

황련해독탕 발효물의 항산화, 항주름 및 미백 효과

엄지나[†] · 민진우 · 주광식 · 강희철

(주)지에프씨

(2017년 3월 15일 접수, 2017년 3월 28일 수정, 2017년 3월 29일 채택)

Antioxidant, Anti-wrinkle and Whitening Effect of Fermented Extracts of Hwangryunhaedoktang

Ji Na Um[†], Jin Woo Min, Kwang Sik Joo, and Hee Cheol Kang

GFC Co. Ltd., 311, Tower-dong, Heungdeok IT Valley, 13 Heungdeok1-ro, Giheung-gu, Yongin, Gyeonggi-do 16954, Korea
(Received March 15, 2017; Revised March 28, 2017; Accepted March 29, 2017)

요약: 황련해독탕(HHT)은 기력을 회복하며 여러 만성질환을 예방하고 치료하기 위해 예로부터 사용되어온 약재로, 본 연구는 인삼에서 분리한 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*)을 이용해 황련해독탕 발효물(FHHT)을 제조하고 항산화, 항주름 및 미백 효과를 조사하였다. 황련해독탕 발효물은 황련해독탕을 70% 에탄올로 추출한 후에 *L. mesenteroides*를 접종하여 발효 제조하였다. 발효 전 황련해독탕과 황련해독탕 발효물에서 2가지 지표 성분 berberine과 palmatine을 high-performance liquid chromatography (HPLC)을 이용하여 retention times (t_R)과 UV spectra를 확인함으로써 정성 및 정량 분석하였다. 세포 생존율 실험 결과, 발효 전후 황련해독탕 모두 독성이 확인되지 않았고 DPPH 라디칼 소거능 실험은 발효물의 SC₅₀ 값이 68.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 발효 전보다 우수한 효능을 나타내었다. Procollagen type I의 생성량 측정 실험에서도 역시 황련해독탕 발효물은 발효 전보다 더 높은 발현량을 나타내었으며, 세포 독성을 나타내지 않는 농도에서 흑색종 세포인 B16F10을 이용한 멜라닌 생성 억제 활성 실험 결과, 황련해독탕 발효물은 강한 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다(IC₅₀ = 9.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 이상의 결과들로부터 황련해독탕 발효물이 항산화 효능, 항주름 효능뿐만 아니라 미백 효능을 갖는 화장품 원료로서 개발 가능성이 있음이 시사되었다.

Abstract: Hwangryunhaedoktang (HHT) has been traditionally used as a preventive and therapeutic medicine to treat enervation and diverse chronic diseases. This study was designed to compare the antioxidant, anti-wrinkle and whitening effects of HHT extract and its fermented extract by *Leuconostoc mesenteroides* (FHHT). FHHT was prepared by inoculation of *L. mesenteroides* after the extraction procedure with 70% ethanol. HHT and FHHT was investigated via high-performance liquid chromatography (HPLC). Simultaneous qualitative analysis of two bioactive components, berberine and palmatine, was achieved by comparing their retention times (t_R) and UV spectra with those of the standard components. Cell viability test results indicated that both HHT and FHHT were non-toxic. In DPPH radical scavenging ability, SC₅₀ values of the FHHT was 68.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which is more effective than HHT. Moreover, FHHT showed higher expression in production of procollagen type I than HHT. In nontoxic concentration range, FHHT showed strong melanin production inhibitory effect in α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-stimulated B16F10 cell (IC₅₀ = 9.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$). These results suggested that fermented extracts of hwangryunhaedoktang had considerable potential as a cosmetics ingredient with an antioxidant and anti-wrinkle and whitening effects.

Keywords: antioxidant, anti-wrinkle, Hwangryunhaedoktang, *Leuconostoc mesenteroides*, whitening effect

[†] 주 저자 (e-mail: jn.um@gfcos.co.kr)
call: 031)211-9311

1. 서 론

피부노화의 원인 중 자외선(ultraviolet)은 대표적인 외인성 요인 중 하나로 자외선에 지속적으로 노출된 피부는 염증 유발, 홍반, 색소 침착 등의 피부질환과 피부가 거칠어지고 깊은 주름이 생기며 특히, 비정상적으로 생성량이 증가되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 피부 노화를 유발하게 된다[1]. 이 활성산소종은 라디칼 종이 포함되어 있으며, 이 라디칼 종은 짝을 이루지 않은 홀 전자를 가지고 있어 에너지가 높고 반응성이 크다. 이러한 불안정한 라디칼 종과 이로 인해 생성되는 ROS는 자동 산화 반응을 개시하게 되고 피부 노화의 원인으로 지질, 단백질 및 DNA를 산화하게 된다. 따라서 활성산소종을 제거할 수 있는 항산화제를 사용하면 피부조직을 보호하고 색소 침착을 줄일 수 있으므로 인체에 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제의 연구 개발이 지속적으로 이루어지고 있다[2].

피부의 표피에 존재하는 멜라닌은 피부색을 결정하는 중요한 요인 중 하나로 멜라닌 색소의 양과 분포에 의해 외관상의 피부색이 결정된다. 피부에 자외선이 조사되면 피부를 보호하기 위해 멜라닌형성세포(melanocyte)의 멜라닌생성반응 과정(melanogenesis)을 거쳐 멜라닌이 생성되고 이 멜라닌에 의해 피부색이 검게 변화하여 색소 침착이 일어나게 된다[3].

피부를 구성하는 단백질로는 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin) 등이 있으며 이 중 콜라겐은 인체 건조 피부의 70%를 차지하고 있으며, 피부뿐만 아니라 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성하고 조직의 결합력, 세포 증식과 분화 유도 등 다양한 기능을 가진다[4].

콜라겐은 세포외기질(extracellular matrix)에 존재하는 섬유아세포(fibroblast)에서 전구체인 프로콜라겐(procollagen)을 거쳐 합성되는데 진피 기질 내에는 콜라겐 타입 I (collagen type I)이 80% 이상 차지하고 있으며, 이 콜라겐 타입 I은 광노화 피부에서 함량이 감소되고 피부 노화과정에서 관찰되는 가장 중요한 콜라겐 타입이다. 콜라겐의 합성과 분해과정은 피부의 주름과 연관이 있으며 이 과정이 비정상적으로 불균형을 이룰 경우 주름이 증가하여 피부 노화의 원인이 된다[5,6].

황련해독탕(黃連解毒湯)은 황백(*Phellodendron amur-*

ense), 황련(*Coptis japonica*), 황금(*Scutellaria baicalensis*) 및 치자(*Gardenia florida*) 4가지 한약재로 구성된 한약처방으로 동의보감(東醫寶鑑)에서 열성병(熱性病)으로 염증이 있고 열과 충혈에 의한 정신불안, 요(尿)가 붉고 심하부(心下部) 결립, 해열, 해독 등을 위한 처방으로 사용되고 있다[7]. 효능연구로는 항바이러스, 항고혈압, 항알레르기, 항염증 작용이 보고되어 있다[8,9]. 황련해독탕은 여러 종류의 alkaloid를 함유하고 있으며 이 중 황백과 황련에 다량 함유되어 있는 berberine과 palmatine은 대표적인 지표 성분으로 이와 같은 유효성분에 대한 연구는 여러 차례 이루어진 바 있는데, berberine은 항염증, 항균, 항암 등 다양한 효과가 알려져 있으며 palmatine은 monoamine oxidase 저해, hyperglycemic 저해 등이 보고된 바 있다[10-14].

천연물이 가진 성분이나 소재의 활용성을 증진시키기 위해 유용한 미생물을 이용한 발효의 방법은 의약품이나 화장품, 식음료 등 다양한 분야에서 오랜 기간 동안 연구 및 적용되어 왔다[15]. 발효에 이용되는 미생물로는 유산균, 세균, 효모, 곰팡이 등이 있으며 특히 유산균의 경우 발효 공정 개발에 빈번히 활용되고 있다. 이와 같은 유산균을 이용한 방법이 항염증 효과, 미백 개선 효과 및 항산화 효과 등에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고되어 왔으며, 한약재 또는 한약재 추출물의 효능을 미생물을 이용하여 증가시키거나 새로운 효능을 도출하고자 하는 연구나 발효 과정을 거치면서 변화하는 성분을 분석하는 연구가 계속해서 진행되고 있다[16-20].

본 연구에서는 자연 숙성된 인삼(*Panax ginseng*)에서 분리한 유산균 *L. mesenteroides*으로 황련해독탕을 발효하여 발효물을 제조하고 발효 전후 두 지표 성분 berberine과 palmatine의 변화를 확인하고자 하였으며, 발효물의 효능을 발효 전과 비교하여 화장품 원료로서 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

황련해독탕의 제조에 사용한 황백, 황련, 황금 및 치자는 제천한방약초에서 구매하였다. 구매한 재료는 DNA를 추출하여 internal transcribed spacer (ITS) 영역에 대해 PCR 후, (주)마크로젠(Seoul, Korea)을 통한 염

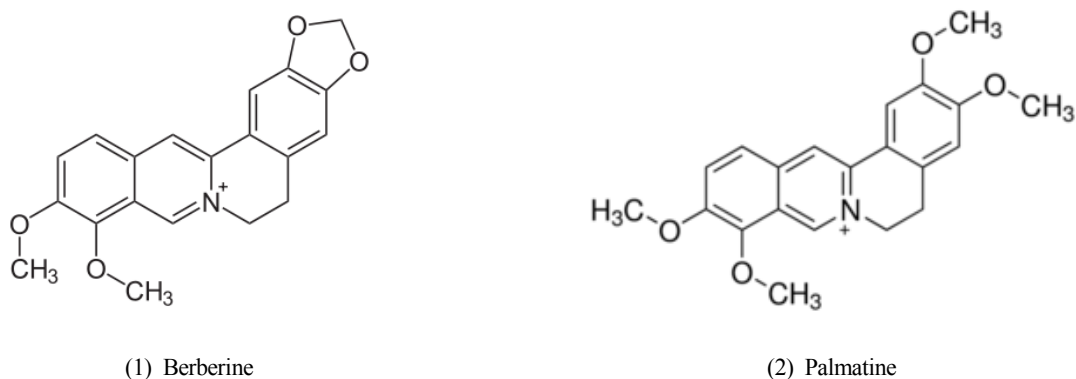


Figure 1. Chemical structure of two marker components in hwangryunhaedoktang.

기서열 분석을 하였고 미국국립생물정보센터(NCBI)에서 확인하였으며, 음지에서 상온 보관하면서 본 실험의 재료로 사용하였다. 추출과 HPLC 분석에 용매 에탄올, 메탄올, 물, 아세토니트릴(Daejung, Korea)을 사용하였고 potassium dihydrogen phosphate, sodium lauryl sulfate (SDS, Sigma, USA)를 사용하였으며, 지표 성분 berberine, palmatine은 Sigma (USA)에서 구매하였다. 세포 배양을 위해 FBS, penicillin-streptomycin, DMEM (Invitrogen, USA)을 사용하였으며, 유산균 배양을 위해 MRS broth (BD Difco, USA)를 사용하였다. 세포 생존을 실험은 lipopolysaccharide (Sigma, USA), Ez-Cytox (Biomax, Korea)을 사용하였으며, 활성 실험을 위해 procollagen type ELISA kit (Takara, Japan), transforming growth factor- β (Sigma, USA), ascorbic acid, arbutin, α -MSH (Sigma, USA)을 사용하였다.

2.2. HPLC 기기 및 분석 조건

HPLC 분석을 위하여 pump, auto sampler, column compartment, photo diode array detector로 구성된 YL9100 HPLC system (Younglin, Korea)을 사용하였으며 데이터 수집 및 처리를 위해 YL-clarity를 사용하였다. 분석에 사용한 컬럼은 kinetex 5 μ m C₁₈ column (250 \times 4.6 mm, Korea)이며 컬럼 온도는 40 $^{\circ}$ C를 유지하였다. 이동상은 0.34% potassium dihydrogen phosphate와 0.17% SDS가 포함된 물 : 아세토니트릴(1 : 1)를 사용하였으며 유속은 1.0 mL/min의 조건으로 유지하였다. UV 검출기의 파장은 345 nm에서 확인하였으며 주입량은 10 μ L로 설정하였다. 지표 성분인 berber-

ine (1), palmatine (2)은 무게를 정확하게 측정된 후 methanol에 녹여 표준 용액으로 조제하였다(Figure 1).

2.3. 균주 분리 동정

인삼을 오존수에 살균한 후 밀봉하여 3개월 동안 실온에서 자연 숙성하였고, 자연 숙성된 인삼을 멸균 증류수에 현탁하여 희석한 후, MRS agar 배지에 도말하였으며, 30 $^{\circ}$ C incubator에서 24 h 배양하여 선발하였다. 선발된 균주는 4회 계대 배양한 후, 형성된 단일 colony를 순수 분리하였으며, DNA 추출하여 DNA 분석 기관인 (주)마크로젠에 의뢰하여 16s rRNA 분석을 실시하고 blast program을 사용하여 균주의 상동성을 분석한 결과, 인삼으로부터 분리한 균주가 *L. mesenteroides*와 99% 이상의 상동성을 갖는 균주임을 확인하였다.

2.4. 황련해독탕 발효물 제조

황련해독탕은 황백, 황련, 황금 및 치자를 Table 1과 같이 각 1 : 1 : 1 : 1로 구성한 총 150 g에 70% ethanol을 1,500 mL를 넣어 2 h 동안 80 $^{\circ}$ C 가열 추출한 후, 여과지 Whatman no. 2로 여과하였고 이 과정을 2회 반복하였다. 추출물은 rotatory vacuum으로 감압농축하여 농축액 상태로 제조하였고, 이 농축액을 10%로 함유하는 배지를 제조하여 121 $^{\circ}$ C, 1.5 기압에서 15 min 간 가압멸균하고 상온까지 냉각시켰으며, 일부는 동결건조하여 발효 과정을 통한 효능 변화 확인을 위해 발효 전 황련해독탕으로 대조군으로서 사용하였다. 이 황련해독탕에 인삼에서 분리한 유산균 *L. mesenteroides*을 MRS broth에서 계대 배양한 뒤 1% (v/v)로 접종하였다.

Table 1. Prescription of Hwangryunhaedoktang

Herb name	Scientific name	Ratio
황백	<i>Phellodendron amurense</i>	1
황련	<i>Coptis japonica</i>	1
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	1
치자	<i>Gardenia florida</i>	1

접종 후, 37 °C의 incubator에서 48 h 이상 배양하여 황련해독탕을 발효하였으며, syringe filter 0.2 µm로 여과 과정을 거쳐 제공하여 황련해독탕 발효물을 제조하였고, 일부는 동결건조하여 시료를 얻어내 발효 전후 성분 및 효능 변화 확인을 위해 사용하였다.

2.5. 세포 배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 cell과 흑색종 세포인 B16F10 cell 및 사람의 섬유아세포(human foreskin fibroblast)인 HFF cell은 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양 받았으며, 각각의 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.6. 세포 생존율 측정

세포생존율은 WST (water-soluble tetrazolium salt) 방법을 사용하여 측정하였다[21]. RAW 264.7 cell은 DMEM배지를 이용하여 5 × 10⁴ cells/mL로 조절한 후 24-well tissue culture plate에 접종하고 5% CO₂ incubator에서 24 h 전 배양하였으며, 세포에 1 µg/mL의 LPS를 처리하고 24 h 뒤에 일정 농도의 시료를 처리하여 24 h 배양하였다. 시료 처리 후 Ez-Cytox 시약이 든 배지로 교체하여 2 h 동안 반응시켰다. multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. HFF cell은 DMEM배지를 이용하여 3 × 10⁴ cells/mL로 96-well tissue culture plate에 접종하고 5% CO₂ incubator에서 24 h 전 배양하였으며, 세포에 FBS를 무첨가한 DMEM과 일정 농도의 시료를 섞어 well 당 100 µL씩 처리하여 48 h 배양하였다. 시료 처리 후 WST 시약이 든 배지로 교체하여 2 h 동안 반응시켰으며, ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

2.7. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 사용하여 라디칼에 대한 시료의 전자공여능 (electron donating ability, EDA)을 측정하였다[22]. 시료의 전자공여능 측정을 위해 일정 농도로 희석한 시료 5 µL에 0.4 mM DPPH 용액 450 µL를 넣고 30 min 간 4 °C의 암실에서 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 표시하여 DPPH 라디칼 소거능으로 나타내었으며, 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하여 황련해독탕 발효 전후 시료와 비교하였다. 소거능 활성은 다음의 식으로부터 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

A: DPPH radical scavenging activity without sample

B: DPPH radical scavenging activity with sample

2.8. 멜라닌 생성 측정

마우스 흑색종 세포인 B16F10 cell에 60 mm 세포배양접시에 1 × 10⁴ cells/well로 세포를 분주해 24 h 배양하여 부착 및 안정화시킨 후, 농도별로 희석한 시료와 α-MSH를 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 배양 후, PBS로 2회 세척하고 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 수확한 뒤 원심분리기로 세포를 모아 상층액을 제거하였다. 세포는 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 첨가된 1 N NaOH 용액을 처리하여 65 °C에서 1 h 동안 반응한 후 생성된 멜라닌 양을 410 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다. 시료액 대신 PBS를 사용한 blank의 흡광도를 기준으로 멜라닌 생성 억제율을 산출하였고, 대조군으로는 arbutin를 사용하여 황련해독탕 발효 전후 시료와 비교하였다.

2.9. Procollagen Type I 생합성 측정

Collagen 생합성량 측정은 procollagen type ELISA kit를 이용하여 kit 매뉴얼에 따라 실험하였다. HFF cell를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 이용하여 24-well plate에 1.2 × 10⁴ cells/mL으로 분주해 24 h 전 배양하였으며, 세포에 DMEM과 일정 농도의 시료를 섞어 well 당 1 mL씩 처리하여 48 h 배양하였다. 배양 후, 세포배양액을 채취하여 procollagen type ELISA kit를 이용해 생성된 colla-

Table 2. Regression Equation of Two Marker Components in Hwangryunhaedoktang

Compounds	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression equation ($y = ax + b$) ^a	R ² values (n = 3)
Berberine	1.953-62.5	$y = 70.021x + 381.22$	0.989
Palmitine	1.953-62.5	$y = 67.548x + 294.87$	0.985

^aY: peak area, x: concentration ($\mu\text{g/mL}$)

gen 양을 450 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다. 시료액 대신 PBS를 사용한 blank의 흡광도를 기준으로 collagen 생합성률을 산출하였고, 대조군으로는 TGF- β 를 사용하여 황련해독탕 발효 전후 시료와 비교하였다.

2.10. 통계 처리

모든 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준 편차(means \pm S.D.)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행한 후 Duncan's multiple range test (DMRT)로 유의성을 $p < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

3. 결과 및 고찰

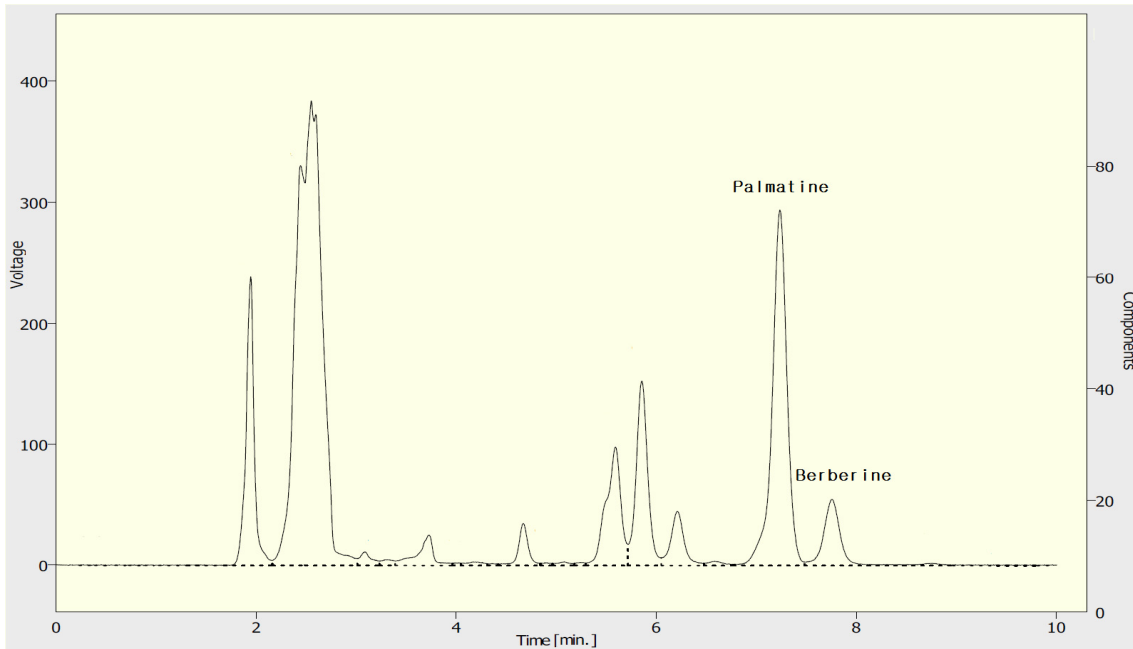
3.1. 황련해독탕 발효물 성분 확인 및 함량 변화

황련해독탕을 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*으로 발효시킨 후 황련해독탕 발효물을 제조하였고 발효 전 황련해독탕과 함께 지표 성분 berberine 및 palmitine을 HPLC를 이용하여 정량, 정성 분석하였다. 분석은 C₁₈ 컬럼을 사용하였고 컬럼 온도 40 °C를 유지하며 이동상 유속 1 mL/min, UV 흡광도 345 nm에서 실험하였다. 두 지표 성분은 동시 분석법으로 수행하였고 각 standard의 체류시간(t_R)을 확인한 결과 berberine은 7.65 min, palmitine은 7.13 min으로 관찰되었다(Figure 2). 발효 전후 황련해독탕의 함량 비교를 위해 x축을 표준 용액의 농도로 y축을 peak 면적으로 하여 검량선(calibration curve)을 작성하였다. 그 결과 berberine과 palmitine 모두 검량선의 상관관계가 0.984 이상으로 정량분석에 알맞은 직선을 나타내었다(Table 2). 두 지표 성분의 peak 면적을 검량선에 대입하여 황련해독탕 발효 전후의 성분 함량을 계산하였다. 분석 결과, 발효 전 황련해독탕에서 berberine은 3.55 $\mu\text{g/mL}$, palmitine은 40.43 $\mu\text{g/mL}$ 으로 palmitine이 berberine보다 비교적

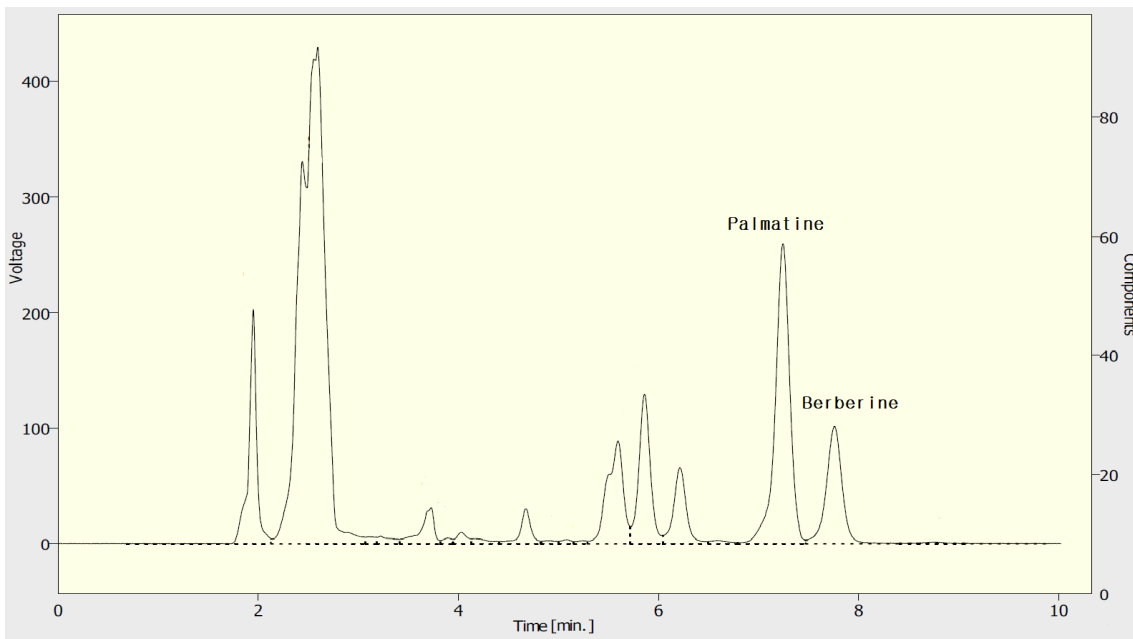
높은 함량을 나타내었다. 황련해독탕 발효물은 berberine의 경우 10.97 $\mu\text{g/mL}$ 으로 발효 과정을 거치면서 발효 전보다 약 7.42 $\mu\text{g/mL}$ 이 증가되었으며, 이는 발효 전 대비 약 3배에 달하는 함량으로 확인되었다. 발효물의 palmitine 함량의 경우 34.89 $\mu\text{g/mL}$ 으로 berberine과 달리 발효 과정을 거치면서 발효 전보다 약 5.54 $\mu\text{g/mL}$ 감소하여 약 13.7%가 감소한 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과로 황련해독탕 발효물은 발효 전보다 berberine이 증가하고 palmitine이 감소함을 확인하였으며, 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*가 berberine을 증가시킬 수 있는 균주로 평가 가능성이 있음을 확인하였다. 그러나 발효 과정 중 두 지표 성분이 어떠한 메커니즘으로 생물 전환이 일어났는지는 확인할 수 없었으며, berberine과 palmitine이 protoberberine alkaloid의 일종으로 이 protoberberine alkaloid 간의 생합성 경로에 대한 연구는 다수 보고된 바 있으므로 발효 과정에 의한 두 성분 간의 전환에 대해 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다[23,24].

3.2. 황련해독탕 발효물의 세포독성 평가

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell과 사람의 섬유아 세포인 HFF cell에 대한 세포독성을 알아보기 위해 황련해독탕 발효 전후 시료를 각각 농도별(0-100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후, WST 실험을 수행하였으며 측정 결과를 Figure 3에 나타내었다. RAW 264.7 cell에 대한 세포생존율의 경우 발효 전 황련해독탕의 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 99.47%의 세포생존율을 나타냄으로써 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였고, 황련해독탕 발효물의 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 101.62%의 세포생존율을 나타냄으로써 발효 전후 모두 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Figure 3A). HFF cell에 대한 세포생존율의 경우 발효 전 황련해독탕의 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 101.22%의 세포생존율을 나타냄으로써 세포 생존에



(A)



(B)

Figure 2. Chromatograms of useful components in hwangryunhaedoctang using HPLC. (A) HHT, (B) FHHT.

대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였고, 황련해독탕 발효물의 최고 처리 농도 $100 \mu\text{g/mL}$ 에서 119.64%의 세포생존율을 나타냄으로써 세포생존율이 오히려 증

대하는 것을 확인하였다(Figure 3B). 이는 발효물이 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 세포 독성이 없으며 발효 과정을 거쳐 세포 성장을 증대시킬 수 있는 특정 물질이 생

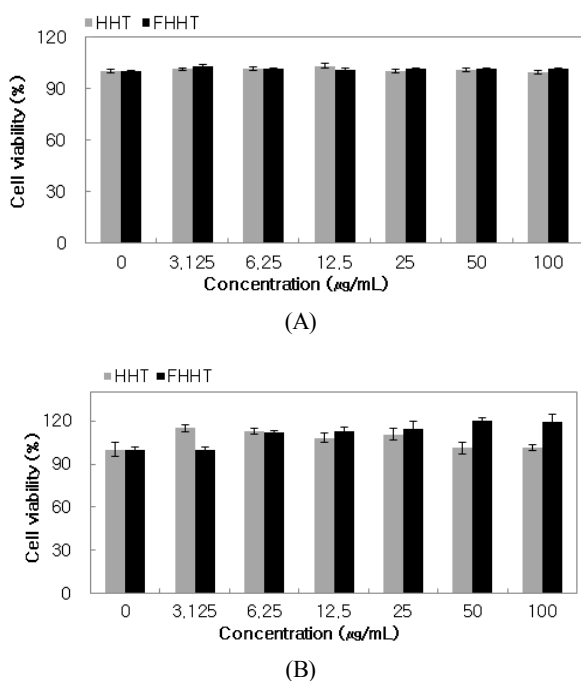


Figure 3. Effect of fermented extracts of hwangryunhaedoktang in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments. (A) RAW 264.7 cells were stimulated with LPS in the presence of samples. (B) HFF cells were stimulated with LPS in the presence of samples.

성 또는 증가되었을 가능성이 있을 것으로 사료된다. 이와 같은 결과로 발효 전후 모두 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였으며, 독성을 나타내지 않는 최대 100 µg/mL의 농도까지 모든 활성 효과 실험을 진행하였다.

3.3. 황련해독탕 발효물의 DPPH 라디칼 소거활성 평가

DPPH는 생체 내에 존재하는 라디칼은 아니지만 그 자체가 흡수전자를 갖고 있어 520 nm에서 강한 흡광도를 나타낸다. 따라서 항산화능이 있는 물질과 반응하게 되면 안정한 형태로 돌아가면서 흡광도 값이 감소한다[25]. 황련해독탕의 발효 전후의 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하기 위해 각각 독성이 나타나지 않은 농도별(0-100 µg/mL)로 처리하였으며, 발효 전 황련해독탕은 6.25 µg/mL에서부터 DPPH 라디칼 소거능이 관찰되기 시작했고 최고 처리 농도 100 µg/mL에서 33.26%의 소거활성을 나타내었다. 반면에 황련해독탕 발효물은 최저 처리 농도 1.563 µg/mL에서 4.07%의 소거활성

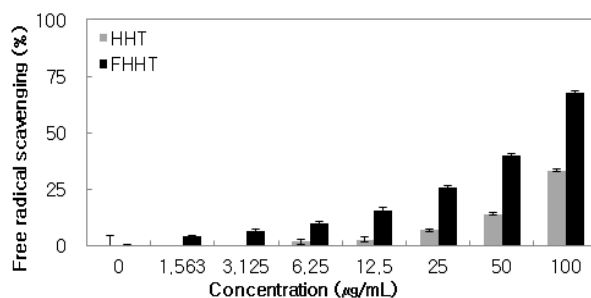


Figure 4. The DPPH radical scavenging activity of the fermented extracts of hwangryunhaedoktang. The data were represented by means ± S.D. in triplicate experiments.

을 나타내어 가장 낮은 농도에서부터 DPPH 라디칼 소거능이 관찰되었으며 최고 처리 농도 100 µg/mL에서 67.85%의 소거활성을 나타내었다. 이는 100 µg/mL의 같은 농도에서 황련해독탕의 발효 전후를 비교하였을 때, 발효물이 발효 전보다 약 2배 이상의 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가했음을 나타내었으며 대조군으로 사용한 ascorbic acid가 1.73 µg/mL의 농도에서 50%의 소거활성을 나타낸 것에 비해 황련해독탕 발효물이 낮은 활성 효과를 나타냈지만 발효 전보다 항산화 활성이 우수함을 확인하였다. 이러한 결과는 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*의 발효 과정을 거쳐 항산화 효능을 갖는 것으로 보고된 바 있는 berberine의 함량이 HPLC 분석 결과에 따라 약 3배 가량 증대된 영향도 있을 것으로 사료되며[26], 이외에도 효능 물질의 생물 전환이 요인이 될 수 있을 것으로 여겨진다(Figure 4).

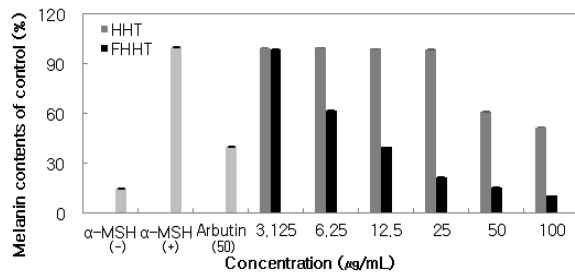
3.4. 황련해독탕 발효물의 멜라닌 생성량 평가

피부의 미백과 관련이 있는 멜라닌 생성에 미치는 효과를 확인하기 위해 황련해독탕 발효 전후 시료를 각각 독성이 나타나지 않은 농도별(0-100 µg/mL)로 처리한 후 멜라닌 생성량을 측정된 결과, 발효 전 황련해독탕은 최고 처리 농도 100 µg/mL에서 51.86%의 멜라닌 생성량으로 억제 효과가 48.14%로 관찰되었다. 황련해독탕 발효물의 경우 최저 처리 농도 3.125 µg/mL에서부터 농도의존적으로 멜라닌 생성량의 감소를 나타내었고 최고 처리 농도 100 µg/mL에서 10.44%의 멜라닌 생성량을 나타냈으며, 89.56%의 억제율로 높은 멜라닌 생성 억제 활성으로 관찰되었다. 발효 전후를 비교하였을 때, 발효 전 황련해독탕은 100 µg/mL 이상

Table 3. Inhibition of Melanin Production (IC_{50} Values) by Fermented Extracts of Hwangryunhaedoktang

Test sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extracts of hwangryunhaedoktang	N/D
Fermented extracts of hwangryunhaedoktang	9.82 ± 0.3
Arbutin	47.19 ± 0.5

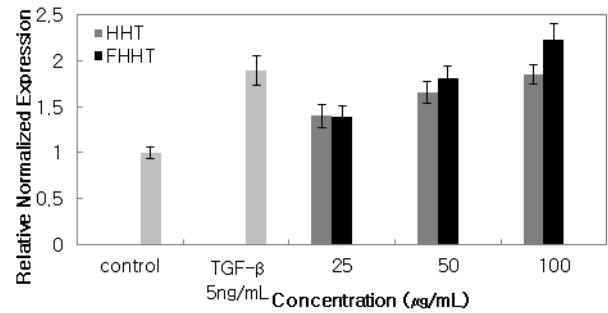
IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. N/D means not detectable.

**Figure 5.** Melanin production inhibitory activity of the fermented extracts of hwangryunhaedoktang. The data were represented by means \pm S.D. in triplicate experiments.

의 농도에서 IC_{50} 값을 나타낸 반면 발효물은 $9.83 \mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타냈으며, 이는 발효 후 멜라닌 생성 억제 활성이 최소 10배 이상 증가한 것으로 확인되었다. 특히, 대조군으로 사용된 arbutin보다도 황련해독탕 발효물이 멜라닌 억제 효과가 뛰어남이 확인되었다. 이것은 황련해독탕에 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*의 발효 과정을 거쳐 berberine의 함량 증대가 요인 중 하나일 것으로 판단되며 berberine은 멜라닌 생성 억제 활성이 보고된 바 있으나[27], alkaloid가 일반적으로 세포독성을 나타낸다는 보고를 고려하였을 때 발효물의 멜라닌 생성 저해 활성에 기인하는 또 다른 유효 성분의 생성 또는 증대가 있을 것으로 사료된다[28]. 이와 같은 결과로 황련해독탕 발효물은 멜라닌 생성량을 효과적으로 감소시켜 우수한 미백 효과 소재로서의 가능성을 보였다(Table 3 and Figure 5).

3.5. 황련해독탕 발효물의 Procollagen Type I 합성 평가

Procollagen의 mRNA 발현량의 변화를 확인하기 위해 황련해독탕 발효 전후 시료 각각 독성이 나타나지 않은 농도별(0-100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후 발현량을 측정하였다. 발효 전후 황련해독탕 모두 procollagen의

**Figure 6.** Effect of the fermented extracts of hwangryunhaedoktang on mRNA expression of procollagen type I. Expression of mRNA was estimated by real-time PCR. The data were represented by means \pm S.D. in triplicate experiments.

mRNA 발현량의 증가를 나타냈으며, 발효 전 황련해독탕의 경우 농도의존적으로 발현량이 증가하고 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 control 대비 1.85배 증가함을 확인하였다. 이에 비해 황련해독탕 발효물의 경우 농도의존적으로 procollagen의 mRNA 발현량이 증가하는 경향은 발효 전과 유사하였으나, 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 control 대비 2.23배 증가했음을 나타내어 그 증가량이 발효 전에 비해 높음을 확인하였다. 특히, 황련해독탕 발효물은 대조군으로 사용된 TGF- β 보다도 높은 procollagen의 mRNA 발현량의 증가를 나타내었다. 이것은 procollagen의 발현량을 증가시키는 효과가 보고된 바 있는 berberine이 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*의 발효 과정을 거쳐 함량이 증가하여 발효물에서 발효 전 대비 더 우수해진 효능을 확인 가능한 것으로 판단된다. 더불어 이와 같은 결과는 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*을 이용한 발효 제조한 황련해독탕 발효물을 항주름 효과를 갖는 소재로서의 응용 가능성을 나타내었다(Figure 6).

4. 결 론

본 연구에서는 최근 한약재의 효능을 미생물을 이용하여 증가시키거나 새로운 효능을 도출하고자 하는 연구와 관련하여 자연 숙성된 인삼에서부터 유산균의 일종인 *L. mesenteroides*와 높은 상동성을 갖는 균주를 분리하여 얻어내었으며, 이를 이용한 황련해독탕 발효물을 발효 과정을 통해 성분 및 효능 변화를 확인하고자 하였다. 이 연구를 통해 발효 과정을 거쳐 2가지 지표

성분인 berberine과 palmatine의 존재를 확인하였고, 각각의 지표 성분 함량이 증가 및 감소가 나타나는 것을 확인하였다. RAW 264.7 cell과 HHF cell를 이용한 세포 실험을 통해 독성이 나타나지 않음을 확인하였고, DPPH 라디칼 소거능과 같은 항산화 활성, 멜라닌 생성 억제와 같은 미백 활성 및 procollagen type I 생합성 증진 활성과 같은 주름 억제 활성 등의 효과가 발효 후 증진됨을 확인할 수 있었다. 이는 *L. mesenteroides*에 의한 발효 과정 중 생성되는 다양한 효소들의 작용에 의한 각각의 효능을 모두 갖는 berberine의 함량이 증가된 것이 하나의 원인일 수 있으며, 또 다른 활성 성분이 생성 또는 증가된 것이 원인일 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 한약재나 한약재 추출물에 미생물을 이용한 발효가 피부의 주름 개선이나 미백 및 항산화 활성 등을 증진시킬 수 있는 방법으로 활용될 수 있음을 보여주는 것이라고 판단될 뿐만 아니라 지표 성분 증대 또는 효능의 증진에 영향을 주는 발효 인자나 성분에 대해 지속적인 연구를 진행한다면 보다 효과적인 한약재 발효물의 활용 방안을 도출할 수 있을 것으로 사료된다.

Reference

1. G. A. Imokawa, Possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide, *J. Dermatol. Sci.*, **55**(1), 1 (2009).
2. J. M. McCord, Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation, *Fed. Proc.*, **46**(7), 2402 (1987).
3. S. Ito and K. Wakamatsu, Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review, *Pigment cell res.*, **16**(5), 523 (2003).
4. P. Brenneisen, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **973**(1), 31 (2002).
5. L. Maumann, *Cosmetic dermatology, principles and practice*, 10, McGraw-Hill, New York (2002).
6. M. K. Lee, D. H. Kim, T. S. Park, and J. H. Son, Antioxidant and anti-wrinkling effects of extracts from *Vitex trifolia* L., *J. Appl. Biol. Chem.*, **58**(2), 125 (2015).
7. J. Heo, *Dongui bogam*, 113, Nam sandang, Seoul (1976).
8. Y. S. Hwang, C. Y. Shin, Y. Huh, and J. H. Ryu, Hwangryun-hae-dok-tang (huanglian-jie-du-tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats, *Life Sci.*, **71**(18), 2105 (2002).
9. H. J. Yang, H. A. Joo, S. C. Baek, J. S. Park, and S. H. Hong, Anti-inflammatory effects of hwangryeonhaedok-tang and fermented hwangnyeohaedok-tang, *J. Korean Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **24**(2), 1 (2011).
10. C. L. Kuo, C. W. Chi, and T. Y. Liu, The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Lett.*, **203**(2), 127 (2004).
11. W. A. Creasey, Biochemical effects of berberine, *Biochem. Pharmacol.*, **28**(7), 1081 (1979).
12. W. Tan, J. Lu, M. Huang, Y. Li, M. Chen, G. Wu, Z. Zhong, Z. Xu, Y. Dang, J. Guo, X. Chen, and Y. Wang, Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs, *Chin. Med.*, **6**(1), 27 (2011).
13. S. S. Lee, Y. H. Kim, and M. K. Lee, Inhibition of monoamine oxidase by palmatine, *Arch. Pharm. Res.*, **22**(5), 529 (1999).
14. D. K. Semwal, U. Rawat, R. Semwal, R. Singh, and G. J. P. Singh, Anti-hyperglycemic effect of 11-hydroxypalmatine, a palmatine derivative from *Stephania glabra* tubers, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **12**(2), 99 (2010).
15. J. S. Lee, K. S. Lee, and B. K. Song, Experimental studies on the effect of samul-tang and samul-tang gagambang aqua-acupuncture, *J. Orient. Obstet. Gynecol.*, **14**(1), 1 (2001).
16. D. Y. Im and K. L. Lee, Melanin production inhibitory activity of the *Dendropanax morbifera* leaf extract fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **47**(1), 18 (2016).

17. C. H. Kang, S. C. Kim, S. C. Jeong, W. Han, S. Y. Lee, S. M. Yu, H. M. Jin, and Y. S. Kim, Physicochemical characteristics of fermented phragmites communis extract and its biological activity, *Kor. J. Pharmacogn.*, **47**(1), 273 (2012).
18. J. M. Jeon, S. K. Choi, U. J. Kim, S. J. Jang, J. W. Cheon, and J. S. Lee, Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **37**(1), 75 (2012).
19. H. J. Choi, J. H. Lee, M. Y. Yun, and J. S. Lee, Anti-inflammatory and whitening effect of the lyophilized powder of oriental plant extracts fermented with *Streptococcus thermophiles*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(2), 159 (2015).
20. W. S. Choi, H. S. Kwon, R. H. No, G. P. Choi, and H. Y. Lee, Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(4), 303 (2013).
21. J. Ranke, K. Molter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser, and B. Jastorff, Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **58**(3), 396 (2004).
22. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**(4617), 1199 (1958).
23. L. Grycova, J. Dostal, and R. Marek, Quaternary protoberberine alkaloids, *Phytochem.*, **68**, 150 (2007).
24. M. S. Lee, S. H. Chung, D. H. Kim, S. Y. Choung, and S. K. Kim, Synthesis of protoberberine derivatives and studies on their biological activities, *Yakhak Hoeji*, **34**(1), 296 (1990).
25. J. Torel, J. Gillard, and P. Gillard, Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, *Phytochem.*, **25**(2), 383 (1986).
26. V. Pongkittiphon, W. Chavasiri, and R. Supabphol, Antioxidant effect of berberine and its phenolic derivatives against human fibrosarcoma cells, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **16**(13), 5371 (2015).
27. J. G. Lee, J. Y. Choi, J. S. Oh, H. W. Jung, E. H. Choi, H. S. Lee, J. A. Kim, T. S. Chang, J. K. Son, and S. H. Lee, Isolation of melanin biosynthesis inhibitory compounds from the *Phellodendri Cortex*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **38**(1), 387 (2007).
28. F. Traore, M. Gasquet, M. Laquet, H. Guiraud, C. Di Giorgio, N. Azas, O. Doumbo, and P. Timon-David, Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis* O. Kuntze and *Nauclea latifolia*, *Phytother. Res.*, **14**(8), 608 (2000).