

## ***Lactiplantibacillus plantarum* SM4 를 이용한 레드비트 생물전환물의 항산화, 피부 미백과 자외선 흡수 효능 연구**

염서희<sup>†</sup> · 강민호<sup>\*\*</sup> · 박제훈<sup>\*\*</sup> · 김소희<sup>\*</sup> · 김진우<sup>\*\*\*,\*\*\*\*,\*\*\*\*\*,††</sup>

<sup>\*</sup>선문대학교 식품과학부, 석사 대학원생

<sup>\*\*</sup>선문대학교 식품과학부, 학부생

<sup>\*\*\*</sup>선문대학교 식품과학부, 교수

<sup>\*\*\*\*</sup>차세대 반도체 기술연구소

<sup>\*\*\*\*\*</sup>프렉스프로 바이오테크놀로지

(2022년 8월 11일 접수, 2022년 9월 12일 수정, 2022년 9월 20일 채택)

### **A Study on Antioxidant, Skin-Whitening and UV Absorption Effect of *Beta vulgaris* Using *Lactiplantibacillus plantarum* SM4**

Suh Hee Yeom<sup>1,†</sup>, Min Ho Kang<sup>1</sup>, Jae Hoon Park<sup>1</sup>, So Hee Kim<sup>1</sup>, and Jin Woo Kim<sup>1,2,3,††</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science, Sun Moon University, 221-70 Sunmoonro, Tangjeong-myeon,  
Asan-si, Chungcheongnam-do 31460, Korea

<sup>2</sup>Center for Next-Generation Semiconductor Technology

<sup>3</sup>FlexPro Biotechnology

(Received August 11, 2022; Revised September 12, 2022; Accepted September 20, 2022)

**요약:** 본 연구의 목적은 *Lactiplantibacillus plantarum* SM4를 이용하여 *Beta vulgaris*의 생물전환물(BBE)의 피부미백 및 자외선 흡수 효과를 확인하기 위한 것으로 총 폴리페놀 함량(TPC), 총 플라보노이드 함량(TFC), 라디칼 소거 활성(RSA), 티로시나아제 활성 억제(TAI)를 측정하여 항산화 활성 및 미백활성을 평가하였다. BBE의 TPC와 TFC는 25.0 mg GAE/g DM, 8.05 mg QE/g DM으로 각각 열수 추출물(HWE) 대비 1.3, 1.1 배 높았다. 항산화 활성 지표인 RSA와 피부 미백 효과 지표인 TAI가 각각 36.8%, 68.6%로 HWE보다 1.1, 1.2 배 높았다. BBE의 UVA와 UVB 흡수율은 각각 21.4, 87.6%로 HWE보다 1.4, 1.7 배 높았다. 또한 LC-MS/MS를 이용한 BBE의 주요 물질을 분석을 통해 항산화 및 피부 미백 효과가 높은 것으로 알려진 폴리페놀의 일종인 kaempferol 과 isorhamnetin이 확인됐다. 이에 따라 BBE는 항산화, 피부 미백, 자외선 흡수 특성이 우수해 기능성 화장품 소재로 활용될 것으로 기대된다.

**Abstract:** The purpose of this study was to confirm the skin whitening and UV absorption effects of bioconverted *Beta vulgaris* (BBE) using *Lactiplantibacillus plantarum* SM4, and the effects were evaluated by measuring total polyphenol content (TPC), total flavonoid content (TFC), radical elimination activity (RSA), and tyrosinase activity inhibition (TAI). TPC and TFC of BBE were 25.0 mg GAE/g DM and 8.05 mg QE/g DM, which were 1.3 and 1.1 times higher than hot-water extract (HWE) respectively. RSA, an indicator of antioxidant activity, and TAI, an indicator of skin-whitening effect, were 36.8%, and 68.6%, respectively, 1.1 and 1.2 times higher than that of HWE. UVA and UVB absorption

† 주 저자 (e-mail: yshee0017@naver.com)

call: 041-530-2278

†† 교신저자 (e-mail: kimjw1028@sunmoon.ac.kr)

call: 041-530-2278

of BBE were 21.4 and 87.6%, which was 1.4 and 1.7 times higher than that of HWE respectively. When main substances of BBE were analyzed using LC-MS/MS, kaempferol and isorhamnetin, a type of polyphenols known to have high antioxidant and skin-whitening effects, were identified. As a results, BBE is expected to be used as a functional cosmetic material as it has excellent antioxidant, skin whitening, and UV absorption properties.

**Keywords:** *Lactiplantibacillus plantarum* SM4, *Beta vulgaris*, bioconversion, skin-whitening, UV-absorption

## 1. 서 론

최근 경제 발전에 따라 삶의 질이 향상되며 피부미용과 같은 외적 요인에 대한 관심이 증가하고 있어 피부 손상과 노화를 억제하는 항산화 및 피부 미백 등과 관련된 기능성 화장품산업이 지속적으로 성장하고 있는 추세이다[1]. 피부 노화는 생명체를 구성하는 세포, 조직과 기관의 자연적인 퇴화 과정인 내인성 노화와 외부 스트레스, 약물과 자외선에 의한 외인성 노화로 분류되며 특히 사회 및 환경적 요인의 악화로 외인성 노화의 위험성이 증가되는 실정이다[2]. 외인성 노화의 주된 원인인 자외선(UV)은 파장에 따라 UVA (400 ~ 320 nm), UVB (320 ~ 290 nm) 그리고 UVC (290 ~ 200 nm)로 분류되며 UVC는 오존층에서 대부분 흡수되어 지표면에 도달하지는 않으나 피부에 도달하는 UVA와 UVB는 피부에 강한 반응성을 가진 활성산소 생성을 유도한다[3]. 특히 활성산소에 의해 피부 색소인 페오멜라닌과 유멜라닌 합성이 촉진된다는 멜라닌 생성 기작이 밝혀져 활성산소를 제거하는 항산화 소재 연구가 활발하게 진행되고 있다[4].

멜라닌 합성은 율속 단계 효소인 타이로시네이즈와 활성산소에 의해 타이로신이 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로 변환된 후 효소적 산화에 의해 도파퀴논으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응을 통해 도파 크롬으로 순차적으로 전환되어 최종적으로 색소 물질인 멜라닌을 합성하게 된다[5]. 과도한 멜라닌 합성은 기미, 주근깨와 피부 반점 등을 생성하고 피부 노화를 유도하는 것으로 알려져 타이로신 산화를 촉진시키는 타이로시네이즈 활성 저해와 활성산소 제거가 멜라닌 합성 억제에 효과적이라고 보고되고 있다[6]. 활성산소를 억제시키는 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT)와 propyl gallate (PG) 등이 미백용 소재로 널리 사용되고 있으나 생체 효소 및 지방의 변이 유발에 의한 발암성과 간 독성이 보고되어 이를 대체할 천연 항산화제 개발이 활발히 진행되고 있는 추세이다[7]. 최근

천연 항산화제 및 기능성 소재 개발에 있어 신규물질 생산 및 효능 향상을 위해 유산균과 효모 등 유익 미생물을 이용한 발효 기반의 생물전환 연구가 활발히 진행되고 있다[8]. 생물전환은 미생물이 에너지 및 필수 대사체 생산을 위해 효소를 이용한 이화작용을 통해 새로운 생리활성물질 생산, 저분자화, 또는 비당체화의 수행을 통해 기능성이 증진된다고 알려져 있다[9]. 이러한 생물전환은 화장품 및 식품 분야에서도 널리 활용되며 알파 글루코시다제, 베타 글루코시다제와 아밀라제 등의 효소에 의한 글루코시드 결합의 분해를 통한 가수분해, 단당화 및 비당체화를 증가시키는 방법이 주로 활용되고 있다[10].

레드비트(*Beta vulgaris*)는 명아주과의 두 해 살이 풀로 유럽 남부 지중해가 원산지인 잎과 뿌리 모두 식용할 수 있는 약용 식물로 식재료로 자주 사용되었으며 우리나라에서는 강원도와 제주도 지방에서 주로 재배되고 있다[11]. 레드비트를 이용한 최근 연구 동향은 주로 색소, 항균작용과 영양학적 연구가 대부분으로 레드비트의 생물전환을 통한 항산화 및 피부 미백 활성 증진 관련 연구는 미비한 실정이다[12]. 따라서, 본 연구에서는 전통 발효 식품인 김치에서부터 분리된 *Lactiplantibacillus plantarum* SM4 (*L. plantarum* SM4)를 이용한 레드비트의 생물전환을 통해 항산화 및 피부 미백 활성 증진을 확인하고 향후 건강식품 및 화장품 기능성 소재로서의 사용 가능성을 탐색하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 및 시약

본 연구에서 사용된 레드비트는 건조 분말(푸른산 농업법인, Korea)을 구입하여 실험에 앞서 열풍건조기(FC 49, Lab house, Korea)로 60 °C에서 수분함량의 변화가 없을 때까지 건조한 후 -21 °C에 보관하였다. 항산화 및 피부 미백 활성 평가를 위한 시약으로 Sigma-Aldrich (USA)사의 aluminum chloride, potassium acetate, L-3,4-dihydroxyphenylalanine

(L-DOPA), 버섯 유래 타이로시네이스, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (PzPLGPR), 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH)를 사용하였다. 항산화 활성과 타이로시네이스 활성 저해 측정에 ascorbic acid와 kojic acid를 양성대조군으로 사용하였으며 이외의 분리 및 분석 실험에서는 Sigma-Aldrich 사의 일급(extra pure) 이상의 시약을 사용하였다.

## 2.2. 초음파 추출

레드비트로부터 생리활성물질 추출을 위해 건조 시료 1 g에 50.0% 주정 20.0 mL를 압력용기에 분주하여 추출 시간과 온도 설정이 가능한 탁상형 초음파기(SD-D250H, Mujigae, Korea)를 이용하여 40 kHz와 300 W로 60 °C에서 30 min 추출을 진행하였다. 추출물은 원심분리기(LZ-1736R, LoboGene, Korea)를 이용하여 4 °C, 5,000 rpm으로 5 min간 고액분리한 후, 상등액을 취해 -21 °C에서 냉동 보관하며 필요에 따라 희석해서 사용하였다.

## 2.3. 미생물 배양 및 생물전환물 생산

레드비트 추출물의 생물전환을 위한 발효를 위해 Hong 등의 연구를 참고하여 김치로부터 균주를 분리하여 사용하였다[13]. MRS (BD Biosciences, USA) 평판배지를 제조한 후 1 : 100 (v/v)로 희석된 김치국물 0.3 mL를 도말하고 37 °C 항온기에서 24 h 배양하였다. 이후 단일 콜로니를 MRS 액체배지 10 mL에 접종하여 항온기에서 48 h 배양 후 API ZYM 키트(BioMerieux, France)를 이용하여 알파 글루코시다제와 베타 글루코시다제 활성이 우수한 균주인 *L. plantarum* SM4를 선정하여 효소생산 균주로 사용하였다.

레드비트 생물전환물 생산을 위해 MRS를 Erlenmeyer flask에 50 mL를 분주하여 고압멸균기(SAC05060P, DaeHan Sci., Korea)에서 121 °C로 15 min간 멸균하였다. 멸균배지에 평균 1.0% (v/v)를 접종한 후 진탕 배양기에서 37 °C와 200 rpm으로 24 h 배양하여 레드비트 추출물과 배양액을 1 : 2 (v/v)로 혼합하여 48 h 생물전환을 수행하였다. 추가적인 생물전환을 위해 배양액을 호모게나이저(HG-15A, Daehan Sci., Korea)로 파쇄하여 조효소액을 생산하고 pH를 5.0 ± 0.1로 조정 후 진탕배양기에서 45 °C와 200 rpm으로 48 h 생물전환을 수행하였다.

## 2.4. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu가 시료의 폴리페놀에 의해 환원되어 청록색으로 변환되는 발색법에 기반한

Folin-Denis법을 변형하여 측정하였다[14]. 시료 0.14 mL에 0.2 N Folin-Ciocalteu 시약 0.7 mL를 첨가하여 8 min간 반응시킨 후 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 0.56 mL 첨가하여 상온에서 60 min간 반응시키고 분광광도계(Optizen 2120UV, KLab. Ltd., Korea)를 이용해 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 사용하여 mg GAE (gallic acid equivalent)/g DM (dry matter)로 환산하여 나타내었다.

레드비트의 총 플라보노이드 함량은 sayyed 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였으며 시료 0.5 mL에 0.1 M potassium acetate와 10.0% aluminum chloride를 0.1 mL 첨가한 후 1 차 증류수 2.8 mL, 99.5% 에탄올 1.5 mL를 첨가하여 상온에서 30 min간 반응을 진행하였다[15]. 이후 분광광도계를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 사용하여 mg QE (quercetin equivalent)/g DM로 환산하여 나타내었다.

## 2.5. 라디칼 소거 활성 측정

레드비트의 항산화 활성 측정은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)가 항산화물질과 반응 시 환원되어 황색으로 변색되는 발색법에 기반한 Kim 등의 분석법을 변형하여 측정하였다[16]. 메탄올에 DPPH (Sigma-Aldrich, USA)를 용해하여 0.1 M 용액을 제조한 후 메탄올로 희석해 흡광도를 0.99 ~ 1.0으로 조정하여 실험에 이용하였다. 시료 0.25 mL에 DPPH 1.25 mL를 가하여 암실에서 20 min간 반응하고 원심분리한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 라디칼 소거 활성은 아래와 같이 백분율로 산출하였다.

라디칼 소거 활성 (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}}\right) \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

시료첨가군: 열수추출물 또는 생물전환물 첨가 흡광도  
무첨가군: 증류수 첨가 흡광도

## 2.6. 타이로시네이스 활성 저해율 측정

타이로시네이스 활성 저해율은 멜라닌 생성과정에서 주요 효소로 작용하는 타이로시네이스 효소에 의해 생성되는 도파크롬을 측정하는 Lee 등의 분석법을 변형하여 측정하였다[17]. 반응을 위해 67 mM sodium potassium phosphate buffer (pH 6.8) 0.4 mL, 시료 0.2 mL, 10 mM

L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA) 0.2 mL와 타이로시네이즈 0.2 mL를 첨가하였으며 양성대조군은 kojic acid를 사용하였다. 도파크롬 발색을 위해 25 °C에서 30 min간 반응을 진행하여 분광광도계로 475 nm에서 흡광도를 측정하고 아래의 식에 따라 타이로시네이즈 활성 저해율을 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{타이로시네이즈 활성 저해율(\%)} \\ & = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}}\right) \times 100 \quad \text{Eq.2} \end{aligned}$$

시료첨가군: 열수추출물 또는 생물전환물 첨가 흡광도  
무첨가군: 증류수 첨가 흡광도

## 2.7. 자외선 흡수율 측정

레드비트 열수추출물과 생물전환물의 자외선 흡수율 비교를 위해 각 시료를 증류수로 50 배 희석 후 분광광도계를 이용하여 200 ~ 400 nm에서 UVA, UVB와 UVC에 대한 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 양성대조군으로 disodium phenyl dibenzimidazole (DPD)를 사용하였으며 시료첨가군과 무첨가군 흡광도를 이용하여 아래 식을 이용해 자외선 흡수율을 백분율로 산출하였고 무첨가군에는 시료 대신 증류수를 첨가하여 흡광도를 측정하였다.

$$\text{자외선 흡수율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}}\right) \times 100 \quad \text{Eq.3}$$

시료첨가군: 열수추출물 또는 생물전환물 첨가 흡광도  
무첨가군: 증류수 첨가 흡광도

## 2.8. LC-MS/MS를 이용한 지표물질 분석

레드비트 생물전환물의 주요물질 탐색을 위해 ROC C18 column USP L1 (3.0 × 150 mm, Restek, England)이 장착된 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, Finnigan TSQ Quantum, Thermo Fisher Sci. Ltd, USA)를 이용하여 분석을 진행하였다. 이동상(A)는 3 차 증류수 (0.1% 포름산) 와 (B)아세트니트릴 (0.1% 포름산)을 혼합하여 0.2 mL/min 유속을 설정하고 column 온도를 30 °C로 고정하여 운전하였다. 분리능 향상을 위한 이동상의 혼합조건은 A: 0.0 ~ 11.0 min 95.0% → 0.0%, 11.0 ~ 14.0 min 0.0% → 0.0%, 14.0 ~ 15.0 min 0% → 95.0%이며 15.0 ~ 20.0 min 95.0% → 95.0%로 설정하였다. 질량분석기는 이

동상에 전기에너지를 가하여 시료의 이온화를 시키는 전기분무 이온화(electrospray ionization; ESI+, ESI-)법의 negative mode를 사용하였으며 m/z 100 ~ 800 에서 검출신호의 질량 스펙트럼을 얻어 검출된 주요 주요물질을 분석하였다.

## 3. 결 과

### 3.1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

폴리페놀과 플라보노이드는 식물계에 분포되어 있는 2 차 대사산물로 분자 내 다가의 수산화기와 메틸기를 보유하여 전자 공여능이 높아 활성산소에 대한 산화 억제 효과가 높아 항산화 및 항노화에 효과적인 소재로 알려져 있다 [18]. 또한 지질과산화물인 maleondialdehyde (MDA) 활성을 저하시키며 항산화효소로 알려진 superoxide dismutase (SOD) 활성을 증가시킨다고 보고된다[19]. 레드비트는 폴리페놀의 일종인 quercetin, kaempferol과 chlorogenic acid 등의 플라보노이드와 페놀산 성분이 풍부하여 항산화 효과가 우수하다 보고되고 있는데 본 연구에서 레드비트의 생리활성물질 증진을 통한 항산화 활성 향상을 위해 생물학적 전환을 수행하였다[20].

레드비트 열수추출물과 생물전환물의 총 폴리페놀 함량은 각각 18.1 ± 0.51과 25.0 ± 0.26 mg GAE/g DM, 총 플라보노이드 함량은 7.01 ± 0.18과 8.05 ± 0.13 mg QE/g DM로 측정되어 레드비트 생물전환물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 열수추출물 대비 각각 1.5배와 1.1배 증가했음이 확인되었다(Table 1). 이는 Song 등의 *L. plantarum*을 이용한 황기 잎 생물전환물 연구에서 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 각각 6.10 mg GAE/g DM과 5.14 mg QE/g DM로 열수추출물 대비 1.3배와 1.2배 증가하였다는 결과와 유사하여 생물전환이 유용물질 증가에 효과적인 것으로 예측된다[21]. 특히 황기 잎 생물전환물과 레드비

**Table 1.** Comparison of Increase in Bioactive Substances Including total polyphenol and total flavonoid contents by Bioconversion Using *L. plantarum* SM4

Bioactive compound	Process for producing bioactive substances	
	HWE	BBE
TPC (mg GAE/g DM)	18.1 ± 0.51 <sup>a</sup>	25.0 ± 0.26 <sup>a</sup>
TFC (mg QE/g DM)	7.01 ± 0.18 <sup>b</sup>	8.05 ± 0.13 <sup>b</sup>

HWE: hot-water extract, BBE: bioconverted *B. Vulgaris* extract, TPC: total polyphenol content, TFC: total flavonoid content and comparison between a and b was conducted. <sup>\*</sup>p < 0.05



트 생물전환물의 총 폴리페놀 함량은 6.10과 25.0 mg GAE/g DM로 레드비트 생물전환물이 황기 잎 생물전환물 대비 4 배 이상 높게 나타나 레드비트 생물전환물은 폴리페놀을 다량 함유하고 있어 항산화 소재로서 적합한 원료임을 확인하였다.

생물전환물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 증가는 천연물의 세포벽에 결합한 형태로 존재하는 폴리페놀과 플라보노이드 화합물이 생물전환 과정 중 베타 글루코시다제, 프로테아제 또는 아밀라제 등의 효소에 의해 유리형 페놀로 전환되어 함량이 증가하는 것으로 사료된다 [22]. 따라서 생물전환을 통해 유용물질 함량이 증가될 수 있으며 레드비트 생물전환물은 기존 천연물에 비해 높은 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드를 함유하고 있어 천연 항산화제로 활용 가능성이 높을 것으로 평가된다.

### 3.2. 라디칼 소거 활성 측정

활성산소는 산화화합물로 생체 내 조직에 손상을 주어 생체 시스템을 교란시키는 화학적으로 반응성이 높은 물질로 단백질, DNA와 지질 등의 산화적 손상을 일으켜 체내 항산화 방어체계를 붕괴시킨다. 따라서 활성산소 소거는 신체 대사 체계 정상화에 중요한 기능임으로 라디칼 소거 활성 측정을 통해 레드비트 열수추출물과 생물전환물의 항산화 활성을 조사하였다.

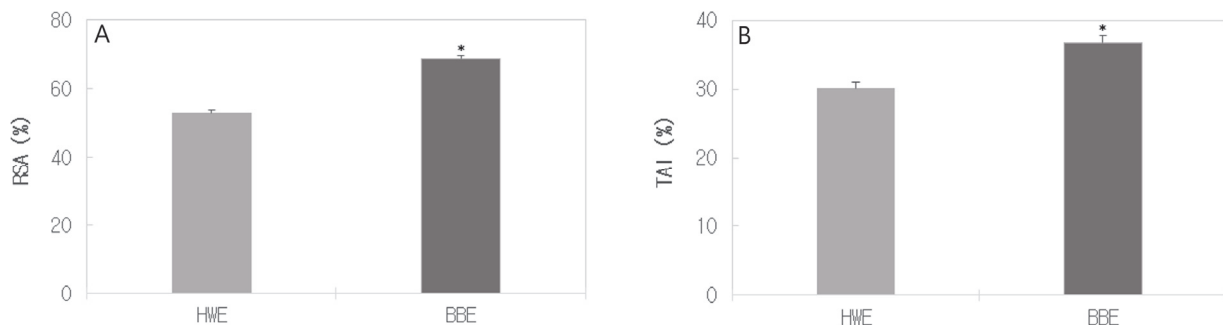
레드비트 열수추출물과 생물전환물의 라디칼 소거 활성은 각각  $52.9 \pm 0.12$ 와  $68.6 \pm 0.31\%$ 로 측정되어 레드비트 생물전환물에서 1.3 배 증가했음을 확인하였다(Figure 1A). 이는 *Lactobacillus brevis* BHN-31를 이용한 트 생물전환물의 라디칼 소거 활성이 67.5%로 열수추출물 대비 1.2 배 증가하였다는 결과와 비교하여 레드비트 생물전환물의 라

디칼 소거 활성이 높게 나타나 레드비트 생물전환물이 트 생물전환물보다 천연물로서 항산화 활성이 우수하다고 판단되었다[23]. 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid의 라디칼 소거 활성이 94.7%로 레드비트 생물전환물에 비해 1.4 배 높았으나 향후 추출공정과 생물전환 공정 최적화를 통해 항산화 활성의 증가가 가능할 것으로 판단된다.

라디칼 소거 활성이 우수한 물질은 하나 이상의 수산기 또는 메틸기를 포함하여 전자공여능이 높은 환원제로 작용하는데 주로 식물체에 존재하는 폴리페놀 및 플라보노이드가 대표적이다[24]. 생물전환을 통해 결합형에서 유리형으로 전환된 폴리페놀과 플라보노이드에 의해 항산화 활성에 주요한 영향을 주는 수산화기와 활성산소의 결합 확률 증가함에 따른 라디칼 소거 활성 증가로 사료된다. 특히, 유리형 폴리페놀의 다가의 수산화기가 활성산소종에 존재하는 알킬라디칼 또는 알킬페록시라디칼과 효과적으로 결합하여 전자를 공여하고 퀴논 형태로 전환되어 항산화 기능을 수행하고 산화 연쇄 반응의 개시나 증식을 억제하였다고 예측된다[25]. 따라서 레드비트 생물전환물은 추출물에 비해 우수한 라디칼 소거 활성을 나타내 피부 노화 및 산화적 손상 억제가 가능한 천연소재 항산화제로서 활용 가치가 높다고 판단된다.

### 3.3. 타이로시네이즈 활성 저해율 측정

타이로시네이즈는 멜라닌 생합성과정의 주요 효소로 피부 미백 화장품 소재 개발에 있어 타이로시네이즈 활성 저해는 피부 기저층의 멜라닌 합성을 효과적으로 저해시키는 지표로서 피부 미백 기능성 증진을 위한 효과적인 전략으로 인정되고 있다[26]. 타이로시네이즈 활성 저해율은 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높을수록 증가한다고 알



**Figure 1.** Comparison of radical scavenging activity and tyrosinase activity inhibition of HWE and BBE. A: RSA: radical scavenging activity, B: TAI: tyrosinase activity inhibition \*  $p < 0.05$

려져 있어 본 연구에서 생물전환을 통한 폴리페놀과 플라보노이드 함량 증가에 따른 타이로시네이즈 활성 저해율 증가 효과를 확인하고자 하였다.

레드비트 열수추출물과 생물전환물의 타이로시네이즈 활성 저해율을 비교한 결과 각각  $30.1 \pm 0.41$ 과  $36.8 \pm 0.27\%$ 로 생물전환물이 열수추출물에 비해 1.2 배 증가했음을 확인할 수 있었다(Figure 1B). 이는 Lee 등의 *Lactobacillus brevis* BHN-LAB38를 이용한 보리 생물전환물의 타이로시네이즈 활성 저해율이 47.9%로 열수추출물 대비 1.2 배 증가하였다는 보고와 유사한 결과이다[27]. 폴리페놀에 의한 타이로시네이즈 활성 저해 연구는 활발하게 진행되고 있는데 타이로시네이즈가 활성부위에 구리이온을 함유하고 있는 효소로 알려져 폴리페놀 또는 플라보노이드의 수산기가 구리이온과 결합하여 티로신의 결합을 경쟁적으로 방해하여 멜라닌 합성이 억제되며 미백효과를 나타내는 것으로 알려져있다 [28].

따라서 레드비트 생물전환물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 증가함에 따라 타이로시네이즈 활성 저해율의 증가가 확인되어 폴리페놀 함량과 타이로시네이즈 활성 저해율 간의 상관관계가 있는 것으로 판단된다. 따라서 타이로시네이즈 활성 저해 증가를 통한 미백효과 최대화를 위해 레드비트의 생물전환 공정이 유효한 과정이며, 위 결과를 기반으로 레드비트 생물전환물이 레드비트 추출물 대비 주근깨, 기미와 검버섯 등 피부 미백 및 노화방지에 효과적인 항장 원료로서 활용 가능할 것으로 예측된다.

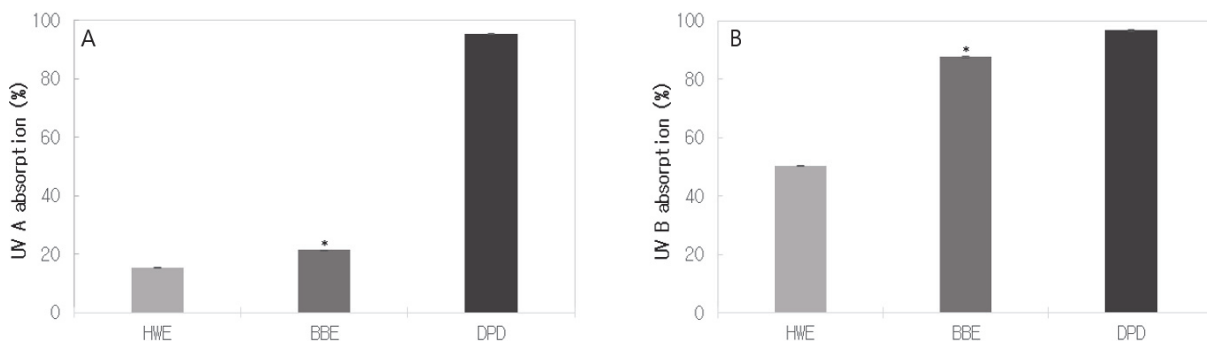
### 3.4. 자외선 흡수율 측정

자외선 중 장파장을 가진 UVA는 피부 진피층까지 침투

하여 색소침착을 발생시키고 진피 결합조직인 엘라스틴, 콜라겐과 피브린 등 단백질을 파괴하여 주름 생성을 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[29]. 또한 UVB는 강한 에너지를 가지고 있어 표피층 세포의 DNA에 직접적으로 작용하여 피부 손상을 주며 동시에 자연성 색소침착, 광노화와 피부암 등을 유발한다고 알려져 있다[30]. 따라서 UVA와 UVB를 포함하는 자외선 흡수율 측정 연구는 피부 노화 억제에 위한 자외선 흡수제 개발에 중요한 평가 지표로 활용되고 있다.

레드비트 열수추출물과 생물전환물의 200 ~ 400 nm 영역의 자외선 흡수율을 측정한 결과 열수추출물과 생물전환물은 모두 중파장 자외선인 UVB (280 ~ 320 nm) 영역부터 장파장인 UVA (320 ~ 400 nm)까지 흡수 피크가 높게 나타났다. 이때 UVA 영역에서 열수추출물과 생물전환물의 흡수율이 각각  $15.3 \pm 0.49\%$ 과  $21.4 \pm 0.27\%$ 로 나타나 열수추출물 대비 생물전환물의 UVA 흡수율이 약 1.4배 높아 생물전환물 UVA 흡수율이 우수함이 확인되었다(Figure 2A). 또한 UVB 영역에서 열수추출물과 생물전환물의 흡수율이 각각  $50.3 \pm 0.43\%$ ,  $87.6 \pm 0.35\%$ 로 나타나 열수추출물 대비 생물전환물의 UVB 흡수율이 1.7 배 증가하여 생물전환물이 UVA와 UVB 흡수율 증가에 모두 효과적인 흡수율을 확인하였다(Figure 2B). 이는 양성대조군으로 사용한 DPD의 UVA 흡수율  $95.4 \pm 0.36\%$ , UVB 흡수율  $96.7 \pm 0.46\%$  대비 낮은 흡수율이지만 천연물소재로서 우수한 결과로 향후 추출 및 생물전환 공정을 통해 흡수율의 차이가 일부 극복될 수 있을 것으로 사료된다.

자외선 흡수율은 폴리페놀과 플라보노이드에 존재하는 탄소사슬에 연결된 벤젠고리의 수에 따라 흡수 파장 및 흡



**Figure 2.** Comparison of UVA and UVB absorption of HWE, BBE, and DPD. A: Comparison of absorbance of HWE and BBE compared to DPD in UV-A range B: Comparison of absorbance of HWE and BBE compared to DPD in UV-B range. HWE: hot-water extract, BBE: bioconverted *B. Vulgaris* extract, DPD: disodium phenyl dibenzimidazole 100 ppm.

수효율이 달라지며 추출 용매 및 종류 용매의 수소 이온 농도 (PH) 등에 따라 자외선 흡수율에 영향을 줄 수 있다고 보고되어있다[31]. 생물전환을 통해 유리화 되어 농도가 증가된 폴리페놀과 플라보노이드에 의해 자외선 흡수율이 증가한 것으로 예측되며 향후 추출조건 및 유용물질의 농도 증가를 통해 추가적으로 자외선 흡수율의 증진이 가능할 것으로 예상된다. 따라서 레드비트 생물전환물은 천연 물소재로서 중파장과 장파장의 자외선이 진피 및 표피층에 도달하는 것을 방지하고 피부 색소침착 감소, 피부 노화억제와 피부암 등을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

3.5 LC-MS/MS를 이용한 주요물질 탐색

이상의 실험에서 확인된 항산화, 피부 미백과 자외선 차단 활성을 나타내는 주요물질 탐색을 위해 LC-MS/MS를 이용하여 레드비트 생물전환물에 존재하는 물질 분석을 수행하였다. 레드비트 생물전환물 내 주요 주요물질 검출을 위해 LC-MS/MS 음이온 모드를 설정하여 분석을 진행하였을 때 kaempferol과 isorhamnetin이 m/z 284와 m/z 315에서 [M-H]<sup>-</sup> 형태의 분자이온 피크로 확인되었다(Figure 3). 이는 기존에 진행된 Pyo와 Ninfali 등의 레드비트 연구

에서 주요물질로 kaempferol과 isorhamnetin이 검출되었다는 결과와 동일하며 kaempferol과 isorhamnetin은 천연물에 존재하는 폴리페놀 화합물인 플라보노이드류로 항산화 활성에 효과적이라고 알려진 주요물질이다[32,33]. 특히 kaempferol은 타이로시나제의 경쟁적 억제제가 되는 분자 기질과 매우 유사하여 타이로시나제 활성 부위에 결합하여 타이로신이 L-DOPA 전환됨을 방지한다고 알려져 있어 미백효과 물질로 평가되고 있다[34]. 또한 kaempferol은 Kim 등의 연구에 따르면 세포 보호 효과가 우수하다고 알려져 있고 다양한 항장료에 응용되고 있는 추세이며 Dhingra의 연구에 따르면 isorhamnetin은 광독성을 나타내지 않으며 피부 염증 등을 유도하지 않는 물질로 연구됐다[35,36]. 따라서 주요물질 kaempferol과 isorhamnetin에 의해 총 폴리페놀, 총 플라보노이드와 항산화 활성이 증가했다 예상할 수 있으며 생물전환을 통해 kaempferol과 isorhamnetin 및 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 증가함에 따라 피부 미백 기능을 나타내는 타이로시네이즈 활성 저해율이 증가한 것으로 예측된다. 레드비트 생물전환물은 kaempferol과 isorhamnetin 등의 항산화와 피부 미백 기능을 나타내는 주요물질을 함유하여 항산화제 및 화장품 조성물로서 우수한 효과가

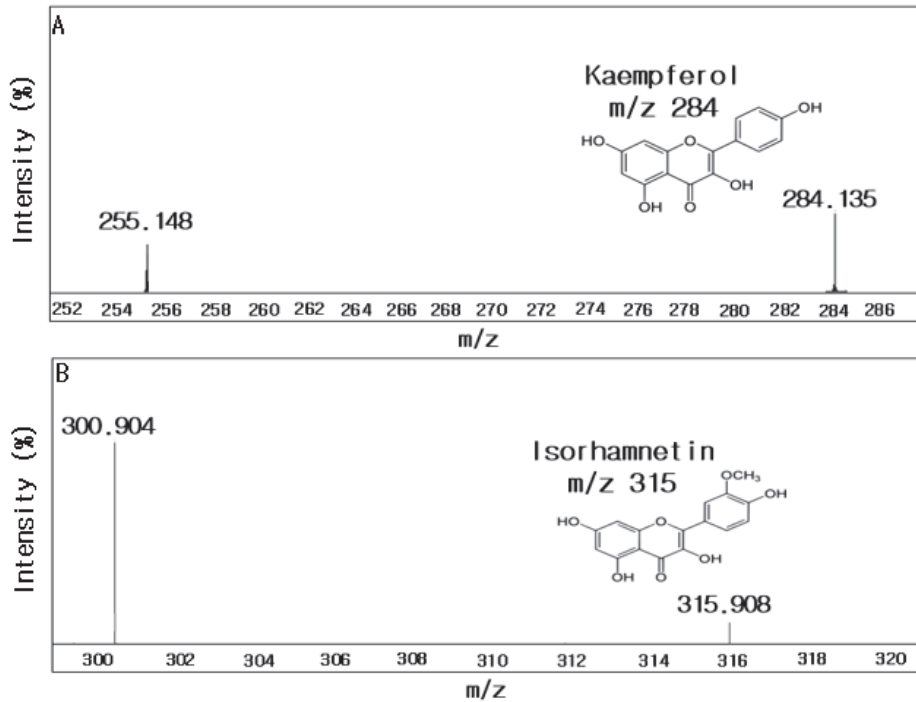


Figure 3. Spectra of LC-MS/MS fragmentation patterns of main substances from BBE by *L. plantarum* SM4 A: kaempferol (m/z 284), B: isorhamnetin (m/z 315).

예측되며 향후 천연 화장품 소재로서 활용 가능하다고 사료된다.

#### 4. 결 론

본 연구는 레드비트 열수추출물의 항산화 및 피부 미백 가능성을 증가시키고자 *L. plantarum* SM4를 이용한 생물 전환을 수행하였으며 레드비트 열수추출물과 생물전환물의 화장품 소재로 활용 가능성을 평가하기 위해 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 라디칼 소거 활성과 타이로시네이즈 활성 저해율을 측정하여 비교하였다. 레드비트 생물전환물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 각각 25.0 mg GAE/g DM과 8.05 mg QE/g DM으로 측정되었으며 항산화 활성과 타이로시네이즈 활성 저해율은 각각 68.6과 36.8%로 확인되어 레드비트 열수추출물 비해 모든 생리활성 지표가 유의적으로 증가함이 확인되었다. 자외선 흡수율 평가를 통해 레드비트 생물전환물이 UVA와 UVB를 각각 21.4%, 87.6% 흡수하는 것으로 나타나 열수추출물 대비 1.4와 1.7 배 높게 나타났다. LC-MS/MS를 이용한 레드비트 생물전환물의 분석에 있어 kaempferol과 isorhamnetin이 주요물질로 확인되어 생물전환에 따른 주요물질이 증진됨에 따라 생물전환물에서 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 라디칼 소거 활성과 타이로시네이즈 활성 저해율이 1.2 ~ 5 배 증가한 것으로 사료된다. 이는 생물전환을 통해 세포벽의 단백질, 당질, 및 리그닌과 결합형으로 존재하던 kaempferol과 isorhamnetin 등의 플라보노이드 물질이 유리형으로 전환됨에 따라 생물전환물에서 함량이 증가하며 항산화 활성과 타이로시네이즈 활성 저해 효과가 증진된 것으로 예상된다. 따라서 향후 *L. plantarum* SM4를 이용한 레드비트의 생물전환물은 항산화 및 피부 미백과 자외선 흡수용 기능성 소재로서 활용 가능하며 다양한 향장료 원료소재로서 활용성이 높을 것이라 사료된다.

#### References

1. J. W. Seo, M. S. Ryu, H. J. Yang, S. J. Jeong, and D. Y. Jeong, The antioxidant and skin-whitening effects of *Saccharomyces cerevisiae* FT4-4 isolated from berries grown in Sunchang, *J. Life Sci.*, **31**(2), 175 (2021).
2. J. E. Park, H. J. Kim, S. N. Kim, S. H. Kang, and Y. J. Kim, Inhibitory effect of *Rosa multiflora* hip extract on UVB-induced skin photoaging in Hs68 fibroblasts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(4), 351 (2015).
3. J. H. Jang, C. Lee, S. C. Kim, J. W. Chung, and C. I. Park, Protective effect of marine natural products against UVB-induced damages in human skin fibroblast via antioxidant mechanism, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **36**(1), 79 (2010).
4. Y. S. Lee, Effects of reactive oxygen species induced by arachidonic Acid on the stimulation of melanin synthesis in B16 melanoma cells, *Arch. Pharm. Res.*, **61**(5), 248 (2017).
5. Y. J. Lee and C. G. Hyun, Mechanistic insights into the ameliorating effect of melanogenesis of psoralen derivatives in B16F10 melanoma cells, *Molecules.*, **27**(9), 2613 (2022).
6. E. K. Kim, H. B. Lee, H. B. Lee, and C. Y. Lee, Trend of depigmenting research based on patent analysis. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **33**(4), 209 (2007)
7. K. S. Lee, M. G. Kim, and K. Y. Lee, Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **35**(2), 182 (2006)
8. H. K. Bae and S. H. You, Biological activity study on anti-oxidant, whitening, and anti-inflammatory effects of *Astragalus membranaceus* ethanol extracts and bioconversion extracts, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **15**(4), 489 (2017)
9. C. H. Park, Y. R. Choi, K. J. Yum, and M. J. Kim, A novel strain of *Saccharomyces servazzii*, ceb-kc-011 from young radish kimchi: optimization of the growth condition and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by bioconverted *Rhynchosia nulubilis* using ceb-kc-011, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **49**(3), 236 (2020).
10. K. J. Lee, B. H. Lee, J. P. Mun, C. Lian, and J. Y. Ma, Analysis of bioconversion components of fermentation hwangryunhaedok-tang, *Arch. Pharm. Res.*, **57**(4), 293 (2013)
11. J. Y. Kim and H. K. Kim, Physiological activity of redbeet, *Bulletin of Food Tech.*, **22**(3), 537 (2009).
12. S. Y. Park, J. H. LEE, B. M. Kim, S. J. Baek, S. H. Lee, and J. S. Nam, Comparison of nutritional components of beets from three different *Beta vulgaris* L. cultivars in Korea, *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **49**(9), 969 (2020).



13. J. W. Hong, H. Y. Park, J. H. Kim, S. H. Yeom, and J. W. Kim, Antioxidation and anti-photoaging effects of white *Taraxacum Coreanum* Extract by *Lactobacillus plantarum*, *JKAIS*, **22**(4), 554 (2021).
14. D. H. Gam, J. M. Jo, H. J. Jung, and J. W. Kim, Optimization of extraction conditions of antioxidant activity and bioactive compounds from rice bran by response surface methodology, *Appl. Chem. Eng.*, **29**(6), 726 (2018).
15. H. F. Al-Sayyed, R. A. Al-Kurd, I. F. Mahmoud, S. M. AbdelQader, D. H. Sweidan, L. T. Rizeq, and M. M. Mwalla, Developing a database for total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Jordanian crops, *Int. J. Food Prop.*, **25**(1), 1290 (2022).
16. S. J. Kim, D. Kim, J. Park, and T. K. Lee, Phenolic content, DPPH radical scavenging, and tyrosinase inhibitory activities of *Ecklonia cava* extracted with the ultrasonic wave method, *J. Life Sci.*, **23**(7), 913 (2013).
17. J. S. Lee, J. A. Kim, S. H. Cho, A. R. Son, T. S. Jang, M. S. So, S. R. Chung, and S. H. Lee, Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L., *Kor. J. Pharmacogn.*, **34**(1), 33 (2003).
18. M. H. Yu, H. G. Im, H. J. Lee, Y. J. Ji, and I. S. Lee, Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder, *Korean J. Food Sci Tech.*, **38**(1), 128 (2006).
19. M. J. In, K. H. Kim, and D. C. Kim, Antioxidant and anticoagulant activities of Ganghwa medicinal mugwort (*Artemisia princeps Pampanini*) extract, *J. Appl. Biol. Chem.*, **63**(4), 439 (2020).
20. S. Y. Park, S. H. Lee, and J. S. Nam, Comparison of the Antioxidant properties and phenolic compositions of different varieties of beets (*Beta vulgaris* L.) cultivated in Korea, *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **50**(10), 1058 (2021).
21. B. N. Song, D. B. Lee, S. H. Lee, B. R. Park, J. h. Choi, Y. S. Kim, and S. Y. Park, Physicochemical properties and antioxidant activity of extract from *Astragalus membranaceus* Bunge leaf fermented with lactic acid bacteria, *KJMCS*, **28**(6), 428 (2020).
22. M. J. Kim, N. R. Shin, M. J. Lee, and H. Kim, Microorganisms involved in natural fermentation of *Asparagus cochinchinensis* roots and changes in efficacies after fermentation, *J. Korean. Med. Obes. Res.*, **18**(2), 96 (2018).
23. H. S. Song, S. H. Eom, Y. M. Kang, J.D. Choi, and Y. M. Kim, Enhancement of the antioxidant and anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiforme* water extract by lactic acid bacteria fermentation, *K. J. Fish Aquat. Sci.*, **44**(2), 111 (2011).
24. P. Vijayabaskar and V. Shiyamala, Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner), *J. Agardh, Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, **2**(1), 90 (2012).
25. T. W. Jang, C. G. Oh, and J. H. Park, Antioxidant activity and protective effects on oxidative DNA damage of Smilax china root, *J. Appl. Biol. Chem.*, **61**(2), 109 (2018).
26. S. Chawla, M. A. DeLong, M. O. Visscher, R. R. Wickett, P. Manga and R. E. Boissy, Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyarbutin and its second-generation derivatives, *Br. J. Dermatol.*, **159**(6), 1267 (2008).
27. J. H. Lee, Y. C. Yoon, J. K. Kim, Y. E. Park, H. S. Hwang, G. S. Kwon, and J. B. Lee, Antioxidant and whitening effects of the fermentation of barley seeds (*Hordeum vulgare* L.) using lactic acid bacteria, *J. Life Sci.*, **28**(4), 444 (2018).
28. J. Solimine, E. Garo, J. Wedler, K. Rusanov, O. Fertig, M. Hamburger, and V. Butterweck, Tyrosinase inhibitory constituents from a polyphenol enriched fraction of rose oil distillation wastewater, *Fitoterapia*, **108**, 13 (2016).
29. H. Lin, K. C. Cheng, J. A. Lin, L. P. Hsieh, C. H. Chou, Y. Y. Wang and C. W. Hsieh, Pholiota nameko Polysaccharides protect against ultraviolet A-induced photoaging by regulating matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts, *Antioxidants*, **11**(4), 739 (2022).
30. Y. Yang, R. Wu, D. Sargsyan, R. Yin, H. C. Kuo, I. Yang, L. Wang, D. Cheng, C. Wang, S. Li, R. Hudlikar, Y. Lu, and A. Kong, UVB drives different stages of epigenome alterations during progression of skin cancer, *Cancer Lett.*, **449**, 20 (2019).

31. K. Y. Nam and J. S. Lee, Characteristics and dyeability of *Juniperus chinensis* extracts, *Korea J. Hum. Ecol.*, **21**(5), 989 (2012).
32. F. Morales Iribas, Z. G. Cerović, I. Moya. Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis, *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.*, **1273**, 251 (1996).
33. K. A. Corleto, J. Singh, G. K. Jayaprakasha, and B. S. Patil, Storage stability of dietary nitrate and phenolic compounds in beetroot (*Beta vulgaris*) and arugula (*Eruca sativa*) juices, *J. Food Sci.*, **83**(5), 1237 (2018).
34. X. Y. Xue, T. Miyakawa, Y. Hayashi, K. Okamoto, F. Hu, N. Mitani, and M. Tanokura, Isolation and tyrosinase inhibitory effects of polyphenols from the leaves of Persimmon, *Diospyros kaki*, *J. Agric. Food Chem.*, **59**(11), 6011 (2011).
35. J. H. Kim, H. Y. Kim, and E. J. Cho, Protective effects of kaempferol, quercetin, and its glycosides on amyloid beta-induced neurotoxicity in C6 glial cell. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **62**(4), 327 (2019).
36. G. Dhingra, P. Dhakad, and S. Tanwar, Review on phytochemical constituents and pharmacological activities of plant *Calendula officinalis* Linn. *Proc. Biol. Sci.*, **2**(2), 216 (2022).