

큰갓버섯(*Macrolepiota procera*)의 Tyrosinase 효소활성 저해효과

곽정훈 · 한영환*

동국대학교 대학원 생명과학과

Tyrosinase Inhibitory Activity of *Macrolepiota procera*

Jung-Hoon Kwak and Yeong-Hwan Han*

Graduate School of Life Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

(Received November 30, 2010. Accepted December 20, 2010)

ABSTRACT: Inhibitory effect on tyrosinase activity and melanogenesis of the mycelia and mycelial culture broth of *Macrolepiota procera* were investigated. The methanol fraction of culture broth showed 56.6% of tyrosinase inhibitory activity and its IC₅₀ was 8.78 mg/ml. Using *Streptococcus bikiniensis* for melanogenesis *in vitro*, the methanol extract of mycelia showed 94.0% inhibition of melanogenesis.

KEYWORDS : Culture, *Macrolepiota procera*, Mycelia, Tyrosinase

큰갓버섯(*Macrolepiota procera*)은 담자균아문, 진정담자균강, 주름버섯목, 갓버섯과, 큰갓버섯속에 속하는 버섯으로 한국, 중국 일본 등 전세계에 분포하며 여름부터 가을까지 산림, 대나무숲, 풀밭, 목장 등 땅위에 단생 또는 군생하는 외생균근성 버섯이다. 순화 재배와 심층발효 배양이 가능한 맛이 좋은 식용버섯으로 알려져 왔다(박 과 이, 1999; 조, 2003).

멜라닌은 페놀류의 고분자 물질로 자외선, 건조, 극한 온도 등에 대한 생존능력을 높여주지만, 이의 과도한 생성은 기미, 주근깨, 검버섯을 형성하고 피부노화를 촉진시키고 악성 흑색종의 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 식품에서는 채소, 과일, 생선 등의 갈변화 현상을 일으켜 품질을 저하시키는 원인이 되기도 한다(Bell and Weeler, 1980; Lerner and Fitzpatrick, 1950; Cherl *et al.*, 1991).

Tyrosine은 tyrosinase에 의하여 L-3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine(L-DOPA), dopaquinone, 5,6-quinone으로 산화되어 최종적으로 중합에 의해 멜라닌으로 생합성된다. 현재까지 알려진 tyrosinase의 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid, kojic acid, azelaic acid 등이 있으나, 피부 안전성, 제형 안전성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다(Ando *et al.*, 1993; Imokawa and Mishima, 1982). 최근, 안전성을 고려하여 천연물로부터 tyrosinase 효소활성 저해제를 선별하기 위한 연구가 활발히 이뤄지고 있다.

본 연구는 기능성 미백 화장품 원료로서의 사용 가능성을 규명하기 위하여 큰갓버섯의 균사체 배양액과 균사체 추출물을 사용하여 멜라닌 생성의 주요 효소인 tyrosinase 효소활

성 저해와 *Streptococcus bikiniensis*를 이용한 멜라닌 생성 효소 저해에 대한 실험을 수행하였다.

사용된 tyrosinase, L-DOPA, kojic acid 등은 Sigma사(USA), 균사체 배양에 사용된 배지 및 배지 조성물은 Difco사(USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다. 사용 버섯은 경상북도 경주시 현곡면에서 채취한 다음, 형태학적 특징에 따라 큰갓버섯(*Macrolepiota procera*)으로 동정하였다(Fig. 1).

균사체 배양은 액체배지(조성; malt extract 7%, soytone 0.3%, yeast extract 0.2%)를 사용하여 27°C에서 7일간 진탕 배양(120 rpm)하였다. 배양후 여과지(Toyo No.2)로 여과하여 균사체와 배양액을 분리하였다. 균사체와 배양 여액은 감압 농축한 다음 분말화하여 시료로 사용하였다. 균사체의 열수 추출은 121°C에서 1시간 동안, 메탄올 추출은 60°C에서 10시간 동안 환류추출하였다.

Tyrosinase 효소활성 측정은 Ishihara *et al.*(1991)의 방법을 사용하였다. 시험관에 0.4 ml의 0.1 M 인산완충용액



Fig. 1. Morphological features of fruiting body and mycelia of *Macrolepiota procera*.

*Corresponding author <E-mail : yghan@dongguk.ac.kr>

(pH 6.0), 0.4 ml의 1.5 mM tyrosine 용액, 0.2 ml의 시료 용액을 혼합하였다. 혼합용액에 0.1 ml의 tyrosinase 효소용액 (100 unit/ml)을 첨가하여 30에서 5분간 반응시킨 다음 475 nm의 흡광도를 측정후 다음의 방법으로 tyrosinase 효소활성 억제율을 구하였다. 각 반응은 3회 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase 효소활성 억제율(\%)} = [1 - (S - B)/C] \times 100$$

S : 효소액 및 시료용액 첨가 시 흡광도 변화값

B : 효소액 대신 0.1 M 인산완충용액 첨가시 흡광도 변화값

C : 시료용액 대신 시료를 녹인 용매 첨가시의 흡광도 변화값

S. bikiniensis KCTC9172를 이용한 멜라닌생성 저해효과를 규명하기 위해 Tomita *et al.*(1990)과 Wang *et al.* (2000)의 방법을 사용하였다. *S. bikiniensis*는 LB액체배지(조성; typtone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)에 시료를 첨가하여 24°C에서 5일간 배양하였다. 배양액을 원심분리(3000 xg, 10분)한 다음 상등액의 흡광도를 400 nm에서 측정하였다.

큰갯버섯 배양 균사체 및 배양액 추출물에 대한 tyrosinase 효소의 기질로 L-DOPA를 사용하여 tyrosinase 효소활성 저해효과를 본 결과, 균사체를 메탄올로 추출한 경우 균사체와 균사체 배양액 모두 메탄올로 추출하였을 때 더 우수한 tyrosinase 효소 활성 억제효과를 보여 주었다.

배양액의 효소활성 억제율은 56.6%로 균사체의 메탄올 추출의 경우(40.5%) 보다 더 우수한 효과를 나타내었다(Table 1). 그러나, 이 저해효과는 tyrosinase 효소활성 저해에 일반적으로 사용되는 정제 코직산의 91.0%와 비교하였을 때 여전히 낮은 측정치를 나타내었다. 그러나 코직산이 인체에 유해한 점과 큰갯버섯이 식용버섯인 상황을 고려하면 큰갯버섯 추출물을 화장품에 적용하기에 장점이 있을 것으로 판단된다. 배양액을 메탄올로 분획하여 농도 의존적 적용실험의 결과 100 mg/ml의 농도에서 99.8% 저해효과를 보여주었으며, 50% 멜라닌 생합성 저해농도는 8.78 mg/ml이었다(Fig. 2). *S. bikiniensis*를 이용한 tyrosinase 생성 저해효과를 측정하였

Table 1. Tyrosinase inhibitory activity of the mycelia and culture broth extracts of *Macrolepiota procera*

Material ¹⁾	Extracts	Inhibition of tyrosinase activity (%)
Mycelia	MeOH	40.5±0.03 ²⁾
	D.W.	11.0±0.66
Culture broth	MeOH	56.6±6.29
	D.W.	27.3±2.24
Kojic acid	-	91.0±1.70

¹⁾The concentration of 10 mg/ml and 1.0 mg/ml was applied to determine the tyrosinase activities for samples and kojic acid as a control, respectively.

²⁾Average±S.D. for three replicates.

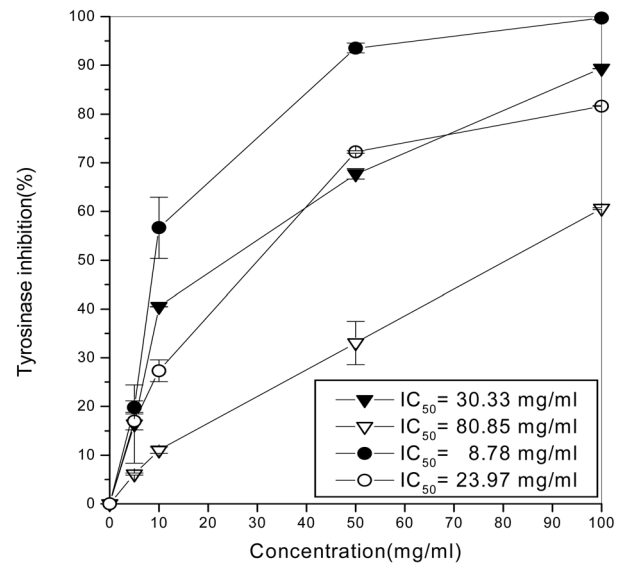


Fig. 2. Effect of extract concentration from *Macrolepiota procera* on the tyrosinase inhibitory activity (—▼—; MeOH extract of mycelia, —▽—; water extract of mycelia, —●—; MeOH extract of culture broth, —○—; culture broth).

Table 2. Inhibitory effects of the extracts from mycelia and culture broth of *Macrolepiota procera* on melanogenesis of *Streptococcus bikiniensis*

Material ¹⁾	Extracts	Melanin formation		
		Abs ₄₀₀	Relative absorbance	Inhibition of melanogenesis (%)
Mycelia	MeOH	0.019±0.004 ²⁾	0.060	94.0
	D.W.	0.303±0.026	0.956	4.4
Culture broth	MeOH	0.044±0.011	0.139	86.1
	D.W.	0.089±0.025	0.281	71.9
Control	-	0.317±0.016	1	N/A

¹⁾The concentration of 50 mg/ml of samples was applied to determine the inhibition ratio of melanogenesis.

²⁾Average±S.D. for three replicates.

을 때, tyrosinase 억제 실험의 결과와 달리 메탄올 추출한 균사체에서 더 우수한 저해효과(효소생성 저해율; 94.0%)를 보여주었다(Table 2). 큰갯버섯 균사체 및 배양액에 대한 메탄올 분획물의 tyrosinase 효소활성 저해결과는 미백효능의 기능성 화장품 원료로서 사용 가능성을 나타내었으나, 독성 메탄올의 대체 추출 용매에 대한 실험은 더 필요할 것으로 판단된다.

적요

멜라닌 생합성에 관련된 tyrosinase 효소활성의 억제를 측정하기 위하여, 큰갯버섯(*Macrolepiota procera*) 균사체 및 균사체 배양액을 이용하여 실험을 하였다. 배양액의 메탄올 분획이 56.6%의 효소활성 억제를 보여주었으며, 농도 의존적

억제 실험에서 50%의 tyrosinase 효소활성 억제 농도는 8.78 mg/ml이었다. *Streptococcus bikiniensis*를 이용한 멜라닌 생성 억제는 균사체의 배탄을 추출물에서 94.0%의 우수한 결과를 나타내었다(Table 2).

참고문헌

- 박완희, 이호득. 1999. 한국야생버섯도감. 교학사. pp.28-29.
- 조덕현. 2003. 원색한국의버섯. 아카데미서적. pp.129-130.
- Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. 1993. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* 100:155-155.
- Bell, A. A. and Weeler, M. H. 1980. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phylrophathol.* 24:411-451.
- Cherl, J. S., Wei, C. and Manhall, M. R. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 39:1897-1901.
- Imokawa, G. and Mishima, Y. 1982. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosilation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 42:1994-2002.
- Ishihara, Y., Oka, M., Tsumakawa, M., Yomita, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Miyaki, T., Komish, M. and Oki, T. 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. *J. Antibiot.* 44:25-32.
- Lerner, A. B. and Fitzpatrick, T. B. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* 30:91-126.
- Tomita, K., Oda, N., Kamel, N., Miyaki, M. and Oki, T. 1990. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot.* 12:1601-1605.
- Wang, G., Aazaz, A., Peng, Z. and Shen, P. 2000. Cloning and overexpression of a tyrosinase gene *mel* from *Pseudomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Letters.* 185:23-27.