

대추 및 포도 발효물의 생리활성 효과에 관한 연구

박태순¹, 김동희¹, 권오준², 손준호^{1*}

¹(재)한국한방산업진흥원 한방화장품개발팀

²(재)대경지역산업평가원

Received: December 11, 2013 / Revised: March 18, 2014 / Accepted: March 24, 2014

A Study on Biological Activities of Fermented Jujube and Grape

Tae-Soon Park¹, Dong-Hee Kim¹, O-Jun Kwon², and Jun-Ho Son^{1*}

¹Herbal Cosmetic Team, Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongsan 710-260, Republic of Korea

²Daegyeong Institute for Regional Program Evaluation, Gyeongsan 712-210, Republic of Korea

For the development of high value consumables utilizing jujube and grape, we investigated the biological activities of a variety of existing fermentation products of jujube and grape. The results revealed that ethanol fermentation products of jujube and grape had a higher antioxidative activity than acetic acid fermentation products. In addition, the ethanol fermentation products of jujube (JEF) had the highest antioxidative activity, with it being greater than that of the ethanol fermentation products of grape (GEF), the acetic acid fermentation products of jujube (JAF) and the acetic acid fermentation products of grape (GAF). As regards tests on whitening effects, JEF exhibited the highest tyrosinase inhibition effects amongst the test groups. However, when immunofluorescence was employed, JAF was seen to inhibit the expression of proteins related to the whitening effect. In the lipopolysaccharide-stimulated mode peritoneal macrophage model, all tested groups of fermentation products (JEF, GEF, JAF and GAF) suppressed nitric oxide production dose-dependently, with ethanol fermentation products demonstrating a higher nitric oxide expression inhibition effect than acetic acid fermentation products. When subjected to antibacterial activity tests, GAF exhibited antibacterial activity against all tested strains except *Propionibacterium acnes*. Both GAF and JEF revealed high antibacterial activity against *Escherichia coli*.

Keywords: Jujube, grape, fermentation, biological activities, antimicrobial activity

서 론

최근 건강에 대한 지대한 관심과 함께 각종 기능성 식품과 원료 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 원인으로 소득 증가와 함께 식생활 등의 생활환경의 변화와 공업화에 의한 환경오염들을 들 수 있으며 결국 이러한 환경 변화와 오염으로 인한 질병들은 과거와는 다른 양상을 나타내어 현대인들에게 건강에 대한 다양한 요구사항을 만들게 하였다. 그에 따라 많은 연구자들이 약용 및 식용 작물들이 발현하는 다양한 생리활성에 대한 연구를 진행하고 있다[14]. 특히 전통적으로 이용되어온 발효는 최근 상당한 관심을 모으고 있는데, 그 이유는 일부 또는 다수의 유효성분이 대부

분 당이 붙은 고분자로 구성되어 있는 경우가 많아 그럴 경우에는 체내 흡수에 지장이 있어 발효를 하면 당이 떨어져 나가면서 저분자화 되어 체내 흡수율이 증가되고, 새로운 활성 성분의 생성, 독성의 감소, 풍미의 향상 및 저장성 향상, 식물섬유소의 활성 증진 등 많은 장점을 가지기 때문이다[17, 23, 29].

식품과 한방재료로서 널리 사용되어온 대추는 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속하는 낙엽활엽교목의 열매로서 약용성분은 각종 sterol, alkaloid, saponin, vitamin, serotonin, organic acid, fatty acid, polyphenol, flavonoid 및 amino acid 등이 보고되고 있으며[2, 19, 34], 약리작용으로는 항 알레르기 작용, 근수축력 증강작용, 간 보호작용과 빈혈증, 결핵, 기관지염 및 신경쇠약, 조직손상 치료에 유효한 것으로 알려져 있다[17, 24]. 최근 성숙도에 따른 대추 추출물의 항산화 활성 검증결과 미숙, 완숙, 건조 대추 모두 폴리페놀 물질도 다량 함유되어 있으며, 항산화 활성도 우수한 것으로 나타낸다고

*Corresponding author

Tel: +82-53-810-0320, Fax: +82-53-810-0399

E-mail: bio115@dgom.re.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

보고된 바 있다[8].

포도는 갈매나무목(Rhamnales) 포도나무과(Vitaceae)에 속하는 나엽성 덩굴식물로, 포도나무과에는 11속, 700여종의 포도가 있다[12]. 포도에 함유되어 있는 페놀성 화합물의 천연항산화제로서 가치에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin, viviferin 및 resveratrol 등의 polyphenol 물질들이 포도의 주요 생리활성물질로 알려져 있으며, 포도 과피와 종자 추출물의 oral tumor cell에 대한 세포독성, proanthocyanidin의 free radical 소거능, 포도 종자로부터 분리한 polyphenolic fraction의 antitumor 촉진활성, 그리고 resveratrol의 암세포성장 억제 등의 생리활성 연구가 진행되었다[1, 20, 22, 28, 33]. 그러나 대추 및 포도는 이들을 이용한 발효물에 대한 생리활성에 관한 연구는 아직 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 이러한 이유로 본 연구에서는 대추 및 포도를 이용하여 알코올 발효와 초산 발효를 하여 생리활성 탐색을 통해 대추 및 포도의 고부가가치성 소재 개발 및 특화작물로서 개발하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

알코올 발효 및 초산 발효 방법

본 실험에 사용된 대추(*Zizyphus jujuba* Miller)와 포도(*Vitis vinifera* L.)는 경상북도 경산시 자인면에서 생산되는 품종을 이용하였다. 이를 이용한 알코올 발효의 경우 전배양과 본배양을 거쳐 활성화된 *Saccharomyces klutveri* DJ97 (KCTC 8842P)를 대추 및 포도의 착즙액(18° brix)에 5% 용량이 되도록 접종하여 30°C에서 4일간 정치배양하면서 알코올 발효를 수행하여 알코올 발효액이 알코올 도수가 3-4% 및 8-9° brix를 나타내었을 때 이를 농축 및 동결건조하여 시험재료로 사용하였다. 또한 초산 발효의 경우 상기에 기술한 알코올 발효액을 살균처리하여 활성화된 *Acetobacter pasteurianus* KFC 819 (KCTC 10173BP)를 접종하여 30°C에서 10일간 정치배양하여 초산의 함량이 3-4% 및 7-8° brix를 나타내는 것을 이용하여 농축 및 동결건조하여 시험재료로 사용하였다.

재료 및 시약

생리활성 측정 실험에 사용된 시약인 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), xanthine, xanthine oxidase, nitro blue tetrazolium (NBT), mushroom tyrosinase, tyrosine 과 L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA) 및 griess reagent 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포 독성에 측정에 사용된 세포주는 대식세포인 RAW 264.7와 멜라노마세포는 B16F10

을 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정 시약은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항균력 실험에서 사용한 공시 균주는 피부상재균으로서 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Escherichia coli* KCTC 1039 및 여드름유발균으로서 *Propionibacterium acnes* KCTC 3314를 계대 배양하여 사용하였다. 전 배양 및 본 배양을 위한 액체 배지는 nutrient broth, tryptic soy broth를 Difco Lab. (Sparks, MD., USA) 및 Gifu anaerobic medium (GAM, Nissui Co. Japan)를 구입하여 사용하였으며, 생육 저해환 측정을 위한 고체배지는 상기 액체배지에 agar를 첨가하여 본 실험에 사용하였다.

항균효과 측정

항균효과 측정은 paper disc 법을 이용하여 측정하였다[6]. 즉, 평판 배지에 배양된 각 균주를 1 백금이 취해서 액체 배지 10 ml에서 18-24시간 배양하여 활성화시킨 후 다시 액체 배지 10 ml에 균액을 0.1 ml 접종하여 3-6시간 본 배양한 후 평판배지 1개당 균 수가 약 1×10^7 cells이 되게 접종하여 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc (8 mm, Tokyo, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 0.05 ml/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜 37°C에서 18-24시간 배양하여 disc 주위의 clear zone (cm)의 직경을 측정하였다.

세포 생존율 측정

대식세포(RAW 264.7) 및 멜라노마세포(B16F10)는 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 세포 독성 측정은 Carmichael 등[5]의 방법에 따라 측정하였다. 이 방법은 MTT가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것으로, RAW 264.7 세포와 B16F10세포 0.6~0.8 × 10³ cells/ml를 96 well plate에 분주하고 대추 및 포도의 발효물을 농도별(0.01-5 mg/ml)로 24시간 동안 처리하였다. Well당 20 μl의 MTT용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

항산화 효과 측정

대추 및 포도의 발효물들의 항산화 활성은 DPPH anion scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity, ABTS⁺· cation scavenging activity를 측정하여 평가하였다. 먼저 DPPH anion scavenging activity에 대한 실험은 기존에 보고된 방법을 변형하여 96 well plate에 맞게 수정하여 측정하였다[3]. 각 시료용액 800 µl에 0.15 mM의 DPPH 용액 200 µl를 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. Superoxide anion radical scavenging activity의 경우, NBT 환원방법에 의해 측정하였다[15]. 각 시료 용액 100 µl와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 400 µl에 xanthine (0.4 mM)을 녹인 기질액 400 µl와 NBT (0.24 mM)를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2 U/ml) 100 µl를 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 superoxide anion radical의 양을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, ABTS⁺· cation scavenging activity 측정은 7 mM 2,2-azino-bis (3-ethyl-benthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺·를 형성시킨 후 ethanol로 희석하여 ABTS⁺· 100 µl에 시료 100 µl를 가하여 1분 동안 방치한 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다[25].

미백효과 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등[31]의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 500 µl에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 200 µl 및 시료용액 100 µl의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/ml) 200 µl를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. 한편, immunofluorescence를 이용한 미백효과 측정은 B16F10 세포를 Lab-tek chamber

8 well에 세포를 1 × 10⁶개로 분주하여 24시간 안정시킨 뒤, 시료를 농도 별로 처리한다. 24-48시간이 지난 뒤 차가운 phosphate buffer saline (PBS) 완충용액으로 3회 세척한 뒤 0.5% triton X-100을 10분간 가하여 세포를 투과하였다. 다시 PBS 완충용액으로 3회 세척한 뒤 1% bovine serum albumin을 넣어 1시간 동안 방치하였다. Primary anti-body (tyrosinase 1:100, microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 1:100)를 4°C에서 over night하였다. 1차 반응이 끝나면 PBS로 3차 세척 후 alexa flour 568 goat anti-mouse IgG (1:1,000)을 첨가하고 차광하여 1시간 동안 반응시켰다. 40분 후에 DAPI를 200 µl씩 well에 첨가하였다. PBS 완충용액으로 4회 세척 후 chamber를 제거한 후 slide에 mounting solution을 첨가하여 커버 슬립으로 고정하여 관찰을 하였다.

항염증 효과 측정

항염증 효과 측정은 nitric oxide (NO)의 농도를 측정하는 방법으로 NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 5 × 10⁴ cells/ml로 조절한 후 12 well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator에서 24시간 전 배양하였다. 세포에 1 µg/ml의 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하고 1시간 뒤에 0.01-1 mg/ml의 대추 및 포도 발효물을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후 griess 시약과 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성율을 백분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

항균효과 측정 결과

대추 알코올 및 초산 발효물과 포도의 알코올 및 초산 발효물의 항균력을 검토하기 위하여 피부상재균인 *S. aureus*, *E. coli* 및 *S. epidermidis*와 여드름 유발균인 *P. acnes*에 대한 clear zone 형성을 관찰한 결과 Table 1과 같이 나타내었

Table 1. Antimicrobial activity of various fermentation products on several microorganisms.

Strains	JEF (mg/disc)			GEF (mg/disc)			JAF (mg/disc)			GAF (mg/disc)		
	1.5	2.5	5	1.5	2.5	5	1.5	2.5	5	1.5	2.5	5
<i>S. epidermidis</i>	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1 ± 0.21 ^b
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2 ± 0.10
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	1.3 ± 0.55	-	1.2 ± 0.07	1.7 ± 0.55	-	1.1 ± 0.06	1.5 ± 0.15
<i>P. acnes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aNo inhibition.

^bInhibition zone diameter (cm), JEF: ethanol fermentation of jujube, GEF: ethanol fermentation of grape, JAF: acetic acid fermentation of jujube, GAF: acetic acid fermentation of grape.

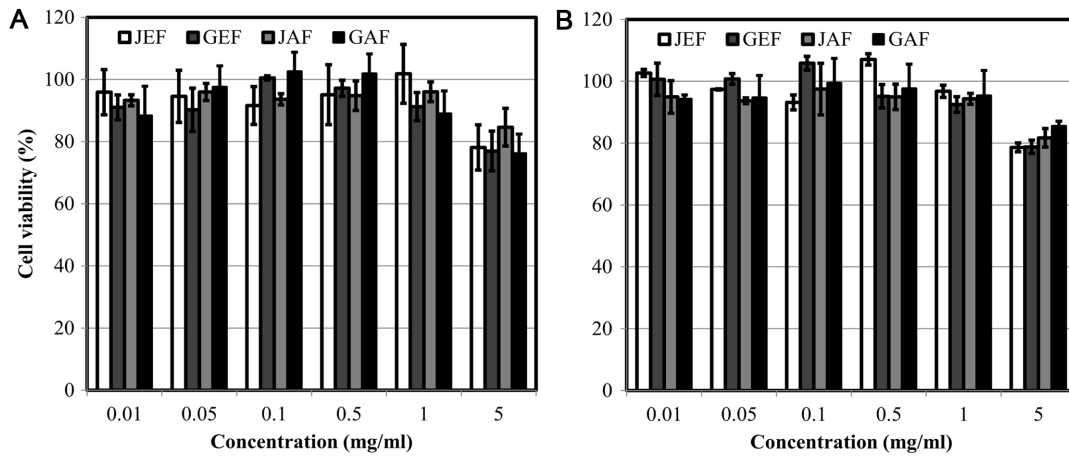


Fig. 1. Cell viability of various fermentation products. (A) macrophage (RAW 264.7), (B) melanoma cell (B16F10), □ JEF : ethanol fermentation of jujube, ■ GEF : ethanol fermentation of grape, ▒ JAF : acetic acid fermentation of jujube, ■ GAF : acetic acid fermentation of grape. Result are means ± S.D. of triplicate data.

다. 포도의 초산 발효물이 *P. acnes*를 제외한 모든 균주에 대해서 항균효과가 나타났으며, 대추의 초산 발효물의 경우 *E. coli*에 대해서 항균 효과가 나타났다. 즉, *E. coli*에 대해서는 포도 알코올 발효물과 초산 발효물이 5 mg/disc에서 1.3 cm, 1.5 cm를 나타내었으며, 대추 초산 발효물의 경우 2.5 mg/disc과 5 mg/disc에서 각각 1.2 cm, 1.7 cm의 저해환을 나타내었다. 이와 같은 결과로 보아 알코올 발효보다 초산 발효가 항균 효과가 높음을 알 수 있었으며, 또한 대추의 발효물 보다는 포도의 발효물이 다양한 균주에서 생육저해환을 나타내는 것으로 조사되었다.

세포 생존율 측정 결과

세포 생존율을 확인하기 위한 MTT 검색법은 96 well plate를 사용하였으며, 검사결과를 ELISA reader (multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있는 방법 중의 한 방법이다[21]. 대추 및 포도 발효물들이 세포의 증식에 미치는 영향에 대해 알아보기 하여 0.01-5 mg/ml으로 48시간 동안 처리한 결과 발효물 모두 1 mg/ml에서는 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었으며, 5 mg/ml에서는 발효물 모두 세포독성을 나타내었다(Fig. 1). 이와 같은 결과로 NO 측정과 immunofluorecence 측정은 1 mg/ml 이하의 농도에서 실험하였다.

항산화 효과 측정 결과

대추 및 포도 발효물들의 항산화 효과를 측정된 결과를 Table 2와 같이 나타내었다. 먼저, DPPH anion scavenging activity (전자공여능) 측정 결과 대추의 알코올 발효는 5 mg/ml에서 59%를 나타내어 발효물 중 가장 높은 DPPH 소거

Table 2. Antioxidant activity of various fermentation products.

Samples (mg/ml)	Antioxidant activity (%)			
	DPPH scavenging activity	Superoxide anion radical scavenging activity	ABTS scavenging activity	
JEF	1	33.8 ± 1.2	36.9 ± 1.9	58.1 ± 4.9
	5	58.7 ± 2.4	76.4 ± 0.8	95.6 ± 1.6
GEF	1	29.6 ± 4.1	19.5 ± 3.9	23.8 ± 1.6
	5	36.9 ± 1.7	61.5 ± 2.2	60.7 ± 5.0
JAF	1	24.1 ± 1.5	41.6 ± 6.7	38.6 ± 2.8
	5	53.2 ± 0.4	69.9 ± 2.8	73.7 ± 1.9
GAF	1	9.5 ± 1.2	21.3 ± 4.1	18.5 ± 1.5
	5	32.1 ± 0.4	57.8 ± 3.9	55.5 ± 1.4
Vit. C	1	83.8 ± 0.2	85.6 ± 7.2	98.8 ± 2.8
	5	86.9 ± 0.1	96.2 ± 5.2	100 ± 1.2

JEF: ethanol fermentation of jujube, GEF: ethanol fermentation of grape, JAF: acetic acid fermentation of jujube, GAF: acetic acid fermentation of grape, Vit. C: ascorbic acid. Result are means ± S.D. of triplicate data.

능을 나타내었으며, 대추의 초산 발효의 경우 53%, 포도의 알코올 발효물은 37%, 포도의 초산 발효물은 32%의 소거능을 나타내어 알코올 발효물과 초산 발효물 비교시 알코올 발효물이 높은 DPPH 소거능을 나타내었다. 이는 Hong 등[8]의 건대추의 전자공여능 측정결과 5 mg/ml에서 53.8%의 효능을 나타내어 대추의 초산 발효물과 유사한 효과를 나타내었다. 또한, Krigaya [13]와 Yamaguchi [32]의 전자공여작용이 페놀산 화합물과 높은 상관관계가 있다는 보고를 참조시 발효과정에서 포도의 페놀산 화합물이 분해되는 것으로

사료되며, 이를 규명하기 위한 향후 연구가 필요하다고 생각된다. 두번째로, superoxide anion radical scavenging activity 측정결과는 대추의 알코올 발효물이 5 mg/ml에서 70%, 초산 발효물이 69%로 높은 소거능을 나타내었으며, 포도의 알코올 및 초산 발효물은 각각 62%, 58%의 소거능을 나타내어 대추의 알코올 발효물이 가장 높은 소거능을 나타내었다. 이는 Hong 등[8]의 미숙, 완숙, 건대추의 열수 및 에탄올 추출물에 대한 xantin oxidase 저해능을 측정한 결과 모든 추출물 5 mg/ml에서 대추 및 포도의 발효물보다 낮은 저해능을 나타내어 발효물들이 우수함을 나타내었다. 마지막으로, ABTS⁺· cation scavenging activity는 ABTS와 potassium persulfate와의 반응으로 ABTS⁺· radical이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띄게 되는데, 시료를 첨가함에 따라 연한 녹색으로 decolorization되는 것을 측정하는 방법이며, hydrogen donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다[30]. 이러한 ABTS 소거능을 측정한 결과 포도의 알코올 및 초산 발효물의 경우 5 mg/ml에서 61%, 56%의 ABTS 소거능을 나타낸 반면, 대추의 발효물 중 알코올 발효의 경우 5 mg/ml의 농도에서 vitamin C에 필적하는 활성을 나타내어 발효물 중 가장 높은 소거능을 나타내었다.

미백효과 측정 결과

Melanin 생성은 tyrosinase, tyrosinase related protein 1, tyrosinase related protein 2와 같은 3종의 효소에 의해 조절된다[11]. 이러한 효소들은 세포 내에서 cyclic adenosine monophosphate / protein kinase A 경로를 통해 melanin을

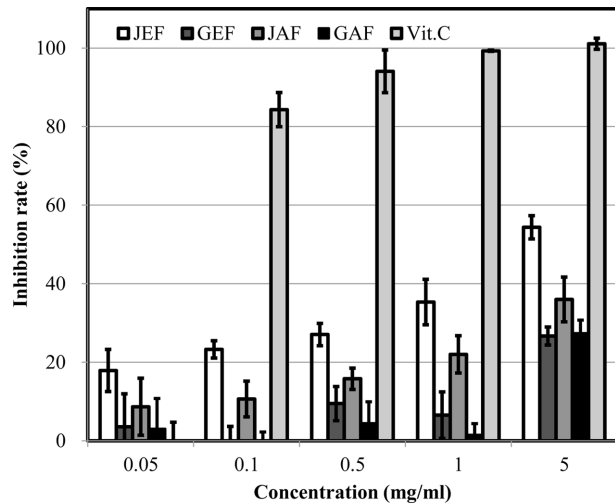


Fig. 2. Tyrosinase inhibition rate of various fermentation products. □ JEF: ethanol fermentation of jujube, ■ GEF: ethanol fermentation of grape, ▒ JAF: acetic acid fermentation of jujube, ■ GAF: acetic acid fermentation of grape, ▒ Vit. C: ascorbic acid. Result are means ± S.D. of triplicate data.

합성한다. 즉, 자외선에 피부가 노출되면 피부의 keratinocyte가 자극을 받게 되어 α-melanocyte stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone 등의 신호전달물질을 melanocyte로 분비하게 되어 세포 내 cyclic adenosine monophosphate가 증가하게 되며, protein kinase A를 활성화시켜 MITF 발현을 증가시킨다[4, 27]. 이렇게 발현이 증가된 MITF는 tyrosinase, tyrosinase related protein 1, tyrosinase related protein 2의 생합성을 촉진시켜 melanin이 증가하게 된다[26]. 3종의 효소 중 tyrosinase는 tyrosin으로부터 DOPA와 DOPA-quinone을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 melanin 색소 생성에 관여하는 효소로 자외선에 의하여 melanocyte의 유사분열이 일어나고 이어서 melanocyte가 활성화 된다[7]. 활성화 된 melanocyte에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 melanin의 생성이 항지되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 되어 기미, 주근깨와 같은 색소 침착이 일어나게 된다. 이

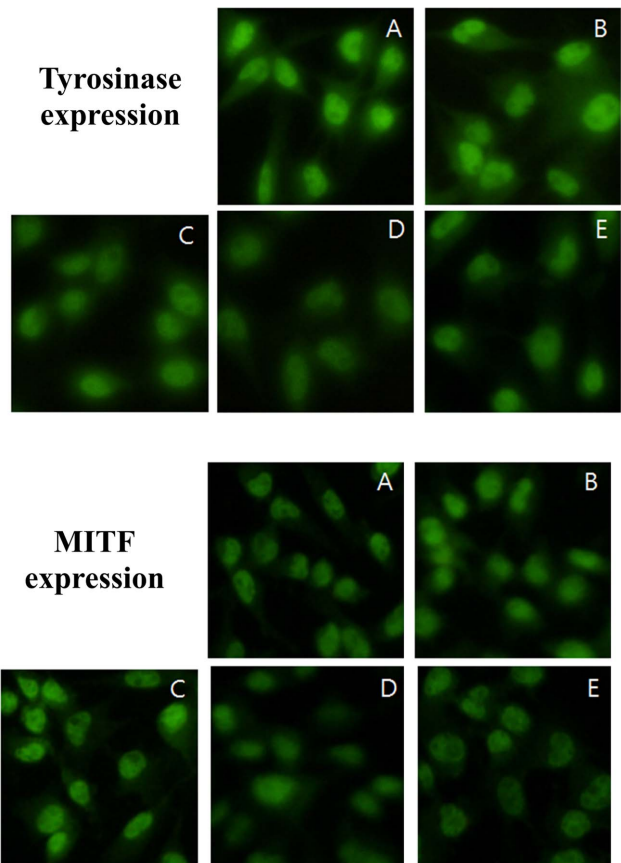


Fig. 3. Reduced cellular expression of tyrosinase and MITF using immunofluorescence assay. (A) control, (B) ethanol fermentation of jujube, (C) ethanol fermentation of grape, (D) acetic acid fermentation of jujube, (E) acetic acid fermentation of grape. B16F10 cells (1×10^6 cells) were seeded in serum free medium for 1 h at room temperature. The cells were treated with 1 mg/ml of various fermentation products for 48 h.

는 따라서 tyrosinase 활성억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성억제 실험은 유용한 평가법으로 인정되고 있다[9, 10]. 대추 및 포도 발효물들의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 대추의 알코올 발효의 경우 5 mg/ml에서 54%의 저해능을 나타내어 발효물 중에서 가장 높은 저해활성을 나타내었으며, 초산 발효는 5 mg/ml에서 36%의 tyrosinase 저해능을 나타내었다. 포도의 알코올 및 초산 발효물은 5 mg/ml에서 각각 26% 이상의 저해능을 나타내었다(Fig. 2). 세포 내에서의 melanin의 합성 기전 및 미백기전의 상관관계를 알아보기 위하여 MITF 및 tyrosinase의 발현 정도를 면역형광 염색법(immunofluorescence)을 실시한 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. MITF 발현은 대추 초산 발효물이 대조군과 비교시 형광발현이 줄어드는 것을 확인하였으며, tyrosinase 단백질 발현의 경우 대추 및 포도의 발효물을 1 mg/ml의 농도로 처리한 결과 대추와 포도의 초산 발효물은 대조군과 비교시 형광 발현이 줄어드는 것을 확인하였다. 또한, 포도의 알코올 발효물은 형광 발현이 미미하게 줄어드는 것을 확인 하였다. 이는 tyrosinase 활성 저해 실험과 상반된 효능을 나타내어 좀 더 정확한 미백기전의 규명을 위한 실험이 향후 수행되어야 할 것이다.

항염증효과 측정 결과

NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginie으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완

등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다[16, 18]. RAW 264.7 cell의 NO 생성억제 정도를 측정하기 위하여 세포에 10 µg/ml의 LPS를 처리 후 대추 및 포도의 발효물을 농도별로 처리하여 생성되는 NO 량을 측정된 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비하여 높은 NO 발현양을 나타내었으며, 각 발효물마다 NO 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 포도의 초산 발효물의 경우 1 mg/ml의 농도에서 37%의 NO 발현 억제 효과를 나타내었으며, 대추 및 포도 알코올 발효물의 경우 같은 농도에서 35%에 가까운 NO 발현 억제 효과를 나타내었다.

이와 같은 상기의 결과를 종합해 보면 초산 발효물보다 알코올 발효물이 우수한 활성을 나타내었으며, 대추의 알코올 발효물이 항산화, 미백, 항염증 및 항균효과를 보유하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 향후 기능성 식품 및 피부 미용 소재로서의 활용을 위한 근거 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

대추 및 포도를 이용하여 고부가가치성 소재 개발 및 특화작물로서 개발하기 위하여 이들을 이용한 알코올 발효와 초산 발효를 한 후 발효물들의 생리활성을 검증하였다. 항산화 활성을 측정결과 초산 발효물보다 알코올 발효물이 우수

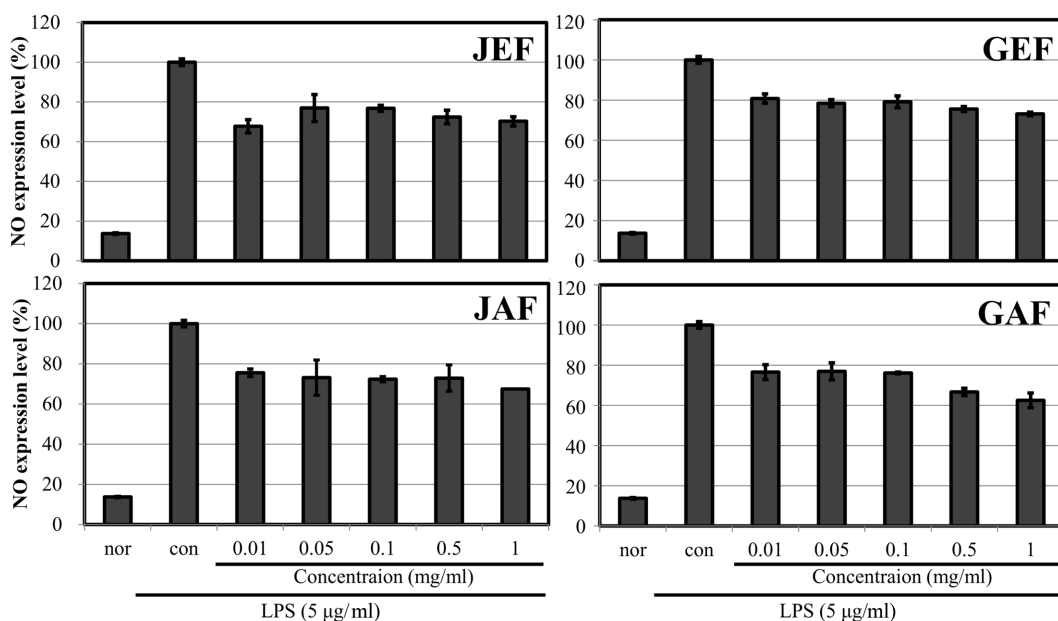


Fig. 4. Effects of various fermentation products on the production of nitric oxide in macrophage cell (RAW 264.7). nor: LPS not induced group, con: LPS induced group, JEF: ethanol fermentation of jujube, GEF: ethanol fermentation of grape, JAF: acetic acid fermentation of jujube, GAF: acetic acid fermentation of grape. Result are means ± S.D. of triplicate data.

한 활성을 나타내었으며, 그 중 대추의 알코올 발효물이 다른 발효물보다 높은 항산화 활성을 나타내었다. 미백효과 측정결과 또한 대추의 알코올 발효물이 우수한 효능을 나타내었으나, immunofluorescence를 이용한 미백효과측정결과 대추의 초산 발효물이 미백에 관련된 단백질 발현을 저해하는 것으로 나타내었다. 대추 및 포도의 발효물들은 대식세포에서 lipopolysaccharide에 의해 생성된 nitric oxide를 농도 의존적으로 감소시켰으며, 알코올 발효물이 초산 발효물보다 우수한 효능을 나타내었다. 발효물들의 항균력을 측정된 결과 포도의 초산 발효물이 *Propionibacterium acnes*를 제외한 모든 균주에 항균력을 나타내었으며, *Escherichia coli*에 대해서는 포도의 알코올 발효물과 대추의 알코올 발효물이 높은 항균력을 나타내었다.

References

1. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **95**: 179-189.
2. Bal JS, Jawanoda JS, Singh SN. 1979. Development physiology of ber (*Zizyphus mauritina*) var. urman. IV. Change in amino acids and sugar (sucrose, glucose and fructose) at different stages of fruit ripening. *Ind. Food. Pack.* **33**: 3335-3337.
3. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* **26**: 1199-1120.
4. Busca R, Ballotti R. 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigm. Cell Res.* **13**: 60-90.
5. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
6. Conner DE, Beuchat LR. 1984. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 229-233.
7. Han HS, Park JH, Choi HJ, Son JH, Kim YH, Kim S, et al. 2004. Biochemical analysis and physiological activity of *perilla* leaves. *Korean J. Food Culture.* **19**: 94-105.
8. Hong JY, Nam HS, Shin SR. 2010. Changes on the antioxidant activities of extracts from the *Zizyphus jujube* Miller Fruits during maturation. *Korean J. Food Preserv.* **17**: 712-719.
9. Imokawa G, Mishima Y. 1980. Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors and their differential action on melanogenic subcellular compartments in amelanotic and melanomas. *Br. Japan Dermatol.* **103**: 625-633.
10. Imokawa G, Mishima Y. 1981. Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br. Japan Dermatol.* **104**: 531-539.
11. Kameyama KC, Sakai C, Kuge S, Nishiyama S, Tomita Y, Ito S, et al. 1995. The expression of tyrosinase, tyrosinase-related proteins 1 and 2 (TRP 1 and TRP 2), the silver protein, and a melanogenic inhibitor in human melanoma cells of differing melanogenic activities. *Pigm. Cell Res.* **8**: 97-104.
12. Kim WS. 1995. *Grape processing industries*. In *New Cultivation Method of Grape*, pp. 58-92. Munun Publishing Co, Seoul.
13. Krigaya N, Kato H, Fujimaki M. 1971. Studies on antioxidant activity of nonenzymic browning reaction products, Part III. Fractionation of browning reaction solution between ammonia and D-glucose and antioxidant activity of the resulting fractions. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **45**: 292-298.
14. Kwon OW, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Ahn JH, Lee HJ, et al. 2007. Comparison of immuno modulatory and anticancer activities according to the parts of the *Styrax japonica* Sieb. et Zucc. *Korean J. Med. Crop Sci.* **15**: 170-176.
15. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474.
16. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* **43**: 109-142.
17. Na HS, Kim KS, Lee MY. 1996. Effect of Jujube Methanol Extract on the Hepatotoxicity in CCl4-Treated Rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**: 893-855.
18. Nathan C, Xie QW. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* **78**: 915-918.
19. Okamura N, Nohara T, Yagi A, Nishioka I. 1981. Studies of dammarane-type saponin of *Zizyphus fructus*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**: 675-683.
20. Palma M, Taylor LT. 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *J. Chromatogr. A.* **849**: 117-124.
21. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, et al. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**: 5875-5879.
22. Piver B, Berthou F, Dreano Y, Lucas D. 2001. Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. *Toxicol. Lett.* **125**: 83-91.
23. Pryor WA. 1986. Oxy-radicals and related species : their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* **48**: 657-667.
24. Rhee YK, Kim DH, Han MJ. 1998. Inhibitory effect of *Zizyhi frutus* on glucuronidase and tryptophanase of human intest-eria. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**: 199-205.
25. Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
26. Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ, et al. 2006. Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activa-

- tion of p38-stress signalling to CREB. *Pigm. Cell Res.* **19**: 595-605.
27. Sassone-Corsi P. 1998. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**: 27-38.
28. Shirataki Y, Kawase M, Saito S, Kurihara T, Tanaka W, Satoh K, *et al.* 2000. Selective cytotoxic activity of grape peel and seed extracts against oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* **20**: 423-426.
29. Shon MY. 2007. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with *Mycelial* Mushrooms. *Food Ind. Nutr.* **12**: 51-57.
30. Wang MF, Shao Y, Li JG, Zhu NQ, Rngarajan M, LaVoie EJ, *et al.* 1999. Antioxidative phenolic compound from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* **62**: 454-456.
31. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica.* **3981**: 517-519.
32. Yamaguchi N. 1969. Studies on the browning reaction products from reducing sugars and amino acids, Part IX. Antioxidative activities of browning reaction products and several reductones. *J. Japanese Soc. Food Sci. Technol.* **16**: 140-144.
33. Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. 1999. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* **20**: 1737-1745.
34. Zryaev R, Irgasheve T, Israilov IA, Abdullaev ND, Yunusov MS, Yunusov S. 1977. Alkaloids of *Zizyphus jujuba* structure of yuziphine and yuzirine. *Khim. Prir. Soedin.* **2**: 239-243.