

유산발효에 의한 발효한약의 기능분석

강동희 · 김현수*

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Received : February 1, 2011 / Revised : June 15, 2011 / Accepted : June 16, 2011

Functionality Analysis of Korean Medicine Fermented by *Lactobacillus* Strains. Kang, Dong Hee and Hyun-Soo Kim*. Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea – Through the process of fermentation with *Lactobacillus* strains this study has evaluated the functionality of the traditional Korean medicine *Bangpungtongsungsan* after the addition of four other medicinal ingredients. In order to facilitate the growth of the *Lactobacillus* strains brown sugar was added to the herbal substances used. For both DPPH radical scavenging activities and SOD-like activities the medicinal mixture, when fermented through heterogeneous co-cultures, scored higher (at 77% and 42%, respectively) than when not fermented (at 31.7% and 36.3%, respectively). The co-cultured Korean medicine inhibited the growth of *Bacillus subtilis* PCI 219, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916 and *Propionibacterium acnes* KCTC 3314. The inhibiting effects on β -hexosaminidase released from RBL-2H3 cells caused by the mixture, with and without fermentation, was seen to be similar (57% and 60%, respectively).

Key words: Lactic acid bacteria, *Bangpungtongsungsan*, fermented Korean medicine, Korean medicine, anti-bacterial and antioxidant effect

서 론

동물의 장관 내에는 건강유지에 기여하는 세균류와 유해하게 작용하는 세균류가 서로 길항관계를 유지하고 있다. 건강유지에 기여하는 세균류는 숙주의 면역능력을 자극하거나 감염을 방어하고 노화방지 등에 관여하며, 유해 작용을 하는 세균류는 장내 부패를 일으키거나 독소, 발암물질 등을 생성하여 숙주의 노화 촉진 및 발암 등에 관여한다[5]. 건강한 성인의 장내 균총은 *Bacteroides* 60%, *Bifidobacterium* 속과 *Lactobacillus* 속 40%, *Escherichia coli*와 *Streptococcus* 속 1%, 그리고 *Clostridium* 속 1%로 구성되어 있다[3]. 이들 균주들은 각종 스트레스, 해로운 환경, 적절하지 못한 영양상태, 항생제 남용 등으로 사멸하고 해로운 미생물들이 그 자리를 대체하는 현상을 유발시키고 있다[13]. *Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium*과 같은 유산균은 당류를 발효하여 유산을 생성하며, 체내 유익균의 성장을 촉진하는 생균 활성화제 (probiotics)로서 체내 콜레스테롤 흡수저해, 면역조절, 영양소의 흡수 및 이용률을 높이는 등 다양한 질병 예방효과와 생리조절작용을 하는 것으로 알려져 있다[7]. 또한 장내 세균총 중 유익한 균의 생육을 촉진시킬 수 있는 식품소재의

탐색에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 천연식물의 단독 또는 몇 가지 조합처리로 *Bifidobacterium bifidum*에 성장을 촉진한다는 보고가 있으며[10], 돌나물과 오미자 추출물에서 *Clostridium perfringens*와 *E. coli*의 생육이 억제되었다는 보고가 있다[3]. 과학과 의학이 발전되고 사회적 환경이 개선됨에 따라 평균수명이 크게 높아져 고령화 인구가 증가되고 있으며, 전염성 질환보다 뇌졸중, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병, 알레르기성 질환 등 만성 질환의 발병률이 높아지고 있다. 이러한 추세로 건강에 대한 관심이 크게 높아지고 있으며, 노화 및 만성적인 질환을 일으키는 원인을 억제하기 위해 천연물 및 생약으로부터 유래하는 기능성 물질에 대한 연구가 다양하게 보고되고 있다[6, 11, 14, 23]. 천연물질 및 생약은 인체 내에서 식균작용을 활성화하고, 항체의 생성을 촉진시키며, 체내 생화학적 수치들을 정상화하는 등 질병에 대한 방어력을 증가시켜 만성질환을 예방하고 치료할 수 있도록 하며, 면역반응을 강화시키거나 저하된 면역기능을 정상화시킴으로써 치료에 사용되기도 한다[17]. 한약은 자연에서 채취한 그대로 이용하는 것은 사용하기 불편하거나 부작용 등이 있어 독성 및 약성의 완화, 효능의 변화 등을 목적으로 수치(修治)라는 간단한 공정을 거쳐 사용되어 왔다. 수치는 천연상태로부터 가공 처리하여 물리·화학적 및 생물학적 활성 변화를 유도하는 한방의 전통적인 제약기술로서 오늘날까지 전래되어 이용되고 있다[12]. 전래 한약

*Corresponding author

Tel: +82-53-580-5284, Fax: +82-53-580-5284

E-mail: hskim@kmu.ac.kr

의 형태는 탕제, 환제, 산제(가루약), 고제(연고)였으나 한약 및 한약제에 미생물을 배양하여 얻은 부산물도 새로운 제형으로 추가되었다. 발효한약은 약효성분의 체내흡수율과 생체이용률을 모두 극대화시켜 약리적 기능성뿐만 아니라 한약의 제형 개량과 포제 방법을 향상시키고, 이를 통해 한약의 새로운 수요를 창출하고 고부가가치의 한약제품을 개발할 수 있어 최근 한의학계에서 관심을 받고 있다[8]. 한약의 발효 방법은 전통 한약재를 미생물이 잘 이용할 수 있도록 찌거나 삶은 후 미생물을 접종하여 고체 및 액체배양을 하는 것이다. 한약의 발효를 위하여 사용되는 미생물은 유산균이나 *Bacillus* sp. 및 버섯 균사체 등이 있다. 이 중에서 유산균이 가장 많이 사용되며, 한약에서 유산균의 생육특성을 확인하는 연구가 보고되고 있다[1, 18, 22]. 발효한약의 기능성에 대한 연구는 주로 항산화, 항암 및 알레르기 억제 효과를 확인하여 이루어지고 있다. 버섯균사체로 복령과 후박을 발효하였을 때 항산화 효과가 다소 떨어졌으나 인체 간암 세포주에서 항암 활성이 뚜렷하게 나타났다는 보고[24]와 용안육을 청국균으로 발효하였을 때 전자공여능이 높고 자궁경부암세포 및 간암세포에 대한 항암 활성이 높아졌다는 보고[25]가 있다. 또한 썸바귀 추출물을 유산균으로 발효하였을 때 썸바귀 추출물보다 알레르기 억제 효과가 개선되었다는 보고[21]가 있으며, 발효농축이 농축보다 면역증강 작용이 우수하다는 보고[9]도 있다.

본 연구에서는 전통한약의 발효에 의한 신기능개발을 규명하기 위한 일환으로, 중풍, 고혈압, 동맥경화, 염증성 피부질환에 사용되고 있으며, 지질저하 효과, 진통, 소염, 항균 효과, 알레르기 억제 및 면역 효과, 간기능 효과 등 다양한 질환들에서 연구되어 있는 방풍통성산[16, 26]을 선정하여 *Lactobacillus* 균주를 단일 및 복합배양 하여 생육특성을 확인하고 *in vitro*에서 발효 및 미발효 시 한약의 항산화능, 항균 활성, 알레르기 억제효과 등 기능을 검토하였다.

재료 및 방법

한약(방풍통성산)

발효에 사용한 한약은 피부 장벽의 회복 및 항염증 작용으로 피부 손상을 완화시킨다는 최근 연구결과[26]를 토대로 방풍통성산을 선정하였으며, 4가지 약재를 가감하여 실

Table 1. Composition of *Bangpungtongsungsan*.

Korean medicine name	Scientific name	Dose (g)
활석	<i>Talcum</i>	6.37
감초	<i>Glycyrrhizae radix</i>	4.5
석고	<i>Gypsum fibrosum</i>	2.62
황금	<i>Scutellariae radix</i>	2.62
길경	<i>Platycodi radix</i>	2.62
방풍	<i>Ledebouriellae radix</i>	1.68
천궁	<i>Cnidii rhizoma</i>	1.68
당귀	<i>Angelicae gigantis radix</i>	1.68
적작약	<i>Paeoniae radix rubra</i>	1.68
대황	<i>Rheiradix etrhizoma</i>	1.68
마황	<i>Ephedrae herba</i>	1.68
박하	<i>Forsythiae fructus</i>	1.68
연교	<i>Natrii sulfas</i>	1.68
망초	<i>Schizonepetae herba</i>	1.68
형개	<i>Atractylodis macrocephalae rhizoma</i>	1.31
백출	<i>Gardeniae fructus</i>	1.31
치자	<i>Gardeniae fructus</i>	1.31
생강	<i>Zingiveris rhizoma recens</i>	5

험에 사용하였다. 한약은 대구시내 한의원에 의뢰하여 구입하였으며, 임상적 복용에 적합한 한약재 추출법에 준하여 조제되었다. 한약재의 배합은 한의학적 배합 방법에 따라 Table 1에서 보는 바와 같이 한 첩 당 첨가되는 각각의 한약재 중량을 정하여 수행하였다. 배합한 한약재는 40점 분량을 한약 추출기에 첨가하여 100°C 이하에서 2시간 동안 가열을 한 후 추출하였으며, 추출된 한약은 100 mesh 체를 이용해 여과하여 한약재를 제거하였다. 유산균의 배양을 위해 한약은 pH 조정, 침전물 제거를 위한 원심분리, 여과를 통한 멸균과 고압증기멸균을 각각 실시하여 배양 전 처리 조건을 검토하였다.

유산균의 복합배양

본 연구에 사용한 발효미생물은 GRAS 미생물로서 유산균을 공시균주로 사용하였으며, Table 2에서 보는 바와 같이 한국생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행(KCTC)에서 분양을 받아 *Lactobacilli* MRS배지(Difco Co.)에 계대배양한 후 균체를 20% glycerol이 포함된 저장액에 넣어 -70°C

Table 2. *Lactobacillus* strains used for the co-culture.

Strains	Sources	Stock solution (CFU/mL)*
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3498	Human feces	10 ⁸
<i>Lactobacillus casei</i> KCTC 3109	Cheese	10 ⁸
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> KCTC 3635	Bulgarian yogurt	10 ⁸
<i>Lactobacillus fermentum</i> KCTC 3112	Fermented beets	10 ⁸
<i>Lactobacillus helveticus</i> KCTC 3545	Emmental (Swiss) cheese	10 ⁸
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> KCTC 3108	Pickled cabbage	10 ⁸

*10 µL of inoculum of each stock solution per 40 mL KM.

에 보관하였으며, 실험에 사용하기 전 계대배양을 실시하였다. 유산균의 복합배양에 사용한 한약은 4°C, 4,000×g에서 10분간 원심분리 하여 침전물을 제거한 후 pH를 6.3으로 조정하여 121°C, 15분간 멸균하였으며, 유산균의 생육을 증대시키기 위해 당밀이 함유된 brown sugar를 각각 1%(w/v)와 5%(w/v)로 첨가하였다. 복합배양 시 유산균은 각각 10⁸ CFU/mL의 stock액을 제조한 후 한약 40 mL(50 mL tube, Corning Co.)에 각각의 stock액 10 µL를 혼합하여 접종하였으며, 유산균이 혼합 접종된 한약은 37°C에서 정치배양 하였다.

항산화 활성 측정

전자공여능: 전자공여능은 Blois의 방법[2](Blois 1985)을 변형하여 실시하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 실험 시작 전 메탄올에 녹인 후 0.3 mM이 되도록 하여 사용하였다. DPPH 용액과 희석된 시료를 1:1로 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구는 시료대신 메탄올을 첨가하여 측정하였으며, 양성 대조구는 기존의 항산화제로 알려진 BHA(butylated hydroxyanisole)로 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가구와 음성대조구의 흡광도를 구하여 다음과 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{DDPH Scavenging (\%)} = \frac{C - (S_1 - S_2)}{C} \times 100$$

C: methanol + DPPH의 흡광도; S₁: 시료 + DPPH의 흡광도; S₂: 시료 + methanol의 흡광도

SOD 유사활성: SOD(superoxide dismutase) 유사활성은 Marklund의 방법에 따라 활성 산소종을 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 나타내었다[19]. 각 시료 용액 0.2 mL에 Tris-HCl의 완충용액(50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL(Sigma Co.)를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1.0 N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 실험구와 대조구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity(\%)} = \left[1 - \frac{\text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right] \times 100$$

항균 활성 측정: 한약 및 발효한약의 항균 활성은 agar diffusion법으로 측정하였다. 검정균주는 Gram 양성균인 *Bacillus subtilis* PCI 219, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916과 *Propionibacterium acnes* KCTC 3314,

Gram 음성균인 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004와 *Salmonella typhimurium* KCTC 2504를 사용하였다. 또한 효모는 *Candida albicans* KCTC 7675, *Cryptococcus neoformans* KCCM 50564을 사용하였으며, 곰팡이는 *Aspergillus niger* KCTC 6910을 사용하였다.

E. coli KCTC 1682와 *S. typhimurium* KCTC 2504는 LB배지(peptone 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 5 g/L, pH 6.8)에 접종하고, *B. subtilis* PCI 219, *S. aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916과 *P. aeruginosa* KCTC 2004는 Nutrient 배지(Difco Co.)에 접종하여 37°C, 170 rpm에서 24시간 계대배양하였다. *P. acnes* KCTC 3314는 Reinforced Clostridial배지(tryptose 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 3 g, dextrose 5 g, sodium chloride 5 g, soluble starch 1 g, cysteine hydrochloride 0.5 g, sodium acetate 3 g/L, pH 7.6)에 접종 후 37°C, 72시간 정치하여 계대배양하였다. *C. albicans* KCTC 7675와 *C. neoformans* KCCM 50564는 YM배지(yeast extract 3 g, malt extract 3 g, dextrose 10 g, peptone 5 g/L, pH 7.6)에 접종하여 28°C, 150 rpm에서 48시간 계대배양하였다. 계대배양한 시험균주는 4°C에서 보관하여 사용하였다. *A. niger* KCTC 6910은 PDA배지(Difco Co.)에 계대배양하여 포자현탁액을 제조한 후 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

항균 활성은 한약과 발효 한약을 4°C, 1000×g에서 10분간 원심분리 후 상등액 20 µL를 paper disc (φ=6 mm, Whatman Co.)에 첨가하여 건조시키고 검정균주가 든 평판 배지 위에 얹어 *B. subtilis* PCI 219, *S. aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916, *E. coli* KCTC 1682, *P. aeruginosa* KCTC 2004와 *S. typhimurium* KCTC 2504는 37°C에서 1일간, *P. acnes* KCTC 3314는 37°C에서 3일간 배양하였으며, 효모와 곰팡이는 28°C에서 각각 2일, 4일간 배양하여 생성된 inhibitory zone의 유무 및 크기를 통해 판단하였다.

세포 배양: 한약 및 발효한약의 알레르기 억제 효과는 알레르기 발생에 관여하는 RBL-2H3 세포주를 대상으로 실험하였다. RBL-2H3 세포주는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, 10% FBS(Gibco Co.)와 1% antibiotics(Gibco Co.)를 포함하는 D-MEM배지(Gibco Co.)와 37°C의 5% CO₂를 포함한 포화습도 공기조건에서 배양하였다. 100 mm tissue culture dish에 배양하면서 세포가 70~80% confluency에 도달하면 PBS로 2회 세척하고 1×trypsin-EDTA(Gibco Co.)를 가하여 37°C의 5% CO₂를 포함한 포화습도 공기조건에서 5분간 배양 후 배지를 첨가하여 현탁하였다. 세포 현탁액은 새로운 50 mL centrifuge tube에 옮긴 후 500×g에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하고 새로운 배지를 첨가하여 1×10⁵~1×10⁶ cells/mL의 밀도로 분주하였다.

세포 독성 확인: 세포 독성은 Mitochondrial dehydrogenase activity를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 검정물질이 세포의 생존에 미치는 효과를 Mosmann

이 보고한 방법에 따라 측정하였다[20]. RBL-2H3 세포주는 96 well plate에 well당 1×10^5 cells 밀도로 분주하여 24시간 배양을 한 후 배지를 제거하고 FBS가 첨가되지 않은 배지를 분주하여 24시간 배양을 하였다. 한약 및 발효한약의 세포독성 확인 농도는 한약의 처리시간을 1시간, 3시간, 6시간, 12시간으로 하여 각 시간에 따라 첨가량을 달리하여 확인한 후 결정하였다. 한약 및 발효한약을 첨가하여 세포배양 후 0.5 mg/mL의 MTT시약(Generay Biotech Co.)을 10 μ L씩 well에 첨가하여 4시간 배양을 하였으며, 잔여 MTT시약과 배지를 제거하고 DMSO와 EtOH를 1:1로 혼합하여 100 μ L씩 분주한 후 침전물을 충분히 용해시켰다. 세포 독성은 ELISA reader를 사용하여 540 nm의 측정 파장을 기준으로 하여 흡광도를 측정한 후 확인하였다.

β -Hexosaminidase의 측정: β -Hexosaminidase의 측정[27]을 위해 RBL-2H3 세포주는 10% FBS, 1% antibiotics를 포함하는 D-MEM배지와 37°C의 5% CO₂를 포함한 포화습도 공기조건에서 배양하여 80~90% confluency에 도달하면 세포수를 5×10^5 cells/mL로 조절하여 24 well plate에 분주 후 IgE를 0.5 μ g/mL로 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 500 μ L Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2)로 2회 세척한 다음 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂ 및 0.1% BSA(Sigma Co.)가 포함된 Siraganian buffer를 160 μ L 첨가하여 10분간 배양하였다. IgE(Sigma Co.)로 감작된 세포에 농도별로 시료를 처리하여 일정시간 배양한 후 antigen(DNP-KLH, Alpha diagnostic Intl Inc.)을 1 μ L/mL로 첨가하여 10분간 반응시켰다. 반응 종결을 위해 10분간 얼음에 꽂아둔 후 반응 혼합물을 500 \times g에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 분리하였다. 96 well plates에 상등액과 기질(1 mM nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide, Sigma Co.)을 각각 25 μ L씩 첨가하여 37°C에서 1시간 배양한 후 0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃를 200 μ L 첨가하여 반응을 정지시켜 ELISA reader로 405 nm에서 측정하였다. RBL-2H3 세포주에서 β -hexosaminidase의 방출 억제제는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Treated} - \text{Blank} - \text{Spontaneous})}{(\text{Control} - \text{Blank} - \text{Spontaneous})} \times 100$$

Control: 항체와 항원 첨가, 시료 미첨가; Treated: 항체, 항원 및 시료 첨가; Blank: 시료와 기질만 첨가; Spontaneous: 항체, 항원 및 시료 미첨가

통계분석

통계분석은 SigmaStat를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 시험 구간의 평균간 유의성 검정은 Student-Newman-Keuls test에 따른 다중검정방법으로 5% 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

한약 전 처리

한약은 *Bacillus* sp.의 포자가 존재하고 있어 유산균을 접종 시 유산발효가 되지 않았다. 한약 내에 *Bacillus* sp.의 포자 제거는 열에 의한 성분변화를 고려하여 0.2 μ m와 0.45 μ m의 filter를 이용해 멸균을 하였으며, 그 결과 한약 내에 미립자가 많아 filter 이용이 적합하지 않았다. 유산균 배양 시 한약의 전 처리는 *Bacillus* sp.의 포자를 사멸시키기 위해 고압증기멸균 방법으로 수행하였다.

항산화 활성

전자공여능: 발효시킨 방풍통성산의 기능을 검토하기 위하여 발효 및 미발효 시킨 방풍통성산의 항산화 활성을 측정하였다. 항산화 활성측정은 DPPH radical 소거능을 이용하는 전자공여능을 검토하였다. 공시균주가 일반적인 배지인 MRS배지에서 항산화 활성 물질을 생산할 수 있어 이를 검토한 결과 항산화 물질을 생산하지 않는 것으로 확인되었다. 전처리 한 한약(KM)은 항산화 효과가 우수하여(결과 미계재) 희석 후 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 100배 희석하였을 경우 한약(KM)은 radical 소거활성이 31.7%로 나타났으며, 발효한약은 모두 77% 이상으로 높게 나타났다. Brown sugar를 첨가하지 않고 한약만으로 배양하였을 경우 배양 7일째 radical 소거능이 94.43%로 가장 높았으며(Fig. 1, A), 양성 대조구인 BHA의 0.5 mM(결과 미계재)에 해당하는 radical 소거능을 갖는 것으로 나타났다.

SOD 유사활성: Fig. 1에서 발효시킨 방풍통성산의 기능으로 강력한 항산화 활성이 확인됨에 따라 발효 및 미발효시킨 방풍통성산의 SOD 유사활성을 검토하였다. SOD 유사활성을 가지는 물질은 주로 phytochemical에 속하는 저분자 물질이 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide로부터 생체를 보호하며 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 노화억제와 더불어 산화적 장애의 방어효과를 가진다고 알려져 있다[15]. 따라서 한약 및 발효한약의 SOD 유사활성은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 한약(KM)의 경우 36.3%로 확인되었으나, 여러 조건으로 복합배양 된 한약의 SOD 유사 활성은 모두 42%이상으로 확인되어 한약보다 높았으며, 전체적으로 1%와 5%로 brown sugar를 첨가하였을 때 활성이 더 높았다.

항균 활성

발효한약의 새로운 기능을 탐색하기 위해 항균 활성을 검토하였다. 일반배지인 MRS배지를 사용한 공시균주 배양액과 한약은 모든 시험균주에 항균 활성이 없었다(결과 미계재). 발효한약은 Table 3에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* PCI 219, *P. aeruginosa* KCTC 2004, *S. aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916과 *P. acnes* KCTC 3314에 항균활성을 보였다. *B. subtilis* PCI 219에 대한 항균 활성은 한약만을

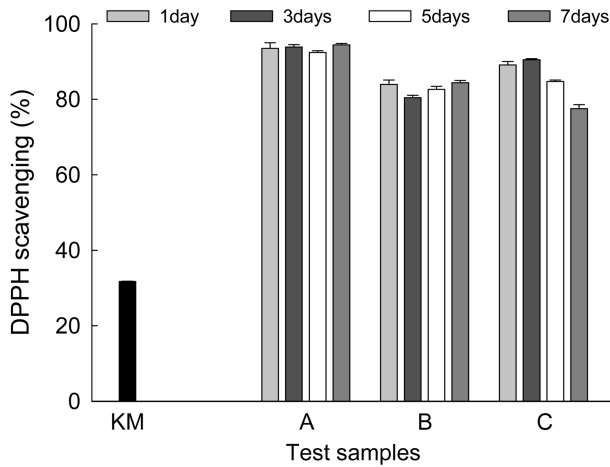


Fig. 1. Electron donating ability of the various co-cultured broths. Each sample was diluted 1 : 100 in sterile distilled water. A: KM, B: 1% brown sugar addition, C: 5% brown sugar addition. Results are expressed as mean ± standard deviation. This test was repeated 3 times.

이용해 1일과 3일간 복합배양 하였을 때 9 mm로 나타났으며, brown sugar를 1%와 5%로 각각 첨가하여 5일과 7일간 복합배양 하였을 때 9 mm로 나타났다. *P. aeruginosa* KCTC 2004, *S. aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916과 *P. acnes* KCTC 3314에 대한 항균활성은 모든 발효한약에서 동일하게 나타났다.

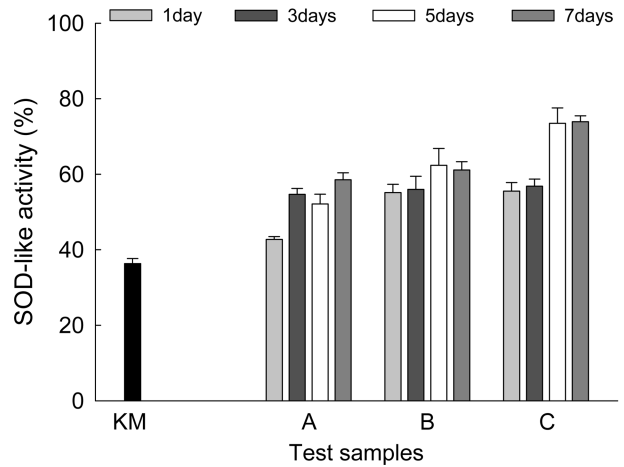


Fig. 2. Superoxide dismutase-like activity of the various cocultured broths (FKM) A: KM, B: 1% brown sugar addition, C: 5% brown sugar addition. Results are expressed as mean ± standard deviation. This test was repeated 3 times.

세포독성

한약의 세포독성을 검토하기 위하여 RBL-2H3 세포주를 대상으로 실험을 수행하였다. 한약의 처리시간(1시간)은 일정하게 하고, 한약(KM)의 첨가량만을 다르게 하여 세포 독성을 확인한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 사용한약을 높은 농도(300 µL/mL)로 첨가하여도 세포 독성이 없으며 오히려 성장이 촉진되는 것을 확인하였다. 한약만을 사용하여 복합배양을 한 발효한약(FKM A)의 세포독성 확인은 처리

Table 3. Antibacterial activity of the co-cultured broth.

Strains	The co-cultured broth			
	Incubation time (days)	FKM A	FKM B	FKM C
Inhibitory zone (φ, 6 mm; Whatman Co.)				
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	1	9	*	-
	3	9	-	-
	5	-	9	9
	7	-	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 2004	1	-	-	-
	3	-	-	-
	5	7	7	7
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC 1916	1	-	-	-
	3	-	-	-
	5	8	8	8
<i>Propionibacterium acnes</i> KCTC 3314	1	-	-	-
	3	-	-	-
	5	10	10	10
	7	10	10	10

-: No inhibition

A: KM, B: 1% Brown sugar addition, C: 5% Brown sugar addition.

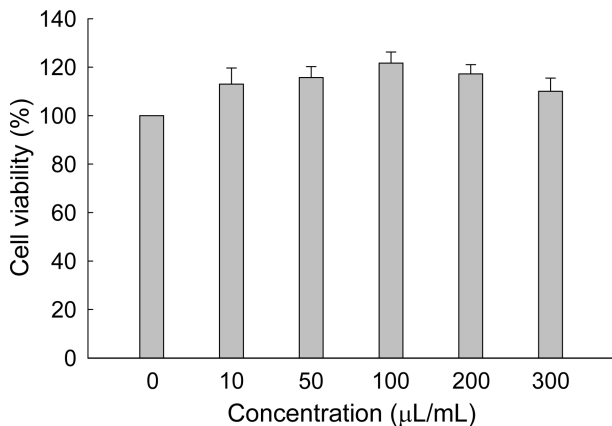


Fig. 3. Cytotoxic effect of KM on RBL-2H3 cells by MTT assay. The percent cell viability was calculated relative to the untreated control. Results are expressed as mean ± standard deviation. Results were a statistically significant difference ($p < 0.05$). This test was repeated 3times.

농도 10 μL/mL로 하였으며, 처리시간은 30분, 1시간, 3시간, 6시간과 12시간으로 하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 발효한약을 세포주에 30분, 1시간과 3시간 처리하였을 때는 세포 독성이 없었으나, 장시간(6시간 이상)처리 시 세포독성을 보이는 경향을 나타내었다.

β-hexosaminidase의 방출 억제 효과

시험물질의 알레르기 억제 효과를 측정하는 방법 중에서 IgE로부터 감작된 비만세포에서 유리된 histamine의 양을 측정하는 방법은 비만세포에서 histamine의 농도가 낮고 복잡한 여러 단계를 수행하여야 하기 때문에 큰 편차를 나타내기 쉽다. 최근에는 높은 농도로 세포 내에 존재하며, 탈과립 시 화학적 매개체들과 함께 방출되는 β-hexosaminidase

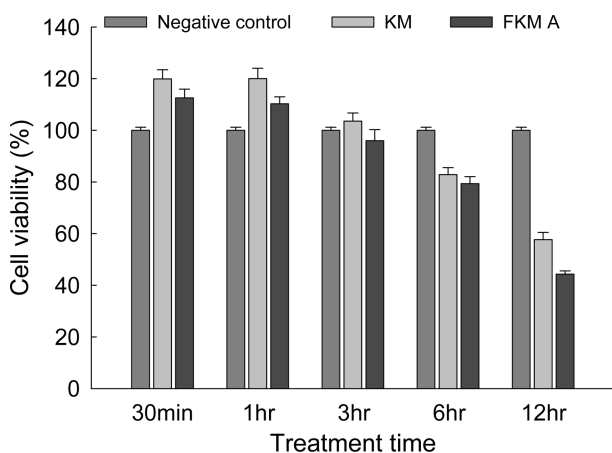


Fig. 4. Cytotoxic effect of negative control, KM and FKM A on RBL-2H3 cells by MTT assay. The percent cell viability was expressed as mean ± standard deviation. Results were a statistically significant difference ($p < 0.05$). This test was repeated 3times.

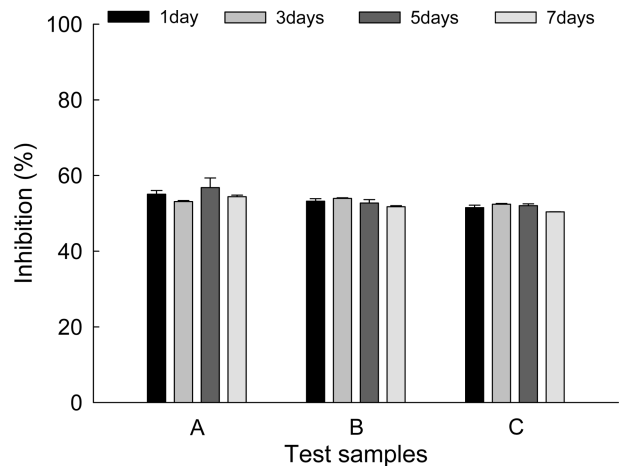


Fig. 5. Effect of FKM on the β-hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. A: KM, B: 1% brown sugar addition, C; 5% brown sugar addition. Inhibition of the β-hexosaminidase release were expressed as mean ± standard deviation. Results were a statistically significant difference ($p < 0.05$). This test was repeated 3times.

을 측정하는 방법이 널리 이용되고 있다[4].

발효한약의 β-hexosaminidase 방출 억제 효과를 측정 한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 배양일수에 따라 유사한 알레르기 억제 효과를 나타냈다. 한약만으로 발효한 것은 배양 5일째에 57%, 1% brown sugar가 첨가된 한약은 배양 3일째 54%, 5% brown sugar가 첨가된 한약은 배양 3일째 53%로 가장 억제효과가 높았다. β-hexosaminidase 방출에 있어 pH의 영향을 검토한 결과, pH 5.4 및 7.2에서 한약의 β-hexosaminidase의 방출 억제 효과는 60%로 유사하게 나타났다으며, 발효한약의 β-hexosaminidase의 방출 억제 효과는 57%로 나타났다(결과 미공개).

요 약

본 연구에서는 중풍, 고혈압, 동맥경화, 염증성 피부질환에 사용되고 있으며, 다양한 질환들에서 연구되어 있는 방풍통성산을 선정하여 4가지 약재를 가미한 후 기존의 기능성 물질과 *Lactobacillus* 균주에 의해 생성되거나 증가된 기능성 물질을 확인하고자 하였다. 한약을 이용한 복합배양은 공시균주의 수 및 접종시기를 달리하여 여러 조합으로 수행하였다. 전자공여능 및 superoxide dismutase 유사 활성 측정을 통해 한약의 항산화 활성은 각각 31.7%와 36.3%로 나타났다으며, 복합배양을 통해 발효된 한약의 항산화 활성은 각각 77% 이상, 42% 이상으로 나타나 한약보다 항산화 활성이 더 높게 나타났다. 항균 활성은 한약의 경우 모든 시험균주에 항균 활성이 나타나지 않았으나, 복합배양된 한약의 경우에는 *B. subtilis* PCI 219, *P. aeruginosa* KCTC 2004, *S. aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916에 항균 활성을 보였다

며, 특히 여드름을 유발시키는 *P. acnes* KCTC 3314에 항균 활성을 보였다. RBL-2H3 세포주에서 알레르기 억제 효과를 확인한 결과 한약은 60% 알레르기 억제 효과를 보였으며, 발효한약은 57% 알레르기 억제 효과를 보였다. 발효한약은 알레르기 억제 효과와 함께 항균 활성과 항산화 활성의 증가로 인하여 알레르기 개선, 피부노화 및 병원성 미생물에 의한 피부질환의 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Bae, H. C., J. Y. Lee and M. S. Nam. 2005. Effect of red ginseng extract on growth of *Lactobacillus* sp., *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in pH controlled medium. *Korean J. Food. Sci. Ani. Resour.* **25**: 257-264.
- Blois, M. S. 1985. Antioxidant determination by use of stable free radical. *Nature.* **191**: 1199-1203.
- Cho, I. S., Y. H. Han, G. Y. Lee and K. Y. Park. 2007. Search for medicinal plants on improvable effect of intestinal microflora. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **15**: 26-29.
- Choi, O. B. 2002. Antiallergic effects of *Petasites japonicum*. *Korean J. Food & Nutr.* **15**: 382-385.
- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutrition.* **125**: 1401-1412.
- Huang, F., K. Yamaki, X. Tong, L. Fu, R. Zhang, Y. Cai, R. Yanagisawa, K. I. Inoue, H. Takano and S. Yoshino. 2008. Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by sinomenine. *International Immunopharmacology.* **8**: 502-507.
- Jung, H. K. 2001. Selection Criteria for Probiotics and Their Industrial Applications. *Bioindustry news.* **14**: 39-48.
- Jung, Y. J., D. O. Han, B. H. Choi, C. Park, H. J. Lee, S. H. Kim and D. H. Hahm. 2007. Effect of fermented herbal extracts, HP-1 on enzyme activities and gene expressions related to alcohol metabolism in ethanol-loaded rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* **21**: 387-391.
- Kim, D. H., S. B. Han, J. S. Park and M. J. Han. 1994. Fermentation of antler and its biological activity. *Korean J. Pharmacogn.* **25**: 233-237.
- Kim, J. D. and T. S. Shin. 2002. The growth promoting effect of *Bifidobacterium bifidum* by combination of natural products bearing antioxidative capacity. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 388-394.
- Kim, K. B., K. H. Yoo, H. Y. Park and J. M. Jeong. 2006. Antioxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**: 328-333.
- Kim, N. J., Y. H. Jin and N. D. Hong. 1995. Studies on the processing of crude drugs (IV): Physico-chemical transformation of glycyrrhizin in glycyrrhizae radix by processing. *Korean J. Pharmacogn.* **26**: 31-39.
- Kim, S. H. and Y. H. Park. 2008. Antimicrobial resistance and food safety. *Safe food.* **3**: 30-36.
- Kim, S. Y., K. S. Park, S. H. Lee, S. W. Jung and W. S. Noh. 2006. A study on effect of *Acanthopanax sessiliflorum* seemen water extract on the growth of lactic acid bacteria. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **16**: 357-363.
- Kitani K., C. Minami, T. Amamoto, S. Kanai, G. O. Ivy and M. C. Carrillo. 2002. Pharmacological interventions in aging and aging associated disorders: potentials of propargylamine for human use. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**: 295-307.
- Lee, J. C. 2005. Effects of *Gambangpungtongseungsan* on lipid composition and antioxidant in rat fed high fat. *Korean J. Herbology.* **20**: 69-75.
- Lee, M. K., G. P. Choi, L. H. Ryu, G. Y. Lee, C. Y. Yu and H. Y. Lee. 2004. Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **12**: 36-42.
- Lim, S. D., K. S. Kim, H. S. Kim and Y. K. Park. 1998. A study on effect of medicinal herbs extract on the growth of lactic acid bacteria. 2. Effect of Daechoo, Goldamcho, Jiwhang water extracts on the growth of lactic acid bacteria. *Korean J. Dairy Sci.* **20**: 53-60.
- Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods.* **65**: 55-63.
- Park, E. K., J. H. Sung, H. T. Trinh, E. A. Bae, H. K. Yun, S. S. Hong and D. H. Kim. 2008. Lactic acid bacterial fermentation increases the antiallergic effects of *Ixeris dentate*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 308-313.
- Park, S. J., D. H. Kim, N. S. Paek and S. S. Kim. 2006. Preparation and quality characteristics of the fermentation product of ginseng by lactic acid bacteria (FGL). 2006. *J. Ginseng Res.* **30**: 88-94.
- Shin, J. Y. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J. Food & Nutr.* **14**: 568-572.
- Shon, M. Y. 2007. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. *Food Industry and Nutrition.* **12**: 51-57.
- Shon, M. Y., S. H. Nam and S. W. Lee. 2007. Antioxidant, anticancer activities and Nitric Oxide Production of *Euphoria longana* fermented with lactic acid bacteria and *Bacillus subtilis*. *Korean J. Food Preserv.* **14**: 531-537.
- Son, J. M. and S. U. Hong. 2007. The Effects of *Bangpung-tongsungsan* extract to the skin damage on mice model after atopic dermatitis elicitation. *Korean J. Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology.* **20**: 99-114.
- Yamada, P., H. Isoda, J. K. Han, T. P. N. Talorete, T. Yamaguchi and Y. Abe. 2007. Inhibitory effect of fulvic acid extracted from canadian sphagnum peat on chemical mediator release by RBL-2H3 and KU812 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1294-1305.