

Increased Anti-oxidative Activity and Whitening Effects of a *Saposhnikovia* Extract Following Bioconversion Fermentation using *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33

Byung-Hyuk Kim¹, Jong-Ok Jang², Jun-Hyeong Lee^{1,2}, YeEun 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, BHN BIO Co., LTD., Gyeongbuk 36729, Korea

²Departments of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Gyeongbuk 36729, Korea

Received February 26, 2019 / Revised October 10, 2019 / Accepted November 11, 2019

Saposhnikovia has been used as a traditional medicinal herb in Asia because of the reported anti-inflammatory, anti-allergic rhinitis, pro-whitening, anti-atopy, anti-allergy, and anti-dermatopathy effects of the phytochemical compounds it contains. In this study, we investigated the antioxidant effects of a *Saposhnikovia* extract after fermentation by *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33. *Saposhnikovia* powder was inoculated with *L. plantarum* BHN-LAB 33 and fermented at 37°C for 72 hr. After fermentation, the total polyphenol content of the *Saposhnikovia* extract increased by about 14%, and the total flavonoid content increased by about 9%. The superoxide dismutase-like activities, DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, reducing power activity, and tyrosinase inhibition activity also increased after fermentation by approximately 70%, 80%, 45%, 39%, and 44%, respectively. The results confirmed that fermentation of a *Saposhnikovia* extract by *L. plantarum* BHN-LAB 33 is an effective way to increase the antioxidant effects of the extract. The bioconversion process investigated in this study may have the potential to produce phytochemical-enriched natural antioxidant agents with high added value from *Saposhnikovia* matrices. These results can also be applied to the development of improved foods and cosmetic materials.

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

서 론

최근 전세계적인 고령화 사회와 더불어 건강에 대한 욕구와 관심이 지속적으로 증가하고 있다. 특히, 건강한 삶을 위한 제품에 관한 산업이 지속적으로 성장하고 있어 항노화 및 항산화 관련 분야의 수요 또한 꾸준히 증가하고 있다[15]. 또한, 산업화에 따른 다양한 화학물의 사용은 인체에 대한 화학물의 노출과 최종 생성물 등이 인간과 생태계에 부정적인 영향이 끼친다고 보고되었다[33]. 고도화된 현대사회에서 과도한 스트레스와 높은 환경 호르몬 노출 빈도로 인해 활성 산소종을 억제하기 위해 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tertiary butylhydroquinone (TBHQ), propyl gallate (PG) 등의 합성 항산화제를 사용하여 왔으나, 많은 연구결과에 의하면 합성 항산화제는 암, 돌연변이 등의 부작용을 나타낸다고 보고되고 있어, 최근 이러한 합성 항산

화제를 대체할 수 있는 천연 항산화제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다[27].

생물전환(Bioconversion)은 미생물 및 효소를 이용한 발효 공정으로 전구물질로부터 기능성 물질을 생산, 제조하는 기술을 일컫는다. 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[17].

한국에서 유산균 발효는 매우 친근한 발효 식품 제조법으로 식품, 사료, 미생물 유래 효소제, 향생제, 향균제 및 생물농약 등 다양한 분야에서 활용되고 있다. 유산균 발효식품은 특유의 풍미 및 보존성을 부여하고 유당 불내증 완화작용, 정장작용, 병원성균에 대한 항균작용, 콜레스테롤 저하작용, 항암작용, 면역 조절작용이 보고되었다. 최근, 유산균은 건강 증진 및 질병 예방의 특징을 가지는 probiotics 군주로 연구와 활용이 증가하고 있다[2, 26].

방풍(防風, *Saposhnikovia divaricata* Schischek)은 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본으로 동양의학에서 어지럼증, 통풍, 항알레르기 질환, 다양한 피부질환, 관절염 및 항염작용 등에 사용되어 왔으며, 항산화 활성과 미백효과가 뛰어나다고 보고되었다[23].

*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 한국 전통발효식품에서 새롭게 분리된 유산균을 통한 생물전환을 통해 천연물이 가지고 있는 기능성 활성을 증가시키고자 하였다. 이를 위해 발효산물로부터 추출된 추출물의 항산화 활성 변화와 미백활성의 변화를 조사하여, 생물전환공정의 활용방안에 대해 기술하고자 한다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용한 방풍은 경북 영덕에서 채취하여 제품화된 것을 구입하여 연구에 사용하였다. 추출 및 발효를 위해 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 0.5 cm mesh로 분리한 후 생물전환에 이용하였다.

발효 유산균 분리와 동정

본 연구에 사용된 미생물은 전통발효식품인 배추김치를 안동시장에서 구매하여 분리 및 동정한 후 연구에 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/ μ l 이상, 순도는 1.8~2.0으로 본 연구를 수행하기에 적합하였다. 16S rRNA gene 분석을 위한 유전자 증폭 primer는 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')을 사용하였다[6]. PCR 반응은 50 μ l 반응액에 10 \times PCR buffer, 20 mM MgCl₂, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 μ M), template DNA와 0.5 U Taq polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다. 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5 min 동안 DNA를 pre-denaturation시켜, 94 $^{\circ}$ C에서 1 min denaturation, 65 $^{\circ}$ C에서 1 min annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1 min 30 sec extension하고 72 $^{\circ}$ C에서 5 min 동안 final extension을 수행하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel에 loading한 후 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)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다. 또한, Phylogenetic tree는 ClusterX를 이용하여 미생물 간 상동성을 분석하고, MEGA 5.0의 neighbor-joining method를 이용하여 유전적 계통분류를 분석하였다[31].

유산균 발효 방법

유산균은 MRS 배지(Difco Laboratories Inc., St. Detroit, MI, USA)에서 배양하였으며, 유산균 배양액을 5%(v/v) 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 또한, 방풍분쇄물 200 g에 유산균 배양액을 75 ml 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 3일간 정치배양하였다.

발효 미생물 정량분석

발효시간에 따른 미생물의 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 이용하였으며, *L. plantarum* BHN-LAB 33의 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 (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[4], 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15 min 동안 pre-denaturation 시켜, 95 $^{\circ}$ C에서 30 sec denaturation, 67 $^{\circ}$ C에서 30 sec annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30 sec extension후 fluorescence를 측정하고 45 cycles을 수행하였다. 그리고 final extension은 72 $^{\circ}$ C에서 5 min 동안 수행하였다. Melting curve 분석은 65 $^{\circ}$ C부터 95 $^{\circ}$ C까지 0.2 $^{\circ}$ C씩 증가시키면서 fluorescence를 측정하였다[11]. 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/ μ l를 분석에 이용하였다[11].

방풍 추출물 조건

발효하지 않은 방풍과 유산균에 의해 발효된 방풍은 각각 200 g에 70% 에탄올 1 l를 이용하여 70 $^{\circ}$ C에서 3시간 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 10.2%와 11.9% 회수하여 본 실험에 사용하였다.

HPLC 분석

유산균을 이용한 방풍의 발효를 확인하기 위해 HPLC (1260 Infinity II LC system, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 분석을 수행하였다. 시료분석은 Agilent Eclips plus C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm, Agilent Technologies)를 이용하였으며, 컬럼온도는 30°C를 설정하였고, 이동상은 acetonitrile:methanol : DW (0.3:0.2:0.5)를 이용하고, 유속은 1 ml/min으로 분석하며, 205 nm, 254 nm, 260 nm, 270 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다[12].

총 폴리페놀 함량의 측정

발효 전·후 추출물은 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 각 시험 물질 10 μl를 취하여 10% Sodium carbonate (Na₂CO₃) 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(μg/ml)을 계산하였다[30].

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 μl를 취하여 70% ethanol 80 μl, 5% Sodium nitrite (NaNO₂) 6 μl와 혼합하여 5분간 상온에서 반응한 후, 10% Aluminum Chloride Hexahydrate (AlCl₃·6H₂O) 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(μg/ml)을 계산하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사 활성 측정은 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하였다[19]. Tris-HCl buffer (50 mM Tris-hydroxymethyl aminomethane 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 μl를 첨가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 활성도는 시험 물질을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율을 백분율로 나타내었다.

DPPH radical 소거활성 측정

추출물의 DPPH radical 소거 활성 측정에는 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 희석

하여 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

방풍 추출물의 ABTS radical 소거능 측정은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate 용액을 혼합하고 24시간 차광 및 정치하여 ABTS 용액을 제조하여 측정하였다[8]. ABTS 용액 970 μl와 추출물 30 μl를 혼합하여 암소에서 30분간 방치한 후, 734 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 소거 활성 측정은 시험 물질을 첨가한 실험 군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율을 백분율로 나타내었다.

Tyrosinase 저해 활성

방풍 추출물의 농도가 다른 시료 10 μl에 mushroom tyrosinase (110 unit/ml) 20 μl와 L-DOPA 170 μl를 첨가하여 잘 혼합한 후, 37°C에서 10분간 반응하였다. L-DOPA 활성 억제체는 UV spectrophotometer를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 양성대조구는 ascorbic acid 500 ppm을 사용하였으며, 음성대조구는 tyrosinase enzyme 대신 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 동량 분주하여 측정하였다[20].

환원력 측정

환원력 측정은 증류수에 희석한 시료 1 ml에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 1 ml와 1% potassium ferricyanide 1 ml을 가해 충분히 혼합한 다음 50°C에서 20분간 반응시켰다. 혼합반응액은 20분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 1.0 ml를 첨가하고 13,000x g에서 5분간 원심분리하고, 상등액 1 ml을 취하고 증류수 1 ml을 첨가한 후 0.1% ferric chloride 0.1 ml을 추가한 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 측정하였다[21].

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's t에 의해 판정하였으며, F값이 0.05 또는 0.01 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

분리 미생물 동정

방풍이 가지고 있는 기능성 성분의 생물전환을 위한 미생물은 한국 전통발효음식인 안동시장에서 구매한 배추김치로부

터 분리하였으며, 생물전환 미생물의 16S rRNA gene의 염기서열을 확인하여 *Lactobacillus plantarum*과 99% similarity를 갖는 것으로 분석되었다(Fig. 1). 또한, 분석된 16S rRNA gene sequence를 이용하여 유전적 계통도를 분석한 결과, Lactobacillaceae에 속하고, *L. amylotrophicus*, *L. faeni*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. gasseri* 등의 species 수준에서 구별되는 것을 확인하고 *L. plantarum* BHN-LAB 33이라 명명하였다.

생물전환 미생물의 성장 곡선

방풍의 생물전환 과정에서 발효시간에 따른 발효배양액 내의 *L. plantarum* BHN-LAB 33의 성장을 Real-time PCR을 이용하여 16S rRNA gene을 확인하였으며, 초기 접종한 후 BHN-LAB 33은 $5.56 \times 10^6 \pm 2.67 \times 10^6$ copy molecules/ml로 확인되었다. 방풍의 발효를 위해 *L. plantarum* BHN-LAB 33을 접종한 후 6, 12, 24, 48, 72, 96시간에 각각 시료를 분석하여, $3.77 \times 10^6 \pm 3.43 \times 10^6$ copy molecules/ml, $7.00 \times 10^7 \pm 2.97 \times 10^6$ copy molecules/ml, $5.90 \times 10^8 \pm 3.83 \times 10^7$ copy molecules/ml, $7.26 \times 10^8 \pm 1.44 \times 10^7$ copy molecules/ml, $7.09 \times 10^8 \pm 3.00 \times 10^7$ copy molecules/ml로 BHN-LAB 33의 성장을 확인하였다(Fig. 2). BHN-LAB 33의 성장은 접종 후 12시까지 매우 낮은 성장으로 lag phase를 확인할 수 있으며, 접종 12시간 이후에 미생물생장이 급격하게 증가하며 exponential phase를 확인하였다. 또한, 접종 48시간 이후 BHN-LAB 33의 성장이 stage 둔화되며 stationary phase가 시작되고, death phase는 확인하지 못했다. 이는, *L. plantarum* BHN-LAB 33의 성장곡선은 일반적인 미생물의 성장곡선을

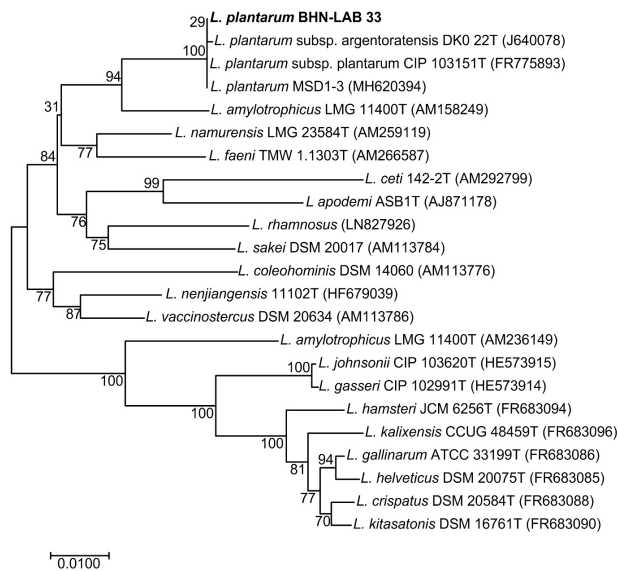


Fig. 1. Phylogenetic tree of the *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33 and related bacteria of the *Lactobacillus* group based on 16S rRNA gene sequence comparisons. The sequences of isolated strains were compared with available from the GenBank database.

나타내고 있으나, MRS 액체배양과 같은 폭발적인 성장을 보이지 않았다. 이는, *L. brevis*와 *Pediococcus pentosaceus*를 이용한 아마씨 고상발효, *L. plantarum*의 엉겅퀴 고상발효과정과 같이 낮은 미생물성장율과 같이 유사한 성장패턴을 확인하였다. 그러나, 생물전환 미생물의 낮은 성장률에도 불구하고, 천연물의 생물전환과 그에 따른 효과가 유효하다는 것이 보고되어 방풍의 생물전환에 따른 효능을 평가하였다[24, 25].

방풍 발효추출물의 물질 분석(HPLC)

HPLC를 이용하여 발효하지 않은 방풍 추출물과 발효한 방풍 추출물의 성분 변화를 확인하였다. 발효 전 방풍 추출물의 주요성분 피크는 2.917, 11.99, 15.593 min에 검출되었으며, 발효 후 방풍 추출물의 주요 피크는 12.201, 14.403 min의 물질이 확인되었다(Fig. 3). 이 물질은 발효 후 방풍 추출물에서 분석되었으며, 이는 미생물 발효로 인해 전환되는 물질일 것으로 추론할 수 있다. 향후, 미생물에 의한 방풍 발효과정에서 생물전환되는 물질, 미생물 대사 및 생물전환에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이와 유사하게, 엉겅퀴의 유산균 생물전환을 통해 항산화능과 미백효과를 증진시킬 수 있으며, 기능성 화장품에서 요구하는 항산화 및 미백효과를 증진시킬 수 있다고 보고되었으며, 미생물 발효는 천연물의 기능성 효과를 증가시킬 수 있는 매우 유용한 기술이라 판단된다[25].

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드

과일, 열매류 및 많은 식물은 폴리페놀류 화합물을 포함하고 있으며, 식물체내에 함유된 분자 내에 다량의 히드록실기(-OH)를 포함하고 있어 항산화 효과, 항암, 콜레스테롤 저해, 정장 작용등의 다양한 생리활성 기능이 보고되었다[14, 15]. 폴리페놀화합물 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소와 단백질 등의 큰 분자들과 수소를 공유하며 결합하기 때문에 활성

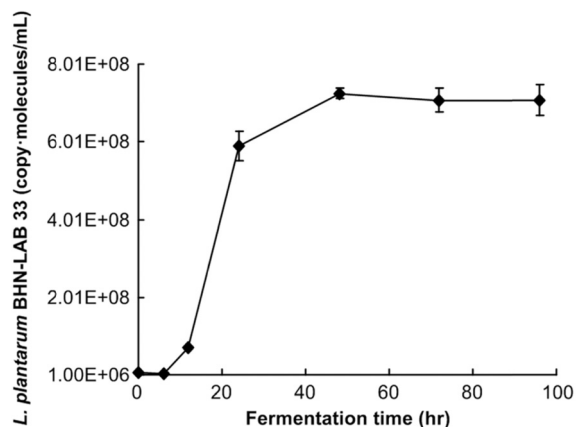


Fig. 2. Quantitative analysis of *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33 in the *Saposhnikovia* fermentation process by the Real-time PCR.

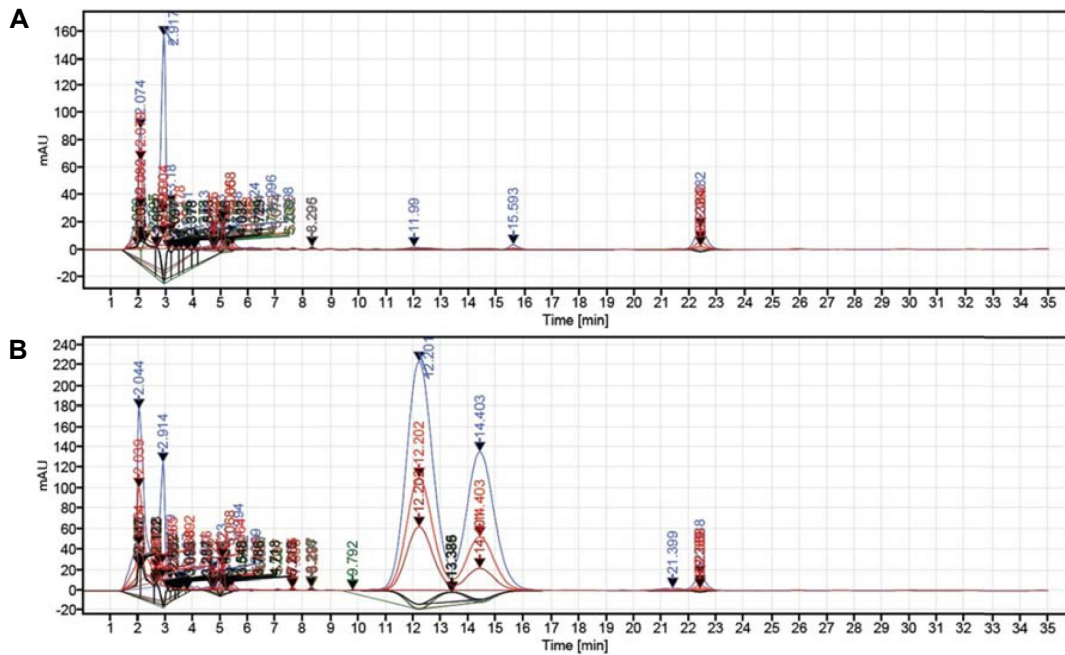


Fig. 3. HPLC analysis of the non-fermented and the fermented *Saposhnikovia* extracts with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33. A; Non-fermented *Saposhnikovia* extracts, B; fermented *Saposhnikovia* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 33.

산소의 효과적인 제거와 산화 및 노화 억제 기능을 하며, 플라보노이드는 폴리페놀계 화합물 중 하나로 항산화 활성과 더불어 다양한 생리활성 기능을 한다고 알려져 있다[24].

방풍의 발효 전과 발효 후 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하여, BHN-LAB 33의 생물전환능을 확인하였다 (Table 1). 총 폴리페놀 함량은 발효하지 않은 방풍 추출물 1,000 ppm은 230.78±2.22 ug/100 g, 500 ppm에는 187.11±2.01 ug/100 g, 250 ppm에는 178.78±1.17 ug/100 g이 포함되어 있는 것으로 분석되었다. 그리고, BHN-LAB 33으로 발효한 방풍 추출물 1,000 ppm, 500 ppm, 250 ppm에 포함된 총 폴리페놀의 함량은 각각 284.56±1.35 ug/100 g, 211.89±1.07 ug/100 g, 188.33±4.23 ug/100 g으로 분석되었다. 또한, 총 플라보노이드 함량은 발효하지 않은 방풍 추출물 1,000 ppm, 500 ppm, 250 ppm내에 각각 142.17±4.01 ug/100 g, 127.33±1.76 ug/100 g, 114.92±3.89 ug/100 g으로 분석되었으며, BHN-

LAB 33으로 발효한 방풍 추출물 1,000 ppm, 500 ppm, 250 ppm에 포함된 총 플라보노이드 함량은 각각 163.00±2.18 ug/100 g, 138.08±1.01 ug/100 g, 121.00±0.87 ug/100 g으로 분석되었다. BHN-LAB 33을 이용한 방풍의 생물전환 과정을 통해 총 폴리페놀은 약 14%, 총 플라보노이드 함량은 약 9% 정도 발효를 통해 증가되는 것을 확인하였다. 플라보노이드는 폴리페놀류의 일종이지만, 플라보노이드 함량의 증가와 폴리페놀의 증가 경향이 다른 것은, 플라보노이드 외에 다른 폴리페놀 성분의 변화가 총 폴리페놀 함량의 증가에 영향을 미칠 수 있다고 보고되어, 이와 같은 원인으로 인해 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 다른 증가분을 보이는 것으로 판단된다[15]. 또한, *L. paracasei*와 *L. plantarum*를 이용한 대마씨 발효에서 총 폴리페놀은 각각 11%와 34%로 증가되고, 총 폴리페놀의 증가는 미생물의 생물전환과정을 통해 증가되었다[24, 25, 34]. 본 연구에서 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 증가는 BHN-

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of extracts from the fermented *Saposhnikovia* extract with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33

	Total polyphenol contents (ug/100 g)		Total flavonoid contents (ug/100 g)	
	Before fermentation	After fermentation	Before fermentation	After fermentation
250 ppm	178.78±1.17	188.33±4.23 ¹⁾	114.92±3.89	121.00±0.87
500 ppm	187.11±2.01	211.89±1.07**	127.33±1.76	138.08±1.01**
1,000 ppm	230.78±2.22	284.56±1.35**	142.17±4.01	163.00±2.18*

Total polyphenol contents (ug/100 g) of the fermented *Saposhnikovia* based on gallic acid as standard. NF; Non-fermented *Saposhnikovia* extract, F; fermented *Saposhnikovia* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 33.

¹⁾Value are means±standard deviation of triplicate determinations. *, p<0.05, **, p<0.01.

LAB 33의 대사과정을 통한 생물전환을 통해 이루어졌을 것이라 판단 할 수 있다.

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

활성산소의 발생으로 인한 산화성 스트레스는 호흡을 통해 세포 에너지를 확보하는 모든 생체에서 필연적으로 야기되는 생물학적 스트레스이다. 그러나 외부 자극등에 의해 유발되는 과도한 산화성 스트레스는 생체의 원활한 대사에 큰 장애요인으로 작용하며, 특히 조절 범위 이상의 활성 산소들은 세포내 주요 물질인 핵산 및 단백질의 구조 변성과 기능 손실 등을 야기시킴으로써 노화촉진, 질병저항성 감소, 생식 능력 저하 등 많은 생리학적 장애를 유발시킨다[22]. 따라서 생체는 이러한 산화성 스트레스로부터 자신을 방어하기 위해 다양한 항산화계를 구축하고 있으며 이중 활성산소를 직접적으로 제거하기 위해 항산화효소들을 발현시킴으로써 생체방어의 기능을 담당하고 있다[29].

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[10, 24]. 따라서 이 실험에서는 생체 항산화 방어기전 중 효소적 방어기전의 하나로 superoxide radical을 환원시켜서 산화와 노화로부터 보호하는 SOD 유사활성 측정을 pyrogallol의 자동 산화반응을 이용하여 superoxide anion radical 소거 여부를 조사하였다. 발효하지 않은 방풍 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 12.9±1.8%, 20.4±1.9%, 30.5±3.4%의 SOD 유사활성을 보였으며, BHN-LAB 33으로 발효한 방풍 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 23.0±2.9%, 33.4±2.7%, 51.8±2.4%의 SOD 유사활성을 보이며 평균 70.7% 증가된 활성을 보였다(Fig. 4A). 발효 방풍 추출물 500 ppm에서 SOD 유사활성은 양성대조군인 vitamin C 500 ppm보다는 약 50%정도

의 SOD 유사활성이 낮게 나타났지만, 생물전환과정을 통한 발효추출물은 발효하지 않은 방풍 추출물에 비교해 유의적 수준에서 증가된 것을 확인할 수 있다.

DPPH radical 소거활성능 측정

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[24]. 발효하지 않은 방풍 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 23.89±0.94%, 29.18±1.83%, 36.38±2.99%의 DPPH radical 소거활성능을 보였으며, BHN-LAB 33으로 발효한 방풍 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 31.71±2.35%, 59.56±2.49%, 83.16±4.12%의 DPPH radical 소거활성능을 보이며 생물전환을 통해 DPPH radical 소거활성능 평균 증가율은 약 28% 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 현재, 생물전환을 통한 생리활성의 증가에 대한 많은 연구들이 보고되고 있는 실정이다. 멸균된 비지를 *Saccharomyces cerevisiae*와 함께 배양한 후 DPPH radical 소거활성능 약 67% 증가되는 것을 확인하였으며, 유산균을 이용한 연씨(lotus seed)의 생물전환으로 약 85% 증가되는 것이 보고되었다[18, 28]. 이들의 연구결과와 같이 본 연구에서도 *L. plantarum* BHN-LAB 33을 이용한 발효추출물 효능은 약 28% 증가되었으며, 발효전 효능대비 약 88%나 높은 증가율을 확인하였으며, 생물전환은 생리활성효능의 증가시키기위한 매우 우수한 공법 중 하나인 것을 확인할 수 있다.

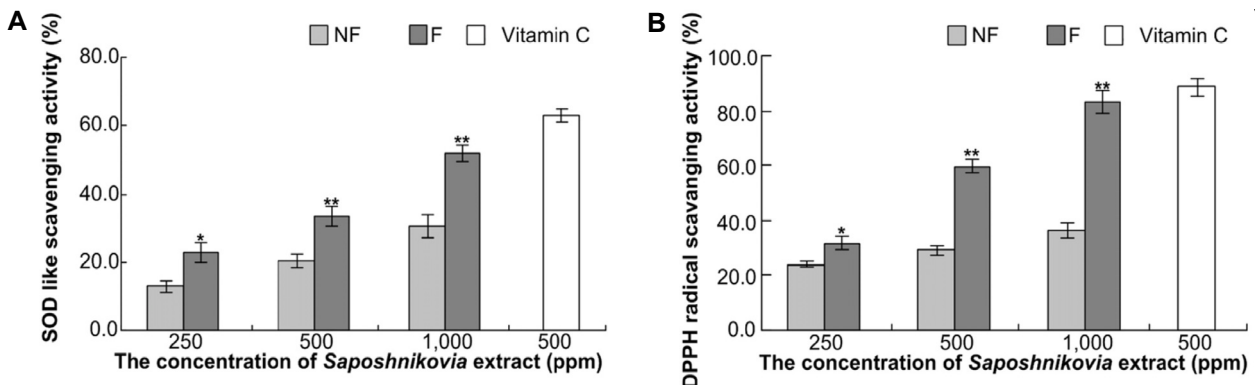


Fig. 4. Superoxide dismutase like activity (A) & DPPH radical scavenging activity (B) of extracts from the fermented *Saposhnikovia* extracts with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33. NF; Non-fermented *Saposhnikovia* extracts, F; fermented *Saposhnikovia* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 33. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

ABTS radical 소거활성능 측정

ABTS radical 소거활성은 24시간 동안 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 양이온 radical 항산화 물질에 의해 제거되어 radical의 색인 청록색이 무색으로 탈색되는 원리를 이용함으로써 추출물의 항산화 활성을 상대적으로 측정하는 방법이다. DPPH radical 소거활성능은 유리radical이 제거되는 것을 이용하는 반면, ABTS radical 소거능은 양이온 radical이 제거되는 것을 이용한다[16]. 발효하지 않은 방풍 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm의 ABTS radical 소거활성능은 각각 $27.31 \pm 1.9\%$, $35.63 \pm 2.05\%$, $42.61 \pm 2.09\%$ 의 ABTS radical 소거활성능을 보였으며, BHN-LAB 33으로 발효한 방풍 추출물 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm의 ABTS radical 소거활성능은 각각 $36.57 \pm 3.67\%$, $48.58 \pm 2.54\%$, $70.43 \pm 2.84\%$ 의 ABTS radical 소거활성능은 평균 약 16.68% 증가하였는데, 이는 발효전에 비해 약 45% 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 5A). 생물전환에 관한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있는 분야이며, *S. cerevisiae* 72시간 배양을 통한 콩의 ABTS radical 소거활성능은 발효전에 비해 약 12% 증가된다고 보고되어 생물전환의 유용성이 검증되고 있다[28].

생물전환을 통한 환원력 변화 측정

환원력은 항산화능력과 매우 밀접한 관계에 있으며, reductone의 존재와 관계가 있다고 보고되었다[35]. 발효전 방풍 추출물의 환원력은 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm의 환원력은 각각 $18.69\% \pm 4.65\%$, $42.69\% \pm 2.63\%$, $59.25\% \pm 4.21\%$ 로 확인되었다. 또한, *L. plantarum* BHN-LAB 33으로 생물전환과정을 거친 발효 방풍 추출물의 환원력은 250 ppm에서 $28.68\% \pm 3.77\%$, 500 ppm에서 $58.13\% \pm 3.59\%$, 1,000 ppm에서 $75.87\% \pm 4.96\%$ 로 확인되었으며, 양성대조구인 vitamin C 500 ppm의 환원력은 $89.58\% \pm 2.58\%$ 로 확인되었다. 발효하지 않은 추출물 1,000 ppm의 환원력은 양성대조구에 비해 약 66.15%로 확인되었으며, 발효 방풍 추출물의 환원력은 84.70%로 확인되었고, 생물전환을 통해 증가된 환원력은 약 18.55%로 확인하였

다(Fig. 5B). 이러한 환원력의 증가는 총 폴리페놀 함량과 상관관계가 있다고 보고되고 있으며, 식물류에 널리 존재하는 phenolic compound는 항산화능을 포함한 다양한 생물학적 효능을 나타내며, 이들의 주요 효능은 산화환원력에 의한 것이며, 총 폴리페놀의 함량이 높을수록 항산화능이 증가한다고 보고되었다[7]. 또한, 본 연구에서도 생물전환을 통해 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량의 증가와 환원력이 증가되는 것을 본 연구를 통해 확인하였으며, 생물전환을 통해 항산화 효과를 증가시킬 수 있을 것이라 판단하고 있다.

생물전환을 통한 tyrosinase 변화 측정

최근 미백(skin whitening)에 대한 관심이 증가되고 있으며, 그 피부 미백에 다양한 제품들이 생산되고 있다. 미백 효과물질은 체내 멜라닌 색소의 생성을 억제시키며, 멜라닌 색소는 생물체의 피부, 머리카락 등 다양하게 분포되어 있는 성분으로 melanocyte라는 색소 세포의 melanosome이라는 세포 소기관에서 tyrosinase 효소에 의해 tyrosine을 DOPA (3,4-dihydroxy-phenylalanine) 혹은 DOPA quinone으로 산화 및 중합반응시켜 생합성이 이루어진다[32]. 멜라닌 색소는 피부 장벽의 역할을 한다고 보고되고 있지만, 표피의 keratinocyte로 방출되어 색소 침착을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한, 자외선 혹은 환경적 요인으로 인하여 α -Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH), ACTH 호르몬에 의해 melanocortin-1 Receptor (MC1R)를 통해 melanocyte를 자극시키며, 활성화된 MC1R 수용체는 cAMP, MITF를 촉진시키며, 멜라닌 생합성 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2가 생성된다[1, 9]. 현재 멜라닌 생성 억제제는 ascorbic acid (vitamin C), arbutin, kojic acid 등이 대표적 물질로 알려져 있으며, 이러한 tyrosinase 활성 억제를 통해 다양한 미백 연구가 진행 중이다[20, 34]. 본 연구를 통해, 발효전 방풍 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 250 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm에서 각각 $25.15\% \pm 1.36\%$, $32.24\% \pm 2.58\%$, $48.25\% \pm 3.84\%$ 로 확인되었다. 또한, *L. plantarum* BHN-LAB 33으로 생물전환과정을 거친 발효 방풍 추출물의

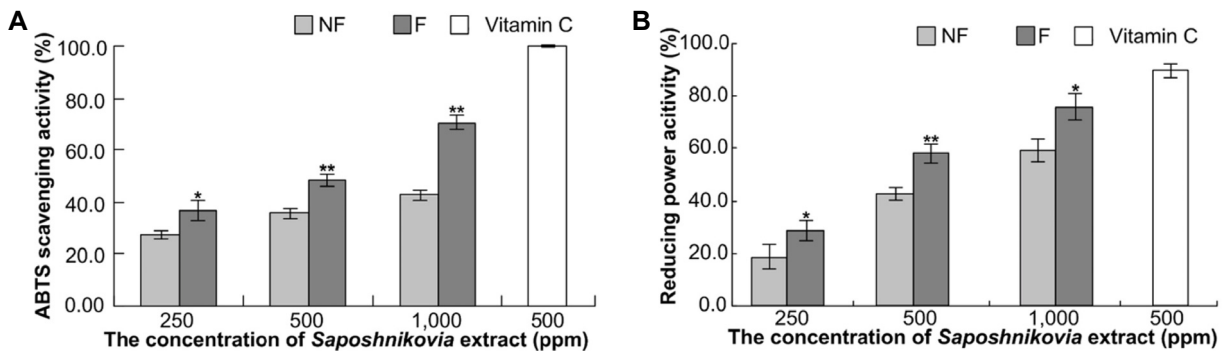


Fig. 5. ABTS radical activity (A) & reducing power activity (B) of extracts from the fermented *Saposhnikovia* extracts with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33. NF; Non-fermented *Saposhnikovia* extracts, F; fermented *Saposhnikovia* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 33. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

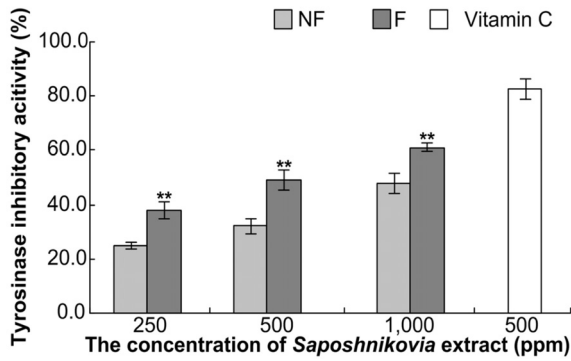


Fig. 6. Tyrosinase activity of extracts from the fermented *Saposhnikovia* extracts with *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33. NF; Non-fermented *Saposhnikovia* extracts, F; fermented *Saposhnikovia* extracts by *L. plantarum* BHN-LAB 33. *, $p<0.05$, **, $p<0.01$.

tyrosinase 저해 활성은 250 ppm에서 $38.55\pm 3.16\%$, 500 ppm에서 $49.37\pm 3.71\%$, 1,000 ppm에서 $61.45\pm 1.50\%$ 로 확인되었으며, 양성대조구인 vitamin C 500 ppm의 환원력은 $82.58\pm 3.48\%$ 로 확인되었다(Fig. 6). 발효하지 않은 추출물 1,000 ppm의 환원력은 양성대조구에 비해 약 27.36%로 증가되었으며, 생물전환을 통해 평균 40%정도 환원력이 증가된 것을 확인하였으며, 본 연구 결과로 생물전환을 통해 방풍 발효 추출물은 tyrosinase 저해 활성이 증가되는 것을 확인하였으며, 대마씨 및 아마란스씨 생물전환 추출물의 발효 전 추출물에 비해 tyrosinase 저해 활성이 증가되는 것과 매우 유사한 것을 확인할 수 있다[34].

본 연구에서는 시중에 판매되는 천연물 방풍을 이용하여 *L. plantarum* BHN-LAB 33으로 발효 후 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량, 항산화 활성(SOD 유사활성, DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성, 환원력) 및 tyrosinase 저해활성을 분석하여 생물전환 전후의 생리활성 변화를 확인하였다. *L. plantarum* BHN-LAB 33으로 발효 전 추출물과 발효 후 추출물내의 총 폴리페놀과 플라보노이드가 각각 14%와 9%로 증가되었다. 또한, 항산화 활성을 측정한 결과, SOD 유사활성 70%, DPPH radical 소거활성 80%, ABTS radical 소거활성 45%, 환원력은 39%가 증가되었으며, tyrosinase 저해 활성은 44% 증가되는 것을 확인하였다.

최근, 생물전환 공정 기술의 중요성이 강조되고 많은 연구들이 진행되고 있으며, 생물전환은 생체 및 생촉매의 기능을 활용하여 의약품, 의약품 원료물질, 비타민, 유용 아미노산, 인지질, 식품원료, 농업용 화학제품등을 포함한 다양한 화학제품의 생산에 활용할 수 있는 기술로 평가되고 있다[13, 25, 34]. 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[5, 24].

본 연구에서는 다량의 생리활성물질을 포함하는 방풍의 항산화 효과를 증가시키기위해 한국 전통발효식품으로 분리된 GRAS 미생물인 *L. plantarum* BHN-LAB 33을 이용해 발효하였다. 발효된 방풍 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드, SOD 유사활성능, DPPH radical 소거활성능, ABTS radical 소거활성능, 환원력, tyrosinase 저해활성을 분석한 결과, 발효되지 않은 방풍 추출물보다 *L. plantarum* BHN-LAB 33으로 생물전환된 방풍 추출물에서 증가된 항산화 효과를 확인하였다. 이런 결과를 통해 유산균 생물전환이 방풍의 항산화능 및 미백효과 증대에 효과적인 것을 확인하였다. 또한, 생물전환기술은 생리활성을 증대시키기 위한 매우 유용한 기술임을 확인하였으며, 생물전환기법 적용을 통한 기능성 식품소재 및 화장품 소재 개발 및 응용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

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

References

1. Abdel-Malek, Z., Swope, V. B., Suzuki, I., Akcali, C., Harriger, M. D., Boyce, S. T., Urabe, K. and Hearing, V. J. 1995. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 1789-1793.
2. Ann, Y. G. 2011. Probiotic lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Nutr.* **24**, 817-832.
3. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **121**, 1999.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

9. Hong, S. H., Kandhasamy, S., Joo, T. W., Lim, C. M., Cho, H. M., Kim, S. M., Kim, G. Y. and Jhoo, J. W. 2015. Ethanol and supercritical fluid extracts of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) increase gene expression of antioxidant enzymes in HepG2 cells. *Asian Pacific J. Rep.* **4**, 147-152.
10. 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.
11. 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.
12. 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 isoflavones to aglycone isoflavones by *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 76 under anaerobic conditions. *Kor. J. Food Preserv.* **26**, 148-156.
13. Kim, C. K. 2001. Ginseng sponins processing by using bio-conversion technology. *The Korean Ginseng Research and Industry* **6**, 3-13.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Liu, Y., Hui, X., Ibrahim, S. A. and Huang, W. 2018. Increasing antiradical activity of polyphenols from Lotus seed epicarp by probiotic bacteria bioconversion. *Molecules* **10**, 2667.
19. 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.
20. Masamoto, Y., Ando, H., Murata, Y., Shimoishi, Y., Tada, M. and Takahata, K. 2003. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculentin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 631-634.
21. Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap. J. Nutr.* **44**, 307-315.
22. 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.
23. Park, J. H., Lee, M. J. and Kim, H. J. 2011. Review on the research related to *Bangpungtongseong-san* (*Bofutsusho-san*) in Korea. *J. Oriental Rehab. Med.* **21**, 189-202.
24. 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.
25. 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.* **1**, 1-13.
26. 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.
27. 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.
28. Santos, V. A. Q., Nascimento, C. G., Schmidt, C. A. P., Mantovani, D., Dekker, R. F. H. and da Cunha, M. A. A. 2018. Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones bio-transformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. *LWT-Food Sci. Technol.* **92**, 509-515.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
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**, 721-730.
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. Health* **219**, 331-342.
34. 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.
35. Yoshino, M. and Murakami, K. 1998. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem.* **257**, 40-44.

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 33의 생물전환공정을 통한 방풍 발효 추출물의 항산화 활성 및 미백 활성 증대 효과

김병혁¹ · 장종옥² · 이준형^{1,2} · 박예은¹ · 김중규^{1,2} · 윤여초^{1,2} · 정수진¹ · 권기석² · 이종복^{1*}

(¹비에이치앤바이오 생물산업소재개발연구소, ²안동대학교 생약자원학과)

방풍의 화합물은 동양 전통 의학에서 사용되고 있는 식물로 항염증, 비염, 미백, 아토피, 항알레르기 및 각종 피부질환에 사용되고 있다. 본 연구는 한국 전통발효식품에서 분리된 *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33를 이용해 발효한 방풍 추출물의 항산화 효과를 조사하였다. *L. plantarum* BHN-LAB 33 발효는 37°C에서 3일간 발효하였으며, 발효하지 않은 방풍 추출물에 비해 *L. plantarum* BHN-LAB 33 발효 방풍 추출물에서 총 폴리페놀 함량은 약 14%, 총 플라보노이드 함량은 약 09% 증가된 것을 확인하였다. 또한, SOD 유사활성능, DPPH radical 소거 활성능과 ABTS radical 소거활성능, 환원력은 각각 약 70%, 80%, 45% 및 39% 항산화능이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, tyrosinase 저해 활성은 44% 증가되는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 *L. plantarum* BHN-LAB 33을 이용한 생물전환을 통한 방풍 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.