

발효 쌍별귀뚜라미 추출물의 생리활성 연구

박인선[#] · 임현지[#] · 정승일* · 정찬현*

(재)전주농생명소재연구원

Biological Activity of Fermented *Gryllus bimaculatus* extracts

In-Sun Park[#], Hyeon-Ji Lim[#], Seung-Il Jeong*, and Chan-Hun Jung*

Jeonju AgroBio-Materials Institute(JAMI), Jeonju 54810, Korea

Abstract – *Gryllus bimaculatus* extract (GbE) have reported that anti-inflammatory activity by suppression of pro-inflammatory cytokines. However, the effects of fermented *Gryllus bimaculatus* extract (FGbE) have not yet been investigated. In this study, we evaluated the anti-inflammatory and anti-wrinkle effect of the fermented *Gryllus bimaculatus* extracts using *Bacillus subtilis* (JB PMB-18) in RAW264.7 cells. Both GbE and FGbE exerted no cytotoxic effects until 1000 µg/mL concentration. FGbE decreased NO production and decreased iNOS and COX-2 mRNA levels in a concentration-dependent manner. In addition, the protein production of inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 was effectively reduced compared to the GbE. Inhibitory activities of elastase and collagenase associated with skin wrinkle improvement were measured to be 45% and 69%, respectively, at a concentration of 500 µg/mL in FGbE. From these results, FGbE can be used as a health functional food and skin functional cosmetic materials for preventing inflammatory diseases because it has excellent anti-inflammatory and anti-wrinkle effects.

Keywords – *Gryllus bimaculatus*, Gryllidae, Fermentation, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle, Cosmetic materials

염증반응은 외부로부터의 병원균에 의한 감염, 조직의 손상 등 유해한 자극에 대항하는 생체 방어 체계로, 체내에 외부물질의 유입이 감지되었을 때 면역세포에서 염증 매개 물질들을 분비하여 체내 면역반응을 일으키는 신호를 전달하게 된다.¹⁾ 면역반응에 관여하는 주요 세포인 대식세포는 Tumor necrosis factor(TNF)- α , Interleukin(IL)-1 β 및 IL-6 등의 pro-inflammatory cytokine(염증성 사이토카인) 과 lipopolysaccharide(LPS) 등의 자극으로 활성화된다. 대식세포의 활성화는 염증성 사이토카인, Prostaglandin E₂(PGE₂) 및 Nitric oxide(NO) 등을 생성함으로써 염증성 반응의 유발과 염증부위로의 면역세포 이동을 촉진하게 된다.²⁾ 이 중 NO는 염증반응의 대표적인 지표물질로 체내에서 NO synthase(NOS) 촉매 반응을 통하여 L-arginine으로부터 생성되며, inducible NOS(iNOS) 및 Cyclooxygenase-2(COX-2)가 과도하게 발현될 경우 다량의 NO를 생성하게 된다.³⁾ 이러한 지속적인 체내 염증반응에 따른 염증성 매개물질들

의 과도한 생산은 염증 질환을 악화시킬 수 있다고 보고되어 있다.^{4,6)}

피부는 항상 산소와 태양광선에 노출되어 있어 이로부터 유발되는 산화적 스트레스는 피부노화를 촉진한다.⁷⁾ 노화가 진행될수록 피부를 구성하는 물질인 collagen, elastin, hyaluronic acid 등 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소하고 type-1 collagenase의 생합성 증가와 matrix metalloproteinases(MMPs : collagenase, elastase 등)의 발현이 증가되면 진피 내 교원 섬유, 탄력 섬유, fibronectin 및 laminin과 같은 기질 단백질 분해를 유도하여 피부탄력을 떨어뜨리고 피부 주름생성을 야기한다.⁸⁾ 따라서 collagen 생성을 촉진하거나 collagen을 분해하는 collagenase나 다양한 기질 단백질 분해 효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현이나 활성을 저해함으로써 주름생성을 억제할 수 있다.⁹⁾ 피부 주름 개선 효과가 있는 다양한 소재 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이미 효과가 확인된 물질로는 retinol, retinyl palmitate, adenosine, epigallocatechin gallate 등이 있다.^{10,11)}

본 연구에서 사용된 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)는 메뚜기목 귀뚜라미과(Gryllidae)에 속하는 아열대성 곤충으로 번식이 빠르며 오메가-3 계열 지방산을 포함한 불포화지

[#]These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): siunite@hanmail.net, biohun@gmail.com

(Tel): +82-63-711-1050, +82-63-711-1026

방산이 풍부하며 단백질, 키틴, 키토산 또한 높은 농도로 함유되어 있다고 보고되어 있으며, 만성 관절염 및 알코올성 지방간염과 같은 여러 질병 모델에서 염증을 억제하고, 혈당 조절 및 피부 보호에 대한 효능이 연구되어 있다.¹²⁻¹⁵⁾

발효는 미생물의 대사 작용으로 유용물질을 생산하는 방법으로 식품, 화장품, 의약품 등 다양한 분야에 활용되어지고 있다.^{16,17)} *B. subtilis*는 대표적인 세균 중 하나로 단백질 분해력이 뛰어난 미생물로서 발효시킬 시 균 생육이 촉진됨과 동시에 균주가 생산해내는 효소의 작용으로 가용성 추출물의 함량이 증가하고, 단백질이 저분자 단백질로 전환되는 이화작용 및 bioconversion에 따른 다당류체, 올리고당, 아미노산류, 펩타이드류, 유기산류, 폴리페놀류 등의 유효 성분의 생성 및 증가에 따라 다양한 생리활성을 나타낸다.^{18,19)}

따라서 본 연구에서는 이처럼 유익한 효능을 가지는 미생물을 이용하여 기존의 쌍별귀뚜라미 추출물의 효과로부터 발효를 통한 시너지 효과를 기대하며 생리활성 증진 효능을 비교 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 제조 - 쌍별귀뚜라미는 (주)MG내추럴에서 구매하여 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김홍준교수로부터 검증을 받아 사용하였다. 증거표본(JBJSI315)은 전주농생명 소재연구원에 보관되어 있다. 분쇄된 쌍별귀뚜라미 500g을 멸균 3차 증류수 5 L에 혼합하여 80°C에서 3시간 열수 추출하였다. 추출물을 8,000 rpm, 15분 초고속 원심분리기를 사용하여 얻은 상등액을 여과지(ADVENTEC, No.2)를 이용하여 필터 한 뒤 동결건조 하여 59.09 g의 고상 추출물을 수득하였다(수율 11.8%). 발효에 사용한 균주는 전주농생명 소재연구원에서 보유하고 있는 *B. subtilis* JB PMB-18 균주이고, 균주를 100 mL NB 배지에서 37°C, 200 rpm 조건에서 24시간 동안 전 배양한 후 5,000 rpm, 10분 초고속 원심분리기를 사용하여 상층액을 버리고 PBS로 한차례 세척 후 2%(v/v)을 0.5 g 쌍별귀뚜라미 추출물 100 mL에 접종하였다. 균주 1.5×10⁶ CFU/mL를 접종하여 37°C, 200 rpm으로 교반하여 48 시간 동안 발효하였다. 얻어진 발효물을 8,000 rpm, 20분 원심분리를 통해 불용성 물질을 제거하였

고, 상등액을 회수하여 0.45 μm 필터에 여과 후 동결 건조하여 0.35 g(수율 70%)을 얻어 실험에 사용하였다.

세포 배양 - 마우스 대식세포(murine macrophage cell line) RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB, No. 40071)에서 분양 받았으며 세포 배양을 위하여 10% FBS(fetal bovine serum; HyClone, GE Healthcare Life Sciences, South Logan, UT, USA)이 함유된 DMEM 배지(Welgene, Seoul, Korea)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하여, 3일에 한 번씩 계대배양을 수행하였다.

세포 독성 평가 - RAW264.7 세포를 5×10⁴ cells/well로 96 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하여 안정화한 후, 혈청이 걸뺀 DMEM 배지에 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)을 농도별(50, 100, 500 및 1,000 μg/mL)로 희석하여 100 μL씩 넣어 24 시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 5 mg/mL의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 4시간 동안 배양한 후, 상등액을 제거하고 DMSO를 100 μL씩 분주하여 well에 생성된 결정체를 모두 녹인 후, microplate reader(Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{세포생존율 (\%)} = \frac{[\text{시료처리군의 흡광도}/\text{대조군의 흡광도}]}{\times 100}$$

NO 생성 억제 평가 - RAW264.7 세포를 5×10⁴ cells/mL 농도로 96 well plate에 분주하여 24 시간 동안 배양하여 안정화한 후, 혈청이 걸뺀 DMEM 배지에 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)을 농도별(50, 100, 500 및 1,000 μg/mL)로 희석하여 처리 후, 2시간 후에 LPS(1 μg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess Reagent System(Promega, Madison, WI) 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액 50 μL에 Griess 시약 100 μL 처리 후 30분 내로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

COX-2, iNOS 생성 억제 활성평가 - RAW264.7 세포를 1×10⁶ cells/mL 농도로 6 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하여 안정화한 후, 혈청이 걸뺀 DMEM 배지에

Table I. Primer sequences used for real-time PCR

Gene		Sequence (5'-3')
Mouse COX-2	Forward	CTC TAC AAC AAC TCC ATC CT
	Reverse	ATT CTG CAG CCA TTT CCT TC
Mouse iNOS	Forward	CGA AAC GCT TCA CTT CCA A
	Reverse	TGA GCC TAT ATT GCT GTG GCT
Mouse β-actin	Forward	CGG TTC CGA TGC CCT GAG GCT CTT
	Reverse	CGT CAC ACT TCA TGA TGG AAT TGA

쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)을 농도별(50, 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 희석하여 처리 후, 2시간 후에 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3분)하여 얻어진 pellet을 RNA 추출 키트를 이용하여 추출 후 정량을 하였다. 1 μg 농도의 RNA를 cDNA 합성 후 primer, 멸균수, master mix를 합성된 cDNA와 혼합하여 total volume을 20 μL 로 맞추었다. 그 후 iNOS, COX-2의 유전자 발현을 확인하였다.

염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)의 생성 억제 활성 평가 – RAW264.7 세포를 5×10^5 cells/mL 농도로 24 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하여 안정화한 후, 혈청이 걸쭉된 DMEM 배지에 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)을 농도별(50, 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 희석하여 처리 후, 2시간 후에 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3분)하여 얻어진 상층액의 염증성 사이토카인의 생성 함량을 측정하였다. 사이토카인은 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) kit(R&D systems Inc, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선 R^2 값이 0.9 이상이었다.

Elastase의 저해 활성 측정 – Elastase 저해 활성은 EnzChek[®] Elastase Assay Kit(ThermoFisher Scientific)를 이용하여 분석하였다. 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)의 최종농도가 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도가 되게 희석한 다음, kit 내 기질과 elastase enzyme을 96-well plate에 넣고 25°C에서 50분간 반응시켰다. 형광 플레이트 분석기를 이용하여 Ex/Em=505/515 nm 파장에서 형광을 측정하고 elastase 저해 활성 퍼센트(% Elastase inhibition activity)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Elastase의 저해 활성(\%)} = \{1 - (\text{S}-\text{B})/\text{C}\} \times 100$$

(S: 시료의 흡광도, B: blank의 흡광도, C: control의 흡광도)

Collagenase의 저해 활성 측정 – Collagenase 저해 활성은 EnzChek[®] Gelatinase/Collagenase Assay Kit(ThermoFisher Scientific)를 이용하여 분석하였다. 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)의 최종농도가 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도가 되게 희석한 다음, kit 내 기질과 collagenase enzyme을 96-well plate에 넣고 25°C에서 1시간 반응시켰다. 형광 플레이트 분석기를 이용하여 Ex/Em=495/515 nm 파장에서 형광을 측정하고 Collagenase 저해 활성 퍼센트(% Collagenase inhibition activity)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Collagenase 저해 활성(\%)} = \{1 - (\text{S}-\text{B})/\text{C}\} \times 100$$

(S: 시료의 흡광도, B: blank의 흡광도, C: control의 흡광도)

통계 처리 – GraphPad Prism 5(Graphpad Software, San Diego, CA, USA) 소프트웨어를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 데이터 간의 유의차는 One-way ANOVA의 Turkey-Kramer method를 통해 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

발효 쌍별귀뚜라미 추출물의 세포독성 및 항염 활성 – 쌍별귀뚜라미 추출물의 고초균 발효에 의한 영향을 알아보기 위하여 전주농생명소재연구원에서 보유하고 있는 *B. subtilis* 균주(JB PMB-18)를 사용하여 발효 쌍별귀뚜라미 추출물을 준비하였다. 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)의 효능을 비교평가 하기 위해, 먼저 MTT 방법을 이용하여 세포독성을 확인하였다. 추출물의 RAW264.7 세포에 대한 세포 독성은 세포에 추출물을

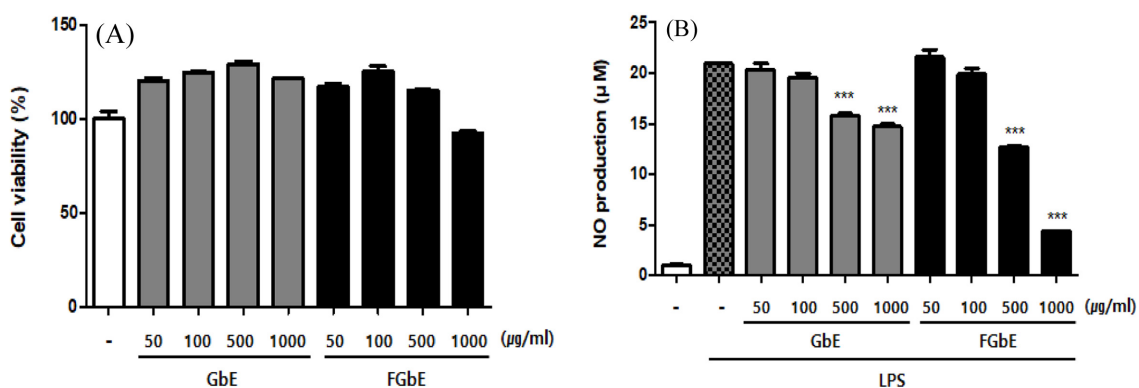


Fig. 1. Cytotoxicity and anti-inflammatory effects of GbE & FGbE in RAW264.7 cells. (A) Cells were treated without or with the indicated concentration of extracts and cell viability was determined by MTT assay. (B) Effects of GbE & FGbE on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentration (50, 100, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of extracts for 2 hr before being incubated with or without 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS for 24 hr. The NO production were measured using Griess reagent system. Values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus LPS alone.

다양한 농도(50, 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$)로 24시간 동안 처리하여 분석하였다. Fig. 1A에서 볼 수 있듯이 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)은 대조군에 비해 유의한 세포 독성 효과를 나타내지 않았다. 따라서 쌍별귀뚜라미 및 발효 쌍별귀뚜라미 추출물에 대해 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도 범위에서 RAW264.7에 대한 생리활성 분석을 진행하였다.

쌍별귀뚜라미 추출물은 항염증 효과가 있다고 알려져 있다.²⁰⁾ 따라서 본 연구에 의해 준비된 발효 쌍별귀뚜라미 추출물이 쌍별귀뚜라미 추출물에 비해 어느 정도 효능이 증

대되는지 확인하기 위해 항염 활성을 평가하였다. 세포 독성이 없는 조건에서 쌍별귀뚜라미와 발효 쌍별귀뚜라미 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위해 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 대한 추출물의 억제 활성을 먼저 조사하였다. RAW264.7 세포를 다양한 농도(50, 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$)의 쌍별귀뚜라미 및 발효 쌍별귀뚜라미 추출물로 2시간 동안 전처리한 다음 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS로 24시간 동안 처리하였다. 배양 상등액의 NO 수준은 각각 Griess 분석 키트를 사용하였다. Fig. 1B에서 볼 수 있듯이 두 추출물은 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로

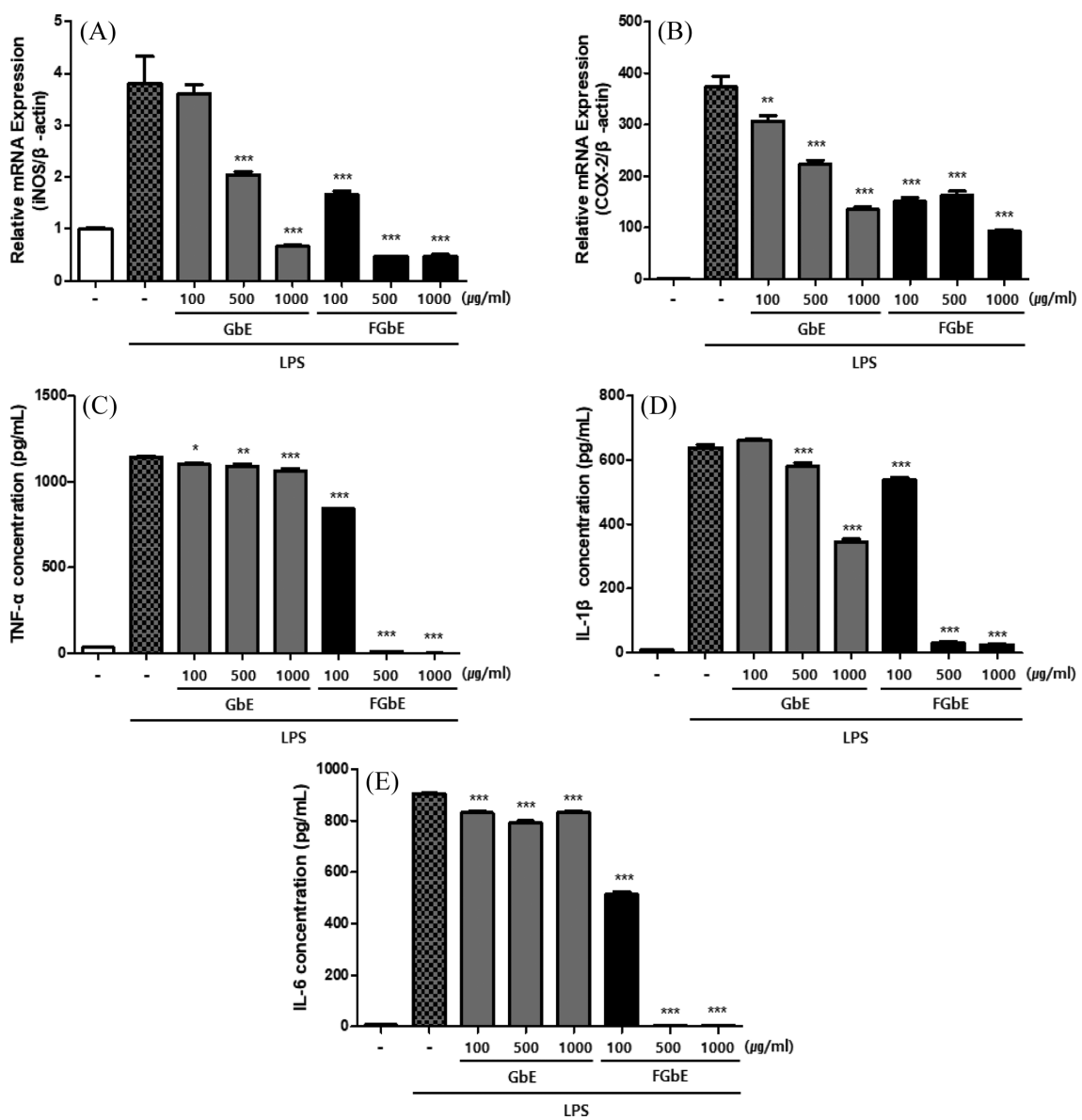


Fig. 2. Anti-inflammatory effects of GbE & FGbE in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with indicated concentration of GbE & FGbE for 2 hr and then incubated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS for 24 hr. (A, B) Relative mRNA levels of iNOS and COX-2 were determined by Real-time PCR. (C, D, E) Secretion level of TNF- α , IL-1 β and IL-6 was determined by ELISA kit. Values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments; * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 versus LPS alone.

NO 수준을 감소시켰다. 쌍별귀뚜라미 추출물 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 전처리시 LPS 단독 처리구 대비 29.8% 가량의 감소 효과를, 발효 쌍별귀뚜라미 추출물 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 전처리시 79.1% 감소 효과를 보여주어 발효에 의해 쌍별귀뚜라미 추출물의 항염 효과가 약 2배 이상 증가됨을 확인할 수 있었다.

발효 쌍별귀뚜라미 추출물의 염증성 사이토카인 억제 효과 - NO는 염증 반응에서 iNOS와 COX-2에 의해 합성되는 것으로 보고 된다.²¹⁾ 따라서 쌍별귀뚜라미 추출물의 NO생성 억제 효과가 각각 합성 효소 iNOS 및 COX-2의 발현 조절과 관련이 있는지 조사하였다. Real-time PCR을 통해 iNOS 및 COX-2의 mRNA 수준을 측정된 결과 쌍별귀뚜라미 추출물과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물은 LPS 유도된 COX-2, iNOS의 mRNA 발현을 감소시켰으며, 발효 쌍별귀뚜라미의 저농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에선 쌍별귀뚜라미 대비하여 COX-2는 55.0% 더 감소하였고, iNOS 유전자는 46.1% 더 감소한 수치가 나타났다(Fig. 2A, B). 이러한 결과는 쌍별귀뚜라미 및 발효 쌍별귀뚜라미 추출물이 iNOS 및 COX-2의 mRNA 수준을 억제함으로써 NO생성을 감소시킬 수 있음을 시사하고 발효 후 항염증 효과가 증가됨을 나타낸다.

또한 대표적인 염증성 사이토카인으로 알려진 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6는 LPS로 유도된 대식세포에서 과도하게 생성되어 조직을 손상시키고 발열을 야기해 염증반응을 촉진한다.^{2,3)} 이러한 항염증 효과를 추가적으로 알아보기 위하여 LPS 자극된 RAW264.7 세포에서 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)의 염증성 사이토카인 발현에 대한 억제 활성을 조사하였다. 그 결과, LPS 단독 처리구에서 TNF- α (Fig. 2C), IL-1 β (Fig. 2D) 및 IL-6(Fig. 2E) 사이토카인 발현량이 현저하게 증가되었으며 추출물 처리시 농도 의존적으로 사이토카인 발현을 현저히 억제하는 것으로 보아 염증반응을 촉진하는 염증성 사이토카인의 생산을 감소시키는 것으로 확인되었다. 특히 발효 쌍별귀뚜라미의 500, 1,000

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에선 아무것도 처리하지 않은 control 군과 비슷한 수치만큼 사이토카인이 감소되어 발효 후 쌍별귀뚜라미 추출물에서의 항염증 활성이 증진됨을 알 수 있다.

발효 쌍별귀뚜라미 추출물의 주름 개선 효능 - Elastin, fibronectin, collagen 등의 다양한 단백질을 분해할 수 있는 elastase는 피부 진피에 그물망 구조를 형성하며 피부 탄력성을 유지하는 데 도움을 준다. 그러나 과다 생성된 elastase는 피부 진피의 그물망 구조를 절단하여 피부의 탄력 섬유를 감소시킴으로서 피부 주름을 형성한다고 알려져 있다.²²⁾ 발효 쌍별귀뚜라미의 추가 기능성을 확인하기 위하여 elastase 저해 활성 평가를 통해 피부 주름 개선효능을 평가하였다. 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)을 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 실험한 결과, 비발효군에서는 elastase 저해 활성 효과가 나타나지 않았으며, 발효 쌍별귀뚜라미 추출물에서 농도 의존적으로 30~65% 정도의 elastase의 활성 저해율을 보였다(Fig. 3A).

피부에 주로 존재하는 기질 단백질인 collagen은 피부 진피조직의 섬유아세포에서 합성되며,²³⁾ 피부를 지지하고 견고하게 하는 역할을 한다. Collagenase는 자외선에 의한 ROS(Reactive oxygen species) 및 환경에 의한 스트레스 등 여러 요인에 의해 활성이 증가하고 collagen을 분해하여 주름 생성의 원인이 되는 효소이다.²⁴⁾ 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)로 collagenase의 저해 활성을 측정된 결과 Fig. 3B와 같이 쌍별귀뚜라미 추출물에서 효과가 나타나지 않았으며, 발효 쌍별귀뚜라미 추출물에서는 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 30% 이상의 collagenase 저해 활성을 나타내었다. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 60% 이상의 우수한 저해활성을 나타냈고 이는 발효에 따라서 쌍별귀뚜라미의 주름개선 효능이 증가되었으며, 발효 쌍별귀뚜라미 추출물의 주름개선제로서의 응용 가능성을 시사한다.

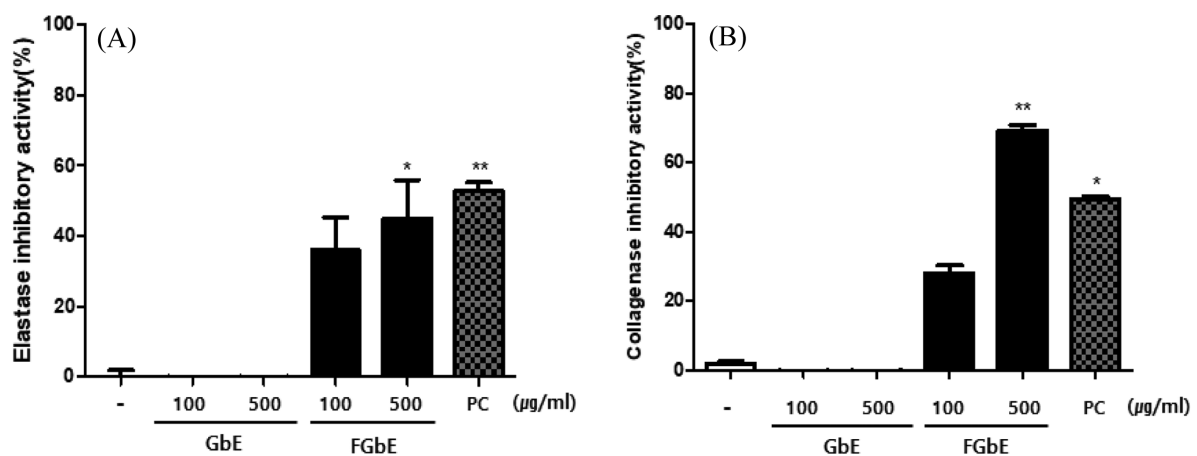


Fig. 3. Inhibitory activity of GbE and FGbE on elastase (A) and collagenase (B). Values are expressed as mean \pm SD of three independent.

결 론

본 연구에서는 대식세포인 RAW264.7 세포에서 발효 쌍별귀뚜라미 추출물의 증가된 항염증 활성과 새로운 기능성인 피부 주름개선 효능을 확인하였다. 기존 쌍별귀뚜라미 추출물의 효능을 증가시키고 새로운 생리활성을 확인하고자 *B. subtilis* 를 이용한 발효를 진행하였다. 세포독성이 없는 농도에서 쌍별귀뚜라미 추출물(GbE)과 발효 쌍별귀뚜라미 추출물(FGbE)의 항염증을 비교해본 결과 발효에 의해 항염증 효과가 약 2배 이상 증가됨을 확인할 있었다. 이러한 항염증 효과는 iNOS, COX-2 mRNA 발현과 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6의 단백질 발현량 억제 정도를 통해 재 확인하였다. 또한 elastase와 collagenase 활성을 평가함으로써 발효에 의해 쌍별귀뚜라미 추출물의 주름개선 효능이 새롭게 생겼음을 확인하였다. 결론적으로 본 연구를 통해 *B. subtilis* 로 발효한 쌍별귀뚜라미 추출물이 염증과 주름개선에 의한 피부노화 방지 효과는 현저하게 증진되었음을 확인하였으며 발효 쌍별귀뚜라미 추출물이 건강기능식품 및 기능성 화장품 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2020년도 전주시에서 지원한 전주농생명소재 연구원 연구소기업설립사업 수행과제 결과의 일부 내용임.

인용문헌

- Kim, Y. S., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, E. H., Park, P. J. and Jeong, J. H. (2012) Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 1205-1210.
- Kim, Y. W., Zhao, R. J., Park, S. J., Lee, J. R., Cho, I. J., Yang, C. H., Kim, S. G. and Kim, S. C. (2008) Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and pro-inflammatory cytokines production. *Brit. J. Pharmacol.* **4**: 165-173.
- Lee, A. K., Sung, S. H., Kim, Y. C. and Kim, S. G. (2003) Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappa B alpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Brit. J. Pharmacol.* **139**: 11-20.
- Jin, K. S., Lee, J. Y., Kwon, H. J. and Kim, B. W. (2014) Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Ardisia arborescens* ethanol extract. *Korean J. Life Sci.* **24**: 713-720.
- Jung, Y. S., Eun, C. S., Jung, Y. T., Kim, H. J. and Yu, M. H. (2013) Anti-inflammatory effects of *Picrasma quassioides* (D.DON) BENN leaves extracts. *Korean J. Life Sci.* **23**: 629-636.
- Kang, C. H., Han, S. H. and So, J. S. (2013) Anti-inflammatory effect of chloroform extract from *Potentilla chinensis*. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **28**: 13-17.
- Oikarine, A. (1990) The aging of skin: chronoaging versus photoaging. *photodermatol. photommunol. photomed.* **7**: 3-4.
- Brenneisen, P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. (2002) Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **973**: 31-43.
- Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J. and Voorhees, J. J. (1999) Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem. Photobiol.* **69**: 154-157.
- Maeda, K. and Fukada, M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**: 361-368.
- Kim, B. Y., Kim, T. G., Kang, W. Y., Baek, H., Cheon, H. Y. and Kim, D. (2010) Functional cosmetic effect of porcine placenta. *Korean Chem. Eng. Res.* **48**: 327-331.
- Ahn, M. Y., Han, J. W., Hwang, J. S., Yun, E. Y. and Lee, B. M. (2014) Anti-inflammatory effect of glycosaminoglycan derived from *Gryllus bimaculatus* (a type of cricket, insect) on adjuvant-treated chronic arthritis rat model. *J. Toxicol. Environ. Health* **77**: 1332-1345.
- Hwang, B. B., Chang, M. H., Lee, J. H., Heo, W., Kim, J. K., Pan, J. H., Kim, Y. J. and Kim, J. H. (2019) The edible insect *Gryllus bimaculatus* protects against gut-derived inflammatory responses and liver damage in mice after acute alcohol exposure. *Nutrients* **11**: 857.
- Park, S. A., Lee, G. H., Lee, H. Y., Hoang, T. H. and Chae, H. J. (2019) Glucose lowering effect of *Gryllus bimaculatus* powder on streptozotocin induced diabetes through the AKT/mTOR pathway. *Food Sci. Nutr.* **8**: 402-409.
- Jeong, T. Y., Yu, M. N., Heo, H. J., Yang, J. W., Jeong, H. S. and Lee, J. S. (2020) Protective effect of *Gryllus bimaculatus* methanol extract on UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. *J. Korean Soc. Food Cult.* **35**: 478-482.
- Jang, H. W., Jang, J. H., Choi, S. Y., Park, B. R. and Park, J. (2019) Changes in nutritional composition of *Gryllus bimaculatus* fermented by *Bacillus* sp. and mycelium of basidiomycetes. *Korean Soc. Food Cult.* **34**: 785-792.
- Shin, I. L., Van, Y. T. and Chang, Y. N. (2002) Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enzyme Microb. Technol.* **31**: 213-220.
- Lee, T. S. and Choi, J. Y. (2005) Volatile flavor components in mash of Takju prepared by using *Aspergillus kawachii* nuruks. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**: 944-950.
- Cha, J. Y., Kim, Y. S., Ahn, H. Y., Kang, M. J., Heo, S. J. and Cho, Y. S. (2011) Biological activity and biochemical properties of silkworm (*Bombyx mori* L.) powder fermented with

- Bacillus subtilis* and *Aspergillus kawachii*. *J. Life Sci.* **21**: 81-88.
20. Park, W. J. and Han, J. S. (2021) *Gryllus bimaculatus* extract protects against lipopolysaccharide and palmitate-induced production of proinflammatory cytokines and inflammasome formation. *Mol. Med. Rep.* **23**: 206-215.
21. Hussein, S. Z., MohdYusoff, K., Makpol, S. and MohdYusof, Y. (2013) Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via NF- κ B pathway. *PLoS One.* **8**: e72365.
22. Tsukahara, K., Nakagawa, H., Moriwaki, S., Takema, Y., Fujimura, T. and Imokawa, G. (2006) Inhibition of UVB-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles. *Int. J. Dermatol.* **45**: 460-468.
23. Lee, S. Y., An, J. H. and Cho, H. Y. (2003). Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* Bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **46**: 60-65.
24. Hong, J. K. (2009) A study on skin aging caused by free-radical and on efficacy of antioxidant vitamins. *Asian J. Beauty Cos.* **7**: 51-62.
- (2021. 5. 28 접수; 2021. 6. 8 심사; 2021. 6. 9 게재확정)