천연발효 경과에 따른 삼정환의 미생물 변화 및 발효특성

신나래 · 왕경화 · 임동우¹ · 이명종 · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학과, ¹동국대학교 한의과대학 한방병리학교실

Microbial Change and Fermentation Characteristics during Samjung-Hwan Natural Fermentation

Na Rae Shin, Jing-Hua Wang, Dongwoo Lim¹, Myeong-Jong Lee, Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University,

¹Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Received: November 6, 2015
Revised: November 23, 2015
Accepted: November 23, 2015

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Rehabilitation Medicine
of Korean Medicine, Dongguk
University Ilsan Oriental Hospital,
College of Korean Medicine, Dongguk
University, 27 Dongguk-ro,
Ilsandong-gu, Goyang 10326, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2015 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: Samjung-hwan (SJH), a well-known traditional fermented herb formula recorded in Dongui Bogam, has been commonly used for prolonging life for four hundred years in Eastern Asia. However, fermented SJH has not been investigated in terms of microbial ecology until present time.

Methods: SJH was fermented for five weeks and fermentation characteristics during SJH fermentation were performed including pH, acidity and microbial profiling. Also, we measured total polyphenol and total flavonoid contents and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. In order to select starter candidate, several lactic acid bacteria were isolated from fermented SJH.

Results: pH of fermented SJH was decreased from 4.7 to 3.0 and acidity was increased from 0.45% to 1.72%. Also, fermented SJH increased antioxidant indicator such as total polyphenol and total flavonoid as well as DPPH free radical scavenging activity. *Lactobacillus brevis* was increased, *Pseudanabaena* sp. was decreased, and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* was stable during 5-week fermentation of SJH. *L. brevis* and *L. plantarum* were isolated from fermented SJH.

Conclusions: Fermented SJH for four weeks had optimal effect on antioxidant and fermentation characteristics such as pH, acidity and microbial profile. Further studies are required to develop starter and analyze functional compounds in order to produce standardized SJH.

Key Words: Samjung-hwan, Lactic acid bacteria, Antioxidants, Fermented herbal

서론

미국 Health 잡지에서 2006년 세계적인 건강식품 다섯 가지에 우리나라의 김치를 포함한 일본의 장류, 그리스의 요구르트 등 세 가지가 발효식품으로 포함되면서 발효에 관한 관심이 증가되었다¹⁾. 발효식품의 기능성이 각광받기 시작하면서 발효한약에 대한 관심도 높아지기 시작했다. 하지만 한약은 표준화 및 질 평가가 상대적으로 부족하며 타 약물과의 상호 작용, 개인차 등의 문제점을 가지고 있다²⁾. 약

효와 부작용의 개인차는 사람마다 장내 미생물 군총의 조성이 다르고 장내 세균에 의한 대사능이 다른 것이 중요한 이유 중의 하나로 알려지고 있다³⁾. 따라서 최근 한약을 발효함으로써 약효성분의 체내흡수율과 생체이용률을 극대화시키는 연구가 수행되고 있다. 발효한약의 기능성과 관련된 연구는 주로 항산화, 항암, 항비만, 알레르기 억제 효과 등의 연구가 보고되었으며⁴⁾ 곰팡이, 세균, 효모와 같은 미생물이나 버섯 균사체 등이 발효한약에 사용되었다⁵⁾.

프로바이오틱스(probiotics)는 적정량 섭취 시 숙주의 건

강에 도움을 주는 미생물 제제를 말한다. 그 건강기능성으로는 정장작용, 병원성 세균의 억제, 혈중콜레스테롤 감소, 변비 및 설사 방지 등이 있다. 신바이오틱스(synbiotics)란 인체 내 프로바이오틱스의 성장을 돕는 영양분인 프리바이오틱스(prebiotics)를 함께 섭취하여 시너지 효과를 낼 수 있다는 용어이다⁶⁾. 프로바이오틱스의 대표적인 예로 유산균이 있으며 최근 프로바이오틱스를 이용한 발효한약에 대한 연구가 수행되면서 발효한약이 신바이오틱스로서의 역할을 할 수 있을 것이라고 기대하고 있다. 최근 발효 백출은 지방세포 억제 및 장투과성, 내독속 완화, 비만관련 장내 미생물 비율 변화에 대한 연구가 수행되었고⁷⁾ 금은화를 이용한 연구에서도 발효하였을 때 점막보호효과가 있다는 연구가 이루어진 바 있다⁸⁾.

동의보감에 기록된 처방인 삼정환(三精丸)은 인정(人精)인 상심자(*Morus alba* Linne)와 지정(地精)인 지골피(*Cortex lycii radices*), 천정(天精)인 창출(*Atractylodes japonica*)로 구성된 대표적인 발효한약 처방으로 “오래 복용하면 몸이 가벼워지고, 얼굴이 동자와 같이 된다.”라고 기록되어 있다. 제조방법은 지골피 및 창출은 각각 1근씩 가루를 내고, 상심자 20근은 즙을 내어 고루 섞은 뒤 옹기에 밀봉 상태로 숙성시킨 후 환으로 제조한다⁹⁾. 이를 통해 숙성과정 중 발효가 일어났음을 유추할 수 있다. 기존 연구 중에서 삼정환은 동물모델을 이용한 항우울 효과¹⁰⁾와 지질 개선 효과¹¹⁾에 대해 나타냈지만, 발효과정을 거치지 않은 상태의 연구였다. 삼정환에 유산균을 접종하여 발효시킨 후 항비만 효과를 보는 연구가 있었지만¹²⁾ 자연 발효시킨 삼정환의 효과에 대한 연구는 미미한 실정이다. 삼정환의 구성 약물들도 많은 연구가 수행되었는데 주성분인 오디는 항산화¹³⁾, 건강기능 개선 효과¹⁴⁾, 지골피는 항산화¹⁵⁾, 혈당강화 효과¹⁶⁾, 창출은 항비만, 콜레스테롤 저하¹⁷⁾ 기능 등이 밝혀져 있다.

우리나라 전통 발효식품은 김치와 된장, 막걸리 등은 발효 동안 관여하는 미생물 변화와 발효특성, 효능 평가와 같은 다양한 연구가 진행되었다¹⁸⁾. 하지만 기존 발효 삼정환 관련된 연구는 삼정환의 숙성 과정 중에서 분리된 미생물이 아닌 프로바이오틱스로 알려진 균주를 이용하여 발효시킨 연구가 보고되었고¹²⁾ 전통방법으로 제조하는 천연 발효한약인 삼정환에 대한 미생물 변화 및 발효 특성에 관한 연구

는 아직 수행되지 않았다.

따라서 본 연구는 전통적인 방식으로 삼정환을 제조하여 발효 동안의 미생물학적 변화를 모니터링하여 발효 특성에 대해 분석 및 항산화 활성이 미치는 영향을 조사하였고 더 나아가 삼정환 발효에 관여하는 유산균을 분리함으로써 표준화된 발효한약 개발에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

상심자, 지골피, 창출은 동국대학교 일산한방병원에서 구입하였다. 상심자는 분쇄하여 즙으로 제조하였고 지골피, 창출은 건조시료를 사용하여 분쇄하였다. 삼정환은 상심자, 지골피, 창출을 각각 20:1:1 비율로 혼합한 뒤 옹기에 담아 통풍이 잘 되고 서늘한 곳에서 5주간 발효시켰다. 발효기간 1주일 마다 50 g의 시료를 채취하여 -80°C 에 보관하여 시료로 사용하였다.

2. pH 및 산도

발효과정 중 pH 변화를 측정하기 위하여 1 g 시료를 9 ml의 0.85% NaCl로 희석한 후 pH를 측정하였다. 총 산도는 1 g 시료를 9 ml의 0.85% NaCl로 희석한 후 0.1 N NaOH로 적정하여 pH 8.3까지 중화하는 데 소비된 0.1 N NaOH의 양을 lactic acid (% w/w) 함량으로 환산하여 표시하였다.

3. 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량

총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 이용하여 측정하였다. 시료는 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 실험에 사용하였다. 2% Na_2CO_3 1 ml에 시료 50 μl , 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 50 μl 를 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시키고 720 nm에서 UV ELISA microplate reader를 이용해 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준 물질로 사용하였고 표준곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 환산하여 표시하였다. 총 플라보노이드 함량은 시료 500 μl 에 5% NaNO_2 300 μl 를 혼합하여 5분간 반응시킨 후 10% AlCl_3 300 μl 를 혼합하여 5분간 반응시킨 다음 1 M NaOH 2 ml로 반응을 정지시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하였

다. chtechin을 표준물질로 사용하였고 표준곡선을 작성하여 총플라보노이드 함량을 환산하여 표시하였다.

4. DPPH free radical 소거능

삼정환 발효 중 free radical 소거활성의 변화를 확인하기 위해 free radical인 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich Corp.)에 대한 환원력을 측정하였다. DPPH는 ethanol에 용해시켜 0.2 mM로 제조하였고 시료 50 μ l를 0.2 mM DPPH 1 ml과 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Free radical 소거능(%)은 $[(\text{대조군 optical density (O.D)} - \text{시료 O.D}) / \text{대조군 O.D}] \times 100$ 의 식을 이용하여 나타냈다.

5. PCR-DGGE 분석

발효된 삼정환의 미생물의 다양성을 분석하기 위해 시료는 PowerFood™ Microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 total DNA를 추출하였고 샘플은 -20°C 에 보관하였다. Genomic DNA는 universal bacterial 16s rRNA gene primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3')을 이용하여 nested-polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 크기를 확인한 다음 약 1.5 kb에서 증폭된 밴드만 잘라 Accuprep gel purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였다. 2차 PCR은 GC clamp가 부착된 GC338F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')을 사용하여 수행하였다. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)는 D Code universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 분석을 수행하였다. Denaturing gradients는 30%~60%로 농도 구배가 연속적으로 형성된 gel을 제작하여 사용하였다. 제작된 gel에 2차 PCR 산물을 로딩하고 1X Tris-acetate-EDTA buffer (60°C)에서 20 V로 30분을 전기영동한 다음 60 V로 13시간을 전기영동하였다. 전기영동이 종료된 gel은 EtBr

로 염색시킨 후 UV illumination (LAS-3000; Fuji photo film, Tokyo, Japan)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

6. DGGE fragment DNA 추출

PCR-DGGE를 통해 분리된 각 DNA 밴드의 염기서열을 분석하고 동정하기 위해 각 위치의 밴드를 자른 후 tube에 옮겨 Gel & PCR Purification System (BioFACT Co. Ltd., Daejeon, Korea)의 protocol을 변형하여 실시하였다. 잘라진 gel 무게의 3배의 UB를 첨가한 다음 4°C 에서 overnight로 배양 후 다음과정은 protocol과 같은 방법으로 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA의 염기서열 분석은 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, 분석된 염기서열은 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)에서 BLAST 분석하여 동정하였다.

7. 미생물 생균수 분석

세균수를 분석하기 위해 시료는 각각 2 g씩 18 ml 0.85% NaCl로 혼합 후 균질화한 다음, 균질액 1 ml를 9 ml 0.85% NaCl로 희석하였다. 희석된 시료는 선발 배지에 100 μ l씩 분주하여 도말 후 배양하였다. 삼정환 내 총 세균수를 확인하기 위해 nutrient agar (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지를, 총 유산균수를 분석하기 위해 MRS agar (Difco) 배지를, *Lactobacillus* 속의 세균수를 분석하기 위해 LBS agar (MB cell, St. Los Angeles, CA USA)를 사용하였다. 30°C 에서 48시간 배양하였고 생균수는 생성 콜로니 개수 (colony forming units per gram, CFU/g)로 나타냈다.

8. 유산균 분리 및 동정

유산균은 MRS agar와 LBS agar plate에서 자란 콜로니 중 무작위로 40개씩 선발하여 순수배양하였다. 순수 분리한 유산균은 random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR을 이용하여 균주를 분류하였다. RAPD-PCR을 위하여 M13 primer (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3')를 사용하였으며 PCR은 94에서 5분간 반응시킨 후 94°C 에서 1분, 45°C 에서 20초, 72°C 에서 2분의 반응을 총 40회 수행한 후 72°C 에서 10분간 최종 신장하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 로딩한 후 100 V에서 3분, 50 V에서 2시간 동안 전기영동한 후 UV illumination (LAS-3000; Fuji photo

film)을 사용하여 밴드를 확인하였다. 밴드 패턴이 비슷한 군주를 그룹으로 나눈 다음 Genomic DNA를 추출하였고 DNA의 염기서열 분석은 Macrogen Inc.에 의뢰하였으며, 분석된 염기서열은 NCBI에서 BLAST 분석하여 동정하였다.

9. 통계처리

모든 측정값은 평균값과 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군 간의 통계분석은 Student's t-test를 통해 시행하였다. 실험의 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. pH 및 총산도 변화

발효식품의 지표 성분 중 pH 및 총산도의 변화는 발효 정도를 알 수 있는 중요한 지표다. 삼정환 발효 동안의 pH 및 총산도는 Fig. 1에 나타났다. 발효 전 삼정환의 pH는 4.7에서 발효 1주 후 4.0으로 급격히 감소하였고 4주 후 pH 3.9를 유지했다. 산도는 발효 전 0.45%에서 발효 1주 후 0.90%, 2주 후 1.44%로 급격히 증가하였고, 발효 4주 이후 1.71%로 일정하게 나타났다. pH와 산도 모두 발효 4주 이후로 일정하게 나타났다.

2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

삼정환 발효 동안의 총폴리페놀 함량의 변화는 Fig. 2와 같다. 발효 전 삼정환의 총 폴리페놀 함량은 9.93 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의

Fig. 1. pH and acidity in Samjung-hwan during fermentation.

함량을 나타내었고, 발효 후 1주 및 2주 후 각각 8.89 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 과 9.30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 함량으로 감소하였다. 하지만 발효 3주 후 10.54 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 함량으로 발효 전보다 높아졌고, 발효 4주 후 11.45 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높게 나타났다으며, 5주 후 11.38 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 반면, 총 플라보노이드 함량은 발효 전 3.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 에서 발효 기간이 증가할수록 그 함량이 증가하였으며, 발효 4주 후 5.63 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 약 1.7배 증가하였고 발효 5주 후 5.56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 함량으로 4주 후 총 플라보노이드 함량과 유의적 차이는 나타나지 않았다(Fig. 3).

Fig. 2. Total polyphenol content ($\mu\text{g}/\text{mg}$) in Samjung-hwan during fermentation. Data shown in mean $\pm$ standard deviation.

Fig. 3. Total flavonoid content ($\mu\text{g}/\text{mg}$) in Samjung-hwan during fermentation. Data shown in mean $\pm$ standard deviation.

3. Free radical 소거 활성

삼정환 발효 동안 DPPH free radical 소거능은 Fig. 4와 같다. 발효 전 11.26%에서 발효 1주 후 45.44%로 약 4배로 급격히 증가하였고, 발효 1, 2, 3, 4주 후 각각 45.44, 48.99, 55.39%로 계속해서 증가하였고, 발효 4주 후 1.84%로 발효 전보다 약 5.5배 더 증가하였다. 하지만 발효 5주 후 58.27%로 그 활성이 감소하였다.

4. 미생물 패턴 변화

발효 시간별로 채취한 삼정환은 PCR-DGGE를 통해 미생물의 변화 양상을 비교하였다. 그 결과, 삼정환은 발효를 시작하고 1주일 후 미생물 패턴이 급격히 변화하였으며, 5주까지 그 패턴이 비슷하게 유지되었다(Fig. 5). 주요 밴드는 16S rRNA gene을 동정하였고 그 결과는 Table 1에 나타났다. 발효 1주 후 *Lactobacillus brevis*는 우점종으로 나타났다으며 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*는 발효 전부터 존재하여 발효 5주 후까지 그 분포도가 유지되었다. 반면

*Enterococcus mundtii*는 발효 1주 후 나타났다 발효가 진행됨에 따라 점차 사라졌으며, *Pseudanabaena* 속도 발효 전부터 나타났으나 발효 5주 후 그 분포도가 급격히 감소되었다. 삼정환은 발효 4주 후 전체적으로 밴드의 굵기가 흐려졌다.

5. 미생물 생균수 변화

삼정환은 일정한 기간 동안 발효 중 총 세균과 유산균, *Lactobacillus* sp.의 생균 수 변화를 조사하였다. 발효를 시작한 시점에서 총 균수는 5.09 log CFU/ml였다(Fig. 6). 발효가 시작되면서 총 세균수는 계속적으로 증가하여 4주 후 7.66 log CFU/ml까지 증가하였다가 5주 후 그 수가 감소하였다. 유산균 역시 초기 5.21 log CFU/ml에서 4주 후 7.98 log CFU/ml까지 증가하였다가 5주 후 7.54 log CFU/ml까지 감소하였다. 반면 *lactobacillus* 속은 초기에 발견되지 않았으나 1주 후 그 수가 6.68 log CFU/ml까지

Fig. 4. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity (%) in Samjung-hwan during fermentation. Data shown in mean $\pm$ standard deviation.

Table 1. Identification of Microorganisms of Samjung-hwan

Band	Description	Assession No.	Identify (%)
a	<i>Lactobacillus brevis</i>	NC 008497.1	95
b	<i>Enterococcus mundtii</i>	NC 022878.1	87
c	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NC 002662.1	100
d	<i>Pseudanabaena</i> sp.	NR 102446.1	90

Fig. 5. Denaturing gradient gel electrophoresis profile during fermentation of Samjung-hwan.

Fig. 6. Change of viable cell counts in Samjung-hwan during fermentation. CFU: colony forming units.

급격히 증가하였고 2주 후 7.75 log CFU/ml로 증가하였다가 5주 후 7.01 log CFU/ml까지 감소하였다.

6. 유산균 분리 및 동정

발효된 삼정환의 유산균은 MRS와 LBS agar 배지를 사용하여 무작위로 크기와 모양이 다른 콜로니를 선발하였다. 40개의 콜로니를 선발하였고, RAPD-PCR를 통해 그 밴드의 패턴이 다른 콜로니를 얻었으며 총 13개의 유산균을 동정하였고 그 결과는 Table 2와 같다. 동정한 유산균 중 11종은 Fig. 5의 결과와 같이 *L. brevis*가 가장 많이 분리되었고 그 다음으로 *L. plantarum* 2종이 분리되었다.

고 찰

최근 발효한약에 대한 관심이 높아지면서 유익한 종균을 한약재에 접종하여 발효시켜 약효를 증진시키거나 부작용을 줄이고자 하는 새로운 재제의 한약이 개발되고 있다. 발효한약은 주로 *Aspergillus* 속 곰팡이나 *Bacillus*, *Bifido-bacterium*, *Lactobacillus* 속의 세균, *Saccharomyces* 속 효모를 이용한 연구가 수행되었다⁵⁾. 이전 연구에서 갈근탕과 쌍화탕을 *Lactobacillus* 속 균주로 발효하였을 때 혈소판 응집 억제 효과가 증가하였고²⁾ 방풍통성산을 *Lactobacillus* 속 균주로 발효하였을 때 항산화 활성이 및 항균 활성이 증가되었다⁴⁾. 하지만 자연발효법을 이용한 발효한약에 대한 연구는 미미하였다. 이에 본 연구는 자연발효법을 이용한 삼정환을 제조하여 발효과정에 따른 특성 및 항산화 활성을 비교하였고 더 나아가 삼정환 발효에 관여하는 미생물 분석

Table 2. List of Lactic Acid Bacteria Isolated from Samjung-hwan

Strain	Description	Assession No.	Identify (%)
L1	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	99
L2	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	100
L5	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	100
L15	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	99
M2	<i>L. plantarum</i> WCFS1	NC_004567.2	98
M25	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	100
M29	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	100
M33	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	99
L16	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	98
L9	<i>L. plantarum</i> WCFS1	NC_004567.2	100
L7	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	99
L6	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	99
L4	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	98
M6	<i>L. brevis</i> ATCC 367	NC_008497.1	98

및 분리하였다.

삼정환은 상심자(오디), 지골피, 창출을 각각 20:1:1로 혼합한 후 숙성과정을 거치면서 제조한다. 삼정환의 주요 구성성분이 오디는 수분이 약 85%로 대부분을 차지하였고, 조단백질은 1%~2%이고 총 당 함량은 건조무게당 32%~77%로 보고되었다¹⁹⁾. 오디의 당은 삼정환 발효 동안 주요 에너지원으로 사용된 것으로 예상된다. 이에 따라 발효 전 pH는 4.7이었으나 발효가 진행됨에 따라 pH가 꾸준히 감소하였고, 발효 4주 후 pH 3.9를 나타냈다. 산도는 발효 전 0.45%에서 발효가 진행됨에 따라 증가하였고 발효 4주 후 1.71%까지 증가하였다. pH나 총산은 발효진행이 주요 지표로 식물성 발효식품인 김치는 이전 연구에서 발효 전 pH가 5.0에서 발효 10일 후 pH 4.0~3.7 정도로 나타났다고 보고한 바 있다²⁰⁾. 삼정환 역시 pH나 총산의 함량을 볼 때 발효가 진행되었다고 생각된다.

삼정환의 발효 동안의 생리활성의 변화를 보기 위하여 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 분석하였다. 페놀 화합물은 과일, 채소, 차와 같은 식품에 존재하며 항산화 활성 및 암과 심혈관계 질환 같은 산화스트레스와 관련된 다양한 질병을 예방하는 효과를 가지고 있다. 유산균은 이러한 페놀 화합물들을 phenolic acid decarboxylase나 reductase와 같은 효소를 이용하여 대사하기도 한다²¹⁾. 자연발효 동안 삼정환의 폴리페놀은 다양한 미생물에 의해 생산되기도 대사되기도 하면서 폴리페놀 함량이 변화 했을 것으로 생각된다. 반면 총 플라보노이드 함량은 계속해서 증

가했는데 이는 삼정환 발효에 관여하는 미생물들이 플라보노이드 생산을 할 수 있으나 이를 더 작은 단위의 화합물로 대사하지 못했을 것으로 예상된다.

삼정환 발효 과정 중 미생물의 변화과정을 비교하기 위하여 PCR-DGGE를 수행하였다. 삼정환은 발효 전 *Lc. lactis* subsp. *lactis*와 *Pseudanabaena* sp.가 주로 존재하였고 이 미생물은 삼정환의 원료인 오디, 지골피, 창출에서 유래했을 것으로 생각된다. 발효 1주 후 미생물의 분포가 다르게 변화하였는데 그 중 *L. brevis*는 주요 미생물로 나타났고 그 *L. brevis*의 밴드는 발효가 종료될 때까지 진하게 유지되었다. *Lc. lactis* subsp. *lactis*는 발효 전부터 존재하였고 다른 미생물에 의해 그 분포도가 크게 감소되지 않았다. 이를 통해 삼정환 발효에 *L. brevis*와 *Lc. lactis* subsp. *lactis*는 가장 큰 영향을 미쳤을 것이다. 반면 *Pseudanabaena* 속은 발효 전부터 존재하였지만 유산균들이 자라면서 그 분포도가 크게 감소하였고 *E. mundtii*는 발효 1주 후 밴드가 진하게 존재하였지만 발효가 진행됨에 따라 밴드가 사라지는 패턴을 보였다. 이는 발효 1주 후 그 분포가 크게 증가한 *L. brevis*가 pH를 감소시켰고 이로 인해 *Pseudanabaena* 속과 *E. mundtii* 생장에 영향을 미쳤을 것을 생각된다. *Lc. lactis*와 *E. mundtii*는 주로 발효유나 치즈 등 동물성 식품에서 분리되었으며, *L. brevis*는 피클이나 사우도우, 김치와 같은 식물성 식품에서 분리되는 유산균이다²²⁾. 따라서 *L. brevis*는 식물성 성분에 잘 적응하여 그 수가 유지된 반면, *E. mundtii*는 환경이 변화하면서 적응하지 못하고 그 수가 줄어들었을 것이다. 삼정환 발효 동안의 생균수 변화를 측정해 보았을 때, *Lactobacillus* 속이 초기에 발견되지 않았으나 발효 1주 후 그 수가 급격히 증가하였다. 이는 PCR-DGGE 결과에서와 같이 *L. brevis*의 밴드가 진해진 결과와 일치하였다. 또한 전체적인 생균 수가 발효 5주 후 감소하였고 PCR-DGGE 결과에서도 전체적인 밴드의 진하기가 줄어든 결과를 보였다.

삼정환 발효에 관여하는 유산균을 분리하였을 때, *L. brevis*가 가장 많이 분리되었고 다음으로 *L. plantarum*이 2종 분리되었다. 이전 연구에서 삼정환은 *L. plantarum*를 이용하여 발효시켜 3T3-L1 지방세포로 실험을 하였을 때, 염색된 지방구 수가 감소한 보고가 있다¹¹⁾. 하지만 가장 많이 분리된 *L. brevis*를 이용한 연구는 아직 수행되지 않아 추후

자세한 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

결론

천연발효 삼정환은 *L. brevis*와 *Lc. lactis* 같은 유산균에 의해 발효되며 발효 기간에 따라 pH 및 총산도와 특성이 변하였다. 또한 발효 후 폴리페놀과 플라보노이드 등 생리활성 물질이 증가하였고 특히 DPPH free radical 소거능은 발효 전보다 발효 4주 후 5.5배 더 증가하였다. pH, 총산도, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH free radical 소거능 등의 결과를 종합해 볼 때 삼정환 최적의 발효 조건은 4주 후가 적합할 것으로 예상된다. 본 연구는 처음으로 삼정환의 발효특성을 분석했다는 점에서 의의가 있다. 하지만 PCR-DGGE에서는 우점종을 나타난 *Lc. lactis* subsp. *lactis*는 분리하지 못하였고 항산화 활성과 관련된 특성을 DPPH free radical 소거능으로만 측정했다는 한계가 있다. 따라서 추후 발효삼정환 제조를 위한 스타터 개발과 천연발효 삼정환의 항산화, 항비만 등 삼정환의 생리활성 기능을 구체적으로 규명할 수 있는 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부 ‘한의약 선도기술개발사업’의 재정 지원을 받아 수행된 연구임(과제고유번호: HI14C0556).

References

1. Raymond J. World's healthiest foods: kimchi [Internet]. New York: Health Media Ventures; 2008 [cited 2008 Feb 1]. Available from: <http://www.health.com/health/article/0,,20410300,00.html>.
2. Son CY, Song BJ, Ma JY, Kwon KI. Anti-platelet aggregation study of fermented Galgeun Tang and fermented Ssanghwa Tang. *Yakhak Hoeji*. 2011 ; 55(5) : 374-8.
3. Gross G, Jacobs DM, Peters S, Possemuier S, Duynhoven J, Vaughan EE, et al. In vitro bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *Agric Food Chem*. 2010 ; 58(18) : 10236-46.
4. Kang DH, Kim JS. Functionality analysis of Korean medicine

- fermented by lactobacillus strains. *J Metabol Bariatr Surg.* 2011 ; 39(3) : 259-65.
5. Choi YK, Sul JU, Park SK, Yu SN, Kim SH, Rhee MS, et al. Research trends of fermented medicinal herbs: based on their clinical efficacy and safety assessment. *J Life Sci.* 2012 ; 22(12) : 1729-39.
6. Park JM, Lee JH, Hong SI. A research trend analysis of probiotics and prebiotics. *Food Sci Ind.* 2014 ; 47(1) : 55-66.
7. Wang JH, Bose S, Kim HG, Han KS, Kim HJ. Fermented *Rhizoma atractylodis macrocephalae* alleviates high fat diet-induced obesity in association with regulation of intestinal permeability and microbiota in rats. *Sci Rep.* 2015 ; 16(5) : 8391.
8. Wang JH, Bose S, Kim GC, Hong SU, Kim JH, Kim HJ. *Flos Lonicera* ameliorates obesity and associated endotoxemia in rats through modulation of gut permeability and intestinal microbiota. *PLoS ONE.* 2014 ; 9(1) : e86117.
9. Huh J. *Dongyibogam*. Seoul : Bubin Press. 1999 : 132.
10. Lee ST, Kim GW, Koo BS. Experimental study on the anti-depressant effect of Sam-Jung-Hwan. *J Orient Neurpsychiatry.* 2008 ; 19(3) : 101-15.
11. Jeong HJ, Kim SY, Jeong JC. Effect of Samjunghwan on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. *J Korean Orient Med.* 2006 ; 27(3) : 14-25.
12. Song MY, Shambhunath B, Kim HJ. Effect of probiotics-fermented Samjunghwan on differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2013 ; 42(1) : 1-7.
13. Jun HI, Kim YA, Kim YS. Antioxidant activities of *Rubus coreanus* and *Morus alba* L. fruits. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 2014 ; 43(3) : 381-8.
14. Kim HB, Kim SY, Ryu KS, Lee WC, Moon JY. Effect of methanol extract from mulberry fruit on the lipid metabolism and liver function on cholesterol-induced hyperlipidemia rats. *Korean J Scric Sci.* 2001 ; 43(2) : 104-8.
15. Jung YS, Park CH, Shin HC. Antioxidative effects of *Lycium chinense* Miller on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Korean J Orient Int Med.* 2014 ; 34(1) : 92-105.
16. Han YK, Park YK. The comparisons of *lycill radicles* cortex and corni fructus water extract effects on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Korea J Herbol.* 2013 ; 28(6) : 71-7.
17. Youh EJ, Seo BK, Nam SS, Kang SK. Anti-obesity effect of *Rhizoma Atractylodis* herbal acupuncture in high fat diet-induced obese ICR mouse. *J Korean Acupuncture Moxibustion Soc.* 2010 ; 26(6) : 31-42.
18. Park KY. Increased health functionality of fermented foods. *Food Industry and Nutrition.* 2012 ; 17(1) : 1-8.
19. Kim EO, Lee YJ, Leem HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH, et al. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberries from seven different *Morus alba* L. cultivars. *J Korea Soc Food Sci Nutr.* 2010 ; 30(10) : 1467-75.
20. Han KI, Kim MJ, Kwon HJ, Kim YH, Kim WJ, Han MD. The effect of container types on the growth of bacteria during Kimchi fermentation. *Korea J Food Nutr.* 2013 ; 26(2) : 249-57.
21. Rodríguez H, Curiel JA, Kandete JM, Rivas B, Felipe FL, Gómez-Cordovés, et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International J Food Microbiol.* 2009 ; 132(2) : 79-90.
22. Leroy F, Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Food Sci Technol.* 2004 ; 15(2) : 67-78.