

Verification of Biological Activities and Tyrosinase Inhibition of Ethanol Extracts from Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Fermented with Lactic Acid Bacteria

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

¹BHNBIO Co., LTD, Institute for Developments of BioIndustrial-Materials, #201, Industry-academic cooperation Building, Andong National University 1375 Gyeongdongro, Andong 36729, Gyeongbuk, Korea

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

³Kyochon F&B, 114-10, Wondong, Osan-si, Gyeonggi-do 18150, Korea

Received November 20, 2017 / Revised June 22, 2018 / Accepted June 27, 2018

Hemp seed (*Cannabis sativa* L.; HS), an annual herbaceous plant in the Cannabis genus, has been reported to play various biological functions in immunity increase, atherosclerosis, constipation, hyperlipidemia prevention, anti-inflammatory, and anti-cancer. In recently years, as superfood, the growing interest in the health care benefits of hemp seed has led to increased consumption. In this study, we investigated the effect of an ethanol extract of HS fermented with lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* KCTC 3107, *L. plantarum* KCTC 3108, *L. brevis* BHN-LAB128, *L. paracasei* BHN-LAB129). An antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were 13.99 mm and 15.17 mm, respectively. The ethanol extracts of fermented hemp seed by lactic acid bacteria that the contents of total polyphenol, total flavonoid content, DPPH radical scavenging activity, SOD-like activity, and α -glucosidase inhibitory activity were increased compared to non-fermented hemp seed. Also, tyrosinase inhibitory activity of the fermented hemp seed (FHS), known to melanin increasing substance was increased. In these results, we suggested that FHS have effects of anti-oxidant, α -glucosidase inhibitory activity, and tyrosinase inhibitory activity. Hence, we proposed that FHS has possible to development as functional foods and cosmetics.

Key words : Anti-oxidant, anti-diabetic, hemp seed, lactic acid bacteria, skin whitening

서론

현대사회는 의료 기술의 발전으로 인한 평균 수명의 연장과 국민의 생활수준 향상으로 건강에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이며, 이로 인해 건강 기능 식품에 대한 관심이 점차 높아지고 있다. 또한, 환경 변화 및 미용에 대한 관심이 증대되어 화장품과 의약품의 연계성으로 코스메슈티컬(cosmeceutical) 시장과 더불어 코스메틱푸드(cosmetic food)라는 먹는 화장품의 등장으로 건강기능식품 시장은 더욱 급격한 성장을 보이고 있다. 최근 식생활 습관의 변화에 따른 다양한 생활 습관성 질병의 발생률 또한 증가하고 있으며, 복분자, 참당귀 등의 천연물을 이용한 개선 연구가 활발하게 진행되고 있다[21, 30].

대마(*Cannabis sativa* L.)는 삼과(Cannabaceae)에 속하는 한해살이 식물로 중앙아시아가 원산지이고, 온화하고 습한 기후에서 잘 자라며, 국내에는 기원전 1세기 무렵부터 재배되었다고 알려져 있다. 대마의 섬유질은 옷감, 실 등을 만드는데 이용되며, 대마씨는 오일의 원료로 사용된다. 대마의 환각 성분은 주로 잎과 줄기에 함유되어 있으며, 씨에는 환각 성분이 소량 함유되어 있으나 껍질을 제거하면 건강식품으로 활용이 가능하다. 이러한 대마씨의 효능으로는 항산화, 면역력 강화, 동맥경화 예방, 정력 향상, 고혈압 개선, 변비 예방, 다이어트, 피부 미용, 고지혈증 예방, 그리고 항염 및 항암작용 등이 있다고 보고되고 있다[35]. 또한, 칼슘 함유량, 감마리놀렌산(Gamma Linolenic acid)이 함유되어 있어 슈퍼 푸드(Super food)로 인식되고 있다. 잣과 비슷한 형태를 가지는 대마씨(*Cannabis sativa* L.; HS)는 다량의 필수 아미노산과 불포화 지방산과 탄수화물 함량이 적고 체내에서 생성되지 않는 비타민 B1, 2, 6, 그리고 식이 섬유가 다량 함유되어 있다고 알려져 있다[6, 17, 18]. 대마씨의 함유 물질은 테트라하이드로칸나비놀(Tetrahydrocannabinol; THC)과 칸나비디올(Cannabidiol; CBD)이 대표적이다. THC는 환각 성분으로 알려져 있으며, CBD는 THC의 환각 효과를 억제한다고 보고 되고 있으며, 대마씨에는 THC 뿐만 아니라, 이를 억제하는 CBD 성분도

*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.

다량 함유되어 있다. 최근 보고에 따르면 THC의 경우 신경 보호 활성, 뇌 성장인자 유전자 발현 조절 등이 있으며, CBD는 항경련 효과, 알츠하이머, 항간질 등이 알려져 있으며 이에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다[20, 24, 25, 29, 39].

당류 발효를 통한 젖산과 다양한 대사 산물들을 생산하는 미생물인 유산균(lactic acid bacteria)은 물질 대사에 의해 글루코오스(Glucose) 등의 탄수화물을 분해하여 다량의 락트산(Lactic acid)을 생성하는 그람(Gram) 양성 세균이다. 유산균은 대표적으로 구균인 *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*과 간균인 *Lactobacillus*가 있다. 이러한 유산균은 포유류의 장내에서 서식하여 항균 물질을 분비함으로써 유해균에 의한 이상 발효의 방지 및 생육을 억제하여 항상성 유지를 돕는 중요한 미생물로 알려져 있으며, 항산화, 항염, 항암, 면역 활성화 등의 기능이 있다고 보고되고 있어 현대인들의 각종 질병의 예방 효과가 있다[26]. 최근에는 이를 이용하여 기능성 소재 개발을 위한 다양한 연구가 진행되고 있으며, 건강 기능성 식품 소재, 화장품 소재, 사료 첨가제 등의 제조에 이용되고 있다[13]. 이러한 유용한 유산균의 기능성을 이용하여 인삼 열매 추출물의 항산화 및 항노화 효과, 천마의 수면 유도 효과, 부추 당침액의 항산화 및 ACE 저해 활성 등 다양한 물질에서의 활성 연구가 보고 되었다[10, 22, 23].

그러나 대마씨를 이용한 다양한 연구와 제품들이 개발되어 있지만, 현재 유산 발효를 통한 생리활성 및 효능 증대에 관한 기술적 연구는 거의 이루어지지 않고 있으며, 기능성 식품에 관한 제품화 개발 또한 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구를 통하여 다양한 생리 활성을 보이는 대마씨에 유산균을 접종(FHS)하여 발효한 추출물의 생리 활성 및 다양한 기능성 변화를 탐색하여 새로운 활용방안을 확인해 보고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 방법

본 연구에서 사용된 대마씨는 동명 홍삼 업체에서 캐나다산을 구매하여, 분쇄 후 사용하였다. Sodium carbonate (Na_2CO_3), Folin-ciocalteu, Gallic acid, TRIS hydrochloride (Tris-HCl), Pyrogallol ($\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$), Hydrochloric acid (HCl), L-Ascorbic acid (Vitamin C), Acarbose, p-nitrophenyl β -D-glucoside (pNPG), Sodium phosphate (monobasic, dibasic), α -glucosidase enzyme, 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), Tyrosinase enzyme 은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. ELISA reader는 SpectraMax M2 Microplate Readers (Molecular devices, USA)를 사용하였다.

사용 균주

본 연구에서 사용된 유산균은 Korea Collection for Type

Culture (KCTC, Korea)에서 분양 받은 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3107, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3108 과 분리 균주 *Lactobacillus brevis* BHN-LAB 128, *Lactobacillus paracasei* BHN-LAB 129 를 사용하였으며 분리 균주 2종은 동정을 진행하였다(Fig. 1). 동결 건조된 균주는 MRS 배지에 48시간 동안 37°C에서 배양하여 사용하였다.

유산균 발효 대마씨 에탄올 추출물(FHS)

분쇄한 대마씨 20 g에 균주를 20 ml 접종하여 배양기(37°C)에서 72시간 동안 발효한 후, 70% 에탄올 100 ml를 넣고 배양기(37°C)에서 총 72시간(24시간씩 3회)동안 추출·여과 후 Rotary evaporator (Eyela, Japan)로 55°C 이하에서 감압 농축을 하고, 동결 건조한 추출물을 본 연구에 사용하였다.

항균 활성 분석

항균 활성 분석은 paper disc assay를 통해 확인하였다. BHI (Brain Heart Infusion) agar 배지에 병원성 균주 배양액을 도말하고 대마씨 발효 추출물을 지름이 6 mm인 paper disc에 100 μ l 흡수시켰다. 이를 1시간 정도 확산시킨 후, 37°C 항온 배양기에서 24시간 정도 배양하였고 배양 후 형성된 투명한 (Clear zone)의 크기로 항균 활성을 측정하였다. 항균 활성 분석에 이용한 균주는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1927, *Bacillus cereus* KCTC 13153, *Salmonella typhimurium* KCTC 1926이다.

총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 활용하여 진행하였으며 [34], 96 well plate에 시험 물질 10 μ l와 Na_2CO_3 시약 200 μ l, 50% folin 시약 10 μ l를 넣고 잘 혼합한 후, 알루미늄 호일로 빛을 차단시킨 상태에서 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후, UV spectrophotometer를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이 때 시험 물질(FHS)의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 표준 곡선을 구해 분석에 이용하였다.

총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 Jia 등의 방법을 변형하여 측정하였으며[11], 96 well plate에 시험 물질 20 μ l, 용매제 80 μ l, 5% NaNO_2 시약 6 μ l 넣고 5분간 상온에서 반응 후, 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 시약 12 μ l 첨가하여 6분간 상온에서 재반응시켰다. 그 후, 반응 정지를 위해 1 N NaOH 를 40 μ l를 넣어 상온에서 11분간 반응시켰으며, UV spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준물질은 rutin을 이용하여 표준곡선을 구해 분석하였다.

DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) radical 소거 활성 측정

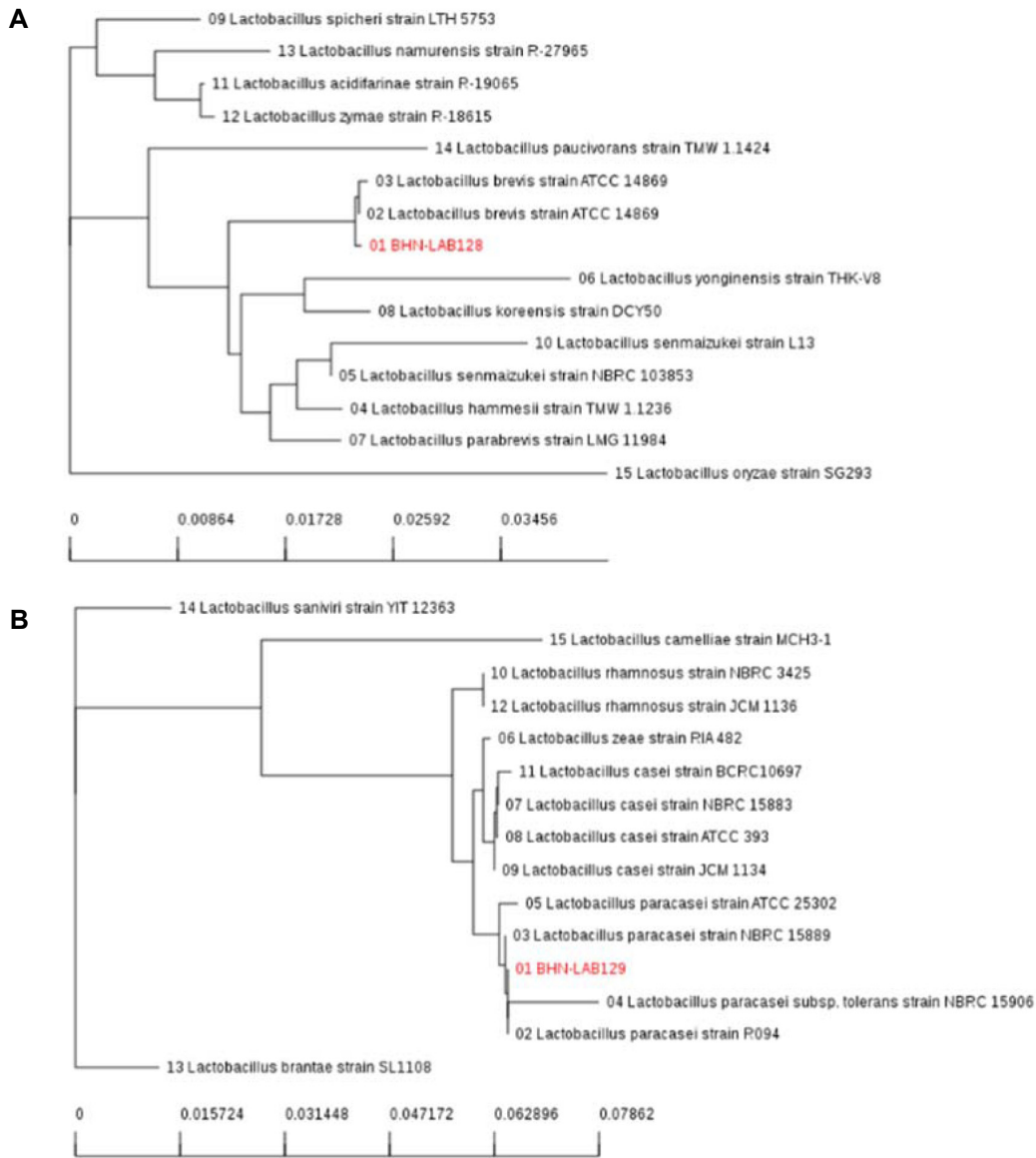


Fig 1. The phylogenetic tree of lactic acid bacteria used in this study. (A) *Lactobacillus brevis* BHN-LAB128, (B) *Lactobacillus paracasei* BHN-LAB129.

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[4]. 시료 20 ul에 DPPH 용액을 180 ul를 첨가한 후, 상온에서 30분간 암상태로 반응시킨 후, UV spectrophotometer를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거 활성능은 DPPH 용액 처리구와 무처리구의 흡광도 차이를 비교하여 백분율로 나타내었으며, 양성대조구는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical 소거 활성능(\%)} = \frac{1 - (S - SB)}{\text{Control} - \text{Blank}} \times 100$$

S: 시료에 DPPH 용액을 처리 후 반응시킨 흡광도

SB: 시료에 용매제(DPPH 용액 대신)를 처리 후 반응시킨 흡광도

Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 분석

SOD 유사 활성은 Marklund와 Marklund의 방법[26]에 따라 수행하였다. 이 방법은 pyrogallol의 생성량 측정을 통하여 과산화수소(H₂O₂)로의 전환 반응을 측정하는 SOD 유사 활성으로 나타내었다. 각 농도의 시료 10 ul에 Tris-HCl buffer (50 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane + 10 mM EDTA, pH 8.5) 130 ul와 7.2 mM pyrogallol 10 ul를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후, 1 N HCl 10 ul를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 UV spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 SOD 유사 활성은 시료 용액을 첨가한 처리구와 무처리구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사 활성(\%)} = \frac{1 - (S - SB)}{\text{Control} - \text{Blank}} \times 100$$

S: 1 N HCl로 반응 정지 전, pyrogallol 반응을 유도한 흡광도

SB: 1 N HCl로 반응 정지 후, pyrogallol 반응을 유도한 흡광도

α-Glucosidase 저해 활성 분석

α-Glucosidase 저해 활성 측정은 Tibbot과 Skadsen의 방법에 따라 pNPG (p-nitrophenyl β-D-glucoside)에서 유리되어 나오는 반응 생성물인 p-nitrophenol을 측정하여 수행하였다 [37]. 각 농도의 시료 25 ul에 2.5 mM pNPG 50 ul와 0.2 unit/ml α- glucosidase enzyme solution 25 ul를 첨가한 후, 37°C에서 20분간 반응시키고 0.1 M NaOH 50 ul를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액 중 p-nitrophenol 생성량은 UV spectrophotometer를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, α - glucosidase 저해 활성은 효소를 첨가한 처리구와 무처리구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 양성대조구로 acarbose를 사용하였으며, 음성대조구로 α-glucosidase enzyme 대신 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 동량 분주하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase 저해 활성(\%)} = \frac{1 - (S - SB)}{\text{Control} - \text{Blank}} \times 100$$

S: α-glucosidase enzyme 처리구의 흡광도

SB: α-glucosidase enzyme 무처리구의 흡광도

Tyrosinase 저해 활성 분석

Tyrosinase 저해 활성 측정은 Masamoto 등의 방법 [27]을 변형하여 수행하였다. 각 농도의 시료 10 ul에 Mushroom tyrosinase (110 unit/ml) 20 ul와 L-DOPA 170 ul를 첨가하여 잘 혼합한 후, 37°C에서 10분간 반응시켰다. L-DOPA 활성 억제체는 UV spectrophotometer를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성대조구로 ascorbic acid를 사용하였으며, 음성대조구로 tyrosinase enzyme 대신 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 동량 분주하였다.

$$\text{Tyrosinase 저해 활성(\%)} = \frac{1 - (S - SB)}{\text{Control} - \text{Blank}} \times 100$$

S: Tyrosinase 처리구 흡광도

SB: Tyrosinase 무처리구 흡광도

통계 분석

모든 실험은 3회 반복하여 진행하였으며, 결과 값은 Mean ± standard deviation (SD)로 나타내었다. 각 그룹 간 평균은 SPSS (SPSS Inc., Armonk, NY, USA)를 이용한 비 모수적

Kruskal-Wallis 및 Mann-Whitney 분석을 사용하여 비교하였으며, p<0.01, p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

유산균 발효 대마씨(FHS)의 항균 활성 분석

Paper disc법을 통하여 항균 활성을 측정한 결과, 그람양성균 *S. aureus* KCTC 1916에 대한 항균 활성은 1 mg/ml의 농도로 처리한 발효하지 않은 대조구에 비해 *L. plantarum* KCTC 3107, *L. plantarum* KCTC 3108, *L. paracasei* BHN-LAB129로 발효한 동일 농도의 대마씨 추출물에서 증가된 항균 활성을 보였다.

특히, 그람양성균 *B. cereus* KCTC 13153에 대해 발효하지 않은 대조구에서의 항균 활성은 나타나지 않았지만, 실험에 사용된 모든 균주(*L. plantarum* KCTC 3107, *L. plantarum* KCTC 3108, *L. brevis* BHN-LAB 128, *L. paracasei* BHN-LAB 129)로 발효한 대마씨 추출물에서 현저히 높은 항균 활성이 나타나는 것으로 확인되었으며, 그람음성균인 *S. typhimurium* KCTC 1926에 대해서도 항균 활성이 나타나지 않은 발효하지 않은 대조구에 비해 *L. plantarum* KCTC 3108과 *L. paracasei* BHN-LAB128로 발효한 대마씨 추출물에서 항균 활성이 나타났다. Roberta 등의 보고[31]에 의하면 대마섬유에서의 *S. aureus*에 대한 항균 활성이 증가한다는 결과가 보고된 바 있지만, 본 연구를 통해 대마씨와 특히 발효 대마씨에서 동일한 병원성 균주에 대한 증가된 항균 활성을 새롭게 확인하였다. 이러한 결과는 *L. plantarum* KCTC 3108과 *L. paracasei* BHN-LAB129를 통한 발효는 새로운 항균 활성능을 가지는 물질로 전환이 가능한 균주이며, 이를 통해 항균 활성을 촉진시키는 것을 확인하였다.

유산균 발효 대마씨(FHS)의 total polyphenol과 total flavonoid 함량 측정

폴리페놀과 플라보노이드는 피토케미컬에 포함된 화합물로서 거의 모든 식물에 함유되어 있으며 항염, 항암 및 항산화 등의 다양한 생리 활성에 관여한다고 보고되었다[7, 14]. 따라서 본 연구를 통해 다양한 유산균을 이용하여 발효한 대마씨 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드를 측정하였다. 1 mg/ml 농도로 처리한 발효 대마씨의 총 폴리페놀 함량은 발효하지 않은 대마씨 추출물 22.17±1.37 mg/g에 비해 모든 발효 대마씨 추출물에서 증가됨을 확인하였다. 특히 *L. brevis* BHN-LAB128로 발효한 대마씨 추출물의 총 폴리페놀 함량은 43.17±2.20 mg/g로 분석되었고, 발효 전과 후의 총 폴리페놀 함량을 비교하면 약 94.7% 정도 증가함을 확인하였다(Table 2). 본 실험의 유산균으로 발효한 대마씨 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Sue-Siang 등이 보고한 탈지된 대마 추출물에서 총 폴리페놀 함량인 3.51 mg/g에 비해 현저히 높은 값이다[36].

Table 1. Antibacterial activities of hemp seed fermented with lactic acid bacteria (concentration: 1 mg/ml)

Hemp seed fermented with lactic acid bacteria		Gram positive		Gram negative
Strain		<i>S. aureus</i> KCTC 1927	<i>B. cereus</i> KCTC 13153	<i>S. typhimurium</i> KCTC 1926
<i>L. plantarum</i>	Non-fermented	+	-	-
	KCTC 3107	+++	++++	-
	KCTC 3108	++	++	+
<i>L. brevis</i>	BHN-LAB_128	+	+	-
<i>L. paracasei</i>	BHN-LAB_129	+++	+++	++

Growth inhibition size of clearzone : -, not detected; +, smaller than 10 mm; ++, 10~12 mm; +++, 12~14 mm; +++++, larger than 14 mm

Table 2. Contents of total polyphenol in ethanol extracts from hemp seed fermented with lactic acid bacteria

	Non-fermented hemp seed	<i>L. plantarum</i>		<i>L. brevis</i>	<i>L. paracasei</i>
		KCTC 3107	KCTC 3108	BHN-LAB_128	BHN-LAB_129
Total polyphenol contents (mg/g)	22.17±1.37	36.00±2.64	39.67±1.71	43.17±2.20	34.50±2.22

또한, 총 플라보노이드 함량을 조사한 결과 1 mg/ml의 농도로 처리한 발효하지 않은 대마씨 추출물의 총 플라보노이드 함량 19.89±0.44 mg/g에 비해 동일한 농도의 유산균 발효 대마씨 추출물의 총 플라보노이드 함량은 모든 유산균 발효 추출물에서 감소되는 것으로 나타났다(Table 3). 이를 통해, 유산균으로 발효한 대마씨의 경우 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드의 함량이 동시에 증가하지는 않는 것으로 보이며, 대마씨에 함유된 페놀성 화합물이 항산화 활성에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

유산균 발효에 의한 대마씨의 DPPH radical 소거능 및 SOD 유사 활성 측정

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 유기 화합물로 화학적으로 안정한 free radical 분자로 구성된 짙은 보라색을 띠는 수용성 물질이며, 항산화제와 반응하면 옅은 노란색을 띠게 된다. 흡광도 파장 517 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지며, 양성대조구로 Ascorbic acid (Vitamin C), BHT, BHA, Trolox, α-Tocopherol를 사용하였다[8, 15]. 다양한 유산균주에 의해 발효된 대마씨 추출물의 DPPH radical 소거능을 측정된 결과 1 mg/ml의 농도로 처리한 발효하지 않은 대마씨 추출물에 비해, 동일한 농도로 처리한 유산균에 의해 발효된 대마씨 추출물의 DPPH radical 소거능은 현저히 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 특히 *L. plantarum* KCTC 3108에서 대조구 대

비, 약 4배 정도의 활성이 촉진되는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 유산균에 의해 발효된 대마씨 추출물이 발효하지 않은 대마씨 추출물에 비해 항산화 활성이 탁월함을 의미하는 것이다. Sue-Siang 등이 보고한 바에 따르면, methanol:acetone:water (7:7:6 v/v/v)으로 추출한 물질의 활성이 다른 추

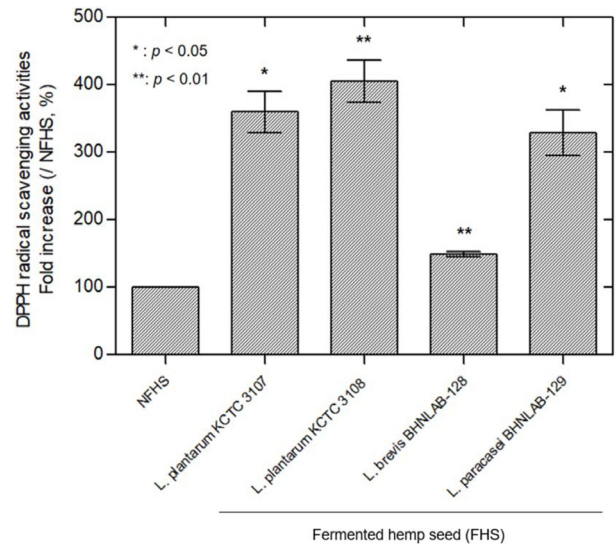


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities of hemp seed fermented with lactic acid bacteria. DPPH radical scavenging activities were measured at 525 nm.

Table 3. Contents of total flavonoid in ethanol extracts from hemp seed fermented with lactic acid bacteria

	Non-fermented hemp seed	<i>L. plantarum</i>		<i>L. brevis</i>	<i>L. paracasei</i>
		19.89±0.44	KCTC 3108	BHN-LAB_128	BHN-LAB_129
Total flavonoid contents (mg/g)	19.89±0.44	8.67±0.33	11.56±1.24	16.33±0.51	8.22±0.22

출 용매보다 현저히 증가된 항산화 활성을 보이는 것으로 보아 후속 연구에서 다양한 추출 용매로 진행할 필요가 있을 것으로 사료된다[36].

SOD는 인체 내 세포에 유해한 초과산화이온을 과산화수소로 전환시켜주는 불균등화 반응을 촉매하는 효소이며, 거의 모든 세포에서 활성 산소로부터 세포를 산화적 손상으로부터 방어하는 역할을 한다[19]. 이러한 SOD 유사 활성을 통한 항산화 활성을 살펴본 결과 1 mg/ml 농도로 처리한 발효하지 않은 대마씨 추출물의 SOD 유사 활성에 비해 동일한 농도로 처리한 모든 유산균 발효 대마씨 추출물에서 증가된 활성이 나타났다. 특히, *L. plantarum* KCTC 3107로 발효한 대마씨 추출물의 SOD 유사 활성은 대조구 대비 약 2배 정도 증가된 활성을 확인하였다. 이러한 결과는 발효하지 않은 대마씨 추출물과 비교하여 유산균 발효를 통한 대마씨 추출물은 항산화 활성을 촉진시키는 것으로 사료된다.

유산균 발효에 의한 대마씨(FHS)의 α-glucosidase 저해 활성

α-Glucosidase는 α-amylase에 의해 분해된 이당류를 단당류로 최종 분해시키는 효소로 혈액 내 포도당을 증가시킨다 [33]. 따라서 이러한 α-glucosidase를 저해시키는 물질은 당질 가수분해 및 흡수를 저해시켜 당뇨와 같은 질병을 치료할 수 있는 물질을 개발하는데 유용하다[2]. 본 연구에서는 다양한 유산균을 이용하여 발효된 대마씨 추출물의 α-glucosidase 저해를 통한 항당뇨 활성을 분석하였다. 양성대조구로 사용된 acarbose (1 mM)는 49.42±1.70%의 α-glucosidase 억제 효과를 보였으며, 1 mg/ml 농도로 처리한 발효하지 않은 대마씨 추출물의 α-glucosidase 저해 활성은 79.92±1.34%로 나타났다. 동일한 농도로 처리한 유산균 발효 대마씨 추출물의 활성은 *L. plantarum* KCTC 3107로 발효한 대마씨 추출물을 제외한 모든 발효 대마씨 추출물은 대조구에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였다(Table 4). 다양한 실험을 통한 검증이 요구되지만, 이러한 결과로 미루어 볼 때 유산균으로 발효한 대마씨 추출물은 α-glucosidase 저해를 증가시킴으로 항당뇨 활성을 촉진하는 것으로 생각되어지며, 추가 연구를 통한 발효 대마씨 추출물에서의 항당뇨 활성을 확인해 볼 필요성이 있다고 생각된다.

유산균 발효에 의한 대마씨(FHS)의 tyrosinase 저해 활성

최근 미용에 있어 주된 관심은 미백(Skin whitening)으로 체내 멜라닌 색소의 생성을 억제시키는 것을 주 목적으로 한

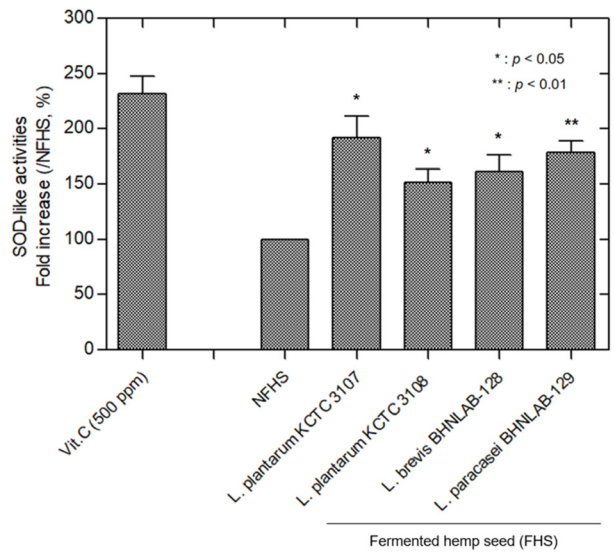


Fig. 3. Inhibitory effects of hemp seed (FHS) fermented with lactic acid bacteria on SOD-like activities. SOD-like activities were measured at 420 nm.

다. 이러한 멜라닌 색소는 생물체의 피부, 머리카락 등 다양하게 분포되어 있는 성분으로 melanocyte라는 색소 세포의 melanosome이라는 세포 소기관에서 tyrosinase 효소에 의해 tyrosine을 DOPA (3,4-dihydroxy-phenylalanine) 혹은 DOPA quinone으로 산화 및 중합 반응시켜 생합성이 이루어진다 [38]. 멜라닌 색소는 피부 장벽의 역할을 한다고 보고되고 있지만, 표피의 keratinocyte로 방출되어 색소 침착을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한, 자외선 혹은 환경적 요인으로 인하여 α-Melanocyte Stimulating Hormone (α-MSH), ACTH 호르몬에 의해 Melanocortin-1 Receptor (MC1R)를 통해 melanocyte를 자극시키며, 활성화 된 MC1R 수용체는 cAMP, MITF를 촉진시키며, 멜라닌 생합성 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2가 생성된다[1, 9, 32]. 현재 멜라닌 생성 억제제는 ascorbic acid (Vitmaine C), arbutin, kojic acid 등이 대표적 물질로 알려져 있으며, 이러한 tyrosinase 활성 억제를 통해 다양한 미백 연구가 진행 중이다[5, 12, 16, 27]. 본 연구에서는 유산균 발효 대마씨 추출물의 tyrosinase의 저해 활성을 분석하였으며, 양성대조구로 tyrosinase 저해 물질인 ascorbic acid (500 ug/ml)를 사용하였다. 1 mg/ml의 농도로 처리한 발효하지 않은 대마씨 추출물에 비해 동일한 농도를 처리한 유산균 발효 대마씨 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 모든 유산균으로 발효한 대마씨 추출물에서 유의적으로 증가된 tyrosinase 저해 활성이

Table 4. Inhibitory effects of hemp seed (FHS) fermented with lactic acid bacteria on α-glucosidase activities

	Non-fermented hemp seed	<i>L. plantarum</i>		<i>L. brevis</i>	<i>L. paracasei</i>	positive control
		KCTC 3107	KCTC 3108	BHN-LAB_128	BHN-LAB_129	Acarbose(1 mM)
α-Glucosidase inhibitory activity (%)	79.92±1.34	74.01±4.29	83.43±0.66	84.30±0.35	81.73±1.16	49.42±1.70

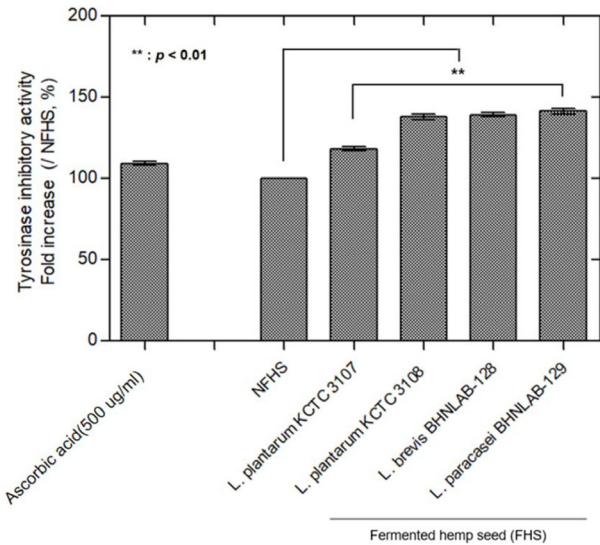


Fig. 4. Inhibitory effects of hemp seed (FHS) fermented with lactic acid bacteria on tyrosinase activities. Inhibitory activities of tyrosinase were measured at 450 nm.

나타났다(Fig. 4). 특히 *L. brevis* BHN-LAB129에서는 발효하지 않은 대마씨 추출물에 비해 약 45% 정도 증가된 tyrosinase의 저해 활성을 확인하였다. 주목할 만한 점은 모든 유산균으로 발효한 대마씨 추출물의 tyrosinase 저해 활성이 양성대조구인 ascorbic acid에 비해 높은 활성이 나타났다는 것이다. 이는 Yang 등이 보고한 아마란스 씨앗 추출물의 tyrosinase 저해 활성이 양성대조구인 cynandione 보다 높다는 보고[40]와 유사한 것으로 이러한 결과를 통해 유산균 발효를 통한 대마씨 발효 추출물은 tyrosinase 저해 활성이 탁월한 것으로 판단된다.

본 연구를 통해 유산균을 이용한 대마씨의 발효 추출물은 항균 활성, 항산화 활성, α-glucosidase 억제 활성 및 tyrosinase 저해 활성을 증가시키는 것을 확인하였다. 향후, 혈당 강화와 B16F10 melanocyte에서 멜라닌 생합성 저해 분석 연구를 통해 보다 세부적인 항당뇨 및 미백 기능 활성을 확인해 볼 필요가 있으며, 본 연구에서 확인한 결과들을 바탕으로 발효 대마씨 추출물은 기능성 식품 및 화장품 등으로 응용 및 발전 가능성이 있다고 판단된다. 이전 보고에 따르면 발효된 대마씨는 균류와 장내 세균의 성장을 감소시키며, biogenic amine (BAs) 농도 또한 현저히 낮다고 보고하였다[3]. 따라서 추가적으로 biogenic amine 외에 발효 과정 중 발생하는 인자들의 활성에 대한 후속 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 또한, 유산균 발효 대마씨 추출물에서 대마씨의 함유 물질인 칸나비디올(CBD), 테트라하이드로칸나비놀(THC)의 활성 변화에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각되며, 본 연구에서는 70% ethanol로 추출된 대마씨 추출물만을 사용하여 연구를 수행하였으나, 다양한 추출 용매와 온도 및 pH 등의 추출 조건에서의 활성 비교 연구를 통해 최적의 생리 활성 조건을 탐색하는

연구를 진행할 필요가 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 안동대학교 연구비에 의하여 연구되었음.

References

1. Abdel-Malek, Z., Swope, V. B., Suzuki, I., Akcali, C., Harriger, M. D., Boyce, S. T., Urabe, K. and Hearing, V. J. 1995. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 1789-1793.
2. Baron, A. D. 1998. Postprandial hyperglycemia and α-glucosidase inhibitors. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **40**, 51-55.
3. Bartkiene, E., Schleining, G., Krungleviciute, V., Zadeike, D., Zavistanaviciute, P., Dimaite, I., Kuzmaite, I., Riskeviciene, V. and Juodeikiene, G. 2016. Development and quality evaluation of lacto-fermented product based on hulled and not hulled hempseed (*Cannabis sativa* L.). *LWT-Food Science and Technology* **72**, 544-551.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
5. Cabanes, J., Chazarra, S. and 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.
6. Callaway, J. C. 2004. Hempseed as a nutritional resource: an overview. *Euphytica* **140**, 65-72.
7. Choi, Y. M., Gu, J. B., Kim, M. H. and Lee, J. S. 2008. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from thirty korean medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 1235-1239.
8. Cherdshewasart, W. and Sutjit, W. 2008. Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobate tubers*. *Phytomedicine* **15**, 38-43.
9. Hong, S. H., Kandhasamy, S., Joo, T. W., Lim, C. M., Cho, H. M., Kim, S. M., Kim, G. Y. and Jhoo, J. W. 2015. Ethanol and supercritical fluid extracts of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) increase gene expression of antioxidant enzymes in HepG2 cells. *Asian Pacific J. Rep.* **4**, 147-152.
10. Jeon, J. M., Choi, S. K., Kim, Y. J., Jang, S. J., Cheon, J. W. and Lee, H. S. 2011. Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. *J. Soc. Cosmet. Sci.* **1**, 75-81.
11. Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
12. Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J. and Han, D. S. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *J. Kor. Food Sci. Technol.* **27**, 891-896.
13. Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A.,

- Pattukumar, V. and Arul, V. 2013. Probiotics and its functionally valuable products (Review). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**, 641-658.
14. Kim, H. J., Jun, B. S., Kim, S. K., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2000. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 1127-1132.
 15. Kim, K. B., Yoo, K. H., Park, H. Y. and Jeong, J. M. 2006. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 328-333.
 16. Kim, S. J., Heo, M. Y., Bae, K. H., Kang, S. S. and Kim, H. P. 2003. Tyrosinase inhibitory activity of plant extract (III): Fifty korean indigenous plants. *J. Applied Pharmacol.* **11**, 245-248.
 17. Koh, D. H. 1990. A study on the composition of fatty acids of hempseed. *J. Kor. Food and Nutr.* **2**, 201-206.
 18. Kriese, U., Schumann, E., Weber, W. E., Beyer, M., Brühl, L. and Matthäus, B. 2004. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. Genotypes. *Euphytica* **137**, 339-351.
 19. Kitani, K., Minami, C., Yamamoto, T., Kanai, S., Ivy, G. O. and Carrillo, M. C. 2002. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: potentials of propargylamines for human use. *Ann N Y Acad. Sci.* **959**, 295-307.
 20. Kozela, E., Juknat, A. and Vogel, Z. 2017. Modulation of astrocyte activity by cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid. *Int. J. Mol. Sci.* **31**, 18.
 21. Kwon, W. J., Lee, H. K., Park, H. J., Kwon, T. O., Choi, H. R. and Song, J. Y. 2011. Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. *J. Kor. Medicinal Crop Sci.* **19**, 325-333.
 22. Lee, K. H., Rhee, K. H., Kim, B. S., Choi, Y. H. and Kim, C. H. 2013. Sleep inducing effect of *Gastrodia elata* fermented with lactic acid bacteria. *J. Kor. Pharmacogn.* **44**, 281-285.
 23. Lee, J. B., Bae, J. S., Son, I. K., Jeon, C. P., Lee, E. H., Joo, W. H. and Kwon, G. S. 2014. Antioxidant and ACE inhibiting activities of sugared-buchu (*Allium ampeloprasum* L. var. *porum* J. Gay) fermented with lactic acid bacteria. *J. Life Sci.* **6**, 671-676.
 24. Mailleux, P., Preud'homme, X., Albalá, N., Vanderwinden, J. M. and Vanderhaeghen, J. J. 1994. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol regulates gene expression of the growth factor pleiotrophin in the forebrain. *Neurosci. Lett.* **175**, 25-27.
 25. Mannucci, C., Navarra, M., Calapai, F., Spagnolo, E. V., Busardò, F. P., Cas, R. D., Ippolito, F. M. and Calapai, G. 2017. Neurological aspects of medical use of cannabidiol. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **16**, 541-553.
 26. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
 27. Masamoto, Y., Ando, H., Murata, Y., Shimoishi, Y., Tada, M. and Takahata, K. 2003. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculentin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 631-634.
 28. Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H. and Khan, I. U. 2011. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Crit. Rev. Microbiol.* **37**, 91-98.
 29. Moreno-Sanz, G. 2016. Can you pass the acid test? Critical review and novel therapeutic perspectives of Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic acid A. *Cannabis Cannabinoid Res.* **1**, 124-130.
 30. Park, Y. H., Lim, S. H., Kim, H. Y., Park, M. H., Lee, K. J., Kim, K. H., Kim, Y. G. and Ahn, Y. S. 2011. Biological activities of extracts from flowers of *Angelica gigas* Nakai. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1079-1085.
 31. Roberta, C., Sonia, T., Teresa, F., Fiore Pasquale, N., Maria Vittoria, M., Cristina, G. and Nevio, P. 2013. Hemp fiber (*Cannabis sativa* L.) derivatives with antibacterial and chelating properties. *Cellulose* **20**, 547-557.
 32. Sassone-Corsi, P. 1998. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 27-38.
 33. Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J. and William, Z. S. 2008. α -Glucosidase inhibitory activity of *Syagium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res.* **343**, 1278-1281.
 34. 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.
 35. Smeriglio, A., Galati, E. M., Monforte, M. T., Lanuzza, F., D'Angelo, V. and Circosta, C. 2016. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of cold-pressed seed oil from finola cultivar of *Cannabis sativa* L. *Phytother. Res.* **30**, 1298-307.
 36. Sue-Siang, T., Alaa El-Din, B. and John, B. 2014. Antioxidative polyphenols from defatted oilseed cakes: Effect of solvents. *Antioxidants* **3**, 67-80.
 37. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol. Biol.* **30**, 229-241.
 38. Vile, G. F. and Tyrrell, R. M. 1995. UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblast is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 721-730.
 39. Vilela, L. R., Lima, I. V., Kunsch, É. B., Pinto, H. P. P., de Miranda, A. S., Vieira, É. L. M., de Oliveira, A. C. P., Moraes, M. F. D., Teixeira, A. L. and Moreira, F. A. 2017. Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. *Epilepsy Behav.* **75**, 29-35.
 40. Yang, Y. S., Li, N., Deng, X. M. and Wu, C. X. 2004. MC1R—the key gene in mammalian melanin synthesis. *Yi Chuan.* **26**, 544-550.
 41. Yi, M. R., Kang, C. H. and Bu, H. J. 2017. Anti-inflammatory and tyrosinase inhibition effects of Amaranth (*Amaranthus spp* L.) seed extract. *Kor. J. Plant Res.* **30**, 144-151.
 42. Yuk, H. J., Noh, G. M., Choe, J. S., Kwon, O. K., Hong, S. Y., Kang, S. S., Cho, K. M. and Park, D. S. 2015. α -Glucosidase inhibitory effect of vicine and α -eleostearic acid from the seeds of *Momordica charantia*. *Kor. J. Environ. Agric.* **34**, 57-63.

초록 : 대마씨 발효 추출물의 생리 활성 및 미백 활성 검증

윤여초^{1,2} · 김병혁¹ · 김중규^{1,2} · 이준형^{1,2} · 박예은¹ · 권기석^{2*} · 황학수³ · 이중복^{1*}

(¹비에이치앤바이오 기업 부설 생물산업소재개발연구소, ²안동대학교 생약자원학과, ³교촌F&B(주))

대마씨(Hemp seed; seed of *Cannabis sativa* L.)는 삼과에 속하는 1년생 초본 식물이며, 면역력 증가, 동맥 경화증, 변비, 고지혈증 예방, 항염증제, 항암제 등 다양한 생물학적 기능을 수행하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 유산균을 이용한 발효 대마씨 추출물의 효능을 조사하였다. 그 결과, *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성은 발효하지 않은 대마씨 추출물에 비해 현저히 증가되었으며, 특히 *Bacillus cereus*에 대하여 발효한 대마씨 추출물에서 항균 활성이 새롭게 나타났다. 또한, 유산균 발효 대마씨 추출물의 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능, SOD 유사 활성, α -glucosidase 저해 활성은 발효하지 않은 대마씨 추출물에 비해 각각 증가됨을 확인하였다. 추가적으로 멜라닌 증가 물질로 알려진 tyrosinase의 저해 활성도 발효하지 않은 유산균에 비해 증가되었다. 이러한 결과들을 통해 유산균으로 발효한 대마씨 추출물은 항산화, α -glucosidase 저해 활성 및 tyrosinase 저해 활성을 촉진시키며, 따라서 유산균으로 발효한 대마씨 추출물을 이용한 기능성 소재 및 식품 개발로의 활용이 가능할 것으로 기대한다.