

젖산발효 처리에 의한 도라지의 Platycosides 조성 및 호흡기질환 유발세균에 대한 항균 활성 변화

이가순¹ · 성봉재¹ · 김선익¹ · 지무근¹ · 박선희¹ · 박명희¹ · 박신영² · 김현호¹

¹충남농업기술원 인삼약초연구소

²농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

Changes in Platycoside Components and Antimicrobial Activities of Bronchus Disease-Inducing Bacteria of Fermented *Platycodon grandiflorum* Root by Lactic Acid Bacteria

Ka Soon Lee¹, Bong Jae Seong¹, Sun Ick Kim¹, Moo Geun Jee¹, Saet Byeol Park¹,
Myeong Hee Park¹, Shin Young Park², and Hyun Ho Kim¹

¹Ginseng & Medicinal Plant Research Institute, CNARES

²Fermented Food Science Division, National Institute of Agricultural Science, RDA

ABSTRACT This study was performed in order to investigate changes in platycosides, as well as antimicrobial activities of bronchus diseases-inducing bacteria (*Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pyogenes*) of *Platycodon grandiflorum* root (PGR) fermented by lactic acid bacteria (*Leuconostoc mesenteroides* N12-4, *Leuc. mesenteroides* N58-5, *Lactobacillus plantarum* N76-10, *L. plantarum* N56-12, *Lactobacillus brevis* N70-9, and *L. brevis* E3-8). Growth of *L. plantarum* on PGR was most active during lactic acid fermentation using different strains. Total platycoside, platycoside E, platycodin A, polygalacin D₂, polygalacin D, and diapioplatycoside E contents of PGR fermented for 96 h at 37°C by *Leuc. mesenteroides* and *L. plantarum* increased, whereas contents of platycodin D and platycodin D₃ were reduced. The antimicrobial activity on PGR fermented by *L. plantarum* N56-12 exhibited strong microbial proliferation for all four kinds of bronchus disease-inducing bacteria and was higher than that of non-fermented PGR extract. MIC of fermented PGR extract by *L. plantarum* N56-12 on *C. diphtheriae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, and *S. pyogenes* were 45, 10, 50, and 25 mg/mL, respectively. Thus, this result shows that the antimicrobial activities of bronchus disease-inducing bacteria and platycoside content of PGR by *L. plantarum* N56-12 were higher than that of non-fermented PGR extract.

Key words: *Platycodon grandiflorum* root, fermentation, lactic acid bacteria, platycosides, antimicrobial activity

서론

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 초롱꽃과에 속하는 다년생 초본류로 섬유질이 풍부하고 칼륨 및 마그네슘 등 무기질이 많이 함유된 알칼리성 식품이며, 우리나라에서는 주로 1~2년근은 제사음식으로 볶음나물뿐만이 아니라 생채 등에 많이 애용하고, 3년근 이상의 도라지는 기관지질환 치료 및 예방 재료로 애용되고 있는 식물이다(1,2). 도라지의 주된 약리성분으로 진해, 거담작용 등 기관지질환 세균에 대하여 항균 효과(3), 혈당강하 작용(4), 콜레스테롤 대사 개선(5,6), 항비만 작용(7), 암세포 증식 억제 효과(8,9), 항산화 효과(10,11) 등의 연구들이 보고되고 있다. 이러한 기

능성을 가지는 도라지의 유효성분은 platycodin D를 포함하여 20여 종의 사포닌을 함유하고 있다고 보고되고 있다(12-16). 도라지의 사포닌도 인삼 사포닌과 비슷하게 oleanane계 triterpene을 aglycone으로 하는 구조로 각 반응기에 각종 당을 결합하고 있어 도라지의 사포닌을 이용할 경우 추출용매 및 조건 등에 따라 사포닌 추출수율이 다르며(17,18), 저장방법과 기간(19), 건조온도 및 방법(20,21), 가압처리(22)에 의해 사포닌 구조가 변하고 이에 따라 사포닌이 가지는 기능성도 변한다고 하였다(22). 이처럼 도라지 내에 함유된 사포닌의 특성을 이용하여 도라지 추출물로부터 천연계면활성제(23), platycoside를 고순도로 함유한 면역 활성 및 항암 활성 증진용 조성물(24), 발효 때문에 유효성분을 증가시킨 도라지 제조(25), 길경을 첨가한 영덕밥식해(26), 젖산발효 한 도라지 당 추출 발효액을 이용한 음료(27), *Aspergillus oryzae* 발효에 의한 항비만 효과가 증가한 도라지(28) 등의 제품 개발에 대한 연구가 이루어지고

Received 1 April 2016; Accepted 21 June 2016

Corresponding author: Ka Soon Lee, Ginseng & Medicinal Plant Research Institute, CNARES, Geumsan, Chungnam 32723, Korea
E-mail: lkasn@korea.kr, Phone: +82-41-635-6473

있다. 이처럼 도라지를 이용한 건강식품 개발이 이루어지고 있으나 가공도라지의 유효성분인 platycoside류의 조성 함량 및 변화에 대한 체계적인 연구가 미비한 실정이다. 또한, 최근 발효에 의한 기능성 증가에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있는바 도라지도 국균발효에 의하여 항비만 효과가 증가하였고(28), 젖산발효 한 도라지당액의 항산화 활성이 증가하였다(27)고 보고된 바 있지만 이러한 발효 때문에 도라지 사포닌의 조성 변화에 대한 보고는 없는 바이다. 이처럼 도라지도 인삼과 같이 함유한 사포닌 종류가 다양하며, 가공 및 발효 처리에 의하여 결합하고 있는 당 물질이 분해하는 정도에 따라 구성하고 있는 사포닌 물질이 달라지고 있으나 변환된 사포닌 물질 각각의 기능성 효과에 대한 연구는 도라지의 대표적 사포닌인 platycodin D 및 platycoside E의 기능성에 대한 연구발표만 있으므로 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 도라지에 각종 젖산균을 접종 배양해본 결과 젖산균의 종류에 따라 도라지 사포닌 조성의 변화를 볼 수 있었으며, 호흡기질환 유발세균에 대한 항균력도 증가하는 것을 볼 수 있었기에 젖산발효에 의한 기능성이 증진된 제품개발에 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 충남 금산군 포장에서 재배된 3년근 도라지를 2014년 10월 중순에 수확한 것으로 한 뿌리당 길이 20 ± 2 cm, 중량 15 ± 1 g 정도의 중뿌리를 선별하여 세척하고 탈수한 후 한약재의 표준 건조방법대로 $40 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 온풍 건조하여 70 mesh로 분쇄한 다음 -20°C 의 냉동고에 보관한 후 시료로 사용하였다.

젖산균 및 호흡기질환 유발세균의 배양

젖산발효를 하기 위하여 사용한 젖산균은 농촌진흥청 국립농업과학원 발효식품과에서 젖산발효균으로 우수하다고 분리된 젖산균인 *Leuconostoc mesenteroides* N12-4, *Leuconostoc mesenteroides* N58-5, *Lactobacillus plantarum* N76-10, *Lactobacillus plantarum* N56-12, *Lactobacillus brevis* N70-9 및 *Lactobacillus brevis* E3-8 등 6종을 농촌진흥청 발효식품과에서 분양받았으며, 균주배양은 MRS broth(Difco Co., Detroit, MI, USA) 배지를 이용하여 37°C incubator에서 24~36시간 배양하여 사용하였다. 호흡기질환 유발세균에 대한 도라지 젖산발효물의 항균 활성을 조사하기 위하여 사용된 균은 *Corynebacterium diphtheriae* KCTC 3075, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2246, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621 및 *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615로 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Daejeon, Korea)에서 분양받았다. 미생물 배

양은 Trypic soy broth(TSB, Difco Co.) 배지와 Trypic soy broth agar(TSA, Difco Co.)를 사용하여 37°C incubator에서 균주에 따라 24~39시간 배양하여 항균력 실험에 사용하였다.

도라지의 젖산발효

젖산발효를 위한 도라지의 처리는 도라지 분말 50 g에 도라지 중량의 10배량의 물을 가하여 충분히 혼합한 후 121°C 에서 20분간 멸균 처리하였다. 젖산균 접종은 MRS broth 배지에서 배양시킨 균주액을 10^6 CFU/mL 농도가 되도록 멸균수로 희석한 후 멸균된 도라지 시료액에 대하여 3%(W/W)가 되도록 접종한 다음 37°C 에서 4일간 발효시켰다.

젖산균주별 도라지 발효에 대한 특성 측정

젖산균주의 종류에 따라 도라지에 대한 발효특성 조사는 발효시간에 따른 발효물의 pH 변화 및 미생물의 생육도 변화를 조사하였다. pH의 변화는 발효도라지물을 일정량 취하여 pH meter(Mettler Toledo 225, Mettler Toledo Instruments Ltd., Langacher, Switzerland)로 측정하였고, 미생물의 생육도는 MRS agar 배지에 발효기간에 따라 발효된 도라지의 일정량을 멸균수로 100배 희석한 발효액을 100 μL 씩 분주하여 균일하게 도말한 후 48시간 배양한 다음 형성된 colony 수를 측정하여 colony forming unit으로 비교 표현하였다.

젖산발효 처리에 의한 platycosides 변화 분석

젖산발효 처리 시간에 따른 도라지 발효물의 platycoside류의 분석은 Kim 등(29)의 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 즉 발효 처리를 24, 48, 72 및 96시간에 따라 발효되는 시료 10 g에 20배의 70% 메탄올 용매를 가한 후 70°C 의 온도에서 5시간씩 환류 추출하고 그 여액을 원심분리 한 다음 상등액을 membrane filter(0.20 μm pore size, Whatman Co., Kent, UK)로 여과, HPLC에 10 μL 씩 주입하여 분석하였다. 사용한 칼럼은 Agilent ZORBAX SB-C18 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 장착한 HPLC system (Agilent 1200 series system with DAD detector at 203 nm 및 210 nm)을 이용하였고, 이동상의 조건은 용매 A (water)와 용매 B(acetonitrile)를 이용하여 용매 B를 0분(20%), 22분(31%), 28분(38%), 32분(40%), 50분(50%), post time 5분의 조건하에 칼럼온도 35°C , 유속 0.8 mL/min으로 흘려주었다. 도라지 사포닌의 표준시약으로는 platycodin D와 D₂는 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.(Chengdu, China), deapioplatycoside D₃와 deapioplatycoside E는 Wuhan ChemFaces Biochemical Co. Ltd.(Wuhan, China), platycodin A는 Quality Phytochemicals LLC(Metuchen, NJ, USA), platycodin D₃, platycoside E 및 polygalacin D는 한국한방산업진흥원(Gyeong-san, Korea), polygalacin D₂는 PubChem(Bethesda, MD,

USA) 등에서 분양받아 9종의 표준품을 사용하였다.

항균 효과 측정

호흡기질환을 유발하는 세균에 대한 항균 효과는 Lee 등 (3)과 Lee와 Moon(30)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 각 균주는 TSB 배지에 접종하여 24시간 배양한 다음 10^6 CFU/mL 농도가 되도록 멸균수로 희석한 균 배양액을 이용하였다. 도라지 시료는 젖산발효 하지 않은 도라지와 젖산균 종류별로 발효한 시료를 원심분리 하여 발효물의 상등액을 TSB 배지에 100 mg/mL가 되도록 양을 조절하여 주입한 후 121°C에서 20분간 멸균한 다음 10^6 CFU/mL 농도로 조절한 호흡기질환 유발세균을 100 µL씩 주입하여 37°C에서 50 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양하는 동안 균 종별에 따라 시간대별로 균의 성장을 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하고 도라지를 젖산 발효 하지 않은 것과 항균력을 조사 비교하였다. 또 항균력이 우수한 도라지 발효추출물의 호흡기질환 유발세균들에 대한 최소생육저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 알아보기 위해 TSA 배지에 대하여 최종농도가 5~250 mg/mL의 범위에서 5 mg/mL 간격으로 발효도라지 추출물을 배지에 각각 첨가하여 plate에 분주 후 응고시켰다. 여기에 균주배양액(10^6 CFU/mL)을 100 µL씩 각각 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 미생물이 증식되지 않은 첨가물 농도를 확인하여 최소생육저해농도로 결정하였다.

통계처리

본 연구의 실험 결과들은 각 처리구 시료에 대하여 3회 반복 측정하여 이루어졌으며 모두 평균±표준편차로 나타내었다. 모든 자료의 통계분석은 SAS(Statistical Analysis System) software package(SAS 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 각 데이터 간의 유의성을 다중범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 5% 및 1% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

젖산균주별 발효 처리기간에 따른 도라지 발효물의 pH 및 젖산균의 생육도의 변화

젖산균주의 종류별, 발효 처리기간별에 따라 도라지 발효물의 pH 및 젖산균의 생육도의 변화는 Fig. 1 및 2와 같다. 젖산균별에 따라 도라지를 발효시키면서 pH의 변화를 본 결과 *L. plantarum*균이 발효 때문에 pH의 변화가 가장 큰 것을 볼 수 있었다. 즉 *L. plantarum* N56-12는 발효 시작과 동시에 pH가 급격히 떨어져 24시간 발효 시 3.73의 pH를 나타냈으며, 기타 *L. brevis*균과 *Leuc. mesenteroides*균은 pH 4.16~4.30 정도로 떨어지는 현상을 보였다. 그 이후 *L. plantarum*균은 지속해서 pH가 낮아지는 경향으로 발효 48

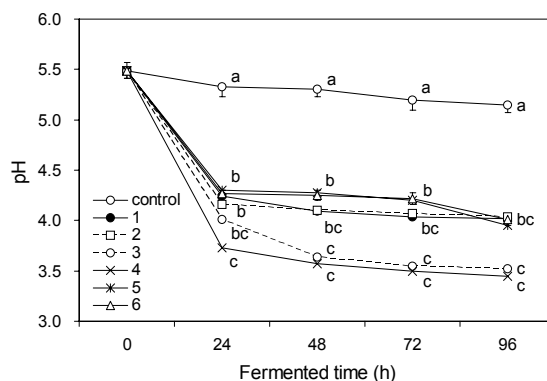


Fig. 1. Changes of pH on *Platycodon grandiflorum* fermented by some different strains during lactic acid fermentation. Values are mean±SD (n=3) of triplicate determinations. Means with different letters (a-c) in the same fermented time indicate significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. 1: *Leuconostoc mesenteroides* N12-4, 2: *Leuconostoc mesenteroides* N58-5, 3: *Lactobacillus plantarum* N76-10, 4: *Lactobacillus plantarum* N56-12, 5: *Lactobacillus brevis* N70-9, 6: *Lactobacillus brevis* E3-8.

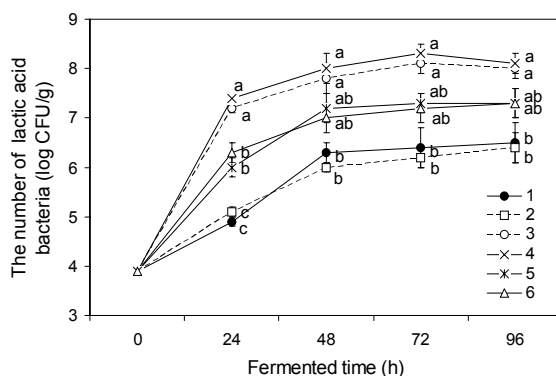


Fig. 2. Changes of lactic acid bacteria growth on *Platycodon grandiflorum* fermented by some different strains during lactic acid fermentation. Values are mean±SD (n=3) of triplicate determinations. Means with different letters (a-d) in the same fermented time indicate significant differences ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. 1: *Leuconostoc mesenteroides* N12-4, 2: *Leuconostoc mesenteroides* N58-5, 3: *Lactobacillus plantarum* N76-10, 4: *Lactobacillus plantarum* N56-12, 5: *Lactobacillus brevis* N70-9, 6: *Lactobacillus brevis* E3-8.

시간 이후부터 pH가 3.6 이하로 낮아져 발효 96시간째 pH가 3.45~3.52를 보여주었다. 기타 균들은 발효 96시간까지 pH가 거의 미비한 수준으로만 낮아짐을 볼 수 있었다. *L. brevis*균은 발효 72시간까지는 미비하게 내려가다가 96시간째 *Leuc. mesenteroides*균보다 미약하게 pH가 내려감으로써 발효 72시간 이후 pH가 낮아지는 현상을 보였고, *Leuc. mesenteroides*균과 *L. brevis*균 모두 발효 96시간째 pH 3.95~4.04를 나타냈다.

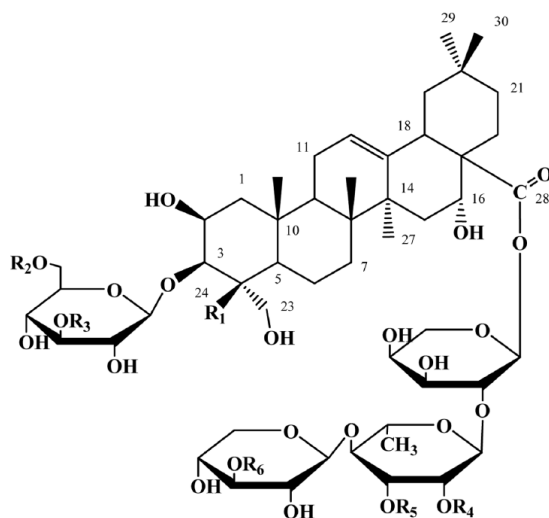
젖산균의 생육도는 젖산균별에 따라 MRS 배지에 배양하여 starter를 만들 때도 *L. plantarum*균의 생육이 가장 좋았고 *Leuc. mesenteroides*균들은 생육도가 낮은 편이었는데, 도라지 원료에다 일정 colony 수가 되도록 첨가한 다음 발

효시킨 이후에도 거의 같은 결과가 나왔다. 즉 *L. plantarum* 균은 발효 시작 24시간째부터 10^7 CFU/g 이상으로 증가하여 발효 72시간째 10^8 CFU/g 이상까지 colony 수가 증가할 정도로 생육도가 좋았으며, *Leuc. mesenteroides* 균들은 초기 생육이 서서히 시작하여 발효 48시간 경과 시 10^6 CFU/g이 된 후 그 이상의 colony 수는 증가하지 않았다. 이는 김치의 신맛에 좌우하는 *L. plantarum* 균은 pH가 지속해서 감소하여도 내산성이 있는 균이라 계속 생육이 활발한 것으로 보이며, *Leuc. mesenteroides* 균은 발효 때문에 pH가 내려가면 생육이 저지되는 특성이 있어서 생육도가 낮은 것으로 생각된다. 또 *L. brevis* 균들은 *L. plantarum* 균보다는 생육도가 낮았으나 *Leuc. mesenteroides* 균보다는 생육도가 높은 편으로 나타나 발효 72시간 이후는 *L. plantarum* 균이 가장 높은 생육도를 보였다. 그러나 Lee 등(27)이 연근 및 도라지를 당칩한 후 그 당액으로 젖산발효를 했을 경우 발효시간이 길어짐에 따라 젖산균이 감소하였다고 보고한 것과는 다른 결과를 보여주어 도라지를 발효시킬 때 시료의 처리에 따라서도 젖산균의 생육이 달라짐을 볼 수 있었다.

젖산균주별 발효 처리기간에 따른 도라지 발효물의 platycosides 조성의 변화

본 실험에 사용한 도라지 사포닌은 platycoside류 표준품 9종을 가지고 상기 분석조건에 의하여 분리한 결과 검출시간이 platycoside E는 12.017분, platycodin D₃는 16.131분, platycodin A는 21.096분, platycodin D₂는 21.533분, platycodin D는 22.026분, polygalacin D₂는 22.521분, polygalacin D는 22.876분, deapioplatycoside E는 23.379분 및 deapioplatycodin D₃는 30.339분대에 검출되어 9종을 모두 분리할 수 있었다(data not shown). 또 본 실험에 사용한 도라지에서 검출된 사포닌은 9종 모두 검출되었으며, Fig. 4에서 보는 바와 같이 platycoside E가 3.29 mg/g으로 사포닌이 가장 많이 함유되어 있었고 그다음은 polygalacin D가 2.04 mg/g, platycodin D가 1.93 mg/g으로 많이 함유되어 있었다. 이는 Kim 등(29)이 한국산 3년생과 21년생 및 중국산 도라지를 분석한 결과 중국산은 platycodin D의 함량이 높았고 한국산에서는 3년생에 비하여 21년생 도라지에서 platycodin D와 D₂를 제외하고는 platycoside E와 diapioplatycoside E 등을 포함한 기타 사포닌류가 더 많이 함유되어 있었다고 보고한 것과 비슷한 결과를 보여주었다. 또 일반적으로 Lee와 Cho(20) 및 Lee 등(21)에 의하면 도라지의 사포닌 함량은 건조온도 및 건조 시 뿌리의 크기 등에 따라 사포닌 함량이 많이 차이가 나며, Lee 등(19)은 저장방법과 저장기간에 따라서도 도라지의 사포닌 조성이 달라진다고 하였으며 Yoo 등(18)에 의하면 도라지 사포닌 추출 시 추출용매에 따라서도 사포닌 조성의 함량에 차이를 보였다고 하였다. 또한, Li 등(31)에 의하면 도라지에 cellulase, hemicellulase, pectinase 및 β -glucuronidase가 복합된 효소제인 snailase 효소처리된 후 사포

닌 조성의 변화를 살펴본 결과 aglycone에 붙어있는 당이 분해되어 당의 결합도가 낮은 사포닌 쪽으로 변한다고 보고하기도 하였고, Ha 등(32)은 미생물 및 식물체에서 추출하여 얻어진 각종 효소를 처리하여 도라지 내에 사포닌 조성의 변화를 본 결과 *Trichoderma reesei* 균에서 추출한 cellulase 처리 시 platycodin D의 C3번 위치에 6탄당이 2개 붙은 platycoside E와 당이 2개 붙은 platycodin D₃가 100% 소실되고 platycodin D가 100% 생성되었다고 보고하였다. 이처럼 도라지 사포닌은 oleanane계 triterpene을 aglycone으로 하는 기본 구조에 결합하고 있는 당의 결합수와 결합위치에 따라 사포닌 명명을 달리하고 있으며(Fig. 3), 도라지 사포닌도 인삼 사포닌과 같이 열처리 및 효소처리 등에 의해 화학적 구조가 크게 변하는 것을 볼 수 있다. 본 연구에서는 도라지를 젖산균의 종류에 따라 발효시킨 후 사포닌 조성의 변화를 본 결과 Fig. 4와 같다. 젖산균별에 따른 발효처리 시 도라지 내에 함유된 사포닌 종류에 따라 증감되는 것이 비슷하거나 좀 다른 양상을 보였다. 도라지 내에 가장 많이 함유된 platycoside E의 경우는 발효 시작 후 48시간까지는 감소하는 경향이다가 그 이후 증가하는 경향을 보였고 일반적으로 도라지의 대표적인 사포닌으로 많이 알고 있는 platycodin D는 발효 72시간까지 꾸준히 미량 증가하다가 감소하는 경향을 보였는데 *Leuc. mesenteroides* N12-4와 *L. brevis* N70-9균은 급격히 감소하는 경향이 있었다. 또 젖산균 발효 때문에 발효 72시간 이후 96시간 발효 시 deapioplatycoside E가 급격히 증가하였다. 이는 Fig. 3의 platycodin D 구조에서 볼 때 도라지 사포닌명 중 deapio가 붙은 사포닌은 C28번 위치에 붙은 4개의 당 중 가장 끝에 붙어있는 apiose가 떨어져 나간 사포닌으로 젖산균이 생육 시 apiose를 분해하는 효소의 생성과 활성이 강함을 볼 수 있었다. 또한, platycodin A가 발효 72시간 이후 96시간째 *L. brevis* 균만 제외하고는 거의 증가한 경향이었는데 platycodin A는 platycodin D의 구조에서 C20과 C27번 탄소에 OH기 대신에 CH₃기가 붙어있는 구조인데 젖산발효 때문에 platycodin D의 구조에서 일부 반응기가 methylation 되는 것이 아닌지 연구를 더 해볼 필요가 있을 것으로 검토된다. 이는 Yun(33)에 의하면 인삼꽃을 젖산발효 했을 경우 기존에 함유된 사포닌의 함량이 감소하였다고 한 것과 Kang 등(34)이 β -glucosidase 활성이 있는 유산균들을 이용하여 인삼을 젖산발효 한 결과 기존 사포닌 함량이 감소하고 결합하고 있던 당이 분해되어 새로운 사포닌들이 증가하였다고 보고한 것을 고려하면 젖산균이 도라지 내에 함유된 사포닌 중 glucoside 결합을 분해하여 사포닌 전환이 이루어지고 있음을 볼 수 있었다. 또 Choi 등(35)에 의하면 도라지의 주된 사포닌이 변환 때문에 생성된 platyconic acid B lactone, deapioplatyconic acid B lactone 그리고 deapioplatycodin D₂가 인간의 종양세포 증식을 억제하는 효과가 있었다고 보고한 것 등을 고려하면 도라지 사포닌도 인삼 사포닌과 마찬가지로 사포닌 구조의 변화로 기능성이 더 우



No	Platycoside	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Molecular formula	MW
1	Platycoside E	CH ₂ OH	Glu-Glc	H	H	H	Api	C ₆₉ H ₁₁₂ O ₃₈	1549
2	Platycodin A	CH ₂ OH	H	H	COCH ₃	H	Api	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₉	1266
3	Deapioplatycoside E	CH ₂ OH	Glu-Glc	H	H	H	H	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₃₄	1417
4	Polygalacin D ₂	CH ₃	H	Glu	H	H	Api	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₂	1371
5	Platycodin D ₂	CH ₂ OH	H	Glu	H	H	Api	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₃	1387
6	Platycodin D ₃	CH ₂ OH	Glu	H	H	H	Api	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₃	1387
7	Deapioplatycodin D ₃	CH ₂ OH	Glu	H	H	H	H	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₉	1255
8	Platycodin D	CH ₂ OH	H	H	H	H	Api	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₈	1225
9	Polygalacin D	CH ₃	H	H	H	H	Api	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₇	1209

Fig. 3. Structures of nine major platycosides. Glu, glucose; Api, apiose.

수한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 이처럼 도라지 사포닌은 본 연구에서 거두된 사포닌 9종 이외에도 더 있으므로 쉽게 판단할 수 있는 것은 아니고 또 젖산균 발효에 의하여 각각의 사포닌의 증감이 발생이 일어나는 것이므로 도라지 사포닌 구조상 배당체결합의 분해능과 분해 속도에 대한 검토가 더 필요할 것으로 생각된다. 그러나 총사포닌 함량은 젖산발효 96시간째 함량이 증가하였으므로 발효 시 본 실험 조건과 같이 도라지 분말을 물을 첨가하여 발효할 경우는 적어도 발효를 96시간 정도 실시하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

발효도라지 추출물의 항균 효과

일반적으로 도라지는 호흡기질환과 관련하여 치료 및 예방에 효과적이라고 보고된 바 있다(1,3,36). 도라지의 유효 성분인 platycoside류가 발효에 의하여 그 조성 및 함량이 Fig. 4와 같이 변화함에 따라 도라지가 호흡기질환 유발세균에 대한 항균 효과가 어떻게 변하는지를 살펴본 결과 Fig. 5와 같다. 젖산균의 생육도, pH의 변화 및 도라지 사포닌 함량 등을 고려하여 도라지를 젖산균별로 96시간 발효시킨 도라지 상등액을 TSB 배지에 첨가하여 멸균 처리한 후 항균 활성을 본 결과 *C. diphtheriae*균(A)에서는 도라지 무발효물에서 균 배양 3시간 처리 시 시료를 첨가하지 않은 대조구에 비하여 균배양이 약간 더 촉진되는 듯 하였으나 그 이후

배양시간이 길어짐에 따라 균의 생육이 저지되는 것을 볼 수 있었으며 배양 5시간째 *L. plantarum*균으로 발효시킨 도라지 추출물은 무발효도라지뿐만이 아니라 다른 젖산균으로 발효시킨 추출물보다 생육저지가 우수하여 유의적인 차이를 보여주었다. 그러나 *Leuc. mesenteroides*균들로 발효한 도라지 상등액은 오히려 도라지 무발효물보다 항균력이 감소하는 것을 볼 수 있었고, *L. brevis*균으로 발효시킨 도라지 상등액에서는 항균력이 2배 정도 더 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 특히 *L. plantarum* N56-12균으로 발효시킨 도라지 상등액에서는 배양 24시간까지 거의 OD값이 증가하지 않아 항균력이 상당히 높음을 볼 수 있었다. *K. pneumoniae*균(B)에서는 도라지 무발효물과 *Leuc. mesenteroides*균들로 발효한 도라지 상등액은 발효 36시간 이전까지는 항균성이 어느 정도 보이다가 그 이후는 오히려 균이 더 급격하게 생육하는 것을 볼 수 있어서 항균 효과를 볼 수 없었다. 그러나 *L. brevis*균으로 발효시킨 도라지 상등액에서 강한 항균 효과를 보여 균 배양 36시간까지 OD값이 거의 변화하지 않았으며, 무발효도라지 추출물과 *Leuc. mesenteroides*균으로 발효시킨 추출물과는 유의적인 차이를 보여주었고 발효 40시간에는 OD값이 약간 상승하였으며, *L. plantarum*균은 발효 40시간까지 OD값이 거의 변하지 않아 도라지 무발효물보다 항균성이 우수함을 보여주었다. *S. aureus*균(C)에 대한 항균 활성은 배양 9시간째 무발

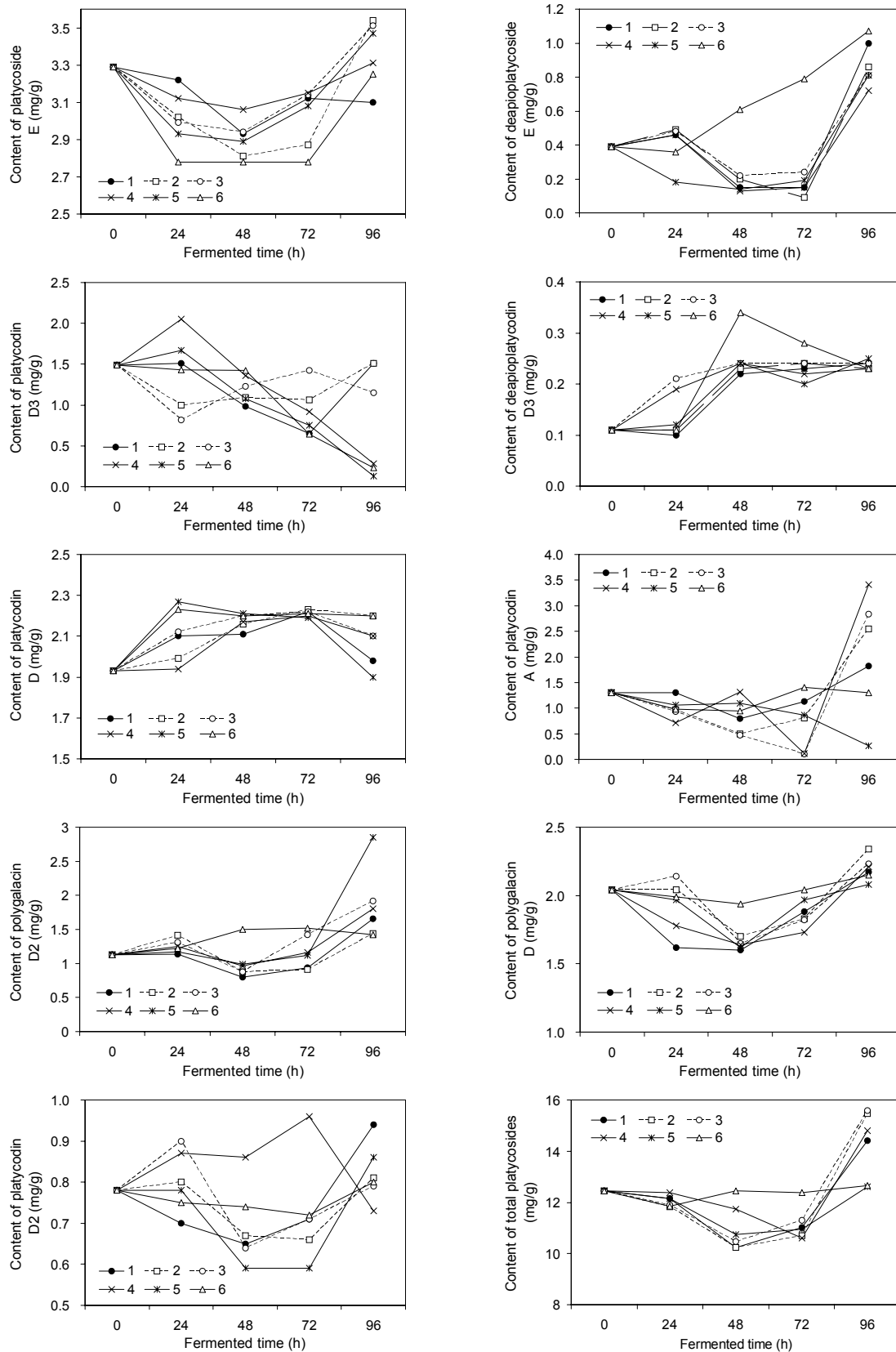


Fig. 4. Changes of platycosides content of *Platycodon grandiflorum* fermented by some different strains during lactic acid fermentation. 1: *Leuconostoc mesenteroides* N12-4, 2: *Leuconostoc mesenteroides* N58-5, 3: *Lactobacillus plantarum* N76-10, 4: *Lactobacillus plantarum* N56-12, 5: *Lactobacillus brevis* N70-9, 6: *Lactobacillus brevis* E3-8.

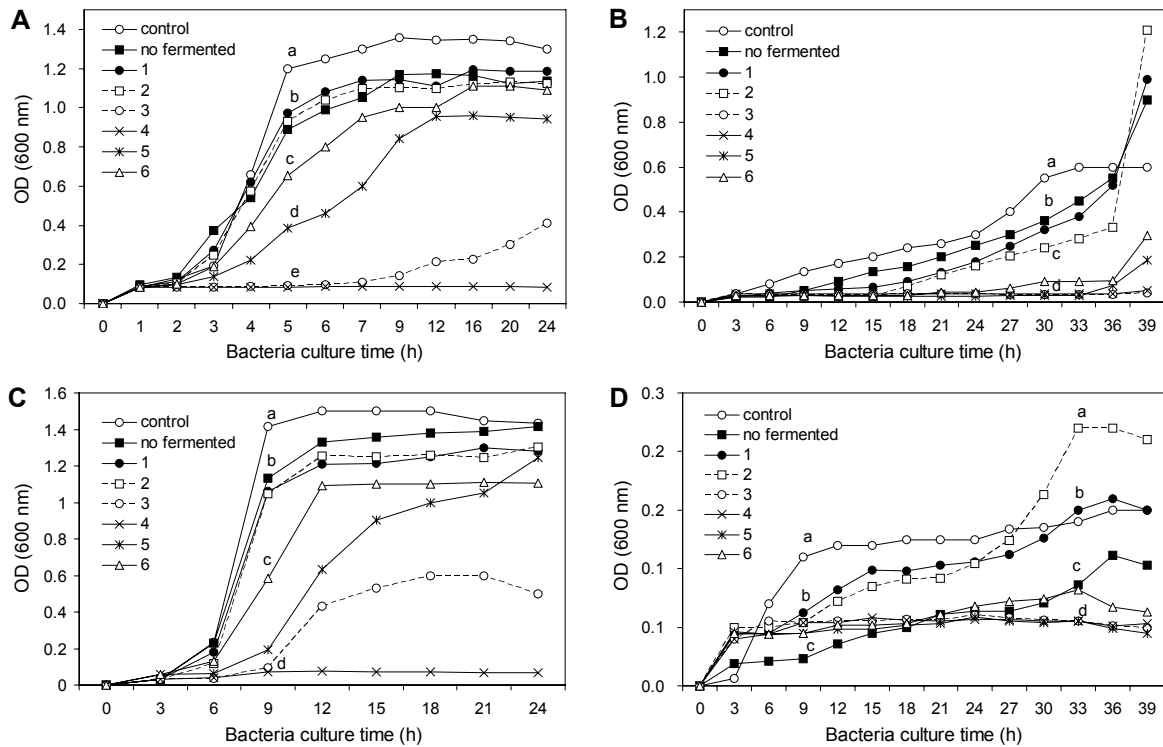


Fig. 5. Antimicrobial effects of water extracts of *Platycodon grandiflorum* fermented by some different strains on the growth of bronchus diseases inducing bacteria. Values are mean±SD (n=3) of triplicate determinations. Means with different letters (a-e) in the same bacteria culture time indicate significant differences ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test. 1: *Leuconostoc mesenteroides* N12-4, 2: *Leuconostoc mesenteroides* N58-5, 3: *Lactobacillus plantarum* N76-10, 4: *Lactobacillus plantarum* N56-12, 5: *Lactobacillus brevis* N70-9, 6: *Lactobacillus brevis* E3-8. A: *Corynebacterium diphtheriae*, B: *Klebsiella pneumoniae*, C: *Staphylococcus aureus*, D: *Streptococcus pyogenes*.

효도라지 추출물이나 *Leuc. mesenteroides*균으로 발효시킨 추출물과 유의적인 차이를 보였으며 *L. plantarum* N56-12균으로 발효시킨 도라지 상등액에서는 발효 24시간 이후까지 세균 생육이 저지되어 항균 활성이 우수함을 볼 수 있었다. 또 *S. pyogenes*균(D)에 대한 항균 활성을 실험한 결과 이 균은 다른 호흡기질환 유발세균보다 생육속도가 느린 편으로 세균 배양에 따른 배지의 혼탁도가 낮아 상대적으로 흡광도 값이 낮게 나타났다. 배양 9시간째 무발효도라지 추출물과 젓산발효 추출물 간의 유의적인 차이로 항균성을 보여주었지만 배양 27시간 이후부터는 *Leuc. mesenteroides* N58-5균에서는 MRS 배지로 배양한 균보다 OD값이 훨씬 더 높아 오히려 기관지질환 유발세균의 생육이 촉진되는 것을 볼 수 있었다. 그러나 *L. plantarum*균과 *L. brevis*균은

배양시간이 진행되어도 OD값의 변화가 거의 없어 항균 효과가 도라지 무발효물보다 상승하는 효과를 보여주었다. 이 상과 같이 호흡기질환 유발세균에 대한 항균 활성이 증대된 발효물은 *L. plantarum*균, 특히 *L. plantarum* N56-12균으로 발효시킨 도라지 상등액에서 본 연구에 사용된 호흡기질환 유발세균 4종 모두에 강한 항균 활성이 나타나 도라지의 항균 활성에 대한 가능성을 더 높여주는 결과를 보여주었다. 따라서 가장 항균성이 뛰어난 *L. plantarum* N56-12균으로 발효시킨 도라지 추출물에 대하여 각 기관지질환 유발세균에 대한 MIC를 조사한 결과 *C. diphtheriae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* 및 *S. pyogenes* 각각 균에 대하여 도라지 무발효 추출물과 비교한 결과(Table 1) 무발효추출물은 각 균에 대하여 200, 180, 210 및 90 mg/mL였고, *L. plantarum* N56-

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of water extracts of *Platycodon grandiflorum* fermented by *L. plantarum* N56-12 for bronchus diseases bacteria

Strains/Sample ¹⁾	Minimum inhibitory concentration (mg/mL)			
	<i>C. diphtheriae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
PGR	200 ^a	180 ^a	210 ^a	90 ^a
FPGR	45 ^b	10 ^b	50 ^b	25 ^b

¹⁾Mixed 10 folds-distilled water to PGR and FPGR, respectively, was taken. Means with different letters (a,b) within a column indicate significant differences ($P<0.01$) by Duncan's multiple range test. PGR, *Platycodon grandiflorum* root; FPGR, *Platycodon grandiflorum* root was fermented by *L. plantarum* N56-12 for 96 hours at 37°C.

12균으로 발효된 도라지 추출액은 45, 10, 50, 그리고 25 mg/mL로 나타나 항균 효과에 유의적 차이가 인정됨을 볼 수 있었다.

요 약

기관지질환에 우수한 기능성을 가지고 있는 도라지는 수십 종의 다양한 사포닌 종류를 함유하고 있다. 이러한 도라지를 젖산발효 시킬 경우 사포닌 조성의 변화와 기관지질환 유발 세균에 대한 항균 활성의 변화를 측정하였다. 도라지 발효를 위하여 사용된 젖산균은 *Leuconostoc mesenteroides* N12-4, *Leuconostoc mesenteroides* N58-5, *Lactobacillus plantarum* N76-10, *Lactobacillus plantarum* N56-12, *Lactobacillus brevis* N70-9 및 *Lactobacillus brevis* E3-8 등 6종이었다. 도라지 발효 시 젖산균 생육은 *L. plantarum*균이 가장 활발하였으며 pH 값도 가장 많이 내려가 발효 24시간째 pH는 3.73을 보였고 colony 수는 10^7 CFU/g 이상으로 증가하였다. 젖산발효 시간 동안 도라지 사포닌 9종에 대한 조성 변화는 사용된 도라지 시료에서 함량이 높았던 platycoside E, diapioplatycoside E, platycodin A, polygalacin D 등이 발효기간 중 일정량 감소하다가 발효 72시간 이후부터는 증가하는 경향이었고 platycodin D는 약간 증가하다가 72시간 이후부터는 오히려 감소하는 경향이었으며, 총사포닌 함량은 발효기간 동안 함량의 변화가 없었던 *L. brevis* E3-8균을 제외하고는 발효 72시간 이후 96시간째 증가하였다. 기관지질환 유발세균에 대한 항균 활성의 변화를 보기 위하여 사용된 세균은 *Corynebacterium diphtheriae* KCTC 3075, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2246, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621 및 *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615균 등 4종으로 각 균에 대한 항균 활성이 발효에 의하여 증대되는 젖산균은 *L. plantarum*균으로, 특히 *L. plantarum* N56-12균이 강한 항균 활성을 보여주었다. 이에 따라 각 기관지질환 유발세균에 대한 MIC를 조사한 결과 각 균에 대하여 도라지 무발효물은 200, 180, 210 및 90 mg/mL였고, *L. plantarum* N56-12균으로 발효된 도라지 상등액은 45, 10, 50 그리고 25 mg/mL였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농축산물 부가가치 향상-농축산물 수확 후 관리 및 가공기술사업(과제번호: PJ01084503) 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lim KH. 1971. *A medicinal phytology (the details)*. Dongmyoungsa, Seoul, Korea. p 281.
2. Chang YJ, Kim E, Choi YS, Jeon KH, Kim YB. 2015. Development process for decreasing bitterness of doraji (*Platycodon grandiflorum*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1550-1557.
3. Lee IS, Choi MC, Moon HY. 2000. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. DC extract on the bronchus diseases bacteria. *Korean J Biotechnol Bioeng* 15: 162-166.
4. Seo JK, Chung YC, Chun SS, Lee YY, Lee SJ, Shon MY, Sung NJ. 2004. Effect of physiologically active compounds isolated from *Platycodon grandiflorum* on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 981-986.
5. Zhao HL, Cho KH, Ha YW, Jeong TS, Lee WS, Kim YS. 2006. Cholesterol-lowering effect of platycodin D in hypercholesterolemic ICR mice. *Eur J Pharmacol* 537: 166-173.
6. Seo EK, Kim KS, Lee TK, Woo DY, Kim CH, Lee YC. 2000. Effect of dietary *Platycodon grandiflorum* on plasma glucose and lipid metabolism in KK-A^y mice and streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Oriental Med* 1: 14-20.
7. Byun BH. 2003. 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* 13: 896-902.
8. Lee JY, Hwang WI, Lim ST. 1998. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extracts on the growth of cancer cell lines. *Korean J Food Sci Technol* 30: 13-21.
9. Kim YS, Lee BE, Kim KJ, Lee YT, Cho KB, Chung YC. 1998. Antitumor and immunomodulatory activities of the *P. grandiflorum* cultivated for more than 20 years. *Yakhak Hoeji* 42: 382-387.
10. Kim CH, Jung BY, Jung SK, Lee CH, Kim BH, Kim SK. 2010. Evaluation of antioxidant activity of *Platycodon grandiflorum*. *J Environ Toxicol* 25: 85-94.
11. Jang JR, Hwang SY, Lim SY. 2011. Inhibitory effect of extracts of *Platycodon grandiflorum* (the ballon flower) on oxidation and nitric oxide production. *Korean J Food Preserv* 18: 65-71.
12. Akiyama T, Tanaka O, Shibata S. 1972. Chemical studies on the oriental plant drugs. XXX. Saponin of the roots of *Platycodon grandiflorum* A. DE CANDOLLE. (1). Isolation of the saponin and the stereochemistry of polygalacic acid. *Chem Pharm Bull* 20: 1945-1951.
13. Tada A, Kaneiwa Y, Shoji J, Shibata S. 1975. Studies on the saponin of the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. I. Isolation and the structure of platycodin-D. *Chem Pharm Bull* 23: 2965-2972.
14. Chung JH, Shin PG, Ryu JC, Jang DS, Cho SH. 1997. Chemical compositions of *Platycodon grandiflorus* (jacquin) A. De Candolle. *Agric Chem Biotechnol* 40: 148-151.
15. Chung JH, Shin PG, Ryu JC, Jang DS, Cho SH. 1997. Pharmaceutical substances of *Platycodon grandiflorus* (jacquin) A. De Candolle. *Agric Chem Biotechnol* 40: 152-156.
16. Shon MY, Seo JK, Kim HJ, Sung NJ. 2001. Chemical compositions and physiological activities of doraji (*Platycodon grandiflorum*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 717-720.
17. Choi JS, Yoo DS, Choi YH, Yon GH, Hong KS, Lee BH, Kim HJ, Kim HK, Kim EJ, Roh SH, Jeong YC, Kim YS, Ryu SY. 2007. Variation of saponin content in the decoctions of Platycodi Radix. *Kor J Pharmacogn* 38: 128-132.
18. Yoo DS, Choi YH, Cha MR, Choi CW, Kim MR, Yon GH, Hong KS, Lee BH, Kim EJ, Cho SW, Kim YS, Ryu SY, Kang JS. 2010. Variation of saponin content in the decoctions of Platycodi Radix (II). *Kor J Pharmacogn* 41: 147-152.
19. Lee BJ, Shin YY, Lee SW, Chun HS, Cho YS. 2014. Effects

- of storage methods and periods on root hardness and content of saponin in *Platycodon grandiflorum* Radix. *Korean J Crop Sci* 59: 134-138.
20. Lee BJ, Cho YS. 2014. Effects of drying temperature on the saponin and free sugar contents of *Platycodon grandiflorum* Radix. *Korean J Food Sci Technol* 46: 769-772.
 21. Lee BJ, Jeon SH, Lee SW, Chun HS, Cho YS. 2014. Effects of drying methods on the saponin and mineral contents of *Platycodon grandiflorum* Radix. *Korean J Food Sci Technol* 46: 636-640.
 22. Ha IJ, Chung JW, Ha YW, Shun EM, Kim YS. 2008. Compositional analysis of major saponins and anti-inflammatory activity of steam-processed Platycodi Radix under pressure. *Nat Prod Sci* 14: 274-280.
 23. Kim HJ, Park SK, Kim BY, Hong SK, Cho SK, Kim D. 2008. Development of a natural surfactant from extracts of *Platycodon grandiflorum*. *Korean J Chem Eng Res* 46: 227-232.
 24. Jeong MK, Shon EH, Hwang YS, Kim HJ, Lee SK, Kim CK. 2013. Immune and anticancer activities enhanced composition containing the *Platycodon grandiflorum* fraction from the *Platycodon grandiflorum* roots with high purity platycosides. *Korea Patent* 10-1322718.
 25. Lee SH, Choi JH, Kim TH, Yoo HJ, Kim KH, Lee SK. 2013. Manufacturing methods of fermentation bellflower increased an effective ingredient. *Korea Patent* 10-1290795.
 26. Bae MJ, Kim SJ, Cho MS, Um YB, Bae MI. 2014. Fermentation characteristic of *Yeongdeok Bobsikhae* to which a natural substance (*Bellflower*) was added. *Korean J Food Preserv* 21: 350-356.
 27. Lee KS, Kim JN, Jeong HC. 2015. Study on anti-oxidative activities and beverage preferences relating to fermented Lotus root and *Platycodon grandiflorum* extracts with sugar through lactic acid fermentation. *J East Asian Soc Diet Life* 25: 183-192.
 28. Kang YH, Kim KK, Kim TW, Yang CS, Choe M. 2015. Evaluation of the anti-obesity activity of *Platycodon grandiflorum* root and *Curcuma longa* root fermented with *Aspergillus oryzae*. *Korean J Food Sci Technol* 47: 111-118.
 29. Kim HK, Choi JS, Yoo DS, Choi YH, Yon GH, Hong KS, Lee BH, Kim HJ, Kim EJ, Roh SH, Jeong YC, Kim YS, Ryu SY. 2007. HPLC analysis of saponins in Platycodi Radix. *Kor J Pharmacogn* 38: 192-196.
 30. Lee IS, Moon HY. 2012. Antimicrobial activity on respiration diseases inducing bacteria and antioxidant activity of water extracts from wild edible vegetables. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 27: 114-120.
 31. Li W, Zhang M, Wang Z, Wang YP. 2011. Simultaneous RP-HPLC determination of six platycosides: application to an enzymatic preparation study. *Chromatographia* 74: 777-782.
 32. Ha IJ, Ha YW, Kang M, Lee J, Park D, Kim YS. 2010. Enzymatic transformation of platycosides and one-step separation of platycodin D by high-speed countercurrent chromatography. *J Sep Sci* 33: 1916-1922.
 33. Yun YS. 2013. Antioxidant activity, immune activation effects, and saponin content analysis of fermented ginseng flower-buds. *MS Thesis*. Chungnam University, Daejeon, Korea. p 35-40.
 34. Kang BH, Lee KJ, Hur SS, Lee DS, Lee SH, Shin KS, Lee JM. 2013. Ginsenoside derivatives and quality characteristics of fermented ginseng using lactic acid bacteria. *Korean J Food Preserv* 20: 573-582.
 35. Choi YH, Yoo DS, Cha MR, Choi CW, Kim YS, Choi SU, Lee KR, Ryu SY. 2010. Antiproliferative effects of saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* on cultured human tumor cells. *J Nat Prod* 73: 1863-1867.
 36. Kim J. 2014. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Platycodon grandiflorum* extracts. *J Digital Convergence* 12: 359-366.