

미백활성을 갖는 신규 천연화합물 melanocin의 화학적, 생물학적 특성

김 종평

한국 생명공학 연구원, 국가지정 항산화 소재연구실

I. 서론

기능성 바이오 화장품은 크게 미백화장품(Skin Whitening), 주름제거 화장품(Anti-Wrinkle), 생체 고분자 화장품(Biomaterial), 피부자극 완화 화장품 및 발모 화장품(Hair Growth) 등이 개발 대상이 되고 있으나, 최근에는 항노화 활성을 갖는 활성산소 제거물질(Free radical scavenger), melanocyte의 멜라닌 형성을 유도하는 signal transduction 차단제, epidermal growth factor, collagen synthase, 암환자 치료시 응용되는 Radio-therapy 또는 Chemo-therapy의 부작용을 최소화 할 수 있는 기능성 화장품 등 다양한 분야에서의 화장품 개발이 이루어지고 있다.

본 연구에서는 항노화, 미백, 주름제거 혹은 자외선 차단용 기능성 화장품 개발을 목표로 미생물 및 천연물 유래의 항산화 활성 물질을 탐색하여 토양 곰팡이 *Eupenicillium shearii*로부터 강력한 멜라닌 생합성 저해활성 및 항산화 활성을 갖는 신규 화합물 melanocin A, B, C 및 D를 창출하여 이들 화합물들에 대한 생물학적 활성으로서 멜라닌 생합성 저해활성, 주름살 형성 억제활성 및 항산화활성 등을 조사하였다.

II. 신규 화합물 melanocin A-D의 생산 균주 및 정제

1) 생산균주

토양으로부터 분리된 곰팡이 및 방선균 균주를 대상으로 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성을 조사하여 곰팡이 F80695 균주를 선발하였다. 선발된 균주 F80695의 동정은 형태적 관찰 및 배양적 특징을 조사하여 실시하였다.

본 균주는 5°C, 25°C, 37°C, 조건중 25°C에서 가장 왕성한 생육을 보였고 5°C에서는 생육하지 않았다. Malt Extract Agar(MEA), Czapek Yeast Extract Agar(CYA), Czapek's Solution Agar(CzA), 25% Glycerol Nitrate(G25N) 배지중 MEA와 CYA에서 가장 좋은 생육을 보였고, CzA배지에서는 25°C에서만 생육하였고, G25N에서는 전혀 생육하지 않았다. 배양적 특징으로 배양 온도에 따른 생육정도, 배지조건에 따른 mycelium, exudate의 생육정도, 색상 등을 조사하였고, 형태적 특징으로서 cleistothecia, ascospore, conidiophores, phialide, conidia 등의 크기, 모양 등을 조사하였다. 그 결과, 본 균주는 *Eupenicillium shearii* Stolk & Scott 1967로 동정 되었으며, F80695 균주는 한국 생명공학연구원 유전자원 센터에 기탁하였으며, 그 번호는 KCTC 0855BP이다. (Fig. 1)

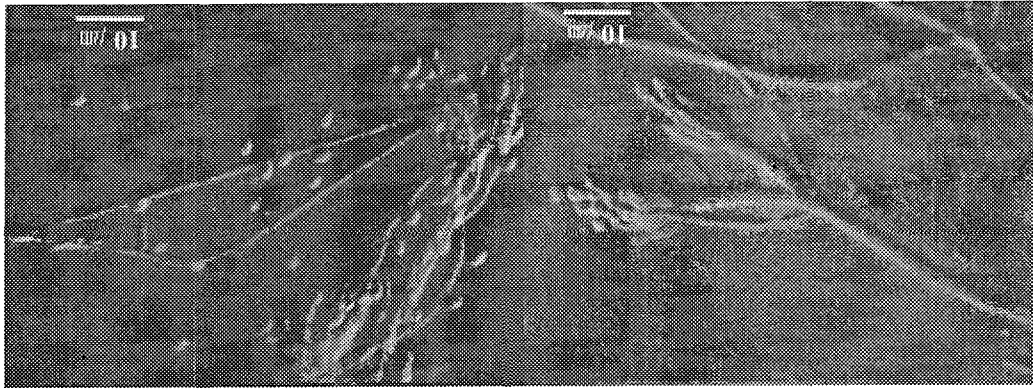


Fig 1. Scanning electron micrographs of *Eupenicillium shearii* F80695

2) Melanocin A, B, C 및 D의 정제

500ml baffled flask에 곰팡이 배양액 YM배지 120ml을 넣고 *Eupenicillium shearii* F80695 균주를 접종하여 3일간 배양한 후 이것을 fermentor에 접종하여 5일 동안 28°C로 배양하였다. 배양액 및 균체로부터 Fig. 2에 나타난 바와 같이 정제하였다. 배양액 6L를 배양액과 배양 균체로 나눈 다음 균체를 80% acetone으로 추출하고 acetone을 제거한 후 이로부터 얻은 잔여물과 배양액을 합한 후 유효 성분이 포함된 혼합액을 ethyl acetate로 3회 추출하였다. 추출액을 evaporator로 감압 농축하여 얻은 잔여물을 Silica gel column, Sephadex LH-20 column chromatography, HPLC를 실시하여 melanocin A (15.0 mg), B (2.4 mg), C (4.5 mg) 및 D (6.6 mg)를 정제하였다.

III. Melanocin A-D의 구조결정

1) Melanocin 화합물의 물리 화학적특성

Melanocin A-D의 물리화학적 특성 (Table 1)을 조사한 결과, melanocin A는 negative ESI-MS에서 337(M-H)⁻과 positive ESI-MS에서 361 (M+Na)⁺이 관측되어 분자량은 338, 분자식은 NMR 및 HRFAB-mass 실험결과 C₁₈H₁₄N₂O₅로 결정되었다.

Melanocin B는 분자량 329, 분자식 C₁₇H₁₅NO₆로서 IR spectrum에서는 3447 cm⁻¹에서 hydroxyl group, 2845 cm⁻¹에서 aldehyde에 기인하는 band가 관찰되었으나, melanocin A에서 관찰된 nitrile의 삼중결합에 기인한 band는 관찰되지 않았다.

Melanocin C는 B와 유사한 성상 및 용해성을 지녔으며 분자량은 EI-mass 측정 결과 354, 분자식은 ¹H, ¹³C NMR 및 mass data로부터 C₁₈H₁₄N₂O₆으로 결정되었다.

Melanocin D는 DMSO, 메탄올에는 잘 용해되나 클로로포름, 헥산, 물 등에는 불용이었다. 분자량은 326, 분자식은 C₁₇H₁₄N₂O₅로 결정되었다.

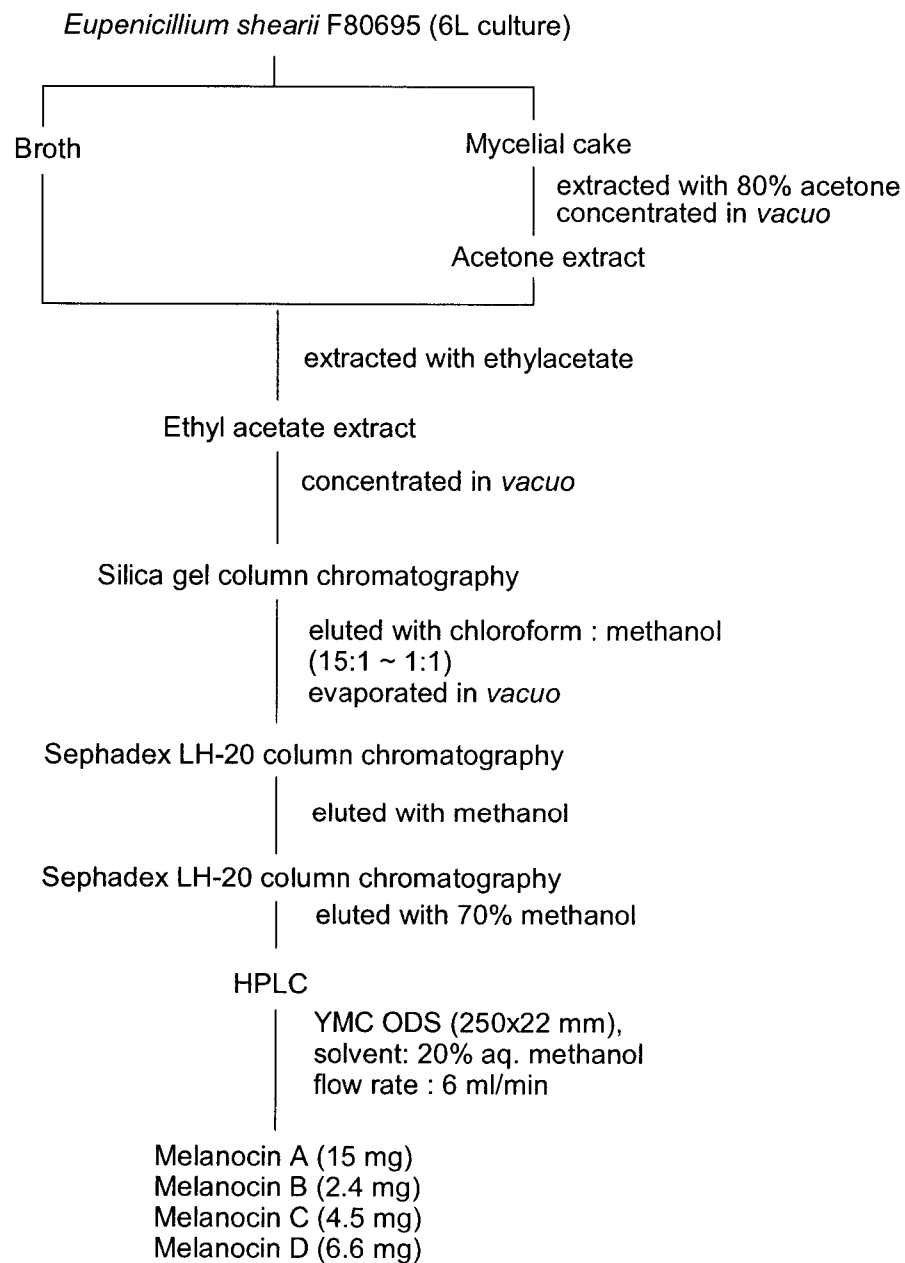


Fig. 2. Purification Procedure of melanocins A, B, C and D from the culture broth of *Eupenicillium shearii* F80695

Table 1. Physico-chemical properties of melanocins A, B, C and D

	Melanocin A	Melanocin B	Melanocin C	Melanocin D
Appearance	Yellow solid	Dark brown solid	Dark brown solid	Dark brown solid
Molecular weight	338	329	354	326
Molecular formula	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₅	C ₁₇ H ₁₅ NO ₆	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₅
UVλ _{max} (MeOH)nm(logε)	220, 336	253, 341	241, 341	221, 325
IR ν _{max} (KBr)cm ⁻¹	OH	3458	3464	3452
	CH	2930	2925	2925
	CHO	2843	2845	2854
	C≡N	2258		2849
Solubility				
soluble in	MeOH, DMSO	MeOH, DMSO	MeOH, DMSO	MeOH, DMSO
insoluble in	H ₂ O, CHCl ₃	H ₂ O, CHCl ₃	H ₂ O, CHCl ₃	H ₂ O, CHCl ₃
TLC(Rf) ^a	0.86	0.76	0.39	0.17
HPLC(Rt) ^b	23.91(min)	6.09(min)	36.98(min)	25(min)

^aSilica gel TLC(Merck Art 5715),(chloroform : methanol = 2 : 1)

^bHPLC conditions: Column: ULTRACARB 5 ODS(30)(250×4.60 mm, micro), mobile phase: 20% aq. methanol, flow rate: 0.4 ml/min, detection: UV 210 nm.

2) melanocin A-D의 화학 구조

Melanocin 화합물의 화학구조는 물리화학적 특성 및 NMR 해석에 의하여 결정되었다 (Fig. 3). Melanocin A의 ¹H NMR 과 ¹H-¹H COSY NMR spectrum에서 2개의 1,3,4-trisubstituted benzene과 2 개의 olefinic singlet proton, 하나의 formamide성 proton (8.30 ppm)이 관찰되었다. ¹³C NMR spectrum에서는 8 개씩의 olefinic carbon 및 sp² 사급탄소, carbonyl 탄소와 isonitrile성 탄소 (171.7 ppm)가 관측되었다. HMQC 실험으로부터 직접 결합한 ¹H-¹³C간의 연결성이 규명되었으며 최종 구조는 HMBC 실험에 의하여 결정되었다.

Melanocin B의 ¹H NMR에서 1,3,4-trisubstituted benzene과 olefinic singlet proton (7.37 ppm), aldehyde proton (8.25 ppm) 및 methylene proton (3.90 ppm)이 관찰되었다. Aldehyde proton은 질소와 결합되어 있어 고자장으로 이동되어 나타났다. ¹³C NMR spectrum에서는 198.2 ppm에서 carbonyl 탄소, 164 ppm에서 질소와 결합한 aldehyde carbonyl group, 산소와 결합한 4개의 sp² quaternary carbon, 7 개의 aromatic methine carbon, 3개의 sp² 사급탄소, 45.0 ppm에서 methylene 탄소가 관찰되었다. 이로부터 본 화합물은 두 개의 방향족환, 한 개씩의 aldehyde, carbonyl, methylene과 이중결합으로 구성된 신규 phenolic 화합물임을 알 수 있었다.

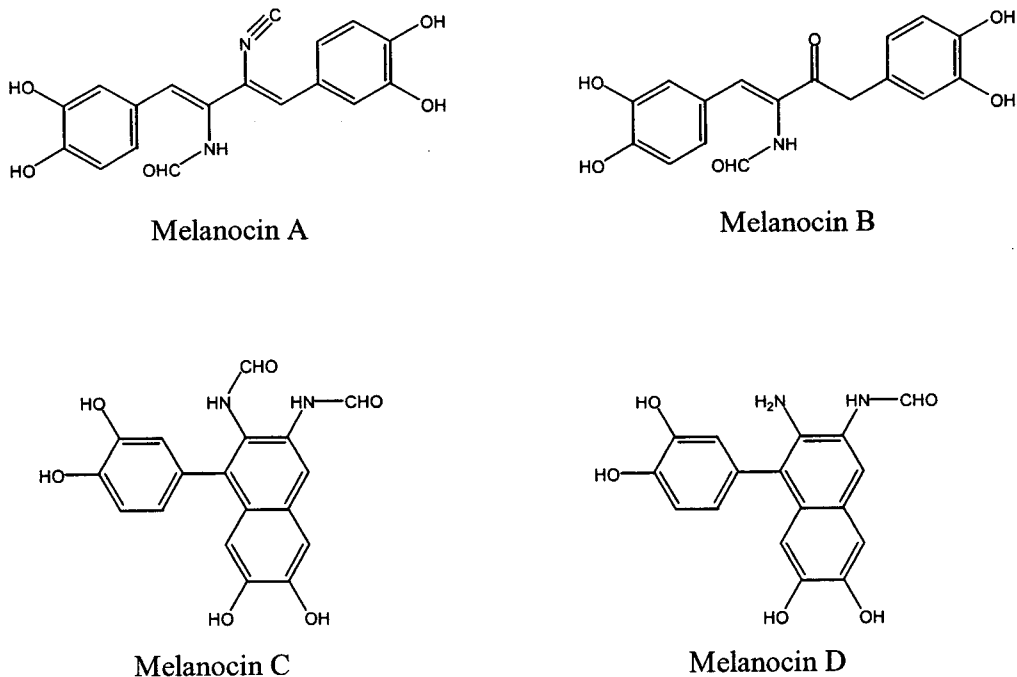


Fig. 3. Structures of melanocins A, B, C, and D.

melanocin C의 ^1H NMR에서 한개의 1,3,4-trisubstituted benzene과 3개의 singlet methine proton, 두 개의 aldehyde proton이 관찰되었다. 이들 aldehyde proton은 chemical shift로부터 질소와 결합하고 있음을 보였다. ^{13}C NMR spectrum에서 질소와 결합한 두 개의 aldehyde carbonyl group, 산소와 결합한 4개의 sp^2 quaternary carbon, 1,3,4-trisubstituted benzene을 구성하는 3개의 methine 탄소를 포함한 6 개의 aromatic methine carbon, 6개의 sp^2 사급탄소가 관찰되었다. 1차원 NMR을 통해 얻어진 부분구조를 HMBC의 long-range correlation에 의해 연결하여 melanocin C의 화학구조를 결정하였다

melanocin D의 화학구조는 melanocin C의 NMR spectrum과의 비교에 의하여 결정되었다. ^1H NMR에서 한개의 1,3,4-trisubstituted benzene과 singlet methine proton (7.80, 7.20, 7.23 ppm), aldehyde proton으로 추정되는 methine proton (8.10 ppm)이 관찰되었다. 관찰된 두 개의 aldehyde proton은 chemical shift로부터 질소와 결합하고 있음을 알았다. ^{13}C NMR은 melanocin C와 매우 유사하나 melanocin C에 존재하는 두 개의 aldehyde carbonyl signal 중 한 개의 aldehyde group만 존재하였다.

이들 화합물들을 각종 database 및 문헌검색을 한 결과, 모두 신규 화합물로 판명되었다.

IV. Melanocin A-D의 생물활성

1) 항산화 활성

Xanthine/xanthine oxidase system을 이용하여 melanocin A의 superoxide radical 소거 활성을 측정하였다. 그 결과 melanocin A는 2.29 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IC_{50} 값을 나타어 잘 알려진 항산화물질인 vitamin E (3.1 $\mu\text{g/ml}$), BHA (20 $\mu\text{g/ml}$) 및 BHT보다 월등히 높은 활성을 보였다 (Fig. 4).

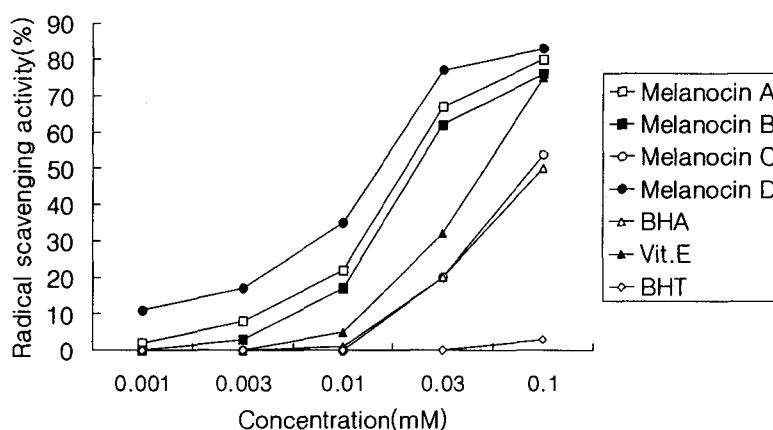


Fig. 4. Superoxide radical scavenging activity of melanocin A

Melanocin A-D는 DPPH radical 소거활성을 나타내었으며 IC_{50} 값은 각각 22.2, 25.0, 94.6, 21.5 μM 이었다. melanocin A, B, D는 잘 알려진 항산화물질인 vitamin E의 60 μM 에 비하여 3배 정도의 강한 항산화활성을 나타냈었다 (Fig. 8). Riboflavin을 이용한 photooxidation 저해활성 측정에서도 vitamin E, BHA, BHT는 100 μM 에서도 antiphotooxidation 활성이 미약한 반면, melanocin A, B, C 및 D의 IC_{50} 값은 각각 55.4, 26.5, 70.0, 84.5 μM 이었다. 반면, , melanocin A, B, C 및 D는 강력한 antiphotooxidation 활성을 보였다(Fig. 5).

2) Tyrosinase 저해활성

멜라닌 생합성의 key enzyme인 tyrosinase에 대한 melanocin A, B, C, D의 저해활성을 기존의 저해제로 잘 알려진 kojic acid, hydroquinone, arbutin, 4-hydroxyanisole 등과 비교하였다. Melanocin A의 mushroom tyrosinase에 대한 IC_{50} 은 9.0 nM로서 kojic acid (31.0 μM) 나 arbutin (38.0 μM)에 비해 각각 3,300배, 4,200배의 월등한 효과를 나타내었다 (Fig. 7) (Table 2).

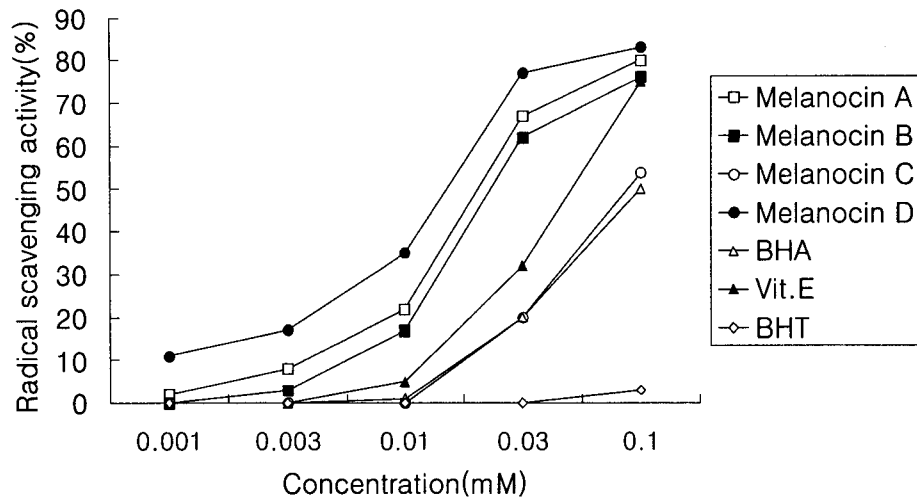


Fig. 5. DPPH radical scavenging activity of melanocins A, B, C and D

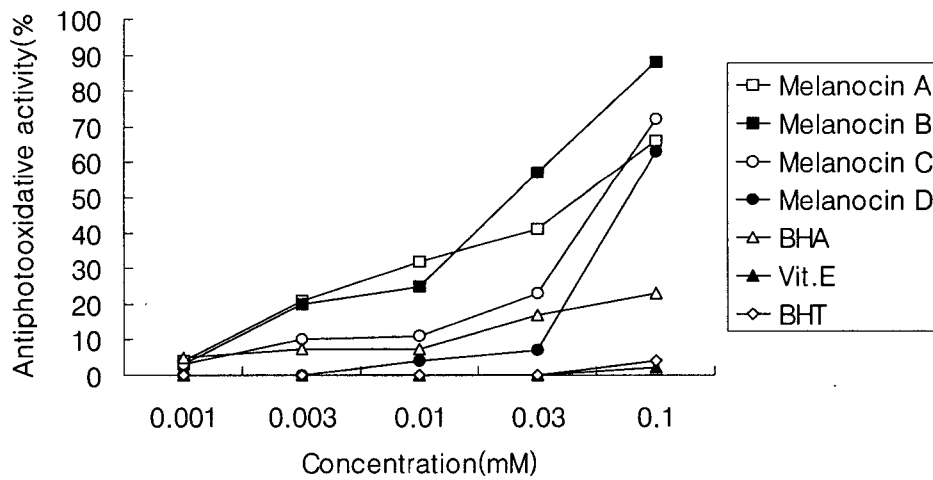


Fig. 6. Antiphotooxidative activity of melanocins A, B, C and D

3) Melanocin 화합물의 멜라닌 생합성 저해

Melanocin A는 *Streptomyces bikiniensis* 및 B16 멜라노마 세포의 멜라닌 생합성을 강하게 저해하였다 (Table 2). B16 멜라노마 세포의 멜라닌 생합성에 대한 저해활성에 대해서 0.9 μM 의 최소 저해농도 (MIC)를 나타내어 kojic acid (106.0 μM), arbutin (36.8 μM)등에 비해 월등한 효과를 보였다.

Table. 2. Inhibitory effects of melanocins A-D on mushroom tyrosinase and melanin formation of *Streptomyces bikiniensis* and B16 melanoma cells.

Compound	<i>S. bikiniensis</i> NRRL B-1049 ¹	B16 Melanoma	Mushroom tyrosinase
	Inhibition zone(mm)	MIC ² (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
Melanocin A	51	0.9	0.009
Melanocin B	0	- ³	> 1mM
Melanocin C	0	- ³	> 1mM
Melanocin D	0	- ³	> 1mM
kojic acid	0	106.0	31.0
hydroquinone	25	- ³	9.1
arbutin	- ³	36.8	38.0
4-hydroxyanisole	30	- ³	120.0

¹ Compound 30 μ g/ paper disc ² Minimum inhibitory concentration ³ Not determined

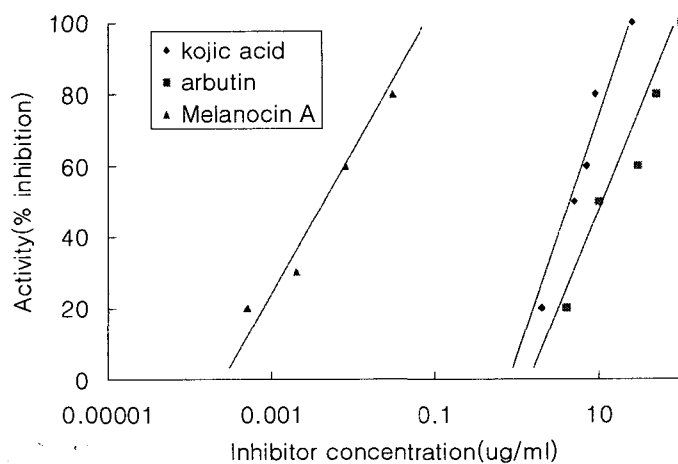


Fig. 7. Inhibitory Activity of Melanocin A against Mushroom Tyrosinase

4) Melanocin A의 MMP 합성 저해활성

섬유아세포 배양을 이용하여 자외선 조사 후 MMP 합성 억제 효과를 조사한 결과 melanocin A는 자외선에 의한 MMP-1 단백질 발현 증가를 예방하는 효과를 나타내었다 (Fig. 8).

Melanocin A

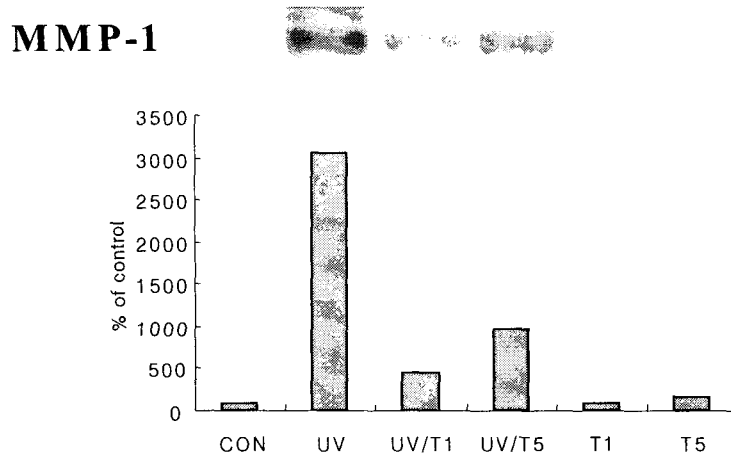


Fig. 8. Inhibition of UV-induced MMP protein production by melanocin A.

V. Reference

1. HOROWITZ, N. H.; M. FLING, G. HORN, S. H. POMERANTY & PEH-CHEN: Tyrosinase. *In* Methods in Enzymology Volume XVIIA. *Eds.*, H. Tabor & C. W. Tabor, pp. 615~626, Academic Press. 1970
2. PITT, J. I.: The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 1979