

발효녹용의 항피로 및 간장보호 효과

심주원¹ · 김남재² · 김영수³ · 김동현^{1*}

¹경희대학교 약학대학, ²경희대학교 동서의학연구소, ³한방발효법제주

Anti-fatigue and Hepatoprotective Effects of Fermented Antler

Joo-Won Shim¹, Nam-Jae Kim², Young-Su Kim³ and Dong-Hyun Kim^{1*}

¹College of Pharmacy, Kyung Hee University

²East-West Medicine Research Institute, Kyung Hee University

³Hanbang Fermentation Institute Ltd.

Abstract – To increase the extraction yield and biological effect of antler by fermentation, probiotics fermenting antler were screened from rice shells. Of screened *Bacillus* species, the most potently antler-degrading probiotics was *Bacillus* KH-07. The supernatant yield of fermented antler is highest. *Bacillus* KH-07 may belong to *Bacillus licheniformis* by biochemical and 16S rDNA sequencing analyses. The KH-07-fermented antler (50 mg/kg) increased the anti-fatigue effect 2.3-fold compared to that of non-treated antler. Furthermore, the KH-07-fermented antler improved CCl₄-induced liver injury in mice. Based on these findings, the extraction yield and biological effect of antler can be increased by KH-07 fermentation.

Key words – Antler, Fermentation, Fatigue, *Bacillus licheniformis*

녹용(Cervi parvum cornu)은 사슴과(Cervidae)에 속하는 매화록, 마록 또는 기타 종속의 수사슴의 머리에 난 골질화되지 않은 어린 뿔을 말한다. 녹용은 산지 및 사슴의 종류에 따라 마록, 매화록, 시베리아산 대록, 뉴질랜드 산 직록, 순록 등으로 구분한다.¹⁾ 예로부터 녹용은 한방에서 기력을 회복하고, 간 기능을 개선시켜 주고, 급격한 정력의 감퇴나 근육의 무기력감과 탄력저하 골격의 약화 증상을 개선하며, 정신력을 강하게 해주며 머리를 맑게 해주고 뇌 세포의 활성화로 지능발달의 효능도 있으며, 저린 증상에 효과가 있으며 부러진 뼈를 잘 붙게 해주고 허리와 척추의 통증에도 효과가 있으며, 스트레스를 줄여 줄 수도 있고 남성의 조루나 몽정을 치유할 수 있으며 성신경을 강장하고 성욕을 항진 시키며, 신체의 면역기능을 증진시키는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 그러나, 녹용을 체질에 맞지 않게 사용하였을 때는 발열, 코피, 두통, 심계항진, 설사 및 소화불량, 오심구토 등을 일으킬 수 있다. 그러므로 녹용의 사용에는 세심한 주의가 필요하다. 녹용의 약리연구에서는 성장촉진작용, 조혈작용, 단백질 합성촉진작용, 혈중콜레스테롤저하작용, 면역활성증가작용, 항노화작용 등이 보고되었다.²⁻⁷⁾

녹용은 전세계적으로 우리나라에서 가장 많이 사용하고 있으며, 녹용은 우리나라에서도 생산되고 있지만 그 양은 아주 적고 대부분 뉴질랜드, 중국, 러시아 등으로부터 수입되고 있다. 산지에서 채취한 녹용은 건조하여 사용한다. 이 녹용을 사용하기 전에 적당히 세절하여 사용한다. 이 녹용을 적당히 세절하기 위해서는 주정에 담겨서 세절하게 된다. 이 과정에서 많은 활성 성분이 소실된다. 이런 단점을 극복하기 위해 저자 등은 계내금으로부터 녹용을 발효시키는 *Bacillus* PY-92 균주를 분리하여 하고 녹용추출물을 용이하게 얻을 수 있는 방법을 개발하였고, 녹용발효물이 항암효과 및 면역활성 증가 작용이 있음을 보고하였다.^{8,9)} 그러나, 이 균주의 배양시 계내금(Galli Stomachichum Corium)으로 발효시킬 때보다는 적으나 이취(異臭)가 발생한다.

이를 극복하기 위해 이취의 생성이 낮은 녹용발효 균주 KH-07를 왕겨(the husks of *Oryza sativa*)로부터 분리하였다. 이 균주로 녹용을 발효하여 녹용의 생리활성인 성장촉진작용, 조혈작용, 단백질 합성촉진작용, 면역활성증가작용 등의 활성을 반영할 수 있는 항피로효과와 녹용의 부작용인 설사발생율을 줄일 수 있는지를 생쥐를 이용하여 조사하였다.

*교신저자(E-mail): dhkim@khu.ac.kr
(Tel): +82-2-961-0374

재료 및 방법

실험재료 및 시약 - 녹용은 뉴질랜드산을 구입하였다. CCl_4 는 Sigma 사 (미국)으로부터 구입하였고, tryptic soy broth, tryptic soy agar는 B.D. (미국)으로부터 구입하였으며, Wizard genomic DNA purification kit 및 T-easy 벡터는 Promega 사 (미국), creatinine, aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) assay kit는 아산 제약(주)로부터 구입하였다.

녹용 분해 균주의 분리 및 동정 - 왕겨 및 쌀겨(약 0.5 g)를 tryptic soy broth(50 ml)에 현탁하고, 상등액을 다시 tryptic soy broth로 100배 희석하여 tryptic soy agar 배지에 이식하고 24시간 동안 37°C에서 배양하여 자라나온 콜로니에 녹용발효균주 검색 배지(50 mg의 녹용 덩어리를 증류수 2 ml에 넣고 멸균한 것에 이식하고, 48시간 내에 녹용분해(녹용덩어리분해)하는 균주를 녹용분해균주 양성으로 하였다. 녹용 분해 활성을 갖는 균주를 21개 선별하고, 이 중에서 녹용분해하면서 이취가 가장 적은 균주 KH-07를 선별했다. 이 균주는 한국중균협회 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하였으며, 수탁번호는 KCCM 10885P이다.

KH-07 균주의 동정은 먼저 그람 염색, Voges-Prokauer, indole, methyl red, 질산환원력, oxidase, urease, catalase 시험, citrate, casein, gelatin, starch, glucose, arabinose, xylose, amygdalin 이용성 시험, 16S rDNA를 sequence를 분석하여 분석하였다.¹⁰⁾

16S rDNA는 제조는 Wizard genomic DNA purification kit를 이용하여 gDNA를 분리하고, 프라이머[정방향: 5'-TCA CCA AGG CRA CGA TGC G-3', 역방향: 5'-CGT ATT CAC CGC GGC ATG-3']를 사용하여 PCR [94°C에서 5 분; 이후, 94°C에서 30 초(denaturation), 54°C에서 40 초(annealing), 및 72°C에서 90 초(extension)의 30 사이클]을 수행하여 1100 bp의 PCR 산물을 얻고 이를 T-easy 벡터에 접합(ligation)시킨 후 JM 109 (Promega 사)에 형질전환(transformation)하였다. Positive clone에서 플라스미드를 다시 분리해 내어 T7, SP6 프라이머를 이용하여 서열분석하였다.

녹용추출물의 제조 - 녹용추출물은 녹용(10 g)에 증류수 100 ml를 넣어 수욕상에서 4시간 추출하고 그 상등액을 동결건조한 것을 실험에 사용하였다(수율 4.1%). Py92 발효 녹용추출물은 녹용(10 g)을 물 100 ml를 넣고 멸균하고, Py-92 균주를 1×10^4 CFU를 이식하여 7 일간 배양하고 그 상등액을 동결건조한 것으로 사용하였다(수율 17%). KH-07 발효녹용 추출물은 녹용(10 g)을 물 100 ml를 넣고 멸균하고, KH-07 균주를 1×10^4 CFU를 이식하여 7 일간 배양하고 그 상등액을 동결건조한 것으로 사용하였다(수율 34%).

실험동물 - 실험동물은 웅성 ICR 생쥐 5 주령 몸무게 19~22 g, SD 흰쥐 4 주령(웅성, 160~180 g)을 오리엔트사

(성남, 한국)에서 구입하여, 물과 사료(삼성사료, 서울, 한국)을 자유롭게 먹을 수 있도록 하고, 온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 10\%$, 빛은 12 시간 간격으로 명암(lights on 07:00-19:00 h) 조절되도록 한 조건에 1주일간 순응시킨 후에 실험에 사용하였다. 동물실험은 경희대학교 약학대학 동물윤리규정에 따라 윤리위원회의 승인을 얻어 실험하였다.

항피로 효과 측정 - $25 \times 40 \times 17$ cm의 투명한 플라스틱 용기에 증류수를 14 cm까지 채우고 항온조의 온도를 18°C로 유지하면서 10개의 수영조에서 생쥐를 넣고 동시에 수영시간을 측정하였다. 수영실험은 생쥐(ICR 웅성 20~25 g)의 체중을 재고 체중에 8%의 납줄을 달아 목의 배면 부위에 고정하고, 생리식염수, 녹용추출물, Py-92 녹용발효추출물, KH-07 녹용발효추출물을 20 mg/kg 및 50 mg/kg 경구 투여하고 30분이 경과한 시점에서 동시에 수영을 시켰으며, 수영 종료시간은 코가 수면 아래로 잠길 때까지(수영이 5초가 진행 될 때까지)의 수영시간을 측정하여 수영가능시간으로 하여 계산하였다. 종료된 생쥐의 혈액을 즉시 채취하여 아산제약(주)의 크레아틴정량키트를 이용하여 혈중 크레아틴 양을 측정하였다.¹¹⁾

간장 손상 보호 효과 - 랫트(웅성, 180~200 g) 1군을 5마리로 하여 100그램당 20% 사염화탄소(올리브유로 희석)을 1 ml 씩 경구투여하고 30분 후에 생리식염수, 녹용추출물, Py-92 녹용발효추출물, KH-07 녹용발효추출물을 100 mg/kg 경구투여하였다. 사염화 탄소 투여 24시간 후에 심장으로 부터 채혈하여 혈중 AST 및 ALT 농도를 측정하였다.¹²⁾

설사 발생을 및 수분함량 측정 - 생쥐(ICR 웅성, 20~22 g)를 한군 5마리로 하여 생리식염수 0.5 ml에 현탁한 녹용과 녹용 발효물을 각각 0.5 g/kg 또는 1 g/kg씩 경구투여하여 설사발생을 및 분변 중 수분함량을 측정하였다. 대조약물로는 망초를 사용하였다.

통계 - 대조군에 대한 실험군의 통계학적 유의성은 Student's two-tailed *t*-test로 분석하였다($p < 0.05$).

결 과

발효녹용균주의 분리 및 동정 - 녹용을 분해하면서 이취가 가장 낮은 KH-07 균주는 호기적, 혐기적 조건에서 자라며, 글루코스, 자이로스, 아리비노스, 전분, 젤라틴을 분해하는 그람 양성 균주였다(Table I). GenBank homology search Blast system에서 얻은 KH-07 균주의 16S rDNA의 서열은 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 바실러스 리케니포르미스(*B. licheniformis*)와 유사했으며, 두 균주와 직접 비교 시에는 후자에 더 유사한 특징을 보였으나 동일하지는 않았다(Table II). 기존의 녹용 발효균주 Py-92가 *B. licheniformis* 보다는 *B. subtilis*와 유사한 특성을 지녔던 것과 비교하면 기존의 녹용발효균주 Py-92와는 다른 균주로 생각된다.

Table I. The characteristic of KH-07 degrading Antler

	<i>Bacillus</i> sp.			
	<i>Bacillus</i> py-92	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1325	<i>Bacillus licheniformis</i> KCTC1026	KH-07
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram	Positive	Positive	Positive	Positive
Voges-Prokauer test	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-
Methyl red	+	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-
Simmon's citrate	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Casein utilization	+	+	+	+
Gelatin utilization	+	+	+	+
Starch utilization	+	+	+	+
D-Glucose utilization	+	+	+	+
L-Arabinose utilization	+	+	+	+
D-Xylose utilization	+	+	+	+
Amygdalin utilization	-	-	-	+
Aerobic growth	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	+	+

Table II. Homology of KH-07 with *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*

	Homology of KH-07 (%)		
	Search	Align	Direct order homology
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1325	-	98	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	99	99	91

이 *Bacillus* 균주를 이용하여 7일간 발효시키고, 상등액을 얻어 동결건조하여 추출 수율을 계산했다. 녹용을 수육에서 추출했을 때 4%였으나, Py-92로 발효시켰을 때는 17%, KH-07 균주로 발효시켰을 때는 34%였다.

항피로 효과 - 녹용추출물 및 발효녹용 추출물의 항피로 효과를 생쥐에 수영시간을 측정하는 방법으로 측정하였다 (Table III). 추를 맨단 생쥐의 수영시간은 9분이었다. 녹용추출물을 투여한 생쥐의 수영시간은 12~14분으로 1.3~1.6 배 증가하였다. Py-92로 발효시킨 녹용추출물도 녹용추출물과 수영시간에 차이가 없었다. 그러나, KH-07로 발효시킨 녹용추출물을 투여한 생쥐는 생리식염수만을 투여한 군에 비해 1.7~2.3배 이상 수영시간이 증가하여 가장 우수한 항피로효과를 나타냈다.

Table III. Anti-fatigue effect of Antlers with or without fermentation in mice

Group	Dose (mg/kg)	Swimming time (min)	Blood creatinine (___)
Normal without bullet	-	-	0.58±0.01
Control with bullet	-	9.2±0.4	0.69±0.02 [#]
Antler extract	20	12.4±2.3	0.66±0.01
	50	14.1±2.2*	0.66±0.01
Py-92-fermented Antler extract	20	11.2±2.8	0.67±0.01
	50	11.9±3.1	0.66±0.02
KH-07-fermented Antler extract	20	14.8±1.5*	0.63±0.01*
	50	20.6±2.5*	0.62±0.01*

All values are the mean ± S.D. (n=10). [#]Significantly different vs. normal group (p<0.05). *Significantly different vs. control group with bullet (p<0.05).

혈액 중의 피로 지표인 크레아틴 양을 측정된 결과에서도 생리식염수만을 건강한 생쥐에 비해 납추를 단 생쥐에서는 유의적으로 증가하였다. 그러나, 녹용, 발효녹용을 투여했을 때 모두 유의적으로 억제되었다. 녹용투여군 중에서는 KH-07로 발효시킨 녹용추출물을 투여하였을 때 가장 강한 억제효과를 보였다.

녹용 및 발효녹용의 간장 손상 보호 효과 - 사염화탄소로 생쥐에 간손상을 유발시켜 녹용추출물 및 발효녹용추출물의 간장보호효과를 측정하였다(Table IV). 사염화탄소에 의해 혈중 ALT, AST가 증가하였으나, 녹용추출물 및 발효녹용 추출물 처리군에서 간손상을 개선하였다. KH-07로 발효시킨 녹용의 추출물이 가장 강한 간장 보호효과를 나타냈으며, 이 효과는 실리마린보다 우수하였다.

녹용 및 발효녹용의 분변의 수분 함량에 미치는 영향 - 녹용추출물 및 발효녹용추출물을 생쥐에 투여하여 분변중의 수분 함량 변화에 대해 조사하였다(Table V). 녹용투여는 분변중의 수분함량을 유의성은 없었으나, 증가시키는 경향을 나타냈다. 발효녹용 추출물도 녹용추출물을 투여한 것과 비슷하게 분변의 수분함량 증가를 보였으나, 녹용추출물

Table IV. Hepatoprotective effect of antlers with or without fermentation against carbon tetrachloride-induced injury in mice

	Dose (mg/kg)	Blood concentration (Karmen unit)	
		AST	ALT
Normal control	-	520±23	212 ± 98
CCl ₄ -treated control	-	2455±205 [#]	1352±176 [#]
Antler extract	100	1652±238*	1021±134*
Py-92-fermented Antler extract	100	1543±281*	1082±155*
KH-07-fermented Antler extract	100	1112±218*	635±178*
Silymarin	100	1422±250*	816±211*

All values are the mean ± S.D. (n=5). [#]Significantly different vs. normal control group (p<0.05). *Significantly different vs. CCl₄-treated control (p<0.05).

Table V. Effect of antlers with or without fermentation on the fecal moisture in mice

	Dose (g/kg)	Fecal moisture (%)
Saline	-	68±5
Antler extract	0.5	76±4
	1	78±5 [#]
Py-92-fermented Antler extract	0.5	75±3
	1	78±6
KH-07-fermented Antler extract	0.5	70±3*
	1	71±4*
Sodium sulfate	0.5	81±4 [#]
	1	85±5 [#]

All values are the mean ± S.D. (n=5). [#]Significantly different vs. saline alone -treated group (p<0.05). *Significantly different vs. antler extract (1 g/kg)-treated group (p<0.05).

을 투여했을 때보다는 분변 수분함량 증가가 낮았다. 그 중에서는 KH-07로 발효시킨 경우가 수분함량 증가가 가장 낮았다.

고찰 및 결론

녹용은 약용 및 건강식품으로 많이 사용하고 있으나, 이에 대한 가공처리 또는 새로운 의약품으로서이 개발은 거의 이루어지지 못했다. 더욱이 우리나라에서 사용되는 녹용의 대부분은 수입에 의존하고 있다. 녹용을 발효처리하여 녹용의 추출율을 높이고, 약효를 극대화하고, 녹용이 부작용인 설사를 줄일 수 있는 방법의 연구는 없었다. 저자 등은 녹용의 추출율을 높이고 효능을 극대화하기 위해 녹용 분해균주인 Py-92균주를 분리하였다. Py-92로 발효시킨 녹용추출물은 녹용추출물에 비해 유기용매 추출물은 2배, 물 추출물 분획은 5배 증가하였다. 이 발효녹용추출물은 장내 미생물의 유해성 효소의 생산을 억제하는 효과가 녹용추출물에 비해 우수했으며, 면역조절 작용인 carbon clearance 효과가 녹용추출물에 비해 1.5배 증가하였다. 그러나, Py-92로 발효시킨 녹용은 이취를 나타냈다. 그러므로 녹용의 추출율을 높이면서 효능이 극대화되는 균주를 왕겨 및 쌀겨 *Bacillus* 속 균주로 검색하였다. 녹용발효가 우수하면서 이취가 가장 적은 균주는 KH-07 였다. 이 균주는 그람염색, 생화학적 특성, 16S rDNA를 통해 분석한 결과 *B. licheniformis*와 유사한 특징을 갖고 있어 *B. licheniformis* KH-07로 하였다. 이 균주로 녹용을 발효시켰을 때 추출율은 약 29배 증가하였다.

이 균주로 발효시킨 녹용추출물은 항피로효과도 녹용추출물 및 Py-92로 발효시킨 녹용추출물에 비해 2.4배 높았다. 추출율을 감안하면, 항피로효과는 20배 이상 증가한 셈이다. 게다가 이 KH-07로 발효시킨 녹용 추출물은 간장보호효과도 녹용추출물 및 Py-92에 의한 발효 녹용추출물에 비해 우수했다. 발효녹용추출물이 녹용추출물에 비해 분변의 수분증가가 낮았으나, 유의성은 없다.

이런 결과들을 종합해볼 때 KH-07 발효녹용 균주는 한방의 유용한 자원인 녹용을 한약에 이용하기 위해 알코올에 담궈다가 세절하는 과정에서 많은 녹용의 유효성분이 소실되는 것을 막고, 녹용의 추출율을 높이고, 항피로효과 등을 포함하여 다양한 효능을 극대화 할 수 있을 것이다.

인용문헌

1. 한방약리학 교재편찬위원회 (2010) 한방약리학 (제 3판) 692-694.
2. 용재익 (1961) 녹용에 관한 연구. Cholesterol 투여 가토의 혈청중 cholesterol에 미치는 녹용의 영향. 약학회지 5: 6-19.

3. 용재익 (1964) 실험적 가토 빈혈에 미치는 녹용투여의 영향. 약학회지 **8**: 6-15.
4. 신국현 이은방, 김재현, 정명숙, 조성익 (1989) 분말녹용의 약물활성 연구. 생약학회지 **20**: 180-187.
5. Wang, B. X., Zhao, X. H., Qi, S. B., Yang, X. W., Kaneko, S., Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y. (1988) Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence-accelerated mice in vivo. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 2593-2598.
6. Wang, B. X., Zhao, X. H., Qi, S. B., Kaneko, S., Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y. (1988) Effects of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 2587-92.
7. Huang, S. L., Kakiuchi, N., Hattori, M. and Namba, T. (1991) A new monitoring system of cultured myocardial cell motion: effect of pilose antler extract and cardioactive agents on spontaneous beating of myocardial cell sheets. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 384-387.
8. 김동현, 한상범, 박주석, 한명주 (1994) 발효녹용의 생리활성. 생약학회지 **25**: 233-237.
9. 김동현, 한상범, 유기웅, 김유숙, 한명주 (1994) 복수암 생쥐에 대한 발효녹용의 항암효과 **38**: 795-799.
10. Smeath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986) *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. 2, 1105, Williams & Wilkins, Baltimore.
11. 신용욱, 최혁재, 김동현, 박정일, 김남재 (2006) 가공인삼의 항피로효과. 동서의학연구소 논문집 **13**: 219-225.
12. 최혁재, 한명주, 백남인, 김동현, 정해곤, 김남재 (2006) 순문의 D-galactosamine 유발 간장해 보호효과. 생약학회 **37**: 258-265.

(2011. 12. 20 접수; 2012. 2. 17 심사; 2012. 2. 24 게재확정)