

Lactobacillus johnsonii IDCC 9203으로 발효한 울금의 소염 및 항알레르기 효과

김성범 · 강병화 · 권혁상 · 강재훈*
일동제약(주) 중앙연구소

Received : July 6, 2011 / Revised : August 24, 2011 / Accepted : August 29, 2011

Antiinflammatory and Antiallergic Activity of Fermented Turmeric by *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203. Kim, Seong-Beom, Byung-Hwa Kang, Hyuk-Sang Kwon, and Jae-Hoon Kang*. *ILDONG Research Laboratories, ILDONG Pharmaceutical Co., Ltd., Hwaseong 445-170, Korea* – Although turmeric has numerous pharmacological effects, the poor water-solubility of curcuminoids, active components of turmeric, restricts their systemic availability in orally administered formulations and limits their therapeutic potential. In this study we attempted turmeric fermentation using several probiotic bacteria to improve its solubility, and also investigated the effects of turmeric and fermented turmeric on anti-inflammatory activity. Fermented turmeric, by *L. johnsonii* IDCC 9203, more strongly inhibited LPS-induced expression of the pro-inflammatory cytokines than non-fermented turmeric and fermented turmeric by other probiotic strains. We used an NC/Nga mouse model for mite antigen-induced atopic dermatitis to examine the efficacy of the fermented turmeric. Fermented turmeric-fed mice exhibited a significantly reduced serum IgE level and mitigated acute inflammation. When the fermented turmeric was pre-treated by oral administration, it had more preventive activity against acute anaphylactic reaction than the non-fermented group. In addition, we observed that fermentation of turmeric leads to increased water-solubility of curcumin and a change in the active components ratios for bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin. Taken together, these results strongly suggest that fermented turmeric by *L. johnsonii* IDCC 9203 could be used as a functional food ingredient for improving treatments for atopic dermatitis.

Key words: Atopic dermatitis, fermented turmeric, immunoglobulin E, *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203, passive cutaneous anaphylaxis, water-soluble curcumin

서 론

최근 고도화된 산업화와 환경오염, 식생활의 서구화 등 많은 원인으로 인해 알레르기 질환이 점점 만연해가고 있다. 알레르기성 질환은 무해한 항원에 대해 면역계가 민감하게 반응하여 신체에 과량의 면역글로블린 E(Immunoglobulin E, IgE)를 생성시키고, 이에 따라 활성화된 비만세포(mast cell)로부터 히스타민(histamine) 같은 여러 매개 물질들이 유리되면서 염증세포를 침윤시키고 복합적인 반응을 유도하여 다양한 자가면역질환을 유발시킨다[2, 13, 17]. 히스타민 같은 매개 물질과 더불어 염증과 알레르기 증상을 유발시키는 중요한 인자로 프로스타글란딘(prostaglandin)과 류코트리엔(leukotrien)의 생합성을 매개하는 효소인 사이클로옥시제나제(Cyclooxygenase, COX) 등이 있다. 이들 중 COX-2는

프로스타글란딘을 생산함으로써 염증과 통증을 야기하여 염증성 질환 발병 및 종양의 생성에 관여한다[17]. 따라서 IgE에 매개되어 생성되는 히스타민 같은 물질의 유리를 방해하거나 COX-2를 억제하는 것은 알레르기나 과민반응에 의해 유도된 염증을 억제할 수 있는 훌륭한 수단이 된다[5]. 현재까지 이러한 알레르기성 질환의 증상을 완화시키는 약물로는 스테로이드, 항류코트리엔, 아드레날린 등 많은 약물들이 사용되고 있으나 이런 약물들은 대부분 인체 내 호르몬과 구조적으로 유사한 물질이기 때문에 과량의 약물 투여 시 부신의 기능을 약화시켜 면역력 감소, 구토, 설사, 저혈당, 빈혈, 심혈관계의 부작용을 초래할 수 있다[18]. 이러한 부작용을 줄이고 알레르기성 질환의 치료 및 예방 효과를 높이기 위해 최근 천연물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다[11, 22].

본 연구에서 사용한 울금(*Curcuma longa*)은 생강목 생강과에 속하는 다년생 속근성 초본식물로서 중국 남부와 인도, 오키나와를 비롯한 동남아시아 지역에서 자생, 재배되며 우

*Corresponding author

Tel: +82-31-371-2901, Fax: +82-31-371-2900

E-mail: jhkang@ildong.com

리나라 남부지역에서도 재배된다. 울금의 대표적인 유효성분으로 커큐민이 있으며 그 유도체로서 디메톡시커큐민, 비스디메톡시커큐민이 있다[1, 7, 18, 23]. 또한 정유성분으로 타메론, 시네올, 알파 크루크멘 등이 있으며 미네랄로는 칼슘, 칼륨, 철, 마그네슘, 인 등이 포함되어 있고 그 밖에 여러 가지 후라보노이드와 식물성 섬유가 많이 포함되어 있다. 울금의 약리 효과로는 살균, 해독, 항염, 간기능 개선, 항암, 항산화 효능 등이 알려져 있으며 맵고 뜨거운 성질이 있어서 혈액순환을 개선시키고 막힌 것을 잘 뚫는 특징을 가지고 있다[4]. 또한 특유의 진한 색과 쓴 맛을 가지고 있기 때문에 과거부터 천연 염색료로 사용되어 왔으며 한방에서도 약재로 이용되고 있다. 하지만 현재까지 나와있는 울금 관련 제품들은 대부분 울금 착즙액이나 울금 분말로 만든 환 그리고 울금에서 추출한 커큐민을 함유한 차와 음료가 대부분이다. 이러한 울금 착즙액이나 울금 분말은 특유의 쓴 맛과 향 때문에 복용이 불편한 단점이 있다. 또한 여러 유용한 기능을 가지는 커큐미노이드는 물에 잘 녹지 않으므로 생체이용률이 매우 떨어지고 이로 인해 다양한 제형 개발이 제한되고 있는 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 울금의 생리활성을 강화하고 동시에 기호성을 향상시키기 위한 연구로 바실러스 나토균(*Bacillus natto*)을 이용해 울금을 발효시킨 예가 있고, 황국균을 이용해 발효시켜 울금 특유의 쓴맛과 냄새를 제거함으로써 소비자의 음용 거부반응을 해소시킨 바도 있지만 커큐미노이드의 생체이용률과 생리활성에 대한 자료는 부족한 상황이다[8].

그러므로 본 연구에서는 유산균으로 울금을 발효하여 울금의 유효성분인 비스디메톡시커큐민과 디메톡시커큐민의 함량을 증가시키고 수용액상으로 커큐민의 추출율을 높여 생체이용률을 증가시킴으로써 다량의 외부 항원에 의해 유발될 수 있는 알레르기성 질환의 예방 및 치료 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 분석시료

실험에 사용한 울금 분말은 인도산 울금을 건조시켜 분쇄한 것으로 서울 제기동 소재의 산들약초에서 구입하였고, 5종의 프로바이오틱 유산균 *Bifidobacterium longum* IDCC 4101, *Lactobacillus gasseri* IDCC 9206, *Lactobacillus plantarum* IDCC 9205, *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201, *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203를 이용하여 발효를 진행하였다(IDCC, ILDONG Culture Collection). 각 유산균은 de Man-Rogosa-Sharpe(MRS, Difco) 배지를 이용하여 전배양과 중간배양을 실시한 뒤 울금 분말 5%, glucose (Samchun chemical) 1%, bacto peptone(Difco) 0.5%가 함유된 배지 40 mL에 5%(v/v) 접종하여 본배양을 진행하였다.

소염활성 측정에 사용한 시료의 제조는 다음과 같다. 배

양 종료 후 pH를 7.0으로 보정한 뒤 원심분리를 통해 상등액을 회수하였고 감압 농축기(EYELA, OSB-2100)를 이용해 상등액을 10배 농축하여 1차 분석 시료를 제조하였다. 2차 분석 시료를 제조하기 위해서 1차 분석 시료에 주정을 처리하여 침전물을 제거하였고, 상등액을 다시 회수해 감압 농축기로 시료를 농축하였다. 농축된 시료는 phosphate based saline(PBS, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KH_2PO_4 2 mM, KCl 2.7 mM)를 이용해 10배 농축액을 만들어 2차 분석 시료를 제조하였다. 대조군으로 사용한 시료는 울금 분말 5%, glucose 1%, bacto peptone 0.5%가 함유된 본배양 배지를 121°C에서 15분 동안 멸균하여 열수추출 하였고, 이를 원심분리하여 상등액을 회수한 후 위와 동일한 방법으로 감압농축 및 주정 침전을 실시하여 제조하였다.

세포배양

본 실험에서 이용한 Raw 264.7 세포주는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 0.2% gentamycin(25 mg/mL)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)을 사용하였으며, 37°C, 5% CO_2 incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. 세포주를 활성화 시키기 위해 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS(lipopolysaccharide, Sigma)를 처리하였으며 여러 가지 농도(62.5, 125, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 시료와 양성 대조군을 처리한 후 18시간 동안 배양하였다.

Western blot assay

염증반응에 직접적으로 관여하는 대표적인 단백질인 COX-2와 iNOS(Inducible nitric oxide synthase)의 발현에 미치는 발효 울금 배양액 및 원료의 효능을 평가하기 위해서 western blot assay를 실시하였다[14]. Raw 264.7 세포주는 6-well에 5×10^5 cell/mL로 분주한 뒤 하루 동안 배양했고, 염증반응을 유도하기 위해 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS(lipopolysaccharide, Sigma)를 처리하여 세포를 활성화시켰다. 배양액을 이용해서 제조한 1, 2차 분석시료는 20 μL 씩 처리하였고, 발효 및 비발효 울금 원료는 각각 62.5, 125, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 DMSO에 현탁하여 처리하였다. 18시간 배양 후 세포를 회수하여 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA)로 세포를 파쇄하였고 세포 파쇄액은 8% SDS-PAGE를 통해 전기영동한 후 PVDF membrane에 transfer하고 COX-2(Cell Signaling Technology), iNOS(Cell Signaling Technology) antibody로 immunoblotting하여 각각의 발현량을 비교 분석했다.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assay

울금 발효물의 소염활성 정도를 측정하기 위해 역전사 중합반응을 실시하였다. 세포의 준비 및 활성화는 western blot

assay에서의 동일하게 준비하였다. 양성 대조군으로는 8uM dexamethasone(Sigma)을 사용하였고 비발효 울금 시료와 함께 효능을 평가하였다. LPS로 활성화된 raw 264.7 세포주에 주정침전법을 이용해서 제조한 울금 2차 분석시료(20 µL/well)를 처리한 뒤 18시간 동안 배양하고 세포를 회수하였다. 그 후 TRIsure reagent(Bioline)로 각 세포의 total RNA를 회수한 뒤 oligo-dT primer(Promega)와 MMLV reverse transcriptase(Super-Bio)를 이용해서 역전사 반응을 진행하였다. PCR 분석에 사용한 각 cytokine의 primer는 다음과 같다. GAPDH(F: 5'-CAT-GAC-CAC-AGT-CCA-TGC-CAT-CAC-3', R: 5'-TGA-GGT-CCA-CCA-CCC-TGT-TGC-TGT-3'), TNF-α(F: 5'-GGC-AGG-TCT-ACT-TTG-GAG-TCA-TTG-3', R: 5'-ACA-TTC-GAG-GCT-CCA-GTC-AAT-TCG-G-3'), IL-6(F: 5'-AAT-GAT-GGA-TGC-TAC-CAA-AC-3', R: 5'-TAG-CCA-CTC-CTT-CTG-TGA-CT-3'). PCR반응은 94°C에서 2분간 pre-denaturation 후 GAPDH와 TNF-α는 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C에서 45초 반응을 진행시켰고 IL-6는 94°C에서 30초, 61°C에서 45초, 72°C에서 45초 반응시켜 총 25회 증폭시킨 다음 72°C에서 1분 동안 마지막 extension을 실시하였다. PCR 결과는 GelRed가 포함된 1.5% agarose gel에 전기영동한 뒤 확인하였다.

발효과정

울금 발효를 위해 유산균 *L. johnsonii* IDCC 9203을 사용하였다. 유산균 발효는 총 3단계 배양을 통해 진행되었다. 우선 MRS broth를 이용해서 전배양과 중간배양을 진행하였고 배양액에 포함되어 있는 유산균이 대수증식기에 이르렀을 때 본배양 배지에 접종하여 최종 발효하였다. 울금 본배양 배지는 유산균이 울금을 최대한 이용하도록 유도하기 위해 1% glucose와 0.5% Bacto peptone이 포함된 최소배지에 울금 분말을 3% 첨가하여 제조하였으며 배양액의 pH는 보정하지 않았다. 대수증식기에 이른 중간배양액을 본배양 배지가 들어있는 5 L jar fermentor에 5% 접종 후 50 rpm의 속도로 교반하면서 21시간 동안 배양하였다.

유산균을 이용한 발효 울금 원료의 제조

울금 발효 종료 후 배양액을 이용해서 발효 울금 원료를 제조하였다. 울금 배양액에서 유효성분만 따로 추출하여 보관 및 사용이 편리한 발효 울금 원료를 제조 후 실험에 사용하였다. 발효 울금 원료 제조공정은 Fig. 1과 같다. 대조군으로 사용한 비발효 울금은 울금 발효를 위한 본배양 배지를 열수추출 후 Fig. 1과 동일한 공정으로 제조하였다.

Mite extract로 유도된 아토피 피부염의 저해효과

발효 울금 원료의 아토피 피부염 저해 및 예방효과를 확인하기 위해서 NC/Nga 마우스(중양실험동물)를 이용해서 동물실험을 진행하였다. 5주령 자성 NC/Nga 마우스는 1주일

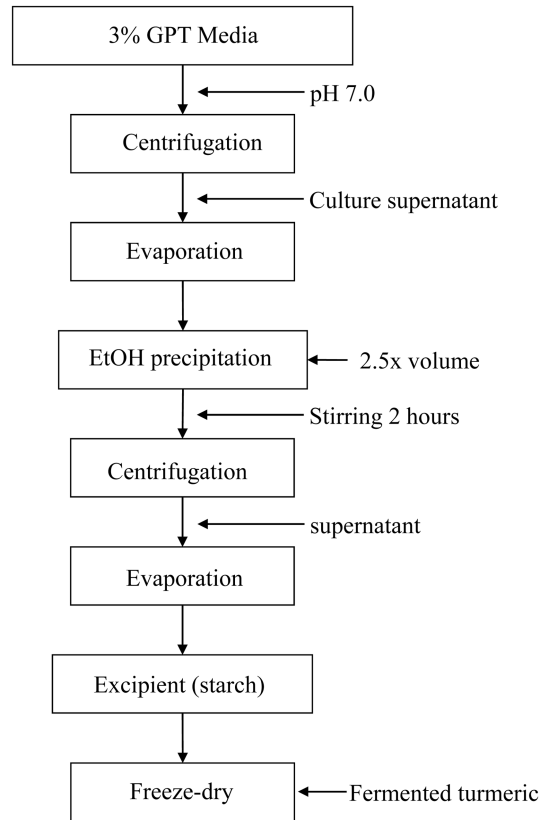


Fig. 1. Manufacturing process of fermented and non-fermented turmeric.

계류 후 각 시료를 1주일 동안 전투여하였다. 실험동물은 비유발균, PBS를 경구투여한 vehicle군, 5 mg/kg의 dexamethasone을 경구투여한 양성 대조군, 340 mg/kg의 발효 울금 원료를 경구투여한 시료 투여군으로 나누어 총 4개의 실험군을 설정하였다. 전투여가 종료된 후 5주 동안 주 5회 시료투여를 지속하면서 마리당 100 mg의 mite extract ointment (AD Biostir)로 아토피 피부염을 유발하였다. 아토피 피부염의 유발은 주 2회로 총 3주 동안 실시하였다. 전투여 기간을 포함해서 총 6주의 실험기간 중 8회에 걸쳐 증상을 기록했는데, 아토피 피부염 유발 전 최초 1회 증상을 기록하였고 4번째 유발 뒤부터 7회에 걸쳐 증상 변화를 기록하였다. 증상의 점수는 흥반/출혈, 건조/상처, 부종, 깃무름/찰과상, 태선화로 구분하여 각 평가항목에 0~3점의 점수를 부과하여 채점하였다[20, 21].

마우스의 혈청 내에 IgE 변화를 측정하기 위해 아토피 피부염 유발 종료 시점에서 안와채혈을 실시하였다. 회수한 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리하고 IgE ELISA kit(Shibayagi)를 이용해서 혈중 IgE의 농도를 정량 하였다.

즉각형 과민반응의 억제 및 예방효과

발효 울금 원료의 즉각형 과민반응에 대한 억제 및 예방효과를 확인하기 위해서 PCA(Passive cutaneous anaphylaxis)

모델을 확립하였다[3, 6, 15]. 실험을 위해 5주령 자성 ICR 마우스를 중앙실험동물로부터 구입하였고 1주일 동안 계류하였다. 실험동물은 PCA를 유발하지 않은 PCA 음성군, PBS를 경구투여한 vehicle군, 340 mg/kg의 발효 울금 원료를 경구투여한 대조 실험군, 340 mg/kg의 발효 울금 원료를 경구투여한 실험군 등 총 4군으로 구성하였다. 계류 후 2주일 동안 시료를 전투여했고, 전투여 종료일에 PCA를 유발시켰다. 유발 1일차에는 유발군 마우스의 양쪽 귀에 10 µg/mL의 anti-dinitrophenyl(DNP)-IgE를 20 µL씩 피내 투여하였고, 24시간 후 DNP-human serum albumin(HSA)과 1% evans blue를 동량으로 혼합한 항원용액 200 µL를 마우스의 정맥에 투여하여 PCA를 유발시켰다. 항원 투입 30분 후 마우스를 치사하여 귀를 적출하고, 1 N KOH를 이용해 적출한 귀 조직으로부터 evans blue를 침출시킨 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량은 evans blue 표준곡선을 이용하였다.

커큐민 및 유도체의 함량분석

발효 울금 원료에 함유된 커큐민과 그 유도체인 디메톡시커큐민, 비스디메톡시커큐민의 함량을 측정하기 위해 정량 분석을 실시하였다. 커큐민을 추출하기 위해서 발효 및 비발효 울금원료 2 g을 10 mL의 DW에 현탁한 후 2.5배의 ethyl acetate로 3회 추출하였다. 그 후 감압농축기로 ethyl acetate를 제거한 뒤 methanol에 1,000 ppm의 농도로 용해시켜 HPLC 분석을 진행하였다[10]. 분석기기는 Thermo Separation Product HPLC system을 사용하였으며 HPLC 조건으로 column은 ODS-H80(150×4.6 mm, 4 µm)를 사용하였고, 100% acetonitrile을 이동상으로 하여 1 mL/min 유속으로 분석하였다. 분석 시료는 10 µL를 injection하였고 UV 450 nm 파장에서 분석하였다. 정량에 사용한 커큐민 표준품은 Sigma에서 구입하였다.

통계처리

실험으로부터 얻은 모든 결과는 mean ± SEM으로 나타내었고 independent t-test를 이용하여 통계처리 한 후 $p < 0.05$ 이하에서 각 시료간의 유의적인 차이를 검증하였다.

결 과

유산균 선별

발효를 통해 울금 분말이 가지고 있는 소염활성을 가장 극대화시킬 수 있는 유산균주를 선별하기 위해 western blot assay를 실시하였다. pH 7.0으로 보정한 5종의 프로바이오틱 유산균 배양 상등액을 10배 농축하여 LPS로 활성화된 raw 264.7 세포주에 처리하였을 때 *B. longum*을 제외한 나머지 *Lactobacillus*속 균주들은 비발효 울금 시료를 처리한 control군에 비해 COX-2발현을 저해함을 확인하였다(Fig.

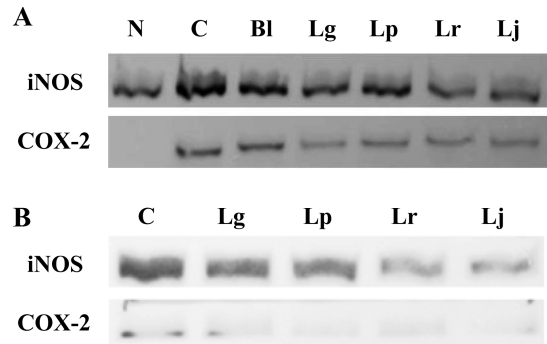


Fig. 2. Antiinflammatory effects of fermented turmeric by probiotic microbes. A, LPS stimulated-raw 264.7 cells were treated with turmeric fermented by probiotic strains for 18 hours. B, LPS-stimulated raw 264.7 cells were treated with ethanol extract of turmeric fermented by lactobacilli. N, not-treated; C, non-fermented turmeric; Bl, fermented turmeric by *B. longum* IDCC 4101; Lg, fermented turmeric by *L. gasseri* IDCC 9206; Lp, fermented turmeric by *L. plantarum* IDCC 9205; Lr, fermented turmeric by *L. rhamnosus* IDCC 3201; Lj, fermented turmeric by *L. johnsonii* IDCC 9203.

2A). 그 중 *L. johnsonii* IDCC 9203 균주로 배양한 시료에서 가장 높은 iNOS 및 COX-2 저해능을 확인하였다. 위 분석 결과에서 COX-2 저해능이 비교적 우수했던 4가지 배양액은 주정 침전법을 이용해서 2차 분석 시료를 제조하였고 2차 western blot assay를 진행하였다(Fig. 2B). 주정 침전법을 이용해서 제조한 모든 시료는 대조군과 비교하여 강한 COX-2 저해능을 보였으며 그 중에서 *L. johnsonii* IDCC 9203 배양액으로 제조한 시료는 iNOS 저해능도 높았다. 위 결과를 종합하면 *L. johnsonii* IDCC 9203을 이용한 울금 발효물의 소염활성이 가장 강하므로 이를 울금 발효를 위한 유산균주로 선정하였다.

발효 유산균주로 선정된 *L. johnsonii* IDCC 9203은 유아분변으로부터 분리된 유산간균으로써, 내산성 및 내담즙산성이 우수하고 *Salmonella paratyphi* A의 생육을 저해하며 인체에 유용한 folic acid를 생산하는 특징을 가진다[12]. 또한 장 정착능이 우수하여 유해세균의 증식을 억제하고 항생제 복용 후 불안정한 장내 균총을 정상화시키는 효과를 가지므로 프로바이오틱 균주로 발효유 등에 활용되고 있다.

울금 배양액의 소염활성

울금 배양액과 울금 열수추출물의 소염활성을 측정하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. LPS에 의해 활성화된 raw 264.7 세포주에 주정 침전법으로 제조한 발효 울금 시료와 비발효 시료를 각 20 µL씩 처리하여 18시간 동안 배양한 후 전염증성 cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 mRNA level을 측정하였다(Fig. 3A). Dexamethasone을 처리한 양성 대조군에서와 같이 발효 울금 시료를 처리했을 때 LPS에 의해 증가된 TNF- α 와 IL-6의 mRNA level이 감소되었다. 하지만 비발효

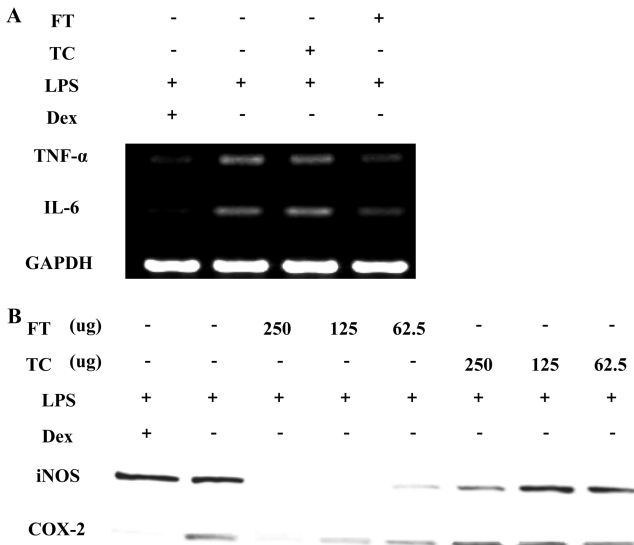


Fig. 3. Anti-inflammatory effects of fermented turmeric by *L. johnsonii* IDCC 9203. A, Effects of fermented turmeric on mRNA expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6). The mRNA level of TNF- α and IL-6 was detected by reverse-transcriptase PCR. GAPDH was included as a control. B, Effects of treatment with the indicated concentration of fermented turmeric on the expression of pro-inflammatory mediator in LPS-stimulated raw 264.7 cells. The expression level of COX-2 and iNOS was detected by western blot assay. FT, fermented turmeric; TC, non-fermented turmeric; LPS, lipopolysaccharide; Dex, dexamethasone.

울금 시료를 처리했을 때에는 두 cytokine의 발현 감소가 보이지 않았다.

발효 울금 원료와 비발효 울금 원료의 소염활성을 측정하기 위해서 western blot assay를 실시하였다. 두 원료는 DMSO에 현탁한 뒤 LPS를 이용해 활성화된 raw 264.7 세포주에 농도별로 처리하고 염증 매개인자인 COX-2와 iNOS의 발현양을 측정하여 발효 울금 원료의 소염활성을 평가하였다(Fig. 3B). 비발효 울금 원료 처리시에는 음성 대조군과 비슷한 수준으로 COX-2와 iNOS의 발현을 저해하지 못하였다. 반면 발효 울금 원료를 처리했을 때에는 농도 의존적인 COX-2와 iNOS의 발현양 감소를 확인하였다. COX-2의 발현 저해는 발효 울금 원료를 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리했을 때부터 활성화되는 것을 확인할 수 있었고 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리했을 때에는 COX-2, iNOS 모두를 강력하게 저해하였다.

앞선 결과들을 종합하면 울금 분말을 *L. johnsonii* IDCC 9203으로 발효함으로써 비발효 울금 원료에 비해 소염활성이 증가됨을 알 수 있었다.

발효 울금 원료의 아토피 피부염 저해효과

Mite extract 연고를 이용해서 아토피 피부염을 유발한 NC/Nga 마우스 모델에서 발효 울금 원료의 아토피 피부염

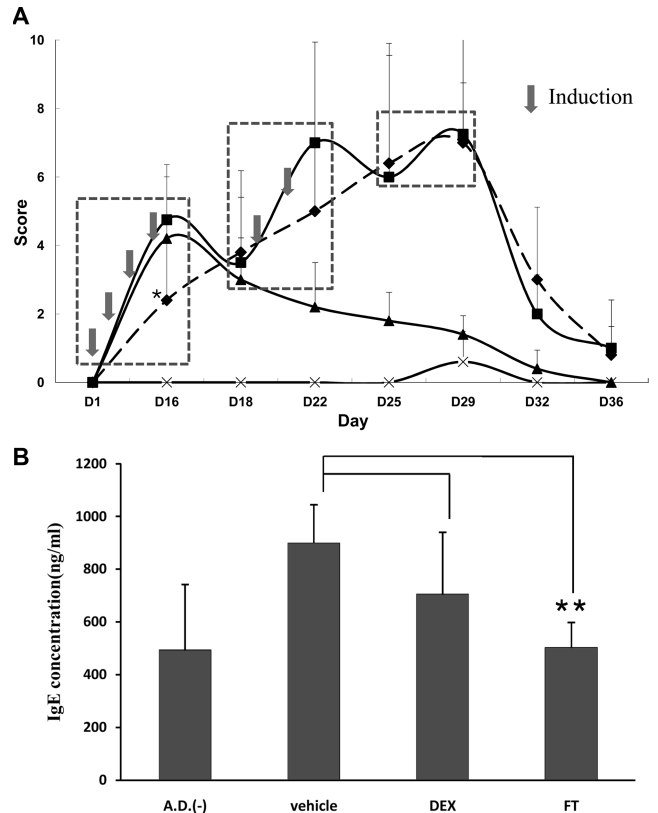


Fig. 4. Antiallergic effects of fermented turmeric on NC/Nga mice with atopic dermatitis. A, The severity of the skin lesion and scoring symptoms of the mouse status. Clinical skin index of dermatitis was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) for each of five signs and symptoms (erythema/hemorrhage, dryness, edema, excoriation/erosion and lichenification). -x-, non-induction group; -■-, vehicle(PBS-treated group); -▲-, dexamethasone(dexamethasone-treated group); -◆-, FT(Fermented turmeric-treated group). B, Effect of fermented turmeric on serum IgE level of mite extract-induced Nc/Nga mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia. Serum IgE were detected using IgE ELISA kit. A.D.(-), Atopic dermatitis negative group; vehicle, PBS-treated group; DEX, dexamethasone; FT, fermented turmeric-treated group. Each value represents the mean \pm SEM ($n=5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the vehicle group.

저해효과를 확인하였다. 전체 실험기간 중 총 8회에 걸쳐 아토피 피부염의 증상을 기록하였다(Fig. 4A). 실험결과 아토피 피부염 비유발군은 실험기간 중 아토피증상이 심화되지 않은 반면 mite extract를 처리하여 아토피 유발 후 PBS를 투여한 vehicle군은 4차, 6차 유발 종료 후 증상이 심하게 악화되다가 완화되었다. 발효 울금 원료를 경구투여한 실험군에서는 아토피 증상이 완만하게 증가되다가 29일째부터 증상이 호전되었으며 양성 대조군으로 사용한 dexamethasone 투여군은 4번의 유발이 끝날 때까지 증상이 악화되다가 16일째부터 증상이 호전되어 실험 종료시 비유발군과 동일한 수준으로 아토피 증상이 개선되었다. 발효 울금 원료 투여

군은 vehicle군과는 달리 증상의 기복이 발생하지 않았고 아토피 피부염의 초기 증상을 유의적으로 감소시켰다. 이는 발효 울금 원료 투여 시 다량의 외부 항원에 노출되어 발생하는 급성기 피부염을 효과적으로 예방하고 치료할 수 있는 가능성을 제공해준다.

아토피 유발 마우스의 혈청 내 IgE의 양을 비교하기 위해 아토피 피부염 유발 종로시점에서 혈액을 채취하여 혈중 IgE 농도를 분석하였다(Fig. 4B). 실험 결과 발효 울금 투여군에서는 mite extract에 의한 IgE의 증가를 비유발군 수준으로 유의적으로 감소시켰다. 이에 반해 양성 대조군인 dexamethasone 투여군은 발효 울금 투여군에 비해 IgE 증가 억제력이 떨어졌다. 이러한 결과는 울금 발효물의 투여가 급성기 피부염에서 급격하게 늘어나는 IgE를 감소시킴으로써 아토피 피부염의 초기억제에 탁월한 효능을 나타내기 때문일 것으로 생각된다. 반면 dexamethasone의 투여는 아토피 피부염 초기에 증가되는 IgE 감소 효과가 떨어지므로 Fig. 4A의 결과와 같이 초기 증상 개선에는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

발효 울금 원료의 급작형 과민반응 저해효과

단시간 내 과량의 항원에 노출될 경우 나타날 수 있는 급작형 과민반응에 대한 발효 울금 원료의 저해효과를 확인하기 위해 PCA assay를 실시하였다[3, 6, 15]. Anti-DNP IgE를 마우스의 양쪽 귀에 투여 후 미정맥을 통해 과량의 항원을 투여하여 급작형 과민반응을 유발함으로써 혈관 투과성을 증가시켰다. 항원으로 사용한 DNP-HSA과 evans blue 혼합물은 증가된 혈관 투과성으로 인해 조직으로 침투하여 조직에 존재하던 anti-DNP IgE와 결합함으로써 조직이 파란색을 띄게 되고 이를 정량함으로써 급작형 과민반응 정도를

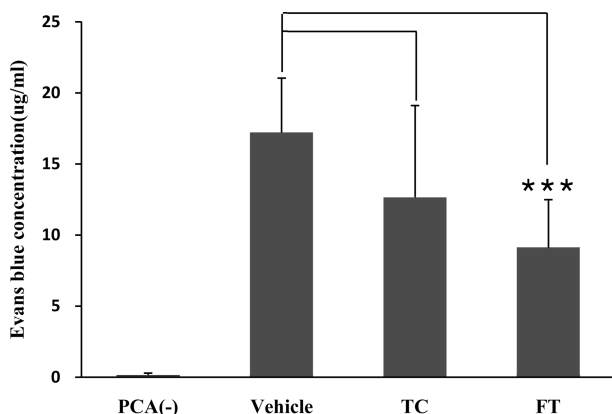


Fig. 5. Effect of fermented turmeric on the plasma extravasation induced by passive cutaneous anaphylaxis. PCA (-), vehicle (PBS), TC(non-fermented turmeric) and FT(fermented turmeric) was administered orally for 2 weeks before the intravenous injection of HSA. The dye was extracted from the ear and read at 620 nm using microplate reader. Each value represented the mean ± SEM (n=12). ***p<0.001 compared with the vehicle group.

확인하였다(Fig. 5). 발효 울금 원료 투여군에서는 유의적인 evans blue 농도 감소가 관찰된 반면 비발효 울금 원료 투여군에서는 유의적인 감소가 보이지 않았다. 따라서 발효 울금 원료는 비발효 울금 원료와 비교했을 때 외부로부터 유입된 다량의 항원에 대해 유발될 수 있는 즉각형 과민반응을 더 효과적으로 예방하고 치료할 것으로 예상된다.

발효 울금 원료의 유효성분 함량분석

울금의 대표적 유효성분 중 하나인 커큐민을 포함한 그 유도체(디메톡시커큐민, 비스디메톡시커큐민)의 함량과 성분 비율이 발효에 의해서 변화되는지를 확인하기 위하여 HPLC를 이용한 정량분석을 실시하였다. 이들 유도체들은 메톡시 그룹의 유무에 따라 커큐민과 구분되며 LC/MS 분석을 통해 커큐민의 유도체인 디메톡시커큐민과 비스디메톡시커큐민이 커큐민 peak 앞쪽에서 분리됨을 확인하였다(Data not shown). 울금 원료를 *L. johnsonii* IDCC 9203으로 발효하여 제조한 원료와 울금이 포함된 본배양 배지의 열수추출물을 이용해서 만든 동량의 비발효 원료로부터 ethyl acetate를 이용해서 유효성분을 추출한 뒤 HPLC를 이용한 정량분석 결과 비발효 울금에 비해 발효 울금 원료에 포함되어있는 커큐민 및 그 유도체의 함량이 증가하였다(Fig. 6A). 정량 분석 결과 발효 울금 원료 1 g에는 총 2777.4 µg의 커큐민이 포함되어 있고 발효 울금 원료 생산량은 28.02 g/L이므로, 배양액 1 L에 포함된 전체 커큐민은 77.8 mg이었다. 반면 비발효 울금 열수추출액 1 L에 포함된 전체 커큐민의 양은 30.7 mg이므로 발효 울금 원료의 커큐민 함량이 2.5배 높았다. 이러한 커큐민 함량의 증가는 *L. johnsonii* IDCC 9203으로 울금 발효시 지용성 커큐민이 수용성으로 전환되기 때문으로 예상된다. 이를 확인하기 위해 울금 배양액과 울금 열수추출물에서 수용성 커큐민의 함량을 측정하였다(Fig. 6B). 발효 울금 원료에서는 총 커큐민 중 30.4%에 해당하는 74.9 mg이 상등액 쪽으로 용출된 반면 비발효 울금 원료에서는 16.8%에 해당하는 31.2 mg의 커큐민만이 상등액으로 용출되었다. 결과적으로 유산균 발효에 의해 커큐민의 용해도가 증가되며 발효에 의해 증가된 수용성 커큐민은 기존 지용성 커큐민에 비해 생체 이용율이 뛰어나기 때문에 수용성 커큐민의 함량이 높은 발효 울금 원료는 다양한 염증성 cytokine의 발현을 저해함으로써 소염활성이 증가되고 동물실험에서 아토피 피부염의 초기 증상 완화 및 급작형 과민반응에 대한 저해효능도 높은 것으로 판단된다.

유산균을 이용한 울금 발효시 커큐민의 함량 증가와 더불어 커큐민 유도체의 성분비도 변화하였다. 울금을 *L. johnsonii* IDCC 9203으로 발효했을 때 전체 커큐미노이드 중 커큐민이 차지하는 비율은 유의적으로 줄어든 반면 디메톡시커큐민과 비스디메톡시커큐민의 함량은 상대적으로 증가하였다(Fig. 6C). 이는 발효에 의해 커큐민이 비스디메톡시커큐민과 디메톡시커큐민으로 전환되었음을 의미한다. 지금까지 알

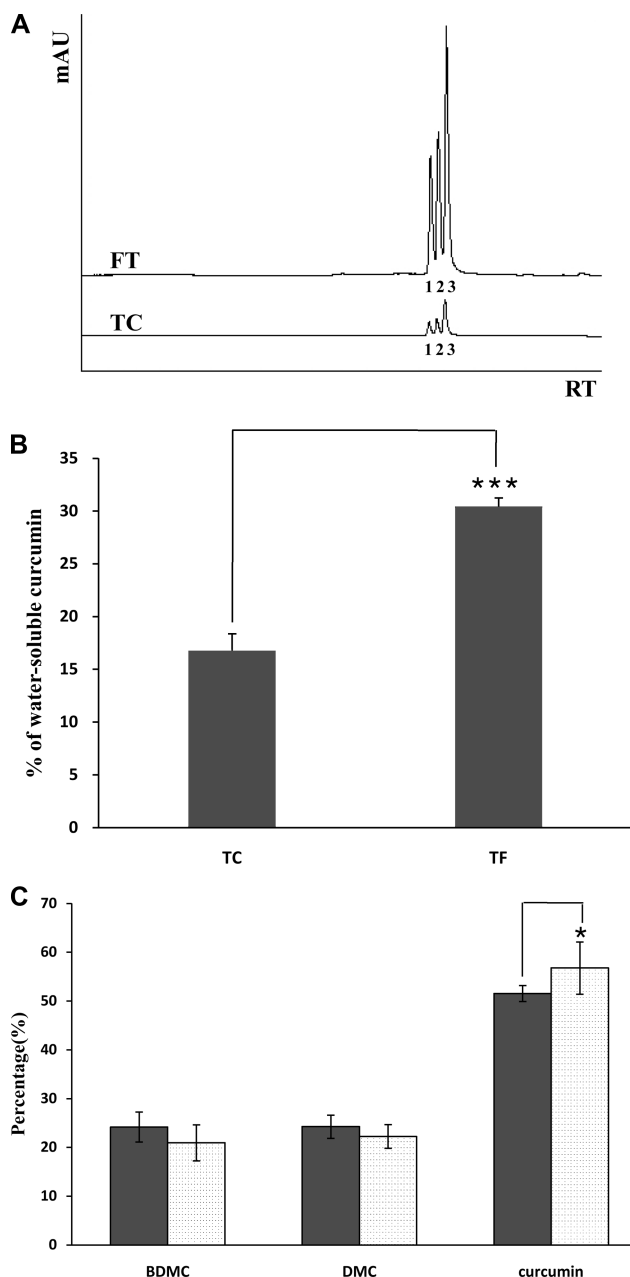


Fig. 6. Analysis of curcuminoids in fermented and non-fermented turmeric by HPLC. A, HPLC chromatogram of acetonitrile extract from FT and TC. Analytic conditions as given in text. Peak assignments: 1, bisdemethoxycurcumin; 2, demethoxycurcumin; 3, curcumin. B, Analysis of water-soluble curcumin content in fermented and non-fermented turmeric liquor. TC, non-fermented turmeric; FT, fermented turmeric. Each value represents the mean \pm SEM ($n=3$). *** $p<0.001$ compared with the TC group. C, The amount of curcuminoid contained in FT and TC. Filled bar, fermented turmeric; open bar, non-fermented turmeric. BDMC, bisdemethoxycurcumin; DMC, demethoxycurcumin. Each value represents the mean \pm SEM ($n=7$). * $p<0.05$ compared with the TC group.

려진 울금 관련 약리작용은 커큐민에 대한 내용이 대부분이었지만 최근에는 커큐민 이외의 커큐미노이드, 특히 비스디

메톡시커큐민의 약리작용에 대한 보고들이 많이 있다[7, 9, 23]. 따라서 유산균 발효에 의한 비스디메톡시커큐민과 디메톡시커큐민 비율의 증가는 매우 고무적이다.

위 결과들을 종합했을 때 *L. johnsonii* IDCC 9203을 이용해 발효한 울금 원료는 커큐미노이드의 성분비가 변화하고 수용성 커큐민의 함량 증가로 생체 이용율이 개선되어 동량의 비발효 울금 원료보다 더 뛰어난 약리효과를 발휘할 수 있으므로 염증반응으로 유발되는 여러 질환을 예방하고 치료하기 위한 목적으로 사용 가능하다고 판단된다.

요 약

인도산 울금 분말을 bifidobacteria와 lactobacilli를 포함한 프로바이오틱 유산균으로 발효한 시료들의 소염활성 정도를 세포 내 염증성 인자들의 발현양을 관찰함으로써 평가하였다. 그 중 *L. johnsonii* IDCC 9203으로 발효한 시료의 소염활성이 가장 뛰어났다. 이를 바탕으로 울금 분말을 포함한 본배양 배지에서 *L. johnsonii* IDCC 9203으로 21시간 동안 배양 후 얻은 상등액으로 발효 울금 원료를 제조하였고, 제조된 발효 울금 원료에 대한 소염활성 효능을 테스트하기 위해 LPS로 활성화된 raw 264.7 세포주에 처리하고 COX-2와 iNOS의 발현양을 확인하였다. 그 결과 발효 울금 원료 250 $\mu\text{g/mL}$ 까지 농도 의존적으로 COX-2와 iNOS의 발현을 감소시켰으며, 그 저해 효능은 동일 농도의 비발효 울금 원료보다 강하였다.

NC/Nga 아토피 피부염 동물모델과 PCA 동물모델에서 발효 울금 원료의 효능 확인 결과 대조군에 비해 아토피 피부염의 초기 증상 개선효과와 급작형 과민반응에 대한 예방효과가 뛰어남을 확인하였다. 발효 울금 원료의 유효성분 함량을 분석했을 때 커큐민의 함량은 비발효 울금 원료에 비해 2.5배 증가했으며, 수용성 커큐민의 함량 역시 증가하였다. 또한 비스디메톡시커큐민이나 디메톡시커큐민의 함량도 증가되었을 뿐 아니라 전체 커큐미노이드 중에서 이들 유도체의 비중이 높아짐을 확인하였다.

모든 결과들을 종합하면, 울금 분말을 *L. johnsonii* IDCC 9203을 이용하여 발효함으로써 유효성분인 커큐미노이드들의 성분비가 변화하고 수용성 커큐미노이드의 증가에 의한 생체 이용율 증가로 울금의 소염 및 항알레르기 활성이 증가된다. 본 연구를 통해 *L. johnsonii* IDCC 9203으로 발효한 울금 원료는 급성기 피부염에 대한 예방 및 치료 목적으로 사용 가능할 것으로 예상된다.

REFERENCES

1. Almeida, L. P., A. P. F. Cherubino, R. J. Alves, L. Dufosse', and M.B.A. Glo'ria. 2005. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demeth-

- oxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Res. Int.* **38**: 1039-1044.
2. Assanasen, P. and R. M. Naclerio. 2002. Antiallergic anti-inflammatory effects of H1-antihistamines in human. *Clin. Allergy Immunol.* **17**: 101-139.
 3. Bae, E. A., H. T. Trinh, Y. C. Lee, S. W. Kim, and D. H. Kim. 2008. Inhibitory effect of fermented red ginseng against passive cutaneous anaphylaxis reaction and scratching behaviors in mice. *J. Ginseng Res.* **32**: 33-38.
 4. Goel, A., A. B. Kunnumakkara, and B. B. Aggarwal. 2008. Curcumin as 'Curecumin': From kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol.* **75**: 787-809.
 5. Hay, C. H. and J.S. de Belleruche. 1998. Dexamethasone prevents the induction of COX-2 mRNA and prostaglandins in the lumbar spinal cord following intraplantar FCA in parallel with inhibition of oedema. *Neuropharmacology* **37**: 739-744.
 6. Inagaki, N., N. Nakamura, M. Nagao, K. Musoh, H. Kawasaki, and H. Nagai. 1999. Participation of histamine H and H receptors in passive cutaneous anaphylaxis-induced scratching behavior in ICR mice. *Eur. J. Pharmacol.* **367**: 361-371.
 7. Jayaprakasha, G. K., L. J. Rao, and K. K. Sakariah. 2006. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem.* **98**: 720-724.
 8. Kang, J. K., H. J. Kang, and H. Y. Lee. 2009. Effects of fermented turmeric (*Curcuma longa*) by *Bacillus natto* supplementation on liver function and serum lipid parameters in mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 430-435.
 9. Kim, A. N., W. K. Jeon, J. J. Lee, and B. C. Kim. 2010. Up-regulation of heme oxygenase-1 expression through CaMKII-ERK1/2-Nrf2 signaling mediates the anti-inflammatory effect of bisdemethoxycurcumin in LPS-stimulated macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 323-331.
 10. Kim, K. S., M. G. Choung, and S. H. Park. 2005. Quantitative determination and stability of curcuminoid pigments from turmeric (*Curcuma longa* L.) root. *Korean J. Crop. Sci.* **50**: 211-215.
 11. Lee, E. B., S. Y. Y. S. Y. Chung, S. A. Seung, H. M. Rhee, J. S. Yang, and T. M. Yoo. 1998. Studies on the antiinflammatory effects of natural products. *J. Appl. Pharmacol.* **6**: 269-275.
 12. Lee, S. H., H. S. Kwon, E. H. Yang, B. H. Kang, and T. Y. Kim. 2008. Isolation of *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203 from infant feces and its probiotic properties. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 121-127.
 13. Leung, D. Y. M. 2000. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**: 860-76.
 14. Mahattanadul, S., T. Nakamura, P. Panichayupakaranant, N. Phdoongsombut, K. Tungsinmunkong, and P. Bouking. 2009. Comparative antiulcer effect of bisdemethoxycurcumin and curcumin in a gastric ulcer model system. *Phytomedicine* **16**: 342-351.
 15. Matsuda, H., S. Tewtrakul, T. Morikawa, A. Nakamura, and M. Yoshikawa. 2004. Anti-allergic principles from Thai zedoary: structural requirements of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 5891-5898.
 16. Novak, N., T. Bieber, and D. Y. M. Leung. 2003. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**: 128-39.
 17. Oh, P. S., H. J. Lee, and K. T. Lim. 2009. Inhibitory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* bureau on histamine release and COX-2 activity in RBL-2H3 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**: 405-412.
 18. Portes, E., C. Gardrat, and A. Castellan. 2007. A comparative study on the antioxidant properties of tetrahydrocurcuminoids and curcuminoids. *Tetrahedron* **63**: 9092-9099.
 19. Schäcke, H., W. D. Döcke, and K. Asadullah. 2002. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.* **96**: 23-43.
 20. Sunada, Y., S. Nakamura, and C. Kamei. 2008. Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain L-55 on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mouse. *Int. Immunopharmacol.* **8**: 1761-1766.
 21. Sung, Y. Y., T. S. Yoon, J. Y. Jang, S. J. Park, G. H. Jeong, and H. K. Kim. 2011. Inhibitory effects of *Cinnamomum cassia* extract on atopic dermatitis-like skin lesions induced by mite antigen in NC/Nga mice. *J. Ethnopharmacol.* **133**: 621-628.
 22. Sur, B. J., B. B. Lee, M. J. Yeom, J. J. Han, H. D. Choi, y. J. Lee, S. J. Kim, S. H. Yoon, and D. H. Hahm. 2010. Inhibitory effect of phosphatidylserine on atopy-like dermatitis in NC/Nga mice. *Food Sci. Biotechnol.* **19**: 1513-1518.
 23. Yodkeeree, S., W. Chaiwangyen, S. Garbisa, and P. Limtrakul. 2009. Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. *J. Nutr. Biochem.* **20**: 87-95.