

소금 첨가에 따른 도라지 발효 특성과 미생물 변화 및 항비만 효능 평가

신나래 · 임수경 · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Effect of *Platycodon grandiflorum* Fermentation with Salt on Fermentation Characteristics, Microbial Change and Anti-obesity Activity

Na Rae Shin, Sokyoun Lim, Hojun Kim

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

Received: November 2, 2018

Revised: November 30, 2018

Accepted: November 30, 2018

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 © 2018 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: This study investigated the effect on microbial ecology, fermentation characteristics and anti-obesity of *Platycodon grandiflorum* (PG) fermentation with salt.

Methods: PG was fermented for four weeks with 2.5% salt and the characteristics of fermented PG were performed by measuring pH, total sugar content, viable bacteria number and microbial profiling. Also, we measured total polyphenol, flavonoid and the percent of inhibition of lipase activity and lipid accumulation.

Results: Salt added to PG for fermentation had an effect on pH, total sugar, total and the number of lactic acid bacteria. Total sugar and pH were reduced and number of total and lactic acid bacteria were increased after fermentation. The majority of bacteria for fermentation were *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* regardless of salt addition. However, microbial compositions were altered by added salt and additional bacteria including *Weissella koreensis*, *W. viridescens*, *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* were found in fermented PG with salt. Total flavonoid was increased in fermented PG and lipid accumulation on HepG2 cells treated with fermented PG was reduced regardless of salt addition. Moreover, fermented PG without salt suppressed lipase activity.

Conclusions: Addition of salt for PG fermentation had influence on fermentation characteristics including pH and sugar content as well as number of bacteria and microbial composition. In addition, fermented PG showed anti-obesity effect by increasing flavonoid content and inhibition of lipase activity and lipid accumulation.

Key Words: *Platycodon grandiflorum*, Fermentation, Salts, Lactic acid bacteria, Anti-obesity agents

서론

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 초롱꽃과로 길경(桔梗), 경초(梗草), 백약(白藥), 고경(苦梗), 이여(利如)로 불리며, 식용으로 이용되는 한약재로 saponin과 platycodin A, C, D와 inulin, betulin 등이 함유되어 있다고 알려져 있다¹⁾. 한방에서는 거담배농(祛痰排膿), 선폐이인(宣肺利咽)과 같은 염

증성 호흡기 치료에 사용되고 소갈(消渴) 같은 당뇨 증상과 장명(腸鳴)과 같은 증상에 처방되는 약재이다²⁾. 비록 도라지가 호흡기 치료 약재로 사용되었지만 현대 약리연구를 통해 비만 흰쥐를 이용한 도라지 추출물의 항비만 효능이 검증되었다³⁾.

발효는 식품 속의 당을 기반으로 세균과 곰팡이, 효모 등의 미생물이 다양한 기질들을 대사하면서 건강에 유익

한 산물을 생성하는 것을 의미한다. 식품 발효에 주로 사용되는 유산균은 유기산을 생성하여 부패균과 식중독균의 생장을 저해시켜 오랜 기간 식품 보관에 안전성을 주는 역할을 한다⁴⁾. 따라서 발효를 통해 식품의 안전성을 높이고 효능을 증진시키는 다양한 연구들이 시도되고 있다. 하지만 식품에 비해 한약은 표준화 공정이나 질을 평가하는 데 부족하며 약물로서 사용되므로 타 약물과의 상호작용 및 개인차 등의 문제점을 가지고 있다⁵⁾. 따라서 최근에는 발효 한약을 개발함으로써 약효 성분의 체내흡수율과 생체이용률을 높이고자 하는 연구가 다수 수행되었다. 발효 한약은 주로 항산화, 항암, 항비만, 알레르기 억제 효과 등의 연구가 진행되었고⁶⁾ 곰팡이, 세균, 효모와 같은 미생물을 넘어 버섯 균사체 등을 이용한 발효 한약 제조에 대한 연구도 진행되고 있다⁷⁾.

도라지를 이용하여 발효한 연구도 다수 수행되었으며, 그 예로 곰팡이인 *Aspergillus oryzae*와 함께 발효시켰을 때 항산화 활성 증진 및 3T3-L1 세포에서 지방세포에서의 지방 축적 감소가 보고되었다⁸⁾. 또한 도라지와 효모를 함께 발효시켜 혈관내피세포에서 세포성장을 촉진시켜 혈관의 안정성과 이동을 촉진시킨 연구가 보고되었고⁹⁾ 식품연구로 젖산균과 도라지 당 추출을 함께 발효한 후 항산화 활성과 관능평가를 실시하여 식품산업에의 사용 가능성을 평가하였다¹⁰⁾.

우리나라 전통 발효 식품에 있어서 김치, 막걸리, 된장 등은 발효 중 특성과 미생물 변화, 스타터로의 활용 가치에 대한 연구가 다수 수행되었다⁴⁾. 하지만 대부분의 도라지 발효 연구들은 기존에 알려진 유산균이나 효모, 곰팡이를 이용한 연구가 진행되었고 자연 발효되었을 때 미생물의 분포나 발효 전후에 따른 연구가 미미한 실정이다. 따라서 자연 발효를 통해 도라지에 잘 적응하는 균주들에 대한 연구 또한 필요하다.

더불어 김치와 된장 같은 전통 발효 식품에는 소금을 첨가하여 발효를 시킨다. 특히 김치에서 소금은 발효 과정 중 미생물의 생육을 조절하고 삼투압 작용으로 유해한 미생물을 사멸시키며 내염성이 있는 미생물을 생육시키는 역할을 한다¹¹⁾. 따라서 본 연구는 소금을 첨가한 도라지를 자연 발효시키는 동안 이화학적 특성과 미생물학적인 변화를 모니터링함으로써 스타터로서의 가능성이 있는 균주들을 선별하고, 나아가 발효에 따른 항비만 효능을 검증하여 활성을 증진시킨 발효 한약을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 도라지 발효

본 실험에 사용한 도라지는 충북 충주에서 생산된 생도라지(Bburi-maeul, Chungju, Korea)를 사용했다. 도라지의 불필요한 부분을 제거하고 세척한 후 분쇄하여 발효에 사용했다. 발효를 위해 1 kg의 도라지를 대조군으로 사용했고 소금 첨가 그룹은 2.5 g/kg의 소금 농도로 소금을 첨가하여 용기에 담았으며 통풍이 잘 되고 서늘한 곳에 4주 동안 발효시켰다. 발효 기간 동안 매주 100 g씩 채취하여 -80°C에 보관한 뒤 시료로 사용하였다.

2. pH 측정

발효 정도를 분석하기 위해 pH를 측정하였다. 이를 위하여 1 g 시료를 9 mL의 0.85% NaCl로 희석한 후, pH 미터(Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. 총 당의 함량 측정

발효 중의 도라지의 당 함량 변화를 측정하기 위해 페놀-황산법을 이용하여 총 당 함량을 측정했다. 즉 발효 샘플을 saline으로 100배 희석한 후 희석한 샘플 2 mL에 5% 페놀 1 mL를 첨가한 후 혼합하였다. 그 후 95% 황산을 5 mL 첨가한 후 30분 동안 실온에 방치하였다. 총 당의 함량은 470 nm에서 흡광도(Spectramax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 측정하였으며, 총 당 함량을 정량하기 위해 포도당을 표준물질로 사용했고 표준곡선을 작성하여 총 당 함량을 환산하여 표시하였다.

4. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) 분석

발효 도라지의 미생물은 PCR-DGGE를 이용하여 분석하였다. 매주 얻은 시료는 PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR-DGGE는 기존 연구 방법에 따라 분석하였다¹²⁾. Total DNA는 미생물의 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-PCR을 시행하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로스젤(agarose gel)에 전기 영동하여 PCR 산물의 크기

를 확인한 후 약 1.5 kb에서 증폭된 밴드만 잘라 Accuprep gel purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 PCR 산물을 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')를 사용하여 PCR 산물을 증폭하였다. PCR-DGGE는 D Code universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 분석을 수행하였다. Denaturing gradients는 30~60%로 농도 구배가 연속적으로 형성된 젤을 제작하여 사용하였다. 제작된 젤에 2차 PCR 산물을 로딩하고 1X Tris-acetate-EDTA buffer (60°C)에서 20 V로 30분을 전기영동한 후 60 V로 13시간을 전기영동하였다. 전기영동이 종료된 젤은 ethidium bromide로 염색시킨 후 UV illumination (LAS-3000; Fuji photo film, Tokyo, Japan)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

5. 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 수행했다. 잘라진 gel 무개의 3배의 UB를 첨가한 다음 4°C에서 overnight로 배양 후 다음 과정은 BioFACT Co., Ltd.에서 제공한 방법과 같은 방법으로 DNA를 정제했다. 정제된 DNA의 염기서열 분석은 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, 분석된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 분석하여 동정했다.

6. 미생물 생균수 분석

세균수를 분석하기 위해 시료는 각각 2 g씩 18 mL 0.85% NaCl로 혼합 후 균질화 한 다음, 균질액 1 mL를 9 mL 0.85% NaCl로 희석하였다. 총 세균수는 Tryptic Soy Agar (TSA) 배지(Difco, Detroit, MI, USA)를, 유산균은 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar 배지(Difco, Detroit, MI, USA)를 이용해 분석했다. 희석한 시료는 100 μ L씩 TSA와 MRS 배지에 분주하여 도달한 후 37°C에서 48시간 배양했다. 생균수는 생성 콜로니 개수는 colony forming units (CFU)/g으로 나타냈다.

7. 미생물 분리 및 동정

TSA와 MRS agar plate에서 자란 콜로니 중 무작위로 20개씩 선별하여 순수배양하였다. 미생물의 분류는 이전 연구에서 사용된 방법에 따라 수행하였다¹²⁾. 순수 분리한 미생물은 random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR)을 이용하여 균주를 분류하였다. RAPD-PCR을 위하여 M13 primer (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3')를 사용했고 PCR은 94°C에서 5분간 반응시킨 후 94°C에서 1분, 45°C에서 20초, 72°C에서 2분의 반응을 총 30회 수행한 후 72°C에서 10분간 최종 신장하였다. PCR 산물은 2% 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 균주를 그룹으로 나눈 다음 Genomic DNA를 추출하였고 DNA의 염기서열 분석은 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, 분석된 염기서열은 NCBI에서 BLAST 분석하여 동정하였다.

8. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 페놀함량(total polyphenol)을 분석하기 위해 시료는 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 사용하였다. 2% Na₂CO₃ 1 mL에 시료 50 μ L, 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma, Louis, MO, USA) 50 μ L를 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시킨 후 720 nm에서 UV ELISA microplate reader (Spectramax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 표준곡선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 환산하였다. 총 플라보노이드(total flavonoid) 함량은 시료 500 μ L에 5% NaNO₂ 300 μ L를 혼합하여 5분간 반응시킨 후 10% AlCl₃ 300 μ L를 혼합하여 5분간 반응시킨 후에 1 M NaOH 2 mL로 반응을 정지시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하였고 표준곡선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 환산하였다.

9. Lipase 저해 활성

Lipase 활성을 분석하기 위해 시료는 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 사용하였다. Lipase from porcine pancreas Type II (Sigma, Louis, MO, USA)를 10 mg/mL 농도로 용해시킨 후 16,000 rpm에서 5분 동안 원심

분리시킨 후 상등액을 효소액으로 사용하였다. 기질은 3 mM p-nitrophenyl-dodecanoate를 5 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 1% triton X-100을 첨가하여 100°C에서 2분 동안 용해시킨 후 37°C에서 식혀서 기질로 사용하였다. 50 μ L 샘플에 100 μ L lipase 효소액과 150 μ L 100 mM tris-HCl buffer (pH 5.0)를 넣어서 준비한 후 100 μ L 기질을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 배양액은 10,000 rpm에서 1분 동안 원심분리한 후 상층액을 따서 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. 간세포 배양 및 Oil red O 염색

사람에서 유래한 간암세포주인 HepG2 세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% Penicillin/Streptomycin solution (P/S)을 첨가한 배지에 배양하였다. 6 well plated 4×10^5 cells/well의 양으로 seeding한 후 37°C, CO₂ 배양기에 24시간 배양하였다. 1 mM free fatty acid (Oleic acid:palmitic acid=2:1)와 30% 에탄올로 추출한 추출물을 100 mg/mL의 농도로 처리한 후 24시간 배양한 뒤 Oil red O 염색으로 간세포에 축적된 지방량을 측정하였다. Oil red O 염색은 배양된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 3번 씻어낸 후 4% formalin에 5분간 배양한 후 다시 버리고 2시간 동안 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 60% isopropanol로 씻어낸 후 Oil red O solution을 분주한 후 10분 동안 배양한 뒤 염색된 세포는 물로 4번 씻어낸 후 100% isopropanol로 염색된 Oil red O를 녹인 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11. 통계분석

모든 측정값은 3번 반복하여 측정하였고 평균값(mean)과 표준오차(Standard Error of the Mean)로 나타냈으며, 각 실험군 간의 통계분석은 Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하였고 one-way analysis of variance (ANOVA) test 혹은 Student t-test를 통해 시행했다. 실험 결과의 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하인 경우에 유의한 것으로 인정했다.

결과

1. pH 및 총 당 함량 변화

발효의 정도는 pH와 총 당 함량을 이용하여 분석했다. 도라지 발효 중 소금의 첨가 유무가 결과에 차이를 나타냈다. 발효 전 도라지의 pH는 5.86, 소금 첨가 도라지의 pH는 5.57이고, 발효 1주일 후 도라지는 4.14인 반면 소금 첨가 도라지는 4.4로 pH가 더 높은 것으로 나타났다. 매주 pH를 측정하였고, 대조군은 발효 4주일 후 pH 4.09까지 내려갔으며 소금 첨가 도라지는 발효 후 pH 3.94로 더 낮은 pH를 보였다(Fig. 1A).

총 당 함량 변화에도 소금 첨가 유무에 따른 차이를 보였는데, 발효 후 1주까지는 소금 첨가 유무에 따른 차이는 없이 감소했고, 3주 후부터 도라지의 총 당 함량이 유의하게 더 감소되었으며 4주 발효 후 최종 총 당 함량은 각각 109.5와 225.7 mg/g으로 소금 첨가 도라지에서 약 2배 정도 높은 총 당 함량을 보였다(Fig. 1B). 따라서 도라지는 발효 중 pH와 당 함량 모두 감소시켰으며, 특히 소금 첨가 도라지에서 총 당 함량의 감소가 더디게 나타나는 것을 확인했다.

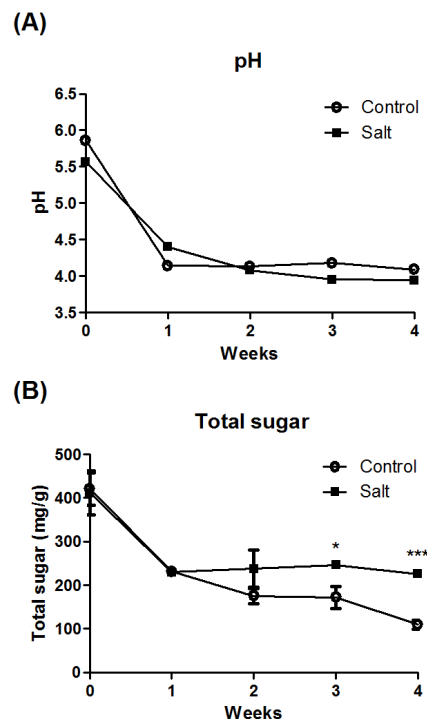


Fig. 1. Change (A) pH and (B) total sugar of *Platycodon grandiflorum* during fermentation with and without salt. Data are expressed as means \pm Standard Error of the Mean (SEM). *P < 0.05; ***P < 0.001 vs. control.

2. 미생물의 생균수 변화

발효에 관여하는 미생물 수의 변화를 비교하기 위해 총 세균과 유산균의 생균수를 측정했다. 총 세균수와 유산균수는 발효 전 소금 첨가 유무에 따른 차이는 보이지 않았다. 하지만 총 세균수에서 발효 1주 후 소금 첨가 도라지에서 유의하게 증가하였고 2주 후에는 도라지에서 유의적으로 증가하였으며, 마지막 4주 후 다시 소금 첨가 도라지에서 유의하게 높은 총 세균수를 보였다(Fig. 2A). 유산균 분석에서도 발효 1주 후 소금 첨가 도라지에서 유의하게 균수가 증가되었고, 최종 4주 후에도 유의하게 증가되었다(Fig. 2B). 소금 첨가 유무에 상관없이 도라지 발효 중 유산균도 상당수 증가되었다.

3. 미생물의 분포 변화

발효 중 미생물 분포의 변화를 보기 위해 PCR-DGGE 분석을 하였다. 그 결과 전체적인 미생물의 분포는 발효

전 그리고 발효 1주 후로 구분되었으며 1주 후부터 발효 기간이 지남에 따른 변화는 크게 나타나지 않았다. 발효 전 나타났던 *Uncultured Chroococcidiopsis* species, *Rhizobium tropici* 균주는 발효가 진행됨에 따라 미생물의 상대적인 분포도가 줄어들었다. 소금 첨가 유무에 상관없이 *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*와 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*가 공통적으로 발효 중 증가되었다. 특히 *L. plantarum*과 *Leu. pseudomesenteroides*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*는 발효 전부터 약하게 존재했고 발효가 진행됨에 따라 그 분포가 증가되었다. 또한 소금 첨가 도라지에서는 더 다양한 미생물들이 발효에 관여했는데 *Weissella ko-reensis*, *Weissella viridescens*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Uncultured Enterobacteriaceae bacterium*이 눈에 띄게 증가했다(Fig. 3, Table 1). 도라지 발효는 *Lactobacillus*와 *Weissella*와 같은 유산균이 주요 발효 미생물로 관찰되었다.

4. 유산균의 분리 및 동정

DGGE로 분석한 미생물을 분리하기 위해 총 200종의 미생물을 순수 분리했고, RAPD-PCR로 그룹을 나누어 총 18종의 미생물 그룹을 동정하였다. 그 결과, 가장 진한 밴드를 보였던 *L. plantarum*이 가장 많이 동정되었고, 또한

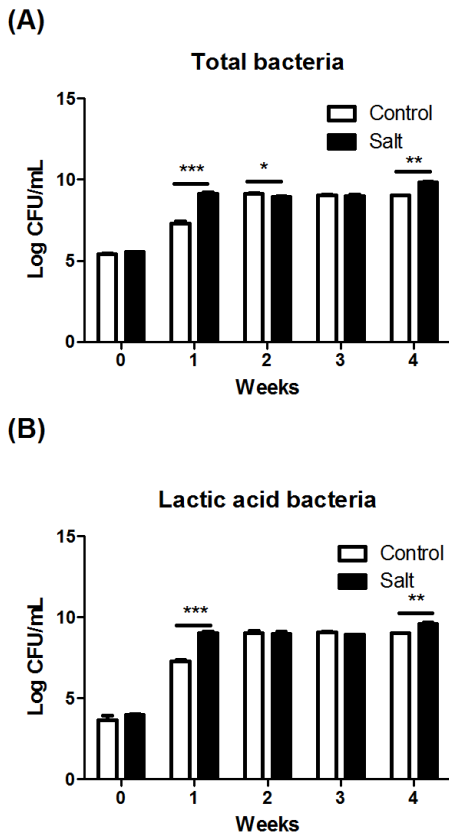


Fig. 2. Changed viable cells of (A) total bacteria and (B) Lactic acid bacteria during *Platycodon grandiflorum* fermentation with and without salt. Data are expressed as means±SEM. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 vs. control.

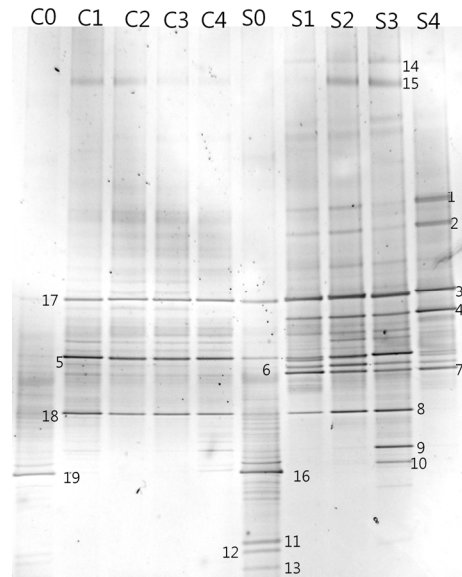


Fig. 3. Bacteria profile by Denaturing gradient gel electrophoresis during *Platycodon grandiflorum* fermentation with (C0-C4) and without salt (S0-S4). The meaning of each number is shown in Table 1, C: control, S: salt.

Table 1. Identification of Bacteria on DGGE Band

No.	Description	Ident (%)
1	<i>Weissella koreensis</i>	98
2	<i>Weissella viridescens</i>	98
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
4	<i>Weissella viridescens</i>	99
5	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	98
6	<i>Lactobacillus sakei</i>	98
7	<i>Lactobacillus curvatus</i>	95
8	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97
9	Uncultured <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium	98
10	Uncultured <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium	99
11	<i>Rhizobium tropici</i>	92
12	<i>Rhizobium tropici</i>	86
13	<i>Wimmerella hederacea</i>	88
14	<i>Weissella viridescens</i>	98
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
16	Uncultured <i>Chroococcidiopsis</i> sp	97
17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
18	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98
19	<i>Wimmerella hederacea</i>	97
	<i>Porterellacarnosula Lobelia thuliniana</i>	

DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis, subsp: subspecies, sp: species.

*Leu. pseudomesenteroides*는 분리되지 않았지만 *Leuconostoc mesenteroides*가 분리되었고, 그 외에도 DGGE 밴드에 나타난 *L. sakei*와 *L. curvatus*도 분리되었다. 그 외에도 *Pseudomonas fluorescens*와 *Lactobacillus brevis*가 추가적으로 분리되었다(Table 2).

5. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

발효 중 활성 물질들의 변화를 보기 위해 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 소금 첨가 유무에 상관없이 발효 전후에 따른 차이는 보이지 않았다(Fig. 4A). 반면 총 플라보노이드 함량은 발효 전후로 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$). 도라지 발효 전 1.11 mg/g에서 발효 4주 후 2.10 mg/g으로 증가하였고, 소금 첨가 도라지는 발효 전 1.53 mg/g에서 3.04 mg/g으로 증가하였다(Fig. 4B). 따라서 도라지 발효는 소금 첨가 유무에 상관없이 총 플라보노이드 함량은 증가시켰으나, 총 폴리페놀의 함량에는 변화가 없었다.

Table 2. Identification of Isolated Bacteria from Fermented *Platycodon grandiflorum*

Name	Description	Ident (%)
1-1T	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98
2-3T	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
3-1T	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
S1-3T	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99
S1-4T	<i>Lactobacillus sakei</i>	99
S2-1T	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
S2-2T	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
S2-9T	<i>Lactobacillus sakei</i>	98
S3-1T	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97
S4-6T	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
1M-1-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	95
1M-2-3	<i>Lactobacillus brevis</i>	96
1M-2-12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	91
1M-4-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97
1M-4-6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97
1M-S1-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	95
1M-S-1-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97
1M-S4-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96

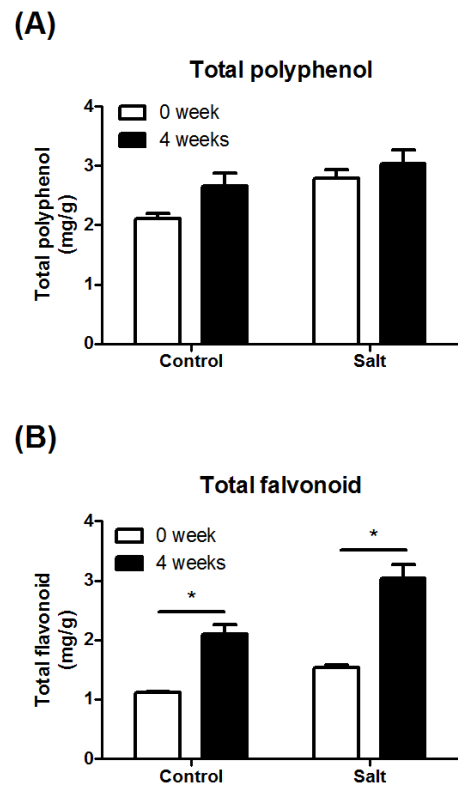


Fig. 4. Content (mg/g) of (A) total polyphenol and (B) flavonoid before and after fermentation of *Platycodon grandiflorum* with and without salt. Data are expressed as means \pm SEM, * $P < 0.05$ vs. control.

6. Lipase 저해 활성

도라지 발효 전후에 따른 지방가수분해에 미치는 영향을 측정하기 위해 lipase 저해 활성을 측정했다. 그 결과 발효 전에도 lipase 활성을 억제시켰고, 특히 대조군인 도라지에서 발효 전과 비교했을 때 발효 후 lipase 저해 활성이 유의하게 증가했다($P < 0.05$). 반면 소금을 첨가한 그룹에서도 발효 후 그 값이 증가했지만 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 5). 따라서 도라지는 발효 후 지방가수분해 효소의 활성 저해를 증가시켰다.

7. 간세포에서의 지방 축적 억제 효과

간세포에서 도라지 발효에 따른 지방 억제능을 평가하기 위해 HepG2 세포에 유리지방산을 처리하여 지방의 축적을 관찰했다. 발효 전에도 지방 축적 값이 감소했지만, 유의한 차이는 없었다. 하지만 도라지 발효 후 소금 첨가 유무에 상관없이 지방산 흡수가 약물을 처리하지 않은 대

조군과 비교하여 유의하게 감소했다($P < 0.05$). 특히 도라지만 발효했을 때 더 유의한 차이를 보였다(Fig. 6).

고찰

발효 식품에 대한 관심이 커지면서 기존 식품발효 이외에도 한약을 발효시켜 효능을 평가하는 연구들이 다수 수행되고 있다. 한약을 발효하기 위해 사용되는 미생물은 세균에서는 *Bacillus*, *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*를, 곰팡이에서는 *Aspergillus*, 효모 중에는 *Saccharomyces*를 이용하고 주로 식품 유래의 미생물을 이용하고 있다⁷⁾. 대표적인 예로 *Lactobacillus*를 이용하여 쌍화탕과 방풍통성산을 발효시켜 혈소판 응집 억제 효능과 항산화 활성 및 항균활성을 평가한 연구가 수행되었다^{5,6)}. 하지만 한약재를 자연 발효시켜 효능을 검증하는 연구는 아직 미미하다.

따라서 본 연구에서 한약재인 도라지를 자연 발효시킴으로써 이화학적인 변화와 미생물학적인 변화를 분석하였고 발효 전후에 따른 비만에 미치는 영향을 평가하였다. 발효 식품에서 소금은 유해균을 억제시키고 내염성을 가지는 유산균의 생육을 증진시키는 역할을 한다. 이를 위해 도라지에 2.5%의 소금을 첨가하여 대조군과 비교하였다. 도라지 발효에 사용된 소금의 농도는 같은 식물성 발효 식품인 김치 발효를 위해 사용하는 농도로 맞추어 사용하였다¹¹⁾.

도라지는 발효 1주일 후, pH는 발효 전보다 각각 대조군에서 4.14, 소금 첨가군은 4.40으로 떨어졌고 총 당 함량은 발효 전보다 각각 대조군에서 190 mg/g, 소금 첨가군은 182 mg/g씩 떨어졌다. 총 세균수는 발효 후 대조군은 log 1.9 CFU/g, 소금 첨가군은 log 1.9 CFU/g씩 급증했고, 유산균 수도 발효 후 대조군은 log 3.6 CFU/g, 소금 첨가군은 log 5.1 CFU/g씩 증가했다. 유산균은 주로 당을 주요 탄소원으로 사용하여 성장하며 발효에 영향을 준다. 기존 연구에서 전통 발효 식품 중 김치는 발효 전 pH가 5.0에서 발효 10일 후 pH 4.0~3.7 정도로 내려갔다¹³⁾. 도라지 역시 pH나 총 당의 함유를 볼 때 발효가 진행되었다고 사료된다. pH 변화에 있어서 소금 첨가 유무에 따른 차이는 크게 나지 않았지만 총 당 함량은 유의한 차이가 나타났는데 소금이 발효 속도 조절에도 상당한 역할을 했을 것이다. 당은 젖산균과 초산균에 의해 젖산과 초산으로 변하게 되고 pH가 낮아진다. 그중 초산은 효모에 의해 알코올이 되면

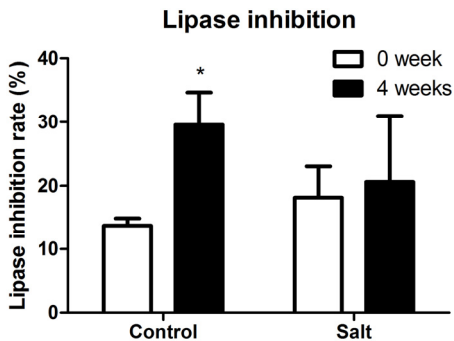


Fig. 5. Lipase inhibition of extracted *Platycodon grandiflorum* of before and after fermentation. Data are expressed as means±SEM. * $P < 0.05$ vs. control.

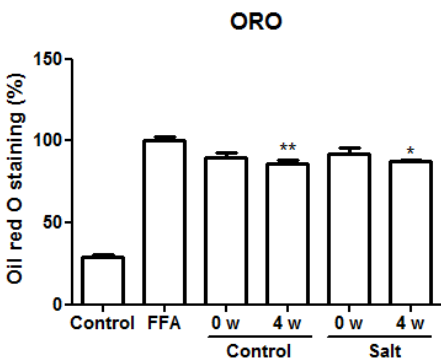


Fig. 6. Oil red O staining for HepG2 cells of extracted *Platycodon grandiflorum* of before and after fermentation. Data are expressed as means±SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; vs. control, FFA: free fatty acid, w: weeks.

pH는 유지되지만, 당 함량이 감소될 수 있다¹⁴⁾. 대표적인 젖산발효인 김치의 pH는 4.0~3.7 정도로 내려갔지만¹³⁾, 초산균은 젖산균에 비해 식품의 pH를 더 낮춘다고 보고되었다. 초산균 종류에 따른 식초의 품질을 평가한 연구에서도 모든 초산균이 pH를 3 이하로 낮추었다¹⁵⁾. 비록 본 연구에서 초산과 효모의 분포에 대한 연구는 수행하지 않았지만, 소금 첨가 도라지에서는 초산균이 pH를 낮추는 역할을 하였을 것으로 사료되고, 대조군에서 효모는 알코올을 생성하면서 pH의 변화 없이 총 당 함량을 감소시켰을 것으로 사료된다. 추후 이를 규명하는 연구가 더 필요할 것이다. 소금 첨가 유무에 따라 총 세균과 유산균 수도 발효 1주 후 유의하게 차이를 보였는데 이러한 변화도 발효 속도에 영향을 주었다고 사료된다.

소금 첨가 유무에 따른 도라지의 발효 과정 중 전체 미생물의 조성을 비교하기 위하여 PCR-DGGE를 수행했다. PCR-DGGE는 배양하기 어려운 미생물로부터 DNA를 추출하여 PCR로 증폭함으로써 비교적 DNA 양이 적어도 미생물의 군집과 다양성을 분석할 수 있는 기술로 사용되고 있다¹⁶⁾. 발효 전 Uncultured *Chroococciopsis* sp, *Rhizobium tropici* 균주가 발견되었다. *Chroococciopsis* sp는 광합성하는 남세균¹⁷⁾으로 *Rhizobium*은 질소고정 세균으로 알려져 있으며¹⁸⁾, 인체에 미치는 영향에 대한 연구는 되어있지 않았다. 하지만 발효 중 증식한 *Lactobacillus*와 *Leuconostoc*, *Lactococcus*는 프로바이오틱스로 건강에 유익한 영향을 주는 균주로 보고되었다¹⁹⁾. *L. plantarum*과 *Leu. pseudomesenteroides*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*는 소금 첨가 유무에 상관없이 발효 중 증가했다. 한약 발효 연구 중 삼정환을 이용한 자연 발효 연구에서 비록 *L. brevis*가 우점종으로 나타났다지만 *L. plantarum*과 *Lc. lactis* subsp. *lactis*도 발효 중 증가했다¹¹⁾. 발효시킨 약재에 차이는 있지만 식물유래의 약재 발효에는 *L. plantarum*과 *Lc. lactis* subsp. *lactis*와 같은 미생물들이 발효에 영향을 주는 것으로 생각된다. 반면 소금 첨가로 *W. koreensis*, *W. viridescens*, *L. sakei*, *L. curvatus*와 같은 균주는 추가적으로 증가되었다. 위의 균주들의 영향으로 총 당 함량과 pH 등의 지표성분에 영향을 준 것으로 사료된다. *W. koreensis*, *L. sakei*와 같은 균주 이외에도 *Lue. mesenteroides*는 발효 도라지에서 순수 분리된 균주로 기존 연구에서도 김치 발효 중 생성되었다²⁰⁾. 김치는 발효 중 소금에 의해 자라는 생균수나 미생물의 패턴에도 영향을 미쳤으며¹¹⁾, 본 연구 결과에서도 소금에 의해 발효

중 성장하는 미생물의 분포와 생균수에도 영향을 주었을 것이다.

도라지는 발효 동안 생리활성 물질의 함량에도 변화를 주었다. 특히 총 플라보노이드 함량은 소금 첨가 유무에 상관없이 유의하게 증가되었다. 페놀화합물은 과일 채소와 같은 식물성 식품에 존재하며 항산화 활성 및 암과 관련된 산화 스트레스 억제에 역할을 하고 있다. 유산균은 이런 페놀 화합물을 decarboxylase나 reductase와 같은 효소에 의해 caffeic acid는 vinyl catechol이나 ethyl catechol로 대사한다. 또한 유산균은 tannic acid와 methyl gallate와 같은 식물유래 페놀화합물을 tanase에 의해 gallic acid로 대사한다²¹⁾. 도라지 발효 동안 총 플라보노이드 함량 증가는 미생물들에 의해 큰 분자로 있던 플라보노이드가 분해되어 그 함량이 증가된 것으로 예상된다²¹⁾.

항비만제는 식욕억제와 대사활성 증진, 지방 흡수를 억제하는 기전에 따라 분류된다. 그중 지방 흡수 억제 기전은 장에서 지방을 분해하는 효소인 lipase의 활성을 억제시켜 장에서 지방이 흡수되지 않고 몸 밖으로 배출시키는 것이다²²⁾. 도라지는 발효 후 지방을 분해하는 lipase의 저해 효과를 증진시켰다. 이런 효능은 발효 도라지를 섭취했을 때 장내에서 지방의 분해가 억제되어 체외로 배출되는 데 도움을 줄 것으로 기대한다. 또한 간세포에서 유리지방산으로 비알코올성 간염을 유발한 모델에서도 도라지 발효 후 간 내 지방 축적이 억제되었고 이런 발효 도라지의 효능은 비만치료와 예방에 도움을 줄 수 있을 것이다.

한방에서 도라지는 호흡기 치료에 사용되었지만²⁾ 기존 연구 중에는 호흡기 질환 이외에도 비만과 같은 대사질환에 대한 연구도 수행되었다. 나아가 곱팡이와 효모, 세균과 같이 다양한 미생물을 이용한 발효 연구 및 효능 평가에 대한 연구들도 수행되었다. 하지만 도라지에 잘 정착하여 성장하며 효능을 증진시킬 수 있는 발효에 대한 연구는 미미한 실정이다. 본 연구는 자연 발효를 통해 도라지에 잘 적응하는 균주들을 조사하였고 이를 통해 도라지 발효에 활용할 수 있는 미생물의 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 도라지 발효 전후 효능을 비교해 봄으로써 lipase의 활성 억제나 간세포의 지방 축적 억제와 같은 항비만 효능에 활성을 나타냈다. 비록 도라지 발효에 소금 첨가는 pH와 총 당 함량, 총 세균수와 유산균 수, 미생물의 조성에 영향을 주었지만, 총 플라보노이드 함량과

lipase 저해 활성에는 발효 후 소금 첨가로 효능을 감소시켰다. 두 그룹 모두 간세포에서 지방 축적 억제 기능에서 효능을 보였지만 소금 첨가의 상승효과를 발견하지 못했다. 따라서 비만을 유도한 동물모델을 이용한 항비만 효능 평가를 통한 추가적인 연구가 더 필요하다.

결론

도라지는 발효 중 소금 첨가 유무에 따라 pH, 총 당 함량, 총 세균수와 유산균 수에 영향을 주었다. 특히 발효 중 미생물의 분포를 비교해 보면 소금 첨가로 인해 *W. korensis*, *W. viridescens*, *L. sakei*, *L. cuvatus*와 같은 유산균의 다양성이 더 증가되었다. 발효 전후에 따른 플라보노이드의 함량에도 상당한 영향을 주었고 도라지만 발효시켰을 때, lipase를 저해하는 활성이 더 크게 나타났다. 하지만 소금 첨가 유무에 상관없이 발효 중 *L. plantarum*과 *Leu. pseudomesenteroides*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*가 주요 미생물로 발효에 관여했으며 간에서 지방 축적이 억제되었다. 비록 소금 첨가가 미생물에 영향을 주었지만, 발효 후 효능에 있어 상승효과는 나타나지 않았다. 결론적으로 본 연구 결과를 통해 도라지 발효는 소금 첨가와 상관없이 장내 지방분해와 간의 지방 축적을 억제함으로써 비만 예방과 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2016년 한국연구재단의 지원에 의해 수행되었다(과제고유번호: NRF-2016R1A2B4014225).

References

- Hong MW. Statistical analyses of Platycodi radix prescriptions. Korean Journal of Pharmacognosy. 1974 ; 5(1) : 61-7.
- Jang YE, Seo BI. The anti-obesity effects of Platycodi Radix, combination of Platycodi Radix and Cyperi Rhizoma on obesity induced by high fat diet. Kor J Herbology. 2016 ; 31(3) : 240-1.
- Byun BH. Antiobesity effects of Platycodon grandiflorum extract on body weight changes and serum lipid profiles of obese rats induced high fat diet. Korean J Life Sci. 2003 ; 13(6) : 896-902.
- Park KY. Increased health functionality of fermented foods. Food Industry and Nutrition. 2012 ; 17(1) : 1-8.
- 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.
- Kang DH, Kim JS. Functionality analysis of Korean medicine fermented by lactobacillus strains. J Microbiol Biotechnol. 2011 ; 39(3) : 259-65.
- 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.
- Kang YH, Kim KK, Kim TW, Yang CS, Choe M. Evaluation of the anti-obesity activity of Platycodon grandiflorum root and Curcuma longa root fermented with Aspergillus oryzae. Korean J Food Sci Technol. 2015 ; 47(1) : 111-8.
- Choi W, Song J, Park MH, Yu HJ, Park H. Effect of fermented Platycodon grandiflorum extract on cell proliferation and migration in bovine aortic endothelial cells. J Life Sci. 2016 ; 26(1) : 59-67.
- Lee KS, Kim JN, Chung HC. Study on anti-oxidative activities and beverage preferences relating to fermented lotus root and Platycodon grandiflorum extracts with sugar through lactic acid fermentation. The East Asian Society of Dietary Life. 2015 ; 25(1) : 183-92.
- Park SJ, Park KY, Jun HK. Effects of commercial salts on the growth of kimchi-related microorganisms. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2001 ; 30(5) : 806-19.
- Shin NR, Wang JH, Lim D, Lee MJ, Lim H. Microbial change and fermentation characteristics during Samjung-Hwan natural fermentation. J Korean Med Obes Res. 2015 ; 15(2) : 123-30.
- 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. The Korean Journal of Food And Nutrition. 2013 ; 26(2) : 249-57.
- Lee SY, Yoo KM, Moon BK, Hwang IK. A study on the development of vinegar beverage using Yacon Roots (*Smallanthus sonchifolius*) and analysis of components changes during the fermentation. Korean J Food Cook Sci. 2010 ; 26(1) : 95-103.
- Baek SY, Kim JS, Mun JY, Lee CH, Park YK, Yeo SH. Quality characteristics of detoxified *Rhus verniciflua* vinegar fermented using different acetic acid bacteria. Korean J. Food Preserv. 2016 ; 23(3) : 347-54.
- Kim YJ, Cho HJ, Yu SN, Kim KY. Diversity of marine microbes by PRC-DGGE. Kor J Fish Aquat Sci. 2007 ; 40(6) : 356-61.
- Caiola MG, Billi D, Friedmann EI. Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). Eur J Phycol. 1996 ; 31(1) : 97-105.

18. Ehrhardt DW, Wais R, Wais SR. Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell*. 1996 ; 85(5) : 673-754.
19. Cha SK. Probiotic microorganisms and lactic acid bacterial foods. *J Microbiol*. 2000 ; 26(2) : 13-21.
20. Jung JY, Lee SH, Jin HM, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2013 ; 163(2) : 171-9.
21. Rodríguez H, Curiel JA, Kandete JM, Rivas B, Felipe FL, Gómez-Cordovés, et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2009 ; 132(2) : 79-90.
22. Back G, Goo BG, Ahn BJ, Park JK. Effects of water-soluble polysaccharides from tott on lipid absorption and animal body weight. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2013 ; 42(4) : 556-62.