

초고압 공정을 이용한 강황 잎 추출물의 피부 면역 활성 증진

김남영* · 이현용**†

*강원대학교 생물의소재공학과, **서원대학교 식품공학과

Enhancement of Skin Immune Activities of *Curcuma longa* L. Leaf Extract by Ultra High Pressure Process

Nam Young Kim* and Hyeon Yong Lee**†

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

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

ABSTRACT : *Curcuma longa* L. leaf was extracted by water at 60°C for 12 hours after being treatment of Ultra High Pressure under 500 MPa for 5-15 minute. The high pressure extraction for 15 minute (HPE15) was measured the highest extraction yield of 25.48% (w/w), compared to those from conventional extraction methods. The HPE15 showed the lowest cytotoxicity as 11.97% in adding 1.0 mg/ml of concentration. Also, HPE15 was measured the highest inhibition of hyaluronidase as 44.48% in adding 1.0 mg/ml. In addition, The production of NO from macrophages was measured as 7.06 μM in adding 1.0 mg/ml of HPE15, which was lower than the those from others processes. Finally, HPE15 significantly reduced up to 649.44 pg/ml of ProstaglandinE₂ production from UV-irradiation. These results suggest that the *Curcuma longa* Linne leaf extract from high pressure process might enhance the skin immune activities possibly by high elution of active components than other processes.

Key Words : *Curcuma longa* L., High Pressure Process, Skin Immune Activity

서 언

강황 (*Curcuma longa* L.)은 생강과에 속하는 여러해살이 풀로, 열대 및 아열대지방에 분포해있으며, 인도 및 동남아시아가 주 원산지 이다 (Lim *et al.*, 2013). 강황은 일부 국가에서 예로부터 염증을 치료하는데 사용해 왔으며, 강황에 많은 양이 함유 되어있다고 보고 된 생리활성물질인 curcumin을 필두로 하여 (He *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005), 그 유사 화학 구조 성분들의 효능 때문에 종양을 생성하는 단백질의 성장을 억제하는 항암효과가 우수한 것으로 알려져 있다 (Jayaprakasha *et al.*, 2005). 이외에도 현재 curcumin에 대한 연구를 살펴보면 항산화 (Jung *et al.*, 2004) 및 항암 (Ryu *et al.*, 2005), 항염증 (Ammon and Wahl, 1991; Gupta and Ghosh, 1999), 항바이러스 (Mazumder *et al.*, 2000)등 각 중 인체의 생리 활성 분야에서 다양한 연구가 보고되었으며, 진

행 중이다. 본 연구는 현대사회에서 각 종 환경오염으로 인한 아토피 피부염, 건선 등 염증성 피부질환이 문제시 되고 있는 것에 착안하여 상기와 같은 강황의 효능 중 강황의 항염증 효능에 중점을 두어 이를 바탕으로한 피부면역 향상소재로서의 가능성을 확인하기 위해 피부면역에 관한 연구를 진행하였다.

염증 반응은 각종 세균으로부터의 감염을 방어하는 현상을 뜻하며, 외부로부터 침입해온 항원에 의하여 대식세포가 활성화되어 염증 반응을 유도한다. 이 때 Cytokine 및 NO (Nitric Oxide), PGE₂ (Prostaglandin E₂)가 생성이 되어, 염증 반응에 있어 핵심이 되는 역할을 담당한다 (Higuchi *et al.*, 1990). 이를 통해 본 연구에서는 NO, PGE₂ 생성량 확인등 염증인자 저해평가를 통해 강황 잎의 피부 면역 효능 평가를 실시하였다.

기존에 강황 잎의 주요활성 성분이 정유상태로 얻어지는 것

†Corresponding author: (Phone) +82-43-299-8471 (E-mail) hyeonl@seowon.ac.kr

Received 2014 July 7 / 1st Revised 2014 July 15 / 2nd Revised 2014 July 31 / 3rd Revised 2014 August 29 / Accepted 2014 September 2

This is an open access article 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.

을 감안하면 천연물로부터 기능성 소재를 얻기 위해 필수적 단계인 추출 공정에 있어 기존 수용성성분 추출에만 중점을 둔 일반적인 공정이 아닌 여러 가지 형태의 성분을 고 수율로 추출할 수 있는 신기술 추출공정이 필요하다. 강황 잎과 같이 표면적이 넓은 잎 종류의 경우 열에 대한 변성이 쉽게 이루어질 수 있는 부분이므로 가공 시 저온 처리와 신속한 공정 처리가 필수적이다.

보통 많이 사용하는 천연물 추출방법인 열수 추출 방법은 효율이 낮고 고온에서 추출을 진행하므로 천연물의 활성성분 파괴나 변성이 될 가능성이 있다 (Park *et al.*, 2004). 이러한 추출방법의 단점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 보다 저온에서 추출하면서, 효율을 높이기 위하여 추출 전 전처리로 초고압 공정을 통해 피부면역에 대한 효능을 알아보고자 하였다.

초고압 공정은 천연물의 유효성분을 비교적 저온에서 단시간 내에 추출이 가능하며, 각 종 천연물의 활성물질 추출에 있어 초고압 공정은 높은 효율과 열에 의한 활성물질의 파괴 및 변성 등의 문제점을 극복하여 높은 순도의 성분을 추출할 수 있다 (Kim, 2007).

본 연구는 이전에 거의 사용되지 않았던 강황 잎을 초고압 공정 및 저온을 이용하여 유용활성물질의 손실을 최소화하며 단 시간에 추출이 가능하도록 하였으며 강황 잎 추출물을 통하여 피부 면역에 대한 활성을 수행함으로써, 강황 잎의 화장품 원료로의 이용가치를 높이고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 강황 (*Curcuma longa* L.)은 전북지역에서 2011년 3월부터 재배한 것을 수확 직전 2011년 9월 강황 잎 부분만 채취하였으며, 실험실로 동결건조기 (PVTFD 100R, ILSHINLAB, Yangju, Korea)를 이용하여 진공도 10 mm Torr, -50°C 조건에서 동결건조하였다. 건조수율은 건조 전 시료에 대하여 건조 후 시료의 무게백분율로 계산하였다.

2. 시료 추출 조건

초고압 추출은 동결건조하여 분쇄 된 강황 잎 시료 10 g을 비닐 팩에 몰과 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출장치 (ILSHIN autoclave, Daejeon, Korea)를 이용하여 5000 bar의 압력으로 각각 5분, 15분간 초고압 전처리 추출공정을 시행하였다. 초고압 추출이 끝난 강황 잎을 수직 환류냉각기가 부착된 flask에 10배의 증류수를 이용하여 60°C에서 12시간동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압여과장치로 여과하여 농축한 후 72시간 동안 동결건조하여 실험에 사용하였다.

3. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주로 Human fibroblast CCD-986sk (KCLB 21947, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 세포배양에 필요한 배지로 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 사용하였고 그 밖의 세포 배양에 필요한 시약으로 hepes buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA), gentamycin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), trysin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) 배지 90%에 FBS를 10%로 적용시켜 배양하여 실험에 이용하였다.

4. 세포 독성 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)를 사용하여 Mosmann방법을 변형시켜 세포 독성을 측정하였다 (Mosmann, 1983). CCD-986sk 세포를 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well 농도로 접종한 후, 80% 정도의 배양시점에서 각 well에 시료를 투여하고 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 5 µg/ml 농도의 MTT 용액을 각 well에 첨가하고 4시간 후 상층액을 제거하고, 10 µl의 acid-isopropanol (0.04N HCl in isopropanol)을 첨가한 다음 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)로 565 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. Hyaluronidase 억제효과 측정

Hyaluronidase 억제효과는 N-acetylglucosamine의 양을 분광광도계로 측정하여 활성을 판단하였다. 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase (7900 unit/ml) 50 µl에 시료를 최종 농도 0.2, 0.6, 1.0 mg/ml가 되도록 하여 20 µl씩 가하고, 효소의 활성화를 위해 12.5 mM의 CaCl₂ 200 µl를 혼합한 후 37°C 수욕상에서 20분간 배양시켰다. 대조군은 DMSO 용액을 넣고 수욕상에서 20분간 배양하였다. 활성화된 hyaluronidase 용액에 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid (12 mg/5 ml) 250 µl를 첨가하여 다시 수욕상에서 40분간 배양하였다. 배양후 0.4 NaOH용액과 100 µl와 0.4 M potassium tetraborate 100 µl를 반응 혼합물에 첨가하여 끓는 수조에서 3분간 배양시킨 후 냉각시켰다 냉각시킨 반응물에 dimethyl aminobenzaldehyd 용액 (p-dimethyl aminobenzaldehyde 4 g, 100% acetic acid 350 ml, 및 10 HCl 50 ml 혼합액) 3.28 ml를 반응 혼합물에 첨가한 후 37°C 수욕상에서 20분간 배양하고, microplate reader를 이용하여 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

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

ODc: Optical density of control, ODs: Optical density of samples

6. Macrophage를 이용한 Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

NO 생성량 측정을 위해 사용된 세포주는 마우스 유래 J774.1 대식세포를 사용하였으며, 세포를 10% FBS와 DMEM 배지에 배양하여 24 well plate에 4.5×10^4 cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가한 것과 첨가하지 않은 두 가지 군을 나누어 모두 37°C, 5% CO₂ 배양기에 48시간 동안 배양한 후 LPS (lipopolysaccharide)를 200 ng/well의 농도로 처리하여 48시간 동안 세포를 배양하였다. 상등액 50 µl을 취하여 동일 부피의 Griess시약 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며, 농도는 32 µM에서부터 0.25 µM까지 RPMI 1640 배지로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다 (Choi *et al.*, 2006).

7. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성량 측정

염증에 관여하는 것으로 알려진 prostaglandin (PG)이 만들어지는 기전은 LPS, SNP 및 UV에 의하여 interleukin-1 (IL-1)과 interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF)과 같은 cytokine이 분비되면, phospholipase A₂(PLA₂)가 활성화 되며, 세포막에 있는 phospholipid에서 Arachidonic acid가 분비되어 Arachidonic acid가 cyclooxygenase (Cox)에 의해 PG로 변환한다 (Bernstein and Chen, 1994). 또한, UV는 COX₂의 양을 증가시켜 다량의 PGE₂가 발생하게 된다 (Liou *et al.*, 2007). HDF (Human Dermal Fibroblast)인 CCD-986sk를 10% FBS와 DMEM 배지에 2×10^5 cells/ml 만큼 주입하였다. 그 뒤 50 M의 aspirin을 넣고 HDF에 존재하는 COX 효소의 활성을 억제시켜 동일한 PGE₂의 양이 되도록 하였다. 그 뒤 세포배양액과 시료를 96-well-plate에 20 µl씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 2시간 동안 UV 등 필터를 통하여 UVA (6.3J/cm²)를 조사하였다. 배양한 뒤 부착된 세포를 PBS로 2회 세척하고, 남은 세포를 통하여 실험을 진행하였다 (Han *et al.*, 2008).

PGE₂ 생성량은 Prostaglandin E₂ Express EIA Short kit (ACETM, 155019)를 이용하여 측정하였다 (Cui *et al.*, 2005). 항 PGE₂ 항체가 부착되어있는 plate의 각 well에 회수한 상층액과 함께 PGE₂-acetylcholinesterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 배양한 후, 각 well에 남아있는 용액을 말끔히 털어낸 후, 0.05% tween 20-phosphate buffer solution으로 각 well을 5회 세척하고 Ellman 시약 200 µl를 각 well에 넣은 후 7시간 배양하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

PGE₂를 표준품으로 검광선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 PGE₂ 생성량을 구하였다.

8. 통계처리

데이터 통계처리는 3회 반복으로 시행하였으며, 실험값의 통계는 SAS (Statistical Analysis System) 프로그램을 통하여 two-way ANOVA 방법 에 의하여 처리하였다. 처리구간의 최소 유의 수준의 차 ($p < 0.05$)로 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

1. 수율

Table 1에 강황 잎 추출물의 추출 방법별 수율을 나타내었다. 추출 수율 측정을 통해 저온 고압 공정을 이용한 강황 잎 추출물이 일반 추출 공정을 이용한 추출물에 비해 약 1.5 배 수율이 향상된 것을 확인하였다. 이와 같은 초고압 공정을 이용한 복분자의 면역 활성화에 관한 연구에서 초고압 추출물의 수율이 일반 열수 추출물에 비해 1.9배까지 증가된 것이 보고되었으며 (Kwon *et al.*, 2007), 다른 천연물인 매자나무를 이용한 연구결과에서는 초고압 추출 시 수율이 34% 가량 증진된 연구 결과를 보여주어 초고압 공정을 사용할 경우 유용 물질의 용출이 증대됨을 확인 할 수 있었다 (Jin *et al.*, 2008). 그러므로 저온고압 추출을 통해 이러한 결합들이 분리되어 새로운 물질의 용출이 가능한 것으로 보인다. 본 연구의 추출물 중 HPE15인 초고압을 15분 동안 가하여 추출한 강황 잎 추출물이 25.53%로 두 번째인 HPE5 추출물보다 높은 수율을, 그 뒤로 HPE5 추출물이 23.20%, 70% 에탄올 추출물은 20.03%의 수율을 보였으며, 열수추출물이 18.35%의 낮은 수율을 보였다. 이를 통하여 초고압 추출공정이 강황 잎 추출 수율 증가에 효과적인 것을 확인하였다.

2. 세포 독성 측정

실험에 사용된 sample의 농도는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8,

Table 1. Yield of *Curcuma longa* L. leaves by extraction condition.

Sample	Temp. (°C)	High Pressure	Yield (%)
EE	75	-	20.03 ± 0.11 ^{A**}
WE	100	-	18.32 ± 0.23 ^B
HPE5	60	5 min	23.24 ± 0.08 ^C
HPE15		15 min	25.48 ± 0.12 ^D

*Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. **Mean with difference letter (A-D) within Yield are significantly different at $p < 0.05$. WE; water extraction at 100°C for 24 h, EE; ethyl alcohol extraction at 75°C for 24 h, HPE5; high-pressure extraction for 5 minute at 500 MPa and 60 °C with water for 12 h, HPE15; high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water for 12 h.

초고압 공정을 이용한 강황 잎 추출물의 피부 면역 활성 증진

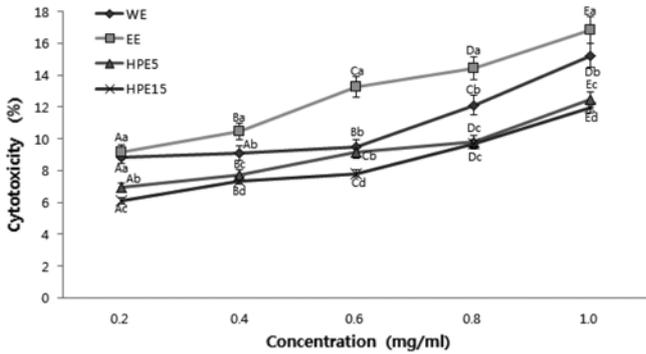


Fig. 1. Cytotoxicity of the *Curcuma longa* L. leaves by different extraction process. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-E) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$. WE; water extraction at 100°C for 24 h, EE; ethyl alcohol extraction at 75°C for 24 h, HPE5; high-pressure extraction for 5 minute at 500 MPa and 60°C with water for 12 h, HPE15; high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water for 12 h.

1.0 mg/ml 로 조절하여 인간섬유아세포인 CCD-986sk에 대한 세포독성을 측정하였다. 실험 결과 대부분의 추출조건에서 농도 의존적으로 세포독성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, HPE15가 거의 모든 농도에서 매우 낮은 세포독성을 나타내었다 (Fig. 1). 열수 추출물이 1.0 mg/ml의 농도에서 15.24%의 세포독성을 보였으며, 에탄올 추출물, 초고압 5분 추출물 및 초고압 15분 추출물은 같은 농도에서 각각 16.83%, 12.46%, 11.97%의 세포독성을 보였다. 이는 피부면역 활성 실험을 진행 한 불가사리 유래 콜라겐 펩타이드의 피부 면역 증진 연구에서 같은 1 mg/ml 농도의 불가사리 유래 펩타이드 콜라겐이 18.53%를 나타낸 것과 비교하면 낮은 세포독성을 보임으로써, 추후 식품이나 향장 원료로서 사용될 가능성이 있을 것으로 확인하였다 (Jeong *et al.*, 2008). 상기 결과를 통하여, 초고압 공정으로 인해 강황 잎에 함유되어 있던 세포독성에 영향을 주는 물질이 제거된 것과 동시에 독성에 저항할 수 있는 면역 관련 물질이 용출된 것으로 보이며, 어떠한 물질인지는 추가 연구가 필요 하지만 앞서 초고압 공정에 관련된 연구들을 살펴보면 (Kim *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2011), 마찬가지로 초고압 공정을 실시하였을 때 세포독성이 감소한 것을 확인할 수 있다. 상기와 같은 결과를 토대로 초고압 공정을 처리함으로써 세포 독성이 감소하는 것을 확인 하였다.

3. Hyaluronidase 억제효과 측정

강황 잎 추출물의 초고압 공정을 통한 피부 면역 활성 증진 효과를 확인하기 위해 hyaluronidase 억제 활성을 확인하였다. Hyaluronidase는 피부의 탄력 및 보습에 있어 영향을 끼치는 hyaluronic acid을 분해하는 효소이며, 피부면역을 저해하는 요

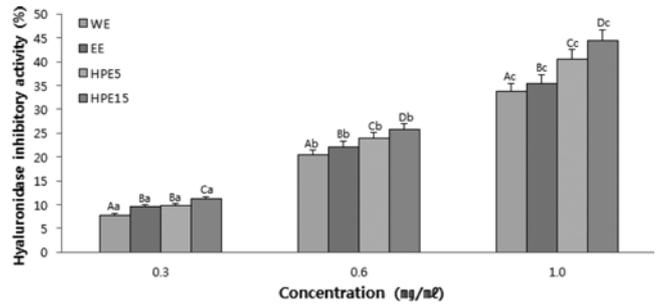


Fig. 2. Hyaluronidase inhibitory activity of the *Curcuma longa* L. leaves by different extraction process. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same sample are significantly different at $p < 0.05$. WE; water extraction at 100°C for 24 h, EE; ethyl alcohol extraction at 75°C for 24 h, HPE5; high-pressure extraction for 5 minute at 500 MPa and 60°C with water for 12 h, HPE15; high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water for 12 h.

소가 될 수 있다. 이 실험에서는 이러한 hyaluronidase의 억제 효과를 확인함으로써 강황 잎 추출물의 피부면역에 대한 효능을 알아보려고 하였다. 강황 잎 추출물의 hyaluronidase 억제 효과를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 결과를 통해 모든 샘플에서 hyaluronidase가 억제되는 것을 확인하였다. 저해 수준은 농도에 비례하여 증가하는 경향을 나타내었으며, 실험을 통해 시료에 따라 약 20~45%의 저해 활성을 나타내었다. HPE15는 최대 시료 투여농도인 1.0 mg/ml에서 44.48%까지 hyaluronidase 저해활성을 나타내었다. 반면, 100°C 열수 추출물인 WE의 경우 같은 농도에서 33.74%로 낮은 활성을 나타내었다. 같은 면역 활성에 대한 선행 연구인 유산균 발효를 통한 황금 추출물에 관한 연구와 비교하였을 때, 동일한 농도에서 최대 42.1%의 저해 활성률을 보인 것에 반해 다소 높은 저해 활성률을 나타낸 것으로 보아 (Choi *et al.*, 2013), 초고압 공정을 거친 강황 잎 추출물은 피부 면역활성에 대하여 충분한 효과가 있는 것을 확인하였다.

4. Macrophage를 이용한 Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

쥐의 대식 세포인 J774.1을 이용한 NO 생성량을 확인하여 강황 잎 추출물의 항염증에 대한 활성을 Fig. 3에 나타내었다. 시료를 단독 투여한 경우 3~4 μ M 정도로 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 LPS와 함께 처리할 경우, LPS를 단독으로 처리한 12.32 μ M보다, 낮은 NO 생성량인 8.9 μ M 이하의 수치를 나타내었으며, 그 중 HPE15의 경우 7.06 μ M로써 낮은 NO 생성량을 나타내었다. 면역 활성을 입증한 극한 저온 공정을 한 지치에 대한 연구와 비교해보면, 지치의 경우 가장 낮은 NO 생성량이 10.5 μ M로 나타내었다

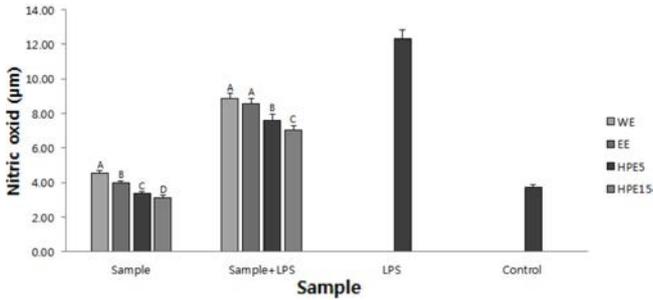


Fig. 3. Stimulation of nitric oxide production on the macrophage, RAW 264.7, through the addition of 1.0 mg/ml of the *Curcuma longa* L. leaves by different extraction process. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same processing are significantly different at $p < 0.05$. WE; water extraction at 100°C for 24 h. EE; ethyl alcohol extraction at 75°C for 24 h. HPE5; high-pressure extraction for 5 minute at 500 MPa and 60°C with water for 12 h. HPE15; high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water for 12 h.

(Seo *et al.*, 2013). 지치의 NO 생성량과 비교하였을 때, 강황 잎은 훨씬 낮은 NO 생성량을 보였으며, 강황 잎 추출물의 낮은 NO 생성량에 따라 항염증 효능이 높은 것으로 사료되며 특히 낮은 NO 생성량이 확인된 15분 동안 초고압공정을 거친 강황 잎 추출물이 항염증 효과가 높은 것은 초고압공정을 함으로써 항염증 효능이 증대된 것으로 판단할 수 있다. 이에 더해 초고압 공정을 거친 시간이 길수록 항염증 효과가 우수하여 피부면역에 대한 효능이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

5. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성량 측정

강황 잎 추출물의 피부면역에 대한 효과를 측정하기 위하여 UV를 이용한 PGE₂ 생성량을 확인하였다. PGE₂ 생성량 측정에는 섬유아세포인 CCD-986sk를 사용하였으며, UV조사를 통하여 섬유아세포에 영향을 주었다. UV를 통한 섬유아세포에 강황 잎 추출물을 처리하여 PGE₂ 생성량을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4(a)는 UV가 없는 실험군에서의 PGE₂의 생성량을 나타낸 것으로서, 가장 높은 농도인 1.0 mg/ml에서 가장 낮은 생성량이 측정된 HPE15의 경우 434.98 pg/ml 생성량을 확인하였다. HPE15에서 다른 추출물과 비교하여 유의적인 차이를 보였지만 열수추출물, 에탄올 추출물 그리고 초고압 공정을 5분만 실시하였을 때는 각각 생성량의 유의적인 차이가 확인되지 않았다. UV 조사 시 PGE₂ 생성량은 UV조사 전과 유사한 양상을 보였으며, 마찬가지로 HPE15이 최대 농도 1.0 mg/ml에서 649.44 pg/ml으로 전체 강황 잎의 추출물 중 낮은 PGE₂ 값을 나타내었다. 전체 샘플이 UV조사 시에 농도 별로 확인한 차이를 보였으나, 동일 농도에서 추출물별로 비교하였을 때, UV 조사 전과 마찬가지로 HPE 15를 제외하고 샘플간의 차이는 매우 미미하였다. 이를 통해 초고압

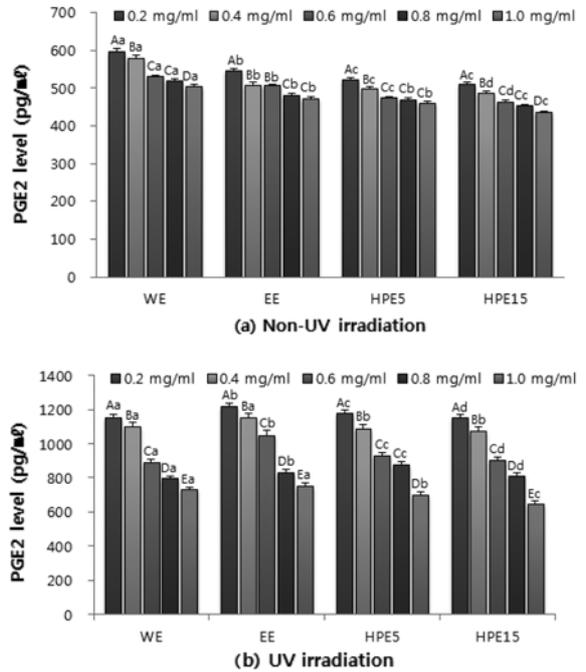


Fig. 4. Effects of *Curcuma longa* L. extraction on the PGE₂ secretion of the human fibroblast, CCD-986sk, by non-UV irradiation and UV irradiation. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-E) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$. WE; water extraction at 100°C for 24 h. EE; ethyl alcohol extraction at 75°C for 24 h. HPE5; high-pressure extraction for 5 minute at 500 MPa and 60°C with water for 12 h. HPE15; high-pressure extraction for 15 minute at 60°C with water for 12 h.

공정이 면역활성 증진에 도움이 될 수 있지만, 초고압 공정 처리 시간이 매우 중요한 것을 알 수 있다. HPE15의 PGE₂ 생성량은 면역 효능이 입증된 초고압을 이용한 스피롤리나의 면역활성 실험과 비교하였을 때 (Oh *et al.*, 2010), 같은 농도에서 스피롤리나의 경우는 UV 조사시에 1,010 pg/ml의 PGE₂ 생성량이 확인되어 강황 잎 추출물의 PGE₂ 생성량이 300 pg/ml 이상 더 낮게 발현되었다. 상기의 결과를 살펴보면 UV로 인하여 자극을 받은 세포가 염증을 유발 시에 IL-1이나 종양괴사인자 (TNF) 등 Cytokine의 생성에 대하여 강황 잎 추출물이 이들을 억제하는 효능이 있음을 확인하였다. 또한, 강황 잎 추출물이 초고압 공정을 거침으로써 기존의 추출방법보다 PGE₂ 생성량이 감소되어 피부면역에 대한 효능이 증진됨을 확인하였다.

기존에 항염 효능에 대해 알려진 강황을 초고압 공정을 처리함으로써 독성 및 Hyaluronidase 저해 평가, NO 생성량 확인 및 PGE₂ 생성량을 측정하여 초고압 처리 추출물이 종래

공정법보다 염증 유발 인자들을 저감시켜 피부 면역에 대한 효능이 증진 됨을 확인하였으나, 염증 유발을 담당하는 중요한 인자인 cytokine의 생성량을 측정하여 초고압 추출물이 cytokine 생성량 또한 저감시킬 수 있는지에 대한 추가 연구가 필요하다.

REFERENCES

- Ammon HP and Wahl MA. (1991). Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica*. 57:1-7.
- Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A and Uitto J. (1994). Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 103:182-186.
- Choi WS, Kwon HS, No RH, Choi GP and Lee HY. (2013). Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 39:303-311.
- Cui X, Bai J, He X and Zhang Y. (2005). Western blot analysis of type I, III, V, VI collagen after laser epithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy in cornea of rabbits. *Yan Ke Xue Bao*. 21:141-148.
- Gupta B and Ghosh B. (1999). *Curcuma longa* inhibits TNF- α induced expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Immunopharmacology*. 21:745-757.
- Han JG, Kim HS, Kwon MC, Kim JC, Hwang BY and Lee HY. (2008). Skin whitening and skin immune activities of the peptides isolated from *Crassostrea gigas* by ultrasonification processes. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 40:394-399.
- He XG, Lin LZ, Lian LZ and Lindenmaier M. (1998). Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in tumeric(*Curcuma longa*). *Journal of Chromatography A*. 818:127-132.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H and Osawa T. (1990). Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *The Journal of Immunology*. 144:1425-1431.
- Jayaprakasha GK, Jagan M, Rao L and Sakariah KK. (2005). Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends in Food Science and Technology*. 16:533-548.
- Jeong HS, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jin L, Kim JC, Kwak HG, Hwang BY and Lee HY. (2008). Enhancement of skin immune activation effect of collagen peptides isolated from *Asteias amurensis*. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 40:522-527.
- Jin L, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Kwon MC, Ahn JH, Kim JC, Choi GP, Chung EK and Lee HY. (2008). Effect of immune activity on *Berberis koreana* Palibin by ultra high pressure low temperature process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:439-445.
- Jung SH, Chang KS and Ko KH. (2004). Physiological effects of curcumin extracted by supercritical fluid from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Korean Journal of Food Science and Technology*. 36:317-320.
- Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC and Lee HY. (2007). Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:398-404.
- Kim CH, Kwon MC, Syed AQ, Hwang B, Nam JH and Lee HY. (2007). Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by ultra high pressure extracts process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:411-416.
- Kim KS, Chung MG and Park SH. (2005). Quantitative determination and stability of curcuminoid pigments from turmeric(*Curcuma longa* L.) root. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 50:211-215.
- Lim JD, Kim EH, Yun JY, Park HI, Shim HS, Choi RN, Yang YS, Park CB, Ahn YS and Chung IM. (2013). Effect of temperatures and fillers on yield and quality of turmeric (*Curcuma longa* L.) during postharvest seed rhizome storage. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:334-341.
- Liou JY, Ellent DP, Lee S, Goldsby J, Ko BS, Matijevic N, Huang JC and Wu KK. (2007). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E₂ protects mouse embryonic stem cells from apoptosis. *Stem Cells*. 25:1096-1103.
- Mazumder R, Mendiratta T, Mondal SC and Mazumder A. (2000). Antimicrobial potency of the leaf stalk extract of *Curcuma longa* (Linn). *Ancient Science of Life*. 20:92-96.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63.
- Oh SH, Kang DH, Choi WY, Seo YC, Heo SJ, Abu AM, Jeong KH and Lee HY. (2010). Enhancement of skin immune activities of *Spirulina maxima* by high pressure extraction process. *Ocean and Polar Research*. 32:157-164.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK and Lee HY. (2004). Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. 19:113-117.
- Ryu GY, No KH, Ryu SR and Yang HS. (2005). Study of separation and analysis method an effective component from ulgeum(*Curcuma longa*) and a contained curcumin as product of national and partial region cultures. *Applied Chemistry*. 9:57-60.
- Seo YC, Choi WY, Kim JS, Cho JS, Kim YO, Kim JC and Lee HY. (2011). Enhancement of anticancer activities from *Lithospermum erythrorhizon* extracts by ultra high pressure process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:103-110.
- Seo YC, Kim JS, Kim YO, Kim Jin Chul and Lee HY. (2013). Immune Activity of *Lithospermum erythrorhizon* extracted by extreme low temperature extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:105-111.