

우리나라 야생화에서 분리한 효모의 항산화 활성과 Xanthine Oxidase 및 Tyrosinase 저해활성

한상민¹ · 현세희¹ · 김나미² · 이종수^{1*}

¹배재대학교 바이오·의생명공학과, ²한국인삼공사 글로벌제품연구소

Antioxidant Activity and Inhibitory Activities of Xanthine Oxidase and Tyrosinase of Yeasts from Wild Flowers in Korea

Sang-Min Han¹, Se-Hee Hyun¹, Na-Mi Kim² and Jong-Soo Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Science and Biotechnology Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

²Global Products Research Institute, Korea Ginseng Corp., Daejeon 305-805, Korea

ABSTRACT : We prepared supernatants and cell-free extracts of yeasts isolated from wild flowers in Korea, and their antioxidant activity and inhibitory activities of xanthine oxidase and tyrosinase were investigated. Among them, cell-free extracts of *Kuraishia capsulata* UL40-2 and *Sporobolomyces ruberrimus* 121-Z-3 showed significantly high xanthine oxidase inhibitory activity of 46.4% and 48.3%, respectively. *Starmarella bombicola* 80-J-1 also showed tyrosinase inhibitory activity of 36.2% in the cell-free extract. Other antioxidant activities and tyrosinase inhibitory activities were not detected or were below 20%. Maximal production of the xanthine oxidase inhibitors were observed when *Kuraishia capsulata* UL40-2 and *Sporobolomyces ruberrimus* 121-Z-3 were cultured in the yeast extract-peptone-dextrose media at 30°C for 24 hour, respectively.

KEYWORDS : Antioxidant activity, Tyrosinase inhibitory activity, Wild flower, Xanthine oxidase inhibitory activity, Yeasts

서론

주로 자낭균류, 담자균류(우포자 효모)와 일부 불완전균류(무포자 효모)에 분포하고 있는 효모는 *Cryptococcus*속 균 등 몇 종을 제외한 대부분이 비병원성 균들로서 오래 전부터 주류 등의 전통 발효 식품 제조 등에 이용되어 오

고 있고 [1] 근래에 진핵세포를 가진 고등 미생물로서 분자 유전학 등의 연구재료로 이용되고 있다. 또한 효모는 다른 미생물에 비하여 빠른 생육과 배양이 용이한 이점 등이 있어 최근에 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해물질 [2, 3], 항치매성 β-secretase 저해물질 [4], acetylcholinesterase 저해물질 [5], 혈관신생억제물질 [6], 미백성 tyrosinase 저해물질 [7], 혈전용해 활성물질 [8] 등 다양한 의약활성물질이나 생리기능성물질들 개발이 보고되고 있다.

저자들은 근래 우리나라 야생화들에 분포하고 있는 효모들을 분리하여 국내외 미기록 효모들의 발굴과 함께 효모 종 다양성을 확립하고자 전보 [9-11]에서는 제주도, 울릉도, 옥지도 등 우리나라 주요 섬들과 오서산, 백암산, 계족산 등 주요 산들의 야생화들에서 효모들을 분리 동정하였다. 본 연구에서는 이들의 항산화 활성과 xanthine oxidase 저해활성 및 tyrosinase 저해활성 등을 측정하여 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성이 높은 효모들을 선별하였다. 또한 선별된 우수효모들을 이용한 xanthine oxidase 저해물질 생산 조건을 조사하였다.

Kor. J. Mycol. 2015 June, 43(2): 99-103
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.2.99>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

Received June 9, 2015
 Revised June 15, 2015
 Accepted June 17, 2015

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

효모와 시약

제주도와 울릉도, 통영 앞바다의 육지도 등의 우리나라 섬들과 충남 홍성의 오서산, 대전의 계족산, 전북 정읍의 백암산 등의 야생화들에서 분리 동정한 효모들을 [9-11] 실험에 사용하였다.

Xanthine oxidase와 tyrosinase, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, 기타 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

배양 상등액과 무세포 추출물의 제조

분리 효모들을 yeast extract peptone dextrose (YPD) 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 8,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상등액과 세포배양물을 각각 얻었다 [12]. 세포배양물은 다시 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.3)에 현탁시킨 후 초음파 균체파쇄기 (Vibra cell; SONICS & Materials, Newtown, CT, U.S.A.)로 파쇄하고 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 무세포추출물을 얻었다. 이들 상등액과 무세포추출물들을 동결건조시킨 후 이들을 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)에 10 mg/mL로 용해시켜 생리기능성 측정용 시료로 사용하였다 [12].

생리 기능성 측정

지금까지 효모를 대상으로 연구가 많이 실시되지 않은 생리기능성 가운데 노화억제에 관련된 항산화활성과 xanthine oxidase 저해활성 및 tyrosinase 저해활성 등을 실시 측정하였다. 항산화활성(전자공여능)은 DPPH를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 시료 60 µL에 DPPH 12.5 mg을 에탄올 100 mL에 용해시킨 DPPH 용액 240 µL를 첨가한 후 10분간 반응시킨 다음 525 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구의 값과 비교하여 활성을 계산하였다 [13, 14].

미백성 tyrosinase 저해활성은 시료 25 µL에 5 mM L-DOPA 50 µL, 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 6.8)을 혼합한 후 tyrosinase 40 U를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 475 nm에서 흡광도를 측정 후 대조구의 값과 비교하여 활성을 계산하였고 3반복의 평균값으로 표시하였다 [8].

Xanthine oxidase (XOD) 저해활성은 시료 100 µL를 1 mM xanthine 용액 200 µL와 0.05 U xanthine oxidase 100 µL에 혼합하고 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 600 µL 첨가하여 1 mL로 정용한 후 37°C에서 5분간 각각 반응시켰다. 1 N HCl 200 µL를 가하여 반응을 정지시키고 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 침전된 단백질을 제거하였다. 배양상등액과 무세포추출물 중에 함유되어 있는 uric acid 함량을 분광분석기 (UV-1601; Shimadzu, Kyoto, Japan)로 292 nm에서 흡광도를 측정하여

정량한 후 다음과 같이 각각의 xanthine oxidase 저해활성을 계산하였고 [15], 위와 같이 얻은 저해활성 결과들을 3반복의 평균값으로 표시하였다.

Xanthine oxidase 저해활성(%) =

$$[1 - \{A(\text{시료구}) - B(\text{시료구 blank}) / C(\text{대조구})\}] \times 100$$

결과 및 고찰

야생화에서 분리한 효모의 항산화활성과 xanthine oxidase 및 tyrosinase 저해활성

제주도와 육지도 및 울릉도 등 우리나라 주요 섬들의 야생화들에서 분리 동정한 [9, 11] 50종 141 효모 균주들의 생리기능성들을 배양상등액과 무세포추출물로 구분하여 측정 후 생리기능성별로 활성이 우수한 효모들을 5개씩 선별한 결과는 Table 1과 같다. 항산화 활성은 제주도 성산 일출봉 야생화에서 분리한 *Rhodospiridium paludigenum* 89-J-3의 배양상등액이 19.0%로 가장 높았고 무세포추출물들은 대부분 활성을 보이지 않았다. 항통풍성 XOD 저해활성은 울릉도 나리분지의 야생화에서 분리한 *Kuraishia capsulata* UL40-2의 무세포추출물에서 46.4%로 비교적 높은 활성을 보였으나 배양상등액에서는 *Rhodotorula graminis* UL20-3이 25.7%를 보였을 뿐 대체로 20% 미만으로 미약하였다. 또한 미백성 tyrosinase 저해활성은 제주도 서귀포 시내 야생화에서 분리한 *Starmerella bombicola* 80-J-1의 무세포추출물에서 36.2%의 활성을 보였고 대부분 배양상등액 보다는 무세포추출물에서 비교적 활성이 높았다.

이 결과들은 Hyun 등 [12]이 전라북도 고군산열도의 선유도 일대에서 2014년 4월 중순에 개화한 꽃들로부터 분리한 효모들 중 *Metschnikowia reukaufii* SY44-6의 배양상등액이 각각 49.6%의 XOD 저해활성과 38.4%의 tyrosinase 저해활성을 보였고 *Cryptococcus aureus* SY40-1의 무세포추출물이 46.5%의 XOD 저해활성을 보였다는 결과와 유사하였다. 그러나 서울 구로동의 야생화에서 분리한 *Pseudozyma hubeiensis* 228-S-1의 무세포추출물의 XOD 저해활성(19.6%) [9]과 Han 등 [17]이 덕유산 야생화에서 분리한 *Sporobolomyces phaffii* JS00583의 40.4% 보다는 높은 결과였다.

한편 계족산과 오서산 및 백암산 등 우리나라 산에 서식하는 야생화들에서 분리 동정한 [10] 32종 66균주 효모들의 무세포추출물과 배양상등액들의 생리기능성을 측정 후 위와 같이 생리기능성별로 우수효모들을 선별한 결과는 Table 2와 같다. 항통풍성 XOD 저해 활성은 *Sporobolomyces ruberrimus* 121-Z-3의 무세포추출물이 48.3%로 가장 높았고 *Pseudozyma antarctica* 123-Z-4와 *Rhodotorula glutinis* 115-Z-1의 무세포추출물들도 각각 46.3%와 45.3%로 비교적 높았으며 *Filobasidium floriforme* 396-JB-1의 배양상등액에서도 41.8%를 보였다. 그러나 항산화 활성은 *Rhodospiridium paludigenum* 89-J-3의 배양상등액이 19.0%로 가장 높았고 무세포추출물들은 대부분 활성을 보이지 않았다.

Table 1. Physiological functionalities of five potent species from total 141 yeast strains of wild flowers collected in Yokjido, Ulleungdo, Jeju-do, Korea

Physiological functionality	Putative species	Isolated No.	Activity (%)	
			Supernatant	Cell-free extract
Antioxidant activity	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	89-J-3 ^a	19.0 ± 0.4	n.d ^b
	<i>Metschnikowia koreensis</i>	UL37-1	17.5 ± 0.3	n.d
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	YJ34-2	17.5 ± 0.2	5.1 ± 0.8
	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	UL22-1	16.9 ± 0.3	n.d
	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	UL28-1	16.9 ± 0.3	n.d
Xanthine oxidase inhibitory activity	<i>Kuraishia capsulata</i>	UL40-2	5.8 ± 0.5	46.4 ± 0.2
	<i>Metschnikowia viticola</i>	UL19-3	18.1 ± 1.2	32.7 ± 1.2
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	UL25-6	5.4 ± 0.3	32.1 ± 0.1
	<i>Candida albicans</i>	YJ23-2	n.d	32.0 ± 0.1
	<i>Rhodotorula graminis</i>	UL20-3	25.7 ± 0.5	29.5 ± 0.7
Tyrosinase inhibitory activity	<i>Starmerella bombicola</i>	80-J-1	15.0 ± 0.2	36.2 ± 0.9
	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	89-J-3	20.7 ± 0.1	31.3 ± 0.9
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	YJ26-1	13.2 ± 1.0	31.2 ± 0.2
	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	YJ10-3	24.3 ± 0.9	29.2 ± 0.3
	<i>Pseudozyma aphidis</i>	94-J-3	n.d	29.1 ± 1.0

^aSource of description [9, 18]; ^bn.d, not detected or < 5%.

Table 2. Physiological functionalities of five potent yeast species from total 66 yeast strains of wild flowers collected in Mt. Gyejok, Mt. Oseo and Mt. Baekam, Korea

Physiological functionality	Putative species	Isolated No.	Activity (%)	
			Supernatant	Cell-free extract
Antioxidant activity	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	399-JB-1 ^a	22.0 ± 0.7	n.d ^b
	<i>Candida</i> sp.	383-CO-1	15.3 ± 0.8	n.d
	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	121-Z-1	14.4 ± 0.4	n.d
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	387-JB-2	13.5 ± 0.7	n.d
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	115-Z-4	12.6 ± 0.3	6.0 ± 0.6
Xanthine oxidase inhibitory activity	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	121-Z-3	7.8 ± 0.6	48.3 ± 0.7
	<i>Pseudozyma antarctica</i>	123-Z-4	10.3 ± 0.6	46.3 ± 0.2
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	9-Z-1	n.d	45.3 ± 0.9
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	380-CO-3	43.0 ± 0.4	17.9 ± 0.5
	<i>Filobasidium floriforme</i>	396-JB-1	41.8 ± 0.3	17.8 ± 0.4
Tyrosinase inhibitory activity	<i>Auriculibuller fuscus</i>	393-JB-1	29.9 ± 0.9	19.7 ± 0.9
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	373-CO-1	29.5 ± 0.6	22.7 ± 0.5
	<i>Filobasidium floriforme</i>	396-JB-1	28.8 ± 0.9	8.5 ± 0.4
	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	376-CO-2	28.7 ± 0.8	15.8 ± 0.9
	<i>Cryptococcus flavescens</i>	371-CO-2	28.6 ± 0.1	23.5 ± 0.7

^aSource of description [9, 18]; ^bn.d, not detected or < 5%.

poridium fluviale 399-JB-1의 배양상등액에서 22.0%를 보였을 뿐 대체로 낮았고 tyrosinase 저해활성도 5균주들의 배양상등액에서 28.6~29.9%를 보였으나 무세포추출물에서는 20% 미만으로 미약하였다.

이 결과들은 Han 등[17]이 2014년 7월에 개화한 덕유산 일대 야생화에서 분리한 *Sporobolomyces phaffii* JS00583 배양상등액의 XOD 저해활성(40.4%)보다는 높았으나 *Cryptococcus magnus* JS00570의 배양상등액의 미백성 tyrosi-

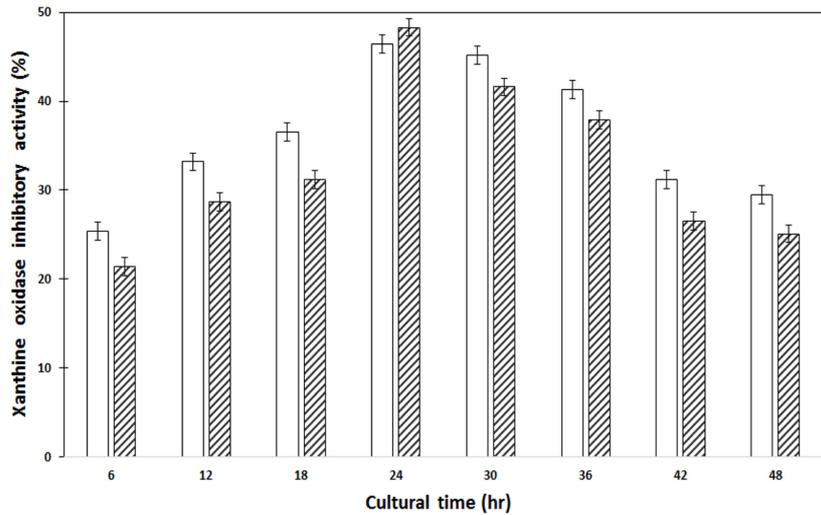


Fig. 1. Effect of cultural times of *Kuraishia capsulata* UL40-2(□) and *Sporobolomyces ruberimus* 121-Z-3(▨) on the production of xanthine oxidase inhibitor.

nase 저해활성(36.1%)보다는 낮은 결과였다.

항통풍성 xanthine oxidase 저해물질의 최적 생산 조건

위와 같이 섬과 산 지역 야생화들에서 분리한 효모들의 생리기능성 중에서 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성이 가장 우수하였던 *Kuraishia capsulata* UL40-2와 *Sporobolomyces ruberrimus* 121-Z-3를 최종 선정하였다. 이들을 이용한 XOD 저해물질 생산 조건을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 *Kuraishia capsulata* UL40-2와 *Sporobolomyces ruberrimus* 121-Z-3 각각을 YPD 배지에 접종하여 30°C에서 배양하였을 때 배양시간이 경과함에 따라 XOD 저해활성이 증가하여 배양 24시간 후 얻은 무세포추출물이 47.2%와 49.5%로 가장 높은 XOD 저해활성을 보였다.

또한 yeast extract malt extract (YM), Luria bertani (LB), YPD, tryptic soy broth (TSB)와 potato dextrose broth (PDB) 배지 등을 이용하여 두 효모들의 XOD 저해물질 생산에 미치는 배지의 영향을 검토한 결과 *Kuraishia capsulata* UL 40-2는 YPD와 YM 배지에서 각각 47.9%와 46.5%를 보였고 PDB 배지와 TSB 배지에서는 30% 미만의 낮은 활성을 보였다(자료 미제시). *Sporobolomyces ruberimus* 121-Z-3 역시 YM 배지와 YPD 배지에서 배양하였을 때 가장 높은 저해활성(49.8%, 49.0%)을 보여 두 균주 모두 YPD 배지나 YM 배지가 XOD 저해물질 생산에 적당한 것으로 생각된다.

이 결과는 Hyun 등[9]이 서울 구로동 일대에서 2012년 개화한 꽃에서 분리한 *Pseudozyma hubeiensis* 228-S-1을 YPD 배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하여 얻은 무세포추출물의 XOD 저해활성(19.6%)보다는 배양시간이 짧았고 더 높은 활성이었다. 그러나 Jang 등[17]의 느타리 버섯 자실체의 물 추출물의 78.3%보다는 매우 낮은 활성

이었다.

Xanthine oxidase는 핵산관련물질인 xanthine을 산화시켜 요산을 생합성하는데 관여하는 rate-limiting 효소로서 이러한 요산이 관절부위에 축적되어 통풍을 유발시킨다[9]. 통풍은 최근 발병이 급속히 증가하고 있는 만성 소모성 질환의 일종이며 아직까지 효능이 우수하면서 부작용이 적은 항통풍성 건강 소재 개발은 매우 미진한 실정이다[9]. 따라서 본 연구 결과들은 비록 느타리버섯 자실체의 물추출물보다 활성이 낮지만 버섯 자실체의 배양기간(3~4주) 등을 감안하였을 때 배양이 용이하고 배양시간이 짧은 이점이 있는 효모에서의 생산은 경제적 측면에서 더 유리할 것이고 새로운 항통풍성 건강 소재의 산업화에 기초자료로 활용할 수 있을 것이다.

적 요

제주도, 울릉도, 옥지도 등 우리나라 섬들과 계족산, 오서산, 백암산 등의 산에서 서식하는 야생화들에서 분리한 207 효모 균주들을 YPD 배지에 24시간 배양하여 각각의 무세포추출물과 배양상등액을 제조한 후 이들의 항산화활성과 Xanthine oxidase 저해활성 및 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 섬 지역 야생화들에서 분리한 *Kuraishia capsulata* UL40-2와 산 지역 야생화에서 분리한 *Sporobolomyces ruberrimus* 121-Z-3의 무세포추출물이 각각 46.4%와 48.3%의 비교적 높은 항통풍성 xanthine oxidase 저해활성을 보였다. 또한 *Starmerella bombicola* 80-J-1의 무세포추출물 역시 36.2%의 미백성 tyrosinase 저해활성을 보였다. 그 밖의 항산화활성과 tyrosinase 저해활성은 모든 분리 효모들에서 없거나 30% 미만으로 미약하였다. 이들 가운데 xanthine oxidase 저해활성이 우수하였던 *Kuraishia capsu-*

late UL40-2와 *Sporobolomyces ruberrimus* 121-Z-3의 xanthine oxidase 저해제의 최적 생산 조건을 검토한 결과 두 효모 각각을 YPD에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 얻은 무세포추출물이 47.2%와 49.5%의 높은 xanthine oxidase 저해활성을 보였다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea.

REFERENCES

- Kim JH, Kim NM, Lee JS. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from traditional Meju. *Kor J Food Nutr* 1999;12:490-5.
- Jeong SC, Kim JH, Kim NM, Lee JS. Production of anti-hypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Malassezia pachydermatis* G-14. *Mycobiology* 2005;33:142-6.
- Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 2004;14:1318-23.
- Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new anti-mentia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2007;42:83-8.
- Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* 2008;36:102-5.
- Jeong SC, Lee DH, Lee JS. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:1904-11.
- Jang IT, Kim YH, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. *Kor J Mycol* 2011;39:227-8.
- Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor J Mycol* 2012;40:60-4.
- Hyun SH, Mun HY, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation of yeasts from wild flowers in Gyonggi-do province and Jeju island in Korea and the production of anti-gout xanthine oxidase inhibitor. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
- Min JH, Ryu JJ, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Gyejoksan, Oseosan and Beakamsan of Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:47-51.
- Hyun SH, Min JH, Lee HB, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of yeasts from wild flowers in Ulleungdo and Yokjido, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:28-33.
- Hyun SH, Han SM, Lee JS. Isolation and physiological functionality of yeasts from wild flowers in Seonyudo of Gogunsanyeoldo, Jeollabuk-do, Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:201-6.
- Hyun SH, Han SM, Lee JS. Characteristics and physiological functionalities of unrecorded yeasts from wild flowers of Seonyudo in Jeollabukdo, Korea. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2014;42:402-6.
- Kim HK, Lee EN, Geum JW, Lee JS. Nutritional characteristics and physiological functionality of polyplant extracts from some vegetables and medicinal plants. *Kor J Food Nutr* 2008;21:410-5.
- Hyun SH, Lee JS. Microbiological characteristics and physiological functionality of new records of yeasts from wild flowers in Yokjido, Korea. *Mycobiology* 2014;42:198-202.
- Han SM, Hyun SH, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Deogyu mountain and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:47-52.
- Jang IT, Hyun SH, Shin JW, Lee YH, Ji JH, Lee JS. Characterization of an anti-gout xanthine oxidase inhibitor from *Pleurotus ostreatus*. *Mycobiology* 2014;42:296-300.
- Hyun SH. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in several islands and mountains of Korea and determination of their functionality [dissertation]. Daejeon (Korea): University of Paichai; 2015.