

발간등록번호

11-1543000-000576-01

**발효에 의한 희귀 진세노사이드 생산과 이들 성분이
증강된 기능성 홍삼제품 개발**

Production of uncommon ginsenosides(Rh₂ and compound K)
by fermentation and development of functional
red ginseng products reinforced with these components

한 방 바이오 (주)

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “발효에 의한 희귀 진세노사이드 생산과 이들 성분이 증강된 기능성 홍삼제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 10월 10일

주관연구기관명 : 한방바이오(주)

주관연구책임자 : 배 귀 식

세부연구책임자 : 배 귀 식

연 구 원 : 김 중 학

연 구 원 : 노 중 훈

협동연구기관명 : 성균관대학교 약학대학

협동연구책임자 : 이 동 권

요 약 문

I. 제 목

발효에 의한 희귀 진세노사이드 생산과 이들 성분이 증강된 기능성 홍삼제품 개발

II. 연구개발의 필요성 및 목표

인삼을 유용균주로 발효시켜 생리활성 물질이 강화된 식품소재를 개발하고, 이를 이용하여 다양한 기능성이 강화된 인삼제품을 개발하고 산업화시키기 위하여 다음과 같은 목표를 두었음.

1. 유용균주 발효에 의한 기능성 **ginsenosides(Rh2, C-K)** 생산 및 표준화
2. 유용균주 발효에 의하여 생산된 기능성 **ginsenosides** 및 복합제품의 급성호흡기 질환 사망률 1 위를 차지하는 **폐렴구균을 대상으로 면역력을 증가시키는 약리효능** 확인
3. 기능성 생리활성 성분강화 인삼제품 개발 및 산업화

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 유용균주 발효에 의한 기능성 **ginsenosides** 생산 및 표준화
 - 1) 유효성분 구성비 변환, 가공기술 및 발효조건 확립
 - 2) 균주 발효기술에 의한 기능성 성분(**ginsenosides Rh2, compound K** 등)의 분리 및 구조동정
2. 유용균주 발효에 의하여 생산된 기능성 **ginsenosides** 및 복합제품의 급성호흡기 질환 사망률 1 위를 차지하는 **폐렴구균을 대상으로 면역력을 증가시키는 약리효능** 확인
 - 1) 면역에서 중추적인 기능을 수행하는 대식세포의 **cytokine** 생산능과 **NO** 생산 능력을 측정하고 탐식작용을 측정함
 - 2) 또한 *in vivo*에서 생쥐에 홍삼 제품을 투여 후 병원균을 감염 시 면역 기능을 측정하여 발효 홍삼이 면역 방어 기능에서 기존 제품 보다 어떻게 기능이 강화되는지 규명함.
 - 3) 동물실험을 통한 전임상 연구
3. 고기능성 생리활성 성분강화 인삼제품 개발 및 산업화
 - 1) Bioreactor를 활용한 고기능성 **ginsenosides** 생산공정 기술확립
 - 2) 고기능성 생리활성 성분(**ginsenosides Rh2, compound K**)이 강화된 인삼제품 개발
 - 3) 고기능성 인삼 건강식품 시제품 제조
 - 4) 고기능성 인삼 건강식품 산업화 기반 확립

IV. 연구개발결과

1. 발효공정을 통한 희귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 생산 유용균주 선발 및 표준화
2. 발효에 의하여 생산된 희귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K) 복합제품의 효능연구
(폐렴구균 면역력 확인)
3. 기능성 생리활성 성분강화 인삼제품 개발 및 산업화
* 4개의 제품개발 완료 및 산업화

V. 연구성과 및 성과활용 계획

구분	(예시)특허		(예시)신제품				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1					0	1		
	달성	2					5	2		
2차 년도	목표	2					3	3	1	
	달성		1					3		
3차 년도	목표								1	
	달성									
4차 년도	목표									
	달성									
5차 년도	목표									
	달성									
계	목표	3					3	4	2	
	달성	2	1				5	3		3 개 는 revision

* 성과활용을 응용한 제품개발을 통하여 자체사업화

SUMMARY

(영문요약문)

Using Ginseng fermented with the useful strain for the development of food material with enhanced physiologically active components and in order to industrialization by developing the ginseng products various functionality is enhanced, and placed these goals as follows

1. Standardization and production functions of ginsenosides((Rh2, C-K)) by fermentation of useful strains
2. Check pharmacological effect of increasing the immune system to target the pneumococcal occupying first place mortality of acute respiratory disease using complex product with enhanced functionality ginsenosides which is produced by fermentation of useful strains
3. Develop ginseng product enhanced physiologically active components and industrialization

Contents

(영 문 목 차)

1. Overview of R & D projects
2. National and international technical developments
3. Contents and results of R & D projects
4. Contribution to the achievement of objectives and related fields
5. The outcomes of R & D projects and application
6. References

제 1장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

(1) 기술적 측면

- (가) 예로부터 신비의 영약으로 불려오던 고려인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 민간에서 수 천년의 약용역사를 가지고 있으며 주로 자양강장, 피로회복, 면역증가활성을 나타냈다. 인삼사포닌(ginsenoside)은 가장 중요한 활성성분으로서 현재까지 고려인삼으로부터 약 40여종의 ginsenoside가 분리되었지만, 그중 major ginsenoside인 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re 및 Rg₁을 포함한 6 종 사포닌이 총 사포닌의 90%이상을 차지함.
- (나) 최근에 major 사포닌이 가수 분해되어 생성된 소량의 minor 사포닌, 특히 ginsenoside Rg₃, Rh₂, compound K 등이 항암활성, 면역증가, 혈행개선, 치매방지 등에서 탁월한 약리활성을 나타낸다는 연구가 활성화되고 있는 실정임.
- (다) Compound K는 암세포의 growth, invasion, migration을 저해하고, 암세포 DNA에 침입하여 apoptosis를 유발시키는 것으로 확인되었는데(Wakabayashi et al., 1998), 가수 분해되지 않은 major 사포닌에서는 이러한 활성이 없음.
- (라) Ginsenoside-Rg₃가 다시 가수 분해되어 생성된 minor 사포닌 G-Rh₂는 -Rg₃보다 강한 cytotoxic 항암효과를 나타내었으며, 특히 PD는 다른 사포닌들(-Rb₁, -Rg₃, -Rh₂)과는 달리 위장의 위해 세균인 *Helicobacter pylori*의 성장을 억제함(Bae et al., 2002).
- (마) Minor 사포닌의 우수한 약리활성이 검증됨에 따라 minor 사포닌 생성을 위한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 주로 산가수분해, 열처리, 효소가수분해 및 유기합성 등의 방법이 시도되었음. 인삼사포닌은 산에 의해 쉽게 가수분해가 되지만 분해산물이 G-Rg₃이거나 G-Rh₂인 경우에는 S-form과 R-form의 optic isomer혼합물이 형성되는 것이 특징이며 당가수분해 과정에서 선택성이 떨어짐.

◆ 인삼의 면역 기능

- (가) 인삼은 항암, 항 스트레스 등의 여러 가지 기능을 갖고 있다고 보고되었고 ginsenoside 수준의 연구가 많이 보고되고 있다 (최, 2008). 그러나 ginsenoside 수준의 연구는 제품화하기에는 순수 분리의 어려움 및 비용 상의 문제로 제품화와는 거리가 있다. 최근 발효를 통해 ginsenoside Rh₂, compound K 등 인삼 유효성분 함량을 증가시키는 연구가 보고되고 있으나 (Yoo 등, 2011; Zhou 등, 2008; Han 등, 2007) 제품화된 것은 없다.
- (나) 면역기능과 관련된 인삼의 기능이 최근 많은 주목을 받고 있으며 항-인플루엔자, 항-수족구병, 항-녹농균, 항-헬리코박터 작용 등이 보고되었으나 (Wu 등, 2011; Song 등, 2010; Quan 등 2007; Song 등, 2009; Song 등, 2010; Lee 등, 2009) 현재까지 호흡기 질환의 주된 원인균인 폐렴구균 및 다른 호흡기 질환에 대한 연구는 보고된바 없다. 따라서 호흡기 질환 사망률 1위를 차지 하고 있는 폐렴구균 질환을 예방할 수 있는 연구는 새로운 수요 창출이 필요하다.

◆ 폐렴구균의 특성

- (가) 폐렴구균은 급성호흡기 질환 및 성인 수막염 사망률 1위를 차지하고 현재 시판되는 23가지 다당류 백신은 95 가지 이상의 혈청형 (Henrichsen, 1995) 중 감염 시 주로 검출되는 23 가지 혈청형 균주로부터 다당류 협막 (capsular polysaccharide)를 분리하여 면역원으로 사용하지만 영유아는 효과가 낮고 T 세포가 관여하지 않아 memory response가 없는 단점이 있다 (Bogaert 등, 2004; Bernatoniene 와 Finn, 2005)). 이런 23가 백신의 단점을 해결하기 위해 개발된 7가 conjugate 백신은 7 가지 다당류에 carrier 단백질을 붙였으나 단가가 높고 95가지 이상의 다당류 type 중에서 7 가지 혈청형에 대해서만 방어효과가 있으므로 폐렴 예방 백신으로 효과가 매우 제한적이다(Bogaert 등, 2004; Bernatoniene 와 Finn, 2005).
- (나) 호흡기 감염으로 인한 사망자 수는 유럽에서 매년 174,000 명, 전 세계적으로는 380만 명임 (전세계 사망률의 6% 차지)(World Health Report, 2003). 호흡기 질환으로 인한 사망은 유럽에서 전체 사망률의 1.3% 에 지나지 않지만 항생제 처방의 가장 많은 부분 (36%)을 차지하고 (IMS Health, 2003) 내성균 출현은 호흡기 감염에서 점차 위협적인 요인으로 대두되고 있으며 항생제 시장에서 뿐만 아니라 처방전을 발행하는 의사들도 계속적으로 새로운 대체 치료제를 찾고 있음(Stakeholder Opinions: Community Acquired Respiratory Tract Infections - Room for Ketek?, Datamonitor 사, 2004. 3. 16). 또한 호흡기 질환 항생제 시장 규모는 계속 증가되어 2008 년 \$2.0billion (전체 항생제의 28%)에 달할 것으로 예측되므로 (Stakeholder Insight: Bacterial Infection Epidemiology, Datamonitor 사, 2003. 11. 10)) 호흡기 세균의 예방에 도움을 주는 인삼제품의 개발은 충분한 시장성을 갖고 있다.
- (다) 따라서 본 연구에서는 전 세계적으로 다제 내성균으로 치료에 어려움이 있으며 고부가 가치의 예방제 개발 필요성이 있는 병원균으로서 급성호흡기 질환 사망률 1 위를 차지하는 폐렴구균을 대상으로 면역력을 증가시켜 예방효능을 규명함으로써 새로운 예방제로 개발할 수 있는 기반을 조성함으로써 질환 예방 및 항생제 내성 극복의 전기를 마련할 필요가 있다. 또한 다른 병원균의 면역기전 및 예방에도 적용될 수 있으므로 앞으로 미생물에 미생물에 의한 감염 질환을 극복하는데 크게 기여함으로써 인삼 제품 개발에 새로운 신성장 동력이 될 수 있다.
- (라) 폐렴구균은 폐렴이외에도 성인 수막염, 중이염을 일으켜서 선진국에서도 경제적인 부담으로 작용하고 있으며 특히 성인 수막염의 주된 원인균으로 작용하여 치료가 어려울 뿐 (사망률이 30% 에 달함; Durand 등, 1993; Lee 등, 1991) 만 아니라 완치 후에도 50% 가 영구적인 정신장애 및 뇌기능 이상을 갖게 되어 (Bohr 와 Rasmussen, 1988) 사회적인 부담이 되고 있으므로 폐렴균 예방제 개발의 필요성은 아무리 강조해도 지나치지 않는다. 즉 뇌기능 저하로 인하여 비정상적인 사회생활을 하게 됨으로써 1년 동안 치료비보다 6 배 많은 막대한 사회복지 비용 (특수학교 설치, 특수교사 채용, 장애인이 이용 가능하도록 학교, 운송수단, 편의시설 등 장애자가 이용할 수 있는 모든 사회시설에 설치) 이 소요된다 (Ess 등, 2003). 따라서 미국, 캐나다를 비롯한 선진국의 소아과 협회에서는 고가임에도 불구하고 13가 접합 백신의 접종을 권장하고 있으므로 폐렴구균에 의한 손상을 예방하거나 경감시키는 연구는 사회복지 차원에서 아무리 강조해도 지나치지 않을 것이다.

(마) 폐렴구균의 항생제 내성이 높은 Spain에서는 폐렴구균 질환의 사망률이 23%나 되었으며 (Pallares 등, 1995) 미국에서도 폐렴균의 24%가 다제내성을 나타내었으며 (Whitney 등, 2000) 폐렴균의 항생제 내성율이 86%인 한국 (Lee 등, 2001)에서도 사망률이 점차 증가하여 사회적인 문제로 대두될 수 있으므로 효과적인 예방제 개발이 시급히 요구된다.

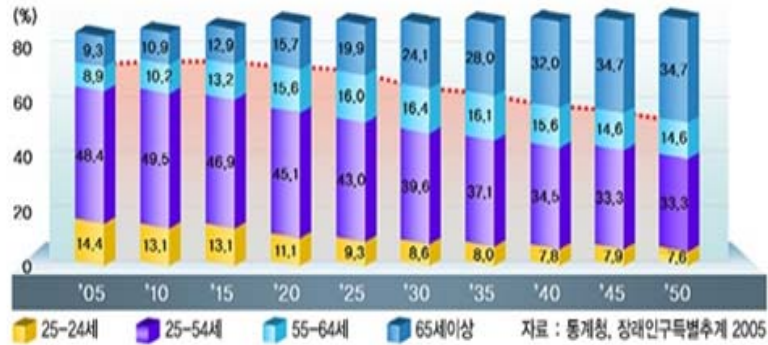


그림 65세 이상 인구비율 (단위:만명)

(바) 특히 치사율이 높은 65세 이상 노인이 매년 증가되어 2018년에는 전체인구의 14.3%, 2026년에는 20.8%로 예상되므로 (65세 이상 인구비율) 삶의 질 향상 및 고부가가치의 예방 및 치료제 개발에 필요한 산업경쟁력을 확보하기 위해서는 새로운 paradigm의 폐렴구균 치료 및 예방을 위한 국가적 차원의 지원이 요구된다.

(사) 인삼에는 citric acid, malonic acid, oxalic acid와 같은 많은 유기산이 존재하는데, 수삼을 홍삼으로 찌는 과정에서 수삼에 원래 함유되어 있지 않는 S-form과 R-form의 ginsenoside-Rg₃가 생성되듯이 열처리를 하는 과정중 ginsenoside-Rb₁, -Rd, -Rc 등 major사포닌이 산가수분해 과정과 마찬가지로 주로 인삼에 존재하는 유기산에 의해 가수분해가 일어남. 인삼사포닌을 가격이 저렴하게 많이 생산하기 위하여 인삼사포닌에 대한 유기합성을 시도하였지만 특이적인 구조특징으로 인하여 전합성은 이루어 지지 못했고, 인삼사포닌구조와 유사한 기타 천연물질로 인삼사포닌을 합성하였지만 수율이 낮고 합성과정이 복잡하여 기술적으로 어려움.

(아) 위의 minor사포닌 생산방법에 비하여 효소반응은 낮은 온도에서 진행할 수 있고 조작이 간단하며 효소의 기질특이성으로 인하여 부산물이 적고 산가수분해와 다르게 S-form만 생성됨으로 어떤 특정한 활성(면역증가, 비만개선, 염증치료)을 가진 minor사포닌을 많이 함유한 사포닌 전환체를 만들 수 있음. 지금까지 효소에 의한 사포닌의 전환연구는 주로 장내세균, 토양미생물 및 식물조직에서 분리한 미생물에 집중되어 왔음. 따라서 본 연구는 기존에 수행하였던 관련 연구에 기초하여 유용균주 발효를 통하여 인삼사포닌의 전환에 사용함으로써 보다 안정하고 특정활성을 지닌 minor사포닌을 보다 많이 함유한 사포닌전환체를 생산하는 기술확립에 있어서 중요한 의의를 가지고 있음.

(2) 경제·산업적 측면

- (가) 경제가 발전하고 국민소득이 증가함에 따라 건강증진에 관심을 모으고 있는 사람들이 점점 많아지고 있는 실정임. 홍삼은 인삼보다 훨씬 높은 가격으로 거래되고 있는데 이는 쪼고 말리는 과정을 반복적으로 처리하여 가공과정에 의한 부가가치 상승도 원인이지만, 무엇보다 주요한 것은 홍삼이 인삼보다 약효가 뛰어나기 때문임.
- (나) 국가와 지역에 따라 인삼뿌리와 제품에 대한 선호도에 차이가 있는데, 한국, 중국 및 소수 동남아시아 국가에서는 약재로 뿌리 삼을 선호하는데 비하여 일본과 서양국가들은 건강보조식품인 캡슐과 가공제품인 차와 드링크 등을 선호함. 최근 한국의 인삼류 수출실적을 보면 제품류가 약 88%를 점유하고 본삼류가 12%점유하여 국제시장에서 인삼제품에 대한 수요가 뿌리 원삼보다 제품이 훨씬 큰 것을 알 수 있음. 따라서 유용균주 발효를 통한 고기능성 인삼사포닌 생산을 통하여 면역증가, 비만 개선, 염증 치료 등에서 높은 활성을 나타내는 minor사포닌을 대량 생산하여 고부가가치의 건강기능성 식품을 개발할 수 있다면 국내의 인삼소비시장 확대를 통한 인삼산업의 활성화는 물론, 수출용 맞춤형 제품개발을 통하여 해외수출증대에 크게 기여함으로써, 인삼종주국으로서의 한국의 위상을 굳건히 하여 국제경쟁력을 높이게 될 것임.

(3) 사회·문화적 측면

- (가) 고려인삼은 한국의 대표적인 특용농작물로서 탁월한 생리활성이 검증됨에 따라 세계 각국에서 인정받아 한국뿐만 아니라 중국, 일본, 미국, 캐나다, 러시아 등 많은 국가에서 인삼재배가 대량으로 이루어지고 인삼에 대한 다양한 연구, 나아가서는 고부가가치의 인삼제품개발까지 관심이 커지고 있음. 그러나 현실은 광활한 토양에서 대량으로 인삼을 재배하는 중국이나 미국, 캐나다에 비해 한국인삼의 재배는 일단 생산량에서 뒤지고 있고, 인삼 효능 향상을 위한 고부가가치의 인삼제품생산 연구도 일본, 홍콩, 미국에서 한국보다 활발히 이루어지고 있는 실정임.
- (나) 고려인삼은 말 그대로 인삼의 종주국은 고려시대부터 한국이었지만, 종주국의 이름에만 만족하면 언젠가는 종주국의 명색이 퇴색되고 나중에는 치열한 국제적인 경쟁에서 패전당하고 말 것임. 이런 국제적인 환경에서 고려인삼이 국제적인 경쟁력과 종주국으로서의 위상을 되찾기 위해서는 고부가가치를 창출하여야 하는데, 유용균주 발효를 통하여 생리활성이 뛰어난 minor 사포닌을 대량생산하고 이를 활용하여 우수하고 균일한 고부가가치의 새로운 건강기능성 인삼제품을 개발하면 한국인삼의 경쟁력을 높이고 한국인삼의 자존심을 되찾는 중요한 계기가 될 것임.

나. 인삼산업 시장현황

(1) 국내 인삼산업 시장현황

- (가) 고려인삼을 분류하면 수삼, 홍삼, 백삼으로 나누어 지는데, 수삼은 모든 인삼의 원료용으로서 또는 그대로 유통되기도 하나 수삼 자체가 75%내외의 수분을 함유하고 있기 때문에 원형 그대로는 장기적 보존이나 유통이 어려워 오랜 역사를 거쳐 저장수단의 방법으로 일광건조법과 열처리 증숙건조법을 이용하여 왔다. 제조방법에 따라 백삼과 홍삼으로 구분하고 2차 가공되는 제품을 원료에 따라 백삼제품과 홍삼제품으로 다시 구분한다.

- (나) 동남아시아 특히 중국, 홍콩, 대만을 중심으로 하는 중국계열의 대부분 소비층은 원형유지 본삼류로 홍삼을 최고의 상품으로 선호하며 고급홍삼인 천삼, 지삼 그리고 대편급을 더욱 요구하고 있으나 고급홍삼의 생산량 부족으로 요구량을 모두 충족시키지 못하고 있는 실정이므로 고려인삼의 우수품종 육성과 우수한 원료수삼의 대량 생산재배 기법의 개발이 시급한 과제로 대두되고 있다. 그래서 KT&G중앙연구원 (2002년 2월까지의 과학기술부 출연연구기관인 한국인삼연초연구원)에서는 그간 선발 육성한 우수품종을 1999년 3월에 처음으로 2품종 (천풍과 연풍)을 등록하였으며 현재까지 고품, 선풍, 금풍, 선운, 선원, 청선 등의 품종이 등록되어 있다. “천풍”은 우수한 외관품질을 소유하며 고급홍삼 제조용 품종으로 개발되었고, “연풍”은 다량 생산하는 특징을 지닌 품종으로 가공제품 원료용으로 개발되어 현재 종자보급 대중화에 노력하고 있다.
- (다) 홍삼과 백삼의 원료가 되는 수삼의 품질과 생산량 그리고 수급조절은 인삼사업을 좌우하는 절대적 요소로서 대단히 중요한 문제이다. 인삼의 생산면적과 생산량 및 생산액의 현황을 보면 2009년의 경우 재배면적은 지정포가 8,944ha, 신고포가 14,341ha로서 신고포가 지정포에 비하여 재배면적이 약 1.6배정도에 이르고 있으며 2000년의 면적과 비교해 보면 대폭 증가하고 있는 경향이고, 신규면적의 경우도 같은 경향을 보이고 있다. 인삼의 생산량은 2009년 현재 지정포가 8,420톤, 신고포가 19,040톤을 점하고 있다.
- (라) 인삼재배에 대한 시도별 경작면적과 농가현황을 보면 2009년의 경우 충북, 경기, 충남, 전북, 강원, 경북, 순으로 나타났다. 2004년 인삼 경작농가수는 13,797호이며 2001년의 19,310호에 비하여 대폭 감소하였으나 2005년에는 15,793호로서 2004년에 비하여 2000여호 증가하였으며 2006년에는 15,856호, 2007년에는 19,850호, 2008년에는 24,298호로서 전년도에 비하여 급격히 증가하였다.
- (마) 2008년 현재 12개의 인삼협동조합이 구성되어 있으며, 이들 인삼협동조합별 인삼경작면적을 보면 충북인삼협동조합이 4,353ha, 전북인삼협동조합이 3,975ha, 강원인삼협동조합이 2,021ha, 경기동부인삼협동조합이 1,585ha, 서산인삼협동조합이 1,543ha 순으로 많으며 이들 5개 인삼협동조합에서 전체면적의 69.4%를 점유하고 있다.
- (바) 홍삼류 원형삼(본삼류, 미삼류 등)의 연도별 생산동향을 보면 2003년 260.8톤, 2004년 390.6톤, 2005년 395.8톤, 2006년 474.1톤으로 증가한 후 2007년 721.9톤, 2008년 697.0톤, 2009년 720.0톤 으로 급증하였으며 특히 2007년에는 2003년의 2.8배로 증가하였는 바, 이는 홍삼 본삼류의 중국 수출물량 증가에 기인된 것으로 추측된다. 백삼류 원형삼(본삼류, 미삼류 등)의 연도별 생산량은 2003년 382.6톤에서 2004년 411.1톤으로 증가하였고 2005년에는 298.6톤으로 다시 감소하였으나 2006년에는 444.1톤으로 급증하였고 2007년에는 480.8톤, 2008년에는 521.7톤으로 급증하였다. 본삼류중에는 곡삼, 피부직삼, 직삼 순으로 많이 생산되었다.

(사) 인삼제품은 제조방법과 제형의 성장에 따라 차류, 엑스류, 분말류, 캡슐류 그리고 액상의 드링크류로 크게 나눌 수 있다. 식품의약품안전청의 자료에 따른 인삼제품류의 연도별 생산량은 2004년 총생산량은 43,478톤으로 이는 2003년의 32,693톤 대비 1.3배 수준으로 증가하였고, 2007년 총생산량은 47,127톤으로 2004년 대비 1.08배 증가하였다. 홍삼제품류의 연간 총생산량의 변동을 보면 모든 제품에서 2001년에 비하여 2002년에는 급증하였고 2003년, 2004년, 2007년은 증가세가 둔화되어 오히려 2002년에 비하여 계속 감소한 경향을 보이고 있다. 2007년도 제품별로 생산량을 보면 농축홍삼류 148톤, 홍삼분말류 3톤, 홍삼차류 210톤, 홍삼음료 25,380톤, 홍삼캡슐류 8톤으로서 홍삼차류 이외의 품목은 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 새로운 제형으로의 신제품개발은 실수요자의 기호성향과 선호도를 정확히 조사 분석하고 이를 응용하여 수요층 요구에 부합되는 제품이 되어야 한다. 백삼제품류의 연간 총생산량을 보면 2004년에 비하여 2007년의 경우 모든 품목이 감가하는 추세로 나타나고 있다.

(아) 국민들의 건강기능식품에 대한 관심증대와 고려인삼의 약리효능과 생리활성 성분에 대한 과학적 연구결과가 많이 발표되면서 음용이 편리한 다양한 인삼제품의 소비가 크게 증가하고 있다. 인삼수요의 동향을 보면 인삼의 수요는 계속 증가하고 있으며 1인당 인삼소비량은 1998년 0.19kg에서 1999년 0.27kg으로 급증한 이후 2003년 0.30kg, 2004년 0.27kg, 2005년 0.28kg, 2006년 0.39kg, 2007년 0.41kg, 2008년 0.45kg 2009년 0.48kg 으로서 꾸준히 소비하는 것으로 나타나고 있다.

(2) 해외 인삼산업의 시장현황

(가) 인삼류의 종류별 수출액 규모를 보면 2002년의 5,500만 달러에서 2004년에는 8,920만 달러로 급격히 증가하였으며 2005년에는 8,250만 달러로 2004년에 비하여 약간 감소하였지만 2006년에는 8,900만 달러, 2007년에는 9,210만 달러, 2008년에는 9,720만 달러, 2009년 10,892만 달러로 증가하였다.

(나) 인삼류별로 살펴보면 2003년 기준으로 전체 수출액에서 홍삼류가 차지하는 비중은 50.2%로 가장 높고 백삼류 37.4%, 기타 12.4% 순이었으나 2006년에는 홍삼류가 62.0%로서 백삼류 33.4%를 능가하였으며 2009년에는 홍삼류가 68%로 증가폭이 큰 것으로 나타나고 있다. 2009년 단일 품목의 비중으로 보면 홍삼이 44.7백만 달러로 최고 수준이고 백삼정 11.1백만 달러, 인삼음료 9.0백만 달러, 홍삼분 13.2백만 달러, 홍삼정 12.3백만 달러, 홍삼조제품 6.9백만 달러, 백삼조제품 5.3백만 달러 순으로 나타났다.

(다) 인삼류의 수출지역별 실적을 보면 연도에 상관없이 동남아 지역이 84 ~ 87%를 차지하고 있으며 2009년의 경우 동남아가 87%, 북미 8.6%, 유럽 2.2%, 중동 0.6%, 중남미 0.1%를 차지하고 있다. 2009년 수출국가는 총 78개국으로 2000년 63개국보다 15개국이 증가된 것이다. 2009년의 수출국가별 인삼수출현황을 보면 일본이 34.4백만 달러(31.7%), 홍콩이 27.9백만 달러(25.7%), 대만이 16.0백만 달러(14.7%)로서 전체의 72.1%를 차지하고 있어 수출지역이 너무 일부국가에 편중되어 있음을 알 수 있으며 수출국가의 다원화가 절실히 요구되고 있다.

(라) 인삼류의 수입현황을 보면 2002년 4,016천 달러, 2003년 5,290천 달러, 2004년 5,669천 달러, 2005년 6,070천 달러로서 매년 증가하였지만 2006년에는 5,314천 달러, 2007년에는 4,553천 달러, 2008년에는 4,974천 달러, 2009년에는 3,062천 달러로서 감소하는 추세를 보였고 2009년 단일 품목의 비중으로 보면 백삼정이 1,351천 달러로서 가장 많으며 그 다음이 백삼 841천 달러, 홍삼 206천 달러, 백삼분 203천 달러, 인삼액즙 139천 달러, 백삼차 77천 달러 순으로 차지하고 있다.

(마) 최근 의료기술의 발달과 더불어 인간의 근본적 욕망인 수명에 대한 장수의욕과 이에 따르는 건강한 삶의 유지 욕구는 점차 고조되어 있고, 질병에 대한 인식이 강화되면서 건강한 생활을 영위하려는 갈망으로 그 의식이 전환되고 또 정착화 되고 있으며, 특히 신체적 정신적 건강을 유지하기 위하여 건강기능성식품을 요구하는 시대로 접어들었다. 인삼을 주재료 하는 인삼제품 개발에서도 이미 시대적 흐름과 소비자의 요구수준에 맞추어 새로운 제형의 제품과 특수용도의 제품을 개발하는 시대속에 와있다. 인삼에 대한 약리적인 효능효과 연구에서도 시대적 요구에 맞추어 한방적 민간요법이나 경험적 효과 수준에서 벗어나 효능효과 발현에 대하여 과학적으로 입증하기 위한 연구로 방향이 전환되고 있으며 신제품 개발도 이들의 연구결과를 토대로 기본방향을 설정하고 또 기초자료로 활용하고 있다.

(바) 식품의약품안전청의 식품 및 식품첨가물 생산실적 통계자료에 따른 인삼 제품류의 연도별 국내용과 수출용으로 구분한 출하액 추이를 보면 표11과 같다. 백삼류와 홍삼류를 합산한 국내 출하액은 2001년 1,746억원 수준에서 2004년 2,575억원으로 증가하였고 2007년에는 3,370억원으로 급증하였으며, 수출액은 2001년 3,286만달러에서 2004년 2,891만달러로 거의 반감하였고 2001년부터 급증하기 시작하여 2003년에는 4,014만달러로 증가하였으나 2004년에는 2,890만달러로 급격히 감소하였고 2007년에는 1,790만달러로 감소하는 추세에 있다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 기술개발 현황

가. 특허분야 기술개발 분석

기존 특허는 인삼 사포닌의 전환에 대해 실험실 스케일에서의 단순한 방법적인 분야에 치중되어 있으며 실제 그 효율 또한 높지 않으며 생성된 일부 물질에 대한 TLC 및 HPLC를 통한 분석을 하는데 그치고 있다. 따라서 본 연구과제에서는 유용균주의 선발을 통한 사포닌 전환시 이용되는 최적의 조건을 탐색하고 효소의 활성 증가를 위한 elicitor 탐색을 통한 유용물질 생산의 최적화를 모색하며 이를 대량 생산하기 위한 scale up을 하는 방향으로 연구를 추진

나. 논문분야 기술개발 분석

- (1) 기존 논문은 균주의 선발을 통한 인삼사포닌의 전환하는데 목적을 두고 있다. 실제 인삼전환을 위해 토양미생물, 유산균등 다양한 균주를 이용하여 사포닌과 반응시켜 minor 사포닌으로 전환하는 분야에 치중되어 있다. 더불어 대부분의 연구가 다양한 ginsenoside의 전환 및 생리활성을 확인하는 것이 아니라 PPD계열의 ginsenoside C-K의 생산에 치우쳐 있어 다른 사포닌 성분에 대한 전환 연구는 미미한 수준으로 PPD계 뿐만 아니라 PPT계열의 대사물질 분석을 통한 검정에 대한 연구를 추진
- (2) 최근 발표된 논문은 단순히 많은 양의 균주를 키워 효소를 뽑아 단일 물질과 반응시켜 극소량의 minor사포닌을 생산하기에 실제적으로 이는 산업화에 적합하지 않다. 따라서 본 연구과제에서는 실제 인삼 추출액을 이용한 균주생장배지조성의 개발 및 반응 통하여 발효홍삼 대량생산을 위한 연구를 수행

다. 제품 및 시장분야 기술개발 분석

- (1) 발효인삼의 시장 현황 : 최근 인삼의 주요성분인 인삼 사포닌을 물리, 화학적, 미생물, 효소적인 방법등을 통하여 많은 사포닌 전환 연구가 이루어지고 이에 따른 인삼 제품이 생산되어 지고 있다. 실제 CJ, 대상, 웅진 등의 대기업들이 발효홍삼이 제품을 출시하고 있으며 중견 기업들로 점차 확대되어 나가는 추세이다. 그러나 기존의 홍삼 제품과의 차별화를 이유로 다양한 발효홍삼 제품이 출시되지만 실제 시중에 유통되어지는 발효홍삼의 대부분이 발효를 통한 물질에 대한 구체적인 명시가 되어 있지 않다. 따라서 실제 유통되어지는 제품이 어떠한 과정을 통하여 발효가 되었는지 또한 발효를 통해 어떠한 구체적인 물질이 얼마나 생산 되었는지에 대한 정보가 없는 실정이며 이에 따라 각각이 제품이 특정한 기준없이 시중에 유통되고 있는 실정이다.
- (2) 본 연구과제에서는 홍삼의 발효를 위한 사용 유용균주 및 발효방법의 정확한 기준을 마련하고 HPLC 및 LC/MS 정성 및 정량 분석을 통한 ginsenoside Rg3, C-K 등 전환 사포닌의 표준화를 이룩할 것임. 더불어 인삼사포닌을 minor사포닌으로 변환 시킨 고기능성 물질은 기능성식품 및 천연물 신약개발을 위한 소재개발에 크게 기여할 것으로 기대된다.

2. 연구개발과제의 기존 기술과의 차별성

가. 핵심기술의 특징

- (1) 성분변환에 유용한 발효균주 선발기술
- (2) 인삼의 농도증가에 따른 유용한 균주의 발효 및 배양기술
- (3) 성분변환에 의해 생성된 고부가가치 기능성 성분으 분석 및 분리기술
- (4) 발효인삼의 생리활성 및 효능검정 기술
- (5) 발효인삼의 산업화 기술

나. 기존 기술과의 차별성

- (1) 기능성 성분(Ginsenoside Rh2, compound k 등)의 변환율이 높은 균주 선발
(기존기술 : 20~40%, 본 연구 : 50% 이상)
- (2) 고농도의 인삼에서도 생장이 가능한 배양기술
(기존기술 : 60 brix extract 1~5%, 본 연구 : 10% 이상)
- (3) 기능성 성분(Ginsenoside Rh2, compound k 등) 분석 및 분리 기술
(기존기술 : 순도 70~80%, 본 연구 : 순도 90% 이상)
- (4) 발효인삼의 폐렴구균 면역력에 대한 생리활성 및 효능검정 기술
(기존기술 : 없음, 본 연구 : 확립되어 있음)
- (5) 발효인삼의 산업화 기술
(기존기술 : 시중에 여러 발효인삼·홍삼제품들이 출시되어 있으나 특정 기능성 검정이 과학적으로 되어있지 않음, 본 연구 : 폐렴구균에 대한 기능성 검증)

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 연구개발의 목표 및 연구수행 내용

가. 연구목표

인삼을 유용균주로 발효 및 효소 처리하여 희귀 진세노사이드(Rh₂ 및 Compound K)를 생산하고, 이들 성분이 강화된 식품소재를 개발하고, 이를 이용하여 다양한 기능성이 강화된 인삼 제품을 개발하고, 산업화 시키기 위하여 다음과 같은 목표를 두었음.

(1) 1차년도

(가) 유용 균주의 탐색 및 희귀 ginsenoside(Rh₂ 및 compound K)의 생산가능 균주 3종 이상 선발 (1세부)

(나) Bioreactor를 이용한 희귀 ginsenosides 생산 기반확립 (1세부)

(2) 2차년도

(가) 선발 균주를 이용한 희귀 ginsenosides 전환 최적화 방안 모색 (1세부)

(나) Bioreactor 전환 희귀 ginsenosides 대량 생산 기술 개발 (1세부)

(다) 희귀 ginsenosides 표준품 생산을 위한 균주시스템 확립(1세부)

(라) 1세부를 통하여 확인된 전환 희귀 ginsenosides를 이용한 폐렴구균을 대상으로 면역력을 증가 시키는 약리효능 확인 (제1협동)

(3) 3차년도

(가) 발효를 이용한 희귀 ginsenosides 생산 표준화(1세부)

① Ginsenosides Rh₂ : 총홍삼사포닌 대비 0.01%를 10%이상 함유

② Compound K : 일반 발효인삼 1~2%를 4%이상 함유(초 사포닌 대비)

(나) 희귀 ginsenosides 대량생산 및 이들 성분이 증강된 홍삼제품화, 산업화 (1세부)

나. 연구내용

(1) 유용균주 발효에 의한 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 생산 및 표준화

- (가) 유효성분 구성비 변환, 가공기술 및 발효조건 확립
- (나) 균주 발효기술에 의한 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 성분의 분리 및 구조동정
- (다) 독성시험을 통한 안전성 확보 : THP-1 cell(monocyte)을 이용하여 sandwich ELISA로 human TNF-alpha 발현 확인
- (라) Probiotic 효과유무 확인.
- (마) 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 생산 및 표준화

(2) 유용균주 발효에 의하여 생산된 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 복합제품의 급성호흡기 질환 사망률 1 위를 차지하는 폐렴구균을 대상으로 면역력을 증가시키는 약리효능 확인

- (가) 면역에서 중추적인 기능을 수행하는 대식세포의 cytokine 생산능과 NO 생산 능력을 측정하고 탐식작용을 측정함
- (나) *in vivo*에서 생쥐에 홍삼 제품을 투여 후 병원균을 감염 시 면역 기능을 측정하여 발효 홍삼이 면역 방어 기능에서 기존 제품 보다 어떻게 기능이 강화되는지 규명함.
- (다) 동물실험을 통한 전임상 연구

(3). 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 성분강화 인삼제품 개발 및 산업화

- (가) Bioreactor를 활용한 희귀 ginsenosides 생산공정 기술확립
- (나) 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 성분이 강화된 휴대하기 쉽고 일회 섭취가 편한 건강 인삼제품 개발
- (다) 기능성 발효인삼 시제품 제조
- (라) 기능성 발효인삼 제품 산업화 기반 확립

다. 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>발효에 의한 회귀 ginsenosides (Rh2 및 compound K) 생산 표준화연구 및 기능성 인삼제품 개발</p> <p>(1세부)</p>	<p>발효공정을 통한 회귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 생산 유용균주 선발 및 표준화 연구</p>	<p>각 연구 연차에서 선발한 유용균주의 2차선발</p> <p>선발된 유용 균주 기질특이성 분석 및 배양 최적화</p> <p>발효기술에 의한 수삼에는 존재하지 않고, 홍삼 등에서도 미량 존재하는 기능성 성분(Rh2, C-K)의 분리 및 구조 동정</p> <p>천연 식품소재를 이용한 발효 최적 조건</p> <p>가공처리된 인삼원료 및 추출엑스를 원료로한 발효 조건확립</p> <p>전환균주의 회귀 사포닌 생산 최적 조건 탐색 및 사포닌 분석</p> <p>분리된 선발 미생물 조효소를 이용하여 홍삼 extract와 반응하고 반응 최적 조건 탐색을 위하여 선발된 미생물의 조효소 분리, 사포닌 전환 효소추출 및 효소를 이용한 인삼 사포닌의 변환</p> <p>독성시험을 통한 안전성 확보 : THP-1 cell (monocyte)을 이용하여 sandwich ELISA로 human TNF-alpha 발현 확인</p> <p>Probiotic 효과유무 확인</p>
	<p>Bioreactor를 이용한 회귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 대량생산 기술 및 발효인삼 응용제품개발</p>	<p>Bioreactor를 이용한 대량 생물전환 미생물의 발효 조건 확립</p> <p>Bioreactor를 이용한 enzyme처리에 의한 생물전환 조건 확립</p> <p>2L, 18L Bioreactor를 이용한 균 생육 활성 측정 및 사포닌 분석, 회귀 사포닌 생산 함량 측정</p> <p>발효생산성 분석</p> <p>scale-up 배양기 이용 균주발효 및 enzyme에 의한 회귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 대량생산조건 확립</p> <p>고생리활성 ginsenosides(-Rh2, compound K) 원료 생산 및 성분표준화</p> <p>소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 유효성분이 강화된 맞춤형 제형 개발</p>
<p>발효에 의하여 생산된 회귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K) 복합제품의 효능연구(폐렴구균 면역력)</p> <p>(2세부)</p>	<p>발효에 의하여 생산된 회귀 ginsenoside 복합제품의 효능 연구(폐렴구균 면역력)</p>	<p>면역력관련 기초실험</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) iNOS 발현 측정 및 NO assay 2) 탐식작용 및 killing assay 3) Cytokine 및 chemokine 측정 <p>회귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 복합제품의 면역증강 활성 검증</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 발효홍삼 제품에 의한 대식세포에서의 폐렴구균에 대한 면역력 변화 측정 2) 발효홍삼 제품에 의한 생쥐에서의 폐렴구균에 대한 면역력 변화 측정 3) 조직검사 <p>동물실험을 통한 전임상 연구</p>

라. 연구결과

1. 발효 식품으로 부터 유산균 균주 분리

(1) MRS 배지 및 색소기질법을 이용한 유산균 분리

- 숙성된 김치 및 발효 식품을 적당한 농도로 희석(원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})하여 plate에 도말한 후 적당한 조건(온도 및 시간)에서 배양하여 유산균을 분리하였다.
- Esculin agar(β -glucosidase는 esculin의 glucose를 떼어내 esculetin 생성)를 이용하여 β -glucosidase활성을 가진 유산균을 선택적으로 분리하고 순수배양을 위해서 다시 한번 MRS agar plate에 계대배양을 한다.
 - > Esculetin이 ferric ammonium citrate와 반응하여 plate상의 colony 주위에 black complex를 형성함.

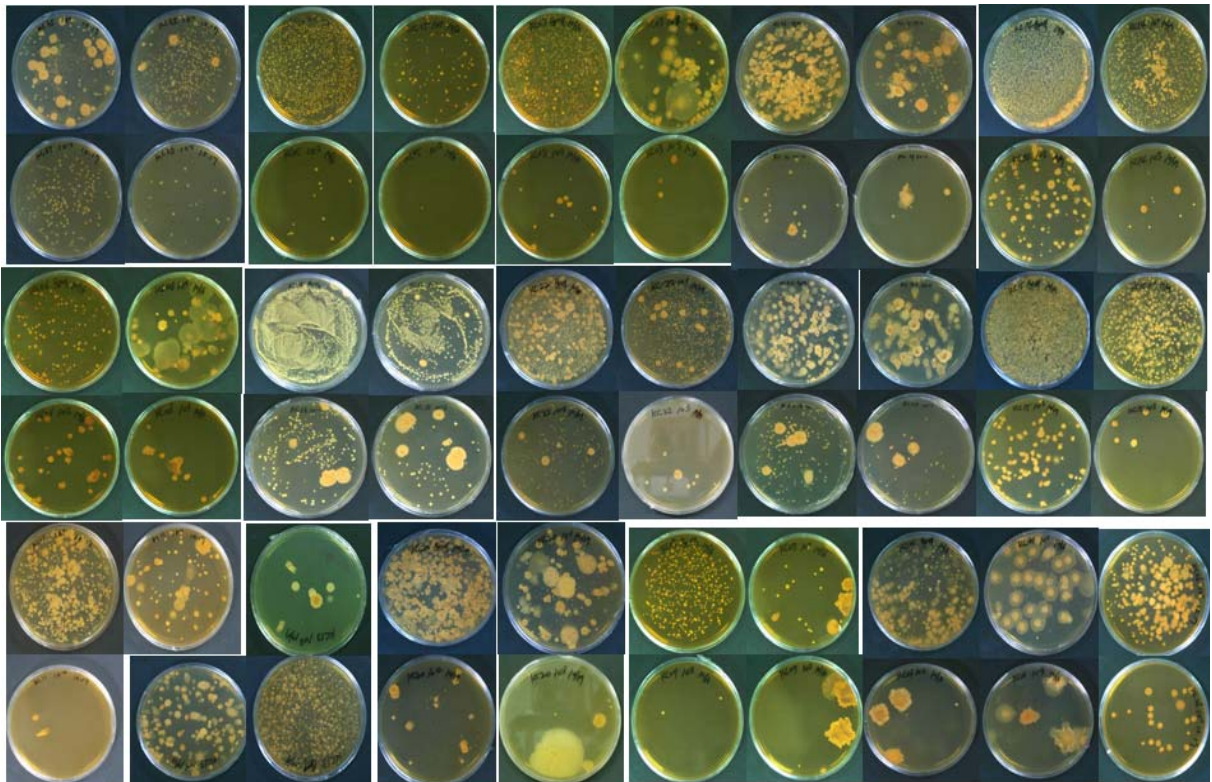


Fig. 1. 발효 식품으로 부터 유산균 균주 분리

전국 각지에서 100종의 발효 식품을 수집 후 각각 1 ml을 취해, 9 ml의 증류수로 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 로 희석한 후 MRS agar에 100 μ l씩 도말하였고 남은 시료는 시간과 온도에 따른 우점균의 변화를 막기 위해 -70°C 에 보관하면서 사용하였다. 도말한 plate는 37°C incubator에서 24h 동안 배양하여 colony 형성을 관찰하였다(Fig. 1).

농도별 MRS plate에서도 한 plate당 10개 정도의 colony를 취하여 총 500여개의 colony를 선별하였다. 대개 1, 10⁻¹농도의 plate에서 colony를 얻기 적당한 것으로 관찰되었고 크기, 색깔, 모양이 어느 정도 차이가 있는 single colony를 모두 선별하여 β -glucosidase 활성을 확인하기 위한 균주로 선별하였다.

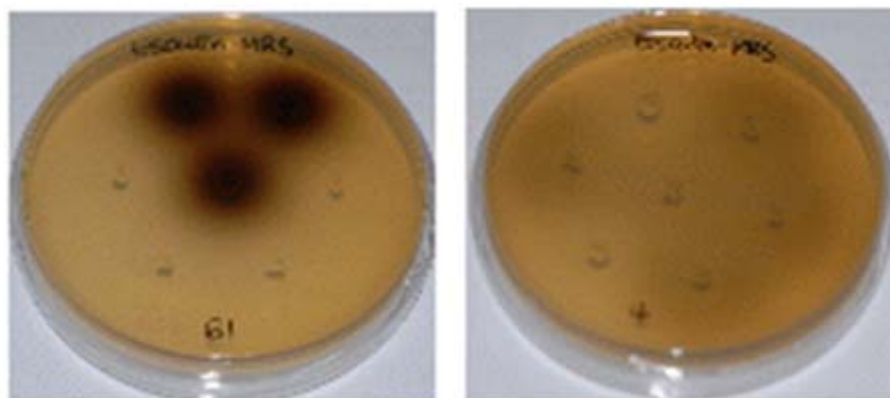
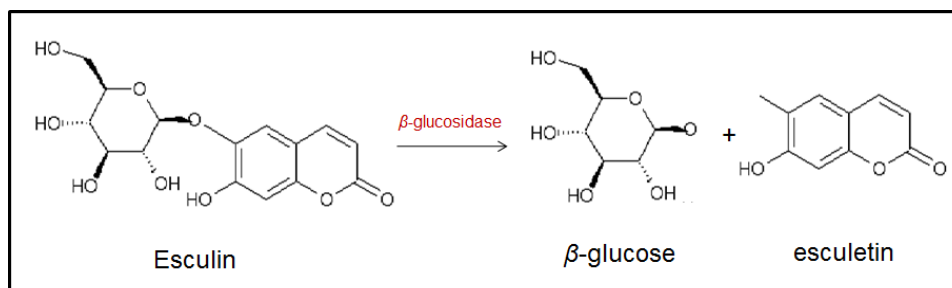


Fig. 2. β -glucosidase 활성균주 선별

Esculin agar(β -glucosidase는 esculin의 glucose를 떼어내 esculetin 생성)를 이용하여 β -glucosidase활성을 가진 유산균을 선택적으로 분리하고 순수배양을 위해서 다시 한번 MRS agar plate에 계대배양 하였다. 이후 Esculetin이 함유된 배지에 접종하였을 때, Esculetin이 ferric ammonium citrate와 반응하여 plate상의 colony 주위에 black complex를 형성하는 균주만을 선별하여 이를 β -glucosidase 활성균주로 확보 하였다.

(2) 미생물 분류를 위한 molecular taxonomy 분석

○ 16S rDNA : Esculin agar법으로 총 60개의 β -glucosidase 분비 미생물을 분리하였으며, 이들의 동정을 위하여 Core One bacterial DNA extraction kit (Coretech. Co. Ltd. Korea)를 이용하여 DNA를 분리한 후 전기영동하였다. 16S rDNA 영역은 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1512R (5'-ACGG(H)TACCTTGTTACGACTT-3')를 이용하여 증폭하였으며, PCR Purification Kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 정제한 후 염기서열분석을 실시한다.

β -glucosidase 활성을 가진 균주는 500종의 발효 식품에서 약 60개(31%)였고, 이 중에서 56%가 *Lactobacillus* genus로 밝혀졌다. MRS 농도별 plate에 smear한 10종의 배추김치에서 62개의 β -glucosidase 활성을 가진 균주를 발견하였다.(Table 1)

Table 1. 사포닌 전환 균주 스크리닝

Stock No.	Sample name	Blast search result high score cultured strain	Similarity (%)	전환(Conversionactivity)	Temp.($^{\circ}$ C)	code No.
1	60301	<i>Lactobacillus</i> sakei	99		37	GBL 053
2	60801	<i>Leuconostocmesenteroides</i>	99		37	GBL 104
3	61001	<i>Lactobacillus arizonensis</i>	99		37	GBL 011
4	61101	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	Rb1-Rd-Rf2-CK (low)	37	GBL 105
5	88601	<i>Leuconostoccitream</i>	99	Rb1-Rd (good)	37	GBL 063
6	88801	<i>Leuconostocmesenteroides</i>	99		37	GBL 111
7	88901	Not determined			37	
8	89004	Not determined			37	
9	89102	<i>Lactobacillusbrevis</i>	99		37	GBL 014
10	89301	Not determined		Rb1-Rd-Rf2 (medium)	37	
11	89401	Not determined			37	
12	89501	Not determined			37	
13	89601	<i>Lactobacillusarizonensis</i>	99		37	GBL 012
14	89701	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99		37	GBL 036
15	810001	<i>Lactobacillus brevis</i>	100		37	GBL 015
16	910101	Yeast			37	
17	910201	Not determined			37	
18	910301	<i>Lactobacillusplantarum</i>	99	Rb1-Gyp-Rd (medium)	37	GBL 037
19	910401	Not determined		Rb1-Gyp-Rd (medium)	37	
20	910501	Not determined			37	
21	910601	Not determined			37	
22	910701	Not determined		Rb1-Gyp-Rd (good)	37	
23	910801	<i>Lactobacillus plantarum</i>			37	GBL 038
24	910901	<i>Lactobacillusplantarum</i>	100		37	GBL 039
25	911001	Not determined		Rb1-Rd (medium)	37	
26	911201	Not determined		Rb1-Rd (good)	37	
27	911301	<i>Lactobacillusplantarum</i>	99	Rb1-Gyp-Rd-Rg3 (good)	37	GBL 040
28	911401	<i>Weissella</i> hellenica	99	Rb1-Rd-CK (good)	37	GBL 140
30	911601	<i>Weissella cibaria</i>	99	Rb1-Rd (medium)	37	GBL 124
31	911706	<i>Leuconostocpseudomesenteroides</i>	99		37	GBL 118
32	911804	<i>Weissella</i> cibaria	99	Rb1-Gyp-Rd-Rf2 (medium)	37	GBL 125
33	911901	Not determined			37	
34	912001	<i>Lactobacillus</i> sakei	99		37	GBL 069
35	912105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100	Rb1-Rd-Rg3-Rh2 (good)	37	GBL 112
36	912301	<i>Weissella cibaria</i>	99	Rb1-Rd-Rg3-Rh2 (good)	37	GBL 126
37	912401	Not determined		Re-Rg1 (low)	37	
38	912501	<i>Weissella cibaria</i>	99		37	GBL 127
39	912601	<i>Weissella cibaria</i>	99		37	GBL 128
41	912701	<i>Leuconostoccitream</i>	99		37	GBL 094
42	912803	<i>Leuconostocgarficum</i>	99	Rb1-Gyp-Rd-Rf2 (medium)	37	GBL 101
43	912901	Not determined			37	
44	913001	Not determined		Rb1-Gyp-Rd-Rf2(medium) Re-Rg1 (low)	37	
45	913101	<i>Leuconostoc citreum</i>	99		37	GBL 095
46	913201	<i>Leuconostoc citreum</i>	99	Rb1-Gyp-Rd-Rf2 (medium)	37	GBL 096
47	913301	<i>Weissella confusa</i>	99	Rb1-Rd-Rf2-CK(good) Re-Rg1 (low)	37	GBL 138
48	913401	<i>Lactobacillus para</i> plantarum	99	Rb1-Gyp-Rd-Rf2 (good)	37	GBL 027
49	913501	Not determined		Re-Rg1 (low)	37	
51	913601	<i>Weissella</i> cibaria	99		37	GBL 129
52	913701	<i>Lactobacillus</i> alimentarius	99	Rb1-Gyp-Rd-Rg3-Rh2 (good)	37	GBL 010
53	913801	<i>Weissella cibaria</i>	99		37	GBL 130
54	913901	<i>Leuconostocmesenteroides</i>	99	Rb1-Gyp-Rd-Rf2(medium) Re-Rh1 (low)	37	GBL 113
55	KC0201	Not determined		Rb1-Rd (medium)	37	
57	KC0202	Not determined		Rb1-Gyp-Rd-Rf2 (medium)	37	
59	KC0204	Not determined		Rb1-Gyp-Rd(medium) Re-Rg1 (low)	37	
60	KC0204	Not determined		Rb1-Gyp-Rd(medium) low)	37	

2. 인삼의 ginsenoside의 전환능 조사

Conversion of ginsenoside by crude enzymes

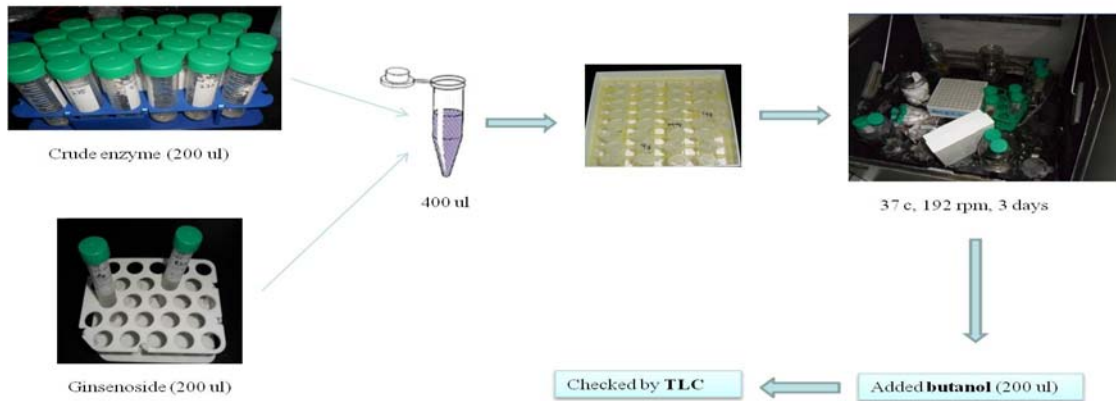


Fig. 3. Conversion of ginsenoside by crude enzymes

인삼에서 분리한 ginsenoside Rb₁ 및 Re를 증류수에 녹여 각각 1 mM, 0.2 mM로 만든 후 esculin agar plate에서 dark circle를 생성했던 균주와 37°C에서 48h 반응시켰다. 반응물을 수포화 n-BuOH로 추출하여 TLC와 HPLC로 분석을 실시하였다. TLC분석은 Silica gel 60 F254 (Merck)에 점적한 후 CHCl₃: CH₃OH: H₂O(65: 35: 10, 하층)가 혼합된 용매로 전개시킨 후 10 % H₂SO₄로 발색시켜 전환된 사포닌을 확인하였다. 멸균한 MRS broth 5 ml에 colony를 잘 풀어 균을 배양한 후, O.D.(600nm)값이 0.8~1.5일 때 1 mM Rb₁ 또는 0.2 mM Re와 37 °C에서 1:1로 48h 동안 반응한 결과 TLC(Thin Layer Chromatography) 상에서 사포닌 전환능을 확인하였다.(Fig. 3-4.)

Ginsenosides analysis by thin-layer chromatography

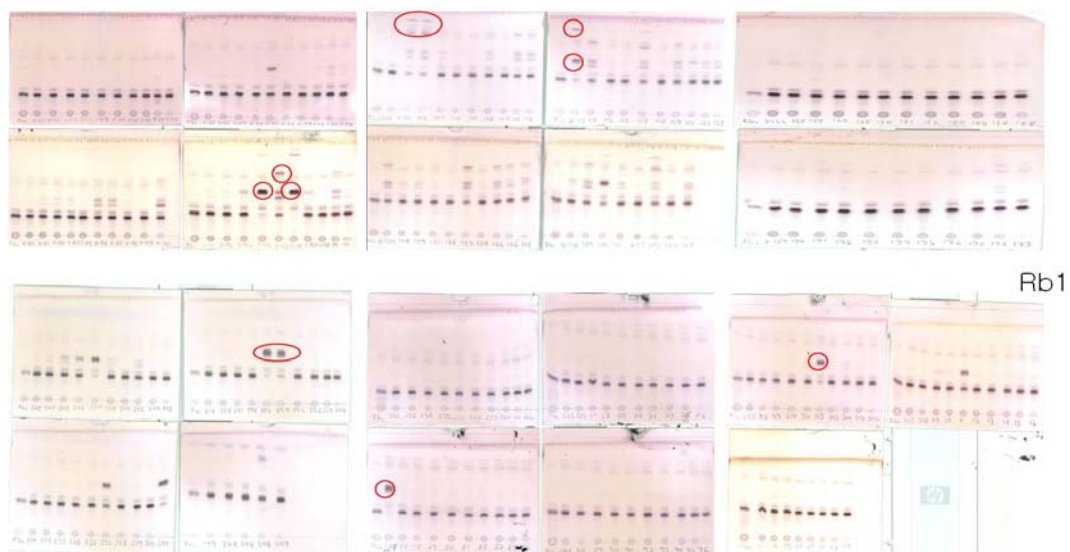


Fig. 4. 진세노사이드의 전환 및 TLC chromatogram.

Ginsenosides analysis by HPLC

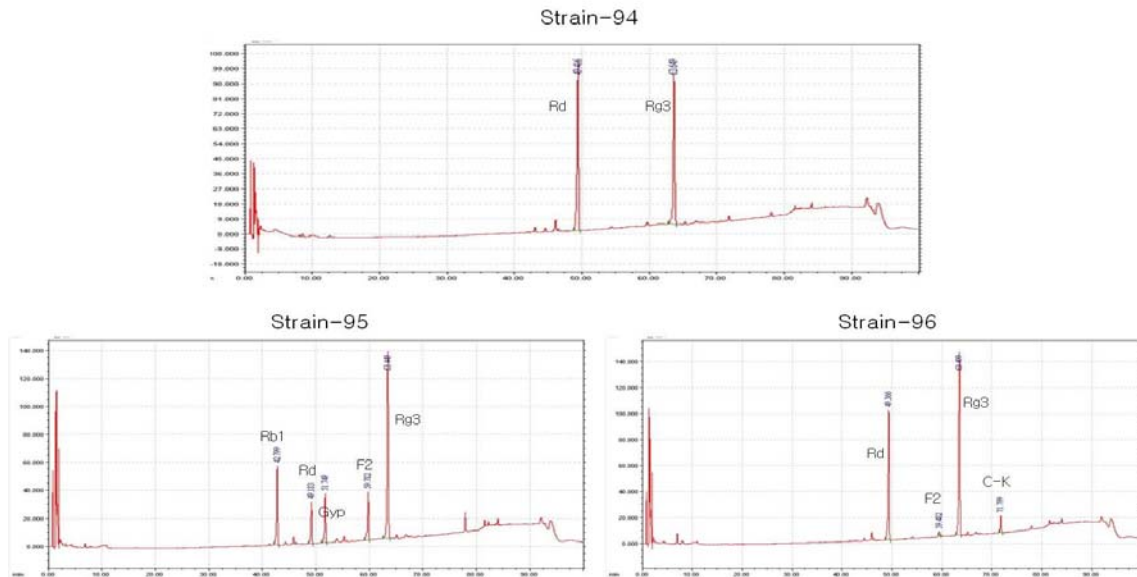


Fig. 5. 균주별 ginsenosides의 HPLC.

변환 산물에 대하여 보다 명확한 확인을 위하여 HPLC분석을 수행하였다. 분석에는 column은 C₁₈ column을 사용하고 용매로 acetonitrile과 water를, UV detector (203nm)로 전환된 사포닌을 확인하였다. Minor 사포닌을 생산하는 균주와 Rb₁ 반응액의 수포화 부탄을 추출액을 농축한 후 MeOH로 잘 녹인 후 filter하여 HPLC로 분석한 결과, Rb₁이 Rg₃ 및 CK 등으로 전환되는 것을 확인하였다.(Fig. 5.)

위와 같이 분리 균주를 각각 인삼 사포닌과 반응시켜 반응 활성을 가지는 균주를 분리하여 확보 하여 이들 균주를 대상으로 본 과제에서 수행 하려고 하였던 C-K등과 같은 minor ginsenoside 대량생산을 위한 연구소재로 활용하였다.

3. 유산균과의 단일 및 혼합배양을 통한 사포닌 전환능 조사

본 연구팀에서는 유산균의 효소를 스크리닝하고 이를 활용한 인삼 사포닌의 전환에 대한 연구를 수행하였다. 인삼사포닌은 인삼에 존재하는 배당체 성분으로 뛰어난 약리 효과가 있다고 알려져 있다. 이러한 사포닌들은 주로 major 사포닌과 minor 사포닌으로 나뉘는데 인삼안에는 일반적으로 major 사포닌들이 존재하며 이들 major 사포닌이 가수분해 될 경우 minor 사포닌으로 가수 분해되어 생성된다(Fig. 6).

이러한 minor 사포닌은 major 사포닌에 비하여 뛰어난 약리효과를 가진 것으로 나타나며 흡수율 또한 뛰어난 것으로 보고되어 최근에는 발효 등을 통한 minor 사포닌의 생성에 대한 연구가 활발히 수행 중이다. 본 연구팀에서는 이러한 minor 사포닌을 생성하는 연구에 주로 유산균을 활용하여 왔다. 유산균의 효소를 스크리닝하여 가수분해 효소를 분비하는 균주를 선발하고 이를 대사체화 연구에 활용하였다. 이러한 연구 수행은 앞으로 본 연구과제에서 진행할 유용균주와의 혼합배양을 통한 면역 기능성 물질 소재 개발에 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

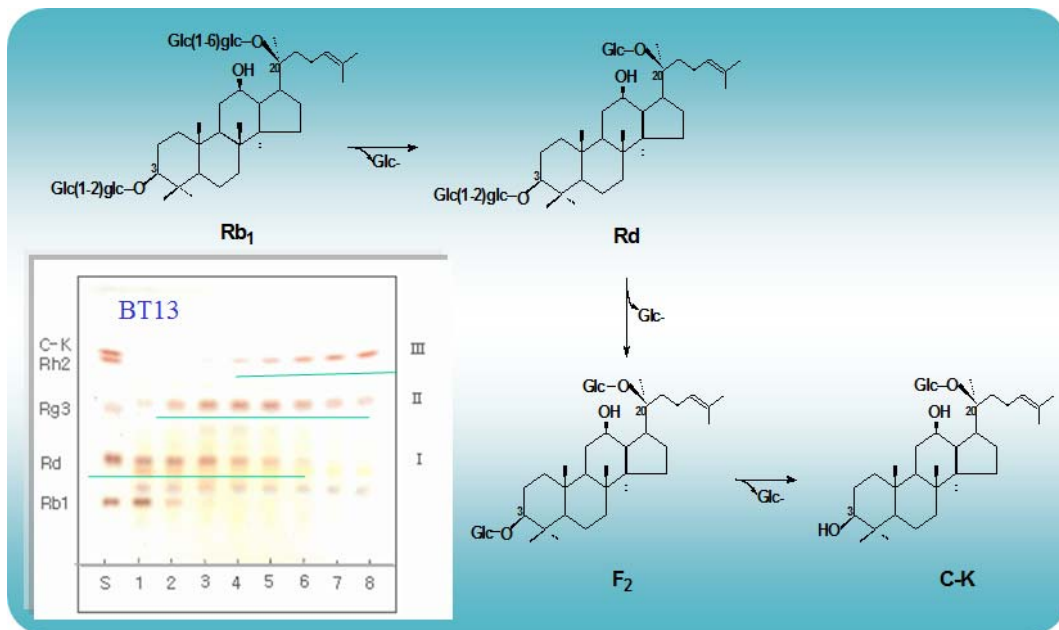


Fig. 6. Biotransformation of ginsenosides.

4. 미삼을 이용한 백삼 및 홍삼제조

미삼을 이용하여 백삼 및 홍삼을 제조하여(Fig. 7) 엑스를 생산하였으며 이들을 본 실험의 발효인삼 연구에 이용하였음.

구분	미삼	수삼(중편)	수삼(대편)
세척전			
	1,000g	3,000g	3,000g
세척후			
	1,101.5g	3,160.5g	3,087.5g
증삼후			
	982g	2,855.5g	2,849g
건조후 (수분함량15%)			
	283.5g	926g	995g
수율	28.35%	30.86%	33.16%

Fig. 7. 제조홍삼의 증량변화

5. 1차 선발된 유용균주의 성장조건 확립

(1) 균주목록

- ◇ JW 02 (*Lactobacillus brevis*)
- ◇ JW 04(*Lactobacillus Paracasei*)
- ◇ DEL(*Lactobacillus delbreckii*)
- ◇ DCY50 (*Lactobacillus koreensis*)
- ◇ DCY51 (*Lactobacillus kimchicus*)
- ◇ XPN02 (*Bombiscardovia coagulans*)
- ◇ PJE04 (*Lactobacillus tuceti*)
- ◇ QN01 (*Lactobacillus sanfranciscensis*)
- ◇ CN01 (*Leuconostoc pseudomesenteroide*)
- ◇ H1-1 (*Lactobacillus brevis*)
- ◇ H107 (*Leuconostoc citreum*)
- ◇ H108 (*Leuconostoc lactis*)
- ◇ H117 (*Leuconostoc mesenteroides*)
- ◇ H119 (*Lactobacillus paralimentarius*)
- ◇ H122 (*Lactobacillus brevis*)

(2) 균주 선발

① 홍삼농축액 농도에 따른 균 성장실험

Table 2. 홍삼농축액 농도에 따른 균 성장

	2.5%	5%	7.5%	10%
JW 02	+	+	+	+
JW 04	+	+	+	+
DEL	+	+	-	-
DCY 50	+	+	-	-
DCY 51	+	+	-	-
XPN02	+	+	-	-
PJE04	+	+	-	-
QN01	+	+	-	-
CN01	+	+	-	-
H1-1	+	+	-	-
H107	+	+	-	-
H108	+	+	+	-
H117	+	+	+	-
H119	+	+	-	-
H122	+	+	-	-

- ◇ MRS broth (o/n) → 홍삼농축액 배지(Plate)에 도말 →37℃, 3일 배양

② 홍삼농축액 농도에 따른 최적의 배지조성 및 균 성장실험

Table 3. 홍삼농축액 농도에 따른 최적의 배지조성 및 균 성장

	2.5%	5%	7.5%	10%
JW 02	+++	+++	++	++
JW 04	+++	+++	++	++
DEL	+++	++	+	-
DCY 50	+++	++	+	-
DCY 51	+++	++	+	-
XPN02	+++	++	+	-
PJE04	+++	++	+	-
QN01	+++	++	+	-
CN01	+++	++	+	-
H1-1	+++	++	+	-
H107	+++	+++	+	-
H108	+++	+++	+	-
H117	+++	+++	+	-
H119	+++	++	+	-
H122	+++	++	+	-

◇ MRS broth (o/n) → 홍삼농축액, Agar 20g, Lactose 15g, K₂HPO₄ 5g, NH₄Cl 2g, NaCl 1g, MgSO₄ 0.1g, Yeast extract 0.1g(per 1L)배지(Plate)에 도말 →37℃, 3일 배양

③ 홍삼농축액 농도와 최적의 균 성장에 필요한 최소 배지 조성 실험

Table 4 홍삼농축액 농도와 최적의 균 성장 및 배지조성

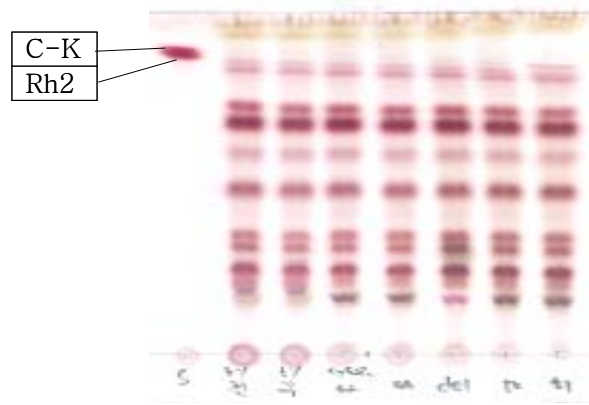
	2.5%	5%	7.5%	10%
JW 02	+++	+++	++	++
JW 04	+++	+++	++	++
DEL	+++	+++	+	-
DCY 50	+++	+++	+	-
DCY 51	+++	+++	++	-
XPN02	+++	+++	+	-
PJE04	+++	+++	+	-
QN01	+++	+++	+	-
CN01	+++	+++	+	-
H1-1	+++	+++	+	-
H107	+++	+++	+	-
H108	+++	+++	++	-
H117	+++	+++	+	-
H119	+++	+++	+	-
H122	+++	+++	+	-

◇ MRS broth (o/n) → 홍삼농축액, Agar 1.5%, Lactose 1%, Yeast extract 0.1%, Cystein 0.01% 배지(Plate)에 도말 →37℃, 3일 배양

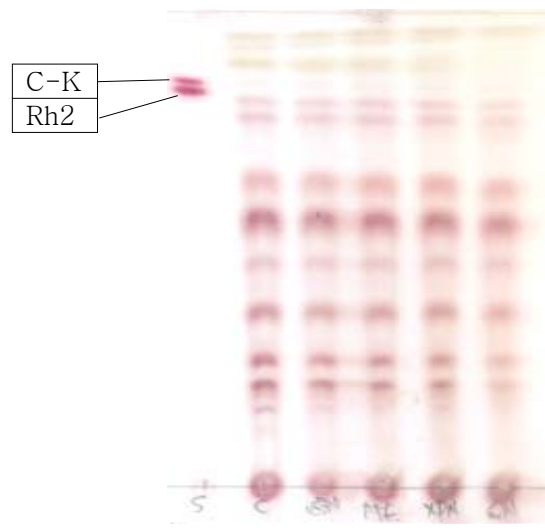
위 선발된 유산균의 성장을 조사하기 위해 홍삼 농축액 2.5, 5, 7.5, 10%를 각각 첨가한 배지에서 생육한 결과 JW02, JW04는 홍삼 농축액 7.5%, 10%의 농축액에서도 잘 성장하였으나, 대부분의 유산균의 생장은 5%에서 모든 균의 생장이 양호하여 5% 홍삼액 첨가된 배지에서 사포닌 분석을 실시하였다.(Table 2-4)

(3) 균주 선발을 위한 TLC 분석

◇ MRS broth (o/n) → 홍삼농축액 5%, Lactose 1%, Yeast extract 0.1%, Cystein 0.01%에 균주 2% 접종 → 37°C, 3일 배양하여 TLC 분석을 실시하였다.



S C C J W DE DC DC
 02 04 L Y50 Y51
 (별균후)



S C C PJE XPN Q
 N 04 02 N
 01 01

Fig. 8. 균주 선발을 위한 TLC 분석

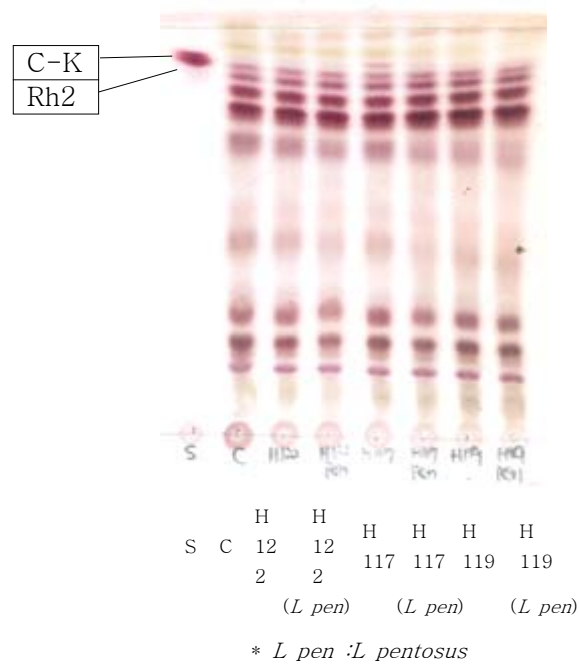
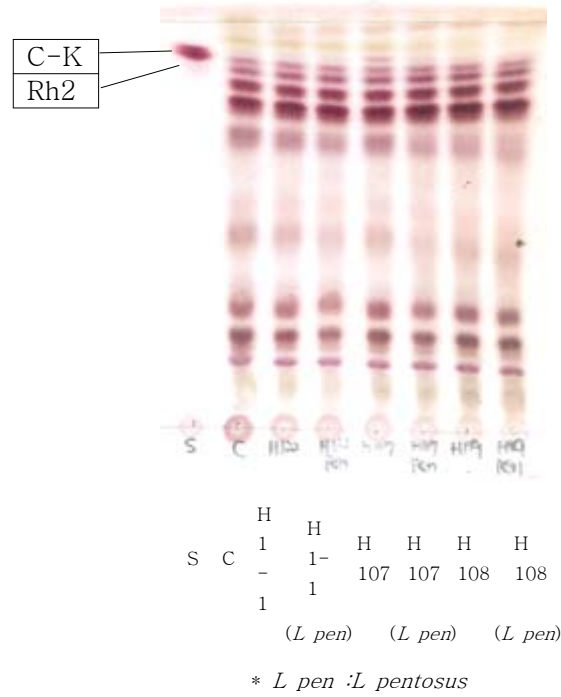


Fig. 9. 균주 선발을 위한 TLC 분석

MRS broth배지에 홍삼농축액 5%, Lactose 1%, Yeast extract 0.1%, Cystein 0.01%에 균주를 2% 접종하여 37°C, 3일 배양하여 TLC를 분석하여 선발된 유산균의 사포닌전환 양상을 조사하였고 최적조건을 탐색하였다.(Fig. 8-9)

6. 선발된 균주의 기질 특이성 조사

선발된 균주의 기질 특이성을 조사하기 위해 API kit을 이용하여 실시하였고 당 이용성과 질소원 이용성으로 균주의 특성을 관찰하였다.(Table 5)

Table 5. 선발균주의 기질특이성

Substrate	DCY51	JW04	JW02	XPN02	PJE04
β-XYLOSIDASE	o		o		
L-Lysine-ARYLAMIDASE		o			
L-Aspartate ARYLAMINDASE					
Leucine ARYLAMIDASE		o	o	o	
Phenylalanine ARYLAMIDASE		o	o		o
L-Proline ARYLAMIDASE		o			
β-GALACTOSIDASE	o		o		
L-Pyrrolydonyl- ARYLAMIDASE		o			
α-GALACTOSIDASE			o		
Alanine ARYLAMIDASE		o	o	o	
Tyrosine ARYLAMIDASE		o			
β-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE					
Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	o	o	o		
CYCLODEXTRIN	o				
D-GALACTOSE			o		
GLYCOGENE					
myo-INOSITOL					
METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE	o				
ELLMAN					
METHYL-D-XYLOSIDE					
α-MANNOSIDASE					
MALTOTRIOSE	o				
Glycine ARYLAMIDASE					
d-MANNITOL		o	o	o	o
D-MANNOSE		o			
d-MELEZITOSE		o			
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE		o	o		
PALATINODASE			o		
L-RHAMNOSE					
β-glucosidase	o				
β-MANOSIDASE					
PHOSPHORYL CHOLINE		o			
PYRUVATE					
α-GLUCOSIDASE	o				
D-TAGATOSE					
D-TREHOLOSE					
INULIN					
D-GLUCOSE		o	o	o	
D-RIBOSE		o	o		
PUTRESCINE assimilation					
Growth in 6.5% NaCl		o	o		
KANAMYCIN RESISTANCE		o	o		o
OLEANDOMYCIN RESISTANCE		o	o		o
ESCULIN Hydrolyse	o	o	o		
TETRAZOLIUM RED					
PLOMIXIN_B RESISTANCE					

◇ DCY51 (*Lactobacillus kimchicus*)

Table 6. Strain DCY51균주의 생리 생화학적 특성

Characteristic	Strain DCY51 ^T	<i>L. paracollinoides</i> DSM 15502 ^T	<i>L. kimchii</i> KCTC 8903P ^T
Habitat arangement	Kimchi single or pairs	Brewery single or short chain	Kimchi single or pairs
Fermentation of :			
L-Arabinose	+	W	+
D-Fructose	+	-	+
D-Mannose	+	-	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	-	+
Amygdalin	+	-	+
Arbutin	+	-	+
Salicin	-	-	+
D-Melbiose	-	+	+
D-Trehalose	-	-	+
D-Melezitose	-	-	+
Gentiobiose	-	-	+
gluconate (potassium)	+	-	+
Growth on MRS medium at:			
10° C	w	-	+
15° C	+	+	+
DNA G+C content(mol%)	39	45	35

+, Positive reaction; -, negative reaction; w, weakly positive reaction.

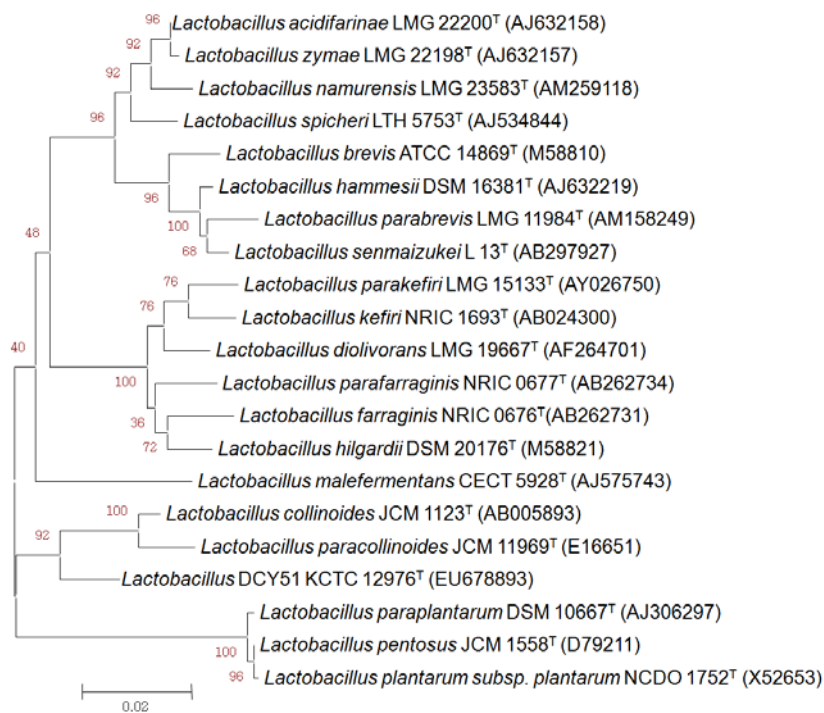


Fig. 7. DCY51의 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 유전적 근연 관계 계통도 (Neighbor-Joining tree)

CN NJ-MX

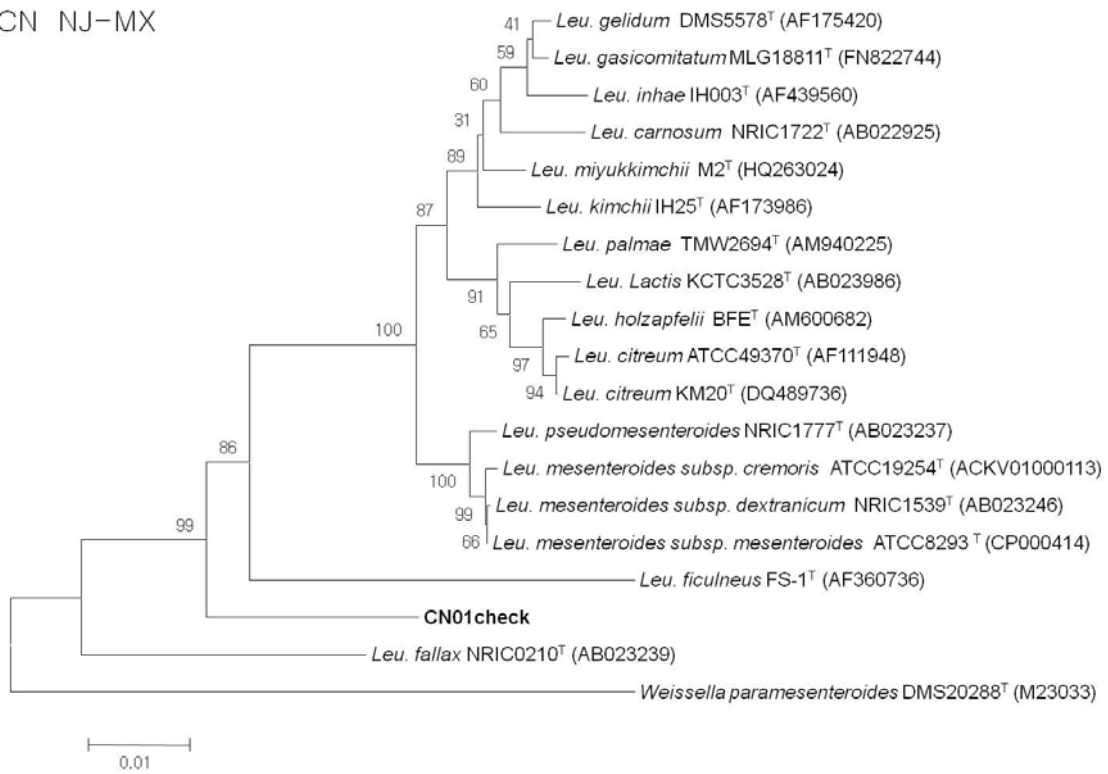


Fig. 8. CN01의 유전적 근연 관계 계통도

PJE 04 NJ-MX

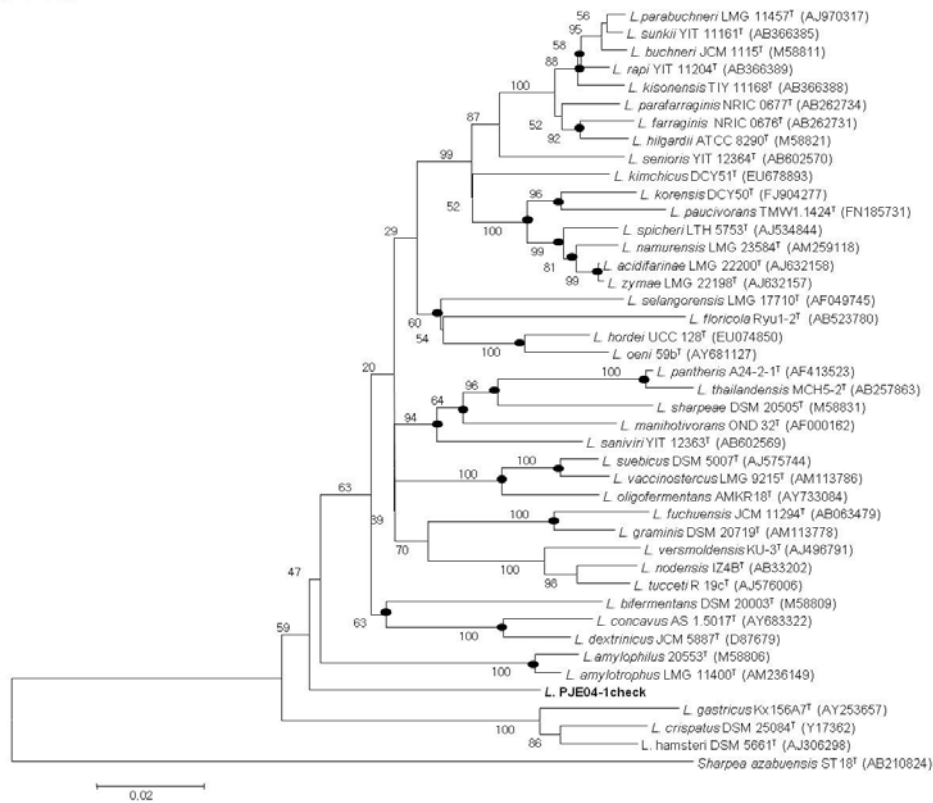


Fig. 9. PJE04-1의 유전적 근연 관계 계통도

XPN02 NJ MX

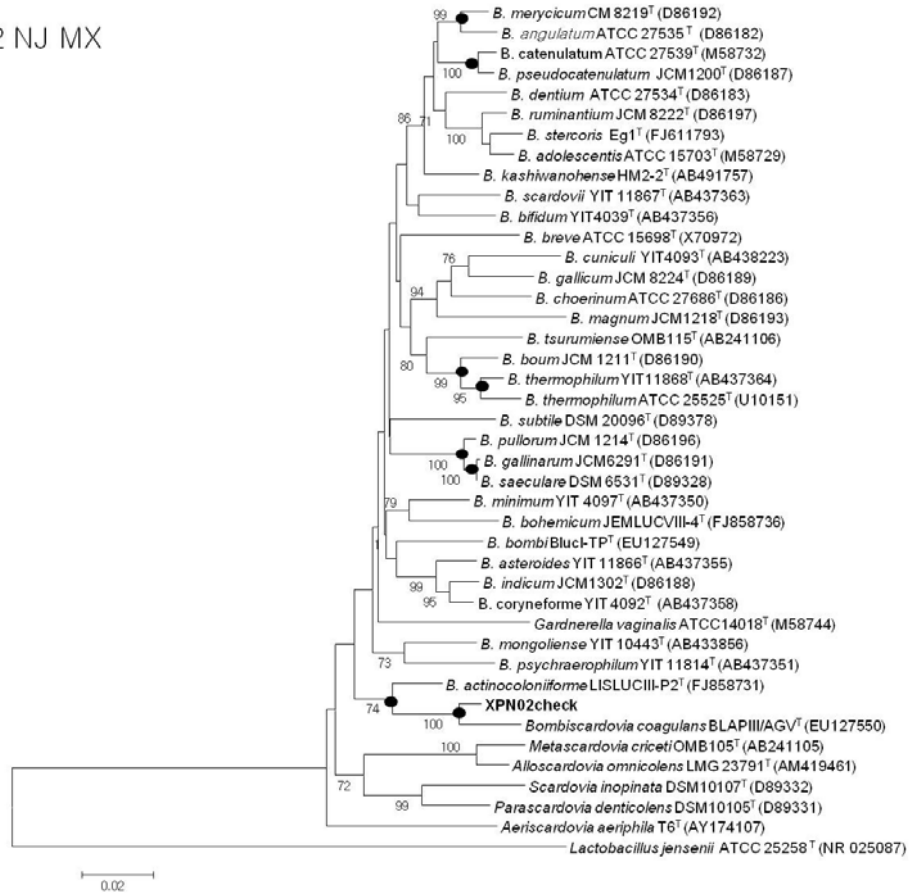


Fig. 10. XPN02 유전적 근연 관계 계통도

QN01 NJ-MX

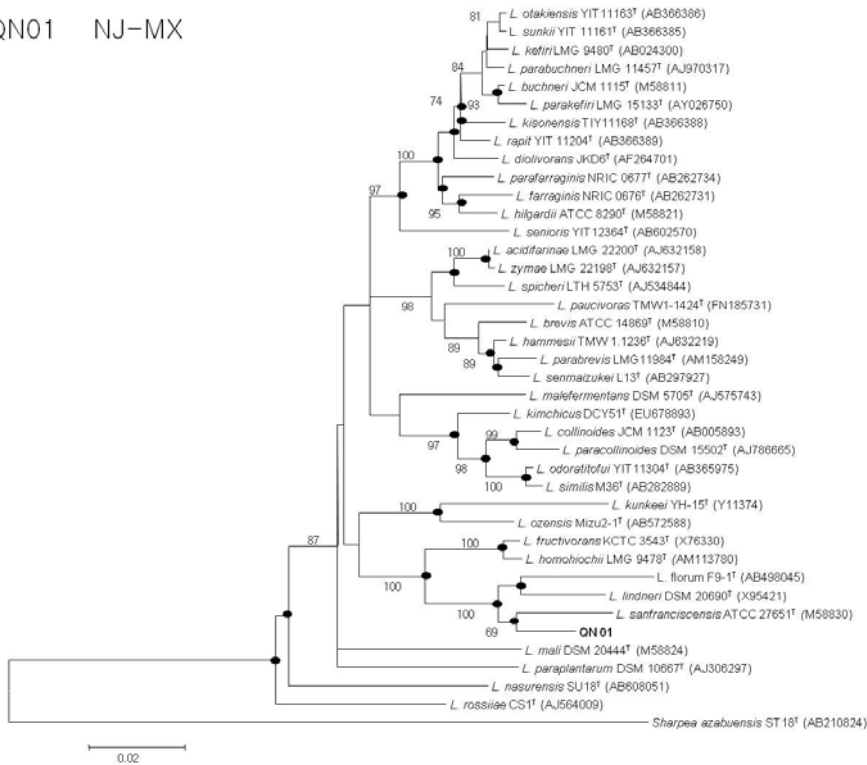


Fig. 11. QN01의 유전적 근연 관계 계통도

선발된 균주의 DNA 염기조성 조사

Analysis of G+C content

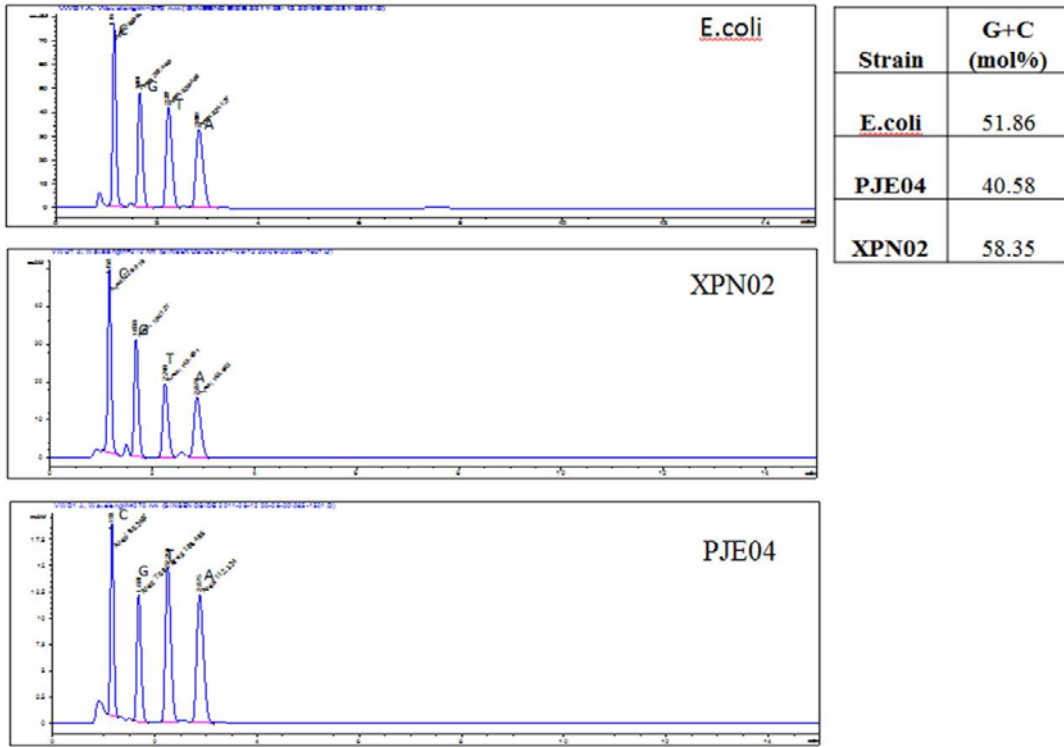


Fig. 12. 선발된 균주의 DNA 염기조성.

선발된 균주의 형태적 특성

Morphology

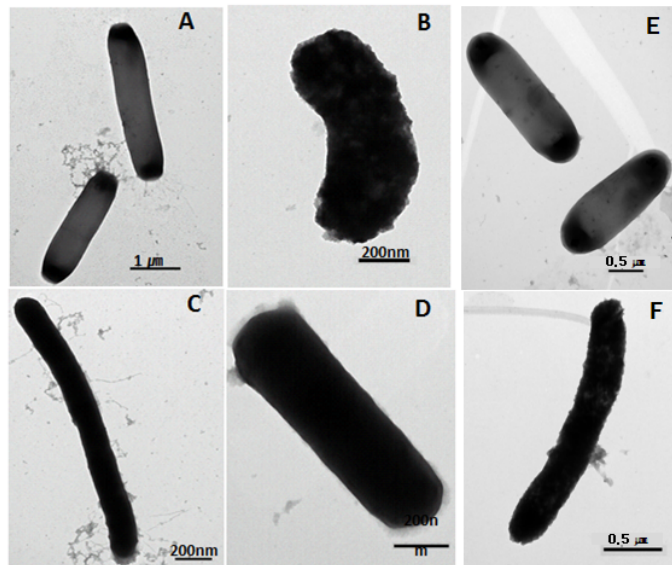


Fig. Morphological characterization of isolated bacteria (TEM analysis)
A; PJE04, B:QN01, C:XPN02, D: CAN, E: JW02, F: JW04

Fig. 13. 선발된 균주의 형태적 특성.

선발된 균주의 단백질 profile

XPN02

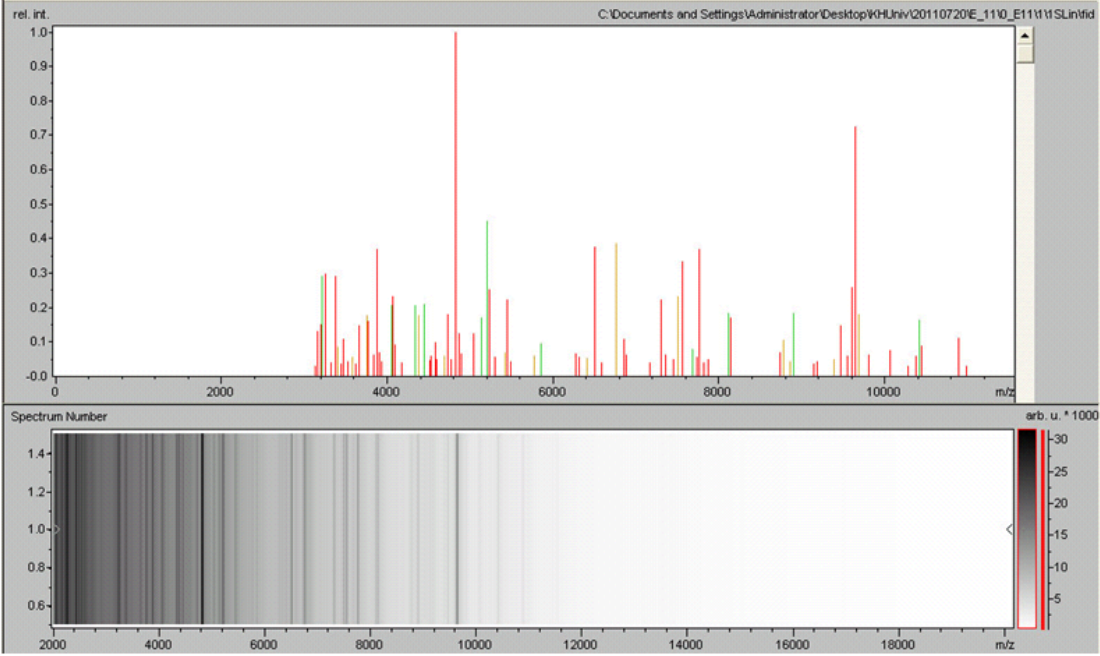


Fig. 14. XPN02의 단백질 Profile.

PJE 04

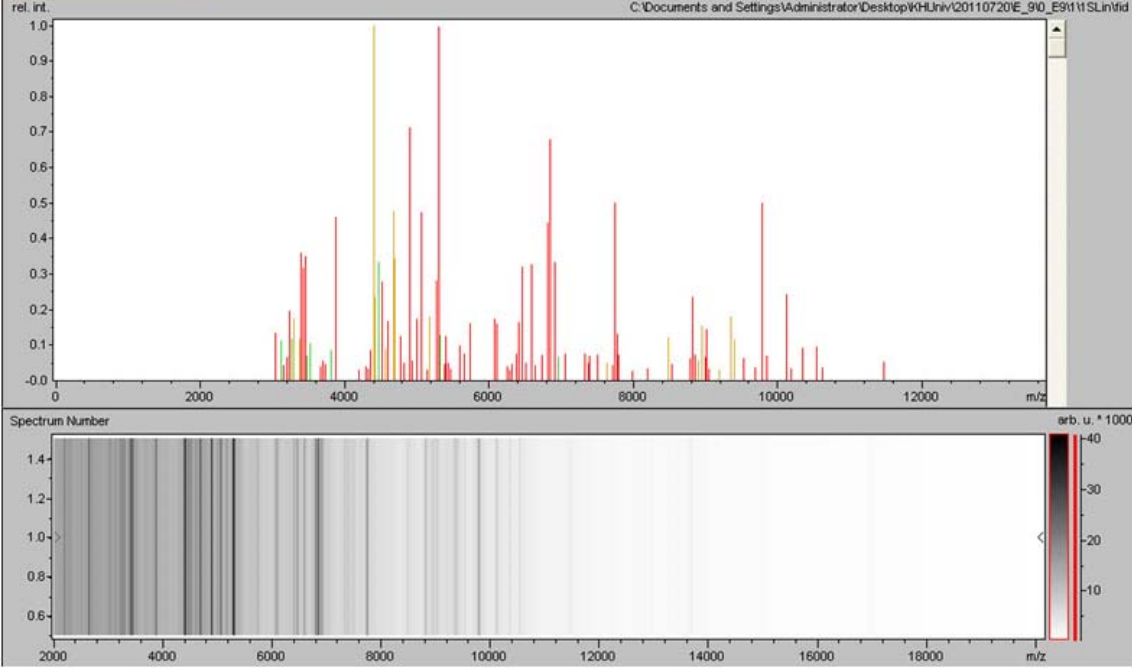


Fig. 15. PJE 04의 단백질 Profile.

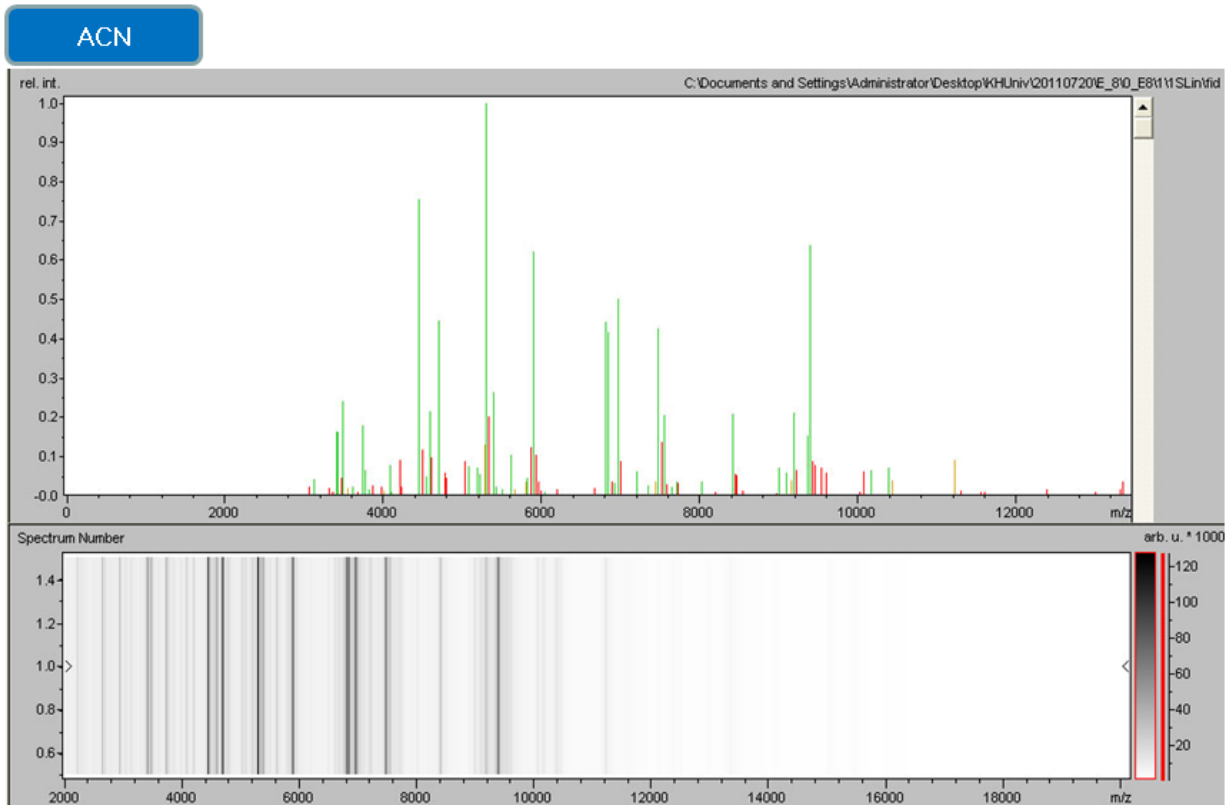
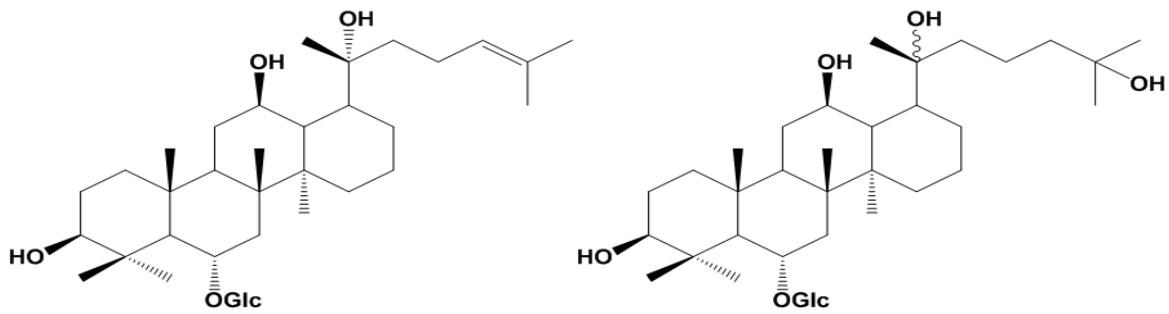


Fig. 16. ACN의 단백질 Profile..

Whole cell의 protein profile을 조사하여 data base의 기존 균주와 비교 검토하였다. (Fig 14-16)

신규 유산균 홍삼 발효에 의한 신규 후보 물질 NMR 동정

홍삼 엑기스 첨가 Lactobacillus kimchicus DCY51 균주에 의한 사포닌 전환 결과



20(R)-ginsenoside-Rh1

From 8:1 Chloroform: methanol

25-hydroxy-20(R, S)-ginsenoside-Rh1

From 9:1 Chloroform: methanol

Fig. 17. 신규 후보물질의 화학구조.

본 신규 물질은 선발된 신종 유산균이 홍삼과 반응 시 생산한 희귀사포닌으로서 구조 동정한 결과 현재까지 알려지지 않는 구조임이 밝혀졌다.(Fig. 17)

7. 분리된 유산균의 면역 활성 조사

본 연구 팀에서는 식물 추출액과의 반응을 통해 이차대사산물 전환체를 생성 할 수 있는 균주를 계속 적으로 확보하고 있다. 더불어 이들 균주의 면역 활성 연구를 진행 하였다. 각각의 확보된 균주를 이용하여 THP-1 cell(monocyte)을 2×10^5 cells/ml로 seeding하여 4 시간 안정화한 후 O.D₆₀₀을 1로 맞춘 Sample을 24 시간 전처리한 다음 LPS(500ng/ml)를 4 시간 동안 처리한 후 sandwich ELISA로 humanTNF-alpha를 확인하였다. 과도한 염증반응을 유발하고, 패혈증의 원인이 되는 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 pro-inflammatory cytokine인 TNF-alpha의 발현을 억제하는 양상을 분리균주에서 확인할 수 있었다. JW01은 *L. plantarum*으로 동정되었으며 일반적으로 이 균주는 pro-inflammatory cytokine인 TNF-alpha의 induction이 적다고 알려져 있다(Fig. 18).

신규 유산균의 면역 활성 검증

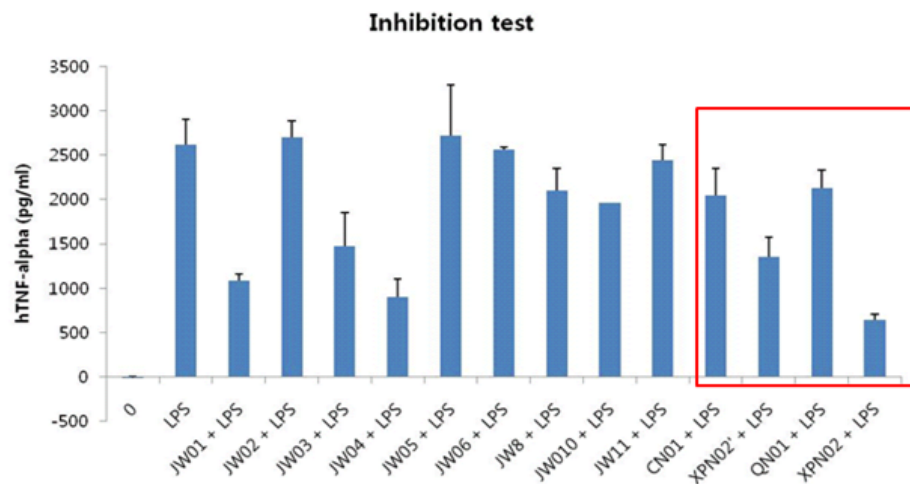


Fig. 18. Effect on LPS-induced TNF-production.

The cells grown on 96 well inserts were treated with indicated concentrations of TNF-for 24 h. The TNF-level in the culture supernatants was determined by ELISA.

그중 면역 활성이 가장 뛰어난 것으로 조사되진 JW04의 경우 *L. paracasei* 와 98%상동성을 가진 것으로 나타나 신균일 가능성이 높고 현재 *Lactobacillus panaxicasei* DCY66 (KACC91724P)로 국내에 특허 기탁되어있다.

본 실험은 분리된 유산균의 장내 상피세포에서의 면역 활성을 조사하기 위해 실시되었으며 LPS만을 처리한 대조군과 비교해 면역활성이 뛰어난을 알 수 있었고 기존 probiotic균주인 *Lactobacillus rhamnosus*와 비교시 더 높은 효과가 입증됨을 알 수 있었음(Fig. 18).

8. 발효공정을 통한 희귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 생산 유용균주 2차 선발 및 표준화 연구

(1) 선발한 다양한 유산균으로부터 사포닌 전환능이 우수한 균주 2차 선발(Table 7)

1차년도에 분리 선발한 균주 중 C-K, Rh2를 형성하는 균주를 중심으로 2차 선발을 하여 최종 5종의 유산균을 선발하여 실험을 진행하였다. 2차 선발된 균주 중 3종의 *Lactobacillus*와 2종의 *Leuconostoc*임을 확인하였다.

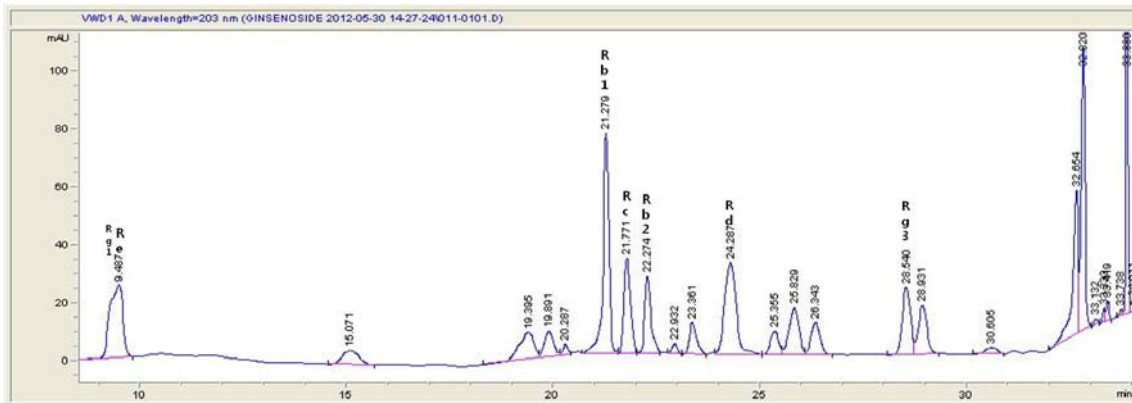
Table 7. Screening and identification of isolated strains

Stock vial No.	Sample name	Blast search result high score cultured strain	Similarity (%)	Stock vial No.	Sample name	Blast search result high score cultured strain	Similarity (%)
1	60301	Lactobacillus sakei	99	26	73204	Leuconostoc mesenteroides	99
2	60801	Leuconostoc mesenteroides	99	27	73303	Not determined	
3	61001	Lactobacillus arizonensis	99	28	73407		
4	61101	Leuconostoc mesenteroides	99	30	73602	Not determined	
5	61201	Yeast		31	73701	Not determined	
6	61301	Not determined		32	73801	Not determined	
7	61401	Not determined		33	73901	Not determined	
8	61501	Leuconostoc pseudomesenteroides	99	34	74001	Lactobacillus sakei	99
9	61601	Lactobacillus plantarum	99	35	74104	Lactobacillus sakei	99
10	61701	Leuconostoc citreum	99	36	74202	Not determined	
11	61901	Leuconostoc citreum	99	37	73302	Not determined	
12	62001	Not determined		38	74401	Not determined	
13	62301	Lactobacillus paraplantarum	99	39	74501	Leuconostoc citreum	99
14	62401	Lactobacillus plantarum	99	41	74702	Leuconostoc mesenteroides	99
15	62501	Not determined		42	74801	Not determined	
16	62601	Lactobacillus sakei	99	43	74901	Bacillus amyloliquefaciens	99
17	62701	Weissella cibaria	99	44	75006	Lactobacillus sakei	99
18	62801	Not determined		45	75201	Not determined	
19	72602	Lactobacillus sakei	99	46	75402	Leuconostoc mesenteroides	99
20	72702	Lactobacillus sakei	100	47	86101	Weissella cibaria	99
21	72807	Not determined		48	86202	Not determined	
22	72903	Lactobacillus sakei	99	49	86302	Leuconostoc citreum	99
23	73001	Leuconostoc mesenteroides	99	51	86501	Lactobacillus sakei	99
24	73101	Leuconostoc mesenteroides	99				
25	73111	Lactobacillus brevis	99				

(2) Compound K와 Rh2 전환 균주 선발

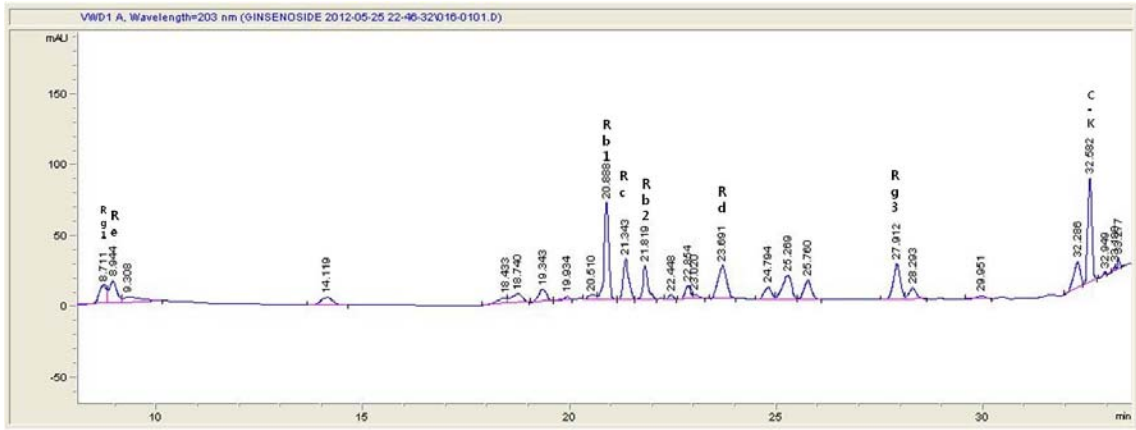
- ◇ JW 02 (*Lactobacillus panaxibrevi*s)
- ◇ DEL (*Lactobacillus delbrueckii*)
- ◇ H108 (*Leuconostoc lactis*)
- ◇ DCY51 (*Lactobacillus kimchicus*)
- ◇ H117 (*Leuconostoc mesenteroides*)

(3) 각 균주별 HPLC 사포닌 정량분석

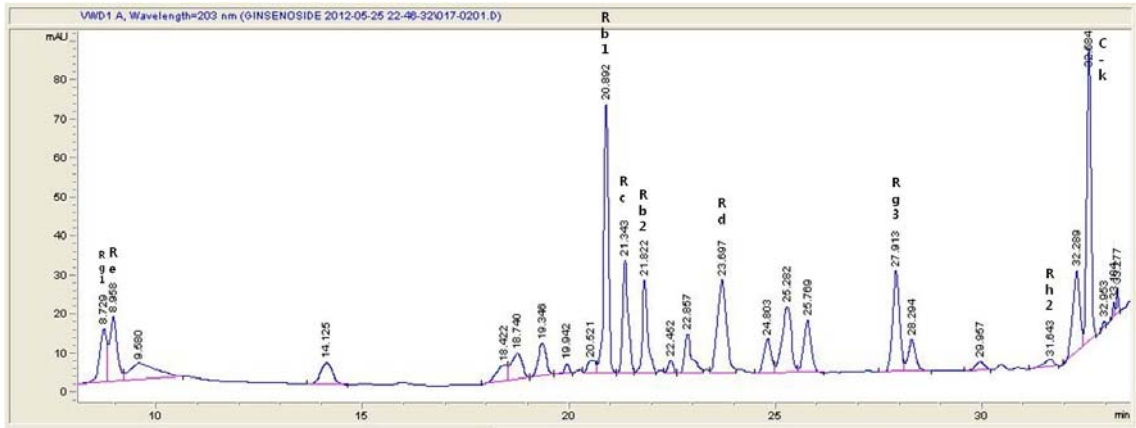


control

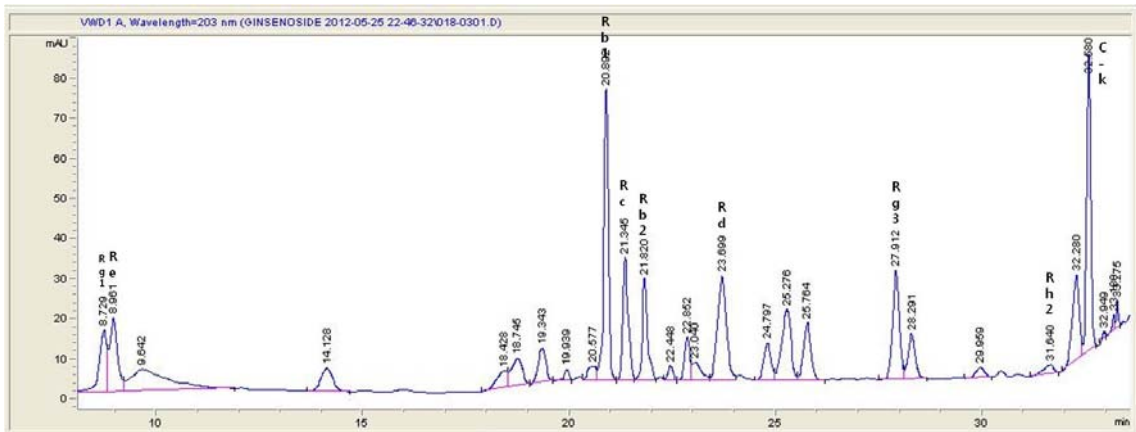
Fig. 19. 균주별 HPLC 사포닌 정량분석(계속)



JW 02

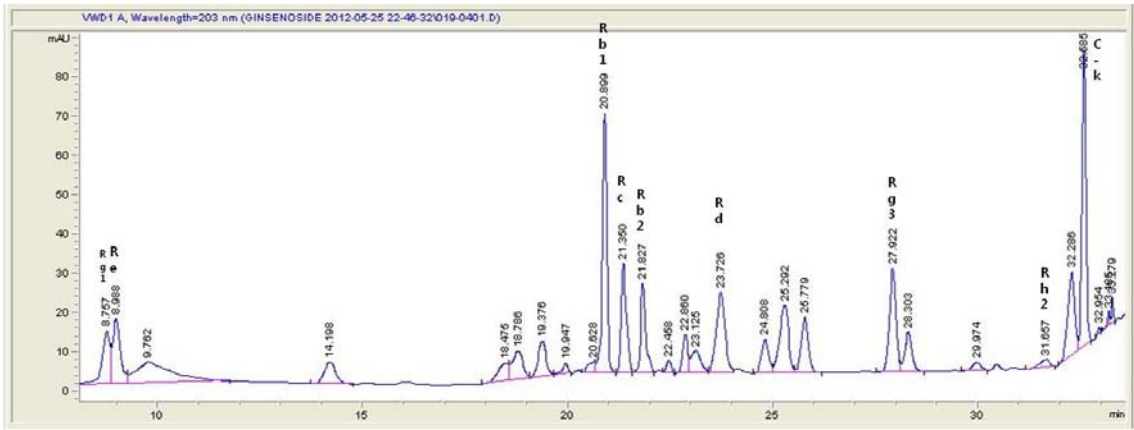


DEL

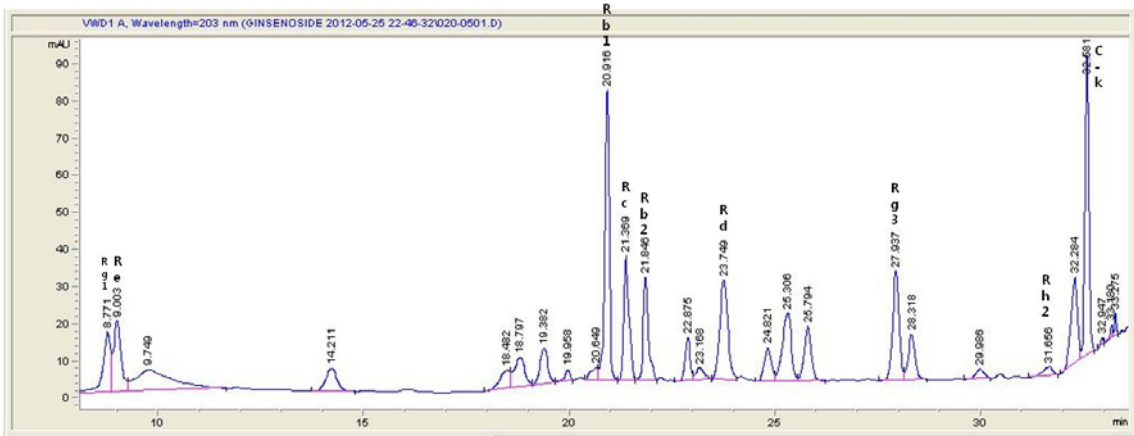


H108

Fig. 19.균주별 HPLC 사포닌 정량분석(계속)



DCY 51



H117

Fig. 19.균주별 HPLC 사포닌 정량분석

Table 8. 5개 균주의 시료 1ml당 사포닌 함량						mg/ml
구분	Con.	JW02	DEL	H108	DCY51	H117
Rg1	0.145	0.1	0.111	0.139	0.121	0.142
Re	0.328	0.21	0.216	0.252	0.225	0.249
Rb1	0.406	0.271	0.274	0.289	0.260	0.304
Rc	0.396	0.281	0.285	0.3	0.268	0.321
Rb2	0.228	0.166	0.168	0.177	0.157	0.188
Rd	0.075	0.048	0.073	0.053	0.046	0.055
Rg3	0.191	0.175	0.18	0.183	0.175	0.192
Rh2	.	.	0.007	0.010	0.008	0.011
C-K	.	0.173	0.184	0.177	0.177	0.184

균발효액의 최종 사포닌 함량 변화를 조사하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다 그 결과 compound K는 선발된 균주 모두에서 발현이 되었으며, JW02균주에서는 Rh2로 전환되어지지 않았다.(Fig. 19, Table 8)

(4) 분리된 균주의 근연관계 분석 및 기질 특이성 조사

① *Lactobacillus kimchicus* DCY51^T

본 균주는 다른 유산균에 비해 홍삼내 사포닌 전환율이 뛰어났으며, 균주의 특성을 조사한 결과 신규한 유산균으로 동정되어 분류학회지에 등록하였다.(Fig. 20)

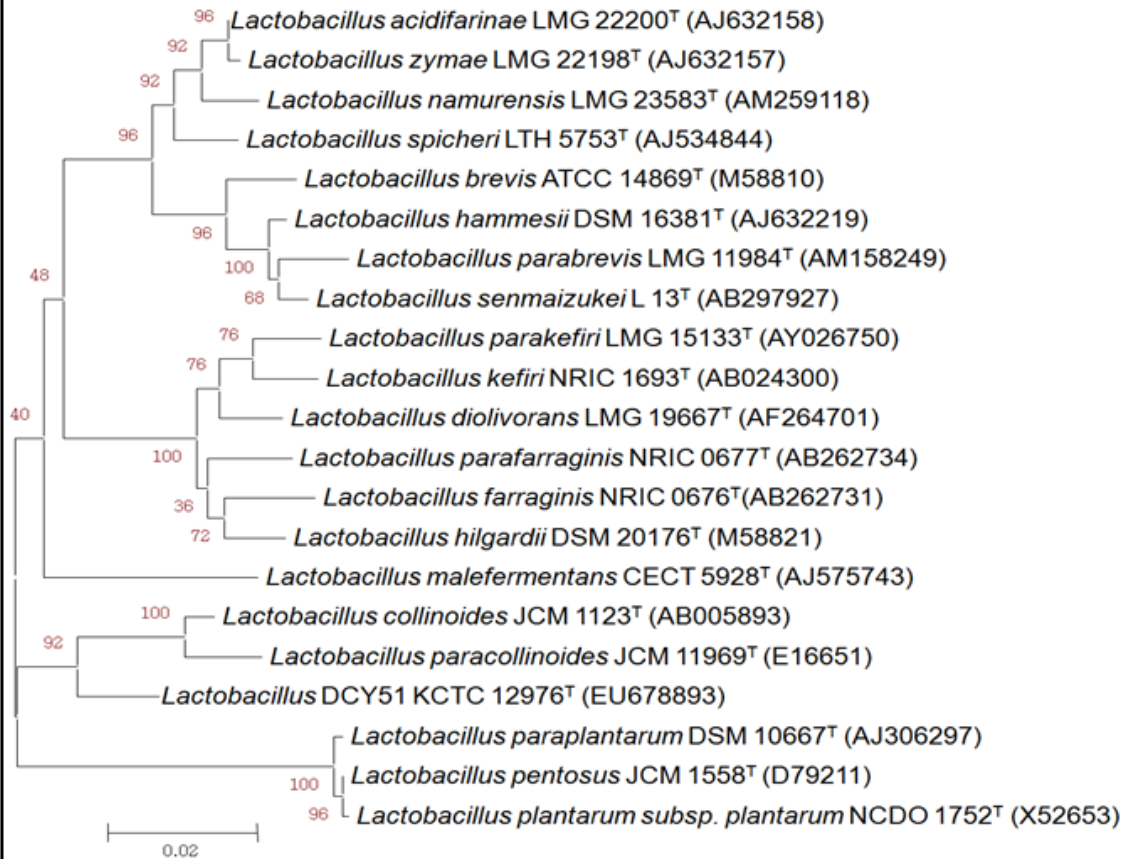


Fig. 20. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the phylogenetic relationships between strain DCY51^T and related species.

Bootstrap values of >70% (percentages of 1,000 replications) are shown at branch points. Filled circles indicate that the corresponding nodes were also recovered in the tree generated with the maximum-parsimony algorithm. The bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position

Table 9. Differential characteristics between strains DCY51^T and closely related type strains. Strains: 1, *Lactobacillus kimchicus* DCY51^T; 2, *L. colinoides* DSM 20515^T; 3, *L. paracollinoides* JCM 11969^T and 4, *L. similis* JCM 2765^T

Data were obtained during this study under identical growth conditions, except where indicated otherwise. +, Positive reaction; -, negative reaction; w, weak positive reaction; R&C, round and convex; R&IR, round and irregular; D, Disc shape; W, white; C-B, cream to buff; A, anaerobic; FA, facultative anaerobic; NA, not available.

Characteristic	1	2	3	4
Colony Morphology (MRS)	R, C	R,IR,	R,C	D
Cell Size (µm)				
Long	1.0-2.0	4.0*	NA	2 - 5*
Wide	0.3-0.8	0.7*		0.5 *
Colony color (MRS)	W	C-B	W	W
Oxygen requirement	FA	A	FA	FA
Optimum growth temperature (°C)	37	30	26	37
Growth at (MRS)				
10-14°C	-	-	+	-
42°C	+	-	-	+
Lactic acid isofer	D	D(L)	D(L)	D(L)
Fermentation (API 50CHL)				
5-Ketogluconate	-	+	-	+
Arbutin	+	-	-	+
D-Cellobiose	-	-	-	+
D-Fructose	+	+	-	-
D-Galactose	+	-	-	+
D-Mannose	+	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-	+
Gluconate	+	w	-	w
Glycerol	-	-	-	+
Maltose	+	+	-	-
Mannitol	+	-	-	-
N-Acetylglucosamine	+	-	-	w
Ribose	+	w	+	+
β-Methyl-D-xyloside	-	-	-	+
G+C content %	39.7	47.2	44.8	48.5
Source of Isolation*	kimchi	apple juice*	brewery*	cane molasses*

*Data from Suzuki *et al.*, 2004 and Carr & Davice 1972

② *Leuconostoc mesenteroides* H117

한국 전통 식품인 김치로부터 분리한 본 균주는 16S rDNA 염기 분석결과 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정 되었으며 ginsenoside Rh2와 compound K가 상대적으로 많이 형성 되었음을 HPLC결과로 확인한바 있다. 본 연구에 사용된 H117의 유연관계 모식도는 Fig.21 와 같고 이균주의 생리적 특성 및 기질 특이성은 Table 10과 같다.

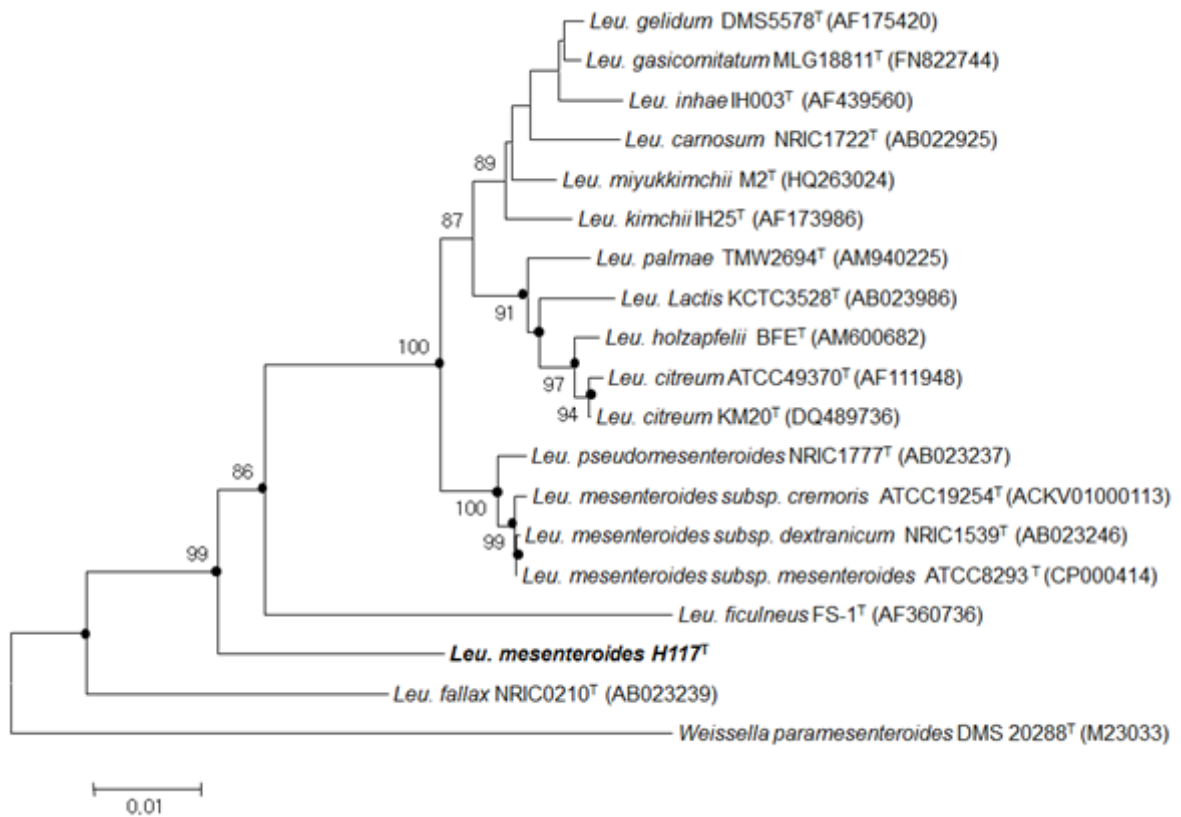


Fig. 21. Neighbour - joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships of strain H117 and related *Leuconostoc* species. Boot strap values > 70 % were based on 1000 replications as shown at branching points. Filled circles indicate that the corresponding nodes were also recovered in the tree generated with the maximum-parsimony algorithm. *Weissella paramesenteroides* DMS 20288^T was used as an out-group. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

Table 10. Differential phenotypic characteristics of strain H117 and related strains
 1, *Leconostoc mesenteroides* H117; 2, *Leconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ATCC
 19254^T; 3, *Leuconostoc pseudomesenteroides* NRIC 1777^T; 4, *Leuconostoc. inhae* IH003^T

Characteristics	1	2	3	4
Enzyme activity (API ZYM)				
Alkaline phosphatase	+	+	w	w
Esterase lipase (C8)	w	-	+	-
Valine arylamidase	+	+	-	+
α -chymotrypsin	-	-	+	-
α -galactosidase	-	+	+	-
β -galactosidase	-	+	+	-
β -glucuronidase	+	-	-	-
<i>N</i> -acetyl- β -glucosaminidase	-	-	+	-
Assimilation (API 50CH)				
L-arabinose	-	+	+	+
D-xylose	-	+	+	-
D-galactose	-	+	+	-
D-mannose	-	+	+	+
D-mannitol	+	+	-	+
<i>N</i> -acetyl-glucosamine	-	+	+	+
Amygdalin	-	+	-	-
Arbutin	-	+	+	-
Salicin	-	+	+	-
D-cellobiose	-	+	+	+
D-maltose	-	+	+	+
D-lactose	-	+	-	-
D-melibiose	-	+	+	+
D-raffinose	-	+	+	+
Gentiobiose	-	+	+	+
D-turanose	-	+	+	+
Potassium gluconate	+	+	-	-
Potassium 2-ketogluconate	-	w	+	+
Potassium 5-ketogluconate	-	-	+	-

③ *Leuconostoc lactic* H108

2차 선발에서 이용된 본 균주는 16S rDNA sequencing결과 *Leuconostoc lactic*로 판명되었고(Fig. 22), pH, 온도에 따른 본균주의 사포닌 전환 양상과 효율성은 Figs. 23 & 24과 같다. 사포닌 전환 최적 조건을 30℃에서 가장 높았으며, pH 6-8의 넓은 범위에서 효소 활성이 강한 것으로 나타났다.

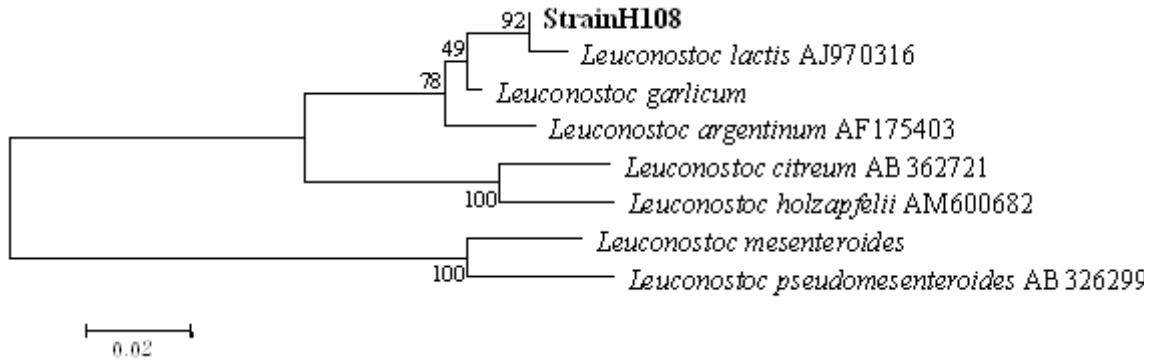


Fig. 22. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing phylogenetic relationships among strain H108 and related *Leuconostoc* species.

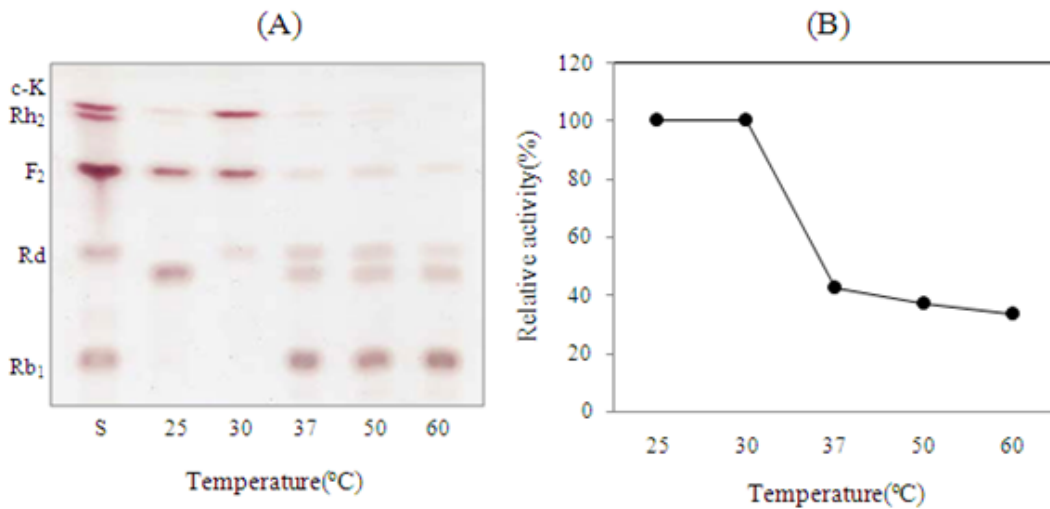


Fig. 23. Effects of temperature on the enzymatic conversion of ginsenoside Rb₁(A) and corresponding effects on β-glucosidase activity (B).

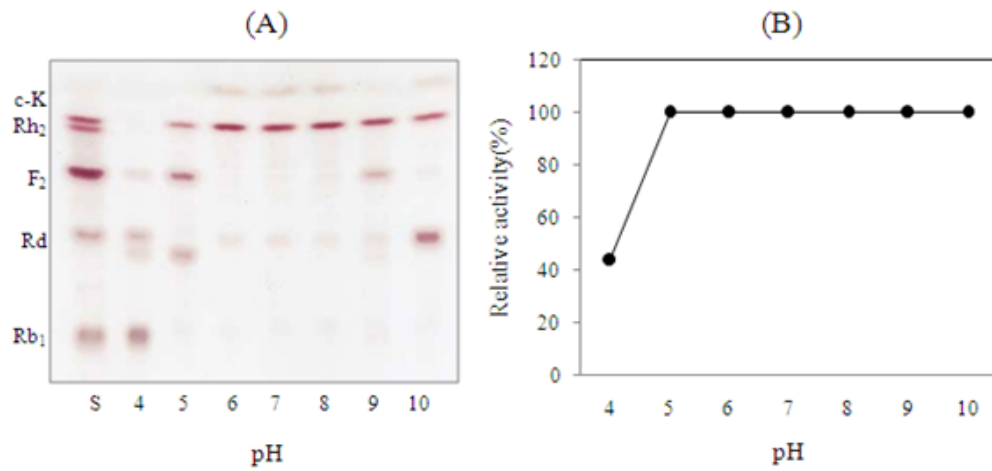


Fig. 24. Effects of pH (4.0~10.0) on the conversion of ginsenoside Rb1 to compound K (A) and corresponding effects on β -glucosidase activity (B).

④ 발효기술에 의한 수삼에는 존재하지 않고, 홍삼 등에서도 미량 존재하는 기능성 성분(C-K)의 분리 및 구조 동정(Figs. 25-27)

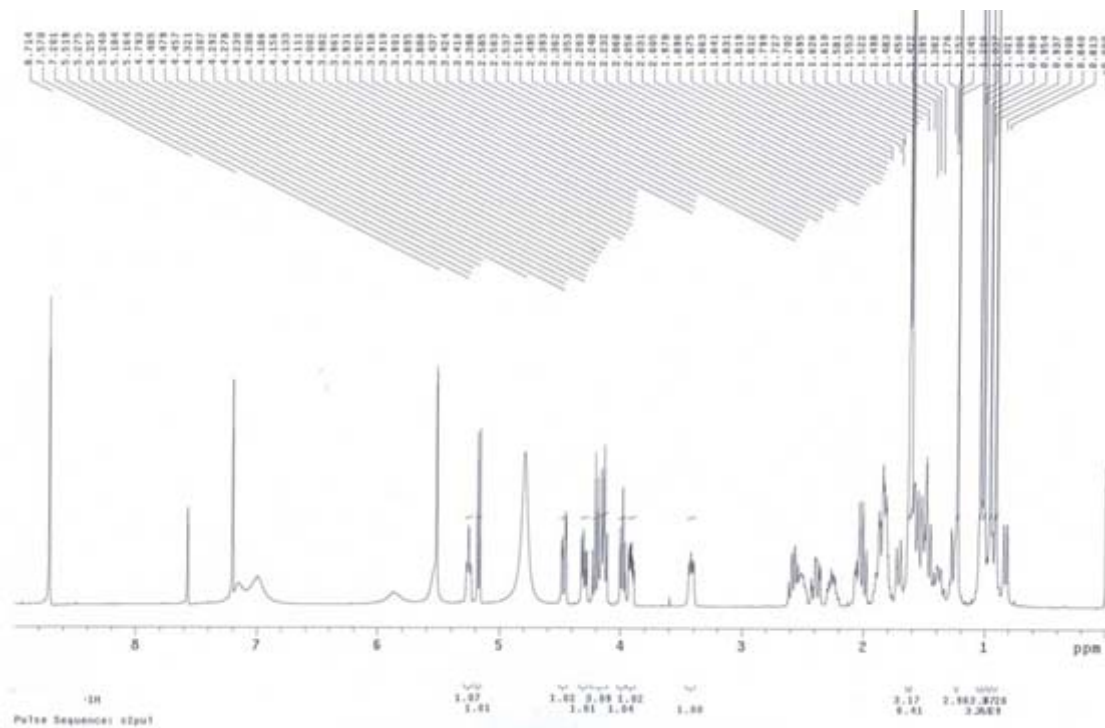


Fig 25. ¹H-NMR spectra of the compound K(400MHz, solvent: pyridine-*d*₅).

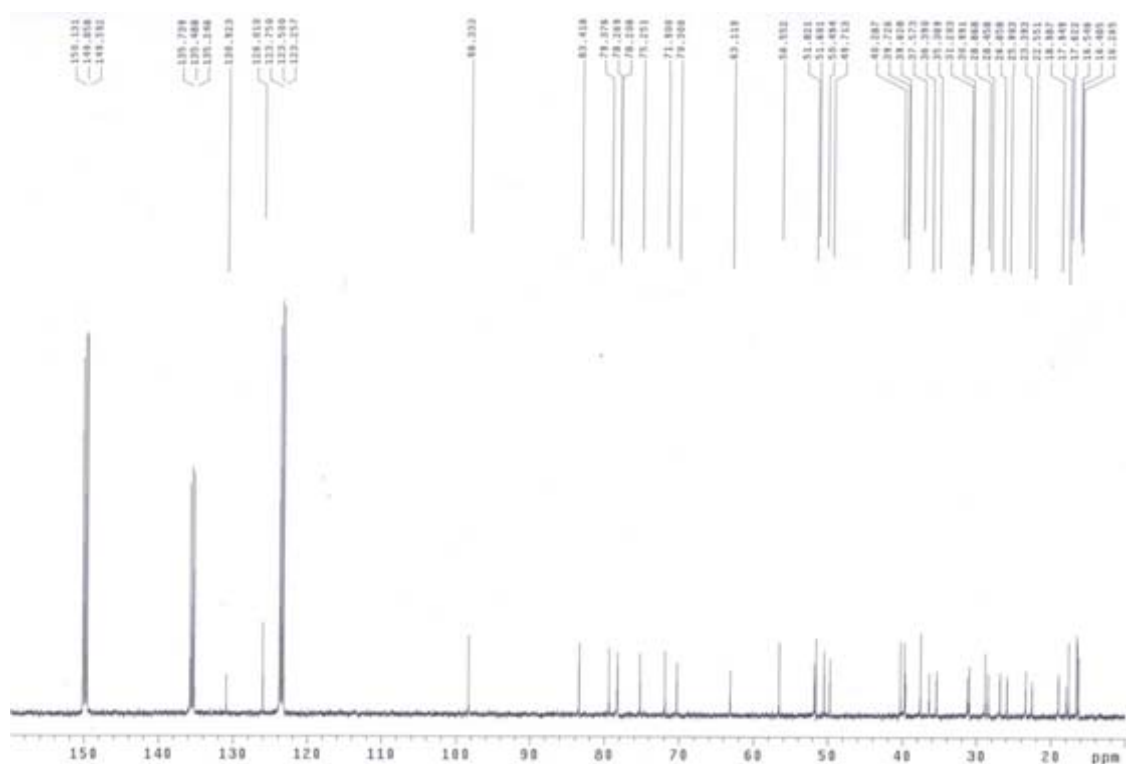


Fig. 26. ^{13}C -NMR spectra of the compound K (100MHz, solvent: pyridine- d_5).

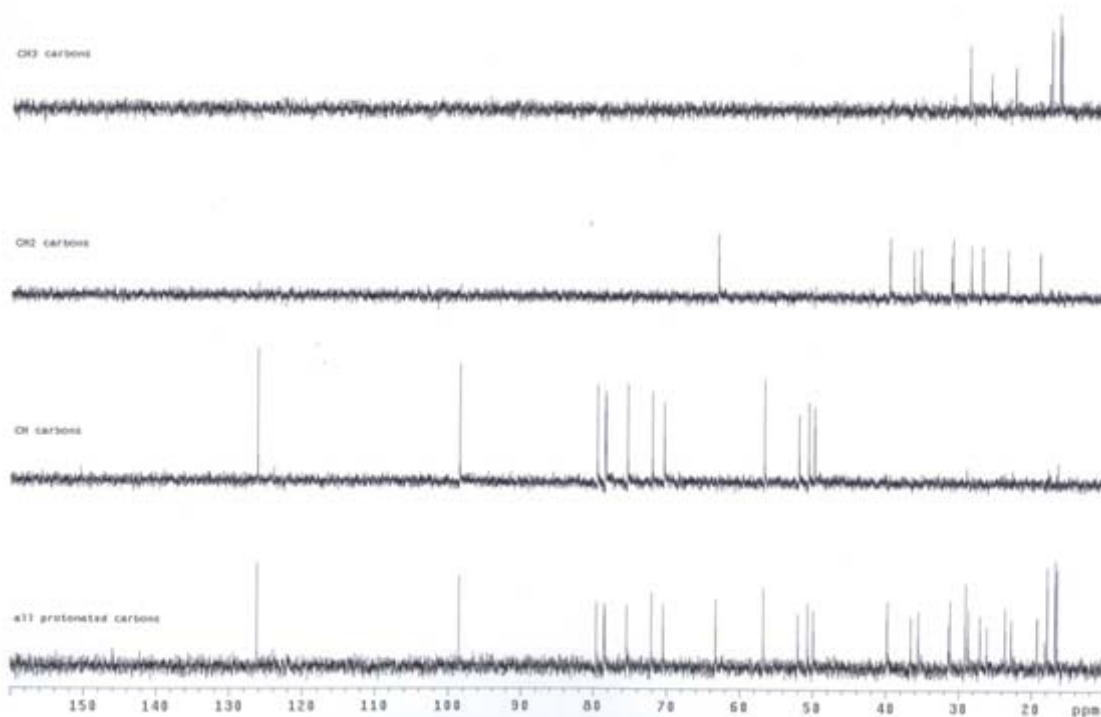


Fig. 27. DEPT spectra of the compound K (solvent: pyridine- d_5).

9. BIOREACTOR를 이용한 생물전환의 미생물 발효조건 확립

Bioreactor를 이용한 대량생물전환의 미생물의 발효조건 확립 및 발효생산성 분석은 사포닌 생산의 최적조건을 확립하기 위하여 한방바이오(주)에서 개발한 2L, 18L Bioreactor를 사용하였다.(Fig. 28-30)

(1) 2L / 18L Bioreactor 장비



Fig. 28. 2L / 18L Bioreactor

(2) Bioreactor 설치를 위한 소요공간

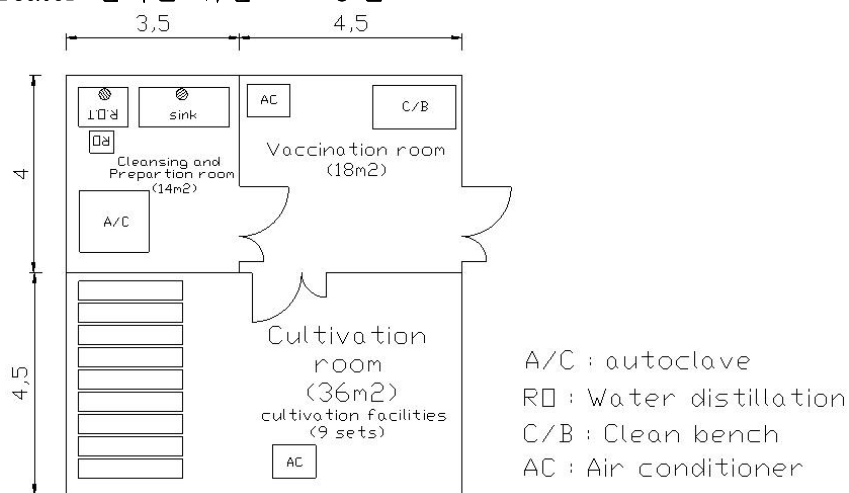


Fig. 29. Bioreactor 설치 평면도.

- ① 대량배양시스템을 위하여 온도를 조절할 수 있는 공간 필요하다.
- ② 실험실 수준의 배양시설이 되게 위해서 8~10평 정도의 배양실을 준비하여야 하며, 균주 또는 효소를 접종할수 있는 5~6평의 접종실, 4평정도의 배지조제 및 오토클레이브 (autoclave, 멸균기)실, 세척 및 준비실(증류수 채취기 등)이 필요하다.
- ③ 배양실은 냉·온풍기를 이용하여 22-25 °C를 유지하였다.



2L Bioreactor




18L Bioreactor

Fig. 30. 실험중인 2L Bioreactor 및 18L Bioreactor.

(3) 18L bioreactor를 이용한 대량 발효시스템 공정

Table 10. Bioreactor를 이용한 발효공정

No.	공정 순서	공정 내용	
1	준비	18L배양통 준비(18개 1세트)	
		정제수를 이용하여 홍삼농축액을 5% 농도로 희석	
2	Autoclave	배양에 이용할 Bioreactor 멸균 (121℃ 15분)	
3	접종	클린벤치 장비를 이용하여 멸균을 마친 bioreactor에 희석된 5%의 홍삼액을 넣은다음 희귀 진세노사이드(Rh2, C-K)를 전환시킬 수 있는 균주와 효소를 접종	
4	배양	온도와 습도를 조절할 수 있는 배양실에서 30℃에서 72시간동안 배양	
5	진세노사이드 변환확인	일정 조건에서 배양되어진 배양액을 HPLC 분석을 통하여 진세노사이드 전환여부 및 정량 확인	
6	수확	발효 된 배양액 수확	
7	농축	수확된 배양액을 대형 감압농축기를 이용하여 농축(고형분 60~65%)	
8	정량분석	발효홍삼 농축액 Rg1+Rb1+Rg3합량 및 희귀진세노사이드 Rh2 / C-K 함량 확인	
9	출하	제품원료로 사용	

10. Bioreactor를 이용한 5종 균주의 사포닌 전환 양상

선발된 5종 균주를 bioreactor을 이용하여 홍삼 농축액의 사포닌 전환 양상을 조사한 결과는 Table 11과 같다.

대조구에 비해 PPD,PPT계 ginsenoside를 분해하여 minor ginsenoside를 생성함을 알 수 있었고, 그중 compound K와 Rh2 생성능을 기준으로 최종 DCY51균주와 H117균주를 선발하여 다음 실험을 진행하였다(Table 11).

Table 11. Content of ginsenosides of 5 strains selected mg/g

구분	Con.	JW 02	del	H108	DCY51	H117
Rg1	2.90	2.40	1.87	2.27	1.98	1.99
Re	6.56	4.26	3.30	3.20	3.40	3.43
Rb1	8.13	5.38	4.50	5.30	4.35	4.87
Rc	7.91	5.77	4.80	5.63	4.84	5.69
Rb2	4.55	2.89	2.46	2.70	2.53	3.05
Rd	1.55	1.19	0.10	1.64	0.97	1.02
Rg3	3.81	3.71	3.50	3.58	3.23	3.60
Rh2	.	0.54	0.85	0.96	0.61	0.98
C-K	.	0.08	0.09	0.08	0.10	0.19

각각 2반복으로 bioreactor을 이용하여 홍삼 농축액 5 %첨가된 용액에 *Lactobacillus kimchicus* DCY51와 *Leuconostoc mesenteroides* H117를 각각 2% 접종하여 37°C에서 3일간 배양하였음. 18L Bioreactor에 13L 5% 홍삼액을 넣은 이유는 홍삼농축액의 사포닌 성분으로 인하여 거품이 많이 발생, 이로 인해 안에 있는 농축액이 넘치지 않는 조건하에서 농축액 양과 공기를 주입하여 실험하였다. 실험결과 *Lactobacillus kimchicus* DCY51의 경우 Rh2 0.61mg/g, C-K 0.10mg/g을 생성하였고, *Leuconostoc mesenteroides* H117의 경우 Rh2 0.98mg/g, C-K 0.19mg/g을 각각 생산하였다(Table 12).

Table 12. The content of ginsenosides after fermentation using bioreactor mg/g

구분	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3	Rh2	C-K
con	2.90	6.56	8.13	3.88	7.91	4.55	3.81	-	-
DCY 51-I	1.98	3.40	4.35	4.84	2.53	0.97	3.23	0.61	0.10
DCY 51-II	1.88	3.60	6.00	5.76	3.06	1.04	3.60	0.57	0.08
H117-I	1.99	3.43	4.87	5.69	3.05	1.02	3.60	0.98	0.19
H117-II	1.66	3.25	5.86	7.11	3.31	0.91	3.80	0.69	0.15

5% red ginseng extract was used as control, the strain DCY51 and strain H117 were inoculated as 5 %, respectively.

11. Bioreactor를 이용한 희귀 ginsenoside(Rh2, C-K) 대량생산 기술 및 발효인삼 응용 제품개발

다음표의 결과를 토대로 DCY51, H117 두 유용균주의 반복실험을 한 결과 발효를 하지 않은 홍삼농축액에 비하여 DCY51의 Rh2는 0.61mg/g과 0.57mg/g로 나왔고, C-K는 0.10mg/g와 0.08mg/g로 분석되었으며, H117의 Rh2는 0.98mg/g과 0.69mg/g로 나왔고, C-K는 0.19mg/g와 0.15mg/g로 분석되어 나왔다.

더 많은 Rh2와 C-K를 얻기위하여 균의 접종량을 10%와 배양일수 7일로 늘려 보았으나 유의한 결과는 나오지 않았다.

실험결과 유용균주 DCY51와 H117의 측정결과를 보았을때, H117이 상대적으로 높게 나와 최종적으로 유용균주 H117을 선택하였다. 홍삼 농축액 5% 시료에 균을 2% 내지 10%를 접종 하였을때 와 배양일수를 3일 내지 10일 배양한 결과 본 실험에서 얻고자하는 Rh2와 C-K양이 충분하지 않게 나왔다 (Table 13) .

Table 13. Content of ginsenosides of red ginseng extract treated with enzyme

	mg/g								
구분	con	1	2	3	4	5	6	7	8
Rg1	2.96	2.79	2.14	2.93	3.09	3.47	2.79	3.44	2.43
Re	3.31	2.16	1.2	2.35	1.63	1.62	2.33	1.95	1.79
Rf	0.84	1.04	0.19	0.25	0.81	0.13	0.15	1.09	0.001
Rb1	6.24	2.70	0.09	0.06	0.24	0.23	-	0.48	0.24
Rb2	3.92	2.27	0.12	0.11	0.65	0.11	0.01	1.34	0.03
Rd	2.51	6.23	0.46	2.13	3.11	1.1	1.9	5.85	2.84
F2	0.26	1.77	0.73	5.34	4.1	8.41	6.04	4.25	8.61
Rg3	0.84	1.32	0.13	1.75	0.66	0.94	1.99	1.1	0.84
C-K	-	0.47	0.28	0.19	0.37	0.69	0.06	1.44	1.08
Rh2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CON : 홍삼농축액 20%

처리구 1 : PECTINEX 5%

처리구 2 : PECTINEX 10%

처리구 3 : PECTINEX 5% : VISCOZYME 5%

처리구 4 : CYTOLASE PCL5 5%

처리구 5 : CYTOLASE PCL5 5% : VISCOZYME 5%

처리구 6 : CYTOLASE PCL5 5% : VISCOZYME 5%

처리구 7 : CYTOLASE PCL5 5% : SUMILACT 0.5%

처리구 8 : CYTOLASE PCL5 5% : VISCOZYME 5% : SUMILACT 0.5%

본 연구팀에서는 보다 높은 희귀 ginsenoside(Rh2, C-K)를 얻고자 4가지의 효소를 이용하여 실험하였다.

배양은 18L Bioreactor에 10L의 홍삼농축액 20%를 사용하였고 온도 37℃에서 12시간 배양하였다. 실험 결과 CYTOLASE PCL5 5%와 SUMILACT 0.5%를 혼합하여 넣은 처리구 7에서 C-K가 1.44mg으로 다른 처리구보다 많은 양이 생성되는 것으로 나왔으나 Rh2는 모든 효소 처리에서 검출되지 않았다(Table 13).

유용균주에 의한 희귀 사포닌 ginsenoside(Rh2, C-K)의 양을 높게 나오게 하기 위해 효소와 유용균주를 혼합처리 하여 실험하였다. 배양은 18L Bioreactor에 10L의 홍삼농축액 20%를 시료로 사용하였고, CYTOLASE PCL5 5%, SUMILACT 0.5%와 H117(*Leuconostoc mesenteroides*) 2%로 각각 접종하였다.

효소는 사용최적 조건온도가 50 ~55℃인데, 효소와 유용균주의 온도를 온도 37℃에서 24시간 배양하였다. 그 결과 CYTOLASE PCL5을 5%, SUMILACT 0.5%와 균주 H117 2%를 혼합하여 접종하여 배양한 결과 Rh2는 0.29mg/g로 대조군과 차이가 없었으며, C-K는 2.98mg/g로 대조군에 비해 많은 양의 C-K를 얻을 수 있었다(Table 14).

Table 14. Content of ginsenosides of red ginseng extract treated with strain and enzyme mg/g

구분	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3	Rf	F2	Rh2	C-K
con	2.96	3.31	6.24	3.88	3.92	2.51	0.84	0.84	0.26	0.32	-
발효	0.28	0.84	1.26	0.25	0.34	4.56	0.31	0.45	5.26	0.29	2.98

CON : 홍삼 농축액 20%

발효 : CYTOLASE PCL5 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2%

Table 15. Contents of ginsenosides of red ginseng extract treated with different enzymes

구분	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3	Rf	F2	Rh2	C-K
con(A)	2.96	3.31	6.24	3.88	3.92	2.51	0.84	0.84	0.26	0.32	-
발효(B)	0.28	0.84	1.26	0.25	0.34	4.56	0.31	0.45	5.26	0.29	2.98
발효(E)	1.42	1.92	3.49	1.27	2.39	3.29	0.66	0.50	1.25	0.29	1.09
발효(F)	3.02	1.82	2.55	0.40	1.70	5.07	0.98	1.05	3.48	0.16	0.32

CON(A) : 홍삼 농축액 20%

발효(B) : CYTOLASE PCL5 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2%

발효(E) : CYTOLASE PCL5 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2% : 홍삼농축액 20%= 7:3

발효(F) : CYTOLASE PCL5 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2% : 홍삼농축액 20%= 3:7

Table 14의 결과에서 유용균주와 효소를 처리하였을 경우 C-K는 2.98mg/g로 높게 나왔다. 그러나 Rb1 1.26 mg/g, Rg1 0.28mg/g, Rg3 0.31mg/g로 식약처에서 요구하는 건강기능식품 규격 (Rb1+Rg1+Rg3) 2.5mg/g이상을 충족시키지 못함으로 인해, 홍삼 농축액 20%의 시료를 발효원액과 혼합하여 측정하였다. 그 결과 CYTOLASE PCL5 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2% : 홍삼농축액 20%= 7:3으로 한 처리구에서 Rb1 3.49mg/g, Rg1 1.42mg/g, Rg3 0.66mg/g로 식약처에서 요구하는 건강기능식품 규격에 충족되었으며, Rh2는 0.29mg/g, C-K는 1.09mg/g로 측정되었다(Table 15).

단일 표준품 ginsenoside Rb1을 유용균주와 처리하였을때의 C-K로의 전환율은 아래와 같이 약 30.2%의 전환효율을 보였다.(Fig. 31)

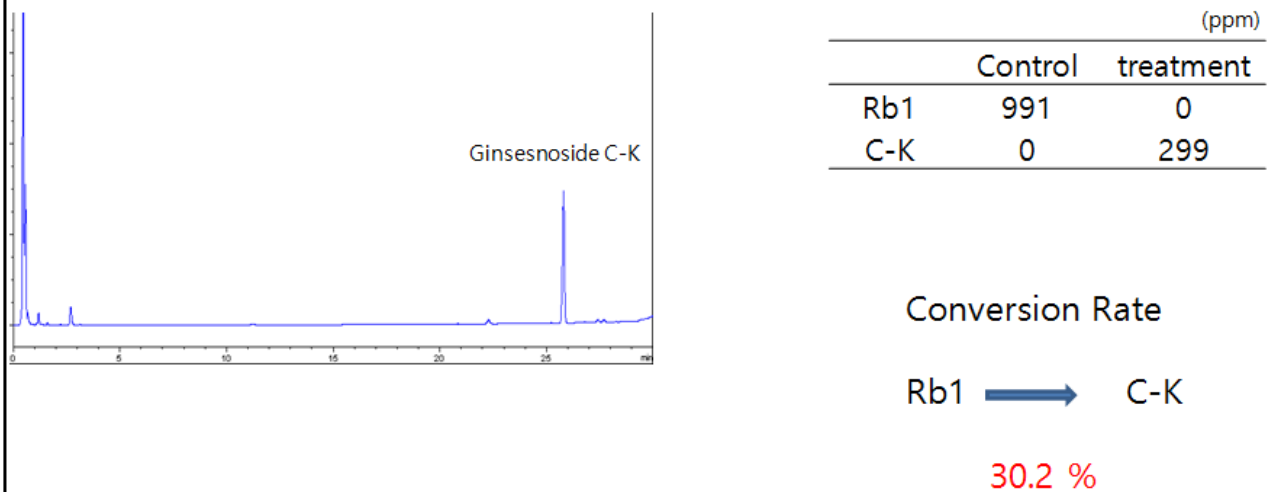


Fig. 31. 단일표준품 ginsenoside Rb1의 C-K로의 전환율

Table 15의 결과를 토대로 홍삼제품에 의한 대식세포에서의 폐렴구균에 대한 면역력 변화 측정하기 위하여 각각의 샘플(A : 홍삼 농축액 20%, B : CYTOLASE PCL 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2%, C : CYTOLASE PCL 5%, H117 2%, D : CYTOLASE PCL5 5%, VISCOZYME 5%, H117 2%, E : CYTOLASE PCL 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2% : 홍삼 농축액 20% = 7 : 3, F : CYTOLASE PCL 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2% : 홍삼 농축액 20% = 3 : 7)을 성균관대학교 이동권 교수님 팀으로 분석의뢰 하였다.

12. 발효에 의하여 생산된 희귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K) 증강 복합제품의 효능연구(폐렴구균 면역력)

(1) 본 연구는 기존 인삼(홍삼)제품과 발효 홍삼 제품의 면역력을 측정하여 기능성이 강화된 발효 홍삼 제품을 생산함으로써 고품질의 기능성 제품을 개발하는 것임. 이를 위해 면역에서 중추적인 기능을 수행하는 대식세포의 cytokine 생산능과 NO 생산 능력을 측정하고 탐식작용을 측정함. 또한 *in vivo*에서 생쥐에 홍삼 제품을 투여 후 병원균을 감염 시 면역 기능을 측정하여 발효 홍삼이 면역 방어 기능에서 기존 제품 보다 어떻게 기능이 강화되는지 규명함.

(2) 연구개발 수행 내용 및 결과

① Material & Method

1. Sample 준비

Ginseng을 PBS(phosphate buffered saline)에 dilution하여 0.22 μ m의 sterile filter unit을 이용하여 filtering한 다음 사용한다. Ginseng sample은 A, B, C, D, E, F가 사용되었으며, 마우스 실험에 사용될 Ginseng 용량은 4g/60kg body weight 기준으로 사용되었다.

A : 홍삼 농축액 20%

B : CYTOLASE PCL 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2%

C : CYTOLASE PCL 5%, H117 2%

D : CYTOLASE PCL5 5%, VISCOZYME 5%, H117 2%

E : CYTOLASE PCL 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2% : 홍삼 농축액 20% = 7 : 3

F : CYTOLASE PCL 5%, SUMILACT 0.5%, H117 2% : 홍삼 농축액 20% = 3 : 7

2. Bacteria strain과 Cell

Bacteria strain은 *S. pneumoniae* 의 독성이 강한 serotype 2인 D39와 serotype 4인 TIGR4를 사용하였다. Cell은 Raw 264.7으로 37 $^{\circ}$ C(95% air, 5% CO₂)에서 culture 되었다.

3. 실험 동물

4주령의 male ICR mice 들은 Orient(Seoul, Korea)에서 구입했으며, 또한 적응을 위해 성균관 대학교 약학대학 내 animal room에서 1주 동안 길렀다. 연구 중 모든 생쥐 실험은 한국 동물 보호법을 준수한 성균관 대학교 동물 윤리 위원회에 의해 승인되었다.

4. Ginseng의 세포독성 확인

Raw cell을 96-well plate에 seeding 후 Ginseng sample 전처리 한다. 24/48시간 처리 후 media는 버리고 PBS 로 헹구어준다. 그리고

3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 시약을 1시간 30분 동안 처리 후 media는 버리고 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 150 μ l를 각 well에 넣고 ELISA machine으로 540nm 에 측정한다.

5. Ginseng에 처리 세포에 Bacteria 감염 시 세포독성 억제 확인

세포 독성확인은 Raw cell을 및 폐렴구균을 이용하여 실시하였다. 96-well plate 에 cell을 seeding 후 24/48 시간 동안 Ginseng 을 전처리 후 PBS로 헹구어 준다. Medium는 antibiotics가 없는 것으로 바꾸어 준 후, *S. pneumoniae* (D39)을 MOI 1:100으로 infection 시킨다. 2시간 infection 후 PBS로 헹구고 MTT 시약을 1시간 30분 처리한다. 처리 한 후 media는 버리고 DMSO150 μ l를 각 well에 넣고 ELISA machine으로 540 nm 에서 측정한다.

6. Ginseng을 처리한 세포의 Cytokine 측정

Raw cell을 96-well plate 에 seeding 후 24시간 동안 Ginseng 을 전처리 후 PBS로 헹구어 준다. Media는 antibiotics가 없는 것으로 바꾸어 준 후, *S. pneumoniae* (D39)을 MOI 1:100으로 infection 시킨다. 2시간 infection 후 상층액을 걷어 준다. 그런 다음 상층액에 있는 bacteria를 제거하기 위해 6000 rpm, 4°C에서 10분간 cell down 시킨다. 상층액에서 cytokine을 얻어낸다. Cytokine 측정은 BD사의 cytokine ELISA kit을 이용하여 측정하였다.

7. Ginseng을 투여한 마우스의 Cytokine 측정

각 그룹 당 10 마리 썬의 마우스를 PBS와 Ginseng 1.5 mg/ml로 100 μ l씩 일주일 동안 경구투여 한다. 일주일 투여 후 *S. pneumoniae* (D39)/TIGR4를 각각의 group에 코에 infection시킨다. Blood를 채취한 후 24시간 동안 4°C에서 보관 후 13000rpm 10분 동안 cell down 시켜 serum을 얻는다. Serum에서cytokine을 측정한다. Cytokine 측정은 BD사의 cytokine ELISA kit을 이용하여 측정하였다.

8. Ginseng을 투여한 마우스의 면역력 확인

각 그룹 당 10 마리 썬의 마우스를 PBS와 Ginseng을 100 μ l 썬 일주일 동안 경구투여 한다. 일주일 투여 후 *S. pneumoniae* (D39)/TIGR4를 각 group에 코에 infection시킨다. 감염 24/48시간 후 마우스를 희생시켜 각 장기를 homogenizer로 간 후 Gentamycin (10 μ g/ml) blood agar plate에 plating하여 박테리아 colony 수를 확인하였다.

9. Ginseng을 처리한 세포의 항염효과 측정

세포의 항염효과를 측정하기 위하여 bacteria 감염시 생성되는 NO의 량을 측정하였다. NO 측정은 Raw cell을 96-well plate에 seeding 후 Ginseng sample을 48시간 전처리 한다. PBS 로 헹군 후 LPS 1 μ g/ml 로 24시간 동안 처리한다. 처리 후 상층액을 걷어낸다. 다른 새로운 96-well plate에 50 μ l의 상층액과 NO를 측정할 수 있는 Griess reagent 50 μ l를 넣고 540 nm로 ELISA machine으로 측정한다.

10. Ginseng을 처리한 마우스의 항염효과 측정

각 그룹 당 10 마리 썬의 마우스를 PBS와 Ginseng dose 4 mg/ml로 100 μ l씩 일주일 동안 경구투여 한다. 일주일 투여 후 *S. pneumoniae* (TIGR4) 로 각 group을 코에 infection시킨다. Blood를 채취한 후 24시간 동안 4°C에서 보관 후 13000 rpm, 10분 동안 cell down 시켜 serum을 얻는다. Serum에서 NO를 측정한다. 다른 96-well plate에 50 μ l의 serum과 NO를 측정할 수 있는 Griess reagent 50 μ l를 넣고 540 nm로 ELISA machine으로 측정한다.

11. Phagocytic activity

Raw cell을 96-well plate 에 seeding 후 48시간 동안 Ginseng 과 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 24 시간 처리 한다. 그 후 Zymosan과 NBT (nitro blue tetrazolium) 0.6 mg/ml을 antibiotics가 있는 medium과 함께 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 1 시간 동안 처리한다. 그리고 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 150 μl 각 well에 넣고 ELISA machine으로 540 nm 에 측정한다.

12. Phagocytosis assay

Raw cell을 24-well plates에 seeding 후 Ginseng sample을 48 시간 전처리 한다. PBS로 행균 후 medium은 antibiotics가 없는 것으로 바꾸어 *S. pneumoniae* (D39)를 2 시간 동안 infection시킨다. 2 시간 후 medium을 10 μg penicillin/ μg , 200 μg gentamycin/ μg 로 바꾸어 3 시간 배양한다. 배양 후 medium은 버리고 PBS로 행구어 준 후 Triton X-100 (0.025%)를 500 μl 넣어주고 100번 pipetting 하여 세포를 용해시킨다. 각 well 마다 1/5 (100 μl), 1/10 (50 μl), 1/50 (10 μl)를 각 각 취해서 THY agar plate에 pour plating 한다. 37°C incubator에서 18~24 시간 배양 후 colony수를 센다.

② Results

㉞ Ginseng의 세포독성 확인

Ginseng sample A, B, C, D의 독성을 확인하기 위해서 0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml의 용량으로 24시간 처리 후, MTT assay를 시행하였다 (Fig. 32). 각각의 sample 10 mg/ml로 처리 시에 독성이 뚜렷하게 관찰되었으며, 1 mg/ml과 10 mg/ml에서 독성의 차이가 심하여 1, 2, 4, 8 mg/ml 용량으로 독성을 측정하였다 (Fig. 33). A, B, C 시료에서 가장 높은 용량은 현저히 높은 독성을 보였으며, 그 중에서 A와 C는 4 mg/ml에서도 높은 수치의 독성을 확인할 수 있었다. D에서는 비록 유의성을 나타내지는 않았지만 마찬가지로 높은 용량에서 높은 독성을 나타냈다. A, B, C, D의 sample 측정 후 E, F sample을 받아 다른 실험에서 좋은 결과를 보이는 A, B와 나중에 받은 E, F를 Ginseng 48시간 처리 한 후 독성을 측정하였다 (Fig. 34). A sample의 1 mg/ml에서 독성이 있었으나 다른 sample에서는 독성이 거의 관찰되지 않았다.

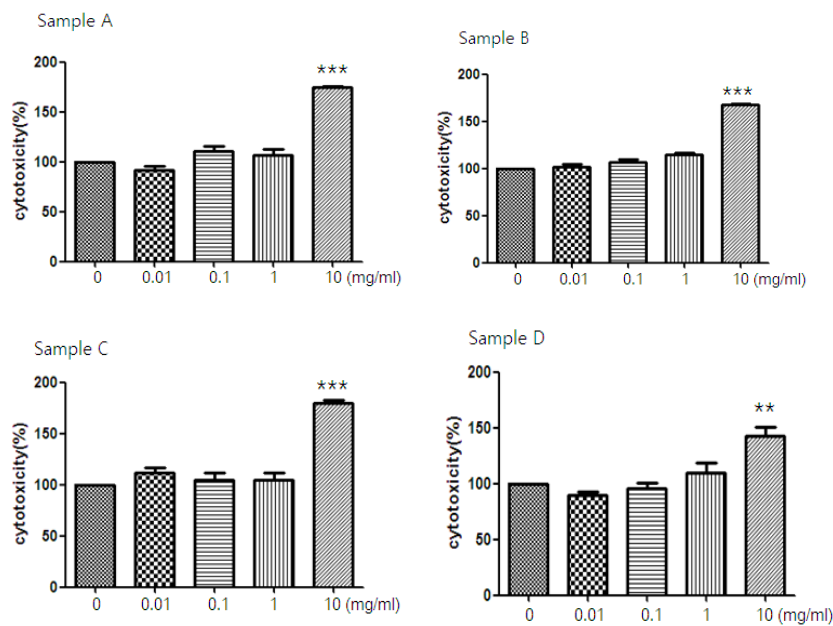


Fig.32. Cytotoxicity of ginseng products.

After treatment of RAW cells with ginseng for 24 hr, MTT assay was performed. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

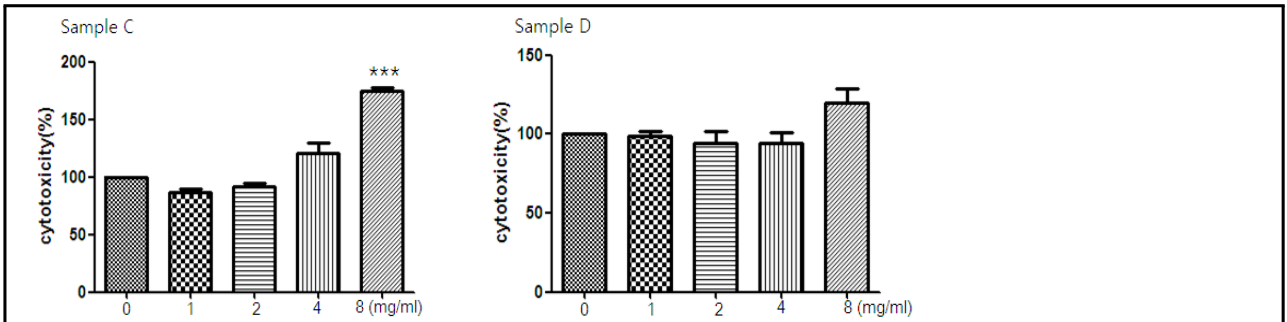


Fig.33. Cytotoxicity of ginseng products.

After treatment of RAW cells with ginseng extract for 24 hr, MTT assay was performed. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

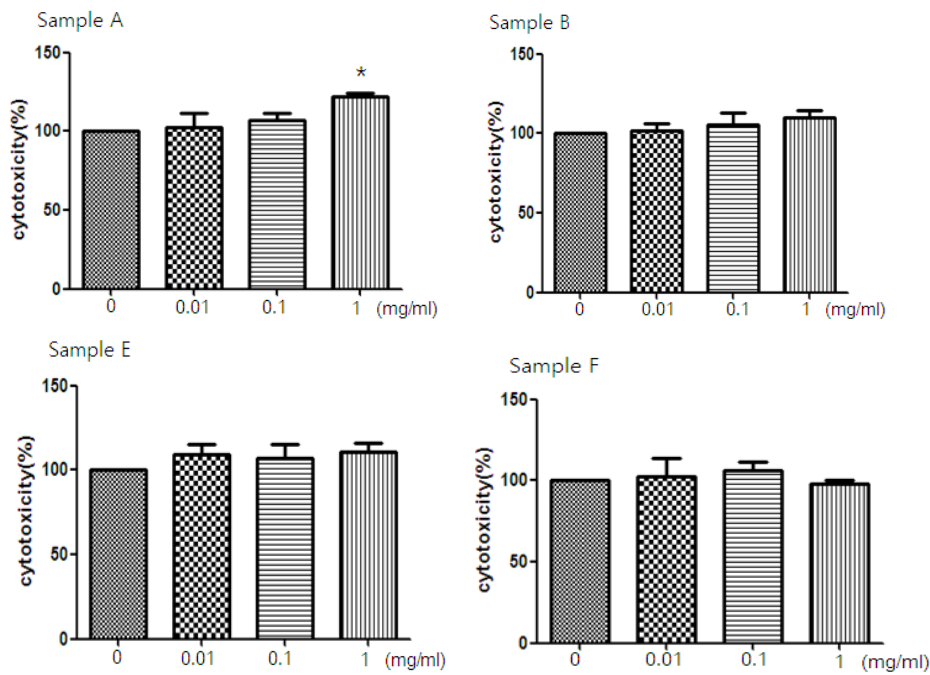


Fig.34. Cytotoxicity of ginseng products.

After treatment of RAW cells with ginseng for 48 hr, MTT assay was performed. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

⊕ Ginseng 전처리 세포에 폐렴구균 감염 시 세포독성 억제 확인

폐렴구균 (D39) 감염 후 Raw cell의 viability를 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다.

A는 0.01, 0.1, B는 0.1, D는 0.1, 1 mg/ml 에서 infection된 control 보다 독성이 낮아서 생존율이 높았지만, 유의성은 없었다. C에서는 세 용량 모두에서 infection된 control보다 높은 독성이 관찰되어, 생존율이 낮았다 (Fig. 35). 반면, sample을 E와 F로 바꾼 후 48 시간 동안 Ginseng을 전처리 후 MTT assay를 시행했을 때, F를 제외한 A, B, E에서 유의성 있는 결과가 나왔다. 공통적으로 0.1 mg/ml 용량에서 감염으로 인한 생존율의 감소가 높아졌으며, B의 경우에는 0.01 mg/ml 용량에서도 유의성있게 세포 생존이 증가되었다 (Fig. 36).

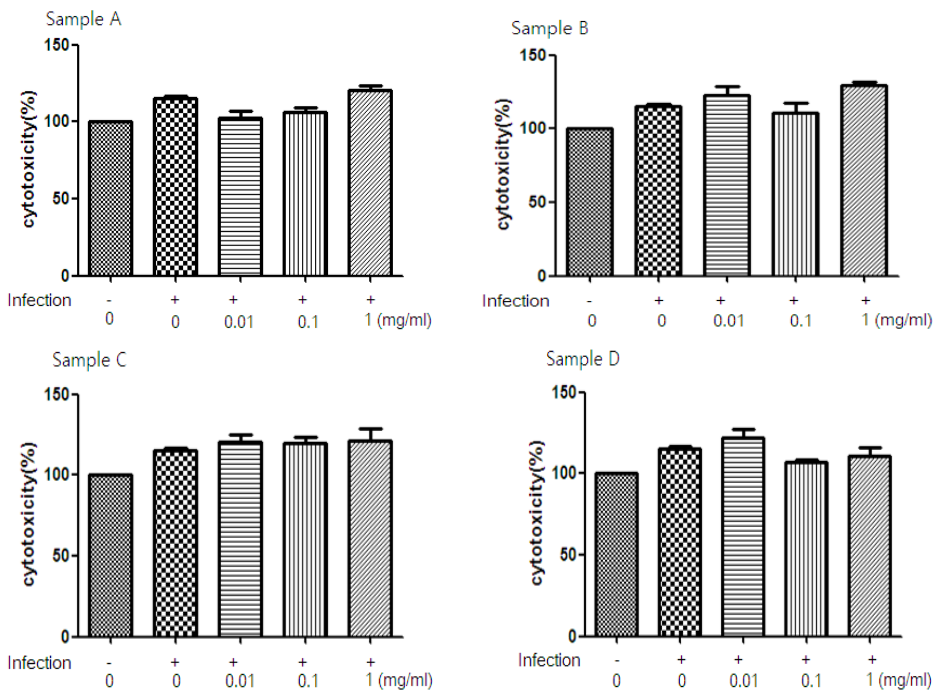


Fig. 35. Increase of cell viability by ginseng treatment after bacterial infection.

After treatment of RAW cells with ginseng for 24 hr, cells were infected with pneumococci for 2 hr. Then MTT assay was performed to check the cell viability. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

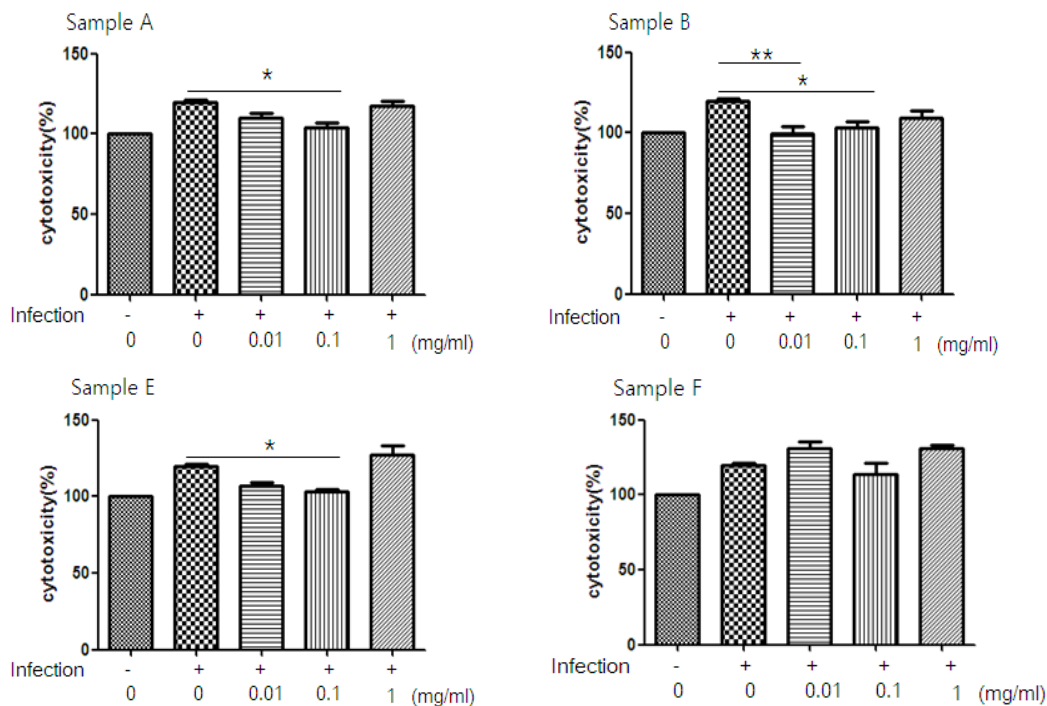


Fig.36. Increase of cell viability by ginseng treatment after bacterial infection.

After treatment of RAW cells with ginseng for 48 hr, cells were infected with pneumococci for 2 hr. Then MTT assay was performed to check the cell viability. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

㊦ Ginseng 에 의한 Cytokine 분비 측정

폐렴구균 (D39) 감염시 세포에서 분비되는 cytokine (TNF α) 수치를 확인하기 위해, in vitro 에서 Raw cell 에 폐렴구균을 감염시킨 후 cell 상등액으로 분리된 TNF α 수치를, in vivo 에서는 일주일 동안 Ginseng sample 경구투여 후, 폐렴구균을 코에 감염시킨 후 TNF α 수치를 측정하였다. Ginseng sample A, B, C, D 모두에서 control 과 비교 시, 별 다른 변화가 보이지 않았다 (Fig. 37). 반면, in vivo 결과에서는 유의성은 없었으나, PBS group과 비교해 보았을 때, 혈청형 2번 균주인 D39 를 감염시킨 (A)와 (B)에서 Ginseng sample A 와 B 의 TNF α 가 다소 감소되었으며, 혈청형 4번인 TIGR4를 감염시킨 (C)에서도 Ginseng sample B가 TNF α 수치를 현저히 억제하였다 (Fig. 38).

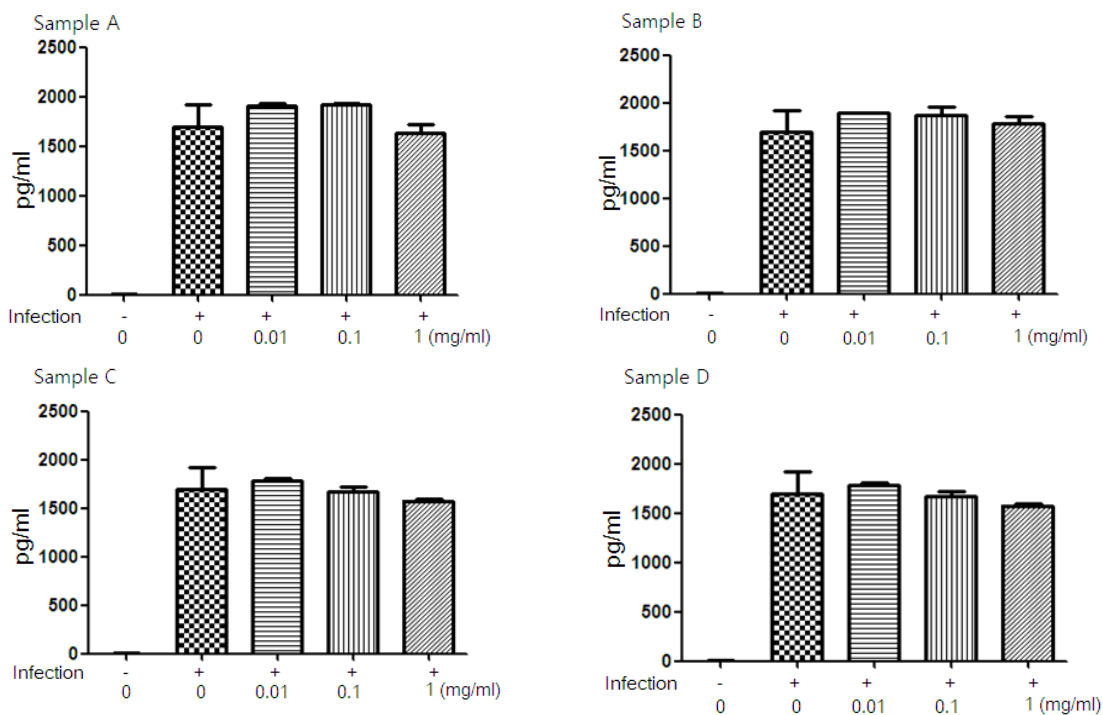


Fig. 37. Inhibition of cytokine (TNF α) secretion by ginseng after pneumococcal infection in vitro.

After treatment of Raw cells with ginseng for 24 hr, cells were infected with pneumococci (D39) for 2 hr. Then cytokine in the supernatant was detected by ELISA machine. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

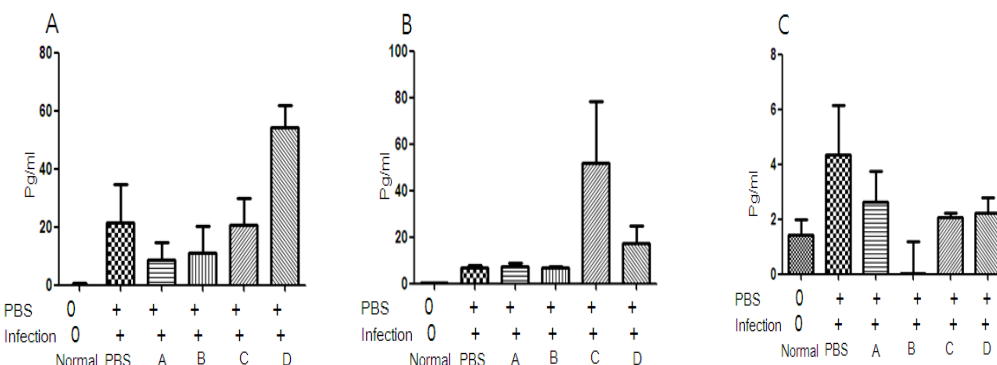


Fig. 38. Inhibition of cytokine (TNF α) secretion by ginseng after pneumococcal infection in vivo. Mice were administered ginseng for 1 week, and infected with pneumococci; (A) 1×10^7 CFU of D39, (B) 2×10^6 CFU of D39, (C) 2.5×10^5 CFU of TIGR4. 24 hr post-infection, cytokine in the serum was detected by ELISA machine. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

㊦ Ginseng 투여에 의한 생쥐의 감염 면역력 증가

Ginseng products 경구투여가 마우스의 면역력을 증강시켜 세균 감염 후 각각의 장기에서 세균 수를 감소시킬 수 있는지 확인하기 위해 colonization assay 를 실시 하였다. D39 감염 24 시간 후에 혈액, 뇌, 폐, 코의 세균 집락수 (CFU)를 측정하였을 때, 비록 유의성은 없었으나 PBS group과 비교 시 A group에서 다소 집락수가 감소되었다. 감염 24 시간 후와 48 시간 후에 균수의 변화 양상을 보려 했으나 48 시간 후 마우스가 모두 죽어 측정할 수 없었다 (Fig. 39). 따라서 처음의 감염 균수보다 1/5 적은 양으로 폐와 코에서 균수를 측정하였으나 48 시간 후에 생쥐가 죽고 24 시간 후에는 A 군에서는 세균수가 감소되었으나 다른 인삼제품군에서는 모두 PBS 군보다 높은 균수가 관찰되었다 (Fig. 40). D39의 독성이 너무 강한 것 같아 이번엔, 혈청형4번인 TIGR4 로 감염시키고 처음 colonization 실험의 1/20 균수로 감염시켰다. 폐와 코의 균수를 측정한 결과 균수가 너무 작아서 인지 폐에서는 전혀 균이 관찰되지 않았으며 코에서도 group 간의 변화가 보이지 않았다 (Fig. 41). 마지막으로 TIGR4 (2.5×10^6 CFU)로 감염시켰을 때 유의성은 없었으나, 24 시간 후에 코에선 다른 Ginseng products에 비해 B와 E가 낮은 균수를 보였고 폐에서는 Ginseng sample E의 경우 균수가 전혀 관찰되지 않았다. 48 시간 후엔 F group에서는 2 마리가 다른 각각의 group에서는 1 마리의 생쥐가 죽었다. 코에서는 A, B, F에서 PBS 보다 낮은 균수가 측정되었지만 E에선 24 시간과 달리 높은 수치를 보였다. 폐에서 역시 A, B, F와 달리 E에선 높은 CFU가 측정되었다 (Fig.42).

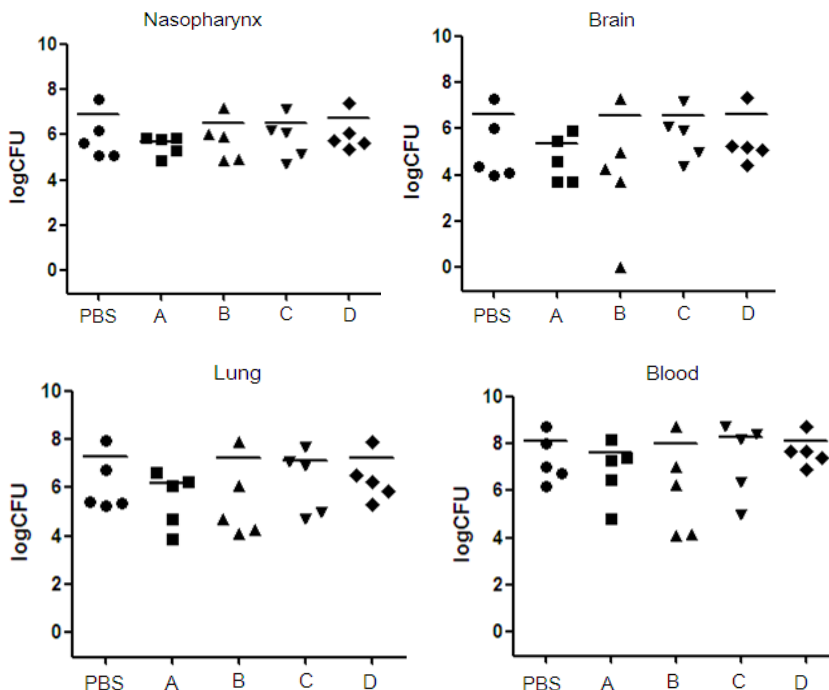


Fig. 39. Decrease of bacterial colonization by ginseng administration.

Ginseng products were administered orally 1.5 mg/day for 7 days. After ginseng treatment, mice were infected with 1×10^7 CFU of D39 intranasally. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

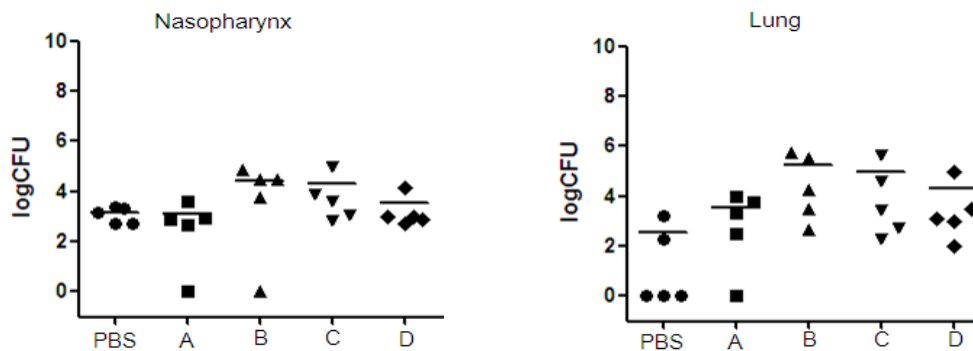


Fig. 40. Decrease of bacterial colonization by ginseng administration.

Ginseng products were administered orally 1.5 mg/day for 7 days. After ginseng treatment, mice were infected with 2×10^6 CFU of D39 intranasally. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

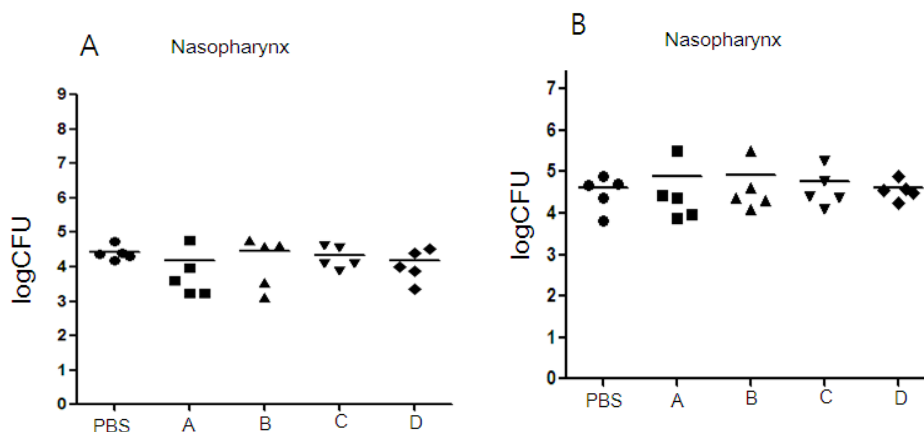


Fig. 41. Decrease of bacterial colonization by ginseng administration.

Ginseng products were administered orally 1.5 mg/day for 7 days. After ginseng treatment, mice were infected with 2.5×10^5 CFU of TIGR4 intranasally. (A) is 24 hr post-infection and (B) is 48 hr post-infection. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

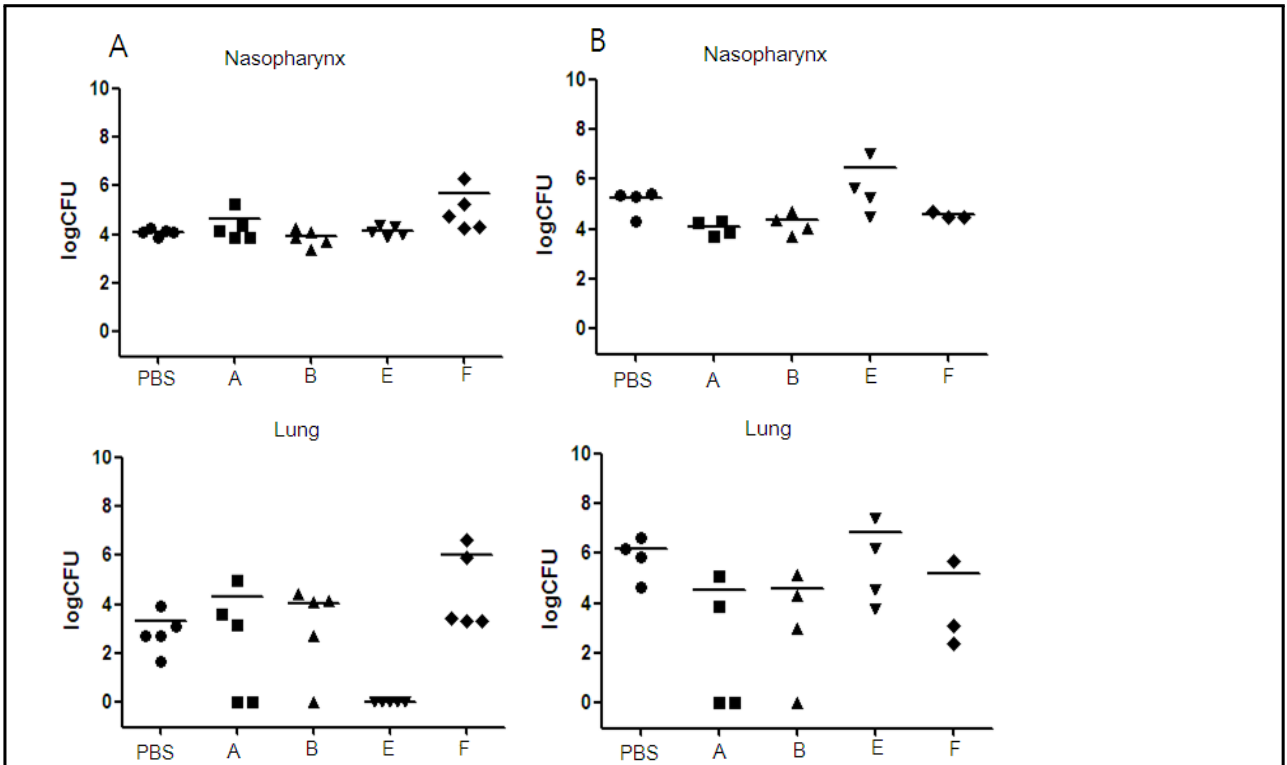


Fig. 42. Decrease of bacterial colonization by ginseng administration. Ginseng products were administered orally 4 mg/day for 7 days. After ginseng treatment, mice were infected with 2.5×10^6 CFU of TIGR4 intranasally. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

㊦ Ginseng을 처리한 세포의 항염효과 측정

Ginseng이 염증에 관련하는 NO 생산에 어떠한 영향을 주는지 알기 위해 NO를 측정하였다. In vivo 상의 NO 생산에서 Ginseng sample F가 높은 NO 수치를 보여 In vitro에서는 A, B, E sample의 NO 수치를 측정하였다. B를 제외한 A와 E에서 용량에 비례하여 NO가 감소하였으며, 각 sample의 가장 높은 용량인 1 mg/ml에서 유의성 있게 NO를 감소시켰다 (Fig. 43). In vivo 상에서는 유의성 있는 결과가 없었으나 감염 48 시간 후 PBS group 과 비교해보았을 때, F를 제외한 나머지 A, B, E group에서 다소 NO 수치가 감소되었으며 그 중 E sample 투여시 가장 감소되었다 (Fig. 44).

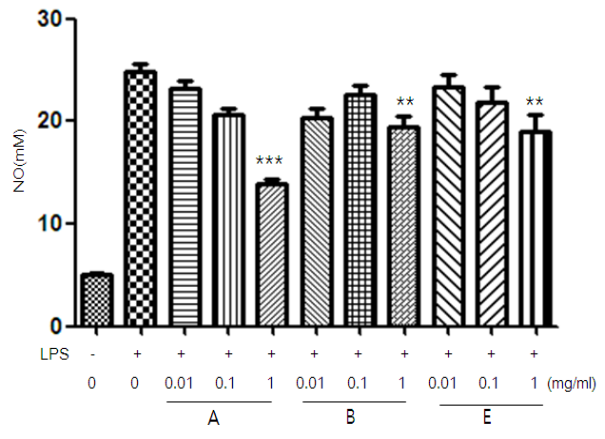


Fig. 43. Inhibition of NO production by ginseng in vitro.

After treatment of raw cells with ginseng for 48 hr, cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) overnight. Then NO production was detected by using Griess reagent to check inflammation level. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

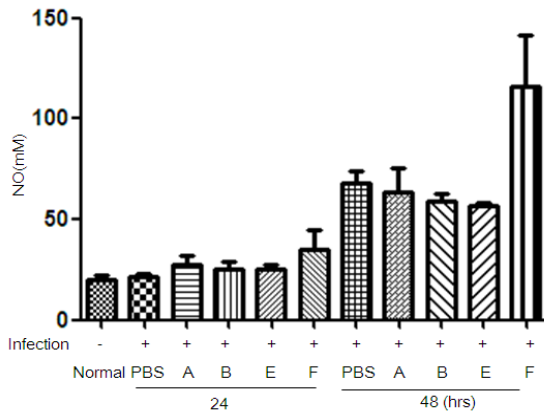


Fig. 44. Inhibition of NO production by ginseng in vivo.

Mice were administered ginseng for 1 week (4 mg/ml), and then infected with pneumococci TIGR4 (2.5×10^6 CFU). Then NO production was detected 24 and 48 hr post-infection by using Griess reagent to check inflammation level. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons between groups; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

㉞ Phagocytic activity

Ginseng이 면역세포인 macrophage를 활성화시킬 수 있는지 확인하기 위해 zymosan을 기질로 이용해 uptake 능력을 측정하는 phagocytic activity를 측정하였다. Normal group과 비교해 보았을 때, A group에서 1 mg/ml, E group에서 0.01과 1 mg/ml에서 유의성 있게 높은 zymosan uptake 수치를 나타냈다(Fig. 45).

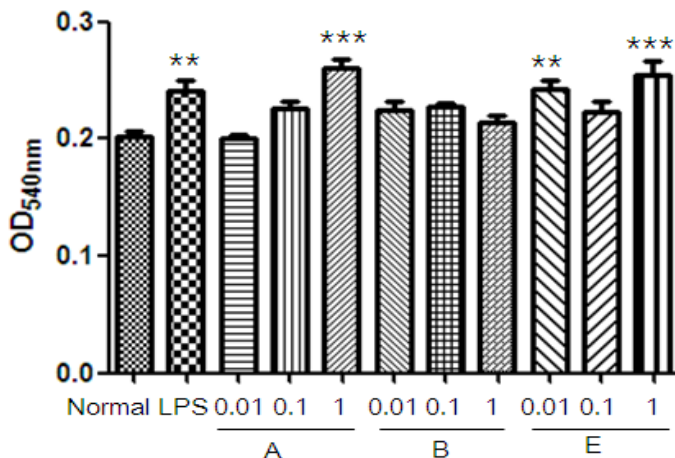


Fig. 45. Increase of phagocytic activity by ginseng administration.

After treatment of Raw cells with ginseng for 24 hr, cells were treated with either LPS or ginseng overnight. Then zymosan and NBT were added to the cell for 1hour to determine the amount of zymosan uptake. The uptake amount was detected by ELISA machine. Statistical analysis was done by ANOVA for comparisons with Normal gorup; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

본 실험은 발효 인삼 시료의 면역 기능 강화 여부를 확인하기 위하여 실시하였다.

실험에 앞서 발효 인삼 시료의 세포독성을 RAW264.7 세포주에서 확인하였다. 세포독성 실험 결과, 시료 A 1 mg/ml 로 48 시간 처리하였을 경우 대조군보다 독성이 22% ($P < 0.05$) 증가되었다. 그러나 시료 A 0.1 mg/ml, B 0.01 mg/ml 및 E 0.1 mg/ml 를 48시간 전 처리하고 폐렴구균 감염으로 증가되는 세포독성을 측정하였을 때 각각 16% ($P < 0.05$), 20% ($P < 0.01$), 15% ($P < 0.05$) 감소하였다. 인삼시료의 항염증 작용을 측정하기 위해 염증유도물질LPS 처리 시 증가되는 nitric oxide (NO) 양을 측정하였을 때 시료 A, B 및 E 1 mg/ml를 48 시간 전 처리로 NO 수치가 각각 44% ($P < 0.001$), 22% ($P < 0.01$) 및 23% ($P < 0.01$) 감소하였다. 또한 인삼처리에 의한 면역기능을 측정하기 위해 시료 A 및 E 1 mg/ml를 48시간 전 처리한 후 대식세포 활성화를 phagocytic activity로 측정하였을 때 대조군보다 각각 29% ($P < 0.001$) 및 25% ($P < 0.001$) 증가되었다.

1주일간 인삼을 투여한 생쥐 코에 폐렴구균을 감염시킨 후 균의 집락수를 확인한 결과, 시료 A 투여 군에서 균의 집락수가 다소 감소하는 경향을 보였으며, 폐렴구균 감염에 의해 증가되는 TNF α 의 경우 시료 B 투여 군에서 감소하는 경향을 보이거나 통계적 유의성은 없었다. 또한 폐렴구균 감염에 의해 증가한 NO의 경우 시료 E 투여 군에서 감소하는 경향을 보였으나 역시 통계적 유의성은 없었다.

결론적으로 시료 A, B 및 E의 경우 폐렴구균 감염 시 면역 기능을 강화시켰다. 고품질의 기능성 제품을 생산하는 측면에서 시료 A의 경우 고용량에서 세포독성을 보이며 시료 B의 경우 가격 측면에서 경제적이지 못하므로 시료 E가 다른 시료보다 우수한 것으로 사료된다.

13. 사포닌 전환활성 증대방안 모색

본 연구팀에서는 유산균의 효소를 스크리닝하고 이를 활용한 인삼 사포닌의 전환에 대한 연구를 수행하였다. 비교적 낮은 전환율을 가지는 유산균의 효소 활성을 높이기 위하여 pH 및 온도의 조절하였으며 elicitor의 첨가를 통해 전환 활성을 극대화 하였다.

(1) Ph에 의한 최적 조건 조사

① 최적 온도 : 25, 30, 35, 40, 50, 60℃ 각각의 온도 조건에서 사포닌 전환활성을 조사한 결과 ginsenoside Rd에서 F2로의 전환은 30℃에서 가장 활발하였다. (Fig. 46)

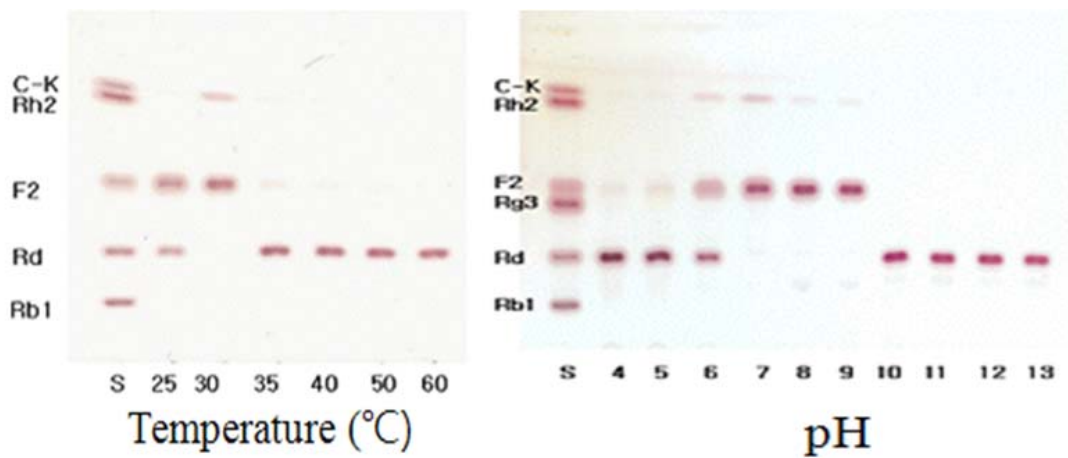


Fig. 46. 균주의 최적 성장 온도 및 산도 분석.

② 최적 pH : pH 4~13의 조건에서 ginsenoside의 전환을 확인한 결과, pH가 6일 때부터 전환이 눈에 띄게 관찰되며, 7~9에서 가장 뛰어나고, pH가 10 이상일 때 전환은 관찰되지 않았다.(Fig. 30)

③ O.D.₆₀₀값 : LH-3 균주 배양이 대수기 상태일 때(O.D₆₀₀ = 1.25~1.75) 강한 전환 활성을 보였다.(Fig. 30)

④ 전환처리 반응시간 : 반응시간이 증가할수록 ginsenoside Rd가 눈에 띄게 줄어들어 반응 60 시간에는 거의 대부분이 F2로 전환되는 것이 확인되었다(Fig. 47).

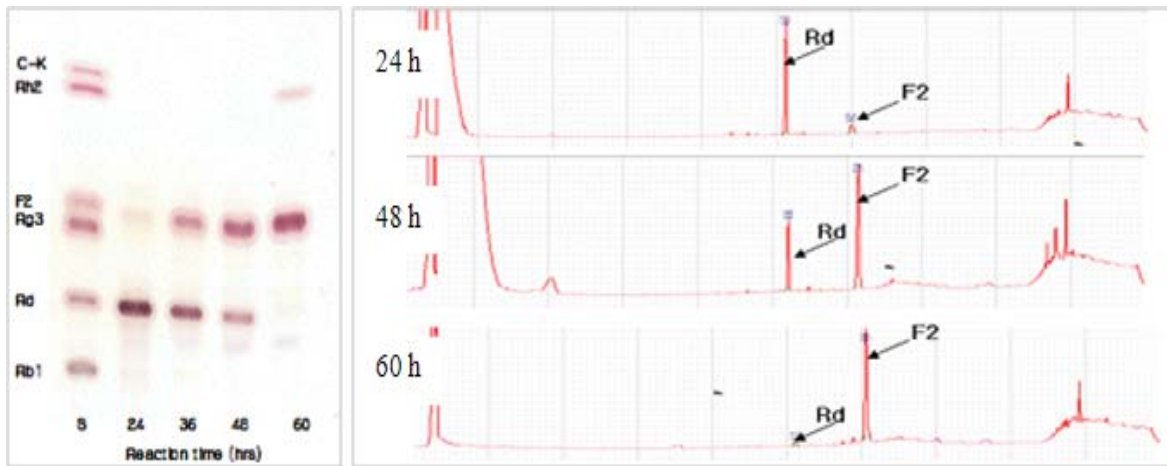


Fig. 47 . 균주의 최적 성장 온도 및 산도 분석.

(2) 균주유래 효소의 최적 활성 조사

이 균주는 실험결과 균체보다 조효소를 추출하여 전환에 이용할 때 활성을 나타내어 모든 실험은 acetone 침전법을 이용하여 조효소를 추출한 후 진행하였다.

① 최적 온도 : 25, 30, 35, 40, 50, 60℃ 각각의 온도 조건에서 사포닌 전환활성을 조사한 결과 30℃에서 F2로의 전환이 가장 뛰어났다.(Fig. 48)

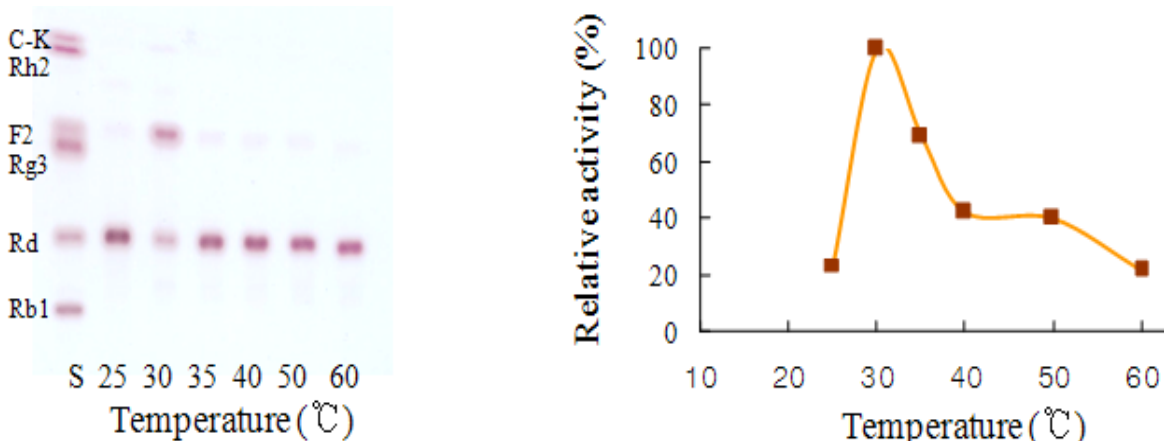


Fig. 48. 균주 효소의 최적 성장 온도 및 산도 분석.

② 최적 pH : pH가 8~12사이에서 활성이 가장 강하며, pH7 이하 및 13이상에서는 눈에 띄는 전환이 확인되지 않았다.(Fig. 49)

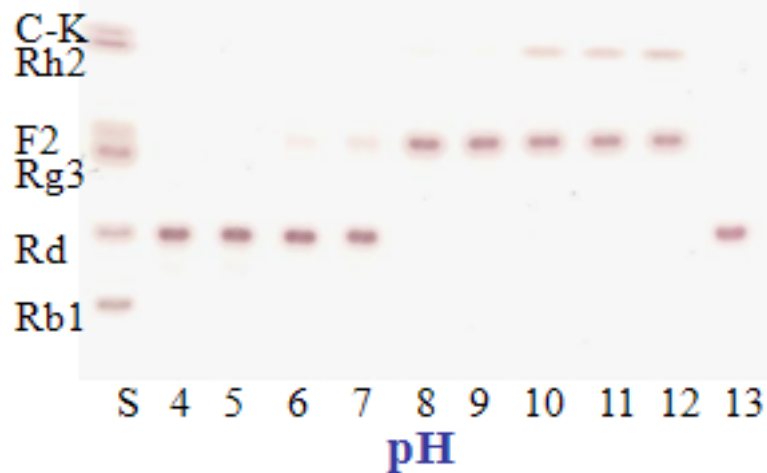


Fig. 49. 균주 효소의 최적 성장 온도 및 산도 분석.

③ O.D.600값 : 균주의 성장주기에 따른 F2에서 compound K로의 전환은 O.D.600값이 0.75~1.0일 때 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 50).

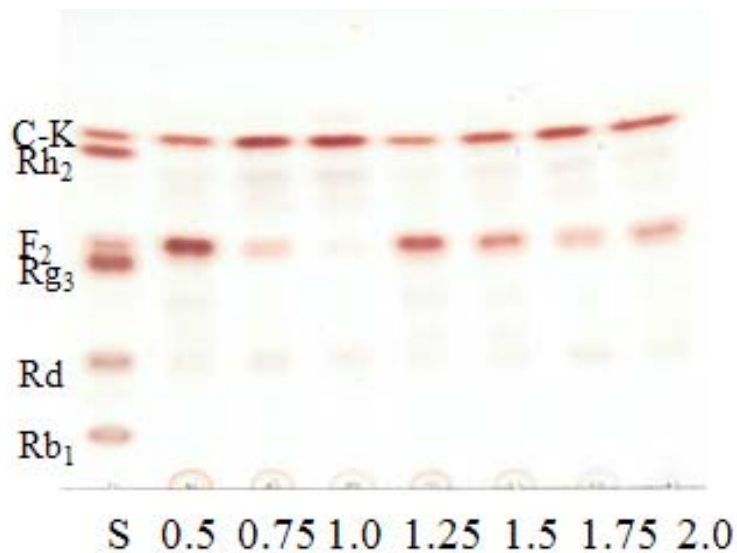


Fig. 50. 균주의 성장에 따른 사포닌 전환활성 분석.

④ 반응시간 : Ginsenoside Rd는 반응 36시간부터 조효소에 의해 F2로의 전환이 확인되며, 48시간부터 F2는 compound K(C-K)로 전환되는 것을 확인할 수 있었다.(Table 16) 반응 60시간 만에 대부분의 ginsenoside Rd가 분해되고, 반응 72시간에 이르렀을 때에 F2 또한 거의 분해되어 compound K가 주 전환성분임을 확인할 수 있었다. Compound K는 전환처리 시간을 경과할 수록 높은 전환효율을 보였다.(Fig. 51)

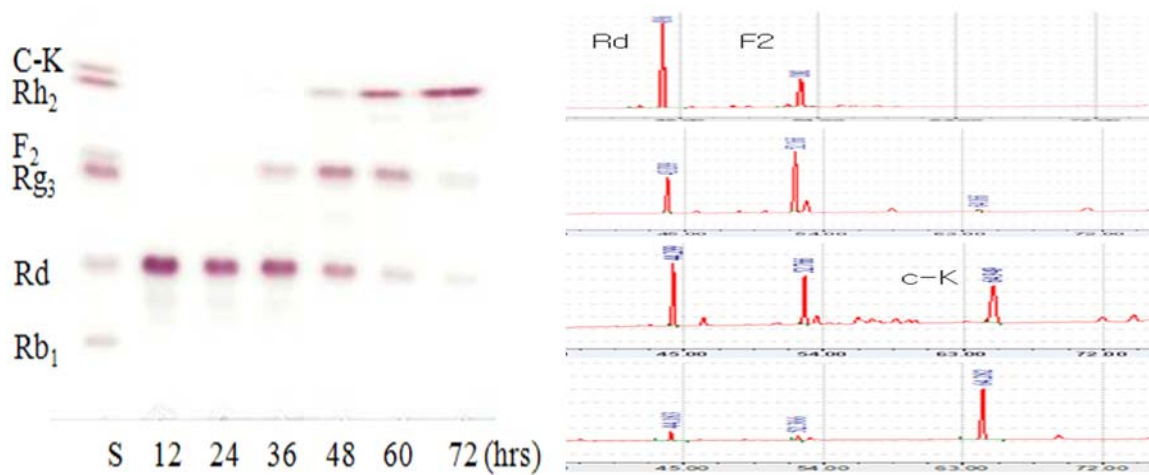


Fig. 51. 균주의 생장에 따른 사포닌 전환활성 분석.

Table 16. 균주의 compound K 전환활성분석을 위한 HPLC 정량분석

Reaction time(h)	Transformed ginsenosides (ug)		
	Rd	F2	C-K
0	200	0	0
36	146	24	0
48	46	123	3
60	40	57	53
72	5	16	115

14. 천연 식품소재를 이용한 최적 균 성장 배지 개발

발효산물이 식품으로 사용하기 위해서는 합성원료나 무기염류의사용이 제한되고 있어서 본 연구는 천연 식품소재를 이용하여 probiotic Lactic acid bacteria를 배양하고자 하였고, 그중 일차적으로 조성된 천연배지에서의 생육을 조사한바 있다. 천연배지의 소재들 더욱 다양하고 사포닌 전환에 효과가 있는 보다 다양한 prebiotic의 개발이 절실히 요구 되고 있어 향후 실험에서 최적의 천연 배지 조성과 그에 따른 사포닌 전환 양상을 조사하고 효능에 미치는 영향도 조사하고자 하였다.

다양한 식품 소재를 이용한 농도 구성을 달리하여 분리균주 및 유산균의 성장을 조사한 결과(Tables 17-18) 최적의 식품 소재 천연재료의 구성비를 제시하였고 이를 통한 사포닌 전환 능 또한 조사하였다. 현재 유산균 배지로 잘 알려진 MRS배지는 매우 고가로 수입되는 것을 사용하고 있다. 본 실험은 국내에서 흔하고 값싸게 구입하여 실시할 수 있는 장점이 있으며 식품으로 사용하지 못하는 MRS에 비해 식품으로 사용할 수 있는 식재료를 이용한 경우 경제적이면서도 상업화가 가능한 배지 로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.(Fig. 52-53)

또한 본 내용을 기초로 유산균이 최적으로 성장할수 있는 천연배지를 소개하고 이를 scale up 할 경우 그 경제적 가치는 더 높ی 평가될 것으로 사료된다.

6 different Media composition

<p style="text-align: center;">Media—2</p> <p>Glucose-----20 gm/L</p> <p>Yeast cell-----10 gm/L</p> <p>Lentil-----5 gm/L</p> <p>Cabbage-----2 gm/L</p> <p>Raddish-----2 gm/L</p> <p>NaCl-----1 gm/L</p> <p>K₂HPO₄-----1 gm/L</p>	<p style="text-align: center;">Media—3</p> <p>Glucose-----20 gm/L</p> <p>Yeast cell-----10 gm/L</p> <p>Lentil-----5 gm/L</p> <p>Cabbage-----2 gm/L</p> <p>NaCl-----1 gm/L</p> <p>K₂HPO₄----- 1 gm/L</p>	<p style="text-align: center;">Media—4</p> <p>Glucose-----20 gm/L</p> <p>Yeast cell-----10 gm/L</p> <p>Lentil-----5 gm/L</p> <p>Cabbage-----2 gm/L</p>
<p style="text-align: center;">Media—5</p> <p>Glucose-----20 gm/L</p> <p>Yeast cell-----10 gm/L</p> <p>NaCl-----1 gm/L</p> <p>K₂HPO₄----- 1 gm/L</p>	<p style="text-align: center;">Media—6</p> <p>Glucose-----15 gm/L</p> <p>Yeast cell-----10 gm/L</p> <p>Lentil-----5 gm/L</p> <p>Cabbage-----5 gm/L</p> <p>Radish-----5 gm/L</p>	<p style="text-align: center;">Media—7</p> <p>MRS-----55 gm/L</p> <p style="text-align: center;">All media pH 6.5 maintain by using Sodium acetate or HCL</p>

Fig. 52. 천연 식품소재를 이용한 최적 균 성장 배지 개발

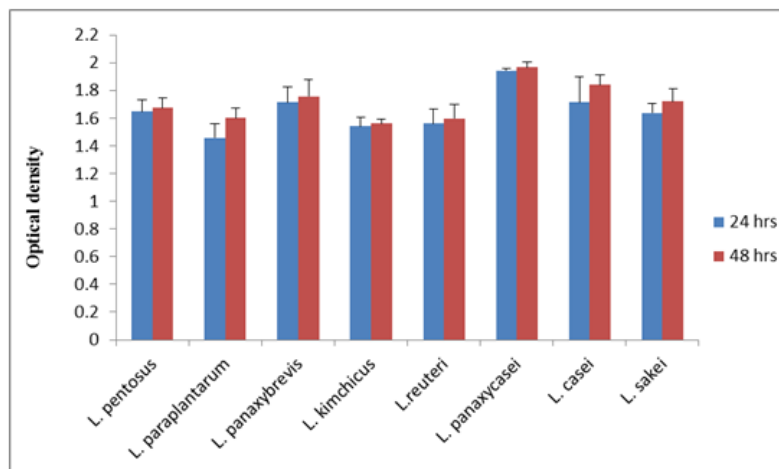
Table 17. 천연식품소재를 이용한 발효배양액 조성 및 균주생장

Strain	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6	M-7	
DCY 51 L.panaxibrevis (JW02)	0.680	0.538	0.	0.007	0.109	1.030	1th
	1.268	1.197	1.003	0.552	1.402	2.019	
	H117	0.674	1.173	0.838	0.075	0.105	
DCY 51 L.panaxibrevis (JW02)	0.701	1.036	0.	.007	.031	1.948	2nd
	1.382	1.497	1.565	.602	1.504	3+	
	H117	0.797	1.478	1.338	.311	1.171	
DCY 51 L.panaxibrevis (JW02)	0.719	1.482	0.368	0.004	0.389	1.957	3rd
	1.410	1.445	1.384	0.624	1.460	3+	
	H117	0.815	1.401	1.179	0.315	1.623	

Table 18. Growth rate of isolated strains(LAB) in different natural media.

Data represent means ± standard deviation (SD) among the replicates. g/l, gram per litre

Medium	Radish (g/l)	Cabbage (g/l)	Glucose (g/l)	Sucrose (g/l)	Yeast extract (g/l)	Optical density (OD) at 600nm		
						24 (h)	48 (h)	72 (h)
1	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.995 ± 0.027	1.097 ± 0.134	1.017 ± 0.179
2	20.00	0.00	10.00	0.00	10.00	1.643 ± 0.042	1.756 ± 0.063	1.470 ± 0.092
3	20.00	0.00	20.00	0.00	10.00	1.805 ± 0.070	1.950 ± 0.098	1.967 ± 0.133
4	20.00	0.00	0.00	20.00	10.00	1.608 ± 0.090	1.676 ± 0.069	1.462 ± 0.057
5	20.00	0.00	20.00	0.00	5.00	1.515 ± 0.119	1.666 ± 0.050	1.314 ± 0.183
6	30.00	0.00	20.00	0.00	10.00	1.753 ± 0.089	1.886 ± 0.083	1.862 ± 0.035
7	10.00	0.00	20.00	0.00	10.00	1.641 ± 0.124	1.783 ± 0.067	1.772 ± 0.093
8	5.00	0.00	20.00	0.00	10.00	1.047 ± 0.212	0.957 ± 0.096	0.892 ± 0.063
9	0.00	5.00	20.00	0.00	10.00	1.496 ± 0.023	1.497 ± 0.011	1.453 ± 0.006
10	0.00	10.00	20.00	0.00	10.00	1.505 ± 0.016	1.719 ± 0.134	1.674 ± 0.063
11	0.00	20.00	20.00	0.00	10.00	1.365 ± 0.093	1.511 ± 0.111	1.620 ± 0.057
12	5.00	5.00	20.00	0.00	10.00	1.594 ± 0.074	1.599 ± 0.082	1.572 ± 0.064
13	10.00	10.00	20.00	0.00	10.00	1.728 ± 0.070	1.736 ± 0.060	1.683 ± 0.065
14	10.00	5.00	20.00	0.00	10.00	1.667 ± 0.062	1.683 ± 0.069	1.672 ± 0.064
MRS						2.282 ± 0.093	2.459 ± 0.033	2.496 ± 0.032



<i>L. pentosus</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. panaxybrevis</i>	<i>L. kimchicus</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. panaxycasei</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. sakei</i>	Time
1.647±0.124	1.456±0.145	1.7135±0.155	1.5415±0.89	1.562±0.146	1.943±0.019	1.714±0.256	1.6375±0.98	24hrs
1.6745±0.095	1.602±0.098	1.756±0.168	1.562±0.041	1.5955±0.144	1.967±0.051	1.8405±0.099	1.7215±0.125	48hrs

Fig. 53. Growth of other lactic acid bacteria in optimal medium.

15. 소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 유효성분이 강화된 맞춤형 제형 개발

가. 회귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K)가 증강된 발효홍삼농축액 시제품 제조

(1) 연구 목적

본 연구는 회귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K)가 증강된 발효홍삼농축액 시제품 제조하는 것을 목적으로 한다.

(2) 연구 방법

(가) 추출 조건 확립 : 용매와 온도에 따른 최적 방법 검토

(나) 여과 조건 확립 : 여과/원심분리/Trap Filter 등 고려

(다) 농축 조건 확립 : 진공감압건조기를 통한 최적의 농축 조건 확립

(라) 보관 조건 확립 : 분말/액상 제형의 온도에 따른 보관방법 개발

(마) 안전성 검사 : 잔류농약검사, 중금속 검사, 미생물 검사

(바) 유통기한 설정

(사) 패키징단위 설정 및 디자인 개발

(아) 공전에 준한 제품 품질검사

(3) 연구 결과

(가) 추출 조건 확립

본 실험에서는 홍삼의 추출 조건에 따른 홍삼 추출물의 제조공정을 비교하여, 최적 조건을 확립하고자 하였다. 산업 현장에서 사용 되는 추출기(Fig.54)을 이용하여 홍삼 추출물의 용매와 온도를 고려하였다. 통상적으로 식약청에서 허용하는 용매는 물과, 주정(알코올)을 추출용매로 허용하고 있다. 물은 사용이 용이한 점이 있지만 식수관리 등의 정도 관리가 필요하고 주정(알코올)에 비해 추출 수율이 떨어지며, 끓는점이 높기 때문에 가열 추출을 한다면 고비용의 에너지 사용이 요구되는 단점이 있다. 반면에 주정(알코올)의 경우는 초기 구매 비용을 감안하면 물에 비해 추출수율도 매우 우수하며 정도 관리가 용이하다. 또한 추출 후 농축시 회수가 가능해 재사용이 가능해지므로 초기 구매 비용의 부담을 없앨 수 있으며, 물보다 끓는점이 현저하게 낮기 때문에 가열 추출시 저에너지의 비용이 들어가므로 물에 비해 비용 절감이 탁월하게 우수하다. 그러나 발효에 있어서 주정(알코올) 추출물에 있어서 발효미생물의 생육에 영향을 미친다. 그래서 홍삼의 추출조건은 물을 사용, 80~85℃로 최적 조건을 확립하였다.



Fig. 54. 현장 사용 추출기

Table 19. 인삼 추출물의 온도 및 시간 조건 별 수율 측정

온도 \ 시간	4시간	6시간	8시간	10시간
60~65℃	50%	54%	60%	60%
70~75℃	54%	60%	63%	63%
80~85℃	57%	62%	65%	65%
90~95℃	60%	63%	65%	65%

(나) 여과 조건 확립

홍삼추출물 여과 조건 확립에 있어 여과, 원심분리, Trap filter 등을 조사하고 현 국내 공장에서 사용하는 여과 제조조건에 적용에 본 결과 현재 추출공장에서 널리 사용하고 있는 원통형 하우징방식의 여과를 이용하여 여과를 실시하였다. 사용하는 필터는 1차 메쉬망 필터로 100 메쉬, 2차 부터는 micro filter로 100~150 micro 그리고 최종적으로 25 micro 이하로 사용하는 여과조건을 확립하였다.

(다) 농축 조건 확립

홍삼추출물의 농축조건은 현 제조공장에서 사용되고 있는 농축방식에 적용하여 생산한 결과 양호한 것으로 나와 진공 환류냉각방식으로 추출액을 용기에 넣고 일정한 온도와 압력(농축 온도 : 60℃이하, 감압 : 800~950mm/Hg)을 유지시켜 증발하는 증기를 환류 냉각장치로 유입시켜 냉각수에 의해 증기를 응축시켜 외부로 배출되고 추출물만 남게 되는 방식으로 확립하였다.

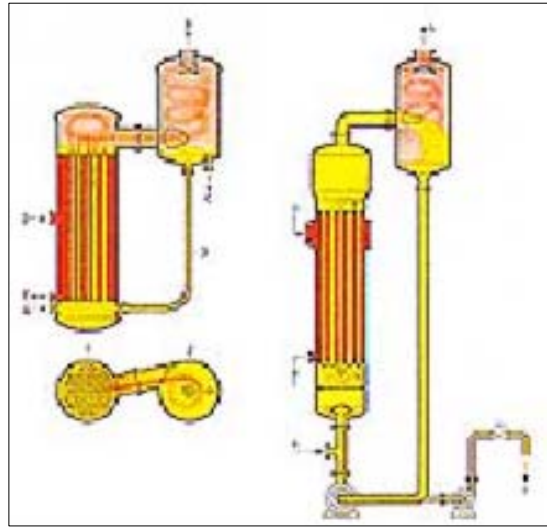


Fig. 55. 현장 사용 농축기의 모식도

(라) 보관 조건 확립

식품의 보관이란 그 품질이 오랫동안 변지 않도록 유지 시키는 것을 말한다. 여기서 품질이란 성분상 품질과 기호성 품질 모두를 말한다. 그러므로 유효성 부분과 미생물 생육조건 등을 고려하여 보관 방법을 식품공전, 건강기능식품공전, 그리고 현재 사용 되고 있는 원료 및 제품 포장 등을 고려하여 설정하였다. 분말의 보관방법은 수분 함량이 8%이하이므로 (평균 3% 이하) 직사광선이 침투하지 못하는 포장에 온도는 상온(15~25℃) 보관이 비용부분까지 고려해서 최적이며 액상제형은 원료는 벌크타입을 포장하는 포장이 밀봉 부분에서 아직 완전하지 못하여 냉장(0~5℃, 식품기준은 10℃ 기준)보관이 최적이며 제품화 하였을 시에는 제품의 제조공정과 밀봉포장을 고려하여 상온 보관한다.

원료선별 및 칭량	1.원료의 이물 등을 선별한다. 2.원료확인 후 비율에 맞게 칭량한다.	*검사성적서, 원산지 증명서, 경작확인서 확인
추 출	1.칭량한 원료를 추출기에 넣고 물을 일정 비율 투입한 후 75~80℃의 온도에서 8시간 추출한다.(4회 반복 추출)	*추출기 *주정계
여 과	1.추출액을 백필터와 카트리지 여과필터를 이용하여 여과한다.	*하우징
농 축	1.추출한 액을 감압농축한다.(60℃이하, 800~950mmHg)	*농축기
살 균	1.농축한 홍삼농축액을 80~90℃에서 1시간 정도 살균한다.	
발 효	1.홍삼농축액을 일정 Brix까지 낮춘 후 효소 및 발효균을 투입 하여 발효시킨다.	*발효조
멸 균	1.발효가 완료된 액을 온도 95~100℃에서 1시간 멸균한다.	
농 축	1.멸균한 액을 일정 Brix 까지 농축한다.(60~65Brix)	*농축기
충 전	1.일정 용기(PE, 유리병)에 자동 충전한다.	*전자저울
포 장	1.충전한 발효홍삼농축액을 포장한다.	
검 사	1.건강기능식품공전에 준하여 자가품질검사를 실시한다. (검사항목:성상, 진세노사이드Rb1+Rg1합, 대장균군, 세균수)	
출 하	1.자가품질검사에 적합한 제품에 한하여 출하한다.	

Fig. 56. 발효홍삼농축액 제조공정

(마) 안전성 검사 : 잔류농약검사, 중금속 검사, 미생물 검사

발효홍삼농축액의 농약잔류성을 조사하기 위해서 식품공전(2014)의 시험법에 따라서 34종에 대한 농약잔류시험 분석을 한 결과 시험항목 등을 전혀 검출이 되지 않았다(표 1).

Table 20. 발효홍삼농축액의 농약잔류시험

시험항목	기준규격	결과	판정
DDT(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Metalaxyl(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Aldrin&Dieldrin	0.1 and less	Not detected	Pass
BHC(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Endrin(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Carbendazim(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Quintozene(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Difenoconazole(ppm)	0.5 and less	Not detected	Pass
Cypermethrin(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Azoxystrobin(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Tolyfluanid(ppm)	0.01 and less	Not detected	Pass
Tolclofos-methyl(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
lminoctadine(ppm)	0.5 and less	Not detected	Pass
Pyrimethanil(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Fenhexamid(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Cyazofamid(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Cyprodinil(ppm)	5.0 and less	Not detected	Pass
Kresoxim-methyl(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Diethofencarb(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Carbosulfan(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Trifloxystrobin(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Pencycuron(ppm)	0.7 and less	Not detected	Pass
Ethylenebis(dithiocarbamate)s(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Fludioxonil(ppm)	3.0 and less	Not detected	Pass
Cyfluthrin(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Chloothalonil(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Tefluthrin(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Fluquinconazole(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Cymoxyanil(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Tebupirimfos(ppm)	0.01 and less	Not detected	Pass
Flutolanil(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Thifluzamide(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Dimethomorth(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Cadusafos(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass

식품공전(2014)의 시험법에 따라서 홍삼으로부터 추출하여 농축한 발효홍삼농축액의 금속 함유여부를 조사하기 위해서 4종의 납(Pb), 비소(As), 카드뮴(Cd), 수은(Hg)의 잔류성을 분석하였다. 그 결과 위 4가지 중금속은 발효홍삼농축액에서는 기준치 이상으로는 검출이 되지 않았다(Table 21).

Table 21. 발효홍삼농축액의 중금속 성분분석

시험 항목	시험기준	시험결과
납(Pb)	1.0 mg/kg 이하	불검출
비소(As)	1.0 mg/kg 이하	불검출
카드뮴(Cd)	1.0 mg/kg 이하	불검출
수은(Hg)	1.0 mg/kg 이하	불검출

발효홍삼농축액의 안전성 조사를 위해서 그람 음성 세균인 대장균군과 일반세균을 조사하였다(식품공전 2014). 발효홍삼농축액을 멸균증류수에 처리한 후 각 단계 희석액 1 ml를 접종한 대장균군 건조필름배지에 접종한 후 잘 흡수시키고, 36±1℃ incubator에서 24시간 배양하였다. 필름에 생성된 붉은 집락 중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락수를 조사한 결과 발효홍삼농축액에서는 전혀 대장균군 및 세균군이 검출되지 않았다(Table 22).

Table 22. 발효홍삼농축액 미생물 검사

시험 항목	시험기준	시험결과	판정
대장균군	음성이어야 한다	음성	적합
세균수	3000 cfu/ml 이하	0/ml	적합

(바) 유통기한 설정

홍삼제품은 보관기간 중에 열과 산 그리고 빛에 의해서 홍삼의 유효성분 함량이 변화되고 내용물이 변질 될 가능성이 있다. 그래서 실온에서 보관하는 조건하에 장기보관의 안전성을 확인하기 위해 식품공전 및 건강기능식품 공전에서 규정하는 방법으로 유통기한 설정 시험인 가속시험을 실시하였으며 아레니우스식을 이용하여 산출한 결과 최대 38개월의 유통기한을 얻었다(Table 23-24).

㉞ 가속시험 방법

- ① 저장조건 : 25±2℃/상대습도 60±5%를 대조구로 하여 30±2℃, 40±2℃, 45±2℃/상대습도 75±5% 중에서 최소 2개 온도 이상을 선택하거나 장기보존시험 저장 온도 +15℃ 이상 (온도에 따른 적절한 상대습도 고려)으로 한다.

- ② 시험기간 : 6개월 이상을 원칙으로 한다.
- ③ 측정시기 : 최소 시험을 포함하여 일정한 간격의 4-6개 시점 이상으로 한다.
- ④ 시험횟수 : 각 시험항목 별로 로트당 3회 이상 실시하여 그 평균치를 사용한다.

㉞ 가속실험 결과

Table 23. 소실속도상수(-기울기 ; k)의 계산

보관 온도	개월	C	lnC	b:y절편	m:기울기	직선의방정식	k
25℃	0	4.4	1.481605	1.48542931	-0.005583	y = -0.005583 t + 1.4854293	0.005583
	1	4.4	1.481605				
	4	4.35	1.470176				
	6	4.25	1.446919				
30℃	0	4.4	1.481605	1.48551549	-0.008165	y = -0.008165 t + 1.4855155	0.008165
	1	4.4	1.481605				
	4	4.28	1.453953				
	6	4.2	1.435085				
40℃	0	4.4	1.481605	1.47957041	-0.0122461	y = -0.012246 t + 1.4795704	0.012246
	1	4.34	1.467874				
	4	4.15	1.423108				
	6	4.1	1.410987				

Table 24. 유통기간의 산출

℃	k	lnk (Y)	T(273+보관온도)	1/T (X)	x 1000
25	0.00558303	-5.18802363	298	0.003355705	3.36
30	0.008165031	-4.8078947	303	0.00330033	3.30
40	0.012246133	-4.40254511	313	0.003194888	3.19

※ 직선의방정식 : Y = -4747.21237 X + 10.788653

℃	(1/T)*1000	lnk (Y)
25	3.19	-5.18802363
30	3.30	-4.80789
40	3.36	-4.40254511

*잔존함량이 표시함량의80%가 될 때까지의 기간(t_{80})은 아래의 방정식으로부터 구한다

$$t_{80} = \frac{1}{k_{25}} \times \ln \left(\frac{C_0}{C} \right)$$

C_0 : 초기농도(%)
 C : 허용농도(%)

*상온(25℃)에서의 소실속도상수

$$\ln k_{25} = -4747.212374 \left(\frac{1}{273 + 25} \right) + 10.788653$$

$$\ln k_{25} = -5.1415896$$

$$k_{25} = 0.0058484$$

$$t_{\text{실감}90\%} = \frac{1}{0.0058484} \times \ln \left(\frac{4.4}{3.52} \right) = 38.2 \text{ 개월}$$

(바) 패키징단위 설정 및 디자인 개발



Fig. 57. 발효홍삼농축액의 패키징단위 및 디자인.

(사) 공전에 준한 제품 품질검사

발효홍삼농축액제품은 성상이 갈색의 액상제품으로서 이미, 이취가 없어야하고 건강기능식품으로서 인정을 받기 위해서는 일정수준이상의 사포닌(ginsenoside Rg1과 Rb1, Rg3의 합(2.4 ~ 34 mg/g)이 함유되어 있어야 한다. 또한 대장균군은 음성이여야 하며, 세균수는 3000cfu/ml 이하이어야 한다. 발효홍삼농축액제품의 기준규격 시험을 분석한 결과 모두 만족하는 결과를 얻을 수 있었다(Table 25).

Table 25 . 발효홍삼농축액 제품의 기준규격시험분석

시험 항목	시험기준	시험결과	판정
성상	고유의 색택과 양미를 가지며 이미·이취가 없어야 함	흑갈색의 점조성 액상제품으로 이미·이취가 없음	적합
Rg1과 Rb1, Rg3의 합	표시량(4 mg/g)의 80%이상	4.4 mg/g	적합
대장균군	음성	음성	적합
세균수	3000 cfu/ml 이하	0/ml	적합

나. 희귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K)가 증강된 발효홍삼농축분말 시제품 제조

(1) 연구 목적

본 연구는 희귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K)가 증강된 발효홍삼농축분말 시제품 제조하는 것을 목적으로 한다.

(2) 연구 방법

- (가) 추출 조건 확립 : 용매와 온도에 따른 최적 방법 검토
- (나) 여과 조건 확립 : 여과/원심분리/Trap Filter 등 고려
- (다) 농축 조건 확립 : 진공감압건조기를 통한 최적의 농축 조건 확립
- (라) 건조 조건 확립 : 열풍건조/동결건조/분무건조 방법 검토
- (마) 보관 조건 확립 : 분말/액상 제형의 온도에 따른 보관방법 개발
- (바) 안전성 검사 : 잔류농약검사, 중금속 검사, 미생물 검사
- (사) 유통기한 설정
- (아) 패키징단위 설정 및 디자인 개발
- (자) 공전에 준한 제품 품질검사

(3) 연구 결과

(가) 추출 조건 확립

본 실험에서는 홍삼의 추출 조건에 따른 홍삼 추출물의 제조공정을 비교하여, 최적 조건을 확립하고자 하였다. 산업 현장에서 사용 되는 추출기(Fig.1)을 이용하여 홍삼 추출물의 용매와 온도를 고려하였다. 통상적으로 식약청에서 허용하는 용매는 물과, 주정(알코올)을 추출용매로 허용하고 있다. 물은 사용이 용이한 점이 있지만 식수관리 등의 정도 관리가 필요하고 주정(알코올)에 비해 추출 수율이 떨어지며, 끓는점이 높기 때문에 가열 추출을 한다면 고비용의 에너지 사용이 요구되는 단점이 있다. 반면에 주정(알코올)의 경우는 초기 구매 비용을 감안하면 물에 비해 추출수율도 매우 우수하며 정도 관리가 용이하다. 또한 추출 후 농축시 회수가 가능해 재사용이 가능해지므로 초기 구매 비용의 부담을 없앨 수 있으며, 물보다 끓는점이 현저하게 낮기 때문에 가열 추출시 저에너지의 비용이 들어가므로 물에 비해 비용 절감이 탁월하게 우수하다. 그러나 발효에 있어서 주정(알코올) 추출물에 있어서 발효미생물의 생육에 영향을 미친다. 그래서 홍삼의 추출조건은 물을 사용, 80~85℃로 최적 조건을 확립하였다.

(나) 여과 조건 확립

홍삼추출물 여과 조건 확립에 있어 여과, 원심분리, Trap filter 등을 조사하고 현 국내 공장에서 사용하는 여과 제조조건에 적용에 본 결과 현재 추출공장에서 널리 사용하고 있는 원통형 하우스방식의 여과를 이용하여 여과를 실시하였다. 사용하는 필터는 1차 메쉬망 필터로 100 메쉬, 2차 부터는 micro filter로 100~150 micro 그리고 최종적으로 25 micro 이하로 사용하는 여과조건을 확립하였다.

(다) 농축 조건 확립

홍삼추출물의 농축조건은 현 제조공장에서 사용되고 있는 농축방식에 적용하여 생산한 결과 양호한 것으로 나와 진공 환류냉각방식으로 추출액을 용기에 넣고 일정한 온도와 압력(농축온도 : 60℃이하, 감압 : 800~950mm/Hg)을 유지시켜 증발하는 증기를 환류 냉각장치로 유입시켜 냉각수에 의해 증기를 응축시켜 외부로 배출되고 추출물만 남게 되는 방식으로 확립하였다

(라) 건조 조건 확립

최적화 건조조건은 생산현장 최적 조건과 경제성을 고려해야 하기에 열풍건조방식으로 열풍 건조조건을 선택하였으며 그 조건으로는 고품분 함량이 32±3% 로 농축한 농축액으로 40℃이하로 20~24h 급속냉각 시킨 후 건조조건: 온도: IN: 200℃ OUT: 98℃에서 건조한다.

(마) 보관 조건 확립

식품의 보관이란 그 품질이 오랫동안 변지 않도록 유지 시키는 것을 말한다. 여기서 품질이란 성분상 품질과 기호성 품질 모두를 말한다. 그러므로 유효성 부분과 미생물 생육조건 등을 고려하여 보관 방법을 식품공전, 건강기능식품공전, 그리고 현재 사용 되고 있는 원료 및 제품 포장 등을 고려하여 설정하였다. 분말의 보관방법은 수분 함량이 8%이하이므로 (평균 3% 이하) 직사광선이 침투하지 못하는 포장에 온도는 상온(15~25℃) 보관이 비용부분까지 고려해서 최적이며 액상제형은 원료는 벌크타입을 포장하는 포장이 밀봉 부분에서 아직 완전하지 못하여 냉장(0~5℃, 식품기준은 10℃ 기준)보관이 최적이며 제품화 하였을 시에는 제품의 제조공정과 밀봉포장을 고려하여 상온 보관한다.

원료선별 및 칭량	1.원료의 이물 등을 선별한다. 2.원료확인 후 비율에 맞게 칭량한다.	*감사성적서, 원산지 증명서, 경작확인서 확인
추 출	1.칭량한 원료를 추출기에 넣고 물을 일정 비율 투입한 후 75~80℃의 온도에서 8시간 추출한다.(4회 반복 추출)	*추출기 *주정계
여 과	1.추출액을 백필터와 카트리지 여과필터를 이용하여 여과한 다.	*하우징
농 축	1.추출한 액을 감압농축한다.(60℃이하, 800~950mmHg)	*농축기
살 균	1.농축한 홍삼농축액을 80~90℃에서 1시간 정도 살균한다.	
발 효	1.홍삼농축액을 일정 Brix까지 낮춘 후 효소 및 발효균을 투 입하여 발효시킨다.	*발효조
멸 균	1.발효가 완료된 액을 온도 95~100℃에서 1시간 멸균한다.	
농 축	1.멸균한 액을 일정 Brix 까지 농축한다.(60~65Brix)	*농축기
건 조	1.열풍건조기에서 건조조건 온도 IN 200℃, OUT 98℃으로 건 조한다.	
충 전	1.일정 용기(PE, PP)에 자동 충전한다.	*전자저울
포 장	1.충전한 발효홍삼농축분말을 포장한다.	
검 사	1.건강기능식품공전에 준하여 자가품질검사를 실시한다. (검사항목:성상, 진세노사이드Rb1+Rg1합, 대장균군)	
출 하	1.자가품질검사에 적합한 제품에 한하여 출하한다.	

Fig. 58. 발효홍삼농축분말 제조공정

(바) 안전성 검사 : 잔류농약검사, 중금속 검사, 미생물 검사

홍삼의 농약잔류성을 조사하기 위해서 식품공전(2014)의 시험법에 따라서 34종에 대한 농약잔류시험 분석을 한 결과 시험항목 등을 전혀 검출이 되지 않았다(Table 26).

Table 26. 발효홍삼농축분말의 농약잔류시험

시험항목	기준규격	결과	판정
DDT(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Metalaxyl(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Aldrin&Dieldrin	0.1 and less	Not detected	Pass
BHC(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Endrin(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Carbendazim(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Quintozene(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Difenoconazole(ppm)	0.5 and less	Not detected	Pass
Cypermethrin(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Azoxystrobin(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Tolyfluanid(ppm)	0.01 and less	Not detected	Pass
Tolclofos-methyl(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
lminoctadine(ppm)	0.5 and less	Not detected	Pass
Pyrimethanil(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Fenhexamid(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Cyazofamid(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Cyprodinil(ppm)	5.0 and less	Not detected	Pass
Kresoxim-methyl(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Diethofencarb(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Carbosulfan(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Trifloxystrobin(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Pencycuron(ppm)	0.7 and less	Not detected	Pass
Ethylenebis(dithiocarbamate)s(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Fludioxonil(ppm)	3.0 and less	Not detected	Pass
Cyfluthrin(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Chloothalonil(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Tefluthrin(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Fluquinconazole(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Cymoxyanil(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Tebupirimfos(ppm)	0.01 and less	Not detected	Pass
Flutolanil(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Thifluzamide(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Dimethomorth(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Cadusafos(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass

식품공전(2014)의 시험법에 따라서 홍삼으로부터 추출하여 농축한 발효홍삼농축분말의 중금속 함유여부를 조사하기 위해서 4종의 납(Pb), 비소(As), 카드뮴(Cd), 수은(Hg)의 잔류성을 분석하였다. 그 결과 위 4가지 중금속은 발효홍삼농축분말에서는 기준치 이상으로는 검출이 되지 않았다(Table 27).

Table 27. 발효홍삼농축분말의 중금속 성분분석

시험 항목	시험기준	시험결과
납(Pb)	1.0 mg/kg 이하	불검출
비소(As)	1.0 mg/kg 이하	불검출
카드뮴(Cd)	1.0 mg/kg 이하	불검출
수은(Hg)	1.0 mg/kg 이하	불검출

발효홍삼농축분말의 안전성 조사를 위해서 그람 음성 세균인 대장균군과 일반세균을 조사하였다(식품공정 2014). 발효홍삼농축분말을 멸균증류수에 처리한 후 각 단계 회석액 1 ml를 접종한 대장균군 건조필름배지(배지 54)에 접종한 후 잘 흡수시키고, 36±1℃ incubator에서 24시간 배양하였다. 필름에 생성된 붉은 집락 중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락수를 조사한 결과 발효홍삼농축분말에서는 전혀 대장균군 및 세균군이 검출되지 않았다(Table 28).

Table 28. 발효홍삼농축분말 미생물 검사

시험 항목	시험기준	시험결과	판정
대장균군	음성이어야 한다	음성	적합
세균수	100 cfu/ml 이하	0/ml	적합

(사) 유통기한 설정

홍삼제품은 보관기간 중에 열과 산 그리고 빛에 의해서 홍삼의 유효성분 함량이 변화되고 내용물이 변질 될 가능성이 있다. 그래서 실온에서 보관하는 조건하에 장기보관의 안전성을 확인하기 위해 식품공전 및 건강기능식품 공전에서 규정하는 방법으로 유통기한 설정 시험인 가속시험을 실시하였으며 아레니우스식을 이용하여 산출한 결과 최대 41개월의 유통기한을 얻었다(Table 29-30).

㉞ 가속실험 방법

- ① 저장조건 : 25±2℃/상대습도 60±5%를 대조구로 하여 30±2℃, 40±2℃, 45±2℃/ 상대습도 75±5% 중에서 최소 2개 온도 이상을 선택하거나 장기보존시험 저장온도 +15℃ 이상 (온도에 따른 적절한 상대습도 고려)으로 한다.
- ② 시험기간 : 6개월 이상을 원칙으로 한다
- ③ 측정시기 : 최소 시험을 포함하여 일정한 간격의 4-6개 시점 이상으로 한다.
- ④ 시험횟수 : 각 시험항목 별로 로트당 3회 이상 실시하여 그 평균치를 사용한다.

㉟ 가속실험 결과

Table 29. 소실속도상수(-기울기 ; k)의 계산

보관 온도	개월	C	lnC	b:y절편	m:기울기	직선의방정식	k
25℃	0	7.2	1.974081	1.97672218	-0.0047929	y = -0.004793 t + 1.9767222	0.004793
	1	7.2	1.974081				
	4	7.1	1.960095				
	6	7	1.945910				
30℃	0	7.2	1.974081	1.98016431	-0.0093223	y = -0.009322 t + 1.9801643	0.009322
	1	7.2	1.974081				
	4	7.05	1.953028				
	6	6.8	1.916923				
40℃	0	7.2	1.974081	1.97570128	-0.0147113	y = -0.014711 t + 1.9757013	0.014711
	1	7.12	1.962908				
	4	6.8	1.916923				
	6	6.6	1.887070				

Table 30. 유통기간의 산출

℃	k	lnk (Y)	T(273+보관온도)	1/T (X)	x 1000
25	0.004792886	-5.34062258	298	0.003355705	3.36
30	0.009322269	-4.67534929	303	0.00330033	3.30
40	0.014711284	-4.21914044	313	0.003194888	3.19

※ 직선의 방정식 : $Y = -6624.72451 X + 17.008179$

℃	(1/T)*1000	lnk (Y)
25	3.19	-5.34062258
30	3.30	-4.67535
40	3.36	-4.21914044

*잔존함량이 표시함량의 80%가 될 때까지의 기간(t_{80})은 아래의 방정식으로부터 구한다

$$t_{80} = \frac{1}{k_{25}} \times \ln \left(\frac{C_0}{C} \right)$$

C_0 : 초기농도(%)
 C : 허용농도(%)

*상온(25℃)에서의 소실속도상수

$$\ln k_{25} = -6624.724513 \times \left(\frac{1}{273 + 25} \right) + 17.008179$$

$$\ln k_{25} = -5.2224398$$

$$k_{25} = 0.0053942$$

$$t_{\text{실량}90\%} = \frac{1}{0.0053942} \times \ln \left(\frac{7.2}{5.76} \right) = 41.4 \text{ 개월}$$

(아) 패키징단위 설정 및 디자인 개발



Fig. 59. 발효홍삼농축분말의 패키징단위 및 디자인.

(자) 공전에 준한 제품 품질검사

발효홍삼농축분말제품은 성상이 갈색의 분말제품으로서 이미, 이취가 없어야하고 건강기능식품으로서 인정을 받기 위해서는 일정수준이상의 사포닌(ginsenoside Rg1과 Rb1, Rg3의 합(2.4 ~ 34 mg/g)이 함유되어 있어야 한다. 또한 대장균군은 음성이어야 한다. 발효홍삼농축분말 시제품의 기준규격 시험을 분석한 결과 모두 만족하는 결과는 얻을 수 있었다(Table 31).

Table 31. 발효홍삼농축분말 제품의 기준규격시험분석

시험 항목	시험기준	시험결과	판정
성상	고유의 색택과 양미를 가지며 이미·이취가 없어야 함	갈색의 분말제품으로 이미·이취가 없음	적합
Rg1과 Rb1, Rg3의 합	표시량(6 mg/g)의 80%이상	7.2 mg/g	적합
대장균군	음성	음성	적합

다. 희귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K)가 증강된 발효홍삼음료 시제품 제조

(1) 1. 연구 목표

본 연구는 희귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K)가 증강된 발효홍삼음료 시제품을 제조하는 것을 목적으로 한다.

(2) 연구방법 및 결과

(가) 발효홍삼음료 포플러 설정

홍삼은 다양한 몸에 좋은 성분을 함유하고 있으나, 쓴맛이 강해 일반 여성이나 어린이가 섭취하는데 어려움이 있다. 그래서 편하게 섭취하고 여성이나 어린이가 거부감이 없는 제품을 개발하였다.

○ 원료 및 성분함량

구 분	원 료 명	배합비(%)
기능성원료	발효홍삼농축액 (Rg1과 Rb1, Rg3의 합 4 mg/g)	0.360
부원료	정제수	84.0575
	구연산	0.065
	정백당	11
	액상과당	3
	구연산나트륨	0.02
	비타민B2	0.0005
	사과산	0.1
	글리신	0.03
	니코틴산아미드	0.007
	비타민C	0.03
	솔비톨	1.2
	판토텍산칼슘	0.006
	합성착향료	0.02
	정제염	0.004

원료선별 및 칭량	1.원료의 이물 등을 선별한다. 2.원료확인 후 비율에 맞게 칭량한다.	*검사성적서, 원산지 증명서, 경작확인서 확인
추 출	1.칭량한 원료를 추출기에 넣고 물을 일정 비율 투입한 후 75~80℃의 온도에서 8시간 추출한다.(4회 반복 추출)	*추출기 *주정계
여 과	1.추출액을 백필터와 카트리지 여과필터를 이용하여 여과한다.	*하우징
농 축	1.추출한 액을 감압농축한다.(800~850mmHg)	*농축기
살 균	1.농축한 홍삼농축액을 80~90℃에서 1시간 정도 살균한다.	
발 효	1.홍삼농축액을 일정 Brix까지 낮춘 후 효소 및 발효균을 투입 하여 발효시킨다.	*발효조
멸 균	1.발효가 완료된 액을 온도 95~100℃에서 1시간 멸균한다.	
농 축	1.멸균한 액을 일정 Brix 까지 농축한다.(60~65Brix)	*농축기
혼 합	1.배합비율에 맞게 원료를 혼합탱크에서 혼합한다.	*혼합탱크
여 과	1.카트리지 필터를 사용하여 혼합액을 여과한다.	*필터여과
살 균	1.UHT를 사용하여 혼합액을 살균한다.	*UHT
충 전	1.일정 용기(PET, 유리병)에 자동 충전한다.	*전자저울, 액상충전기
포 장	1.충전한 발효홍삼음료를 포장규격에 맞게 포장한다.	
검 사	1.식품공전에 준하여 자가품질검사를 실시한다. (검사항목:성상, 홍삼성분확인, 대장균군, 세균수, 납)	
출 하	1.자가품질검사에 적합한 제품에 한하여 출하한다.	

Fig. 60. 발효홍삼음료 제조공정

(나) 유통기한 설정

일반식품 홍삼음료제품은 보관기간 중에 열과 산 그리고 빛에 의해서 내용물이 변질 될 가능성이 있다. 그래서 실온에서 보관하는 조건하에 장기보관의 안전성을 확인하기 위해 대장균과 미생물 검사를 실시하였으며 그리고 시중에 유통중인 유사제품의 일반적인 유통기한이 24개월이었다. 미생물 실험결과 미생물에 안전하였으며 유사제품을 비추어서 유통기한을 24개월로 설정하였다.(Table 32).

Table 32. 대장균 및 미생물 확인시험

구분 \ 시간	0	2개월	4개월	6개월
대장균	음성	음성	음성	음성
세균수	적합	적합	적합	적합

(다) 패키징단위 설정 및 디자인 개발



Fig. 61. 발효홍삼음료의 패키징단위 및 디자인.

(라) 공전에 준한 제품 품질검사

발효홍삼음료제품은 성상이 갈색의 액상제품으로서 이미, 이취가 없어야하고 일반식품 홍삼음료로 인정을 받기 위해서는 홍삼성분이 확인 되어야 한다. 또한 대장균은 음성이어야 한다. 발효홍삼음료제품의 기준규격 시험을 분석한 결과 모두 만족하는 결과는 얻을 수 있었다(Table 33).

Table 33. 발효홍삼음료 제품의 기준규격시험분석

시험 항목	시험기준	시험결과	판정
성상	고유의 색택과 양미를 가지며 이미·이취가 없어야 함	질은 갈색의 액상제품으로 이미·이취가 없음	적합
홍삼성분 확인	확인	확인	적합
대장균군	음성	음성	적합
세균수	100 cfu/ml 이하	0/ml	적합
납	0.3이하(mg/kg)	불검출	적합

라. 회귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K)가 증강된 발효홍삼캡슐 시제품 제조

(1) 발효홍삼캡슐 포뮬러 설정

홍삼은 다양한 몸에 좋은 성분을 함유하고 있으나, 특유의 향과 쓴맛을 가지고 있어 주로 성인을 대상으로 판매 되어 왔었다. 그리하여 홍삼 성분이 증강되어 있고, 섭취하는데 거부감이 없는 후대가 간편한 캡슐시제품을 설정하였다.

○ 원료 및 성분함량

구 분	원 료 명	배합비(%)
기능성원료	발효홍삼농축액 (Rg1과 Rb1, Rg3의 합 4 mg/g)	25
부원료	대두유	46.28
	팜유	13.4
	밀납	5
	대두레시틴	3
	스피루리나	3
	비타민E	2
	L-아르기닌	0.5
	과라나추출물분말	0.5
	마카분말	0.5
	타우린	0.5
	비타민B1염산염	0.2
	비타민B2	0.12

작업 전 확인	1. 작업자의 위생상태 및 작업기계·기구 청소확인 2. 기계기구:전자저울, 혼합기, 젤라틴농축기, 캡슐성형기, 건조기 등	작업자,기계,기구 확인
원료선별 및 칭량	1. 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물공전에 적합한 원료를 구입한다. 2. 원료확인 후 비율에 맞게 전자저울을 이용하여 칭량한다.	*원료검사성적서 확인 *전자저울
젤라틴농축	1. 1차 용해 : 정제수, 젤라틴, 글리세린을 용해탱크에 넣고 교반 후 일정 감압 진공도에서 혼합한다. 2. 2차 용해 : 1차 용해한 탱크에 이산화티타늄과 에틸바닐린 그리고 색소 등을 넣고 80℃이상을 유지하면서 2시간동안 용융시킨 후 감압하여 점도를 조정한다.	*조제 탱크
혼 합	1. 칭량한 원료를 혼합탱크에서 혼합한다.(온도 60℃이상, 4시간) (혼합 후 80mesh 체를 통과시켜 입자를 일정하게 하여 준다.)	*전자저울 *혼합탱크
균 질	1. 여과액을 콜로이드밀에 투입한 후 90분간 1,000~1,800rpm으로 균질화 한다.	*콜로이드밀
충전 및 성형	1. 캡슐 성형기를 통해 일정량 충전 성형한다. (내용물 : 500mg±15) (냉각드럼온도: 10~15℃, fill tank온도: 50~55℃ Injection wedge 온도: 30~40℃의 조건으로 충전)	*연질캡슐 성형기
건 조	1. 덤블러에서 1차 건조 한 후(1~2시간) 건조실로 옮겨서 24~48시간 건조한다. (건조실온도 : 30℃±2, 습도 : 30%이하)	*덤블러
선 별	1. 충전한 연질캡슐을 선별한다. (중량미달, 모양불량, 색상불량 등)	*선별기
PTP포장	1. 선별된 캡슐을 포장단위별로 PTP포장 한다.	*PTP포장기
포 장	1. PTP한 캡슐→케이스→카튼 순으로 포장한다.	
검 사	1. 건강기능식품공전 홍삼제품에 준하여 자가품질검사를 실시한다. (검사항목:성상, 홍삼성분, 대장균군, 세균수, 붕해도)	
출하 및 보관	1. 자가품질검사에 적합한 제품에 한하여 출하 또는 보관 관리한다.	

Fig. 62. 발효홍삼캡슐제품 제조공정

(2) 유통기한 설정

발효홍삼캡슐제품은 보관기간 중에 열과 산 그리고 빛에 의해서 홍삼의 유효성분 함량이 변화되고 내용물이 변질 될 가능성이 있다. 그래서 실온에서 보관하는 조건하에 장기보관의 안전성을 확인하기 위해 식품공전 및 건강기능식품 공전에서 규정하는 방법으로 유통기한 설정 시험인 가속시험을 실시하였으며 아레니우스식을 이용하여 산출한 결과 최대 30개월의 유통기한을 얻었다(Table 34-35).

(가) 가속시험 방법

- ① 저장조건 : 25±2℃/상대습도 60±5%를 대조구로 하여 30±2℃, 40±2℃, 45±2℃/상대습도 75±5% 중에서 최소 2개 온도 이상을 선택하거나 장기보존시험 저장온도 +15℃ 이상 (온도에 따른 적절한 상대습도 고려)으로 한다.
- ② 시험기간 : 6개월 이상을 원칙으로 한다
- ③ 측정시기 : 최소 시험을 포함하여 일정한 간격의 4-6개 시점 이상으로 한다.
- ④ 시험횟수 : 각 시험항목 별로 로트당 3회 이상 실시하여 그 평균치를 사용한다

(나) 가속시험 결과

Table 34. 소실속도상수(-기울기 ; k)의 계산

보관 온도	개월	C	lnC	b:y절편	m:기울기	직선의방정식	k
25℃	0	1	-	0.00732761	-0.0073276	y = -0.007328 t + 0.0073276	0.007328
	1	1	-				
	4	1	-				
	6	0.95	-0.051293				
30℃	0	1	-	0.00684127	-0.0099494	y = -0.009949 t + 0.0068413	0.009949
	1	1	-				
	4	0.98	- 0.020203				
	6	0.94	- 0.061875				
40℃	0	1	-	-0.0025193 6	-0.0180789	y = -0.018079 t + -0.0025194	0.018079
	1	0.98	- 0.020203				
	4	0.92	- 0.083382				
	6	0.9	- 0.105361				

Table 35. 유통기간의 산출

℃	k	lnk (Y)	T(273+보관온도)	1/T (X)	x 1000
25	0.007327613	-4.9161054	298	0.003355705	3.36
30	0.009949382	-4.61024481	303	0.00330033	3.30
40	0.018078855	-4.01301226	313	0.003194888	3.19

※ 직선의 방정식 : $Y = -5622.05699 X + 13.947696$

℃	(1/T)*1000	lnk (Y)
25	3.19	-4.9161054
30	3.30	-4.61024
40	3.36	-4.01301226

*잔존함량이 표시함량의 80%가 될 때까지의 기간(t_{80})은 아래의 방정식으로부터 구한다

$$t_{80} = \frac{1}{k_{25}} \times \ln \left(\frac{C_0}{C} \right)$$

C_0 : 초기농도(%)
 C : 허용농도(%)

*상온(25℃)에서의 소실속도상수

$$\ln k_{25} = \frac{-5622.05699}{4} \times \left(\frac{1}{273 + 25} \right) + 13.947696$$

$$\ln k_{25} = -4.9182672$$

$$k_{25} = 0.0073118$$

$$t_{\text{실감90\%}} = \frac{1}{0.0073118} \times \ln \left(\frac{1}{0.8} \right) = 30.5 \text{ 개월}$$

(다) 패키징단위 설정 및 디자인 개발

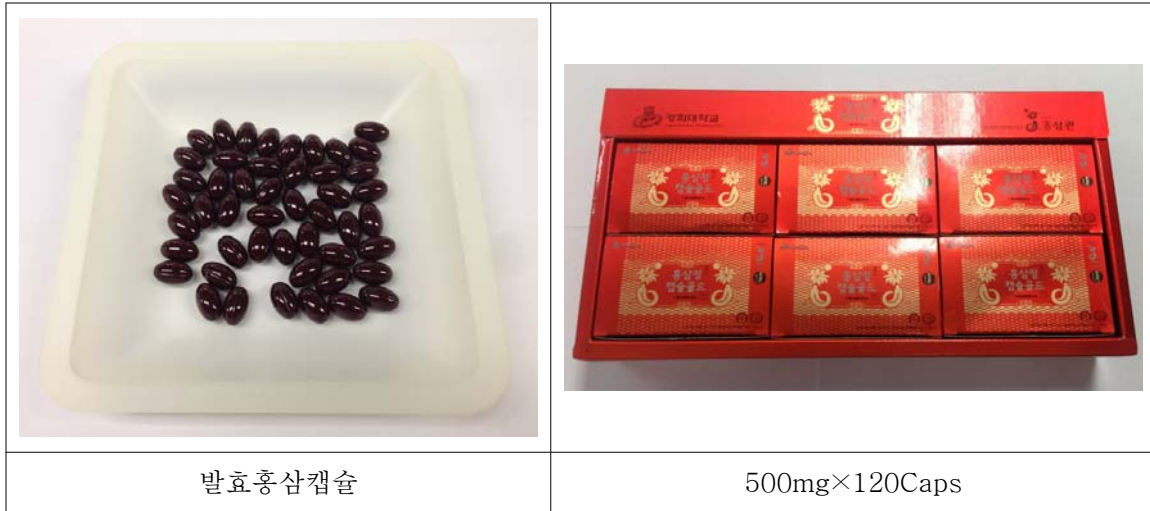


Fig 63. 발효홍삼캡슐의 패키징단위 및 디자인.

(라) 공전에 준한 제품 품질검사

발효홍삼캡슐제품은 성상이 짙은 갈색의 캡슐제품으로서 이미, 이취가 없어야하고 건강기능식품으로서 인정을 받기 위해서는 일정수준이상의 사포닌(ginsenoside Rg1과 Rb1, Rg3의 합(2.4 ~ 34 mg/g)이 함유되어 있어야 한다. 또한 대장균군은 음성이어야 한다. 발효홍삼캡슐 시제품의 기준규격 시험을 분석한 결과 모두 만족하는 결과는 얻을 수 있었다 (Table 36).

Table 36. 발효홍삼캡슐 제품의 기준규격시험분석

시험 항목	시험기준	시험결과	판정
성상	고유의 색택과 양미를 가지며 이미·이취가 없어야 함	짙은 갈색의 캡슐제품으로 이미·이취가 없음	적합
Rg1과 Rb1, Rg3의 합	표시량(1mg/g)의 80%이상	1.2 mg/g	적합
대장균군	음성	음성	적합
세균수	3000 cfu/ml 이하	0/ml	적합
붕해도	20분	20분	적합

라. 기능성 발효홍삼제품의 산업화

(1) 시제품 선호도 조사

연구개발한 희귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K)가 증강된 발효홍삼 시제품(농축액, 분말, 음료, 캡슐) 4종을 한방바이오 주식회사 고객과 미국 바이어(LA 한인타운), 중국 바이어(중국 길림성, 심양)를 상대로 선호도 조사를 한 결과 미국 바이어 및 자사 고객은 주로 농축액제품군과 파우치 음료제품군을 선호한 반면, 중국 바이어들은 대체로 분말제품군을 선호하는 경향을 보였다.

(2) 동일품목 제품 조사

		
대왕의힘발효홍삼단	보령6년근발효홍삼	한삼인발효홍삼공들
환제품	액상제품	액상제품
웅진식품	보령제약	한삼인
진세노사이드 Rg1+Rb1	홍삼성분 70mg/g	홍삼성분 70mg/g
		
광동발효홍삼진액	6년근 발효홍삼진액	발효홍삼원
액상제품	액상제품	액상제품
광동제약	경남제약	종근당건강
홍삼사포닌	홍삼	홍삼성분 50mg/g

Fig. 64. 국내유통 제품군

현재 출시되어있는 발효홍삼의 제품의 기준성분을 살펴보면 일반식품의 경우 사포닌(70mg/g)을 기준 성분으로 설정되어 있으며 현재 건강기능식품의 경우에는 진세노사이드 Rb1과 Rg1, Rg3의 합을 지표성분으로 설정되어 있다. 국내에 유통되어지는 발효홍삼 제품은 주로 액상과 파우치 제품군이 대부분을 차지하고 있다.

(3) 경제성을 고려한 적절한 가격 설정 시 고려사항

발효홍삼 시제품을 개발하여 본 바 발효공정이 추가로 들어가기 때문에 기존의 인·홍삼 제품보다 가격대가 다소 높음을 알 수 있다. 그러나 소비자들은 좀 더 저렴하지만 고품질의 제품을 원하고 있는 추세이기 때문에 생산단가를 최대한 낮추어 소비자들의 진입장벽을 낮추는데 중점을 두어야 할 것이다. 따라서 본 연구개발을 통하여 특정성분을 증강시킬 수 있는 유용균주를 직접 분리·동정하여 대량으로 배양하고, 연구개발된 시제품을 대량생산 할 수 있는 기존 GMP인증업체의 설비를 활용하여 생산단가를 최대한 낮출 수 있었다.

(4) 발효홍삼 제품의 차별화 및 마케팅 설정 및 판매

앞서 선호도 조사에서 도출된 결과를 통하여 국내에서는 농축액제품군과 음료제품군을 선호하여 발효홍삼과 각종 한약재가 어우러져 맛을 낸 농축액 제품과 성인대상 액상 파우치 제품, 어린이용 액상 파우치제품, 그리고 개발된 발효공정을 산삼배양근에 적용한 제품을 개발하여 출시하였으며 오픈마켓, 카다로그 판매, 벤더유통망을 이용하여 판매중에 있다.

미국 수출제품(교포를 타겟으로 하는 제품)도 마찬가지로 음료제품군을 선호하는 경향을 보여 발효홍삼에 녹용을 가미하여 남녀노소 누구나 섭취할 수 있는 제품을 개발하여 중간에 이전시를 통하여 판매하고 있다.

중국의 경우 아직 출시되지는 않았으나 차후 시제품을 보완하여 중국인을 대상으로 한 다양한 맞춤형 제품군을 개발하여 중국 판매망을 통하여 온라인 및 오프라인 판매를 추진하고 있다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연도별 연구개발 목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	발효에 의한 희귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K) 생산 표준화연구 및 기능성 인삼제품 개발	인삼을 원료로 하여 콩/김치 등과 같은 전통발효 식품으로부터 유용균주 및 신 종 균주의 탐색	100	김치 등의 발효 식품을 활용한 유산균주의 분 리 및 <i>Asepergillus</i> 속 균주의 확보
		사포닌 내성 유용균주의 최적의 발효조건 확립	100	scale up하기위한 최적 발효 조건 확립(온 도, pH, 최적 생장곡선 확인등) 뿐만 아니라 합성배지, 천연 배지 조성확립을 위해 바나 나, 양배추, 옥수수, 무 등의 고상재료의 농 도별 처리 함량 최적화 실험 중.
		기질 전환율이 50% 되는 유용균주를 이용해 기질특이성 분석	100	균주별 ginsenoside 변환 pathway확인
		가공 처리된 인삼 원료 추출 엑스의 유 용균주 발효 조건 확립	100	온도, pH 조건, elicitor 첨가에 따른 전환 활 성 확인 및 최적 발효 조건의 탐색
		발효 인삼을 대량 추출 한 후 성분 분석	100	홍삼 및 백삼 농축액을 활용한 발효물의 HPLC를 이용한 분석 수행
		각종 크로마토그래피를 이용한 활성물 질의 분리 정제	100	발효를 통해 생성된 물질을 확인 하기 위한 분 리 정제 수행(open column chromatography)
		¹ H, ¹³ C-NMR등을 이용한 화합물의 구 조동정	100	NMR을 활용한 생성물질의 구조 동정 수행. 생성물질은 ginsenoside CK로 확인
		지표물질의 분석 및 최적의 추출방법을 확립함	100	발효홍삼을 위한 최적 분석 방법을 수립
		수삼을 이용한 백삼 및 홍삼 제조	100	수삼을 이용하여 백삼 및 홍삼을 제조완료
		18L 발효조에서의 최적 전환 반응 조건	80	18L 생물반응기를 이용하여 온도, 시간, pH, 유용균주 접종량 등 반응 조건 확립중임.
		발효 생산성 분석	60	유용균주를 이용하여 Rh2 및 C-K로 전환 율을 30%이상으로 하여 생산성은 분석중
		엑스추출, 미세 분말화 및 극한 가공 최 적 방법 확립	60	현재 상업적으로 진행되고 있는 가공방법 조사중임
		인삼 내생 b-glucosidase활성화를 통한 고기능성 사포닌 bioreactor생산 최적 조건 확립	70	기능성 사포닌을 생산하기 위한 bioreactor에 서 생산된 사포닌의 최적조건 실험 진행중 사포닌 추출·정제 및 HPLC 분석, 생산성 분석
희귀 ginsenoside (Rh2 및 CK) 원료 생 산 및 성분 표준화	60	유용균주를 이용한 Rh2와 CK의 사포닌 전 환이 확인되어 희귀ginsenoside가 증강된 홍 삼엑스는 생산하여 2차년도의 효능시험에 제 공할 예정이며 성분의 표준화는 scale-up을 통하여 최적의 발효조건을 설정한 후에 결정 할 예정임.		
유효성분의 복합 비율에 따른 인삼 제 품의 개발	40	제품의 유형 및 디자인 컨셉 설정		
평균		85		

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012)	발효에 의한 회귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K) 생산 표준화연구 및 기능성 인삼제품 개발	1차년도에서 선발한 유용균주의 2차선발	100	1차년도에서 선발한 유용균주에서 DCY51 (<i>Lactobacillus kimchicus</i>)과 H117 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>) 2균주 선발 하였음, H117 균주가 C-K 함량이 높았음. 1차 선발된 균주 중 활성이 우수하고 신규한 유산균을 동정함, 특히 출원
		선발된 유용 균주 기질특이성 분석 및 배양 최적화	100	선발된 유용균주 DCY51, H117 이들에 대한 유용균주의 기질특이성 및 배양최적화를 구명하였음.
		기능성 성분(Rh2, C-K)의 분리 및 구조동정	100	기능성 성분 구조 동정, 신규한 화합물 합성
		천연 식품소재를 이용한 발효 최적 조건	100	고가의 MRS배지 대체용으로 값싸고 구입용이한 천연 배지 조성 개발, 무 추출물 첨가, 특허출원예정
		가공처리된 인삼원료 및 추출엑스를 원료로한 발효 조건확립	100	각 분리된 유산균을 이용하여 발효 최적 조건을 탐색하였고 그중 활성이 우수한 균주의 조효소액을 추출하여 홍삼액기스 첨가하여 생물 전환 실시
		전환균주의 회귀 사포닌 생산 최적 조건 탐색 및 사포닌 분석	100	배양시간 별, 효소 반응 조건 탐색(pH, 온도)
		선발된 미생물의 조효소 분리, 사포닌 전환 효소추출 및 효소를 이용한 인삼 사포닌의 변환	100	조효소 분리, 사포닌 전환 효소추출 및 효소를 이용한 인삼 사포닌의 변환 수율 조사함
		독성시험을 통한 안전성 확보THP-1 cell (monocyte)을 이용하여 sandwich ELISA로 humsnTNF-alpha 발현 확인	100	humsnTNF-alpha 발현 확인함으로써 면역 활성이 유의한 균주임을 밝힘
		Probiotic 효과유무 확인	100	대장균과 페렴구균에 대한 항균활성 <i>in-vitro</i> assay 실시함
		Bioreactor를 이용한 대량 생물전환 미생물의 발효 조건 확립	100	유용균주 37°C에서 3일간 배양으로 발효조건 확립
		Bioreactor를 이용한 enzyme처리에 의한 생물전환 조건 확립	100	효소처리에 의한 ginsenosides(Rh2, C-K) 생산조건 확립
		2L, 18L Bioreactor를 이용한 균 생육 활성 측정 및 사포닌 분석, 회귀 사포닌 생산 함량 측정	100	Bioreactor를 이용한 균의 활성과 배양온도, 사포닌 함량 측정 및 조건확립
		발효 생산성 분석	100	유용균주와 효소를 처리하여 발효 분석
		scale-up 배양기 이용 균주발효 및 enzyme에 의한 회귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 대량생산조건 확립	100	scale-up한 Bioreactor 배양에서의 ginsenosides(Rh2, C-K) 대량생산조건 확립
		고생리활성 ginsenosides(-Rh, compound K) 원료 생산 및 성분표준화	100	유용균주와 효소처리에 의한 ginsenosides(Rh2, C-K) 생산, 성분 표준화 확립
		소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 유효성분이 강화된 맞춤형 제형 개발	100	표준화된 발효홍삼을 이용한 유효성분이 강화된 시제품을 개발하였음.
평균		100		

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012)	발효에 의하여 생산된 회귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K) 복합제품의 효능연구(폐렴구균 면역력)	면역력관련 기초실험 - iNOS 발현 측정 및 NO assay	100	iNOS 발현 측정 및 NO assay 실험결과 발효 홍삼에서 NO수치가 감소됨
		탐식작용 및 killing assay	100	폐렴구균(D39) 감염후 raw cell의 viability 를 확인하기위해 MTT assay를 시행하였 음. 발효홍삼처리(0.1 mg/ml)에서 감염으로 인 한 생존율의 감소가 높았음. 발효홍삼이 면역세포인 macrophage를 활성화 시킬 수 있는지 확인하기 위해 zamosan 을 기질로 이용해 uptake 능력을 측정하는 phagocytic activity를 측정하였음.
		Cytokine 및 chemokine 측정	100	폐렴구균(D39) 감염시 세포에서 분비되는 cytokine(TNF α) 수치를 확인하기 위해 <i>in vitro</i> 에서 raw cell에 폐렴구균을 감염시킨후 cell 상등액으로 분비된 TNF α 수치를 <i>in vivo</i> 에서는 일주일 동안 발효홍삼 경구투여 후, 폐렴구균을 코에 감염시킨 후 TNF α 수 치를 측정하였음.
		회귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 복합제 품의 면역증강활성 검증 - 발효 홍삼제품에 의한 대식세포에서의 폐렴구균에 대한 면역력 변화 측정	100	발효홍삼균은 폐렴구균에 대하여 면역력이 다소 증가 하는 경향이있음
		발효 홍삼제품에 의한 생쥐에서의 폐렴 구균에 대한 면역력 변화 측정	100	발효 홍삼제품의 폐렴구균에 대한 면역력은 다소 면역기능이 강화되었음을 나타냄.
		동물실험을 통한 전임상 연구	100	홍삼제품 경구투여가 마우스의 면역력을 증강 시켜 세균감염 후 각각의 장기에서 세균수를 감소시킬 수 있는지 확인하기 위해 colonization assay를 실시하였음.
		평균	100	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2013)	발효에 의한 회귀 ginsenosides(Rh2 및 compound K) 생산 표준화연구 및 기능성 인삼제품 개발	1차년도에서 선발한 유용균주의 2차선발	100	1차년도에서 선발한 유용균주에서 DCY51 (<i>Lactobacillus kimchicus</i>)과 H117 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>) 2균주 선발 하였음, H117 균주가 C-K 함량이 높았음. 1차 선발된 균주 중 활성이 우수하고 신규한 유산균을 동정함, 특히 출원
		선발된 유용 균주 기질특이성 분석 및 배양 최적화	100	선발된 유용균주 DCY51, H117 이들에 대한 유용균주의 기질특이성 및 배양최적화를 구명하였음.
		기능성 성분(Rh2, C-K)의 분리 및 구조동정	100	기능성 성분 구조 동정, 신규한 화합물 합성
		천연 식품소재를 이용한 발효 최적 조건	100	고가의 MRS배지 대체용으로 값싸고 구입용이한 천연 배지 조성 개발, 무 추출물 첨가, 특허출원예정
		가공처리된 인삼원료 및 추출액을 원료로한 발효 조건확립	100	각 분리된 유산균을 이용하여 발효 최적 조건을 탐색하였고 그중 활성이 우수한 균주의 조효소액을 추출하여 홍삼액기스 첨가하여 생물 전환 실시
		전환균주의 회귀 사포닌 생산 최적 조건 탐색 및 사포닌 분석	100	배양시간 별, 효소 반응 조건 탐색(pH, 온도)
		선발된 미생물의 조효소 분리, 사포닌 전환 효소추출 및 효소를 이용한 인삼 사포닌의 변환	100	조효소 분리, 사포닌 전환 효소추출 및 효소를 이용한 인삼 사포닌의 변환 수율 조사함
		독성시험을 통한 안전성 확보THP-1 cell (monocyte)을 이용하여 sandwich ELISA로 humsnTNF-alpha 발현 확인	100	humsnTNF-alpha 발현 확인함으로써 면역 활성이 유의한 균주임을 밝힘
		Probiotic 효과유무 확인	100	대장균과 페렴구균에 대한 항균활성 <i>in-vitro</i> assay 실시함
		Bioreactor를 이용한 대량 생물전환 미생물의 발효 조건 확립	100	유용균주 37℃에서 3일간 배양으로 발효조건 확립
		Bioreactor를 이용한 enzyme처리에 의한 생물전환 조건 확립	100	효소처리에 의한 ginsenosides(Rh2, C-K) 생산조건 확립
		2L, 18L Bioreactor를 이용한 균 생육 활성 측정 및 사포닌 분석, 회귀 사포닌 생산 함량 측정	100	Bioreactor를 이용한 균의 활성과 배양온도, 사포닌 함량 측정 및 조건확립
		발효 생산성 분석	100	유용균주와 효소를 처리하여 발효 분석
		scale-up 배양기 이용 균주발효 및 enzyme에 의한 회귀 ginsenosides(Rh2, C-K) 대량생산조건 확립	100	scale-up한 Bioreactor 배양에서의 ginsenosides(Rh2, C-K) 대량생산조건 확립
		고생리활성 ginsenosides(-Rh, compound K) 원료 생산 및 성분표준화	100	유용균주와 효소처리에 의한 ginsenosides(Rh2, C-K) 생산, 성분 표준화 확립
		소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 유효성분이 강화된 맞춤형 제형 개발	100	표준화된 발효홍삼을 이용한 유효성분이 강화된 시제품을 개발하였음.
		발효공정을 통한 회귀 진세노사이드 성분이 증강된 시제품의 제품화 및 산업화	100	발효공정을 이용한 유효성분이 증강된 4개의 제품을 생산하여 유통 및 판매(산업화)
평균		100		

2. 관련분야의 기술발전예의 기여도

인삼을 유용균주로 발효시켜 생리활성 물질이 강화된 식품소재를 개발 및 이를 이용하여 기능성이 강화된 인삼제품을 개발하고 산업화를 하였음

1. 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 생산기반 확립
2. Bioreactor를 이용한 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 대량생산 방법 확립
3. 유용균주 발효에 의하여 생산된 희귀 ginsenosides(Rh₂ 및 Compound K) 복합제품의 급성호흡기 질환 사망률 1 위를 차지하는 폐렴구균을 대상으로 면역력을 증가시키는 약리효능 확인
4. 기능성 인삼제품(발효홍삼 농축액, 발효홍삼 분말, 발효홍삼 음료, 발효홍삼 경질캡슐, 발효홍삼 연질캡슐) 개발기술 확립

제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과 실적 총괄

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	1						0	1		
	달성	2						5	2		
2차 년도	목표	2						3	3	1	
	달성		1						3		
3차 년도	목표									1	
	달성										
4차 년도	목표										
	달성										
5차 년도	목표										
	달성										
계	목표	3						3	4	2	
	달성	2	1					5	3		3 개 는 revision

2. 특허성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	신규한 β-글루코시다제 단백질 및 이의 용도	경희대 한방바이오(주)	대한민국	10-2011-0108053	2012	배추김치 유래의 젓산균을 이용하여 고농도 홍삼추출액을 함유하는 유제품을 젓산 발효하는 방법	경희대 한방바이오(주)	대한민국	10-1175955호
2012	홍삼 발효용 신규 미생물 락토바실러스 파낙시카세이 및 이를 이용하여 제조한 발효 홍삼을 포함하는 식품 조성물	경희대 한방바이오(주)	대한민국	10-2012-0106345					



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1175955 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	계 2010-0021191 호
	출 원 일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2010년 03월 10일
	동 록 일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2012년 08월 16일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

배추 김치 유래의 젖산균을 이용하여 고농도의 홍삼 추출액을 함유하는 유제품을 젖산 발효하는 방법

특허권자 (PATENTEE)

한방바이오 주식회사(164711-0*****)
경기도 용인시 기흥구 신정로 101 (신갈동)

발명자 (INVENTOR)

등록사항관에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록 되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2012년 08월 16일



특 허 칭

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료 납부일은 실정등록일 이후 4년차부터 매년 08월 16일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2011.10.21
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2011-0108053 (접수번호 1-1-2011-0825861-28)
 출원인명칭 한방바이오 주식회사(1-2002-015619-8)
 대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8)
 발명자성명 양덕춘 전림호 양동욱 최광태 김연주
 발명의명칭 신규한 β-글루코시다제 단백질 및 이의 용도

특 허 청 장

출원번호통지서

출원일자 2012.09.25
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2012-0106345 (접수번호 1-1-2012-0777548-16)
 출원인명칭 한방바이오 주식회사(1-2002-015619-8)
 대리인성명 김순웅(9-2006-000534-4)
 발명의명칭 홍삼 발효용 신규 미생물 락토바실러스 파낙시카세이 및 이를 이용하여 제조한 발효 홍삼을 포함하는 식품 조성물

Delftia sp. 6Y7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 GenBank: JN852948.1
 EASIS Graphics
 Go to: [GenBank](#)

LOCUS JN852948 1476 bp DNA linear ECT 10-MAR-2012
 DEFINITION Delftia sp. 6Y7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION JN852948
 VERSION JN852948.1 GI:379069013
 KEYWORDS
 SOURCE Delftia sp. 6Y7
 ORGANISM Delftia sp. 6Y7
 Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Dismoniadaceae; Delftia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1476)
 AUTHORS Vang, D.-C., Nguyen, N.L., and Kim, Y.-J.
 TITLE Isolation and characterization of Delftia ginsengisoli 6Y7 from ginseng soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1476)
 AUTHORS Vang, D.-C., Nguyen, N.L., and Kim, Y.-J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (15-SEP-2011) Korean Ginseng Center for Most Valuable Products & Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University, 1 Secheon, Gilheung-su, Yongsin, Gyeonggi-do 449-701, South Korea
 FEATURES source
 Location/Qualifiers
 1..1476
 /organism="Delftia sp. 6Y7"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="6Y7"

Epilithonimonas sp. DCY 78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 GenBank: JX827729.1
 EASIS Graphics
 Go to: [GenBank](#)

LOCUS JX827729 1439 bp DNA linear ECT 27-OCT-2012
 DEFINITION Epilithonimonas sp. DCY 78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION JX827729
 VERSION JX827729.1 GI:409691583
 KEYWORDS
 SOURCE Epilithonimonas sp. DCY 78
 ORGANISM Epilithonimonas sp. DCY 78
 Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Epilithonimonas.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1439)
 AUTHORS Vang, D.-C., Ponnuraj, S.P., and Kim, Y.-J.
 TITLE Isolation and characterization of a novel bacteria from ginseng soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1439)
 AUTHORS Vang, D.-C., Ponnuraj, S.P., and Kim, Y.-J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-SEP-2012) Department of Biotechnology, Kyung Hee University, Ajiro, Seon, Gyeonggi 449 701, Republic of Korea
 FEATURES source
 Location/Qualifiers
 1..1439
 /organism="Epilithonimonas sp. DCY 78"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="DCY 78"
 /isolation_source="ginseng soil"
 /db_xref="taxon:132523"

Chryseobacterium ginsengisoli strain M19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 GenBank: JN852949.1
 EASIS Graphics
 Go to: [GenBank](#)

LOCUS JN852949 1430 bp DNA linear ECT 10-MAR-2012
 DEFINITION Chryseobacterium ginsengisoli strain M19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION JN852949
 VERSION JN852949.1 GI:379069014
 KEYWORDS
 SOURCE Chryseobacterium ginsengisoli
 ORGANISM Chryseobacterium ginsengisoli
 Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Chryseobacterium.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1430)
 AUTHORS Vang, D.-C., Nguyen, N.L., and Kim, Y.-J.
 TITLE Isolation and characterization of Chryseobacterium ginsengisoli M19 from ginseng soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1430)
 AUTHORS Vang, D.-C., Nguyen, N.L., and Kim, Y.-J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (15-SEP-2011) Korean Ginseng Center for Most Valuable Products & Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University, 1 Secheon, Gilheung-su, Yongsin, Gyeonggi-do 449-701, South Korea
 FEATURES source
 Location/Qualifiers
 1..1430
 /organism="Chryseobacterium ginsengisoli"

Microbacterium sp. DCY56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 GenBank: HQ44973.1
 EASIS Graphics
 Go to: [GenBank](#)

LOCUS HQ44973 1433 bp DNA linear ECT 20-FEB-2011
 DEFINITION Microbacterium sp. DCY56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION HQ44973
 VERSION HQ44973.1 GI:320522206
 KEYWORDS
 SOURCE Microbacterium sp. DCY56
 ORGANISM Microbacterium sp. DCY56
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteriales; Actinomycetales; Micrococcales; Microbacteriaceae; Microbacterium.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1433)
 AUTHORS Vang, D.-C., Nguyen, N.L., and Kim, Y.-J.
 TITLE Isolation and characterization of Microbacterium pauciterae DCY56 from ginseng soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1433)
 AUTHORS Vang, D.-C., Nguyen, N.L., and Kim, Y.-J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-JAN-2011) Korean Ginseng Center and Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University, 1 Secheon, Gilheung-su, Yongsin-si, Gyeonggi-do 449-701, South Korea
 FEATURES source
 Location/Qualifiers
 1..1433
 /organism="Microbacterium sp. DCY56"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="DCY56"
 /db_xref="taxon:132523"



Chrysanthemum x morifolium genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA, complete and partial sequence, cultivar: Lionking
 GenBank: AB064264.1
 EASIS Graphics
 Go to: [GenBank](#)

LOCUS AB064264 662 bp DNA linear PLN 29-JUN-2001
 DEFINITION Chrysanthemum x morifolium genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA, complete and partial sequence, cultivar: Lionking.
 ACCESSION AB064264
 VERSION AB064264.1 GI:14575650
 KEYWORDS
 SOURCE Chrysanthemum x morifolium
 ORGANISM Chrysanthemum x morifolium
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; camassulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Artemisiinae; Chrysanthemum.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Vang, D.C., In, J.G., Kim, D.C., Shin, D.G. and Min, B.H.
 TITLE Chrysanthemum morifolium internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
 JOURNAL Published Only in Database (2001)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 662)

<유전자 등록건>

3. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Microbial transformation of ginsenoside Rb1 to compound K by <i>Lactobacillus paralimentarius</i> .			공동저자	World J Microbiol Biotechnol	29:1001 - 1007	국외	SCI
2014	Physiolochemical properties and volatile compounds of Red ginseng extract using lactobacillus panaxicasei DCY66			공동저자	Journal of the Science Food and Agriculture	Minor revision	국외	SCI
2014	<i>Delftia insengisoli</i> sp. nov., isolated from mountain ginseng soil.			공동저자	Int J Syst Evol Microbiol,	minor revision	국외	SCI
2014	Microbial Biotransformation of Red Ginseng Extract Using <i>Lactobacillus panaxicasei</i> DCY66 ^T from fermented fresh ginseng			공동저자	Journal of the Science of Food and Agriculture	revision	국외	SCI
2014	<i>Lactobacillus rossiae</i> DC05 as a potential strain for the bioconversion of the major ginsenosides Rb1 and Re into the pharmacologically active ginsenosides C-K and Rg2.			공동저자	Biosci. Biotechnol. Biochem	online published	국외	SCI
2014	Amelioration of insulin resistance by Rk ₁ +Rg ₅ complex under endoplasmic reticulum stress conditions.			공동저자	2014. Pharmacognosy Research. 6(4): 292-296	published	국외	SCIE

02-Oct-2012

Reference: JSFA-12-1467

"Physicochemical Properties and volatile compounds of Red Ginseng Extract Using *Lactobacillus panaxicae* DCY66"

Dear Professor Yang,

Thank you for submitting your paper to the Journal of the Science of Food and Agriculture for consideration. Expert referees have now reviewed it but I regret to advise you that your paper is not acceptable for publication in its present form, and will require substantial revision before it can be considered further.

I would, however, would be happy to consider a revised and resubmitted paper. There are a number of important points (see enclosed comments) which I ask you to please carefully address in your revision.

Upon resubmission please provide:

- your revised manuscript including highlighted amendments
- a clear list of your response to Editor/referee comments, including page and line numbers indicating where you have made changes

1 Microbial Biotransformation of Red Ginseng Extract Using *Lactobacillus*
2 *panaxicae* DCY66^T from fresh ginseng fermented-

6 Ji-Na Jeon, Yeon-Ju Kim, Jin-Woo Min, Bong-Jun Jung¹, Kwang-Tae Choi and
7 Deok-Chun Yang*
8 Department of Oriental Medicinal Material and Processing, College of Life Science,
9 Korean Ginseng Center Most Valuable Products and Ginseng Genetic Resource
10 Bank, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea¹

11 ¹Industrial Microbiology Lab¹

18 *Corresponding author¹

19 Deok-Chun Yang E-mail

20 Tel.: , Fax: .

21 Address:

02-Oct-2012

Dear Dr. Yang,

Manuscript ID: JSFA-12-1467 entitled "*Lactobacillus panaxicae* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field" which you submitted to the *Journal of Science and Applied Food Science*, has been reviewed. The comments of the referee and are included at the bottom of this letter.

The reviewer has recommended publication, but also suggested some revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the reviewer's comments and revise your manuscript.

To revise your manuscript, log on to <http://mc.manuscriptcentral.com/jsfa> and enter your Author Centre where you will find your manuscript file for revision. You can also click on "Update System" link on "Account Settings" if your manuscript number has been accepted to derive a revision.

You will be unable to make your revisions on the original submitted version of the manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript in the documents, using the track changes mode in MS Word only, unless otherwise indicated.

Once the revised manuscript has been saved, you can upload it and submit it through your Author Centre.

After submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the reviewer(s) in the acknowledgments. You can also click on "Update System" link on "Account Settings" if your manuscript number has been accepted to derive a revision. In your response to the reviewer(s).

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please backup any relevant files before commencing the submission.

Due Date: 02-Oct-2012

Because we are trying to facilitate the submission of manuscripts submitted to the *Journal of Science and Applied Food Science*, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision in a reasonable amount of time, we may have to consider your paper as a non-submission.

1 *Opikingsomonas ginsengensis* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field.

1 Van-An Hoang, Yeon-Ju Kim, Ngo-Lan Nguyen, Kwang-Tae Choi and Deok-Chun Yang*
4 Korean Ginseng Center and Ginseng Genetic Resources Bank, Kyung Hee University,
5 Seochon - dong, Giheung-gu, Yangju-si, Gyeonggi-do 449-701, South Korea.

9 *Corresponding author.

10 Deok-Chun Yang, Yeon-Ju Kim, Tel: Fax:

11 E-mail:

16 Key Words: DCY58, *Opikingsomonas ginsengensis*.

18 The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the 16S rDNA gene sequence of strain
19 DCY58^T is JN852951.

Dear professor Yang & Dr Choi,

We have received the reports from our advisors on your manuscript, "Microbial transformation of ginsenoside Rb1 to compound K by *Lactobacillus paralimentarius*", which you submitted to World Journal of Microbiology and Biotechnology.

Based on the advice received, I feel that your manuscript could be reconsidered should you be prepared to revise it to incorporate major revisions particularly in study design and experiments. More experiments may be necessary to address the questions raised in the reviewers' comments. When preparing your revised manuscript, you are asked to carefully consider the reviewer comments which are attached, and submit a list of responses to the comments.

Please also submit your response as separate submission item.

If one or more reviewers have uploaded files related to their reviews, these files can be found on line, and you should download and read them carefully.

We regret that the constraints of Journal space and editorial time do not allow more than one revision. If the revisions you make do not satisfy the editors and/or reviewers, the manuscript will be rejected. If you need further guidance on your revision, please contact the Editorial Office.

Please also, if you have not already done so, make certain that the English language in the manuscript is correct and intelligible. If you have any doubts, please have your manuscript checked by a native English speaker.

In order to submit your revised manuscript, please access the following web site:

We look forward to receiving your revised manuscript within six weeks.

With kind regards,
Lingeng Lu, MD, PhD
Associate Editor

1
2 **Microbial transformation of ginsenoside Rb1 to compound K by *Lactobacillus***
3 ***paralimentarius***

4
5 **Liu-Hu Quan · Yeon-Ju Kim · Kwang Tae Choi* · Deok-Chun Yang***



6
7 Department of Oriental Medicinal Material and Processing, College of Life
8 Science, Korean Ginseng Center Most Valuable Product and Ginseng Genetic
9 Resource Bank, Kyung Hee University, Seodheon-dong, Giheung-gu, Yongin-si,
10 Gyeonggi-do 446-701, Republic of Korea

11 *Corresponding author

12 Address:

13
14 (Tel)

15 (Fax)

16 (E-mail)

Microbial transformation of ginsenoside Rb1 to compound K by *Lactobacillus paralimentarius*

Lin-Hu Quan · Yeon-Ju Kim · Guan Hao Li · Kwang-Tea Choi · Deok-Chun Yang

Received: 4 September 2012 / Accepted: 12 January 2013 / Published online: 22 January 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract In this study, the major ginsenoside Rb1 was transformed into the more pharmacologically active minor compound K by food grade *Lactobacillus paralimentarius* LH4, which was isolated from kimchi, a traditional Korean fermented food. The enzymatic reaction was analyzed by TLC, HPLC, and NMR. Using the cell-free enzyme of *Lactobacillus paralimentarius* LH4 at optimal conditions for 30 °C at pH 6.0, 1.0 mg ml⁻¹ ginsenoside Rb1 was transformed into 0.52 mg ml⁻¹ compound K within 72 h, with a corresponding molar conversion yield of 88 %. The cell-free enzyme hydrolyzed the two glucose moieties attached to the C-3 position and the outer glucose moiety attached to the C-20 position of the ginsenoside Rb1. The cell-free enzyme hydrolyzed the ginsenoside Rb1 along the following pathway: ginsenoside Rb1 → gypenoside XVII and ginsenoside Rd → ginsenoside F2 → compound K. Our results indicate that *Lactobacillus paralimentarius* LH4 has the potential to be applied for the preparation of compound K in the food industry.

Keywords Transformation · Compound K · Ginsenoside Rb1 · *Lactobacillus paralimentarius*

Introduction

Ginseng, the root of *Panax ginseng* C. A. Meyer, belongs to the family Araliaceae. It has been used in Asia as a medicine to treat various diseases for several thousand years. Ginsenosides, the principal components of ginseng, are a class of triterpenoid saponins exhibiting diverse pharmacological activities such as anti-inflammatory (Wu et al. 1992), anti-tumor (Mochizuki et al. 1995), anti-fatigue (Lee et al. 2005), anti-diabetic (Ni et al. 2010), and anti-cancer activities (Chae et al. 2009). Currently, more than 180 ginsenosides have been discovered and identified in ginseng (Christensen 2008). The protopanaxadiol (PPD)-type ginsenosides are further classified into subgroups based on the position and number of sugar moieties attached to the aglycon at positions C-3 and C-20 (Fig. 1). Pharmaceutically active ginsenosides exist as deglycosylated forms at low concentrations or are absent in ginseng (Tawab et al. 2003). These deglycosylated ginsenosides, including ginsenosides Rg3, Rh2, and compound K, can be produced by the hydrolysis of sugar moieties from the major ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, and Rd, accounting for more than 50 % of the total ginsenosides (Noh et al. 2009).

Several methods for the transformation of the major ginsenosides to the minor ginsenosides, including acid hydrolysis (Tawab et al. 2003), physical (Akao et al. 1988), alkali cleavage (Kim et al. 2000), and biological processes (Quan et al. 2010, 2011) have been previously attempted. However, most of the physical and chemical methods such as mild acid hydrolysis, chemical synthesis, and alkaline cleavage are accompanied by inevitable and undesirable side reactions (Keum et al. 2000). These problems of physical and chemical reactions could be avoided by using microbial or enzymatic conversion methods, as these methods use milder reaction conditions and are environmentally compatible.

Amelioration of insulin resistance by Rk₁ + Rg₆ complex under endoplasmic reticulum stress conditions

Shree Priya Ponnuraj, Fayeza Ghaj, Gera Kang, Hae Yong Noh, Jin-Woo Min, Yeon-Ju Kim, Deou-Chun Yang

Department of Oriental Medical Materials and Processing, Kyung Hee University, Seoul, Korea
 Submitted 21-01-2014 Revised 11-03-2014 Published 06-09-2014

ABSTRACT

Background: Diabetes mellitus is a metabolic syndrome exacerbated by stress conditions. Endoplasmic reticulum stress (ER) impairs the insulin signaling pathway making the diabetic conditions worse. Pharmacological agents are sought externally to overcome this malfunction. Ginsenosides from *Panax ginseng* C. A. Meyer possesses many pharmacological properties and are used for the treatment of diabetes. **Objective:** To investigate the effects of the Rk₁ + Rg₆ complex on the amelioration of insulin resistance in 3T3-L1 cells under endoplasmic reticulum stress conditions. **Materials and Methods:** Heat-treated ginseng extracts are found to contain many pharmacologically active ginsenosides. Among them Rk₁ + Rg₆ is found to be present in higher concentrations than the other major ginsenosides. The Rk₁ + Rg₆ complex was tested for its effect in the 3T3-L1 insulin-resistant model and subjected to the MTT assay, glucose oxidase assay and gene expression studies using RT-PCR and real-time PCR under endoplasmic reticulum stress conditions. **Results:** Rk₁ + Rg₆ treatment is found to increase the glucose uptake into the cells when compared to that of a positive control (tunicamycin treatment group). This further we have analyzed the role of gene expression level. The Rk₁ + Rg₆ complex was found to show an effect on the IGF 2R receptor, CHOP-10, and C/EBP gene at a particular treated concentration (50 µM). Moreover, stress condition (about 50% decrease) was overcome by the ginsenoside treatments at 50 µM. **Conclusion:** The present results showed that under endoplasmic reticulum stress conditions Rk₁ + Rg₆ complex exhibits a potential protective role in insulin-resistant 3T3-L1 cells.

Keywords: 3T3-L1, de-amethazone, diabetes, insulin, insulin resistance, ginsenosides



INTRODUCTION

Insulin resistance refers to the incompatible state of the cells in taking up the glucose. Insulin lowers blood glucose levels by facilitating glucose uptake into peripheral organs such as the liver, fat and skeletal muscle. Under insulin-resistant conditions, these organs are found to be functioning improperly.¹ Endoplasmic reticulum stress is the potential contributor in increasing the diabetic conditions. ER stress triggers transcriptional factors in the protection of the cells from the stress situations. Some of them include CHOP-10, XBP1 splicing, GRP 78, CHOP-10/GADD 153, a member in the family of C/CAAT/enhancer-binding proteins. It

includes other components such as α, β and γ C/EBP. One of the members C/EBP β is known to interact with CHOP-10 protein, which in turn leads to C/EBP β an increasing Glut-4 translocation. Some reports stress that C/EBP β and β are very essential for adipocyte differentiation and insulin-stimulated glucose uptake; it is also possible that they may be the therapeutic targets to treat diabetes mellitus. In addition, ER stress, by the up regulation of CHOP, impairs insulin transcription in adipocytes related to insulin resistance.^{2,3} The insulin signaling pathway is initiated via insulin binding on the IGF receptor (insulin-like growth factor receptor) of the adipose cells. In diabetic conditions, the insulin binding and the downstream signaling pathway are reported to be malfunctioning and in 3T3-L1 cells (adipose cells) the insulin signaling pathway was found to be decreased making diabetic conditions complicated. ER stress reduces the insulin signaling pathway restoring the glucose transporters.^{4,5} (Continuing a well known medical herb

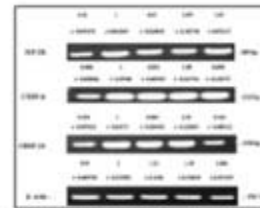


Figure 4: Effect of Rk₁+Rg₆ on the gene expression of signaling proteins in IGF-2R, C/EBP β, CHOP-10 in 3T3-L1 cells. Number of bands (i.e. amplification of DNA) estimated as 100%. Intensity of the bands has been calculated using Image J software and calibrated with the positive control and the adjusted result with that of the beta-actin have been shown (mean ± S.D.).

compounded treatment at 100 µM modulate the adipogenic pathway to combat the stress situations. In addition, C/EBP beta gene expression was increased by compound treatment (50 µM, adjusted density of 1.00, Figure 4).⁶ Furthermore, from Figure 5, Glut-4 gene expression has been found to be increased by Rk₁ + Rg₆ treatment compared to that of the control and tunicamycin stress treatment group. One of the possible mechanisms may be that of CHOP-10 (25, 50 µM) hetero-dimerizing with the C/EBP β gene, which has been reported to have a remarkable role in Glut-4 translocation.⁷ Thus from the above results, we can report that the ginsenoside Rk₁ + Rg₆ complex plays a role in making the insulin-resistant adipocytes to become sensitive to insulin. This acted by increasing C/EBP β at 25, 50 µM concentrations and increasing the Glut-4 gene expression, thus reversing the insulin resistance related to type 2 diabetes, obesity and endoplasmic reticulum stress.⁸ Many reports deal with the effective role of ginsenosides in reversing an insulin-resistant state in the peripheral organs.⁹ The IGF-2R gene expression has been found to be increased by TM (Tunicamycin). Importantly, treatment with Rk₁ + Rg₆ (µM) was found to show a greater increase in expression at 50 µM than at 25 and 100 µM (3.2 adjusted density) (Figure 4). The IGF-2 protein is one of the proteins involving the function of insulin in the peripheral organs containing adipocytes.¹⁰ Pharmacological agents acting in a similar way to the IGF-2 protein and ginsenosides have also been reported; some of them include Rk₁, Compound K, Rg₆, Rg₁₁ and licoflavin.^{11,12} How we are reporting on the Rk₁ + Rg₆ complex involving the function of the IGF-2 protein in binding with that of

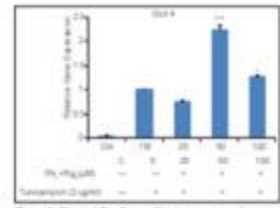


Figure 5: Effect of Rk₁+Rg₆ on Glut-4 gene expression under endoplasmic reticulum stress. Each bar represents the average of three independent experiments (Mean ± S.D.). **Adj.S.D. ***Adj.S.D. significant levels relative to the tunicamycin treatment group.

the IGF-2 receptor under ER stress. On analysis of the anti-ER stress mechanism of the complex treatment, it was found to have no effect on the downstream signaling of the IGF signaling pathway (IR3-2) (data not shown). However, it was found to have an effect on the IGF-2R receptor gene expression correlating with the Glut-4 gene expression maximum at 50 µM. Similar results using the role of Rg₆ acting as agonist have also been reported and are related to adipogenesis competing with IGF-1R.¹³

In conclusion, the Rk₁ + Rg₆ complex treatment increases IGF-2R receptor binding sites and facilitates the Glut-4 translocation, aiding in the glucose uptake by the peripheral organs, via the CHOP-mediated signaling pathway especially in adipocytes (in this study), thus ameliorating the insulin-sensitive state of the 3T3-L1 cells and making them responsive to insulin, and thereby combating the insulin resistance closely associated with type 2 diabetes under ER stress conditions.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by a grant from Korean Institute of Planning and Evaluation for Industry in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (KIPAFF-013-013-0001). This study was supported by a grant from the Yoon-Generation BioGreen 21 Program (51AC, grant# T20080205).

REFERENCES

1. Sirtori CR, Schenone VA, Corbelli GJ, Barbell A, Michelassi R. Mechanisms of insulin resistance. *Diabetologia* 2008;21:61-65.
2. Nishikawa Y, Harada H, Yamamoto S, Yoshitani T, Takeuchi M,

4. 성과활용 계획(자체 사업화)

가. 연구목표 대비 실시결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과	달성도
① 유용균주 발효에 의한 기능성 ginsenosides(Rh2, C-K) 생산 및 표준화	발효공정을 통한 희귀 ginsenosides (Rh2, C-K) 생산 유용균주 선발 및 표준화 완료	100%
②유용균주 발효에 의하여 생산된 기능성 ginsenosides 및 복합제품의 급성호흡기 질환 사망률 1 위를 차지하는 폐렴구균을 대상으로 면역력을 증가시키는 약리효능 확인	발효에 의하여 생산된 희귀 ginsenosides (Rh2 및 compound K) 복합제품의 효능연구 (폐렴구균 면역력 확인)	100%
③기능성 생리활성 성분강화 인삼제품 개발 및 산업화	기능성 생리활성 성분강화 인삼제품 개발 및 산업화 * 4개의 제품개발 완료 및 산업화	100%

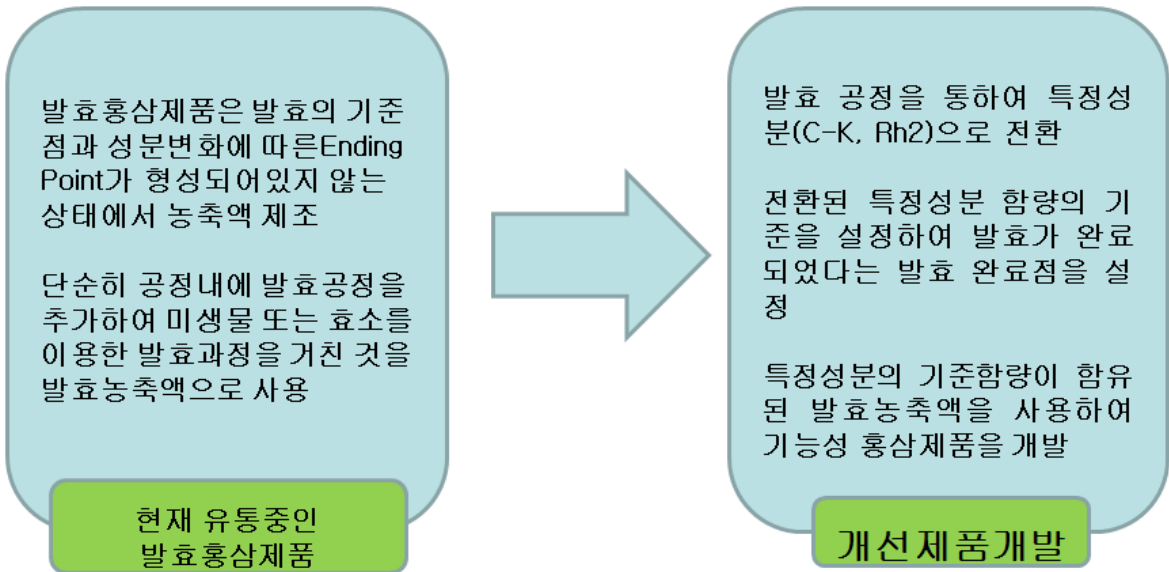
나. 핵심기술 별 구체적 활용계획 및 기대효과

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
인삼 사포닌의 생물학적 전환기술 개발	1. 인삼사포닌의 전환을 통한 기능성 사포닌 생산 2. 기능성 물질의 대량 생산 및 상업화 3. 본 과제외 연구를 통한 기술 적용한 다양한 식물에서의 기능성 사포닌 대사물질 생산연구에 적용 가능
효능 검정을 통한 인삼의 기능성 검정(폐렴 구균 대상 면역력 활성화)	1. 효능 검정을 통한 인삼의 신규 기능성 확인(폐렴구균에 대한 면역력) 2. 향후 관련 후속 연구 진행을 통해 개별인정형 기능성으로 활용
ginsenoside Rh2와 C-K 성분이 강화된 인삼제품 개발	1. 사업화 및 산업체 기술이전을 통한 인삼제품의 특성화 및 매출증대에 기여 2. 자체 상용화를 통한 사업화와 같은 계통의 업체에 기술이전을 통한 발효제품의 활성화 및 대중화로 인삼산업의 발전에 도움

다. 연구개발 성과 활용 자체 사업화 현황(제품화)

구분	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)
1	발효홍삼키즈업 (어린이 건강기능식품)		2013.01.08	52	40
2	발효홍삼녹용진 액골드 (미국수출제품)		2013.03.13	32	30
3	발효산삼배양근 기력보		2013.03.26	50	40
4	발효홍삼보골드		2013.03.26	20	40
매출액 합계 (개발제품(기술) 총 매출액)				154백만원	

라. 발효에 의한 특정 유효성분(C-K, Rh2)을 함유한 홍삼제품개발 방향



대왕의힘발효홍삼단	보령6년근발효홍삼	한삼인발효홍삼꿀들
환제품	액상제품	액상제품
음진식품	보령제약	한삼인
진세노사이드 Rg1+Rb1	홍삼성분 70mg/g	홍삼성분 70mg/g
광동발효홍삼진액	6년근 발효홍삼진액	발효홍삼원
액상제품	액상제품	액상제품
광동제약	경남제약	종근당건강
홍삼사포닌	홍삼	홍삼성분 50mg/g

Fig. 1. 시중 발효제품 현황

현재 출시되어있는 발효홍삼의 제품의 기준성분을 살펴보면 일반식품의 경우 사포닌(70mg/g)을 기준 성분으로 설정되어 있으며 현재 건강기능식품의 경우에는 진세노사이드 Rb1과 Rg1, Rg3의 합을 지표성분으로 설정되어 있다.

홍삼은 진세노사이드 38종이 밝혀진 상태이며 각각의 진세노사이드 마다 특유의 기능성을 내포하고 있다. 사포닌은 한국인의 38%가 장내에서 흡수를 못함에 따라서 발효공정을 통하여 장내에서 사포닌 흡수를 용이하게 할 수 있으나 현재 발효홍삼제품 실정은 발효공정에 대한 체계 및 발효가 완료되었다는 어떠한 관리 포인트 없이 발효공정을 거치는 것만으로 발효가 완료되었다는 생각을 가지고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 발효홍삼의 특정성분 전환을 통한 발효완료시점을 설정하고 특정성분이 함유된 발효홍삼제품을 개발하고자 한다.

발효홍삼의 특정(C-K, Rh2) 진세노사이드 성분변화에 안정하고 유통기한 내에 제품의 변질방지에 강한 제형으로 환 형태의 제품을 개발하고자 하며, 휴대하기 쉽고 어느 장소에서든 쉽게 섭취할 수 있도록 사면포 형태의 포장방법으로 제품을 개발하고자 한다.

	
<p>농축액</p>	<p>환</p>
	
<p>캡슐(연질, 경질)</p>	<p>정제</p>

Fig. 2. 개발하고자 하는 제품의 제형

		
<p>사면포</p>	<p>스틱</p>	<p>용기</p>

Fig. 3. 개발하고자 하는 제품의 디자인 컨셉

마. 식약청 고시형인정에 대한 연구계획

(1) 일반식품 및 건강기능식품

구분	식품유형	현행 규격	기능성 표시	비고
일반식품	음료류 및 기타	음료제품의 경우는 홍삼성분 70mg/g 이상이며 그 외의 식품유형은 고형분 표시만 해주면 됨.	-	
건강기능식품	홍삼제품	원료 규격이 진세노사이드 Rb1+Rg1의 합이 0.8~34mg/g (개정고시(2012.11.07.)진세노사이드 Rb1+Rg1 +Rg3의 합이 2.4~34mg/g)	면역력 증진·피로개선·혈소판 응집억제를 통한 혈액흐름·기억력 개선에 도움을 줄 수 있음.	

(2) 개별인정형

구분	기능성원료	섭취량	효능표시
개별인정형	인삼가수분 해농추액	인삼가수분 해농추액으로서 960 mg/일	혈당 조절에 도움을 줄 수 있음(기타기능II)

※ 인삼관련 개별인정형 원료가 2건 더 있지만 다른 식물성분과의 복합추출물이므로 개별인정형 인삼제품 리스트표에서 제외시킴.

바. 기능성 홍삼제품의 연구 방향

(1) 기존 일반식품은 사포닌을 성분규격으로 하고, 건강기능식품은 Rg1과 Rb1을 기준규격으로 설정하고 있습니다. 그에 따른 효능에 대한 표현은 일반식품은 표현을 할 수 없으며, 건강기능식품은 면역력 증진, 피로개선, 혈소판 응집억제를 통한 혈액흐름, 기억력 개선에 도움을 줄 수 있다는 표현을 허가하고 있다.

(2) 연구과제를 통해 도출된 기술을 활용하여 앞으로 홍삼의 C-K와 Rh2 함량 표현과 기능성 표현을 하는데 있어서 건강기능식품 개별인정형을 통한 기준규격 설정과 표현에 대해 인정을 받아야 될 것임.

제 6장 참고문헌

1. Jung HK, Lim SK, Park MJ, Bae CS, Yoon KC, Han HJ, and Park SH. The protective effect of ginseng saponin against high glucose-induced secretion of insulin-like growth factor (IGF)-I in primary cultured rabbit proximal tubule cells. *J Ginseng Res.* 2009; 33: 26-32.
2. Hong HD, Choi SY, Kim YC, Lee YC, and Cho CW. Rapid determination of ginsenosides Rb₁, Rf, and Rg₁ in Korean ginseng using HPLC. *J Ginseng Res.* 2009;33: 8-12.
3. Lee DY, Cho JG, Lee MK, Lee JW, Park HJ, Lee YH, Yang DC, and Baek NI. Standardization of physico-chemical data for ginseng saponins-I. Identification of NMR data for ginsenoside Rg₁. *J Ginseng Res.* 2009; 32: 291-299.
4. Lee CR, Whang WK, Shin CG, Lee HS, Han ST, Im BO, and Ko SK. Comparison of ginsenoside composition and contents in fresh ginseng roots cultivated in Korea, Japan, and China at various ages. *Korean J Food Sci Technol.* 2004; 30: 847-850.
5. Park JD. Study on chemical constituents from *Panax ginseng*. p. 79. In: The Korean Society of Ginseng (ed), *Ginseng Research during the Past 20 Years*. The Korean Society of Ginseng, Seoul(1997)
6. Dong A, Ye M, Guo H, Zheng J, and Guo D. Microbial transformation of ginsenoside Rb₁ by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnol Lett.* 25: 339-344 (2003)
7. Du Q, Jerz G, Waibel R, and Winterhalter P. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr. A.* 1008: 173 (2003)
8. Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, and Takino Y. Studied on Absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponin. VI. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb₂ in the stomach of rats. *Chem Pharm Bull.* 39: 400 (1991)
9. Kim Y-H, Lee Y-G, Choi K-J, Uchida K, and Sujuki, Y. Transglycosylation to ginseng saponins by cyclomaltodextrin glucanotransferases. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65: 875 (2001)
10. Xuesong Z, Juan W, Jie L, Ling F, Juan G, Xiuli D, Hongtao B, Yifa Z, and Guihua T. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb₁ to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36: 721-726 (2009)
11. Yang T, Kasai R, Zhou J, and Tanaka O. Dammarane saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry* 22: 1473 (1983)
12. Cao X-L, Tian Y, Zhang T-Y, Liu Q-H, Jia L-J, and Ito Y. Separation of dammarane-saponins from notoginseng, root of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen, by HSCCC coupled with evaporative light scattering detector. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 26: 1579-1591 (2003)
13. Cheng LQ, Kim MK, Lee JW, Lee YJ, and Yang DC. Conversion of major ginsenoside Rb₁ to ginsenoside F₂ by *Caulobacter leidyia*. *Biotechnol Lett.* 28: 1121-1127 (2006)

14. Liu C, Han, JY, Duan YQ, Xin H, and Hua W. Purification and quantification of ginsenoside Rb₃ and Rc from crude extracts of caudexes and leaves of *Panax notoginseng*. *Sep Purif Technol.* 54: 198-203 (2007)
15. Wei GM, Masanori M, Karl EM, Shao LL, Bertrand D, and Satoshi T. Saponins from the roots of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry* 52: 1133-1139 (1999)
16. Wei W, Yuqing Z, Elizabeth RR, Donald LH, Hui W, and Ruiwen Z. *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother Phamacol.* 59: 589-601 (2007)
17. Xuesong Z, Juan W, Jie L, Ling F, Juan G, Xiuli D, Hongtao B, Yifa Z, and Guihua T. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb₁ to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (*syn. Fulvia fulva*). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36: 721-726 (2009)
18. Teng R, Li H, Chen J, Wang D, He Y, and Yang C. Spectral assignments and reference data. *Magn Reson Chem.* 40: 483 (2002)
19. Oura H, Kumakai A, Shibata S, and Takaki K. Chemical constituents of *Panax ginseng*. pp. 46-47. In: *Panax ginseng ; It's study and progress*. Kyoritz Press Ltd., Tokyo(1981)
20. Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, and Takino Y. Studied on Absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponin. VII. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb₁, and -Rb₂ in the digestivetract of rats. *Chem Pharm Bull.* 39: 2357 (1991)
21. Sanada S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O, and Shibata S. Studied on the saponins of ginseng. I. Structures ginsenoside-Ro, -Rb₁, -Rb₂, -Rc and-Rd. *Chem Pharm. Bull.* 22: 421 (1974)
22. Yahara S, Kaji K, and Tanaka O. Further study on dammarane-type saponins of roots, leaves, flower-buds, and fruits of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Chem Pharm Bull.* 27: 88-92 (1979)
23. Dong A, Ye M, Guo H, Zheng J, and Guo D. Mecrobial transformation of ginsenoside R₁ by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnol Lett.* 25: 339-344 (2003)
24. Teng R, Ang C, McManus D, Armstrong D, Mau S, and Bacic A. Regioselective acylation of ginsenosides by *Novozyme 435* to generate molecular diversity. *Helv Chim Acta.* 87: 1860-1872 (2004)
25. Wang H, Tong Y-X, Ye W-C, and Zhao S-X. Studies on chemical constituents in root of *Polygala tenuifolia*. *China J Chinese Materia Medica* 28: 830-833 (2003)
26. 2009-2010 식품연감 인삼분야
27. 2009년 인삼 통계자료집

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.