

생물전환에 의한 Rhapontigenin의 생산 및 멜라닌 합성저해

전민¹ · 이강문¹ · 임영희² · 김정근^{1*}

¹한국산업기술대학교 생명화학공학과, ²고려대학교 보건과학대학 임상병리학과

Rhapontigenin Production by Bioconversion and Inhibition of Melanin Synthesis. Jeon, Min¹, Kang-moon Lee¹, Young-Hee Lim², and Jeong Keun Kim^{1*}. ¹Department of Chemical Engineering & Biotechnology, Korea Polytechnic University, Siheung 429-793, Korea, ²Department of Clinical Laboratory, Science College of Health Science, Korea University, Seoul 136-703, Korea – Rhapontin is the glycosylated stilbene compound, and comprising major component of rhubarb root extract. Rhapontin has been used as a raw material of skin-whitening cosmetics in Korea. Rhapontigenin, the aglycone of rhapontin, has been suggested to be more active than its glycosylated form. Therefore, the rhubarb root extract was treated with commercial enzyme, Pectinex to remove glycosylated moiety of rhapontin and rhapontigenin was prepared. The resulting material was analysed and identified as rhapontigenin by proton NMR and MALDI-Mass. Rhapontigenin exhibited tyrosinase inhibitory activity with an IC₅₀ of 126.72 µg/mL. The tyrosinase inhibitory activity of rhapontigenin was six times higher than that of rhapontin. In melanin biosynthesis inhibition assay using *Streptomyces bikiniensis*, rhapontigenin showed wider inhibition zone than that of rhapontin. From these results, we expect that rhapontigenin has stronger skin whitening effect than rhapontin and has advantages in cosmetic industry.

Key words : Rhapontigenin, tyrosinase inhibitor, melanin

서론

일반적으로 인간의 피부, 머리카락, 눈동자를 비롯한 생물체에 널리 분포되어 있는 색소 성분인 멜라닌은 피부색을 결정하는데 가장 중요한 인자이다. 멜라닌은 유황화합물로서 시스테인과 글루타치온 및 Fe 함유에 따라 갈색에서 흑색의 다양한 색의 농도를 갖는 polymer이다[6]. 멜라닌의 합성은 L-tyrosine을 기질로서 tyrosinase에 의해 L-DOPA로 전환되고 다시 L-DOPA quinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌이 된다. Tyrosinase에 의하여 생성이 촉진되는 동물 멜라닌은 노란색-적갈색의 페오멜라닌(pheo-melanin)과 갈색-검은색의 유멜라닌(eu-melanin)으로 구분된다[2, 11]. 멜라닌은 단백질과 결합된 형태의 polymer로서 자외선을 포함한 넓은 영역의 빛을 흡수하는 기능이 있어 피부를 자외선의 조사에 의한 피해로부터 방어하고[14, 15], 건조, 극한 온도 등에 대한 생존능력을 높여주어 피부내의 세포나 조직들을 보호하는 역할을 한다[9, 10]. 그러나 멜라닌은 긍정적인 기능뿐만 아니라 백반증, 기미, 주근깨, 피부암 발생과 같은 부정적인 기능도 가진다[4, 5, 10, 13]. 이러한 부정적인 기능 때문에 최근 멜라닌의 생합성 대사가 집중적으로 연구되고 있고, hydroquinone[18], kojic acid[1, 3], arbutin[7], oxyresveratrol

[8, 9] 등 다양한 멜라닌 생성 저해제가 개발되어 의약품 산업에서 피부 질환 치료제, 화장품 산업에서 미백제 등으로 적용되고 있다. 그러나 미백화장품의 원료로 사용되었던 hydroquinone과 kojic acid에서 부작용이 나타나면서[18] 천연 원료 물질개발에 대한 연구가 요구되고 있다.

효소전환을 통해 글루코사이드(glycosides)를 aglycones로 전환하여 생물활성을 증가시키는 방법에 대해 보고된 예들이 있다[12, 16, 17]. 따라서 본 연구에서는 펙틴네이즈 효소 뿐만 아니라 β-glucosidase를 다량 함유하고 FDA로부터 식품용으로 안전성을 인정받아 오렌지쥬스 청징화등 식품용으로 널리 사용중인 효소인 Novozyme사의 Pectinex[®]를 사용하여 대황뿌리(rhubarb root)로부터 추출한 rhapontin을 가수분해한 후 생성된 물질의 분자량 및 구조를 분석하여 rhapontigenin임을 확인하였다. 제조된 rhapontigenin과 rhapontin에 대한 tyrosinase 저해활성 측정 및 tyrosinase 저해 활성 기작에 대하여 검토하였다. 또한 *Streptomyces bikiniensis* KCTC 9172를 이용한 멜라닌 생성 억제효과를 비교하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 대황뿌리(rhubarb root)는 경상북도에서 재배된 것을 수집하여 건조한 건화약품 제품을 사용하였다. Rhapontin으로부터 rhapontigenin으로의 효소 전환반응에는

*Corresponding author

Tel: 82-31-8041-0615, Fax: 82-31-8041-0629

E-mail: kjkim@kpu.ac.kr

Pectinex(Novozymes, DENMARK)를 사용하였으며, tyrosinase 저해활성 측정에 사용된 L-tyrosine, mushroom tyrosinase, hydroquinone, kojic acid 및 ascorbic acid는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

Rhapontin 제조

건화약품의 대황 뿌리 48 kg을 교반기에 넣고 methanol (MeOH) 160 L를 첨가한 후 48시간 순환 교반하였다. 이후 상온에서 48시간 정치시켜 1차로 MeOH층을 분리하고 다시 MeOH 120 L를 넣고 순환교반 시켜 위와 같은 방법으로 MeOH층을 분리하여 1차 추출액과 합쳐 여과한 후 75°C에서 증류하였다. 3차 증류수 40 L를 넣어 상온에서 30분간 교반하고, 다시 80 L의 ethyl acetate(EA)를 넣어 30분간 교반한 후 상온에서 2시간 정치하였다. 분리된 물층을 상온에서 16시간 정치시키고, 여과한 후 3차 증류수 10 L와 EA 10 L로 각각 세척하여 50°C에서 30시간 진공 건조하였다. 건조 후 atomizer로 분쇄하여 48 kg의 대황으로부터 1 kg의 rhapontin을 추출하였다.

Rhapontigenin 제조

대황으로부터 추출한 rhapontin 30 g을 DMSO 500 mL에 용해시킨 후 acetate buffer(pH 4.0) 1500 mL와 Pectinex® 100 mL를 넣어 55°C, 100 rpm으로 4시간 반응하였다. 반응

완료 후 증류수 1500 mL을 첨가하여 냉장실에서 하룻밤 방치하였다. 방치된 반응물을 여과지(Qualitative filter papers, 110 mm Ø, Whatman)를 이용하여 여과한 후 증류수로 침전물을 충분히 세척하였다. 획득된 침전물을 모아 50°C에서 30시간 진공 건조시켜 건조중량 11.8 g의 rhapontigenin을 얻었다.

Rhapontin과 rhapontigenin의 HPLC 분석

대황뿌리로부터 제조된 rhapontin과 이를 효소 가수분해하여 제조한 rhapontigenin의 정량분석은 HPLC(LCQ Advantage MAX, Thermo Electron, USA)로 수행되었다(Fig. 1). HPLC 분석조건은 다음과 같다: 검출기 PDA detector, 검출파장 325 nm, 분석 칼럼 Luna-Pak® C-18(5 µm, 4.6×250 mm, Waters), 시료 주입량 20 µL, 유량 1.0 mL/min, 전개용매 CH₃CN : 10 mM H₃PO₄ = 35 : 65.

제조된 Rhapontigenin의 분자량 및 구조분석

Rhapontin으로부터 효소 가수분해에 의해 제조된 rhapontigenin의 분자량은 서울대학교 농생명과학 공동기기원의 MALDI-Mass(Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation, Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하여 확인하였다. 분자구조의 확인은 한양대학교의 ¹H NMR(Varian 400-MR, 500 MHz, Varian Inc., USA)을 이용하였다.

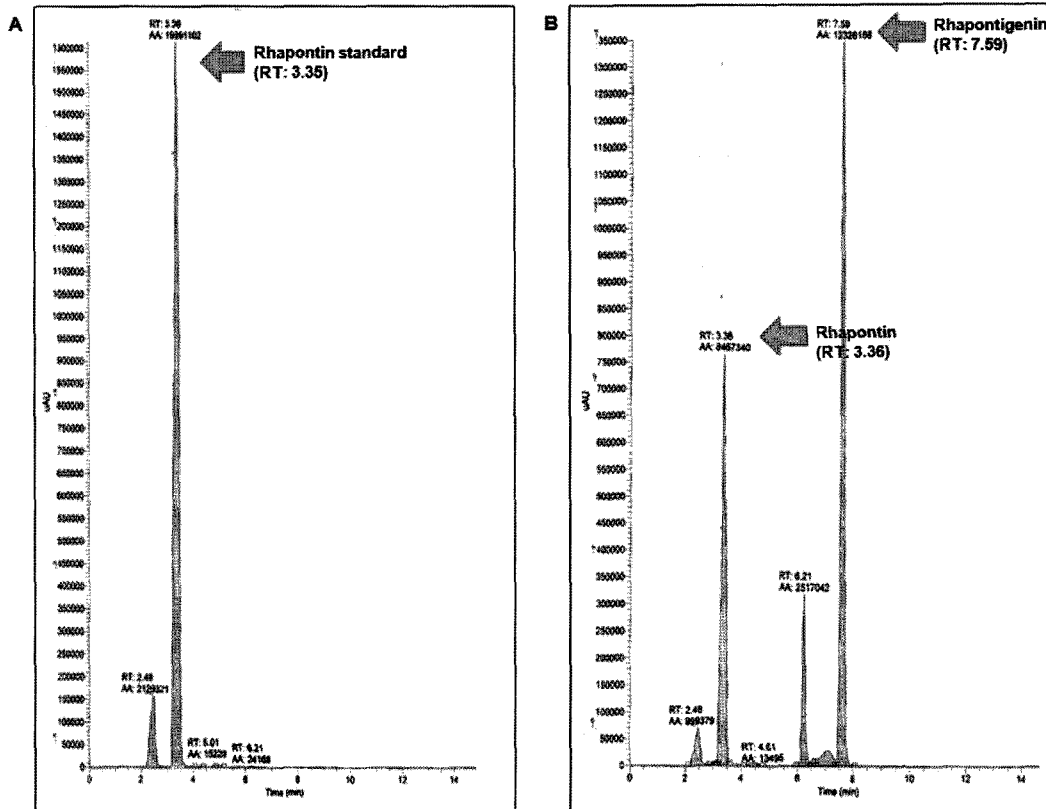


Fig. 1. HPLC chromatogram of rhapontin standard (A) and mixture of rhapontin extract and rhapontigenin (B).

Tyrosinase 저해활성 측정

추출물의 tyrosinase 저해활성은 Tomita[19] 등을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 반응액은 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 1.15 mL, 0.05 M phosphate buffer(pH 6.5) 50 μ L, mushroom tyrosinase(2,000 U/mL) 50 μ L, 1.5 mM L-tyrosine 0.2 mL, 추출물 0.1 mL로 구성하였고, 1.5 mL microtube에 반응액을 첨가하여 25°C heating bath(BS-11, Lab. Companion, Korea)에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 얼음상에서 효소반응을 정지시킨 후 UV-Vis spectrophotometer(CE 9020, Cecil Instrument, ENGLAND)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물은 DMSO, 비교물질인 hydroquinone, kojic acid 및 ascorbic acid는 증류수로 각각 62.5~1,000 μ g/mL의 농도범위로 단계적으로 희석하여 사용하였다. 추출물 대신에 DMSO 0.1 mL을 가하여 control로 하였고, 비교물질 대신에 증류수 0.1 mL을 가하여 비교물질의 control로 하였다. 또한 tyrosinase 대신 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 50 μ L를 가하여 blank로 하였다. 이때의 효소 활성 저해율(%)은 아래와 같이 계산하고, 효소의 활성을 50% 저해하는 농도를 내삽법으로 구하여 이를 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율(\%)} = \{(A-B)/A\} \times 100$$

A; OD at 470 nm without sample

B; OD at 470 nm with sample

Enzyme kinetic assay

Enzyme kinetic assay는 기본적으로 tyrosinase 저해활성 측정방법과 동일한 조건 하에서 수행되었다. 단, L-tyrosine의 농도는 각각 0.25, 0.5, 1, 1.5 mM로 변화시켜 각각의 추출물에 적용하였고, 추출물의 농도도 각각 0, 0.05, 0.1, 0.4 mM로 변화시켜 적용하였다. 1.5 mL microtube에 반응액을 첨가하여 25°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 얼음상에서 5분간 효소반응을 정지시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정결과는 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 분석하였다.

*Streptomyces bikiniensis*를 이용한 melanin 생성 억제효과 측정

Tyrosinase 저해활성과 마찬가지로 Tomita[19] 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 실험하였다. 멜라닌 생산균주인 *Streptomyces bikiniensis* KCTC 9172는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, Daegu, Korea)로부터 확보하였다. 본 균주는 -70°C에서 동결보관하고 그것을 ISP No. 2 medium(Difco)에 도말하여 28°C에서 48시간 배양하였다. V-8 juice(Campbell Soup Company, USA) 200 mL, glucose 2 g, yeast extract 2 g(Difco), CaCO₃ 1 g, agar 20 g을 증류수 800 mL에 용해시켜 제조한 Papavizas' VDYA agar에 *S. bikiniensis*를 계대하여 28°C에서 2주간 배양하였다. 회색

의 포자가 형성되면 멸균수 10 mL에 적당한 농도로 포자를 현탁시키고, Bacto-yeast extract(Difco)를 0.2% 포함하는 ISP No. 7 medium에 0.1 mL를 도말하여 배지에 흡수시킨다. 배지표면이 완벽히 마르면 시료 용액 20 μ L를 8 mm paper disc(ADVANTEC, Toyo Roshi kasha, Ltd., JAPAN)에 흡수시킨 후 배지의 중앙에 올리고, 28°C에서 48시간 배양하였다. 이때 시료의 농도는 20 μ L내에 125~1,000 μ g이 되도록 하였고, control은 DMSO로 하였다. 배양 후 나타나는 inhibition zone의 크기는 vernier calipers(Digimatic caliper 500-182, Mitutoyo Corporation, JAPAN)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

Rhapontigenin의 정성분석

Rhapontin으로부터 효소 가수분해에 의해 생성된 물질의 분자량 확인을 위하여 MALDI-Mass 분석을 한 결과, 분자량 258.1로 rhapontigenin의 분자량과 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 생성된 물질의 구조 확인을 위한 ¹H-NMR 분석결과, 비교물질인 rhapontin에 나타난 4.5~5.5분의 peak가 없어진 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 효소반응에 의해 배당체를 형성하고 있던 rhapontin의 glucose가 가수분해 되어 aglycon형태의 rhapontigenin이 생성된 것을 알 수 있었다. 생물전환에 의한 rhapontin(30 g)으로부터 rhapontigenin(11.8 g)으로의 전환 회수율은 39.3%를 보였다.

Tyrosinase 저해활성

Tyrosinase 저해활성 측정 결과, 62.5 μ g/mL의 rhapontin 및 rhapontigenin을 처리한 결과 각각 4.5% 및 31.4%의 활성 저해율을 보였고, 비교물질로 사용한 hydroquinone, kojic acid 및 ascorbic acid는 각각 76.4%, 93.3%, 73.7%의 활성 저해율을 보였다. 또한 1,000 μ g/mL에서 rhapontin은 47.1%,

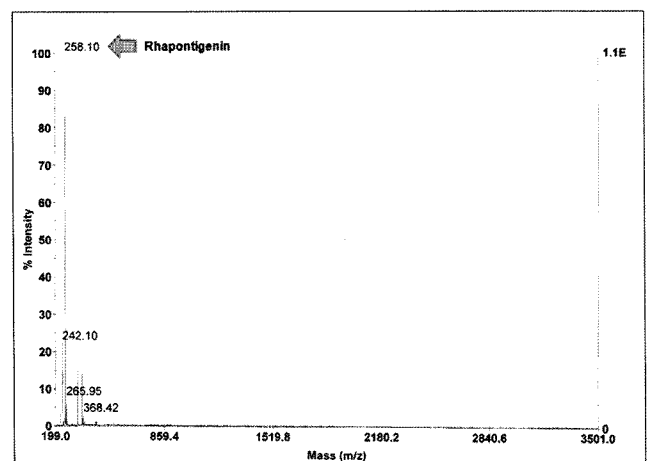


Fig. 2. MALDI-Mass spectrum of rhapontigenin.

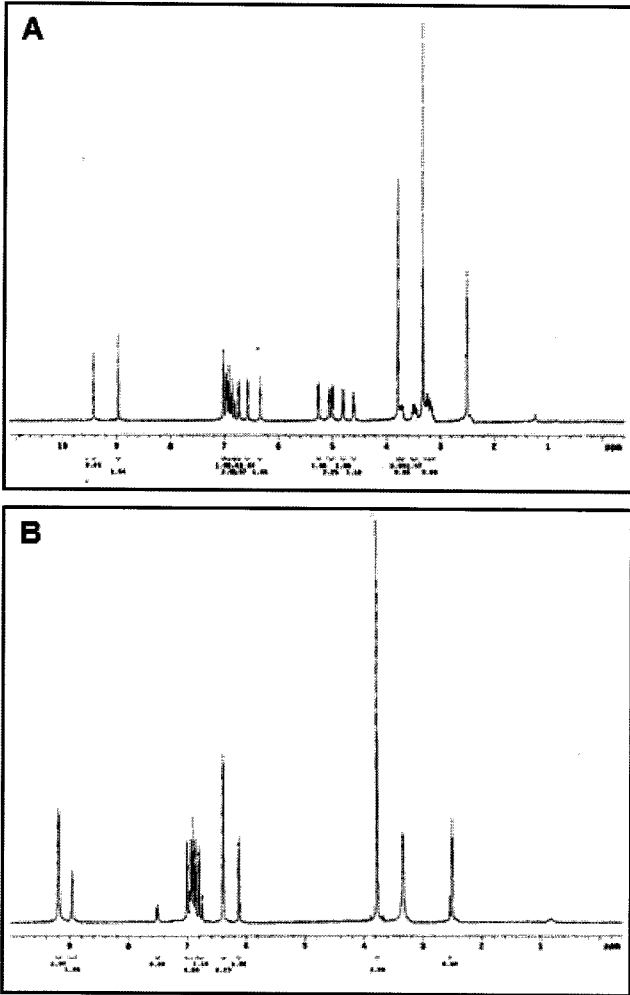


Fig. 3. ¹H NMR spectrum of rhapontin extract (A) and rhapontigenin (B).

rhapontigenin은 89.0%의 활성 저해율을 보였고, 비교물질인 hydroquinone, kojic acid는 99.8%, ascorbic acid는 98.8%의 활성 저해율을 보였다(Fig. 4). 초기 저해율이 높은 kojic acid의 경우 농도 증가에 따라 저해율 증가에 큰 변화를 보이지 않은 반면, rhapontigenin의 경우는 200 µg/mL 이하에서는 농도 증가에 따라 tyrosinase 활성 저해가 급격히 증가하는 농도 의존적인 저해 양상을 보였다. 효소의 활성을 50% 저해하는 농도를 나타내는 IC₅₀ 값을 측정한 결과, rhapontigenin이 rhapontin에 비해 약 7배 높은 저해 활성을 나타내었다(Table 1).

위의 결과로 rhapontin과 rhapontigenin 모두 tyrosinase 저해활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. Rhapontigenin의 경우 저해활성이 저농도에서는 tyrosinase inhibitor로 알려진 kojic acid 및 hydroquinone과 비교하면 큰 차이를 보였으나, 일정농도(500 µg/mL) 이상이면 저해활성의 차이가 크게 감소함을 알 수 있었다. 반면, rhapontin의 경우에는 농도증가에 의해 저해율이 서서히 증가하였으나 시험에 사용한 범위

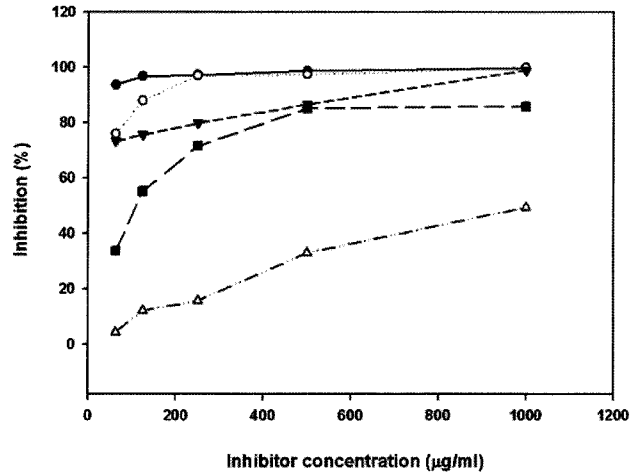


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory activity assay. The test was repeated three times independently and the each result was expressed as the mean value of the results. ●; Kojic acid, ○; Hydroquinone, ▼; Ascorbic acid, △; Rhapontin extract, ■; Rhapontigenin.

Table 1. Determination of IC₅₀ for tyrosinase inhibition.

Inhibitors	IC ₅₀ (µg/mL)
Rhapontin extract	832.8 ± 23.1
Rhapontigenin	126.7 ± 4.5

내에서는 비교물질 및 rhapontigenin에 비해 저해율이 크게 낮은 것을 알 수 있었다. 따라서 rhapontin의 배당체를 효소 가수분해에 의해 제거함으로써 tyrosinase 저해활성을 월등히 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

Enzyme kinetic assay

Tyrosinase inhibition mode에 대한 실험결과 rhapontin과 rhapontigenin 모두 농도가 증가할수록 V_{max} 값과 K_m 값이 감소하였다(Table 2). 따라서 rhapontin과 rhapontigenin은 모두 mixed-type inhibition(혼합형 억제)의 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 즉, tyrosinase의 active site에 기질과 경쟁적으로 결합하여 멜라닌의 생성을 억제하는 competitive inhibition(경쟁 억제)과 tyrosinase의 active site에 기질이 결합한 후 생성되는 효소-기질 복합체에 결합하여 멜라닌의 생성을 억제하는 uncompetitive inhibition(무경쟁 억제)이 혼합되어 있는 형태이다. Inhibition constant (K_i)는 경쟁 억제 일 때 K_i 값과 무경쟁 억제 일 때 K_i' 값으로 나누어 나타내었다. 이 결과는 농도증가에 따라 저해율이 증가하다 일정농도 이상에서는 저해율이 더 이상 증가하지 않는 포화현상을 보인 rhapontigenin 농도증가에 따른 tyrosinase저해 활성 결과(Fig. 4)와 높은 상관성을 보였다.

*Streptomyces bikiniensis*를 이용한 melanin 생성 억제효과
Streptomyces bikiniensis KCTC 9172를 이용한 멜라닌

Table 2. K_i , V_{max} , and K_m values for the mushroom tyrosinase activity in the presence of rhapontin extract and rhapontigenin.

Inhibitory agent	Concentration (mM)	V_{max}	K_m	K_i (mM)	K_i' (mM)	Mode of inhibition
Rhapontin extract	0.05	0.021	4.505	1.042	1.190	Mixed-type
	0.1	0.018	4.292	1.163	0.422	
	0.4	0.010	3.745	0.487	0.340	
Rhapontigenin	0.05	0.020	5.747	0.118	0.450	Mixed-type
	0.1	0.017	5.525	0.175	0.321	
	0.4	0.004	3.322	0.118	0.079	

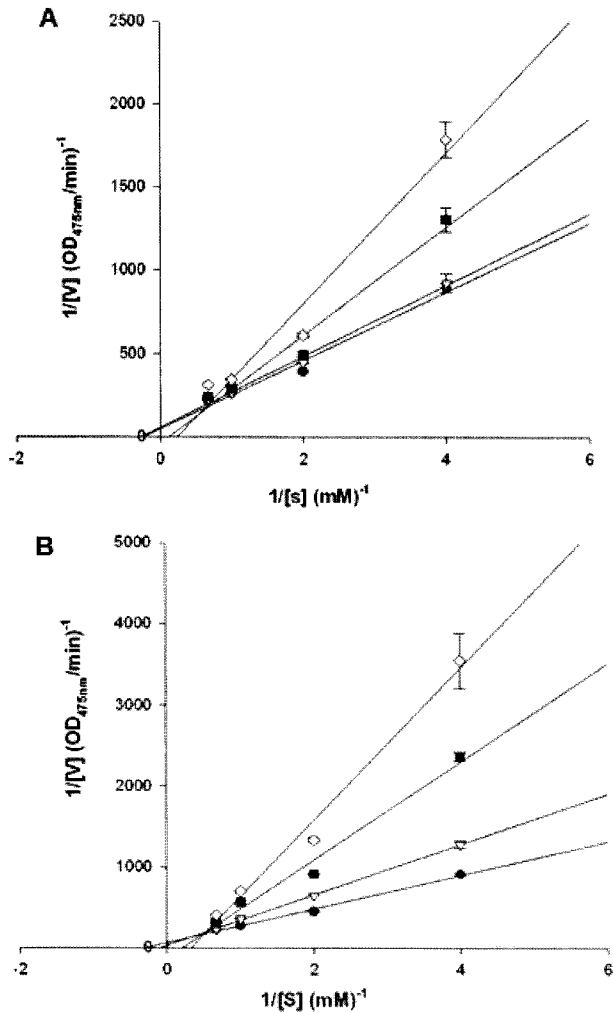


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of mushroom tyrosinase and L-tyrosine with rhapontin (A) and rhapontigenin (B). ●; 0 mM, ▽; 0.05 mM, ■; 0.1 mM, ◇; 0.4 mM. The test was repeated three times independently and the each result was expressed as the mean value of the results.

생성 억제효과를 검토한 결과, rhapontin과 rhapontigenin 모두 inhibition zone이 나타났다. Rhapontin과 rhapontigenin을 용해시키는데 사용된 DMSO를 negative control로 이용한 경우에는 inhibition zone이 나타나지 않았다. Inhibition zone의 크기는 농도 의존적으로 증가 하였으며, rhaponti-

Table 3. Inhibitory activities of rhapontin extract and rhapontigenin on melanin formation in *Streptomyces bikiniensis* KCTC 9172.

Inhibitory agent	Amount used (μg)	Inhibition zone (mm)
Rhapontin extract	125	11.0 ± 0.08
	250	14.8 ± 0.10
	500	20.4 ± 0.17
	1000	23.6 ± 0.09
Rhapontigenin	125	14.9 ± 0.53
	250	17.6 ± 0.15
	500	21.5 ± 0.12
	1000	24.5 ± 0.05

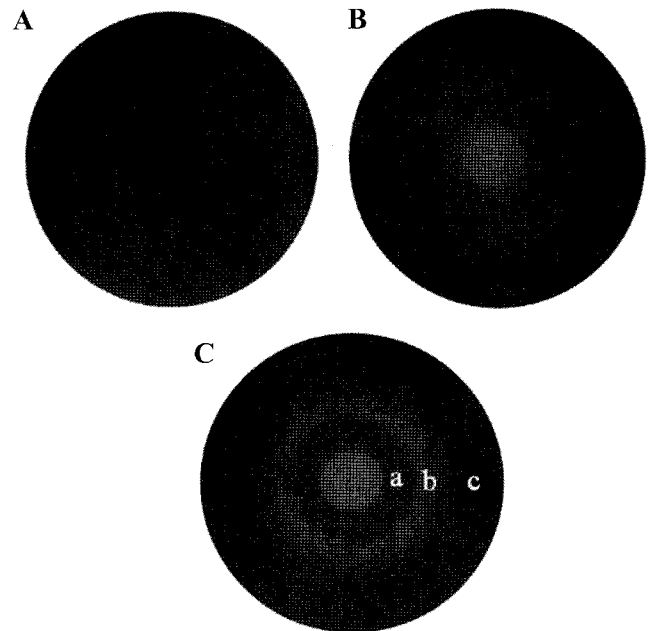


Fig. 6. The inhibition zone of DMSO (A), rhapontin (B), and rhapontigenin (C). The disc contained 1000 μg of each substance. The zones of growth inhibition, melanin synthesis inhibition, and melanin formation were a, b, and c, respectively.

genin의 멜라닌 생성 억제효과가 rhapontin보다 뛰어남을 알 수 있었다(Table 3). 이 결과를 tyrosinase inhibition 측정 결과와 비교해 보면, 두 결과가 매우 유사하여 높은 상관성을 나타내었다.

본 실험에서 관찰된 inhibition zone은 *S. bikiniensis*의 증식이 억제되어 투명하게 보이는 부분과 균이 증식은 되었으나 멜라닌 색소를 생성하지 못하여 흰색을 띄는 부분으로 나누어져 있다(Fig. 6). 이것은 rhapontin과 rhapontigenin이 멜라닌의 생성을 억제함과 동시에 *S. bikiniensis*의 증식 또한 억제한다는 의미로 해석할 수 있다. 따라서 rhapontin과 rhapontigenin은 멜라닌 생성 억제효과 뿐만 아니라 항균제로서의 이용가능성도 있을 것으로 기대된다.

요 약

대황으로부터 추출한 rhapontin을 산업용 효소로 가수분해하여 rhapontigenin을 제조하고 kojic acid, hydroquinone 및 ascorbic acid를 비교물질로 한 tyrosinase 활성저해 실험과 *S. bikiniensis*를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 실험을 통해 미백효과에 대한 가능성을 확인하였다. Rhapontin과 rhapontigenin의 결과를 비교해 보면 rhapontigenin의 경우 tyrosinase 활성저해 및 멜라닌 생성 억제능이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 rhapontin을 효소 가수분해하여 생성된 rhapontigenin은 미백능이 월등히 증가된 천연 미백화장품소재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Battaini, G., E. Monzani, L. Casella, L. Santagostini, and R. Pagliarin. 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**: 262-268.
- Bell, A. A. and M. H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
- Canabás, J., S. Chazarra, and F. García-Carmona. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**: 982-985.
- Choi, B. W., B. H. Lee, K. J. Kang, E. S. Lee, and N. H. Lee. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharm.* **29**: 237-242.
- Dooley, T. P., R. C. Gadwood, K. Kilgore, and L. M. Thomasco. 1994. Development of an in vitro primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agent. *Skin Pharmacol.* **7**: 188-200.
- Hül, H. Z., W. Li, P. Xin, and D. L. Mitchell. 1997. Melanin: A two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**: 158-161.
- Hori, I., K. Nihei, and I. Kubo. 2004. Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytother. Res.* **18**: 475-479.
- Ikeda, T. and T. Tsutsumi. 1990. Function and skin depigment activity of crude drugs. *Fragrance J.* **18**: 59-66.
- Kim, Y. M., J. Yun, C. K. Lee, H. H. Lee, K. R. Min, and Y. S. Kim. 2002. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds: Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **277**: 16340-16344.
- Kubo, M. and H. Matsuda. 1995. Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis. *Fragrance J.* **8**: 48-55.
- Lerner, A. B. and T. B. Fitzpatrick. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 91-126.
- Marotti, I., A. Bonetti, B. Biavati, P. Catizone, and G. Dinelli. 2007. Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flavonoid glycosides by bifidobacterium species from human intestinal origin. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 3913-3919.
- Matsukami, M. 1995. Evaluation of antimelanogenic effects. *Fragrance J.* **19**: 14-19.
- Matubara, H. 1998. Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells. *Natural Product Sciences* **4**: 161-169.
- Mishima, Y., S. Hatta, and Y. Ohyama. 1988. Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* **1**: 367-374.
- Nielsen, I. L., W. S. Chee, L. Poulsen, E. Offord-Cavin, S. E. Rasmussen, H. Frederiksen, M. Enslin, D. Barron, M. N. Horcajada, and G. Williamson. 2006. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J. Nutr.* **136**: 404-408.
- Otieno, D. O. and N. P. Shah. 2007. A comparison of changes in the transformation of isoflavones in soymilk using varying concentrations of exogenous and probiotic-derived endogenous β -glucosidases. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 601-612.
- Peter, E. and I. H. Maibach. 2000. Cosmeceuticals: Drugs vs. Cosmetics. pp. 123-145. Marcel Dekker, New York.
- Tomita, K., N. Oda, M. Ohbayashi, H. Kamei, T. Miyaki, and T. Oki. 1990. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot.* **43**: 1601-1605.

(Received Feb. 25, 2009/Accepted March 9, 2009)