

Lactobacillus pentosus 발효에 의한 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 항산화 및 세포보호 효과

박 소 현·성 준 섭·이 건 수·박 영 민·현 송 화·차 미 연*·강 희 철*·박 수 남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, 코스메틱 융·복합산업 지원 센터

*(주)지에프씨 생명과학연구원

(2017년 6월 4일 접수, 2017년 9월 9일 수정, 2017년 9월 22일 채택)

Antioxidant and Cellular Protective Effects of *Parthenocissus tricuspidata* Stem Extracts Fermented by *Lactobacillus pentosus*

So Hyun Park, Joon Seob Seong, Keon Soo Lee, Young Min Park,
Song Hua Xuan, Mi Yeon Cha*, Hee Cheol Kang*, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center,
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

*GFC Co., Ltd., Korea

(Received June 4, 2017; Revised September 9, 2017; Accepted September 22, 2017)

요약: 본 연구에서는 담쟁이덩굴 줄기 70% 에탄올 추출물과 발효균주 *Lactobacillus pentosus*를 이용하여 발효시킨 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물에 대하여 항산화 및 세포보호 효과를 측정하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용한 자유라디칼 소거 활성(FSC₅₀)은 담쟁이덩굴 줄기 추출물 및 발효추출물이 각각 42.3 및 34.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 발효 후의 라디칼 소거활성이 약 18.4% 더 높게 나타났다. LumioI-의존성 화학발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서의 총 항산화능(OSC₅₀) 평가에서도 담쟁이덩굴 줄기 추출물과 발효추출물은 각각 2.6 및 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 발효 후가 약 4.2% 정도 더 높은 총 항산화능을 나타냈다. $^1\text{O}_2$ 로 유도된 적혈구 세포 손상에 있어서 추출물 및 발효추출물의 세포 보호 효과(τ_{50})는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 126.4 및 173.0 min을 나타내어 발효 후 세포 보호 효과가 약 34.0% 더 높게 나타났다. 발효추출물은 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol (43.4 min)보다도 3.9배 높은 세포 보호 활성을 보여주었다. 사람 섬유아세포인 Hs68을 대상으로 elastase 저해 활성을 조사하였다. Elastase 저해 활성(IC₅₀)은 담쟁이덩굴 줄기 추출물과 발효추출물에서 각각 873.6 및 687.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 발효 후에 elastase 저해 활성이 약 21.3% 더 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과들은 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물이 항산화 작용과 더불어 주름개선 효과를 가지는 천연 화장품 소재로써 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the antioxidant activities, cellular protective effects, and inhibitory effects on elastase of non-fermented and fermented extracts of *Parthenocissus tricuspidata* (*P. tricuspidata*) stem using *Lactobacillus pentosus* were investigated. The free radical scavenging activities (FSC₅₀) of non-fermented and fermented extracts were 42.3 and 34.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, in which the activity after fermentation was approximately 18.4% higher. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) in Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 system of non-fermented and fermented extracts were 2.6 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The activity after fermentation was approximately 4.2% higher. In the $^1\text{O}_2$ -induced cellular damage of erythrocytes, the cellular protective effects (τ_{50}) of non-fermented and fermented extracts were 126.4 and 173.0 min at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The activity after fermentation was approximately 34.0% higher. The

† 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)
call: 02)970-6451

effect of fermented extract was 3.9 times higher than (+)- α -tocopherol ($\tau_{50} = 43.4$ min), known as a lipophilic antioxidant at 50 $\mu\text{g/mL}$. The inhibitory effect of elastase was investigated to predict the anti-wrinkle efficacy using Hs68 human fibroblasts cells. The elastase inhibitory activities (IC_{50}) of non-fermented and fermented extracts were 873.6 and 687.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and the activity after fermentation was approximately 21.3% higher. These results indicated that fermented extract of *P. tricuspidata* stem has potentials as natural cosmetic ingredients with antioxidant and anti-wrinkle effect.

Keywords: *Parthenocissus tricuspidata*, *Lactobacillus pentosus*, fermentation, antioxidant activity, cellular protective effect

1. 서 론

아름다움을 추구하는 인간의 본능과 더불어 경제활동 하는 여성 인구의 증가, 남성 및 중장년층의 소비계층 확대와 중국 등 동남아시아의 화장품 소비자의 증가로 국내 화장품 시장 규모는 계속 상승하는 추세에 있다. 특히 한국 고유의 한방화장품 및 융·복합 기술이 접목된 새로운 화장품들은 글로벌 경쟁력을 높이는데 크게 기여하고 있다.

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]. 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 아글리콘 구조로 바이오 전환시킬 수 있음이 알려져 있다. 아글리콘 구조의 물질들은 일반적으로 항산화 활성 등이 배당체 구조에 비하여 큰 것으로 알려져 있다[2-4]. 저자들은 선행 연구에서, 레몬밤 및 라벤더 발효추출물이 발효시키지 않은 추출물보다 항산화 활성 및 세포보호효능이 높음을 확인하여 보고한 바 있다[5,6]. 이와 같이 발효 및 바이오 전환기술을 이용하여 항노화나 미백 등 기능성 화장품소재 개발하여 화장품에 응용하는 연구들이 최근 활발히 이루어지고 있다[7,8].

태양 자외선이나 공해 등에 과다 노출되면 피부 세포 및 조직 손상에 따른 피부노화가 급속히 진행된다. 특히 자외선(UV)은 외인성 피부 광노화의 주요한 원

인이다. 피부가 자외선에 노출되면 피부에서는 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$), alkoxy radical ($\bullet\text{OR}$) 및 hydroperoxy radical ($\bullet\text{OOR}$) 등 다양한 종류의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다[9]. 이들 ROS는 피부에 존재하는 지질, 단백질 및 DNA를 산화 손상시킬 뿐만 아니라 콜라겐이나 엘라스틴과 같은 매트릭스 구성 단백질들의 절단 및 비정상적인 가교결합을 통하여 주름생성을 동반하는 피부노화를 촉진시킬 수 있다. 따라서 피부에서 생성되는 과잉의 활성산소 생성을 억제하거나 피부 세포의 매트릭스 성분인 콜라겐 및 엘라스틴 등을 분해시키는 matrix metalloproteinases (MMPs) 활성을 억제하는 효능이 있는 기능성 소재의 개발은 기능성 화장품 연구에 있어서 매우 중요하다.

담쟁이덩굴(*P. tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.)은 쌍떡잎식물로서 포도과에 속하며, 한국·일본·대만·중국과 같은 동아시아에 주로 분포하고 있다. 담쟁이덩굴 새순·잎·줄기·뿌리는 민간 전통 약용식물로 신경통, 당뇨, 기침 가래, 편두통 등에 사용되는 것으로 전해지고 있다. 주성분으로는 miquelianin 등의 플라보노이드 배당체, caffeic acid 및 stilbene 배당체 등이 알려져 있다[10-13]. 담쟁이덩굴 추출물은 항말라리아, 항균, 항산화 및 항암 활성 등이 있는 것으로 알려져 있다[12-14]. 하지만 발효법이나 바이오 전환 기술을 이용한 소재 개발 연구는 아직 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 담쟁이덩굴 줄기 추출물 및 발효추출물에 대하여 자유라디칼 소거 활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소종에 대한 총항산화능, $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 조사하고, Hs68 사람 섬유아세포를 이용한 elastase 저해 활성을 측정하여 담쟁이덩굴 발효추출물이 항산화 및 항노화 소재로서 화장품에의 응용 가능성이 있는지를 알아보하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

라디칼 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 화학발광 실험에 사용한 luminol과 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H₂O₂, L-ascorbic acid, 세포보호효과 측정에 사용한 heparin, rose-bengal, (+)- α -tocopherol, 그리고 elastase 저해활성에 사용한 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 및 oleanolic acid는 Sigma-Aldrich (Korea)에서 구입하였다. 그 외 FeCl₃ · 6H₂O는 Junsei Chemical Co. (Japan)에서 구입하였고, 에탄올 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, 적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을, pH 미터는 Hanna (Korea)사의 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 담쟁이덩굴 줄기는 2017년 1월경 서울 경동시장에서 국내에서 채취된 것을 구입 사용하였다.

2.2. 담쟁이덩굴 줄기의 추출 및 발효

건조된 담쟁이덩굴 줄기 50 g을 잘게 잘라 70% 에탄올 2 L에 일주일 동안 침적시킨 뒤 여과지로 3번 반복 여과하여 추출하였다. 그 후 감압·건조하여 파우더를 얻었다.

담쟁이덩굴 줄기 발효추출물은 (주)지에프씨로부터 얻었다. 발효 유산 균주는 여러 미생물 중에서 bromophenol blue (BPB)를 이용한 산 생성 균주 선발[15], esculin agar 방법을 통한 β -glucosidase를 생성하는 균주 선발[16], ρ -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (ρ NPG) 방법을 이용한 glucosidase 활성 균주 선발[17] 과정을 거쳐 최종 β -glucosidase 고역가 균주인 *Lactobacillus pentosus* (*L. pentosus*)를 선정하였으며 colony PCR을 이용한 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 유산 균주 동정[18]으로부터 *L. pentosus* D79211 [19]와 99%의 상동성을 확인하였다. 발효는 1% glucose를 함유한 액상 발효 방법을 사용하였다. 액상배양은 최소한의 영양원으로 1% glucose를 첨가한 증류수에 70% 에탄올 추출물 파우더를 1% 농도가 되도록 첨가한 후, autoclave를 통해 멸균하고 발효 균주 *L. pentosus* seed 3%로 첨가하여 37 °C에서 5일간 발효를 진행하였다. 이

를 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물이라고 칭하였다. 발효 전후 차이를 비교하기 위하여 동일한 조건의 용액에 발효 균주를 처리하지 않은 용액을 제조하였고 이를 담쟁이덩굴 줄기 추출물이라고 칭하였다.

2.3. 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

생체에서 유리라디칼은 홀수 전자를 가지고 있는 화학종으로 매우 불안정한 상태이며 지질연쇄반응을 일으켜 세포를 손상시킬 수 있다. 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 천연물의 전자주개 작용에 의한 환원력을 나타내는 라디칼 소거활성을 측정하였다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 혼합하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 UV/Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 DPPH 시약을 넣지 않은 것을 공시험(blank), 시료를 넣지 않은 것을 대조군(control), 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 계산하였다. 자유라디칼 소거활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, μ g/mL)로서 표기하였으며, 자유라디칼 (DPPH) 소거활성(%)을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

$$\text{Radical Scavenging (\%)} = \left\{ 1 - \left(\frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100$$

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 Fenton 반응에 의해 각종 ROS를 생성시키며 철과 같은 전이금속은 특히 반응성이 큰 \cdot OH를 생성시키는데 촉매 역할을 한다. 따라서 이계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있으며, 이 총 항산화능에는 활성산소 생성에 촉매 역할을 하는 전이금속의 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS와의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 확인할 수 있다. 실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM

EDTA 40 μ L 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μ L를 가한 후 35 mM luminol 80 μ L를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 통한 활성산소종 생성을 위해 150 mM H₂O₂ 40 μ L를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 값은 다음 식으로 활성산소 소거율(%)을 계산하였고, 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀)로 표기하였다.

$$\begin{aligned} ROS\ Scavenging\ (\%) \\ = \left(\frac{Cpm_{control} - Cpm_{experiment}}{Cpm_{control} - Cpm_{blank}} \right) \times 100 \end{aligned}$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 4 °C의 냉장고에 보관하고 12 h 이내에 이용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6이 되도록 제조되었으며, 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/mL로 계산된다.

2.4.2. 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물의 광용혈 억제 효과

1.5×10^7 cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 추출물 용액을 농도별로 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 간 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose-bengal (12 μ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광 조사 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에

20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 시간 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)를 통해 평가하였다. 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 상온에서 진행되었다.

담쟁이덩굴 줄기 추출물 및 발효추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈 되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ_{50} 이 30.3 min으로 오차범위 ± 1.3 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

2.5. 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물의 항노화 활성 측정

2.5.1. 세포배양

사람 피부 유래 섬유아세포 Hs68은 ATCCTM (USA, CRL-1635TM)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)는 10% fetal bovine serum (FBS, PAA, Austria), 1% penicillin / streptomycin, (P/S, PAA, Austria)을 혼합하여 사용하였고, 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.5.2. Elastase 저해 활성 측정(Hs68 사람섬유아세포)

사람 Hs68 섬유아세포(USA, CRL-1635TM)를 사용하여 elastase 저해 활성을 측정하였다[20,21]. 배양된 세포의 배양액을 제거한 후 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척하였다. 0.1% Triton X-100 · 0.2 M Tris 액(pH 8.0 HCl)을 넣어 녹이고 초음파 분쇄를 통하여 세포를 균질화시켜 원심분리 후 상층액을 취하여 섬유아세포 elastase를 포함하는 효소액을 얻었다. 만들어진 elastase 용액을 BCA kit를 이용하여 단백질 정량하고, 각 well 당 100 μ g의 단백질을 함유하는 양을 96-well에 넣고 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)을 넣어 88 μ L가 되도록 한다. 여러 농도의 추출물 및 발효추출물을 10 μ L씩 각 well에 넣고 elastase의 기질인 N-succinyl-trialanyl-p-nitroanilide (STANA, 50 mM)액을 2 μ L씩 각 well에 넣었다. 이후 37 °C에서 90 min 동안 반응 후

Table 1. Yields of 70% EtOH Extract of *P. tricuspidata* Stem

	Raw material (g)	Solvent (L)	Dry Extract (g)	Yields (%)
<i>P. tricuspidata</i> stem	50.0	2.0	5.2	10.5

405 nm에서 ELISA reader로 측정하였다. 대조군(control)은 시료 대신에 시료용액으로 사용된 용매만 넣었고, 공시험(blank)은 실험군(experiment)과 조건이 동일하나 elastase 용액 대신 Tris-HCl 완충액(pH 8.0)을 첨가하였다. Elastase 저해 활성은 elastase의 활성을 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC₅₀)로 표기하였다.

2.6. 통계처리

본 연구의 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였고 통계자료의 값은 mean ± S.D.로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA) 프로그램을 이용하였으며, one-way ANOVA 검정을 적용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 수율

수율은 건조된 담쟁이덩굴 줄기 무게를 기준으로 계산하였다(Table 1). 담쟁이덩굴 줄기 70% 에탄올 추출물 파우더의 수율은 10.5%였다.

3.2. DPPH 시험법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

활성산소에는 O₂^{•-} 및 •OH과 같은 라디칼 종이 포함된다. 라디칼은 홀수 전자를 가지고 있어 반응성이 매우 높고 불안정한 상태로 생체 내에서 자동산화 연쇄 반응에 의한 지질과산화물을 일으켜 세포 및 조직들에 손상을 일으키고 피부노화를 가속화 시킨다. 지용성 항산화제로 잘 알려진 (+)- α -tocopherol은 라디칼에 전자를 제공함으로써 연쇄반응을 종결시킨다. 라디칼은 전자를 받아 환원됨으로써 높은 반응성이 소멸될 수 있다. 이와 같이 전자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통해서 시료의 자유라디칼 소거 활성 FSC₅₀을 측정할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH를 이용하여 담쟁이덩굴 줄기 추출물 및 발효추출물의 라디칼 소거 활성을 측정하였다.

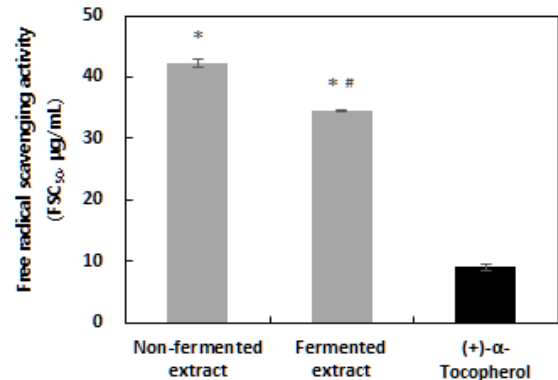


Figure 1. Free radical scavenging activity of non-fermented and fermented extracts of *P. tricuspidata* stem and reference compounds. Data are presented as mean ± S.D. * $p < 0.05$ compared with (+)- α -tocopherol, # $p < 0.05$ compared with the non-fermented extract.

자유라디칼이 50% 소거되는 농도인 FSC₅₀은 담쟁이덩굴 줄기 추출물이 42.3 µg/mL, 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물이 34.5 µg/mL로 나타났다(Figure 1). 이들은 항산화제로 잘 알려진 (+)- α -tocopherol (FSC₅₀, 9.0 µg/mL)보다는 낮은 활성을 보였으나 발효 후 약 18.4% 활성이 증대되었다. 이를 통하여 발효 후에 자유라디칼 소거활성이 증가함을 확인하였다.

3.3. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

본 연구에서는 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계를 이용하여 다양한 종류의 활성산소를 발생시키고 이들 소거 활성을 측정하였다. 철(Fe)과 구리(Cu) 같은 전이금속 이온들은 생체 내에도 존재하며 자외선에 의해 생성된 H₂O₂와 Fenton 반응을 일으켜 다양한 활성산소종이 생성된다. Luminol은 활성산소에 의해 높은 에너지의 들뜬 상태로 되고 이어 바닥상태로 떨어지게 되면서 420-450 nm에서 발광하는 특성을 가진다. 이 계에 항산화제를 첨가하여 화학발광이 감소하는 정도에 따라 활성산소 소거 활성을 측정할 수 있다. 이를 이용하여 총 항산화능 OSC₅₀을 평가하였다. 활성산소가 50% 감소하는 농도인 OSC₅₀은 담쟁이덩굴 줄기 추출물이 2.6 µg/mL,

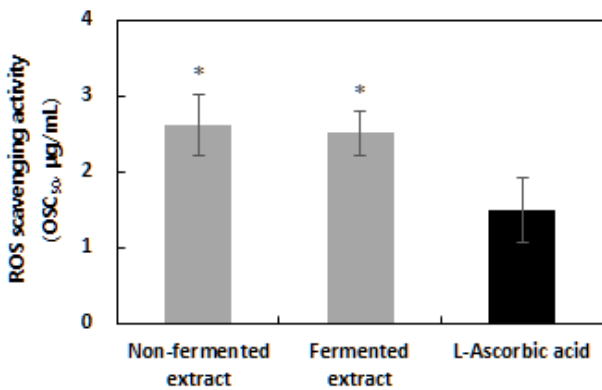


Figure 2. ROS scavenging activity of non-fermented and fermented extracts of *P. tricuspidata* stem and reference compounds. Data are presented as mean \pm S.D. * p < 0.05 compared with L-ascorbic acid.

담쟁이덩굴 줄기 발효추출물이 2.5 µg/mL로 나타났다 (Figure 2). 이들은 수용성 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid (1.5 µg/mL)보다는 낮은 활성을 나타냈으나 발효 후 약 4.2% 활성이 증대되었다. 이를 통하여 발효 후에 총 항산화능이 약간 증가함을 확인하였다.

3.4. 1O_2 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

피부가 자외선에 노출되게 되면 생체 내 존재하는 광증감제(porphyrin 또는 riboflavin)들은 다양한 활성산소를 발생시키는 광증감 반응(photosensitization)을 일으킨다. 특히 1O_2 은 광증감 반응의 주생성물이며 반응성이 매우 큰 활성산소로 세포막에 침투하여 인지질 및 세포 구성성분들의 자동산화반응을 개시하여 세포막 파괴 및 세포 손상을 야기하게 된다. 본 연구에서는 세포막의 지질 이중층과 유사한 적혈구 세포를 이용하여 구축된 세포 보호 효과 측정 시스템으로 1O_2 로 유도된 세포손상에 대한 보호효과를 평가하고자 하였다. 광증감제로써 rose-bengal을 사용하여 1O_2 을 발생시키고, 적혈구 세포의 용혈 정도를 통해 이를 판단하였다.

세포보호효과의 결과는 시료를 5, 10, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 적혈구가 50% 용혈되는데 걸리는 시간 (τ_{50})으로 나타내었으며(Figure 3), 먼저 시료를 넣지 않은 대조군으로 약 30.3 min에서 50%의 적혈구가 파괴되는 것으로 측정되었다. 이러한 조건에서 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 τ_{50} 은 5, 10, 25, 50 µg/mL에서 각각 33.3, 39.2, 63.5, 126.4 min, 발효추출물은 각각

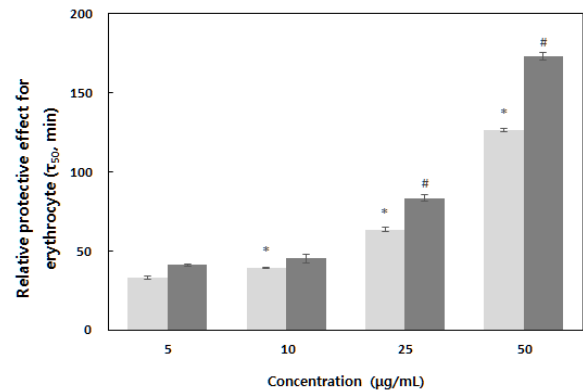


Figure 3. Cellular protective effects of non-fermented and fermented extracts of *P. tricuspidata* stem on rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Data are presented as mean \pm S.D. * p < 0.05 compared with concentration of 5 µg/mL in non-fermented extract dose-treated groups, # p < 0.05 compared with concentration of 5 µg/mL in fermented extract dose-treated groups.

41.2, 45.2, 83.5, 173.0 min으로 농도의존적인 세포보호 효과를 나타내었다. 특히 25 µg/mL 농도에서 발효 후 31.4% 증가, 50 µg/mL 농도에서 발효 후 34.0% 증가하였다. 자유라디칼 소거 활성 및 활성산소 소거 활성 결과에 비해 추출물과 발효추출물이 큰 차이로 세포보호 활성 증대를 보였다.

세포막은 지질을 주성분으로 하고 있음을 고려할 때, 배당체에서 당 성분들이 제거된 발효추출물은 세포막에의 침투가 훨씬 용이하여 세포막에서 일어나는 라디칼 연쇄반응을 차단함으로써 활성산소에 의한 손상으로부터 세포막을 효율적으로 보호할 수 있을 것으로 추정된다[22]. 이러한 결과는 50 µg/mL 농도에서 발효추출물(173.0 min)이 (+)- α -tocopherol (43.4 min) 보다도 3.9배 월등한 세포보호효과로부터 알 수 있다 (Figure 4). 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물은 세포 수준에서의 항산화능이 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol 보다도 우수하여 화장품에서 항노화 화장품의 항산화제로 응용 가능성이 매우 큰 것으로 사료된다.

3.5. Elastase 저해 활성(Hs68 사람섬유아세포)

주름 생성을 유발하는 효소 MMPs (matrix-metalloproteinases)는 피부 진피층에 존재하며 발현 시 세포 외기질에 존재하는 엘라스틴이나 콜라겐을 분해한다. MMPs는 자외선이나 활성산소에 의해 발현되며 종류

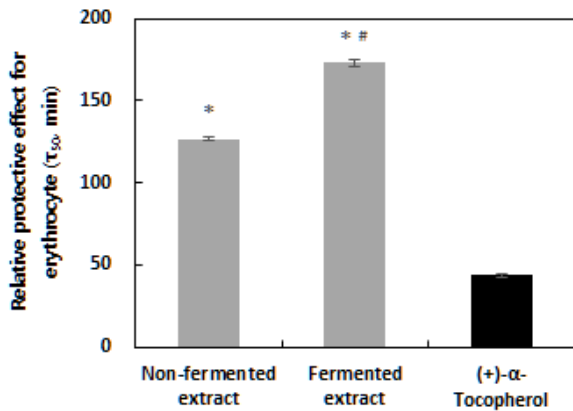


Figure 4. The cellular protective effects of non-fermented and fermented extracts of *P. tricuspidata* stem and (+)- α -tocopherol at 50 $\mu\text{g/mL}$ on the photohemolysis of human erythrocytes. Data are presented as mean \pm S.D. * $p < 0.05$ compared with (+)- α -tocopherol, # $p < 0.05$ compared with the non-fermented extract.

로는 elastase, collagenase 및 gelatinase 등이 있다. 이들은 피부의 탄력에 영향을 주는 엘라스틴 및 콜라겐의 분해를 촉진하여 주름 생성을 일으킨다. 특히, 엘라스틴을 분해하는 효소 elastase의 활성은 피부의 탄력감소 및 주름 생성을 촉진한다. 따라서 이들의 활성을 저해하는 것은 피부노화를 방지하는데 있어 매우 중요하다. 담쟁이덩굴 줄기 추출물 및 발효추출물의 elastase 저해 활성(IC₅₀)은 각각 873.6 $\mu\text{g/mL}$, 687.8 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타나 발효 후 elastase 저해 활성이 약 21.3% 증가함을 확인하였으며 비교물질로 oleanolic acid (IC₅₀, 7.2 $\mu\text{g/mL}$)를 사용하였다(Figure 5).

4. 결 론

이상의 결과들로부터 *L. pentosus*를 이용한 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물은 자유라디칼 소거 활성, 활성산소 소거 활성(총 항산화능), ¹O₂으로 유도된 세포손상에 대한 세포보호 효과, elastase 저해 활성이 증가함을 확인하였다. 이는 발효 후 발효균주 *L. pentosus*에 의해 배당체들이 아글리콘 구조로 생물 전환되어 나타난 결과로 사료된다. 폴리페놀 및 플라보노이드 배당체와 각각의 아글리콘 형태의 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀)과 총 항산화능(OSC₅₀)을 비교해보면 아글리콘 형태일 때가 우수한 활성을 나타낸다[23]. 발효 균주에 의해

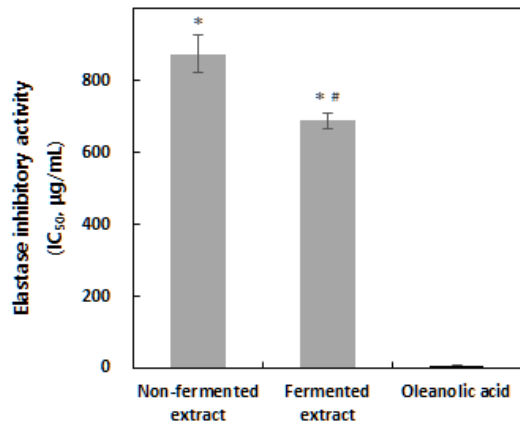


Figure 5. Inhibitory activity of non-fermented and fermented extracts of *P. tricuspidata* stem and reference compounds on elastase from Hs68 human fibroblast cells. Data are presented as mean \pm S.D. * $p < 0.05$ compared with oleanolic acid, # $p < 0.05$ compared with the non-fermented extract.

폴리페놀 및 플라보노이드 배당체가 아글리콘 형태로 생물 전환되어 저분자화된 것이 자유라디칼 소거 활성과 총 항산화능, 세포보호 효과, elastase 저해 활성이 높아지는 데에 기인한 것으로 보인다[24-26].

이러한 결과들을 통해 담쟁이덩굴 줄기 발효추출물은 항산화 활성 및 주름개선 효과를 가지는 천연 화장품 소재로써 응용 가능성이 있음이 시사되었다.

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, *Asian J. Beauty 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. H. J. Yang, E. H. Kim, J. O. Park, J. E. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of fermented *Melissa officinalis* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**(1), 47 (2009).
 6. Y. J. Ahn, B. R. Won, M. K. Kang, J. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidant activity and component analysis of fermented *Lavandula angustifolia* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**(2), 125 (2009).
 7. A. R. Im, J. H. Song, M. Y. Lee, S. H. Yeon, K. A. Um, and S. Chae, Anti-wrinkle effects of fermented and non-fermented *Cyclopia intermedia* in hairless mice, *BMC Complement. Altern. Med.*, **14**, 424 (2014).
 8. 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).
 9. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
 10. H. K. Hwang, H. K. Sung, W. K. Whang, and I. H. Kim, Flavonol glycosides from *Parthenocissus tricuspidata* leaves, *J. Pharm. Soc. Korea*, **39**(3), 289 (1995).
 11. M. Saleem, H. J. Kim, C. Jin, and Y. S. Lee, Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata*, *Arch. Pharm. Res.*, **27**(3), 300 (2004).
 12. T. Kundaković, T. Stanojković, M. Milenković, J. Grubin, Z. Juranić, B. Stevanović, and N. Kovačević, Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of *Ampelopsis brevipedunculata* and *Parthenocissus tricuspidata* (vitaceae), *Arch. Biol. Sci.*, **60**(4), 641 (2008).
 13. W. H. Park, S. J. Lee, and H. I. Moon, Antimalarial activity of a new stilbene glycoside from *Parthenocissus tricuspidata* in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**(9), 3451 (2008).
 14. M. Ohyama, T. Tanaka, T. Ito, M. Iinuma, K. F. Bastow, and K. H. Lee, Antitumor agents 200. Cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**(20), 3057 (1999).
 15. B. U. Ridwan, C. J. Koning, M. G. Besselink, H. M. Timmerman, E. C. Brouwer, J. Verhoef, H. G. Gooszen, and L. M. A. Akkermans, Antimicrobial activity of a multispecies probiotic (Ecologic 641) against pathogens isolated from infected pancreatic necrosis, *Let. Appl. Microbiol.*, **46**(1), 61 (2008).
 16. L. H. Quan, L. Q. Cheng, H. B. Kim, J. H. Kim, N. R. Son, S. Y. Kim, H. O. Jin, and D. C. Yang, Bioconversion of ginsenoside Rd into compound K by *Lactobacillus pentosus* DC101 isolated from kimchi, *J. Ginseng Res.*, **34**(4), 288 (2010).
 17. Y. H. Pyo, T. C. Lee, and Y. C. Lee, Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria, *Food Res. Int.*, **38**(5), 551 (2005).
 18. J. W. Min, H. J. Kim, K. S. Joo, and H. C. Kang, Isolation of *Stenotrophomonas rhizophilae* Strain GFC09 with ginsenoside converting activity and anti-wrinkle effects of converted ginsenosides, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(4), 375 (2007).
 19. S. H. Kim, J. W. Min, L. H. Quan, S. Lee, D. U. Yang, and D. C. Yang, Enzymatic transformation of ginsenoside Rb1 by *Lactobacillus pentosus* strain 6105 from Kimchi, *J. Ginseng. Res.*, **36**(3), 291 (2012).
 20. N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity, *Photochem. Photobiol.*, **74**(2), 283 (2001).
 21. K. Tsukahara, Y. Takema, S. Moriwaki, N. Tsuji, Y. Suzuki, T. Fujimura, and G. Imokawa, Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concen-

- tration-dependent prevention of ultraviolet b-Induced wrinkle formation, *J. Invest. Dermatol.*, **117**(3), 671 (2001).
22. B. J. Kong, Y. J. Kim, J. S. Baek, D. B. Lee, J. W. Lee, N. Y. Min, A. Y. Kim, and S. N. Park, Antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of Mate (*Ilex paraguariensis*) extract/fractions, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(4), 391 (2015).
23. H. J. Lee, G. N. Lim, M. A. Park, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* G. Don extracts, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **39**(1), 63 (2011).
24. D. H. Kim, J. H. Kim, S. H. Baek, J. H. Seo, Y. H. Kho, T. K. Oh, and C. H. Lee, Enhancement of tyrosinase inhibition of the extract of *Veratrum patulum* using cellulase, *Biotechnol. Bioeng.*, **87**(7), 849 (2004).
25. S. Y. Kim, S. J. Kim, J. Y. Lee, W. G. Kim, W. S. Park, Y. C. Sim, and S. J. Lee, Protective effects of dietary soy isoflavones against UV-induced skin-aging in hairless mouse model, *J. Am. College Nutr.*, **23**(2), 157 (2004).
26. H. M. Chiang, H. C. Chen, T. J. Lin, I. C. Shih, and K. C. Wen, *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts, *Food Chem. Toxicol.*, **50**(12), 4260 (2012).