

광나무 열매 발효 추출물의 항염 및 항산화 활성

김정은·김소희**·김미애**·고미선**·신찬성**·이남호***†

*제주대학교 화학·코스메틱스학과, 연구원

**㈜브이에스신비

***제주대학교 화학·코스메틱스학과, 교수

(2023년 4월 24일 접수, 2023년 6월 9일 수정, 2023년 6월 21일 채택)

Anti-inflammatory and Anti-oxidative Activities for Extract of Fermented *Ligustrum japonicum* Fruits

Jung Eun Kim¹, So Hee Kim², Mi Ae Kim², Mi Sun Ko², Chan Seong Shin², and Nam Ho Lee¹

¹Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea

²R&D Center, VS Shinbi Co., Ltd.

(Received April 24, 2023; Revised June 9, 2023; Accepted June 21, 2023)

요약: 본 연구에서는 광나무(*Ligustrum japonicum*) 열매 발효 추출물의 항염 및 항산화 효능을 비발효 추출물과 비교 분석하였다. 광나무 열매의 발효는 제주 자리돔(*Chromis notata*) 내장에서 분리한 *Latilactobacillus curvatus* (*L. curvatus*) 및 *Weissella minor* (*W. minor*) 균주를 이용하였으며, 각각의 발효 추출물(LJF-LC 및 LJF-WM)의 수율은 40.5 ~ 46.0%로 비발효 추출물(LJF)의 29.5% 보다 높게 나타났다. Lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW 264.7 대식세포를 이용한 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 실험 결과, 발효 추출물인 LJF-WM이 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해시키는 효과가 우수함을 확인하였다. 또한 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험 결과, 발효 추출물의 라디칼 소거 활성이 비발효 추출물과 유사하게 나타났으며, 발효 추출물 LJF-WM은 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 보였다. 광나무 열매의 주성분인 salidroside의 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 발효 추출물 LJF-LC에서 15.6 mg/g, LJF-WM에서 13.9 mg/g으로 확인되어 비발효 추출물(12.0 mg/g) 보다 함유량이 높게 분석되었다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 광나무 열매 발효 추출물은 항염 및 항산화 효과를 갖는 천연 화장품 소재로써 활용 가능할 것이라 사료된다.

Abstract: In this study, the anti-inflammatory and anti-oxidative activities were compared for the extracts of non-fermented *Ligustrum japonicum* fruits (LJF) and fermented counterparts. Use of *Latilactobacillus curvatus* (*L. curvatus*) and *Weissella minor* (*W. minor*), isolated from the Jeju *Chromis notata*, as fermented strains led to the extracts of LJF-LC and LJF-WM in this experiment. The yield of each fermented extract (LJF-LC and LJF-WM) was 40.5 ~ 46.0%, higher than 29.5% of non-fermented extract (LJF). As a result of an activity experiment using RAW 264.7 macrophages stimulated by lipopolysaccharide (LPS), it was confirmed that LJF-WM, a fermented extract, has an excellent effect of inhibiting NO production in a concentration-dependent manner without cytotoxicity. Upon the screening of DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities, the fermented LJF-LC and LJF-WM showed comparable to the non-fermented LJF. In the study of cell protection effect using HaCaT keratinocytes damaged by hydrogen peroxide (H₂O₂), the fermented LJF-WM indicated protective effect against oxidative stress. In addition, quantitative analysis of a major constituent salidroside by HPLC indicated about

† 주 저자 (e-mail: namho@jejunu.ac.kr)
call: 064-754-3548

15.6 mg/g for the LJF-LC and 13.9 mg/g for the LJF-WM, which were higher than that of non-fermented LJF (12.0 mg/g). Based on these results, it was suggested that the fermented extract from *L. japonicum* fruits could be used as a natural cosmetics material with anti-inflammatory and anti-oxidative effects.

Keywords: *Ligustrum japonicum*, fermentation, anti-inflammation, anti-oxidation, cell protective effect

1. 서 론

피부는 외부의 물리, 화학적 자극으로부터 신체를 보호하는 물리적 장벽으로서 인체 항상성을 유지하고 체내 독소를 배출하는 역할을 한다. 표피가 화학물질이나 자외선 등의 환경적 스트레스에 지속적으로 노출되면 체내 대사 균형이 무너지며, 피부 노화나 염증 반응을 유발한다[1]. 대식세포(macrophage)는 염증 반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있으며, 자극에 노출되거나 면역세포들이 분비하는 사이토카인(cytokine) 등에 의해 활성화되며, 감염 초기에 nitric oxide (NO)와 사이토카인을 생산하여 생체방어에 중요한 역할을 한다[2]. 그러나 염증 상태에서 과도하게 생성된 NO는 염증 매개 물질의 생합성을 촉진하여 염증을 악화시키는 것으로 알려져 있으므로 NO의 생성을 조절하는 물질은 염증성 질환을 예방할 수 있다[3-5].

인체에 손상을 미치는 대표적인 활성산소종에는 $\cdot O_2$ (superoxide anion radical), $\cdot OH$ (hydroxyl radical) 등의 산소 라디칼, 1O_2 (singlet oxygen), H_2O_2 (hydrogen peroxide)와 같은 몇 종류의 비라디칼 뿐만 아니라 생체 성분과의 반응에서 유래된 ROO·(peroxyl radical), RO·(alkoxyl radical), ROOH (hydroperoxide), NO (nitric oxide) 등이 있다[6]. 이러한 활성산소들의 산화적 손상을 억제하기 위한 생체 방어 기구로는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px), catalase 등의 항산화 효소가 존재하여 체내의 항상성을 유지시켜 주지만, 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있는 피부는 그 항산화성 방어망의 불균형이 일어나 산화 생성물 및 과산화지질 등이 축적되어 피부 노화가 촉진된다. 이에 필요 이상의 활성산소를 제거할 수 있는 외부 항산화제를 보충하여 항산화 네트워크를 회복시켜 피부 조직을 보호할 수 있게 해줄 필요가 있다[7].

천연물이 가진 성분이나 소재의 활용성을 증진시키기 위해 유용한 미생물을 이용한 발효의 방법은 의약품이나 화장품, 식음료 등 다양한 분야에서 오랜 기간 동안 연구 및 적용되어 왔다[8]. 발효는 미생물이 자신의 효소를 이용하여 유기물을 분해함으로써 인간의 생활에 유용하게 사

용되는 물질을 만드는 과정이다[9]. 발효에 이용되는 미생물로는 유산균, 세균, 효모, 곰팡이 등이 있으며 특히 유산균의 경우 발효 공정 개발에 빈번히 활용되고 있다. 이와 같은 유산균을 이용한 방법이 항염증 효과, 미백 개선 효과 및 항산화 효과 등에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고되어 왔으며, 천연물의 효능을 미생물을 이용하여 증가시키거나 새로운 효능을 도출하고자 하는 연구나 발효 과정을 거치면서 변화하는 성분을 분석하는 연구가 계속해서 진행되고 있다[10].

광나무(*Ligustrum japonicum*, *L. japonicum*)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 떨기나무로 정목 또는 여성목이라고 부르며, 전남과 경남의 해안 및 섬지방, 일본과 대만 등지에 분포한다. 광나무의 열매를 여정실이라고 부르는데 길이가 7 ~ 10 mm로 10월경 까맣게 익으며 이전부터 간과 신장을 튼튼하게 하는 보약으로 잘 알려져 있다[11,12]. 광나무 열매의 주요 성분으로는 tyrosol, salidroside 등의 페놀성 화합물과 ursolic acid, oleanolic acid와 같은 다량의 triterpenoids 외에도 secoiridoids, flavonoids 및 이들의 다양한 배당체들이 보고되어 있다[12-14]. 또한, 광나무와 동속이종인 쥐똥나무속의 당광나무(제주광나무, *Ligustrum lucidum*)는 열매에서 분리한 성분인 secoiridoids의 항염증 효능과 oleanolic acid의 항노화 효과 등이 보고되어 있다[15,16].

따라서 본 연구에서는 광나무 열매의 효능 증대 및 유효성분 함량 증진의 목적으로 제주 바다에 서식하는 자리돔(*Chromis notata*)의 신선한 내장으로부터 분리한 유산균인 *Latilactobacillus curvatus* (*L. curvatus*) 및 *Weissella minor* (*W. minor*)를 이용하여 광나무 열매를 발효하였다. 어류 가공의 부산물인 어류 내장은 대부분 폐기되거나 사료, 비료 등으로 사용되는데 전통 발효식품의 일종인 젓갈은 어류, 패류 또는 어류 내장을 원료로 하여, 여러 종류의 미생물과 효소가 작용한다. 젓갈에서는 대부분이 내염성으로 호기성과 혐기성 균이 공존하고, 발효 속성에는 주로 *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus halophilus* 및 *Sarcina litoralis* 등이 관련된 것으로 알려져 있다[17]. 자연

발효식품에서 자주 분리되는 젖산균인 *Lactobacillus* 및 *Weissella* 속 역시 발효식품의 스타터 배양 균주로 사용되며, 자리돔 내장에서 분리한 균주인 *L. curvatus* 및 *W. minor*는 유산균 중 프로바이오틱스로서 적합한 발효 균주로 이용될 수 있으며, 현재 많은 연구가 진행되지 않은 균주이므로 본 연구에 사용하였다. *L. curvatus* 및 *W. minor* 균주로 발효한 광나무 열매 발효 추출물의 항염, 항산화 및 세포보호 효과를 확인하였으며, 광나무 열매 발효 추출물의 주성분인 salidroside의 함량을 비발효 추출물과 비교 연구하여 화장품 원료 등의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 연구에 사용한 광나무 열매는 2020년 10월에 제주시 한림읍에서 채집한 시료를 제주자원식물연구소(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 건조된 광나무 열매는 분쇄하여 냉장 보관하면서 사용하였다.

2.2. 균주 분리 및 동정

유산균 분리에 사용한 자리돔은 2022년 6월에 서귀포시 보목리(Korea)에서 수집하여 사용하였으며, 자리돔의 내장을 멸균 가위로 잘게 자른 후 buffer로 $10^1 \sim 10^5$ 로 희석하였다. MRS 한천배지에 100 μ L 씩 분주 도말하고, 30 $^{\circ}$ C에서 72 h 배양 후 나타난 독립된 colony 중 특징적인 colony를 순수 분리하였다. 순수 분리한 유산균은 MRS 한천배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 24 h 배양한 후 4 $^{\circ}$ C 냉장 보관하면서 사용하였다. 선별된 균주의 16S rRNA gene은 (주솔젬트(Korea)에 샘플을 전달하여 시퀀싱(sequencing)을 통하여 분석하였으며, NCBI 데이터베이스를 이용하여 분리된 균주와 데이터베이스 상의 표준균주(type strain)와의 유사성(similarity, %)을 확인하였다.

2.3. 광나무 열매 발효물 제조

건조 및 분쇄된 광나무 열매 200 g을 40% MRS 배지(Difco, USA) 3 L에 넣고 121 $^{\circ}$ C에서 15 min 동안 멸균하여 광나무 열매 배지를 준비하였다. 이후 제조한 광나무 열매 배지 중량 당 *L. curvatus* 및 *W. minor* 균주 1%를 접종한 후 35 $^{\circ}$ C에서 66 h 동안 배양하였다[18]. 발효 배양액을 121 $^{\circ}$ C에서 15 min 동안 멸균한 후, 동결건조 및 분말화하여 광나무 열매 발효 분말을 제조하였다.

2.4. 광나무 열매 발효 및 비발효 추출물 제조

광나무 열매 발효 분말 및 비발효 분말 4.0 g을 80% 에탄올 80 mL에 넣고 실온에서 24 h 동안 교반하여 추출하였다. 추출된 용액을 여과하여 걸러진 여액을 감압 농축하고 동결건조시켜 분말형태의 광나무 열매 발효 및 비발효 추출물을 얻었다.

2.5. 항염 활성

2.5.1. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (GIBCO Inc., USA) 및 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., USA) 이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 2 ~ 3 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.5.2. NO 생성 억제 활성

48 well plate에 1×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 배양 후, 배지를 제거하였다. 100 ng/mL의 LPS (Sigma, USA)를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 μ L를 혼합하여 96 well plate에서 10 min 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO₂)를 standard로 사용하여 정량하였다.

2.5.3. 세포 독성 평가(MTT Assay)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Biosesang, Korea) assay는 RAW 264.7 세포를 48 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 전배양 후, LPS와 시료를 농도별로 동시에 처리하여 24 h 배양하였다. 이후 500 μ g/mL의 농도로 MTT를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3 ~ 4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.6. 항산화 활성

2.6.1. DPPH 라디칼 소거 활성

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법[19]을 응용하였고, 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 μ L와 0.2 mM DPPH 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 10 min 동안 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity) 백분율(%)을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma, USA)를 사용하였다.

2.6.2. ABTS⁺ 라디칼 소거 활성

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma, USA) 양이온 라디칼 소거 활성은 Re 등의 방법[20]을 응용하였고, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate (Sigma, USA)를 혼합하여 실온 및 암소에서 16 h 동안 반응시켜 ABTS⁺ 라디칼을 형성시켰다. 이 용액을 에탄올로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.02 가 되도록 하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 μ L와 ABTS⁺ 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 15 min 동안 반응시킨 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성 백분율(%)을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 BHT를 사용하였다.

2.7. 세포보호 효과

2.7.1. 세포 배양

Immortalised human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 ATCC (USA)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin 및 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.7.2. 세포 독성 평가(MTT assay)

96 well plate에 1×10^4 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전배양 후, 배지를 제거하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 각각 처리하여 24 h 배양 후, 500 μ g/mL의 농도로 MTT를 첨가하여 37 °C에서 3 ~ 4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.7.3. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과

96 well plate에 1×10^4 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전배양 후, 배지를 제거하였다. 6 mM 과산화수소를 포함하는 배지 100 μ L로 교환하여 30 min 동안 배양 후, 배지를 제거하고 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)로 2 회 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 각각 처리하고 24 h 배양한 후, MTT assay로 세포 생존율(%)을 계산하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 확인하였다.

2.8. Salidroside 함량 분석

광나무 열매 발효물의 주성분인 salidroside (Sigma, USA)의 함량을 확인하기 위해 HPLC (Alliance, Waters Co., USA) 및 Kromasil 100-5-C₁₈ (4.6 \times 250 mm, AkzoNobel, Netherlands) 컬럼을 사용하여 정량 분석하였다. 각 추출물과 표준품은 메탄올에 녹여 PTFE syringe filter로 여과하여 준비하였다. 이동상은 0.1% 포름산을 포함하는 증류수(용매 A)와 아세트나이트릴(용매 B)을 사용하였으며 유속은 1 mL/min, 주입량은 10 μ L로 하였고 검출기는 PDA detector (275.5 nm)를 사용하였다. 용출조건은 gradient mode로 15 min 동안 용매 B를 2 ~ 26.5%의 비율로 변화시키면서 용출시켰다. 농도별로 제조한 salidroside의 peak 면적을 구하여 회귀 방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였으며, 검량선의 r² 값은 0.999 이상이었다.

2.9. 통계 분석

모든 실험은 3 회 반복으로 이루어졌으며, 실험 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 또한 excel software (version 2022, Microsoft Corp., USA)의 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

광나무 열매(LJF) 발효 추출물의 항염 및 항산화 효능을 확인하기 위해 비발효 추출물과 수율, 효능 및 salidroside의 함량을 비교하였다. 광나무 열매의 발효는 제주 자리돔 내장에서 분리한 유산균인 *L. curvatus* (LJF-LC) 및 *W. minor* (LJF-WM)를 이용하였으며, 각 발효 추출물의 수율이 LJF-LC는 40.5%, LJF-WM은 46.0%로 비발효 추출물

Table 1. Yield of Fermented and Non-fermented Extracts from *L. japonicum* Fruits

Condition of fermentation		Sample (g)	Extract (g)	Yield (%)
Fermentation	<i>L. curvatus</i> (LJF-LC)	4.0	1.62 ± 0.05	40.5 ± 1.1
	<i>W. minor</i> (LJF-WM)	4.0	1.84 ± 0.06	46.0 ± 1.4
Non-fermentation (LJF)		4.0	1.18 ± 0.05	29.5 ± 1.3

(29.5%) 보다 높게 나타남을 확인하였다(Table 1)

광나무 열매 발효 추출물의 항염 효능 검증은 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포를 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성을 확인하였다. 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소로 잘 알려진 LPS는 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6와 같은 염증 매개성 사이토카인들의 분비를 촉진하며 NO의 대량 생성에 관여하게 되어 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있다[21]. 광나무 열매 발효 및 비발효 추출물에 대한 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성 측정 결과, 광나무 열매를 *W. minor* 균주로 발효시킨 추출물(LJF-WM)은 200 μ g/mL 이하의 농도에서 세포 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 효과가 우수함을 확인하였다. 비발효 추출물(LJF)의 경우 고농도(100 ~ 200 μ g/mL)에서 세포독성이 나타나지만 발효 추출물 특히, *W. minor* 발효 추출물은 고농도에서도 세포에 대한 독성 없이 NO 생성을 효과적으로 억제시킴을 확인하였다 (Figure 1).

또한 광나무 열매 발효 추출물의 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 비발효 추출물

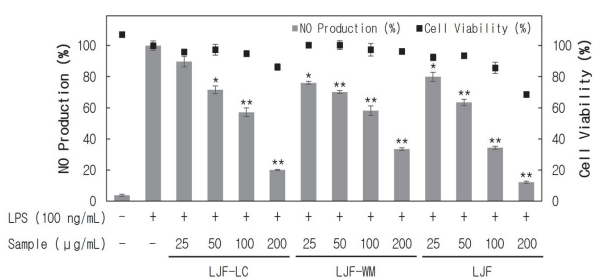


Figure 1. Effects of fermented and non-fermented extract from *L. japonicum* fruits on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 100 ng/mL of LPS only, or with LPS plus fermented and non-fermented extract from *L. japonicum* fruits for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

과 비교하였다. 그 결과 광나무 열매 발효 추출물(LJF-LC 및 LJF-WM)은 발효 후에도 라디칼 소거 활성이 감소하지 않고 비발효 추출물(LJF)과 유사하게 나타남을 확인하였다 (Figure 2). 현재까지 문헌 등에 알려진 광나무 열매 추출물의 항산화 활성은 HT-1080 세포 내 ROS 소거능, peroxynitrite 억제 효과 및 Fe³⁺ 이온에 대한 환원력이 보고 되어 있다[12]. 이와 같은 광나무 열매 및 발효 추출물의 항산화 효능은 활성산소종, 활성질소종 및 라디칼에 대해 유의적인 소거 효과를 가지는 페놀성 화합물이 광나무 열매에 함유되어 나타난 결과로 보인다.

산소의 대사 과정에서 생성되거나 자외선 및 스트레스와 같은 환경적 요인에 의해서 과잉 생성된 과산화수소는

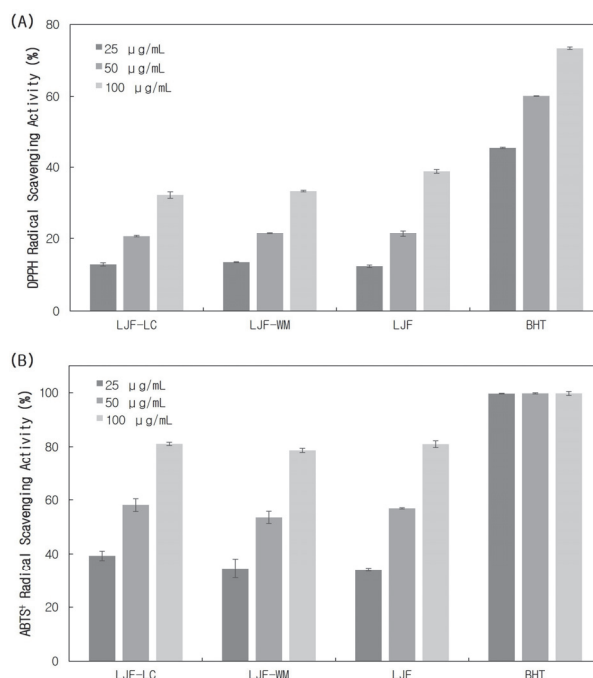


Figure 2. DPPH (A) and ABTS⁺ (B) radical scavenging activities of fermented and non-fermented extract from *L. japonicum* fruits. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

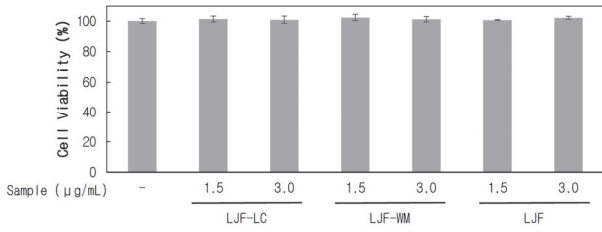


Figure 3. Cell viability of fermented and non-fermented extract from *L. japonicum* fruits. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

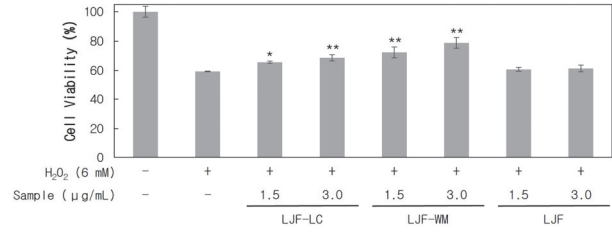


Figure 4. Cell protective effects of fermented and non-fermented extract from *L. japonicum* fruits on HaCaT cells damaged by H₂O₂. HaCaT cells were treated with different concentration of fermented and non-fermented extract from *L. japonicum* fruits for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. (**p* < 0.05, ***p* < 0.01)

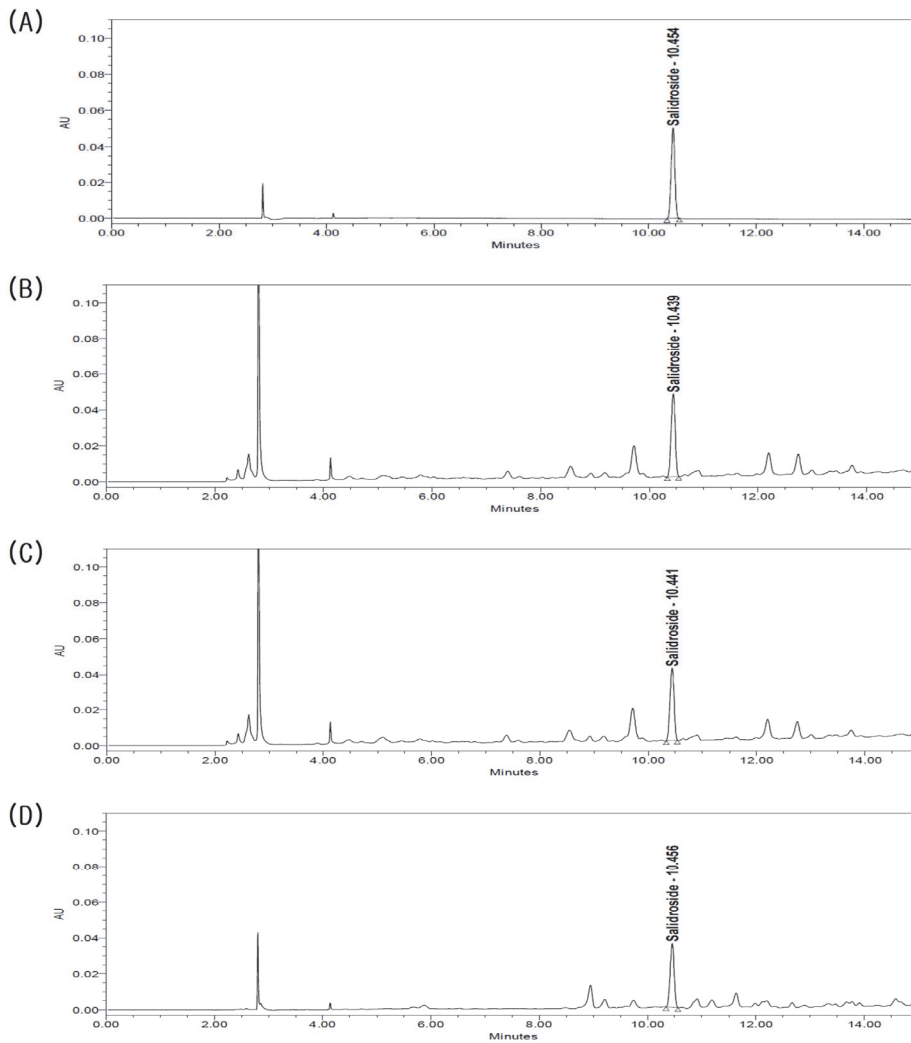


Figure 5. HPLC chromatogram of standard salidroside (A), fermented extract with *L. curvatus* (LJF-LC, B), *W. minor* (LJF-WM, C) and non-fermented extract (LJF, D) from *L. japonicum* fruits at 275.5 nm.

세포막을 통과하여 생체 내 미량으로 존재하는 금속이온과 반응하고 다른 활성산소를 생성시켜 세포 손상을 야기시킨다. 산화적 손상을 유발하는 활성산소인 과산화수소를 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포에 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다[22]. 과산화수소 처리 전, MTT assay로 광나무 열매 발효 및 비발효 추출물의 세포 독성을 확인함으로써 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. 1.5 및 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 광나무 열매 발효 및 비발효 추출물의 세포 독성 평가 결과, 세포 생존율이 모두 90% 이상을 나타내었다(Figure 3).

광나무 열매 발효 및 비발효 추출물이 인간 각질형성세포에 독성을 미치지 않는 농도 범위를 바탕으로, 과산화수소로 세포 손상이 유도된 HaCaT 세포에서 세포보호 효과를 측정하였다. 그 결과 광나무 열매 비발효 추출물(LJF)의 세포 생존율은 과산화수소 6 mM을 처리한 control (59.4%) 대비 증가하지 않았으나, 발효 추출물의 세포 생존율은 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 LJF-LC는 68.8% 및 LJF-WM은 78.8%로 세포보호 효과가 있음을 확인하였다. 특히, 발효 추출물 LJF-WM은 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대하여 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 13.0%, 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 19.4%의 세포보호 효과가 있는 것으로 확인되었다. (Figure 4).

광나무 열매 발효 및 비발효 추출물의 주성분을 확인하기 위해 HPLC 분석을 하였으며, 그 결과 salidroside가 주요 피크로 관찰되었다. Salidroside는 페놀 배당체 구조로 항산화[23], 항염[24] 및 신경보호 작용[25] 등의 효과가 보고되어 있다. 광나무 열매 발효 및 비발효 추출물의 salidroside 함량 분석 결과, 발효 추출물에서 함량이 비발효 추출물 보다 높게 나타남을 확인하였다. 특히, *L. curvatus* 발효 추출물에서 salidroside의 함량은 15.6 mg/g으로 가장 높게 분석되었다(Table 2, Figure 5). Salidroside는 생합성 경로가 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으나, L-tyrosine이 tyrosine decarboxylase (TDC)에 의해 tyramine으로 전환된 후, tryamine oxidase (TYO) 및 alcohol

dehydrogenase (ADH)에 의해 salidroside의 aglycon인 tyrosol이 생성되며, 이후 glucosyltransferase (UGT)에 의해 tyrosol이 salidroside로 전환되는 것으로 메커니즘이 보고되어 있다[26,27]. 따라서 본 연구 결과에서 발효에 의해 salidroside의 함량이 증가한 이유는 *L. curvatus* 및 *W. minor* 균주에 의한 발효과정 동안 salidroside의 생합성 경로에서 작용하는 과정을 유도하기 때문인 것으로 보이나, 이와 관련된 대사경로에 대한 연구가 추후 이루어져야 할 것으로 판단된다.

4. 결론

천연물이 가진 성분이나 소재의 활용성을 증진시키기 위해 유용한 미생물을 이용한 발효의 방법은 다양한 분야에서 오랜 기간 동안 연구 및 적용되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 광나무 열매를 자리돔에서 분리한 유산균인 *L. curvatus* 및 *W. minor*로 발효하여 발효 추출물의 항염, 항산화 효능 및 salidroside의 함량을 비발효 추출물과 비교 분석하였다. 그 결과, 발효 추출물의 수율이 비발효 추출물보다 높게 나타났으며, 특히 *W. minor* 발효 추출물의 수율이 비발효 추출물보다 1.5배 이상 높게 나타나는 것을 확인하였다. 광나무 열매 발효 추출물의 항염 효능 실험 결과, *W. minor* 발효 추출물이 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해시키는 효과가 우수함을 확인하였다. 또한 광나무 열매 발효 추출물은 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성이 비발효 추출물과 유사하게 나타났으며, 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과가 있음을 확인하였다. 광나무 열매 발효물의 주성분인 salidroside의 함량을 분석한 결과, 발효 추출물 LJF-LC에서 15.6 mg/g, LJF-WM에서 13.9 mg/g으로 비발효 추출물인 LJF (12.0 mg/g) 보다 함유량이 높게 분석되었다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 광나무 열매 발효 추출물은 항염, 항산화 및 세포보호 효과를 갖는 친환경 천연 화장품 소재로 활용 가능할 것이라 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 중소벤처기업부와 중소기업기술정보진흥원의 “지역특화산업육성(R&D, S3258521)”사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

Table 2. Content of Salidroside from Fermented and Non-fermented Extracts of *L. japonicum* Fruits

Condition of fermentation		Salidroside (mg/g)
Fermentation	<i>L. curvatus</i> (LJF-LC)	15.6 ± 0.4
	<i>W. minor</i> (LJF-WM)	13.9 ± 0.3
Non-fermentation (LJF)		12.0 ± 0.3

References

1. S. H. Kim, J. E. Kim, and N. H. Lee, Anti-inflammatory and anti-oxidative constituents from the extract of *Cinnamomum yabunikkei* leaves, *J. Kor. Chem. Soc.*, **65**(1), 15 (2021).
2. D. H. Kim, S. J. Park, J. Y. Jung, S. C. Kim, and S. H. Byun, Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyeonhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells, *Kor. J. Herbol.*, **24**(4), 39 (2009).
3. M. J. Kim, N. Y. Bae, K. B. W. R. Kim, J. H. Park, J. s. Choi, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract on LPS-induced RAW 264.7 cells, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **45**(2), 181 (2016).
4. M. H. Kim, J. H. Kim, Y. K. Lee, W. S. Kim, and H. K. Kim, Anti-inflammatory effects and its mechanisms of NANA (N-acylneuraminic acid) isolated from glycomacropeptide, *Korean J. Dairy Sci. Technol.*, **29**(2), 17 (2011).
5. S. B. Park, H. M. Song, H. N. Kim, G. H. Park, H. J. Son, Y. Um, J. a. Park, and J. B. Jeong, Antin-inflammatory effect of Biji (soybean curd residue) on LPS-stimulated RAW264.7 cells, *Korean J. Plant Res.*, **31**(2), 117 (2018).
6. S. H. You, J. S. Moon, A study on anti-oxidative, anti-inflammatory, and melanin inhibitory effects of *Chrysanthemum sibiricum* extract, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **33**(4), 762 (2016).
7. C. H. Shin, Studies on the antioxidative character in the ethyl acetate extractions of *Rumex crispus*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **16**(2), 592 (2001).
8. J. S. Lee, K. S. Lee, and B. K. Song, Experimental studies on the effect of Samul-tang and Samul-tang gagambang aquacupuncture, *J. Oriental Obstet. Gynecol.*, **14**(1), 1 (2001).
9. Y. H. You, J. H. Koh, S. O. Chung, W. J. Jun, and K. M. Kim, Effects of fermented Ssanghwatang on swimming capacity in mice, *Food Sci. Biotechnol.*, **18**(1), 275 (2009).
10. J. N. Um, J. W. Min, K. S. Joo, and H. C. Kang, Enhancement of antioxidant and whitening effect of fermented extracts of *Scutellariae baicalensis*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **43**(3), 201 (2017).
11. J. O. Jo and I. C. Jung, Phenolic compounds of *Ligustrum japonicum* leaves, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **35**(6), 713 (2006).
12. Y. W. Seo and H. J. Kim, Antioxidant activity of fruits of *Ligustrum japonicum*, *Ocean and Polar Research*, **39**(2), 115 (2017).
13. Q. M. T. Ngo, T. Q. Cao, M. H. Woo, B. S. Min, and K. Y. Weon, Cytotoxic triterpenoids from the fruits of *Ligustrum japonicum*, *Natural Product Sciences*, **24**(2), 93 (2018).
14. Q. M. T. Ngo, H. S. Lee, V. T. Nguyen, J. A. Kim, M. H. Woo, and B. S. Min, Chemical constituents from the fruits of *Ligustrum japonicum* and their inhibitory effects on T cell activation, *Phytochemistry*, **141**, 147 (2017).
15. S. W. Yeon, S. R. Choi, Q. Liu, Y. H. Jo, D. H. Choi, M. R. Kim, S. H. Ryu, S. Lee, B. Y. Hwang, H. S. Hwang, and M. K. Lee, Therapeutic potentials of secoiridoids from the fruits of *Ligustrum lucidum* Aiton against inflammation-related skin diseases, *Pharmaceuticals*, **15**(8), 932 (2022).
16. Y. J. Kim, J. E. Lee, H. S. Jang, S. Y. Hong, J. B. Lee, S. Y. Park, and J. S. Hwang, Oleanolic acid protects the skin from particulate matter-induced aging, *Biomol. Ther.*, **29**(2), 220 (2021).
17. C. H. Lee, Fish fermentation technology, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**(6), 645 (1989).
18. J. Y. Lee, T. H. Park, S. H. Park, S. A. Yang, and K. H. Jhee, The antimicrobial activity of fermented extracts from Korean *Dendropanax morbifera*, *J. Life Sci.*, **29**(1), 29 (2019).
19. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
20. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(9-10), 1231 (1999).
21. A. L. Jeon, J. E. Kim, and N. H. Lee, Whitening and anti-inflammatory constituents from the extract of

- Citrullus lanatus* vines, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **43**(1), 53 (2017).
22. H. S. Yeom, N. H. Lee, and J. M. Hyun, Anti-oxidative activities for the flavonoids of the *Syzygium aqueum* Burm.f. Alston branches from Jeju island, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(2), 151 (2018).
23. Y. Yuan, S. J. Wu, X. Liu, and L. L. Zhang, Antioxidant effect of salidroside and its protective effect against furan-induced hepatocyte damage in mice, *Food Funct.*, **4**(5), 763 (2013).
24. S. Guan, H. Feng, B. Song, W. Guo, Y. Xiong, G. Huang, W. Zhong, M. Huo, N. Chen, J. Lu, and X. Deng, Salidroside attenuates LPS-induced pro-inflammatory cytokine responses and improves survival in murine endotoxemia, *International Immunopharmacology*, **11**, 2194 (2011).
25. B. Zhang, Y. Wang, H. Li, R. Xiong, Z. Zhao, X. Chu, Q. Li, S. Sun, and S. Chen, Neuroprotective effects of salidroside through PI3K/Akt pathway activation in Alzheimer's disease models, *Drug Des Devel Ther.*, **10**, 1335 (2016).
26. J. Jiang, H. Yin, S. Wang, Y. Zhuang, S. Liu, T. Liu, and Y. Ma, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of salidroside from glucose, *J. Agric. Food Chem.*, **66**(17), 4431 (2018).
27. H. Liu, Y. Tian, Y. Zhou, Y. Kan, T. Wu, W. Xiao, and Y. Luo, Multi-modular engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titre production of tyrosol and salidroside, *Microb. Biotechnol.*, **14**(6), 2605 (2021).