

The Antioxidant and Skin-whitening Effects of *Saccharomyces cerevisiae* FT4-4 Isolated from Berries Grown in Sunchang

Ji won Seo[†], Myeong Seon Ryu[†], Hee-Jong Yang, Su-Ji Jeong and Do-Youn Jeong*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

Received October 20, 2020 / Revised January 12, 2021 / Accepted January 19, 2021

Saccharomyces lysate has the well-known function of soothing the skin in various ways: it is an anti-irritant and can treat skin care conditions, such as skin whitening and antioxidative activity. However, data on the safety for use of *Saccharomyces* lysate in cosmetics and skin care products are still limited. To design a new cosmetic material with antioxidant and skin-whitening effects, 80 yeast strains were isolated from berries grown in Sunchang. Among the isolates, the FT4-4 strain, which exhibited superior biological activities, was selected for further experiments. The FT4-4 strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae* by 18S rRNA gene sequencing analysis. *S. cerevisiae* FT4-4 showed higher DPPH radical-scavenging (51.41%), superoxide dismutase (62.23%), and tyrosinase inhibition (64.75%) activities. The highest yield of biomass (3.16 g/l) and maximum growth rate of *S. cerevisiae* FT4-4 were observed within 16 h. Furthermore, the cytotoxicity potential of *S. cerevisiae* FT4-4 on B16F10 melanoma cells was measured by an MTT assay, and the results indicated that *S. cerevisiae* FT4-4 had a capacity to inhibit melanin up to 72.02% at an initial 10 mg/ml concentration. These results suggest that *S. cerevisiae* FT4-4 could be a promising candidate as a multi-functional material for application in the cosmetic industry, especially because of its antioxidant and skin-whitening effects.

Key words : Antioxidant effects, melanin, *Saccharomyces cerevisiae*, skin-whitening, tyrosinase

서 론

국민 생활수준 및 사회 활동 증가로 인해 미적 요인에 대한 욕구가 증가하여 남녀노소 불문하고 피부 건강, 깨끗한 피부 및 미백 등의 미용 산업에 대한 소비자의 요구와 관심이 증가하고 있다. 피부와 관련된 미용 산업의 수요 증가로 주름개선, 미백 등과 같은 기능성을 강조하는 화장품에 대한 소비 시장 및 관련 제품에 대한 소비자의 관심도가 나날이 증가하고 있는 추세이다[1]. 특히, 자외선, 대기 오염과 식습관 변화 등의 원인으로 체내외부적으로 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)이 증가하게 되고, 성인병, 암 및 뇌질환을 유발하기도 하지만 신체 외부인 피부의 경우 트러블 및 노화를 가속시킨다고 보고되고 있어[20], 피부의 세포 내 단백질과 지질의 손상으로 인한 활성산소종 증가를 억제하고 산화적 스트레스로부터 보호할 수 있는 항산화제에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있다[27]. 이외에도 자외선에 의해 자극된 피부 각질 형성 세포에서 멜라닌 생성이 증가함으로써 색소 침착을 억제하는

미백 관련 제품도 시장에서 각광받고 있다[17]. 멜라닌은 멜라닌 합성에 관여하는 tyrosinase에 의해 L-tyrosine을 L-dihydroxy phenylalanine (L-DOPA) 또는 DOPA quinone으로 중합 또는 산화를 유도하여 생성되며[28], 이로 인해 기미 또는 주근깨를 형성하고 피부 노화를 촉진하므로 tyrosinase 활성을 저해하는 것이 미백 효과를 판단할 수 있는 일반적인 방법으로 보고되고 있다[7]. 일반적으로 화장품 소재로 사용되는 tyrosinase 저해 물질로는 알부틴, kojic acid 및 천연물 유래 물질이 사용되고 있으나[31], 합성 원료의 경우 안전성으로 인해 일부 부작용이 유발되며[13], 천연 소재의 경우 특유의 냄새, 제형의 안정성 및 대량 생산 시 문제점 등이 노출되어 사용하기에 일부 제약이 따르고 있다[18]. 이러한 문제점 해결을 위해 최근에는 경제적이며 안전한 바이오 소재 관련 연구가 추진되고 있으며[10], 홍차를 후효모로 발효한 발효액의 항산화 활성 및 미백활성 증진 효과[12], 골담초 효모 발효물을 이용한 멜라닌 합성 관련 tyrosinase 저해효과[25], 천연 효모 발효 여과물인 갈라톡미세스 발효물 함유 화장품의 각질 및 피부 밝기 개선 효과[16] 등 효모 발효를 통한 미백 관련 소재 발굴에 대한 다양한 연구결과가 보고되고 있다.

효모는 유익한 생리활성을 지니는 미생물로 과일 또는 토양 등에 분포하고 있으며, 특히, *Saccharomyces cerevisiae*는 대표적인 GRAS (Generally Recognized as Safe) 미생물로 다른 미생물에 비해 생육이 빠르므로 배양에 용이하며, 알코올 발효능이 우수하여 주류 생산 및 전통 발효식품 제조에 사용되는 대표 균주로 알려져 있다[9]. 또한, 식품 이외에도 혈압상승

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2000, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : jdy2534@korea.kr

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.

유지에 중요한 작용을 하는 안지오펜신 전환효소 저해 활성[8]과 체내 형성된 라디칼과 활성산소를 제거하는 항산화 활성을 갖고 있으며[5], 피부 노화 저해 및 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase 저해 활성 등이 보고되면서 바이오 화장품 소재로도 각광받고 있다. 하지만 국내 유통 및 판매되고 있는 효모의 경우 대부분 수입산 종균으로 퍼미빈(fermivin)을 가장 많이 사용되고 있어, 국내산 토종 효모의 발굴을 통한 수입 종균 대체 등 사회적 문제 해결이 우선시되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 국내산 효모를 순창군 베리류 및 과수원 토양에서 분리하였으며, 화장품 산업에 적용 가능한 소재 개발을 위한 기초 연구로서 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성 등 생리활성을 검토하여 소재로의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

효모의 분리 및 선별

효모 분리를 위해 순창군에서 채배된 베리류 및 과수원 토양을 수집하여 균원 시료로 사용하였다. 각각의 시료 1 g을 멸균식염수 9 ml에 단계 희석하여 YPD agar (Yeast extract Peptone Dextrose agar, Difco, MI, USA) 고체배지에 도말하고, 30°C에서 48시간 배양 후 형성된 집락의 형태학적 차이를 이용하여 효모를 분리하였다. 순수 분리된 효모의 경우 YPD 액체배지(YPD broth, Difco, MI, USA)에 접종하여 30°C, 150 rpm에서 48시간 진탕배양하고 배양액을 제거한 균체를 10% skim milk (Difco, MI, USA)에 현탁 후 -80°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

가스 생성능을 갖는 효모의 선별

가스 생성능을 갖는 효모를 선별하기 위해 20% glucose (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)를 함유한 YM 액체배지 (Difco, MI, USA)에 튜브관을 넣고 121°C에서 15분 멸균 후 각각의 분리주 전 배양액 2%를 접종하여 30°C, 48시간 배양 후 가스 생성 여부를 확인하였다[29].

항산화 활성

1차 선별 균주를 대상으로 항산화 활성 분석은 YPD 액체배지(Difco, USA)에 30°C, 150 rpm으로 48시간 진탕배양 후 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 각각의 상등액을 시료로 이용하였다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용한 free radical 소거능은 각 시료 20 µl에 100 µM DPPH ethanol 용액 180 µl을 혼합 후 암조건에서 30분간 반응 하여 UV/VIS spectrophotometer (SPECORD200, Analytik Jena, Jena, Germany)로 517 nm에서 흡광도를 측정 한 후 아래 식에 대입하여 산출하였으며, 대조구로는 YPD 액체배지(Difco, USA)를 사용하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A/B)] \times 100(\%)$$

A : Absorbance of DPPH solution with sample at 517 nm

B : Absorbance of DPPH solution without sample at 517 nm

SOD (Superoxide dismutase) 유사 활성능은 SOD kit (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하였으며, 각각 분리주의 배양액 시료 20 µl에 WST working solution 200 µl와 enzyme working solution 20 µl를 혼합하고, 37°C에서 20분간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다[24].

Tyrosinase 저해 활성 분석

Tyrosinase 저해 활성 분석을 위한 시료는 각각의 분리주 배양액을 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하여 사용하였다. 각 균체는 50 mM PBS buffer (pH 6.8)로 현탁하여 초음파분쇄기로 파쇄 후 13,000 rpm, 10분간 원심분리한 상등액을 시료로 사용하였다. 기질로는 50 mM PBS buffer (pH 6.8)에 1 mM L-tyrosine (Sigma-aldrich, USA)을 완전히 녹여서 사용하였다[21]. 각각의 시료 50 µl에 L-tyrosine 용액 100 µl 혼합 후 tyrosinase (50 units/ml) 50 µl을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응하고 470 nm에서 흡광도를 측정 후 아래의 식과 같이 산출하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibitor activity (\%)} = [1 - (A/B)] \times 100(\%)$$

A : Absorbance of tyrosinase solution with sample at 470 nm

B : Absorbance of tyrosinase solution without sample at 470 nm

최종 선별 균주의 동정 및 효소 활성 분석

최종 선별 균주의 동정을 위해 YPD 액체배지(Difco, USA)에 접종하여 30°C, 150 rpm으로 48시간 배양 후 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep kit (Zymo Research Corp., CA, USA)로 DNA를 추출한 후 PCR로 유전자 단편을 증폭하고 정제한 염기서열을 (쥘)마크로젠에 의뢰하여 분석하였다[20]. 분석한 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA)의 BLAST를 이용하여 서열 일치도가 높은 표준 균주의 18S rRNA 염기서열을 확보하여 계통도를 작성하였다. 계통도 분석은 Neighbor-joining 알고리즘을 이용하여 분석하였다[14]. 산출한 각각의 계통수의 신뢰도 산출을 위하여 bootstrap 분석을 1,000회 반복 실행 후 MEGA 7.0.26 program을 이용하여 견고성을 확인하였다. 또한 효모가 생성하는 효소 활성의 측정은 API ZYM kit (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France)를 이용하여 측정하였다. YPD 고체배지(Difco, USA)에서 30°C, 48시간 배양 후 suspension medium에 배양한 균체를 suspension standard 5 탁도에 맞춰 사용하였다. 100 µl씩 분주한 후 30°C에서 4시간 반응하고 ZYM A, ZYM B를 한방울씩 분주하여 발색 유무를 측정하였다.

최종 선별 균주의 성장 조사

최종 선별 균주의 균체 성장을 조사하기 위해 YPD 액체배지(Difco, USA)에서 30°C, 150 rpm으로 48시간 동안 전배양을 하였다. 균체 성장 측정을 위해 전배양액 5%를 접종한 후 30°C, 150 rpm에서 48시간 동안 진탕배양 하면서 4시간 단위로 시료를 회수하여 흡광도, 생균수 및 건조균체량을 측정하였다. 흡광도의 측정은 각 배양액 1 ml을 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리 후 멸균 증류수로 3회 세척하고 1 ml의 멸균 증류수로 재부유하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생균수는 각각 회수한 배양액 1 ml을 멸균식염수 9 ml에 단계희석하여 YPD 고체배지(Difco, USA)에서 100 µl를 도말하여 30°C, 48시간 배양 후 확인하였다. 건조 균체량은 각각의 회수한 배양액 10 ml을 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리 후 멸균 증류수로 3회 세척하여 80°C에서 항량이 도달할 때까지 건조 후 건조된 균체의 무게를 측정하였다.

세포 생존율 및 멜라닌 생합성 측정

세포생존율 및 멜라닌 생합성 측정에 이용한 Melanoma cell (B16F10)의 경우 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였으며, DMEM (phenol red free Dulbecco's Modified Eagle's Medium, HyClone, USA)배지로 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하여 이용하였다. 세포 생존율의 경우 Yoo 등[30]의 실험법을 일부 변형하여 측정하였다. Melanoma cell (B16F10)을 이용해 MTT assay로 측정하였으며, 분석용 시료는 FT4-4를 YPD 액체배지(Difco, USA)에 30°C, 150 rpm으로 16시간 배양 후 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 동결건조하여 50 mM PBS buffer (pH 6.8)을 이용하여 1.0×10⁸ CFU/ml 농도로 희석 후 이용하였다. Melanoma cell (B16F10)은 96 well에 1×10⁵ cell/ml의 농도로 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양 후 측정하고자 하는 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide, Intron Biotechnology, Korea) 10 µl를 처리하여 MTT가 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되도록 4시간 배양하고, 배양액을 제거하여 각 well에 생성된 formazan 결정을 회수하여 570 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포의 생존율을 확인하였다. 또한, 멜라닌 생성 억제능은 Shin 등[26]의 실험법을 변형하여 분석하였으며, melanoma cell (B16F10)을 96 well에 2×10⁵ cell/ml의 농도로 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양 후 PBS buffer로 2회 세척을 진행하였다. 세척한 균체에 2 ml의 DMEM (phenol red free Dulbecco's Modified Eagle's Medium, HyClone, USA)을 첨가 후 앞서 준비한 시료 100 µl를 처리 하였으며, 대조군으로는 kojic acid (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 먼저 멜라닌 합성을 유도하기 위해 forskolin (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 µl을 처리하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 72시간

배양하였다. 배양이 종료된 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 회수하고 475 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 생성 억제능을 확인하였다.

통계 분석

실험결과는 3회 이상 반복 결과를 통계분석 SPSS for Window (ver. 12.0, SPP Inc., USA)을 사용하였다. 일원배치 분산 분석(ANOVA)으로 평균, 표준편차 분석하였고, 사후 검증의 경우 Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)를 실시하였다.

결과 및 고찰

효모 후보 균주 선별

화장품 소재로써 활용 가능한 효모 균주의 분리를 위해 산창균에서 재배되고 있는 베리류 및 과수원 토양 약 80종을 수집하였으며, 각 시료로부터 육안으로 집락의 형태학적 차이 및 가스생성능 여부에 따라 *Saccharomyces cerevisiae* 후보균 약 20여종의 분리주를 선별하였다(data not shown).

항산화 활성

세포 손상 또는 파괴로 인해 노화, 동맥경화 및 피부 질환 등의 질병은 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical과 같은 활성산소에 의해 발병하며, 이러한 질병에 원인인 활성산소는 일부 효모에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다[21]. 따라서, 일반적으로 항산화 활성 측정에 많이 이용하는 DPPH 라디칼 소거능과 superoxide를 과산화 수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 항산화 효소 SOD (superoxide dismutase)활성을 측정하였다. 분리 효모균을 대상으로 DPPH 라디칼 소거능 분석 결과가 30% 이상인 FT4-4, FT4-7, FT4-32, FT4-98, FT4-140 5종을 선별하였으며, 그 중 FT4-4는 51.41%로 가장 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 보였다(Table 1). 또한, SOD 활성 측정된 결과에서도 타 균주에 비해 FT4-4의 경우 62.23%의 높은 활성을 지니는 것을 확인하였다(Table 1). YM 배지에서 *S. cerevisiae* FF-8을 배양 후 DPPH 활성을 측정된 결과 55.49%[15], 배추출박 배지를 이용하여 발효한 *S. cerevisiae* KTCT 7904의 SOD 활성은 39%로 보고되었으며[5], 효모 균주 자체의 항산화 활성을 측정된 연구는 미비한 실정이나 와인 또는 과실주와 천연물을 발효하여 최종 제품에 적용 후 측정된 결과가 비교하여도, 본 연구에서 베리류로부터 분리하여 측정된 효모 균주의 활성이 유사하거나 더 우수한 항산화 활성을 보여 향후 식품, 화장품 등 다양한 분야에 항산화제로 활용 가능성을 확인하였다.

Tyrosinase 저해 활성 분석

머리카락, 피부 등에 다양하게 분포하고 있는 멜라닌은 단백질성 유기색소로 피부 기저층에 존재하는 melanocyte에서

Table 1. Comparison of biochemical characterization for selected strains

Strain	Identification	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD activity (%)	Tyrosinase inhibition activity (%)
FT4-4	<i>S. cerevisiae</i>	51.41±0.55 ^c	62.23±2.17 ^d	64.75±0.10 ^c
FT4-7	<i>S. cerevisiae</i>	31.13±2.92 ^a	51.21±2.12 ^b	51.09±0.07 ^a
FT4-32	<i>S. cerevisiae</i>	34.89±5.35 ^a	41.99±2.34 ^a	52.24±0.19 ^a
FT4-98	<i>S. cerevisiae</i>	43.68±2.45 ^b	56.46±0.86 ^c	54.65±1.35 ^b
FT4-140	<i>S. cerevisiae</i>	49.88±3.99 ^c	55.61±1.89 ^c	55.72±0.31 ^b

The results are expressed as the mean ± S.D (n=3).

Means of differed letters ^(a-d) with the values (in the DPPH radical scavenging, SOD activity and tyrosinase inhibition activity) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

생성되는 단백질 복합체로써[4], 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase 효소를 측정하여 미백 효능을 검증하는 지표로 활용하고 있다[19]. 따라서, 선별한 5종의 균주를 대상으로 tyrosinase 저해활성을 측정하여 미백에 대한 효능을 확인한 결과 선별 균주 5종 모두 50% 이상의 tyrosinase 저해 활성을 보였다(Table 1). Jang 등[6]의 보고에 따르면 누룩과 전통장류, 한국식품연구원에서 분양받은 *S. cerevisiae* 균주 49종을 대상으로 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 대부분 10% 이하의 낮은 저해 활성을 보유하고 있었으며, *S. cerevisiae* Y277-3균주가 42.7%의 활성으로 가장 우수한 활성을 갖는 것을 확인하였으며, 대전천 주변 토양에서 분리한 *S. cerevisiae* WJSL0191 균주는 33.2%로 가장 우수하였고, 나머지 야생효모의 경우 대부분 15% 이하이거나 활성이 없었다고 보고하였다[11]. 따라서 FT4-4 균주는 64.75%로 앞서 보고된 *S. cerevisiae*의 tyrosinase 저해 활성보다도 우수한 저해 활성을 보유하고 있어 최종 균주로 선정하였으며, 미백 기능성 발효식품의 스타터 또는 이

를 이용한 기능성 소재 생산에 배양물 전체를 사용하여도 기능성 측면 및 산업적 측면에서 매우 유리한 장점을 지닐 것으로 사료된다.

최종 선별 균주의 동정 및 효소 활성 분석

최종 선별한 FT4-4의 18S rRNA 분석을 통해 유전자 염기서열을 확인하였고, BLAST 분석 결과 *Saccharomyces cerevisiae*로 판명되었다. 표준 균주와 상동성 비교 분석을 실시하였으며, 그 결과 *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 (EU011664)와 100%의 상동성을 보여 *S. cerevisiae* FT4-4로 명명하고, 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 *S. cerevisiae* KCCM 12522P로 기탁하였다. 염기서열을 이용하여 Maximum Likelihood method를 사용하여 FT4-4의 계통수를 작성하였다(Fig. 1). 계통수의 신뢰도 확보를 위해 bootstrap 분석은 1,000회 실시하여 신뢰성을 향상시켰으며, 추가적으로 API ZYM kit를 이용하여 효소활성을 측정된 결과

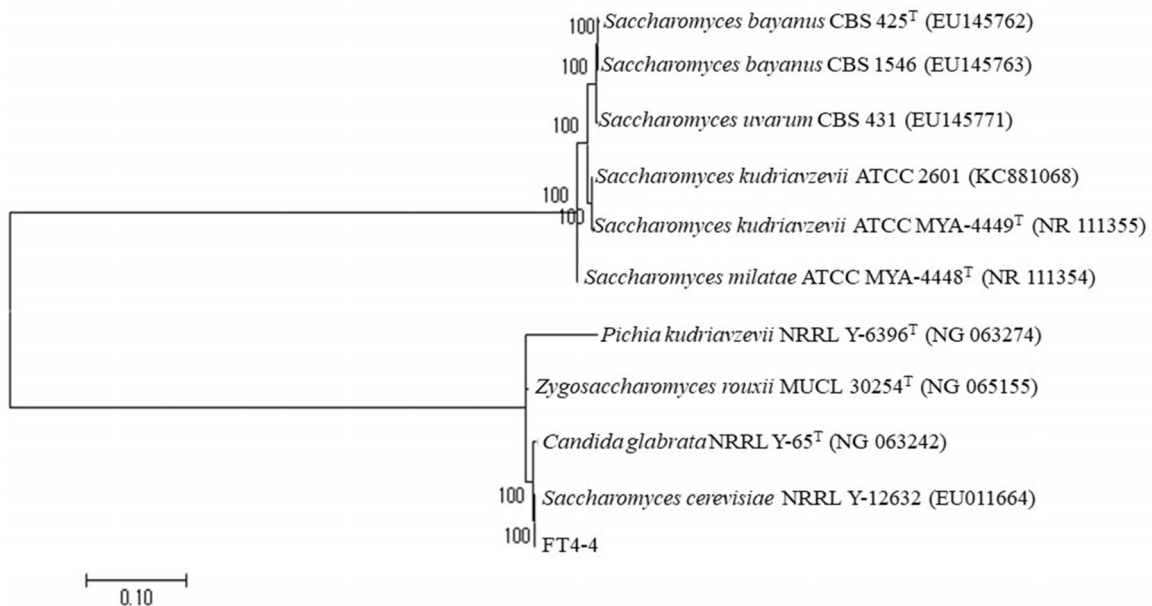


Fig 1. Phylogenetic tree based on nearly complete 18S rRNA gene sequence of FT4-4. The bootstrap values were calculated based on 1,000 replications to estimate the topological robustness.

Table 2. Enzyme production profiles tested by API ZYM kit of *S. cerevisiae* FT4-4

Enzymes	FT4-4	Enzymes	FT4-4
Control	- ¹⁾	Acid phosphatase	-
Alkaline phosphatase	-	Naphol-AS-BI-phosphohydrolase	-
Esterase (C4)	+ ²⁾	α-galactosidase	-
Esterase lipase (C8)	-	β-galactosidase	-
Lipase (C14)	-	β-glucuronidase	-
Leucine arylamidase	+	α-glucosidase	+
Valine arylamidase	+	β-glucosidase	-
Cystine arylamidase	-	N-acetyl-β-galcosaminidase	+
Trypsin	-	α-mannosidase	-
α-chymotrypsin	-	α-fucosidase	-

¹⁾Negative effect. ²⁾Positive effect.

esterase, leucine arylamidase, valine arylamidase, α-glucosidase, N-acetyl-β-galcosaminidase에 활성을 보유하고 있음을 확인하였다(Table 2). Pennacchia 등[22]의 보고에 따르면 일반적으로 효모는 α-glucosidase 활성을 갖고 esterase, esterase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, N-As-BI-phosphohydrolase의 활성을 지니는 것으로 알려지고 있으나, 10종의 효모를 대상으로 조사한 결과 10종 중에서도 각기 다른 효소의 활성을 갖는 것으로 보고하고 있어, 이는 분리주의 배양 방법 및 접종량 등 외부 요인에 의한 차이와 각각의 균주마다 갖는 특성이 다르기 때문에 기인한 것으로 판단된다.

배양시간에 따른 균체 성장 및 tyrosinase 저해 활성

최종 선별 균주인 *S. cerevisiae* FT4-4의 배양시간에 따른 균체 성장과 tyrosinase 저해 활성 변화를 측정하기 위하여 3% glucose를 함유한 YPD 액체배지에 배양하면서 4시간 간격으로 시료를 회수하여 건조 균체량, 흡광도, 생균수 및 tyrosinase 저해 활성의 변화를 측정하였다. 먼저 배양시간에 따른 균체 성장은 흡광도, 생균수, 건조 균체량을 측정하여 조사하였고, 접종 후 4시간 이후부터 급격히 증가하기 시작하여 12시간~16시간에 stationary phase에 도달하였으며, 이후에는 균체 성장이 서서히 증가하거나 감소하는 log phase를 나타내었다(Fig. 2). 균체량과 비교를 위한 흡광도와 생균수 모두 동일한 경향을 나타내었고, 흡광도, 생균수는 배양 후 16시간에 각각 1.45, 8.12 log₁₀ CFU/ml로 측정되었으며, 건조 균체량 또한 3.16 g/l로 최대 균체 성장을 나타내었다(Fig. 2). 동일한 조건에서 *S. cerevisiae* BA34가 20시간에 6.39 g/l의 균체 성장을 나타낸 Yang 등[29]의 결과와 비교하여도 큰 차이를 나타내지 않고 유사함을 확인하였다. 또한, 배양시간에 따른 tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위한 실험 결과 균체 성장에 따라 서서히 증가하여 균체 성장이 최대인 16시간에 tyrosinase 저해 활성도 67.68%로 최대를 나타내었으며, 이후에는 큰 변화가 없이 유지되었다(Fig. 3). Jang 등[6]의 보고에서 *S. cerevisiae* Y277-3과 Y157-1 2종의 효모 균주에 대한 tyrosinase 저해 활

성이 균 생육과 더불어 점차 증가하다 정지기인 배양 24시간에 최고 활성을 보인 후 변화가 없었다는 결과와 동일함을 확인할 수 있었으며, tyrosinase 저해 활성의 경우 더 우수함을

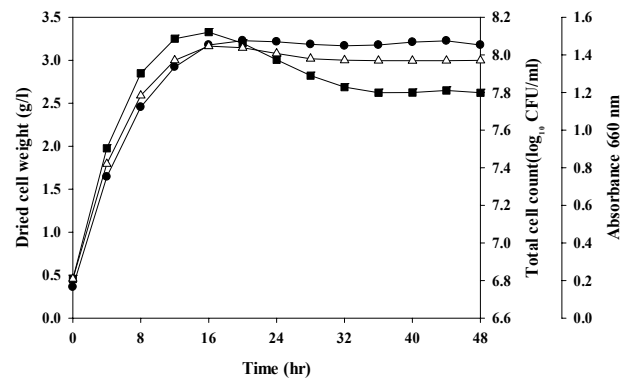


Fig. 2. Time course profile of cell growth by *S. cerevisiae* FT4-4 cultivated in YPD medium (as basal medium) at 30°C with 150 rpm. Δ: dried cell weight, ■: Log CFU/ml, ●: absorbance 660 nm.

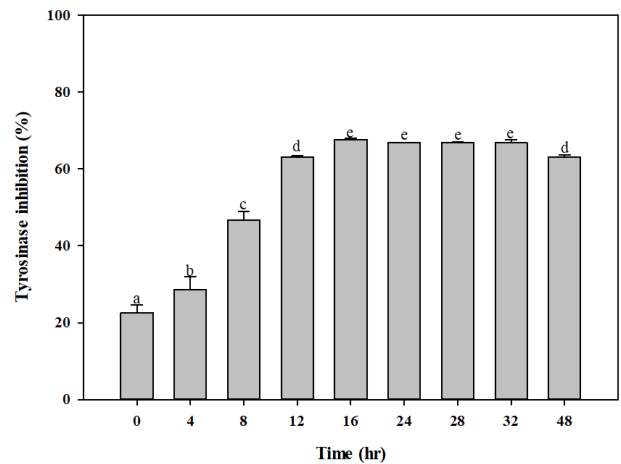


Fig. 3. Tyrosinase inhibition activity by *S. cerevisiae* FT4-4. The results are expressed as mean ± S.D of three independent experiments triplicate in each run (*p*<0.05).

확인하였다. 향후 균체 성장을 위한 배양 조건 최적화 및 FT4-4의 활용성 측면과 직접적으로 관련된 연구가 더 필요하지만 미백 관련 화장품 소재로 활용하기에는 충분한 가치가 있을 것으로 사료된다.

FT4-4의 B16F10 세포 생존율 및 멜라닌 생성 억제 효과

최종적으로 선별한 FT4-4 균주의 화장품 소재로 사용하기 위해 세포 생존율에 미치는 영향과 멜라닌 생합성 저해능을 B16F10 세포를 이용하여 분석하였다. 먼저 세포독성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide)라는 황색 수용성 기질이 세포의 미토콘드리아 내 탈수소효소에 의해 환원되어 불용성인 formazan을 생성하는 정도를 통해 측정하는 MTT assay로 분석하였다[31]. 독성평가 결과 FT4-4는 모든 농도(0.5~50 mg/ml)에서 100% 이상의 세포 생존율이 나타나 세포독성이 없는 것으로 조사되었다(Fig. 4). 일반적으로 *S. cerevisiae*는 대표적인 GRAS 균주로서 식약처에서도 식품 및 화장품 원료로 사용이 허가된 균주로 안전성이 검증되었으며, 본 실험에서도 세포독성이 전혀 나타나지 않아 해당 균주의 위험성이 없음을 다시 한번 확인할 수 있었다. 멜라닌 색소는 피부의 자체 방어기전으로써 자외선으로부터 피부 보호를 위해 생성되며, 피부 기저층의 멜라노사이트(melanocyte)가 자외선의 자극으로 활성화 되면서 tyrosinase 효소의 작용으로 생성된 후 피부 표면으로 올라오게 된다[3]. 따라서, 앞서 tyrosinase 저해능 측정 결과에서 우수한 억제능을 보인 FT4-4가 실제 세포에서의 멜라닌 생합성에 영향을 미치는지 확인을 위한 실험을 진행하였다. 멜라닌 생성 억제 효과는 forskoin으로 합성을 유도하여 이를 100%로 설정하여 비교하였고, FT4-4를 1.25, 2.5, 5, 10 mg/ml의 농도로 처리한 결과 37.38, 58.47, 65.67, 72.02%로 처리 농도가 증가할 수록 멜라닌 생성을 억제하는 효과가 증가하였으며, 1.25 mg/ml의

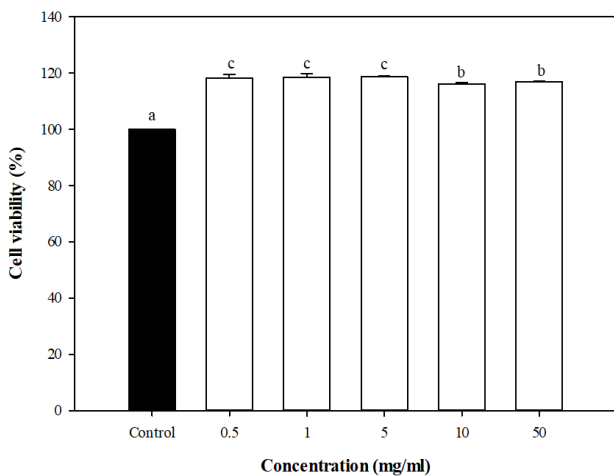


Fig. 4. Effect of *S. cerevisiae* FT4-4 on viability of B16F10 cells. The results are expressed as mean ± S.D of tree independent experiments triplicate in each run ($p < 0.05$).

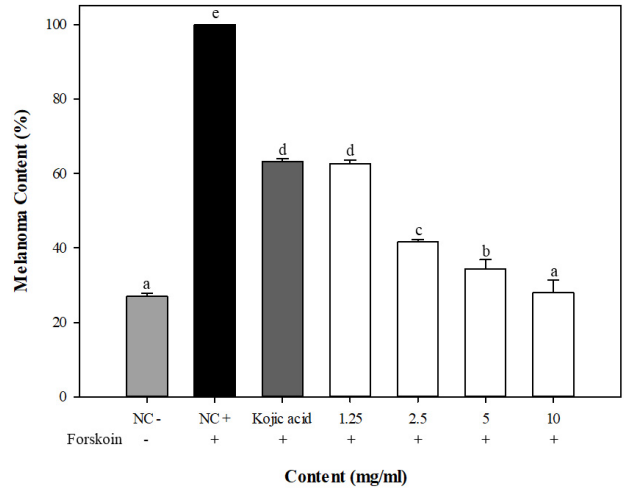


Fig. 5. Inhibitory effect of *S. cerevisiae* FT4-4 on melanin production in B16F10 cells. The results are expressed as mean ± S.D of tree independent experiments. NC - : negative control, NC + : positive control, - : no treated, + : treated.

처리 농도에서는 대조구인 kojic acid와 유사한 정도로 억제함을 확인하였다(Fig. 5). 5 mg/ml 이상 농도의 경우 멜라닌 합성을 유도하지 않은 상태와 유사한 결과를 나타내어 FT4-4의 경우 멜라닌 생성 억제에 효과가 우수함을 확인하였다. Choe 등[2]의 연구 결과를 보면 효모에서 분리한 멜라닌 생성 억제 물질인 melanoston의 경우 melanoma 세포에서 멜라닌 생성을 70% 합성을 저해한다는 결과와 유사한 결과를 확인할 수 있었으며, 골담초 추출물을 *S. cerevisiae* 균주로 발효한 경우에도 추출물에 비해 발효액의 멜라닌 생성 억제 효과가 5~10% 증가한 연구 결과가 보고되어[25], 향후 FT4-4를 이용하여 다양한 천연 화장품 소재와 발효를 통해 멜라닌 생성 억제 효과가 더욱 증진 될 수 있다는 가능성 또한 확인할 수 있었다. 따라서 *S. cerevisiae* FT4-4의 경우 항산화 활성 및 미백에 대한 우수한 활성을 지닌 것을 판단되며 이를 이용한 발효 starter 및 기능성 소재로의 활용 가치를 매우 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 순창군 향토건강식품명품화사업 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Cha, J. Y., Yang, H. J., Jeong, J. J., Seo, W. S., Park, J. S.,

- Ok, M. and Cho, Y. S. 2010. Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J. Life Sci.* **20**, 940-947.
2. Choe, T. B., Lee, S. S. and Jung, H. K. 2005. Inhibition of melanoma differentiation by melanogenesis inhibitor isolated from yeast. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* **31**, 25-33.
 3. Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Mitchell, D. L. 1997. Melanin: a two edged sword *Pigm. Cell Res.* **10**, 158.
 4. Hwang, J. Y., Park, T. S. and Son, J. H. 2013. Whitening effect of extracts and fractions from *Diospyros kaki* calyx. *J. Life Sci.* **23**, 383-388.
 5. Jang, I. T., Kang, M. G., Na, K. C. and Lee, J. S. 2011. Growth characteristics and physiological functionality of yeasts in pear marc extracts. *Mycobiology* **39**, 170-173.
 6. Jang, I. T., Kim, Y. H., Kang, M. G., Yi, S. H., Lim, S. I. and Lee, J. S. 2012. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Mycol.* **40**, 60-64.
 7. Kang, H. C., Cha, M. Y. and Kim, J. Y. 2015. A study of the antioxidant activities and whitening activities of *Areca semen* extracts as cosmetic ingredient. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* **41**, 269-277.
 8. Kang, M. G., Kim, H. K., Yi, S. H., Lim, S. and Lee, J. S. 2011. Screening new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor-producing yeast and optimization of production condition. *Kor. J. Mycol.* **39**, 194-197.
 9. Kim, J. H., Kim, N. M. and Lee, J. S. 1999. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from traditional Meju. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **12**, 490-495.
 10. Kim, J. Y., Han, S. M. and Lee, J. S. 2018. Isolation and tyrosinase inhibitory activity of wild yeasts obtained from soil in the fields of medicinal plants, Ginseng and Korean angelica. *Kor. J. Mycol.* **46**, 315-323.
 11. Kim, J. Y. and Lee, J. S. 2020. Microbiological characteristics of whitening tyrosinase inhibitor-producing wild yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0191 and *Papiliotrema laurentii* ON30 and production. *Kor. J. Mycol.* **48**, 285-296.
 12. Kim, Y. E., Yeo, M. A., Han, J. H., Lee, J. M., Jung, S. K., Jeong, H. A., Kim, S. H. and Lee, J. E. 2017. *Aureobasidium pullulans* ferment of black tea for anti-oxidation, whitening and anti-wrinkle effects. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* **43**, 265-271.
 13. Kim, Y. G., Pham, D. N., Lee, Y. H., Jo, J. J., Choe, E. Y., Lee, Y. H., Kim, S. B. and Kim, C. J. 2017. Whitening and antioxidant activities of fermentation broth of acacia flower (*Robinia pseudoacacia*). *Clean Technol.* **23**, 401-407.
 14. Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings Bioinf.* **5**, 150-163.
 15. Lee, C. H., Cha, J. Y., Jun, B. S., Lee, H. J., Lee, Y. C., Choi, Y. L. and Cho, Y. S. 2005. The antioxidative activity of glutathione-enriched extract from *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 in *in vitro* model system. *J. Life Sci.* **15**, 819-825.
 16. Lee, M. J., Kim, H. S., Cho, A., Jeon, S. H., Lee, N. K., Ahn, K. J. and An, I. S. 2014. The effects of essence-formed cosmetic ingredients containing the *galactomyces* ferment filtrate on skin improvements in keratinization, pores, sebum excretion, brightness and acne. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **12**, 77-84.
 17. Lee, S. J., Choi, H. R., Lee, J. C., Park, H. J., Lee, H. K., Jeong, J. T. and Lee, T. B. 2014. The anti-aging effects of various berries in the human skin keratinocyte (HaCaT) cells. *Food Sci. Technol.* **46**, 198-204.
 18. Lee, Y. H., Park, S. S., Lee, S. W., Lee, S. H., Park, K. H., Choi, Y. J. and Gal, S. W. 2006. Whitening effect of mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mixture of cucumber and crape extracts. *J. Life Sci.* **16**, 870-875.
 19. Mo, J. H. and Oh, S. J. 2015. Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of extract of *Thuja orientalis*. *Kor. J. Aesthet Cosmetol.* **13**, 189-194.
 20. Park, I. H. and Kim, M. M. 2011. Inhibitory effect of spermidine with antioxidant activity on oxidative stress in human dermal fibroblasts. *J. Life Sci.* **21**, 693-699.
 21. Park, S. K., Kim, D. M. and Oh, K. H. 2017. Enhanced physiological activities of wine yeasts *Pichia manshurica* and *Pichia terricola* isolated from grapes pericarp. *Kor. J. Mycol.* **53**, 235-241.
 22. Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O. and Villani, F. 2008. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1919-1928.
 23. Ryu, M. S., Yang, H. J., Jeong, S. J., Seo, J. W., Ha, G., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2018. Characteristic study and optimization of culture conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 100731 as probiotic resource for companion animal. *Kor. J. Microbiol.* **54**, 384-397.
 24. Seo, J. W., Yang, H. J., Jeong, S. J., Ryu, M. S. and Jeong, D. Y. 2020. Potential probiotic activity of *Lactobacillus brevis* SCML 504 isolated from traditional Korean fermented food and the preparation of Sikhye with brown rice. *Kor. J. Food Preserv.* **27**, 46-57.
 25. Seok, J. H., Lee, S. Y., Chae, E. J. and Choi, S. W. 2010. Skin whitening effects of Caragana sinica Rehder extract fermented by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* **36**, 207-213.
 26. Shin, B. Y., Jung, B. R., Jung, J. G., Cho, S. S. and Bang, M. 2017. Inhibitory effects on melanin production in B16 melanoma cells of fallen pear. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **46**, 320-326.
 27. Sim, S. Y., Park, W. S., Shin, H. S., Ok, M., Cho, Y. S. and Ahn, H. Y. 2019. Physicochemical properties and biological activities of angelica gigas fermented by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Life Sci.* **29**, 1136-1143.
 28. Yang, E. S., Hwang, J. S., Choi, H. C., Hong, R. H. and Kang, S. M. 2008. The effect of genistein on melanin synthesis and *in vivo* whitening. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **36**, 72-81.
 29. Yang, H. J., Jeong, S. J., Jeong, S. Y., Heo, J. H. and Jeong, D. Y. 2015. Screening of biogenic amine non-producing yeast and optimization of culture conditions using statistical method for manufacturing black raspberry wine. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 592-601.
 30. Yoo, D. H., Joo, D. H. and Lee, J. Y. 2017. Anti-oxidant func-

tion and inhibitory effects of the expression of MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase of *Sesamum indicum* L. in B16F10 melanoma cells. *J. Life Sci.* **27**, 318-324.

31. Yoon, M. Y. 2016. A study on peanut spouts extract as the anti-oxidant activity and the skin whitening cosmetic ingredients. *KSBB. J.* **31**, 14.

초록 : 화장품 소재로서 순창 베리류 유래 *Sacchromyces cerevisiae* FT4-4의 항산화 활성 및 미백 효과

서지원[†] · 류명선[†] · 양희종 · 정수지 · 정도연*

((재)발효미생물산업진흥원)

기능성 화장품 소재로서 활용할 수 있는 효모의 분리를 위하여 순창군 베리류 및 과수원 토양에서 분리주 80종을 1차로 선별하였다. 80종의 분리주를 대상으로 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과 DPPH 라디칼 소거능은 51.41%, SOD 활성은 62.23%, tyrosinase 저해 활성 64.75%로 가장 우수한 FT4-4를 최종적으로 선별하였다. 18S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Saccharomyces cerevisiae* FT4-4로 명명하였으며, API ZYM을 이용하여 세포의 효소 활성을 추가로 측정하였다. 발효 시간에 따른 균체 성장 및 tyrosinase 저해 활성의 변화를 측정된 결과 배양 후 16시간에 최대 균체량인 3.16 g/l와 67.68%의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 또한, *S. cerevisiae* FT4-4의 화장품 소재로 활용하기 위한 세포 독성과 melanoma B16F10 세포 멜라닌 억제능을 확인한 결과, 세포독성은 50 mg/ml 이하의 농도에서 100% 이상의 세포 생존율을 보였으며, 시료 10 mg/ml에서의 멜라닌 생합성 저해능은 72.02%로 측정되었다. 향후 FT4-4의 화장품 소재로 활용하기 위해서는 생산 수율을 증가하기 위한 생산조건 확립 이외에도 안전성을 향상시키기 위한 추가적인 독성연구 등 다양한 연구가 수반되어야 하나, 본 연구에서의 항산화 및 미백 효능만으로도 충분히 활용할 가치가 있는 소재로 사료된다.