유산균으로 발효한 침향공진단으로부터 분리한 Nodakenetin의 Neuraminidase 활성 억제 효능

서지현, 박동준, 이소영, 조호성, 진무현*
LG 생활건강 기술연구원

Received: January 30, 2020 / Revised: March 10, 2020 / Accepted: March 11, 2020

Neuraminidase-inhibition Activity of Nodakenetin from Gongjin-dan Fermented by Lactic Acid Bacteria

Ji Hyun Seo, Dong Jun Park, So Young Lee, Ho Song Cho, and Mu Hyun Jin*

Science Research Park, LG Household and Healthcare Ltd., Seoul 07795, Republic of Korea

The purpose of this study was to identify the changes in the components of unfermented Gongjin-dan (GD) and fermented Gongjin-dan (FGD) and to confirm whether GD or FGD has an inhibitory effect on viral neuraminidase (NA) activity. A major component of FGD was isolated and identified as nodakenetin, which is the aglycone of nodakenin. After fermentation, the nodakenetin content in FGD was approximately 10-fold higher than that in GD. Then, we examined the viral NA-inhibitory activity of GD, FGD, nodakenin, and nodakenetin. At a concentration of 500 µg/ml, FGD inhibited viral NA activity by 92% compared to the DMSO-treated control, while GD barely inhibited viral NA activity. In addition, 250 µg/ml of nodakenetin inhibited viral NA activity by 68% compared to the control, while nodakenin inhibited viral NA activity by only 4% at the same concentration as nodakenetin. Collectively, these results suggest that FGD has a more remarkable viral NA-inhibitory activity than GD because the content of the anti-viral component nodakenetin was higher in FGD due to the hydrolysis of nodakenin by *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104.

Keywords: Gongjin-dan, fermentation, *Lactobacillus plantarum*, nodakenin, nodakenetin, neuraminidase

서론

공진단은 원나라 남풍의 의학자 위역림이 가문에 5대째 내려오는 경험방을 모아 편찬한 책인 세의득효방에 근거하여 만들어진 보약처방이다[1]. 조선시대 허준이 편찬한 동의보감 잡평편의 허로문에는 ‘체질이 선천적으로 허약하더라도 천원일기를 굳혀서 신수를 오르게 하고 심화를 내리게 하므로 온갖 병마가 생기지 않는다’고 공진단의 수승화강 효능이 기재되어 있다[2]. 공진단은 기본적으로 사향, 당귀, 녹용, 산수유 4가지 약재로 구성된 원방공진단 처방을 의미하지만, 사향은 국내에서 식품에서 사용할 수 없는 약재로 지정되었을 뿐만 아니라 그 진위에 대한 논란이 제기되어 사향을 다른 약재로 대체한 가감공진단 개발의 필요성이 대두되었다.

이로 인해, ‘당귀와 녹용으로 구성된 흑원방이 원방공진단과 동일한 약효를 가진다’는 동의보감의 공진단 조문 기록[3]과 ‘사향 대신 침향 혹은 목향을 넣는다’는 방약합편 활투의 기록[4]을 근거로 하여, 최근에는 사향을 목향이나 침향으로 대체한 가감공진단 처방을 활용하고 있다. 한편, 침향은 수령 30년 이상의 침향나무(*Aquilaria agallocha*)에 상처로 인해 생긴 수지가 응집하고 숙성된 것으로, 동북아시아권에서는 피부 소양, 소화불량 및 천식 등에 사용하였으며 중국 송나라 의서인 본초연의에 ‘나쁜 기운을 제거하고 치료되는 것은 나머지를 고친다. 부드럽게 효능을 취해 이익은 있고 손해는 없다’고 침향의 효능을 기록되어 있다[5].

발효는 미생물이 자신의 효소를 이용하여 유기물을 분해함으로써 인간의 생활에 유용하게 사용되는 물질을 만드는 과정이다. 발효를 통해 고분자 물질이 유기산과 아미노산 같은 저분자 물질로 전환되고 배당체는 비배당체 성분으로 가수분해됨에 따라, 발효 식품 섭취 시 영양분의 체내 흡수율 및 생체 이용률이 강화될 수 있다[6]. 한편, 러시아 과학자

*Corresponding author

Tel: +82-2-6980-1554; Fax: +82-2-6980-1602

E-mail: mhjin@lghnh.com

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Elie Mechinikoff가 불가리아 사람들의 장수 요인이 *Lactobacillus* 속 유산균으로 발효된 발효유의 섭취라는 것을 밝혀낸 이후부터 발효에 대한 본격적인 연구가 시작되어 현재는 유익균(Probiotics)과 대사산물(Postbiotics)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[7-9]. 특히, *Lactobacillus*속 유산균은 유익균에 포함되는 미생물 중에서 가장 많은 종을 차지하고 있으며, 현재 가장 많이 연구된 미생물 속의 하나로 대부분의 종이 전장유전체(whole genome sequence) 분석이 완료되었다[10-12]. 그 중에서도 *Lactobacillus plantarum* 종은 항산화, 항균[13], 항염[14] 및 항암[15] 등의 효능이 보고되었으며, 알츠하이머와 파킨슨과 같은 만성 질환뿐만 아니라 당뇨와 고혈압 같은 질병의 치료에도 활용되고 있다[16]. 한편, 한의학계에서도 한약의 새로운 수요를 창출하고 고부가가치의 한약 제품을 개발하기 위한 일환으로, 전통 한약재를 찌거나 삶은 후 미생물을 접종 및 배양하는 방법으로 전통 한약을 발효하고, 제조한 발효 한약의 생화학적 분석 및 효능에 대한 연구를 진행하고 있다[17]. 주로, 발효를 통해 전환된 성분을 규명하거나[18-21], 발효를 통해 강화된 항염[22], 항산화 및 항균[23] 등의 효능을 밝힌 논문들이 보고되었다. 따라서, 본 연구에서는 전통 한방 처방인 공진단에 신구한 효능을 더하거나 기존의 효능을 강화하고자 원방공진단의 사향을 침향으로 대체한 가감공진단(침향공진단)을 *L. plantarum* 종으로 발효하였다.

원방공진단을 포함한 다양한 가감공진단 처방들에 대한 효능 고찰 및 생화학적 분석 연구들이 지속적으로 보고되고 있다. 특히, 공진단에 대한 효능 논문은 주로 항산화 작용에 집중되어 있으며 그 외에도 중추신경계 질환, 염증 질환, 심혈관계 질환, 및 간 질환 등에 대한 효능이 보고되었다[24]. 한편, 공진단의 효능을 언급한 고서에 따르면 공진단은 선천적으로 몸이 허약하거나 병에 걸려 허약해진 허로에 처방한다고 알려져 있는데, 이는 결국 면역력 강화를 의미한다. 이에 본 연구에서는 공진단 혹은 발효한 공진단 섭취를 통한 면역력 강화, 정확히는 인플루엔자 바이러스로 인한 독감의 예방 가능성을 neuraminidase (NA) 활성 억제 평가를 통해 확인하고자 하였다. 인플루엔자 바이러스 표면에 존재하는 당단백질인 NA는 숙주 세포 표면의 sialic acid와 바이러스 표면의 hemagglutinin의 결합을 가수분해함으로써 세포 표면으로부터 바이러스를 분리시키고 새로운 세포들에 대한 감염을 지속함으로써 바이러스가 생물체 내에서 증식할 수 있도록 한다. 따라서, 인플루엔자 바이러스로 인한 독감을 예방 혹은 치료하기 위하여 바이러스 증식의 필수 효소인 NA에 대한 활성을 억제하는 소재를 개발하고자 하는 노력이 계속되고 있다[25-27].

본 연구에서는 침향공진단을 *L. plantarum*으로 발효하고 발효를 통해 증가한 침향공진단의 유효 성분을 밝히고, 인플

루엔자 바이러스 감염에 대한 예방 및 치료 효능을 가지는 발효 한약으로의 침향공진단의 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

침향공진단 추출액 제조

본 실험에서는 원방공진단의 구성 약재인 당귀, 녹용, 산수유, 사향 중 식품에 사용할 수 없는 사향을 침향으로 대체하였다(침향공진단). 당귀(*Angelica gigas*), 녹용(*Cervu snippon*), 산수유(*Cornus officinalis*), 및 침향(*Aquilaria agallocha*)의 약재들은 모두 휴먼허브(Humanherb, Korea)에서 구입하였으며, 대한민국 약전 및 생약규격집에 기술된 각각의 약재 항목에 적합한 것을 엄선하여 사용하였다. 당귀, 녹용, 산수유, 및 침향을 각각 128 g, 128 g, 128 g, 16 g씩 혼합한 총 400 g의 원물에 증류수 4 L를 가하여 80℃에서 3시간 동안 열수 추출하였다. 침향공진단 추출액을 qualitative filter papers (#1004090, Whatman, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 감압 여과하고, rotary evaporator (Buchi, Switzerland)로 감압 농축하여 고형분이 약 50%인 열수 추출물(침향공진단 농축액) 181.5 g을 얻었다. 침향공진단 추출액의 수율은 27.7%이다.

침향공진단 발효액(FGD)의 제조

한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB) 산하의 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받은 *L. plantarum* KCTC 3104 균주를 121℃, 1.5 기압에서 15분 동안 가압 멸균한 MRS broth (Difco, Detroit, MI, USA)에서 계대 배양한 뒤, 생장 배지의 optical density at 600 nm (OD 600) 값이 1이 될 때까지 배양하여 inoculum으로 사용했다. 이후, 침향공진단 농축액 80 g이 함유된 MRS 배지 8 L (unfermented Gongjin-dan, GD)에 inoculum 80 ml를 접종하여 37℃의 항온배양기에서 72시간 동안 발효하고, Millipore membrane filters (PVDF, 0.22 µm, Merck KGaA, Germany)를 이용하여 멸균 여과하였다(침향공진단 발효액, fermented Gongjin-dan, FGD). 이후, high-performance liquid chromatography (HPLC) 및 NA 활성 평가에 사용된 GD, FGD, 침향공진단 농축액, 및 MRS 배지는 모두 rotary evaporator로 감압 농축한 뒤, 용도에 따라 각각 methanol (MeOH) 및 dimethyl sulfoxide (DMSO, #D2650, Sigma-Aldrich)에 녹여서 사용하였다.

Nodakenetin의 분리 시약 및 기기

Nuclear magnetic resonance (NMR)은 Advance III 600 (600 MHz) spectrometer (Bruker, Germany)를 사용하여

측정하였으며, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)는 Qtrap 6500 (SCIEX, USA)를 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60 (#9385, Merck KGaA)을, preparative liquid chromatography (Prep-LC)는 Agilent 1260 infinity preparative scale purification system (Agilent, USA)을 사용하였으며, 컬럼은 Eclipse XCB-C18 (Agilent, 21.2 mm × 250 mm, 7 µm)을 사용하였다. TLC Plate는 Kieselgel 60F₂₅₄S 및 RP-18₂₅₄S pre-coated plate (Merck KGaA). Nodakenetin과 nodakenin 표준품은 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (China)에서 구입하여 사용하였으며, 성분 분리 및 분석을 위해 사용된 MeOH과 acetonitrile (ACN)은 HPLC용으로 Duksan pure chemicals (Korea)에서, phosphoric acid (H₃PO₄)는 HPLC용으로 Fujifilm Wako pure chemical Corp. (Japan)에서 구입하였으며, 증류수는 Milli-Q purification system (Millipore, USA)으로 정제하여 사용하였다.

발효에 의한 침향공진단의 성분 변화를 확인하기 위해 GD, FGD, 침향공진단 농축액, 및 MRS 배지의 HPLC chromatogram 패턴을 분석하였다. 기기는 Agilent 1260 infinity system이며, 컬럼은 Phenomenex kinetex C18 (4.6 mm × 50 mm, 2.6 µm, Phenomenex, USA)를 사용하였다. 이동상은 용매를 A (0.1% H₃PO₄)와 B (ACN)로 설정하여 다음과 같은 조건에서 분석하였다. 0–2 min, 100% A; 2–9 min, 100–5% A; 9–12 min, 5% A; 12–13 min, 5–100% A로 분석하고 이후 4분간 안정화 시간을 주었다. 유속은 1 ml/min으로, 시료주입량은 3 µl이며, 210 및 240 nm에서 검출하였다. GD와 FGD 내 nodakenetin과 nodakenin의 함량 분석은 Zhang *et al.*의 방법을 일부 변형하여 사용하였다[18]. 요약하여 설명하자면, 이동상은 MeOH/H₂O (4:6)을 이용하여 330 nm에서 검출하였다. 유속은 1 ml/min로 분석하였으며 시료는 3 µl를 주입하였다. 모든 표준 용액과 검액의 조제는 Millipore membrane filters (PTFE, 0.45 µm, Merck KGaA)로 여과하여 사용하였다. 데이터의 수집과 처리는 Agilent HPLC Chem station을 사용하였다.

Nodakenetin의 분리

총 8 L의 FGD를 동량의 n-hexane을 가하여 진탕 방치하여 분획하고, 순차적으로 ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (BuOH)을 가하여 진탕 방치하여 각각의 분획물을 얻었다. EtOAc 분획(15 g)을 n-hexane/EtOAc (gradient) 용출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 11개의 소분획으로 나누었다. 소분획 Fr. 9를 ACN/0.1% H₃PO₄ (3:7) 용출용매로 Prep-LC를 실시하여 화합물 A (30 mg)를 얻었다.

Compound A (Nodakenetin) – White amorphous powder,

ESI-MS m/z : 247 [M + H]⁺; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.59 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-4), 7.22 (1H, s, H-5), 6.75 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 4.74 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-2'), 3.22 (2H, m, H-3'), 1.37 (3H, s, CH₃), 1.24 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 163.2 (C-2), 161.4 (C-7), 155.7 (C-10), 143.7 (C-4), 125.0 (C-6), 123.4 (C-5), 112.8 (C-9), 112.4 (C-3), 98.0 (C-8), 91.1 (C-2'), 71.7 (C-4'), 29.5 (C-3'), 26.1 (C-6'), 24.3 (C-5').

Neuraminidase (NA) 활성 평가

NA activity assay kit (#MAK121, Sigma-Aldrich)를 이용하여 manufacturer's instructions에 따라 다음과 같은 순서로 실험하였다. 먼저, 10 mM 표준 시약(#MAK121F) 20 µl와 증류수 480 µl를 혼합하여 400 µM 표준 시약 용액을 제조한 후, 증류수를 추가하여 표준 시약의 최종 반응 농도가 각각 0 (blank), 120, 240, 및 400 µM이 되도록 96 well plate (#3610, Corning, USA)에 각각 10 µl/well씩 넣어주었다(표준 시약 wells). 또한, 100 nM zanamivir (RelenzaTM, 양성대조군, #SML0492, Sigma-Aldrich) 또는 10 × 시료 4중(GD, FGD, nodakenetin, 및 nodakenin)을 96 well plate에 각각 5 µl/well씩 넣어주었다. 이때, 양성대조군을 포함한 시료 4중은 최종 반응 농도에 10배가 되도록 DMSO에 녹인 후 멸균 필터하여 사용하였다. NA dilution buffer에 희석한 NA (#4858-NM-005, R&D systems, USA)를 표준 시약 wells을 제외한 모든 wells에 최종 반응 농도가 10 µg/ml이 되도록 5 µl/well씩 넣어주었다. NA dilution buffer는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 1 M Tris-HCl (pH 7.5, #EBA-1103, Elpis Biotech Inc., Korea) 1 ml, 1 M NaCl 12.5 ml, 그리고 증류수 36.5 ml를 혼합하고, Millipore membrane filters (PTFE, 0.22 µm, Merck KGaA)를 이용하여 멸균 여과하였다. 마지막으로 표준 시약 wells을 포함한 모든 wells에 assay buffer (#MAK121A) 15 µl, substrates (#MAK121C) 27.5 µl, cofactors (#MAK121E) 0.5 µl, enzyme (#MAK121D) 0.5 µl 및 dye reagent (#MAK121B) 0.25 µl를 혼합하여 제조한 반응 시약을 40 µl/well씩 첨가하고, 37°C 항온배양기에서 차광하여 20분 동안 반응시킨 후 Epoch microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도(A_{570,20})를 측정하였다. 동일 조건에서 30분 동안 추가로 반응시킨 후 동일 방법으로 흡광도(A_{570,50})를 측정하였다. 양성대조군 및 시료처리군에 대한 상대적인 NA 활성도는 ΔA₅₇₀ (=A_{570,50} - A_{570,20})를 이용하여 계산하였다.

통계 처리

본 연구에서 실시한 실험은 총 3회 이상 반복하였으며, 실

험 군간의 결과값의 통계적 유의성 검정은 one-tailed, unpaired student's t-test로 실시하였다. 결과값들은 mean $\pm$ standard deviation (S.D.)으로 나타냈으며, P 값이 0.01 이하일 경우 **, 0.001 이하일 경우 ***으로 통계적 유의성을 표시하였다.

결과 및 고찰

Nodakenetin의 분리 및 정제

침향공진단 성분 중 발효를 통해 생성 혹은 증가하는 유효 성분을 분리하기 위하여 총 4가지 시료들(GD, FGD, 침향공진단 농축액, 및 MRS 배지)에 대하여 HPLC를 실시하였다. 분석 결과, FGD의 spectrum에서 침향공진단 유래 성분이면서 동시에 발효를 통해 증가한 peak들을 확인하고, 그 중에서 함량 변화가 가장 큰 성분을 분리 및 정제하고자 하였다. FGD를 동량의 n-hexane, EtOAc, BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물 중 EtOAc 분획에서 발효를 통한 함량 변화가 가장 큰 성분을 확인하고, Silica gel column chromatography 및 Prep-LC를 실시하여 Fig. 1과 같이 compound A를 분리, 정제하였다.

Compound A의 화학 구조는 NMR 및 MS spectrum을 통해 확인하였다. 전형적인 Furocoumarines 구조의 특징적인 peak들을 확인하였으며, 이와 같은 spectral data를 종합하여 기존에 알려진 문헌과[28] 비교하여 compound A를 nodakenetin으로 동정하였으며, nodakenetin 표준품과 TLC 및 HPLC를 통해 직접 비교하여 재확인하였다(Fig. 2).

발효 전후 침향공진단(GD, FGD)의 Nodakenin 및 Nodakenetin 함량 변화

GD의 nodakenetin 함량은 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으나 FGD의 nodakenetin 함량은 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 발효를 통해 nodakenetin의

Fig. 1. Isolation scheme of compound A.

Fig. 2. Chemical structure of nodakenetin (A).

Table 1. The contents of nodakenin and nodakenetin in unfermented and fermented Gongjin-dan (GD and FGD).

Gongjin-dan ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Nodakenin 330 nm ^b	Nodakenetin 330 nm
GD	41.20 $\pm$ 1.90 ^a	6.06 $\pm$ 0.24
FGD	n.d. ^c	70.02 $\pm$ 2.57

^aValues are mean $\pm$ standard deviation; n = 3. ^bUV wavelength used for detection. ^cNot detected.

함량이 10배 이상 증가하였다(Table 1). 반면, nodakenetin에 glucose가 결합된 배당체인 nodakenin의 함량은 GD에서는 41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으나 발효함에 따라 감소하여 측정되지 않았다.

발효 전후 침향공진단(GD, FGD)의 NA 활성 억제 효과

침향공진단 혹은 발효한 침향공진단의 인플루엔자 바이러스에 대한 감염 억제 가능성을 확인해보고자, GD 및 FGD

Fig. 3. Inhibitory effect of unfermented Gongjin-dan (GD) and fermented Gongjin-dan (FGD) on viral neuraminidase (NA) activity. NAs were treated with 10 nM zanamivir (positive control), GD (10, 50, 250, or 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or FGD (10, 50, 250, or 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Relative NA activities were calculated using the difference in absorbance at 570 nm between a 50 min reaction ($A_{570, 50}$) and a 20 min reaction ($A_{570, 20}$) as described in the materials and methods. Each column represents the mean $\pm$ standard deviation (S.D.) of two independent experiments performed in triplicate. ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with the same concentration of GD-treated groups.

Fig. 4. Inhibitory effect of nodakenetin and nodakenin on viral neuraminidase activity. NAs were treated with 10 nM zanamivir (positive control), nodakenin (10, 50, or 250 µg/ml), or nodakenetin (10, 50, or 250 µg/ml). Relative NA activities were calculated using the difference in absorbance at 570 nm between a 50 min reaction ($A_{570, 50}$) and a 20 min reaction ($A_{570, 20}$) as described in the materials and methods. Each column represents the mean $\pm$ standard deviation (S.D.) of two independent experiments performed in triplicate. ** $p < 0.01$ compared with the same concentration of nodakenin-treated groups.

의 NA 활성 억제 평가를 실시하였다. GD (10–250 µg/ml) 처리시 NA 활성을 전혀 억제하지 못하였으며 500 µg/ml 처리시에만 NA 활성을 DMSO 처리 대조군 대비 약 1%만큼 억제하였으나, FGD (10, 50, 250, 및 500 µg/ml)는 NA 활성 억제율이 각각 24%, 55%, 84%, 및 92%로 동일 농도의 GD 대비 유의미한 NA 활성 억제 효과가 있었다(Fig. 3).

Nodakenin, nodakenetin의 NA 활성 억제 효과

GD가 발효를 통해 FGD가 됨에 따라 NA 활성이 억제되는 것이 발효를 통해 증가한 침향공진단 성분인 nodakenetin에 의한 것인지 확인해보고자, nodakenetin과 nodakenin의 NA 활성 억제 평가를 실시하였다. 250 µg/ml nodakenin은 DMSO 처리 대조군 대비 NA 활성을 약 4%만큼 억제하였으나, nodakenetin (10, 50, 및 250 µg/ml)은 NA 활성 억제율이 각각 12%, 22%, 및 68%로 동일 농도의 nodakenin 대비 농도의존적으로 유의미한 NA 활성 억제 효과가 있었다(Fig. 4).

고 찰

이상의 결과들을 종합하여 침향공진단을 *L. plantarum* KCTC 3104로 발효함으로써 침향, 당귀, 녹용, 산수유로 구성된 침향공진단에 함유된 nodakenin이 nodakenetin으로

전환된다는 것을 확인하였다. 대한민국약전에 수재된 당귀의 기원 식물은 *Angelica gigas* Nakai (산형과 Umbelliferae)의 뿌리이며, 건조 원물에 대한 정량법은 nodakenin 및 total decursin (decursin and decursinol angelate)의 총합이 6% 이상이 되도록 규정하고 있고, 대한민국약전의 기준에 부합하는 당귀 약재의 성분 분석에 대한 선행 문헌[29]에 따르면 당귀의 nodakenin 함량은 약 0.2% 정도이다. 이러한 사실로부터, 침향공진단의 nodakenin은 당귀에서 유래한 것으로 추정할 수 있다. 본 연구 이전에도 당귀가 포함된 한방 처방을 *Lactobacillus*속의 미생물로 발효함으로써 nodakenin이 nodakenetin으로 전환된다는 것이 보고된 바 있다[19–21]. 그러나, 본 연구는 처음으로 침향공진단을 발효하고 발효 전에는 없었던 NA 활성 억제 효능을 밝힘으로써 발효 한약으로의 침향공진단의 가능성을 확인하였고, 침향공진단의 성분 중 발효를 통해 변환된 성분을 추적하여 nodakenetin을 분리, 동정하였다는 것에 그 의의가 있다.

한편, 침향공진단 발효액(FGD)의 nodakenin 함량은 *L. plantarum* KCTC3104으로 발효함에 따라 감소하여 측정되지 않은 반면 nodakenin의 비배당체인 nodakenetin은 약 10배 이상 증가하였는데, 이는 *L. plantarum* 중에서 공통적으로 발현되는 β -glucosidase의 작용[30]으로 인해 nodakenin의 glucose가 분리되어 nodakenetin으로 전환되었기 때문으로 추정된다. 또한, nodakenin과 nodakenetin의 분자량을 고려하더라도 nodakenin 감소율에 비해 nodakenetin 증가율이 높은 것은 발효 중에 효소의 작용으로 nodakenin 외의 다른 물질로부터 nodakenetin으로 전환되었을 가능성을 시사하지만 정확한 물질 규명과 기작에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 발효한 침향공진단뿐만 아니라 그로부터 분리한 nodakenetin의 NA 활성 억제 효능을 처음으로 규명하였다. Nodakenin의 경우, 동물실험을 통해 기억력 개선[31] 및 인지능 개선 효과[32], 호흡기 염증 억제 효과[33], 항박테리아 효과[28] 등이 보고되었으나, 비배당체인 nodakenetin의 효능에 관한 연구는 암세포에 대한 독성 효과[34] 외에 보고된 바가 없었으며 본 연구에서 밝힌 NA 활성 억제 효능이 유일하다. 배당체인 nodakenin은 NA 활성 억제 효능이 거의 없는 반면 비배당체인 nodakenetin은 NA 활성 억제 효능이 매우 우수한데, 이는 nodakenin의 glucose가 NA와의 결합을 구조적으로 방해함으로써 NA 억제 활성을 감소시키기 때문일 것으로 사료된다[26].

마지막으로, 본 연구는 효소 수준에서 nodakenetin의 인플루엔자 바이러스 증식 억제 효과를 확인한 것으로 추가적으로 세포 및 동물 실험을 통해 nodakenetin의 항바이러스 효능을 확인해야만 한다. 또한, 당귀 및 공진단 처방은 오래 전부터 섭취해왔지만 발효한 당귀 및 가감공진단 처방은 섭

취 사례가 아직 부족하다. 따라서, 침향공진단을 발효 한약으로 상용화하기 위해서는 nodakenetin과 그 외의 발효를 통해 증가하거나 생성된 성분들에 대한 인체에서의 안전성에 관한 연구가 선행되어야 할 것이다. 이러한 추가 연구들을 통해 NA 활성 억제 성분인 nodakenetin을 함유한 침향공진단 발효액은 환절기 감기 예방에 도움을 줄 수 있는 식품 소재로 활용될 수 있을 것이다.

요 약

대표적인 한방 보약 처방인 원방공진단을 재해석한 침향공진단 (당귀, 녹용, 산수유, 및 침향의 혼합추출물)을 유산균으로 발효하고, 침향공진단 성분 중 발효를 통해 증가하는 성분을 분리, 정제하고 nodakenetin임을 동정하였다. 발효 전 침향공진단(침향공진단 농축액 1% 함유 MRS 배지, unfermented Gongjin-dan, GD) 및 발효후 침향공진단(침향공진단 발효액, fermented Gongjin-dan, FGD)에서의 nodakenetin 함량 분석 결과, 각각 6 µg/ml과 70 µg/ml으로 발효를 통해 nodakenetin이 약 10배 이상 증가하였다. 한편, 고서에 전해지는 공진단의 면역력 강화 효능에 근거하여, GD 및 FGD의 인플루엔자 바이러스 증식 억제 효능을 확인하고자 Neuraminidase (NA) 활성 평가법(NA activity assay)을 실시하였다. 실험 결과, GD는 NA 활성을 억제하지 못하였으나, FGD는 농도의존적으로 NA 활성을 억제하였으며 500 µg/ml에서 대조군 대비 약 92%의 억제율을 보였다. 또한, 발효를 통해 증가한 침향공진단의 성분인 nodakenetin과 그 배당체인 nodakenin에 대한 NA 활성 평가 결과, nodakenin은 NA 활성을 거의 억제하지 못하였으나, nodakenetin은 농도의존적으로 NA 활성을 억제하였으며 250 µg/ml에서 대조군 대비 약 68%의 억제율을 보였다. 이상의 결과들을 종합하여, 유산균 발효를 통해 침향공진단 내에 미량 존재하던 nodakenetin이 nodakenin의 가수분해로 인해 증가하였으며, NA 활성 억제 성분인 nodakenetin이 증가함으로 인해 FGD도 높은 NA 활성 억제 효능을 보였다고 판단할 수 있었다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Wi YL. 1990. *Seuideughyobang*, pp. 271. Uiseongdang, Seoul.
2. Heo J. 1993. *Hangul Donguibogam*. pp. 817. Minjoong-Seogak, Seoul.
3. Kim HJ, Hwang SY, Mok JY, Hwang BS, Jeong SI, Jang SI. 2009. Gagam-Gongjiindan extract attenuates immune responses to ovalbumin in Balb/c mice. *Kor. J. Herbology* **24**: 127-135.
4. Hwang DY. 2014. *Daeyeog Jeungmaeg-Bangyaghabpyeon*. pp. 163-164. Namsandang, Seoul.
5. Lee KH, Choi DK. 2016. Study on classification system and use of song dynasty Agarwood Line. *Chin. Hist. Res.* **100**: 171-203.
6. You YH, Koh JH, Chung SO, Jun WJ, Kim KM. 2009. Effects of fermented Ssanghwatang on swimming capacity in mice. *Food. Sci. Biotechnol.* **18**: 275-277.
7. Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park YH, Shin HS, Das G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* **26**: 927-939.
8. Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E. 2019. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat. Med.* **25**: 716-729.
9. Knackstedt R, Knackstedt T, Gatherwright J. 2019. The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies. *Exp. Dermatol.* **29**: 15-21.
10. Siezen RJ, Tzeneva VA, Castioni A, Wels M, Phan H, Rademaker J, et al. 2010. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environ. Microbiol.* **12**: 758-773.
11. Herbel SR, Vahjen W, Wieler LH, Guenther S. 2013. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathog.* **5**: 27.
12. Sun Z, Harris H, McCann A, Guo C, Argimon S, Zhang W, et al. 2015. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* **6**: 8322.
13. Arasu MV, Kim DH, Kim PI, Jung MW, Ilavenil S, Jane M, et al. 2014. In vitro antifungal, probiotic and antioxidant properties of novel *Lactobacillus plantarum* K46 isolated from fermented sesame leaf. *Ann. Microbiol.* **64**: 1333-1346.
14. Murofushi Y, Villena J, Morie K, Kanmani P, Tohno M, Shimazu T, et al. 2015. The toll-like receptor family protein P105/MD1 complex is involved in the immunoregulatory effect of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* N14O. *Mol. Immunol.* **64**: 63-75.
15. Wang K, Li W, Rui X, Chen X, Jiang M, Dong M. 2014. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int. J. Biol. Macromol.* **63**: 133-139.
16. Woo JY, Gu W, Kim KA, Jang SE, Han MJ, Kim DH. 2014. *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 ameliorates memory impairment and inflammation in a D-galactose-induced accelerated aging mouse model. *Anaerobe* **27**: 22-26.
17. Jung YJ, Han DO, Choi BH, Park C, Lee HJ, Kim SH, et al. 2007. Effect of fermented herbal extracts, HP-1 on enzyme activities and gene expressions related to alcohol metabolism in ethanol-loaded rats. *Korean J. Oriental Physiol. Pathol.* **21**: 387-391.
18. Zhang P, Yang XW. 2009. Biotransformation of nodakenin and simultaneous quantification of nodakenin and its aglycone in incubated system of human intestinal bacteria by HPLC

- method. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **11**: 371-379.
19. Kwang JL, Song NY, Roh JH, Liang C, Ma JY. 2013. Analysis of bio-converted components in fermented Jaeumganghwa-tang by *Lactobacillus*. *J. Appl. Biol. Chem.* **56**: 131-135.
20. Yang MC, Jeong SW, Ma JY. 2011. Analysis of constituents in Sip-jundaebo-tangs fermented by lactic acid bacteria. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 350-356.
21. Kim DS, Roh JH, Cho CW, Ma JY. 2012. Analysis of nodakenetin from Samultangs fermented by lactose bacteria strains. *Kor. J. Herbology* **27**: 35-39.
22. Lee KW, Cho HK, Yoo HR, Seol IC, Kim YS. 2018. The effects of an extract of fermented *Artemisiae lwayomogii* Herba, *Curcuma longae*, *Crataegi fructus* and *Salviae miltiorrhizae radix* on anti-inflammation associated with dyslipidemia and anti-oxidation in RAW264.7 and HUVEC Cells. *J. Int. Korean Med.* **39**: 480-494.
23. Kang DH, Kim HS. 2011. Functionality analysis of korean medicine fermented by *Lactobacillus* strains. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 259-265.
24. Lee JH, Jo DC, Kim CG, Moon SJ, Park TY, Ko YS. *et al.* 2013. A literature review of effectiveness on the Gongjin-dan (Gongchen-dan). *J. Korean Med. Rehabi.* **23**: 69-78.
25. Moscona A. 2005. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *N. Engl. J. Med.* **353**: 1363-1373.
26. Liu AL, Wang HD, Lee MY, Wang YT, Du GH. 2008. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg. Med. Chem.* **16**: 1741-1747.
27. Kim EH, Lee JH, Song MS, Baek YH, Choi YK, Ma JY. 2012. Administration of novel oriental medicine, KIOM-C, protect against influenza virus. *J. Biomed. Res.* **13**: 149-156.
28. Lee SH, Shin DS, Kim JS, Oh KB, Kang SS. 2003. Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 449-452.
29. Seong GU, Beak ME, Lee YJ, Won JH. 2018. Quality evaluation of *Angelica gigas* Nakai with different drying methods and different root parts. *Kor. J. Herbology* **33**: 85-91.
30. Landete JM, Curiel JA, Rodriguez H, Rivas B, Munoz R. 2014. Aryl glycosidases from *Lactobacillus plantarum* increase antioxidant activity of phenolic compounds. *J. Funct. Foods.* **7**: 322-329.
31. Kim DH, Kim DY, Kim YC, Jung JW, Lee S, Yoon BH, *et al.* 2007. Nodakenin, a coumarin compound, ameliorates scopolamine-induced memory disruption in mice. *Life Sci.* **80**: 1944-1950.
32. Gao Q, Jeon SJ, Jung HA, Lee HE, Park SJ, Lee YH, *et al.* 2015. Nodakenin enhances cognitive function and adult hippocampal neurogenesis in mice. *Neurochem. Res.* **40**: 1438-1447.
33. Xiong Y, Wang JS, Yu H, Zhang X, Miao C, Ma S. 2014. The effects of nodakenin on airway inflammation, hyper-responsiveness and remodeling in a murine model of allergic asthma. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **36**: 341-348.
34. Hideji T, Yun YS, Hiroshi M, Koich T, Lee SR. 1994. Cytotoxic coumarins from the roots of *Angelica gigas* Nakai. *J. Oriental Bot. Res.* **7**: 13-15.