

Antioxidant and Whitening Effects of the Fermentation of Barley Seeds (*Hordeum vulgare* L.) Using Lactic Acid Bacteria

Jun-Hyeong Lee¹, Yeo-Cho Yoon¹, Jung-Kyu Kim¹, Ye-Eun Park¹, Hak-Soo Hwang³, Gi-Seok Kwon^{2*} and Jung-Bok Lee^{1*}

¹BHNBIO IDBM (Institute for Developments of BioIndustrial-Materials), #201, Industry-academic cooperation Building, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea

³Kyochon F&B, Osan 39852, Korea

Received November 20, 2017 / Revised February 6, 2018 / Accepted February 10, 2018

Barley (*Hordeum vulgare* L.), of the Poaceae/Gramineae family, is a common grain in the surrounding area. It has been used in Ancient Egyptian medicine and it has been used worldwide for many years as food and as an ingredient in beer. Barley has been reported to have anti-inflammatory, anti-carcinogenic and anti-diabetic effects. So far, a lot of research has been done on barley but the effects of fermented barley seeds with lactic acid bacteria have not been studied largely. In this study, we investigated the effects of ethanol-extracted barley seeds after their fermentation with lactic acid bacteria. The biological activities of fermented barley seeds with lactic acid bacteria and non-fermented barley seeds were analyzed for total polyphenol content, total flavonoid content, DPPH radical scavenging, superoxide dismutase-like activity and tyrosinase inhibition. These results showed that fermented barley seeds with lactic acid bacteria have more advanced anti-oxidant and whitening properties than non-fermented barley seeds. Hence, we suggest that fermenting barley seeds with lactic acid bacteria can be an impressive material in the food and cosmetic industries.

Key words : Antioxidant, barley seeds, fermentation, lactic acid bacteria, whitening

서 론

호흡 과정을 통해 우리 몸으로 들어온 산소의 2% 가량은 산화 과정을 거치면서 우리 체내의 세포와 조직을 손상시키는 산소로 변하는데 이 산소를 활성산소(reactive oxygen species, ROS)라고 한다. 활성산소는 일반 산소와 다른 불안정한 상태의 산소를 의미하며 다양한 질병을 일으키는 원인이 된다. 활성산소가 다량 발생하면 세포, 단백질, DNA가 손상되거나 파괴가 되고 이로 인해 노폐물을 만들어내며 세포의 신호전달 체계에 이상이 발생할 수 있다[17]. 질병의 약 90%가 활성산소와 연관 있다고 알려져 있으며, 암, 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 심근경색, 뇌졸중 등 각종 성인병 및 노화의 원인이 된다[27]. 하지만 이러한 활성 산소는 항산화제(antioxidant)를 통해 제거 된다. 대표적으로 비타민 C, 비타민 E, β -카로틴, 카로티노

이드 등이 항산화제 물질로 알려져 있으며 폴리페놀, 플라보노이드 또한 활성산소를 제거하는 항산화물질로 알려져 있다 [14, 17, 22]. 폴리페놀은 식물이 자외선으로부터 보호하기 위해 생성하는 물질로 활성산소로부터 세포 및 DNA를 보호하고 단백질과 효소가 분해되거나 파괴되는 것을 예방하며 암, 바이러스, 콜레스테롤의 억제에도 효과가 있다고 보고되고 있다. 최근 이러한 활성산소를 제거해줄 수 있는 항산화제에 대한 사람들의 관심이 증가됨에 따라 이를 이용한 화장품, 건강 기능식품, 질병 예방에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[1, 2, 6, 8, 12, 14, 17, 22, 26, 28].

활성산소와 피부와의 관련성을 살펴보면 피부가 자외선에 노출되면, 산화적 스트레스에 의해 과산화수소와 같은 활성산소를 증가시키며 항산화 효소의 발생도 감소시키며 멜라닌 생성을 증가시킨다[3, 16, 19, 26, 31]. 활성산소가 증가되면 피부노화가 촉진되는데 이 중 색소 침착을 보호하는 것이 멜라닌이다[10]. 멜라닌의 합성효소는 tyrosinase와 tyrosinase related protein 인 TRP-1, TRP-2 등이 있으며, tyrosinase는 tyrosine을 L-DOPA로 또다시 dopaquinone으로 전환하는 역할을 하며 TRP-2 효소에 의해 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 변환되어 마지막으로 TRP-1 효소에 의해 indole-5-6-quinone carboxylic acid로 전환되어 최종적으로 멜라닌으로 합성된다고 알려져 있다[9, 31].

멜라닌의 종류에는 흑갈색의 유멜라닌(eumelanin)과 적황

*Corresponding authors

Tel : +82-54-822-8972, Fax : +82-54-822-8973

E-mail : bio91@bhnbio.com (Jung-Bok Lee)

Tel : +82-54-820-5909; Fax : +82-54-820-6252

E-mail : gskwon@andong.ac.kr (Gi-Seok Kwon)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

색의 페오멜라닌(pheomelanin)이 있다. 높은 자외선 노출은 과도한 멜라닌 생성을 유도하여 기미, 주근깨, 검버섯, 반점 등의 과색소 침착을 일으킨다[8, 9, 13, 16, 34].

최근 화학성분의 독성 이슈화로 화장품 성분의 안전화에 대해 소비자들이 큰 관심을 가지고 있으며 무독성 천연물질을 이용한 활성산소 억제 기능과 멜라닌 생성 억제를 가진 미백 화장품의 개발의 필요성이 증가되고 있다.

보리(*Hordeum vulgare* L.)는 벼과(Poaceae/Gramineae)에 속하는 한해살이 작물로 세계 각국에서 재배되는 대표적인 곡물이다. 보리에는 플라보노이드의 일종인 quercetin, kaempferol, catechin과 비타민C, 비타민E, β-carotene 등의 강력한 항산화물질을 다량 함유하고 있고 단백질 및 필수아미노산을 많이 가지고 있어 간과 위장 보호에 효과적이며, β-glucan이라는 수용성 식이섬유 또한 많기 때문에 콜레스테롤을 낮추어 비만, 고혈압, 동맥경화와 당뇨병 등의 성인병 예방에 효과가 있다고 알려져 있다[7, 12, 22, 25].

그러나 이러한 보리를 이용한 연구는 많이 이루어지고 있지만 유산균 발효를 통한 생리활성 및 효능 증대에 관한 연구는 미미한 실정이다. 발효를 이용한 기법은 인체에 유익한 유산균의 대사작용을 이용하여 천연물과 미생물 상호작용에 의해 생리활성에 영향을 미치는 것으로 연구된 바 있다[15]. 또한, 유산균은 항산화, 면역 작용 및 미백 등의 다양한 생리활성이 보고되어 있다[15, 33].

따라서 본 연구에서는 보리 씨앗을 유산균으로 발효 후 추출하여 항산화 및 미백 활성 등의 생리활성을 발효 전과 비교 연구함으로써 보리를 이용한 화장품 소재를 개발에 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시료의 제조

본 연구에서 사용된 보리 씨앗은 (주)다농에서 국내산 길보리 씨앗을 구매하였으며, 분쇄 후 사용하였다. Sodium carbonate (Na₂CO₃), folin-ciocalteu, gallic acid, Tris hydrochloride (Tris-HCl), pyrogallol (C₆H₃(OH)₃), hydrochloric acid (HCl), L-ascorbic acid (Vitamin C), acarbose, 4-nitrophenol-α-D-glucopyranoside (pNPG), sodium phosphate (monobasic, dibasic), α-glucosidase enzyme, L-3,4-dihydroxyphenylalanine

(L-DOPA), tyrosinase enzyme는 Sigma Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. ELISA reader는 SpectraMax M2 Microplate Readers (Molecular devices, USA)를 사용하였다.

사용 균주

약 20여 가지의 것갈에서 분리한 유산균 균주를 보리와 예비 발효하여 발효 유무를 확인하고 오염도를 관찰한 후 발효에 최적화된 4개 균주만을 선별하였다

본 연구에서 선별되어 사용된 유산균 균주는 (주)솔젠트(Solgent, Korea)에 의뢰하여 동정 명명하였으며 동정된 *Lactobacillus brevis* BHN-LAB38, *Lactobacillus brevis* BHN-LAB96, *Lactobacillus paracasei* BHN-LAB111, *Lactobacillus paracasei* BHN-LAB129 를 사용하였다. 동결 건조된 균주는 MRS 배지에 48시간 동안 37°C에서 배양한 후, 사용하였다.

유산균 발효 보리 씨앗과 에탄올 추출

분쇄한 보리 씨앗 20 g에 균주를 20 ml 접종하여 37°C 배양기에서 72시간 동안 발효한 후, 70% 에탄올 100 ml를 넣고 배양기(37°C)에서 총 72시간(24시간 씩 3회)동안 추출 후 여과하였으며, Rotary evaporator (Eyela, Japan)로 55°C 이하에서 감압 농축을 하고, 동결 건조하여 얻은 추출물을 실험에 사용하였다.

Total polyphenol 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법[29]을 활용하여 진행하였으며, 96 well plate에 시험물질 10 ul와 Na₂CO₃ 시약 200 ul, 50% Folin 시약 10 ul를 넣고 잘 혼합한 후, foil 로 빛을 차단시킨 상태에서 30 분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후, ELISA를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이 때 시험물질의 총 폴리페놀 함량은 galic acid를 이용하여 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 ug/ml 의 농도로 작성된 표준 곡선을 통하여 분석하였다.

Total flavonoid 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Jia 등[11] 방법을 활용하여 진행하였으며, 96 well plate에 시험 물질 20 ul, 용매제 80 ul, 5% NaNO₂ 6 ul을 넣고 5분간 상온에서 반응한 후 10% AlCl₃·6H₂O 12 ul를 상온에서 6분간 반응시키고 1N NaOH 40 ul를

Table 1. Contents of total polyphenol in ethanol extracts from *Hordeum vulgare* L. fermented with Lactic acid bacteria

Concentration (ppm)	Non-fermented <i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>L. brevis</i>		<i>L. paracasei</i>	
		BHN-LAB38	BHN-LAB96	BHN-LAB111	BHN-LAB129
100	10.92±0.14 ¹⁾	8.67±2.50	8.00±1.15	12.58±0.88	12.26±1.97
500	20.42±0.95	35.33±2.31**	28.50±2.78*	35.67±3.40*	26.33±1.01*
1,000	51.25±0.66	58.58±3.01	77.75±1.98**	76.00±5.65*	58.33±3.88

¹⁾Value are means ± standard deviation of triplicate determinations.

Units: ug/100 g *; p<0.5, **: p<0.01

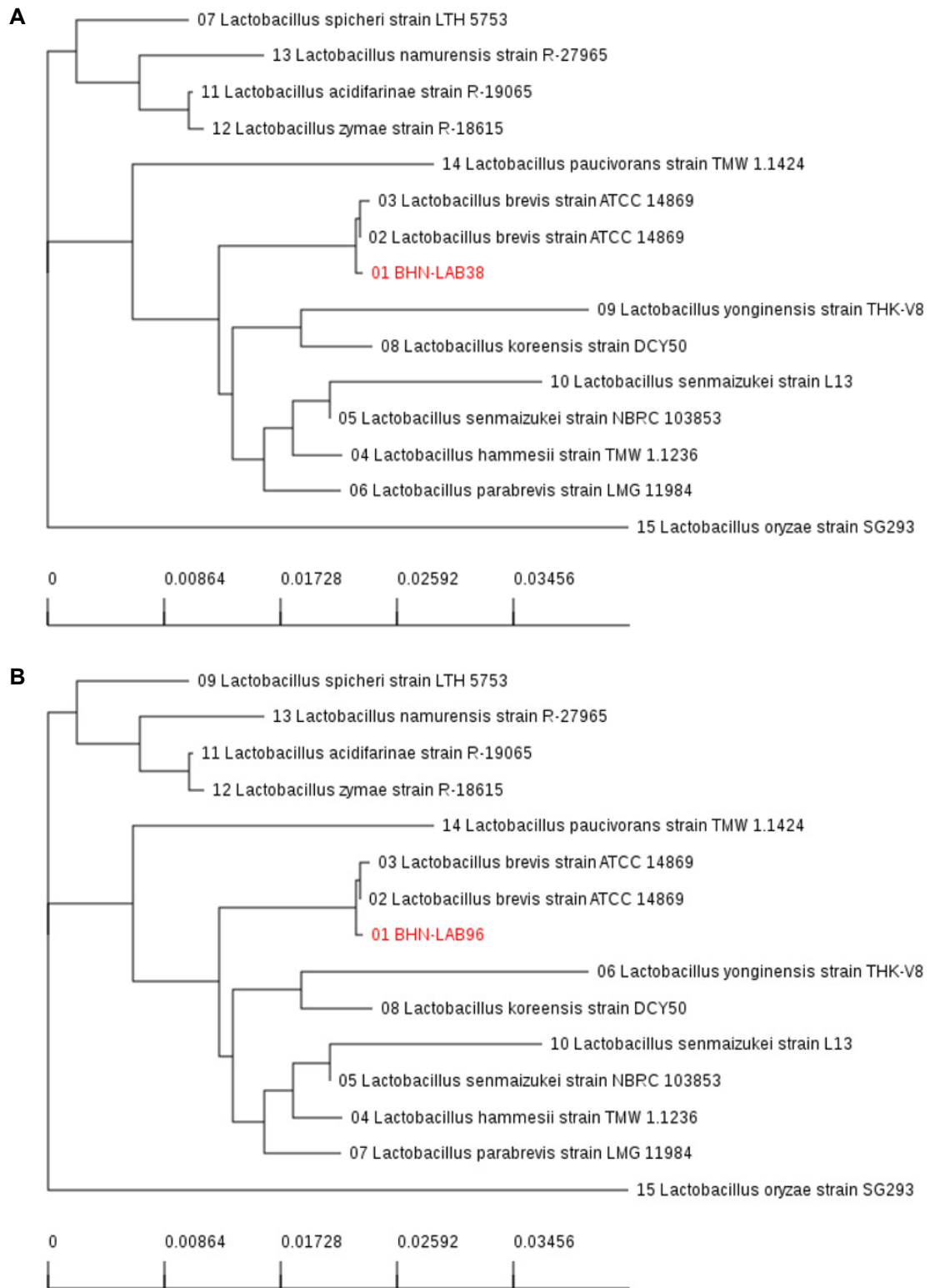


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the isolated BHN-LAB38 (A), 96(B), 111(C), 129(D) and related bacteria of the *Lactobacillus* group based on 16 rRNA gene sequence comparisons, The sequences of isolated strains were compared with available from the GenBank database.

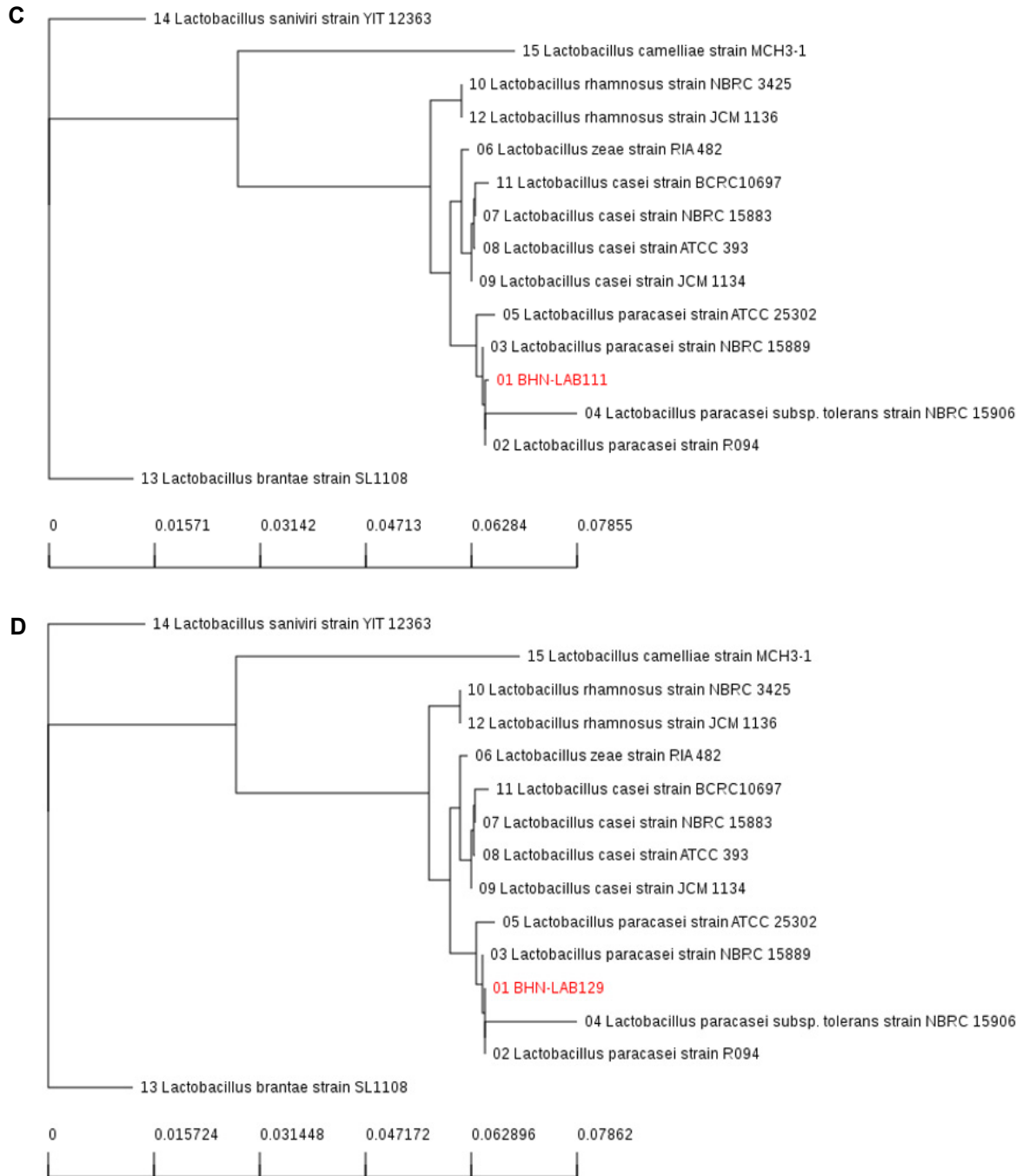


Fig. 1. Continued.

넣어 반응을 정지시키고 상온에서 11분 동안 반응을 시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 시험물질의 총 폴리페놀 함량은 rutin을 이용하여 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 ug/ml의 농도로 작성된 표준 곡선을 통하여 분석하였다.

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 소거능 측정

DPPH radical 소거 활성은 Blois [4]에 방법을 일부 변형하

여 수행하였다. 96 well plate에 20 ul 시험 물질, 180 ul DPPH를 각각 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응 시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거 활성능은 시료 용액을 첨가한 실험군과 첨가하지 않는 군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = [(1 - (\text{Sample} - \text{Sample blank}) / (\text{Control-Blank})) \times 100]$$

Sample : 시료에 DPPH 용액을 처리 후 반응 시킨 흡광도

Sample blank : 시료에 용매제를 처리 후 반응시킨 흡광도

SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund 방법[18]에 따라 수행하였다. 이 방법은 pyrogallol의 생성량 측정을 통하여 과산화 수소(H₂O₂)로의 전환 반응을 촉매 하는 SOD 유사활성으로 나타내었다. 각 농도의 시료 10 ul에 Tris-HCl buffer (50 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane in 10 mM EDTA, pH 8.5) 130 ug/ml와 7.2 mM pyrogallol 10 ul를 첨가하여 25℃에서 10 분간 반응시킨 후, 1 N HCl 10 ul를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 UV spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 SOD 유사활성은 시료 용액을 첨가한 실험군과 첨가하지 않는 군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = [(1 - (\text{Sample} - \text{Sample blank}) / (\text{Control} - \text{Blank}))] \times 100$$

Sample : 1 N HCl로 반응을 정지 전, pyrogallol 반응을 유도한 흡광도

Sample blank : 1 N HCl로 반응을 정지 후, pyrogallol 반응을 유도한 흡광도

Tyrosinase 저해 활성 분석

Tyrosinase 저해 활성 측정은 Masamoto [20]의 방법을 변형하여 수행하였다. 각 농도의 시료 10 ul에 Mushroom tyrosinase (110 unit/ml) 20 ul와 L-DOPA 170 ul를 첨가하여 잘 혼합한 후, 37℃에서 10분간 반응시켰다. L-DOPA 활성 억제체는 UV spectrophotometer를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성대조군으로 ascorbic acid, 음성대조군으로 tyrosinase enzyme 대신 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 동량 분주하여 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase 저해 활성 (\%)} = [(1 - (\text{Sample} - \text{Sample blank}) / (\text{Control} - \text{Blank}))] \times 100$$

Sample : Tyrosinase을 첨가한 군의 흡광도

Sample blank: Tyrosinase을 첨가하지 않는 군의 흡광도

통계 분석

모든 실험은 최소 3회 반복하여 진행하였으며, 각 시료들의 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 각 실험 결과의 통계적 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조군과 비교하여 Student's t-test에 의하여 판정하였으며 F 값이 0.05 또는 0.01 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

Total polyphenol 및 Total flavonoid 함량 측정

Benzene 고리의 수소 중 하나가 hydroxyl (-OH)로 치환된

물질을 페놀이라 하며 2개 이상의 하이드록시기를 갖고 있는 물질을 폴리페놀이라고 하며 플라보노이드는 폴리페놀의 일종으로 페닐기 2개가 C₆-C₃-C₆ 형 탄소골격구조와 결합되어 있는 물질이다[20]. 폴리페놀과 플라보노이드는 식물이 자외선으로부터 보호하기 위하여 만든 물질로 항산화 작용, 항균, 세포재생 등의 역할을 한다[27].

본 실험에서는 각 종 유산균으로 발효를 한 보리 씨앗(Lactobacillus fermented barley seeds; LFB)과 발효를 하지 않은 보리 씨앗(Non-fermented barley seeds; NFB)을 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 gallic acid과 rutin을 기준 물질로 하여 측정하였다. 그 결과, LFB와 NFB 모두 농도 의존적으로 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 각각 증가하였다. 총 폴리페놀 함량은 500 ppm 농도에서 NFB는 20.42±0.95 ug/100 g이었으며 *L. brevis* BHN-LAB38, *L. brevis* BHN-LAB96, *L. paracasei* BHN-LAB111, *L. paracasei* BHN-LAB129는 각각 35.33±2.31 ug/100 g, 28.50±2.78 ug/100 g, 35.67±3.40 ug/100 g, 26.33±1.01 ug/100 g으로 모든 LFB는 NFB에 비해 유의성 있는 증가를 보였으며 1,000 ppm 농도에서의 NFB는 51.25±0.66 ug/100 g이었으며 *L. brevis* BHN-LAB96, *L. paracasei* BHN-LAB111로 발효를 한 LFB는 각각 77.75±1.98 ug/100 g, 76.00±5.65 ug/100 g으로 유의성 있는 증가를 보였다.

총 플라보노이드 함량은 500 ppm에서의 NFB는 18.83±1.61 ug/100 g이었으며 *L. brevis* BHN-LAB38, *L. brevis* BHN-LAB96, *L. paracasei* BHN-LAB111, *L. paracasei* BHN-LAB129는 각각 28.00±2.50 ug/100 g, 25.50±1.32 ug/100 g, 27.50±0.87 ug/100 g, 25.17±0.76 ug/100 g로 모든 LFB는 NFB에 비해 유의성 있는 증가를 보였지만 1,000 ppm 농도에서는 모든 LFB에서 유의성을 찾지는 못하였다.

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 소거 측정

본 실험은 홀전자를 갖고 있는 free radical에 수산기(-OH)가 붙어서 radical 생성 및 반응을 종결 시켜주는 역할을 한다. DPPH (α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl) radical 은 보라색을 띠고 있는데 이것이 항산화제(시험 물질)와 반응하면 옅은 노랑색을 띠게 되며, 이런 색의 변화는 항산화능의 척도로 평가하는 실험방법이다[9].

본 연구에서는 다양한 농도에서 LFB와 NFB의 DPPH radicals 소거 활성을 측정하였다. 그 결과 *L. paracasei*, *L. brevis*로 발효를 한 모든 LFB와 NFB 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 1,000 ppm 농도에서 NFB의 DPPH radicals의 소거 활성은 14±0.01%을 보였으며 *L. brevis* BHN-LAB38, *L. brevis* BHN-LAB96, *L. paracasei* BHN-LAB111, *L. paracasei* BHN-LAB129로 발효를 한 LFB는 32.26±0.01%, 25.63±0.01%, 35.83±0.01%, 28.89±0.00%로 모든 LFB에서 NFB에 비해 유의성 있는 증가를

Table 2. Contents of total flavonoid in ethanol extracts from *Hordeum vulgare* L. fermented with Lactic acid bacteria

Concentration (ppm)	Non-fermented <i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>L. brevis</i>		<i>L. paracasei</i>	
		BHN-LAB38	BHN-LAB96	BHN-LAB111	BHN-LAB129
100	10.00±1.32 ¹⁾	5.83±1.15	6.67±3.88	12.33±3.25	11.17±1.26
500	18.83±1.61	28.00±2.50**	25.50±1.32**	27.50±0.87**	25.17±0.76**
1,000	48.67±1.04	56.50±3.28	52.00±2.78	47.83±4.75	44.67±4.51

¹⁾Value are means±standard deviation of triplicate determinations.

Units: ug/100 g **: p<0.01

보이며 NFB에 비해 항산화 활성이 증가함을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 저 농도인 100과 500 ppm에서도 유사한 결과를 확인하였다.

SOD 유사활성 측정

SOD는 superoxide dismutase로, superoxide를 다른 형태로 바꾸는 효소이다. 일반적으로 SOD는 superoxide를 과산화수소로 바꿀 수 있는 항산화제이며, 이러한 superoxide (O₂)를 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매 하는 pyrogallol의 생성량의 변화를 측정하는 실험방법이다[18].

본 연구에서는 다양한 유산균으로 발효를 한 LFB와 NFB의 SOD 유사 활성 분석 측정하였다. 그 결과, *L. paracasei*, *L. brevis*로 발효를 한 LFB와 NFB 모두 농도 의존적으로 증가하였다. 1,000 ppm 농도에서 NFB의 SOD 유사 활성 분석은 14.90±0.02%을 보였으며 *L. paracasei* BHN-LAB111로 발효를 한 LFB에서만 32.38±0.04%로 두 배 이상의 활성 변화를 보이며 유의성 있는 증가를 보였으며 저 농도 100, 500 ppm에서도 유사한 결과를 확인하였다.

Tyrosinase 저해 활성 분석

티로신은 티로시나제에 의해 L-DOPA (4-dihydroxy-phenylalanine)가 변환된 후 도파퀸으로 산화된다. 차후 도파퀸과 시스테인이 결합하여 중간체로 벤조티아젠을 거친 후 페오멜라닌을 형성하거나 도파퀸의 다른 경로를 통해 류코도파크롬으로 전환된 후 최종적으로 유멜라닌으로 전환된다. 이런 멜라닌 형성은 피부의 색소침착을 일으키게 되는데 이를 방지하기 위해 멜라닌 형성 과정 중 한 단계를 차단함으로써 멜라닌생성을 억제할 수 있다[8-10, 16, 34].

본 연구에서는 다양한 유산균으로 발효를 한 LFD와 NFD의 tyrosinase 저해 활성 측정하였다. 그 결과, *L. paracasei*, *L. brevis*로 발효를 한 LFD와 NFD 모두 농도 의존적으로 증가하였다. *L. paracasei* BHN-LAB129로 발효를 한 보리는 100 ppm에서만 NFD에 비해 유의한 억제 활성을 보였으나 고농도에서는 유의성이 관찰되지 않았다. 또한 1,000 ppm 농도에서 NFB의 tyrosinase 저해 활성은 39.06±0.03%을 보였으며 *L. brevis* BHN-LAB38, *L. paracasei* BHN-LAB111로 발효를 한 보리는 각각 47.89±0.02%, 57.47±0.01%, tyrosinase 저해 활성을 보이며 가장 높은 효소 저해 활성을 보였다. 비록 positive control에 사용된 ascorbic acid에 비해서는 낮은 저해 활성을 보였지

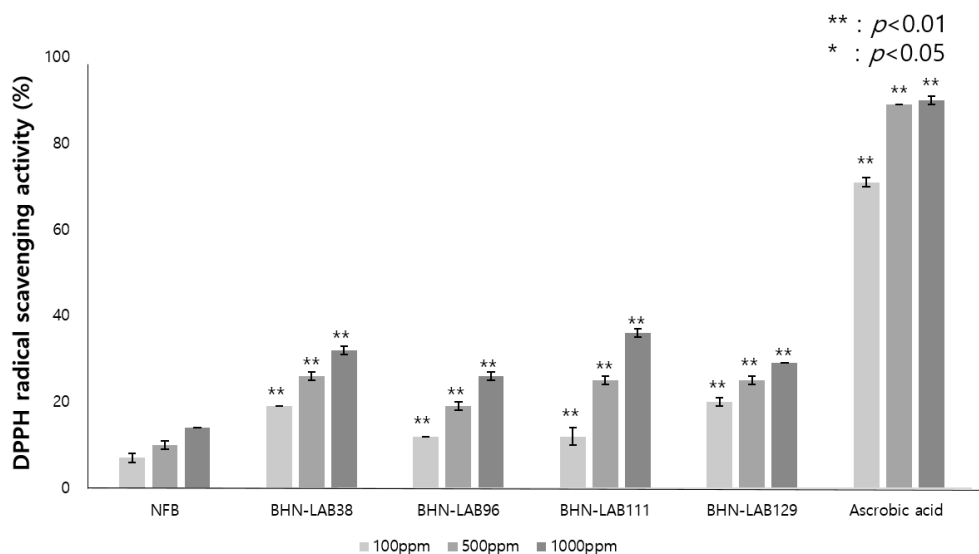


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities of Barley fermented by Lactic acid bacteria (*Lactobacillus brevis* ; BHN-LAB38, BHN-LAB96 *Lactobacillus paracasei* ; BHN-LAB111, BHN-LAB129). DPPH radical scavenging activities were measured at 525 nm. Results were expression as % control (non-fermented Barley seeds) and data means ± S.D. of at least triplication.

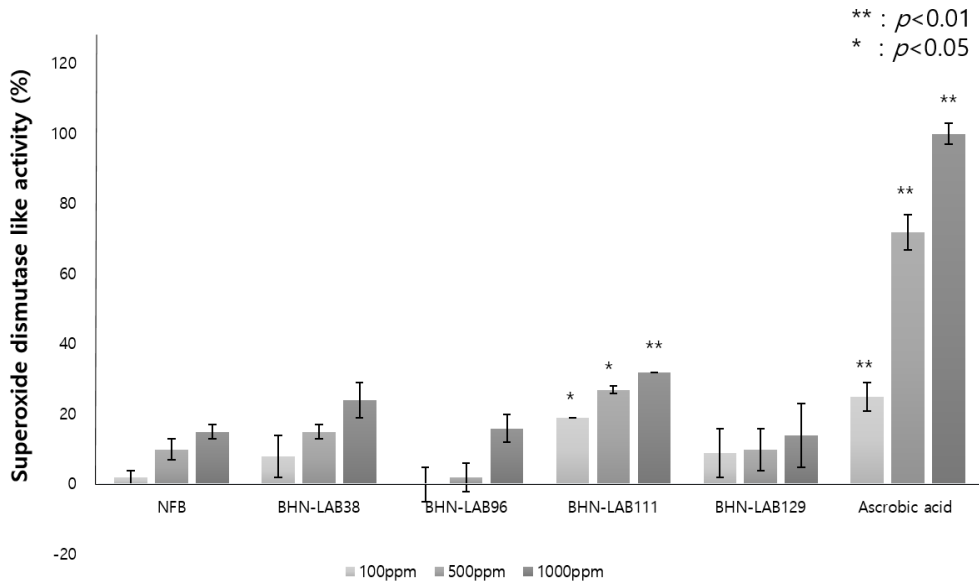


Fig. 3. SOD-like activities of Barley fermented by Lactic acid bacteria (*Lactobacillus brevis* ; BHN-LAB38, BHN-LAB96 *Lactobacillus paracasei* ; BHN-LAB111, BHN-LAB129). Superoxide dismutase-like activities were measured at 420 nm. Results were expression as % control and data mean ± S.D. of at least triplication.

만 발효하지 않은 대조군에 비해 약 1.2-1.5배 증가되며 유의적인 억제 활성을 보이는 것으로 보아 tyrosinase 저해를 활성화시키는 것으로 사료된다.

고찰

본 연구에서는 짓갈에서 분리한 유산균 *L. brevis*, *L. paracasei*로 발효를 한 보리 씨앗이 발효하지 않은 보리 씨앗에 비

해 항산화 및 다른 기능들의 효과를 확인하고 이를 통해 항산화 및 미백 화장품소재로서의 적용 및 응용하기 위한 항산화 (총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH radicals 소거 활성, SOD 유사 활성 분석), 미백(tyrosinase 저해 활성 측정)등의 실험을 진행하였다. 총 플라보노이드 함량은 모든 LFB가 NFB를 500 ppm에서 유의성 있게 증가하였으며 총 폴리페놀 함량은 500 ppm 농도에서는 모든 LFB가 NFB에 비해 유의성 있게 증가하였고 1,000 ppm에서는 BHN-LAB96,

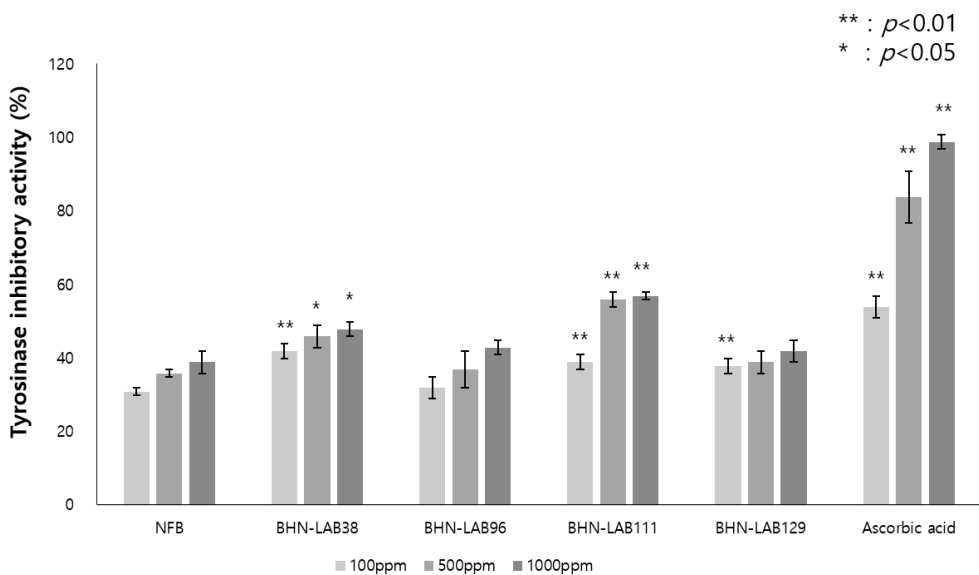


Fig. 4. Inhibitory effects of Barley fermented with Lactic acid bacteria (*Lactobacillus brevis* ; BHN-LAB38, BHN-LAB96 *Lactobacillus paracasei* ; BHN-LAB111, BHN-LAB129) on tyrosinase activities. Inhibitory activities of tyrosinase were measured at 450 nm. Results were expression as % control and data mean ± S.D. of at least triplication.

BHN-LAB111 균주로 발효를 한 LFB가 유의성 있게 증가하였다. DPPH radicals 소거 활성에서도 NFB에 비해 LFB가 모두 유의한 증가를 확인하였다. 이를 통해 유산균 발효 보리 씨앗은 항산화 작용이 뛰어난 것으로 사료된다. SOD 유사 활성 분석에서는 BHN-LAB111 균주로 발효한 LFB에서만 NFB에 비해 활성 효과를 나타내었다. 한편 보리 씨앗을 *L. rhamnosus* 로 발효를 한 논문에서 총 폴리페놀 함량, DPPH radicals 소거 활성 외에도 FRAP method, thiobarbituric acid test 등 항산화 측정 실험에서도 모두 발효하지 않은 것에 비해 농도 의존적으로 항산화 능력이 증가되었다고 한다[30]. 본 연구와 비교를 해보면 *L. rhamnosus*로 보리를 발효를 한 논문에서는 최고 농도의 총 폴리페놀 함량이 발효를 하지 않은 보리에 비해 약 22.56% 증가된 반면 본 연구에서 사용되어진 유산균으로 보리를 발효를 한 최고 농도의 총 폴리페놀 함량은 발효를 하지 않은 보리에 비해 약 14.31-48.29% 증가되었다. DPPH radicals 소거 활성 실험에서도 같은 100 ppm 농도에서 보고된 연구에서는 약 26.42% 정도 증가된 반면 본 연구에서는 약 63.19-166.67% 정도 활성이 증가되었다. 이를 통해 기존의 논문보다도 본 연구에서 사용되어진 유산균을 통해 발효를 한 보리의 항산화 능력이 더 뛰어난 것을 알 수가 있었다.

또한 실험에 사용되어진 유산균 원액만으로 DPPH radicals 소거 활성 실험을 한 결과에서는 *L. brevis* BHN-LAB38, *L. brevis* BHN-LAB96, *L. paracasei* BHN-LAB111, *L. paracasei* BHN-LAB129는 각각 0%, 0%, 2%, 12% 활성이 나타났다. 이러한 결과들로 보아 유산균 원액의 항산화 능력 보다는 유산균과 보리의 발효를 통해 항산화 능력이 증가되는 것을 알 수 있었다. 따라서, 기존의 항산화 능력이 뛰어난 보리에 유산균을 통한 발효 공정은 더욱더 뛰어난 항산화 능력을 가지는 것으로 생각된다.

또한 L-DOPA를 사용한 미백 실험 시 BHN-LAB38, BHN-LAB111 균주로 발효를 한 LFB가 유의성 있게 억제 시키는 것을 확인하였다. 일반적으로 phenolic compound, flavonoid 등이 tyrosinase 활성을 저해를 통한 멜라닌 생합성을 억제하고 멜라노마 세포의 증식을 억제한다고 알려져 있다[6]. 본 연구를 통해서 총 폴리페놀 함량 및 항산화 능력이 증가되면서 tyrosinase 저해 활성이 증가되는 것으로 생각되며 특히 DPPH radicals 소거 활성 결과에서 BHN-LAB38과 BHN-LAB111이 가장 활성이 강하였는데 tyrosinase 저해 활성 실험에서도 이 두 균주로 발효한 LFB에서 가장 강한 활성을 나타내는 것으로 보아 앞서 언급한 이론을 뒷받침한다고 생각한다. 실험에 사용되어진 유산균 원액만으로 L-DOPA를 사용한 미백 실험에서는 *L. brevis* BHN-LAB38, *L. brevis* BHN-LAB96, *L. paracasei* BHN-LAB111, *L. paracasei* BHN-LAB129는 각각 1%, 2%, 24%, 23% 활성이 나타나며 유산균 원액에서는 *L. paracasei* BHN-LAB111, *L. paracasei* BHN-LAB129의 tyrosinase 저해 활성이 가장 강한 반면 보리와 발효 시 *L. brevis* BHN-LAB38, *L.*

paracasei BHN-LAB111에서 활성이 가장 강한 것으로 보아 기존에 유산균의 tyrosinase 저해 활성 외에도 보리와 발효를 통해 더욱더 강한 tyrosinase 저해 활성이 나타나는 것으로 생각된다.

이러한 결과들을 통해 본 연구에서 사용한 유산균으로 발효를 한 보리 씨앗은 뛰어난 항산화 작용 및 tyrosinase 발현을 억제함으로써 멜라닌 합성 억제 효과를 나타내는 것으로 생각되며 이는 향후 보리의 유산균 발효를 통한 미백 화장품 개발로의 발전 가능성이 있을 것으로 사료된다.

References

1. Alu'datt, M. H., Ereifej, K., Abu-Zaiton, A., Alrababah, M., Almajwal, A., Rababah, T. and Yang, W. 2012. Anti-oxidant, anti-diabetic, and anti-hypertensive effects of extracted phenolics and hydrolyzed peptides from barley protein fractions. *Int. J. Food Prop.* **15**, 781-795.
2. Bae, M. J. and Ye, E. J. 2010. Antioxidant activity and in vitro for anticancer effects of manufactured fermented Mulberry Leaf Tea. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **39**, 796-804.
3. Barber, L. A., Spandau, D. F., Rathman, S. C., Murphy, R. C., Johnson, C. A., Kelley, S. W., Hurwitz, S. A. and Travers, J. B. 1998. Expression of the platelet-activating receptor results in enhanced ultraviolet B radiation-induced apoptosis in a human epidermal cell line. *J. Biol. Chem.* **273**, 18891-18897.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
5. Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L. O., Wlacheck, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. 1998. Central role of ferrous/ferric iron in the ultra violet B irradiation mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **273**, 5279-5287.
6. Cha, J. Y., Yang, H. J., Jeong, J. J., Seo, W. S., Park, J. S., Ok, M. and Cho, Y. S. 2010. Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J. Life Sci.* **20**, 940-947.
7. Eun, C. S., Hwang, E. Y., Lee, S. O., Yang, S. A. and Yu, M. H. 2016. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Barley sprout extract. *J. Life Sci.* **26**, 537-544.
8. Han, J. S. and Yi, D. H. 2012. Effects of Pine Needles fermentation extracts on antioxidant activity and inhibition of melanin synthesis. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **10**, 619-624.
9. Han, S. M., Kim, J. M., Lee, K. G., Park, K. K. and Chang, Y. C. 2012. Inhibitory effects of purified Bee Venom on melanin synthesis. *Yakhak. Hoeji.* **56**, 254-259.
10. Ito, S. and Wakamatsu, K. 2008. Chemistry of mixed melanogenesis-pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* **84**, 582-592.
11. Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects

- on superoxide radicals. *Food. Chem.* **64**, 555-559.
12. Jo, S. H., Cho, C. Y., Ha, K. S., Choi, E. J., Kang, Y. R. and Kwon, Y. I. 2013. The Antioxidant and antimicrobial activities of extracts of selected barley and wheat inhabited in Korean Peninsula. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **42**, 1003-1007.
 13. Kang, M. C. and Lee, K. S. 2009. Expression of apoptosis related genes from HaCaT cell after UVB irradiation. *Kor. J. Dermatol.* **47**, 790-797.
 14. Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Lee, B. H. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 337-342.
 15. Kim, H. S., Chae, H. S., Jeong, S. G., Ham, J. S., Im, S. K., Ahn, C. N. and Lee, J. M. 2006. *In vitro* antioxidative properties of lactobacillus. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **19**, 262-265.
 16. Kim, M. J. And Ryu, M. J. 2012. Inhibition of melanogenesis and anti-UV properties *Reynoutria elliptica*. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **10**, 961-968.
 17. Lee, S. O., Lee, H. J., Yu, M. H., Im, H. G. and Lee, I. S. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extract from vegetables produced in Ullung Island. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 233-240.
 18. Marklund, S. and Marklund, G. 1975. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Herbol.* **23**, 1-8.
 19. Masake, H., Atsumi, T. and Sakurai, H. 1995. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 474-479.
 20. Masamoto, Y., Ando, H., Murata, Y., Shimoishi, T. M. and Takahata, K. 2003. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 631-634.
 21. Nazare, J. A., Normand, S., Oste, T. A., Brac de la Perrière, A., Desage, M. and Laville, M. 2009. Modulation of the postprandial phase by β -glucan in overweight subjects: effects on glucose and insulin kinetics. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 361-369.
 22. Nirupama, G., Mohammad, B. H., Dilip, K. R. and Nigel, P. B. 2015. A Review of extraction and Analysis of bioactives in Oat and Barley and scope for use of novel food processing technologies. *Molecules* **20**, 10884-10909.
 23. Park, J. B., Sim, H. S., Ha, S. J. and Kim, M. D. 2015. Enhancement of antioxidative activities of berry or vegetable juices through fermentation by lactic acid bacteria. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**, 291-295.
 24. Park, N. Y. and Lee, S. H. 2017. Fermentative characteristics of yogurt using lactic acid bacteria isolated from Korean traditional fermented food. *Kor. J. Food* **24**, 707-713.
 25. Park, S. J., Lee, J. S., Hoe, Y. H., Moon, E. Y. and Kan, M. H. 2008. Physiology activity of barley leaf using different drying methods. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **37**, 1627-1631.
 26. Park, S. A., Park, J., Park, C. I., Jie, Y. J., Hwang, Y. C., Kim, Y. H. Jeon, S. H., Lee, H. M., Ha, J. H., Kim, K. J. and Park, S. N. 2013. Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 407-415.
 27. Park, S. J., Kim, E. S., Choi, Y. S. and Kim, J. D. 2008. Effects of *Sophorae fructus* on antioxidative activities and lipid levels in rats. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **37**, 1120-1125.
 28. Seo, E. J., Hong, E. S., Choi, M. H., Kim, K. S. and Lee, S. J. 2012. The Antioxidant and skin whitening effect of *Artemisia iwayomogi* extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 89-93.
 29. Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. A colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158.
 30. Tijana, M. Đ., Slavica, S. Š. and Suzana, I. D. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chem.* **119**, 957-963.
 31. Yang, H. S., Choi, Y. J., Oh, H. H., Moon, J. S., Jung, H. K., Kim, K. J., Choi, B. S., Lee, J. W. and Huh, C. K. 2014. Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 80-85.
 32. Yang, S. J. and Choe, T. B. 2011. Antioxidant activity and whitening effect of *Forsythiae Fructus* extracts. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **19**, 472-477.
 33. Yamamoto, Y. 2001. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J. Dermatol. Sci.* **27**, 1-4.
 34. Yoon, Y. M., Bae, S. H., An, S. W., Choe, Y. B., Ahn, K. J. and An, I. S. 2013. Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **11**, 417-426.

초록 : 유산균을 이용한 보리의 발효를 통한 항산화 및 미백 효과이준형¹ · 윤여초¹ · 김중규¹ · 박예은¹ · 황학수³ · 권기석^{2*} · 이중복^{1*}(¹비에이치앤바이오 기업부설 생물산업소재개발연구소, ²안동대학교 생약자원학과, ³교촌에프앤비)

보리(*Hordeum vulgare* L.)는 Poaceae/Gramineae 과에 속하며 주위에 흔히 있는 곡물이지만 고대 이집트에서는 보리가 의약품으로 사용되어 왔으며 오랜 전부터 많은 나라에서 기능성 식품, 향료 및 맥주로 사용되는 중요한 곡물이다. 보리의 효능에는 항염증, 항암 및 항당뇨병에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 현재까지 보리에 관한 많은 연구가 진행되어왔지만 유산균 발효를 이용한 발효 보리에 대한 연구는 많이 진행되지 않았다. 본 연구에서는 유산균을 이용하여 발효 후 에탄올로 추출한 보리 씨앗의 효과에 대하여 조사 하였다. 이를 위해서 유산균으로 발효한 보리 씨앗과 발효하지 않은 보리의 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능, SOD 유사활성 및 타이로시나제 저해 활성을 분석하였다. 결과적으로 유산균으로 발효한 보리 씨앗이 발효하지 않은 보리 씨앗보다 더 효과적인 항산화 효과 및 미백 활성을 나타내는 것으로 보였다. 따라서 우리는 유산균으로 발효한 보리 씨앗이 건강 기능 식품 및 화장품 개발의 기초가 될 수 있음을 제안한다.