



Original Article / 원저

포제 및 발효 가공에 따른 오미자와 구기자 물 추출물의 항염증 및 숙취해소 효과

김하림¹, 김상준¹, 김솔¹, 김홍준², 정승일¹, 유강열¹, 김선영^{1*}

¹(재)전주농생명소재연구원, ²우석대학교 한의과대학

Anti-inflammation and hangover relief effects of *Schisandra chinensis* (SC) and *Lycium chinense* (LC) water extracts depending on drug processing and fermentation

Ha-Rim Kim¹, Sang-Jun Kim¹, Sol Kim², HongJun Kim², Seung-Il Jeong¹, Kang-Yeol Yu¹, Seon-Young Kim^{1*}

¹Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju, Jeonbuk, Republic of Korea

²Department of Korean Medical Prescription, College of Korean Medicine, Woosuk University, Jeonju, Jeonbuk, Republic of Korea

ABSTRACT

Schisandra chinensis (SC) and *Lycium chinense* (LC) were widely distributed in Asia and the fruit has been used traditionally for medicinal herbs. The processing method was solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* for 48 h after stir-frying treatment at 220 °C for 12 min. In this study, *in vitro* the anti-inflammatory effect and *in vivo* hangover reduction were compared to unprocessed SC and LC water extract. Anti-inflammatory effects have been evaluated in pro-inflammatory mediators which were secreted by lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages. Nitric oxide (NO) was determined using Griess reaction. Proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β were measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde

dehydrogenase (ALDH) activities were compared to processed SC or LC and mixtures thereof (1:1). *In vivo* study was compared to hangover relief in alcohol-fed mice. After administering a mixture of SC and LC (300 mg/kg) water extract (1:1), mice were fed 3 g/kg of ethanol. Serum was collected at 1, 3, and 5 h intervals to analyze ethanol and acetaldehyde levels using a colorimetric assay kit. The processed SC and LC water extracts compared to raw materials significantly inhibited LPS-induced NO and inflammatory cytokine production in RAW 264.7 cells. The results of the hangover mouse model are also consistent with anti-inflammatory effects. These results suggest that processed SC and LC extracts may be functional materials for the treatment of inflammation and hangover.

Key words : *Schisandra chinensis*, *Lycium chinense*, inflammation, hangover relief.

I. 서론

적절한 알코올 섭취는 스트레스를 해소시키고 인간 관계를 부드럽게 하는 긍정적인 기능을 한다. 그러나 알코올의 남용과 만성적인 소비는 심근경색, 신경장애, 알콜성 지방간, 암, 당뇨 등 심각한 사회적 결과를 초래할 수 있다^{1,2,3,4}). 특히 알코올 섭취에 따른 급성 증상은 두통, 구강건조, 현기증, 메스꺼움 등으로 전형적인 숙취현상이다⁵).

흡수된 에탄올의 대부분은 ADH에 의해 아세트알데히드로 산화되며, 아세트알데히드는 간에서 아세트알데히드탈수효소에 의해 아세트산으로 산화된다⁶). 숙취의 주요 원인은 아세트알데히드로서 체내 농도가 높을 때 간세포에 잔류하여 미토콘드리아의 기능을 저해하고⁷), ALDH의 활성을 감소하며 즉시 중추신경계에 유해한 영향을 미치므로 아세트알데히드를 효율적으로 제거하는 것이 중요하다⁸). 따라서 알코올로 인해 야기되는 숙취 감소 및 제거를 위한 약물이 개발되었으나 화학성분의 독성 같은 부작용으로 인해 보다 안전한 천연물 소재의 개발과 건강음료에 대한 관심이 증대되고 있다. 현재까지 숙취에 관한 천연물 소재의 연구는 헛개나무 추출물, 참나물, 대나무, 콩나물, 미나리, 꿀, 솔잎, 민들레즙, 매실즙, 칩뿌리, 차나무 등이 있는 것으로 보고되어 있으나 대부분 항산화능 및 알코올 탈수효소 활성 검토에 그치며 아세트알데히드의 저해 및 활성에 대한 검토나 마우스 모델을 제작하여 숙취해소 가능성을 평가한 연구는 부족한 실정이다.

오미자는 오미자과에 속하는 식물인 오미자나무의 열매로, 주성분은 lignan으로 gomisin, schisandrin, wuweizichun A 등이 함유되어 있다^{9,10}). 주로 생약재 및 식품 원료로 이용되며, 진정, 진통, 간장보호, 알콜해독, 항당뇨 작용의 효능으로 알려져 있다¹¹). Schizandrin, gomisin 등을 효율적으로 생산하기 위한 추출 조건 및 건조 방법에 대한 비교 연구가 보고되었다^{12,13}).

구기자는 구기자나무의 열매로, 주성분은 betaine, zeaxanthin 등으로 vitamin A, vitamin B1, vitamin B2, vitamin C, 칼슘, 인 등 영양분을 풍부하게 함유하고 있어 피로회복 및 노화방지 등에 좋으며 강장, 간질환, 두통, 당뇨, 어지럼증 등의 효능이 알려져 있다¹⁴). 구기자에 관한 연구로는 대부분 이화학적 특성, 항균효과¹⁵) 및 항산화¹⁶)에 관한 연구가 대부분이며 숙취해소에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

포제는 한약재를 가공 처리하는 것으로 약물의 유효성분의 용출을 도와 독성, 부작용 등을 저하하기 위해 이용되는 가공방법이다⁹). 포제 방법에 따른 품질 비교 연구¹⁷)와, 한약재 포제가공의 현대적 연구 현황¹⁸)이 보고되었으며, 청초와 주정 전처리에 따른 오미자 물 추출물의 항산화 활성 비교에 대한 연구¹⁹) 등 포제 방법에 따른 생리활성 비교연구가 진행되고 있다. 또한, 발효기술은 유효성분의 증가 및 생리활성을 높이기 위해 적용되는 기술이며 본 연구에 활용된 *Aspergillus oryzae*는 GRAS (Generally Regarded As Safe)로 인정된 미생물로 전통식품을 포함한다. 다양한 식품소재에 활용성이 높으며, *Lactobacillus*

*Corresponding author : Seon-Young Kim, 111-27, Wonjangdong-gil, Deokjin-gu Jeonju-si, Jeollabukdo, 54810, Republic of Korea.
Tel : +82-63-711-1053, Fax : +82-63-711-1051, E-mail : Seon02@jbmi.re.kr

• Received : November 12, 2018 / Revised : November 23, 2018 / Accepted : November 28, 2018



속 미생물의 기질로 사용됨으로서 유해세균에 대한 항균력을 높이고 *Aspergillus oryzae* 로 발효한 다양한 소재의 항산화²⁰⁾, 항비만²¹⁾, 알코올에 의한 간해독²²⁾ 등에 대한 효능이 밝혀진 바 있다.

따라서 본 연구에서는 오미자, 구기자의 원물 열수 추출물과 포제 가공 추출물 및 포제 후 발효 처리 추출물의 항염증 효과를 조사하고, 가공 조건에 따른 오미자, 구기자 혼합 추출물의 동물모델에서의 숙취해소 효과를 비교 관찰하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Dulbecco's-modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 과 Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin은 Gibco (Gibco, USA)사에서 구입하였다. Mouse TNF- α ELISA kit와 Mouse IL-1 β ELISA kit는 R&D system (R&D System, Abingdon, UK)에서 구입하였다. Ethanol, Alcohol dehydrogenase (ADH) 및 aldehyde dehydrogenase (ALDH), Acetaldehyde assay kit는 BioVision (BioVision Inc., CA, USA)사에서 구입하였다. 이외 시약은 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 시료의 제조

본 연구에 사용된 오미자(*Schisandra chinensis*, SC), 구기자(*Lycium chinense*, LC) 원물 (Original, Ori), 포제 가공(1st) 및 포제 후 발효 가공 용액(2nd)은 열수추출 후 동결건조기(FDU-2100, EYELA, Japan)로 건조하여 분말형태로 회수하였다. 포제 가공은 원물을 220 °C에서 12분간 가열 처리하였으며, 포제 후 *Aspergillus oryzae*를 접종하여 28 °C에서 48시간 고체 발효하였다. 발효가 완료된 2차 가공시료는 8배수의 물을 첨가하여 100 °C에서 4시간동안 추출하여, 여과(100 mesh) 후 감압 농축하였다(40 °C, 1,000 mmHg). 최종 건고물은 60 °C에서 72시간동안 열풍 건조하였다(yield: 28%). 건조한 추출물은 -80 °C에서 보관하면서 사용하였다

3. 세포배양

RAW 264.7 (TIB-71; ATCC, USA) 대식세포주는

ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% FBS(Fetal Bovine Serum; Gibco, USA), 1% Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 μ g/ml)을 함유한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, USA) 에서 37 °C, 5% CO₂조건으로 배양하였다.

4. 대식세포의 NO 측정

RAW 264.7 세포주 1 \times 10⁵ cell/well 에 시료(500 μ g/ml)를 1시간 동안 처리한 후, LPS (1 μ g/ml) 처리하여 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포배양 상등액과 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.1% α -naphthylamide in 2.5% phosphoric acid)를 1:1의 비율로 혼합, 차광(실온, 10분) 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 표준물질은 sodium nitrite를 사용하여 세포배양 상등액에 함유되어 있는 NO의 값을 계산하였다.

5. Cytokines (TNF- α , IL-1 β) 측정

RAW 264.7 세포주를 6 well plate에 1 \times 10⁵ cell/well 로 분주하고 각 시료(500 μ g/ml) 를 처리한 후 1시간 뒤LPS (1 μ g/ml)를 처리하였으며, 24시간 배양 후 상등액을 수거하여 sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법으로²³⁾ ELISA kit 를 사용하여 측정하였다. TNF- α 농도의 측정은 anti-mouse TNF- α antibody가 코팅된 microplate에 상등액을 2시간 동안 반응시킨 후, 각 well을 wash buffer (300 μ L/well)로 4회 세척하였다. 그 후, Mouse conjugated antibody (100 μ L/well)를 첨가하여 2시간 동안 반응시킨 다음 5회 세척하고, 1:1로 혼합한 substrate solution (100 μ L/well)을 가하여 실온(차광)에서 30분간 발색 후, stop solution으로 반응을 정지시켜 microplate reader를 이용하여 450nm에서 측정하였다. IL-1 β 농도의 측정은 TNF- α 와 같은 방법으로 측정하였다.

6. 항산화 효능 분석

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, MO, USA) radical 소거능은 시료액과 DPPH 용액을 1:1로 혼합하여 30분간 실온에 반응시킨 후, 517 nm에서 분광광도계(Perkin Elmer, Victor2

1402 Multilabel counter)로 측정하였으며, ABTS (2,2'-Azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) radical 소거능은 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM 과황산칼륨(Potassium persulfate, $K_2S_2O_8$) 용액을 혼합하여 암소에서 약 12시간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도가 1 ± 0.1 이 되도록 조절된 ABTS 용액을 사용하였다. ABTS 용액 285 μ L와 각 농도별 시료 15 μ L를 혼합하여 암소에서 30분간 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SOD (superoxide dismutase) 활성능은 SOD assay kit (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 이용하여 측정하였으며, 측정방법은 kit의 방법에 준하였다.

DPPH radical 소거능과, ABTS radical 소거능 및 SOD 활성능은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50%로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration)값으로 나타내었다.

7. 숙취해소 마우스 모델

본 연구에 사용한 C57BL/6J 수컷 마우스(20 ~ 22 g)는 Damul Science (Dejeon, Korea)에서 구입하여, 1주간 사육실에서(12 h/12 h light/dark cycle condition)에서 순화시킨 후 실험에 사용하였으며, 동물실험은 (재)전주농생명소재연구원 동물실험윤리위원회 지침에 의해 수행하였다(동물실험승인번호: JAMI IACUC2018004).

실험군은 총 5개 군으로 군당 6마리씩 분리한 후, 각 군은 정상 대조군(CON), 알코올섭취군(EtOH), 오미자, 구기자 원물 혼합물군(1:1, SC/LC Ori), 오미자, 구기자 포제 가공 혼합물군(1:1, SC/LC 1st), 오미자, 구기자 포제 후 발효 가공 혼합물군(1:1, SC/LC 2nd)으로 구분하였다(Table 1). 18시간 절식 후, 실험군에 각각 300 mg/kg을 경구투여 하였으며, 대조군은 멸균수만 투여하였다. 30분 후에 알코올(3 g/kg)을 경구투여하고, 투여 후 1시간, 3시간, 5시간 간격으로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액에서 혈청은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻었다. Ethanol, Alcohol dehydrogenase (ADH) 및 aldehyde dehydrogenase (ALDH), Acetaldehyde는 Assay kit (BioVision Inc., CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

8. 통계 분석

각 실험 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD) 로 나타내었고, 각 데이터의 통계 분석은 unpaired Student's *t*-test를 통해 *P*값이 0.05 미만($P < 0.05$) 인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. 결과

1. 가공 조건에 따른 오미자 및 구기자 추출물의 항산화능 분석

가공 조건에 따른 오미자 및 구기자 추출물의 항산화능을 분석하기 위해 DPPH, ABTS radical 소거능과 SOD 효소 유사활성 효과를 측정하였다. DPPH radical 소거 활성을 분석한 결과 오미자 및 구기자 포제 후 발효 가공 추출물에서 각각 1.57 ± 0.20 mg/ml, 1.65 ± 0.20 mg/ml의 IC_{50} 값을 나타내었으며, ABTS radical 소거활성을 분석한 결과 구기자의 포제 후 발효 가공 추출물에서 1.90 ± 0.29 mg/ml의 IC_{50} 값을 나타내었다. SOD 유사 활성을 분석한 결과는 오미자 및 구기자 포제 후 발효 가공 추출물에서 각각 1.84 ± 0.14 mg/ml, 1.47 ± 0.14 mg/ml의 IC_{50} 값을 나타내어 ABTS, DPPH radical 소거 활성에서 보인 바와 같이 항산화 효능을 확인하였다(Table 2.). 분석법에 따라 항산화능의 차이가 있었으나 가공 후 항산화능은 오미자는 DPPH radical 소거능과 SOD 유사활성이 유의하게 증가하였고, 구기자는 ABTS, DPPH radical 소거능과 SOD 유사활성 모두 가공 전보다 가공 후에 증가하는 것으로 확인되었다.

2. 산화질소 합성 및 염증관련 Cytokines (TNF- α , IL-1 β) 분비 억제 효과

오미자, 구기자 원물, 포제 가공 및 포제 후 발효 가공 추출물의 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성 억제능을 조사하기 위하여 RAW 264.7 세포에 각 추출물을 동일한 농도(500 μ g/ml)로 처리한 후 관찰하였다. 그 결과, 정상군에 비해 LPS 처리한 대조군에서 약 22.8배 많은 산화질소를 생성하였다. LPS 처리한 대조군에 비해 가공 조건에 따른 오미자, 구기자 추출물은 모두 산화질소 생성을 유의적으로 억제하는 경향을 나타냈으며, 특히 포제 후 발효

가공 추출물에서 각각 64.9%, 56.2%의 유의한 억제능을 확인하였다.

또한, 실제 생성된 염증관련 cytokines (TNF- α , IL-1 β)의 분비량을 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay)법으로 측정된 결과는 Fig. 1 와 같다. LPS 처리한 RAW 264.7 세포에서 가공 조건에 따른 오미자, 구기자 추출물의 TNF- α , IL-1 β 분비 억제 효과를 관찰한 결과, TNF- α 의 경우 LPS 처리한 대조군이 25.2 ng/ml로 정상군에 비해 TNF- α 생성을 약 40배 증가시켰으며, 오미자 및 구기자 추출물의 처리하였을 때 가공 후 따라 유의한 생성 억제능을 확인하였다. IL-1 β 의 경우 LPS 처리한 대조군이 31.9 pg/ml로 정상군에 비해 약 6.3배 높은 수준의 IL-1 β 가 생성되었으며, 오미자 및 구기자의 가공 추출물을 처리한 결과 TNF- α 와 유사하게 가공조건에 따라 감소하는 것을 확인하였다.

결과적으로 가공 조건에 따른 오미자 및 구기자 추출물은 산화질소 생성 및 염증관련 cytokines을 유의적으로 억제하며, 특히 포제 후 발효 가공 추출물에서 우수한 항염증 효능을 보이는 것으로 판단된다.

3. 오미자 및 구기자 추출물의 가공 조건에 따른 ADH, ALDH 효소 활성도

알코올이 peroxidase에 의해 대사 될 때, 알코올대사물질인 아세트알데히드의 영향을 받으며, 숙취해소 효과를 연구하기 위해서는 ADH와 ALDH 활성을 조사할 필요성이 있다. ADH 활성도 측정 결과(Fig. 2) 오미자와 구기자 모두 원료에 비해 포제와 포제 후 발효 공정에 따라 ADH 활성이 증가하는 것으로 확인되었으며, 오미자와 구기자를 1:1로 혼합한 원료, 포제, 포제 후 발효 추출물이 단독으로 처리한 군에 비해 활성이 높게 측정되었다.

ALDH 활성도 역시 ADH와 마찬가지로 오미자와 구기자 모두 원료에 비해 포제와 포제 후 발효 공정에 따라 ALDH 활성이 증가하는 것으로 확인되었으며, 오미자와 구기자를 1:1로 혼합한 원료, 포제, 포제 후 발효 추출물이 단독으로 처리한 군에 비해 활성이 높게 측정된 것으로 보아 알코올 분해 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다. 이에, 알코올로 유도된 마우스 모델에서 숙취해소 효능은 오미자, 구기자 원물, 1차 가공, 2차 가공 추출물을 1:1로 혼합하여 비교하였다.

4. 가공 조건에 따른 오미자 및 구기자 혼합 추출물의 알코올로 유도된 마우스 모델에서 숙취해소 효능

가공 조건에 따른 오미자 및 구기자 추출물의 숙취 개선 효능을 확인하기 위하여 마우스를 이용하여 혈중 알코올, 아세트알데히드 농도를 측정하였다(Fig. 3). 가공 조건 별 오미자 및 구기자 혼합(1:1) 추출물을 마우스에게 알코올 투여(3 g/kg) 30분 전에 경구 투여 한 후 1, 3 및 5시간 후 혈중 알코올 농도를 측정하였다. Fig. 3A에서 알코올 투여 1시간 후 10초간 이동 유무를 비교한 대표 사진을 제시하였다. 자리의 이동과 꼬리의 위치의 변화를 통해 잠든 마우스를 구분할 수 있다. 알코올만 투여한 군의 마우스는 모두 움직임이 없이 잠들어 있었으며 오미자와 구기자 원물, 1차, 2차 가공 추출 혼합물을 투여한 군은 알코올 단독 투여군에 비해 상태가 호전되는 것이 확인되었다. 2차 가공 추출 혼합물을 투여한 군이 가장 효과적이었다. 혈액 중의 알코올 농도는 모든 군에서 1시간째 최고 농도에 도달하였으며, 알코올 섭취 3시간 후, EtOH군에 비하여 오미자 및 구기자 원물 혼합 추출물(SC/LC_Ori)군은 30.1%, 오미자 및 구기자 포제 혼합 추출물(SC/LC_1st)군은 29.0%, 오미자 및 구기자 포제 후 발효 혼합 추출물(SC/LC_2nd)군은 41.9% 정도의 유의적인 감소를 나타냈다. 알코올 섭취 5시간 후의 혈중 알코올 농도를 비교해본 결과 EtOH군을 제외하고 모든 실험군에서 CON군과 비슷하게 감소하였으며 SC/LC_2nd 군에서 가장 낮은 농도를 나타내어 알코올 분해 효과를 확인하였다.

혈중 아세트알데히드 농도를 측정하기 위해 숙취해소 동물모델을 제작하여 가공 조건 별 오미자 및 구기자 혼합(1:1) 추출물을 경구투여 하고 30분 후 알코올을 투여하여 1시간, 3시간 및 5시간의 혈액을 실험에 사용하였다. 그 결과 모든 군에서 알코올 투여 1시간 후에 최고 농도에 도달하였으나 EtOH군에 비해 약 30% 이상 낮은 농도를 나타냈으며, 이후 꾸준히 감소하여 아세트알데히드를 신속하게 대사시키는 것을 확인하였다.

가공 조건 별 오미자 및 구기자 혼합(1:1) 추출물을 마우스에게 알코올 투여(3 g/kg) 30분 전에 경구투여 한 후 1, 3 및 5시간 후의 혈중 알코올 탈수소효소(ADH)는 Table 3에 나타내었다. 알코올 투여 3시간 후의 혈중 ADH 농도는 EtOH군에서 급격히 증가하였다가 감소되었으나, 실험군은 5시간째 ADH 농도

가 증가하는 것으로 보아 혈중 알코올 농도를 감소시키기 위해 ADH 효소가 활성화된 것을 확인하였다. 그러나 ALDH의 경우 시간 경과에 따라 효소 활성이 증가되긴 하지만 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Data not shown).

결과적으로 가공 조건에 따른 오미자 및 구기자 추출물은 알코올 섭취로 인해 나타나는 증상을 완화시킬 수 있으며, 특히 발효 후 포제 추출물이 가장 효과적인 것으로 판단된다.

IV. 고찰

현재 잦은 음주, 과음으로 인한 숙취를 제거하기 위한 몇몇 의약품이 개발되었으나 효능 대비 독성이나 부작용으로 인해 보다 안전한 기능성 소재의 개발에 관심이 증대되고 있다. 또한 숙취 해소용 건강음료가 시판되고 있으나, 체내 알코올 분해 효과는 미미하여 천연물 소재의 기능성 발굴에 대한 연구가 진행되고 있다.

오미자는 플라보노이드 및 유기산류 등이 풍부하여 한의학적으로 진정, 진통, 간장보호, 항당뇨 등으로 이용되었으며, 구기자는 강장, 간질환, 두통, 당뇨, 어지럼증 등으로 이용되고 있다.

본 연구에서는 가공 조건에 따른 오미자와 구기자의 항염증 관련 세포 실험 및 급성 알코올 투여에 의한 숙취 해소 효능을 검증하였다.

산화스트레스는 인슐린 저항성, 비만, 심혈관 질환 등을 포함하여 다양한 질병에 주요한 요인으로 알려져 있다.

Endotoxin의 일종인 LPS가 대식 세포주인 RAW 264.7 세포에 처리되면 NO 등의 염증 매개물질의 분비가 증가된다²⁰. NO의 발현 증가로 인한 염증 반응은 염증 매개물질 분비 및 전염증성 사이토카인을 생산하여 과도한 면역반응을 야기한다²⁴. 이는 여러 질환에 영향을 미치므로 염증 반응을 억제하는 연구는 활발히 지속되고 있다. 본 연구에서 RAW 264.7 세포주를 이용하여 500 µg/ml의 동일한 농도에서 가공 조건에 따른 오미자 및 구기자의 항염증 효과를 확인한 결과 산화질소 생성을 유의적으로 억제하며, 특히 포제 후 발효 가공 추출물에서 산화질소 생성을 억제하고 있음을 확인하였다(Fig. 1A). TNF- α , IL-1 β 등 전염증성 사이토카인은 LPS 반응의 주요

매개체로서, TNF- α 는 주로 급성 및 염증 반응과 관련되어 있으며²⁵, IL-1 β 는 T, B 세포를 활성화하여 염증세포를 자극한다²⁶. LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증성 사이토카인을 확인한 결과 TNF- α 와 IL-1 β 를 모두 억제하며, NO 생성능과 마찬가지로 포제 후 발효 가공 추출물에서 유의적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 1B).

혈중 알코올 농도는 음주 후 약 30분 이내에 섭취량의 60~90%가 체내로 흡수되며, 60~90분 사이에 최고 농도에 도달한다는 보고²⁷와 같이 본 연구에서도 알코올을 투여한 모든 군에서 1시간 만에 혈중 알코올 농도가 최고치에 도달하였다(Fig. 3B). 그러나 가공 조건 별 오미자와 구기자 추출물을 공급한 군에서 알코올 섭취 후 3시간에서부터 혈중 알코올 농도가 감소하기 시작했으며, 5시간에서는 모든 군에서 알코올 대조군보다 유의적으로 감소하여 정상수준으로 회복되었다. 또한 알코올 섭취시 대사과정에서 생성되는 아세트알데히드가 알코올 자체보다 유해한 것으로 알려져 있으며²⁸, 본 실험을 통해 혈중 아세트알데히드를 시간별로 측정 한 결과 알코올 섭취 후 1시간에서 알코올 대조군에 비해 실험군의 혈중 아세트알데히드 농도가 유의적으로 감소되는 것이 관찰되었으며, 특히 SC/LC_2nd 군에서 유의적인 감소 효과가 관찰되었다(Fig. 3C).

알코올이 체내에 들어오면 일차적으로 간에서 알코올 탈수소효소(ADH)에 의해 분해가 시작된다⁶. 이 ADH의 작용에 의하여 아세트알데히드가 생성되면, 아세트알데히드 탈수소효소(ALDH)에 의해 알코올이 분해되는 것으로 효소의 활성이 증가함으로써 숙취가 감소될 수 있다. 본 연구에서는 *in vitro*에서 오미자 및 구기자 가공 조건에 따른 추출물의 ADH, ALDH 효소 활성도를 검토하였으며(Fig. 2), 숙취해소 동물 모델의 *in vivo*시험을 통해 가공 조건 별 혼합 추출물의 혈중 ADH, ALDH 효소 활성을 측정하였다(Table 3). 그 결과 *in vitro*수준의 ADH, ALDH 모두 오미자와 구기자 원료에 비해 포제와 포제 후 발효 공정에 따라 활성이 증가하였으며, 오미자와 구기자를 1:1로 혼합한 가공 조건 별 추출물이 단독 처리한 군에 비해 활성이 높게 나타났다. 또한 *in vivo*시험에서는 알코올 섭취 후 1시간에서 알코올 대조군의 ADH효소 활성이 증가하였다가 이후 감소하였으나, 오미자와 구기자를 1:1로 혼합한 가공 조건 별 추출



물은 3시간에서부터 ADH 효소 활성이 증가하기 시작하여 5시간에서 최고 농도를 나타내었다.

이상의 결과는 오미자 및 구기자를 포제 후 발효 가공한 열수 추출물은 산화질소 생성 및 염증성 사이토카인을 억제하여 항염증 효과의 유의한 증가와, ADH 및 ALDH 효소를 활성화시켜 혈중 알코올, 아세트알데히드 농도를 감소시킴으로 숙취해소 효능을 증가시키는 것을 보여주었다.

V. 결론

본 연구의 결과는 오미자 및 구기자 원물, 포제 가공 및 포제 후 발효 가공한 열수 추출물을 비교하여 산화질소와 전염증성 사이토카인을 억제하여 세포내염증을 제어하며, ADH와 ALDH 효소를 활성화시키는 효과가 있음을 보여주었다. 또한 알코올로 유도된 급성 숙취해소 마우스 모델에서 혈중 알코올, 아세트알데히드 농도를 조절하고, 혈중 알코올 탈수소효소를 활성화시키는 것을 확인하였다. 본 연구 결과는 오미자 및 구기자를 포제 후 발효 가공한 열수 추출물이 항염증과 숙취해소에 효과적인 소재로서의 가능성을 보여주었다.

감사의 글

본 결과물은 한국임업진흥원의 융복합기반 임산업의 신산업화 기술개발(R&D) 사업(과제번호: 2017054A00-1720-AB02)의 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. TSUKAMOTO S, MUTO T, NAGOYA T, SHIMAMURA M, SAITO M, TAINAKA H. Determinations of ethanol, acetaldehyde and acetate in blood and urine during alcohol oxidation in man. *Alcohol and Alcoholism*. 1989;24: 101-08.
2. Tsukamoto S, Kanegae T, Uchigasaki S, Kitazawa M, Fujioka T, Fujioka S, Imamura Y, Nagoya T, Shimamura M, Mieda Y. Changes in free and bound alcohol metabolites in the urine during ethanol oxidation. *Arukuru Kenkyu to Yakubutsu Izon* 1993;28:441-52.
3. Xu BJ, Xu BJ, Zheng YN, Xu BJ, Zheng YN, Sung CK, Sung CK. Natural medicines for alcoholism treatment: a review. *Drug Alcohol Abuse Rev*. 2005;24:525-36.
4. Lieber CS. Medical disorders of alcoholism. *N. Engl. J. Med*. 1995;333:1058-65.
5. Lieber CS, Garro A, Leo MA, Mak KM, Worner T. Alcohol and cancer. *Hepatology* 1986; 6:1005-19.
6. Forsander OA, Raiha NC. Metabolites produced in the liver during alcohol oxidation. *J Biol Chem*. 1960;235:34-36.
7. Mezey E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1980; 33:2709-18.
8. Lieber C-S, DeCarli L-M. Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system in vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem*. 1970;245: 2505-12.
9. Ju Y-S. *Ungok Herbology*. Jeonju:Woosuk Press 2013;819: 826-8.
10. Kim M-J, Park E-J. Antioxidative and antigenotoxic effect of omija (*Schizandra chinensis* B.) extracted with various solvents. *Korean J Crop Sci* 2010;39:487-93.
11. Kim K, Park C, Ryu S, Bang J, Lee BJ. Schizandrin, oil compounds, and their extraction yield in fruits of *Schizandra chinensis* Baillon. 2000;45:158-62.
12. Koo D-C, Suh W-S, Baek S-Y, Shim S-H. Quantitative determination of lignans from *Schizandra chinensis* by HPLC. *Korean J. org. Agric* 2011.
13. Lee S, Moon H-K, Lee S-W, Moon J-N, Kim J-K. Effects of drying methods on quality characteristics and antioxidative effects of Omija (*Schizandra chinensis* bailon). *Korean J Food Preserv* 2014;21:341-49.
14. Lee B-Y, Kim E-J, Choi H-D, Kim Y-S, Kim I-H, Kim S-S. Physico-chemical properties of Boxthorn (*Lycii fructus*) hot

- water extracts by roasting conditions. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL 1995;27:768-72.
15. Park U-Y, Chang D-S, Cho H-R. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J. Korean Soc. Food Nutr 1992;21:91-96.
 16. Lim D-K, Choi U, Shin D-H. Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL 1996;28:83-89.
 17. Cho E-H, Roh S-S, Seo Y-B, Jeong G-HJTKJoH. The Comparative Study of Quality by Processing Methods of *Liriope platyphylla*. Kor. J. Herbology 2010;25:95-102.
 18. Oh J-H, Sin J-S, Ahn E-S, Lee S-J, Lee J-c, Lim J-h, Hong S-k, Hong J-k, Lee Y-JJJoPI. A Literature Survey of the Modern Techniques Used for the Processing of Herbal Medicines. J. Kor. Pharm. Sci 2009;39: 275-297.
 19. Nam H-H, Kim H-J, Choi N-J, Roh S-S, Choo B-K. A Comparison of Antioxidant Activity from *Schisandra chinensis* Water Extracts depending on Stir-frying and Stir-frying with Liquids Process. Korean J. org. Agric 2015;23:987-997.
 20. Lee, S-I, Lee, Y-K, Kim, S-D, Yang, S-H, Suh, J-W. Sensory quality, antioxidant, and inhibitory activities of XO and AO of *Smilax china* leaf tea fermented by *Aspergillus oryzae*. Korean J. Food Preserv 2014;21:129-139.
 21. Kang, Y-H, Kim, K-K, Kim, T-W, Yang, C-S, Choe, M. Evaluation of the anti-obesity activity of *Platycodon grandiflorum* root and *Curcuma longa* root fermented with *Aspergillus oryzae*. Korean J. Food SCI. TECHNOL 2015; 47:111-118.
 22. Sung, H, Lee, Y-H, Jun, W. In Vitro Hepatoprotective Effects of Fermented *Curcuma longa* L. by *Aspergillus oryzae* against Alcohol-Induced Oxidative Stress. J Korean Soc Food Sci Nutr 2016; 45:812-818.
 23. Engwall E, Perlmann PJJI. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol 1972;109:129-35.
 24. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. J Ethnopharmacol 2001;77:209-17.
 25. Delgado AV, McManus AT, Chambers JPJN. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides 2003; 37:355-61.
 26. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med 1993;119:771-8.
 27. Shumate R, Crowther R, Zarafshan MJJofm. A study of the metabolism rates of alcohol in the human body. J. Forensic Med 1967; 14:83.
 28. Lieber CSJNEJoM. Liver adaptation and injury in alcoholism. N. Engl. J. Med 1973;288: 356-62.

Figure legends

Fig. 1

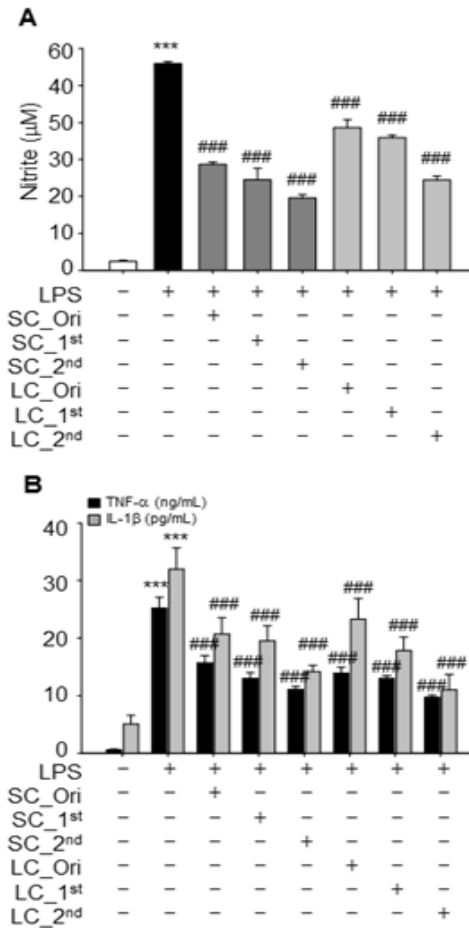


Fig. 1. Inhibitory effects of processed *Schisandra chinensis* (SC) and *Lycium chinense* (LC) on nitric oxide (NO) and inflammatory cytokines production in RAW 264.7 cell. (A) NO production was determined in culture supernatant using Griess reagent. (B) TNF- α and (C) IL-1 β production were determined in the supernatant by ELISA. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. LPS, Lipopolysaccharide. ***P <0.001 versus control (CON) group; ###P <0.001 versus LPS group.

Fig. 2

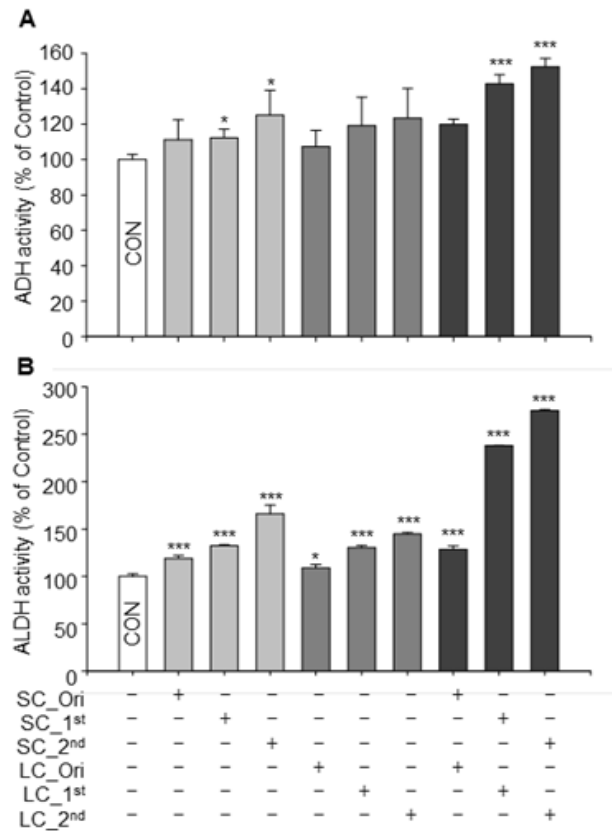


Fig. 2. Comparison results for the processed SC and LC products against on Alcohol dehydrogenase (ADH) and Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activation.

(A) Alcohol dehydrogenase (ADH) activity. (B) Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity. ADH and ALDH activity was measured using ethanol (EtOH) and acetaldehyde (CH₃CHO) by the reduced NAD level measurement. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. *P < 0.05 ***P < 0.001 versus CON group; ###P < 0.001 versus LPS group.

Fig. 3

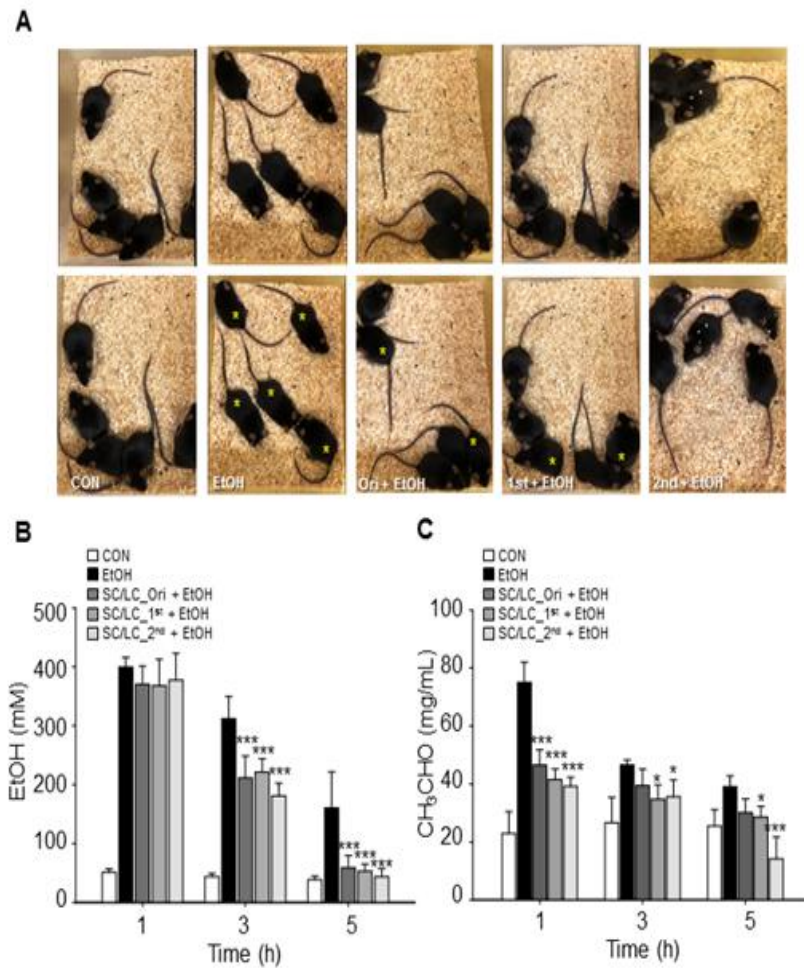


Fig. 3. Effects of processed SC and LC mixture on relieving hangover in mice administered alcohol. (A) Representative mice image of each treatment group after 1 h of EtOH administration. Snapshots of mouse movements were displayed on the top and bottom panels. The symbol (*) indicate a hangover mouse. (B) EtOH levels. (C) CH₃CHO levels. The mice were pretreated with a mixture of raw or processed SC and LC extracts (1: 1) for 30 min, then fed with alcohol (3 g / kg). Serum was collected at 1, 3, and 5 h intervals for colorimetric analysis. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. *P < 0.05, ****P < 0.001 versus EtOH group.

Table 1. The classification of group

Group	Treatment administration (p.o.)	EtOH administration (p.o.)
CON	Vehicle	–
EtOH	Vehicle	alcohol (3g/kg)
SC/LC_Ori	Raw SC and LC extract mixtures (1:1)	alcohol (3g/kg)
SC/LC_1st	1st processed SC and LC extract mixtures (1:1)	alcohol (3g/kg)
SC/LC_2nd	2nd processed SC and LC extract mixtures (1:1)	alcohol (3g/kg)

Table 2. ABTS radical scavenging activity, DPPH radical scavenging activity and SOD activity of *Schisandra chinensis* (SC) and *Lycium chinense* (LC)

Sample	ABTS (IC ₅₀ ^a , mg/ml)	DPPH (IC ₅₀ ^a , mg/ml)	SOD (IC ₅₀ ^a , mg/ml)
SC_Ori	0.69 ± 0.01	6.59 ± 1.07	2.46 ± 0.34
SC_1st	1.26 ± 0.08	1.08 ± 0.02***	2.60 ± 0.03
SC_2nd	2.21 ± 0.08	1.57 ± 0.20***	1.84 ± 0.14***
LC_Ori	2.99 ± 0.50	1.81 ± 0.12	1.73 ± 0.07
LC_1st	2.22 ± 0.05	2.09 ± 0.04	1.00 ± 0.01***
LC_2nd	1.90 ± 0.29***	1.65 ± 0.20***	1.47 ± 0.14***
PC	0.02 ± 0.00	0.47 ± 0.00	–

^aIC₅₀ value in the concentration (mg/ml) of sample required for 50% inhibition.

Ori, Original; 1st, 1st processed (stir-frying treatment); 2nd, 2nd processed (fermented using *Aspergillus oryzae* for 48 hr)

Each value represents mean ± SD (n=3). ***P <0.001 versus each Ori group.

Table 3. Effects of processed SC and LC mixture on serum ADH activity.

Sample	ADH (mU/ml)		
	1h	3h	5h
CON	36.74 ± 19.68	55.07 ± 26.18	48.82 ± 21.73
EtOH	56.54 ± 18.88	128.26 ± 25.49	88.57 ± 19.49
SC/LC_Ori	42.23 ± 15.61	55.44 ± 16.00***	101.51 ± 34.01
SC/LC_1st	46.34 ± 20.73*	64.00 ± 18.11***	106.87 ± 29.62
SC/LC_2nd	40.68 ± 10.85	55.00 ± 17.83***	107.87 ± 20.03*

Ori, Original; 1st, 1st processed (stir-frying treatment); 2nd, 2nd processed (fermented using *Aspergillus oryzae* for 48 hr)

Each value represents mean ± SD (n=6). *P <0.05, ***P <0.001 versus EtOH group.