

***Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus paracasei* 복합 배양의 피부 미백 및 주름 개선 활성 증진**

김 남 영* · 이 현 용**†

*강원대학교 생물소재공학과, **서원대학교 식품공학과
(2015년 8월 21일 접수, 2015년 9월 16일 수정, 2015년 9월 23일 채택)

Enhancement of Skin Whitening and Anti-wrinkle Activities of the Co-culture of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei*

Nam Young Kim* and Hyeon Yong Lee**†

*Department of Medical Biomaterial Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea.

**Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Chungju 361-742, Republic of Korea.

(Received August 21, 2015; Revised September 16, 2015; Accepted September 23, 2015)

요 약: 본 연구는 여성의 손으로부터 분리한 두 유산균의 co-culture에 의한 항산화활성에 대한 것이다. *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*)와 *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*)를 함께 배양하는 것은 최초이며, co-culture를 이용한 유산균은 tyrosinase 저해율이 *L. paracasei*와 *L. rhamnosus*에 비해 20.68%로 가장 높은 수치를 보였다. 또한, co-culture 유산균은 melanin 생성 저해율에서도 63.5%의 가장 높은 활성을 보였으며, 주름개선활성에 영향을 미치는 MMP-1의 생성량이 3726.3 pg/mL로 확인되었다. 반면 단일 유산균 배양시 얻어지는 MMP-1 생성량은 각각 *L. rhamnosus*가 13613.5 pg/mL, *L. paracasei*는 13012.0 pg/mL이 확인되었다. Collagen 생성량을 확인한 결과 co-culture 유산균이 380.7 ng/mL로 323.4 ng/mL의 양이 확인된 *L. paracasei*와 304.1 ng/mL의 양이 확인된 *L. rhamnosus*보다 많은 양이 생성됨을 확인하였다. 상기의 결과는 유산균의 co-culture가 항산화활성 증진을 시킬 수 있다는 것을 나타내고, 이는 항산화 활성에 영향을 미치는 항산화 활성을 측정된 결과 단일 유산균 배양을 통한 결과보다 co-culture 유산균의 항산화 활성이 더 높은 것으로 확인할 수 있었다.

Abstract: In this study, cosmeceutical activities of the co-cultures of both lactic acid bacteria isolated from the hands of women, *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) and *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) were first reported: For whitening and anti-wrinkle activities, the co-culture showed the highest tyrosinase inhibition of 20.68%, compared *L. paracasei* and *L. rhamnosus*. The co-culture also showed the highest inhibition of melanin synthesis as 63.7%. In observing the anti-wrinkle activities of the co-culture, it generated only 3726.3 pg/mL of matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) production when 13613.5 pg/mL and 13012.0 pg/mL of MMP-1 production were estimated from *L. rhamnosus* and *L. paracasei*. Besides these, the extract from the co-culture yielded higher collagen production as 380.7 ng/mL, compared to 323.4 ng/mL and 304.1 ng/mL from *L. paracasei* and *L. rhamnosus*. These results indicate that the co-culture of both lactic acid could improve its cosmetic activities. This hypothesis was also confirmed that the co-culture of both bacteria showed strong antioxidant activities of DPPH free radical scavenging while the extract of *L. rhamnosus* and *L. paracasei*.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, anti-skin wrinkle effect, skin whitening effect

1. 서 론

현대사회는 과학기술의 발달에 따른 삶의 질 향상으로 사람들의 관심사는 의식주에서 더 나아가, 개인의 건강과 미용에 초점이 맞추어지게 되었다. 최근 남녀노소 할 것 없이 피부미용에 많은 관심이 집중되어 있으며, 대표적으로 피부미백과 주름개선이 주요 관심사에 해당된다. 하지만, 이러한 피부미용은 자외선을 받음으로서 생성되는 활성산소에 멜라닌(melanin) 색소가 필요 이상으로 생성되어 피부에 기미나 점, 색소 침착과 피부노화 등의 피부질환을 유발할 수 있는 문제가 있다[1]. 멜라닌 합성에는 효소 tyrosinase가 관여하게 되는데 이 효소에 의해 tyrosine이 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 변하고, 활성산소에 의한 산화반응 및 효소반응에 의하여 dopachrome로 바뀌고 멜라닌으로 합성하게 되며[2], 활성산소는 피부 탄력유지에 도움이 되는 collagen의 생성을 저해할 뿐만 아니라, collagen을 분해하는 효소 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 생성을 촉진하여 피부노화를 더욱 빠르게 진행시킨다[3]. 따라서, 이러한 화장품 시장에서는 인체에 부작용이 적은 천연물을 이용한 화장품 제조에 많은 노력을 기울이고 있으며, 실제로도 다양한 제품들이 출시되어 시판되고 있다.

이러한 천연물을 이용한 방안 중, 유산균은 현재까지 항균 활성 및 면역 활성, 항산화 활성에 대한 효과가 보고된 바 있으며[4-6], 근래에는 유산균의 미백 및 보습효능에 관해 연구가 되어 향장 소재로서의 가능성을 언급하였다[7]. 이러한 유산균은 치즈나 요구르트 등의 유제품을 비롯한 발효 식품이 많이 사용되었지만[8,9], 최근 들어 각 중 천연물의 생리활성 성분을 가수분해하여 전환시키는 기능이 있으며[10], 천연물을 발효시켜 유용활성 물질의 증진을 가져다 준다는 연구 및 보고가 이루어지고 있다[11-13]. 특히, 유산균 중에서 *Lactobacillus*균의 효능으로는 많은 연구가 되어 있으며 면역력 증진, 항균 효능, 피부미백 및 아토피성 피부염 개선효과 등이 보고된 바 있다[8,9]. 이에 착안하여 본 연구는 인체 피부에서 분리 및 동정하여 획득하게 된 균주 중에서 인체에 유익한 균으로 잘 알려진 유산균 *Lactobacillus*균 중 *L. rhamnosus*와 *L. paracasei*를 이용한 향장효능을 이용한 향장효능 평가를 실시하였으며, 그 효과를 증진시키기 위해 co-cul-

ture 방법을 적용하였다.

Co-culture는 기존에 배양 방법보다 유산균의 균체량을 증진 시킬 수 있는 장점이 있다고 알려져 있다[14]. 또한, 유산균 *Lactobacillus*에서는 항산화 효과와 함께 향장 활성 효과를 보이는 lipoteichoic acid 등의 활성 물질이 있다고 알려져 있기 때문에 co-culture 방법을 통해 유산균의 균체량을 증진시켜 향장 활성을 높이는 방안을 모색하였다[15]. 따라서, 항산화 효과가 주름개선 및 피부미백효능에 대해 미치는 영향과 기존에 연구된 유산균에 대한 미백효능을 참고하여, 유산균 *L. rhamnosus*와 *L. paracasei*의 co-culture를 이용하여 유산균에 대한 향장소재로서의 가치를 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포 및 시약

인간 표피 세포인 human dermal fibroblasts (HDF, CCD-986sk) (KCLB NO. 21947, KCLB, Korea)와 mouse melanocyte인 B16F10 (KCLB NO. 80008, KCLB, Korea)은 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다. 구입한 세포는 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 그 외 사용된 모든 시약들은 Sigma-aldrich (USA)을 통하여 구입, 사용하였다.

2.2 균의 분리, 동정 및 배양

실험에 쓰인 유산균 *L. rhamnosus*와 *L. paracasei*는 20 ~ 40대 남녀 40명의 손바닥을 MRS agar 배지에 찍어서 획득한 콜로니를 MRS broth에 옮겨 37 °C에서 48 h을 배양하였다. 이때, 콜로니가 확연하게 나타난 20대 여성의 손바닥을 찍은 배지에서 배양한 균을 다시 MRS agar에 2차 접종을 실시하여, 획득한 콜로니를 16S rDNA sequence 분석을 통해 유산균 식별을 진행하여 신규 유산균 *L. rhamnosus*와 *L. paracasei*를 동정 하였으며, 각각 한국미생물보존센터에 기탁하여 기탁번호 KCCM11349P와 KCCM11254P를 부여받았다[16]. 실험에 사용된 유산균 파쇄액은 *L. rhamnosus*와 *L. paracasei*를 MRS broth 배지(Difco™ *Lactobacilli* MRS broth, BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 37 °C, 120 rpm에서 배양하였으며, 초기균수는 10⁵

CFU/mL로 하였다. Co-culture을 위해서 seed culture한 *L. rhamnosus*와 *L. paracasei* 유산균을 1 : 1 (v : v)로 총 1 L가 되게 하였다. 두 가지 균을 48 h 동안 배양하였으며, 최종적으로 각각 4.3×10^7 과 4.1×10^7 의 균수로 배양을 하였다. 이 같은 방법으로 얻어진 각 유산균 배양액과 co-culture 유산균을 원심분리기(Supra 30K, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)를 사용해 6000 rpm에서 15 min 동안 원심분리하고, 얻어진 유산균체를 초음파(AUG-R3-900, Asiaultrasonic, Korea)를 이용하여 140 kHz에서 30 min 동안 균을 파쇄하였다. 파쇄된 유산균을 상층액만 따로 분리해 여과한 후 동결건조기(PVTFA 10AT, IIShinBioBase, Dongducheon, Korea)에 72 h 동안 동결건조하여 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

2.3. 배양체 추출물들의 세포 독성 평가

유산균 균체 파쇄물들의 세포독성을 평가하고자 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 사용한 MTT assay를 실시하였다. 피부섬유아세포 CCD-986sk를 3.7×10^5 cells/mL 농도로 96-well plate에 주입한 뒤 24 h 동안 incubator에서 배양하여 부착시켰다. 24 h 뒤에 배지를 제거하고 유산균 샘플별 농도에 따라 200 μ L씩 주입한 후, 다시 하루 동안 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 시료를 제거하고, MTT 용액을 첨가하여 빛을 차단한 채 37 $^{\circ}$ C 조건으로 4 h 동안 배양하였다. 4 h 후에 MTT 용액을 제거하고, PBS로 2회 세척하였다. 세척 후 DMSO를 200 μ L 주입한 뒤 30 min 동안 반응을 시키고 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 570 nm의 파장에서 흡광도를 확인하여 유산균에 대한 세포독성을 확인하였다[17].

2.4. DPPH Free Radical Scavenging 활성 측정

DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) free radical scavenging activity 실험은 기존에 연구를 참고하여 진행하였다[18]. 각 공정별 농도별로 시료 150 μ L을 첨가 후 methanol로 제조한 0.1 mM DPPH용액 150 μ L을 혼합하여 상온에서 30 min 간 암실에 방치 한 뒤 517 nm의 파장에서 흡광도 측정하였다. 측정된 값은 아래의 식으로 구하여 DPPH radical scavenging activity (%)

로 나타내었다.

$$\begin{aligned} & \text{DPPH radical scavenging activity}(\%) \\ &= \frac{\text{control O.D.} - \text{sample O.D.}}{\text{control O.D.}} \times 100 \end{aligned}$$

2.5. Tyrosinase 효소 저해율 측정

유산균의 tyrosinase inhibition 확인은 기존의 실험방법을 참고하여 진행하였다[19]. 50 mM의 potassium phosphate buffer에 L-tyrosine (0.3 mg/mL)을 용해시킨 용액 400 μ L와 추출물 100 μ L를 넣고 그 후에 tyrosinase (2000 units/mL) 25 μ L을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 조건에서 15 min 동안 방치하였다. 15 min 동안 반응한 뒤 냉장고에 넣어 반응을 끝내고 475 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. Melanin 합성 저해율 측정

배양한 멜라닌색소 생성 세포 B16F10을 96-well plate에 well당 2.5×10^5 cell/mL 만큼 주입하고 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 조건에서 24 h 동안 배양하였다. 24 h 지난 후 각 유산균 별 파쇄물을 배지에 녹여 농도별로 처리하고 다시 48 h 동안 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 조건으로 incubator에서 배양하였다. 48 h 후 처리한 샘플을 제거하고 PBS로 2회 세척 후 10%의 DMSO (dimethyl sulfide)를 포함한 1 N 농도의 NaOH을 넣고 2 h 동안 배양하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다[20].

2.7. Metalloproteinase-1 (MMP-1) 합성 저해능 평가

Collagen을 분해하는 효소 중 하나인 MMP-1 실험은 Human MMP-1 ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, GA, USA)를 통해 평가하였다. 먼저 CCD-986sk 세포를 부착한 well plate에 배지에 녹인 유산균 샘플을 처리하고 2일 동안 배양한 상등액을 실험에 사용하였다. MMP-1 ELISA 키트에 준비된 plate에 샘플과 standard 100 μ L을 주입하고 상온에서 2 h 30 min 간 배양한다. 배양한 후 배양액을 제거하고 wash buffer로 4회 세척한 뒤에 100 μ L의 준비된 detection antibody MMP-1 시약을 처리하고 1 h 동안 상온에 배양하였다. 1 h 후 처리한 배양액을 버리고 다시 4회 세척한 후 streptavidin solution을 넣고 45 min 간 상온에서 흔들어주었다. 다시 배양액을 제거하고 그 전과 같이 wash buffer로 세

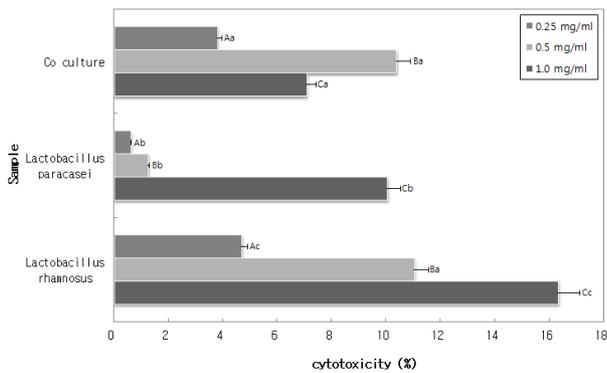


Figure 1. Cytotoxicity of the extracts from *L. rhamnosus*, *L. paracasei* and the co-cultures. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-b) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$.

척 후 substrate reagent를 넣어 30 min 동안 암실에서 방치하였다. 30 min 뒤에 반응이 종료 되도록 stop solution을 50 μ L 넣어 반응을 종결시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다[21].

2.8. Collagen 합성능 평가

유산균 샘플에 대한 collagen 생성량은 procollagen Type I C-peptide (PIP) EIA Kit (Takara, Otsu, Japan) 제품을 통하여 확인하였다. 제품에 포함된 plate에 먼저 antibody-POD conjugate solution 100 μ L을 넣고, MMP-1과 마찬가지로 앞서 피부섬유아세포에 배양한 유산균 배양액 상등액을 농도별로 20 μ L를 첨가하였다. 첨가한 뒤 호일로 빛을 차단하고 37 $^{\circ}$ C 조건에서 3 h 배양하였다. 3 h 뒤 배양액을 제거하고, 각 well에 washing buffer로 4회 세척한 후 substrate solution 처리하여 상온에서 15 min 동안 방치하였다. 15 min 뒤 stop solution인 1 N H₂SO₄을 넣어 반응을 종결시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagen 생성량의 정량은 제품에 준비된 standard를 통해 그 값을 정량하였다[21].

2.9. 통계처리

모든 실험의 데이터 통계처리는 3회 반복하였으며, 실험값의 통계는 statistical analysis system (SAS) 프로그램을 통하여 two-way ANOVA 방법으로 처리하였

다. 처리구간의 최소 유의 수준의 차는 $p < 0.05$ 로 처리 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유산균 파쇄물들의 세포 독성평가

시료를 제외한 배지만을 처리한 것을 control로 하고 0%의 세포 독성으로 하여 각 파쇄물의 세포독성을 측정된 결과를 Figure 1에 나타내었다. *L. rhamnosus* 파쇄물의 경우는 첨가 농도에 따라 농도 의존적으로 세포 독성이 증가하는 경향을 보였으며, 최대 처리 농도 1.0 mg/mL에서 16.32%의 세포독성을 보였다. 또한 *L. paracasei*의 경우도 농도 의존적으로 독성이 증가하였으며, 최대 농도에서 10.04%의 독성 나타내 *L. rhamnosus*균 보다 상대적으로 낮은 독성을 보였다. 반면, 두 유산균을 co-culture한 파쇄물의 경우는 전체적으로 세포 독성이 감소하는 경향을 보였으며, 0.5 mg/mL 농도에서 10.38% 독성을 보였다. 이는 기존의 다른 천연물들의 해당 세포에 대한 평균적인 세포 독성인 15 ~ 20% 보다 낮은 것으로 본 실험에 사용된 유산균 파쇄물이 피부 세포에 독성이 없음을 확인하였다[22].

3.2. 유산균 파쇄물의 항장 활성 평가

Tyrosinase 저해에 대한 각 유산균의 활성 정도를 측정함으로써 각 샘플의 미백효능을 확인하였다(Table 1). *L. rhamnosus*의 경우 최대 17.92%의 저해 효과를 보였고, 다음으로 *L. paracasei*가 19.94%의 저해율을 보였다. *L. rhamnosus*와 *L. paracasei*의 co-culture균이 20.64%로 가장 높은 효과를 보이긴 하였으나, *L. paracasei* 균과는 유의적인 차이가 없었다. 양성대조군으로 쓰인 ascorbic acid가 55.76%를 나타내 이와 비교하였을 때, 유산균샘플의 tyrosinase 저해 활성률이 낮았으며 다른 미백효능에 대해 확인된 일부 천연물들이 동일 농도에서 50 ~ 70% 가량 높은 수치가 확인된 것에 반해 유산균 파쇄물의 경우 그 효과가 비교적 낮은 것으로 사료된다[23,24]. Tyrosinase 저해 평가에 이어, 유산균의 피부미백에 대한 효능을 확인하기 위하여 멜라닌 생성세포 B16F10을 이용한 멜라닌 생성 저해 측정을 확인함으로써 미백효능을 평가하였다(Figure 2). 유산균 *L. rhamnosus*의 경우 샘플 최대 처리 농도인 1.0

Table 1. Estimation of Inhibition Ratios of Tyrosinase Synthesis of the Extracts from *L. rhamnosus*, *L. paracasei* and the Co-cultures

Tyrosinase inhibition (%)	Concentration (mg/mL)		
	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL
Sample			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	11.16 ± 0.23 ^{Aa}	13.41 ± 0.58 ^{Ba}	17.92 ± 1.38 ^{Ca}
<i>Lactobacillus paracasei</i>	12.57 ± 0.59 ^{Ab}	19.94 ± 1.09 ^{Bb}	17.17 ± 1.51 ^{Ca}
Co-culture	14.60 ± 1.32 ^{Ac}	20.68 ± 1.64 ^{Bb}	17.73 ± 1.11 ^{Ca}
Ascorbic acid (0.1 mg/mL)		55.76 ± 3.18	

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$.

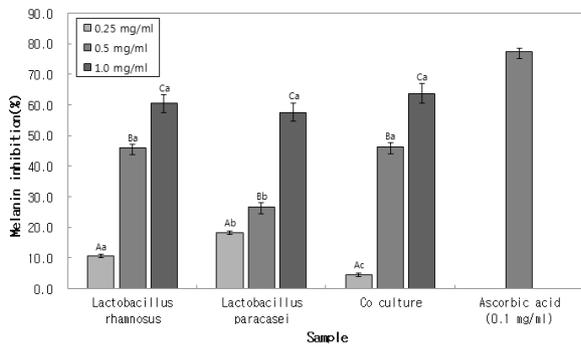


Figure 2. Comparison of inhibition of melanin synthesis by the extracts from *L. rhamnosus*, *L. paracasei* and the co-cultures. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$.

mg/mL에서 60.5%만큼의 멜라닌 색소 생성저해 효과를 확인할 수 있었으며, *L. paracasei*는 동일 농도에서 57.6%의 멜라닌 생성 저해를 보였다. co-culture 유산균 시료는 가장 낮은 0.25 mg/mL의 농도에서는 유산균 각각의 효과에 비해 매우 낮은 활성을 보였으나, 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성 저해율이 상승하여 다른 두 유산균에 비해 가장 높은 63.7%의 저해율을 확인하여 두 유산균을 co-culture하였을 때, 그 값이 증진됨을 확인할 수 있다. 상기의 유산균샘플들의 멜라닌 색소 저해율은 피부미백에 대해 보고된 바 있는 대추 및 포도발효물의 생리활성에 대한 연구에서 동

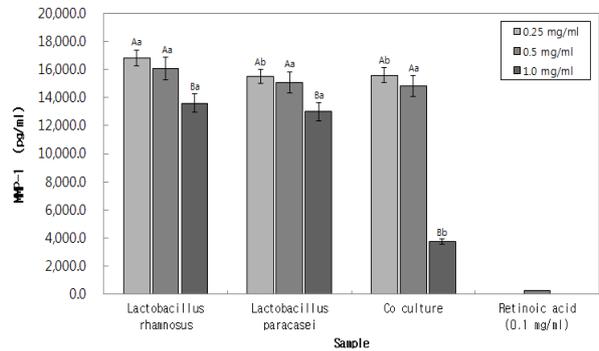


Figure 3. Comparison of MMP-1 production by the extracts of *L. rhamnosus*, *L. paracasei* and the co-culture. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-B) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-b) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$.

일농도에서 최대 40%의 멜라닌 저해율을 보여[25], 유산균이 멜라닌 색소 저해효과를 가지는 다른 천연물 이상으로 효과가 있음을 확인할 수 있다.

또한, 유산균의 주름개선에 대한 효과를 확인하고자 MMP-1 생성량을 측정하였다(Figure 3). Collagenase인 MMP-1의 생성량이 적을수록 피부탄력을 유지하는 기능이 있는 collagen이 분해가 되지 않기 때문에 주름개선에 대한 효과가 있다고 할 수 있다. 모든 유산균 샘플이 1.0 mg/mL까지 농도가 증가할수록 MMP-1의 생성량이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. *L. rhamnosus*는 최저 13613.5 pg/mL의 생성량을 보

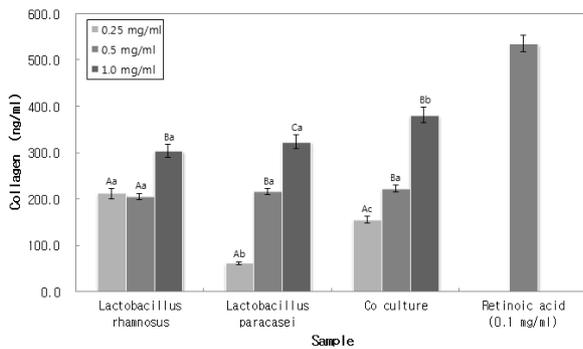


Figure 4. The production of collagen from the extracts of *L. rhamnosus*, *L. paracasei* and the co-cultures. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$.

였으며, *L. paracasei*는 좀 더 낮은 13012.0 pg/mL의 생성량을 보였다. 두 유산균의 co-culture 시료는 1.0 mg/mL에서 3726.3 pg/mL의 MMP-1 생성량이 측정되어 두 균 단일의 MMP-1 저감효과 보다 co-culture하였을 때 그 효과가 증가하여 co-culture 시 주름개선에 대한효과가 증진됨을 알 수 있었다. 그러나, 양성대조군으로 쓰인 retinoic acid의 경우 236.8 pg/mL으로 유산균 샘플이 15배에서 최대 50배 이상 많은 양이 측정되었으며, 주름개선효능에 대해 보고된 바 있는 아로니아 추출물의 MMP-1 생성량은 동일 농도에서 100 pg/mL 미만으로 유산균 샘플의 MMP-1 저감효과는 비교적 낮은 것으로 보인다[21]. 피부탄력을 유지하는 collagen에 대한 생성량을 확인함으로써 주름개선에 대한 유산균의 효능을 확인하였으며 그 결과를 Figure 4에 나타내었다. *L. rhamnosus*의 collagen 생성량은 최대 농도 1.0 mg/mL에서 304.1 ng/mL로 가장 낮은 collagen 생성량이 측정되었으며, *L. paracasei*의 경우 323.4 ng/mL로 보다 높게 측정되었다. 두 균의 co-culture는 최대 농도에서 380.7 ng/mL로 가장 높은 collagen 생성량을 확인하였다. Collagen 생성량 또한 두 유산균을 혼합하였을 때, 유산균 각각의 주름개선 효능보다 더욱 증진됨을 알 수 있었다. 유산균 샘플의 collagen 생성량은 양성대조군인 retinoic acid에 비하여 낮은 수치이나, 유산균의 상기와 같은 결과는 초음파 처리 아로니아 추출물의 주름개선 효능에 대해 보고

한 논문을 보면[21], 아로니아 추출물의 경우 동일농도에서 최대 200 ~ 250 ng/mL로 유산균 샘플의 collagen 생성량이 더욱 높아 주름개선에 대한 효능이 있을 것으로 사료된다.

특히, 본 연구에서 나타나는 항장 활성 결과는 그람 양성균에 존재하는 lipoteichoic acid (LTA)의 성분으로 인한 것으로 사료된다[26]. 기존에 알려진 바에 의하면, 그람 양성균에는 lipoteichoic acid가 약 2% (dry weight of cells) 가량 함유되어있는데[26], 이 lipoteichoic acid는 항산화 및 멜라닌 색소 생성 저해 등의 효능이 알려져 있다[14,27]. 따라서, 본 연구의 유산균에도 lipoteichoic acid가 존재하고 있으므로 항장 활성이 존재한다고 가정을 할 수 있다. 다만 lipoteichoic acid의 함량이 매우 적게 존재하기 때문에 단리 물질로서의 효과는 낮을 수 있다. 하지만, 유산균들의 co-culture에 의해 균체수가 증가한다는 기존의 연구를 참고하면 co-culture를 통해 배양된 유산균은 그 균체량이 단일 배양의 균체량 보다 많이 때문에 lipoteichoic acid를 비롯하여 세포막에 포함 된 인지질 등 그 외 활성 물질들에 의해 피부 미백 및 주름개선효능이 증가된 것으로 사료된다[15]. 다만, 기존에 연구되어진 유산균 파쇄물에 대한 항장 활성의 경우 lipoteichoic acid나 substance P 등의 단리 물질의 연구 등 극히 일부만 연구가 되어 있기 때문에 항장 활성을 보이는 물질에 대한 추가 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

3.3. 파쇄물의 DPPH Free Radical 소거능을 이용한 항산화능 평가

상기의 얻어진 co-culture 유산균의 항장 활성 결과를 항산화능과 연계하여 평가하고자 DPPH 실험법을 진행하였다. Table 2를 보면 유산균 *L. rhamnosus*는 최대 농도 1.0 mg/mL에서 16.03%의 자유라디칼 소거활성을 보였으며, *L. paracasei*의 경우 15.54%의 소거활성을 확인하여 *L. rhamnosus*와 유의적인 차이는 없었다. 두 유산균의 혼합배양균 co-culture는 19.61%의 활성률을 보여 다른 단일 유산균 샘플에 비해 높은 활성률을 보였지만 양성대조군인 ascorbic acid와 비교하였을 때, 매우 낮은 자유라디칼 소거활성을 확인할 수 있었다. 항산화효능에 대해 잘 알려진 일부 천연물들의 DPPH소거활성값은 초고압 처리한 블루베리의 경우 동일농도에서 블루베리의 경우 30 ~ 50%의 소거활

Table 2. DPPH Free Radical Scavenging Activities of *L. rhamnosus*, *L. paracasei* and the Co-cultures

DPPH Free radical scavenging (%)	Concentration (mg/mL)			
	Sample	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		4.32 ± 0.97 ^{Aa}	15.31 ± 2.06 ^{Ba}	16.03 ± 0.92 ^{Ba}
<i>Lactobacillus paracasei</i>		10.48 ± 1.26 ^{Ab}	12.41 ± 0.35 ^{Bb}	15.54 ± 0.83 ^{Ca}
Co-culture		10.73 ± 1.08 ^{Ab}	15.17 ± 0.59 ^{Ba}	19.61 ± 1.31 ^{Cb}
Ascorbic acid (0.1 mg/mL)			78.64 ± 3.38	

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-b) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$.

성을 보였고[28], 증숙처리한 더덕은 10 ~ 40%만큼의 소거활성을 보여 유산균과쇄물의 항산화 효과는 천연 물들에 비하여 다소 낮은 값을 확인할 수 있다[29]. 따라서, 이러한 항산화 효과로 인한 활성을 바탕으로 활성산소로 인한 melanin 생성 촉진의 억제 및 MMP-1의 합성의 저해에 활성이 있는 것을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구는 20대 여성으로부터 새롭게 분리한 두 종류의 유산균인 *L. rhamnosus* 와 *L. paracasei* 두 균체를 co-culture함으로써 향장 활성의 증진 효과에 대한 결과를 처음으로 보고하게 되었다. 단일 배양 보다 co-culture를 통한 유산균 파쇄물의 향장 활성이 높아지는 것을 확인하였으며, 특히 co-culture를 통한 유산균 파쇄물의 경우 collagen 생성량 및 MMP-1 저해에 대한 향장 활성이 각각 단일 균체의 활성들보다 현저히 증가되는 것이 확인되었다. 특히, 높은 항산화 효과로 인한 활성을 바탕으로 활성산소로 인한 melanin 생성 촉진의 억제 및 MMP-1의 합성의 저해에 활성이 있는 것을 확인하였으며, 유산균에 대한 향장소재로서의 활용 가능성이 높다고 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : HN12C0060).

Reference

1. K. Wang, R. D. Lin, F. L. Hsu, Y. H. Huang, H. C. Chang, C. Y. Huang, and M. H. Lee, Cosmetic applications of selected traditional chinese herbal medicines, *J. Ethnopharmacol.*, **106**(3), 353 (2006).
2. S. Alaluf, A. Heath, N. Carter, D. Atkins, H. Mahalingam, K. Barrett, R. Kolb, and N. Smit, Variation in melanin content and composition in type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: the dominant role of DHI, *Pigment Cell Res.*, **14**(5), 337 (2001).
3. S. H. Park, K. H. Lee, C. S. Han, K. H. Kim, and Y. H. Kim, Inhibitory effects of *carex humilis* extract on elastase activity and matrix metalloproteinase-1 expression, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **36**(2), 129 (2010).
4. H. Lee, S. G. Yang, S. N. Park, and D. Y. Jeon, Effect of *Lactobacilli* on reactive oxygen scavenging and immune stimulation, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**(4), 290 (1992).
5. M. Y. Lin and F. J. Chang, Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Dig. Dis. Sci.*, **45**(8), 1617 (2000).
6. S. H. Park, Y. A. Kim, D. K. Lee, S. J. Lee, M. J. Chung, B. Y. Kang, K. J. Kim, and N. J. Ha, Antibacterial activity and macrophage activation of

- lactic acid bacteria, *J. Environ. toxicol.*, **22**(4), 287 (2007).
7. C. C. Tsai, C. F. Chan, W. Y. Huang, J. S. Lin, P. Chan, H. Y. Liu, and Y. S. Lin, Applications of *Lactobacillus rhamnosus* spent culture supernatant in cosmetic antioxidation, whitening and moisture retention applications, *Molecules*, **18**(11), 14161 (2013).
 8. W. S. Choi, H. S. Kwon, H. W. Lim, R. H. No, and H. Y. Lee, Whitening effect of *Lactobacillus rhamnosus* associated with its antioxidative activities, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**(2), 183 (2013).
 9. S. Tadao and K. S. Lim, Immunogenicity and survival strategy of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human Gut, *Korean J. Dairy Sci. Technol.*, **30**(1), 31 (2012).
 10. M. C. Yang, S. W. Jeong, and J. Y. Ma, Analysis of constituents in Sipjundaebotangs fermented by lactic acid bacteria, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **39**(4), 350 (2011).
 11. W. S. Choi, H. S. Kwon, R. H. No, G. P. Choi, and H. Y. Lee, Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**(4), 303 (2013).
 12. N. Y. Kim, Y. D. Lee, S. C. Cho, Y. C. Shin, and H. Y. Lee, Enhancement of anti-inflammation effect by fermentation process in *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott extract, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **22**(6), 475 (2014).
 13. J. B. Weon, B. R. Yun, J. W. Lee, M. R. Eom, H. Y. Lee, D. S. Park, H. C. Chung, J. Y. Chung, and C. J. Ma, Cognitive enhancing activity of the steamed and fermented extracts of *Codonopsis lanceolata* Radix, *Yakhak Hoeji*, **57**(5), 323 (2013).
 14. H. R. Kim, H. G. Kim, B. J. Jung, G. E. You, S. J. Jang, and D. K. Chung, Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells, *Mol. Cells*, **38**(2), 163 (2015).
 15. J. H. Kim and J. I. Kim, Processing of radish juice by mixed culture with lactic acid bacteria, *Korean J. Food Preserv.*, **6**(4), 448 (1999).
 16. Korea, PCT/KR2013/000801 (2014).
 17. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**(1-2), 55 (1983).
 18. B. M. Dietz, Y. H. Kang, G. Liu, A. L. Eggler, P. Yao, L. R. Chadwick, G. F. Pauli, N. R. Farnsworth, A. D. Mesecar, and R. B. V. Breemen, Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase, *Chem. Res. Toxicol.*, **18**(8), 1296 (2005).
 19. J. E. Kim, A. R. Kim, M. J. Kim, and S. N. Park, Antibacterial, antioxidative and anti aging effects of *Allium cepa* peel extracts, *Appl. Chem. Eng.*, **22**(2), 178 (2011).
 20. I. S. An, J. H. Kim, H. S. Yoo, R. Zhang, S. M. Kang, T. B. Choe, T. J. Kwon, S. K. An, and G. Y. Kim, The inhibition effect of L-cysteine on melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells, *Korean J. Aes. Soc.*, **5**(2), 239 (2007).
 21. N. Y. Kim, J. H. Kim, G. P. Choi, and H. Y. Lee, Comparison of anti-skin wrinkle activities of *Aronia melanocarpa* extracts by extraction methods, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **22**(3), 217 (2014).
 22. J. S. Kim, W. S. Choi, J. Y. Chung, H. C. Chung, and H. Y. Lee, Enhancement of cosmeceutical activity from *Codonopsis lanceolata* extracts by stepwise steaming process, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **21**(3), 204 (2013).
 23. J. Y. Hong, K. M. Kim, H. S. Nam, and S. R. Shin, Antioxidant activities of hot-water extracts from *Aster scaber* by cultivation and drying methods, *Korean J. Food Preserv.*, **21**(1), 82 (2014).
 24. M. H. Jeong, S. S. Kim, J. S. Kim, H. J. Lee, G. P. Choi, and H. Y. Lee, Skin whitening and skin immune activities of different parts of *Acer mono* and *Acer okamotoanum*, *J. Korean For. Soc.*, **99**(4), 470 (2010).

25. T. S. Park, D. H. Kim, O. J. Kwon, and J. H. Son, A study on biological activities of fermented jujube and grape, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **42**(2), 106 (2014).
26. I. C. Sutcliffe and N. Shaw, Atypical lipoteichoic acids of gram-positive bacteria, *J. Bacteriol.*, **173**(22), 7065 (1991).
27. Y. Wang, H. J. Zhang, M. F. Liu, and S. H. Chen, Study on antioxidant by lipoteichoic acid of bifidobacterium, *Chinese J. Gerontol.*, **13**, 1254 (2007).
28. S. J. Park, Y. B. Choi, J. R. Ko, Y. E. Kim, and H. Y. Lee, Enhancement of antioxidant activities of blueberry (*Vaccinium ashei*) by using high-pressure extraction process, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **43**(3), 471 (2014).
29. C. H. Song, Y. C. Seo, C. G. Lee, D. U. Kim, J. Y. Chung, H. C. Chung, D. S. Park, C. J. Ma, and H. Y. Lee, Enhancement of antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **20**(4), 238 (2012).