

## 발효 더덕 및 소금 처리 발효 더덕의 미생물 특성과 항산화, 항비만, 항당뇨 효능 변화

성은학 · 이명종 · 김호준 · 신나래

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

### Changes of Efficacy of Antioxidant, Antidyslipidemic, Antidiabetic and Microbiological Characteristics in Fermented and Salt-treated Fermented *Codonopsis lanceolata*

Eun-Hak Seong, Myeong-Jong Lee, Hojun Kim, Na Rae Shin

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

**Received:** November 3, 2018  
**Revised:** November 25, 2018  
**Accepted:** November 27, 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:** We investigated about the microbial properties and changes in the efficacy of the *Codonopsis lanceolata* (CL) by natural fermentation.

**Methods:** CL was fermented for four weeks in a well-ventilated place with 2.5% salt. pH, total sugar, total polyphenol, and total flavonoid were measured to determine fermentation characteristics according to fermentation period and salt treatment. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction were carried out for microbial analysis during fermentation. In addition, HepG2 cell was cultured to check the lipid accumulation through oil red O staining and the glucose uptake was analyzed by measuring the 2-NBDG at C2C12 cell.

**Results:** The pH level and the total sugar decreased with the CL fermentation. Total polyphenol and flavonoid increased after CL fermentation. It was confirmed that *Leuconostoc mesenteroides* were maintained continuously during fermentation. In the salt treatment CL, there was a sharp increase in *Rahnella aquatilis*, *Lactobacillus plantarum* matrix was observed in fermented CL. In addition, *Lactococcus lactis*, *Weissella koreensis*, *R. aquatilis*, *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides* have been added to the salt treatment. Glucose uptake were significantly increased after fermentation with salt for four weeks. Lipid accumulation in the HepG2 cells was observed that there was difference ( $P < 0.01$ ) between free fatty acid group (100%) and decreased 4 weeks after fermentation (90.38%) at 800  $\mu$ g/mL.

**Conclusions:** Total polyphenol and flavonoid were increased after CL fermentation. Especially, percentage of the glucose uptake and lipid accumulation inhibition increased in CL fermentation with salt. It is expected that fermentation of salt treated CL will be more effective in diabetes and fatty liver.

**Key Words:** *Codonopsis lanceolata*, Antioxidants, Antidyslipidemic, Antidiabetic, Salts, Fermentation

## 서론

발효란 미생물, 특히 유용한 미생물인 probiotics가 당질을 이용하여 발효 산물로 알코올, 유기산, CO<sub>2</sub> 등을 생산하는 것이다<sup>1)</sup>. 예로부터 한국 전통 음식에서 사용된 방

법으로, 발효를 이용한 식품들은 음식으로서의 경계를 넘어서 기능성 식품으로서 역할을 하고 있으며, 발효식품은 잠재적으로 항산화<sup>2,3)</sup>, 항암<sup>2,4)</sup>, 항지질<sup>2,3)</sup>, 항당뇨<sup>2,3)</sup>, 항노화<sup>2)</sup>의 활성을 가지는 것으로 보고된다. 발효를 이용한 식품 가공이 관심을 얻어감에 따라 발효 한약의 연구 역시 활

발하게 진행되고 있는데 항산화<sup>5)</sup>, 항노화<sup>5)</sup>, 항바이러스<sup>6)</sup>, 항암<sup>7)</sup>, 신경보호효과<sup>8)</sup> 등의 연구가 보고되었으며, 그 안전성이 높은 것으로 추정된다<sup>9)</sup>.

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 중앙, 동부, 남아시아에서 주로 발견되는 쌍자엽의 다년생초본이다. 기관지염, 기침, 경련, 정신질환, 암, 비만, 이상지질혈증, 부종, 간염, 대장염, 폐질환 등의 질병과 증상을 치료할 수 있는 의학적 특성을 가지고 있으며, polyphenol, saponin, tannin, triterpene, alkaloid, steroid 등을 함유하여 다양한 약리작용을 한다고 알려져 있다<sup>10)</sup>. 더덕은 한의학적으로 羊乳라 한다. 養陰潤肺, 祛痰排膿, 清熱解毒, 催乳, 治乾咳, 肺癰, 乳癰, 腸癰, 瘡瘍腫毒, 乳汁不足, 毒蛇咬傷 등의 효능 주치를 가지고 있으며<sup>11)</sup>, 鎮咳, 祛痰 등의 약효가 있다 전해져 血積 및 驚氣, 頭痛, 消炎藥으로 사용된다<sup>12)</sup>.

더덕의 약리효과를 증강시키기 위해 발효된 더덕에 대한 다양한 연구가 진행되었다. 발효 더덕은 항산화<sup>13,14)</sup>, 항암<sup>15)</sup>, 면역력 증강, 항균<sup>14)</sup>, 효소활성저해, 인지기능개선<sup>14,16)</sup> 활성을 나타냈고, *Bifidobacterium longum* B6<sup>14)</sup>, *Lactobacillus rhamnosus*<sup>14)</sup>, *Leuconostoc mesenteroides*<sup>13,15,16)</sup> 등의 유산균이 발효를 위해 사용됐다. 자연 발효는 예로부터 내려오는 한국 전통 발효식품과 같이 특별한 가공법이 필요 없어 제조가 용이하다는 점에서 그 의의가 있다. 그러나 유산균을 접종하여 더덕을 발효시키는 연구가 다수 수행된 것에 비해, 자연 발효 더덕에 대한 연구는 미미한 실정이다.

소금은 김치 등의 발효식품에서 미생물의 생육을 억제시키는데<sup>17)</sup>, 소금의 농도가 낮을수록 젖산균들의 증식이 유리하다고 보고되었다<sup>18)</sup>. 내염성의 발효유산균이 선택적으로 성장할 수 있도록 조절해 주는 역할을 하고 있다고 알려져 있다<sup>18)</sup>. 따라서 본 연구는 소금 처리 및 발효에 따른 더덕의 기간별 화학적 특징과 미생물학적인 변화를 모니터링하고, 발효에 따른 활성 물질과 항지질, 항당뇨 효능을 검증하여 활성 성분을 높인 발효 한약을 개발하고자 시행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 더덕

본 실험에는 강원도 횡성에서 생산된 더덕(Hoengseong-SanMaruDeoDok, Hoengseong, Korea)이 사용되었다. 대조군으로 사용된 더덕은 물로 불순물을 제거한 후 분쇄하여

사용되었으며, 소금 첨가군은 대조군과 동일한 더덕에 2.5% 천일염 추가 후 옹기에 보관하여 서늘하고 공기가 잘 통하는 곳에서 4주 동안 저온의 환경(1.4~33.2°C)에서 발효했다. 발효 중 100 g씩 매주 시료를 채취하여 -80°C에 보관 후 사용하였다. 시료 채취 시에는 매주 한 번 잘 저어서 골고루 샘플링하였다.

### 2. 산도 측정

pH는 발효 진행 정도를 확인하기 위해 측정되었다. 1 g의 시료를 0.85%의 NaCl 9 mL로 희석한 후, pH 미터를 이용하여 pH를 측정하였다.

### 3. 총 당 함량 측정

페놀-황산법을 이용하여 발효 중의 더덕의 총 당 함량을 측정했다. 0.85%의 NaCl로 100배 희석한 샘플 2 mL에 5% phenol (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 mL를 추가, 혼합 후 95% 황산 5 mL를 첨가하여 30분 동안 실온에서 발열을 일으키게 두었다. 470 nm에서 흡광도를 측정하였고, glucose standard를 표준물질로 표준곡선을 작성하여 총 당 함량을 환산했다.

### 4. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량 측정을 위해 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 샘플에서 상등액을 얻어 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL에 샘플 50 μL와 50% Folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 50 μL를 혼합 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 720 nm에서 UV ELISA microplate reader (Spectramax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였고, gallic acid를 표준물질로 표준곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 환산했다.

총 플라보노이드 함량 측정을 위해 500 μL의 샘플에 300 μL의 5% NaNO<sub>2</sub>를 혼합하여 5분간 반응시켰다. 이후 300 μL의 10% AlCl<sub>3</sub>을 혼합하여 다시 5분간 반응시킨 후 1 M NaOH 2 mL로 반응을 정지시키고 570 nm에서 microplate reader (Spectramax Plus, Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 사용하였고, 표준곡선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 환산했다.

## 5. 미생물 생균수 분석

2 g의 샘플을 각각 18 mL의 0.85% NaCl과 혼합하여 균질화 후 균질액 1 mL를 9 mL의 0.85% NaCl로 희석하였다. 총균수 및 유산균은 각각 Trypticase Soy agar (TSA) (Difco, Sparks, MD, USA), De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Difco, Sparks, MD, USA)를 이용해 분석했다. 희석한 샘플은 100  $\mu$ L씩 TSA와 MRS agar 배지에 분주하여 도말 후 37°C에서 48시간 동안 배양했다. 생균수의 생성 콜로니 개수는 colony forming units per gram (CFU/g)로 표시했다.

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

발효 더덕의 미생물 분석을 위해 PCR-DGGE를 수행하였다. 샘플은 매주 PowerFood™ Microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA)를 사용, total DNA를 추출하였고, 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-PCR을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 크기를 확인한 후 약 1.5 kb에서 증폭된 밴드만을 절단하여 Accuprep gel purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 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. PCR-DGGE는 D Code universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. Denaturing gradients는 30~60% 범위로 농도 구배가 연속적으로 형성된 gel을 제작하여 사용하였다. 제작된 gel에 2차 PCR 산물을 로딩하여 1X Tris-acetate-EDTA buffer (60°C)에서 20 V로 30분간 전기영동 후 60 V로 60 hrs 전기영동하였다. 전기영동이 종료된 gel은 ethidium bromide로 염색 후 UV illumination (LAS-3000; Fuji photo film, Tokyo, Japan)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

## 7. DGGE fragment DNA 추출

PCR-DGGE를 통해 분리된 DNA 밴드의 염기서열을 분석하고 동정하기 위하여 각 위치의 밴드를 절단 후 tube에

옮겨 Gel & PCR Purification System (BioFACT Co. Ltd., Daejeon, Korea)의 protocol을 변형하여 실시하였다. 잘라진 gel 무게의 3배의 ubiquitination을 첨가한 다음 4°C에서 overnight로 배양 후 protocol과 같은 방법으로 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA의 염기서열 분석은 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하였으며, 분석된 염기서열은 미국 국립 생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)에서 Basic Local Alignment Search Tool 분석하여 동정하였다.

## 8. C2C12 세포 분화 및 Glucose uptake

근육세포의 당 처리 정도를 평가하기 위해 C2C12 세포의 2-[N-(7-160 nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose (2-NBDG) 흡수량을 측정하였으며, 400  $\mu$ g/mL의 농도에서는 양성대조군으로 metformin 처리 그룹을 함께 분석하였다. C2C12 세포(ATCC, Manassas, VA, USA)는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin (P/S)가 첨가된 배지에서 계대 배양했다. C2C12 세포의 glucose uptake 측정을 위해 세포는 96 well plate에  $2 \times 10^3$  cells/well의 양으로 seeding한 후 37°C 배양기에서 plate에 48 hrs 배양하였다. 세포의 confluence가 90% 정도 되면 분화를 위해 2% horse serum (HS)이 첨가된 DMEM 배지로 교체했다. 매 2일마다 배지를 교환하고 6일 후 분화가 약 90% 정도 완료 시에 glucose-free DMEM에 2-NBDG 75  $\mu$ g/mL가 포함된 배지로 교환한 후, 더덕 추출물, 양성 대조군인 metformin (2.5 mM) 및 glucose uptake inhibitor인 apigenin (100  $\mu$ M)을 각각 처리하였다. 4시간 동안 반응시킨 후, 배지를 제거하고, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (Welgene Inc., Gyeongsan, Korea)로 세척한 후 50  $\mu$ L의 DPBS를 첨가한 후, 세포의 2-NBDG 흡수량을 microplate reader (Spectramax Plus, Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 9. HepG2 cell 배양 및 Oil red O 염색

HepG2 세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며, 세포는 DMEM에 10% FBS와 1% P/S를 첨가한 배지에 배양했다. 6 well plated  $4 \times 10^5$  cells/well의 양으로 seeding한 후 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에 24시간 배양했다. 1 mM free fatty acid (FFA) (Oleic acid:palmitic acid=2:1)와 30%

에탄올로 추출한 추출물을 100 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양 후 Oil red O 염색으로 간세포의 지방량을 측정하였다. Oil red O 염색은 배양된 세포를 phosphate buffer saline으로 3번 세척 후 4% formalin 용액에 5분간 배양하여 2시간 동안 세포를 고정하였다. 이후 60%의 isopropanol로 세척 후 Oil red O solution을 분주하여 10분 동안 배양하였다. 염색된 세포는 물로 4회 세척 후 100% isopropanol로 염색된 Oil red O를 녹여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 10. 통계 처리

실험값들은 평균값±표준오차로 나타냈으며, one-way analysis of variance (ANOVA) test 또는 Student t-test를 통해 실험군 간의 통계분석을 시행하였다. 실험 결과의 통계적 유의성은 P값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 보았다.

## 결과

### 1. pH 및 총 당 함량 변화

발효 진행을 알아보기 위해 더덕의 pH와 총 당 함량을 측정하였다. 발효 진행 중 산도는 증가하였다. 발효 전 더덕의 pH는 5.47, 소금 처리 더덕의 pH는 5.27이었고, 4주 경과 후 더덕의 pH는 4.19, 소금 처리 더덕의 pH는 4.26이었다(Fig. 1A). 발효 전 더덕의 총 당 함량은 130 mg/g이었고, 소금 처리 더덕의 총 당 함량은 138.40 mg/g이었다. 4주 경과 후 더덕의 총 당 함량은 52.27 mg/g이었고, 소금 처리 더덕의 총 당 함량은 61.53 mg/g이었다(Fig. 1B).

### 2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

활성 물질의 변화를 알아보기 위해 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 총 폴리페놀은 발효 전 후 및 소금 처리와 관련하여 유의미한 차이를 보이지 않았다. 발효 전 더덕 및 소금 처리 더덕의 총 폴리페놀은 각각 2.29 mg/g, 2.56 mg/g이었고 발효 4주 경과 후 더덕 및 소금 처리 더덕의 총 폴리페놀은 각각 3.32 mg/g, 3.23 mg/g이었다(Fig. 2A). 총 플라보노이드의 경우 발효 전 더덕 및 소금 처리 더덕의 총 플라보노이드는 각각 0.97 mg/g, 1.21 mg/g로  $P < 0.01$ 에서 통계적 유의성이 있었고, 발효 4주 경과 후 대조군 및 소금 처리 더덕의 총 폴리페놀은 각각 1.78 mg/g, 2.31 mg/g으로 0.53 mg/g의 차이를 보였으나 통계적 유의성을 보이지 않았다(Fig. 2B).

### 3. 미생물 생균수 변화

발효 경과에 따른 미생물의 생균수를 측정하였다. 총균수와 유산균 수는 더덕군에서 2주에서 최고치를 보였으나 4주까지 발효가 진행됨에 따라 감소하는 양상이 관찰되었고, 소금 처리군에서는 발효가 진행됨에 따라 4주까지 증가하는 양상을 보였다. 총균수에서 발효 전 더덕군과 소금 처리군은 각각 7.15 log CFU/mL, 7.19 log CFU/mL였으나, 2주 경과 후 각각 9.07 log CFU/mL, 9.02 log CFU/mL였으며, 4주 경과 후 각각 5.82 log CFU/mL, 9.89 log CFU/mL로 4.07 log CFU/mL의 차이를 보였다( $P < 0.0001$ ) (Fig. 3A). 유산균 수에서 발효 전 더덕군과 소금 처리군은 각각 5.14 log CFU/mL, 4.86 log CFU/mL였으나, 2주 경과 후 각각 9.18 log CFU/mL, 8.37 log CFU/mL였으며, 4주 경과 후 각각 5.92 log CFU/mL, 9.87 log CFU/mL로 3.94 log CFU/mL

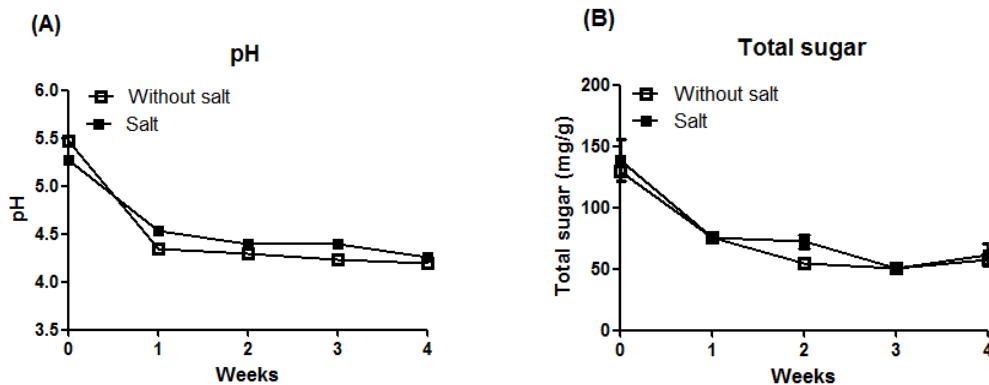


Fig. 1. pH (A) and total sugar (B) in *Codonopsis lanceolata* and salt-treated *Codonopsis lanceolata* during fermentation. pH and Total sugar decreased with fermentation.

의 차이를 보였다( $P < 0.0001$ ) (Fig. 3B).

#### 4. 미생물의 분포 변화.

DGGE 분석을 통해 발효에 따른 미생물의 분포 변화를 확인하였다. 소금을 첨가하지 않은 더덕균에서는 *Serratia* species, *Uncultured Klebsiella* sp., *Gluconobacter naphelii*가 발효 1주와 비교하여 발효 4주까지 지속적으로 감소하였고, *Asaia bogorensis*는 증가하는 것으로 관찰되었다. *Leuconostoc mesenteroides*는 계속적으로 밴드에서 진하게 관찰되었다. 소금을 첨가한 더덕균에서는 상대적으로 더 많은 미생물이 관찰되었는데, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*의 경우 발효 1주 이후 급격히 감소하는 것이 관찰되었고, *Lactococcus lactis*는 발효 1주 이후 감소하다가 3주경부터 다시 증가하는 양상이 관찰되었으며, *Weissella koreensis*의 경우 발효 2주까지 비슷하게 유지되다가 3주 후부터 급격히 감

소하는 것이 관찰되었다. DGGE에서 12번에 있는 균주는 동정되지는 않았지만 *Rahnella aquatilis*와 함께 발효 2주까지는 거의 나타나지 않다가, 발효 3주째 급격히 증가 후 4주째 감소하는 것이 관찰되었다. RAPD-PCR에서는 더덕의 발효 진행에 따라 *Lactobacillus plantarum*이, 소금 처리 더덕의 발효 진행에 따라 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*가 증가함이 관찰되었다(Fig. 4, Table 1).

#### 5. 근육세포의 포도당 처리 활성

분석 결과, 400  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 더덕 및 소금 처리 더덕에서 glucose uptake의 차이가 관찰되지 않았다. 800  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 4주 동안 발효한 소금 처리 더덕균(120.37%)의 2-NBDG uptake가 대조군(100%)과 큰 차이를 보였다( $P < 0.0001$ ). 발효 기간에 따른 glucose uptake의 차이는 타 균에서는 관찰되지 않았으나, 800  $\mu\text{g/mL}$ 에서 소금 처리 더덕의 발효 전

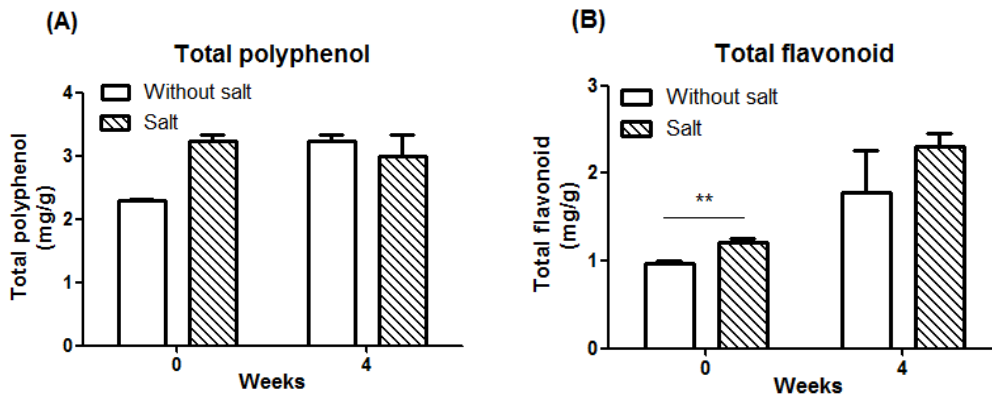


Fig. 2. Total polyphenol (A) and total flavonoid (B) in *Codonopsis lanceolata* and salt-treated *Codonopsis lanceolata* during fermentation. Date shown in mean±standard deviation, \*\* $P < 0.01$ .

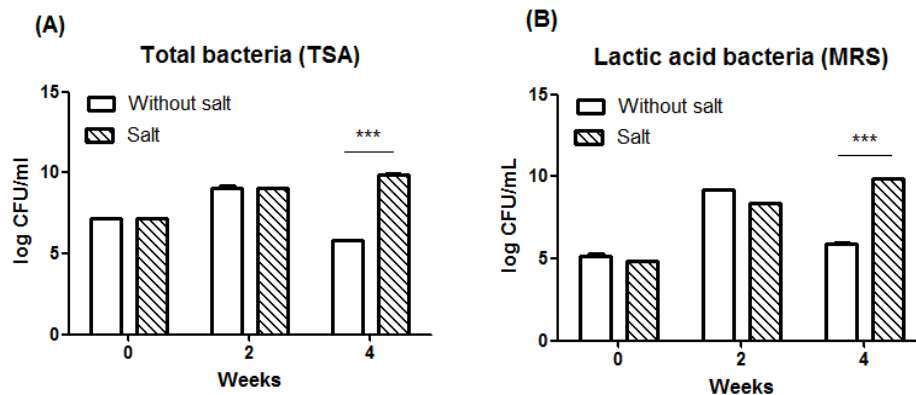
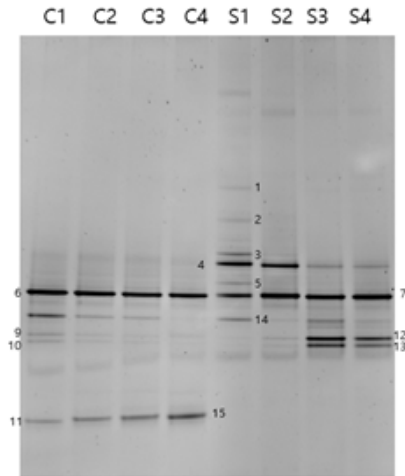


Fig. 3. Total bacteria (A) and Lactic acid bacteria (B) in *Codonopsis lanceolata* and salt-treated *Codonopsis lanceolata* during fermentation. Date shown in mean±standard deviation, CFU: colony forming units, \*\*\* $P < 0.0001$ .

(106.80%)과 비교하였을 때, 4주간 발효 시(120.37%) glucose uptake가 유의미하게 증가하여(P<0.01) 근육세포에서의 당 처리능이 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 5).

### 6. HepG2 세포에서의 지방축적 억제 효과

발효 더덕의 간세포에서의 지방 억제능을 평가하기 위



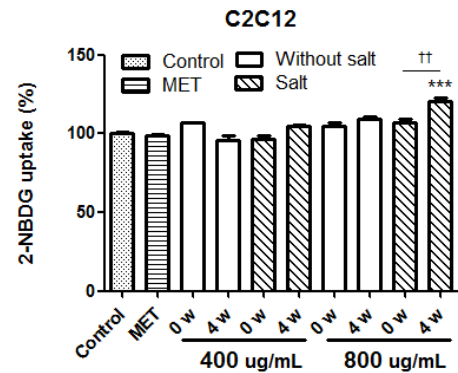
**Fig. 4.** Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis in *Codonopsis lanceolata* and salt-treated *Codonopsis lanceolata* during fermentation. The left four lines are analysis from *Codonopsis lanceolata* during fermentation and the right four lines are from salt-treated *Codonopsis lanceolata* during fermentation. The numbers in figure 4, refer to the strains shown in Table 1. C1, C2, C3 and C4 means a *Codonopsis lanceolata* group that has not been treated with salt in the period of fermentation, and S1, S2, S3, S4, means a *Codonopsis lanceolata* group that has been treated with salt in the period of fermentation.

**Table 1.** Identification of Microorganisms of *Codonopsis lanceolata*

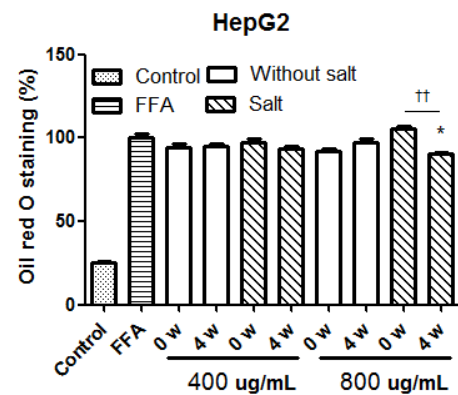
No.	Description	Ident (%)
1	<i>Weissella cibaria</i>	99
2	<i>W. confusa</i>	100
3	<i>W. confusa</i>	98
4	<i>W. koreensis</i>	95
5	<i>W. cibaria</i>	98
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98
9	<i>Serratia</i> sp.	94
10	Uncultured <i>Klebsiella</i> sp.	91
11	<i>Gluconobacter nephelii</i>	97
12	Uncultured bacterium	95
13	<i>Rahnella aquatilis</i>	100
14	<i>Lactococcus lactis</i>	95
15	<i>Asaia bogorensis</i> (acetobacterium)	99

sp: species.

해 HepG2 세포에 유리지방산을 처리하여 지방축적 양을 관찰하였다. 400  $\mu$ g/mL에서는 유리지방산 처리군과 더덕 및 소금 처리 더덕군과의 차이가 관찰되지 않았으나, 800  $\mu$ g/mL에서 유리지방산 처리군에 비해 4주 동안 발효한 소금 처리 더덕군(90.38%)의 지방축적 양이 유의하게 감소한 것으로 나타났다(P<0.05). 또한 이를 발효 전(94.47%)과 비교했을 때, 4주간 발효 시(90.38%) 지방 축적량이 유의하게 감소하여(P<0.01) 발효 후 지방 억제 효능이 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 6).



**Fig. 5.** 2-NBDG absorption of C2C12 cells treated by *Codonopsis lanceolata* and salt-treated *Codonopsis lanceolata* during fermentation at 400  $\mu$ g/mL and 800  $\mu$ g/mL. Date shown in mean $\pm$ standard deviation. 2-NBDG: 2-[N-(7-160 nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001. w: weeks, MET: metformin.



**Fig. 6.** Oil red O Staining of lipid accumulation in HepG2 cell treated by *Codonopsis lanceolata* and salt-treated *Codonopsis lanceolata* during fermentation at 400  $\mu$ g/mL and 800  $\mu$ g/mL. Date shown in mean $\pm$ standard deviation, FFA: free fatty acid, w: weeks. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

## 고찰

본 연구는 자연발효 더덕을 제조하여 발효 기간에 따른 더덕의 미생물 특성과 활성 물질 변화를 조사하였으며, 더불어 소금 처리에 따른 차이를 분석하였다. 더덕의 발효 진행 정도는 pH와 총 당 함량으로 알아보았다. 4주간의 발효 진행에 따라 더덕 및 소금 처리 더덕의 pH가 감소하여 산도가 증가하는 것이 확인되었다. 총 당 함량은 4주의 발효 기간 동안 더덕 및 소금 처리 더덕에서 발효 기간이 경과함에 따라 감소하는 것이 확인되었다. 발효균은 당을 주요 에너지원으로 하여 발효를 진행시키며, 그 과정에서 pH가 떨어진다는 사실로 미루어 보아 더덕에서 발효가 일어났음을 유추할 수 있었다.

더덕의 발효 진행에 따른 활성 성분의 변화를 알아보기 위해 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 분석하였다. 폴리페놀과 플라보노이드는 이전 항산화 연구에서 지표로 사용된 바 있다<sup>14)</sup>. 총 폴리페놀 및 플라보노이드는 더덕 및 소금 처리 더덕에서 발효 4주 동안 증가하였으며, 발효가 활성 성분의 증폭에 영향을 미침을 확인할 수 있었다.

더덕의 발효 동안의 생균수 변화를 알아보기 위해 총 균수 및 유산균 수를 측정하였다. 더덕의 총균수 및 유산균은 발효가 진행됨에 따라 2주에서 가장 많이 측정되었고, 4주가 되어감에 따라 감소하는 것이 관찰되었다. 이는 *W. cibaria*, *W. confuse*, *Lc. lactis*, *W. koreensis* 등의 균주가 발효 과정 중 증가하다가 감소하는 양상을 보이는 것과 일치한다. 이와 대조적으로 소금 처리 더덕은 발효가 진행됨에 따라 증가하는 것이 관찰되었는데, 이는 *Lc. lactis*, *W. koreensis*, *Uncultured bacterium*, *R. aquatilis*, *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides* 등의 균주가 발효 2~3주경부터 급격하게 증가함과 일치한다. 이를 종합해 보면 대조군과 소금 처리군의 적정 발효 기간의 차이가 있다고 생각된다.

더덕의 발효 기간에 따른 미생물 변화 과정을 비교하기 위하여 PCR-DGGE를 수행하였다. 더덕의 소금 첨가 유무에 따라 미생물군의 변화가 다르게 나타났다. 더덕의 발효 중에 *Serratia* sp., *Uncultured Klebsiella* sp. *Gluconobacter naphelii*는 감소하는 반면, *Asaia bogorensis*는 증가하는 경향을 보였다. 발효 기간 동안 *Leu. mesenteroides*는 밴드에서 꾸준히 유지되는 경향을 보여 기존 발효 더덕 연구에서도 사용되었던<sup>13,15,16)</sup> *Leu. mesenteroides*가 발효에 큰

영향을 미쳤을 것임을 유추할 수 있었다. 반면 소금 처리 더덕 발효 중에 *W. cibaria*, *W. confuse*, *Lactococcus lactis*는 발효 1주까지 유지되다가 발효 2주부터 급격하게 감소하였다. 김치에서 발견되는 유산균인 *W. koreensis*는 발효 2주까지 유지되다가 발효 3주부터 급격하게 감소하는 한편, *Uncultured bacterium* 및 *Rahnella aquatilis*는 발효 2주까지는 유지되다가 발효 3주부터 급격하게 증가함이 확인되었다. 발효에 가장 큰 영향을 미쳤을 것으로 사료되는 균주가 발효 기간 동안 밴드에서 진하게 유지되었으나 동정이 되지 않았다. 이 균주가 *W. cibaria*, *W. confuse*, *W. koreensis*의 생장에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다. *Weissella* 종들은 김치, 젓갈 등 한국 발효 음식에서 자주 보이는 균주로 소금 처리 후 발효 진행 시에만 균주가 추출되는 것이 확인되었다.

더덕의 발효에 따른 TSA의 RAPD-PCR 분석에서 발효가 진행되어 감에 따라 대조군과 소금 처리군에서 모두 *L. plantarum*이 증가하는 것이 확인되었고 MRS 분석에서는 대조군에서는 *L. plantarum*이 증가하는 반면, 소금 처리 더덕에서는 *L. plantarum*과 함께 *Leu. mesenteroides*가 함께 관찰되었다. 이를 통해 더덕의 발효 과정에서 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*가 관여함을 유추할 수 있었는데, *Leu. mesenteroides*는 기존의 발효 더덕 연구에서도 총 폴리페놀 및 플라보노이드<sup>13,15)</sup>, 항미생물<sup>15)</sup>, 효소활성저해<sup>15)</sup>, 인지기능개선<sup>15)</sup>, 항암효과<sup>16)</sup> 관련 연구에서 효과를 보기 위해 사용된 유산균이다. 본 연구에서는 *L. plantarum*이 추가적으로 발효에 관여했으며, 앞으로 *Leu. mesenteroides* 이외에도 *L. plantarum*과 같은 다양한 미생물을 이용한 발효 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

Glucose uptake가 원활하지 못한 경우 조직세포가 혈당을 효과적으로 사용하지 못하는 상태가 되어, 고혈압이나 심혈관병, 당뇨병 등을 초래하게 된다<sup>19)</sup>. 발효 더덕의 당 대사 관련 효과를 분석하기 위하여 C2C12 cell의 2-NBDG uptake를 분석하였다. 800  $\mu$ g/mL의 concentration에서 소금 처리 후 4주간 발효한 더덕에서 발효 전 더덕과 비교하여 유의미한 차이를 보여 소금 처리 더덕이 발효 진행에 따라 그 효과가 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. 이전 고압 증류수 처리 더덕의 epididymal fat mass, serum glucose, urinary glucose, 등의 감소를 확인한 연구가 있었으나<sup>20)</sup>, 발효 더덕이 처리된 C2C12 cell에서의 Glucose uptake를 직접 측정한 연구는 없었기에 발효 더덕의 당

대사 증가 효능을 직접 확인했다는 점에서 그 의의가 있었다.

이전 더덕의 항지방 효과를 C57BL/6 mice에서의 triglycerides, total cholesterol, low density lipoprotein, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase 등의 감소로 확인한 연구가 있었다<sup>21)</sup>. 이번 연구에서는 지질대사와 관련된 더덕의 효과를 알아보기 위해 HepG2 cell 세포에 FFA를 처리하여 Oil red O 염색을 통해 지방축적 양을 관찰하였다. 800  $\mu$ g/mL에서 소금 처리 후 4주간 발효한 더덕에서 FFA 처리군과 비교하여 지방축적 양의 감소를 보이며 간 세포에서의 지방축적 억제에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

## 결론

더덕의 천연 발효는 *L. plantarum*과 *Leu. mesenteroides*와 같은 유산균에 의해 진행되는 것으로 유추된다. 발효 기간에 따라 pH 및 총 당 함량이 변화하였으며, 발효 후 폴리페놀과 플라보노이드 등 활성 물질이 증가하였다. 지질 대사 및 당 대사 관련 효과는 800  $\mu$ g/mL에서 소금 처리하여 4주간 발효한 더덕에서 두드러지는 것으로 확인되었다. 여러 결과를 종합해 봤을 때, 4주가 최적의 발효 조건이라 사료되며 소금을 처리하여 발효하였을 때, 그 효과가 극대화되는 것으로 사료된다. 본 연구는 처음으로 더덕의 자연 발효 및 소금 처리 자연 발효 특성을 분석했다는 점에서 의의가 있다. 하지만 소금 처리 시에 온도나 농도를 엄격히 통제하지 못했다는 점에서 그 한계가 있다. 추후 발효 더덕의 제조를 위한 유산균 연구와, 자연 발효 및 소금 처리 발효에 대한 구체적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 지원에 의해 이뤄졌다(NRF-2016R1A2B4014225).

## References

1. Park KY. Increased health functionality of fermented foods. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2012 ; 17(1) : 1-8.
2. Dharaneedharan S, Heo MS. Korean traditional fermented foods - a potential resource of beneficial microorganisms and their applications. J Life Sci. 2016 ; 26(4) : 496-502.
3. Hwang J, Shieh DE, Shyu YS, Hsu CK, Lin CW. Antidiabetic, antihyperlipidemic, and antioxidant activities of mulberry lees fermented products in diabetic mice. J Food Sci. 2018 ; 83(11) : 2866-72.
4. Zhang K, Dai H, Liang W, Zhang L, Deng Z. Fermented dairy foods intake and risk of cancer. Int J Cancer. 2018 Oct 29. doi: 10.1002/ijc.31959. [Epub ahead of print]
5. Seong JS, Xuan SH, Park SH, Lee KS, Park YM, Park SN. Antioxidative and antiaging activities and component analysis of *Lespedeza cuneata* G. Don extracts fermented with *Lactobacillus pentosus*. J Microbiol Biotechnol. 2017 ; 27(11) : 1961-70.
6. Wang Y, Jung YJ, Kim KH, Kwon Y, Kim YJ, Zhang Z, et al. Antiviral activity of fermented ginseng extracts against a broad range of influenza viruses. Viruses. 2018 ; 10(9). pii: E471.
7. Oh J, Jeon SB, Lee Y, Lee H, Kim J, Kwon BR, et al. Fermented red ginseng extract inhibits cancer cell proliferation and viability. J Med Food. 2015 ; 18(4) : 421-8.
8. Yun BR, Weon JB, Lee J, Eom MR, Ma CJ. Neuroprotective effect of the fermented Gumiganghwal-tang. J Biosci Bioeng. 2014 ; 118(2) : 235-8.
9. 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.
10. Hossen MJ, Kim MY, Kim JH, Cho JY. *Codonopsis lanceolata*: a review of its therapeutic potentials. Phytother Res. 2016 ; 30(3) : 347-56.
11. A compilation committee of herbalogy association textbook of Korean Medical College. Herbalogy. 2nd ed. Seoul : Young Lim Press. 2012 : 644.
12. Kim CH, Chung MH. Pharmacognostical studies on *Codonopsis lanceolata*. Kor J Pharmacog. 1975 ; 6(1) : 43-7.
13. Park SJ, Park DS, Lee SB, He X, Ahn JH, Yoon WB, et al. Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2010 ; 39(12) : 1898-902.
14. He X, Zou Y, Yoon WB, Park SJ, Park DS, Ahn J. Effects of probiotic fermentation on the enhancement of biological and pharmacological activities of *Codonopsis lanceolata* extracted by high pressure treatment. J Biosci Bioeng. 2011 ; 112(2) : 188-93.
15. Jung LS, Yoon WB, Park SJ, Park DS, Ahn JH. Evaluation of physicochemical properties and biological activities of steamed and fermented Deodeok (*Codonopsis lanceolata*). Korean J Food Sci Technol. 2012 ; 44(1) : 135-9.



16. Kim SS, Ha JH, Jeong MH, Ahn JH, Yoon WB, Park SJ, et al. Comparison of biological activities of fermented *Codonopsis lanceolata* and fresh *Codonopsis lanceolata*. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2009 ; 17(4) : 280-5.
17. Ahn SJ. The effect of salt and food preservatives on the growth of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Soc Food Sci.* 1988 ; 4(2) : 39-50.
18. So MH, Lee YS, Kim HS, Cho EJ, Yea MJ. An influence of salt concentrations on growth rates of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Food and Nutr.* 1996 ; 9(3) : 341-7.
19. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001 ; 109 Suppl 2 : S135-48.
20. Jeong SY, Kang S, Kim DS, Park S. *Codonopsis lanceolata* water extract increases hepatic insulin sensitivity in rats with experimentally-induced type 2 diabetes. *Nutrients.* 2017 ; 9(11) : E1200.
21. Lee JS, Kim KJ, Kim YH, Kim DB, Shin GH, Cho JH, et al. *Codonopsis lanceolata* extract prevents diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Nutrients.* 2014 ; 6(11) : 4663-77.