

## 유산균을 이용한 발효삼정환의 미생물 특성 및 세포 보호 효과

장세주 · 왕경화 · 신나래 · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

### Microbiological Characteristics and Cytoprotective Effects of Samjung-Hwan Fermented by Lactic Acid Bacteria

Seju Chang, Jing-Hua Wang, Na Rae Shin, Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

Received: May 9, 2016

Revised: May 28, 2016

Accepted: June 1, 2016

**Correspondence to:** Hojun Kim  
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University Medical Center, 27 Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10326, Korea  
Tel: +82-31-961-9111  
Fax: +82-31-961-9009  
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2016 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

**Objectives:** To confirm microbiological change and cytoprotective effect of Samjung-hwan (SJH) which fermented by Lactic acid bacteria from natural fermented SJH.

**Methods:** SJH was fermented by *Lactobacillus brevis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from natural fermented SJH. After 1 week of fermentation, we analysed pH and microbial profiling. We also performed measuring total polyphenol total flavonoid contents and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity to investigate antioxidant ability. Cell viability was performed by using HepG2 cell.

**Results:** pH of lactic acid bacteria inoculated group and non-inoculated group was decreased and total counts of lactic acid bacteria for both group was increased after fermentation of SJH. Total polyphenol and flavonoid contents and DPPH free radical scavenging activity was increased in both group. Total polyphenol contents of lactic acid bacteria inoculated group is more increased than non-inoculated group. HepG2 cell viability was increased in both group.

**Conclusions:** SJH fermented by *Lactobacillus brevis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* shows change in microbiological character and has cytoprotective effect. Further studies are required for investigating function of lactic acid bacteria during fermentation of SJH.

**Key Words:** Samjung-hwan, Fermentation, Lactobacillus, Cytoprotection, Antioxidants

## 서론

삼정환(Samjung-hwan)은 동의보감에 기록된 처방 중 하나이며 그 효능에 대해서 “오랜 복용하면 몸이 가벼워지고 수명이 연장되며 얼굴이 동자와 같이 된다”라고 기록되어 있다. 이러한 동의보감의 내용을 바탕으로 현재 삼정환의 항산화 및 항지질, 항비만 효과에 대한 선행 연구들이 진행되었다<sup>1,2)</sup>. 또한 삼정환을 구성하는 약재인 상삼자(*Morus alba* Linne), 창출(*Atractylodes japonica*), 지골피(*Cortex lycii radices*)에 대한 개별적인 연구에서도 여러 효능이 있는 것으로 나타났으며 상삼자<sup>3)</sup>는 항산화, 항지질, 항고지혈증 효과를 갖고 있으며 창출<sup>4)</sup>은 혈압강하효과, 콜레스테롤

저하효과, 그리고 지골피<sup>5)</sup>는 혈압강하 및 혈당 강하효과가 있는 것으로 알려져 있다.

삼정환의 제조법은 동의보감에서 “지골피 및 창출은 각각 1근씩 가루를 내고, 상삼자 20근은 즙을 내어 고루 섞은 뒤 옹기에 밀봉상태로 숙성시킨 후 환을 제조한다”라고 기록되어 있으며 숙성을 통한 발효가 이루어졌을 것이라 유추해볼 수 있다. 삼정환은 대표적인 발효한약 중에 하나이며 삼정환의 발효에 대한 많은 선행연구들이 진행되었다. 삼정환의 여러 선행연구들 중 발효삼정환의 항비만 효과에 대한 연구<sup>6)</sup> 또한 진행되었으며 삼정환 외에 다른 여러 한약재들의 발효 연구에서도 기존 무처리 단독투약군에 비해 개선된 효과 및 다른 결과가 관찰된 연구 결과들이 있었다. 백출의

발효를 통해 지방세포 억제 및 비만과 관련된 장내 미생물 비율변화를 살펴본 연구<sup>7)</sup>와 발효처리한 금은화에서 소화관 점막 보호효과가 나타난 연구<sup>8)</sup>들이 이루어졌다. 이외에도 발효한약이 장내미생물의 균형을 유지시켜 주어 비만, 당뇨 병과 같은 대사증후군 치료에 도움이 된다는 연구<sup>9)</sup>들도 있었다.

발효한약은 한약을 사용하기 위해 가공하는 포제법 중 하나로 미생물이 가지고 있는 효소를 이용해 한약에 포함된 유기물을 분해시켜 유효한 산물을 얻어 한약의 효능을 증가시키는 방법<sup>10)</sup>이다. 이러한 발효를 통하여 한약내의 약효성분의 체내흡수율과 생체이용률을 모두 극대화시켜 약리적 기능성뿐만 아니라 새로운 한약제형의 개량 및 포제방법으로 개발될 수 있는 가능성을 가지고 있다.

인간의 장내미생물 중 인체에 유익하게 사용되는 probiotic으로 작용하는 유산균은 장운동조절, 병원성세균의 억제, 소화흡수의 촉진, 변비 및 설사 방지의 건강개선효과와 발효유제품, 자연발효식품 등에서 다양하게 사용되고 있다<sup>11)</sup>. 이러한 유산균은 발효한약의 발효기전에도 중요한 영향을 미칠 것이라 생각되나 이에 대한 연구들이나 기전에 대한 이해는 미비한 상태이다.

전통적인 숙성방식으로 제조한 천연 발효삼정환의 미생물 변화를 살펴본 연구를 통해 발효에 관여하는 대표적인 유산균은 *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*임을 밝혀냈다<sup>12)</sup>. 이에 본 연구에서는 상기 2종의 유산균을 숙성 전 삼정환에 재접종하여 발효되는 동안 나타나는 미생물의 변화와 발효 특성 및 항산화 활성에 미치는 영향 등을 살펴봄으로써 삼정환 발효의 표준화와 나아가 발효한약의 표준 정량화에 기여하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험재료

삼정환의 구성재료인 상심자, 지골피, 창출은 동국대학교 일산한방병원에서 구입하였으며 상심자는 분쇄하여 즙으로 제조하였고 지골피, 창출은 분쇄하여 건조시료를 사용하였다. 상심자, 지골피, 창출을 각각 20:1:1 중량 비율로 혼합하여 용기에 담아 통풍이 잘 되고 25°C가 유지되는 서늘한 곳에서 5주간 발효시켰다.

### 2. 천연 발효삼정환에서 유산균 분리

5주간의 발효가 진행된 삼정환에서 시료를 채취하여 실험을 진행하였다. 세균 수를 분석하기 위해 시료는 각각 2 g 씩 18 ml 0.85% NaCl로 혼합 후 균질화한 다음, 균질액 1 ml를 18 ml 0.85% NaCl로 희석하였다. 희석된 시료는 선발 배지에 100 µl씩 분주하여 도말 후 배양하였다. 전체 유산균 수를 배양하기 위해 MRS agar (Difco, Franklin, NJ, USA) 배지를 사용하였고, *Lactobacillus* 속의 유산균을 배양하기 위해 LBS agar (MB Cell, Los Angeles, CA, USA)를 사용하였으며 *Lactococcus* 속의 유산균을 배양하기 위해서는 M17 agar (Difco)를 사용하였다. 배양은 30°C에서 48시간 배양하였고 이후 MRS agar와 M17 agar plate에서 자란 콜로니 중 무작위로 10개씩 선발하여 순수배양하였다. Genomic DNA를 추출하였고 DNA의 염기서열 분석은 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, 분석된 염기서열은 미국 국립생명정보센터(National Center for Biotechnology Information)에서 BLAST 분석하여 동정하였다.

### 3. 유산균 접종 후 삼정환의 재발효

상심자, 지골피, 창출을 각각 20:1:1 중량 비율로 혼합하여 삼정환을 조제한 후 유산균을 접종하였다. 유산균은 천연 발효삼정환에서 분리한 *Lactobacillus brevis* (NC 008497.1) 1종과 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NC 002662.1) 1종을 각각 한 종씩 선택하여 MRS broth에서 37°C, 24시간 동안 활성시킨 후 접종하였다. 유산균을 접종한 삼정환은 전통 숙성 과정 환경과 유사한 25°C를 유지하며 선행연구<sup>13)</sup>에서 급격한 미생물의 변화가 일어난 시점인 1주일간의 발효 후 시료로 사용하였다.

### 4. 재발효한 삼정환에서 미생물 생균 수 분석

세균 수를 분석하기 위해 시료는 각각 2 g 씩 18 ml 0.85% NaCl로 혼합 후 균질화한 다음, 균질액 1 ml를 18 ml 0.85% NaCl로 희석하였다. 희석된 시료는 선발 배지에 100 µl씩 분주하여 도말 후 배양하였다. 발효삼정환 내 총 유산균 수를 분석하기 위해 MRS agar (Difco) 배지를 사용하였으며 *Lactobacillus* 속의 세균 수를 분석하기 위해 LBS agar (MB Cell)를 사용하였고 *Lactococcus* 속의 세균 수를

분석하기 위해서는 M17 agar (Difco)를 사용하였다. 배양은 30°C에서 48시간 배양하였고 생균 수는 생성 콜로니 개수(colony forming units per gram, CFU/g)로 나타냈다.

## 5. pH 측정

발효과정 중 pH 변화를 측정하기 위하여 1 g의 시료를 9 ml의 0.85% NaCl로 희석한 후 pH를 측정하였다.

## 6. 시료 추출

시료 5 g에 0.1% HCl이 포함된 물을 20 ml 첨가한 후 1 시간 동안 shaker에서 흔들어주면서 추출하였다. 1시간 후 7,000 rpm, 20분 동안 원심분리를 시행하였다. 상등액을 filter paper로 한 번 여과한 후 시료로 사용하였다.

## 7. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 이용하여 측정하였다. 재발효한 삼정환 시료를 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 실험에 사용하였다. 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 ml에 시료 50 µl, 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 50 µl를 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시키고 720 nm에서 UV ELISA microplate reader를 이용해 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma-Aldrich)를 표준물질로 사용하였고 표준곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 환산하여 표시하였다.

총 플라보노이드 함량은 시료 500 µl에 5% NaNO<sub>2</sub> 300 µl를 혼합하여 5분간 반응시킨 후 10% AlCl<sub>3</sub> 300 µl를 혼합하여 5분간 반응시킨 다음 1 M NaOH 2 ml로 반응을 정지시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Chatechin (Sigma-Aldrich)을 표준물질로 사용하였고 표준곡선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 환산하여 표시하였다.

## 8. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical 소거능

삼정환 발효 중 free radical 소거활성의 변화를 확인하기 위해 free radical인 DPPH (Sigma-Aldrich)에 대한 환원력을 측정하였다. DPPH는 ethanol에 용해시켜 0.2 mM로 제조하였고 시료 50 µl를 0.2 mM DPPH 1 ml과 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Free radical

억제율(%)은 하기 공식을 통해 구하였다.

$$\text{억제율} = (\text{대조군 optical density [O.D]} - \text{시료 O.D}) / \text{대조군 O.D} \times 100$$

## 9. 세포 배양

인간 간암 세포주인 HepG2 세포(HB8065)는 한국세포주은행(Korea)으로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. HepG2 cell lined은 10% fetal bovin serum (Hyclone; GE Healthcare, Chicago, IL, USA)과 100 units/ml penicillin and streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium을 이용하여 배양하였다. 이후 배양된 HepG2 세포를 96 well plate에 최종농도가 3×10<sup>5</sup> cells/ml가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 삼정환 추출물의 농도별로 전처리하여 1 시간 동안 배양하였으며 1시간 후 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 다음 24시간 배양하였다. 이후 EZ-Cytox 시약을 이용하여 cell viability를 측정하였다.

## 10. 세포 생존율

세포 생존율의 측정은 Ez-Cytox cell viability assay kit (DAEIL Lab, Seoul, Korea)를 사용하였다. 약제를 처리한 후 분화된 HepG2 세포에 EZ-Cytox 시약을 첨가하여 2 시간 동안 반응시킨 후 UV ELISA microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 대조군에 대한 상대적인 값을 구하기 위해 하기 공식을 사용하였다.

$$\text{세포생존율} = (\text{시료 optical density [O.D]} / \text{대조군 O.D}) \times 100$$

## 11. 통계처리

측정값은 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 표시하였다. 각 실험군 간의 통계적인 분석은 Student's t-test를 통해 시행하였다. 모든 실험은 1회 시행하였으며 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능, 세포 생존율 분석은 3개의 well을 사용해 측정된 평균값을 사용하였다. 통계적 유의성은 P값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 재발효한 삼정환에서의 미생물 생균 수 차이

유산균을 접종한 삼정환을 발효 후 유산균, *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp.의 생균 수를 조사하였다. 발효 전 총균 수는 7.31 log CFU/g이었으며 1주일간의 발효 후 무접종군의 총 유산균 수는 9.05 log CFU/g, 접종군의 총 유산균 수는 8.55 log CFU/g으로 두 군 모두에서 증가하였다. *Lactobacillus* 속의 생균수는 발효전 7.02 log CFU/g이었으며 1주일간의 발효 후 무접종군에서는 9.02 log CFU/g,

접종군에서는 8.48 log CFU/g으로 두 군 모두에서 증가하였다. *Lactococcus* 속 생균 수는 발효 전 7.10 log CFU/g으로 측정되었으나 발효 후 무접종군, 접종군 모두에서 발견되지 않았다(Fig. 1).

### 2. pH 차이

유산균 생균 수와 더불어 발효 정도 차이를 비교하기 위해 pH도 함께 비교하였다. 발효 전 삼정환에서 pH는 4.81이 측정되었으며 발효 후 무접종군에서는 4.12, 접종군에서는 3.66으로 접종군에서의 pH가 더 낮게 측정되었다(Fig. 2).

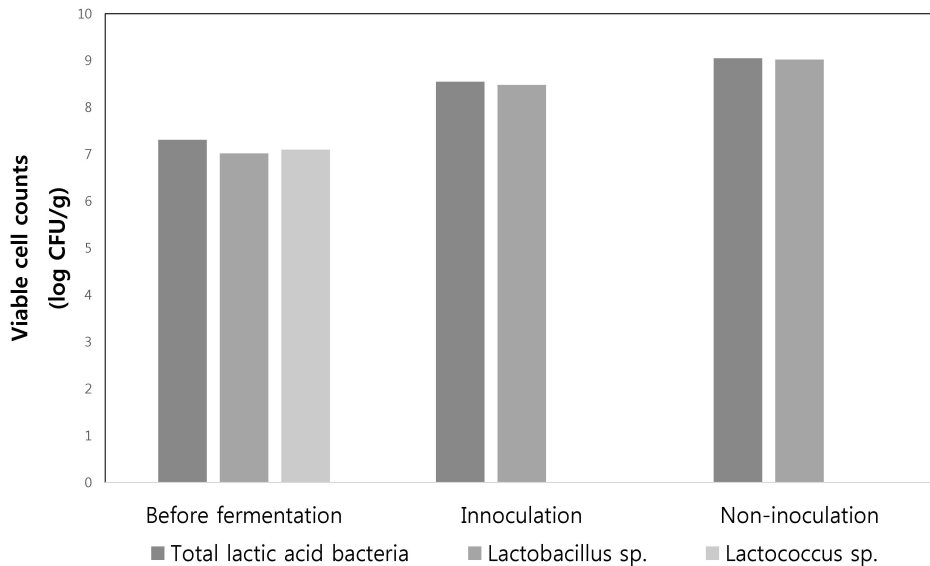


Fig. 1. Counts of lactic acid bacteria of Samjung-hwan during fermentation. CFU: colony formin units.

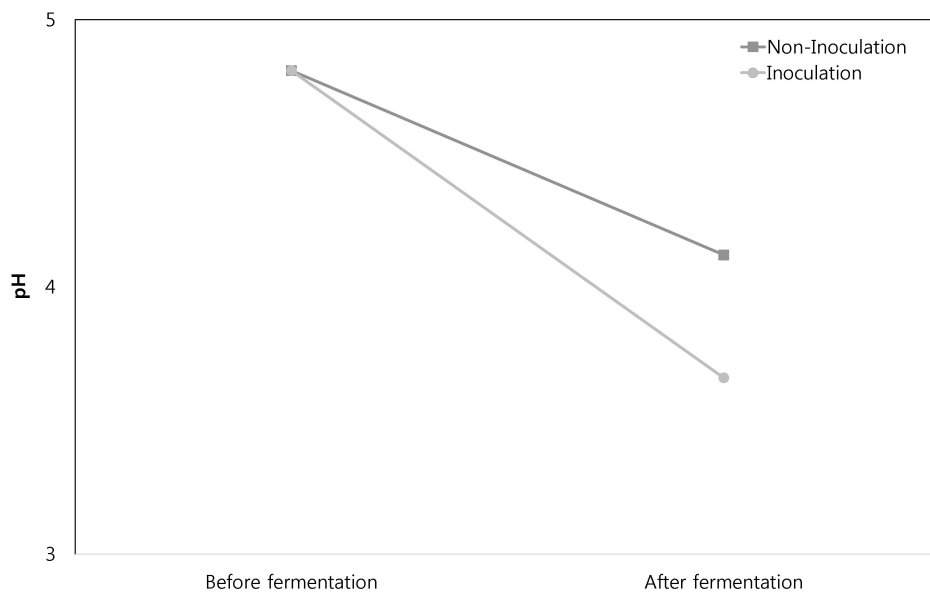


Fig. 2. pH of Samjung-hwan during fermentation.

### 3. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

발효 후 무접종군과 접종군 간의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량의 차이를 비교하였다. 발효 전 삼정환의 총 폴리페놀 함량은 1.219 mg/g이었으며 발효 후 접종군에서는 1.798 mg/g, 무접종군에서는 1.639 mg/g으로 두 군 모두 유의성 있는 증가를 보였다(P=0.0001, P=0.002) (Fig. 3). 발효 후 두 군 간의 총 폴리페놀 함량을 비교하였을 때 접종군에서 무접종군에 비해 유의성 있게 증가되어 있는 것으로 나타났다(P=0.046). 발효 전 삼정환의 총 플라보노이드 함량은 0.706 mg/g이었으며 발효 후 접종군에서는 1.240 mg/g, 무접종군에서는 1.203 mg/g으로 두 군 모두 유의성 있는 증가를 보였다(P=0.00009, P=0.0001) (Fig. 4). 발효 후 두 군 간의 총 플라보노이드 함량에는 유의한 차이가 보이지는 않았다.

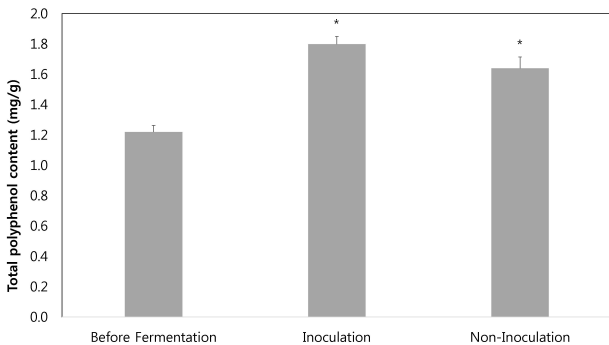


Fig. 3. Total polyphenol content (mg/g) in Samjung-hwan before fermentation and after fermentation. Data shown in mean±standard deviation (\*P<0.05).

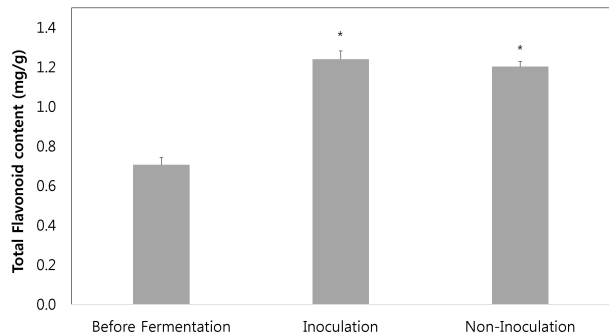


Fig. 4. Total flavonoid content (mg/g). Data shown in mean±standard deviation (\*P<0.05).

### 4. Free radical 소거 활성

발효 전 삼정환의 DPPH free radical 소거능은 33.96%에서 발효 후 접종군은 59.15%, 무접종군에서는 59.21%로 측정되었고 두 군 다 모두 유의성 있는 증가를 보였다(P=0.0001, P=0.0001) 무접종군이 접종군에 비해 소거능 활성이 소폭 증가되었다고 측정되었으나 유의적 차이는 보이지 않았다(Fig. 5).

### 5. 세포 생존율 비교

HepG2 세포에 삼정환 추출물을 처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 세포독성을 일으켜 접종군 및 무접종군 간의 농도별 세포생존율을 비교하였다. 발효 전 삼정환 단독투여군, 유산균 접종군, 유산균 미접종군 모두에서 무처리 대조군에 비해 세포생존율이 상승하는 경향을 보였다. 발효 전 삼정환군에서는 1 mg/ml 처리군에서 62.7%로 세포생존율이 가장 높게 측정되었으나 유의성이 보이지는 않았으며 4 mg/ml 처리군에서 60.4%로 측정되어 유의성 있는 결과를 보였다(P=0.005). 유산균 접종군에서는 4 mg/ml 처리군에서 62.9%로 세포생존율이 가장 높게 측정되었으며 유의성 있는 증가를 보였다(P=0.013). 유산균 미접종군에서는 모든 농도에서 유의성이 보이지 않았으며 4 mg/ml 처리군에서 세포생존율이 60.7%로 가장 높은 측정값이 측정되었다 (Fig. 6).

## 고찰

발효 한약은 한약재에 유익한 균종을 접종하여 발효시키

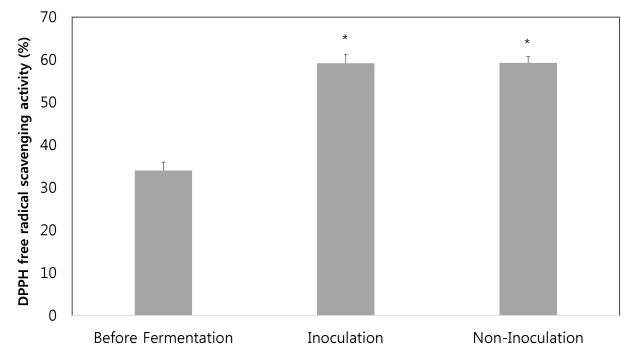


Fig. 5. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity (%) in Samjung-hwan before fermentation and after fermentation. Data shown in mean±standard deviation (\*P<0.05).

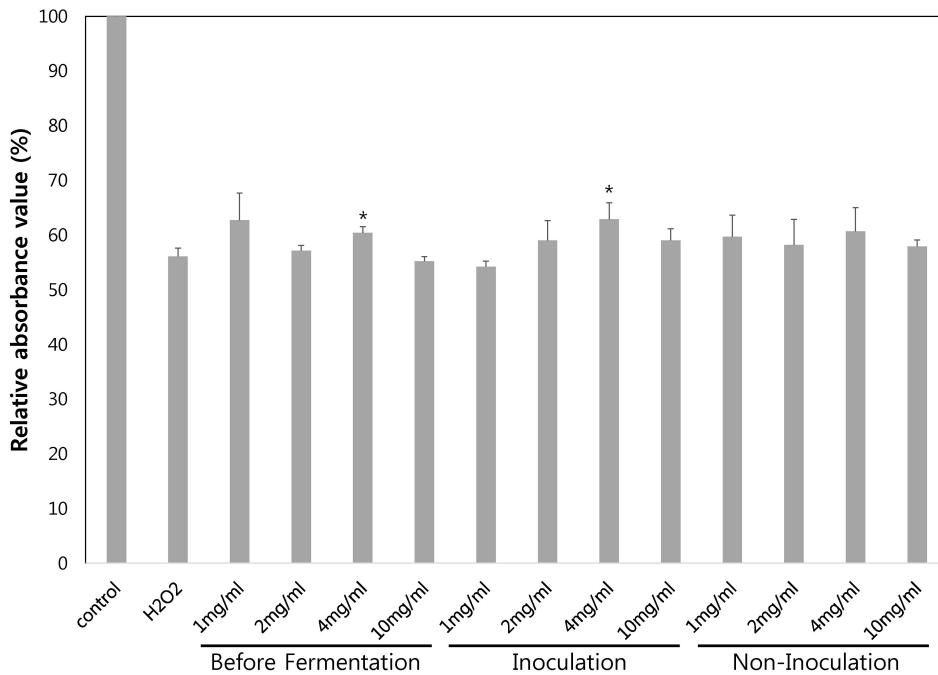


Fig. 6. Comparison between extract of pre-fermented Samjung-hwan (SJH) and fermented SJH on HepG2 cell viability. Data shown in mean  $\pm$  standard deviation (\*P < 0.05).

게 되며 이를 통해 기존의 한약이 가지는 효능을 증가시키거나 새로운 효능을 발현시키며 부작용을 줄이게 된다<sup>14)</sup>. 이러한 발효에 관여하는 유산균들은 그 종에 따라 서로 다른 발효 능력을 갖게 되며 이러한 발효대사물의 차이가 인체에서 다양한 효과를 나타낼 것이라 생각된다. 비만치료에 많이 사용되는 한약재인 마황을 *Lactococcus* 속의 균주로 발효시켜 항비만효과 및 항노화효과를 증대시키며 부작용 등을 완화시켰다고 보고된 연구<sup>15)</sup>와 방풍통성산에 *Lactobacillus* 속의 균주를 이용하여 발효시켜 항산화작용이 증가되었다는 연구<sup>16)</sup>들이 있었다. 삼정환의 자연발효를 통해 항비만, 항지질 효과가 증가되었다는 연구<sup>3)</sup>는 진행되었으나 이는 주로 자연발효를 통한 숙성으로 발효한약재 연구에서 주로 사용되는 균주접종 방식과는 실험방법에 차이가 있으며 숙성 후 생균분석이 이루어지지 않아 유익균에 대한 분석 및 발효 기전에 대한 이해가 부족한 실정이었다. 천연발효 삼정환에 대한 선행 연구를 통하여 *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 등의 유산균들이 발효에 관여한다는 것을 밝혀냈다<sup>13)</sup>. 이에 본 연구에서는 삼정환의 천연발효 과정에서 추출한 상기 유산균을 접종하여 발효시켰으며 이러한 발효과정에서 나타나는 미생물의 변화와 항산화 활성을 관찰하였다.

유산균 접종 후 발효 전과 미접종군과의 pH와 총 유산균

수를 비교함으로써 발효 정도를 파악하였다. 발효 전 삼정환의 pH는 4.81이 측정되었으며 1주일간의 발효 후 접종군에서 3.66, 무접종군에서 4.12가 측정되어 접종군에서 발효가 더 빨리 진행되었다고 예상된다. 총 유산균 수 분석에서 발효 전 삼정환에서 7.31 log CFU/g으로 측정되었고 1주일간의 발효 후 접종군에서 8.55 log CFU/g이 측정되었으며 무접종군에서 9.05 log CFU/g 측정되었다. *Lactobacillus* 속의 생균 수는 발효 전 7.02 log CFU/g이었으며 1주일간의 발효 후 접종군에서는 8.48 log CFU/g, 무접종군에서는 9.02 log CFU/g이 측정되어 무접종군에서 더 많은 미생물의 분화가 일어났을 것으로 예상된다. *Lactococcus* 속 생균 수는 발효 전 7.10 log CFU/g 측정되었으나 발효 후 무접종군, 접종군 모두에서 발견되지 않아 추후 추가적인 연구를 통해 각 유산균의 발효기전에 대한 이해가 필요할 것으로 생각된다.

발효 후 삼정환의 생리활성의 변화를 비교해보기 위해 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 분석하였다. 발효음식에서 페놀화합물들은 유산균의 대사과정을 통해 발생하며 항산화활성 및 여러 인체에 유익한 작용을 하는 대사물질로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 이를 비교하여 발효대사물 생성정도를 비교하였다. 발효 후 총 폴리페놀 함량은 접종군에서는 1.798 mg/g, 무접종군에서는 1.639 mg/g으로 측정되어 발

효 전 삼정환의 1.219 mg/g에 비해 두 군 모두 유의성 있는 증가를 보였다. 발효 후 두 군 간의 비교에서 접종균이 무접종균에 비해 유의성 있는 차이를 보였으며 이는 접종균에서 인체에 유익한 대사물들을 더 생성했을 것으로 유추해볼 수 있다. 발효 후 총 플라보이드 함량은 접종균에서는 1.240 mg/g, 무접종균에서는 1.203 mg/g으로 발효 전 0.706 mg/g에 비해 두 군 모두 유의성 있는 증가를 보였으나, 두 군 간에는 유의성 있는 차이는 보이지 않아 상기 유산균들의 발효대사물 차이를 비교해보는 지표로 사용하기에는 한계를 가질 것으로 생각된다.

발효삼정환의 항산화 활성 및 간세포 보호 효과에 대해 알아보기 위해 HepG2 cell을 배양하여 처리후 DPPH free radical 소거능을 측정하였다. 발효 후 접종균은 59.15%, 무접종균에서는 59.21%로 측정되어 발효 전 33.96% 측정값에 비해 유의성 있는 증가를 보여 항산화 작용이 더 증가되었다고 할 수 있다. 하지만 두 군 간의 유의성 있는 차이는 보이지 않아 유산균 접종균의 항산화 활성의 우세성을 알아보기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 세포 생존율에서는 삼정환 처리군이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독군에 비해 증가되는 경향을 보이며 일부 측정값에서 유의성 있는 증가를 보여 세포독성에 대한 보호효과를 가질 것으로 생각된다. 유산균 접종균 중 4 mg/ml에서 62.9%로 가장 높게 측정되며 유의성 있는 결과를 나타내 투약의 적절한 농도였음을 확인해볼 수 있었다. 한약재들의 항산화작용이 항비만, 항지질작용과 큰 연관성<sup>18)</sup>을 갖고 있으므로 발효삼정환 항산화 기전에 대한 이해를 통해 추후 항비만, 항지질작용을 규명하기 위한 연구로 이어질 수 있다. 본 연구는 기존의 연구를 통해 삼정환의 발효에 주로 관여하는 상기 유산균들을 삼정환 발효에 재접종하여 무접종균과의 발효대사물의 차이를 비교해보았으며 이를 통해 추후 발효삼정환의 제품화 시 발효에 사용할 유산균 선별을 위한 초석을 다졌으나 접종균에서의 발효대사물 함량의 뚜렷한 효능차이가 보이지는 않아 추후 지속적인 연구를 통하여 발효대사물들 간의 차이와 발효기전에 대한 이해를 통해 항비만, 항지질 효과에 대한 규명이 필요할 것으로 여겨진다.

## 결론

천연발효를 통해 추출한 유산균을 접종한 삼정환과 접종하지 않은 두 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 두 군의 발효정도를 비교하기 위해 총 유산균 수와 pH를 비교하였으며 총 유산균 수는 무접종균에서 더 큰 차이를 보였으며 접종균에서 더 큰 pH 변화가 일어났다. 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, DPPH 활성산소 소거능, 세포생존율에서는 접종균이 더 우세한 결과가 나타났다. 무접종균의 경우 접종균에 비해 미생물 수의 증가를 통해 발효정도가 더 진행되었다고 예상된다. 하지만 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량에서 접종균이 더 높은 측정값을 보여 발효를 통해 생성되며 인체에 유익한 작용을 할 수 있는 물질들은 접종균에서 더 많이 생성되었다고 생각해볼 수 있다. 이에 천연발효에서 추출한 상기 유산균들이 발효삼정환 제조에 사용되기 적합한 유산균이라 할 수 있으며 추후 삼정환의 발효 메커니즘 및 발효산물들의 개별연구를 통해 발효삼정환 항산화, 항비만 효과에 대한 규명이 필요할 것으로 생각되며 추후 제품화 및 규격화에도 기여할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부 '한의약 선도기술개발사업'의 재정 지원을 받아 수행된 연구임 (과제고유번호: HI14C0556).

## References

1. Jeong HJ, Kim SY, Jeong JC. Effect of Samjung-hwan on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. *J Korean Orient Med.* 2006 ; 27(3) : 24-35.
2. Kim JH, Kim GW, Koo BS. Effect of Samjung-hwan (sanjingwan) on obesity and lipid metabolism in rats with high fat diet. *J Orient Neuropsychiatry.* 2009 ; 20(2) : 47-60.
3. Kim AJ, Park SJ, Rho JO. Mulberry fruit extract consumption is inversely associated with hyperlipidemia in middle-aged men. *Korean J Food Nutr.* 2008 ; 21(2) : 121-6.
4. Kim YC, Jun M, Jeong WS, Chung SK. Antioxidant properties of flavone C-glycosides from *atractylodes japonica* leaves in human low-density lipoprotein oxidation. *J Food Sci.* 2005 ; 70(9) : S575-80.

5. Sung NK, Kim SH, Seo YB, Oh AH. Effect on blood glucose, hypertension of *Lycium chinense miller*. *J Herbol*. 1994 ; 9 : 161-71.
6. Song M, Bose S, Kim H. Anti-obesity effects of fermented Samjung-hwan in high fat diet rats. *J Korean Med Obes Res*. 2013 ; 13(1) : 17-23.
7. Wang JH, Bose S, Kim HG, Han KS, Kim HJ. Fermented *Rhizoma atractylodes macrocephalae* alleviates high fat diet induced obesity in association with regulation of intestinal permeability and microbiota in rats. *Sci Rep*. 2015 ; 16(5) : 83-91.
8. Wang JH, Bose S, Kim GC, Hong SU, Kim JH, Kim HJ. Flos *Lonicera* ameliorates obesity and associated endotoxemia in rats through modulation of gut permeability and intestinal microbiota. *PLoS One*. 2014 ; 9(1) : e86117.
9. Park JH, Kim HJ, Lee MJ. The role of gut microbiota in obesity and utilization of fermented herbal extracts. *J Korean Med Obes Res*. 2009 ; 9(1) : 1-14.
10. Kim HG, Bose S, Kim DI, Koo BS, Kim HJ. Effect of fermented Lotus extract on glucose intolerance and lipid metabolism-related gene expression. *J Korean Med Rehab*. 2014 ; 24(1) : 1-12.
11. An YT. Health functional food and probiotic. The Korean Society of Food and Nutrition Conference, Busan, Korea. Uijeongbu : The Korean Society of Food and Nutrition. 2011 : 32-43.
12. Shin NR, Wang JH, Lim DW, Lee MJ, Kim HJ. Microbial change and fermentation characteristic during samjung-hwan natural fermentation. *J Korean Med Obes Res*. 2015 ; 15(2) : 123-30.
13. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*. 2007 ; 2(4) : 875-7.
14. Kim KY, Song HJ. Herbal processology. Seoul : Shinil Press. 2002 : 547.
15. Shin YJ, Kim HJ, Lee MY. The effect of fermented *Ephedra sinica* on obese rats fed by high fat diet. *J Orient Rehab Med*. 2009 ; 19(4) : 37-57.
16. Kang DH, Kim JS. Functionality analysis of Korean medicine fermented by lactobacillus strains. *J Metabol Bariatr Surg*. 2011 ; 39(3) : 259-65.
17. Rodríguez H, Curiel JA, Kandete JM, Rivas B, Felipe FL, Gómez-Cordovés, et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2009 ; 132(2) : 79-90.
18. Prakash D, Suri S, Upadhyay G, Singh BN. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr*. 2007 ; 58(1) : 18-28.