

## *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물의 항산화 및 미백효과

최우석<sup>1</sup>, 권희석<sup>2</sup>, 임혜원<sup>3</sup>, 노라환<sup>4</sup>, 이현용<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 생물의소재공학과

<sup>2</sup>한국코스모화장품

<sup>3</sup>세바바이오텍

<sup>4</sup>서원대학교 식품공학과

Received : February 18, 2013 / Accepted : April 3, 2013

**Whitening Effects of *Lactobacillus rhamnosus* Associated with Its Antioxidative Activities.** Choi, Woo Seok<sup>1</sup>, Hee-Souk Kwon<sup>2</sup>, Hye Won Lim<sup>3</sup>, Ra Whan No<sup>4</sup>, and Hyeon Yong Lee<sup>4\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, <sup>2</sup>Hankook Cosmo Cosmetics Co., Bucheon 421-808, Korea, <sup>3</sup>Shebah Biotech Co., Chuncheon Bioindustry Foundation Hi-Tech Venture Town, Chuncheon 200-161, Korea, <sup>4</sup>Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Chungju 361-742, Korea

This study was performed to investigate the whitening effects of *Lactobacillus rhamnosus* in addition to its antioxidative activities. The cytotoxicity of the *Lactobacillus rhamnosus* was 7.6% at 10.0% (v/v) concentration. Its cytotoxicity was lower than 3.2% of *Lactobacillus casei* when adding the same concentration. *Lactobacillus rhamnosus* exhibited high antioxidative activities at 14.9% of DPPH radical scavenging activity, and a lower reducing power was measured. *Lactobacillus casei* exhibited relatively lower antioxidative activities at 13.4%. The tyrosinase inhibition activity of *Lactobacillus rhamnosus* was observed at 31.3% when adding 10.0% (v/v), as compared to 17.7% for *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus rhamnosus* demonstrated strong inhibition activity for melanin synthesis at 58.6% when adding 10.0% (v/v), while *Lactobacillus casei* increased to 80.6%. It was also observed that the high antioxidative activities of *Lactobacillus rhamnosus* were strongly correlated to whitening activities, due to the inhibition of both tyrosinase and melanin synthesis. These results support the expanded use of lactic acid bacteria as a functional bioresources in the cosmetics industry.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, *Lactobacillus rhamnosus*, antioxidative activity, whitening effect

### 서론

의학기술이 발전되고 현대사회의 생활수준이 점점 향상됨에 따라 인간의 평균수명도 증가되면서 사람들의 관심은 건강하게 오래살며 아름답게 늙어가는 것으로 집중되고 있다. 이러한 시대의 관심에 부응하여 기능성 식품 및 화장품 분야의 시장규모가 확대되고, 특히 천연물질을 활용한 분야의 연구가 급속히 진행되고 있다[3].

천연물질 중 많이 사용되는 프로바이오틱스는 체내에 들어가서 건강에 도움을 주는 살아있는 균을 지칭하는데, 현재 프로바이오틱스로 사용되는 것은 *Bifidobacterium* 속,

*Enterococcus* 속, *Lactobacillus* 속, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus sporogenes*, *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus polyfermenticus* 등이 있으며 이들의 면역 조절 및 항암 기능에 대한 연구들이 보고되고 있다[6, 17].

프로바이오틱스로 사용되는 유산균(*Lactobacillus*)은 치즈, 발효유 및 유산균 음료 등의 발효 유제품을 비롯하여 각종 발효 식품의 제조에 광범위하게 응용되고 있는 산업적으로 중요한 미생물이다. 예로부터 오랫동안 식품의 발효와 장질환 치료 및 예방의 정상 효과를 목적으로 유산균이 사용되어 발전을 거듭하여 왔다. 이러한 유산균을 이용한 발효물은 요구르트나 치즈와 같은 형태로 제품화가 되거나, 김치 및 청국장 같은 산업에 크게 영향을 미치고 있다. 하지만 일반 유산균을 이용하여 제품을 발효할 경우 유산균 종류에 따라 발효 수율 및 생리활성 물질의 생산 수율이 달라질 수 있으며, 식품 및 화장품의 원료로써 활용 되어지는 등 유산균 중

#### \*Corresponding author

Tel: +82-43-299-8471, Fax: +82-43-299-8471

E-mail: hyeonl@seowon.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

류에 따라 발효에 따른 활성이 다르기 때문에 발효능력이 뛰어난 신규 유산균의 확보는 경제적으로 매우 큰 효과를 가질 수 있다[18, 32]. 또한 유산균의 자신을 보호하는 항산화 메커니즘이 발견[1, 15, 27] 됨에 따라 유산균의 항산화 효과에 대한 연구가 시작되고 있다.

특히 *Lactobacillus* 균은 장내 정상세균으로 면역증강, 항바이러스, 항균 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있으며[8, 21]. 국내외 연구진들에 의하여 피부장벽을 강화하는 효능 및 미백, 보습효과가 뛰어나다는 연구 결과가 보고된 바 있다[5, 26]. 유산균에 의한 효능들은 서로 밀접하게 영향을 가지고 있다고 사료되어, 본 연구진은 *Lactobacillus rhamnosus*의 항산화 및 미백활성의 연관성을 확인하여 기능성 화장품으로써의 발전을 위한 연구를 꾀하였다.

피부는 자외선의 영향을 받기 쉬운 기관이다. 자외선의 영향으로 피부에 활성산소가 생성되고 이에 따라 생성된 활성산소종은 피부 세포를 손상시키며 손상 받은 세포는 식세포에 의해 제거된다. 활성산소는 매우 불안정한 상태이므로, 강한 반응성을 갖고, 세포내 매우 강한 독성을 갖게 하여 그 중 O<sub>2</sub>은 thiol, ascorbate, tocopherol 그리고 catecholamine을 산화시켜 (Fe-s)<sub>4</sub> cluster 함유 단백질을 공격하기도 한다[10]. 활성산소가 노화 및 각종 질병의 직접적이며, 근본적인 원인으로 작용함에 따라 과량의 활성산소가 존재하면 체내의 항산화물질을 고갈시키면서 멜라닌 생성 반응을 증가시킨다. 이는 곧 각질형성세포에 작용하여 사이토카인을 분비시켜 직·간접적으로 멜라닌 세포의 증식과 합성을 증가시켜 피부의 색소침착 및 기미 형성이 증가된다[31]. 추가로 피부는 자외선을 받아도 피부에서 색소침착이 증가되는데, 이와 같이 색소침착이 증가하는 것은 자외선 흡수에 의한 피부 세포의 손상을 억제할 목적으로 멜라닌 생성이 증가된 결과이다. 자외선에 의한 광노화는 깊은 주름살과 잔주름살 생성, 색소 탈색, 피부건조, 탄력성 감소 및 색소 침착 등의 변화가 나타난다[17, 22]. 결국 자외선에 의한 피부의 노화가 진행되면 멜라닌 증식이 항시적으로 되고 그 결과 기미가 생성된다[28]. 이 멜라닌 생성에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 효소가 바로 tyrosinase이며 melanosome 내에 tyrosine을 산화시켜 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 만드는 tyrosine hydroxylase로 DOPA를 산화시켜 dopachrome을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 최종적으로 melanin polymer를 합성하게 된다. 따라서 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase활성 억제 실험은 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다[23, 25].

향장소재로서의 항산화 및 미백 활성은 멜라닌 세포에 직접적으로 작용되는 활성산소와 관련되며, 멜라닌 세포 생성 경로 내의 생성인자 억제 및 활성산소의 증가를 억제하면 미백 활성이 증가한다[2, 30]. 더 나아가 각종 질병 및 노화의

직접적으로 관련된 활성산소를 제거하는 것이 멜라닌 색소 형성 억제에 효과적임을 알 수 있다. 이에 따라 항산화 및 미백 활성을 높일 수 있는 소재를 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있다[4, 19].

본 연구진은 lactic acid bacteria인 *Lactobacillus rhamnosus*의 세포독성 실험 및 항산화 활성 실험을 바탕으로 하여 유산균 파쇄물이 활성산소를 억제할 수 있는 능력이 있는지 확인함과 동시에 미백 기능성 향장소재로써 가치가 있는지 여부를 확인할 수 있는 tyrosinase inhibition activity와 melanogenesis activity를 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 확보 및 배양조건

본 연구에서 사용된 유산균 *Lactobacillus rhamnosus* (KCCM40069)와 보편적으로 사용되는 프로바이오틱스인 *Lactobacillus casei* (KCCM12452)를 초기균수 10<sup>5</sup> CFU/ml로 37°C에서 24시간동안 1 L MRS broth에서 각각 혐기 배양을 한 후, 항산화 활성 및 미백활성을 측정하기 위하여 균주와 불멸용 볼(직경 1 mm)을 불멸(HK-BA01, SAMHAW CERAMIC COMPANY, KOREA)에 넣어 하루동안 파쇄시킨 후 파쇄물을 0.45 μm 필터에 여과한 후 여과물을 가지고 실험을 진행하였다.

### 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주로 human fibroblast CCD-986sk (KCLB 21947, KOREA), melanoma cell B16F10 (KCLB 80008, KOREA)를 사용하였으며, 세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640 (GIBCO, USA)을 사용하였고 그 밖의 세포배양에 필요한 시약으로 hepes buffer (SIGMA, USA)와 fetal bovine serum (GIBCO, USA), gentamycin sulfate (SIGMA, USA), trypsin-EDTA (SIGMA, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포는 RPMI 1640 (GIBCO, USA) 배지 90%에 FBS를 10%로 적용시켜 배양하여 실험에 이용하였다.

### 세포 독성 측정

Mosmann 방법을 변형시켜 세포 생존율을 측정하였다. CCD-986sk 세포를 96 well plate에 1.5 × 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 접종한 후, 80% 정도의 배양시점에서 각 well에 시료를 투여하고 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 5 μg/ml 농도의 MTT 용액을 각 well에 첨가하고 4시간 후 상층액을 제거하고, 10 μl의 acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 microplate reader (Tecan, USA)로 565 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### DPPH 자유라디칼 소거활성 측정

DPPH ( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) radical에 대한 소거활성은 Dietz 등 [6]의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. 96-well plate에 용매를 ethanol로 하여 제조한 0.1 mM DPPH용액 200  $\mu$ l와 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v)의 농도로 조절된 *Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus casei*, positive control인 ascorbic acid 80  $\mu$ l을 각각 혼합하여 25°C에서 20분동안 암실에 방치한 후 525 nm에서 흡광도 측정하였다. 측정값은 아래의 DPPH radical scavenging activity (%)로 계산하였다.

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

### 환원력 측정

환원력은 sample 및 positive control를 각각 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v)의 농도 2.5 ml에 200 mM sodium phosphate buffer (SIGMA, USA) 2.5 ml와 1% potassium ferricyanide (HAYASHI PURE CHEMICAL, JAPAN) 2.5 ml을 혼합시키고, 50°C에서 20분간 incubation시킨 다음 2.5 ml trichloroacetic acid (SIGMA, USA) (10%, w/v)를 첨가하여 3500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 5 ml에 탈이온수 5 ml와 1% ferric chloride (SIGMA, USA) 1 ml를 첨가시킨 후 UV-vis Spectrophotometer (852A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다[20].

### Tyrosinase 억제 효과 탐색

dopachrome법을 이용하여 tyrosinase 억제 효과를 측정하였다[24]. mushroom tyrosinase-150 unit 150  $\mu$ l와 2.5 mM L-tyrosine 225  $\mu$ l, 0.4 M hepes buffer (pH 6.8) 225  $\mu$ l, ethanol 용액 또는 1 mg/ml 농도의 시료 300  $\mu$ l를 혼합한 후 배양 전, 15분간 배양 후의 각각의 흡광도를 475 nm의 파장에서 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition (\%)} = \frac{(D - C) - (B - A)}{(D - C)} \times 100$$

A와 B는 각각 시료가 첨가된 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이다. 이들 tyrosinase 억제 효과는 100으로 나타날 때 완전한 억제를 의미하며, 0일 때 전혀 억제를 하지 못하는 것을 의미한다.

### Melanoma cell를 이용한 멜라닌 생성량 측정

멜라닌 생성량 측정을 위해 melanoma cell B16F10을 각각의 시료와 positive control인 arbutin을 2.5%, 5.0%,

10.0% (v/v)의 농도로 처리하여 미백활성을 측정하였다. Melanoma cell B16F10을 96-well plate에  $1.5 \times 10^4$  cells/well 농도로 접종한 후 시료를 3일간 처리하였다. 3일 후에 각 well의 배지를 제거한 후에 PBS로 세척하고, 각 well 당 1 ml의 1 N NaOH를 가한 다음 교반시켜 멜라닌 성분이 용출되도록 하였다. 용출된 멜라닌의 함량을 측정하기 위하여 microplate reader를 이용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다[9].

### 통계처리

데이터의 통계처리는 모두 3회 반복으로 행해졌으며, 실험값의 통계는 SAS (Statistical Analysis System) 프로그램을 사용하여 평균을 구하였으며, 각 처리구간의 최소유의차 ( $p < 0.05$ ) 수준에서 통계처리 하였다.

### 결과 및 고찰

#### 세포 독성 측정

*Lactobacillus rhamnosus*의 파쇄물의 human fibroblast cell인 CCD-986sk에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 본 실험을 진행하였다. *Lactobacillus rhamnosus*가 장내 일반 유산균과 비교하여 피부세포에서 어떠한 차이를 나타내는지 비교 및 관찰하기 위하여 대조군으로써 *Lactobacillus casei* 파쇄물을 사용하였다. 각 sample은 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v) 농도로 처리하였으며, 그 결과 농도 의존적으로 세포독성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 10.0% (v/v)의 농도의 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물의 경우 7.6%의 세포독성을 나타내어, 같은 농도의 *Lactobacillus casei* 파쇄물의 세포독성인 9.8%보다 낮은 독성을 가진다는 것을 Fig. 1을 통해서 알 수 있다. 따라서 보편적으로 사용되는 프로바이오틱

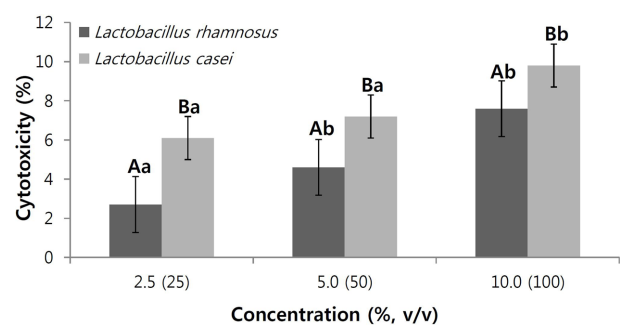


Fig. 1. Cytotoxicity of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*.

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

스인 *Lactobacillus casei*보다 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물이 fibroblast에 주는 자극이 현저하게 낮은 것을 확인할 수 있다. 상기 프로바이오틱스와 비교하여도 현저히 낮은 세포독성을 나타내는 *Lactobacillus rhamnosus*가 추후 식품이나 향장원료로서 큰 문제점 없이 사용될 수 있을 것이라고 사료된다.

**DPPH 자유라디칼 소거활성 측정**

DPPH는 안정된 자유라디칼로 517 nm 근처에서 최대 흡수하며, 수소 또는 전자를 받으면 517 nm 근처에서 흡광도가 감소한다. 따라서, 항산화 활성을 판단할 수 있는 DPPH 자유라디칼 소거활성 측정을 통해 라디칼을 환원시키는 능력이 크면 항산화 활성이 크다고 기대할 수 있다[14]. 이러한 원리로 측정된 DPPH 자유라디칼 소거 활성 결과를 Table 1에 나타내었다. 실험군으로 *Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus casei* 각각의 파쇄물을 이용하였으며, positive control로써 ascorbic acid를 사용하였다.

*Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus casei* 모두 DPPH 자유라디칼 소거능이 농도의존적으로 증가하였으며, 각각 10.0%(v/v) 농도에서 14.9%, 13.2%의 DPPH 자유라디칼 소거활성을 나타냈다. 본 실험의 결과는 positive control인 ascorbic acid과 증숙더덕 추출물 1.25 mg/ml의 농도에서 41.58%의 항산화활성의 결과[29]보다 작은 값이지만, 농도의 증가에 따른 DPPH 자유라디칼 소거활성 증가를 확인할 수 있다.

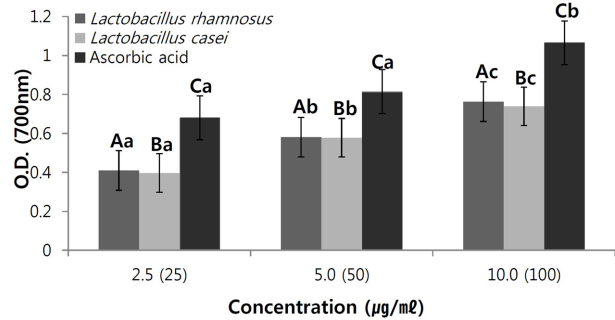
활성산소가 감소할 경우 체내의 항산화물질을 고갈시키 것을 막는 동시에, 각질형성세포에 작용하여 사이토카인의 분비를 억제시킴으로써 멜라닌세포에 영향을 미치게 된다[31]. 따라서 활성산소의 감소는 직·간접적으로 멜라닌 세포 생성 경로 및 인자들에 영향을 미치게 되어 멜라닌 생성 작용도 억제된다. 결국 항산화활성의 증가에 따른 추가적인 미백활성에도 영향을 미칠 것이라고 사료된다.

**Table 1. Free radical scavenging activity of the *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*.**

Sample (10%, v/v)	The DPPH radical scavenging activity (%) <sup>*</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	14.91% ± 0.48 <sup>Aa</sup>
<i>Lactobacillus casei</i>	13.21% ± 0.26 <sup>Aa</sup>
Ascorbic acid	56.56% ± 0.18 <sup>Bb</sup>

<sup>\*</sup>Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at  $p < 0.05$  and mean with difference letter (a-b) within same sample are significantly different at  $p < 0.05$ .



**Fig. 2. Reducing power of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*.**

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

**환원력 측정 분석**

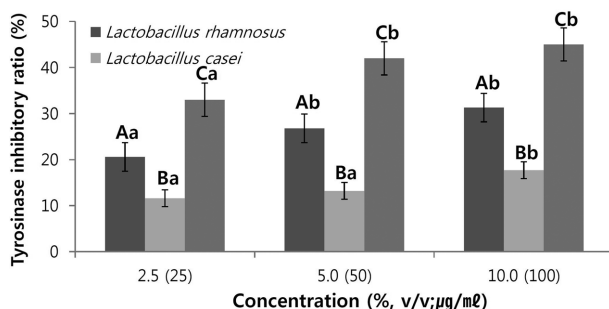
환원력은 활성산소에 전자를 제공할 수 있는 활성 수소의 수치를 측정하는 것으로 흡광값이 높으면 활성산소 제거 능력이 높음을 나타낸다. *Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus casei* 파쇄물을 각각 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v)의 농도로 사용하였으며 ascorbic acid는 positive control로 사용하였다. 실험 결과를 보면 각 sample의 파쇄물 농도가 점차적으로 증가함에 따라 농도 의존적으로 환원력이 증가하는 경향을 볼 수 있었으며, positive control인 ascorbic acid의 O.D. 값이 1.0635로 가장 강한 환원력을 나타내었고, *Lactobacillus rhamnosus*가 0.7636, *Lactobacillus casei*가 0.7391의 O.D. 값이 측정되었다(Fig. 2). 위의 결과로 *Lactobacillus rhamnosus*의 환원력은 초고압 공정을 거친 지치의 추출물[13]보다 작은 값이지만, 일반적인 장내유산균인 *Lactobacillus casei*보다 높은 항산화 활성을 가짐을 확인할 수 있다. DPPH 자유라디칼 소거활성 실험과 마찬가지로 항산화 활성의 증가는 멜라닌색소 형성의 신호전달 경로에 영향을 미침으로써 멜라닌 색소 형성억제에 효과적으로 알려져 있다[31]. 따라서 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물이 체내의 활성 산소를 감소시키므로 항산화 활성이 증가됨에 따라 활성산소에 영향을 받는 멜라닌 생성기작에도 영향을 미치게 되어 피부미백 효능이 동반될 것이라 사료되기에 다음과 같은 미백 효능 실험을 진행하였다.

**Tyrosinase 억제 효과 탐색**

Tyrosinase는 피부의 멜라닌 색소의 생성을 촉진하는 효소로 tyrosinase의 저해활성을 측정함으로써 각 시료들의 미백효과를 알아 볼 수 있다.

*Lactobacillus rhamnosus*와 *Lactobacillus casei* 파쇄물





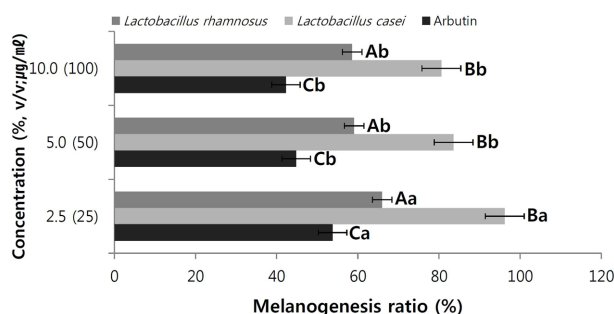
**Fig. 3. Tyrosinase inhibition activity of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*.**

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

을 각각 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v)의 농도로 처리하고, positive control로써 hydroquinone을 25, 50, 100 µg/ml 농도로 투여하여 tyrosinase 저해활성을 측정하였다(Fig. 3). Positive control인 hydroquinone의 경우 가장 높은 농도인 100 µg/ml에서 40.65%의 미백활성을 나타내었으며, *Lactobacillus rhamnosus*가 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v)의 농도에서 각각 20.6%, 26.8%, 31.1%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었으며, *Lactobacillus casei*도 같은 농도에서 각각 11.6%, 13.2%, 17.7%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. *Lactobacillus rhamnosus*가 *Lactobacillus casei*와 비교하여 약 2배에 가까운 높은 미백활성을 보였다. Kim의 연구에서는 1 mg/ml 농도의 녹차 추출물이 38.64%의 미백활성을 나타낸 것과 비교하면 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물 만으로도 천연 추출물만큼의 미백활성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다. 위의 결과로 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물이 *Lactobacillus casei* 파쇄물의 약 2배 이상의 tyrosinase 저해 활성을 나타냄에 따라, 멜라닌 생성에 관여하는 효소인 tyrosinase를 저해하여 멜라닌 생성을 방해해 미백효과를 나타낼 것으로 생각되며, 추후 미백 기능을 가지는 향장소재로서 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

#### Melanoma cell을 이용한 멜라닌 생성량 측정

Melanoma 세포를 이용하여 시료 투여 시 멜라닌 생합성과 세포생존율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 농도별로 처리하고 24시간 후, 멜라닌 생성량을 측정하였다(Fig. 4). 실험 결과, *Lactobacillus rhamnosus*의 경우 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v) 농도에서 각각 66%, 59%, 58.6%의 생성률을 보였으며, *Lactobacillus casei* 파쇄물은 같은 농도에서 96.2%, 83.6%, 80.6%의 생성률을 보였다. positive control인 hydroquinone의 경우 25, 50, 100 µg/ml의 농도에서 각각



**Fig. 4. Melanogenesis ratio of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*.**

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

53.8%, 46.2%, 40.9%의 낮은 생성률을 보였다. 위의 세포독성결과에서 *Lactobacillus casei*가 가장 높은 세포독성을 가지는 데에도 불구하고 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물의 멜라닌 생성량이 낮은 결과로 보아, 멜라닌의 생성을 억제하는 활성물질이 함유되어 있을 것이라 사료된다. 미백 효능이 뛰어나다고 알려진 고로쇠 수액의 경우 100 µg/ml의 농도에서 35% 가량의 멜라닌 생성 저해율을 나타낸 것과 비교하여도 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물의 미백활성이 월등히 우수한 것이 확인되었다[12]. 또한 초고압 추출 공정에 의한 당귀 추출물의 미백 및 자외선 차단 효과 연구에서 보고된 초고압 처리된 당귀의 멜라닌 생성량이 82.4%인 것과 비교하면 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물의 미백활성이 높다는 것을 유추할 수 있다[11]. Positive control인 hydroquinone의 미백활성이 *Lactobacillus rhamnosus*에 비해 약 15% 정도 높지만, 대표적인 미백제로 알려진 hydroquinone은 높은 미백활성과 함께 독성을 가지고 있는 합성물질로 현재 많은 연구진들이 이러한 합성 미백제를 대체할 수 있는 천연물질들에 대해 연구 중에 있다. 위의 결과를 토대로 독성이 거의 없는 *Lactobacillus rhamnosus*가 합성미백제인 hydroquinone의 미백 활성보다 낮지만 피부 적합성이 높아 합성미백제 및 기타 천연물을 대체할 수 있는 긍정적인 향장소재로 다가갈 수 있으며, 멜라닌 생성은 줄어들면서 세포독성은 낮아야 하는 향장미백제로서 *Lactobacillus rhamnosus*의 활용 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

#### 요 약

유산균은 국내외 연구진들에 의하여 피부장벽을 강화하는 효능 및 미백, 보습효과가 뛰어나다는 연구 결과가 보고된 바 있다[5, 26]. Lactic acid인 *Lactobacillus rhamnosus*는

**Table 2. Comparison of cosmeceutical activities of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*.**

	Concentration (% v/v)					
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>			<i>Lactobacillus casei</i>		
	2.5	5.0	10.0	2.5	5.0	10.0
Cytotoxicity (MTT)	2.7	4.6	7.6	6.1	7.2	9.8
Tyrosinase inhibition activity	20.6	26.8	31.3	11.6	13.2	17.7
Melanogenesis activity	66	591	58.6	96.2	83.6	80.6
Radical scavenging activity (DPPH)	13.7	14.4	14.9	12.2	12.7	13.4
Reducing power (O.D.)	0.410	0.581	0.763	0.397	0.578	0.739

\*Mean values  $\pm$  SD from triplicate separated experiments are shown.

보편적으로 많이 사용하는 프로바이오틱스인 *Lactobacillus casei*보다 낮게 측정되는 세포독성 결과와 높은 tyrosinase 억제활성을 바탕으로 멜라닌 생성을 줄임에 따라 미백활성을 가진다. 또한 *Lactobacillus rhamnosus* 파쇄물은 melanoma cell의 멜라닌 생성 저해능이 *Lactobacillus casei*보다 월등히 높아, 높은 미백 향상 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있다(Table 2). 이는 곧 천연물질로써 기존에 사용하던 합성미백제보다 피부에 독성을 주지 않고, 부작용 없이 피부에 적합한 향상소재로 판단되며, 현대의 새로운 미백향장소재로서 활용가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

더 나아가 항산화 활성은 멜라닌 세포 형성 억제에 직접적으로 영향을 주며, 주름 및 노화 등의 출발점이 되어, 미백 활성도 증가됨을 확인할 수 있다. 따라서, 기능성 향상소재로써 가치가 높은 *Lactobacillus rhamnosus*는 합성물질 및 기타 천연물을 대체할 수 있는 항산화 및 미백 기능성 향상소재로 다가갈 수 있으며, 향상소재로써 선택의 폭을 늘릴 수 있을 것으로 사료된다.

## Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Grant NO. : A103017).

## References

- Ahoutupa, M., M. Saxelin, and R. Korpela. 1996. Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. *Nutr. Today (suppl.)*. **31**: 518-528.
- Bennett, P. B., R. E. Marquis, and I. Demchenko. 1998. High pressure biology and medicine. *University of Rochester Press*. New York.
- Cho, W. G. 2007. Comparison of drug delivery using hairless and pig skin. *J. Korean Oil Chem. Soc.* **24**: 410-415.
- Dean, R. T. and M. J. Gieseg Davises. 1993. Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 437-441.
- Di Mazio, L., B. Cinque, C. De Simone, and M. G. Cifone. 1999. Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on ceramide levels in human keratinocytes in vitro and stratum corneum in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **113**: 98-106.
- Dietz, B. M., 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. van Breemen. 2005. Xanthohumol isolated from *Humulus Lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **18**: 1296-1305.
- Furrie Elizabeth. Probiotics and allergy. 2005. *P. Nutr. Soc.* **64**: 465-469.
- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of probiotics. *J. Nutr.* **125**: 1401-1412.
- Kim, C. H., M. C. Kwon, J. G. Han, C. S. Na, H. G. Kwak, G. P. Choi, U. Y. Park, and H. Y. Lee. 2008. Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. *Korean J. Med. Crop Sci.* **26**: 110-116.
- Kim, H. Y. and J. S. Ham. 2003. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Res.* **23**: 186-192.
- Kim, I. C. 2008. Antioxidative property and whitening effect of the polygoni multiflori radix, polygonati rhizoma and ephedrae herba. *J. Korean Oil Chem. Soc.* **25**: 533-538.
- Kim, J. S., Y. C. Seo, W. Y. Choi, H. S. Kim, B. H. Kim, D. H. Shin, C. S. Yoon, H. W. Lim, J. H. Ahn, and H. Y. Lee. 2011. Enhancement of antioxidant activities and whitening effect of acer mono sap through nano encapsulation processes. *Korean J. Med. Crop Sci.* **19**: 191-197.
- Kim, J. S., M. H. Jeong, W. Y. Choi, Y. C. Seo, C. J. Ma, J. H. Ahn, N. S. Kim, B. Hwang, J. S. Cho, and H. Y. Lee. 2011. Enhancement of whitening effects of *Lithospermum erythrorhizon* extracts by ultra high pressure. *Korean J. Med. Crop Sci.* **19**: 97-102.
- Kim, S. S., M. H. Jeong, Y. C. Seo, J. S. Kim, N. S. Kim, J. H. Ahn, B. Hwang, and H. Y. Lee. 2010. Comparison of antioxidant activity by high pressure extraction of *Codonopsis lanceolata* from different production areas. *Korean J. Med. Crop*

- Sci.* **18**: 248-245.
15. Korpela, R., K. Peuhkuri, T. Lahteenmaki, E. Sievi, M. Saxelin, and H. Vapaatalo. 1997. *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. *Milchwissenschaft*. **52**: 503-505.
  16. Kopp-Hellihan Lori. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics. *J. Am. Dietetic Assoc.* **101**: 229-241.
  17. Lim, A. K., Y. J. Jung, J. S. Kim, Y. H. Kim, J. H. Kwak, J. H. Hong, H. Y. Kim, and D. I. Kim. 2010. Skin UVB photo aging effect from extract of fermented *Reynoutria elliptica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **39**: 369-375.
  18. Lim, S. W., H. C. Ryoo, and S. H. Lee. 2002. Understanding of skin aging and its prevention and care. *The J. Skin Barrier Res.* **4**: 71-80.
  19. Macrae, R. G., R. K. Robinson, and M. J. Sadler. 1993. Encyclopedia of food science. *Food Technol. Nutr.* **1**: 607-171.
  20. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**: 307-315.
  21. Park, H. S., H. S. Lee, and T. B. Uhm. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 433-440.
  22. Park, J. M., J. Y. Lee, T. S. Park, S. J. Hyun, H. H. Kim, Y. J. Cho, O. J. Kwon, A. R. Son, D. S. Kim, and B. J. An. 2008. A study on the cosmeceutical activities of *prunus sargentii* R.. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**: 70-78.
  23. Pavel, S. and F. A. Muskiet. 1980. Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect Prev.* **6**: 311-318.
  24. Pomerantz, S. H. 1963. Separation, purification and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *J. Biol. Chem.* **238**: 2351-2357.
  25. Prota, G. 1990. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* **75**: 122-128.
  26. Prince, T., A. J. McBain, and C. A. O'Neill. 2012. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5119-5126.
  27. Sanders, J. W., K. J. Leehouts, A. J. Haandrikman, G. Venema, and J. Kok. 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J. Bacteriol.* **177**: 5254-5260.
  28. Shin, J. Y. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korea J. Food Nutr.* **14**: 568-572.
  29. Song, C. H., Y. C. Seo, W. Y. Choi, C. G. Lee, D. U. Kim, J. Y. Chung, H. C. Chung, D. S. Park, C. J. Ma, and H. Y. Lee. 2012. Enhancement of antioxidative activity of *codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. *Korean J. Med. Crop Sci.* **20**: 238-244.
  30. Tobin, D. and A. J. Thody. 1994. The superoxide anion may mediate short but not long term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **3**: 99-105.
  31. Yamakoshi, J., F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, and Y. Kubota. 2003. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pig Cell Res.* **16**: 629-638.
  32. Yoon, T. J., W. S. Yang, S. M. Park, H. Y. Jung, A. N. Lee, J. H. Jung, T. B. Kang, Y. C. Yoo, and J. B. Kim. 2009. *In vivo* toxicity and immunoadjuvant activity of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract fermented with *Lactobacillus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**: 560-565.