

유산균 발효를 통한 황금 추출물의 항염증 효과 증진

최우석·권희석*·노라환**·최근표***·이현용**†

강원대학교 생물의소재공학과, *한국코스모화장품, **서원대학교 식품공학과, ***강원도립대학 식품가공제과제빵과
(2013년 5월 10일 접수, 2013년 5월 31일 수정, 2013년 6월 26일 채택)

Enhancement of Anti-inflammatory Activities of Fermented *Scutellaria baicalensis* Extracts using *Lactobacillus rhamnosus*

Woo Seok Choi, Hee-Souk Kwon*, Ra Hwan No**, Geun Pyo Choi***, and Hyeon Yong Lee**†

Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

*Hankook Cosmo Cosmetics Co., Bucheon 421-808, Korea.

**Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea.

***Department of Food Processing and Bakery, Gangwon Provincial College, Gangneung 210-804, Korea.

(Received May 10, 2013; Revised May 31, 2013; Accepted June 26, 2013)

요약: 본 연구에서는 소염, 항염 작용이 뛰어난 작물로 알려진 황금을 유산균인 *Lactobacillus rhamnosus*를 이용해 발효를 통한 황금의 추출물에 대한 추출공정별 항염증 효과 증진을 측정하였다. 추출 공정으로는 일반 열수추출(WE), 일반 70% 에탄올 추출(EE), *L. rhamnosus* 발효 열수 추출(FWE), *L. rhamnosus* 발효 70% 에탄올 추출(FEE)로 나누어 진행하였다. 각각의 추출 공정별 수율 측정결과 발효 70% 에탄올 추출이 25.9%로 최대 수율을 얻었으며, 발효 열수 추출, 일반 70% 에탄올 추출, 일반 열수 추출 순으로 높은 수율을 얻었다. 추출 공정별 세포독성 측정에서 발효 황금 에탄올 추출물의 농도가 1.0 mg/mL일때 9.8%로 가장 낮은 세포 독성을 나타냈으며, 일반 에탄올 추출의 경우 22.6%로 가장 높은 세포 독성을 가졌다. Hyaluronidase 저해 효과는 발효 황금 에탄올 추출물의 농도가 1.0 mg/mL에서 최대 46.8%의 hyaluronidase 저해 활성을 보였으며, NO 생성량 및 PGE₂ 생성량 측정도 1.0 mg/mL 농도의 발효 황금 에탄올 추출물이 각각 36%의 최대 NO 생성량 감소 및 810 pg/mL의 낮은 PGE₂ 값을 나타냈다. 따라서 황금의 항염증 관련 효과를 위한 최적 추출 공정으로는 발효를 통한 황금의 70% 에탄올 추출 수율이 가장 높았으며, 이에 따라 항염증 관련 생리활성 물질이 보다 더 많이 용출됨을 확인할 수 있다.

Abstract: This study was performed to investigate the anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*. The extracts were WE (water extract at 100 °C for 24 h), EE (70% ethanol extract at 60 °C for 24 h), FWE (fermented and water extract at 60 °C for 24 h), FEE (fermented and 70% ethanol extract at 60 °C for 24 h). The cytotoxicity of the extracts was in the range of 11.2 ~ 15.6 % at 1.0 mg/mL concentration. The FEE showed the lowest activity at 1.0 mg/mL concentration. Compared to the WE, hyaluronidase inhibitory activity contents in the FEE increased to 9.2% at 1.0 mg/mL concentration. Nitric oxide production of WE, EE, FWE and FEE at 1.0 mg/mL concentration was measured as 7.6, 7.9, 6.9, 6.4 μM, respectively. PGE₂ secretion of the human fibroblast of the FEE were lower than 810 pg/mL. Our results suggested that the extracts from fermentation process after 70% ethanol extraction had relatively high anti-inflammatory activities and that the *Scutellaria baicalensis* could be more extracted in FEE than others.

Keywords: *Scutellaria baicalensis* GEORGE, *Lactobacillus rhamnosus*, anti-inflammatory activities, fermentation, extraction process

† 주 저자 (e-mail: hyeonl@seowon.ac.kr)

1. 서 론

염증반응은 외부 물리적·화학적 자극과 세균 등의 감염에 대한 생체 조직의 면역체계 반응의 하나이며, 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다[1]. 생체 내 조직 재생 기전에서 대식세포는 염증반응과 면역기능을 조절하는 매우 중요한 역할을 한다. 외부의 항원과 자극에 의해 활성화된 대식세포는 성장인자, 사이토카인, 프로스타글란딘 E₂ (prostaglandin E₂; PGE₂)와 lipid mediator 및 nitric oxide를 다량 분비하게 되는데[2], 이 중 PGE₂는 혈관의 확장 및 혈관 벽의 투과성을 높이고 염증부위로 면역세포들이 모이게 할 뿐만 아니라 interleukin-6과 같은 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시킨다. 또한 미생물이 침입하였을 때 대식세포는 침입한 미생물에 대해 독성 반응을 일으키는 ROI, hypochlorite, NO, myeloperoxidase, neutral protease 그리고 lysosomal hydroxylase 등을 미생물을 향해 방출하거나 생성하게 되는데, 이러한 분자들은 개체의 조직에도 직접적으로 손상을 주게 된다.

이러한 기존에 항염증 효과가 있다고 알려져 있는 천연물 중, 황금(*Scutellaria baicalensis* GEORGE)은 한국, 중국, 몽골 및 시베리아 동부에서 재배되고 있는 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 예로부터 소염, 해열, 충열, 설사, 위장염, 소대장염, 요도염으로 인한 출혈 뿐만 아니라 불면증, 천식 등에 치료약으로 쓰고 있으며 항염증 작용이 뛰어나 천식과 같은 항알러지 작용에 있어서 기존의 약품과 같은 작용기전을 갖고 있다고 알려져 있다[3-5]. 황금의 활성을 나타내는 주요성분으로는 baicalin, baicalein, wogonin 등의 flavonoid류이며, 이들 성분은 산화 메커니즘 내 활성산소 생성을 억제하는 항산화 작용과 더 나아가 활성산소의 생성을 차단함으로써 염증의 확산을 방지하는 항염증 작용 등이 보고되고 있다[6,7].

이러한 항산화 또는 항염증 효과를 나타내는 황금의 유용생리활성 물질을 수득하기 위해서는 일반적으로 천연물 추출에 사용되는 열수 추출, 에탄올 추출 및 초음파 추출을 통해서 활성 물질을 추출해야 한다. 황금 추출에 있어서 기존에 연구되어진 추출법은 열수 추출, 에탄올 추출 등의 단일 추출법이 연구되어 있다[8,9]. 하지만, 기존의 단일 추출법보다 2가지 추출공정이 결합된 병행 추출법은 높은 수율 및 생리활

성 물질의 증진 등의 효과를 나타낸다[10].

따라서 황금의 유용생리활성 성분을 추출하기 위해서는 천연물 병행 추출방법 중에서 유산균, 효모, 고초균 등 우리에게 유익한 미생물들의 대사작용을 이용한 천연물 발효공정이 효과적일 수 있으며, 발효공정은 천연물의 생리활성을 극대화시킬 수 있는 공정으로 많이 알려져 있다[11]. 발효공정은 최종 대사산물의 성분의 변환 혹은 천연물의 생리활성 효과를 극대화시킬 수 있고, 천연물과 미생물 상호 간의 상승효과에 의한 생리활성 효능이 증가될 수 있다[12]. 따라서, 발효공정에서 사용되는 유산균은 항산화 효능, 면역 증진 및 항암효과 등의 다양한 예방 효능을 가지고 있다고 보고되었으며[13,14] 발효공정과 에탄올 열수 추출의 병행 추출은 미생물에 의한 대사활동을 통해 기존의 천연물이 가지고 있는 유효성분 및 생리활성 물질의 수율을 극대화시킬 수 있으며, 새롭게 생성되는 물질을 기대할 수 있다.

따라서 본 실험에서는 소염, 위장염 등의 항염증 효과가 좋다고 알려진 황금 추출물을 유산균 *Lactobacillus rhamnosus*를 통해 기존의 황금 추출물이 갖고 있는 항염증 효과의 증진을 확인하고 항염 및 항장 소재로의 이용 가능성을 확인하기 위하여 실험을 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 황금은 대광약업사(Chunchen, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 구입된 황금은 분쇄기(HMF-1000A, HANIL ELECTRIC, Korea)를 통해 2 ~ 3 mm의 크기로 분쇄한 후 사용하였다. 황금 발효에 사용된 유산균의 배양 방법으로 55% 농도의 액상 MRS 배지(288130, DIFCO, USA)에 0.5%의 L-Cysteine hydrochloride (C1276, SIGMA, USA)를 첨가하여 배지를 제작하였으며, 오토클레이브(AC-14, JEIO TECH, Korea)를 이용하여 121 °C에서 멸균시켜 사용하였다. 상기의 방법으로 제작된 배지 1 L에 *Lactobacillus rhamnosus* (40069, Korean Culture Center of Microorganisms, Korea) 균주를 접종한 후, 37 °C의 배양 온도에서 50 ~ 60 rpm의 속도로 교반하여 24 h 동안 배양하여 사용하였다.

2.2. 발효 황금 제조 방법

발효 황금의 제조 방법은 1 L의 배양 배지에 100 g의 황금을 첨가한 후, *L. rhamnosus* 균주를 5% 접종하여 48 h 동안 발효하였다. 발효가 종료된 황금 발효물을 Whatman사의 20 ~ 25 μm 여과지를 사용하여 황금 발효액과 황금을 분리한 후, 분리된 황금에 증류수 또는 70% 에탄올 2 L를 가하여 24 h 동안 추출하였다. 증류수를 이용하였을 경우 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 추출하였으며, 70% 에탄올을 이용하였을 경우 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 추출하였다.

상기에서 얻어진 황금 발효액과 각각의 추출물들을 감압여과장치(Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Germany)로 여과하여 농축을 하였고, 동결건조를 한 후 분말로 제조하여 실험에 사용하였다.

2.3. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주로 human fibroblast CCD-986sk (KCLB 21947, Korean Cell Line Bank, Korea), RAW264.7 (KCLB 40071, Korean Cell Line Bank, Korea)을 사용하였으며, 세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640 (31800022, GIBCO, USA)을 사용하였고 그 밖의 세포배양에 필요한 시약으로 HEPES buffer (90909C, SIGMA, USA)와 fetal bovine serum (10437028, GIBCO, USA), gentamycin sulfate (G1914, SIGMA, USA), trypsin-EDTA (T6689, SIGMA, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포는 RPMI 1640 (31800022, GIBCO, USA) 배지 90%에 FBS를 10%로 적용시켜 배양하여 실험에 이용하였다.

2.4. 세포 독성 측정

세포 생존율을 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) 용액을 이용한 세포 독성 실험을 진행하였다. CCD-986sk 세포를 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well 농도로 접종한 후, 80% 정도의 배양시점에서 각 well에 시료를 투여하고 CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양하였다. MTT의 농도를 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 맞춘 용액을 각 well에 첨가하고 4 h 후 상층액을 제거하고, 10 μL 의 acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 microplate reader (Tecan, USA)로 565 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Hyaluronidase 억제 효과 측정

Hyaluronidase 억제 효과는 Rooster Comb.에서 형성된 N-acetylglucosamine양을 분광광도계로 측정하여 활성을 판단하였다. 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase (77,900 unit/mL) 50 μL 에 시료를 최종 농도 0.2, 0.6, 1.0 mg/mL가 되도록 하여 20 μL 씩 가하고, 효소의 활성화를 위해 12.5 mM의 CaCl₂ 200 μL 를 혼합한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 수욕 상에서 20 min 배양시켰다. 대조군은 DMSO 용액을 넣고 수욕 상에서 20 min 배양하였다. 활성화된 hyaluronidase 용액에 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid (12 mg / 5 mL) 250 μL 를 첨가하여 다시 수욕 상에서 40 min 배양하였다. 배양 후 0.4 NaOH 용액과 100 μL 와 0.4 M potassium tetraborate 100 μL 를 반응 혼합물에 첨가하여 끓는 수조에서 3 min 배양시킨 후 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 dimethyl aminobenzaldehyde 용액 (p-dimethyl amino-benzaldehyde 4 g, 100% acetic acid 350 mL, 및 10% HCl 50 mL 혼합액) 3.28 mL를 반응 혼합물에 첨가한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 수욕 상에서 20 min 배양하고 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 다음과 같이 계산하였다[15].

$$\text{Hyaluronidase Inhibition (\%)} = \left(\frac{\text{ODc} - \text{ODs}}{\text{ODc}} \right) \times 100$$

ODc : Optical density of control,

ODs : Optical density of samples

2.6. Nitric oxide 생성량 측정

RAW264.7 세포를 사용하여 Green 등의 방법을 변형하여 측정하였다[16]. 10% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin을 포함하는 RPMI 1640 (31800022, GIBCO, USA)에 1.0×10^6 cells/mL의 농도로 96-well에 분주하여 2 h 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 1 h 배양하고, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 24 h 동안 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 양성 대조군으로써 resveratrol을 사용하였으며, NO assay를 위하여 세포배양 시 생성된 NO의 양을 측정하였다. 세포배양 상층액 50 μL 를 취하여 Griess 시약 50 μL 와 5 min 반응 시킨 후, microplate reader (EMax Endpoint ELISA Microplate Reader, Sunnyvale, CA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때의 표준으로 NaNO₂를 사용하였다.

Table 1. Yield of *S. baicalensis* by Extraction Condition

Extraction yield (%)			
WE ¹⁾	EE ²⁾	FWE ³⁾	FEE ⁴⁾
18.5 ± 0.24 ^A	20.7 ± 0.84 ^B	24.8 ± 0.78 ^C	25.9 ± 0.65 ^D

¹⁾ WE : *S. baicalensis* water extract.

²⁾ EE : *S. baicalensis* 70% ethanol extract.

³⁾ FWE : Fermented and *S. baicalensis* water extract.

⁴⁾ FEE : Fermented and *S. baicalensis* 70% ethanol extract.

* Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$.

2.7. PGE₂ 측정

PGE₂ 측정은 Assay Design의 Correlate-EIATM Prostaglandin E₂ (PGE₂) kit를 사용하였다. 96-well plate에 5.0×10^5 cells/mL로 macrophage를 24 h 배양한 후 일정 농도의 시료를 처리하여 4 h 반응시키고 LPS 1 µg/mL을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂에서 18 h 배양하였다. 이로부터 얻은 media를 EIA kit의 시료로 사용하여 PGE₂의 양을 측정하였다.

2.8. 통계처리

데이터의 통계처리는 모두 3회 반복으로 행해졌으며, 실험값의 통계는 SAS (Statistical Analysis System) 프로그램을 사용하여 평균을 구하였으며, 각 처리구간의 최소유의차($p < 0.05$) 수준에서 통계처리 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 황금의 추출 공정별 수율 측정

각 가공 공정별 추출물의 수율은 Table 1과 같다. 각각의 추출공정은 미 발효시킨 황금을 이용한 열수 추출 및 70% 에탄올 추출과 *Lactobacillus rhamnosus*를 통해 발효시킨 황금을 이용한 열수 추출 및 70% 에탄올 추출물을 동결건조 후 파우더화 하여 무게를 잰 후 수율을 측정하였다. 상기의 방법이 적용된 황금의 가공 공정별 수율은 발효의 유무에 따라 약 1.3 배 차이를 나타내었으며, 발효하지 않은 황금의 열수 추출물과 에탄올의 경우 각각 18.5%, 20.7%의 수율을 나타내었다. 특히, 발효공정을 추가한 황금의 열수 추출물과 에탄올 추출물은 각각 24.8%, 25.9%의 추출 수율을 나타내었다. 이는 유산균 발효를 통한 황금의 1차적인 세포 외부조직에 의한 파괴, 2차적인 황금의 에탄올

추출법에 의한 활성물질 추출로 기존의 단일 추출방법으로 용출이 어려웠던 성분의 용출도 가능해졌다고 사료된다.

위 결과로 보아, 황금에 함유되어 있는 유용 활성물질은 단일 추출법에 의한 추출공정보다 유산균 발효 후 에탄올을 용매로 사용한 병행 추출공정이 더 많은 성분 및 물질이 용출되는 것으로 확인되며, 이는 유산균의 발효를 통한 세포 외부조직 파괴와 더불어 황금의 주성분인 baicalein이 에탄올에 더 잘 용해가 되기 때문인 것으로 사료된다[17]. 또한, 유산균 *L. rhamnosus*에 의한 발효는 기존에 일반 추출에서는 용출되지 않았던 생리활성 물질 및 유효 성분 등이 추출되었고, 병행추출에 의한 추출이 열수 및 에탄올 단일 추출보다 높은 수율을 나타내는 것으로 사료된다[10].

3.2. 세포 독성 측정

추출 용매별 발효 전 후의 황금 추출물이 인간섬유아세포에 미치는 독성을 평가하였다. 실험에 사용된 샘플들은 추출 조건별로 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/mL의 농도로 처리하여 독성을 측정하였고, 각 실험군별 세포독성 수치를 Figure 1에 나타내었다.

모든 실험군에서 농도 의존적으로 세포 독성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 황금 에탄올 추출물 처리군의 세포독성도가 15.6%로 가장 높았다. 발효 황금 추출물의 경우에는 추출용매에 따른 두드러진 차이는 확인되지 않았으나, 발효 황금 열수 추출물이 1.0 mg/mL의 농도에서 11.9%, 발효 황금 에탄올 추출물이 11.2%의 세포 독성을 나타내어 발효 황금 에탄올 추출물이 미미하게나마 더 낮은 세포 독성을 나타내었다. 또한, 발효 황금의 열수 및 에탄올 추출물은 고로쇠 목부 추출물 1.0 mg/mL의 세포 독성인 21.64%보다 낮은

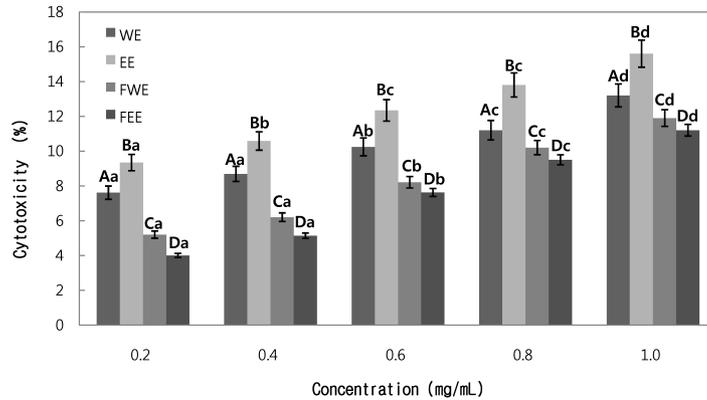


Figure 1. Cytotoxicity of the *S. baicalensis* by various extraction process.

* Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown.

Mean with difference letter (A-D) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

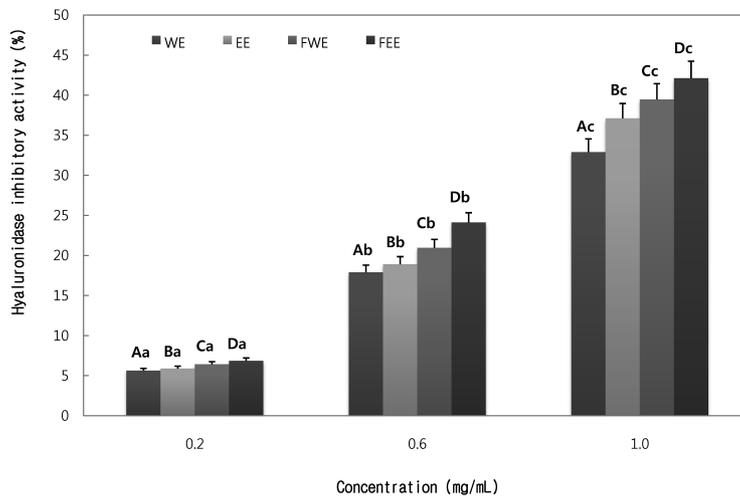


Figure 2. Hyaluronidase inhibitory activity of the *S. baicalensis* by various extraction process.

* Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

값이며[18], 불가사리펩타이드 나노입자 1.0 mg/mL의 세포 독성인 13.28%보다 낮은 값을 나타내고 있다 [19]. 이러한 결과는 발효 황금 추출물의 낮은 세포 독성을 확인할 수 있으며, 이는 유산균 *L. rhamnosus*를 이용하여 발효가 진행되는 도중에 유산균과 황금이 상호 대사과정을 거침으로써 세포에 독성을 나타낼 수 있는 유효물질을 분해시켜 일반 추출물보다 낮은 세포독성을 갖는 것으로 사료된다[11,12].

3.3. Hyaluronidase 억제효과 측정

발효 황금의 항염증 활성 증진을 확인하기 위하여 hyaluronidase 저해 활성도를 측정하였다. Hyaluronidase는 피부 보습 및 탄력 유지에 기여하는 hyaluronic acid의 분해효소로 피부면역 저해인자로 알려져 있다. 따라서 hyaluronidase의 효과적인 제어를 통해 피부 면역 증진 효과를 얻을 수 있다. 따라서 황금의 추출 공정별 hyaluronidase 저해 효능을 측정된 결과를 Figure 2에 나타내었다.

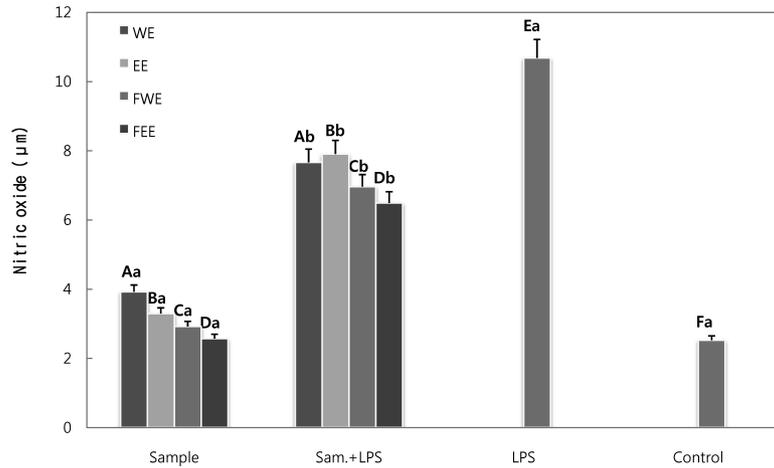


Figure 3. Stimulation of nitric oxide production on the macrophage, J774.1, through the addition of 1.0 mg/mL of the *S. baicalensis* by various extraction process.

* Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-F) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-b) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

추출 용매별 발효 전 후의 황금 추출물을 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL의 농도로 처리하였으며, 모든 샘플과 모든 농도에서 농도의존적인 hyaluronidase 저해활성을 나타내었다. 발효 황금 에탄올 추출물이 42.1%의 가장 높은 hyaluronidase 저해활성을 나타내었으며, 발효 황금 열수 추출물, 황금 에탄올 추출물 및 황금 열수 추출물의 순으로 각각 39.4%, 37.1%, 32.8%의 저해활성을 나타내었다. 위 결과는 숙지황 40% 에탄올 추출물 200 μ g/mL의 hyaluronidase 저해활성이 약 5% 미만인 것을 감안하면 발효 황금 에탄올 추출물의 hyaluronidase 저해활성이 월등하게 높은 것을 알 수 있다[20]. 또한 황금의 일반 열수 추출물의 경우 모든 농도에서 가장 낮은 hyaluronidase 저해활성을 나타내었는데, 이는 황금에 함유되어 있는 항염 활성 물질은 물을 용매로 추출하였을 경우보다 에탄올을 용매로 추출하였을 때 항염 활성 물질의 용출이 잘 일어나 피부 면역 활성의 지표로 판단되는 hyaluronidase 저해활성이 높게 나타나는 것으로 사료된다. 또한 유산균 자체의 면역 증진 효과 및 예방 효과에 의한 복합작용으로 *Lactobacillus rhamnosus* 발효 황금 에탄올 추출물이 기타 다른 공정을 거친 황금 추출물보다 hyaluronidase 저해활성이 높게 나타나는 것으로 사료된다.

3.4. Macrophage를 이용한 nitric oxide (NO) 생성량 측정

대식 세포를 이용한 NO 생성능을 통해 염증 억제 작용을 확인할 수 있으며, 대식 세포의 NOS (nitric oxide synthase)는 항상 존재하는 것이 아니라, TNF- γ , TNF- α 와 같은 여러 가지 cytokine이나 LPS (*E. coli* 유래 lipopolysaccharide) 등 세균 내 독소의 영향을 받아 NOS 유전자가 발현 유도됨으로써 나타나기 때문에 이를 확인하고자 황금 추출물과 LPS를 단독 및 병합 투여함으로써 NO의 생성능을 확인하였다.

이러한 NO의 생성능을 확인한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 황금 열수 추출물, 에탄올 추출물, 발효 열수 추출물 및 발효 에탄올 추출물 시료를 단독 투여한 경우 양성대조군인 resveratrol과 비교하여 위의 샘플 모두 큰 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있다. LPS 단독 처리군은 10.68 μ M의 nitric oxide 생성량을 나타내었으며, LPS와 일반 열수 추출물 샘플 처리군은 7.90 μ M의 가장 높은 nitric oxide 생성량을 나타내었고, LPS와 발효 황금 에탄올 추출물 샘플 처리군의 경우 6.49 μ M로 LPS 처리군 중에서 가장 낮은 NO 생성량을 나타내었다. LPS를 처리하지 않은 샘플 투여군과 LPS 단독 처리군의 nitric oxide 생성량을 비교했을 때 생성된 10.68 μ M의 nitric oxide를 발효 황금 에탄올 추출물이 6.49 μ M까지 떨어뜨림으로써, 최대 36% nitric oxide 생성 대비 감소 효과를 갖음을 확인

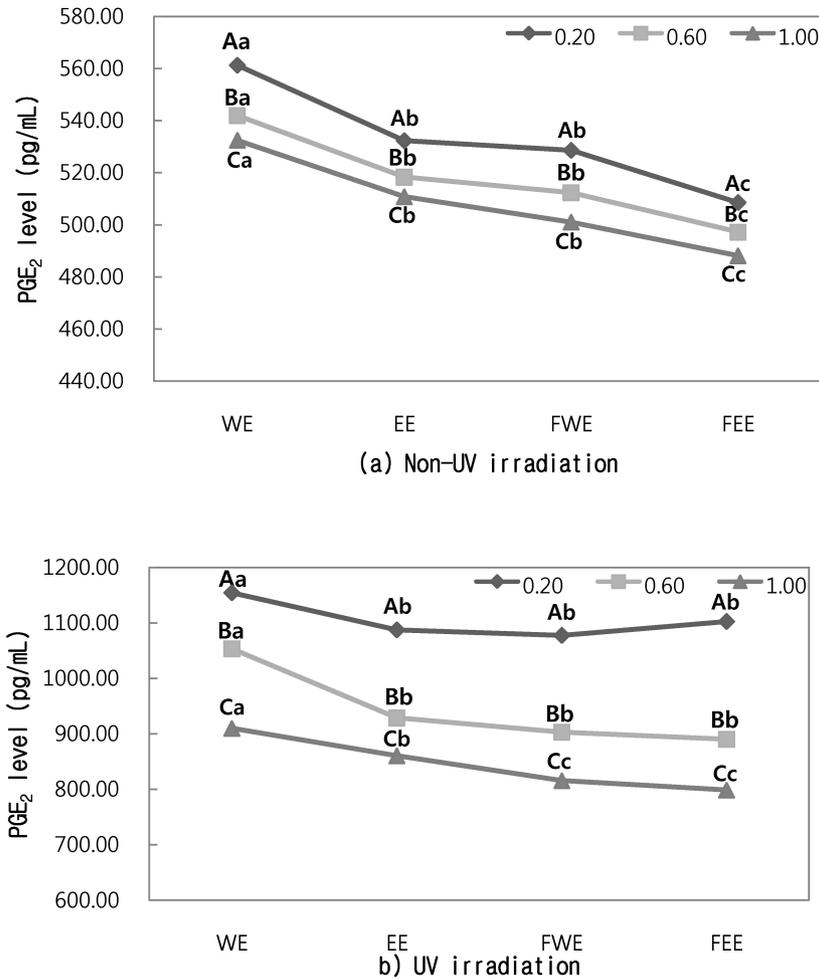


Figure 4. Effects of *S. baicalensis* extraction on the PGE₂ secretion of the human fibroblast, CCD-986sk, by non-UV irradiation and UV irradiation.

* Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

할 수 있다. 이에 따라 발효 및 에탄올 추출을 거친 황금의 항염증 활성 물질은 에탄올 추출에 의해 추출됨을 확인할 수 있으며, 유산균 발효를 통한 유산균과 천연물의 상호 대사과정이 항염증 활성 성분을 증진시킨 것으로 사료된다.

3.5. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성량 측정

황금 추출물이 피부 면역에 미치는 효능을 찾기 위해 UV를 이용하여 인간 fibroblast인 CCD-986sk를 자극함으로써 PGE₂ 생성량을 측정된 결과를 Figure 4에 나타내었다. Figure 4(a)는 UV를 조사하지 않은 세포

에서의 PGE₂ 발현 정도를 나타낸 것으로, 시료 무첨가 대조군의 경우 788 pg/mL을 나타내었다. 그러나 본 실험에서 처리한 황금 열수 추출물, 황금 에탄올 추출물, 발효 황금 열수 추출물 및 발효 황금 에탄올 추출물의 경우 대조군에 비해 낮은 PGE₂ 발현을 나타내었으며, 발효 황금 에탄올 추출물의 경우 1.0 mg/mL에서 392 pg/mL로 가장 낮은 PGE₂ 생성량을 나타내었다. Figure 4(b)는 UV를 조사한 경우 PGE₂ 생성량을 나타낸 것으로 시료 무첨가 대조군은 2,105 pg/mL을 나타내었고, Figure 4(a)와 같은 패턴을 보였다. 발효 황금 에탄올 추출물의 경우 최대 농도 1.0 mg/mL에서 810

pg/mL으로 가장 낮은 PGE₂ 값을 나타내었으며 대조군의 자외선 조사 시 세포에서 생합성 되는 PGE₂의 양이 자외선 영향이 없는 군에 비해 약 2.5 배 이상 증가하는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 UV로 인한 IL-1과 TNF와 같은 cytokine이 분비되는 것을 특정 펩타이드가 저해하였을 가능성과 차후 PLA₂ 활성을 직접 저해하였을 가능성, 또는 직접적 염증 물질인 arachidonic acid가 phospholipid에서 분비되는 최종 과정을 막았을 것이라고 사료된다.

본 실험 결과에 앞서 황금 내 주요 성분인 baicalein, baicalin 등을 추출하여 항염증 효과가 있음을 확인할 수 있었고, 유산균 발효 및 에탄올 추출의 병행 공정을 통한 황금 추출물은 기존 단일의 일반 열수 추출 공정을 거친 황금보다 최대 7.4% 이상의 추출 수율의 증진을 확인할 수 있었으며, 인간 피부 섬유아세포에 대한 공정별 황금 추출물의 독성을 판단한 결과, *L. rhamnosus*를 이용한 발효 황금 에탄올 추출물 1.0 mg/mL에서의 가장 낮은 세포 독성 9.8%를 확인할 수 있었다. 또한 항염증 효과를 판단할 수 있는 hyaluronidase 저해 활성 측정에서는 발효 황금 에탄올 추출물이 최대 46.8%의 hyaluronidase 저해 활성을 가졌으며, 대식세포를 활용한 NO 생성량 측정과 피부면역과 연관된 Prostaglandin E₂ 억제 활성 측정은 각각 최대 36% 감소, 810 pg/mL의 낮은 측정값을 나타냄을 확인할 수 있다.

위의 실험결과를 바탕으로 황금이 가지고 있는 baicalein, baicalin 등의 성분이 활성산소의 생성을 차단하여 염증 생성 및 확산을 방지한다는 기존의 연구의 결과를 확인할 수 있었으며, 더 나아가 유산균 *L. rhamnosus*를 이용한 발효 황금 에탄올 추출물이 황금의 열수 추출물보다 황금 내 baicalein, baicalin 등의 소염·항염 효과를 유산균과의 상호 상승효과에 의한 생리활성 효능이 증가될 수 있으며, 유산균 자체에 함유한 면역 증진 및 예방효과에 의해 기존의 공정보다 항염증 효과가 증진됨을 확인할 수 있었다[6,7].

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : A103017).

Reference

1. R. Zamora, Y. Vodovtz, and T. R. Billiar, Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases, *Mol. Med.*, **6**, 347 (2000).
2. C. A. Janeway Jr., Approaching the asymptote? evolution and revolution in immunology, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, **54**, 1 (1989).
3. M. Broncel, Antiatherosclerotic properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis georgi*, *Wiad. Lek.*, **60**, 294 (2007).
4. B. P. Burnett, Q. Jia, Y. Zhao, and R. M. Levy, A medicinal extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation, *J. Med. Food*, **10**, 442 (2007).
5. W. Z. Song, Studies on the resource of the chinese herb *Scutellaria baicalensis georgi*, *Acta. Pharm. Sin.*, **16**, 139 (1981).
6. H. J. Yoon and Y. S. Park, Effects of *scutellaria baicalensis* water extract on lipid metabolism and antioxidant defense system in rats fed high fat diet, *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, **39**(2), 219 (2010).
7. Y. C. Shen, W. F. Chiou, Y. C. Chou, and C. F. Chen, Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes, *Eur. J. Pharmacol.*, **465**, 171 (2003).
8. E. N. Kim, J. Y. Paek, Y. H. Kim, and M. D. Han, Antibacterial activities of a aqueous extract form *scutellaria baicalensis* against pathogenic bacteria, *Journal of Natural Sciences of Soonchunhyang University*, **14**(1), 11 (2008).
9. S. H. Hwang and C. H. Park, Preservation of cosmetics by ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE, *Korean Journal of biotechnology and bio-engineering*, **24**, 347 (2009).
10. J. H. Park, H. S. Lee, H. C. Mun, D. H. Kim, N. S. Seong, H. G. Jung, J. K. Bang, and H. Y. Lee, Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *ephedra sinica* staph and *fubus coreanus* Miq, *Korean Journal of Biotech-*

- nology and Bioengineering*, **19**(2), 113 (2004).
11. B. M. Kong, M. J. Park, J. W. Min, H. B. Kim, S. H. Kim, S. Y. Kim, and D. C. Yang, Physico-chemical characteristics of white, fermented and red ginseng extracts, *J. Ginseng Res.*, **32**, 238 (2008).
 12. B. S. Jeon, J. W. Park, B. K. Kim, H. K. Kim, T. S. Jung, J. R. Hahm, D. R. Kim, Y. S. Cho, and J. Y. Cha, Fermented mushroom milk supplemented dietary fiber prevents the onset of obesity and hypertriglyceridemia in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, *Diabetes Obes. Metab.*, **7**, 709 (2005).
 13. H. S. Kim and J. S. Ham, Antioxidative ability of lactic acid bacteria, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **23**(2), 186 (2003).
 14. K. M. Sekine, T. Yoida, M. Saito, M. Kuboyama, T. kawashima, and Y. Hashimoto, A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice, *Cancer Res.*, **4**, 1300 (1985).
 15. J. M. Park, J. Y. Lee, T. S. Park, S. J. Hyun, H. H. Kim, Y. J. Cho, O. J. Kwon, A. R. Son, D. S. Kim, and B. J. An, A study on the cosmeceutical activities of *Prunus sargentii* R., *Journal of the Korean society for Applied Biological Chemistry*, **51**, 70 (2008).
 16. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, **126**(1), 131 (1982).
 17. H. Y. Kwak, D. H. Kim, H. Y. Lee, and N. I. Baek, A Large scale isolation of flavonoids from the roots of *scutellaria baicalensis*, *Institute of Life Sciences & Resources*, **26**, 47 (2007).
 18. M. H. Jung, S. S. Kim, J. S. Kim, H. J. Lee, G. P. Choi, and H. Y. Lee, Skin whitening and skin immune activities of different parts of acer mono and acer okamotoanum, *Journal of Korean Forest Society*, **99**(4), 470 (2010).
 19. H. S. Jung, S. H. Oh, S. S. Kim, M. H. Jung, W. Y. Choi, Y. C. Seo, G. P. Choi, J. C. Kim, and H. Y. Lee, Enhancement of immune activities of peptides from *asterias amurensis* using a nano-encapsulation process, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **42**(4), 424 (2010).
 20. Y. J. Cho, Characterization of biological activities of *rehmannia glutinosa* extracts, *Journal of Life Science*, **22**(7), 943 (2012).