

홍국발효 콩 함유 현미 식초의 Tyrosinase와 Elastase의 저해작용에 미치는 영향 - 연구노트 -

황지영 · 조호연 · 표영희
성신여자대학교 식품영양학과

Effect of Unpolished Rice Vinegar Containing *Monascus*-Fermented Soybean on Inhibitory Activities of Tyrosinase and Elastase

Ji-Young Hwang, Ho-Youn Cho, and Young-Hee Pyo

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

ABSTRACT Cosmeceutical potentials of unpolished rice vinegars containing different amounts of *Monascus*-fermented soybean powder (soy-koji) were investigated. Four different vinegar types were prepared using 0, 10, 30, and 50% soy-koji addition. Soy-koji vinegar showed stronger cosmeceutical properties, in terms of tyrosinase and elastase inhibitory activities as well as antioxidant capacities, than unpolished rice vinegars ($P<0.05$). Bioactive effects of soy koji vinegar increased with increasing concentrations of total phenolics and isoflavone aglycones ($P<0.05$). Results indicate that unpolished rice vinegar supplemented with soy-koji can be an efficient strategy to improve bioactivities in vinegar with associated enhancement of cosmeceutical functionality.

Key words: *Monascus* sp., soy-koji vinegar, cosmeceutical potentials, isoflavone aglycone

서 론

오늘날 미용기능식품(bauty food) 산업은 현재 전 세계적으로 크게 성장하고 있는 추세로, 식이와 피부 및 건강에 대한 소비자들의 이해와 인식이 깊어짐에 따라 다양한 목적의(nutriceuticals, beauty supplements, nutricosmetics) 미용건강 제품이 연구 개발되고 있다(1,2). 특히 건강기능성 소재의 미용기능식품으로의 활용은 이너뷰티(inner beauty) 이상의 특수한 복합 기능성을 지향하여 소비자의 건강과 미용 효과를 동시에 구현하려는 연구가 활발한 추세이다(2). 이러한 목적이 실현되기 위해서는 먹을 수도 있고 바를 수도 있어야 하지만 피부노화의 주요 원인인 활성산소종을 제거할 수 있는 항산화 기능은 물론 미백 효과와 주름개선 효과 등이 동시에 나타나야 한다. 인체의 가장 큰 장기의 하나인 피부는 자외선의 영향을 받기 쉬운 기관으로 melanin 증식에 의한 피부노화가 쉽게 진행된다(3). 이러한 melanin 생성에서 가장 중요한 역할을 하는 효소가 tyrosinase이기 때문에 피부 미백제의 개발에서 tyrosinase 활성 억제 실험은 유용한 일차 평가법으로 인정되어 왔다(4). 피부노화의 또 다른 경로는 내인성 피부노화 발생으로, elastase는 피부 각질층의 elastin을 분해하여 피부 탄력성을 저하시켜 주름 생성을 유도하는 유일한 효소이다(5). 따라서 천연소재에서

elastase 저해제를 탐색하는 연구는 주름 개선 효과를 목표로 보고되어 왔다(6,7).

식초는 특유의 자극적인 향과 신맛을 지닌 알칼리성 발효 식품으로 원료의 종류, 제조방법, 발효법 등에 따라 독특한 풍미와 다양한 기능성을 나타낸다. 특히 혈당과 혈압 조절뿐 아니라 심혈관질환의 예방 및 항종양 등의 생리활성이 보고됨에 따라 식초 본연의 조미식품으로서의 기능 이외에 건강 기능성 식품으로의 연구가 활발히 이루어져 왔다(8-10).

홍국(red yeast rice, red koji)은 증백미에 홍국균주(*Monascus* sp.)를 배양시켜 생산한 것으로 천연색소나 민간요법의 소재로 오래전부터 중국을 비롯한 동아시아에서 널리 식용해 온 대표적인 발효제품이다. 특히 *Monascus* 속의 사상균은 쌀 등의 고상기질(solid substrate)에서 성장하는 동안 콜레스테롤 생합성 저해 기능을 특성으로 하는 monacolin K 등의 이차 대사산물을 생산하는 것이 밝혀진 이후로 홍국을 이용한 기능성 건강식품의 개발을 목적으로 하는 연구는 활발하게 진행되어 왔다(11,12). 최근에 보고된 홍국발효 콩과 홍국발효 혼합곡의 항산화, 항고혈압, 항당뇨 및 항콜레스테롤 등의 *in vitro* 상의 실험 결과(13,14)는 홍국발효 쌀(red rice, red koji)에 비해 콩이나 잡곡류가 갖는 기질로서의 다양한 활성 기능이 홍국발효에 의해 증대된 결과로 평가되었다. 특히 콩 기질에 함유된 이소플라본 화합물과 GABA 등의 생리활성 물질은 홍국발효에 의해 그 농도가 증가하므로(15) 홍국발효 콩의 기능성 소재로의 활용은 매우 다양하게 시도될 수 있다. 따라서 본 연구에서는

홍국발효 콩을 함유하는 현미 식초를 제조하여 이미 알려진 다양한 생리활성 이외에 피부미백 및 주름개선 효과 등의 가능성을 탐색하기 위해 tyrosinase와 elastase 효소들의 저해 기능 및 항산화 활성을 평가하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 현미와 백태는 서울에 위치한 대형 마트에서 구입하였다. 한국미생물보존센터(Seoul, Korea)에서 분양받은 홍국균(*Monascus pilosus* KCCM 60084)은 PDA (potato dextrose agar, Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 접종하여 활성화한 후, 홍국균 종배양액(rice powder 34 g/L, peptone 11 g/L, glycine 26 g/L, glucose 129 g/L) 제조에 사용하였다. 술 발효에 사용된 생 전분 분해효소와 효모는 제품명 바이오 누룩-R(Korea Enzyme Co., Ltd., Hwaseong, Korea)을 구입하여 사용하였다. 식초 제조에 사용한 초산균(*Acetobacter aceti* KCCM 40229)은 yeast extract 0.5%, peptone 0.3%, mannitol 2.5%, agar 1.5%, pH 7의 배지조성에서 계대 배양한 후 5%(v/v) 농도로 술에 접종하여 배양한 다음 종초(균수 5.4×10^6 CFU/mL)로 사용하였다. 표준 시약으로 사용한 mushroom tyrosinase, porcine pancreatic elastase(PPE), N-succinyl-tri-L-alanine-4-nitroanilide, tris-HCl buffer, L-tyrosine, L-DOPA, dimethyl sulfoxide, kojic acid, epigallocatechin, Folin-Ciocalteu's reagent, gallic acid, Trolox, daidzin, daidzein, genistin, genistein 등은 모두 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

홍국발효 콩 제조

백태는 흐르는 물에 12시간 이상 침지한 후 물 빼기를 한 시료 50 g을 500 mL 삼각플라스크에 넣고 밀봉한 뒤 121°C에서 20분간 멸균하였다. 종배양액의 액체배지를 시료 중량의 10%(v/w)를 취하여 멸균한 시료에 무균적으로 접종한 다음 30°C의 배양기에서 20일간 발효한 후 동결 건조하여 식초 제조의 원료로 사용하였다.

현미 식초와 홍국발효 콩 식초 제조

현미와 홍국발효 콩을 혼합하여 발효시킨 술을 이용하여 식초를 제조하는 공정은 다음과 같다. 술의 발효기간은 총 8일로 1단 담금에서는 현미, 생전분 분해효소, 효모, 증류수를 혼합하여 25°C에서 발효한 후 대조군 시료의 식초 제조에 사용하였다. 2단 담금에서는 현미 1 kg, 생전분 분해효소 20 g과 증류수 1,500 mL를 넣고 현미 첨가량의 10%, 30%, 50%의 홍국발효 콩을 첨가하여 25°C에서 6일 동안 더 발효시켰다. 발효한 술을 원심분리 한 후 증류수로 모든 시료의 알코올 농도를 6%가 되도록 희석하여 60°C에서 20분간 살

균한 다음, 종초 5%(v/v)를 접종하여 진탕배양기(30°C, 150 rpm)에서 20일간 발효한 후에 식초 종류에 따라 5~10배로 희석하여 시료로 사용하였다. 현미 식초(rice vinegar)와 홍국발효 콩을 10%, 30%, 50% 함유한 세 종류의 현미 식초(이하 홍국발효 콩 식초, soy-koji vinegar)의 아세트산 함량은 각각 평균 $4.1 \pm 0.5\%$, $4.8 \pm 0.6\%$ 였으며 고형물의 함량(solid content)은 각각 평균 $12.7 \pm 1.1\%$ 와 $18.3 \pm 1.3\%$ 로 나타났다.

Tyrosinase 저해 활성 평가

Tyrosinase 저해 활성을 측정하기(4) 위해 반응구는 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5)와 1 mM L-tyrosine을 녹인 기질액 250 μ L, 시료용액 500 μ L의 혼합액에 mushroom tyrosinase 250 μ L를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료 대신 완충용액을 넣은 것은 대조군으로, kojic acid를 넣은 것은 양성 대조군으로 각각 사용하였으며, tyrosinase 저해 활성(%)은 다음 식을 이용하여 계산하였다. 저해 활성(%) = $(1 - \text{시료처리군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$

Elastase 저해 활성 평가

Elastase 저해 활성은 Kraunsoe 등(5)의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉 농도별로 조정된 시료 0.5 mL에 50 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 0.6 unit/mL의 elastase pancreatic solution(source: porcine pancreas) 용액 0.5 mL를 기질과 혼합하였다. 기질의 농도는 50 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 녹인 N-succinyl-tri-L-alanine-4-nitroanilide(1 mg/mL)를 1.5 mL 첨가하였으며 이들 혼합액을 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 흡광도를(410 nm) 측정하여 시료의 elastase 저해 활성을 대조군과 비교하였다. 대조군은 시료 대신 완충용액을 사용하였고, 양성 대조군으로 epigallocatechin을 사용하여 elastase의 저해 활성을 다음 식을 이용하여 평가하였다. 저해 활성(%) = $(1 - \text{시료처리군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$

총 페놀화합물 함량

시료용액 50 μ L에 3차 증류수 1 mL를 첨가한 후 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 넣고 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켰다(16). 반응용액에 7% Na_2CO_3 용액 450 μ L를 넣어 다시 혼합한 다음 실온에서 1시간 동안 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성된 검량선으로 총 페놀화합물 함량을 계산하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalents(mg GAE)/mL로 나타내었다.

Isoflavone 함량 분석

식초의 isoflavone 분석은 HPLC를 사용하여 gradient solvent system으로 분석하였다(17). 시료의 전처리는 현

미 식초와 홍국발효 콩 식초를 80% ethanol과 혼합하여 ultrasonicator(3210-DTH, Branson Ultrasonic Co., Danbury, CT, USA)에서 30분간 추출한 다음 원심분리(2,000 ×g, 10 min) 하였다. 상등액을 취하여 농축한(rotavapor R-300, BUCHI, Flawil, Switzerland) 다음 80% methanol로 재용해한 후 여과(0.22 μm)하여 HPLC(Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)에 20 μL 주입하였다. 분석에 사용된 column은 ODS C18 column(4.6 mm×150 mm, 3.9 μm)이었고 254 nm에서 UV detector로 검출하였다. 이동상 용매는 A(20% methanol)와 용매 B(acetonitrile)를 100:0으로 시작하여 55분 후에는 0:100이 되도록 1 mL/min의 유속에서 이동시켰다. 분리한 isoflavone 함량은 daidzin, genistin, daidzein, 그리고 genistein의 표준물질 UV spectrum을 통해 각각의 peak를 확인한 다음 농도에 따른 표준검량곡선(standard calibration curve)으로부터 산출하였다.

DPPH radical 소거 활성

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich Co.) 라디칼 소거 활성능을 이용한 항산화력은 Brand-Williams 등(18)의 방법을 변형하여 측정하였으며 DPPH에 대한 전자공여능으로 시료에 대한 환원력을 측정하였다. 실험방법은 시료의 종류에 따라 5~10배로 희석한 시료 100 μL에 에탄올로 용해시킨 35 μM DPPH 용액 900 μL를 첨가한 후 10분 후에 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거 활성은 mg Trolox equivalents(mg TE)/mL로 제시하였다.

ABTS radical 소거 활성

ABTS[2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; Sigma-Aldrich Co.] 라디칼 소거 활성 측정은 Re 등(19)의 방법을 변형하여 측정하였다. ABTS를 7.4 mM 농도로 증류수에 용해한 다음 2.6 mM potassium persulfate(Sigma-Aldrich Co.)를 가하여 혼합한 후 실온의 암실에서 24시간 동안 반응시키고 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 사용하였다. 라디칼이 형성된 ABTS 용액을 에탄올로 희석하여 734 nm에서 측정한 흡광도가 0.75±0.04가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액

900 μL와 시료 100 μL를 혼합하여 3분간 반응 후 734 nm에서 측정하였다. 각 시료의 ABTS 라디칼 소거 활성은 mg Trolox equivalents(mg TE)/mL로 제시하였다.

통계 처리

실험 결과는 3회 반복 측정한 후 평균±표준편차로 나타내었다. 각 평균치 간의 유의성은 SPSS program(ver. 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test로 5% 수준에서(P<0.05) 검정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

곡류나 두류에 함유된 폴리페놀 성분은 세포벽과 강하게 결합된 상태로 존재하여 쉽게 흡수되지 않으나, 발효 중인 기질에 존재하는 폴리페놀 성분은 가용성 상태로 존재하여 생물학적 이용성이 증대될 수 있다(20). Table 1에서와 같이 현미 식초와 홍국발효 콩 함유 식초에 들어 있는 총 페놀 함량은 홍국발효 콩 재료의 첨가량이 증가할수록 증가하는 경향으로 나타났다. 특히 50%의 홍국발효 콩을 첨가한 시료의 총 페놀 함량은 현미 식초에 비해 4.8배로 높게 측정되어 현미 식초보다 다양한 폴리페놀 물질이 함유된 것을 알 수 있다. 즉 초산발효 한 현미 식초의 4.15 mg GAE/mL에 비해 홍국발효 콩을 혼합한 시료(10%, 30%, 50%)는 평균 14.26 mg GAE/mL로 나타나 현미 식초에 비해 243.6% 더 증가한 것으로 비교되었다. 그러나 식초 제조 시 50%보다 많은 홍국발효 콩 시료를 첨가하면 비정상적인 초산발효가 발생하여 본 연구에서는 50% 첨가량까지 관찰하였다. 일반적으로 총 폴리페놀의 함량은 초산발효가 진행되는 동안 변화되어 발효 전에 비해 초산발효 후에 유의적으로 감소하는 것으로 보고되어 왔다(8,20). 이는 기질의 pH 변화에 따른 다양한 페놀 물질들의 구조적 변형과 분해로 인한 결과로 발효 전 식초의 pH는 3.5~4.3에 비해 발효 후의 pH는 2.2~2.6으로 감소하기 때문이다(20). 그러나 본 연구에서 현미 식초에 비해 홍국발효 콩 식초의 총 페놀화합물의 함량이 높게 산출된 것은 홍국발효 콩에 함유된 페놀 물질 중 pH의 변화에 영향을 받지 않는 페놀화합물의 함량이 현미에 비해 보다

Table 1. Content of total polyphenols and isoflavones of unpolished rice vinegars containing different amount of *Monascus*-fermented soybean powder (MFSP)

MFSP (%)	Total phenol (mg GAE/mL)	Isoflavones (μg/mL)			
		Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
0	4.15±0.03 ^a	ND	ND	ND	ND
10	6.53±0.06 ^b	12.35±0.13 ^a	1.98±0.06 ^a	33.81±0.94 ^a	57.07±0.32 ^a
30	12.21±0.12 ^c	30.88±0.12 ^b	5.15±0.03 ^a	84.53±1.18 ^b	148.38±2.02 ^b
50	20.04±0.17 ^c	164.56±0.16 ^c	210.22±0.08 ^b	367.21±1.67 ^c	687.32±2.56 ^c

Each value is mean±SD (n=3). Means with different letters (a-c) within a column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test. ND: not detected.

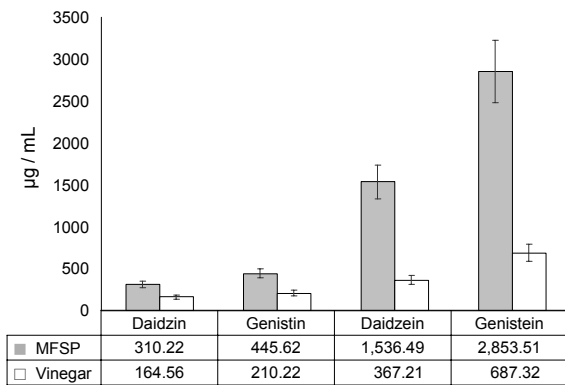


Fig. 1. Isoflavone contents in soy-koji vinegar (unpolished rice+MFSP, 1:1, w/w) and *Monascus*-fermented soybean powder (MFSP).

더 높기 때문으로 추정할 수 있다. 실제로 Hsieh 등(21)은 홍국발효 쌀로 빚은 red koji 식초의 총 페놀 함량이 30일간의 식초발효 동안 발효일에 따라 증가하여 발효 전의 55 ppm에 비해 87 ppm으로 58.2% 증가한 것으로 보고하였다. 따라서 현미와 홍국발효 콩을 혼합하여(w/w) 제조한 식초의 총 페놀 함량은 홍국발효 콩의 첨가량이 증가함에 따라 유의적으로($P < 0.05$) 증가하는 경향을 나타내었다.

Isoflavone 함량

홍국발효 콩 첨가량에 따른 현미 식초의 이소플라본 함량은 Table 1과 같다. 첨가량의 혼합비율이 늘어날수록 이소플라본 화합물의 농도가 높아지는 것으로 나타났다. 이것은 총 페놀 함량의 경향과 유사한 결과로 홍국발효 콩에 함유된 이소플라본 화합물 등이 식초발효 중에 용출하였기 때문이다. 그러나 Fig. 1에서와 같이 홍국발효 콩의 원료에 함유된 이소플라본의 농도에 비해 홍국발효 콩 식초의 이소플라본 함량은 원료의 23.9%~53.1% 정도로 평가되었다. 특히 홍국발효 콩 원료의 주요 이소플라본인 daidzein과 genistein의 식초 기질의 용출량은 각각 23.9%와 24.1%에 비해 β -glycoside형의 daidzin과 genistin의 용출량은 각각 53.1%와 47.2%로 나타나 비배당체에 비해 높게 비교되었다. 이 같은 결과는 식초의 극성 기질에서 소수성의 특성을 갖는 daidzein과 genistein의 용해도가 낮기 때문으로 초산 발효일이 지나도 식초에 함유된 aglycone isoflavones의 농도

는 증가하지 않는 것으로 보고되었다(22,23). 그럼에도 불구하고 본 실험에서 홍국발효 콩을 혼합한 현미 식초의 주요 이소플라본의 이성체는 genistein과 daidzein으로 나타났으며 특히 genistein의 농도는 전체의 48.1%로 나타났다. 이것은 원료인 홍국발효 콩의 성분에 기인한 것으로 Fig. 1에서와 같이 홍국발효 콩 원료의 이소플라본의 93%가 비배당체형의 daidzein과 genistein으로 측정되었다. 많은 연구는 콩에 함유된 배당체형의 이소플라본은 가열이나 미생물 발효 및 산 처리에 의해 대부분 비배당체형 이소플라본으로 전환되기 때문에 생체효율성 및 생리활성이 증대하는 것으로 보고하였다(22-24). 특히 genistein은 daidzein에 비해 보다 강력한 생리활성을 나타내어 nutraceuticals 혹은 cosmeceuticals의 소재로 그 활용가치가 높은 것으로 알려져 왔다(6,23). 본 실험의 결과는 Chen 등(23)이 보고한 홍국발효 식초로 배아 콩을 절임 할 때 기질의 주요 이소플라본은 malonyl daidzin이라는 결과와는 다르게 genistein과 daidzein이 주요 성분으로 비교되었다. 따라서 홍국균을 콩 기질에 직접 접종하여 식초발효를 하는 것보다 먼저 기질을 홍국발효한 후에 식초의 원료로 활용하는 것이 비배당체형의 이소플라본을 효율적으로 활용할 수 있음을 알 수 있다.

항산화 활성

노화의 가장 큰 원인인 산화 방지 효과와 라디칼 생성 때문에 유발되는 피부노화(3) 억제 효과를 측정하기 위해 식초 시료의 항산화 활성을 측정하였다. 현미 식초와 홍국발효 콩 함유 식초의 시료를 희석한 후 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정하여 Trolox 등량 값으로 나타낸 결과는 Table 2와 같다. 현미 식초에 비해 홍국발효 콩 함유 식초의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능이 최대 6.3~7.9배 더 높은 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 홍국발효 콩에 함유된 이소플라본 등의 항산화 물질이 식초 기질에 용출되어 나타난 결과로, 비배당체형의 이소플라본과 항산화 활성 측정치 간의 평균 상관관계수는 $r^2=0.853$ 으로 나타났다. 일반적으로 발효하지 않은 콩 속에 함유된 주요 이소플라본은 genistin과 daidzin 등의 배당체형이 주로 존재하지만, 홍국발효 후 20일이 지나면 이들 성분의 90% 이상이 각각 genistein과 daidzein 등의 비배당체형으로 전환된다(15). 12개의 이소플라본 이성체 중에서 비배당체형의 이소플라본이 배당체

Table 2. Cosmeceutical properties of unpolished rice vinegars containing different amount of *Monascus*-fermented soybean powder (MFSP)

MFSP (%)	DPPH (mM Trolox/mL)	ABTS (mM Trolox/mL)	Anti-tyrosinase (%)	Anti-elastase (%)
0	0.41±0.03 ^a	0.51±0.04 ^a	35.6±1.02 ^a	41.2±0.08 ^a
10	0.84±0.08 ^b	2.15±0.05 ^b	41.1±0.09 ^b	38.7±1.01 ^a
30	1.42±0.06 ^c	3.23±0.12 ^c	66.8±1.12 ^c	52.8±1.33 ^b
50	2.57±0.12 ^d	4.03±0.09 ^d	90.3±1.43 ^d	77.2±1.08 ^c
Kojic acid (0.1%)	—	—	91.5±1.18 ^d	—
Epigallocatechin (0.1%)	—	—	—	89.2±1.06 ^d

Each value is mean±SD (n=3).

Means with different letters (a-d) within a column are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

에 비해 항산화능이 더 높을 뿐 아니라 특히 genistein의 항산화능은 다른 이성체에 비해 가장 항산화 활성이 높은 것으로 알려져 왔다(13,23). Fig. 1에서와 같이 홍국균으로 20일간 발효시킨 홍국발효 콩 분말의 daidzein과 genistein의 함량은 건조 중량 g당 각각 1,536.5 μg 과 2,853.5 μg 으로 높게 나타났으며 특히 genistein의 함량이 가장 높았다. 이들 성분은 식초발효 기간 동안 원료인 발효 콩에 비해 식초의 기질에 daidzein은 23.9%인 367.21 μg , genistein은 24.1%인 687.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 측정되어 이들 성분들이 본 시료의 항산화 활성에 일부 기여한 것으로 평가할 수 있다. 그밖에 식초 기질에 다양하게 존재하는 아세트산 등의 유기산 화합물 역시 기질의 항산화 성분과 상승작용을 통해 시료의 항산화 활성에 긍정적인 영향을 미쳤을 것으로 추정된다. 실제로 Hsieh 등(21)은 홍국발효 쌀로 빻은 red koji 식초의 DPPH 라디칼 소거능에 acetic acid와 melanoidin 등의 화합물이 기여한 결과로 보고하였으며, 기질의 항산화 활성은 발효일에 따라 증가하는 것으로 나타났다. Table 2와 같이 홍국발효 콩의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능에 비해 ABTS 라디칼 소거능이 보다 더 높은 것으로 나타났다. 이는 마늘 식초의 ABTS 라디칼 소거 활성이 DPPH 라디칼 소거 활성보다 높았다는 Jung 등(7)의 보고와 일치하는 결과로, 이 같은 차이는 자유 라디칼인 DPPH와 양이온 라디칼인 ABTS와 반응하는 페놀화합물의 종류가 다르기 때문으로 설명할 수 있다.

Tyrosinase와 elastase 저해 활성

홍국발효 콩 식초의 산미료로서의 기능 이외에 추가적인 생리활성 기능 부여를 위해 식초 시료의 *in vitro* tyrosinase와 elastase의 저해 활성을 측정하여 시료의 미백과 피부 탄력성에 관련된 잠재적 기능성을 평가한 결과는 Table 2와 같다. 현미 식초에 비해 홍국발효 콩 식초의 tyrosinase와 elastase 효소의 저해 활성은 홍국발효 콩 첨가량이 증가할수록 모두 유의적으로 높은 활성을 나타내었다($P < 0.05$). 특히 홍국발효 콩 50% 함유 식초의 tyrosinase 저해 활성은 현미 식초의 $35.6 \pm 1.02\%$ 에 비해 2.5배 이상 높은 $90.3 \pm 1.43\%$ 로 나타났으며 양성 대조군인 kojic acid의 $91.5 \pm 1.18\%$ 와 유사한 저해 활성을 보여 주었다. 이 같은 결과는 홍국발효 콩에 함유된 이소플라본을 비롯한 여러 플라보노이드 성분들이 작용한 결과로 추정된다. 특히 비배당체형의 이소플라본의 농도와 이들 두 효소의 저해 활성 간의 평균 상관계수는 $r^2 = 0.915$ 로 높게 나타나 이들 물질이 주요 기여 성분으로 평가되었다. 이소플라본 특히 daidzein과 genistein의 미백 기능은 여러 연구에 의해 오래전부터 밝혀진 바 있다(25-27). 지금까지 알려진 tyrosinase 저해제는 ascorbic acid, kojic acid, quercetin, 4-hydroxyanisole, hydroquinone, 그리고 arbutin 등이 알려져 왔으나 안전성과 경제성 등의 문제로 대부분 사용이 제한되는 것으로 알려진다(3). Tyrosinase는 melanin 생합성 과정의 key en-

zyme으로 tyrosine을 3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine과 dopaquinone으로 산화시키고 이는 다시 5,6-dihydroxyindole과 5,6-quinone으로 산화되어 최종적으로 중합에 의해 melanin을 생합성한다(4). 이러한 melanin 생성이 과도할 경우 기미, 주근깨, 검버섯, 피부노화 및 피부암 유발 등의 문제가 야기되는 것으로 알려져 왔다(3).

Elastase는 피부주름 생성으로 인한 내인성 피부노화를 발생하는 유일한 효소이므로 elastase 저해제는 피부주름을 개선하는 효과로 보고되었다(1,28). Table 2에서와 같이 홍국발효 콩 식초의 elastase 저해 활성은 현미 식초의 $41.2 \pm 0.08\%$ 에 비해 50% 첨가군에서 $77.2 \pm 1.08\%$ 로 나타나 87.4% 더 높은 저해 활성으로 비교되었으나, 양성 대조군의 epigallocatechin의 $89.2 \pm 1.06\%$ 보다는 낮은 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 Huang 등(26)이 보고한 UVB 조사로 유도한 실험동물의 광산화적 스트레스에 의한 피부노화에서 daidzein과 genistein이 보호 효과를 나타내었다는 결과와 유사한 경향으로 설명할 수 있다. 즉 홍국발효 콩의 함유율이 높은 시료일수록 elastase에 대한 저해 활성이 증가하는 경향은 시료에 함유된 daidzein과 genistein의 농도와 밀접한 관계($r^2 = 0.946$)가 성립되었다. 따라서 홍국발효 콩과 현미를 1:1(w/w)의 비율로 혼합하여 식초를 제조하면 항산화 활성뿐 아니라 tyrosinase와 elastase의 저해 활성이 유의적으로 강화됨을 알 수 있었다($P < 0.05$). 이 같은 결과는 현미와 홍국발효 콩으로 제조한 식초를 음용하거나 화장품 소재로 활용한다면 라디칼 생성에 의해 유발되는 피부노화 억제 효과뿐 아니라 피부의 미백 및 탄력성 강화에도 도움이 될 수 있음을 시사한다.

요 약

현미와 홍국발효 콩 시료의 첨가량을 달리하여 제조한 식초의 미용건강기능성 소재(cosmeceuticals)로의 활용 가능성을 평가한 결과는 다음과 같다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거능으로 측정된 항산화 활성은 현미 식초에 비해 홍국발효 콩이 첨가된 시료가 첨가량에 비례하여 최대 7배 이상 증가하였다($P < 0.05$). 특히 tyrosinase 저해 활성은 50% 첨가량의 시료에서 kojic acid의 저해 활성과 유사하게 나타나 미백 소재로서의 가능성을 보였으며, elastase 저해 활성 역시 첨가량에 비례하여 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). 현미 식초에 비해 홍국발효 콩을 1:1(w/w)의 비율로 첨가한 식초의 높은 생리활성은 시료에 함유된 총 페놀 함량, 특히 이소플라본 비배당체형의 genistein과 daidzein의 농도와 높은 상관관계가 성립되었다.

감사의 글

본 연구는 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었으므로 감사드립니다.

REFERENCES

1. Preetha JP, Karthika K. 2009. Cosmeceuticals – An evolution. *Int J ChemTech Res* 1: 1217-1223.
2. Royer M, Prado M, García-Pérez ME, Diouf PN, Stevanovic T. 2013. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *PharmaNutrition* 1: 158-167.
3. Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM. 2011. Skin ageing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25: 873-884.
4. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol* 46: 982-985.
5. Kraunsoe JA, Claridge TD, Lowe G. 1996. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* 35: 9090-9096.
6. Zhao R, Bruning E, Rossetti D, Starcher B, Seiberg M, Iotsova-Stone V. 2009. Extracts from *Glycine max* (soybean) induce elastin synthesis and inhibit elastase activity. *Exp Dermatol* 18: 883-886.
7. Jung EY, Hong YH, Kim SH, Suh HJ. 2010. Physiological effects of formulations added with black garlic extract on skin care: oxidative stress, tyrosinase and elastase activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 662-668.
8. Kajimoto O, Ohshima Y, Tayama K, Hirata H, Nishimura A, Tsukamoto Y. 2003. Hypotensive effects of drinks containing vinegar on high normal blood pressure and mild hypertensive subjects. *J Nutr Food* 6: 51-68.
9. Nakamura K, Ogasawara Y, Endou K, Fujimori S, Koyama M, Akano H. 2010. Phenolic compounds responsible for the superoxide dismutase-like activity in high-Brix apple vinegar. *J Agric Food Chem* 58: 10124-10132.
10. Chou CH, Liu CW, Yang DJ, Wu YH, Chen YC. 2015. Amino acid, mineral, and polyphenolic profiles of vinegar, and its lipid lowering and antioxidant effects *in vivo*. *Food Chem* 168: 63-69.
11. Journoud M, Jones PJ. 2004. Red yeast rice: a new hypolipidemic drug. *Life Sci* 74: 2675-2683.
12. Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, Heber D. 2008. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 19: 448-458.
13. Pyo YH, Lee TC. 2007. The potential antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Monascus*-fermented soybean extracts: evaluation of *Monascus*-fermented soybean extracts as multifunctional food additives. *J Food Sci* 72: S218-S223.
14. Pyo YH, Seong KS. 2013. Effects of *Monascus*-fermented grain extracts on plasma antioxidant status and tissue levels of ubiquinones and α -tocopherol in hyperlipidemic rats. *Food Chem* 141: 428-435.
15. Pyo YH. 2007. Production of a high value-added soybean containing bioactive mevinolins and isoflavones. *J Food Sci Nutr* 12: 29-34.
16. Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
17. Hsieh HC, Kao TH, Chen BH. 2004. A fast HPLC method for analysis of isoflavones in soybean. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 27: 315-324.
18. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci Technol* 28: 25-30.
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evan C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
20. Andlauer W, Stumpf C, Fürst P. 2000. Influence of the acetic acidification process on phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48: 3533-3536.
21. Hsieh CW, Lu YR, Lin SM, Lai TY, Chiou RY. 2013. Stability of monacolin K and citrinin and biochemical characterization of red-koji vinegar during fermentation. *J Agric Food Chem* 61: 7276-7283.
22. Kim JS, Kim JG, Kim WJ. 2004. Changes of isoflavone contents in soybean cultivars pickled in persimmon vinegar. *Korean J Food Sci Technol* 36: 833-836.
23. Chen JC, Wang J, Wang ZJ, Li YJ, Pang J, Lin HT, Yin SW. 2015. Effect of *Monascus* aged vinegar on isoflavone conversion in soy germ by soaking treatment. *Food Chem* 186: 256-264.
24. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130: 1695-1699.
25. Paine C, Sharlow E, Liebel F, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M. 2001. An alternative approach to depigmentation by soybean extracts via inhibition of the PAR-2 pathway. *J Invest Dermatol* 116: 587-595.
26. Huang ZR, Hung CF, Lin YK, Fang JY. 2008. In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. *Int J Pharm* 364: 36-44.
27. Leyden J, Wallo W. 2011. The mechanism of action and clinical benefits of soy for the treatment of hyperpigmentation. *Int J Dermatol* 50: 470-477.
28. Werb Z, Banda MJ, McKerrow JH, Sandhaus RA. 1982. Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol* 79: 154s-159s.