



당귀, 작약, 지황, 천궁 혼합 발효물의 항산화, 항주름 및 미백 효과

엄지나[†] · 민진우 · 주광식 · 강희철
(주) 지에프씨

Antioxidant, Anti-Wrinkle Activity and Whitening Effect of Fermented Mixture Extracts of *Angelica gigas*, *Paeonia Lactiflora*, *Rehmannia chinensis* and *Cnidium officinale*

Ji Na Um[†], Jin Woo Min, Kwang Sik Joo and Hee Cheol Kang
Life Science Research Institute, GFC Co., Ltd., Yongin 17095, Korea.

ABSTRACT

Background: In this study, examined the effects of an extract of a mixture of *Angelica gigas*, *Cnidium officinale*, *Paeonia lactiflora*, and *Rehmannia glutinosa* fermented by *Leuconostoc mesenteroides*, with enhanced value and functionality. In oriental medicine, a mixture of these herbs is called Samultang.

Methods and Results: In this study, we evaluated the effects of a fermented extract of Samultang on oxidative stress, procollagen type I expression, and melanin production. Samultang was extracted with 70% ethanol, followed by inoculation with *Leuconostoc mesenteroides* to obtain the fermented extract. The evaluation of viability of B16F10 cells and human foreskin fibroblast (HHF) revealed that both ethanol and fermented extracts of Samultang were non-toxic. The results of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) test showed that the fermented extract of Samultang (SC₅₀ value = 100 μg/ml) was a more effective DPPH free radical scavenger than its ethanol extract. In addition, procollagen type I expression was higher in cells treated with the fermented extract of Samultang than in cells treated with ethanol. In the non-toxic concentration range, the fermented extract of Samultang showed strong inhibitory effect on melanin production in α-melanocyte stimulin hormone-stimulated B16F10 cells (IC₅₀ = 37.9 μg/ml).

Conclusions: These results suggest that the fermented extract of Samultang has considerable potential as a cosmetic ingredient owing to its antioxidant, anti-wrinkle, and whitening effects.

Key Words: *Angelica gigas*, Antioxidant Activity, Anti-Wrinkle Activity, *Cnidium officinale*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Paeonia Lactiflora*, *Rehmannia chinensis*, Samultang, Whitening Effect

서 언

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 (Imokawa, 2009). 이 활성산소종은 superoxide anion radical (·OH), hydroxyl radical (O₂·) 등의 라디칼 종이 포함되어 있으며, 이 라디칼 종은 짝을 이루지 않은 홀 전

자를 가지고 있어 에너지가 높고 반응성이 크다. 이러한 불안정한 라디칼 종과 이온에 의해 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 (McCord, 1987).

피부의 표피에 존재하는 멜라닌 (melanin)은 피부색을 결정하는 중요한 요인 중 하나로 멜라닌 색소의 양과 분포에 의해 외관상의 피부색이 결정된다. 자외선이 조사되면 피부를 보호

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-211-9311 (E-mail) jn.um@gfcos.co.kr

Received 2017 May 15 / 1st Revised 2017 May 31 / 2nd Revised 2017 June 19 / 3rd Revised 2017 June 26 / Accepted 2017 June 28

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.

하기 위해 멜라닌형성세포 (melanocyte)에서 멜라닌생성반응과정 (melanogenesis)을 통해 멜라닌이 생성되고, 이 생성된 멜라닌에 의해 피부색이 검게 변화하여 색소 침착이 일어나게 된다 (Ito and Wakamatsu, 2003).

피부를 구성하는 단백질로는 콜라겐 (collagen), 엘라스틴 (elastin) 등이 있으며 이중 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 (Brenneisen *et al.*, 2002).

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 (Baumann, 2002; Lee *et al.*, 2015).

사물탕 (四物湯)은 당귀 (*Angelica gigas*), 작약 (*Paeonia lactiflora*), 지황 (*Rehmannia chinensis*) 및 천궁 (*Cnidium officinale*) 4 가지 한약재로 구성된 한약처방으로 동의보감 (東醫寶鑑)에 혈병 (血餅)의 통치약 (痛治藥)이라고 되어 있다. 혈액 (血)이 부족하면 보충할 수 있고 건조하면 윤택하게 할 수 있으며, 혈액이 나쁜 체질, 월경불순 등을 위한 처방으로 사용되고 있다 (Heo, 1976; Ahn, 1999). 효능연구로는 항암효과 및 염증 및 알러지 억제, 항산화 효과, 아토피성 피부염 개선 등이 보고되어 있다 (Ahn, 1995; Lee *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2000, 2007; Tahara *et al.*, 1999).

우리나라의 전통 한약재로서 국내에 자생하는 참당귀는 혈액을 보충시켜주는 보혈 효과와 혈액 순환을 도와 노화방지, 주름개선 및 조직재생에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 미백 및 자외선 차단 효과가 보고된 바 있다 (Kim *et al.*, 2008). 천궁은 미나리과에 속하는 다년생 초본으로 약재로는 천궁의 뿌리 부위가 이용되고 있으며 진경작용, 항균작용, 항진균작용과 피부장벽 및 염증 완화 효과가 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2011). 현삼과에 속하는 지황은 뿌리를 한약재로 이용하는데 혈당강하 효과, 면역 효과, 치매 치료 효과와 항산화 효과가 보고된 바 있다 (You *et al.*, 2011). 천궁은 미나리과에 속하는 다년생 초본으로 그 뿌리는 보혈, 진정, 진통 효과가 뛰어나고 월경불순 및 부인과 질환 등에 당귀와 함께 널리 사용되는 생약으로서 항산화, 항진균 효과가 알려져 있다 (Oh *et al.*, 2010).

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 (Hubert *et al.*, 2008). 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 (Yang *et al.*, 2011; Im and Lee, 2016; Kang *et al.*, 2016; Jeon *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2013, 2015).

본 연구에서는 항산화 및 주름개선 효과가 우수하다고 보고된 바 있는 숙성된 인삼 (*Panax ginseng*)에서부터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*를 분리하였고 이 분리 유산균을 사물탕에 발효하였다 (Kim *et al.*, 2012). 이러한 발효 과정을 거쳐 제조된 사물탕 발효물을 이용해 사물탕의 항산화 및 주름 개선 효과의 증대뿐만 아니라 새로운 효능을 도출하고자 하였으며, 화장품 원료로서의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

사물탕의 제조에 사용한 당귀 (*Angelica gigas*), 작약 (*Paeonia lactiflora*), 지황 (*Rehmannia chinensis*) 및 천궁 (*Cnidium officinale*)은 제천한방약초에서 구매하였다. 구매한 재료는 음지에서 상온 보관하면서 본 실험의 재료로 사용하였다.

2. 기기 및 시약

추출 과정에 용매 ethyl alcohol (extra pure grade, Daejung Chemicals and Metals Co., Ltd., Siheung, Korea)을 사용하였고, 37°C rotatory vacuum evaporator (400 series, Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 세포 배양을 위해 FBS, penicillin-streptomycin, DMEM은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였으며, 유산균 배양을 위해 MRS broth (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하였다. 세포 생존율 실험은 EZ-cytox (Biomax Co., Ltd., Seoul, Korea)을 사용하였으며, 활성 실험을 위해 TRI reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), transforming growth factor-β (TGF-β), ascorbic acid, α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH), arbutin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 위해 Bio-Rad real-time system (C1000, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였고, 흡광도 측정을 위해 multi-plate reader (Paradigm, Beckman, CA, USA)를 이용하였다.

3. 균주 분리 동정

인삼을 오존수에 살균한 후 밀봉하여 3 개월 동안 실온에서 자연 숙성하였고, 자연 숙성된 인삼을 멸균 증류수에 현탁하여 희석한 후, MRS agar 배지에 도말하였으며, 30°C incubator에서 24 시간 배양하여 선발하였다. 선발된 균주는 4 회 계대 배양한 후, 형성된 단일 colony를 순수 분리하였으며, DNA 추출하여 DNA 분석기관인 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.

4. 사물탕 발효물 제조

사물탕은 Lee 등 (2010)을 참고하여 당귀, 작약, 지황 및 천궁을 각 1:1:1:1로 구성한 총 150 g에 70% ethanol을 1,500 ml를 넣어 2 시간 동안 80°C 가열 추출한 후, 여과지 (Whatman no. 2, Whatman Co., Maidstone, England)로 여과하였고 이 과정을 2 회 반복하였다. 추출물은 rotary vacuum evaporator로 감압농축하여 20 brix인 농축액 상태로 제조하였고 이 농축액을 10%로 함유하는 배지를 제조하여 121°C, 1.5 기압에서 15 분간 가압멸균하고 상온까지 냉각시켰으며, 일부는 동결건조하여 발효 과정을 통한 효능 변화 확인을 위해 발효 전 사물탕으로 대조군으로서 사용하였다. 이 사물탕에 인삼에서 분리한 유산균 *L. mesenteroides*을 MRS broth에서 계대 배양한 뒤 1% (v/v)로 접종하였다. 접종 후, 37°C의 incubator에서 48 시간 이상 배양하여 사물탕을 발효하였으며, syringe filter (0.2 µm)로 여과 과정을 거쳐 제공하여 사물탕 발효물을 제조하였고, 일부는 동결건조하여 발효 전후 효능 변화 확인을 위해 사용하였다.

5. 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Taga 등 (1984)에 의해 실시된 Folin-Ciocalteu 방법을 참고하여 다음과 같이 측정하였다. 시료 100 µl (10 mg/ml)에 Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 µl를 가하여 5 분간 상온에서 안정화하였다. 10% sodium carbonate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 µl를 가하고 30°C에 1 시간 반응시킨 후, 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Chae 등 (2002)의 방법 참고하여 다음과 같이 측정하였다. 시료 100 µl (10 mg/ml)에 diethylene glycol (Daejung Chemicals and Metals Co., Ltd., Siheung, Korea) 1 ml을 가하여 잘 혼합한 후 1 N Sodium hydroxide (Daejung Chemicals and Metals Co., Ltd., Siheung, Korea) 100 µl를 첨가하고 37°C에서 1 시간동안 반응시켰다. 반응이

끝난 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 세포 배양

흑색종 세포인 B16F10 cell 및 사람의 섬유아세포 (human foreskin fibroblast)인 HFF cell은 한국세포주은행 [Korea cell line bank (KCLB), Seoul, Korea]에서 분양받았으며, 각각의 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

8. 세포 생존율 측정

세포생존율은 WST (water-soluble tetrazolium salt) 방법을 사용하여 측정하였다 (Ranke *et al.*, 2004). B16F10 cell은 DMEM배지를 이용하여 3 × 10⁴ cells/ml로 조절한 후 24 well tissue culture plate에 접종하고 5% CO₂ incubator에서 24 시간 전 배양하였으며, 24 시간 뒤에 일정 농도의 시료를 처리하여 24 시간 배양하였다. 시료 처리 후 EZ-cytox 시약이 든 배지로 교체하여 2 시간 동안 반응시켰다. Multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. HFF cell은 DMEM배지를 이용하여 1.5 × 10⁴ cells/ml로 96 well tissue culture plate에 접종하고 5% CO₂ incubator에서 24 시간 전 배양하였으며, 세포에 FBS를 무첨가한 DMEM과 일정 농도의 시료를 섞어 well 당 100 µl 씩 처리하여 48 시간 배양하였다. 시료 처리 후 WST 시약 이 든 배지로 교체하여 2 시간 동안 반응시켰으며, multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3 회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

9. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 사용하여 라디칼에 대한 시료의 전자공여능 (electron donating ability, EDA)을 측정하였다 (Blois, 1958). 시료의 전자공여능 측정을 위해 일정 농도로 희석한 시료 50 µl에 0.4 mM DPPH 용액 450 µl를 넣고 30 분간 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 사물탕 발효 전후 시료와 비교하였다. 소거능 활성은 다음의 식으로부터 계산하였다. SC₅₀값은 발생한 라디칼 50%를 소거하는데 필요한 최소농도를 µg/ml 단위로 표시하였다.

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

A: DPPH radical scavenging activity with blank
B: DPPH radical scavenging activity with sample

10. Melanin 생성 측정

마우스 흑색종 세포인 B16F10 cell에 60 mm 세포배양접시에 3×10^4 cells/well로 세포를 분주해 24 시간 배양하여 부착 및 안정화시킨 후, 농도별로 희석한 시료와 α -MSH를 처리하여 72 시간동안 배양하였다 (Hosoi *et al.*, 1985). 배양 후, PBS로 2 회 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 시간 동안 반응한 후 생성된 melanin 양을 410 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다. 시료액 대신 PBS를 사용한 blank의 흡광도를 기준으로 melanin 생성 억제율을 산출하였고, 대조군으로는 멜라닌 생성 저해 효과를 갖는 arbutin를 사용하여 사물탕 발효 전후 시료와 비교하였다 (Chakraborty *et al.*, 1998). IC₅₀값은 발생한 라디칼 50%를 소거하는데 필요한 최소농도를 $\mu\text{g/ml}$ 단위로 표시하였다.

11. Procollagen mRNA 측정

HFF cell은 100 mm 세포배양접시에 1.5×10^4 cells/well로 세포를 분주해 배양하여 부착 및 안정화시킨 후, 배지를 제거해 PBS로 2 회 세척하고 농도별로 희석한 시료를 처리하여 48 시간 배양하였다. Total RNA는 TRI reagent를 이용하여 제조사의 방법으로 추출하였다. 추출된 total RNA는 multi-plate reader를 이용해 정량하여, 1 μg 의 RNA를 이용하였고, cDNA 합성 및 RT-PCR은 Bio-Rad real-time system을 이용하여 수행하였으며 PCR 조건은 95°C 3 분, 58°C 30 초, 72°C 30 초씩 40 cycles 수행하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같고, 대조군으로는 TGF- β 를 사용하여 사물탕 발효 전후 시료와 비교하였다.

12. 통계 처리

모든 측정값은 3 회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준 편차 (means \pm SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS (Statistical Package for Social

Science, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 One-way analysis of variance (ANOVA)를 시행한 후 유의성이 있을 경우 5% 유의수준에서 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

사물탕 발효 전후의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 Table 2에 나타내었다. 페놀성 화합물은 항암, 항콜레스테롤 및 항산화 작용을 하여 체내 조직을 보호하여 생리적 효율성을 높임으로써 식품에 페놀 화합물의 함량이 많을수록 항산화 활성이 높다고 알려져 있다 (Duval and Shetty, 2001). 사물탕 발효 전후 각각의 총 페놀 함량은 9.6 mg/g 및 16.2 mg/g으로 사물탕 발효물에서 약 1.7 배 더 높은 총 페놀 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 각각 3.1 mg/g 및 4.2 mg/g으로 나타냄으로써 발효 후 1.4 배 더 높아진 총 플라보노이드 함량을 나타냄을 확인하였으며, 총 페놀과 총 플라보노이드 함량이 모두 발효 후 증가하는 것을 확인하였다. 이는 인삼으로부터 분리한 균주인 *L. mesenteroides*을 이용한 사물탕의 발효가 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 모두 증가하는데 중요한 요인일 것으로 여겨지며, 최근 보고된 연구에서도 여러 미생물을 이용한 발효공법을 통해 발효한 산삼배양근 중 *L. mesenteroides*를 이용한 발효처리가 총 페놀이 3 배 이상 증가와 플라보노이드 함량 6 배 이상 증가를 나타내어 총 페놀과 총 플라보노이드 함량을 모두 우수하게 증가시킴을 확인한 바 있다. (Kim *et al.*, 2016a).

2. 세포독성 평가

흑색종 세포인 B16F10 cell과 사람의 섬유아세포인 HFF cell에 대한 세포독성을 알아보기 위해 사물탕 발효 전후 시료를 각각 농도별 (0 - 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후, WST 실험을 수

Table 1. Nucleotide sequence of primers.

Name	Primer	Expected size (bp)
β -actin	5' - CATGAAGTGTGACGTGGACA - 3' Forward	76
	5' - CAGGGCAGTGATCTCCTTCT - 3' Reverse	
COL1A1 (procollagen)	5' - GACCTCAAGATGTGCCACTC - 3' Forward	107
	5' - CCAGTCTCCATGTTGCAGAA - 3' Reverse	

Table 2. Total phenolic and flavonoid contents of fermented extracts of Samultang.

Test sample	Total polyphenol (mg · GAE ¹ /g)	Total flavonoid (mg · NE ² /g)
Extracts of Samultang	9.6 \pm 0.4	3.1 \pm 0.1*
Fermented extracts of Samultang	16.2 \pm 0.6	4.2 \pm 0.1

Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (* $p < 0.05$). ¹GAE; Gallic acid equivalent, ²NE; Naringin equivalent. Each value in mean \pm standard deviation of three replicate tests.

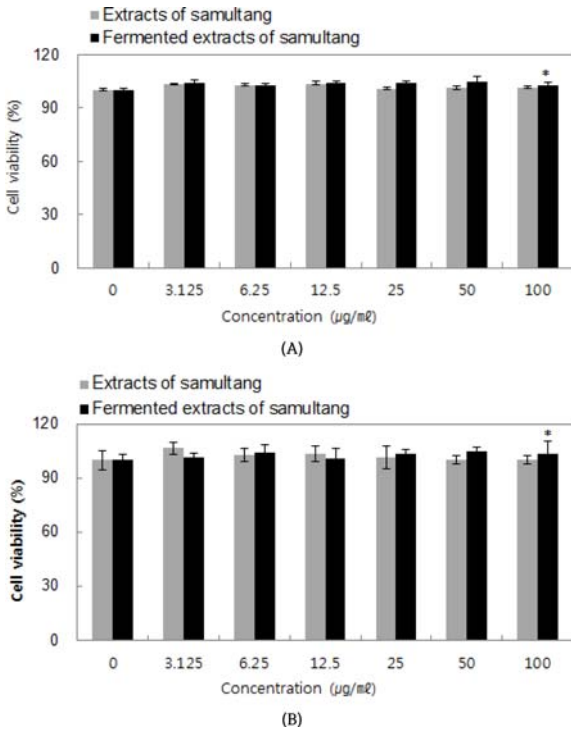


Fig. 1. Effect of fermented extracts of Samultang in B16F10 cells and HFF cell. (A); B16F10 cells were stimulated in the presence of samples. (B); HFF cells were stimulated in the presence of samples. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ($*p < 0.05$).

행하였으며 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. B16F10 cell에 대한 세포생존율의 경우 발효 전 사물탕의 최고 처리 농도 100 µg/ml에서 101.4%의 세포생존율을 나타냄으로써 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였고, 사물탕 발효물의 최고 처리 농도 100 µg/ml에서 102.4%의 세포생존율을 나타냄으로써 발효 전후 모두 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (Fig. 1A). HFF cell에 대한 세포생존율의 경우 발효 전 사물탕의 최고 처리 농도 100 µg/ml에서 100.3%의 세포생존율을 나타냄으로써 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였고, 사물탕 발효물의 최고 처리 농도 100 µg/ml에서 105.8%의 세포생존율을 나타냄으로써 발효 전후 모두 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (Fig. 1B). 이와 같은 결과로 최대 100 µg/ml의 농도까지 모든 활성 효과 실험을 진행하였다.

3. 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 (Torel *et al.*, 1986). 사물탕의 발효 전후의 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하기 위해 동결 건조 시료를 각각 농도별 (0 - 100 µg/ml)로 처리하였으며, 발효 전 사물탕은 50 µg/ml에서부터 DPPH 라디칼 소거능이 관찰되었고 최고 처리 농도 100 µg/ml에서 16.3%의 소거활성을 나타내었다. 반면에 사물탕 발효물은 최저 처리 농도에서 8.2%의 소거활성을 나타내어 가장 낮은 농도에서부터 DPPH 라디칼 소거능이 관찰되었으며 최고 처리 농도 100 µg/ml에서 50%의 소거활성을 나타내었다. 이는 100 µg/ml의 같은 농도에서 사물탕의 발효 전후를 비교하였을 때, 발효물이 발효 전보다 약 3 배의 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가했음을 나타내었다. 대조군으로 사용한 ascorbic acid가 1.7 µg/ml의 농도에서 50%의 소거활성을 나타낸 것에 비해 사물탕 발효물이 낮은 활성 효과를 나타냈지만 발효 전보다 항산화 활성이 우수함을 확인하였으며, 이것은 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*을 이용한 발효에 의해 항산화 활성에 영향을 미치는 페놀성 화합물과 플라보노이드류가 증가된 것이 원인일 것으로 여겨진다 (Table 3, Fig. 2). Hong (2011)에 따르면 *L. mesenteroides*를 이용한 발효 자몽 추출물이 발효 후 플라보노이드류가 증가하

Table 3. DPPH radical scavenging activity (SC_{50} value) of fermented extracts of Samultang.

Test sample	SC_{50} (µg/ml) ¹⁾
Extracts of Samultang	N/D ²⁾
Fermented extracts of Samultang	100.0 \pm 0.9*
Ascorbic acid	1.7 \pm 0.1

¹⁾ SC_{50} ; half maximal scavenging concentration, SC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. ²⁾N/D means not detectable. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ($*p < 0.05$).

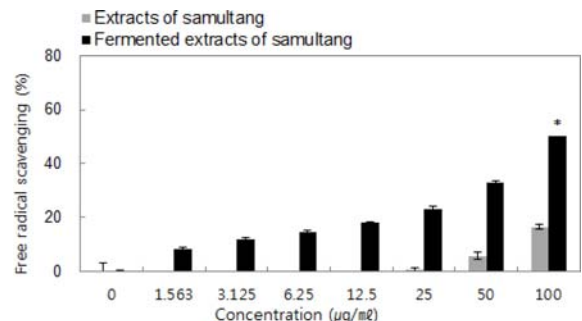


Fig. 2. The DPPH radical scavenging activity of the fermented extracts of Samultang. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ($*p < 0.05$).

고 항산화 활성이 증가됨이 보고된 바 있고 (Hong, 2011), 어성초 발효물에서 페놀성 화합물과 플라보노이드류가 증가와 항산화 효과가 증가됨이 보고된 바 있는 등 발효물의 페놀성 화합물과 플라보노이드류의 증가와 항산화 효과에 대한 연구가 다수 보고된 바 있다 (Kim *et al.*, 2016b).

4. Melanin 생성량 평가

피부의 미백과 관련이 있는 melanin 생성에 미치는 효과를 확인하기 위해 사물탕 발효 전후 동결 건조 시료를 각각 농도별 (0 - 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후 melanin 생성량을 측정할 결과, 발효 전 사물탕은 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 93.3%의 melanin 생성량을 나타내 melanin 생성 억제 활성이 거의 없음을 확인하였다. 반면에 사물탕 발효물은 최저 처리 농도에서부터 농도의존적으로 melanin 생성량의 감소를 나타내었고 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 25.1%의 melanin 생성량을 나타냈으며, 74.9%의 억제율로 높은 melanin 생성 억제 활성으로 관찰되었다. 이는 발효 전과 비교하였을 때, melanin 생성량이 약 3.7 배 이상으로 감소됨을 확인하였고 발효 전 사물탕에서 나타나지 않았던 melanin 생성 억제 활성이 발효물에서 높은 melanin 생성 억제 활성을 나타내었으며, 특히 50 ng/ml 처리한 대조군 arbutin보다도 사물탕 발효물이 melanin 억제 효과가 뛰어남을 확인하였다. 이것은 사물탕에

Table 4. Melanin contents of fermented extracts of Samultang.

Test sample	Melanin contents of control (%)			
	0	25	50	100
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
Extracts of Samultang	100.0 \pm 0.4	99.3 \pm 0.2	99.0 \pm 0.3	93.3 \pm 0.3*
Fermented extracts of Samultang	100.0 \pm 0.4	64.6 \pm 0.4	38.1 \pm 0.3	25.1 \pm 0.4

Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (* $p < 0.05$).

Table 5. Melanin production inhibitory (IC_{50} values) of fermented extracts of Samultang.

Test sample	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ¹⁾
Extracts of Samultang	N/D ²⁾
Fermented extracts of Samultang	37.9 \pm 0.4*
Arbutin	47.2 \pm 0.5

¹⁾ IC_{50} ; half maximal inhibitory concentration, IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. ²⁾N/D means not detectable. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (* $p < 0.05$).

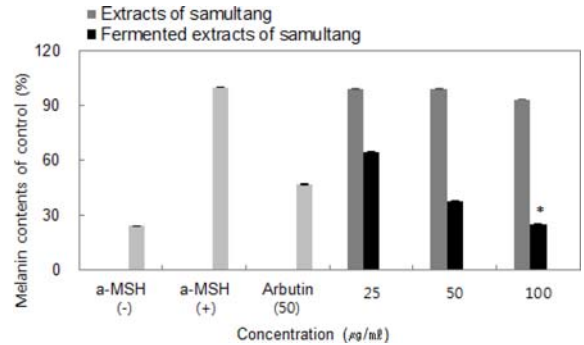


Fig. 3. Melanin production inhibitory activity of the fermented extracts of Samultang. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (* $p < 0.05$).

인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*을 사용하여 발효한 발효물이 발효 전 사물탕보다 melanin 생성 저해 활성을 갖는 물질이 생물전환에 의해 생성되었을 것으로 여겨지며, melanin 생성량을 효과적으로 감소시켜 우수한 미백 효과 소재로서의 가능성을 보였다 (Table 4, 5, Fig. 3).

5. Procollagen type I 합성 평가

Procollagen의 mRNA 발현량의 변화를 확인하기 위해 사물탕 발효 전후 동결건조 시료를 각각 농도별 (0 - 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후 발현량을 측정하였다. 발효 전후 사물탕 모두 procollagen의 mRNA 발현량의 증가를 나타냈으며, 발효 전 사물탕의 경우 농도의존적으로 발현량이 증가하고 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 control 대비 약 1.7 배 증가함을 확인하였다. 이에 비해 사물탕 발효물의 경우 농도의존적으로

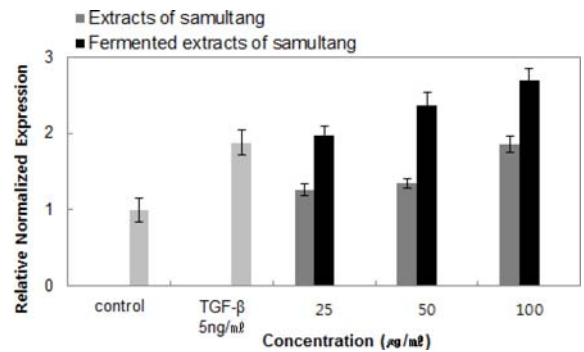


Fig. 4. Effect of the fermented extracts of Samultang on mRNA expression of procollagen type I. Expression of mRNA was estimated by real-time PCR. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (* $p < 0.05$).

procollagen의 mRNA 발현량이 증가하는 경향은 발효 전과 유사하였으나, 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 control 대비 2.7 배 증가했음을 나타내어 그 증가량이 발효 전에 비해 높음을 확인하였다. 특히, 사물탕 발효물은 5 ng/ml 처리한 대조군 TGF- β 보다도 높은 procollagen의 mRNA 발현량의 증가를 나타내었다. 이것은 본래 사물탕에 procollagen의 mRNA 발현량을 증가시키는 활성을 갖는 어떠한 물질들이 발효 과정을 거쳐 양이 증가하였거나 새로운 물질로 전환되었을 가능성이 있을 것으로 여겨지며, 사물탕 발효물이 항주름 효과를 갖는 소재로 응용될 수 있을 것으로 확인하였다 (Fig. 4).

본 연구 결과에 따라, 실험재료에 사용된 인삼 분리 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*를 이용해 당귀, 작약, 지황, 천궁의 복합 추출물인 사물탕에 발효하여 제조한 사물탕 발효물에서 발효 전 대비 항산화, 항주름, 미백 효과가 증가되었음을 확인하였고 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다. 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 판단된다. 또한, 효능의 증진 또는 새로운 효능의 도출에 영향을 주는 발효 인자나 성분에 대해 지속적인 연구를 진행한다면 보다 효과적인 한약재 발효물의 활용 방안을 도출할 수 있을 것으로 사료되며, 이러한 가능성이 높은 미생물을 활용한 화장품 및 건강기능식품 등의 원료로 다양하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Ahn CK. (1999). Sangyong hanbang haeseul-jip. Kihwa Pharmaceutical Co., Ltd. Jinju, Korea. p.333.
- Ahn HD. (1995). Articles: Experimental study of Siwutang on reducing side-effects of the anticancer agents. Journal of Physiology and Pathology in Korean Medicine. 9:341-359.
- Baumann L. (2002). Cosmetic dermatology: Principles and practice. McGraw-Hill Co., Inc. NY, USA. p.10.
- Blois MS. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 181:1199-1200.
- Brenneisen P, Sies H and Scharffetter-Kochanek K. (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. Annals of the New York Academy of Sciences. 973:31-43.
- Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MM and Oh SH. (2002). Standard food analysis. Jigu Publishing. Paju, Korea. p.381-382.
- Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M and Ichihashi M. (1998). Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. Pigment Cell and Melanoma Research. 11:206-212.
- Choi HJ, Lee JH, Yun MY and Lee JS. (2015). Anti-inflammatory and whitening effect of the lyophilized powder of oriental plant extracts fermented with *Streptococcus thermophiles*. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 41:159-164.
- 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.
- Duval B and Shetty K. (2001). The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. Journal of Food Biochemistry. 25:361-377.
- Heo J. (1976). Dongui bogam. Nam sandang. Seoul, Korea. p.113.
- Hong KP. (2011). Optimum conditions for production of fermented grapefruit extract using *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505. Journal of the East Asian Society of Dietary Life. 21:661-668.
- Hosoi J, Abe E, Suda T and Kuroki T. (1985). Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. Cancer Research. 45:1474-1478.
- Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F and Daydé J. (2008). Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. Food Chemistry. 109:709-721.
- Im DY and Lee KI. (2016). Melanin production inhibitory activity of the dendropanax morbifera leaf extract fermented by *Lactobacillus plantarum*. Korean Journal of Pharmacognosy. 47:18-23.
- Imokawa G. (2009). A Possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: Expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. Journal of Dermatological Science. 55:1-9.
- Ito S and Wakamatsu K. (2003). Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: A comparative review. Pigment Cell and Melanoma Research. 16:523-531.
- Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheon JW and Lee HS. (2011). Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 37:75-81.
- Kang CH, Kim SC, Jeong SC, Han W, Lee SY, Yu SM, Jin HM and Kim YS. (2016). Physicochemical characteristics of fermented *Phragmites communis* extract and its biological activity. Korean Journal of Pharmacognosy. 47:273-279.
- Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY and Lee HY. (2008). Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:255-260.
- Kim CJ, Seong ES, Yoo JH, Lee JG, Kim NJ, Choi SK, Lim JD and Yu CY. (2016a). Biological activity of *Panax ginseng* C. A. Meyer culture roots fermented with microorganisms. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 24:191-197.
- Kim YM, Jeong HJ, Chung HS, Seong JH, Kim HS, Kim DS and Lee YG. (2016b). Anti-oxidative activity of the extracts from *Houttuynia cordata* Thunb. fermented by lactic acid bacteria. Journal of Life Science. 26:468-474.
- Kim EK, Kim EY, Lee HS, Jung HS, Park SK, Sohn YJ and Sohn NW. (2007). Effect of Samul-tang on the allergic inflammatory response. Journal of Physiology and Pathology in

- Korean Medicine. 21:617-625.
- Kim HJ, Lee KS and Song BK.** (2000). Effects of a constituent herbs of Samul-tang on anti-fatigue. The Journal of Oriental Obstetrics and Gynecology. 13:54-93.
- Kim MJ, Kwon RH, Jang MW and Ha BJ.** (2012). Antioxidant and anti-wrinkle effects of steamed three ginseng extracts. Journal of the Societh of Cosmetic Scientists of Korea. 38:155-162.
- Kim SE, Kang SR, Park MS and Kim YC.** (2011). Alleviating effects of *Cnidium officinale* water extract on skin barrier and inflammation in hairless mouse. Journal of Investigative Cosmetology. 7:137-145.
- Lee HY, Ha HK, Jung DY, Lee NH and Shin HK.** (2010). Immuno stimulatory activities of Samul-tang, Sagunja-tang, Pamul-tang and Sipjeondaebo-tang *in vitro*. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 21:41-51.
- Lee JS, Lee KS and Song BK.** (2001). Experimental studies on the effect of Samul-tang and Samul-tang gagambang aqua-acupuncture. The Journal of Oriental Obstetrics and Gynecology. 14:1-26.
- Lee MK, Kim DH, Park TS and Son JH.** (2015). Antioxidant and anti-wrinkling effects of extracts from *Vitex trifolia L.* Journal of Applied Biological Chemistry. 58:125-129.
- McCord JM.** (1987). Oxygen-derived radicals: A link between reperfusion injury and inflammation. Federation Proceedings. 46:2402-2406.
- Oh YJ, Seo HR, Chio UM and Jung DS.** (2010). Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of *Cnidium officinale* Makino. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:373-378.
- Ranke J, Mölter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczobutt J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J and Jastorff B.** (2004). Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. Ecotoxicology and Environmental Safety. 58:396-404.
- Tahara E, Satoh T, Toriizuka K, Nagai H, Nunome S, Shimada Y, Itoh T, Terasawa K and Saiki I.** (1999). Effect of Shimotsu-to(a kampo medicine, Si-wu-tang) and its constituents on triphasic skin reaction in passively sensitized mice. Journal of Ethnopharmacology. 68:219-228.
- Taga MS, Miller EE and Pratt DE.** (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society. 61:928-931.
- Torel J, Cillard J and Cillard P.** (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry. 25:383-385.
- Yang HJ, Joo HA, Baek SC, Park JS and Hong SH.** (2011). Anti-inflammatory effects of Hwangnyeonhaedok-tang and fermented Hwangnyeonhaedok-tang. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 24:1-15.
- You BR, Kim HR, Kim HJ, Lee JY, Lee SY, Song MR, Park JY and Kim MR.** (2011). Catalpol content and antioxidant activities in various cultivars of *Rehmannia glutinosa*. Journal of Food Science and Nutrition. 40:481-485.