

## 홍차 흑효모 발효물의 항산화, 항주름 및 미백효과

김 영 은 · 여 민 아 · 한 정 희 · 이 정 민 · 정 석 균\* · 정 현 아\* · 김 선 화\* · 이 지 언†

(주)모아캠, \*(주)메가코스

(2017년 9월 14일 접수, 2017년 9월 21일 수정, 2017년 9월 26일 채택)

### *Aureobasidium pullulans* Ferment of Black Tea for Anti-oxidation, Whitening and Anti-wrinkle Effects

Young Eun Kim, Min-A Yeo, Jeung Hi Han, Jung Min Lee, Suk Kyun Jung\*,  
Hyeon Ah Jeong\*, Seon Hwa Kim\*, and Ji Ean Lee†

606 Heungdeok IT Valley, 13 Gil Heungdeok 1-ro, Gihnung-gu Yongin-si, Gyeonggi-do 16954, Korea

\*Megacos, Korea

(Received September 14, 2017; Revised September 21, 2017; Accepted September 26, 2017)

**요 약:** 본 연구에서는 홍차 흑효모 발효물의 기능성화장품 소재로서의 가능성을 규명하고자 항산화, 미백, 항주름 효능을 확인하였다. 홍차 흑효모 발효물의 결과는 홍차 추출물, 흑효모 발효물과 비교하여 나타내었다. 항산화능 평가 결과 홍차 흑효모 발효물은 흑효모 발효물보다 뛰어난 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈으며 홍차 추출물과는 유사한 결과를 나타냈다. 과산화수소로 유도된 세포 내 활성산소종 실험에서도 홍차 흑효모 발효물은 유의적 제거 활성을 보였다. 또한 홍차 흑효모 발효물은 tyrosinase 저해 활성을 보이며 Melan-a, B16F10 세포를 이용한 멜라닌 형성이 억제됨을 확인하였다. 항주름 효능 확인을 위해 콜라겐 분해 효소(MMP-1)를 측정된 결과 홍차 흑효모 발효물이 홍차 추출물, 흑효모 발효물보다 높은 항주름 활성을 보였다. 본 연구 결과를 통해 홍차 흑효모 발효물은 항산화능 효능을 보이며 미백, 항주름 효능을 보아 기능성 화장품 소재로 개발될 수 있음을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, anti-oxidant, whitening and anti-aging effects were investigated the possibility of fermented black tea yeast as a functional cosmetic material. The results of *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*) ferment of black tea (AFBT) were compared with black tea (BT) and *A. pullulans* ferment (AF). The antioxidant activity of the AFBT product showed DPPH radical scavenging ability higher than that of AF. In the intracellular ROS experiments induced by hydrogen peroxide, the AFBT showed significant decreased activity. In addition, AFBT showed tyrosinase inhibitory activity and inhibited the formation of melanin using Melan-a and B16F10 cells.

Through suppression of MMP-1 expression, the AFBT showed higher anti-wrinkle activity than BT and AF. From the results of this study, it was confirmed that AFBT showed antioxidant activity and was developed as a functional cosmetic material based on whitening and anti-wrinkle efficacies.

**Keywords:** black tea, *Aureobasidium pullulans*, antioxidation, whitening, anti-wrinkle

† 주 저자 (e-mail: jelee@morechem.net)  
call: 031)214-5822

## 1. 서 론

인간의 생체 내에서 필요한 에너지 공급을 위해 끊임없이 일어나는 생화학적 반응 과정에서 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 superoxide dismutase, catalase 그리고 glutathione peroxidase과 같은 효소 등을 이용한 자기 방어 기구인 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸되지만, 이러한 ROS가 정상적으로 소거되지 않았을 때, 유리기로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에 가해지면 이들 ROS는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 뇌졸중, 파킨슨씨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화 등과 같은 성인병과 암 등의 각종 질병을 일으키는 원인이 되고 있다[1].

세포 내 색소침착은 melanogenesis의 각각의 다른 단계에서 제어가 가능하며, 특히 tyrosinase 억제제와 항산화제는 효소적 및 비효소적 산화반응에 의한 멜라닌 생성과 같은 세포 내 색소침착을 저해하기 위해 사용된다. Arbutin, hydroquinone, kojic acid, licorice 추출물 및 vitamin C와 같은 물질들은 화장품에 첨가되어 피부톤을 밝게 하고 과색소 침착을 개선하기 위해서 의약품에 첨가되기도 하는데, 이들의 원리는 대개 멜라닌 합성에 관여하는 tyrosinase의 활성을 저해하여 멜라닌 생성을 억제한다[2].

내인성 노화는 나이가 들어가면서 서서히 피부세포 활성이 저하되어 나타나는데, 피부에 존재하는 세포의 대사과정 중에 생성되는 ROS 등에 의해 발생한다[3,4].

또한 자외선에 의해 손상받은 피부는 collagen의 양이 감소되어 있는데, 이는 자외선에 의해 피부 내에서 matrix metalloproteinase (MMPs)의 발현이 증가하기 때문이며, 이러한 MMPs는 피부 광노화 발생에 중요한 역할을 한다[5]. MMPs는 피부의 keratinocytes, fibroblasts를 비롯한 많은 세포들로부터 분비되어 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막(basement membrane, BM)을 구성하는 대부분의 단백질 성분을 분해함으로써 피부 탄력을 유지하는 결합조직을 파괴하여 주름과 탄력저하 및 피부 처짐의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[6].

홍차는 녹차, 우롱차 등과 더불어 생활에서 쉽게 이용하는 차이다. 이 중 홍차는 건조된 차잎을 80% 이상

발효한 차로, 발효되는 과정에서 카테킨류가 차잎에 함유된 polyphenol oxidase에 의해 theaflavin으로 변하고 이는 차의 색 뿐만 아니라 항산화[7], 면역력 향상[8] 등의 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 홍차 열수추출물은 tyrosinase 활성을 감소시켜 멜라닌 합성을 저해시킨다[9]. 흑효모(*A. pullulans*)균주는 야생화에서 유래한 흑효모 종중 하나로[10], 발효과정 중  $\beta$ -1,3/1,6-glucan을 생성하며, 암세포 전이를 억제하는 기능하는 것으로 알려져 있다[11,12].

따라서 본 연구에서는 홍차 추출물과 홍차 흑효모 발효물의 항산화 효능, 미백 그리고 항주름 효과를 확인하여 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시료의 추출 및 발효

#### 2.1.1. 홍차 추출물(Black Tea, BT)

요크셔 골드 홍차잎(Taylors of Harrogate, UK) 2 g을 증류수 98 g에 가하여, 1 h 동안 80 °C에서 추출 후, 여과하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 동결건조(FE8512, Ilshin, Korea)하여 최종 파우더 0.4 g을 수득하였다.

#### 2.1.2. 흑효모 발효물(*A. pullulans* Ferment, AF)

미생물자원센터에서 흑효모균사체(*A. pullulans* var. *melanogenum*, KCTC No. 6081)를 분양받았다. 이 균체 배양을 위해, YM broth (Difco, France)와 정제수를 투입하여 배지를 제조하였다. 이 배지에 흑효모균사체를 접종한 후, 진탕 배양기(VS-8480, Vision, Korea)에서 48 h 동안 발효를 시켰다. 이 발효액을 원심분리 후, 얻은 여과액을 동결 건조하여 최종 파우더 0.64 g을 수득하였다.

#### 2.1.3. 홍차 흑효모 발효물(*A. pullulans* Ferment of Black Tea, AFBT)

균사체 배양을 위해 YM broth (difco, France)와 정제수 대신 동결건조전의 홍차 추출액을 투입하여 배지를 제조하였다. 이 배지에 흑효모균사체를 접종한 후, 48 h 동안 발효시켰다. 이 발효액을 원심분리 후 여과 및 동결건조 하여 최종 파우더 1.29 g을 수득하였다.

## 2.2. DPPH Radical Scavenging Activity 측정

(DPPH) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl법은 천연물의 수용성 혹은 유기용매 추출물의 항산화 활성 측정법으로 널리 사용하는 방법이다. 본 실험에서는 항산화 활성 측정방법 중 Blois의 방법에 따라 측정 하였다[13]. DPPH 라디칼 소거능을 평가하기 위해 시료 0.1 mL에 0.2 mM DPPH (Sigma, USA) 용액을 0.1 mL 분주하여, 30 min 방치시킨 후 520 nm에서 ELISA reader (Eon, Biotek, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료대신 용매를 가하여 동일한 방법으로 측정하였다. 또한 시료 자체의 색에 대한 흡광도 값을 보정해 주기 위해 0.2 mM DPPH 대신에 에탄올을 첨가하여 흡광도를 측정한 후 DPPH 라디칼 소거능을 아래와 같이 백분율로 나타내었다. 이때, DPPH 라디칼 소거능의 양성대조구로써 L-ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하여 이의 효과를 대비 판단하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

## 2.3. 형광물질을 이용한 활성산소종 소거능

ROS 측정은 DCF-DA를 사용하여 형광을 측정하는 방법으로 이용하였다[14,15]. 시험에 사용한 세포주는 인간 각질형성세포 HaCaT 세포주로 형광측정용 96-well 블랙 플레이트에 각 well당  $5.0 \times 10^4$ 개로 분주하고, 페니실린/스트렙토마이신과 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Korea) 첨가된 Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM, Welgene, Korea) 배지를 사용하여, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 1일간 배양한 후 시험시료를 처리하였다. 사용된 배지로 무혈청 DMEM을 사용하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 1일간 배양하였다. 이후 각각의 시료를 넣고 24 h 배양한 후 Hanks' balanced salt solution (HBSS, Welgene, Korea)로 세척하여 남아 있는 배지를 제거하고, HBSS에 50 μM로 준비된 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma, USA)를 100 μL 가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 1 h 배양하고, HBSS로 세척하였다. 이후 HBSS에 50 μM로 준비된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극원 100 μL를 가한 다음, 초기에 ROS로 산화된 DCF (dichlorofluorescein)의 형광도를 형광플레이트 리더(tecan plate reader, Switzerland)를 이용해 Excitation = 485 nm, Emission = 530 nm로 형광 강도를

측정하였다.

## 2.4. Tyrosinase 저해 활성

0.1 M Potassium phosphate buffer (pH 6.5) 220 μL에 농도별로 희석한 시료 20 μL를 첨가 후 2,000 unit/mL mushroom tyrosinase (Sigma, USA) 20 μL를 첨가한다. 기질 1.5 mM L-tyrosine (Sigma, USA) 40 μL씩 첨가하여 잘 섞은 후 37 °C에서 10 min 반응 후 490 nm에서 ELISA reader (Eon, Biotek, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하고, 아래의 식에 따라 시료의 처리 농도에 따른 억제율(inhibition %)을 구하였다. 이때 tyrosinase 저해 활성의 양성대조구로써 kojic acid (Sigma, USA)를 사용하여 이의 효과를 대비 판단하였다.

$$\text{Inhibition \%} = 100 - (A - B) / (C - D) \times 100$$

A: 시료액의 반응 후의 흡광도

B: Tyrosinase 대신 완충액으로 대체하여 측정한 시료액의 흡광도

C: 공시료액의 반응 후의 흡광도

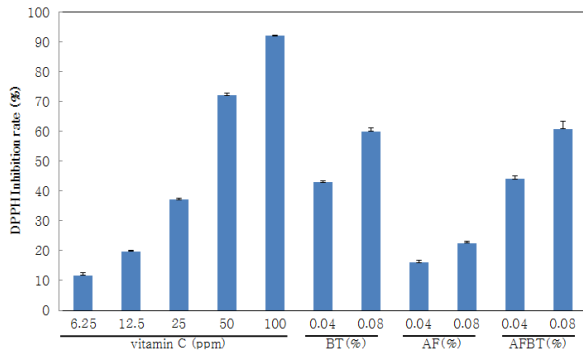
D: Tyrosinase 대신 완충액으로 대체하여 측정한 공시료액의 흡광도

## 2.5. 멜라닌 생합성 억제 확인

멜라닌 생성세포인 Melan-a 세포(Dr. Dorothy C. Bennett, St. George's hospital medical school, UK)를 24-well 플레이트에 각 well당  $1 \times 10^5$ 개가 되도록 넣고, 24 h 배양하였다. 배양 후 10% FBS가 첨가된 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Welgene, Korea) 배지에 각각의 시료를 농도별로 처리하고 6일 간 배양해 주었다. 배양이 끝난 후, 세포를 phosphate buffered saline (PBS, Welgene, Korea)로 세척 후 1 N NaOH 200 μL에 녹이고 50 °C에서 1 h 반응시켰다. 이후 ELISA reader (Eon, Biotek, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 결과는 대조군의 흡광도 값과 비교하여 백분율로 나타내주었다.

## 2.6. α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생합성 억제 확인

B16F10 melanoma 세포주(ATCC, USA)를 24-well 플레이트에 각 well당  $2 \times 10^4$ 개가 되도록 넣고, 24 h 배양하였다. 배양 후 DMEM (FBS 10%) 배지에 시료 및 alpha-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH, Sigma,



**Figure 1.** DPPH radical scavenging activity of BT, AF and AFBT (BT : black tea, AF : *A. pullulans* ferment, AFBT : *A. pullulans* ferment of black tea).

USA) 처리하고 72 h 배양해주었다. 배양이 끝난 후, 세포를 PBS로 세척 후 1 N NaOH 200  $\mu$ L에 녹이고 50  $^{\circ}$ C에서 1 h 반응시켰다. 이후 ELISA reader (Eon, Biotek, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정 한 후 결과는 대조군의 흡광도 값과 비교하여 백분율로 나타내주었다.

### 2.7. MMP-1 발현 억제 효과

사람 섬유아세포를 6-well plate에  $1 \times 10^5$  수만큼 분주한 후, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24 h 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 HBSS를 넣어준 후 UVB 비조사군을 제외한 나머지 세포군에 220 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사한 뒤 추출물을 농도별로 첨가하여 72 h 동안 추가로 배양하였다. 그 후 human total MMP-1 ELISA kit (R&D SYSTEMS, USA) 방법대로 MMP-1을 정량하였다.

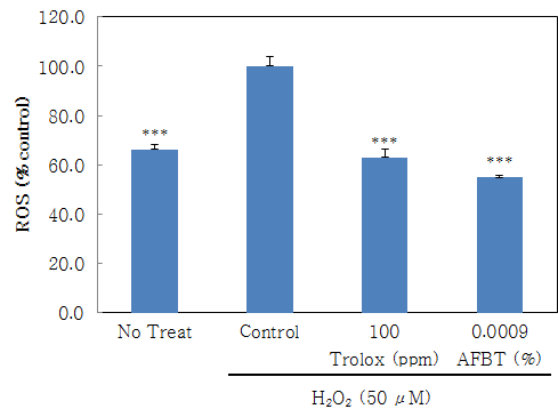
### 2.8. 통계 처리

본 연구의 실험 결과는 3회 반복하였으며, 실험결과를 mean  $\pm$  S.D.로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's *t*-test 방법으로 분석하였으며, 유의성 수준은 \*\*\**p* < 0.001, \*\**p* < 0.01, \**p* < 0.05로 표시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. DPPH 라디칼 소거능 측정

본 연구에서는 홍차 추출물(BT), 흑효모 발효물(AF) 및 홍차 흑효모 발효물(AFBT)의 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였다(Figure 1). 양성 대조구인 vitamin C의



**Figure 2.** Effect of AFBT on ROS inhibitory activity. (AFBT : *A. pullulans* ferment of black tea) The data shown represent the mean  $\pm$  S.D. derived from three determinations. \*\*\**p* < 0.001, \*\**p* < 0.01, \**p* < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.

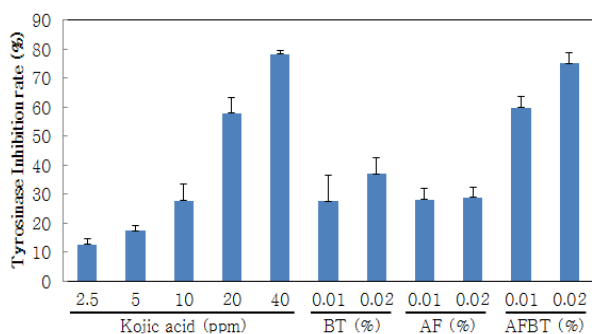
IC<sub>50</sub> 값은 34 ppm으로 나타났다. 흑효모 발효물보다 홍차 흑효모 발효물과 홍차 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 현저하게 증가함을 확인하였다. 이는 홍차 흑효모 발효물이 높은 항산화능이 있음을 증명한다.

### 3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 자극에 대한 ROS 소거능 효과

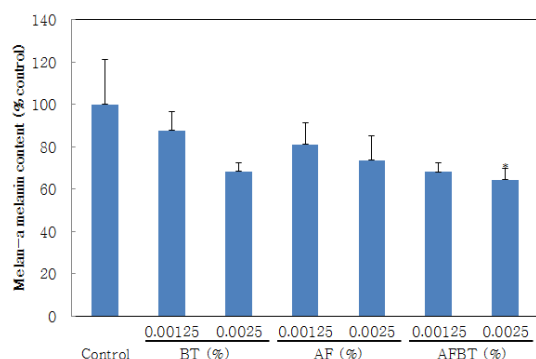
산화적 스트레스인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 시 다양한 활성산소종의 생성이 증가되고, 피부세포 내 내인성 항산화 효소 등의 발현은 감소하게 된다. DPPH 라디칼 제거능에서 높은 항산화능을 보인 홍차 흑효모 발효물의 세포 내 활성산소종 제거능 평가를 진행하였다(Figure 2). 그 결과, 홍차 흑효모 발효물을 0.0009% 처리하였을 때 대조군 대비 45%의 활성산소종이 제거되는 것을 확인하였다.

### 3.3. Tyrosinase 저해 활성 효과

홍차 흑효모 발효물의 tyrosinase 저해 활성을 평가하기 위하여 kojic acid를 양성대조군으로 사용하고 홍차 추출물, 흑효모 발효물, 홍차 흑효모 발효물의 tyrosinase의 효소 활성을 측정하였다(Figure 3). 홍차 추출물과 흑효모 발효물은 각각 낮은 tyrosinase 효소 저해 활성을 보였으나 홍차 흑효모 발효물의 경우 0.02%에서 75%의 높은 tyrosinase 저해능을 나타내어 우수한 미백효과를 입증하였다.



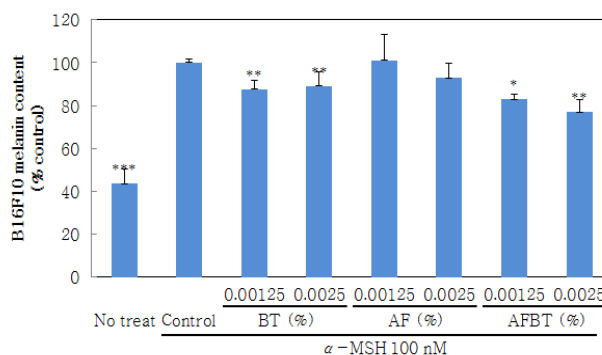
**Figure 3.** Effect of BT, AF and AFBT on tyrosinase inhibition activity (BT : black tea, AF : *A. pullulans* ferment, AFBT : *A. pullulans* ferment of black tea).



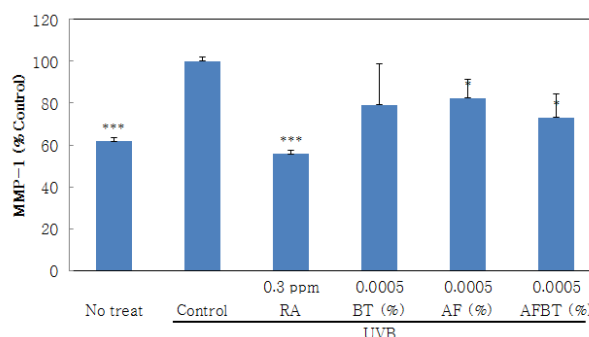
**Figure 4.** Effect of BT, AF and AFBT on melanin synthesis in Melan-a cells. (BT : black tea, AF : *A. pullulans* ferment, AFBT : *A. pullulans* ferment of black tea) The data shown represent the mean  $\pm$  S.D. derived from three determinations. \*\*\* $p$  < 0.001, \*\* $p$  < 0.01, \* $p$  < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.

### 3.4. 멜라닌 생성률 측정 결과

홍차 효효모 발효물의 미백효과를 평가하기 위해서 Melan-a 세포와 B16F10 세포를 이용하여 멜라닌 생성률을 확인하였다(Figure 4, 5). 홍차 효효모 발효물을 처리한 Melan-a와 B16F10 세포를 수확하여 멜라닌 양을 측정된 결과 홍차 효효모 발효물을 0.00125, 0.0025% 처리할 때 Melan-a 세포에서 멜라닌 생성률이 각각 33%, 37% 감소하였다. 또한 B16F10 세포에서 홍차 효효모 발효물을 0.00125, 0.0025% 처리할 때 각각 17%, 23% 감소하여 대조군에 비해 감소하였다. 따라서 홍차 효효모 발효물은 홍차 추출물과 효효모 발효물보다 더 낮은 멜라닌 생성률을 보여 더 좋은 미백효과를 보임을 확인하였다.



**Figure 5.** Effect of BT, AF and AFBT on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. (BT : black tea, AF : *A. pullulans* ferment, AFBT : *A. pullulans* ferment of black tea) The data shown represent the mean  $\pm$  S.D. derived from three determinations. \*\*\* $p$  < 0.001, \*\* $p$  < 0.01, \* $p$  < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.



**Figure 6.** Effect of BT, AF and AFBT on MMP-1 inhibitory activity. (RA : retinoic acid, BT : black tea, AF : *A. pullulans* ferment, AFBT : *A. pullulans* ferment of black tea) The data shown represent the mean  $\pm$  S.D. derived from three determinations. \*\*\* $p$  < 0.001, \*\* $p$  < 0.01, \* $p$  < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.

### 3.5. UV에 의한 MMP-1 발현 억제 효과

자외선(UVB)에 의해 유도되는 MMP-1의 발현에 홍차 효효모 발효물이 주는 영향을 보기 위해, UV-B를 가한 섬유아세포에 홍차 효효모 발효물을 처리하여 MMP-1 발현양을 측정하였다(Figure 6). 그 결과 UV-B 처리 시 MMP-1 발현양 증가를 확인하였고 양성대조군인 retinoic acid에 의해 그 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 홍차 추출물, 효효모 발효물, 홍차 효효모 발효물 모두 UVB에 의해 발현된 MMP-1 저해를 확인하였으며 그중 홍차 효효모 발효물이 27%의 MMP-1

저해율로 가장 높은 항노화 활성을 보였다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 홍차 흑효모 발효물의 화장품에서의 활용 가능성을 확인하기 위해 항산화, 미백 및 항주름 활성을 측정하였다.

홍차 흑효모 발효물은 DPPH 라디칼을 없애고, 0.0009% 처리하였을 때 대조군 대비 45%의 활성산소 종이 제거되어 피부의 ROS를 감소시키는 항산화 효능을 보였다.

홍차 흑효모 발효물의 미백 활성을 확인하기 위하여 tyrosinase 억제 활성과 멜라닌 생성 억제 효과를 측정한 결과, 홍차 흑효모 발효물 0.02%에서 75%의 tyrosinase의 활성을 억제하였다. 멜라닌을 형성하는 B16F10, Melan-a 세포의 멜라닌 생성 측정 결과 B16F10 세포에서 홍차 흑효모 발효물을 0.00125, 0.0025% 처리할 때 각각 17%, 23% 감소하여 대조군에 비해 감소하였으며 Melan-a 세포에서는 동일 농도에서 멜라닌 생성률이 각각 33%, 37% 감소하였다.

또한 피부 항주름 효과 확인을 위해 콜라겐 분해효소(MMP-1)을 측정한 결과 홍차 흑효모 발효물은 0.005%의 농도에서 이를 27% 저해시켜 항주름 효능을 보였다.

결론적으로 홍차 흑효모 발효물은 피부의 유해 라디칼을 제거하고, 멜라닌 생성을 억제하며 콜라겐 분해효소를 발현을 억제하여 항산화, 미백 및 항주름 소재로서 화장품 응용 가능성이 있음을 시사하였다.

#### Reference

1. S. R. Maxwell, Prospects for the use of antioxidant therapies, *Drugs*, **49**(3), 345 (1995).
2. M. Rendon, M. Berneburg, I. Arellano, and M. Picardo, Treatment of melasma, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **54**(5), S272 (2006).
3. H. S. Talwar, C. E. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton, and J. J. Voorhees, Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **105**(2), 285 (1995).
4. J. Kim, C. W. Lee, E. K. Kim, S. J. Lee, N. H. Park, H. S. Kim, H. K. Kim, K. Char, Y. P. Jang, and J. W. Kim, Inhibition effect of gynura procumbens extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts, *J. Ethnopharmacol.*, **137**(1), 427 (2011).
5. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.*, **69**(2), 154 (1999).
6. Y. Wang, A. R. Johnson, Q. Z. Ye, and R. D. Dyer, Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain, *J. Biol. Chem.*, **274**(46), 33043 (1999).
7. M. Friedman, Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas, *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**(1), 116 (2007).
8. S. Y. Choi, Y. C. Kim, and B. S. Chang, Inhibitory efficacy of black tea water extract on melanogenesis in melan-a cells and its action mechanisms, *J. Microbiol.*, **41**(3), 169 (2011).
9. A. Scabert, C. Manach, C. Morand, C. Remesy, and L. Jimenez, Dietary polyphenols and the prevention of disease, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**(4) 287 (2005).
10. J. H. Andrews, R. N. Spear, and E. V. Nordheim, Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces, *Can. J. Microbiol.*, **48**(6), 500 (2002).
11. Y. Kimura, M. Sumiyoshi, T. Suzuki, and M. Sakanaka, Antitumor and antimetastatic activity of a novel water-soluble low molecular weight  $\beta$ -1, 3-D-glucan (branch  $\beta$ -1, 6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast, *Anticancer Res.*, **26**(6B), 4131 (2006).
12. H. S. Yoon, J. W. Kim, H. R. Cho, S. B. Moon, H. D. Shin, K. J. Yang, H. S. Lee, Y. S. Kwon, and S. K. Ku, Immunomodulatory effects of *Aureobasidium pullulans* SM-2001 exopolymers on cyclophosphamide-treated mice, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**(2), 438 (2010).

13. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**(4617), 1199 (1958).
14. H. Wang and J. A. Joseph, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radical Biol. Med.*, **27**(5), 612 (1999).
15. Y. Rong, Z. Geng, and B. H. Lau, *Ginkgo biloba* attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells, *Free Radical Biol. Med.*, **20**(1), 121 (1996).