

# 소청룡탕과 유산균 발효 소청룡탕의 약리효능의 비교

한종현\* · 이승용

원광대학교 한의과대학 약리학교실

## Comparing Medical Efficacy of Socheongyong-tang with Lactic Acid Bacteria Fermented Socheongyong-tang

Jong Hyun Han\*, Seung Yong Lee

*Department of Pharmacology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University*

To compare the medical efficacy of original Socheongyong-tang with fermented Socheongyong-tang, we've studied the two medicines according to the search for optimal bacteria and optimal conditions, component analysis, assessment of medical efficacy and toxicity, and have the result below. The results were obtained as follows: Considering bacterial growth, CO<sub>2</sub> gas emission and pH, we examined that using 3 kinds of bacteria(S. cerevisiae KCTC 7913, L. casei KCTC 3109, L. brevis KCTC 3102) is desirable. There is no main difference in optimum conditions between incubator and shaking incubator. And it is considered that ideal fermentation time is 2 days after vaccination. As the result of componential analysis of before and after fermentation, there's a noticeable decrease of total sugar and protein. But there's no alterations in total phenolics compounds and in total flavonoid compounds that influence on medical effect. The result was interpreted that it can promote the assimilation of herbal decoction after fermentation. As the result of medical efficacy assessment, we can check out that there is more anti-oxidating effects in fermented Socheongyong-tang, whereas anti-inflammatory effects and obesity-preventing effects were favorable in original Socheongyong-tang. And there is no main difference of whitening and COX-2 removing effects between before and after the fermentation. As a result of assessing weight change, hepatotoxicity and nephrotoxicity, we can not notice any unusual difference between before and after the fermentation. According to the results above, it is considered that we checked out the optimal bacteria and optimal conditions, advantages and disadvantages of the medical efficacy of original Socheongyong-tang and fermented Socheongyong-tang. And we suggest that there will have to be a following in-depth and systematic research on this subject in the future.

**Key words :** Socheongyong-tang, fermentation, anti-oxidant, anti-inflammation, obesity prevention, whitening effect, COX-2 removal efficacy

### 서 론

최근 경제성장에 비례하여 현대인들의 불규칙하고 부적절한 식습관과 환경오염, 스트레스 증가 등으로 건강에 대한 관심이 증대되고 있다. 그에 발맞추어 紅蓼를 필두로 한 많은 건강보조 식품이 활발하게 소비되고 있다.

예전에 주로 이용되었던 韓藥은 자연에 존재하는 다양한 動物, 礦物質 등을 乾燥 및 修治 등의 제한적 가공을 통해 湯劑,

\* 교신저자 : 한종현 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : gernie@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6842

· 접수 : 2010/12/10 · 수정 : 2011/03/28 · 채택 : 2011/04/06

丸劑, 散劑 정도로만 활용되어오고 있다. 한방 관련 산업은 놀랄 만한 성장을 하고 있으나, 일반 한의원의 補藥은 수요가 감소하여 최근에는 한의원에서도 단순한 補藥에서 탈피하여 많은 제형 변화를 시도하고 있다. 가장 대표적인 변화 중 하나가 바로 醱酵 韓藥이고, 건강보조식품도 醱酵紅蓼 등 많은 醱酵관련 제품이 출시되고 있다<sup>1)</sup>.

醱酵란 미생물의 작용에 의해서 有機物이 분해되어 인간에게 유용한 물질이 생성되는 현상으로, 생화학적 관점으로 보면 어떤 물질의 酸化에 의해 생성되는 수소가 呼吸에서와 같이 산소와 결합하지 않고 대사경로 중의 다른 중간 생성물의 還元에 사용되며, 그 때문에 무산소 상태에서 대사가 진행되어 대량의

대사산물이 축적되는 동시에 ATP가 생성되는 형식의 에너지 획득대사를 일컫는다.

醱酵의 종류로는 嫌氣醱酵과 好氣醱酵가 있다. 嫌氣醱酵는 酵母에 의한 알코올醱酵, 젖산균에 의한 젖산醱酵, 부티르산균에 의한 부티르산醱酵, 프로피온산균에 의한 프로피온산醱酵, 대장균에 의한 혼합산醱酵 등이 있으며, 好氣醱酵는 아세트산균에 의한 아세트산醱酵(산화醱酵), 곰팡이에 의한 유기산醱酵, 코리네형 세균에 의한 아미노산醱酵에서 시트르산·푸마르산 등의 유기산이나 글루탐산 등의 아미노산 생성醱酵, 미생물에 의한 페니실린·스트렙토마이신 등의 항생물질 생산, 석유 등의 탄화수소를 분해해서 증식하는 미생물을 이용한 유용 물질을 생산하는醱酵 등이 있다.

醱酵韓藥은 엄선된 한약재를 우수한 種菌으로 醱酵시켜, 원래 한약이 가지는 성질이 醱酵할 때 사용되어진 미생물의 성질에 의해서 약효가 증가하게 된다. 인체에 유익한 균들에 의해 한약은 醱酵되고, 菌이 가지고 있는 좋은 성분들을 같이 얻어 정밀한 여과장치를 거쳐 여과기를 통과하도록 해 맑고 순수한 성분을 모은 것이 醱酵韓藥이다. 즉 醱酵韓藥이란 한약재를 적당한 조건에서 醱酵시켜서 원래의 性과 효능이 효소 등 미생물에 의해 변화되어 증강되거나 새로운 효능이 생겨 임상에서 辨證論으로 다스릴 때 치료에 사용되는 한약을 말한다<sup>2)</sup>.

즉, 醱酵한약은 미생물을 이용하여 한약의 유효성분을 추출하는 것과 동시에 그 성분들을 活性化 시킨 것으로, 설비 투자비용의 증가·기술개발 시간의 소요·설치장소와 기술인력 필요·醱酵시간 등 많은 단점이 있지만, 일반한약에 비해 맛이 좋으며, 체내 흡수율이 좋아 약효가 빠르고 뛰어나며 소화도 용이하고, 색과 맛의 개성이 가능하고 농약 및 독성물질의 감소가 가능한 장점이 있다. 특히 한약재의 면역력 증진 효과를 더욱 향상시켜 면역력과 脾胃機能이 떨어지는 현대인들에게 적합한 방법이며 여러 종류의 질병에 도움이 된다.

醱酵韓藥은 이미 本草綱目이나 東醫寶鑑에서 神麴, 豆豉, 紅麴 등을 밝혀놓았으나 神麴과 豆豉등을 제외하고는 주로 한약에서 많이 활용되기보다 식품이나 민간요법에서 많이 사용되어져 왔다<sup>11-13)</sup>. 최근에는 醱酵紅蔘, 醱酵山蔘, 醱酵鹿角 등 일부 제약회사나 학회단위에서 보약과 관련한 醱酵韓藥에 대한 연구와 임상활용이 어느 정도 진행되고 있으나, 小靑龍湯과 같은 治療韓藥과 관련한 醱酵한약에 대한 연구는 미진한 상황이다<sup>15,17-19)</sup>.

이에 저자는 한의원에서 다용되는 處方 중 하나인 小靑龍湯을 연구의 대상으로 삼았다.

小靑龍湯은 漢代 張機의 傷寒論 (太陽病中編)에서 [傷寒, 表不解, 心下水氣, 乾嘔發熱而咳, 或渴, 或利, 或小便不利, 少腹滿, 或喘者, 小靑龍湯主之.]라고 처음 언급되어 外感風寒으로 水飲이 內停하게 되어 나타나는 肺寒症을 치료한다고 하였고, (太陽病中編) [傷寒, 表不解, 心下水氣, 咳而微喘, 發熱不渴, 服湯已, 渴者, 此寒去欲解也, 小靑龍湯主之.]라고 나와 있다.

金櫃要略에는 (痰飲病編) [咳逆倚息不得臥, 小靑龍湯主之.], (痰飲病編) [婦人吐涎沫, 醫反下之, 心下即, 當先治其吐涎沫, 小靑龍湯主之.]라고 언급되었고, 方藥合編 (中統 二十七寶)에 治傷寒

表不解 心下水氣 乾嘔 氣逆 發熱 咳喘 ① 服此渴者 裡氣溫 水欲散, 適應症은 氣管支炎, 喘息, 肺炎, 百日咳, 腎炎, 네프로제, 膀胱炎, 위산과다증, 感冒, 關節炎, 浮腫, 濕性肋膜炎, 濕疹, 癩疹, 排尿異常, 알레르기성비염, 트라코마, 肺氣腫, 호흡곤란이라고 나와 있다.

小靑龍湯에 대한 기존 研究를 살펴보면 다수의 실험연구로 金<sup>16)</sup>등은 鎮痛, 抗痙攣 효과를, 李<sup>8)</sup>등은 I형 및 IV형 Allergy 반응과 肺浮腫에 미치는 영향을, 車<sup>9)</sup>등은 asthma model 내의 cytokine에 미치는 영향을, 임상연구로 金<sup>10)</sup>등은 小靑龍湯合玉屏風散加味方의 알레르기 비염에 대한 효과를, 姜<sup>14)</sup> 등은 기관지천식에 사용되는 加味小靑龍湯의 임상적 효과 등을 보고한 바 있다.

小靑龍湯의 藥理<sup>5)</sup>를 보면 과량의 IgE의 분비를 억제하고, 비만세포막을 강화하며, Mast cell에서 화학물질의 유리를 억제하여 Allergy를 개선하고, 鎮咳작용, 기침과 천식에 鎮痙작용을 한다.

이처럼 小靑龍湯의 실험연구와 임상연구 및 약리작용에 대해서는 많은 연구가 존재하나, 醱酵小靑龍湯에 대한 연구는 거의 없는 현실이다.

이에 저자는 기존의 湯劑에 비해 증강된 효능과 더불어 여러 장점을 가진 醱酵韓藥에 대한 연구의 일환으로 小靑龍湯의 醱酵에 대해 문제점을 보완하고 객관적으로 검증하기 위해 연구를 진행하였고, 小靑龍湯에 알맞은 최적균주를 찾고, 성분을 분석하고 약리효능을 시행하여, 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 시료

小靑龍湯에 사용되는 한약재<sup>3)</sup>는 麻黃(보림제약, 원산지 중국), 芍藥(전남생약농업협동조합, 원산지 전남화순), 五味子(전남생약농업협동조합, 원산지 전남장성), 半夏(이레제약, 원산지 중국), 細辛(온니허브, 경북 야산), 乾薑(전남생약농업협동조합, 원산지 충남서산), 桂枝((주)한국허브, 원산지 중국), 甘草(온니허브, 경북 영진)에서 직접 구입하였고, 小靑龍湯 처방<sup>4)</sup>에 사용된 한약재 구성 및 첨당 중량은 麻黃, 白芍藥, 五味子, 半夏 各 1.5錢, 細辛, 乾薑, 桂枝, 甘草 各 1錢을 사용하였다. 그리고 모든 실험에 사용된 일반 시약은 Sigma Co.(USA)로부터, 미생물 배지(YM, MRS, Nutrient medium)은 Difco Co.(USA)로 부터 구입한 특급 시약을 사용하였다.

### 2. 탕약조제

발효 연구에 필요한 탕약은 약탕기에서 처방 한약제를 부직포에 넣고 물을 사용하여 1시간 30분간 약탕기에서 달인 후 냉각시켜 원심분리(8,000rpm × 25min, 10min, VS 24SMT, Vision Sci. Co, Korea)하였다. 그 후 상등액을 회수하여 여과지(Watman No. 2, 300 mm)로 여과하여 실험에 사용하였다. 발효 전 후 탕액은 추출 후 동결건조기(본디로, 일신 Lab, Korea)를 사용하여 2일간 건조하여 사용하였다.

### 3. 균주의 선별

탕약 발효를 위해 (주)서진바이오텍 부설 면역의학연구소에서 보유하고 있는 유산균류(Lactobacillus planatarum KCTC 3104, Lactobacillus reuteri KCTC 3677, Lactobacillus reuteri KCTC 3678, Lactobacillus mesenteroids KCTC 3718, Lactobacillus casei KCTC 3109, Lactobacillus brevis KCTC 3102), Bacillus subtilis KCTC 8289과 효모(Saccharomyces cerevisiae KCTC 7913)를 사용하였으며, 종균의 최적배양을 위해 유산균은 MRS배지에서, 효모는 YM배지, 고초균은 Nutrient 배지에서 혐기 조건으로 37°C에서 24시간 배양하였으며, 탕약 발효를 위해 균 접종량은 종균을 원심분리하여 회수한 후 살균된 증류수로 2회 세척하여 O.D. 660 nm에서 흡광도 1.0으로 조정된 액체를 1%(v/v) 접종하였다.

### 4. 균주의 성장확인

小青龍湯 발효균주의 성장을 확인하기 위해 UV-VIS spectrophotometer (UV-1700, Shimadzu Co., Japan)를 사용하여 660nm에서 측정하였으며, 탕약의 탁도를 고려하여 균체의 건조중량을 동시에 측정하였다. 건조중량은 배양시간별로 sampling한 시료 1 ml를 원심 분리하여 (15,000rpm × 10min, at 4°C) pellet을 수집하였으며, 이 pellet은 1 ml 증류수로 washing 한 후 다시 원심분리하여 상층 액은 버리고, pellet을 회수하였다. 이 과정은 2회 반복 실험하였으며, 회수된 pellet은 미리 건조하고 정량화된 eppendorf tube를 이용하여, 100°C dry oven에서 12시간 건조한 후 무게로서 정량 하였다. 또한 혐기 발효시 생성되는 CO<sub>2</sub>가스 생성 여부를 확인하기 위해 듀람관을 사용하였으며, 발효는 37°C에서 최장 48시간, 탕약 발효를 위해 균 접종량은 종균을 원심분리하여 회수한 후 살균된 증류수로 2회 세척하여 O.D. 660nm에서 흡광도 1.0으로 조정된 액체를 1%(v/v) 접종하였다.

### 5. 최적배양조건

#### 1) 종균배양배지

유산균의 종균 배양을 위해 MRS배지(Difco Co., USA)를 사용하였으며, 효모 균(Saccharomyces cerevisiae KCTC 7913)배양은 YM broth(Difco Co., USA), Bacillus subtilis KCTC 8289는 Nutrient broth(Difco Co., USA)를 사용하였다. 그리고 탕약 발효에는 탕약을 발효배지로 활용하고, 탄소원으로는 glucose(Sigma Co., USA)를 첨가하여 최적배지 배양조건을 검토하였다.

#### 2) pH 변화에 따른 균주 성장 검토

균주의 성장에 따른 배양액의 pH의 변화와 최적 pH조건을 pH meter(Neomet pH 220L, Istek Co. korea)를 사용하여 측정하였다.

#### 3) 정치배양과 진탕배양 조건하에서 균주생육 검토

小青龍湯 발효는 혐기발효로 진행하였으며, 혐기발효를 위해서는 250 ml 삼각플라스크에 50 ml 탕약배지를 넣고, 탕약 발효를 위해 균 접종량은 종균을 원심분리하여 회수한 후 살균된 증류수로 2회 세척하여 O.D. 660 nm에서 흡광도 1.0으로 조정된 액체를 1%(v/v) 접종하였다. 균주를 접종한 후 실리콘마개를 씌

운 후 37°C에서 배양하였으며, 정치배양은 항온배양기(VS 1203 PI-S, Vision Sci. Co., korea), 진탕배양은 진탕배양기(VS 8480 SFN, Vision Sci. Co., korea)를 사용하였다.

### 6. 발효탕약의 성분분석

#### 1) 총 당량<sup>31)</sup>

탕약의 전 당량을 측정하기 위해서 시료 용액 0.2 ml를 test tube에 넣고 5%(v/v) Phenol 용액 0.2 ml를 첨가한 후, 황산 1.0 ml를 반응액에 서서히 적하시킨 후 혼합하여 실온에 20분간 방치한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준당으로는 D-glucose (glucose 10 mg+DW 20 ml)를 사용하여 검량곡선을 작성한 후 비교하여 전 당량을 계산하였다.

#### 2) 환원당 정량

소청룡탕 탕약의 환원당량을 측정하기 위해 DNS solution은 1) 3,5-Dinitrosalicylic acid(DNS) 0.75 g/100 ml, 2) NaOH 1.4 g/100 ml, 3) Potassium sodium tartrate tetrahydrate 21.62 g/100 ml, 4) Phenol 0.54 g/100 ml, 5) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.59 g/100 ml을 조제하여 사용하였으며, 540 nm 흡광도값을 측정하였다.

#### 3) 단백질정량<sup>28)</sup>

Bradford Reagent은 0.1 g brilliant blue G-250 in 50 ml Methanol(high purity) 100 ml, 85% phosphoric acid 50 ml 증류수에 녹인 후 filtering하여 냉장 보관 하며, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 페놀화합물분석<sup>37)</sup>

페놀화합물 분석을 위하여 Phenol류와 Folin-Ciocalteu's reagent가 반응하여 생성된 청색의 착체 인몰리브덴산블루를 측정하게 되는데, 1 ml 탕약(1 mg/ml)에 46 ml D.W.를 넣고, 1 ml 2N Folin-Ciocalteu's reagent를 가한 후 3 min간 실온에 방치한다. 여기에 3 ml 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 넣고 다시 2 hours 동안 실온에 방치한 후 760 nm에 흡광도를 측정하였다. 표준용액 gallic acid를 사용하였으며, D.W. 1 ml에 gallic acid 5 mg을 넣고 녹인 후 희석하여 검량곡선을 작성하여 측정값을 계산하였다.

#### 5) 플라보노이드 화합물분석

Flavonoid류와 AlCl<sub>3</sub><sup>3+</sup>가 반응하여 생성된 노랑색의 착체를 측정하는 방법으로, 0.5 ml 탕약(1 mg/ml)에 0.5 ml 2% AlCl<sub>3</sub> (in EtOH)를 넣고 반응시켜 1시간 동안 실온에 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 Rutin을 사용하였다. 표준물질은 Ethanol 1 ml에 Rutin 1 mg을 넣고 용해시킨 후 희석하여 검량곡선을 만들었 총 플라보노이드 화합물을 분석하였다.

### 7. 약리효능평가

#### 1) 항균

항균활성은 Filter Paper disc method를 사용하였으며, 사용된 균주로는 E. coli, S. typhimurium, S. aureus, B. subtilis, C. albicans를 사용하였다. 시험균주를 37°C로 TSB에서 mid-logarithmic phase까지 배양하였고, 항균활성을 측정하고자 하는 시료들은 일정농도를 취하여 멸균된 증류수 (50 µl)에 녹인 후, paper disk에 흡수시켜 건조하였다. 배양한 균주는 원심분리

(10분, 2,000 × g)한 후 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 6.7)로 3회 반복하여 세척한 후 배양한 균액 100 μL (A 570 nm = 0.1)를 Trypticase Soy Agar (TSA)에 도말하고 준비한 paper disk를 배지 위에 일정간격으로 정치시켜 37 °C에서 18 시간동안 배양하여 항균활성을 측정하였다.

2) 항산화(DPPH method)<sup>32)</sup>

항산화활성을 측정하기 위해 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity, Superoxide anion scavenging activity, Ferric thiocyanate activity를 측정하였다. 전자공여능(EDA: electron donating ability) 측정법으로 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. DPPH radical 제거 효과는 추출물의 DPPH에 대한 전자공여효과로 시료의 환원력을 측정하는 방법에 의하여 측정하였다. 시료 용액 10 μL(control: 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH (in 99.5% ethanol) 용액을 190 μL를 가하고, vortex mixer로 10초간 진탕하여 37°C에서 30분 동안 반응 시킨 후, Microplate Reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로는 시료 대신 methanol을 10 μL 첨가하여 반응시켰고, 양성대조군으로는 L-ascorbic acid, caffeic acid를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 대조군에 비하여 감소된 흡광도로부터 radical 제거율을 계산하였다.

$$EDA(\%) = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

Sample O.D. : 시료를 가진 시험액의 흡광도  
Control O.D. : 시료를 가지지 않은 시험액의 흡광도

3) 항염증<sup>20,21)</sup>

COX-2(Cyclooxygenase-2) 의 저해활성을 측정하였다. 실험 방법은 다음과 같다: 96 well plate의 2 well 에 10 μL heme, 10 ul assay buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.0) 그리고 10 μL solvent (inhibitor를 녹였던 용매)를 첨가하였다. Background well에는 2 well 에 10 μL heme, 10 ul assay buffer 그리고 10 μL의 solvent를 첨가하였고, 100% initial activity 측정을 위해 2 well 에 10 μL heme, 10 ul 효소(COX-2) 그리고 10 μL의 solvent를 첨가하였다. Sample(inhibitor)의 COX 저해활성측정을 위해 2 well에 10 μL heme, 10 μL 효소 (COX-2) 그리고 10 μL의 sample을 첨가하였다. Standard inhibitor로는 Indomethacin을 dimethyl sulfoxide 에 녹여 처리하였고, Sample은 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 녹여 농도별로 처리하였으며, 모든 well에 200 μL의 assay buffer를 첨가하여 실온에서 반응시킨 후, Luminometer(SpectraMax L, Molecular devices, USA)에 부착되어 있는 2개의 dispenser를 이용하여 하나의 dispenser로 모든 well에 10 μL의 chemiluminescent substrate를 첨가하고, 즉시 다른 하나의 dispenser를 이용하여 50 μL 의 arachidonic acid를 첨가한 후 Relative Luminescent Units (RLU)를 Luminometer로 측정하였다.<sup>38,39)</sup>

4) 세포독성 측정(MTT assay)

MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아 활성도의 indicator

로서 세포생존의 index 로 주로 사용되고 있다. 즉, 생존세포의 active mitochondrial dehydrogenase는 MTT를 절단하여 formazan을 생성하게 되는 데 이 양은 곧 대사적으로 활동적인 세포의 수와 직접적인 상관관계에 놓여있다. 시료를 농도별로 처리하고 세포배양 20시간이 지난 후, 5 mg/ml 의 MTT 시약을 이용하여 0.1 mg MTT/(200 ul) well 에 넣고 2시간 동안 배양하였다. 각 실험군당 well 수는 3으로 하였고, 배양 후 상등액을 제거하고, 200 ul 의 PBS 로 세척한 후, 100 ul의 DMSO를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA microplate reader(Model: MQX200R, BioTek, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존률은 control cell 에 대한 백분율로 표시하였다 [i.e. viability (% of control) = 100×/(absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

5) NO생성 저해능 측정<sup>33)</sup>

Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양을 LPS 처리 후, 20 시간에 있어서 측정하였으며, 각 실험군당 well 수는 3으로 하였다. 96 well plate에 세포배양 상등액 100 μL와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 150 μL를 혼합한 후, 5분 동안 반응시켜 ELISA microplate reader(Model: MQX200R, BioTek, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선 작성을 위해 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 표준품으로 사용하여 비교하였다.

6) 전지방 감소율

(1) Oil Red O staining

생체 외 실험으로 전 지방세포(preadipocyte)인 3T3-L1 세포가 지방세포의 대사과정을 연구하는데 널리 이용되고 있다. 3T3-L1 세포를 배양액을 이용하여 5%로 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 온도는 37°C로 배양하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제(antibiotics)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)을 사용하며, 2-3 일 간격으로 배양세포 포면을 인산 완충염 용액 (phosphate buffered saline,PBS)으로 세척한 후 0.5% 트립신(trypsin)을 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양하였다. 세포를 개별 실험에 사용할 때는 분화유도물질인 인슐린(5 μg/ml), dexamethasone (DEX, 0.25 uM), 1-methyl- 3-methylxanthine(MIX, 0.5 mM) 이 함유된 분화유도 배양액으로 교환하여 1-3일간 배양하여 지방세포로 분화를 유도한다. 배양 3일 후 인슐린만 함유하는 배지로 2-3일간 배양한 후 인슐린을 제거한 배양액으로 바꾸고, 중성지방으로 유입되는 포도당 측정 실험이나 포도당 산화 실험에는 10-12일 째에 저 농도 (5 mM) 포도당을 함유한 배양액으로 배양한다. 항비만효과 물질 처리는 분화유도 전 혹은 분화유도 후에 처리하였다.

7) 미백효과<sup>6,7)</sup>

멜라닌 합성과정의 속도 결정 단계를 촉매하는 tyrosinase의 활성 저해율을 측정하여 미백 성분의 효과를 평가하는 방법으로, 0.1 M Na-phosphate buffer(pH 6.5) 183 μL 에 test sample 17 μL 과 17 μL의 mushroom tyrosinase(2000 Unit/ml), substrate(tyrosine) 33 μL을 첨가하여 최종 반응액이 250 μL이 되

도록 96-well microplate 에 넣는다. 이 반응액을 37℃에서 15분 간 배양한 후, 신속하게 ice에서 5분 동안 방치하여 반응을 중단 시킨 후, microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 490 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, Tyrosinase의 활성 저해율은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율 (\%)} = \frac{100-(b-b')}{a-a'} \times 100$$

a : 공시료액의 반응 후 흡광도  
 b : 시료액의 반응 후 흡광도  
 a', b' : tyrosinase 대신 완충액을 처리한 흡광도

## 결 과

### 1. 小青龍湯 발효에 사용된 발효균주의 선별

탕약 발효를 위해 식용 가능한 유산균류(Lactobacillus planatarum KCTC 3104, Lactobacillus reuteri KCTC 3677, Lactobacillus reuteri KCTC 3678, Lactobacillus mesenteroids KCTC 3718, Lactobacillus casei KCTC 3109, Lactobacillus brevis KCTC 3102), Bacillus subtilis KCTC 8289과 효모 (Saccharomyces cerevisiae KCTC 7913)를 사용하여 탕약의 최적 발효 균주를 선별하였다. 그 결과, Lactobacillus planatarum KCTC 3104, Lactobacillus reuteri KCTC 3677, Lactobacillus mesenteroids KCTC 3718, Lactobacillus casei KCTC 3109, Lactobacillus brevis KCTC 3102, Saccharomyces cerevisiae KCTC 7913가 小青龍湯 발효에 사용이 가능한 균주로 확인 되었다(Table 1). 그리고 유산균 혐기발효에서 최적 발효의 기준으로 판단할 수 CO<sub>2</sub>생성 유무를 튜브관을 이용하여 확인 한 결과 S. cerevisiae KCTC 7913에서 가장 뚜렷한 결과를 확인할 수 있었 으며, L. mesenteroids KCTC 3718, L. casei KCTC 3109, L. brevis KCTC 3102에서 CO<sub>2</sub>가스 생성능이 확인 되었다(Table 2). 따라서 小青龍湯 발효와 관련해서 사용가능한 균주로는 균 성장 과 CO<sub>2</sub>가스 생성능의 결과로 볼 때 S. cerevisiae KCTC 7913, L. mesenteroids KCTC 3718, L. casei KCTC 3109, L. brevis KCTC 3102를 사용하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

### 2. 균주별 발효전과 발효후의 pH변화

小青龍湯 발효에 사용될 균주에 대한 발효전과 발효후의 pH변화량을 살펴보았다(Fig. 1). 小青龍湯 발효 전 pH는 3.82였 으나, 37℃에서 48시간 진탕 배양 후 L. mesenteroids KCTC 3718는 pH 3.82, L. casei KCTC 3109는 pH 4.14, S. cerevisiae KCTC 7913는 pH 3.77, L. brevis KCTC 3102는 pH 3.78로 L. mesenteroids KCTC 3718, S. cerevisiae KCTC 7913, L. brevis KCTC 3102는 pH가 동일하거나 감소하였으며, L. casei KCTC 3109는 소폭 증가함을 알 수 있었다. 이것은 균주의 생육특성과도 관련이 있으며, 대부분의 유산균들이 장내에서 산성조건하에서 생존하기 때문에 pH의 변화에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인 되었다. 이는 거의 대부분의 탕약이 산성으로 균 성장에 특별한 저해요소가 발견되지 않는 한 무난하게 발효가 진행될

것으로 판단된다.

Table 1. Selection of strain for Socheongyong-tang fermentation

Strains	Socheongyong-tang	Optimal medium
L. planatarum KCTC 3104	+	+
L. reuteri KCTC 3677	+	+
L. reuteri KCTC 3678	-	+
L. mesenteroids KCTC 3718	+	+
L. casei KCTC 3109	+	+
S. cerevisiae KCTC 7913	+	+
L. brevis KCTC 3102	+	+
B. subtilis KCTC 1021	-	+

+, Cell growth ; -, None, \* Optimal medium : MRS medium(Lactobacillus planatarum KCTC 3104, Lactobacillus reuteri KCTC 3677, Lactobacillus reuteri KCTC 3678, Lactobacillus mesenteroids KCTC 3718, Lactobacillus casei KCTC 3109, Lactobacillus brevis KCTC 3102), YM medium(Saccharomyces cerevisiae KCTC 7913), Nutrient broth(Bacillus subtilis KCTC 8289)

Table 2. Carbon dioxide generation test by Socheongyong-tang fermentation

Strains	Socheongyong-tang	Optimal medium
L. planatarum KCTC 3104	-	-
L. reuteri KCTC 3677	-	++
L. reuteri KCTC 3678	-	++
L. mesenteroids KCTC 3718	+	++
L. casei KCTC 3109	+	+
S. cerevisiae KCTC 7913	++	+
L. brevis KCTC 3102	+	++
B. subtilis KCTC 1021	-	-

+, Below 1/5 CO<sub>2</sub> generation; ++, More than 1/5 CO<sub>2</sub> generation

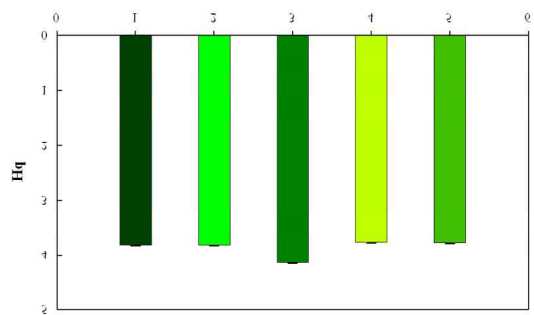


Fig. 1. Change of the pH that fermentation is later for strains 48 hours. 1. Control, 2. L. mesenteroids KCTC 3718, 3. L. casei KCTC 3109, 4. S. cerevisiae KCTC 7913, 5. L. brevis KCTC 3102

### 3. 선별된 균주 별 pH변화에 따른 생육조건 검토

균 성장과 관련된 최적 pH를 확인하기 위하여 산성 pH 2.0, 약산성 pH 6.0, 약알칼리성 pH 8.0에 대한 균 성장에 대한 상대 적인 비교를 실시하였다. 그 결과 L. mesenteroids KCTC 3718는 pH 2.0에서의 생육이 pH 6.0에서 보다 1.8배 높은 것으로 확인되 어 내산성이 아주 강한 유산균으로 확인 되었으며, L. casei KCTC 3109, L. brevis KCTC 3102는 약산성과 산성에서 생육이 좋은 것으로 확인 되었다. 그리고 S. cerevisiae KCTC 7913는 약 산성과 약 알칼리에서 생육이 좋았다. 내산성이 아주 우수한 L. mesenteroids KCTC 3718는 통상적인 발효에서 내산성 실험을 제외하고는 이용가능성이 떨어지고, 생체 내가 아닌 생체외부에서 발효가 진행되기 때문에 한약발효에는 적합하지 않은 것으로

판단된다. 따라서 산성과 알칼리에서 성장이 우수한 세 균주(*L. casei* KCTC 3109, *L. brevis* KCTC 3102, *S. cerevisiae* KCTC 7913)를 小青龍湯 발효실험에 이용하는 것이 바람직할 것으로 판단되며, 탕약의 특성과 성질, 발효의 안정성을 고려하여 혼합배양을 통한 발효조건을 검토하였다(Fig. 2).

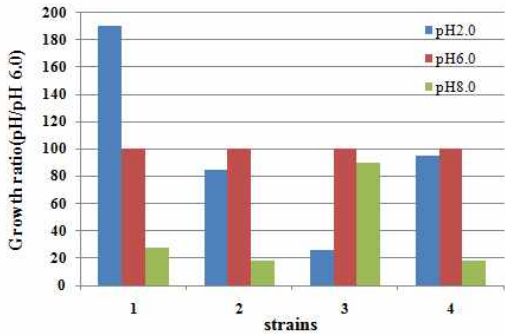


Fig. 2. Effect of cell growth by pH of media. Growth ratio by adjusted pH in optimal media (initial pH ~ 6.5) at 37°C for 24h under anaerobic condition. Cell was inoculated at levels of 10% into 200 ul. Used media was MRS media, YM media.(1. *L. mesenteroids* KCTC 3718, 2. *L. casei* KCTC 3109, 3. *S. cerevisiae* KCTC 7913, 4. *L. brevis* KCTC 3102)

4. 혼합 균주를 이용한 배양 형태별 생육활성 검토

정치배양과 진탕 배양 시 혼합 발효균주의 생육조건을 검토하였다. 그 결과 정치배양과 진탕배양 했을 때 균 성장에는 큰 변화가 없는 것으로 확인 되었다(Fig. 3).

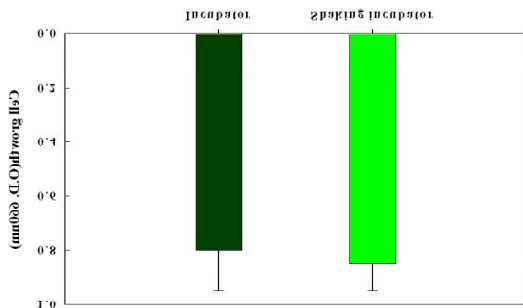


Fig. 3. Change of the cell growth in incubating type.

5. 혼합균주 최적배양시간 및 조건검토

균 성장과 유산균이 생산하는 총 Lactic acid 생성량 pH의 변화 등을 분석한 결과 혼합균주에 있어서 배양시간은 1일(24hr)이 가장 높은 성장을 보이고 있다. 그러나 탕약의 특성과 균의 성장, lactic acid 생성량을 종합해서 해석해 볼 때 충분히 반응시간을 부여하고 숙성도를 고려해 본다면 균 접종 후 2일이 가장 적합할 것으로 판단된다(Fig. 4).

6. 小青龍湯 발효 탕약의 성분분석

1) 혼합 배양 후 발효 시간에 따른 색깔 풍미의 변화

대조군에 비해 발효가 진행될수록 색깔이 얼어지는 것을 볼 수 있으며, 약맛은 발효 전에 비해 약간 부드러우면서 약간 신맛이 더하며, 향은 유산균의 특유취가 있어 먹기가 편한 것으로 판

단된다(Fig. 5).

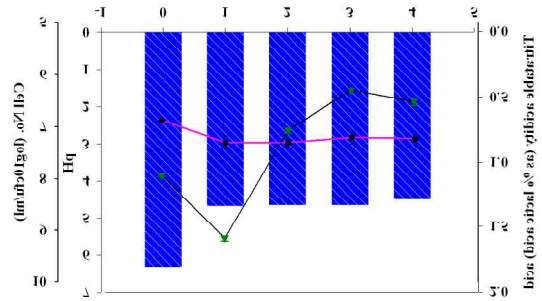


Fig. 4. Microbial population, pH changes, and lactic acid concentration in SCRT during fermentation at 37°C. pH of SCRT was adjusted to pH 6.5. Lactic acid bacteria were inoculated at levels of 10% into 20 ml, and incubated on static condition. ( pH (■), lactic acid (●), Cell cfu (▲) (n = 2)



Fig. 5. Change of a color in culture time.

2) 혼합배양시간에 따른 탕약구성성분의 변화

小青龍湯 발효액을 단백질, 탄수화물, 환원당을 기준으로 분석한 결과 발효가 진행 될수록 탕약 내 존재하는 단백질은 감소되고, 전분당을 포함해서 환원당이 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 발효과정 중에 균주가 생성하는 효소에 의해 분해 된 것으로 판단된다. 이러한 변화는 발효과정 중에 특별한 탄소원이나 질소원을 공급하지 않고 탕약으로 직접 배양하기 때문이 균주가 생육에 필요한 에너지원으로 사용하기 분비하는 것으로 판단 된다(Fig. 6).

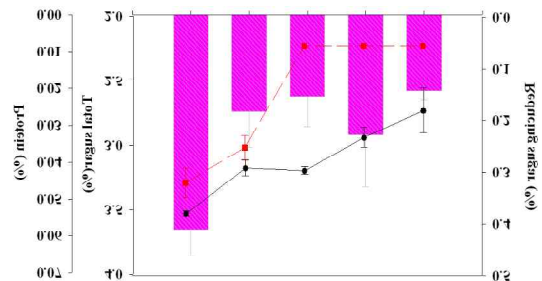
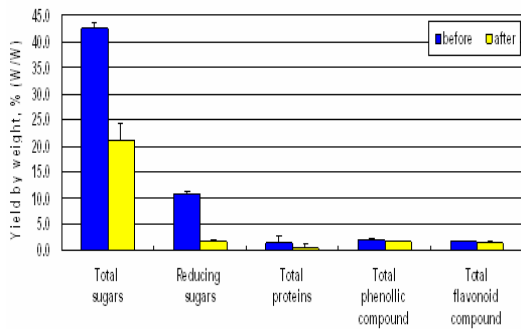


Fig. 6. Concentration of protein, total sugar, and reducing sugar in SCRT during fermentation at 37°C. pH of SCRT was adjusted to pH 6.5. Lactic acid bacteria were inoculated at levels of 10% into 20 ml, and incubated on static condition. Protein (pink:■), total sugar (black:●), reducing sugar (red:▲) (n = 2)

3) 小青龍湯 발효 전과 후의 당약의 성분분석

小青龍湯을 발효하기전과 후의 당약 내 존재하는 Total sugar, 환원당, 단백질, 페놀화합물, 플라보노이드 화합물을 분석한 결과 발효에 영향을 미치는 당과 단백질은 현격하게 감소하는 경향을 보이지만 약효에 영향을 미치는 페놀화합물과 플라보노이드 화합물은 전혀 균주에 의해 분해되지 않는 것으로 확인되었다. 이것은 난소화성 탄수화물과 단백질을 균이 분해함으로써 당약의 소화 흡수를 촉진 시켜줄 수 있다는 것을 입증하는 결과로 해석된다(Fig. 7).



Yield by weight, % (W/W)					
Fermentation	Total sugars <sup>a)</sup>	Reducing sugars <sup>b)</sup>	Total proteins <sup>c)</sup>	Total phenolic compound <sup>d)</sup>	Total flavonoid compound <sup>e)</sup>
before	42.67±0.87	10.68±0.42	1.45±0.13	2.05±0.15	1.59±0.20
after	21.11±3.19	1.75±0.19	0.55±0.04	1.74±0.00	1.55±0.16

a) g total sugars/g sample: Glucose equivalents(mean±S.D.;n=2) b) g reducing sugars/g sample: Glucose equivalents(mean±S.D.;n=2) c) g total proteins/g sample: BSA equivalents(mean±S.D.;n=2) d) g total phenolic/g sample: Galic acid equivalents(mean±S.D.;n=2) e) g total flavonoid/g sample: Rutin equivalents(mean±S.D.;n=2)

Fig. 7. Change of compound in fermented liquid by strains.

7. 약리효능평가

1) 발효 전 · 후의 항균활성비교

小青龍湯에 대한 발효 전 · 후의 항균활성(E. coli, S. typhimurium, S. aureus, B. subtilis)을 비교한 결과 우수한 항균활성을 확인할 수는 없었으며, 발효 전 · 후의 변화도 없었다(Table 3).

Table 3. Antimicrobial activities of 3 decoctions, which were selected by disc-paper method, against bacteria or yeasts

Strains	Fermentation	Clear zone(mm)		Remark
		Results	Control (Ampicillin/Amphotericin B)	
E. coli	Before	-	11	
	After	-		
S. typhimurium	Before	-	24	
	After	-		
S. aureus	Before	-	29	
	After	-		
B. subtilis	Before	8	22	
	After	9		
C. albicans	Before	-	-	
	After	-		

2) 발효 전 · 후의 항산화 활성비교

산소를 이용하여 대사를 하는 생명체내에서 산소의 대부분

은 세포내의 미토콘드리아에서 호흡 체인을 거치면서 물로 환원되지만, 일부의 산소들은 부분 환원되는 과정에서 중간 대사물을 생성하는데, 이것들을 reactive oxygen species(ROS)라고 하며 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical(OH<sup>-</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등이 여기에 속한다. ROS는 화학 반응성이 강하기 때문에 저 농도에서는 세포내 신호전달 물질 역할을 하지만 고농도에서는 지질, 단백질, 핵산 등 기존 분자 구조를 변형시켜서 세포의 손상을 일으킬 수 있다. 그러므로 산소를 이용하는 모든 생명체는 진화 과정에서 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxide(GPX) 등의 효소나 혹은 vitamin과 같은 물질을 통해서 이들을 소거하여 세포를 보호하고자 하는 기전을 가지게 되었다. 그러나 ROS의 생성이 과도하거나 또는 antioxidant reserve가 비정상적으로 줄어들면 양자의 균형이 무너지는데 이러한 상태를 oxidative stress라 하며 oxidative injury로 인해 생체조직의 구조와 기능에 이상을 초래할 수 있다. Redox state는 흔히 환원 glutathione과 산화 glutathione의 비(GSH/GSSG)로서 표현되는데 이는 세포내 oxidative stress를 나타내는 예민한 지표이다. 활성산소들은 혼자서 존재하거나 활동하는 일이 없다. 이들은 전형적으로 연쇄반응의 산물이며 하나의 활성산소가 다른 활성산소를 생성시킨다. 'superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)'이라고 불리우는 것은 호흡에 의하여 들이마신 산소가 영양분을 태워서 에너지를 만들 때 발생하는 것이다. Superoxide radical은 세포내의 미토콘드리아에서 끊임없이 발생하는데 체내에서 장시간 머물러 있다. 이는 부대전자를 가진 free radical이며 체내에 가장 많이 존재한다<sup>36)</sup>. Superoxide radical이 한 개의 전자를 받아서 'hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'가 된다. Hydrogen peroxide 자체는 그 만큼 활성이 높지 않지만 체내에 있는 철 이온과 같은 금속이온과 반응하면 즉시 활성력이 강한 'singlet oxygen(O<sub>2</sub>)'이나 'hydroxyl radical(OH<sup>-</sup>)'로 변한다. Hydroxyl radical은 강한 산화력을 가진 활성산소이다. 활성산소의 그룹은 아니지만 활성산소로 말미암아 동일한 독성을 가지는 것이 'lipid peroxide'이다. 이것은 불포화지방산이 활성산소에 의해서 산화된 것으로서 다른 불포화지방산을 산화시켜 차례로 lipid peroxide를 증대하여 간다. 또 다른 free radical은 'nitric oxide(NO)'로 지질과 반응하여 lipid peroxide을 만든다(Fig. 8).

이들 활성산소는 세포구성 성분들에 대하여 비 선택적, 비 가역적인 파괴 작용을 함으로써 지질을 산화시키고 단백질도 변성을 초래하여 세포막이 파괴되고, DNA도 손상을 입혀 백내장, 당뇨병, 간염, 신장염, 아토피성피부염, 관절염, 위염, 기미, 주근깨, 주름, 백내장, 파킨슨씨병, 알츠하이머형 치매 등 난치병의 90% 이상을 일으킨다<sup>34)</sup>. 또한 정상세포의 유전자의 고리를 절단하여 최초의 단일한 암세포를 만드는 발암과정에도 깊게 관여하고 있다. 따라서 최근 암, 당뇨, 뇌질환, 심혈관질환 등 모든 성인병의 원인을 oxidants와 antioxidants의 밸런스의 파괴에 의한 결과로 해석하는 시각이 대두되고 있으며, 이들 질병의 치료 및 예방을 위한 목적으로 항산화 물질에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 항산화 물질의 역할은 크게 금속 이온의 착염화 기능, enzyme 활성화와 enzyme 유사활성 물질에 의한 free radical

포집력으로 radical 반응을 종결시켜 이들 활성산소에 의한 지방질 산화 및 DNA의 손상을 억제시킴으로써 동맥경화, 심장병 예방, 노화 억제 등의 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisol)와 같은 합성 항산화제의 경우 과다 복용 시 여러 가지 질병을 유발하는 것으로 알려져 안전성의 문제가 제기되고 있다<sup>35)</sup>. 또한, 웰빙에 대한 사람들의 욕구증대로 합성품의 사용에 대해 경계하는 추세이므로, 각종 질병의 예방에 밀접한 관계를 맺고 있는 천연물을 이용한 천연 항산화제 개발이 절실하다.

항산화활성은 어떤 성분이나 물질 등이 산화분해를 억제하는 능력을 말하며, 항산화 활성을 측정하는 방법으로 DPPH법을 사용하였다. 이 방법은 원래 천연에 있는 수소공여체 (H-donor)를 측정하기 위해 고안되었으나 이후 페놀성 물질이나 식품의 free radical 소거활성을 측정하는데 사용되었다. 또한, 이 방법은 안정한 자유라디칼인 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH)이 수소공여체(H-donor)와 반응하는 능력을 원리로 하여 측정하는 것으로, DPPH는 가시광선 영역에서 매우 강한 흡수를 보여주기 때문에 UV-Vis 분광광도계로 측정할 수 있어 항산화 활성측정에 일반적으로 광범위하게 이용되어진다.

본 연구결과 발효액분말을 동결건조 후 정량해서 농도별로 발효 전·후의 항산화활성을 비교하였다. 대조군으로 BHA, Ascorbic acid를 사용하였으며, 농도별 항산화 효과가 이들 두 대조군에 비해 높지는 않았지만 발효 전보다는 小靑龍湯 발효액의 항산화 효과가 개선되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 9).

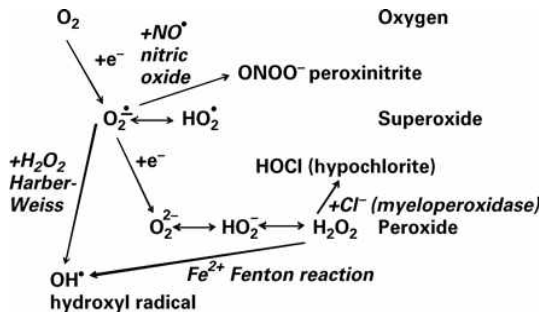


Fig. 8. Derivation of reactive oxygen species from oxygen.

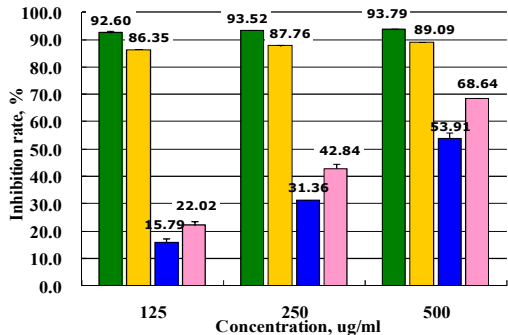


Fig. 9. Free radical scavenging activities of different amounts of sample measured by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl decoloration system. The absorbance values were converted to scavenging effects(%) and data as the means of replicate scavenging effects(%) ± 1 S.D. (n=2) against extract concentration in mg extract per ml reaction volume. Symbol, Positive control: green, Ascorbic acid: yellow, BHA, Sample: blue, before: pink, after.

3) 발효 전·후의 항염증 활성비교

통상 항염증 활성을 분석하는 방법에는 대식세포 Raw 264.7 cell에 LPS 자극을 통한 항염증을 분석하는 방법과 마우스를 이용하는 방법, COX kit를 사용하는 방법 등 다양한 분석방법이 있다. 그 중 본 실험에서는 효소반응을 통한 저해활성을 분석하는 방법인 Chemiluminescent COX inhibitory screening assay를 통하여 항염증 활성에 대한 효과를 측정하였다. 이 방법의 경우 최근에 개발된 방법으로 빠르게 항염증 활성을 동시분석이 가능한 방법으로 알려져 있으며, 항염증과 관련된 많은 논문에서 이 방법을 사용하고 있다<sup>22-25)</sup>. Cyclooxygenase(COX)효소는 물리적 자극에 의해 염증이 발생할 경우 COX-1효소가 발현하고, 염증 자극에 의해서는 COX-2효소가 발현하는데 이것은 세포에 상처가 나게 되면 아라키돈산(Arachidonic acid)이 COX효소에 의해 산화되어 prostaglandin으로 전환되면서 염증이 발생하게 된다<sup>26)</sup>. COX실험의 목적은 바로 이러한 효소의 발현을 억제하는 정도가 얼마인가에 따라 항염증활성이 좋고 나쁘다가 결정된다. 효소(COX)의 활성에 대한 억제율(저해율)이 높을수록 항염증 활성이 높은 것으로 판단하면 된다<sup>29,30)</sup>.

본 실험에서는 발효전과 후의 탕약에 대한 COX-2 저해 효과를 희석배율별로 확인하였다. 그 결과 항염증 효과는 원방에 비해 다소 떨어지는 것으로 확인 되었다(Fig. 10). 이것은 발효과정 중 균주들로 부터 생성되는 부산물들의 의해 일부 영향을 받는 것으로 판단되지만 약효에 큰 영향을 줄 수 있을 것으로는 판단되지 않는다.

4) 세포독성 측정(MTT assay)

본 실험에서는 小靑龍湯 원액과 발효액에 대해서 대식세포에 영향을 줄 수 있는 최소농도를 검증하기 위하여 세포독성 실험을 실시하였다. 대식세포인 RAW 264.7 세포를 사용하여 대식세포의 자극 유발원인 LPS를 대식세포에 처리한 후, MTT assay 방법으로 세포 생존율로서 세포독성 유무를 확인하였다. 그 결과 탕약이나 발효액 모두에서 50배, 100배, 500배 희석액 모두에서 80%이상의 세포 생존율을 보였다. 따라서 小靑龍湯을 세균주를 이용하여 발효를 진행하더라도 세포독성에는 아무런 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 11).

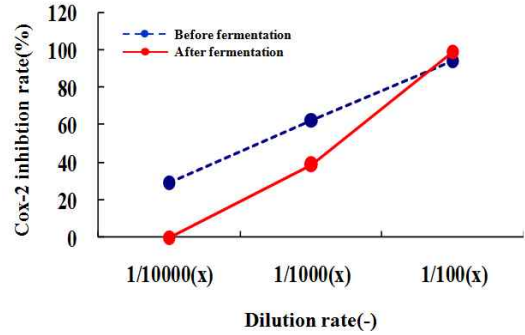


Fig. 10. Comparison of COX-2 inhibition rate by fermented Socheongyong-tang and Socheongyong-tang.

5) NO 생성억제 효과 비교

흔히 공해 물질로 알려져 나쁜 분자로 여겨지는 일산화질소



(NO)는 산소와 질소 원자로 된 작은 분자인 일산화질소는 물에 잘 녹지 않는 무색의 기체이며, 헤모글로빈과 아주 잘 결합하고 세포의 다른 부분을 공격하여 파괴하기 때문에 우리 몸에는 매우 좋지 않은 분자로 알려져 왔다. 그러나 최근 들어 일산화질소의 연구가 활발해지면서 일산화질소가 조개에서부터 인간에 이르기까지 거의 모든 고등 생물의 세포에서 만들어지고 신경 신호 전달과 혈액 응고 및 혈압 조절에 중요한 구실을 하는 것으로 밝혀지고 있어서 관심을 모으고 있다. 일산화질소는 성기를 발기시키는 혈액의 흐름을 유발하기도 하고, 종양 세포를 죽이는 면역 작용에도 관여하는 것으로 확인되고 있다.

일산화질소는 반응을 너무 잘하기 때문에 체내에서는 0.1초 이상 존재할 수 없다. 따라서 일산화질소는 뇌 또는 혈관과 같이 필요한 곳에서, 일산화질소 합성효소(NOS)가 알지닌이라는 체내의 아미노산에서 질소를 떼어내어 산소와 결합시킴으로써 만들어진다. 아세틸콜린이라는 화학 신호 전달자에 의하여 혈관 벽의 칼슘 이온 통로가 열리게 되면 혈액 속의 칼슘이온이 세포 속으로 들어가게 된다. 세포 속에 들어간 칼슘 이온이 칼모듈린이라는 단백질과 결합하여 eNOS라고 불리는 내피세포 일산화질소 합성효소를 작동시키면 일산화질소가 만들어진다. 이렇게 만들어진 일산화질소는 그 크기가 매우 작기 때문에 세포벽을 통하여 인접한 혈관 근육 세포로 쉽게 이동해갈 수 있으며, 여러 단계의 화학 반응을 거쳐 혈관 근육 세포를 이완시키는 구실을 하게 된다. 충분한 숫자의 근육 세포들이 이완되면 혈압이 떨어진다.

최근의 실험에 따르면 eNOS의 기능을 인위적으로 막아줄 경우에는 혈압이 올라간다고 한다. 이러한 연구 결과로부터 일산화질소를 직접 주입하여 신생아의 폐혈관 수축 증상을 치료하는 방법도 시도되고 있으며, 일산화질소의 생리적 기능을 이용한 새로운 의약품도 개발되고 있다.

일산화질소의 생리적 기능은 다른 생화학적 신호 전달자와는 매우 다른 점이 있다. 대부분의 분자는 체내에서 특별히 고안된 분자들에 의하여 운반되고, 분자의 모양이 생리적 기능에 큰 영향을 미친다. 그러나 일산화질소는 크기가 매우 작아서 세포 내에서 어느 방향으로나 자유롭게 움직여 다닐 수 있고, 세포벽도 마음대로 통과할 수 있다. 일산화질소의 생리적 기능은 모양보다도 그 자체가 가진 화학 반응성에 의하여 결정된다.

일산화질소의 강력한 화학 반응성은 좋다고도 할 수 없고 나쁘다고도 할 수 없다. 일산화질소가 어디에 있는가에 따라 '좋은' 역할을 할 수도 있고 '나쁜' 역할을 할 수도 있기 때문에 최근에는 분자의 화학 반응성만이 중요한 관심의 대상으로 자리 잡고 있다.

본 연구에서는 이러한 일산화질소의 장점을 연구하는 것이 아닌 세포내 일산화질소를 과잉 생산하게 유도한 후 염증유발에 관여하는 일산화질소에 대한 억제율을 확인하기 위한 연구이다. 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하면, 일산화질소(NO)가 방출되어 나온다. 이렇게 대식세포에 LPS로 자극을 주었을 때 NO생성을 얼마나 억제하는지에 대한 실험을 실시하였다. 그 결과 小青龍湯 원액과 발효액 모두에서 앞서 설명한 COX-2 저해능 실험과 거의 동일한 결과가 확인되었다. 50배, 100배 희

석액에서는 NO억제능이 발효액이 원액에 비해 낮지만 500배 희석액에서는 발효액에서 NO억제능이 원액보다 나은 것으로 확인되었다(Fig. 12).

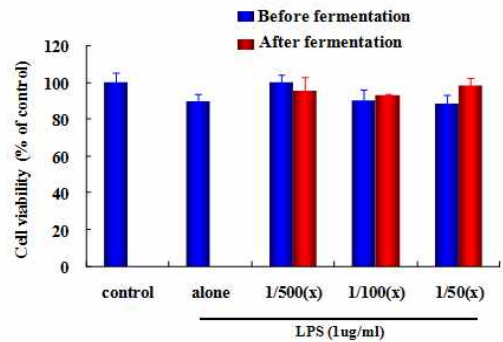


Fig. 11. Effect of Socheongyong-tang on cell viability in mouse macrophage cell line, Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of Socheongyong-tang dissolved in DMEM and the cells were incubated for 24h. Cell viability was measured by MTT assay. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments.

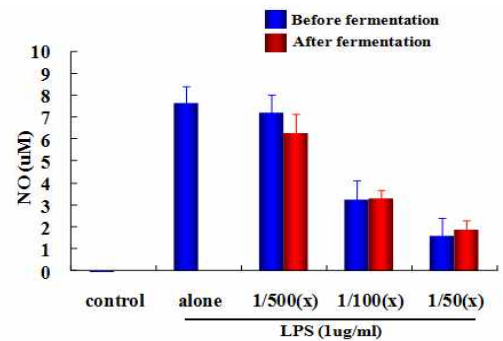


Fig. 12. Effects of Socheongyong-tang on NO production and inflammatory mediator production in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of Socheongyong-tang dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1ug/ml), and the cells were further incubated for 24 h. NO formation was measured by the Griess reaction. Data represent the mean ± S.D. with four separate experiments.

#### 6) 전 지방 감소를

생체 외 실험으로 전지방세포(pre-adipocyte)인 3T3-L1 세포가 지방세포의 대사과정을 연구하는데 널리 이용되고 있다. 3T3-L1 세포를 배양액을 이용하여 5%로 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 온도는 37°C로 배양하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제(antibiotics)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)을 사용하며, 2-3 일 간격으로 배양세포 포면을 인산완충염용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 세척한 후 0.5% 트립신(trypsin)을 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양하였다. 세포를 개별 실험에 사용할 때는 분화유도물질인 인슐린 (5 µg/ml), dexamethasone(DEX, 0.25 uM), 1-methyl-3-methylxanthine(MIX, 0.5 mM)이 함유된 분화유도 배양액으로 교환하여 1-3일간 배양하여 지방세포로 분화를 유도한다. 배양 3일 후 인슐린만 함유하는 배지로 2-3일간 배양한 후 인슐린을 제거한 배양액으로 바꾸고, 중성지방으로 유입되는 포도당 측정 실험이나 포도당 산화실험 시에는 10-12일째에

저농도 (5 mM) 포도당을 함유한 배양액으로 배양한다. 항 비만 효과 물질 처리는 분화유도 전 혹은 분화유도 후에 처리하였다. 그 결과, 대조군과 발효 전 원액을 비교하면 붉게 보이는 지방세포의 지방이 상당 부분 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 이것은 小青龍湯에 들어 있는 처방 약재 중 마황의 영향인 것으로 판단되며, 발효전과 후의 탕약을 비교해봤을 때 발효 후 小青龍湯 탕약에서 체지방 감소율이 약간 나은 것으로 확인 할 수 있었다 (Fig. 13).

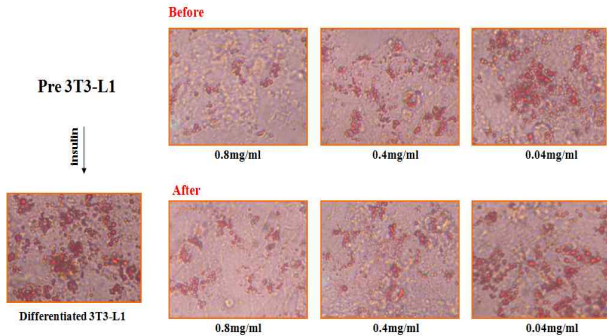


Fig. 13. On Post-MDI 8 day, cultures were fixed and stained for triacylglycerol with Oil Red O.

7) 미백효과

발효 小青龍湯과 小青龍湯 원액에 대한 Tyrosinase 저해 효과를 농도별로 확인한 결과 미백효과는 알부틴에 비해 낮은 30% 억제율로 높지 않은 것으로 확인 되었으며, 발효 전·후 비교에 서로 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 14).

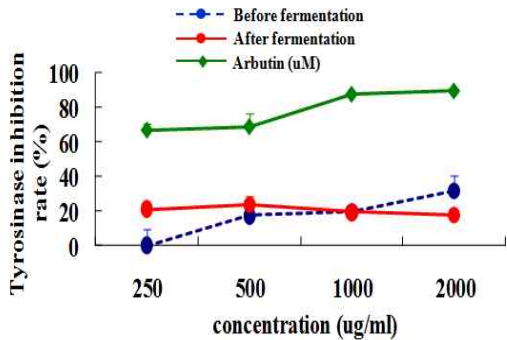


Fig. 14. Effect of Socheongyong-tang on tyrosinase inhibition activity. L-Tyrosine oxidation by tyrosinase was spectrophotometrically determined, respectively. Arbutin was used as a positive control. Data represent the mean ± S.D. with two separate experiments.

결 론

小青龍湯과 醱酵小青龍湯의 藥理效能을 비교해보기 위하여 最適의 菌株찾기와 培養條件, 成分分析, 藥理效能評價한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

최적의 균주는 균 성장과 CO2가스 생성능, pH의 결과로 볼 때 세 균주(S. cerevisiae KCTC 7913, L. casei KCTC 3109, L. brevis KCTC 3102)를 사용하는 것이 바람직 할 것으로 사료된

다. 최적의 배양조건은 정치배양과 진탕배양 모두 큰 변화가 없는 것으로 확인되었고, 배양시간은 균 접종 후 2일이 가장 적합할 것으로 판단된다. 발효 전후의 성분분석 결과 당과 단백질은 현격하게 감소되었지만, 약효에 영향을 미치는 페놀화합물과 플라보노이드 화합물은 변화가 없어서 발효 후 탕약의 소화흡수를 촉진 시켜줄 수 있다는 것을 입증하는 결과로 해석된다. 藥理效能 평가결과 항산화, 항비만 효과는 발효액이, 항염증 효과는 원방이 더 우수한 것으로 확인되었으며, 미백효과와 COX-2 저해능은 발효 전·후 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다.

이상의 실험결과로 보아 小青龍湯의 발효를 위한 최적의 균주와 배양조건, 발효 전·후 약리효능의 장단점을 유의성 있게 확인하였다

참고문헌

- 대한병리학회 대구·경북지부학회. 간추린 병리학, 서울, 정문각, 2000.
- 김기영, 송호준 편저. 韓藥炮製學, 신일상사, p 547, 2002.
- 이상인, 안덕균, 신민교. 韓方臨床應用, 서울, 정보사, p 44, 49, 50, 56, 62, 64, 79, 82, 101, 105, 122, 130, 140, 142, 181, 299, 317, 359, 361, 399, 525, 1982.
- 황도연. 方藥合編, 서울, 남산당, p 122, 1983.
- 박영순. 한방의 약리해설 개정판, 아카데미서적, 2002.
- 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인, 식품의약품안전청, 2003.
- 정진호, 조윤희. 미용관련 기능성시험, 건강기능식품 시험법 가이드, 식품의약품안전청, 2004.
- 이혜경. 小青龍湯과 加味小青龍湯이 I형 및 IV형 Allergy 반응과 폐부중에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 1995.
- 차은수, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향, 경희의학 15(1):78-89, 1995.
- 김석산. 小青龍湯 合 玉屏風散이 알레르기 鼻炎에 미치는 효과, 경원대학교 대학원, 2005.
- 김상현. 한약의 효율성 개선을 위한 발효한약 유용성에 관한 연구, 경기대 대체의학대학원석사, 2009.
- 김준형. 人蔘成分이 Zymomonas mobilis의 알콜醱酵에 미치는 영향에 관한 연구, 중앙대 대학원 석사, 1984.
- 노성구. 인삼전분의 알코올발효 적성과 발효 인삼약주의 성분 분석 중앙대대학원석사, 1999.
- 강석균. 기관지천식에 사용되는 加味小青龍湯의 임상적 고찰, 대한한의학회지 10(1):138-144, 1989.
- 공병만. 백삼, 홍삼, 발효인삼 농축액의 이화학적특성 및 약리효능에 관한 연구, 경희대 대학원박사, 2008.
- 김기창, 이형구. 小青龍湯의 鎮痛, 抗痙攣 및 環氧의 肺損傷에 미치는 影響, 경희한의대논문집, 8(1):129-138, 1985.
- 고성권, 이충렬, 이학성, 김 현, 백구현, 토쿠오카 키요시, 정성현, 중대황. 스틸벤 유도체의 cyclooxygenase 저해작용, 생

- 약학회지 34: 25-27, 2003.
18. 姜東希, 高億鮮, 金現洙. 발효한약의 특성분석, 自然科學研究論集 27(1):45-53, 2008.
  19. 신언환. 김치에서 분리한 *Lactobacillus brevis*의 성장 특성에 관한 연구, I :Sourdough 배지의 영양 조성 최적화, 한국식품영양학회지 15(3):215-219, 2002.
  20. Dale, M.M., and Foreman, J.C. Introduction to the immunology and pathology of host defece mechanism & the neutrophil leucocyte, Textbook of Immunopharmacology 1-18, pp 37-55, 1989.
  21. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Haise, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12013-12017, 1994.
  22. Bombardier, C. An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs, The americal journal of cardiology 89: 3D-9D, 2002.
  23. Flattery, M.P., Hylton Gravatt, L.A. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Progress in Cardiovascular Nursing, 20: 123-125, 2005.
  24. Kortz, F., Schiele, T.M., Klaus, V., Sohn, H.Y. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction, Journal of Vascular Research 42: 312-324, 2005.
  25. Linton, M.F., Fazio, S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis, Current Opinion in Pharmacology 4: 116-123, 2004.
  26. Johnson, J.L., Wimsatt, J., Buckel, S.D., Dyer, R.D. and Maddipati, K.R. Purification and characterization of prostaglandin H sunthase-2 from sheep placental cotyledons, Arch. Biochem, Biophys. 324: 26-34, 1995.
  27. Virador, V.M., Kobayashi, N., Matsunaga, J. and Hearing, V.J. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation, Anal. Biochem. 270: 207-219, 1999.
  28. Laurent Bedouet, Maria Jose Schuller, Frederic Marin, Christian Milet, Evelyne Lopexl Michel Giraud : Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*, extraction and partial analysis of nacre proteins, Comparative Biochemistry and Physiology 128: 389-400, 2001.
  29. Fitzgerald, G.A. and Patrono, C. : The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2, N. Engl. J. Med. 345: 433-442, 2001.
  30. Grosser, T., Fries, S. and Fitzgerald, G.A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities, J. Clin. Invest. 116: 4-15, 2006
  31. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem. 28: 350-356, 1956.
  32. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature 181: 1199-1200, 1958.
  33. Gao, I., Igarashi, K., & NuKina, M. Three new phenylethanoid glycosides from *Caryopteris incana* and their antioxidative activity, Chemical and Farmaceutical Billetin 48: 1075-1078, 2000.
  34. Aruoma, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, Food and chemical Toxicology 62: 671-683, 1994.
  35. Madavi, D.L., & Salunkhe, D.K. Toxicological aspects of food antioxidant, Food antioxidants, New York, Marcel Dekker, p 267, 1995.
  36. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals, Nature 181: 1199-2000, 1958.
  37. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
  38. Vane, J. and Botting, R. Inflammation and the mechanism of action of antiinflammatory drugs, FASEB. J. 1: 89-96, 1987.
  39. Dawson, W. and Willoughby, D.A. Inflammation mechanism and mediator, Nonsterodial antiinflammatory drugs of therapeutics, pp 77-109, 1985.