

## Increased Antioxidative Activity of Fermented *Ligusticum striatum* Makino Ethanol Extract by Bioconversion using *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129

Byung-Hyuk Kim<sup>1</sup>, Su Jin Jeong<sup>1</sup>, Jong-Ok Jang<sup>2</sup>, Jun-Hyeong Lee<sup>1,2</sup>, YeEun Park<sup>1</sup>, Jung-Gyu Kim<sup>1,2</sup>, Gi-Seok Kwon<sup>2</sup>, Hak-Soo Hwang<sup>3</sup> and Jung-Bok Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Development of Bio-industrial Materials, BHN-BIO Co., LTD., Chungbuk 27850, Korea

<sup>2</sup>Division of Horticulture & Medicinal Plant, Andong National University, Gyeongbuk 36279, Korea

<sup>3</sup>Kyochon F&B Co., LTD., Gyeonggi-do 18150, Korea

Received April 4, 2019 / Revised August 9, 2019 / Accepted August 19, 2019

Phytochemical compounds of *Ligusticum striatum* Makino are used as traditional medicinal herbs in Asia. These compounds are reported to have pain relief and antioxidant activities in gynecological and brain diseases. In this study, we investigated the antioxidant effects of *Ligusticum* fermented ethanol extract from *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129 isolated from Kimchi, a Korean traditional food. The total polyphenol and total flavonoid contents increased by about 116.2% and 281.0% respectively, in the fermented *Ligusticum* extract as compared with those in the nonfermented *Ligusticum* ethanol extract. Superoxide dismutase-like (SOD), DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, and reducing power activities increased by around 139.9%, 199.6%, 301.0%, and 137.1%, respectively, in the fermented *Ligusticum* ethanol extract as compared with these parameters in the nonfermented *Ligusticum* ethanol extract, respectively. In conclusion, the fermented *Ligusticum* ethanol extract with *L. plantarum* BHN-LAB 129 was effective in increasing the antioxidant effects. The bioconversion process in this study points to the potential of using *Ligusticum* to produce phytochemical-enriched natural antioxidant agents with high added value. The findings may prove useful in the development of improved foods and cosmetic materials.

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

### 서 론

생물전환(Bioconversion)기법은 미생물 및 효소를 활용한 발효공정으로 전구물질에서 원하는 산물을 생산, 제조하는 기술을 일컫는다. 생물전환 공정은 미생물 또는 효소의 기질 특이성을 활용하여 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[18, 25, 34]. 한국의 미생물 발효는 익숙한 발효 식품 제조법으로 식품, 사료, 미생물 유래 효소제, 향생제, 향균제 및 생물농약 등의 많은 생활 및 산업 분야에서 이용되고 있다. 유산균 발효식품은 정상작용, 병원성 균에 대한 항균작용, 콜레스테롤 저하작용, 항암작용, 면역

조절작용이 보고되었으며, 건강 증진 및 질병 예방의 특징을 가지는 probiotics 균주로 많은 연구와 활용이 증가하고 있다 [1, 9, 26].

최근 한국, 일본 및 전 세계적으로 고령화 사회 진입으로 건강 증진을 위한 욕구가 증가하고 있으며, 웰스케어 산업과 실버 산업의 지속적 성장으로 인해 항노화 및 항산화 분야의 관심이 지속적으로 증가하고 있다[16]. 그러나, 산업화에 따른 많은 화학물의 사용은 인체에 대한 화합물의 노출과 최종 생성물 등이 건강한 삶에 부정적인 영향이 끼친다고 알려져 있다[33]. 현대사회에서 스트레스와 높은 환경 호르몬 노출 빈도로 인한 활성 산소종의 억제제는 합성 항산화제[butyated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tertiary butylhydroquinone (TBHQ), propyl gallate (PG)]를 사용하여 왔으나, 합성 항산화제는 암, 돌연변이 등의 부작용을 나타낸다고 보고되고 있어, 최근 이러한 합성 항산화제를 대체할 수 있는 안전한 천연 항산화제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다[27, 28].

천궁(防風, *Ligusticum striatum* Makino)은 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본으로 보혈, 진정, 진통의 효과가 뛰어나며, 월경불순 및 부인과 질환 등에 당귀와 함께 널리 사용되는 생약이며, 항산화활성, 뇌질환 관련 효능이 보고되었다[14, 20].

#### \*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.

따라서, 본 연구에서는 김치에서 분리된 유산균을 이용한 생물전환을 통해 천연물이 가지고 있는 생리활성효과를 향상시키고자 하였다. 이를 위해 발효산물로부터 추출된 추출물의 항산화 활성을 조사하였으며, 생물전환공정의 활용방안에 대해 기술하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료

본 연구에 사용한 천궁은 경북 영덕에서 채취하여 제품화된 것을 구입하여 연구에 사용하였다. 천연물의 추출 및 발효는 천연물을 homogenizer로 분쇄한 후 0.5 cm mesh로 분리된 0.5 cm 이하 크기의 천궁을 본 연구에 이용하였다.

### 발효 유산균 분리와 동정

본 연구에 사용된 미생물은 안동시장에서 구입한 배추김치에서 분리하였으며, 분리된 미생물 중 paper disc법을 통해 천궁 추출물에 활성이 우수한 균주를 선별하였으며, 이 균주를 동정한 후 연구에 사용하였다[24]. 분리 유산균의 미생물 동정은 16S rRNA gene 분석하여 결정하였다. Total DNA 추출은 배양액 1.5 ml를 취해 Fast DNA Spin kit for Soil (MP bio, USA)을 이용하여 분리하였다. 추출된 total DNA의 농도와 순도는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 결정하였으며, 시료의 농도는 50 ng/μl 이상, 순도는 260/280 nm ratio 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')를 사용하였다[4]. PCR 반응은 50 μl 반응액에 1× PCR buffer, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 μM), template DNA와 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5 min 동안 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 산물은 1.2% agarose gel에서 약 1,500 bp 크기의 band를 확인한 후, agarose gel을 회수하여 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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))의 GenBank database BLAST search를 통해 분석하였다. 또한, Phylogenetic tree는 ClusterX를 이용하여 미생물간 상동성을 분석하고, MEGA 5.0의 neighbor-joining method를 이용하여 유전적

계통분류를 분석하였다[32].

### 유산균 발효 방법

천궁의 생물전환을 위한 발효 유산균은 배추김치로부터 분리한 유산균을 이용하였다. 유산균은 MRS 배지(Difco Laboratories Inc., St. Detroit, MI, USA)에서 배양하였으며, 유산균 배양액을 5%(v/v) 접종하여 37°C에서 배양하였다. 유산균 배양액은 원심분리한 후, 멸균 증류수로 MRS 배지 성분을 세척한 후, 멸균 증류수에 현탁하였다. 또한, 천궁 분쇄물 200 g에 유산균 배양액을 75 ml 접종하여 37°C에서 3일간 발효하였다.

### 발효 미생물 정량분석

생물전환 과정에서 발효 미생물의 성장 변화를 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, *L. plantarum*의 total DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 350 bp의 PCR 산물을 얻었다[3]. 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 (CFX96 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[3], 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[10]. 또한, 유전자 정량을 위해서 표준 유전자를 serial dilutions하여 Real-time-PCR을 수행하였으며, 정량을 위한 표준곡선은  $y = -4.1879x + 36.693$  ( $R^2 = 0.999$ )로 확인되어 유산균 정량에 이용하였다. 또한, DNA 농도는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 1 ng/μl를 분석에 이용하였다[10].

### 천궁 추출물 조건

발효하지 않은 천궁 200 g과 유산균에 의해 발효된 천궁에 에탄올 1 l를 이용하여 70°C에서 3시간 추출하였으며, 3회에 걸쳐 추출을 수행하였다. 에탄올 추출물은 filter paper로 여과한 후 Rotary evaporator (N-1100 and N-1000; EYELA Co.,

Japan)을 이용하여 감압 농축하고 동결 건조(FD8512, Ilshin BioBase Co. Ltd.)하여 실험에 사용하여, 발효 전후 각각 9.28%와 9.85% 회수하여 본 실험에 사용하였다.

#### 총 폴리페놀 함량의 측정

발효 전·후 추출물은 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 각 시험 물질 10  $\mu$ l를 취하여 10% Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 200  $\mu$ l, 50% Folin-ciocalteu reagent 10  $\mu$ l와 혼합하여 상온에서 30분간 반응 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준 물질로 사용하여 얻어진 표준 곡선으로 총 폴리페놀 함량( $\mu\text{g/ml}$ )을 계산하였다[31].

#### 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량의 측정은 flavonoid에 알칼리를 작용시켜 측정하였다[36]. 발효 전·후 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석한 각 시험 물질을 20  $\mu$ l를 취하여 70% ethanol 80  $\mu$ l, 5% Sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) 6  $\mu$ l와 혼합하여 5분간 상온에서 반응한 후, 10% Aluminum Chloride Hexahydrate ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 12  $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 6분간 반응하였다. 1 N Sodium Hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) 40  $\mu$ l를 첨가한 후 11분간 배양하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Rutin을 표준 물질로 사용하여 표준 곡선을 작성하고 총 플라보노이드 함량( $\mu\text{g/mL}$ )을 계산하였다.

#### Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사 활성 측정은 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하였다[19]. Tris-HCl buffer (50 mM Tris-hydroxymethyl aminomethane in 10 mM EDTA, pH 8.5) 130  $\mu$ l를 준비하여 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석한 각 시험 물질을 10  $\mu$ l를 첨가한 후 7.2 mM pyrogallol 10  $\mu$ l과 혼합하여 10분간 상온에서 반응하였다. 1 N HCl 10  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 활성도는 시험 물질을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율을 백분율로 나타내었다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{\text{Absorbance of sample} - \text{Absorbance of sample blank}}{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of blank}} \times 100$$

#### DPPH radical 소거활성능 측정

추출물의 DPPH radical 소거 활성능 측정은 DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소 공여 효과로 측정하였다[2]. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 빛을 차단한 상태에서 99% Ethanol을 이용하여 2 mM 농도가 되도록 희석하여 사용하였다. 각 시험 물질 20  $\mu$ l에 DPPH solution 180  $\mu$ l를 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

천궁 추출물의 ABTS radical 소거능 측정은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate 용액을 혼합하고 24시간 차광 및 정치하여 ABTS 용액을 제조하여 측정하였다[6]. ABTS 용액 970  $\mu$ l와 추출물 30  $\mu$ l를 혼합하여 암소에서 30분간 방치한 후, 734 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 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 $\times$  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[21].

#### 통계분석

모든 실험은 최소 3회 반복하여 진행하였으며, 각 시료들의 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, 각 실험 결과의 통계적 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조군과 비교하여 student's t에 의해 판정하였으며, F값이 0.05 또는 0.01 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

## 결과 및 고찰

#### 발효 미생물 분리 및 동정

천궁이 가지고 있는 기능성 성분의 생물전환을 위한 미생물은 경북 안동시장에서 구매한 배추김치로부터 분리하였으며, 분리된 미생물의 16S rRNA gene의 염기서열을 확인하여 *Lactobacillus plantarum*과 99% similarity로 분석되었다(Fig. 1). 또한, 분석된 16S rRNA gene 염기서열을 이용하여 유전적 계통도를 분석한 결과, Lactobacillaceae에 속하고, *L. acetotolerans*, *L. sakei*, *L. faeni*, *L. vini*, *L. rhamnosus*, *L. zymae* 등과 species 수준에서 구별되는 것을 확인하였으며, 이를 근거로 *L. plantarum* BHN-LAB 129이라 명명하였다.

#### 천궁의 발효과정에서 미생물 성장 확인

Real-time PCR을 통해 천궁의 생물전환 과정에서 발효시간에 따른 발효배양액 내의 *L. plantarum* BHN-LAB 129의 성장상을 확인하였으며, 초기 접종된 BHN-LAB 129은  $6.88 \times 10^7$

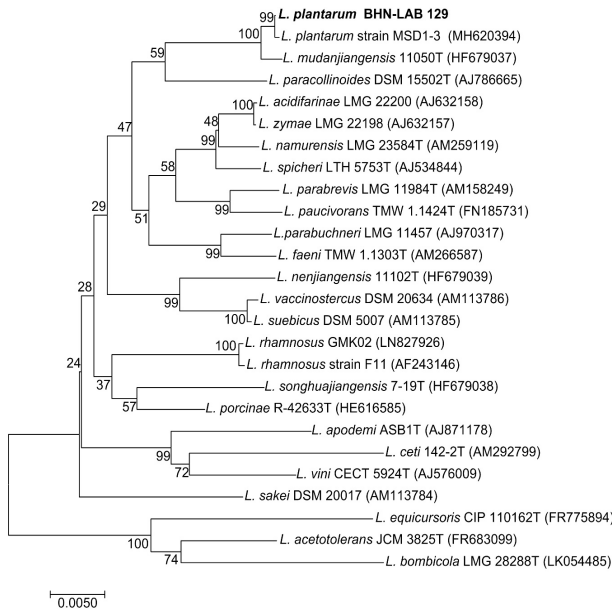


Fig. 1. Phylogenetic tree of the *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129 and related bacteria of the *Lactobacillus* group based on 16S rRNA gene sequence comparisons. The sequences of isolated strains were compared with available from the GenBank database.

Table 1. Quantification of *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129 in the *Ligusticum* fermentation process using the *Lactobacillus* sp. 16S rRNA gene by the Real-time PCR

Time	<i>L. plantarum</i> BHN-LAB 129	
	Average	STDEV
0	6.88E+07	2.53E+06
6	6.85E+07	6.00E+06
12	2.55E+08	6.75E+07
24	8.96E+08	1.51E+08
48	3.65E+09	2.12E+08
72	3.87E+09	3.79E+08
96	3.87E+09	2.49E+08

$\pm 2.53 \times 10^6$  copy molecules/ml로 확인되었다. 천궁의 발효를 위해 *L. plantarum* BHN-LAB 129을 접종한 후 6, 12, 24, 48, 72, 96시간에 각각 시료를 채취하여 *L. plantarum* BHN-LAB 129의 16S rRNA gene copy를 분석하였으며, 배양 96시간 후  $3.87 \times 10^9 \pm 2.49 \times 10^8$  copy molecules/ml까지 성장하는 것을 확인하였다(Table 1, Fig. 2). BHN-LAB 129의 성장은 접종 후 12시까지 매우 낮은 성장의 lag phase를 확인하였으며, 접종 12시간 이후에 성장이 급격하게 증가되며 exponential phase를 확인하였다. 또한, 접종 48시간 이후 BHN-LAB 129의 성장이 둔화되며 stationary phase가 시작되고, 이후 death phase는 확인하지 못했다. 이는, *L. plantarum* BHN-LAB 129의 성장 곡선은 일반적인 미생물의 성장곡선을 나타내고 있으나, MRS 액체배양과 같은 폭발적인 성장은 확인하지 못했다. 이는, *L.*

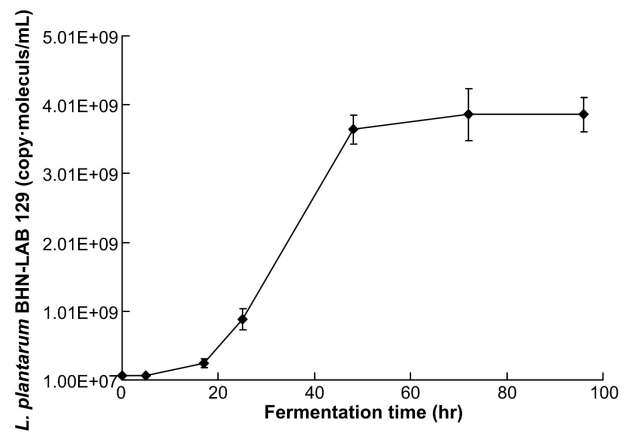


Fig. 2. Quantitative analysis of *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129 in the *Ligusticum* fermentation process by the Real-time PCR.

*rhamnosus*를 이용한 영경귀 고상발효와 *L. rhamnosus*의 최적 혐기성조건에서 액상발효과정의 낮은 미생물성장율과 같이 유사한 성장패턴을 확인할 수 있었다. 그러나, 낮은 미생물 성장에도 불구하고 천연물의 생물전환으로 인한 물질의 변화와 향산화 효과의 변화가 보고되어 천궁의 생물전환에 따른 효능 평가를 수행하였다[11, 24].

### 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 변화

폴리페놀화합물은 채소, 차, 과일 및 다양한 식물에 하이드록실기(-OH)를 가지는 다량으로 포함하며, 향산화 효과, 항염증, 면역조절, 혈관 확장, 항암, 콜레스테롤 저해와 프로바이오틱스와 유사한 효과 등의 다양한 생리활성 기능이 보고되었다[13, 16]. 본 연구에서 BHN-LAB 129의 생물전환 과정을 통한 천궁의 향산화능 변화를 확인하기 위해, 발효 전과 발효 후 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하였다(Table 2). 총 폴리페놀 함량은 발효하지 않은 천궁 추출물 1,000 ppm은  $71.00 \pm 1.17 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 으로 분석되었으며, BHN-LAB 129으로 발효한 천궁 추출물 1,000 ppm에서  $101.33 \pm 15.45 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 으로 분석되었다. 또한, 총 플라보노이드 함량은 발효하지 않은 천궁 추출물 1,000 ppm내에  $21.08 \pm 2.09 \mu\text{g}/100 \text{g}$ , BHN-LAB 129으로 발효한 천궁 추출물 1,000 ppm내에  $62.61 \pm 7.61 \mu\text{g}/100 \text{g}$  ( $p < 0.01$ )으로 분석되었다. BHN-LAB 129을 이용한 생물전환을 통해 총 폴리페놀은 약 161.2%, 총 플라보노이드 함량은 약 281.0%정도 증가되는 것을 확인하였다. *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*를 이용한 칬, 방풍, 아마씨, 영경귀의 발효에서 총 폴리페놀은 각각 증가되었으며, 미생물의 생물전환을 통해 증가된다고 보고하였다[11, 12, 23, 24, 35]. 플라보노이드 함량의 증가와 폴리페놀의 변화 양상의 차이는 플라보노이드 외의 성분 변화로 인해 총 폴리페놀 함량의 증감에 영향을 미칠 수 있으며, 생물전환을 통한 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량 변화에 영향을 줄 수 있다고 판단하였다[16]. 이와 같이,

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid contents of extracts from the fermented *Ligusticum* extract with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129. Total polyphenol contents ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) of the fermented *Ligusticum* based on gallic acid as standard. NF; Non-fermented *Ligusticum* extract extracts, F; fermented *Ligusticum* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 129

	Total polyphenol contents ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )		Total flavonoid contents ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	
	Before fermentation	After fermentation	Before fermentation	After fermentation
250 ppm	13.21 $\pm$ 1.12	23.13 $\pm$ 2.39** <sup>1)</sup>	6.89 $\pm$ 1.28	16.11 $\pm$ 1.49**
500 ppm	35.83 $\pm$ 0.53	51.22 $\pm$ 7.47	10.00 $\pm$ 1.85	31.23 $\pm$ 3.09**
1,000 ppm	71.00 $\pm$ 3.89	101.33 $\pm$ 15.45	21.08 $\pm$ 2.09	62.61 $\pm$ 7.61**

<sup>1)</sup>Value are means  $\pm$  standard deviation of triplicate determinations. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ .

총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 증가는 BHN-LAB 129의 대사과정을 통한 생물전환을 통해 이루어졌을 것으로 사료된다.

**Superoxide dismutase (SOD) 유사활성의 변화**

활성산소로 인한 산화성 스트레스는 호흡을 통해 에너지를 확보하는 모든 생체에서 일어나는 생물학적 스트레스로, 과도한 활성 산소는 세포 기능의 손상 및 조직의 기능저하를 유도하여 노화촉진, 질병저항성 감소, 생식 능력 저하 등의 다양한 생리학적 장애를 유발시킨다[22]. 활성산소는 세포 내의 항산화 방어기전에 의해 제거될 수 있으며, superoxide dismutase, catalase와 같은 효소를 이용한 방어기전과 비타민 E, 비타민 C와 glutathione과 같은 항산화 물질을 이용한 활성산소의 제거가 가능하다[30]. SOD (Superoxide dismutase)는 항산화 효소 중 하나이며, SOD에 의해 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 peroxidase 또는 catalase에 의해 물 분자와 산소 분자로 전환되어 산화로부터 생체를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다[23]. 발효하지 않은 천궁 추출물 1,000 ppm에서 44.97 $\pm$ 4.45%의 SOD 유사활성을 보였으며, BHN-LAB 129으로 발효한 천궁 추출물 1,000 ppm에서 68.95 $\pm$ 4.42%( $p < 0.01$ )의 SOD 유사활성을 보이며 평균 193.9% 증가된 SOD 유사활성을 보였다(Fig. 3). 발효 천궁 추출물 500 ppm에서 SOD 유사활성은 양성대조군인 vitamin C 보다는 약 43%정도의 낮은 SOD 유사활성이 나타났

지만, 생물전환과정을 통한 발효추출물은 발효하지 않은 천궁 추출물에 비해 유의적 수준에서 증가된 것을 확인할 수 있다. 이를 통해, 생물전환은 기존에 알려진 항산화 물질의 항산화능을 증가시키는데 매우 유용할 것으로 판단된다.

**ABTS radical 소거활성능 변화**

ABTS radical 소거활성은 potassium persulfate와 반응하여 생성된 ABTS 양이온 radical 항산화 물질에 의해 제거되어, 청록색이 무색으로 탈색되는 원리를 이용하여 추출물의 항산화 활성을 상대적으로 측정하는 방법이다. DPPH radical 소거활성능은 유리라디칼이 제거되는 것을 이용하며, ABTS radical 소거능은 양이온 라디칼이 제거되는 것을 이용하고 있다[17]. 발효하지 않은 천궁 추출물 1,000 ppm에서 0.31 $\pm$ 3.99% ABTS radical 소거활성능을 보였으며, BHN-LAB 129으로 발효한 천궁 추출물 1,000 ppm에서 56.81 $\pm$ 3.47%( $p < 0.01$ )의 ABTS radical 소거활성능을 확인하였다. 또한, 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 측정하였으며 발효전에 비해 발효 후 ABTS radical 소거활성능은 평균 약 13.5% 증가하였는데, 이는 발효전에 비해 약 199.6% 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 현재 생물전환에 관한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있는 분야이며, 방풍, 콩, 아마씨, 영경귀의 ABTS radical 소거활성능은 생물전환을 통한 활성능 증가가 보고되고 있다. 이와 같이,

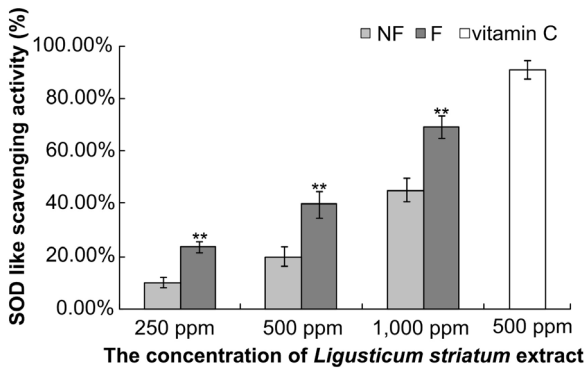


Fig. 3. Superoxide dismutase like activity of the fermented *Ligusticum* extracts with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129. NF; Non-fermented *Ligusticum* extracts, F; fermented *Ligusticum* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 129. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ .

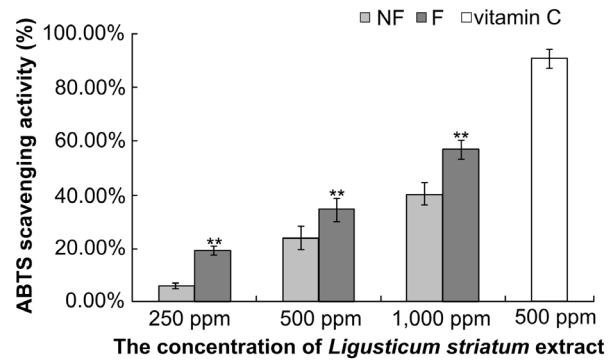


Fig. 4. ABTS radical activity of the fermented *Ligusticum* extracts with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129. NF; Non-fermented *Ligusticum* extracts, F; fermented *Ligusticum* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 129. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ .

다양한 천연물을 대상으로 천연물이 가지고 있는 항산화능을 향상시키기 위해 생물전환방법이 주목받고 있으며, 생물전환의 유용성이 보고되고 있다[11, 23, 24, 29, 35].

**DPPH radical 소거활성능 변화**

DPPH radical 소거활성능은 활성 radical에 전자나 수소를 공여하여 free radical의 활성을 저해시켜 활성 산소를 억제시키는 능력을 의미한다. DPPH는 온도, pH와 빛에 매우 민감하지만, 빠른 천연물 항산화 활성 측정법으로 널리 이용되고 있다[8, 23]. 발효하지 않은 천궁 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 측정하였으며, 천궁 추출물 1,000 ppm에서 16.06±1.59%의 DPPH radical 소거활성능을 확인하였으며, BHN-LAB 129으로 발효한 천궁 추출물 1,000 ppm에서 34.11±2.09%( $p<0.01$ )의 DPPH radical 소거활성능을 보이며 생물전환을 통해 DPPH radical 소거활성능 평균 증가율은 약 16.4%

증가되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 현재까지 생물전환 유용성에 대한 많은 연구들이 보고되고 있으며, 콩 분말의 *Saccharomyces cerevisiae* 생물전환을 통해 DPPH radical 소거활성능 약 67% 향상되었으며, *L. plantarum*을 이용한 방풍 발효 추출물이 약 28% 향상된다고 보고되었다[12, 29]. 본 연구에서도 *L. plantarum* BHN-LAB 129을 이용한 생물전환된 천궁 추출물 효능은 약 16.4% 증가되었으며, 발효전에 비해 약 301% 향상된 증가율을 확인하였다.

**생물전환을 통한 환원력 변화**

천궁 추출물의 환원력은 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm의 환원력을 측정하였으며, 발효 전 천궁 추출물 1,000 ppm에서 58.55%±3.25%, 생물전환된 천궁 추출물 1,000 ppm의 환원력은 78.25%±2.59%( $p<0.01$ )로 확인되었으며, 양성대조구인 vitamin C의 환원력은 95.58%±2.55%로 확인되었다. 발효하지 않은 천궁 추출물 1,000 ppm의 환원력은 양성대조구에 비해 약 61.25%로 확인되었으며, 발효된 천궁 추출물의 환원력은 81.87%로 확인되었고, 생물전환을 통해 약 20.62% 증가된 환원력을 확인하였다(Fig. 6). 식물에 존재하는 phenolic compounds는 항산화능을 포함한 다양한 생물학적 효능을 가지며, 총 폴리페놀의 함량이 높을수록 항산화능이 증가된다고 알려져 있다[5, 7, 15]. 환원력의 향상은 폴리페놀의 함량과 상관관계가 있다고 보고되고 있으며, 생물전환을 통한 폴리페놀의 증가가 환원력 향상의 주된 원인으로 파악 할 수 있다. *L. plantarum* BHN-LAB 33 방풍 발효 추출물의 총 폴리페놀 함량은 발효 전에 비해 약 14% 증가하였으며, 환원력은 약 18.55% 증가하였다고 보고되었다[11]. 이와 유사하게, *L. plantarum* BHN-LAB 129 천궁의 생물전환을 통해 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 증가되며, 환원력이 향상되는 것을 확인하였다.

최근, 생물전환의 유용성이 많은 연구자들에게 관심을 갖게 되며 천연물이 가진 효능 증대 연구가 다양한 미생물과 천연물을 대상으로 진행되고 있다. 생물전환은 의약품 원료물질, 유용 아미노산, 인지질, 식품원료, 화장품 원료, 농업용 원료등을 포함한 다양한 산업에 활용할 수 있는 기술로 관심을 받고 있다[7, 11, 23, 24, 29, 35]. 본 연구는 천연 약재인 천궁을 이용하여 *L. plantarum* BHN-LAB 129으로 생물전환을 거쳐 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 및 항산화 활성(SOD 유사활성, DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성, 환원력)을 분석하여, 미생물 생물전환의 유용성을 확인하였다. *L. plantarum* BHN-LAB 129의 생물전환을 통해 천궁 추출물 내의 총 폴리페놀과 플라보노이드가 각각 161.2%와 281.0% 증가되었다. 또한, 항산화 활성을 측정된 결과, SOD 유사활성 193.9%, ABTS radical 소거활성 199.6%, DPPH radical 소거활성 301.0%, 환원력은 137.1%가 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 생물전환기술의 유용성은 천연물의 생리활성이 가지는 항산

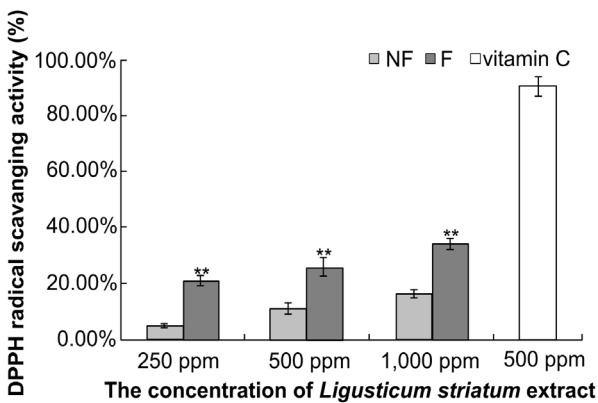


Fig. 5. DPPH radical scavenging activity of the fermented *Ligusticum* extracts with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129. NF; Non-fermented *Ligusticum* extracts, F; fermented *Ligusticum* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 129. \*,  $p<0.05$ , \*\*,  $p<0.01$ .

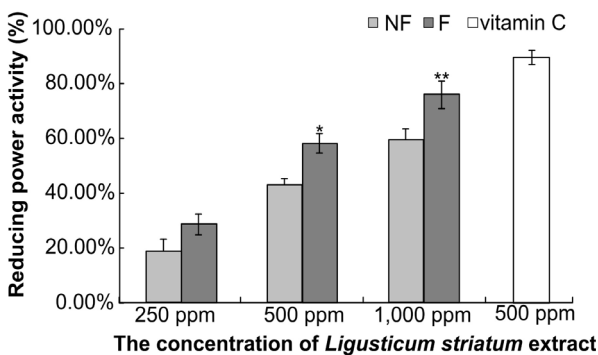


Fig. 6. Reducing power activity of the fermented *Ligusticum* extracts with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129. NF; Non-fermented *Ligusticum* extracts, F; fermented *Ligusticum* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 129. \*,  $p<0.05$ , \*\*,  $p<0.01$ .

화능을 향상시키는데 매우 유익한 기술이며, 생물전환기법을 통해 향상된 천연물의 효능을 증가시킨 기능성 식품소재 및 화장품 소재로 활용할 수 있을 것을 기대한다.

## 감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역 특화산업육성사업”으로 수행된 연구결과입니다.

## References

- Ann, Y. G. 2011. Probiotic lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Nutr.* **24**, 817-832.
- 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.
- 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.
- Han, S. R., Noh, M. Y., Lee, J. H. and Oh, T. J. 2015. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of solvent extracts from *Coriolus 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kim, B. H., Jang, J. O., Lee, J. H., Park, Y. E., Kim, J. G., Yoon, Y. C., Jeong, S. J., Kwon, G. S. and Lee, J. B. 2019. Bioconversion of glycosides isoflavone to aglycone isoflavone by *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 76 in the anaerobic conditions. *Kor. J. Food Preserv.* **26**, 148-156.
- Kim, B. H., Jang, J. O., Lee, J. H., Park, Y., Kim, J. G., Yoon, Y. C., Jeong, S. J., Kwon, G. S. and Lee, J. B. 2019. Increased anti-oxidative activity and whitening effect of fermented *Saposhnikovia* extract by bioconversion using *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33. *J. Life Sci.* **in press**.
- 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.
- Kim, J. M., Son, D., Lee, P., Lee, K. J., Kim, H. and Kim, S. Y. 2003. Ethyl acetate soluble fraction of *Cnidium officinale* Makino inhibits neuronal cell death by reduction of excessive nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated rat hippocampal slice cultures and microglia cells. *J. Pharmacol. Sci.* **92**, 74-78.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Oh, Y. J., Seo, H. R., Choi, Y. M. and Jung, D. S. 2010. Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of *Cnidium officinale* Makino. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **18**, 373-378.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap. J. Nutr.* **44**, 307-315.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B. and Raisuddin, S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu. (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.* **309**, 105-115.
- 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.
- Park, Y. E., Kwon, G. S., Kim, B. H. and Lee, J. B. 2019. Evaluation of the usefulness of the fermented Thistle (*Cirsium japonicum*) with *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 105 for antioxidative and whitening effects. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **17**, 1-13.
- 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  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) contents in plant food materials. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **16**, 895-905.
26. Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J. and Gil, A. 2015. The role of probiotic lactic acid bacteria and Bifido-bacteria 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**, 505-878.
27. 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.
28. 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.
29. Santos, V. A. Q., Nascimento, C. G., Schmidt, C. A. P., Mantovani, D., Dekker, R. F. H. and Cunha, M. A. A. d. 2018. Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones bio-transformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. *LWT - Food Sci. Technol.* **92**, 509-515.
30. Shin, M. J., Lee, J. E. and Seo, E. W. 2015. Stress resistance of *Zacco koreanus* due to exposure of cement powder. *J. Life Sci.* **25**, 615-623.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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 plantarum* BHN-LAB 129의 생물전환공정을 통한 천궁 발효 추출물의 항산화 활성 증대

김병혁<sup>1</sup> · 정수진<sup>1</sup> · 장종욱<sup>2</sup> · 이준형<sup>1,2</sup> · 박예은<sup>1</sup> · 김중규<sup>1,2</sup> · 권기석<sup>2</sup> · 황학수<sup>3</sup> · 이중복<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>㈜비에이치앤바이오 생물산업소재개발연구소, <sup>2</sup>안동대학교 원예·생약융합학부, <sup>3</sup>교촌 F&B(주))

천궁은 동양 전통 의학에서 사용되고 있는 식물로 향진통, 부인과 질환, 항산화활성, 뇌질환에 사용되고 있다. 본 연구는 한국 전통발효식품인 김치에서 분리된 *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129를 이용해 발효한 천궁 추출물의 항산화 효과를 조사하였다. 발효하지 않은 천궁 추출물에 비해 *L. plantarum* BHN-LAB 129 발효 천궁 추출물에서 총 폴리페놀 함량은 약 161.2%, 총 플라보노이드 함량은 약 281.0% 증가된 것을 확인하였다. 또한, SOD 유사활성능, ABTS radical 소거활성능, DPPH radical 소거 활성능, 환원력은 각각 약 139.9%, 199.6%, 301.0% 및 137.1% 증가된 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 *L. plantarum* BHN-LAB 129을 이용한 생물전환을 통한 천궁 발효 추출물의 항산화능 증대에 효과적인 것을 확인하였다. 또한, 생물전환기술은 생리활성을 증대시키기 위한 매우 유용한 기술임을 확인하였으며, 생물전환기법을 통한 기능성 식품소재 및 화장품 소재 개발 및 응용이 가능할 것으로 기대된다.