

해방풍 유산균 발효물의 항균 및 항산화 증진 효과

조현솔, 홍선미*
환동해산업연구원

Enhancement of the Antibacterial and Antioxidative Capacities of *Glehnia littoralis* Extracts through Lactic Acid Bacteria Fermentation

Hyun Sol Jo, Sun Mee Hong*

Marine Industry Research institute for East sea rim (MIRE)

요약 본 연구는 동해안 해수에서 분리된 *L. plantarum*(Lp)과 *P. acidilactic*(Pa)를 이용한 해방풍 발효를 통해, GABA 증량과 항산화, 항균 및 멜라닌 억제 효능을 확인하였다. 해방풍 잎과 뿌리 추출물의 Lp와 Pa의 공발효 (GLE_LpPa, GRE_LpPa)에서 유산균은 각각 1.0E+11과 1.5E+12 cfu/mL의 성장을 나타냈고, 잎과 뿌리의 GABA 함성이 GLE_LpPa는 16 %, GRE_LpPa는 167 %p의 증량이 확인되었다. 해방풍 잎 발효물의 DPPH 라디칼 소거능은 GLE_Lp 75.6%, GLE_Pa 79.2%로 높은 항산화 활성을 보였으나, 뿌리 발효물인 GRE_Lp 20.9%, GRE_Pa 23.2%로 조금 낮았다. 또한, 잎과 뿌리 발효물의 B16-F10 세포 독성 실험은 1,000 ug/mL 농도의 72시간까지 세포가 안정적으로 성장하는 것으로 나타났다. 또한 각 배양물은 B16-F10 세포에서 멜라닌 억제 효능이 확인 되었으며, 특히 유산균 Lp에 의한 GLE_Lp와 GRE_Lp는 각 71.3%와 68.6%로 Pa 발효보다 높은 멜라닌 억제 기능이 확인되었다. 또한 뿌리 공배양물인 GRE_LpPa는 추출물인 GRE보다 치아우식균 2.2배, 충치균 2.5배, 여드름균 1.25배, 특히 비듬균에 있어서는 12배의 항균 활성 증가가 확인되었다. 이들 결과는 다른 영양성분 첨가 없이 Lp와 Pa가 접종된 해방풍 발효는 GABA 증량이 가능하고, GABA가 포함된 해방풍 발효물은 항산화, 항균과 멜라닌 억제 효능과 세포 안정성이 확인되어 식품 및 화장품 산업의 유효 소재로의 활용 가치가 있을 것으로 사료된다.

Abstract In this study, the effects of *Lactobacillus plantarum* (Lp) and *Pediococcus acidilactic* (Pa) based fermentation of *Glehnia littoralis* extracts on GABA levels and antioxidative, antibacterial, and anti-melanin effects were investigated. Lp and Pa co-culture of *G. littoralis* leaf and root extracts (GLE_LpPa, GRE_LpPa) led to bacterial growth rates of 1.0E+11 and 1.5E+12 cfu/mL, respectively. After 48 h of fermentation, the amounts of MSG and GABA produced were enhanced. In particular, GABA levels in GLE_LpPa and GLE_LpPa were found to have increased by 16% and 167%, respectively. Fermentation of GLE_Lp and GLE_Pa resulted in DPPH activity increases of 75.6% and 79.2%, indicating that both fermented extracts had antioxidative activity. B16F10 cell assays showed GLE_Lp and GRE_Lp inhibited melanin levels by 71.3% and 68.6%, respectively. Furthermore, GRE_LpPa showed enhanced activities against bacterial species that cause dental caries (2.2-fold for *Streptococcus mutans*, 2.5-fold for *Streptococcus sobrinus*) and acne (1.25-fold for *Propionibacterium acnes*). Of note was a 12-fold increase in activity against the dandruff bacterium *Malassezia furfur*. In conclusion, the study shows that the antioxidative, antibacterial, and melanin-inhibiting effects and GABA levels in *G. littoralis* extracts are enhanced by fermentation, in the absence of additional nutrients. These results support the use of fermented *Glehnia littoralis* extracts as active ingredients in the food and cosmetics industries.

Keywords : *Glehnia Littoralis*, Lactic Acid Bacteria, GABA, Antibacterial Activity, Antioxidant

이 논문은 2022년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임.(20220027, 해양치유자원 효능 검증 및 활용 기술 개발)

*Corresponding Author : Sun-Mee Hong(Marine Industry Research institute for East sea-rim, MIRE)

email: hongsunmee@mire.re.kr

Received October 31, 2022

Revised December 5, 2022

Accepted February 3, 2023

Published February 28, 2023

1. 서론

국내의 해안사구에 자라는 미나리과 식물인 해방풍(갯방풍; *Glehnia littoralis*)은 다년초 염생식물(halophyte)로 일본, 만주, 중국 등에 분포한다[1]. 예부터 해방풍은 여러 생리활성과 약리활성이 있어 고혈압, 뇌졸중, 해열, 진통, 신경통 등의 질환 치료를 위해 한약 재료로 이용되었다[1]. 최근에는 잎과 줄기의 식용 가치가 높아 재배 작물로 되어 동해안의 경상북도(울진군, 영덕군)와 강원도(고성군)에서 재배 단지를 조성하고 식품과 기타 기능성 제품 등의 활용을 위해 육성 되고 있다[2]. 국내에서 해방풍 연구는 지방산, 스테롤 또는 정유성분에 대한 이차 대사물과[3,4], 폴리아세틸렌(polyacetylene), 베타 시토스테롤(β -sitosterol), 베르캅텐(bergapten), 쿠마린(coumarin) 등의 생리활성물질 등을 확인하고 수용성과 유기용매로 추출 분리한 물질의 항산화, 항균, 항염, 항바이러스, 항암 효과 등의 효능에 대한 연구가 발표되었다[5-9]. 이러한 해방풍을 포함하는 식물 천연물로부터의 기능성 물질의 효능이 알려지면서 식물기반의 인체와 환경에 안전한 항균과 항산화 등의 기능성 물질 분리 필요성이 높아지고 있다. 특히, 산화적 스트레스의 원인인 활성산소(Reactive Oxygen)를 조절하는 항산화제는 효소계 항산화물질인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione reductase와 합성 항산화제인 propyl gallate(PG), butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), 및 천연 항산화제인 phenol 화합물, flavone 유도체, tocopherol, ascorbic acid, carotenoids, glutathione, 아미노산 등이 관심 받고 있다[9]. 또한, 안전성, 경제성과 더불어 고기능의 천연물을 대상으로 EM(Effective Micro organisms)균과 유산균 발효를 적용한 항산화, 항균 등의 기능 연구도 활발하다[10,11].

미생물이 생산하는 비단백질성 아미노산인 GABA (γ -aminobutyric acid, GABA)는 자연계에 널리 분포하는 물질로 고등생물의 중추신경계에 신경전달물질 억제 기능으로 알려져 있다[12]. 특히, 사람에서는 신경계, 혈액에 함유되어 있으나, 대부분은 뇌의 골수에 존재하여 신경전달 물질인 아세틸콜린(acetylcholine)을 증가시켜 뇌기능 촉진 기능 외에도 항산화, 혈압강하, 이노, 성장 호르몬 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다[13-16]. 일반적으로 GABA 함량이 높은 천연물로는 현미(4-8 mg/100g), 녹차(35-205 mg/100g), 뽕잎(56 mg/100g) 등이 알려져 있다. 최근에 천연물에서 얻을 수 있는

GABA의 양으로는 약리 작용에 한계가 있어 농도를 증량하기 위해 미생물 등을 적용한 다양한 소재 활용 연구도 보고되고 있다[17,18]. GABA는 천연물에 있는 글루타민(glutamine; $C_5H_{10}N_2O_3$)을 탈탄산화 반응(decarboxylation reaction)을 통해 생산하나, 천연물 내에 있는 글루타민의 양에 따라 GABA 생산량이 정해지는 것으로 알려져 있다[19,20]. 따라서 이러한 한계를 극복하기 위해 미생물 특히 유산균(Lactic Acid Bacteria; LAB)을 이용한 GABA 생산 연구 보고가 이어지고 있다[21-23].

본 연구는 해양에서 분리한 유산균으로 해방풍 추출물을 배양하여 GABA 증량의 확인과 이에 따른 항산화와 비듬균, 여드름균, 충치균 등에 대한 항균과 B16-F10 세포에서의 멜라닌 색소 억제 효과를 분석하여 식·의약 소재와 화장품 등의 다양한 산업 소재로서의 해방풍 유산균 발효물의 가능성을 제시하고 관련한 기초 데이터를 제시하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 해방풍 발효물의 제조

해방풍은 경상북도 울진군 기성에서 재배된 해방풍 잎(*Glehnia littoralis* Leaf; GL; 30 ~ 40일)과 뿌리(*Glehnia littoralis* Root GR; 3 ~ 5년)를 채취하여 50 °C에서 48시간 건조 후, -20 °C 보관하고 실험에 사용하였다. 해방풍 발효에 사용된 균주는 환동해산업연구원(경상북도, 울진군)에서 동해안 해수에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* _DSW(Lp; KCCM12299P)와 *Pediococcus acidilactic*(Pa; KCCM12472P) 2종으로 한국미생물보존센터에 기탁하고 실험에 사용하였다. 유산균 접종을 위한 배지는 멸균 증류수에 해방풍 분말 5%(w/v)을 넣고 121 °C에서 15분간 멸균하여 해방풍 잎(GL Leaf Extract; GLE) 및 뿌리 추출물(GL Root Extract; GRE)을 준비하였다. 균주는 1×10^8 cfu/ml 농도로 1% 접종하고 30 ± 1 °C에서 24시간동안 배양하여 해방풍 단일 유산균 발효물(GLE_Lp, GRE_Lp, GLE_Pa, GRE_Pa)과 공발효물(GLE_LpPa, GRE_LpPa)을 제조하고 액상 또는 동결건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

2.2 해방풍 발효물의 GABA 분석

해방풍 발효물 내의 GABA 성분을 확인하기 위해 얇

은 막 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC) 분석을 수행하였다[22]. 해방풍 잎과 뿌리 추출물(GLE, GRE), 해방풍 잎과 뿌리의 발효물(GLE_Lp, GRE_Lp, GLE_Pa, GRE_Pa, GLE_LpPa, GRE_LpPa) 시료 6종과 1% GABA(Sigma, USA; w/v), 및 0.2% MSG(Mono sodium glutamate; Sigma, USA; w/v)를 TLC silica gel(Merck, USA)에 각 3 µl씩 점적하였다. 분리 용매로 n-부탄올: 아세트산: 물을 5:2:2 (v/v/v; Sigma, USA)을 사용하였으며, 각 시료를 분리하고 건조 후, 0.2% ninhydrin 용액(Sigma, USA)을 분사 후, 발색하여 GABA 등의 spot을 확인하였다.

다음으로 GABA 정량 분석을 위해 Rat GABA ELISA kit(ABIVA systems biology, USA)를 사용하였고, 검량 값 측정을 위해 lyophilized GABA (AVIVA, USA) 100 ng/mL을 사용하였다. 각 시료의 1% (v/v)의 50 µL를 96 well plate에 분주하고, 바이오틴(Biotin)이 결합된 1x GABA complex 50 µL를 더하고, 37 °C에서 60분간 물질의 결합 반응 후, 용액을 제거하고, 1x wash 용액 300 µL를 2분간 반응하는 단계를 3회 반복하였다. 발색을 위해 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 용액 90 µL 처리하고 37 °C에서 15~30분간 암처리 후에 분광광도계(Ultra Spectrometer, Biochrom, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고 검량선을 통해 각 GABA를 정량하였다.

2.3 DPPH 라디칼 소거 활성 분석

자유 라디칼(free radical)의 하나인 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 이용하여 자유라디칼인 DPPH 소거 활성을 분석하였다[2,9]. 준비된 동결건조 해방풍 발효 분말은 멸균 증류수(distilled water)에 용해하여 1% 농도의 실험 시료를 준비하고, 1mM 메탄올(MeOH; 100 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 DPPH를 용해하여 실험에는 100 µM 농도로 희석하여 사용하였다. 0.1% (v/v) 농도의 각 시료 10 µL를 100 µM DPPH 용액과 혼합하여 최종 부피가 100 µL가 되도록 96 well plate에 넣어 실온에서 30분간 반응하고 분광광도계(UltraSpectrometer, Biochrom, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도(absorbance)를 이용하여 아래 Eq. (1) DPPH 라디칼 소거활성률(Superoxide radical scavenging activity; %)를 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Superoxide radical scavenging activity (\%)} \\ & = (1 - \text{Sample absorbance} / \text{Control absorbance}) \\ & \times 100 \end{aligned} \quad (1)$$

2.4 세포 독성과 멜라닌 억제 효능 분석

마우스 흑색종(melanoma) 세포(B16-F10; ATCC CRL-6745)는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medim; GIBCO, USA) 배지에 10% (v/v) FBS(Fetal Bovine Serum, GIBCO, USA), 1% (w/v) 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 2 x 10⁶ cells/mL로 배양한 세포를 사용하였다. B16-F10 세포는 24 well plate에 2 x 10⁶ cells/mL 로 분주하고 24 시간 배양하고, 각 1 mg, 100 µg, 10 µg, 1 µg/ml 시료를 처리하고 24, 48 또는 72 시간 동안 배양하였다. 시간 경과 후에 세포를 모아 Cell counting kit-8(CCK-8, Korea)를 이용하여 540 nm 흡광도를 측정하고 무처리군 대비 세포 생존률(cell viability)을 측정하였다. 다음으로 B16-F10 세포에 100 µg/mL(0.1%; v/v)의 각 시료와 양성 대조군으로 0.1% Albutin (Sigma, UAS; v/v)을 처리하고 48시간 후에 10% (v/v) DMSO가 포함 된 1 N NaOH에 용해하고 80 °C에서 1시간 배양 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 함량의 변화를 측정하였다[25].

2.5 항균 효능 분석

항균 효능 확인을 위해 치아우식균 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, ATCC33478), 충치균 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, ATCC3065), 여드름균 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, ATCC6919), 비듬균 말라세지아 퍼퍼(*Malassezia furfur*, ATCC14521) 4종에 대해 분석하였다. 여드름균은 RCM (Reinforced Clostridial Medium, Dibco) 배지, 비듬균은 LNA(Leeming&Notman Agar, MBcell)배지(1% Olive oil add), 충치균과 치아우식균은 BHI(Brain Heart Infusion, Difco) 액상 배지에 접종하고 37 °C 배양기에서 24시간 전배양 하였다. 다음으로 1% LB Agar 배지에 전배양한 시험균주 200 µL씩 도포한 후 30분 건조하였다. 이후 펀치를 이용하여 시료 주입용 홀(hole)을 만들고 1% 각 시료를 30 µL씩 분주하고 24 ~ 72 시간동안 배양하고 억제환(inhibition clear zone)의 직경을 측정하고 Eq. (2)에 따라 항균활성을 측정하였다[5].

$$\text{Inhibition zone (mm)} = (\text{Clear circle diameter} - \text{Disc diameter}) \div 2 \quad (2)$$

2.6 통계처리

측정값은 평균값 ± 표준오차평균(mean ± SEM)로 표시하였고, 실험의 통계학적 분석은 IBM SPSS Statistics 프로그램을 이용하여 일원분산분석법을 사용하였다. 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test로 *P*값이 0.05 미만에서 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 해방풍 발효물의 제조

항산화와 항균 등의 기능 증진 발효를 위해 동해권 해수에서 분리한 유산균 80종 중 대장균(*Escherichia coli*)과, 식중독균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균기능을 가지는 균주 2종 Lp(KCCM12299P)와 Pa(KCCM12472P)를 선발하였다(data not shown). Lp와 Pa 균주는 1.0×10^6 ($1.0E + 6$) cfu/mL 농도로 전배양(pre-culture)하고, 각 유산균은 멸균된 해방풍 잎과 뿌리 추출물에 0.1% (*v/v*)로 단일 또는 공접종(1:1 *v/v*)하여 30 °C, 24 시간 배양 후, 해방풍 잎과 뿌리 발효물에서의 생균수를 조사하였다(Table 1). 해방풍의 잎, 뿌리와 유산균 2종의 단일 및 공접종에 따라 6개 GLE_Lp, GRE_Lp, GLE_Pa, GRE_Pa, GLE_LpPa, GRE_LpPa 시료의 생균수를 유산균 성장 배지인 MRS 배지와 비교하였다. Lp의 경우는 MRS와 해방풍 잎, 뿌리추출물 배지에서 비슷한 유산균 성장을 보였고, Pa는 해방풍 잎 추출물에서는 6.0×10^9 ($6.0E + 9$) cfu/mL 생균수에 비해 해방풍 뿌리추출물과 대조군은 MRS 배지에는 각 5.0×10^5 ($5.0E + 5$)와 1.0×10^5 ($1.0E + 5$) cfu/mL에 불과하였다. 그러나, LaPa 공배양에서는 해방풍 잎과 뿌리 추출물과 대조군인 MRS 배지 모두 생균수가 증가하였고 특히 해방풍 추출물이 MRS 배지인 대조군보다 성장이 좋았다(Table 1). 우리는 질소원(0.5% yeast extract)와 탄소원(2% 덱스트로스, 수크로스, 갈락토스)를 첨가하여 생균수를 확인하였으나 질소원과 탄소원을 첨가하지 않은 경우가 10 ~ 100배 생균수가 많았다(data not shown). 이는 해방풍 잎(탄수화물 7.95 g/100g, 단백질 3.94 g/100g)과 뿌리(탄수화물 57.09 g/100g, 단백질 15.41 g/100g)의 일반성분이 유산균

성장에 필요한 탄소원과 질소원의 기질로 적합한 것으로 생각된다[24].

Table 1. Viable cell counts in *G. littoralis* extracts with lactic acid bacteria isolated from sea water during fermentation at 30°C for 24 h.

Samples (log cfu/mL)		Lp	Pa	LpPa
<i>G. littoralis</i>	Leaf	4.0E+9	6.0E+9	1.5E+12
	Root	4.0E+10	5.0E+5	1.0E+11
MRS	CONT	1.0E+9	1.0E+5	1.0E+10

* Lp, *Lactobacillus plantarum*(KCCM12299P); *Pediococcus acidilacticus*(KCCM12472P); LpPa, Lp and Pa co-culture. MRS De Man, Rogasa and Sharpe media; CONT, control.

3.2 해방풍 발효물의 GABA 분석

해방풍 잎과 뿌리 발효물에서의 GABA 생산을 확인하기 위해 Lp와 Pa로 48시간 공배양물에 대해 TLC로 확인하였다(Fig. 1). 해방풍 잎과 뿌리의 추출물에서 GABA와 MSG가 확인 되었으며, 공배양 후에 두 물질 모두 양적으로 증가 된 것이 확인 되었다. TLC 밴드로는 해방풍 잎 발효물보다 해방풍 뿌리 발효물의 GABA가 더 많은 것으로 보였다. 높은 GABA 함량을 가진 녹차와 병잎[17,18]과 같이 해방풍 잎과 뿌리 모두 MSG(monosodium glutamate)와 GABA가 확인 되었으며, 접종한 Lp와 Pa 유산균의 발효에 의해 해방풍의 MSG가 유산균의 탈탄

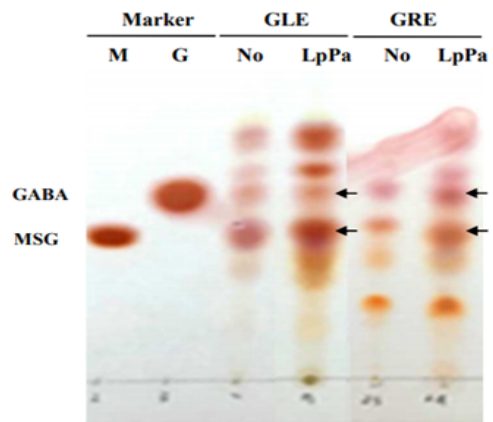


Fig. 1. TLC analysis of ν -aminobutyric acid (GABA) in *G. littoralis* extracts by co-culture with Lp and Pa. M, MSG; G, GABA, LpPa, Lp and Pa co-culture; No, No culture; arrows, increased MSG and GABA bands.

산 효소(GAD; Glutamate decarboxylase) 촉매 작용으로 GABA가 합성과 더불어 유산균에 의해 MSG도 증가된 것으로 판단된다. 이는 유산균에 의해 lactose, trans oligosaccharide, MSG 등이 생성된 이전 연구 [19-23]에서처럼 해방풍 유산균 발효에서 MSG의 생성과 더불어 GABA로의 전환으로 두 물질 모두 증가됨이 확인되었다(Fig. 1). 이는 Lp와 Pa 단일배양의 경우도 양적인 차이는 있었지만 증가의 양상은 같았다(data not shown).

TLC 분석으로 확인된 발효에 의한 GABA 증량에 대한 정량분석을 위해 ELISA 분석을 진행하였다. 해방풍 잎 추출물 1%에 대해 0.75 ng/mL, 뿌리 추출물 1%는 0.49 ng/mL로 뿌리의 GABA 함량이 적었다(Table 2). 발효 후, 잎에서 GABA는 0.87 ng/mL, 뿌리는 1.31 ng/mL,으로 잎은 16%p, 뿌리에서는 167%p가 증량된 것으로 확인되었으며 이는 TLC의 결과와 같았다(Fig. 1 and Table 2). 이는 유산균 GAD 효소에 의한 GABA 합성으로 해방풍 뿌리에서의 활성이 더 높은 것으로 확인되었다. 발효의 시간 경과에 따라(24 ~ 72 시간) MSG와 GABA의 증량은 확인되었고 96 시간에 GABA의 양이 감소하는 경향이 TLC 분석(sub data)으로 확인되어 지속적 생산을 위한 검토가 필요하다.

Table 2. Concentration of ν -aminobutyric acid (GABA) in *G. liitoralis* extracts fermented with LpPa using ELISA kit

Sample	GABA (ng/mL)	
	GLE	GRE
LAB		
NO	0.75 ± 0.06	0.49 ± 0.03
LpPa	0.87 ± 0.05	1.31 ± 0.07

* Lp, *Lactobacillus plantarum* (KCCM12299P); *Pediococcus acidilactici* (KCCM12472P); No, No culture; LpPa, Lp and Pa co-culture. CONT, control. Means ± SEM (n=3, p<0.05)

3.3 해방풍 발효물의 항산화 기능

해방풍 잎 추출물 DPPH 활성은 56.5%이고 Lp발효 75.6%, Pa 발효는 79.2%로 발효에 따라 항산화 효능은 모두 증가되었다(Fig. 2). 그러나 뿌리의 경우는 추출물은 20.8%, GRE_Lp와 GRE_Pa 발효는 20.9%와 23.2%로 큰 유의성은 인정되지 않았다. 이는 Gu 등[9]의 해방풍 부위별 항산화 연구에 있어 잎과 뿌리의 열수추출물이 각 84.7%, 25.0%로 보고된 것과 비교할 때, 본 연구의 잎과 뿌리 추출물 활성이 낮게 측정된 것은 시료 추출법과 식물 잎에 풍부한 파이토스테롤, 폴리페놀 등의 함량 차이에 의

한 것으로 생각된다[4,10,24]. 그러나, 본 연구의 결과에서 천연 항산화제의 대표 물질인 아스코르빅산(Vitamin C)보다는 낮았지만 합성 항산화제인 BHT의 73.6% 보다 높은 항산화 효능이 확인되어 유산균 발효를 통해 항산화 증가 효능을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

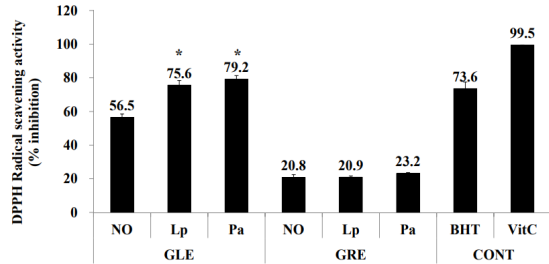


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity from *G. liitoralis* extracts fermented with each Lp and Pa. GLE, *G. liitoralis* leaf extract; GRE, *G. liitoralis* root extract; No, No culture; Lp and Pa, LAB used for fermentation; CONT, control. Each sample is 1,000 ug/mL; Bar values are means ± SEM (n=3, *p<0.05).

3.4 해방풍 발효물의 멜라닌 억제 효능

먼저, 해방풍 추출물과 발효물은 쥐의 멜라닌 생성 상피 유래 세포주(B16-F10)에 100 ug/mL 농도로 72 시간 동안 처리하여 무처리군 대비 세포 생존율(cell viability)을 확인하였다(Fig. 3). 해방풍 잎과 뿌리 추출물과 각 발효물 모두 세포 생존을 대조군(100%) 대비 비율로 확인한 경우 잎과 뿌리 추출물(GLE, GRE)과 잎과 뿌리 발효물(GLE_Lp, GLE_Pa, GRE_Lp, GRE_Pa) 모

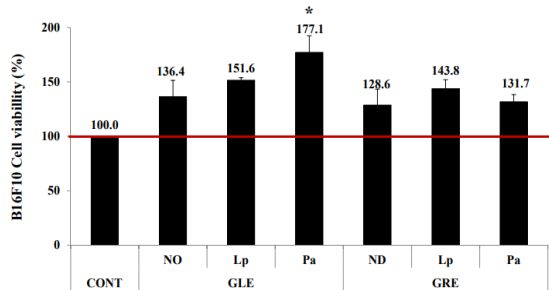


Fig. 3. Viability of B16-F10 cell of *G. liitoralis* extracts fermented with each Lp and Pa. Cells were incubated with 100 ug/mL for 72 h. CONT, cells in DMEM media non-treated; GLE, *G. liitoralis* leaf extract; GRE, *G. liitoralis* root extract; NO, No culture; Lp and Pa, LAB used for fermentation; horizon line is basic growth of control cells; Bar values are means ± SEM (n=3, *p<0.05).

두 128.6 ~ 177.1 %로 세포 수가 증가하였다(Fig. 3). 각 추출물과 발효물에 대해 농도 1 ~ 1,000 ug/mL에 따라 24 ~ 72시간 동안 생존율을 조사한 경우 모두 100 % 이상으로 확인되었다(data not shown). 이로 고 농도와 장기간의 세포 노출에 있어서도 세포에 성장이 확인되어 세포에 대한 세포 독성은 없는 것으로 판단된다.

다음으로 B16-F10 세포의 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 분석하기 위해 해방풍 잎과 뿌리 추출물과 발효물 100 ug/mL (0.1%; v/v)의 농도로 처리하고 48 시간 후에 확인한 결과, 해방풍 잎 추출물(GLE)은 90.5%, Lp 잎 발효물(GLE_Lp) 71.3%, Pa 잎 발효물(GLE_Pa) 81.5%로 각 19.2 %p와 10 %p 정도 멜라닌 생성을 억제 하였다. 해방풍 뿌리 추출물(GRE)의 멜라닌 억제 효능은 89.2%였으며, Lp 뿌리 발효물(GRE_Lp) 68.6%, Pa 뿌리 발효물(GRE_Pa) 77.1%로 세포내 멜라닌 함량을 각 20.6 %p와 12.1 %p 정도의 멜라닌 억제 효능이 확인되었다(Fig. 4). 해방풍 추출물 발효의 멜라닌 억제 효능은 Lp의 발효가 Pa 발효의 경우보다 활성이 높았다. 이는 멜라닌 생성에 관여하는 티로시나아제(tyrosinase) 활성을 억제하는 것으로 알려진 1% (v/v) 알부틴의 55.8% 활성과 비교할 때 Lp에 의한 해방풍 잎과 뿌리의 발효물의 멜라닌 억제 활성은 미백 소재로의 가능성을 확인하였다[25]. 이는 해방풍 추출물과 비교에 있어서 Lp와 Pa 발효 모두 멜라닌 억제 효과가 확인되었으며, 뿌리의 추출물과 발효물이 조금 높은 멜라닌 억제 효과가 있는 것으로 조사되었다(Fig. 4).

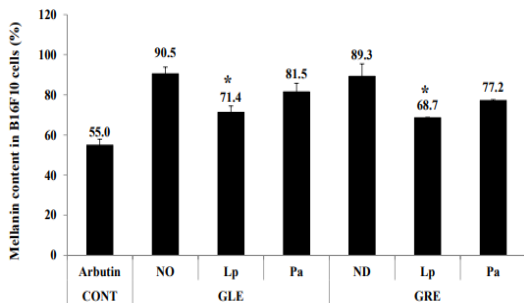


Fig. 4. Effects of melanin inhibition in B16-F10 cells of *G. littoralis* extracts fermented with each Lp and Pa. Cells were incubated with 100 ug/mL (0.1%) albutin as positive control; GLE, *G. littoralis* leaf extract; GRE, *G. littoralis* root extract; No, No culture; Lp and Pa, LAB used for fermentation; Bar values are means \pm SEM (n=3, *p<0.05).

3.5 해방풍 발효물의 항균 활성

해방풍잎 추출물 또는 해방풍 뿌리 추출물을 접종한 경우, 해방풍 뿌리 추출물이 치아우식균(*Streptococcus sobrinus*; 0.4 mm), 충치균(*Streptococcus mutans*; 0.2 mm), 여드름균(*Propinibacterium acnes*; 0.4 mm)과 비듬균(*Malassezia furfur*; 0.1 mm)에서 항균효과를 보여 시험균주가 자라지 못해 원형의 환이 생성되었으나, 해방풍 잎 추출물의 경우, 항균 효과를 의미하는 환이 생성되지 않았다(Table 3). 그러나, Lp, Pa를 공접 종한 잎추출물의 경우 여드름균(0.4 mm)에서 항균 환이 보였고 뿌리 추출물의 발효물의 경우 치아우식균(0.9 mm), 충치균(0.5 mm), 여드름균(0.5 mm) 및 비듬균(1.2 mm)에서 추출물보다 더 강한 항균 환이 확인되었다(Table 3). 대부분 발효물의 항균 효과가 추출물보다 우수함을 확인할 수 있었다. 특히 해방풍의 뿌리 추출물은 4 균주 모두에 대해 우수한 항균 활성을 나타내고, 치아우식균은 약 2.2배, 충치균은 약 2.5배, 여드름균은 약 1.25배, 비듬균에 있어서 12배 활성이 높았다. 유산균은 박테리옌(bacteriocin)과 단쇄지방산(short-chain fatty acids) 등의 항균물질을 생산하여 병원균 억제와 항생제 소재로의 연구가 활발하다[26]. 유산균이 생산한 GABA의 항산화와 항균에 대한 연구 보고는 있지만 기전연구에 대해서는 아직 미비하다[27]. 본 연구의 GLE_LpPa와 GRE_LpPa의 GABA 증량(Fig. 1, Table 2)과 항산화, 항균, 멜라닌 억제의 지표 물질임은 확인이 어렵지만 결과적으로 발효를 통해 각 기능의 증강은 확인되었다. 이는 GABA가 증량된 해방풍 잎과 뿌리의 발효물이 추출물의 항균 기능을 Lp와 Pa 유산균 발효를 통해 기능 증강에 도움을 줄 수 있는 것으로 보인다. 이는

Table 3. Evaluation of the antibacterial properties by measuring inhibition zone diameter against 4 pathogenic bacteria by well diffusion agar method.

Pathogene	Inhibition zone (mm)			
	GLE		GRE	
	No	LpPa	No	LpPa*
<i>Streptococcus sobrinus</i>	-	-	0.4 \pm 0.05	0.9 \pm 0.03
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	0.2 \pm 0.03	0.5 \pm 0.04
<i>Propinibacterium acnes</i>	-	0.4 \pm 0.02	0.4 \pm 0.04	0.5 \pm 0.06
<i>Malassezia furfur</i>	-	-	0.1 \pm 0.02	1.2 \pm 0.08

* Lp, *Lactobacillus plantarum*(KCCM12299P); Pa, *Pediococcus acidilactis*(KCCM12472P); No, No culture; LpPa, Lp and Pa co-culture. Means \pm SEM (n=3, *p<0.05).

프로바이오틱스로서 유산균과 프리바이오틱스 천연물의 특성에 따라 2차 대사산물이 질적, 양적 특성의 다양성에 대한 연구에서도 보고 된 것처럼[23-26] 본 연구에서 제시한 해방풍 뿌리 공발효물(GRE_LpPa)과 또는 유산균만으로도 여드름, 충치, 치주 개선 특히 비듬 개선 소재로 사용할 수 있음을 확인하였다.

4. 결론

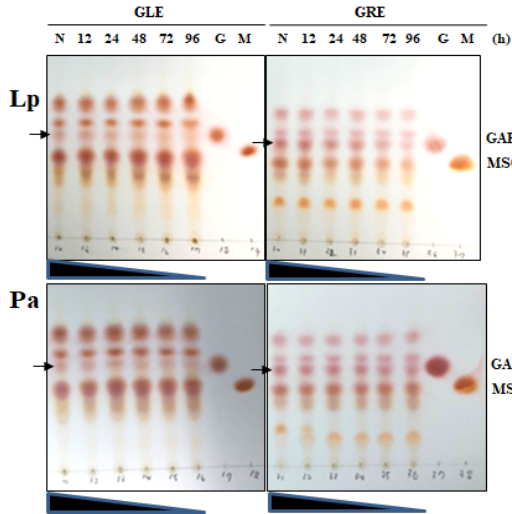
최근 천연물을 대상으로 유산균과 효모 등의 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물을 활용하여 기능성 물질 생산과 적용 연구가 활발하다[17,18]. 본 연구는 해수에서 분리한 *L. plantarum*(Lp; KCCM12299P)과 *P. acidilacti*(Pa; KCCM12472P) 2종의 유산균과 해방풍을 기타 영양성분 첨가없이 발효공정하여, 잎(GLE_LpPa)과 뿌리(GRE_LpPa)에서 각 16 %, 167 %p의 GABA 증량을 확인했다. GABA를 포함하는 해방풍 잎의 공발효물(GRE_LpPa)은 항산화 효능이 확인되었고, 뿌리는 발효 전후가 20.8%과 23.2%로 낮았다. 다음으로 마우스 멜라노마 세포인 B16-F10 세포에서의 멜라닌 억제 기능 분석은 Lp 발효물(GLE_Lp, GRE_Lp)이 Pa 발효물 보다 억제 효능이 높았다. 항균 분석에서 치아우식균, 충치균, 여드름균 및 비듬균 4종의 항균 효능은 잎 추출물인 GLE는 4종 모두에 대해 항균 효능이 없고 발효물 GLE_LpPa는 단지 여드름균에서만 항균 효과가 확인되었다. 반면, 뿌리 추출물인 GRE는 4종 모두에 대해 항균 효능이 있었고, 발효물(GRE_LpPa)은 추출물 대비 치아우식균은 약 2.2배, 충치균은 약 2.5배, 여드름균은 약 1.25배, 특히 비듬균에 있어서 12배 활성이 있었다. 본 연구의 바이오공정에 의해 생산된 해방풍 발효물은 GABA의 증량과 안전성, 친환경적 및 항산화, 항균 및 멜라닌 억제 증강 효능을 얻을 수 있어 식품과 화장품류 등 다양한 분야 적용에 유효하며 나아가 천연물 발효물의 연구의 기초 데이터로 활용할 수 있을 것이다.

References

- Y. Chen, L. Lei, Y. Bi, L. Jiang, W. Guo. "Quality Control of *Glehniae Radix*, the Root of *Glehnia Littoralis* Fr. Schmidt ex Miq., Along its Value Chains", *Frontiers in Pharmacology*, Vol.12, pp.1-14, Oct. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.729554>
- E. J. Cho, T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, S. C. Kim, N. Shibahara. "Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical", *Phytomedicine*, Vol.10, No.6, pp. 544-551, Feb. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1078/094471103322331520>
- S. W. Shin, "Antifungal activities of Essential oils from *Glehnia littoralis* alone and in combination with Ketoconazole", *Natureal Product Sciences*, Vol.11, No2, pp.92-96, May 2005. <https://koreascience.kr/article/JAKO200503041155160.pdf>
- S. M. Kim, D. I. Shin, H. S. Song, S. T. Yoon. "Contents of fatty acid and phytosterols of *Glehnia littoralis* among habitat areas in south Korea", *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. Vol.16, No.5, pp.337-340, Oct. 2008. <https://koreascience.kr/article/JAKO200835062474898.pdf>
- H. Matsuura, G. Saxena, S. W. Farmer, R. E. Hancock, G. H. Towers. "Antibacterial and antifungal polyine compounds form *Glehnia littoralis* ssp. leiocarpa", *Planta Medica*, Vol.62, pp.256-259, Jul. 1996. <http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/wp-content/uploads/2016/10/163.-Matsuura-1996.pdf>
- T. S. Yoon, B. K. Choo, M. S. Cheon, D. Y. Lee, G. Y. Choi. "Pharmacological activities of *Glehnia littoralis*", *Korean Journal of Oriental Medicine* Vol.14, No.1, pp. 123-128, Apr. 2008. <https://koreascience.kr/article/JAKO200824650602840.pdf>
- T. S. Yoon, M. S. Cheon, A. Y. Lee, Y. D. Lee, B. C. Moon. "Anti-inflammatory Activity of Methylene Chloride Fraction From *Glehnia littoralis* Extract via Suppression of *NF-κB* and Mitogen-Activated Protein Kinase Activity", *Journal of Pharmacological Sciences*, Vol.12, No.1, pp. 46-55, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1254/jphs.09168FP>
- Y. R. Um, J. I. Lee, J. H. Lee, H. J. Kim, S. S. Yea, Y. W. Seo. "Chemical constituents of the Halophyte *Glehnia littoralis*", *Journal of the Korean Chemical Society*, Vol.54, No.6, pp.701-706, Jan. 2010. <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201007049670769.page>
- Y. R. Gu, S. W. Kim, Y. W. Son, J. H. Hong. "Antioxidant activities of solvent extracts from different *Glehnia Radix* parts and their inhibitory effect against nitric oxide production in Raw 264.7 cell", *Korean Journal Food Preservation*, Vol.24, No.1, pp. 116-124, 2017. DOI: <https://doi.org/10.11002/kjfp.2017.24.1.116>
- D. H. Lee, J. H. Hong, "Physicochemical properties and antioxidant activities of fermented mulberry by lactic acid bacteria", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrient*, Vol.45, No.2, pp.202-208, Feb. 2016. DOI: <http://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.2.202>
- J. A. Reis, A. T. Paula, S. N. Casarotti, A. L. B. Penna. "Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds:

- Characteristics and Applications”, *Food Engineering Reviews*. Vol.4, No.2, pp.124-140, Apr. 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- [12] M. Watanabe, K. Maemura, K. Kanbara, T. Tamayama, H. Hayasaki. “GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs”, *Inermatopmal Review of Cytology*, Vol.213, pp.1-47, 2002.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(02\)13011-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(02)13011-7)
- [13] M. Shimada, T. Hasegawa, C. Nishimura, H. Kan, T. Kanno. “Anti-hypertensive effect of gamma -aminobutyric acid (GABA)-rich chlorella on high normal blood pressure and borderline hypertension in placebo controlled double blind study”, *Clinical and Experimental Hypertension*. Vol.31, No.4, pp.342-354, Sep. 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10641960902977908>
- [14] D. Rashmi, R. Zanan, S. John, K. Khandagale, A. Nadaf. “ γ -aminobutyric acid (GABA): biosynthesis role, commercial production and applications”, *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol.57, pp. 413-452, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00013-2>
- [15] D. Das, A. Goyal. “Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of sikkim”, *LWT-Food Science and Technology*. Vol.61, No.1, pp.263-268, Apr. 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.013>
- [16] M. Powers. “GABA supplementation and growth hormone response”, *Medicine and Sport Science*. Vol.59, pp.36-46, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1159/000341944>
- [17] R. Dhakal, V. K Bajpai, K. H. Baek. “Production of GABA (γ - aminobutyric acid) by microorganisms: a review”, *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol.43, No.4, pp.1230-1241, Dec. 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400001>
- [18] N. R. M. Sahab, E. Subroto, R. L. Balia, G. L. Utama. “ γ -aminobutyric acid found in fermented foods and beverages: current trends”, *Heliyon*. Vol.6, No.11, pp.e05526, Nov. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05526>
- [19] G. Fenaliti, R. H. P. Law, A. M. Bucel, C. Langendorf, J. C. Whisstock. “GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop”, *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol.14, No.4, pp.280-286, Mar. 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb1228>
- [20] S. E. Lee, Y. J. Lee, G. H. Lee. “The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain”, *Archives of Pharmacal Research*, Vol.42, No.12, pp.1031-1039, Nov. 2019.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12272-019-01196-z>
- [21] E. Y Hwang, J. Y. Park. “Isolation and characterization of gamma-aminobutyric acid (GABA) -producing lactic acid bacteria from kimchi”, *Currunt Topics in Lactic Acid Bacteria and Probiotics*. Vol.6, No.2, pp.64-69, Dec. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.35732/ctlabp.2020.6.2.64>
- [22] J. Kanklai, T. C. Somwong, P. Rungsirivanich, N. Thongwai. “Screening of GABA-Producing Lactic Acid Bacteria from Thai Fermented Foods and Probiotic Potential of *Levilactobacillus brevis* F064A for GABA-Fermented Mulberry Juice Production”, *Microorganisms*. Vol.9, No.1, pp.33-50, Jan. 2021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7823765/>
- [23] V. Galli, M. Venturi, E. Mari, S. Guerrini, L. Granchi. “Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in fermented milk by lactic acid bacteria isolated from spontaneous raw milk fermentation”, *International Dairy Journal*. Vol.127, pp.105-284, Apr. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105284>
- [24] J. H. Kim, Y. R. Gu, J. H. Hong. “Antioxidant Activities of Crude Polysaccharides from Glehniae Radix Root using Pressurized Extraction”, *Journal of Chitin and Chitosan*. Vol.23, No.1, pp.36-43, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.17642/jcc.23.1.6>
- [25] M. G. Choung, Y. S. Hwang, G. P. Kim, K. G. Ahn, H. S. Shim. “Antimelanogenic Effect and Whitening of Anthocyanin Rich Fraction from Seeds of Liriope platyphylla”, *Korean Journal Medicinal Crop Science.*, Vol.21, No.5, pp.361-371, Oct. 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7783/KJMCS.2013.21.5.361>
- [26] J. T. Na, S. Y. Kim, J. O. Lee, Y. J. Kim, E. Lee. “Antibacterial and Antifungal Activity of *Lactobacillus Plantarum* Isolated from Green Tea”, *Research Square*. Vol.21, No.5, pp.361-371, Dec. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-129183/v1>
- [27] B. A. Behbahani, H. Jooyandeh, F. Falah, A. Vasiee. “Gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and antimicrobial activity”, *Food Science and Nutrition*, Vol.8, No.10, pp.5330-5339, Aug. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1838>

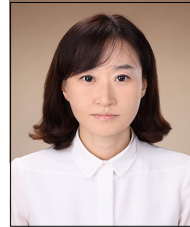
[Sub data]



Sub Fig. Change of ν -aminobutyric acid (GABA) in *G. littoralis* extracts according to culture time (h) with each Lp and Pa using TLC analysis. N, no culture; G, GABA; M, MSG; Lp, *Lactobacillus plantarum*; Pa, *Pediococcus acidilactici*; arrows, increased or decreased MSG and GABA bands.

홍 선 미(Sun Mee Hong)

[정회원]



- 1999년 2월 : 경북대학교 농업생명과학대학 (농학석사)
- 2005년 2월 : 경북대학교 농업생명과학대학 (농학박사)
- 2002년 3월 ~ 2005년 2월 : 농촌진흥청 국립농업과학원 연구원

- 2005년 3월 ~ 2006년 11월 : 농촌진흥청 국립농업과학원 PostDoc
- 2006년 12월 ~ 2009년 12월 : 일본 큐슈대학교 농생명과학대학원 PostDoc
- 2010년 1월 ~ 현재 : 환동해산업연구원 책임연구원

<관심분야>

재조합단백질, 생물공학, 해양유산균, 산업곤충

조 현 솔(Hyun Sol Jo)

[정회원]



- 2019년 9월 ~ 2020년 9월 : 환동해산업연구원 연구원
- 2020년 2월 : 영남대학교 미생물생명공학과 (이학석사)
- 2020년 10월 ~ 현재 : 환동해산업연구원 원급연구원

<관심분야>

미생물생명공학, 포스트바이오틱스, 산업곤충