

# 地黃과 醱酵 地黃의 생리활성 비교 연구

김은혜 · 김경신 · 채순기<sup>1</sup> · 김병수 · 강정수\*

대전대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 배재대학교 생명공학과

## Comparison of Biological Activities on *Rehmanniae Radix* and Fermented *Rehmanniae Radix*

Eun Hyu Kim, Kyoung Shin Kim, Suhn Kee Chae<sup>1</sup>, Byoung Soo Kim, Jung Soo Kang\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,  
1: Department of Life Science and Technology, PaiChai University

Herbal medicines are medicinal products containing a single or a mixture of two or more different herbal substances or herbal preparations as active principles. Recently, much attention has been paid to developing various kinds of fermented herbal extracts, a new type of traditional herbal medicine in the field of Korean traditional medicine. The fermentation of medicinal herbs is intended to exert a favorable influence on bioestability, bioavailability and pharmacological activity of herbal extract in the gastrointestinal tract as well as intensifying the nutritional and pharmacological aspects of the medicinal herbs. The purpose of this study was to investigate biological activities of fermented *Rehmanniae Radix* by lactic acid bacteria at 30°C for 3 days in comparison with those for *Rehmanniae Radix*. The fermented *Rehmanniae Radix* exhibited different chemical profile to *Rehmanniae Radix* generated with HPLC, indicating production of new ingredients during fermentation. *Rehmanniae Radix* served as good nutritional sources for the growth of lactic acid bacteria showing increased number of bacteria during fermentation. Toxic effect of the fermented *Rehmanniae Radix* to cells were not seen judged by the MTT assay. The fermented *Rehmanniae Radix* exhibited better antioxidant effect than non-fermented *Rehmanniae Radix* analyzed by a SOD-likely assay. Both hypoglycemic and hypotensive effects of the fermented *Rehmanniae Radix* were also detected and better than those for *Rehmanniae Radix* in showing dose-dependent inhibitory effects on alpha-glucosidase and ACE, respectively. In conclusion, fermented *Rehmanniae Radix* appears to have more biological activities than non-fermented *Rehmanniae Radix* showing not only antioxidant effect but also cardiovascular protection.

Key words : *Rehmanniae Radix*, fermentation, lactic acid bacteria

### 서 론

地黃 (*Rehmanniae Radix*)은 玄蓼科 (Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본인 지황 (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz)의 근경으로<sup>1)</sup>, 『神農本草經』上品에 “味甘寒 主折跌 絕筋 傷中 逐血痺 填骨髓 長肌肉 作湯 除寒熱 積聚 除痺 生者尤良 久服輕身 不老 一名地髓 生川澤”<sup>2)</sup>이라 하여 건지황에 대해 최초로 收載된 이래, 한의학계에서 널리 이용되고 있다. 지황에 함유되어 있는 성분으로는 iridoid로서 rehmaglutin A, B, C 및 D, iridoid 배당체로서

catalpol, aucubin, leonuride, melittoside, rehmannioside A, B, C 및 D 등, raffinose, manninotriose 등 당류, lysine, histidine 등 아미노산과 β-sitosterol과 stigmasterol 등이 알려져 있다<sup>3,4)</sup>. 지황의 약리작용에 대한 연구동향으로는 뇌신경세포사멸 보호<sup>5)</sup>, 간회복<sup>6)</sup>, 면역촉진 효과<sup>7)</sup>, 항당뇨<sup>8)</sup>, 약성 빈혈<sup>9)</sup> 등의 효능이 알려져 있다.

포제는 약의 정선과 약성의 변화를 일으켜 환부에 따라 약력을 강화하거나 약화하기 위하여 법제하는 것을 말한다<sup>1)</sup>. 지황은 포제방법에 따라, 신선한 뿌리를 생지황 (鮮地黃, *Rehmanniae Radix Crudes*)이라 하여 淸熱滋陰, 涼血止血, 養陰生津, 止渴의 효능이 있고, 그대로 말린 것을 건지황 (*Rehmanniae Radix*)이라 하여 淸熱涼血, 養陰生津의 효능이 있으며, 뿌리를 포제 가공한

\* 교신저자 : 강정수, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학

· E-mail : omdkjs@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2617

· 접수 : 2012/04/05 · 수정 : 2012/05/16 · 채택 : 2012/05/25

것을 숙지황 (*Rehmanniae Radix preparata*)이라고 하여 補血滋陰, 益精填髓의 효능이 있다<sup>10)</sup>. 지황은 『神農本草經』上品에 收載된 이래, 임상에서 널리 사용되는 약으로, 淸熱涼血, 養陰生津의 효능이 있다<sup>10)</sup>. 그러나 건지황은 脾虛泄瀉者와 胃虛食少者는 복용을 禁하며, 숙지황은 痰多氣鬱者, 陽虛脈細 및 便溏者는 복용을 禁한다<sup>11)</sup>고 하여, 지황의 炮製방법이 다르면 社會 作用에 미치는 영향도 달라진다. 이는 酒蒸과 건조를 되풀이하면서 stachyose 농도는 급격히 감소되고 iridoid 배당체들은 완전히 분해되거나 함량이 현저히 낮아지는데 비하여 다당류의 분해로 단당류 및 올리고당의 농도는 증가와 관련된다<sup>11,12)</sup>, 이를 개선하기 위해 砂仁, 甘草 등을 첨가하여 腸 運動운동에 미치는 영향이 보고되고 있다<sup>13)</sup>. 최근 지황의 炮製방법에 대한 다양한 연구가 진행되고 있는데 특히, 제조법에 따른 당류 함량의 변화<sup>14)</sup>와 蒸數에 따른 약성 빈혈에 대한 치료 효능<sup>9)</sup> 그리고 숙지황의 지표 물질인 5-HMF 함량변화<sup>11)</sup>와 수치, 전탕법에 대한 연구<sup>15)</sup>를 통해 가공에 의한 지황의 성분변화와 효소활성에 미치는 영향이 보고되었다.

최근 발효 식품은 생리활성 작용이 알려지면서 세계적으로 건강기능성 장수식품으로서 인식되고 있고 특히 *Lactobacilli* 및 *Bifidobacterium*과 같은 유산균은 당류를 발효하여 젖산을 생성하는 세균으로 위장기능 개선, 체내 콜레스테롤 흡수저해, 면역조절, 영양소의 흡수 및 이용률을 높이는 등 다양한 질병 예방효과와 생리조절 작용을 하는 것으로 밝혀진 건강기능성 식품소재이다<sup>16-18)</sup>. 한방 약물은 일반적으로 경구 투여되면 우선 장내 미생물에 의하여 대사되어질 수 있고, 장내 미생물에 의한 유효성분이 약효성분으로 대사변환 또는 흡수를 촉진시킬 가능성도 매우 높다고 할 수 있다<sup>19)</sup>. 본 연구에서는 유산균을 이용하여 발효지황을 제조하고, 건지황과 발효지황의 pH 및 적정산도, SOD 활성과 전자공여능을 통하여 항산화능, ACE (angiotensin converting enzyme) 활성 저해를 통해 혈당강화와 α-glucosidase 저해 활성과 같은 생리활성 지표를 비교하여 연구 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 건지황 (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz)은 중국 하북 지역에서 생산되어 건조된 것으로 중국 안국시장에서 구입하였다.

#### 2) 시약

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, gallic acid, potassium phosphate buffer pH 8.3, NaCl, hippuryl-his-leu (HHL, H-1635), rabbit lung acetone powder (L-0756), tetrazolium MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), phenolphthalein alcohol, potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, sodium bicarbonate 등은 Sigma-Aldrich (U.S.A.) 제품을, trypsin-EDTA, D-PBS (dulbecco's phosphate buffered

saline), antibiotic solution (penicillin streptomycin), nonessential amino acid, MEM 배지는 GIBCO BRL Life Technology (U.S.A.) 제품을, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 hyclone (Logan, U.S.A.) 제품을, MRS 한천배지는 Difco (U.S.A.) 제품을, 그리고 SOD assay kit는 Dojindo (Japan)를 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 3) 기기

열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A.), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A.), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.) 및 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.), pH meter (Horiba F-51, Japan), HPLC (Shimadzu, Japan), C<sub>18</sub>역상 HPLC column (Hypersil, U.S.A.) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액

건지황 100 g을 증류수 1,000 ml에 넣고 2 시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체 성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 약리성분을 추출하였다. 2 시간 동안 초음파 추출한 후 Whatman filter paper를 사용하여 여과하였고, 여과된 추출액은 동결 건조하였다. 시료는 증류수에 녹여 10 mg/ml로 희석하였으며, injection 직전에 MFS-13 (pore size 0.20 μm)으로 여과해 HPLC 분석을 하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 10.6 g의 분말을 얻었다. 얻은 분말은 냉동고에 보관하면서 사용 시에는 필요한 농도로 phosphate buffer에 희석하였다.

### 2) 유산균을 이용한 발효지황 제조

#### (1) 유산균 균주

실험에 사용된 종균은 7 종류로 *Lactobacillus* Spp. (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. slivarius*), *Bifidobacterium* Spp. (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*), *Pediococcus* spp. (*P. acidilactica*)이다. MRS 한천배지에 배양하여 4℃에서 보관하고 3 주마다 계대하면서 사용하였다. 또한 균주는 멸균된 20% glycerol에 배양액을 현탁하여 -70℃에서 장기 보관하였다.

#### (2) 발효지황 제조

유산균을 MRS 액체배지를 이용하여 37℃에서 정지 배양하여 활성화하였다. 지황 시료를 5% 첨가하여 배지를 제조하고 멸균시킨 후 활성화된 유산균을 1% (1.0 X 10<sup>6</sup> CFU/ml) 씩 접종하여 48 시간 동안 배양하였고 배양 후 분석에 이용하였다.

#### (3) 생균수 및 pH 측정

생균수는 시료 1 ml를 멸균 생리식염수 9 ml에 희석하고 단

계별로 희석 후 1 ml를 취하여 *Lactobacillus* 속과 *Pediococcus* 속은 glucose 함량을 1%로 높은 한천배지에 접종하여 잘 혼합하였고, *Bifidobacterium* 속은 BL 한천배지에 접종하여 도달한 후 혐기성 상자(BBL Gas Pak Anaerobic System)에 넣고 37°C에서 48 시간 배양한 후 생성된 집락수를 계측하고 그 평균 집락 수에 희석 배수를 곱하여 배양액 ml 당 생균수를 산출하였다. 시료의 pH는 pH meter를 이용하여 측정하였다.

### 3) HPLC (high performance liquid chromatography) 분석

건지황의 수용성 성분을 분석하기 위하여 C<sub>18</sub>역상 HPLC column을 장착한 HPLC를 사용하였다. 전체 분석시간은 30 분으로 이동상의 구성은 초기 5 분 동안 H<sub>2</sub>O를 흘려주었고, 이후 20 분 동안은 acetonitrile gradient를 하여 acetonitrile을 100%까지 올린 다음, 그 상태를 5 분간 지속하였다. 214 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료를 확인하였다.

### 4) 세포 배양 및 MTT assay

본 연구에 사용한 세포주는 Huh7 간 (Liver) 세포를 사용하였다. Huh7 세포주는 10% v/v fetal bovine serum, 1% v/v antibiotic solution(penicillin streptomycin, 1% v/v nonessential amino acid, 그리고 sodium bicarbonate (Sigma, MO, Germany)가 함유된 DMEM 배지로 배양하였다. Incubator의 배양 조건은 온도 37°C, CO<sub>2</sub> 농도 5%로 항상 일정하게 유지시켰다. 세포가 70-80% confluent한 상태가 되면 0.25% trypsin-EDTA solution으로 flask 바닥으로부터 세포를 유리시켰다. 배지는 이틀에 한번 새로운 배지로 교환 배양 후, 배지를 제거하고, 10% FBS이 함유된 DMEM으로 교체한 다음, 시료를 같은 배지로 적당히 희석하여 첨가한 후, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 세포가 well의 바닥에 약 80%이상 될 때까지 배양하였다.

세포 독성 및 세포 생존율을 측정하기 위하여 자동 microplatereader spectrophotometer를 이용한 MTT 분석을 하였다. Huh7 cell을 96-well plate에 각각 1×10<sup>4</sup> Cells/ml의 농도로 200 μl씩 분주 한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 동안 세포를 적응시키고, 시료의 농도가 각각 0-200 μM / 200 μl이 되도록 조정 한 후 (6개 농도), 200 μl씩 세포에 처리하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 2 mg/ml의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution을 빛을 차단한 상태에서 200 μl을 각 well에 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3 시간동안 배양하였다. 자색의 MTT formazan이 생성되면 dimethylsulfoxide (DMSO) 150 μl를 첨가하고 10 분간 상온에서 용해시켜 ELISA reader를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 생존 세포율은 중복 측정된 3 회 반복실험의 평균값으로 제시하였다.

### 5) SOD 유사활성 (superoxide dismutase-likely activity) 측정

SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법<sup>20)</sup>에 따라 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol 생성량을 측정하여 SOD 유사활성을 측정하였다.

발효액을 동결건조한 시료를 1%, 5%, 10%, 25% 그리고 50%의 용액으로 만든 후 각 시료용액 0.2 ml에 Tris-HCl의 완충용액 (50 mM Tris 10 mM EDTA, pH 8.5) 3.0 ml와 7.2 mM

pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25°C에서 10 분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타냈으며 각각의 활성을 %로 나타내었다.

### 6) 전자공여능 (electron donating ability, EDA) 측정

시료의 전자공여능 측정은 Blois<sup>21)</sup>와 Lee 등<sup>22)</sup>의 방법에 준하여 시료의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 시료를 각각 1%, 5%, 10%, 25% 그리고 50%의 시료용액으로 만든 후 측정 시료로 사용하였다. 시료 100 μl에 4 mM DPPH 용액 0.8ml를 가한 후 10 분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 무첨가 대조군의 흡광도와 백분율로 나타내었고, 각각의 활성을 %로 나타내었다.

### 7) α-glucosidase 저해 활성

혈당강하 실험은 α-glucosidase를 10 mM PIPES buffer에 용해시킨 10 μl 효소액, 20 mM maltose 40 μl, 각 농도의 발효액 10 μl를 혼합해서 37°C에서 20 분간 반응시킨 후 1 ml DNS 시약을 첨가하고 100°C에서 10 분간 열처리한 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성 저해율을 계산하였다<sup>23)</sup>.

각 시료는 50 μl를 0.15 U/ml α-glucosidase 효소액 50 μl, 200 mM KPB (pH 7.0) 50 μl와 혼합하여 37°C에서 15 분간 예비 배양한 후 3 mM pNPG 100 μl를 가하여 37°C에서 10 분간 반응시켰다. 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 750 μl로 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대응하는 α-glucosidase의 IC<sub>50</sub>을 계산하였다.

### 8) ACE (angiotensin converting enzyme) 저해 활성

ACE 저해활성 측정은 Cushman과 Cheung의 spectrophotometric assay 방법<sup>24)</sup>을 응용하여 측정하였다. 먼저 효소원을 준비하기 위해서 rabbit lung acetone powder 10 g을 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.3) 100 ml에 충분히 섞어준 후에 40,000×g에서 40 분간 원심분리를 하였다. 원심분리한 상등액은 활성이 매우 높고 5°C에서 한 달 정도 보관이 가능한 ACE의 효소원이 된다.

ACE 저해활성의 측정은 먼저 0.25 ml assay mixture(100 mM potassium phosphate buffer pH 8.3, 300 mM NaCl, 5 mM hippuryl-his-leu (HHL, H-1635)에 10 mU enzyme 0.15 ml를 가하여 30분간 37°C에서 반응시켰다. 이때 반응액의 시료구에는 시료를 60 μl 첨가하고 대조군에는 시료 대신 증류수를 동량으로 첨가하였다. Blank는 효소원을 첨가하기 전에 먼저 0.25ml 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 효소원을 첨가하였다. 반응을 끝낸 후 0.25 ml 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시키고 1.5 ml ethyl acetate를 넣어준 후에 15 초간 잘 섞어 900×g에서 15 초간 원심분리하여 ethyl acetate 층을 분리하였다. 분리된 ethyl acetate 1 ml를 tube에 담은 후 120°C oil bath에서 15 분간 증류 건조시켰다. 건조가 끝나면 2 ml의 증류수에 다시 녹이고 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해활성도는 아래의 식에 따라 계산하였다. 효소 1단위(U)는 37°C에서 1 분간 hippuric acid 1 μmol을 생산하는 효소의 양으로 하였다.

$$\text{ACE inhibition rate (\%)} = \left[ 1 - \frac{(S - SB)}{(C - CB)} \right] \times 100$$

S : sample의 O.D.  
 C : control의 O.D.  
 SB : sample blank의 O.D.  
 CB : control blank의 O.D.

9) 통계분석

모든 실험 결과들은 평균값 ± 표준편차로 기록하였고 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다. 특별한 언급이 없는 경우, 실험값이 95% 유의성이 인정되는 경우를 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 건지황, 발효지황의 HPLC에 의한 분석

건지황과 발효지황의 차이를 측정하기 위해서 C<sub>18</sub>역상 HPLC를 사용한 결과, 앞부분에서 수용 성분을 확인하였다. 발효지황의 HPLC에서는 건지황에서는 나타나지 않았던 성분(chemical profile)을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

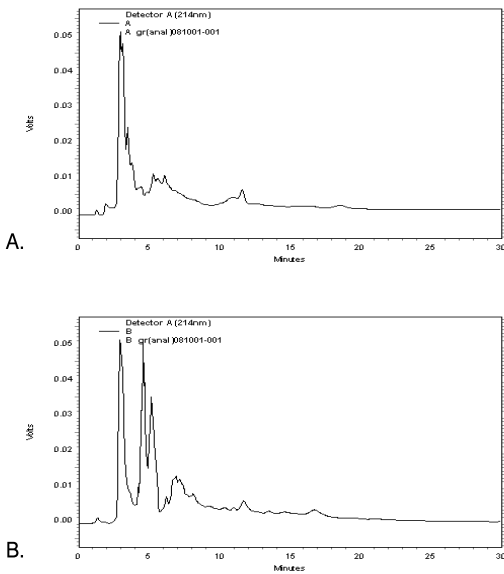


Fig. 1. HPLC profiles of *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix* fermented. Water extracts were subjected to C<sub>18</sub> column Chromatography on acetonitrile gradient over a 30 min period at a flow rate of 1 ml/min. Absorbance was monitored at 214 nm. (A) *Rehmanniae Radix* (B) *Rehmanniae Radix* fermented

2. 건지황 발효 중 유산균 생육에 미치는 영향

건지황 추출물 5%에 균체를 접종한 후 초기 유산균 수는 1.0×10<sup>6</sup>(CFU/ml)이었고, 24시간 후 8.2×10<sup>7</sup>(CFU/ml)로, 48시간 후 1.27×10<sup>8</sup>(CFU/ml)로, 초기 대비 100배 이상 증가하였다(Table 1). 건지황을 첨가한 후 유산균의 발효 중 pH 변화를 비교하기 위하여 각 시료에 유산균을 접종하고 37°C에서 배양하여 24 시간 단위로 측정하였다. 건지황의 첨가로 인한 발효액의 pH는 초기에는 4.56±0.01이었으나 48시간 후 4.23±0.01로 낮아졌다(Table 1).

Table 1. The Viable Cell Counts & pH of the Fermentation Product of *Rehmanniae Radix* by Lactic Acid Bacteria

Incubation time (hr)	CFU/ml (1.0 × 10 <sup>8</sup> )	pH
24	0.82 ± 0.17	4.56 ± 0.01
48	1.27 ± 0.05*	4.23 ± 0.01*

Each value is mean ± SD (n>3). (\*, p<0.05)

3. Huh7 간세포 증식에 미치는 영향

Huh7 세포주에 건지황과 발효지황을 0.1, 1, 10 µg/ml 농도로 48시간동안 배양한 후 Huh7 세포증식에 미치는 영향을 조사한 결과, 발효지황은 대조군(건지황)에 비해 증식률이 각각 104.18±9.01%, 126.96±5.53%, 131.46±186%로 나타났다. 모두 100% 이상의 viability를 나타냈고, 세포 독성에 영향을 주지 않았다(Fig. 2). 음성 대조군으로 이용된 유산균액(Lactic acid Bacteria) 경우도 대조군(건지황)과 유사한 증식률을 나타냈다.

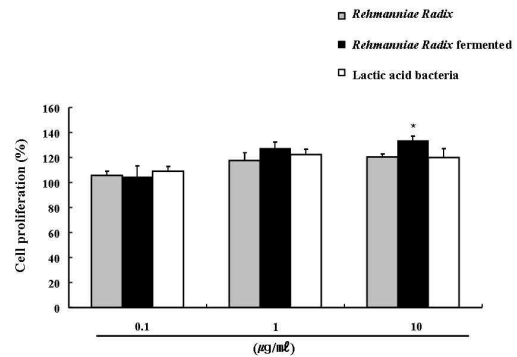


Fig. 2. Effect of *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix* fermented on the Cell Proliferation. Huh7 cells were treated with *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix* fermented for 48hr. The cell proliferation was measured by the MTT assay as described in materials and methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean±S.D. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \* p < 0.05. (Lactic acid Bacteria groups were compared control groups)

4. SOD 유사활성(superoxide dismutase-likely activity)과 전자공여능(electron donating ability, EDA)에 미치는 영향

건지황과 발효지황의 SOD 유사활성 실험에서 발효지황은 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 시료농도에서 각각 38.21±1.11%, 60.35±0.1%, 79.78±0.13%의 농도 의존적 활성증가를 나타내었다. 대조군인 건지황은 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 시료농도에서 각각 36.0±2.62%, 58.35±0.5%, 70.07±0.25%의 농도 의존적인 활성증가를 나타내었다. 음성 대조군인 유산균은 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 시료농도에서 각각 16.21±3.73%, 30.57±0.1% 그리고 50.21±1.17%의 농도 의존적인 활성증가를 나타내었다(Fig. 3-A).

건지황과 발효지황의 DPPH 라디칼 소거능에 대하여 실험한 결과, 발효지황은 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml 시료농도에서 각각 96.42±2.52%, 86.51±0.12%, 77.28±0.8%의 농도 의존적 활성을 나타내었다. 대조군인 건지황은 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 시료농도에서 각각 93.39±1.51%, 91.78±1.2%, 78.57±0.62%의 농도 의존적 활성을 나타내었다. 음성 대조군인 유산균은 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 시료농도에서 각각 95.98±0.37%,

84.37±1.89%, 68.39±1.51%의 농도 의존적 활성증가를 나타내었다(Fig. 3-B). DPPH 라디칼 소거능을 살펴보면 발효지황, 건지황, 유산균 간의 유의한 차이는 없었다.

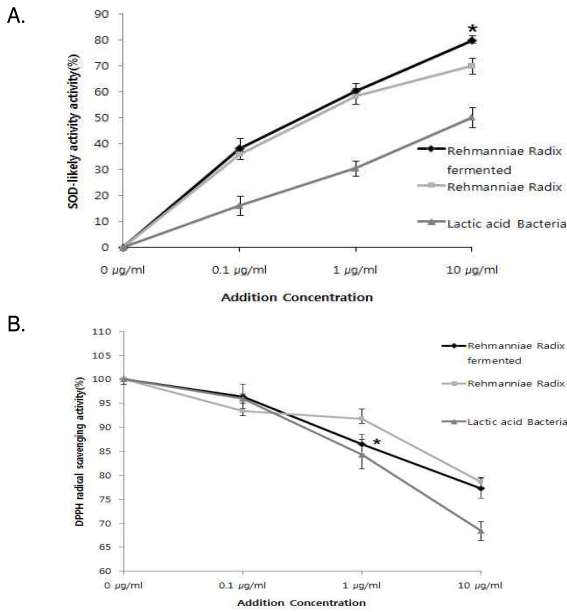


Fig. 3. SOD-likely activity & DPPH radical scavenging in fermented extracts using *Rehmanniae Radix*. The effect on SOD-likely activity(A) & DPPH radical scavenging activity(B) was tested with *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix* fermented. Date are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \* p < 0.05.

5. α-glucosidase 저해 활성에 미치는 영향

혈당강하 기능검색을 위한 기질로서 maltose와 건지황 추출물을 첨가하여 추출물에 의한 효소 활성을 검색한 결과, 발효지황은 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml의 시료농도에서 각각 92.36±3.54%, 90.11±1.37%, 89.14±2.4%의 농도 의존적 저해 활성을 나타내었다. 건지황은 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml의 시료농도에서 각각 102.43±2.15%, 97.22±1.31%, 85.22±1.33%의 농도 의존적 저해 활성을 나타내었다(Fig. 4).

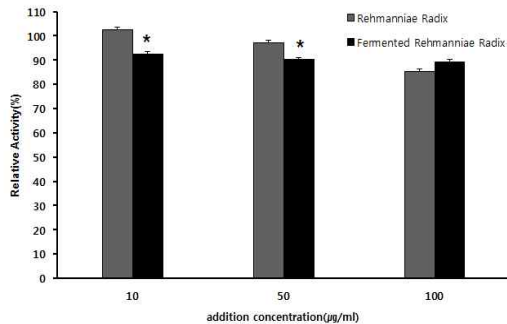


Fig. 4. Inhibition of α-glucosidase activity (%) in adding the extract of *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix* fermented. The effect on α-glucosidase was tested with *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix* fermented. Date are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \* p < 0.05.

6. ACE(angiotensin converting enzyme) 활성 저해에 미치는 영향  
혈압강하 기능검색을 위해 건지황 및 발효 지황 추출물을 첨가하여 추출물에 의한 효소 활성 억제율을 실험한 결과, 건지황은 0.2 μg/ml, 0.4 μg/ml, 0.6 μg/ml, 0.8 μg/ml, 1 μg/ml 시료농도에서 각각 19.02±3.18%, 20.42±2.98%, 23.46±2.88%, 30.98±2.52%, 35.12±2.88%의 농도 의존적인 활성 저해를 나타내었다. 발효지황은 0.2 μg/ml, 0.4 μg/ml, 0.6 μg/ml, 0.8 μg/ml, 1 μg/ml 시료농도에서 각각 22.82±5.76%, 23.02±3.14%, 24.35±2.8%, 29.49±2.59%, 36.18±2.34%의 농도 의존적인 활성 저해를 나타내었다(Fig. 5).

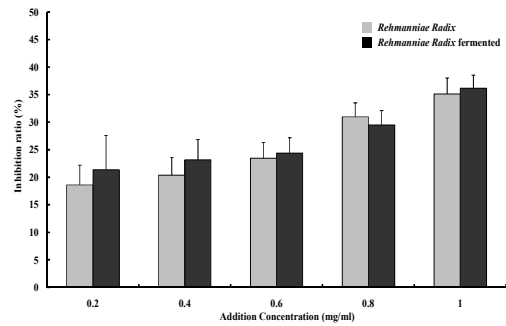


Fig. 5. Inhibition effect of ACE(angiotensin converting enzyme) in adding the extract of *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix* fermented. The effect on ACE was tested with *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix* fermented. Date are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \* p < 0.05.

고찰 및 결론

炮製는 修治·炮炙라고도 하며, 약물을 醫療·調製·製劑 등의 수요에 의거하여 가공 처리하는 방법의 총칭이며, 약물의 整形·잡질의 제거 가열처리·보조물의 첨가·精製 등을 포함한다<sup>25)</sup>. 포제의 목적은 여러 가지가 있으나, 약물의 독성과 부작용을 저하시키거나 제거하고, 약성을 변화시키거나 혹은 완화시키고, 약물의 치료효과를 증강시키는데 있다<sup>26)</sup>. 약제의 치료효과는 함유된 성분에서 결정된다. 약제를 포제하면 함유된 성분과 성분의 양이 달라지므로 그에 따른 약리작용과 임상효과의 변화가 나타나고, 포제 전후의 성분변화를 약리학적 실험방법으로 연구하면 炮製품의 품질과 가공을 개선시킬 수 있다<sup>27)</sup>. 최근 한의학계에서도 발효에 대한 관심이 증가하고 있으며, 효소를 이용한 한약 전당법 개선<sup>28)</sup>을, 지황식초가 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 사멸에 대한 효능<sup>29)</sup>을, 발효농축이 장내 유산균 증식효과가 있음을 발표<sup>30)</sup>하였다.

발효 법제(bio-fermentation)는 미생물로 한약재를 발효시켜 그 유효성분을 이용하는 것이다. 발효법제에 사용되는 미생물은 안전성이 과학적으로 입증된 미생물이며, 순수 액체발효 또는 순수 고체발효 방법을 이용하여 한약재를 수차 법제한다. 당약으로 만들 때 일반한약은 한약재의 유효성분이 40-50% 정도 밖에 추출되지 않지만, 발효시키면 저분자화 되면서 세포 간 결합이 끊어지기 때문에 유효성분이 90%까지 추출되고, 아울러 장내 흡수

후 체내이용률이 높아지게 된다<sup>31)</sup>.

유산균은 포도당 또는 유당과 같은 탄수화물을 분해 이용하여 유산을 많이 만드는 박테리아로서 단백질을 분해하지만 분해시키는 능력이 없으며 인체에 해로운 물질을 생성하지 않으며 유익한 작용을 하는 세균을 말한다. 유산균의 생리활성은 첫째 유기산을 생산하여 장내의 pH를 저하시킴으로써 유해세균의 증식을 억제하며 정상적인 장내균총을 유지시켜주고, 둘째  $\beta$ -galactosidase를 생산하여 유당소화불량증이 있는 사람에게 유리하게 작용하며, 셋째 장내 pH를 저하시켜 carcinogenesis에 직접 영향을 미치고 lactic acid, acetic acid는 부패균의 성장을 억제하여 N-nitroso compounds, phenolic products 등의 carcinogen을 감소시켜 항암활성을 나타내고, 넷째 bifidobacteria는 hydroxymethylglutarate를 생산하여 HGM-CoA reductase를 억제하는 작용을 나타내므로 콜레스테롤 저하효과를 나타내며, 다섯째 비타민 등의 합성이 이루어지며, 설사의 원인균을 억제하고 장내 균총을 정상화함으로써 설사를 방지한다<sup>32,33)</sup>.

본 실험에서 HPLC를 통하여 건지황과 발효지황의 성분을 비교한 결과, 건지황은 3 분에서 peak를 나타냈고, 발효지황은 5 분을 전후로 하여 peak를 나타냈는데, 이는 유산균을 통한 발효지황이 성분상에 변화를 초래했음을 의미한다(Fig. 1). 일반적으로 유산균 발효 중 pH가 급격히 감소하는 것은 유산균 발효과정에서 생성되는 젖산 및 여러 가지 유기산의 생성에 기인하는 것으로 알려져 있다<sup>31)</sup>. 이와 같은 유산균의 대사산물은 다양한 유기산 및 아미노산이 생성되고, 이들은 적정산도에 영향을 주는 직접적인 원인물질이 되며, 최종발효 물질의 향기와 맛 그리고 영양학적 측면에서 유산균 생육지표로서 이용할 수 있는 중요한 요인이 된다.

건지황 발효를 통해 유산균 증식률이 100배 이상인 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 이와 같은 결과는 건지황의 78%가 탄수화물이고, 이들 중 다당류를 제외한 발효 가능한 glucose, fructose, maltose, sucrose, galactose 등과 같은 단당류들의 양이 약 14%가 존재하므로 발효에 필요한 탄소원으로 작용할 것으로 추정되고<sup>34)</sup>, 생균체가 시간이 경과함에 따라 적응하여 생균수가 증가한 것으로 보이며, 건지황 내의 풍부한 무기질과 당이 균체 접촉 후 발효기간 동안 균체의 생존율에 긍정적인 영향을 미친 것으로 생각된다. 또한 건지황의 첨가로 인한 발효액의 pH 감소는(Table 1), 시간이 증가함에 따라 유산균 수가 증감하여 산도가 높아진 것이다.

발효지황과 건지황의 항산화 활성을 평가하고자 SOD 활성과 전자 공여능을 실험하였다. Superoxide dismutase(SOD)는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical과 반응하여 과산화수소를 생성하는 효소로 알려져 있으며, 산소를 소비하는 모든 생물 종에 존재하여 생체 내에서 활성산소 장애에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이며, 지황의 SOD activity가 비교적 높게 나타났다는 보고<sup>35)</sup>가 있다.

건지황, 발효지황, 유산균에 대한 SOD 유사활성에 대해 농도 의존적 활성증가를 나타냈으며(Fig. 3), 발효지황이 건지황보다 SOD 유사활성이 우수한 것으로 나타났다. 한편 발효를 통해

저분자량의 polyphenol성 물질은 증가하게 되고 이로 인해 항산화력이 증가하였다는 연구<sup>36)</sup>를 통해, 희석 후에도 일정 농도 범위에서 항산화 활성을 보이는 것은 건지황 고유의 높은 항산화 활성능력과 발효과정으로부터 얻어진 polyphenol 성분에 기인하는 것으로 여겨진다. 발효지황에 대한 DPPH에 대한 결과에도 농도 의존적인 활성을 나타냈으며, 발효지황과 건지황은 전자공여능이 유사한 것으로 나타났다(Fig. 3). 다만 발효지황, 건지황, 유산균 간의 차이가 없어서 발효지황의 효능이 상대적으로 우수하다고 할 수는 없었다.

당뇨병 치료방법 중 탄수화물의 소화 분해를 억제함으로써 혈액 속에 당의 농도를 조절하는 방법이 있다. 탄수화물은 주로 소장점막에서 분비되는  $\alpha$ -glucosidase에 의해 포도당으로 분해되어 흡수되는데 이  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 조절하면 식후의 급격한 혈당상승을 억제할 수 있다. 식후 혈당을 효과적으로 조절할 수 방법의 하나로 음식물 중의 탄수화물의 소화를 지연시켜 소장으로부터의 흡수를 방해하는 연구가 보고되었다. 즉, 소화기관 내의 탄수화물은 소화 효소인  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase에 의해 분해되며, 소장에서 최종적으로 glucose와 fructose 등으로 분해되어 흡수된다. 그러나 혈당의 효과적인 조절이 안 되는 당뇨병 환자의 경우 소화 흡수되는 glucose를 제대로 처리하지 못하여 고혈당 상태가 악화된다. 따라서 소화기관의  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase를 저해함으로써 glucose의 흡수가 천천히 일어나게 하여 식후 혈당을 조절해야 한다.  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성 실험에서 발효지황과 건지황은 농도 의존적 활성 억제 경향을 나타냈다(Fig. 4).

고혈압 원인은 renin-angiotensin계가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되어 있으며, 여기에는 angiotensin I converting enzyme[EC 3.4.15.1, ACE: peptidyl dipeptide hydrolase]이라는 효소가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 생체 중에 존재하는 불활성형의 angiotensin I은 ACE에 의해 dipeptide가 떨어져 나감으로써 혈관벽 수축 작용이 있는 angiotensin II로 전환되며, 생체 내 혈압강하 인자인 bradykinin을 불활성화시킴으로써 혈압이 상승하게 된다. 특히 식품의 생체 조절 기능에서 혈압상승 원인 중에 하나인 ACE에 대해 저해작용이 있다는 것이 알려지면서 이에 관해 많은 연구가 진행되고 있다<sup>37)</sup>. 혈압강하 기능 검색을 위해 효소 활성 억제 실험에서도 본 연구는 농도 의존적인 활성 억제를 나타내었다(Fig. 5).

지황은 한의학적 포제 공정에 의해 숙지황으로도 이용되어진다. 숙지황의 경우 지황의 열처리로 이루어지며 이로 인해 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나인 페놀 화합물은 식물체에 특유의 색을 부여하며 산화 환원 반응시 기질로 작용한다. 갈변물질의 경우 주로 가열 처리시 당과 아미노산의 중합반응으로 생성되는 것으로 일반적으로 가열처리 온도 및 가열 시간이 길어질수록 갈변에 관련된 가용성 성분은 감소하고 갈변물질의 생성은 증가하는 것으로 알려져 있으며, 또한 가열처리공정에 생성되는 일부 갈변물질의 경우 항산화활성을 증가시키는 요인이 되기도 한다<sup>38)</sup>. 폴리페놀과 플라보노이드 화합물은 항산화력을 나타내는 대표적인 화합물로서, 숙지황의 열처리에 따라 풀

리페놀 및 플라보노이드 화합물이 증가되는데<sup>39)</sup>, 열처리에 의해 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 증가하는 원인은 건지황 및 숙지황의 세포벽이 파괴되어 불용성 성분으로부터 폴리페놀 성분이 유리되기 때문이라 판단되며, 또한 열처리 및 가공과정 중에 항산화력을 가지고 있는 maillard reaction products 생성, 단백질 가수분해 등에 의하여 새로운 항산화 물질들이 형성되는 것으로 보고 있다<sup>40)</sup>. 따라서 발효지황은 건지황의 새로운 생리활성 물질의 생성과 건지황이 가지고 있는 효능의 검증을 통해 발효지황의 우수성을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 발효지황은 건지황에 비하여 항산화, 혈압강하, 혈당강하에 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 발효지황이 생리활성에 효과가 있음을 시사하며, 포제법의 변화가 약효에 영향을 준다는 한의학 이론을 실험적으로 입증하였다. 향후 단일 균주 탐색 및 단일균주와 복합균주의 병용 연구를 통하여 발효지황 제조에 가장 적합한 유산균주 및 최적 공정을 탐색해야 할 것이다.

### 참고문헌

1. 이상인. 본초학. 서울, 수서원, pp 47, 106-110, 1981.
2. 鄒澍, 임진석 옮김. 본경소증 상. 서울, 대성의학사, pp 50-54, 2001.
3. 안덕균, 김창민, 신민교, 이경순. 중약대사전(1). 서울, 도서출판 정담, pp 129-135, 1998.
4. Morota, T., Sasaki, H., Nishimura, H., Sugama, K., Chin, M. and Mitsahashi, H. Two iridoid glycosides from *Reridoia glutinosa*. *Phytochemistry*, 28: 2149-2153, 1989.
5. 송효인, 김광중. 베타아미로이드로 유도된 신경세포사멸에 대한 지황 및 지황식초의 보호효과. *동의생리병리학회지* 21(1):190-198, 2007.
6. 김윤상, 손영중, 이영중. 지황이 CCl<sub>4</sub>로 손상된 쥐의 간회복에 미치는 효과. *대한본초학회지* 15(1):45-51, 2000.
7. 이금홍, 강신성, 안원근, 이영선, 권영규, 신상우. 보혈 약재인 당귀, 지황, 백작약, 가수오의 면역 촉진 효과 비교 분석. *동의생리병리학회지* 20(6):1507-1515, 2006.
8. 이인자. 지황 및 그 함유제제의 항 당뇨 효과에 관한 연구. 대구효성가톨릭대학교 연구논문집, 47: 465-477, 1993.
9. 마진열, 하창수, 성현제, 지옥표. Cyclophosphamide로 Rat에 유도된 약성빈혈에 대한 숙지황의 증수에 따른 치료효능에 관한 연구. *생약학회지* 31(3):325-334, 2000.
10. 김남재, 정은아, 김희정, 심상범, 김종우. 지황의 품질평가. *생약학회지* 31(2):130-141, 2000.
11. 황석연, 황방연, 최우희, 정한진, 허재두, 이경순, 노재섭. 수처리에 따른 숙지황 중의 5-hydroxymethyl-furaldehyde 함량 분석. *생약학회지* 32(2):116-120, 2001.
12. Wen Xuesen, Yang Shilin, Ma Xiaojun, Zheng Junhua. HPLC chromatogram changes with processing for roots of *Radix Rehmanniae*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*,

- 35(2):153-156, 2004.
13. 신명섭, 손영중, 이영중. 지황이 흰쥐의腸 연동운동에 미치는 영향. *대한본초학회지* 16(1):189-199, 2001.
14. 시진국, 손영중, 이영중. 숙지황제조 방법에 따른 당류함량의 변화. *대한본초학회지* 14(2):1-11, 1999.
15. 김인락, 황금희, 주혜정, 마진열. 한약제 절단, 수처, 전당법에 관한 연구 II. *한국한의학회연구논문집*, 4(1):115-127, 1998.
16. Goldin, B.R. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.*, 80: 203-207, 1998.
17. Fuller, R. Probiotics in man and animals. *J. Applied Bacteriology*, 66: 365-378, 1989.
18. 배은아, 한명주. 약선 식품 소재의 유산균 증식 효과. *Korean J. Soc. Food. Cookery Sci.*, 17(3):211-217, 2001.
19. 김남재, 김동현, 박종백, 홍남두. 생약복합제중 보기제의 혈청 성분 및 장내 미생물에 대한 작용. *생약학회지* 24(3):235-243, 1993.
20. Marklund S., Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 47: 469-474, 1974.
21. Blois, M.S. Antioxidant determination by use of stable free radical. *Nature*, 191: 1199-1203, 1985.
22. Lee, J.S., Lee, S.H., Kwon, S.J., Ahn, C., Yoo, J.Y. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional meju. *Korean J Food Sci Technol*, 25: 448-453, 1997.
23. Kim, J.S., Kwon, C.S. and Son, K.H. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2458-2461, 2000.
24. Cushman, D.W., Cheung, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*, 20: 1637-1648, 1971.
25. 강병수, 서부일, 최호영. 한약 포제와 임상응용. 서울, 영림사, p 15, 2003.
26. 안덕균, 김호철. 한약포제학. 서울, 일지사, pp 31-38, 1997.
27. 김기영, 송호준. 한약포제학. 서울, 도서출판 신일상사, p 15, 2002.
28. 고병섭, 박갑주, 홍원식, 최미경, 김명희. 효소를 이용한 한약 전당법의 개선에 관한 연구. *대한한의학회지* 18(1):506-514, 1997.
29. 송효인, 김광중. 베타아미로이드로 유도된 신경세포사멸에 대한 지황 및 지황식초의 보호효과. *동의생리병리학회지* 21(1):190-198, 2007.
30. 김동현, 한상범, 박주석, 한명주. 녹용발효와 생리활성. *생약학회지* 25(3):232-233, 1994.
31. 김상현. 한약의 효율성 개선을 위한 발효한약 유용성에 관한 연구. *경기대학교 대체의학대학원 석사학위논문*, pp 1-7, 29-45, 2008.

32. Newcomer, A.D., Park, H.S., O'Brein, P.C. and McGill, D.B. Rspnse of patients with irritable bowel syndrome and lactate deficiency during unfermented acidophilus milk. *Am. J. Cli. Nutr.* 38: 257, 1983.
33. Tomoko, A.K., Tomoko, Y. and N. Ishibashi, Inhibitory effect of human-derived Bifidobacterium on pathogenic Escherichia coli Serotype O-111. *Bioscience Microflora*, 15: 17, 1996.
34. 안상욱, 김민희, 정우택, 황백, 성낙술, 이현용. 건지황 추출물을 이용한 알콜 발효 수율 증진. *한국약용작물학회지* 8(4):351-361, 2000.
35. 임정대, 유창연, 김명조, 윤성중, 이선주, 김나영, 정일민. 한국산 약용식물로부터의 SOD 활성 및 Phenolic Compounds 함량 비교. *한국약용작물학회지* 12(3):191-202, 2004.
36. Niwa Y., Miyachi Y. Antioxidant action of natural health products and Chinese herbs. *Inflammation*, 10: 79-91, 1986.
37. 손미예, 남상해. 두충차 추출물의 Angiotensin Converting Enzyme 저해효과. *한국식품영양과학회지* 36(12):1511-1516, 2007.
38. 홍희도, 김영찬, 노정혜, 김경탁, 이영철. 증숙 횡수에 따른 고려인삼의 이화학적 특성 변화. *J. Ginseng Res.*, 31(4):222-229, 2007.
39. Eriksson, C.E., Na, A. Antioxidant agents in raw materials and processed foods. *Biochem. Soc. Symp.*, 61: 221-234, 1995.
40. Jiratanan, T., Liu, R.H. Antioxidant activity of processed table beets and green beans. *J. Agr. Food Chem.*, 52: 2659-2670, 2004.