

최 중
연구보고서

기능성이 강화된 인삼제품의 개발
Development of Ginseng Products with
Functional Improvement

부 산 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성이 강화된 인삼제품의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 부산대학교

총괄연구책임자 : 안 순 철

세부연구책임자 : 안 순 철

연 구 원 : 강 주 형

연 구 원 : 김 보 혜

연 구 원 : 이 선 이

연 구 원 : 유 선 녕

연 구 원 : 김 광 연

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 박 천 석

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 백 무 열

참 여 기 업 명 : (주)고려원인삼

참여기업대표자 : 최 성 욱

요 약 문

I. 제 목

기능성이 강화된 인삼제품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제 의 최종 목표는 유효 활성물질의 효율적인 추출과 인삼 특유의 효능이 증대된 유효 기능성 성분을 규명하고 기능성식품 및 식품의약 소재로 개발하여 인삼의 고부가가치를 창출한다.

○ 생균제로 사용되고 있는 미생물로 인삼을 발효하여 인삼 내의 구성성분을 새로운 항산화물질이나 생리활성이 증가한 물질로 전환하고, 유효성분인 saponin 성분과 새로이 생성된 활성물질의 변화를 분석한다.

○ 배당체 분해 효소 및 당전이 효소를 이용하여 인삼 내의 성분을 유용 성분으로 전환하고 전환된 유용 성분을 분석하고 새로운 생리활성을 검토한다.

○ 생물전환 인삼 소재의 기능성 식품으로서의 적용 가능성을 검토하기 위하여, 기능성 식품 제조 시 식품가공기술에 필수적으로 동반되는 가열, 건조, 살균 및 pH 변화에 대한 유효성분의 안정성을 검토함으로써 분말, 캡슐 또는 음료 등 적합한 형태의 기능성 식품으로서의 적용 가능성을 제시한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

(1) 인삼의 발효 조건 확립

최적 조성, 최적 온도, 최적 pH, 최적 접종량 및 최적 배양기간을 조사하고 발효산물의 유기산 분석 및 생리활성 분석한다.

(2) 배당체 분해 및 당전이 효소의 선별

초고온성 미생물유래 유전체로부터 β -glucosidase를 선별하고 PCR cloning을 수행하여 유전자를 확보하며 효소로는 CGTase, maltogenic amylase, maltosyltransferase와 같은 다양한 효소를 이용한다. 확보된 유전자를 대량 발현할 수 있는 vector (pHIS119, pREST)에 삽입하여 대량발현 시킨다.

(3) 재조합 효소의 반응특성

각 효소에 의한 여러 배당체의 기질 특이성 관찰하고 각 효소와 기질에 대한 효율적 전환 관계를 확인하고 배당체의 분해 및 당전이 산물을 효율적으로 생산할 수 있는 효소 반응 조건을 확립. 효소, 기질의 농도, pH, 온도, 유기용매에 대한 반응 수율 등을 실험하여 최적 조건 확립한다.

(4) 활성물질의 분리, 정제 및 구조 동정

Column chromatography를 통해 활성물질의 분리, 정제하고 Rf 값, 발색반응, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, mass spectroscopy 등의 기기분석을 통한 구조 동정한다.

(5) 인삼의 가공적성 검사

농축 전, 후 생물전환 인삼 유효성분의 열, pH 안정성 및 초고압 처리 분석한다. 또한 열, pH 안정성의 분석을 통한 유효성분의 온도의존성 분석 및 가공 방법 검토한다. 초고압 처리를 통해 유효성분의 열 및 pH 안정성 및 관능평가를 통한 기능성 식품소재로서의 가능성 검토한다.

(6) 인삼 발효산물의 생리활성

전환된 물질의 nitric oxide 저해활성, free radical scavenging 활성, 항균활성, 세포독성 측정 등을 측정한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

(1) 인삼의 효능 증대

생균제를 이용하여 인삼을 발효, 가수분해하고 발효산물과 분해물을 건조 분말화하여 특정 성분의 함량을 증가하거나 추출능을 증가시키고 장내 효과 개선 및 소화 흡수율을 증대시킬 수 있다. 그리고 식물체내에 존재하는 비활성 형태의 물질로부터 glucoside 결합을 분해하는 pectinase, hemicellulase, lactase 및 cellulase 등의 효소를 사용하여 배당체 화합물을 aglycone 형태로 전환하여 활성 형태의 유효물질 양을 증가시키거나 유효활성 물질을 효율적으로 추출, 정제하여 효소와 미생물을 이용한 인삼 가공식품을 개발을 통해 체내 소화를 촉진할 뿐만 아니라 인삼 속에 함유되어 있는 생리활성 성분이나 미생물 발효 및 효소 반응에 의해 생성되는 생리활성 물질을 생산해 낼 수 있다. 따라서 유용 미생물과 효소 전처리에 의한 인삼의 발효를 통

하여 활성성분 추출을 증대 및 인삼가공 산물의 보존성을 증가시킬 수 있다.

(2) 대사산물의 전환에 의한 유효물질 생합성

β -Glucosidase 활성을 갖는 효소들을 대상으로 식물체의 aglycone 형태 활성물질을 보다 효율적으로 추출하는 방법을 개발한다. 이런 기술들은 참깨로부터 sesaminol, 상백피와 포도로부터 resveratrol, 백강잠, 상백피, 닭의장풀로부터 1-deoxy nojirimycin, 귤, 오렌지로부터 naringenin 및 hesperetin, 은행잎, 메밀, 양파로부터 quercetin, 황금으로부터 baicalin 등의 전환에 활용할 수 있다. 또한 생균제의 생합성 효소에 의해 천연물내의 구성성분의 전환으로 새로운 생리활성물질을 개발하거나 당의 결합에 의한 감미료와 같은 새로운 기능성 식품소재를 개발하여 사료첨가제, 식품가공의 첨가제, 기능성식품, 건강보조식품에 사용할 수 있다

(3) 활성이 강화된 제품 개발

활성이 강화된 인삼 제품은 인삼에 함유되어 있는 특정 단일 성분을 분리·정제하여 약리효능을 입증한 인삼의 성분의 강화제품과 차별화된 제품을 개발할 수 있고 밝혀져 있지 않은 유효성분 물질에 대한 화학적 연구와 작용 기전에 대한 연구를 통해 우수성을 과학적으로 입증하여 인삼의 고부가가치 및 활용성을 확대해 나갈 수 있다. 최근 축산분야에서는 광우병, 구제역의 발생 등이 세계적인 현안으로 부각되고 있으며 축산 사료에 항생제의 사용이 규제되면서 친 환경적 이미지를 가지는 미생물 제제나 천연물질의 이용에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 인삼을 생물전환하여 기능성과 소화성을 향상시킴으로써 가축의 소화 촉진, 항병력 증진, 건강 증진 및 장내 세균의 균형 조절 효과를 가지는 기능성 사료 첨가제 개발이 가능하다.

SUMMARY

Ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer, is cultivated mainly in the Korea Peninsula and the northeast areas of China. Its root, also called 'ginseng', has been used as a representative medicinal herb, having tonic effect for 1000 years or longer in the far-east Asia. Ginsenosides are triterpenes saponins considered to be the main bioactive materials of ginseng. More than 30 types of ginsenosides have been found in the roots and in other parts of *P. ginseng*. The transformed natural ginsenosides are more effective in human health than their original form, like ginsenoside Rh2 and 20-(S)-Rg3 in red ginseng which is created by thermal processing like steaming process of fresh ginseng. Additionally, thermal and enzymatic transformation of ginseng has been reported. The objectives of this research were to improve the effective functional compounds of ginseng by converting the effective functional compounds of ginseng using physical and biochemical transformation, and to create the value-added ginseng products using developed physical and biochemical transformation technology.

Because ginseng saponins of sugar structures (glycones) are the main bioactive components in *P. ginseng*, we used commercially available hydrolyzing enzymes to determine their metabolites. We combined a 5% crude ginseng saponin preparation with each of the following: 5% AMG, 5% Pectinex, and 5% Viscozyme. The metabolites generated by the action of Pectinex, which contains pectinase and arabanase, were detected at several bands on TLC and one of these products was supposed to be compound K through same R_f value on TLC. However, the metabolites transformed significantly by AMG and Viscozyme were not detectable, which contains amyloglucosidase and cellulase, respectively. A greater amount of compound K was found in the mixtures containing 5% ginseng extract than in those of other ginseng products. The extent of biotransformation ginseng in the presence of Pectinex depends on the pH and temperature of the reaction mixture. The amount of compound K produced, as determined by HPLC, was produced optimally at pH 3 to pH 5 and at 50⁰C-55⁰C on the first day after Pectinex exposure. The optimal conditions for the production of compound K from rootlet ginseng were found to be 10% to 15% rootlet ginseng, pH 5, 50⁰C, and 2 to 3 days of incubation.

For physical transformation, ultra high pressure processing was applied. Approximately 150g of ginseng powder slurry (70%, 80%, 90% moisture content) was put into a

retortable pouch then hermetically sealed using heat sealer, and subjected to ultrahigh pressure treatment at selected pressures in the range of 150–600 MPa for different durations (5-15min). UHP ginseng showed relatively higher extraction yield (312.2-387.1 mg/g ginseng) and amounts of crude saponin (19.3-32.6 mg/g ginseng) than control ginseng (189.9 ± 1.8 mg/g ginseng and 17.5 ± 1.1 mg/g ginseng, respectively). Extraction yield gradually increased with increasing pressure level and pressing time. However, crude saponin content was not affected by pressure level and pressing time. Therefore, correlation coefficient between extraction yield and crude saponin content was relatively low ($r^2=0.2908$, data not shown) suggesting that these two parameters are not always highly correlated. When ginseng slurry was treated with UHP, the cellular structure altered and/or damaged. Therefore, not only crude saponin content but also large amounts of cellular contents were extracted during UHP processing resulting in relatively higher extraction yield. This may be one reason for relatively low correlation between extraction yield and crude saponin content. The highest extraction yield and crude saponin content were obtained in 90 % moisture content sample pressurized at 600 MPa for 15 min. Overall, amounts of measured six ginsenosides (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, and Rg1) increased with UHP processing but Rg3 did not appear in both control and UHP treated ginsengs. On the other hand, pressure level and pressing time did not influence the amount of ginsenosides suggesting that relatively lower pressure level and short pressing time would be enough to increase the amount of ginsenosides compared to control. It is interesting to note that the sharp contrast between control ginseng and UHP treated ginseng is enhanced by intensity of latter peak area. The peaks at retention time about 81 min and about 82 min are considered as Rh2 and compound K, respectively. It has been reported that these two ginsenosides showed very similar retention time in HPLC analysis. Thus it is very difficult to identify these two peaks with only HPLC analysis and further investigation is needed to clear interpretation of these two materials. UHP processing of ginseng greatly influence the extraction yield and ginsenoside contents at relatively low pressure level and pressing time and UHP induced non-thermal transformation of some ginsenosides needs to be further investigated. This work elucidates the potential of non-thermal UHP extraction of ginseng. In this work, we developed both physical and biochemical transformation of ginsenoside, which can be used to produce value-added ginseng products.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of the Research	13
1. Goal of the Research	13
2. Need of the Research	17
3. Scope of the Research	21
Chapter 2. Status of the Research	23
1. Domestic Status of the Research	23
2. Oversea Status of the Research	24
Chapter 3. Research Contents and Results	25
1. Materials and Methods	25
2. Results	33
Chapter 4. Object Achievement and Contribution to Related Fields	87
1. Object of Research	87
2. Object Achievement	88
3. Contribution to Related Fields	90
Chapter 5. Their Applications of Research Results	91
Chapter 6. State of the Art Report	95
Chapter 7. References	97

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	13
제 1 절 연구개발의 목적	13
제 2 절 연구개발의 배경	14
1. 인삼의 효능	14
2. 인삼의 유효성분	15
3. 인삼의 체내 대사	15
4. 인삼의 생물전환	16
제 3 절 연구개발의 필요성	14
1. 기술적 측면	17
2. 경제·산업적 측면	19
3. 사회·문화적 측면	20
제 4 절 연구의 내용 및 범위	21
1. 생물전환 조건 확립	21
2. 전환물질의 분석 및 분리·정제	21
3. 전환물질의 가공적성 분석	22
4. 발효물의 생리활성 분석	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 1 절 국내 연구동향	23
제 2 절 국외 연구동향	24
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1 절 연구내용	25
1. 사용 균주 및 효소	25
2. 사용시약 및 기기	25
3. 인삼의 발효 및 분석	28
4. 배당체 분해 및 당전이 효소의 개발	29
5. 당분해효소를 이용한 인삼의 전환	30
6. 인삼 유효성분의 가공 적성 연구	31

7. 생리활성 분석	31
제 2 절 연구결과	33
1. 생균제를 이용한 인삼의 발효	33
2. 당 분해효소에 의한 인삼의 전환	43
3. 배당체 분해 및 당전이 효소를 이용한 인삼의 전환	53
4. 인삼 유효성분의 가공 적성 연구	64
5. 시제품 개발	81
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	87
제 1 절 연구개발 목표와 내용	87
1. 세부 연구기관	87
2. 제1협동 연구기관	87
2. 제2협동 연구기관	87
제 2 절 연차별 연구개발 목표와 내용	88
1. 1차년도	88
2. 2차년도	88
3. 3차년도	88
제 3 절 연구평가의 착안점	90
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	91
제 1 절 기대효과	91
1. 인삼의 효능 증대	91
2. 활성이 강화된 제품 개발	91
3. 친환경 소재 개발	92
제 2 절 활용방안	92
1. 다양한 형태별 인삼 제품의 개발	92
2. 대사산물의 전환에 의한 유효물질 생합성	93
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	95
제 7 장 참고문헌	97

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

천연물을 구성하고 있는 성분들은 탄수화물, 질소화합물, 지용성 화합물 및 기타 미네랄 등으로 미생물이 발효하는데 필요한 모든 성분을 함유하고 있다. 인삼의 경우, saponin (protopanaxadiol, protopanaxatriol, oleanolic acids)은 3-6%, 질소화합물 (단백질, amino acids, peptides, 핵산, alkaloids)은 12-16%, 지용성 화합물 (지질, 지방산, essential oils, terpenoids, polyacetylenes, phenolic compounds)은 1-2%, vitamin (thiamine, riboflavin, ascorbic acid, niacin, biotin, folic acid)은 0.05%, 탄수화물 (다당류, lignins)은 60-70%, 무기화합물 (N, P, K, Ca, Mg 등의 미량원소)은 4-6%를 함유하고 있다. 따라서 인삼은 천연의 재비성분으로 적합하며, 특정 미생물의 발효를 위해 일부 성분만을 보충해 줌으로써 미생물을 이용하여 발효 혹은 생물 전환이 용이하다.

본 연구에서는 다양한 종류의 분해 효소를 생산하는 미생물 생균제를 이용하여 인삼의 배당체 형태를 무배당체 형태로 전환시켜 특정 성분의 함량 증가, 장내 효과 개선 및 소화 흡수율 증대와 생리활성이 증가되거나 새롭게 생합성된 대사산물을 기대하였다. 인삼을 장내 미생물이나 상업적으로 사용되는 생균제나 효소를 이용하여 발효함으로써 유효성분의 추출 증가와 체내에서의 흡수 증대로 장내 미생물의 유무나 가수분해 능력의 차이로 인한 흡수와 효능의 차이를 제거할 수 있다. 미생물에 의한 인삼의 전환 뿐 만 아니라 당분해효소인 Pectinex를 이용한 인삼의 전환으로 생리활성을 보이는 물질을 분리함으로써 기존에 알려진 효능 뿐 만 아니라 새로운 효과를 기대하고 응용방안을 검토하게 되었다. 최종적으로는 기존의 방법에 비교하여 인삼의 ginsenoside의 강력한 성분으로 알려진 compound K의 수율을 더 높일 수 있는 방법과 이 성분을 분리 및 정제하는 방법을 고안하였고 생균제의 발효와 효소의 처리를 통해 새로운 전환물질에 대한 연구도 진행하게 되었다.

Compound K는 면역증강작용, 중앙혈관신생 억제작용 및 세포침윤 억제작용이 있는 것으로 알려져 있는 장내 대사산물의 최종 생리활성물질이다. Compound K를 제조하기 위한 종래의 방법으로, 토양균이나 사람 분변유래의 장내세균을 이용할 경우 상당 시간의 배양기간을 필요로 할 뿐 만 아니라 compound K외에도 다른 중간

체들이 제조되며, β -galactosidase, nariginase 및 lactase 등의 효소를 반응시키는 경우에는 compound K와 진세노사이드 F1이 소량 생성되고 ginsenoside Rh1과 Rh2가 주로 생성되는 문제점이 있다. Compound K의 제조방법으로서 다이올계 사포닌을 쥐에 경구투여한 후 대장에서 compound K를 분리한 경우가 있으나 수율이 매우 낮고 여러 가지 2차 대사산물이 생성되어 compound K를 고순도로 정제하는 데 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 인삼으로부터 여러 공정을 통해 조사포닌 혹은 정제 진세노사이드를 제조하지 않고 미삼, 수삼 자체를 분쇄한 현탁액에 다당류 분해 효소인 Pectinex 또는 Viscozyme을 반응시켜 인삼의 배당체 형태를 무배당체 형태로 전환함으로써 인삼의 진세노사이드 중 가장 강력한 성분으로 알려진 화합물 K와 같은 특정 성분으로 간단하게 전환하여 수율을 향상할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 배경

1. 인삼의 효능

인삼은 생약의 형태로 한국, 중국, 일본 등의 아시아 국가에서 정신의학적, 신경계의 질병 및 당뇨병 등의 여러 가지 질병에 대해 사용되어 왔다(1). 인삼의 주요 생리활성 성분으로는 saponin을 비롯하여 정유성분, 폴리아세틸렌(polyacetylene), 페놀 성분, 배당체 및 산성펩티드 등이 있으며 그밖에도 비타민, 당류, 무기질과 같은 다양한 영양성분들이 함유되어 있다. 그 중 가장 대표적인 생리활성 성분인 saponin의 경우, 1960년의 일본의 Shibata와 Tanaka 그룹에 의해 그 화학적 연구가 시작되었으며, 이후 최근까지도 새로운 saponin 성분 및 saponin 성분의 생리활성에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(2). 인삼의 화학성분과 약리효능은 현대 과학적인 연구를 통해 saponin이 주요 유효 성분으로 밝혀졌고, 그 약리작용으로는 항암작용, 면역기능 강화작용, 혈당 강하 작용, 간 기능 강화작용, 혈압조절 및 동맥경화 예방작용, 조혈 및 빈혈 회복 효과, 노화방지 효과, 뇌기능 강화작용, 갱년기 장애 개선작용, 항스트레스와 항피로작용, 항산화 작용, 기초대사촉진, 중추신경작용, 강장효과, 알코올 해독작용, AIDS 면역 기능 증진, 성기능 부전에 관한 효능, 위장 장애 개선, 불감증, 항위

쾌양 작용, histamine 및 serotonin 유리작용 등이 있다(3,4,5).

2. 인삼의 유효성분

Saponin은 인삼의 약리 효능을 나타내는 주요 물질 중의 하나로 지금까지 30 종의 saponin이 인삼으로부터 분리되어 ginsenoside로 명명되어 있다. 그 중에서 ginsenoside Rh2는 홍삼에만 함유되어 있는 saponin으로 함량이 낮아 약리효능 연구에 필요한 시료의 공급이 제한되어 있어 연구 결과가 아주 적다(6). 이러한 saponin은 당부분(glycone)와 비당부분(aglycone)로 구성된 배당체로서 식물계에 널리 분포하고 있는데, ginsenoside은 비당부가 dammarane계 triterpene인 점이 특징적이고 protopanaxadiol (PD) 및 protopanaxatriol (PT)계로 나누어지며 현재까지 30 여종 이상의 화학구조가 밝혀져 있다(7). 인삼에서 발견되는 주요한 3 가지 형태의 ginsenoside는 protopanaxadiol계, protopanaxatriol계, oleanolic acid이다. 20번, 3번 탄소에 glucose가 붙어 있는데 이것이 가수분해 되어 H로 치환되면, OH기가 두 개가 붙게 되어 diol이 되고, 20번, 6번 탄소에 glucose가 붙어 있는데, 이것이 가수분해되어 H로 치환되면 OH기가 20번, 6번, 3번 탄소에 붙게 되어 triol이 된다(8,9,10). 그러나 이러한 ginsenoside는 고분자 구성성분과 연결되어 있어서 섭취 후 사람의 장내에 서식하는 특유의 미생물에 의해 분해되지 않고서는 체내 흡수가 되지 않아 약효가 없으므로 반드시 장내에 서식하는 미생물에 의해 분해가 되어야 저분자의 형태로 흡수된다(11,12,13). 즉 여러 가지 당이 떨어져 나간, 분자량이 작은 ginsenoside만 인체에 잘 흡수된다고 볼 수 있다. 사람의 배설물을 표본 추출하여 장내미생물의 ginsenoside Rb1의 가수분해 능력을 실험한 결과 표본 중 21%는 분해능력이 없는 것으로 나타났다. 즉, ginsenoside를 분해하는 미생물을 보유하지 않은 것으로 나타났다으며, 분해미생물을 보유한 것으로 나타난 79%도 ginsenoside를 분해하는 능력에 있어서 저마다 차이가 있음을 확인하였다(14,15).

3. 인삼의 체내 대사

인삼의 치료 효과를 높이기 위한 관심의 고조로 인해 인삼의 약효 발현을 위한 주요성분으로 생각되는 ginsenoside의 경구투여 후 관찰되는 활성성분에 초점이 맞추어졌다. 약물 동태학적 연구에서 경구로 투여된 ginsenoside 중 혈중에서 검출되는

활성성분이 ginsenoside 자체가 아니라 ginsenoside의 장내 대사산물이라는 것이 제시되었다. 또한 약물학적 활성에 대한 각각의 활성을 *in vitro*에서 검토한 연구에서도 대사산물이 ginsenoside 보다 활성이 더 높다는 것이 보고되고 있다. 즉 생체막에 대한 친화성이 ginsenoside 보다 대사산물에서 더 높고, ginsenoside의 대사산물이 중앙세포에서 글루코오스의 유입을 차단하는 등의 작용으로 중앙세포의 성장을 억제시키고 중앙과 세균에 대한 여러 약물내성을 반전시키는 효과를 나타낸다는 것이다.

현재까지의 연구에 의하면 경구 투여한 사포닌 중 ginsenoside는 장내 미생물에 의해 대사되어 활성을 보이는 대사체로 변환되며 특히 *Prevotella oris*가 이에 관여한다고 밝혀졌다. 이런 ginsenoside의 장내 미생물에 의한 대사체 중 항암효과가 가장 큰 물질이 20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol (IH-901, compound K)이다. Ginsenoside 중 protopanaxadiol type의 saponin 즉, ginsenoside Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, F2 등의 장내 미생물에 의한 최종적으로 20-β-O-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol 또는 20(S)-protopanaxadiol로 전환되고 대사산물로서 우수한 암세포 전이 억제효과가 보고되었다(1). 전환된 compound K는 tumor invasion를 방해하거나 염색체 변이와 tumorigenesis를 예방함으로써 항전이 나 항암활성을 유도한다(16,17). 그러나 이러한 대사적 경로는 장내 미생물에 따라서 다르다.

4. 인삼의 생물전환

Bifidobacterium K-103은 ginsenoside Rc를 ginsenoside Rd를 거쳐 compound K로 전환된다. 반면에 *Bifidobacterium* K-506은 ginsenoside Mb를 거쳐 compound K로 전환된다(16). 게다가 이러한 ginsenoside Rb1, Rb2와 Rc는 위산과 같은 약산의 처리에 의해 ginsenoside Rg3로 전환되어진다. Bae 등은 ginsenoside Rg3가 사람 장내 미생물에 의해 ginsenoside Rh2로 전환됨을 보고했다(18). 전환된 ginsenoside Rh2는 ginsenoside Rg3나 Rc보다 더 높은 세포독성 활성을 보여준다. 또한 tumor cell line에 대해 인삼 추출액과 발효된 인삼 추출액의 항암활성을 측정하였을 때, 인삼 추출액은 tumor cell line에 대해 항암활성은 나타나지 않았다. 하지만, 발효된 인삼 추출액은 tumor cell line에 대해 항암활성을 나타내었다. 이러한 결과로 보아 인삼 추출액을 경구투여 하였을 때, ginsenoside Rb1, Rb2 그리고 Rc는 사람의 장에서

compound K로 전환됨을 알 수 있다. 그리고 전환된 compound K는 tumor cell line에 대한 항암활성과 같은 약물학적인 활성을 나타낸다. 이러한 결과로 natural glycosides인 ginsenoside Rb1, Rb2 그리고 Rc는 prodrugs로써 장내 미생물에 의해 활성화된 성분으로 전환될 수 있다(19).

제 3 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 천연물의 소화·흡수

천연물에는 유익한 생리활성 성분들이 다량 함유되어 있으며, 많은 종류들이 생리활성물질과 당이 결합된 배당체로 존재하며 배당체를 구성하는 당으로는 glucose, arabinose, galactose, rhamnose, xylose 등이 있다. 대부분 활성물질과 β -glycoside 결합으로 존재하므로 당 결합을 끊을 수 있는 β -glucosidase, pectinase, hemicellulase, lactase 및 cellulase 등의 효소나 미생물을 사용하여 천연물 내의 배당체 화합물을 무배당체 형태로 전환하여 활성 형태의 유효물질 양을 증가시키거나 효율적으로 추출, 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 다양한 종류의 분해 효소를 생산하는 미생물을 이용하여 인삼의 배당체 형태를 무배당체 형태로 전환시켜 특정 성분의 함량 증가, 추출능의 증가, 장내 효과 개선 및 소화 흡수율 증대와 생리활성이 증가되거나 새롭게 생합성된 대사산물을 기대할 수 있다(20).

배당체들은 소장이나 대장에 서식하는 미생물들이 분비하는 다양한 효소에 의해 분해되어 체내로 흡수되지만, 분해되지 않은 성분은 흡수되지 못하고 체외로 배출된다. 배당체의 β -glycoside 결합은 소장에서 미생물에 의해 분해되어야 대장에서 흡수되어 생리활성을 나타낸다(21). 배당체의 종류, 결합 위치에 따라 소장에서의 흡수율이 달라지며, 무배당체가 배당체에 비해 혈액 내로의 흡수나 생리활성이 더 효과적이다. 소장에 존재하는 β -glucosidase 활성에 의한 deglycosylation 과정이 식이 ginsenoside 배당체의 흡수 및 대사 과정에 중요하다고 알려져 있다. 인체로부터 glucocerebrosidase, lactase phlorizin hydrolase와 broad-specific enzyme 등의 β

-glucosidases가 동정되었으며 broad-specific enzyme은 간, 신장, 소장 존재하며 배당체의 흡수, 대사, 배출, 생리활성에 관여하는 것으로 알려졌다.

나. 인삼의 항산화활성

인삼의 효능은 free radical 공격에 대한 방어 기전과 밀접한 관련이 있으므로, 인삼 추출물은 hydroxyl, DPPH, superoxide radical의 제거 및 과도한 운동에 의해 유도되는 산화적 스트레스에 대한 간의 방어 작용에 기여한다고 알려져 있다(22). 활성 산소 및 과산화물이 각종 질병 및 노화 등에 직접적인 원인으로 밝혀지면서, 미국의 대학 및 연구소를 중심으로 노화억제 및 질병치료제로서의 천연 항산화제의 개발 및 생물학적 기능 연구가 활성화 되고 있는 추세이다(23). 인삼의 여러 가지 유효 성분에서 다양한 항산화 활성이 보고되어 있어, 생물전환을 통하여 항산화 활성이 증가되거나 항산화 활성을 가지는 새로운 대사산물을 개발함으로써 지질의 산화 억제, free radical 소거 활성 및 glutamate 독성 보호 작용을 기대할 수 있다.

인삼을 발효하는 동안 saponin을 비롯한 유효성분이 분해됨으로써 분자량이 작아져 경구 섭취할 경우 체내 흡수력이 증진되고, 피부를 통한 흡수도 용이해져 국소적으로 여러 가지 유익한 작용을 기대할 수 있다. 또한 각종 식물 또는 버섯에 함유되어 있는 산성 다당질들의 항암작용, 면역활성 증강작용과 같이 인삼의 산성 다당질에서도 유사한 효과가 보고되어 있다(24).

다. 체내에서 인삼의 소화·흡수

수삼의 유효성분인 ginsenoside 등은 고분자 구성성분과 연결되어 있어서 섭취 후 사람의 장내에 서식하는 특유의 미생물에 의해 분해되지 않고서는 체내 흡수가 되지 않아 약효가 없으므로 반드시 장내에 서식하는 미생물에 의해 분해가 되어야 저분자의 형태로 흡수된다(11). 자연 건조된 백삼은 열수 추출법에 의해 유효성분이 추출되어도 체내에서의 분해는 불완전하여 효과가 낮다. 가열 건조한 홍삼도 유효성분의 추출은 가능하나 체내에서 분해가 불완전하여 더 좋은 효과를 보기 위해서 열수 추출을 한 뒤 섭취하고 있으며, 홍삼 추출물의 경우에 methanol로 유효성분을 추출하지만 체내에서의 분해는 불완전하여 효과가 낮다.

2. 경제·산업적 측면

인체의 생리기능을 활성화시키는 기능성 식품으로서의 인삼(Ginseng)의 유용성이 과학적으로 입증되면서, 세계 건강보조식품시장에서 은행 (Gingko), 마늘 (Garlic)과 함께 소위 "3-G Boom-up"을 주도할 정도로 시장규모가 증가되고 있다. 인삼제품의 주요 소비국은 중국, 홍콩, 한국, 일본, 대만 및 기타 동남아 국가들이며, 주요 수출국으로는 우리나라, 중국, 일본, 미국, 캐나다 등이 있다. 우리나라의 인삼수출은 1990년 1억 6,490만 달러를 정점으로 지속적으로 감소하여, 2002년에는 5,500만 달러로 1990년의 30% 수준으로 축소되고 있는 추세이므로 인삼의 신기능성을 창출함으로써 새로운 시장의 개척이 필수적인 시점이다.

인삼은 우리나라의 전통산업으로 품질에 있어서 세계최고의 수준이나, 최근 중국, 미국, 캐나다 등 새로운 경쟁자의 출현으로 세계시장 및 우리나라에서의 시장경쟁력이 크게 약화되고 있다. 현재 세계 백삼시장은 캐나다와 미국산 백삼이 시장을 주도하고 있으며, 우리나라의 백삼은 이미 세계 시장에서 경쟁력을 상실하여 국내시장에서만 소비되고 있다. 이상과 같이 우리나라 인삼 관련 제품의 총 수출량이 감소하고 있을 때, 스위스의 Pharmaton 제약회사가 제조한 GINSANA라는 인삼 캡슐제품은 2001년도에만 약 1억불 정도가 전 세계에 판매되고 있으며(25), 최근 중국, 미국, 캐나다 등 새로운 경쟁자의 출현으로 세계시장 및 우리나라에서의 시장 경쟁력이 크게 약화되고 있다.

인삼 종주국이라는 명성과 지위를 유지하고 있는 6 년근 홍삼 역시 1996년의 전매제 폐지에 따른 품질저하, 국내업체간 수출시장에서의 과다경쟁, 외국시장에서의 가짜 홍삼 범람, 국내 묘종의 해외 생산에 따른 품질 격차의 감소, 재배지역의 감소, 인건비의 상승 등 생산원가의 증가, 불합리한 유통구조에 의한 물류비용의 증가 등의 복합적인 문제로 인하여 해외시장에서의 점유율이 지속적으로 하락하고 있음. 따라서 고부가가치를 목적으로 하는 새로운 시장의 창출이 필요하다(26). 더욱이 2인삼 관련 시장의 개방은 우리나라 인삼 관련 산업의 존립에 영향을 미칠 수 있는 심각한 위기적 상황을 야기하고 있다. 따라서 인삼 가공 제품의 기능성을 증진시키고 인삼 성분의 생물전환 관련 기술을 확보하여 농가 소득수준의 향상과 관련 제조업의 확대를 유도함으로써 인삼 종주국으로서의 명예를 지키고 인삼 관련 제품의 세계 시장

확대에 따른 준비가 필요하다.

3. 사회·문화적 측면

가. 생균제를 이용한 인삼의 발효

생균제 (probiotics)는 Parker (1974)에 의해 "장내 미생물 균형에 도움을 주는 미생물 혹은 첨가물"로 제안되면서, Fuller (1989)에 의해 "장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주에 유익하게 작용하는 살아있는 미생물 첨가물"로 정의된다. 상업적으로 사용되는 생균제로는 젖산균 간균 (*Lactobacillus acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. casei*), 젖산균 구균 (*Enterococcus faecium*, *Ec. faecalis*, *Streptococcus thermophilus*), 비피더스균 (*Bifidobacterium thermophilum*, *Bif. Bifidum*, *Bif. pseudolongum*), 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*), 고초균 (*Bacillus subtilis*, *B. coagulans*), 국균 (*Aspergillus oryzae*), 낙산균 (*Clostridium butyricum*) 등이 있다(27).

나. 인삼의 발효물의 친환경 소재로의 개발

최근 축산분야에서는 광우병, 구제역의 발생 등이 세계적인 현안으로 부각되고 있다. 축산 사료에 항생제의 사용이 규제되면서 친 환경적 이미지를 가지는 미생물 제제나 천연물질의 이용에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 인삼을 생물전환하여 기능성과 소화성을 향상시킴으로써 가축의 소화 촉진, 항병력 증진, 건강 증진 및 장내 세균의 균형 조절 효과를 가지는 기능성 사료 첨가제 개발이 가능하다.

다. 인삼 가공 식품에 대한 선행연구의 필요성

기능성 식품의 약리활성은 체내에서 효과가 느리고 대상 동물의 상태, 성장단계, 투여방법, 투여량 및 주위환경 등에 따라 그 효과가 영향을 받기 때문에 정확한 생리적 기능을 설명하기 곤란하므로 인삼 성분의 정확한 작용기전, 생리적 효능, 장내 미생물과의 상호관계 및 여러 조건에서의 안정성에 대한 기초 연구가 필요하다.

제 4 절 연구의 내용 및 범위

1. 생물전환 조건 확립

가. 미생물 발효 조건

- 발효 미생물의 특성 분석
- pH, 온도, 배지, 발효산물, 접종량 등 검토

나. 유전자 확보 및 발현

- 효소의 수집
- 배당체 분해 및 변환효소 유전자 확보
- 배당체 분해 및 변환효소 대량 발현 조건 확립

다. 효소작용 연구

- 재조합 효소에 의한 인삼유효성분의 변환 특성 관찰
- 배당체의 분해 및 당전이 산물에 생합성 확인
- 각 효소에 의한 기질 특이성 확립
- 성분 변환 관련 최적효소 선발 및 최적화
- 효소 반응 최적화를 통한 기능성 인삼유효성분의 생산

2. 전환물질의 분석 및 분리·정제

가. 유용 전환물질의 분석

- TLC 분석 조건 확립
- PDA-HPLC 분석 조건 확립

나. 전환물질의 분리·정제

- 산, 알카리 안정성, 수지 흡착성, 용매 이행성
- Diaion HP-20, silica gel, Sephadex LH-20, HPLC 이용
- 인삼유효성분 전환 산물의 분리 정제 및 구조 분석
- UV, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS 등의 기기분석

3. 전환물질의 가공적성 분석

가. 초고압 처리

- 생물전환 전·후의 인삼 유효성분에 대한 초고압 특성 분석
- 초고압처리 인삼의 관능적 평가를 통한 식품소재로의 가능성 검토
- 초고압 처리를 통한 인삼 유효성분의 변화분석

나. pH 안정성 분석

- 농축 방법 및 열처리에 따른 인삼 유효성분의 pH 안정성 분석
- 생물전환 인삼 유효성분의 pH 안정성 분석
- pH 의존성 분석을 통한 가공 적성 검토

다. 열안정성 분석

- 농축 방법 및 열처리에 따른 인삼 유효성분의 열 안정성 분석
- 생물전환 인삼 유효성분의 열 안정성 분석
- 온도의존성 분석을 통한 가공 적성 검토

4. 발효물의 생리활성 분석

- free radical scavenging 활성
- NO 저해활성 측정
- 항균활성 측정
- 세포독성 측정

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구동향

우리나라는 인삼에 대한 재배기술과 가공기술에 관한 노하우가 오랫동안 축적되어 있어 기본 기술력에 인삼의 효능을 극대화시킬 수 있는 신기술을 접목할 경우 고부가가치가 기대되고 있다. 최근 들어 신기술을 이용하여 고부가가치의 기능성 식품을 개발함으로써 국내 인삼 산업을 활성화시키고 고려인삼을 세계적인 상품으로 발전시키려는 연구들이 진행되고 있다. 그 예로서, 한국생명공학연구원 김영국 박사팀은 인삼에서 비만을 억제하는 polyacetylene 계열의 신물질 panaxynone A를 분리하였다(28). 이 물질은 장내 콜레스테롤의 흡수를 억제하여 체내로 유입되는 콜레스테롤의 양을 감소시키는 것으로 알려져 있으며, 생명공학기술전문개발 기업 (주)싸이제닉에 특허실시권을 양도하여 상업화하였다. 그리고 원광대학교 약학대학 김재백 교수팀에 의해서도 국내에서 처음으로 4년 근 인삼을 적정온도, pH, 수분에서 1개월 발효시킨 약리성분이 대폭 향상된 효삼을 개발하였다. 뿐만 아니라 일화 중앙연구소와 경희대학교 약학대학 김동현 교수팀에 의해 세계 최초로 유산균 발효 인삼이 개발되어 ginsenoside의 대사물질인 IH-901의 암 전이 억제 능력과 건강 증진 작용을 확인하였다(29). 그래서 인삼 농축액을 유산균으로 발효하여 saponin 함량과 흡수력을 높인 인삼 제품 락토진생을 출시하여, 인삼과 유산균의 효과를 함께 내어 장내의 부패균 번식을 억제하고 유익균의 번식을 도와 장을 건강하게 하고, 인삼의 항암 및 건강 증진 작용의 효과를 보고하였다. 그리고 서울 대학교와 (주)제일제당의 연구팀은 인삼을 특수 가공하여 일부 기능이 산삼보다 8배 이상 월등한 선삼을 개발하였는데, 일반 인삼에는 없고 홍삼에만 미량이 들어있는 특유의 약효성분인 ginsenoside Rg3, Rg5 등을 다량 함유하여 암세포의 apoptosis를 유도해 암을 예방하고 억제함을 보고하였다(30).

일부 벤처기업에서는 β -glucosidase 등의 미생물 효소를 이용하여 saponin의 분자 구조를 전환시키는 방법으로 ginsenoside Rb2, Rc로부터 Rd 및 다른 특이 성분을 생산하고, 신장 기능 개선 및 혈관확장 등에 효험이 있는 기능성 식의약품을 개발하였으며 기존의 saponin을 산 가수분해하여 고부가가치의 saponin으로 전환하

는 기술도 개발하였다. 또한 사람의 분변을 이용하여 puerarin을 daidzein으로, poncirin을 ponciretin으로, glycyrrhizin을 18 β -glycyrrhetic acid로, ginsenoside Rb1을 compound K로, ginsenoside Rb2를 compound K 등의 유효 생리활성물질로 전환하려는 연구도 진행 중이다(31). 또한 β -glucosidase 효소를 이용하여 300종 이상의 천연물 함유 saponin의 분자 구조를 전환하여 ginsenoside Rb2, ginsenoside Rc로부터 ginsenoside Rd 및 다른 특이 성분의 생산을 시도하고 있다.

제 2 절 국외 연구동향

Akao와 Hasegawa 등은 경구 투여한 인삼의 진세노사이드는 체내에서 대사되어 유의한 효능을 보이는데 이때 장내 미생물의 일종인 *Prevotella oris*가 관여하는 것으로 보고하였다(14). 또한 녹차를 섭취한 뒤, 오줌, 땀, 혈액 등에서 녹차의 catechin 대사산물을 분석하거나 대사산물의 transport와 신진대사과정에 대한 연구가 진행되고 있다. 한편, 특정 물질을 투여한 후 urine 또는 혈액 내에서의 metabolite profiling을 분석하고 이들 자료를 probabilistic neural network 기법을 이용하여 조직 독성을 규명하는 metabonomics 연구 수행되고 있으며 Mayo clinic의 Biomedical Mass Spectrometry and Functional Proteomics Facility에서는 *in vitro*와 *in vivo*에서 치료제의 metabolites를 분석하기 위해 line chromatography with tandem MS 사용하여 약물의 체내 대사에 대한 연구를 수행하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용

1. 사용 균주 및 효소

가. 사용균주

실험에 사용한 균주 중 생균제로 이용된 *Bacillus subtilis* KCTC1666, *Aspergillus oryzae* KCTC6292, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC7919, *Lactobacillus plantarum* KCTC3108, *Lactobacillus acidophilus* KCTC3155(27)와 test organism으로 이용된 *Bacillus subtilis* KCTC1021, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC1750, *Escherichia coli* KCTC1924, *Salmonella typhimurium* KCTC1926, *Staphylococcus aureus* KCTC1927, *Candida albicans* KCTC7965, *Malassezia furfur* KCTC7743는 한국생명공학연구원(KRIBB)으로부터 분양 받아 사용하였다. *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*의 고체 및 액체 배지는 MRS (Difco), *Bacillus*는 nutrient broth (Difco)를, *Saccharomyces*는 YM broth (Difco), *Aspergillus*는 potato dextrose (Difco)를 사용하였다.

나. 사용효소

수삼을 분해하여 유효성분으로의 전환에 사용한 효소들은 상업적으로 판매되어 사용되고 있는 AMG 300L (Novo Nordisk Co., Denmark), Pectinex 100L (Novo Nordisk Co., Denmark) 및 Viscozyme (Novo Nordisk Co., Denmark)을 부산소재 바이오시스로부터 구입하여 사용하였다.

2. 사용시약 및 기기

가. 인삼 재료

실험 재료인 미삼, 수삼 6 년근은 부산광역시 부전시장 인삼상가에서 구입하여

원료로 사용하였고, 원료를 믹서로 2 분 가량 분쇄하여 시료로 사용하였다. 인삼엑기스와 홍삼 엑기스는 (주)고제로부터 얻었고, 홍삼 분말은 (주)고려원인삼으로부터, saponin 분말은 대전소재 KT&G로부터 얻었다. 실험의 대조군으로 사용된 compound K (IH901), Rh2, Rb1, Rg3는 경희대학교 약학대학 김동현 교수님으로부터 얻어서 실험에 사용하였다.

나. 사용시약

배양에 사용된 배지인 Nutrient broth (NB), Luria broth (LB), yeast extract-malt extract (YM) broth, Lactobacilli MRS (MRS) broth, potato dextrose (PD) broth는 Difco (Maryland, USA) 제품을 사용하였다. 활성물질 분리 및 확인에 사용된 silica gel (Kieselgel 60, particle size : 0.045~0.063 nm)은 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터, ODS RP-18 column (ODS-A, 120A, S-5 μ m)은 YMC-GEL사(Tokyo, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)에 이용된 precoated silica plate 60F₂₅₄ (0.25 mm in thickness)와 ODS R18 F_{254s} (25DC-Platten 5x10 cm)는 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 각 분리 단계에서 사용된 유기용매는 SKY SOLTECH 제품을 이용하였고, HPLC 용매는 J.T.Baker (Ashland, USA)의 고순도 제품을 사용하였다. DPPH assay에 사용한 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrozyl와 MTT assay에 사용한 triazolyl blue tetrazolium bromide는 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 세포주 실험에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)는 HyClone (Logan, Utah, USA)사의 제품을 구입하였다.

다. 사용기기

시료의 활성 검색을 위한 흡광도 측정은 ELISA reader (VERSA, USA)를 이용하여 측정하였다. 효소 및 인삼 배양을 위한 진탕 배양기는 Labtech(한국)사의 것을 사용하였고, 인삼 대량배양을 위한 발효조는 Biotron(한국)사의 Pilot 50L Fermentor를 사용하였다. 추출을 위한 초음파 분쇄기는 Hwashin(한국)사의 Power Sonic420을 사용하였다. 물질 분석을 위해 HPLC와 MS를 사용하였다. 본 실험에 사용된 HPLC는 SCL-10A controller, SPD-M10A UV spectrophotometric detector, LC-10AT

liquid chromatograph, FCV-10AL, DGU-14A (Shimadzu Scientific Co., Japan)로 구성되었다. LR-MS는 부경대학교 공동실습관이 보유하고 있는 QP 5050A (Shimadzu Scientific Co., Japan)을 사용하였고, inlet은 DIP로 하고 초기온도는 30°C로 하여 분당 40°C씩 올려 최대온도 340°C까지 고정하였으며, 스캔범위는 50~750m/z로 하였다. 세포배양에는 CO₂ incubator (NUAIRE, USA)를 사용하였다.

라. Thin Layer Chromatography (TLC)

전환된 배양물질을 확인하기 위하여 시료를 silica gel TLC plate (Silica gel 60F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany)의 하단으로부터 5 mm 되는 위치에 점적하였고, 점적 시 각 점적의 직경이 최소가 되도록 주의 하였으며 시료간의 거리는 전개 후 옆 시료에 의해 생성된 spot에 시료가 방해 받지 않도록 0.5 cm 이상 차이가 나도록 하였다. 시료의 전개용매는 chloroform/methanol/water (4/2/1, v/v/v)의 아래층을 사용하여 전개하였다. 전개 후 anisaldehyde sulfuric acid로 분무하고 110°C에서 약 10 분간 가온하여 발색시켰다.

마. High performance liquid chromatography (HPLC)

생균제로의 인삼 발효액의 분리된 활성분획의 농도를 1 mg/ml로 맞추어 5 µl씩 주입하였으며, 이동상은 90% MeOH, 유속 0.5 ml/min, 고정상으로는 YMC C18 column을 사용하였다. 효소 반응하여 전환시킨 활성분획의 농도는 5 mg/ml로 맞추어 10 µl씩 주입하였으며, 이동상은 물(A)와 acetonitrile(C)을 사용하여 30% C(0-5 min); 30-80% C(5-40 min); 80% C(40-50 min)로 농도구배를 주면서 0.5 ml/min의 유속으로 흘렸다. 고정상으로는 YMC C18 column (6.0x150 mm)을 사용하였다.

바. 전환산물의 분리 및 동정

인삼 발효산물이나 효소 전환산물로부터 유용물질로 전환되었거나 신규 가능성이 있는 전환물질을 분리하기 위하여 먼저 발효산물과 전환산물을 MeOH로 추출하고 상등액만을 농축하여 BuOH 추출을 하였다. BuOH 추출물의 산, 알카리 안정성, 수지에 대한 흡착성, 용매 이행성을 조사하여 정제하기 위하여 Diaion HP-20 흡착 chromatography, silica gel TLC와 column chromatography, Sephadex LH-20

column chromatography, reverse phase (RP-18) column chromatography 그리고 HPLC를 통해 활성물질을 분리 및 정제하였다. 그리고 Rf 값, 발색반응, UV, mass spectroscopy 등의 기기분석을 통하여 구조 동정을 하였다. 전환된 산물이 분리 가능한 정도일 경우, recycling HPLC 또는 paper chromatography를 이용하여 당전이 및 배당체를 분리 정제하였으며 정제된 전환 산물은 MALDI-TOF MS, NMR등을 이용하여 구조를 분석하였다.

3. 인삼의 발효 및 분석

가. 인삼의 발효 조건 확립

배양조건은 *Saccharomyces*와 *Aspergillus*인 경우, 30°C에서 120 rpm의 속도로 진탕하면서 5~7 일간 배양하고 *Bacillus*는 37°C에서 2~3일 간 120 rpm으로 진탕 배양하며, *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*는 동일한 조건에서 혐기적 정치 배양하였다. 인삼을 믹서기로 완전 분쇄하여 첨가한 인삼 발효용 배지에 여러 가지 생균제를 접종하여 30°C 혹은 37°C에서 적당한 기간 동안 배양하였다. 인삼 분쇄물을 적당한 배지에 첨가하고 배양한 후, 최적 조성, 최적 온도, 최적 pH, 최적 접종량 및 최적 배양기간을 조사하고 발효산물의 유기산 분석 및 생리활성 분석하였다.

나. 발효 인삼 시료의 제조

인삼 발효액을 대상으로 주요 생리활성 성분인 saponin의 함량과 발효에 의해 생성된 대사산물을 분석하기 위하여 동량의 메탄올을 넣어 2시간 동안 초음파로 추출한 뒤, 진공 건조기로 건조하였다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁한 후 chloroform (CHCl₃), butanol (BuOH)로 순차적으로 추출하여 각 분획물을 완전히 건조시킨 후, MeOH을 이용하여 5 mg/ml, 1 mg/ml의 용액을 만들고 일정량을 취하여 high performance liquid chromatography (HPLC)하여 saponin과 대사산물의 변화를 측정하였다.

다. *Aspergillus oryzae*를 이용한 대량배양

*A. oryzae*를 이용하여 대량 배양하기 위해 먼저, 인삼 3 kg을 믹서로 분쇄하여

30 L potato dextrose (PD, Difco) 액체배지와 함께 멸균한 후, 종배양한 집종균 *A. oryzae*를 10% 접종하여 50 L 발효조(Biotron, KOREA) 30°C에서 120 rpm으로 5 일 간 배양하였다. 배양기간 동안 0.5 g의 소포제(LS-303, Dow-corning, KOREA)를 2 회 첨가하여 saponin에 의해 생성되는 배양액의 기포를 제거하였다.

라. 배양액의 추출 및 용매분획

*A. oryzae*로 5 일 배양한 수삼을 원심분리하여 배양 상등액은 Diaion HP-20 (Mitsubishi, Tokyo, Japan)에 흡착하여 MeOH로 용출하고 인삼 침전물은 MeOH로 추출하여 각각을 모아 농축하였다. 농축액을 chloroform, ethylacetate, buthanol로 추출하여 용매별 분획물을 얻었다. 추출물과 각 분획물은 진공 농축기로 용매를 제거하여 메탄올에 용해시킨 후 정량하여 성분의 변화와 활성 실험에 사용하였다.

4. 배당체 분해 및 당전이 효소의 개발

가. 배당체 분해 효소의 선발

배당체로 구성되어 있는 인삼 성분의 비배당체로의 전환을 효율적으로 수행할 수 있는 효소를 선발하였다. 주로 β -glycosidic 결합을 분해할 수 있는 β -glucosidase를 주 target으로 하였다. 기질의 수용성이 낮으므로 유기용매에서 반응 조건에서도 활성을 갖는 초고온성 미생물 (*Sulfolobus*, *Pyrococcus* 등) 유래 효소에 관심을 갖고 연구를 수행하였다. 기존에 알려진 여러 미생물 유래 유전체로부터 β -glucosidase를 선별하고 PCR cloning을 수행하여 유전자를 확보하였으며 확보된 유전자를 대량 발현할 수 있는 vector (pHIS119, pREST)에 삽입하여 대량발현 시켰다. 이 때 효율적인 정제를 위하여 histidine이나 GST와 같은 tagging을 연결하였다.

나. 당전이 효소의 선발

인삼성분의 전환에 있어서 배당체에 당전이를 시킴으로써 새로운 형태의 배당체를 만들고자 여러 종류의 당전이 효소를 선발하고자 하였다. 당전이 효소로는 CGTase, maltogenic amylase, maltosyltransferase와 같은 다양한 효소를 이용하고자 하였다. 이들 효소의 source로는 현재 본 연구실에서 보유하고 있는 *Bacillus*,

Thermus 유래효소 또는 초고온성 미생물 (*Sulfolobus*, *Pyrococcus* 등)을 사용하고자 하였다. 위에 언급된 효소들을 여러 미생물 유래 유전체로부터 선발하고 대량 발현시킬 수 있는 vector에 삽입 재조합 효소를 만들고 자 하였다.

다. 재조합 효소의 반응특성

재조합 효소에 의한 인삼 saponin의 변환 특성을 관찰함. 배당체 분해효소에 의하여 인삼에 존재하는 여러 배당체가 분해되는 정도를 TLC를 통하여 간단하게 확인함. 또한 당전이 효소가 여러 배당체에 당을 효과적으로 붙일 수 있는지를 관찰하였다. 각 효소에 의한 여러 배당체의 기질 특이성 관찰하고 각 효소와 기질에 대한 효율적 전환 관계를 확인하였다.

라. 효소반응 최적화

배당체의 분해 및 당전이 산물에 생합성에 가장 효과적인 효소를 선발하고 생합성 산물에 대한 전환률을 확인하였다. 배당체의 분해 및 당전이 산물을 효율적으로 생산할 수 있는 효소 반응 조건을 확립하기 위하여 효소, 기질의 농도, pH, 온도, 유기용매에 대한 반응 수율 등을 실험하여 최적 조건 확립하였다.

5. 당분해효소를 이용한 인삼의 전환

가. 처리조건

효소의 선정을 위하여 5% saponin에 식품첨가물 효소인 AMG, Pectinex, Viscozyme을 각각 10%씩 첨가하여 37°C에서 150 rpm으로 5 일간 처리하였다. 또한 인삼시료의 선정을 위하여 5%의 수삼 엑기스, 홍삼 엑기스, 홍삼 분말, 사포닌과 10%의 수삼과 미삼에 분해 활성이 우수한 Pectinex를 10% (v/v) 처리하여 위와 같은 조건으로 반응하였다. 온도별, 날짜별 및 효소 농도별 최적 조건을 선정하기 위하여 온도는 37°C와 50°C의 두 조건에서 실험하였으며 최적 효소 농도를 측정하기 위하여 10% 수삼과 미삼, 그리고 5% 홍삼 분말에 Pectinex를 각각 0.1%, 1%, 3%, 10%를 첨가하여 처리하였다.

나. 배양액의 추출 및 용매분획

10% Pectinex로 5일간 처리한 수삼과 미삼을 원심분리하여 침전물에 상등액과 동량의 MeOH을 첨가하여 1시간 동안 초음파 분쇄기로 분쇄하였다. 진공 농축기로 MeOH을 제거한 후 물에 현탁하고 BuOH로 용매추출한 뒤, 정량하여 성분의 변화와 활성 실험에 사용하였다.

6. 인삼 유효성분의 가공 적성 연구

가. 열 안정성 분석

농축 전, 후 및 농축방법에 따른 인삼 유효성분의 열 안정성 분석하였으며 생물 전환한 인삼의 유효성분에 대한 열 안정성을 분석하였다. 열 안정성의 분석을 통해 유효성분의 온도의존성 분석 및 가공 방법을 검토하였다.

나. pH 안정성 분석

농축 전, 후 및 농축방법에 따른 인삼 유효성분의 pH 안정성 분석하였으며 생물 전환한 인삼의 유효성분에 대한 pH 안정성을 분석하였다. pH 안정성의 분석을 통해 유효성분의 온도의존성 분석 및 가공 방법을 검토하였다.

다. 초고압 처리

인삼 소재의 초고압 처리를 통한 인삼 유효성분의 변화를 분석하였다. 또한 생물 전환한 인삼 소재의 초고압 처리를 하여 인삼 유효성분의 변화를 분석하였다. 초고압 처리 후 유효성분의 열 및 pH 안정성 및 관능평가를 통한 기능성 식품소재로서의 가능성을 검토하였다.

7. 생리활성 분석

가. 항균활성 측정

Paper disc를 이용한 agar diffusion method를 이용하여 배양된 물질의 항균 스펙트럼을 조사하였다. 각 검정 균은 다음표의 각 균주용 배지를 시험관에 3 ml씩 넣어

전배양 하였다. *B. subtilis* KCTC1021, *P. aeruginosa* KCTC1750, *E. coli* KCTC1924, *S. typhimurium* KCTC1926, *S. aureus* KCTC1927은 37°C에서 12~18 시간 진탕배양 하였고, *C. albicans* KCTC7965, *M. furfur* KCTC7743은 30°C에서 24 시간 진탕 배양하였다. LB 한천배지를 멸균하여 식힌 후 각 검정 균의 전 배양액을 1% 접종하고 90 mm Petri dish에 20 ml씩 분주하여 검정 plate로 사용하였다. 물질의 항균활성을 검정하기 위해 10 mg/ml의 농도로 MeOH에 녹인 측정시료 50 μ l를 8 mm paper disc에 흡수시켜 건조시킨 후, 고체배지에 얹어 놓고 24 시간 동안 배양한 후 disc 주위에 나타나는 생육저지환(inhibitory zone)의 직경을 측정하였다.

나. DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH 분자내 질소는 쉽게 전자를 받아들임으로써 본래의 짙은 자색을 잃어버리는 성질을 갖는다. 이러한 전자 공여 작용은 지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 활성 free radical 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도가 된다. 이러한 활성 free radical은 인체 내에서 각종 질병과 노화를 일으키기 때문에 이들과 반응하여 그 활성을 소거시키는 능력을 지닌 항산화제로 작용할 수 있는 새로운 물질을 탐색할 필요성이 있다(22). EtOAc로 추출한 시료를 silica gel TLC를 실시하고 건조시킨 후 DPPH용액(1.5×10^{-4} M in EtOH)을 plate에 분사하여 보라색에서 노란색으로 변화하는 radical 소거활성을 나타내는 부분을 확인하였다. 96-well plate상에서 90 μ l DPPH 용액에 10 mg/ml의 농도로 MeOH에 녹인 측정시료 10 μ l를 넣어 30 분간 방치한 다음 490 nm에서의 흡수도의 감소 정도를 조사하였다.

다. 세포독성 저해 활성 측정

MTT assay는 살아있는 세포의 mitochondria에 있는 탈수소효소에 의해 생성된 blue formazan 결정을 DMSO (dimethyl sulfoxide)로 녹여서 540 nm에서 흡광도로 측정하였다. 세포주로는 MCF-7 cell (5×10^4 cells/500 μ l/24 well)과 PC-3 cell (1×10^4 cells/250 μ l/48 well)을 5% CO₂가 포함된 37°C 배양기에서 12 시간 배양한 후, 측정시료를 처리하고 다시 48 시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 0.5 mg/ml 이 되게 배양세포에 첨가한 후, 37°C에서 4 시간 동안 반응하고 DMSO를 처리하여 20 분간 shaking한 뒤, ELISA reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

라. Nitric oxide (NO) 저해활성 측정

복강 대식세포를 세포 배양관에 5×10^5 /ml의 세포가 되도록 재부유하여 LPS (1 μ g/ml)의 자극 하에 48 시간 배양하고 배양 상등액내의 nitrite 화합물 (NO)를 Griess 반응에 의해 측정하였다(32).

제 2 절 연구결과

1. 생균제를 이용한 인삼의 발효

가. 배양산물의 추출 및 분석

전환된 배양물질을 확인하기 위하여 수삼 배양액을 MeOH로 추출, 건조하고 물에 현탁한 뒤, BuOH로 재 추출 및 건조하여 MeOH에 녹여 10 mg/ml 농도의 시료로 만들어 대사산물의 변화를 TLC로 확인하였다. 시료를 silica gel TLC plate (60F₂₅₄, Merck, Germany)의 하단으로부터 5 mm 되는 위치에 점적하였고, 시료의 전개용매는 chloroform/methanol/water (4/2/1, v/v/v)의 아래층을 사용하여 전개하였다. 전개 후 anisaldehyde sulfuric acid로 분무하고 가온하여 발색시켰다.

수삼 발효액의 분획 농도를 1 mg/ml로 맞추어 5 μ l씩 주입하였으며, 이동상은 0-5분 30% CH₃CN, 5-40분 30-80% CH₃CN, 40-50분 80% CH₃CN으로 하여 유속 0.5 ml/min, 고정상으로는 YMC-Pack C18 column (\varnothing 6.0x150 mm, YMC Co., Japan)을 사용하였다. 표준물질로서 compound K, Rh2, Rb1, Rg3를 사용하였으며, Fig. 1A와 같이 수삼의 protopanaxatriol ginsenoside인 Rb1은 24 분대, Rb1에서 포도당이 1개 분해되어 제거된 Rg3는 33 분대와 36 분대, Rb1에서 포도당이 2개 분해되어 제거되거나 Rg3에서 포도당이 1개 분해되어 제거된 Rh2의 경우, 43.5 분에 확인할 수 있었다. 한편 protopanaxadiol ginsenoside로서 Rh2와 같이 포도당이 2개 분해되어 제거된 compound K의 경우, Rh2와 유사하게 43.0 분에서 확인할 수 있었다. Compound K의 함량을 비교하기 위하여 농도 의존적으로 compound K에 해당 하는 peak의 면적이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1B).

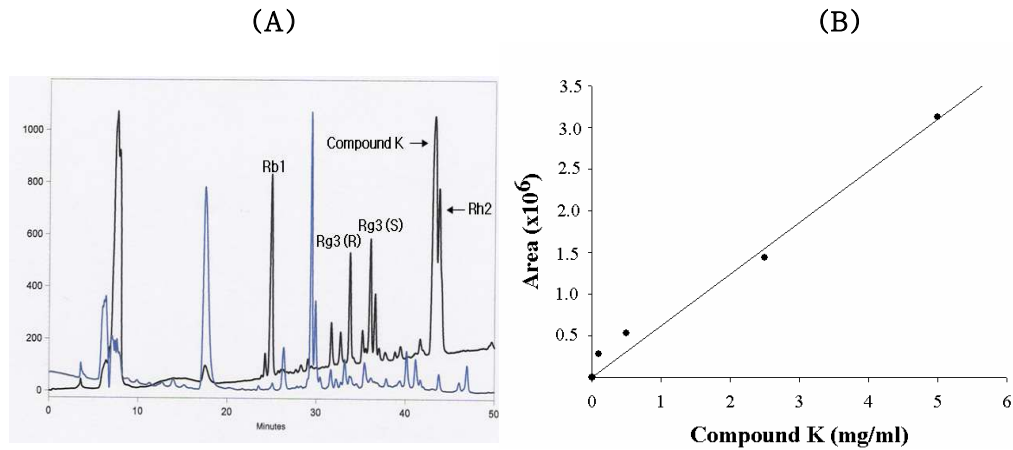


Fig. 1. Quantitative analysis of compound K. (A) Representative HPLC chromatogram of authentic ginsenosides as standards. YMC-Pack C18, \varnothing 6.0x150 mm; A, H₂O; B, CH₃CN; 0–5 min, 30% C; 5–40 min, 30–80% C; 40–50 min, 80% C; 0.5 ml/min. (B) Standard curve of compound K by HPLC.

나. 수삼 발효를 위한 생균제의 선정

Compound K와 새로운 전환물질을 탐색하기 위하여 생균제로서 이용되고 있는 5개의 균주를 선별하여 수삼과 함께 배양하였다. 수삼 6년근은 부산광역시 부전시장 인삼상가에서 구입하여 원료로 사용하였고, 원료를 믹서로 2분간 분쇄하여 시료로 사용하였다. 생균제로는 *B. subtilis* KCTC1666, *A. oryzae* KCTC6292, *S. cerevisiae* KCTC7919, *L. plantarum* KCTC3108, *L. acidophilus* KCTC3155가 이용되었으며, 배지와 함께 멸균된 수삼에 10%씩 각각 접종하여 37°C에서 150 rpm으로 5일간 배양하였다. 생균제에 의한 수삼의 배양 조건은 Table 1과 같았다.

새로운 전환물질을 확인하기 위하여 수삼발효물의 BuOH 추출물을 순상 silica TLC plate에 점적하고 C/M/W (65/35/10, lower phase)를 전개한 후 anisaldehyde sulfuric acid로 분무하여 발색시킨 결과, Fig. 2에서와 같이 *A. oryzae* KCTC6292로 배양한 분획물의 Rf치 0.9 부근에서 새로이 생성된 것으로 예상되는 성분변화를 확인할 수 있었으나, *B. subtilis* KCTC1666, *L. acidophilus* KCTC3155, *L. plantarum* KCTC3108 및 *S. cerevisiae* KCTC7919를 첨가하여 배양한 수삼에서는 전환물질을 확인할 수 없었다. 90% MeOH을 전개용매로 한 RP-18 TLC 결과에서도 순상 TLC에서 확인된 물질로 추정되는 spot을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 한편 수삼을 첨가하지 않고 *A. oryzae* KCTC6292의 종배양액만으로 배양한 분획물에서는 이러한 전환물질을 확인할 수 없었기 때문에 전환물질은 *A. oryzae* KCTC6292 배양액 자체의

것이 아니라 *A. oryzae* KCTC6292에 의해 전환된 수삼에서 유래된 것으로 추정되었다.

Table 1. Fermentation condition of Undried Ginseng by Probiotics.

Probiotics	Medium	Cultural Conditions	Final pH
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1666 (BS)	Nutrient broth (Difco)	Inoculation size : 10% 37°C, 120 rpm, 5 days	8.0
<i>Aspergillus oryzae</i> KCTC6292 (AO)	Potato dextrose broth(Difco)	Inoculation size : 10% 30°C, 120 rpm, 5 days	7.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC7919 (SC)	YM broth(Difco)	Inoculation size : 10% 30°C, 120 rpm, 5 days	5.0
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3108 (LP)	MRS(Difco)	Inoculation size : 10% 37°C, standing, 5 days	3.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC3155 (LA)	MRS(Difco)	Inoculation size : 10% 37°C, standing, 5 days	4.5

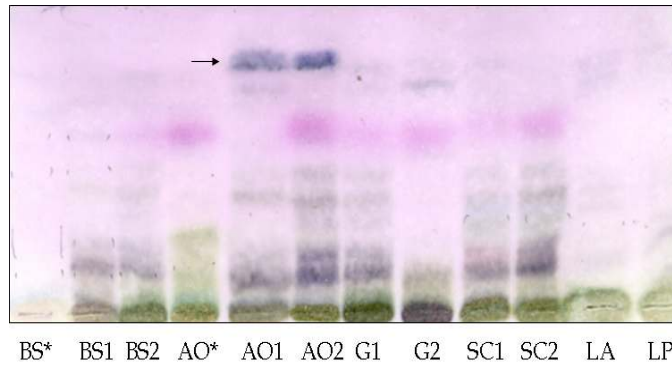


Fig. 2. TLC analysis of fermented Ginseng by probiotics. Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate; chloroform/MeOH/H₂O(65/35/10, lower phase); BS, *Bacillus subtilis* only; BS1, 1st fermented ginseng; BS2, 2nd fermented ginseng; AO, *A. oryzae* only; AO1, 1st fermented ginseng; AO2, 2nd fermented ginseng; G1, autoclaved ginseng; G2, unautoclaved ginseng; SC1, 1st fermented ginseng; SC2, 2nd fermented ginseng; LA, fermented ginseng; LP, fermented ginseng

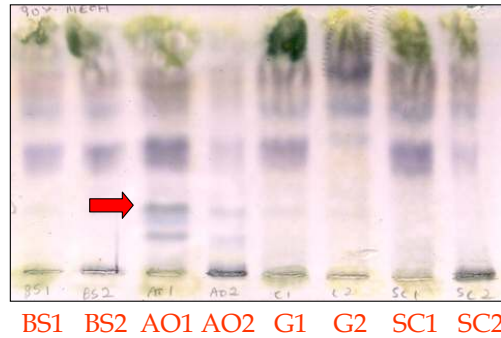


Fig. 3. Reverse phase TLC analysis of Undried Ginsengs Fermented by Probiotics. RP-18; 90% MeOH; BS1, 1st fermented ginseng; BS2, 2nd fermented ginseng; AO1, 1st fermented ginseng; AO2, 2nd fermented ginseng; G1, autoclaved ginseng; G2, unautoclaved ginseng; SC1, 1st fermented ginseng; SC2, 2nd fermented ginseng.

다. *A. oryzae* KCTC6292를 이용한 수삼의 대량 배양

Fig. 2에 나타난 Rf치 0.9의 대사산물의 생성 양상을 검토하기 위하여 수삼의 양과 배양 날짜를 달리하여 실험하였다. 종 배양액은 10% *A. oryzae* KCTC6292로 고정하고 수삼의 양을 각각 5%, 10%, 20%로 하였으며, 배양 날짜는 0 일을 기준으로 하여 3 일째, 5 일째, 8 일째, 10 일째 배양액을 회수하였다. Fig. 4A는 5% 수삼, Fig. 4B는 10% 수삼, Fig. 4C는 20% 수삼에서의 *A. oryzae* KCTC6292에 의한 날짜별 변화를 보여주고 있다. 10 일까지 진탕 배양한 결과, 전환물질이 3 일째부터 생성되기 시작하여 배양 후 5 일에서 8 일째 10% 수삼이 최대로 전환됨을 TLC를 통해 알 수 있었다. 전환물질의 확인을 위하여 인삼 혹은 인삼 전환물질의 주요성분인 ginsenoside Rb1, Rg3, Rh2, compound K와 HPLC를 통하여 비교한 결과, 전환된 물질이 compound K와 동일한 retention time (RT)인 43 분과 일치하며 *A. oryzae* KCTC6292에 의해 수삼의 전환된 물질에는 compound K가 포함되어 있음을 확인할 수 있었다.

전환된 물질을 대량 생산하기 위하여, 수삼 3 kg을 믹서로 분쇄하고 30 L potato dextrose broth 배지와 함께 멸균한 후, 종배양한 *A. oryzae*를 10% 접종하여 50 L 발효조(Biotron, 한국)에서 30℃, 120 rpm으로 5 일간 배양하였다. 사용된 발효조는 Biotron사의 Pilot 50L fermentor이며 초기 배양액의 pH는 4.91이었으나 배양 2 일째 pH 6.6, 배양 4 일째는 pH 6.96, 배양이 끝나는 5 일째 pH는 7.67로 상승하였다(Fig.

5A). 배양기간 동안 공기는 30 vvm으로 고정하였고, saponin에 의한 거품 생성을 방지하기 위하여 소포제(LS-303, Dow-corning, 한국)를 1 일과 4 일째에 2 회 첨가 하였다. 2 일, 4 일 5 일의 발효물을 회수하여 MeOH 추출하고 회수한 시료를 HPLC하여 날짜별로 배양액 내의 전환된 compound K 양을 비교한 결과, 배양 2 일 부터 검출되기 시작하여 5 일째 최대로 생성되는 것을 확인하였다(Fig. 5B).

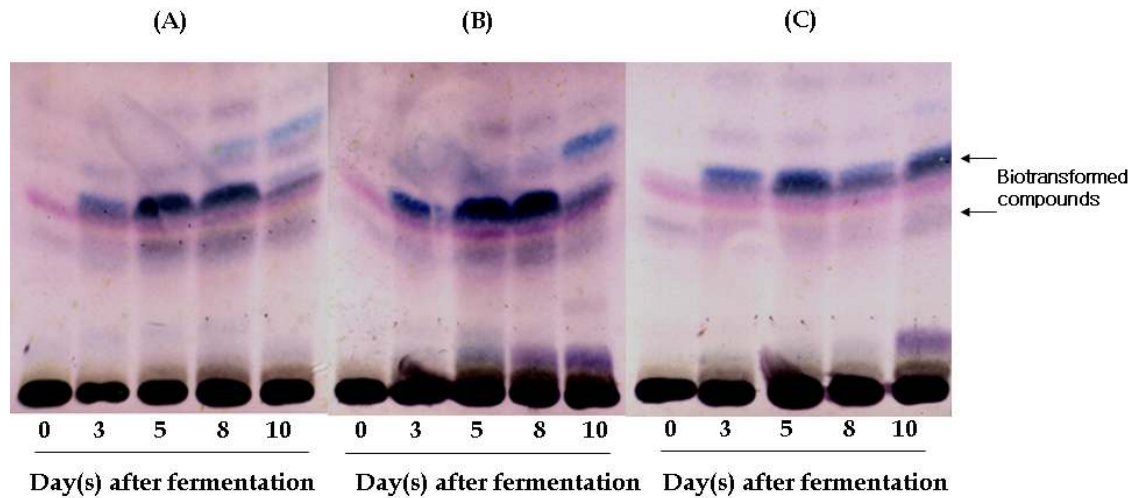


Fig. 4. Culture Profiles of Fermented Ginseng by *Aspergillus oryzae* KCTC6292. Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate; chloroform/MeOH/H₂O(4/2/1, lower phase). (A) 5% ginseng, (B) 10% ginseng, (C) 20% ginseng

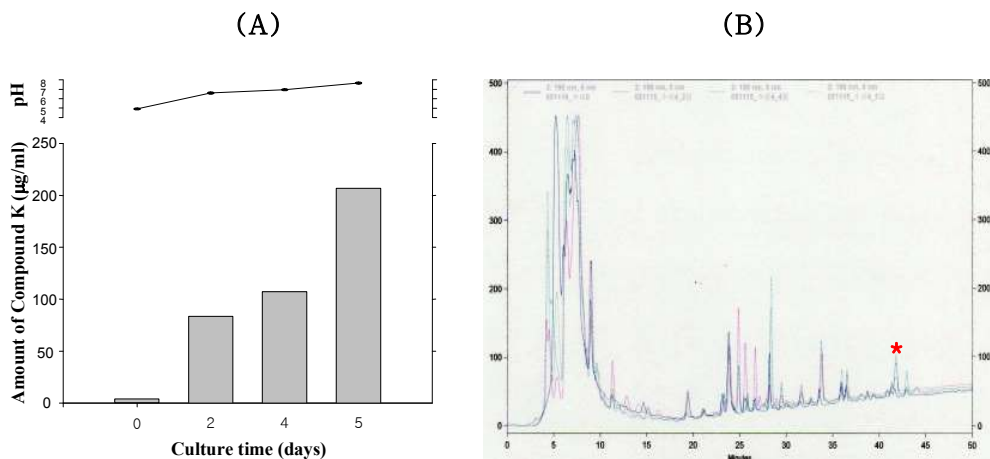


Fig. 5. Cultural Profile of Undried Ginseng by *Aspergillus oryzae*. (A) Profiles of Compound K and pH during Fermentation of Undried Ginseng. (B) HPLC of Undried Ginsengs Fermented by *Aspergillus oryzae*. YMC C8 6.0X150

mm, 0–5min, 30% CH₃CN; 5–40min, 30–80% CH₃CN; 40–50min, 80% CH₃CN, 0.5 ml/min.

라. 전환물질 WG2-2-1과 WG2-2-2의 분리 및 정제

A. oryzae KCTC6292로 발효하여 대량으로 얻은 배양액으로부터 compound K 및 새로운 전환물질을 분리하기 위하여 배양액을 원심분리하여 상등액과 침전물로 나누고 침전물은 30 L의 MeOH로 2 일간 추출하였다. 물로 현탁된 수삼의 MeOH 추출물을 ethylacetate (EtOAc)로 3 회 추출하여 농축시킨 활성분획을 chloroform으로 충전된 silica gel column에서 chloroform과 methanol의 비율을 단계적으로 증가시키는 step-wise 용출법(chloroform : methanol = 50 : 1 → 10 : 1, v/v)으로 전개하여 WG1, WG2, WG3를 분리하였다(Fig. 6). 이 중 활성이 높은 WG2를 선택하여 2 차 silica gel column chromatography 하였고, 이때 전개용매는 chloroform/MeOH/water (65/35/10, lower phase)을 사용하여 WG2-1과 WG2-2의 분획을 분리하였으며 활성이 높은 WG2-2는 80% MeOH로 충전된 RP-18 column chromatography로 용출하였다. Reverse phase column chromatography로 용출된 활성분획을 Fig. 7과 같이 HPLC (3 ml/min, 70% acetonitrile ; 고정상, YMC C18 column, 20.0x150 mm ; detector, PDA)를 이용하여 WG2-2-1 분획을 분리하였다.

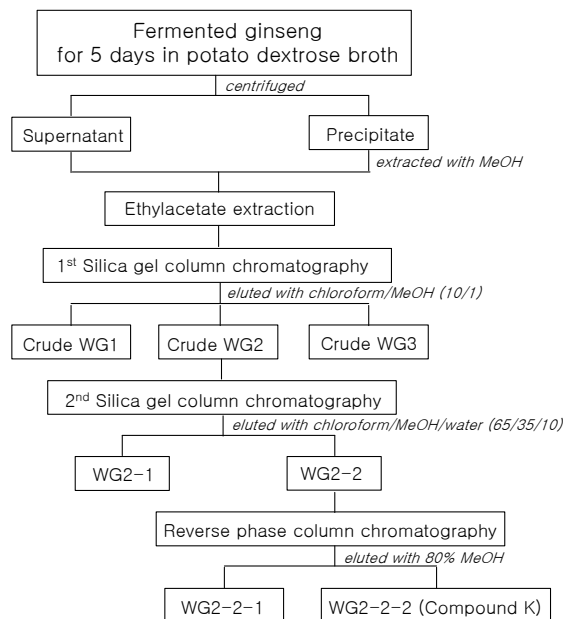


Fig. 6. Purification Scheme of WG2-2-1 and WG2-2-2 from Fermented Undried Ginseng.

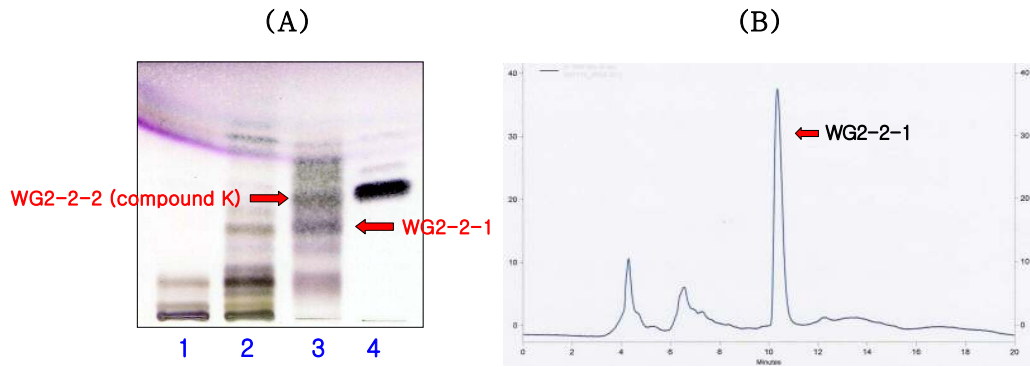


Fig. 7. Purification of WG2-2-1 from Fermented Undried Ginseng.

(A) TLC analysis of WG2-2. silica gel 60F₂₅₄ TLC plate; chloroform/MeOH/H₂O (4/2/1, lower phase); 1, autoclaved ginseng; 2, fermented ginseng by AO; 3, partially purified compound WG2-2. 4, Compound K. (B) HPLC purification of WG2-2-1. YMC C18, \varnothing 20.0x150 mm, 70% MeOH, 3.0 ml/min

마. 전환물질 WG2-2-2의 동정

A. oryzae KCTC6292에 의해 전환된 WG2-2-2가 compound K임을 확인하기 위하여 compound K의 표준물질을 구하여 분리한 WG2-2-2와 LR-MS를 수행하여 비교하였다. 스캔 범위는 50~750 m/z로 두었고 분당 40 °C씩 최대 340 °C까지 올려 분석한 결과, Fig. 8에서 보면 기준에 알려진 compound K의 분자량은 621로서(33, 34) 135, 207, 341, 425 등에서 분절된 molecular ion peak를 확인할 수 있었으며 compound K와 WG2-2-2의 분절양상이 동일하여 전환된 물질 WG2-2-2가 compound K임을 확인하였다.

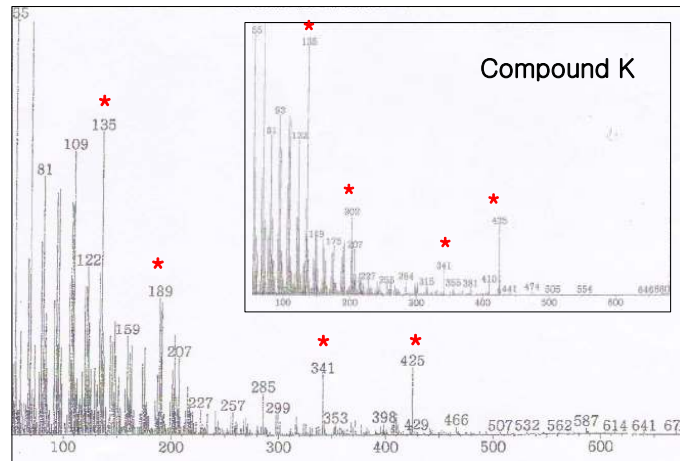


Fig. 8. LR-MS Spectrum of WG2-2-2.

바. 생리활성 측정

배양한 발효산물과 분리, 정제한 물질의 생리활성을 측정하기 위하여 항균활성, DPPH free radical 소거활성, PC-3와 MCF-7 세포에 대한 세포독성을 조사하였다.

1) 항균활성 측정

항균활성을 측정하기 위하여 전배양 된 균종 *B. subtilis* KCTC1021, *P. aeruginosa* KCTC1750, *E. coli* KCTC1924, *S. typhimurium* KCTC1926, *S. aureus* KCTC1927, *C. albicans* KCTC7965, *M. furfur* KCTC7743 1%를 LB 한천배지에 접종하여 검정 plate로 사용하였다. Paper disc에 각 시료의 농도를 10 mg/ml로 맞추어 50 μ l씩 loading 하였으며, disc 당 올려진 시료의 양은 500 μ g이다. Table 3에서와 같이 실험에 사용된 농도에서는 *B. subtilis* KCTC1666, *S. cerevisiae* KCTC7919, *L. plantarum* KCTC3108, *L. acidophilus* KCTC3155에 의한 인삼 발효물의 항균활성이 나타나지 않았다. 그리고 *A. oryzae* KCTC6292에 의해 대량 배양된 수삼의 발효산물에서도 위의 test organism에 대한 항균활성은 전혀 나타나지 않았으며 보고된 바에 의하면 항균활성에 대한 보고는 아직까지 없다.

Table 2. Antibacterial Activity of Ginseng Fermented by Probiotics.

Probiotics	Test Organisms ¹⁾					
	BE	SL	BS	209	R209	C
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1666	- ²⁾	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i> KCTC6292	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC7919	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3108	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC3155	-	-	-	-	-	-
Unfermented ginseng	-	-	-	-	-	-
Fermented ginseng ³⁾	-	-	-	-	-	-

¹⁾ *Staphylococcus aureus*(209), *Staphylococcus aureus*(R209), *Escherichia coli*(BE), *Bacillus subtilis*(BS), *Salmonella typhimurium*(SL), *Candida albicans*(C)

²⁾ 500 μ g of MeOH extract from fermented ginseng

³⁾ Fermented ginseng by *A. oryzae*.

2) DPPH free radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거활성 측정을 위하여 각 분획의 농도를 10 mg/ml로 맞추어 실험에 이용하였다. 96-well plate에 1.5×10^{-4} M의 DPPH를 90 μ l를 넣고 희석된 시료를 10 μ l 섞어 실온에서 30 분간 방치한 다음 ELISA를 이용하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다. 시료의 농도는 1 mg/ml, 300 μ g/ml, 100 μ g/ml, 30 μ g/ml가 되게 하였다. 그 결과 농도의 차이는 있었으나, 분획별 차이는 크게 보이지 않음을 알 수 있었고, 농도 의존적으로 활성이 나타남을 볼 수 있었다. 그리고 분리한 WG2에서의 DPPH radical 소거활성이 1 mg/ml과 300 μ g/ml에서 강한 활성을 확인할 수 있었다 (Fig. 9).

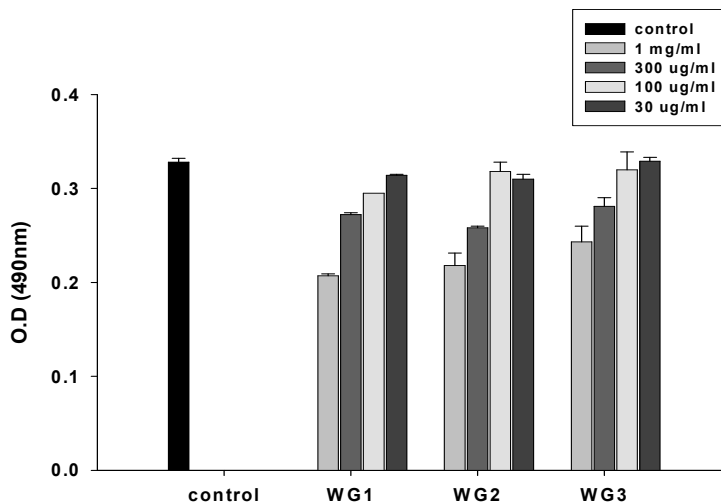


Fig. 9. DPPH radical Scavenging Activity of WG1, WG2, and WG3.

3) 세포독성 측정

PC-3와 MCF-7 세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 48-well plate에 1×10^4 cells/250 μ l의 cell을 분주하여 12 시간 뒤에 WG1, WG2, WG3를 최종 농도가 30 μ g/ml, 10 μ g/ml, 3 μ g/ml이 되게 처리하였다. 그리고 48 시간동안 37°C, CO₂ 세포배양기에서 배양한 다음, 상등액을 제거하고 Triazolyl Blue Tetrazolium Bromide를 0.5 mg/ml이 되게 넣은 후, 37°C에서 4 시간동안 방치하였다. DMSO를 넣어 Fomazan 결정을 완전히 녹이고, 다시 96-well에 100 μ l씩 분주하여 흡광도 540 nm의 ELISA reader로 측정하였다. WG1, WG2는 농도 의존적으로 PC-3 세포와

MCF-7 세포에 대해 저해하는 것을 확인할 수 있었고, WG3는 PC-3 세포에 대하여 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약간 저해하는 것을 볼 수 있었으나 대체적으로 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 10, 11). 따라서 분리된 WG2-2의 분획의 PC-3 세포에 대한 세포독성을 측정 하였고, HPLC (YMC C18 column, $\varnothing 20.0 \times 150$ mm, 70% MeOH, 3 ml/min)를 통하여 분리된 분획(WG2-2-1)에서 세포독성이 나타남을 확인할 수 있었다. WG2-2-2는 WG2-2-1에 비해 세포독성 활성이 더 강했으며, 이런 결과를 통해 WG2-2-1은 WG2-2-2의 중간 단계의 대사산물임을 추정할 수 있었다(Fig. 12).

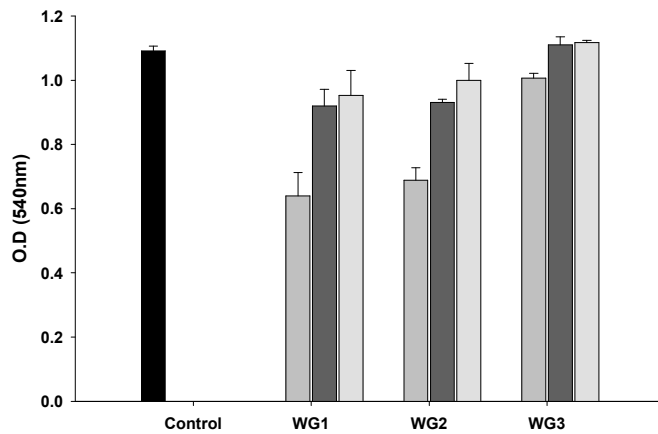


Fig. 10. Cytotoxicity of WG1, WG2, and WG3 on PC-3 cells.

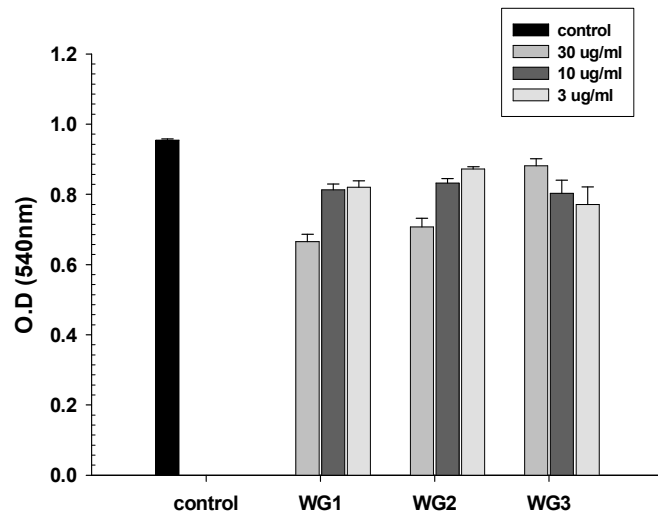


Fig. 11. Cytotoxicity of WG1, WG2, and WG3 on MCF-7 cells.

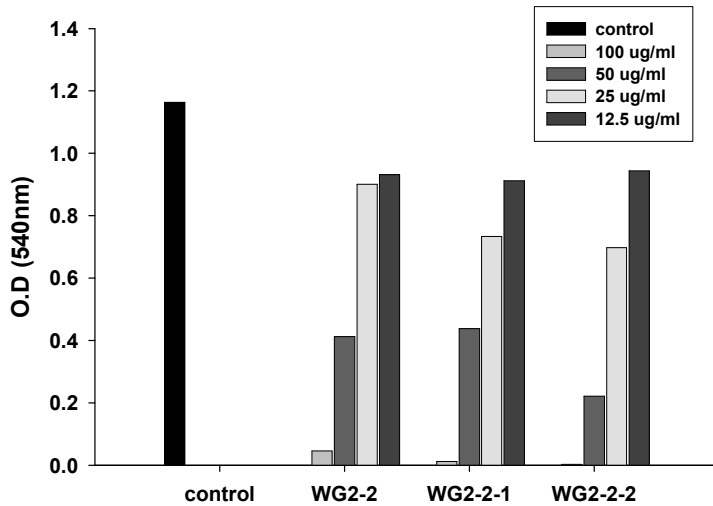


Fig. 12. Cytotoxicity of WG2-2, WG2-2-1, and WG2-2-2 on PC-3 cells.

2. 당 분해효소에 의한 인삼의 전환

가. 전환물의 추출 및 분석

당분해 효소를 처리한 사포닌과 인삼의 메탄올 추출물을 박층크로마토그래피와 고속액체 크로마토그래피를 이용하여 진세노사이드를 분석하였다. 박층크로마토그래피 조건은 키젤겔 60 F254 박층크로마토그래피판(Merck, Germany)를 사용하였으며 클로로포름-메탄올-물의 비율을 4:2:1로 하여 아래 유기용매층을 전개용매로 사용하였다. 전개 후, anisaldehyde sulfuric acid로 분무하고 110°C에서 약 10 분간 가온하여 발색시켰다. 고속액체 크로마토그래피 조건은 시료의 농도를 1 mg/ml로 맞추어 5 µl씩 주입하였으며, 이동상으로 물과 아세트나이트릴을 부피비 30%로 하여 5분간 흘려주고, 40분까지는 80% 아세트나이트릴, 40분에서 50분까지는 80% 아세트나이트릴로 농도구배를 주며 유속은 0.5 ml/min로 하였으며 고정상으로는 YMC-Pack C18 column (∅6.0×150 mm, YMC Co., Japan)을 사용하였다.

나. 효소의 선정

Saponin의 전환에 이용된 당분해효소인 AMG, Pectinex, Viscozyme은

NOVOZYME사의 제품을 이용하였다. AMG와 Pectinex는 *Aspergillus niger*로부터 생산된 효소이며 최적 pH는 4.5이고 최적 온도는 60°C이다. 그리고 Pectinex의 최적 pH와 온도는 pH 3.5와 50°C이다. 또한 Viscozyme은 *Aspergillus aculeatus* 유래의 효소이며 최적 pH는 pH 5이고, 최적 온도로는 55°C이다.

효소의 선정을 위하여 시료로 사용된 saponin을 5%로 고정하고 식품첨가물 효소로 이용되고 있는 AMG, Pectinex, Viscozyme을 각각 10%가 되게 첨가하여 37°C에서 150 rpm으로 진탕 배양한 결과, Pectinex를 처리한 saponin에서 인삼 ginsenoside의 강력한 성분으로 알려진 compound K가 생성되는 것을 TLC를 통해 확인할 수 있었고(Fig. 13), HPLC를 한 결과 29 분, 34 분, 40 분대에도 새로운 물질이 생성됨을 확인할 수 있었다. AMG를 처리한 saponin에서는 새로운 전환물질 및 compound K는 생성되지 않았고, Viscozyme을 처리한 saponin에서는 compound K가 미량 생성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 14). 위의 결과로 AMG와 Viscozyme을 처리 하였을 때, 전환량이 없거나 극미량이므로 새로운 전환 물질과 compound K가 상대적으로 많이 전환된 Pectinex를 선택하여 다른 시료에 적용하였다.

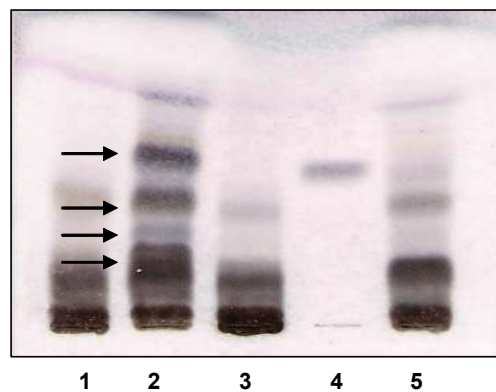


Fig. 13. Ginseng Saponin Biotransformed by AMG, Pectinex, and Viscozyme. Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate; chloroform/MeOH/H₂O(4/2/1, lower phase); 1, biotransformed saponin by AMG; 2, biotransformed saponin by Pectinex; 3, saponin; 4, compound K; 5, biotransformed saponin by Viscozyme

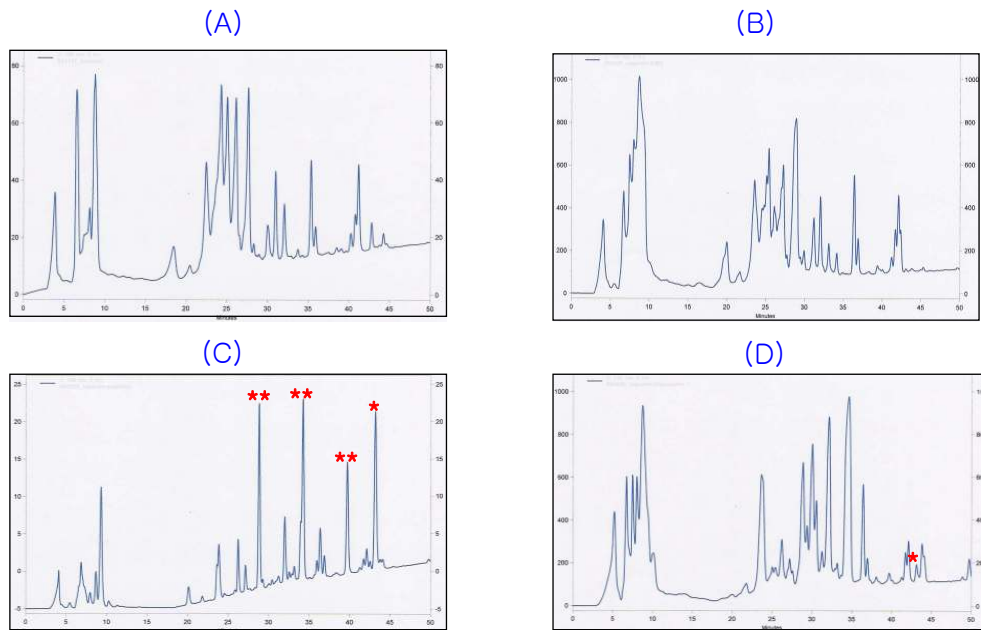


Fig. 14. HPLC Chromatograms of Biotransformed Saponin by Enzymes.

YMC C₁₈ Ø6.0x150 mm; A, H₂O; B, acetonitrile; 0.01–5 min, 30% C; 5–40 min, 30–80% C; 40–50 min, 80% C; 0.5 ml/min. * Compound K, ** Biotransformed saponin by Pectinex, (A) 5% saponin, (B) Biotransformed saponin by AMG, (C) Biotransformed saponin by Pectinex, (D) Biotransformed saponin by Viscozyme

다. Pectinex를 이용한 인삼 진세노사이드의 전환

인삼내 진세노사이드를 화합물 K로 전환하기 위하여 5% 인삼엑기스, 5% 홍삼 엑기스, 5% 홍삼 분말, 10% 수삼, 5% 미삼에 5% Pectinex를 처리하여 50°C에서 150 rpm으로 3일간 효소를 반응시킨 후, 75% 메탄올로 추출하고 부탄올로 추출하여 화합물 K로의 전환량을 고속액체 크로마토그래피로 비교 분석하였다(Fig. 15). 0일, 1일, 2일, 3일의 시료를 회수하여 분석한 결과, 0일째 모든 시료에서의 화합물 K는 측정되지 않았으나, 인삼 시료 모두에서 1일부터 화합물 K가 최대 생성되어 3일까지 유지되었다. 다른 인삼에 비해 5% 인삼 엑기스에의 화합물 K로의 전환율이 가장 높았으며, 5% 미삼, 5% 홍삼엑기스에서도 비슷한 전환율을 보였다. 그러나 10% 미삼, 5% 홍삼분말의 경우, 화합물 K로의 전환율이 낮았다.

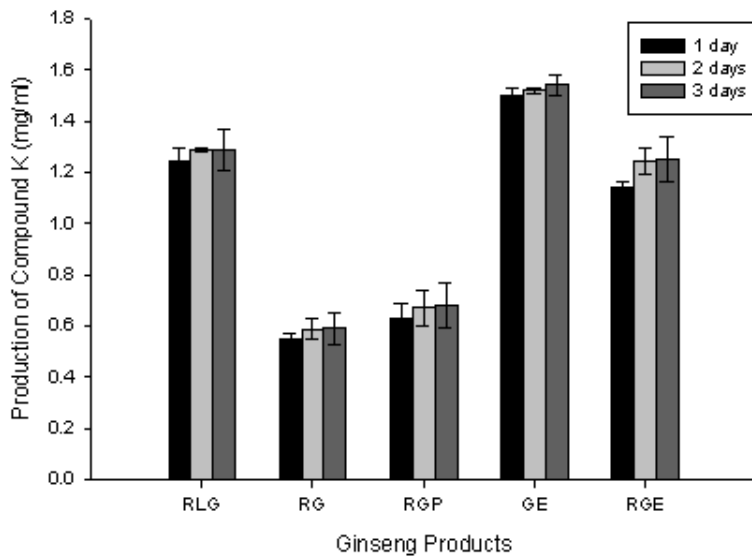


Fig. 15. Amount of compound K produced from ginseng products by Pectinex. RLG: rootlet ginseng; RG: raw ginseng; RGP: red ginseng powder; GE: ginseng extract; RGE: red ginseng extract.

라. Pectinex의 최적 반응 조건 선정

미삼에 대한 Pectinex 처리 pH에 대한 영향을 조사하기 위하여, 5% 미삼에 5% Pectinex를 처리하고 pH 3, 5, 7, 9의 조건에서 50°C에서 150 rpm으로 각각 3일간 배양하고 화합물 K로의 전환율을 알아보았다(Fig. 16). pH 3과 pH 5에서는 1일째부터 화합물 K가 최대 생성되기 시작하여 3일째까지 비슷하게 유지되었으며, pH 7과 9에는 1일째 생성되기 시작하여 3일째에 최대로 전환되었다. 또한 반응온도에 대한 영향을 조사하기 위하여 5% 미삼에 5% Pectinex를 처리하고 pH 5의 조건에서 25, 37, 50, 55°C에서 150 rpm으로 각각 3일간 배양하고 화합물 K로의 전환율을 알아보았다(Fig. 17). 그 결과, 배양온도 50–55°C에서 최대로 전환되었다. 그러나 25, 37°C에서는 전환율이 낮았다. 따라서 미삼에 Pectinex를 처리하여 화합물 K로의 전환을 위해서는 50°C 이상으로 열을 가하는 과정이 필요하다. 한편 효소 처리시 미삼의 함량에 대한 영향을 조사하기 위하여 0.2, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0% 미삼에 5% Pectinex를 처리하고 산도 5, 50°C에서 150 rpm으로 각각 3일간 배양하고 화합물 K로의 전환율을 알아보았다 (Fig. 18). 그 결과, 1일째에는 5.0–15.0%에서 비슷한 전환율을 보

였으나 2-3일째는 10.0-15.0%에서 최대로 화합물 K로 전환 되었다. 따라서 미삼으로부터 화합물 K로 최대 전환하기 위해서는 10.0-15.0% 미삼, 5% Pectinex, pH 5, 50-55°C에서 150 rpm으로 각각 2-3 일간 반응 시키는 것이 최적이었다.

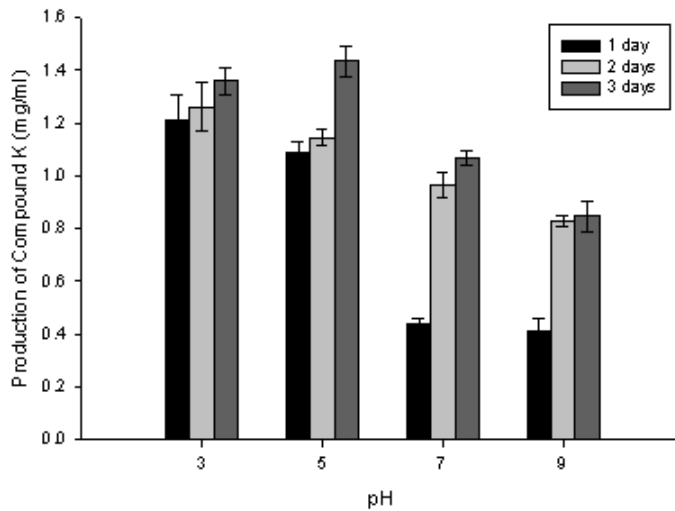


Fig. 16. Optimal pH on the production of compound K from rootlet ginseng by Pectinex.

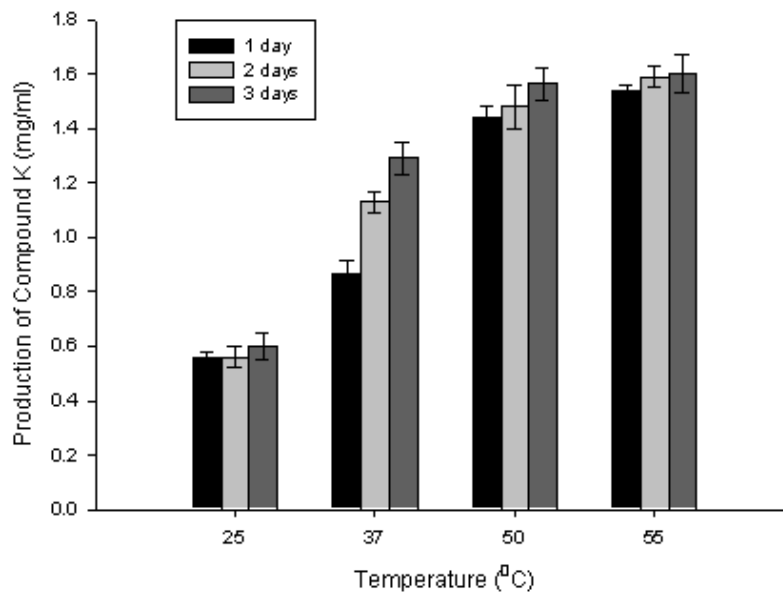


Fig. 17. Optimal temperature on the production of compound K from rootlet ginseng by Pectinex.

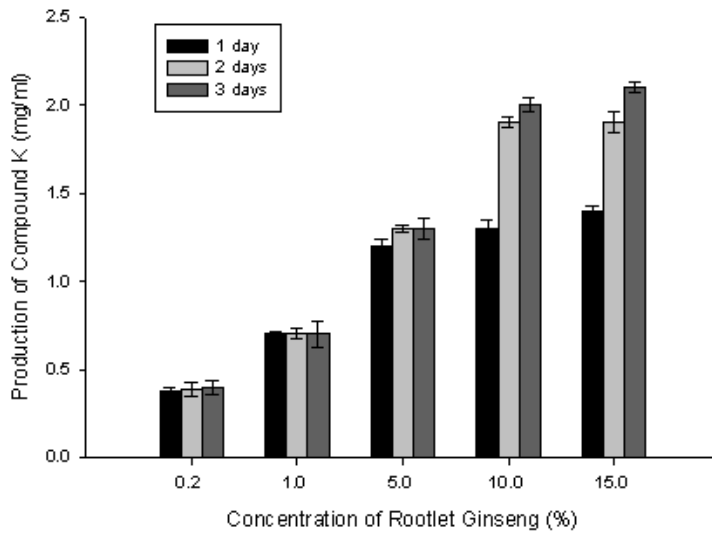


Fig. 18. Optimal concentration of rootlet ginseng on the production of compound K by Pectinex.

마. Pectinex 처리한 미삼으로부터 화합물 K의 분리

위의 결과를 토대로 다량의 화합물 K의 양을 분리하기 위하여 Pectinex로 2일간 처리한 미삼 300 g을 회수하였다. 상등액과 침전물로 나누고 침전물에 상등액과 동량의 메탄올을 처리하여 초음파 분쇄기로 1 시간동안 침전물을 분쇄하여 상등액만을 농축한 후, 부탄올 추출을 하여 30 g의 추출물을 얻었다. 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 위하여 추출물을 실리카겔에 흡착을 시킨 후, 클로로포름으로 충전된 실리카겔에 클로로포름 (200 ml)과 에틸아세테이트 (500 ml)를 용출시키고 클로로포름-메탄올-물의 비율을 부피비 4:2:1으로 하여 아래층만을 전개용매로 사용하였다. 박층 크로마토그래피한 결과, 클로로포름-메탄올-물 (4:2:1, 아래층)의 용매에서 Pectinex에 의해 전환된 화합물 K가 포함된 분획 18 g을 얻을 수 있었다. 이를 60% 메탄올로 충전된 역상 RP-18 컬럼크로마토그래피를 통하여 진세노사이드 F1 (PG-1)을 1.4 g, 70% 메탄올에서는 PG-2(미동정 진세노사이드)를 310 mg 분리하고 70-80% 메탄올에서는 화합물 Y (PG-3)와 화합물 K (PG-4)를 얻었다. PG-3와 PG-4 혼합물은 2차 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 통해 전개용매 클로로포름-메탄올(20:1-10:1, 부피비)의 조건에서 백색분말의 화합물 Y (PG-3, 250 mg)과 화합물 K (PG-4, 4.2 g)을 얻었다 (Fig. 19).

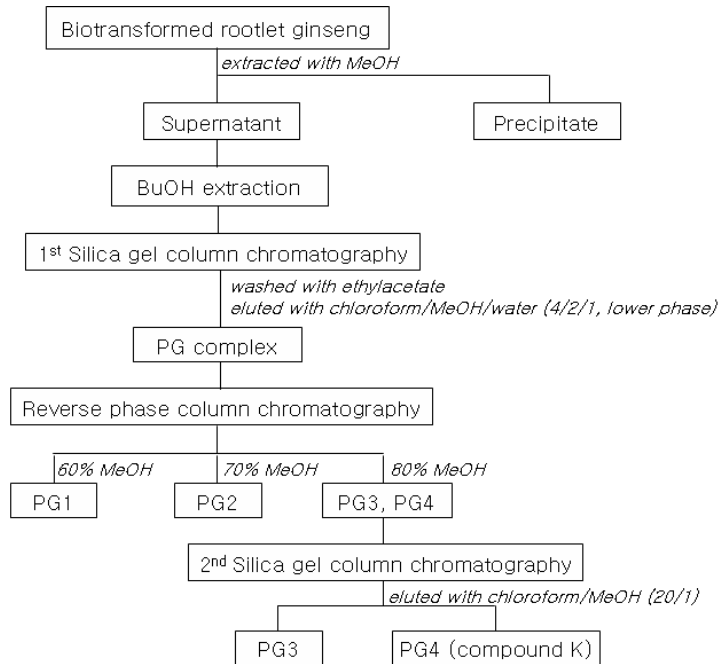


Fig. 19. Purification Procedure of PG-1, PG-2, PG-3 & PG-4.

바. Pectinex 처리를 통해 전환된 화합물 K의 동정

여러 가지 정제과정을 통해 얻은 분리물질 PGF-1, PG-2, PG-3, PG-4를 박층 크로마토그래피, 고속액체 크로마토그래피, 핵자기공명법 등으로 기기분석하여 구조를 동정하였다.

분리 물질 PG-1(진세노사이드 F1)의 물리화학적 성상은 백색의 무정형 분말로서 키젤겔 60 F254 박층크로마토그래피를 이용하여 클로로포름-메탄올-물(4:2:1, 아래층)로 전개하였을 때 Rf값이 0.65이고 RP-18 박층크로마토그래피를 이용하여 메탄올-물(8:2)로 전개하였을 때 Rf값이 0.60이다. 또한 탄소 핵자기공명 스펙트럼(δ)은 16.5, 17.4, 17.5, 17.6, 17.8, 22.3, 23.2, 25.8, 26.7, 28.2, 30.8, 31.0, 32.0, 36.2, 39.4, 39.4, 40.4, 41.2, 47.5, 49.2, 49.9, 51.4, 51.6, 61.8, 63.0, 67.6, 70.2, 71.7, 75.1, 78.3, 78.5, 79.2, 83.3, 98.3, 126, 131 ppm에서 signal을 보여 PG-1은 20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxatriol (진세노사이드 F1)으로 동정되었다(Fig. 20).

분리 물질 PG-3(화합물 Y)의 물리화학적 성상은 백색의 무정형 분말로서 키젤겔 60 F254 박층크로마토그래피를 이용하여 클로로포름-메탄올-물(4:2:1, 아래층)로 전

개하였을 때 Rf값이 0.50이고 RP-18 박층크로마토그래피를 이용하여 메탄올-물(8:2)로 전개하였을 때 Rf값이 0.35이다. 또한 탄소 핵자기공명 스펙트럼(δ)은 16.1, 16.3, 16.3, 17.4, 17.9, 18.8, 22.3, 23.2, 25.8, 26.6, 28.3, 28.7, 30.7, 30.8, 35.1, 36.2, 37.4, 39.4, 39.6, 40.1, 49.5, 50.3, 51.4, 51.7, 56.4, 65.6, 68.6, 69.2, 70.2, 71.8, 72.1, 74.1, 74.9, 76.7, 78.1, 79.3, 83.5, 98.1, 104.78, 126.0, 131.1 ppm에서 signal을 보여 PG-3는 20-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl]-20(S)-protopanaxadiol (화합물 Y)으로 동정되었다(Fig. 21).

분리 물질 PG-4(화합물 K)의 물리화학적 성상은 백색의 무정형 분말로서 키젤겔 60 F254 박층크로마토그래피를 이용하여 클로로포름-메탄올-물(4:2:1, 아래층)로 전개하였을 때 Rf값이 0.70이고 RP-18 박층크로마토그래피를 이용하여 메탄올-물(8:2)로 전개하였을 때 Rf값이 0.30이다. 또한 탄소 핵자기공명 스펙트럼(δ)은 115.9, 16.2, 16.3, 17.3, 17.6, 18.7, 22.2, 23.1, 25.6, 26.5, 28.2, 28.6, 30.7, 30.9, 35.1, 36.1, 37.2, 39.3, 39.5, 40.0, 49.4, 50.2, 51.3, 51.5, 56.2, 62.8, 70.0, 71.6, 75.1, 77.9, 78.2, 79.2, 83.1, 98.1, 125.9, 130.8 ppm에서 signal을 보여 PG-4는 20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol (화합물 K)으로 동정되었다(Fig. 22).

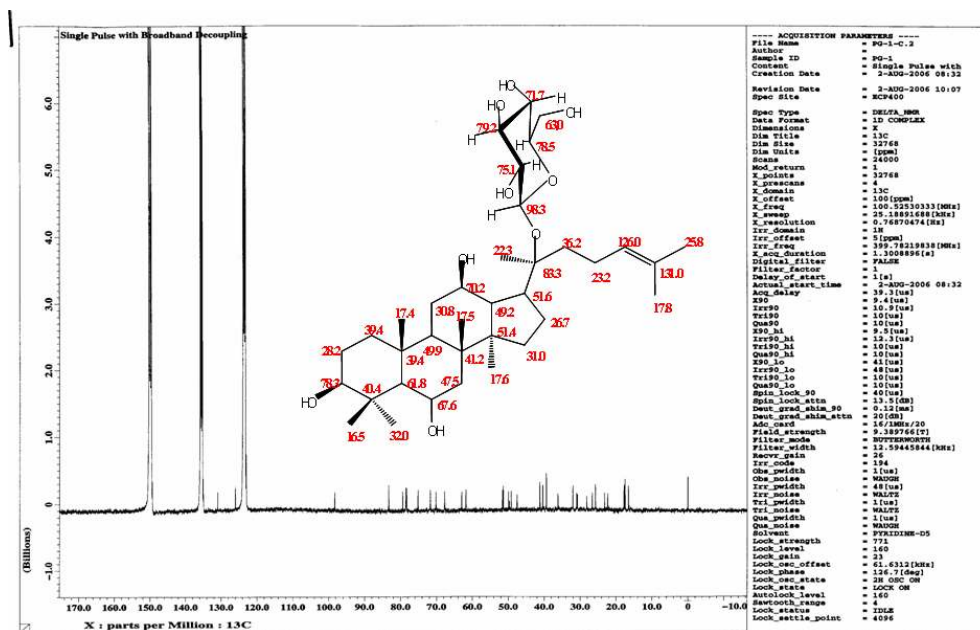


Fig. 20. ^{13}C Assignment and Chemical Structure of PG1.

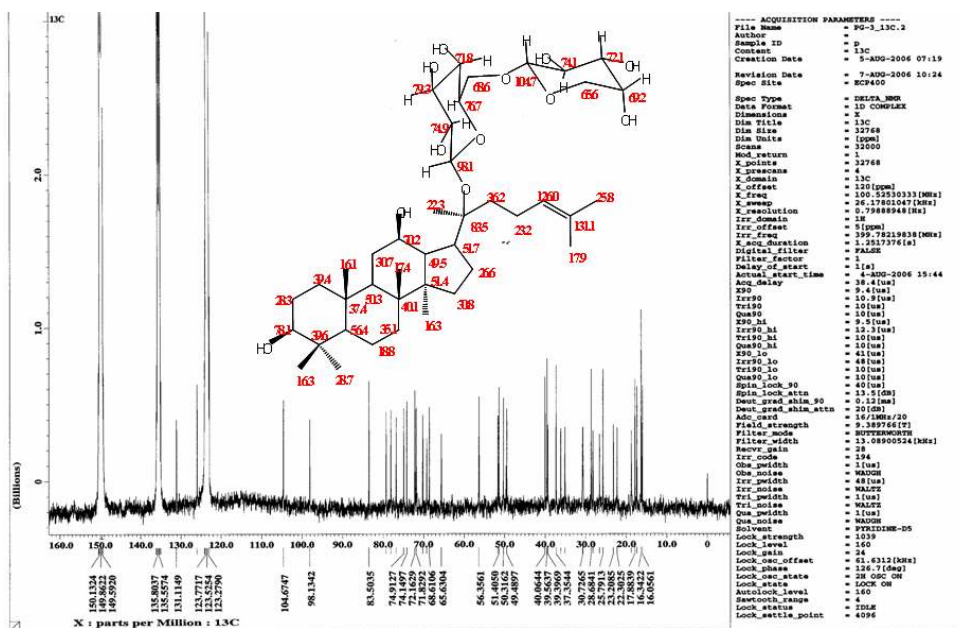


Fig. 21. ¹³C Assignment and Chemical Structure of PG1.

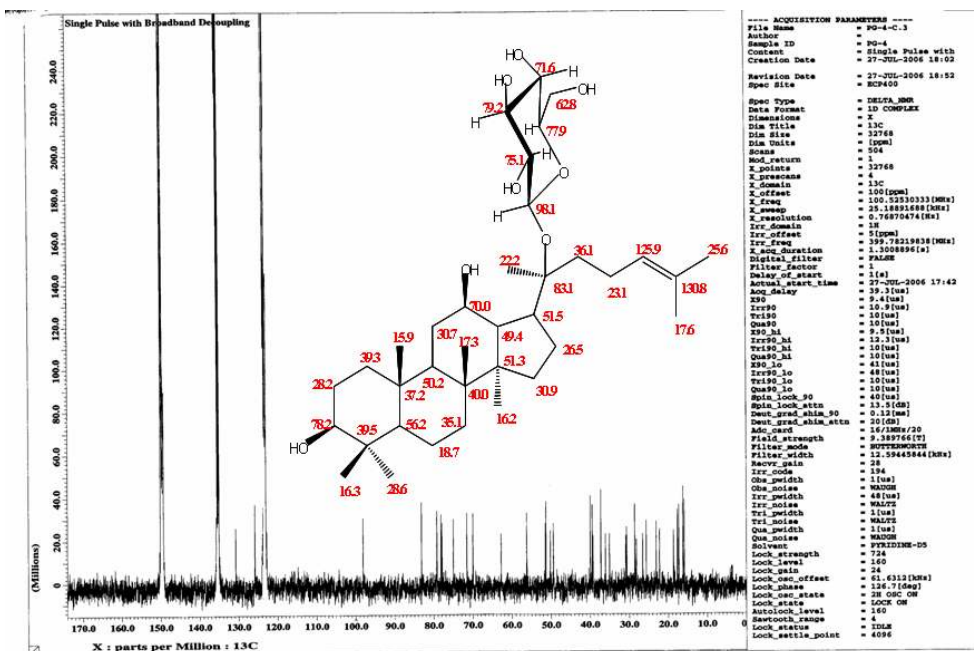


Fig. 22. ¹³C Assignment and Chemical Structure of PG1.

사. 전환물질의 생리활성 분석

인삼의 대사산물은 항암활성을 포함한 여러 가지 생리활성이 보고되었으며 주요 생리활성 성분으로는 사포닌이 알려져 있다. Pectinex에 의해 전환된 미삼, 분리 정제한 전환물질 진세노사이드 F1(PG-1), 화합물 Y(PG-3), 화합물 K(PG-4), PG-2의 전립선 암세포인 PC-3 세포(Fig. 23)와 유방암 세포인 MCF-7 세포(Fig. 24)에서의 항암 활성을 분석한 결과, 전환된 미삼 추출물, 진세노사이드 F1(PG-1), 화합물 Y(PG-3), 화합물 K(PG-4), PG-2 등이 PC-3 세포와 MCF-7 세포에 대하여 세포독성을 보였다. 따라서 전환된 미삼에서 항암활성을 나타내는 인삼 성분으로 진세노사이드 F1(PG-1), 화합물 Y(PG-3), 화합물 K(PG-4), PG-2인 것으로 밝혀졌으며 그 중, 화합물 K로 동정된 PG-4의 경우 농도 의존적으로 가장 높은 항암활성을 보였

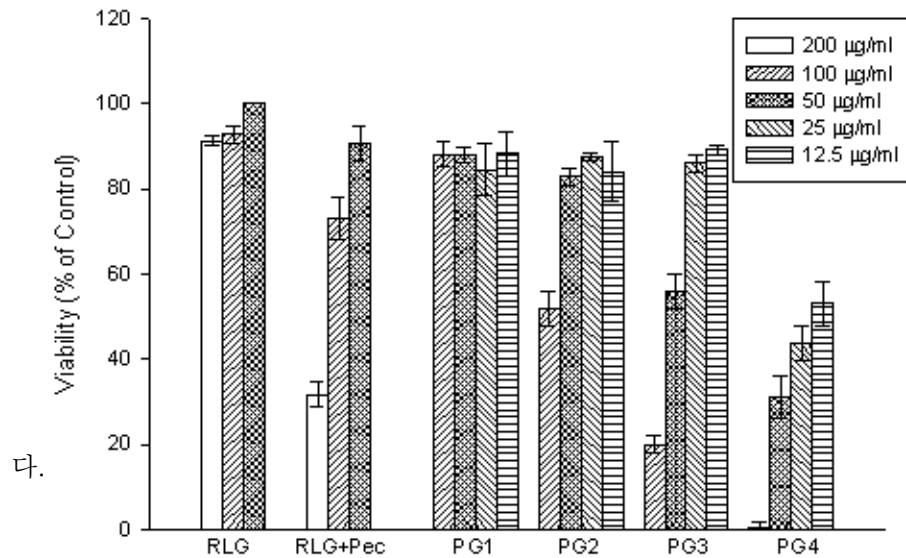


Fig. 23. Cytotoxic activity of ginsenosides metabolites on the prostate cancer PC-3 cells.

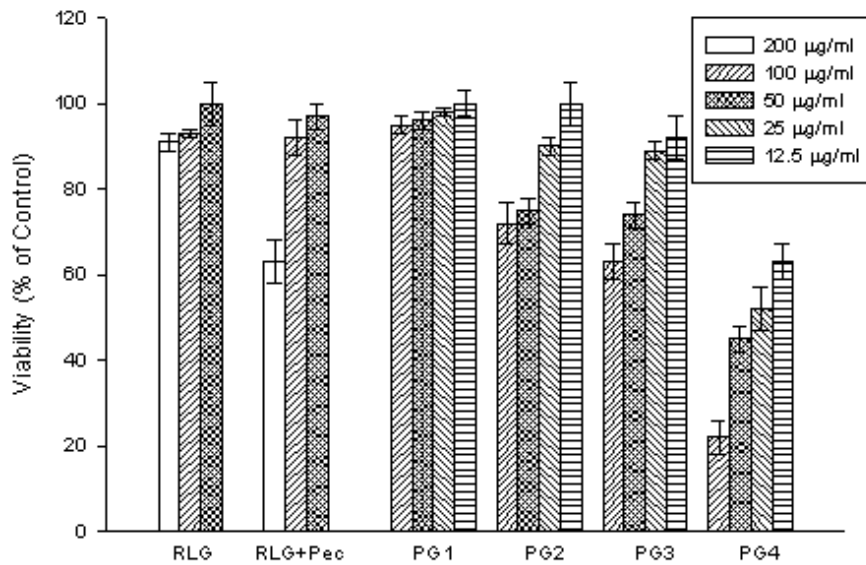


Fig. 24. Cytotoxic activity of ginsenosides metabolites on the breast cancer MCF-7 cells.

3. 배당체 분해 및 당전이 효소를 이용한 인삼의 전환

가. 내열성 *Thermus* 속 균주로부터 α -glucanotransferase 유전자 확보

1) *Thermus* α -glucanotransferase 유전자의 cloning

배당체를 분해 또는 변환할 가능성이 있는 효소 중 기존에 유전자를 확보하고 있는 maltogenic amylase 와 β -glucosidase 외에 α -glucanotransferase (amylomaltase) 유전자를 cloning하고자 하였다. 내열성을 갖는 효소를 확보하기 위하여 내열성 균주인 *Thermus* 속 균주로부터 α -glucanotransferase를 search 한 결과, *T. aquaticus*, *T. scotoeductus*, *T. thermophilus*로부터 유전자가 알려져 있었다. 따라서 이들 이외의 균주인 *Thermus brockianus*를 이용하여 α -glucanotransferase 유전자의 확보를 시도하였다. *T. aquaticus*, *T. scotoeductus*, *T. thermophilus*로부터 알려진 유전자 서열을 비교하여 가능성이 있는 PCR primer를 다음과 같이 제조하였다.

5'→3' primer : ATG GAG CTT CCN C/AGC/G GCT/C TT/AC/T GG

3'→5' primer : TAC CGG/C CTC CGG TGC CCG/C ACC G/CAN ATC

위 primer를 이용하여 아래와 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. 이때 template는 *Thermus brockianus*의 genomic DNA를 사용하였다(PCR 조건 : 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 2min → 35 cycles). PCR 결과, Fig. 25와 같은 PCR fragment를 얻었으며 pGEM T-easy vector에 cloning하여 염기서열을 확인한 결과(Fig. 26), α -glucanotransferase 와 상당히 높은 유사성을 보임을 확인하고 계속하여 발현 벡터를 만들고자 하였다. 염기서열 분석 결과를 다른 *Thermus* 속 α -glucanotransferase 들과 sequence 유사성 비교한 결과는 Fig 27과 같았다. 즉, cloning 된 유전자는 확실하게 α -glucanotransferase와 확인이 되었으며 유전자의 유사성은 다른 *Thermus* 속 유래 α -glucanotransferase와 84-87% 정도의 상당히 높은 유사성을 보였다.

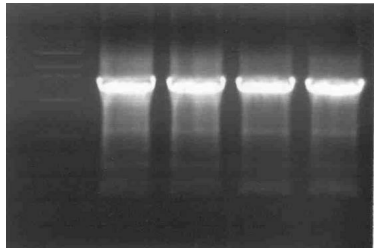


Fig. 25. PCR products from *Thermus brockianus*.

· DNA sequence

```

ATGGAGCTTCCTTGCCTTATGGTCTGCTCCTCCACCCCACGAGCCTTCCGG
GCCCTTGGGGTGTGGGGGTGCTGGGGGAGGAAGCCCGGGGCTTTCTCCGCTT
CCTGAAGGAAGCGGGAGCCCGTTACTGGCAGGTCTACCCCTGGGCCCCACG
GGCTATgGCGACTCCCCCTACCAGTCCTTTAGCGCCTTCGCCGGGAACCCTTA
CCTGATAGACCTAAGGCCCTGGTGGACCGGGGCTTCGTTCGGCTGGAAGAC
CCCGGGTTCCCGGAGGGCAGGGTGGACTACGGGCTCCTTTATGCCTGGAAGT
GGCCCGCCCTGCGGGCAGCTTTCCAAGGCTTCCGCCAAAAGGCTTCTCCTGA
GGAGAAGGAGGACTTCGCCCCTTCCAGGAGGAGGAGGCCTGGTGGCTTCGG
GACTATGCCCTTTTCATGACCCTGAAGTCCCACCACGGCGGTCTTCCCTGGA
ACGCCTGGCCCTTGGCCCTGAGGACGCGGGAGGAGAGGGCGCTAAAAGAGGC
GGAGGCTTCTTGGCGGAGGAAATCGCTTTCCACGCCTTTACCCAGTGGCTC
TTTTTCCGCCAGTGGGGCGCCCTCAAGGAGGAGGCCGAGGCCTTGGGCATCG
CCTTCATCGGGGACATGCCCATCTTCGTGGCCGAGGACTCCGCCGAGGTCTG
GGCCACCCCGAGTGGTTCCACCTGGACGAGGAGGGGAGGCCACGGTGGTG
GCGGGGGTGCCCCCGGATTACTTCTCGAAAACCGGGCAACGCTGGGGCAACC
CCCTTTACCGCTGGGAGGTTTTGGAGGAGGAGGGCTTCTCCTTTTGGATCGC
CCGCTTGCGGAAGGCATTGGAACCTTCCACTTGGTACGCATTGACCACTTC
CGGGGTTTTGAGGCCTACTGGGAAATCCCCGCCTTTGCCCCACGGCGGtGGA
GGGGCGCTGGGTCAAGGCCCGGGGAAAAGCTTTTCGCCCGCATCCAGGAG
GCCTTCGGCCGGATTCCCATCCTGGCGGAGGACCTAGGGGTCATCACCCCGA
GGTGGAGGCCTTGCGGGACCGCTTCGGTCTGCCCGGGATGAAGGTCCTGCAG

```

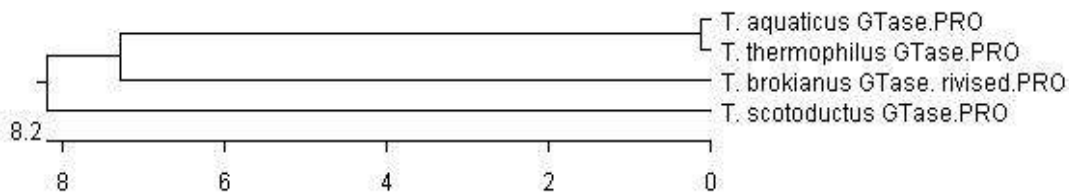
TTCGCCTTTGACAACGGGATGGAAAACCCCTTCCTCCCCACAATTACCCCG
 AGCACGGGCGGGTGGTGGTCTACACCGGCACCCACGACAACGACACCACCT
 GGGCTGGTACCGCACCGCCACGCCCCACGAGCGGGATTTCTGAAGCGGTAT
 CTGGCGGACTGGGGATCACCTTTAGGGAGGAAGCCGAGGTGCCCTGGGCC
 TCATGCGCTGGGGATGGCGTCCCGGGCCCGGCTTGCCGTCTACCCGGTCCAG
 GACGTGCTGGCCCTGGGCTCGGAAGCGCGGATGAACTACCCGGGAAGGCCCA
 GCGGCAACTGGGCTGGCGGCTTCGGCCGGGGGAGATAAAGGAGGAACACGG
 GGAAAGGCTTCTCTCCCTGGCGGAGGCCACGGGCAGGGTTAA

· Amino acid sequence (total 501 a.a)

MELPCAYGLLLHPTSLPGPWGVLGEEARGFLRFLKEAGARYWQVPLPGPTGY
 GDSPYQSFSAFAGNPLYLIDLRPLVDRGFVRLEDPGFPEGRVDYGLLYAWKWPAL
 RAAFQGRQKASPEEKEDFARFQEEEAWWLRDYALFMTLKSHHGGLPWNAWP
 LALRTREERALKEAEASLAEIIFHAFTQWLFFRQWGALKEEAEALGIAFIGDM
 PIFVAEDSAEVWAHPEWFHLDEEGRPTVVAGVPPDYFSETGQRWGNPLYRWEV
 LEEEGFSFWIARLRKALELFLVLRIDHFRGFAYWEIPASCPTAVEGRWVKAPGE
 KLFARIQEAFGRIPLAEDLGVITPEVEALRDRFGLPGMKVLQFAFDNGMENPFLP
 HNYPEHGRVVVYTGTHDNDTTLGWYRTATPHERDFLKRYLADWGITFREEAE
 VPWALMRLGMASRARLAVYPVQDVLALGSEARMNYPGRPSGNWAWRLRPGEI
 KEEHGERLLSLAEATGRV.

Fig. 26. Sequencing of PCR products

· Phylogenetic tree of *T. brockianus* α-glucanotransferase



· Pair distance of *T. brockianus* α-glucanotransferase

		Percent Identity					
		1	2	3	4		
Divergence	1	■	86.4	99.8	86.8	1	T. aquaticus GTase.PRO
	2	15.0	■	86.4	84.2	2	T. scotoductus GTase.PRO
	3	0.2	15.0	■	86.8	3	T. thermophilus GTase.PRO
	4	14.6	17.8	14.6	■	4	T. brockianus GTase. rivised.PRO
		1	2	3	4		

Fig. 27. Phylogenetic tree and Pair distance of *Thermus brockianus* α-glucanotransferase.

2) *T. brockianus* α -glucanotransferase 유전자의 발현

T. brockianus α -glucanotransferase를 대장균에서 발현하기 위하여 기존에 많이 사용이 된 p6XHis119를 이용하여 발현을 시도하였으나 성공적인 발현이 되지 않았다. 따라서 다른 vector인 pRSET vector를 사용하여 발현을 시도하였다 이 pRSET vector는 T7 promoter와 histidine tag를 포함하고 있는 vector이다. Cloning된 *T. brockianus* α -glucanotransferase 유전자를 pRSET vector에 삽입하여 단백질의 생산과 효소 활성을 측정한 결과, 성공적으로 *T. brockianus* α -glucanotransferase의 유전자가 발현되는 것을 확인하였다.

이 때 사용한 발현 방법은 다음과 같았다. 재조합 *T. brockianus* α -glucanotransferase 유전자를 포함하는 전배양한 대장균을 LB 배지에 접종하고 37°C 에서 3 시간 동안 배양한다. 이후 IPTG 를 10 mM 의 농도가 되게 첨가한 후 3 시간 가량 추가 배양하고 cell lysis 한 후에 glucose oxidase method를 이용하여 활성을 측정하였다. 성공적으로 발현된 재조합 *T. brockianus* α -glucanotransferase를 Ni-NTA column을 이용하여 one step으로 분리 정제하였다. 이때 효소는 65°C에서 20분간 열처리를 하여 내열성을 갖고 있지 않은 효소들을 제거한 후 분리, 정제를 시도하였으며 분리된 단백질의 SDS-PAGE 사진은 Fig. 28과 같았다.

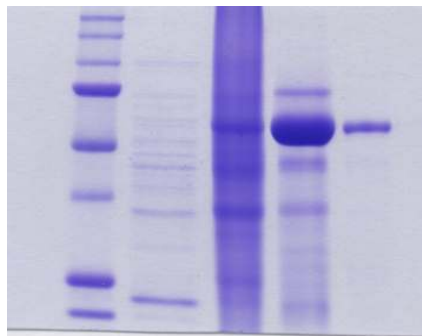


Fig. 28. SDS-PAGE of purified *T. brockianus* α -glucanotransferase. 1. Standard, 2. BL 21, 3. Pellet, 4. Heat treated sample, 5. purified enzyme

나. 당전이 효소 및 배당체 분해 효소 유전자의 확보

1) 당전이 효소 및 배당체 분해 효소의 발현 및 정제

당전이 활성이 있는 효소와 배당체를 분해할 수 있는 효소인 *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase (BSMA), *Bifidobacterium* sucrose

phosphorylase, *Sulfolobus shibatase* β -glucosidase, *Thermus brockianus* α -glucanotransferase (amylomaltase) 유전자를 cloning하였다. 각각의 재조합 유전자는 대장균 expression vector인 p6XHis119에 삽입하였고 분리, 정제를 간편하게 하기 위하여 histidine tag를 붙였다. 발현된 단백질은 Ni-NTA column을 이용하여 one step으로 분리 정제하였고. 정제된 재조합 단백질의 SDS-PAGE 결과는 Fig. 29와 같았다. 각 효소의 활성을 측정하여 성공적인 효소 활성을 확인하였다.

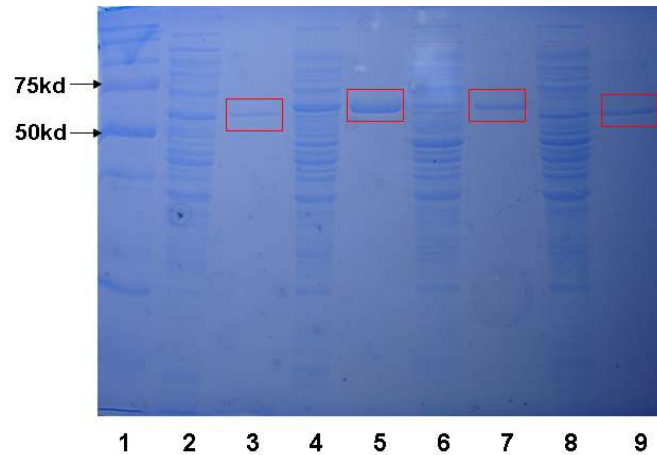


Fig. 29 Purification of various enzymes having transglycosylation and carbohydrate-hydrolyzing activity. 1: marker, 2: whole cell extract, 3: purified α -glucanotransferase, 4: *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase (BSMA) whole cell extract, 5: purified BSMA, 6: sucrose phosphorylase whole cell extract, 7: purified sucrose phosphorylase, 8: β -glucosidase whole cell extract, 9: purified β -glucosidase.

2) 당전이 효소 및 배당체 분해 효소를 이용한 인삼의 생물전환

정제된 효소를 이용하여 인삼의 생물전환을 시도하였다. 각 enzyme에 인삼농축액의 농도를 10% 되도록 하여 total volume 10ml scale로 반응시켰다. 반응시간은 0 hr에서 control을 잡고 각각 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 hr으로 반응시켰다. 당전이 활성이 있는 효소의 경우, 인삼농축액에 존재하는 ginsenoside의 다양성으로 인하여 특별한 당전이 산물이 생성되는 것으로 보이지 않았다. 그러나 배당체를 분해할 수 있는 효소인 *Sulfolobus shibatase* β -glucosidase의 경우 ginsenoside의 변화를 확인할 수 있었다(Fig. 30). Ginsenoside 분석조건에 의하여 TLC를 수행한 결과, 특히 Ginsenoside Rb₁ (G-Rb₁)과 β -glycosidase가 반응하여 compound K로 변하는 결과

를 확인할 수 있었다. G-Rb₁이 compound K로 변하는지 알아보기 위해 순수한 G-Rb₁과 β-glycosidase를 반응시킨 결과, G-Rb₁의 spot이 사라지고 compound K의 spot이 생기는 결과를 얻을 수 있었다. TLC로 정성적 분석을 마친 후, 인삼농축액을 기질로 반응시킨 sample을 HPLC로 정량분석을 시도하였다. 결과적으로 60 시간 이후에 반응이 steady-state로 도달하고 compound K가 최대 생성됨을 보였다(Fig. 31). HPLC 분석 결과 Rb₁, Rc, Rb₂가 분해된 것으로 보이며 세 가지 물질이 분해되어 생긴다고 보고되어 있는 Rd가 1-12 hr 까지는 증가하고 12 hr 이후부터는 감소하는 경향을 보였다(Table 1). Rd에서 당이 하나 떨어져 나가면서 생기는 compound K 역시 24 hr 이후의 시간대에서는 증가하는 경향을 보였다. 그리고 계속 일정한 peak를 보이던 Unknown Product는 72hr 대에서 급격한 증가의 추이를 보였다.

β-glycosidase 활성을 갖는 다른 효소도 같은 활성을 보이는 확인하기 위하여 β-glycosidase *Themotoga neapolitana* 유래 β-glucosidase을 cloning하고 정제한 후 같은 실험을 하였으나 *T. neapolitana* 유래 β-glucosidase는 ginsenoside에 별다른 영향을 미치지 못하였다. 이런 결과를 통해 효소의 종류에 따라 substrate specificity가 다르다는 것으로 결론을 맺을 수 있었다.

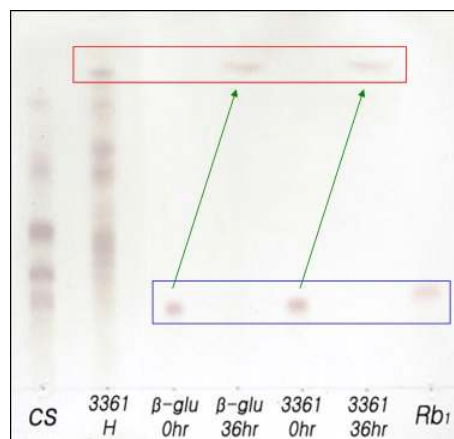


Fig. 30. Ginsenoside Rb₁ reacted by β-glycosidase from *S. shibatae*.

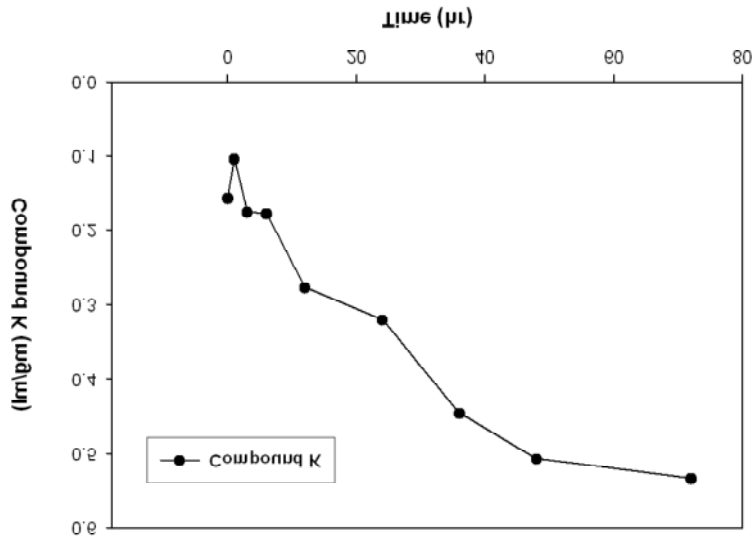


Fig. 31. HPLC results by β -glucosidase from *S. shibatae*.

Table. 3. Relative yield of various ginsenosides reacted with *S. shibatae* β -glucosidase

	Rb ₁ (%)	Rd(%)	F ₂ (%)	C-K(%)
0hr	100	100	100	100
12hr	0	246.6	103.8	145.7
24hr	0	88.9	111	218.5
36hr	0	70.8	98.4	222.4
48hr	0	56.3	103.4	247.7
60hr	0	40.2	108.5	285.5

다. 효율적인 인삼 유효 성분의 생물전환

당전이 효소를 이용하여 인삼의 유효 사포닌에 대한 전환을 시도한 결과, 반응 결과물의 난해함과 효율적인 당전이 반응의 측정이 어렵다는 결론을 얻었다. 따라서, 다양한 배당체 분해 효소를 이용한 효율적인 인삼 유효 성분의 생물전환을 목표로 하여 실험을 진행하였다.

1) 곰팡이로부터 β -glucosidase 효소의 탐색

1차적으로 전통식품으로부터 분리된 곰팡이 균들로부터 β -glucosidase의 활성을 확인하였다. 곰팡이균은 국내 전통식품 제조에 사용되는 메주로부터 순수 분리된 20 균주의 곰팡이균을 사용하였다. API-zym Kit를 이용한 효소의 정성적 활성을 분석한 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 몇 종류의 *Aspergillus oryzae* (#4, 6, 10, 11, 18, 19, 23)와 *A. fumigatus* (# 3, 12, 17, 24)에서 높은 β -glucosidase의 활성을 나타내었다. 그러나 *A. fumigatus*의 경우 비록 식품재료로부터 유래 되었으나 미생물학적으로 식품에 적용가능성이 낮으므로 *Aspergillus oryzae*에 집중하여 다음 실험을 진행하였다. 7 균주의 *Aspergillus oryzae*을 배양하여 배양액에서의 β -glucosidase의 활성을 정량적으로 측정하였다. 각 균주의 crude extract로서의 β -glucosidase 효소 활성은 각각 다음과 같다(Table 5).

2) 곰팡이 β -glucosidase를 이용한 인삼의 생물전환

각 곰팡이 균주의 배양액을 이용하여 crude cell extract를 제조하고 crude extract의 효소활성을 일정하게 맞춘 후에 ginsenoside Rb1과 반응한 후 다른 ginsenoside로의 전환을 HPLC로 확인하였다. 시간을 12시간, 24시간, 48시간 동안 반응 후 분석한 결과는 Table 6과 같았다. 결론적으로 *A. oryzae* 6, 11, 19가 효과적으로 ginsenoside Rb1을 biotransform할 수 있는 능력을 가지고 있음을 확인하였다. 그러나 48시간 반응한 후의 결과를 보면 *A. oryzae* 6, 19의 경우는 거의 모든 ginsenoside Rb1을 compound K로 전환하였으나 *A. oryzae* 11의 경우 ginsenoside Rb1을 전부 변화하지는 하였으나 모두 compound K로 전환되는 것은 아니고 약 50%정도만 전환하고 나머지는 ginsenoside Rd와 F2로 남아 있었다.

Ginsenoside의 생전환 효율을 *S. shibatae* β -glucosidase 효소와 비교하기 위하여 같은 효소활성 조건에서의 *A. oryzae* 6, 19의 ginsenoside Rb1의 전환 효율을 살펴 보았다. Table 7에서 보듯이 전환효율은 곰팡이 유래 효소의 경우 *S. shibatae* β -glucosidase와 비슷한 정도로 관찰되었으나 전환 속도에 있어서 많은 차이를 보여주었다. *S. shibatae* β -glucosidase의 경우 반응 24시간 내에 거의 모든 ginsenoside가 compound K로 전환되었으나 곰팡이 유래 β -glucosidase의 경우는 48시간이 지난 후에야 전환이 다 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 이는 반응 온도가 곰팡이 효소의 경우 30°C에서 이루어졌고 *S. shibatae* β -glucosidase의 경우는 이보다 높은 70°C에서 반응을 진행하였다. 결론적으로 ginsenoside의 생물전환은 *S. shibatae* β -glucosidase를 사용하여 최적화 하였다.

Table 4. Enzymatic activity of various fungal strains isolated Korean traditional food.

	strains	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	unknown	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
2	unknown	-	++	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
3	<i>A. fumigatus</i>	-	++	+	+	-	+++	+++	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+++	+++	-	-
4	<i>A. oryzae</i>	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+++	+++	-	-
6	<i>A. oryzae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	-	+	+++	+	-	-
7	<i>Arthriniium.sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
8	<i>A. fumigatus</i>	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	-	-	-	+	+	-	-
9	<i>A. fumigatus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10	<i>A. oryzae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	++	-	-
11	<i>A. oryzae</i>	-	-	+	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+	+++	+++	-	-
12	<i>A. fumigatus</i>	-	+++	-	+	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	+	-	+++	+++	+++	-
13	<i>A. oryzae</i>	-	++	+	-	-	+	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	+++	+++	-
16	<i>A. oryzae</i>	-	++	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
17	<i>A. fumigatus</i>	-	+++	+	+++	-	+	-	-	-	-	+++	+	-	-	-	-	+++	+++	-	-
18	<i>A. oryzae</i>	-	+++	+	+	-	+	-	-	-	-	++	++	+	+	-	+	+++	+++	+	-
19	<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+++	+++	-	-
21	<i>A. oryzae</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	++	-	-	++	+++	-	-
22	<i>A. oryzae</i>	-	-	+	+	+	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-
23	<i>A. oryzae</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+++	+++	-	-
24	<i>A. fumigatus</i>	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	++	-	-

* Each enzyme is as follows. 1. control; 2. alkaline phosphatase; 3. esterase; 4. esterase lipase; 5. lipase; 6. leucine arylamidase; 7. valine arylamidase; 8. cystine arylamidase; 9. trypsin; 10. alpha-chymotrypsin; 11. acid phosphatase; 12. Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase; 13. alpha-galactosidase; 14. beta-glucuronidase; 15. beta-glucosidase; 16. alpha-glucosidase; 17, beta-glucosidase; 18. N-acetyl-beta-glucosaminidase; 19. alpha-mannosidase; 20. alpha-fucosidase

Table 5. β -Glucosidase Activity of *Aspergillus oryzae* strains.

No of strains	Units/ml
<i>A. oryzae</i> 4	6.8
<i>A. oryzae</i> 6	18.22
<i>A. oryzae</i> 10	2.64
<i>A. oryzae</i> 11	13.46
<i>A. oryzae</i> 18	10.7
<i>A. oryzae</i> 19	19.18
<i>A. oryzae</i> 23	7.48

Table 6. Biotransformation of ginsenosides with fungal β -glucosidases

Microbes	Transformed ginsenoside (μ M), after 12 h				
	Rb1	Rd	F2	CK	Rh2
<i>A. oryzae</i> 4	810	16	18	–	–
<i>A. oryzae</i> 6	492	196	185	–	–
<i>A. oryzae</i> 10	799	18	21	–	–
<i>A. oryzae</i> 11	516	182	–	–	–
<i>A. oryzae</i> 18	762	41	38	–	–
<i>A. oryzae</i> 19	507	190	–	–	–
<i>A. oryzae</i> 23	753	53	46	–	–

Microbes	Transformed ginsenoside (μ M), after 24 h				
	Rb1	Rd	F2	CK	Rh2
<i>A. oryzae</i> 4	836	–	10	–	–
<i>A. oryzae</i> 6	24	628	196	114	–
<i>A. oryzae</i> 10	848	–	–	–	–
<i>A. oryzae</i> 11	–	696	159	67	–
<i>A. oryzae</i> 18	802	33	–	–	–
<i>A. oryzae</i> 19	–	578	166	138	–
<i>A. oryzae</i> 23	821	–	21	–	–

Microbes	Transformed ginsenoside (μ M), after 48 h				
	Rb1	Rd	F2	CK	Rh2
<i>A. oryzae</i> 4	825	5	12	–	–
<i>A. oryzae</i> 6	–	14	23	824	–
<i>A. oryzae</i> 10	829	–	7	–	–
<i>A. oryzae</i> 11	–	345	164	438	–
<i>A. oryzae</i> 18	799	26	–	–	–
<i>A. oryzae</i> 19	–	18	10	836	–
<i>A. oryzae</i> 23	809	–	–	–	–

Table 7. Biotransformation of ginsenosides with selected fungal β -glucosidases

Enzymes	Transformed ginsenoside (μ M)									
	Rb1		Rd		F2		CK		Rh2	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>A. oryzae</i> 6	24	—	628	14	196	23	114	824	—	—
<i>A. oryzae</i> 19	—	—	578	18	166	10	138	836	—	—
<i>S. shibatae</i> β -glucosidase	—	—	20	11	32	28	852	842	—	—

3) *S. shibatae* β -glucosidase를 이용한 최적 생물전환 조건 확립

S. shibatae β -glucosidase의 경우 최적 온도와 pH는 각각 95°C와 pH 5.0으로 알려져 있다. 따라서 생물전환 효율을 온도 및 pH에 따라서 관찰하였다. 반응 온도에 따른 생전환 효율: 반응 온도를 30°C, 50°C, 70°C, 90°C로 나누어서 ginsenoside Rb1의 전환 효율을 살펴보았다. 반응 24시간 후의 ginsenoside Rb1과 compound K의 양은 Table 8과 같았다. Table 9에서 살펴보듯이 비록 효소의 최적 온도가 95°C이지만 70°C 이상의 반응에서는 거의 같은 전환속도로 ginsenoside Rb1을 compound K로 전환할 수 있음을 확인하였고 따라서 굳이 높은 온도인 90도에서 반응하는 것이 아니라 70°C에서 반응하여도 같은 결과를 도출할 수 있었다. 반응 pH에 따른 생전환 효율: 반응 pH를 pH 4-9까지 변환 후에 ginsenoside Rb1의 전환 효율을 살펴보았다. 이때 반응 온도는 70°C 일정하게 유지하였다. 반응 24시간 후의 ginsenoside Rb1과 compound K의 양은 Table 9와 같았다. pH의 경우 pH 5, 6에서만 높은 전환효율을 나타내었다. pH7에서 그나마 낮은 전환 효율을 나타내었으나 그 외 pH 즉 pH 4, 5, 9에서는 거의 반응이 일어나지 않았다. 이는 *S. shibatae* β -glucosidase의 최적 pH와 많은 관련이 있는 것으로 *S. shibatae* β -glucosidase는 매우 좁은 범위에서의 optimum pH를 보여준다. 즉 pH 5-6에서만 높은 활성을 보여주지만 그 외의 조건에서는 매우 낮은 활성이 관찰되기 때문이다.

결론적으로 인삼의 유효성분이 ginsenoside 그 중에서도 ginsenoside Rb1을 compound K로 전환하기 위하여서는 pH의 control이 매우 중요할 것으로 사료된다. 또한 여러 곰팡이 균주가 ginsenoside Rb1의 compound K로의 전환에 관여하고 높은 효율로 전환할 수 있음을 관찰하였다. 하지만 본 연구의 결과는 미생물 유래 효

소가 생물전환에 좀더 효율적임을 확인하였다.

Table 8. Effect of Temperature on biotransformation of ginsenosides with *S. shibatae* β -glucosidase

Temperature ($^{\circ}$ C)	Transformed ginsenoside (μ M)				
	Rb1	Rd	F2	CK	Rh2
	24h	24h	24h	24h	24h
30	369	123	93	307	—
50	—	56	78	637	—
70	—	20	32	852	—
90	—	18	26	849	—

Table 9. Effect of pH on biotransformation of ginsenosides with *S. shibatae* β -glucosidase

pH	Transformed ginsenoside (μ M)				
	Rb1	Rd	F2	CK	Rh2
	24h	24h	24h	24h	24h
4	768	62	54	—	—
5	—	20	32	852	—
6	—	17	29	844	—
7	452	88	102	195	—
8	779	45	53	—	—
9	782	43	38	—	—

4. 인삼 유효성분의 가공 적성 연구

가. 인삼 전분의 특성 분석

1) 인삼 전분 입자의 형태

인삼전분을 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 32와 같았다. 인삼 전분 입

자의 형태는 거의 구형 및 다각형이며 일부 손상 받은 모양의 입자도 관찰 되었는데, 이는 전분제조 시 물리적으로 파손되거나 시료처리 과정 중, 금으로 증착 시 기계적인 파손 또는 현미경 관찰 중 전자선 조사에 의해 손상된 것으로 생각되며, 전분입자 중에서 표면이 함몰된 입자가 관찰되었는데 이는 전 분 입자간 혹은 조직과 전분입자가 밀착 되었다가 떨어진 부분으로 생각된다. 인삼전분의 입자의 크기는 1, 2, 3 등급 간에 차이를 보이지 않았다.

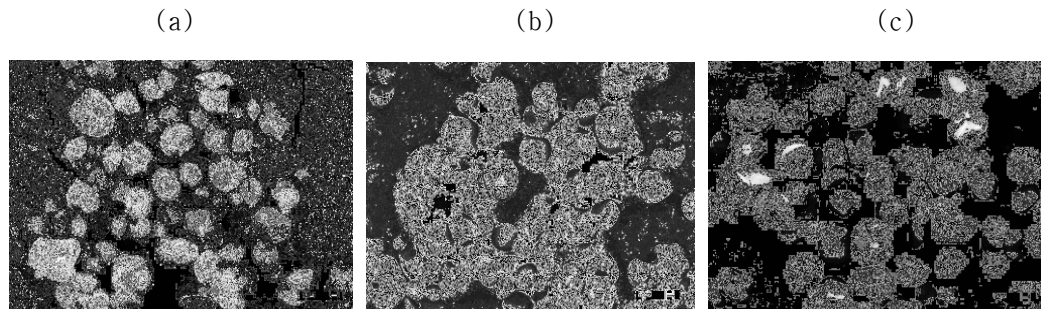


Fig. 32. Scanning electron micrographs of ginseng starches. (a : 1st , b : 2nd, c : 3rd grade)

2) 인삼 전분의 팽윤력 및 용해도

인삼전분의 팽윤력과 용해도는 Fig. 33 및 34와 같았다. 팽윤력은 전분입자를 충분한 양의 수분과 함께 가열할 때 팽윤된 입자의 무게를 측정함으로써 수분을 얼마나 보유할 수 있는가를 측정하는 것으로, 40℃이후부터 가열온도가 증가할수록 급격히 증가하는 경향을 보인다 70℃이후에는 다소 완만하게 증가 하였다. 팽윤력은 가열온도 50℃에서는 1, 2, 3등급의 순서로 높은 팽윤력을 나타내다 60℃에서는 등급간에 차이를 보이지 않았으며 70℃이후부터 등급간의 차이가 나타나기 시작하여 80℃와 90℃에서는 1등급이 2, 3등급에 비해 낮은 팽윤력을 나타냈으며 2등급과 3등급간에는 큰 차이를 나타내지 않았다.

용해도는 전분입자의 팽윤 시 전분입자 바깥으로 빠져 나와 물에 녹게 되는 수용성 전분을 측정한 것으로 40℃이상에서는 가열온도가 증가할 수록 급격히 증가하다 60℃이후로는 완만하게 증가하였으며 등급간에 유의적으로 차이를 나타내지 않았다.

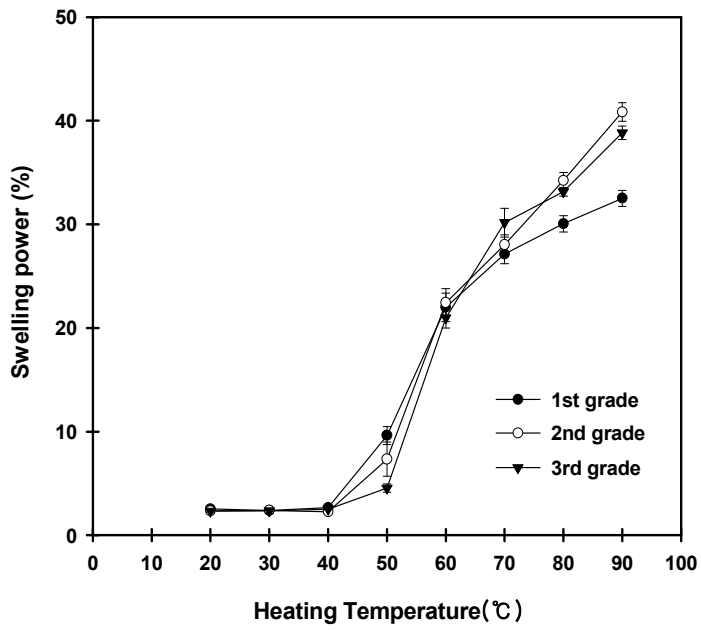


Fig. 33. Changes in swelling power of ginseng starches.

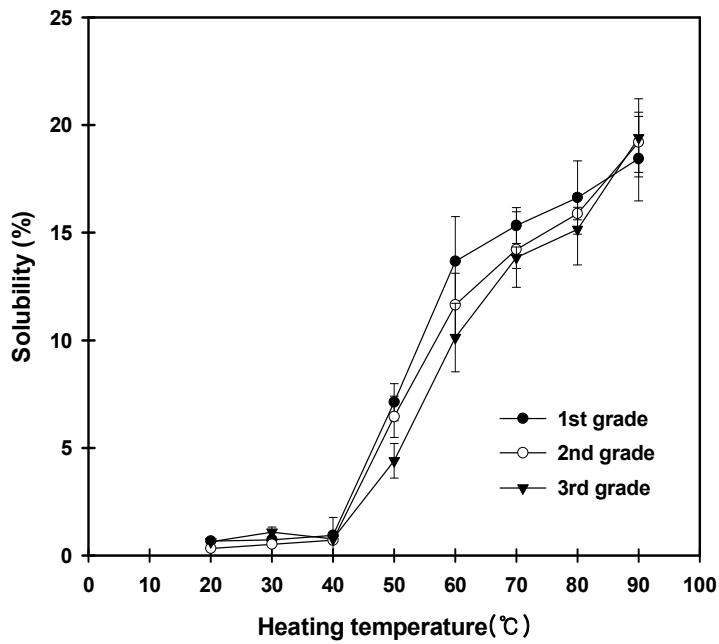


Fig. 34. Changes in solubility of ginseng starches.

3) 인삼전분의 등온흡습곡선

식품 속에 함유되어 있는 수분은 외부 환경 조건에 따라 수증기압차이에 의해 이동하는데 특히 온도가 일정한 조건 하에 물분자는 식품을 중심으로 확산 과 물질이동에 따라 일어나는 탈습 및 흡습과정을 통해 평형상태에 도달하게 된다. 이러한 평형상태 하에서 식품에 존재하는 수분함량을 평형수분함량 이라고 하며 이는 외부 상대습도의 변화에 따라 진행되는 탈·흡습과정에 따라 변화하며 이러한 상대습도변화에 따른 식품 속의 평형수분함량의 변화를 나타낸 것이 등온 흡·탈습곡선이다.

인삼 전분의 등온흡습곡선은 Fig. 35에서와 같이 전형적인 sigmoid형의 곡선을 나타내었고 0.11~0.94 범위의 수분활성도에서 2등급이 1, 3등급 보다 전반적으로 낮은 평형수분함량을 나타내었다. 등온흡습곡선은 전분내의 결정성영역의 표면과 무정형영역에 있는 hydroxyl group과 물분자 사이의 hydrogen bonding에 의한 것으로, 전체 수분활성도에서 1, 3등급이 2등급보다 수분함량이 많다는 것은 각 A_w 에서 1, 3등급이 2등급보다 흡습력이 큰 것에 기인 한 것으로 판단된다.

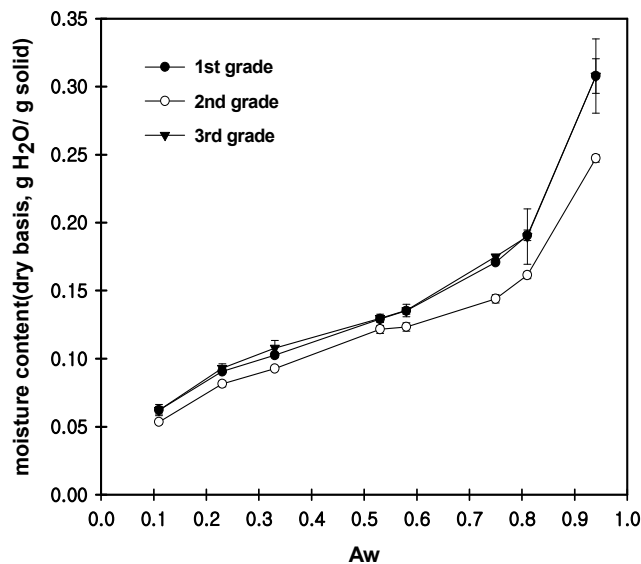


Fig. 35. Moisture sorption isotherms of ginseng starches.

4) 인삼전분의 X-선 회절도

일반적으로 전분입자의 결정형태와 결정화도를 비교하는데 X-선 회절도를 이용한다. 즉 X-선 회절도의 peak가 날카로울수록 결정화도가 크다는 것을 의미하며

peak의 형태로부터 A, B 및 C type로 구분한다. A type은 회절각도(2θ) 15° , 23° 부근에서 강한 peak를 보이며 18° 부근에서 두 개의 peak를 나타내는 것으로 옥수수 전분과 같은 곡류 전분은 일반적으로 A형으로 알려진 X-선 회절도를 보여주며, 감자와 같은 근경류와 밤, 바나나 전분 등은 B형으로 알려진 X-선 회절도를 주는 것으로 회절각도(2θ) 17° 부근에서 강한 peak와 $22\sim 24^\circ$ 에서 몇 개의 작은 peak를 나타내며 특히 5° 부근에 peak를 나타내는 것이 특징이다. C형은 A형과 B형을 주는 전분들의 혼합물에 의해 얻어지는 것으로 고구마, 녹두, 완두 등이 알려져 있다. X선 회절에 의해서 인삼전분의 구조를 조사해 본 결과(Fig. 36), 1, 2, 3등급 삼 전분은 모두 회절 각도(2θ) 5.6° , 17.1° 에서 peak를 보이는 전형적인 B형의 회절양상을 나타내었다. Table 10은 X선 회절도형으로 결정 부분과 비결정 부분의 면적비를 계산하여 나타낸 상대적 결정화도로서 1, 2, 3등급간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 $3 > 2 > 1$ 등급의 순으로 상대적 결정화도가 크게 나타났으며 같은 B형의 회절양상을 나타내는 감자전분과 참마 전분의 상대적결정화도가 $30.0 \pm 0.7\%$, $32.0 \pm 0.2\%$ 인 것에 비해 매우 작은 것으로 나타났다.

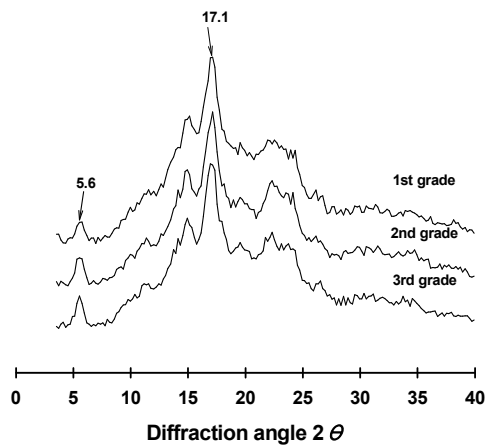


Fig. 36. X-ray diffraction patterns of ginseng starches.

Table 10. Relative crystallinity of ginseng starches

Sample	Relative crystallinity(%)*
1 st grade	12.46±1.68 ^a
2 nd grade	14.83±2.04 ^a
3 rd grade	16.33±2.15 ^a

*Relative crystallinity(%) = $I_c / (I_a + I_c) \times 100$

Ia = amorphous area on the X-ray diffractogram

Ic = crystallized area on the diffractogram

나. 인삼의 초고압 처리

1) 초고압 처리에 대한 추출 수율

각기 다른 초고압 처리 압력과 시간을 처리한 인삼 분말 시료의 추출수율은 Table 11에 나타내었다. Table 11에 따르면 90% 수분함량 시료가 다른 시료들에 비해 높은 추출수율을 보였다. 이는 용질 대 용매의 비율에 의해 영향을 받은 것으로 생각된다. 초고압처리에 있어 용질에 비해 높은 용매의 비율은 liquid phase에 닿는 solid phase의 면적이 증가시킨다고 알려져 있다. 본 연구의 결과도 이와 유사한 결과값을 보여 90% 수분함량에서 가장 높은 추출수율이 나타난 것으로 생각된다. 초고압을 처리하지 않은 group에 있어 methanol에 비해 water의 추출수율이 높은 것으로 나타났다. 이는 물에 수용성 물질들이 더 쉽게 녹아 나오는 것에 영향을 받은 것으로 고려된다.

본 연구에서 결과치는 제시하지 않았지만 80°C water shaking bath에서 가열추출한 시료 중 70%의 경우 인삼 내 전분입자로 수분이 유입이 되면서 인삼전분의 호화가 일어나 추출액을 분리할 수 없었던 것도 관찰할 수 있었다. 전반적으로 초고압을 처리하지 않은 것에 비해 초고압을 처리한 경우가 추출수율이 늘어난 것은 관찰하였으나 처리압력과 시간에는 크게 영향 받지 않은 것을 관찰할 수 있었다.

2) 초고압 처리에 대한 조사포닌 함량의 변화

각기 다른 초고압 처리 압력과 시간을 처리한 인삼 분말 시료의 조사포닌 함량을 Table 12에 나타내었다. 조사포닌 함량은 초고압 처리 압력과 시간에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. 홍삼에서 추출한 조사포닌의 함량은 초고압처리에 의해 영향을 받지 않는다고 보고와 식품을 초고압으로 처리할 경우 셀구조의 파괴를 야기

한다는 보고가 있는데, 인삼을 초고압 처리할 경우 세포구조는 변하게 되고 세포는 확연하게 손상을 입는 것으로 알려져 있다. 따라서 초고압처리를 하게 되면 물에 녹지 않는 성분들(pectin과 같은)도 수용성 성분과 함께 추출되어 나온 것으로 생각되며, 이것이 조사포닌 함량에 영향을 미친 것으로 여겨진다. 수포화 부탄올로서 추출하는 동안에 butanol layer에 부탄올에 녹지 않는 불용성 물질들이 많이 존재하는 것을 확인하였으며, 증류수 30mL로 세척을 하는데 있어 3회 이상을 세척해야만 눈에 보이는 불용성 물질들이 씻어져 나오는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 초고압 처리에 의해 추출수율이 늘어난 것을 확인하였으나 조사포닌의 함량은 각 수분함량 내에서 초고압의 처리에 별 영향을 받지 않은 것으로 나타났다.

Table 11. Extraction yield of UHP treated ginseng powder at different pressure and time

		70% moisture	80% moisture	90% moisture
0 MPa	MeOH	401.2(±1.1)a*	224.3(±0.9)h	251.9(±2.0)c
	Water	189.9(±1.8)i	324.1(±0.9)g	331.5(±1.7)g
150 MPa	5min	350.8(±3.1)f	356.1(±5.6)fg	366.4(±5.7)b
	10min	322.3(±6.5)g	358.0(±8.9)efg	375.5(±6.5)ab
	15min	358.0(±2.6)e	362.6(±8.3)def	372.9(±6.8)ab
300 MPa	5min	362.6(±1.3)d	376.5(±5.8)a	374.7(±4.8)ab
	10min	370.4(±7.0)c	366.8(±3.8)cd	380.3(±5.4)ab
	15min	346.7(±4.7)f	364.0(±8.1)cde	379.5(±7.7)ab
450 MPa	5min	360.6(±5.3)de	358.8 (±5.8)efg	372.7(±1.4)ab
	10min	361.6(±1.8)de	354.3(±4.5)g	378.3(±4.8)ab
	15min	312.2(±3.1)h	356.8(±7.7)fg	387.1(±4.8)a
600 MPa	5min	362.7(±3.6)d	370.9(±4.3)abc	383.3(±5.1)a
	10min	385.2(±1.1)b	364.9(±7.8)cde	383.6(±3.7)a
	15min	320.8(±1.6)g	369.2(±1.7)bcd	386.7(±1.4)a

* Means with the same letter are not significantly different

Table 12. Crude saponin content of UHP treated ginseng powder at different pressure and time

		70% moisture	80% moisture	90% moisture
0 MPa	MeOH	23.6(±1.6)a*	25.5(±1.9)bc	24.4(±1.7)cd
	Water	17.5(±1.1)a	20.3(±4.3)d	23.1(±3.6)cd
150 MPa	5min	21.5(±3.7)a	20.3(±1.0)d	32.7(±3.6)a
	10min	19.3(±4.8)a	26.6(±2.8)bc	29.3(±0.1)abc
	15min	21.9(±1.1)a	25.2(±3.2)bc	29.8(±5.5)abc
300 MPa	5min	20.8(±0.8)a	27.1(±7.6)b	29.3(±0.3)abc
	10min	24.8(±4.7)a	27.8(±1.4)b	32.8(±1.5)a
	15min	25.4(±4.4)a	34.6(±4.5)a	28.0(±3.4)abc
450 MPa	5min	22.5(±6.5)a	23.9(±1.8)bcd	28.8(±3.7)abc
	10min	22.8(±4.9)a	22.2(±2.7)cd	26.0(±0.0)bc
	15min	23.3(±6.7)a	27.2(±0.3)b	32.6(±0.2)a
600 MPa	5min	23.9(±6.6)a	27.4(±1.1)b	30.9(±0.0)ab
	10min	26.6(±3.8)a	25.4(±0.2)bc	28.3(±0.0)abc
	15min	23.1(±5.3)a	28.1(±3.7)b	21.6(±4.1)d

* Means with the same letter are not significantly different

3) 초고압 처리에 대한 추출 수율과 조사포닌 함량과의 상관관계

초고압 처리한 인삼 분말의 추출수율과 조사포닌 함량 사이의 상관관계를 Fig. 37에 나타내었다. 둘 사이에는 상관계수인 $R^2=0.2908$ 이 아주 낮은 수치를 나타내어 추출수율과 조사포닌 함량과의 상관관계가 아주 낮은 것으로 나타났다. 결과적으로 초고압 처리 시 불용성물질이 다량 추출되어 추출수율을 많이 증가시키지만 조사포닌의 경우 상대적으로 증가량이 크지 않아 둘 사이의 상관관계가 낮게 나타난 것으로 판단된다.

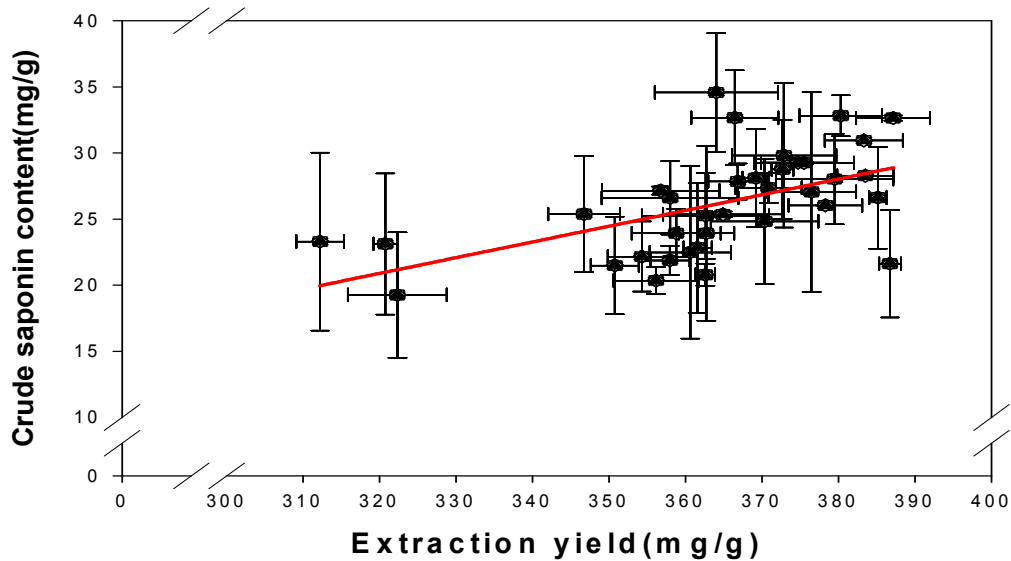


Fig. 37. Correlation between extraction yield and crude saponin content.

4) 초고압 처리 시료에 대한 HPLC 분석

HPLC를 통한 7개 ginsenoside에 대한 정량분석은 아래 Table 13에 나타내었다. 정량은 추출 수율이 가장 높고 methanol에 녹였을 때 가장 불순물이 적은 90% 수분 함량에 대하여만 정량하였다. 전반적으로 Total ginsenoside의 함량은 초고압 처리에 따라 다소 증가하는 양상을 보였다.

Fig. 38에 나타낸 HPLC chromatogram을 살펴보면 전반적으로 HPLC chromatogram의 전반부의 peak는 감소하는 경향을 보인 반면 후반부의 peak는 증가하는 현상을 나타내었다. HPLC 분석에 사용된 7개의 ginsenoside 표준품을 제외한 나머지 미지의 후반부 peak 중 하나가 ginsenoside Rg3인 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 초고압 처리에 의해 물리적인 transformation이 일어난 것으로 판단되는데, ginsenoside Rg3는 protopanaxadiol(PPD)계열의 saponin으로 수삼에는 그 양이 미미할 정도로 들어있지만 홍삼의 특이성분인 Rh2와 더불어 같은 PPD 계열의 ginsenoside인 Rb1, Rc, Rd등으로부터 heat processing이나 mild acid hydrolysis에 의해 glucose분자가 떨어져 나가는 deglycosylation에 의해 변환되는 것으로 알려져

왔다. 또한 장내 미생물이 생성하는 효소에 의해서도 deglycosylation이 효과적으로 일어나며 그 중간 metabolite중 하나로서 Rg3가 생성된다고 알려져 있다. 하지만 이러한 연구들은 모두 열이 필요하거나 생체 내 metabolism이 필요한 방법이다. 본 연구에서는 비가열 공정인 초고압을 이용하여 이때까지 보고된 연구들과는 다른 물리적인 방법으로 Rg3의 함량을 증가시키는 transformation 방법의 가능성을 확인하였다.

Table 13. Ginsenoside contents of UHP treated 90% moisture ginseng powder at different pressure and time

		Rg1	Re	Rf	Rb1	Rc	Rb2	Rd	total
Extract	MeOH	1.55	0.82	1.03	4.76	2.15	1.69	0.57	22.63
	Water	1.63	0.93	0.96	3.47	1.71	1.18	0.58	10.45
150MPa	5min	2.19	1.20	1.66	4.30	2.48	1.23	0.97	14.03
	10min	1.88	0.92	1.20	3.47	1.89	1.23	0.73	11.31
	15min	2.80	1.14	2.21	2.10	1.79	0.62	0.71	11.36
300MPa	5min	2.09	1.10	1.20	3.93	1.98	1.42	0.61	12.34
	10min	2.40	1.33	1.47	4.38	2.26	1.48	0.60	13.91
	15min	1.75	0.94	1.08	3.53	1.76	1.15	0.84	11.04
450MPa	5min	2.43	0.91	1.32	4.88	1.71	1.24	0.70	13.20
	10min	1.83	0.94	1.33	4.19	2.06	1.39	0.99	12.72
	15min	2.14	1.16	1.40	4.50	2.07	1.51	1.02	13.79
600MPa	5min	2.10	1.18	1.10	4.49	2.15	1.52	1.01	13.54
	10min	1.41	0.70	0.97	2.96	1.37	0.83	0.48	8.73
	15min	1.87	0.97	0.72	3.42	1.68	1.18	0.82	10.66

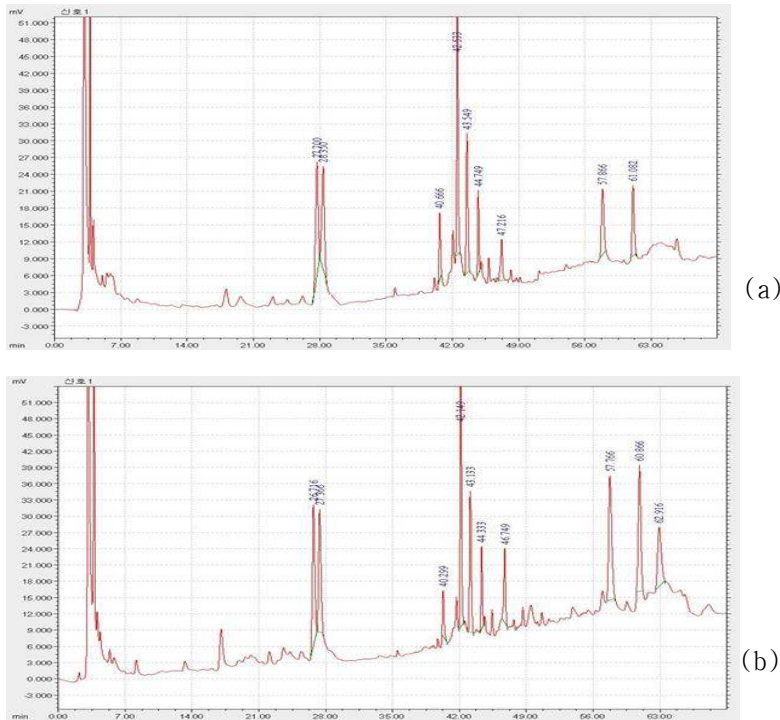


Fig. 38. HPLC Chromatograms of Control and UHP Treated Ginseng Powder, (a) Control (b) 600MPa, 15min, 90% moisture.

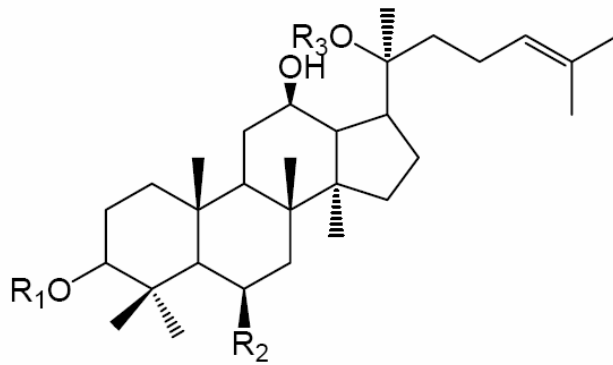
다. 열 및 산 처리 후의 ginsenoside의 변화

1) 열 및 pH 안정성

일정한 품질의 시료를 얻기 위해 인삼분말로부터 80%MeOH을 사용하여 유효성분을 추출하고 vacuum rotary evaporator(BÜCHI rotavapor R-124, BÜCHI water bath B-481, Switzerland)를 사용하여 60Brix로 농축하여 시료를 준비하였고, pH에 따른 ginsenoside의 안정성을 알아보기 위한 실험 시 증류수를 이용하여 25Brix 용액으로 만든 뒤 구연산(sigma, USA)을 사용하여 pH를 각각 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0으로 맞추었다. 열처리에 따른 ginsenoside의 안정성을 알아보기 위해 각각의 시료를 25°C, 60°C, 80°C 항온수조(비전과학, 한국)에서 각각 2시간 동안 열처리를 하였으며, 120°C는 autoclave를 사용하여 2시간 동안 처리하였다. 인삼 속에 존재하는 dammarane계 saponin인 ginsenoside는 열처리나 산처리에 의해서 잔기의 배치가 틀려지게 되며 새로운 약리활성을 가지는 ginsenoside로 전환이 되게 된다. 잔기가 단순화될수록 체내에서의 소화흡수율이 높아지게 되어 그 생리적인 활성이 증가하게

된다(Fig. 39).

열처리와 pH처리가 진행이 될 수록 HPLC chromatogram의 초반부가 감소되고 후반부가 증가되는 양상을 나타내었다. 같은 온도에서 pH가 낮아지면 PPD type의 ginsenoside가 전환되어 나타나게 되는 Rg3와 C-K의 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.(Fig. 40) 또한 같은 pH일 때 처리온도가 높아지면 산처리보다는 덜하지만 산처리와 마찬가지로 HPLC chromatogram의 전반부의 피크가 줄어들고 후반부의 피크가 생성되는 것을 관찰할 수 있었다.(Fig. 40) 이와 같은 결과로 볼 때 열처리 및 산처리가 ginsenoside의 안정성에 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있었고 산처리에 의해 ginsenoside의 안정성이 더 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.



Group	Ginsenoside	R1	R2	R3
PPD	Rb1	-Glc-Glc	H	-Glc-Glc
	Rb2	-Glc-Glc	H	-Glc-Ara(pyr)
	Rc	-Glc-Glc	H	-Glc-Ara(fur)
	Rd	-Glc-Glc	H	-Glc
	Rg3	-Glc-Glc	H	H
	C-K	H	H	-Glc
PPT	Re	H	-O-Glc-Rha	-Glc
	Rg1	H	O-Glc	-Glc

Fig. 39. Structure of Ginsenosides.

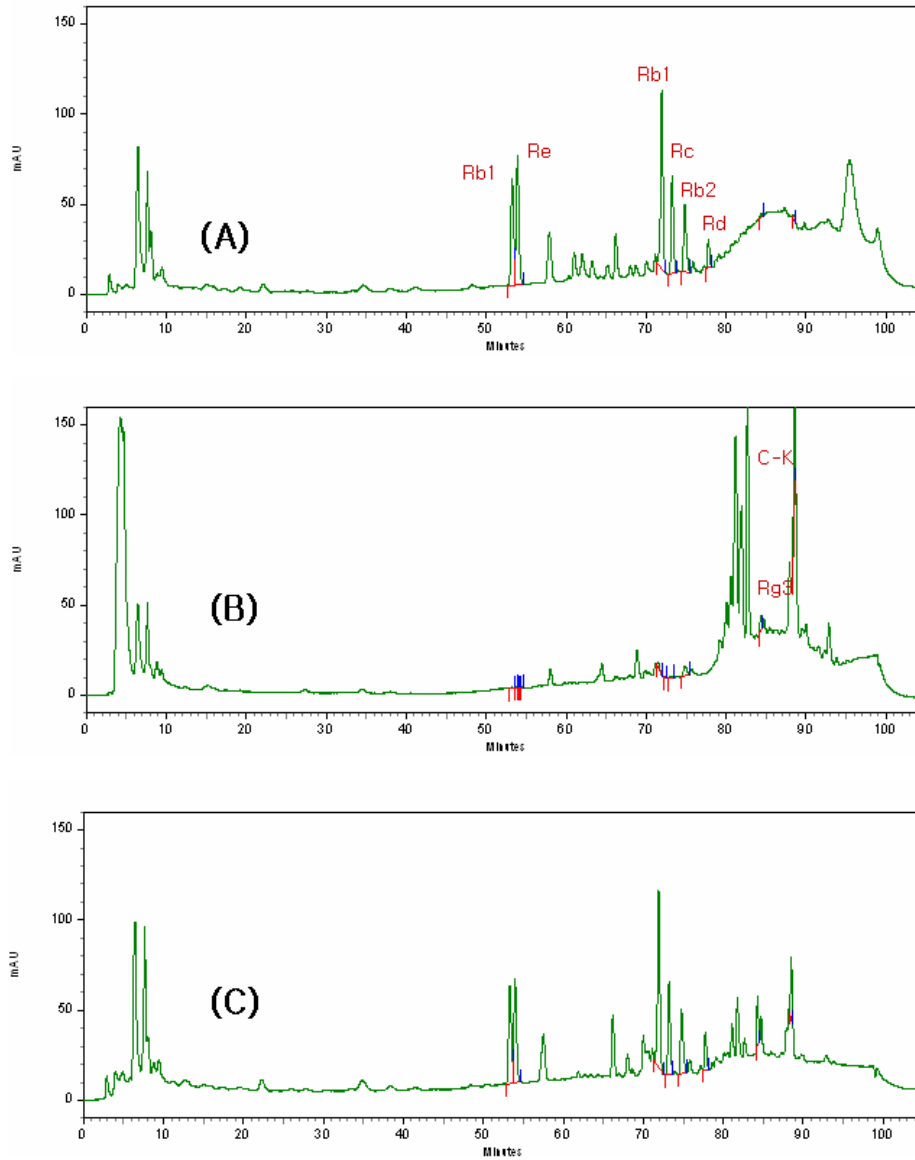


Fig. 40. HPLC Chromatograms of (A) : control at 25°C, (B) : pH2.0 at 25°C, (C) : control at 120°C

2) PPD type ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, C-K의 변화

PPD type의 ginsenoside중 수삼에 다량 함유된 Rb1과 Rb2, Rc와 Rd는 열과 pH에 따라 전체적으로 감소하는 비슷한 경향을 나타내었다. 80°C이하의 열처리에서는 열처리 온도에 의한 영향보다는, pH에 의한 영향을 더욱 크게 받았으며, pH가 낮아

질수록 더욱 함량의 감소가 크게 일어난 것을 확인하였다.(Fig. 41) 120℃가 넘어가는 경우 Rb1을 제외한 Rb2, Rc, Rd이 모두 분해가 되어 검출되지 않는 것으로 나타났다.

Rg3의 경우, 25℃에서는 산처리를 할수록 그 함량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나(Fig. 41E), 온도가 높아지면 산처리에 따라 함량이 증가하다가 오히려 감소하였다. 이는 산처리와 열처리가 함께 적용할 경우 ginsenoside의 전환보다는 ginsenoside의 파괴가 더욱 활발하게 일어나 그 함량이 줄어드는 것으로 나타났다. 60℃, 80℃에서는 pH 3.5까지는 함량이 증가하는 것을 확인하였으나, pH 3.5보다 낮을 시에는 전환보다는 파괴가 더욱 크게 일어나 그 함량이 줄어들다 pH 2.5부터는 다 분해되어 검출되지 않았다. 120℃의 경우 pH 4.0까지만 증가하고 그 이하에서는 감소하기 시작해 pH 3.0에서 다 분해되어 검출되지 않았다.

C-K의 경우, Rg3보다는 열처리와 산처리에 의한 전환이 더욱 크게 일어나는 것을 확인할 수 있었다. Rg3와는 다르게 25℃는 물론이고, 60℃에서도 pH가 낮아질수록 그 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 80℃에서는 Rg3보다는 산에 대한 안정성이 커서 pH 3.0까지 낮아질수록 그 함량이 증가하는 것으로 나타났으며, pH 3.0보다 낮을 시 그 함량이 줄어들다 pH 2.5부터는 다 분해되어 검출되지 않았다. 120℃의 경우 Rg3와 마찬가지로 pH 4.0까지만 증가하고 그 이하에서는 감소하기 시작해 pH 3.0에서 다 분해되어 검출되지 않았다.

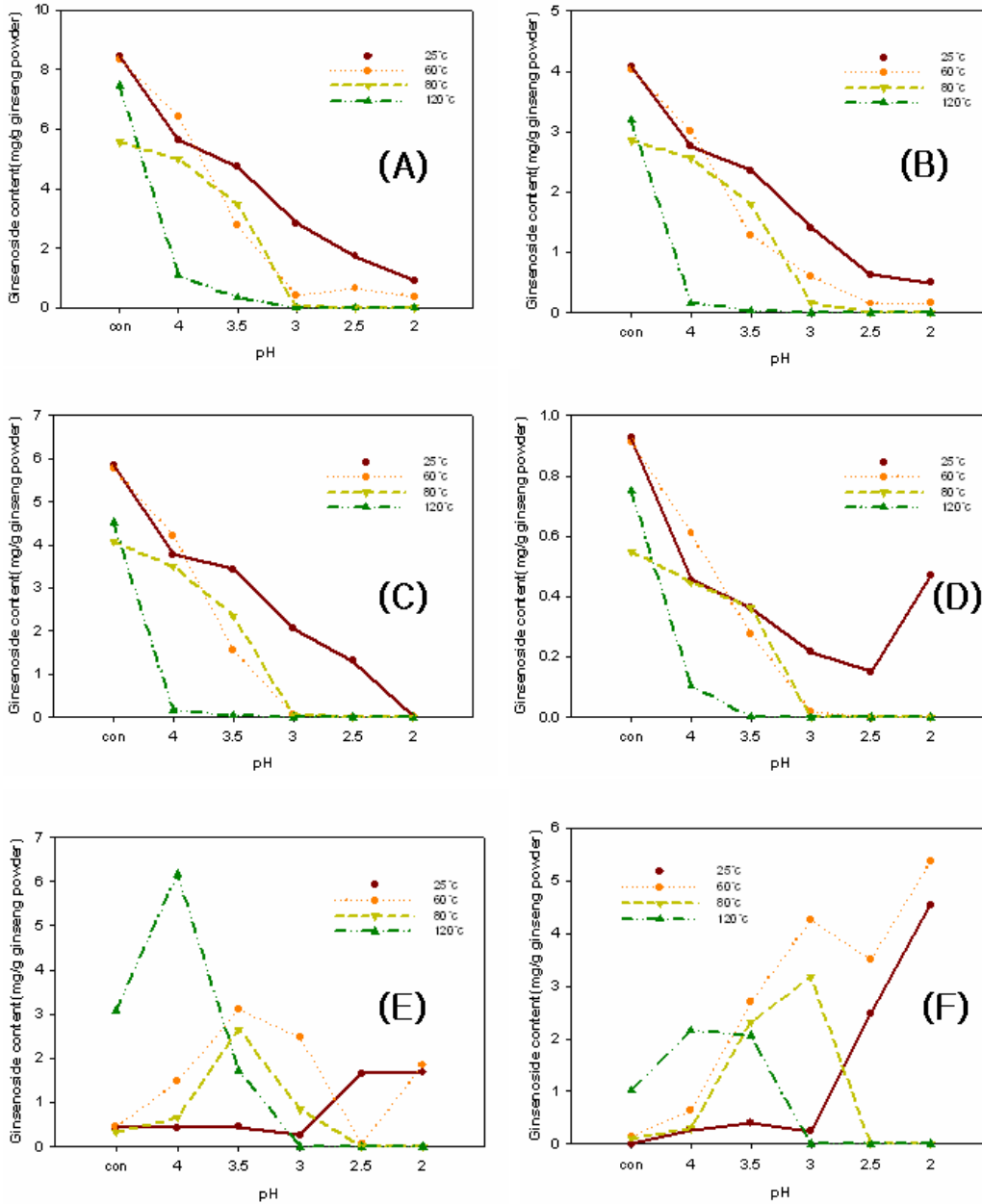


Fig. 41. PPD type ginsenoside contents after treatment with citric acid and heating. (A):Rb1, (B):Rb2, (C):Rc, (D):Rd, (E):Rg3, (F):C-K.

3) PPT type ginsenoside Re, Rg1의 변화

수삼에 다량 함유된 PPT type인 ginsenoside Re, Rg1 역시 PPD type의

ginsenoside인 Rb1과 Rb2, Rc와 Rd와 마찬가지로 열과 pH에 따라 전체적으로 감소하는 비슷한 경향을 나타내었다.(Fig. 42) 60℃, 80℃의 경우 pH3.0이하에서는 Re, Rg1 둘 다 모두 파괴되어 검출되지 않았으며, 120℃에서는 이보다 높은 pH4.0에서 이미 거의 파괴되어 pH3.5부터 검출되지 않았다. 감소가 되는 동안 PPD type과 마찬가지로 잔기가 열과 산에 의해 떨어져 나가면서 새로운 형태로 전환이 되는 것으로 추측이 되나 standard의 부재로 인해 규명을 하지 못하였다. 다만, 문헌을 통해 retention time 78분과 84분 사이에 열과 산처리를 하여 생긴 피크가 Rg1과 Re가 분해되어 생길 수 있는 Rh1과 F1이라는 것을 추측할 뿐이다. 이 부분에 있어서는 추후 standard의 확보를 통해 좀 더 연구가 진행되어야 할 것이다.

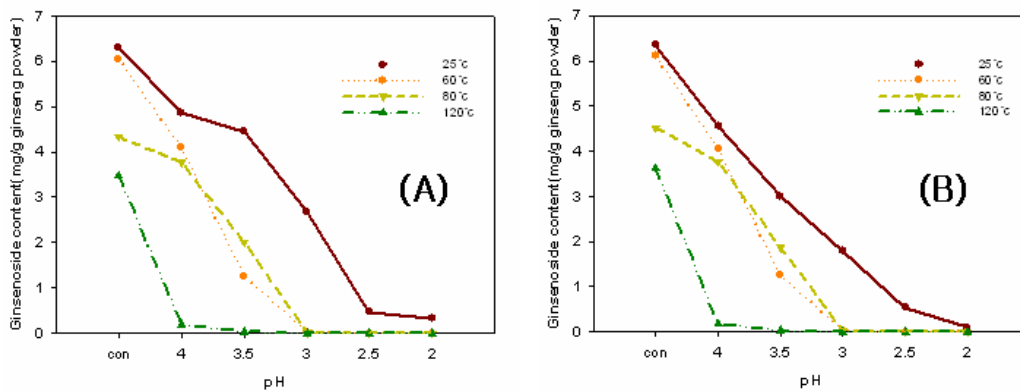


Fig. 42. PPT type ginsenoside contents after treatment with citric acid and heating. (A):Re, (B):Rg1.

4) 온도와 pH에 따른 Total ginsenoside의 변화

온도와는 상관없이 pH가 낮을수록 ginsenoside의 파괴가 일어나 total ginsenoside의 함량이 줄어드는 것으로 나타났다.(Fig. 43) 80℃일 경우 pH 2.5부터 다 파괴가 되어서 검출이 되지 않았으며, 120℃의 경우 그보다 높은 pH 3.0에서 모두 파괴되어 검출이 되지 않는 것으로 나타났다.

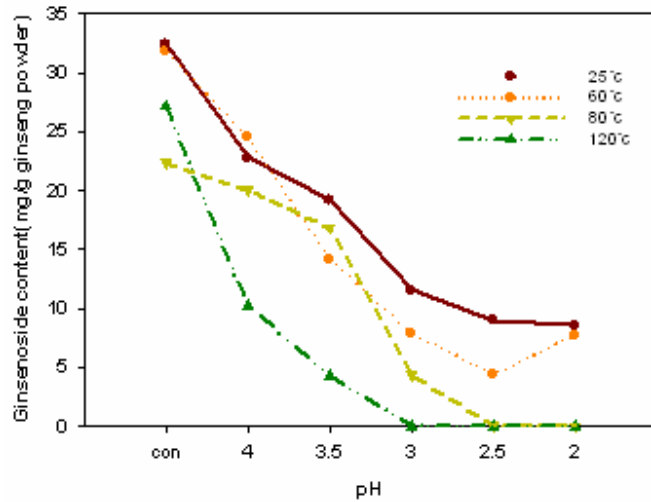


Fig. 43. Total ginsenoside contents after treatment with citric acid and heating.

라. 결론

본 연구에서는 비가열 처리 공정인 초고압을 이용하여 인삼 분말의 추출에 있어 추출시간을 단축시키고 보다 효율적인 초고압 처리시간과 압력에 대한 영향을 살펴 보았다.

먼저 추출수율에 있어 90% 수분함량이 다른 수분함량에 비해 높은 추출수율을 보였다. 이는 용질 대 용매의 비율에 의해 영향을 받은 것으로 보이며, 전반적으로 초고압을 처리하면 추출수율이 늘어나는 것으로 나타났으나 초고압의 처리시간과 압력에는 크게 영향 받지 않는 것으로 나타났다. 조사포닌의 함량에 있어 초고압 처리 압력과 시간에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 초고압처리에 따른 물에 녹지 않는 성분들(pectin과 같은)도 함께 추출되어 나오는 것에 영향을 받아 비록 초고압 처리에 의해 초고압을 처리하지 않은 것에 비해 추출수율이 늘어났음에도 불구하고 조사포닌의 함량은 각 수분함량 내에서 초고압의 처리에 별 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 따라서 초고압 처리한 인삼 분말의 추출수율과 조사포닌 함량사이의 correlation은 $R^2=0.2222$ 정도로 아주 낮은 correlation을 보였다. HPLC 결과에서는 초고압에 따라 total ginsenoside의 함량이 증가하는 것으로 나타났으며, PPD계열의 ginsenoside의 deglycosylation에 따른 비가열적인 transformation의 가능성을 관찰하

였다. 눈에 띄는 큰 함량의 변화는 아니지만 이제까지의 가열공정이나 효소처리공정과는 다른 인삼 내 ginsenoside의 transformation 가능성을 발견한 것이 본 연구의 가장 큰 수확이라 하겠다. 열과 산을 동시에 처리하여 인삼 내 유효성분인 ginsenoside의 전환을 알아보았다. 연구 결과 열처리보다는 산처리가 ginsenoside의 전환에 더욱 큰 영향을 미치는 것을 확인하였다. 높은 열처리와 함께 산처리를 하는 경우에는 전환보다는 파괴가 더욱 진행이 되어 ginsenoside가 검출이 되지 않는 것으로 나타났다. 홍삼 내 유효성분인 Rg3와 장내에서 소화되어 흡수되기 좋은 형태인 C-K를 얻기 위해서는 높은 온도(80℃, 120℃) 처리보다는 60℃가 적당한 것으로 생각된다.

5. 시제품 개발

가. 시제품 제조 공정

생산계획 → 생산량결정 → 원료구입 → 로스팅 → 추출 → 효소처리 → 침전
→ 여과(원심분리) → 농축 → 숙성 → 배합 → 살균 → 포장 → 검사 → 출하

나. 홍삼농축액 작업 소요기간

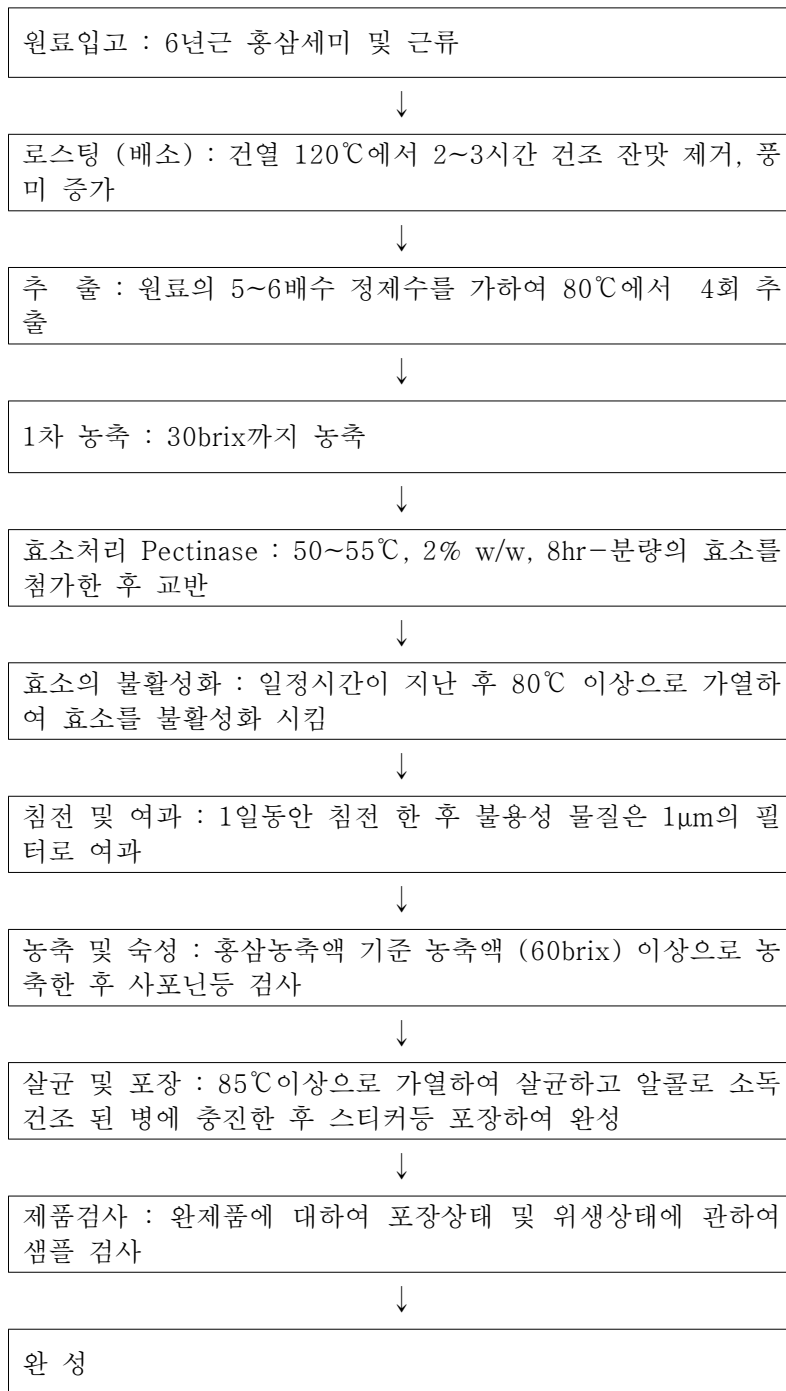
1) 디자인 및 부재료 준비 일정 (20일)

- 1) 디자인 설계 및 교정 (10일)
- 2) 부재료 발주 및 입고 (10일)

2) 생산일정 (21일)

- 1) 원료입고
- 2) 로스팅 (1일)
- 3) 추 출 (6일)
- 4) 효소처리 (1일)
- 5) 침전 및 여과 (1일)
- 6) 농축 및 숙성 (2일)
- 7) 살균 및 포장 (2일)
- 8) 제품검사 (8일)

다. 세부 생산과정



라. 제품 생산 및 품질 관리



그림 1. 추출기



그림 2. 농축기



그림 3. 완제품 포장



그림 4. 품질관리실

3) 설명서 및 카톤 디자인

효 **홍삼정**

홍삼이란
 홍삼은 수삼의 저장성을 높이기 위해 증숙과 건조과정을 거쳐 색상이 붉은 빛을 띠는 심을 말합니다. 홍삼제조과정중에서 인삼의 효능(진세노사이드)을 나타내는 사포닌이 감소하기도 하고 인삼에 없는 특이 사포닌이 생성되기도 하는데 근래에 이 특이 사포닌에 대한 효능이 알려지고 건강에 관심이 높아지면서 홍삼을 보편적으로 애용하게 되었습니다.

고려원인삼의 효(孝)홍삼정
 고려원인삼의 효(孝)홍삼정은 정선된 6년근 홍삼을 정성을 다해 달여서 사포닌 흡수를 높이기 위해 최적의 방식으로 효소처리 하여 농축한 것입니다. 효소 처리로 인하여 점도가 낮아 잘 흐르지만 재품에 이상이 있는 것이 아니라 효소처리에 의한 자연스러운 현상입니다.
 *Biotransformation of Korean Panax ginseng by Pectinex, Biol. Pharm. 23(12)2472~2478 (2006), Jae-Kwon Lee, Moo-Yeol BAIK, Cheon-Seok PARK, Soon-Cheol AHN; (주)고려원인삼 장제

1. 섭취량, 섭취방법 및 섭취시 주의사항
 · 성인 1회 3회, 1회 1~2g을 온수 또는 냉수에 타서 직접 드십시오.
 · 15세 이하의 어린이는 위 섭취량의 절반정도를 드십시오.
 · 특이체질 등 알러지 체질의 경우 성분을 확인하신 후 섭취하십시오.

2. 원재료명 및 함량
 홍삼농축액 (6년근, 고형분 60% 이상, 대한민국) ————— 100%
 원료상배합비율: 홍삼근70%, 홍미상30%

3. 효소처리 홍삼농축액
 (주)고려원인삼에서 제조하는 홍삼농축액은 홍삼추출 후 효소 처리하여 사포닌이 사포닌 흡수율이 다른 것들 인체에 흡수율을 높이고자 연구개발한 것으로 2006년도 농림부 연구개발과제로 선정되어 경희대학교 식품공학과 (박찬선), 부산시에대 미생물실험실 (안순철), 경기대학교 식품생물공학과 (이재권)과 공동 연구된 것입니다.

※ 보관상주의사항
 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관하십시오.
 개봉 후에는 변질 될 수 있으므로 마개를 꼭 닫아 냉장 보관하십시오.

Hyo(孝) Korean Red Ginseng Extract

What is Red Ginseng
 Red Ginseng is a dried Ginseng which has been processed by steaming and drying process. During the production process, a substance called "Saponin", which is a measure of effectiveness of Ginseng, can be destroyed or a unique saponin can be created. Lately, Red Ginseng is being used more popularly due to the effectiveness of this unique saponin.

Hyo(孝) Red Ginseng Extract from Korean One Ginseng Products Co., Ltd.
 To produce Korean One's Hyo(孝) Red Ginseng Extract, 6 year old red ginseng is carefully extracted and undergoes enzyme process to increase the absorption of saponin then concentrated. The extract flows well due to the decreased viscosity but it is a natural condition after enzyme process.
 *Biotransformation of Korean Panax ginseng by Pectinex, Biol. Pharm. 23(12)2472~2478 (2006), Jae-Kwon Lee, Moo-Yeol BAIK, Cheon-Seok PARK, Soon-Cheol AHN

material and contents
 Korean Red Ginseng Extract (6year old root, soluble solid content 60%, Origin : Korean) ————— 100%

Direction
 1. Please put one or two tea spoons(1~2g) a cup and pour hot or cold water.
 2. Have half content of adult usage under 15 year old children.
 3. If you have allergic disease, check material and contents before having this product.

Storage method
 Please avoid direct sunlight, recap a bottle and keep in refrigerator after opening.

www.oneinsam.co.kr
 master@oneinsam.co.kr

4) 제본 및 완성품



5) 자매품 개발

효홍삼정을 이용하여 액상제품 개발되었다(80ml ×30포, 60포).



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표와 내용

종합적으로 본 과제에의 최종 목표는 유효 활성물질의 효율적인 추출과 인삼 특유의 효능이 증대된 유효 기능성 성분을 규명하고 기능성식품 및 식품의약 소재로 개발하여 인삼의 고부가가치를 창출한다.

1. 세부 연구기관

생균제로 사용되고 있는 미생물로 인삼을 발효하여 인삼 내의 구성성분을 새로운 항산화물질이나 생리활성이 증가한 물질로 전환하고, 유효성분인 saponin 성분과 새로이 생성된 활성물질의 변화를 분석한다.

2. 제1협동 연구기관

배당체 분해 효소 및 당전이 효소를 이용하여 인삼 내의 성분을 유용 성분으로 전환하고 전환된 유용 성분을 분석하고 새로운 생리활성을 검토한다.

2. 제2협동 연구기관

생물전환 인삼 소재의 기능성 식품으로서의 적용 가능성을 검토하기 위하여, 기능성 식품 제조 시 식품가공기술에 필수적으로 동반되는 가열, 건조, 살균 및 pH 변화에 대한 유효성분의 안정성을 검토함으로써 분말, 캡슐 또는 음료 등 적합한 형태의 기능성 식품으로서의 적용 가능성을 제시한다.

제 2 절 연차별 연구개발 목표와 내용

1. 1차년도(2005)

가. 인삼의 발효 조건 확립

- 발효 미생물의 특성 분석
- pH, 온도, 배지, 발효산물, 접종량 등 검토

나. 유용 전환물질의 분석

- TLC 분석 조건 확립
- PDA-HPLC 분석 조건 확립

다. 배당체 분해 및 변환

- 효소의 수집
- 배당체 분해 및 변환효소 유전자 확보
- 배당체 분해 및 변환효소 대량 발현 조건 확립

라. 초고압 처리

- 생물전환 전·후의 인삼 유효성분에 대한 초고압 특성 분석
- 초고압처리 인삼의 관능적 평가를 통한 식품소재로의 가능성 검토
- 초고압 처리를 통한 인삼 유효성분의 변화분석

2. 2차년도(2006)

가. 전환물질의 분리·정제

- 산, 알카리 안정성, 수지 흡착성, 용매 이행성
- Diaion HP-20, silica gel, Sephadex LH-20, HPLC 이용
- UV, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS 등의 기기분석

나. 인삼 유효성분에 대한 효소작용 특성 연구

- 제조합 효소에 의한 인삼유효성분의 변환 특성 관찰
- 배당체의 분해 및 당전이 산물에 생합성 확인

·각 효소에 의한 기질 특이성 확립

다. pH 안정성 분석

·농축 방법 및 열처리에 따른 인삼 유효성분의 pH 안정성 분석

·생물전환 인삼 유효성분의 pH 안정성 분석

·pH 의존성 분석을 통한 가공 적성 검토

3. 3차년도(2007)

가. 전환물질의 분리·정제

·Diaion HP-20, silica gel, Sephadex LH-20, HPLC 이용

·UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS 등의 기기분석

나. 발효물의 생리활성 분석

·free radical scavenging 활성

·NO 저해활성 측정

·항균활성 측정

·세포독성 측정

다. 효소반응 최적화 및 전환산물 분리, 정제

·인삼유효성분의 변환 관련 최적효소 선별

·인삼유효성분 전환 산물의 분리 정제 및 구조 분석

·효소 반응 최적화를 통한 기능성 인삼유효성분의 생산

라. 열안정성 분석

·농축 방법 및 열처리에 따른 인삼 유효성분의 열 안정성 분석

·생물전환 인삼 유효성분의 열 안정성 분석

·온도의존성 분석을 통한 가공 적성 검토

제 3 절 연구평가의 착안점

평가의 착안점 및 척도		달성도 (%)
1차년도(2005)		
착안 사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼의 발효 조건 확립 ○ 배당체 분해 및 변환 효소 수집 ○ 유용 전환물질의 분석 ○ 초고압 처리에 대한 유효성분의추출 	100
척도 (점수)	<ul style="list-style-type: none"> ·발효 미생물의 특성 분석 및 발효 조건 검토(30) ·변환효소 유전자 확보 및 대량 발현 조건 확립(30) ·TLC, HPLC 분석 조건 확립(10) ·초고압 처리를 통한 인삼 유효성분의 변화 분석(30) 	
2차년도(2006)		
착안 사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전환물질의 분리·정제 ○ 인삼 유효성분에 대한 효소작용 특성 연구 ○ pH 변화에 대한 유효성분의 안정성 	100
척도 (점수)	<ul style="list-style-type: none"> ·chromatography를 이용한 유용성분의 분리 및 기기분석(40) ·배당체의 분해 및 당전이 산물에 생합성 확인(30) ·농축 및 열처리방법에 따른 생물전환 인삼 유효성분의 pH 안정성 분석(30) 	
3차년도(2007)		
착안 사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전환물질의 분리·정제 ○ 생리활성 분석 ○ 열에 대한 유효성분의 안정성 	100
척도 (점수)	<ul style="list-style-type: none"> ·효소반응 최적화 및 전환산물 분리, 정제(40) ·free radical 소거능, NO 저해활성, 항균활성, 세포독성 측정(30) ·농축 및 열처리에 따른 인삼 유효성분의 열 안정성 분석(30) 	
최종평가		
착안 사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효 활성물질의 효율적인 추출 ○ 효능 증가 또는 전환물질 규명 ○ 기능성 식품으로서의 적용 가능성 제시 ○ 기능성식품 소재 시제품 개발 	100
척도 (점수)	<ul style="list-style-type: none"> ·효소 및 미생물 처리에 의한 유효성분의 추출성의 증가(20) ·생리활성 증가 또는 새로운 전환물질 5개 이상 확보(30) ·가열, 건조, 살균 및 pH 변화에 대한 유효성분의 안정성 확립(30) ·분말, 캡슐, 음료 형태의 시제품 제작(20) 	

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 기대효과

1. 인삼의 효능 증대

생균제를 이용하여 인삼을 발효, 가수분해하고 발효산물과 분해물을 건조 분말화하여 특정 성분의 함량을 증가하거나 추출능을 증가시키고 장내 효과 개선 및 소화 흡수율을 증대시킬 수 있다. 그리고 식물체내에 존재하는 비활성 형태의 물질로부터 glucoside 결합을 분해하는 pectinase, hemicellulase, lactase 및 cellulase 등의 효소를 사용하여 배당체 화합물을 aglycone 형태로 전환하여 활성 형태의 유효물질 양을 증가시키거나 유효활성 물질을 효율적으로 추출, 정제하여 효소와 미생물을 이용한 인삼 가공식품을 개발을 통해 체내 소화를 촉진할 뿐만 아니라 인삼 속에 함유되어 있는 생리활성 성분이나 미생물 발효 및 효소 반응에 의해 생성되는 생리활성 물질을 생산해 낼 수 있다. 따라서 유용 미생물과 효소 전처리에 의한 인삼의 발효를 통하여 활성성분 추출을 증대 및 인삼가공 산물의 보존성을 증가시킬 수 있다.

한편 인삼잎 성분도 유효성과 약리효능에 대한 연구가 시도되면서 인삼잎의 효과적인 활용에 많은 관심이 모아지게 되었다. 최근 들어 인삼잎을 이용한 차의 개발에 관한 연구가 보고되고 있고 식품학적인 관점에서 인삼 부산물들을 이용하고자 하는 관심이 증대되고 있어 향후 부산물의 성분 뿐 아니라 활용방안에 관한 광범위한 연구가 기대되고, 인삼 부산물의 활용차원에서 동물의 사료나 기능성 식품 재료로의 사용은 가능할 것으로 생각된다. 그리고 향후 동물실험 및 임상실험을 이용한 기능성 평가를 통해 확실하고 구체적인 활용방안의 모색이 요구되어진다.

2. 활성이 강화된 제품 개발

항산화제로의 인삼제품을 개발을 위하여 기존 항산화제의 미약한 활성, 독성 및 사용 한계 등으로 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 천연 항산화제의 개발과 이를 통

한 고부가가치의 기능성 물질을 생산해 낼 수 있다. 항산화제는 식품공업, 발효공업 및 의약산업 분야, 농업 분야에 이용될 수 있기 때문에 국가 경제 산업적 측면에서 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있고 항산화제의 탐색과 개발을 통해 지질과산화 억제활성, 뇌신경세포 보호활성을 갖는 다수의 신규 항산화제를 항염증제, 뇌신경세포 보호제, 피부노화 방지제 및 식품 첨가물을 개발할 수도 있다. 뿐만 아니라 인삼이 함유된 화장품 제품을 개발하여 침체된 국내 화장품산업의 부흥과 화장품 산업의 경쟁력을 높이기 위한 새로운 방법으로 인삼에서 분리된 다당체, saponin 등을 함유한 화장품 원료는 체형에 관계없이 다양하게 이용되어 피부개선, 노화방지, 미백효과 등 다양한 효과를 기대할 수 있다.

활성이 강화된 인삼 제품은 인삼에 함유되어 있는 특정 단일 성분을 분리·정제하여 약리효능을 입증한 인삼의 성분의 강화제품과 차별화된 제품을 개발할 수 있고 밝혀져 있지 않은 유효성분 물질에 대한 화학적 연구와 작용 기전에 대한 연구를 통해 우수성을 과학적으로 입증하여 인삼의 고부가가치 및 활용성을 확대해 나갈 수 있다.

3. 친환경 소재 개발

최근 축산분야에서는 광우병, 구제역의 발생 등이 세계적인 현안으로 부각되고 있으며 축산 사료에 항생제의 사용이 규제되면서 친 환경적 이미지를 가지는 미생물 제제나 천연물질의 이용에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 인삼을 생물전환하여 기능성과 소화성을 향상시킴으로써 가축의 소화 촉진, 항병력 증진, 건강 증진 및 장내 세균의 균형 조절 효과를 가지는 기능성 사료 첨가제 개발이 가능하다.

제 2 절 활용방안

1. 다양한 형태별 인삼 제품의 개발

생균제의 기능성식품으로 개발하는데 걸림돌이 되었던 생리활성물질에 대한 식품

가공 적성 검토 및 적용 방법 확립하고 살균기술이 아닌 생물반응기로서의 초고압기술을 인삼에 적용함으로써 생물 전환물질 분야에의 적용을 통한 신기술 확보 및 새로운 기능성식품 가공기술을 확보한다. 그러므로 일반 가열 온도 및 가압살균조건에서의 인삼 유효성분의 열안정성 분석을 통한 기능성식품 설계시 각각의 열 안정성 및 pH 안정성 profile을 이용한 분말, 캡슐 및 음료 등 다양한 형태별 제품설계 가능하다.

효소 및 미생물 발효를 이용한 식품의약이나 어류 및 가축의 항병, 항균 천연사료 첨가제로 사용할 수 있다. 친환경 소재인 인삼의 발효물을 사료첨가제로 이용하여 축산 분야에서 항생제의 남용을 막을 수 있는 대체제로서 친환경적 이미지가 가능하므로 국내 사료첨가제 시장에 인삼 발효액을 사용한 사료첨가제를 도입함으로써 효능과 경제성 있는 제품을 공급하여 수입 대체 효과 유도할 수 있다.

유용미생물을 이용한 경제적인 발효공정 및 공정설계기술을 확보하고 유기성 부산물 재활용 연구개발 기반이나 기능성 평가시스템 구축에 의한 천연물 연구를 위한 기반 조성하여 인삼 가공품의 시험생산 및 시제품 제작을 통한 본격적인 생산체제를 구축하고 타 식품관련 가공부산물의 재활용 방안을 위한 기초자료 제공할 수 있다. 본 과제 의 기능성 평가법을 이용하여 다른 생물소재로 탐색을 확대하고, 발효산물로부터 획득된 생물소재의 기능성 확대 및 천연물과 관련된 연구에 기초자료로 활용할 수 있다. 최종적으로는 인삼을 이용한 발효물을 사료 첨가제 또는 기능성 식품으로 개발하여 관련업체에 기술 이전한다.

2. 대사산물의 전환에 의한 유효물질 생합성

천연물관련 가공부산물의 재활용 방안을 위한 기초자료 제공할 수 있으며 본 과제의 기능성 평가법을 이용하여 다른 생물소재로 탐색을 확대하고, 발효산물로부터 획득된 생물소재의 기능성 확대 및 천연물과 관련된 연구에 기초자료로 활용할 수 있다. 미생물의 특성을 분석하고 최적의 미생물 선정 및 반응조건을 검토하고 분해 활성이 높은 미생물을 우선적으로 선정한 뒤, 최종적으로 유해성이 없으면서 장내 기능성을 부여할 수 있는 미생물(예 유산균)으로 확대한다.

β -Glucosidase 활성을 갖는 효소들을 대상으로 식물체의 aglycone 형태 활성물

질을 보다 효율적으로 추출하는 방법을 개발한다. 이런 기술들은 참깨로부터 sesaminol, 상백피와 포도로부터 resveratrol, 백강잠, 상백피, 닭의장풀로부터 1-deoxy nojirimycin, 귤, 오렌지로부터 naringenin 및 hesperetin, 은행잎, 메밀, 양파로부터 quercetin, 황금으로부터 baicalin 등의 전환에 활용할 수 있다. 또한 생균제의 생합성 효소에 의해 천연물내의 구성성분의 전환으로 새로운 생리활성물질을 개발하거나 당의 결합에 의한 감미료와 같은 새로운 기능성 식품소재를 개발하여 사료첨가제, 식품가공의 첨가제, 기능성식품, 건강보조식품에 사용할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1970년도 중반, Smith와 Rosazza에 의해 미생물을 이용하여 포유류의 대사과정 모방한 Microbial Models of Mammalian Metabolism이 제안되었다. 포유류에서 일어나는 천연물의 Phase I 전환 반응의 대부분을 미생물의 생물전환계가 모방이 가능하다고 알려졌다. 미생물의 대사작용이 포유류의 대사과정을 모방하거나 천연물로부터 파생된 대사산물에 대한 정보를 줄 수 있다면 동물모델을 대체할 수 있는 가능성이 있다. 따라서 1980년 중반기부터는 포유류의 천연물대사 연구를 위해 미생물을 많이 이용되어 왔다.

미생물에 의한 천연물의 전환과 포유동물의 대사작용과의 관련성을 규명하기 위한 많은 연구가 필요하다. 약리학적, 독성학적인 연구를 위한 많은 양의 대사산물을 얻기 위해서는 미생물에 의한 대사가 유용하며 천연물 유효성분의 정확한 작용기전, 생리적 효능, 장내 미생물과의 상호관계 및 여러 조건에서의 안정성에 대한 기초 연구가 필요가 더욱 중요하다.

Akao와 Hasegawa 등은 경구 투여한 인삼의 진세노사이드는 체내에서 대사되어 유의한 효능을 보이는데 이때 장내 미생물의 일종인 *Prevotella oris*가 관여하는 것으로 보고하였다(14). 또한 장내에 서식하는 catechin 가수분해 미생물의 존재는 체내에서 녹차의 약리작용을 설명하는데 중요한 것으로 오줌, 담즙 혈장에서 녹차의 catechin 대사산물을 분석하거나 대사산물의 transport와 신진대사과정에 대한 연구가 진행되고 있다. 녹차의 주성분인 catechin의 중요 대사과정으로는 methylation, glucuronidation, sulfation 등이 있으며 소장과 간은 catechin의 흡수와 대사에 중요한 기관으로 작용한다. (-)-epicatechin-3-O-gallate의 생물전환은 주로 분변을 사용하여 수행되었으며 분리된 15가지 대사산물 중에서 2가지 epimer와 4가지 화합물이 새로운 물질로 분리되었다.

한편, 미생물을 이용한 대사산물의 분석에는 thin layer chromatography(TLC), gas chromatography(GC), high performance liquid chromatography(HPLC), mass spectrophotometry(MS)가 장착된 GC-MS, LC-MS, Liquid chromatography가 장착된 nuclear magnetic resonance(NMR)(LC-NMR), 방사선화학 기술 등이 이용되고 있으며 소량의 대사산물을 분석하기 위해서는 많은 시간과 노동력이 소요한 점이

단점이다. 그러나 최근에 개발된 LC-NMR 기술은 미생물 모델을 사용한 비교적 많은 양의 대사산물의 분석에 적합하다. 대사체의 분석에는 각각의 대사체를 확인 및 정량하기 위한 metabolite analysis로 구분되며 특정 물질을 투여한 후 urine 또는 혈액 내에서의 metabolite profiling을 분석하고 이들 자료를 probabilistic neural network 기법을 이용하여 조직 독성을 규명하는 metabonomics 연구 수행되고 있다. 대사체를 분석하는데 이용되는 방법으로는 solid extraction, liquid-liquid extraction의 방법으로 얻은 후 각각의 대사체를 high performance liquid chromatography나 gas chromatography 등의 크로마토그래피 기술 및 질량 분석을 통해서 가능하다. Mayo clinic의 Biomedical Mass Spectrometry and Functional Proteomics Facility에서는 *in vitro*와 *in vivo*에서 치료제의 metabolites를 분석하기 위해 line chromatography with tandem MS 사용하여 약물의 체내 대사에 대한 연구를 수행하였다.

제 7 장 참고문헌

1. Kwon, O. S., and Chung, Y. B. 2004. Solubilization of IH-901, a Novel Intestinal Metabolite of Ginseng Saponin, in Aqueous Solution. *J. Kor. Pharm. Sci.* **34(5)** : 385~391.
2. Hong, H. D. 2004. Qualitative and Quantitative Analysis of Saponin in Ginseng. *한국작물학회* : 146~154.
3. Park, C. G., Jeon B. S., Yang J. W. 2003. 고려인삼의 화학성분. *식품산업과 영양* **8(2)** : 10~23.
4. Shin, J. Y., Choi, E. H., and Wee, J. J. 2001. 인삼 조사포닌의 새로운 분리 방법. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **33(2)** : 166~172.
5. Kitts, D. D., and Hu, C. 2000. Efficacy and safety of ginseng. *Public Health Nutrition* **3(4A)** : 473~485.
6. Baek, N. I., Kim, D. S., Lee, Y. H., Park, J. D., Jung, S. Y., Lee, C. B., and Kim, S. I. 1995. 2D-NMR 기법을 이용한 (20S)-와 (20R)-ginsenoside Rh₂의 ¹H- 및 ¹³C-NMR Signals의 완전 동정. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **38(2)** : 184~189.
7. Kim, J. H., Nah, S. Y. 2005. Effect of Ginsenoside Total Saponins on Experimental Irritable Bowel Syndrome in Rat. *J. Ginseng Res.* **29(2)** : 94~99.
8. Ko, S. R., Suzuki, Y., Chei, K. J., and Kim, Y. H. 2000. Enzymatic Preparation of Genuine Prosapogenin, 20(S)-Ginsenoside Rh₁, from Ginsenosides Re and Rg₁. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64(12)** : 2739~2743.
9. Park, E. K., Shin, Y. W., Lee, H. U., Kim, S. S., Lee, Y. C., Lee, B. Y., and Kim, D. H. 2004. Inhibitory Effect of Ginsenoside Rb1 and Compound K on NO and Prostaglandin E2 Biosyntheses of RAW264.7 cells Induced by Lipopolysaccharide. *Bio. Pharm. Bull.* **28(4)** : 652~656.
10. Hasegawa, H. 2004. Proof of the Mysterious Efficacy of Ginseng: Basic and Clinical Trials: Metabolic Activation of Ginsenoside: Deglycosylation by Intestinal Bacteria and Esterification With Fatty Acid. *J Pharmacol Sci.* **95** : 153~157.

11. Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, Takino Y. 1991. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rh₂ in the stomach of rats. *Chem. Pharm. Bull.* **39(2)** : 400~404.
12. Tawab, M. A., Bahr, U., Karas, M., Wurglice, M., and Schubert-Zsilavec, M. 2003. Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. *Drug Metab Dispos.* **31(8)** : 1065~1071.
13. Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S., and Uchiyama, M. 1996. Main Ginseng Saponin Metabolites Formed by Intestinal Bacteria. *Planta Medica.* **62** : 453~457.
14. Hasegawa, H., Sung, J. H., and Benno, Y. 1997. Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins. *Planta Medica.* **63(5)** : 436~440.
15. Hasegawa, H., and Uchiyama, M. 1998. Antimetastatic Efficacy of Orally Administered Ginsenoside Rb₁ in Dependence on Intestinal Bacterial Hydrolyzing Potential and Significance of Treatment with an Active Bacterial Metabolite. *Planta Medica.* **64** : 696~700.
16. Bae, E. A., Choo, M. K., Park, E. K., Park, S. Y., Shin, H. Y., and Kim, D. H. 2002. Metabolism of Ginsenoside R_c by Human Intestinal Bacteria and Its Related Antiallergic Activity. *Biol. Pharm. Bull.* **25(6)** : 743~747.
17. Saiki, I. 2003. Anti-metastatic Effect of Ginseng Saponins and its Molecular Mechanism. *J. Ginseng Res.* **27(4)** : 151~157.
18. Bae, E. A., Han, M. J., Choo, M. k., Park, S. y., Kim, D. H. 2002. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg₃ by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* **25** : 58~63.
19. Bae, E. A., Choo, M. K., Lee, Y. C., and Kim, D. H. 2004. Biotransformation of Ginseng Extract to Cytotoxic Compound K and Ginsenoside Rh₂ by Human Intestinal Bacteria. *Natural Product Sciences.* **10(6)** : 347~352.
20. Venisetty RK, Ciddi V. 2003. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **4(3)** : 153~167.

21. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutrition* **130(7)** : 1695~1699.
22. Kim YK, Guo Q, Packer L. 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* **127** : 149~156.
23. Adelman R, Saul RL, Ames BN. 1988. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 2706~2708.
24. 한병훈. 2001. 인삼의 활성성분 및 기타연구. *J. Ginseng Res.* **25(1)** : 26~30.
25. 이부용. 2003. 국내 인삼산업 현황 및 새로운 인삼제품 개발 전망. *식품산업과 영양* **8(2)** : 1~9.
26. 박재기, 송우용, 윤동섭. 2001. 우리나라 인삼산업의 활성화 방안에 관한 연구. *경영경제연구* **24(2)** : 65~82.
27. 박홍석, 이선희, 엄태봉. 1998. 생균제로서 가능성이 있는 미생물의 선별 및 특성. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27(3)** : 433~440.
28. Kwon BM, Nam JY, Lee SH, Jeong TS, Kim YK, Bok SH. 1996. Isolation of cholesteryl ester transfer protein inhibitors from Panax ginseng roots. *Chem. Pharm. Bull.* **44(2)** : 444~445.
29. Bae, E. A., Kim, N. Y., Han, M. J., Choo, M. K., and Kim, D. H. 2003. Transformation of Ginsenosides to Compound K (IH-901) by Lactic Acid Bacteria of Human Intestine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13(1)** : 9~14.
30. Kim, W. Y., Kim, J. M., Han, S. B., Lee, S. K., Kim, N. D., Park, M. K., Kim, C. K., and Park, J. H. 2000. Steaming ginseng at high temperature enhances biological activity. *Natural Products.* **63(12)** : 1702~1704.
31. Lee, D. S., Kim, Y. S., Ko, C. N., Cho, K. H., Bae, H. S., Lee, K. S., Kim, J. J., Park, E. K., and Kim, D. H. 2002. Fecal metabolic activities of herbal components to bioactive compounds. *Arch. Pharm. Res.* **25(2)** : 165~169.
32. Choi SS, Lee JK, Han EJ, Han KJ, Lee HK, Lee J, Suh HW. 2003. Effect of Ginsenoside Rd on Nitric Oxide System Induced by Lipopolysaccharide Plus TNF- α in C6 Rat Glioma Cells. *Arch. Pharm. Res.* **26(5)** : 375~382.

주 의

1. 이 보고서는 농림식품수산부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림식품수산부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.