



유산균으로 발효한 황기 잎 추출물의 이화학적 특성 및 항산화 활성

송빛나¹ · 이다빈² · 이성현³ · 박보람⁴ · 최지호⁵ · 김용석⁶ · 박신영^{7†}

Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Extract from *Astragalus membranaceus* Bunge Leaf Fermented with Lactic Acid Bacteria

Bit Na Song¹, Da Bin Lee², Sung Hyun Lee³, Bo Ram Park⁴, Ji Ho Choi⁵,
Yong Suk Kim⁶ and Shin Young Park^{7†}

ABSTRACT

Received: 2020 September 29
1st Revised: 2020 October 19
2nd Revised: 2020 November 11
3rd Revised: 2020 November 9
Accepted: 2020 November 9

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: This study aimed to investigate the quality characteristics of *Astragalus membranaceus* Bunge leaf (AMBL) fermented with lactic acid bacteria and the applicability of its biologically active compounds.

Methods and Results: An assessment of physicochemical properties such as pH, total acidity, free sugars, and isoflavonoid (calycosin-7-*o*- β -*d*-glucoside, ononin, calycosin, and formononetin) was conducted. Furthermore, the levels of antioxidant compounds, including polyphenols and flavonoids, and radical scavenging activities of the extracts using 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate and 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) were investigated. The calycosin content in the water extract of AMBL fermented with *Leuconostoc mesenteroides* increased by approximately twice as much as the control.

Conclusions: These results indicate that *L. mesenteroides* can be used to improve biological activity through fermentation, and that AMBL can be used as a functional materials and edible resource in industrial areas.

Key Words: *Astragalus membranaceus* Bunge, Leaf, Antioxidant Activities, Fermentation, Lactic Acid Bacteria

서 언

황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과 (*Leguminosae*)에 속하는 다년생 초본으로 주로 *Astragalus membranaceus*의 뿌리를 일컫는다. 황기의 뿌리는 다당류, 사포닌, 플라보노이드, 아미노산과 미량원소 등의 약리작용을 하는 다양한 성분이 함유되어 있어 면역증강을 비롯하여 생리적 활성 증진을 위해 임상에서 응용되어 왔다 (Kitagawa *et al.*, 1983; He and Findlay, 1991; Toda and Shirataki, 1999; Jeon *et al.*, 2010). 특히 황기 뿌리에는 이형다당류 (heteropolysaccharide)

와 astrogaloside I - IV 등이 풍부하게 존재하며 이들은 면역조절 기능에 기인하여 근래에 약물개발 분야에서 많은 관심을 받고 있다 (Zhong *et al.*, 2012).

황기속 식물인 *Astragalus vulneraria*의 연구결과 지상부에서 새로운 flavonol glycoside인 isorhamnetin 3-*o*- β -Dapiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranoside와 isorhamnetin 3-*o*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside를 분리하였다 (Bedir *et al.*, 2000). 또한 몽고황기 (*A. membranaceus* var. *mongholicus*)의 지상부로부터 2 개의 새로운 cycloartane-type의 사포닌인 mongholicoside A와 B는

†Corresponding author: (Phone) +82-63-238-3641 (E-mail) soyoenj@korea.kr

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과 연구원 / Researcher, Fermentated Processing Food Science Division, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea.

²농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과 연구원 / Researcher, Fermentated Processing Food Science Division, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea.

³농촌진흥청 국립농업과학원 기능성식품과 연구관 / Researcher, Functional Food & Nutrition Division, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea.

⁴농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과 연구사 / Researcher, Fermentated Processing Food Science Division, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea.

⁵농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과 연구관 / Researcher, Fermentated Processing Food Science Division, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea.

⁶전북대학교 식품공학과 교수 / Professor, Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea.

⁷농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과 연구사 / Researcher, Fermentated Processing Food Science Division, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea.

분리 보고되었다 (Yu *et al.*, 2007).

황기 지상부와 지하부에서 *astrogaloside* I - IV 등의 사포닌 성분을 비교한 결과 지상부에서 일부 *astrogaloside*의 함량은 지하부와 유사하거나 지하부 보다 더 높은 수준으로 나타난다고 보고하였다 (Kim *et al.*, 2012). 최근 연구에 의하면 황기의 지상부는 지하부 보다 더 높은 수준의 페놀성 화합물을 포함하고 있으며 페놀성 화합물 중에서도 *phenolic acid* (*chlorogenic*, *caffeic*, *ferulic*, *p-coumaric*)보다 *flavonoids* (*formononetin* 및 *quercetin*, *rutin*, *quercitrin*, *isorhamnetin*, *kaempferol*, *luteolin*)가 더 높은 비율로 포함되어져 있음을 보고되고 있다 (Jun *et al.*, 2012). Isoflavonoid 성분은 식물성 유사호르몬 (*phytoestrogen*)의 일종으로 에스트로겐과 구조적 유사성을 가지며, 작용도 유사하여 여성호르몬의 천연 대체물질로서 알려져 있고, 특히 이들은 항산화효과, 미백 및 주름개선 등의 노화방지 효과를 가지고 있으며, 천연물에서 추출되어 다양한 방법으로 응용되어지고 있다 (Kim *et al.*, 2007).

최근에는 황기 싹이 항주름 및 항알러지 효능의 증진을 확인하여 화장품 소재로서 가능성이 있다고 확인되었다 (Jung, 2018). 최근 천연물 등 다양한 기질에서도 자랄 수 있는 미생물을 활용해 고체발효 함으로써 발효 대상 기질을 그대로 이용해 생물 전환 효율을 높이는 기술을 사용하고 있다 (Bae *et al.*, 2004). 이는 미생물이 식물체에서 생물 전환 작용을 하여, 2차 대사산물의 기능성을 구명하는 연구가 진행되고 있으며, 섬유소 및 각종 천연물을 분해 및 변환하는 능력이 우수하므로 대부분 식물유래 천연물질을 발효 대상으로 사용할 수 있는 장점이 있기 때문이다 (Cho *et al.*, 2006).

유산균, 효모, 곰팡이 등의 미생물을 이용한 발효 기술의 연구로 다당체, 올리고당, 아미노산 펩타이드 등의 발효 산물을 얻고, 상호 간의 시너지 작용으로 생리활성 효능이 상승된다는 연구가 많이 진행되고 있다 (Ahn *et al.*, 2013). 유산균은 발효를 통해 젖산 및 여러 가지 대사산물을 생산하는 미생물로 각종 발효식품, 건강기능식품, 의약품, 사료 첨가제 등으로 광범위하게 이용되고 있으며, 최근에는 건강 증진 및 질병 예방의 특징을 가지는 probiotics 균주에 대한 연구와 응용이 증가되고 있다 (Kim and Lim, 2018). 대표적인 유산균인 *Lactobacillus* sp.는 β -glucosidase 활성을 가지고 있어 다양한 식물 배당체의 장대가수분해에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Choi *et al.*, 1999).

그러나 지금까지 황기의 잎을 포함한 지상부는 황기의 지하부 못지 않는 생리 및 약리적 효능이 있음에도 불구하고 황기의 지하부의 생육을 위해 재배하는 동안 가지치기를 통해 제거되어 왔다. 황기와 같은 근류 혹은 근경류를 사용하는 약용작물의 경우 부가가치가 높은 상태로 지하부를 수확하기 위해서는 파종 후 수확까지 장기간이 소요되는 단점을 가지고 있다. 반면 지상부의 경우 재배 기간 동안 수시로 수확이 가능

하다는 장점을 가지고 있으며 현재 대부분 폐기되고 있는 현실을 고려할 때 잉여자원의 재이용이라고 하는 장점을 가지고 있다. 이러한 황기 지상부의 활용도를 증가시키기 위한 연구가 필요한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 유산균으로 황기 잎을 발효하여 기능성뿐만 아니라 이용성을 증가시킨 식품 개발과 더불어 다양한 용도로 쓰일 수 있는 소재를 개발하기 위한 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 균주는 국립농업과학원 발효가공식품과 (Wanju, Korea)에서 분리한 *Lactobacillus brevis* E3-8 (KACC 92213P), *Leuconostoc mesenteroides* N12-4, *L. plantarum* N56-12를 사용하였으며, 황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge) 잎은 전북 익산에서 2017년에 재배되어 1년 7개월 동안 생육시킨 개체의 잎을 채취하여 농촌진흥청 원예특작과학원 약용작물과 (Eumseong, Korea)에서 확인 후 사용하였다.

2. 균주 배지 및 배양조건

균의 보존용 배지로는 *Lactobacilli* MRS Agar 배지 (Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하여, 37°C에서 48시간 평판 배양하였다. 형성된 단일 colony를 *Lactobacilli* MRS Broth 배지 (Difco, Detroit, MI, USA)배지에 37°C에서 48시간 3회 계대 배양한 후, 접종원으로 사용하였다.

3. 발효 황기 잎 제조

황기 잎은 세척한 것을 음건하여 5분간 찌고 1시간 건조하는 과정을 거친 후, 균주를 같은 조건에서 접종하기 위해 적외선 수분 측정기 (MS-70, AND Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 수분 함량을 50%로 조정하였다. *L. brevis*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*을 계대 배양한 뒤 초기균수를 $1 \times 10^6/ml$ 접종하여 37°C의 incubator (VS-1203PFHLN, Vision Scientific Co., Ltd., Daejeon, Korea)에서 48시간 동안 배양하며 발효시켰다.

균을 배양한 황기 잎은 -80°C 초저온냉동기 (deep freezer, Ilsin BioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에서 24시간 동결시킨 후 동결건조기 (freeze dryer, Ilsin BioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에서 72시간 동안 동결 건조시킨 것을 분쇄하여 시료로 사용하였다.

4. 추출물 제조

동결 건조한 발효 황기 잎을 사용하여 물 추출물을 제조하

였다. 물 추출물의 제조는 다음과 같다. 각 발효물 5 g에 끓인 증류수 100 ml을 혼합 후 ultrasonication (Power Sonic 420, Hwashin Co., Seoul, Korea) 로 1 시간 씩 2 회 반복 추출한 후 Whatman No. 2 여과지를 이용하여 여과시킨 후, 여과액을 200 ml로 정용하여 rotary vacuum evaporator (BUCHI, Flawil, Switzerland)를 이용하여 50°C 이하에서 감압-농축한 뒤, 이를 같은 추출용매로 용해하여 본 실험의 분석용 시료로 사용하였다.

5. pH 및 산도 측정

발효 황기 잎의 pH는 시료 2 g을 칭량하여 8 ml의 증류수를 가하여 균질화한 후 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 pH meter (HM-30P, DKK-TOA Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다.

총 산도는 pH 측정의 시료와 동일한 시료를 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리한 후 시료액 0.1 ml에 0.9 ml의 증류수를 가하여 1.0 ml로 정용한 후, 0.1 N NaOH로 pH 8.3에 도달 할 때까지 적정하였다. 적정에 소비된 NaOH 소비량을 이용하여 acetic acid 함량 (%)으로 환산하여 총산 함량을 표시하였다. 실험은 3 회 반복하여 그 평균값으로 나타내었다.

6. DPPH radical 소거 활성 측정

2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) radical에 대한 Blois 등 (1958)에 의한 방법을 변형하여 측정하였다. 각 농도별로 조제 한 시료 0.2 ml에 0.2 mM의 DPPH 용액 0.8 ml를 가하여 혼합한 뒤 상온에서 30 분간 반응시킨 후 microplate reader (Biotek Syergy Mx, Biotek Instruments Inc., VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 각 시료를 3 회 반복 측정하여 평균값을 구하였다. DPPH radical 소거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\begin{aligned} & \text{전자공여능 (\%)} \\ & = [1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도})] \times 100 \end{aligned}$$

7. ABTS 라디칼 소거 활성 측정

2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 소거활성 측정은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온 암소에서 24 시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액을 732 nm에서 흡광도가 0.70 ± 0.03이 되도록 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 950 μl에 추출물 50 μl를 가하여 암소에서 10 분간 반응시킨 후 microplate reader (Biotek Syergy Mx, Biotek Instruments

Inc., VT, USA)로 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 총 페놀성 화합물 측정

총 페놀성 화합물 함량의 측정은 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법을 응용하여 측정하였다 (Kim *et al.*, 1993).

황기 잎 추출물 시료를 0.2 ml를 시험관에 취하고 증류수 1.8 ml를 가하여 2 ml로 만든 후, 0.2 ml의 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 3 분간 실온에 방치하였다. 70°C에서 녹인 Na₂CO₃ 포화용액 0.4 ml를 가하여 혼합하고 증류수 1.4 ml를 첨가한 후 실온에서 1 시간 경과 후 microplate reader (Biotek Syergy Mx, Biotek Instruments Inc., VT, USA)로 725 nm에서 흡광도를 측정하고 표준물질로는 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 표준곡선을 구해 정량하였다.

9. 총 플라보노이드 화합물 측정

황기 잎 추출물 시료 0.1 ml를 취하여 튜브에 넣고, 증류수를 0.4 ml와 5% NaNO₂ 0.03 ml를 첨가하여 잘 혼합한 후 5 분간 실온에 방치하였다. 10% AlCl₃ 0.03 ml를 첨가하여 혼합하고 실온에 5 분간 방치 한 후, 1 M NaOH 용액을 0.2 ml 첨가하였다. 1 분간 상온에서 반응시킨 후 증류수를 3.24 ml를 첨가한 후 잘 혼합하여 microplate reader (Biotek Syergy Mx, Biotek Instruments Inc., VT, USA)로 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 표준곡선을 구해 정량하였다.

10. 유리당 분석

유리당 분석은 HPLC (Waters 2414, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 발효 황기 잎 추출물을 희석하여 0.45 μm PVDF membrane filter (Waters Co., Miliford, MA, USA)를 여과한 것을 시험용액으로 하였고, column은 YMC-PACK Polyamine II (5 μm, 4.6 mm × 250 mm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)을 사용하였으며, mobile phase는 acetonitrile : water 혼합액 (75 : 25, v/v), flow rate는 1.0 ml/min, detector는 ELSD signal (Waters 2414, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 사용하여 분석하였다.

11. 추출물의 성분 분석

발효 황기 잎의 추출물 시료의 성분은 HPLC (Waters 2998, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 발효 황기 잎 추출물을 희석하여 0.2 μm PVDF membrane filter (Waters Co., Miliford, MA, USA)를 여과

한 것을 시험용액으로 하였고, 분석조건은 다음과 같다.

Column은 ACQUITY HPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 mm \times 50 mm, Waters Co., Miliford, MA, USA), mobile phase 조성은 solvent A는 0.5%의 acetic acid를 포함한 water를 혼합하여 사용하였으며 solvent B의 경우 acetonitrile를 사용하였고, flow rate 및 column 온도는 각각 0.5 ml/min, 30 $^{\circ}$ C, 검출 파장은 280 nm로 detector는 Photodiode array detector ELSD signal (Waters 204, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 사용하여 검출하였다.

HPLC에서 나타난 peak area의 3 회 반복 평균값을 취한 후 표준품의 양과 peak area사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하여 계산하였다 (Jang *et al.*, 2016).

12. 통계처리

본 실험의 결과는 3 회 반복 실험을 실시한 뒤 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 25.0 program (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA를 실시한 후 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)방법을 사용하여 각 처리구간의 유의적 차이를 검증하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 발효 황기 잎의 이화학적 특성 변화

발효 황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge) 잎의 pH는 대조구가 pH 6.28인데 비하여 *L. plantarum* 실험군의 pH가 6.15로 가장 낮은 값을 나타내었다. 일반적으로 유산균 배양에 많이 사용되는 MRS배지의 pH가 6.2 - 6.6 사이인 것을 고려하여 이를 적정 pH로 보고 유산균 발효 시험에 사용하였다 (Table 1). 본 연구는 균주 접종에 의한 황기 잎 내 생리활성의 변화를 확인하는 것으로, 균주를 접종할 시료는 해당 균주의 생육이 가능할 조건이어야 하는 것이 기본 전제이다 (Bae *et al.*, 2004).

발효 황기 잎의 산도는 발효 후에 증가함을 보였고, *L.*

Table 1. Changes in pH and total acidity of fermented *A. membranaceus* Bunge leaves.

Sample	Components	
	pH	Total acidity (%)
Control	6.28 \pm 0.01 ^c	0.24 \pm 0.01 ^b
<i>Lactobacillus brevis</i>	6.37 \pm 0.03 ^b	0.40 \pm 0.01 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6.48 \pm 0.02 ^a	0.36 \pm 0.03 ^a
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6.15 \pm 0.01 ^d	0.37 \pm 0.02 ^a

Values are means \pm SD (n = 3). *Means with different superscript in the same column are significantly different at 5% by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT, $p < 0.05$).

*brevis*로 발효한 실험구의 산도가 0.40%로 가장 높은 값을 보였다. 산도의 증가는 유산균 배양에 의해 생성된 유기산과 미생물의 유기물 분해 시 발생하는 적은 양의 옥살산, 젖산 및 아세트산 등이 생성되어 (Kim and Bae, 1999) 잡균의 생육을 저해시킬 뿐만 아니라, 잡균에 의한 오염 방지 및 추출물의 저장성이 향상될 것으로 기대된다.

2. 추출물의 DPPH 및 ABTS 항산화 활성

발효 황기 잎의 DPPH 라디칼 소거능의 결과는 다음과 같다. 대조군 42.2%에 비해 발효 황기 잎의 결과가 *L. brevis* 51.02%, *L. mesenteroides* 64.33%, *L. plantarum* 50.78%로 모두 증가하였으며, *L. mesenteroides* 로 발효한 실험군이 가장 높은 활성을 나타내었다 (Table 2). 폴리페놀 함량이 증가하면 항산화 등의 생리활성이 비례적으로 증가한다고 보고되고 있으며 (Imai *et al.*, 1994; Halliwell *et al.*, 1995), 본 연구에서는 발효 황기 잎에서의 DPPH 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Kim 등 (2016)이 보고한 바와 같이 유산균에 의한 발효물의 항산화 활성이 높아지기 때문이라고 판단되었다. 또한 Jun 등 (2014)의 연구에서 밤송이추출물의 *Lactobacillus sakei*를 이용한 발효 시 대조군보다 높게 나왔다는 결과와 유사함을 보였다.

DPPH 라디칼 소거 활성능이 유리라디칼이 제거되는 원리를 이용한다면, ABTS 라디칼 소거능은 양이온 라디칼이 제거되는 것을 이용하므로 두 종류의 라디칼 소거능 확인의 필요가 있을 것으로 사료되어 실험 진행하였고 발효 황기 잎의 ABTS 라디칼 소거능의 결과는 다음과 같다. 대조군 68.44%에 비해 발효 황기 잎의 결과가 *L. brevis* 75.66%, *L. mesenteroides* 87.08%, *L. plantarum* 79.55%로 모두 증가하였으며, *L. mesenteroides*로 발효한 실험군이 가장 높은 활성을 나타내었다 (Table 2).

이러한 결과는 DPPH 라디칼 소거 활성에서 발효한 황기 잎이 발효하지 않은 황기 잎 대비 증가한다는 결과와는 일치하나, DPPH 라디칼 소거 활성과 비교하여 제거 능력이 다소 높은 것으로 나타났다. 이러한 소거능의 차이는 측정방법의 차

Table 2. Antioxidant activity of hot water extracts from fermented *A. membranaceus* Bunge leaves.

Sample	Contents (%)	
	DPPH	ABTS
Control	42.20 \pm 0.60 ^c	68.44 \pm 0.74 ^d
<i>Lactobacillus brevis</i>	51.02 \pm 0.79 ^b	75.66 \pm 0.80 ^c
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	64.33 \pm 1.33 ^a	87.08 \pm 0.80 ^a
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50.78 \pm 0.95 ^b	79.55 \pm 0.67 ^b

Values are means \pm SD (n = 3). *Means with different superscript in the same column are significantly different at 5% by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT, $p < 0.05$).

이로 사료된다. Jeong 등 (1994)에 의하면 DPPH는 자유라디칼을 ABTS는 양이온 라디칼을 소거하는 점에서 서로 차이가 나며 두 기질과 반응물과의 결합정도가 달라지므로 라디칼 제거 능력에서도 차이가 있음을 보고한 바와 같이 이는 본 연구 결과와 유사하였다.

3. 추출물의 총 폴리페놀 함량 변화

대조구에서는 4.51 mg/ml의 총 페놀함량을 보였지만 *L. mesenteroides*는 발효한 실험군에서는 6.46 mg/ml로 증가하였다. *L. brevis*와 *L. plantarum*는 각각 6.11 mg/ml, 6.10 mg/ml로 유사한 결과값을 나타내었다 (Table 3). 이 결과는 Kim 등 (2016)이 수행한 유산균 발효의 효과 연구에서 폴리페놀의 함량이 대조군에 비해 발효물에서 증가했다고 보고한 결과와 유사하였다.

발효한 실험군에서 총 페놀의 함량이 증가한 결과는 DPPH 라디칼 소거능 측정의 결과와 유사함을 보여 총 페놀의 함량이 DPPH 라디칼 소거능과 상관성이 있다고 추정되었다. Lee 등 (2004)은 DPPH 라디칼 소거능은 총 폴리페놀의 함량과 관련이 높다고 보고하였으며, Song 등 (2011)은 유산균 발효에 의하여 DPPH 라디칼 소거능이 증가한 것이 페놀성 화합물의 증가에 의해 기인한 것으로 추정된다고 보고한 바 있다.

4. 추출물의 총 플라보노이드 화합물 함량 변화

대조군에서의 총 플라보노이드 함량은 4.08 mg/ml로 나타났고, *L. mesenteroides*는 발효한 실험군에서는 5.39 mg/ml로 가장 높았다. *L. brevis*와 *L. plantarum*는 각각 5.29 mg/ml, 5.13 mg/ml로 결과값을 나타내었다 (Table 3).

플라보노이드 또한 폴리페놀의 일종이며, 일반적으로 폴리페놀 함량이 증가하면 항산화 등의 생리활성이 비례적으로 증가한다고 보고되고 있다 (Imai *et al.*, 1994; Halliwell *et al.*, 1995). 미생물에 의한 생물전환을 통해 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량 변화에 영향을 줄 수 있으며, *Lactobacillus paracasei*, *L. rhamnosus* 등을 이용하여 칩과 엉겅퀴의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드가 증가하는 것이 보고되었다 (Kim *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2019). 이와 같이 발효한 황기 잎

Table 3. Total phenolic and flavonoid content in extract from fermented *A. membranaceus* Bunge leaves.

Sample	Contents (mg/ml)	
	Total polyphenols	Total flavonoids
Control	4.51±0.10 ^d	4.08±0.02 ^d
<i>Lactobacillus brevis</i>	6.11±0.06 ^b	5.29±0.02 ^b
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6.46±0.05 ^a	5.39±0.02 ^a
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6.10±0.14 ^c	5.13±0.01 ^c

Values are means ± SD (n = 3). *Means with different superscript in the same column are significantly different at 5% by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT, p < 0.05).

의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 증가함은 *L. brevis*, *L. mesenteroides*와 *L. plantarum*의 대사과정을 통한 생물전환을 통해 이루어졌을 것으로 판단하였다.

5. 추출물의 유리당 함량 변화

대조군의 경우 fructose 117.55 mg/100g, glucose 21.99 mg/100g, sucrose 9.87 mg/100g이 검출되었다. *L. brevis*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*을 발효한 실험군의 유리당 함량은 모두 감소하였다. *L. mesenteroides*로 발효한 실험군은 fructose와 glucose가 각각 117.55 mg/100g, 4.59 mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타내었고, glucose는 대조구에 비해 4.8배 감소하였다. *L. brevis*로 발효한 실험군은 sucrose가 2.06 mg/100g으로 가장 낮은 함량을 보였다 (Table 4).

이 결과는 유산균으로 발효함에 따라 glucose나 전체적인 유리당의 함량이 현저히 감소하였는데, 발효 과정 중에 유산균에 의해 당류가 영양원으로 사용되었기 때문인 것으로 사료된다 (Kim *et al.*, 1999).

6. 추출물의 성분 변화

발효 황기 잎의 이소플라본 성분 함량을 측정하였다. 본 실험에서는 황기 잎에 존재하는 이소플라본 성분인 calycosin-7-*o*-β-d-glucoside, ononin, calycosin, formononetin을 HPLC로 분석을 통해 확인하였다.

Table 4. The free sugar content of fermented *A. membranaceus* Bunge leaves.

Sample	Components (mg/100 g)		
	Fructose	Glucose	Sucrose
Control	117.55±9.14 ^a	21.99±0.80 ^a	9.87±0.17 ^a
<i>Lactobacillus brevis</i>	109.24±5.30 ^a	16.24±2.29 ^c	2.06±0.58 ^c
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	69.60±8.97 ^b	4.59±0.57 ^d	5.38±0.47 ^b
<i>Lactobacillus plantarum</i>	110.77±5.77 ^a	18.98±0.70 ^b	5.30±0.37 ^b

Values are means ± SD (n = 3). *Means with different superscript in the same column are significantly different at 5% by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT, p < 0.05).

Table 5. The isoflavonoid compounds of hot-water extracts from fermented *A. membranaceus* Bunge leaves.

Sample	Contents (mg/100 g, dry weight)			
	Calycosin-7-O-β-d-glucoside	Ononin	Calycosin	Formononetin
Control	71.90±7.21 ^a	0.97±0.10 ^b	5.41±0.54 ^c	0.86±0.09 ^c
<i>Lactobacillus brevis</i>	66.78±6.68 ^b	1.26±0.13 ^a	5.51±0.55 ^c	0.92±0.09 ^{bc}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	61.53±6.15 ^c	1.22±0.12 ^a	9.93±0.99 ^a	5.41±0.54 ^a
<i>Lactobacillus plantarum</i>	59.89±5.99 ^c	1.27±0.13 ^a	7.60±0.76	1.05±0.10 ^b

Values are means ± SD (n = 3). *Means with different superscript in the same column are significantly different at 5% by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT, p < 0.05).

분석 결과 대조구의 calycosin-7-o-β-d-glucoside, ononin, calycosin, formononetin은 각각 71.89 mg/100g, 0.97 mg/100g, 5.41 mg/100g, 0.86 mg/100g으로 나타내었다. 발효 황기 잎의 calycosin과 formononetin은 대조구에 비해 모두 증가 하였으며, *L. mesenteroides*로 발효한 실험군이 각각 9.93 mg/100g, 5.41 mg/100g으로 가장 높게 증가하였다. 또한 ononin은 모든 실험군에서 유사하게 증가하였다. 반면에 calycosin-7-o-β-d-glucoside은 모든 실험군이 각각 66.78 mg/100g, 61.53 mg/100g, 59.89 mg/100g으로 감소하였다 (Table 5).

이는 Chien 등 (2006)이 보고한 바와 같이 유산균에 의한 배당체의 비배당체화 활성에 의해 나타난 것으로, Pyo 등 (2005)의 보고와 같이 이는 유산균의 β-glucosidase의 활성과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정되었다.

이는 황기에는 calycosin 및 formononetin의 배당체를 많이 함유하고 있는데 이러한 배당체형태의 성분들인 calycosin 7-o-β-D-glucoside 및 formononetin 7-o-β-D-glucoside가 균주의 효소분해 작용으로 인해 비배당체 형태인 calycosin 및 formononetin으로 전환되어 함량이 증가한 것으로 사료된다. Im 등 (2010)의 당분해효소를 이용하여 배당체 형태의 황기 성분을 aglycon형태로 전환한 연구결과 및 Lee 등 (2013)의 유산균 발효를 통해 자음 강화당의 배당체 성분인 nodakenin을 aglycon인 nodakenitine으로 전환시킨 보고와 유사하였다. 이러한 황기의 대표적인 isoflavonoid 성분인 calycosin 및 formononetin은 항산화, 항염증 효능 및 면역증진 활성 등의 다양한 생리활성 효능이 보고되어 있는데 (Du *et al.*, 2012), 배당체 형태로 존재하여 체내 흡수, 이용률 저하 등 미비한 효과를 나타내는 성분들을 유산균 발효공정을 통해 미생물의 효소를 이용하여 유기물을 분해 및 변화시킬 뿐만 아니라 활성성분의 생물전환을 일으켜 체내흡수율과 생체 이용률을 증진 시키므로 식품산업 등 여러모로 폭넓은 이용 가능성이 있을 것으로 사료된다 (Cho *et al.*, 2006).

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구사

업(과제번호: PJ 01357002)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn HY, Park KR, Kim YR, Cha JY and Cho YS. (2013). Chemical characteristics in fermented cordycepin-enriched *Cordyceps militaris*. Journal of the Korean of Life Science. 23:1032-1040.
- Bae EA, Han MJ, Kim EJ and Kim DH. (2004). Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh₂ by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. Archives of Pharmacal Research. 27:61-67.
- Bedir E, Çalis I, Piacente S, Pizza C and Khan IA. (2000). A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Astragalus vulneraria*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 48:1994-1995.
- Blois MS. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 26:1199-1200.
- Chien H, Huang H and Chou C. (2006). Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Food Microbiology. 23:772-778.
- Cho SI, Kim HW and Lee GJ. (2006). Biological activities of extracts of fermented *Camellia japonica* leaf and flower. Korean Journal of Herbology. 21:55-62.
- Choi YB, Woo JG and Noh WS. (1999). Hydrolysis of β-glucosidic bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. Korean of Journal Food science Technology. 31:189-195.
- Du XG, Z Hao B, Li JY, Cao XH, Diao MK, Feong HB, Chen XB, Cheon ZY and Zeong XY. (2012). *Astragalus* polysaccharides enhance immune responses of HBV DNA vaccination via promoting the dendritic cell maturation and suppressing Treg frequency in mice. International Immunopharmacology. 14:463-470.
- Halliwel B, Aeschbach R, Löliger J and Aruoma OI. (1995). The characterization of antioxidants. Food and Chemical Toxicology. 33:601-617.
- He ZQ and Findlay JA. (1991). Constituents of *Astragalus membranaceus*. Journal of Natural Products. 54:810-815.
- Im KR, Kim MJ, Jung TK and Yoon KS. (2010). Analysis of isoflavonoid contents in *Astragalus membranaceus* Bunge

- cultivated in different areas and at various ages. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal. 25:271-276.
- Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H and Itakura Y.** (1994). Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Medica*. 60:417-420.
- Jang YJ, Kim EJ, Kim SY, Lee YH and Park SY.** (2016). Changes in physicochemical components of *Astragalus membranaceus* fermented with *Phellinus linteus*. The Korean Society of Food Preservation. 23:680-688.
- Jeon YH, Moon JW, Kweon HJ, Jeung YJ, An CS, Jin HL, Hur SJ and Lim BO.** (2010). Effects of *Lycii fructus* and *Astragalus membranaceus* mixed extracts on immunomodulators and prevention of diabetic cataract and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes rat model. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:15-21.
- Jeong JW, Lee YC, Jung SW and Lee KM.** (1994). Flavor components of citron juice as affected by the extraction method. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 26:709-712.
- Jun DH, Cho WA, Lee JB, Jang MJ, You MS, Park JY, Kim SH and Lee JT.** (2014). Antioxidant activity of Chestnut(*Castanea crenata* S.et Z.) bur fermented by *Lactobacillus sakei*. *Journal of Life Science*. 24:1193-1199.
- Jun YM, Kim EH, Lim JJ, Kim SH, Kim SH, Lim JD, Cheoi DS, Cheoi YS, Yu CY and Chung IM.** (2012). Variation of phenolic compounds contents in cultivated *Astragalus membranaceus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:447-453.
- Jung SY.** (2018). Cosmetic application of sprouts of *Scutellaria baicalensis* and *Astragalus membranaceus*. Ph.D. Thesis. Kyung Hee University. Seoul, Korea. p.1-106.
- Kim BH, Jang JO, Lee JH, Park YE, Kim JG, Yoon YC, Jeong SJ, Kwon GS and Lee JB.** (2019). Evaluation of the anti-oxidant activity of *Pueraria* extract fermented by *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB 76. *Journal of the Korean of Life Science*. 29:545-554.
- Kim DS, Roh JH, Cho CW and Ma JY.** (2012). Analysis of nodakenetin from *Samultangs fermented by lactose* bacteria strains. *Korean Journal of Herbology*. 27:35-39.
- Kim GH and Bae EK.** (1999). Lactic acid bacteria for the preservation of fruit and vegetables. *Korean Journal of Food Preservation*. 6:245-254.
- Kim MJ, Lim KR, Jung TK and Yoon KS.** (2007). Anti-aging effect of *Astragalus membranaceus* root extract. *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 33:33-40.
- Kim NM, Sung HS and Kim WJ.** (1993). Effect of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. *Korean of Journal Food science Technology*. 25:204-209.
- Kim SH, Lee JS, Park KS, Lee JS, Lee HW and Park S.** (1999). Liquid culture of basidiomycetes on natural media. *Korean Journal of Mycology*. 27:373-377.
- Kim SK and Lim SD.** (2018). Functionality and research trend of probiotics. *Food Industry and Nutrition*. 23:18-23.
- Kim YM, Jeong HJ, Chung HS, Seong JH, Kim HS, Kim DS and Lee YG.** (2016). Anti-oxidative activity of the extracts from *Houttuynia cordata* Thunb. fermented by lactic acid bacteria. *Journal of the Korean of Life Science*. 26:468-474.
- Kitagawa I, Wang H and Yoshikawa M.** (1983). Saponin and saponenol. XXXVII: Chemical constituents of Astragali Radix, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. (4): Astragalosides VII and VIII. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 31:716-722.
- Lee KJ, Song NY, Roh JH, Liang C and Ma JY.** (2013). Analysis of bioconverted-components in fermented Jaeumganghwa-tang by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 56: 131-135.
- Lee SE, Kim YS, Kim JE, Bang JK and Seong NS.** (2004). Antioxidant activity of *Ulmus davidiana* var *Jiponica* N and *Hemipteleae davidii* P. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 12:321-327.
- Park YE, Kwon GS, Kim BH and Lee JB.** (2019). Evaluation of the usefulness of the fermented thistle(*Cirsium japonicum*) with *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB105 for antioxidative and whitening effects. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*. 17:1-13.
- Pyo YH, Lee TC and Lee YC.** (2005). Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Journal Food Research*. 38:551-559.
- Song HS, Eom SH, Kang YM, Choi JD and Kim YM.** (2011). Enhancement of the antioxidant and anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiforme* water extract by lactic acid bacteria fermentation. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 44:111-117.
- Toda S and Shirataki Y.** (1999). Inhibitory effects of Astragali radix, crude drug in oriental medicines on lipid peroxidation and protein oxidative modification by copper. *Phytotherapy Research*. 68:331-333.
- Yu Q, Li P, Bi Z, Luo J and Gao X.** (2007). Two new saponins from the aerial part of *Astragalus membranaceus* var. mongholicus. *Chinese Chemical Letters*. 18:554-556.
- Zhong R, Yu M, Liu H, Sun H, Cao Y and Zhou D.** (2012). Effects of dietary *Astragalus* polysaccharide and *Astragalus membranaceus* root supplementation on growth performance, rumen fermentation, immune responses, and antioxidant status of lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 174:60-67.