유산균 발효된 매자나무 추출물이 마우스 혈청중의 Melatonin 및 Serotonin의 함량에 미치는 영향

Jin Ling* · 김지선** · 서용창** · 최운용* · 안주희* · 마충제* · 윤창순*** · 이현용****†

*강원대학교 바이오산업공학부, **강원대학교 의료 · 바이오신소재융복합연구사업단, ***세바바이오테크

The Effect of Extracts of *Berberis koreana* Bark by *Lactobacillus* Fermentation on the Concentration of Serotonin and Melatonin in the Serum of Treated ICR Mice

Jin Ling*, Ji Seon Kim**, Yong Chang Seo**, Woon Yong Choi*, Ju Hee Ahn*, Choong Je Ma*, Chang Soon Yoon*** and Hyeon Yong Lee****†

*College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**Medical & Bio-Material Research Center and College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

***Shebah Biotech Co., Hallym Business Incubator/Industry-University, Coop Center #301, Chuncheon 200-702, Korea.

ABSTRACT : This study was to investigate the effect of fermentation extracts on the concentration of serotonin and melatonin in the serum of the ICR mice. The ICR mice were divided into water control group, lactobacillus fermentation solution including (*Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium longum* B6) control group, positive control group (milk and doxylamine succinate), negative control group (caffeine) and the groups treated with the extracts of *Berberis koreana* bark (WE: water extracts, FE-L.P: fermentation extracts of *Lactobacillus paracasei*, FE-B.L: fermentation extracts of *Bifidobacterium longum* B6). After ten-day feeding treatment, the mean concentration of serotonin for water control, WE, FE-L.P and FE-B.L group was 134.72, 183.01, 232.09 and 223.78 ng/ml, respectively. The mean concentration for FE-L.P and FE-B.L group were approximately 66% larger than that for water control group. The mean concentration of melatonin for water control, WE, FE-L.P and FE-B.L group was 76.92, 106.66, 157.56 and 141.81 pg/ml, respectively. The mean concentration of melatonin for FE-L.P and FE-B.L group were also larger than that for water control group. Our results indicated that the fermentation extracts of *Berberis koreana* bark have relatively greater potential to induce secretion of serotonin and melatonin. Therefore, the fermentation extracts have antidepressant effect.

Key Words : *Berberis koreana* bark, Fermentation, Serotonin, Melatonin, Antidepressant

서 언

우울증이란 가장 흔한 정신장애 중 하나로 사람이 살아가면서 일상의 삶에 대한 흥미나 쾌락을 느끼지 못하고 슬퍼하고 절망하는 장애이다 (Park *et al.*, 2004). 인구 전체에서 우울증의 발병율은 6~17%로 알려져 있고 여성이 남성보다 2배 이상 높게 나타나고 있으며 (Song and Li, 2002), 특히 산후, 폐경기 등 특정 시기에는 우울증의 임상적 증세가 더욱 뚜렷하다고 보고되어 있다 (Kim *et al.*, 2000; Chung, 1996). 이런 질병은 심한 우울감과 함께 전반적인 흥미와 의욕상실, 자책, 절망, 염세 등 감정의 장애가 두드러지며 체중감소, 자살 및 수면장애 등의 증상이 동반된다. 이중 수면장애는 고통스

러울 뿐만 아니라 2차적으로 정신적 및 신체적 문제를 악화시킬 수 있으므로 수면상태의 개선이 우울증의 호전과 밀접한 관계가 있다고 한다 (Hong *et al.*, 1998).

우울증이 발병하는 원인을 아직 명확하게 규명하지 못하고 있는 실정이지만 주로 생물학적, 유전적, 사회심리학적 요인으로 대별된다. 특히 norepinephrine, serotonin 등과 같은 monoamine계의 신경전달물질의 감소 또는 결핍이 우울증을 야기하는 가장 중요한 원인으로 알려져 있다 (Kim and Lee, 2004). 현재, 우울증을 치료하는데 사용되는 약물요법으로서 서양의학에서는 주로 monoamine의 재흡수를 억제하는 삼환계 항우울제 tricyclic antidepressants (TCA)와 monoamine의 분해를 억제하는 monoamine 산화효소 억제제 monoamine

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received 2010 November 5 / 1st Revised 2011 April 19 / 2nd Revised 2011 April 21 / Accepted 2011 April 22

oxidase inhibitor (MAOI) 등이 사용되고 있지만 심장 독성, 오심, 구토, 체위성 저혈압 등 여러 가지 부작용이 동반된다고 보고되고 있다 (Lee *et al.*, 2003). 따라서 부작용이 적은 것으로 알려진 천연 약용식물에 대한 연구가 항우울증 영역에서의 새로운 방안으로 대두되고 있다.

매자나무 (*Berberis koreana*)는 미나리아재비목 매자나무과의 낙엽관목으로 약효를 가지는 한국 특산종 수목종의 하나로써 주로 강원도, 경기도 및 함경남도 지역에 분포되어 있다 (Jin *et al.*, 2008; Cho and Kim, 1974). 키가 2m를 넘지 않으며 흙이 많이 과인 잔가지가 많이 나서 다복한 수형을 만들고 2년 이상 자라면 가지에 붉은 빛이 돌고 1cm가 채 되지 않는 가시가 많이 난다. 한방에서 사용하고 있는 매자나무는 소염, 진통, 항염증, 지혈, 항균, 항산화, 항암, 면역 등에 효과가 있다고 알려져 있다 (Jin *et al.*, 2009; Qadir *et al.*, 2009). 또한 매자나무 뿌리의 ethanol 추출물에서 얻은 황색침상결정을 마우스에 ethanol과 병용 투여시 수면지속시간이 증가되고 직장온도가 저하된다고 보고되었고 (Cho and Kim, 1974), 매자나무 뿌리에서 얻은 활성성분인 Majorine (5,6-Dihydro-9,10 dimethoxybenzo [g]-1,3-benzodioxolo [5,6-a] quinolinium)을 마우스에 투여시 혈압강하 등 중추신경계에 영향을 미친다고 보고되고 있다 (Kim, 1986).

한편, 발효법은 역사상 가장 오래된 기술로서 식품,약품, 화장품 등 다양한 분야에서 활용되고 있는데 그 중 인류 역사와 함께 해온 식품 발효는 현재까지 전 세계적으로 가장 널리 이용되고 있는 기술이다. 최근에는 발효식품의 생리활성 작용이 알려지면서 세계적으로 건강기능성 장수식품으로 인식되고 있으며 (Park *et al.*, 2006), 특히 프로바이오틱스 (probiotics)로서 유산균의 건강기능성이 밝혀지면서 이에 대한 관심이 높아지고 있다. 유산균은 발효식품에 특유의 풍미와 우수한 보존성을 부여할 뿐만 아니라 유당불내증의 완화작용, 정장작용, 병원성세균의 생육억제 작용, 콜레스테롤 저하작용, 항암작용 등 다양한 질병을 예방하고 치료할 수 있다고 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2002). 또한 건강한 사람의 장내에 존재하면서 인체의 특이 및 비특이적 면역체계의 증강에 기여한다고 알려져 있으며, 최근에는 유산균 발효에 의한 천연물의 면역증진 효과에 관한 연구가 많이 보고되고 있다 (Yoon *et al.*, 2009). 하지만, 아직까지 매자나무 및 발효기술을 이용한 매자나무의 항우울 효과에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 매자나무의 항우울 효과를 확인하고자 동물실험을 통해 신경생화학적 측면에서 정신적 문제에 작용하는 것으로 알려진 신경전달물질인 serotonin과 melatonin의 양적 변화를 측정하였다. 또한 발효기술을 접목하여 기존 추출법에 비교하면서 발효법에 따른 매자나무의 항우울 효과와 수면유도 효과의 변화를 알아보고 향후 매자나무의 기능성 발효제품으로 개발하기 위한 선행 연구 자료로 이용하기 위하

여 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출방법

본 실험에 사용된 매자나무는 한국 특산종으로써 서림종묘에서 채취한 것으로, 재료를 실온에서 음건시킨 후 사용하였다.

대조군으로 사용된 일반 열수추출 방법은 100g의 매자나무 수피를 수직환류 냉각기가 부착된 추출 플라스크에 10배의 증류수를 사용하여 100℃에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 발효방법은 일반 열수추출이 끝난 후, 매자나무 추출물에 유산균 *Lactobacillus paracasei* (L.P) 혹은 *Bifidobacterium longum* B6 (B.L)를 적정농도 10^5 CFU/ml로 접종하여 0.05% L-cysteine-HCl이 첨가된 MRS broth를 이용하여 37℃ 혐기적 조건 Gaspak anaerobic system (BBL, Cockeysville, MD, USA)에서 96시간 배양하였다. 얻어진 각각의 추출물을 감압 여과한 후 감압농축기 (rotary vacuum evaporator N-N series, Evela, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 다음 농축액을 동결 건조한 분말을 실험에 사용하였다.

2. 세포주 및 세포 생육배지

본 실험에 사용된 세포주는 정상세포로 인간 신장세포인 HEK293 (human embryonic kidney cell, ATCC, Manassas, VA, USA)을 사용하였고 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) 배지에 10% Fetal bovine serum (FBS)를 첨가하여 incubator (37℃, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3. 세포독성 측정

매자나무 시료의 정상세포에 대한 독성을 알아보기 위해 인간 정상신장 세포인 HEK293을 사용하였으며 sulforhodamine B (SRB) assay (Kim *et al.*, 2007)방법을 이용하여 세포독성을 측정하였다.

SRB assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험대상 세포인 HEK293 (in 10% FBS media)의 농도를 $4 \sim 5 \times 10^4$ cell/ml로 96 well plate의 각 well에 100 μ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37℃, 5% CO₂)한 후 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 100 μ l 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 100 μ l를 가하여 4℃에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 μ l 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않는 잔여 염색액의 제거를 위해 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM tris buffer

100 μ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (THERMO max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4. 실험동물, 사육조건, 시료 및 시약

1) 실험동물

실험에 사용된 마우스는 오리엔트바이오 (Orient Bio Inc. Seongnam, Korean)사에서 암컷 ICR 마우스 (4주령, 22~24 g)를 구입하여 사용하였으며 마우스를 총 9개 군으로 나누어 한 군당 마우스를 20마리씩 배정하였다.

2) 사육조건

사육장은 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도와 $55 \pm 10\%$ 의 습도를 유지시켰으며, 환기횟수는 10~15 회/hr, 명암은 12시간을 주기로 조절하였다. 사료는 고형 사료로 자유급식을 하였으며, 물도 살균하여 자유급식을 하였다. 실험 마우스는 10일간 적응시킨 후 실험을 시작하였다.

3) 시료의 투여

양성대조군인 milk는 1 ml, 다른 양성대조군인 수면보조제 (doxylamine succinate)는 10 mg를 1 ml 증류수에 녹여 사용하였고 음성대조군인 caffein은 0.6 mg를 1 ml 증류수에 녹여 사용하였다. 매자나무 시료 [water extract (WE), fermentation extract by *Lactobacillus paracasei* (FE-L.P), fermentation extract by *Bifidobacterium longum* B6 (FE-B.L)]는 각각 75 mg를 1 ml 증류수에 녹여 사용하였다. 유산균 및 배지의 영향도 고려하기 위해 8 log CFU/ml 농도로 발효된 유산균 발효액 (L.P와 B.L)을 각각 1 ml 씩 사용하였다. 이상의 시료는 매일 일정한 시간에 경구투여 하였다.

4) 시약

혈청중의 serotonin과 melatonin의 측정을 위해 Serotonin ELISA kit과 Melatonin ELISA kit는 GENWAY (San Diego, USA)사로부터 구입하였고 양성대조군으로 사용된 doxylamine succinate는 Boram Pharm (Ansan, Korea)사로부터 구입하여 사용하였으며, 음성대조군인 caffein은 Samchun pure Chem. (Pyeongtaek, Korea)사로부터 구입하여 사용하였다.

5. 혈액의 채취

혈액의 채취는 2일 간격으로 실시하였으며 시료투여 2시간 후에 즉시 혈액을 채취하였다. 각 군의 마우스를 4마리씩 임의적으로 선택하여 모세관채혈 tube를 이용한 안와정맥총법 (retro-orbital sinus bleeding)으로 혈액을 채취한 후, 3000 rpm에서 15분간 원심분리를 하여 분리된 혈청만 EDTA가 들어있는 tube에 보관하여 사용하였다.

6. ELISA법을 이용한 serotonin 측정

1) Sample 준비

피펫으로 20 μ l의 혈청을 polystyrene tube에 넣은 후 100 μ l의 assay buffer를 넣고 vortex하였다. 25 μ l의 acylation reagent (3% acetic acid anhydride in acetone)를 넣은 후 즉시 vortex시킨 후, tube를 싸서 37°C 에서 15분 반응시켰다. 그리고 2 ml의 assay buffer를 더 넣은 후 vortex시킨 후 $1,500 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 단백질을 침전시키고 남은 용액을 사용하였다.

2) Serotonin 정량

피펫으로 50 μ l의 standard와 acylated control 및 acylated sample를 ELISA용 well plate에 각각 넣고, 50 μ l의 serotonin-biotin과 50 μ l의 serotonin antiserum (항혈청)을 넣고 plate를 조심스럽게 흔들어 준 후, plate를 접착 호일로 싸서 $2-8^\circ\text{C}$ 에서 16~20시간 반응시켰다. plate에 쓴 접착 호일을 제거하고 250 μ l wash buffer (phosphate buffer)로 3회 세척한 후 wash buffer액을 조심스럽게 제거하였다. 피펫으로 150 μ l의 enzyme conjugate를 가한 후 접착 호일을 싸서 incubator ($18-25^\circ\text{C}$, 500 rpm)에서 60분 배양하였다. 호일을 제거하고 상등액을 제거한 후 250 μ l wash buffer로 3회 세척하였다. 각각의 well에 200 μ l의 para-nitrophenylphosphate (PNPP) substrate solution을 넣고 incubator ($18-25^\circ\text{C}$, 500 rpm)에서 30분 반응한 후, 각각의 well에 50 μ l의 PNPP stop solution을 넣어 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Hong et al., 1999).

7. ELISA법을 이용한 melatonin 측정

1) Column 준비

Melatonin 추출을 위해 column에 methanol (undiluted) 1 ml를 넣어 1분간 $200 \times g$ 에서 원심분리를 2회 반복 실시하고, 여기에 2차 증류수를 column에 넣어 1분간 $200 \times g$ 에서 원심분리를 2회 반복 실시하였다.

2) Sample 준비

Column을 tube에 넣고 0.5 ml의 standard, control 및 sample를 각각의 column에 넣고 $200 \times g$ 로 1분간 원심분리를 실시하고, 10%의 1 ml의 methanol을 넣어 $500 \times g$ 에서 1분간 원심분리를 2회 반복 실시하여 column을 세척하였다. 새 polystyrene tube속에 column을 장착하고 column에 1 ml의 methanol (undiluted)을 넣어 1분간 $200 \times g$ 에서 원심분리하였다. Column을 제거하고 tube속에 포함된 methanol을 증발시킨 후 시료를 0.15 ml의 증류수에 녹여 이용하였다.

3) Melatonin 정량

피펫으로 50 μ l의 시료를 ELISA용 well plate에 standard, control 및 sample를 넣고 50 μ l melatonin-biotin과 50 μ l의 melatonin-antiserum (항혈청)을 가하고, 접착 호일로 싸서 밀봉하여 2~8°C에서 14~20시간 반응시켰다. 상등액을 제거하고 250 μ l의 assay buffer로 3회 세척한 후 잔액을 제거하였다. 피펫으로 secondary antibody인 enzyme 150 μ l과 결합시키고 호일로 다시 싸서 상온에서 120분간 반응시킨 후에 3회 반복 세척하였다. 각각의 well에 200 μ l의 PNPP 기질용액을 넣은 후, 상온 (18~24°C)의 orbital shaker상에서 30분간 반응시켰다. 3 M PNPP stop solution을 50 μ l 씩 넣어 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Hong *et al.*, 1999).

8. HPLC를 이용한 매자나무 추출물의 phenolic acids에 대한 정량분석

추출공정에 따른 매자나무 추출물의 phenolic acids에 대한 정량분석을 알아보기고 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC; High-performance Liquid Chromatography)를 이용하여 비교 분석하였다.

HPLC 기기는 UV absorbance detector (280 nm, 0.05 AUFS)가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, Waters M600E, Milford, MA)를 사용하였으며, 유리 phenolic acids를 분리하기 위하여 Waters Spherisorb ODS2 Column [250 mm $\times$ 4.6 mm (inside diameter), 5 μ m]를 사용하였다. 공정에 따른 매자나무 추출물들의 성분분석을 위해 시료를 HPLC 분석용 water에 녹여 0.2 μ m syringe filter로 여과하고 Injection volume 20 μ l로 측정하였다. 이동상은 용액 A [1 mM trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 10% (V/V) acetonitrile], 용액 B [1 mM TFA가 함유된 40% methanol과 40% acetonitrile]를 사용하였고 용액의 비율은 시간에 따라 (0 min 90% A와 10% B; 0~10 min 90% A와 10% B; 10~15 min 60% A와 40% B; 15~24 min 60% A와 40% B; 24~40 min 0% A와 100% B; 40~45 min 90% A와 10% B; 45~50 min 90% A와 10% B) 설정하였으며 유속은 1.0 ml/min로 흘려주었다. Phenolic acids의 표준물질인 vanillin, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, *trans-p*-coumaric acid, *trans*-cinnamic acid, *trans*-ferulic acid를 10, 50, 100 mg/ml로 희석하여 검량선을 구하였다 (He *et al.*, 2010).

9. Scanning electron microscope (SEM) 관찰

수율증진 및 활성증진 효과를 나타내는 매자나무 추출물의 특성을 알아보기고 매자나무 일반 추출물과 발효 추출물을 저진공 주사전자현미경 (Low Vacuum-Scanning Electron, $\times$ 1 K)으로 구조와 형태를 관찰하였다. 먼저 3% glutaraldehyde

용액으로 실온에서 3시간 동안 전고정한 후, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.87.2)로 15분씩 3회 세척하였다. 세척된 시료는 2% aqueous osmium tetroxide에 의해 4°C에서 26시간 후고정 (postfixation) 처리되어 다시 0.1 M sodium phosphate buffer로 15분씩 3회 세척되었다. 이어 30% acetone을 시작으로 10%씩 상승된 graded acetone series 탈수과정을 거치고, 탈수된 시료들은 isoamyl acetate에 34회 교체된 후 4°C에서 냉장 보관되었다. 이후 이들 시료는 Hitachi HCP-2 critical point dryer를 이용하여 liquid CO₂에 의한 임계점 건조과정 (critical point drying, CPD)을 거쳐 Hitachi E-1030 sputter 장치로 약 10 nm 두께의 금속피막 (Au gold coating)을 입힌 후 저진공 주사전자현미경으로 관찰하여 수집된 image data는 file에 저장된 후 출력되어 각각의 조직 형태를 관찰하고 비교하였다 (Kim and Lee, 2005).

10. 통계처리

모든 분석 수치는 mean $\pm$ SD으로 나타냈다. 모든 실험 결과는 통계 프로그램인 SPSS 16.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석 (ANOVA: analysis of variance)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중 검증법 (DMRT: Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 세포독성 측정

실험에 사용된 매자나무 시료들을 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml 농도로 조절하여 정상 신장세포인 HEK293에 대한 세포독성을 측정하였다. Fig. 1에서 보여 주는 바와 같이 모든 추출물에서 세포독성이 농도 의존적으로 상승하였으며, 특히 WE가 0.6 mg/ml 농도를 기점으로 세포독성이 급격히 증가한 것으로 나타내었다. 모든 농도에서 FE-L.P가 상대적으로 낮은 세포독성을 나타내었으며 WE는 0.6 mg/ml 농도 이상에서부터

Fig. 1. Cytotoxicity of *Berberis koreana* bark on human normal cell line, HEK293. (WE: water extract at 100°C, control. FE-L.P: fermentation extract by *Lactobacillus paracasei*. FE-B.L: fermentation extract by *Bifidobacterium longum* B6.). Each value represents the mean $\pm$ SD.

높은 세포독성을 나타내었다. 최고농도 1.0 mg/ml 에서 비교하였을 때 WE의 20.52% 상대적으로 높은 세포독성에 비해 FE-B.L와 FE-L.P는 각각 17.39%, 15.96%로 열수 추출물에 비해 약 3.1%~4.5% 독성저감 효과가 나타내었다. 이는 초고압 추출공정을 이용한 *Spirulina maxima*에 관한 연구 (Oh *et al.*, 2010)의 13.8%~18.6% 세포독성에 비해 높게 나타내었지만, 초고압 추출공정을 이용시 *Spirulina maxima*의 세포독성이 1.7%~4.8% 독성저감 효과에 비교하면 유사한 결과를 나타내었다. 또한 한국산 겨우살이 유산균 발효 추출물의 독성 및 면역증강 효과에 관한 연구에서 *in vivo* 독성을 조사한 결과 발효된 겨우살이의 독성효과가 가장 낮게 나타내었는데, 이는 발효로 인해 독성을 나타내는 렉틴 성분의 구조가 파괴, 변형되었기 때문으로 보고되어 있다 (Yoon *et al.*, 2009). 본 연구에서 유산균 발효를 통해 독성이 감소된 것은 발효과정에서 생성된 대사산물이 매자나무 독성성분의 구조를 변형 혹은 파괴시켜 독성성분을 대사시키고 분해하며 중화시키는 것으로 추측된다.

따라서 상기 유산균 발효를 통한 독성저감 효과를 이용하여 향후 매자나무를 이용한 기능성 식품 및 약품으로의 개발이 가능하며, 또한 발효공정을 이용한 천연물의 독성 감소방법은 새로운 천연물을 개발, 이용에도 큰 도움이 될 것이라고 사료된다.

2. Serotonin 정량

Monoamine계 신경전달물질인 serotonin (5-hydroxytryptamine : 5HT)은 식욕, 체온, 통증민감도 및 뇌하수체 호르몬 분비를 조절 (Kwon *et al.*, 2000)할 뿐만 아니라 우울, 공격성 등 감정조절에서도 관여하는 것으로 알려져 있으며 (Lee *et al.*, 1996), 또한 수면과도 관계가 있다고 보고되어 있다 (Choi *et*

al., 1988).

Fig. 2는 10일 동안 마우스에 시료를 투여시 2일 간격으로 혈액을 채취하여 혈청중의 serotonin 농도를 측정한 결과이다. 추출방법에 따른 매자나무 시료 (WE, FE-LP, FE-B.L)를 사용한 동시에 정상균인 물 (water), 유산균 발효액 (L.P와 B.L), 양성대조균인 우유 (milk)와 수면보조제 (doxylamine succinate) 또한 음성대조균인 카페인 (cafein)을 사용하여 비교하였다. 총체적으로 보면 시간이 지날수록 milk, doxylamine succinate, WE, FE-L.P 및 FE-B.L 투여군의 serotonin 함량이 증가하는 경향을 볼 수 있었으며, 특히 10일째에 각각 180.29 ng/ml, 237.36 ng/ml, 216.62 ng/ml, 265.35 ng/ml 및 272.35 ng/ml로 가장 높게 나타났다. 반대로 시간이 지남에 따라 caffein 투여군의 serotonin 함량이 감소되는 경향을 볼 수 있는데 8일째에 69.12 ng/ml로 가장 낮았다. 10일 동안 유산균 발효액을 투여한 L.P군과 B.L군의 serotonin 함량이 water 군에 비해 유의적 차이를 나타내지 않는 것으로부터 유산균 발효액이 신경전달 물질 분비에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다 ($P < 0.05$). Serotonin의 함량변화를 시료 투여군 별로부터 관찰할 때, milk군은 시간이 지남에 따라 함량이 증가하였으나 water군과 통계학적 유의성 차이가 없었고 doxylamine succinate군 및 WE 군은 각각 4일째, 8일째부터 그리고 FE-L.P군 및 FE-B.L군은 각각 2일째부터 water군과 유의성 있게 증가하였으며, caffein군은 8일째 되는 날부터 유의성 있게 감소되었다 ($P < 0.05$). 이는 매자나무 발효추출물이 doxylamine succinate와 미 발효된 추출물보다 serotonin 분비에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

10일 동안 마우스에 매자나무 추출물 및 기타 대조로 사용된 약물을 투여시 혈청중의 serotonin 평균함량을 관찰했을 때 water군, milk군, doxylamine succinate군, caffein군, L.P군 및

Fig. 2. Comparison of serotonin concentration in the serum of ICR mice by different oral administration treatment [water, milk, doxylamine succinate, caffein, lactobacillus fermentation solution (L.P and B.L) and the extracts of *Berberis koreana* bark (WE, FE-L.P and FE-B.L)]. Each value represents the mean $\pm$ SD. Means followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$).

B.L군은 각각 134.72 ng/ml, 167.58 ng/ml, 194.11 ng/ml, 100.08 ng/ml, 147.63 ng/ml 및 145.21 ng/ml이 나타내었다. 한편 매자나무 시료 투여 군에서 WE군은 183.01 ng/ml, FE-L.P군은 232.09 ng/ml, FE-B.L군은 223.78 ng/ml이 생성되었다. Doxylamine succinate, WE, FE-L.P 및 FE-B.L 투여군의 serotonin 함량이 water군에 비해서는 각각 44.08%, 35.84%, 72.28% 및 66.11% 통계적으로 유의하게 증가하였고 milk 투여군은 24.39% 증가하였으나 유의성 있는 증가는 아니었으며 caffein 투여군은 25.71% 유의하게 감소되었다 ($P < 0.05$). Lee 등이 연구한 감초 (甘草), 정향 (丁香), 지모 (知母) 및 황백 (黃柏) 등 추출물을 마우스에 투여시 혈청중의 serotonin 함량을 측정한 결과 정상군에 비해 각각 52.75%, 47.76%, 31.37% 및 41.76% 증가하였다고 보고되어 있다 (Lee *et al.*, 2000). 이에 비해 본 실험결과에서는 마우스에 매자나무 발효추출물을 투여시 혈중 serotonin 농도가 66% 이상 증가한 것으로 매자나무 발효 추출물이 serotonin의 분비에 더 좋은 효과를 갖고 있음을 보여주는 결과라고 사료된다. 또한 FE-L.P군 및 FE-B.L군의 함량이 WE군에 비해 20% 이상 유의적으로 증가한 것으로부터 발효법을 통한 매자나무 시료가 기존의 추출법을 이용한 시료보다 serotonin 분비에 더 좋은 효과를 갖고 있음을 확인할 수 있는데, 이는 발효과정을 통해 유용활성물질의 용출이 증가하거나 혹은 발효된 매자나무의 유용성분이 유기체에서 더 잘 흡수되어 serotonin의 분비량이 증가된 것으로 사료된다.

3. Melatonin 정량

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine)은 포유동물의 뇌의 송과선에서 분비되는 호르몬으로 수면, 생체 리듬의 조절, 항산화, 항암, 면역작용에 관여되며, 또한 난소 기능과 번식에도 영향을 미친다고 한다 (Kang and Baick, 2008; Na *et al.*, 2008).

Table 1은 ICR 마우스를 이용하여 10일 동안 2일 간격으로 혈액을 채취하여 혈청중의 melatonin 함량을 측정한 결과이다. 전체적으로 보면 시간이 지날수록 milk, doxylamines succinate, WE, FE-L.P 및 FE-B.L 투여군의 melatonin 함량이 증가하는 경향을 볼 수 있었고 10일째에 각각 159.46 pg/ml, 226.21 pg/ml, 124.01 pg/ml, 195.94 pg/ml, 187.33 pg/ml로 가장 높게 나타났다. 반대로 시간이 지남에 따라 caffein 투여군의 melatonin 함량이 감소되는 경향을 볼 수 있었는데 10일째에 38.58 pg/ml로 가장 낮았다. 정상군인 water군과 유산균 발효액 투여군 (L.P군 및 B.L군)이 10일 동안에 함량변화가 크지 않았다. Melatonin의 함량변화를 시료 투여군 별로 관찰했을 때 2일째, 4일째, 6일째에 milk, doxylamine succinate, FE-L.P 및 FE-B.L를 투여한 4군만이 각각 정상인 water군과 유의성 차이를 나타내었고 8일째부터 L.P군과 B.L군을 제외한 모든 군이 water군과 유의성 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$). 이는 melatonin의 분비량은 시료의 영향을 받을 뿐만 아니라 시료 투여시간의 영향도 받고 있다는 것을 설명할 수 있다.

10일 동안 마우스에 매자나무 추출물 및 기타 대조로 사용된 약물을 투여시 혈청중의 melatonin의 평균함량을 관찰했을 때 양성대조군인 milk군과 doxylamine succinate군은 water군 (76.92 pg/ml)에 비해 각각 0.7배와 1.4배 유의적으로 증가하는 한편, 음성대조군인 caffein군은 약 0.3배 유의적으로 감소되었다 ($P < 0.05$). 매자나무 시료 사이에서 비교했을 때 함량이 FE-L.P군 (157.56 pg/ml) > FE-B.L군 (141.81 pg/ml) > WE군 (106.66 pg/ml)의 순으로 나타내었으며, 이들이 water군에 비해 약 38% 이상 함량이 증가되었다. 이는 Hong 등이 연구한 melatonin 함량이 가장 높게 나타난 산조감맥탕군 (20.4%)의 증가율 보다 높은 것으로 매자나무 시료가 melatonin 분비과정에 보다 높은 작용을 발휘하고 있음을 확인할 수 있다 (Hong *et al.*, 1999). FE-L.P군의 melatonin 함량이 157.56

Table 1. Melatonin concentration in the serum of ICR mice by different oral administration treatment [water, milk, doxylamine succinate, caffein, lactobacillus fermentation solution (L.P and B.L) and the extracts of *Berberis koreana* bark (WE, FE-L.P and FE-B.L)].

Samples	Melatonin concentration (pg/ml)				
	2 day	4 day	6 day	8 day	10 day
Water	75.67±8.33 ^{de†}	78.44±5.59 ^{de}	74.32±4.79 ^{de}	77.04±4.85 ^d	79.14±3.33 ^{e*}
Milk	105.50±7.95 ^{ab}	127.39±14.57 ^{bc}	125.13±7.22 ^{bc}	135.66±23.53 ^b	159.46±16.60 ^c
Doxylamine succinate	122.90±15.66 ^a	168.29±28.39 ^a	205.06±18.36 ^a	201.29±12.08 ^a	226.21±21.07 ^a
Caffein	73.66±6.15 ^e	47.86±4.39 ^e	52.83±4.24 ^e	41.09±3.75 ^f	38.58±3.61 ^f
L.P	80.66±5.36 ^{cde}	86.62±9.80 ^d	94.76±15.73 ^{cd}	99.36±11.91 ^{cd}	95.35±12.56 ^{de}
B.L	86.93±10.49 ^{bcde}	82.57±9.67 ^{de}	85.65±9.16 ^{de}	91.36±9.44 ^{cd}	93.66±12.98 ^{de}
WE	99.07±9.82 ^{ad}	93.03±19.83 ^{cd}	101.77±15.61 ^{cd}	115.41±21.47 ^{bc}	124.01±19.66 ^d
FE-L.P	117.50±18.09 ^a	162.35±19.47 ^{ab}	122.89±24.11 ^{bc}	189.14±18.26 ^a	195.94±21.33 ^{ab}
FE-B.L	104.55±7.82 ^{ac}	110.34±11.07 ^{cd}	162.35±28.96 ^b	144.46±21.43 ^b	187.33±16.67 ^{bc}

*Mean±SD with different capital superscripts in the same column are significantly different at $P < 0.05$.

Fig. 3. Typical HPLC chromatogram of phenolic acid standards (A: *p*-hydroxybenzoic acid. B: vanillic acid. C: *p*-hydroxybenzaldehyde. D: vanillin. E: *trans*-*p*-coumaric acid. F: *trans*-ferulic acid. G: *trans*-cinnamic acid.).

Table 2. Comparison of phenolic acids in the extracts of *Berberis koreana* bark according to different extraction processes. (mg/100 g)

Sample	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	vanillic acid	<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	vanillin	<i>trans</i> - <i>p</i> -coumaric acid	<i>trans</i> -ferulic acid
FE-L.P [†]	25.60	50.65	1.28	23.22	27.18	32.00
FE-B.L [‡]	17.72	57.70	—	14.60	18.20	39.73

[†]FE-LP: fermentation extract by *Lactobacillus paracasei*.

[‡]FE-B.L: fermentation extract by *Bifidobacterium longum* B6.

pg/ml로 매자나무 추출물 중에서 가장 높았지만 양성대조군인 doxylamine succinate군의 184.75 pg/ml까지 도달하지 못했다. 그러나 FE-L.P군과 doxylamine succinate군 사이에 통계적인 유의성 차이가 나타나지 않는 것으로부터 이들이 melatonin의 분비조절과정에서 비슷한 효능을 갖고 있다는 것으로 사료된다 ($P < 0.05$).

이상의 결과로부터 매자나무 및 이의 발효추출물이 신경전달물질인 serotonin과 melatonin 분비에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었고 특히 발효기술을 이용한 매자나무 시료의 효과가 더 좋은 것을 알 수 있었으며, 또한 신경전달물질의 분비량이 시료의 투여시간에 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 향후 매자나무를 항우울 및 수면보조제 소재로 사용하려면 신경전달물질의 분비에 영향을 주는 매자나무 추출물속의 유효 활성성분에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

4. HPLC를 이용한 매자나무 발효추출물의 phenolic acids에 대한 분석

추출방법에 따른 매자나무 수피의 phenolic acids에 대해 정량분석하기 위하여 *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin, *trans*-*p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid, *trans*-cinnamic acid 등 7가지 표준물질을 사용하였고 HPLC를 이용하여 측정된 결과 각각 9.95분, 11.34분,

13.52분, 16.65분, 20.02분, 21.00분, 30.63분에 검출되었다 (Fig. 3).

Table 2는 매자나무 발효 추출물의 phenolic acids를 정량하여 비교한 결과이다. 전체적으로 보면 발효된 매자나무 추출물의 phenolic acids 중에서 vanillic acid 함량이 가장 높게 나타난 반면 *trans*-cinnamic acid는 검출되지 못했다. *p*-hydroxybenzoic acid, vanillin, *trans*-*p*-coumaric acid 경우 FE-L.P가 각각 25.60 mg/100 g, 23.22 mg/100 g, 27.18 mg/100 g로 FE-B.L에 비해 각각 44.5%, 59.0%, 49.3% 함량이 증가하였다. 반면 Vanillic acid와 *trans*-ferulic acid 경우에는 FE-B.L의 함량이 각각 57.70 mg/100 g, 39.73 mg/100 g로 FE-L.P에 비해 각각 13.9%, 24.2% 증가되었다. *p*-hydroxybenzaldehyde 경우 오직 FE-L.P에서만 검출되었고 FE-B.L에서는 검출되지 못했다. 상기 결과로부터 매자나무 유산균 발효추출물의 phenolic acids의 함량변화가 활성증진 및 독성저감 원인으로 추정할 수 있는데 향후 매자나무속의 phenolic acids에 대한 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

5. Scanning electron microscope (SEM) 관찰

추출방법에 따른 매자나무 수피의 조직형태 변화를 관찰하기 위하여 저진공 주사현미경을 이용하여 관찰하였다 (Fig. 4). A는 일반 열수추출물 형태로서 조직이 아직 크게 남아 있는

Fig. 4. Morphology observation of *Berberis koreana* bark by SEM (A: water extract at 100°C, control. B: fermentation extract by *Lactobacillus paracasei*. C: fermentation extract by *Bifidobacterium longum* B6.).

반면 발효 추출물인 B와 C의 표면 조직이 파괴되어 작은 절편으로 조각나 있었으며 다공성 조직이 형성되어 있음을 확인할 수 있다. 이는 발효과정에서 생성된 유산 및 유기산으로 매자나무 조직을 느슨하게 함으로써 조직이 파괴되어 절편이 쉽게 형성되거나 혹은 발효과정에서 생성된 가스가 국부 조직을 파괴하여 다공조직이 형성된 것으로 사료된다. SEM 사진을 통해 유산균 발효가 매자나무 내부까지 영향을 주어 세포벽이 깨지면서 조직 및 구조가 변형, 파괴된 것을 확인할 수 있는데, 이는 매자나무의 생리활성이 증가한 원인중의 하나로 사료된다. 또한 유산균 및 대사산물이 독성감소 및 활성증진의 원인일 가능성도 높아 향후 유산균과 이의 대사산물에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 결과물은 2011년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구 (지역거점연구단육성사업/의료·바이오신소재융복합연구사업단)로 이에 감사를 드립니다.

LITERATURE CITED

Chung ES. (1996). An analysis of the relationship between

- depression and menopausal syndroms in women at midlife. *Korean Journal of Women Health Nursing*. 3:230-240.
- Cho SH and Kim CI.** (1974). Effects of *Berberis koreana* palibin on sleep duration and rectal temperature in mouse. *Korean Journal of Pharmacology*. 10:61-65.
- Choi BS, Jeoung HY and Han SH.** (1988). Low platelet serotonin level in Insomnia. *Journal of the Korean Neuropsychiatry Association*. 27:487-495.
- Hong SC, Han JH, Lee SP and Bang SK.** (1998). The effect of tricyclic antidepressant (Dothiepin) on sleep in depressed patients. *Journal of the Korean Neuropsychiatry Association*. 37:728-736.
- Hong YY, Moon IS, Kom DI and Lee TK.** (1999). A study on melatonin, serotonin secretion change and behavior in the rats treated with Yiseontang, Gammakdaejotang, Sanjointang and Sanjogammaktang. *The Journal of Oriental Gynecology*. 12:209-230.
- He X, Kim SS, Park SJ, Seong DH, Yoon WB, Lee HY, Park DS and Ahn J.** (2010). Combined effects of probiotic fermentation and high-pressure extraction on the antioxidant, antimicrobial, and antimutagenic activities of Deodeok (*Codonopsis lanceolata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:1719-1725.
- Jin L, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Kwon MC, Ahn J, 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.

- Jin L, Ha JH, Jeong MH, Chung EK, Chung AR, Kim JC, Ahn JH and Lee HY.** (2009). Enhancement of the antioxidant and anticancer activities of *Berberis koreana* bark by using a low temperature and high-pressure extraction process. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 41:284-291.
- Kang SH and Baick SC.** (2008). The effects of milking time and dairy processes on melatonin contents in milk. *Journal of the Korean of Dairy Science and Technology*. 26:1-4.
- Kim IJ and Lee DW.** (2004). Experimental study on the antidepressant effect of Ginseng Radix Alba and Cyperi Rhizoma. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 15:101-119.
- Kim HT, Kim JW, Lim MK, Jin TW, Yeo SG, Jang KH, Oh TH and Lee KW.** (2007). Cytotoxic effect of *Artemisia capillaris* extracts on the cancer cells on *in vitro*. *Journal of Veterinary Clinics*. 24:367-371.
- Kim IS and Lee SH.** (2005). Trichome type and development in leaves of *Althaea rosea*. *Korean Journal of Electron Microscopy*. 35:97-104.
- Kim JH, Shin KS and Lee H.** (2002). Characterization and action mode of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 34:290-295.
- Kim L, Kim S and Kwon B.** (2000). A clinical study on the postpartum depression. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 11:123-130.
- Kim YS.** (1986). The central action of Maja (*Berberis koreana* Palibin) and its constituents. *The Journal of Soonchunhyang University*. 9:323-334.
- Kwon YH, Lee YW and Kim H.** (2000). A study on the serotonin metabolism and the morphine-related analgesic mechanism in mice fed tryptophan supplemented diet. *The Journal of Applied Pharmacology*. 8:311-317.
- Lee DK, Gwak DG and Park SD.** (2003). Antidepressant effect of *Licium chinense* Mill. and its influence on indoleamine and its metabolite of depression model rats. *The Koreana Journal of Oriental Medical Prescription*. 11:185-196.
- Lee HC, Lee DK, Kim DI and Lee TK.** (2000). Effects of *Glycyrrhiza uralensis* FISCH., *Eugenia caryo-phyllata* Thunb., *Anemarrhena sphodeloides* BGE., and *Phellodendron chinense* SCHNEID. on serotonin, melatonin concentration and activity of rats. *The Journal of Oriental Gynecology*. 13:136-148.
- Lee JM, Kim KS and Lee WJ.** (1996). Effects of brain serotonin on kidney function and hormone release in water-deprived rats. *Kyungpook Univrsity of Medicine Journal*. 37:99-109.
- Na KA, Kim ES, Eum JH, Kim JH, Yoon SI and Lee DR.** (2008). Effect of melatonin on the maturation of mouse germinal vesicle (GV)-stage oocytes and apoptosis of cumulus cells *in vitro*. *Development and Reproduction*. 12:125-132.
- Oh SH, Kang H, 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 S, Kim DH, Paek NS and Kim SS.** (2006). Preparation and quality characteristics of the fermentation product of ginseng by lactic acid bacteris (FGL). *Journal of Ginseng Research*. 30:88-94.
- Park SJ, Hwang UW, Kim JW, Kim HT, Chi SE and Kim WR.** (2004). The effects of bambusae caulis and St. John's Wort in the chronic mild stress model of depression in rats. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 15:53-70.
- Qadir SA, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Chung HS, Ahn J and Lee HY.** (2009). Effect of different extraction protocols on anticancer and antioxidant activities of *Berberis koreana* bark extracts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107:331-338.
- Song JY and Li GZ.** (2002). Why the depression is prevalent in women? *Kyung Hee of Medicine*. 18:170-181.
- Yoon TJ, Yang WS, Park SM, Jung HY, Lee AN, Jung JH, Kang TB, Yoo YC and Kim JB.** (2009). *In vivo* toxicity and immunoadjuvant activity of korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract fermented with *Lactobacillus*. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 41:560-565.