

Inhibition of Tyrosinase by Metabolites Originating from *Trichoderma atroviride*

Dong Woo Kang, Kyu-Min Kim, Ye-Seong Kim, Yu-Jin Seo, Da-Yeong Song, Da-Yun Oh, Si-On Choi, Ju-Hyeon Hwang, Sam Woong Kim, Kyu Ho Bang and Sang Wan Gal*

Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

Received August 20, 2020 / Revised October 26, 2020 / Accepted October 27, 2020

In today's society, functional whitening cosmetics are important to beauty. Fungi are known to produce a variety of whitening-related metabolites. In this study, we searched for tyrosinase inhibitors with metabolic products derived from *Trichoderma atroviride* supernatant in order to apply a material for whitening functional cosmetics. In addition, the inhibitory effect was compared to arbutin, which has already been approved as a whitening raw material by the Korea Ministry of Food and Drug Safety (KMFDS). The metabolites from the *T. atroviride* supernatant showed higher tyrosinase inhibitory activity than that of arbutin. Some of the tyrosinase inhibitors were stable to heat, whereas some were unstable. The heat unstable material was exhibited in the case of samples treated with little amounts, such as 0.02~0.2%. They were very unstable in acidic and alkali pHs, especially under acidic conditions. However, it was found that a weakly-acidic to neutral pH range was the optimal working pH, especially neutral pH. Since the activity of the inhibitory substances in the *T. atroviride* supernatant was maintained regardless of proteinase K treatment, it was assumed that the metabolites, but not the bioactive peptides, were involved in the activity. In summary, we propose that the metabolites derived from *T. atroviride* supernatant have strong potential as whitening raw material.

Key words : Cosmetics, metabolite, *Trichoderma atroviride*, tyrosinase inhibitor, whitening raw material

서론

오늘날, 피부보호 및 항노화 화장품은 전세계적으로 유행되고 있으며, 특히 아시아에서는 이 산업이 지속적으로 확장되어 오고 있다[3]. 또한, 미백화장품은 전세계 인구의 15%가 애용하고 있는 것으로 나타나고 있다[13]. 이러한 미백화장품은 멜라닌과 관련이 있는데, 멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 데 중요한 역할을 한다. 멜라닌은 흑갈색 또는 검은색을 띠는 알갱이로서 사람의 피부에 존재하는 색소이다. 멜라닌의 양이 많을수록 검은색 피부를 띄게 된다.

멜라닌의 생합성은 멜라노솨에서 수행되며, 주요한 역할은 자외선을 흡수하여 자외선이 인체 내에 침투하는 것을 차단하는 매우 중요한 작용을 한다[5]. 그러나 이러한 멜라닌이 과도하게 생성이 되면 기미나 주근깨를 형성하고 피부 노화를 촉진하여 피부암 유발에 관여를 한다[1, 2, 19, 20]. 멜라닌 합성의 개시는 tyrosine이 tyrosinase라는 효소에 의해 진행되며, 본 효소에 의해 DOPA와 멜라닌 전구체인 DOPA quinone으로 전환이 되고 최종적으로 멜라닌이 합성된다[7, 8]

현재 밝혀진 미백원료는 vitamin C, vitamin C 유도체, 태반 추출물, kojic acid 등이다[13]. 그러나 원료의 안전성 등이 이유로 현재에는 식약처 고시 미백원료는 알부틴, 유용성감초추출물, 에칠아스코빌에텔, 닥나무추출물 등이 사용되고 있다[10]. 대표적인 tyrosinase를 억제하는 작용 기전을 지니고 있는 원료는 식약처 고시 원료인 arbutin과 전통발효식품인 간장, 된장 등에서 분리된 누룩의 발효로 인해 얻어진 kojic acid 이다[4, 6, 12].

따라서 본 연구에서는 가장 많이 사용되는 식약처 고시 미백원료인 arbutin보다 안정하고 효능이 강한 tyrosinase를 억제하는 물질을 탐색하는 것을 목표로 연구를 진행하였고 그 결과 *Trichoderma atroviride*가 tyrosinase를 억제하는 것을 발견하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 균주는 *Trichoderma atroviride*로 2018년 9월 13일에 버섯배지(소나무)에서 발견한 것으로 같은 해 10월 5일에 마크로젠에 동정을 받았다. 이 균주를 PDB에 25°C 5일간 배양하여 0.2 µm syringe filter로 여과한 상등액을 실험에 사용하였다. 처리된 상등액은 적절하게 희석하여 시험에 사용하였고, positive control로 arbutin을 사용하였다.

농도별 tyrosinase 억제 활성 시험

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3393, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sangal@gntech.ac.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.

시험액을 E-tube에 100 µl씩 3반복하여 만든 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 96 well plate에 옮겨 microtiter reader (Multiscan GO, Thermo Scientific Co. Ltd., Rochester, NY, USA)에 의해 490 nm에서 흡광도를 측정하여 억제율을 조사하였다.

온도별 억제 활성 시험

상등액 원액 500 µl 5개를 dry bath incubator에서 각각 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C 1시간 가열하였다. 각 온도별로 가열 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 96 well plate에 옮겨 microtiter reader 490 nm (Multiscan GO, Thermo Scientific Co. Ltd., Rochester, NY, USA)에 의해 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Proteinase K 처리 후 tyrosinase 억제 활성 분석

Proteinase K 처리 그룹은 상등액(원액) 500 µl에 Proteinase K 5 µl를 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응 한 후 80°C에서 10분간 열처리하여 Proteinase K를 불활성화한 상등액을 사용하였다. Proteinase K 비처리 그룹은 상등액(원액) 500 µl를 37°C에서 1시간 반응한 다음 80°C에서 10분간 열처리하여 사용하였다.

pH별 억제 활성 시험

pH 4.83인 상등액 원액을 0.2 N HCl과 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH 2, 4, 7, 10이 되도록 pH를 조정한 후 각 pH별로 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 96 well plate에 옮겨 microtiter reader (Multiscan GO, Thermo Scientific Co. Ltd., Rochester, NY, USA)에 의해 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

농도별 tyrosinase 억제 활성 분석

*Trichoderma atroviride*로부터 유래된 물질대사산물이 tyrosinase의 활성을 억제할 수 있는지를 확인하기 위해, *T. atroviride*의 상등액을 농도 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10% 조건에서 반응을 시켰으며, 이들 상등액의 농도별 test 결과 값을 Fig. 1에 나타내었다. 기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인의 In vitro tyrosinase 활성저해시험에 따라 490 nm에서 흡광도 값을 측정하였다[10].

양성대조군인 arbutin 10%는 46.4%의 저해율을 나타내고 *T. atroviride* 상등액 동일 조건인 10%에서는 약 81.3% 저해율을 나타내었다(Fig. 1). 그러나 이미 0.2%에서 포화상태를 보이기 때문에 실질적으로 arbutin과 유사한 활성을 보이는 구간은 *T. atroviride* 상등액의 농도가 0.11%이기 때문에, *T. atroviride* 상등액의 활성은 arbutin에 비교하여 약 95배 높은 것으로 나타났다. 그러나 본 배양 상등액에는 다양한 산물들이 혼합에 의해 활성을 보이지만, 명확하게 높은 활성을 보이기 때

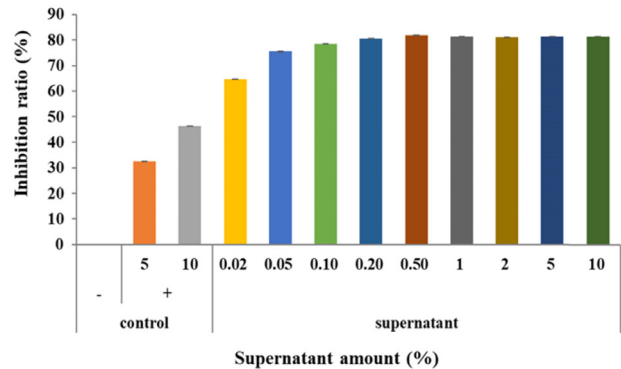


Fig. 1. Comparison of tyrosinase inhibition rate by concentration of *Trichoderma atroviride* supernatant. The treated supernatant was reacted depending on concentration. The positive control was applied by arbutin. The prepared solution was reacted for 30 min at 37°C, and then measured at 490 nm in wavelength. X- and Y-axes mark supernatant amount (%) and inhibition ratio (%), respectively.

문에, 본 배양액은 미백개선제로써 활용가능성이 있는 것으로 제외된다.

자연에서 발견되는 tyrosinase inhibitor의 소재는 식물, 곰팡이, 세균 등에서 다양하게 발견되고 있다[21]. 최근에 tyrosinase inhibitor가 *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Phellinus linteus*, *Daedalea dickinsii*, *Dictyophora indusiata* 등 다양한 균류에서 발견되고 있으며, 이들을 활용한 산업화 연구가 활발히 진행되고 있다[21]. 이들 중에 버섯류에서 chalcones, flavanone, resveratrol analog, coumarin derivatives 등 다양한 tyrosinase inhibitor들이 발견되어 있다[13, 14, 17]. 따라서 비록 활성은 높게 평가되었지만, 추후 보다 정밀한 연구가 필요한 것으로 추정된다.

온도별 tyrosinase 억제 활성 분석

*T. atroviride*의 상등액을 온도 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C에서 각각 1시간 반응을 시켰으며, 각 온도별로 가열한 상등액을 농도별로 test한 결과 값은 Fig. 2에 나타내었다. 저농도인 0.02%에서는 모든 온도에서 58% 미만의 저해율을 보였고, 특히 100°C에서 24.8% 저해율로 매우 저조한 것으로 나타났다. 90°C 미만에서는 0.2% 이상에서 모두 포화상태 이상의 활성을 보였지만, 100°C에서는 5% 이상에서 포화상태의 저해 활성을 보였다.

이 결과로 볼 때, *T. atroviride*의 물질대사산물 중에 부분적으로 온도에 매우 안정한 물질들이 존재하지만, 일부 물질들은 열에 불안정한 것으로 추정된다. 또한, 고농도의 상등액에서 저해활성이 온도에 따른 포화상태에 도달할 수 있는 것은 열에 안정한 물질이 과량으로 존재함에 기인된 것으로 추정된다. 따라서 본 결과를 종합해 보면, *T. atroviride* 유래의 tyrosinase 억제물질들은 다양한 산물들이 관여하며, 이들은 열

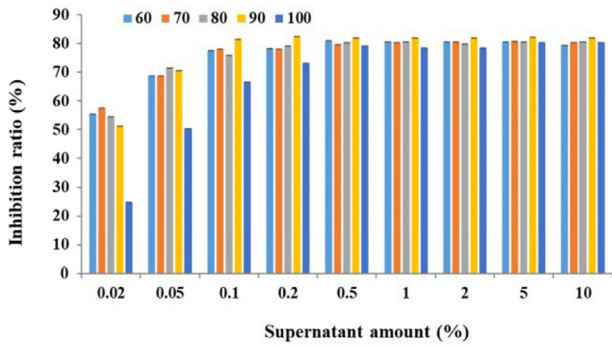


Fig. 2. Comparison of tyrosinase inhibition rate by concentration of *Trichoderma atroviride* supernatant depending on temperature. The treated supernatant was reacted at the indicated temperature. The positive control was applied by arbutin. The prepared solution was reacted for 30 min at 37°C, and then measured at 490 nm in wavelength. X- and Y-axes mark supernatant amount (%) and inhibition ratio (%), respectively.

에 안정한 것과 불안정한 것들이 공존하는 것으로 추정된다.

본 연구 결과 tyrosinase inhibitor는 온도에 대한 안정성이 존재하는 것과 불안정한 물질이 양립하였다. 온도에 안정한 산물은 물질대사 산물이거나[13, 14, 17], 열에 안정한 환형 펩타이드로 구성된 것으로 추정된다[16]. 최근래 연구에서 tyrosinase 억제물질 중에 peptide 기반의 억제제가 존재하는 것이 확인되었다[9, 11, 15, 18]. 열에 불안정한 물질은 이들과 유사한 열에 의해 실활될 수 있는 펩타이드성 산물로 추정된다.

pH별 tyrosinase 억제 활성 분석

산과 염기를 첨가하여 pH를 조절한 *Trichoderma atroviride*의 상등액을 반응을 시켰으며, 각 pH별 상등액을 농도별로 test한 결과 값은 다음 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 *T. atroviride*의 상등액을 pH 4.83인 control과 비교하였을 때 pH 2.0에서는 저해 효과가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었고, 매우 고농도에서 낮은 정도의 활성만이 검출되었다. 또한, pH 4.0과 10.0으로 조정된 경우에는 0.5% 이하의 농도에서 활성이 소실되는 것으로 나타났다. 그러나 pH 4.0은 pH 10.0에 비교하여 저농도에서 높은 활성이 유지되는 것으로 관찰되었다. 이 결과로 볼 때 본 균류에서 생산되는 조건이 약산성이기 때문에, 알칼리 조건보다 비교적 활성이 유지되는 것으로 추정된다.

산성과 알칼리 조건과 비교할 때 중성인 pH 7.0은 대조군인 pH 4.83과 가장 근접한 활성을 보였고, 대부분의 활성이 0.1% 부근에서 회복되는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 tyrosinase 억제물질들의 대부분은 약알칼리에서 중성 부근의 pH에서 최적 활성을 보유하고 있는 것으로 추정된다. 또한, 약산성인 pH 4.0과 약알칼리인 pH 10.0에서 저농도로 투여될 때 다른 활성을 보이는 것으로 볼 때, 이들 pH에서 작용하는 물질들이

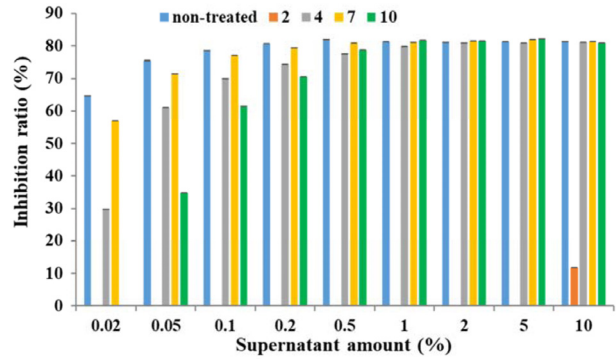


Fig. 3. Comparison of tyrosinase inhibition rate by concentration of pH-adjusted *Trichoderma atroviride* supernatant. The treated supernatant was reacted at the indicated pH. The positive control was applied by arbutin. The prepared solution was reacted for 30 min at 37°C, and then measured at 490 nm in wavelength. X- and Y-axes mark supernatant amount (%) and inhibition ratio (%), respectively.

상호 다른 기능 group을 가지거나 완전히 다른 물질일 가능성이 높은 것으로 추정된다.

Tyrosinase의 활성을 억제하는 물질 중 활성 부위에 peroxide group에 proton 전위에 의해 활성이 억제되거나 산화/환원의 단계에 의해 활성이 조절하는 inhibitor들이 존재한다 [21]. 따라서 본 연구에서 대부분의 tyrosine inhibitor들은 특정 pH 영역에서만 안정한 것으로 볼 때, 활성 부위에 proton전위나 산화/환원 반응의 매개에 의해 활성을 조절하는 것으로 추정된다.

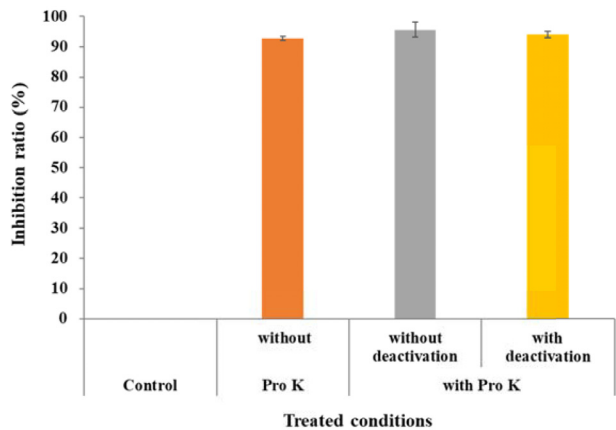


Fig. 4. Comparison of tyrosinase inhibition rate by *Trichoderma atroviride* supernatant treated with Proteinase K. The treated supernatant was reacted with proteinase K. The deactivation of proteinase K was done for 10 min at 80°C. The treated solution was reacted for 30 min at 37°C, and then measured at 490 nm in wavelength. X- and Y-axes mark treated condition and inhibition ratio (%), respectively.

T. atrovirde 물질대사산물의 물질 특성

최근 연구에서 tyrosinase 억제물질 중에 peptide 기반의 억제제가 존재하는 것이 확인되었다[9, 11, 15, 18]. 따라서 본 tyrosinase 억제물질 중에 peptide 기반에 의한 활성 억제제가 존재하는 지에 대해 확인하기 위해, T. atroviride의 상등액을 추출하여 proteinase K를 처리하여 반응을 시킨 것과 동일한 조건에서 proteinase K만 처리하지 않은 샘플에 대해 비교하여 보았다(Fig. 4).

T. atroviride의 상등액에 proteinase K 처리 그룹과 비처리 그룹의 저해율이 94~96%로 비슷한 저해율을 나타낸 것을 확인할 수 있다. 이는 proteinase K를 첨가하여도 저해능력에는 전혀 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다.

본 proteinase K 처리 test에서 proteinase K 처리군과 미처리 군의 저해율이 비슷한 것으로 보아 Trichoderma atroviride의 상등액에 존재하는 tyrosinase 억제물질의 대부분이 물질대사산물이며, 일부 protease에 저항성이 환형 또는 직쇄상 펩타이드 성 물질이 존재할 것으로 추정된다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 경남과학기술대학교 교원 연구활성화 지원 사업의 예산지원으로 수행되었음.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Ahn, S. J., Koketsu, M., Ishihara, H., Lee, S. M., Ha, S. K., Lee, K. H., Kang, T. H. and Kim, S. Y. 2006. Regulation of melanin synthesis by selenium-containing carbohydrates. *Chem. Pharm. Bull.* **54**, 281-286.
- Brenner, M. and Hearing, V. J. 2008. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem. Photobiol.* **84**, 539-549.
- Chen, Y. H., Huang, L., Wen, Z. H., Zhang, C., Liang, C. H., Lai, S. T., Luo, L. Z., Wang, Y. Y. and Wang, G. H. 2016. Skin whitening capability of shikimic acid pathway compound. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 1214-1220.
- Chib, S., Dogra, A., Nandi, U. and Saran, S. 2019. Consistent production of kojic acid from *Aspergillus sojae* SSC-3 isolated from rice husk. *Mol. Biol. Rep.* **46**, 5995-6002.
- Costin, G. E. and Hearing, V. J. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **21**, 976-994.
- Gonzalez, M., Correa, M. and Chorilli, M. 2013. Skin delivery of kojic acid-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging. *BioMed. Res. Int.* **2013**, 271-276.
- Halaban, R., Patton, R. S., Cheng, E., Svedine, S., Trombetta, E. S., Wahl, M. L., Ariyan, S. and Hebert, D. N. 2002. Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 14821-14828.
- Hearing, V. J. 1987. Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **19**, 1141-1147.
- Hsiao, N. W., Tseng, T. S., Lee, Y. C., Chen, W. C., Lin, H. H., Chen, Y. R., Wang, Y. T., Hsu, H. J. and Tsai, K. C. 2014. Serendipitous discovery of short peptides from natural products as tyrosinase inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 3099-3111.
- KMFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety): www.mfds.go.kr.
- Li, D. F., Hu, P. P., Liu, M. S., Kong, X. L., Zhang, J. C., Hider, R. C. and Zhou, T. 2013. Design and synthesis of hydroxypyridinone-L-phenylalanine conjugates as potential tyrosinase inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6597-6603.
- Lourith, N., Kanlayavattanakul, M. and Pongpunyayuen, S. 2011. Botanical Arbutin from Naringi crenulata. In: Hayes LM, ed. *Cosmetics: Types, Allergies and Applications*. New York: Nova; 157-164.
- Pillaiyar, T., Manickam, M. and Namasivayam, V. 2017. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 403-425.
- Radhakrishnan, S. K., Shimmom, R. G., Conn, C. and Baker, A. T. 2015. Azachalcones: a new class of potent polyphenol oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 1753-1753.
- Reddy, B., Jow, T. and Hantash, B. M. 2012. Bioactive oligopeptides in dermatology: part I. *Exp. Dermatol.* **21**, 563-568.
- Scott, C. P., Abel-Santos, E., Wall, M., Wahnnon, D. C. and Benkovic, S. J. 1999. Production of cyclic peptides and proteins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 13638-13643.
- Sonmez, F., Sevmezler, S., Atahan, A., Ceylan, M., Demir, D., Gencer, N., Arslan, O. and Kucukislamoğlu, M. 2011. Evaluation of new chalcone derivatives as polyphenol oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 7479-7482.
- Tseng, T. S., Tsai, K. C., Chen, W. C., Wang, Y. T., Lee, Y. C., Lu, C. K., Don, M. J., Chang, C. Y., Lee, C. H., Lin, H. H., Hsu, H. J. and Hsiao, N. W. 2015. Discovery of potent cysteine-containing dipeptide inhibitors against tyrosinase: a comprehensive investigation of dipeptides in inhibiting dopachrome formation. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 6181-6188.
- Urabe, K., Nakayama, J. and Hori, Y. 1998. In Norlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ. eds. *The pigmentary system: physiology and pathophysiology*. New York, NY: Oxford University Press; 909-913.
- Yang, J. Y., Koo, J. H., Song, Y. G., Kwon, K. B., Lee, J. H., Sohn, H. S., Park, B. H., Jhee, E. C. and Park, J. W. 2006. Stimulation of melanogenesis by scoparone in B16 melanoma cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **27**, 1467-1473.
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F. and Saboury, A. A. 2019. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **34**, 279-309.

초록 : *Trichoderma atroviride* 배양액의 tyrosinase 억제제에 관한 연구

강동우 · 김규민 · 김예성 · 서유진 · 송다영 · 오다운 · 최시온 · 황주현 · 김삼웅 · 방규호 · 갈상완*
(경남과학기술대학교 제약공학과)

현대인에게 미백화장품은 미를 나타내는 중요한 요소이다. 균류는 미백에 연관된 다양한 물질대사산물을 생산한다. 본 연구에서 미백기능성 화장품에 소재를 탐색하기 위해 *Trichoderma atroviride* 배양액에 물질대사산물에 의한 tyrosinase inhibitors를 조사하였다. 또한, 억제 효과는 식의약안전처에 미백화장품 원료로 승인된 알부틴과 비교하였다. *T. atroviride* 배양액에 물질대사산물은 알부틴의 활성보다 높은 tyrosinase 억제 활성을 보였다. *T. atroviride* 배양액에 포함된 tyrosinase inhibitors 중 일부는 열에 안정한 반면에, 일부는 열에 불안정하였다. 본 물질들은 약산성~중성 pH 영역에서는 안정하였지만, 그 외 영역에서는 매우 불안정하였다. Proteinase K에 의해 활성 영향이 거의 없었기 때문에 inhibitor들은 대부분 물질대사산물로 구성된 것으로 추정된다. 따라서 본 *T. atroviride* 배양액에 물질대사산물은 미백화장품 소재로써 잠재적 가치가 있는 것으로 제의된다.