



멜라닌 생합성 억제물질의 탐색 (I)

Screening of Melanin Biosynthesis Inhibitors (I)

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처



제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “멜라닌생합성억제물질탐색” 과제의 1차년도 보고서로 제출합니다.

1993 . 8 . 31

주관연구기관 : 유 전 공 학 연 구 소

연구책임자 : 서 영 배 (선임연구원)

연 구 원 : 고 영 희 (책임연구원)

전 효 곤 (선임연구원)

이 충 환 (연 구 원)

정 명 철 (연 구 원)

이 페이지는

이로 읽히다

요 약 문

I. 제 목

멜라닌 생합성억제물질의 탐색(I)

II. 연구개발의 목적 및 중요성

생명공학 기술보호주의, 물질특허개발, UR 등과 같은 국내산업경제에 막대한 영향을 미칠 선진국의 압력이 증가하고 있으므로 우리나라에서도 이에 대응하여 독창적인 생명공학기술개발, 신물질창출과 농업생산성증대에 노력을 배가하지 않으면 안된다. 멜라닌은 동물, 식물, 미생물에서 발견되는 검은 색소로 인체에 기미, 주근깨 같은 이상혹변을 초래하는 원인물질이며 특히 암세포(melanoma)에서 환경인자에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질이고 식물병원성 곰팡이의 식물체 침투에 관여하는 물질이다. 그러므로 멜라닌 생합성 억제물질을 탐색하는 것은 항암활성, 미백효과활성, 면역증강활성, 항균활성이 있을 것으로 예상되는 신규의 생리활성물질개발 및 멜라닌 생합성 기작규명에 있어서 중요한 연구과제일 것이다.

본 연구에서는 항암제, 면역조절제, 의료 및 농업용항생제, 미백효과제로 산업적 이용성이 다양한 melanin 생합성 억제물질을 탐색하고 이를 유용물질로서의 이용성을 검토하여 의약품 또는 농약의 기초물질로 개발하고자 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 멜라닌생합성억제물질 생산균주의 선별

방선균주, 식물의 MeOH 추출물을 대상으로 하여 tyrosinase 저해물질과 멜라닌생합성억제물질의 생산 및 존재여부를 확인하여 선별한다.

2. 멜라닌생합성억제물질의 분리

일차선정된 균주 배양액의 용매추출성이나 resin의 선택성 등을 이용한 활성추적분리법에 따라 순수화합물로 분리한다.

3. 멜라닌생합성억제물질의 물리화학적 특성

순수분리된 물질의 물리화학적 특성을 알기 위하여 기기분석을 행한다.

4. 멜라닌생합성억제물질의 구조동정

기기분석 data를 기초로 하여 구조를 동정한다.

IV. 연구의 결과 및 활용방안

1. 멜라닌생합성억제물질생산 균주의 선별

Tyrosinase 저해제생산균주를 1,000여개의 방선균으로부터 스크리닝하여 최종적으로 20727 과 20747 균주를 선별하였고, 멜라닌생합성억제물질 (*S. bikiniensis* melanin)은 세균 60여종, 곰팡이 100종, 방선균 1400여종에서 스크리닝하여 21011, 30240, 30277, 30408 균주를 선별하였으며, 식물에서는 쉰싸리와 팥을 선별하였다. DHN 멜라닌생성억제하는 균주로 ARa 27 균주를 선별하였다.

2. 멜라닌생합성억제물질의 분리

선별된 균주의 배양액에서 활성성분을 유기용매로 추출하여 Silicagel, Sephadex LH-20, HPLC에 의하여 순수하게 분리정제하였다.

3. 멜라닌생합성억제물질의 물리화학적 특성

분리정제된 물질을 UV spectrum, H-NMR, C-NMR, EI-mass 등의 기기분석결과 20727 과 20747 이 생성하는 물질은 isoflavonoid 계의 물질이었다.

4. 멜라닌생합성억제물질의 구조동정

기기분석 data를 기초로 하여 구조를 동정하여 본 결과 20727균주가 생성하는 물질은 genistein이고 20747균주가 생성하는 물질은 genistein-7-rhamnoside, daidzein, daidzein 7-rhamnoside 이었다.

이 페이지는

여러 일이다.

S U M M A R Y

Melanins are polymeric pigments found in a wide range of organisms. These pigments are involved in localized hyper-pigmentation in human. Melanisation of the appressoria appears essential for surface penetration of some pathogenic fungi into host plants. Thus, melanin biosynthesis inhibitors could be used for the treatment of localized hyper-pigmentation in human such as lentigo, nevus, ephelis, post-inflammatory state and melanoma of pregnancy. Synergistic effect of melanin biosynthesis inhibitor on the treatment of cancer, especially melanoma, could be expected by providing it for cancer patients who were treated by chemotherapy and radiation therapy. The inhibitors of fungal melanin biosynthesis are expected to be a new class of fungicide that prevent direct penetration of plant tissues by inhibiting melanin biosynthesis in appressorial cells.

In this study, melanin biosynthesis inhibitors were screened by several screening methods, such as tyrosinase inhibition, *Streptomyces bikiniensis* melanin biosynthesis inhibition and DHN melanin biosynthesis inhibition, for development of bioactive compounds having anticancer, immunopotential, hyper-pigmentation prevention, and antifungal

activity.

Three isoflavonoids with tyrosinase-inhibiting activity were isolated from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. 20747. Their structures were established by UV, EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR to be daidzein, daidzein 7-rhamnoside, and genistein-7-rhamnoside which were competitive with substrate and had IC₅₀ value of 14, 19 and 16 μg/ml, respectively, to mushroom tyrosinase. Genistein produced by *Streptomyces* sp. 20727 also inhibited tyrosinase. But these isoflavonoids did not inhibit melanin production of *Streptomyces bikiniensis*.

Strain 21011, 30240, 30277, and 30405 were selected on the basis of inhibiting melanin production of *S. bikiniensis*. All of them however did not inhibit tyrosinase. Methanol extract of red bean also inhibit *S. bikiniensis* melanin biosynthesis and its active principle was assumed to be 4-hydroxy benzyl aldehyde. DHN melanin inhibitor was produced by strain ARA 27 and its purification are now in progress.

목 차

제 1 장	서 론	13
제 2 장	실험재료 및 방법	17
제 1 절	실험 재 료	17
제 2 절	실험 방 법	17
1.	사용기기	17
2.	사용균주	17
3.	저해제의 생산	18
4.	Tyrosinase 역가 측정	18
5.	<i>Streptomyces bikiniensis</i> melanin의 생성 저해	19
제 3 장	결과 및 고찰	21
제 1 절	Tyrosinase 저해제의 탐색	21
1.	Tyrosinase 저해제 생산균주의 선별	21
제 2 절	<i>Streptomyces</i> sp. 20727이 생산하는 저해제의 분리정제 및 특성	21
제 3 절	<i>Streptomyces</i> sp. 20747이 생산하는 저해제	25
1.	분리정제	25
2.	UV흡수 spectrum	26
3.	Mass spectrum	28
4.	¹ H-NMR spectrum	28
5.	¹³ C-NMR spectrum	28
6.	IC ₅₀ 값과 저해양상	32
7.	발효측정	34

제 4절	<i>Streptomyces bikiniensis</i> melanin에 대한 저해제의	
	탐색	36
1.	미생물로 부터의 탐색	36
2.	식물 성분으로 부터의 탐색	37
3.	팔오로 부터의 저해물질의 분리	37
제 5절	DHN melanin 억제물질의 분리	40
참 고 문 헌	41

C O N T E N T S

Chapter 1 . Introduction	13
Chapter 2 . Materials and Methods	17
Section 1 . Materials	17
Section 2 . Methods	17
1 . Instruments	17
2 . Microorganisms	17
3 . Production of inhibitor	18
4 . Assay of tyrosinase activity	18
5 . Assay of inhibitory activity of <i>Streptomyces</i> <i>bikiniensis</i> melanin	19
Chapter 3 . Results and Discussion	21
Section 1 . Screening of tyrosinase inhibitors	21
1 . Screening of microorganism producing tyrosinase inhibitors	21
Section 2 . Purification and properties of inhibitor produced by <i>Streptomyces</i> sp.20727	21
Section 3 . Purification and properties of inhibitor produced by <i>Streptomyces</i> sp.20747	25
1 . Purification	25
2 . UV absorption spectrum	26
3 . Mass spectrum	28

4. ^1H -NMR spectrum	28
5. ^{13}C -NMR spectrum	28
6. IC_{50} value and inhibition pattern	32
7. Fermentation characteristics	34
Section 4. Screening of inhibitors for <i>Streptomyces</i>	
<i>bikiniensis</i> melanin	36
1. Screening from microorganisms	36
2. Screening from herbs	37
3. Purification of melanin inhibitor from red bean	37
Section 5. Purification of DHN melanin	
inhibitors	40

제 1 장 서 론

Melanin은 동물, 식물, 미생물 등에서 발견되는 검은 색소로 생육이나 발달에 필수적이진 않지만 어떤 환경에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질이며, 특히 동물에서의 melanin은 피부병과 악성 melanomas와 관계가 있으며, tyrosinase에 의해 tyrosine으로 부터 생산되는 DOPA melanin외에 DHN melanin, GDHB melanin, Catechol melanin 등이 보고되고 있다.¹⁾

Tyrosinase (monophenol, dihydroxy-L-phenylalanin:oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 구리를 함유한 효소로 Fig.1과 같이 melanin 합성의 초기단계인 L-tyrosine에서 L-3,4-dihydroxy-phenylalanin (DOPA) (cresolase activity), DOPA에서 L-dopa-quinone으로의 전이(catecholase activity)에 작용한다.^{2~4)}

Tyrosinase를 저해 함으로써 DOPA melanin 합성을 초기단계에서 억제하고자 tyrosinase inhibitor에 관한 연구가 진행되어 왔으며, 최근 까지 benzoic acid⁵⁾, *Albartrellus confluens*가 생산하는 neogri-folin, grifolin⁶⁾ 외에 많은 물질이 보고되었다. 이중 kojic acid는 미백 효과제로 사용되며, 4-hydroxyanisole, hydroxyquinone 등은 인체의 hyper-pigmentation 치료에 사용되고 있으며, 4-hydroxy anisole은 melanoma cell의 증식억제에 효과가 있고 malignant melanoma 치료에도 사용이 시도되고 있으나, cytotoxicity를 나타내는 것으로 알려졌다.^{7,8)} 또한 항암제인 retinoic acid, 면역 조절제인 FR 900490, 항생물질인 feldamycin이 tyrosinase 유도를 억제한다고 밝혀졌으며, 1991년에는 tyrosinase를 저해하지 않지만 melanin 합성을 억

제하는 물질을 탐색하는 과정에서 방선균으로부터 melanostatin을 발견하였다는 보고가 있었다.⁷⁾ 최근에 피부암에 대한 관심고조로 DOPA melanin 대사에 대한 연구가 활발하게 진행되어 dopachrome이 decarboxylation 되어 5,6-dihydroxy indole로 전환되는 경로외에 dopachrome tautomerase라는 새로운 효소에 의해 dihydroxy indole carboxylic acid로 전환되는 새로운 경로가 밝혀지는등 활발한 기초연구가 이루어지고 있다. 그러나 지금까지의 연구결과로는 안정된 치료제가 개발되지 못하였고, dopa melanin 생성경로 및 작용기작에 대해서도 연구가 진행중인 상황이다. 그러므로 독성이 적고 새로운 저해제를 탐색하는 일은 미백 효과

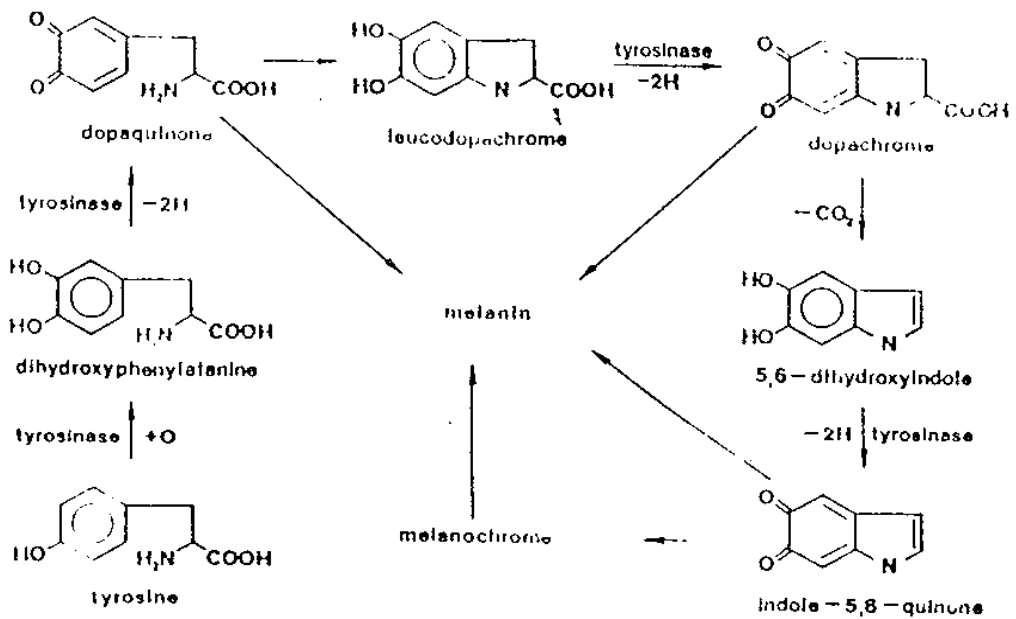


Fig.1. Biosynthesis of dihydroxyphenylalanine (DOPA) melanin from tyrosine.

제, 항 피부암제의 개발 측면에서 뿐만 아니라 melanin 작용기작 규명이 라는 면에서도 중요한 연구과제라 할 수 있다.

도열병 원인균인 *Pyricularia oryzae* 는 DHN melanin을 생합성함으로써 병원성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 melanin은 *Pyricularia oryzae*, *Pyricularia grisea*, *Colletotrichum* 등에서 appressoria에 필요한 견고성을 제공할 뿐만 아니라 penetration peg를 형성하여 식물체에 침투하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.^{1,9} Melanin 합성이 결실된 균주는 발병을 일으키지 못하며 melanin 합성 저해제인 tricyclazole을 처리했을 때 식물체내 침투가 방해받아 발병을 못하는 것으로 나타났다. 따라서 melanin 합성 저해제의 탐색은 도열병을 포함한 여러 melanin 성 식물병원균을 방제하는데 중요하다. Fig. 2에서 reductase 저해물질로는 pyroquilon(1,2,5,6-tetrahydropyrrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-one), tricyclazole(5-methyl-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3]benzothiazole), fthalide(4,5,6,7-tetrachlorophthalide), 과 chlobenthiazone(4-chloro-3-methylbenzothiazol-2(3H)-one) 등이 화학합성 되었으며¹⁰⁾ 이 중 tricyclazole은 도열병에 대한 농약으로 사용되고 있으나 독성 및 환경 문제가 야기된다. 그러므로 미생물 유래 melanin 합성 저해제의 탐색은 중요한 연구 방향이라고 생각되며 특히 이에 대한 보고가 거의 없는 점 때문에 관심이 집중되고 있다.

본 연구에서는 신규 tyrosinase inhibitor 및 dopa melanin 생성억제제를 탐색하고자 방선균, 잡초등으로 부터 탐색을 실시하였으며, 물질의 분리정제후 그 물질의 이화학적 특성을 규명하고자 하였고, DHN melanin 합성 억제제를 탐색하여 신규농약을 개발하고자 탐색 및 물질분리를 실시하였다.

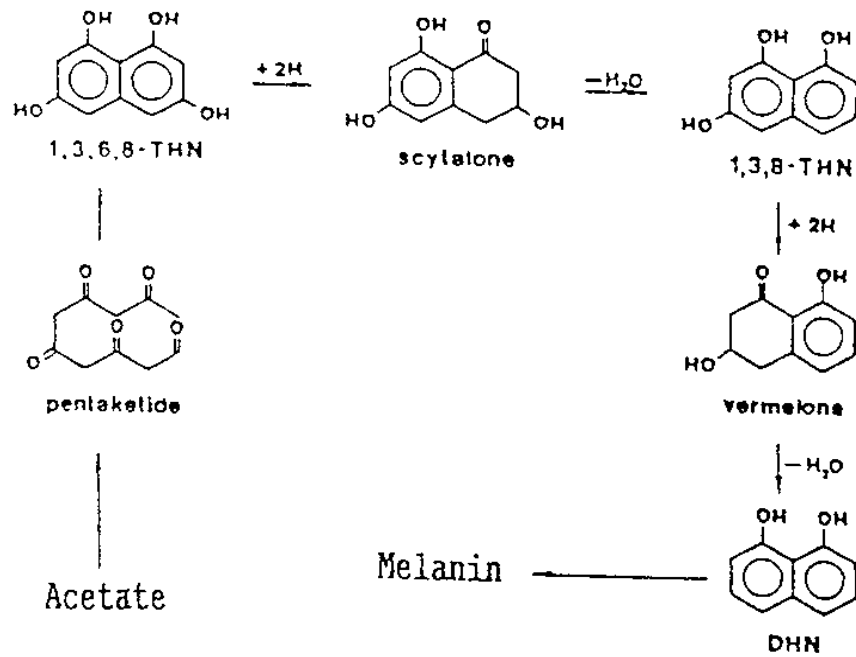


Fig. 2. Melanin biosynthetic pathway of *P. oryzae*
 $+2H$; reductase, $-H_2O$; dehydratase

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험 재료

실험에 사용한 무기염류, 일반용매는 시약특급을 사용하였고, 배양에 사용한 배지류는 주로 Difco 제품을 사용하였다. 물질분리 및 확인에 사용한 silica gel은 Merck사의 silica gel 60(63-200 μ m)를, TLC plate는 Merck TLC plate silica 60F₂₅₄를 사용하였고, HPLC column은 Merck사, sephadex LH-20과 기타 이온 교환수지는 Pharmacia 제품을 각각 사용하였다. 한편 mushroom으로부터 분리한 tyrosinase (EC 1.14.18.1)와 기질인 tyrosine은 Sigma 사로부터 구입하여 사용하였다.

제 2 절 실험 방법

1. 사 용 기 기

HPLC는 Tosoh TSK-6041 detector와 Tosoh TSK-6011 pump를, UV/Vis. spectrophotometer는 Shimadzu UV-260을 El-mass는 HEWLETT-Packard MS-Engine-5989A를 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR은 Varian UNITY 300을 사용하였다.

2. 사 용 균 주

실험에 사용한 균주는 전국의 여러 지역 토양으로부터 유전공학연구소 미생물탐색실에서 분리한 각종 방선균을 분양받아 사용하였다. 분리를 위한

배지로는 humic acid 1.0g, Na_2HPO_4 0.5g, KCl 1.7g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, CaCO_3 0.01g, B-vitamins trace, cyclohexamide 50mg을 1L의 물에 녹여 살균후 사용하였고, 보존용 배지로는 soluble starch 5.0g, glucose 5.0g, peptone 1.0g, yeast extract 1.0g, malt extract 1.0g, agar 15.0g을 물 1L에 녹여 pH 7.0으로 조절한 후 살균하여 사용하였다. 또한 *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049는 KCTC(Korean Collection For Type Culture)로 부터 분양받아 사용하였다.

3 . 저해제의 생산

선 발균주로 부터 tyrosinase inhibitor를 생산하기 위하여 soluble starch 1%, glucose 2%, yeast extract 0.4%, beef extract 0.1%, soybean meal 2.5%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.025%로 구성된 배지를 pH 7.3으로 조정하여 사용하였으며, 이 배지 6l에 2일간 배양된 종균을 2% (v/v)로 접종하여 10l의 발효조(Marubishi Co.)에서 통기량 1 vvm, 교반속도 250rpm, 28℃에서 5일간 배양하였다.

또한, isoflavonoid 생산과 soybean meal과의 상관관계를 비교하기 위하여 위의 배지에 soybean meal 2.5% 대신 corn steep liquor, casamino acid, bacto-peptone, soytone, fish meal을 각각 1.5%씩 첨가하여 500ml Δ flask에서 7일간 배양하였다.

4 . Tyrosinase 역가 측정

효소의 역가는 IC_{50} 의 경우 0.1M phosphate buffer (pH 6.5) 2.3ml, 1.5mM L-tyrosine solution 0.4ml과 2100 u/ml mushroom tyrosinase(Sigma, 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 0.1ml의 혼합

용액에 0.2ml의 sample 용액을 첨가하여 25 °C에서 10분간 반응시킨 후 470 nm에서 optical density를 측정하여 효소활성의 50%를 저해하는 sample 농도를 환산하였으며, screening 과정에서는 전체 반응용액을 200 μ l로 하여 microplate reader (Bio-Rad 3550)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해역가(%)는 저해제를 넣은 것은 반응전 흡광도(A)와 반응후 흡광도(B), 저해제를 넣지 않은 것은 반응전 흡광도(C)와 반응 후 흡광도(D)로 부터 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Percent inhibition} = \frac{(B-A)-(D-C)}{(D-C)} \times 100$$

5. *Streptomyces bikiniensis* melanin의 생성 저해

Streptomyces bikiniensis NRRL B-1049를 Papavizas' VDYA agar slant 배지 (V-8 juice 200ml, glucose 2g, yeast extract 2g, CaCO₃ 1g, agar 20g, 증류수 800 ml, pH 7.2)에서 2주간 28°C로 배양시켜 포자를 생성시킨 후 멸균수로 포자 현탁액을 만들었다. 0.2%의 yeast extract를 첨가한 ISP No.7 배지에서 포자현탁액 0.2 ml씩을 도포한 후 배지표면에 sample을 직선 paper disc를 올리고 28°C에서 48시간 배양 후 생성된 zone으로 4-hydroxyanisole을 대조구로 하여 melanin 생성 저해여부를 관찰하였다.⁷⁾

Handwritten text inside a rectangular box, possibly a signature or stamp.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 Tyrosinase 저해제의 탐색

1. Tyrosinase 저해제 생산균주의 선별

미생물 탐색실로 부터 토양에서 분리한 방선균 약 1,000 균주들의 배양액을 받아 tyrosinase에 대하여 강한 저해활성을 보이는 균주 10여 개를 선별하여 용매 추출성, 열 및 pH 안정성, 저해활성 등을 조사하였으며, 이들 중 20727 및 20747 균주를 최종 선별하여 저해제를 분리 정제한 후 그 이화학적 특성 및 구조를 규명하고자 하였다.

제 2 절 Streptomyces sp. 20727 이 생산하는 저해제의 분리정제 및 특성

배양 상등액을 농축하여 ethylacetate로 추출한 후, silica gel column chromatography에서 chloroform:methanol (10:1)의 용매로 전개시켜 얻은 활성분획을 chloroform:methanol (1:1)의 조건으로 Sephadex LH20 column chromatography를 실시하였으며, ethylacetate:hexane (2:3)의 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 얻은 활성분획을 HPLC로 최종분리 하였다.(Fig.3).

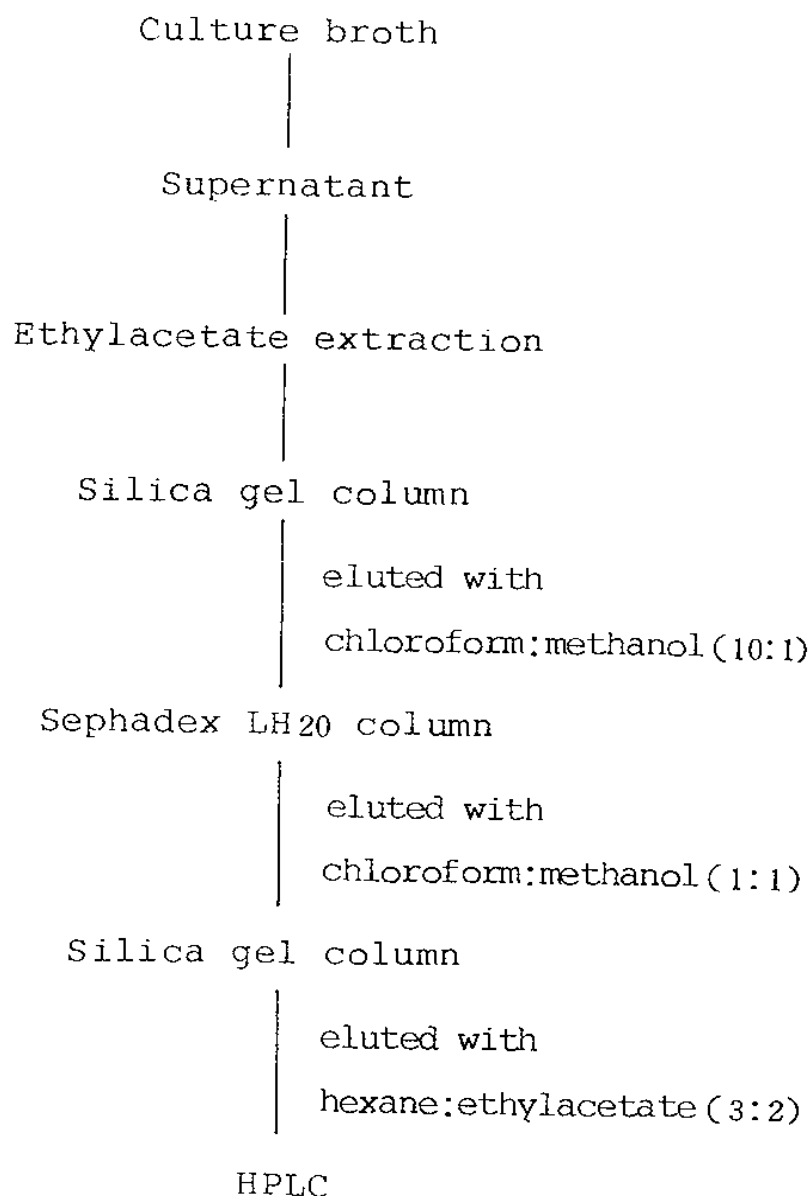


Fig. 3. Isolation of tyrosinase inhibitor from *Streptomyces* sp. 20727.

이 물질은 EI-Mass spectrum (Fig. 4)으로 보아 molecular weight는 270이며, UV흡수 spectrum의 maximum은 260nm로 나타났고 (Fig. 3), $^1\text{H-NMR}$ spectrum (300 MHz, CD_3OD) 결과 (Fig. 4) δ 8.10 (1H, s), 7.14 (2H, d, $J=7.1\text{Hz}$) 6.89 (2H, d, $J=7.1\text{Hz}$), 6.39 (1H, s),

6.27(1H, s)의 peak를 보여, 이 물질의 구조를 genistein으로 추정하였다.

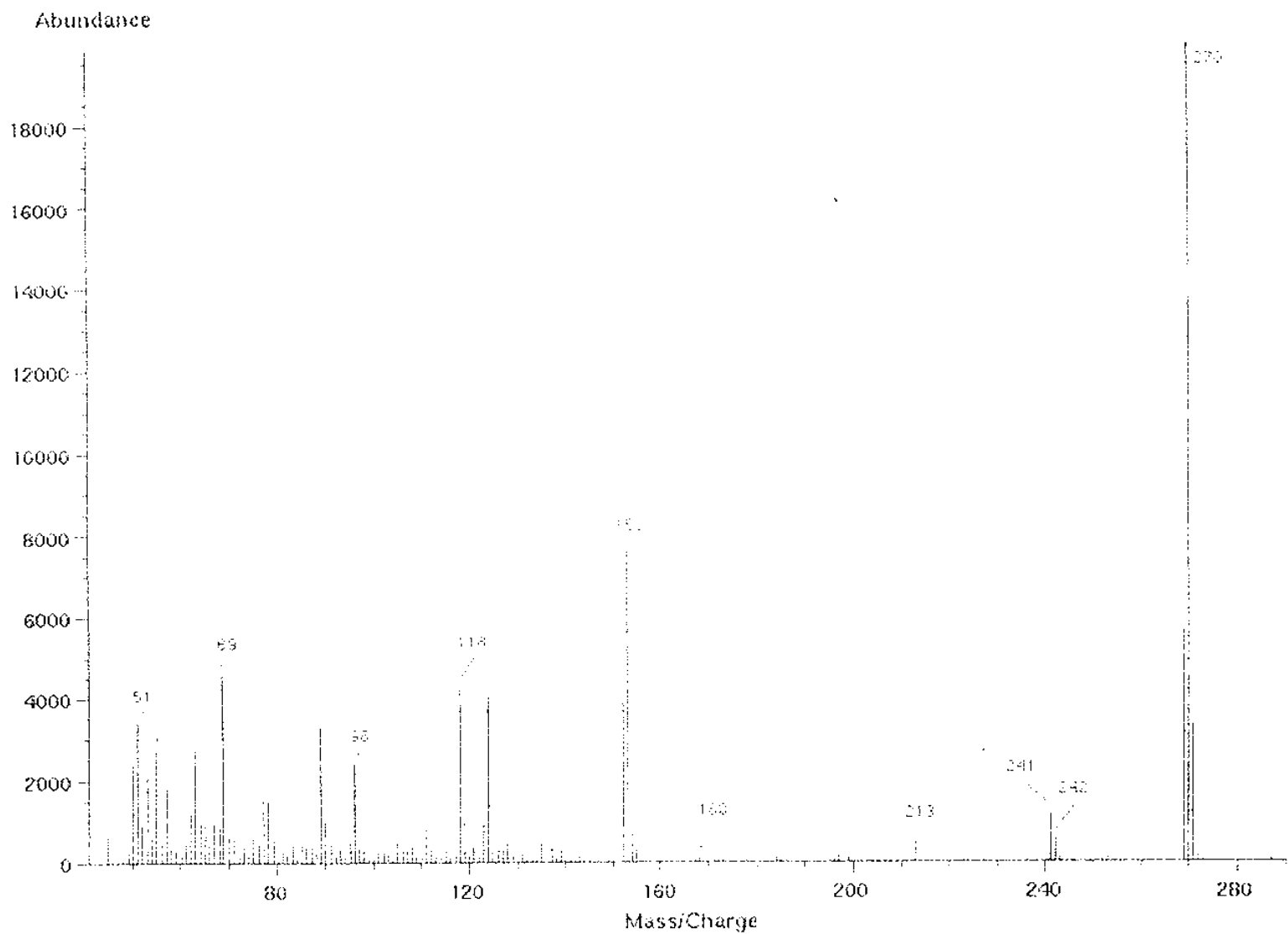


Fig. 4. El-mass spectrum of genistein produced by *Streptomyces* sp. 20727.

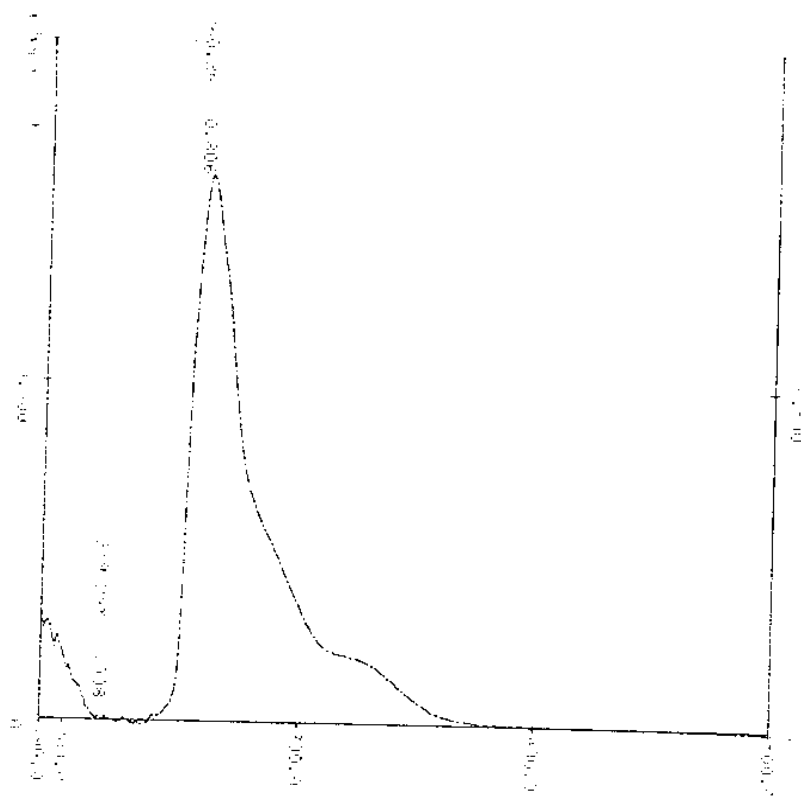


Fig. 5. UV spectrum of genistein produced by *Streptomyces* sp. 20727.

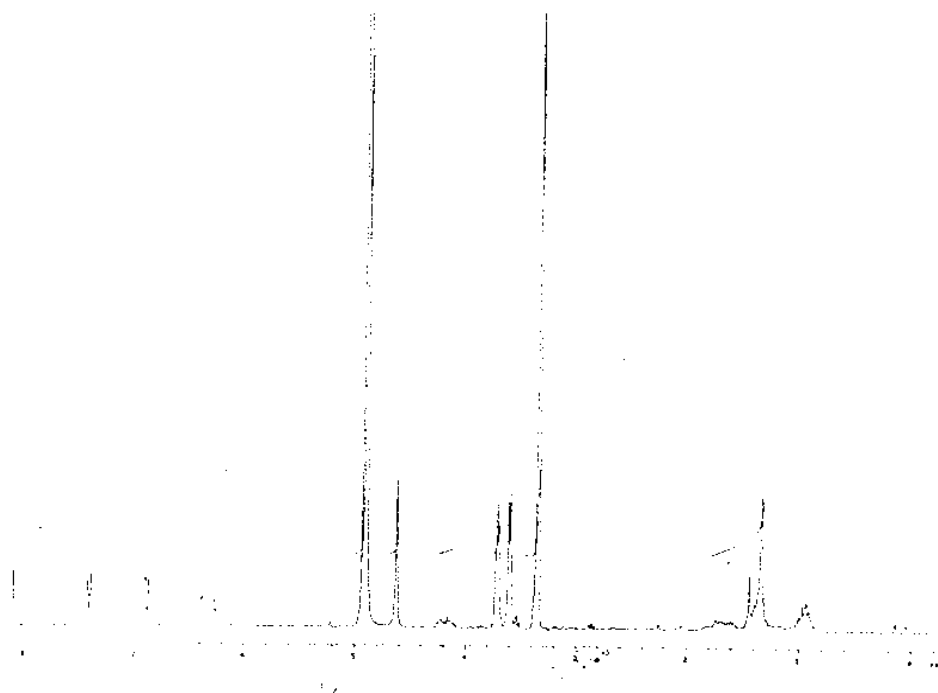


Fig. 6. ¹H-NMR spectrum of genistein produced by *Streptomyces* sp. 20727.

제 3 절 Streptomyces sp.20747 이 생산하는 저해제

1. 분 리 정 제

Fig. 7와 같이 배양상등액을 Dialon HP 20 column에 흡착시킨 후, 증류수, methanol, 30% acetone / 증류수 (v/v)로 수세한 후 60% acetone / 증류수 (v/v)로 용출시켜 얻은 활성분획을 농축한 후 물에 녹여 ethylacetate로 추출하였다. 이를 silica gel (Merck) column chromatography에서 chloroform:methanol (15:1)의 용매로 전개시켜 Fr.

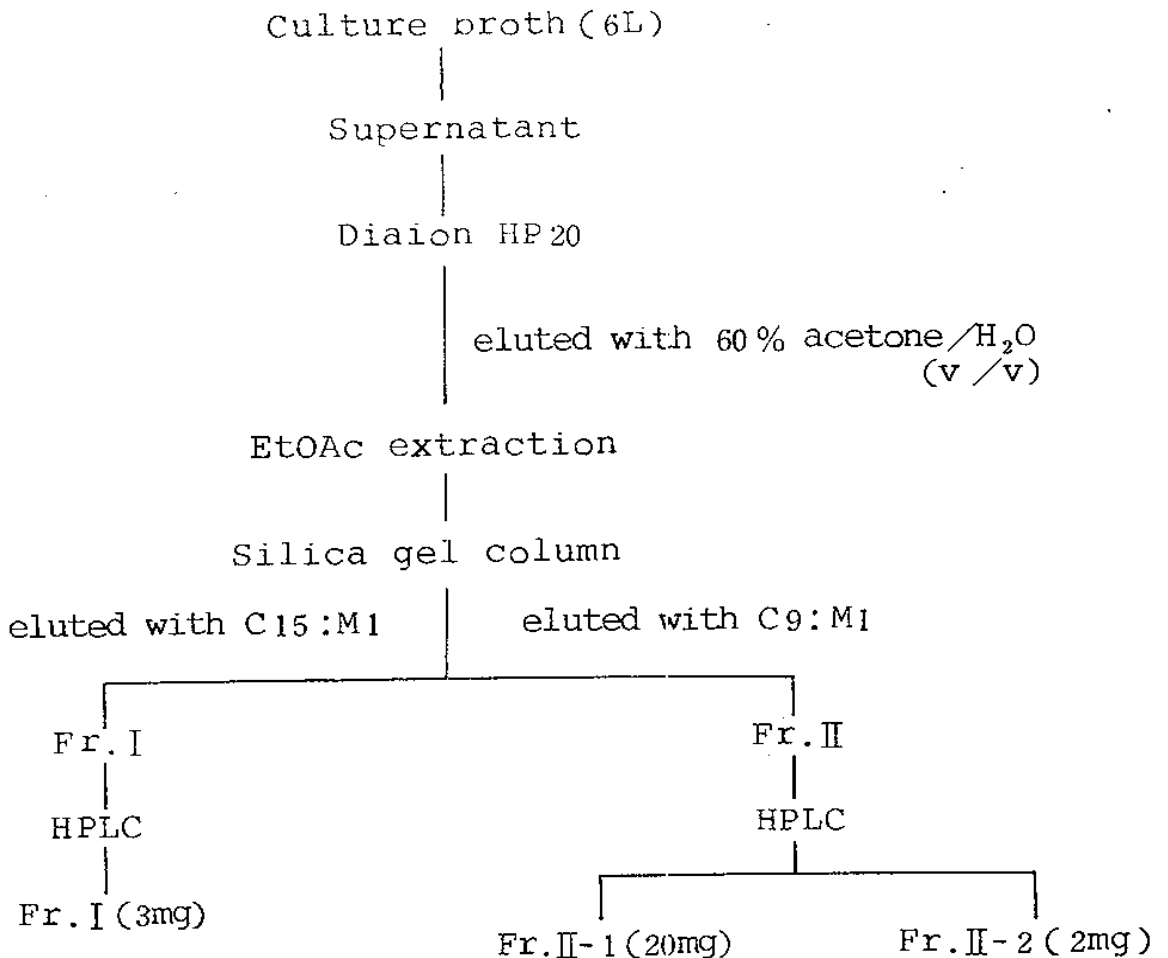


Fig. 7. Isolation of tyrosinase inhibitors from *Streptomyces* sp. 20747.

C:Chloroform M:Methanol

I을 얻었으며 chloroform:methanol (9:1)의 용매 조건으로 전개시켜 Fr.Ⅱ를 얻었다. Fr.Ⅰ은 HPLC로 정제하여 최종적으로 3mg의 활성물질을 얻었으며, Fr.Ⅱ는 HPLC를 사용하여 Fr.Ⅱ-1(20mg)과 Fr.Ⅱ-2(2mg)로 분리하였다. 이때 사용한 HPLC column은 LiChrosorb RP-18 (7 μm) 250 × 7 mm, 용매는 30% acetonitrile / 증류수 (v/v), 유속은 2ml/min, 흡수파장은 254nm로 하여 흡수 peak를 분취한 뒤 각 peak의 활성유무를 조사하였다.

2. UV 흡수 spectrum

분리 정제된 3가지 물질의 UV 흡수 spectrum은 Fig. 8-9과 같으며, peak의 shift는 Table 1과 같다. Fr.Ⅰ은 MeOH에서 최대 파장이 248이었고, NaOAc와 NaOH에서 shift가 일어났으며, Fr.Ⅱ-1은 MeOH에서 261이던 것이 NaOH에서 shift가 있었고, Fr.Ⅱ-2는 AlCl₃와 NaOH에서 shift가 있었다.

이 결과는 전형적인 isoflavonoid계의 UV 흡수 peak와 일치하는 것으로 Fr.Ⅰ, Fr.Ⅱ-1, Fr.Ⅱ-2의 UV pattern은 각각 daidzein, daidzein 7-rhamnoside, genistein 7-rhamnoside의 UV shift와 일치하였다.

Table 1. UV absorption maxima (nm) of isoflavonoids in methanol

Compound	None	NaOAc	AlCl ₃	NaOH
Fr.Ⅰ	248	254	248	258
Fr.Ⅱ-1	261	260	259	280
Fr.Ⅱ-2	261	261	271	268

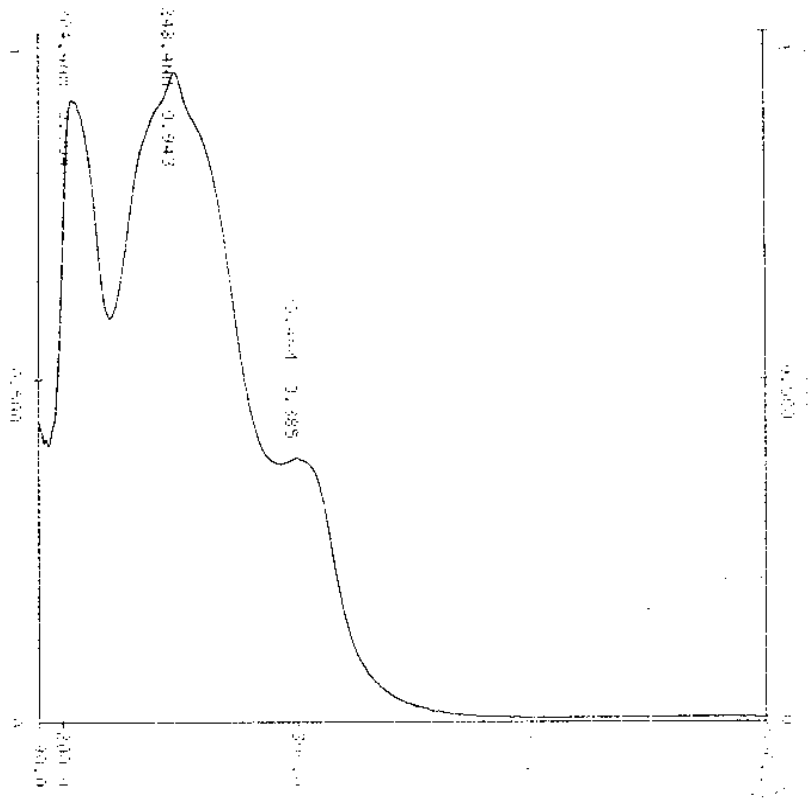


Fig. 8. UV spectrum of Fr. I produced by *Streptomyces* sp. 20747.

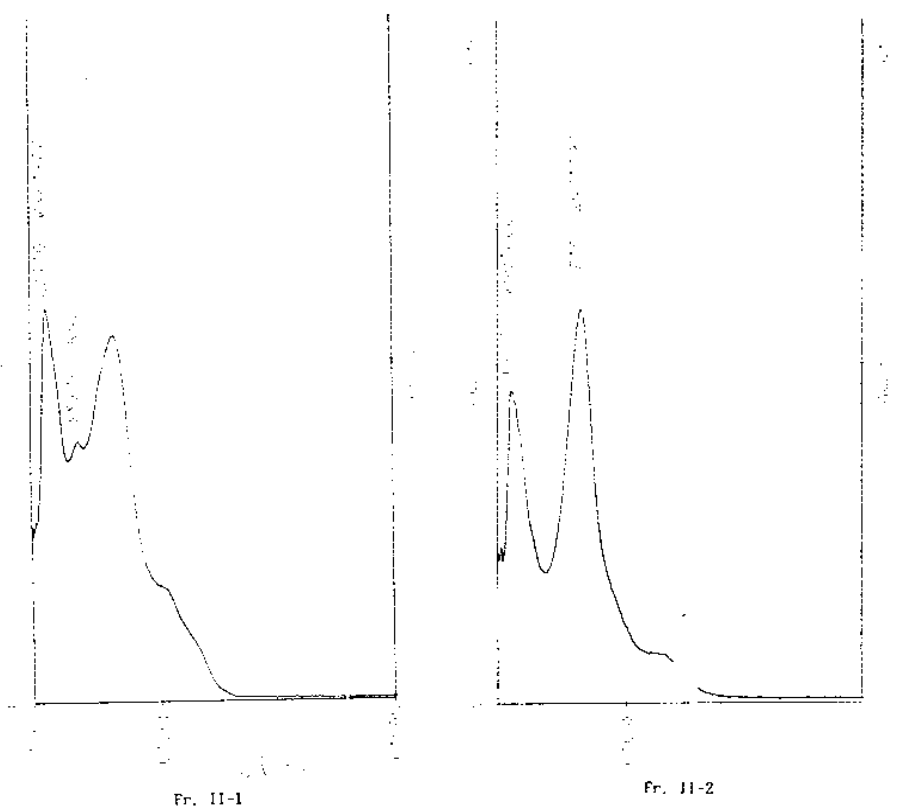


Fig. 9. UV spectrum of Fr. II-1 and Fr. II-2 produced by *Streptomyces* sp. 20747.

3. Mass spectrum

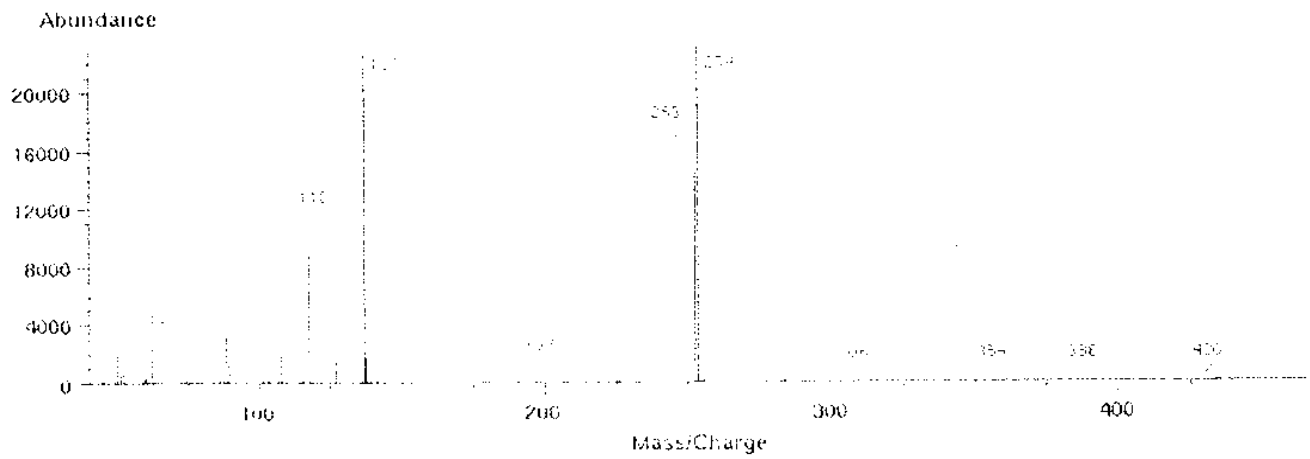
El mass spectrum 분석 결과 (Fig. 10) Fr. I, Fr. II-1, Fr. II-2의 분자량은 각각 254, 400, 416으로 밝혀졌으며 mass spectrum에 대한 data base 탐색 결과 Fr. I은 daidzein으로 추정되었고, Fr. II-1은 daidzein (MW 254)에 MW 146의 물질이 결합되어 있는 것으로 분석되었다. Fr. II-2mass의 모든 주요 peak가 Fr. II-1의 peak보다 각각 16씩 더 많은 것으로 나타나 genistein (MW 270)에 MW 146의 물질이 결합되어 있는 것으로 추정되었다.

4. ^1H -NMR spectrum

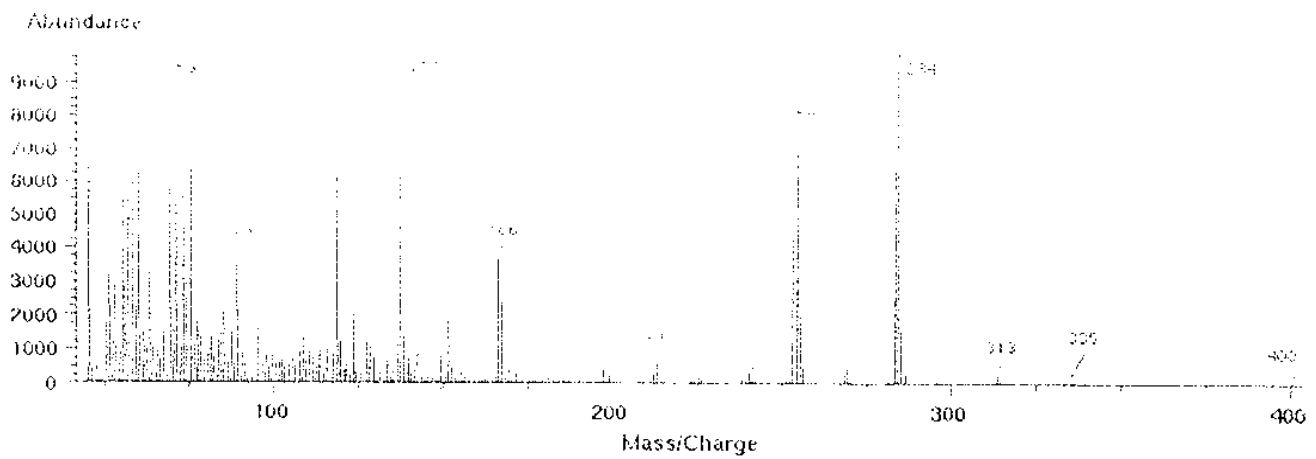
Fr. I, Fr. II-1, Fr. II-2의 ^1H -NMR spectrum (Fig 11 ~ 13)을 분석한 결과 Fr. I의 경우 daidzein의 proton 수 및 종류와 일치하였으며, Fr. II-1의 경우 daidzein의 proton peak 이외에 $\delta 5.5$ 에 broad singlet, $\delta 3 \sim 4$ 사이에 5개의 proton ($\delta 3.9, \delta 3.7, \delta 3.5, \delta 3.4, \delta 3.2$), $\delta 1.15$ (3H, doublet) 부근에 $-\text{CH}-\text{CH}_3$ 기를 가지는 6-deoxy-hexose의 proton peak를 보였으며 Fr. II-2의 경우 genistein의 proton pattern에 Fr. II-1과 동일한 당이 결합된 것으로 사료되었으며, 그 결합당은 rhamnose로 판단되었다.

5. ^{13}C -NMR spectrum

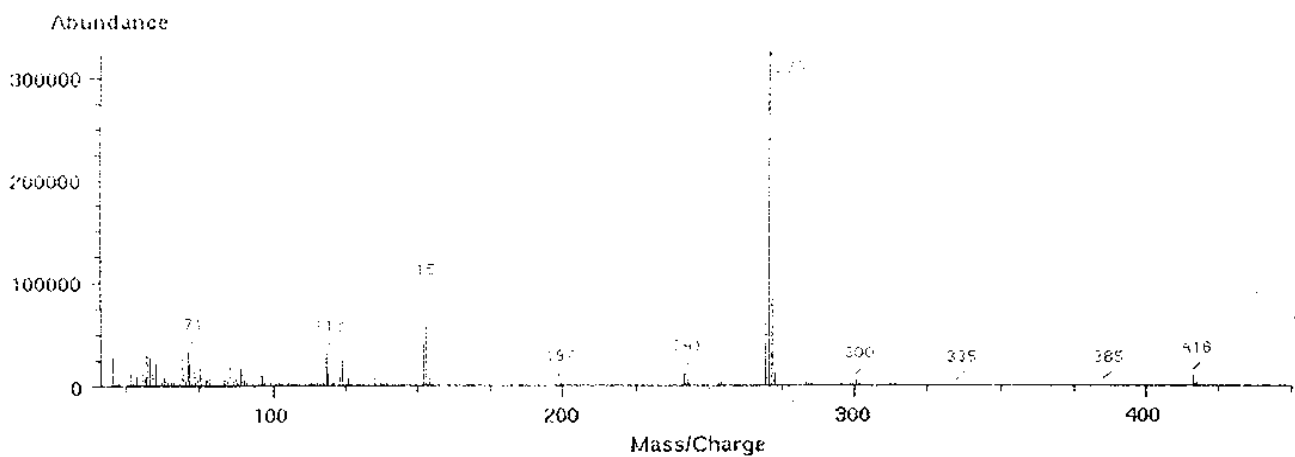
Fr. II-2의 ^{13}C -NMR (Fig. 14) 결과 genistein의 spectrum과 C⁷ 부위의 shift를 제외하고 모든 peak가 일치하였으며, rhamnose에 해당하는 6개의 carbon peak가 $\delta 78.4$ 에 1개 $\delta 72 \sim 69$ 사이에 4개



Fr. I



Fr. II-1



Fr. II-2

Fig. 10. EI-mass spectrum of isoflavonoids produced by *Streptomyces* sp. 20747.

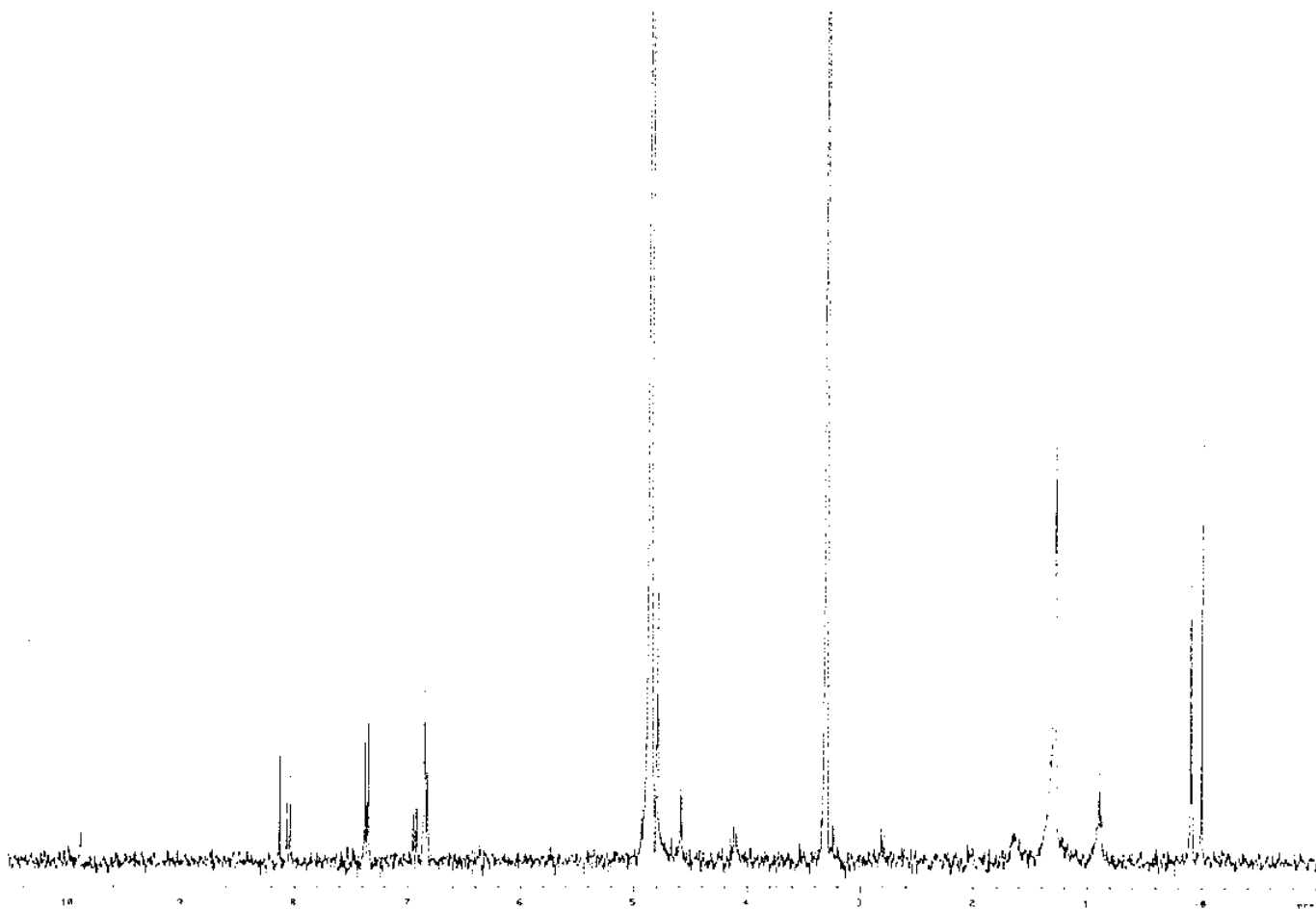


Fig. 11. ^1H -NMR spectrum of Fr. I produced by *Streptomyces* sp. 20747.

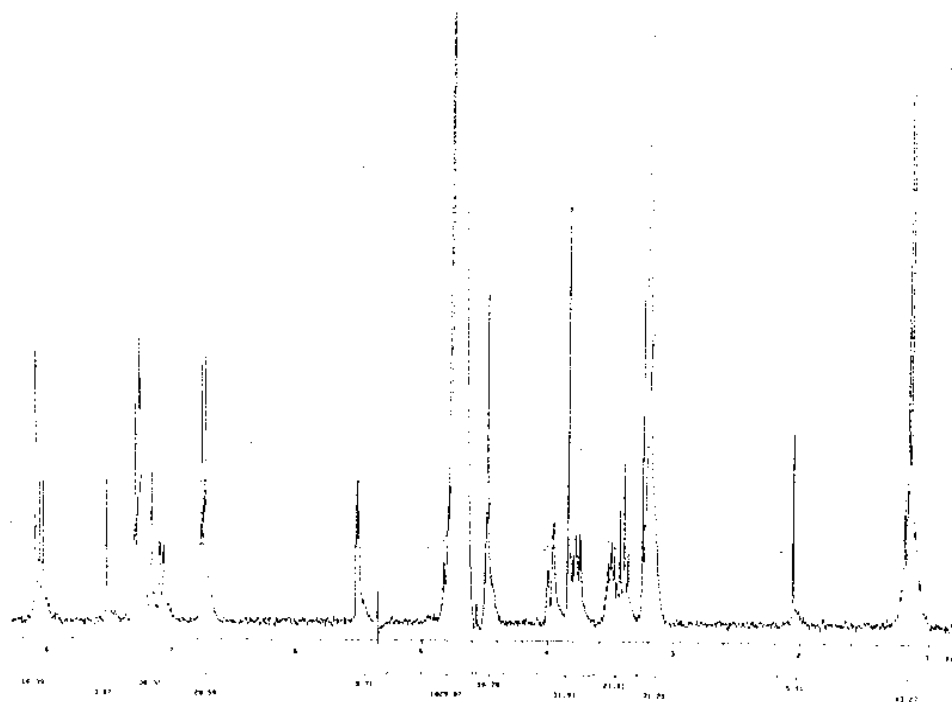
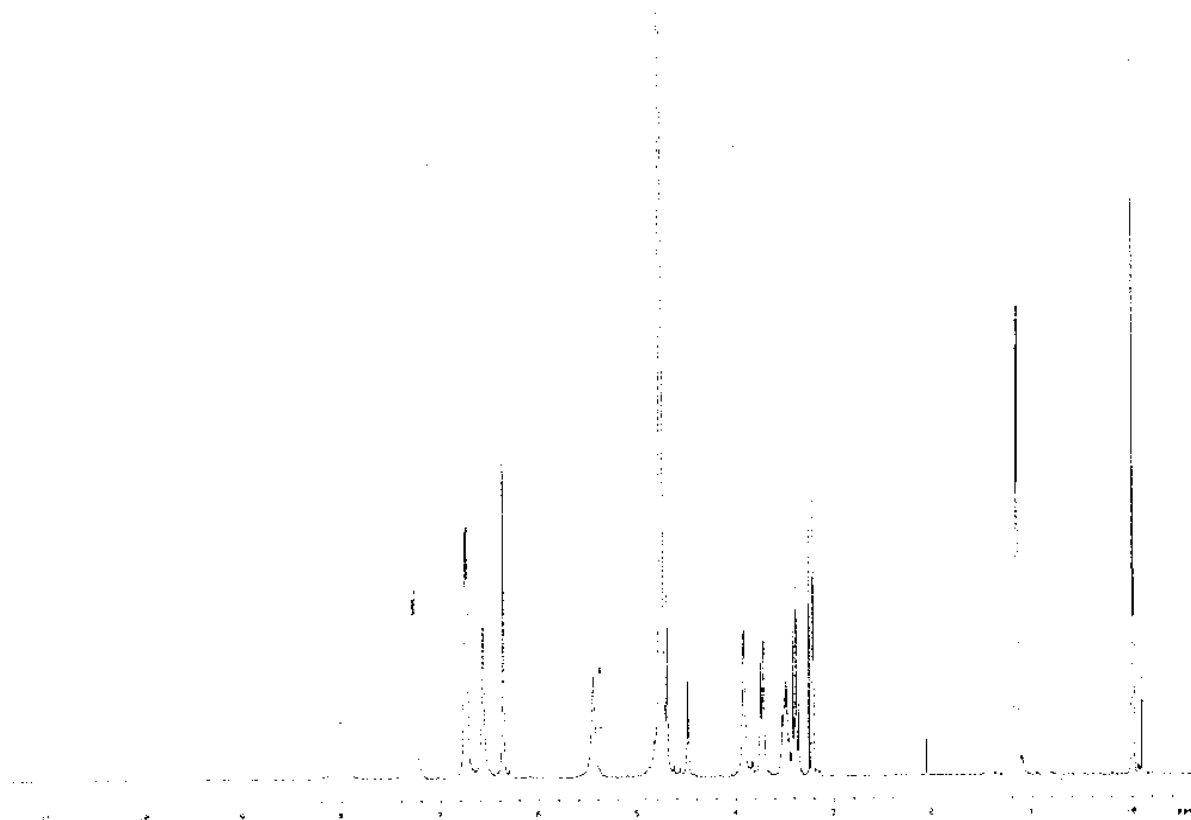
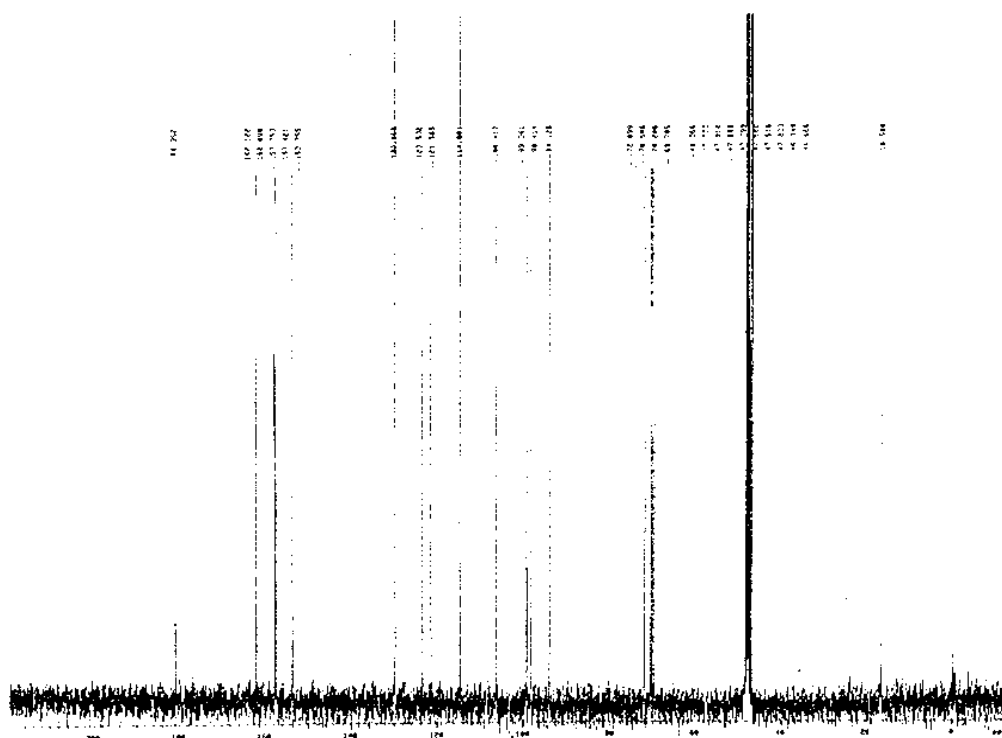


Fig. 12. ^1H -NMR spectrum of Fr. II-1 produced by *Streptomyces* sp. 20747.



Fr.II-2

Fig. 13. ^1H -NMR spectrum of Fr. II-2 produced by *Streptomyces* sp. 20747.



Fr.II-2

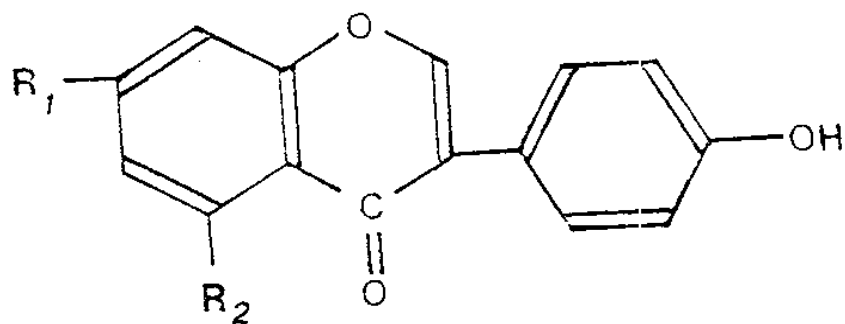
Fig. 14. ^{13}C -NMR spectrum of Fr. I-2 produced by *Streptomyces* sp. 20747

δ 16.6에 1개가 나타났다. 이와같은 기기분석 결과를 바탕으로 Fr. I, Fr. II-1, Fr. II-2를 각각 daidzein, daidzein 7-rhamnoside, genistein 7-rhamnoside로 구조결정을 하였으며, 그 구조는 Fig. 15과 같다. 이 구조는 Hazato 등¹²⁾이 β-galactosidase inhibitor screening 과정에 분리한 isoflavonoids와 일치하였다.

6. IC₅₀ 값과 저해양상

세계의 isoflavonoids와 genistein의 mushroom tyrosinase에 대한 IC₅₀은 Lineweaver-Burk plot 결과 Table 2와 같이 나타났으며, 모두 competitive inhibition pattern을 보였고, *Streptomyces bikiniensis*의 melanin 생성을 억제하지 않았다.

Hazato 등은 *Streptomyces xanthophaeus*에서 β-galactosidase 저해물질을 탐색하는 과정에서 isoflavonoids를 발견하여, 이들 물질에 대한 특성을 조사하였으나, tyrosinase 및 melanin 생성저해에 대한 특성연구는 보고한 바가 없다. 특히 Hazato 등이¹²⁾ β-galactosidase 저해제 탐색 과정에서 분리한 isoflavonoids 중 daidzein, daidzein 7-rhamnoside, genistein 7-rhamnoside만이 tyrosinase 저해제 탐색 과정에서 발견되었는데, 이는 daidzein 4', 7-dirhamnoside와 genistein 4', 7-dirhamnoside와 같이 C^{4'} 위치에 OH 대신 rhamnose가 결합하면 기질인 tyrosine과 다른 구조를 갖게되어 tyrosinase에 대한 competitive inhibition을 못하게 됨으로 분리 과정에서 배제된 것으로 사료된다.



	R ₁	R ₂	
Fr. I	OH	H	daidzein
Fr. II-1	O-Rha	H	daidzein 7-rhamnoside
Fr. II-2	O-Rha	OH	genistein 7-rhamnoside

Fig. 15. The structures of isoflavonoids produced by *Streptomyces* sp.20747.

Table 2. Inhibitory activity of isoflavonoids to mushroom tyrosinase and to melanin formation of *Streptomyces bikiniensis*.

Compound	Mushroom tyrosinase		<i>S. bikiniensis</i> NRRL B-.1049
	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inhibition type	Inhibition zone ^a
Daidzein	14	Competitive	NF ^c
Daidzein 7-rhamnoside	19	Competitive	NF
Genistein ^b	13	Competitive	NF
Genistein 7-rhamnoside	16	Competitive	NF

^a Concentration of 1 mg/ml

^b ICN biomedical

^c Not formed

7. 발 효 특 성

Isoflavonoid는 대부분 콩과 식물에서 발견되었고, 미생물이 생산하는 대부분의 isoflavonoid도 배지 성분중의 soybean meal에 기원한다는 보고에 따라 soybean meal을 다른 배지성분으로 바꾸면서 tyrosinase inhibitor 생산을 조사하였다 (Table 3).

Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of tyrosinase inhibitor.

Nitrogen source	Inhibition %		
	0 day	4 day	7 day
Corn steep liquor	45	64	65
Soytone	18	48	50
Fish meal	3	35	25
Casamino acid	34	41	70
Peptone	0	51	65
Soybean meal	12	76	41

Corn steep liquor, casamino acid는 자체에 tyrosinase inhibitor를 가지면서 발효생산은 미약하였으며, peptone 배지에서는 7일, soybean meal 배지에서는 4일 배양시 가장 높은 역가를 나타내었고, peptone의 경우 Fig. 16와 같이 pH 변화 및 carbon 이용성으로 보아 정상적인 생육 상태에서 tyrosinase inhibitor를 생산하였다. 그러므로 *Streptomyces* sp. 20747의 tyrosinase inhibitor는 배지중의

soybean meal에 직접 기원하지 않는 것으로 판단되었다.

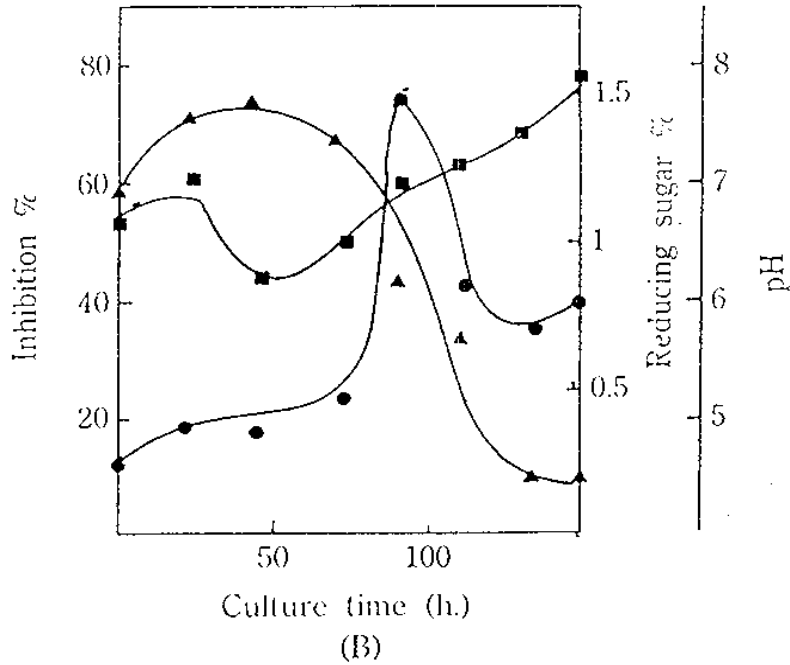
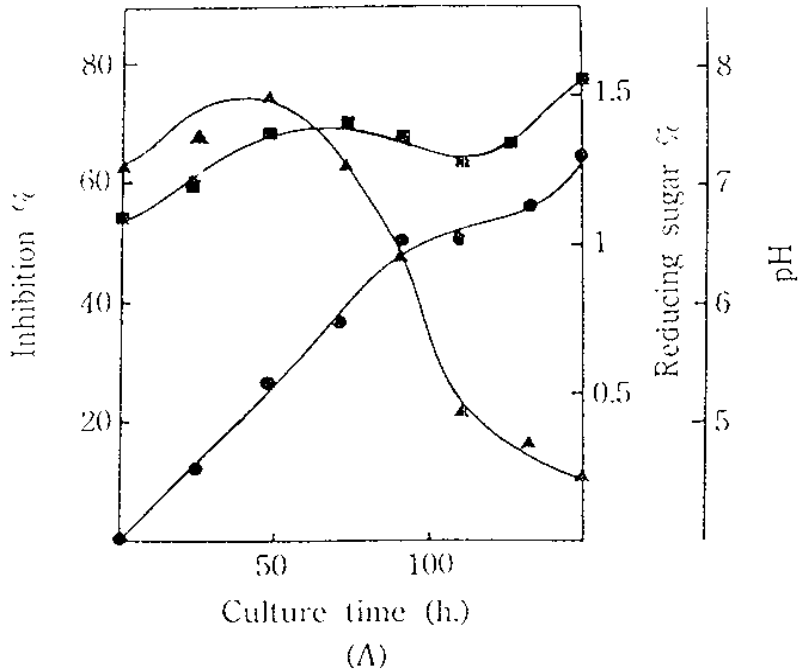


Fig. 16. Time course of tyrosinase inhibitor production by *Streptomyces* sp.20747 in peptone(A) and soybean meal(B) containing medium.

○; Inhibition, □; pH, △; Reducing sugar

제 4 절 Streptomyces bikiniensis melanin에 대한 저해제의 탐색

1. 미생물로 부터의 탐색

미생물 탐색실로 부터 분리된 세균 65여종, 곰팡이 100여종, 방선균 1400여종의 배양액을 분양받아 *Streptomyces bikiniensis melanin*의 생성을 억제하는 곰팡이 2종과 (25034, 25073) 방선균 16균주를 1차 선발하였으며, 1차 선발된 방선균의 특징은 Table 4와 같다.

1차 선발된 균주 중 역가의 재현성이 있으며, tyrosinase 저해 활성이 약하고, 항균활성이 없는 균주를 신물질 생산후보 균주로 하여 21011, 30240, 30277, 30408 등의 균주를 2차 선발하여 이들 균주의 발효 및 물질정제 특성을 조사중이다.

Table 4. Characteristics of *Actinomyces* sp. isolated by the screening room.

Strain No.	Media	Activity		Tyrosinase inhibition (%)	Antibacterial activity	DAP type
		1st	2nd			
SL 415	G	+	-	22	-	L
20264	G	+	-	5	-	L
21011	G	+	+	14	-	L
21096	G	+	-	6	-	meso
21477	G	+	-	17	-	L
21496	G	+	+	25	209, R-209	meso
21504	G	+	-	18	-	L
30031	G	+	-	15	-	L
30063	G	+	-	5	-	L
30165	G	+	-	22	R-209	L
30180	G	+	-	44	-	L
30216	p	+	-	not determined	-	L
30240	p	+	+	//	-	L
30277	p	+	+	//	-	L
30286	p	+	-	//	-	L
30408	p	++	+	//	-	meso

2. 식물 성분으로 부터의 탐색

100여개의 weed extract 및 민간에서 기미, 주근깨 등에 효과가 있다고 알려진 감, 가지, 오이, 팔, 울무 등에 대하여 tyrosinase 저해활성 및 *Streptomyces bikiniensis* melanin 저해능을 조사한 결과 weed extract 중에서는 깨풀, 고들빼기, 승마, 솔나물, 까실쑥부쟁이, 방동싸네 대가리, 개박하, 쉼싸리, 조개풀 등과 또한 팔에서도 *Streptomyces bikiniensis* melanin에 대한 저해활성이 관찰되어 이들 중 팔에 대한 물질분리를 시도하였다. 1차로 역가가 확인된 weed extract 중 역가가 우수하고, 항균활성이 없으며, ethylacetate에 추출되는 쉼싸리와 조개풀을 2차로 선별하였으며, 이중 쉼싸리에 대한 물질분리를 시행중이다.

3. 팔으로 부터의 저해물질 분리

팔 3.2kg을 물에 불린 후 파쇄하여 80% methanol/증류수(v/v)로 저해물질을 추출하였고, Diaion HP-20 column에 흡착시킨 후 30% methanol/증류수(v/v)로 용출시켜 활성분획을 농축한 후 물에 녹여 ethylacetate로 추출하였다. 이를 chloroform:methanol(10:1)의 용매 조건으로 silica gel(Merck) plate에서 preparative TLC를 실시하여 Rf value 0.7 부근의 물질을 얻었으며, 이물질을 HPLC로 최종분리하였다. 이때 사용한 HPLC column은 Lichrosorb RP-18(7 μ m) 250 × 7mm, 용매는 35% acetonitrile/증류수(v/v), 유속은 2ml/min, 흡수파장은 254nm로 하여 흡수 peak를 분취한 뒤 각 peak의 활성유무를 조사하였다.

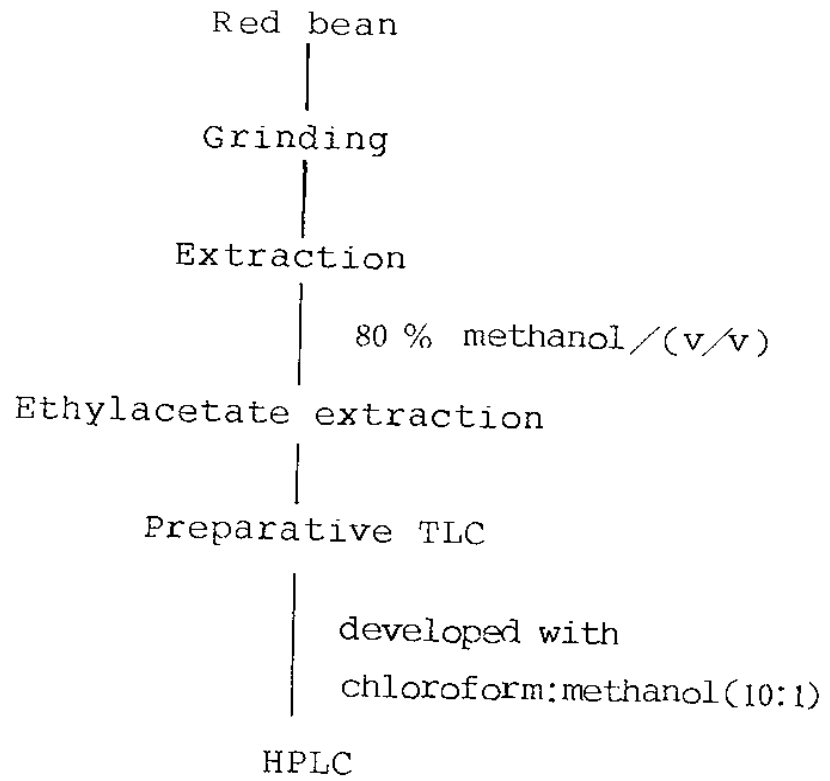
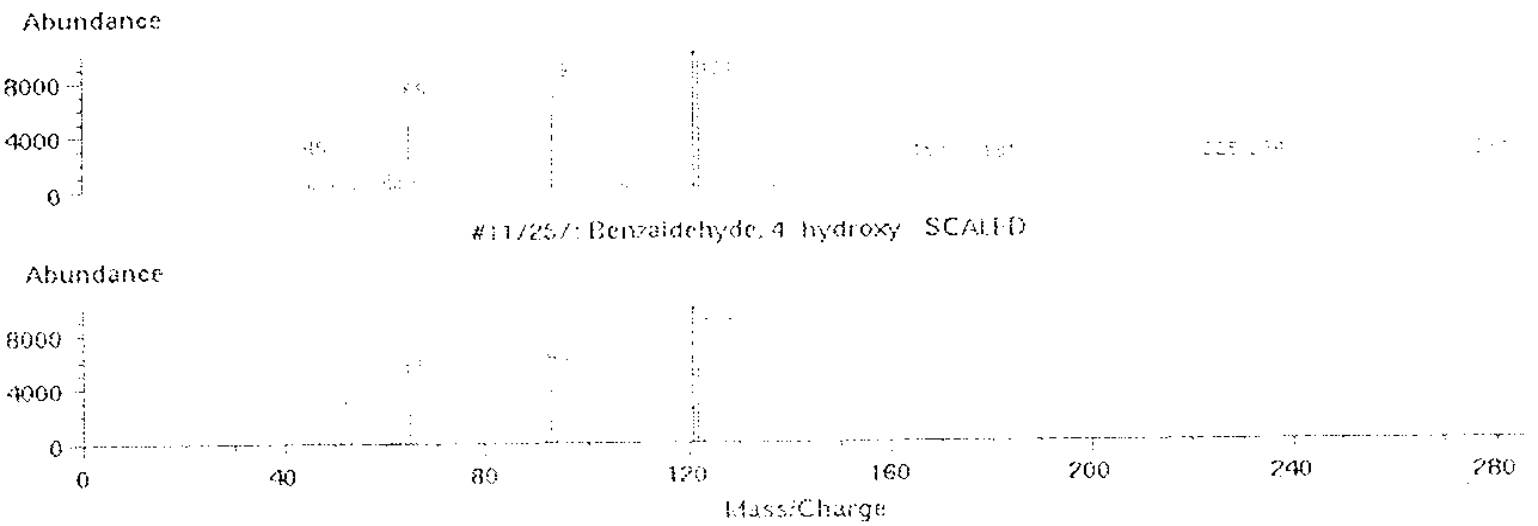


Fig.17. Isolation of melanin synthesis inhibitor from red bean.

이와 같이 분리한 물질의 EI-mass spectrum (Fig. 18) 결과 molecular weight가 121로 판명되었으며, mass data 검색 결과 4-hydroxy-benzaldehyde와 유사한 구조의 물질로 추정하였다.

Average of 0.077 to 0.197 min. from lch0320 1.4 SUBTRACTED SCALED



1. Benzaldehyde, 4 hydroxy

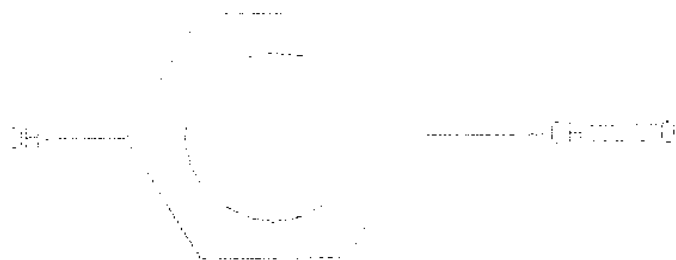


Fig.18. EI-mass spectrum of melanin inhibitor of red bean

제 5 절 DHN melanin 억제물질의 탐색

DHN melanin 저해제의 탐색은 방선균 배양액 200 μ l를 PDA 배지에 가하고, 이 plate에 *P.oryzae*의 mycelial disc (5mm)를 중앙에 놓아 10일 동안 27 $^{\circ}$ C에서 방치후 red-brown 색소를 나타내는 균주를 1차 선발한 결과 1,000여개의 방선균 중에서 tricyclazole과 비교하여 melanin 합성저해 역가가 있다고 판단되는 균주 8개 (20299, 20411, 20435, 20454, 20482, 20492, ARa 27, ARa 52)를 선별하였으며, 이들 균주 중 liquid culture method에서 역가를 나타내며 역가의 재현성이 보이는 20482, 20492, ARa 27 균주를 2차 선발하여, 벼 도열병에 대한 *in vivo* test를 실시하였다. *In vivo* test 결과 활성이 우수하고 산성에서 butyl alcohol에 추출되는 ARa 27 균주를 대상으로 물질분리를 실시하였다.

20 l의 ARa 27 균주 배양 상등액을 농축하여 pH3으로 조정한 후 butyl alcohol로 추출 농축하였다. DEAE cellulose column에 흡착시킨 후 0.5M acetic acid로 용출하여 활성물질을 얻은 상태로 분리정제를 실시 중이다.

참 고 문 헌

1. Bell, A.A. and M.H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann.Rev.Phytopathol.* **24**: 411-451.
2. Lerner, A.B. and I.B. Fitzpatrick. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**:91-126.
3. Korner, A., and J. Pawelek. 1982. Mammalian tyrosinase three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**:1163-1165.
4. Swan, G.A. 1974. Structure, chemistry and biosynthesis of the melanins, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **31**: 521-582.
5. Memon, S., R.W. Fleck, G. Young and K.G. Strothkamp. 1990. Benzoic acid inhibition of the α , β and γ isozymes of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Archiv, Biochem. Biophys.* **280** (1): 27-32.
6. Misasa, H., Y. Matsui, H. Uehara, H. Tanaka, M. Ishihara and H. Shibata. Tyrosinase inhibitor from *Albatrellus confluences*. 1992. *BioSci. Biotech. Biochem.* **56** (10):1660-1661.
7. Tomit, K.N., N. Oda, M. Kamel, T. Miyaki and T. Oki. 1990. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot.* **12**: 1601-1605.
8. Rustin, G.J., M.R. Stratford, A. Lamont, N. Beehen, P.A. Philip, N. Howells, R.R. Watfa J.A. Slack. 1992. Phase I

- study of intravenous 4-hydroxyanisole. *Eur. J. Cancer.* **28A**:1362-1364.
9. Chida, T., and H.D. Sisler. 1987. Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on Appressorial penetration and reductive reactions in *Pyricularia oryzae* and *Pyricularia grisea*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **29**:244-251.
 10. Omata, K., H. Tomita, T. Nagajima, B. Natsumes. 1989. Design of new melanin biosynthesis inhibitors. *Pestic. Sci.* **26**:271-281.
 11. Markham, K.R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*, Pp. 15-50. Academic Press.
 12. Hazato, T., H. Naganawa, M. Kumagai, T. Aoyagi and H. Umezawa. 1979. β -Galactosidase-inhibiting new isoflavonoids produced by Actinomycetes. *J. Antibiot.* **32**: 217-222.
 13. Agrawal, P.K. 1989. *Carbon-13-NMR of Flavonoids*, Pp. 196-197. Elsevier.
 14. Harbone, J.B. 1988. *The Flavonoids*, Pp. 125-126. Chapman and Hill Ltd.