pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 2, pp. 196~203 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.2.196

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Lactobacillus plantarum CM에 의해 발효한 황백 추출물의 항산화 및 항염증 활성

장길웅[1] · 최선일[1] · 한웅호[1] · 문효[1] · 권희연[1] · 최예은[1] · 강나윤[2]
박병우[3] · 김정진[3] · 강석남[4] · 이옥환[1,2]*

[1]강원대학교 식품환경융합학과, [2]강원대학교 식품생명공학과,
[3]콤비메드, [4]대구대학교 동물자원학과

Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Phellodendron amurense* Extract Fermented with *Lactobacillus plantarum* CM

Gill-Woong Jang[1], Sun-Il Choi[1], Xionggao Han[1], Xiao Men[1], Hee-Yeon Kwon[1], Ye-Eun Choi[1], Na-Yoon Kang[2], Byung-Woo Park[3], Jeong-Jin Kim[4], Ok-Hwan Lee[1,2]*

[1]*Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[3]*CombiMed Co. Ltd., Yanggu, Korea*
[4]*Department of Animal Resource, Daegu University, Gyeongsan, Korea*

(Received January 13, 2021/Revised February 1, 2021/Accepted February 23, 2021)

ABSTRACT - In this study we investigated the total phenolic (TP) and total flavonoid (TF) contents, in addition to the antioxidant and anti-inflammatory activities, of *Phellodendron amurense* extract fermented with *Lactobacillus plantarum* CM. The fermentation of *P. amurense* extract (FP) was performed using *Lactobacillus plantarum* CM in non-fermented *P. amurense* extract (NFP) during various fermentation times (5 h, 10 h, and 20 h), respectively. Our results showed that FP was higher in TP and TF contents, DPPH radical scavenging activity, ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), and nitrite scavenging activity than those of NPF. Neither RAW 264.7 nor HaCaT cells treated with FP and NF showed any cytotoxicity up to 12.5 μg/mL. Treatment of FP (12.5 μg/mL) significantly inhibited NO production in RAW 264.7 cells and cytokine production, including IL-6 and IL-1β, in HaCaT cells. These results indicate that the enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of FP is due to fermentation by *Lactobacillus plantarum* CM, which can be used in functional foods and cosmetics materials.

Key words: *Phellodendron amurense*, Fermentation, *Lactobacillus plantarum* CM, Total phenol and total flavonoid contents, Antioxidant and anti-inflammatory activities

피부는 자외선이나 공해와 같은 외부자극이나 화학 물질로부터 보호기능을 갖게 해주는 이체의 부분을 덮는 조직으로 병원성 미생물에 대한 방어체계를 갖는다[1]. 피부질환을 야기하는 피부 상재균에는 *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, Typhimurium, *Listeria monocytogenes* 등이 있다. 이러한 피부 상재균 및 기타 세균에 의한 피부질환이 악화되면 피부는 기능이 약화되고 지나친 수분 손실이 발생한다. 아토피성 피부질환은 가려움과 피부 건조 및 특징적인 습진성 병변을 동반하는 만성적, 재발성 피부질환으로 전 세계적으로 유아와 소아들에게 고통을 주고 있다[2]. 아토피성 피부염에 사용되고 있는 치료제들은 아토피 피부염 발현에 관여하는 면역세포의 활성화를 억제 및 조절하는 기전에 초점을 맞추고 있다[3]. 그러나, 이와 같은 만성적인 피부질환의 치료 목적으로 스테로이드와 같은 약물을 장기간 투여함으로 인해 피부의 위축, 다모증 사용

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6454, Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

함으로 인해 많은 부작용에 대한 보고가 증가하면서 안전성 문제가 제기되고 있다. 이에 따라, 유효성과 안정성이 확보된 지속적인 사용이 가능한 피부질환 증상완화 목적의 치료제의 개발이 절실한 상황이다[4].

최근 삶을 건강하게 살려는 문화적 필요성에 따라 식물자원에 포함된 화합물에 많은 관심이 집중되고 있다. 따라서, 다양한 자원으로부터 생리기능을 가진 물질을 탐색하려는 연구가 꾸준히 진행되고 있다[5]. 황백은 운향과(*rutaceae*) 식물인 황벽나무(*Phellodendron amurense Ruprecht*)의 껍질을 벗겨내 말린 줄기껍질로, 우리나라 전 지역을 비롯한 일본, 중국에 분포하여 자생되고 있다. 국내에서 황백은 신라시대부터 사용된 전통 한약재로 해독, 해열, 황달, 설사, 염증, 폐렴, 감기 등에 유용한 생약으로 폭넓게 사용되고 있다[6,7]. 또한, 황백나무의 피부 melanin 생합성 저해 활성[8], 지방분해 활성[9], 구강균[10] 등이 연구된 바 있다. 황백은 한방에서 항균작용이 있는 것으로 알려져 있으며 다양한 세균에 대한 항균작용이 있다고 알려져 있으며 obacunone, berberine, palmatine 등의 alkaloid를 함유하고 있다. 특히 berberine은 항염증, 항균작용, 전염증성 cytokine 생성 억제, 암세포 생장 억제 등의 연구가 진행된 바가 있다[11-15]. 이와 같이 황백에 관한 다양한 약리학적 효능 및 생리활성 연구에 관한 연구가 꾸준히 진행되어 왔으나, *Lactobacillus plantarum* CM에 의해 발효한 황백 추출물에 대한 연구는 아직 초기단계에 있다. 발효미생물에 의해 특정성분이 증가하거나 및 새로운 기능성분의 생성하는 연구가 최근 활발히 이루어지고 있으며 건강식품이나 화장품 등의 개발에 있어서 유용성 및 효과성을 향상시키는데 이용되고 있다[16,17].

따라서 본 연구에서는 *Lactobacillus plantarum* CM에 의해 발효된 황백 추출물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량, 항산화 활성을 평가하였고 RAW 264.7 및 HaCaT 세포주에서의 항염증 활성을 평가하고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료

본 실험에서는 NFP와 FP (CombiMed, Yanggu, Korea)를 제공받아 사용하였다. Phosphoric acid, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, Iron (III) chloride, sodium acetate, sodium phosphate, TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), ferric chloride, acetic acid, griess reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 등을 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin streptomycin (P/S), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA 및 phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco Co., Gaithersburg, MD, USA)을 구입하여 사용하였고, Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)를 구입하여 사용하였다.

황백 발효물 조제

황백 시료 1.5 kg을 9 L의 증류수(DW)를 사용하여 추출한 여액을 121°C에서 20분간 멸균한 후, 초기 접종농도가 1%, 1.0E+07 이상이 되도록 *Lactobacillus plantarum* CM 균을 접종하여 37°C 배양기에서 5시간, 10시간, 20시간 동안 각각 배양한 배양액을 제조하였다. 각각의 배양액은 감압농축기에서 농축공정을 거쳐 동결건조기로 건조하여 발효된 황백 추출물을 제조하였다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Kim 등[18]의 방법을 이용하여 측정하였다. 발효 전후 황백 시료에 2% Folin-ciocalteau's phenol regent 및 10% Na_2CO_3를 각각 1:1:1 비율로 혼합한 후, 1시간 동안 반응시켰다. 이후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정한 후 gallic acid 표준곡선을 이용하여 총 페놀 함량을 계산하였으며, 총 페놀 함량은 mg gallic acid equivalent (GAE)/g으로 표시하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Kim 등[18]의 방법을 이용하여 측정하였다. 발효 전후 황백 시료에 95% 에탄올 1.5 mL, 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 첨가하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 microplate reader로 415 nm에서 흡광도를 측정한 후 quercetin 표준곡선을 이용하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였으며, 총 플라보노이드 함량은 mg quercetin equivalent (QE)/g으로 표시하였다.

FRAP 측정

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)는 Kwon 등[19]의 방법을 이용하여 측정하였다. FRAP은 ferric ion (Fe^{3+})가 ferrous (Fe^{2+})로 환원되어 TPTZ와 결합하여 blue 계열의 색을 나타내어 환원력을 흡광도 값으로 나타내는 방법으로 sodium acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s- triazine) 및 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$를 10:1:1 비율로 혼합하여 만들어 사용하였다. 조제한 용액 1.5 mL와 발효 전후 황백 시료 50 μL, DW 150 μL를 혼합한 후 37°C에서 4분간 반응시키고 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Cho 등[20]의 방법을 이용하여 측정하였다. 70% 에탄올을 사용하여 용해시킨 시료 0.1 mL와 0.4 mM DPPH 용액 0.1 mL를 혼합한 뒤, 30분 동안 암소에서 반응시켰다. 반응액의 흡광도(515 nm)를 측정한 후, 다음의 식을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거능(%) = [(Ac - As) / Ac]×100
Ac : 공시료 흡광도, As : 시료군 흡광도

Reducing power 측정

Reducing power는 Sim 등[21]의 방법을 이용하여 실험하였다. Reducing power는 ferric-ferricyanide (Fe^{3+}) 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe^{2+})로 전환하는 환원력을 흡광도의 값으로 나타내는 방법이다. 발효 전후 황백 시료 0.5 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer 2.5 mL, 1% potassium ferricyanide 2.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 용액에 10% trichloroacetic acid 2.5 mL를 첨가한 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액 2.5 mL에 3차 증류수 2.5 mL와 0.1% iron(III) chloride 2.5 mL를 첨가하였다. 상온에서 10분간 반응시켜 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값을 통해 reducing power를 비교하였다.

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Sim 등[21]의 방법을 이용하여 측정하였다. 발효 전후 황백 시료 0.5 mL에 1 mM $NaNO_2$ 용액 0.5 mL를 첨가하고, 0.1 N HCl로 반응용액의 pH를 1.2로 보정한 후 반응용액의 최종 부피는 증류수를 첨가하여 5 mL로 하였다. 그 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 반응액을 1 mL씩 취하여 2% acetic acid 5 mL을 Griess reagent 0.4 mL를 혼합시킨 뒤 상온에서 15분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

아질산염 소거능 = [(Ac-As)/Ac]×100
Ac : 공시료 흡광도, As : 시료군 흡광도

세포배양

RAW 264.7 대식세포와 HaCaT 피부표피세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockwille, MD, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 10% FBS, 1% P/S가 함유된 DMEM 배지에서 CO_2 incubator (MCO-20AIC, Sanyo, Osaka, Japan) (37°C, 5% CO_2)에서 배양되어 각 실험에 사용하였다.

세포독성평가

RAW 264.7 대식세포에 대한 발효전후 황백 시료의 세포독성평가는 Kim 등[22]의 방법에 따라 XTT{2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt} assay kit를 이용하여 측정하였다. 세포를 1×10^5 cell/mL로 96 well plate에 분주하고, 발효 전후 황백 시료를 농도별(3.13, 6.25, 12.5, 25 μg/mL)로 처리하여 24시간 배양시킨 후, XTT 시약을 첨가하여 CO_2 incubator (MCO-20AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 4시간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 사용하여 450, 690 nm에서 흡광도 값을 측정하여 값을 빼준 후 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Cell viability}(\%) = (A_{\text{Experimnet}}/A_{\text{Control}})\times100\ (\%)$$

Nitric Oxide (NO) 생성능 평가

NO 생성능 평가는 Bae 등[23]의 방법을 수정하여 측정하였다. 세포 배양액의 NO 함량은 sodium nitrite ($NaNO_2$)로 표준곡선을 그려 계산에 사용하였다. 세포를 1×10^5 cell/mL로 96 well plate에 분주하고, 0.1 μg/mL LPS가 첨가된 배지에 1 μM indomethacin과 농도별 발효 전후 황백 시료(3.13, 6.25, 12.5 μg/mL)를 각각 처리한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양시켰다. 이후 배양액 100 μL를 다른 96 well plate에 옮긴 후 Griess reagents (0.1% NEDHC(N-1-(naphthyl)-ethylene diamide;sulfanilanide) in 5% H_3PO_4) 100 μL를 새롭게 옮긴 배양액과 섞어주고 실온에서 10분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Berberine 및 palmatine 분석

Berberine과 palmatine의 HPLC 분석은 Jang 등[24]의 분석방법에 따라 측정하였다. 시험용액은 발효 전후 황백 시료를 10 mg 취한 뒤, 10 mL 정용플라스크를 이용하여 1,000 μg/mL의 농도가 되도록 증류수로 표선까지 정용하고, 0.22 μm 필터로 여과하여 사용하였다. 분석에는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 분석조건은 Table 2와 같다. 분석용 column은 Intersil ODS-3 C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Intersil, Milpitas, CA, USA)으로 분석하였다.

통계분석

본 실험에서 얻어진 결과에 모든 값은 3회 이상의 반복실험의 측정값의 평균 ± 표준오차로 나타내었으며, 실험결과 값에 대한 통계적 분석은 SPSS® version 11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 각 시료별 측정 결과에 one-way ANOVA test를 실시하였으며, p값이 0.05 이하이면 유의성이 있다고 판단하였다.

Results and Discussion

총 플라보노이드 및 페놀 함량

발효 전 황백 추출물(NFP)과 5시간, 10시간, 20시간 동안 발효한 황백 발효물(5 h, 10 h, 20 h FP)의 총 플라보노

이드 함량은 표준물질 quercetin (QE)으로 하여 표준검량곡선을 작성한 후 그 함량을 확인하였다. 총 페놀함량은 표준물질 gallic acid (GAE)로 하여 표준검량곡선을 작성한 후 그 함량을 확인하여 Table 1과 같이 나타내었다.

Table 1. Total flavonoid and total phenolics contents for NFP[1)] and FP[2)]

Sample	Total flavonoid (mg QE/g)	Total phenolic content (mg GAE/g)
NFP	7.26 ± 0.04[c]	7.23 ± 0.14[b]
5 h FP[3)]	40.04 ± 0.24[b]	36.94 ± 0.03[a]
10 h FP	42.82 ± 0.16[a]	37.02 ± 0.08[a]
20 h FP	42.14 ± 1.01[a]	37.01 ± 0.13[a]

[1)]Non fermented *P. amurense.*
[2)]Fermented *P. amurense.*
[3)]Fermentation of *P. amurense* was performed in various times (5 h, 10 h and 20 h), respectively.
Each value represents mean ± SD (n=3). [a-c]Means with different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

식물에 널리 분포되어 있다고 알려진 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 황색계열의 물질로 항산화 활성을 비롯하여 여러 생리활성 기능을 가진 물질이다. 플라보노이드는 최근 많은 연구에서 항비만, 항염증 등의 반응에 효과가 있다고 발표된 바 있으며, 플라보노이드 성분을 지방전구세포 분화 과정 동안 처리했을 시 분화 억제 및 항산화 효과가 있음이 밝혀진 바 있다. NFP의 총 플라보노이드의 함량은 7.26 ± 0.04 mg QE/g 수준으로 나타났으나 FP에서는 40.04 ± 0.24 mg QE/g 이상의 수준으로 총 플라보노이드 함량이 높아졌음을 확인하였다.

폴리페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화 환원반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (-OH)기를 가진 방향족 화합물을 가리킨다. 총 페놀 함량 측정은 시료 내의 다양한 페놀류 물질들이 Folin & Ciocalteau 시약의 phosphomolybdic acid에 전자를 공여함에 따라 청자색 환원물을 생성하는 원리를 이용한 방법이다. NFP의 총 페놀의 함량은 7.23 ± 0.14 mg GAE/g 수준으로 총 플라보노이드 함량과 마찬가지로 FP에 비해 낮은 결과를 나타냈다. 이 결과는 Lee 등

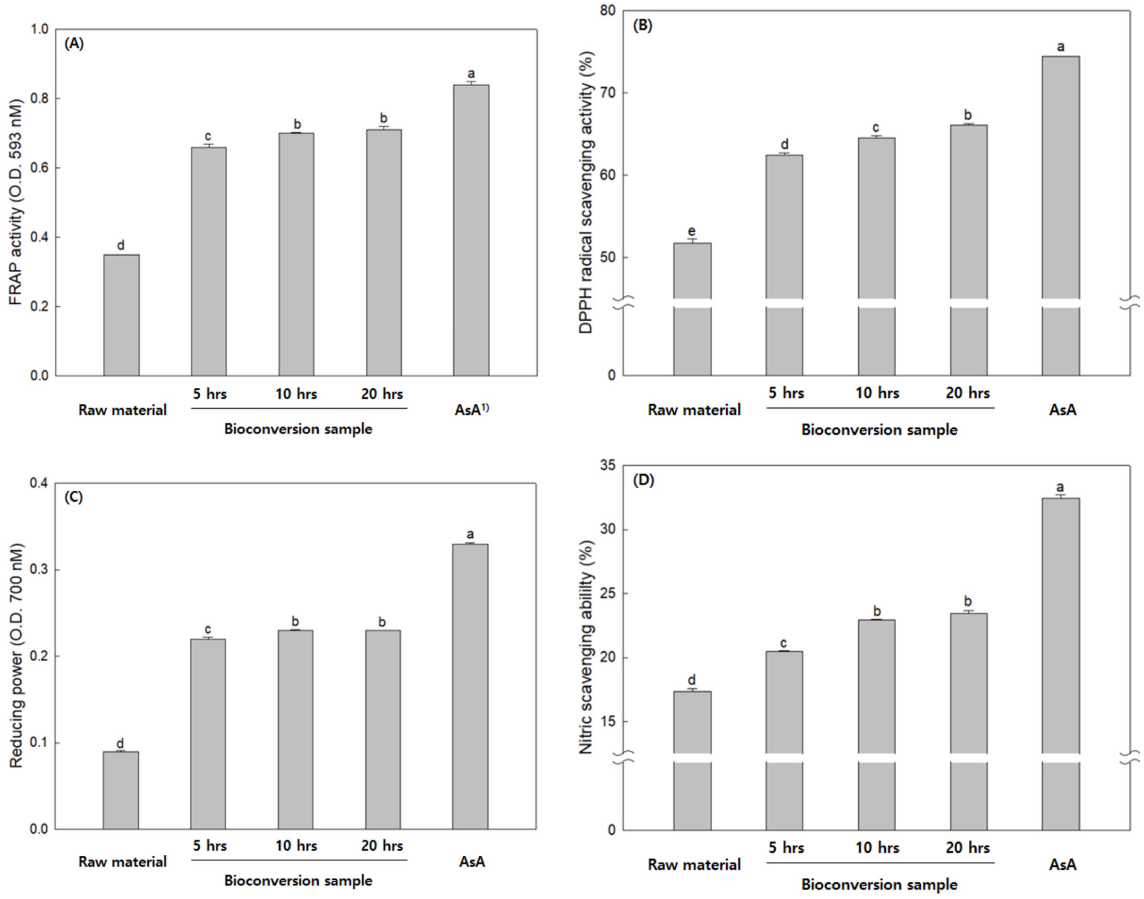

Fig. 1. FRAP assay (A), DPPH radical scavenging (B), reducing power (C) and Nitrite scavenging activity (D) of NFP and FP. Each value represents mean ± SD (n=3). [a-e]Means with different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.
[1)]AsA: Ascorbic acid.

[25]의 연구결과와 같이 발효를 통하여 플라보노이드와 페놀의 함량이 증가하는 결과를 나타내었다.

FRAP, DPPH 라디칼 소거능, reducing power 및 아질산염 소거능 활성

FRAP assay는 산화환원 반응을 이용하여 항산화 능력을 측정하는 방법으로, 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한다. DPPH는 항산화 능력을 측정하는 데 있어 대표적인 반응물질로 그 자체로 매우 안정한 자유 라디칼이며, DPPH 라디칼 소거능은 하이드록시 라디칼(–OH)을 갖는 페놀성 화합물이나 플라보노이드를 가진 물질에서 수소공여를 통한 라디칼의 소거로 자색 화합물이 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하는 방법이다. Reducing power는 ferric-ferricyanide (Fe^{3+}) 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe^{2+})로 전환되는 환원력을 흡광도 값으로 측정하는 원리를 이용한 방법이다. Griess 시약의 sulfanilamide는 N-1-naphylethylenediamine dihydrochloride가 NO_2와 반응하여 azo 화합물을 형성하게 되는데, 아질산염 소거능 측정은 이 azo 화합물의 흡광도를 측정하는 방법이다. NFP와 FP의 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

NFP에서 FRAP은 0.35 ± 0.00으로 측정되었으며, FP는 5 h, 10 h, 20 h에서 각각 0.66 ± 0.01, 0.70 ± 0.00, 0.71 ± 0.01으로 측정되었다. DPPH 라디칼 소거능의 측정 결과 NFP에서는 51.80 ± 0.49%로 측정되었고, FP에서는 발효시간이 증가함에 따라 각각 62.45±0.30%, 64.54 ± 0.30%, 66.10 ± 0.17%로 측정되었다. Reducing power의 측정 결과 NFP에서는 0.09 ± 0.00으로 측정되었으며, 발효시간이 증가함에 따라 0.22 ± 0.00, 0.23 ± 0.00, 0.23 ± 0.00 value로 측정되었다. 아질산염의 측정 결과 NFP에서는 17.35 ± 0.25%로 측정되었고, 발효시간이 증가함에 따라 20.47 ± 0.10%, 22.94 ± 0.08%, 23.46 ± 0.22%로 측정되었다. Reducing power와 아질산염 소거능의 측정 결과는 FRAP assay의 결과와 유사하게 나타났음을 확인할 수 있었다. 항산화 실험의 결과 발효 과정을 거쳐 항산화 활성은 높아지는 결과가 나타났다.

XTT 세포독성평가

NFP와 FP에 대한 세포독성평가에서 XTT assay를 이용하였으며, RAW 264.7 세포 및 HaCaT 세포의 분화 과정 중에 3.13, 6.25, 12.5, 25 μg/mL의 NFP와 FP를 처리하여 세포 독성을 확인하였다(Fig. 2). 황백 발효물을 처리한 RAW 264.7 세포 및 HaCaT 세포 모두에서 3.13-12.5 μg/mL 농도까지는 독성을 보이지 않았으나, 25 μg/mL 농도에서는 세포독성이 확인되어 세포증식이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 이후 진행된 실험에서 황백 발효물의 처리농도는 세포에 독성을 나타내지 않는 12.5 μg/mL로 진행하였다.

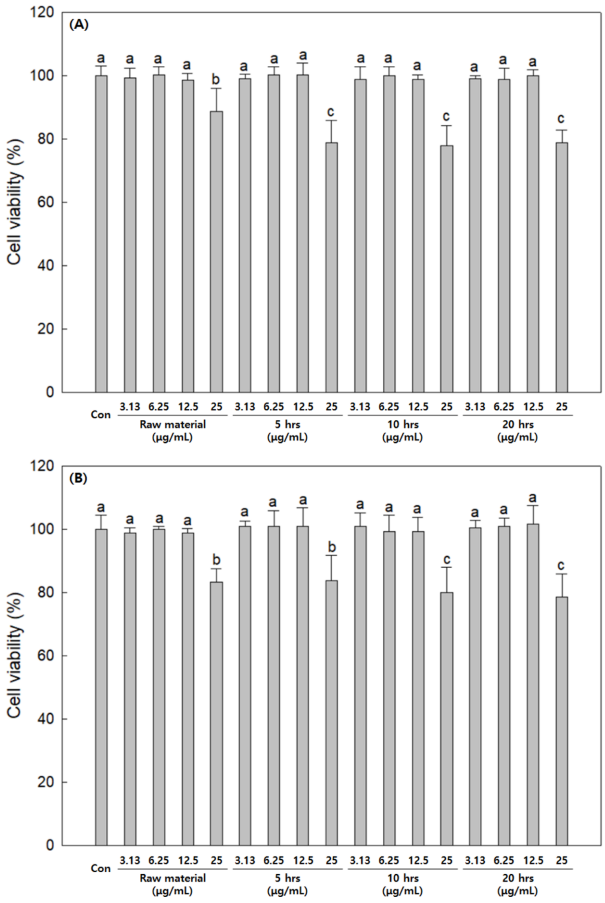

Fig. 2. Effects of NFP and FP on cell viability of RAW 264.7 cells (A), and HaCaT cells (B). Each bar represents the mean ± SD of triplicate determinations. [a-c]Means with different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Nitric oxide (NO) 생성능 평가

RAW 264.7 세포 분화 및 NO 생성 억제능을 확인하기 위하여 세포에 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 세포에 염증반응을 유도했으며, 염증반응이 유도된 세포에 NFP와 FP를 처리하여 NO 생성 억제능을 확인하였다. 그 결과는 Fig. 3과 같으며, NFP와 5 h FP 시료는 NO 생성 억제능의 효능을 보이지 않았으나, 10 h, 20 h FP 시료에서 NO 생성이 억제됨을 확인할 수 있었다. NO는 감염부위의 활성화된 대식세포에서 면역조절, 혈관확장, 신경전달 등의 역할이 있다고 보고되었으며, 지속적인 염증의 진행에 의한 종양형성촉진, 면역반응촉진 등 여러 생물학적 반응에 관여하는 인자로 보고된 바 있다. 따라서 FP의 NO 생성 억제능은 염증관련 질환 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

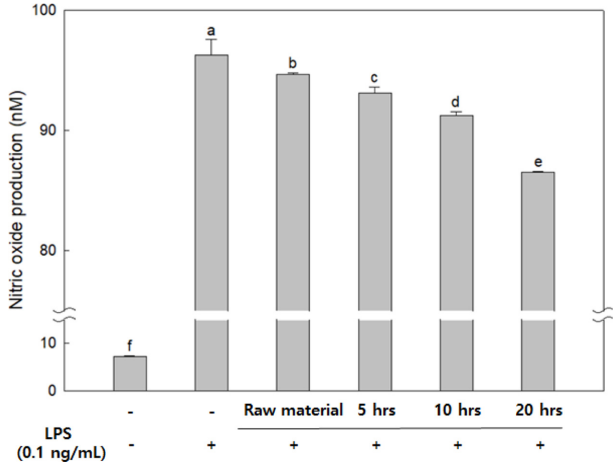

Fig. 3. Effects of NFP and FP on NO production in RAW 264.7 cells. Each value represents mean ± SD (n=3). [a-f]Means with different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

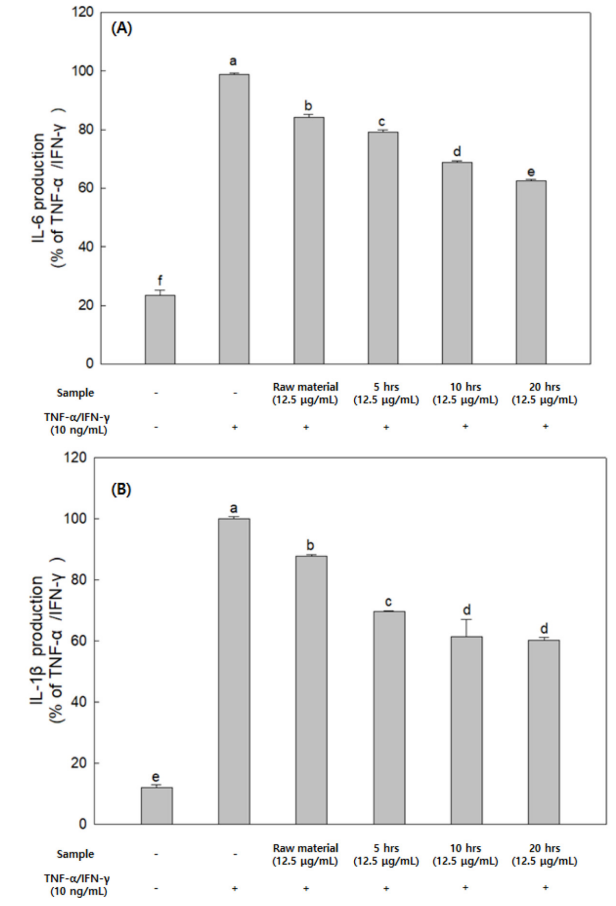

Fig. 4. Effects of NFP and FP on TNF-α/IFN-γ-induced IL-6, and IL-1β production in HaCaT cells. The production of IL-6 (A), and IL-1β (B) protein was measured by ELISA. Each value represents mean ± SD (n=3). [a-f]Means with different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

후보 소재의 염증성 cytokine 및 chemokine 생성량에 미치는 영향 평가(ELISA)

IL-6는 림프구를 활성화시켜 항체의 생산을 증가시키는 cytokine으로 IL-6의 발현은 염증반응에서 항상 증가되는 것으로 보고되어 있으며, IL-1β는 염증 반응의 중요한 매개체로 세포 증식, 분화 및 세포 사멸과 같은 다양한 세포 활동에 관여하는 것으로 알려져 있다[26,27]. 따라서 염증이 유도되었을 때, 이와 같은 cytokine을 효과적으로 조절하는 것은 항염증 반응에서 매우 중요하다.

NFP와 FP가 TNF-α/IFN-γ를 유도한 HaCaT 세포에서 염증성 cytokine인 IL-1β의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위해 ELISA kit를 사용하여 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. HaCaT 세포에 TNF-α/IFN-γ 염증성 cytokine을 처리하였을 때의 IL-6와 IL-1β의 발현량을 각각 100%로 하여 결과를 산출했으며, FP를 처리할 경우 TNF-α/IFN-γ로 유도된 IL-6와 IL-1β의 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 발효 전 황백시료를 처리하였을 때, 발효시간이 증가할수록 IL-6 및 IL-1β 단백질의 발현을 더 효과적으로 억제시킴을 확인하였다. 따라서 황백 시료의 발효에 따라 염증성 cytokine의 발현 억제 기능이 향상되었고 이를 통해 피부기능 개선에 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

Berberine 및 palmatine 분석

확립된 HPLC 분석조건으로 황백 sample에 함유되어 있는 berberine과 palmatine의 농도를 확인한 결과는 Table 2와 같다. Palmatine의 함량의 경우 Jang 등[24]의 연구에서

Table 2. HPLC conditions of berberine and palmatine analysis

Instrument	Conditions		
Column	Intersil ODS-3 C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm, Intersil)		
Column temp.	25°C		
Mobile phase (Gradient)	Time (min)	A[1)]	B[2)]
	0	88	12
	10	85	15
	18	78	22
	24	76	24
	30	72	28
	35	72	28
Detector	Water 996 photodiode array detector (334 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	40 min		

[1)]0.1% Phosphoric acid.
[2)]Acetonitrile.

Table 3. Concentration of palmatine and berberine in NFP and FP

Sample	Concentration (μg/mL)	
	Palmatine	Berberine
NFP	N.D[1)]	9.05 ± 0.26[c]
5 h FP	N.D	131.30 ± 1.32[b]
10 h FP	N.D	142.62 ± 2.18[a]
20 h FP	N.D	140.48 ± 1.35[a]

[1)]Not detected.
Each value represents mean ± SD (n=3). [a-c]Means with different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

확인된 검출한계인 0.32 μg/mL 보다 높게 나타났으나 정량한계인 0.97 μg/mL보다 낮게 나타나 불검출(N.D)로 표기하였으며, berberine의 함량은 sample별로 약간의 차이가 확인되었다. NFP에서는 berberine의 함량이 9.05 mg/g의 함량을 보였고, FP에서 berberine의 함량이 증가하였음을 확인하였다. 이 결과는 Um 등[7)]의 연구결과와 같이 발효를 통해 berberine의 함량이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

Acknowledgments

본 논문은 2020년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 사회맞춤형 산업협력 선도대학(LINC+) 육성사업(2020-D-G035-010108) 및 2020년도 지역주력산업육성사업(과제번호 S2877914)의 일환으로 수행된 것으로 중소벤처기업부의 지원을 받아 연구되었음.

국문요약

본 연구는 발효 전후 황백 시료의 항산화 활성, 피부기능 개선 효과 및 항균 활성을 연구하고 그 효능을 평가하여 발효 황백의 피부기능 개선 효능에 대한 자료를 제공하고자 하였다. 항산화 활성을 평가하기 위해 총 플라보노이드, 총 페놀 함량, FRAP, DPPH 라디칼 소거능, reducing power, 아질산염 소거능 등을 측정하였고, 피부기능 개선 효과를 확인하기 위해 LPS를 처리한 RAW 264.7 대식세포와 TRF-α/IFN-γ를 처리한 HaCaT 피부표피세포를 바탕으로 XTT 세포독성평가, NO 생성 억제능 평가, ELISA kit를 이용한 염증성 cytokine의 생성량을 평가하여 항염증 활성을 평가하였다. 항산화 활성의 측정 결과 발효 전 황백 시료에서는 현저히 낮은 결과를 보였으나, 발효과정을 거치며 항산화 활성이 증가하는 결과를 확인할 수 있었다. XTT 세포독성 평가 결과, RAW 264.7 세포와 HaCaT 세포 모두 3.13, 6.25, 12.5 μg/mL의 농도에서 독성이 없음을 확인하였다. NO 생성 억제능 평가와 ELISA kit를 이용한 실험 결과 황백 시료가 발효됨에 따라 염증반응 매개물질인 NO의 생성량이 감소하고 IL-6와 IL-1β의 발현이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다. 발효 전후 황백 추출물의 berberine 및 palmatine의 함량을 분석한 결과 palmatine은 검출되지 않았으며 berberine의 함량은 발효에 따라 증가함을 확인할 수 있었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Gill-Woong Jang https://orcid.org/0000-0003-1436-7498
Sun-Il Choi https://orcid.org/0000-0001-7400-6286
Xionggao Han https://orcid.org/0000-0002-5057-7401
Xiao Men https://orcid.org/0000-0003-1101-5796
Hee-Yeon Kwon https://orcid.org/0000-0002-1142-7777
Ye-Eun Choi https://orcid.org/0000-0001-8298-248X
Na-Yoon Kang https://orcid.org/0000-0002-7351-9351
Byung-Wo Park https://orcid.org/0000-0002-0052-2461
Jeong-Jin Kim https://orcid.org/0000-0002-1158-7543
Suk-Nam Kang https://orcid.org/0000-0002-9230-3070
Ok-Hwan Lee https://orcid.org/0000-0001-6855-3136

References

1. Kim, S.Y., Lee, M.H., Jo, N.R., Park, S.N., Antibaterial activity and skin moisturizing effect of *Cedrela sinensis* A. Juss shoots extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **36**, 315-321 (2010).
2. Kim, B.A., Kim, M.S., Kang, B.M., Byeon, S.H., Park, I.H., Park, J.H., Jung, J.W., Ahn, E.M., Jung, H.A., Jang, J.H., Bae, W., Lee, H.Y., Choi, P.N., Park, C.I., Inhibitory studies of Hwangryunhaedok-tang on development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Kor. J. Herbology*, **23**, 59-65 (2008).
3. Park, S.N., Jeong, S.H., Kim, Y.W., Choi, O.B., Immunomodulation effect of combined herbal extracts on atopic dermatitis in CBA/N mouse. *J. Kor. Soc. Cosm.*, **19**, 153-158 (2013).
4. Kim, S.C., Ahn, K.J., Hann, S.K., Kim, J.W., Sung, K.J., Kye, Y.C., Kim, N.I., Cho, K.H., Kim, K.J., Youn, J.I., Clinico-epidemiologic study on the abuse, misues, and adverse effects of topical dermatologic drugs. *Korean J. Dermatol.*, **41**, 1129-1135 (2003).
5. Cho, Y.J., Anti-inflammatory effect of jatrorrhizine from *Phellodendron amurense* in lipopolysaccharide-stimulated Raw264.7 cells. *J. Appl. Biol. Chem.*, **54**, 114-119 (2011).
6. Lee, S.H., Lee, J.A., Shin, M.R., Lee, J.H., Roh, S.S., The protective effect of water extract of *Phellodendri Cortex* in chronic reflux esophagitis-induced rats. *Kor. J. Herbology*,

35, 25-36 (2020).
7. Um, J.N., Min, J.W., Joo, K.S., Kang, H.C., Nitric oxide production and elastase inhibitory activities of extract and its fraction from *Phellodendri* Cortex. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **25**, 22-28 (2017).
8. Lee, J.G., Choi, J.Y., Oh, J.S., Jung, H.W., Choi, E.H., Lee, H.S., Kim, J.A., Chang, T.S., Son, J.K., Lee, S.H., Isolation of melanin biosynthesis inhibitory compounds from the *Phellodendri Cortex*. *Kor. J. Pharmacogn*., **38**, 387-393 (2007).
9. Kim, K.H., Ahn, S.C., Lee, M.S., Kweon, O.S., Oh, W.K., Kim, M.S., Sohn, C.B., Ahn, H.S., Adipocyte differentiation inhibitor isolated from the barks of *Phellodendron amurense*. *Korean J. Food Sci. Technol*., **35**, 503-509 (2003).
10. Kwak, D.J., Antibacterial activities of *Phellodendri* cortex on the *Streptococcus mutans*. *J. Korean Soc. Hyg. Sci.*, **10**, 99-107 (2004).
11. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, (2018, December 26). *Phellodendron* Bark. Retrieved from https://www.nifds.go.kr/brd/m_184/view.do?seq=13
12. Schmeller, T., Latz-Brüning, B., Wink, M., Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, **44**, 257-266 (1997).
13. Chung, S.R., Choi, M.W., Park, I.D., Kim, K.H., Effect of berberine on the proinflammatory cytokines production in mice. *J. Life Sci*., **20**, 1276-1280 (2010).
14. Creasey, W.A., Biochemical effects of berberine. *Biochem. Pharmacol*., **28**, 1081-1084 (1979).
15. Tan, W., Lu, J., Huang, M., Li, Y., Chen, M., Wu, G., Gong, J., Zhong, Z., Xu, Z., Dang, Y., Guo, J., Chen, X., Wang, Y., Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chinese Med*., **6**, 27 (2011).
16. Jung, T.D., Kim, J.M., Choi, S.I., Choi, S.H., Cho, B.Y., Lee, J.H., Lee, S.J., Park, S.J., Heo, I.Y., Lee, O.H., Method validation for determination of lignan content in fermented sesame by bioconversion. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*., **46**, 646-652 (2017).
17. Cho, Y.H., Cho, J.S., Lee, G.W., Antioxidant activity of wood vinegar by bioconversion. *J. Korea Acad. Industr. Coop. Soc*., **12**, 4434-4442 (2011).
18. Kim, Y.H., Lee, Y.J., Park, S.O., Lee, S.J., Lee, O.H., Antioxidant compounds and antioxidant activities of fermented black rice and its fractions. *Korean J. Food Sci. Technol*., **45**, 262-266 (2013).
19. Kwon, H.Y., Lee, S.M., Choi, S.I., Cho, B.Y., Choi, S.H., Sim, W.S., Han, X., Jang, G.W., Lee, O.H., Park, D.H., Antioxidant activities of *B. campestris* var. *chinensis* and *B. juncea L. Czern* var. Laciniata Makino baby leaf extracts. *Korean J. Food Preserv*., **26**, 336-342 (2019).
20. Cho, M.L., Lee, H.S., Kang, I.J., Won, M.H., You, S.G., Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chem*., **127**, 999-1006 (2011).
21. Sim, W.S., Lee, J.S., Lee, S., Choi, S.I., Cho, B.Y., Choi, S.H., Han, X., Jang, G.W., Kwon, H.Y., Choi, Y.E., Kim, J.Y., Kim, J.D., Lee, O.H., Antioxidant effect of extracts from 9 species of forest plants in Korea. *J. Food Hyg. Saf*., **34**, 404-411 (2019).
22. Kim, D.J., Jung, J.H., Kim, S.G., Lee, H.K., Lee, S.K., Hong, H.D., Lee, B.Y., Lee, O.H., Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J. Food Preserv.*, **18**, 366-373 (2011).
23. Bae, I.K., Min, H.Y., Han, A.R., Seo, E.K., Lee, S.K., Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazilin in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur. J. Pharmacol*., **513**, 237-242 (2005).
24. Jang, G.W., Choi, S.I., Han, X., Men, X., Kwon, H.Y., Choi, Y.E., Park, B.W., Kim, J.J., Lee, O.H., Development and validation of analytical method and antioxidant effect for berberine and palmatine in *P. amurense*. *J. Food Hyg. Saf*., **35**, 544-551 (2020).
25. Lee, D.H., Hong, J.H., Physicochemical properties and antioxidant activities of fermented mulberry by lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*., **45**, 202-208 (2016).
26. Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P., Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*, **37**, 355-361 (2003).
27. Han, M.H., Lee, M.H., Hong, S.H., Choi, Y.H., Moon, J.S., Song, M.K., Kim, M.J., Shin, S.J., Hwang, H.J., Comparison of Anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their mixtures in RAW 246.7 murine macrophages. *J. Life Sci*., **24**, 329-335 (2014).