

## Physicochemical Characterization of Fermented *Rhododendron micranthum* Turcz. Extract and Its Biological Activity

Min-Jin Kim<sup>1</sup>, Sang-Mi Yu<sup>1</sup>, Do-Yeon Kim<sup>2</sup>, Tae-Im Heo<sup>3</sup>, Jun Woo Lee<sup>3</sup>, Ji-Ae Park<sup>3</sup>, Chang-Su Park<sup>4\*</sup> and Yeong-Su Kim<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Freshwater Bioresources Utilization Division, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Science and Technology, International Ginseng and Herb Research Institute, Geumsan 32724, Korea

<sup>3</sup>Forest Plant Industry Department, Baekdudaegan National Arboretum, Bonghwa 36209, Korea

<sup>4</sup>Department of Food Science and Technology, Daegu Catholic University, Gyeongsan 37430, Korea

Received March 22, 2018 / Revised April 3, 2018 / Accepted April 3, 2018

This study evaluated tyrosinase, elastase inhibitory, and antioxidant activities of fermented *Rhododendron micranthum* Turcz. extract using a lactic acid bacterium, *Lactobacillus rhamnosus*. The optimum conditions for fermentation of *R. micranthum* Turcz. extract were 37°C and 3% *R. micranthum* Turcz. extract for 3 days based on the bacterial cell number, total phenolic compounds, DPPH radical scavenging activity, and tyrosinase and elastase inhibitory activity. After culture for 3 days using 3% *R. micranthum* Turcz. extract, the cell mass of *L. rhamnosus* reached  $5.7 \times 10^9$  CFU/ml. The results indicated that *R. micranthum* Turcz. extract can be used for industrial lactic acid bacteria culture. After fermentation under optimum conditions, the total content of phenolic compounds of the fermented *R. micranthum* Turcz. extract was 157 GAE mg/ml, and the IC<sub>50s</sub> of DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and tyrosinase and elastase inhibitory effects were 78.8, 79.8, 329.1, and 449.5 µg/ml, respectively. The fermented *R. micranthum* Turcz. extract exhibited 1.2-, 1.3-, 1.5-, 2.4-, and 5.6-fold higher total content of phenolic compounds, DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and tyrosinase and elastase inhibitory effects than the nonfermented *R. micranthum* Turcz. extract. These results indicated that fermented *R. micranthum* Turcz. extract using *L. rhamnosus* can be used for developing new natural functional ingredients for the health food or cosmetic industry.

**Key words** : Antioxidant activity, Baekdudaegan, fermentation, lactic acid bacteria, *Rhododendron micranthum* Turcz.

### 서론

꼬리진달래(*Rhododendron micranthum* Turcz.)는 진달래과(Ericaceae) 진달래속(*Rhododendron*) 상록활엽관목으로 우리나라 원산의 희귀·특산 식물로 백두대간을 비롯하여 경상북도, 충청북도, 강원도 등지와 중국 북부 지방에서 자생 하는 것으로 알려져 있다. 꼬리진달래는 참꽃나무겨우살이 라고도 불리우며 관상가치가 높아 조경용 또는 원예용으로 주로 사용되는 화목류 중의 하나이다[11, 12]. 꼬리진달래의 지엽 또는 꽃을 조산백(照山白)이라 하여 기관지염, 이질, 산후 신체의

동통, 골절을 치료하는 용도로 약용 한다고 알려져 있으나 구체적인 출처나 과학적 근거는 제시되지 못하고 있는 실정이다.

미생물의 대사 작용에 의해 유용 물질을 생산하고 생물 전환 시키는 기술인 발효는 식품, 화장품, 사료, 의약품 등 산업 전반에 걸쳐 다양하게 이용 되고 있다[18]. 전통적으로 발효는 김치, 장류, 주류, 식초, 유제품, 젓갈 등 다양한 발효 음식에 사용 되어 왔다. 최근 발효 기술은 그 생산물의 영양학적 가치와 생명공학 등 관련 기술의 발전으로 발효를 통한 천연물의 생리활성 기능을 증가 시키는 연구 등 그 기능성 및 응용 가능성으로 인해 다양한 산업 분야에서 관심과 중요성이 높아지고 있어 식품 분야에 국한되지 않고 화장품, 의약품, 생활 용품 등 다양한 산업 분야에 적용 가능한 기술로 발전되고 있다. 특히 최근 화학 제품보다 웰빙 바람을 타고 천연 제품에 대한 사회적 관심이 증대하고 있지만 기능성 물질을 천연에서 추출 하기에는 한계가 있다. 따라서 발효 기술을 이용하여 고기능성 물질의 함량을 증대 시키는 기술 등이 각광 받고 있는 실정으로 발효 기술이 적용된 다양한 제품들이 시장에 선보이고 있다[7, 15, 20, 23].

유산균은 프로바이오틱스(Probiotics)로 장내 균총 개선에

#### \*Corresponding authors

Tel : +82-54-679-2740, Fax : +82-54-679-0636

E-mail : yskim@bdna.or.kr (Yeong-Su Kim)

Tel : +82-53-850-3216, Fax : +82-53-850-3219

E-mail : parkcs@cu.ac.kr (Chang-Su Park)

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.

도움을 주는 기능을 할 뿐 아니라 대사를 통해 젖산과 아세트산과 같은 유기산, 박테리옌과 같은 항균 물질, 비타민 B군 등 다양한 생리활성 기능을 가지는 유용 물질을 생산하는 중요한 미생물로 초기 유제품 발효 등 발효식품에 사용되어 오던 것이 최근에는 건강기능식품, 화장품 등에도 널리 사용되고 있다[4, 16, 19]. 유산균 균체는 물론 아세트산과 젖산과 같은 유기산, 유산균 유래 다양한 대사 물질은 장운동 촉진, 면역력 증가, 항암 활성, 장내 부패 억제, 장내 미생물 군총 개선 등의 프로바이오틱스 기능이 알려져 있어 현재 다양한 분야에서 연구가 진행 중이다. 또한 최근에는 천연물의 유산균 발효를 통한 항산화, 항염, 항균, 미백, 주름개선 등의 기능성 증진에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있다[5, 8, 17].

현재까지 꼬리진달래는 조경용으로 활용하고 보존하기 위한 식물학적 기초 연구 및 재배에 관한 연구는 일부 수행되어 오고 있으나[11] 꼬리진달래의 생리활성에 관한 연구는 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내 특산식물인 꼬리진달래와 유산균을 이용하여 꼬리진달래 발효 추출물을 제조하고 그 발효 소재의 이화학적 특성 및 항산화, 미백, 주름개선 등의 생리활성 증진 효과를 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 기기 및 시약

본 연구에서 사용된 microplate reader는 Molecular Devices (VersaMax™, Sunnyvale, CA, USA)사의 제품을 rotary evaporate는 일본 Eyla (Tokyo, Japan)사의 제품을 사용하여 연구를 진행하였다. 또한 일반 성분 분석 및 생리활성 분석을 위해 사용한 Folin-Ciocalteu reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothianoline-6-sulfonic acid) (ABTS), elastase, tyrosinase 및 기타 시약류는 sigma (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 시료 제조

본 연구에 사용된 꼬리진달래(*Rhododendron micranthum* Turcz)는 2017년 7월 경북 봉화군에서 채취하여 사용하였다. 발효에 사용한 *Lactobacillus rhamnosus*는 농업진흥청 농업유전 자원센터로부터 분양 받아 사용하였다. 채취한 꼬리진달래는 전초를 건조 후 잘게 분쇄 후 100 g의 꼬리진달래를 70°C에서 물을 사용하여 24시간 추출하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 농도를 고형분 함량이 3%가 되게 희석 후 멸균하여 다른 성분은 첨가하지 않고 *L. rhamnosus*를 1%가 되게 접종하여 3일간 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 후 원심분리 및 감압 여과기를 사용하여 여과하여 균체를 제거한 후 rotary evaporate로 농축 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

유산균 생균수의 측정은 배양액을 멸균 생리식염수(0.9% NaCl)을 사용하여 10진 희석법에 따라 희석한 후 BCP첨가 평판 측정용 한천배지(0.5% peptone, 0.25% yeast extract, 0.1% dextrose, 0.1% polyoxyethylene sorbitan monooleate, 0.01% cysteine, 0.04% bromocresol purple, 1.5% agar)를 사용하여 37°C에서 배양한 후 생성된 집락을 3회 반복하여 측정하였다.

### 일반 성분 측정

시료의 총 페놀 함량은 Singleton and Rossi method을 이용하여 Folin-Ciocalteu 시약이 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색 되는 원리를 이용하여 분석하였다. 96-microwell plate에 시료 20 µl씩 분주하고 20% sodium carbonate 100 µl를 혼합한 후, 상온에서 5분간 방치하였다. 1.0 N Folin-Ciocalteu reagent 100 µl를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응한 후, microplate reader를 이용하여 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 총 페놀 함량을 계산하였다. 시료의 총당은 페놀-황산법으로 희석된 시료 100 µl와 5%(v/v) phenol (Shinyo Pure Chemicals Co., Ltd., Osaka, Japan) 용액 50 µl를 넣고 혼합 시켰다. 여기에 95% 황산 250 µl를 가하여 발열시킨 후 30분 동안 상온에서 반응한 후, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 glucose를 이용하여 작성한 표준곡선으로 총당 함량을 계산하였다.

### 항산화 활성 측정

DPPH radical 소거능은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다[1]. 시료 0.2 ml에 에탄올에 녹인 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 0.8 ml를 가하고 vortexing한 후, 상온의 암실에서 30분간 반응시키고, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference는 시료 대신 D.W.를 사용하였으며, DPPH radical 소거능은 시료 첨가구와 비첨가구(reference)의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하였다. 양성 대조군으로는 10 µg/ml 농도의 ascorbic acid를 사용하여 시험을 진행하였다. ABTS radical 소거능은 Pellegrin 등[21]의 ABTS<sup>+</sup> cation decolorization assay 방법에 따라 측정하였다. D.W.에 녹인 7.4 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothianoline-6-sulfonic acid) (ABTS)와 2.6 mM potassium persulphate을 실온의 암소에서 하루 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup> radical를 형성시켰으며, 실험 직전에 ABTS<sup>+</sup> 용액을 여러 단계로 희석시켜 O.D. 값을 0.8~0.9 사이로 조절하였다. 시료 50 µl에 희석된 ABTS<sup>+</sup> 용액 1 ml를 가하여 상온의 암소에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference는 시료 대신 D.W.를 사용하였으며, ABTS radical 소거능은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하였다. 양성 대조군으로는 10 µg/ml 농도의 ascorbic acid를 사용하여 시험을 진행하였다.

**Tyrosinase, elastase 저해 활성 측정**

Tyrosinase 저해 활성은 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9) 100 µl에 시료 20 µl를 혼합하여 5분간 상온에서 방치 후 100 unit/ml의 mushroom tyrosinase 30 µl와 1.5 mM tyrosine 30 µl를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료액 대신 phosphate buffer를 넣은 반응액을 blank로 사용하였다. Tyrosinase저해 활성은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하였고 양성 대조군으로는 기능성 미백 원료인 100 µg/ml 농도의 arbutin을 사용하여 시험을 진행하였다.

Elastase 저해 활성은 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 1.0 mM N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide를 용해시킨 용액 180 µl에 시료 20 µl를 첨가하여 5분간 상온에서 방치 후 2.5 unit/ml의 elastase 10 µl를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료액 대신 buffer를 넣은 반응액을 blank로 사용하였다. Elastase 저해 활성은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하였고 양성 대조군으로는 100 µg/ml 농도의 ursolic acid를 사용하여 시험을 진행하였다.

**통계 처리**

실험결과는 SPSS (version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 분산분석(ANOVA)을 실시하였고 각 측정 평균값의 유의성(p<0.05)은 Duncan's multiple range test를 실시하여 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**유산균 배양**

꼬리진달래 추출물의 유산균 발효를 위해 꼬리진달래 추출물을 고형분 함량 0.5-10%로 정량된 추출물에 *L. rhamnosus*를

1%가 되게 접종한 후 37°C에서 3일간 배양 후 pH와 생균수를 측정 하였다(Table 1). 그 결과 꼬리진달래 3% 추출물에서 가장 높은 생균수를 나타내었으며 비교군인 MRS 배지와 비교하였을 때 유사한 정도의 생균수를 확인할 수 있었다. 꼬리진달래 추출물 함량을 3%로 정량된 추출물에 *L. rhamnosus*를 1%가 되게 접종한 후 37°C에서 배양 하면서 5일까지 pH, 생균수, 총당, 총페놀 함량을 측정 하였다(Fig. 1, Table 2). 배양 일수에 따른 pH 변화는 배양 초기 pH는 6.4이었고 배양 시간이 증가할수록 pH가 감소하여 배양 5일째 pH 3.7로 감소 하였다. 배양액의 유산균 총균수는 배양 3일째  $5.0 \times 10^9$  CFU/ml로 증가 하였고 배양 4일과 5일째 총균수와 큰 차이를 나타내지 않았다. 유산균 배양 배지인 MRS를 사용하여 *L. rhamnosus*를 배양하였을 때  $5.7 \times 10^9$  CFU/ml로 유사한 결과를 보여 주었다. 이는 꼬리진달래 추출물이 유산균 성장을 저해하지 않는 것으로 사료되어 유산균 배양에 적합한 것으로 사료 된다. 배양 시간별 총당 함량은 배양 초기 시료의 고형분중 총당 함량은 594 mg/g에서 배양 시간이 증가 할수록 감소하여 배양 5일째 268 mg/g으로 줄었다. 이는 유산균이 꼬리진달래 추출

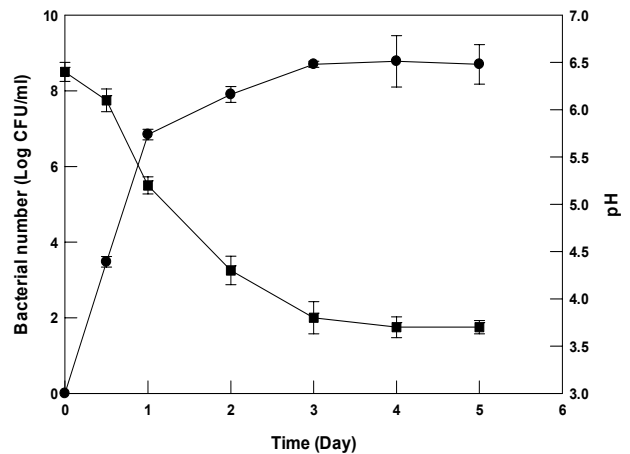


Fig. 1. Cell growth (●) and pH change (■) during fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* on *Rhododendron micranthum* Turcz. extract.

Table 1. pH and bacterial number of culture media of *R. micranthum* Turcz. extract according to the culture time at 72 hr of *L. rhamnosus*

<i>R. micranthum</i> Turcz. extract (%)	pH	Bacterial number (CFU/ml)
MRS	4.14±0.08 <sup>a</sup>	5.7×10 <sup>9</sup> ±0.14 <sup>a</sup>
0	6.28±0.57 <sup>c</sup>	1.2×10 <sup>5</sup> ±0.09 <sup>e</sup>
0.5	6.07±0.17 <sup>c</sup>	2.8×10 <sup>7</sup> ±0.21 <sup>e</sup>
1.0	5.24±0.25 <sup>b</sup>	2.5×10 <sup>8</sup> ±0.37 <sup>e</sup>
3.0	4.28±0.34 <sup>a</sup>	5.0×10 <sup>9</sup> ±0.16 <sup>b</sup>
5.0	4.32±0.28 <sup>a</sup>	4.5×10 <sup>9</sup> ±0.28 <sup>c</sup>
7.0	4.18±0.11 <sup>a</sup>	4.2×10 <sup>9</sup> ±0.09 <sup>c</sup>
10.0	4.21±0.25 <sup>a</sup>	3.7×10 <sup>9</sup> ±0.12 <sup>d</sup>

All values are expressed as means ± SD of triplicate determinations. Different superscripts with the column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

Table 2. Change of total phenolic compounds and total sugar content during fermentation

Time (day)	Total phenolic compounds (mg/g)	Total sugar (mg/g)
0	130.16±0.45 <sup>d</sup>	594.90±2.72 <sup>a</sup>
1	138.54±2.37 <sup>c</sup>	548.45±2.29 <sup>b</sup>
2	149.82±1.42 <sup>b</sup>	489.54±3.62 <sup>c</sup>
3	157.30±2.92 <sup>a</sup>	354.33±1.77 <sup>d</sup>
4	153.14±2.42 <sup>ab</sup>	314.98±7.54 <sup>e</sup>
5	152.84±3.14 <sup>ab</sup>	268.58±6.28 <sup>f</sup>

All values are expressed as means ± SD of triplicate determinations. Different superscripts with the column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

물의 탄수화물을 가수분해하여 탄소원으로 사용한 결과로 생각 된다. 유산균 배양에 따른 총페놀성 화합물의 함량은 배양 초기 130.16 GAE mg/g에서 배양 3일째 157.3 GAE mg/g으로 약 20% 증가하였다. 고형분 함량 1%의 갈대 추출물을 *L. rhamnosus*를 이용하여 발효하였을 때 4일 동안 배양 한 경우  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml의 농도로 유산균이 배양 되었다고 알려져 있다. 발효에 의한 총페놀 함량 변화는 구찌뽕(*Cudrania tricuspidata*) 추출물[10], 진생베리 추출물[6], 갈대 추출물[9] 및 금은화 추출물[24]을 *Bacillus* sp. *Lactobacillus* sp. KYH, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*을 이용하여 각각 발효하였을 경우 각각 45, 43, 100, 30% 증가하였다. 유산균 대량 생산을 위해 경제적인 유산균 배양 배지 개발을 위해 홍삼 가공 부산물, 옥수수 침지액(corn steep liquor)을 이용한 유산균 배양 연구가 수행된 바 있다[14, 25]. 따라서 유산균의 산업적 대량

생산을 위한 천연 배지 개발에 대한 연구가 다양하게 수행되고 있는 만큼 식물 추출물을 이용한 기능성 배지로 꼬리진달래를 이용 할 수 있을 것으로 사료 된다.

**발효 조건 설정**

꼬리진달래 추출물의 발효 조건 설정을 위해 꼬리진달래 추출물을 고형분 함량 3%로 정량된 추출물에 *L. rhamnosus*를 1%가 되게 접종한 후 37°C에서 5일간 배양 하면서 DPPH radical 소거능, tyrosinase, elastase 저해 활성을 측정 하였다. 유산균 발효를 통한 꼬리진달래 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해 배양 일수별 시료를 100 µg/ml의 농도로 DPPH radical 소거능을 조사한 결과 발효 전 시료의 DPPH radical 소거능은 56.6%였으나 발효 1일차부터 DPPH radical 소거능이 증가하기 시작하여 3일째 시료는 70.5%로 증가한 것으로 확인 되었다(Fig. 2A). 또한 꼬리진달래 발효 추출물의 tyrosinase와 elastase 저해 활성을 확인하기 위해 배양 일수별 시료를 200 µg/ml의 농도로 시험한 결과 발효 전 시료의 tyrosinase와

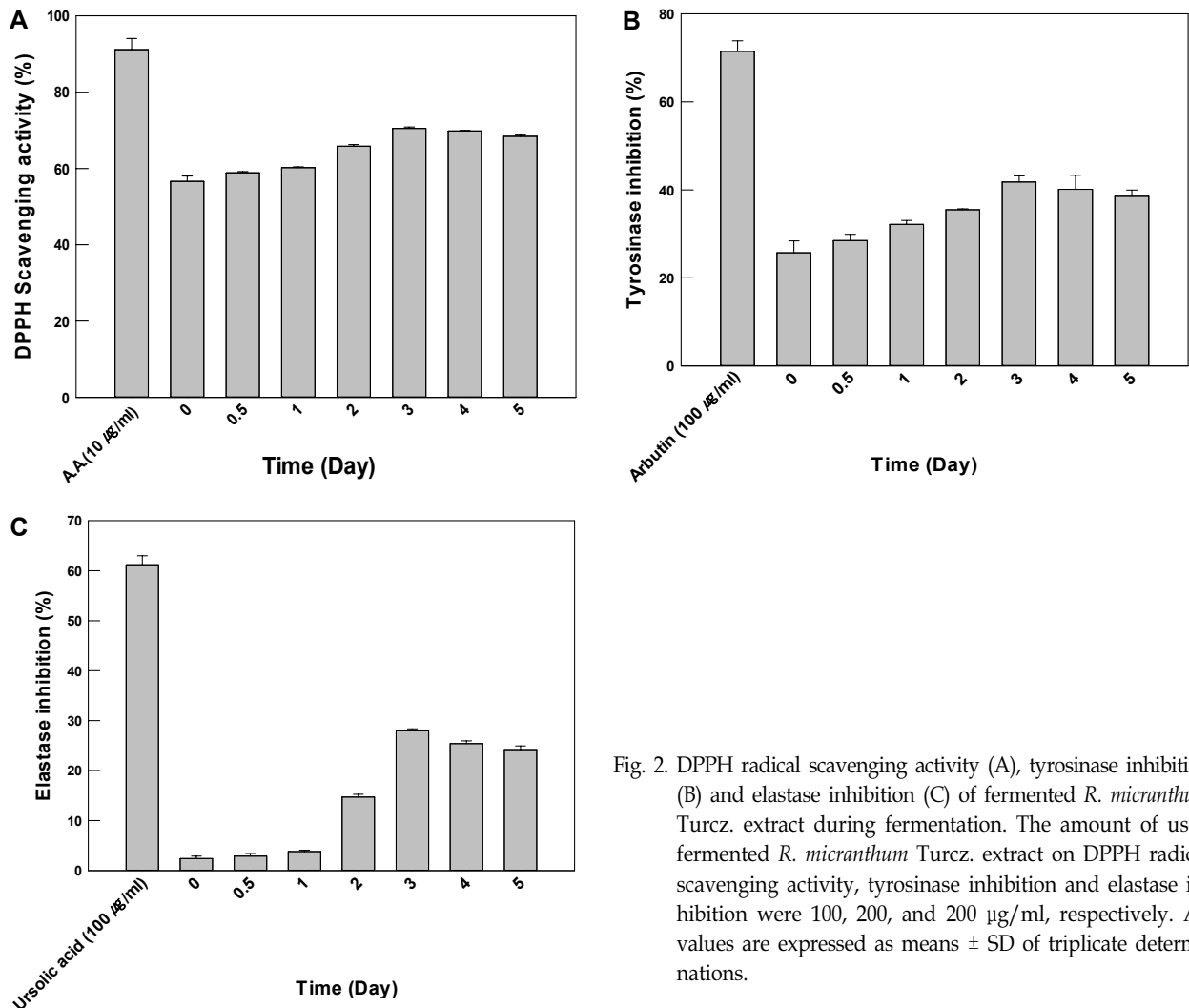


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity (A), tyrosinase inhibition (B) and elastase inhibition (C) of fermented *R. micranthum* Turcz. extract during fermentation. The amount of used fermented *R. micranthum* Turcz. extract on DPPH radical scavenging activity, tyrosinase inhibition and elastase inhibition were 100, 200, and 200 µg/ml, respectively. All values are expressed as means ± SD of triplicate determinations.

elastase 저해 활성은 각각 25.7, 2.4% 였으나 발효 3일차 시료는 41.8, 28%로 증가 한 것으로 확인 되었다(Fig. 2B, Fig. 2C). 유산균 생균수, 총페놀함량, 항산화 활성, tyrosinase 및 elastase 저해 활성을 확인한 결과 꼬리진달래 추출물 3%를 이용하여 37°C에서 3일 배양하는 것이 최적의 조건으로 확인되어 최적 배양 조건을 설정하고 실험을 진행 하였다. 유산균을 이용한 갈대, 금은화, 배초향, 울피의 최적 발효 배양 시간은 각각 4일, 2일, 7일, 1일로 알려져 있다[2, 9, 13, 24]. 다양한 연구에서 유산균 발효를 통해 생리활성이 증가 하였다는 보고가 있는 만큼 유산균 발효 기술을 이용한 기능성 소재 개발이 가능할 것으로 사료 된다.

**발효 소재의 DPPH 및 ABTS radical 소거능**

꼬리진달래 유산균 발효 소재에 대한 항산화 활성을 알아보기 위해 꼬리진달래 추출물 3%에 *L. rhammosus*를 1%가 되게 접종한 후 37°C에서 3일간 배양한 시료를 이용하여 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 조사 하였다. 그 결과 DPPH 및 ABTS radical 소거능은 시료의 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인 되었고 발효전 DPPH 및 ABTS 소거능에 대한 IC<sub>50</sub>값은 각각 102.7, 118.9 µg/ml이었고 발효 후 시료의 IC<sub>50</sub>값은 각각 78.8, 79.80 µg/ml로 확인되어 유산균 발효를 통한 꼬리진달래 추출물의 DPPH 및 ABTS radical 소거능이 각각 29, 48%의 의적으로 증가하였다(Fig. 3). 유산균 발효를 통해 꼬리진달래 추출물의 총페놀성 화합물의 양이 130.16 GAE mg/g에서 157.3 GAE mg/g으로 약 20%증가 하였는데 식물에서 발견되는 페놀성 화합물은 체내 활성산소를 제거하는 항산화 작용 등 다양한 생리활성 작용을 하는 물질로 알려져 있는데 이러한 총페놀성 화합물의 증가가 DPPH 및 ABTS radical 소거능 증가에 영향을 미친 것으로 생각 된다. 기존 연구에서도 유산균을 이용한 갈대뿌리[9], 배초향[13], 울피[2], 꾸지뽕[10], 진

생베리[6]를 발효 시켰을 때 DPPH radical 소거능이 유의적으로 증가 한다고 알려져 있어 본 연구와 유사한 결과를 보이고 있다.

**발효 소재의 tyrosinase 및 elastase 저해 활성**

피부 개선 활성을 평가하는 방법으로 tyrosinase와 elastase 두가지 효소의 저해 활성 연구가 잘 알려져 있다. Tyrosinase는 melanin 생합성 과정에 관여하는 주요 효소로 tyrosine을 산화 시켜 L-3,4-dehydroxyl-L-phenylalanine (L-DOPA)를 거쳐 멜라닌을 생성시키는데 중요한 작용을 한다고 알려져 있다. 그리고 elastase는 elastin을 분해하여 피부 조직의 탄력 유지에 영향을 미쳐 피부 주름을 생성 시킬 수 있다고 알려져 있는 효소이다.

꼬리진달래 유산균 발효 소재에 대한 tyrosinase 및 elastase 저해 활성을 알아보기 위해 꼬리진달래 추출물 3%에 *L. rhammosus*를 1%가 되게 접종한 후 37°C에서 3일간 배양한 시료를 이용하여 tyrosinase 및 elastase 저해 활성을 조사하였다. 그 결과 발효 전 tyrosinase 및 elastase 에 대한 IC<sub>50</sub>값은 각각 800.9, 2557.8 µg/ml이었고 발효 후 시료의 IC<sub>50</sub>값은 각각 329.1, 449.5 µg/ml로 발효 과정을 통해 각각 2.4, 5.6배 저해 활성이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 시험에 양성대조군으로 사용된 arbutin과 ursolic acid는 각각 100 µg/ml 농도에서 71.2, 62.1%의 저해 활성을 나타내고 있어 꼬리진달래 발효 추출물 보다 높은 활성을 보이고 있지만 꼬리진달래 유래 단일 물질이 아닌 추출물의 활성으로 본다면 본 발효 소재에서도 높은 활성을 보인다고 할 수 있을 것이다. 발효를 통한 총페놀 함량의 증가, 꼬리진달래 추출물 내의 유효 물질의 발효를 통한 생물 전환, 유산균의 대사 산물 등의 영향으로 이러한 생리활성이 증가 하였다고 생각된다. 유산균은 자체로 피부미백, 보습 등의 효과가 뛰어나다는 연구 결과가 보고 되어

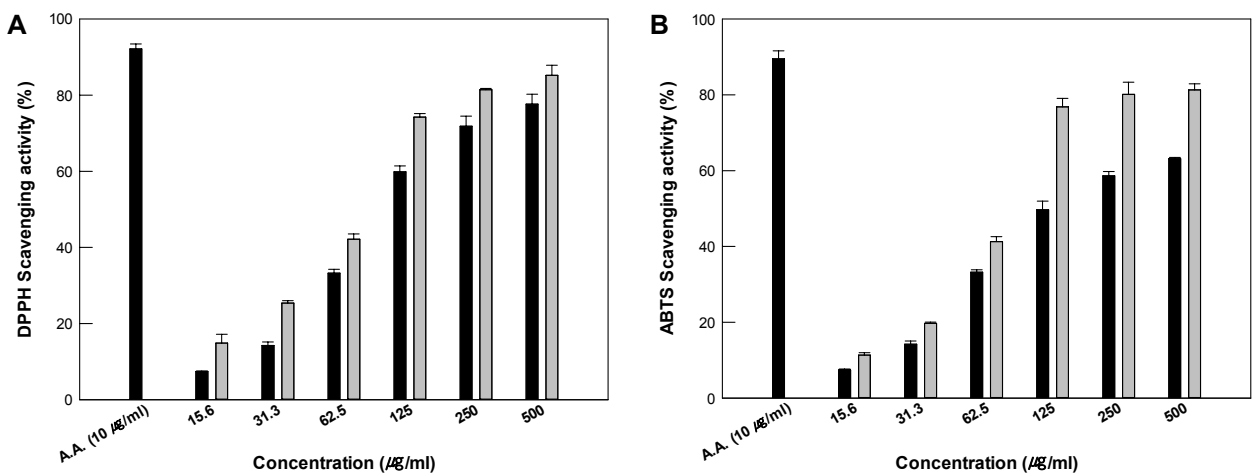


Fig. 3. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity of *R. micranthum* Turcz. extract (black bar) and fermented *R. micranthum* Turcz. extract (gray bar). The fermented *R. micranthum* Turcz. extract was prepared with *L. rhammosus* for 3 days at 37°C. All values are expressed as means ± SD of triplicate determinations.

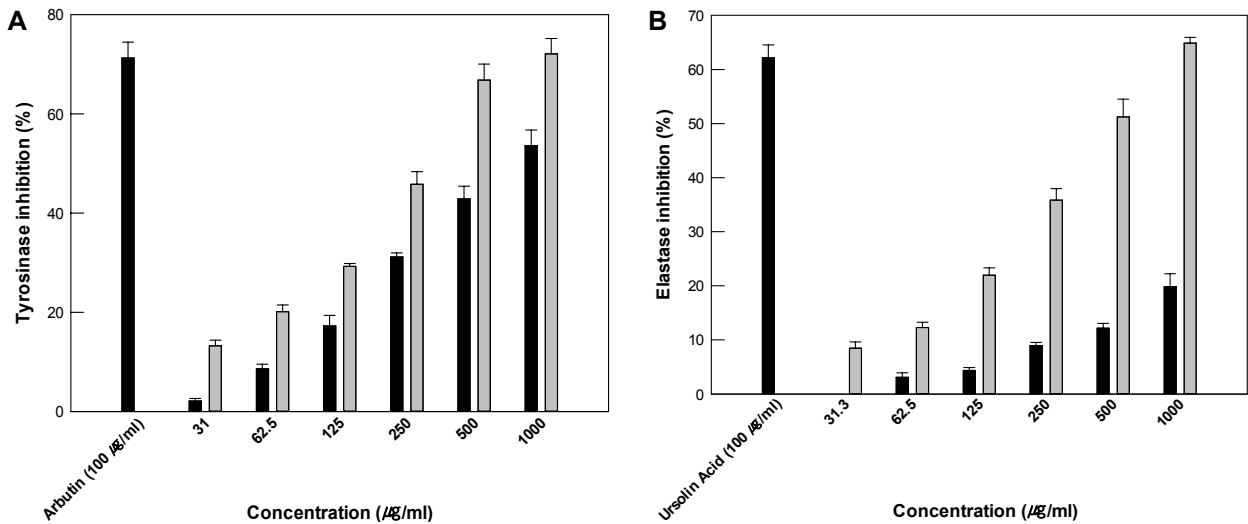


Fig. 4. Inhibitory effects of tyrosinase (A) and elastase (B) of *R. micranthum* Turcz. extract (black bar) and fermented *R. micranthum* Turcz. extract (gray bar). The fermented *R. micranthum* Turcz. extract was prepared with *L. rhamnosus* for 4 days at 37°C. All values are expressed as means ± SD of triplicate determinations.

있고 특히 *L. rhamnosus*의 항산화, tyrosinase 저해 활성 등을 나타낸다는 보고가 있는 만큼[3, 22] 꼬리진달래 추출물에서 고농도로 배양된 유산균도 이러한 생리활성 증가에 한 몫을 했을 것으로 생각 된다. 갈대뿌리를 *L. rhamnosus*를 이용하여 발효한 경우 tyrosinase 저해 활성이 약 4배 증가 하였고 발효 과정을 통해 elastase 저해 활성이 새로이 나타 났다는 보고가 있다[9].

꼬리진달래 추출물은 유산균을 이용한 발효 과정을 통해 총페놀성 화합물 함량, DPPH ABTS radical 소거능, tyrosinase, elastase 저해 활성이 크게 증가 한 것으로 확인 되어 향후 다양한 분야에 기능성 소재로의 개발이 가능 할 것으로 생각 된다. 하지만 아직 유효물질, 지표물질에 대한 분리·정제·동정에 대한 연구가 미비하고 생리활성 증가에 대한 작용 기전 등이 밝혀져 있지 않기 때문에 향후 기능성 소재로 산업적 이용을 위해서는 이러한 연구가 추가로 수행되어야 할 것이다.

### References

- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1203.
- Choi, M. O., Kim, B. J., Jo, S. K., Jung, H. K., Lee, J. T., Kim, H. Y. and Kweon, D. J. 2013. Anti-allergic activities of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus biferrmentans*. *Kor. J. Food Preserv.* **20**, 583-591.
- Choi, W. S., Kwon, H. S., Lim, H. W., No, R. W. and Lee, H. Y. 2013. Whitening effects of *Lactobacillus rhamnosus* associated with its antioxidative activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 183-189.
- Diep, D. B., Godager, L., Brede, D. and Nes, I. F. 2006. Datamining and characterization of a novel pediocin-like

- bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology* **152**, 1649-1659.
- Doron, S., Snyderman, D. R. and Gorbach, S. L. 2005. *Lactobacillus* GG: Bacteriology and clinical applications. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **34**, 483-498.
- Ha, Y. J., Yoo, S. K. and Kim, M. R. 2016. Process optimization of ginseng berry extract fermentation by *Lactobacillus* sp. strain KYH isolated from fermented Kimchi and product analysis. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **26**, 88-98.
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C. Choi, I. and Kim, G. B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant based foods. *Food Chem.* **160**, 346-356.
- Jl, G. E. 1994. Composition and distribution of intestinal microbial flora in Korean. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 453-458.
- Kang, C. H., Kim, S. C., Jeong, S. C., Han, W., Lee, S. Y., Yu, S. M., Jin, H. M. and Kim, Y. S. 2016. Physicochemical characteristics of fermented *Phragmites communis* extract and its biological activity. *Kor. J. Phamacogn.* **47**, 273-279.
- Kang, D. H., Kim, J. W. and Youn, K. S. 2011. Antioxidant activities of extract from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit and inhibitory action on elastase and tyrosinase. *Kor. J. Food Preserv.* **18**, 236-243.
- Kim, N. Y., Bae, K. H., Kim, Y. S., Lee, H. B. and Park, W. G. 2013. Habitat environment and cutting, seed propagation of rare plant *Rhododendron micranthum* Turcz. *J. For. Environ. Sci.* **29**, 165-172.
- Kim, N. Y., Kim, H. S., Kim, Y. S. and Park, W. G. 2006. Studies on morphological variation among provenances of a rare *Rhododendron micranthum* in Korea. *J. Kor. For. Soc.* **95**, 55-59.
- Kim, N. Y., Park, D. S. and Lee, H. Y. 2015. Effect of antiskin wrinkle and antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through fermentation process of the lactic acid. *Kor. J. Medicinal Crop*

- Sci.* **23**, 37-42.
14. Kim, Y. S., Lee, H., Kim, D. Y., Kim, S. Y., Lee, W. K., Lee, S. M., Park, J. D. and Shon, M. Y. 2013. Cultivation of lactic acid bacteria for the development of probiotic products using red ginseng starch. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **23**, 818-826.
  15. Lee, Y. W., Lee, J. E., Kim, J. H., Yeo, S. H., Back, S. Y., Park, S. Y. and Park, H. Y. 2013. Status of technology on fermented liquid. *Food Sci. Ind.* **46**, 33-47.
  16. Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C. M. A. P., Kutima, P. M., Mbugua, S., Shin, H. K. and Holzappel, W. H. 2008. Functional characteristics of *Lactobacillus* sp. from traditional maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 57-64.
  17. Muller, D. M., Carrasco, M. S., Tonarelli, G. G. and Simonetta, A. C. 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Ip 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 2031-2040.
  18. Park, K. Y. 2012. Increased health functional of fermented foods. *Food Ind. Nutr.* **17**, 1-8.
  19. Park, S. H., Yang, S., Lee, J. H. and Kang, M. 2013. Selection of phytate-degrading lactic acid bacteria from Kimchi and reaction properties in brown rice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 627-632.
  20. Park, Y. S. and Jang, H. G. 2003. Evaluation of physiological activity and lactic acid fermentation of *Rubus Coreanus* Miq. *J. Kor. Soc. Agric. Chem.* **46**, 367-375.
  21. Pellegrini, N., Re, R., Yang, M. and Rice-Evans, V. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Meth. Enzymol.* **299**, 379-389.
  22. Prince, T., McBain, A. J. and O'Neill, C. A. 2012. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5119-5126.
  23. Rajan, K. N. and Rajendan, A. D. 2009. Effect of fermentation parameters on extra cellular tannase production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *Eur. J. Chem.* **6**, 979-984.
  24. Shin, J. H. and Yoo, S. K. 2012. Antioxidant properties in microbial fermentation products of *Lonicera japonica* Thunb. extract. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **22**, 95-102.
  25. Wee, Y. J., Kim, H. O., Yun, J. S. and Ryu, H. W. 2006. Pilot-scale lactic acid production via batch culturing of *Lactobacillus* sp. RKY2 using corn steep liquor as a nitrogen source. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 293-298.

## 초록 : 꼬리진달래 발효추출물의 이화학적 특성 및 생리활성 연구

김민진<sup>1</sup> · 유상미<sup>1</sup> · 김도연<sup>2</sup> · 허태임<sup>3</sup> · 이준우<sup>3</sup> · 박지애<sup>3</sup> · 박창수<sup>4\*</sup> · 김영수<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>국립낙동강 생물자원관 담수생물특성연구실, <sup>2</sup>(재)금산국제인삼약초연구소 기술사업부, <sup>3</sup>국립백두대간수목원 산림식물산업부실, <sup>4</sup>대구가톨릭대학교 식품공학전공)

우리나라 특산, 희귀 식물로 알려져 있는 꼬리진달래(*Rhododendron micranthum* Turcz)를 기능성 유산균 *Lactobacillus rhamnosus*를 이용하여 발효 소재를 만들고 발효 소재의 항산화 활성 및 피부 개선 활성을 조사 하였다. 고형분 함량 3%의 꼬리진달래 추출물에 *L. rhamnosus*를 3%가 되게 접종하여 3일간 배양하여  $5 \times 10^9$  CFU/ml의 높은 농도의 유산균이 배양 되었고 총페놀 함량은 배양 전 130 GAE mg/ml에서 157 GAE mg/ml로 증가 한 것으로 확인 되었다. DPPH, ABTS radical 소거능과 tyrosinase, elastase 저해 활성은 발효 전과 비교 하였을 때 각각 1.3, 1.5, 2.4, 5.6배 높게 나타났다. 이러한 결과는 꼬리진달래 추출물을 유산균을 이용 하여 발효하였을 때 새로운 발효 소재로 식품 및 화장품 산업 분야에 다양한 용도로 사용 가능할 것으로 생각 된다. 하지만 발효에 의한 천연 성분의 변화 및 활성 성분에 대한 분석, 생리활성 관련 작용 기전에 대해 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.