

## 천연물 유래 항산화 기능성 화장품 신소재 개발

유익 등<sup>†</sup> · 김종평 · 김원곤 · 윤봉식 · 유인자

한국생명공학연구원 기능성화장품신소재개발센터  
(2005년 12월 7일 접수, 2005년 12월 15일 채택)

### Development of New Natural Antioxidants for Cosmeceuticals

Ick Dong Yoo<sup>†</sup>, Jong Pyung Kim, Won Gon Kim, Bong Sik Yun, and In Ja Ryoo

National Cosmeceutical Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 52  
Oeundong, Yuseong, Daejeon 305-333, Korea  
(Received December 7, 2005; Accepted December 15, 2005)

**요약** 미생물, 버섯류, 약용식물 등 천연물 대사산물로부터 미백, 주름개선용 화장품 신소재로 활용 가능한 항산화 신소재를 탐색하였다. 그 결과 *Eupenicillium shearii* 균주 배양액으로부터 4개의 phenolic 항산화 활성물질을 순수하게 분리하고 화학구조를 결정하여 melanocin A-D로 명명하였다. Melanocin A ~ D 화합물의 DPPH 라디칼 소거활성은 EC<sub>50</sub> 21 ~ 94  $\mu$ M, superoxide 소거활성은 EC<sub>50</sub> 7 ~ 84  $\mu$ M로 arbutin 및 BHA보다 우수한 활성을 나타냈으며, 주름개선 효과도 매우 우수하였다. 기와층버섯 (*Inonotus xeranticus*) 자실체 추출물로부터 강력한 항산화 활성물질인 히스피딘계 신물질을 얻어 inoscavin A로 명명하였다. Inoscavin A 화합물의 항산화 활성을 측정된 결과, superoxide radical 소거활성은 EC<sub>50</sub> 0.03  $\mu$ g/mL, rat의 간 microsome의 지질 과산화 억제활성 EC<sub>50</sub>는 0.3  $\mu$ g/mL로서  $\alpha$ -tocopherol의 1.5  $\mu$ g/mL, BHA의 4.9  $\mu$ g/mL 보다 우수하였다. *Streptomyces nitrosporeus* 균주 배양액으로부터 신규 지질과산화 억제 활성물질을 benzastatin A ~ G를 분리하였다. Benzastatin A ~ G의 지질과산화 억제활성 EC<sub>50</sub>는 3 ~ 30  $\mu$ M로 매우 우수하였다. *Penicillium* sp. 균주로부터 미백활성물질을 탐색하여 cyclopentene계 화합물인 terrein을 얻었다. Terrein은 kojic acid 보다 약 10배 이상 강력한 미백활성을 나타낸 반면, 100  $\mu$ M 농도에서도 비교적 안전한 화합물로 확인되었으며, 작용기전은 MITF 단백질 발현을 조절함으로써 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

**Abstract:** New antioxidative substances for cosmeceuticals were screened from natural resources such as microbial metabolites, mushrooms, and medicinal plants. Four antioxidants were isolated from the fungal metabolite of *Eupenicillium shearii* and their structures were determined to be new phenolic compounds. The compounds were designated as melanocins A, B, C, and D. Melanocins A ~ D exhibited free radical scavenging activity on DPPH and superoxide with EC<sub>50</sub> values of 21 ~ 94 and 7 ~ 84  $\mu$ M, respectively, which were stronger activity than those of  $\alpha$ -tocopherol and BHA. Melanocin A showed anti-wrinkle effects on the UV-irradiated hairless mouse skin. A novel hispidin antioxidative compound designated as inoscavin A was isolated from the fruiting body of the mushroom, *Inonotus xeranticus*. Inoscavin A scavenged superoxide radical with EC<sub>50</sub> values of 0.03  $\mu$ g/mL, and inhibited rat liver microsomal lipid peroxidation with EC<sub>50</sub> values of 0.3  $\mu$ g/mL. Benzastatins A ~ G, the novel antioxidants isolated from the culture of *Streptomyces nitrosporeus* showed potent lipid peroxidation inhibitory activity with EC<sub>50</sub> values of 3 ~ 30  $\mu$ M. A cyclopentene compound with strong hypopigmentary effect was isolated from the fungal metabolite of *Penicillium* sp. and identified as terrein. Terrein significantly reduced melanin levels in a melanomocyte cell line, Mel-Ab. It showed 10 times stronger activity than kojic acid, but exhibited no cytotoxic effect even in 100  $\mu$ M. It was suggested that terrein reduced melanin synthesis by reducing tyrosinase production by MITF down-regulation.

**Keywords:** cosmeceuticals, antioxidants, inoscavin A, benzastatin, terrein, melanocin

### 1. 서 론

최근 건강하고 여유로운 삶이 요구되고 있는 가운데

기능성 화장품에 관한 관심이 더욱 높아지고 있다. 이에 따라 최근의 화장품은 단순한 미용의 개념에서 진화하여 질병의 예방과 치료의 개념이 도입된 고기능성, 다기능성을 지닌 미백, 주름개선, 자외선 차단용과 같은 기능성 화장품(cosmeceuticals)이 큰 비중을 차지하고 있으며, 기능

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: idyoo@kribb.re.kr)

성 화장품 신소재의 개발도 활발하게 진행되고 있다.

한편, 산소는 지구상에서 가장 많은 원소로서(53.8%) 건조대기 중의 21%를 차지하고 있으며 호기성 생물은 이렇게 풍부한 산소를 전자 수용체로 하는 호흡을 통하여 에너지를 획득한다. 그러나 이와 같이 생명 유지에 절대적으로 필요한 산소이지만 안정한 분자상태인 기저삼중항산소(ground state triplet oxygen)가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 superoxide radical( $O_2^-$ ), hydroxyl radical( $HO\cdot$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), singlet oxygen( $^1O_2$ )과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species)으로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다.

이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 각종 질병은 물론, 노화, 피부질환을 일으키는 원인이 된다. 또한 지질과산화 반응 결과 생성되는 지질 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 노화의 원인이 되기도 한다. 따라서 활성산소 및 프리라디칼 소거활성을 갖는 항산화 소재는 매우 유용한 노화방지용 화장품소재로 활용되고 있다.

저자들은 기능성 화장품 신소재의 개발을 위하여 국내 토양으로부터 분리하여 확보하고 있는 방선균과 곰팡이를 비롯하여 버섯류로부터 강력한 항산화 활성을 나타냄과 동시에 미백, 노화조절, 주름개선 효과를 나타내는 신규 화합물을 탐색하여 왔다[1-4].

본보에서는 최근 저자들에 의해서 탐색, 개발된 항산화 기능성 신규 화장품 소재를 중심으로 보고하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 기능성 화장품 신소재 탐색원의 분리 및 수집

2001년부터 한국생명공학연구원 항산화소재연구실의 연구진에 의해 국내토양으로부터 순수하게 분리한 후, 균주 은행으로 유지 보관하고 있는 방선균 및 곰팡이 균주 배양액 및 버섯류의 자실체를 탐색원으로 사용하였다.

### 2.2. 기능성화장품 신소재의 추출정제, 물성, 및 화학구조 결정

#### 2.2.1. 활성물질의 추출정제

탐색원으로 사용된 미생물은 균체를 acetone으로, 버섯의 자실체는 80% MeOH로 각각 추출하였다. MeOH 또는 acetone 추출액을 45°C에서 감압농축하여 용매를 제거한 후, 균주의 배양액과 균체추출물 혼합액 또는 자실체 추출물을 *n*-hexane,  $CHCl_3$ , EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 순

차적으로 추출하여 활성분획을 얻었다. 이 활성분획에 대하여 silica gel, Sephadex LH20 column chromatography 등을 실시하였으며, 최종적으로 HPLC 등을 통해 순수한 활성물질을 얻었다.

#### 2.2.2. 활성물질의 물리화학적 특성조사 및 구조결정

순수하게 정제된 화합물의 물리화학적 특성을 규명하기 위하여 성상을 조사하였고, spectrophotometer를 이용하여  $UV\lambda_{max}$ , KBr pellet을 이용하여  $IR\nu_{max}$ , 화합물의 입체구조를 위한 선광도, TLC Rf value, solubility 등을 조사하였다. 화합물의 구조는  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR 등의 1D와 COSY, HMQC, HMBC 등 다양한 2D NMR 분석과 함께 저분해능 및 고분해능 Mass 분석을 통해 실시하였다.

#### 2.2.3. 기기분석

HPLC는 photodiode array detector가 부착된 Waters 991 HPLC system (Waters, USA)을 이용하였다. 자외선 흡수스펙트럼은 MeOH을 용매로하여 UVIKON spectrophotometer 930 (Kontron Instrument, USA)을 사용하여 측정하였으며, 적외선 스펙트럼은 FT-IR spectrophotometer RFX-65S (Laser Precision)로 측정하였다. NMR 스펙트럼의 측정에는 Bruker사(USA)의 Bruker DMX-600 NMR spectrophotometer (600 MHz) 등을 사용하였다. MS 분석은 HP EIMS system (HP, USA) 및 JMS HX-HX 110A (JEOL, Japan)을 사용하였으며, 항산화 활성의 측정에는 wavelength 조절이 가능한 Versamax microplate reader (Molecular Device, USA)를 사용하였다.

## 2.3. 생물활성 측정

### 2.3.1. DPPH Radical 소거활성

DPPH radical 소거활성은 Brand-Williams의 방법[5]을 변형하여 측정하였으며 대표적인 항산화제인 BHA, Vitamin C, Vitamin E 등과 비교하였다. 즉 96-well plate에 메탄올에 녹인  $1.5 \times 10^{-4}$  M DPPH 용액 90  $\mu$ L에 첨가하여 25°C에서 10 min간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{Scavenged DPPH}(\%) = (1 - A_{\text{test}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

여기서,  $A_{\text{test}}$ 는 시료와 반응한 10 min 후의 흡광도이며,  $A_{\text{control}}$ 은 시료 대신 MeOH를 첨가한 대조구의 흡광도이다. DPPH radical을 50% 소거하는 시료의 농도를  $EC_{50}$ 으로 나타내었다.

### 2.3.2. Superoxide Radical 소거활성

Superoxide radical 소거활성은 irradiated riboflavin/EDTA/NBT system[6]을 변형하여 측정하였다. 즉, 96-well plate에 well당 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)에 녹인 riboflavin (0.03 mM), EDTA (1.0 mM), methionine (0.6 mM), NBT (0.03 mM) 혼합용액 150  $\mu$ L와 MeOH에 녹인 시료를 10  $\mu$ L를 첨가한 후 광화학 반응에 의하여 발생된 superoxide radical을 소거하는 활성을 측정하였다. Superoxide radical 발생을 위한 광화학 반응은 알루미늄 포일로 씌운 illumination box에 설치된 2개의 형광 램프를 이용하여 광의 세기를 1000 lux가 되도록 조절하였으며, 25°C에서 8 min간 반응시킨 다음 560 nm에서의 광흡수도 변화를 microplate reader로 측정하였다. 광화학 반응에 의하여 발생된 superoxide radical과 NBT가 반응하여 청색의 formazan을 형성하여 광흡수도가 증가하는데, 시료에 의하여 superoxide radical이 소거됨으로써 감소되는 광흡수 정도를 측정하여 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = (1 - \Delta A_{\text{test}}/\Delta A_{\text{control}}) \times 100$$

여기서  $\Delta A_{\text{test}}$ 는 시료를 첨가한 반응구에서 8 min간의 광흡수도 변화이며,  $\Delta A_{\text{control}}$ 은 시료 대신 MeOH를 첨가한 대조구의 광흡수도 변화이다. Superoxide radical을 50% 소거하는 시료의 농도를  $EC_{50}$ 으로 나타내었다.

### 2.3.3. 지질과산화 억제활성

지질과산화 억제활성을 측정하기 위한 지질원으로 사용한 microsome은 rat의 간으로부터 Hogeboom의 방법 [7]을 변형하여 differential centrifugation 방법으로 분리하였으며, 분리된 microsome의 단백질을 정량한 후 10 mg protein  $\text{mL}^{-1}$ 이 되도록 완충용액(0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)으로 조절하여 사용하였다. Microsome에 대한 시료의 지질과산화 억제활성은 Ohakawa 등[8]의 방법에 따라  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbate 반응계를 이용하여 thiobarbituric acid (TBA)법으로 측정하였다. 시료의 지질 과산화 억제활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도( $A_C$ )와 시료를 첨가한 반응구에서의 흡광도( $A_S$ )차를 시료 및  $\text{FeSO}_4$  용액을 첨가하지 않은 blank의 흡광도( $A_B$ )와 대조구의 흡광도( $A_C$ ) 차에 대한 백분율 [ $(A_C - A_S)/(A_C - A_B) \times 100$ ]로 산출하였다.

### 2.3.4. Tyrosinase 저해 활성

Mushroom tyrosinase에 대한 저해활성은 Ishihara 등 [9]의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 시료 15  $\mu$ L를 96 well microplate에 넣고, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5)

150  $\mu$ L와 1.5 mM L-tyrosine 용액 25  $\mu$ L를 넣은 후, 2100 units/mL에 해당하는 Mushroom tyrosinase (0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 7  $\mu$ L를 첨가하여 30°C에서 10 min간 반응시킨 후 생성되는 dopachrome의 양을 microplate reader를 사용하여 흡광도(490 nm)로 측정하였다. Tyrosinase에 대한  $IC_{50}$  값은 효소활성 저해율 50%에 달하는 시료의 농도로 결정하였다.

### 2.3.5. *Streptomyces bikiniensis* 멜라닌 생합성에 대한 저해활성

*Streptomyces bikiniensis* 멜라닌 생합성에 대한 저해활성 측정은 Tomita 등[10]의 방법을 개량하여 사용하였다. *S. bikiniensis* NRRL B-1049를 agar plate에 가한 후 glass hockey bar를 사용하여 균일하게 도포하였다. 배지 표면을 건조시킨 후 40  $\mu$ L의 시료를 적신 8 mm 직경의 paper disc를 올려놓은 후 28°C 조건에서 48 h 배양하였다. 생성된 멜라닌 생성 저해환의 크기를 배지의 배면에서 계측하였으며, 대조구로서는 kojic acid와 arbutin을 사용하였다.

### 2.3.6. B16 멜라노마 세포의 멜라닌 생합성 저해활성(11)

B16 마우스 멜라노마 세포를  $5 \times 10^3$  cells/mL의 농도로 10% FCS (Gibco)를 포함하는 DMEM (Dulbesco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL) 배지에 현탁시켰다. 현탁된 세포 5 mL을 tissue culture flask (Falcon, Becton dickinson)에 넣고 검정 시료를 농도별로 첨가한 후 5%  $\text{CO}_2$  - 95% 공기조건으로 37°C에서 배양하였다. 4일간 배양 후 플라스크 바닥에 흡착된 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 씻은 후, 0.05% trypsin 0.53 mM EDTA 용액으로 떼어 내었다. 떼어낸 세포를 1500 rpm으로 10 min간 원심분리하여 튜브에 모은 후 세포의 수를 측정하였다. 각 tube의 세포수를 일정하게 조절한 후 원심분리하여 모은 세포의 색깔을 arbutin을 첨가한 대조구와 비교하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 신규 주름개선 항산화 소재, Melanocin A-D 화합물(12-14)

#### 3.1.1. Melanocin A-D 화합물의 추출정제, 물성 및 화학구조

토양미생물의 일종인 *Eupenicillium shearii* 균주가 강력한 항산화 활성물질들을 생산하고 있음을 확인하고 활성 물질을 추출 정제하였다. 즉 *Eupenicillium shearii* 균주 배양액을 acetone으로 추출한 후 활성분획을 ethyl acetate

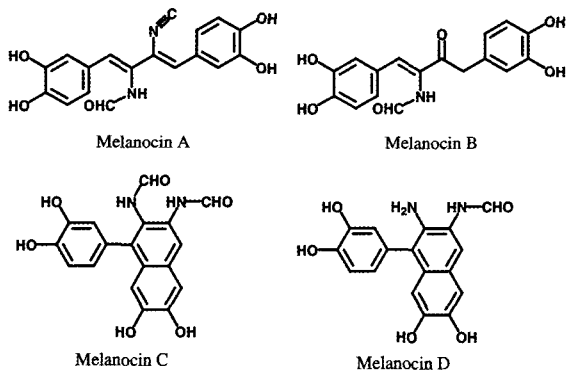


Figure 1. Chemical structures of melanocins A, B, C, and D.

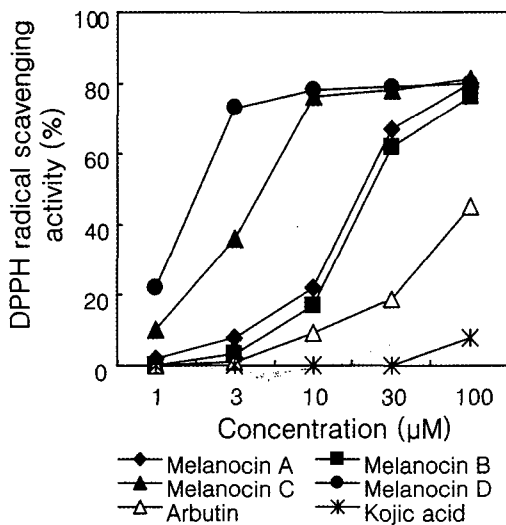


Figure 2. DPPH radical scavenging activity of melanocins A ~ D, arbutin, and kojic acid.

로 3회 추출한 후 silica gel 및 LH-20 column chromatography를 실시한 후 최종적으로 HPLC에 의해 4개의 순수하게 정제된 화합물을 얻어 melanocin A-D로 명명하였다.

Melanocin A-D 화합물의 물리화학적 특성을 조사한 결과, melanocin A-D 화합물은 모두 백색분말로 분자량은 각각 338, 329, 354, 326이었으며 분자식은  $C_{18}H_{14}N_2O_5$ ,  $C_{17}H_{13}NO_6$ ,  $C_{18}H_{14}N_2O_6$ ,  $C_{17}H_{14}N_2O_5$ 로 결정하였다(Figure 1).

3.1.2. Melanocin A-D 화합물의 항산화 활성

Melanocins A-D 화합물의 DPPH 라디칼 소거활성은  $EC_{50}$  21 ~ 94  $\mu M$ 로 arbutin에 비하여 약 3배 이상 강한 활성을 나타냈다(Figure 2). 한편 superoxide 소거활성을 조사한 결과,  $EC_{50}$ 은 7 ~ 84  $\mu M$ 로 arbutin 및 BHA보다 우수한 활성을 나타냈다(Figure 3).

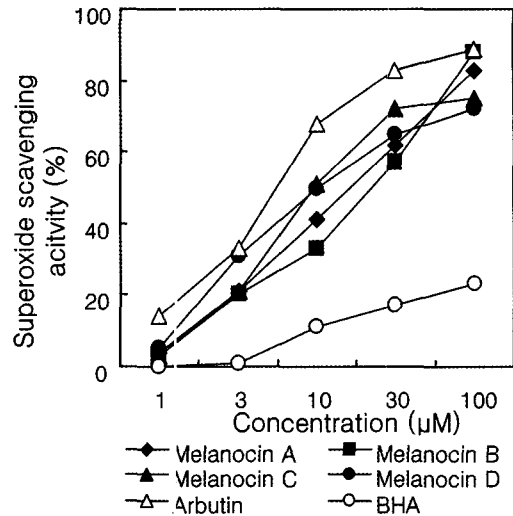


Figure 3. Antiphotoxidative activity of melanocins A ~ D, arbutin, and BHA.

Table 1. Inhibitory Effects of Melanocins A ~ D and Positive Controls Against Mushroom Tyrosinase and Melanin Formation in *Streptomyces bikiniensis* and B16 Melanoma Cells

Compound	<i>S. bikiniensis</i>	B16	Mushroom
	NRRL-1049 <sup>a)</sup>	melanoma	tyrosinase
	Inhibition zone (mm)	MIC <sup>b)</sup> ( $\mu M$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu M$ )
Melanocin A	51	0.9	0.009
Melanocin B	0	ND <sup>c)</sup>	> 1 mM
Melanocin C	0	ND	> 1 mM
Melanocin D	0	ND	> 1 mM
Kojic acid	0	106.0	31.0
Hydroquinone	25	ND	9.1
Arbutin	ND	36.8	38.0
4-Hydroxyanisole	30	ND	120.0

<sup>a)</sup> compound 30  $\mu g$ /paper disc <sup>b)</sup> Minimum Inhibitory Concentration <sup>c)</sup> Not Determined

3.1.3. Melanocin A-D 화합물의 Tyrosinase 저해활성

Melanocin A 화합물의 mushroom tyrosinase 저해활성은  $IC_{50}$  0.009  $\mu M$ 로 kojic acid 31  $\mu M$ , arbutin 38  $\mu M$ 에 비하여 약 3000배 이상 강한 활성을 나타냈다. 그밖에도 *Streptomyces bikiniensis* 멜라닌 저해활성에도 효과가 있었으며 B16 멜라노마 세포의 멜라닌 생합성 저해활성도 0.9  $\mu M$ 로 kojic acid 106  $\mu M$ , arbutin 36.8  $\mu M$ 에 비하여 약 30 ~ 100배 강한 활성을 나타냈다. 그러나 melanocin B ~ D 화합물의 tyrosinase 저해활성은 매우 미미하였다(Table 1).

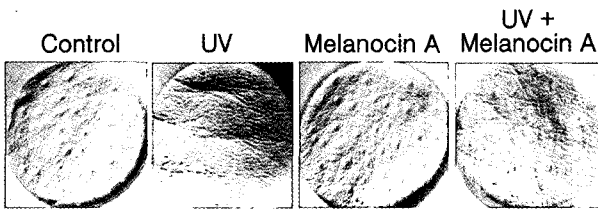


Figure 4. Anti-wrinkle effect of melanocin A.

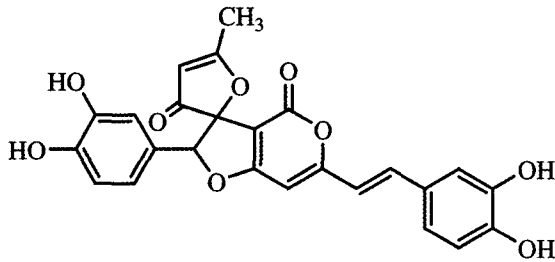


Figure 5. Chemical structures of inoscavin A.

3.1.4. Melanocin A 화합물의 주름개선 효과

한편, melanocin A 화합물은 섬유아 배양세포에서 자외선에 의해 유도되는 MMP 단백질 및 mRNA의 생성을 강력하게 저해하였다. 따라서 melanocin A 화합물의 주름개선 효과를 확인하기 위하여 SKh-1 hairless mice를 사용하여 자외선 조사에 의해 생성되는 주름의 개선효과를 조사한 결과 Figure 4와 같이 주름형성이 현저하게 개선되는 것을 확인할 수 있었다[14]. 그러나 MTT법에 의한 세포독성은 나타나지 않았다. Melanocins 계열의 신소재는 강력한 항산화 신소재 및 주름개선용 기능성 화장품으로 유용하게 활용될 것이 예상된다.

3.2. 신규 노화조절 항산화 소재, Inoscavin A[15]

3.2.1. Inoscavin 화합물의 추출정제

국내 자생버섯의 일종인 기와층버섯(*Inonotus xeranticus*) 자실체 추출물로부터 강력한 항산화 활성물질이 있음을 확인하고 추출정제를 실시하였다. 즉, 건조중량 500 g의 기와층버섯 자실체를 분쇄한 다음 80% MeOH로 5일간 3회 추출하였다. 추출액은 hexane, chloroform, ethylacetate 용매로 순차적으로 추출하였다. 활성분획인 ethylacetate 추출분획으로부터 silica gel, LH-20 column chromatography 및 ODS-MPLC, ODS-TLC 및 HPLC 등을 통하여 순수한 신규 화합물 10 mg을 얻었으며, 본 화합물을 inoscavin A로 명명하였다.

3.2.2. Inoscavin 화합물의 물리화학적 특성 및 화학구조

Inoscavin A 화합물은 황색 분말로 분리되었으며 FAB-mass 측정 결과, m/z 463(M + H)<sup>+</sup>과 m/z 485(M + Na)<sup>+</sup>

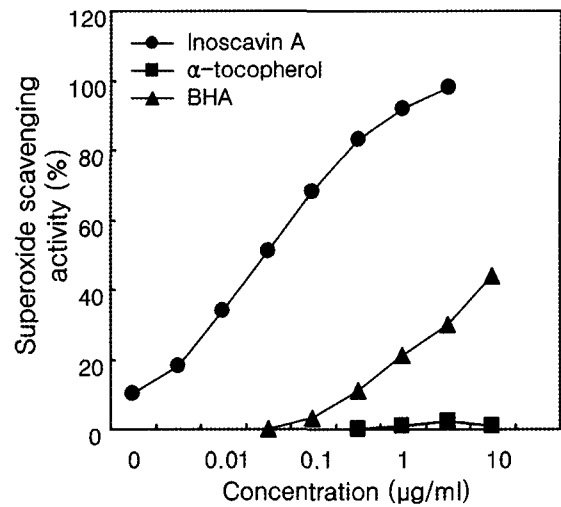


Figure 6. Superoxide scavenging activity of inoscavin A, BHA, and α-tocopherol.

에서 peak를 나타내 본 화합물의 분자량이 462임을 확인하였다. 또한 분자식을 결정하기 위하여 HRFAB-mass를 측정한 결과, 실측치 463.1045(M+H)<sup>+</sup>, 계산치 563.1029 (M + H)<sup>+</sup>를 나타내었으며 이상의 결과들로부터 분자식을 C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>로 결정하였다.

또한 inoscavin A의 화학구조를 결정하기 위하여 각종 NMR 기기분석을 실시한 결과 최종적으로 Figure 5와 같이 spiro형의 매우 특이한 형태의 구조를 가지고 있는 히스피딘계 신규 화합물임을 확인하였다.

3.2.3. Inoscavin A 화합물의 항산화 활성

Inoscavin 화합물의 superoxide radical 소거활성을 측정한 결과, EC<sub>50</sub> 값이 0.03 µg/mL의 매우 강한 활성을 나타냈다(Figure 6). 그에 비해 BHA는 7.8 µg/mL의 활성을 나타냈으며 α-tocopherol은 superoxide radical 활성이 거의 없었다. Rat microsomes을 이용한 지질과산화 저해 활성을 측정한 결과 Figure 7과 같이 inoscavin A 화합물은 0.3 µg/mL로 비타민 E 1.5 µg/mL, BHA 4.9 µg/mL 보다 5배 내지 16배 이상의 높은 활성을 나타냈다. 이상의 결과로부터 inoscavin A 화합물도 유용한 노화 예방 화장품 소재로 활용될 것으로 판단되었다.

3.3. 신규 활성산소 소거물질, Benzastatins[16-20]

3.3.1. Benzastatins 화합물의 추출정제

*Streptomyces nitrosporeus* 균주 배양액을 동량의 EtOAc로 3회 추출하고 감압농축한 후 silica gel column chromatography 및 HPLC 등을 통하여 7개의 순수한 신규 화합물을 얻어 benzastatin A-G라고 명명하였다.

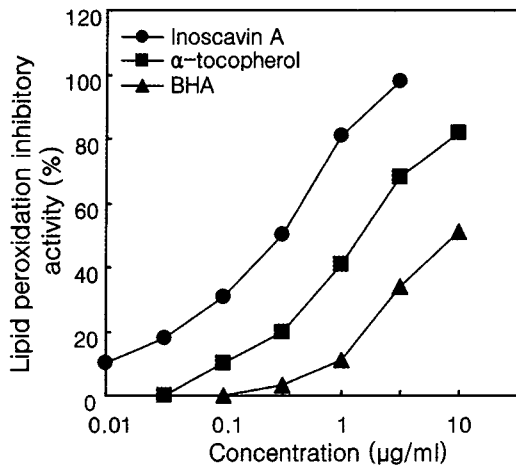


Figure 7. Rat liver microsomal lipid peroxidation inhibitory activity of inoscavin A, BHA, and α-tocopherol.

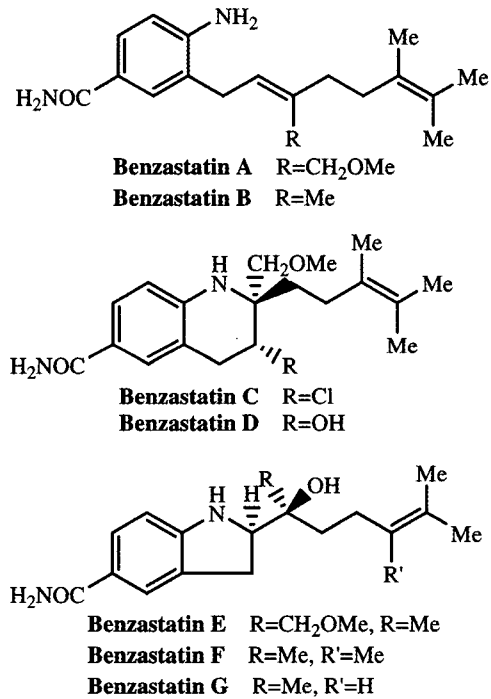


Figure 8. Chemical structures of benzastatins A ~ G.

3.3.2. Benzastatins 화합물의 물리화학적 특성 및 화학구조 규명

Benzastatin A-G 화합물의 용해도를 조사한 결과 benzastatin A-C는 chloroform, ethyl acetate, acetone, methanol 등에는 잘 용해되나 물에는 불용이었다. 또한 benzastatin D-G는 methanol, dimethylsulfoxide, acetone 등에는 잘 녹고 chloroform에는 약간 녹으나 물에는 녹지 않았다. 각 화합물의 분자구조를 확인하기 위하여 HRFAB

Table 2. Rat Liver Microsomal Lipid Peroxidation Inhibitory Activity and Cytotoxicity of Benzastatins A ~ G and Related Compounds

Compound	Rat liver microsomes	
	EC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
Benzastatin A	37.9	> 100
Benzastatin B	16.9	84.3
Benzastatin C	3.3	38.1
Benzastatin D	4.2	> 200
Benzastatin E	4.7	> 200
Benzastatin F	5.3	> 200
Benzastatin G	15.7	> 200
Vitamin E	3.9	> 200
Idebenone	4.1	4.9
4-aminobenzamide	> 50	> 100
Indole acetic acid	> 50	> 100

-mass 분석결과 분자식은 각각 C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O, C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl, C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>이었다. 각 화합물의 화학구조를 규명하기 위하여 NMR 기기분석 결과, benzastatin A, B 화합물은 amino-benzamide계, benzastatin C, D 화합물은 tetrahydroquinoline alkaloid계, benzastatin E-G 화합물은 indoline alkaloid계 화합물로 결정하였다(Figure 8).

3.3.3. Benzastatins 화합물의 지질과산화 저해활성

Benzastatins 화합물의 rat microsome을 이용한 지질과산화 저해활성을 측정된 결과, Table 2와 같이 EC<sub>50</sub> 3 ~ 30 µM에서 활성을 나타냈으며 그 중에서도 benzastatin C, D, E, F 화합물이 각각 3.2, 4.2, 4.7, 5.3으로 강한 활성을 나타냈다. 반면 세포독성은 IC<sub>50</sub> 200 µM 이상에서도 안전한 화합물로 평가되어 유력한 항 노화 화합물로 활용될 가능성이 매우 높은 화합물로 예상되었다.

특히 tetrahydroquinolin계의 benzastatin C 및 indoline계의 benzastatin E 화합물은 rat microsome을 이용한 지질과산화 저해활성 및 free radical 소거활성이 EC<sub>50</sub> 1 ~ 2 µM 정도로 강력한 활성을 나타내는 반면, 세포독성은 IC<sub>50</sub> 200 µM 이상에서도 안전한 화합물로 평가되어 유력한 항 노화 화합물로 활용될 가능성이 있는 화합물로 예상되었다(Table 2).

3.4. 신규 미백화장품 소재, Terrein(21-23)

3.4.1. Terrein 화합물의 추출정제, 물성 및 화학구조 결정

미생물로부터 미백 활성 물질을 탐색한 결과, 토양곰팡

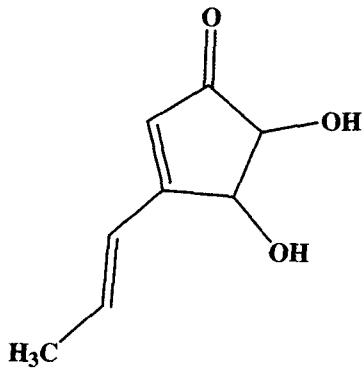


Figure 9. Chemical structure of terrein.

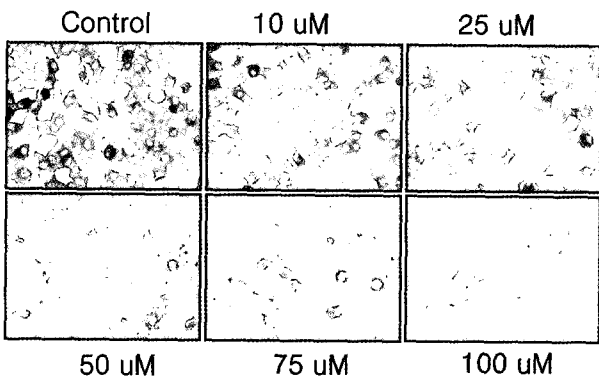


Figure 10. Effects of terrein on Mel-Ab cell viability. Cell viabilities were determined by crystal violet assay.

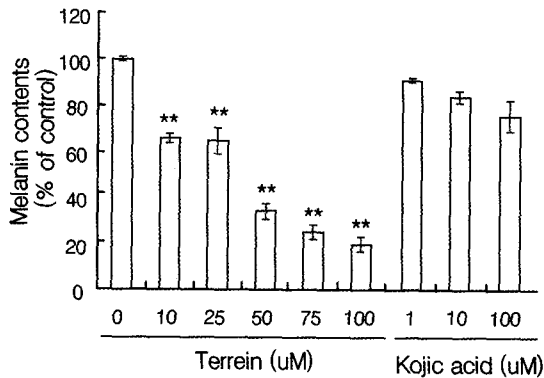


Figure 11. Effects of terrein on tyrosinase activity in Mel-Ab cells. Mel-Ab cells were cultured for 4 days in medium containing 10 ~ 100  $\mu$ M terrein.

이의 일종인 *Penicillium* sp. 균주 배양액으로부터 melanocyte 세포주인 Mel-Ab 세포에 대하여 강력한 멜라닌 생합성 저해활성을 나타냄을 발견하였다. 따라서 본 균주의 배양액을 EtOAc 추출 후, Sephadex LH-20 및 HPLC 등에 의해 백색 분말의 순수하게 정제된 화합물을 얻었다. 본 화합물의 물리화학적 특성 조사 및 Mass 등 기기

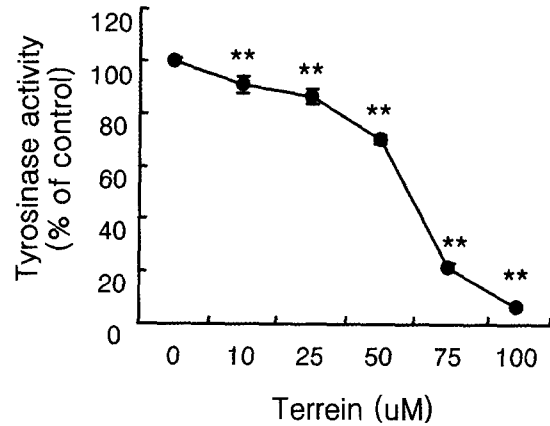


Figure 12. Effects of terrein on tyrosinase activity in Mel-Ab cells. Mel-Ab cells were cultured for 4 days in medium containing 10 ~ 100  $\mu$ M terrein.

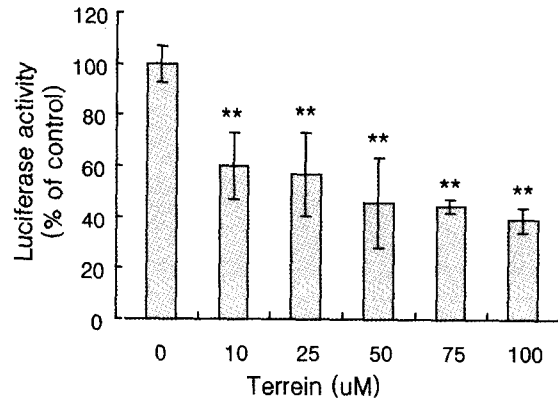
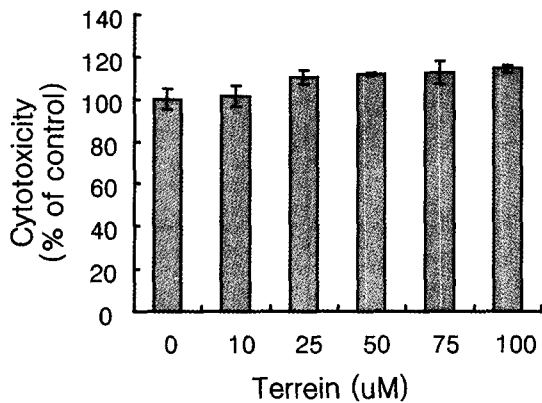


Figure 13. Effects of terrein on melanogenesis in Mel-Ab cells. Mel-Ab cells were cultured for 4 days in medium containing 10 ~ 100  $\mu$ M terrein. Pictures were taken under a phase contrast microscope.

분석을 통하여 분자식  $C_8H_{10}O_3$ , 분자량 154 KDa의 terrein으로 규명하였다. Terrein의 화학구조를 규명하기 위하여 NMR기기분석을 실시한 결과, 최종적으로 4,5-dihydroxy-3-propenyl-2-cyclopentene-1-one의 구조를 갖는 cyclopentenone계 화합물로 결정하였다(Figure 9).

#### 3.4.2. Terrein 화합물의 미백활성 및 작용기작

Melanocyte 유래 세포주인 Mel-Ab 세포를 이용하여 미백활성을 조사한 결과, 대표적인 미백활성물질인 kojic acid 보다 약 10배 이상의 높은 활성을 나타냈으며(Figure 10 ~ 13), *in vivo* 예비 임상실험에서도 매우 우수한 미백활성을 나타내 향후 좋은 미백소재로 활용될 수 있음을 확인하였다. 한편, 세포독성을 조사한 결과에서도 terrein은 100  $\mu$ M 농도까지 처리하여도 세포독성은 나타나지



**Figure 14.** Terrein down-regulates MITF promoter activity. The luciferase reporter plasmid pMITF was transfected into B16 melanoma cells. Terrein was then applied for 48 h, and luciferase activity was measured.

않았으며(Figure 14), mouse를 이용한 독성실험에서도 500 mg/kg 농도에서 안전한 화합물로 확인되었다. 매우 흥미로운 사실은 이와 같이 강력한 미백활성을 나타냄에도 불구하고 cell-free 조건에서의 tyrosinase 효소 저해활성은 200  $\mu$ M 농도까지 처리하여도 전혀 활성을 나타내지 않는다는 점이다.

Terrein 화합물의 미백작용기작을 규명한 결과, 멜라닌 색소세포내에서 p-ERK 활성을 촉진함과 동시에 MITF (microphthalmia-associated transcription factor)의 발현을 억제함으로써 미백효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 terrein은 기존의 미백활성 물질과는 작용점이 상이한 새로운 기전의 멜라닌 생합성 저해물질임을 확인하였다. 본 terrein 화합물은 향후 매우 유용한 미백 화장품 소재로 활용될 것이 예상된다.

#### 4. 결 론

약용식물, 미생물, 버섯류 등 천연물이 생산하는 기능성 화장품 신소재의 탐색 및 개발 연구를 수행한 결과, 곰팡이의 일종인 *Eupenicillium shearii* 균주가 생산하는 항산화 활성물질인 melanocin A-D 화합물은 노화조절 및 주름개선 신소재로 활용될 것이며, 자생버섯의 일종인 기와층버섯(*Innonotus xeranticus*) 자실체 추출물로부터 얻어진 inoscavin A 화합물은 superoxide radical 소거활성이 매우 강하여 노화조절 화장품 신소재로 활용될 것이다. 또한 방선균의 일종인 *Streptomyces nitrosporeus* 균주 배양액으로부터 얻어진 benzastatin A ~ G 화합물은 지질과산화 저해활성이 강하여 노화예방 기능성 화장품 소재로 활용될 것이다. 한편, 국내 토양 곰팡이의 일종인 *Penicillium* sp. 배양액으로부터 얻어진 terrein은 뛰어난

미백활성을 나타냄과 동시에 작용기작도 MITF 단백질을 조절함으로써 미백효과를 나타내는 새로운 기전의 미백활성 물질로 향후의 활용이 기대된다.

#### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다(과제고유번호 : A050432).

#### 참 고 문 헌

1. B. S. Yun, I. K. Lee, Y. R. Cho, and I. D. Yoo, New tricyclic sesquiterpenes from *Stereum hirsutum*, *J. Natural Products*, **65**, 786 (2002).
2. B. S. Yun, Y. R. Cho, I. K. Lee, S. M. Cho, T. H. Lee, and I. D. Yoo, Sterins A and B, New antioxidative compounds from *Stereum hirsutum*, *J. Antibiotics*, **55**, 208 (2002).
3. J. P. Kim, I. K. Lee, B. S. Yun, S. H. Chung, G. S. Shim, H. Koshini, and I. D. Yoo, Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globulus*, *Phytochemistry*, **57**, 587 (2001)
4. N. H. Yoo, J. P. Kim, I. J. Ryoo, E. S. Yoon, I. D. Yoo, and B. S. Yun, Hirsutenols D, E and F, new sesquiterpenes from the culture broth of *Stereum hirsutum*, *J. Antibiotics*, in press (2005).
5. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm-Wiss, u-Technol.*, **28**, 25 (1995).
6. C. Beauchamp and I. Fridovich, Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels *Anal. Biochem.*, **44**, 266 (1971).
7. G. H. Hogeboom, General methods for isolation of liver cell components: Fraction of cell components of animal tissues, *Meth Enzymol.*, **1**, 16 (1965).
8. H. N. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979).
9. Y. Ishihara, M. Oka, M. Tsumakawa, K. Yomita, M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaki, M. Komish, and T. Oki, Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor, *J. Antibiotics*, **44**, 25 (1991).
10. K. Tomita, N. Oda, M. Kamel, T. Miyaki, and T. Oki, A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*, *J. Antibiotics*, **12**, 1601 (1990).



11. K. Komiyama, S. Takamatsu, Y. Takahashi, M. Shinose, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Iwai, S. Omura, and G. Imokawa, New inhibitors of melanogenesis, OH-3984 K1 and K2. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological characteristics, *J. Antibiotics*, **46**, 1520 (1993).
12. J.-P. Kim, B.-K. Kim, B.-S. Yun, I.-J. Ryoo, C. H. Lee, W.-G. Kim, S.-K. Lee, and I.-D. Yoo, Melanocins A-D, New melanin synthesis inhibitors produced by *Eupenicillium shearii*, I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties, *J. Antibiotics*, **56**(12), 993 (2003).
13. J.-P. Kim, B.-K. Kim, B.-S. Yun, I.-J. Ryoo, W.-G. Kim, and I.-D. Yoo, Melanocins A ~ D, new melanin synthesis inhibitors produced by *Eupenicillium shearii*, II. Physico-chemical properties and structural elucidation, *J. Antibiotics*, **56**(12), 1000 (2003).
14. C. H. Park, M. J. Lee, J. P. Kim, I. D. Yoo, and J. H. Chung, Prevention of ultraviolet-induced premature skin aging by a novel antioxidant, melanocin A, in hairless mice, *Molecular and Cellular Pharmacology*, in press (2005).
15. J. P. Kim, B. S. Yun, Y. K. Shim, and I. D. Yoo, Inoscavin A, a new free radical scavenger from the mushroom *Inonotus xeranticus*, *Tetrahedron Letters*, **40**, 6643 (1999).
16. W. G. Kim, J. P. Kim, C. J. Kim, K. H. Lee, and I. D. Yoo, Benzastatin A, B, C and D: new free radical scavengers from *Streptomyces nitrosporeus* 30643, (I) Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities, *J. Antibiotics*, **49**, 20 (1996).
17. W. G. Kim, J. P. Kim, and I. D. Yoo, Benzastatin A, B, C and D: new free radical scavengers from *Streptomyces nitrosporeus* 30643, (II) Structure determination, *J. Antibiotics*, **49**(1), 26 (1996).
18. W. G. Kim, J. P. Kim, H. Koshino, K. Shin-Ya, H. Seto, and I. D. Yoo, Benzastatin E, F, and G: new indoline alkaloids with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces nitrosporeus*, *Tetrahedron*, **53** (12), 4309 (1997).
19. W. G. Kim, I. J. Ryoo, J. S. Park, and I. D. Yoo, Benzastatins H and I, new benzastatin derivatives with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces nitrosporeus*, *J. Antibiotics*, **54**(6), 513 (2001).
20. W. G. Kim and I. D. Yoo, Benzastatin J, a new demethylated derivative of benzastatin B produced by controlled fermentation of *Streptomyces nitrosporeus*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 838 (2002).
21. S. H. Park, D. S. Kim, W. G. Kim, I. J. Ryoo, D. H. Lee, C. H. Hur, S. W. Youn, I. D. Yoo, and K. C. Park, Terrein, A New melanogenesis inhibitor and its mechanism, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 2878 (2004).
22. W. G. Kim, I. J. Ryoo, D. S. Kim, K. C. Park, and I. D. Yoo, Isolation of a melanin biosynthesis inhibitor from *Penicillium* sp.20135, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **15**(4), 891 (2005).
23. S. K. Lee, E. S. Kim, W. G. Kim, I. J. Ryoo, H. K. Lee, J. Y. Kim, S. H. Jung, and I. D. Yoo, Synthesis and melanin biosynthesis inhibitory activity of ( $\pm$ )terrein produced by *penicillium* sp. 2013, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**(2), 471 (2005).