

Physicochemical Properties and Biological Activities of *Angelica gigas* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae*

So-Yeon Sim¹, Woo-Sang Park¹, Hyun-Seung Shin¹, Min Ok², Young-Su Cho¹ and Hee-Young Ahn^{1*}

¹Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

²OK BIOLAB Co., Ltd., Busan 49315, Korea

Received August 21, 2019 / Revised September 11, 2019 / Accepted September 16, 2019

The purpose of this study was to investigate the biological activities of an aqueous extract of *Angelica gigas* (Ag) fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). First, the soluble solids of the F/3 group, in which the Ag was fermented by Sc for 3 days, decreased from 1°Bx to 0.9°Bx. On the other hand, the pH increased with the number of days of fermentation. The result of a TLC experiment confirmed that it gradually decomposed into a low - molecular weight sugar form upon fermentation. The total phenolic compounds and flavonoid contents were higher in the fermented group than in the non-fermented group. K and Ca contents were increased by fermentation in the following order: F/3, NF, and F/0 groups. Decursin and decursinol angelate contents were highest in the F/3 group. The DPPH (α , α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) radical scavenging activity of the NF, F/0, and F/3 groups were 41.89%, 39.51%, and 60.26%, respectively. The inhibition activities of tyrosinase and lipoxygenase were stronger in the F/3 group than in the NF group. This experiment showed that the fermentation of Ag Nakai can lead to an increase in its antioxidant ability, physiological activity, whitening and anti-inflammatory effects. Thus, this oriental herbal medicine can be developed into a functional material that can be utilized in the development of cosmetic products in future.

Key words : *Angelica gigas*, antioxidant, biological activity, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

최근 국·내외 소비자들의 화장품에 대한 지식과 인식수준의 상승으로 새로운 기대를 충족시킬 수 있는 고부가가치 뷰티 제품의 개발이 필요하다. 특히 한방 및 발효화장품[22]은 이미 세계적인 트렌드가 된 '웰빙', '자연주의'를 지향하며 자연 성분을 선호하는 소비자 욕구를 만족시키고, 동시에 동양적 정서가 함께 적용하면서 화장품 기업들 대부분이 하나 또는 그 이상의 브랜드를 가지고 있을 만큼 독자적인 영역을 구축하고 있다. 불과 몇 년 전까지만 해도 화장품 제조 원료는 합성 화합물이 주를 이루었으나, 천연소재 기능성 화장품 시장의 확대로 고부가가치 원료 사용이 증가되고 있는 추세다[21].

기능성이 강화된 제품의 소비는 나날이 증가하는 추세이며, 소비자를 포함한 각 연구기관 및 기업에서는 천연 생리활성 효능을 가진 기능성 소재 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 대부분의 생물체는 다양한 요인에 의해 활성산소종[6]이 생성

되며, 체내 활성 산소가 증가되게 되면 산화적 스트레스를 일으켜 세포 내 단백질 및 지질성분이 변성되어 기능저하 및 여러 질환의 원인이 되기도 한다. 이를 지연시키거나 억제하는 새로운 기능성 소재를 천연 공법인 발효과정을 통해 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행 중이다[5].

한방소재인 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 미나리과(*Umbelliferae*)에 속하는 다년생 초본으로 크게 한국당귀(*Angelica gigas* Nakai), 중국당귀(*Angelica acutiloba* Kitagaw), 일본당귀(*Angelica sinensis* Diels)로 구분된다[18]. 참당귀는 예로부터 약성이 따뜻하고, 맛은 달며, 독성과 부작용 또한 미미하여 질병치료 및 건강증진 목적으로 많이 사용되는 대표적인 생약재이다. 국내에 재배되고 있는 참당귀의 약효성분으로는 decursin, decursinol, decursinol angelate, nodakenin, nodakenetin, umbelliferone, β -sitosterol, α -pinene, limonene 등이 있다 [15]. 이들 성분은 항산화, collagenase 저해에 의한 주름개선, 조직 재생, 미백 작용 및 항암작용 등의 효과를 가지고 있는 것으로 보고된다[26]. 특히 참당귀 내 다량 함유되어있는 decursin 및 decursinol angelate는 항균, 혈관형성억제, 항암 등의 약리적인 효과가 알려져 있다[25].

최근 들어 유용 미생물을 이용해 발효 시킴으로써 추출물이 가진 독성을 줄이는 동시에 새로운 물질이 생성되거나 기존의 생리활성 물질이 다른 물질로 전환되어 처음과는 다른 긍정적인 효능을 가지게 되는 등 관련된 기능성 향상 연구가 활발히 진행되고 있다. 유산균, 곰팡이, 바실러스, 효모 등의 인체에

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-5746, Fax : +82-51-200-5746

E-mail : ahnhhy@dau.ac.kr

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.

유익한 미생물을 이용한 발효기술을 통해 다당체, 올리고당, 사포닌, 펩타이드, 피틴산 등의 새로운 발효산물을 얻거나 또는 상호 간의 시너지 작용에 의해 생리활성 및 기능성 효능이 상승되는 것으로 알려져 왔다[30].

이에 본 연구진은 예로부터 한방소재로 사용되어왔던 참당귀에 대한 연구는 다양하게 이루어져 왔으나 발효를 이용한 참당귀의 생리 활성 연구는 부족한 것으로 판단하였다. 따라서 본 연구에서는 참당귀의 건조 분말과 유용미생물인 효모를 이용한 발효 공정을 통해 우수한 기능성소재 개발을 위한 기초 연구의 일환으로 이화학적 특성 및 생리활성을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 2018년 9월에 제천황기연합 영농조합법인(충청북도 제천시)에서 구입하여 시료로 사용하였다. 참당귀분말의 발효 균주로는 효모의 일종인 *Saccharomyces cerevisiae*를 선택하여 사용하였으며, 전 배양 시킨 균주를 참당귀분말에 1:1 비율로 접종한 후 30°C에서 72시간 발효과정을 거쳤다. 24시간마다 희석한 발효참당귀를 60°C에서 8시간 열풍 건조시켜 실험시료로 사용하였다. 실험군으로 사용된 시료는 발효하지 않은 참당귀(NF), 비발효 균인 참당귀 + *Saccharomyces cerevisiae*의 혼합물(F/0) 및 발효 균인 참당귀 + *Saccharomyces cerevisiae* 발효 3일차(F/3)으로 진행하였다.

추출조건, 가용성 고형물(°Brix) 및 pH

시료의 추출은 참당귀 및 발효참당귀 건조 분말 500 g을 각각 취해 20배의 정제수를 사용하여 상온에서 3시간씩 3회 환류 추출하여 Adventec 110 mm No. 2 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)로 여과한 다음 실험재료로 사용하였다. 가용성 고형물 측정에는 시료를 1.5 ml 취하고 2,000× g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 당도계(Hand refractometer, Kruss, Germany)로 사용하여 total soluble solids (°Brix)를 측정하였다. pH는 pH meter (SevenCompact™ pH/Ion S220, Mettler-Toledo Ag, Switzerland)를 이용하여 3회 측정하였다.

TLC(Thin-layer chromatography)

다당체를 확인하기 위하여 박층 크로마토그래피법을 사용하였다. 박층 크로마토그래피는 silica gel plate (25 DC-Alufo-lien Kieselgel 60, Merck Co., Ltd.) 상에 참당귀 및 발효참당귀 분말의 5% 수용성 추출물을 점적하여 전개용매인 1-butanol/ethanol/water (5 : 5 : 3)로 전개시켰다. 전개가 완료된 plate를 완전히 건조시킨 후 methanol에 3% 황산을 첨가하여 만든

발색용액을 살포한 후 100°C 이상의 hot plate 위에 놓고 10분간 가열하였다. 이때 사용한 표준물질은 standard malto-oligosaccharide (G1~G7)으로써 G1, G2, G3, G4, G5, G6 및 G7은 각각 glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose 및 maltoheptaose이었다.

페놀성 화합물 함량 측정

페놀성 화합물의 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 법[29]으로 측정하였다. 0.1%(w/v) 시료 용액 0.5 ml에 Folin-ciocalteu's phenol reagent 2.5 ml를 첨가하여 혼합하고 5분간 실온에서 방치하였다. 5분 반응시킨 후 7.5% Na₂CO₃ 2 ml를 가하여 혼합하고 50°C에서 5분간 발색시킨 후 spectrophotometer (Hitachi U-2900, Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japan) 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 페놀성 화합물의 함량은 tannic acid를 일정한 농도(0~500 µg/ml)로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정된 표준곡선으로부터 mg/100 g로 나타내었다.

Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량은 Jia 등의 방법[12]에 따라 측정하였다. 0.1%(w/v) 시료 용액 0.25 ml에 1.25 ml의 정제수와 5% NaNO₂ 용액 5 ml를 가하고, 5분 후 10% AlCl₃·6H₂O 0.15 ml를 잘 혼합하고, 이 혼합 용액을 spectrophotometer의 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 함량은 표준 물질로서 (+)-catechin hydrate을 일정 농도(20~200 µg/ml)로 시료와 동일한 방법으로 측정하여 작성한 표준 곡선으로부터 mg/100 g로 계산하여 나타내었다.

미네랄 함량 측정

참당귀분말 및 발효참당귀분말의 미네랄 함량은 A. O. A. C. 분석방법[11]에 준하여 측정하였다. 즉, 건조 분말 1 g을 정확히 취해 각 550°C 회화로에서 3시간 회화 시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시켜 수욕상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl를 가하여 Adventec 110 mm 2 여과지(Toyo 2A; Toyo Roshi, Tokyo, Japan)로 여과한 후 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석하여 원자 흡광 분광광도계(Analyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

Decursin 및 decursinol angelate 함량 측정

참당귀 및 발효참당귀 건조 분말 20배에 해당하는 95% 에탄올로 3시간씩 3회 환류 추출 한 다음 Sartorius minisart 0.45 µm filter (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany)로 여과 한 후 진공농축기(Buchi Rotavapor R-215, Flawil, Switzerland)로 농축하였다. 농축된 시료를 메탄올로 녹인 다음 Sartorius

Minisart 0.2 μm filter로 여과시킨 후 분석시료로 사용하였다. 메탄올에 녹인 시료는 HPLC (Agilent 1200, Agilent Technologies, USA)를 사용하여 칼럼은 Waters symmetry C18 column (4.5×250 mm, 5 μm), 온도 30°C, 이동상의 속도는 1 ml/min, UV 파장은 340 nm, 분석 용매로 용매 A는 HPLC용 water 및 용매 B로 HPLC용 acetonitrile, 분석조건은 Table 4와 같이 분석하였다.

DPPH에 의한 항산화 활성 측정

항산화 활성 측정은 Blois 등의 방법[2]에 따라 측정하였다. 에탄올 100 ml에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 ml를 혼합하여 Whatman filter paper NO. 2에 여과시켜 반응 용액을 만들었다. 참당귀 추출물 1.00%의 농도 시료 용액 1 ml을 취한 후 DPPH 반응 용액 5 ml을 넣어 잘 혼합한 후 암실에서 30분간 반응시켜 spectrophotometer의 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위하여 항산화제로 많이 사용되고 있는 합성 항산화제 BHT (butylated hydroxytoluene)를 0.05% 농도로 첨가하여 시료와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다. DPPH 법을 이용한 항산화 활성 계산법은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차를 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}_{528\text{nm}}}{\text{control absorbance}_{528\text{nm}}}\right) \times 100$$

Tyrosinase inhibition 활성

Tyrosinase 활성은 Masamoto 등의 실험 방법[19]을 변형하여 측정하였다. *In vitro* mushroom tyrosinase 활성 저해 능력을 측정하기 위하여 1.5 ml plastic cuvette에 2.5 mM 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 0.3 ml, 시료 추출물 0.05 ml 및 0.1 M 인산완충용액(pH 6.8)을 혼합하여 25°C에서 먼저 반응시켰다. 여기에 1,380 units/ml mushroom tyrosinase (2,500 unit, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) 0.05 ml를 넣은 후 25°C에서 2분간 반응시키면서 spectrophotometer의 475 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 대조군은 시료가 들어있지 않는 시료 용해 용액을 사용하였고, 양성대조군은 tyrosinase 저해제로 알려진 0.6 mM kojic acid를 사용하였다. 이때 tyrosinase 활성 저해율(%)은 다음의 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율(\%)} = 100 - \left(\frac{A-B}{A}\right) \times 100$$

- A는 시료가 들어있지 않은 반응액의 0.5~1분 사이의 흡광도 차이

- B는 시료가 들어있는 반응액의 0.5~1분 사이의 흡광도 차이

Lipoxygenase inhibition 활성

Lipoxygenase inhibition 활성 측정은 corning flat 96well에

시료 10 μl첨가 후 borate buffer 20 μl를 넣고 기질인 linoleic acid를 70 μl 첨가 후 효소를 넣기 전 흡광도 값을 측정한 뒤, 효소인 lipoxygenase 10 μl 넣고 상온에서 10분간 반응한 후 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 spectrophotometer를 이용하여 파장 234 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 indomethacin (Sigma, USA)을 0.05%(w/v)로 에탄올에 녹여서 사용하였다.

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준 오차(mean ± SE)로 표시하였고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 나타내었다[8].

결과 및 고찰

추출물 가용성 고형분(Soluble solid) 및 pH

본 연구에서 추출한 참당귀 및 발효참당귀 수용성 추출물의 °Brix 및 pH의 변화는 Table 1에 나타내었다. 참당귀 및 발효 참당귀 수용성 추출물의 soluble solid 경우, NF군에서 1 °Brix, F/0군에서 1.5 °Brix로 발효균주가 첨가됨에 따라 조금의 증가된 경향을 보였다. 반면에 F/3군에서 0.9 °Brix로 발효가 됨에 따라 오히려 당도가 감소하는 경향을 보였다. 이는 효모가 참당귀 내의 당 성분을 이용하여 증식함으로써 당 함량이 감소한 것으로 판단된다. 한편, F/3군의 pH는 6.22로 NF군 및 F/0군에 비해서 높은 수치를 나타냈다. 본 연구에서 사용된 *Saccharomyces cerevisiae*는 항산화 방어계에서 중요한 역할을 하는 물질을 생산하는데, 그 함량이 pH 6에서 최대치를 나타냈다는 선행 연구결과[23]와 유사하게 NF군에 비해 F/3군에서 항산화 활성 및 생리활성물질 함량이 증가했을 것으로 기대된다.

TLC (Thin-layer chromatography)

Malto-oligosaccharides 표준 물질 G1~G7 (G1, Glucose; G2, Maltose; G3, Maltotriose; G4, Maltotetraose; G5, Malto-

Table 1. Change of total soluble solids and pH in aqueous extract of *Angelica gigas* fermented using *Saccharomyces cerevisiae*

Composition	Total soluble solids (°Brix)	pH
<i>Angelica gigas</i> NF	1.00±0.00 ^a	5.18±0.00 ^a
<i>Angelica gigas</i> F/0	1.50±0.02 ^b	4.90±0.02 ^b
<i>Angelica gigas</i> F/3	0.90±0.01 ^a	6.22±0.01 ^c

Values are mean ± S.E, n=3.

Values with different letters are significantly different at p<0.05.

NF: *Angelica gigas*

F/0: *Angelica gigas* with *Saccharomyces cerevisiae* for 0 day

F/3: *Angelica gigas* fermented by *Saccharomyces cerevisiae* for 3 day

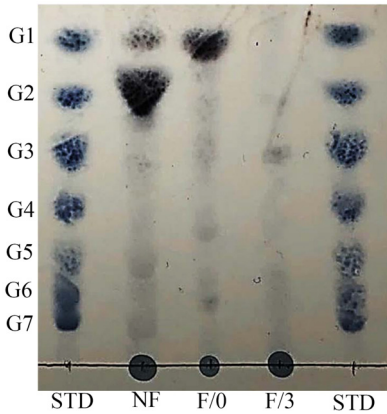


Fig. 1. In aqueous extract of *Angelica gigas* fermented using *Saccharomyces cerevisiae* were chromatographed on thin-layer chromatography. Abbreviations are the same as in Table 1. STD: Standard, malto-oligosaccharides (G1~G7). Substrates: G1, Glucose; G2, Maltose; G3, Maltotriose G4, Maltotetraose G5, Maltopentaose G6, Maltohexaose G7: Maltohepaose.

pentaose; G6, Maltohexaose; G7: Maltohepaose)를 기준으로 참당귀 및 발효참당귀 분말 10% 수용액 추출물을 TLC plate에 전개시킨 결과는 Fig. 1과 같다. NF군에서 진한 spot을 보인 maltose (G2)가 발효 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*가 첨가됨에 따라 F/0군에서 glucose (G1)으로 대부분 저분자의 당 형태로 분해되었으며 발효 3일 차부터 단당 위치의 spot 또한 분해되어 없어진 것을 확인하였다. 발효가 진행됨에 따라 maltotriose (G3) 위치의 spot이 일부 생성되어 나타났는데, 이는 *Saccharomyces cerevisiae*이 성장하면서 참당귀분말 내의 다당을 먹이로 사용하며 발효시킴으로써 짧은 사슬의 당이 일부 생성했다고 판단된다. 즉, 참당귀 분말에 발효 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*로 발효시킨 발효 참당귀 분말(F/3군)이 미발효 참당귀 분말(NF군)과 비교했을 때 짧은 사슬의 당 함량을 증가 시킨다는 것을 입증 하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물[10]으로써 flavonoid, catechin, tannin 류로 크게 구분되며, 이 중 플라보노이드는 페닐기 2개가 C3 사슬을 매개하여 결합한 형태로 C6-C3-C6의 탄소 골격 구조로 이루어져있다. Flavanol, flavanone, isoflavone, anthocyanidin가 속하는 천연 항산화제인 플라보노이드는 폴리페놀류에 포함된다[20].

본 실험에서 사용한 참당귀 및 발효참당귀 수용성 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 참당귀 및 발효참당귀 수용성 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 각각 NF군에서 67.66 mg/100 g, F/0군에서 60.71 mg/100 g에 비해 F/3군에서 93.61 mg/100 g으로 발효에 의해 수치가 증가하였다. 또한 총 flavonoid 함량은 NF군에서 8.43

Table 2. The concentration of total phenolic compounds and total flavonoids compounds in aqueous extract of *Angelica gigas* fermented using *Saccharomyces cerevisiae*

Composition		Total phenolic compounds concentration (mg/100 g)	Flavonoids concentration (mg/100 g)
<i>Angelica gigas</i>	NF	67.66±3.61 ^a	8.43±0.13 ^a
	F/0	60.71±1.64 ^b	6.53±0.88 ^b
	F/3	93.61±4.86 ^c	9.46±0.35 ^c

Values are mean ± S.E, n=3.

Values with different letters are significantly different at *p*<0.05. Abbreviations are the same as in Table 1.

mg/100 g, F/0군에서 6.53 mg/100 g이었던 것이 발효 후 F/3군에서 9.46 mg/100 g으로 증가하여 발효 참당귀 수용성 추출물의 항산화 활성 증가는 발효에 의해 총 폴리페놀 화합물 및 총 flavonoid 함량 증가에 기인하는 것을 시사하였다.

미네랄 함량

참당귀 및 발효참당귀 분말의 미네랄 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 미네랄 성분 조성 비율 측정결과, 전반적으로 NF, F/0 및 F/3군 순으로 K가 각각 2.67, 2.61 및 3.51 ppm으로 F/3군에서 가장 많은 함유량을 보였으며, 다음으로 Ca이 각각 0.77, 0.76 및 0.89 ppm으로 함유되어 있었다. Fe는 각각 0.43, 0.59 및 0.56 ppm, Zn은 각각 0.40, 0.32 및 0.35 ppm, Mn는 각각 0.39, 0.38 및 0.49 ppm, Mg은 각각 0.29, 0.29 및 0.37 ppm, 마지막으로 Na가 각각 0.16, 0.22 및 0.29 ppm 함유되어 있었다. 국내산 참당귀분말의 미네랄 성분 비율은 K가 가장 많이 함유되어 있다고 보고되며[4], 본 연구결과에서도 유사하게 참당귀분말에 비해 발효참당귀분말의 미네랄 중에 K와 Ca의 함량이 다른 미네랄에 비해 많이 함유되어 있으며, 발효함으로써 함량 또한 증가하는 경향을 보였다.

이상과 같이 당귀에 함유된 K, Ca, Fe, Zn 등은 필수 미네랄 성분으로 영양적인 측면에서도 매우 중요 하며[7], 피부과학

Table 3. Mineral concentrations of *Angelica gigas* fermented using *Saccharomyces cerevisiae*

Composition	<i>Angelica gigas</i>		
	NF	F/0	F/3
K	2.67±0.08 ^a	2.61±0.09 ^b	3.51±0.09 ^c
Ca	0.77±0.05 ^a	0.76±0.02 ^a	0.89±0.07 ^b
Fe	0.43±0.01 ^a	0.59±0.01 ^b	0.56±0.04 ^c
Zn	0.40±0.02 ^a	0.32±0.04 ^b	0.35±0.04 ^c
Mn	0.39±0.01 ^a	0.38±0.03 ^a	0.49±0.03 ^b
Mg	0.29±0.03 ^a	0.29±0.03 ^a	0.37±0.04 ^b
Na	0.16±0.04 ^a	0.22±0.03 ^b	0.29±0.05 ^c

Values are mean ± S.E, n=3.

Values with different letters are significantly different at *p*<0.05. Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 4. Solvent gradient condition for HPLC analysis

Time (min)	Flow rate (ml/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	1.0	50	50
10	1.0	50	50
11	1.0	70	30
31	1.0	70	30
32	1.0	100	0
42	1.0	100	0
43	1.0	0	100
53	1.0	0	100
54	1.0	50	50
70	1.0	50	50

측면에서도 밸런스 유지 및 항산화 활성을 가지는 중요한 요인으로 작용함으로 기능성 소재로서의 가치를 한층 더 높일 것으로 사료된다.

Decursin 및 decursinol angelate 함량

당귀의 주요 약리적 성분으로 decursin과 decursinol angelate이 잘 알려져 있으며[13], 이에 본 연구에서도 참당귀 뿌리에 탄수화물(68.75%)이 많이 함유[28, 24]된 점을 감안하여 당질 분해력이 높은 발효 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하여 발효시킴으로써 decursin과 decursinol angelate의 함량이 증가될 수 있을 가능성에 대하여 검토하였다. 본 실험에서 참당귀 뿌리의 decursin과 decursinol angelate 분석한 결과 각각 17.18분 및 17.51분대에 peak가 나타났으며(Table 4), 이들의 함량은 NF군에서 각각 270.85 ppm 및 276.11 ppm, F/0군에서 각각 288.30 ppm 및 302.62 ppm, F/3군에서 각각 369.53 ppm 및 398.03 ppm 로서 발효 3일 후인 F/3군에서 decursin과 decursinol angelate이 가장 많이 함유되어 있었다. 참당귀 주요성분 중 decursin [31]은 면역기능 활성화, 항염, 항산화 및 항암[17] 등에 효과가 있다고 보고되며, 본 연구에서 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 발효 참당귀 추출물에서 decursin 함량이 증가한 경향을 보아 체내에 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다.

Table 5. Content analysis by HPLC chromatogram of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* fermented using *Saccharomyces cerevisiae*

Strain	Name	RT	Area (%)	Height	Amount (ppm)
NF	Decursin	17.180	8386522	649528	270.856
	Decursinol angelate	17.513	8720421	515035	276.117
F/0	Decursin	17.169	9108256	712636	288.306
	Decursinol angelate	17.500	9552622	563264	302.624
F/3	Decursin	17.185	11593135	899058	369.531
	Decursinol angelate	17.517	12459208	709015	398.032

RT : Retention time.

Abbreviations are the same as in Table 1.

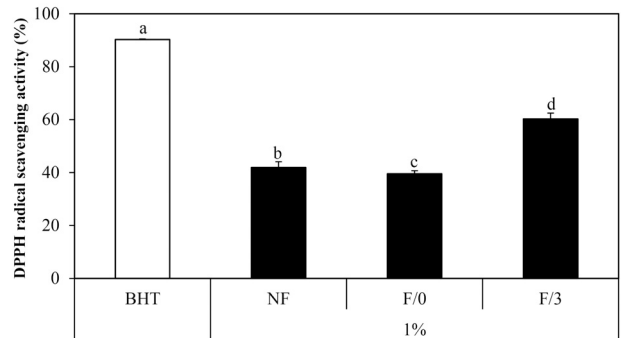


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities in aqueous extract of *Angelica gigas* fermented using *Saccharomyces cerevisiae*. BHT: butylated hydroxytoluene (0.05%). Values are mean \pm S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations are the same as in Table 1.

DPPH free radical에 의한 전자공여활성

DPPH는 비교적 안정한 유리 라디칼로써, 천연 항산화제인 ascorbic acid, tocopherol 및 방향족 아민류에 의해 환원반응이 일어나 보라색이 노랗게 탈색되는 정도를 측정하여 항산화 활성을 판단한다[1]. 참당귀 및 발효 참당귀 수용성 추출물의 DPPH radical 소거정도에 의한 항산화 활성은 Fig. 2에 나타내었다. 양성 대조구로 사용된 시판 합성 항산화제인 BHT 0.05% 처리에 의해 90.26%로 높은 활성을 보였다. 참당귀 및 발효 참당귀 수용성 1% 추출물의 항산화 활성은 NF군에서 41.89%, F/0군에서 39.51%로 유의적인 차이를 보이지 않았으나 발효가 진행됨에 따라 F/3군에서 60.26%으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 총 폴리페놀 화합물 및 flavonoid가 항산화 활성에 영향을 미친다는 연구결과를 토대로 판단했을 때, 이전의 실험결과로 증가한 총 폴리페놀 화합물 및 flavonoid 함량이 항산화 활성에 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료된다[27].

Tyrosinase 저해 활성

Melanin은 머리카락, 피부 등 여러 부위에 존재하고, 인간

을 포함한 생물체[9]에 널리 분포되어 있는 색소 성분이다. 주로 표피층의 melanocyte라는 색소세포 내의 melanosome에서 합성되는데, tyrosine이 tyrosinase 효소에 의해 DOPA (3,4-dihydroxy-phenylalanine) 및 DOPA quinone으로 산화된 후 일련의 과정을 거쳐 구성아미노산 간의 중합 반응으로 합성된다[32]. 이때 생성된 melanin은 피부의 색을 검게하는 특징을 갖고 있으며, 이에 따라 tyrosinase의 활성을 저해하는 정도를 측정하는 실험이 미백효과를 증명하는 효과적인 방법으로 주목받고 있다[14].

본 실험에서는 대조구로 사용한 albutin 500 μM에서 약 60%의 저해효과를 나타낸 반면 참당귀 및 발효참당귀 수용성 1% 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 NF군에서 9.13%, F/0군에서 13.46%, F/3군에서 25.48%로 발효가 진행됨에 따라 비발효군보다 활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 참당귀 자체에 tyrosinase 저해활성을 내는 물질이 비교적 적은 수치를 보였으나, 발효가 진행됨에 따라 약 2.5배 증가한 수치를 확인하였으므로, 발효 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* 와의 시너지 상승효과로, 미백활성의 유효성분이 유리 되어 나타나는 것이라 사료된다. 당귀는 한방 생약재로써 많이 사용되고 있으며, 참당귀 수용성 추출물은 자체 미백 효과가 있는 것으로 알려져 있다[26]. 이를 발효 함으로써 tyrosinase 저해활성이 증가하였고, 참당귀를 이용하여 향후 미백제 화장품 원료로 사용될 때에 발효과정을 거치는 것이 좋을 것으로 보고된 연구[3]와 유사한 결과를 나타내었다. 이를 통해, 참당귀를 미백제 원료로 사용 시 발효를 통해 미백 효과를 증진시키는 것이 효율적이라 판단된다.

Lipoxygenase 저해 활성

Lipoxygenase는 정상적인 세포에서는 발현이 미비하지만, 염증이 유발되면 leukotrienes 물질의 증가로 인해 활성을 나타내는 것으로 보고된다[16]. 발효 균주인 *Saccharomyces cer-*

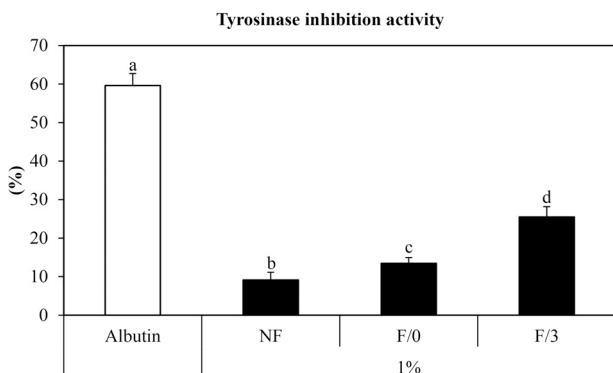


Fig. 3. Inhibition activity of tyrosinase in aqueous extract of *Angelica gigas* fermented using *Saccharomyces cerevisiae*. Albutin: 0.05%. Values are mean ± S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at p<0.05. Abbreviations are the same as in Table 1.

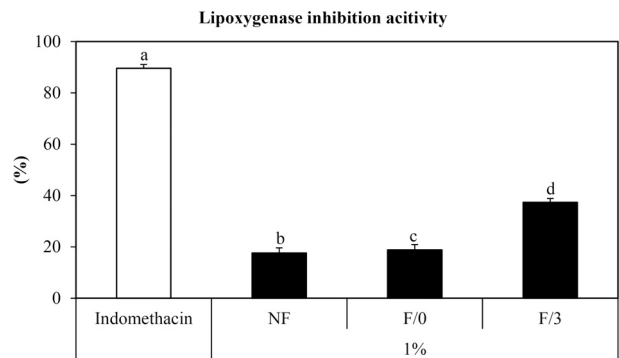


Fig. 4. Inhibition activity of lipoxygenase in aqueous extract of *Angelica gigas* fermented using *Saccharomyces cerevisiae*. Indomethacin: 0.05%. Values are mean ± S.E., n=3. Values with different letters are significantly different at p<0.05. Abbreviations are the same as in Table 1.

*ovisae*에 의해 발효한 참당귀 수용성 1% 추출물의 lipoxygenase 저해 활성을 비교 검토한 수치는 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과 양성 대조군인 indomethacin 0.05% 처리에 의해 lipoxygenase 저해 활성은 89.58%로 높은 수치를 나타냈으며, NF 군에서 17.62%, F/0군에서 18.83%으로 미비한 수치를 나타낸 데 반해, 발효 진행 후 F/3군에서 37.35%로 약 2배에 높은 수치를 보였다. 따라서 한방 생약재 유래 항염증 기능성 화장품 소재개발은 추출물 단독사용보다는 미생물 또는 균사체로 발효시켜 사용함으로써 세포 독성 경감, lipoxygenase 활성 저해, 멜라닌 생합성 억제 작용과 같은 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 결과물은 (주)오케이바이오랩 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

- Ahn, H. Y., Cha, J. Y., Jeong, Y. K. and Cho, Y. S. 2013. Antioxidative activity and chemical characteristics of cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* JLM0636 Powder. *J. Life Sci.* **23**, 249-258.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
- Cha, J. Y., Yang, H. J., Jeong, J. J., Seo, W. S., Park, J. S., Ok, M. and Cho, Y. S. 2010. Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J. Life Sci.* **20**, 940-947.
- Cha, J. Y., Kim, H. W., Heo, J. S., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Heo, S. J. and Cho, Y. S. 2010. Ingredients analysis and biological activity of fermented *Angelica gigas* Nakai by mold. *J. Life Sci.* **20**, 1385-1393.
- Chae, G. Y., Kwon, R. H., Jang, M. W., Kim, M. J. and Ha,

- B. J. 2011. Whitening and antioxidative effect of rice bran fermented by *Bacillus subtilis*. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **37**, 153-159.
6. Cho, S. H., Choi, Y. J., Rho, C. W., Choi, C. Y., Kim, D. S. and Cho, S. H. 2008. Reactive oxygen species and cytotoxicity of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) sap. *Kor. J. Food Preserv.* **15**, 105-110.
7. Ding, J. L., Lim, I. J., Lee, H. D. and Cha, W. S. 2006. Analysis of minerals, amino acids, and vitamin of *Lespedeza cuneata*. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 414-417.
8. Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **1**, 1-42.
9. Han, J. S. and Yi, D. H. 2012. Effects of pine needles fermentation extracts on antioxidant activity and inhibition of melanin synthesis. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **10**, 619-624.
10. Heo, J. S., Cha, J. Y., Kim, H. W., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Heo, S. J. and Cho, Y. S. 2010. Bioactive materials and biological activity in the extracts of leaf, stem mixture and root from *Angelica gigas* Nakai. *J. Life Sci.* **20**, 750-759.
11. Horwitz, W. 1975. Official methods of analysis (Vol. 222). Washington, DC: J. Assoc. Offic. Anal. Chem.
12. Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
13. Jung, O. and Lee, S. S. 2013. Preparation of dye sensitized solar cell using coumarin dyes extracted from plants. *Kor. Chem. Eng. Res.* **51**, 157-161.
14. Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J. and Han, D. S. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 891-896.
15. Kang, S. A., Jang, K. H., Lee, J. E., Ahn, D. K. and Park, S. K. 2003. Differences of hematopoietic effects of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* extract on cyclophosphamide-induced anemic rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**, 1204-1208.
16. Kwon, E. S., Kim, I. R. and Kwon, H. J. 2007. Inhibitory effects on the enzymes involved in the inflammation by the ethanol extracts of plant foodstuffs. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 348-352.
17. Lee, S. H., Lee, S. H., Jin, M., Hong, C. O., Hur, M., Han, J. W., Lee, W. M., Yun, H. M., Kim, Y. B., Lee, Y. and Koo, S. C. 2019. Analysis of index component content and antioxidant activity according to the root diameter of *Angelica gigas* Nakai. *Kor. J. Plant Res.* **32**, 116-123.
18. Lee, J. J., Kim, A. R., Seo, Y. N. and Lee, M. Y. 2009. Comparison of physicochemical composition of three species of genus *Angelica*. *Kor. J. Food Preserv.* **16**, 94-100.
19. Lee, S., Kim, W. G., Kim, E., Ryoo, I. J., Lee, H. K., Kim, J. N., Jung, S. H. and Yoo, I. D. 2005. Synthesis and melanin biosynthesis inhibitory activity of (+/-)-terrein produced by *Penicillium* sp. 20135. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 471-473.
20. Oh, M. H. and Yoon, K. Y. 2017. Biological activity of crude polyphenol fractions of *Cedrela sinensis* isolated using different extraction methods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **49**, 438-443.
21. Oh, S. J. and Mo, J. H. 2011. A comparative study on bioactivity of dried and fermented *Salicornia herbacea* extracts as cosmetics materials. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **9**, 305-312.
22. Park, J. H. and Kim, J. D. 2012. Study on awareness and purchase behavior of fermented cosmetics. *J. Kor. Soc. Cosmet. Cosmetol.* **2**, 183-195.
23. Park, J. C., Ok, M., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2003. Isolation and identification of the high-glutathione producing *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 from Korean traditional rice wine and optimal producing conditions. *Appl. Biol. Chem.* **46**, 348-352.
24. Park, K. W., Choi, S. R., Shon, M. E., Jeong, I. Y., Kang, K. S., Lee, S. T., Shim, K. H. and Seo, K. I. 2007. Cytotoxic effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in human cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1385-1390.
25. Park, M. J., Kang, S. J. and Kim, A. J. 2009. Hypoglycemic effect of *Angelica gigas* Nakai extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **22**, 246-251.
26. Park, S. K., Hong, S. K., Kim, H. J., Kim, B. Y., Kim, T. G., Kang, J. S. and Kim, D. U. 2009. Cosmetic effect of *Angelica gigas* Nakai root extracts. *Kor. Chem. Eng. Res.* **47**, 553-557.
27. Sim, S. Y., Jang, S. H., Ahn, H. Y., Cho, H. D., Seo, K. I. and Cho, Y. S. 2019. Optimization of fermentation conditions *Protactia brevitarsis seulensis* larvae using *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Food Preserv.* **26**, 123-133.
28. Son, J. W., Kim, H. J. and Oh, D. K. 2008. Ginsenoside Rd production from the major ginsenoside Rb(1) by beta-glucosidase from *Thermus caldophilus*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 713-716.
29. Swain, T. and Hillis, W. E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 63-68.
30. Um, J. N., Min, J. W., Joo, K. S. and Kang, H. C. 2017. Antioxidant, anti-wrinkle activity and whitening effect of fermented mixture extracts of *Angelica gigas*, *Paeonia lactiflora*, *Rehmannia chinensis* and *Cnidium officinale*. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **25**, 152-159.
31. Um, Y. R., Lee, J. H. and Ma, J. Y. 2010. Quantitative analysis of marker substances in solid fermented *Angelicae Gigantis radix* by HPLC. *Kor. J. Ori. Med.* **16**, 173-1780.
32. 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**, 721-725.

초록 : 유용 효모균주를 이용한 발효참당귀분말 추출물의 이화학적 특성 및 생리활성 효과심소연¹ · 박우상¹ · 신현승¹ · 옥민² · 조영수¹ · 안희영^{1*}(¹동아대학교 생명공학과, ²주오케이바이오랩)

본 연구는 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 발효한 참당귀 분말을 수용성 용매에 추출하여 이화학적 특성 및 생리활성을 비교 검토하였다. 당도 및 pH를 확인한 결과, NF군 1 °Brix에 비해 F/3군 0.9 °Brix로 발효가 됨에 따라 당도가 감소하는 경향을 보였다. 한편, F/3군의 pH는 NF군 및 F/0군에 비해서 높은 수치를 나타냈다. Thin-layer chromatography 실험결과, F/3군이 NF군에 비해 대부분 저분자의 당 형태로 분해된 것을 확인하였다. 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량은 참당귀 분말 추출물에 비해 발효 참당귀 분말 추출물에서 전반적으로 함량이 증가하였다. 미네랄 중 K 및 Ca 함량은 F/3군, F/0군 및 NF군 순으로 증가하는 경향을 보였다. Decursin 및 decursinol angelate 함량은 NF군보다 F/3군에서 더 높은 함량을 나타냈다. 참당귀 및 발효 참당귀 수용성 추출물의 항산화 활성은 NF군 41.89%, F/0군 39.51%, F/3군에서 60.26%으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 미백 및 항염증 효능 실험결과, 참당귀 분말 추출물에 비해 발효 참당귀 분말 추출물에서 효능이 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 한방 생약재 중 참당귀를 유용 미생물로 발효시켜 사용함으로써 항산화능, 생리활성물질, 미백효능 및 항염증 효과에서 긍정적인 결과를 나타내어 향후 화장품 개발을 위한 소재로써 기대할 수 있을 것으로 사료된다.