



## 유산균으로 발효한 황기 잎 추출물의 이화학적 특성 및 항산화 활성

송빛나<sup>1</sup> · 이다빈<sup>2</sup> · 이성현<sup>3</sup> · 박보람<sup>4</sup> · 최지호<sup>5</sup> · 김용석<sup>6</sup> · 박신영<sup>7†</sup>

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

Bit Na Song<sup>1</sup>, Da Bin Lee<sup>2</sup>, Sung Hyun Lee<sup>3</sup>, Bo Ram Park<sup>4</sup>, Ji Ho Choi<sup>5</sup>,  
Yong Suk Kim<sup>6</sup> and Shin Young Park<sup>7†</sup>

#### 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*- $\beta$ -*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*- $\beta$ -Dapiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-galactopyranoside와 isorhamnetin 3-*o*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -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

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

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

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

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

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

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

<sup>7</sup>농촌진흥청 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 방면으로 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  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지고 있어 다양한 식물 배당체의 장대 가수분해에 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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% NaNO<sub>2</sub> 0.03 ml를 첨가하여 잘 혼합한 후 5 분간 실온에 방치하였다. 10% AlCl<sub>3</sub> 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  $\mu$ 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 <sup>c</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	6.37 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6.48 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6.15 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

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 <sup>c</sup>	68.44 $\pm$ 0.74 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	51.02 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	75.66 $\pm$ 0.80 <sup>c</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	64.33 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	87.08 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50.78 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	79.55 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>

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 <sup>d</sup>	4.08±0.02 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	6.11±0.06 <sup>b</sup>	5.29±0.02 <sup>b</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6.46±0.05 <sup>a</sup>	5.39±0.02 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6.10±0.14 <sup>c</sup>	5.13±0.01 <sup>c</sup>

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 <sup>a</sup>	21.99±0.80 <sup>a</sup>	9.87±0.17 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	109.24±5.30 <sup>a</sup>	16.24±2.29 <sup>c</sup>	2.06±0.58 <sup>c</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	69.60±8.97 <sup>b</sup>	4.59±0.57 <sup>d</sup>	5.38±0.47 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	110.77±5.77 <sup>a</sup>	18.98±0.70 <sup>b</sup>	5.30±0.37 <sup>b</sup>

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 <sup>a</sup>	0.97±0.10 <sup>b</sup>	5.41±0.54 <sup>c</sup>	0.86±0.09 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	66.78±6.68 <sup>b</sup>	1.26±0.13 <sup>a</sup>	5.51±0.55 <sup>c</sup>	0.92±0.09 <sup>bc</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	61.53±6.15 <sup>c</sup>	1.22±0.12 <sup>a</sup>	9.93±0.99 <sup>a</sup>	5.41±0.54 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	59.89±5.99 <sup>c</sup>	1.27±0.13 <sup>a</sup>	7.60±0.76	1.05±0.10 <sup>b</sup>

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 Rh<sub>2</sub> 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  $\beta$ -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.