발효 괴각의 항산화 활성과 Tyrosinase 및 Elastase 저해 활성

강소윤 · 김경희 · 육홍선

충남대학교 식품영양학과

Antioxidant Activities of Fermented *Sophorae fructus*, and Inhibitory Actions on Tyrosinase and Elastase

So-Yun Kang, Kyoung-Hee Kim, and Hong-Sun Yook

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

ABSTRACT This study was undertaken to measure the physicochemical characteristics, and tyrosinase and elastase inhibitory activity of *Sophorae fructus* fermented with various useful microorganisms (BS: *Bacillus subtilis*, CU: *Candida utilis*, SC: *Saccharomyces cerevisiae* strain CHY1011, LP: *Lactobacillus plantarum*, LC: *Lactobacillus casei*), to investigate the potential for future application of *Sophorae fructus* as an industrial raw material in health functional foods and cosmetics. The highest yield of freeze-dried powder of fermented *Sophorae fructus* was obtained with LP. The total phenol content was highest in the group fermented by CU. Maximum flavonoid contents were obtained in the control group, but the group fermented by CU had highest total flavonoid content as compared to other fermented groups. The DPPH radical scavenging activity showed IC₅₀ values of 0.20 mg/mL and 0.18 mg/mL in the control group and the group fermented by BS, respectively, whereas the ABTS radical scavenging activities had IC₅₀ values of 1.15 mg/mL and 0.86 mg/mL for control group and the group fermented by CU, respectively. Highest FRAP value was obtained in the CU group. Tyrosinase inhibition activity was determined to be the highest at 10 mg/mL in the LP fermented group, whereas elastase inhibition was highest at 1 mg/mL in the BS fermented group. Evaluation of the antimicrobial activity revealed inhibition of *Staphylococcus aureus* growth. Taken together, our results indicate that fermentation of *Sophora fructose* using various microorganisms has the potential to be developed for use in functional foods and cosmetics, due to the acquired property of increased antioxidant activity and enzyme inhibition.

Key words: antioxidant, *Sophorae fructus*, fermentation, tyrosinase and elastase inhibition activity

서 론

괴각은 회화나무 *Sophora japonica* Linné(콩과 Leguminosae)의 열매이며 괴실(槐實)이라고도 부른다. 콩 꼬투리 모양의 열매이고 길이는 약 4 cm, 너비 약 0.5 cm로 씨가 들어있다. 열매의 씨는 둥근 모양이며 씨가 들어있는 부위는 열매껍질이 불룩하게 부풀어 있고 껍질은 얇은 편이다. 열매 껍질은 녹색이며 씨는 흑갈색~검은색이다(Chung과 Lee, 1985). 냄새가 없고 맛은 쓴맛이 나며 콩의 비린 맛이 있다. 주성분은 플라보노이드와 이소플라보노이드 화합물이며 여기에는 genistein, sophoricoside, sophorabioside, kaempferol glucoside C, sophoraflavonolloside 및 rutin 등이 있는데, rutin은 어린 열매에서 가장 높게 나타나며 함량은

46%에 달한다(Chung과 Lee, 1985). 이러한 플라보노이드의 생리활성에 관한 연구로는 항산화 작용, 고지혈증 억제 작용, 항균효과, 항염효과, 암세포의 증식억제 등이 보고되고 있다(Huang과 Ho, 2010).

Lee(2014)의 연구에 따르면 식물계에 추출성분인 rutin의 항산화 효과를 확인한 결과, rutin은 H₂O₂에 의한 세포 내 ROS를 농도 의존적으로 제거하는 항산화 효과가 있다고 보고하였는데, 특히 항산화 유전자로 알려진 SOD1과 CAT의 세포 내 mRNA를 조절하여 H₂O₂에 의해 감소한 SOD1과 CAT를 농도 의존적으로 회복시키는 현상을 확인하였다고 보고하였다. 이러한 활성 외에도 세포 내에서 항산화에 영향을 주는 유전자의 발현을 조절하는 물질로서의 가능성도 확인하여 ROS가 일으키는 다양한 질환의 치료 및 보조제의 원료 성분 이외에도 세포노화와 직결된 기능성 원료로서의 가능성까지 고려해 볼 수 있어 앞으로 지속적인 연구를 통해 생물학적 원료로 월등한 가치가 있다고 판단하였다.

최근 노화 방지와 질병으로부터의 예방에 좋은 건강 보조 식품들이 물밀듯이 출시 및 연구되고 있으며, 화장품 또한 단순한 미용 개념을 넘어서 항산화, 미백, 보습, 주름 개선과

같은 기능성 화장품에 대한 소재개발 연구가 활발히 진행되고 있다(Song과 Jang, 2016). Jang과 Park(2017)의 연구에 따르면 피화와 피각 ethyl acetate 분획물의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF 단백질 발현에서 같은 농도로 처리된 알부틴 처리구보다 높은 저해 효과를 확인하였으며, 미백 관련 인자들의 저해 효과는 천연 추출물을 기반으로 한 화장품 첨가제로 높은 효과를 기대할 수 있을 것으로 보고하였다. 이처럼 천연물 원료를 이용한 한방 화장품의 관심을 증가시키고 있는데, 한방 화장품은 화학 성분의 화장품에 비해 인체와 피부에 미치는 해가 적은 것이 큰 장점이다(Song과 Jang, 2016). 과거 미백기능과 관련한 연구는 아스코르빈산 유도체, 알부틴류와 다른 합성 미백제 등과 같은 연구가 주를 이루었으나 최근 들어서는 전 세계적으로 천연물로부터 추출한 미백 및 주름 개선의 기능성 성분에 대한 연구가 진행되고 있으며, 천연물을 이용한 향산화 및 주름 개선 화장품은 한국 및 아시아 화장품 시장에서 매우 비중 있는 제품으로서 제형보다 효능 중심에 의한 차별화 시도가 뚜렷하여 안정성이 우수하고 효과가 우수한 천연물 유래 소재개발이 계속해서 요구되고 있다. 천연에서 유래한 기능성 화장품의 원료는 천연물이나 허브, 약용 식물을 중심으로 활발히 개발되고 있으며, 피부 노화 억제와 관련된 부작용 없는 천연 향산화 물질에 대한 연구들도 활발히 진행되고 있다(Wiedow 등, 1990; Jeong 등, 2009).

발효는 생물학의 기술로 가장 오래된 역사를 가지고 있다. 산업 전반에 걸친 기술개발이 지금까지도 이루어지고 있으며, 특히 식품에서의 기술개발이 주를 이루고 있다(Jo와 Sung, 2015). 추출물 발효식품은 건강식품에 속하는 유형으로서 일반적으로 여러 가지 식물성 원료에 당을 첨가하거나 유산균 등의 미생물을 첨가하여 일정 기간 발효시켜 제조한다. 현대인들이 많이 접하게 되는 가공식품은 제조과정에서 효소들이 파괴되기 쉽고, 식품첨가물이나 화학 성분들도 효소 기능을 약화시키게 되므로 현대인이 섭취하는 식품에는 효소가 많이 부족해지기 쉽다. 식물체에는 여러 가지 효소가 함유되어 있으며 식품추출액을 발효시키면 많은 효소가 활성화되어 여러 가지 생화학 반응을 일으킴으로써 식물체의 영양성분이 소화나 흡수되기 쉬운 형태로 변환될 수 있으며, 효소작용으로 생성된 성분들에 의해 새로운 생리조절기능을 발현할 수 있다. 또한, 효소 자체를 섭취함으로써 체내에서 신진대사 기능을 촉진하게 된다(Choi 등, 2018).

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성 성분을 가진 피각을 여러 유용 미생물을 이용하여 발효시킨 후 미생물별 발효물의 향산화 활성과 항균 활성, 효소저해 활성을 조사하여 향후 건강기능식품 및 화장품 등과 같은 산업원료 소재로서의 이용 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

피각 발효물의 제조는 1 L의 증류수에 20 g의 glucose와 5 g의 peptone을 넣고 섞은 것을 121°C에서 15분간 가압 고온 멸균하여 실온에서 식힌 다음 미리 활성화한 6종의 발효 균주를 각각 10 mL씩 넣은 후 피각 100 g을 넣고 *Bacillus subtilis*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*를 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 여과지(Whatman No. 2, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과시킨 후 그 여액을 121°C에서 15분 동안 가압 고온 멸균시켰다. 멸균된 배양액을 -50°C의 deep freezer에 12시간 두었다가 동결건조한 후 실험에 사용하였다. 피각의 무발효 대조군은 피각 10 g당 10배량(w/v)의 증류수로 24시간 동안 2회 추출한 후 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 다음 동결건조하여 얻은 추출물(이하 무발효균)을 사용하였다. 각 시료는 30% 에탄올에 용해하여 실험에 사용하였다.

사용균주

피각 발효에 사용된 균주로서 *B. subtilis* KCTC 1022 (BS), *L. plantarum* KCTC 3104(LP), *L. casei* KCTC 2180(LC), *C. utilis* KCCM 50342(CU)는 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea) 및 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였고, *S. cerevisiae* 균주(*S. cerevisiae* strain CHY1011; SC)는 빵 발효에 이용되는 효모를 사용하였다. 18S rRNA 서열의 유사성에 근거하여 가장 가까운 종을 표시하였다. BS는 nutrient broth에서, LP 및 LC는 Lactobacilli MRS broth에서, CU, SC는 YM broth에서 배양하였다. 모든 균주는 30°C에서 24시간 주기로 3회 계대배양 후 600 nm에서 흡광도 값이 0.4~0.6(1×10^5 CFU/mL) 범위 안에 들게 하여 발효 균주로 사용하였다.

사용균주에 따른 구멍갈파래 발효액의 배양 특성

균주의 성장에 따른 배양액의 pH 변화는 24시간 배양 후 여과지(Whatman No. 2)에 여과한 다음 pH meter(Neomet pH 200L, Istek Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혼탁도 측정은 24시간 배양 후 여과된 발효액을 600 nm에서 흡광도를 측정(xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA)하여 미생물의 발효 정도를 확인하였다. 생균수 측정은 24시간 배양한 피각 발효액을 여과하여 멸균된 생리식염수에 희석해 측정하였다. 발효 희석액을 충분히 혼합한 후, plate count agar 및 potato dextrose agar 배지에 분주한 다음 30°C에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Denis(1912)의 방법을 사용

하여 측정하였다. 시료 10 μ L와 Folin-Ciocalteu's reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 μ L를 가하여 진탕하고 3분간 방치한 다음 10% Na_2CO_3 용액(Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Ansan, Korea) 150 μ L를 섞어 1시간 후 765 nm에서 흡광도를 측정(xMarkTM Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc.)하였다. 결과값은 표준물질인 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 검량선을 작성한 후 수율을 적용하여 g 중 mg gallic acid(GAE, dry basis)로 표시하였다.

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(1999)의 방법을 사용하여 측정하였다. 시료 125 μ L와 증류수 500 μ L를 넣어 섞은 다음, 5% sodium nitrite(NaNO_2 , Thermo Fisher Scientific Co., Ltd., Waltham, MA, USA) 37.5 μ L를 넣어 5분간 방치하고, 10% aluminium chloride($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 75 μ L를 넣고 6분간 방치한 다음 1 M NaOH(Samchun Pure Chemical Co., Ltd., Paeongtaek, Korea) 250 μ L를 가하여 11분 10 nm에서 흡광도를 측정(xMarkTM Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc.)하였다. 표준물질로 catechin hydrate(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 검량선을 작성한 후 수율을 적용하여 g 중 mg catechin hydrate(CE, dry basis)로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능은 Blois(1958)의 방법을 참고하여 측정하였다. 일정 농도로 제조한 시험용액 100 μ L에 0.2 mM DPPH(Sigma-Aldrich Co.) 용액 100 μ L를 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도(xMarkTM Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 측정하였다. 이때 대조군으로서 시료 대신 시료를 녹인 용매인 30% 에탄올(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)을 사용하였으며 반응한 결과 값을 50% 감소시키는 시료의 농도인 IC_{50} 값(mg/mL)으로 나타내었다. 양성대조군으로 기존의 항산화제인 ascorbic acid(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 사용하여 비교하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거능 측정

2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) 라디칼 소거 활성 측정은 Fellegrin 등(1999)의 방법에 따라 측정하였다. ABTS solution은 7 mM ABTS (Sigma-Aldrich Co.)와 140 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)을 섞어 암실에서 12~16시간 동안 방치한 후, 이를 absolute ethanol(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)과 1:88 비율로 섞어 734 nm에서 흡광도(xMarkTM

Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc.) 값이 0.7 ± 0.02 가 되도록 조절하여 제조하였다. 일정 농도로 제조한 시료 50 μ L에 ABTS solution 1 mL를 가한 다음, 30초간 진탕하고 2.5분간 암반응 시켜 734 nm에서 흡광도(xMarkTM Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 측정하였으며, 이때 대조군으로서 시료 대신 시료를 녹인 용매인 증류수와 반응한 결과 값을 50% 감소시키는 시료의 농도인 IC_{50} 값(mg/mL)으로 나타내었고 기존의 항산화제인 ascorbic acid(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 양성대조군으로 사용하여 비교하였다. ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}}\right) \times 100$$

FRAP 측정

Ferric reducing antioxidant potential(FRAP) 측정 방법은 Benzie와 Strain(1996) 방법을 참고하여 측정하였다. FRAP reagent는 acetate buffer(300 mM, pH 3.6)와 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co.), 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 섞은 후 37°C의 incubator에서 10분간 반응시켜 제조하였다. 2.5 mg/mL의 농도로 녹인 시료 10 μ L에 증류수 30 μ L와 FRAP reagent 300 μ L를 넣고 37°C에서 10분간 암반응 시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정(xMarkTM Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc.)하였다. 양성대조군으로서 0.1 mg/mL 농도의 ascorbic acid(Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)를 사용하여 비교했으며 FRAP 활성은 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 및 0.5 mM의 농도로 반복하여 작성한 FeSO_4 의 검량식에 대입하여 환산하였다.

항균 활성 평가

항균 활성은 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay (Bauer 등, 1966)로 측정하였다. 항균 활성 측정에 사용된 균주는 Gram 양성균으로서 *B. cereus* KCTC 1012, *Staphylococcus aureus* KCTC 3881과 Gram 음성균으로서 *Enterobacter cloacae* KCTC 1685, *Escherichia coli* KCTC 2441, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1636의 총 5종을 생물자원센터, 한국미생물보존센터 및 국립농업과학원 씨앗은행(Korean Agricultural Culture Collection, Wanju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 배지는 휴면 상태의 균주들을 Table 1과 같은 조건으로 생육 배양하였다. 즉, 분양받은 균주를 nutrient broth에 접종하고 30°C와 37°C에서 24~30시간씩 3회 계대 배양하여 600 nm에서 측정된 흡광도 값이 $0.4 \sim 0.6 (1 \times 10^5 \text{ CFU/mL})$ 범위 안에 들게 한 후 항균 활성 측정을 위한 균주로 사용하였다. 활성화된

Table 1. List of strains used for antibacterial experiments

	Strain	Media ¹⁾	Temperature (°C)
Gram (+) bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	NA/NB	30
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA/NB	30
Gram (-) bacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	NA/NB	30
	<i>Escherichia coli</i>	NA/NB	30
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA/NB	37

¹⁾NA: nutrient agar, NB: nutrient broth.

균주는 nutrient agar에 100 µL씩 분주한 뒤 멸균 spreader 로 도말하여 항균시험용 평판배지를 준비하였다. 시험용액은 10 mg이 되도록 paper disc(8 mm)에 천천히 흡수시킨 후 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 뒤, 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 각각 24시간 동안 30°C와 37°C의 incubator에서 배양한 다음 disc 주변에 생성된 생육 저해환(clear zone)의 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다.

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해능은 Flurkey(1991)의 방법을 참고하여 측정하였다. Potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 6.8)에 용해시킨 효소액(mushroom tyrosinase, 100 unit/mL, Sigma-Aldrich Co.) 25 µL와 기질인 10 mM L-DOPA(dihydroxyphenylalanine, Sigma-Aldrich Co.) 50 µL, 0.1 M potassium phosphate buffer 125 µL를 혼합한 후 시료 50 µL를 첨가하여 37°C incubator에서 15분간 반응시킨 다음 475 nm에서 흡광도를 측정(xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc.)하였다. Tyrosinase 저해능은 다음의 환산식에 의해 계산되었으며 tyrosinase 효소의 작용 저해 효과를 나타내는 대표적인 물질인 kojic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 양성대조군으로 사용하여 비교하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition ability (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100$$

A: Absorbance at 475 nm determined with sample

B: Absorbance at 475 nm determined with buffer instead of enzyme

C: Absorbance at 475 nm determined with buffer instead of sample

Elastase 저해 활성

Elastase 저해 활성 측정은 Kraunsoe 등(1996)의 방법을 참고하여 측정하였다. 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0) buffer 350 µL에 *N*-succinyl-(Ala)3-*p*-nitroanilide 125 µL와 시료 20 µL를 첨가한 후 50 µL/mL elastase(pancreatic from porcine pancreas, 1.4 units/mg, Sigma-Aldrich Co.) 5 µL를 가하여 37°C의 incubator에서 20분 동안 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다(xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad Laborato-

ries, Inc.). Elastase 저해 활성은 다음의 환산식에 의해 계산되었으며 노화된 피부를 개선해주는 대표적인 물질인 ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하여 비교하였다.

$$\text{Elastase inhibition ability (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100$$

A: Absorbance at 410 nm determined with sample
B: Absorbance at 410 nm determined with buffer instead of enzyme

C: Absorbance at 410 nm determined with buffer instead of sample

통계처리

모든 실험은 3회 이상 실시한 후 평균값으로 나타내었으며 얻어진 결과는 SPSS 26.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 ANOVA analysis를 실시하였다. 평균치의 차이에 대한 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

괴각 발효물의 수율

5종의 단일 균주를 이용하여 발효시킨 괴각 발효물의 수율은 Table 2에 나타내었다. LP 발효물이 32%로 가장 높게 나타났고, 그다음으로 BS(28%), LC(26%), SC(24%), CU(16%), control(14%) 순으로 높았다. 이는 Kim 등(2012)의 6종의 단일균주 및 혼합균주를 이용하여 발효시킨 포도박 발효물에 대한 연구에서 대조군보다 발효물의 수율이 증가

Table 2. The yield of fermented *Sophorae fructus* by various microorganism

Microorganism ¹⁾	Yield (%)
Control	14
BS	28
CU	16
SC	24
LC	26
LP	32

¹⁾Control: water extract of *Sophorae fructus*, BS: *Bacillus subtilis*, CU: *Candida utilis*, SC: *Saccharomyces cerevisiae* strain CHY1011, LC: *Lactobacillus casei*, LP: *Lactobacillus plantarum*.

Table 3. pH value, turbidity, and viable cell count in the broth of *Sophorae fructus* fermented by microorganism

Microorganism ¹⁾	pH	Turbidity ⁴⁾	Viable cell count (log CFU/mL)
Control	5.02±0.00 ^{a2)3)}	0.12±0.00 ^f	—
BS	4.95±0.02 ^b	2.82±0.00 ^a	8.46±0.04 ^a
CU	3.94±0.01 ^f	2.41±0.01 ^b	8.32±0.01 ^b
SC	4.63±0.00 ^c	2.33±0.00 ^c	6.54±0.08 ^e
LC	4.42±0.01 ^d	1.41±0.00 ^e	7.47±0.01 ^c
LP	3.96±0.01 ^e	1.59±0.00 ^d	7.34±0.06 ^d

¹⁾Abbreviations are the same as Table 2.

²⁾Mean±SD (n=3).

³⁾Different letters (a-f) within the same column differ significantly ($P<0.05$).

⁴⁾Turbidity measurement based on OD 600 in the broth of *Sophorae fructus* fermented by microorganism.

하였다는 결과와 동일하게 나타났으나, 발효물 중 BS의 수율이 가장 높았다는 결과는 다르게 나타났다. 이는 *L. plantarum*이 발효과정에서 생성되는 효소에 의한 효소작용의 차이가 수율에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

과각 발효물의 배양 특성

여러 유용 미생물로 발효시킨 과각의 발효 정도를 확인하기 위하여 24시간 동안 발효시킨 과각 발효액의 배양성 결과를 Table 3에 나타내었다. pH는 미생물이 과각의 유기 화합물을 분해하고 대사산물을 축적하는 발효과정을 통해 유기산의 축적이 이루어지면서 감소하게 된다(Seo, 2017). 발효하지 않은 배지의 pH 값은 5.02±0.00인 반면, 발효균에서는 3.94~4.95가 되어 발효에 의해 pH가 낮아진 것으로 보아 모든 실험군에서 발효가 일어났음을 확인하였다. 이 중 *B. subtilis*를 이용한 발효균에서 4.95±0.02로 가장 높은 pH 값을 보였으며 SC(4.63±0.00), LC(4.42±0.01), LP(3.96±0.01), CU(3.94±0.01)의 순서로 높아지는 것을 확인하였다. Kim 등(2013)은 보통 BS를 이용한 발효물의 경우 pH 변화가 적다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 또한 본 연구에서 측정된 pH 값이 3.94~4.95인데, 이는 Oh 등(1990)의 연구에서 구기자, 당귀, 오가피 물 추출물의 pH 값을 측정한 결과인 4.6~5.0으로 보고된 값과 유사한 경향을 보였다.

미생물이 일정한 배수로 증가하는 특성은 흡광도 측정(OD 600)에 의해 배양액 속 미생물의 양을 측정함으로써 판단할 수 있다(Alpen과 Mandel, 1960). 과각 발효 후 미생물 생장에 의한 turbidity 분석 결과 1.41~2.82로 나타났으며, 이는 Kim 등(2013)과 Kim 등(2012)의 연구에서 인삼꽃과 포도박을 LC로 발효하였을 때 혼탁도가 가장 낮았다고 보고한 결과와 일치하였다.

과각 발효액이 미생물 생장에 미치는 영향을 알아보기 위해 24시간 발효 후 생균수를 측정하였으며, 그 결과 6.54~8.46 log CFU/mL로 나타났고 BS가 8.46±0.04 log CFU/mL로 가장 높았으며 이어서 CU(8.32±0.01 log CFU/mL), LC(7.47±0.01 log CFU/mL), LP(7.34±0.06 log CFU/mL), SC(6.54±0.08 log CFU/mL)의 순서로 나타났다. 따라서 균주별로 과각을 24시간 배양하여 발효액을 제조한

경우, pH, 흡광도 측정, 생균수 측정 결과에 의해 과각 발효가 잘 진행되었음을 확인하였으며, 이 중 *B. subtilis*나 *C. utilis*를 사용하여 발효를 진행했을 때 사용된 미생물들이 과각을 효과적으로 이용하여 자기 증식에 이용하는 것으로 판단된다.

과각 발효물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

식품이나 체내 생체막에 있는 지질은 활성산소에 의해 산화되어 식품의 품질 변화나 생체노화를 일으키는 것으로 알려져 있는데, 이러한 산화를 방지하기 위하여 천연 항산화제인 페놀성 화합물이 널리 이용되고 있다(Nijveldt 등, 2001). 폴리페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포하는 2차 대사산물로서 수산기를 가지는 방향성 화합물을 전부 일컫는 말로 hydroxy cinnamic acid를 비롯한 대부분의 폴리페놀성 화합물은 세포벽, 다당류, 리그닌 등과 에스테르 결합이 되어 있거나 중합체로 존재하며, 수산기를 통한 수소공여와 페놀 고리구조의 공명 안정화에 의해 항산화 능력을 나타낸다(Yusof 등, 1990; Herrmann과 Nagel, 1989). 플라보노이드는 외부 스트레스나 질병으로부터 자신을 보호하는 작용을 하는 물질로 항산화, 항균 및 항염증 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Dixon 등, 2002).

과각 발효물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 총 페놀 함량은 발효균 및 무발효균 중에서 CU를 이용한 발효물(17.84±0.22 GAE mg/g)이 유의적으로 높았다. 그다음으로 무발효균(17.66±0.12 GAE mg/g), BS(17.12±0.10 GAE mg/g), LP(16.57±0.08 GAE mg/g), LC(15.95±0.05 GAE mg/g), SC(15.08±0.12 GAE mg/g)의 순서로 높은 함량을 보였으며 이 중 CU와 무발효균은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 총 플라보노이드 함량은 무발효균이 가장 높은 값(7.22±0.05 CE mg/g)을 나타내었고, 그다음으로 CU(7.14±0.00 CE mg/g), BS(6.47±0.04 CE mg/g), LP(5.60±0.04 CE mg/g), LC(5.43±0.03 CE mg/g), SC(3.99±0.01 CE mg/g)의 순서로 높은 함량을 나타내었다. 따라서 과각 발효 시 CU로 발효한 경우 다른 미생물 발효균에 비해 총 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량이 높아지는 것으로 나타났다.

Bae 등(2019)의 명월초 발효물의 항산화 활성 연구에 따

Table 4. Total polyphenol and flavonoid contents of fermented *Sophorae fructus* by various microorganism

Microorganism ¹⁾	Total polyphenol contents (GAE mg/g) ²⁾	Total flavonoid contents (CE mg/g) ³⁾
Control	17.66±0.12 ^{a4)5)}	7.22±0.05 ^a
BS	17.12±0.10 ^b	6.47±0.04 ^c
CU	17.84±0.22 ^a	7.14±0.00 ^b
SC	15.08±0.12 ^c	3.99±0.01 ^f
LC	15.95±0.05 ^d	5.43±0.03 ^e
LP	16.57±0.08 ^c	5.60±0.04 ^d

¹⁾Abbreviations are the same as Table 2.

²⁾GAE: gallic acid equivalent mg/g.

³⁾CE: catechin equivalent mg/g.

⁴⁾Mean±SD (n=3).

⁵⁾Different letters (a-f) within the same column differ significantly ($P<0.05$).

르면 발효를 할 경우, 대조군에 비해 발효군의 총 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량이 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 이는 발효할 경우 생성된 미생물에 의해 protease, lipase 등의 효소로 생성되는 페놀 화합물 때문인 것으로 판단된다고 보고하였다(Bea 등, 2019). Kim 등(2016)의 유산균을 이용한 어성초 연구에서도 발효에 의해 폴리페놀 함량이 증가하였다고 보고하였다. 이는 미생물들이 생산하는 효소 활성과 밀접한 관련이 있다고 판단된다. Seo(2017)의 발효숙성생강의 항산화 활성 연구에 따르면 발효숙성생강 추출물의 총 플라보노이드 함량이 생강 추출물보다 낮게 나타나 발효 후 감소하는 경향을 볼 수 있었다. Cha 등(2010)의 곰팡이 발효 참당귀 연구에 따르면 참당귀 뿌리의 폴리페놀 화합물 함량은 2.78%였으나 *A. oryzae*, *A. kawachii* 및 *M. purpureus* 균주로 발효시킨 발효 당귀의 폴리페놀 화합물 함량은 각각 2.32~2.42%로 감소하였으며, 플라보노이드 함량 또한 1.03%에서 발효 후 각각 0.90, 1.04 및 1.18%로 감소하여 모든 군에서 발효에 의해 이들의 함량이 약간씩 낮아졌다. 이런 결과가 나온 이유는 페놀성 화합물을 많이 함유한 식물체 추출물 사용에 의한 세포독성 작용이 추출물의 발효에 의해 경감되는 것과 관련이 있다고 보고하였다. 또한, Yoon 등(2015)은 국내 복분자로부터 분리된 토종효모 *S. cerevisiae* M-5로 발효한 블루베리 발효주(BBM; blueberry wine fermented with *S. cerevisiae* M-5) 및 수입 시판 건조효모 *Fermivin*으로 발효한 블루베리 발효주(BBF; blueberry wine fermented with *Fermivin*)에 대한 항산화 활성을 비교하였는데, 그 결과 총 폴리페놀 함량이 BBF보다 BBM에서 약 1.2배 높았고, 총 플라보노이드 함량에서도 BBM이 더 높은 결과를 나타내어 같은 효모종이라도 균주에 따라 발효과정 중에 생성된 알코올에 의해서 항산화 물질의 용출량이 달라진다고 보고하였다.

괴각 발효물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 발효에 의한 식물체 세포독성 작용의 감소와 알코올의 생성으로 생리활성 물질의 생성량이 균주에 따라 달라

Table 5. DPPH and ABTS radical scavenging activity of fermented *Sophorae fructus* by various microorganism

Microorganism ¹⁾	DPPH radical scavenging activity IC ₅₀ (mg/mL) ²⁾	ABTS radical scavenging activity IC ₅₀ (mg/mL)
Ascorbic acid	0.01±0.00 ^{g3)4)}	0.09±0.00 ^f
Control	0.20±0.00 ^e	1.15±0.06 ^d
BS	0.18±0.01 ^f	1.30±0.00 ^c
CU	0.27±0.00 ^d	0.86±0.00 ^e
SC	0.48±0.00 ^a	2.72±0.01 ^a
LC	0.32±0.00 ^c	1.53±0.01 ^b
LP	0.35±0.00 ^b	1.50±0.00 ^b

¹⁾Abbreviations are the same as Table 2.

²⁾Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration inhibition curve.

³⁾Mean±SD (n=3).

⁴⁾Different letters (a-g) within the same column differ significantly ($P<0.05$).

지는 것으로 사료된다.

괴각 발효물의 라디칼 소거능

괴각 발효물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 5와 같다. DPPH 라디칼 소거능을 평가한 결과, BS 발효군이 가장 높았고 다음으로 무발효군, CU, LC, LP, SC 발효군 순서로 높게 나타났다. 이때 각각의 IC₅₀ 값은 0.18±0.01 mg/mL, 0.20±0.00 mg/mL, 0.27±0.00 mg/mL, 0.32±0.00 mg/mL, 0.35±0.00 mg/mL, 0.48±0.00 mg/mL였으며 모든 발효군 및 무발효군에서 유의적인 차이를 보였다($P<0.05$). 이는 Lee 등(2009)이 탈지대두의 *B. subtilis* 발효군에 대해 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 발효하지 않은 것보다 RC₅₀ 값이 더 낮게 나타났다는 결과와 일치하였다.

과채류 및 곡류 중의 식물성 폴리페놀 및 플라보노이드와 같은 화합물과 항산화 활성 사이에는 높은 상관관계가 있다는 보고가 있는 반면(Vile과 Tyrrell, 1995), 30종의 한방 생약재를 이용한 실험에서는 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물과 DPPH 라디칼 소거 활성 또는 chelating effect 사이에는 상관관계가 상당히 낮은 것으로 보고되었다(Choi 등, 2008).

대부분의 식물체 추출물에서 폴리페놀 및 플라보노이드 성분의 함량이 높으면 항산화 활성이 높다는 상관관계를 나타내지만(Kim 등, 2004), 일부에서는 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물 함량은 높으나 항산화 활성이 낮은 경우도 보고되고 있다(Maxson과 Rooney, 1972). 당귀를 발효한 연구에 따르면 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 증가하지 않았더라도 항산화 활성이 증가할 경우 발효액 중에 폴리페놀 및 플라보노이드 이외의 활성 성분이 존재할 가능성이 있다고 보고하였다(Cha 등, 2010).

괴각 발효물의 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 5와 같다. ABTS 라디칼 소거능을 평가한 결과, CU

발효균이 가장 높았으며 다음으로 무발효균, BS, LP, LC, SC의 순서로 높게 나타났다($P<0.05$). 각 발효균의 IC_{50} 값은 0.86 ± 0.00 mg/mL, 1.15 ± 0.06 mg/mL, 1.30 ± 0.00 mg/mL, 1.50 ± 0.01 mg/mL, 1.53 ± 0.00 mg/mL, 2.72 ± 0.01 mg/mL였으며 LP와 LC 발효균에서는 유의적인 차이가 없었다. 무발효균 및 발효균에 대한 DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능의 결과는 서로 다른 경향을 보이기도 하였는데, 일반적으로 반응속도가 빠른 ABTS 라디칼과는 반대로 DPPH 라디칼의 반응속도는 화합물에 따라 변화하고 비타민 C의 경우 EC_{50} 농도에서 동적평형상태(steady-state)로 도달하는 시간이 75분인데 반해 rutin의 경우 103분이 걸린다고 알려져 있으며(Huang 등, 2005), ABTS 라디칼과 잘 반응하는 항산화 물질이 DPPH와는 전혀 반응하지 않을 수도 있다고 보고되고 있다(Kim 등, 2010). 따라서 각각의 미생물에 대한 발효 생성물의 차이가 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성에 대한 차이를 나타내었다고 판단된다(Choi 등, 2018).

괴각 발효물의 FRAP

괴각 발효물의 FRAP 측정 결과는 Table 6과 같다. 양성 대조균인 ascorbic acid는 1 mg/mL의 농도에서 2.03 mM의 활성을 나타내었고 10 mg/mL 농도의 시료군에서는 CU의 FRAP 값(3.99 ± 0.01 mM)이 가장 높았으며 무발효균(3.91 ± 0.00 mM), BS(3.78 ± 0.01 mM), LC(3.14 ± 0.01 mM), LP(2.92 ± 0.07 mM), SC(2.29 ± 0.01 mM) 발효균의 순서로 높게 나타났다($P<0.05$). FRAP 측정 결과 본 연구의 다른 항산화 측정 결과와 동일한 경향성을 보였다. FRAP 방법은 DPPH 라디칼 소거 활성과 같이 직접적으로 자유라디칼을 제거하는 것과는 다른 원리로(Bogin과 Abrams, 1976), pH가 산성일 때 환원제에 의해 ferric tripyridyl-triazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 전환되는 과정을 이용한 것으로 시료 내의 총 항산화능을 측정하는 방법이다(Arano 등, 2001). Park 등(2007)은 목련을 *Pediococcus acidilactici* KCCM 11614P를 이용하여 0, 12, 24, 48, 72시간 동안 발효시킨 발효균의 항산화능을 측정하였다. 그 결과 DPPH 라디칼 소

거능의 경우에는 모든 발효 시간군의 소거능이 비발효균보다 모두 높았으나, FRAP 측정 결과에서는 0, 24시간 발효균이 비발효균과 비슷하거나 낮은 항산화능을 나타내었으며 48시간 발효 시간 이후부터 FRAP 값이 급격히 증가하는 것으로 나타났다고 보고하였으므로 발효기간에 따른 항산화 활성에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

괴각 발효물의 항균 활성

괴각 발효균의 항균 활성 측정 결과는 Table 7과 같다. 10 mg/disc의 농도에서 무발효균을 제외한 모든 발효균에서 *S. aureus*에 대해 항균력을 나타내었다($P<0.05$). 이 중에서도 CU 발효균은 16.7 mm, BS 발효균은 15 mm의 가장 큰 생육 저해환을 나타내었다. 또한, BS 발효균만 *E. cloacae* 균에서 11 mm 생육 저해환이 나타났으며 다른 시료군은 *S. aureus*를 제외한 나머지 균에 대해 항균력을 나타내지 않았다. 반면 무발효균은 모든 균주에서 항균 활성을 나타내지 않았다.

Seo(2017)의 연구에 따르면 생강의 발효 속성을 통해 gram 양성균인 *S. aureus*와 *L. monocytogenes* 균에 대해 항균 활성이 있는 것을 확인하였지만, *Salmonella* sp.와 *E. coli* 균주에는 clear zone이 형성되지 않아 생육 저해 활성이 미비하다고 보고하였다. 본 연구에서도 *S. aureus*에서는 항균 활성이 나타났지만 *E. coli*에서는 나타나지 않아 동일한 경향을 나타내었다.

황색포도상구균(*S. aureus*)은 식중독 원인균 중 하나로 환경 저항성이 강하고 enterotoxin을 생성한다. 또한, 식중독 증상으로 구토 및 설사 등을 일으키는 주요 원인으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 눈에서 가장 많이 발견되는 균 중의 하나로 정상적인 피부와 결막을 포함한 점막에 상주하여 손상된 각막에 감염을 일으키고 심하면 주변부 궤양을 유발한다고 한다(Kim 등, 2015). Kim 등(2015)의 연구에 따르면 괴각은 *S. aureus*와 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*에서만 항균 활성 연구가 진행되었다고 보고하였다.

Table 6. FRAP value of fermented *Sophorae fructus* by various microorganism

Microorganism ¹⁾	FRAP value (mM) ²⁾
Control	$3.91\pm0.00^{b3)4)}$
BS	3.78 ± 0.01^c
CU	3.99 ± 0.01^a
SC	2.29 ± 0.01^f
LC	3.14 ± 0.01^d
LP	2.92 ± 0.07^e

¹⁾Abbreviations are the same as Table 2.

²⁾Sample concentration is 10 mg/mL.

³⁾Mean $\pm$ SD (n=3).

⁴⁾Different letters (a-f) differ significantly ($P<0.05$).

Table 7. Antibacterial activity with fermented *Sophorae fructus* by various microorganism

Strain	Clear zone (mm)					
	Control ¹⁾	BS	CU	SC	LC	LP
	10 mg/disc					
<i>B. cereus</i>	— ²⁾	—	—	—	—	—
<i>E. cloacae</i>	—	11	—	—	—	—
<i>E. coli</i>	—	—	—	—	—	—
<i>P. aureginosa</i>	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i>	—	15 ^{ab3)}	16.7 ^a	12 ^c	12 ^c	11.7 ^c

¹⁾Abbreviations are the same as Table 2.

²⁾Not detected.

³⁾Values with different letters (a-c) within the same row are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 8. Tyrosinase inhibition activity of fermented *Sophorae fructus* by various microorganism

Microorganism ¹⁾	Tyrosinase inhibition activity (%)	
	1 mg/mL ²⁾	10 mg/mL
Control	7.45±0.32 ^{b3)4)}	54.31±1.07 ^c
BS	— ⁵⁾	55.62±1.10 ^c
CU	3.07±0.56 ^c	60.59±0.63 ^b
SC	—	61.30±1.50 ^b
LC	4.28±1.13 ^c	62.21±1.53 ^b
LP	10.71±1.13 ^a	65.96±1.82 ^a

¹⁾Abbreviations are the same as Table 2.

²⁾Sample concentration (solvent fractions from 95% methanol extract of *Sophorae fructus*).

³⁾Mean±SD (n=3).

⁴⁾Values with different letters (a-c) within the same column are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

⁵⁾Not detected.

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase는 멜라닌 생합성 과정의 key enzyme으로 melanocyte내의 melanosome에서 연속적인 산화 반응을 일으켜 멜라닌을 생성하는 것으로 알려져 있다(Wang 등, 2006). 따라서 tyrosinase 효소 활성을 저해하거나 중간체들의 산화 반응이 저해됨으로써 멜라닌 색소가 감소한다(Shin, 2001).

피각 발효군의 tyrosinase 저해 활성은 Table 8과 같다. 양성대조군인 kojic acid는 0.5 mg/mL의 농도에서 약 56.68%로 높은 저해율을 보였고 피각의 LP 발효군은 1 mg/mL 농도에서 10.71%로 발효물 중 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. 그다음으로 control 7.45%, LC 4.28%, CU 3.07%로 나타났으며 SC와 BS에서는 활성이 나타나지 않았다. LC와 CU 사이에서는 유의적인 차이가 없었다. 10 mg/mL 농도에서는 54.31~65.96%로 모든 시료군에서 tyrosinase 저해 활성이 나타났으며, LP 발효군에서 65.96%로 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. CU, SC, LC 발효군 사이에서는 유의적인 차이는 없었으며, 무발효군과 BS 발효군 사이에서도 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 본 실험 결과, 10 mg/mL 농도에서 모든 발효군은 무발효군보다 tyrosinase 저해 활성이 유의하게 증가하고 시료의 농도가 낮아질수록 저해 활성이 급격하게 떨어지는 것으로 나타났다.

Yang 등(2009)의 연구에서 *Melissa officinalis* 추출물과 발효 추출물의 경우 tyrosinase 저해 활성(IC₅₀)이 각각 365 및 122 µg/mL로 발효에 의해 tyrosinase 저해작용이 높아졌다고 보고하였다. Cha 등(2010)의 연구에서도 당귀 뿌리 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 18%로 매우 낮았으나 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii* 및 *Monascus purpureus* 균주로 발효시킨 발효 당귀에서는 각각 34~45% 증가한 것으로 나타났다고 보고하였다. 따라서 발효에 의해 tyrosinase 저해능이 증가하는 것으로 보이나 사용된 균주에 따라 그 활성 정도는 달라진다고 보인다.

Table 9. Elastase inhibition activity of fermented *Sophorae fructus* by various microorganism

Microorganism ¹⁾	Elastase inhibition activity (%) ²⁾
Control	8.99±0.63 ^{e3)4)}
BS	30.61±1.21 ^a
CU	22.93±1.43 ^b
SC	16.87±1.54 ^c
LC	14.44±0.17 ^d
LP	5.25±0.63 ^f

¹⁾Abbreviations are the same as Table 2.

²⁾Sample concentration is 1 mg/mL.

³⁾Mean±SD (n=3).

⁴⁾Values with different letters (a-f) within the same column are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Elastase 저해 활성

Elastase는 체내의 백혈구 과립 효소 중 하나로 elastin을 분해하는 역할을 한다. Elastase는 이상 조직에서 활성이 증가하여 조직과피의 직접적인 원인이 되어 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발하며, 진피 내 피부 탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastin의 분해에 영향을 준다(DeWitt 등, 1981). 따라서 elastase 저해제는 피부의 주름을 개선하는 효과가 있다.

피각 발효물의 elastase 저해 활성은 Table 9와 같다. 양성대조군인 ascorbic acid는 0.1 mg/mL의 농도에서 72.64%의 저해율을 나타냈다. 피각의 발효물 중에서는 BS가 30.61%로 가장 높은 활성을 나타냈으며, 그다음으로 CU(22.93%), SC(16.87%), LC(14.44%), control(8.99%) 및 LP(5.25%) 발효군이 유의적으로 높은 elastase 저해 활성을 나타내었다. 반면 tyrosinase 저해 활성이 가장 높았던 LP 발효군은 elastase 저해 활성이 가장 낮게 나타내었다.

Kang 등(2011)은 꾸지뽕 열매 분말에 대한 70% 에탄올 추출물, 40°C에서 *B. licheniformis*, *B. subtilis* 균주로 발효시킨 70% 에탄올 추출물의 elastase 저해 활성을 조사한 결과, 무발효군에 비해 발효군의 elastase 저해능이 각각 86.19% 및 77.60%로 활성이 크게 증가했다고 보고하였다. 이는 본 연구에서 LP 발효군 외의 발효군과 동일한 결과를 나타내었고, LP 발효군에서 활성이 감소한 것으로 볼 때 발효 균주에 따라 그 활성 정도가 달라지는 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서는 항산화 활성이 우수한 피각(회화나무 열매)을 유용 미생물로 발효 후 항산화 및 항균 활성을 분석하고, 효소 저해 활성을 측정하여 피각의 건강 기능성 및 화장품 등과 같은 산업원료 소재로서의 활용성을 확인하고자 하였다. 피각을 발효시킨 결과, 수율은 LP 발효군이 32%로 가장 높게 나타났으며, pH는 BS 균주를 이용한 발효군에서 4.95±0.02로 가장 높은 값을 보였고 CU가 3.94±0.01로

가장 낮게 나타났다. 피각 발효 후 미생물 생장에 의한 혼탁도 분석 결과, 1.41~2.82로 나타났으며 BS 발효균이 가장 높은 값을 나타내었다. 피각 발효균의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 총 페놀 함량은 CU를 이용한 발효물(17.84 ± 0.22 GAE mg/g)이 높은 함량을 나타냈고, 총 플라보노이드 함량은 무발효균(7.22 ± 0.05 CE mg/g), CU(7.14 ± 0.00 CE mg/g)가 높은 값을 나타내었다. 따라서 피각 발효 시 *C. utilis*로 발효한 경우 총 페놀 및 플라보노이드의 함량이 가장 높아지는 것으로 판단된다. 피각 발효물의 DPPH 라디칼을 측정한 결과 BS 발효균의 IC_{50} 값이 0.18 ± 0.01 mg/mL로 유의적으로 가장 높았다. ABTS 라디칼을 측정한 결과는 CU 발효균의 IC_{50} 값이 0.86 ± 0.00 mg/mL로 유의적으로 가장 높았다. 피각 발효물의 FRAP 측정 결과 CU의 FRAP 값(3.99 ± 0.01 mM)이 가장 높게 나타났다. 피각 발효물의 tyrosinase 저해 활성은 피각의 LP 발효균이 1 mg/mL 농도에서 10.71%로 발효균 중 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. Elastase 저해 활성은 BS 발효균이 30.61%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 피각 발효균의 항균 활성 측정 결과는 10 mg/disc의 농도에서 무발효균을 제외한 모든 발효균에서 *S. aureus*에 대해 항균력을 나타내었다. 이 중에서도 CU 발효균은 16.7 mm, BS 발효균은 15 mm의 가장 큰 생육 저해환을 나타내었다. 이상의 연구 결과를 종합해볼 때, 피각은 CU로 발효를 진행했을 경우 대체로 항산화 활성이 높았으나 화장품 재료로 사용할 경우에는 BS 발효균이 더 좋을 것으로 사료되며 이에 대한 연구는 좀 더 진행할 예정이다. 피각 및 발효피각은 높은 항산화 활성, 항균 활성 및 화장품 관련 효소 저해 활성을 가지고 있어 가공 식품의 첨가물, 건강 기능성 식품, 화장품 원료 등의 소재로서 산업적 활용성을 가질 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Alpen EL, Mandel HG. A rapid assay method for tritium in bacterial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1960. 43:317-321.
- Arano MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem*. 2001. 73:239-244.
- Bae DB, Kim KH, Yook HS. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of fermented *Gynura procumbens*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2019. 48:1214-1222.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966. 45:493-496.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996. 239:70-76.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958. 181:1199-1200.
- Bogin E, Abrams M. The effect of garlic extract on the activity of some enzymes. *Food Cosmet Toxicol*. 1976. 14:417-419.
- Cha JY, Kim HW, Heo JS, Ahn HY, Eom KE, Heo SJ, et al. Ingredients analysis and biological activity of fermented *Angelica gigas* Nakai by mold. *J Life Sci*. 2010. 20:1385-1393.
- Choi MH, Kim KH, Yook HS. Antioxidant activity of fermented *Kaempferia parviflora* and inhibitory action against tyrosinase and elastase. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2018. 47:1076-1084.
- Choi Y, Gu JB, Kim M, Lee J. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from thirty Korean medicinal plants. *Food Sci Biotechnol*. 2008. 17:1235-1239.
- Chung DK, Lee SI. Comparison of pharmacological effects of *Sophora* and *Sophora fructus*. *Oriental Medicine*. 1985. 10:5-18.
- DeWitt DL, Rollins TE, Day JS, Gauger JA, Smith WL. Orientation of the active site and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1981. 256:10375-10382.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang L. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol Plant Pathol*. 2002. 3:371-390.
- Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol*. 1999. 299:379-389.
- Flurkey WH. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J Food Sci*. 1991. 56:93-95.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem*. 1912. 12:239-243.
- Herrmann K, Nagel CW. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1989. 28:315-347.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005. 53:1841-1856.
- Huang YS, Ho SC. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chem*. 2010. 119:868-873.
- Jang TW, Park JH. Evaluation of whitening activities of flower and fruit of *Sophora japonica* L.. *Korean J Plant Res*. 2017. 30:22-28.
- Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, et al. Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsulated water extract from *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J Med Crop Sci*. 2009. 17:83-89.
- Jo KT, Sung SK. Cosmetic composition for skin whitening having *Kaempferia parviflora*. *Korean Patent* 101551240. 2015.
- Kang DH, Kim JW, Youn KS. Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J Food Preserv*. 2011. 18:236-243.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*. 2004. 36:333-338.
- Kim JH, Do EJ, Lee G. Investigation of anti-microbial activity of herbal medicines used as natural preservatives based on the analysis of papers and patents. *J Physiol Pathol Korean Med*. 2015. 29:101-113.
- Kim KH, Kim DM, Byun MW, Yun YS, Yook HS. Antioxidant activity of *Panax ginseng* flower-buds fermented with various microorganisms. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2013. 42:663-669.
- Kim KH, Yun YS, Chun SY, Yook HS. Antioxidant and antibacterial activities of grape pomace fermented by various microorganisms. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012. 41:1049-1056.

- Kim SJ, Kim SM, Kang SW, Um BH. The rapid detection of antioxidants from safflower seeds (*Carthamus tinctorius* L.) using hyphenated-HPLC techniques. Korean J Food Sci Technol. 2010. 42:414-419.
- Kim YM, Jeong HJ, Chung HS, Seong JH, Kim HS, Kim DS, et al. Anti-oxidative activity of the extracts from *Houttuynia cordata* Thunb. fermented by lactic acid bacteria. J Life Sci. 2016. 26:468-474.
- Kraunsoe JAE, Claridge TDW, Lowe G. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by hemologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Biochemistry. 1996. 35: 9090-9096.
- Lee SG, Kim HJ, Lee SP, Lee IS. Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009. 38:657-662.
- Lee SN. The antioxidant effect of rutin in human dermal fibroblasts damaged by reactive oxygen species. Asian J Beauty Cosmtol. 2014. 12:831-836.
- Maxson ED, Rooney LW. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. Cereal Chem. 1972. 49:719-729.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr. 2001. 74:418-425.
- Oh SL, Kim SS, Min BY, Chung DH. Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic acids and tannins in the extracts of *L. chinensis* M., *A. acutiloba* K., *S. chinensis* B. and *A. sessiliflorum* S.. Korean J Food Sci Technol. 1990. 22:76-81.
- Park JW, Lee YJ, Yoon S. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. Korean J Food Cult. 2007. 22:353-358.
- Seo YH. Antioxidant and antimicrobial activities of ginger with aging and fermentation. Korean J Food Preserv. 2017. 24: 1180-1187.
- Shin JY. Screening of natural products that have activities against skin-aging. Korean J Food Nutr. 2001. 14:568-572.
- Song HS, Jang HI. Study on the effects of the extracts from *Sophora japonica* L. flowers, fruits and branches on improvements in skin condition. J Soc Cosmet Sci Korea. 2016. 42:351-358.
- Vile GF, Tyrrell RM. UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblast is dependent on iron and singlet oxygen. Free Radic Biol Med. 1995. 18:721-730.
- Wang KH, Lin RD, Hsu FL, Huang YH, Chang HC, Huang CY, et al. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. J Ethnopharmacol. 2006. 106:353-359.
- Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E. Elafin: an elastase-specific in inhibitor of human skin. J Biol Chem. 1990. 265:14791-14795.
- Yang HJ, Kim EH, Park JO, Kim JE, Park SN. Antioxidative activity and component analysis of fermented *Melissa officinalis* extracts. J Soc Cosmet Scientists Korea. 2009. 35:47-55.
- Yoon HH, Chae KS, Son RH, Jung JH. Antioxidant activity and fermentation characteristics of blueberry wine using traditional yeast. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2015. 44:840-846.
- Yusof S, Ghazali HM, King GS. Naringin content in local citrus fruits. Food Chem. 1990. 37:113-121.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 1999. 64:555-559.