

*Lactobacillus pentosus*에 의한 발효 전후 마가목 가지 추출물의 항산화 활성 및 Matrix Metalloproteinases 발현 억제 효과

박영민 · 박소현 · 차미연* · 강희철* · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, *(주)지에프씨 생명과학연구원
(2017년 9월 13일 접수, 2017년 10월 5일 심사, 2017년 10월 23일 채택)

Comparison of Antioxidant and Matrix Metalloproteinases Inhibitory Effects of *Sorbus commixta* Twig Extracts before and after Fermentation with *Lactobacillus pentosus*

Young Min Park, So Hyun Park, Mi Yeon Cha*, Hee Cheol Kang*, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

*Life Science Research Institute, GFC Co. Ltd., Yongin-si, Gyeonggi-do 16954, Korea

(Received September 13, 2017; Revised October 5, 2017; Accepted October 23, 2017)

초 록

본 연구에서는 마가목 가지 비발효 추출물과 발효균주 *Lactobacillus pentosus*를 이용하여 발효시킨 발효 추출물에 대하여 항산화 및 MMPs 발현 억제 효과를 조사하고 유효 성분을 분석하였다. 마가목 가지 비발효 추출물과 발효 추출물의 자유 라디칼 소거 활성(FSC₅₀)에서 비발효 추출물은 41.0 µg/mL, 발효 추출물은 58.2 µg/mL이었다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 활성산소 소거 활성(OSC₅₀)은 각각 2.6, 3.0 µg/mL로 나타났다. 진피 섬유아세포에서 세포내 활성산소 소거활성은 10 µg/mL에서 각각 35.3, 40.2%를 나타냈다. 진피 섬유아세포에서 MMPs (MMP-1, MMP-2 및 MMP-3) 발현은 10 µg/mL에서 비발효 추출물은 각각 68.3, 35.0 및 24.2%이었고, 발효 추출물은 각각 84.3, 70.5 및 69.2% 억제되었다. 마가목 발효 전후 추출물의 성분 변화는 TLC, HPLC 및 LC/ESI-MS/MS를 이용하였다. 그 결과, caffeic acid, (-)-epicatechin, isoquercitrin 및 quercetin을 확인하였다. 이상의 결과들은 *L. pentosus*를 이용한 마가목 가지 발효 추출물은 비발효 추출물보다도 ROS 소거 활성이 크게 나타났고 또한 MMPs 발현 억제 효과도 보여주었다. 따라서 마가목 가지 발효 추출물은 항노화 화장품 소재로서 응용 가능성이 있음을 시사하였다.

Abstract

In this study, we investigated antioxidative and matrix metalloproteinases (MMPs) inhibitory effects of *Sorbus commixta* twig extracts and fermented extracts with *Lactobacillus pentosus* and analyzed active ingredients. The free radical scavenging activity (FSC₅₀) of non-fermented and fermented extracts of *S. commixta* twig were 41.04 and 58.2 µg/mL, respectively. In the Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system, the active oxygen scavenging activity (OSC₅₀) was 2.6 and 3.0 µg/mL, respectively. In the dermal fibroblasts, the intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging activity was 35.3% for non-fermented extract and 40.2% for fermented extracts at the concentration of 10 µg/mL. Also at the same concentration, the expression of MMPs (MMP-1, -2, -3) by western blot was 68.3, 35.0 and 24.2%, respectively for non-fermented extracts and 84.3, 70.5 and 69.2% for fermented extracts. TLC, HPLC, and LC/ESI-MS/MS were used for measuring the changes in the components of the extract before and after fermentation. As a result, caffeic acid, (-)-epicatechin, isoquercitrin, and quercetin were identified. From the results, *S. commixta* twig fermented extracts by *L. pentosus* showed greater ROS scavenging activity and inhibitory effects on MMPs expression than those of using non-fermented extracts. Therefore, it is suggested that *S. commixta* twig fermented extracts can be used as an anti-aging cosmetic material.

Keywords: *Sorbus commixta* twig, *Lactobacillus pentosus*, fermentation, antioxidant, MMPs

1. 서 론

전 세계적으로 건강뿐만 아니라 피부 미용에 대한 관심이 증대되면서 건강한 노년을 보내기 위해 노화에 대한 관심이 높아지고 있다[1]. 피부 노화는 내인성 노화와 외인성 노화로 분류된다. 특히, 피부 노화에 가장 큰 영향을 미치는 외인성 노화 중 가장 대표적인 현상은 광노

[†] Corresponding Author: Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr

화이며, 주원인은 자외선에 노출될 때 나타난다[2]. 자외선은 UVA (320-400 nm)와 UVB (280-320 nm)로 크게 구분되며, 그중 UVB는 피부 표피까지 침투하며, 에너지가 크기 때문에 피부노화에 큰 영향을 미친다[3]. UVB에 노출된 피부에서는 싱글렛 옥시젠(1O_2), 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼($O_2^{\cdot-}$), 과산화수소(H_2O_2), 히드록실 라디칼($\cdot OH$), 알콕실 라디칼($RO\cdot$) 및 과산화 라디칼($ROO\cdot$) 등 다양한 종류의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다[4]. 활성산소는 세포 내 손상과 분자 신호 등의 다양한 반응에 관여하는 반응성이 큰 분자로서 단백질 산화, DNA 손상, 지질과산화 반응 개시뿐만 아니라 matrix metalloproteinases (MMPs)들의 분비를 촉진시켜 콜라겐 또는 젤라틴 등의 세포의 기질 분해를 유도하여 피부노화를 가속화시킬 수 있다[5].

MMPs에는 구조와 기능적 특성에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin 등으로 나누어진다[6]. MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, type I과 III collagen을 기질로 하며 MMP-3은 stromelysin 1으로 type IV collagen을 기질로 하여 콜라겐을 조각으로 분해한다[7]. MMP-2는 gelatinase로 이 또한 피부 진피를 구성하는 기질들을 분해하여 피부 노화에 주요한 역할을 한다[8]. 그러므로 피부에서 생성되는 과잉의 활성산소의 생성을 억제하여 피부를 구성하는 기질 물질인 콜라겐과 엘라스틴을 분해하는 MMPs의 발현을 억제하는 소재의 개발은 기능성 화장품 연구에 있어서 매우 중요한 것으로 평가되고 있다[9].

피부 노화를 가속화시키는 MMPs의 발현을 억제하기 위해 합성소재, 천연 식물 추출물 등의 소재들이 사용되고 있으나 안정성과 독성으로 인한 부작용 등의 문제를 나타내고 있다. 이에 최근, 독성과 부작용을 최소화시키기 위해 발효 및 바이오 전환기술을 이용하여 피부항노화 및 미백 등의 기능성을 증가시키는 연구들이 활발히 이루어지고 있다[10,11]. 특히, 발효는 유용한 미생물을 활용하여 천연물이 가진 성분이나 소재 자체의 활성성을 증진시키는 기술로 살아있는 생물을 이용하기 때문에 효소의 효능을 높이고, 분자의 크기 및 극성을 낮추어 피부 흡수력이 용이하며, 생체 이용률을 높인다는 장점을 가지고 있다[12-14]. 이에 따라 저자들은 선행 연구에서, 레몬밤 및 라벤더 발효 추출물이 발효시키지 않은 추출물보다 항산화 활성 및 세포보호 효능이 높음을 확인하여 보고한 바 있다[15,16].

마가목(*Sorbus commixta* Hedl)은 장미과의 낙엽활엽수로 소교목에 속하며 민간적으로 기침, 신경통, 천식, 기관지 치료에 사용하거나 강장제로서 이용되었다[17,18]. 마가목 가지에 함유된 성분으로는 catechin-7-O- β -D-xylopyranoside, catechin-7-O- β -D-apiofuranoside 등의 플라보노이드가 알려져 있고, 혈관계 염증성 질환 예방 및 항동맥경화 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다[19,20]. 저자들은 선행 연구에서 마가목 가지 추출물의 항산화 활성에 대해 연구한 바 있다[21]. 마가목 가지를 이용한 항노화 관련 연구는 거의 없고, 발효를 이용한 발효추출물의 항노화 연구는 아직 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 마가목 가지 추출물과 발효 추출물에 대하여 항산화 및 MMPs 발현 저해 효능을 비교함으로써 발효를 활용한 마가목 가지 추출물의 피부노화 예방 및 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고자 했다.

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

라디칼 소거활성 실험에서 사용된 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT, ELISA reader는 Tecan (Austria)사의 제품을

사용하였으며, pH 미터는 Mettler-Toledo (Switzerland)를 사용하였다. Folin-ciocalteu's phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, luminol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H_2O_2 , 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT), (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g) 및 L-ascorbic acid은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였고, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을 사용하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S) 및 trypsin 등은 Capricorn Scientific (Germany) 제품을 사용하였다.

2.2. *S. commixta* Twig Extracts의 추출 및 발효

2.2.1. 추출 및 발효 추출물 제조

잘게 자른 건조된 마가목 가지(뿌리 제외) 100 g 기준으로 70% 에탄올 4 L에 일주일 동안 침적시켜 추출하였다. 그 후 여과, 감압 건조하여 파우더를 얻었다. 마가목 발효 추출물은 (주)지에프씨로부터 얻었다. 발효 유산 균주는 여러 미생물 중에서 bromophenol blue (BPB)를 이용한 산 생성 균주 선발[22], esculin agar 방법을 통한 β -glucosidase를 생성하는 균주 선발[23], p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p NPG) 방법을 이용한 glucosidase 활성 균주 선발[24] 과정을 거쳐 최종 β -glucosidase 고역가 균주인 *L. pentosus*를 선정하였으며 colony PCR을 이용한 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 유산균주 동정[25]으로부터 *L. pentosus* D79211[26]와 99%의 상동성을 확인하였다. 발효는 1% glucose를 함유한 액상 발효 방법을 사용하였다. 액상배양은 최소한의 영양원으로 1% glucose를 첨가한 증류수에 70% 에탄올 추출물 파우더를 1% 농도가 되도록 첨가한 후, autoclave를 통해 멸균하고 발효 균주 *L. pentosus* 3%로 첨가하여 37 °C에서 5일간 발효를 진행하였다. 이를 마가목 가지 발효 추출물이라고 칭하였다. 발효 전후 차이를 비교하기 위하여 동일한 조건의 용액에 발효 균주를 처리하지 않은 용액을 제조하였고 이를 마가목 가지 비발효 추출물이라고 칭하였다.

2.3. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 피부 노화의 원인으로 간주되고 있다. 본 연구에서는 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자 주개 능력을 통하여 마가목 가지 비발효 추출물, 발효 추출물의 환원력을 측정하였다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가한 후 농도별로 추출물을 각각 1 mL씩 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치한 후 UV/Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소하는 데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, μ g/mL)로 표기하였다.

2.4. 루미놀 화학발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능)

철이나 구리 같은 전이 금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical ($\cdot OH$)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용된 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 각종 ROS ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, 그리고 H_2O_2)를 생성시킨다. 따라서 이계를 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 사이의 반응을 통한 화학 발광을 측정함으로써 알 수

Table 1. HPLC Condition for Separation of Ethyl Acetate Fractions of Non-Fermented Extracts and Fermented Extracts of *S. commixta* Twig

Condition of HPLC analysis				
Column	Shim-pack VP-ODS C18 column (L : 250 mm, LD : 4.6 mm, 5 μ m)			
Detector	UVD 170s DIONEX			
Detection wavelength	254, 365 nm			
Flow rate	1.0 mL/min			
Injection volume	20 μ L			
Mobile phase conditions for HPLC gradient-elution	Program order	Time (min)	2% AA ¹⁾ in D. W (%)	0.5% AA ¹⁾ in 50% ACN ²⁾ (%)
	1	0	100	0
	2	10	100	0
	3	140	50	50
	4	180	30	70
	5	190	30	70
	6	195	100	0
	7	200	100	0

¹⁾ AA : Acetic acid

²⁾ ACN : Acetonitrile

있다. 실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 마가목 가지 비발효 추출물, 발효 추출물과 2.5 mM EDTA 40 μ L, 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μ L, 35 mM luminol 80 μ L를 첨가하여 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고, 5 min 동안 37 °C에서 항온시켰다. 그 후 150 mM H₂O₂ 40 μ L를 넣고 25 min 동안 화학발광을 측정하였다. 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기(counts perminute, cpm)가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygenspecies scavenging activity, OSC₅₀, μ g/mL)로 표기하였다.

2.5. 마가목 가지 발효추출물의 성분 분석

2.5.1. TLC 및 HPLC를 이용한 성분 분석

마가목 가지 추출물의 발효 전후 성분 변화 분석에 마가목 가지 발효 전후 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 사용하였다. 에틸아세테이트 분획물을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 μ m)를 이용하여 여과시킨 추출물 용액을 이용하여 TLC 및 HPLC 분석에 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 상대적으로 극성인 성분을 분석하기 위하여 ethyl acetate : chloroform : formic acid : D.W = 8 : 1 : 1 : 1을 사용하였고, 상대적으로 비극성인 성분을 분석하기 위하여 n-hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5를 사용하였다. TLC로 분리된 여러 띠 중 발효 전후 양의 차이를 보이는 띠를 긁은 후 70% 에탄올 추출, 여과, 감압 · 건조 과정을 거쳐 성분을 추출하여 한 후 100% 에탄올에 녹이고 syringe filter (Milopore 0.45 μ m)를 이용하여 여과하고 그 여액을 UV-Visible 흡수스펙트럼, HPLC, LC/ESI-MS/MS 분석에 이용하였다.

성분 확인은 표준물질과 같이 전개시킨 TLC 크로마토그램을 NP 발색시약, vanillin 발색시약과 자외선(UV-365 nm)을 통해 띠의 색상, R_f value를 비교하고 HPLC 크로마토그램에서 표준물질의 peak retention time과 UV-Visible 흡수스펙트럼을 비교하여 분석하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid 수용액과 0.5% acetic acid를 함유한 50% acetonitrile 수용액을 이용해 기울기 용리법으로 분석하였고, HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다.

2.5.2. LC/ESI-MS/MS를 이용한 성분 분석

분석 기기로 LC기기는 Thermo-Finnigan surveyor instrument (Thermo scientific, USA)(column spec. U-VDSpher Pur C18-E 1.8 μ m, 50 × 2.0 mm Cat.-No. N0520E181UVC), autosampler, PDA-UV detector를 사용하였으며, 질량분석(Mass spectrometric analysis)기기는 Thermo Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer, with ESI interface를 사용하였다. Injection volume은 5 μ L, flow rate는 200 μ L/min이며 전개용매 조건으로는 0.1% formic acid (in D. W) (A 용매) : 0.1% formic acid (in acetonitrile)(B 용매) = 75 : 25를 사용하였다.

2.5.3. 마가목 가지 발효추출물의 성분 정량 분석

마가목 가지 비발효 추출물 및 발효 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 각각 10,000 μ g/mL를 Table 1의 조건으로 HPLC 기기를 이용하여 정량 분석하였다. 함량 측정을 위하여 표준물질 caffeic acid, (-)epicatechin, isoquercitrin, quercetin을 사용하여 검량선을 작성하였다. 유의성 있는 검량선을 얻기 위해 4가지 농도에서 실험을 실시하였다. Caffeic acid, (-)epicatechin, isoquercitrin은 100% 에탄올에 녹여 1, 0.5, 0.25, 0.125 mM의 농도를 제조하였고, quercetin은 2, 1, 0.5, 0.25 mM의 농도를 제조하여 검량선을 작성하였다. Regression equation을 $y = ax + b$ 의 형태로 구하여 검량선을 작성하였고 작성된 검량선은 R² 값을 통하여 직선성을 판단하였고, R² 값이 0.99일 때 성분의 함량을 평가하는 검량선을 사용하였다. HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram에서 성분들의 각각의 면적을 회귀직선 방정식에 대입하여 각각 성분들의 함량을 구하였다.

2.6. Cell Culture

사람유래 섬유아세포인 HDFs (passage 6-8)를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (P/S)을 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다.

2.7. MTT Assay

3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT,

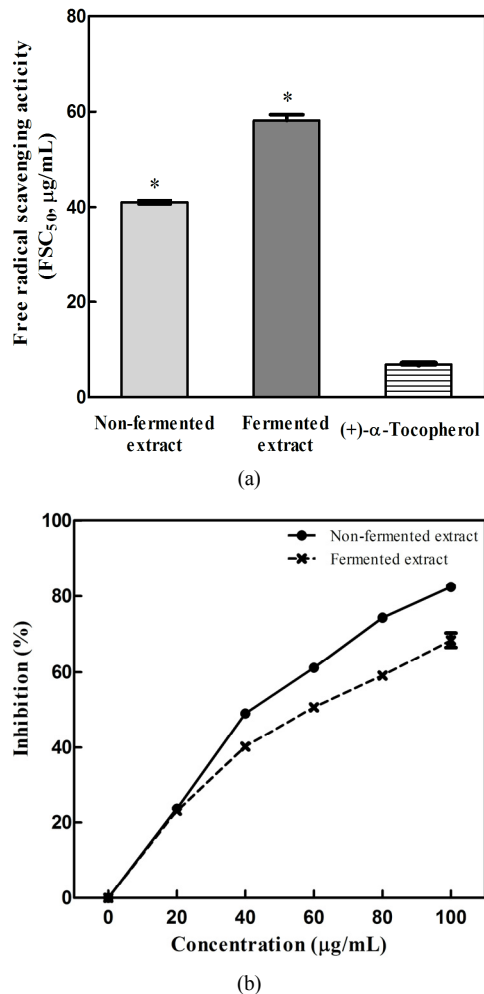


Figure 1. Free radical DPPH scavenging activity of non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig. Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. (a) FSC₅₀ was defined the concentration needed to reduce 50% of the initial DPPH concentration ($p < 0.05$ compared with (+)- α -tocopherol by one-way ANOVA), (b) Percentage of inhibition of DPPH induced by non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig.

Sigma, USA) assay를 이용하여 세포 독성평가를 확인하였다. HDF 세포는 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하여 60-80%까지 배양하였다. 무혈청 배지에 마가목 가지 추출물, 발효물의 다양한 농도별로 희석하여 24 h 동안 처리한 후, 배지를 모두 제거하고 0.5 mg/mL MTT용액을 각 well에 첨가하고 2 h 동안 37 °C에 반응시켰다. 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹이고 ELISA reader (Tecan, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. 세포 내 ROS 소거활성 평가

세포 내 ROS 소거활성 평가는 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)를 사용하여 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. HDF 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24 h 동안 배양하여 부착 및 안정화 시킨 후, 농도별로 희석한 시료를 처리하여 24 h 동안 배양하였다. Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)를 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 20 μ M H₂DCFH-DA로 30

min 동안 37 °C에서 처리한 후, CL-1000 ultraviolet crosslinker를 이용하여 DPBS 상태에서 80 mJ/cm² UVB를 조사하여 세포 내 ROS를 생성시켰다. 형광의 세기는 fluorescence ELISA reader (excitation, 490 nm; emission, 530 nm) 기기를 통하여 형광의 세기를 측정하였다.

2.9. Western Blot

배양 배지 내의 MMPs 발현을 western blot을 통해 분석하였다. HDF 세포를 100 mm dish에 분주하여 70-80% 배양 후, 여러 농도의 마가목 가지 추출물, 발효물을 무혈청 배지에 희석하여 처리하였다. 24 h 배양 후, PBS로 2회 세척하여 PBS를 넣고 UVB 조사량은 이전 연구 결과[27]를 통해 MMPs 발현 조사량인 80 mJ/cm²를 처리한 후 무혈청 배지로 교체해주었다. 72 h 배양 후 세포 상층액을 Amicon (Millipore, USA)으로 농축하여 이용하였다. 각각의 배지 농축액을 5 \times loading buffer와 섞어 5 min 동안 끓였다. 10% SDS-PAGE gels에 단백질을 분리하여 PVDF membranes (Millipore, USA)에 transfer 하였다. 5% BSA로 blocking한 뒤, membranes를 1차 항체를 결합하여 24 h, 4 °C에서 배양하였다. 0.1% Tween-20을 함유한 tris-buffered saline로 3회 세척 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 이차항체를 1 h 처리하였다. 마지막으로 chemiluminescence reagents (GE Healthcare, USA)로 검출하였고, chemiluminescence imaging system로 감광하였다. 밴드는 Image J software로 수량화하였다.

2.10. Statistical Analysis

본 연구의 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였고 통계자료의 값은 mean \pm SD로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA) 프로그램을 이용하였으며, Student's *t*-test 및 one-way ANOVA 검정을 적용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

자외선에 의해 과잉 생성되는 ROS는 지질 과산화 반응을 일으켜 세포를 손상시키고 피부 노화를 야기한다. 항산화제는 전자 공여능을 가진 것으로 수소주개로 작용하여 활성산소종에 의해 개시된 연쇄반응을 종결하여 피부 노화를 방지한다. DPPH 라디칼 소거 활성은 비교적 안정한 free radical인 DPPH와 시료의 반응을 통해 시료의 수소 공여 능력을 평가하는 방법이다. 이러한 항산화 효과를 평가하기 위해 시료를 20-100 μ g/mL로 처리하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 마가목 가지 비발효 추출물, 발효 추출물 및 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol의 자유 라디칼 소거 활성을 FSC₅₀으로 나타내었다(Figure 1a). 비발효 추출물의 FSC₅₀은 41.0 μ g/mL, 발효 추출물은 58.2 μ g/mL로 ((+)- α -tocopherol 6.9 μ g/mL) 두 경우 모두 높은 소거활성을 나타내었다. Figure 1b에서는 마가목 가지 발효전후 추출물의 라디칼 소거능을 20-100 μ g/mL 농도에서 비교하였다. 그 결과 모두 농도가 증가함에 따라 free radical 소거능이 증가하였다.

3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성 산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 다시 바닥 상태로 떨어지며 발광(420-450 nm)하는 것으로 알려져 있다. 마가목 가지 비발효 추출물, 발효 추출물(1.5-3.5 μ g/mL) 및 대

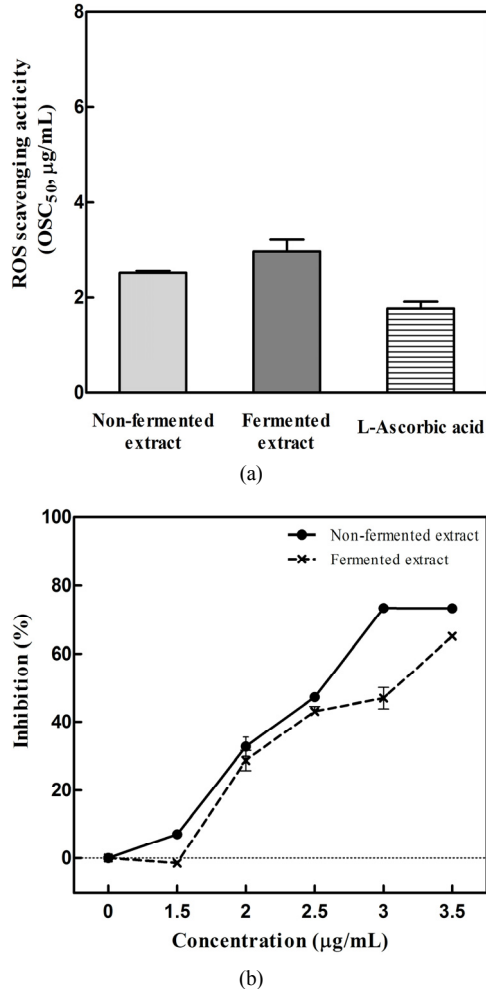


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activities of non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay. Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. (a) OSC₅₀ was defined the concentration needed to reduce 50% of the initial ROS concentration (**p* < 0.05 compared with L-ascorbic acid by one-way ANOVA), (b) Percentage of inhibition of ROS induced by non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig.

조금으로 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid의 총 항산화능을 luminol 발광법을 이용하여 측정하여 OSC₅₀으로 나타냈다(Figure 2a). 실험 결과 비발효 추출물의 경우 2.6 µg/mL, 발효 추출물의 경우 3.1 µg/mL로 나타났다. Positive control인 L-ascorbic acid (1.5 µg/mL)와 비교해 볼 때 유의적 차이를 나타내지 않는 것으로 마가목 가지 발효 전후 추출물 모두 높은 항산화능을 나타냈다. Figure 2b에서는 마가목 가지 발효 전후 추출물의 총 항산화능을 1.5-3.5 µg/mL 농도에서 비교하였다. 실험 결과, 3 µg/mL 농도를 제외한 나머지 농도에서 마가목 가지 비발효 추출물과 발효 추출물의 활성산소 소거능이 거의 일치한 것으로 나타났다. 결론적으로 마가목 가지 발효 전후 추출물 모두 높은 활성산소 소거능을 나타냈고, 대조군인 L-ascorbic acid만큼 뛰어난 항산화능을 나타냈다.

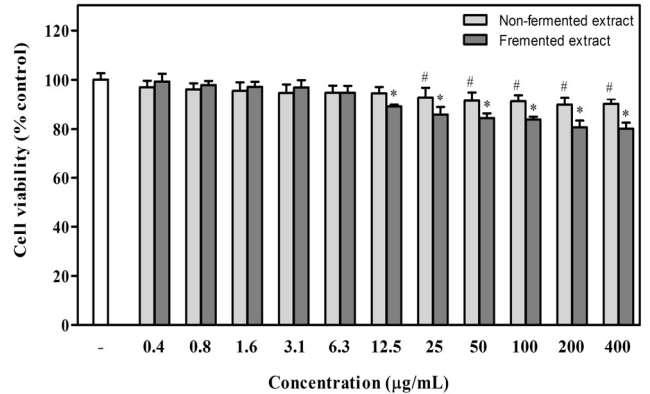


Figure 3. Effect of non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig treatment on human dermal fibroblast (HDF) cell viability. HDF cells were treated with various concentrations of samples for 24 h and cell viability was determined using the MTT assay. Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. **p* < 0.05, #*p* < 0.05 compared with untreated control by one-way ANOVA.

3.3. 세포 독성 평가

MTT assay를 통해 마가목 가지 발효 전후 추출물이 사람유래 섬유아세포인 HDF 세포에 대한 독성 평가를 평가함으로써 앞으로의 노화 효능 평가를 위한 샘플의 농도 범위를 결정하였다. 0.4-400 µg/mL 농도의 마가목 가지 발효 전후 추출물을 HDF 세포에 24 h 처리 후 세포 생존율을 확인하였다. 실험결과, 아무처리하지 않은 군에 비해 비발효 추출물은 25 µg/mL, 발효 추출물은 12.5 µg/mL부터 세포독성을 나타내었다(Figure 3). 따라서 본 실험에서는 마가목 가지 비발효 추출물과 발효 추출물을 같은 농도로 효능을 비교하기 위해 10 µg/mL을 최고 농도로 설정하였다.

3.4. 세포 내 ROS 억제효능 평가

최외각 방어망인 표피에 자외선 처리 시 세포내 생성된 ROS는 세포의 구성 성분인 단백질, DNA 및 지질을 손상시키고 콜라겐, 엘라스틴과 같은 세포외 기질을 분해시키는 MMPs의 발현을 촉진시켜 피부 노화를 가속화시킨다. 세포 내 ROS 억제를 통해 피부 노화를 억제할 수 있다. 본 연구에서 마가목 가지 발효 전후 추출물의 세포 내 ROS 억제활성을 진피 섬유아세포인 HDF 세포에 H₂DCF-DA를 이용하여 측정하였다. 실험 결과, UVB를 조사한 실험군은 조사하지 않은 군에 (100%) 비하여 ROS가 204%로 증가하였다. 마가목 가지 발효 전후 추출물을 HDF 세포에 0.1-10 µg/mL을 24 h 처리하였을 때, 모두 농도 의존적으로 ROS 감소를 나타내었다(Figure 4). 비발효 추출물의 경우 UVB 처리 군에 비해 5 µg/mL 이상에서 유의적 감소를 나타냈으며, 각각 29.4, 35.3% 감소율을 나타냈다. 그에 반해 발효 추출물의 경우 1.3 µg/mL 이상에서 유의적 감소가 있음을 나타냈으며, 각각 31.4, 36.3, 39.7, 40.2%의 감소율을 나타냈다. 또한 비발효 추출물군과 발효 추출물군을 비교해 보았을 때 1.3 µg/mL 이상에서 유의적 차이가 있음을 통계적으로 관찰함으로써 세포 내 ROS 억제 효능이 비발효 추출물보다 발효 추출물에서 더욱 뛰어난 것을 확인하였다.

3.5. UVB로 유도된 MMPs 발현 억제 효과

MMPs는 중심부에 아연을 갖는 금속 단백질 분해 효소로서 세포외 기질을 분해하며, 그 종류는 구조와 기능에 따라 구분된다. 다양한

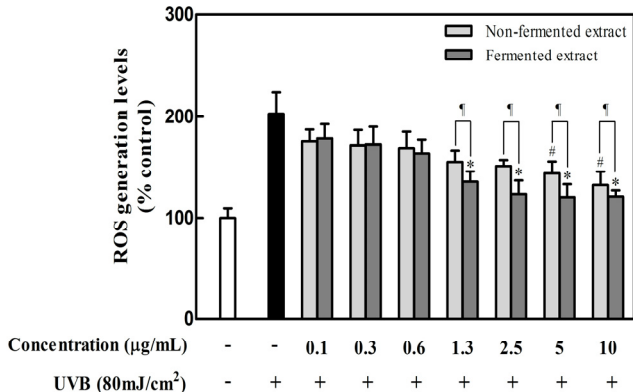


Figure 4. Effects of non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig on UVB-induced oxidative stress in HDFs. Non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig scavenged UVB-induced upregulation of intracellular ROS production. The 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) probe was used to investigate intracellular ROS levels. Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. # $p < 0.05$ compared with UVB treated control in non-fermented extract-treated groups by one-way ANOVA, * $p < 0.05$ compared with UVB treated control in fermented extract groups by one-way ANOVA. # $p < 0.05$ non-fermented extract versus fermented extract by Student's *t*-test.

MMPs의 발현 억제는 항노화 효능을 입증할 수 있다[5-9]. 본 실험에서는 MMP-1 (collagenase 1), MMP-2 (gelatinase) MMP-3 (stromelysin 1) 등의 다양한 MMPs의 발현에 대한 마가목 가지 추출물과 발효물의 억제 효과를 확인하고자 하였다. MMPs 단백질 발현은 western blot을 통해 확인하였다. 실험결과 MMP-1의 경우 UVB를 조사하지 않은 군에(100%) 비해 UVB (80 mJ/cm²)를 조사한 군의 MMP-1 단백질 발현이 약 4배(396.7%) 증가하였으며 마가목 가지 추출물 및 발효물을 전처리(24 h)한 경우 농도 의존적으로 MMP-1 발현을 저해하였다(Figure 5a). 마가목 가지 추출물과 발효물을 비교해 보았을 때, 추출물의 경우 UVB 조사 군에 비해 MMP-1 발현을 36.4, 45.5, 68.3%로 감소하였으며, 발효물의 경우 67.3, 72.8, 84.3%로 감소하였다. 통계적 유의성으로 비교해보았을 때 발효물이 전농도적으로 더 높은 유의성을 나타냄으로써 추출물보다 발효물의 MMP-1 저해 효능이 현저하게 뛰어난다는 것을 확인할 수 있었다. 두 번째 MMP-2의 발현 억제 효능을 Figure 5b 통해 나타내었다. 마가목 가지 추출물 및 발효물은 UVB로 유도된 MMP-2의 발현(435.7%)을 농도 의존적으로 감소시켰다. MMP-2 발현은 마가목 추출물의 경우 18.6, 24.8, 35%로 감소하였고, 발효물의 경우 24.8, 60, 70.5%로 감소하였다. 추출물의 경우 최고 농도만이 유의적 감소를 나타냈다.

반면, 발효물의 경우 두 농도에서 유의적 감소를 나타냈을 뿐만 아니라 최고농도에서는 더 높은 유의성을 나타냈다. 따라서 MMP-2 발현 억제 효능 역시 발효물이 더 뛰어난 것을 알 수 있다. 마지막 MMP-3의 억제 효능 또한 발효물에서 더욱 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. MMP-3 발현은 마가목 가지 추출물의 경우 UVB군(415.3%) 대비 14.6, 17.1, 24.2% 감소하였고, 발효물의 경우 21.4, 58.4, 69.2% 감소하였다(Figure 5c). 추출물의 경우 MMP-2와 같이 최고 농도에서만 유의적 감소를 나타냈다면, 발효물의 경우 전농도 유의적 감소를 나타냈을 뿐만 아니라 더 높은 유의성을 나타냈다. 결과적으로 마가목 가지 추출물과 발효물 모두 MMPs의 발현을 농도 의존적으로 저해시키

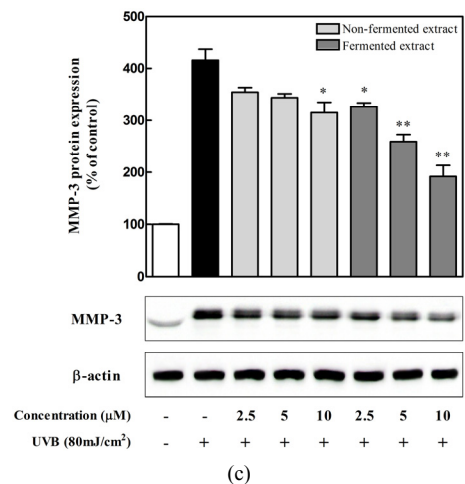
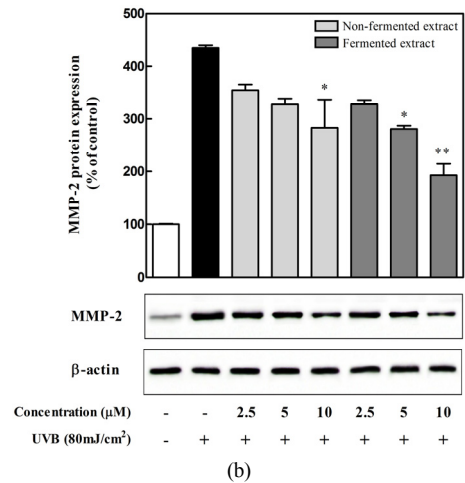
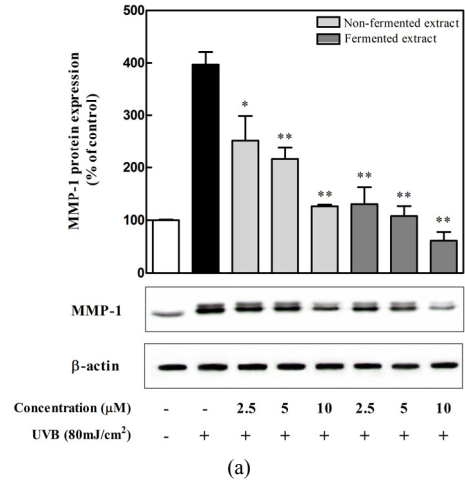


Figure 5. Effect of non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig treatment on MMPs protein expression induced by UVB irradiation in HDF cells. The cultured HDF cells were treated with different concentrations of samples for 24 h and then irradiated with 80 mJ/cm² UVB. Following UVB irradiation, fresh medium was added for 72 h. MMPs protein were measured by western blot analysis. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the UVB-treated control by one-way ANOVA.

Table 2. LC/ESI-MS and UV Spectrum Characteristics of Ethyl Acetate Fraction of Non-Fermented Extracts and Fermented Extracts from *S. commixta* Twig

TLC band	HPLC peak No.	Identified compound	Measurement				Reference
			Retention time (min)	λ_{\max} (nm)	$[M+H]^+$ (m/z)	MS^2 (m/z)	
SCT-1	1	Caffeic acid $C_9H_8O_4$	47.730	326.9	181.1	-	[1]
SCT-2	2	(-)Epicatechin $C_{15}H_{14}O_6$	60.432	280.0	291.1	122.9, 138.9, 165.0, 273.0	[2]
SCT-3	3	Isoquercitrin $C_{21}H_{20}O_{12}$	94.223	258.0, 363.0	465.1	303.1	[3]
-	4	Quercetin $C_{15}H_{10}O_7$	131.241	256.0, 372.0	-	-	[4]

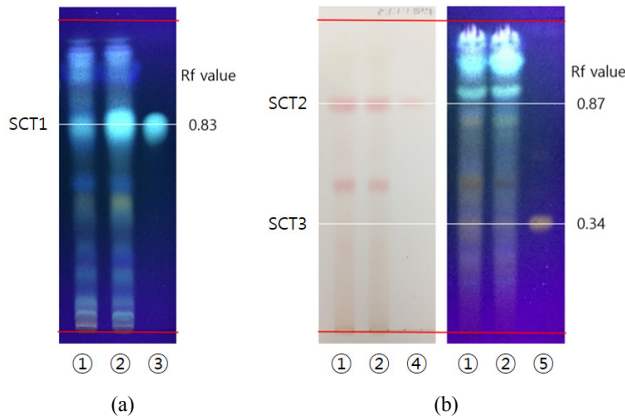


Figure 6. TLC chromatogram of ethyl acetate fractions of non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig and reference compounds (NP-PEG reagents; UV-365 nm, vanillin reagents). (a) Eluent system; n-hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v), (b) Eluent system; ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), ① ethyl acetate fraction of non-fermented extract, ② ethyl acetate fraction of fermented extract, ③ caffeic acid, ④ (-)epicatechin, ⑤ isoquercitrin.

지만 같은 농도로 비교해 보았을 때, 발효물의 MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3) 발현 억제 효능이 더욱 뛰어난을 입증하였다.

3.6. 마가목 가지 발효추출물의 성분 분석

Figure 6의 (a)와 (b)에서 마가목 가지 비발효 추출물의 에틸아세테이트 분획물과 발효 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 TLC 크로마토그램은 발효 전후 양의 변화가 있는 띠가 3개로 관찰되었다. TLC 띠의 발색의 진하기를 비교하여 보았을 때, 그중 SCT1이 발효 후에 양이 증가한 것으로 보이고, SCT2, 3이 발효 후에 양이 감소한 것으로 보인다. 발효 전후 양의 차이가 있는 3개의 띠를 긁어서 추출하여 얻은 물질을 LC/ESI-MS/MS 분석하였다(Table 2). 또한 TLC, HPLC, UV-visible 흡수스펙트럼에서 표준물질과 비교하여 종합하여 성분을 확인하였다(Figure 6, Table 2).

TLC에서 3개의 띠의 R_f value 및 발색 색깔은 SCT1 (0.84, NP-과량), SCT2 (0.68, vanillin-분홍), SCT3 (0.76, NP-주황)으로 각각 caffeic acid, (-)epicatechin, isoquercitrin의 R_f value 및 발색 색깔과 일치하였으며 HPLC에서 각각 표준물질과 peak retention time 및 UV-Visible 흡수스펙트럼이 일치하였다. 따라서 종합하여 보았을 때, SCT1은 caffeic acid, SCT2는 (-)epicatechin, SCT3는 isoquercitrin으로 확인되었다. 이 외에 HPLC에서 성분변화가 큰 1개의 피크(peak 4)는

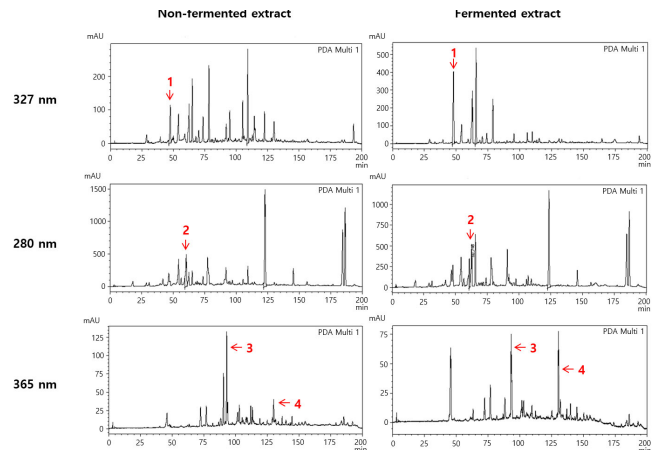


Figure 7. HPLC chromatogram of ethyl acetate fractions of non-fermented extract and fermented extract of *S. commixta* twig (10,000 μ g/mL) at $\lambda = 327, 280, 365$ nm, 1 : caffeic acid, 2 : (-)epicatechin, 3 : isoquercitrin, 4 : quercetin.

UV-Visible 흡수스펙트럼 및 retention time 비교를 통해 quercetin임을 확인하였다.

3.7. 마가목 가지 추출물의 성분 정량 분석

마가목 가지 비발효 추출물 및 발효 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 caffeic acid, quercetin, (-)epicatechin, isoquercitrin의 함량을 측정하기 위하여 먼저 각각의 표준물질을 이용하여 검량선을 작성하였다. Regression equation을 $y = ax + b$ 의 형태로 구하였으며, R² 값을 통하여 직선성을 판단하여 R² 값이 0.99일 때 검량선으로 사용하였다 (data not shown).

마가목 가지 비발효 추출물 및 발효 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 HPLC 크로마토그램(Figure 7)에서 peak 1 (caffeic acid), peak 2 ((-)epicatechin), peak 3 (isoquercitrin), peak 4 (quercetin)의 피크 면적을 각각 표준물질의 검량선의 회귀직선 방정식에 대입하여 양을 구한 후 마가목 가지 비발효 추출물 및 발효 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 수율을 고려하여 원재료인 건조된 마가목 가지 중량당 각각의 성분들의 함량을 계산하였다(Table 3). Caffeic acid의 함량은 발효 전보다 발효 후에 약 278% 증가하였으며, (-)epicatechin의 함량은 발효 전보다 발효 후에 약 25% 감소하였으며, isoquercitrin의 함량은 발효 전보다 발효 후에 약 13% 감소하였으며, quercetin의 함량은 발효 전보다 발효 후에 약 46% 증가하였다. 발효 후 발효균주 *L. pentosus*에 의해 quercetin 배당체인 isoquercitrin이 quercetin으로 생물 전환됨을 확인하였다.

Table 3. Content Ratio of Data of Caffeic Acid, (-)Epicatechin, Isoquercitrin, and Quercetin according to *S. commixta* Twig

HPLC Peak No.	Identified compound	Non-fermented extract (mg/g)	Fermented extract (mg/g)	Increase/Decrease amount (mg/g)	Increase/Decrease rate (%)
1	Caffeic acid	0.086	0.325	0.239	278
2	(-)Epicatechin	1.534	1.150	-0.384	-25
3	Isoquercitrin	0.112	0.097	-0.015	-13
4	Quercetin	0.101	0.147	0.046	46

4. 결 론

References

본 연구에서는 마가목 가지 에탄올 추출물과 *L. pentosus*를 이용한 발효물의 항산화 활성 및 MMPs 발현 억제 효과를 비교하였다. 항산화 활성은 DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성, 루미놀을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 활성산소 소거 활성, H_2DCF -DA를 이용한 세포 내 ROS 억제 활성을 통해 확인하였다. 마가목 가지 추출물과 발효물의 자유 라디칼 소거 활성을 측정한 결과(FSC₅₀), 추출물(41.0 μ g/mL)이 발효물(58.2 μ g/mL)로 나타났다. Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 활성산소 소거 활성은(OSC₅₀) 추출물(2.6 μ g/mL)과 발효물(2.9 μ g/mL)의 유의적 차이는 나타내지 않은 것으로 추출물, 발효물 모두 총 항산화능이 뛰어나다. 반면 세포 내 ROS 억제 활성에서는 마가목 가지 추출물과 발효물 모두 세포 내 ROS 억제 활성이 뛰어났지만 발효물의 경우 현저한 효능을 나타낸 농도(1.3 μ g/mL)가 추출물(5 μ g/mL) 보다 적은 농도로 또한 둘의 유의적 차이가 있음을 확인함으로써 발효물의 효능이 뛰어남을 확인할 수 있다. 따라서 마가목 가지 추출물과 발효물의 항산화 활성은 모두 뛰어나지만 세포 내로 처리하였을 때의 항산화 활성이 발효물이 더 우수하다는 것을 확인하였다. 이러한 효능 차이는 MMPs 억제 효과에서 더욱 두드러졌다. HDF 세포를 이용하여 마가목 가지 추출물, 발효물 처리에 따른 UVB로 유도된 MMPs 발현 저해 효과를 확인하였다. 실험결과, 최고농도(10 μ g/mL)에서 MMP-1, 2, 3의 발현은 추출물의 경우 각각 68.3, 35.0 및 24.2%, 발효물의 경우 각각 84.3, 70.5 및 69.2%의 감소를 나타냈었다. 마가목 가지 추출물 및 발효물 모두 감소하는 경향을 나타냈으나, 같은 농도별로 MMPs의 발현 양을 비교하였을 때, 추출물에 비해 발효물에서 MMPs 억제 효능이 뛰어난 것을 확인하였다. 이는 발효 균주에 의해 생성된 β -glucosidase는 식물 소재 내의 이소플라본 배당체를 비배당체로 전환되어 저분자화 된 것이 항산화 효능 및 MMPs 저해 효과 높이는 데 기인한 것으로 보인다.

피부 진피층을 구성하며 피부의 탄력성을 제공하는 콜라겐, 엘라스틴, 젤라틴 등과 같은 세포 외 기질을 분해하는 MMPs의 발현을 저해시키는 것은 항 노화에 있어서 중요하다. MMPs의 발현은 주로 외부 자극으로 유도된 ROS에 의해 합성이 촉진된다. 그러므로 피부 세포 내의 ROS 생성을 억제시키는 것은 피부 노화를 예방하는데 필수적이다.

결론적으로, *L. pentosus*를 이용한 마가목 가지 발효물은 마가목 가지 에탄올 추출물보다 세포 내 ROS를 더 효율적으로 억제함으로써 MMPs 발현 억제 효능이 더 우수한 것으로 나타났으며, 이는 항 노화 기능성 소재로서 응용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감 사

본 논문은 중소기업청 기술혁신과제(과제번호 : S2297176)의 지원에 의해 수행하였습니다.

- H. S. Lee and S. H. Kim, Safety evaluation of black garlic extract for development of cosmeceutical ingredients-skin irritation and sensitization studies, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**, 1213-1219 (2010).
- B. A. Gilchrest, Skin aging and photoaging: an overview, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, 610-613 (1989).
- M. A. Zaid, F. Afaq, D. N. Syed, M. Dreher, and H. Mukhtar, Inhibition of UVB mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx, *Photochem. Photobiol.*, **83**, 882-888 (2007).
- A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16-29 (2015).
- M. Kim, Y. G. Park, H. J. Lee, S. J. Lim, and C. W. Nho, Youngiasides A and C isolated from *Youngia denticulatum* inhibit UVB-induced MMP expression and promote type I procollagen production via repression of MAPK/AP-1/NF- κ B and activation of AMPK/Nrf2 in Hacat cells and human dermal fibroblasts, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 5428-5438 (2015).
- G. L. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, F. McPhillips, Z. Wang, X. Li, Y. Wan, S. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1432-1440 (1998).
- G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, **379**, 335-339 (1996).
- L. Rittie and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **1**, 705-720 (2002).
- S. G. Park, S. N. Kim, J. C. Lee, H. S. Kim, Y. J. Kim, B. G. Lee, and I. S. Jang, Anti-aging effect on skin with Jaeum-Dan (JED), *Korean J. Herbology.*, **19**, 67-76 (2004).
- A. R. Im, J. H. Song, M. Y. Lee, S. H. Yeon, K. A. Um, and S. Chae, Anti-wrinkle effects of fermented and non-fermented cyclopia intermedia in hairless mice, *BMC Complement. Altern. Med.*, **14**, 424-429 (2014).
- C. C. Tsai, C. F. Chan, W. Y. Huang, J. S. Lin, P. Chan, H. Y. Liu, and Y. S. Lin, Applications of *Lactobacillus rhamnosus* spent culture supernatant in cosmetic antioxidation, whitening and moisture retention applications, *Molecules*, **18**, 14161-14171 (2013).
- Y. Okabe, T. Shimazu, and H. Tanimoto, Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of aglycone-rich fermented soybeans compared with glucoside-rich non-fermented soybeans in Japanese postmenopausal women, *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 658-663 (2011).

13. C. G. Schmidt, L. M. Goncalves, L. Prietto, H. S. Hackbart, and E. B. Furlong, Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*, *Food Chem.*, **146**, 371-377 (2014).
14. B. G. Park, H. J. Jung, Y. W. Cho, H. W. Lim, and C. J. Lim, Potentiation of antioxidative and anti-inflammatory properties of cultured wild ginseng root extract through probiotic fermentation, *J. Pharm. Pharmacol.*, **65**, 457-464 (2013).
15. H. J. Yang, E. H. Kim, J. O. Park, J. E. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of fermented *Melissa officinalis* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**, 47-55 (2009).
16. Y. J. Ahn, B. R. Won, M. K. Kang, J. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidant activity and component analysis of fermented *Lavandula angustifolia* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**, 125-134 (2009).
17. T. Yu, Y. J. Lee, H. J. Jang, A. R. Kim, S. Y. Hong, T. W. Kim, M. Y. K, J. H. Lee, Y. G. Lee, and J. Y. Cho, Antiinflammatory activity of *Sorbus commixta* water extract and its molecular inhibitory mechanism, *J. Ethnopharmacol.*, **134**, 493-500 (2011).
18. S. H. Kim, Y. S. Jang, H. G. Chung, M. S. Choi, and S. C. Kim, Selection of superior trees for larger fruit and high productivity in *Sorbus commixta* Hedl, *Korean J. Plant. Res.*, **6**, 120-128 (2003).
19. L. R. Bhatt, M. S. Bae, B. M. Kim, G. S. Oh, and K. Y. Chai, A chalcone glycoside from the fruits of *Sorbus commixta* Hedl, *Molecules*, **14**, 5323-5327 (2009).
20. M. K. Na, R. B. An, S. M. Lee, B. S. Min, Y. H. Kim, K. H. Bae, and S. S. Kang, Antioxidant compounds from the stem bark of *Sorbus commixta*, *Nat. Prod. Sci.*, **8**, 26-29 (2002).
21. G. N. Lim, M. A. Park, and S. N. Park, Antioxidative and antiaging effects of *Sorbus commixta* twig extracts, *J. Korean Oil Chem. Soc.*, **28**, 482-490 (2011).
22. B. U. Ridwan, C. J. M. Koning, M. G. H. Besselink, H. M. Timmerman, E. C. Brouwer, J. Verhoef, H. G. Gooszen, and L. M. A. Akkermans, Antimicrobial activity of a multispecies probiotic (Ecologic 641) against pathogens isolated from infected pancreatic necrosis, *Lett. Appl. Microbiol.*, **46**, 61-67 (2008).
23. L. H. Quan, L. Q. Cheng, H. B. Kim, J. H. Kim, N. R. Son, S. Y. Kim, H. O. Jin, and D. C. Yang, Bioconversion of ginsenoside Rd into compound K by *Lactobacillus pentosus* DC101 isolated from Kimchi, *J. Ginseng Res.*, **34**, 288-295 (2010).
24. Y. H. Pyo, T. C. Lee, and Y. C. Lee, Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria, *Food Res. Int.*, **38**, 551-559 (2005).
25. J. W. Min, H. J. Kim, K. S. Joo, and H. C. Kang, Isolation of *Stenotrophomonas rhizopilae* strain GFC09 with ginsenoside converting activity and anti-wrinkle effects of converted ginsenosides, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**, 375-382 (2007).
26. S. H. Kim, J. W. Min, L. H. Quan, S. Lee, D. U. Yang, and D. C. Yang, Enzymatic transformation of ginsenoside Rb1 by *Lactobacillus pentosus* strain 6105 from Kimchi, *J. Ginseng Res.*, **36**, 291-297 (2012).
27. S. H. Xuan, Y. M. Park, J. H. Ha, Y. J. Jeong, and S. N. Park, The effect of dehydroglyasperin C on UVB-mediated MMPs expression in human HaCaT cells, *Pharmacol. Rep.*, Doi: 10.1016/j.pharep.2017.05.012 (2017).