

Evaluation of the Anti-oxidant Activity of *Pueraria* Extract Fermented by *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 76

Byung-Hyuk Kim¹, Jong-Ok Jang², Jun-Hyeong Lee^{1,2}, Ye-Eun Park¹, Jung-Gyu Kim^{1,2},
Yeo-Cho Yoon^{1,2}, Su Jin Jeong¹, Gi-Seok Kwon² and Jung-Bok Lee^{1*}

¹Institute for Development of Bio-industrial Materials, BHNbio Co., LTD., Chungbuk 27850, Korea

²Division of Horticulture & Medicinal Plant, Andong National University, Gyeongbuk 36729, Korea

Received December 16, 2018 / Revised March 14, 2019 / Accepted March 29, 2019

The phytochemical compounds of *Pueraria*, a medicinally important leguminous plant, include various isoflavones that have weak estrogenic activity and a potential role in preventing chronic disease, cancer, osteoporosis, and postmenopausal syndrome. However, the major isoflavones are derivatives of puerarin and occur mainly as unabsorbable and biologically inactive glycosides. The bioavailability of the glucosides can be increased by hydrolysis of the sugar moiety using β -glucosidase. In this study, we investigated the antioxidant effects of a *Pueraria* extract after fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 76. The *L. rhamnosus* BHN-LAB 76 strain was inoculated into *Pueraria* powder and fermented at 37°C for 72 hr. The total polyphenol content of the *Pueraria* extract increased by about 134% and the total flavonoid content increased around 110% after fermentation with *L. rhamnosus* BHN-LAB 76 when compared to a non-fermented *Pueraria* extract. Superoxide dismutase-like activities, DPPH radical scavenging, and ABTS radical scavenging increased by approximately 213%, 190%, and 107%, respectively, in the fermented *Pueraria* extract compared to the non-fermented *Pueraria* extract. Fermentation of *Pueraria* extracts with *L. rhamnosus* BHN-LAB 76 is therefore possible and can effectively increase the antioxidant effects. These results can be applied to the development of improved foods and cosmetic materials.

Key words : Anti-oxidant, fermentation, lactic acid bacteria, *Lactobacillus* sp., *Pueraria*

서 론

21세기 산업화의 고도화에 따른 다양한 화학물의 생산과 이에 따른 원료 화합물질의 생산과 이용은 오늘날 사회의 급속한 성장을 이끌었다. 화학산업의 발전은 전자, 기계, 화장품, 식품등의 다양한 산업의 발전과 삶의 질 향상에 기여하였으나, 많은 화학물질의 노출과 난분해성 화학물질로 인해 인간과 생태계의 삶에 부정적인 영향이 보고되었다[17, 55, 57]. 또한, 체내의 산화적 스트레스에 의해 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 체내에 과다하게 존재할 경우 세포의 DNA, 단백질, 지질 등에 손상을 일으켜 암, 노화, 심장병 등을 유발시킨다[9]. 생체내에는 활성 산소종에 방어역할을 하는 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase 등을 가지고 있지만, 현대사회의 과도한 스트레스와 환경 호

르몬의 노출 빈도가 높아 활성 산소종을 억제하기 위하여 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tertiary butylhydroquinone (TBHQ), propyl gallate (PG) 등의 합성 항산화제를 사용하여 왔다. 그러나 많은 연구 결과에 의하면 합성 항산화제는 암, 돌연변이 등의 부작용을 나타낸다고 보고되고 있어, 최근 이러한 합성 항산화제를 대체할 수 있는 천연 항산화제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다[2, 16, 31, 48, 49].

이를 해결하기 위한 수단 중 하나로 생물전환이 주목받고 있다. 이를 통해 보다 안전한 화합물 생산을 도모하고, 합성화학산업의 문제점 중 하나인 고에너지 사용 문제 및 환경문제를 해결할 수 있는 첨단 유용물질 생산 방식으로 미국, 유럽, 일본등을 중심으로 청정산업기술의 핵심으로 인식되어 관련 연구 및 기술개발이 이루어지고 있다. 생물전환(Bioconversion)은 미생물 및 효소를 이용한 발효공정으로 전구물질에서 원하는 산물을 생산, 제조하는 기술을 뜻한다. 생물전환 공정은 미생물 또는 효소의 기질에 대한 선택성을 이용하여 기존 물질의 구조적 변화를 통해 유효성분의 함량 및 흡수율 증가 등의 생물학적 변화를 유도하는 기술로, bacteria, fungi, yeast 등의 미생물과 이들이 보유하고 있는 효소에 대한 연구가 활발하게 진행되어 차세대 기술로 각광받으며 중요성이 더욱 높아지고 있다[32, 36, 45, 56]. 버섯균사를 이용하여 발효한

*Corresponding author

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

E-mail : bio91@bhnbio.com

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.

천년초 추출물의 항산화활성(DPPH 및 ABTS 소거능)이 증가되었으며, 대두의 생물전환을 통해 이소플라본 함량 및 항산화활성 분석 결과, 배당체의 이소플라본은 생물전환과정 중에 비배당체로 전환되며 항산화활성(FRAP, ORAC)의 증가되는 것이 보고되었다[21, 29]. 또한, 유산균을 이용한 발효법은 한국에서 매우 친근한 발효 식품 제조법으로 식품뿐만 아니라, 현재에는 EM균을 이용한 발효사료나 미생물 유래 효소제, 항생제 및 항균제, 생물농약 등 다양한 분야에서 사용되고 있는 보편적인 방법이다. 유산균은 다양한 발효식품 제조에 사용되는 GRAS (Generally recognized as safe) 미생물로 알려져 있으며, 프로바이오틱스(probiotics) 균주가 매우 많이 포함되어 있다. 유산균 발효식품은 특유의 풍미 및 보존성을 부여하고 유당 불내증 완화작용, 정장작용, 병원성 균에 대한 항균작용, 콜레스테롤 저하작용, 항암작용, 면역 조절작용의 효과가 알려져 있다[1, 20, 54]. 또한, 유산균은 발효를 통해 젖산 및 여러 가지 대사산물을 생산하는 미생물로 각종 발효 식품, 의약품, 사료 첨가제 등에 광범위하게 이용되며, 최근에는 건강 증진 및 질병 예방의 특징을 가지는 probiotics 균주로 연구와 활용이 증가하고 있다[37, 47]

췌(Pueraria thumbergiana)는 다년생 덩굴성 관목이며, 한국, 일본, 중국, 북미 등에서 자생하고 있는 콩과 식물로 해열작용, 혈압강화작용, 술독제거, 담증과 위액의 분비증가, 저산소증 보호효과 활성, 호흡조절작용 및 심장박동강화작용, 간손상에 대한 보호효과, 골다공증, 폐경기 질환에 대한 효과가 보고되었다[5, 10, 23, 40, 63]. 췌에는 daidzin, daidzein, genistein, 및 genistein 등의 다량의 이소플라본과 폴리페놀등이 함유되어 에스트로겐의 유사한 생리활성을 나타낸다[22, 27].

따라서, 본 연구에서는 김치로부터 분리된 유산균을 이용하여 췌를 발효하였으며, 췌 발효 추출물의 항산화 활성의 변화를 조사하여, 유산균을 통한 생물전환공정의 유용성과 활용방안에 대해 기술하고자 한다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용한 췌는 경북 영천에서 채취하여 제품화된 것을 구입하여 사용하였다. 추출 및 발효연구를 위해서 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 0.5 cm mesh를 이용하여 걸러 실험에 사용하였다.

발효 유산균 분리 및 동정

본 연구에 사용된 미생물은 김치로부터 분리 및 동정한 유산균을 사용하였다. 분리 유산균의 미생물 동정은 16S rRNA gene 분석을 통해 수행하였으며, 배양액 1.5 ml를 취해 Fast DNA Spin kit for Soil (MP bio, USA)을 이용하여 total DNA를 추출하였다. 추출된 total DNA의 농도와 순도는 NanoDrop

ND-2000 (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 결정하였으며, 시료의 농도는 50 ng/μl 이상, 순도는 1.8~2.0으로 본 연구를 수행하기에 적합하였다. 16S rRNA gene 분석은 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')을 사용하였다[7]. 각각의 primer를 이용하여 50 μl 안에 1× PCR buffer, 20 mM MgCl₂, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 μM), template DNA와 0.5 U Taq polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다. 반응조건은 94°C에서 5 min 동안 DNA를 pre-denaturation시켜, 94°C에서 1 min denaturation, 65°C에서 1 min annealing, 72°C에서 1 min 30 sec extension하고 72°C에서 5 min 동안 final extension을 수행하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel에 loading한 후 약 1,500 bp 크기의 band를 잘라, HiGene™ Gel & PCR Purification Solution Kit (Biofact, Korea)를 이용하여 정제하여 cloning 하였다. Cloning은 All-in-one PCR cloning kit (Biofact, Korea)를 이용하였고, manufacturer's protocol을 따라 수행하여 16S rRNA gene의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 CAP3 sequence assembly program (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>)을 통해 assemble 하여 1,500 bp의 16S rRNA gene을 염기서열을 확인하였으며, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다. 또한, Phylogenetic tree는 ClusterX를 이용하여 미생물간 상동성을 분석하고, MEGA 5.0의 neighbor-joining method를 이용하여 유전적 계통분류를 수행하였다[53].

유산균 발효 방법

췌의 발효를 위해 사용된 유산균은 김치로부터 분리한 유산균을 이용하였다. 유산균은 MRS 배지(Difco Laboratories Inc., St. Detroit, MI, USA)에서 배양하였으며, 유산균 배양액을 5% (v/v) 접종하여 37°C에서 배양하였다. 또한, 췌 분쇄물 200 g에 유산균 배양액을 75 ml 접종하여 37°C에서 3일간 발효하였다.

발효 미생물 정량분석

시간에 따른 유산균의 크기를 정량적으로 평가하기 위해 qPCR을 수행하였다. 유산균의 정량적 평가를 위해 Lacto-F (5'-GCA GCA GTA GGG AAT CTT CCA-3')와 Lacto-R (5'-GCA TTY CAC CGC TAC ACA TG-3') primer를, *E. coli* DH5 α의 total DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 350 bp의 PCR 산물을 얻었다[4]. PCR 산물은 All-in-one vector (Biofact, Korea)에 cloning하였으며, plasmid DNA는 HiGene™ Plasmid Mini Prep Kit (Biofact, Korea)를 이용하여 추출하였다. 염기서열분석은 M13-20F (All-in-one Vector Systems manual)를 이용하여 분석하였고, BLAST search를 통해 확인하였다. 염기서열이 확인된 plasmid DNA는 Real-time PCR (CFX 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, USA)

를 이용하여 melting curve 분석 후 정량분석을 위한 표준 유전자(artificial standard clone)로 사용하였다.

정량 PCR을 위해 Real-time PCR과 iTaq™ SYBR® Green Supermix with ROX (Bio-Rad, USA)를 이용하였다. *Lactobacillus* sp. 16S rRNA gene 정량 PCR은 Lacto-F/R를 이용하였고[4], 반응조건은 95°C에서 15 min 동안 pre-denaturation 시켜, 95°C에서 30 sec denaturation, 67°C에서 30 sec annealing, 72°C에서 30 sec extension 후 fluorescence를 측정하고 45 cycles을 수행하였다. 그리고 final extension은 72°C에서 5 min 동안 수행하였다. Melting curve 분석은 65°C부터 95°C까지 0.2°C씩 증가시키면서 fluorescence를 측정하였다[24]. 또한, 유전자 정량을 위해서 표준 유전자를 serial dilutions하여 Real-time-PCR을 수행하였으며, 정량을 위한 표준곡선은 $y = -4.073x + 48.617$ ($R^2 = 0.9918$)로 확인되어 유산균 정량에 이용하였다. 또한, DNA 농도는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 1 ng/μl를 분석에 이용하였다[24].

침 추출물 조건

발효하지 않은 침과 유산균에 의해 발효된 침은 각각 200 g에 물 1 l를 이용하여 80°C에서 24시간 열수 추출하였으며, 3회에 걸쳐 추출을 수행하였다. 또한 추출된 추출물은 filter paper로 여과한 후 Rotary evaporator (N-1100 and N-1000; EYELA Co., Japan)을 이용하여 감압 농축하고 동결 건조 (FD8512, ilshinBioBase Co. Ltd.)하여 실험에 사용하여, 발효 전후 각각 17.5%와 17.7% 회수하여 본 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량의 측정

총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis 방법에 따라 측정하였다[51]. 천연물로 추출물은 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 각 시험 물질 10 μl를 취하여 10% Sodium carbonate (Na_2CO_3) 200 μl, 50% Folin-ciocalteu reagent 10 μl와 혼합하여 상온에서 30분간 반응 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준 물질로 사용하여 얻어진 표준 곡선으로 총 폴리페놀 함량(ug/ml)을 계산하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량의 측정은 flavonoid에 알칼리를 작용시켜 측정하였다[64]. 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석한 각 시험 물질을 20 μl를 취하여 70% ethanol 80 μl, 5% Sodium nitrite (NaNO_2) 6 μl와 혼합하여 5분간 상온에서 반응한 후, 10% Aluminum Chloride Hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 12 μl를 첨가하여 상온에서 6분간 반응하였다. 1 N Sodium Hydroxide (NaOH) 40 μl를 첨가한 후 11분간 배양하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Rutin을 표준 물질로 사용하여 표준 곡선을 작성하고 이를 따라 총 플라보노이드

함량(ug/ml)을 계산하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사 활성 측정은 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 나타내었다[38]. Tris-HCl buffer (50 mM Tris-hydroxymethyl amino-methane in 10 mM EDTA, pH 8.5) 130 μl을 준비하여 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석한 각 시험 물질을 10 μl를 첨가한 후 7.2 mM pyrogallol 10 μl과 혼합하여 10분간 상온에서 반응하였다. 1 N HCl 10 μl을 첨가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 활성도는 시험 물질을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율을 백분율로 나타내었다.

DPPH radical 소거활성능 측정

추출물의 DPPH radical 소거 활성능 측정은 DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소 공여 효과로 측정하였다[3]. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 빛을 차단한 상태에서 99% Ethanol을 이용하여 2 mM 농도가 되도록 희석하여 사용하였다. 각 시험 물질 20 μl에 DPPH solution 180 μl을 넣고 37°C에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시험 물질을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

ABTS radical 소거능 측정

침 추출물의 ABTS radical 소거능 측정은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate 용액을 혼합하고 24시간 차광 및 정치하여 ABTS 용액을 제조하여 측정하였다[11]. ABTS 용액 970 μl와 추출물 30 μl를 혼합하여 암소에서 30 분간 방치한 후, 734 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거 활성 측정은 시험 물질을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율을 백분율로 나타내었다.

환원력 측정

환원력 측정은 증류수에 희석한 시료 1 ml에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 1 ml와 1% potassium ferricyanide 1 ml를 가해 충분히 혼합한 다음 50°C에서 20분간 반응시켰다. 혼합반응액은 20분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 1.0 ml를 첨가하고 13,000× g에서 5분간 원심분리하고, 상등액 1 ml를 취하고 증류수 1 ml를 첨가한 후 0.1% ferric chloride 0.1 ml를 추가한 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 측정하였다[42].

통계분석

모든 실험은 최소 3회 반복하여 진행하였으며, 각 시료들의 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 각 실험 결과의

통계적 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조구와 비교하여 student's에 의해 판정하였으며, F값이 0.05 또는 0.01 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

16S rRNA gene 염기서열 분석을 통한 유산균 동정

침의 발효를 위해 사용한 유산균은 고성이씨 종갓집 김장김치로부터 분리하였으며, 선발 균주의 16S rRNA gene을 분석한 결과 *Lactobacillus rhamnosus*와 99% 유사도를 갖는 것으로 분석되었다(Fig. 1). 또한, 분석된 16S rRNA gene sequence를 이용하여 유전적 계통도를 분석한 결과, Lactobacillaceae에 속하고, *L. acidifarinae*, *L. zymae*, *L. parabrevis*, *L. plantarum*, *L. ceti*,

L. amylotrophicus 등의 species 수준에서 구별되는 것을 확인하여 *L. rhamnosus* BHN-LAB 76이라 명명하였다.

Real time PCR을 통한 유산균 성장 측정

시간에 따른 발효배양액 내의 *L. rhamnosus* BHN-LAB 76의 성장을 Real-time PCR을 통해 확인하였으며, 초기 접종한 후 BHN-LAB 76은 $1.90 \times 10^6 \pm 5.28 \times 10^5$ copy·molecul/ml로 확인되었다(Table 1). 침의 발효를 위해 *L. rhamnosus* BHN-LAB 76을 접종한 후 6, 12, 24, 48, 72, 96시간에 각각 시료를 채취하여 *L. rhamnosus* BHN-LAB 76의 16S rRNA gene copy를 분석한 결과, 각 채취 시간별로 $1.86 \times 10^6 \pm 4.77 \times 10^5$ copy·molecul/ml, $2.75 \times 10^6 \pm 5.25 \times 10^5$ copy·molecul/ml, $5.49 \times 10^6 \pm 6.58 \times 10^5$ copy·molecul/ml, $1.53 \times 10^7 \pm 1.38 \times 10^6$ copy·molec-

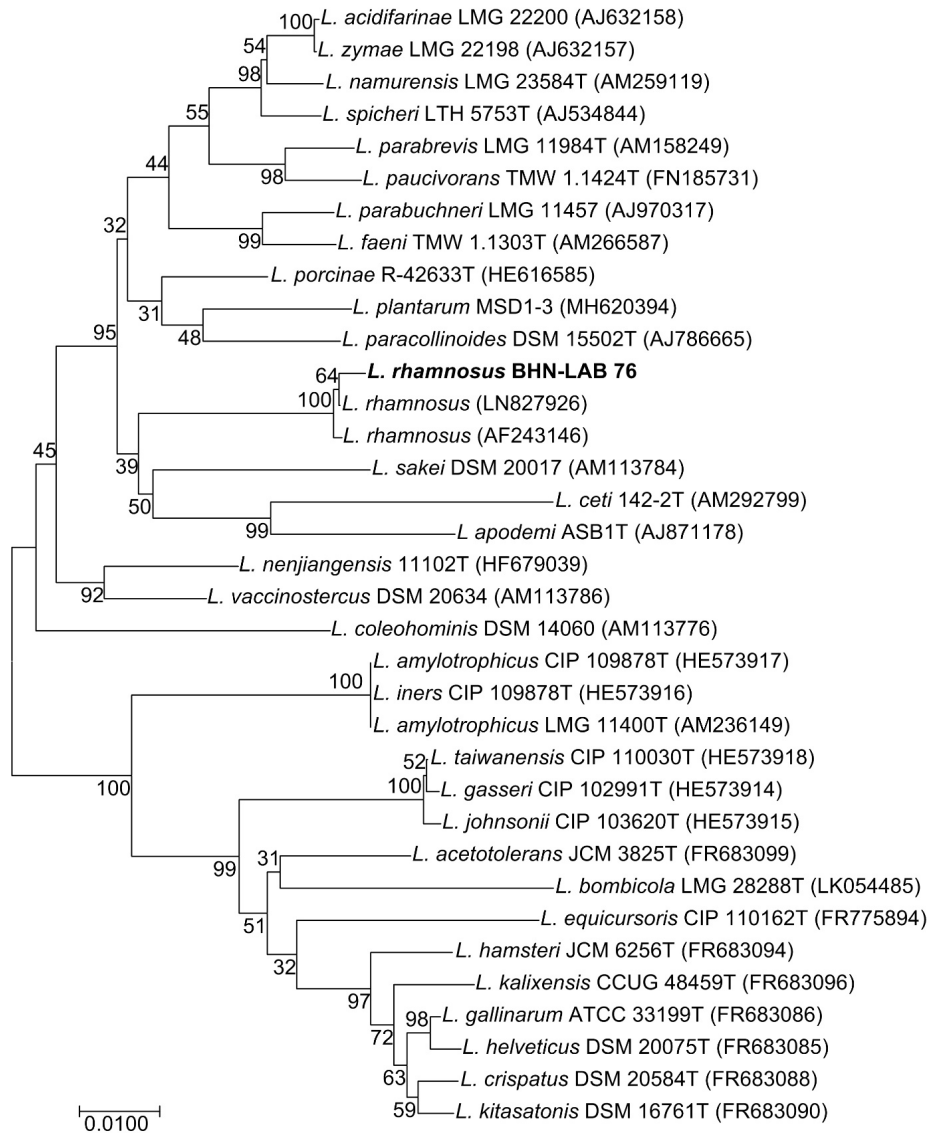


Fig. 1. Phylogenetic tree of the *L. rhamnosus* BHN-LAB 76 and related bacteria of the *Lactobacillus* group based on 16S rRNA gene sequence comparisons. The sequences of isolated strains were compared with available from the GenBank database.

Table 1. Quantification of *L. rhamnosus* BHN-LAB 76 in the *P. thunbergiana* fermentation process using the *Lactobacillus* sp. 16S rRNA gene by the Real-time PCR

Time	<i>L. rhamnosus</i> BHN-LAB 76	
	Average	STDEV
0	1.90E+06	5.28E+05
6	1.86E+06	4.77E+05
12	2.75E+06	5.25E+05
24	5.49E+06	6.58E+05
48	1.53E+07	1.38E+06
72	1.88E+07	1.28E+06
96	1.86E+07	1.56E+06

ul/ml, $1.88 \times 10^7 \pm 1.28 \times 10^6$ copy·molecul/ml, $1.86 \times 10^7 \pm 1.56 \times 10^6$ copy·molecul/ml로 미생물 성장을 확인하였다(Fig. 2, Table 1). BHN-LAB 76의 성장은 접종 초기부터 12시까지 낮은 성장을 보였으며, 접종 12시간 이후에 미생물성장이 급격하게 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 접종 48시간 이후 BHN-LAB 76의 성장이 둔화되는 것을 확인하였다. 이는, *L. rhamnosus* BHN-LAB 76의 성장곡선은 일반적인 미생물의 성장곡선을 나타내고 있으나, MRS 배양과 같은 액체배지에서 폭발적인 성장을 보이지 않았다. 이는, *L. brevis*와 *Pediococcus pentosaceus*를 이용한 아마씨 고상발효와 *L. rhamnosus*를 이용한 영경귀 고상발효과정에서 낮은 미생물성장율을 보인 것과 매우 유사한 것을 확인하였다[43, 44]. 그러나, 유산균의 낮은 성장률에도 불구하고, 천연물의 생물전환과 그에 따른 효과가 유효하다는 것이 보고되었다[43, 44].

생물전환 후 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 증가

폴리페놀류 화합물은 과일 및 열매류 등의 다양한 식물에 풍부하게 함유된 분자 내에 다량의 히드록실기(-OH)를 함유하여 항산화 효과뿐만 아니라 항암, 콜레스테롤 저해, 정장작용등의 생리활성 기능이 보고되었다[26, 33, 46]. 페놀성 화합물 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질 등 큰 분자들과 수소를 공유하며 결합하기 때문에 활성산소의 효과적인 제거와 산화 및 노화 억제에 기능을 하며, 플라보노이드는 폴리페놀계 화합물 중 하나로 항산화 활성과 더불어 다양한 생

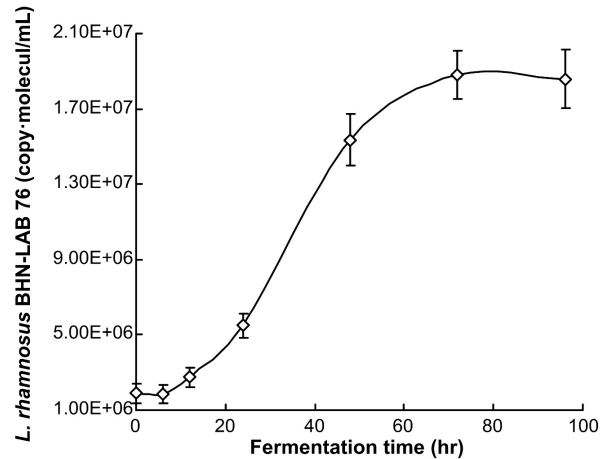


Fig. 2. Quantitative analysis of *L. rhamnosus* BHN-LAB 76 in the *P. thunbergiana* fermentation process by the Real-time PCR.

리활성 기능을 한다고 알려져 있다[13, 33, 43, 52].

최의 발효 전 후의 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정하여, BHN-LAB 76의 생물전환능을 확인하였다(Table 2). 총 폴리페놀 함량은 발효하지 않은 추출물 1,000 ppm 내 172.50 ± 5.34 ug/ 100 g, 500 ppm에는 78.08 ± 12.39 ug/100 g, 250 ppm에는 46.08 ± 2.98 ug/100 g이 포함하고 있는 것으로 분석되었다. 그리고, BHN-LAB 76으로 발효한 칩 추출물 1,000 ppm, 500 ppm, 250 ppm에 포함된 총 폴리페놀의 함량은 각각 183.75 ± 18.19 ug/100 g, 88.83 ± 2.98 ug/100 g, 40 ± 6.34 ug/100 g으로 분석되었다. 또한, 총 플라보노이드 함량은 발효하지 않은 칩 추출물 1,000 ppm, 500 ppm, 250 ppm내에 각각 57.83 ± 3.09 ug/100 g, 26.00 ± 11.38 ug/100 g, 10.08 ± 4.42 ug/100 g을 포함하는 것으로 분석되었으며, BHN-LAB 76으로 발효한 칩 추출물 1,000 ppm, 500 ppm, 250 ppm에 포함된 총 플라보노이드 함량은 각각 74.00 ± 2.70 ug/100 g, 30.17 ± 7.32 ug/100 g, 11.59 ± 4.95 ug/100 g으로 분석되었다. BHN-LAB 76을 이용한 칩의 미생물 발효를 통해 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 발효 전 시료보다 증가되는 것을 확인하였다. 총 폴리페놀 함량은 발효 후 약 110% 증가되었으며, 총 플라보이드 함량은 약 122%정도 증가하였다. 그러나, 증가

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid contents of extracts from the fermented *P. thunbergiana* extracts with *L. rhamnosus* BHN-LAB 76

	Total ployphenol contents (ug/100 g)		Total flavonoid contents (ug/100 g)	
	Before fermentation	After fermentation	Before fermentation	After fermentation
250 ppm	46.08 ± 2.98^1	40 ± 6.34	10.08 ± 4.42	11.59 ± 4.95
500 ppm	78.08 ± 12.39	88.83 ± 2.98	26.00 ± 11.38	30.17 ± 7.32
1,000 ppm	172.50 ± 5.34	183.75 ± 18.19	57.83 ± 3.09	$74.00 \pm 2.70^{**}$

¹Value are means ± standard deviation of triplicate determinations. **, p<0.01.

Total polyphenol contents (ug/100 g) of the fermented *P. thunbergiana* based on gallic acid as standard. NF; Non-fermented *P. thunbergiana* extracts, F; fermented *P. thunbergiana* extracts by *L. rhamnosus* BHN-LAB 76.

된 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량의 차이를 보였다. 플라보노이드는 폴리페놀류의 일종이지만 결과적으로 플라보노이드 함량의 증가와 폴리페놀의 증가 경향이 다른 것은, 플라보노이드 외에 다른 폴리페놀 성분의 변화가 총 폴리페놀 함량의 증감에 영향줄 수 있다고 보고되어, 이와 같은 원인에 기인한 것으로 판단된다[33]. 또한, *L. plantarum*와 *L. paracasei*를 이용해 대마씨 발효시, 총 폴리페놀은 각각 134%와 111%로 증가되었으며, 총 폴리페놀 함량 증가는 생물전환 과정을 통해 증가되었다고 보고되었다[43, 44, 58]. 이러한 변화된 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량 변화는 BHN-LAB 76 성장 중 신진대사를 통한 생물전환 과정을 통해 증가되었다고 판단된다.

생물전환 후 Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 증가

SOD (Superoxide dismutase)는 세포에 유해한 환원 산소를 과산화수소로 전환시키는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 항산화 효소이다. 이 과정에서 생성된 H_2O_2 는 catalase에 의해 물 분자와 산소 분자로 전환되어 산화로부터 생체를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다[19, 35, 43]. 따라서 이 실험에서는 생체 항산화 방어기전 중 효소적 방어기전의 하나로 superoxide radical을 환원시켜서 산화와 노화로부터 보호하는 SOD 유사활성 측정을 pyrogallol의 자동 산화 반응을 이용하여 superoxide anion radical 소거 여부를 조사하였다. 발효하지 않은 칩 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 3.25±1.14%, 4.45±1.07%, 8.49±0.31%의 SOD 유사활성을 보였으며, BHN-LAB 76으로 발효한 칩 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 6.44±1.09%, 12.69±0.54%, 13.37±1.15%의 SOD 유사활성을 보이며 평균 213% 증가된 활성을 보였다(Fig. 3). 양성대조군인 vitamin C보다는

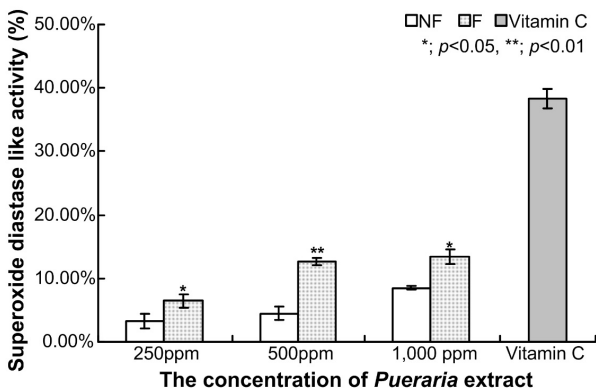


Fig. 3. Superoxide dismutase like activity of extracts from the fermented *P. thunbergiana* extracts with *L. rhamnosus* BHN-LAB 76. SOD-like activity was measured at 420 nm. NF; Non-fermented *P. thunbergiana* extracts, F; fermented *P. thunbergiana* extracts by *L. rhamnosus* BHN-LAB 76, C; vitamin C 500 ppm.

낮게 나타났지만, 미생물 과정을 통한 발효산물 추출물은 발효하지 않은 칩 추출물에 비교해 증가된 것을 확인할 수 있다.

생물전환 후 DPPH radical 소거활성능 증가

DPPH radical 소거활성능은 활성 radical에 전자나 수소를 공여하여 free radical의 활성을 저해시켜 활성 산소를 억제시키는 능력을 의미한다. DPPH는 free radical 상태에서 보라색을 띠며, 항산화 물질로부터 전자 또는 수소를 얻어 non-radical로 환원이 되어 노란색의 DPPH로 전환된다. DPPH는 온도, pH와 빛에 매우 민감한 것이 단점으로 알려져 있지만, DPPH radical 소거활성 측정법은 천연물 추출물의 항산화 활성 측정의 한 방법으로 널리 사용되고, 비교적 빠르게 평가할 수 있어 널리 이용되고 있다[14, 43, 60]. 발효하지 않은 칩 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 4.13±1.19%, 4.38±1.23%, 13.71±0.28%의 DPPH radical 소거활성능을 보였으며, BHN-LAB 76으로 발효한 칩 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 5.03±1.77%, 10.57±0.49%, 28.42±2.26%의 DPPH radical 소거활성능을 보이며 평균 190% 증가된 활성을 확인하였다(Fig. 4). 이 결과를 통해 미생물 발효과정을 통한 발효한 칩 추출물은 발효하지 않은 칩 추출물에 비교해 높은 DPPH radical 소거활성능을 갖는다는 것을 확인할 수 있다.

생물전환 후 ABTS radical 소거활성능 증가

ABTS radical 소거활성은 24시간 동안 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 양이온 radical 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼의 색인 청록색이 무색으로 탈색되는 원리를 이용함으로써 추출물의 항산화 활성을 상대적으로 측정하는 방법이다. DPPH radical 소거활성능은 유리라디칼

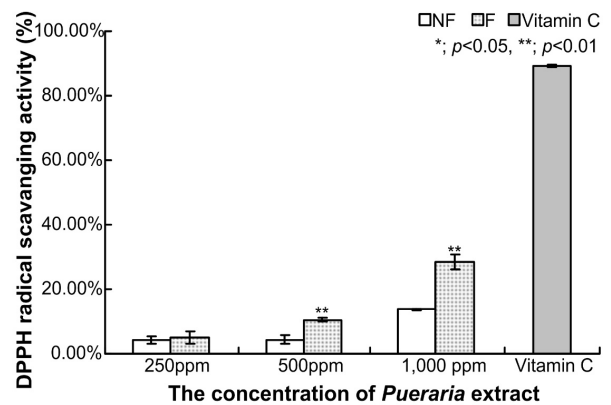


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of extracts from the fermented *P. thunbergiana* extracts with *L. rhamnosus* BHN-LAB 76. DPPH radical scavenging activity was measured at 517 nm. Percent scavenging of the DPPH free radical was quantified compared to the control. NF; Non-fermented *P. thunbergiana* extracts, F; fermented *P. thunbergiana* extracts by *L. rhamnosus* BHN-LAB 76, C; vitamin C 500 ppm.

이 제거되는 것을 이용하는 반면, ABTS radical 소거능은 양이 온 라디칼이 제거되는 것을 이용한다[34]. 발효하지 않은 칩 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm의 ABTS radical 소거활성은 각각 54.6±2.19%, 79.5±1.23%, 91.3±0.28%의 ABTS radical 소거활성을 보였으며, BHN-LAB 76으로 발효한 칩 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm의 ABTS radical 소거활성은 각각 60.1±2.77%, 82.7±0.49%, 96.3±1.53%의 ABTS radical 소거활성을 확인하였으며, 평균 약 107% 정도로 매우 미약하게 증가된 것을 확인하였다(Fig. 5).

생물전환 후 환원력 증가

환원력은 항산화능력과 매우 밀접한 관계에 있으며, reductone의 존재와 관계가 있다고 보고되었다[59]. 발효전 칩 추출물의 환원력은 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm의 환원력은 각각 22.25%±3.19%, 45.69%±2.23%, 65.28%±3.28%로 확인되었다. 또한, *L. rhamnosus* BHN-LAB 76으로 생물전환과정을 거친 발효 칩 추출물의 환원력은 250 ppm에서 38.27%±2.27%, 500 ppm에서 65.28%±2.25%, 1,000 ppm에서 85.59%±3.53%로 확인되었으며, 양성대조구인 vitamin C 500 ppm의 환원력은 97.95%±1.80%로 확인되었다. 발효하지 않은 추출물 1,000 ppm의 환원력은 양성대조구에 비해 약 66.62%로 확인되었으며, 발효 칩 추출물의 환원력은 87.38%로 확인되었고, 생물전환을 통해 약 20%정도 환원력이 증가된 것을 확인하였다. 이러한 환원력의 증가는 총 폴리페놀 함량과 연관이 있다고 알려졌다[8, 30]. 식물류에 널리 존재하는 phenolic compound는 항산화능을 포함한 다양한 생물학적 효능을 나타내며, 이들의 주요 효능은 산화환원력에 의한 것이며, 총 폴리페놀의 함량이 높을수록 항산화능이 증가한다고 보고되었다[12, 41]. 또한, 본 연구에서도 생물전환을 통해 총 폴리페놀과 총 플라보노이드

함량의 증가와 환원력이 증가되는 것을 확인하였으며, 생물전환을 통해 항산화효과를 증가시킬 수 있을 것이라 판단하였다.

본 연구에서는 시중에 판매되는 칩 천연물을 이용하여 *L. rhamnosus* BHN-LAB 76으로 발효 후 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성(SOD 유사활성, DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성)을 분석하여 발효 전후의 변화를 확인하였다. *L. rhamnosus* BHN-LAB 76으로 발효 전 추출물과 발효 후 추출물내의 총 폴리페놀과 플라보노이드가 각각 110%와 122%로 증가되었다. 또한, 항산화 활성을 측정할 결과, SOD 유사활성 213%, DPPH radical 소거활성 190%, ABTS radical 소거활성 107%가 증가되는 것을 확인하였다. 식물체 내의 많은 생리활성물질들은 배당체의 형태로 존재하며, 이를 보완하고 생리활성을 증가시키기 위해서는 배당체 형태에서 비당체 형태로 전환하는 생물전환(bioconversion) 공정 기술 및 가공기술이 필요하다. 또한, 비배당체 형태의 생리활성 물질의 생물학적 활성은 에스트로겐과 유사하여 체내에서 배당체 형태보다 빠르게 흡수되고 생리활성 역시 증진된다고 보고되었다[18, 50]. 포도당 잔기가 β-glucoside 결합을 하고 있는 배당체 형태의 물질로부터 생물의 효소인 β-glucosidase에 의하여 가수분해과정을 통해 비배당체 형태로 전환되며 생리활성이 증가되기 때문에 생물전환 공정 기술의 중요성이 강조되고 많은 연구들이 진행되고 있다[6, 15, 18, 39, 44, 58, 61]. 비배당화 방법은 가수분해, 효소적 변화와 미생물에 의한 생물전환이 있다. 특히 미생물에 의한 생물전환은 epimerization, hydration, hydroxylation과 같은 부가적 반응이 적은 장점이 있다. 따라서, 생물전환공정에 의한 비배당체 전환 물질은 면역활성 및 생리활성이 증가된 기능성물질로 활용할 수 있을 것이다[28, 44, 58]. 또한, 생물전환은 생체 및 생축매의 기능을 활용하여 의약품, 의약품 원료물질, 비타민, 유용

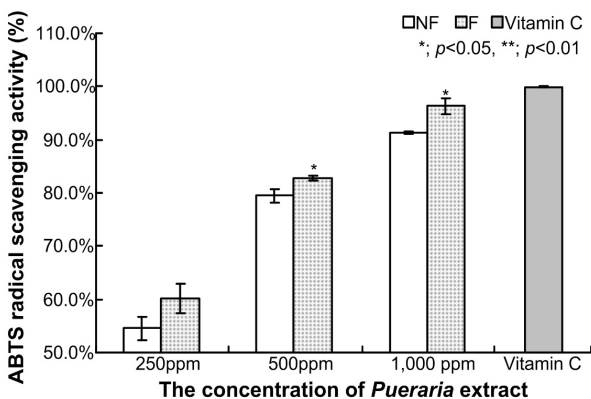


Fig. 5. ABTS radical activity of extracts from the fermented *P. thunbergiana* extracts with *L. rhamnosus* BHN-LAB 76. SOD-like activity was measured at 734 nm. NF; Non-fermented *P. thunbergiana* extracts, F; fermented *P. thunbergiana* extracts by *L. rhamnosus* BHN-LAB 76, C; vitamin C 500 ppm.

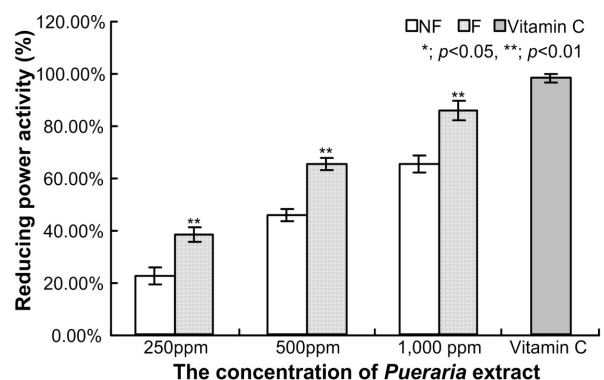


Fig. 6. Reducing power of extracts from the fermented *P. thunbergiana* extracts with *L. rhamnosus* BHN-LAB 76. Reducing power was measured at 700 nm. NF; Non-fermented *P. thunbergiana* extracts, F; fermented *P. thunbergiana* extracts by *L. rhamnosus* BHN-LAB 76, C; vitamin C 500 ppm.

아미노산, 인지질, 식품원료, 농업용 화학제품 등을 포함한 다양한 화학제품의 생산에 활용할 수 있는 기술이다[25]. 현재 유산균 및 GRAS (Generally recognized as safe) 미생물을 이용하여 생물전환공법을 활용하여 영경귀, 녹차, 양파, 인삼, 대두등의 다양한 물질의 생리활성의 증대를 이루고자 다양한 시도들이 보고되고 있다[6, 19, 21, 43, 62].

본 연구에서는 다량의 생리활성물질을 포함하는 칩의 항산화 효과를 증가시키기 위해 김치로 부터 분리된 GRAS 미생물인 *L. rhamnosus* BHN-LAB 76을 이용해 발효하였다. 발효된 칩으로부터 추출된 발효 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드, SOD 유사활성능, DPPH radical 소거활성능, ABTS radical 소거활성능을 탐색한 결과, 발효되지 않은 칩 추출물보다 *L. rhamnosus* BHN-LAB 76으로 생물전환된 칩 추출물에서 보다 높은 항산화 효과를 확인하였다. 이런 결과를 통해 *L. rhamnosus* BHN-76을 이용한 칩의 발효가 가능한 것을 확인하였으며, 유산균 발효가 칩의 항산화능 증대에 효과적인 것을 확인하였으며, 미생물에 의한 생물전환기술은 생리활성을 증대시키기 위한 매우 유용한 기술임을 확인하였다. 본 연구를 기반으로 한 기능성 식품 또는 화장품 소재로의 개발 및 응용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성사업”으로 수행된 연구결과입니다.

References

- Ann, Y. G. 2011. Probiotic lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Nutr.* **24**, 817-832.
- Aruoma, O. I. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *JAOCs* **75**, 199-212.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **121**, 1999.
- Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Manzanilla, E. G., Badiola, I., Martín, M. and Gasa, J. 2005. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* **114**, 165-170.
- Cherdshewasart, W., Subtang, S. and Dahlan, W. 2007. Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 428-434.
- Cho, Y. H., Imm, J. Y., Kim, H. Y., Hong, S. G., Hwang, S. J., Park, D. J. and Oh, S. 2009. Isolation and partial characterization of isoflavone transforming *Lactobacillus plantarum* YS712 for potential probiotic use. *Kor. J. Food Sci. An. Resour.* **29**, 640-646.
- Forney, L. J., Zhou, X. and Brown, C. J. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 210-220.
- Gheldof, N. and Engeseth, N. J. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3050-3055.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Lligier, J. and Aruoma, O. I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 601-617.
- Han, S. H., Kim, J. B., Min, S. G. and Lee, C. H. 1995. The effect of *Puerariae radix* catechins administration on liver function in carbon tetrachloride-treated rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 713-719.
- Han, S. R., Noh, M. Y., Lee, J. H. and Oh, T. J. 2015. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of solvent extracts from *Corioliolus versicolor*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1793-1798.
- Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J. and Vavreinova, S. 2002. Buckwheat-the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res. Int.* **35**, 207-211.
- Hyon, J. S., Kang, S. M., Han, S. W., Kang, M. C., Oh, M. C., Oh, C. K., Kim, D. W., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Flavonoid component changes and antioxidant activities of fermented *Citrus grandis* Osbeck peel. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1310-1316.
- Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* **60**, 417-420.
- Ioku, K., Pongpiriyadach, Y., Konishi, Y., Takei, Y., Nakatani, N. and Terao, J. 1998. β -Glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1425-1431.
- Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T. and Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 1071-1082.
- Ivar do Sul, J. A. and Costa, M. F. 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ. Pollut.* **185**, 352-364.
- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y. and Kikuchi, M. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* **130**, 1695-1699.
- Jeong, H. J., Park, S. B., Kim, S. A. and Kim, H. K. 2007. Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1491-1496.
- Jung, H. K., Kim, E. Y., Yae, H. S., Choi, S. J., Jung, J. Y. and Juhn, S. L. 2000. Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria and fermented milks as probiotic functional foods. *Food Ind. Nutr.* **5**, 29-35.
- Jung, T. D., Shin, G. H., Kim, J. M., Choi, S. I., Lee, J. H., Lee, S. J., Heo, I. Y., Park, S. J., Oh, S. K., Woo, K. S., Lim, J. K. and Lee, O. H. 2016. Isoflavone, β -glucan content and

- antioxidant activity of defatted soybean powder by bio-conversion with *Lentinula edodes*. *J. Food Hyg. Saf.* **31**, 386.
22. Kaufman, P. B., Duke, J. A., Brielmann, H., Boik, J. and Hoyt, J. E. 1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: Implications for human nutrition and health. *J. Altern. Complement. Med.* **3**, 7-12.
 23. Keung, W. M. and Vallee, B. L. 1993. Daidzein a potent selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1247-1251.
 24. Kim, B. H., Jang, J. O., Joa, J. H., Kim, J. A., Song, S. Y., Lim, C. K., Kim, C. H., Jung, Y. B., Seong, K. C., Kim, H. S. and Moon, D. G. 2017. A comparison of the microbial diversity in Korean and Chinese post-fermented teas. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**, 71-80.
 25. Kim, C. K. 2001. Ginseng sponins processing by using bio-conversion technology. *The Korean Ginseng Research and Industry* **6**, 3-13.
 26. 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.
 27. Kim, H. Y., Hong, J. H., Kim, D. S., Kang, K. J., Han, S. B., Lee, E. J., Chung, H. W., Song, K. H., Sho, K. A., Kwack, S. J., Kim, S. S., Park, K. L., Lee, S. K., Kim, M. C., Kim, C. M. and Song, I. S. 2003. Isoflavone content and estrogen activity in arrowroot *Puerariae Radix*. *Food Sci. Biotechnol.* **12**, 29-35.
 28. Kim, J. S., Lee, J. H., Surh, J., Kang, S. A. and Jang, K. H. 2016. Aglycone isoflavones and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus acidophilus* in fermented soybean paste. *Prev. Nutr. Food Sci.* **21**, 117-123.
 29. Kim, M. H. 2015. Biological activity of ethanol extracts from fermented *Opuntia humifusa* with 3 different mushroom mycelia. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 620-627.
 30. Kim, S. I., Sim, K. H., Ju, S. Y. and Han, Y. S. 2009. A Study on antioxidative and hypoglycemic activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. *Kor. J. Food Nutr.* **22**, 41-47.
 31. Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969-978.
 32. Lee, K. J., Gu, M. J., Roh, J. H., Jung, P., M. and Ma, J. Y. 2013. Quantitative analysis of bioconversion constituents of insampeadock-san using various fermented bacteria. *Yakhak Hoeji* **57**, 167-172.
 33. Lee, M. Y., Yoo, M. S., Whang, Y. J., Jin, Y. J., Hong, M. H. and Pyo, Y. H. 2012. Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 540-544.
 34. Lee, W. H., Han, S. R., Yu, S. C. and Oh, T. J. 2018. Comparison of physiological activities of *Flammulina velutipes* according to solvent extractions. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **47**, 83-89.
 35. Lim, J. D., Cha, H. S., Choung, M. G., Choi, R. N., Choi, D. J. and Youn, A. R. 2004. Antioxidant activities of acidic ethanol extract and the anthocyanin rich fraction from *Aronia melanocarpa*. *Kor. J. Food Cook Sci.* **30**, 573-578.
 36. Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Ross, R. P. and Stanton, C. 2017. Lactic acid bacteria and Bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Front. Microbiol.* **8**, 846.
 37. Ljungh, Å. and Wadström, T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **7**, 73-90.
 38. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *FEBS J.* **47**, 469-474.
 39. Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M. and Terao, J. 2002. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: Comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J. Nutr.* **132**, 1956-1961.
 40. Oh, J., Lee, K. S., Son, H. Y. and Kim, S. Y. 1990. Antioxidative components of *Pueraria* root. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**, 793-800.
 41. Osawa, T. 1994 *Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems*. Japan Scientific Societies, Tokyo, Japan.
 42. Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap. J. Nutr.* **44**, 307-315.
 43. Park, Y. E., Kim, B. H., Yoon, Y. C., Kim, J. K., Lee, J. H., Kwon, G. S., Hwang, H. S. and Lee, J. B. 2018. Total polyphenol contents, flavonoid contents, and antioxidant activity of roasted-flaxseed extracts based on lactic-acid bacteria fermentation. *J. Life Sci.* **28**, 547-554.
 44. Park, Y. E., Kwon, G. S., Kim, B. H. and Lee, J. B. 2019. Usefulness evaluation for anti-oxidative and whitening effects of the fermented Thistle (*Cirsium japonicum*) with *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 105. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **in press**.
 45. Poojary, M. M., Dellarosa, N., Roohinejad, S., Koubaa, M., Tylewicz, U., Gómez-Galindo, F., Saraiva, J. A., Rosa, M. D. and Barba, F. J. 2017. Influence of innovative processing on γ -aminobutyric acid (GABA) contents in plant food materials. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **16**, 895-905.
 46. Rice Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.
 47. Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J. and Gil, A. 2015. The role of probiotic lactic acid bacteria and Bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: A systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Res. Int.* **2015**, 505878.
 48. Saito, M., Sakagami, H. and Fujisawa, S. 2002. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Res.* **23**, 4693-4701.
 49. Samak, G., Shenoy, R. P., Manjunatha, S. M. and Vinayak, K. S. 2009. Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*. *Food Chem.* **115**, 631-634.
 50. Setchell, K. D. R. and Cassidy, A. 1999. Dietary isoflavones:

- Biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* **129**, 758-767.
51. 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**, 1298-1307.
52. Song, H. S., Kim, H. K., Min, H. O., Choi, J. D. and Kim, Y. M. 2011. Changes in physicochemical and sensory properties of hizikia fusiforme water extract by fermentation of lactic acid bacteria. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **44**, 104-110.
53. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731-2739.
54. Tannock, G. W. 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. *Trends Biotechnol.* **15**, 270-274.
55. Vrijheid, M., Casas, M., Gascon, M., Valvi, D. and Nieuwenhuijsen, M. 2016. Environmental pollutants and child health-A review of recent concerns. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* **219**, 331-342.
56. Waltenberger, B., Halabalaki, M., Schwaiger, S., Adamopoulos, N., Allouche, N., Fiebich, B. L., Hermans, N., Jansen-Dürr, P., Kesternich, V., Pieters, L., Schönbichler, S., Skaltsounis, A. L., Tran, H., Trougakos, I. P., Viljoen, A., Wolfender, J. L., Wolfrum, C., Xynos, N. and Stuppner, H. 2018. Novel natural products for healthy ageing from the mediterranean diet and food plants of other global sources-The MediHealth Project. *Molecules* **23**, 1097.
57. Xiaohai, W., C. S., G. and Tsao, G. T. 1998. Bioconversion of fumaric acid to succinic acid by recombinant *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70**, 919-928.
58. Yoon, Y. C., Kim, B. H., Kim, J. K., Lee, J. H., Park, Y. E., Kwon, G. S., Hwang, H. S. and Lee, J. B. 2018. Verification of biological activities and tyrosinase inhibition of ethanol extracts from Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) fermented with lactic acid bacteria. *J. Life Sci.* **28**, 688-696.
59. Yoshino, M. and Murakami, K. 1998. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem.* **257**, 40-44.
60. Yu, S. C. and Oh, T. J. 2016. Antioxidant activities and antimicrobial effects of extracts from *Auricularia auricula-judae*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 327-332.
61. Yuan, J. P., Wang, J. H. and Liu, X. 2007. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora - implications for health. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 765-781.
62. Yun, Y. J., Lee, A., Nguyen, T. M. T., Park, J. T., Yun, S. M. and Kim, J. 2018. Bioconversion of onino extract to improve the bioavailability of quercetin glycoconjugate. *Korean J. Food Sci. Technol.* **50**, 391-399.
63. Zeng, C. Y., Zhang, L. Y., Zhou, Y. P. and Fan, L. L. 1982. Pharmacological studies on *Pueraria radix*. *Clin. Med. J.* **95**, 145-150.
64. Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.

초록 : *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 76에 의한 *Pueraria* 발효 추출물의 항산화 활성 평가

김병혁¹ · 장종욱² · 이준형^{1,2} · 박예은¹ · 김중규^{1,2} · 윤여초^{1,2} · 정수진¹ · 권기석² · 이중복^{1*}

(¹비에이치엔바이오 생물산업소재개발연구소, ²안동대학교 원예·생약융합학부)

췌의 화합물은 동양 전통 의학에서 매우 중요한 콩과 식물로서 다량의 이소플라본을 함유한다고 보고되었다. 그러나, 췌의 주요 함유 이소플라본은 생물학적으로 이용가능성이 낮기 때문에, 생물학적 이용가능성을 증대시키기 위해서는 가수분해나 β -glucosidase를 사용하여 생물전환을 통해 이용 효율성을 증대시킬 수 있다. 본 연구는 김치로부터 분리된 *Lactobacillus rhamnosus* BHN-76를 이용해 발효한 췌 추출물의 항산화 효과를 조사하였다. *L. rhamnosus* BHN-76 발효는 37°C에서 3일간 발효하였으며, 발효하지 않은 췌 추출물에 비해 *L. rhamnosus* BHN-76 발효 췌 추출물에서 총 폴리페놀 함량은 약 134%, 총 플라보노이드 함량은 약 110% 증가된 것을 확인하였다. 또한, SOD 유사활성능, DPPH radical 소거 활성능과 ABTS radical 소거활성능은 각각 약 213%, 190%와 107% 항산화능이 증가하는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 *L. rhamnosus* BHN-76을 이용한 췌의 발효가 가능하며, 유산균 발효가 췌의 항산화능 증대에 효과적인 것을 확인하였으며 본 연구를 기반으로 한 기능성 식품 또는 화장품 소재로의 개발 및 응용이 가능할 것으로 기대된다.