

발간등록번호

11-1543000-000378-01

발효 인삼 종자의 기능성 및 고부가가치 식품 연구

Study on Functional and High Value Added Food Fermented Ginseng Seed

연구기관
한국식품연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “발효 인삼 종자의 기능성 및 고부가가치 식품 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 12 월 24 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
주관연구책임자 : 김 경 탁
연 구 원 : 이 영 철
연 구 원 : 김 성 수
연 구 원 : 홍 희 도
연 구 원 : 노 정 해
연 구 원 : 최 상 윤
연 구 원 : 조 장 원
연 구 원 : 이 영 경
연 구 원 : 이 명 희
협동연구기관명 : 중앙대학교
협동연구책임자 : 이 상 현
연 구 원 : 이 동 구
연 구 원 : 이 기 호
협동연구기관명 : 구안산업(주)
협동연구책임자 : 김 상 욱
연 구 원 : 천 영 일
연 구 원 : 조 말 희
연 구 원 : 송 계 로
연 구 원 : 성 원 진
연 구 원 : 전 혜 정

요 약 문

I. 제 목

발효 인삼 종자의 기능성 및 고부가가치 식품연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

인삼 뿌리에 국한되어 있는 인삼 시장에서 인삼뿌리와 차별적 성분과 조성을 갖는 인삼종자 (ginseng seed)를 활용한 인삼종자 오일 및 추출물을 유효성분으로 함유한 제품개발 및 피부 미용 효과를 검증하여 새로운 기능성 소재로써 도출하고자 함

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 인삼종자의 연근별 특성평가
 - 인삼종자의 연근별 특성
 - 인삼종자의 연근별 사포닌, 식물성스테롤, 일반성분 및 영양성분 분석
 - 인삼종자의 연근별 항산화 효능평가
- 인삼종자 오일의 최적 추출방법 및 특성평가
 - 인삼종자 오일 최적 추출방법 선정
 - 인삼종자 오일의 지방산 조성 및 식물성스테롤 분석
 - 인삼종자 오일의 저장성 평가
- 인삼종자 추출방법에 따른 생리활성 변화
 - 인삼종자 오일의 항산화 효능평가
 - Melanocytes에서의 세포독성 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향 검증
- 인삼종자의 식물성스테롤 분리, 정제 및 구조동정
 - 크로마토그래피에 의한 식물성스테롤 성분의 분리 및 구조동정
 - 식물성스테롤의 분석
- 인삼종자의 최적 발효조건 선정 및 발효인삼종자의 특성
 - 인삼종자의 최적 발효조건 선정 및 발효물 특성평가
 - 발효인삼종자의 총당, 산성다당체 및 총페놀 함량 측정
 - 발효인삼종자의 항산화활성 평가
- 발효인삼종자 오일의 최적 추출조건 확립 및 발효인삼종자 오일의 특성평가
 - 발효인삼종자 오일의 추출 및 특성
 - 발효인삼종자 오일의 지방산조성, 식물성스테롤 및 페놀성분 분석
- 발효인삼종자 오일의 안전성 및 미백효과 검증
 - 발효인삼종자 오일의 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향

- 발효인삼종자 오일 추출물 함유 수용액의 인체 피부에 대한 효과
- 발효인삼종자 오일을 이용한 드레싱 제품 개발
 - 기존 샐러드 드레싱 시제품 조사
 - 드레싱 제품 최종 배합비 및 포장 형태
 - 관능평가를 통한 소비자 기호도 조사
- 인삼종자의 식물성스테롤 성분 분리분석을 통한 신소재 개발 기술
 - 인삼종자의 식물성스테롤 성분의 함량분석 비교연구

IV. 연구개발 결과

- 인삼종자 3, 4, 5년근 각각의 특성을 살펴본 결과 외관상 크기는 년 수가 늘어날수록 종자의 크기가 더 크게 나타났고, 외관 색도는 년 수가 오래될수록 색이 약간 진하게 나타났지만 3, 4, 5년근 모두 큰 차이는 없었다. 그리고 인삼종자를 분쇄 후 측정된 색깔은 분쇄하지 않은 인삼종자의 색도보다 L값이 전반적으로 높게 나타났고, 적색도 a값은 분쇄 전과 유사하게 나타났다. 황색도 b값의 경우 분쇄전보다 높게 나타났는데, 이는 갈색을 띄는 인삼종자의 배유부분이 껍질부분과 함께 분쇄되면서 생긴 결과로 사료되었다.
- 연근별 인삼종자의 사포닌 조성을 분석한 결과 년 수가 증가할수록 총 ginsenoside 함량이 증가하는 경향을 보였다. 그리고 인삼종자의 식물성 스테롤 중 β -sitosterol, campesterol을 분석한 결과 년 수의 증가에 따라 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 연근별 인삼종자의 일반성분(수분, 조회분, 조단백질, 조지방) 및 영양성분(유리당, 구성아미노산, 유리지방산) 분석 결과 큰 차이 없이 유사한 경향을 보였다.
- 인삼종자 3, 4, 5년근 추출물을 이용하여 측정된 총페놀 함량은 4년근 종자의 함량이 1.350 mg/g으로 가장 높게 나타났고, 항산화효과인 DPPH, ABTS radical 소거효과의 경우 농도 의존적인 결과를 보였다. 그리고 년 수가 증가함에 따라 radical 소거효과가 소폭 감소하는 경향을 보였으며, SOD 효소활성의 경우에는 4년근 종자의 SOD 효소활성이 100 ppm 농도에서 다른 종자와 비교하여 높게 나타났다.
- 인삼종자의 볏음처리 후 압착추출, 용매추출 및 초임계 추출 방법으로 오일을 추출한 결과 추출수율은 전반적으로 500 bar의 높은 압력 조건에서의 초임계 추출 방법이 압착추출 방법과 용매추출 방법에 비해 추출 수율이 높았다. 즉, 500 bar, 65°C의 조건으로 초임계 추출한 인삼종자의 오일 추출 수율이 17.48%로 가장 높게 나타났다. 각 추출방법으로 추출한 인삼종자 오일의 색도는 L값(lightness)과 a값(redness)에서 인삼종자의 볏음 조건에 따른 차이를 거의 보이지 않았다. 그러나 b값(yellowness)의 경우 인삼종자의 볏음 시간이 증가

할수록 압착방법과 용매방법으로 추출한 오일에서 모두 증가한 것으로 나타났다.

- 인삼종자의 볶음처리 및 압착, 용매 및 초임계 추출방법에 의한 오일의 페놀성 성분 조성을 분석한 결과 페놀성분은 gentisic acid, vanillic acid, ferulic acid, cinnamic acid 으로 나타났다. 또한 각 추출방법에 따른 인삼종자 오일의 지방산 조성을 분석한 결과 지방산 조성의 차이는 크게 나타나지 않았고, 인삼종자 오일은 불포화지방산을 95% 이상 함유하는 것으로 나타났다. 인삼종자 오일의 식물성 스테롤은 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol 과 sitostanol이 검출되었고, 초임계 추출한 오일에서 높은 함량을 보였다.
- 인삼종자 오일의 60℃에서 28일간 저장 중 산가를 측정된 결과 압착추출, 용매추출 오일에서는 큰 변화가 없었으나, 초임계 추출 오일 중 500 bar 추출 오일의 산가가 저장 7일째 증가한 이후에는 비슷하게 유지되었다. 그리고 동일 조건에서의 과산화물가를 측정된 결과 압착추출한 오일이 저장 중 과산화물가가 가장 적게 나타나 저장 안정성이 높은 것으로 나타났다.
- 인삼종자 오일 추출물은 뚜렷한 라디칼 제거효과를 나타내지 않았고, tyrosinase 억제효과 또한 크지 않았지만, 인삼종자 초임계 추출물은 멜라닌 생성세포에서 세포독성 없이 멜라닌 생성량을 크게 감소시켰다.
- 인삼종자의 phytosterol 성분을 GC/MS로 분석한 결과 squalene, stigmasterol, β -sitosterol, lupeol 이 확인되었고, HPLC로 분석한 결과 stigmasterol, β -sitosterol 이 나타났다.
- 인삼종자를 발효시키기 위한 균주는 Gram 양성 세균인 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162, *Pediococcus pentosaceus* LY 011, *Bacillus subtilis* KFRI 1124 및 *Bacillus subtilis* KFRI 1127이 사용되었다.
- 발효 인삼종자 분말 추출물의 총당, 산성다당체 및 페놀 함량이 발효하지 않은 인삼종자보다 모두 높게 나타났다. 특히 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주로 발효한 인삼종자에서 모두 높은 값을 보였다. 발효인삼종자의 페놀성분을 분석한 결과 *p*-coumaric acid만이 검출되었고, 발효 유무에 따라 그 함량차이가 크게 나타났다. ABTS radical 소거효과와 SOD 효소활성을 살펴본 결과 발효인삼종자의 ABTS 소거효과와 SOD 효소활성이 발효하지 않은 대조구보다 증가하는 결과를 보였다.
- 발효인삼종자 오일의 추출방법에 따른 색도를 측정된 결과 밝기 L값은 발효처리에 따라서

약간의 차이는 있었지만 그 차이가 크지 않았고, 각 추출방법에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았다. 적색도 a값의 경우 발효처리 한 인삼종자 오일의 적색도가 발효하지 않은 대조구보다 모두 낮은 값을 보였으며, 황색도 b값의 경우 압착추출 한 오일은 발효처리하지 않은 오일의 황색도 값보다 유사하거나 감소하는 경향을 나타냈다. 용매추출 및 초임계추출 한 오일은 대조구 오일과 비교하여 뚜렷하게 증가하는 경향을 보였다.

- 발효인삼종자 오일의 추출방법에 의한 지방산 조성 및 함량측정 결과 인삼종자의 발효 및 추출방법에 의한 지방산 조성의 차이는 크지 않았다. 그리고 발효인삼종자 오일의 지방산 조성은 불포화지방산인 oleic acid와 linoleic acid가 전체 지방산 함량의 90% 이상 차지한 것을 알 수 있었고, 특히 oleic acid의 비중이 높게 나타났다.
- 추출방법에 따른 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석 결과 발효균주 및 추출방법에 따라서 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, sitostanol 함량에 큰 차이를 나타내었다. 그리고 총 phytosterol 함량이 가장 높은 추출방법은 초임계 추출방법이었고, 그 다음으로 용매추출, 압착추출 순으로 나타났다.
- 추출방법을 달리하여 추출한 발효인삼종자 오일 중 페놀성분을 분석한 결과 압착추출 한 오일의 경우 maltol, *p*-coumaric acid, trans-cinnamic acid 가 검출되었고, 용매추출 한 오일은 *p*-coumaric acid 와 trans-cinnamic acid, 초임계추출 한 오일은 maltol, vanillic acid+caffeic acid, *p*-coumaric acid, trans-cinnamic acid 가 각각 검출되어 추출방법 및 발효균주에 의하여 페놀성분 함량에 차이를 나타냈다.
- *Bacillus subtilis* KFRI 1124 균주로 발효하여 초임계 추출한 발효인삼종자 오일은 우수한 세포내에서의 멜라닌 생성억제효과를 나타내었을 뿐만 아니라 인체 피부에서 피부색 감소 및 유분량 증가효과를 나타내었다.
- 인삼종자 오일과 인삼엑기스를 첨가하여 시저드레싱, 발사믹 드레싱 제품을 제조하였다. 각 제품에 대한 소비자 선호도를 조사한 결과 발사믹 드레싱 제품의 선호도가 높게 나타났다.
- HPLC 분석결과 인삼 종자의 재배 년도에 따른 lupeol, stigmasterol, β -sitosterol 그리고 squalene의 함량은 GS-3에서 가장 많이 나타났다. 종자의 품종에 따른 lupeol, stigmasterol, β -sitosterol의 함량은 천풍에서 가장 많은 함량이 나타났으며, squalene의 함량은 금풍에서 가장 많이 나타났음을 알 수 있다. 그리고 종자의 국가별 결과에 따르면 lupeol, squalene, β -sitosterol의 함량은 중국종자에서 가장 나타났으며, stigmasterol의 함

량은 미국종자에서 가장 많이 나타났음을 알 수 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통하여 SCI 논문 비SCI 논문, 특허, 기술이전, 학술발표의 성과를 나타내었다. 특허출원으로는 “인삼종자 추출물을 포함하는 항산화 및 항노화용 화장품 조성물(10-2012-0130500)”, “인삼종자 추출물을 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물(10-2012-0130501)”, “인삼씨 배유 추출박을 포함하는 항산화 활성이 향상된 기능성 식품 및 이의 제조방법(10-2013-0024609)”, “인삼씨 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화력이 증진된 조성물(10-2013-0037030)”, “인삼씨 배유 추출박 분말의 추출물을 포함하는 항산화력이 증가된 조성물(10-2013-0037026)”, “인삼 종자유 및 이의 제조방법(10-2013-0037041)” 등 6개의 특허를 2012년도와 2013년도에 걸쳐 특허 출원하였고, “발효 인삼종자 추출물을 함유하는 항산화 및 항노화용 조성물”, “발효 인삼종자 오일을 함유하는 항산화 및 항노화용 조성물”, “발효 인삼종자 오일의 제조방법”, “발효 인삼종자 함유 드레싱 및 이의 제조방법”, “발효 인삼종자 오일을 함유하는 미백용 조성물”의 5개의 특허를 2014년 1월 초에 출원하여 총 11편의 특허를 출원하였다. 그리고 *J. Ginseng Res.*(SCIE), *Korean J. Food Cookery Sci.*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, *Bulletin of Food Technology* 등의 학술지에 SCIE 2편, 국내외 논문 3편을 게재하였고, 2014년 2월에 *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*에 1편의 국내 논문이 게재될 예정이며 2014년 상반기에 발효인삼종자와 오일 품질특성, 식물성스테롤 관련 SCIE 논문 3편을 *J. of Ginseng Res.*에 게재할 예정이다. 그리고 “인삼종자 오일 추출 및 인삼엑기스 혼합 인삼종자 오일 제조 기술”로 1건의 유상 기술이전을 실시하였다. 현재 개발된 기술을 활용하여 인삼종자를 이용한 국내 최초 인삼종자 오일 제품개발을 통하여 국내에 시판 계획으로 있다. 또한 올리브 오일의 주요 섭취국인 유럽 등에 수출 상품화를 계획하고 있다.

SUMMARY

I. Title

Study on fermented ginseng seed as functional and high value-added food

II. R&D Purpose and Rationale

To draw a new functional material by developing products containing ginseng seed oil and its extract as active ingredients using ginseng seed which has different ingredients and composition compared to ginseng root and by verifying its cosmetic effect in the ginseng market, which is currently limited to ginseng roots

III. Details and Scope of R&D

- Evaluation of year-root characteristics of ginseng seed
 - Year-root characteristics of ginseng seed
 - Analysis of saponin, phytosterol, general composition, and nutrients by year-root in ginseng seed
 - Evaluation of year-root antioxidant activity of ginseng seed
- Optimal extraction method and characteristics evaluation of ginseng seed oil
 - Selection of optimal extraction method for ginseng seed oil
 - Analysis of fatty acid composition and phytosterol in ginseng seed oil
 - Evaluation of shelf life of ginseng seed oil
- Changes in physiological activities according to different ginseng seed extraction methods
 - Evaluation of antioxidant activity of ginseng seed oil
 - Effects on cell viability and melanin production in melanocytes
- Isolation, purification, and structure identification of phytosterol in ginseng seed
 - Isolation and structure identification of phytosterol by chromatography
 - Analysis of phytosterol
- Optimal fermentation condition for ginseng seed and characteristics of fermented ginseng seed
 - Selection of optimal fermentation condition for ginseng seed and characteristics evaluation of the fermented products
 - Measurement of total sugars, acidic polysaccharides, and total phenol content in fermented ginseng seed

- Evaluation of antioxidant activity of fermented ginseng seed
- Optimal extraction condition for fermented ginseng seed oil and characteristics evaluation of fermented ginseng seed oil
 - Extraction of fermented ginseng seed oil and its characteristics
 - Analysis of fatty acid composition, phytosterol, and phenols in fermented ginseng seed oil
- Verification of safety and whitening effect of fermented ginseng seed oil
 - Effects of fermented ginseng seed oil on cell viability and melanin production in melanocytes
 - Effects of solutions containing fermented ginseng seed oil extract on human skin
- Development of dressing products using fermented ginseng seed oil
 - Survey of salad dressings in the market
 - Mixing ratio and package type of dressing products
 - Consumer preference survey through sensory evaluation
- Technology for developing new materials through the isolation and analysis of phytosterol in ginseng seed
 - Comparative analysis of phytosterol in ginseng seed

IV. Results of R&D

- The characteristics of 3-year-root, 4-year-root, and 5-year-root ginseng seeds showed that size was bigger by year, and that color was darker by year; no difference was observed among 3, 4, and 5-year-root ginseng seeds, however. The color of ginseng seed after pulverization generally showed higher L value than that before pulverization, but redness (a value) was similar to that before pulverization. Yellowness (b value) was higher than that before pulverization, which was considered to be attributable to the fact that the brownish endosperm of ginseng seed was pulverized along with the seed coat.
- The analysis of saponin composition of ginseng seed by year-root showed that total ginsenoside content increased by year. Likewise, the analysis of β -sitosterol and campesterol among the phytosterol of ginseng seed showed a tendency to decrease by the increase in years. In addition, the analysis of general composition (moisture, crude ash, crude protein, and crude fat) and nutrients (free sugars, amino acids, free fatty acids) of ginseng seed by year-root showed similar tendencies without significant

differences.

- In measuring the total phenol content in the extracts of 3, 4, and 5-year-root ginseng seeds, the highest value was found in the 4-year-root ginseng seed with 1.350 mg/g; the DPPH and ABTS radical scavenging effect as antioxidant effect showed a concentration-dependent result. The radical scavenging effect tended to decrease slightly as the years increased, and SOD activity was higher in the 4-year-root ginseng seed at 100 ppm compared to other seeds.
- The extraction yield of ginseng seed oil following compress extraction, solvent extraction, or supercritical fluid extraction after roasting pre-treatment showed that the yield was higher in the supercritical fluid extraction at high pressure condition of 500 bar compared to compress extraction and solvent extraction. In other words, the yield of ginseng seed oil extracted by supercritical fluid extraction at 500 bar and 65°C was 17.48%, which was the highest. The color of ginseng seed oil extracted by each extraction method seldom shows differences in L value (lightness) and a value (redness) depending on the roasting condition of ginseng seed. However, the b value (yellowness) increased in oils extracted by compress method and solvent method as the roasting time increased.
- The analysis of phenolic compounds in ginseng seed oil as obtained after roasting pre-treatment as well as compress, solvent, or supercritical fluid extraction revealed gentisic acid, vanillic acid, ferulic acid, and cinnamic acid. Moreover, the analysis of fatty acid composition of ginseng seed oil following each extraction method showed not much differences in fatty acid composition; ginseng seed oil seemed to contain over 95% unsaturated fatty acids. Phytosterol detected in ginseng seed oil were campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, and sitostanol, occurring in higher amount in oils obtained by supercritical fluid extraction.
- The acid value of ginseng seed oil during 28-day storage at 60°C did not change significantly in oils by compress extraction and solvent extraction, but that of ginseng seed oil by supercritical fluid extraction at 500 bar increased on the 7th day and maintained a similar level since then. The peroxide value measured under the same condition showed that the value of oil by compress extraction was lowest during storage, suggesting the highest storage stability.

- The ginseng seed oil extract did not show distinct radical scavenging effect and greater tyrosinase inhibitory effect, but the ginseng seed extract by supercritical fluid extraction greatly decreased melanin production without cytotoxicity in melanocytes.
- The analysis of phytosterol in ginseng seed by GC/MS detected squalene, stigmasterol, β -sitosterol, and lupeol, whereas the analysis by HPLC revealed stigmasterol and β -sitosterol.
- The strains used for the fermentation of ginseng seed were Gram positive *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162, *Pediococcus pentosaceus* LY 011, *Bacillus subtilis* KFRI 1124, and *Bacillus subtilis* KFRI 1127.
- The total sugars, acidic polysaccharides, and phenolic compounds of the extract of fermented ginseng seed powder were all higher than those of unfermented ginseng seed. In particular, ginseng seed fermented by the *Bacillus subtilis* KFRI 1127 strain all showed higher values. The analysis of phenolic compounds in fermented ginseng seed detected only *p*-coumaric acid, and its content differed significantly by fermentation. Specifically, the ABTS radical scavenging effect and SOD enzyme activity increased in fermented ginseng seed compared to the unfermented control group.
- The analysis of colors depending on the extraction method of fermented ginseng seed oil showed that lightness (L value) differed slightly depending on the fermentation treatment, but was similar without significant differences by extraction method. Redness (a value) was lower in the fermented ginseng seed oil compared to the unfermented control group, with the yellowness (b value) of ginseng seed oil by compress extraction showing similarity to or tending to be lower than that of unfermented oil; ginseng seed oil by solvent extraction and supercritical fluid extraction tended to increase clearly compared to the control group.
- The analysis of fatty acid composition and content by extraction method of fermented ginseng seed oil showed that fatty acid composition did not differ greatly depending on the fermentation and extraction methods of ginseng seed. The fatty acid composition of fermented ginseng seed oil showed over 90% unsaturated acids such as oleic acid and linoleic acid, particularly a higher ratio of oleic acid.

- The analysis of phytosterol in fermented ginseng seed oil by extraction method showed great differences in campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, and sitostanol contents depending on the fermentation strain and extraction method. Supercritical fluid extraction yielded the highest total phytosterol content, followed by solvent extraction and compress extraction.
- The phenolic compounds in fermented ginseng seed according to different extraction methods showed that ginseng seed oil by compress extraction had maltol, *p*-coumaric acid, and trans-cinnamic acid ginseng seed oil by solvent extraction contained *p*-coumaric acid and trans-cinnamic acid, whereas ginseng seed oil by supercritical fluid extraction had maltol, vanillic acid+caffeic acid, *p*-coumaric acid, and trans-cinnamic acid. In other words, phenolic compounds varied according to the extraction method and fermentation strain.
- Fermented ginseng seed fermented by *Bacillus subtilis* KFRI 1124 and extracted by supercritical fluid extraction showed not only excellent inhibitory effect on melanin production in the cell but decreased skin color and increased oil content as well in human skin.
- Caesar salad dressing and balsamic dressing products were manufactured by adding ginseng seed oil and ginseng extract. The consumer preference survey for each product revealed higher preference for balsamic dressing product.
- The amount of lupeol, stigmasterol, β -sitosterol, and squalene was highest in ginseng (GS-3) according to the cultivation years, particularly in Chunpung cultivar. Finally, by cultivating nation, the amount of lupeol, β -sitosterol, and squalene was highest in ginseng from China, with stigmasterol content highest in ginseng from America.

V. Research Outcome and Utilization Plan

This study was featured in SCI papers, non-SCI papers, patents, technology transfers, and scientific presentations. For patent applications, six patents were applied for in 2012 and 2013: “A composition for anti-oxidative & anti-aging cosmetic ingredient containing ginseng seed extract (10-2012-0130500)”, “Cosmetic composition for skin whitening comprising ginseng seeds extract (10-2012-0130501)”, “Functional foods improved

antioxidant activity that comprising defatted ginseng seed meal and manufacturing method of thereof (10-2013-0024609)", "Composition improved antioxidant activity containing extract of ginseng seeds (10-2013-0037030)", "Composition improved antioxidant activity comprising extract of defatted ginseng seed meal (10-2013-0037026)", "Ginseng seed oils and manufacturing method of Thereof (10-2013-0037041)". Five patents will be applied for in 2014: "An anti-oxidative & anti-aging composition containing fermented ginseng seed extract", "An anti-oxidative & anti-aging composition containing fermented ginseng seed oil", "A manufacturing method for fermented ginseng seed oil", "A dressing containing fermented ginseng seed and its manufacturing method", "A whitening composition containing fermented ginseng seed oil". In addition, five papers were published in scientific journals such as *J. Ginseng Res.* (SCIE), *Korean J. Food Cookery Sci.*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, and *Bulletin of Food Technology*, with one paper to be published in February 2014 in *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* In addition, one case of technology transfer was made: "Manufacturing technology for ginseng seed oil extract and ginseng seed oil mixed with ginseng extract." For the first time in the country, ginseng seed oil products using ginseng seed are developed and planned to be marketed using currently developed technologies. Export commercialization is also planned for export to Europe, where olive oil is largely consumed.

CONTENTS

SUMMARY	9
CONTENTS	15
Chap. 1. Outline of research project	19
1. Objective	19
2. Significance	19
3. Scope	22
Chap. 2. Research development state	23
Chap. 3. Methods and Result of project	25
1. Evaluation of year-root characteristics of ginseng seed	25
1-1. Year-root characteristics of ginseng seed	25
1-2. Analysis of saponin, phytosterol, general composition, and nutrients by year-root in ginseng seed	27
1-3. Evaluation of year-root antioxidant activity of ginseng seed	34
2. Optimal extraction method and characteristics evaluation of ginseng seed oil	40
2-1. Optimal extraction method for ginseng seed oil	40
2-2. Analysis of fatty acid composition and phytosterol in ginseng seed oil	46
2-3. Evaluation of shelf life of ginseng seed oil	50
3. Changes in physiological activities according to different ginseng seed extraction methods	60
3-1. Evaluation of antioxidant activity of ginseng seed oil	60
3-2. Effects on cell viability and melanin production in melanocytes	61
4. Isolation, purification, and structure identification of phytosterol in ginseng seed	65
5. Selection of optimal fermentation condition for ginseng seed and characteristics of fermented ginseng seed	75
5-1. Optimal fermentation condition for ginseng seed and characteristics evaluation of the fermented products	75
6. Optimal extraction condition for fermented ginseng seed oil and characteristics evaluation of fermented ginseng seed oil	86
6-1. Extraction of fermented ginseng seed oil and its characteristics	86
6-2. Analysis of fatty acid composition, phytosterol, and phenols in fermented ginseng seed oil	91
7. Verification of safety and whitening effect of fermented ginseng seed oil	108
7-1. Effects of fermented ginseng seed oil on cell viability and melanin production in melanocytes	108

7-2. Effects of solutions containing fermented ginseng seed oil extract on human skin	110
8. Development of dressing products using fermented ginseng seed oil	115
9. Technology for developing new materials through the isolation and analysis of phytosterol in ginseng seed	123
9-1. Comparative analysis of phytosterol in ginseng seed	123
Chap. 4. Attainment and Contribution	128
Chap. 5. Achievement and proposal for Application	130
Chap. 6. Information from Abroad Related to This Project	131
Chap. 7. References	133

목 차

요 약 문	3
SUMMARY	9
CONTENTS	15
목 차	17
제 1 장 연구개발과제의 개요	19
제 1 절 연구개발의 목적	19
제 2 절 연구개발의 필요성	19
제 3 절 연구개발의 범위	22
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1 절 인삼종자의 연근별 특성평가	25
1. 인삼종자의 연근별 특성	25
2. 인삼종자의 연근별 사포닌, 식물성 스테롤, 일반성분 및 영양성분 분석	27
3. 인삼종자의 연근별 항산화 효능평가	34
제 2 절 인삼종자 오일의 최적 추출방법 및 특성평가	40
1. 인삼종자 오일 최적 추출방법 선정	40
2. 인삼종자 오일의 지방산 조성 및 식물성스테롤 분석	46
3. 인삼종자 오일의 저장성 평가	50
제 3 절 인삼종자 추출방법에 따른 생리활성 변화	60
1. 인삼종자 오일의 항산화 효능평가	60
2. Melanocytes에서의 세포독성 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향 검정	61
제 4 절 인삼종자의 식물성스테롤 분리, 정제 및 구조동정	65
제 5 절 인삼종자의 최적 발효조건 선정 및 발효인삼종자의 특성	75
1. 인삼종자의 최적 발효조건 선정 및 발효물 특성평가	75
제 6 절 발효인삼종자 오일의 최적 추출조건 확립 및 발효인삼종자 오일의 특성평가	86
1. 발효인삼종자 오일의 추출 및 특성	86
2. 발효인삼종자 오일의 지방산조성, 식물성스테롤 및 페놀성분 분석	91
제 7 절 발효인삼종자 오일의 안전성 및 미백효과 검정	108
1. 발효인삼종자 오일의 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향	108
2. 발효인삼종자 오일 추출물 함유 수용액의 인체피부에 대한 효과	110

제 8 절 발효인삼종자 오일을 이용한 드레싱 제품 개발	115
제 9 절 인삼종자의 식물성스테롤 성분 분리분석을 통한 신소재 개발 기술	123
1. 인삼종자의 식물성스테롤 성분의 함량분석 비교연구	123
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	128
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	130
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	131
제 7 장 참고문헌	133

제 1 장 연구개발과제의 개요

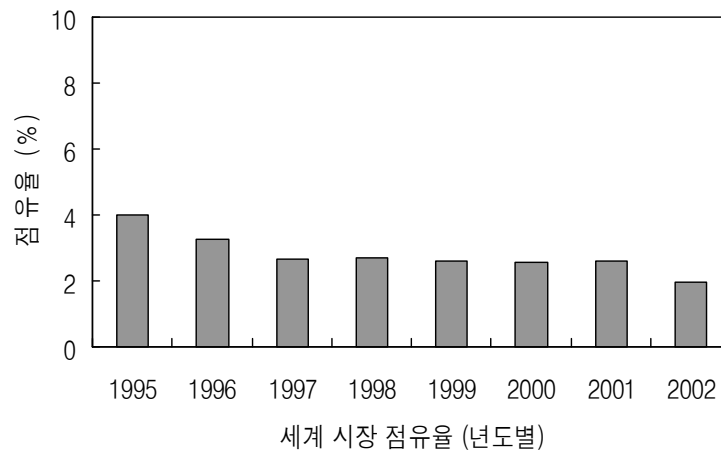
제 1 절 연구개발의 목적

인삼 뿌리에 국한되어 있는 인삼 시장에서 인삼뿌리와 차별적 성분과 조성을 갖는 인삼종자(ginseng seed)를 활용하여 인삼종자 오일 및 추출물을 유효성분으로 함유한 제품개발 및 피부미용 효과를 검증하여 새로운 기능성 소재로써 도출하고자 함.

제 2 절 연구개발의 필요성

인삼은 수천 년 동안 우리나라 최고의 상품으로서 화려한 명성을 유지하여 왔다. 아직도 해외조사에서도 우리나라를 대표하는 명품으로 인식하고 있어서 우리인삼의 문화적 가치를 전 산업 중 단순히 수출 총액의 비율 등으로 인삼을 비교하는 것은 근시안적 견해라고 본다.

그럼에도 불구하고 최근에는 고려인삼의 명성은 부끄럽게도 국제 시장 점유율은 형편없이 추락하고 있다. 약 15년 전부터 국제 시장에서 시장을 급격히 빼앗기기 시작하여 최근 5년간은 국제 시장에서 약 3% 이상의 시장 점유율을 넘지 못하는 위기 이상의 상황으로 전환되었다 <그림 1>. 이러한 원인은 중국 및 미국 캐나다 등에서는 전략적 농산물로 지정하여 국가와 지자체의 적극적 협조로 활발한 연구 및 마케팅에 의한 수출 노력의 결과이다.



<그림 1. 한국 인삼의 세계 시장 점유율. [자료: 농수산물 무역정보 (2003)]>

예로부터 인삼은 대표적인 생약제로 사용되어 왔으며, 사포닌, 폴리페놀, 폴리아세틸렌, 알칼로이드, 다당체 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 왔다. 그 중에서 가장 대표적인 약리성분인 사포닌은 항암, 면역증강, 혈압강하, 혈당강하, 항염증 및 항산화 효과 등 매우 다양한 효능을 가지는 것으로 밝혀졌다.

최근 우리 국민들은 식생활 구조의 변화로 인해 영양부족이나 영양불균형이 나타나 고지혈증, 심장병, 암, 당뇨병, 비만등과 같은 성인병이 지속적으로 증가하고 있다. 자연히 건강에 대

한 소비자들의 관심과 천연물에 대한 선호도가 증가함에 따라 식품의 고유한 기능 이외 건강 증진과 질병 치료 등의 기능을 가진 식품에 대한 관심이 늘어나고 있다. 동양에서는 수천년의 역사를 가진 인삼은 전통적으로 신비한 힘을 가진 약용식물로 알려져 있으며, 특히 신체적 정신적 건강을 유지하기 위하여 건강기능성 식품을 요구하는 시대에 접어들면서 특정 유용성분이 강화된 인삼을 개발하고자 하는 연구가 지속되고 있다. 현재 인삼열매에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 상태로 최근 인삼열매의 성분 함량 차이에 대한 연구가 이루어지고 있다. 인삼은 오랫동안 뿌리를 약재로 사용하여 왔고 지상부는 최근까지 이용되지 않고 있는 실정이었다. 하지만 최근에는 화장품, 비누에 부산물인 잎, 줄기와 꽃의 추출물을 첨가하거나 식물체를 사료에 혼합하여 사용하기도 한다. 인삼열매는 사포닌 함량이 인삼 뿌리와 달라 이러한 성분 차이에 의해 인삼 뿌리보다 우수한 효과를 나타내는 것으로 보고되었고, 최근에는 피부 노화를 지연시키는 효과를 나타내는 것으로 보고되었다. 또한 유산균 발효를 통하여 천연 추출물 함유 활성 성분 및 생리활성의 증가를 목적으로 다양한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

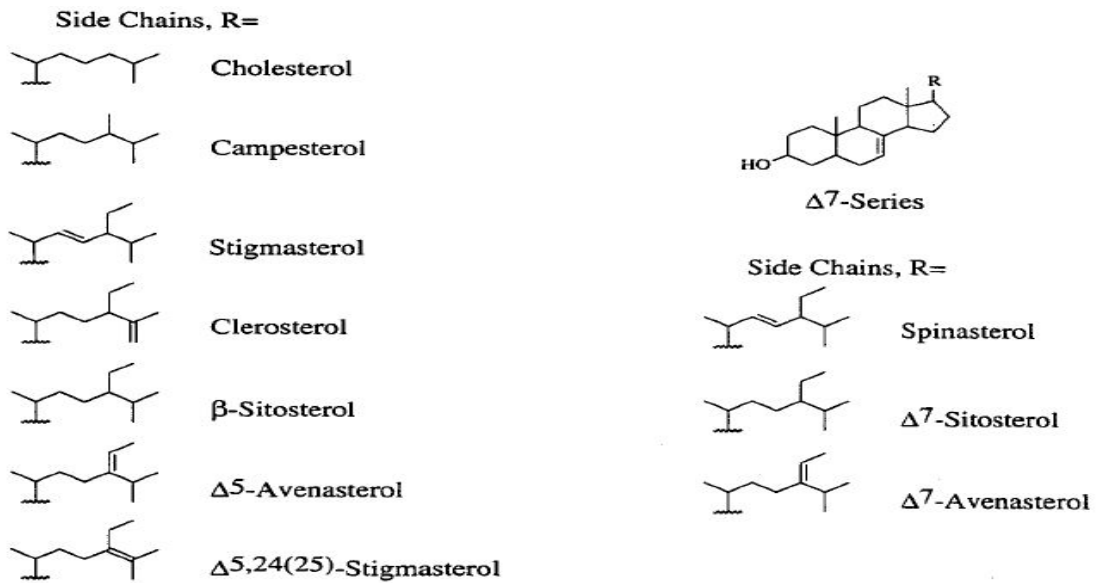


<그림 2. 인삼열매(좌)와 인삼씨(우).>

인삼지하부는 기능성 식품, 또는 의약품으로써 고품질 고려인삼 가공제품에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있는 반면 인삼 지상부에 관한 연구들은 전무한 실정이다. 최근 인삼종자에 함유된 오일에 대한 연구로 인삼종자 오일의 지방산 조성과 phytosterol 함량분석 연구결과를 살펴보면 인삼종자에는 15~30%의 유지성분과 콜레스테롤 흡수 저해효과를 나타내는 phytosterol이 0.8~1.0% 정도 함유되어 있다는 보고가 있다(*J. Agric. Food Chem.*, 50, 744~750, 2002). Phytosterol은 자연에서 얻을 수 있는 식물성 씨앗(콩, 유채, 해바라기씨, 올리브, 참깨 등), 열매 및 식물 자체의 정제 과정을 통하여 얻을 수 있는 식물성 스테롤이다. 식물성 스테롤은 식물성 기름이나 견과류, 과일 및 채소 등에서 발견되는 천연물질로 현재까지 자연계에서 알려지고 있는 것은 약 40여종 이고, 그중 sitosterol과 campsterol이 각각 40~60%, 10~30%로 가장 많이 존재하며 그 외 stigmasterol이 10~20%로 상당부분을 차지하는 것으로 알려지고 있다<그림3>.

식물성 스테롤은 인체 내에서 생합성되지 않으며, 담즙과 반응성이 강하여 콜레스테롤의 용해를 저해함으로써 소장으로부터 혈액으로 흡수되는 콜레스테롤의 흡수억제 효과가 있기 때문

에 콜레스테롤에 의한 질환을 방지한다. 식물성 스테롤은 화학물질에 의해 유도된 tumor cell의 증식을 억제하며, 폐암을 효과적으로 호전시킬 수 있으며 이들은 anti-colonic tumor 활성을 가지고 있기 때문에 식물성 스테롤을 다량으로 섭취하는 집단에서는 colon cancer의 위험이 상당량 감소된다고 보고되고 있다. 콜레스테롤의 흡수를 경쟁적으로 감소시키는 식물성 스테롤의 관심이 새롭게 조명 되고 있는 현실에 볼 때 식물성 스테롤에 대한 연구는 상대적으로 빈약할 뿐만 아니라 유전특성, 함량변이를 비롯한 각종 재배환경에 대한 다른 변이 등에 관련된 연구 정보는 매우 드물다. 따라서 인삼의 품질 고급화는 물론 기능성 향상을 위하여 인삼 연구에 있어서 새롭게 시도해 보아야 할 연구 분야라 할 수 있다.



<그림 3. 주요 phytosterol 분자구조.>

인삼 종자에서 기능성 물질 또는 식품개발이 가능한 유용한 식물성 스테롤 성분을 선별함으로써 향후 항산화 활성과 항균, 항바이러스, 항암, 항염증, 항알러지, 혈관확장능 등을 적용시켜 건강기능식품의 임상적 효능을 평가하고자 할 때, 근거자료로 활용 가능하다. 인삼종자의 재배 환경에 따른 식물성 스테롤의 함량 변이에 대한 검토가 이루어진다면 경쟁력 있는 인삼의 개발이 가능하리라 기대된다. 해외시장에서의 경쟁력 강화와 시장점유율 확대 인삼에 대한 우수성의 과학적 입증과 학술적 연구자료 확보, 외국삼과의 우의성 입증 및 특징적 차별화, 제품의 국제수준화와 일류상품화로의 개발이 필요한 상황이다. 이로 인해 우리 인삼의 국제 경쟁력 강화를 높일 수 있을 뿐만 아니라 궁극적으로 국민의 건강과 인류건강 복지에 이바지 할 수 있을 것으로 기대된다. 인삼의 기존 많은 연구들은 ginsenoside에 관한 연구들 위주로 진행되었기 때문에 인삼의 식물성 스테롤 성분 연구는 확실히 제시되지 못하고 있다. 인삼 종자의 식물성 스테롤 성분이 명확하게 밝혀진다면 예방의학적 차원에서의 항산화 활성과 항균, 항바이러스, 항암, 항염증, 항알러지, 혈관확장능 등의 관련 질병들을 개선할 수 있는 건강기능식품의 개발이 가능하리라 기대된다.

제 3 절 연구개발의 범위

- 인삼종자의 연근별 특성평가
 - 인삼종자의 연근별 특성
 - 인삼종자의 연근별 사포닌, 식물성스테롤, 일반성분 및 영양성분 분석
 - 인삼종자의 연근별 항산화 효능평가
- 인삼종자 오일의 최적 추출방법 및 특성평가
 - 인삼종자 오일 최적 추출방법 선정
 - 인삼종자 오일의 지방산 조성 및 식물성스테롤 분석
 - 인삼종자 오일의 저장성 평가
- 인삼종자 추출방법에 따른 생리활성 변화
 - 인삼종자 오일의 항산화 효능평가
 - Melanocytes에서의 세포독성 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향 검정
- 인삼종자의 식물성스테롤 분리, 정제 및 구조동정
 - 크로마토그래피에 의한 식물성스테롤 성분의 분리 및 구조동정
 - 식물성스테롤의 분석
- 인삼종자의 최적 발효조건 선정 및 발효인삼종자의 특성
 - 인삼종자의 최적 발효조건 선정 및 발효물 특성평가
 - 발효인삼종자의 총당, 산성다당체 및 총페놀 함량 측정
 - 발효인삼종자의 항산화활성 평가
- 발효인삼종자 오일의 최적 추출조건 확립 및 발효인삼종자 오일의 특성평가
 - 발효인삼종자 오일의 추출 및 특성
 - 발효인삼종자 오일의 지방산조성, 식물성스테롤 및 페놀성분 분석
- 발효인삼종자 오일의 안전성 및 미백효과 검정
 - 발효인삼종자 오일의 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향
 - 발효인삼종자 오일 추출물 함유 수용액의 인체 피부에 대한 효과
- 발효인삼종자 오일을 이용한 드레싱 제품 개발
 - 기존 샐러드 드레싱 시제품 조사
 - 드레싱 제품 최종 배합비 및 포장 형태
 - 관능평가를 통한 소비자 기호도 조사
- 인삼종자의 식물성스테롤 성분 분리분석을 통한 신소재 개발 기술
 - 인삼종자의 식물성스테롤 성분의 함량분석 비교연구

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

우리 식생활의 다양화 및 고급화 추세에 따라 좋은 품질의 기능성 오일 제품의 수요는 더욱 증가할 것으로 전망되고 있다. 건강 지향적 식문화의 확산으로 올리브유를 시작으로 포도씨유, 카놀라유, 현미유까지 소비자 웰빙, 건강 지향적 소비 형태로 고급 식용유 시장이 급성장하고 있다. 건강 기능적 측면과 소비자 선호도로 볼 때 포도씨유, 홍화씨유, 해바라기씨유, 채종유 등 종실유의 활용이 높아지는 상황에서 대중들에게 건강식품으로 잘 알려진 인삼지상부 열매의 인삼종자 오일에 대한 제품 개발은 유지시장의 고급화 및 대중화를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

세계 화장품 시장규모는 1,400억불을 상회하며 국내 화장품시장의 규모만도 5조 8000억원에 이르고 있다. 이중 국내 미백화장품은 1,500억원 규모이고 매년 성장하고 있다(출처: 데일리 코스메틱). 그러나 수요가 급증하고 있는 기능성 미백소재에 대한 대부분의 부분을 외국에서 수입하고 있는 실정이기 때문에 연구개발을 통한 빠른 대응 및 선점전략이 필요하다. 최근 한방 소재를 활용한 많은 화장품들이 출시되면서 국내 한방화장품 시장규모는 2조원정도로 전체 화장품의 1/4 수준이다. 이에 따라 현재 인삼도 화장품의 중요한 피부 효능을 가진 한방 소재로 연구되고 있다. 한방 화장품이 인기를 끈 데 이어, 최근에는 천연 원료를 발효하여 제조하는 발효화장품 시장이 5000억원 규모로 급성장하면서 주목받고 있다. 화장품업계에 따르면 최근 3년간 연평균 40% 이상 급성장한 발효화장품 시장에 브랜드숍까지 가세하면서 제2의 한방화장품으로 주목받고 있다.

유산균은 우리 몸에 좋은 이로운 미생물로 장에 필요한 유전자의 자원이 되며 장내미생물의 균형을 이루는 역할을 하고 있으며 식품에 적용할 때 안전성 있다. 이에 유산균은 천연 추출물 함유 활성 성분 및 생리활성의 증가를 목적으로 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다. 인삼에 대한 건강기능성이 널리 알려지면서 인삼을 이용한 유산균발효제품으로 국내외 일부 식품회사들이 제품을 출시하고 있다. 인삼을 발효시키면 진세노사이드를 포함한 다양한 phytochemical 들은 식품 내에 배당체의 형태로 존재하며 장 내 미생물에 의한 발효 과정 및 장 표면에 존재하는 효소 작용에 의해 aglycone 형태로 전환된 후 흡수되는 것으로 알려져 있다. 그러나 노화 및 다양한 종류의 스트레스 인자는 그 전환율을 저하시키게 되어 흡수이용률이 낮아지게 된다. 또한 세포 및 전임상 시험에서도 배당체 형태에 비해 aglycone 구조로 전환되었을 때 그 활성이 높은 것으로 알려지고 있다. 인삼 종자를 유산균 발효시켜 인삼 종자 자체를 추출할 때보다 성분 물질을 활성화 하여 항산화활성 및 면역 활성 및 생리 활성을 극대화 할 것으로 사료된다. 이에 인삼 종자를 발효하여 제품 개발을 하게 되면 식품소재로 널리 활용될 뿐 아니라 발효시킴으로써 저장 기간을 늘려주고 미생물 작용으로 우리의 생명까지 연장시켜 국민 건강에 이바지 할 수 있다.

발효화장품이란 된장, 요구르트, 와인 등 음식에 적용되던 발효기술을 화장품에 적용한 것으로, 미생물을 발효시키는 과정에서 발효균을 제거하고, 효소를 비롯한 유용한 성분을 추출해

만들고, 피부자극이 적고 흡수성이 높은 것으로 알려져 있다. 현재 발효화장품은 한방발효, 식물발효, 술발효, 곡물발효 등 각종 화장품 성분에 발효기법을 도입해 다양한 제품은 물론 영역이 확대되고 있는 추세이다. 인삼종자를 이용한 에센스 제품이 출시되고 있고 홍삼을 이용한 화장품은 제품화되어 있지만 이들을 발효시킨 발효물에 대한 제품개발은 아직 미미한 실정이다.



<그림 4. 아모레퍼시픽의 인삼종자 오일 활용 화장품.>

서구권을 중심으로 berry류 (Blueberry, Blackberry, Strawberry, Raspberry 등)의 항산화 효과와 관련된 관심이 폭발적으로 증가되고 있으며 실제로 수많은 연구 및 상용화 기술개발이 활발히 진행되고 있다. 인삼은 4년근 이상에서 여름에 열매를 맺는데 이를 ginseng-berry라고 한다. 씨를 포함하고 있는 ginseng-berry의 항산화, 항비만, 항당뇨 효과 등이 알려지면서 인삼의 종주국인 한국보다도 ginseng-berry에 대한 관심이 높아 이미 캡슐이나 비누의 형태로 개발되어 시판되고 있다. 우리나라의 경우 아직까지 초기연구 상태로 (주)태평양에서 2010년 초 ginseng-berry의 여러 활성에 대한 특허를 출원한 바 있다. 인삼뿌리를 발효시켜 활성 및 흡수율을 높이는 연구는 2000년대 들어 활발히 진행되어 이를 이용한 많은 기능성식품, 화장품 등이 시판된바 있으나 아직까지 뿌리 이외의 발효소재에 대한 연구는 미비하여 이의 연구를 통한 빠른 인삼종자 발효소재의 선점전략이 시급히 필요하다고 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 인삼종자의 연근별 특성평가

1. 인삼종자의 연근별 특성

가. 재료 및 방법

(1) 재료

실험에 사용한 인삼종자는 충남 금산에서 2012년에 수확한 3, 4, 5 년근 인삼종자를 구입하여 사용하였다. 구입 후 50℃ 열풍건조기에서 48시간 건조시킨 후 분쇄기(FRITSCH, Germany)를 사용하여 껍질과 배유부분을 모두 분쇄하였고, 입자크기는 1 mm trapezoidal을 통과시켜 균일하게 하여 실험에 사용하였다.

(2) 색도측정

인삼종자의 색도는 색차계(Minolta, CR-200, Japan)를 이용하여 L값(lightness), a값(+: red, -: blue), b값(+: yellow, -: green) 그리고 총 색차 ΔE (Total color difference, $\Delta E = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2}$) 값을 측정하였다. 색도측정은 종자의 분쇄 전, 후의 색도를 구분하여 측정하였고, 각각 3회 측정된 수치를 평균한 값으로 나타내었으며, 표준 백색판(L: 97.79, a: -0.38, b: 1.94)으로 보정하여 색도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 인삼종자의 연근별 외관특성

인삼종자는 얇고 동그란 형태로 가운데 부위가 볼록한 편상으로 되어있으며 종피는 단단하여 경실종자에 속한다. 한 개의 종자는 두 조각으로 된 편 조각이 봉합되어 있어 내부의 배유를 외곽에서 둘러싸고 있다. 보통 이들 조각편은 굳게 닫혀 있으나 개갑처리에 의해 배가 성숙하면 틈새가 벌어진다. 겉껍질의 평면은 가로와 세로로 잔주름이 깊게 파여 있고 종자의 하부는 발아공이 있어 호흡과 수분을 조절하는 기능을 갖는다.

실험에 사용한 인삼종자는 2012년 7월 수확하여 과육부분을 제거한 seed 부분을 사용하였다. 그림 1에 나타난 것 같이 3년근, 4년근, 5년근의 외관상 크기는 3년근보다 5년근 종자의 크기가 더 크게 나타났다. 색깔은 종자의 년 수가 오래될수록 색이 약간 진하게 나타났지만 3, 4, 5년근 모두 큰 차이 없이 유사한 것을 알 수 있었다.



3년근 인삼종자

4년근 인삼종자

5년근 인삼종자

그림 1. 연근별 인삼종자의 외관 사진.

(2) 인삼종자 색도

인삼종자의 연근별 색도를 측정된 결과는 표 1과 같다. 분쇄하지 않고 껍질부분의 색도를 측정한 결과 밝기 L값은 3년근 인삼종자가 65.95로 가장 높게 나타났고, 년 수가 늘어날수록 밝기는 감소하여 5년근 인삼종자의 L값은 60.77로 나타났다. 적색도 a값은 5년근이 4.52로 가장 높은 값을 보였고 3년근과 4년근 종자는 3.73, 3.74로 나타났다. 황색도 b값은 년 수에 따른 차이는 크게 나타나지 않았지만 4년근 종자가 15.87로 높은 결과를 보여주었다.

분쇄 후 측정된 색도는 분쇄 전 측정된 색도보다 L값이 전반적으로 높게 나타났고, 적색도 a값은 분쇄 전과 유사하게 나타났다. 황색도 b값의 경우 분쇄전보다 높게 나타났는데 이는 갈색을 띠는 인삼종자의 배유부분이 껍질부분과 함께 분쇄되면서 생긴 결과로 사료되었다.

표 1. 인삼종자의 분쇄 전, 후 색도

	분쇄 전			분쇄 후		
	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
3년근	65.95±0.19	3.73±0.25	14.67±0.32	71.89±0.53	3.91±0.23	19.54±0.69
4년근	64.03±1.38	3.74±0.28	15.87±0.21	73.72±0.55	3.00±0.16	19.03±0.01
5년근	60.77±1.10	4.52±0.28	14.77±0.13	70.45±0.42	4.16±0.20	18.41±0.35

2. 인삼종자의 연근별 사포닌, 식물성 스테롤, 일반성분 및 영양성분 분석

가. 재료 및 방법

(1) 사포닌 조성 분석

인삼종자 중의 사포닌 조성 분석은 Shi *et al.* (2007)의 방법을 변형하여 사용하였다. 각 시료 1.3 g에 70% ethanol을 250 mL 삼각플라스크에 넣고 ultra-sonicator를 사용하여 75°C에서 추출하였다. 추출물을 냉각시켜 여과한 후 잔사에 70% ethanol을 넣고 앞의 방법으로 2회 반복 추출하였다. 총 3회에 걸쳐 추출된 성분을 모아 rotary evaporator를 이용하여 감압 농축시킨 후 건조된 물질에 HPLC용 water 25 mL을 가해 현탁하였다.

SPE 전처리 방법은 Kim *et al.* (2008)의 방법을 변형하여 사용하였다. SPE Sep-Pak C₁₈ cartridge (Agilent Technologies, USA)을 먼저 100% MeOH 5 mL로 서서히 용출시켜 1차 conditioning을 하고, 다시 dd-H₂O 5 mL로 2차 conditioning 시켰다. 추출시료액 5 mL을 cartridge에 loading 하고 5 mL dd-H₂O를 서서히 용출하여 당류를 제거하고 5 mL의 20% MeOH를 서서히 용출하여 지질성분을 제거하였다. 이 cartridge에 90% MeOH 10 mL을 처리하여 서서히 ginsenoside 성분을 용출시켰다. SPE Sep-Pak C₁₈ cartridge를 통과한 ginsenoside 용출액은 N₂를 사용하여 용매를 모두 날리고, HPLC용 MeOH에 녹인 다음 0.45µm membrane filter로 여과 후 HPLC로 분석하였다.

(2) 식물성 스테롤 조성 분석

연근별 인삼종자 분말 5 g에 내부 표준물질인 5α-cholestane (in hexane) 0.5 mL (2 mg/mL)과 6% pyrogallol (in ethanol)용액 10 mL을 넣은 후 1분간 vortex 후 질소로 1분간 flushing 하였다. 그 후 상온에서 10분간 sonication을 진행하였다. 여기에 8 mL의 60% KOH (in water)용액을 가한 후 vortex 후 1분간 다시 질소로 flushing하여 내부 산소를 질소로 치환하였다. 이를 1시간 동안 75°C, 100 rpm으로 shaking water bath에서 검화를 수행한 후 찬물을 이용하여 냉각시켰다. 그 후 2% NaCl (in D.W.)용액 20 mL과 추출용매(hexane: ethyl acetate = 85:15, BHT 0.01% 첨가)를 15 mL 첨가하여 1분간 vortex를 진행한 후 상등액을 분리하여 50 mL volume flask에 옮겼다. 이 때 sodium sulfate에 여액이 통과하도록 하여 탈수시켰으며 이를 3번 반복하였다. 50 mL까지 정용한 후 잘 혼합하여 추출액 중 20 mL을 취한 후 질소로 용매를 완전히 제거한 후 hexane 1 mL을 가하여 용해시켜서 0.50 µm filter로 여과한 후 GC vial에 옮겨 phytosterol 중에서 β-sitosterol, stigmasterol, campesterol를 분리 및 검출하였다. 기기 분석은 gas chromatography (GC, younglin M600D, Korea)를 사용하여 분석하였고, 이 때 사용한 칼럼은 HP ultra-2 Crosslinked 5% PH ME siloxane (25 m × 0.25 mm × 0.33 µm)를 사용하였고, 칼럼온도는 285°C로 유지하였고 주입온도와 검출기 온도는 300°C로 하였다. 운반가스는 N₂를 사용하였고 시료는 2 µL 주입하였으며, 각 시료 당 총 분석시간은 40 min이었다. 표준시료(standard)는 70% β-sitosterol과 5α-cholestane 용액을 이용하여 RF 값을 계산하여 정량하였다.

(3) 일반성분 분석

인삼종자 중의 일반성분 분석은 식품공전(2011) 방법에 준하여 분석하였다. 인삼종자 중의 수분함량 측정은 105°C 상압가열건조법, 조회분 함량은 회화시험법, 조단백질 함량은 Micro-Kjeldahl 질소 정량법, 조지방 함량은 Soxhlet's 에테르 추출법으로 2회 반복 측정하여 백분율로 나타내었다.

(4) 영양성분 분석

(가) 유리당 분석

인삼종자 분말 10 g을 50% 에탄올용액으로 추출한 시료액은 Sep-Pak C₁₈ cartridge (Waters Co., USA) 및 membrane filter (pore size 0.2 µm, whatman Co., UK)로 연속적으로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. 유리당 분석은 high performance liquid chromatography (HPLC, RI-2031 Plus, Jasco Co., Japan)를 사용하였다. 이때 사용한 칼럼은 asahipak NH2P-50 4E column (4.6 mm × 250 mm, 5µm particle size)이고, 이동상은 acetonitrile-water (75:25, v/v)를 1 mL/min의 속도로 용출하였으며, 시료는 20 µL 주입하였다. 분석표준물질은 D(-)-fructose (F2543-100G, Sigma Co., USA), D-(+)-glucose (G7528-250G, Sigma Co., USA), sucrose (S7903-250G, Sigma Co., USA)를 사용하였다.

(나) 구성아미노산 분석

인삼종자의 아미노산 분석은 시료 5 g에 6N-HCl 10 mL를 가하여 교반한 후 질소가스를 충전시킨 후 105°C heating block에 장착시킨 후 24시간 동안 가수분해한 후 여과하여 감압 농축하였다. 이를 pH 2.2의 구연산완충액을 가하여 10 mL로 한 후 0.45 µm의 membrane (PRFE; polytetrafluoroethylene) filter로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 이 때 아미노산 분석은한 아미노산자동분석기(AAA L-8900, Hitachi, Co., Japan)를 사용하였다. 이때 사용한 column은 Ion change column (4.6 mm × 60 mm)이었고, 검출기는 visible detector(visible 1: 570 nm, proline 이외 peak.; visible 2: 440 nm, proline 검출)를 사용하였으며, 완충용액 (PH: Protein Hydrolyze 1~4)의 flow rate는 1 mL/min, column의 온도는 20~85°C (in 1°C steps), 반응온도는 50~140°C (in 1°C steps)로 하였고 분석시간은 30분이었으며, 시료는 20 µL 주입하였다. 이 때 사용한 분석표준물질은 아미노산표준혼합용액 (AAS18-10ML, Sigma Co., USA)으로 stock solution을 일정농도로 희석하여 사용하였다.

(다) 유리지방산 분석

인삼종자 분말시료 10 g을 취하여 에테르로 추출하여 얻은 추출지방 약 25 mg에 0.5N-메탄올성수산화나트륨용액(NaOH-methanol) 2 mL를 가하여 처리하여 알칼리염을 만든 후 14% BF₃-Methanol용액 2 mL를 가하고 가열하여 에스테르화하여 생성된 지방산에스테르를 이소옥탄에 녹여 사용하였다. 이 액을 무수황산나트륨(Na₂SO₄ anhydrous)으로 탈수하여 지방산 분석

시료로 사용하였다. 인삼종자의 유리지방산 분석은 AOAC official method에 준하여 gas chromatography (GC, Agilent 6890, USA)를 사용하여 분석하였다. GC 분석의 column은 HP-FFAP(polyethylene glycol-terphthalic acid; 25 m × 0.32 mm × 0.5 μm)를 사용하였고, column의 온도는 150℃에서 1분간 유지 후 230℃까지 1분당 4℃씩 승온하여 10분간 유지하였다. Injection 온도는 230℃, detector 온도는 250℃로 하였으며, carrier gas는 He (1.5 mL/min), H₂ (30 mL/min), air (300 mL/min)를 사용하였다. 시료는 메탄올성 수산화나트륨용액으로 처리하여 알칼리염을 만든 후 트리플루오로보란메탄올(BF₃ in MeOH)을 가하고 가열하여 에스테르화하여 생성된 지방산에스테르를 이소옥탄에 녹여 시료로 사용하였다. 시료는 1 μL씩 주입하였으며, 불꽃이온화 검출기(flame ionization detector, FID)를 사용하여 분석하였다. 지방산 확인을 위한 표준물질은 Supelco 37 component FAME (fatty acid methyl ester) mix C4~C24(Supelco, USA)를 사용하여 retention time을 비교하여 확인하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 사포닌 조성 분석

인삼종자의 연근별 사포닌 조성을 분석한 결과는 표 2와 같다. 실험에 사용한 ginsenoside는 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 총 6종의 표준품을 사용하여 측정하였다. 표 2에 나타난 것과 같이 인삼종자 중 ginsenoside는 년수가 증가할수록 총 ginsenoside 함량도 증가하여 5년근 인삼종자에서 총 함량이 80.96 mg/g으로 가장 높았다. Ginsenoside 중에서 가장 함량이 높았던 성분은 Re로 전체 ginsenoside 함량 중 3년근 종자에서 59.82%, 4년근 종자는 67.51%, 5년근 종자에서는 66.21%로 ginsenoside 대부분을 차지하였고, 다음은 Rd가 차지하는 비중이 높았다. Re는 인삼과육 및 열매에 많이 함유된 성분으로 알려져 있다. 가장 적게 검출된 ginsenoside는 Rg1으로 3년근 1.68 mg/g, 4년근 2.10 mg/g, 5년근 2.20 mg/g 각각 검출되었다.

표 2. 인삼종자의 연근별 ginsenoside 조성 및 함량 분석

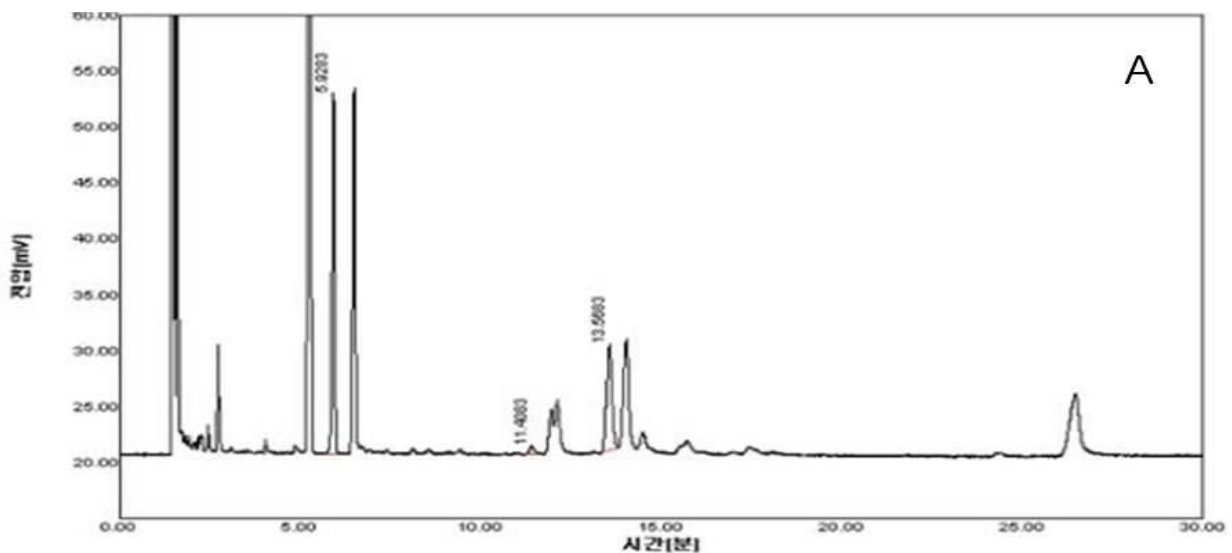
Ginsenoside	3년근(mg/g)	%	4년근(mg/g)	%	5년근(mg/g)	%
Rb1	4.03	8.01	5.04	6.48	5.21	6.43
Rb2	3.38	6.72	4.22	5.43	4.35	5.37
Rc	2.57	5.10	3.21	4.13	3.20	3.95
Rd	8.56	17.01	10.70	13.75	12.40	15.32
Re	30.10	59.82	52.50	67.51	53.60	66.21
Rg1	1.68	3.34	2.10	2.70	2.20	2.72
Total	50.32	100	77.77	100	80.96	100

(2) 인삼종자의 식물성 스테롤 조성 분석

인삼종자의 연근별 식물성스테롤 조성을 분석한 결과는 다음 표 3, 그림 2와 같다. 표에 나타난 것과 같이 인삼종자 중에 존재하는 식물성스테롤은 β -sitosterol과 campesterol이 검출되었다. 주요 식물성스테롤로 알려진 β -sitosterol의 경우 3년근 종자(그림 2-A)와 4년근 종자(그림 2-B)가 16.96 mg/100g, 16.80 mg/100g 으로 유사하게 검출되었고, 5년근 종자(그림 2-C)는 13.51 mg/100g으로 3년근과 4년근 종자보다 다소 낮게 나타났다. Campesterol도 3년근과 4년근 종자의 함량이 각각 1.08 mg/100g과 1.11 mg/100g으로 유사한 수치를 보였지만 5년근 종자는 0.82 mg/100g으로 적게 함유되어 있었다. 전반적으로 총 인삼종자 중의 phytosterol 함량은 3년근 18.04 mg/100g, 4년근 17.91 mg/100g, 5년근 14.33 mg/100g 으로 인삼종자의 연수가 클수록 감소하는 경향을 보였다.

표 3. 인삼종자의 식물성 스테롤 분석

	β -sitosterol	Campesterol	Total
3년근	16.96±0.39	1.08±0.24	18.04
4년근	16.80±0.65	1.11±0.22	17.91
5년근	13.51±0.24	0.82±0.11	14.33



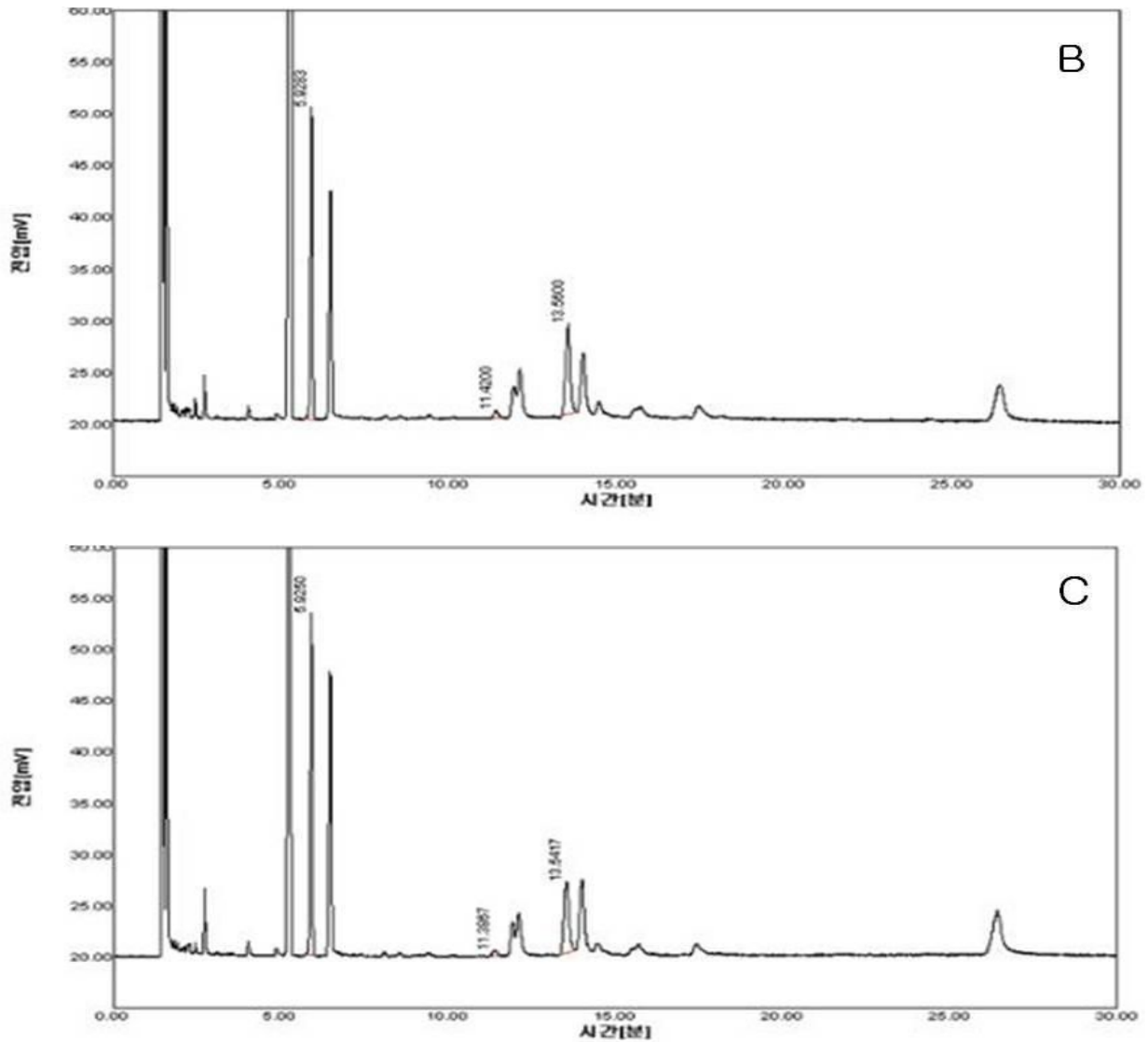


그림 2. 인삼종자 연근별 식물성스테롤 크로마토그램(A: 3년근, B: 4년근, C: 5년근).

(3) 일반성분(수분, 조회분, 조단백질, 조지방) 분석

인삼종자의 수분함량, 조회분 함량, 조단백질 함량, 조지방 함량을 분석한 결과는 표 4와 같다. 인삼종자의 수분함량은 50℃ 열풍건조기에서 48시간동안 1차 건조 후 분쇄하여 측정된 것으로 3, 4, 5년근 모두 5% 이하의 낮은 수분함량을 보였다. 조회분 함량은 3년근 종자 1.7%, 4년근 종자 1.9%, 5년근 종자 2.0%로 년 수가 증가할수록 소폭 증가했지만 결과에 나타난 것처럼 큰 차이를 보이지는 않았다. 조단백질 함량은 3년근 종자가 12.5%로 가장 낮게 나타났고, 4년근과 5년근 종자가 각각 13.6%, 13.4%로 유사한 결과를 보였으며 3년근 종자와 비교하여 높은 조단백질 함량을 나타냈다. 조지방 함량은 3년근 종자 18.5%, 4년근 종자 20.4%, 5년근 종자 19.8%로 4년근 종자의 조지방 함량이 가장 높게 나타났다.

표 4. 인삼종자의 연근별 일반성분 분석

	3년근	4년근	5년근
수분 (%)	4.68±0.06	4.29±0.06	4.10±0.15
조회분 (%)	1.72±0.03	1.85±0.03	2.01±0.05
조단백질 (%)	12.53±0.10	13.61±0.41	13.37±0.30
조지방 (%)	18.50±0.21	20.40±0.40	19.84±0.43

(4) 유리당 분석

인삼종자 중에 존재하는 유리당을 분석한 결과는 표 5와 같다. 인삼종자 중 유리당은 fructose와 glucose는 검출되지 않고 sucrose만 검출되었다. 함량은 3년근이 2.05 g/100g, 4년근 2.11 g/100g, 5년근 1.90 g/100g 으로 나타나 큰 차이를 보이지 않았지만 4년근 종자가 다른 종자의 sucrose 함량보다 높은 결과를 보였다.

표 5. 인삼종자의 연근별 유리당 조성 및 함량

	3년근	4년근	5년근
Fructose	ND ¹⁾	ND	ND
Glucose	ND	ND	ND
Sucrose	2.05	2.11	1.90
Total	2.05	2.11	1.90

¹⁾ not detected

(5) 구성아미노산 분석

인삼종자의 연근별 구성아미노산을 분석 결과는 표 6과 같다. 인삼종자 중에는 총 16종의 아미노산이 검출되었으며, 그 중 필수아미노산은 threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, histidine 총 8종이 검출되었다. 인삼종자의 비필수아미노산 중에는 glutamic acid가 시료 구분없이 총 아미노산 함량 중 23%로 상당히 많이 함유되어 있고, 필수아미노산 중에는 leucine, lysine, valine 등의 순으로 많이 함유된 것으로 나타났다. 필수아미노산 중 valine, methionine, isoleucine의 경우 인삼종자의 년 수가 증가할수록 함량이 크게 증가하여 5년근 종자에서 함유량이 가장 높게 나타났다. 총 아미노산 함량은 3년근 종자가 11309.0 mg/100g 으로 가장 낮게 나타났고, 4년근과 5년근 종자는 각각 11884.2 mg/100g, 11886.3 mg/100g 으로 두 시료간 차이는 거의 없었지만 3년근 시료보다 아미노산 함량이 높게 나타났다. 필수아미노산 함량은 모든 시료가 36%로 나타나 년 수가 증가함에 따른 차이는 크

게 보이지 않았지만, 그 중 valine, methionine 및 isoleucine의 함량은 년 수에 따라 증가하는 경향을 보였다.

표 6. 인삼종자의 연근별 구성아미노산 조성 및 함량

Amino acid	3년근		4년근		5년근	
	Content (mg/100g)	%	Content (mg/100g)	%	Content (mg/100g)	%
Essential						
Valine	528.6	4.67	584.0	4.92	608.1	5.12
Leucine	1031.8	9.12	1090.2	9.17	1074.2	9.04
Methionine	57.3	0.51	77.0	0.65	89.6	0.75
Threonine	469.1	4.15	488.8	4.11	486.6	4.09
Lysine	796.5	7.04	787.1	6.62	772.5	6.50
Phenylalanine	519.5	4.59	544.5	4.58	544.6	4.58
Histidine	265.8	2.35	267.2	2.25	271.7	2.29
Isoleucine	425.1	3.76	469.5	3.95	487.7	4.10
Non-essential						
Aspartic acid	1224.9	10.83	1277.1	10.75	1285.0	10.81
Serine	685.0	6.06	691.8	5.82	686.6	5.78
Glutamic acid	2656.2	23.49	2822.1	23.75	2808.4	23.63
Proline	433.5	3.83	431.8	3.63	419.9	3.53
Glycine	686.2	6.07	684.6	5.76	689.1	5.79
Alanine	605.8	5.36	639.8	5.38	643.7	5.42
Tyrosine	90.3	0.80	89.9	0.76	100.1	0.84
Arginine	833.4	7.37	938.8	7.90	918.5	7.73
Total AA ¹⁾	11309.0	100	11884.2	100	11886.3	100
Total EAA ²⁾	4093.7	36.19	4308.3	36.25	4335.0	36.47
EAA/AA(%)	36.19		36.25		36.47	

¹⁾ Total AA: Total amino acid

²⁾ Total EAA: Total essential amino acid

(6) 유리지방산 분석

인삼종자의 연근별 유리지방산 조성 및 함량 분석 결과는 표 7과 같다. 인삼종자 연근에 따른 구성지방산 중 포화지방산은 palmitic acid(C16:0), stearic acid(C18:0)로 총 2종이 검출되었고,

불포화지방산은 palmitoleic acid(C16:1), oleic acid(C18:1), linoleic acid(C18:2), linolenic acid(C18:3), gadoleic acid(C20:1)로 총 5종이 검출되었다. 인삼종자의 주요 구성지방산은 oleic acid, linoleic acid, palmitic acid 순으로 함량이 많았으며, 그 중 oleic acid는 3년근 종자 80.0%, 4년근 종자 80.5%, 5년근 종자 80.1%로 다른 지방산보다 월등히 높게 나타났다. 인삼종자의 구성지방산 중 불포화지방산은 97%이상으로 포화지방산(2.3~2.4%)과 비교할 수 없을 정도로 높게 나타났다. 인삼종자 년 수에 따른 차이는 보이지 않았고, 지방산함량은 유사하게 나타났다.

표 7. 인삼종자의 연근별 유리지방산 조성 및 함량

	3년근 (%)	4년근 (%)	5년근 (%)
Palmitic acid (C16:0)	2.1	2.0	2.1
Stearic acid (C18:0)	0.3	0.3	0.3
Palmitoleic acid (C16:1)	0.3	0.3	0.3
Oleic acid (C18:1)	80.0	80.5	80.1
Linoleic acid (C18:2)	17.1	16.7	17.0
Linolenic acid (C18:3)	0.1	0.1	0.1
Gadoleic acid (C20:1)	0.1	0.1	0.1
TSFA ¹⁾	2.4	2.3	2.4
TUFA ²⁾	97.6	97.7	97.6
Total	100.0	100.0	100.0

¹⁾ Total saturated fatty acid

²⁾ Total unsaturated fatty acid

3. 인삼종자의 연근별 항산화 효능평가

가. 재료 및 방법

(1) 총페놀 분석

분말시료 1 g에 80% 메탄올 25 mL을 가한 후 80℃에서 환류냉각장치를 이용하여 가용성 성분들을 2회 추출하였다. 추출물은 여과한 후 감압농축시키고 증류수 10 mL에 녹였다. 이를 0.45 µm 막필터로 여과한 여액을 총 페놀 함량 분석용 시료로 사용하였다. 총 페놀 함량 분석은

Folin-ciocalteu's 법에 따라 측정하였으며, 표준물질로는 gallic acid를 사용하였다.

(2) 항산화 활성 평가 시험용액 추출

인삼종자 분말 시료 5 g을 농축용 플라스크에 평량하고 50 mL 70% ethanol을 첨가한 후 80°C 환류냉각추출기에서 1시간 추출하였다. 30분간 방냉 후 추출액을 여과한 후 45°C 수조에서 rotary evaporator를 이용하여 진공농축하였다. 농축한 잔류물은 50 mg/mL(50,000 ppm)의 농도로 희석하여 시험용액으로 사용하였다.

(3) DPPH radical 소거효과 측정

인삼종자 추출물 시료의 DPPH radical 소거활성 측정방법은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 에탄올 2.8 mL에 각각의 농도로 80% 에탄올에 희석한 각각의 인삼종자 추출물을 0.4 mL 첨가하고 에탄올에 녹인 4×10^{-4} M DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Inc.)용액을 0.8 mL 가하고 10초간 vortexing 하였다. 이것을 10분간 상온에 방치하여 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical scavenging ability는 시료 첨가구와 음성대조군의 흡광도를 측정하여 백분율로 나타내었으며 양성 대조군은 비타민 C로 하였다. 인삼종자 추출물은 최종농도가 5000, 500, 50, 5 ppm이 되도록 첨가하였다.

(4) ABTS radical 소거효과 측정

인삼종자 시료의 ABTS radical scavenging ability는 ABTS cation decolorization assay 방법에 의하여 측정하였다. 7 mM ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Wako. Ltd., Japan)와 2.45 mM $K_2S_2O_8$ 를 실온인 암소에서 24시간 반응하여 ABTS 라디칼을 형성시켜 ABTS stock solution을 제조하였으며, 이를 734 nm에서 흡광도 0.70 ± 0.02 로 희석시켜 사용하였다. 0.1 M PBS에 녹인 각각의 농도의 인삼종자 추출물 20 μ L에 ABTS⁺ 용액 980 μ L을 가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 비타민 C와 Trolox[®] (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich. Inc.)를 사용하였으며 시료 첨가구와 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군의 흡광도를 측정하여 백분율로 나타내었다. 인삼종자 추출물은 최종농도가 1000, 100, 10, 1 ppm이 되도록 첨가하였다.

(5) 항산화 효소활성 측정

각각의 인삼종자 추출물의 활성산소(O_2^-) 제거와 관련된 SOD (superoxide dismutase) 유사활성을 측정하였다. 인삼종자 추출물은 최종농도가 1000, 100, 10, 1 ppm이 되도록 첨가하여 SOD-assay kit-WST (Dojindo Lab., Japan)를 이용하여 반응시킨 후 450 nm에서 microplate reader (Thermomax, Molecular Device co.)를 이용하여 측정하였으며 양성 대조군으로는 비타민 C를 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 총 페놀 함량분석

인삼종자 3, 4, 5년근 추출물의 총 페놀 함량을 측정된 결과는 표 8과 같다. 측정결과 연근별로 큰 차이를 보이지는 않았지만 4년근 종자의 총 페놀 함량이 1.35 mg/g 으로 가장 높게 나타났고, 3년근 종자와 5년근 종자에서 각각 1.13 mg/g, 1.12 mg/g 으로 나타났다.

표 8. 인삼종자의 연근별 총페놀 함량

	페놀함량 (mg/g)
3년근 종자	1.125±0.087
4년근 종자	1.350±0.027
5년근 종자	1.116±0.011

(2) DPPH radical 소거효과

인삼종자 3, 4, 5년근 추출물을 5, 50, 500, 5000 ppm의 농도로 DPPH radical 소거효과를 측정된 결과는 그림 3과 같다. 측정결과 5, 50, 500 ppm의 경우 10~20%의 radical 소거효과를 보였고 각 연근별 차이는 크게 나타나지 않았지만, 추출물의 농도가 높을수록 radical 소거효과도 높게 나타나 농도의존적인 결과를 보였다. 5000 ppm의 농도에서는 3년근과 4년근 종자의 DPPH radical 소거활성이 50%로 나타났고, 5년근 종자는 DPPH radical 소거효과가 44%로 3년근, 4년근 시료보다 낮게 나타났다.

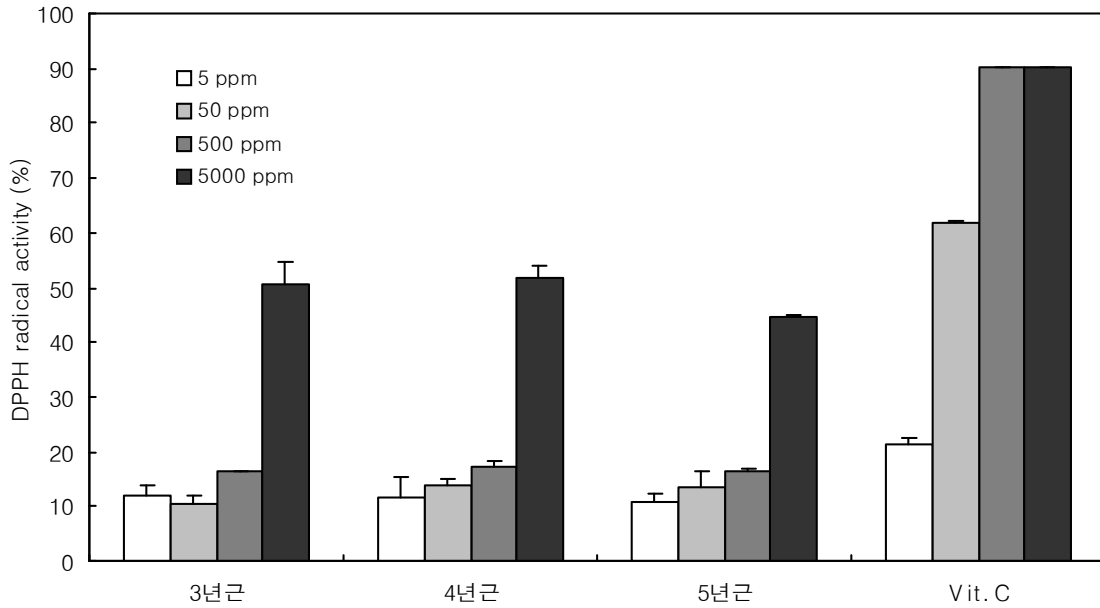


그림 3. 인삼종자 추출물의 연근별 DPPH radical 소거효과.

(3) ABTS radical 소거효과

인삼종자 3, 4, 5년근 추출물을 1, 10, 100, 1000 ppm의 농도로 ABTS radical 소거효과를 측정된 결과는 그림 4와 같다. 측정결과 1 ppm 농도에서는 효과가 전혀 나타나지 않았고, 추출물의 농도가 높아질수록 ABTS radical 소거효과도 높게 나타나 DPPH radical 소거효과와 마찬가지로 농도의존적인 결과를 보였다. 1000 ppm에서는 양성대조군인 vitamin C 10 ppm 농도, trolox 100 ppm 농도와 비슷한 85% 이상의 효과를 나타냈다. 1, 10, 100 ppm에서는 년근에 따른 소거효과가 나타나지 않았지만, 1000 ppm 농도에서는 3년근의 소거효과가 91%, 4년근이 89%, 5년근이 88%로 년수가 클수록 ABTS radical 소거효과는 소폭 감소하는 것으로 나타나 DPPH radical 소거효과와 유사한 경향을 보여주었다.

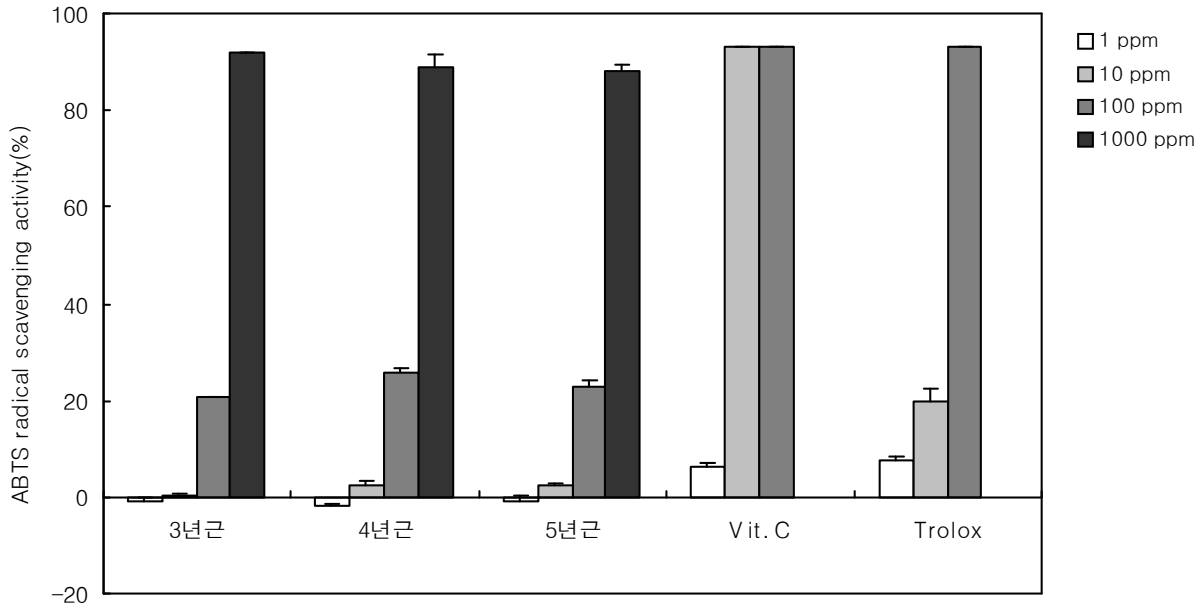


그림 4. 인삼종자 추출물의 연근별 ABTS radical 소거효과.

(4) SOD 효소활성

SOD(superoxide dismutase) 효소활성은 초과산화이온이 가지고 있는 자유 라디칼 음이온이 세포에 해로운 영향을 미치기 때문에 SOD는 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔 줌으로써 독성으로부터 세포를 방어하는 역할을 한다. 산소에 노출되는 거의 모든 세포에서 이러한 SOD에 의한 항산화방어기작이 중요하며, 일부 유산균들의 경우 다른 방어기작을 사용하는 것으로 알려져 있다.

인삼종자 3, 4, 5년근 추출물을 1, 10, 100, 1000 ppm의 농도로 SOD 효소활성을 측정한 결과는 그림 5와 같다. 측정결과 4년근 종자의 SOD 효소활성이 100 ppm농도에서 18%, 1000 ppm 농도에서 54%로 다른 종자와 비교하여 높은 결과를 보였다. 3년근 종자는 1, 10 ppm 농도에서는 효과가 전혀 나타나지 않고 100 ppm에서 10%, 1000 ppm 농도에서 43%로 증가하였지만 4년근과 5년근 종자와 비교하여 가장 낮은 효소활성을 나타냈다. 5년근 종자의 SOD 효소활성은 4년근 종자의 SOD 효소활성보다 소폭 감소하는 경향을 보여주었다.

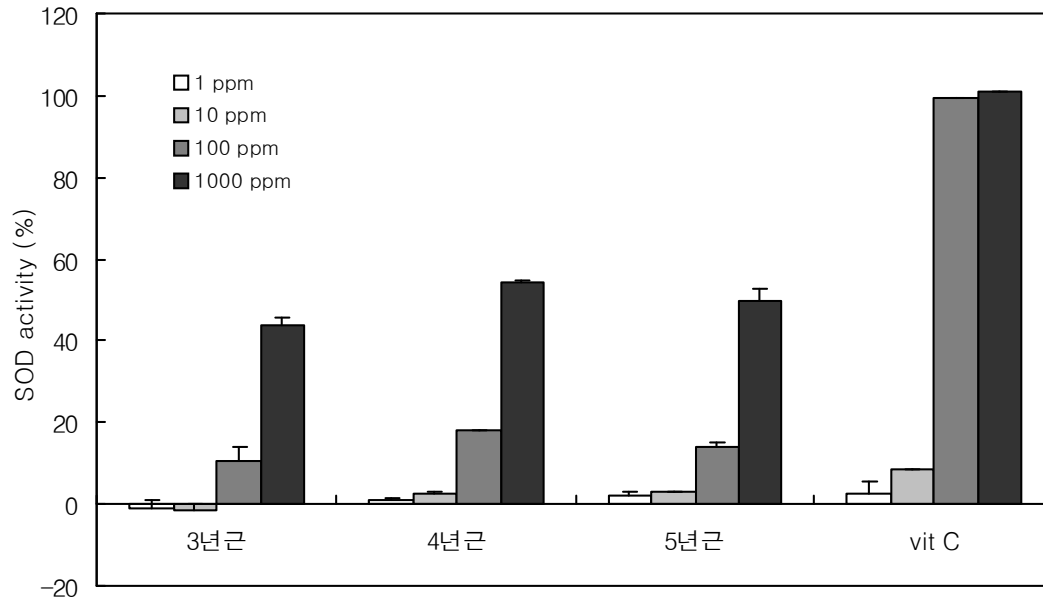


그림 5. 인삼종자 추출물의 연근별 SOD 효소활성.

제 2 절 인삼종자 오일의 최적 추출방법 및 특성평가

일반적인 유지의 채취방법은 용출법(rendering), 압착법(mechanical expression)과 추출법(solvent extraction)으로 크게 나눌 수 있다. 어느 방법이든 공통적인 목적은 가능한 불순물이 없는 좋은 품질의 유지를 얻고, 채유수율을 높이며, 부가가치가 높은 유박을 얻는데 있다. 용출법은 동물 지방조직 중의 유지를 용출, 채취하는 방법으로 식물유지의 채취에는 거의 이용하지 않는다. 압착법은 원료에 압력을 가하여 기름을 짜내는 방법인데, 주로 식물 원료에 이용되는 방법이다. 압착법에는 어느 방법을 사용하더라도 유박에 상당한 기름이 흡착되는 단점이 있다(유박에 대하여 4~7%). 용제를 써서 유지를 추출하는 추출법의 경우에는 대두박 중의 잔유량을 1% 이하로 할 수 있다. 그러나 용제 추출법의 결점은 설비비가 비싸고, 원료에 따라서는 용제에 의하여 미세화 되어 조작이 어려워지는 점이 있다.

최근 많이 이용되는 추출방법으로 초임계유체 추출(supercritical fluid extraction)이 있다. 초임계유체 추출은 물질의 기상과 액상의 상경계 지점인 critical point 이상의 압력과 온도를 설정해 줌으로써 액상의 용해력과 기상의 확산계수와 점도의 특성을 지니게 하여 신속한 추출과 선택적 추출이 가능하게 하는 방법이다. 또한 초임계 유체는 주로 이산화탄소 혹은 이산화탄소와 미량의 보조용매로 형성되기 때문에 용매추출법에 비해 유해성 용매의 잔존 위험이 낮을 뿐만 아니라 상온 부근에서 추출조작이 이루어질 수 있기 때문에 천연물 또는 열에 민감한 물질의 추출에 유용한 방법이다.

본 실험에서는 압착추출, n-hexane을 이용한 용매추출, 초임계유체 추출 방법으로 인삼종자 중의 오일을 추출하여 수율 및 품질 특성을 살펴보았다.

1. 인삼종자 오일 최적 추출방법 선정

가. 재료 및 방법

(1) 재료

인삼종자 오일 추출은 충남 금산 인삼시장에서 2011년 생산된 4년근 인삼종자를 구입하여 사용하였다. 착유과정에서 껍질을 제거하지 않고 착유하면 껍질이 유지를 흡유하여 착유율이 떨어지고 처리능력도 감소하기 때문에, 인삼종자를 충분히 건조시킨 후 껍질을 제거하여 얻은 배유부분을 실험에 사용하였고, 초임계 유체 추출의 경우 껍질을 포함한 인삼종자 전체를 분쇄하여 사용하였다.

(2) 압착 추출

인삼종자 오일의 효과적 추출을 위하여 껍질을 제거한 인삼종자의 배유 부분을 200℃에서 10분, 20분, 30분 각각 볶음 처리 후 분쇄하였고, 이때 대조구는 볶음처리하지 않은 시료로 하

였다. 시료는 150 g 씩 각각 볶음 처리한 후 screw 압착방식의 채유기(현대녹색산업, 한국)를 사용하여 압착하였다. 압착하여 얻은 오일을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 불순물을 제거하였고 상층오일의 무게를 측정하여 수율을 계산하였다. 이때 추출 전 제거한 껍질무게를 감안하여 수율을 계산하였다.

(3) 용매(n-hexane) 추출

인삼종자 오일의 용매 추출은 식물유지 추출에 주로 사용하는 n-hexane을 사용하여 추출하였다. 시료의 전처리는 압착추출의 전처리 방법과 동일하게 200℃에서 10분, 20분, 30분 볶음처리 하였고, 대조구는 볶음처리 하지 않은 시료로 하였다. 껍질을 제거하여 분쇄한 인삼종자 배유부분 150 g에 n-hexane 600 mL을 넣고 70℃에서 3시간 추출하였고 이를 2회 반복하였다. 추출물은 감압여과장치로 여과한 후 50℃에서 농축하여 인삼종자 오일을 얻었고 오일의 무게를 측정하여 수율을 계산하였다. 이때 추출 전 제거한 껍질무게를 감안하여 수율을 계산하였다.

(4) 초임계 유체 추출

인삼종자 중의 오일성분 추출을 위해 초임계 이산화탄소 추출장치(Greentek21 Co., Ltd., Anyang, Korea)를 이용하여 추출을 진행하였다. 초임계 추출을 용이하게 하기 위하여 인삼종자를 볶음처리 하지 않은 상태로 분쇄기(FRITSCH, Germany)를 사용하여 껍질과 배유부분을 모두 분쇄하였고, 입자크기는 1 mm trapezoidal을 통과시켜 균일하게 하였다. 추출조는 내용량 500 mL으로 분쇄한 인삼종자 분말 230 g을 투입하여 energized seal로 밀봉하였으며, extractor의 head 부분과 본체는 clamp 체결 방식을 사용하였다. CO₂ cylinder에서 나온 CO₂ gas는 condenser를 거쳐 액화되어 CO₂ 펌프에서 압축된 뒤 추출조로 들어가게 된다. 추출조에서 나온 이산화탄소와 추출물은 압력이 상압으로 낮아지면서 이산화탄소는 날아가고 receiver에 모인 추출물을 인삼종자 초임계 추출물 시료로 하였다. 초임계 유체 추출은 150 bar/ 35℃, 150 bar/ 65℃, 500 bar/ 35℃, 500 bar/ 65℃의 조건으로 각각 추출하였다.

(5) 색도측정

인삼종자 오일의 색도는 색차계(Minolta, CR-200, Japan)를 이용하여 각각 추출 조건별로 L 값(lightness), a 값(+: red, -: blue), b 값(+: yellow, -: green) 그리고 총색차 ΔE (Total color difference, $\Delta E = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2}$) 값을 측정하였다. 인삼종자 오일 시료는 35×10 mm 크기의 petri dish (Falcon®, USA)에 일정량 취하여 3회 측정된 수치를 평균한 값으로 나타내었으며, 이때 표준 백색판(L: 97.83, a: -0.36, b: 1.94)으로 보정하여 색도를 측정하였다.

(6) 페놀 성분 분석

인삼종자 오일 중의 페놀성 성분에 대한 분석은 high performance liquid chromatography (HPLC, PU-980, Jasco Co., Japan)를 사용하였다. 페놀성 성분의 HPLC 분석은 Waters C-18

column (5.0 μm , 4.6 \times 250 mm, Ireland)을 사용하여 2% acetic acid를 함유한 Water (용매 A)와 0.5% acetic acid를 함유하는 50% acetonitrile (용매 B)을 이동상으로 사용하였다. 초기 A 용매 100%에서 70분 후 A용매 45%로 gradient를 주어 0.8 mL/min의 속도로 총 80분간 전개하였으며 시료는 20 μL 주입하였다. 시료의 검출은 UV detector (MD-2010, Jasco Co., Japan)를 사용하여 280 nm에서 측정하였다. 분석에 사용한 표준물질은 총 10 종류로 maltol, coumaric acid, cinnamic acid, salicylic acid, vanillic acid, syringic acid, ferulic acid, gentisic acid, caffeic acid 는 Sigma (USA), hydroxy benzoic acid는 Junsei (Japan)의 제품을 사용하였다. 시료의 전처리는 각 시료 2 g 씩을 취하여 n-hexane 10 mL에 녹인 후 80% methanol 20 mL를 가하여 80 $^{\circ}\text{C}$ 환류추출장치에서 2시간동안 폐놀성 물질을 추출하였다. 이 추출물에 n-hexane 10 mL를 가하여 잔존하는 유지성분을 제거하고 층 분리 된 80% methanol 층을 감압 농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 농축된 추출물은 10 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹인 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 인삼종자 오일의 추출방법에 따른 수율

인삼종자의 볶음처리와 압착, 용매 및 초임계 추출방법에 의한 오일의 추출 수율을 측정된 결과는 표 9에 나타나있다. 압착 방법으로 추출한 오일의 수율이 n-hexane을 이용한 용매추출의 오일 수율보다 높게 나타났다. 그리고 초임계 추출은 추출압력 및 추출온도에 따라 추출 수율에 큰 차이를 보였다. 볶음 처리 조건에 따른 인삼종자의 오일 추출 수율은 볶음처리하지 않은 인삼종자(control)보다 볶음처리 한 인삼종자의 오일 추출 수율이 높게 나타났다.

압착방법으로 추출한 오일에서는 인삼종자의 볶음시간에 의한 추출 수율 차이는 큰 차이가 없었고, 이 중 200 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 볶음 처리 후 압착하여 얻은 인삼종자 오일의 수율이 16.53%로 높았다. 용매를 이용하여 추출한 인삼종자의 오일의 경우 볶음시간이 긴 인삼 종자일수록 추출 오일의 수율도 약간 증가하는 것으로 나타났고 볶음시간 30분 처리하여 얻은 인삼종자 오일의 수율은 13.70%의 결과를 나타냈다. 그리고 초임계 추출방법으로 추출한 오일은 500 bar의 압력에서 추출한 오일의 수율이 150 bar 압력에서 추출한 오일의 수율보다 높게 나타나서 초임계 추출 방법에 의한 오일 추출은 압력의 영향을 많이 받은 것을 알 수 있었다.

전반적으로 추출방법에 의한 인삼종자의 오일 추출 수율을 비교해볼 때 초임계 추출 방법이 압착추출 방법과 용매추출 방법에 의한 오일 추출 수율보다 높았고 500 bar, 65 $^{\circ}\text{C}$ 의 조건으로 초임계 추출한 인삼종자의 오일 추출 수율이 17.48%로 가장 높게 나타났다.

표 9. 인삼종자 오일의 추출방법에 따른 수율

Extraction conditions		Yield (%)
Compress extraction	Control	13.90
	200℃, 10 min	16.00
	200℃, 20 min	16.53
	200℃, 30 min	16.10
Solvent extraction (n-hexane)	Control	10.20
	200℃, 10 min	12.00
	200℃, 20 min	13.40
	200℃, 30 min	13.70
Supercritical fluid extraction	150 bar, 35℃	4.30
	150 bar, 65℃	2.40
	500 bar, 35℃	16.59
	500 bar, 65℃	17.48

(나) 인삼종자 오일의 색도

인삼종자의 볶음처리 및 압착, 용매 및 초임계 추출방법에 의한 오일의 색도를 측정된 결과는 표 10과 같다. 추출한 인삼종자 오일의 색도는 L값(lightness)과 a값(redness)에서 인삼종자의 볶음 조건에 따른 차이를 거의 보이지 않았다. 그러나 b값(yellowness)의 경우 인삼종자의 볶음 시간이 증가할수록 압착방법과 용매방법으로 추출한 오일에서 모두 증가한 것으로 나타났다. 특히 200℃에서 30분 볶음처리된 인삼종자의 압착 추출 오일의 b값이 20.49로 용매방법과 초임계 방법으로 추출한 오일과 비교하여 가장 높은 값을 보였다. 이 같은 결과는 인삼종자의 볶음 처리에 의한 색도의 생성과 갈변에 의한 결과로 사료된다.

초임계 추출한 인삼종자 오일의 밝기 L값은 추출조건에 따른 차이를 보이지 않았지만, 압착 추출과 용매추출한 인삼종자 오일과 비교하여 L값이 약간 높게 나타났다. 그리고 적색도 a값은 추출압력에 따라 약간의 차이가 있었으며 150 bar, 35℃, 65℃의 경우 57.24, 55.63을 나타내었고 500 bar의 경우 35℃, 65℃에서 57.67을 나타내었다. 황색도 b값은 추출압력 및 추출온도가 높을수록 b값이 높게 나타났고, 500 bar, 65℃에서 추출한 오일의 황색도 값이 15.60으로 가장 높은 값을 보였다.

표 10. 인삼종자 오일의 색도

Extraction conditions		<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
Compress extraction	Control	55.23±0.32	-2.33±0.13	10.98±0.27	60.93±0.47
	200°C, 10 min	54.67±0.18	-1.99±0.08	17.50±0.26	62.98±0.28
	200°C, 20 min	55.50±0.40	-2.20±0.08	17.91±0.24	61.96±0.57
	200°C, 30 min	55.23±0.19	-1.96±0.11	20.49±0.20	63.04±0.22
Solvent extraction (n-hexane)	Control	56.51±0.09	-2.70±0.06	10.87±0.16	59.11±0.15
	200°C, 10 min	57.51±0.18	-2.78±0.08	11.58±0.34	57.38±0.30
	200°C, 20 min	56.38±0.27	-2.54±0.05	13.02±0.17	59.65±0.40
	200°C, 30 min	56.69±0.25	-2.47±0.06	14.01±0.35	59.42±0.40
Supercritical fluid extraction	150 bar, 35°C	57.24±0.21	-0.22±0.03	3.54±0.13	57.42±0.31
	150 bar, 65°C	55.63±0.19	-0.03±0.01	5.11±0.24	59.76±0.26
	500 bar, 35°C	57.67±0.39	-2.68±0.07	12.60±0.16	57.78±0.55
	500 bar, 65°C	57.67±0.06	-2.89±0.03	15.60±0.24	58.41±0.06

(다) 인삼종자 오일 중의 페놀성분 분석

인삼종자의 볶음처리 및 압착, 용매 및 초임계 추출방법에 의한 오일의 페놀성분 조성과 함량을 HPLC로 분석한 결과는 표 11~13과 같다. 분석에 사용한 maltol, p-coumaric acid, cinnamic acid, salicylic acid, vanillic acid, syringic acid, ferulic acid, gentisic acid, caffeic acid, p-hydroxyl benzoic acid 10개의 표준물질 중 인삼종자 오일에서 검출된 페놀성분은 gentisic acid, vanillic acid, ferulic acid, cinnamic acid 이었다. 압착방법으로 추출한 인삼종자 오일에서는 ferulic acid와 cinnamic acid가 검출되었고 볶음처리에 따른 함량 차이는 거의 없었다. 용매방법으로 추출한 인삼종자 오일에서는 cinnamic acid가 0.007~0.029 µg/g 검출되었고, 볶음처리하지 않은 인삼종자의 추출 오일에서 gentisic acid가 1.438 µg/g 검출되었다. 그리고 초임계 추출방법으로 추출한 인삼오일에서 검출된 페놀성분은 vanillic acid와 ferulic acid이었고, vanillic acid는 압력과 온도가 높을수록 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 수삼의 증숙 횟수에 따른 페놀산 조성을 살펴본 논문에서 증숙 횟수가 증가할수록 페놀산 중 cinnamic acid, p-hydroxyl benzoic acid, vanillic acid가 감소한 결과와 유사하였다. Ferulic acid는 초임계 추출 150 bar 압력 조건에서는 검출되지 않았고, 500 bar, 35°C에서 0.012 µg/g, 500 bar, 65°C에서 0.016 µg/g 검출되었는데 이것은 초임계 추출시 높은 압력에서 약간의 ferulic acid가 검출되는 것으로 판단되었다.

표 11. 압착추출 인삼종자 오일의 페놀성분 분석

Phenolic compound ($\mu\text{g/g}$)	Compress extraction			
	Control	200°C, 10min	200°C, 20min	200°C, 30min
maltol	ND ¹⁾	ND	ND	ND
hydroxy benzoic acid	ND	ND	ND	ND
gentisic acid	ND	ND	ND	ND
vanillic acid	ND	ND	ND	ND
caffeic acid	ND	ND	ND	ND
syringic acid	ND	ND	ND	ND
coumaric acid	ND	ND	ND	ND
ferulic acid	0.020	0.025	0.034	0.027
salicylic acid	ND	ND	ND	ND
cinnamic acid	0.039	0.040	0.041	0.038

¹⁾ not detected

표 12. 용매(n-hexane)추출 인삼종자 오일의 페놀성분 분석

Phenolic compound ($\mu\text{g/g}$)	Solvent extraction (n-hexane)			
	Control	200°C, 10min	200°C, 20min	200°C, 30min
maltol	ND ¹⁾	ND	ND	ND
hydroxy benzoic acid	ND	ND	ND	ND
gentisic acid	1.438	ND	ND	ND
vanillic acid	ND	ND	ND	ND
caffeic acid	ND	ND	ND	ND
syringic acid	ND	ND	ND	ND
coumaric acid	ND	ND	ND	ND
ferulic acid	ND	ND	ND	ND
salicylic acid	ND	ND	ND	ND
cinnamic acid	0.029	0.007	0.011	0.017

¹⁾ not detected

표 13. 초임계추출 인삼종자 오일의 페놀성분 분석

Phenolic compound ($\mu\text{g/g}$)	Supercritical fluid extraction			
	150bar, 35 $^{\circ}\text{C}$	150bar, 65 $^{\circ}\text{C}$	500bar, 35 $^{\circ}\text{C}$	500bar, 65 $^{\circ}\text{C}$
maltol	ND ¹⁾	ND	ND	ND
hydroxy benzoic acid	ND	ND	ND	ND
gentisic acid	ND	ND	ND	ND
vanillic acid	1.286	1.064	0.025	0.08
caffeic acid	ND	ND	ND	ND
syringic acid	ND	ND	ND	ND
coumaric acid	ND	ND	ND	ND
ferulic acid	ND	ND	0.012	0.016
salicylic acid	ND	ND	ND	ND
cinnamic acid	ND	ND	0.003	ND

¹⁾ not detected

2. 인삼종자 오일의 지방산 조성 및 식물성스테롤 분석

가. 재료 및 방법

(1) 지방산 분석

인삼종자 오일 중의 유리지방산 분석은 AOAC official method에 준하여 gas chromatography (GC, Agilent 6890, USA)를 사용하여 분석하였다. GC 분석의 column은 HP-FFAP (polyethylene glycol-terphthalic acid; 25 m \times 0.32 mm \times 0.5 μm)를 사용하였고, column의 온도는 150 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 유지 후 230 $^{\circ}\text{C}$ 까지 1분당 4 $^{\circ}\text{C}$ 씩 승온하여 10분간 유지하였다. Injection 온도는 230 $^{\circ}\text{C}$, detector 온도는 250 $^{\circ}\text{C}$ 로 하였으며, carrier gas는 He (1.5 mL/min), H₂ (30 mL/min), air (300 mL/min)를 사용하였다. 시료는 메탄올성 수산화나트륨용액으로 처리하여 알칼리염을 만든 후 트리플루오로보란메탄올(BF₃ in MeOH)을 가하고 가열하여 에스테르화하여 생성된 지방산에스테르를 이소옥탄에 녹여 시료로 사용하였다. 시료는 1 μL 씩 주입하였으며, 불꽃이온화 검출기(flame ionization detector, FID)를 사용하여 분석하였다. 지방산 확인을 위한 표준물질은 Supelco 37 component FAME (fatty acid methyl ester) mix C4~C24(Supelco, USA)를 사용하여 retention time을 비교하여 확인하였다.

(2) 인삼종자 오일 중의 식물성 스테롤(phytosterol) 분석

인삼종자 오일 0.5 g에 내부 표준물질인 5 α -cholestane (in hexane) 0.5 mL (2 mg/mL)과 6% pyrogallol (in ethanol)용액 10 mL을 넣은 후 1분간 vortex 후 질소로 1분간 flushing 하였다. 그 후 상온에서 10분간 sonication을 진행하였다. 여기에 8 mL의 60% KOH (in DW)용액을 가한 후 vortex 후 1분간 다시 질소로 flushing하여 내부 산소를 질소로 치환하였다. 이를 1시간 동안 75°C, 100 rpm으로 shaking water bath에서 검화를 수행한 후 찬물을 이용하여 냉각시켰다. 그 후 2% NaCl (in DW)용액 20 mL과 추출용매(hexane:ethyl acetate = 85:15, BHT 0.01% 첨가)를 15 mL 첨가하여 1분간 vortex를 진행한 후 상등액을 분리하여 50 mL volumetric flask에 옮겼다. 이 때 sodium sulfate에 여액이 통과하도록 하여 탈수시켰으며 이를 3번 반복하였다. 50 mL까지 정용한 후 잘 혼합하여 추출액 중 20 mL을 취한 후 질소로 용매를 완전히 제거한 후 hexane 1 mL을 가하여 용해시켜서 0.50 μ m filter로 여과한 후 GC vial에 옮겨 phytosterol 중에서 β -sitosterol, stigmasterol, campesterol를 분리 및 검출하였다. 기기 분석은 gas chromatography (GC, younglin M600D, Korea)를 사용하여 분석하였고, 이 때 사용한 칼럼은 HP ultra-2 Crosslinked 5% PH ME siloxane (25 m \times 0.25 mm \times 0.33 μ m)를 사용하였으며, 칼럼온도는 285°C, 주입온도와 검출기 온도는 300°C로 하였다. 운반가스는 N₂를 사용하였고 시료는 2 μ L 주입하였으며, 각 시료 당 총 분석시간은 40 min이었다. 표준시료(standard)는 70% β -sitosterol과 5 α -cholestane 용액을 이용하여 RF 값을 계산하여 정량하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 인삼종자 중의 지방산 조성

인삼종자의 볶음처리 및 압착, 용매 및 초임계 추출방법에 의한 오일의 지방산 조성 및 함량을 살펴 본 결과는 표 14와 같다. 전반적으로 인삼종자의 볶음처리와 압착추출, 용매추출 그리고 초임계 추출에 의한 인삼종자의 오일 추출 방법에 따른 지방산 조성의 차이는 크게 없었다. 그리고 지방산 중 불포화지방산 함량이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 즉 인삼종자 오일은 불포화지방산을 95% 이상 함유하고 있었고 oleic acid(C18:1)를 약 80%, linolenic acid(C18:2)를 약 16%, palmitic acid(C16:0)를 약 2%, 그리고 일부 palmitoleic acid(C16:1), stearic acid(C18:0), linoleic acid(C18:3), gadoleic acid(C20:1)를 함유하고 있었다. Walnut, pistachio, hazel nut, cashew nut, ginkgo, pecan 등의 견과류 및 해바라기 씨, 호박씨 등의 지방산 함량을 살펴본 논문에서 hazel nut의 oleic acid 함량이 82% 그리고 총 불포화지방산 함량이 91%로 보고하였는데 이러한 결과는 인삼종자 오일의 지방산 조성 측정 결과와 매우 유사하였다. 그리고 인삼종자의 oleic acid 함량은 식용유로 주로 많이 사용되는 콩기름, 참기름 (23.5%, 45.3%)과 비교하여 두 배 이상 높은 것으로 나타났다.

표 14. 인삼종자 오일의 지방산 조성 및 함량

Fatty acid (g/100g)		Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid	Gadoleic acid	Unknown	Total
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	-	
compress extraction	control	1.9	0.3	0.3	80.0	16.1	0.1	0.1	0.2	100.0
	200℃/10min	2.0	0.3	0.3	79.8	16.2	0.1	0.1	1.2	100.0
	200℃/20min	2.0	0.3	0.3	79.8	16.2	0.1	0.1	1.2	100.0
	200℃/30min	2.1	0.3	0.3	79.3	16.6	0.1	0.1	1.2	100.0
solvent extraction	control	1.9	0.3	0.3	79.9	16.2	0.1	0.1	1.2	100.0
	200℃/10min	2.0	0.3	0.3	79.7	16.3	0.1	0.1	1.2	100.0
	200℃/20min	2.0	0.3	0.3	79.7	16.3	0.1	0.1	1.2	100.0
	200℃/30min	2.0	0.2	0.3	79.7	16.3	0.1	0.1	1.2	100.0
supercritical fluid extraction	150bar/35℃	2.5	0.3	0.3	79.1	16.4	0.1	0.1	1.2	100.0
	150bar/65℃	2.9	0.3	0.4	79.1	15.9	0.1	0.1	1.2	100.0
	500bar/35℃	1.9	0.3	0.3	79.6	16.5	0.1	0.1	1.2	100.0
	500bar/65℃	1.9	0.3	0.3	79.8	16.3	0.1	0.1	1.2	100.0

(2) 인삼종자 오일의 식물성스테롤(phytosterol) 분석

보통 식물성 유지는 phytosterol 및 tocopherol 류도 다량 함유하고 있는데, tocopherol은 생체 내에서 노화현상과 관련이 많은 과산화지질의 생성을 억제하는 항산화 효과를 나타내어 영양학적으로 볼 때 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 phytosterol은 과일, 채소, 견과류, 곡류, 옥수수, 두과작물 등 식물계에 널리 함유되어 있으며, 종실의 호분층, 배유, 과피 층에 함유되어 있다고 알려져 있다. 지금까지 알려진 phytosterol은 약 250여 종인데 영양학, 기능성 측면에서는 4-desmethyl sterol인 campesterol, β -sitosterol, stigmasterol, campestanol 및 β -sitostanol과 같은 5종의 phytosterol이 주요 관심대상으로 알려져 있다.

인삼종자의 볶음처리 및 압착, 용매 및 초임계 추출방법에 의한 오일 중의 phytosterol 성분 중 대표적인 stigmasterol, β -sitosterol, sitostanol, campesterol의 함량을 분석한 결과는 표 15~17과 같다. 인삼종자 오일의 phytosterol 함량 분석결과 압착추출 오일은 273.0~296.4

mg/100g, 용매추출한 오일은 411.4~441.5 mg/100g, 그리고 초임계 추출한 오일의 phytosterol 함량은 667.9~746.1 mg/100g 으로 초임계 추출한 오일의 phytosterol 함량이 압착추출과 용매추출 오일의 phytosterol 함량과 비교하여 가장 높게 나타났다. 분석 결과 추출방법에 따라서 phytosterol의 함량차이가 크게 나타난 것을 확인하였고, 특히 초임계 추출방법으로 추출한 오일의 함량이 크게 증가한 것을 확인하였다. 이는 초임계 유체 이산화탄소의 경우 비극성 물질을 잘 용해하는 특성을 가지고 있기 때문에 다른 추출방법으로 추출한 오일보다 phytosterol 함량이 높게 나온 것으로 사료된다. 특히 초임계 추출 조건 중 150 bar의 압력 조건에서 phytosterol 함량이 가장 높게 나타났는데 초임계 유체 추출한 오일 중 150 bar, 65°C에서 추출한 오일의 phytosterol 함량이 746.1 mg/100g 으로 가장 높게 나타났다. 일반적으로 식물 유지의 phytosterol 조성은 β -sitosterol이 40~60%로 조성비가 가장 높고 campesterol 10~30%, stigmasterol 10~20%, 그리고 Δ^5 -avenastanol이 약 5%에 달한다는 보고가 있는데, 인삼종자 오일의 경우에도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

표 15. 압착추출 인삼종자 오일의 식물성스테롤 조성 및 함량

Phytosterol (mg/100g)	Compress extraction			
	Control	200°C, 10min	200°C, 20min	200°C, 30min
campesterol	42.7	43.1	48.3	45.6
stigmasterol	43.8	44.5	49.2	47.4
β -sitosterol	45.3	46.5	48.1	47.6
sitostanol	141.2	145.4	150.8	148.3
Total	273.0	279.5	296.4	288.9

표 16. 용매(n-hexane)추출 인삼종자 오일의 식물성스테롤 조성 및 함량

Phytosterol (mg/100g)	Solvent extraction(n-hexane)			
	Control	200°C, 10min	200°C, 20min	200°C, 30min
campesterol	56.1	63.4	57.1	65.1
stigmasterol	55.3	61.8	58.4	62.2
β -sitosterol	148.1	151.7	149.8	153.9
sitostanol	151.9	155.2	152.1	160.3
Total	411.4	432.1	417.4	441.5

표 17. 초임계추출 인삼종자 오일의 식물성스테롤 조성 및 함량

Phytosterol (mg/100g)	Supercritical fluid extraction			
	150bar, 35℃	150bar, 65℃	500bar, 35℃	500bar, 65℃
campesterol	103.2	105.6	80.4	85.1
stigmasterol	111.7	116.8	93.3	95.2
β-sitosterol	291.3	295.2	283.5	285.0
sitostanol	220.9	228.5	210.7	215.4
Total	727.1	746.1	667.9	680.7

3. 인삼종자 오일의 저장성 평가

인삼종자 오일의 저장 중 품질 유지 정도를 살펴보기 위하여 산가와 과산화물가를 측정하였다. 압착추출, 용매추출, 초임계 추출 시료를 60℃의 항온기에서 저장하면서 7일 간격으로 시료를 채취하여 저장기간 중 유지의 품질변화를 살펴보았다. 이때 대조구는 콩기름을 사용하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 산가(acid value) 측정

산가는 유지의 보존, 가열 등에 의하여 변하는 변수로서 유지 및 유지를 함유한 식품의 품질판정에 필요한 항수이며, 특히 유지의 산패 정도를 나타내는 기준이 되는 값이다. 정제된 식용유에서의 산가는 대체로 1.0 이하이다.

산가 측정은 시료 5 g을 250 mL 삼각플라스크에 취한 후 ether:ethanol=1:1 용액 100 mL을 가하여 유지를 녹여주고 1% phenolphthalein 지시약(in ethanol)을 2~3방울 첨가한 후 0.1N KOH·ethanol 용액으로 적정하였다. 이때 무색이 미홍색이 될 때를 종말점으로 하였고, 아래의 식으로 산가를 계산하였다.

$$\text{산가} = \frac{(V_1 - V_0) \times 5.611 \times F}{S}$$

(2) 과산화물가(peroxide value) 측정

과산화물가는 유지의 초기단계에 있어서 산패정도를 나타내는 척도가 되며 이 값이 높을수록 유지의 산패가 진행된 것으로 식품으로서 부적당한 것이다. 과산화물은 유지의 산화가 진행됨에 따라 증가하다가 carbonyl 화합물로 분해되어 결국에 가서는 감소되는 특징이 있다. 과산

화물가는 일반적으로 ICU(international chemical union)법에 따라 요오드적정법에 의해 측정한다. 식물성 유지의 경우에는 과산화물가가 60~100 meq/kg, 동물성 유지의 경우에는 20~40 meq/kg에 도달하는 시기를 산패발생 시기로 본다.

과산화물가 측정은 시료 1 g을 250 mL 삼각플라스크에 취하고 chloroform : acetic acid=10:15 용액 1 mL을 가하여 유지를 녹여주었다. 여기에 KI 포화용액 1 mL을 가하여 1분간 심하게 진탕해주고 5분간 암소에서 반응시켰다. 반응 시킨 후 30 mL 증류수를 가하여 반응을 정지시키고 1% starch 용액 1 mL을 가한 후 0.01N-Na₂S₂O₃ 용액을 사용하여 적정하였다. 이때 청남색이 무색이 될 때를 종말점으로 하였고, 아래의 식으로 과산화물가를 계산하였다.

$$\text{과산화물가(meq/kg)} = \frac{(V_1 - V_0) \times F \times 0.01}{S} \times 1000$$

나. 결과 및 고찰

(1) 산가

산가는 유지의 고유의 특성은 아니며 유지분자들의 가수분해에 의해서 형성된 유리 지방산 함량의 척도이다. 따라서 정제되지 않거나 정제상태가 불량한 유지나 오래 사용되거나 저장된 유지에서 높으며, 정제가 잘 된 유지에서는 낮기 때문에 이 산가는 유지의 품질 또는 유지의 내력을 표시하여 주는 중요한 척도가 된다.

산가는 유리지방산가(free fatty acid value) 라고도 불리며, 1 g의 유지 중에 존재하는 유리 지방산을 중화하는데 필요한 KOH의 밀리그램수로 표시된다.

(가) 압착추출 오일

압착추출 한 오일의 저장 중 산가를 측정한 결과는 표 18, 그림 6과 같다. 저장 초기의 산가가 2 이상으로 높게 나타났지만 저장 기간 중 산가의 변화는 크게 나타나지 않는 것으로 나타났다. 가장 높은 수치를 보인 처리구는 볶음처리하지 않고 압착하여 얻은 오일로 초기 2.6에서 저장 28일째 2.8로 저장기간 내내 높은 수치를 보였다. 볶음처리한 오일의 경우에는 볶음처리 시간에 따른 차이없이 유사한 결과를 보여주었다.

표 18. 압착추출 오일의 저장 중 산가변화

		저장기간 (일)				
		0	7	14	21	28
대두유(Control)		0.140	0.560	0.550	0.548	0.503
압착추출	Control ¹⁾	2.641	2.788	2.792	2.760	2.787
	200℃, 10분	2.381	2.229	2.231	2.201	2.392
	200℃, 20분	2.380	2.235	2.233	2.233	2.390
	200℃, 30분	2.237	2.194	2.229	2.202	1.941

¹⁾ 볶음처리 하지 않은 시료

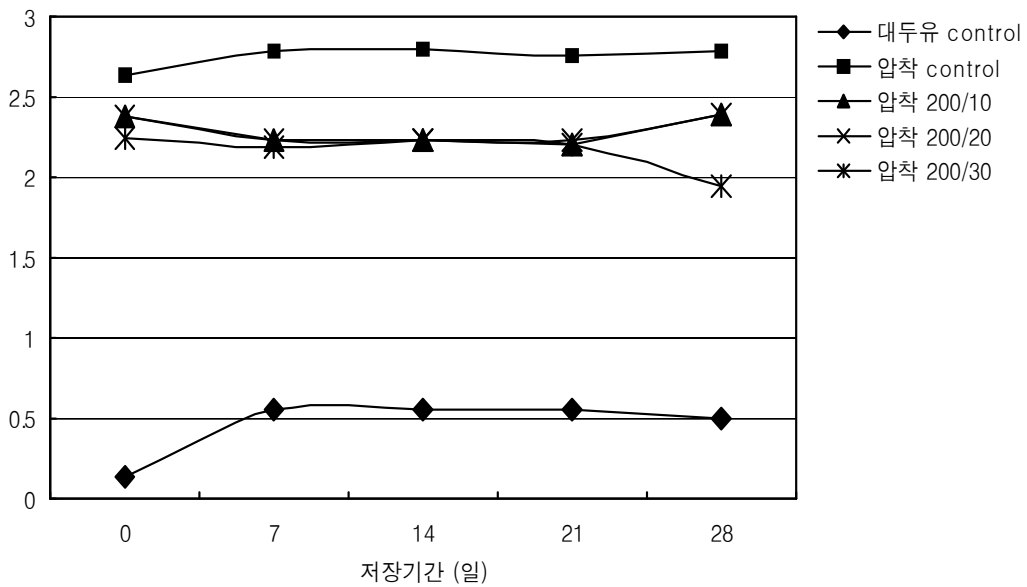


그림 6. 압착추출 오일의 저장 중 산가변화.

(나) 용매(n-hexane) 추출 오일

용매(n-hexane)추출 한 오일의 저장 중 산가를 측정 한 결과는 표 19, 그림 7과 같다. 저장 초기의 산가는 압착추출 오일의 산가와 비슷하게 나타났고 볶음처리 안한 시료와 볶음 처리한 시료 모두 저장기간에 따른 변화는 크게 나타나지 않았지만 200℃, 20분 볶음처리 후 추출한 오일의 산가변화가 가장 적게 나타났다.

표 19. 용매추출 오일의 저장 중 산가변화

		저장기간 (일)				
		0	7	14	21	28
대두유(Control)		0.140	0.560	0.550	0.548	0.503
용매추출	Control ¹⁾	2.100	2.227	2.200	2.168	2.204
	200℃, 10분	2.095	2.239	2.233	2.172	2.206
	200℃, 20분	1.957	2.154	2.231	2.112	1.979
	200℃, 30분	2.242	2.138	2.187	2.181	2.185

¹⁾ 볶음처리 하지 않은 시료

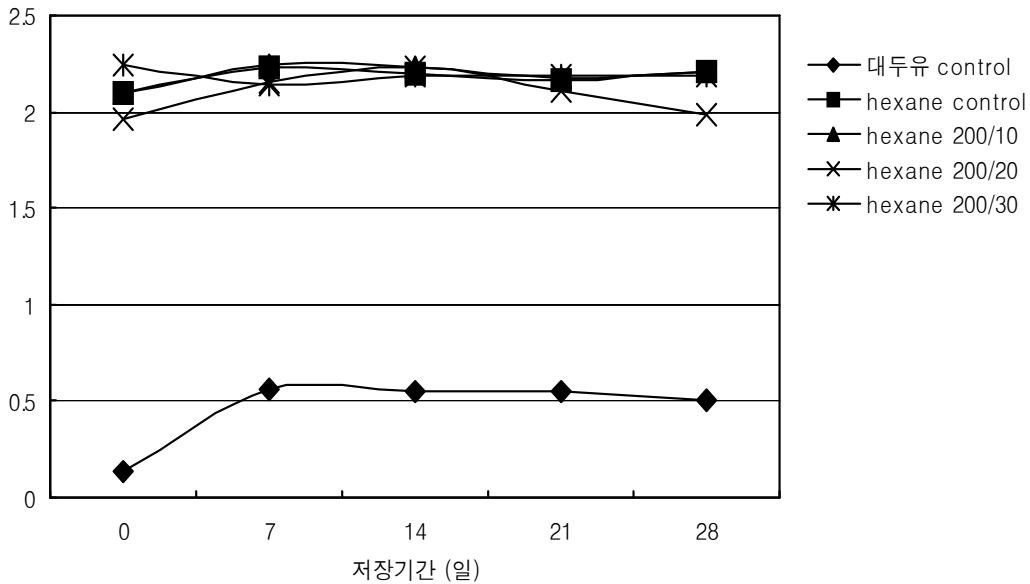


그림 7. 용매추출 오일의 저장 중 산가변화.

(다) 초임계 추출 오일

초임계추출 한 오일의 저장 중 산가를 측정 한 결과는 표 20, 그림 8과 같다. 초임계 추출한 오일은 압착추출 오일과 용매추출오일과 비교하여 초기 산가가 높게 나타났다. 또한 추출압력에 따라서 비슷한 결과를 보였는데 150 bar 압력에서 추출한 오일은 초기 산가가 2.5 정도로 나타났는데, 60℃에서 7일간 경과 후 25~28 정도로 산패정도가 심하게 나타났고, 7일 이후로는 큰 변화없이 유지되는 경향을 보였다. 반면 500 bar의 추출압력에서는 초기 산가가 8정도로 150 bar의 압력에서 추출한 오일보다 높게 나타났지만 저장 중에는 큰 변화 없이 안정적인 것으로 나타났다. 결과에 나타난 것과 같이 초임계 추출 오일은 추출 온도에 따른 차이는 보이지 않고 추출 압력에 따라서 유지의 저장 안정성이 차이를 나타나는 것으로 사료되었다.

표 20. 초임계추출 오일의 저장 중 산가변화

		저장기간 (일)				
		0	7	14	21	28
대두유(Control)		0.140	0.560	0.550	0.548	0.503
초임계 추출	150bar, 35°C	2.501	25.359	25.751	27.351	27.396
	150bar, 65°C	2.787	28.511	28.581	29.284	28.127
	500bar, 35°C	8.424	8.370	8.176	7.992	9.112
	500bar, 65°C	8.238	8.748	8.637	8.656	7.328

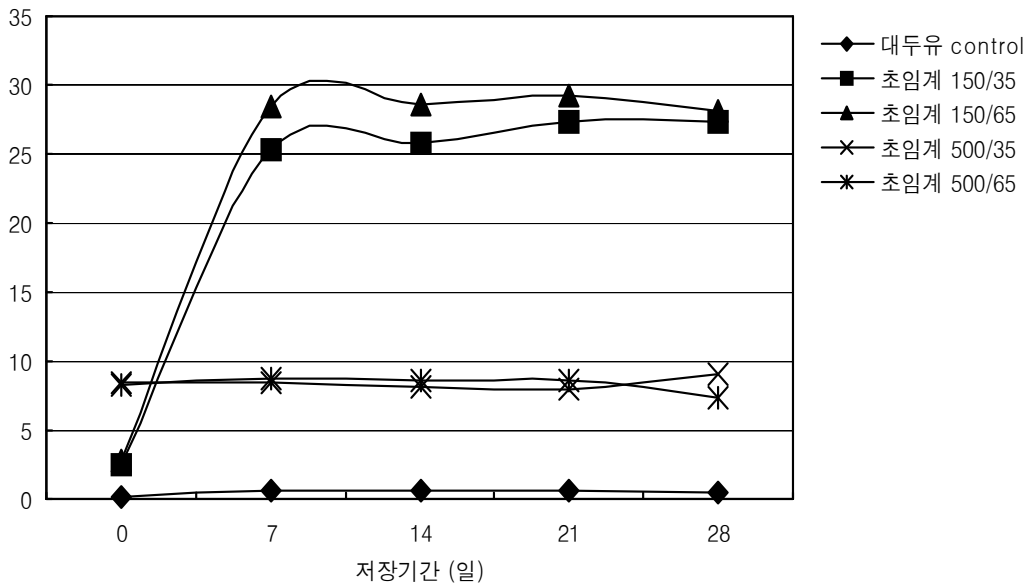


그림 8. 초임계추출 오일의 저장 중 산가변화.

(2) 과산화물가

일반적으로 식용유지나 지방질 식품에서 산패가 일어나는 시기는 산소흡수속도가 급격하게 증가하는 시기이며, 이 시기는 hydroperoxides의 생성속도가 증가하는 시기, 또는 carbonyl compound의 생성속도가 급증하는 시기와 대략 일치된다. 따라서 산패가 발생하는 시기는 관능 검사들에 의해서 유지의 실제적인 산패를 알아내는 주관적인 방법 이외에도 산소의 흡수속도, hydroperoxides의 생성량, carbonyl compound의 생성량을 수시로 측정함으로써 추정할 수 있다.

식용유지나 지방질 식품들 속의 유지성분의 산패가 발생할 때까지의 시기, 즉 유통기간은 실온에서는 수개월에 달하는 것이 보통이므로, 대개는 실온보다는 높은 온도에 저장하거나, 공

기나 산소를 일정한 속도로 주입하거나, 광선을 조사하여 자동산화과정을 촉진시켜 줌으로써 단축된 유도기간을 측정한다.

본 실험에서는 화학적 측정방법 중 대표적인 과산화물가 측정법을 이용하여 인삼종자 오일의 산패 정도를 확인하고자 하였다. 과산화물가는 유지 1 kg에 함유된 과산화물(peroxides)의 밀리몰수(mM), 또는 밀리당량(meq)으로써 표시된다.

(가) 압착추출 오일

압착추출 한 오일의 저장 중 과산화물가를 측정한 결과는 표 21, 그림 9와 같다. 그림에 나타난 것과 같이 저장기간이 경과함에 따라 과산화물가는 증가하는 것으로 나타났다. 볶음처리를 하지 않은 압착 오일은 초기 과산화물가가 2.0 meq/kg 으로 가장 높게 나타났고 볶음처리 후 압착한 오일은 대조구로 사용한 콩기름의 과산화물가와 유사한 0.9 meq/kg 이었다. 저장 중 볶음처리하지 않은 오일의 과산화물가는 증가폭이 가장 크게 나타나 저장 28일 경과 후에는 21.2 meq/kg으로 가장 높은 수치를 보였다. 10분, 20분, 30분 볶음처리 후 압착한 오일의 경우 저장 중 증가폭이 큰 차이없이 유사하게 나타났고, 10분, 30분 볶음처리한 오일보다 20분 볶음처리한 오일의 저장 중 과산화물가가 낮게 나타나 다른 처리구와 비교하여 과산화물의 생성량이 적어 안정적인 것으로 사료되었다. 특히 20분 볶음처리한 오일의 경우 저장 28일째 과산화물가가 9.4 meq/kg 으로 대조구로 사용한 콩기름의 과산화물가(10.3 meq/kg) 보다도 낮은 과산화물가를 보였다.

표 21. 압착추출 오일의 저장 중 과산화물가 변화

		저장기간 (일)				
		0	7	14	21	28
대두유(Control)		0.981	1.961	7.963	9.947	10.313
압착추출	Control ¹⁾	1.996	3.975	7.919	15.707	21.262
	200℃, 10분	0.958	3.999	3.918	8.879	14.120
	200℃, 20분	0.961	3.947	3.943	4.982	9.389
	200℃, 30분	0.957	3.865	3.979	7.684	12.503

¹⁾ 볶음처리 하지 않은 시료

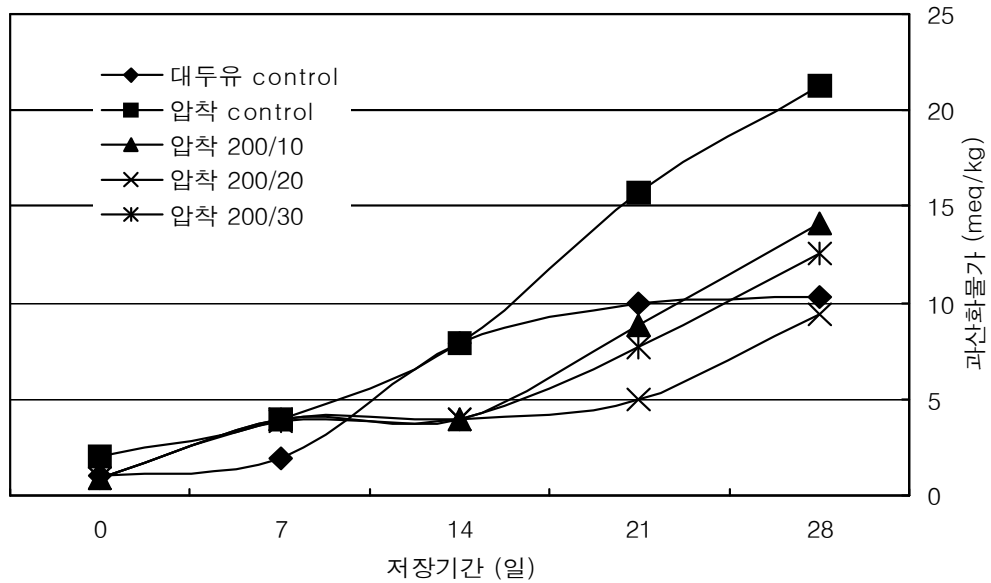


그림 9. 압착추출 오일의 저장 중 과산화물가 변화.

(나) 용매(n-hexane) 추출 오일

압착추출 한 오일의 저장 중 과산화물가를 측정된 결과는 표 22, 그림 10과 같다. 용매추출 한 오일은 추출 전처리에 따라서 저장 중 과산화물가의 차이를 보였다. 추출 전 볶음처리를 하지 않은 오일과 10분간 볶음처리한 오일의 과산화물가가 20분과 30분 볶음처리 후 용매추출한 오일의 과산화물가 값보다 증가폭이 크게 나타나 안정성이 떨어지고 산패 진행이 빠른 것으로 나타났다. 용매추출 시료는 모든 처리구가 대조구인 콩기름의 과산화물가보다 높게 나타났지만 20분 볶음처리한 오일의 저장 28일째 과산화물가 값이 20.0 meq/kg으로 다른 처리구와 비교하여 낮은 것으로 나타나 압착추출한 오일과 비슷한 경향을 보였다. 또한 압착추출 오일과 비교하여 저장기간 중 용매추출한 오일의 과산화물가 증가폭이 더 크게 나타나 추출방법에 따라서 저장 안정성에 차이가 있는 것으로 사료되었다.

표 22. 용매추출 오일의 저장 중 과산화물가 변화

		저장기간 (일)				
		0	7	14	21	28
대두유(Control)		0.981	1.961	7.963	9.947	10.313
용매추출	Control ¹⁾	4.935	4.924	15.016	22.863	29.465
	200℃, 10분	2.925	2.953	12.788	23.060	30.193
	200℃, 20분	1.934	2.991	7.985	14.519	20.002
	200℃, 30분	1.984	4.007	8.818	15.633	23.768

¹⁾ 볶음처리 하지 않은 시료

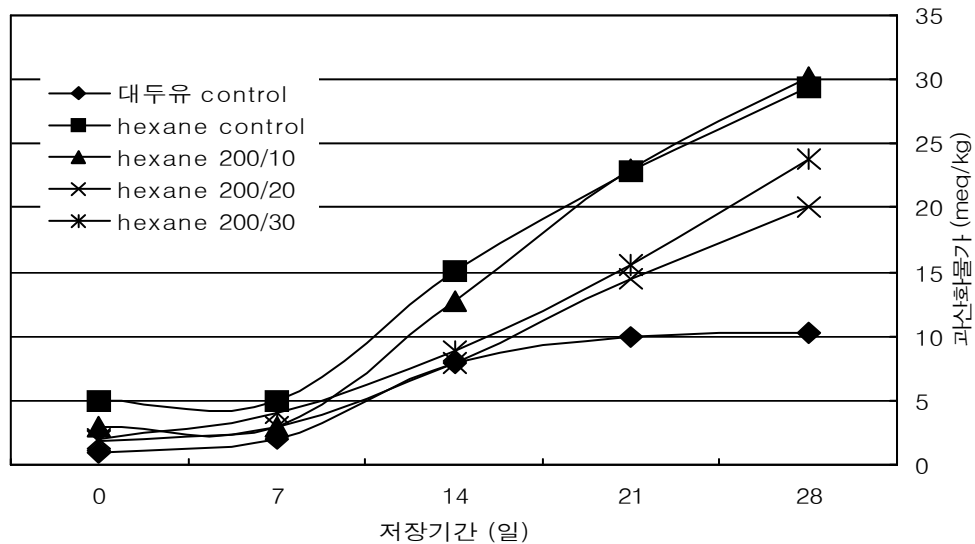


그림 10. 용매추출 오일의 저장 중 과산화물가 변화.

(다) 초임계 추출 오일

압착추출 한 오일의 저장 중 과산화물가를 측정 한 결과는 표 23, 그림 11과 같다. 초임계 추출한 오일의 초기 과산화물가는 압착추출과 용매추출한 오일의 과산화물가보다 높게 나타났다. 오일의 저장 중 150 bar 압력에서 추출한 오일의 과산화물가가 500 bar 압력에서 추출한 오일보다 더 높게 나타났지만 처리구간 큰 차이는 보이지 않았다. 500 bar 압력에서 추출한 오일의 경우 35℃와 65℃ 두 처리구 모두 저장 14일째가 되면서 각각 13.7 meq/kg, 14.6 meq/kg 으로 큰 폭으로 증가하였고, 추출온도가 높을수록 안정성이 떨어져 과산화물가가 높게 나타났다. 초임계 추출한 오일의 저장 중 과산화물가는 동일 압력 조건에서 추출온도가 높은 오일의 과산화물가가 더 높은 것으로 나타나, 이는 산가의 결과 비슷한 경향을 보였다.

표 23. 초임계 추출 오일의 저장 중 과산화물가 변화

		저장기간 (일)				
		0	7	14	21	28
대두유(Control)		0.981	1.961	7.963	9.947	10.313
초임계 추출	150bar, 35°C	6.011	10.935	14.476	18.493	21.998
	150bar, 65°C	7.597	11.043	16.986	19.954	23.059
	500bar, 35°C	3.786	7.889	13.752	15.335	17.907
	500bar, 65°C	4.847	7.779	14.630	16.955	19.457

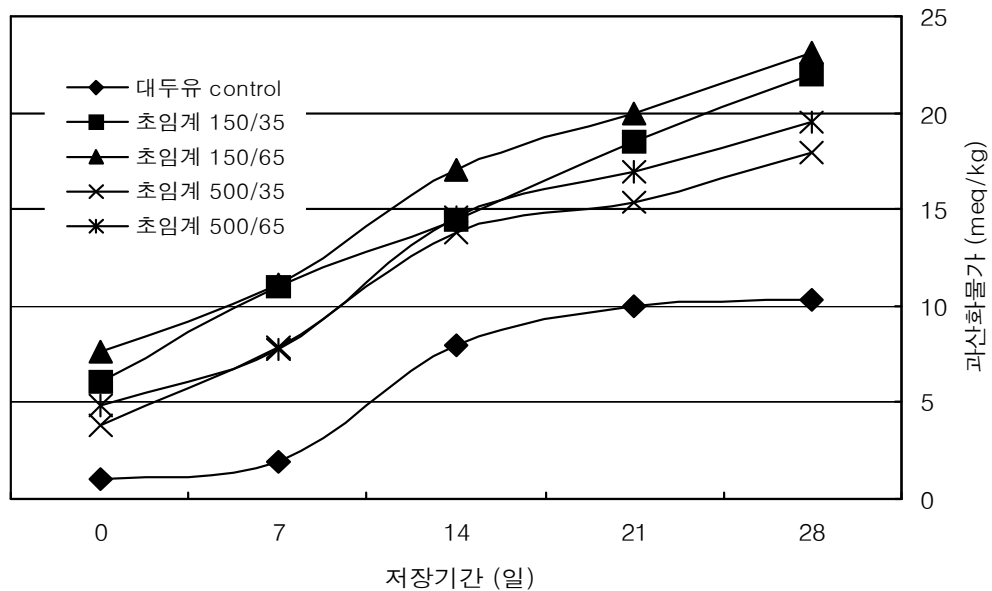


그림 11. 초임계추출 오일의 저장 중 과산화물가 변화.

(3) 종합적 고찰

인삼종자 오일의 60°C에서 28일간 저장 중 산가는 압착추출, 용매추출한 오일에서 큰 변화를 보이지 않았지만, 초임계 추출 오일 중 500 bar 추출 오일의 산가가 저장 7일째 크게 증가한 후 이후에는 비슷하게 유지하였다. 산가는 유지의 품질 및 내력을 표시하는 척도가 되는 방법으로 오일의 정제유무가 나타나기 때문에 실험에 사용한 압착추출, 용매추출, 초임계 추출 시료에 정제과정을 추가할 경우 더 높은 품질의 유지를 얻을 것으로 사료되었다.

과산화물가의 경우 200°C에서 20분 볶음처리 후 압착추출한 오일의 저장 중 과산화물가가 대조구인 콩기름보다도 적게 나타났다. 전반적으로 압착추출한 오일의 저장 중 과산화물가가 가장 적게 나타나 저장 안정성이 높은 것으로 나타났다. 용매추출 오일과 초임계 추출오일의 저장성은 유사하게 나타났는데 초임계 추출 오일 중 150 bar, 65°C 추출 오일의 저장 28일째

과산화물 생성이 80 meq/kg으로 식물성유지의 산패 기준인 60~100 meq/kg을 넘어가 저장 안정성이 낮았다. 본 실험은 가속된 저장수명 측정법으로 60℃에서 유지를 저장하여 실험한 결과이므로 인삼종자 유지의 저장성은 더 안정적인 것으로 판단되며, 유지의 산패에 영향을 주는 요인인 온도, 광선 및 산소를 차단하여 자동산화과정을 억제시킨다면 유지의 저장성은 더 크게 연장될 것으로 사료된다.

제 3 절 인삼종자 추출방법에 따른 생리활성 변화

1. 인삼종자 오일의 항산화 효능평가

가. 재료 및 방법

(1) ABTS radical 소거효과 측정

인삼씨 시료의 항산화 관련 효과를 검정하기 위하여 ABTS radical scavenging ability를 Pellegrini 의 방법을 이용하여 측정하였다. 0.1 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)에 2.5 mM ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Wako. Ltd.)와 1.0 mM AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, Wako. Ltd.)를 혼합하여 68°C, 암소에서 12 분간 반응시키고 재빨리 냉각시켜 ABTS⁺ 용액을 만든다. 0.1 M PBS에 녹인 각각의 농도의 인삼씨 추출물 20 µL에 ABTS⁺ 용액 980 µL을 가하여 37°C water bath에서 10 분간 반응시킨 후 734 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich. Inc.)를 사용하였으며 시료 첨가구와 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군의 흡광도를 측정하여 백분율로 나타내었다.

나. 결과 및 고찰

(가) ABTS radical 소거효과 측정

인삼종자 오일의 ABTS radical 소거효과 측정 결과는 그림 12와 같다. 측정결과 인삼씨 압착, hexane, 초임계추출물은 뚜렷한 ABTS 라디칼 소거 효과를 나타내지 않았다.

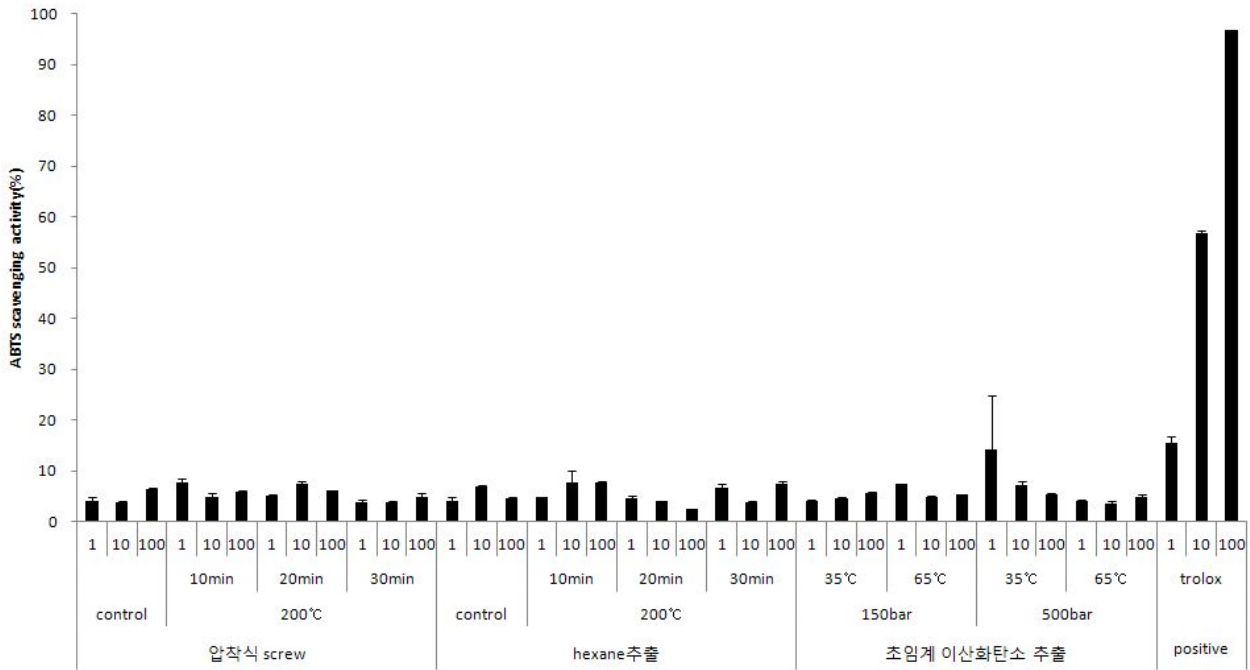


그림 12. 인삼종자 시료의 ABTS radical 소거활성.

2. Melanocytes에서의 세포독성 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향 검정

가. 재료 및 방법

(1) Tyrosinase 활성 억제 효과

멜라닌의 생합성은 tyrosine의 산화로 시작되어 L-dopa, dopaquinone 및 dopachrome가 생성된 후 dihydroxyindole이나 dihydroxyindole-2-carboxylic acid가 생성되는 과정을 거쳐 진행되며 초기의 tyrosine으로부터 dopaquinone의 생성까지는 tyrosinase가 큰 역할을 한다. 이러한 tyrosinase 활성억제도를 8.0 mM L-dopa (67 mM phosphate buffer, pH 6.8 에 녹임) 120 μ L 와 메탄올에 녹인 여러 농도의 인삼씨 추출물시료 40 μ L를 96-well microplate에 넣고 mushroom tyrosinase (125 U/mL) 40 μ L을 가한 후 생성된 dopachrome의 양을 492 nm 에서의 흡수도를 측정하여 검정하였다.

(2) 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향

인체의 피부는 표피와 진피, 피하조직의 세 개 층으로 구성되어 있으며 이중 가장 바깥에 위치한 표피의 하부인 기저층에 피부색소인 멜라닌을 생성시키는 melanocytes가 존재한다. 피부의 색은 주로 melanin에 의하여 결정되며 melanin의 생성은 멜라닌 생성세포의 melanosome에서 이루어진다. 제조된 각각의 인삼씨 시료가 mouse 유래의 멜라닌 생성 세포인 melan-a 세포주에서 세포의 생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하기 위해 10% fetal bovine

serum 과 1% penicillin-streptomycin, 200 nM의 phorbol-12 myristate 13-acetate 가 함유된 RPMI 1640 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 EtOH:H₂O = 6:4 용액에 녹인 각각의 인삼씨 추출물 시료를 1 ug/mL, 10 ug/mL, 100 ug/mL의 농도로 3 일간 처리하였다. 세포 생존률은 배지 제거 후 PBS로 washing하고 well 당 crystal violet (CV 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS)를 200 µL 첨가하여 5 분간 상온에서 incubation한 후 EtOH 1 mL를 첨가하고 상온에서 10 분간 shaking한 후 590 nm에서 UV 흡수도를 측정하여 결정하였다. 또한 멜라닌 생성량은 배지 제거 후 PBS로 세척하고 well 당 1 N NaOH 1 mL를 가하여 멜라닌을 녹인 후 400 nm에서 UV 흡수도를 측정하여 결정하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) Tyrosinase 활성 억제 효과

각 인삼씨 추출물 시료의 tyrosinase 억제도 측정 결과는 그림 13과 같다. 측정결과 인삼씨 압착, hexane, 초임계추출물 시료는 뚜렷한 tyrosinase 억제효과를 나타내지 않았다.

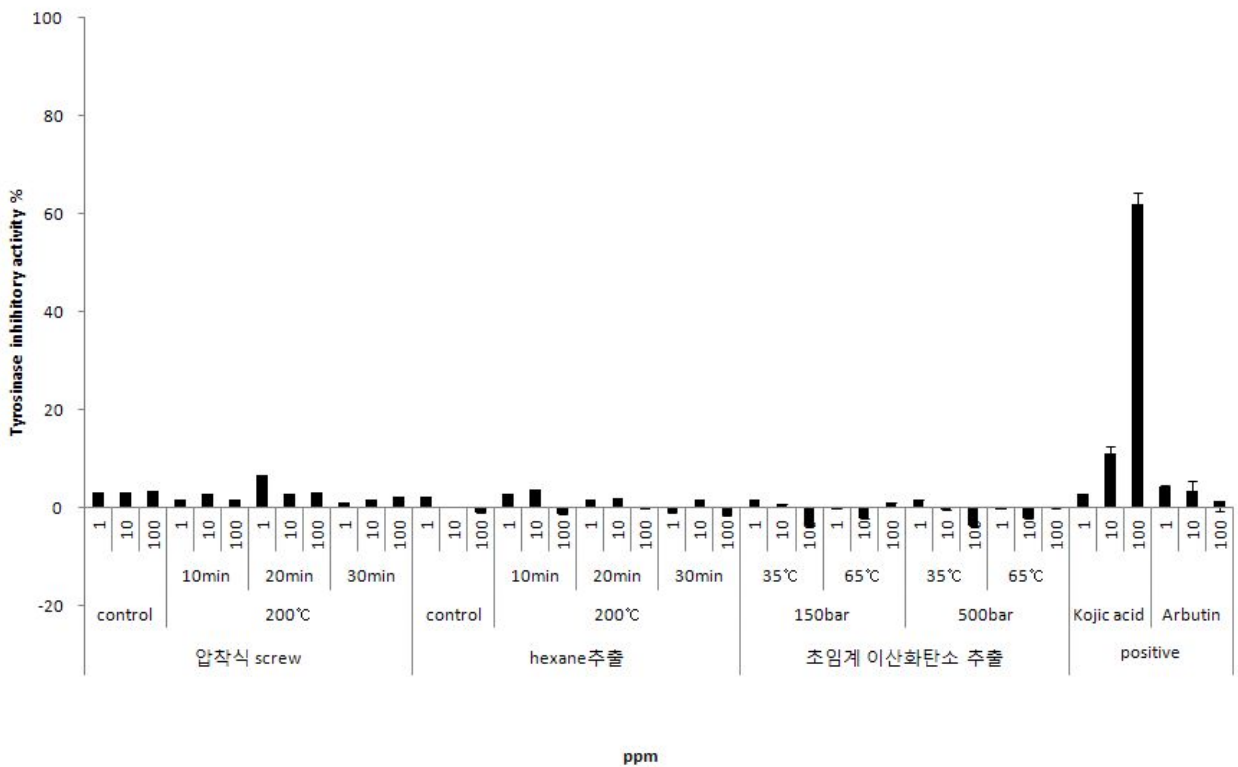


그림 13. 인삼종자 시료의 tyrosinase 억제 활성.

(2) 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향

추출방법에 따른 활성증진 여부를 확인하기 위하여 압착 추출물, hexane 추출물, 초임계 이산화탄소 추출물에 대한 멜라닌 생성억제 효과를 측정된 결과는 그림 14, 15와 같다. 인삼씨 초임계 추출물(150 bar, 65°C)은 100 ppm 농도에서 큰 세포독성을 나타내지 않으면서 멜라닌 생성량을 37% 이상 감소시켜 현재 사용하고 있는 미백 물질인 kojic acid나 알부틴보다 동일 농도에서 우수한 활성을 나타내었다.

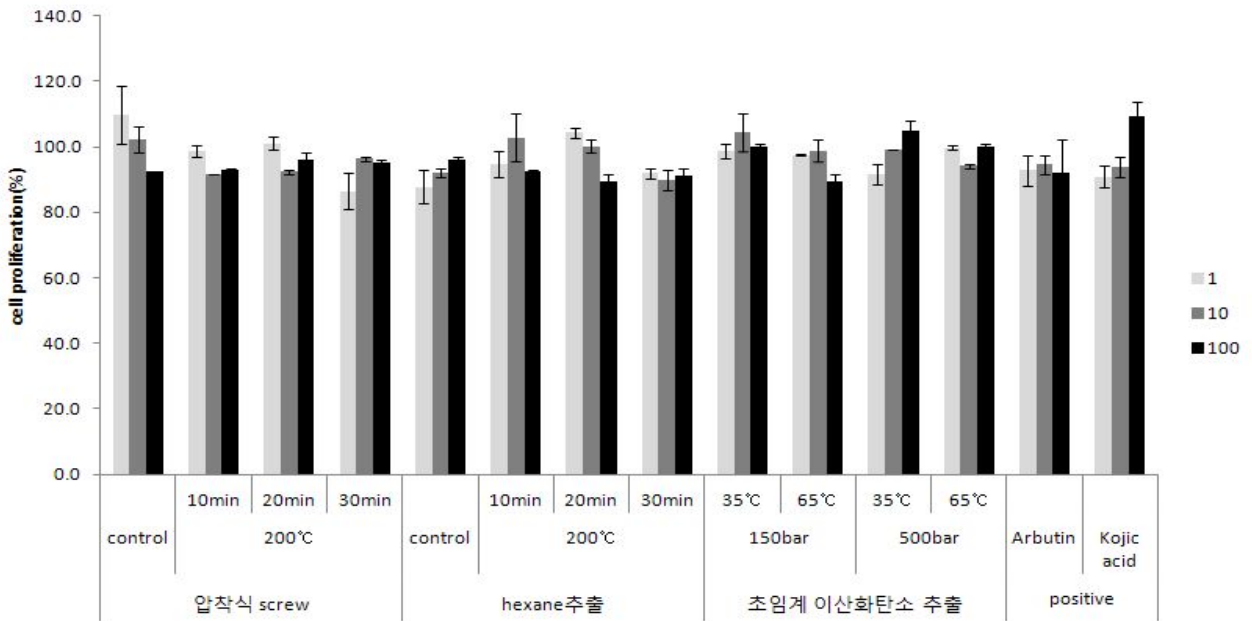


그림 14. Melan-a 세포생존율에 미치는 영향.

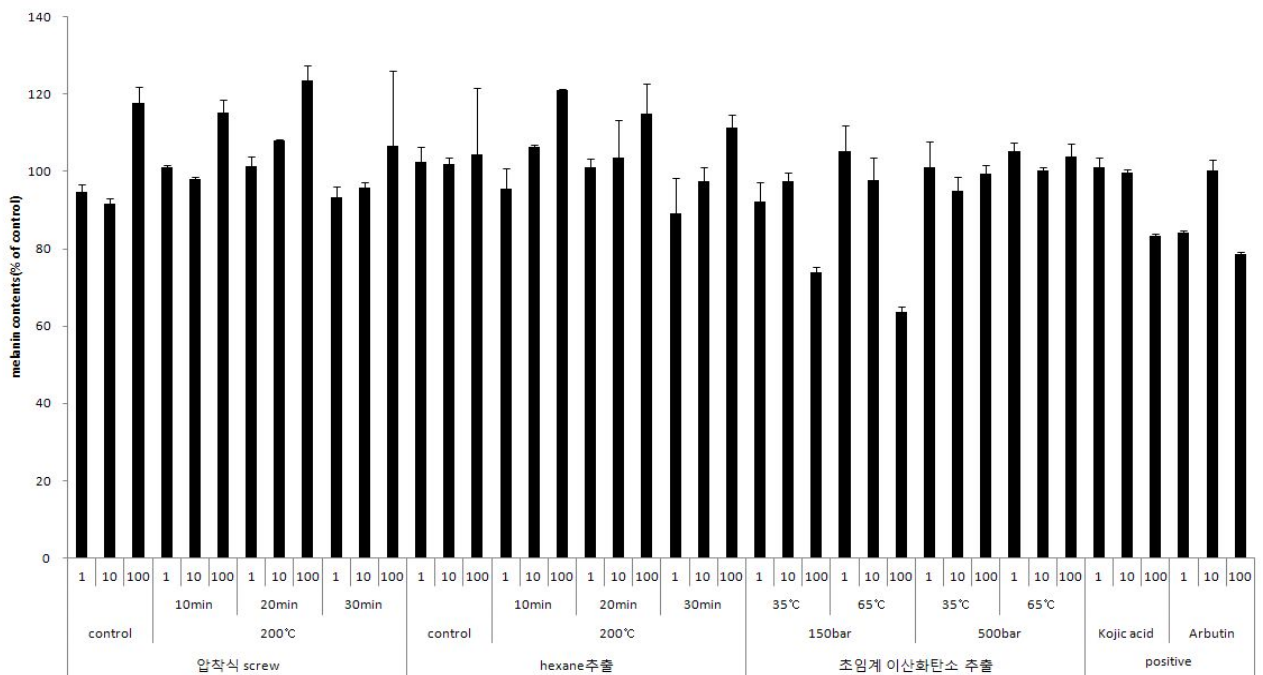


그림 15. Melan-a 세포에서 인삼종자 시료의 멜라닌 생성억제도.

(3) 종합적 고찰

인삼씨 압착 추출물, hexane 추출물, 초임계 이산화탄소 추출물은 뚜렷한 라디칼 제거효과를 나타내지 않았으며 tyrosinase 억제효과 또한 크지 않았다. 그러나 인삼씨 초임계 추출물은 멜라닌 생성세포에서 세포독성 없이 멜라닌 생성량을 크게 감소시켰으며 따라서 인삼씨의 멜라닌 생성억제 효과에는 tyrosinase 활성억제 이외의 다른 세포내 작용조절 기전이 있는 것으로 판단되었다. 본 연구팀은 이러한 세포내 미백활성기전을 밝히기 위한 연구를 진행 중에 있다.

제 4 절 인삼종자의 식물성스테롤 분리, 정제 및 구조동정

인삼종자의 추출물 중의 유용한 식물성스테롤 성분을 살펴보기 위하여 성분분리 분석을 실시하였다. 그리고 식물성스테롤의 분석 및 확인은 용매추출 시료를 high performance liquid chromatography (HPLC)와 gas chromatography mass spectrometry (GC/MS)를 사용하여 측정하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 재료 및 시약

(가) 식물재료

실험에 사용한 인삼종자는 충남 금산 인삼시장에서 2011년 생산된 4년근 인삼종자를 구입하여 사용하였다.

(나) 시약 및 기기

본 연구에 사용한 용매는 *n*-hexane, chloroform (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), ethanol (EtOH) (SamChun Pure Chemical Company, Pyeongtaek, Republic of Korea)을 사용하였으며, HPLC 용매로는 acetonitrile (ACN)과 methanol (MeOH, J.T.Baker, Center Valley, PA, USA.)를 사용하였다.

분석용 HPLC는 Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA)가 장착된 Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA)를 사용하였으며, 칼럼은 SunFire C-18 stainless steel column (2.1 mm × 50 mm, 5 μm thickness, Miami, USA)을 사용하였다.

성분의 정성분석을 위하여 사용한 GCMS는 Agilent 7890 gas chromatography / Headspace (Agilent, Santa clara. CA. USA)를 사용하였으며, 칼럼은 DB-5 silica capillary column (60 m 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA)을 사용하였다.

(2) 방법

(가) 식물성스테롤 성분 분리를 위한 표준 추출물 및 분획물의 조제

인삼 스테롤 성분의 분리 정제는 인삼종자 (8750 g)를 분쇄한 후 인삼종자 분말에 EtOH (7L × 5)를 가하여 65~75℃에서 3시간 동안 가열하여 추출하였다. 추출된 용액은 감압농축하고, 농축된 EtOH 추출물은 증류수에 용해하여, *n*-hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc, 및 *n*-BuOH 을 순차적으로 가하여 각각의 용매에서 2차적으로 물질들을 용출하였다.

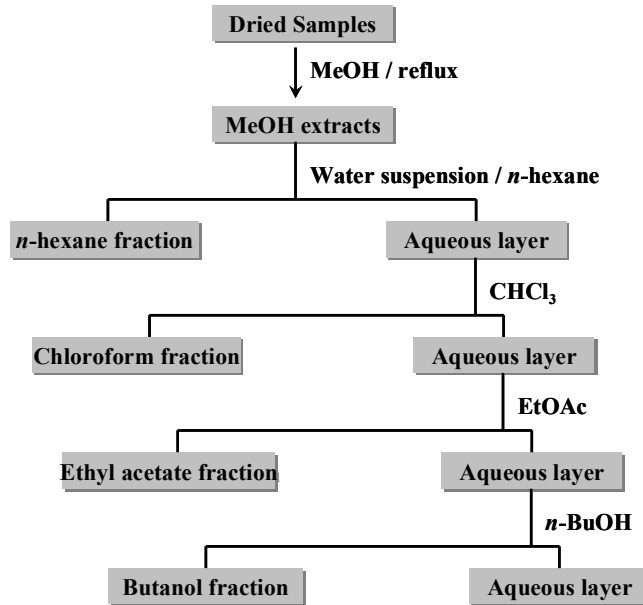


그림 16. 인삼종자의 계통적 추출법.

(나) 크로마토그래피에 의한 식물성스테롤 성분의 분리

각 시료는 음건한 후 methanol을 이용해 계통적 추출을 실시하며 3회 이상 실시하여 충분한 methanol extract양을 확보하였다. 시료의 methanol extract는 극성별 유기용매를 통해 분획물을 수득하여 초기 extract와 마찬가지로 가장 약리효과를 보이는 분획물을 선정하여 성분분리를 진행하였다. 선정된 분획물층은 chromatography를 통해 물질을 분리 정제하여 이 과정은 물질을 수순하게 분리하기 위해 반복 진행하였다.

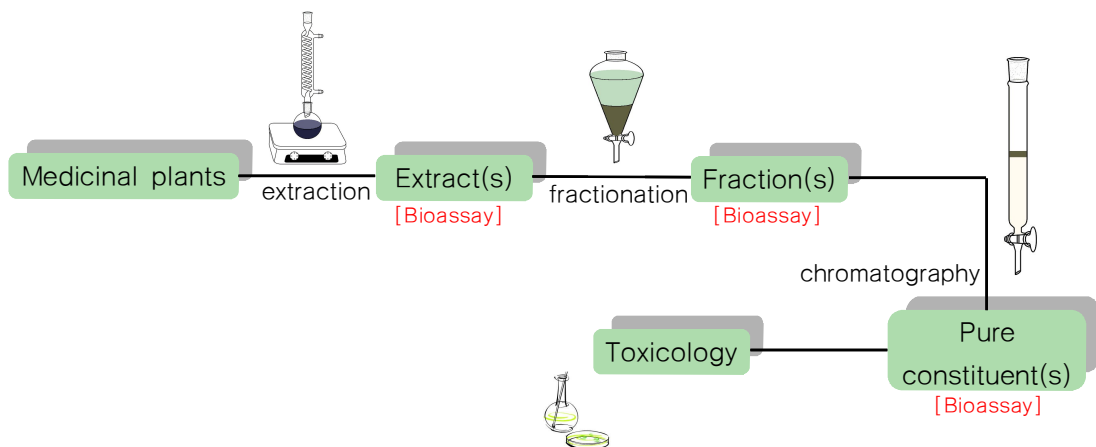


그림 17. 추출 및 분획과정 모식도.

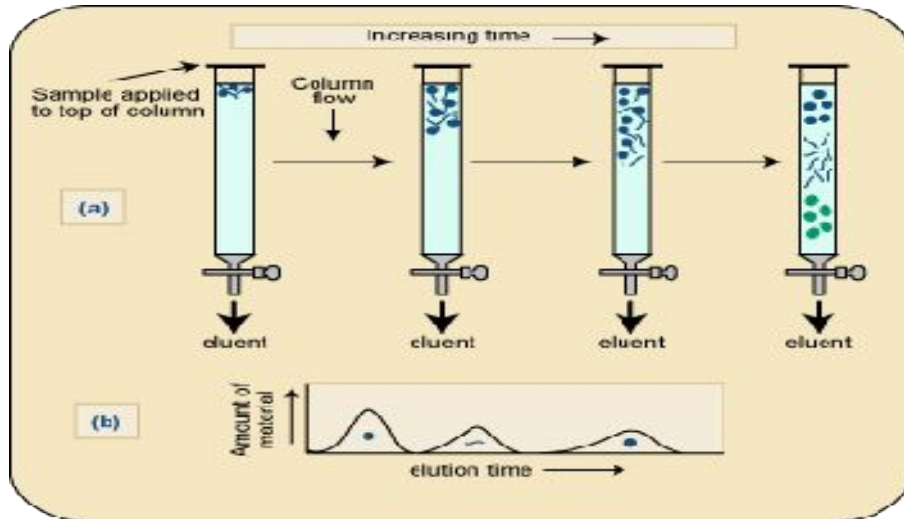


그림 18. Open chromatography 분리 과정.

(다) Prep-HPLC 등을 이용한 식물성스테롤 성분의 정제

또한 recycling prep-HPLC 등의 기계를 이용하여 소량의 물질을 분리하며 전개용매는 TLC를 통해 분리능이 좋은 용매를 선정하여 실험을 진행하였다. 그 외 분획물에서도 신물질 발견과 성분종류의 database 구축을 위해 동일하게 물질분리를 실시하였다.



그림 19. TLC 분석.

(라) 스펙트럼 분석을 통한 식물성스테롤 성분의 구조동정 및 확인

Chromatography를 통하여 분리된 순수결정은 HPLC 방법으로 순도를 확인하고 각 분석스펙트럼을 찍어 확인하였다. 사용하는 분석기기는 IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, COSY, HMQC, HMBC, MS, FAB-MS 등을 이용하여 각 스펙트럼 데이터 분석을 통하여 구조를 결정하며 분리된 단일물질의 구조를 밝혀내었다.

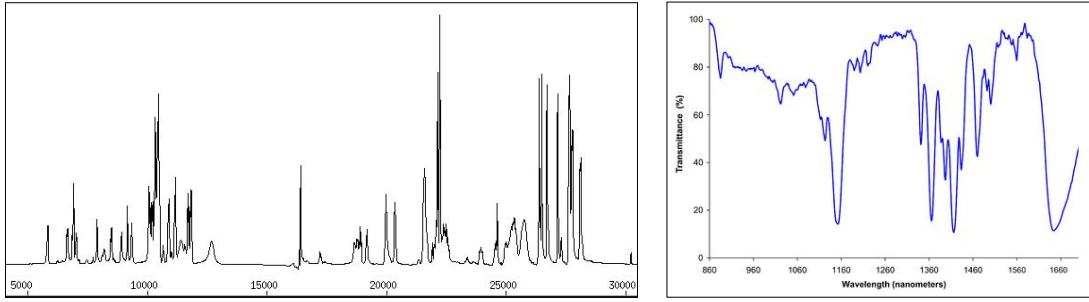


그림 20. 각종 분석 스펙트럼 데이터.

(마) 식물성스테롤의 분석

인삼종자에 들어 있는 식물성스테롤을 분석하기 위해 분리된 표준 스테롤을 GC/MS 및 HPLC 분석으로 실시하였고, 각 분석조건은 아래에 나타내었다.

표 24. GC analytical instruments and conditions

Instrument	GC model : Perkin-Elmer MS model : HP 5973 Mass selective detector
Column	DB-5MS capillary (30 m × 0.25µm) 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA)
Injection Volume	1.0 µL
Injector temperature	320°C
Column temperature	80°C(4 min) → 300°C(15.00 min) hold 50.00 min Total 68.67 min
Carrier gas	Helium
Split ratio	100.0 : 1
Separator temperature	250°C
Ion source temperature	200°C

표 25. MS analytical instruments and conditions

Type	MS Scan
Ionmode	EI+
Start Mass	30.
End Mass	550.00
Scan Time (sec)	0.20
InterScan Time (sec)	0.10
Start Time (min)	3.00
End Time (min)	68.67

표 26. Sterol 분석을 위한 HPLC 조건

HPLC	Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA) Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA)
Column	SunFire C-18 stainless steel column (2.1 mm × 50 mm, 5 μm thickness)
Wavelength	208 nm
Temperature	30 °C
Solvent	Solvent A : MeOH Solvent B : ACN
Flow rate	0.5 mL/min
Gradient	0 min 30% A : 70% B 5 min 0% A : 100% B
Condition	23 min 0% A : 100% B 25 min 30% A : 70% B

(2) 결과 및 고찰

(가) 크로마토그래피에 의한 식물성스테롤 성분의 분리 및 구조동정

β -Sitosterol의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 두개의 angular methyl singlet인 18-Me, 19-Me의 시그널이 각각 δ 0.68과 0.82에서 나타났다. 그리고 세 개의 methyl기(21-Me, 26-Me, 27-Me)가 doublet으로 각각 δ 1.25, 0.83, 0.92에서 확인되었으며, H-6의 시그널이 broad doublet으로 δ

5.35에서 나타났음을 그림 22를 통하여 확인되었다. 그림 23에 나타난 β -Sitosterol의 ^{13}C -NMR spectrum을 통해서 27개의 탄소를 확인할 수 있으며, δ 141과 122를 통하여 C-5, C-6의 시그널이 이중결합임을 확인할 수 있었다.

표 27. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectral Data for β -Sitosterol in CDCl_3

Position	1		Position	1	
	d_{H}	d_{C}		d_{H}	d_{C}
1	-	37.2	16	-	28.2
2	-	31.6	17	-	56.0
3	3.54 (m)	71.8	18	0.68 (s)	12.0
4	2.29 (d, 8.5)	42.3	19	1.00 (s)	19.0
5	5.35 (d, 5.3)	140.7	20	-	36.1
6	-	121.7	21	-	18.7
7	-	31.9	22	-	33.9
8	-	31.9	23	-	23.0
9	-	50.1	24	-	45.8
10	-	36.5	25	-	29.1
11	-	21.0	26	0.83 (d, 6.4)	19.8
12	2.00 (t, 6.6)	39.8	27	0.86 (d, 6.7)	19.3
13	-	42.3	28	-	26.0
14	-	56.8	29	0.82 (t, 5.5)	11.8
15	-	24.2			

Form: White Crystal

Chemical Formula: $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$

EI-MS(rel. int., %):

m/z 414 $[\text{M}]^+$ (44.8), 396 (60.3), 381 (22.57), 329 (14.31), 303 (19.5), 273 (13.8), 255 (35.53), 213 (34.9), 159 (30.2), 145 (43.8)

IR ν_{max} (KBr): 3436 (OH) cm^{-1}

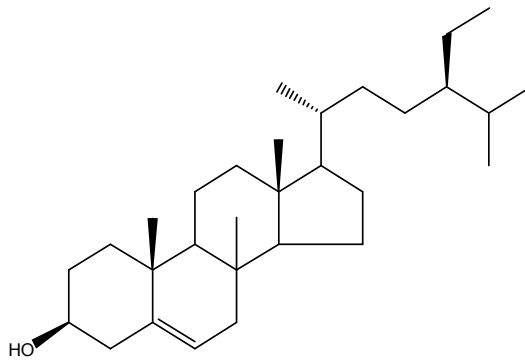


그림 21. β -Sitosterol의 화학구조.

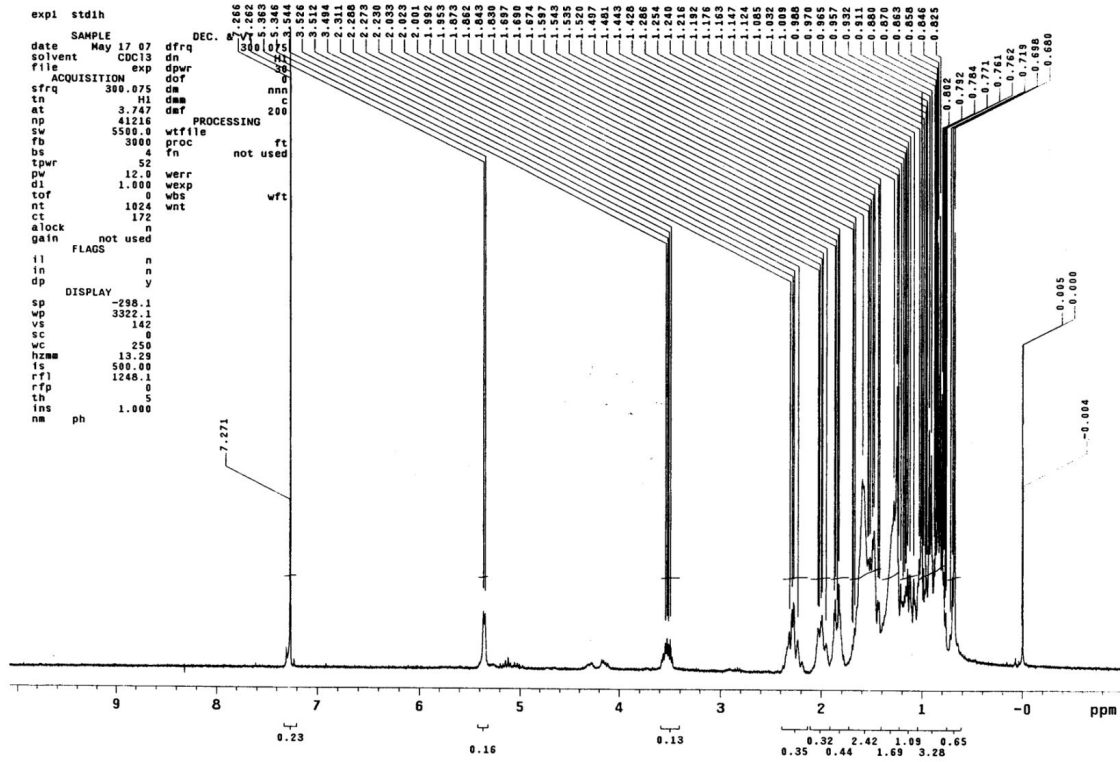


그림 22. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of β -Sitosterol.

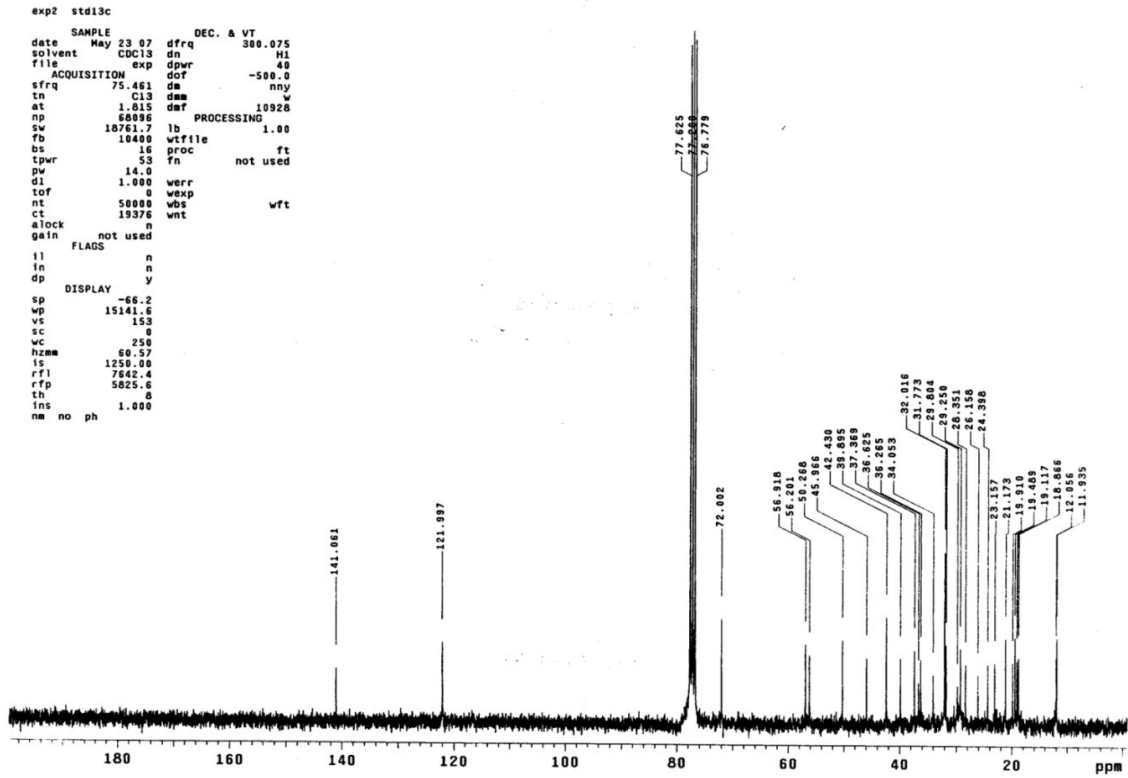


그림 23. $^{13}\text{C-NMR}$ Spectrum of β -Sitosterol.

(나) 식물성스테롤의 분석

① GC/MS에 의한 phytosterol 성분 분석

인삼종자의 EtOH 추출물, n-Hexane 분획물, 및 CH_2Cl_2 분획물을 GC/MS에서 스테롤 성분의 분석을 실시하였으나, EtOH 추출물에서만 일부 스테롤이 확인되고, 나머지 분획물에 대해서는 확인되지 않았다. 결과적으로 스테롤인 squalene, stigmasterol, β -sitosterol, lupeol이 확인되었다.

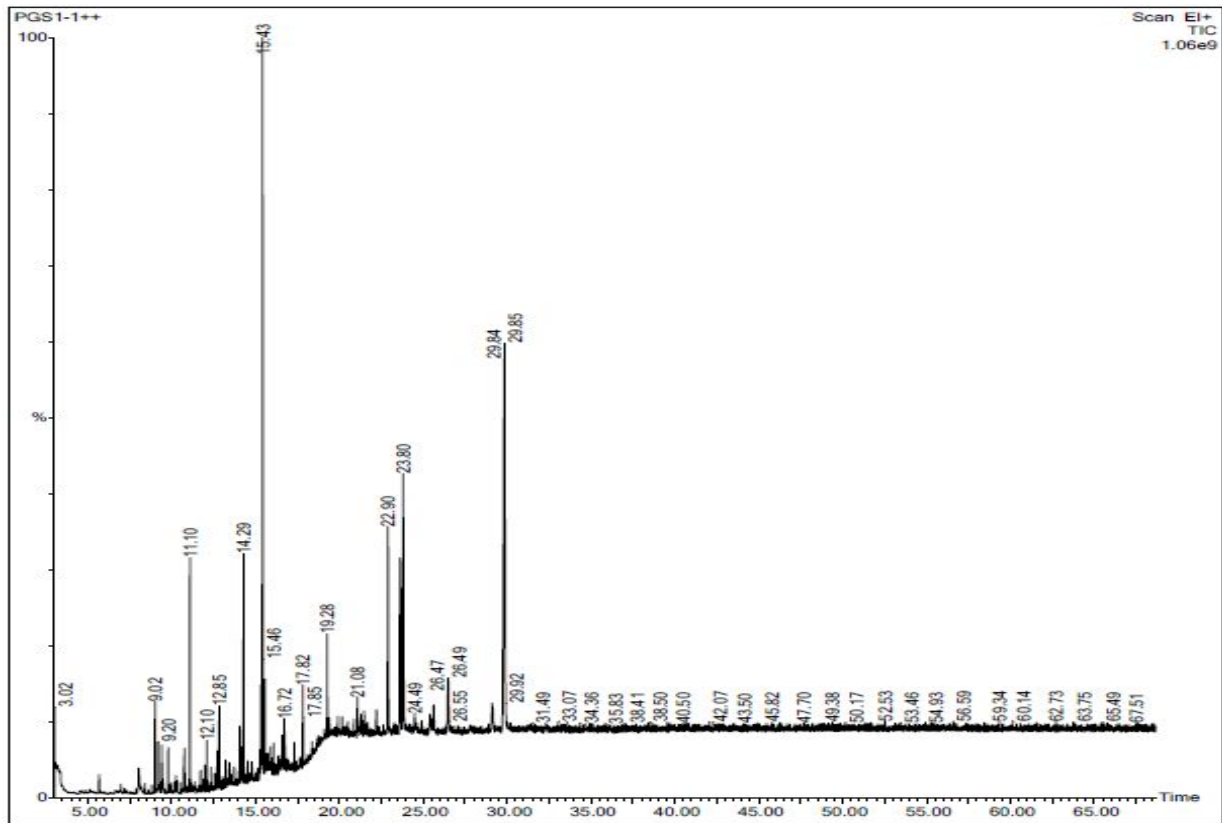


그림 24. EtOH 추출물(사포닌화)의 TIC 크로마토그램.

표 28. GC/MS에 의한 EtOH ext.의 스테롤 성분 정성분석

Sterol	Retention time (min)	Area (%)
Squalene	19.28	0.7
β -Sitosterol	22.90	3.2
Stigmasterol	23.80	2.9
Lupeol	29.84	12.3

② HPLC에 의한 phytosterol 성분 분석

인삼종자의 EtOH 추출물에 대하여 HPLC 분석조건에 따라 스테롤 성분을 분석하였다. 인삼종자를 EtOH로 추출하면 액체성 추출물과 고체성 추출물이 발생되어 두 추출물에 대하여 stigmasterol, β -sitosterol를 분석 하였다. 결과적으로 액체성 추출물에 스테롤 화합물이 좀 더 많이 들어있었다.

표 29. HPLC에 의한 EtOH ext.의 스테롤 성분 정량분석

Sterol	Retention time (min)	Content (mg/g)	
		Liquid	Solid
β -Sitosterol	18.5	0.719 \pm 0.083	0.149 \pm 0.027
Stigmasterol	20.65	0.129 \pm 0.012	0.111 \pm 0.008

제 5 절 인삼종자의 최적 발효조건 선정 및 발효인삼종자의 특성

1. 인삼종자의 최적 발효조건 선정 및 발효물 특성평가

가. 재료 및 방법

(1) 재료 및 전처리

실험에 사용한 인삼종자는 충남 금산에서 2012년에 수확한 4년근 인삼종자를 구입하여 50℃ 열풍건조기에서 48시간 건조시킨 후 실험에 사용하였다. 인삼종자 발효 후 오일을 추출하기 위한 인삼종자의 전처리는 다음과 같이 실시하였다.

압착추출용 시료의 경우 인삼종자를 충분히 건조시킨 후 껍질을 제거하여 얻은 배유(endosperm) 부분을 발효에 사용하였고, 용매추출 및 초임계 유체 추출용 시료의 경우 껍질을 포함한 인삼종자 전체를 분쇄기(FRITSCH, Germany)를 사용하여 껍질과 배유부분을 모두 분쇄하였고, 입자크기는 1 mm trapezoidal을 통과시켜 균일하게 하였다.

(2) 인삼종자 발효에 사용된 균주

인삼종자 발효에 사용된 균주는 Gram 양성 세균인 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 (미호기성 젖산간균), *Pediococcus pentosaceus* LY 011 (호기성 젖산 발효형 구균), *Bacillus subtilis* KFRI 1124 및 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 (호기성 포자형성 간균)을 한국생명공학연구원 생물자원센터와 한국식품연구원에서 분양받아 3회 계대배양하여 사용하였다. 시험균주와 사용배지 및 배양온도는 표 30에 나타내었다.

표 30. 인삼종자 발효에 사용한 균주, 배지 및 배양조건

구분	균주	배지	배양온도 (℃)
Gram(+)	<i>Lactobacillus gasseri</i> KCTC 3162	MRS (the Man, Rogosa and Sharpes) broth (agar)	30
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> LY 011	MRS broth (agar)	30
	<i>Bacillus subtilis</i> KFRI 1124	TS (Tryptic Soy) broth (agar)	30
	<i>Bacillus subtilis</i> KFRI 1127	TS broth (agar)	30

(3) 인삼종자 발효

인삼종자의 발효는 각 균주별 특성과 발효 후 오일 추출조건에 따라 멸균처리 시 증류수의 양을 다르게 하여 멸균하고 균주를 접종하였다. *Bacillus* 균주(KFRI 1124, 1127)의 경우 수분함량이 적은 조건에서도 잘 자라기 때문에 수분함량을 최소화하였고, *Lactobacillus*,

Pediococcus 균주(LY 011, KCTC 3162)는 수분함량을 시료대비 2~3배 증량하여 멸균처리 하였다. 유산균(A)에 속하는 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162와 *Pediococcus pentosaceus* LY 011 그리고 고초균(B)에 속하는 *Bacillus subtilis* KFRI 1124와 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 두 그룹으로 나누어 실험한 조건은 다음 표 31과 같다.

표 31. 균주 및 발효 후 추출방법에 따른 멸균조건

	균주	시료	인삼종자 : 증류수 비율
압착추출	A ¹⁾	인삼종자 내부 핵	1:2
	B	인삼종자 내부 핵	1:1
용매추출/초입계추출	A	분쇄한 인삼종자	1:3
	B	분쇄한 인삼종자	1:1

¹⁾ A: *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162, *Pediococcus pentosaceus* LY 011
 B: *Bacillus subtilis* KFRI 1124, KFRI 1127

표 31의 조건에 따라 멸균한 인삼종자에 각 균주를 1% 씩 접종하고 균주가 시료에 잘 퍼지도록 멸균한 spatular로 잘 섞어준 다음 30°C incubator에서 24시간 배양하여 발효인삼종자를 제조하였다. 이를 냉동시켜 동결건조하고 분쇄하여 발효인삼종자 오일 추출용 시료로 사용하였다.

(4) 인삼종자 발효물의 특성

각각의 균주를 이용하여 발효한 인삼종자의 총당, 산성다당체, 총페놀 함량 및 항산화활성을 알아보기 위해 다음의 실험을 실시하였다. 실험에는 발효 후 동결건조 한 인삼종자 분말을 총당, 산성다당체, 총페놀 함량 및 항산화활성 각 실험방법에 맞게 다음과 같이 추출하여 진행하였다.

(가) 총당, 산성다당체 분석

분말 시료 2 g에 증류수 50 mL을 가하고 80°C에서 환류냉각장치를 이용하여 3시간동안 추출한 후 추출액을 100 mL volumetric flask에 옮겨 정용하고, 일부를 취해 4°C, 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 얻었다. 상정액 5 mL을 0.45 µm membrane filter로 여과한 여액을 총당 측정용 시료로 사용하였다. 앞서 원심분리하여 얻은 상정액 5 mL에 cold 에탄올을 20 mL 첨가하여 산성다당체를 형성시키고 4°C, 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 버리고 산성다당체 침전물을 얻었다. 침전물을 증류수 5 mL로 녹인 후 0.45 µm 막필터로 여과한 여액을 산성다당체 측정용 시료로 사용하였다. 총당은 phenol-황산법으로, 산성다당체는 carbazole-황산법을 이용하여 측정하였다. 이 때 표준물질로는 각각 glucose와

galacturonic acid를 사용하였다.

(나) 총 페놀화합물 함량 분석

분말시료 1 g에 80% 메탄올 25 mL을 가한 후 80°C에서 환류냉각장치를 이용하여 가용성 성분들을 3시간씩 2회 추출하였다. 추출물은 여과한 후 감압농축시키고 증류수 10 mL에 녹였다. 이를 0.45 µm membrane filter로 여과한 여액을 총 페놀화합물 함량 분석용 시료로 사용하였다. 총 페놀화합물 함량 분석은 Folin-ciocalteu's 법에 따라 측정하였으며, 표준물질로는 gallic acid를 사용하였다.

(다) 페놀 성분 분석

발효인삼종자 중의 페놀성 성분에 대한 분석은 high performance liquid chromatography (HPLC, PU-980, Jasco Co., Japan)를 사용하였다. 페놀성 성분의 HPLC 분석은 Waters C-18 column (5.0 µm, 4.6×250 mm, Ireland)을 사용하여 2% acetic acid를 함유한 Water (solvent A)와 0.5% acetic acid를 함유하는 50% acetonitrile (solvent B)을 이동상으로 사용하였다. 전 개는 A 용매를 100%에서 70분 후 45%로 gradient를 주어 0.8 mL/min의 속도로 총 80분간 진행하였으며 시료는 20 µL 주입하였다. 시료의 검출은 UV detector (MD-2010, Jasco Co., Japan)를 사용하여 280 nm에서 측정하였다. 분석에 사용한 표준물질은 총 10 종으로 maltol, *p*-coumaric acid, cinnamic acid, salicylic acid, vanillic acid, syringic acid, ferulic acid, gentisic acid, caffeic acid는 Sigma (USA), *p*-hydroxy benzoic acid는 Junsei (Japan)의 제품을 사용하였다.

각 균주를 사용하여 발효시킨 인삼종자를 동결건조하여 분말화시킨 후 페놀함량 분석 방법과 동일하게 전처리하여 실험에 사용하였다. 농축된 추출물을 10 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹인 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다.

(라) 항산화 활성 평가 시험용액 추출

발효인삼종자 분말 시료 5 g을 농축용 플라스크에 평량하여 50 mL 70% ethanol로 80°C 환류냉각추출기에서 1시간 추출 후 30분간 방냉하고 여과하였다. 추출과정을 2회 반복하여 실시하였고 여과한 여액은 45°C 수조에서 rotary evaporator를 이용하여 진공농축하였다. 농축한 잔류물은 50 mg/mL (50,000 ppm)의 농도로 희석하여 시험용액으로 사용하였다.

(마) ABTS radical 소거효과 측정

발효인삼종자 시료의 ABTS radical scavenging ability는 ABTS cation decolorization assay 방법에 의하여 측정하였다. 7 mM ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Wako. Ltd., Japan)와 2.45 mM K₂S₂O₈를 실온인 암소에서 24시간 반응하여 ABTS 라디칼을 형성시켜 ABTS stock solution을 제조하였으며, 이를 734 nm에서 흡광도 0.70±0.02로 희석시켜

사용하였다. 0.1 M PBS에 녹인 각각의 농도의 인삼종자 추출물 20 μ L에 ABTS⁺ 용액 980 μ L을 가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 비타민 C와 Trolox[®] (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich, Inc.)를 사용하였으며 시료 첨가구와 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군의 흡광도를 측정하여 백분율로 나타내었다. 인삼종자 추출물은 최종농도가 100, 10, 1 ppm이 되도록 희석하여 첨가하였다.

(바) 항산화 효소활성 측정

각각의 발효인삼종자 추출물의 활성산소(O₂⁻) 제거와 관련된 SOD (superoxide dismutase) 유사활성을 측정하였다. 인삼종자 추출물은 최종농도가 1000, 100, 10, 1 ppm이 되도록 첨가하여 SOD-assay kit-WST (Dojindo Lab., Japan)를 이용하여 반응시킨 후 450 nm에서 microplate reader (Thermomax, Molecular Device co.)를 이용하여 측정하였으며 양성 대조군으로는 비타민 C를 사용하였다.

(사) 통계분석

모든 실험은 최소 3회 반복 측정된 평균치로 나타내었고, 실험결과 자료의 통계분석은 SAS (Statistical Analytical System, version 9.3) 프로그램을 사용하여 Duncan's multiple range test를 실시하여 시료간 유의성 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 인삼종자 발효 균주별 특성

(가) *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162

Lactobacillus 균주는 요거트, 치즈, 피클, 맥주, 김치 등 발효식품에 주로 이용되는 균주로 lactose와 sugar 등의 당을 이용하여 발효시켜 젖산으로 전환시키는 이유로 젖산균이라 불리고 있다. 본 실험에 사용한 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받아 계대하여 사용하였다. 인삼종자분말의 멸균 후 pH는 5.98로 측정되었고, 균주를 접종하여 발효시킨 다음의 pH는 5.01로 낮아지는 것을 확인하였다.

(나) *Pediococcus pentosaceus* LY 011

Pediococcus 균주는 독일 김치의 일종인 sauerkraut를 만들 때 주로 사용되는 균주로 양배추 등의 야채를 젖산 발효시켜 시큼한 향이 나게 하고 저장성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 본 실험에 사용한 *Pediococcus pentosaceus* LY 011은 한국식품연구원에서 김치에서 분리한 균주를 분양받아 실험에 사용하였다. (가)의 균주와 마찬가지로 인삼종자 멸균 후 pH는 5.98이었고, 균주를 접종하여 발효시킨 후의 pH는 5.53으로 측정되었다. *Lactobacillus gasseri*

KCTC 3162와 비교하여 *Pediococcus pentosaceus* LY 011의 pH가 더 높게 측정되었다.

(다) *Bacillus subtilis* KFRI 1124, KFRI 1127

고초균으로 알려진 *Bacillus subtilis*는 자연계에 널리 분포하는 비병원성 세균으로 공기, 마른풀, 하수, 토양 속에 존재한다. 균주가 형성하는 호기성 내생포자는 건조나 고온에 대한 저항력이 강하며, 사람과 동물에 병원성이 없으며 배지 중에 다량의 단백질을 분비한다. 균체는 글리코젠을 함유하는 그람 양성균으로 다수의 탄수화물을 분해하여 산을 생성하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에 사용한 *Bacillus subtilis* KFRI 1124, 1127은 한국식품연구원에서 분양받아 계대하여 사용하였다. 인삼종자분말의 멸균 후 pH가 5.98 이었고, *Bacillus subtilis* KFRI 1124 균주 접종 후에는 pH가 6.13 으로 나타나 앞의 다른 균주와 다르게 pH가 올라가는 경향을 보였고, *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주의 경우는 발효 후 pH가 5.11로 낮게 측정되어 같은 *Bacillus subtilis* 균주에 속하는 KFRI 1124와 KFRI 1127의 발효 특성이 차이를 보이는 것으로 판단되었다.

(2) 발효인삼종자의 총당, 산성다당체 및 총 페놀화합물 함량

당류는 인삼의 구성성분 중에서 가장 많은 비율을 차지하는 물질로 크게 가용성 유리당과 다당체 성분 및 cellulose, hemicellulose 등과 같은 불용성 당류성분으로 나누어진다. 일반적으로 수삼에 함유되어 있는 유리당으로는 glucose, fructose, sucrose 및 maltose 등이 보고되어 있으며 이들 유리당 성분은 맛에도 중요한 영향을 미치지만 당과 아미노산의 갈변반응을 통해 제품의 색에도 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 인삼의 중요당류 성분 중의 하나인 다당체 성분은 혈당강하 효능을 가진 당류인 Panaxan A, B, C, D 및 E가 Hikino 등에 의해 최초로 분리된 이후 면역활성, 항종양활성, 항궤양작용 등을 나타내는 중요한 생리활성성분으로 인식되고 있다. 페놀성 물질의 경우 인삼 고유 성분은 아니지만 주로 지질과 산화방지 등과 같은 항산화 활성과 관련이 높은 것으로 알려져 있으며, 그 밖에 인삼의 항암활성 등 다양한 생리활성과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

각 균주별 발효인삼종자의 총당, 산성다당체 및 페놀성분 함량을 측정한 결과는 표 32와 같다. 표에 나타난 것과 같이 발효 처리한 인삼종자의 총당, 산성다당체 및 페놀 함량이 대조구보다 모두 높게 나타난 것을 확인하였는데 특히 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주로 발효한 인삼종자에서 모두 높은 값을 보였다.

총당 함량의 경우 발효처리하지 않은 대조구가 31.94 mg/g로 나타났고, *Bacillus subtilis* 균주인 KFRI 1124와 KFRI 1127이 각각 35.41 mg/g, 45.32 mg/g, *Pediococcus pentosaceus* LY 011이 37.63 mg/g, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162가 40.14 mg/g 으로 나타났다. 발효시킨 인삼종자의 총당 함량이 대조구보다 모두 높게 나타났는데, 특히 *Bacillus subtilis* KFRI 1127로 발효시킨 인삼종자의 총당 함량이 다른 균주로 발효한 인삼종자보다 높은 값을 보였다. 이는 탄수화물을 분해시켜 당을 생성시키는 *Bacillus subtilis* 특성의 결과로 사료되었고, 같은 균

주인 KFRI 1124보다 더 높은 총당 함량을 보인 KFRI 1127의 발효능이 더 뛰어난 것으로 판단되었다.

산성다당체 함량은 발효하지 않은 대조구가 2.15 mg/g 으로 나타났고, 발효한 인삼종자의 경우 대조구보다 2.5~4배 높은 산성다당체 함량을 보였다. *Bacillus subtilis* KFRI 1127의 경우 8.74 mg/g 으로 다른 발효 균주와 비교하여 높은 값을 보였고, *Bacillus subtilis* KFRI 1124는 5.72 mg/g, *Pediococcus pentosaceus* LY 011과 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162는 각각 5.05 mg/g, 5.08 mg/g 으로 나타나 대조구보다는 약 2.5배 정도 증가 값을 보였다. 산성다당체 함량은 일반적으로 백삼보다 홍삼에서 높게 나타나는 경향이 있는데 이는 반복되는 열처리와 탈수과정이 원인으로 다당체 성분이 가용화되어 나타난 결과로 알려져 있는데, 본 실험의 경우도 산성다당체 함량의 증가는 이와 유사한 결과로 판단되었다.

총 페놀화합물의 경우에도 총당과 산성다당체 함량 결과와 마찬가지로 대조구(0.81 mg/g)보다 증가하는 경향을 보였고 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주로 발효시킨 인삼종자의 총 페놀화합물 함량이 1.31 mg/g 으로 가장 높게 나타났다. *Bacillus subtilis* KFRI 1124로 발효시킨 인삼종자는 1.28 mg/g 으로 KFRI 1127과 유사하게 나타났지만, *Pediococcus pentosaceus* LY 011과 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162로 발효한 인삼종자는 각각 1.08 mg/g, 1.05 mg/g 으로 발효균주에 따라서 총 페놀화합물 함량의 차이를 보이는 것으로 나타났다. 일반적으로 인삼에서 추출되는 총 페놀화합물 함량의 경우 가열온도와 처리시간이 증가할수록 함께 증가하는 경향을 나타내어 항산화 활성도 증가하는 것으로 보고되고 있으며 처리시간보다는 가열처리 온도에 더 많은 영향을 받는 것으로 보고되어 있는데, 발효과정 중 멸균시킬 때의 과정이 총 페놀화합물의 증가에 일부 영향을 미친 것으로 판단되었다.

표 32. 인삼종자의 발효균주에 따른 총당, 산성다당체, 총 페놀화합물 함량

균주명	총당 (mg/g)	산성다당체 (mg/g)	총 페놀화합물 (mg/g)
control	31.94±2.15 ^{d1)}	2.15±0.17 ^d	0.81±0.02 ^c
KFRI 1124	35.41±0.54 ^{cd}	5.72±0.18 ^b	1.28±0.01 ^a
KFRI 1127	45.32±2.67 ^a	8.74±0.12 ^a	1.31±0.04 ^a
LY 011	37.63±3.78 ^{bc}	5.05±0.06 ^c	1.08±0.02 ^b
KCTC 3162	40.14±1.85 ^b	5.08±0.05 ^c	1.05±0.03 ^b

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD deviation triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test

(3) 발효인삼종자의 페놀성분 분석

발효인삼종자 추출물의 페놀성분 분석 결과는 표 33과 같다. 일반적으로 인삼에 함유되어 있는 페놀성분은 표준품으로 사용한 maltol, *p*-coumaric acid, trans-cinnamic acid, salicylic acid, vanillic acid, syringic acid, ferulic acid, gentisic acid, caffeic acid, *p*-hydroxy benzoic acid 10종이 알려져 있는데, 발효인삼종자에서는 *p*-coumaric acid가 검출되었다. 특히 발효 유무에 따라 *p*-coumaric acid의 함량차이가 크게 나타났는데, 표 33에 나타난 것과 같이 대조구 (0.069 µg/g)와 비교하여 발효시킨 인삼종자의 페놀성분 함량은 크게 증가한 것으로 확인되었다. 발효시킨 인삼종자의 *p*-coumaric acid의 함량은 발효 전보다 5배에서 많게는 6배 증가하였는데 가장 높은 값을 나타낸 발효균주가 *Pediococcus pentosaceus* LY 011로 0.448 µg/g 으로 나타났다.

표 33. 발효인삼종자 추출물의 페놀성분 분석

Phenolic compound ($\mu\text{g/g}$)	Fermentation strain				
	control	<i>B.subtilis</i> KFRI 1124	<i>B.subtilis</i> KFRI 1127	<i>P.pentosaceus</i> LY 011	<i>L.gasseri</i> KCTC 3162
maltol	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -hydroxy benzoic acid	ND	ND	ND	ND	ND
gentisic acid	ND	ND	ND	ND	ND
vanillic acid+caffeic acid	ND	ND	ND	ND	ND
syringic acid	ND	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -coumaric acid	0.069	0.444	0.369	0.448	0.381
ferulic acid	ND	ND	ND	ND	ND
salicylic acid	ND	ND	ND	ND	ND
trans-cinnamic acid	ND	ND	ND	ND	ND

¹⁾ not detected

(4) 발효인삼종자의 ABTS radical 소거효과

발효인삼종자 추출물을 1, 10, 100 ppm의 농도로 ABTS radical 소거효과를 측정한 결과는 표 34, 그림 25와 같다. 측정결과 1 ppm과 10 ppm 농도에서는 처리구간 큰 차이를 보이지 않았지만 100 ppm 농도에서는 발효하지 않은 대조구와 큰 차이를 나타냈다. 대조구의 ABTS radical 소거능이 15.2%으로 나타난 것과 비교하여 *Bacillus subtilis* KFRI 1124, KFRI 1127은 31.6%, 32.7%, *Pediococcus pentosaceus* LY 011, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162는 각각 27.9%, 25.5%의 ABTS radical 소거활성을 나타내 대조구와 비교하여 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 *Bacillus subtilis* 균주로 발효한 인삼종자의 소거능이 *Pediococcus*나 *Lactobacillus* 균주로 발효한 인삼종자의 소거능이 더 높게 나타났고, 소거활성이 가장 좋았던 발효인삼종자는 *Bacillus subtilis* KFRI 1127로 발효시킨 인삼종자로 나타났다.

표 34. 발효인삼종자의 ABTS radical 소거효과

	control	KFRI 1124	KFRI 1127	LY 011	KCTC 3162	vitamin C	Trolox [®]
1 ppm	2.86±3.78 ^{c1)}	5.42±3.35 ^c	4.14±3.37 ^c	3.97±3.48 ^c	4.04±3.19 ^c	23.78±0.75 ^a	12.60±1.81 ^b
10 ppm	4.02±0.86 ^c	5.90±0.92 ^b	6.74±0.94 ^b	6.34±0.66 ^b	5.96±1.52 ^b	90.26±0.03 ^a	89.68±0.62 ^a
100 ppm	15.23±1.05 ^e	31.62±0.98 ^b	32.70±4.24 ^b	27.92±0.44 ^c	25.24±1.03 ^d	90.19±0.00 ^a	90.05±0.13 ^a

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

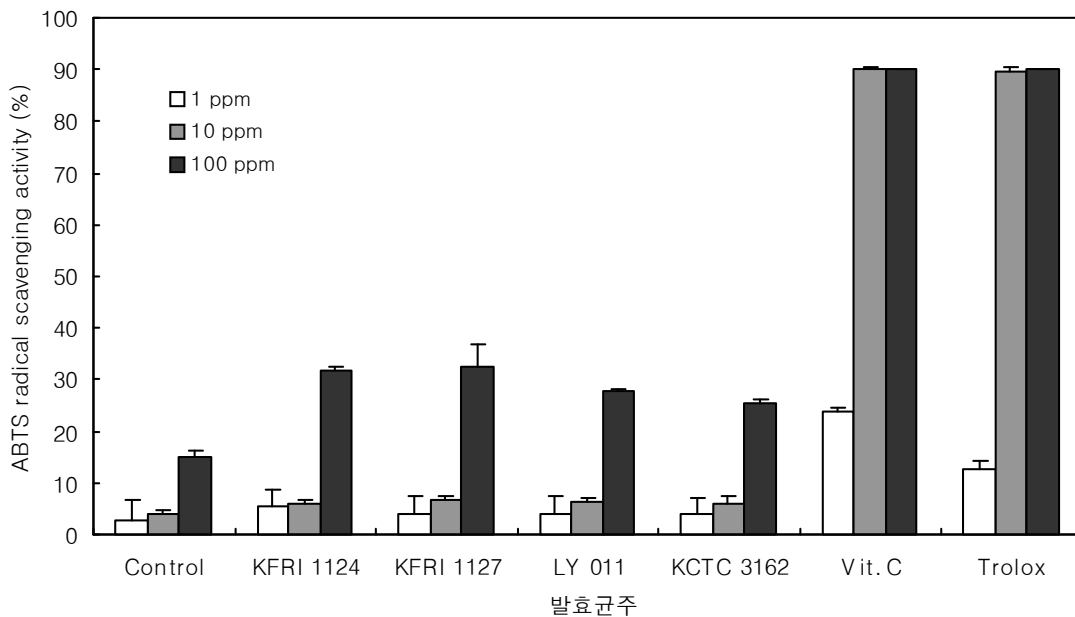


그림 25. 발효인삼종자의 ABTS radical 소거효과.

(5) 발효인삼종자의 SOD 효소활성

SOD (superoxide dismutase) 효소활성은 초과산화이온이 가지고 있는 자유 라디칼 음이온이 세포에 해로운 영향을 미치기 때문에 SOD는 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔 줌으로써 독성으로부터 세포를 방어하는 역할을 한다. 산소에 노출되는 거의 모든 세포에서 이러한 SOD에 의한 항산화방어기작이 중요하며, 일부 유산균들의 경우 다른 방어기작을 사용하는 것으로 알려져 있다.

발효인삼종자 추출물을 1, 10, 100, 1000 ppm의 농도로 SOD 효소활성을 측정한 결과는 표 35, 그림 26과 같다. 측정결과 1, 10, 100, 1000 ppm 농도조건 모두 발효 처리한 인삼종자의 SOD 효소활성이 발효하지 않은 대조구 인삼종자보다 높은 활성을 보인 것을 확인하였다. 발효 균주에 따라서는 1000 ppm 농도에서 그 차이가 뚜렷하게 나타났는데, 대조구의 SOD 효소활성이 22.2%로 나타났고, *Bacillus subtilis* KFRI 1124, KFRI 1127 균주로 발효한 인삼종자의 효소활성이 각각 39.9%, 34.2%로 나타났고, *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주로 발효한

인삼종자는 41.7%, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효한 인삼종자는 41.8%의 SOD 유사활성을 나타냈다. 전반적으로 발효한 인삼종자의 SOD 효소활성이 높게 나타났는데 *Bacillus* 균주보다 *Lactobacillus* 균주와 *Pediococcus* 균주의 효소활성이 더 높은 것을 확인하였다.

표 35. 발효인삼종자의 SOD 효소활성

	control	KFRI 1124	KFRI 1127	LY 011	KCTC 3162	vitamic C
1 ppm	3.52±3.09 ^{b1)}	10.67±4.69 ^a	6.84±0.29 ^{ab}	7.16±1.24 ^{ab}	8.17±0.49 ^{ab}	5.48±1.55 ^{ab}
10 ppm	1.76±3.52 ^b	9.24±5.08 ^a	6.68±1.31 ^{ab}	6.06±0.50 ^{ab}	7.13±0.35 ^{ab}	4.71±1.27 ^{ab}
100 ppm	1.41±4.49 ^c	14.14±1.92 ^b	11.48±1.49 ^b	10.02±1.78 ^b	9.20±0.99 ^b	95.48±1.92 ^a
1000 ppm	22.19±1.29 ^d	39.97±0.11 ^b	34.17±0.15 ^c	41.68±0.51 ^b	41.79±0.64 ^b	94.65±1.80 ^a

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

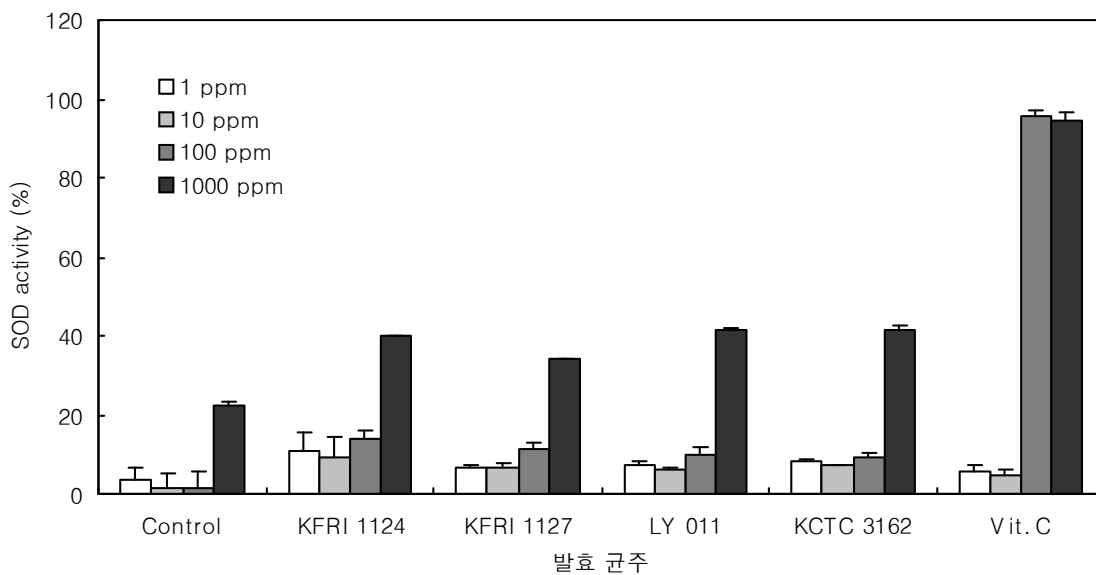


그림 26. 발효인삼종자의 SOD 효소활성.

다. 종합적 고찰

인삼종자를 각각의 균주로 발효하여 그 특성을 살펴본 결과 발효 후 pH는 감소하는 경향을 보였고, 총당, 산성다당체, 페놀 함량을 측정된 결과 발효한 인삼종자 추출물은 발효하지 않은 대조구보다 그 값이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 로 발효한

인삼종자에서 가장 높게 나타났다. 발효인삼종자의 페놀성분을 분석한 결과 *p*-coumaric acid가 검출되었고, 발효 유무에 따라 그 함량차이가 크게 나타났는데 대조구 (0.069 µg/g)와 비교하여 발효시킨 인삼종자의 페놀성분 함량은 크게 증가한 것으로 확인되었다. 항산화 효과의 경우 발효한 인삼종자의 효과가 발효하지 않은 대조구 인삼종자보다 높게 나타났는데, ABTS 소거 효과를 살펴본 결과 *Bacillus subtilis* 균주로 발효한 인삼종자의 소거능이 *Pediococcus*나 *Lactobacillus* 균주로 발효한 인삼종자의 소거능보다 더 높게 나타났고, SOD 효소활성의 경우 *Bacillus* 균주보다 *Lactobacillus* 균주와 *Pediococcus* 균주의 효소활성이 더 높은 것을 확인하였다.

제 6 절 발효인삼종자 오일의 최적 추출조건 확립 및 발효인삼종자 오일의 특성평가

1. 발효인삼종자 오일의 추출 및 특성

발효인삼종자 오일의 추출은 1차년도에 시행했던 압착추출, n-hexane을 이용한 용매추출, 초임계유체 추출 방법으로 추출하여 수율 및 품질 특성을 살펴보았다. 단, 전처리 과정이었던 볶음처리를 수행하지 않고, 발효 후 동결건조 된 발효인삼종자 분말 및 배유 부분을 각각 추출하였다.

또한 발효인삼종자 오일의 추출조건별 색도, 지방산 조성분석, phytosterol 분석 및 페놀성분을 분석하여 그 특성을 살펴보았다.

가. 재료 및 방법

(1) 재료

실험에 사용한 인삼종자는 충남 금산에서 2012년에 수확한 4년근 인삼종자를 구입하여 50℃ 열풍건조기에서 48시간 건조시킨 후 실험에 사용하였다. 앞서 각각의 균주로 발효시킨 발효인삼종자를 동결건조시킨 후 분말화하여 다음의 추출방법으로 오일을 추출하였다.

(2) 발효인삼종자 압착추출

발효인삼종자 오일의 압착추출은 발효 후 동결건조시킨 발효인삼종자 핵(endosperm)을 사용하였다. 발효인삼종자의 압착은 screw 압착방식의 채유기(내쇼날이엔지(주), 한국)를 사용하여 얻은 오일을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 불순물을 제거하였고 상층오일의 무게를 측정하여 수율을 계산하였다. 이때 추출 전 제거한 껍질무게를 감안하여 수율을 계산하였다.

(3) 발효인삼종자 용매추출

발효인삼종자 오일의 용매 추출은 발효 후 동결건조시킨 인삼종자 분말을 사용하였고, 식물유지 추출에 주로 사용하는 n-hexane을 사용하여 추출하였다. 추출을 용이하게 하기 위하여 인삼종자를 분쇄기(FRITSCH, Germany)를 사용하여 껍질과 배유부분을 모두 분쇄하였고, 입자크기는 1 mm trapezoidal을 통과시켜 균일하게 하였다. 추출용 2 L bottle에 발효인삼종자 분말 200 g에 n-hexane 800 mL을 넣고 70℃에서 3시간 추출하였다. 추출물은 감압여과장치로 여과한 후 50℃에서 감압농축하여 발효인삼종자 오일을 얻었고 오일의 무게를 측정하여 수율을 계산하였다.

(4) 발효인삼종자 초임계 유체추출

발효인삼종자 오일의 초임계 유체추출은 발효 후 동결건조시킨 인삼종자 분말을 사용하였다. 발효인삼종자 중의 오일성분 추출을 위해 초임계 이산화탄소 추출장치(Greentek21 Co., Ltd., Anyang, Korea)를 이용하여 추출을 진행하였다. 초임계 추출을 용이하게 하기 위하여 인

삼종자를 분쇄기(FRITSCH, Germany)를 사용하여 껍질과 배유부분을 모두 분쇄하였고, 입자 크기는 1 mm trapezoidal을 통과시켜 균일하게 하였다. 추출조는 내용량 500 mL으로 분쇄한 발효인삼종자 분말 230 g을 투입하여 energized seal로 밀봉하였으며, extractor의 head 부분과 본체는 clamp 체결 방식을 사용하였다. CO₂ cylinder에서 나온 CO₂ gas는 condenser를 거쳐 액화되어 CO₂ 펌프에서 압축된 뒤 추출조로 들어가게 된다. 추출조에서 나온 이산화탄소와 추출물은 압력이 상압으로 낮아지면서 이산화탄소는 날아가고 receiver에 모인 추출물을 발효인삼종자 초임계 추출물 시료로 하였다. 초임계 유체 추출은 1차년도 결과 중 생리활성(미백효과)이 우수한 조건으로 나타난 150 bar 65°C 조건으로 결정하고 모든 시료에 동일하게 적용하여 추출하였다.

(5) 발효인삼종자 오일의 색도

발효인삼종자 오일의 색도는 색차계(Minolta, CR-200, Japan)를 이용하여 L값(lightness), a값(+: red, -: blue), b값(+: yellow, -: green) 그리고 총 색차 ΔE (Total color difference, $\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$) 값을 측정하였다. 색도측정은 six well plate (Nunclon™, Shanghai, China)에 시료 일정량을 담아 측정하였고, 각각 5회 반복 측정된 수치를 평균한 값으로 나타내었으며, 표준 백색판(L: 97.83, a: -0.36, b: 1.94)으로 보정하여 색도를 측정하였다.

(6) 통계분석

모든 실험은 최소 3회 반복 측정된 평균치로 나타내었고, 실험결과 자료의 통계분석은 SAS (Statistical Analytical System, version 9.3) 프로그램을 사용하여 Duncan's multiple range test를 실시하여 시료간 유의성 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 발효인삼종자 오일의 추출방법에 따른 수율

발효인삼종자 오일의 추출방법에 따른 수율은 표 36과 같다. 압착추출 한 오일의 수율은 발효하지 않은 인삼종자 오일(5.2%) 보다 발효 처리한 인삼종자 오일이 높게 나타났는데, 특히 *Bacillus*균으로 발효한 인삼종자의 수율이 7% 이상으로 나타났다. 용매추출은 반대로 발효처리 하지 않은 대조구의 수율이 16.68%로 높게 나타났고, *Bacillus* 균주로 발효한 인삼종자의 수율이 13%대로 낮은 결과를 보였다. *Lactobacillus*균으로 발효한 인삼종자의 용매추출 수율은 16.35%로 대조구 인삼종자 오일과 유사한 수치를 나타냈다. 초임계 추출의 경우 압착추출과 용매추출방법으로 추출한 오일과 반대로 발효하지 않은 대조구 인삼종자의 추출 수율이 4.87%로 발효한 인삼종자보다 높게 나타났고, 발효인삼종자 오일은 발효균주에 따라 수율차이를 보였다. 발효인삼종자로 초임계추출 한 오일 중 가장 높은 수율을 보인 발효균주는 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 로 4.11%의 수율을 나타냈다.

표 36. 발효인삼종자의 추출방법에 따른 수율

	압착추출 (%)	용매추출 (%)	초임계추출 (%)
control	5.2±1.09 ^c	16.68±0.97 ^a	4.87±2.60 ^a
KFRI 1124	7.8±1.12 ^a	13.53±1.05 ^b	3.68±1.84 ^b
KFRI 1127	7.7±2.97 ^a	13.83±0.93 ^b	4.11±2.77 ^{ab}
LY 011	6.5±1.13 ^b	14.80±1.08 ^b	2.71±1.73 ^c
KCTC 3162	6.7±1.83 ^b	16.35±1.13 ^a	3.85±1.87 ^b

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

(2) 발효인삼종자 오일의 추출방법에 따른 색도

발효인삼종자 오일의 추출방법에 따른 색도 결과는 다음과 같다. 밝기 L값은 발효처리에 따라서 약간의 차이가 있었지만 그 차이가 크지 않았고, 각 추출방법에 따라서도 큰 차이를 보이지 않았다. 적색도 a값의 경우 압착추출 한 오일의 경우에는 발효균주에 따라서 큰 차이를 보였고, 발효처리 한 시료의 적색도가 발효처리하지 않은 대조구보다 모두 낮은 적색도 값을 보였다. 용매추출 한 오일의 경우에도 각각의 시료 간에 차이를 보였지만 그 차이가 압착추출 한 오일과 비교하여 크지 않았다. 초임계추출 한 오일은 적색도 값이 시료 간 큰 차이 없이 유사한 값을 나타냈다. 황색도 b값의 경우 압착추출 한 오일의 경우 발효처리하지 않은 오일의 황색도 값보다 유사하거나 감소하는 경향을 보였고, 용매추출·초임계추출 한 오일은 대조구 오일과 비교하여 뚜렷하게 증가하는 경향을 보였다.

(가) 압착추출 한 발효인삼종자 오일의 색도

압착추출 방법을 이용하여 추출한 발효인삼종자 오일의 색도는 표 37과 같다. 밝기 L값과 적색도 a값의 경우 *Bacillus* 균주(KFRI 1124, KFRI 1127)로 발효한 인삼종자의 오일이 *Lactobacillus*, *Pediococcus* 균주(KCTC 3162, LY 011)로 발효하여 추출한 오일보다 낮은 값을 나타냈고, 발효하지 않은 오일이 가장 낮은 값을 보였다. 특히, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효하여 추출한 오일의 경우 밝기 L값이 42.69로 다른 처리구와 비교하여 가장 높은 값을 보였고, 반대로 적색도 a값의 경우 가장 낮은 값인 -0.47로 나타났다. 그림 27과 비교해 보면 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효하여 추출한 오일이 다른 처리구와 비교하여 매우 투명해 보이는 것을 알 수 있다. 황색도 b값은 대조구와 *Bacillus* 균주로 발효하여 추출한 오일이 *Lactobacillus* 균주보다 높게 나타났다. 황색도가 2.51로 가장 높은 값을 보인 오일은 *Bacillus subtilis* KFRI 1124로 발효한 시료로 나타났다. 색차인 ΔE값의 경우 발효하여 추출한 오일의 색차가 대조구보다 낮게 나타났고, 발효오일 중 대조구(58.04)와 가장 큰 차이를 보인 균주는 ΔE값이 55.14로 나타난 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효한 오일이었다.

표 37. 압착추출 한 발효인삼종자 오일의 색도

압착추출	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
control	39.80±0.05 ^{d1)}	0.51±0.05 ^a	2.41±0.03 ^b	58.04±0.05 ^a
KFRI 1124	40.97±0.07 ^c	0.13±0.04 ^b	2.51±0.00 ^a	56.87±0.07 ^b
KFRI 1127	41.96±0.05 ^b	-0.19±0.02 ^c	2.26±0.01 ^c	55.87±0.05 ^c
KCTC 3162	42.69±0.02 ^a	-0.47±0.01 ^e	1.57±0.01 ^e	55.14±0.02 ^d
LY 011	42.63±0.01 ^a	-0.28±0.03 ^d	1.79±0.02 ^d	55.20±0.01 ^d

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

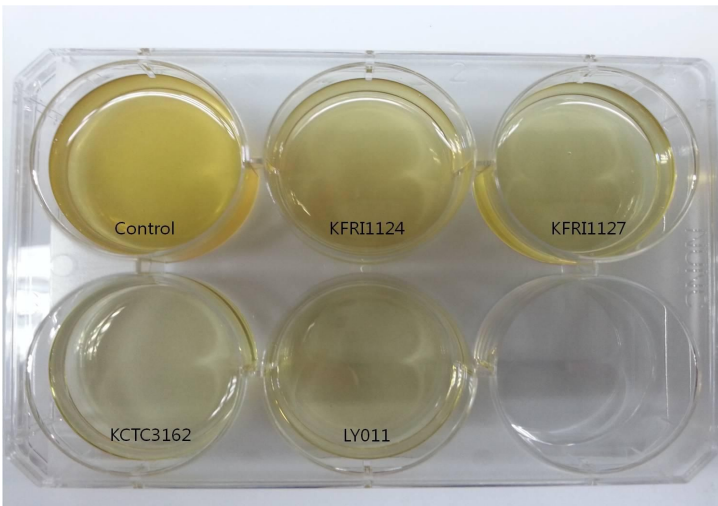


그림 27. 압착추출 한 발효인삼종자 오일.

(나) 용매추출 한 발효인삼종자 오일의 색도

용매추출 방법을 이용하여 추출한 발효인삼종자 오일의 색도는 표 38과 같다. 그림 28에 나타난 것과 같이 육안으로는 시료 간 차이가 거의 없는 것으로 나타났고, 색차계로 측정된 결과 발효처리하지 않은 대조구와 발효처리 한 시료 간에 미미한 차이를 보였다. 밝기 *L*값의 경우 대조구 오일보다 발효처리하여 추출한 오일 시료 모두 증가하는 경향이었고, 적색도 *a*값의 경우는 감소하는 경향을 보였는데, 발효 균주에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다. 황색도 *b*값의 경우에는 발효 처리한 오일이 2.99의 대조구와 비교하여 모두 증가하였고 특히 *Bacillus subtilis* KFRI 1127의 *b*값이 4.34로 가장 높게 나타났다. 색차값인 ΔE 값은 대조구와 발효처리 구 모두 거의 비슷하게 나타났다.

표 38. 용매추출 한 발효인삼종자 오일의 색도

용매추출	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
control	40.92±0.05 ^{d1)}	-0.50±0.02 ^a	2.99±0.01 ^d	56.92±0.05 ^a
KFRI 1124	42.30±0.03 ^a	-0.73±0.04 ^c	3.93±0.01 ^b	55.56±0.03 ^d
KFRI 1127	42.18±0.09 ^b	-0.85±0.02 ^d	4.34±0.04 ^a	55.70±0.09 ^c
KCTC 3162	41.86±0.05 ^c	-0.56±0.04 ^b	2.56±0.02 ^e	55.97±0.05 ^b
LY 011	42.27±0.10 ^{ab}	-0.70±0.03 ^c	3.39±0.04 ^c	55.58±0.10 ^d

1) All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

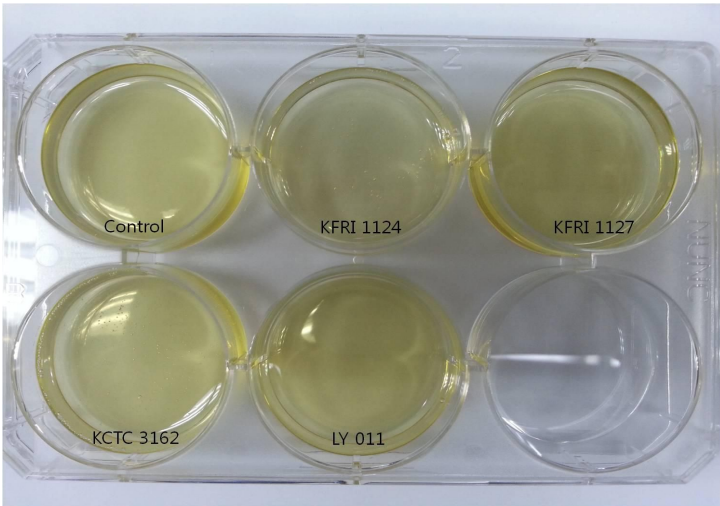


그림 28. 용매추출 한 발효인삼종자 오일.

(다) 초임계추출 한 발효인삼종자 오일의 색도

초임계추출 방법을 이용하여 추출한 발효인삼종자 오일의 색도는 표 39, 그림 29와 같다. 다른 추출방법과 다르게 초임계추출 방법으로 추출한 오일은 발효처리하지 않은 대조구의 L값이 가장 높게 나타났다. 발효처리 한 오일의 L값은 발효균주에 따라 차이를 보였고 L값이 가장 높았던 시료는 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162로 대조구 값과 비슷한 42.13으로 나타났다. 적색도 a값의 경우 대조구 포함 모두 비슷한 수치를 보였고, 황색도 b값의 경우는 대조구 오일이 1.86인 것과 비교하여 발효처리 한 오일의 값은 크게 증가하였는데 특히 *Bacillus subtilis* KFRI 1124 균주와 *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주의 b값이 각각 3.91, 3.82로 높은 값을 보였다. ΔE 값의 경우 *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주의 ΔE 값이 57.31로 대조구 오일의 ΔE 값인 55.58과 비교하여 큰 차이를 나타냈다.

표 39. 초임계 추출한 발효인삼종자 오일의 색도

초임계추출	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
control	42.25±0.14 ^{a1)}	-0.13±0.08 ^a	1.86±0.04 ^e	55.58±0.14 ^d
KFRI 1124	40.91±0.12 ^c	-0.13±0.03 ^a	3.91±0.09 ^a	56.95±0.12 ^b
KFRI 1127	41.52±0.27 ^b	-0.12±0.04 ^a	2.42±0.10 ^d	56.31±0.26 ^c
KCTC 3162	42.13±0.01 ^a	-0.17±0.10 ^a	3.73±0.04 ^c	55.73±0.01 ^d
LY 011	40.55±0.07 ^d	-0.12±0.02 ^a	3.82±0.01 ^b	57.31±0.07 ^a

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

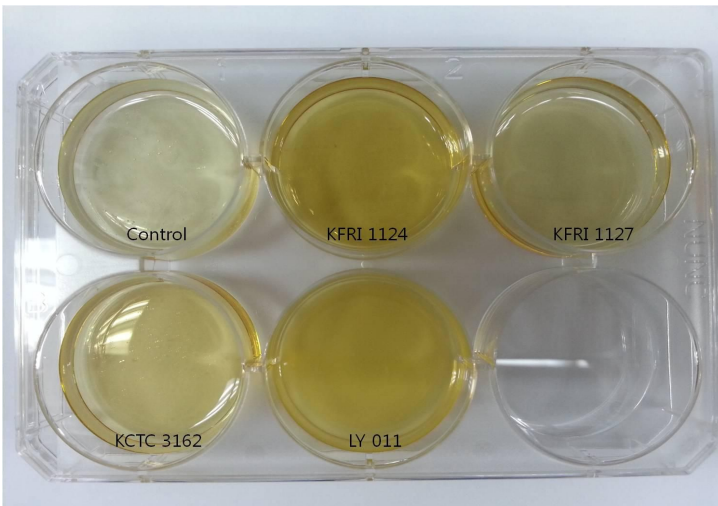


그림 29. 초임계추출 한 발효인삼종자 오일.

2. 발효인삼종자 오일의 지방산조성, 식물성스테롤 및 페놀성분 분석

(가) 재료 및 방법

(1) 발효인삼종자 오일의 지방산분석

발효인삼종자 오일 중의 유리지방산 분석은 AOAC official method에 준하여 gas chromatography (GC, Agilent 6890, USA)를 사용하여 분석하였다. GC 분석의 column은 HP-FFAP (polyethylene glycol-terphthalic acid; 25 m × 0.32 mm × 0.5 μm)를 사용하였고, column의 온도는 150℃에서 1분간 유지 후 230℃까지 1분당 4℃씩 승온하여 10분간 유지하였다. Injection 온도는 230℃, detector 온도는 250℃로 하였으며, carrier gas는 He (1.5 mL/min), H₂ (30 mL/min), air (300 mL/min)를 사용하였다. 시료는 메탄올성 수산화나트륨용액(NaOH solution in MeOH)으로 처리하여 알칼리염을 만든 후 트리플루오로보란메탄올(BF₃ in MeOH)을 가하고 가열하여 에스테르화하여 생성된 지방산에스테르를 이소옥탄에 녹여 시료

로 사용하였다. 시료는 1 μ L씩 주입하였으며, 불꽃이온화 검출기(flame ionization detector, FID)를 사용하여 분석하였다. 지방산 확인을 위한 표준물질은 Supelco 37 component FAME (fatty acid methyl ester) mix C4~C24 (Supelco, USA)를 사용하여 retention time을 비교하여 확인하였다.

(2) 발효인삼종자 오일 중의 식물성 스테롤(phytosterol) 분석

발효인삼종자 오일 0.5 g에 내부 표준물질인 5 α -cholestane (in hexane) 0.5 mL (2 mg/mL) 과 6% pyrogallol (in ethanol)용액 10 mL을 넣은 후 1분간 vortex 후 질소로 1분간 flushing 하였다. 그 후 상온에서 10분간 sonication을 진행하였다. 여기에 8 mL의 60% KOH (in DW) 용액을 가한 후 vortex 후 1분간 다시 질소로 flushing하여 내부 산소를 질소로 치환하였다. 이를 1시간 동안 75 $^{\circ}$ C, 100 rpm으로 shaking water bath에서 검화를 수행한 후 잔물을 이용하여 냉각시켰다. 그 후 2% NaCl (in DW)용액 20 mL과 추출용매(hexane:ethyl acetate = 85:15, BHT 0.01% 첨가)를 15 mL 첨가하여 1분간 vortex를 진행한 후 상등액을 분리하여 50 mL volumetric flask에 옮겼다. 이 때 sodium sulfate에 여액이 통과하도록 하여 탈수시켰으며 이를 3번 반복하였다. 50 mL까지 정용한 후 잘 혼합하여 추출액 중 20 mL을 취한 후 질소로 용매를 완전히 제거한 후 hexane 1 mL을 가하여 용해시켜서 0.50 μ m filter로 여과한 후 GC vial에 옮겨 phytosterol 중에서 β -sitosterol, stigmasterol, campesterol를 분리 및 검출하였다. 기기 분석은 gas chromatography (GC, younglin M600D, Korea)를 사용하여 분석하였고, 이 때 사용한 칼럼은 HP ultra-2 Crosslinked 5% PH ME siloxane (25 m \times 0.25 mm \times 0.33 μ m)를 사용하였으며, 칼럼온도는 285 $^{\circ}$ C, 주입온도와 검출기 온도는 300 $^{\circ}$ C로 하였다. 운반가스는 N₂를 사용하였고 시료는 2 μ L 주입하였으며, 각 시료 당 총 분석시간은 40 min이었다. 표준 시료(standard)는 70% β -sitosterol과 5 α -cholestane 용액을 이용하여 RF 값을 계산하여 정량하였다.

(3) 발효인삼종자 오일의 페놀성 성분 분석

발효인삼종자 오일 중의 페놀성 성분에 대한 분석은 high performance liquid chromatography (HPLC, PU-980, Jasco Co., Japan)를 사용하였다. 페놀성 성분의 HPLC 분석 column은 Waters C-18 column (5.0 μ m, 4.6 \times 250 mm, Ireland)을 사용하여 2% acetic acid를 함유한 Water (solvent A)와 0.5% acetic acid를 함유하는 50% acetonitrile (solvent B)을 이동상으로 사용하였다. 전개는 A용매를 100%에서 70분 후 45%로 gradient를 주어 0.8 mL/min의 속도로 총 80분간 진행하였으며 시료는 20 μ L 주입하였다. 시료의 검출은 UV detector (MD-2010, Jasco Co., Japan)를 사용하여 280 nm에서 측정하였다. 분석에 사용한 표준물질은 총 10 종으로 maltol, coumaric acid, cinnamic acid, salicylic acid, vanillic acid, syringic acid, ferulic acid, gentisic acid, caffeic acid 는 Sigma (USA), hydroxy benzoic acid는 Junsei (Japan)의 제품을 사용하였다.

발효인삼종자 오일시료의 전처리는 각 시료 2 g 씩을 취하여 n-hexane 10 mL에 녹인 후 80% methanol 20 mL를 가하여 80°C 환류추출장치에서 2시간동안 폐놀성 성분을 추출하였다. 이 추출물에 n-hexane 10 mL을 가하여 잔존하는 유지성분을 제거하고 층 분리 된 80% methanol 층을 감압 농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 농축된 추출물은 10 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹인 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다.

(나) 결과 및 고찰

(3) 발효인삼종자 오일의 지방산조성 분석

발효인삼종자 오일의 추출방법에 따른 지방산 조성 및 함량을 살펴본 결과는 표 40과 같다. 전반적으로 인삼종자의 발효 및 추출방법에 의한 지방산 조성의 차이는 크지 않았다. 발효인삼종자 오일의 지방산 조성은 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)를 78%, linoleic acid(C18:2)가 18% 정도로 전체 지방산 함량의 90% 이상 차지한 것을 알 수 있었고, 특히 oleic acid의 비중이 높게 나타났다. 이 외에 palmitic acid(C16:0)를 약 2%, 그리고 일부 palmitoleic acid(C16:1), stearic acid(C18:0), α-linolenic acid(C18:3, ω3), γ-linolenic acid(C18:3, ω6), gadoleic acid(C20:1)를 함유하고 있었다. 이러한 결과는 이(1988)의 개화시기에 따른 인삼 종자 내 지방산 함유량을 살펴본 결과인 oleic acid>linoleic acid> palmitic acid>stearic acid 순으로 나타난 것과 유사한 것을 알 수 있었다. 표 40에 나타난 것과 같이 압착추출방법과 용매추출방법으로 추출한 오일의 지방산 조성은 처리구간 거의 차이가 나타나지 않았다. 반면 초임계추출방법으로 추출한 오일의 경우 다른 추출방법과 비교하여 포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid가 높게 나타났다. 특히 *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주로 발효하여 추출한 오일의 수치가 가장 높게 증가하였고, 포화지방산의 증가에 따라 oleic acid가 상대적으로 감소한 것을 확인하였다.

표 40. 추출방법에 따른 발효인삼종자 오일의 지방산 조성 및 함량

Fatty acid (g/100g)	균주명	palmitic acid	stearic acid	palmitoleic acid	oleic acid	linoleic acid	γ -linolenic acid	α -linolenic acid	gadoleic acid	Total
		C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3 (ω 6)	C18:3 (ω 3)	C20:1	
compress extraction	control	2.1	0.3	0.3	79.1	17.9	0.1	0.1	0.1	100.0
	KFRI 1124	2.1	0.3	0.3	79.2	17.8	0.1	0.1	0.1	100.0
	KFRI 1127	2.1	0.3	0.3	78.9	18.1	0.1	0.1	0.1	100.0
	LY011	2.0	0.3	0.3	79.3	17.8	0.1	0.1	0.1	100.0
	KCTC 3162	2.0	0.3	0.3	79.4	17.7	0.1	0.1	0.1	100.0
solvent extraction	control	2.1	0.3	0.3	78.5	18.5	0.1	0.1	0.1	100.0
	KFRI 1124	2.0	0.3	0.3	80.2	16.9	0.1	0.1	0.1	100.0
	KFRI 1127	2.1	0.4	0.3	78.7	18.2	0.1	0.1	0.1	100.0
	LY011	2.0	0.4	0.3	78.7	18.3	0.1	0.1	0.1	100.0
	KCTC 3162	2.0	0.3	0.3	78.5	18.6	0.1	0.1	0.1	100.0
supercritical fluid extraction (150bar, 65°C)	control	4.0	0.5	0.3	77.1	17.7	0.1	0.1	0.2	100.0
	KFRI 1124	2.5	0.4	0.3	79.3	17.2	0.1	0.1	0.1	100.0
	KFRI 1127	2.7	0.4	0.3	77.9	18.4	0.1	0.1	0.1	100.0
	LY011	5.8	0.7	0.3	75.2	17.6	0.1	0.1	0.2	100.0
	KCTC 3162	2.1	0.4	0.3	79.2	17.7	0.1	0.1	0.1	100.0

(4) 추출방법에 따른 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석

추출방법에 따른 발효인삼종자 오일의 phytosterol 성분으로 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, sitostanol 의 함량 및 그 비율은 다음 표 41과 같다. 추출방법에 따라서 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, sitostanol의 함량이 큰 차이를 보였고 total phytosterol이 가장 높은 함량을 나타낸 추출방법은 초임계 추출방법이었고, 다음으로 용매추출, 압착추출 순으로 나타났다.

각각의 추출방법에 따른 오일의 phytosterol 함량 차이를 살펴보면 다음과 같다. Campesterol의 경우 압착추출과 용매추출 방법으로 추출한 오일에서 함량이 유사하게 측정되었고, 다른 성분인 stigmasterol, β -sitosterol, sitostanol 함량은 압착추출 오일보다 용매추출오일에서 더 높은 함량을 보였다. 총 phytosterol 함량의 경우 초임계추출 한 오일이 압착추출과

용매추출 한 오일 시료보다 두 배 정도 증가한 것으로 나타났다. Stigmasterol, β -sitosterol, sitostanol 은 압착추출<용매추출<초임계추출 오일 순으로 뚜렷하게 증가하였는데, β -sitosterol 이 가장 크게 증가하는 것으로 나타났다.

발효균주에 따른 오일의 phytosterol 함량도 차이를 보였는데 압착추출과 용매추출방법으로 추출한 오일은 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162로 발효한 phytosterol의 함량이 각각 296.6 mg/100g, 445.75 mg/100g 으로 다른 균주로 발효한 오일의 phytosterol 함량보다 높은 수치를 보였다. 특히, 초임계추출 방법으로 추출한 경우 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주로 발효한 오일의 phytosterol 함량이 983.58 mg/100g 으로 추출방법 중 가장 높은 수치를 보여 같은 시료임에도 추출방법에 따른 phytosterol의 추출정도가 다른 것을 확인하였다. 이러한 결과는 초임계추출 방법이 비극성 물질을 잘 용해하는 특성을 가지고 있기 때문에 다른 추출방법으로 추출한 오일보다 phytosterol 함량이 높게 나온 것으로 사료된다.

김등은 일반적으로 식물 유지의 phytosterol 조성은 β -sitosterol이 40~60%로 조성비가 가장 높고 campesterol 10~30%, stigmasterol 10~20%, 그리고 Δ^5 -avenastanol이 약 5%에 달한다는 보고하였는데, 본 연구의 결과도 마찬가지로 phytosterol 함량에 다소 차이는 나타났으나 시료나 추출방법에 상관없이 β -sitosterol (sitostanol 포함)이 60% 이상을 차지하였고, campesterol 10~20%, stigmasterol 12~18% 로 유사한 결과를 나타냈다.

표 41. 추출방법에 따른 발효인삼종자 오일의 phytosterol 함량 분석

		mg/100g				
		campesterol	stigmasterol	β -sitosterol	sitostanol	Total
compress extraction	control	42.70±0.77	44.18±4.82	45.34±0.26	141.21±0.97	273.43
	(%)	15.6	16.2	16.6	51.6	100
	KFRI 1124	54.21±8.33	41.79±0.30	41.72±3.54	146.82±16.13	284.54
	(%)	19.0	14.7	14.7	51.6	100
	KFRI 1127	49.11±4.86	41.84±6.72	41.37±1.96	138.51±9.82	270.83
(%)	18.1	15.4	15.3	51.2	100	
	LY 011	51.15±4.52	45.46±0.79	46.36±2.97	147.80±7.52	290.77
(%)	17.6	15.6	16.0	50.8	100	
	KCTC 3162	59.41±9.26	49.66±1.24	45.61±0.15	141.92±18.11	296.60
(%)	20.0	16.8	15.4	47.8	100	
solvent extraction	control	56.09±0.47	55.31±0.89	148.09±7.00	151.90±10.12	411.39
	(%)	13.6	13.4	36.0	37.0	100
	KFRI 1124	53.33±6.88	73.76±7.20	164.98±3.17	113.57±5.30	405.64
	(%)	13.1	18.2	40.7	28.0	100
	KFRI 1127	51.75±7.76	60.64±6.59	154.83±10.08	151.68±0.57	418.90
(%)	12.4	14.5	36.9	36.2	100	
	LY 011	52.38±8.61	64.69±11.29	167.48±25.86	155.90±4.31	440.45
(%)	11.9	14.7	38.0	35.4	100	
	KCTC 3162	56.95±5.12	54.68±0.23	175.77±7.89	158.32±5.16	445.72
(%)	12.8	12.3	39.4	35.5	100	
supercritical fluid extraction (150bar,65 °C)	control	105.59±18.45	116.76±4.08	295.21±1.23	228.49±34.19	746.05
	(%)	14.2	15.7	39.5	30.6	100
	KFRI 1124	90.35±5.15	156.65±1.46	386.53±10.44	241.04±14.76	874.57
	(%)	10.3	17.9	44.2	27.6	100
	KFRI 1127	118.22±7.82	160.72±24.94	398.91±24.42	305.73±17.12	983.58
(%)	12.0	16.3	40.6	31.1	100	
	LY 011	112.78±2.94	126.56±12.93	344.43±7.26	272.80±4.44	856.57
(%)	13.2	14.8	40.2	31.8	100	
	KCTC 3162	120.82±3.50	140.05±7.00	391.91±4.95	291.65±10.36	944.43
(%)	12.8	14.8	41.5	30.9	100	

(가) 압착추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석

압착추출 방법으로 추출한 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석 결과 및 크로마토그램은 표 42, 그림 30-34와 같다. 압착추출 한 오일의 경우 발효처리가 전반적인 phytosterol 증가 효과를 나타냈지만 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주로 발효한 오일의 phytosterol 함량은 270.83 mg/100g 으로 발효하지 않은 대조구 273.43 mg/100g보다 감소한 경향을 보였다. 압착추출로 추출한 오일의 경우 sitostanol의 함량이 전체 phytosterol 중 평균 50% 이상으로 큰 비중을 차지하였고, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol 은 15~20% 정도 차지하는 것으로 나타났다.

압착추출의 경우 시료 간 함량차이는 있지만 평균적으로 *Bacillus* 균주보다는 *Pediococcus*나 *Lactobacillus*로 발효시킨 오일의 phytosterol 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 특히 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효시킨 오일의 phytosterol 함량이 296.60 mg/100g 으로 가장 높게 나타났다.

표 42. 압착추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석

	mg/100g				
	campesterol	stigmasterol	β -sitosterol	sitostanol	Total
control	42.70±0.77	44.18±4.82	45.34±0.26	141.21±0.97	273.43
KFRI 1124	54.21±8.33	41.79±0.30	41.72±3.54	146.82±16.13	284.54
KFRI 1127	49.11±4.86	41.84±6.72	41.37±1.96	138.51±9.82	270.83
LY 011	51.15±4.52	45.46±0.79	46.36±2.97	147.80±7.52	290.77
KCTC 3162	59.41±9.26	49.66±1.24	45.61±0.15	141.92±18.11	296.60

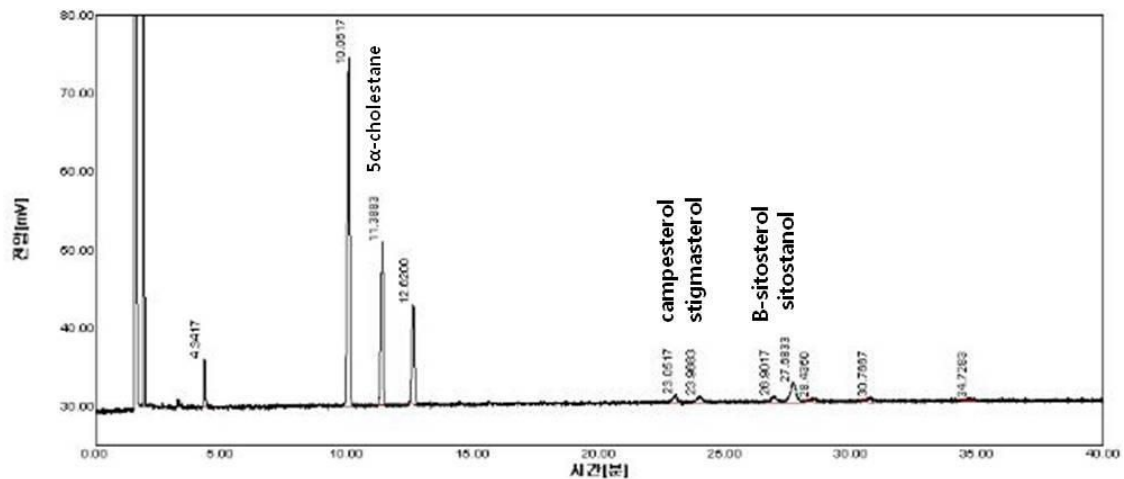


그림 30. 압착추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol graph (Control).

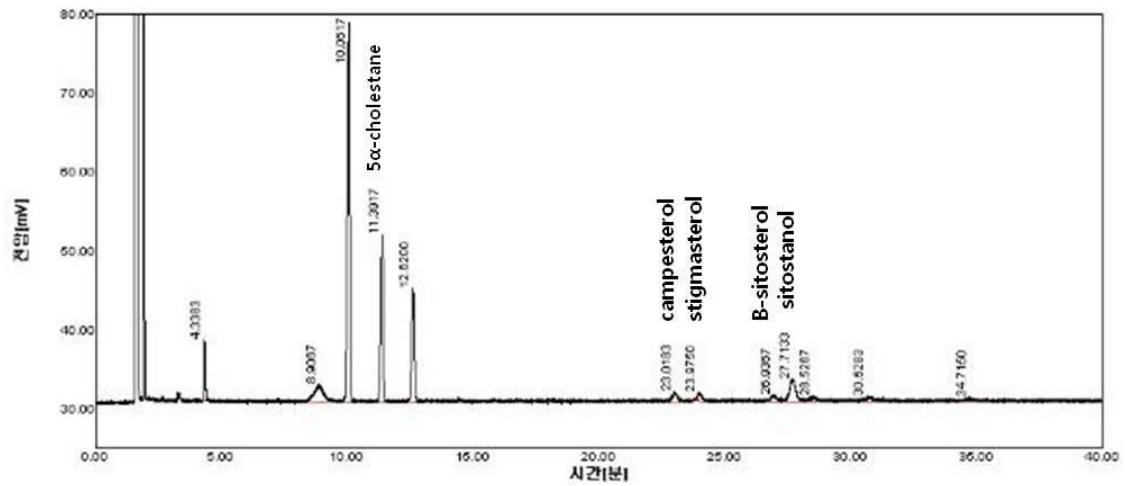


그림 31. 압착추출 발효인삼종자 오일의 phytoosterol graph (KFRI 1124).

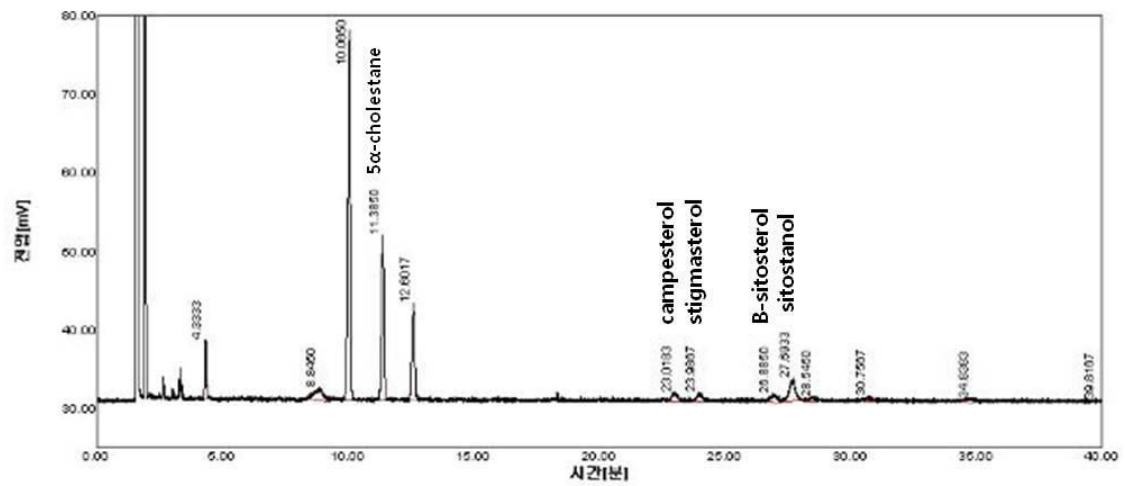


그림 32. 압착추출 발효인삼종자 오일의 phytoosterol graph (KFRI 1127).

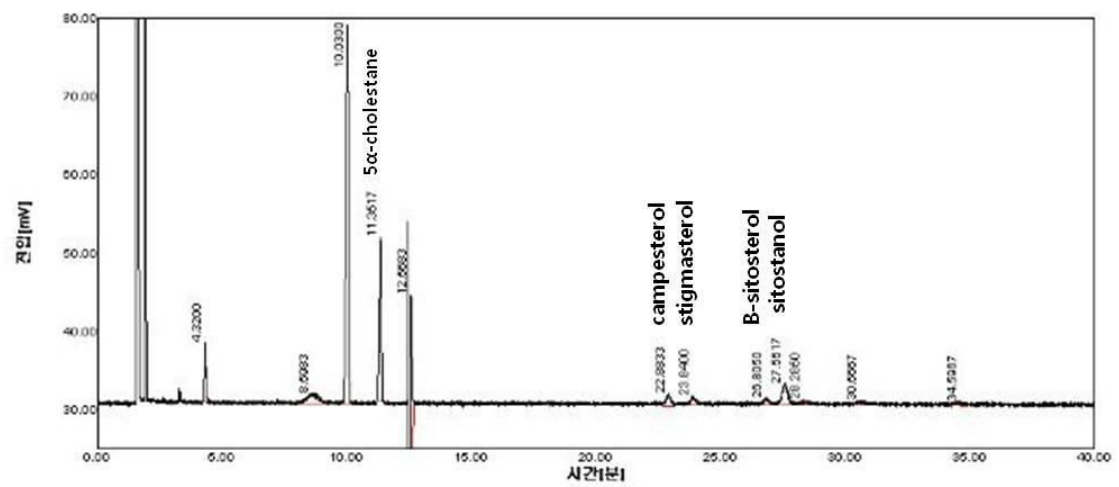


그림 33. 압착추출 발효인삼종자 오일의 phytoosterol graph (LY 011).

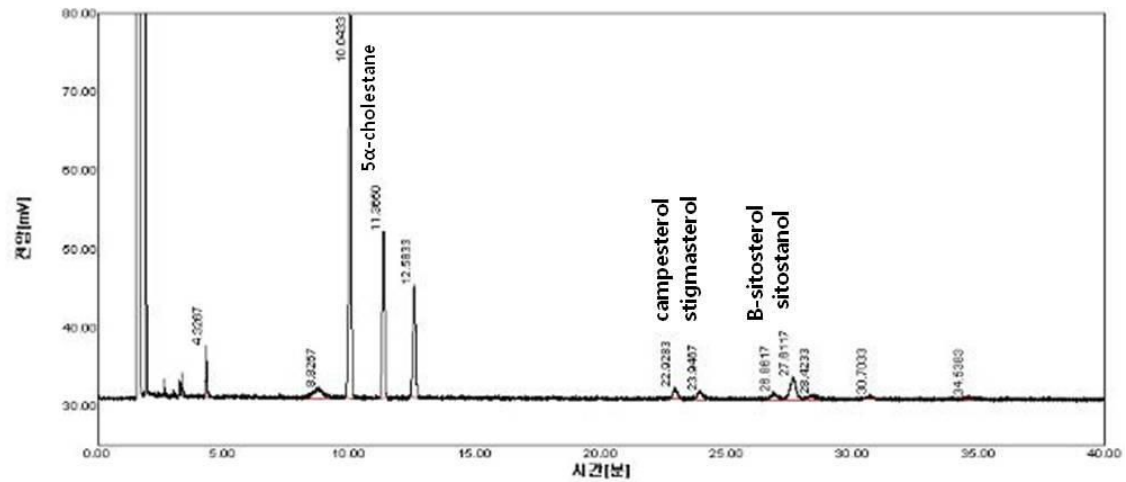


그림 34. 압착추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol graph (KCTC 3162).

(나) 용매추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석

용매추출 방법으로 추출한 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석 결과 및 크로마토그램은 표 43과 그림 35-39와 같다. 압착추출 방법과 비교하여 가장 특징적인 것은 β -sitosterol의 함량이 크게 증가하여 sitostanol 함량과 비슷하거나 더 높게 나타났고, campesterol을 제외한 다른 성분들 역시 증가하는 경향을 보였다. Total phytosterol 함량은 *Bacillus subtilis* KFRI 1124 균주로 발효시킨 오일이 대조구 (411.39 mg/100g)보다 낮은 405.64 mg/100g으로 가장 낮게 나타났고, 압착추출과 마찬가지로 *Bacillus* 균주보다는 *Pediococcus*나 *Lactobacillus*로 발효시킨 오일의 phytosterol 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 용매추출 오일의 경우 그 차이가 뚜렷하게 나타났는데, 이러한 결과는 인삼종자의 발효과정 중 발효균주가 인삼종자의 내부 matrix를 자극하여 phytosterol의 함량이 차이를 보인 것으로 판단되었다. 오일 중 total phytosterol 함량이 445.72 mg/100g으로 가장 높게 나타난 발효균주는 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 이었다.

표 43. 용매추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석

	mg/100g				
	campesterol	stigmasterol	β -sitosterol	sitostanol	Total
control	56.09±0.47	55.31±0.89	148.09±7.00	151.90±10.12	411.39
KFRI 1124	53.33±6.88	73.76±7.20	164.98±3.17	113.57±5.30	405.64
KFRI 1127	51.75±7.76	60.64±6.59	154.83±10.08	151.68±0.57	418.90
LY 011	52.38±8.61	64.69±11.29	167.48±25.86	155.90±4.31	440.45
KCTC 3162	56.95±5.12	54.68±0.23	175.77±7.89	158.32±5.16	445.72

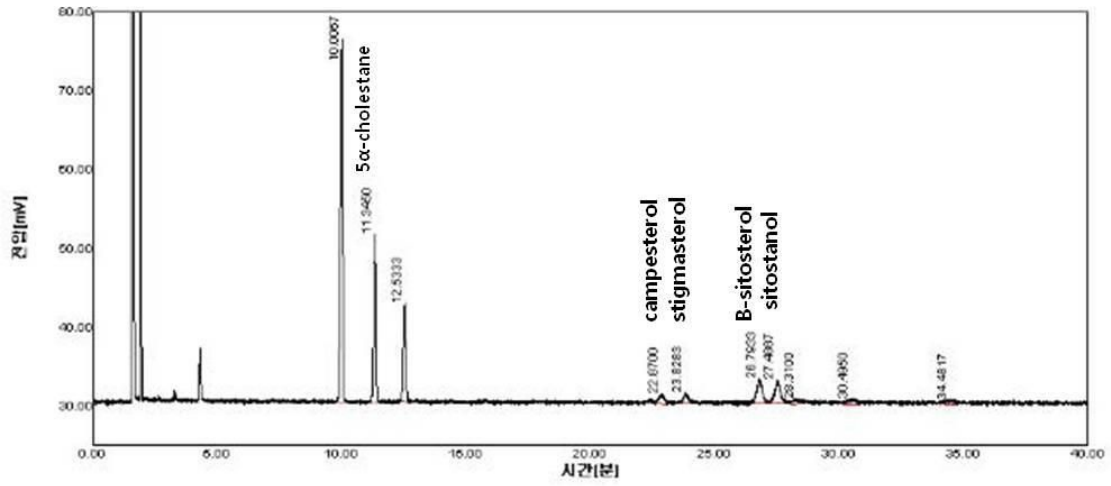


그림 35. 용매추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol graph (Control).

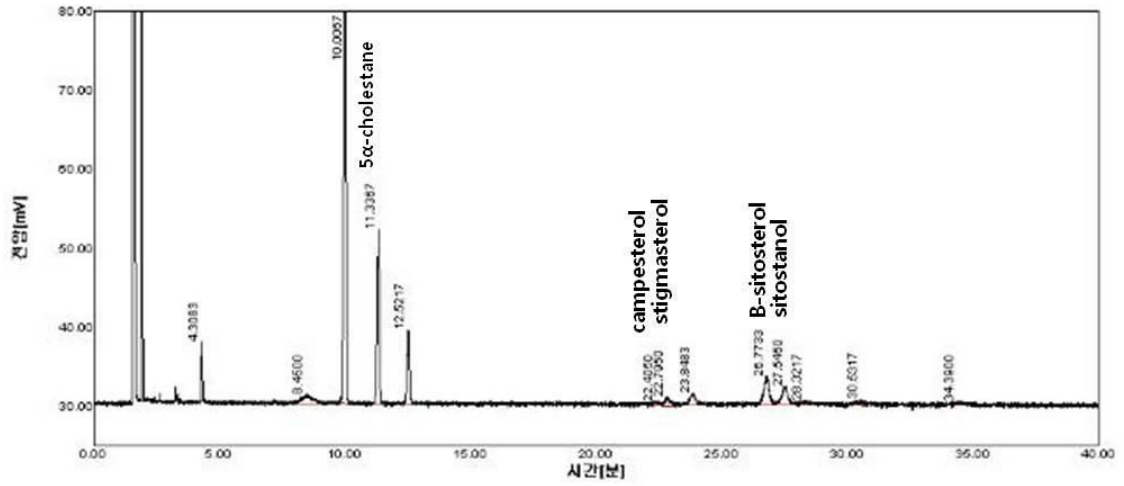


그림 36. 용매추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol graph (KFR1 1124).

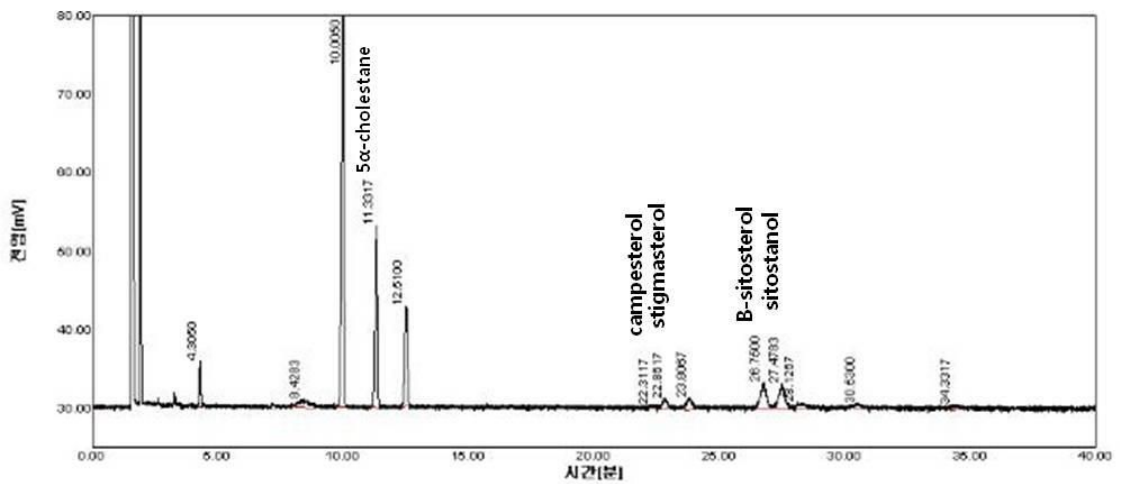


그림 37. 용매추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol graph (KFR1 1127).

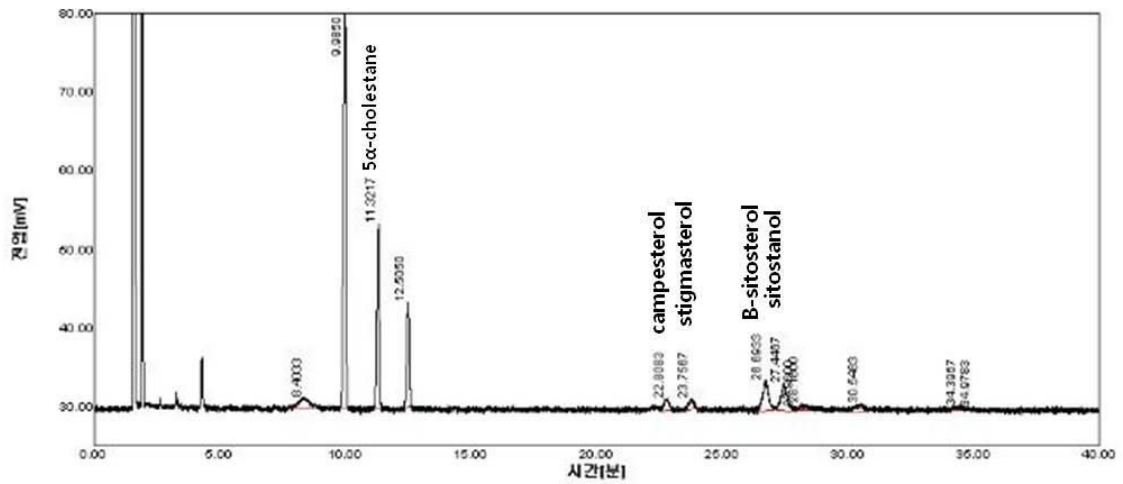


그림 38. 용매추출 발효인삼종자 오일의 phyosterol graph (LY 011).

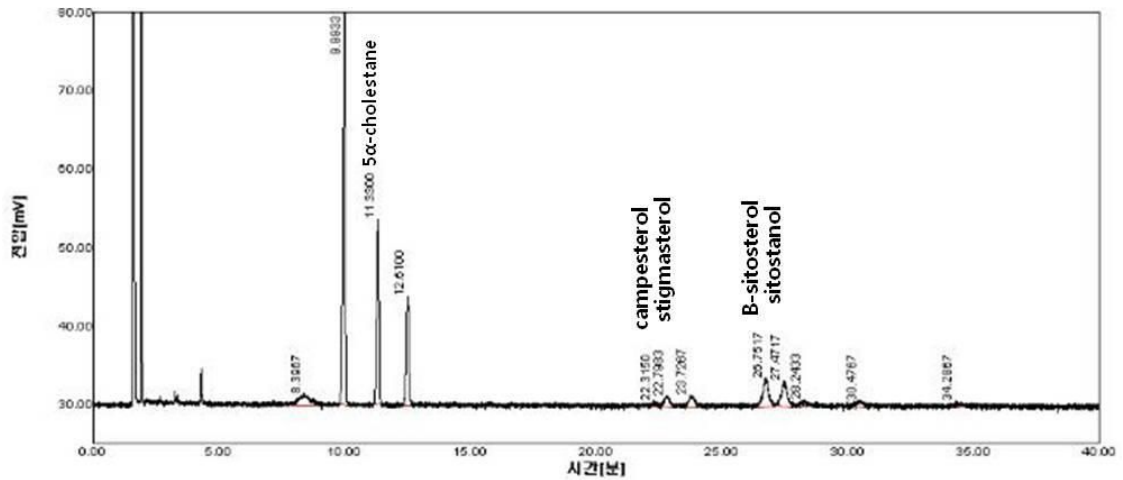


그림 39. 용매추출 발효인삼종자 오일의 phyosterol graph (KCTC 3162).

(다) 초임계추출 발효인삼종자 오일의 phyosterol 분석

초임계추출 방법으로 추출한 발효인삼종자 오일의 phyosterol 분석 결과 및 크로마토그램은 표 44와 그림 40-44와 같다. 전반적으로 초임계추출 방법으로 추출한 오일은 다른 추출방법과 비교하여 높은 phyosterol 함량을 보였는데, 압착추출보다 3배, 용매추출 오일보다는 2배 이상 높은 함량으로 측정되었다. 또한 발효 후 추출한 오일은 발효하지 않고 추출한 대조구와 비교하여 total phyosterol 함량이 모두 증가하는 경향을 보였다. 특히 β -sitosterol의 증가가 두드러지게 나타났는데, 가장 높은 함량을 나타낸 발효 균주는 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 로 398.91 mg/100g 의 높은 함량을 나타냈다. *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주의 경우 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, sitostanol 의 함량이 다른 균주로 발효한 오일보다 높은 수치를 보였다.

표 44. 초임계추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol 분석

	campesterol	stigmasterol	β -sitosterol	sitostanol	Total
control	105.59±18.45	116.76±4.08	295.21±1.23	228.49±34.19	746.05
KFRI 1124	90.35±5.15	156.65±1.46	386.53±10.44	241.04±14.76	874.57
KFRI 1127	118.22±7.82	160.72±24.94	398.91±24.42	305.73±17.12	983.58
LY 011	112.78±2.94	126.56±12.93	344.43±7.26	272.80±4.44	856.57
KCTC 3162	120.82±3.50	140.05±7.00	391.91±4.95	291.65±10.36	944.43

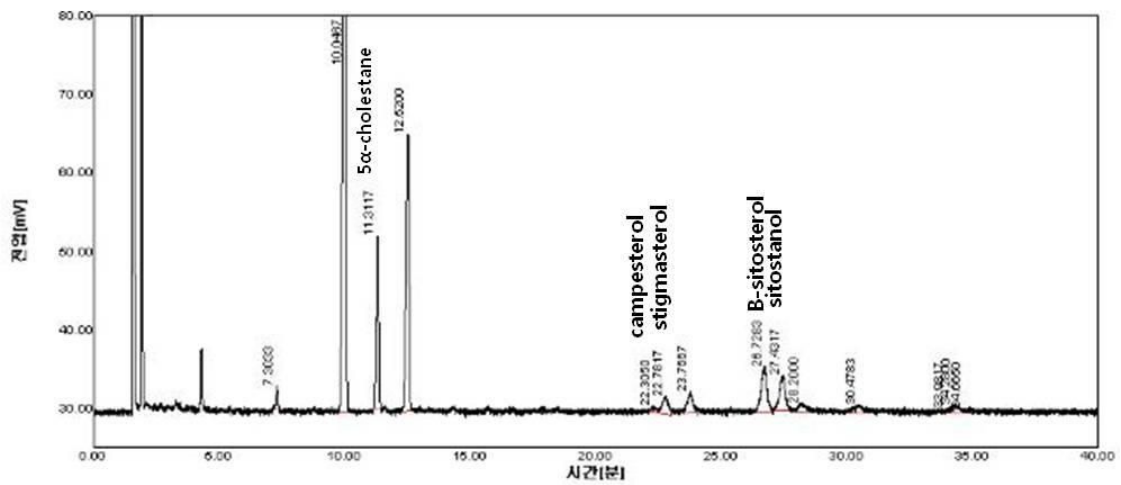


그림 40. 초임계추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol graph (Control).

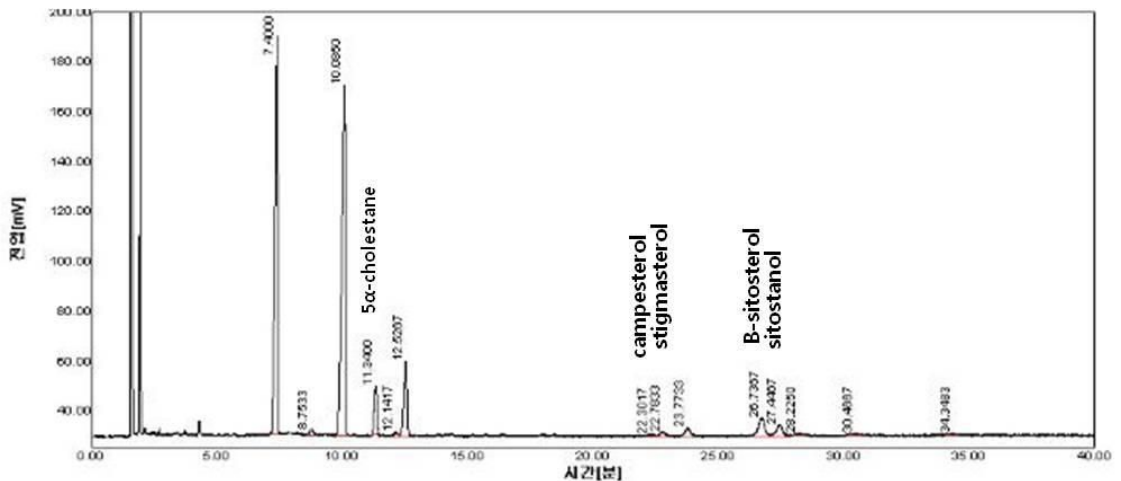


그림 41. 초임계추출 발효인삼종자 오일의 phytosterol graph (KFRI 1124).

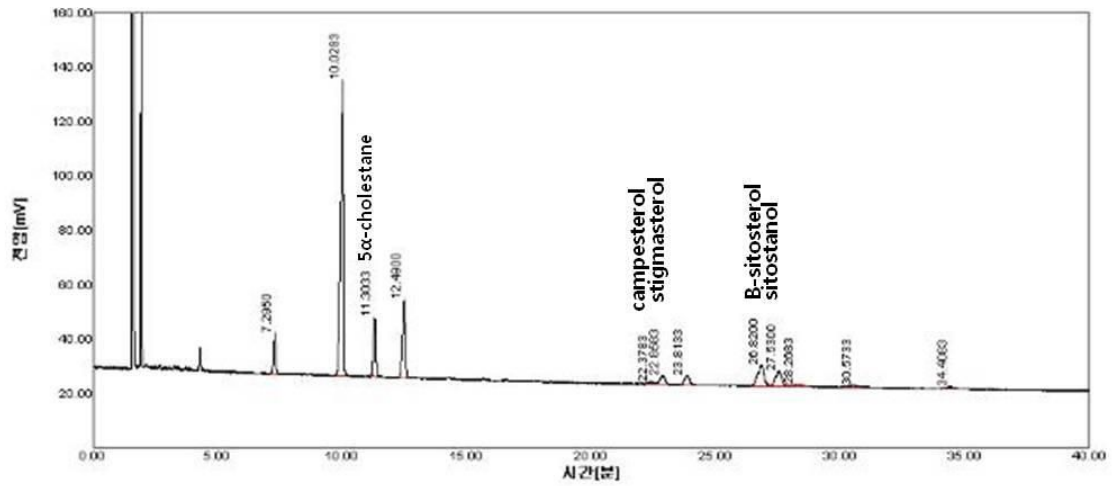


그림 42. 초임계추출 발효인삼종자 오일의 phytoosterol graph (KFR1 1127).

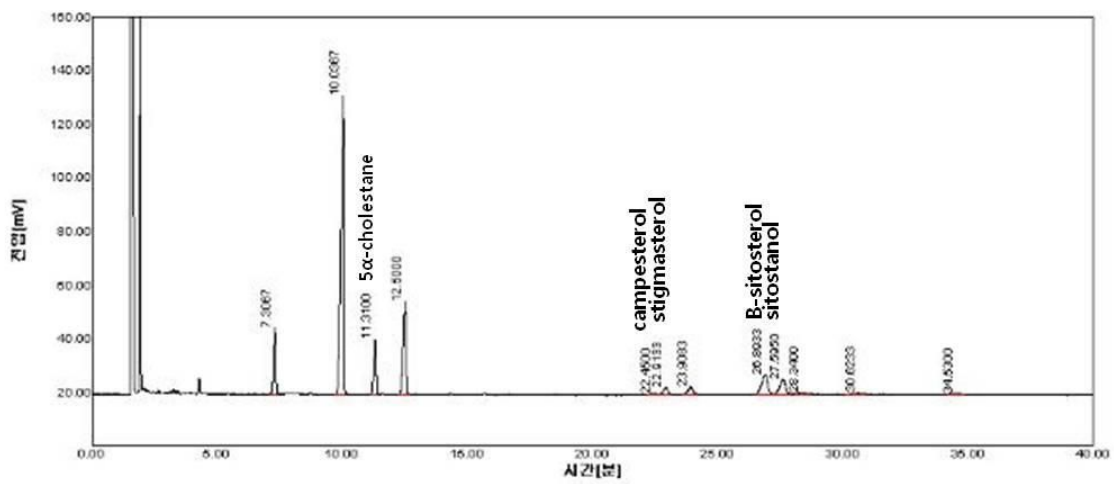


그림 43. 초임계추출 발효인삼종자 오일의 phytoosterol graph (LY 011).

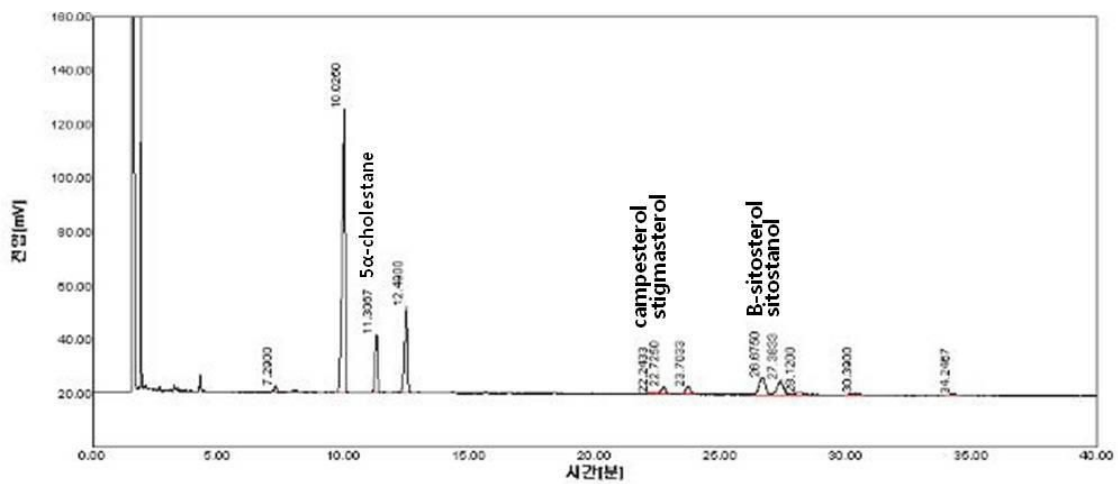


그림 44. 초임계추출 발효인삼종자 오일의 phytoosterol graph (KCTC 3162).

(4) 발효인삼종자 오일의 페놀성분 분석

추출방법을 달리하여 추출한 발효인삼종자 오일 중의 페놀성분을 분석한 결과 추출방법에 따라 검출되는 페놀성분 및 그 함량에 있어서 차이를 나타내었다. 압착추출 한 오일의 경우 maltol, *p*-coumaric acid, trans-cinnamic acid 가 검출되었고, 용매추출 한 오일은 *p*-coumaric acid 와 trans-cinnamic acid, 초임계추출 한 오일은 maltol, vanillic acid+caffeic acid, *p*-coumaric acid, trans-cinnamic acid 가 검출되어 추출방법에 따른 차이를 보였다. 특히 trans-cinnamic acid 는 추출방법이나 발효조건에 관계없이 모든 시료에서 공통적으로 검출된 것을 확인하였다. 앞서 발효인삼종자 분말의 페놀성분을 분석한 결과 *p*-coumaric acid 만이 검출되었는데, 추출방법에 따라 추출된 오일에서도 모두 검출되었고, 이외에 더 많은 성분이 검출되었는데 이는 추출과정에서 영향을 받은 것으로 판단되었다. 한편 발효하지 않은 대조구에서 *p*-coumaric acid 가 모두 검출되지 않았는데, 이는 인삼종자 분말 추출물에서 검출된 *p*-coumaric acid 양이 0.069 µg/g 으로 미량이었고, 또한 발효처리한 시료의 결과에서 나타난 것과 같이 오일 중의 페놀성분은 분말 추출물에서 나타난 함량보다 크게 감소하는 것으로 나타난 것과 같은 이유 때문으로 사료되었다. *p*-Coumaric acid 의 함량은 *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주로 발효하고 초임계추출 한 오일을 제외하고 발효인삼종자 분말에서의 값이 모두 높게 측정되었다.

(가) 압착추출 발효인삼종자 오일의 페놀성분 분석

압착추출 방법으로 추출한 오일의 페놀성분 분석 결과는 표 45와 같다. 압착추출 오일 시료에서는 maltol, *p*-coumaric acid, ferulic acid, trans-cinnamic acid 가 검출되었다. Maltol의 경우 *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주와 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효한 오일에서 각각 0.072 µg/g, 0.054 µg/g 이 검출되었고 다른 처리구에서는 검출되지 않았다. *p*-Coumaric acid 는 발효균주에 따른 차이가 크게 나타났는데, 발효하지 않은 오일에서는 검출되지 않았고 *Bacillus subtilis* KFRI 1124, 1127 균주로 발효한 오일에서는 0.020 µg/g, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주 발효 오일은 0.279 µg/g 이 검출되었고, *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주 발효 오일은 분말 추출물에서 검출된 0.448 µg/g 함량보다 높은 0.778 µg/g 으로 크게 증가한 것으로 나타났다. 특징적으로 다른 추출방법에서 검출되지 않은 ferulic acid 성분이 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효한 오일에서 0.045 µg/g 검출된 것을 확인하였다. Trans-cinnamic acid 는 대조구 오일과 *Bacillus subtilis* KFRI 1124, KFRI 1127 균주로 발효한 오일의 함량이 각각 0.070 µg/g, 0.061 µg/g, 0.072 µg/g 이 검출되어 큰 차이가 없었다. *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주 발효 오일의 경우 trans-cinnamic acid 가 0.092 µg/g 검출되어 대조구 오일과 비교하여 소폭 증가하였고, *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주 발효 오일은 0.141 µg/g 으로 대조구 오일보다 두 배 정도 증가한 수치를 보였다. 압착추출 오일에서는 *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주로 발효한 오일의 페놀성분 함량이 모두 높게 측정되었다.

표 45. 압착추출 발효인삼종자 오일의 페놀성분 분석

Phenolic compound ($\mu\text{g/g}$)	Fermentation strain				
	Control	<i>B.subtilis</i> KFRI 1124	<i>B.subtilis</i> KFRI 1127	<i>P.pentosaceus</i> LY 011	<i>L.gasseri</i> KCTC 3162
maltol	ND ¹⁾	ND	ND	0.072	0.054
<i>p</i> -hydroxy benzoic acid	ND	ND	ND	ND	ND
gentisic acid	ND	ND	ND	ND	ND
vanillic acid+caffeic acid	ND	ND	ND	ND	ND
syringic acid	ND	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -coumaric acid	ND	0.020	0.020	0.778	0.279
ferulic acid	ND	ND	ND	ND	0.045
salicylic acid	ND	ND	ND	ND	ND
trans-cinnamic acid	0.070	0.061	0.072	0.141	0.092

¹⁾ not detected

(나) 용매추출 발효인삼종자 오일의 페놀성분 분석

용매추출 방법으로 추출한 오일의 페놀성분 분석 결과는 표 46과 같다. 용매추출 한 오일의 페놀성분은 *p*-coumaric acid 와 trans-cinnamic acid 2종이 검출되었는데 다른 추출방법으로 추출한 오일과 비교하여 검출된 성분 수와 함량이 크게 낮은 것으로 나타났다. *p*-Coumaric acid 는 압착추출 오일과 마찬가지로 발효하지 않은 대조구 오일에서는 검출되지 않았고, 가장 높은 값을 보인 오일은 *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주로 발효한 것으로 0.042 $\mu\text{g/g}$ 이었다. Trans-cinnamic acid 는 대조구 오일의 함량(0.009 $\mu\text{g/g}$)과 발효처리 한 오일의 함량이 모두 유사한 값을 보여 발효균주간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 46. 용매추출(n-hexane) 발효인삼종자 오일의 페놀성분 분석

Phenolic compound ($\mu\text{g/g}$)	Fermentation strain				
	Control	<i>B.subtilis</i> KFRI 1124	<i>B.subtilis</i> KFRI 1127	<i>P.pentosaceus</i> LY 011	<i>L.gasseri</i> KCTC 3162
maltol	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -hydroxy benzoic acid	ND	ND	ND	ND	ND
gentisic acid	ND	ND	ND	ND	ND
vanillic acid+caffeic acid	ND	ND	ND	ND	ND
syringic acid	ND	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -coumaric acid	ND	0.025	0.018	0.042	0.022
ferulic acid	ND	ND	ND	ND	ND
salicylic acid	ND	ND	ND	ND	ND
trans-cinnamic acid	0.009	0.010	0.013	0.013	0.012

¹⁾ not detected

(다) 초임계추출 발효인삼종자 오일의 페놀성분 분석

초임계추출 방법으로 추출한 오일의 페놀성분 분석 결과는 표 47과 같다. 초임계추출 방법으로 추출한 오일에서 검출된 페놀성분 함량은 압착추출과 용매추출 한 오일과 비교하여 모두 증가한 것을 확인하였다. 특히 발효 균주에 따라서 그 함량차이가 크게 나타났는데, *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주와 *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효한 오일의 함량이 크게 증가하였다. *Bacillus subtilis* KFRI 1127 균주로 발효한 오일의 경우 maltol 0.228 $\mu\text{g/g}$, vanillic acid+caffeic acid 0.267 $\mu\text{g/g}$, *p*-coumaric acid 2.249 $\mu\text{g/g}$, trans-cinnamic acid 0.287 $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었고, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효한 오일의 경우 maltol 0.227 $\mu\text{g/g}$, vanillic acid+caffeic acid 0.411 $\mu\text{g/g}$, *p*-coumaric acid 1.311 $\mu\text{g/g}$, trans-cinnamic acid 0.236 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 두 균주 모두 *p*-coumaric acid 의 증가가 두드러지게 나타나 분말 추출물에서 검출된 함량보다도 크게 증가하였고, maltol의 함량도 대조구와 비교하여 4배 이상 높게 나타났다. Vanillic acid+caffeic acid 역시 대조구 오일의 함량보다 크게 증가했는데, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3162 균주로 발효한 오일에서 대조구보다 6배 이상 높은 값을 보였다. *Bacillus subtilis* KFRI 1124 균주로 발효한 오일은 maltol 0.057 $\mu\text{g/g}$, vanillic acid+caffeic acid 0.066 $\mu\text{g/g}$, *p*-coumaric acid 0.219 $\mu\text{g/g}$, trans-cinnamic acid 0.056 $\mu\text{g/g}$ 으로 발효하지 않은 오일이 maltol 0.052 $\mu\text{g/g}$, vanillic acid+caffeic acid 0.062 $\mu\text{g/g}$, trans-cinnamic acid 0.118 $\mu\text{g/g}$ 으로 검출된 것과 비교하여 비슷하거나 약간 감소하는 경향을 보였다. *Pediococcus pentosaceus* LY 011 균주로 발효한 오일은 maltol 0.117 $\mu\text{g/g}$, vanillic acid+caffeic acid 0.125 $\mu\text{g/g}$, *p*-coumaric acid 0.094 $\mu\text{g/g}$, trans-cinnamic acid 0.182 $\mu\text{g/g}$ 이

검출되어 대체적으로 대조구 오일보다는 증가하는 경향을 보였는데 *p*-coumaric acid 는 다른 발효처리구와 비교하여 가장 낮은 값을 보였다.

표 47. 초임계추출 발효인삼종자 오일의 페놀성분 분석

Phenolic compound ($\mu\text{g/g}$)	Fermentation strain				
	Control	<i>B.subtilis</i> KFRI 1124	<i>B.subtilis</i> KFRI 1127	<i>P.pentosaceus</i> LY 011	<i>L.gasseri</i> KCTC 3162
maltol	0.052	0.057	0.228	0.117	0.227
<i>p</i> -hydroxy benzoic acid	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND
gentisic acid	ND	ND	ND	ND	ND
vanillic acid+caffeic acid	0.062	0.066	0.267	0.125	0.411
syringic acid	ND	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -coumaric acid	ND	0.219	2.249	0.094	1.311
ferulic acid	ND	ND	ND	ND	ND
salicylic acid	ND	ND	ND	ND	ND
trans-cinnamic acid	0.118	0.056	0.287	0.182	0.236

¹⁾ not detected

제 7 절 발효인삼종자 오일의 안전성 및 미백효과 검증

1. 발효인삼종자 오일의 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

(1) 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향

인체의 피부는 표피와 진피, 피하조직의 세 개 층으로 구성되어 있으며 이중 가장 바깥에 위치한 표피의 하부인 기저층에 피부색소인 멜라닌을 생성시키는 melanocytes가 존재한다. 피부의 색은 주로 melanin에 의하여 결정되며 melanin의 생성은 멜라닌 생성세포의 melanosome에서 이루어진다. 제조된 각각의 발효인삼종자오일 시료가 mouse 유래의 멜라닌 생성 세포인 melan-a 세포주에서 세포의 생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하기 위해 10% fetal bovine serum 과 1% penicillin-streptomycin, 200 nM의 phorbol-12 myristate 13-acetate 가 함유된 RPMI 1640 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 EtOH:H₂O = 6:4 용액에 녹인 각각의 발효인삼종자 오일 추출물 시료를 1 ug/mL, 10 ug/mL, 100 ug/mL의 농도로 3 일간 처리하였다. 세포 생존율은 배지 제거 후 PBS로 washing하고 well 당 crystal violet (CV 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS)를 200 µL 첨가하여 5 분간 상온에서 incubation한 후 EtOH 1 mL를 첨가하고 상온에서 10 분간 shaking한 후 590 nm에서 UV 흡수도를 측정하여 결정하였다. 또한 멜라닌 생성량은 배지 제거 후 PBS로 세척하고 well 당 1 N NaOH 1 mL를 가하여 멜라닌을 녹인 후 400 nm에서 UV 흡수도를 측정하여 결정하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향

앞서 1차 년도에 실시한 melan-a 세포에서 인삼종자 오일의 멜라닌 생성억제도를 살펴본 결과를 기반으로 발효 인삼종자 오일 시료 15종(표 48)을 제조하여 동일한 방법으로 세포생존율 및 멜라닌 생성억제도를 측정한 결과 그림 45에 나타난 것처럼 15종 모두 100 ppm 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.

표 48. 발효인삼종자 오일의 시료번호

시료번호	추출방법	발효균주명
1-1		무발효
1-2		KFRI 1124
1-3	압착추출	KFRI 1127
1-4		LY011
1-5		KCTC 3162
2-1		무발효
2-2		KFRI 1124
2-3	용매추출 (n-hexane)	KFRI 1127
2-4		LY011
2-5		KCTC 3162
3-1		무발효
3-2		KFRI 1124
3-3	초임계 추출 (150 bar, 35°C)	KFRI 1127
3-4		LY011
3-5		KCTC 3162

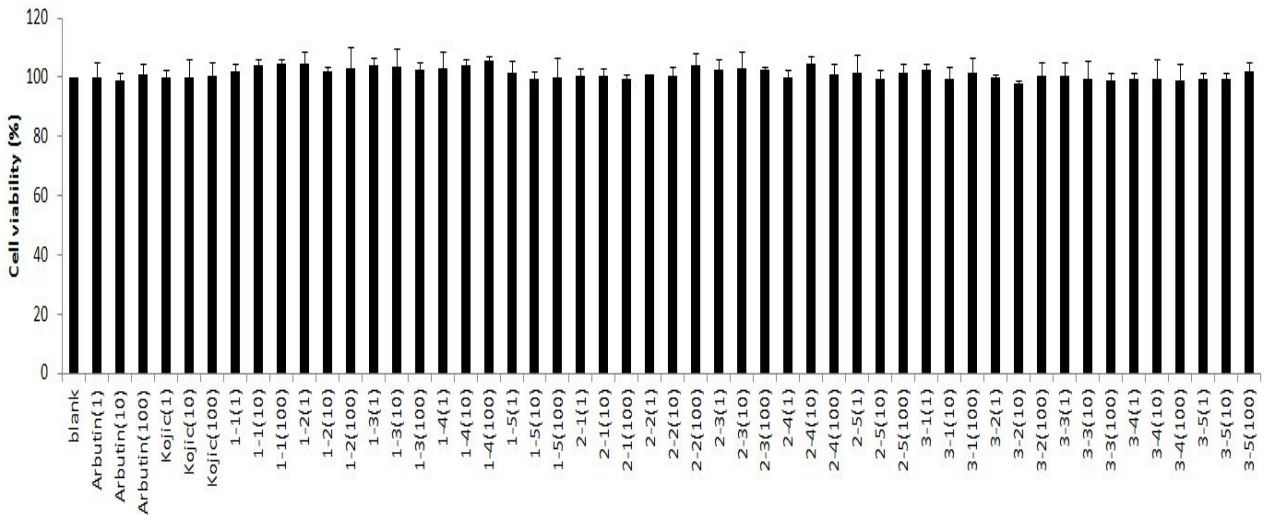


그림 45. 발효인삼종자 오일의 Melan-a 세포생존율에 미치는 영향.

멜라닌 생성에 미치는 영향을 측정된 결과는 그림 46에 나타나있다. 시료번호 3-1과 3-2 즉, 초임계 추출한 발효인삼종자 오일 중 무발효균과 *Bacillus subtilis* KFRI 1124 균주로 발효시킨 오일이 100 ppm에서 60% 이상의 멜라닌 생성억제 활성을 나타내어 미백기능성 고시물 질인 알부틴보다 동일농도에서 더욱 우수하였다. 이는 앞서 1차년도 결과에서 도출된 발효하지

많은 인삼종자 오일 보다 높은 활성이며 인삼종자 오일 시료가 추출물임을 고려할 때 매우 우수한 것으로 판단되었다.

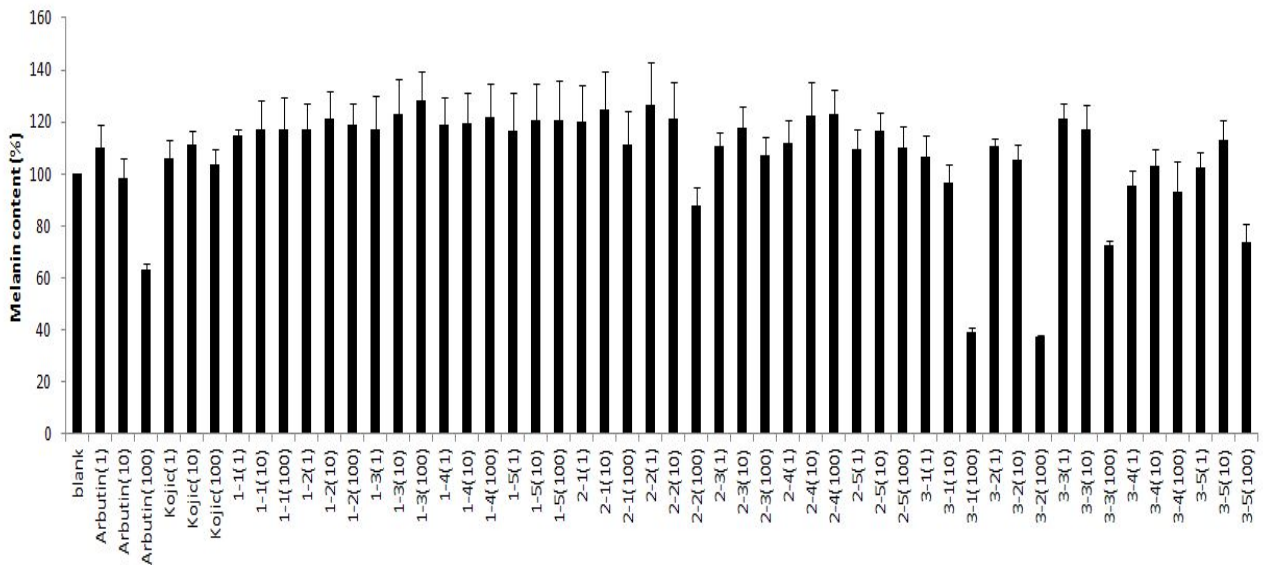


그림 46. 발효인삼종자 오일이 멜라닌 생성에 미치는 영향.

2. 발효인삼종자 오일 추출물 함유 수용액의 인체피부에 대한 효과

가. 재료 및 방법

앞서 멜라닌 생성억제활성 효과를 나타낸 3-2 시료인 *Bacillus subtilis* KFRI 1124 균주로 발효시켜 초임계추출방법으로 얻은 오일의 2% 수용액을 제조하여 한국식품연구원의 11명의 피시험자에게 제공하고 5주간 매일 2회씩 팔의 일정부위에 도포하면서 피부의 수분량, 유분량, 거칠기, 탄력도, 투명도를 피부측정기(Aramo-TS, Aramhuvis Co. Korea)를 이용하여 1 주일에 한 번씩 측정하였다.

또한 측정 종료 후 피시험자들에게 오일 함유 수용액의 사용 후 향, 색상, 끈적임, 피부흡수도, 종합적기호도를 9점 척도법으로 평가하도록 하였다. 또한 설문조사는 종합적 피부상태, 수분개선, 탄력개선, 피부색 개선, 각질감소, 모공감소 항목에 대하여 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 발효인삼종자 오일 수용액의 피부테스트 결과

초임계추출 한 *Bacillus subtilis* KFRI 1124 균주이용 발효인삼종자 오일을 피부에 도포하여 피부의 수분량, 유분량, 거칠기, 탄력도, 투명도를 측정한 결과는 다음 그림 47-51과 같다. 도포

결과, 발효인삼종자 오일은 비도포부위에 비하여 피부의 색도를 감소시켰고, 유분량을 증가시키는 경향을 나타내었고, 수분량과 탄력도, 거칠기에는 영향을 나타내지 않았다.

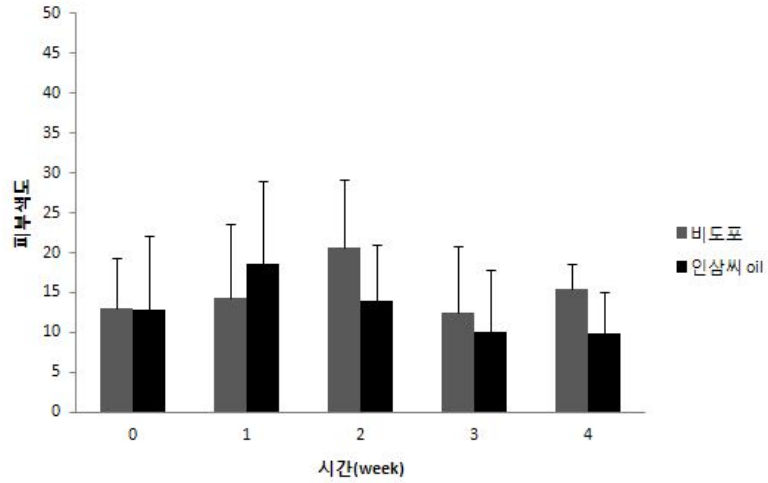


그림 47. 발효인삼종자 오일 시료가 피부색도에 미치는 영향.

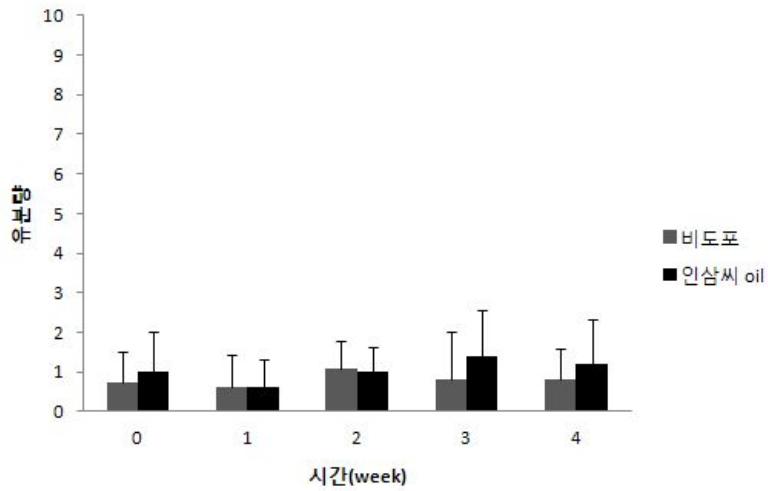


그림 48. 발효인삼종자 오일 시료가 피부 유분량에 미치는 영향.

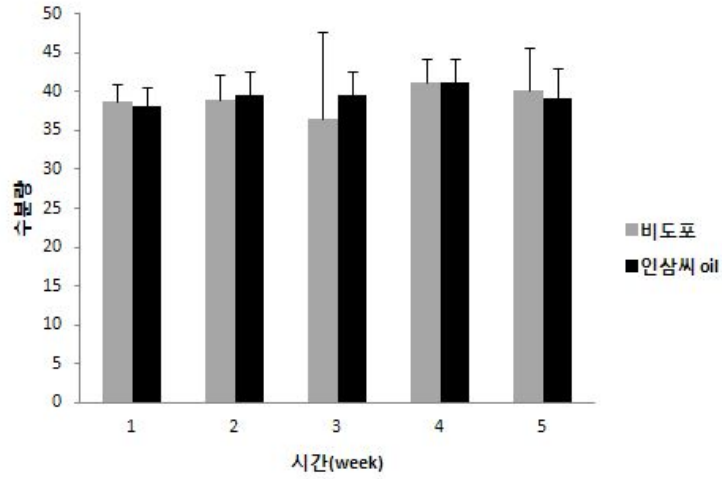


그림 49. 발효인삼종자 오일 시료가 피부 수분량에 미치는 영향.

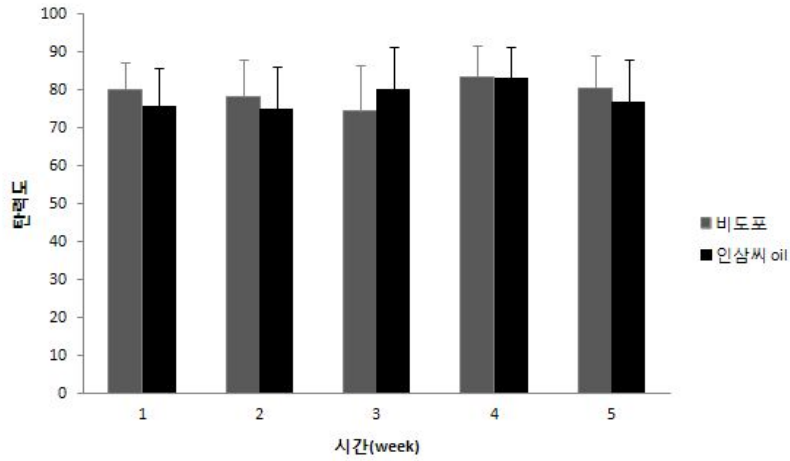


그림 50. 발효인삼종자 오일 시료가 피부 탄력도에 미치는 영향.

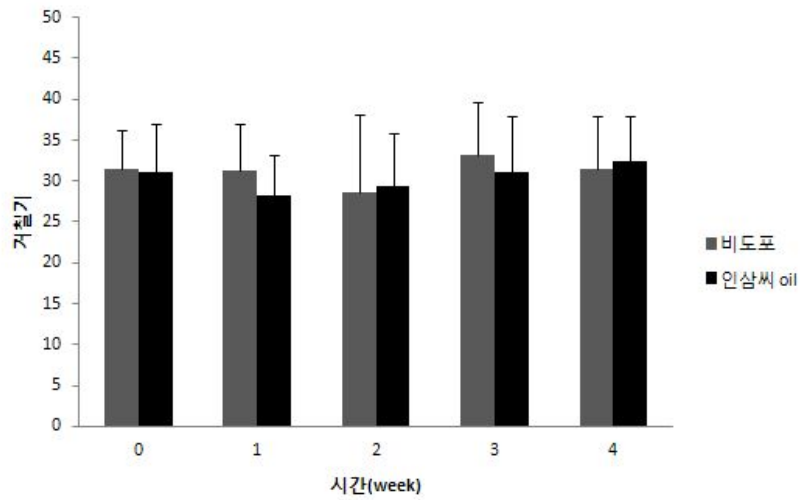


그림 51. 발효인삼종자 오일 시료가 피부 거칠기에 미치는 영향.

(2) 피부도포에 사용한 발효인삼종자 오일 수용액의 소비자 평가

피시험자들에게 피부도포에 사용한 발효인삼종자 오일 수용액 사용 후 기호도를 조사한 결과는 그림 52와 같다. 조사한 결과 발효인삼종자 오일 시료는 향 부분에 낮은 기호도를 나타내었으나 색상과 끈적임, 피부흡수도, 종합적 기호도 측면에서 5점 이상의 점수를 나타내었다.

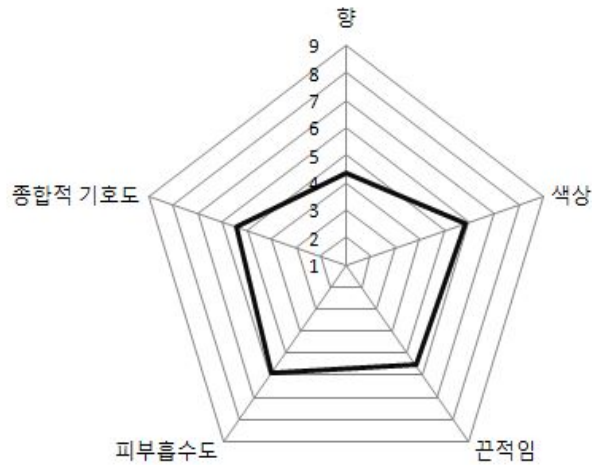


그림 52. 발효인삼종자 오일 시료의 기호도 조사.

(3) 피부도포에 사용한 발효인삼종자 오일 수용액의 설문조사

피부도포에 사용한 발효인삼종자 오일 시료에 대한 피시험자들의 의견을 수렴하기 위하여 설문조사를 실시한 결과는 그림 53과 같다. 피시험자들에 대한 설문조사 결과 발효인삼종자 오일은 종합적 피부상태, 수분개선, 탄력개선, 피부색 개선, 각질감소, 모공감소 항목에서 4.5점 이상의 점수를 받았고, 피부트러블 유발 및 피부자극감 유발 항목에서 1.5점 이하의 점수 분포를 나타내어 피부안전성이 높은 것으로 나타났다.



그림 53. 발효인삼종자 오일 시료에 대한 피시험자들의 평가.

(4) 종합적 고찰

Bacillus subtilis KFRI 1124 균주로 발효하여 초임계 추출한 발효인삼종자 오일 발효물은 우수한 세포내에서의 멜라닌 생성억제효과를 나타내었을 뿐만 아니라 인체 피부에서 피부색 감소 및 유분량 증가효과를 나타내었다. 또한 피부 자극감이나 부작용이 관찰되지 않아 천연화장품으로써 우수한 경쟁력을 가질 것으로 판단되었다.

제 8 절 발효인삼종자 오일을 이용한 드레싱 제품 개발

식품의 관능적 특성을 좋게 하고 음식의 향미를 더해주기 위해서 각광받고 있는 것이 소스이다. 소스는 그 제법에 따라 색, 향, 맛 등이 달라지며, 그 중에서도 샐러드에 곁들이는 소스를 유럽에서는 소스, 미국에서는 드레싱이라고 한다. 드레싱은 식품을 제조·가공·조리함에 있어 식품의 풍미를 돋우기 위한 목적으로 사용되는 것으로, 식용유, 식초 등을 주원료로 하여 식염, 당류, 향신료, 알류 또는 식품첨가물을 가하고 유화시키거나 분리액상으로 제조한 것 또는 이에 채소류, 과일류 등을 가한 것으로 마요네즈, 유화형 드레싱, 분리액상 드레싱, 샐러드 드레싱, 프렌치 드레싱을 말한다고 식품공전에 명시되어 있다.

최근 건강식·채식에 대한 관심이 높아지면서 샐러드가 주 요리 자체로 많이 이용되고 있고, 이에 따라 샐러드의 맛을 더해 주는 드레싱의 이용률도 더불어 증가하고 있다. 드레싱을 샐러드에 곁들이면 채소의 풍미와 향미 증진 및 체액을 알칼리성으로 유지하고, 특히 생채소의 이용과 섭취를 증가시켜 최근 문제가 되고 있는 비만과 성인병 예방에 중요한 역할을 할 수 있다. 드레싱에 관한 연구는 과일드레싱, 고추 드레싱, 닭발 추출 젤라틴을 이용한 드레싱, 마늘 드레싱, 복분자 드레싱, 삼백초 추출물 첨가 요구르트 드레싱, 송이버섯과 키토산을 첨가한 사과 드레싱, 키위 드레싱 등으로 생리 활성이 높은 천연식품을 활용한 제품이 대부분이다. 이에 본 연구에서는 인삼종자 오일과 발효 홍삼 엑기스를 첨가하여 드레싱을 제조하고 이에 대한 소비자의 기호도를 조사하여 새로운 기능성 드레싱을 개발하고자 하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 재료

인삼종자 오일 함유 드레싱의 제조에 사용한 오일은 인삼종자를 건조하여 압착추출 한 인삼종자 오일을 사용하였고, 시저 드레싱에 첨가한 인삼 엑기스는 구안산업(금산, 한국)에서 제공받아 사용하였다.

(2) 인삼종자 오일 첨가 드레싱 제조

인삼종자 오일 첨가 드레싱 제조에는 볶음·발효 처리를 하지 않은 압착추출 오일을 사용하였고, 인삼 엑기스는 구안산업(금산) 제품을 사용하였다. 드레싱 타입은 발사믹 드레싱과 시저 드레싱 두 종류로 하여 인삼종자 오일을 1%씩 첨가하였고, 시저 드레싱의 경우에는 인삼 엑기스를 전체 중량 대비 0.5%(A), 0.2%(B)로 다르게 첨가하였다.

(3) 개발 드레싱 제품의 국내·외 관능평가

개발 시제품에 대한 관능평가는 소비자의 선호도를 평가하기 위하여 기호도 평가를 실시하였다. 총 10명의 패널을 구성하여 시저드레싱(A, B), 발사믹 드레싱 제품을 샐러드나 빵에 곁

들여 시식하고 향미, 맛, 종합적 기호도를 9점 척도법으로 평가하도록 하였다.

또한 2013년 9월 호주 시드니에서 개최된 호주식품박람회에 참석하여 풍기인삼조합의 협조를 받아 호주 현지인들에 대하여 기호도 조사를 실시하였다. 기호도 조사 방법은 인삼에 관심을 가지고 박람회에 방문한 총 28명의 현지인 패널을 구성하여 시저드레싱(B type; 인삼종자 오일 1%, 인삼엑기스 0.2%), 발사믹 드레싱을 빵과 함께 시식한 후 향미, 맛, 종합적 기호도에 대하여 9점 척도법으로 평가하도록 하였다.

(4) 통계분석

모든 실험은 최소 3회 반복 측정된 평균치로 나타내었고, 실험결과 자료의 통계분석은 SAS (Statistical Analytical System, version 9.3) 프로그램을 사용하여 Duncan's multiple range test를 실시하였고, 시료 간 유의성 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 시중 판매 중인 샐러드 드레싱 시제품 조사

현재 시중에서 판매중인 여러 제품들을 수거하여 배합비, 제품 및 포장 형태 등을 살펴본 결과는 표 49와 같다. 드레싱 제품은 주로 제품에 첨가된 재료를 인용하여 제품명이 결정되었고, 발사믹 드레싱과, 프렌치 드레싱, 시저드레싱 그리고 오리엔탈 드레싱 등이 주로 판매되고 있었다. 드레싱 제품에 대부분을 차지하는 재료는 오일과 발사믹 식초 그리고 마요네즈 등으로 맛과 건강을 중요시 생각하는 현대인의 니즈에 따라 올리브오일, 참기름, 마늘, 허브 등 여러 가지 부재료를 혼합하여 드레싱이 제조되는 것으로 판단되었다.

표 49. 시중 판매 중인 드레싱 제품

제조사	제품명	배 합 비	내용량	보관방법	포장재질
풀무원	올리브유 발사믹 드레싱	정제수, 발사믹식초 20.6%(와인식초, 포도과즙/이태리산), 고과당, 옥배유(수입산), 정백당, 정제염, 압착올리브유 2%(스페인산), 양파, 허브 베이스(밀), 레몬농축과즙	240 g	0~10℃ 냉장보관	용기-폴리 에틸렌 테레프탈 레이트, 뚜껑-폴리 에틸렌
대상	프렌치 발사믹 드레싱	카놀라유(호주산), 발사믹식초 14%(와인식초 72%), 포도농축액 27%(포도:이탈리아산), 무수 아황산(산화방지제), 과당, 백설탕, 조제겨자, 발효식초, 정제소금, 벌꿀, 흑후추, 건마늘조각, 겨자씨, 잔탄검, EDTA칼슘이나트륨(산화방지제)	325 g	개봉후 냉장보관	용기-폴리 프로필렌 (PP), 외캡-PP, 내캡-폴리 에틸렌 (PE)
풀무원	세서미 오리엔탈 드레싱	정제수, 양조간장(미국산/밀,대두,정제염), 사과식초(농축사과즙/중국산, 주정, 포도당), 양념베이스(야채농축액, 양조간장, 액상과당, 식물성가수분해단백, 조미양조간장), 정백당, 옥배유, 조미액(약주, 과당, 포도당, 중백당, 효모추출분말), 과당, 합수결정포도당, 양념간장베이스(밀), 참기름 19.4%, 다진마늘, 볶음참깨 0.85%(중국산)	250 g	0~10℃ 냉장보관	용기-폴리 에틸렌 테레프탈 레이트, 뚜껑-폴리 에틸렌
대상	오리엔탈 드레싱	정제수, 양조간장, 카놀라유(호주산), 백설탕, 발효식초(주요, 주정, 효모추출물), 양파, 참기름, 유자농축액, 건조마늘조각, 볶음흑임자, 볶음참깨, 통참깨, 잔탄검, 다시마농축액, 겨자향오일, EDTA칼슘이나트륨(산화방지제)	325 g	개봉 후 냉장보관	용기-폴리 프로필렌 (PP), 외캡-PP, 내캡-(PE)
풀무원	레몬갈릭	정제수, 고과당, 양조식초, 합수결정포도당, 레몬농축과즙 5.9%, 가용성고형분 45%(생물환산 37.9%), 정제염, 사과청정농축과즙, 치자혼합분말(밀), 레몬 1.5%, 양파, 홍피망, 마늘 0.8%, 건마늘조각 0.5%(중국산, 생물환산 4.06%), 오레가노홀, 파슬리 후레이크, 천연레몬향 0.3%	260 g	0~10℃ 냉장보관	용기-폴리 에틸렌 테레프탈 레이트, 뚜껑-폴리 에틸렌
Fontana (샘표)	오리엔탈 드레싱	정제수, 양조간장(탈지대두, 소맥, 천일염, 액상과당, 주정), 양조식초(맥아엑기스, 주정, 발효영양원), 액상과당, 카놀라유, 백설탕, 미향, 적포도주(아황산염), 정제소금, 양과분말, 레몬농축액, 마늘엑기스, 마늘후레이크, 고추엑기스, 볶음검정깨, 산탄검, 타마린드검, 천연향신료, 참기름, 유화제, 올레오레진겔시검, 향미증진제, 바질, EDTA칼슘이나트륨(산화방지제)	270 g	개봉 후 냉장보관	용기-유리, 뚜껑- PP

제조사	제품명	배 합 비	내용량	보관방법	포장재질
East&West(티디에프코리아)	비네거 드레싱	정제수, 해바라기유, 식초(맥아추출물, 주정, 초산), 겨자[정제수, 겨자씨, 식초, 정제소금, 설탕, 향신료(참깨), 천연겨자향], 정제소금, 설탕, 아세틸아디핀산이전분, 레몬주스, 산탄검, 천연착향료(파프리카, 강황), 카라멜 색소	250 mL	개봉 후 냉장보관	용기-유리, 뚜껑-철
East&West(이태리)	프렌치 드레싱	정제수, 해바라기유, 설탕, 토마토페이스트, 와인 식초[와인, 메타중아황산나트륨(산화방지제)], 겨자, 양파, 정제소금, 탈지분유, 구아검, 산탄검, 우유단백질, 천연착향료(서양자초, 바실), 난황, 허브(파슬리, 서양자초), 젓산	250 mL	개봉 후 냉장보관	용기-유리, 뚜껑-철
프레시안(CJ)	시저 드레싱	마요네즈[식물성유지(대두:수입산), 난황액(난황(계란:국산), 정제소금:국산), 발효식초, 백설탕, 정제소금, 정제수, 파르메산치즈파우더 3%(그레이티드파마산치즈 60%(미국산), 탈지우유(우유), 정제소금, 유청분말(수입산), 벡스트린정제염, 비타셀 L-600, 이산화규소, 실리코알루미산나트륨], 올리고당, 홀그레인머스터드, 백설탕, 마늘, 산도조절제, 마늘분말, 천일염, 시트로스(글리세린, 산도조절제, 비타민 C, 감귤농축과즙액), 산탄검	235 g	0~10℃ 냉장보관	용기-폴리에틸렌테레프탈레이트, 뚜껑-PE
대상	유자 폰즈소스	양조간장, 정제수, 유자농축액 15%[유자 50%(국산)40 brix, 정백당], 발효식초, 액상과당, 주정, 정제소금, 구연산, 혼합제제(유자향, 주정), 혼합제제(향미증진제), 영양강화제	225 g(201 mL)	개봉 후 냉장보관	용기-유리, 뚜껑-PE
Lesieur(프랑스)	플레인 샐러드 드레싱	정제수, 유채유, 식초(맥아추출물, 주정, 초산), 탈지우유, 설탕, 디존머스터드[겨자씨, 식초, 정제소금, 메타중아황산칼륨(산화방지제), 구연산, 산화전분, 정제소금, 농축레몬주스, 잔탄검, EDTA칼슘이나트륨(산화방지제), 로즈마리추출물, 천연착향료(겨자향)	500 mL	개봉 후 냉장보관(4주안에 섭취)	용기-폴리에틸렌테레프탈레이트

(2) 드레싱 제품 제조 배합비 및 최종 제품

인삼종자 오일 및 인삼 엑기스를 첨가하여 제조한 시저드레싱 및 발사믹 드레싱 제품의 배합비는 표 50, 51과 같다. 표 50에 나타난 시저드레싱의 경우에는 마요네즈와 홀그레인 머스터드를 55 : 20으로 전체 배합의 대부분을 차지하게 하여 배합하였고, 기타 재료의 배합은 맛이 전체적으로 어우러지게 배합하였다. 인삼종자 오일은 공통적으로 1%씩 첨가하였고, 시저드레싱 A에는 인삼엑기스를 0.5%, 시저드레싱 B에는 0.2% 첨가하여 제조하였다.

발사믹 드레싱(표 51)의 경우에는 발사믹 식초와 옥수수유의 비율을 총 함량의 20.6 : 60.4로 정하고 올리브유와 양파, 건마늘조각, 흑후추 등을 함께 혼합하여 기호도 높은 드레싱 제품을 제조하고자 하였다. 인삼종자 오일은 시저드레싱과 동일하게 1% 첨가하였고 인삼엑기스는 예비실험 결과 발사믹 식초와 전혀 어우러지지 않아 발사믹 드레싱에는 첨가하지 않았다.

표 50. 인삼종자 오일 첨가 개발 시저드레싱의 배합비

	시저드레싱 A (%)	시제드레싱 B (%)
마요네즈	55	55
정제수	6.5	6.8
생크림	6	6
액상과당	0.5	0.5
백설탕	0.5	0.5
발효식초	1	1
반경성치즈	2	2
정제소금	0.4	0.4
인삼종자 오일	1	1
인삼엑기스	0.5	0.2
홀그레인머스터드	20	20
레몬농축과즙액	1	1
흑후추분말	1	1
체다치즈향버드	1	1
파마산치즈향버드	2	2
건마늘조각	0.5	0.5
사과산	0.1	0.1
효모추출물	0.4	0.4
구연산	0.1	0.1
밀분해추출물	0.5	0.5
Total	100	100

표 51. 인삼종자 오일 첨가 개발 발사믹드레싱의 배합비

	발사믹드레싱 (%)
정제수	4
발사믹식초	20.6
액상과당	0.5
옥수수유	60.4
백설탕	0.6
정제소금	0.4
압착올리브유	2
양파	4
레몬농축액	0.5
인삼종자 오일	1
카라멜색소	0.1
건마늘조각	3
밀분해추출물	0.5
잔탄검	0.1
흑후추분말	1
구연산	0.1
효모추출물	0.2
바질홀	1
Total	100



드레싱 시제품



관능검사 테이블

그림 54. 개발 드레싱 제품.

(3) 드레싱 관능평가(국내)

인삼중자 오일 첨가 드레싱에 대한 기호도 평가는 시저드레싱(A, B type), 발사믹 드레싱 세 가지 시료를 셀러드, 빵과 함께 제공하여 각각 드레싱과 곁들여 시식 후 평가하도록 하였다. 셀러드에 곁들여 관능평가 한 결과는 표 52와 같다. 개발한 드레싱을 셀러드에 버무려 관능평가한 결과 전반적으로 발사믹 드레싱에 대한 기호도가 시저드레싱보다 더 높게 나타났다. 발사믹 드레싱에 대한 향과 맛, 종합적 기호도 점수가 각각 6.7점, 6.9점, 7.2점으로 시저드레싱 A의 5.9점, 6.7점, 6.7점보다 높게 나타났다. 빵을 드레싱에 곁들여 평가한 결과는 표 53에 나타내었는데, 셀러드로 평가했을 때와는 다른 결과를 보였다. 발사믹 드레싱의 기호도가 여전히 높게 나타났지만, 인삼엑기스를 0.5% 넣어 제조한 시저드레싱 A에 대한 기호도 점수가 7.3점으로 7.2점을 받은 발사믹 드레싱보다 조금 높게 평가되었다. 개발 드레싱 제품의 전반적인 기호도 평가점수는 6.5점 이상으로 셀러드와 빵 모두에 곁들여도 호응이 좋을 것으로 생각되었고, 시저드레싱의 향에 대한 점수가 조금 낮게 나타나 이에 대한 보완이 필요할 것으로 사료되었다.

표 52. 국내 드레싱 기호도 평가 결과(셀러드)

	향	맛	기호도
시저드레싱 A	5.9±0.74 ^{a1)}	6.7±0.67 ^a	6.7±0.67 ^a
시저드레싱 B	6.2±1.55 ^a	6.7±0.95 ^a	6.9±0.99 ^a
발사믹드레싱	6.7±2.21 ^a	6.9±2.13 ^a	7.2±2.04 ^a

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test

표 53. 국내 드레싱 기호도 평가 결과(빵)

	향	맛	기호도
시저드레싱 A	5.7±0.95 ^{b1)}	7.3±0.95 ^a	7.3±1.06 ^a
시저드레싱 B	5.9±1.29 ^b	6.8±1.03 ^a	7.0±0.94 ^a
발사믹드레싱	7.1±1.60 ^a	7.4±1.26 ^a	7.2±1.48 ^a

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test

(4) 드레싱 관능평가(국외)

호주 현지인들을 대상으로 하여 실시한 드레싱 제품의 기호도 평가 결과는 표 54와 같다. 결과에 나타난 것과 같이 대체적으로 양호한 결과를 보이며 관능평가 점수가 높았다. 발사믹 드레싱 제품의 경우 향미 관능평가 결과는 7.2점, 맛은 7.6점, 종합적 기호도는 7.4점을 나타내었고 시저 드레싱의 경우 향미, 맛, 종합적 기호도에서 각각 7.1, 7.3, 7.2점을 나타내어 발사믹 드레싱에 대한 선호도가 더 높게 나타났다. 드레싱 전체적으로 맛이 좋은 balance를 가지고 있어 단맛과 짠맛이 잘 어우러져 있는 것으로 느껴지고, 조금 더 인삼의 맛과 향이 강하면 좋을 것 같다는 의견이 있었다. 또한 기존 드레싱 제품들과 차별화하기 위해서 드레싱의 끝맛에 인삼 맛이 약간 느껴지게 하는 것과, 인삼의 쓴맛이 드레싱의 전반적인 맛을 방해할 수 있으므로 인삼향을 첨가하여 제품에 인삼이 첨가되어 있다는 것을 소비자가 느끼게 할 수 있으면 좋겠다는 의견도 있었다.

표 54. 국외 드레싱 기호도 평가 결과

	향	맛	종합적 기호도
발사믹 드레싱	7.2±0.93 ^{a1)}	7.6±1.07 ^a	7.4±0.63 ^a
시저 드레싱	7.1±0.99 ^a	7.3±1.06 ^a	7.2±0.69 ^a

¹⁾ All values are expressed as Mean±SD triplicate determinations. Means with the same alphabet in each column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

(5) 관능평가 기타의견

기호도 조사를 통하여 드레싱 제품에 대한 관능평가 의견들을 살펴보면 시저드레싱보다 발사믹 드레싱의 맛이 전반적으로 양호하고 인삼종자 오일이 첨가된 발사믹 드레싱이 단순히 발사믹 식초만 들어간 발사믹 제품보다 소비자들에게 더 좋은 평가를 받을 수 있을 것 같다는 의견이 있었다. 시저드레싱의 경우 약간 부드러우며 단맛이 조금 강하게 느껴져 단맛을 줄이면 좋겠다는 평가의견과 인삼종자 오일과 홍삼엑기스가 첨가되었기 때문에 쓴맛이 약간 느껴지는 제품이어도 좋겠다는 의견도 있었다.

관능평가에 참여한 패널 중 전문가적 평가의견을 한 패널은 발사믹 드레싱과 시저드레싱 제품의 원재료의 맛과 향이 강하기 때문에 인삼종자 오일 및 인삼엑기스를 첨가하여도 드레싱에서 크게 인삼의 맛과 향이 느껴지지 않는다고 하였다. 이를 감안하여 홍삼엑기스의 첨가를 늘리거나 인삼과우더 등을 첨가하여 인삼의 맛과 향이 느껴지는 드레싱을 제조하고 낮은 등급의 인삼을 사용하여 드레싱을 제조한다면 제조원가 측면에서도 큰 부담이 없는 제품을 제조할 수 있을 것이라는 의견을 제시하였다.

제 9 절 인삼종자의 식물성스테롤 성분 분리분석을 통한 신소재 개발 기술

1. 인삼종자의 식물성스테롤 성분의 함량분석 비교연구

가. 재료 및 방법

(1) 재료 및 시약

실험에 사용한 인삼종자는 농촌진흥청에서 품종(재래종, 연풍, 금풍, 천풍)별 제품을 제공받았고, 재배연도(GS-4, -5, -6)에 따른 종자는 금산의 인삼시장에서 2012년 7월에 미리 구입하여 건조 후 실험에 사용하였으며, 나라(한국(KG), 중국(CG), 미국(AG)) 별로 준비하여 실험하였다.

물질 분석 확인을 위해 Thin layer chromatography (TLC)는 silica gel 60 F254 (Art. 5715, Merck Co., Germany)을 사용 하며, 물질 분리를 위해 column chromatography 는 silica gel (No. 7734; Merck Co., Germany)을 사용하였다. HPLC에 사용하는 Water와 acetonitrile은 HPLC grade으로 구매하여 사용하였다.

(2) 추출방법

재배 연도, 품종, 나라에 따른 각각의 인삼 종자를 분쇄기로 분쇄하여 분말을 200 g씩 취하여 100% ethanol 500 mL로 80°C에서 3회 반복 환류 추출한다. 추출액은 40°C에서 감압농축기로 농축한다. 추출물은 methanol과 물로 용해시켜 0.45 μ m millipore filter로 여과한 후 HPLC에 주입하여 검색하였다. 표준물질은 Lupeol, Stigmasterol, β -sitosterol 그리고 squalene 로 한다. 종자의 EtOH 추출물에 대하여 HPLC 분석조건 (표 55) 에 따라 Phytosterol을 분석 하였다.

(3) HPLC 조건

HPLC chromatogram은 Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA)가 장착된 Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA)를 사용하였으며, phytosterol 분석을 위해 사용한 HPLC 조건(표 55)에 따라 분석하였다.

표 55. Determination of sterol constituents by HPLC

HPLC	Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA) Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA).
Column	SunFire C-18 stainless steel column (2.1 mm × 50 mm, 5 μm thickness)
Wavelength	210 nm
Temperature	30 °C
Solvent	Solvent A : MeOH Solvent B : ACN
Flowrate	1 mL/min
Gradient condition	0 min 30% A : 70% B 20 min 30% A : 70% B 30 min 0% A : 100% B 40 min 0% A : 100% B 45 min 30% A : 70% B 50 min 30% A : 70% B

나. 결과 및 고찰

(1) 식물성스테롤 성분 비교연구

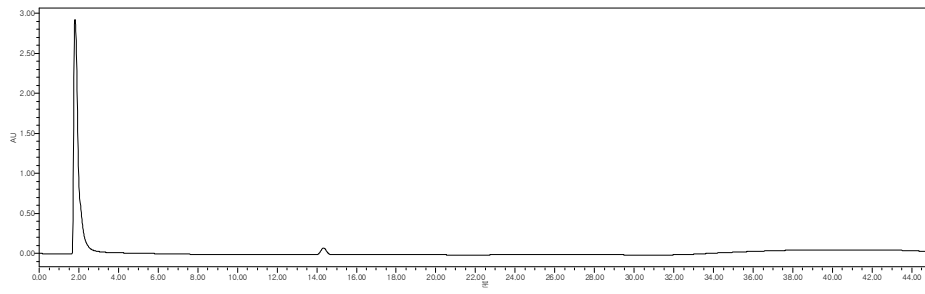
Lupeol, stigmasterol, β-sitosterol and squalene에 대한 standard calibration curve는 wavelength 210 nm에 확인할 수가 있었다(표 56, 그림 55). Lupeol은 항염증 활성이 있다고 알려져 있으며(Geetha and Varalakshmi, 2001), Stigmasterol은 항산화, 갑상샘결절, 항과산화 그리고 저혈당증에 활성이 있다고 보고되고 있다(Panda et al., 2009; Jamaluddin et al., 1994). β-sitosterol은 항염증, 항암, 면역반응 그리고 세포자살에 활성이 있다고 알려져 있으며(Bouic, 2002), squalene은 항산화, 항암, 콜레스테롤 저하, 면역 강화 활성이 있다고 보고되고 있다(Martinez-Correa et al., 2010; Smith, 2000).

표 56. Linearity of standard curves of Lupeol, Stigmasterol, β-Sitosterol and Squalene

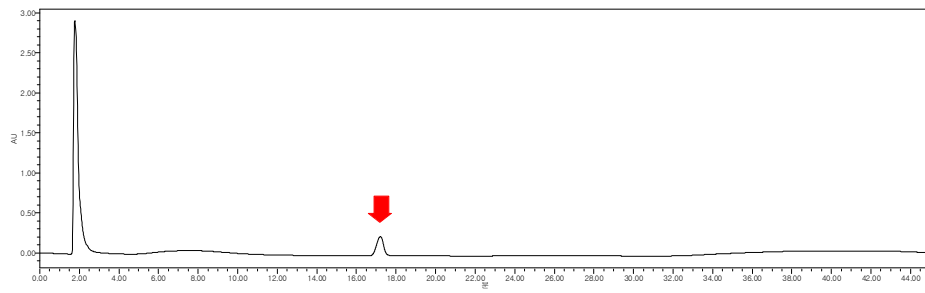
Compound	t _R	Calibration equation ^a	Correlation factor, r ^{2b}
Lupeol	14.0	Y = 2539X + 20.301	0.9997
Stigmasterol	17.1	Y = 1037.7X + 29.186	0.9992
β-Sitosterol	19.5	Y = 1047.1X + 17.006	0.9993
Squalene	24.0	Y = 180227X - 75.779	0.9997

^a Y = peak area, X = concentration of standards (mg/mL)

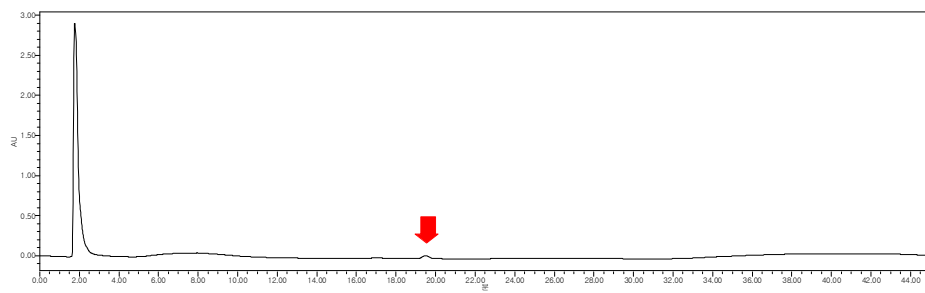
^b r² = correlation coefficient for three data points in the calibration curves (n = 3)



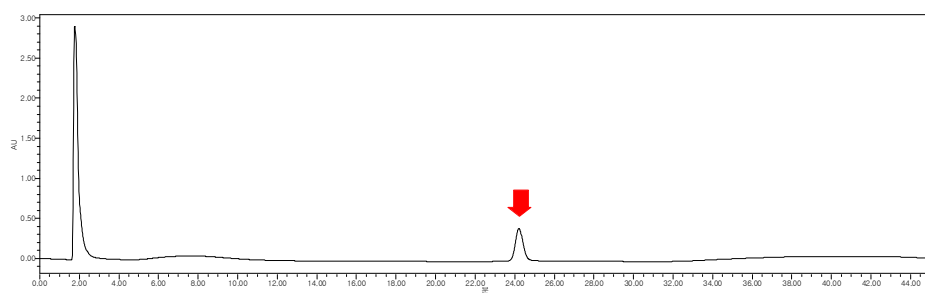
Lupeol



Stigmasterol



β -sitosterol



Squalene

그림 55. HPLC chromatograms of the Lupeol, Stigmasterol, Beta-sitosterol, and squalene from the seeds of *panax ginseng*.

(2) 인삼종자의 재배 연도에 따른 phytosterol 성분 비교 연구

표 57에서 나타난 인삼 종자의 재배 연도에 따른 HPLC 결과에 따르면 Lupeol, Stigmasterol, β -sitosterol 그리고 squalene의 함량은 GS-3에서 가장 많이 나타났음을 알 수 있다.

표 57. The sterol contents in seed of *Panax ginseng* cultivated in the various cultivation years by HPLC

Sample	Content ($\mu\text{g/g}$)				
	Lupeol	Stigmasterol	β -Sitosterol	Squalene	Total
GS-3	0.10625 \pm 0.00962	0.05570 \pm 0.00416	0.12383 \pm 0.00525	0.00490 \pm 0.00069	0.29068 \pm 0.01972
GS-4	0.03888 \pm 0.00235	0.03112 \pm 0.00250	0.05895 \pm 0.00297	0.00362 \pm 0.00033	0.13257 \pm 0.00815
GS-5	0.08497 \pm 0.00387	0.03638 \pm 0.00314	0.08220 \pm 0.00730	0.00026 \pm 0.00001	0.20381 \pm 0.01432

Data are represented as the mean \pm S.D. (n = 3) in mg/g of the dried samples

(3) 인삼 종자의 품종에 대한 phytosterol의 성분 비교 연구

표 58에 나타난 인삼 종자의 품종에 따른 HPLC 결과에 따르면 Lupeol, Stigmasterol, β -sitosterol 의 함량은 천풍에서 가장 많은 함량이 나타났으며 squalene의 함량은 금풍에서 가장 많이 나타났음을 알 수 있다.

표 58. The sterol contents in seed of *Panax ginseng* cultivated in the various varieties by HPLC

Sample	Content ($\mu\text{g/g}$)				
	Lupeol	Stigmasterol	β -Sitosterol	Squalene	Total
재래종	0.05497 \pm 0.00551	0.03933 \pm 0.00273	0.03909 \pm 0.00243	0.00231 \pm 0.00034	0.13570 \pm 0.01101
연풍	0.06443 \pm 0.00453	0.03475 \pm 0.00365	-	0.00022 \pm 0.00002	0.09940 \pm 0.00820
금풍	0.05050 \pm 0.00456	0.04630 \pm 0.00226	0.03587 \pm 0.00356	0.00310 \pm 0.00022	0.13577 \pm 0.01060
천풍	0.10502 \pm 0.00676	0.05344 \pm 0.00374	0.09353 \pm 0.00381	0.00009 \pm 0.00001	0.25208 \pm 0.01441

Data are represented as the mean \pm S.D. (n = 3) in mg/g of the dried samples

(4) 인삼 종자의 나라별 Phytosterol의 성분 비교 연구

표 59에 나타난 인삼 종자의 나라에 따른 HPLC 결과에 따르면 Lupeol, squalene, β -sitosterol 의 함량은 중국종자에서 가장 많은 함량이 나타났으며 Stigmasterol의 함량은 미국종자에서 가장 많이 나타났음을 알 수 있다.

표 59. The sterol contents in seed of *Panax ginseng* cultivated in the various countries by HPLC

Sample	Content ($\mu\text{g/g}$)				
	Lupeol	Stigmasterol	β -Sitosterol	Squalene	Total
KGS ¹⁾	0.10102 \pm 0.00266	0.04347 \pm 0.00242	0.09115 \pm 0.00834	-	0.23564 \pm 0.01342
CGS	0.14151 \pm 0.01032	0.10594 \pm 0.00957	0.09541 \pm 0.00754	0.00017 \pm 0.00001	0.34172 \pm 0.27440
AGS	-	0.21330 \pm 0.01451	0.03246 \pm 0.00330	-	0.24576 \pm 0.01781

Data are represented as the mean \pm S.D. (n = 3) in mg/g of the dried samples

¹⁾ KGS: Korean ginseng seed

CGS: Chinese ginseng seed

AGS: American ginseng seed

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	인삼종자의 특성평가	○ 인삼종자의 수분함량, 색도 등 외관분석	100	○ 3, 4, 5년근 인삼종자의 분쇄 전, 후 외관비교 및 수분함량 측정
		○ 인삼연합회와 종자 수급 방안 도출	100	○ 금산 인삼시장에서 인삼종자 수급 가능
		○ HPLC를 이용한 인삼종자 중의 사포닌 조성 분석	100	○ 각 연근별 인삼종자 분말을 추출하여 SPE Sep-Pak cartridge 처리 후 HPLC로 분석
		○ 인삼종자 중의 식물성스테롤 조성 분석	100	○ 식물성스테롤 조성 분석은 gas chromatography를 사용하여 분석하였고, 인삼종자 중에는 β -sitosterol과 campesterol이 검출됨
		○ 일반성분(수분, 회분, 조단백, 조지방) 분석	100	○ 인삼종자 각 연근별 수분함량, 조회분함량, 조단백, 조지방 함량 측정
		○ 영양성분(유리당, 구성아미노산, 유리지방산) 분석	100	○ 인삼종자 각 연근별 유리당, 구성아미노산, 유리지방산 분석
		○ 인삼종자의 항산화 효능평가	100	○ 연근별 인삼종자 추출물의 DPPH, ABTS radical 소거활성 및 SOD 효소활성 측정
	인삼종자 오일의 최적 추출방법 개발	○ 추출방법(압착, 용매, 초임계 추출), 추출조건(볶음조건, 추출온도 및 시간, 추출압력 등)에 따른 인삼종자 오일 추출	100	○ 껍질을 제거한 인삼종자 핵을 200℃에서 10분, 20분, 30분 볶음 처리한 후 분쇄하여 압착, 용매 추출함. 초임계 추출은 150bar, 35℃/65℃, 500bar, 35℃/65℃ 각각의 압력과 온도로 추출하여 수율측정.
	인삼종자 오일의 특성 평가	○ 추출조건에 따른 인삼종자 오일 중의 phytosterol 함량 분석	100	○ 인삼종자 오일 중 식물성스테롤 분석은 gas chromatography를 이용하여 측정하였고, stigmasterol과 β -sitosterol이 검출됨
		○ 인삼종자 오일의 저장성 및 품질특성 조사	100	○ 60℃에서 28일간 저장하면서 일간격으로 산가, 과산화물가 변화 측정
	인삼종자 오일의 활성 검증	○ 인삼종자 오일의 항산화 효능평가	100	○ 인삼종자 오일의 ABTS radical 소거활성 및 tyrosinase 활성 억제효과 측정
		○ 인삼종자 오일의 활성평가	100	○ melanocytes에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향 검증

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013)	발효인삼종자의 제조 및 특성조사	○ 인삼종자의 발효에 적합한 최적 균주 선별	100	○ 인삼종자의 발효에 사용한 균주는 <i>Bacillus subtilis</i> KFRI 1124, KFRI 1127, <i>Pediococcus</i> <i>oentosaceus</i> LY 011, <i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i> KCTC 3162 총 4종의 균 주를 이용하여 발효
		○ 인삼종자 발효물의 특성평가	100	○ 발효인삼종자의 총당, 산성다당 체, 총페놀함량, ginsenoside 분석
		○ 발효인삼종자의 항산화활성 평가	100	○ 발효인삼종자 추출물의 ABTS radical 소거효과, SOD 유사활성 측정
	발효인삼종자 오일의 추출 및 특성 평가	○ 추출방법에 따른 발효인삼 종자 오일의 추출 및 특성	100	○ 압착, 용매 (n-hexane), 초임계추 출(150 bar, 65℃) 방법으로 발 효인삼종자 오일 추출 및 수율, 색도 측정
		○ 각 발효 및 추출조건별 오일의 지방산 및 phytosterol 분석	100	○ 각 발효 및 추출조건에 따른 오 일의 phytosterol 은 GC로 분석 하였고, campesterol, stigmasterol, β-sitosterol, sitostanol이 검출 되었고 조건에 따라 큰 차이를 보임
		○ 발효인삼종자 오일의 페놀 성분 분석	100	○ HPLC를 이용하여 페놀성분을 분석하였고, 발효균주 및 추출 방법에 따른 차이를 보임
	발효인삼종자 오일의 안전성 및 미백효과 검증	○ 발효인삼종자 오일의 미백 효능 평가	100	○ melanocytes에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성량에 미치는 영 향 검증
		○ 발효인삼종자 오일의 미백 효능 임상 평가	100	○ <i>Bacillus subtilis</i> KFRI 1124 균 주로 발효하여 초임계 추출한 오일을 피시험자의 피부에 4주 간 도포하여 미백효과 평가
	인삼종자 오일을 이용한 제품 개발	○ 오일, 드레싱 관련 시장조사	100	○ 시중에서 판매되고 있는 드레싱 제품을 수거하여 재료, 배합비 및 용기 등에 대하여 조사
		○ 인삼종자 오일 첨가 드레싱 의 제조 및 기호도 조사	100	○ 인삼종자 오일 첨가 드레싱은 발사믹, 시저 드레싱 두 가지 타입으로 하여 제조 ○ 개발 제품에 대한 기호도 조사 는 국내 및 국외 (호주) 에서 실 시하여 평가함
	인삼종자의 식물성스테롤 성분 분리분석을 통한 신소재 개발 기술	○ 인삼종자의 식물성 성분의 함량분석 비교 연구	100	○ HPLC를 이용하여 인삼종자의 재배년도, 품종, 나라에 따른 phytosterol 함량 차이 측정

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통하여 SCI 논문 비SCI 논문, 특허, 기술이전, 학술발표의 성과를 나타내었다. 특허출원으로는 “인삼종자 추출물을 포함하는 항산화 및 항노화용 화장품 조성물 (10-2012-0130500)”, “인삼종자 추출물을 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물 (10-2012-0130501)”, “인삼씨 배유 추출박을 포함하는 항산화 활성이 향상된 기능성 식품 및 이의 제조방법(10-2013-0024609)”, “인삼씨 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화력이 증진된 조성물(10-2013-0037030)”, “인삼씨 배유 추출박 분말의 추출물을 포함하는 항산화력이 증가된 조성물(10-2013-0037026)”, “인삼 종자유 및 이의 제조방법(10-2013-0037041)” 등 6개의 특허를 2012년도와 2013년도에 걸쳐 특허 출원하였고, “발효 인삼종자 추출물을 함유하는 항산화 및 항노화용 조성물”, “발효 인삼종자 오일을 함유하는 항산화 및 항노화용 조성물”, “발효 인삼종자 오일의 제조방법”, “발효 인삼종자 함유 드레싱 및 이의 제조방법”, “발효 인삼종자 오일을 함유하는 미백용 조성물” 의 5개의 특허를 2014년 1월 초에 출원하여 총 11편의 특허를 출원하였다. 그리고 *J. Ginseng Res.*(SCIE), *Korean J. Food Cookery Sci.*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, *Bulletin of Food Technology* 등의 학술지에 SCIE 2편, 국내외 논문 3편의 논문을 게재하였고, 2014년 2월에 *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 에 1편의 논문이 게재될 예정이다. 이와 함께 2차년도에 완료된 발효처리한 인삼종자 품질 및 식물성스테롤 관련 논문 3편을 SCIE 논문을 상반기에 게재할 예정으로 있다. 그리고 “인삼종자 오일 추출 및 인삼엑기스 혼합 인삼종자 오일 제조 기술”로 1건의 유상 기술이전을 실시하였다. 현재 개발된 기술을 활용하여 인삼종자를 이용한 국내 최초 인삼종자 오일 제품개발을 통하여 국내에 시판 계획으로 있다. 또한 올리브 오일의 주요 섭취국인 유럽 등에 수출 상품화를 계획하고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 2012년 10월 파리에서 개최되는 식품박람회(2012 SIAL EUROPE, 2012.10.20~10.25)에 참석하여 인삼종자 오일 관련 제품의 기호도 조사와 참여기업 업체와 함께 해외 바이어와 상담 및 인삼 가공제품 현황 등 시장성 조사를 실시하였다. 파리 식품시장 및 마트를 방문하여 올리브오일 및 발사믹 식초 등의 기호도를 살펴보고 이를 기초로 향후 개발 예정인 발효 인삼종자 오일 및 인삼종자 제품의 기호성에 응용하고자 하였다.
 - “발효 인삼종자의 기능성 및 고부가가치 식품연구”의 과제에서 개발된 인삼종자 오일 시제품의 기호도 조사는 한국관에 참여하면서 인삼종자 오일 제품에 관심을 가지고 있는 (주) 두바이오 업체의 협조를 받아 현지인들을 상대로 기호도 조사를 실시하였다. 인삼종자 오일 시제품은 3개 품목으로 100% 인삼종자 오일 제품과 올리브 오일 90%에 인삼종자 오일을 10% 첨가한 제품, 그리고 올리브 오일 90%에 인삼종자 오일 10% 제품에 인삼엑기스를 첨가한 제품 등 상기 세제품에 대하여 기호도조사를 9점 평점법에 의하여 실시하였다. 1점은 아주 나쁘다, 5점은 나쁘지도 좋지도 않다, 9점은 아주 좋다로 하여 관능평가를 실시하였다.
 - 인삼종자 오일 시제품에 소비자들의 반응은 올리브 오일을 첨가한 제품보다는 100% 인삼종자 오일 제품을 더 선호하는 경향을 나타내었다. 즉, 100% 인삼종자 오일 제품의 기호도는 7.8점, 올리브 오일 90%에 인삼종자 오일 10%를 첨가한 오일제품의 기호도는 6.7점, 그리고 인삼종자 오일 10%와 인삼엑기스를 첨가한 제품은 7.1점을 나타내었다.
 - 이는 건강을 중시하는 소비경향을 보이는 것으로 판단되지만 인삼종자 100% 오일 제품의 경우 높은 생산단가로 인하여 실제 구매로 이루어지기에는 어려움이 있을 것으로 판단되어 향후 참여기업에서 마케팅, 홍보 전략 등을 잘 구상하여 접근하는 것이 필요할 것으로 판단되었다.
 - Sial 전시에서 출품된 오일 제품들로는 올리브 오일 제품이 가장 많이 출품되었으며 그 외 peanut oil, walnut oil, hazelnut oil, sesame oil, grape oil, pumpkin seed oil, almond oil, pistachio oil, avocado oil, argan oil, macadamia oil 등으로 과일 씨앗, 견과류를 이용한 오일 제품들이 출품되었다.
 - 인삼종자 오일 제품들의 소비자 기호도 조사를 통하여 해외, 특히 유럽시장에 수출상품으로 성공할 수 있는 가능성을 얻을 수 있었으며 이를 통하여 향후 참여기업에서 좀 더 정확한 분석에 기초한 마케팅과 홍보를 통하여 해외수출이 가능한 수출상품으로 추진하고자 한다.



인삼씨유
(인삼씨 100%)



인삼씨 올리브유



인삼씨 올리브유
(홍삼농축액 첨가)



시제품 3종

<그림> 인삼종자 오일을 이용하여 제조한 오일 시제품.

2. 2013년 9월 호주 시드니에서 개최된 Fine Food 호주 국제 식품박람회(2013년 9월 9일 ~ 9월 12일)에 참석하여 인삼종자 오일을 이용한 드레싱 시제품의 기호도 조사 및 식품 가공제품 현황 등에 대한 시장성 조사를 실시하였다.

- 호주 국제 식품박람회는 식품 전문 바이어들이 방문하는 무역 박람회로서 호주에서 식품 수요가 가장 높은 시드니와 멜버른에서 번갈아가며 개최되고 있다. 전시품목은 flavours of the world(일반식품), meat & seafood world(천연식품), drinks world(음료), confectionery world(제과), bakery world(제빵), equipment(케이터링, 호텔&레스토랑 장비), packaging world(포장기기 및 제품) 등이 전시되고, 매년 영국, 한국, 중국, 이태리, 말레이시아, 뉴질랜드, 스페인, 태국, 터키 등의 11개의 국가관이 형성되고 있다.
- 발효 인삼종자 오일이 첨가된 드레싱 시제품의 현지 기호도 조사는 한국 전시관에 참여한 풍기인삼농협의 협조와 함께 전시실 옆 테이블에서 실시하였다. 약 28명의 현지인들을 대상으로 시저드레싱과 발사믹 드레싱 세제품 두종류에 대하여 실시하였다. 현지인을 대상으로 한 드레싱 세제품의 기호도 평가 결과 대부분 양호한 관능평가 결과를 나타내었는데, 전반적으로 시저드레싱보다는 발사믹 드레싱 세제품을 더 선호하는 것으로 나타났다. 즉 시저드레싱의 기호도 점수는 7.2점, 발사믹 드레싱의 기호도 점수는 7.4점을 나타내었다.



<그림> 인삼종자 오일 첨가 드레싱 제품 기호도 조사.

제 7 장 참고문헌

1. Kim SL, Park KY, Lee YH, Ryu YH: Biological activities of phytosterols and their variations in crops. *Korean J. Crop Sci.*, 48(S) 24-30 (2003)
2. Sung MH, Lyu HK, Lee SM, Lee KT: Studies on the content of triacylglycerol species, tocopherols, and phytosterols from the selected nuts. *Korean J. Food Preserv.*, 17(3) 376-383 (2010)
3. Wie MJ, Jang SH, Jeong MR, Yoon JM, Jeong HS, Lee JS: Analysis of phytosterol and fatty acid compositions of grape seeds produced in Korea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 38(4) 525-528 (2009)
4. Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheon JW, Lee HS: Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 37(1) 78-81 (2011)
5. Jung HW, Kim JE, Seo JH, Lee SP: Physicochemical and antioxidant properties of red ginseng marc fermented by bacillus subtilis HA with mugwort powder addition. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 39(9) 1391-1398 (2010)
6. Matsumoto T, Akihisa T, Soma S, Takido M, Takahashi S, Yamanouchi S: Composition of unsaponifiable lipid from seed oils of *panax ginseng* and *P. quiquefolium*. *JAOCS*, 63(4) 544-546 (1986)
7. Kong YH, Rho JH, Cho CW, Kim MH, Lee YC, Kim SS, Lee PJ, Choi SY: Variation of phenolic ingredient and ginsenoside content in red ginseng extract by acid treatment. *J. Ginseng Res.*, 33(3) 194-198 (2009)
8. Hong HD, Kim YC, Rho JH, Kim KT, Lee YC: Changes on physicochemical properties of *panax ginseng* C.A. Meyer during repeated steaming process. *J. Ginseng Res.*, 31(4) 222-229 (2007)
9. Cho CW, Kim SW, Rho JH, Rhee YK, Kim KT: Extraction characteristics of saponin and acidic polysaccharide based on the red ginseng particle size. *J. Ginseng Res.*, 32(3) 179-186 (2008)
10. Nam KY: The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs precessed ginsengs (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J. Ginseng Res.* 29(1) 1-18 (2005)
11. Beveridge THJ, Li TSC, Drover JCG: Phytosterol content in american ginseng seed oil. *J. Agric. Food Chem.*, 50(4) 744-750 (2002)
12. Park QH, Lee MK, Park H: Change of ginsenosides and free sugars in seeds during stratification and seedling during early growth stage of *Panax ginseng*. *Korean J. crop Sci.*, 31(3) 286-292 (1986)

13. Ko SK, Bae HM, Cho OS, Im BO, Chung SH, Lee BY: analysis of ginsenoside composition of ginseng berry and seed. *Food Sci. Biotechnol.*, 17(6) 1379-1382 (2008)
14. Choi JE, Li XG, Han YH, Lee KT: Changes of saponin contents of leaves, stems and flower-buds of *Panax ginseng* C.A. harvesting days. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 17(4) 251-256 (2009)
15. Hu JN, Lee JH, Shin JA, Choi JE, Lee KT: Determination of ginsenosides content in Korean ginseng seeds and roots by high performance liquid chromatography. *Food Sci. Biotechnol.*, 17(2) 430-433 (2008)
16. Kim GH, Seong BJ, Kim SI, Han SH, Kim HH, Lee KS: Yield and quality characteristics of ginseng's first by products. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 19(5) 313-318 (2011)
17. Zhu XM, Hu JN, Shin JA, Lee JH, hong ST, Lee KT: Comparison of seed oil characteristics from Korean ginseng, Chinese ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and American ginseng (*Panax quiquefolium* L.). *J. Food Sci. Nutr.*, 15, 275-281 (2010)
18. Lee DH, Cho HJ, Kang HY, Rhee MH, Park HJ: Total saponin from Korean red ginseng inhibits thromboxane A₂ production associated microsomal enzyme activity in platelets. *J. Ginseng Res.*, 36(1) 40-46 (2012)
19. Liu SQ, Ren YY, Xu HB: Effect of thinning flower buds on fruit seed traits and root yield of *panax ginseng* C.A. Meyer. *Industrial Crops and products*, 33, 559-565 (2011)
20. Satue MT, Huang SW, Frankel EN: Effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined, bleached, and deodoried olive oil. *JAOCS*, 72(10) 1131-1137 (1995)
21. Kim JH, Kim JK: Antioxidant activity and functional component analysis of Korean mountain ginseng's different sections. *J. Korean Soc, Food Sci. Nutr.*, 35(10) 1315-1321 (2006)
22. Kim JH, Lee GD, Lee IS, Kim JK: Comparison of chemical characteristics of *Korean Mountain Ginseng* different parts according to extract conditions. *Korean J. Food Preserv.*, 13(6) 720-725 (2006)
23. Lee JW, Park JW: Changes of fatty acid composition and oxidation stability of edible oils with frying number of french potatoes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 39(7) 1011-1017 (2010)
24. Cerretani L, Bendini A, Rodriguez-Estrada MT, Vittadini E, Chiavaro E: Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 115, 1381-1388 (2009)

25. Park RK, Lee KT: Optimization for the phytosterol extraction and production of structured lipids from safflower seed. *Korean J. Food Preserv.*, 10(2) 219-223 (2003)
26. Lesage-Meessen L, Navarro D, Maunier S, Sigoillot J-C, Lorquin J, Delattre M, Simon J-L, Labat M: Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75, 501-507 (2001)
27. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H: The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European J. cancer.*, 36, 1235-1247 (2000)
28. Kup YH, Ikegami F, Lambein F: Neuroactive and other free amino acids in seed and young plants of *Panax ginseng*. *Phytochemistry*. 62, 1087-1091 (2003)
29. Lee YG, Lim SU, Kim JO: Influence of roasting conditions on the flavor quality of sesame seed oil. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 36(6) 407-415 (1993)
30. Proctor JTA, Louttit D: Low-temperature storage of immature (green) North American ginseng seed for fall planting. *J. Ginseng Res.*, 30(2) 78-81 (2006)
31. Choi SW, Chung US, Lee KT: Preparation of high quality grape seed oil by solvent extraction and chemical refining process. *Korean J. Food Preserv.*, 12(6) 600-607 (2005)
32. Lee HW, Park SS, Yun YC, Jeon NG, Kim SH: The effects of sesame seed roasting conditions on volatile component patterns of essential oils obtained from sesame meals. *Korean J. Food & Nutr.*, 20(1) 9-13 (2007)
33. Kim JK, Kim BS, park CW, Seo DB, Yoo HR, Lee SJ: Effect of ginseng-berry extract on the improvement of blood microcirculation and skin brightness. *Korean J. Oriental Physiology & pathology.*, 24(1) 85-90 (2010)
34. Yeom MH, Lee JY, Kim JS, Park CW, Kim DH, Kim HK: The anti-aging effects of Korean ginseng berry in the skin. *Korean J. Pharmacogn.*, 41(1) 26-30 (2010)
35. Seo IW, Nam HJ, Shin HS: Influence of polycyclic aromatic hydrocarbons formation in sesame oils with different roasting conditions. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 41(4) 355-361 (2009)
36. Park CW, Choi KJ, Shim KB, Ha TJ, Lee MH, Hwang JD, Pae SB, park KY, Baek IY: Studies on the improvement of roasting condition of sesame seeds for producing seed season and oil. *Korean J. Crop Sci.*, 56(3) 205-211 (2011)
37. Kang MH, chung HK, Song ES, Park WJ: improved method for increasing of the oil yields in grape seed. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34(5) 931-934 (2002)
38. Im MH, Choi JD, Choi KS: The oxidation stability and flavor acceptability of oil from roasted soybean. *Agri. Chem. and Ciotechnol.*, 38(5) 425-430 (1995)

39. Lee SJ, Choi SY, Shin JH, Kim SH, Lim HC, Sung NJ: Fatty acid composition and oxidative stability of citron seed oils. *J. Life Sci.*, 16(3) 427-432 (2006)
40. Huang YH, Li XG, Cui SY, Yu WB, Kuang YL, Yan JK, Yang JX, Liu RS, Kim HS: Dynamic studies on physiology and biochemistry in American ginseng seed during stratification (Part II. Contents of soluble carbohydrate, crude fat, fatty acid and soluble protein). *Korean J. Ginseng Sci.*, 21(1) 39-42 (1997)
41. Bouic PJ: Sterols and sterolins: new drugs for the immune system. *Drug Discov.*, 7, 775-778 (2002)
42. Chen F, Luo J, Kong L: Fast isolation of ginsenosides Re and Rg₁ from the roots of *Panax ginseng* by HSCCC-ELSD combined with MCI GEL CC guided by HPLC-MS. *J. Liq. Chromatogr.*, 35, 912-923 (2012)
43. Cho JG, Lee MK, Lee JW, Park HJ, Lee DY, Lee YH, Yang DC, Baek NI: Physicochemical characterization and NMR assignments of ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, and Rd isolated from *Panax ginseng*. *J. Ginseng Res.*, 34, 113-121 (2010)
44. Martinez-Correa HA, Gomes DCA, Kanehisa SL, Cabral FA: Measurements and thermodynamic modeling of the solubility of squalene in supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.*, 96, 43-50 (2010)
45. Smith TJ: Squalene: potential chemoprotective agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9, 1841-1848 (2000)

