

천문동 뿌리의 자연발효에 관여하는 미생물 및 발효 후 효능 변화

김민지 · 신나래 · 이명종 · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Microorganisms Involved in Natural Fermentation of *Asparagus cochinchinensis* Roots and Changes in Efficacies after Fermentation

Min-Jee Kim, Na Rae Shin, Myeong-Jong Lee, Hojun Kim

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

Received: November 3, 2018

Revised: December 3, 2018

Accepted: December 4, 2018

Correspondence to: Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine
of Korean Medicine, Dongguk University
Ilsan Oriental Hospital, 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: The aim of this study was to examine the effect of *Asparagus cochinchinensis* (AC) and fermented AC (fAC) on microorganisms and efficacies.

Methods: AC was fermented for four weeks without using any bacterial strains. Then we investigated fermentation characteristics including potential of hydrogen (pH), total sugar, microbial profiling and antioxidant compound contents such as total polyphenol and total flavonoid. The anti-obesity effects of AC and fAC were evaluated by using Oil Red O staining in 3T3-L1 adipocyte. Also anti-diabetic effects of them were evaluated by using 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose (2-NBDG) uptake in C2C12 skeletal muscle cell.

Results: Both pH and total sugar of fAC were decreased significantly compared to unfermented AC. And the abundance of total bacteria and lactic acid bacteria increased during fermentation, especially *Lactobacillus plantarum*. Also fermentation of AC increased the content of total polyphenol. On the metabolic aspects, we found that AC and fAC suppressed fat accumulation.

Conclusions: After four weeks of fermentation, AC increased concentrations of active compounds, altered microbial composition, and inhibited fat accumulation such as triglyceride. These results indicate that fermentation of AC might be a beneficial therapeutic approach for obesity.

Key Words: *Asparagus cochinchinensis*, Fermentation, Microbiota, Lipid metabolism, Glucose metabolism disorders

서론

천문동은 백합과(Liliaceae)의 다년생 천문동(*Asparagus cochinchinensis* Merr.)의 덩이뿌리로, 한의학적으로는 자음윤조(滋陰潤燥), 청폐생진(淸肺生津) 효능이 있어 폐조건해(肺燥乾咳), 해수토혈(咳嗽吐血), 폐위(肺痿), 폐옹(肺癰), 인후종통(咽喉腫痛) 등의 호흡기 질환뿐 아니라 장조변비(腸燥便秘), 소갈(消渴)과 같은 당뇨에도 사용되었다¹⁾. 현대 약리학적으로 천문동은 asparagine, β -sitosterol 등의 다양한 유효성분을 함유하고 있고²⁾, 천문동에서 물 추출

한 성분 중 *Asparagus polysaccharide* A, B, C, D는 급성임파세포형, 만성과립세포형, 단핵세포형 백혈병 환자의 dehydrogenase에 대한 억제 효과가 보고된 바가 있다³⁾. 천문동 에탄올 추출물은 조골세포 분화를 촉진하고 파골세포 생성을 억제하며²⁾, 천문동 메탄올 추출물은 호흡기 세균에 대한 항균 작용을 하고⁴⁾, 열수 추출물은 free radical 소거능 및 NO 생성 저해효과가 있음이 나타났다⁵⁾. 그 외에도 간암 세포에서 종양 괴사를 유도하고⁶⁾, 신경아교세포에서 lipopolysaccharide (LPS)와 substance P에 의한 염증성 물질인 tumor necrosis factor alpha와 interleukin 1의

생성을 억제한다는 연구 결과가 있다⁷⁾.

발효는 유산균에 의한 음식물의 처리 과정으로 병원체 물질의 오염을 피하고 음식 맛을 증가시키기 위해 오래전부터 사용되어 온 방법으로, 한의학에서도 포제법의 한 방법으로 사용하고 있다. 발효법(醱酵法)이란 '일정한 온도에서 매균(霉菌)을 이용해 발효토록 함으로써 약성의 변화 및 새로운 약효의 생성과 더불어 약효를 증강시키는 방법'이다⁸⁾. 이를 이용한 발효 한약은 한약재를 유익한 종균으로 발효시켜 원래 한약이 가지는 약효를 증가시키거나 부작용을 줄이고 새로운 효능이 생긴 것을 말한다⁹⁾. 즉 발효 한약은 약효성분의 체내흡수율과 생체이용률을 극대화시키고¹⁰⁾, 소화기 불내성 등의 부작용을 최소화시킬 뿐만 아니라¹¹⁾ 장내 미생물의 균형을 맞출 수 있다¹²⁾. 이미 발효 한약에 대한 다수의 선행 연구가 진행되어, 발효 한약재의 항산화 및 항알레르기 효과¹³⁾, 항비만 효과¹⁴⁾, 그 외에도 대사증후군, 피로, 혈액순환, 당조절, 간 기능 개선 효과 등 다양한 효능이 보고되고 있다^{15,16)}. 또한 *Lactococcus confusus*로 발효시킨 마황은 마황 본연의 체중 감소 및 지방세포 분화 억제 효과를 유지하면서도, 불안과 같은 교감신경자극에 의한 부작용이 상대적으로 경미한 것으로 나타났다¹⁷⁾.

천문동의 발효에 대한 연구는 비교적 최근에 진행되었는데, 유산균 발효 후 천문동의 항균활성이 개선되어 호흡기 질환에 대한 개선 효과를 보였다¹⁸⁾. 그리고 *Weissella cibaria*로 발효한 천문동은 LPS로 유발된 염증반응을 억제하여 항천식 효과¹⁹⁾ 및 히알루론산분해효소 억제 효과²⁰⁾, *Aspergillus oryzae*와 함께 발효한 천문동은 기존의 항산화제보다 더 높은 환원력과 antityrosinase 활성을 나타내었다²¹⁾.

하지만 천문동의 발효에 따른 항염증 효능 외에 대사 관련 연구는 부족한 실정이다. 더 나아가 유산균과 같은 균접종이 아닌 자연발효에 대한 천문동의 연구는 아직 없었다. 따라서 본 연구에서는 천문동의 자연발효 전후에 따른 생리활성과 미생물의 변화뿐 아니라 발효천문동이 C2C12 세포의 당대사 및 3T3-L1 세포의 지질대사의 변화에 미치는 영향에 대해서 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 천문동은 전남 광양에서 생산된 생

천문동을 사용하였다(MansuHerb, Seoul, Korea). 천문동을 물로 잘 세척한 후 분쇄하여 대조군으로 사용하였고, 발효군은 김치와 같이 자연발효에 의한 효과를 알고자 하기에 옹기에 담아 통풍이 잘 되고 서늘한 곳에 4주 동안 발효했다. 따라서 표면은 호기적으로, 내부는 혐기적으로 발효되었다. 발효 기간 동안 매주 100 g의 시료를 채취하여 -80℃에 보관한 뒤 시료로 사용하였으며, 시료를 채취할 때는 매주 한 번씩 잘 저어서 골고루 샘플링하였다. 발효 온도는 1.2~32.8℃ 사이를 유지하였다.

2. Potential of hydrogen (pH) 및 총 당 함량

발효 과정 중 pH 변화를 측정하기 위하여 1 g 시료를 9 mL의 0.85% NaCl로 희석한 후 pH를 측정하였다. 총 당은 페놀-황산법으로 측정하였다. 시료 2 mL를 5% phenol 용액 1 mL에 넣고 혼합한 후 95% 황산을 5 mL를 첨가하여 발열시킨 후 30분 동안 상온에 방치하였다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 당 함량의 정량을 위해 glucose를 표준물질로 사용하였고 표준곡선을 작성하여 총 당 함량을 환산하여 계산하였다.

3. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 2 mL를 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 실험에 사용하였다. 2% Na₂CO₃ 1 mL에 시료 50 μL, 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 50 μL를 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시키고 720 nm에서 UV ELISA microplate reader (Spectramax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하였고 표준곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 환산하여 표시하였다. 총 플라보노이드 함량은 시료 500 μL에 5% NaNO₂ 300 μL를 혼합하여 5분간 반응시킨 후 10% AlCl₃ 300 μL를 혼합하여 5분간 반응시킨 다음 1 M NaOH 2 mL로 반응을 정지시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하였고 표준곡선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 환산하여 표시하였다.

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

발효한 천문동의 미생물 다양성을 분석하기 위해 PCR-DGGE를 수행하였다. 매주 채취한 시료는 PowerFood™ Microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 total DNA를 추출하였고 샘플은 -20°C에 보관하였다. 그 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-PCR을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기 영동하여 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. PCR-DGGE는 D Code universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. Denaturing gradients는 30~60%로 농도 구배가 연속적으로 형성된 gel을 제작하여 사용하였다. 제작된 gel에 2차 PCR 산물을 로딩하고 1X Tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (60°C)에서 20 V로 30분 동안 전기영동한 다음 60 V로 13시간을 전기영동하였다. 전기영동이 종료된 gel은 EtBr로 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 실시하였다. 잘라진 gel 무게의 3배의 ubiquitination을 첨가한 다음 4°C에서 overnight로 배양 후 다음 과정은 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 Basic Local Alignment Search Tool 분석하여 동정하였다.

6. 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. 희석한 시료는 선발 배지에 100 µL씩 분주하여 도말 후 배양하였다. 총 세균수를 확인하기 위해 TSA (Difco, Sparks, MD, USA) 배지를, 총 유산균수를 분석하기 위해 MRS agar (Difco, Sparks, MD, USA) 배지를 사용하였다. 37°C에서 48시간 배양하였고 생균수는 생성 콜로니 개수(colony forming units per gram, CFU/g)로 나타났다.

7. 세포배양

C2C12 세포는 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용했고 3T3-L1은 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank [KCLB], Seoul National University Cancer Research Institute, Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 세포를 배양하기 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 사용했다. 배지에 옮겨진 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에 48시간 배양하였다. 분화 배지는 DMEM에 10% calf serum과 antibiotics를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 confluent 상태가 되면 trypsin-EDTA를 처리하여 원심분리를 통해 세포를 모아서 계대 배양했다.

8. C2C12 세포 분화 및 glucose uptake assay

C2C12 세포의 glucose uptake를 측정하기 위해 세포를 96 well plate에 2×10³ cells/well의 양으로 심은 후 37°C 배양기에서 48시간 배양했다. 세포의 confluence 90% 정도가 되면 분화를 위해 2% horse serum을 첨가한 DMEM 배지로 교체했다. 2일마다 배지를 교환하고 6일 후 분화가 약 90% 정도 완료되면 glucose uptake를 측정하기 위해 glucose-free DMEM에 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose (NBDG) 75 µg/mL가 포함된 배지로 교환한 후, 천문동 추출물, 양성 대조군인 메트포르민 (2.5 mM) 및 glucose uptake inhibitor인 apigenin 100 µM를 각각 처리하였다. 4시간 동안 반응시킨 후, 배지를 제거하고, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (Welgene Inc., Gyeongsan, Korea)로 세척한 후 50 µL의 DPBS를 첨가한 후, 세포의 2-NBDG 흡수량을 fluorescence microscopy를 이용하여 측정하였다.

9. 3T3-L1 세포 분화 및 Oil Red O 염색

3T3-L1 세포 분화를 위해 6 well plate에 5×10^3 cells/well의 양으로 심은 후 37°C 배양기에서 48시간 배양했고 confluence가 100%가 되면 10% FBS-DMEM에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μ M dexamethasone, 10 μ g/mL 인슐린이 첨가된 배지를 처리하여 분화를 2일간 유도한 뒤 다시 2일간 10% FBS-DMEM에 10 μ g/mL 인슐린이 첨가된 배지로 교체해주었다. 그 후 2일마다 10% FBS-DMEM에 10 μ g/mL 인슐린 배지로 교체하였다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다.

3T3-L1 세포에서 축적된 지방을 분석하기 위해 Oil red O 염색을 수행하였다. 분화된 세포를 phosphate buffered saline로 2번 씻어낸 후 10% formalin에 5분간 배양한 후 다시 버리고 10% formalin으로 1시간 동안 세포를 고정한다. 고정된 세포는 60% isopropanol로 세척한 후 완전히 건조시킨다. 60% isopropanol에 희석한 Oil red O solution을 분주한 후 10분 동안 배양한다. 염색된 세포는 물로 4번 씻어낸 후 100% isopropanol로 염색된 Oil red O를 녹인 후 520 nm에서 흡광도를 측정했다.

10. 통계 처리

모든 측정값은 평균값과 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군 간의 통계분석은 Student's *t*-test 혹은 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 통해 시행하였다. 실험의 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

결과

1. pH 및 총 당 함량 변화

발효식품의 지표 성분 중 pH와 총 당 함량 변화는 발효 정도를 알 수 있는 중요한 지표이다. 천문동 발효 동안의 pH와 총 당 함량 변화는 Fig. 1에 나타났다. 발효 전 천문동의 pH는 5.37에서 발효 1주 후 3.92로 급격히 감소하였고, 2주 후에 3.84까지 감소하였다. 하지만 3주 이후 소폭 증가하여 4주 후 pH는 3.96을 유지하였다(Fig. 1A). 천문동의 총 당 함량은 발효 전 331.73 mg/g에서 발효 4주 후에는 248.7 mg/g까지 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 1B).

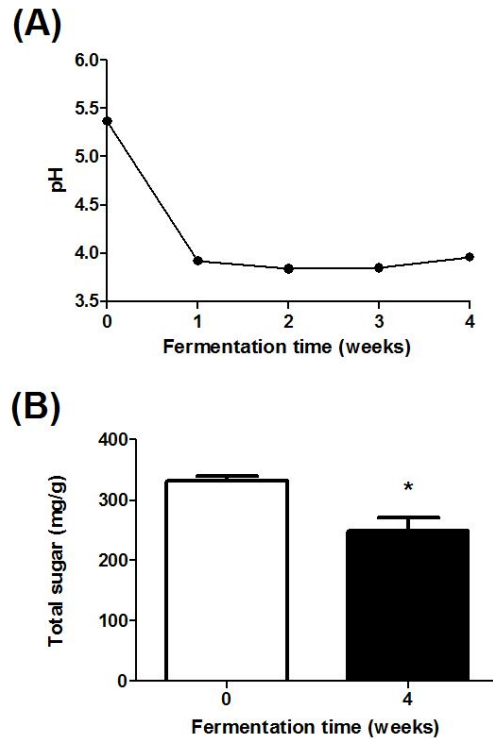


Fig. 1. Changes of pH (A) and total sugar (B) during fermentation of AC. Data shows mean \pm standard deviation (* $P < 0.05$). pH: potential of hydrogen, AC: *Asparagus cochinchinensis*.

2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

천문동 발효 전후 총 폴리페놀 함량의 변화는 Fig. 2와 같다. 발효 전 천문동의 총 폴리페놀 함량은 2.09 mg/g에서 발효 4주 후에는 3.77 mg/g으로 발효 전보다 약 1.8배 유의하게 증가하였다($P < 0.001$) (Fig. 2A). 반면 총 플라보노이드 함량은 발효 전 1.25 mg/g에서 발효 4주 후에는 0.93 mg/g으로 발효 전보다 총 플라보노이드 함량이 감소하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 2B).

3. 미생물 패턴 변화

발효 시간별로 채취한 천문동에서 PCR-DGGE를 통해 미생물의 변화 양상을 비교하였다. 그 결과, 천문동은 발효 전과 발효 4주 후 미생물 패턴의 차이가 나타났다(Fig. 3). 주요 밴드에 대해서 16S rRNA gene을 동정하였고 그 결과는 Table 1에 나타났다. 발효 1주 후 *Leuconostoc citreum*은 우점종으로 나타났다으며 *Gamma proteobacterium*은 발효 전부터 존재하여 발효 4주 후까지 그 분포도가 유지되었고 *Lactobacillus plantarum*은 발효 전에 존재하지 않았으나 발효 4주 후 나타났다. 반면 *Erwinia amylovora*, *Rahnella*

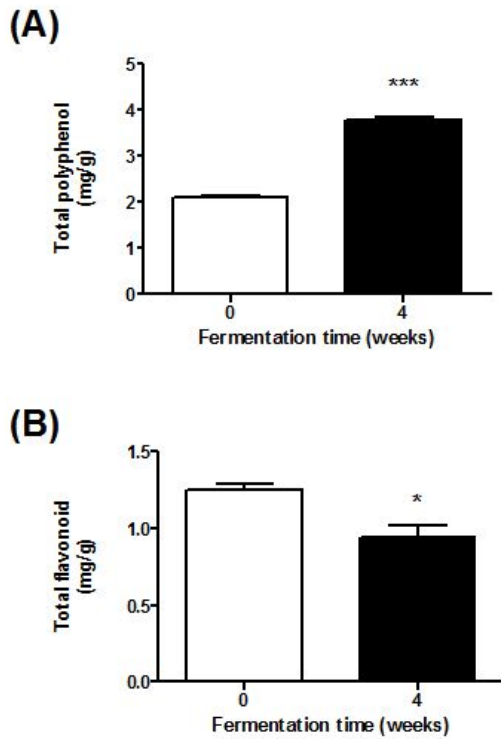


Fig. 2. Changes of total polyphenol content (A) and total flavonoid content (B) during fermentation of AC. Data shows mean±standard deviation (P<0.05, ***P<0.001). AC: *Asparagus cochinchinensis*.

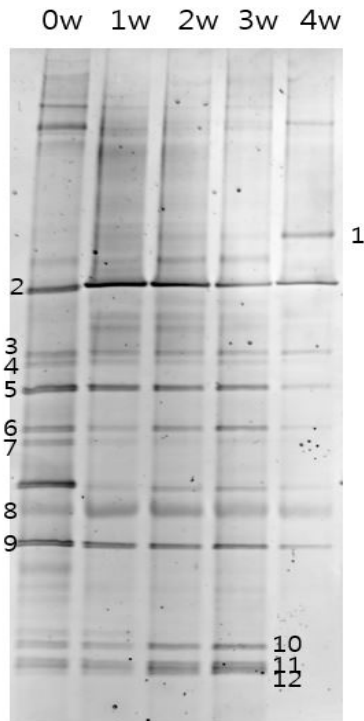


Fig. 3. Denaturing gradient gel electrophoresis profile during fermentation of *Asparagus cochinchinensis*. The numbers in figure 3, refer to the microbial strains shown in Table 1, w: week.

Table 1. Identification of Microorganisms of *Asparagus cochinchinensis*

| No. | Discription | Ident (%) |
|-----|-----------------------------------|-----------|
| 1 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 99 |
| 2 | <i>Leuconostoc citreum</i> | 99 |
| 3 | <i>Gamma proteobacterium</i> | 86 |
| 4 | <i>Gamma proteobacterium</i> | 90 |
| 5 | <i>Pseudomonas jessenii</i> | 99 |
| 6 | <i>Pseudomonas deceptionensis</i> | 95 |
| 7 | <i>Pseudomonas putida</i> | 95 |
| 8 | <i>Gamma proteobacterium</i> | 87 |
| 9 | <i>Gamma proteobacterium</i> | 91 |
| 10 | <i>Erwinia amylovora</i> | 99 |
| 11 | <i>Rahnella aquatilis</i> | 99 |
| 12 | <i>Serratia plymuthica</i> | 99 |

aquatilis, *Serratia plymuthica*는 발효 3주까지 분포도가 증가하였지만 발효 4주 후 사라졌으며, *Pseudomonas jessenii*, *P. deceptionensis*, *P. putida*는 발효 4주 후 그 분포도가 감소되었다.

4. 미생물 생균수 변화

천문동 발효 중 총 세균과 유산균의 생균수 변화를 조사하였다(Fig. 4). 발효를 시작한 시점에서 총균수는 5.15 log CFU/mL였다. 발효가 시작되면서 총 세균수는 발효 2주 후 8.44 log CFU/mL까지 급격히 증가하였다가 이후 증가추세가 완만해지면서 발효 4주 후 총균수는 8.82 log CFU/mL였다(Fig. 4A). 유산균 역시 초기 2.47 log CFU/mL에서 발효 2주 후 8.81 log CFU/mL로 약 3.57배 증가하였다. 하지만 3주 후 8.46 log CFU/mL로 감소했다가 다시 4주 후 8.74 log CFU/mL까지 증가하였다(Fig. 4B). 즉 총 세균과 유산균의 생균수는 발효 1~4주 후 모두 발효 전과 비교하여 유의하게 증가하였다(P<0.001, P<0.01).

5. Glucose uptake 조절 작용

천문동의 당 대사 조절 효능을 분석한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 대조군에 비해 천문동 농도 200 μg/mL에서는 발효 전과 발효 4주 후 모두 glucose uptake가 증가하였다. 또한 400 μg/mL의 농도에서도 대조군에 비해 발효 전과 발효 4주 후 모두 glucose uptake가 증가하였고, 발효 4주 후 발효 전보다 glucose uptake가 증가하였지만 유의한 차이는 보이지 않았다. 반면 대조 약물인 메트포르민에서는 glucose uptake가 유의하게 증가하였다(P<0.05).

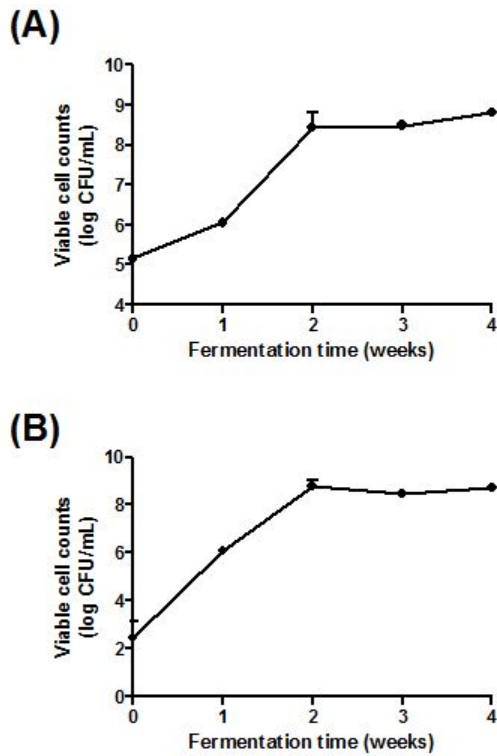


Fig. 4. Changes in viable cell counts of total bacteria (A) and lactic acid bacteria (B) during fermentation of AC. Data shows in mean±standard deviation, CFU: colony forming units, AC: *Asparagus cochinchinensis*.

6. 3T3-L1 세포 지방 축적에 미치는 영향

농도별 및 발효 기간에 따른 천문동의 3T3-L1 세포의 지방 축적에 미치는 효과는 Fig. 6과 같다. 대조군에 비해 천문동 농도 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 발효 전과 발효 4주 후 지방 축적의 유의한 변화가 보이지 않았다. 하지만 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 발효 전과 발효 4주 후 지방 축적이 유의하게 감소하였다($P < 0.001$, $P < 0.05$).

고찰

일부 또는 다수 한약의 유효성분은 대부분 당이 붙은 고분자로 구성되어 있어 체내 흡수에 지장이 있으나, 발효를 하면 당이 떨어져 나가면서 저분자화 되어 체내 흡수율이 증가된다²². 이런 이점 때문에 최근에 발효 한약에 대한 관심이 높아지고 있다. 발효 한약이란 한약재를 적정 온도 및 습도에서 미생물과 함께 발효할 때 미생물이 가지고 있는 효소에 의해 한약재 중 유기물이 분해, 변화되어 약효를 증진 혹은 약화시키거나 새로운 효능이 추

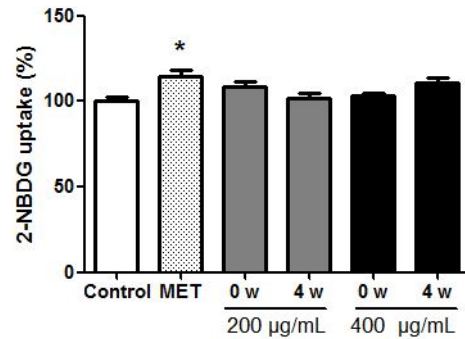


Fig. 5. Changes in glucose uptake by treatment of different concentration of fermented AC extracts in C2C12 cells. Data shows in mean±standard deviation ($P < 0.05$). 2-NBDG: 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose, AC: *Asparagus cochinchinensis*, MET: metformin, w: week.

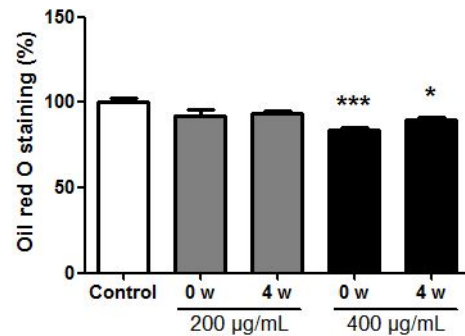


Fig. 6. Changes in lipid accumulation by treatment of different concentration of fermented AC extracts in 3T3-L1 cells. Data shows in mean±standard deviation ($P < 0.05$, *** $P < 0.001$). AC: *Asparagus cochinchinensis*, w: week.

가된 한약이다²³. 발효 한약에 관한 선행 연구에서 이미 다양한 기능과 활용성이 보고되었다. 발효 백출은 발효 전에 비해 NO 생성량이 감소되었으며²⁴, 장점막 투과성에 있어서 발효 금은화는 점막보호효과를 보였다²⁵. 단일 약재뿐 아니라 복합처방의 발효 후 효과에 대해 보고한 연구도 있는데, 예를 들어 발효 삼정환은 체중을 감량하고 지질 및 당대사를 개선한 바 있다²⁶. 이에 따라 본 연구에서는 천문동을 자연발효시킴으로써 발효 전과 비교하여 당조절 및 지방 축적 억제 효능이 증가되고, 발효에 관여하는 미생물을 분리하고자 하였다.

동의보감 신형문(身形門)²⁷에서 천문동은 ‘오랫동안 복용하면 몸이 가벼워지고 오래 살며 배고픈 줄을 모른다(久服輕身 延年不飢)’라고 기록되어 있으며, 예로부터 호흡기 질환에 많이 사용되고 있다. 그 외에도 현대 약리학

적으로 *in vitro* 실험에서는 돼지의 지방전구세포 분화를 35% 이상 감소시켜 지방 축적 억제 효과가 있음이 나타났다²⁸⁾. 또한 최근에는 증숙 처리한 발효 천문동이 증숙 처리하지 않은 발효 천문동보다 항균활성이 개선된다는 것이 밝혀졌다²⁹⁾. 하지만 천문동의 발효에 따른 연구는 아직까지 미미하며, 특히 자연발효에 대한 연구는 없었다. 이에 본 연구에서는 천문동을 자연발효하여 그로 인한 생리활성, 혈당 및 지질을 비롯한 대사변화와 발효에 관여하는 미생물을 분석하였다.

우선 발효 4주 후 총 당 함량은 발효 전에 비해 약 25% 감소한 248.7 mg/g으로 나타나 천문동의 발효 중에 당분이 미생물의 주요 영양원으로 사용된 것으로 판단된다. 이에 따라 발효 전 pH는 5.37이었으나 발효 4주 후에는 pH가 3.96까지 감소하였다. 따라서 발효 전과 발효 4주 후 pH나 총 당 함량을 비교한다면 천문동은 발효가 진행된 것을 알 수 있다.

다음으로 발효 시간에 따른 생리활성의 특성을 보기 위하여 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량의 변화를 관찰하였다. 플라보노이드는 phytochemical로 여러 식물에 다량 함유되어 있으며 천연항산화제로서 작용하는 물질로 알려져 있는데³⁰⁾, 발효 4주 후 총 플라보노이드 함량은 발효 전보다 감소하였다. 이는 자연발효 동안 천문동의 플라보노이드가 미생물에 의해 생산되기도, 대사되기도 하면서 플라보노이드 함량이 변화하고, 발효 4주째 유산균이 증가하면서 플라보노이드가 감소한 것으로 여겨진다³¹⁾. 반면 총 폴리페놀 함량은 발효 1주 후에는 감소하였지만 이후 지속적으로 유의하게 증가했는데, 이는 천문동 발효에 관여하는 유산균인 *L. plantarum*이 결합형 폴리페놀을 분해하여 유리형 폴리페놀이 증가한 결과로 보인다. *L. plantarum*은 decarboxylase와 같은 효소에 의해 gallic acid, methyl gallate, tannic acid는 pyrogallol로 대사한다. 또한 ferulic acid와 같은 페놀화합물은 reductase에 의해 ethyl guaiacol, hydroferulic acid로 대사한다³²⁾. 즉 *L. plantarum*이 여러 효소에 의해 당을 젖산으로 전환하여 총 당 함량과 pH가 감소하고 폴리페놀 함량이 증가하는 것이다. 더 나아가 폴리페놀은 식물 내에 존재하는 2차 대사산물 중 하나로 phenolic hydroxyl 기가 있어 생체 내의 radical에 수소를 공여하여 radical을 제거함으로써 항산화 작용을 나타내며³³⁾, 페놀성 화합물은 콜레스테롤 저하작용, 항암 및 항산화 작용 등 다양한 생리활성 기능을

가지는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 따라서 천문동은 자연발효를 통해 폴리페놀 함량이 증가되어, 발효 후 항산화 작용, 지질 대사 개선 등의 효능이 강화될 수 있다고 볼 수 있다. 또한 천문동에 존재하는 폴리페놀의 함량은 플라보노이드보다 부위에 따라서 6배에서 10배 정도 높은 함유량을 나타내고 있으며, 항산화 활성에 직접적으로 영향을 주는 물질은 플라보노이드계열의 물질보다 폴리페놀계의 물질로 판단된다고 보고되었다³⁵⁾.

천문동 발효 4주 후 미생물 총 생균수와 유산균 수가 크게 증가한 것으로 보아, 발효에 의해 생균의 성장이 극대화되며, 특히 유산균의 생장이 촉진되는 것을 알 수 있다. 이때 발효에 관여하는 미생물의 변화 과정을 비교하기 위하여 PCR-DGGE를 수행하였다. 천문동에서 *Leu. citreum*과 *G. proteobacterium*의 밴드는 발효 전부터 존재하여 종료가 될 때까지 다른 미생물에 의해 수가 크게 감소되지 않았다. 이로써 천문동의 발효에 *Leu. citreum*과 *G. proteobacterium*이 가장 크게 영향을 주었을 것으로 생각된다. *Leu. citreum*은 발효한 김장 김치 속에서 분리되며 항암효과가 높다고 보고되었다³⁶⁾. *G. proteobacterium*에는 많은 병원균이 포함되어 있으며, 그중 하나인 Legionellaceae는 레지오넬라 폐렴과 폰티악 열(Pontiac fever)을 유발한다고 알려져 있다³⁷⁾. 반면에 *P. jessenii*, *P. deceptionensis*, *P. putida*는 발효가 진행될수록 그 수가 급격히 감소되었다. 이는 발효 1주 후 크게 증가한 *Leu. citreum*이 pH를 크게 감소시키고 이로 인해 *Pseudanabaena* 속 성장에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 따라서 *Leu. citreum*은 발효에 잘 적응하여 그 분포가 유지된 반면, *Pseudanabaena* 속은 환경이 변화하면서 적응하지 못하고 그 수가 감소했을 것이다. 미네랄위터에서 분리되는 *P. jessenii*와 저온내성균인 *P. deceptionensis*는 그 특성에 대해 명확히 밝혀진 바가 없지만, *P. putida*는 원내감염을 일으키는 기회감염균으로 알려져 있다³⁸⁾. 발효 2주 후 전체적인 생균수가 증가하였는데 PCR-DGGE 결과에서도 *E. amylovora*, *R. aquatilis*, *S. plymuthica* 밴드의 진하기가 발효 2주부터 증가하는 양상과 일치한다. 반면 *L. plantarum*은 발효 전에 존재하지 않았으나 발효 4주 후 밴드가 진하게 나타났다. *L. plantarum*은 lactic acid bacteria 중 가장 흔한 유산균으로 hepatic cholesterol을 담즙산으로 분해시키는 경로를 증가시켜 low-density lipoprotein cholesterol, triglyceride를 감소시키는 것으로 보고되었다³⁹⁾. 또한 *L. plantarum*의 투여는 장내 미생물, 특히

*Lachnospiraceae*와 *Ruminococcaceae*의 분포를 조절하여 장 간막 지방 조직에서 지질 대사와 관련된 유전자 발현에 영향을 끼쳐 장내미생물 불균형에 의한 비만을 완화시킬 수 있다고 알려져 있다⁴⁰⁾.

대조군과 비교하여 천문동 농도 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서 2-NBDG 발현량은 각각 발효 전과 발효 4주 후 모두 증가하였지만 메트포민만큼 유의한 차이는 보이지 않았는데, 이를 통해 천문동의 항당뇨 효과는 미미한 것으로 볼 수 있다. 하지만 Oil red O staining을 통해 분화된 세포 내의 중성지방의 양을 측정된 결과, 천문동 농도 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군에 비해 지방 축적이 유의하게 감소하여 항비만 효과가 있다. 이로써 천문동은 지방 축적을 억제하여 항비만 효과가 있음을 알 수 있다. 하지만 발효 전후에 따른 차이가 없었고, 항비만 효과를 Oil red O staining으로만 판단하기에는 어려워 추후 지방생성과 관련된 세포나 동물 모델 등을 이용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

천문동의 자연발효 특성 및 미생물 변화를 관찰하였는데, 우선 천문동은 주로 *Leu. citreum*과 *G. proteobacterium*에 의해 발효되었다. 그리고 발효 4주 후 총 생균수와 유산균수 모두 증가하였고, 특히 유익균인 *L. plantarum*이 특징적으로 나타났다. 반면 병원균인 *P. putida*는 발효 4주 후 감소하였다. 또한 발효 4주 후 pH 및 총 당 함량이 유의하게 감소하고, 총 폴리페놀은 발효 전보다 약 1.8배 증가하였다. 즉 자연발효로 천문동의 유산균 수 및 활성물질이 증가됨을 알 수 있다. 그리고 천문동 농도 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서 발효 전과 후 모두 대조군과 비교하여 유의하게 지방 축적을 억제하여, 천문동이 호흡기 질환뿐 아니라, 항비만 혹은 항고지혈증 약물로 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다. 본 연구는 처음으로 천문동의 자연발효 특성을 분석했다는 점에서 의의가 있다. 다만 *G. proteobacterium* 중 *Legionellaceae* 과는 잠재적인 병원성을 지니고 있어 천문동에 있는 *G. proteobacterium*이 어떤 과에 속하는지에 대한 추가적인 실험이 필요하며, 만약 *Legionellaceae* 과라면 추후 발효 천문동 개발 시 이 미생물은 제거되어야 할 것이다. 또한 지방 축적 억제에서 발효 전후에 따른 차이는 보이지 않고 중성지방 축적만 측정했기 때문에, 추후 자세한 유전자 마커나 동물 실험 등을 통한 항비만, 항당뇨

활성에 관한 연구가 필요하다.

감사의 글

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

References

1. National College of Oriental Medicine Collaborative Textbook Compilation Committee. Herbal medicine. 2nd ed. Seoul : Younglimsa. 2011 : 647.
2. Lee SY, Kim SN, Kim JK. Effect of *Asparegus cochinchinensis* (Lour.) Merr. on the stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast generation. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2008 ; 37(1) : 16-9.
3. Pae HO, Lim CK, Jang SI, Han DM, Gun AW, Yoon SY, et al. Review of anti-leukemia effects from medicinal plants. Korean J Ori Med Phywiol Pathol. 2003 ; 17(3) : 605-10.
4. Jung MG, Kim SI, Jeong HJ, Lee CY, Son HJ, Hwang DY, et al. Antimicrobial activity against respiratory bacteria by *Asparagus Cochinchinensis* extracts and its antioxidant capacity. Microbiology and Biotechnology Letters (MBL). 2004 ; 43(4) : 367-72.
5. Samad NB, Debnath T, Hasnat A, Pervin M, Kim DH, Jo JE, et al. Phenolic contents, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Asparagus cochinchinensis* (Loureiro) Merrill. Journal of Food Biochemistry. 2014 ; 38(1) : 83-91.
6. Koo HN, Jeong HJ, Choi JY, Choi SD, Choi TJ, Cheon YS, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by *Asparagus cochinchinensis* in Hep G2 cells. J Ethnopharmacol. 2000 ; 73(1-2) : 137-43.
7. Kim H, Lee E, Lim T, Jung J, Lyu Y. Inhibitory effect of *Asparagus cochinchinensis* on tumor necrosis factor- α secretion from astrocytes. Int J Immunopharmacol. 1998 ; 20(4-5) : 153-62.
8. Shin DW. Korean Medicine Sermon. 2nd ed. Seoul : Shinilbooks Publishing Co. 2010 : 327.
9. Kim KY, Song HJ. Herbal processology. 1st ed. Seoul : Shinil Press. 2002 : 547.
10. Jung YJ, Han DO, Choi BH, Park C, Lee H, Kim SH, et al. Effect of fermented herbal extracts, HP-1 on enzyme activities and gene expressions related to alcohol metabolism in ethanol-loaded rats. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2007 ; 21(2) : 387-91.
11. Kim YM. A study on the trend of researches in fermented herb medicines [dissertation]. Seongnam (KR): University

- of Kyungwon; 2009 : 1-10.
12. Park JH, Kim HJ, Lee MJ. The role of gut microbiota in obesity and utilization of fermented herbal extracts. *J Soc Korean Med Obes Res.* 2009 ; 9(1) : 1-14.
 13. Seo YG. Antioxidant and anti-allergic activities of fermented product of *houltuynia cordata* thumb extract [dissertation]. Suncheon (KR): The Graduate School, Suncheon National University; 2005 : 25-26.
 14. Lee JW, Lee YC, Kim DH, Na HS, Ma JY. A study on the treatment of SD rat menopausal obesity utilizing fermentation techniques. *Kor J Clin Pharm.* 2005 ; 15(2) : 118-26.
 15. Kim DH, Han SB, Park JS, Han MJ. Fermentation of antler and its biological activity. *Korean Journal of Pharmacognosy.* 1994 ; 25(3) : 233-37.
 16. Choi HJ, Kim EJ, Han MJ, Baek NI, Kim DH, Jung HG, et al. Hepatoprotective effect of fermented *artemisia princeps pampanini* by lactic acid bacteria. *Korean Journal of Pharmacognosy.* 2007 ; 38(3) : 245-53.
 17. Shin YJ. The effects of fermented Mahuang on obese rats fed by high fat diet [dissertation]. Seoul (KR): Graduated School of Dongguk University; 2009 : 50-53.
 18. Kim SI, Lee SM, Lee CY, Son HJ, Hwang DY, Lee HS, et al. Antimicrobial activity and characteristics of *Asparagus Cochinchinensis* fermented with lactic acid bacteria. *Food Engineering Progress.* 2016 ; 20(4) : 278-84.
 19. Choi JY, Park JW, Kim JE, Park JJ, Lee MR, Song BR, et al. Dose dependence and durability of the therapeutic effects of *Asparagus cochinchinensis* fermented extract in an ovalbumin-challenged asthma model. *Laboratory Animal Research.* 2018 ; 34(3) : 101-10.
 20. Kim M, Kim WB, Koo KY, Kim BR, Kim D, Lee S, et al. Optimal fermentation conditions of hyaluronidase inhibition activity on *Asparagus cochinchinensis* Merrill by *Weissella cibaria*. *Microbiology and Biotechnology Letters (MBL).* 2017 ; 27(4) : 701-8.
 21. Wang GH, Lin YM, Kuo JT, Lin CP, Chang CF, Hsieh MC, et al. Comparison of biofunctional activity of *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. Extract before and after fermentation with *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng.* 2018 ; 127 (1) : 59-65.
 22. Shon MY. Antioxidant and anticancer activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* fermented with mycelial mushrooms. *Food Industry and Nutrition.* 2007 ; 12(2) : 51-7.
 23. Chae US. *Haneuihakgaeron.* 2nd ed. Seoul : Daeseoungmunhwasa. 1997 : 294.
 24. Han K, Kim K, Wang J, Kim H. Effect of unfermented and fermented *atractylodes macrocephalae* on gut permeability and lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Korean Med Obes Res.* 2013 ; 13(1) : 24-32.
 25. Lee SJ, Lee MJ, Jung JE, Kim HJ, Bose S. In vitro profiling of bacterial influence and herbal applications of *loniceræ flos* on the permeability of intestinal epithelial cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012 ; 41(7) : 881-7.
 26. Song M, Bose S, Kim H. Anti-obesity effects of fermented Samjung-hwan in high fat diet rats. *J Korean Med Obes Res.* 2013 ; 13(1) : 17-23.
 27. Huh J. *Dongyibogam.* 2nd ed. Seoul : Bubin Press, 2012 : 224.
 28. Choi YS, Choi KD, Kim SD, Owens P, Chung CS. Extracts of Korean medicinal plant extracts alter lipogenesis of pig adipose tissue and differentiation of pig preadipocytes in vitro. *Journal of Animal Science and Technology.* 2010 ; 52(5) : 383-8.
 29. Lee SM, Kim SI, Kang MS, Lee CY, Hwang DY, Lee HS, et al. Evaluation of antimicrobial activity of steamed and fermented *Asparagus cochinchinensis*. *Food Engineering Progress.* 2017 ; 21(2) : 143-9.
 30. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem.* 1992 ; 40(12) : 2379-83.
 31. Chien HL, Huang HY, Chou CC. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soy-milk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 2006 ; 23(8) : 772-8.
 32. 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(2-3) : 79-90.
 33. Labuza TP, Dugan Jr LR. Kinetics of lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition.* 1971 ; 2(3) : 355-405.
 34. Choi SY, Cho HS, Sung NJ. The antioxidative and nitrite scavenging ability of solvent extracts from wild grape (*Vitis Coignetia*) skin. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2006 ; 35(8) : 961-6.
 35. Koo KY, Kim WB, Park SH, Kim M, Kim BR, Hwang J, et al. Antioxidative properties of *Asparagus cochinchinensis* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2016 ; 45(4) : 524-32.
 36. Han GJ, Choi HS, Lee SM, Lee EJ, Park SE, Park KY. Addition of starters in pasteurized brined baechu cabbage increased kimchi quality and health functionality. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011 ; 40(1) : 110-5.
 37. Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infect Genet Evol.* 2016 ; 43 : 108-22.
 38. Fernández M, Porcel M, de la Torre J, Molina-Henares MA, Daddaoua A, Llamas M A, et al. Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. *Front Microbiol.* 2015 ; 6 : 871.

39. Jeun J, Kim S, Cho SY, Jun HJ, Park HJ, Seo JG, et al. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition*. 2010 ; 26(3) : 321-30.
40. Park S, Ji Y, Jung HY, Park H, Kang J, Choi SH, et al. *Lactobacillus plantarum* HAC01 regulates gut microbiota and adipose tissue accumulation in a diet-induced obesity murine model. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017 ; 101(4) : 1605-14.