

RESEARCH ARTICLE

미백성 Tyrosinase 저해물질 생산 비병원성 야생효모 *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0191와 *Papiliotrema laurentii* ON30의 균학적 특성과 Tyrosinase 저해물질의 생산

김지윤, 이종수*

배재대학교 바이오의약학부

Microbiological Characteristics of Whitening Tyrosinase Inhibitor-producing Wild Yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0191 and *Papiliotrema laurentii* ON30 and Production

Ji-Yoon Kim and Jong-Soo Lee*

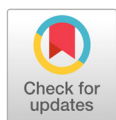
Faculty of Biomedicine and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea

*Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr

ABSTRACT

The goal of this study and potent whitening tyrosinase inhibitor-producing wild yeasts and further optimiz production of tyrosinase. Among non-pathogenic wild yeasts obtained from soils in Daejeon city and spice field of Geumsan in Chungcheongnam-do, Korea, we selected *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) WJSL0191 and *Papiliotrema laurentii* (*P. laurentii*) ON30 show 33.2% and 27.3% respectively. These selected strains formed and not pseudomycelium. *S. cerevisiae* WJSL0191 was sugar-tolerant as well as halophilic in 20% glucose-containing yeast (YPD) medium and 15% NaCl-containing YPD medium. *S. cerevisiae* WJSL0191 and *P. laurentii* ON30 showed 26.2% and 18.6% anti-wrinkle elastase inhibitory activities, respectively. aximal production of tyrosinase inhibitors obtained when *S. cerevisiae* WJSL0191 was cultured at 30 for 72h in YPD medium and *P. laurentii* ON30 was incubated at 20°C for 24hr.

Keywords: *Papiliotrema laurentii* ON30, *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0191, Tyrosinase inhibitor, Whitening, Wild yeast



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 September, 48(3): 285-296
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200028>

Received: August 12, 2020

Revised: September 17, 2020

Accepted: September 22, 2020

© 2020 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

최근 건강과 아름다움을 동시에 추구하려는 사람들이 크게 증가함에 따라 주름생성 억제와 멜라닌의 피부 침착을 방지하는 미백 등 다양한 생리활성을 가진 기능성 화장품의 수요가 크게 증가하고 있고 따라서 이들에 관한 연구, 개발이 많이 실시되고 있다[1].

미백에 관련된 멜라닌 생성의 rate-limiting 효소인 tyrosinase (EC 1.14.18.1)는 L-tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)으로 전환시키고 L-DOPA를 DOPA quinone으로 변환하여 최종적으로 eumelanin과 pheomelanin 등의 멜라닌을 생합성 한다[1].

현재 미백 소재로 이용되고 있는 것들은 대부분이 tyrosinase 저해제들로 albutin과 kojic acid등이 많이 알려져 있는데 이들은 vitamin C와 함께 피부색을 밝게 하고 멜라닌 과잉 침착을 억제하는 효능이 있어 기능성 화장품이나 미용식품 등의 제조의 소재로 사용되고 있다[1,2]. 그러나 이들 미백 소재들은 주로 재배 기간이 긴 식물체들로부터 추출되고 대량 추출 등에 문제점이 있으므로 값싼 배지로 단시간에 경제적으로 대량 생산이 가능하면서 미백 활성이 높은 새로운 미생물로부터의 미백 소재 개발이 필요하다.

한편, 효모는 *Cryptococcus neoformans*와 *Candida albicans* 등 몇 종의 효모들만이 수막염이나 칸디다증을 일으키는 기회감염성 병원균으로 알려져 있을 뿐 대부분 비병원성이면서 GRAS 균주들로 오래 전부터 전통 발효 식품 제조[3]와 protease 등 산업용 효소 생산[4] 등에 이용되어 오고 있다. 최근에는 다양한 생리활성물질 생산에 이용되는 등 산업적으로 유용한 미생물이며[4-14] 또한 학술적으로 생명공학 연구의 이종단백질 생산을 위한 숙주 외에도 여러 가지 대사산물들의 분비 기작 연구 등에 이용되고 있다[7].

필자 등은 전보[15]에서 야생화에서 분리한 야생효모들 중 미백활성을 가진 tyrosinase 저해물질을 생산하는 야생효모들을 선발하였으나 활성이 비교적 낮았고 배지조성과 배양방법 등 대량 생산을 위한 조건에서 비경제적인 문제점 등이 있었다. 따라서 본 연구에서는 이들의 단점을 보완할 수 있는 새로운 미백성 tyrosinase 저해활성이 우수한 야생효모들을 선별하여 이들을 기능성 화장품 산업에 응용하기 위하여 실시되었다.

이를 위해 먼저 대전 주요 하천과 충남 금산의 향신료 재배지역의 토양과 부식물 등에서 분리한 비병원성 야생효모들 중 미백성 tyrosinase 저해활성이 우수한 2종류의 야생효모들을 선별하여 이들의 균학적 특성과 피부노화관련 elastase와 collagenase 저해활성등을 측정하였다. 또한, tyrosinase 저해물질 생산 최적 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

야생효모 균주 및 재료

미백성 tyrosinase 저해 물질 생산 우수 효모 선발을 위한 야생효모들은 배재대학교 생물공학연구실에서 대전광역시 3대 하천들과 충남 금산의 향신료 재배지역의 토양과 부식물 등에서 분리, 동정한 비병원성 야생효모들을 사용하였다[16].

Tyrosinase 저해활성 측정에는 Sigma사(St. Louis, Mo, USA)의 tyrosinase 와 ELISA reader를 사용하였고, 피부 노화 관련 효소활성 실험에는 elastase (돼지 췌장에서부터 생산), collagenase (*Clostridium histolyticum*으로부터 생산) 등을 사용하였다. 기타, 효소활성 측정과 완충용액 제조 등에는 분석용 특급 시약들을 사용하였다.

야생효모 무세포 추출물의 제조 및 Tyrosinase 저해활성 측정

야생효모들을 yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 8000 rpm으로 20분간 원심분리하여 세포 균체들을 얻었다. 세포 균체들을 다시 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.3)에 현탁 시킨 후 초음파 균체파쇄기 (Vibra Cell; Sonics & Materials, Newtown, CT, USA)로 파쇄하고 12,000 rpm으로 20 분간 원심분리하여 무세포 추출물을 얻었다.

이들 무세포 추출물들을 동결건조 시킨 후 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 6.8)에 10 mg·mL로 용해시켜 tyrosinase 저해활성 측정용 시료로 사용하였다[17,18].

Tyrosinase 저해활성은 위와 같이 제조한 야생효모 무세포 추출물 시료 50 µL에 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 6.8) 100 µL와 1.5 mM L-tyrosine 50 µL를 혼합 후 37°C에서 ELISA reader를 이용하여 5분간 반응시킨 후 tyrosinase 40U을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 470 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같은 식으로 tyrosinase 저해활성을 계산하였다[15].

$$\text{Tyrosinase 저해활성(\%)} = \{C - (T - B)\} / C \times 100 \quad (1)$$

(C, 대조구의 흡광도; T, 시료구의 흡광도; B, 시료구 blank의 흡광도)

주름생성과 피부노화억제 관련 생리활성 측정

Elastase 저해활성; 야생효모 무세포 추출물 시료 50 µL에 0.2 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0) 150 µL, 4 mM N-Succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide 50 µL 혼합 후 ELISA reader를 이용하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 elastase (0.2 unit·mL) 50 µL을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 410 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같은 식으로 elastase 저해 활성을 계산하였다[19].

$$\text{Elastase 저해활성(\%)} = \{C - (T - B)\} / C \times 100 \quad (2)$$

(C, 대조구의 흡광도; T, 시료구의 흡광도; B, 시료구 blank의 흡광도)

Collagenase저해활성; 야생효모 무세포 추출물 시료 50 µL에 4 mM CaCl₂를 함유한 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 125 µL와 collagenase (0.5 mg·mL) 125 µL를 혼합 후 37°C에 20분 동안 반응 후 6% 구연산 용액 200 µL로 반응을 정지시키고 ethyl acetate 700 µL를 첨가하였다.

30초 vortex를 한 뒤 원심분리 후 상층액 200 µL를 취하여 ELISA reader를 이용해 340 nm에서 활성을 측정한 후 아래와 같은 식으로 collagenase 저해활성을 계산하였다[20].

$$\text{Collagenase 저해활성(\%)} = \{1 - (T - T.B / C - B)\} \times 100 \quad (3)$$

(C, 대조구 흡광도; T, 시료구 흡광도; T.B, 시료구 blank 흡광도; B, 대조구 blank 흡광도)

항산화 활성; 야생효모 무세포 추출물 60 μL 에 DPPH(α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 240 μL 혼합한 후 ELISA reader를 이용하여 525 nm에서 10분 동안 흡광도를 측정된 후 아래와 같은 식으로 DPPH 활성을 계산하였다. 대조구는 99.5% EtOH 60 μL 에 DPPH 240 μL 를 혼합한 것으로 하였다(20).

$$\text{DPPH 활성(\%)} = 1 - \{T_{10} - (T_0 - C)\} / C \times 100 \quad (4)$$

(C, 대조구의 흡광도; T_0 , 시료구의 0분 흡광도; T_{10} , 시료구의 10분 흡광도)

SOD 유사 활성; 야생효모 무세포 추출물 285 μL 와 24 mM pyrogallol 15 μL 를 혼합 후 ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 10분 동안 흡광도를 측정된 후 아래와 같은 식으로 SOD 유사활성을 계산하였다. 대조구는 55 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.2) 285 μL 와 pyrogallol 15 μL 를 혼합한 것으로 하였다[21].

$$\text{SOD 유사 활성(\%)} = \{(C - T) / C\} \times 100 \quad (5)$$

(C, 대조구 흡광도; T, 시료구 흡광도)

선발균주의 균학적 특성

선발균주들의 미생물학적 특성으로 형태학적, 배양학적 특성 등은 일반 미생물 실험방법과 현미경 등을 이용하여 조사하였고[22,23] 당 자화성과 발효성은 yeast nitrogen base를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

미백성 tyrosinase 저해활성 우수 효모 균주의 선발

대전광역시 3대 주요하천들과 충남 금산의 향신료 재배지들의 토양과 식물체 부식물 등에서 분리, 동정한 야생효모 중 비병원성 효모들의 미백성 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다.

먼저, 대전광역시내를 흐르는 대전천, 유등천, 갑천 등에서 분리한 비병원성 야생효모들의 무세포 추출물들을 제조하여 이들의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다.

대전천 주변 토양에서 분리한 *Saccharomyces cerevisiae* (S. cerevisiae) WJSL0191 균주의 tyrosinase 저해활성이 33.2%로 분리균주중 가장 높았고 S. cerevisiae WJSL0088 균주도 21.3%의 저해활성을 보였으나 나머지 야생효모들은 대부분 15% 미만이거나 활성이 없었다. 따라서 tyrosinase 저해활성이 가장 높은 S. cerevisiae WJSL 0191을 우수 균주로 선발하였다.

선발균주인 S. cerevisiae는 비병원성이면서 GRAS 균주로 오래전부터 주류 등의 전통 발효 식품과 빵 효모 등으로 이용되어오고 있고 최근에는 항고혈압활성 안지오텐신전환효소 저해활성 [7]과 항치매성 β -secretase 저해활성[8]과 acetylcholinesterase 저해활성[9], 암전이 억제성 혈관신생 억제활성[5]등 다양한 생리활성들이 보고되어 약용효모로도 매우 주목을 받고 있는 산업적으로 유용한 효모이다.

Table 1. Tyrosinase inhibitory activities of non-pathogenic wild yeasts obtained from main riverside soils of Daejeon city, Korea.

No.	Strains	Isolated No.	Tyrosinase inhibitory activity (%)	Remarks (collected site)
1	<i>Candida infanticola</i>	WJSL0039	n.d ^a	Daejeon-cheon
2	<i>Candida norvegica</i>	WJSL0145	n.d	
3	<i>Candida pseudolambica</i>	WJSL0050	n.d	
4	<i>Candida railenensis</i>	WJSL0149	4.10	
5	<i>Candida zeylanoides</i>	WJSL0077	13.20	
6	<i>Debaryomyces vindobonensis</i>	WJSL0163	10.00	
7	<i>Geotrichum fragrans</i>	WJSL0166	n.d	
8	<i>Kazachstania servazzii</i>	WJSL0084	14.40	
		WJSL0085	7.70	
9	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	WJSL0086	12.90	
10	<i>Pichia membranifaciens</i>	WJSL0178	5.40	
		WJSL0179	1.40	
11	<i>Pichia spartinae</i>	WJSL0087	7.59	
12	<i>Pseudozyma aphidis</i>	WJSL0180	n.d	Yudeung-cheon
13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WJSL0013	13.10	
		WJSL0088	21.30	
		WJSL0089	12.70	
		WJSL0191	33.20	
		WJSL0014	19.70	
		WJSL0015	10.80	
14	<i>Candida vartiovaarae</i>	WJSL0101	2.20	
		WJSL0097	2.40	
		WJSL0098	6.70	
		WJSL0099	8.50	
		WJSL0100	12.70	
		WJSL0102	4.30	
		WJSL0103	8.50	
15	<i>Candida sake</i>	WJSL0053	10.10	
		WJSL0153	12.90	
16	<i>Geotrichum klebahnii</i>	WJSL0081	10.10	
		WJSL0082	6.50	
17	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	WJSL0112	1.00	
18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WJSL0091	2.60	
19	<i>Saccharomyces cf. cerevisiae</i>	WJSL0190	5.40	
20	<i>Torulaspora delbruecki</i>	WJSL0117	15.80	

^an.d; not detected, bold type font; selected yeast

비록, 선발 야생효모 *S. cerevisiae* WJSL 0191의 tyrosinase 저해활성이 *Diutina siamensis* JR37-5의 30.9%와 *Starmerella bombicola* 80-J-1의 36.2%들[15]과 비슷하거나 약간 낮은 저해활성이었지만 아래와 같은 생산조건의 최적화 연구를 통해 저해활성을 크게 증진시킬 수 있었고 선발균주가 전통 발효식품 산업에 오랫동안 이용되고 있는 GRAS 균주이기 때문에 이 야생효모 균주를 이용한 고부가가치의 기능성 미용 화장품 소재로서의 산업적 응용성이 매우 클 것으로 사료된다.

한편, 향신료 재배지 주변 토양에서 분리한 비병원성 야생 효모들의 무세포 추출물들의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 이들 야생효모들 중 양파 재배 토양에서 분리한 *Papiliotrema laurentii* (*P. laurentii*) ON 30이 tyrosinase 저해활성이 27.3%로 가장 높았고, 마늘 재배 토양에서 분리한 *Meyerozyma guilliermondii* M1C-3균주도 19.7%를 보였다. 따라서 우수 균주로 최종 *P. laurentii* ON30을 선발하였다.

선발균주인 *P. laurentii*에 관한 연구로 Sarkar등[24]은 본 균주가 질소원이 결핍된 배지에서도 생육이 왕성한 결과를 토대로 이 균의 질소원 스트레스에 대한 전사체 분석 등의 생화학적 연구 등을 실시하여 보고하였다. 또한 Wang등[25]은 바이오 디젤 생산을 위한 *P. laurentii*의 inulin 가수분해와 오일 생산 등에 관하여 보고하였다.

Table 2. Tyrosinase inhibitory activities of non-pathogenic, wild yeasts obtained from spices field of Geumsan in Chungcheongnam-do, Korea.

No.	Putative species	Isolated No.	Tyrosinase inhibitory activity (%)	Remarks (collected site)
1	<i>Bamettozyma californica</i>	M4a-2	n.d ^a	Garlic (<i>Allium Sativum</i> L.)
2	<i>Candida intermedia</i>	M4a-1	n.d	
3	<i>Candida pseudolambica</i>	M1a-2	n.d	
4	<i>Cryptococcus laurentii</i>	M15-1	6.5	
5	<i>Cryptococcus luteolus</i>	M9c-1	9.4	
6	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	M14-1	n.d	
7	<i>Debaryomyces vindobonensis</i>	M5b-1	6.8	
8	<i>Hannaella oryzae</i>	M9b-1	18.1	
9	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	M1c-3	19.7	
10	<i>Papiliotrema flavescens</i>	M12-1	n.d	
11	<i>Papiliotrema laurentii</i>	M8a-2	2.7	Ginger (<i>Zingiber officinale</i>)
12	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	M13-2	13.2	
13	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	M1a-3	8.0	
14	<i>Candida intermedia</i>	PA1b-1	11.1	
15	<i>Debaryomyces hansenii</i>	K2a-1	3.4	
16	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	K5a-1	n.d	
17	<i>Papiliotrema laurentii</i>	K4b-2	9.4	
18	<i>Rhodotorula oryzae</i>	PA3c-1	11.4	
19	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	K5c-2	n.d	
20	<i>Sampaiozyma ingens</i>	K1c-3	n.d	
21	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	K4b-1	n.d	Onion (<i>Allium cepa</i>)
22	<i>Wickerhamomyces onychis</i>	PA1b-2	13.2	
23	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	ON13	14.3	
24	<i>Aureobasidium pullulans</i>	ON6	n.d	
25	<i>Candida pimensis</i>	ON12	8.8	
26	<i>Cryptococcus laurentii</i>	ON28	14.1	
27	<i>Curvibasidium pallidicorallinum</i>	ON7	n.d	
28	<i>Papiliotrema laurentii</i>	ON30	27.3	
29	<i>Sydowia polyspora</i>	ON5	n.d	
30	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	ON29	16.7	
31	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	ON27	11.7	
32	<i>Kwoniella bestiolae</i>	ON10	n.d	

^an.d; not detected, bold type font; selected yeast

Tyrosinase 저해활성 우수 효모 균주들의 균학적 특성과 생리활성

균학적 특성 위와 같이 Tyrosinase 저해물질 생산 우수 균주로 선발한 야생효모 *S. cerevisiae* WJSL 0191와 *P. laurentii* ON30 균주들의 분석된 염기서열을 NCBI에 BLAST하여 유사도를 확인한 후, 이를 바탕으로 분자 계통수를 작성하였다. 이때 bootstrap 분석은 2,000회 반복으로 수행되었고 MEGA-X [26]를 이용하여 neighbor-joining 계통수를 완성하였으며 outgroup 균주들로는 각각 *Hanseniaspora opuntiae*와 *Trimella moniformis* 등을 사용하였다. 이들 두 균주들의 phylogenetic tree는 Fig. 1과 같고, 형태학적, 배양학적 특징들을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

이들 균주들의 세포의 형태는 구형~타원형으로 출아에 의해 영양증식을 하였고 모두 자낭포자를 형성하였으나 의균사를 형성하지 않았다.

또한, 선발균주 모두 YPD 배지와 yeast extract-malt extract 배지에서 잘 생육하였고 비타민을 첨가하지 않은 YPD 배지에서도 잘 생육하였다. 선발균주 모두 20% 포도당을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 내당성을 보였고, 5% NaCl을 함유한 YPD 배지에서 생육하는 호염성 효모들이었다. 특히 *S. cerevisiae* WJSL0191은 일반적으로 주류 제조나 빵 효모로 이용되는 *Saccharomyces cerevisiae* 와 달리 20% 포도당 함유 YPD 배지와 15% NaCl 함유 YPD 배지에서도 잘 생육하는 강한 내당성과 호염성을 보여 산업적 응용성이 매우 클 것으로 사료된다.

또한 선발균주 모두 일반적인 효모들과 유사하게 pH 5.0-6.0에서 잘 생육하였으나 *S. cerevisiae* WJSL0191만이 일반 효모들같이 20-30°C에서 생육이 좋았으나 *P. laurentii* ON 30은 조금 더 높은 온도인 20-35°C에서 생육하여 내열성을 보였다.

Table 3. Microbiological characteristics and anti-aging enzyme activities of the selected tyrosinase inhibitor - producing wild yeasts.

Characteristics	Saccharomyces cerevisiae WJSL0191	Papiliotrema laurentii ON30
Morphological characteristics		
Shape/size (μm)	Oval/1.4-1.8	Global/1.6-1.6
Vegetative reproduction	Budding	Budding
Ascospore	+	+
Pseudomycelium	-	-
Cultural characteristics		
Growth on YPD/ YM/ PD media	+++ /++ /++	+++ /+++ /+
Color on YPD medium	White	Cream
Growth on Vitamin-free medium	+	++
Growth on 10%/20% glucose-YPD medium	+++ /+++	++ /+
Growth on 5%/15%/18% NaCl-YPD medium	++ /+ /-	++ /- /-
Growth on temp/pH range	20-30°C/pH 5.0-6.0	20-35°C/pH 5.0-6.0
Assimilation and fermentation on sugars	(Assimilation) Glu., Gal., Suc., Man., Raf., Mal., Fru., Cel., Sta.	Glu, Mal
	(Fermentation) Glu., Gal., Mal.	-
Physiological functionalities related anti-wrinkle and anti-aging		
Elastase inhibitory activity (%)	26.2 (±2.2)	18.6 (±1.7)
Collaganase inhibitory acitivity (%)	n.d	n.d
Antioxidant activity (%)	n.d	3.1 (±0.4)
SOD-like activity (%)	10.2 (±0.3)	3.7 (±0.1)

YPD: Yeast extract-peptone-dextrose; YM: Yeast extract-malt extract; PD: Potato dextrose; +++: Very good growth; -: No growth; Glu: Glucose; Gal: Galactose; Suc: Sucrose; Man: Mannose; Raf: Raffinose; Mal: Maltose; Fru: Fructose; Cel: Cellulose; Sta: Soluble starch, n.d: Not detected.

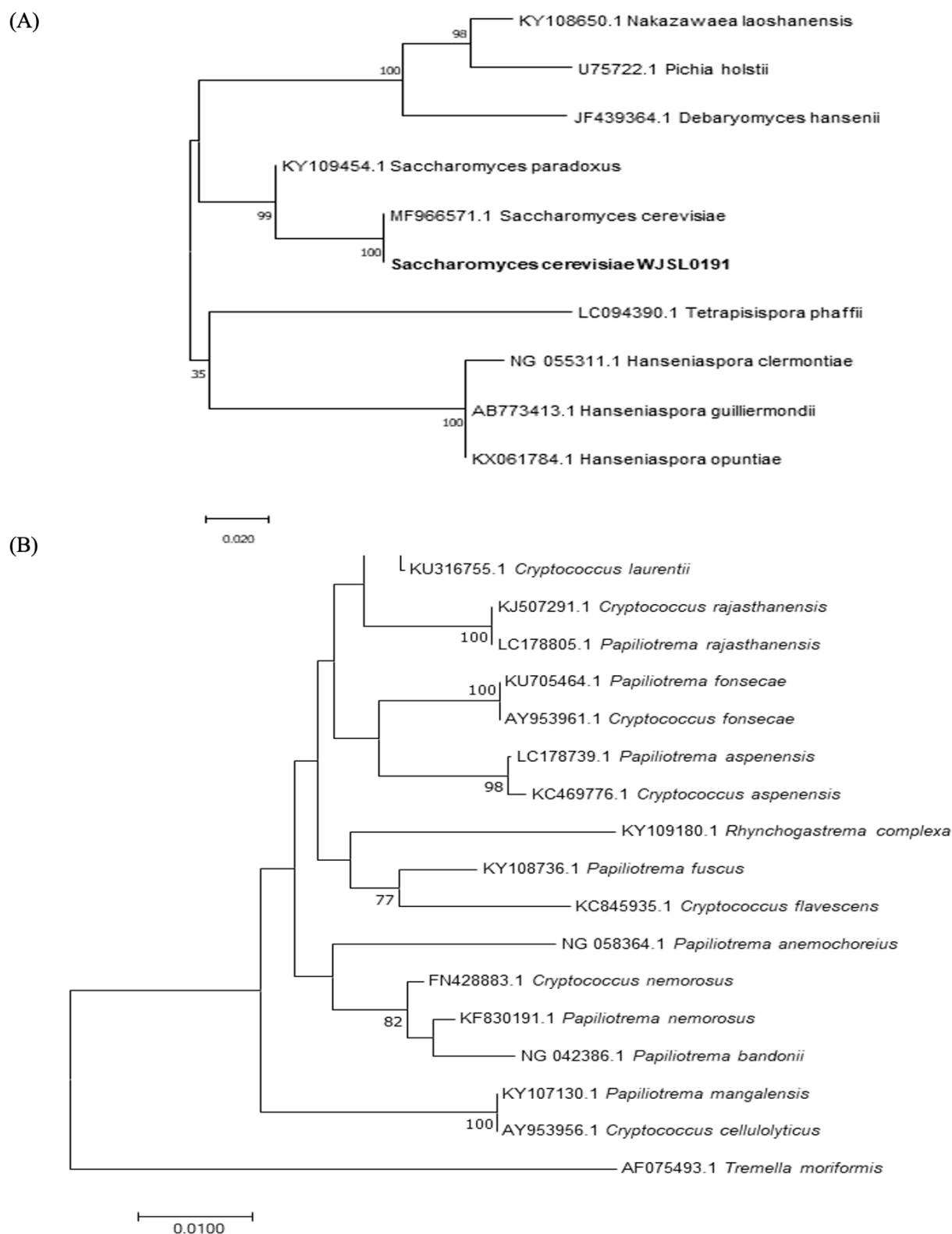


Fig. 1. Phylogenetic tree of the tyrosinase inhibitor – producing wild yeasts, based on the nucleotide sequences of large subunit 26S ribosomal DNA D1/D2 region. The tree was generated by the neighbor-joining method, using MrGA 7. (A) *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0191, (B) *Papiliotrema laurentii* ON 30. (bold type font; selected yeast)

한편, 이들 2종류의 미기록 균주들의 당 자화성을 조사한 결과 *S. cerevisiae* WJSL0191는 glucose, galactose, fructose, maltose, sucrose, mannose, raffinose, cellulose, 전분등을 자화 시켰고 glucose, galactose, maltose등을 발효시켰다(Table 3). 그러나, *P. laurentii* ON 30는 glucose와 maltose만을 자화 시켰고 시험에 사용한 모든 당들을 발효시키지 못하였다.

주름생성 억제와 피부 노화 관련 생리활성

Tyrosinase 저해물질 생산 우수 야생효모들의 주름생성 억제와 피부 노화관련 생리활성으로 elastase와 collagenase 저해활성들과 항산화 활성, SOD 유사 활성 등을 측정하였다(Table 3).

주름생성 원인이 되는 elastase에 대한 저해활성은 *S. cerevisiae* WJSL0191이 26.2%로 비교적 높았고 *P. laurentii* ON30도 18.6%를 보였다. 또한 SOD 유사 활성은 *S. cerevisiae* WJSL0191이 10.2%를 보였을 뿐, collagenase 저해활성과 항산화 활성들은 없거나 10% 미만의 낮은 활성을 보였다.

한편, elastase 저해활성이 우수했던 *S. cerevisiae* WJSL0191 균주의 elastase 저해물질 생산 최적 배양 시간의 영향을 조사한 결과 배양 48시간에 30.0%, 72시간에 32.4%를 보였다(data not shown).

Tyrosinase 저해물질 생산 조건

배양온도의 영향, 위와 같이 Tyrosinase 저해활성 우수 균주로 최종 선발한 *S. cerevisiae* WJSL0191와 *P. laurentii* ON 30들을 YPD 배지에 접종하여 15°C에서 40°C까지 일정온도에서 24시간 배양한 후 균 생육과 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 두 균 모두 생육은 20°C와 30°C에서 매우 좋았고 특히 *S. cerevisiae* WJSL0191는 40°C에서도 비교적 생육이 양호하였다(Fig. 2). Tyrosinase 저해활성은 *S. cerevisiae* WJSL0191 균주가 30°C에서 배양하였을 때 34.0%로 가장 높았고 20°C에서도 21%를 보인 반면에 *P. laurentii* ON30는 20°C에서 가장 높았고(32.6%), 30°C 배양에서는 26%를 보였다. 15°C배양에서는 각각 11%와 8.0%, 40°C 배양에서는 13%와 2.3%로 매우 낮았다(Fig. 2).

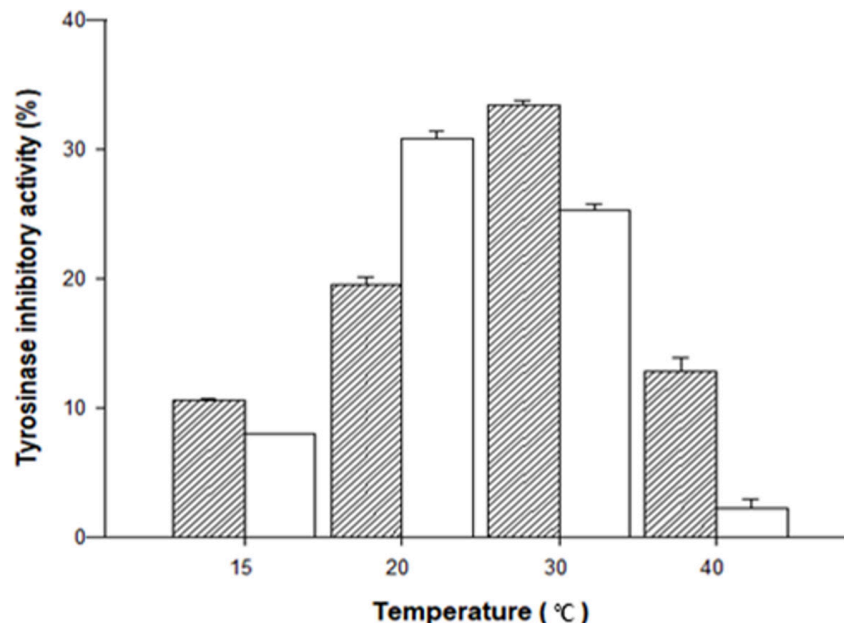


Fig. 2. Effect of cultural temperature on the tyrosinase inhibitory activities of *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0191 (▨) and *Papiliotrema laurentii* ON30 (□).

배양시간의 영향, 우수 균주로 선발한 야생효모, *S. cerevisiae* WJSL0191의 균 생육과 tyrosinase 저해활성에 미치는 배양시간의 영향을 조사한 결과 Fig. 3과 같다. Tyrosinase 저해활성은 배양시간이 길어짐에 따라 증가하여 균 생육이 대수기 말기인 배양 48시간에 약 63.5%를 보였고 균 생육이 정지기에 들어가는 배양 72시간에 tyrosinase 저해활성이 96.1%로 크게 증가하여 최고 저해활성을 보인 후 배양 96시간에 약간 감소하는 경향이었다.

또한, *P. laurentii* ON30의 배양시간에 따른 균 생육과 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 배양 12시간 후 대수기 중기부터 tyrosinase 저해활성이 20.6%로 급격히 증가한 후 배양 24시간에 30.4%로 최고에 달한 후 48시간까지 점점 낮아지는 경향이었다(Fig. 3).

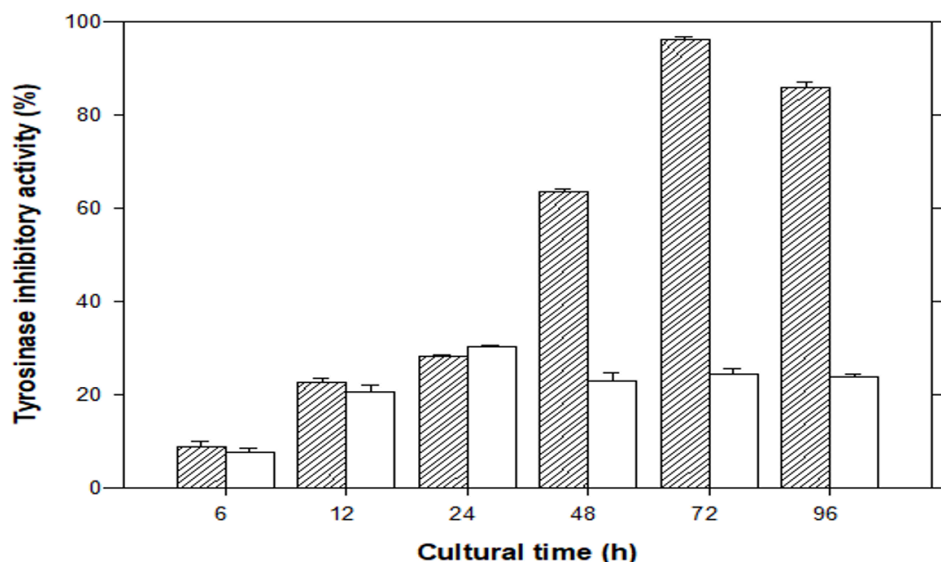


Fig. 3. Effect of cultural time on the tyrosinase inhibitory activities of *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0191 (▨) and *Papiliotrema laurentii* ON30 (□).

위와 같이 tyrosinase 저해물질 생산 우수 균주로 선발한 *S. cerevisiae* WJSL0191과 *P. laurentii* ON30 등의 tyrosinase 저해물질 생산 조건을 비교한 결과 두 균주 모두 tyrosinase 저해물질 생산에 제일 적합한 배지는 YPD 배지이었고 배양온도는 20°C~30°C에서 제일 좋았다. 그러나 *P. laurentii* ON30은 최적 배양시간이 24시간으로 매우 짧은 반면에 tyrosinase 저해활성은 30.4%로 낮았고 *S. cerevisiae* WJSL0191은 tyrosinase 저해활성이 96.1%로 높은 반면에 배양시간이 72시간으로 비교적 길었다.

최종적으로 경제성과 산업적 응용성등을 고려했을 때 *S. cerevisiae* WJSL0191 균주가 *P. laurentii* ON30보다 비록 배양시간이 48시간 길었지만 tyrosinase 저해활성이 3배 이상 높아 tyrosinase 저해물질 대량생산을 통한 산업적 응용에 더 적합한 것으로 사료된다.

적요

본 연구는 야생효모로부터 미백성 tyrosinase 저해 물질을 생산하여 기능성 화장품 생산에 응용할 목적으로 실시되었다. 이를 위해 대전광역시 3대 하천과 충남 금산의 향신료 재배지의 주변 토양들과 부식물 등에서 분리한 비병원성 효모들의 tyrosinase 저해활성을 측정하여 우수 균주들을 선발하여 이들의 균학적 특성과 tyrosinase 저해제 생산 조건을 조사하였다. 먼저 대전시 하천에서 분리한 야생효모들 중에서는 *S. cerevisiae* WJSL0191의 무세포추출물이 가장 높은 33.2%의 tyrosinase 저해활성을 보였고 금산 향신료 재배지에서 분리한 효모들 중에서는 *P. laurentii* ON30가 27.3%로 가장 높은 활성을 보여 이들 두 효모들을 우수균주들로 최종 선발하였다. 선발균주 모두 자낭포자를 형성하였으나 의균사를 형성하지 않았고 YPD 배지와 비타민을 첨가하지 않은 YPD 배지에서 잘 생육하였다. 특히 *S. cerevisiae* WJSL0191은 20% 포도당을 함유한 YPD 배지와 15% NaC을 함유한 YPD 배지에서 잘 생육하는 내당성과 호염성을 보였다. *S. cerevisiae* WJSL0191과 *P. laurentii* ON30의 주름생성 억제에 관련된 elastase 저해 활성은 각각 26.2, 18.6%를 보였고 노화 억제관련 SOD유사활성은 각각 10.2%와 3.7%로 나타내었다. *S. cerevisiae* WJSL0191의 tyrosinase 저해물질의 최적 생산 조건은 30°C에서 72시간동안 YPD 배지에서 배양하였을 때 최고 96.1%의 저해활성을 보였고, *P. laurentii* ON30은 YPD 배지로 20°C에서 24시간 배양하였을 때 30.4%의 최고 저해활성을 나타내었다.

REFERENCES

1. Yang ES, Hwang JS, Choi HC, Hong RH, Kang SM. The effect of genistein on melanin synthesis and in vivo whitening. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2008;36:72-81.
2. Kim YE, Yeo MA, Han JH, Lee MJ, Jung SK, Jeong HA, Kim SH, Lee JE. *Aureobasidium pullulans* ferment of black tea for anti-oxidation, whitening and anti-wrinkle effects. *J Soc Cosmet Sci Korean* 2017;43:265-71.
3. Lee JS, Yi SH, Kwon SH, Ahn C, Yoo JY. Isolation identification and cultural conditions of yeasts from traditional Meju. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25:435-41.
4. Lee JS, Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional Meju. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 1997;25:448-53.
5. Jeong SC, Lee DH, Lee JS. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:1904-11.
6. Kim JH, Kim NM, Lee JS. Physiological characteristics and ethanol fermentation of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* OE-16 from traditional Meju. *Kor J Food Nutr* 1999;12:490-5.
7. Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. Characterization of antihypertensive angiotensin I - converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 2004;14:1318-23.
8. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antidementia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbiol Technol* 2007;42:83-8.
9. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiol* 2008;36:102-5.

10. Jeong SC, Kim JH, Kim NM, Lee JS. Production of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Malassezia pachydermatis* G-14. *Mycobiol* 2005;33:142-6.
11. Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor J Mycol* 2012;40:60-4.
12. Jang IT, Kim YH, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. *Kor J Mycol* 2011;39:227-8.
13. Lee JS, Hyun KW, Jeong SC, Kim JH, Choi YJ, Miguez CB. Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and physiological activities. *Can J Microbiol* 2004;50:489-92.
14. Han SM, Hyun SH, Kim NM, Lee JS. Antioxidant activity and inhibitory activities of xanthine oxidase and tyrosinase of yeasts from wild flowers in Korea. *Kor J Mycol* 2015;43:99-103.
15. Kim JY, Han SM, Lee JS. Isolation and tyrosinase inhibitory activity of wild yeasts obtained from soil in the fields of medicinal plants, ginseng and Korean angelica. *Kor J Mycol* 2018;46:315-23.
16. Han SM, Lee SY, Kim HK, Lee JS. Isolation and diversity of wild yeasts from the waters and bank soils of Daejeoncheon, Gapcheon, and Yudeungcheon in Daejeon metropolitan city, Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:259-69.
17. Hyun SH, Mun HY, Lee HB, Lee JS. Isolation of yeasts from wild flowers in Gyeonggi-do province and Jeju island in Korea and the production of anti-gout xanthine oxidase inhibitor. *Kor J Microbiol Biotechnol* 2013;41:383-90.
18. Han SM, Hyun SH, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers in Deogyu mountain and their physiological functionalities. *Kor J Mycol* 2015;43:47-52.
19. Yu HE, Leaniza MMP, Bae YJ, Lee DH, Park JS, Kwak HS, Kim HK, Lee JS. Screening and extraction condition of antiaging bioactive substances from medicinal plants. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 2005;34:1136-42.
20. Jeong YU, Park YJ. Studies on antioxidant, anti-inflammation, and collagenase inhibitory effects of extracts from plants of the *Salix* genus. *Kor J Soc Cosmet* 2018;44:335-41.
21. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469-74.
22. Lee JS, Choi YJ, Kwon SJ, Yoo JY, Chung DH. Screening and characterization of osmotolerant and gas-producing yeasts from traditional Doenjang and Kochujang. *Food Biotechnol* 1996;5:54-8.
23. Kim HK, Kim JY, Han SM, Kim CM, Lee JS. Microbiological characteristics and physiological functionalities of unrecorded wild yeast strains in the soils of Hajodae and Gyungpodae Beaches in Korea. *Kor J Mycol* 2019;47:249-58.
24. Sarkar S, Chakravorty S, Mukherjee A, Bhattacharya D, Bhattacharya S, Gachhui R. De novo RNA-Seq based transcriptome analysis of *Papiliotrema laurentii* strain RY1 under nitrogen starvation. *Gene* 2018;645:146-56.
25. Wang G, Liu L, Liang W. Single cell oil production from hydrolysates of inulin by a newly isolated yeast *Papiliotrema laurentii* AM113 for biodiesel making. *Appl Biochem Biotechnol* 2018;184:168-81.
26. Kumar S, Stecher G, Li M. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547-9.