

Biochemical Properties of a Whitening Bioactive Agent Derived from *Trichoderma viridescens* SW-1

Dong Woo Kang¹, Pan Gil Kim², Sam Woong Kim³, Kyu Ho Bang¹, Chul Ho Kim¹, Sang Won Lee¹ and Sang Wan Gal^{1,3*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

²Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 52655, Korea

³Gene Analysis Center, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

Received May 11, 2021 / Revised May 20, 2021 / Accepted May 20, 2021

In this study, in order to isolate excellent whitening agents from fungal cultural broth, various fungi were collected from wild areas in South Korea and then screened for tyrosinase inhibition activity, as tyrosinase is a precursor for the biosynthesis of melanin in regulating skin color. A fungus strain that inhibits tyrosinase activity has been identified and confirmed as *Trichoderma viridescens* (later renamed *T. viridescens* SW-1) via ITS sequencing. In *T. viridescens* SW-1, tyrosinase inhibitory activity was strongest on day three of culture. A 5% culture broth showed a tyrosinase inhibitory activity greater than 90% and exhibited high thermostability on day three. At 10% culture broth, the accumulations of intra- and extracellular melanin were inhibited above 27.1% and 7.5%, respectively. In summary, the physical and functional properties of the tyrosinase inhibitory substances of *T. viridescens* SW-1 included high levels of inhibition of melanin synthesis and antioxidative activity as well as thermostability. Therefore, we suggest that the whitening substance identified from the cultural broth of *T. viridescens* SW-1 has potential for application as a functional cosmetic ingredient.

Key words : Cosmetics, metabolite, *Trichoderma viridescens*, tyrosinase inhibitor, whitening bioactive agent

서 론

멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜에서 생성되며, 피부, 머리 카락 등에 존재하며 갈색 또는 흑색을 띤다[6, 12, 13]. 피부가 태양빛을 받으면 자외선에 의해 손상될 수 있으며 인체에서는 방어기작으로 멜라닌 세포에서 멜라닌을 합성하여 피부 표피로 이동 시켜 보호하는 기능을 수행한다. 그러나 과도한 멜라닌의 생성은 피부 색소를 침착 시켜 피부색을 어둡게 만들게 된다[1, 10]. 멜라닌이 생성되기 위해서는 자외선 뿐만 아니라 tyrosine 산화 효소인 tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP1), TRP2 그리고 멜라닌 생성 촉진 인자인 melanocyte-stimulating hormone (MSH), 멜라닌 생성 조절 인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 등 외인성 및 내인성 인자들에 의해 조절된다[1, 20, 21, 23]. 멜라닌의 합성 과정은 비 필수 아미노산인 tyrosine으로부터 시작되며 tyrosine에 산화 효소인 tyrosinase에 의해 개시되며, 일련의

과정을 걸쳐 최종적으로 멜라닌이 합성된다[5, 14, 16, 18, 19].

미백이란 피부의 멜라닌 농도를 줄임으로 피부를 밝게 하거나 균일한 피부색을 제공하기 위해 기능성 물질을 사용하는 것을 말한다. 외모 및 피부에 대한 사람들의 관심이 증대됨에 따라 화합물 또는 천연물질 유래 등 미백 관련 기능성 화장품 등이 각광받고 있다. 미백 관련 기능성을 가지는 원료의 작용 기전은 크게 세 가지로 나뉜다. 첫째, tyrosine의 초기 합성에 작용하는 효소인 tyrosinase를 저해하여 미백효과를 나타내는 기전이며 대표적인 물질로 코직산, 알부틴, 닥나무 추출물, 유용성 감초 추출물, 알파-비사볼롤 등이 알려져 있다[1, 4]. 둘째, tyrosinase의 기질이 되는 tyrosine의 산화를 억제하여 나타나며 에칠 아스코빌 에텔, 아스코빌 글루코사이드, 아스코빌테트라소필메이트 등의 비타민C 유도체가 대표적인 물질이다[11]. 마지막으로 melanin 합성 후 단계에서 멜라닌 세포에서 생성된 멜라닌이 표피로 이동하는 단계를 억제하며 대표적인 물질로 나이아신 아마이드가 알려져 있다[15]. 이외에도 세포내에서 멜라닌 합성 관련 인자인 tyrosinase, TRP1, TRP2, MITF 유전자의 전사 및 발현을 억제함으로써 멜라닌 합성을 억제하는 기능을 하는 물질들도 연구되고 있다[2]. 미백 활성을 나타내는 물질들이 발견되어 사용되고 있지만, 실제 인체 피부에서 미백효과를 나타내기에는 여러 애로사항이 존재한다. 먼저 tyrosinase 활성 부위의 구리 이온을 킬레이트화 시켜 tyrosine과의 합성 과정을 저해하는 코직산 같은 경우 화장품

*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.

원료로서 사용되지만, 인체 독성 관련하여 문제가 제기되어 왔으며 현재는 일부 국가에 한해서만 사용이 용인되고 있다 [17]. Hydroquinone은 강한 미백 능력을 가지는 물질이지만, 전에 설명한 미백 메커니즘과 다르게 멜라닌 생성 세포 사멸을 통해 미백 기능을 나타낸다[9]. Hydroquinone은 세포 살해 기능에 의해 미백효과를 나타내지만, 강한 미백 효과에 의해 사용 시 백반증을 일으킬 수 있을 위험성이 있다. 따라서 화장품이 아닌 약품으로서 사용되며 일정 농도 이상 사용 시에는 의사 처방에 의해 사용된다[24]. 산업적으로 사용되는 많은 미백물질들의 경우 피부 독성 및 인체알레르기 반응 등의 부작용이 보고됨에 따라 독성이 없는 천연물질로부터의 화장품 원료 개발의 필요성이 대두되고 있다[3, 8, 25].

본 연구에서는 천연물 유래 미백기능성 화장품 원료를 발굴하기 위해 미생물 중 진균류로부터 피부 색조를 조절할 수 있는 tyrosinase inhibitor 활성 균주를 탐색하였다. 그 결과 수집된 진균으로부터 미백 기능성 특성이 우수하게 보유하는 균주인 *Trichoderma viridescens* SW1을 확보하였고, 이 균주로부터 미백기능성물질의 생화학적 특성을 분석하였다. 추가적으로 미백기능성물질의 안전성 및 생체 효능을 확인하여 기능성 화장품으로서 가치를 확인할 것이다.

재료 및 방법

실험 재료 및 기기

세포 실험에 사용된 세포주 B16F0 mouse melanoma cell은 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양 받아 사용하였다[7]. 세포 배양시 필요한 소 태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS) 및 배지(DMEM)는 Lonza Walkersville, Inc (Maryland, USA)와 Gibco ThermoFisher Scientific Korea (Korea)에서 구입하여 사용하였다. Tyrosinase 효소 저해 확인 실험을 위한 L-tyrosine 및 mushroom tyrosinase는 (Sigma-Aldrich, USA)에서 구입하여 사용하였다.

시료 채취 및 자생 곰팡이 순수 분리

봉화군 백두대간 국립공원에서 채취한 나무껍질 및 버섯 등으로부터 28개의 시료를 채취하였다. 채취한 시료 각각을 distilled water로 세척 후 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종한 후 25°C에서 2~7일간 배양하였다. 각 시료에서 생성된 균사 일부를 자른 후 새로운 PDA 배지에 접종 후 배양하고 생성된 균사 일부를 잘라 1% triton X-100이 첨가된 PDB (potato dextrose broth) 액체 배지에 접종하여 25°C, 150 rpm으로 48시간 진탕 배양 하였다. Triton X-100에 의하여 구형으로 응집된 균사를 PDA 배지에 올려 접종한 후 배양을 통해 순수 분리 하였다.

Tyrosinase 효소 저해 활성에 따른 screening

순수 분리된 곰팡이를 액체 배양 하여 tyrosinase 억제 시험을 통해 1차 screening을 진행하였다. 96 well microtiter plate에 배양 상등액을 20 ml 분주 후 mushroom tyrosinase (2000 unit, Sigma-Aldrich, USA) 5 ml와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 20 ml 혼합 후 10 mM L-tyrosine 20 ml를 첨가한 후에 신선한 배양 배지로 200 ml가 되도록 조절하여 제조하였다. 그 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 Microtiter reader (LTEK Co, Korea)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음 계산식을 이용하여 tyrosinase 활성 저해율을 구하였다.

$$\text{* Tyrosinase 활성 저해율 (IC ratio \%)} = \frac{(100 - b - b')}{a - a'} \times 100$$

a: 공 시료액의 반응 후 흡광도

b: 시료액의 반응 후 흡광도

a'와 b': Tyrosinase 대신 완충액으로 대체하여 측정된 흡광도

항산화 활성에 따른 screening

Tyrosinase 저해활성으로 스크리닝된 균주들에 대하여 항산화능 분석을 통해 최종 균주를 선발하였다. 항산화 활성 측정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용한 전자공여능 측정법에 따라 진행하였으며 각 시료의 DPPH에 대한 수소 공여 효과로 측정 하였다. 각 배양액을 96 well microtiter plate에 상등액 농도를 50%, 100% 농도별로 제조하여 0.25 mM DPPH 용액 100 ml를 혼합하여 실온에서 30분 반응시킨 다음 microtiter reader (Multiscan GO, Thermo Scientific Co. Ltd., Rochester, NY, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화활성은 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{항산화 효능(\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

a: 시료 무첨가군의 흡광도

b: 시료액 첨가군의 흡광도

선발된 균주 동정

Tyrosinase 효소 저해 활성 및 항산화 효과가 가장 뛰어난 균주를 최종 선발하였으며, 선발된 균주는 (주)마크로젠(한국)에 의뢰하여 ITS (internal transcribed spacer) region sequencing을 통하여 균주 동정을 실시하였다.

T. viridescens SW-1 배양 기간별 tyrosinase 저해 효과

T. viridescens SW-1의 배양 기간별 tyrosinase 활성 저해율을 측정하기 위해 1일부터 6일까지 하루 단위로 배양액을 채취하였으며, 96 well plate에 *T. viridescens*의 1일차부터 6일차까지 채취한 배양 상등액을 2 ml 넣은 후 mushroom ty-

rosinase (2,000 unit, Sigma-Aldrich, USA) 5 ml와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 20 ml 혼합 후 10 mM L-tyrosine 20 ml를 넣고 배양 배지로 200 ml가 되게 조절하여 제조하였다. 그 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 microtiter reader (LTEK Co, Korea)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며 tyrosinase 저해율 계산식을 이용하여 tyrosinase 활성 저해율을 구하였다.

T. viridescens SW-1 농도별 tyrosinase 저해 효과

T. viridescens SW-1의 농도별 tyrosinase 활성 저해율을 측정하기 위하여 96 well plate에 T. viridescens SW-1배양액 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10% 농도 별로 첨가한 후 mushroom tyrosinase (2,000 unit, Sigma-Aldrich, USA) 5 ml와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 20 ml 혼합 후 10 mM L-tyrosine 20 ml를 넣고 배양 배지로 200 ml가 되게 조절하여 제조하였다. 그 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 microtiter reader (LTEK Co, Korea)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며 tyrosinase 저해율 계산식을 이용하여 tyrosinase 활성 억제율을 구하였다.

T. viridescens SW-1 배양 상등액의 열안정성 분석

T. viridescens SW-1배양 상등액의 tyrosinase 저해 성분의 열 안정성을 조사하기 위해 배양 상등액을 100°C, 80°C, 60°C에서 1시간 반응 시킨 후 96 well plate에 각 온도 처리한 T. viridescens SW-1배양 상등액을 20 ml 넣은 후 mushroom tyrosinase (2000 unit, Sigma-Aldrich, USA) 5 ml와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 20 ml 혼합 후 10 mM L-tyrosine 20 ml를 넣고 배양 배지로 200 ml가 되게 조절하여 제조하였다. 그 후 37°C에서 60분간 반응시킨 후 Microtiter plate Spectrophotometer (LTEK Co, Korea)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며 tyrosinase 저해율 계산식을 이용하여 tyrosinase 활성 저해율을 구하였다.

세포 배양 및 세포독성

B16F0 mouse melanoma cell은 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza, Valais, Switzerland) medium을 함유한 DMEM (21063-029, phenol red, GIBCO, Grand Island, NY) 배지를 사용하였다. 세포 주는 습도 95%, 5% CO₂, 37°C로 조절된 배양기에서 배양 하였으며, 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 항생물질 [Penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l, Gibco, CA, USA)]을 사용하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA (PBS-EDTA)로 세척한 후 0.25% Trypsin EDTA를 1 ml 처리하여 dish 바닥에 부착되어 있는 세포를 부유시켜 계대 배양하였다. 배지는 48 시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

세포주의 생존율 측정은 MTS (CellTiter 96® AQueous

One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA) 시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 96 well plate에 B16F0 mouse melanoma cell를 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주 후 습도 95%, 5% CO₂, 37°C로 조절된 배양기에서 24시간 안정화 하였다. 이 후 시료를 농도 별로 처리하여 동일 조건으로 배양기에서 72시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 MTS 시약 1 ml에 DMEM 9 ml을 넣어 희석한 후 시료 처리 완료된 well 당 100 μl씩 처리하였다. 37°C에서 60분간 반응 후 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

세포내 및 외 멜라닌 생성 억제

세포내 멜라닌 생성 억제는 6-well plate에 well당 1×10⁵ cells/well로 B16F0 mouse melanoma cell를 이식하고 세포 배양조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 100 nM α-MSH, 검액을 함유한 새로운 배지로 교환하고, 72시간 동안 배양하였다. 배지는 phenol red가 포함되지 않은 것을 사용하여 흡광도 측정에 영향을 미치지 않도록 하였다. 배지는 제거하고, 부착된 세포는 1 N 수산화나트륨용액 120 ml 넣고 60°C 항온조에서 1시간 용해하고 2,000 rpm, 4°C, 10분 동안 원심분리 하였다. 멜라닌 함량은 멜라닌 표준품으로 표준 검량선을 작성하여 멜라닌 함량을 구하였다. 멜라닌 양은 배양 세포의 단백질함량에 대한 멜라닌 양으로 환산하고, 시료를 녹인 용매를 처리한 대조군의 결과와 비교하였다.

세포외 멜라닌 생성 억제는 6-well plate에 well당 1×10⁵ (1×10⁵ cells/1.2ml/well)으로 B16F0 mouse melanoma cell를 이식하고 세포배양조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 100 nM α-MSH, 검액 및 새로운 배지를 넣고 72시간 배양하였다. 배지는 phenol red가 포함되지 않은 것을 사용하여 흡광도 측정에 영향을 미치지 않도록 하였다. 72시간 후 세포의 배양 배지는 96 well에 100 μl 취하여(3 반복) 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 함량은 세포내 멜라닌 함량과 동일한 방법으로 계산하였다.

통계분석

반복 실험을 통하여 얻은 결과는 SAS program (V. 9.2, Cary, NC, USA)를 사용하여 분산분석 하였으며, 시료에 대한 결과는 평균±표준편차에 의해 산정되었다. 각 시료의 분석결과에 대한 유의성 검정은 분산분석을 한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test (DMRT)를 실시하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 효소 저해 활성에 따른 screening

봉화군 국립공원 등에서 채취한 버섯에서 자생하는 곰팡이를 순수 분리 한 후 각 순수 분리된 곰팡이 시료 28가지에 대하여 tyrosinase 저해 활성 측정을 통한 1차 screening을 진행한 결과, GF-5, 8, 17, 18, 20, 25 등에서 비교적 높은 tyrosinase 억제 효과가 나타났다(Fig. 1A). 이 중에서 GF-8, GF-17, GF-18, GF-25 등의 4개 시료로부터 유래된 균류가 각각 65.3, 48.9, 61.2, 57.6%의 저해율로써 다른 균주에 비교하여 높은 tyrosinase 억제 효과를 보였기 때문에 일차 선발되었다. 균류 유래 tyrosinase 억제제는 이미 버섯류에서 잘 알려져 있지만, 일반적인 균류에서는 아직 제한적으로 알려져 있다 [22, 27]. 따라서 본 연구에서 나타나는 tyrosinase 억제제는 신규한 물질일 가능성이 존재하는 것으로 추정된다.

Tyrosinase의 활성은 산화반응 유도에 의해 활성이 나타나기 때문에 항산화 효능을 보이는 물질은 tyrosinase의 활성 억제와 연관성을 보일 수 있다[11]. 따라서 tyrosinase 저해 활성이 높았던 4균류에 대해 전자공여능 측정법을 이용한 항산화 활성 분석에 따라 2차 screening을 진행한 결과 GF-8 시료에서 50과 100% 농도에서 각각 29%와 47.5%의 항산화 활성으로 다른 균주에 비교하여 상대적으로 높은 것으로 나타났다(Fig. 1B).

Tyrosinase 억제 및 항산화활성 분석 결과, 활성이 가장 우수했던 GF-8 균주를 (주)마кро젠에 의뢰하여 ITS region sequencing을 통하여 균주 동정을 실시하였다. 분석결과, *Trichoderma viridescens*와 99% 이상의 상동성을 보이는 것을 확인하였다(data not shown). 따라서 본 균주는 *Trichoderma*

viridescens SW-1으로 명명하고 이후 실험에 사용하였다.

T. viridescens SW-1 배양 기간별 tyrosinase 저해 효과

In vitro 상에서 배양 기간에 따른 tyrosinase 억제 활성을 확인하기 위해 1일차부터 6일차까지 1일 간격으로 배양액을 수거 후 L-tyrosine과 mushroom tyrosinase의 반응액에 각 기간별 *T. viridescens* SW-1 배양 상등액을 0.5%를 첨가 하여 분석을 수행하였다. *T. viridescens* SW-1 배양 상등액은 1일차부터 활성을 나타내기 시작하여 3일차에서 68%까지 저해되었으며 이후 점차 활성이 낮아지는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2A). 따라서 본 배양액의 tyrosinase의 억제물질은 *T. viridescens* SW-1 성장 상태와 연관되어 생성이 증가된 후에 균체의 사멸이 일어나는 시기에는 이 물질이 분해되거나 수식되어 활성이 없어지는 것으로 추정된다.

가장 활성이 우수한 3일차 배양 상등액에 대해 농도 의존적으로 활성이 제어되는지를 확인하기 위해 L-tyrosine과 mushroom tyrosinase의 반응액에 *T. viridescens* SW-1 배양 상등액을 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50%의 농도로 첨가하여 분석을 실시하였다. 그 결과 0.2%부터 5% 농도에서 각각 25.3, 64.9, 70.6, 84.3, 94.0%로 농도 의존적으로 비례하여 활성이 증가되는 양상을 보였다(Fig. 2B). 다른 한편으로 5% 이상을 첨가하였을 때 100%에 근접한 저해율을 확인 할 수 있었다. 따라서 *T. viridescens* SW-1 배양 상등액은 tyrosinase 활성 저해를 농도에 비례하여 저해하는 것이 제의된다.

T. viridescens SW-1 배양 상등액의 tyrosinase 저해 성분이

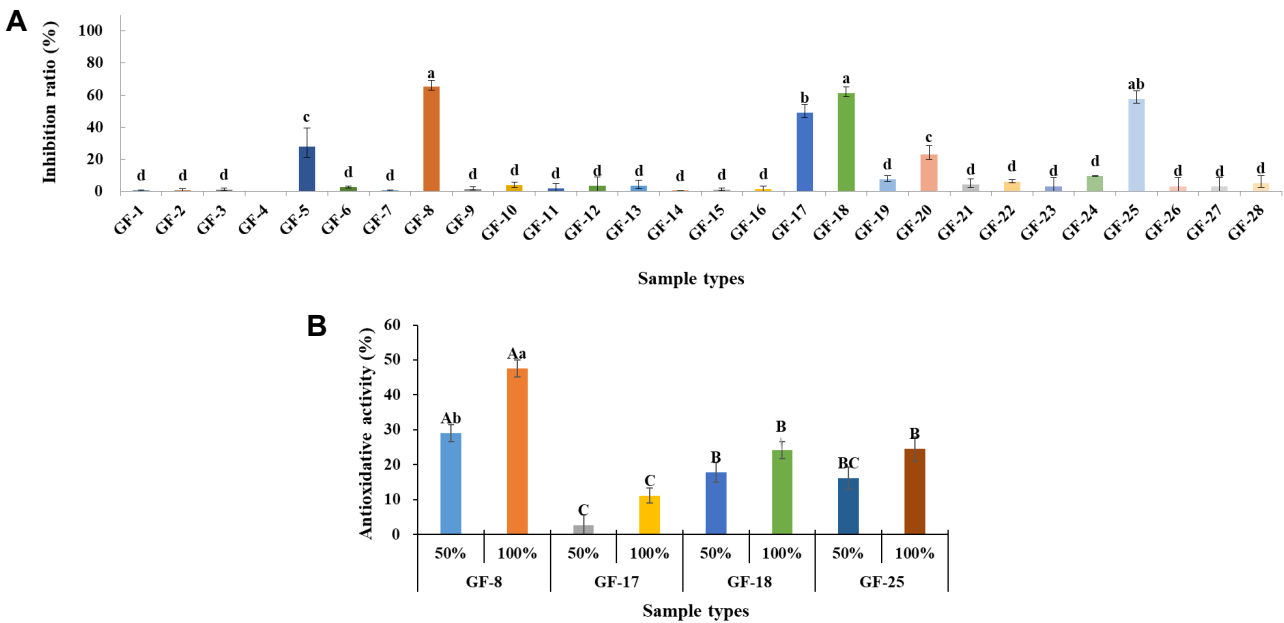


Fig. 1. Screening of substances to show tyrosinase inhibitory (A) and antioxidative activities (B). Fungi were cultured at 25°C for 48 hr, the cultural broths were centrifuged for 5 min at 8,000×g, the supernatant was filtered through a 0.22 um filter, and then the treated solution was applied for tyrosinase inhibitory and antioxidative activities. X- and Y-axes indicate sample types and inhibitory ratio or antioxidative activity, respectively.

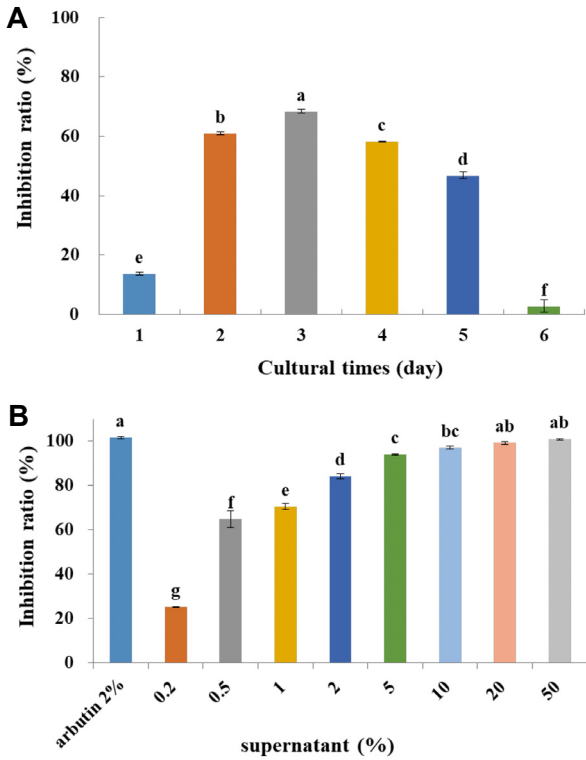


Fig. 2. Tyrosinase-inhibitory activity depending on *T. viridescens* SW-1 cultural time (A) and supernatant amount (B). *T. viridescens* SW-1 was grown for the indicated times at 25°C, centrifuged for 5 min at 8,000x g, the supernatant was filtered through a 0.22 um filter, and then the treated solution was applied for tyrosinase inhibitory activity. X- and Y-axes indicate cultural times and inhibitory ratio, respectively. **p*<0.05.

온도에 대한 안정성을 확인하기 위하여 배양 상등액을 60, 80, 100°C 등의 조건에서 1시간 동안 열처리 후, 처리군과 비 처리

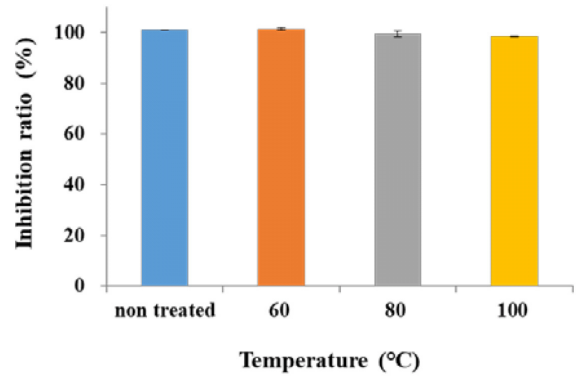


Fig. 3. Evaluation of thermostability to tyrosinase-inhibitory activity by the mycelial culture broth of *T. viridescens* SW-1. An aliquot of 3 day cultural supernatant was treated for 1 hr at 60, 80, and 100°C. The reaction mixture was heat-treated at each temperature by 5% supernatant with tyrosine, tyrosinase, and sodium phosphate. After reaction, the solution was measured at 490 nm.

군을 각각 10% 첨가 후 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 열 처리 온도 및 처리 유무와 상관없이 100% 수준의 저해활성을 나타내었다(Fig. 3). 따라서 본 배양액의 tyrosinase 억제제는 온도에 매우 안정한 것으로 제의된다.

Tyrosinase 억제제가 해양 침전물 유래 *Trichoderma viride* H1-7로부터 분리되었으며, 항생물질인 homothallin II와 동일 구조를 형성하고 있었다[22]. 본 연구에서 관찰된 *T. viridescens* SW-1의 tyrosinase 억제제는 분리된 기원과 지역이 *Trichoderma viride* H1-7와 다른 영역에서 분리된 균주이다. 따라서 기존에 *T. viride*로부터 밝혀진 경쟁적 저해제인 homothallin II과는 다른 물질일 가능성이 있다. 다른 한편으로 proteinase K 처리 후 tyrosinase 저해활성을 평가해 본 결과 전혀 활성에는 연관성이 없는 것으로 나타났다(data not shown). 따라서 본

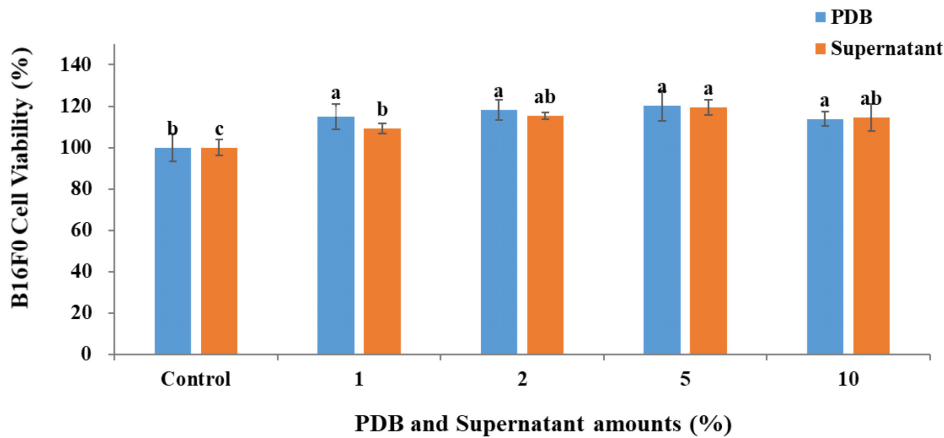


Fig. 4. Cytotoxicity assay according to the cultural supernatant amount of *T. viridescens* SW-1. B16F0 mouse melanoma cells were cultured in a DMEM medium supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum) at 37°C with 95% humidity and 5% CO₂. The cultural medium seeded with B16F0 mouse melanoma cells was added from 1% to 10% supernatant amounts. The cell viability was confirmed by MTS reagent. **p*<0.05.

α -MSH	-	+	+	+	+	+
supernatant	-	-	1.0	2.0	5.0	10.0

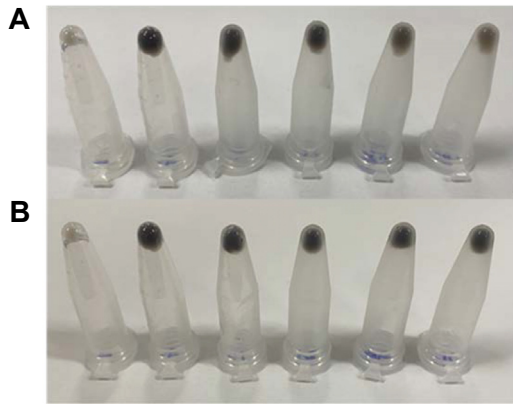


Fig. 5. Change of melanin production according to the cultural supernatant amount of *T. viridescens* SW-1 (A) and PDB (B; control) on B16F0 cell. The supernatant was adjusted into 1, 2, 5, and 10% amounts in cultural medium, The inhibition of melanin synthesis was visually compared with the α -MSH-treated group and the non-treated group.

연구에서 나타난 tyrosinase 저해물질은 펩타이드나 단백질성은 아닌 것으로 제외된다.

멜라닌 생성 능력 저해

본 연구에서 사용된 세포주 B16F0 mouse melanoma cell에 대하여 MTS 방법에 의하여 *T. viridescens* SW-1 배양 상등액을 농도별로 처리한 결과 대조군인 PDB와 동일하게 1%부터 10%

까지 모든 농도에서 생존율에서 차이를 보이지 않았으며 따라서 독성이 존재하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4). 본 결과를 바탕으로 하여 독성을 나타내지 않았던 범위의 시료 농도로 세포에 처리할 때 *T. viridescens* 상등액을 5% 이상의 농도에서 멜라닌 세포의 색상에 변화가 관찰되었다(Fig. 5). 따라서 5% 이상의 배양상등액을 처리할 때 tyrosinase 억제 활성이 명확하게 나타나는 것으로 추정된다.

상등액 처리시 멜라닌 합성 억제의 특성을 정확하게 산정하기 위해 독성을 나타내지 않았던 범위의 시료 농도로 세포에 처리 후 단백질 당 멜라닌 함량을 측정하여 멜라닌 생성 저해 활성을 확인하였다. 단백질은 pierce BCA protein Assay kit (thermo fisher Scientific, Cramlington, UK)를 이용하여 계산하였고, 멜라닌 함량은 멜라닌(M0418-100MG, sigma)을 1 N NaOH로 희석하여 검량곡선을 작성 후 대입하여 산출하였다. PDB 배지를 농도별로 처리하였을 때, 세포 내 멜라닌 함량이 유의적으로 감소하였으며, 특히, *T. viridescens* 상등액 5%와 10% 처리시 세포의 멜라닌 함량은 46.69 mg/g 와 39.32 mg/g protein이었으며 멜라닌 저해 활성은 16.3%과 27.1%로 각각 나타났다(Fig. 6).

다른 한편으로 세포의 멜라닌 함량 측정을 위해 PDB 배지를 첨가하여 tyrosinase 억제 활성을 측정할 경우에는 α -MSH (100nM)만 처리한 군에서 농도가 42.75 mg/g protein이었으며(Fig. 6), PDB 배지 농도 의존적으로 약간씩 낮아지는 것으로 관찰되었다. *T. viridescens* SW-1 상등액을 농도별로 처리하였을 때, 세포 외 멜라닌 함량은 세포내에 비교하여 감소폭이 낮은 것으로 나타났고, 10% 상등액을 처리시 7.5%의 저해 활성을 보였다. 따라서 세포내에 비교하여 3.6배 낮은 저해 활성

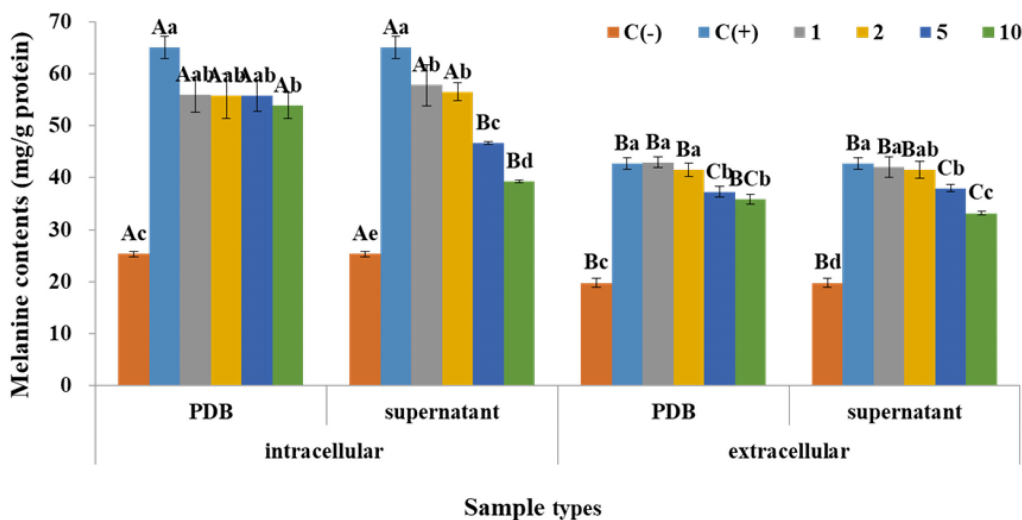


Fig. 6. Changes of intra- and extra-cellular melanin contents according to the cultural supernatant amount of *T. viridescens* SW-1 on B16F0 cell. The cell viability was measured by the MTS method. The medium was removed after cell culture, the cells were treated with 9 ml of DMEM and 1 ml of MTS reagent and then sample solution was added into the reaction mixture. After treatment during the indicated time, the reaction mixture was measured at 490 nm with a microplate reader for calculation of melanin biosynthesis inhibition ratio. C (-); PDB only, C (+); 2.0% albutin. * p <0.05.

이 관찰되었다.

*T. viridae*가 생산하는 tyrosinase 억제 물질 중에 3종은 기존에 알려진 버섯 유래 억제물질과는 완전히 구조가 다른 것으로 나타났기 때문에 신소재 tyrosinase 억제 물질을 발굴할 가능성이 높은 것으로 제의된다[22, 26]. 이와 같은 선행 연구에 따라 신규한 tyrosinase 저해제가 발굴하기 위해 수행된 본 연구에서 *T. viridescens* SW-1 상등액에 존재하는 tyrosinase 억제물질이 전사수준에서 발현에 전혀 관여하지 않았다(data not shown). 따라서 본 물질이 tyrosinase의 활성이나 tyrosinase 자체를 수식하는 것에 의해 기능성을 조절할 가능성이 있는 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합해 보면, tyrosinase 억제 활성 및 항산화 효과에 의해 *T. viridescens* SW-1이 선발되었고, 본 억제물질은 내열성이 강한 것으로 나타났다. 본 배양 상등액을 10%까지 처리할 때 세포독성은 관찰되지 않았고, 멜라닌 생성세포내외에 멜라닌 합성 억제효과가 관찰되었다.

감사의 글

이 논문은 2020~2021년도 경상국립대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Boo, Y. C. 2020. Up- or Downregulation of melanin synthesis using amino acids, peptides, and their analogs. *Biomedicines* **8**, 322.
- Gillbro, J. M. and Olsson, M. J. 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin lightening agents - existing and new approaches. *Int. J. Cosmet. Sci.* **33**, 210-221.
- Han, J. S. and Yi, D. H. 2012. Effects of pine needles fermentation extracts on antioxidant activity and inhibition of melanin synthesis. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **10**, 619-624.
- 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.
- Inoue, Y., Hasegawa, S., Yamada, T., Date, Y., Mizutani, H., Nakata, S., Matsunaga, K. and Akamatsu, H. 2013. Analysis of the effects of hydroquinone and arbutin on the differentiation of melanocytes. *Biol. Pharm. Bulletin* **36**, 1722-1730.
- Jablonski, N. H. and Chaplin, G. 2014. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 8962-8968.
- KCTC (Korean Collection for Type Cultures). <https://kctc.kribb.re.kr/>
- Kim, K. Y. and Lee, N. K. 2014. Herbal extracts research trend that have effects on melanin production and control. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **12**, 453-461.
- Kowichi, J., Obata, H., Pathak, M. A. and Fitzpatrick, T. B. 1974. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J. Invest. Dermatol.* **62**, 436-449.
- Kumari, S., Thng, S. T. G., Verma, N. K. and Gautam, H. K. 2018. Melanogenesis inhibitors. *Acta dermato-venereologica* **98**, 924-931.
- Lee, Y. H., Lim N. H., Joung, M. S., Kim, J. H. and Sim, S. S. 2005. Chemical stability and whitening activity of mixture of functional ingredients. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **31**, 295-304.
- Lin, J. Y. and Fisher, D. E. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**, 843-850.
- Ohbayashi, N. and Fukuda, M. 2020. Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000Res.* **9**, F1000 Faculty Rev-608.
- Olivares, C. and Solano, F. 2009. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 750-760.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., Cho, C., Hong, M. C., Shin, M. K. and Bae, H. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* **20**, 921-934.
- Rzepka, Z., Buszman, E., Beberok, A. and Wrześniok, D. 2016. From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* **70**, 695-708.
- Saedi, M., Eslamifar, M. and Khezri, K. 2019. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomed. Pharmacother.* **110**, 582-593.
- Schiano, M. V. 2010. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1094-1104.
- Simon, J. D., Peles, D., Wakamatsu, K. and Ito, S. 2009. Current challenges in understanding melanogenesis: Bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 563-579.
- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. and Wortsman, J. 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **84**, 1155-1228.
- Steinho, M., Stander, S., Seeliger, S., Ansel, J. C., Schmelz, M. and Luger, T. 2003. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch. Dermatol.* **139**, 1479-1488.
- Tsuchiya, T., Yamada, K., Minoura, K., Miyamoto, K., Usami, Y., Kobayashi, T., Hamada-Sato, N., Imada, C. and Tsujibo, H. 2008. Purification and determination of the chemical structure of the tyrosinase inhibitor produced by *Trichoderma viride* strain H1-7 from a marine environment. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1618-1620.
- Videira, I. F. D. S., Moura, D. F. L. and Magina, S. 2013. Mechanisms regulating melanogenesis. *An. Bras. Dermatol.* **88**, 76-83.

24. Wang, D. H., Ootsuki, Y., Fujita, H., Miyazaki, M., Yie, Q., Tsutsui, K. and Ogino, K. 2012. Resveratrol inhibited hydroquinone-induced cytotoxicity in mouse primary hepatocytes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **9**, 3354-3364.
25. Yamada, K., Imada, C., Tsuchiya, T., Miyamoto, K., Tsujibo, H., Kobayasi, T. and Hamada-Sato, N. 2007. An application study of culture supernatant of a filamentous fungus isolated from marine environment as an ingredient for whitening cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan* **41**, 254-261.
26. Yoon, M. Y., Han, E. H. and Han, Y. S. 2013. A study on anti-oxidant activity and whitening action of *Plantago asiatica* L. seed extract. *J. Kor. Soc. Beauty Art* **14**, 259-269.
27. 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 viridescens* SW-1 미백 기능성소재의 생화학적 특성

강동우¹ · 김판길² · 김삼웅³ · 방규호¹ · 김철호¹ · 이상원¹ · 갈상완^{1,3*}

(¹경상국립대학교 제약공학과, ²진주보건대학교 임상병리과, ³경상국립대학교 유전자분석센터)

최근 기능성 화장품 시장의 증가와 더불어 안전성과 기능성을 가진 제품에 대한 소비자들의 요구가 증대됨에 따라 안전성, 기능성, 안정성을 가진 새로운 기능성 화장품 소재의 개발 필요성이 대두 되고 있다. 본 연구에서는 야생 버섯에 자생하는 균류에 대하여 tyrosinase 저해 활성 및 항산화 활성에 대하여 우수한 기능성을 가지는 균주를 선발 하였으며, 선발된 균주를 동정 후 *T. viridescens* SW-1으로 명명하였다. 배양 기간별 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과 3일차에서 가장 강한 활성을 나타내었으며, 3일차 배양 상등액을 이용하여 농도별 활성을 측정된 결과 상등액 5% 이상 처리시 94% 이상의 저해활성을 유지하는 것으로 확인 되었다. 상등액을 온도별 처리 후 저해율을 확인한 결과 tyrosinase 저해 활성이 유지되었으며 이에 따라 우수한 열 안정성을 확인 하였다. 세포 생존율 측정 결과 10% 상등액 처리시까지 세포 독성이 나타나지 않았으며 세포에서의 멜라닌 함량 조사 결과 10% 상등액 처리시 세포내 27.1%, 세포외 7.5%의 저해율을 확인하였다. 본 연구에서 *T. viridescens* SW-1 배양 상등액의 세포독성 및 항균, 멜라닌 합성 저해 등의 기능성, 열처리 후 tyrosinase 저해활성 확인을 통한 열 안정성을 확인 하였다. 따라서 *T. viridescens* SW-1 배양 상등액을 활용한 미백기능성 원료로써 활용 가능성이 높기 때문에 향후 산업화를 위한 연구가 수행되어야 할 것이다.