

Saccharomycopsis fibuligera로 발효된 블랙커런트추출물의 항산화 및 항염증 효과

장 준 환[†] · 이 형 규^{*} · 배 준 태^{*} · 이 재 섭^{*} · 황 방 연^{**}

^{*}㈜제이투케이바이오 기술연구소

^{**}충북대학교 약학대학, 교수

(2020년 10월 5일 접수, 2020년 11월 12일 수정, 2020년 11월 17일 채택)

Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Fermented Blackcurrant Fruit Extracts with *Saccharomycopsis fibuligera*

Jun-Hwan Jang[†], Hyung-Kyu Lee^{*}, Jun-Tae Bae^{*}, Jae-Seob Lee^{*}, and Bang-Yeon Hwang^{**}

^{*}R&D Center, J2KBIO, 50-3, Dureungyuri-ro, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28103, Korea

^{**}College of Pharmacy and Medical Research Center, Chungbuk National University

(Received October 5, 2020; Revised November 12, 2020; Accepted November 17, 2020)

요약: 유용한 미생물을 탐색하던 중, 제주도의 전통발효식품에서 화장품소재로 활용이 가능한 *Saccharomycopsis fibuligera*를 분리하였다. 본 연구에서는 안토시아닌 배당체를 많이 함유한 블랙커런트추출물(blackcurrant fruit extract, BE)을 *S. fibuligera*로 발효시켰다. 블랙커런트추출물(BE)과 발효된 블랙커런트추출물(fermented blackcurrant fruit extract, FBE)의 성분 분석을 위해 HPLC분석을 실시하였다. 그 결과, delphinidin과 cyanidin의 생물전환을 확인할 수 있었다. 블랙커런트추출물(BE)과 발효된 블랙커런트추출물(FBE)의 항산화 효능을 검증하기 위해 DPPH 및 ABTS 라디칼소거활성을 수행하였다. 또한 항염증 효능을 확인하기 위해 LPS (lipopolysaccharide)로 염증반응을 유도시킨 RAW 264.7 대식세포에서의 Nitric Oxide (NO)생성 저해력과 western blot분석을 통한 염증관련 단백질 iNOS와 COX-2의 발현 저해를 확인하였다. 그 결과, 발효된 블랙커런트추출물(FBE)은 항산화 및 항염증 효과를 가지고 있어 화장품용을 위한 효과적인 원료로 사용 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: While searching for useful microorganisms, *Saccharomycopsis fibuligera* which can be used as cosmetic materials were divided from Jeju island's traditional fermented foods. In this study, blackcurrant extract which contains a large amount of anthocyanin glycosides was fermented with *S. fibuligera*. HPLC analysis was performed to analyze the components of blackcurrant extract (BE) and fermented blackcurrant fruit extract (FBE). As a result, bio-conversion of delphinidin and cyanidin were able to be identified. In order to verify the anti-oxidant effect of BE and FBE, we investigated radical scavenging ability with DPPH and ABTS. In addition, to confirm anti-inflammatory effect, we investigated inhibition effect of nitric oxide (NO) production on lipopolysaccharide (LPS) - stimulated RAW264.7 macrophages, and inhibition effect of the expression of inflammatory-related proteins (iNOS, COX-2) by western blot analysis. As a result, as FBE has anti-oxidant and anti-inflammatory effects, we suggest that it might be used as an active ingredient for cosmetics.

Keywords: microbiome, blackcurrant, bio-conversion, anti-oxidant, anti-inflammatory

1. 서론

최근 인간에게 유익한 미생물을 이용하여 기능성 발효 성분을 함유한 화장품은 자연 친화적인 이미지를 내세우면서 연구와 개발 그리고 마케팅에 이르기까지 그 폭을 넓혀가고 있다. 발효과학이란 인체에 유익한 미생물이 여러 성분들을 작게 분해시켜서 체내에 흡수가 잘 되도록 하거나 새로운 물질을 만들어서 유익한 기능을 나타내도록 돕는 것을 말한다[1]. 이에 본 연구는 제주도의 전통발효식품에서 분리, 동정하여 획득하게 된 균주 중에서 화장품소재로 활용이 가능한 *Saccharomycopsis fibuligera* (*S. fibuligera*)를 사용하였다.

유산균, 효모 등과 같은 미생물을 이용한 발효로 유효 성분의 함량은 크고 독성이 작아 인체에 안전한 소재를 개발하는 연구들이 주를 이루고 있다. 특히 유산균으로 잘 알려진 젖산균(*Lactobacillus*)은 천연에 주로 배당체 형태로 존재하는 물질들을 발효과정에서 당이 없는 비배당체 구조로 바이오 전환시킬 수 있음이 알려져 있다. 비배당체 구조의 물질들은 일반적으로 항산화 활성 등이 배당체 구조에 비하여 큰 것으로 알려져 있다[2-4].

*S. fibuligera*는 전분에서 활발히 트레할로스를 축적하는 것으로 밝혀졌으며, 트레할로스의 생합성을 담당하는 유전자가 복제되어 그 발현이 특징화되었다. 이 효모는 또한 발효 산업에서 잠재적으로 응용할 수 있는 다량의 아밀라제, 산 프로테아제 및 β -글루코시다아제를 분비하는 것으로 밝혀졌다[5].

블랙커런트(*Ribes nigrum* L.)는 온대 기후의 여러 지역에서 일반적으로 재배되는 관목이다. 맛이 좋은 과일에는 비타민 C와 일상적인 유기산, 펙틴, 미량 및 다량 영양소, 에센셜 오일과 같은 기타 건강에 유익한 물질이 풍부하다[6]. 블랙커런트 과일에는 항산화, 항균, 항바이러스 및 항균 특성이 있는 폴리페놀 물질이 포함되어 있다[7]. 안토시아닌은 상업적으로 중요한 여러 종의 과일을 포함하여 여러 식물에 파란색, 보라색 또는 진한 빨간색의 색조를 부여하는 600 개가 넘는 자연 발생 플라보노이드 화합물의 다양한 그룹이다. 안토시아닌은 슈퍼 옥사이드, 산화질소, 하이드록실 및 퍼옥실 라디칼 및 과산화수소와 같은 반응성 산소(reactive oxygen species, ROS) 및 질소(reactive nitrogen species, RNS) 종의 제거제와 같은 강력한 항산화 활성을 가지고 있다[8].

한편, 염증반응은 외부 물리적·화학적 자극과 세균 등

의 감염에 대한 생체 조직의 면역체계 반응의 하나이며, 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다[9]. 신체 내 대식세포는 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 과량 만들어지는 prostaglandin E2 (PGE2) 등과 같은 염증 촉진 인자들을 생성한다[10]. Lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균의 세포벽을 구성하는 성분으로 대식세포의 toll-like receptor (TLR)에 결합하여 염증 매개반응을 유발하는 유력한 인자로 알려져 있으며 다양한 염증 연구에 활용되고 있다[11-15].

따라서 본 연구에서는 *S. fibuligera*를 활용하여 블랙커런트 추출물의 안토시아닌 배당체를 비배당체로 생물학적 전환하는 공정을 개발하고, 항산화 및 항염증 효능을 갖는 소재를 연구하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 재료 및 기구

본 실험에 사용된 블랙커런트(blackcurrant, Poland)는 동결건조 분말형태인 것을 구입하여 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), delphinidin chloride, cyanidin chloride, DMEM powder, glucose, NaHCO₃, MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), DMSO, lipopolysaccharide (LPS)은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. Antibiotics는 Gibco (USA) 제품을 사용하였다. FBS는 Cellgro (USA) 제품을 사용하였다. β -Actin은 Santa Cruz (USA) 제품을 사용하였다. ECL (enhanced chemiluminescence) 용액은 Amersham (USA)를 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 및 일급시약을 구입하여 사용하였다. High-performance liquid chromatography (HPLC)는 Alliance Waters 2695 (Waters, USA) 제품을 사용하였다. Microplate reader는 spectramax abs plus (Molecular Devices, USA) 제품, Chemi-Doc은 Universal Hood II (Bio-rad, USA) 제품을 사용하였다.

2.2. 균의 분리 및 동정

제주 전통발효식품(콩된장, 제주지원식물연구소, Korea)을 멸균 증류수에 현탁하여 희석한 후, YPD agar배지에 도말하였으며 30 °C incubator에서 24 h 배양하여 선발하였다.

선발된 균주는 4 회 계대 배양한 후 형성된 단일 colony를 순수 분리하였으며, DNA 추출하여 DNA 분석기관인 (주)마크로젠에 의뢰하여 16S rRNA 분석을 실시하고 BLAST program을 사용하여 균주의 상동성을 분석한 결과, 제주 전통발효식품에서 분리한 균주가 *S. fibuligera*와 99% 이상의 상동성을 갖는 균주임을 확인하였다. 본 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 KCTC 14223BP를 부여받았다.

2.3. 추출 및 발효 조건

말린 블랙커런트 열매(100 g)를 열수추출(80 °C, 4 h)하였다. 열수추출로 얻은 블랙커런트추출물(BE)을 기질로 하여 효모균 *S. fibuligera* 균주를 접종하여 30 °C, 150 rpm에 48 h 배양한 후 발효된 블랙커런트추출물(fermented blackcurrant fruit extract, FBE)을 확보하였다.

2.4. β -Glucosidase 활성 측정

블랙커런트추출물(blackcurrant fruit extract, BE)에서 *S. fibuligera*의 β -Glucosidase 활성 측정은 Peralta 등의 방법을 사용하여 측정하였다[16]. 샘플은 50 °C 항온수조에서 5 min 간 활성화시켰다. 5 mM ρ -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (Sigma Chemical Co., USA)를 함유한 50 mM 인산완충용액 (pH 6.0) 0.5 mL에 효소액 0.2 mL를 가하여 50 °C에서 10 min 간 반응시킨 후 1 mL의 sodium tetraborate saturated solution으로 반응을 중지시켜 유리되는 ρ -nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1 단위는 반응시간 분당 생성되는 ρ -nitrophenol 1 μ mole을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

2.5. HPLC 분석

블랙커런트추출물(BE)과 발효된 블랙커런트추출물(FBE)의 안토시아닌 성분차이를 확인하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다. 컬럼은 Capcell PAK C18 column (250 × 4.6 mm I.D., OSAKA SODA Co., Japan)을 사용하였고, 1.0 mL/min의 유속으로 520 nm에서 검출하였다. 컬럼온도는 30 °C로 설정되었다. 또한 이동상은 용매 A (MeOH)와 용매 B (5% Formic acid in D.W)의 gradient 조건을 사용하였다. 0~30 min 동안 A를 5~45% 까지 진행하였고 30~35 min 동안 A를 45~95%로 진행되었다. 모든 추출물은 0.45 μ m 필터를 통해 여과하고 HPLC 주입되었다. 생물전환 후 지표성분인 delphinidin chloride (A)과 cyanidin chloride (B) 무게를 정확하게 측정된 후 메탄올에 녹여 표준용액으로 조제하였다(Figure 1).

2.6. 항산화 효과 측정

2.6.1. DPPH를 이용한 자유라디칼 소거 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois MS의 방법을 변형하여 시행하였다[17]. 시료 0.5 mL에 60 μ M DPPH (in EtOH) 3 mL을 혼합하여 암실에서 15 min 간 반응한 다음 분광광도계를 사용하여 517 nm에서 측정하였다. 전자공여능은 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 활성산소 작용의 척도로 사용되는 실험으로 소거율을 백분율로 환산하여 결과를 나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{실험군흡광도}}{\text{대조군흡광도}}\right) \times 100$$

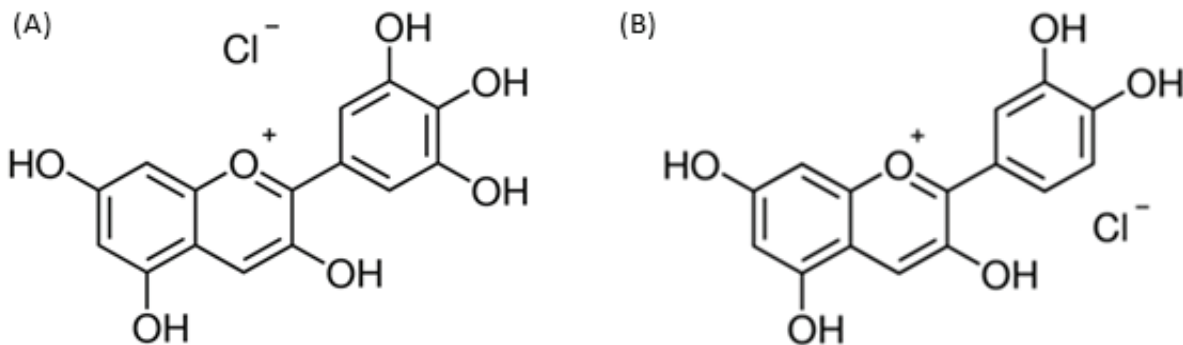


Figure 1. Chemical structure of standard ((A): delphinidin chloride, (B): cyanidin chloride).

2.6.2. ABTS 측정

ABTS(2, 2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical 소거능은 Nicoletta[18]의 방법을 따라 측정하였다. 7 mM ABTS 5 mL와 140 mM K₂S₂O₈ 88 μ L를 섞어 암실에 14 ~ 16 h 반응 시켰다. 이를 absolute ethanol과 1 : 88 비율로 섞어 734 nm에서 흡광도 값이 0.7 ± 0.002 가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 150 μ L와 ABTS solution 3 mL를 혼합하여 30 sec 간 vortex 후 2 ~ 3 min 간 상온에서 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{실험군 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}}\right) \times 100$$

2.7. 세포 독성 평가

세포에 미치는 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 진행하였다. 먼저 96 well plate에는 5×10^4 cell/well 되도록 분주 후 24 h 뒤에 각 농도에 맞도록 DMSO에 녹인 sample을 첨가하였다. 24 h 뒤에 배지를 제거한 후 MTT 시약 (in PBS 2.5 mg/mL) well에 40 μ L씩 가하고 incubator에 4 h 반응 후 다시 상층액을 제거한다. DMSO를 100 μ L씩 분주하여 완전히 녹인다. 분광광도계를 이용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다.

2.8. NO 생성량 측정

Nitric oxide (NO)측정은 cell의 supernatant에서의 NO의 양을 nitrite와 nitrate로써 측정하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent를 사용하였으며, 96 well plate (5×10^4 cells/well)에 RAW 264.7세포의 confluence가 80%일 때, PBS로 2 번 washing한 후에 무혈청 배지를 사용하여 18 h 이상 배양시킨 후에 시료를 농도별로 처리하여 1 h 동안 배양한 후 lipopolysacchride (LPS) 1 μ g/mL 처리하고 24 h 동안 배양하였다. 배양액의 상층액을 취하여 griess 시약과 반응시킨 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성율을 백분율로 표시하였다.

2.9. Western Blot 측정

RAW 264.7세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 6 well plate에 2×10^6 cells/well의 세포수가 되도록 3 mL 씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24 h 배양

하였다. 새로운 DMEM 배지로 교환한 후 2 h 동안 자극제인 LPS를 처리하여 배양한 후 추출물을 농도별로 세포에 처리하여 배양하였다. 24 h 후 단백질 발현을 측정하기 위하여 배지를 제거하고 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 cell lysates는 RIPA buffer에 Protease & Phosphatase Single-Use inhibitor Cocktail 100X를 첨가하여 단백질을 추출하였다. 단백질을 정량 (BCA protein kit)하여, 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후, membrane으로 transfer하여 5% skim milk(5% skim milk in TBST)에 2 h 동안 blocking하였다. 1 차 항체를 희석(3% skim milk in TBST)하여 4 $^{\circ}$ C에서 over night한 다음, TBST로 3 회 세척하였다. 2 차 항체는 실온에서 2 h 동안 배양하였다. iNOS 및 COX-2의 단백질 발현은 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 이용하여 확인하였다. Internal control로써 1 : 1000으로 희석한 β -actin을 사용하였다.

2.10. 통계처리

결과값은 3 번의 독립적인 실험을 통한 평균과 표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 tukey test를 사용하면서 ANOVA검정을 적용하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

3. 실험결과

3.1. HPLC 분석결과

발효에 의한 블랙커런트추출물(FBE)의 성분차이를 확인하기 위해 HPLC 분석을 실시한 결과, 안토시아닌의 delphinidin (RT, 18.5 min)과 cyanidin (RT, 20.6 min)이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. Figure 2에서 나타난 바와 같이 delphinidin과 cyanidin의 피크는 48 h 발효하는 동안 유의하게 증가하였다. 또한 안토시아닌 배당체로 추정되는 두 개의 피크(RT, 14.2 min와 15.7 min)는 발효 후 전환율 약 50% 이상인 것을 확인하였다. 생물전환에 의해 생성된 delphinidin의 함량은 0.136%, cyanidin의 함량은 0.078%였다.

3.2. β -Glucosidase 활성 측정

발효 시간에 따른 *S. fibuligera*의 β -glucosidase 활성을 확인하기 위해 β -glucosidase 활성 측정을 한 결과, 36 ~ 48 h에서 가장 높은 활성을 보였으나, 시간이 경과할수록감소하는 경향을 보였다. 발효된 블랙커런트추출물의 β -glucosidase

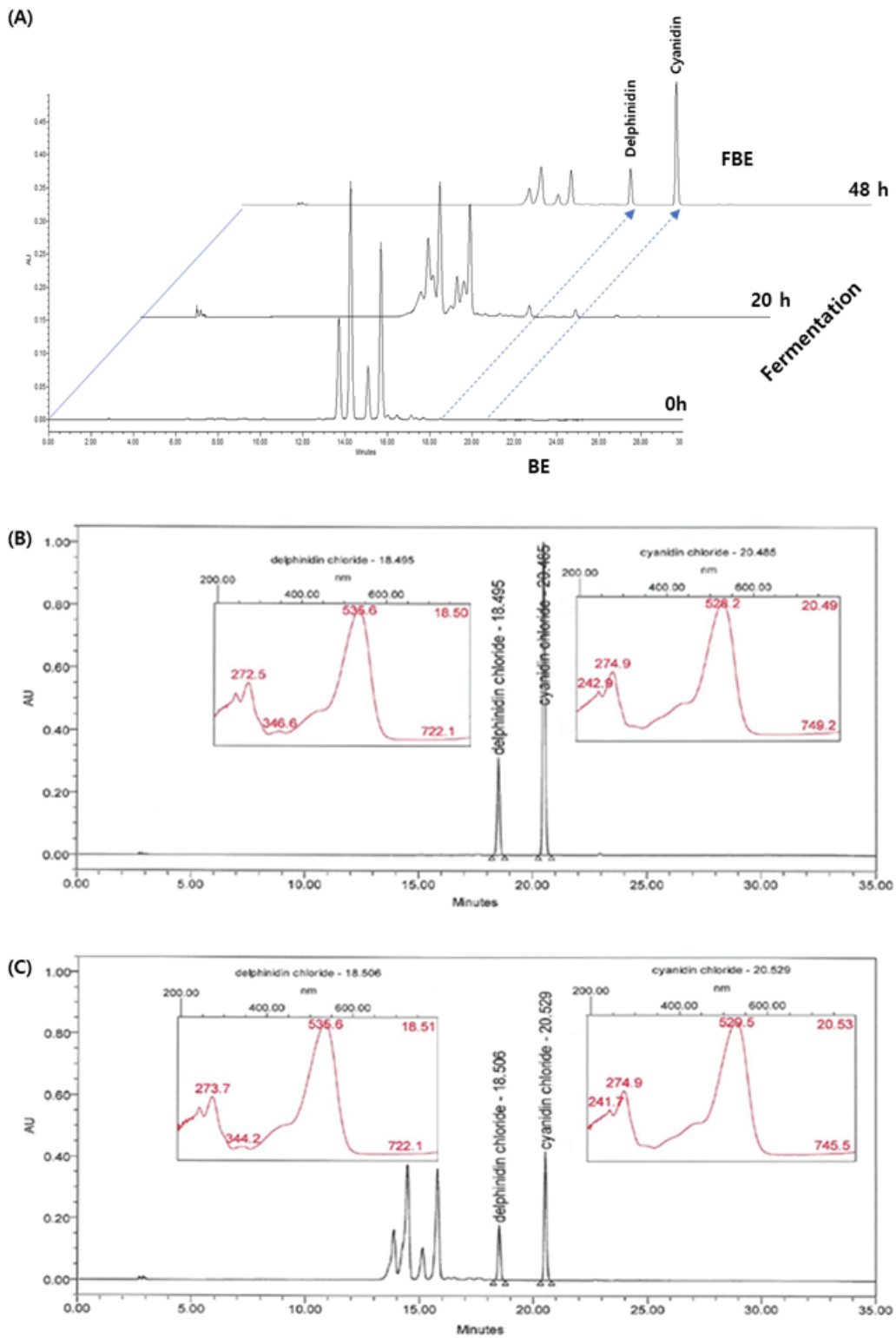


Figure 2. Chromatograms of HPLC Analysis of BE and FBE ((A): Changes in peaks during fermentation, (B): Delphinidin chloride and Cyanidin chloride, (C): FBE).

활성은 48 h에서 30 mU/mL로 가장 높은 것으로 확인되었다(Figure 3).

3.3. 항산화 효과 측정

3.3.1. DPPH Radical 소거능 측정

DPPH radical은 보라빛을 띠는 비교적 안정한 라디칼로서 항산화 물질과 반응하면 proton-radical scavenger에 의하여 노란빛으로 탈색되는 특징이 있으며[19] 색변화에 의한 흡광도의 차이는 517 nm 부근에서 최대가 된다. 비교적 간단한 방법을 사용하므로 항산화 활성을 측정하는데 많이

이용되고 있다. 블랙커런트추출물(BE)과 발효된 블랙커런트추출물(FBE)의 항산화 효능을 측정하기 위한 방법으로 DPPH radical 소거능을 측정하였으며 Figure 4에 나타내었다. 블랙커런트추출물과 발효된 블랙커런트추출물 모두 농도의존적인 항산화 효과가 나타났다. 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 발효된 블랙커런트추출물의 효과가 블랙커런트추출물보다 더 높게 나타났다. 특히 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 대조군인 L-ascorbic acid와 비교하였을 때, 더 높은 효과를 보여 효과적인 항산화 기능 첨가물질로서 가능성을 확인하였다.

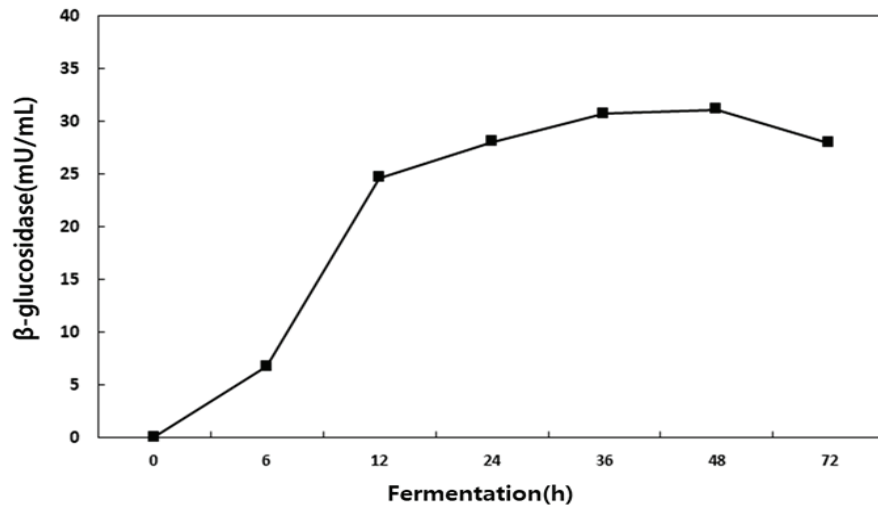


Figure 3. Changes in β -glucosidase activity during fermentation.

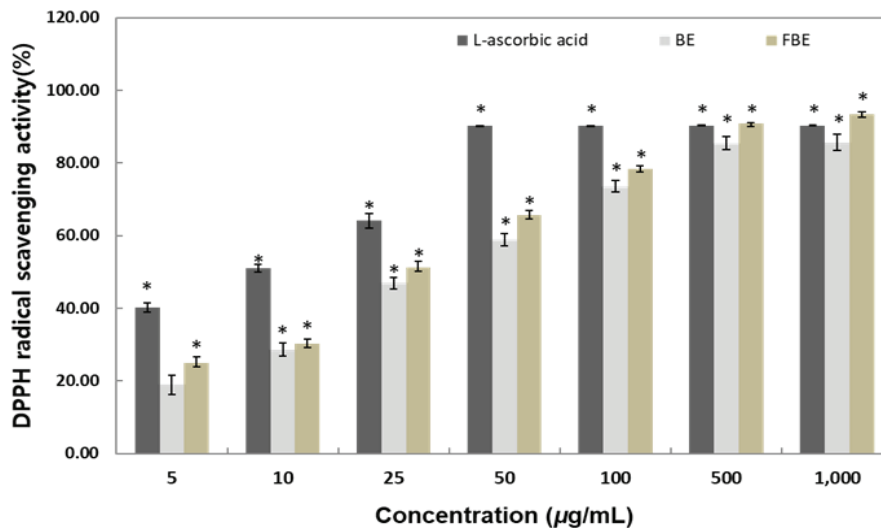


Figure 4. The DPPH radical scavenging activity of BE and FBE. Each value presents the mean \pm SD of triplicate determinations. * $p < 0.05$ indicate a significant difference from sample not treated control.

3.3.2. ABTS Radical 소거능 측정

ABTS cation radical은 짙은 청록색을 띠는 라디칼로 항산화 물질과 반응함에 따라 연한 녹색으로 탈색되는 특징이 있다. Hydrogen-donating antioxidant와 chainbreaking antioxidant 모두를 측정할 수 있는 방법으로 알려져 있으며[19], DPPH 실험법과 마찬가지로 비교적 손쉬운 실험방법으로 인해 일반적으로 많이 사용하고 있는 항산화활성 측정 방법 중 하나이다. 블랙커런트추출물과 발효된 블랙

커런트추출물 모두 농도의존적인 항산화 효과가 나타났다 (Figure 5). 10, 25, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 발효된 블랙커런트추출물의 효과가 블랙커런트추출물보다 더 높게 나타났다. 특히 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 대 L-ascorbic acid와 비교하였을 때, 더 높은 효과를 보여 효과적인 항산화 기능 첨가물질로서 가능성을 확인하였다.

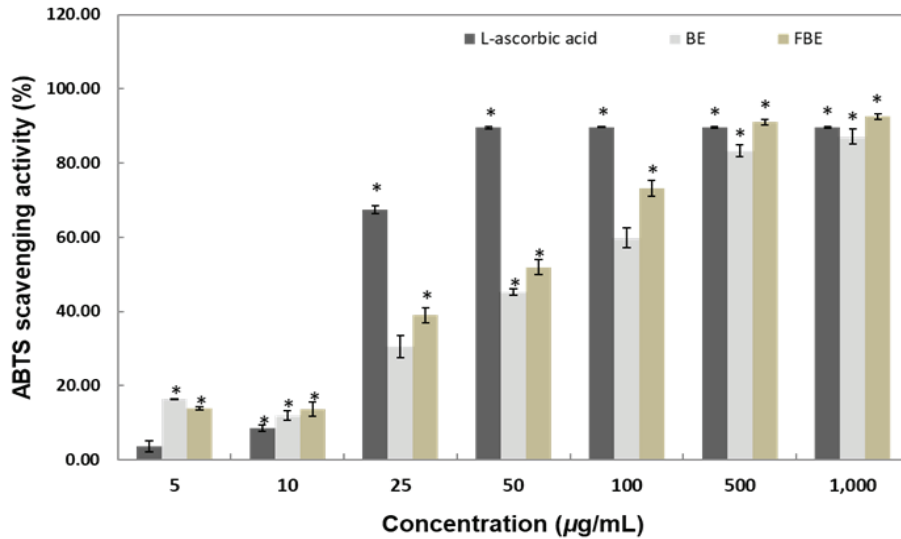


Figure 5. The ABTS scavenging activity of BE and FBE. Each value presents the mean \pm SD of triplicate determinations. * $p < 0.05$ indicate a significant difference from sample not treated control.

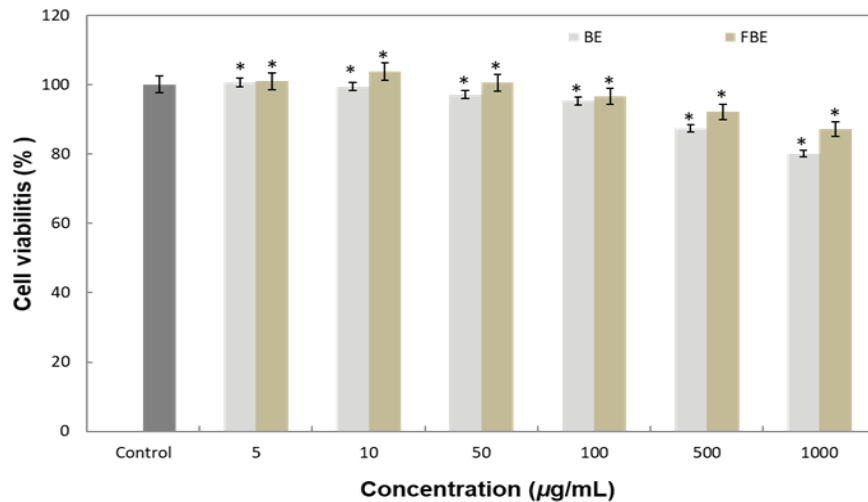


Figure 6. Cell viability of RAW264.7 macrophage cell on each concentration of BE and FBE. Each value presents the mean \pm SD of triplicate determinations. * $p < 0.05$ indicate a significant difference from sample not treated control.

3.4. 세포독성

대식세포인 RAW 264.7는 외부 환경에 의해 다양한 숙주반응에 관여하며 염증 반응 시 NO와 염증성 cytokine이 생성 및 분비되며 염증반응에 관여하는 주요한 세포이다. 모든 시료의 세포 생존율을 확인하기 위해 MTT assay를 진행하였다(Figure 6). 블랙커린트추출물과 발효된 블랙커린트추출물을 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 결과, 발효된 블랙커린트추출물의 세포 생존율이 불

랙커린트추출물의 세포 생존율보다 더 높게 나타났다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 아래의 농도에서 95% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 90%의 세포생존율을 나타냈다. 따라서 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 이후 항염증 관련 세포 실험의 최고 농도로 설정하였다.

3.5. NO 생성량 측정

염증반응의 대표적인 인자인 NO의 생성을 억제하는지

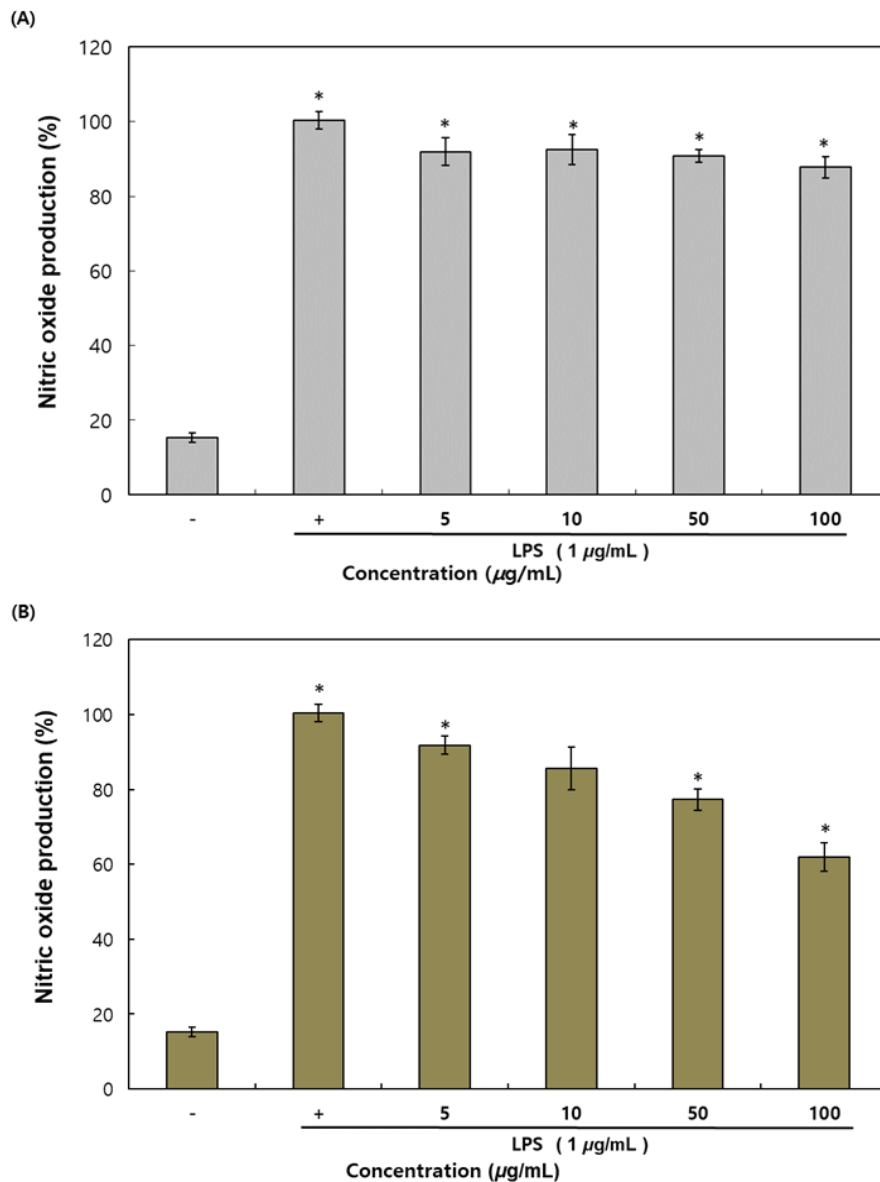


Figure 7. Nitric oxide production of LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell on each concentration of extracts ((A): BE (B): FBE). Each value presents the mean \pm SD of triplicate determinations. * $p < 0.05$ indicate a significant difference from sample not treated control.

확인하기 위해 RAW 264.7세포에 lipopolysaccharide (LPS)를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 후 추출물을 각 농도별로 처리하였다 (Figure 7). 그 결과, 발효된 블랙커런트추출물은 처리한 구간에서 모두 LPS에 의해 증가한 NO의 생성량을 농도의존적으로 감소시키는 것으로 나타났으나, 블랙커런트추출물은 상대적으로 덜 감소시켰다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 처리한 구간에서의 NO 생성량은 발효된 블랙커런트추출물의 효과 (약 65%)가 블랙커런트추출물(약 90%)보다 더 낮게 나타

났다. 발효된 블랙커런트추출물은 LPS로 자극시킨 RAW 264.7세포에서 염증물질 NO의 생성을 유의성 있게 저해시킨다는 것을 확인하였다.

3.6 Western Blot을 통한 단백질 발현

LPS에 의해 자극된 RAW264.7 세포에서 염증관련 단백질 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot 분석을 시행하였다(Figure 8). 그 결과, 발효된

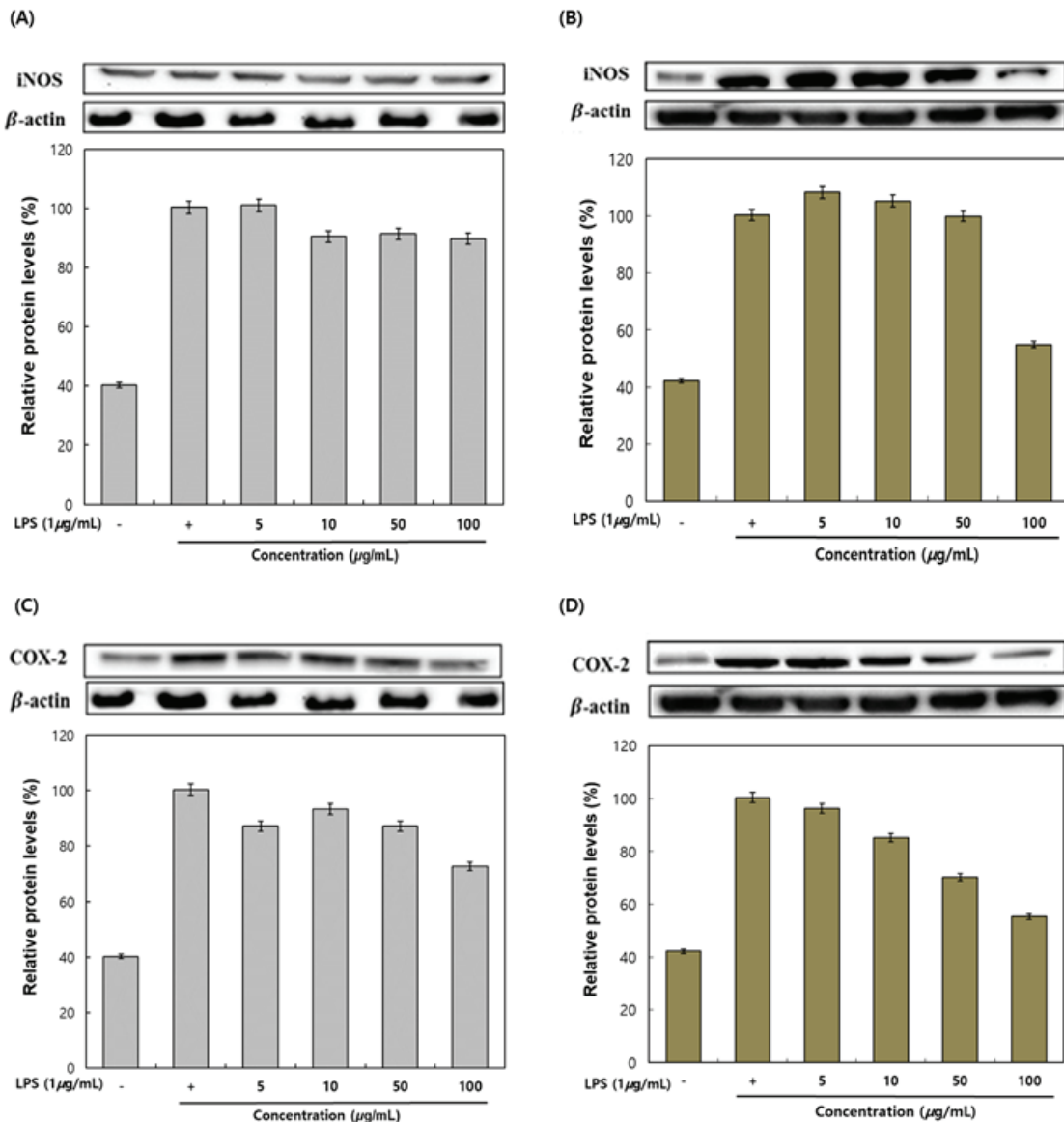


Figure 8. Relative protein levels of iNOS, COX-2 protein in LPS-stimulated RAW264.7 cells on each concentration of extracts ((A): iNOS of BE, (B):iNOS of FBE, (C): COX-2 of BE, (D): COX-2 of FBE). Each value presents the mean \pm SD of triplicate determinations. * $p < 0.05$ indicate a significant difference from sample not treated control.

블랙커런트추출물은 5, 10, 50 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 유의성 있게 감소시켰다는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로 항염증 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

4. 고 찰

본 연구에서는 제주도의 전통발효식품(콩된장)에서 분리한 *S. fibuligera*를 활용하여 블랙커런트 추출물의 안토시아닌 배당체를 비배당체로 생물학적 전환하는 공정을 개발하고, 항산화 및 항염증 효능을 갖는 소재를 연구하고자 하였다. 이 연구를 통해 발효과정을 거쳐 생물전환에 의해 생성된 delphinidin과 cyanidin의 존재를 확인하였고, 각각의 지표성분이 증가하는 것을 확인하였다. 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH, ABTS의 실험을 진행한 결과, 기존의 항산화제로 널리 사용되고 있는 L-ascorbic acid와 비교해 보았을 때 발효된 블랙커런트추출물은 효과적인 항산화 기능성 첨가 물질로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 MIT assay에서는 발효된 블랙커런트추출물의 세포 생존율이 블랙커런트추출물의 세포 생존율보다 더 높게 나타난 것을 통해 안전한 소재라는 것을 확인하였다. 항염증 효과를 알아보기 위해 LPS로 염증반응을 유도시킨 RAW 264.7에서 NO생성 저해력과 western blot 분석을 통한 염증관련 단백질 iNOS와 COX-2의 발현 저해를 확인한 결과, 발효된 블랙커런트추출물은 NO를 비롯한 염증 매개물질 iNOS와 COX-2의 발현을 적절하게 억제시키는 효과를 검증하였다. 따라서 발효된 블랙커런트추출물은 항염증 및 피부 진정소재로서의 활용가치가 있는 소재라는 것을 확인하였다. 특히 발효전보다 발효 후에 항산화, 세포 생존율, 항염증 효과가 증진됨을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과에 따르면 *S. fibuligera*을 사용하여 발효된 블랙커런트추출물은 세포독성이 없으면서도 항산화, 항염증 효과를 기대할 수 있어 화장품을 위한 효과적인 원료로 사용 가능할 것으로 판단된다.

Reference

1. G. Y. Kim, A. G. Kim, S. W. Ham, and C. H. Chin, A clinical study on effects of the fermented cosmetic products on skin – focused on the skin trouble products of MigadoCos, *Kor J Aesthet Cosmetol*, **8**(4), 1 (2010).
2. Y. Okabe, T. Shimazu, and H. Tanimoto, Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of aglycone-rich fermented soybeans compared with glucoside-rich non-fermented soybeans in Japanese postmenopausal women, *J Sci. Food Agric.*, **91**(4), 658 (2011).
3. C. G. Schmidt, L. M. Gonçalves, L. Prietto, H. S. Hackbart, and E. B. Furlong, Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*, *Food Chem.*, **146**, 371 (2014).
4. B. G. Park, H. J. Jung, Y. W. Cho, H. Y. Lim, and C. J. Lim, Potentiation of antioxidative and anti-inflammatory properties of cultured wild ginseng root extract through probiotic fermentation, *J. Pharm. Pharmacol.*, **65**(3), 457 (2013).
5. Z. Chi, Z. Chi, G. Liu, F. Wang, L. Ju, and T. Zhang, *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology, *Biotechnology Advances*, **27**(4), 423 (2009).
6. P. H. Mattila, J. Hellström, G. McDougall, G. Dobson, J. M. Pihlava, T. Tiirikka, D. Stewart, and R. Karjalainen, Polyphenol and vitamin C contents in European commercial blackcurrant juice products, *Food Chem.*, **127**(3), 1216 (2011).
7. J. Tabart, T. Franck, C. Kevers, J. Pincemail, D. Serteyn, J. O. Defraigne, and J. Dommès, Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts, *Food Chem*, **131**(4), 1116 (2012).
8. H. Wang, G. Cao, and R. L. Prior, Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, **45**(2), 304 (1997).
9. R. Zamora, Y. Vodovtz, and T. R. Billiar, Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases, *Mol. Med.*, **6**(5), 347 (2000).
10. M. Higuchi, N. Higashi, H. Taki, and T. Osawa, Cytolytic mechanism of activated macrophages. tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages, *J. Immunol*

- 144(4), 1425 (1990).
11. E. J. Han, S. B. Roh, and S. J. Bae, Cytotoxicity of *Daucus carota* L. on various cancer cells, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**(1), 153 (2000).
 12. E. J. Jeon, J. S. Kim, Y. K. Park, T. S. Kim, and M. H. Kang, Protective effect of yellow-green vegetable juices on DNA damage in Chinese hamster lung cell using comet assay, *Korean J. Nutr.*, **36**(1), 24 (2003).
 13. C. M. Kim, M. G. Shin, D. G. Ahn, G. S. Lee, B.S. Kang, and S. S. Kang, The chinese herbal Dictionary, 2770, Jeongdam, Seoul (1997).
 14. T. J. Kim, Wild flowers and resources plants in Korea, *Seoul National University Press*, **1**(24), 4 (2008).
 15. S. N. Rho, D. H. Kim, Anti-tumor effect of carrot extracts in the human lung cancer cell line NCI-H1299, *J. East Asian Soc. Diet. Life*, **12**(4), 289 (2002).
 16. R. M. Peralta, M. K. Kadowaki, H. F. Terenzi, and J. A. Jorge, A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization, *FEMS Microbiology Letters*. **146**(2), 291 (1997).
 17. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199, (1958).
 18. N. Fellegrini, K. Roberta, Y. Min, and R. E. Catherine, Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay, *Methods Enzymol*, **299**, 379 (1999).
 19. C. I. Park and G. H. Park, Antioxidant and anti-wrinkling effects of extracts from *Nelumbo micifera* leaves, *Korea J. Herbol.*, **31**(4), 53 (2016).
 20. F. Natella, M. Maldini, G. Leoni, and C. Scaccini, Glucosinolates redox activities: can they act as antioxidants?, *Food Chem.*, **149**, 226 (2014).