

황금 발효물의 항산화 및 미백 효과 증진

엄지나·민진우·주광식·강희철[†]

(주)지에프씨

(2017년 7월 13일 접수, 2017년 7월 21일 수정, 2017년 8월 10일 채택)

Enhancement of Antioxidant and Whitening Effect of Fermented Extracts of *Scutellariae baicalensis*

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

GFC Co., Ltd., 311, Tower-dong, Heungdeok IT Valley, 13 Heungdeok 1-ro, Giheung-gu, Young-city, Gyeonggi-do 16954, Korea

(Received July 13, 2017; Revised July 21, 2017; Accepted August 10, 2017)

요약: 황금(*Scutellariae baicalensis*)은 항염 작용이 뛰어나 예로부터 사용되어온 약재로, 본 연구는 인삼에서 분리한 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*)을 이용해 황금 발효물을 제조하고 항산화와 미백 효과를 조사하였다. 황금 발효물은 황금을 70% 에탄올로 추출한 후에 *L. mesenteroides*를 접종하여 발효 제조하였다. 발효 전 황금과 황금 발효물에서 2가지 지표 성분 baicalin과 baicalein을 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 황금 모두 독성이 확인되지 않았고 DPPH 라디칼 소거능 실험은 발효물의 SC₅₀ 값이 34.43 $\mu\text{g/mL}$ 로 발효 전보다 우수한 효능을 나타내었으며, 세포 독성을 나타내지 않는 농도에서 흑색종 세포인 B16F10을 이용한 melanin 생성 억제 활성 실험 결과, 황금 발효물은 우수한 melanin 생성 억제 효과를 나타내었다(IC₅₀ = 68.17 $\mu\text{g/mL}$). 이상의 결과들로부터 황금 발효물이 항산화 효능뿐만 아니라 미백 효능을 갖는 화장품 원료로서 개발 가능성이 있음이 시사되었다.

Abstract: *Scutellariae baicalensis* (*S. baicalensis*) has been traditionally used for anti-inflammatory effect. This study was designed to compare the antioxidant and whitening effects of *S. baicalensis* extract and its fermented extract by *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*). Fermented extract of *S. baicalensis* was prepared by inoculation of *L. mesenteroides* after the extraction procedure with 70% ethanol. *S. baicalensis* extract and its fermented extract was investigated via high-performance liquid chromatography (HPLC). Simultaneous qualitative analysis of two bioactive components; baicalin and baicalein 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 *S. baicalensis* extract and its fermented extract were non-toxicity. In DPPH radical scavenging ability, SC₅₀ values of the fermented extract was 34.43 $\mu\text{g/mL}$ as a result of more effective than *S. baicalensis* extract. In nontoxic concentration range, fermented extract of *S. baicalensis* showed strong melanin production inhibitory effect in α -melanocyte stimulating hormone (MSH)-stimulated B16F10 cell (IC₅₀ = 68.17 $\mu\text{g/mL}$). These results suggested that fermented extracts of *S. baicalensis* has considerable potential as a cosmetics ingredient with an antioxidant and anti-wrinkle and whitening effects.

Keywords: antioxidant, baicalein, baicalin, *Leuconostoc mesenteroides*, *Scutellariae baicalensis*, whitening effect

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

1. 서 론

피부노화의 원인 중 자외선은 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 활성산소종에 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 멜라닌형성세포의 멜라닌생성반응 과정(melanogenesis)을 거쳐 멜라닌이 생성되고 이 멜라닌에 의해 피부색이 검게 변화하여 색소 침착이 일어나게 된다[3].

황금은 한국, 중국 및 시베리아 동부에서 재배되고 있는 쌍떡잎식물 꿀풀과에 속하는 여러해살이풀로 예로부터 소염, 해열, 변비, 위장염, 알레르기 및 천식의 치료로 사용되어 왔으며 효능연구로는 항균, 항암, 항염증, 항히스타민 등의 다양한 작용이 보고되어 있다[4-7]. 황금의 활성을 나타내는 주요성분으로는 baicalin, baicalein, wogonin, wogonin glucuronide 등의 flavonoid류가 있고 이와 같은 유효성분에 대한 연구는 여러 차례 이루어진 바 있는데, 이 중 baicalin은 황금에서 가장 많이 함유되어 있는 성분으로 항알레르기 및 항염증 작용, 항암 효과 등 다양한 효과가 알려져 있으며 baicalein은 항암, 항바이러스, 항산화 효과 등이 보고된 바 있다[8-16].

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[17]. 발효에 이용되는 미

생물로는 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[18-22].

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

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

황금은 제천한방약초에서 구매해 DNA를 추출하여 ITS (internal transcribed spacer) 영역에 대해 PCR 후, (주)마크로젠(Magrogen, Seoul)을 통한 염기서열 분석을 하였고 NCBI (미국국립생물정보센터)에서 확인하였으며, 음지에서 상온 보관하면서 본 실험의 재료로 사용하였다. 추출과 HPLC 분석에 용매 ethyl alcohol, methanol, water, acetonitrile, acetic acid (Deajung, Korea)을 사용하였고, 지표 성분 baicalin, baicalein은 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 Ez-cytox (Biomax, Korea)을 사용하였으며, 활성 실험을 위해 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), ascorbic acid, arbutin (Sigma, USA)을 사용하였다. 흡광도 측정을 위해 multi-plate reader (Paradigm, USA)를 이용하였다.

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 사용하였

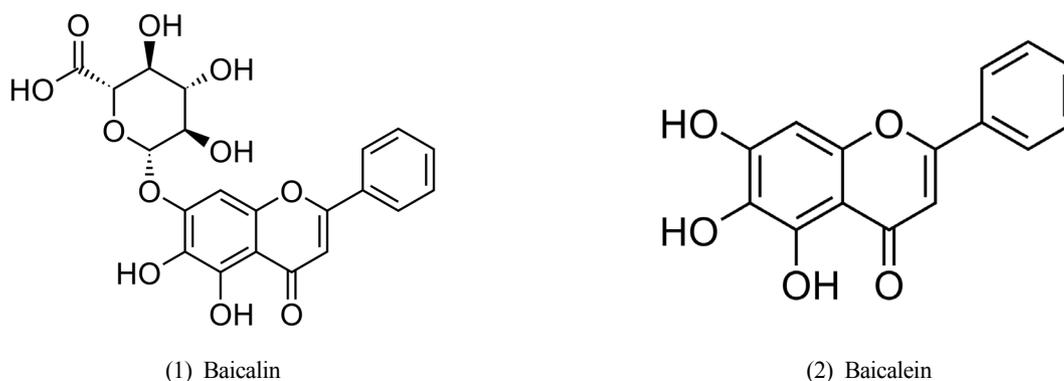


Figure 1. Chemical structure of two marker components in *S. baicalensis*.

다. 분석에 사용한 컬럼은 kinetex 5 μm C₁₈ column (250 × 4.6 mm, Korea)이며 컬럼 온도는 40 °C를 유지하였다. 이동상 A로 1% acetic acid를 사용하였고 이동상 B는 1% acetic acid가 포함된 water : acetonitrile (7 : 3)를 사용하였으며 gradient 적용하여 유속 1.0 mL/min의 조건으로 유지하였다. UV 검출기의 파장은 277 nm에서 확인하였으며 주입량은 10 μL 로 설정하였다. 지표 성분인 baicalin (1), baicalein (2)은 무게를 정확하게 측정 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 °C incubator에서 24 h 배양하여 선발하였다. 선발된 균주는 4회 계대 배양한 후, 형성된 단일 colony를 순수 분리하였으며, DNA 추출하여 DNA 분석기관인 (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. 황금 발효물 제조

황금 40 g에 70% ethanol을 1 L를 넣어 2 h 동안 80 °C 가열 추출한 후, 여과지 Whatman no. 2로 여과하였고 이 과정을 2회 반복하였다. 추출물은 rotatory vacuum로 감압농축하여 농축액 상태로 제조하였고, 이 농

축액을 10%로 함유하는 배지를 제조하여 121 °C, 1.5 atm에서 15 min 간 가압멸균하고 상온까지 냉각시켰으며, 일부는 동결건조하여 발효 과정을 통한 효능 변화 확인을 위해 발효 전 황금을 대조군으로서 사용하였다. 이 황금에 인삼에서 분리한 유산균 *L. mesenteroides*를 MRS broth에서 계대 배양한 뒤 1% (v/v)로 접종하였다. 접종 후, 37 °C의 incubator에서 48 h 이상 배양하여 황금을 발효하였으며, syringe filter 0.2 μm 로 여과 과정을 거쳐 제균하여 황금 발효물을 제조하였고, 일부는 동결건조하여 시료를 얻어내 발효 전후 성분 및 효능 변화 확인을 위해 사용하였다.

2.5. 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Taga 등에 의해 실시된 Folin-Ciocalteu 방법을 참고하여 측정하였다[23]. 시료 100 μL (10 mg/mL)에 Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, USA) 100 μL 를 가하여 5 min 간 상온에서 안정화하였다. 10% sodium carbonate (Sigma, USA) 100 μL 를 가하고 30 °C에 1 h 동안 반응시킨 후, 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Chae 등의 방법을 참고하여 다음과 같이 측정하였다[24]. 시료 100 μL (10 mg/mL)에 diethylene glycol (Deajung, Korea) 1 mL를 가하여 잘 혼합한 후 1 N sodium hydroxide (Deajung, Korea) 100 μL 를 첨가하고 37 °C에서 1 h 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. 세포 배양

마우스의 대식세포주인 RAW264.7 cell과 흑색종 세포인 B16F10 cell은 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양받았으며, 각각의 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.8. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 WST (water-soluble tetrazolium salt) 방법을 사용하여 측정하였다[25]. RAW264.7 cell은 DMEM배지를 이용하여 5×10^4 cells/mL로 조절한 후 24-well tissue culture plate에 접종하고 5% CO₂ incubator에서 24 h 전 배양하였으며, 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. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

2.9. 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[26]. 시료의 전자공여능 측정을 위해 일정 농도로 희석한 시료 50 μ L에 0.4 mM DPPH 용액 450 μ L를 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 황금 발효 전후 시료와 비교하였다. 소거능 활성은 다음의 식으로부터 계산하였다. SC₅₀ 값은 발생한 라디칼 50%를 소거하는데 필요한 최소농도를 μ g/mL 단위로 표시하였다.

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

A: DPPH radical scavenging activity without sample

B: DPPH radical scavenging activity with sample

2.10. Melanin 생성 측정

마우스 흑색종 세포인 B16F10 cell에 60 mm 세포배양접시에 1×10^4 cells/well로 세포를 분주해 24 h 배양

하여 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 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 황금 발효 전후 시료와 비교하였다[27]. IC₅₀ 값은 멜라닌 생성 50%를 억제하는데 필요한 최소농도 μ g/mL 단위로 표시하였다.

2.11. 통계 처리

모든 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준 편차(mean \pm S.D.)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS를 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.

3. 결과 및 고찰

3.1. 황금 발효물 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 변화

황금 발효 전후의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다. 페놀성 화합물은 항암, 항콜레스테롤 및 항산화 작용을 하여 체내 조직을 보호하여 생리적 효율성을 높임으로써 식물에 페놀 화합물의 함량이 많을수록 항산화 활성이 높다고 알려져 있다 [28]. 황금 발효 전후 각각의 총 페놀 함량은 26.42 ± 0.61 mg · GAE/g 및 31.66 ± 0.44 mg · GAE/g으로 황금 발효물에서 약 1.20배 더 높은 총 페놀 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 각각 22.01 ± 0.43 mg · NE/g 및 24.37 ± 0.37 mg/g으로 나타냄으로써 발효 후 약 1.11배 더 높은 총 플라보노이드 함량을 나타내었으며, 총 페놀과 총 플라보노이드 함량이 모두 발효 후 소폭 증가하는 것을 확인하였다. 이는 이전 연구에서 *L. mesenteroides*를 이용한 사물탕 발효물의 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량이 발효 전보다 증가함을

Table 1. Total Phenolic and Flavonoid Contents

Test sample	Total phenolics (mg · GAE ^a /g)	Total flavonoids (mg · NE ^b /g)
Extracts of <i>S. baicalensis</i>	26.42 ± 0.61	22.01 ± 0.43
Fermented extracts of <i>S. baicalensis</i> .	31.66 ± 0.44	24.37 ± 0.37

Mean values ± S.D. from triplicate separated experiments are shown. ^aGAE; gallic acid equivalent, ^bNE; naringin equivalent. Each value in mean ± S.D. of three replicate tests.

Table 2. Regression Equation of Two Marker Components

Compounds	Linear range (μg/mL)	Regression equation (y = ax + b) ^a	R ² values (n = 3)
Baicalin	1.953-62.5	y = 31.39x + 127.56	0.985
Baicalein	1.953-62.5	y = 75.646x - 34.46	0.996

^ay: peak area, x: concentration (μg/mL)

Table 3. Concentration of Two Marker Components

Test sample	Concentration (μg/mL)	
	Baicalin	Baicalein
Extracts of <i>S. baicalensis</i>	71.75 ± 0.92	N/D
Fermented extracts of <i>S. baicalensis</i> .	59.44 ± 0.49	7.37 ± 0.31

Concentration were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments. N/D means not detectable.

관찰한 결과와 유사한 경향임을 확인하였다[29]. 이 결과로 인삼으로부터 분리한 균주인 *L. mesenteroides*을 이용한 황금의 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 3배 이상 증가와 플라보노이드 함량 6배 이상 증가를 나타내어 총 페놀과 총 플라보노이드 함량을 모두 우수하게 증가시킴을 확인한 바 있다[30].

3.2. 황금 발효물 성분 확인 및 함량 변화

황금을 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*으로 발효시킨 후 황금 발효물을 제조하였고 발효 전 황금과 함께 지표 성분 baicalin 및 baicalein을 HPLC를 이용하여 정량, 정성 분석하였다. 분석은 C₁₈ 컬럼을 사용하였고 컬럼 온도 40 °C를 유지하며 이동상 유속 1 mL/min, UV 흡광도 277 nm에서 실험하였다. 두 지표 성분은 각각 분석 수행하였고 각 standard의 체류시간(*t_R*)을 확

인한 결과 baicalin은 11.11 min, baicalein은 15.31 min으로 관찰되었다(Figure 2). 발효 전후 황금의 함량 비교를 위해 x축을 표준 용액의 농도로 y축을 peak 면적으로 하여 검량선(calibration curve)을 작성하였다. 그 결과 baicalin과 baicalein 모두 검량선의 상관관계가 0.985 이상으로 정량분석에 알맞은 직선을 나타내었다(Table 2). 두 지표 성분의 peak 면적을 검량선에 대입하여 황금 발효 전후의 성분 함량을 계산하였다. 분석 결과 발효 전 황금에서 baicalin은 71.75 ± 0.92 μg/mL으로 나타났으나 baicalein은 확인되지 않았다. 황금 발효물은 baicalin의 경우 59.44 ± 0.49 μg/mL으로 발효 과정을 거치면서 발효 전보다 약 12.31 μg/mL이 감소되었고 baicalein 함량의 경우 7.37 ± 0.31 μg/mL로 발효 전 황금에서 볼 수 없었던 양이 확인되었다(Table 3). 이와 같은 결과로 황금 발효물은 발효 전보다 baicalein이 증가하고 baicalin이 감소함을 확인하였으며, 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*가 baicalein을 증가시킬 수 있는 균주로 평가 가능성이 있음을 확인하였다. 이 발효 과정을 통해 두 유효성분이 어떠한 메커니즘으로 생물

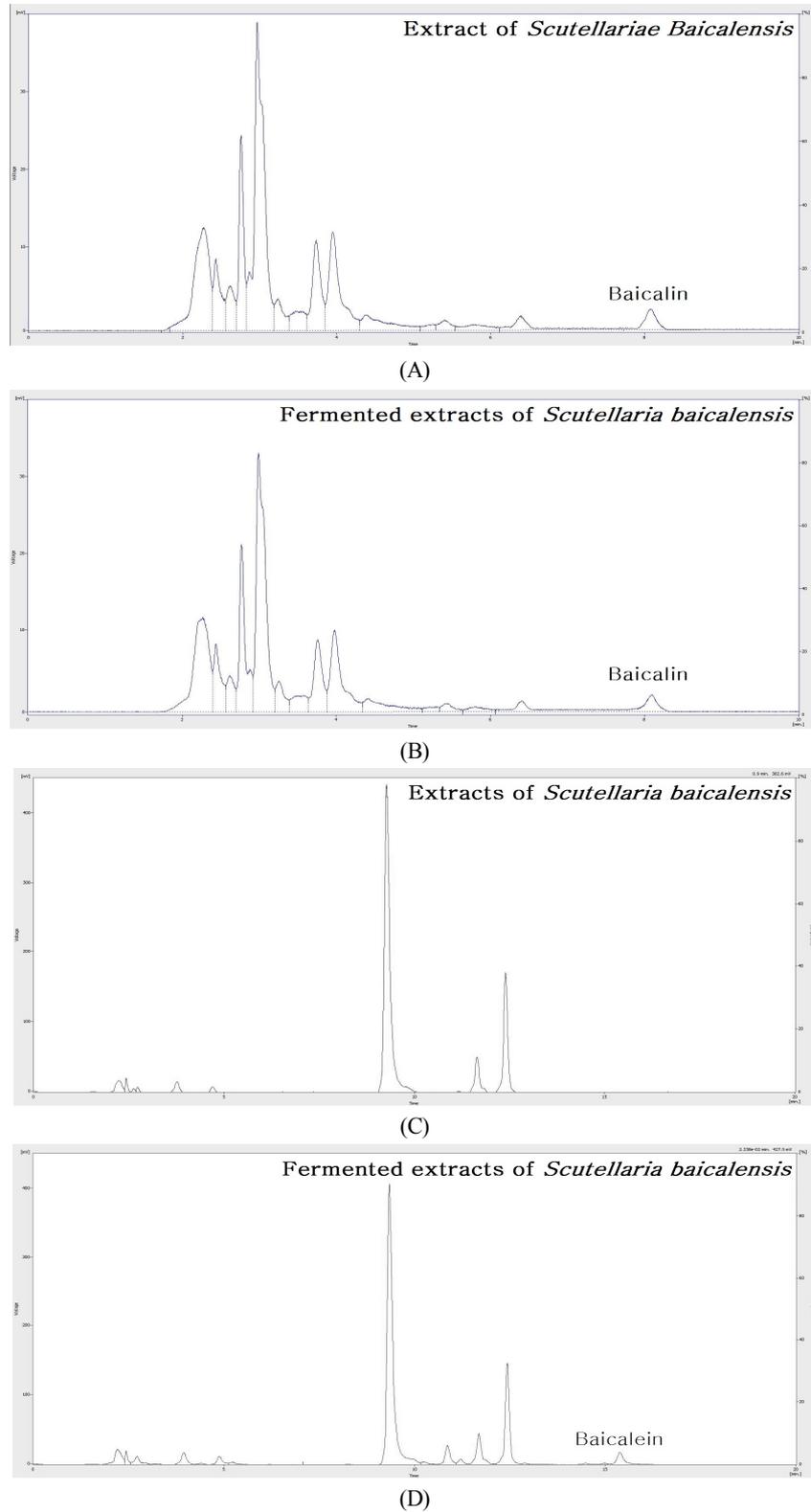


Figure 2. Chromatograms of useful components in *S. Baicalensis* using HPLC. (A), (C): Extracts of *S. Baicalensis*, (B), (D): Fermented extracts of *S. Baicalensis*.

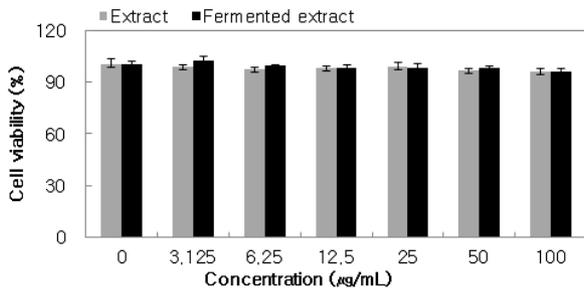


Figure 3. Effect of fermented extracts of *S. Baicalensis* in RAW264.7 cells. Mean values \pm S.D. from triplicate separated experiments are shown.

전환이 일어났는지는 확인할 수 없었으나 baicalin에 glucuronic acid가 결합된 형태의 baicalin은 특정 가수분해 과정을 통해 baicalin을 생성하는 경로에 대한 연구는 다수 보고된 바 있으므로 발효 과정에 의한 두 성분 간의 전환에 대해 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다[31].

3.3. 황금 발효물의 세포독성 평가

마우스 대식세포인 RAW264.7 cell에 대한 세포독성을 알아보기 위해 황금 발효 전후 시료를 각각 농도별 (0-100 µg/mL)로 처리한 후, WST 실험을 수행하였으며 측정 결과를 Figure 3에 나타내었다. RAW264.7 cell에 대한 세포생존율의 경우 발효 전 황금의 최고 처리 농도 100 µg/mL에서 96.28%의 세포생존율을 나타냄으로써 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였고, 황금 발효물의 최고 처리 농도 100 µg/mL에서 95.94%의 세포생존율을 나타냄으로써 발효 전후 모두 세포 생존에 대한 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (Figure 3). 이는 발효물이 100 µg/mL의 농도까지 세포 독성이 없으며 발효 과정을 거쳐 세포 성장을 증대시킬 수 있는 특정 물질이 생성 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.

3.4. 황금 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 반응

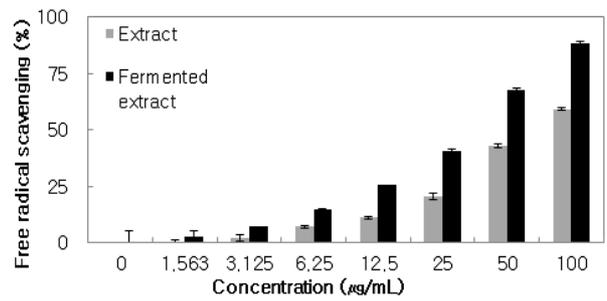


Figure 4. The DPPH radical scavenging activity of the fermented extracts of *S. baicalensis*. Mean values \pm S.D. from triplicate separated experiments are shown.

하게 되면 안정한 형태로 돌아가면서 흡광도 값이 감소한다[32]. 황금의 발효 전후의 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하기 위해 각각 독성이 나타나지 않은 농도별(0-100 µg/mL)로 처리하였다. 발효 전 황금은 최고 처리 농도 100 µg/mL에서 59.23%의 소거활성을 나타내었고 SC₅₀ 값이 76.52 µg/mL으로 확인되었다. 반면에 황금 발효물은 최고 처리 농도 100 µg/mL에서 88.44%의 소거활성을 나타내었고 SC₅₀ 값이 34.43 µg/mL으로 확인되었으며 이는 100 µg/mL의 같은 농도에서 황금의 발효 전후를 비교하였을 때, 발효물이 발효 전보다 약 1.5배의 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가한 것으로 관찰되었다. 또한 SC₅₀ 값으로 발효 전후를 비교하였을 때, 발효 후 소거활성이 발효 전 대비 약 45% 증가하였음을 나타내었고 대조군으로 사용한 ascorbic acid가 1.73 µg/mL의 농도에서 50%의 소거활성을 나타낸 것에 비해 황금 발효물이 낮은 활성 효과를 나타냈지만 발효 전보다 항산화 활성이 우수함을 확인하였다(Figure 4). 이전에 보고된 연구에 따르면 free radical 소거 활성 실험 결과 baicalin보다 baicalin이 우수하게 소거활성을 나타냄이 보고된 바 있으며[33], 이러한 결과는 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*의 발효 과정을 거쳐 HPLC 분석을 통해 발효 전엔 확인되지 않았던 baicalin이 생성된 영향도 있을 것으로 사료된다.

3.5. 황금 발효물의 Melanin 생성량 평가

피부의 미백과 관련 있는 melanin은 이전 연구에서 항산화 효과를 갖는 유효 물질들이 산화형 melanin을 환원형 melanin으로 되돌려 산화를 방지함으로써 melanin 합성이 저해된다는 연구가 보고된 바 있다[34]. 따라서 발효 전 황금에 비해 항산화 효과가 증가된 황금

Table 4. Inhibition of Melanin Production (IC_{50} values) by Fermented Extracts of *S. baicalensis*

Test sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extracts of <i>S. baicalensis</i>	N/D
Fermented extracts of <i>S. baicalensis</i>	57.05 ± 0.8
Arbutin	49.85 ± 0.6

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

발효물에서 melanin 생성량의 변화를 확인하고자 하였다. 황금 발효 전후 시료를 각각 독성이 나타나지 않은 농도별(0-100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후 melanin 생성량을 측정된 결과, 발효 전 황금은 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 52.76%의 melanin 생성량으로 억제 효과가 47.24%로 관찰되었다. 황금 발효물의 경우 최저 처리 농도 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서부터 농도의존적으로 melanin 생성량의 감소를 나타내었고 최고 처리 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 20.38%의 melanin 생성량을 나타냈으며, 79.62%의 억제율로 높은 melanin 생성 억제 활성으로 관찰되었다. 발효 전후를 비교하였을 때, 발효 전 황금은 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 IC_{50} 값을 나타낸 반면 발효물은 57.05 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타냈으며, 이는 발효 후 melanin 생성 억제 활성이 최소 2배 이상 증가한 것으로 확인되었다. 대조군으로 사용된 arbutin보다 황금 발효물이 melanin 억제 효과는 조금 낮았으나 arbutin만큼 억제 효과가 증가했음이 확인되었다. 이것은 황금에 인삼 분리 유산균 *L. mesenteroides*의 발효 과정을 거쳐 baicalein의 함량 증대가 요인 중 하나일 것으로 판단되며 이전에 보고된 연구에서 baicalein에 의해 ERK가 활성화되어 melanin 합성이 감소됨이 확인된 바 있다 [35]. 또한 baicalein 이외에도 발효물의 melanin 생성 저해 활성에 기인하는 또 다른 유효 성분의 생성 또는 증대가 있을 것으로 사료되며 이와 같은 결과로 황금 발효물은 melanin 생성량을 효과적으로 감소시켜 우수한 미백 효과 소재로서의 가능성을 보였다(Table 4, Figure 5).

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 분

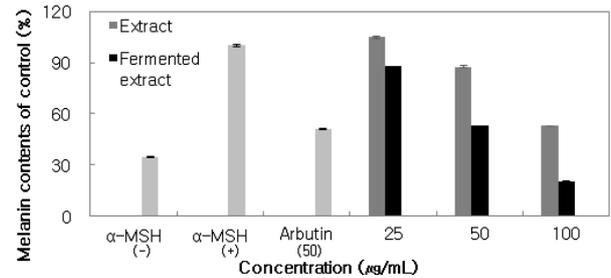


Figure 5. Melanin production inhibitory activity of the fermented extracts of *S. baicalensis*. Mean values \pm S.D. from triplicate separated experiments are shown.

리하여 얻어내었으며, 이를 이용한 황금 발효물 제조하여 발효 과정을 통해 성분 및 효능 변화를 확인하고자 하였다. 이 연구를 통해 발효 과정을 거쳐 2가지 지표 성분인 baicalin과 baicalein의 존재를 확인하였고, 각각의 지표 성분 함량이 증가 및 감소가 나타나는 것을 확인하였다. RAW264.7 cell를 이용한 세포 실험을 통해 독성이 나타나지 않음을 확인하였고, DPPH 라디칼 소거능과 같은 항산화 활성, melanin 생성 억제와 같은 미백 활성 등의 효과가 발효 후 증진됨을 확인할 수 있었다. 이는 *L. mesenteroides*에 의한 발효 과정 중 생성되는 다양한 효소들의 작용에 의해 각각의 효능을 모두 갖는 baicalein의 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 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, 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, *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, *Pigm. Cell Melanoma Res.*, **16**(5), 523 (2003).
4. M. Broncel, Antiatherosclerotic properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* georgi, *Wiad. lek.*, **60**(5-6), 294 (2007).
5. B. P. Burnett, Q. Jia, Y. Zhao, and R. M. Levy, A medicinal extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation, *J. Med. Food*, **10**(3), 442 (2007).
6. W. Z. Song, Studies on the resource of the chinese herb *Scutellaria baicalensis* georgi, *Acta Pharm Sin B.*, **16**, 139 (1981).
7. J. S. Hang, J. H. Kim, and M. J. Kwon, Antibacterial Activity of *Scutellaria baicalensis* Extract against Antibiotic Resistant Bacteria, *Korean J. Food & Nutr.*, **24**(4), 708 (2011).
8. A. Koda, S. Watanabe, Y. Yanagihara, H. Nagai, and K. Sakamoto, A comparative study of the anti-allergic effects of disodium baicalein 6-phosphate (BPS) and disodium cromoglycate (DSCG), *Jpn. J. Pharmacol.*, **27**(1), 31 (1977).
9. B. Q. Li, T. Fu, W. H. Gong, N. Dunlop, H. Kung, Y. Yan, J. Kang, and J. M. Wang, The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines, *Immunopharmacology*, **49**(1), 295 (2000).
10. B. Q. Li, T. Fu, Y. D. Yan, N. W. Baylor, F. W. Ruschetti, and H. F. Kung, Inhibition of HIV infection by baicalin-a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine, *Cell. Mol. Biol. Res.*, **39**(2), 119 (1993).
11. J. A. Wu, A. S. Attele, L. Zhang, and C. S. Yuan, Anti-HIV activity of medicinal herbs: usage and potential development, *Am. J. Chin. Med.*, **29**(1), 69 (2001).
12. T. Konoshima, M. Kokumai, M. Kozuka, M. Iinuma, M. Mizuno, T. Tanaka, H. Tokuda, H. Nishimo, and A. Iwashima, Studies on inhibitors of skin tumor promotion. XI. Inhibitory effects of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* on Epstein-Barr virus activation and their anti-tumorpromoting activities, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **40**(2), 531 (1992).
13. F. L. Chan, H. L. Choi, Z. Y. Chen, P. S. Chan, and Y. Huang, Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin, *Cancer Lett.*, **160**(2), 219 (2000).
14. S. Ikemoto, K. Sugimura, N. Yoshida, R. Yasumoto, S. Wada, K. Yamamoto, and T. Kishimoto, Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines, *Urology*, **55**(6), 951 (2000).
15. Z. Gao, K. Huang, and H. Xu, Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells, *Pharmacol. Res.*, **43**(2), 173 (2001).
16. D. E. Shieh, L. T. Liu, and C. C. Lin, Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin, *Anticancer Res.*, **20**(5A), 2861 (2000).
17. 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. Oriental Obstet. Gynecol.*, **14**(1), 1 (2001).
18. D. Y. Im, and K. L. Lee, Melanin Production Inhibitory Activity of the *Dendropanax moribifera* Leaf Extract Fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Korean J. Pharmacogn.*, **47**(1), 18 (2016).
19. 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, *Korean J. Pharmacogn.*, **47**(1), 273 (2012).
20. 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).
 21. 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).
 22. 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).
 23. M. S. Taga, E. E. Miller, and D. E. Pratt, Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**(5), 928 (1984).
 24. S. K. Chae, G. S. Kang, S. J. Ma, K. W. Bang, M. M. Oh, and S. H. Oh, Standard food analysis, 381, Jigu-moonwha Sa, Paju, Korea (2002).
 25. 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).
 26. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**(4617), 1199 (1958).
 27. A. K. Chakraborty, Y. Funasaka, M. Komoto, and M. Ichihashi, Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigm. Cell Melanoma Res.*, **11**(4), 206 (1998).
 28. B. Duval and K. Shetty, The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea(*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract, *J. Food Biochem.*, **25**(5), 361 (2001).
 29. J. N. Um, J. W. Min, K. S. Joo, and H. C. Kang, Antioxidant, Anti-Wrinkle Activity and Whitening Effect of Fermented Mixture Extracts of *Angelica gigas*, *Paeonia Lactiflora*, *Rehmannia chinensis* and *Cnidium officinale*, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **25**(3), 152 (2017).
 30. C. J. Kim, E. S. Seong, J. H. Yoo, J. G. Lee, N. J. Kim, S. K. Choi, J. D. Lim, and C. Y. Yu, Biological activity of *Panax ginseng* C. A. Meyer culture roots fermented with microorganisms, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **24**(3), 191 (2016).
 31. T. Tanaka, K. Metori, S. Mineo, M. Hirotsani, T. Furuya, and S. Kobayashi, Inhibitory effects of berberine-type alkaloids in elastase, *Planta Med.*, **59**(3), 200 (1993).
 32. J. Torel, J. Gillard, and P. Gillard, Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, *Phytochemistry*, **25**(2), 383 (1986).
 33. S. N. Park, Antioxidative Properties of Baicalein, Component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and Its Application to Cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
 34. H. M. Kim, The effect of plantago asiatica extract on antioxidative activity and inhibition of melanin synthesis, Chungbuk University, **2**, (2011).
 35. X. Li, Y. Sun, Y. Gu, and Y. Li, Baicalein inhibits melanogenesis through activation of the ERK signaling pathway, *Int. J. Mol. Med.*, **25**(6), 923 (2010).