe aurantiaca* KCTC 11143BP 배양액으로부터 또 다른 신규 유도체를 발견하여 clitocybin D로 명명한 후 주름생성의 원인이 되고 있는 human neutrophil elastase 억제활성이 epigallocatechin gallate와 대등한 효과가 있음을 보고하였다.

한편, Zhenq 등[21]은 *C. sinopica* 자실체로부터 44 kDa의 항세균성 물질을 보고하였으며, Nakajima 등[11]은 *C. acromelalga*이 생산하는 버섯 독극물을 규명하였다. 그 밖에도 Pohleven 등은 살충성 활성을 나타내는 lectin 관련 연구[13], 항산화 활성연구[16] 등을 수행하였다. 또한 Seok 등[14]은 국내에서 새로운 종을 발견하여 *C. albofundibulliforme*라고 명명하고 포자의 형태 등 형태적 특성을 규명하였다. 특히 Yoo 등[18, 19]에 의한 대한민국 특허가 등록되어 있다.

본 연구에서는 *Clitocybe aurantiaca* KCTC 11143BP 균주가 생산하는 항노화 활성물질인 clitocybin A 화합물의 대량생산을 위한 최적 배지의 선정 및 발효조건을 확립하고 발효생산물 중 clitocybin A 화합물의 추출정제 방법, 기능성 주름개선 화장품 소재로 활용하기 위한 세포독성 및 MMP-1 발현 억제활성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 발효기

본 연구에 사용한 미생물배지 및 시약은 모두 (주)Difco (USA) 제품을 사용하였으나 300 L 대용량 발효조 배양시 yeast peptone은 (주)Biospringer (USA)의 yeast peptone 0202를 사용하였다. 발효 중의 기포 발생억제를 위한 소포제는 (주)Sigma (USA)의 antifoam 204를 사용하였다. 발효기는 (주)Kobiotech (Korea)의 KFC LA-150 5 L 발효기 및

KFC 300LB 300 L 발효기를 사용하였으며 포도당 농도는 (주)YSI (Korea) 2700 SELECT를 사용하여 조절하였다. 균체량은 packed mycelium volume (PMV, %)을 측정하였다. 즉 배양액 30 ml를 경시적으로 conical tube에 취한 후 15,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액의 부피를 측정하여 침전물의 부피를 구한 후 침전물의 부피를 백분율하여 부피차를 측정하여 구하였다. 오차를 줄이기 위하여 각각 3반복으로 측정하였다.

미생물 균주 및 배양조건

주름개선 소재인 clitocybin A의 발효생산을 위하여 사용된 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 보관하고 있는 *Clitocybe aurantiaca* KCTC 11143BP 균주를 사용하였다. 고체배지는 yeast-maltose (YM) 고체배지(yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, bacto peptone 5 g/l, glucose 10 g/l, agar 15 g/l)와 potato-dextrose (PD) 고체배지(potato starch 4 g/l, glucose 20 g/l, agar 15 g/l)를 사용하였으며 28°C에서 7일간 전 배양하여 사용하였다. 5 L 회분식 배양을 위한 전 배양은 100 ml의 YM 액체배지 및 PD 액체배지를 함유한 1 L Erlenmeyer flasks를 사용하였고 28°C, 150 rpm에서 5일간 배양하였으며, 300 L 유가식 배양은 YM 액체배지에서 5일동안 전 배양한 배양액 100 mL를 1 L의 YM 액체배지를 함유한 5 L Erlenmeyer flasks에 옮겨 28°C, 150 rpm에서 5일 배양 후 본 배양에 사용하였다. 특히 300 L 유가식 본 배양시의 배지는 YM 액체배지를 변형하여(yeast extract 30 g/l, glucose 80 g/l, KH_2PO_4 1.5 g/l, $MgSO_4$ 1 g/l, antifoam 2 ml/l) 사용하였다. 5 L 회분식 배양과 300 L 유가식 배양의 working volume은 각각 3 L와 120 L로 하였고 pH는 조절하지 않았다. 교반은 5 L 회분식 배양은 0.5 air volume/liquid volume/minute (vvm), 300 L 유가식 배양은 0.4-0.8 vvm으로 유지하며 배양하였다.

세포주의 배양 및 조제

본 시험에 사용된 시험재료는, cell proliferation reagent WST-1은 Roche 1644-807, DC protein assay kit는 bio-rad 500-0116, human total MMP-1 ELISA kit는 R&D system DY901, oleanolic acid는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다. 사용한 세포주는 human neonatal foreskin에서 유래한 normal human primary dermal fibroblasts-neonatal (HDF-N)로서 배양접시 바닥에 접종한 후 0.1% insulin, 0.1% rhFGF, 0.1% gentamicin, 2% FBS를 함유하는 fibroblast basal medium (FBM, lonza, CC-3131) 배지를 넣고, 37°C를 유지하며 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다.

세포독성시험

Clitocybin A 화합물의 세포독성을 확인하기 위하여 HDF-N cells에서의 세포독성을 측정하였다. 즉, HDF-N cells를 96 well plate에 각각 5×10^3 cells/well로 분주한 다음 세포 배양 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 12시간의 기아 상태를 유지한 뒤, clitocybin A 및 새로운 배지(media supplement 제외)를 넣고, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포의 생존율을 측정하기 위하여 WST-1 반응액을 supplement가 제외된 배지에 1/10로 희석하고 이를 각 well 당 100 μ l씩 처리하여 1시간동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

자외선에 의한 MMP-1 발현 억제시험

Clitocybin A 화합물이 자외선에 의한 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HDF-N 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주한 다음 37°C, 5% 농도의 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 자외선 챔버를 이용하여 배양한 세포에 영향을 주지 않는 범위인 UV-A 5 J/cm² + UV-B 40 mJ/cm²를 조사한 후 시료가 첨가된 배지로 교환하여 48시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 human total MMP-1 ELISA kit를 이용하여 MMP-1 발현 정도를 측정하였다. 이때 oleanolic acid를 비교군으로, 시료를 처리하지 않은 세포배양액의 반응 흡광도를 대조군으로 설정하였으며 각각 3회씩 반복하여 평균값을 구하였다. 측정값은 아래의 수학적식에 의해 MMP-1 발현 저해 정도를 나타내었다.

$$\text{MMP-1 발현저해율(\%)} = \frac{\text{대조군의 반응흡광도} - \text{시료의 세포배양액 반응흡광도}}{\text{대조군의 반응 흡광도}} \times 100$$

통계처리

실험결과는 각 군의 Student *t*-test를 이용하여 *p*-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

***C.aurantiaca* KCTC 1143BP의 5 L 회분식 배양**

C.aurantiaca KCTC1143BP 균주를 이용한 5 L 발효조 회분식 배양에서 PD 액체배지를 이용하여 28°C, 14일동안 배양한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 먼저 pH의 변화를 보면 배양초기 pH 5.6으로 시작하여 배양 5일경에는 pH 6.0까지 미미하게 증가하다가 다시 서서히 저하되어 배양 14일경에는 pH 5.5를 나타내 전반적으로 큰 변화는 나타나지 않았다. 그와 동시에 용존산소(DO)의 농도 변화도 초기 100%에서

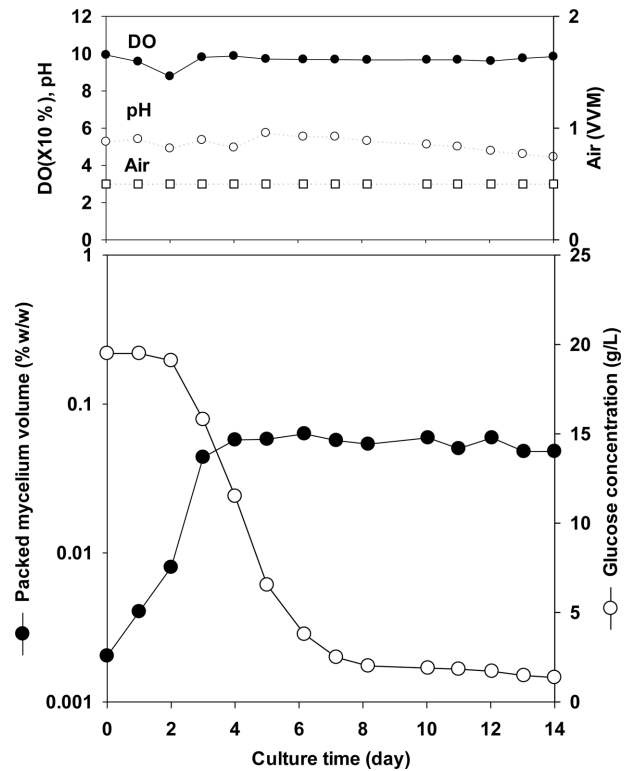


Fig. 1. Batch culture profile of *C. aurantiaca* using potato-dextrose (PD) broth in 5 L jar fermenter.

배양 후 2일에는 약 82%까지 저하하다가 바로 회복되어 배양 종료 시까지 큰 변동 없이 유지되었다. 그와 함께 공시한 균주의 packed mycelium volume (PMV)은 초기 0.0057 (% PMV)에서 배양 4일 후에는 0.006 (% PMV)을 나타낸 후 더 이상의 증가 없이 오히려 미미하게나마 서서히 저하하는 것으로 나타났다. 이와 동시에 배지 중의 포도당의 농도도 배양 3일경부터 급격하게 저하하여 배양 6일경에는 거의 소진되었다. 이상으로 *C.aurantiaca* KCTC 1143BP 균주는 5 L 발효조 회분식 배양에서 PD 액체배지를 이용하여 배양 할 경우 14일간 배양하여도 균체 성장이 원활하지 않았고, 따라서 PMV가 매우 낮음을 알 수 있었다. 14일간 배양이 진행되면서 배지 중의 용존산소 및 pH의 경시적 변화가 거의 없었던 것도 동일한 이유로 추정되었다. 이상의 결과는 PD 액체배지가 *C.aurantiaca* KCTC1143BP 균주의 발효에는 적합하지 않은 배지임을 시사한다고 하겠다.

한편, 5 L 발효조 회분식 배양에서 YM 액체배지를 이용하여 28°C에서 14일간 배양한 경우에는 Fig. 2와 같이 PMV가 0.0087 (% PMV)로 PD 액체배지를 사용했을 때보다 월등히 높게 나타났다. 그와 함께 pH 변화도 배양초기에는 pH 4.0까지 저하하다가 서서히 증가하기 시작하여 배양 후기에는 pH 6.95까지 상승하여 일반적인 담자균류의 배양패턴을

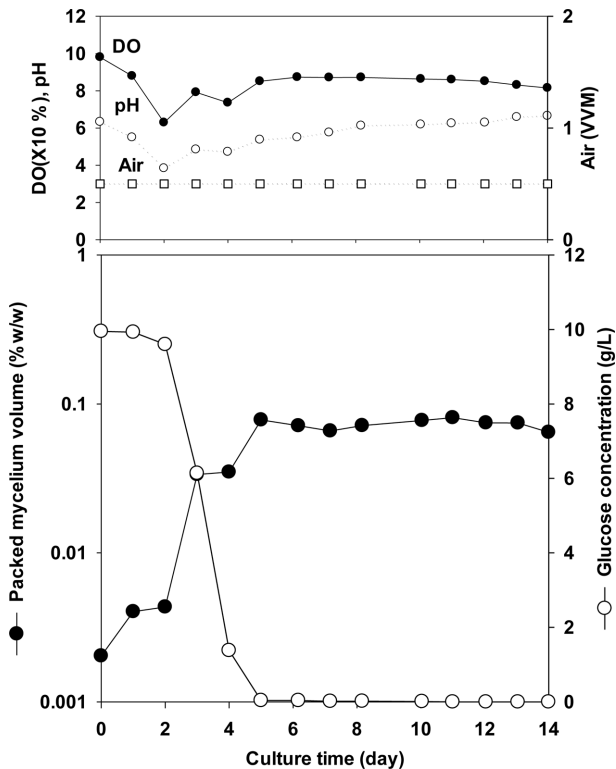


Fig. 2. Batch culture profile of *C. aurantiaca* using yeast-maltose (YM) broth in 5 L jar fermenter.

보여 주었다. 배지 중의 용존산소의 경시적 변화도 배양 초기에는 pH의 변화와 함께 62.9%까지 저하 하다가 서서히 상승하여 배양 후기에는 80% 정도를 유지하여 후기까지 세포가 활발히 증식하고 있음을 시사하였다. 이상의 결과로부터 *C.aurantiaca* KCTC 11143BP의 발효공정에는 PD 액체배지 보다는 YM 액체배지가 적합하다고 판단되었다.

C.aurantiaca KCTC 11143BP의 300 L 유가식 배양

C. aurantiaca KCTC11143BP 균주 발효를 통한 clitocybin A의 대량생산을 위하여 300 L 발효기를 이용하여 유가식 배양한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 300 L 발효기 유가식 배양 시에는 상기의 결과에서 PD 액체배지보다 YM 액체배지가 양호함을 확인하였기 때문에 YM 액체배지를 사용하여 배양하였다. 즉, 본 배양인 300 L 발효조의 경우, 28°C에서 14시간 배양된 4 L의 종균 배양액을 120 L의 YM 액체배지를 포함한 300 L 발효조에 접종하였다. 교반은 용존산소 농도가 20% 이상 유지되도록 150-200 rpm 범위 내에서 교반 속도를 조절하며 배양하였다. YM 액체배지를 이용한 5 L 회분식 배양에서의 초기 포도당 농도를 10 g/l 농도로 하였을 때 배지 중의 포도당이 급속도로 감소함을 확인하였기 때문에 300 L 발효기 유가식 배양에서는 초기 포도당 농도를 80 g/l로

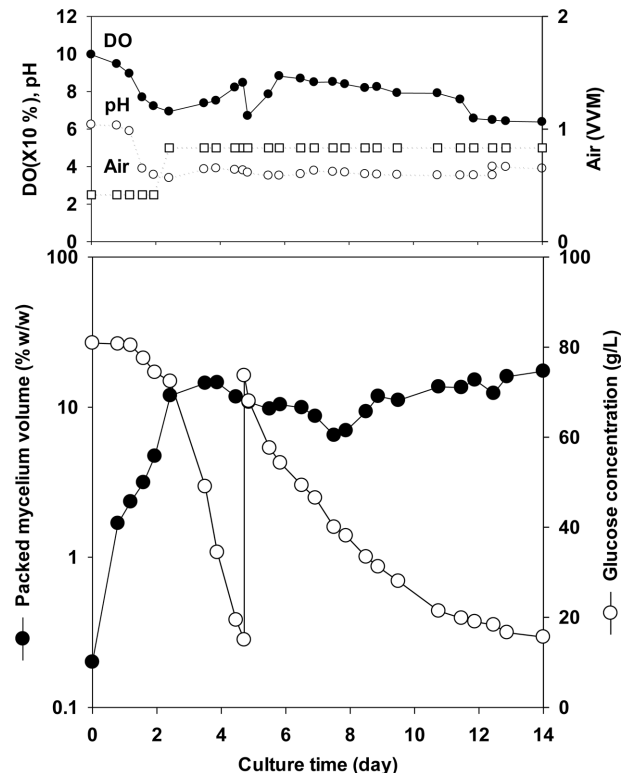


Fig. 3. Fed-batch culture profile of *C. aurantiaca* using modified yeast-maltose (YM) broth in 300 L fermenter.

상향 첨가하고 배양 90시간 후에 다시 50 g/l의 포도당을 첨가함으로써 활발한 세포성장을 유도하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 PMV는 최대 15.1 (% PMV)을 나타내 5 L 발효기를 이용하였을 때에 비하여 매우 양호한 세포성장성이 이루어짐을 확인할 수 있었다. 또한, 배양 후 30시간이 경과하였을 때 균체의 증식과 포도당 소비속도를 증가시키기 위하여 5N KOH를 이용하여 pH를 3.5에서 4.0으로 소폭 상승시켰지만 효과는 미비하게 나타났다. 배양기간 14일간의 장기간 배양으로 인하여 약 30%의 배양액이 유실되었으나 배양이 종료된 후 원심분리 된 균사체의 동결건조를 통하여 균체 수율을 계산한 결과, 12.5 kg/120 L의 *C. aurantiaca* KCTC11143BP 균사체를 확보할 수 있었다.

담자균류는 일반적으로 세균이나 방선균 등에 비해 배양기간이 길고, 그에 비하여 균체량은 소량으로 담자균류 배양 균사체를 활용하기에 많은 문제점을 가지고 있다. 본 연구결과, *C.aurantiaca* KCTC11143BP 균주는 5 L 발효조를 이용하여 회분식으로 배양하였을 경우, PD 액체배지보다 YM 액체배지에서 양호하게 잘 자라는 것을 확인하였다. 또한 YM 액체배지를 사용하여 유가식으로 배양할 경우, 매우 높은 PMV의 증가량을 보였으며 균체 생산량도 12.5 kg/120 L의 높은 수율을 얻었다. 이는 104 g/l의 수율에 해당하는 균체

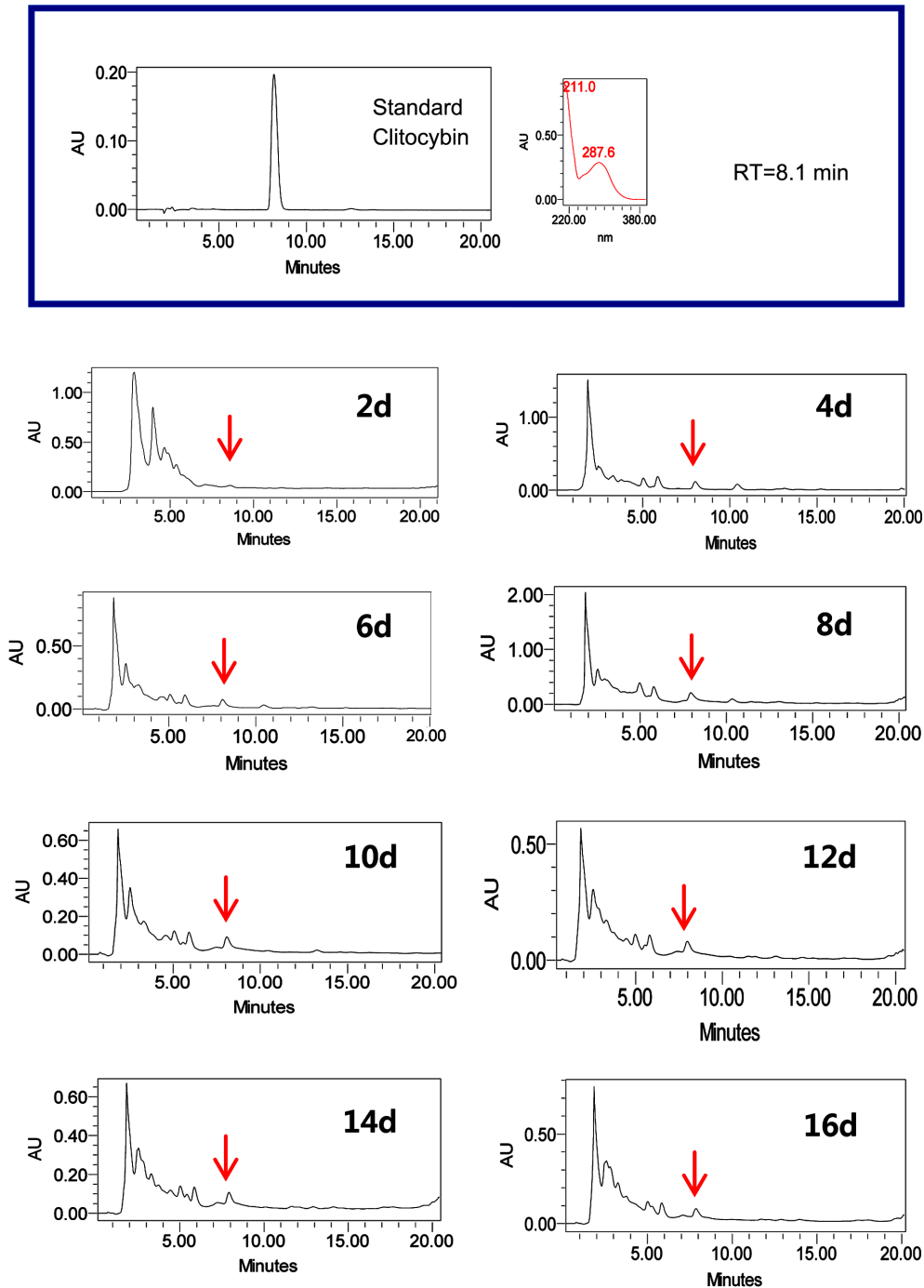


Fig. 4. HPLC profile of EtOAc extract of fermented cell mass by *C. aurantiaca*.

량이다. Kim 등[3]은 담자균류의 일종인 *Agaricus bisporus* 균주 배양시 최대 15.0 g/l의 균사체를 생산하였다고 보고하였으며, Xu 등[17]도 medicinal mushroom의 일종인 *Trametes trogii* 균주를 stirred-tank 및 airlift reactors를 이용하여 배양하였을 경우 최대 10.81 g/l를 얻었다고 보고하였다. 또한

Silva 등[15]도 *Pleurotus ostreatus* 균주 배양액으로부터 항암 활성을 나타내는 다당류를 생산하기 위한 배양에서 최대 9.35 g/l의 수율을 얻었다고 보고하였다. 이들의 결과에 비하여 본 연구결과는 매우 우수한 균체 생산량을 얻은 결과라 할 수 있다. 이는 본 배양 시 YM 변형배지를 사용하여 yeast

extract 30 g/l, glucose 80 g/l 등 탄소원과 질소원을 충분히 넣어준 결과라고 하겠다.

주름개선 소재 clitocybin A의 추출정제

C.aurantiaca KCTC 11143BP 균주의 유가식 배양을 통하여 확보한 균사체 추출물 중의 clitocybin A 함유량을 배양 일수에 따라 경시적으로 조사한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 즉 배양 시작 후 2일, 4일, 6일, 8일, 10일, 12일 및 14일의 배양 균사체를 채취한 후 먼저 동량의 acetone으로 1차 추출하였다. Acetone 추출물은 다시 동량의 EtOAc로 분획 추출한 후 EtOAc 층을 chloroform : methanol 비율을 50:1에서 1:1로 순차적으로 silica gel column chromatography를 실시하여 분획한 후 fraction 3과 fraction 4를 재차 용매 100% MeOH을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. 최종적으로 HPLC (20% MeCN, 210 nm)을 실시하여 배양액 중의 clitocybin A 함유량을 확인하였다. 이때, 순수한 clitocybin A 화합물을 standard로 비교하여 retention time 8.1 분대의 피크를 확인함으로 배양액 중의 clitocybin A 함유량을 확인하였다. 그 결과, Fig. 4와 같이 배양 후 2일경에는 피크가 보이지 않다가 배양 후 4일경부터 clitocybin A의 피크가 보이기 시작하여 배양 후 8일, 10일 이후에는 안정적으로 clitocybin A가 생성됨을 확인할 수 있었다.

Clitocybin A의 세포독성

Clitocybin A 화합물의 *in vitro* 세포독성은 세포의 미토콘드리아 활성에 의존하여 세포의 생존을 결정할 수 있는 WST-1 반응액에 의해 측정되었다. 즉 세포 생존율은 HDF-N 세포를 이용하여 평가하였으며 시료를 제외한 배양 배지만 처리한 값(control)에 대한 백분율로 나타냈다. 즉 clitocybin A를 최저 농도 0.001 µg/ml에서 최고 농도 200 µg/ml까지 각 농도 별로 처리한 후 세포 생존율을 측정함으로써 본 화합

물의 세포독성을 조사하였다. 대조 화합물로는 MMP-1 효소 활성 조사 시 일반적으로 사용하는 oleanolic acid를 사용하였다. 그 결과, 대조구인 oleanolic acid 처리구에서, 배양배지만 처리한 구의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, oleanolic acid 0.5, 1.0, 5.0, mg/ml 처리시에는 102.4 ± 1.4, 102.9 ± 4.0, 103.7 ± 5.0%로 거의 변화가 없다가 10.0, 15.0, 20.0 µg/ml 처리시에는 각각 110.1 ± 1.4, 107.8 ± 10.9, 125.1 ± 7.6%로 미세하나마 세포증식효과를 나타내는 경향이였다. 그러나 25.0 µg/ml 처리시에는 37.5 ± 1.2%의 세포 생존율을 보이며 급격한 세포독성을 나타냈다(Table 1).

한편, clitocybin A 처리구에서는 배양배지만 처리한 구의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, clitocybin A 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 µg/ml 처리시의 생존율은 각각 93.8 ± 3.0, 99.3 ± 1.5, 95.4 ± 3.4, 100.3 ± 3.6%로 별 변화가 없다가 10.0, 100.0 µg/ml 처리시에는 114.7 ± 5.0, 134.6 ± 10.4%로 세포 생존율이 약간 증가하였다. 그러나 200.0 µg/ml 처리시에는 73.5 ± 5.5%로 세포가 감소하기 시작하는 것으로 나타났다(Table 1).

이상의 결과로부터 clitocybin A 화합물은 대조구로 활용되는 oleanolic acid에 비하여 매우 안전하며 100.0 µg/ml의 고농도를 처리하여도 오히려 135% 정도의 세포증식 효과를 나타내는 안전한 화합물임을 확인하였다.

Clitocybin A 화합물의 MMP-1 발현 억제활성

Clitocybin A 화합물의 주름개선 효능을 확인하기 위하여 주름생성에 직접적으로 관여하는 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 발현 저해효능을 immuno ELISA assay법을 이용하여 조사하였으며 이때 oleanolic acid를 표준 대조구로 비교 검토하였다(Table 2). 먼저 대조구인 oleanolic acid 처리구에서, oleanolic acid 0.5, 1.0, 5.0 µg/ml 처리시에는 각각 7.5, 5.3, 4.2%로 미미한 MMP-1 저해활성을 보이거나 혹은 거의 변화가 없었으나 10.0 µg/ml 처리시에는 16.7%의 MMP-1의

Table 1. Cytotoxicity of clitocybin A.

Sample	Concentration (µg/ml)	Cell viability (%)	Sample	Concentration (µg/ml)	Cell viability (%)
Control	0	100	Control	0	100
Clitocybin A	0.001	93.8 ± 3.0	Oleanolic acid	0.5	102.4 ± 1.4
	0.01	99.3 ± 1.5		1	102.9 ± 4.0
	0.1	95.4 ± 3.4		5	103.7 ± 5.0
	1	100.3 ± 3.6		10	110.1 ± 1.4
	10	114.7 ± 5.0		15	107.8 ± 10.9
	100	134.6 ± 10.4		20	125.1 ± 7.6
	200	73.5 ± 5.5		25	37.5 ± 1.2

The data were expressed as mean values (± standard deviations) of three experiments.

Table 2. Effect of clitocybin A on the expression of MMP-1 mRNA.

Sample	Concentration (μg/ml)	MMP-1 Inhibition Activity (%)	Sample	Concentration (μg/ml)	MMP-1 Inhibition Activity (%)
Clitocybin A	0	0	Oleanolic acid	0	0
	0.001	-1.1		0.5	7.5
	0.01	-2.0		1	5.3
	0.1	1.1		5	4.2
	1	2.0		10	16.7
	10	9.9		15	3.2
	100	33.1		20	-37.6

The data were expressed as mean values of three experiments.

저해활성을 나타냈다. 한편, clitocybin A 처리구에서는 10.0, 100.0 μg/ml 처리구에서 9.9, 33.1%로 높은 MMP-1 발현 저해활성을 나타냈다. 이상의 결과로부터 대조구인 oleanolic acid는 비교적 낮은 농도인 10.0 μg/ml 처리에서 약 16.7%의 MMP-1 발현 저해활성을 보였으며, clitocybin A는 10-100 μg/ml 농도 처리시 높은 MMP-1 저해활성을 보여 대조구인 oleanolic acid 보다 우수한 소재임을 확인하였다.

인체의 주름생성에는 MMP-1효소가 매우 중요한 인자가 되며 따라서 MMP-1의 발현을 저해하는 화합물은 주름개선 화장품 소재로 효과가 있다는 것은 이미 잘 알려져 있다 [1, 6, 7, 9]. 특히 Kim 등[6]은 주름개선 소재로 *Sanguisorba officinalis* 뿌리 추출물로부터 ziyuglycoside I을 분리한 후 MMP-1 및 type I collagen 합성능을 조사하여 우수한 효과가 있다는 것을 규명하여 화장품 소재로 활용하고 있다. 본 연구결과, 주름개선 소재로 활용되고 있는 대조군인 oleanolic acid는 10 μg/ml 처리까지는 16.6% 정도의 MMP-1 발현 저해활성을 나타내나 그 이상의 농도를 처리하면 오히려 급격한 역효과를 내고 있지만, clitocybin A는 100 μg/ml의 농도를 처리하여도 33.1%의 MMP-1 발현 저해활성을 보여 안전하면서도 주름개선 효과가 우수한 항노화 소재임을 확인하였다. 향후 clitocybin A의 주름개선 효과를 임상학적으로 검증할 예정이다.

요 약

본 연구에서는 국내 자생버섯의 일종인 *Clitocybe aurantiaca* KCTC11143BP 균주가 생산하는 주름개선 화장품 신소재 clitocybin A의 발효생산 최적조건, 추출정제조건, 세포독성 및 자외선 조사에 따른 MMP-1 발현 저해활성을 규명하였다. *C. aurantiaca* 균주를 5 L 발효조를 이용하여 회분식으로 배양하였을 경우, PD 액체배지보다 YM 액체배지에서 양호하게 생육하는 것을 확인하였다. 300 L 용량의 대형 발효조에서 modified된 YM 배지를 이용한 유가식 배양으로 14

일간 배양한 결과, 12.5 kg/120 L의 총 균체량을 얻었다. 발효 추출물로부터 항노화 소재인 clitocybin A를 추출정제를 한 후 HPLC를 실시하여 배양 4일째부터 clitocybin A가 생산되고 있음을 확인하였다. Clitocybin A 화합물의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시한 결과, 100 μg/ml 농도로 처리하였을 경우 134.6 ± 10.4%로 오히려 세포가 증식하여 안전한 소재임을 확인하였다. 반면, 대조군으로 사용한 oleanolic acid는 25 μg/ml 농도에서도 강한 세포독성을 나타냈다. 또한, clitocybin A는 100 μg/ml 처리시 33.1%의 MMP-1 발현 저해활성 보여 주름개선 기능성화장품 소재로 매우 우수한 화합물임을 확인하였다.

Acknowledgments

This work was supported by the INNOPOLIS Foundation of Korea grant funded by the Korea government Ministry of Science, ICT & Future Planning.

References

- Farwick M, Watson RE, Rawlings AV, Wollenweber U, Lersch P, Bowden JJ, et al. 2007. Salicyloyl-phytoosphingosine: a novel agent for the repair of photoaged skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **29**: 319-329.
- Han SK, Cho JW, Cho HJ, Kim HJ, Lee YM. 2013. A field guide to mushrooms, pp. 386-393. 2th Ed. *Korea national arboretum*, Hwang TS, Geobook, Seoul.
- Kim KB, Choi B, Lee I, Kwon S, Oh K, Kim AY. 2011. Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *J. Sci. Food Agric.* **91**: 1561-1568.
- Kim YH, Cho SM, Hyun JW, Ryoo IJ, Choo SJ, Lee SK, et al. 2008. A new oxidant, clitocybin A, from the culture broth of *Clitocybe aurantiaca*. *J. Antibiot.* **61**: 573-576.
- Kim YH, Ryoo IJ, Choo SJ, Xu GH, Seok SJ, Bae KH, et al. 2009. Clitocybin D, a novel human neutrophil elastase inhibi-

- tor from the culture broth of *Clitocybe aurantiaca*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 1139-1141.
6. Kim YH, Chung CB, Kim JG, Park SH, Kim JH, Eom SY, *et al.* 2008. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 303-311.
 7. Kim YH, Kim KH, Han CS, Yang HC, Park SH, Jang HI, *et al.* 2010. Anti-wrinkle activity of *Platycarya strobilacea* extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *J. Cosmet. Sci.* **61**: 211-214.
 8. Lee JY. 1993. *Hygrophoropsis aurantiaca*. pp. 203. Coloured Korean mushrooms, Vol. I. Academy. Seoul.
 9. Maity N, Nema NK, Abedy MK, Sarkar BK, Mukherjee PK. 2011. Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.* **137**: 1300-1305.
 10. Moon EY, Kim YH, Ryoo IJ, Yoo ID. 2009. Clitocybins, novel isoindolinone free radical scavengers, from mushroom *Clitocybe aurantiaca* inhibit apoptotic cell death and cellular senescence. *Biol. Pharm. Bull.* **32**: 1689-1694.
 11. Nakajima N, Ueda M, Nigashi M, Katayama Y. 2013. Therapeutic potential of nicotinic acid in erythromelalgia associated with *Clitocybe acromelalga* intoxication. *Clinical Toxicology* **51**: 815-815.
 12. Park ES, Yoo KD, Kang SI, Yoo SH, Won HH, Kim YH, *et al.* 2012. Clitocybin A, a novel isoindolinone, from mushroom *Clitocybe aurantiaca*, inhibits cell proliferation through G1 phase arrest by regulating PI3K/Akt cascade in vesicular smooth muscle cells. *J. Pharmacological Sci.* **118**: 171-177.
 13. Pohleven J, Brzin J, Vrabec L, Leonardi A, Cokl A, Strukelj B, *et al.* 2011. Basidiomycete *Clitocybe nebularis* is rich in lectins with insecticidal activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**: 1141-1148.
 14. Seok SJ, Kim YS, Park KM, Kim WG, Yoo KH, Park IC. 2009. New species of agaricales. *Mycobiology* **37**: 295-299.
 15. Silva S, Martins S, Kamali A, Eosa E. 2012. Production, purification and characterization of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumor activity. *J. Sci. Food Agric.* **92**: 1826-1832.
 16. Vaz JA, Heleno SA, Martins A, Almeida GM, Vasconcelos MH, Ferreira IC. 2010. Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: *in vitro* antioxidant activity and growth inhibition of human tumor cell lines. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 2881-2884.
 17. Xu C, Geng L, Zhang W. 2013. Production of extracellular polysaccharides by the medicinal mushroom *Trametes trogii*(high Basidiomycetes) in stirred-tank and airlift reactors. *Int. J. Med. Mushrooms.* **15**: 183-189.
 18. Yoo ID, Ryoo IJ, Kim YH, Choo SJ, Lee SK. 2010. Novel clitocybin derivates, preparation method thereof and composition containing the same for prevention of aging as an active ingredient. *Korea Patent No.* 100991375.
 19. Yoo ID, Ryoo IJ, Kim YH, Choo SJ, Lee SK. 2010. The composition comprising the extract or fraction of *Hygrophoropsis aurantiaca* for prevention of aging as an active ingredient. *Korea Patent No.* 100998570.
 20. Yoo KD, Park ES, Lim Y, Kang SI, Yoo SH, Won HH, *et al.* 2012. Clitocybin B inhibits rat aortic smooth muscle cell proliferation through suppressing PDGF-R β phosphorylation. *Vascular Pharmacology* **56**: 91-97.
 21. Zheng S, Liu Q, Zhang G, Wang H, Ng T. 2010. Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of the wild mushroom *Clitocybe sinopica*. *Acta Biochim Pol.* **57**: 43-48.