

Issatchenkia orientalis (KCTC 7277)를 이용한 소음인과 소양인 약재의 비교 실험연구

박영주^{1,3}, 최지은^{2,3}, 강영민^{2,3†}, 김종열^{1,3*}

An Experimental Study on the Comparison between Sasang Herbal Medicine for So-Eum and So-Yang Type Using *Issatchenkia orientalis* (KCTC 7277)

Young Joo Park^{1,3}, Ji Eun Choi^{2,3}, Young Min Kang^{2,3†}, and Jong Yeol Kim^{1,3*}

Received: 24 January 2017 / Revised: 21 March 2017 / Accepted: 23 March 2017

© 2017 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: There are four types (So-Eum, So-Yang, Tae-Eum, Tae-Yang type) in Sasang constitutional medicine (SCM). In SCM, not only people but also herbal medicine are classified into four types. To date, there has been very little evidence of experimental classifications in SCM. So, we adapted *Issatchenkia orientalis* in two different culture media made from the herbal medicines for So-Eum and for So-Yang type. And the adapted *Issatchenkia orientalis* was inoculated into another eight culture media made from the herbal medicines for So-Eum and for So-Yang type. The mass reduction was measured every 12 hours for 2 days. Then, we analyzed the statistical differences of herbal medicines for So-Eum and for So-Yang type. There were significant differences of variables (R: rate of change in mass reduction, S: convex degree

of mass reduction graph) in herbal medicine media for So-Eum ($p=0.001$, 0.001 , respectively.). Suggesting a microbiological method of Sasang medicine research, current study may contribute to the establishment of experimental Sasang constitutional herbal medicine.

Keywords: Sasang medicine, Herbal medicine, Alternative medicine, Yeast

1. INTRODUCTION

사상의학은 동무 이제마가 제창한 한국의 전통의학으로 사람의 체질을 소음인, 소양인, 태음인, 태양인 네 가지로 분류한다. 사상의학에서는 체질에 따라 장부(臟腑)의 균형상태가 다르다고 본다. 장부 균형상태의 차이는 곧 생리기능의 차이로 나타난다. 이제마의 저서 “동의수세보원”에서는 소음인은 신대비소(腎大脾小)하다고 보며, 이는 현대 생리학적으로 대소변을 배설하는 기능이 강하지만 음식물을 섭취하는 기능은 약한 것과 관련이 있다. 소양인은 비대신소(脾大腎小)하며, 소음인과 반대로 음식물을 섭취하는 기능이 강하고 대소변을 배설하는 기능은 약하고 본다. 태음인은 간대폐소(肝大肺小)하며, 에너지를 저장하는 기능이 강하지만 에너지를 소비하는 기능은 약하다고 본다. 태양인은 폐대간소(肺大肝小)하며, 태음인과 반대로 에너지를 소비하는 기능이 강하고 저장하는 기능은 약하다고 본다 [1]. 이러한 생리기능

¹한국한의학연구원 한의기반연구부

¹KM Fundamental Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), Daejeon, Korea

Tel: +82-42-868-9489

e-mail: ssmmed@kiom.re.kr

²한국한의학연구원 K-herb연구단

²K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), Daejeon, Korea

Tel: +82-42-868-9684

e-mail: ymkang@kiom.re.kr

³과학기술연합대학원대학교 한의생명과학과

³Korean Medicine Life Science, University of Science and Technology (UST), Daejeon, Korea

의 차이는 겉으로는 체형, 안면형태, 목소리, 소증(素證)에 영향을 주어 체질에 따른 차이가 나타나고 체질을 진단하는 단서가 된다 [2,3].

생물학 분야에서도 사상의학은 연구되어 왔다. 사상체질과 관련된 질병 유전자 [4]를 비롯해서 체질에 따라 연관성을 갖는 유전자가 연구되었으며 [5], 장내 미생물과의 연관성도 밝혀진 바 있다 [6]. 기존 대부분의 사상의학의 연구는 사람의 주관적인 감각을 객관적으로 연구하는 데 초점이 맞춰졌다면, 근래의 생물학적 연구는 바이오마커 (bio-marker)의 발굴과 실험실적 근거를 찾는 방향으로 이루어지고 있다.

한편, 사상의학에서는 사람의 체질뿐 아니라 한약재도 네 가지로 분류하고 있다. 예를 들어, 인삼의 경우 소음인 약재로 분류되어 있으며, 팔물근자탕과 향사양위탕 등의 소음인 처방에 들어가지만 다른 체질의 처방에는 사용되지 않는다 [7]. 다른 약재들도 마찬가지로 하나의 약재는 한 체질의 처방에만 쓰인다. 이는 사람의 체질뿐 아니라 약재도 성질에 따라 네 가지로 분류되어 있음을 보여준다.

지금까지 사상의학의 약재에 대해서 체질별 질병과 그에 적용되는 약재들의 성질을 문헌적으로 분석하는 연구 [8], 문헌고찰과 체질식품에 대한 연구 [9], 체질별 음식선호와 관련된 연구 [10], 단일 대상으로는 무에 대한 사상의학적 연구 [11], 한약재인 목통에 대한 사상의학적 고찰 [12] 등이 이어져왔다. 이러한 분류들은 문헌에 나타난 약재의 성질을 기준으로 이루어졌다 [7]. 그런데 약재의 성질은 객관적으로 정량화하기 어렵기 때문에 과학적 근거로서는 부족하다. 때문에 사람의 체질의 분류뿐 아니라 약재의 분류도 생물학적 근거가 필요하다.

최근에 식초를 이용하여 식품을 체질별로 분류하고자 한 시도가 있었다. 식초의 원료가 되는 과일의 환경에 미생물이 적응해 있다고 보고, 여러 식초를 실험에 사용하였다. 그리고 그 식초를 과일농축액으로 만든 새로운 배양액에 접종했을 때 질량의 감소량이 측정되었고, 질량 감소량을 이용한 변수를 통계적으로 검정하여 체질별 약재를 분류하고자 하였다 [13]. 특정 환경에 적응한 미생물이 든 식초를 이용하여, 과일을 체질별로 분류하고자 한 시도로, 기존의 연구와 접근하는 방법이 달랐다. 하지만 표준화된 실험방법으로 이루어지지 않았으며, 실험실에서 이루어진 연구가 아니었다.

이에 본 연구는 앞서 행해진 연구를 실험실에서 표준화된 방법으로 개선하여 실행하였다. 우선 표준화된 균주를 선택하였다. 한약에 따라 항균작용 [14]이 있기 때문에 낮은 pH와 높은 온도 등의 다양한 스트레스에 적응력이 뛰어난 효모인 *Issatchenkia orientalis* [15,16]를 선택하였다.

그리고 식초를 대신하여 효모를 ‘적응한약’으로 만들어진 배양액에 적응시켜 사용하였다. 적응시킨 효모를 ‘배양한약’으로 만들어진 배양액에 접종하여 질량을 측정하였다. 또한, 기존 연구 [13]와 마찬가지로 질량 감소량을 이용한 변수를 검정하여 생물학적 반응의 차이를 찾고자 하였으며, 새로운 사상의학적 약재분류 방법을 탐색하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 문헌조사

전통의학정보포털 오아시스 [17]를 이용하여 ‘효모’, ‘사상’을 키워드로 논문을 검색하여 기존 연구의 동향을 파악하였다. ‘효모’를 키워드로 검색된 9건의 논문 중 효모로 발효된 약재의 효능을 보인 연구가 7건 있었다. ‘사상’을 키워드로는 총 498건의 논문이 검색되었다. 임상연구, 관찰연구, 질병에 관련된 논문이 106건이 있었으며, 소증, 심리, 성격, 행동, 생리지표와 관련된 논문은 124건 검색되었다. 진단과 관련하여 음성, 체형, 맥진 등과 관련된 논문은 76건 검색되었고, 생명과학이나 데이터와 관련된 논문은 40건 검색되었다. 약재나 음식과 관련된 논문은 16건, 사상의학 이론, 문헌연구나 기타 관련 연구논문은 70건 검색되었다. 사상의학에 대한 다양한 연구가 있었으나 특정 환경에 적응한 미생물을 이용하여 진단하거나 약재를 분류하는 연구는 없었다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 표준약재 및 추출

건강 (KIOM 2-16-0482), 당귀 (KIOM 2-16-0485), 백출 (KIOM 2-16-0475), 육계 (KIOM 2-16-0479), 천궁 (KIOM 2-16-0484), 지모 (KIOM 2-16-0480), 지황 (KIOM 2-16-0486), 택사 (KIOM 2-16-0487), 황련 (KIOM 2-16-0481), 황백 (KIOM 2-16-0483)은 광명당제약 한약재료, 한국한의학연구원 한약표준표본관에서 분양받아 사용하였다. 또한 학명은 산림청 국가표준식물목록과 한국한의학연구원 한약표준표본관을 참고하였다 (Table 1).

약재 추출을 위해 소음인 약재로 분류된 육계, 백출, 건강, 천궁, 당귀와 소양인 약재로 분류된 지모, 황련, 황백, 지황, 택사를 40 g씩 부직포에 담아서 각각 유리병에 넣었다. 100°C 증류수를 200 mL씩 부어 24시간 동안 추출했다. 추출액은 오토클레이브를 이용하여 121°C에서 15분간 고압멸균을 하였다.

2.2.2. 표준균주 및 적응배양

표준균주인 *Issatchenkia orientalis* (KCTC 7277)는 생물자원센터 (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 사용하였다. PDB (potato starch 4.0 g, dextrose 20.0 g/L, Difco, NJ, USA)에서의 흡광도를 측정하여 그래프로 나타내었다 (Fig. 1).

위 균주를 PDA (potato starch 4.0 g, dextrose 20.0 g, 15.0 g/L, Difco, NJ, USA) 배지에서 계대배양한 후 단일콜로니를 PDB배지에서 24시간 순수배양을 하고, 500 µL를 각각 육계 배양액 (육계추출액과 14.0°Brix 포도당용액의 1:7 혼합액 8.8 mL)과 지모배양액 (지모추출액과 14.0°Brix 포도당용액의 1:7 혼합액 8.8 mL)에 접종하여 32시간 동안 적응시켜 육계적응균 (YG yeast)과 지모적응균 (GM yeast)을 만들었다.

2.2.3. 한약 배양액 분주

적응한약인 육계와 지모를 제외한 8개의 배양한약 건강, 당

Table 1. Sasang constitutional herbal medicines used in experiment [7]

Sasang type	Scientific name	Korean name of herbal medicine (Chinese)	Abbreviation
For So-Eum type	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	건강(乾薑)	GG
	<i>Angelica acutiloba</i> (Siebold & Zucc.) Kitag	당귀(當歸)	DG
	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz	백출(白朮)	BC
	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J.Presl	육계(肉桂)	YG
	<i>Ligusticum officinale</i> (Makino) Kitag	천궁(川芎)	CG
For So-Yang type	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	지모(知母)	GM
	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Libosch. ex Steud.	지황(地黃)	GH
	<i>Alisma plantago-aquatica</i> ssp. orientale (Sam.) Sam	택사(澤瀉)	TS
	<i>Coptis chinensis</i> Franch	황련(黃連)	HR
	<i>Phellodendron chinense</i> C.K.Schneid	황백(黃柏)	HB

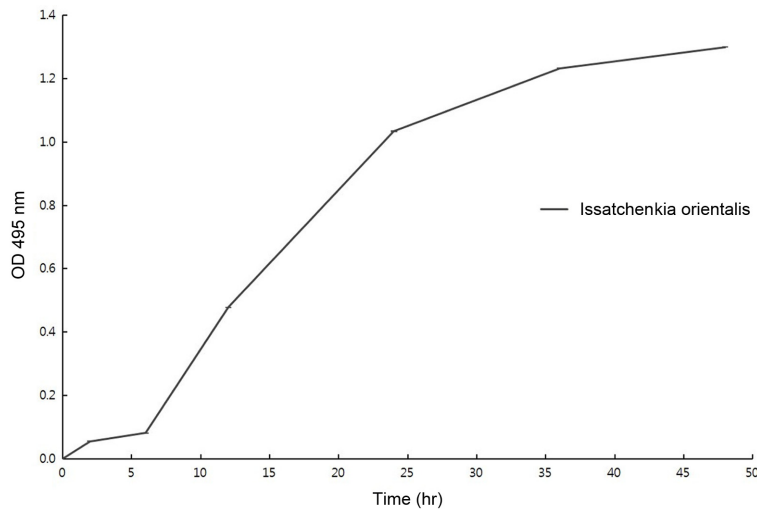


Fig. 1. Absorbance of yeast in PDB (28°C, 160 rpm). The measurement was repeated 3 times technically. Standard errors are indicated in the graph.

귀, 백출, 천궁, 지황, 택사, 황련, 황백 추출액을 각각 4개의 시험관 (총 32개 시험관, 20×200 mm)에 1 mL씩 분주했다 (효모를 특정 환경에 적응시키는 데 쓰인 한약을 ‘적응한약’, 적응된 균을 배양하는 배양액에 쓰인 한약은 ‘배양한약’이라고 명명하였다). 한 개의 대조군 시험관에는 배양한약을 분주하지 않았다.

한약 추출액이 1 mL 담긴 32개 시험관에 14.0°Brix의 포도당 용액 34 mL를 추가로 분주했다. 대조군 시험관 1개에는 포도당 용액 35 mL만 분주했다.

2.2.4. 효모 접종

각 배양한약이 담긴 동일한 4개의 시험관 중에 2개에는 적응 배양이 된 육계적응균 500 µL를, 2개에는 지모적응균 500 µL를 접종했다. 대조군 시험관 한 개에는 효모를 접종하지 않았다.

2.2.5. 배양 및 질량 측정

효모 접종이 끝나고 실리스토퍼 (22 mm)로 시험관을 균일하

게 막아 질량을 10분간 안정화하였다. 그리고 발란스 (CPA 224S, Sartorius, Germany, 10⁻⁴ g 단위 측정)를 이용하여 10⁻⁴ g 단위로 질량을 측정하고 (0 hr), 28°C, 160 rpm으로 진탕배양기 (SI-300R, Jeiotech, Korea)에서 배양하였다.

배양 후 12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr인 시점의 질량을 10⁻⁴ g 단위로 측정하고 기록했다. 질량의 측정은 시험관을 배양기에서 실온으로 꺼내고 10분간 질량 안정화를 한 이후에 실시했다.

위와 같은 방법과 동일한 조건으로 서로 다른 날에 세 번의 반복 실험을 시행했다.

2.3. 변수 설정

소음인 약재와 소양인 약재에 대해서 질량 감소량에 따른 차이를 통계적으로 검정하기 위해 기존의 변수를 응용한 변수 두 가지를 설정하였다. 기존의 연구에서는 ‘질량 감소량 비율의 변화율’을 변수로 하여 검정하였는데 [13], 본 연구에서는 ‘질량 감소량의 변화율’ 및 ‘질량 감소량 그래프의 볼록한 정도’를 각각 변수 R과 S로 설정하여 검정하였다. 자세한 변

수의 설정은 아래와 같다.

2.3.1. 시험관 표지

시험관을 구분하기 위한 것으로 다음과 같이 나타냈다.

$$[\text{배양한약_번호}]_{\text{적용한약}}$$

택사 배양액에 육계적응균을 접종한 2개의 시험관 중 1번 시험관의 경우 [TS_1]_{YG}로 나타냈다.

2.3.2. 시험관의 질량 (M)

배양 후 m시간이 지난 후 측정된, 실리스토퍼와 배양액을 모두 포함한 시험관의 질량이며 아래와 같이 표기했다.

$$M[\text{배양한약_번호}]_{\text{적용한약}}^{mh}$$

택사 배양액에 육계적응균을 접종한 1번 시험관의 배양 24시간 후 질량의 경우 M[TS_1]_{YG}^{24h} 와 같이 나타냈다.

2.3.3. 시험관의 질량 감소량 (D)

배양을 시작하고 m시간 후 질량에서 n시간 후 질량을 빼준 값으로 감소된 시험관의 질량이며, 아래와 같이 표기하고 계산하였다.

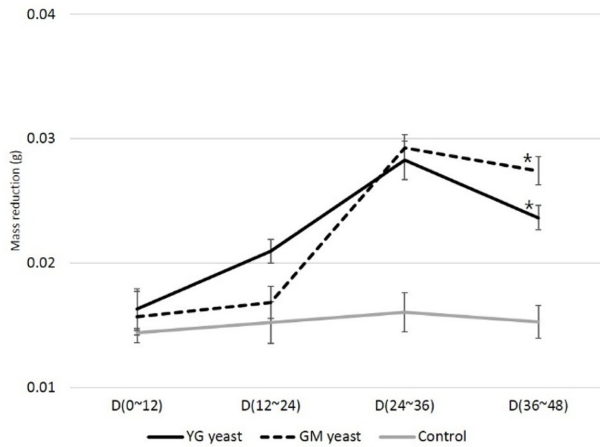
$$D[\text{배양한약_번호}](m \sim n)_{\text{적용한약}}$$

$$= M[\text{배양한약_번호}]_{\text{적용한약}}^m - M[\text{배양한약_번호}]_{\text{적용한약}}^n$$

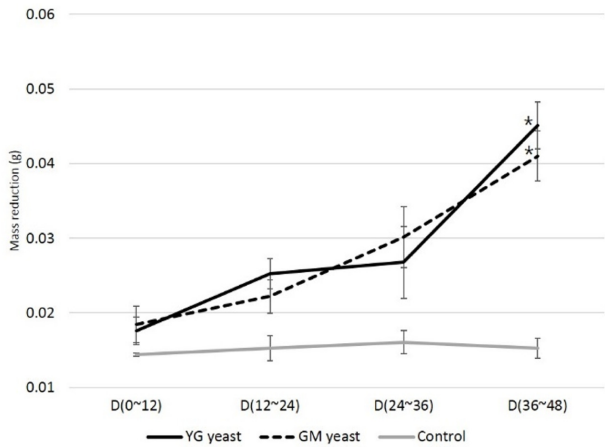
택사배양액에 육계적응균을 접종한 1번 시험관의 배양 0시간 이후부터 배양 24시간까지의 질량 감소량의 경우 D[TS_1](0~24)_{YG}로 나타냈다.

2.3.4. 질량 감소량의 변화율 (R)

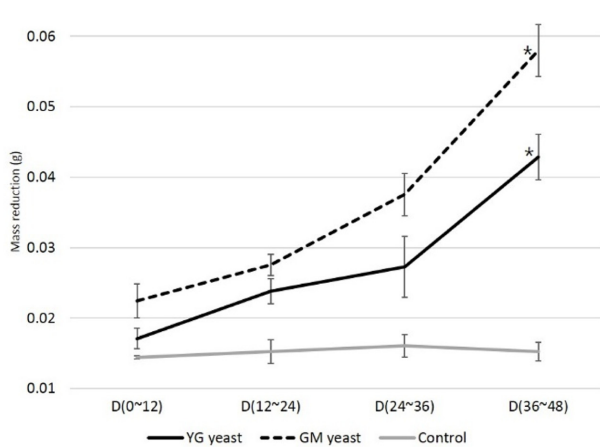
아래와 같이 배양을 시작하고 12시간부터 24시간까지의 질량 감소량을 0시간부터 12시간까지의 질량 감소량으로 나누어 초기 질량 감소량의 변화율인 변수 R로 나타내었다.



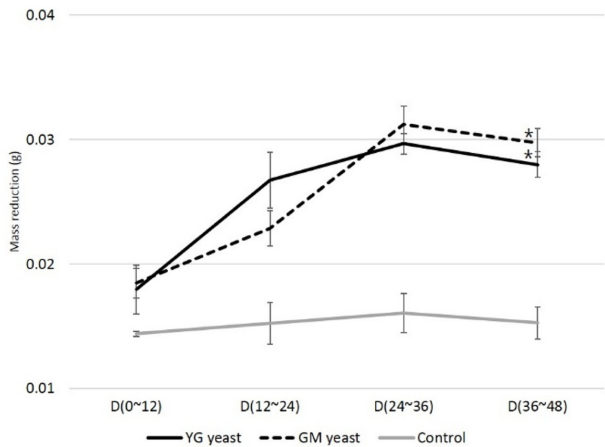
(a) GG culture medium



(b) DG culture medium



(c) BC culture medium



(d) CG culture medium

Fig. 2. Mass reduction rate pattern of herbal medicine for So-Eum type. GG, Zingiber officinale Roscoe; DG, Angelica acutiloba Kitag; BC, Atractylodes macrocephala Koidz; CG, Ligusticum officinale Kitag; YG yeast, Issatchenkia orientalis adapted in Cinnamomum cassia J. Presl medium; GM yeast, Issatchenkia orientalis adapted in Anemarrhena asphodeloides Bunge medium; The result represent the mean±standard error of three independent experiments.; *p<0.05 compared with control group.

$$R = \frac{D(12 \sim 24)}{D(0 \sim 12)}$$

2.3.5. 질량 감소량 그래프의 불룩한 정도 (S)

엔센 부등식을 응용하여 아래와 같이, 배양 후 12시간부터 24시간까지의 질량 감소량의 2배에 0시간부터 12시간까지의 질량감소량과 24시간부터 36시간까지의 질량 감소량을 빼서 변수 S를 설정하였다. 변수 S는 질량 감소량 그래프에서 D(12~24) 부분의 불룩한 정도와 관련이 있다 (Fig. 2, 3).

$$S = 2 \cdot D(12 \sim 24) - D(0 \sim 12) - D(24 \sim 36)$$

2.4. 통계분석

소음인 약재, 소양인 약재 각각에 육계적응균과 지모적응균을 접종한 경우의 변수 R과 S의 차이를 통계적으로 검정하

였다 (Table 2, 3). 질량감소 그래프에서는 효모가 작용한 것을 확인하기 위해 D(36~46)과 대조군의 차이를 통계적으로 검정하였다 (Fig. 2, 3). 통계학적 분석을 위해 비모수적 방법인 윌콕슨 순위합 검정 (Wilcoxon rank sum test)을 사용하였으며 [18], 유의수준은 0.05로 하여 검정하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

소음인 약재와 소양인 약재 각각 4종에 대하여 육계적응균과 지모적응균을 각각 2개의 시험관에 동일하게 접종했으며, 3번의 반복실험을 시행하여 총 6번의 실험결과에 대한 평균과 표준오차 값을 그래프로 나타내었다 (Fig. 2, 3). 단, 대조군 실험은 실험당 한 개의 시험관에서 이루어져 총 3번의 반복실험에 대한 평균과 표준오차를 나타내었다.

정의된 두 개의 변수 R과 S에 대하여 통계적 분석이 이루어

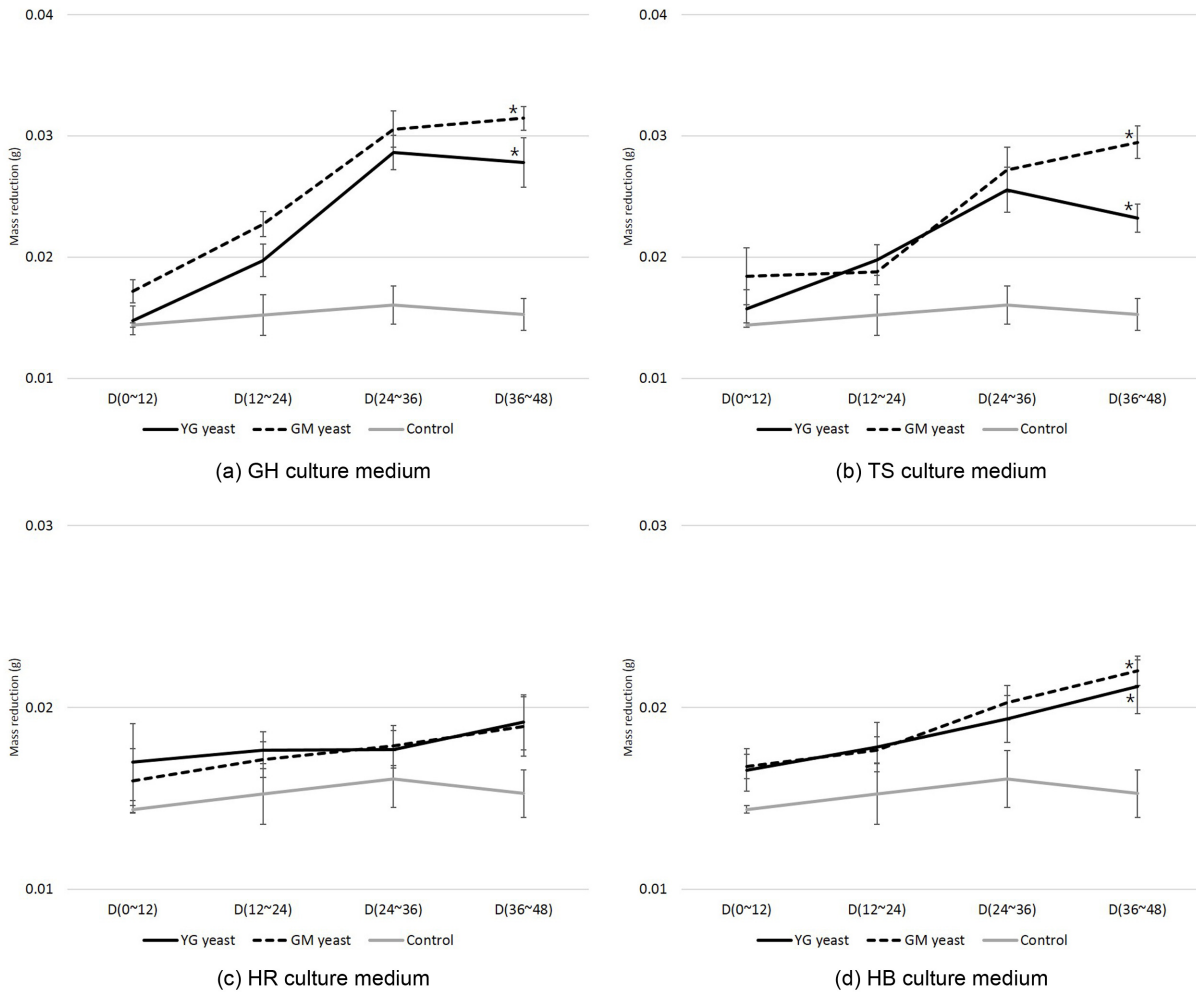


Fig. 3. Mass reduction rate pattern of herbal medicine for So-Yang type. GH, *Rehmannia glutinosa* Libosch. ex Steud; TS, *Alisma plantago-aquatica* ssp. orientale Sam; HR, *Coptis chinensis* Franch; HB, *Phellodendron chinense* C. K. Schneid; YG yeast, *Issatchenkia orientalis* adapted in *Cinnamomum cassia* J.Presl medium; GM yeast, *Issatchenkia orientalis* adapted in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge medium; The result represent the mean±standard error of three independent experiments.; **p*<0.05 compared with control group.

Table 2. Statistical analysis of two variables (R, S) about herbal medicine for So-Eum type

Yeast	Tube	1st experiment		2nd experiment		3rd experiment		Integrated analysis	
		R	S	R	S	R	S	R	S
YG yeast	[GG_1]	1.088	-0.005	1.595	-0.005	1.503	0.008	1.348	-0.001
	[GG_2]	0.882	-0.016	2.019	0.009	1.120	-0.007	1.218	-0.004
	[DG_1]	1.311	0.007	2.289	0.015	1.376	0.008	1.540	0.010
	[DG_2]	1.144	0.004	1.500	-0.005	1.448	0.009	1.365	0.002
	[BC_1]	1.193	0.004	1.637	-0.006	1.341	0.004	1.404	0.001
	[BC_2]	1.191	0.006	1.883	0.007	1.302	0.004	1.387	0.006
	[CG_1]	1.342	0.007	2.159	0.008	0.885	-0.014	1.349	0.001
	[CG_2]	1.335	0.006	2.418	0.018	1.461	0.009	1.621	0.011
	Mean±SD	1.19±0.14	0.00±0.01	1.94±0.32	0.01±0.01	1.30±0.19	0.00±0.01	1.40±0.12	0.00±0.01
GM yeast	[GG_1]	0.800	-0.018	1.516	-0.009	1.056	-0.011	1.038	-0.013
	[GG_2]	0.789	-0.017	1.753	-0.006	1.180	-0.007	1.115	-0.010
	[DG_1]	1.098	-0.012	1.385	0.004	1.206	-0.003	1.192	-0.004
	[DG_2]	1.095	-0.010	1.400	0.002	1.230	-0.006	1.220	-0.005
	[BC_1]	1.090	-0.006	1.568	-0.001	1.226	-0.005	1.241	-0.004
	[BC_2]	1.111	-0.011	1.517	0.006	1.140	-0.012	1.213	-0.006
	[CG_1]	1.116	-0.006	1.362	-0.006	1.021	-0.009	1.162	-0.007
	[CG_2]	1.000	-0.009	2.165	0.014	1.085	-0.007	1.327	-0.001
	Mean±SD	1.01±0.13	-0.01±0.00	1.58±0.25	0.00±0.01	1.14±0.08	-0.01±0.00	1.19±0.08	-0.01±0.00
p-value	0.028*	0.005**	0.038*	0.234	0.050*	0.028*	0.001**	0.001**	

$R = D(12\sim 24) / D(0\sim 12)$; $S = 2 \cdot D(12\sim 24) - D(0\sim 12) - D(24\sim 36)$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p-value was calculated by comparing YG yeast group and GM yeast group.; SD, standard deviation; GG, *Zingiber officinale* Roscoe; DG, *Angelica acutiloba* Kitag; BC, *Atractylodes macrocephala* Koidz; CG, *Ligusticum officinale* Kitag; YG yeast, *Issatchenkia orientalis* adapted in *Cinnamomum cassia* J.Presl medium; GM yeast, *Issatchenkia orientalis* adapted in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge medium.

Table 3. Statistical analysis of two variables (R, S) about herbal medicine for So-Yang type

Yeast	Tube	1st experiment		2nd experiment		3rd experiment		Integrated analysis	
		R	S	R	S	R	S	R	S
YG yeast	[GH_1]	0.953	-0.009	1.663	-0.003	1.241	-0.009	1.221	-0.007
	[GH_2]	1.080	-0.006	2.024	0.009	1.392	-0.004	1.446	0.000
	[TS_1]	1.010	-0.011	2.304	0.019	1.145	-0.007	1.366	0.000
	[TS_2]	0.947	-0.002	1.575	-0.002	1.101	-0.007	1.145	-0.004
	[HR_1]	0.925	-0.001	1.530	0.004	0.910	-0.002	1.040	0.000
	[HR_2]	0.868	-0.001	1.551	0.006	0.957	-0.001	1.037	0.001
	[HB_1]	0.885	-0.003	1.406	0.006	0.935	-0.005	1.075	-0.001
	[HB_2]	0.892	-0.002	1.492	0.006	0.982	-0.002	1.078	0.000
	Mean±SD	0.94±0.07	0.00±0.00	1.69±0.29	0.01±0.01	1.08±0.16	0.00±0.00	1.18±0.15	0.00±0.00
GM yeast	[GH_1]	0.972	-0.012	1.852	0.006	1.260	-0.002	1.310	-0.003
	[GH_2]	1.256	0.000	1.529	-0.003	1.243	-0.002	1.334	-0.002
	[TS_1]	0.836	-0.010	1.346	-0.007	0.976	-0.011	1.008	-0.010
	[TS_2]	0.776	-0.014	1.874	0.005	0.934	-0.011	1.032	-0.007
	[HR_1]	0.883	-0.002	1.325	0.004	1.015	0.000	1.047	0.001
	[HR_2]	0.954	-0.002	1.580	0.005	1.036	-0.002	1.100	0.000
	[HB_1]	0.957	-0.005	1.285	0.004	1.012	-0.006	1.079	-0.002
	[HB_2]	0.971	-0.005	1.326	0.004	0.856	-0.003	1.027	-0.001
	Mean±SD	0.95±0.13	-0.01±0.00	1.51±0.22	0.00±0.00	1.04±0.13	0.00±0.00	1.12±0.12	0.00±0.00
p-value	0.959	0.505	0.195	0.195	0.878	0.878	0.328	0.328	

$R = D(12\sim 24) / D(0\sim 12)$; $S = 2 \cdot D(12\sim 24) - D(0\sim 12) - D(24\sim 36)$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p-value was calculated by comparing YG yeast group and GM yeast group.; SD, standard deviation; GH, *Rehmannia glutinosa* Libosch. ex Steud; TS, *Alisma plantago-aquatica* ssp. orientale Sam; HR, *Coptis chinensis* Franch; HB, *Phellodendron chinense* C.K.Schneid; YG yeast, *Issatchenkia orientalis* adapted in *Cinnamomum cassia* J.Presl medium; GM yeast, *Issatchenkia orientalis* adapted in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge medium.

졌다. 1, 2, 3차 실험 각각에 대한 분석과 더불어 3번의 반복 실험의 평균을 구해서 통합분석 (Integrated analysis)을 실시 하였다.

3.1. 소음인 약재에 대한 결과 및 고찰

소음인 약재인 육계에 적용한 효모와 소양인 약재인 지모에 적용한 효모가 소음인 약재 4종에 접종되었을 때 질량 감소량

의 차이가 있을 것이라는 가설을 세우고 실험을 진행하였다.

Fig. 2에서 육계적응균에 의한 질량 감소가 지모적응균에 의한 질량 감소에 비해, D(0~12)에서 D(12~24)로, 더 많이 증가된 것을 확인할 수 있다. 이를, table 2에서는 변수를 이용한 통계적 분석으로 보였다. 1차, 2차, 3차 실험, 통합분석 모두에서 육계적응균을 접종한 경우가 지모적응균을 접종한 경우에 비해, D(0~12)에서 D(12~24)로의 증가율인 R이 유의하게 크게 나타났다 (Table 2, p 는 각각 0.028, 0.038, 0.050, 0.001). 또한, 1차, 3차 실험, 통합분석에서 육계적응균을 접종한 경우가 지모적응균을 접종한 경우에 비해 위로 불룩한 정도를 나타내는 변수 S가 유의하게 크게 나타났다 (Table 2, p 는 각각 0.005, 0.028, 0.001). 다만, 2차 실험에서는 변수 S가 유의하지 않았다 ($p=0.234$). 2차 실험에서는 결과가 유의하지 않았지만, 3번의 반복 실험에서 모두 같은 경향성을 보인 데에는 의미가 있다.

3.2. 소양인 약제에 대한 결과 및 고찰

소양인 약제 4종에 대해서도 소음인 약제에서와 동일한 분석이 이루어졌다 (Fig. 3, Table 3). 소양인 약제에서는 소음인 약제에서와 반대로 지모적응균이 육계적응균에 비해 변수 R과 S가 클 것으로 기대했다. 하지만 검정한 변수 R과 S에 대하여 유의한 차이를 관찰하지는 못했으며, 변수의 평균도 육계적응균에서 대체로 크게 나타났다.

택사의 경우, 소음인 약제와 유사한 질량감소 양상을 보여 예상과 달랐으며 (Fig. 3(b)), 황련의 경우 D(36~48)의 값과 대조군의 질량감소량이 유의한 차이가 없었다 ($p>0.05$). 황련의 항균작용으로 효모의 작용이 제한된 것으로 사료된다 [19].

소양인 약제에서는 소음인 약제에서와 같이 가설에 대한 유의한 결과를 얻지는 못했지만 소음인 약제에서와는 다른 양상이 나타난 것은 긍정적으로 사료된다.

3.3. 본 연구의 한계와 향후 개선 방안

본 연구에는 몇 가지 한계가 있다. 우선, 질량감소의 기전에 대한 분석이 이루어지지 않았다. 질량감소량은 미생물이 작용한 정도와 관련이 있다고 생각할 수 있지만 정확한 기전에 대한 연구는 따로 이루어지지 않았다. 그리고 실험에서 육계적응균과 지모적응균의 생균수를 일치시키지 못했다. 육계적응균과 지모적응균의 적응배양 조건을 동일하게 하고 소음인 약제와 소양인 약제에 동일하게 접종하였지만, 두 적응균의 생균수가 동일하다고 볼 수는 없다. 약제에 대한 반응을 정확하게 비교하기 위해서는 접종하는 균의 수가 같아야 한다. 또한, 본 연구는 *Issatchenkia orientalis* 단일 효모에 대한 실험의 결과로 일반화하기는 어렵다.

개선된 실험을 위해서는 균의 적응기간도 늘려야 한다. 본 연구에서는 32시간 동안 적응이 이루어진 효모가 쓰였는데, 효모가 특정 환경에 적응하기에는 다소 짧은 시간으로 사료된다. 앞으로 다양한 효모와 시료를 이용한 정량적 실험이 이어진다면 보다 정확한 사상의약(四象醫藥)의 실험적 근거를 얻을 수 있을 것이다.

4. CONCLUSION

한약의 사상의학적 분류를 실험적으로 밝히는 연구는 아직까지 거의 없었다. 본 연구는 사상의학 약제 분류에 대한 실험적 근거를 얻기 위해 진행하였다. 이에 육계와 지모 두 한약에 적응시킨 효모를 소음인 약제와 소양인 약제로 만든 배양한약에 접종하고 변수 R과 S를 분석하여 유의한 차이를 보였다. 소음인 약제의 경우, 육계적응균을 접종했을 때의 변수 R과 S가 지모적응균을 접종했을 때보다 크게 나타났다 (통합분석 $p=0.001, 0.001$). 소양인 약제의 경우는 R과 S에 유의한 차이가 없었으나 소음인 약제에서와는 다른 양상이 보인 데에는 의미가 있다 (통합분석 $p=0.328, 0.328$).

Acknowledgements

본 연구는 한국한의학연구원 기관고유 과제 ‘체질분석틀(SCAT)을 이용한 체질 분석, 관련 표현형 분석’ (K16810)의 지원을 받아 수행되었고 이에 감사드립니다. 또한, UST 현장연구 ‘본초현장실습’ 수업과정 중 진행된 실험과 그 성과물의 일부이며 한약재는 한국한의학연구원 한약표준표본관에서 분양 받아 사용하였으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, J. Y., and D. P. Duong (2009) Sasang constitutional medicine as a holistic tailored medicine. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* 6: 11-19.
- Kim, J. Y., G. Y. Kim, and J. M. Song (1998) An objectification method of constitutional discrimination using the constitutional panel. *J. Sasang Constitutional Med.* 10: 181-213.
- Lee, S. W., E. S. Jang, J. Lee, and J. Y. Kim (2009) Current researches on the methods of diagnosing Sasang constitution: An Overview. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* 6: 43-49.
- Cha, S., H. Yu, A. Y. Park, S. A. Oh, and J. Y. Kim (2015) The obesity-risk variant of FTO is inversely related with the So-Eum constitutional type: Genome-wide association and replication analyses. *BMC Complement. Altern. Med.* 15: 120-128.
- Kim, B. Y., H. J. Jin, and J. Y. Kim (2012) Genome-Wide association analysis of Sasang constitution in the Korean population. *J. Altern. Complement. Med.* 18: 262-269.
- Kim, B. S., H. S. Bae, C. Y. Lim, M. J. Kim, J. G. Seo, J. Y. Kim, J. E. Kim, and H. Kim (2013) Comparison of gut microbiota between Sasang constitutions. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/171643>
- Lee, J. M. and S. H. Choi (1966) *Longevity & life preservation in oriental medicine*. Kyung Hee University Press, Seoul, Korea.
- Kim, J. Y. (2000) *A research on the classification of herbal medicines based on the Sasang constitution*. Ph.D. Thesis. Dept. of Oriental Medicine Graduate School of Won Kwang University, Iksan, Korea.

9. Lee, B. H., K. B. Kwon, J. H. Han, and D. G. Ryu (2009) Bibliographical study on the constitutional foods in Korean medicine. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 23: 1207-1220.
10. Lee, S., S. Moon, H. Kim, and J. Kim (2007) A clinical study on the Sasang constitutional preference for foods. *Korean J. Oriental Med.* 13: 77-83.
11. Kim, J., S. Ahn, and I. Song (2004) A research on the radish based on the Sasang constitutional medicine (SCM). *Korean J. Oriental Med.* 10: 63-80.
12. Jin, M., S. Y. Ryu, and J. C. Joo (2014) Consideration on origin and efficiency in Sasang constitutional medicine of Mu tong. *J. Kor. Inst. Oriental Med. Inform.* 20: 1-8.
13. Park, Y. J. (2016) *Sasanguidam*. Bookk, Bucheon.
14. Shan, B., Y. Z. Cai, J. D. Brooks, and H. Corke (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 112-119.
15. Shin, H. (2013) *Development of honey fermentation yeast and honey-wine manufacturing process using Issatchenkia orientalis* MS-Thesis. Andong University, Andong, Korea.
16. Isono, N., H. Hayakawa, A. Usami, T. Mishima, and M. Hisamatsu (2012) A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 113: 76-78.
17. Korea Institute of Oriental Medicine. OASIS. <https://oasis.kiom.re.kr>. (2017).
18. Song, M., C. Park, and H. Kim (2015) *Nonparametric statistics*. Freecademy, Paju, Korea.
19. Yan, D., C. Jin, X. H. Xiao, and X. P. Dong (2008) Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by micro calorimetry. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 845-849.