

발간등록번호

11-1543000-000165-01

금산 발효홍삼 우량균주개발 및 발효공정 표준화  
(Development of Geumsan's fermented red ginseng and  
standardization of fermentation process)

충 남 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “금산 발효홍삼 우량 균주개발 및 발효 공정 표준화에 관한 연구” 과제의  
보고서로 제출합니다.

2013 년 08 월 13 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 송 규 용

세부연구책임자 : 남 명 수

연 구 원 : 조 수 현

연 구 원 : 랜 치 헨 디

협동연구기관명 : 건양대학교

협동연구책임자 : 이 계 원

# 요 약 문

## I. 제 목

금산 발효홍삼 우량균주개발 및 발효공정 표준화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 전통발효식품에서 유래하는 유산균 등에서 금산인삼 발효에 적합한 균주를 개발한 후 최적의 발효조건을 확립함.
2. 발효한 인삼(뿌리, 잎)으로부터 새롭게 생성되는 물질의 구조확인 및 아토피 억제 및 항산화활성을 검증함
3. 표준화된 제품을 개발하기 위하여 분석 및 검증이 용이한 지표물질 선정 및 분석방법 확립.
4. 인삼(뿌리, 잎)을 소재로 한 흡수율이 개선된 발효인삼 제품의 개발.
5. 아토피 억제 활성이 증강된 복합제의 개발
6. 개발된 제품의 실용화 및 산업화
7. 제품의 적극적인 홍보 및 마케팅을 통한 해외수출로 인한 농가소득 증대
8. 지적재산권 확보-발효 홍삼 관련 특허 3건 출원 및 등록
9. 발효인삼 생산을 희망하는 가공업체나 농가에 안정적으로 발효균주와 표준화된 발효기술 보급으로 고품질의 농가형 발효홍삼 가공업체 육성-비단피 기술이전

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구조직은 1) 발효인삼의 물질분석 및 활성검증팀, 2) 인삼발효팀 및 3) 산업화팀과 같이 세 가지 연구팀으로 구성되어 있음. 발효인삼의 물질분석 및 활성검증팀과 인삼발효팀은 대학에서, 산업화팀은 참여기업으로 현재 다양한 인삼제품을 개발하여 국내 및 해외에 수출하고 있는 금산덕원, 비단피으로 구성되어 있음.

### 1. 물질분석 및 활성검증팀

- 발효인삼의 성분분석연구
- 활성 유효성분의 분리 : 실리카겔, C-18, MPLC, prep-HPLC 등을 이용한 활성을 나타내는 유효물질의 분리
- 분리된 유효물질의 IR, Mass, NMR 등과 같은 spectroscopy를 이용한 구조결정
- 다른 한약재가 가미되어 효능이 증강된 고기능성 복합제의 개발
- 효능이 밝혀진 인삼사포닌을 지표물질로 한 제품의 표준화 확립

- 발효인삼의 아토피억제 및 항산화활성 검증
- 활성균주 선발시 진세노사이드 조성의 변화에 미치는 영향 검증

## 2. 인삼발효팀

- 전통발효식품을 비롯한 다양한 분리원으로부터 인삼을 발효시킬 수 있는 안전성이 확보된 우량균주 46종 개발
- 유산균 발효시 종말점 선정 방법 확립
- 발효공정 표준화 확립

## 3. 산업화팀

- 발효인삼을 이용한 최근 시대적 흐름에 따른 국내 소비자의 성향 변화와 소비자가 요구하는 새로운 형태의 제형 개발 : 정제, 산제, 캡슐제, 속방성, 서방성 제제 등
- 중제품의 대량 생산공정 확립
- 권역별 제품의 홍보 및 수출판로 개척

## IV. 연구개발결과

- 수삼을 비롯한 인삼잎 등의 각각의 15종 미생물 발효를 통하여 발효 홍삼은 성분 변화를 알아본 결과 발효 홍삼의 진세노사이드는 적지 않은 변화를 보여 주고 있었음
- 수삼에 의한 419 발효에서는 ginsenoside Rb1을 0.4%로 이하로 존재하는 ginsenoside Rd로 변환 시킴으로써 Rd의 대량 생산에 영향을 줄수 있는 발효 생산 미생물임.
- 또한 수삼의 미생물 발효를 통해 얻은 좋은 결과로써 수삼에는 거의 존재하지 않고 홍삼에 소량 존재하는 약리 효능을 지닌 진세노사이드 생산에 고효율을 얻을 수 있음.  
; (S)-ginsenoside Rg3, (R)-Rg3, Rg5
- 발효 홍삼 내 고 함량의 진세노사이드를 분리 하였음.  
; Ginsenoside Rd, (S)-ginsenoside Rg3, (R)-Rg3, Rg 순수 대량분리
- 김치 및 마유로부터 인삼을 발효 시킬수 있는 신규 균주 5종을 분리하여 확인하였음. 이 중에서 A3와 2-2와 같은 2종의 균주를 KCTC에 기탁하였으며 특허를 출원하였다. 나머지 3종에 대해서도 동정을 하였으며 2차년도에 KCTC에 균주기탁과 동시에 특허를 출원하였음.
- 최적의 발효 조건(발효온도, pH 등)을 확립하였음.
- Ginsenoside 성분을 전환하는 신균주의 분리는 2균주로 *Paenibacillus* sp MBT213와 *Lactobacillus buchneri*-103L으로 동정되었으며, 분리된 2균주 모두 Single saponin Rb1을 Rd로 전환하는 능력이 우수한 것으로 확인되었음.
- *Paenibacillus* sp. MBT213를 접종한 인삼뿌리 발효에서 첨가시 생균수가 증가되어 발효 마지막 날인 14일째는  $1.43 \times 10^8$  으로 높게 나타났다. 또한 *Lactobacillus buchneri*-103L를 접종한 인삼뿌리 발효에서는 발효 7일째 가장 높은  $1.86 \times 10^8$  으로 나타났고 14일째는 생균수가 감소하여  $3.2 \times 10^7$  으로 나타났음.
- *Paenibacillus* sp MBT213 및 *Lactobacillus buchneri*-103L를 뿌리에 접종하여 반응시킨 결과 2 균주 모두 발효시간이 경과됨에 따라 Rb1은 줄어들고 Rd 성분이 증가된 것으로 나



타났다. Rb1에서 Rd로 ginsenoside 전환 반응이 잘 일어났고 발효 14일째는 Rg3를 포함한 새로운 ginsenoside들이 생성되었음.

- Ginsenoside를 전환하는 신균주의 분리는 4균주로 *Enterococcus durans* 으로 동정되었으며, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium* 으로 각각 동정되었다. 분리된 신균주 모두 Single saponin Rb1, Rb2, Rd, Re, Rg1과 꽃봉우리, 뿌리의 전환 능력이 우수한 것으로 확인하였음.
- 인삼(뿌리)의 발효는 성공적으로 수행되었음.
- 면역활성에 좋은 초유성분 등과 함께 발효홍삼 성분이 함유된 정제를 적합한 향과 함량을 선택하여 제조할 수 있었음.
- 발효홍삼을 함유하는 음료 제조시 적합한 향과 생약 추출물을 선택하여 적당한 음료를 제조할 수 있었음.
- 발효홍삼 성분이 함유된 NLC를 제조하여 향후 피부적용제제를 개발할 수 있는 기초 자료를 얻을 수 있었음.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### ■ 발효 홍삼의 미생물 동정에 관련된 학회 포스터

- 1) Microorganism Screening from Mare's Milk with  $\beta$ -glucosidase activity and Hydrolysis of Saponin of Korean Ginseng -2012년 한국축산식품학회
- 2) Biotransformation of ginsengs in *Panax ginseng* (Korean Ginseng) by beta-glucosidase extracted from *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 in Korean Kimchi -2012년 International Food Technology
- 3) Fermentation characteristics of *Panax ginseng* by *Lactobacillus paraplantarum* 17 -2013년 한국축산식품학회
- 4) Fermentation characteristics of *Panax ginseng* by *Leuconostoc cetrinum* 38 - 2013년 한국축산식품학회
- 5) Fermentation characteristics of *Panax ginseng* by *Enterococcus faecalis* CRNB-A3 -2013년 한국축산식품학회

### ■ 발효 인삼의 미생물 동정과 발효에 의한 사포닌 전환에 관련된 특허 출원

특허출원 5건; 1) 인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 출원번호 : 10-2010-0029649, 2) 인삼 발효능을 갖는 신규 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 출원번호 10-2011-0043206, 충남대학교산학협력단) 3) 락토바실러스 플랜타럼 시알엔비-22를 이용하여 발효한 발효인삼을 함유하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물, 10-2012-0045101, 4) 엔테로코커스 패칼리스 시알엔비-에이3를 이용하여 발효한 발효인삼을 함유하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물, 10-2012-0045101, 5) 신규한 패니바실러스 속 엠비티213 균주, 이를 이용한 발효인삼 및 이를 이용한 발효인삼 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물, 출원번호 :

- ◆ 논문투고 2건; 1) 흑삼의 신생혈관 억제활성에 대한 연구, 대한분초학회지, 26(3), 83-90 (2011), 2) 흑삼의 아토피 억제활성에 대한 연구, 대한피부미용학회지,10(1), 91-97(2012),
- ◆ 논문투고 중 2건; 1) Identification of  $\beta$ -glucosidase activity of *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 in Kimchi and its potential in conversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> from *Panax ginseng*; Journal of Agricultural and Food Chemistry 2) 발효균주에 의한 선택적 Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환된 발효 홍삼과 그의 아토피 억제 효과;대한피부미용학회지 에 투고 하였음.
- ◆ 기술이전 1건 : 인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22[KCTC 11931BP] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환방법(출원번호 : 10-2011-0043207), 비단피농업 법인으로 일금30,000,000원에 기술이전 하였음(2012.4.30).

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### Development of Geumsan's fermented red ginseng and standardization of fermentation process

The purpose of this study is to manufacture fermented red ginseng products by the isolated new strains from kimchi and mare's milk. We finally isolated 15 kinds of new strains; *Enterococcus faecalis*(CRNB-A3), *Enterococcus faecium*(B9), *Enterococcus durans*(S16), *Enterococcus faecium*(SA5), *Enterococcus faecium*(SA4), *Enterococcus faecalis*(S18), *Lactobacillus paraplantarum*(17), *Lactobacillus plantarum*(CRNB-22), *Lactobacillus plantarum*(30), *Lactobacillus buchineri*(103), *Leuconostos cerium*(38), *Leuconostos mesenteroides*(46), *Paenibacillus* sp.(419), *Paenibacillus* sp.(95, MBT213), and *Bacillus coagulans*(123).

Among the isolated new strains, *Enterococcus durans*(S16), and *Enterococcus faecium*(SA4) strains produced a relatively large amount of compound K and *Enterococcus faecalis*(A3) strain produced a relatively large amount of ginsenoside Rg3 and Rg5 during fermentation of ginseng, respectively. Also, *Paenibacillus* sp.(419) strain converted ginsenoside Rb1 to ginsenoside Rd. From the 10Kg of fermented ginseng by *Paenibacillus* sp.(419), we obtained 10g of ginsenoside Rd. The optimum conditions for fermentation were pH 7, 35°C and 14 days. Rg3 and Rd were selected as standard ginsenoside for manufacturing fermented ginseng products and analysis method was been established.

It was found that the extract of fermented ginseng exhibited strong anti-oxidative effects on scavenging of DPPH radical, nitrite, superoxide anion and hydrogen peroxide. The radical scavenging activity was in the order of S16, S18, SA4 and SA5.

In regard to *in vitro* and *in vivo* anti-atopic experiments in THP-1 cells, the extracts of fermented ginseng strongly suppressed the secretion of MCP-1, IL-6 and IL-8 induced by the house dust mite. Also, the extracts of fermented ginseng strongly suppressed the

secretion of IL-13 and MIP-1 $\alpha$  in MC/9 mast cells stimulated by DNP.

In summary, an efficient method for the fermented ginseng by the new strains from kimchi and mare's milk without tumor-promoting agent such as benzopyrene was developed and the extracts of fermented ginseng were found to show anti-oxidative and anti-atopic activities. Therefore, we already transferred these technologies to company for the production of various dietary supplement products that may be used for the treatment of aging and atopic disease.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

<b>Chapter 1. Outline of Project</b> .....	1
1. The need for research and development .....	1
2. Domestic and foreign status and problems related technologies .....	3
3. Research Trends .....	4
4. The goal of research and development .....	6
<b>Chapter 2. Contents and Results of Research and Development</b> .....	8
1. Analysis of fermentation and fermented red ginseng saponins separation .....	10
2. Traditional Fermented Ginseng fermented by lactic acid bacteria in food and biochemical changes .....	101
3. Using the formulation development and stability of fermented ginseng .....	145
<b>Chapter 3. Achievement Degree of Objective and Contribution Degree to related field</b> .....	201
<b>Chapter 4. Future Plan Due to the Results of Research and Development</b> .....	205
<b>Chapter 5. References</b> .....	210

# 목 차

□	제 출 문 .....	i
□	요 약 문 .....	ii
□	영문요약문 .....	vi
□	영문 목차 .....	viii
□	목 차 .....	ix

## 제 1 장. 연구개발과제의 개요.....1

제 1 절.	연구개발의 필요성 .....	1
제 2 절.	국내·외 관련기술의 현황과 문제점 .....	3
제 3 절.	국내·외 연구 동향 분석 .....	4
제 4 절.	연구개발의 목표.....	6

## 제 2 장. 연구 개발 수행 내용 및 결과 .....8

제 1 절.	제 1세부과제 수행 내용 및 결과 .....	10
1.	발효홍삼 성분 분석 및 발효 사포닌 분리 .....	10
2.	발효 균주별 발효 홍삼 분석 .....	14
가.	균주별 사포닌 변화 - <i>Enterococcus</i> 에 의한 발효 홍삼 .....	14
나.	균주별 사포닌 변화 - <i>Paenibacillus</i> sp.에 의한 발효 홍삼 .....	27
다.	균주별 사포닌 변화 - <i>Lactobacillus</i> 에 의한 발효 홍삼 .....	32
라.	균주별 사포닌 변화 - <i>Leuconostos</i> 에 의한 발효 홍삼 .....	39
마.	발효홍삼 내 고함량 진세노사이드 3종 분리법 .....	43
3.	발효인삼의 벤조피렌 발암성 검사 .....	52
4.	잔류농약 검사 .....	55
5.	발효인삼의 항산화 활성 측정 .....	57
6.	발효인삼의 아토피억제활성 측정 .....	65
7.	아토피 억제효능 - <i>in vivo</i> .....	83
8.	제1세부과제 결론 .....	100

## 제 2 절. 제 2세부과제 수행 내용 및 결과 .....101

1.	전통발효식품 및 유산균을 이용한 인삼발효에 따른 생화학적 변화.....	101
----	---	-----

2. 실험방법	102
가. 사포닌 분해 유산균의 분리	102
나. 사포닌 분해 미생물의 선발과 미생물의 동정	103
다. 사포닌 분해 미생물의 특성	103
라. 선발균주의 온도에 따른 성장 특성	104
마. 선발균주의 pH 조건에 따른 성장 특성	104
바. 사포닌 분해 미생물의 효소 분리와 효소 특성	104
사. 사포닌 전환 유산균에 의한 saponin 전환	105
아. 대규모 발효공정에 의한 인삼(뿌리)의 발효	105
3. 실험결과	105
가. 사포닌 분해 유산균의 분리 I	105
나. 사포닌 분해 유산균의 분리 II	108
(1) 사포닌 분해 미생물의 특성	117
(2) 사포닌 전환 미생물의 특성	118
(3) 미생물에 따른 사포닌 분해 조효소의 특성	124
(4) 사업화를 위한 유산균를 이용한 대량 발효	126
(5) 대규모 발효공정에 의한 인삼(뿌리)의 발효	128
4. Ginsenoside Rb1의 Rd로의 선택적 전환 균주 분리 동정	128
5. 제 2세부과제의 결과	132
6. 제 2세부과제 결론	144

제 3 절. 제 1협동과제 : 발효 인삼을 이용한 제형 개발 및 안정성 145

1. 발효 홍삼을 이용한 제형 개발 및 안정성	145
2. 발효 홍삼을 함유한 면역력 강화 정제의 제조 및 평가 I	156
3. 발효홍삼을 함유한 음료의 제조 및 평가 I	163
4. 나노구조형 지질 전달체를 이용한 제형의 제조 및 평가	166
5. 발효 홍삼을 함유한 면역력 강화 정제의 제조 및 평가 II	172
6. 고체 분산체 제조를 이용한 공정 개선	175
7. 발효홍삼을 함유한 음료의 제조 및 평가	182
8. 문제점 해결	198
9. 결론	200

제 3 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 201

제 1 절. 연차별 목표 달성도	201
1. 1차년도 달성도	202
2. 2차년도 달성도	203
3. 3차년도 달성도	204
제 2 절. 관련 분야에의 기여도	204

제 4 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	205
1. 실용화·산업화 계획 .....	205
2. 교육지도, 홍보, 특허, 지적재산권 확보 계획 .....	205
제 5 장. 참고문헌 .....	210



# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발의 필요성

### 1. 발효인삼 제품 개발의 필요성

- 발효는 미생물을 이용하여 유용한 산물을 생산해내는 기술로서 우리나라를 비롯한 아시아 국가에서는 전통적으로 다양한 발효식품을 사용하여 왔음. 서양의 우유를 소재로 하여 발효를 수행한 유제품(Yogurt)에 비하여 아시아에는 다양한 제품들 (김치, 된장, 고추장, 간장-한국, 미소, 우메보시-일본, 템페-인도네시아, 춘장-중국)이 전통적으로 사용되어 졌음.
- 이러한 발효기술은 근세에 들어서면서 각종 의약품의 생산에 활용되어져 왔고, 특히 항생물질(페니실린, 세팔로스포린, 스트렙토마이신 등), 항암제(푸마질린, 텍솔 등)의 경우에는 약 70%이상이 발효공정을 통해 생산되는 “발효의약품” 임.
- 따라서 부패와는 다르게 발효의 경우는 인체에 유익한 다양한 생리활성물질을 생산할 수 있는 검증된 생물공학적 공정의 하나임. 이러한 발효 공정을 홍삼제품에 도입할 경우, 마찬가지로 홍삼 성분중 유용한 성분의 함량을 특이적으로 올려서, 기존 홍삼제품과의 차별화를 시킬 수 있는 좋은 방안의 하나임.
- 인삼의 섭취 시 체내(장내)에서 일어나는 반응은 주로 장내 미생물에 의해 진행되어 지며, 이 과정을 통해서 사포닌배당체는 사포닌에 결합되어 있는 당류들을 순차적으로 잃어가며 점차 사포닌비배당체(Aglycon) 형태로 변환되어 지는 것이 국내외 많은 연구자들에 의해 보고됨.(그림 1)

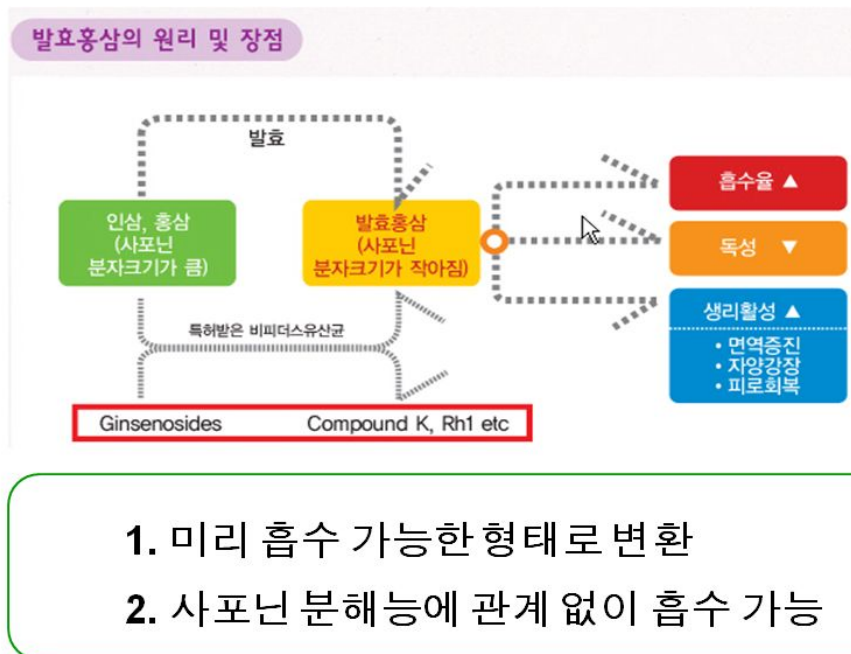


그림 1. 인삼과 발효공정 응용

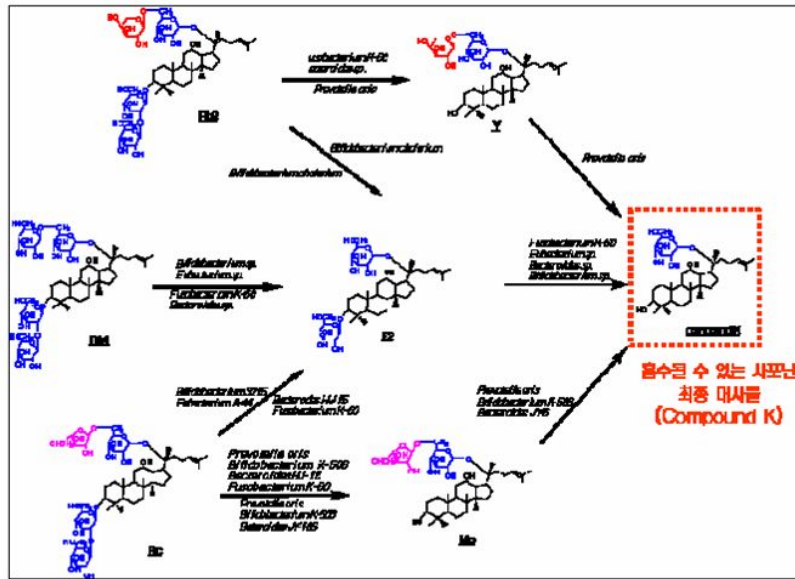


그림 2. 장내 미생물에 의한 사포닌 대사 경로 (Kobashi *et al.*, Bioscience Microflora. 16:1, 1997. Hasegawa *et al.*, Planta Med. 62:453, 1996)

- 이러한 과정을 ADME(Absorption-흡수, Distribution-분포, Metabolites-대사, Elimination-배설)의 약물학적 체내동태 중에서 대사와 흡수과정이라 일컬음.
- 따라서 장내미생물의 최종 대사산물인 Compound-K와 Rg3, Rh1, Rh2, Rg5 등의 물질 들 이 비로소 장관내 흡수를 통해 체내에서 이용되어 질 수 있음.(그림 2)
- 이러한 인삼의 체내동태 연구를 기반으로 20여 가지의 사포닌 성분 중에서 체내 흡수가 가 능한 Compound-K와 Rg3, Rh1, Rh2, Rg5등의 물질이 실제로 약효를 나타내는 성분으로 확인됨.
- 그러므로 앞서 설명한 발효를 통해서 흡수가 가능한 사포닌의 7가지 성분을 생산해내게 된 다면, 흡수를 저하로 인한 효능감소를 막을 수 있으며, 특별히 장내 미생물균총의 약화로 충분한 사포닌 대사물을 생성하지 못하는 노약자의 경우, 발효를 통한 고흡수율 사포닌 함 유 발효인삼을 통해 약효를 증강 시킬 수 있음. (그림 3)

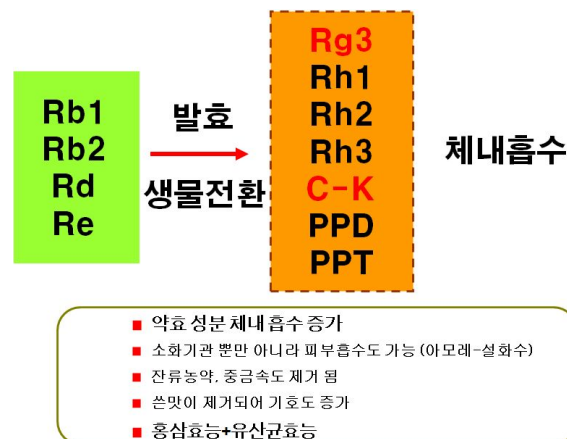


그림 3. 발효를 통한 인삼 성분의 전환

## 제 2 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

### 1. 사회적·문화적 측면

- Well-Being 이라는 단어가 많은 사람들의 관심인 요즘, 현재를 살고 있는 대다수의 사람들의 초미의 관심사는 건강임.
- 국내뿐만 아니라 국제적으로 인삼의 지명도 상승, 국제 시장 대형화, 소비자 계층의 다양화로 새로운 인삼 가공제품의 다양성 요구가 증가됨.
- 전체 건강기능성 식품의 판매품목별 비교를 보면, 여러 가지 관련 식품 중에서 단연 홍삼제품이 수위를 차지하고 있음.
- 건강기능성 식품의 1위 판매 품목인 홍삼의 주요 성분은 사포닌 계열의 물질들로서 이미 많은 연구 보고를 통해 기능성과 효능이 입증되었음.

### 2. 경제적 측면

- 새로운 고부가가치 인삼상품을 개발한 후 이를 이용한 건강기능성 식품 및 의약품 수준의 제품 개발이 절실히 요구됨.
- 인삼의 약효를 나타내는 주요한 성분은 dammarane계 triterpene인 aglycone에 당류가 결합된 배당체인 saponin으로 알려져 있음. 인삼뿌리에는 대략 3-5% 정도의 조사포닌이 함유되어 있으며 인삼에 대한 연구는 대부분 뿌리에 국한되어있음.
- 하지만 근래 들어 인삼뿌리 뿐만 아니라 인삼잎 및 꽃봉오리에 대한 관심이 증가되고 있음.
- 특히, 인삼잎의 조사포닌 함량은 13-18%로써 인삼뿌리보다 조사포닌의 양이 3~5배나 되고, 화학구조도 인삼근과 동일할 뿐만 아니라 인삼뿌리에는 존재하지 않는 성분들도 존재한다고 보고되어 있음.
- 그러나 우리나라에서는 위와 같이 인삼의 활성을 나타내는 사포닌 함량이 인삼뿌리보다 월등히 높아 인삼잎은 기능성식품 및 의약적 자원으로써 경제적 가치가 있음에도 불구하고 대부분 사료로 사용되거나 폐기되고 있는 실정으로 이를 활용한 고부가가치 가공제품의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 기존의 인삼/홍삼 제조지역 혹은 제조업체의 경우, 진부한 기존제품의 이미지에서 보다 과학적이고 소비자 취향에 맞는 신제품 개발이 절실히 요구됨.
- 한국식품영양과학회에 보고된 “한국인의 장내 미생물에 의한 사포닌분해 능력의 개인차”란 논문에 따르면 한국인중 37.5%는 사포닌을 분해할 수 있는 효소가 아예 없거나 효소의 성분 중 일부가 결여돼 사포닌을 제대로 분해 할 수 없는 상태인 것으로 나타났음.
- 그동안 홍삼이 사람이나 연령에 따른 체내 흡수 조건에 따라 아무리 좋은 인삼을 먹어도 인삼 효능의 주성분인 ‘사포닌’을 분해, 소화하지 못한다는 사실이 학계를 통해 알려져 왔었음.

### 3. 산업적 측면

- 이러한 약효능을 보유한 사포닌의 함량을 높이기 위한 다양한 연구와 개발이 기업, 대학, 정부출연을 통해 이루어져 왔으며, 항암/항종양, 항염증 및 콜레스테롤 저하효과를 중심으로 연구가 되었고 최근에는 치매예방 (PPT, PPD) 효능도 보고됨.
- 따라서 관련 효능을 이용한 다양한 제품들이 출시되어 시장을 점유하고 있음.
- 출시된 제품을 유형별로 나누어 보면 크게 두 가지로 나누어 질 수 있음:

- ① 홍삼을 물리 화학적 방법으로 처리한 제품군
- ② 홍삼을 미생물학적 처리 (발효와 생물전환)한 제품군
- 이들 제품의 각각의 마케팅 포인트를 정리
  - ① 물리화학적 처리를 통한 특정 사포닌의 함량 증가
  - ② 발효를 통한 소화 흡수가 용이한 사포닌 함량 증가로 나누어짐.
- 상기의 마케팅 포인트를 중심으로 판매가 이루어지는 이유는, 오랜시간 다양한 연구를 통해 효능이 검증된 사포닌의 종류가 이미 자세히 밝혀져 있으며, 식생활문화의 변화와 소비자 계층의 변화로 인하여 선호하는 식품의 맛과 향에 맞추어 제품을 제조하려는 기업의 방향 전환 때문.

### 제 3 절. 국내 · 외 연구 동향 분석

#### 1. 국내 · 외 인삼관련 연구동향

- 35억 달러 세계 인삼시장을 잡기 위하여 국내 바이오 벤처기업들이 연간 35억 달러에 달하는 세계 인삼 관련 신 물질 개발에 열을 올리고 있음.
- 현재까지 인삼을 기능성식품으로 표준화 해 세계 시장에서 성과를 올리고 있는 기업은 스위스 베링거인겔하임 산하의 “파머톤사” 뿐이며 국내에서도 인삼에 대한 국가차원의 연구와 벤처업계의 상품화가 속속 진행되고 있음.
- 또한 중국의 경우 백삼에는 거의 존재하지 않으며 홍삼에 소량 존재하는 인삼 사포닌인 Rg3를 대량 생산하는 방법을 개발하여 ‘Shenyi’ 라는 상품명으로 항암치료 보조제로 사용하고 있음.
- 국내의 경우 기능성 인삼의 대표 제품은 지난 98년 바이오벤처기업 진생사이언스가 개발한 ‘선삼’으로써 지난 2001년 선삼정으로 개발돼 국내 건강기능성식품 시장에 본격 알려진 이후 국내는 물론 전 세계적인 발명품으로도 인정받으며 기능성 인삼의 선두주자로 자리매김한 상태임.
- 이밖에도 다음과 같은 여러 종류의 가공인삼이 개발되고 있음.
  - 한국생명공학연구원과 바이오벤처기업 비티진이 공동 개발한 ‘황삼EX’
  - (주)남일농장 인삼영농조합이 (주)그린바이오 벤처와 제휴하여 제품화 한 ‘팽화홍삼’
  - 남양알로에서 분사한 (주)유니젠은 최근 미국 UPI사와 공동으로 개발 한 ‘바이오맥스’
  - 코인텍은 인삼에서 인체 면역력을 강화시키는 물질을 다량으로 추출하는데 성공했다.
  - (주)CJ의 ‘식스플러스’
  - (주)일동제약의 ‘황삼’

#### 2. 발효인삼관련 연구동향

- 대부분의 개발된 가공인삼은 뿌리를 이용한 제품들이 대부분임.
- 그러나 인삼은 뿌리삼에만 유효성분이 존재되는 것은 아니기에 버려지고 있는 인삼잎을 발효과정을 통해 가공하여 유효 성분 증가를 보여 기능성 인삼으로 만들어진다면 다양한 인삼 제품을 보여 줄 수 있음.

- 발효홍삼 제조 시 식용 가능한 유산균을 종균으로 사용하게 되면 인삼 중에 포함되어 있는 잔류농약과 중금속의 제거가 용이하며, 쓴맛 또한 제거되어 기호도의 증가를 기대할 수 있음. 여기에 더하여 기존 유산균의 장 건강, 면역강화 효능 등이 추가 될 수 있으므로 별도의 효능 설명 없이도 제품화가 용이함.
- 이러한 최근의 연구 결과에 비추어 볼 때, 기업들의 잇따른 발효를 통한 홍삼제품의 고부가가치화는 상당부분 기술적으로 또한 과학적으로 그 의미가 있다고 사료됨.
- 또한 최근에 각광을 받고 있는 Effective Microorganism(EM)은 인간과 환경에 유익한 미생물 80여종을 배양하여 만든 것으로 항산화력, 소생력, 정화력이 탁월한 유용미생물로서 광합성세균(이산화탄소와 수소를 흡수, 산소생산), 유산균(당분을 유산균으로, 강력한 살균작용으로 유해균 증식억제), 효모(술과 빵을 만드는데 사용되며 발효를 돕고 비타민류와 생리활성 물질을 생산)이며 결합되어 있는 형태로 존재함.
- 또한 최근에 전통발효식품으로부터 미생물을 수집하여 공존 공생하는 유익한 균을 분리하여 한약을 발효시켜 활성이 증가됨은 물론 흡수율을 증가시켜 점점 그 활용도가 증가되고 있는 실정임.
- 실제로 전통발효식품으로부터 분리한 균주를 이용하여 인삼(잎)을 발효한 결과 그림 4와 같이 새롭게 생성되는 물질을 발견하였음.

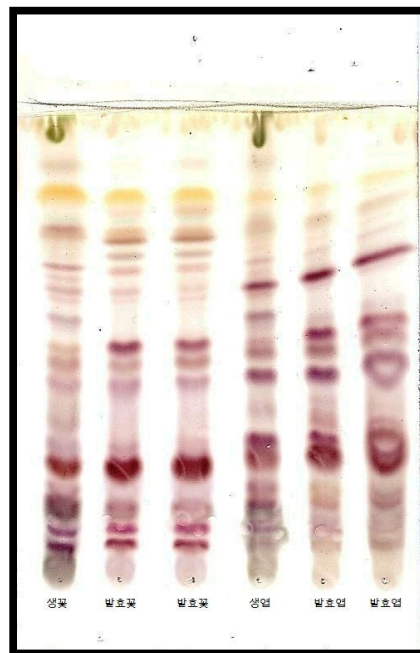


그림 4. 인삼 및 발효홍삼의 TLC 변화

- 따라서 본 연구에서는 “전통발효식품을 비롯한 다양한 분리원으로부터 미생물을 수집하여 공존공생하는 유익한 균을 활용하여 인삼을 발효시켜 활성을 증강, 체내 흡수율 증가 및 인삼의 잔류농약을 제거함으로써 안심하고 복용할 수 있는 다양한 제품을 개발한 후 이를 상품화하여 인삼의 소비촉진은 물론 나아가서 세계시장에서 인정받을 수 있는 고부가가치 발효인삼제품을 개발”하는 것임.

## 제 4 절. 연구개발의 목표

### 1. 연구개발의 최종목표

- 최근 선삼, 효삼, 황삼 등 다양한 형태의 가공 인삼이 개발되어 시장에 판매되고 있으나 사포닌을 제외한 여타한 ① 지표성분이 명확하지 않고 ② 용도별 지표물질 중심의 생리 활성이 검증되지 않아 ③ 단순가공품 생산에 그치고 있는 실정임.
- 미국 화기삼의 경우 사포닌 성분 외에도 여러 가지 생리활성에 대한 체계적인 연구를 바탕으로 세계시장에서 화기삼의 영역을 넓혀가고 있는 실정임.
- 우수하고 지명도가 있는 금산인삼의 경우도 수요층별로 기호 적성에 부합하면서 기능성 검증 및 보강을 통해 차별화된 새로운 형태의 제품과 특수용도의 제품을 개발하는 시대를 맞이하였음.

이러한 요구충족을 위해 본 과제의 최종목표는 다음과 같음.

- ① 인삼(뿌리, 잎) 발효가 가능한 안정한 "전통발효식품 및 다양한 분리원으로부터 미생물을 선정하고, ② 활성이 확인된 발효인삼의 지표물질(biomarker)을 2종 이상 설정하고, ③ 우수한 기능성과 고흡수률이 보고된 지표물질의 함량을 높이기 위하여 발효를 통한 가공공정을 개선 및 표준화를 확립함.
- 이를 통하여 분석 및 검증이 용이한 지표물질로 품질관리가 이루어진 표준화된 제품을 개발하여 기술력이 낮은 농가형 가공업체에서도 쉽게 습득하여 현장에서 생산할 수 있도록 함.
- 인삼(뿌리, 잎)을 소재로 한 활성이 증강된 발효홍삼 제품을 개발함.

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용



그림 5. 세부과제별 연구내용

☞ 본 연구팀은 그림 5과 같이 물질분석 및 활성화 검증팀 (충남대학교 약학대학), 인삼발효팀 (충남대학교 농과대학) 및 산업화팀 (건양대학교 제약공학과, 금산덕원, 비단피)으로 구성되어 있음.

## 제 2 장. 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구진은 제1세부과제: 발효인삼의 성분분석, 물질분리정제, 구조동정 및 활성검증, 제2세부과제: 우량 발효균주 확립, 발효조건 확립, 제1협동과제: 제품개발과 같이 총 3과제로 구성되어 있음.

제 1세부과제에서는 제2세부과제에서 선택한 발효 미생물이 이용하여 얻은 발효홍삼의 성분 분석 및 물질 분리 정제를 실시하였으며 그의 물질 동정 및 아토피와 항산화활성을 실시하였음. 그를 토대로 제1 협동 과제를 통해 신제품 개발과 대량화를 통한 사업화에 기틀을 마련해 주었음. 제 2세부과제에서는 김치(28종) 및 마유(33종)로부터 인삼을 발효시킬 수 있는 15가지 균주를 최종 선발하였으며, 균주 동정 결과 15종 모두 신규 균주로 판정되어 5종은 이미 미생물은행인 KCTC에 기탁하여 기탁번호를 부여받았음.

발효홍삼 및 발효홍삼을 열처리 한 발효증숙홍삼의 제조과정 중에 새로이 생성되는 물질들을 분석하였으며, 증숙과정 중에 발생될 수 있는 벤조피란과 같은 발암성 물질을 분석함과 동시에 아토피 억제활성 및 항산화활성과 같은 연구를 수행하여

- ◆ 발효인삼의 미생물 동정에 관련된 학회 포스터; 1) Microorganism Screening from Mare's Milk with  $\beta$ -glucosidase activity and Hydrolysis of Saponin of Korean Ginseng -2012년 한국축산식품학회, 2) Biotransformation of ginsengs in Panax ginseng (Korean Ginseng) by beta-glucosidase extracted from *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 in Korean Kimchi -2012년 International Food Technology, 3) Fermentation characteristics of Panax ginseng by *Lactobacillus paraplantarum* 17 -2013년 한국축산식품학회, 4) Fermentation characteristics of *Panax ginseng* by *Leuconostoc cetrium* 38 - 2013년 한국축산식품학회, 5) Fermentation characteristics of Panax ginseng by *Enterococcus faecalis* CRNB-A3 -2013년 한국축산식품학회
- ◆ 특허출원 5건; 1) 인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 출원번호 : 10-2010-0029649, 2) 인삼 발효능을 갖는 신규 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 출원번호 10-2011-0043206, 충남대학교산학협력단) 3) 락토바실러스 플랜타럼 시알엔비-22를 이용하여 발효한 발효인삼을 함유하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물, 10-2012-0045101, 4) 엔테로코커스 패칼리스 시알엔비-에이3를 이용하여 발효한 발효인삼을 함유하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물, 10-2012-0045101, 5) 신규한 패니바실러스 속 엠비티213 균주, 이를 이용한 발효인삼 및 이를 이용한 발효인삼 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물, 출원번호 : 10-2013-0090695
- ◆ 논문투고 2건; 1) 흑삼의 신생혈관 억제활성에 대한 연구, 대한본초학회지,26(3), 83-90 (2011), 2)흑삼의 아토피 억제활성에 대한 연구, 대한피부미용학회지,10(1), 91-97(2012),



- ◆ 논문투고 중 2건; 1) Identification of  $\beta$ -glucosidase activity of *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 in Kimchi and its potential in conversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> from *Panax ginseng*; Journal of Agricultural and Food Chemistry 2) 발효균주에 의한 선택적 Ginsenoside Rb1 전환된 발효 홍삼과 그의 아토피 억제 효과 ; 대한피부미용학회지 에 투고 하였음,
- ◆ 기술이전 1건 : 인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 [KCTC 11931BP] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환방법(출원번호 : 10-2011-0043207), 비단피농업법인으로 일금 30,000,000원에 기술이전 하였음(2012.4.30).
- ◆ 시제품 개발 1건

## 제 1 절. 제1세부과제 수행 내용 및 결과

### 1. 발효홍삼 성분 분석 및 발효 사포닌 분리

#### 가. 발효홍삼 추출 및 인삼 사포닌 분리

■ 제2세부과제로부터 제공 받은 발효홍삼/인삼잎 시료의 전처리를 통해 발효 물질에 대한 분리/분석을 수행함

#### ■ 기구 및 시약

실험에 사용한 기구는 실험에 사용한 기구는 Rotary evaporator, separatory funnel(3000ml), Round flask, 탁상형 초음파 세정기(KD-04AB-144-Z), erlenmeyer flask, HPLC 1(Shimadzu LC-6AD, Japan), HPLC 2(Agilent Technologies 1260 infinity), ELSD 검출기(UV, Japan), MPLC(Yamazen, YFLC-AI-580-10V, Japan), HPLC column(ACE 5-C<sub>18</sub> cloumz (250×4.6mm)), syringe filter(0.22um, 0.45um) 등을 사용하였다. 시약은 methanol, n-butanol, chloroform, ether, acetonitrile, acetic acid, water 등을 사용 하였음.

#### ■ 실리카겔 컬럼 분리법

추출 및 HPLC 성분분석용 시료제조 : 채취 또는 발효한 인삼(뿌리, 잎)을 80% 에탄올로 추출함. 에탄올 추출물을 물로 현탁시킨 뒤 에테르로 비극성 물질을 제거한 후 수포화 부탄올로 3회 추출하여 조사포닌 분획물을 얻음. 제조한 조사포닌 20 mg을 메탄올 1 ml에 녹인 후 0.5 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용함.

#### ■ HPLC를 이용하여 인삼사포닌의 성분을 분석함 :

HPLC 장치는 Agilent Technologies 1260 infinity 이었으며, 컬럼은 ACE 5-C<sub>18</sub> cloumz (250×4.6mm)를 사용하였다. 이동상으로 사용한 A 용매는 H<sub>2</sub>O, B 용매는 CH<sub>3</sub>CN을 사용하였다. 용매는 gradient elution system으로 0~35분(20% B), 35~85분(40%B), 85~105분(50%B), 105~135분(65% B), 135~145분(85% B), 145~155분(100% B), 155~160분(100% B), 160~163분(20% B), 163~165분(20% B)으로 조절하였다. 전개온도는 40℃이었고 유속은 1.0ml/min이었으며, 검출기는 UV 205nm (Agilent Technologies 1260 infinity)를 사용하여 사포닌의 성분을 분석하였음.

#### 나. 발효홍삼으로부터 아토피 억제 및 항산화활성 물질의 분리정제

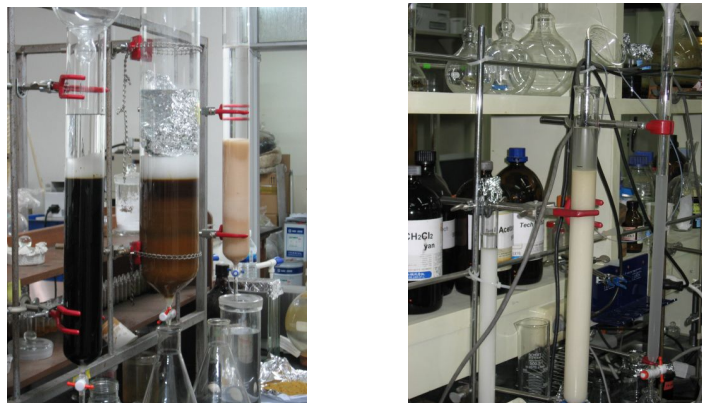


그림 6. 물질분리

- 그림 6과 같이 발효홍삼(뿌리, 잎)을 메탄올추출 엑스, 수포화 부탄올분획 엑스로부터 활성 물질의 분리정제를 수행함. 분리정제는 주로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피와 같은 흡착크로마토그래피를 수행하였으며, cosmosil 75C18-PREP을 이용하여 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 실리카겔 분획에서 얻은 진세노사이드 분획을 분리정제를 수행함.
- 그림 7과 같이 대형컬럼크로마토그래피를 통하여 여러 분획으로 나누어진 각 분획은 TLC와 발색시약, UV lamp등을 이용하여 모니터링 하여 다시 세부 분획함.

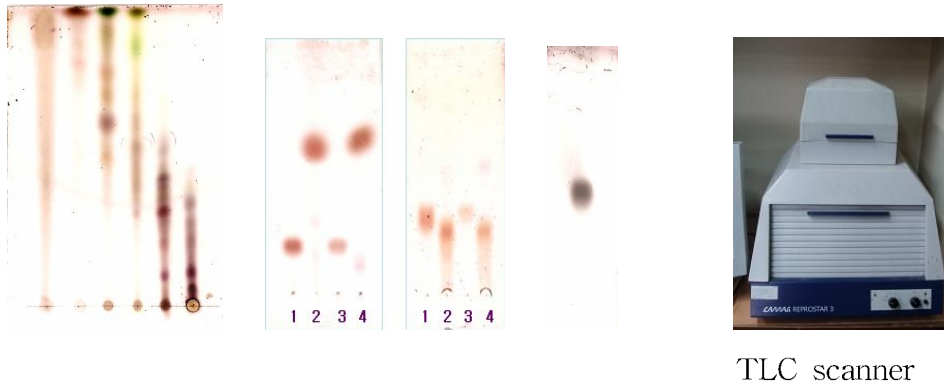


그림 7. 물질분리

- 그림 8과 같이 각종 컬럼 크로마토그래피를 이용하여도 단일물질로 분리되지 않는 분획은 YAMAZEN-MPLC (medium pressure liquid chromatography)을 이용하여 분리정제 수행.
- 진세노사이드 중 이성질체의 경우나 순도 70-80%이내의 단일 진세노사이드는 prep HPLC (high pressure liquid chromatography)를 이용하여 순도 98 % 이상의 단일물질로 분리정제함.



MPLC



HPLC

그림 8. 물질분리

#### ■ 성분 분석 : HPLC

발효인삼 및 발효인삼의 증숙시간에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분을 분석하기 위하여 위에서 제조한 추출물을 50mg을 취해 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. (그림 8)

① Shimadzu LC-6AD(Japan) 분석 조건

사용한 HPLC 장치는 Shimadzu LC-6AD(Japan) 이었으며, 컬럼은 Bischoff C<sub>18</sub>-ACE EPS column (4.6×250mm)를 사용하였음. 이동상으로 사용한 A 용매는 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=20:80, B 용매는 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=80:20 이었음. 용매는 gradient elution system으로 0분(0%B), 0~10분(5% B), 10~30분(15%B), 30~60분(35%B), 60~70분(50% B), 70~95분(100% B), 95~140분(100% B), 140~142분(0% B), 142~150분(0%B)으로 조절하였음. 전개온도는 40℃이었고 유속은 1.2ml/min이었으며, 검출기는 UV 205nm (Shimadzu, Japan)를 사용하여 사포닌의 성분을 분석하였음.

표 1. 사포닌의 성분 분석 조건 - Shimadzu LC-6AD

컬럼	<b>Bischoff 120-5-C18 ace-EPS (250X4.6mm)</b>
유량 (Flow rate)	1.2ml/min
디텍터 (Detector)	UV detector, 205nm
용매(Solvent)	A; CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O= 20:80 B; CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O = 80:20 0분(0%B),0~10분(5%B),10~30분(15%B),30~60분(35%B),60~70분(50%B),70~95분(100%B),95~140분(100%B),140~142분(0%B), 142~150분(0%B)
온도	40도

② Agilent Technologies 1260 infinity 분석 조건

사용한 HPLC 장치는 Agilent Technologies 1260 infinity 이었으며, 컬럼은 ACE 5-C<sub>18</sub> column (250×4.6mm)를 사용하였음. 이동상으로 사용한 A 용매는 H<sub>2</sub>O, B 용매는 CH<sub>3</sub>CN을 사용하였음. 용매는 gradient elution system으로 0~35분(20% B), 35~85분(40%B), 85~105분(50%B), 105~135분(65% B), 135~145분(85% B), 145~155분(100% B), 155~160분(100% B), 160~163분(20% B), 163~165분(20% B)으로 조절하였음. 전개온도는 40℃이었고 유속은 1.0ml/min이었으며, 검출기는 UV 205nm (Agilent Technologies 1260 infinity)를 사용하여 사포닌의 성분을 분석하였음

표 2. 사포닌의 성분 분석 조건 -Agilent Technologies 1260 infinity

컬럼	<b>ACE 5-C<sub>18</sub> (250X4.6mm)</b>
유량 (Flow rate)	1.0ml/min
디텍터 (Detector)	UV detector, 205nm
용매(Solvent)	A; H <sub>2</sub> O, B; CH <sub>3</sub> CN 0~35분(20% B), 35~85분(40%B), 85~105분(50%B), 105~135분(65% B), 135~145분(85% B), 145~155분(100% B), 155~160분(100% B), 160~163분(20% B), 163~165분(20% B)
온도	40도

다. 발효인삼으로부터 아토피 억제 및 항산화활성 물질의 구조동정

- 그림9와 인삼뿌리 및 잎과 발효된 시료에 존재하는 진세노사이드의 성분이 분리 정제되면 구조분석을 수행함.
- 구조분석의 방법으로는 물리화학적인 성질로서 성상을 관찰하고, 융점을 측정하며, 선광도를 측정함. 또한 각종 스펙트럼을 측정하여 구조를 동정하며 주로 이용되는 방법은 UV, IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , COSY, HMBC, HMQC.등을 이용하여 구조를 동정함.

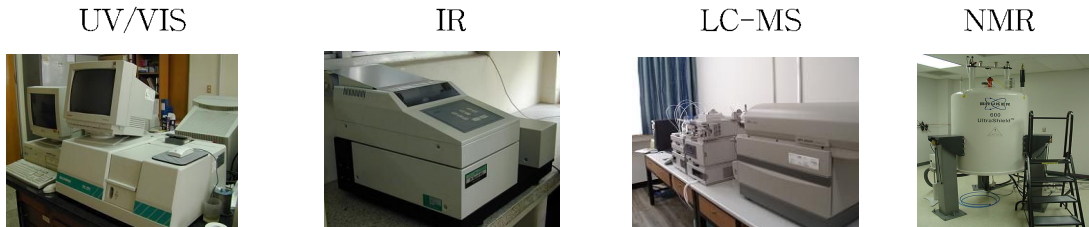


그림 9. 물질구조 동정용 각종 장치

라. 활성검증

- 발효인삼의 항산화 활성을 위하여 폴리페놀의 정량, DPPH 라디칼 소거능 측정, 아질산염 소거 작용, superoxide anion 소거능 측정, hydrogen peroxide 소거능 측정 등의 방법을 사용함.
- 아토피 억제 활성을 측정함.
- 아토피 억제 활성측정 중 *in vitro*에서 좋은 효과를 지닌 2개의 샘플을 택하여 동물실험을 실시함.

## 2. 발효 균주별 발효 홍삼 분석

표 3. 발효 균주 종류

연번	균주	학명
1	CRNB-A3	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	B9	<i>Enterococcus faecium</i>
3	S16	<i>Enterococcus durans</i>
4	SA5	<i>Enterococcus faecium</i>
5	SA4	<i>Enterococcus faecium</i>
6	S18	<i>Enterococcus faecalis</i>
7	17	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
8	CRNB-22	<i>Lactobacillus plantarum</i>
9	30	<i>Lactobacillus plantarum</i>
10	103	<i>Lactobacillus buchneri</i>
11	38	<i>Leuconostos cerium</i>
12	46	<i>Leuconostos mesenteroides</i>
13	419	<i>Paenibacillus</i> sp.
14	95 (MBT213)	<i>Paenibacillus</i> sp.
15	123	<i>Bacillus coagulans</i>

발효 홍삼을 만드는 균주는 15종으로 각각 김치와 같은 전통 발효 식품에서 분리 동정한 균주들임. 이들 미생물을 이용하여 뿌리(수삼), 잎, 꽃봉오리를 각각 발효하여 발효홍삼의 샘플을 제조 하였음.

### 가. 균주별 사포닌 변화 -*Enterococcus*에 의한 발효홍삼

(A3, B9, S16, SA4, SA5, S18)

*Enterococcus*류는 제2세부과제에서 분리된 균주 A3, B9, S16, SA4, SA5, S18등으로 이를 통한 발효의 변화를 보았음. 먼저 균주 A3, B9, S16, SA4, SA5에 의한 단일 사포닌 Ginsenoside Rd와 Rg1의 변화를 관찰하였으며, A3에 의한 Rb1을 대상으로 발효 전 후의 변화를 관찰하였음.

#### ■ 단일 사포닌 PD계 Ginsenoside Rd의 발효균주에 의한 변화

##### ① TLC를 이용한 발효에 따른 Rd의 성분변화

제2세부과제에서 발효한 샘플의 성분 분석을 위해 1차적으로 TLC를 수행한 결과 그림 10에서와 같이 발효균주(S16, SA4)에 따라 Rd가 감소되며 일부 성분이 생성됨을 관찰할 수 있었음. 이는 표준품을 비교하여 compound K임을 알 수 있었고 이를 좀 더 자세히 확인하고자 C<sub>18</sub>

plate로 분석 결과 확실하게 물질 확인을 할 수 있었으며, compound K가 존재함을 확인할 수 있었음. 한편, 나머지 유산균의 발효균주 S18, SA5 및 B9 및 A3 균주에서는 거의 변화가 없었음.

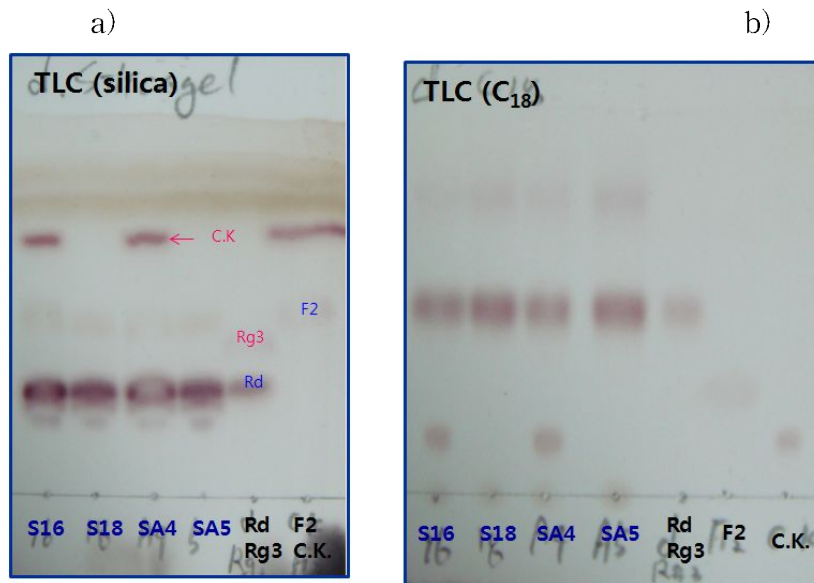


그림 10. Ginsenoside Rd의 발효에 따른 TLC 형태  
a) Silicagel plate; b) C<sub>18</sub> plate  
TLC 조건=>Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10>  
C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

② HPLC를 이용한 발효에 따른 Rd의 성분변화

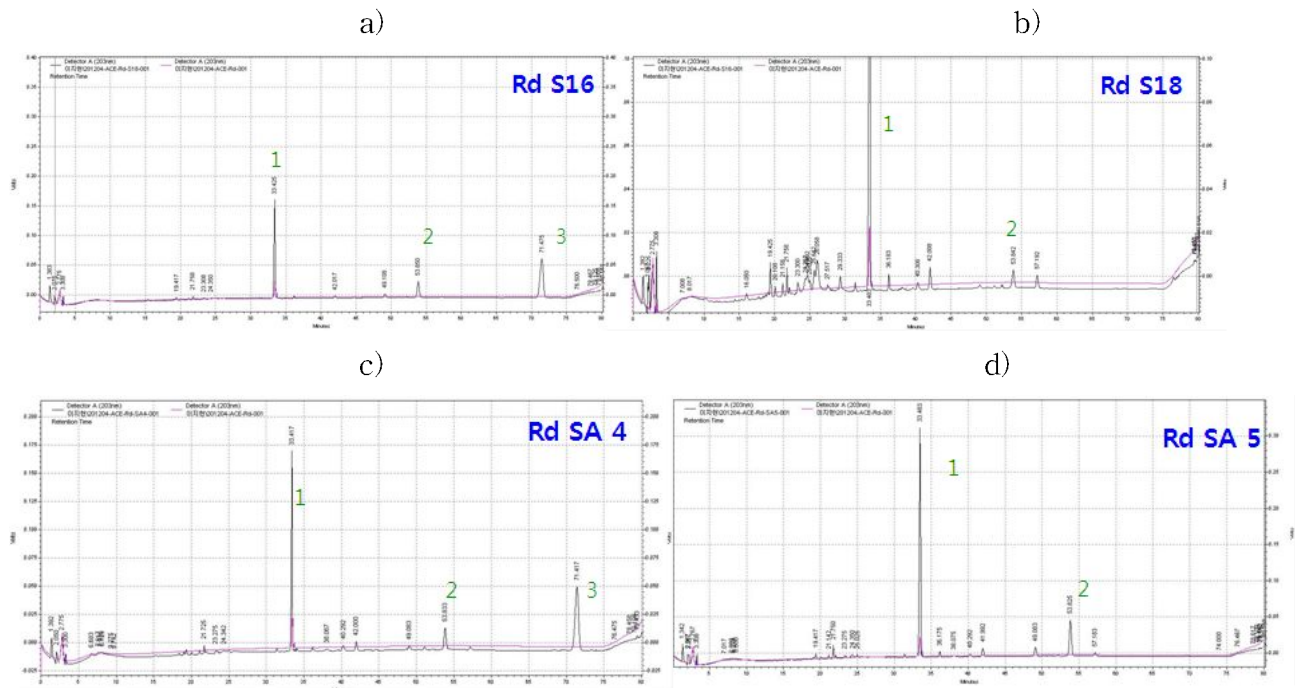


그림 11. Ginsenoside Rd의 발효에 따른 HPLC 분석  
a) S-16 발효균주; b) S-18 발효균주; c) S-A4 발효균주; d) S-A5 발효균주  
1:Rd, 2: Rg3, 3:Compound K

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu\text{m}$  필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 1의 조건으로 분석을 하였으며 TLC 결과와 마찬가지로 분석 결과 4개 균주에서 발효과정을 거친 후에 결과에서 작지만 ginsenoside Rg3의 피크를 볼 수 있었음.

큰 변화로는 두 개의 균주에서 ginsenoside Rd가 compound K로 전환시킴을 알 수 있었음. 즉, S16과 SA4 균주가 비교적 대량으로 compound K를 생산하였음을 알 수 있었음. (그림 11)

발효된 샘플의 성분 변화를 1차적인 TLC 분석 결과와 2차적인 HPLC결과로 Rd가 발효균주에 의해 compound K라는 물질의 화학적 구조 변화를 찾을 수 있었음.

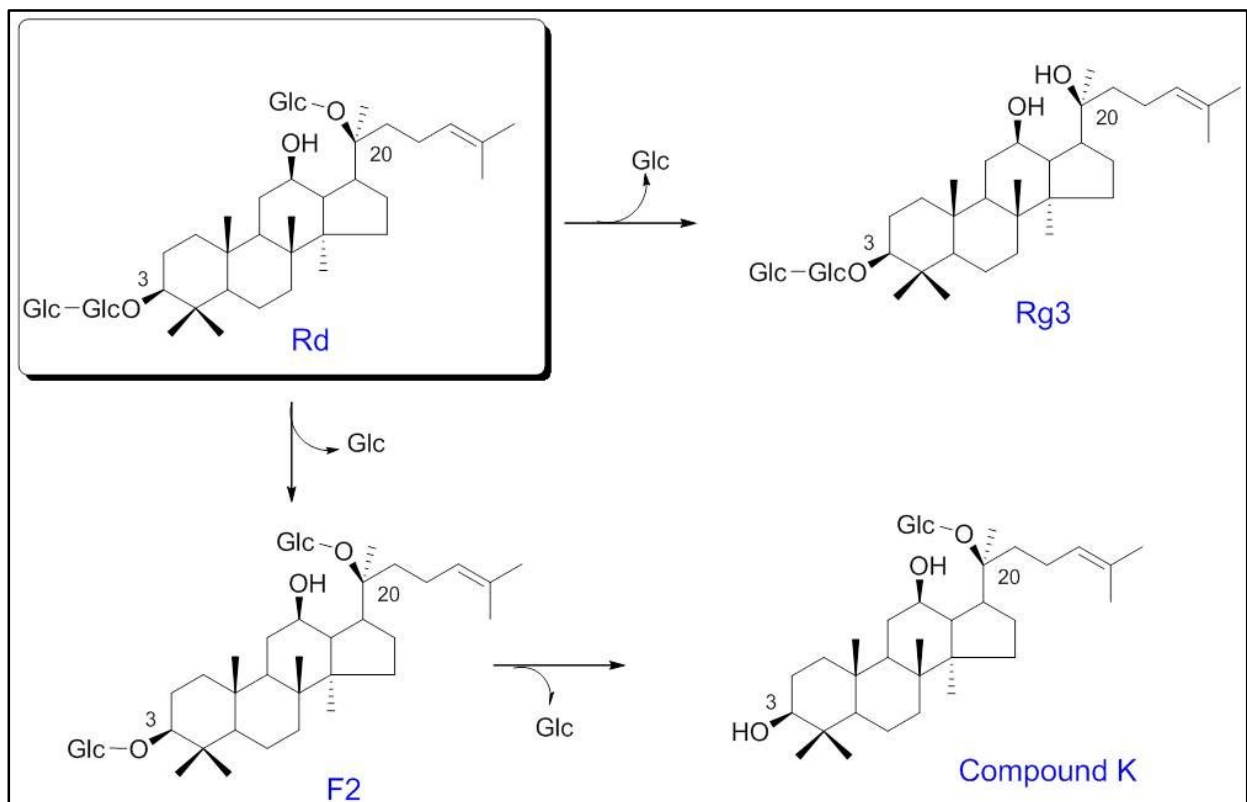


그림 12. 발효에 의한 Ginsenoside Rd에서 Rg3 & Compound K로의 화학적 구조변화 과정

#### ■ 단일 사포닌 PT계 Ginsenoside Rg1의 발효균주에 의한 변화

##### ① TLC를 이용한 발효에 따른 Rg1의 성분변화

제2세부과제에서 발효한 샘플의 성분 분석을 위해 1차적으로 TLC를 수행한 결과 그림 13에서와 같이 발효균주(S16, SA4)에 따라 Rg1가 감소되며 일부성분이 생성됨을 관찰할 수 있었음. 이는 표준품을 비교하여 ginsenoside Rh1임을 알 수 있었고 이를 좀 더 자세히 확인하고자 C<sub>18</sub> plate로 분석 결과 확실하게 물질 확인을 할 수 있었음. 한편, 나머지 유산균의 발효균주



S18, SA5, B9 및 A3 균주에서는 거의 변화가 없었음.

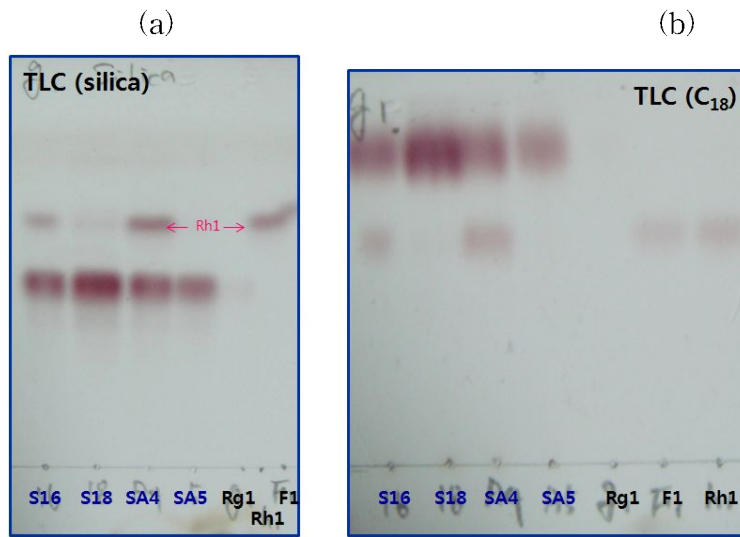


그림 13. Ginsenoside Rg1의 발효균주에 따른 TLC 형태  
 a) Silicagel plate; b) C<sub>18</sub> plate  
 TLC 조건=>Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10>  
 C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

② HPLC를 이용한 발효에 따른 Rg1의 성분변화

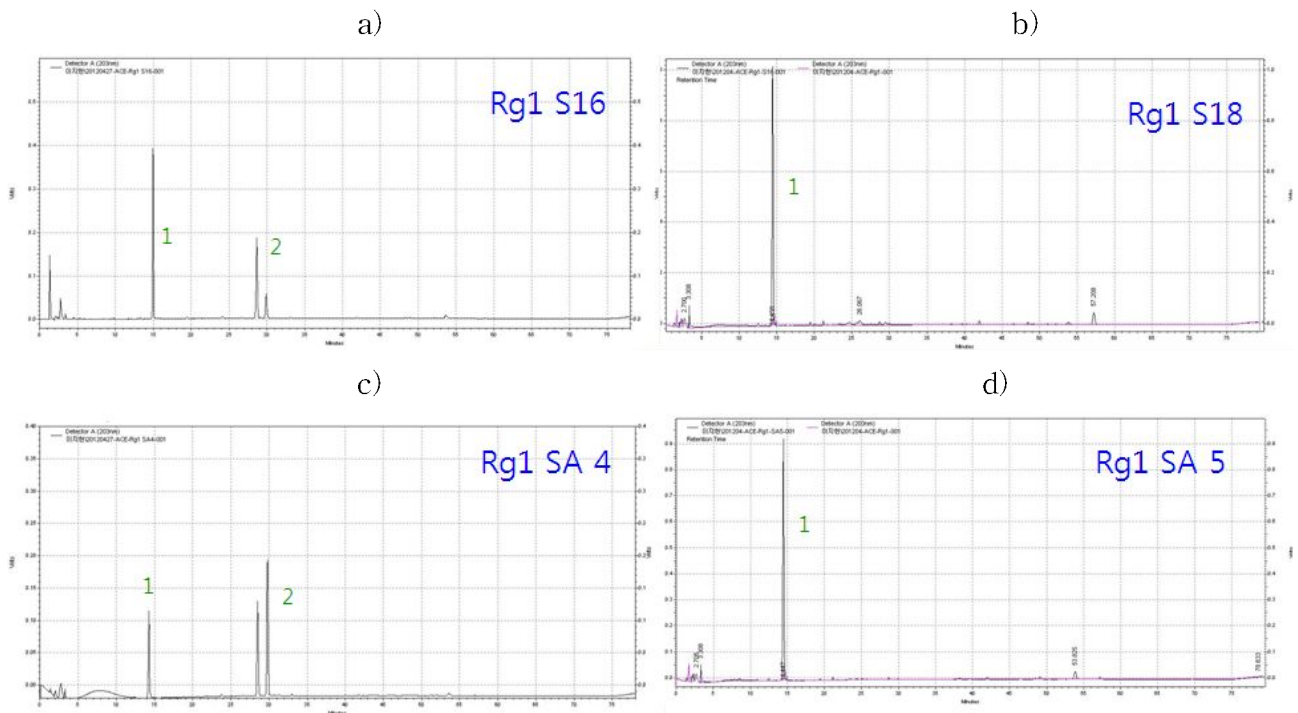


그림 14. Ginsenoside Rg1의 발효에 따른 HPLC 분석  
 a) S16 발효균주; b) S18 발효균주;  
 c) SA4 발효균주; d) SA5 발효균주;  
 1: Rg1, 2: Ginsenoside Rh1

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu\text{m}$  필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 1의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 두 개의 균주에서 ginsenoside Rg1이 ginsenoside Rh1으로 전환시킴을 알 수 있었음.

S16과 SA4 균주가 비교적 대량으로 ginsenoside Rh1(S/R)를 생산하였음을 알 수 있음.(그림 14)

발효된 샘플의 성분 변화를 1차적인 TLC 분석 결과와 2차적인 HPLC결과로 Rg1이 발효균주에 의해 ginsenoside Rh1(R,S)이라는 물질의 화학적 구조 변화를 찾을 수 있었음.(그림 15)

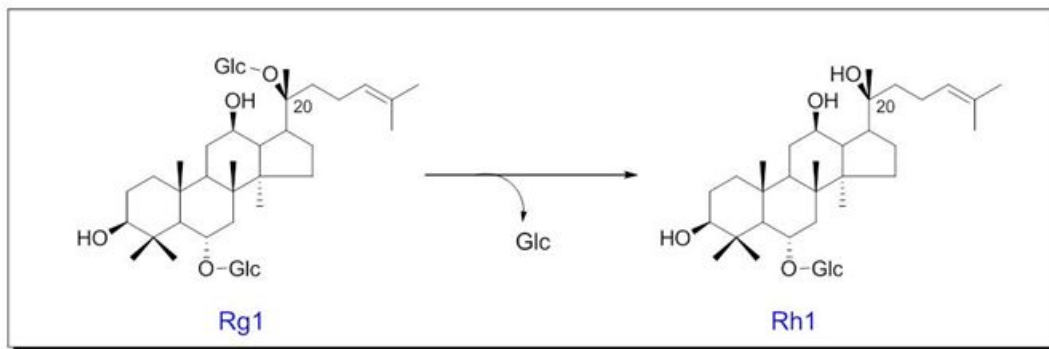


그림 15. 발효에 의한 Ginsenoside Rg1에서 ginsenoside Rh1으로의 화학적 구조변화 과정

### ■ 단일 사포닌 Ginsenoside Rb1의 A3 발효균주에 의한 변화

① HPLC를 이용한 발효에 따른 Rb1의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu\text{m}$  필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 두 개의 균주에서 ginsenoside Rb1이 ginsenoside Rg3, Rg5로 전환시킴을 알 수 있었음.

A3 균주는 비교적 대량으로 (S, R)-ginsenoside Rg3와 Rg5를 생산하였음을 알 수 있었음. (그림16)

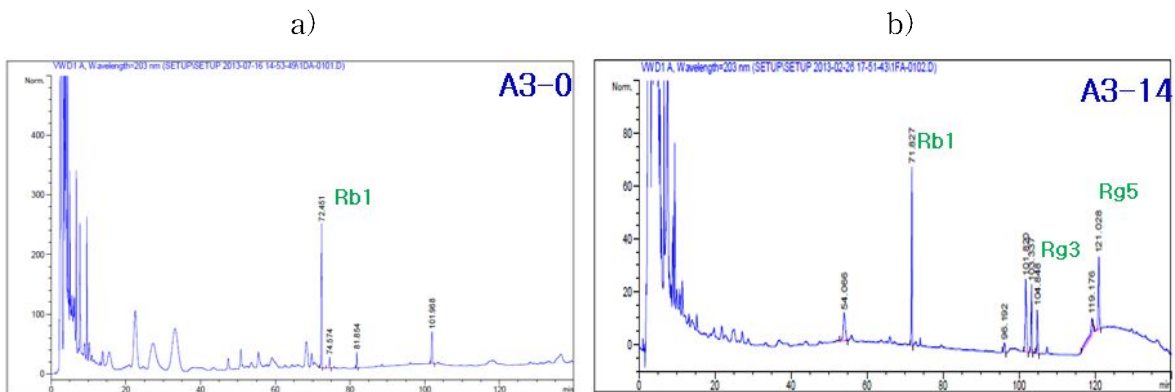


그림 16. Ginsenoside Rb1의 A3 균주발효에 따른 HPLC 분석  
a) 0일 ; b)14일 발효

A3의 균주의 발효에 의한 변화는 retention time 72분대에 Rb1은 사라지면서 작아지고 새로이 retention time 103분과 105분 120분에 새로운 피크가 생긴 것을 볼 수 있었고, 이를 표준 사포닌과 비교해보니 Rg3와 Rg5임을 알수 있었음. 이는 그림 17에서 보는 바와 같이 화학적 변화를 거쳐 ginsenoside가 만들어 지는 것임.

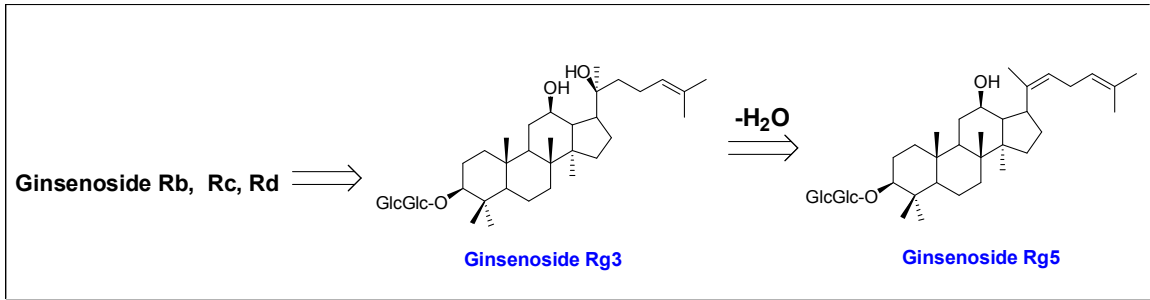


그림 17. 발효에 의한 Ginsenoside Rb1에서 Rg3와 Rg5의 화학적 구조변화 과정

■ A3 유산균에 의한 수삼을 이용한 발효홍삼의 변화

A3 유산균은 발효 과정을 거쳐 단일 사포닌 Rb1을 Rg3와 Rg5로 전환시키는 균주임. 이를 수삼의 발효 과정을 통해 발효홍삼의 변화를 알아보려고 함.

① TLC를 이용한 성분변화

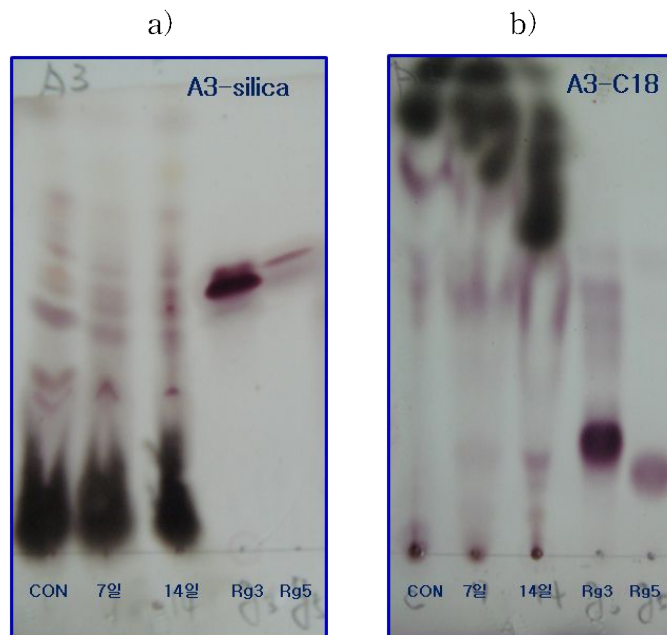


그림 18. 인삼 뿌리의 A3 균주의 발효에 따른 TLC 형태

a) 발효홍삼의 시간별 성분변화<Silica>; b) 발효홍삼의 시간별 성분변화<C<sub>18</sub>>;

TLC 조건=>Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10>

C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

A3 균주에 의한 발효홍삼의 사포닌 성분 변화를 알아보기 위하여 그림 18에서와 같이 TLC의 패턴으로 수삼을 이용한 A3 균주에 의한 발효 홍삼의 성분변화를 표준물질과 비교분석함. 실험 결과 그림 18에서와 같이 발효 시간에 따라서 ginsenoside Rg3와 Rg5가 생성되고 발효 시간에 따라 점차적으로 증가하는 것을 알 수 있었음.

② HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 A3 균주발효에서 96분대의 피크인 ginsenoside Rg4가 생성됨을 알 수 있었고 그와 더불어 103분과 105분대의 피크, 즉 R & S형의 ginsenoside Rg3가 각각 생성되면서 121분대에 ginsenoside Rg5가 생성됨을 알 수 있었음. 또한 A3 균주에 발효에 의해서 비교적 대량으로 ginsenoside Rg3, ginsenoside Rg5를 생산하였음을 알 수 있었음.(그림 19)

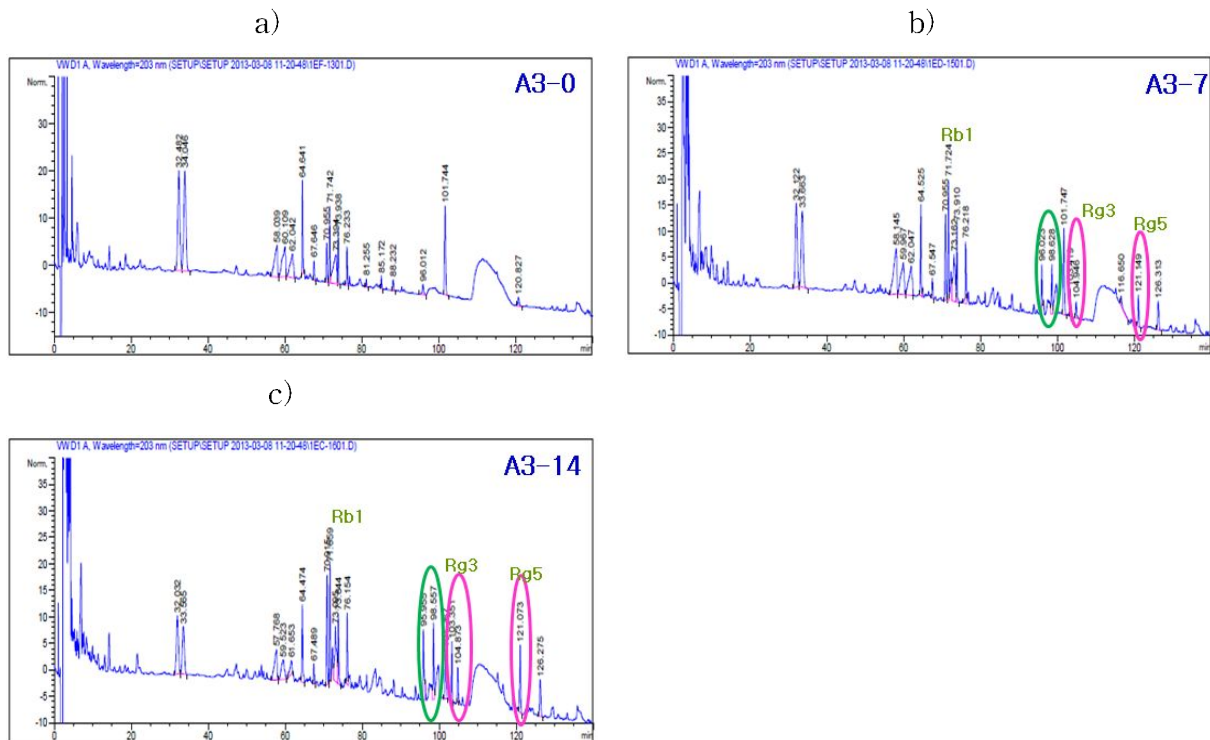


그림 19. 발효홍삼의 HPLC 분석-A3 유산균 발효  
 a) 0일 발효홍삼; b)7일 발효홍삼; c)14일 발효홍삼

발효된 샘플의 성분 변화를 HPLC결과로 수삼이 A3 유산균 발효에 의해 ginsenoside Rg4, (R)-ginsenoside Rg3, (S)-ginsenoside Rg3, ginsenoside Rg5 물질의 화학적 구조 변화를 찾을 수 있었음.

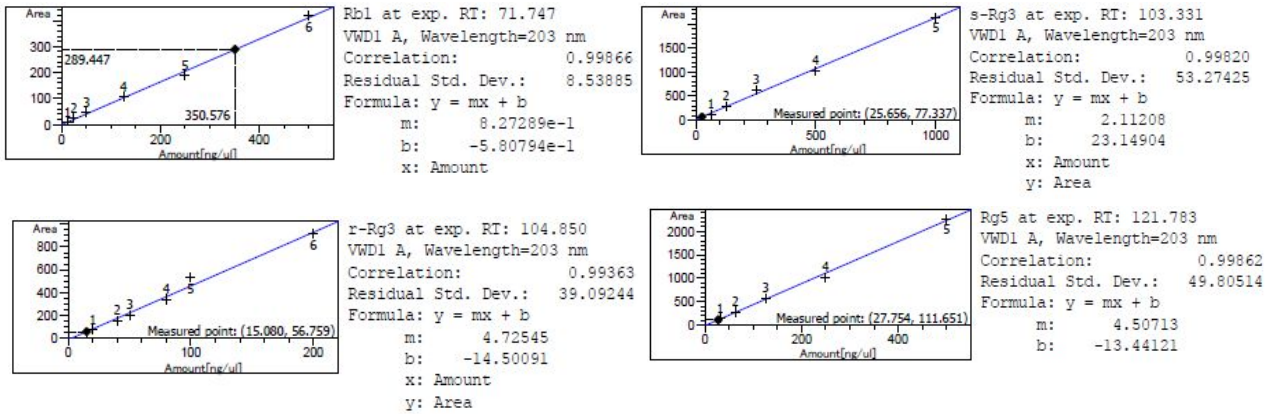


그림 20. 검량선 그래프 -Ginsenoside Rb1, (S)-Rg3, (R)-Rg3, Rg5

a) 7일 발효 결과

b) 14일 발효 결과

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name	RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
71.724	BV	289.44727	1.21119	350.57632	Rb1	Rb1	71.659	BB	256.77374	1.21150	311.08165	Rb1	Rb1
82.096	-	-	-	-	Rd	Rd	82.096	-	-	-	-	Rd	Rd
103.419	BB	77.33730	3.31746e-1	25.65632	s-Rg3	s-Rg3	103.351	BB	167.67705	4.08101e-1	68.42914	s-Rg3	s-Rg3
104.946	BB	56.75945	2.65685e-1	15.08011	r-Rg3	r-Rg3	104.873	BB	93.09931	2.44581e-1	22.77035	r-Rg3	r-Rg3
121.149	BB	111.65062	2.48581e-1	27.75423	Rg5	Rg5	121.073	BB	229.48351	2.34866e-1	53.89791	Rg5	Rg5

그림 21. A3-발효홍삼(수삼)의 검량 데이터

발효된 샘플에서 성분 변화된 사포닌은 추출물을 50mg 기준으로 삼았을 때 발효 전 Rb1이 0.532mg정도를 지니고 있었으나 발효가 진행되면서 7일 발효시 0.35mg에서 14일 발효가 진행되면서 0.311mg까지 줄어들었고 반면에 (S)-Rg3의 경우는 7일 발효시 0.026mg 생성되더니 14일 발효를 마치고 난 뒤 0.068mg을 생성 하였고, Rg5의 경우는 7일 발효시 0.027mg에서 14일 발효를 마치고 난 뒤 0.053mg이 생성되었음을 알 수 있었음 (그림 20, 21).

■ S16 유산균에 의한 수삼의 발효홍삼의 변화

A3 유산균은 발효 과정을 거쳐 단일 사포닌 Rb1을 Rg3와 Rg5로 전환시키는 균주임. 이는 Enterococcus류로 해당되는 균주의 수삼에 의한 발효홍삼의 변화를 알고자 하였음. 이들 균주에는 앞에서 발효를 실시한 A3와 B9, S16, SA4, SA5, S18등이 있다. 이들의 수삼 발효과정에서 어떠한 변화가 존재하는지 알아보려고 하였음.

① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

S-16에 의한 발효 홍삼의 성분 변화를 알아보기 위하여 제2 세부과제에 의해 발효를 마친 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 A3 균주발효에서 96분대의 피크인 ginsenoside Rg4가 생성됨을 알 수 있었고 그와 더불어 103분과 105분대의 피크, 즉 R & S형의 ginsenoside Rg3가 각각 생성되면서 121분대에 ginsenoside Rg5가 생성됨을 알 수 있었음.

또한 A3 균주에 발효에 의해서 비교적 대량으로 ginsenoside Rg3, ginsenoside Rg5를 생산하



였음을 알 수 있었음.(그림 22)

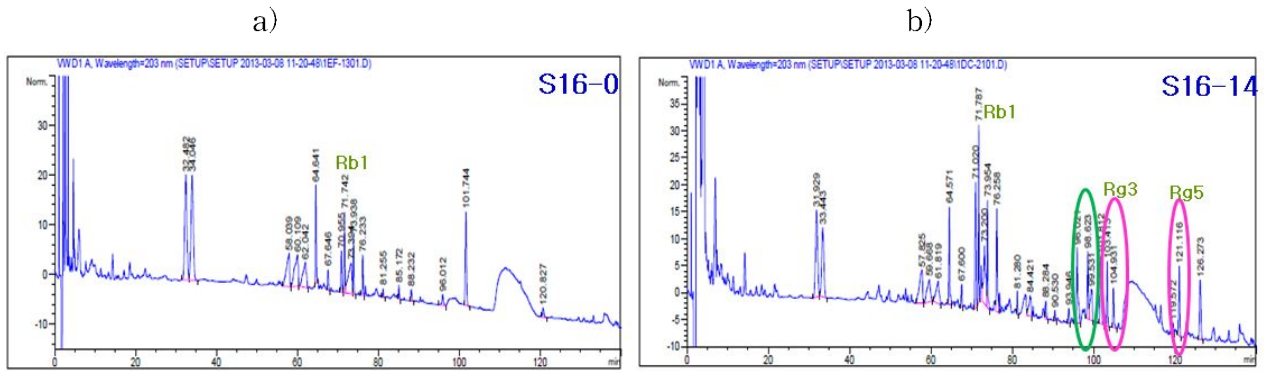


그림 22. 발효홍삼의 HPLC 분석-S-16 유산균 발효

a) 0일 발효홍삼; b)14일 발효홍삼

발효된 샘플의 성분 변화를 HPLC결과로 수삼이 S-16 유산균 발효에 의해 ginsenoside Rg4, (R)-ginsenoside Rg3, (S)-ginsenoside Rg3, ginsenoside Rg5 물 질의 화학적 구조 변화를 찾을 수 있었음.

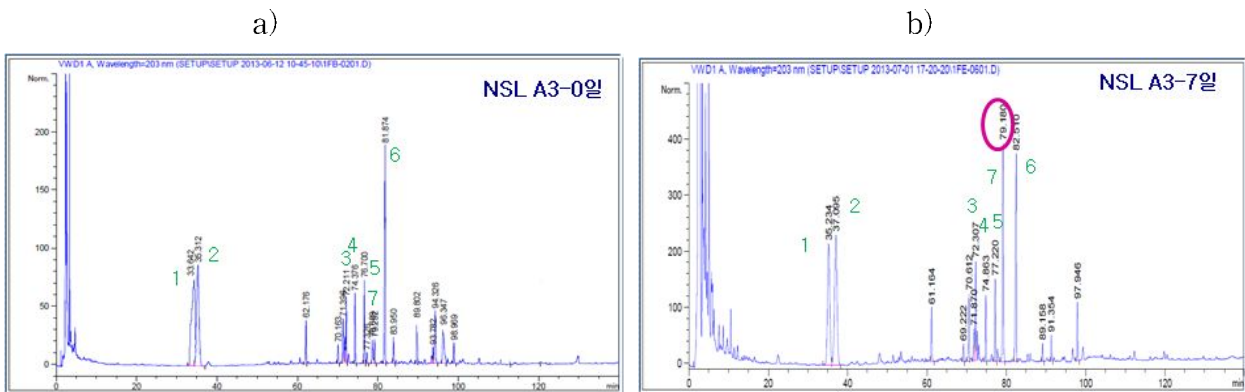
■ A3 유산균에 의한 인삼잎 발효홍삼의 변화

A3 유산균은 발효 과정을 거쳐 단일 사포닌 Rb1을 Rg3와 Rg5로 전환시키는 균주임. 이를 인삼잎의 발효 과정을 통해 발효홍삼의 변화를 알아보하고자 하였음.

① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

A3 균주에 의한 발효홍삼의 사포닌 성분 변화를 알아보기 위하여 제2 세부과제에서 받은 인삼잎을 이용한 발효 홍삼을 시료로 택하여 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였음.

분석 결과 A3 균주에 의한 인삼잎 발효 홍삼은 retention time 79분대의 peak가 생성됨을 알 수 있었으며, 현재 그 구조를 분석하고 있음. (그림 23)



c)

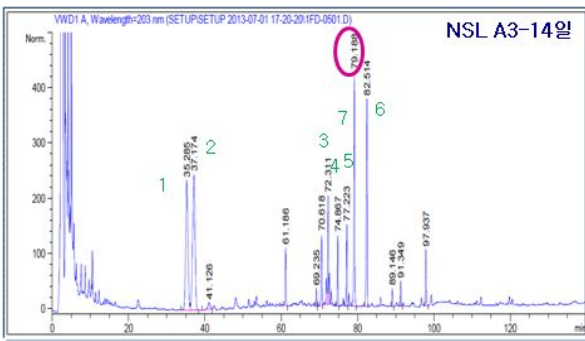


그림 23. 발효홍삼의 HPLC 분석-A3 유산균의 인삼잎 발효  
 a) 0일 발효홍삼; b)7일 발효홍삼; c)14일 발효홍삼  
 1:Rg1, 2:Re, 3:Rb1, 4:Rc, 5:Rb2, 6:Rd 7; unknown

■ 인삼 꽃봉오리를 이용한 발효홍삼

① TLC를 이용한 성분변화

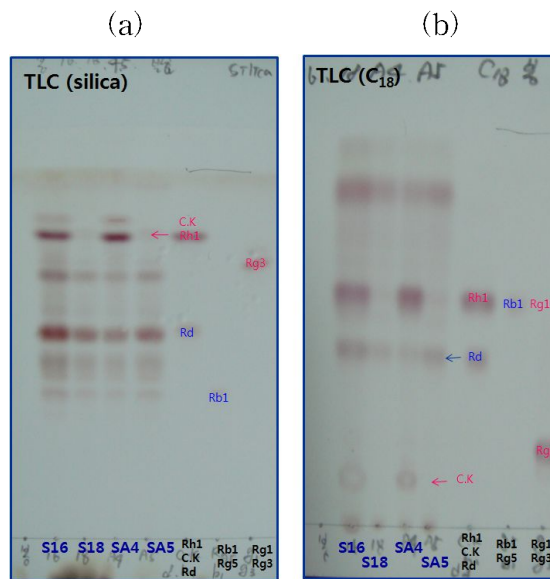
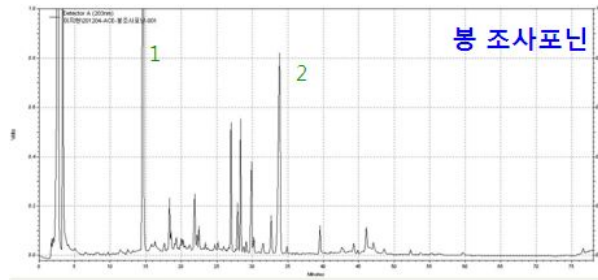


그림 24. 인삼 꽃봉오리의 발효에 따른 TLC 형태  
 a) Silicagel plate; b) C<sub>18</sub> plate  
 TLC 조건=>Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10>  
 C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

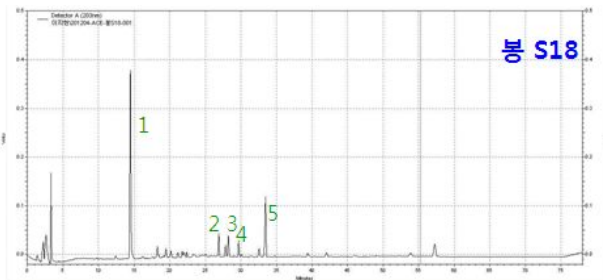
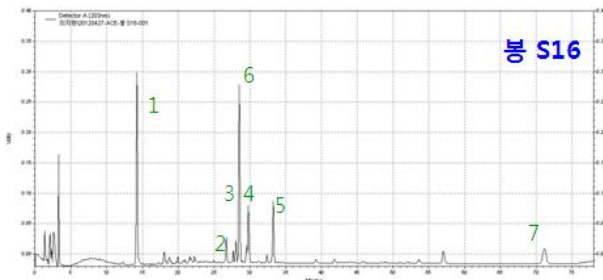
② HPLC를 이용한 성분변화

(a)



(b)

(c)



(d)

(e)

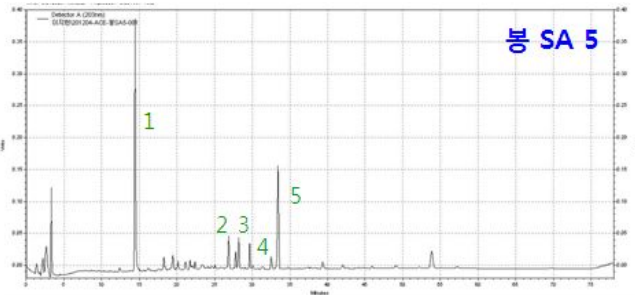
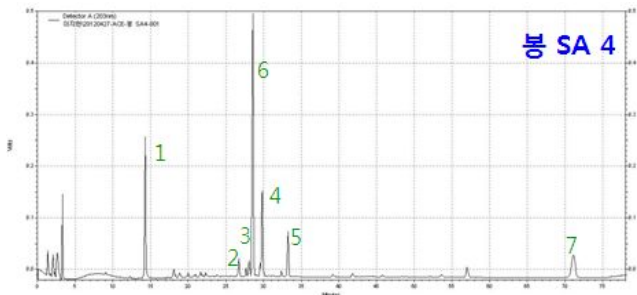


그림 25 . 인삼 꽃봉오리의 발효에 따른 HPLC 분석

a) 인삼 꽃봉오리 조사포닌; b) S16발효 ; 3) S18 발효; 4) SA4 발효; SA5발효  
1:Rg1&Re, 2:Rb1, 3:Rb2, 4:Rc, 5:Rd, 6:Rh1, 7:Compound K

분석결과 그림 24 및 25에서와 같이 발효균주 6종 중 2종(S16, SA4)에 의해서 발효가 진행되었으며, 이들 균주는 신규균주로 KCTC에 기탁하였고, 특허를 출원하였음.

이들은 ginsenoside Rg1을 ginsenoside Rh1으로 변화 및 Rd를 compound K로 전환시키는 균주로 TLC에서 표준품과 비교하고 HPLC 분석한 결과 14분대에 피크가 작아지고 28.5분대의 피크가 새로 생성 되었음. 이는 14분대의 피크 ginsenoside Rg1이 28.5분대의 피크인 ginsenoside Rh1으로 전환되었음으로 볼 수 있었음. 또한 71분대에 compound K가 존재함을 확인하였음.



■ SN-6(S-16) 발효균주에 의한 발효 인삼꽃봉오리의 증속시간에 따른 형태 변화

① TLC를 이용한 성분변화

그림 26에서와 같이 발효인삼꽃봉오리(SN-6)을 30분, 60분, 120분, 180분 증속함에 인삼의 성분변화는 점차적으로 변화됨에 따라서 구체적으로 어느 성분의 변화가 가장 많이 변화하는지를 관찰하고자 표준물질과 비교 분석하였음.

실험 결과 그림 26에서와 같이 증속 시간이 증가함에 따라서 ginsenoside Rb1, Rb2, Rd, Rg1 등이 점점 사라지고 최근에 항암활성 및 항산화활성 등 여러 가지 활성이 있다고 알려져 있는 compound K 및 Rg5 & Rk1이 증속 시간별로 점차적으로 증가하는 추세로 생성됨을 알 수 있었음.

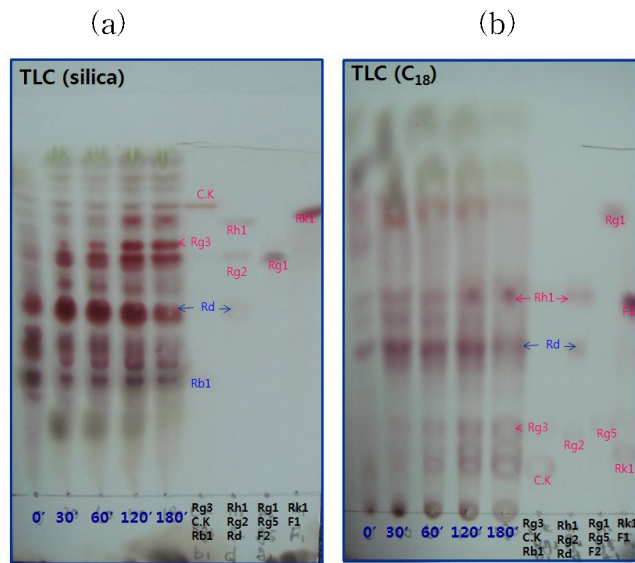


그림 26. 발효인삼꽃봉오리(SN-6)의 증속시간에 따른 발효증속인삼꽃봉오리의 TLC 변화

a) 증속시간별 인삼성분변화<Silica>; b) 증속시간별 인삼성분변화<C<sub>18</sub>>;

TLC 조건=> Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10 하층>

C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

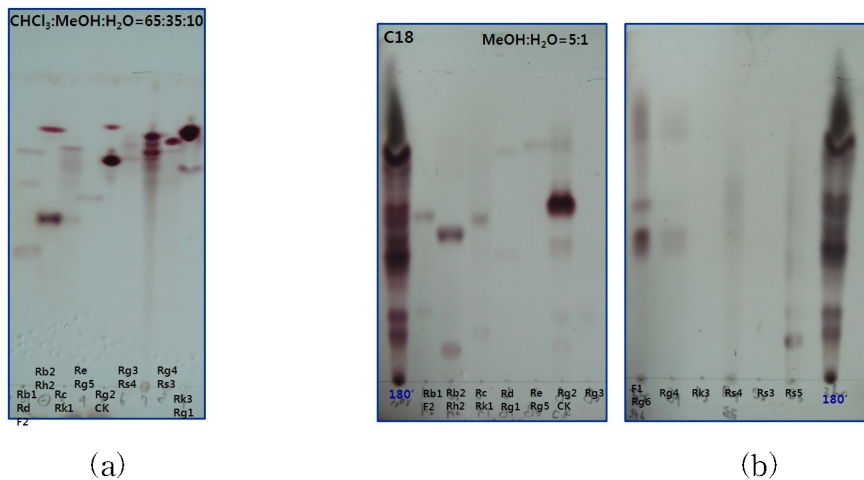
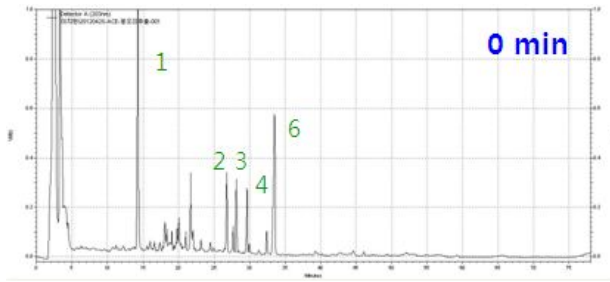


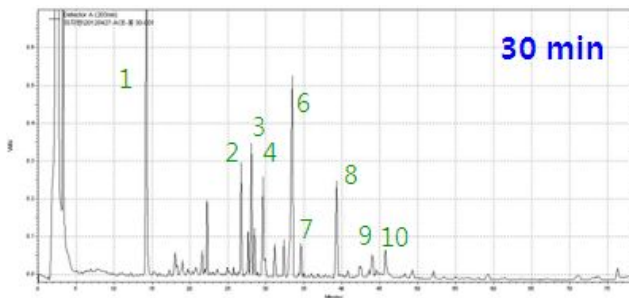
그림 27. 표준물질의 TLC 변화

② HPLC를 이용한 증숙 시간에 따른 발효 증숙 인삼꽃봉오리의 성분분석

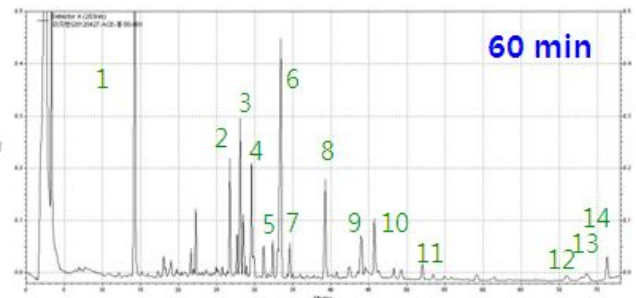
a)



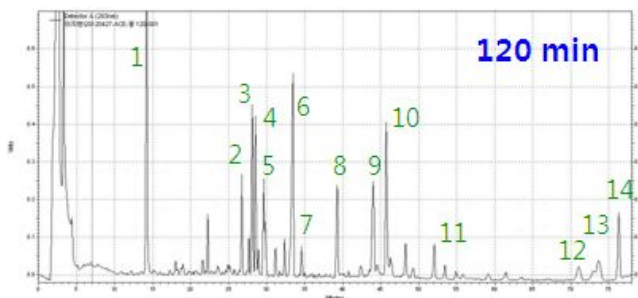
b)



c)



d)



e)

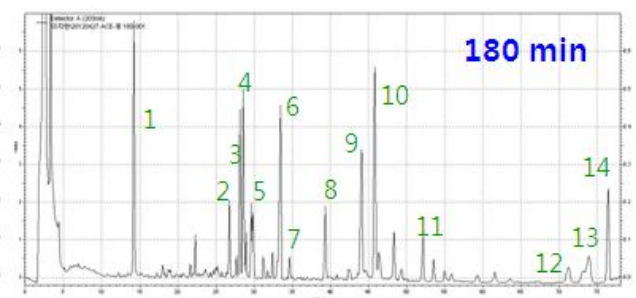


그림 28. 발효증숙인삼꽃봉오리의 증숙시간에 따른 인삼 HPLC 분석

a) 0분 증숙; b) 30분 증숙; c) 60분 증숙; d) 120분 증숙; e) 180분 증숙

1:Rg1&Re, 2:Rb1, 3:Rb2, 4:Rc, 5:Rh1, 6:Rd, 7:Rg2, 9:Rg4, 10:ginsenoside F2, 11:Rg3(S,R),  
12:Compound K, 13:Rk1, 14:Rg5

그림 28에서와 같이 HPLC 결과 발효꽃봉오리(SN6)을 120°C에서 30분에서 180분까지 시간 별 증숙한 결과 인삼 꽃봉오리의 주 사포닌인 ginsenoside Rb1, Rb2, Rg1, Re 등이 증숙시간에 비례해서 점점 사라짐을 알 수 있었음. 반대로 증숙시간에 따라 최근에 많은 관심을 받고 있는 사포닌인 Rk1, Rg5 그리고 compound K가 점점 증가됨을 알 수 있었음.

이러한 증숙과정 중 증숙시간 120분대에서 이러한 변화가 거의 이루어짐을 알 수 있었음. 이 밖에도 6, 7, 8번 즉 40-50분대에서 나타나는 사포닌들이 새로이 생성됨을 볼 수 있으며 증숙과정 중에 새로운 사포닌이 최소한 10개 이상 생성됨을 확인할 수 있었음.

나. 균주별 사포닌 변화 -*Paenibacillus* sp에 의한 발효홍삼 (419, 59균주)

■ 단일 사포닌 Ginsenoside Rb1의 419 발효균주에 의한 변화

(1) 단일 사포닌 PD계 Ginsenoside Rb1의 발효균주에 의한 변화

① HPLC를 이용한 발효에 따른 Rb1의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였음.

분석 결과 419 균주에서 ginsenoside Rb1이 ginsenoside Rd로 전환시킴을 알 수 있었고 시간이 지남에 따라 ginsenoside Rd의 함량이 높아지고 있는 것을 알 수 있었음.

419균주에서 다른 ginsenoside의 생성은 보이지 않은 것으로 비교적 선택적으로 Rd가 생성하는 균주임을 알 수 있었고 시간에 따라 점차 증가하며 14일 발효시 retention time 71분대의 ginsenoside Rb1이 모두 retention time 81분대의 peak가 보임으로 ginsenoside Rd로 전환됨. (그림 29)

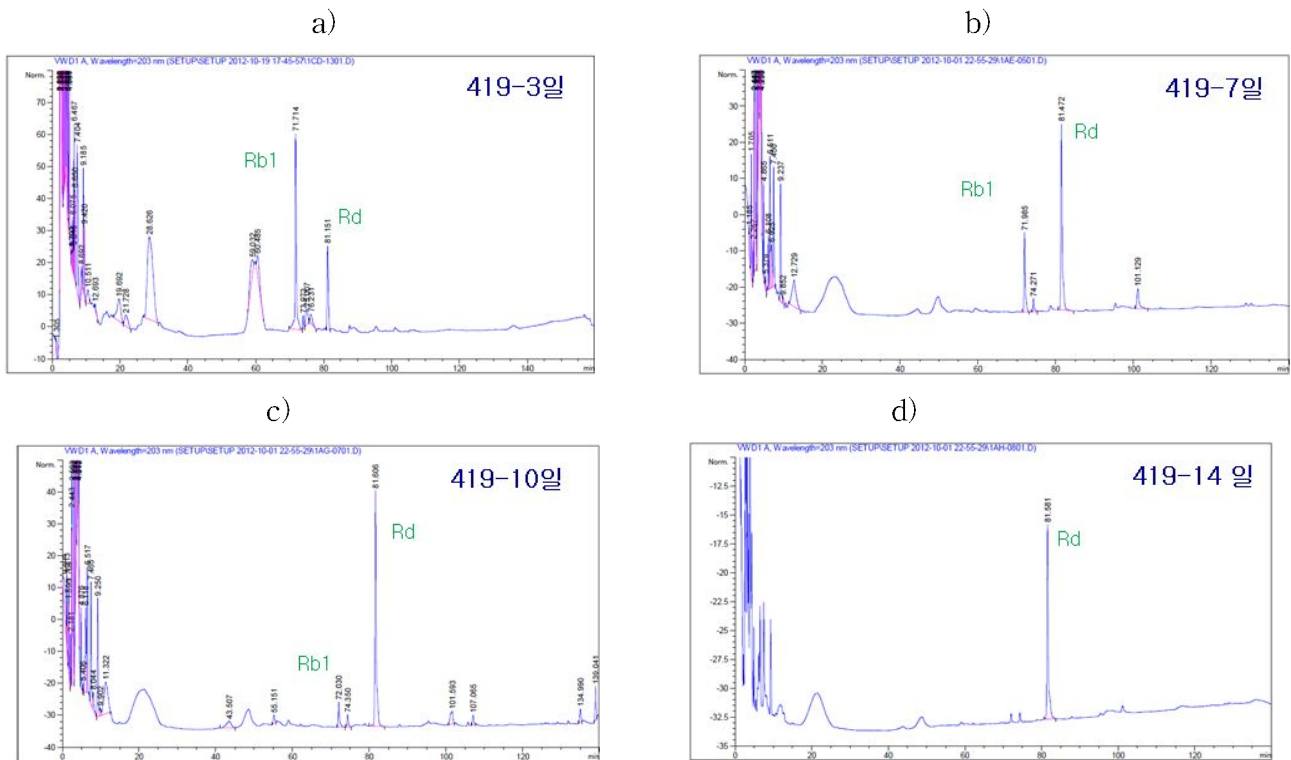


그림 29. Ginsenoside Rb1의 신규 균주 419의 시간에 따른 발효 HPLC 분석

a) 3 days; b) 7 days; c) 10 days; d) 14 days

발효된 샘플의 성분 변화를 HPLC결과로 Rb1이 유산균 419 발효에 의해 ginsenoside Rd로 변화됨을 볼 수 있었음.

■ 단일 사포닌 Ginsenoside Rb1의 발효 균주 없는 조건에 의한 변화

: 단일 사포닌 PD계 Ginsenoside Rb1의 발효 균주가 아닌 발효조건에 의한 변화

① HPLC를 이용한 발효조건에 따른 Rb1의 성분변화

균주 없이 발효조건에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌 ginsenoside Rb1의 성분의 변화를

알아보기 위하여 Rb1의 균주없이 발효의 조건으로 발효 시킨 샘플 시료를 50mg을 취한 후 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용 하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였음. 분석 결과 HPLC 데이터 결과 71분대의 피크가 그대로 유지함으로써 ginsenoside Rb1이 그대로 유지하고 있음을 알수 있었음.(그림 30) 이는 발효 균주 없이 조건에 의한 변화가 되지 않았음을 알수 있었음.

따라서 발효 균주의 변화 ginsenoside Rb1이 ginsenoside Rd로 전환되는 과정에서 균주에 의한 선택발효이지 발효 조건에 의한 변화가 아님을 알 수 있었음.

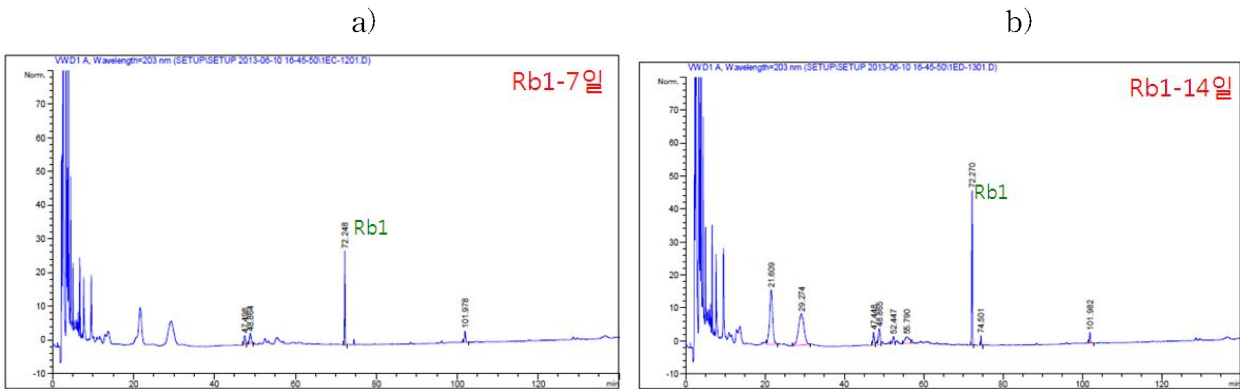


그림 30. Ginsenoside Rb1의 신규 균주 419 없이 발효 조건으로 시간에 따른 발효 HPLC 분석 - a) 7days; b) 14 days

발효된 샘플의 성분 변화를 HPLC결과로 Rb1이 새로운 균주 419 발효에 의해 ginsenoside Rd로 변화됨을 볼 수 있음.(그림 31)

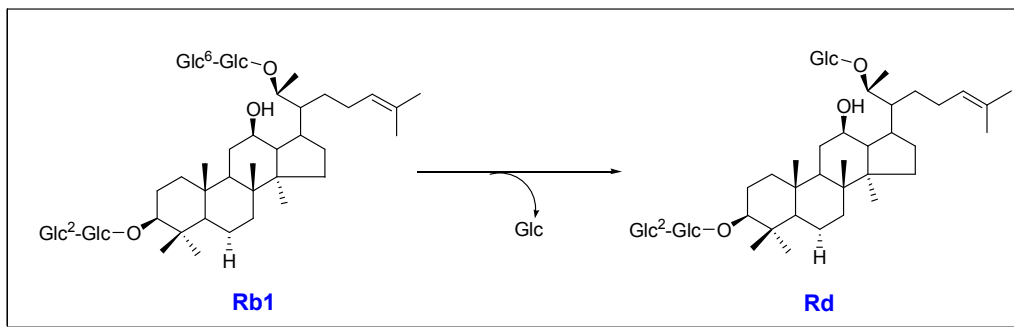


그림 31. 발효에 의한 Ginsenoside Rb1에서 Rd로의 화학적 구조변화 과정

■ 419 균주에 의한 수삼의 발효홍삼의 변화

: 단일 사포닌 ginsenoside Rb1의 발효시켜 ginsenoside Rd 변화 시키는 균주 419에 의한 인삼 발효

① TLC를 이용한 성분변화

419 균주에 의한 발효홍삼의 사포닌 성분 변화를 알아보기 위하여 그림 32에서와 같이 TLC의 패턴으로 수삼을 이용한 419 균주에 의한 발효 홍삼의 성분변화를 표준물질과 비교분

석하였음.

실험 결과 그림 32에서와 같이 발효 시간에 따라서 ginsenoside Rb1이 점점 사라지고 ginsenoside Rd가 발효 시간에 따라 점차적으로 증가하는 추세로 생성됨을 알 수 있었음.

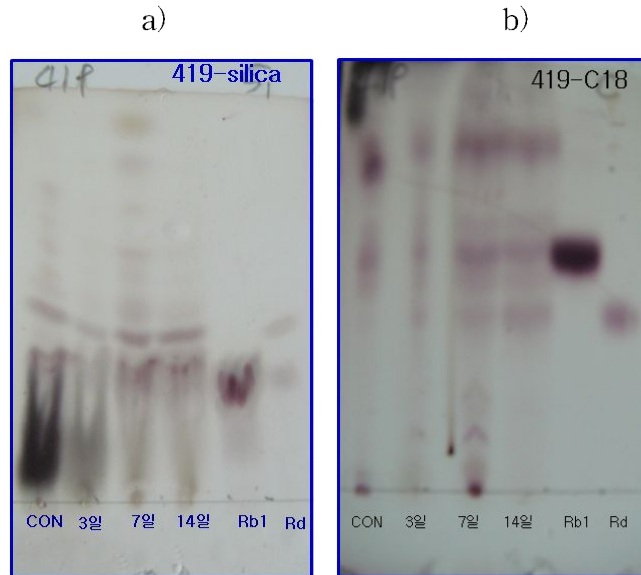
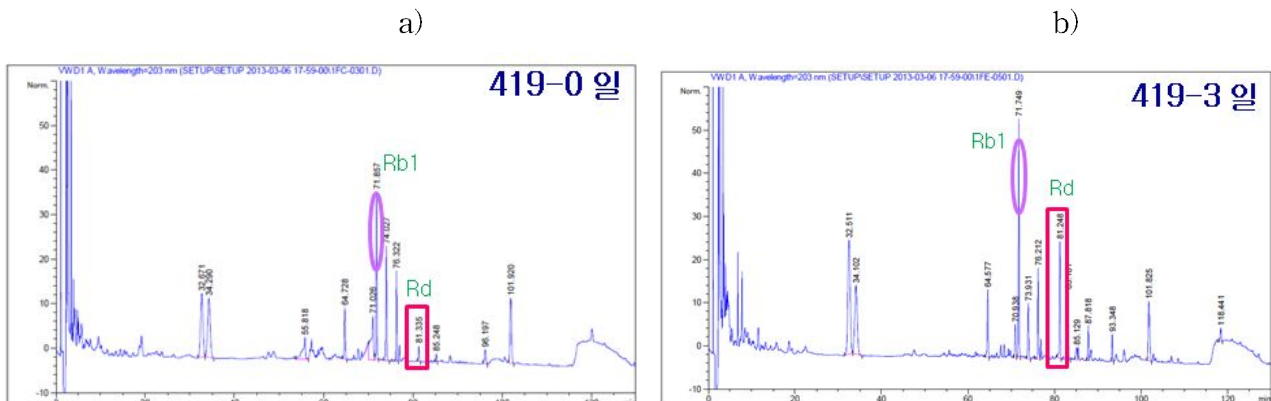


그림 32. 인삼 뿌리의 419 균주의 발효에 따른 TLC 형태  
 a) 발효홍삼의 시간별 성분변화<Silica>; b) 발효홍삼의 시간별 성분변화<C<sub>18</sub>>;  
 TLC 조건=>Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10>  
 C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

② HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

419 균주에 의한 발효홍삼의 사포닌 성분 변화를 알아보기 위하여 샘플 50mg을 취해 HPLC 용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 HPLC 분석 결과 419 균주에 의한 발효된 홍삼은 71분대 나타나는 ginsenoside Rb1이 사라지고 81분대에 나타나는 ginsenoside Rd가 많이 나타남을 알 수 있다. 이는 발효를 통하여 Rb1이 Rd로 전환되었음을 알 수 있음.

따라서 419 균주가 비교적 대량으로 ginsenoside Rd를 생산하는 균주임을 알 수 있음.(그림 33)





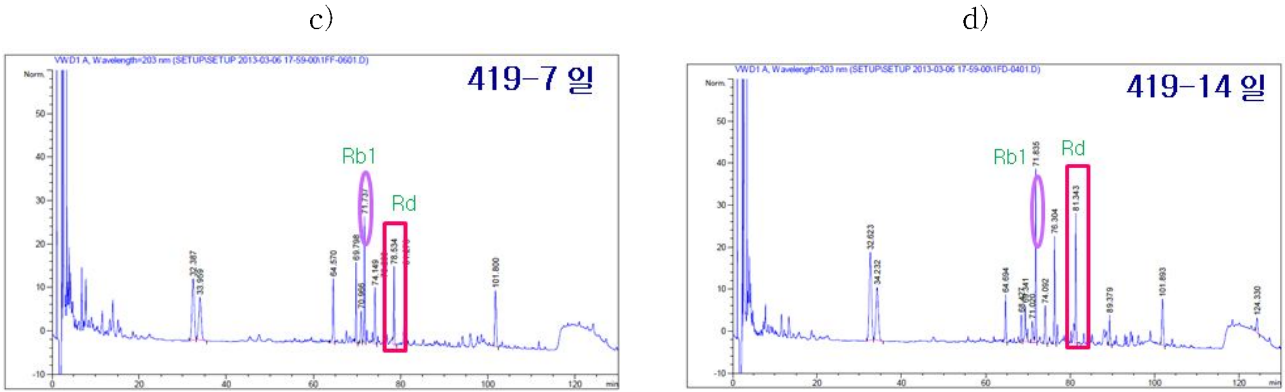
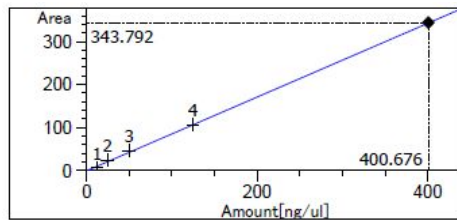


그림 33. 발효홍삼의 HPLC 분석-419 균주 발효

a) 0일 발효 홍삼; b) 3일 발효홍삼; c) 7일 발효 홍삼; d) 14일 발효 홍삼

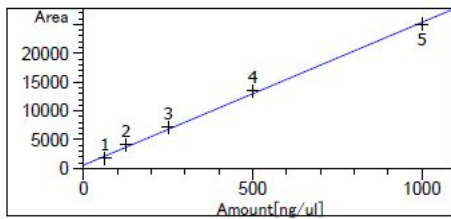
발효된 샘플의 성분 변화를 1차적인 TLC 분석 결과와 2차적인 HPLC결과로 수삼이 419 균주 발효에 의해 ginsenoside Rb1이 ginsenoside Rd 물질의 화학적 구조 변화를 찾을 수 있음.

1) Ginsenoside Rb1의 검량선



Rb1 at exp. RT: 71.749  
 VWD1 A, Wavelength=203 nm  
 Correlation: 0.99742  
 Residual Std. Dev.: 3.54365  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m:  $8.58042e-1$   
 b:  $-5.35207e-3$   
 x: Amount  
 y: Area

2) Ginsenoside Rd의 검량선



Rd at exp. RT: 81.248  
 VWD1 A, Wavelength=203 nm  
 Correlation: 0.99886  
 Residual Std. Dev.: 498.71445  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 24.83557  
 b: 567.03169  
 x: Amount  
 y: Area

그림 34. Ginsenoside Rb1과 Rd의 검량 그래프

발효 홍삼의 정량 분석을 실시한 결과 그림 34에서 보는 검량 그래프에 따라 대입하여 계산한 결과 419균주에 수삼을 이용한 발효홍삼은 수삼 추출물 100mg을 기준으로 하였을 때 Rb1이 2.198mg이 존재함. 발효 시간에 따라 Rb1은 2.198mg에서 1.375mg 까지 줄어들고 Rd는 3일에 0.153mg 생성되어 14일 0.803 mg으로 서서히 증가됨을 알 수 있었음.

■ 419 균주에 의한 발효홍삼(잎)의 변화

① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼(잎)의 성분변화

발효에 따른 인삼(잎)에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였음.

419 균주가 비교적 대량으로 84분대에 피크가 보임으로 ginsenoside의 전환이 있음을 알 수 있음.(그림 35)

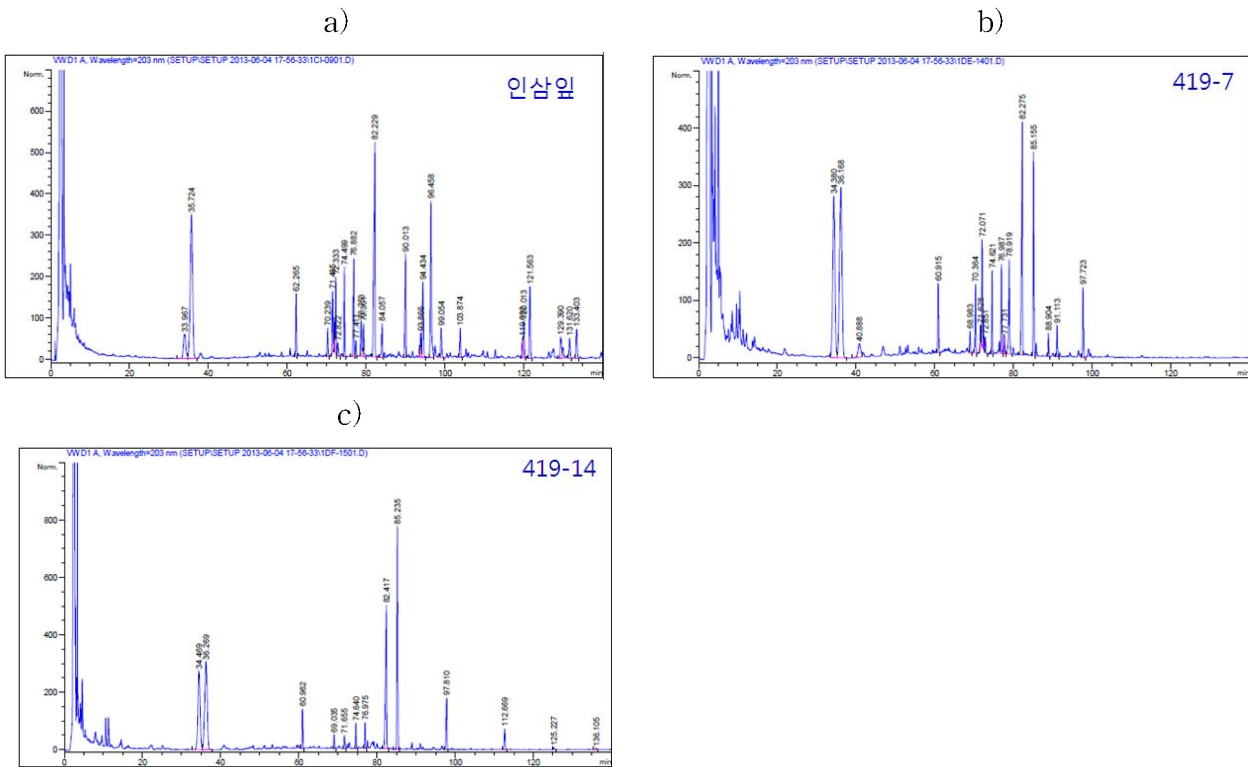


그림 35. 발효홍삼(잎)의 HPLC 분석-419 발효  
 a) 0일 발효 홍삼; b) 7일 발효홍삼; c) 14일 발효홍삼

발효된 샘플의 성분 변화를 알기 위해 419 발효되어진 발효 홍삼의 84분대 피크는 현재 분리 정제 하는 중이다.

■ 단일 사포닌 Ginsenoside Rb1의 59 균주에 의한 변화

① HPLC를 이용한 발효에 따른 Rb1의 성분변화

제2세부과제에서 넘겨받은 발효샘플을 발효에 따라 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였음.

분석 결과 419 균주에서처럼 59 균주의 발효도 ginsenoside Rb1이 ginsenoside Rd로 전환시킴

을 알 수 있었고 시간이 지남에 따라 ginsenoside Rd의 함량이 높아지고 있는 것을 알 수 있음.

59균주에서도 다른 ginsenoside의 생성은 보이지 않은 것으로 비교적 선택적으로 Rd가 생성하는 균주임을 알 수 있었고 시간에 따라 점차 증가하며 10일 발효시 71분대의 ginsenoside Rb1이 모두 81분대의 피크가 보임으로 ginsenoside Rd로 전환된다고 할수 있음.(그림 36)

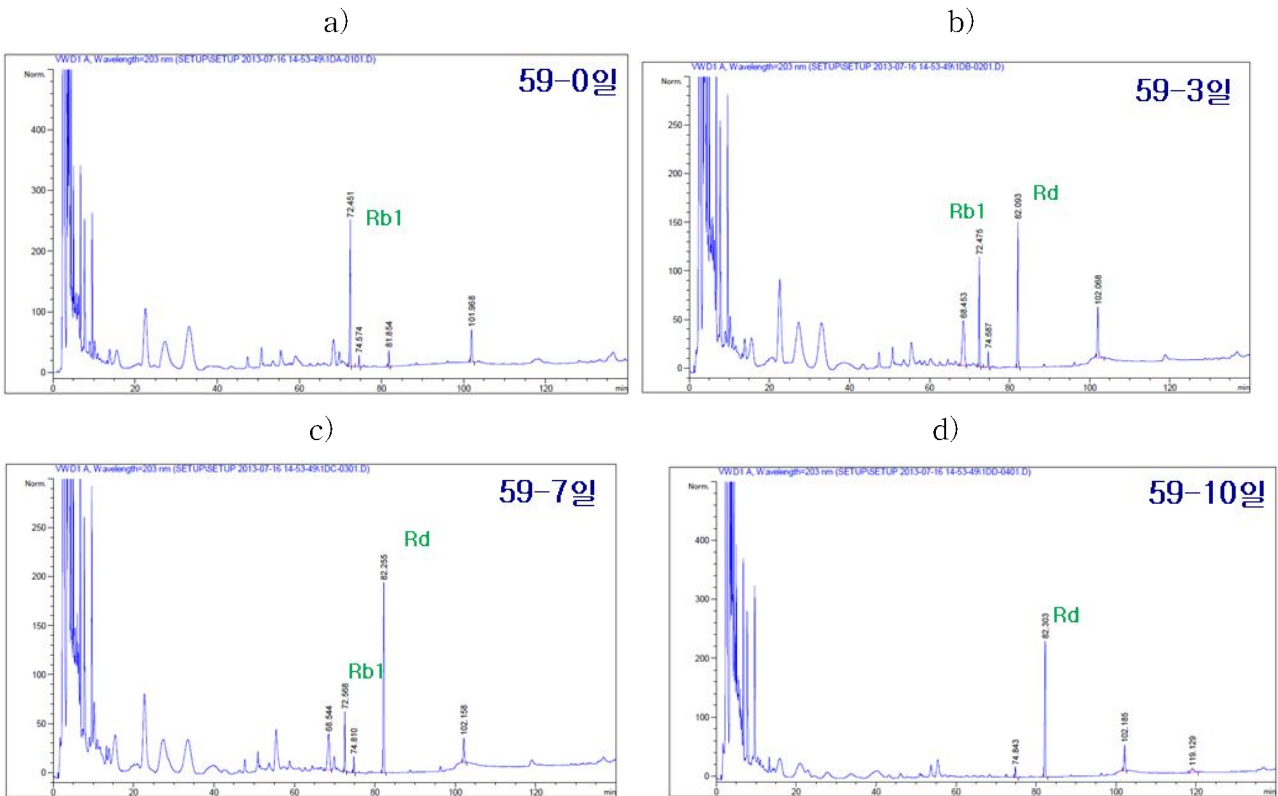


그림 36. Ginsenoside Rb1의 신규 균주 59의 시간에 따른 발효 HPLC 분석  
a) 0 days; b) 3 days; c) 7 days; d) 10 days

발효된 샘플의 성분 변화는 HPLC결과로 Rb1이 59 발효에 의해 ginsenoside Rd로 변화됨을 볼 수 있음. 또한 419와 비교시 59 균주 역시 단일 사포닌 ginsenoside Rb1을 Rd로만 변환시키는 선택성을 지니고 있으며, 발효 시간은 419보다 10일 정도로 좀 더 빠른 변화를 관찰할 수 있음.

#### 다. 균주별 사포닌 변화 - *Lactobacillus*에 의한 발효 홍삼-22(*Lactobacillus Plantarum*)

##### ■ 균주 22에 의해서 발효된 수삼의 발효홍삼(SN-5)의 성분 변화



① TLC를 이용한 성분변화

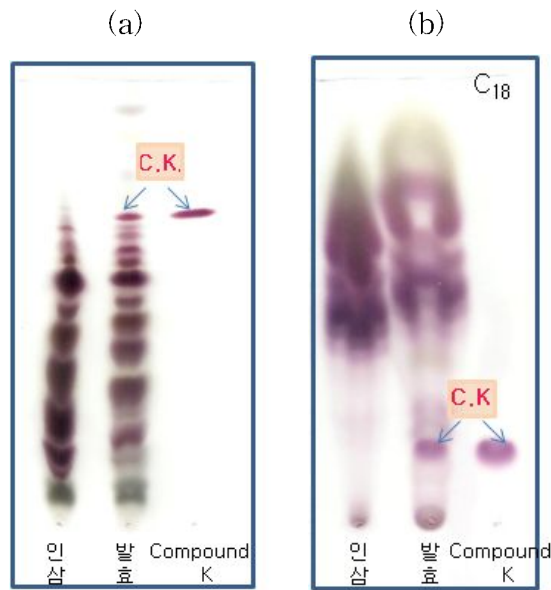


그림 37. 인삼 뿌리의 유산균(22)에 발효에 따른 TLC 형태

a) Silicagel plate; b) C<sub>18</sub> plate

TLC 조건=>Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10>

C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 중 신규균주로 KCTC에 기탁하였고, 특허를 출원했으며 비교적 많이 compound K를 생성했던 22 발효균주에 의해서 발효한 발효홍삼(SN-5)의 TLC 변화를 관찰하였음. 고정상으로 사용한 silicagel 및 역상인 C-18으로 코팅된 plate에 전개한 결과 compound K 가 새로이 생성됨을 확인 할 수 있음.(그림 37).

② HPLC를 이용한 성분변화

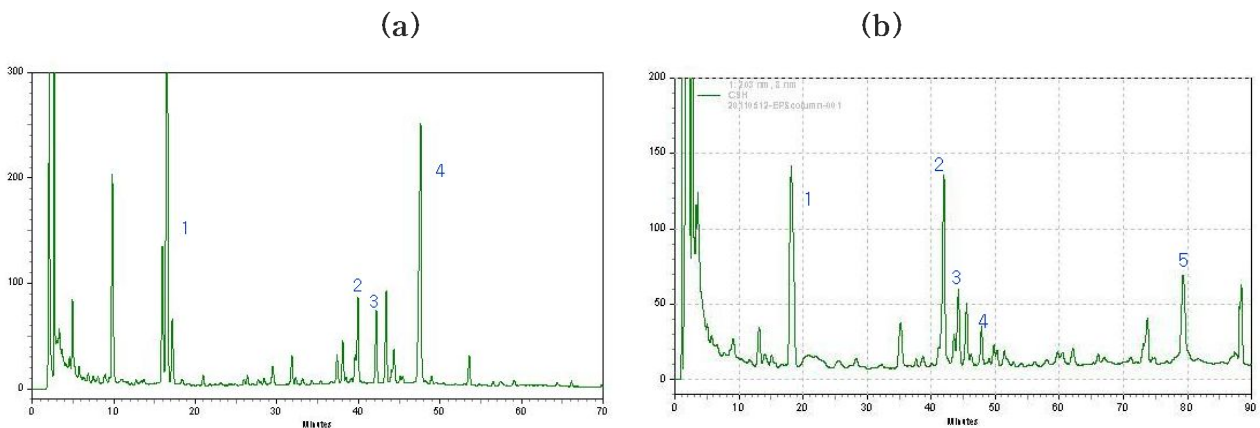


그림 38. 인삼 뿌리의 유산균(22)에 발효에 따른 HPLC 분석

인삼 뿌리 조사포닌; b) 발효인삼 조사포닌

1:Rg1 & Re, 2:Rb1, 3:Rb2, 4:Rd, 5: Compound K

제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 중 신규균주 22는 KCTC에 기탁하였고, 특허를 출원했으며 비교적 많이 compound K를 생성했던 22 발효균주에 의해서 발효한 발효홍삼(SN-5)의 HPLC 변화를 관찰한 결과 80분대에서 compound K가 새로이 생성되었음을 확인 할 수 있었음.(그림 38).

■ 발효인삼(SN5)의 증속시간에 따른 발효홍삼의 변화

열처리를 통한 발효홍삼의 증속

발효홍삼의 증속방법은 본 연구자가 개발한 신공법에 의한 흑삼의 제조방법(송규용외 6명; 흑삼의 제조방법 및 이를 함유하는 조성물, 등록 10-754253 (2007. 08. 27)을 바탕으로 하여 제2세부과제에서 선발한 균주에 의해서 발효한 발효홍삼을 대상으로 발효홍삼에 비해서 다양한 성분을 함유할 뿐만 아니라 항산화 및 아토피억제활성이 증강된 발효증속홍삼을 제조한 뒤 조사포닌 분석을 통해 사포닌의 성분변화를 중점적으로 관찰하였음.

즉, 제2세부과제로부터 넘겨받은 발효인삼 중 특허를 출원한 ginsenoside Rb1을 compound K로 비교적 많이 전환시키는 발효균주인 22에 의해서 발효시킨 발효인삼 SN-5을 선택한 후 증속기에 넣고 120℃에서 0분 증속, 30분 증속, 60분 증속, 90분 증속한 뒤 각각의 조사포닌 분석을 통해 TLC와 HPLC분석을 통해 성분 변화를 관찰하였음.

① TLC를 이용한 성분변화

그림 39에서와 같이 발효홍삼(SN5)를 30분, 60분, 90분 증속함에 발효홍삼의 성분변화는 점차적으로 변화됨에 따라서 구체적으로 어느 성분의 변화가 가장 많이 변화하는지를 관찰하고자 표준물질과 비교분석하였음.

실험결과 그림 39에서와 같이 증속시간이 증가함에 따라서 ginsenoside Rb1, Rb2, Rd, Rg1 등이 점점 사라지고 최근에 항암활성 및 항산화활성 등 여러 가지 활성이 있다고 알려져 있는 Rg3 및 Rg5 & Rk1이 증속 시간별로 점차적으로 증가하는 추세로 생성됨을 알 수 있음.

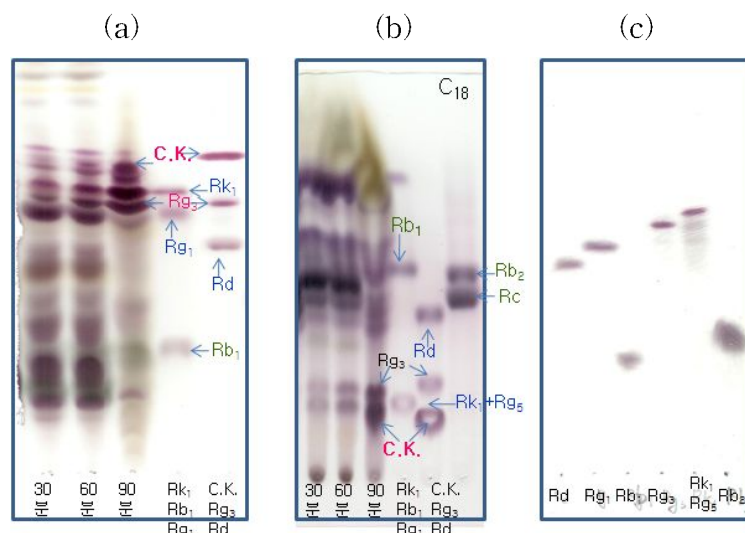


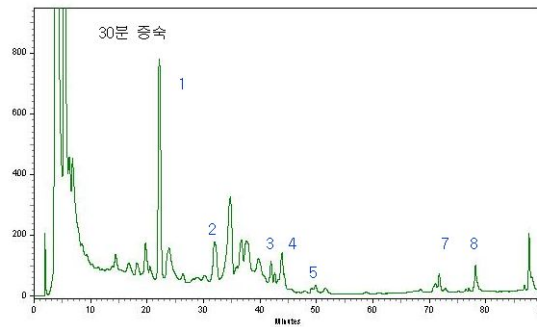
그림 39. 발효홍삼(SN-5)의 증속시간에 따른 발효증속홍삼의 TLC 변화

- a) 증속시간별 발효홍삼의 성분변화<Silica>; b) 증속시간별 발효홍삼의 성분변화<C<sub>18</sub>>;
- c) 표준물질의 위치<Silica>

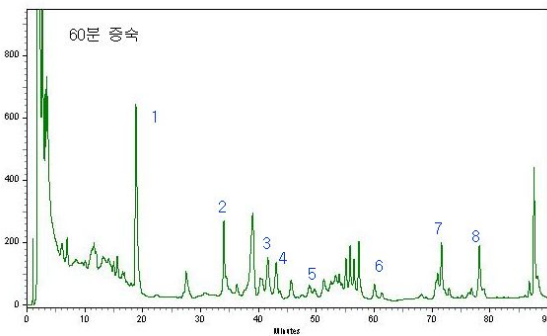
TLC 조건=>Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10> ; C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

② HPLC를 이용한 증속시간에 따른 발효홍삼의 성분분석

a)



b)



c)

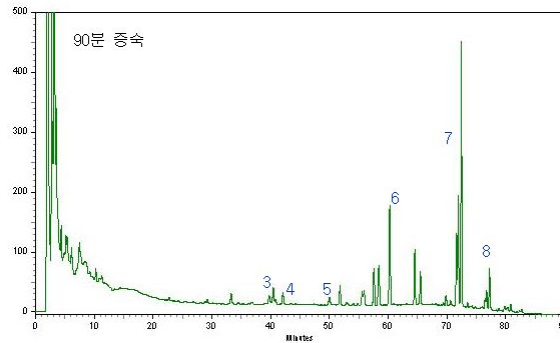


그림 40. SN-5의 증속시간에 따른 인삼 HPLC 분석

a) 30분 증속; b) 60분 증속; c) 90분 증속

1:Rg1 & Re, 2:Rf, 3:Rb1, 4:Rb2, 5:Rd, 6:Rg3(S,R), 7:Rk1& Rg5, 8: Compound K

그림 40에서와 같이 HPLC 결과 발효홍삼(SN-5)을 120℃에서 30분에서 90분까지 증속한 결과 ginsenoside Rb1, Rb2, Rd, Rg1, Re 등이 증속시간에 비례해서 점점 사라짐을 알 수 있었음. 반대로 증속시간에 비례해서 최근에 많은 관심을 받고 있는 사포닌인 Rg3, Rk1 및 Rg5가 점점 증가됨을 알 수 있었음. 특히 90분 증속하면 이러한 변화가 거의 이루어짐을 알 수 있었음. 이밖에도 6, 7, 8번 및 50-70분대에서 나타나는 피크에 해당되는 사포닌들이 새로이 생성되어 증속과정 중에 새로운 사포닌이 최소한 10개 이상 생성됨을 확인할 수 있었음.

■ 22 균주에 의한 인삼잎의 발효홍삼의 변화

① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 22균주의 인삼잎 발효는 419의 인삼잎 발효홍삼과 같은 패턴의 HPLC분석 결과를 보인다. 새로이 생긴 peak는 retention time 79분대에서 상당량의 ginsenoside를 나타내는데 이의 화학적 구조는 분리 중으로 알아내지 못하였음.(그림 41)

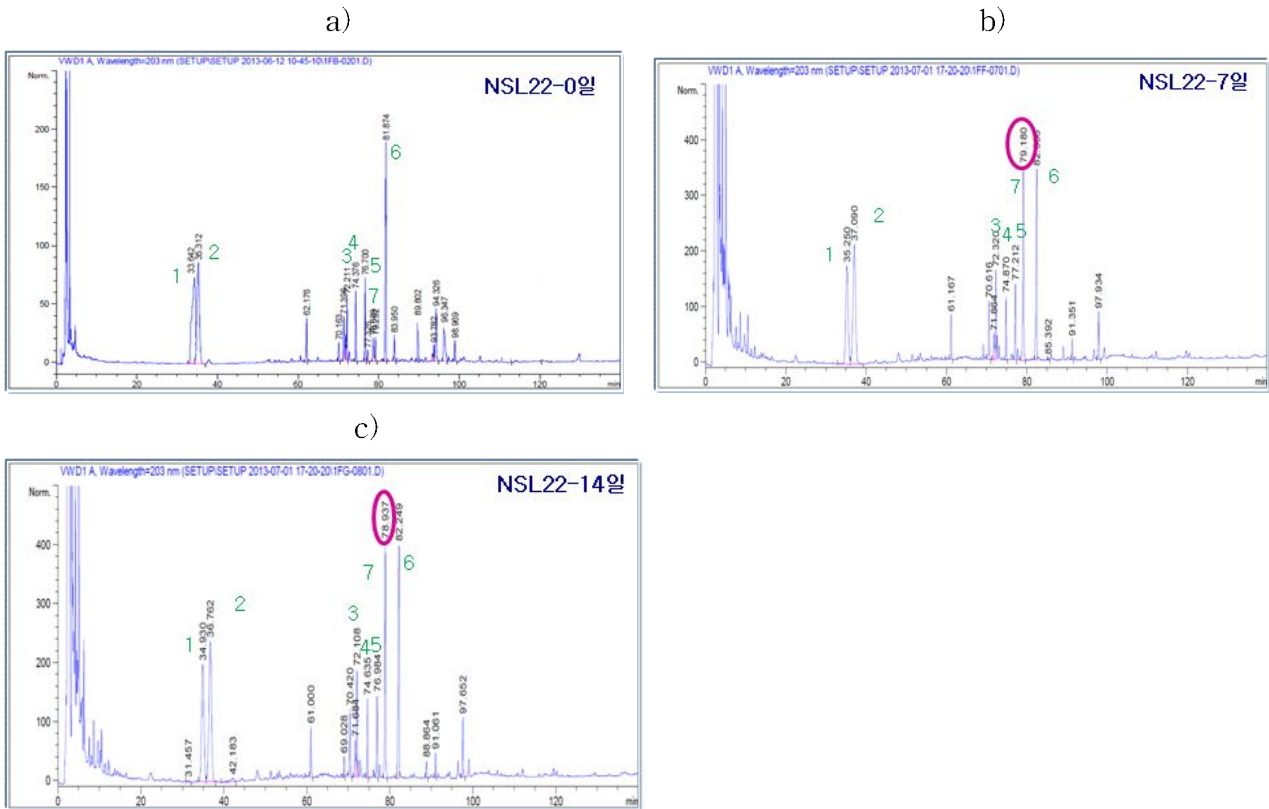


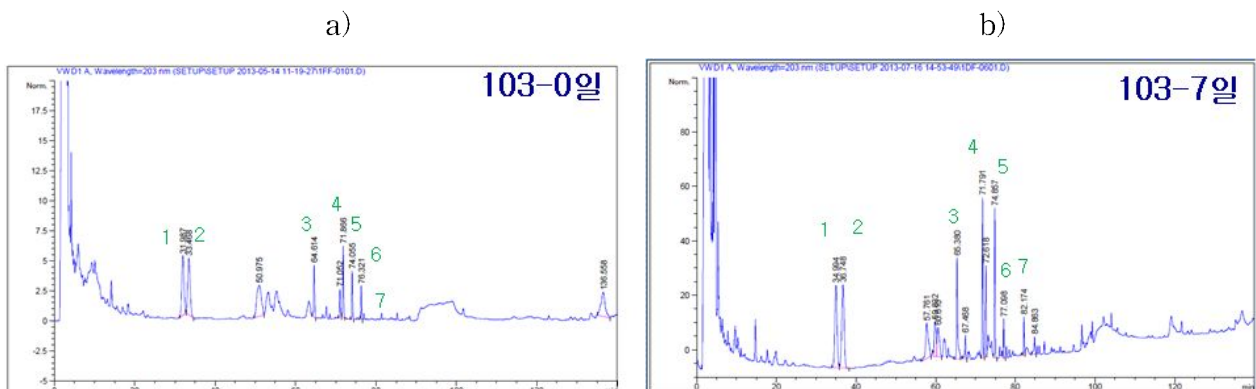
그림 41. 발효홍삼의 HPLC 분석-22 균주 발효  
 a) 0일 발효 홍삼; b) 7일 발효홍삼; c) 14일 발효홍삼  
 1:Rg1, 2:Re, 3:Rb1, 4:Rc, 5:Rb2, 6:Rd 7; unknown

■ 103 균주에 의한 발효홍삼의 변화- 103(*Lactobacillus buchneri*)

(1)수삼 발효

① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 103균주의 발효와 같이 103균주의 발효 홍삼에서는 14일이 되었을때는 96분대의 ginsenoside Rg4, 104분대의 피크인 (S)-Rg3 그리고 121분대의 Rg5가 생성됨을 알 수 있음. (그림 42)



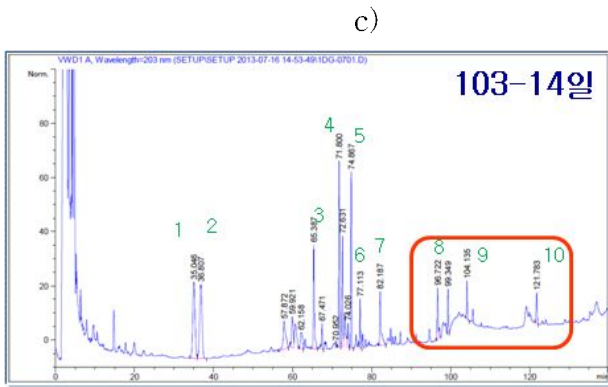


그림 42. 발효홍삼의 HPLC 분석-103 균주 발효  
a) 0일 발효 홍삼; b) 7일 발효홍삼; c) 14일 발효홍삼  
1:Rg1, 2:Re, 3:Rf, 4:Rb1, 5:Rc, 6:Rb2, 7:Rd, 8:Rg4 9:Rg3(S,R), 10:Rg5

■ 103 균주에 의한 인삼잎의 발효홍삼의 변화- 103(*Lactobacillus buchineri*)

① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼(잎)의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 26의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 잎의 419균주에의 발효와 같이 103균주의 발효 홍삼에서 비교적 대량으로 84분대 피크를 볼 수 있었다. 84분대에 해당하는 화학적 구조를 알기 위해서 현재 분리 중에 있음. (그림 43)

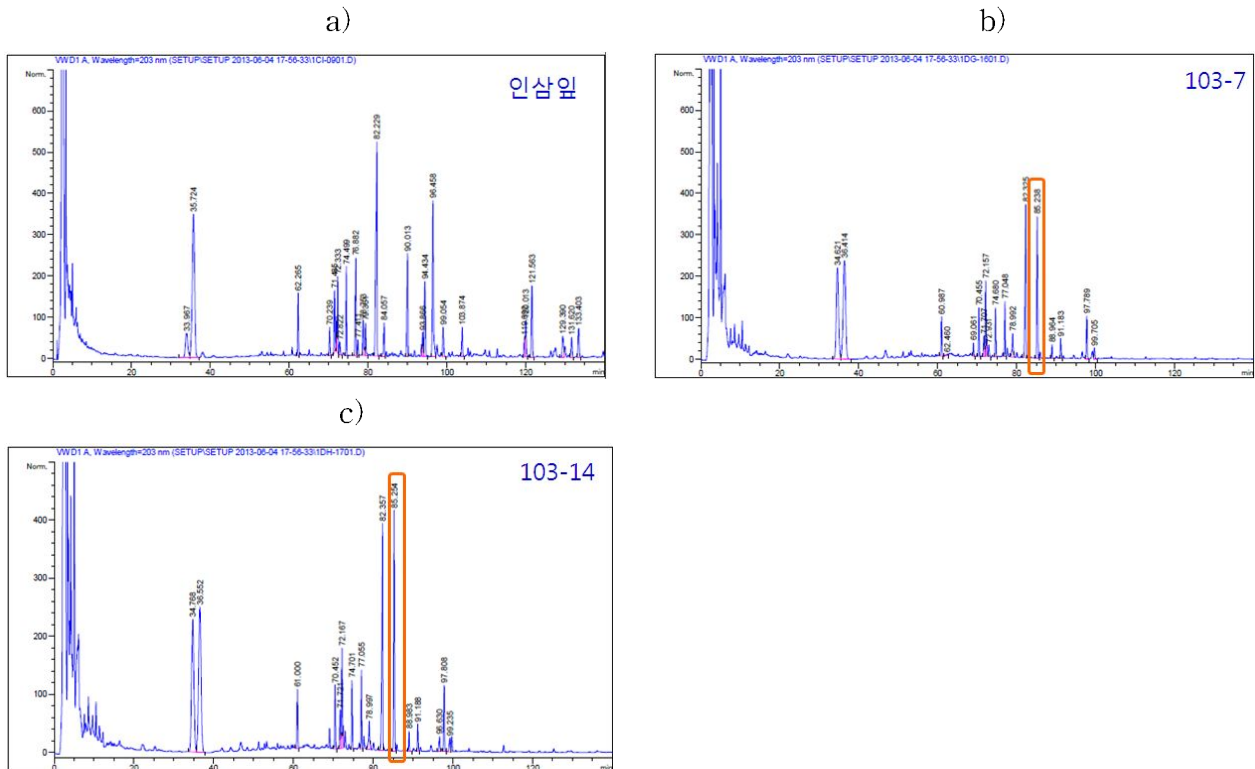


그림 43. 발효홍삼(잎)의 HPLC 분석-103 균주 발효  
a) 0일 발효 홍삼; b) 7일 발효홍삼; c) 14일 발효홍삼

■ 123균주에 의한 수삼의 발효홍삼의 변화-123(*Bacillus coagulans*)

① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 419균주의 수삼 발효에서와 같이 123균주 발효 홍삼에서 비교적 대량으로 84분대의 피크가 나타남을 알 수 있었음.(그림 44)

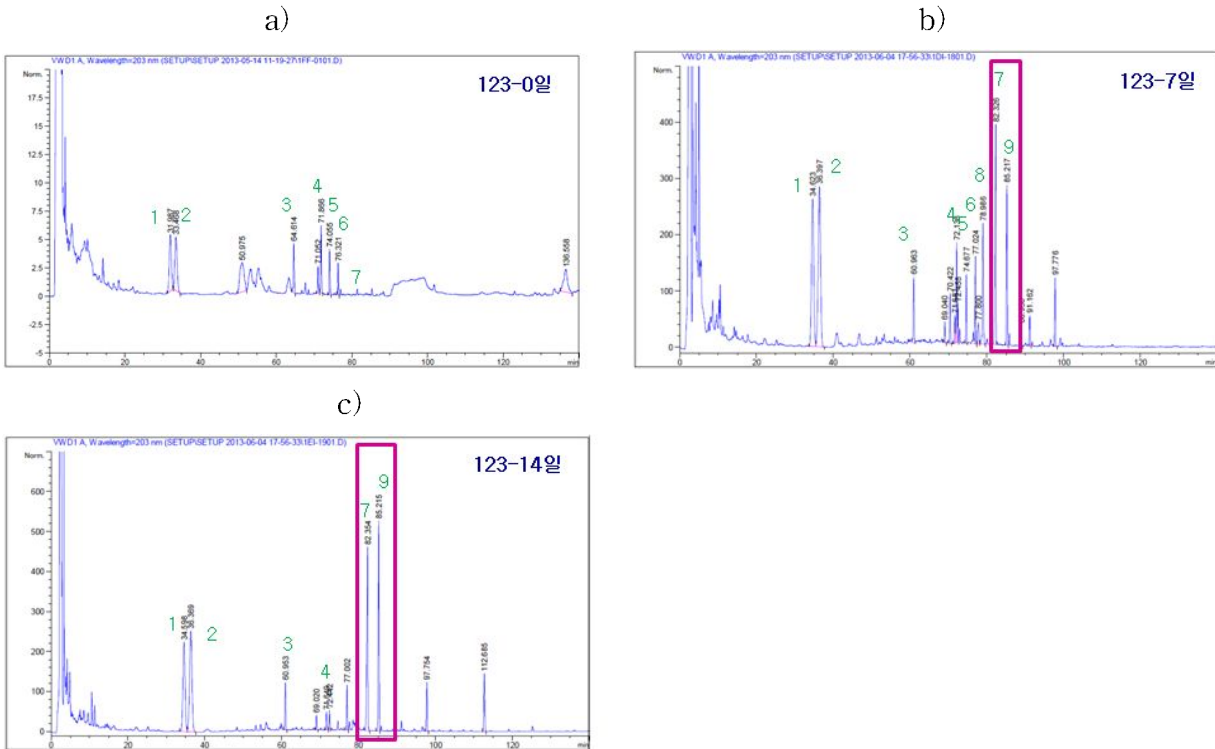


그림 44. 발효홍삼(翌)의 HPLC 분석-123 균주 발효  
a) 0일 발효 홍삼; b) 7일 발효홍삼; c) 14일 발효홍삼  
1:Rg1, 2:Re, 3:Rf, 4:Rb1, 5:Rc, 6:Rb2, 7:Rd, 8:ginsenoside F1

123균주의 발효 홍삼의 경우는 81분대에 나타나는 Rd가 발효 전 인지정도로 적은 양을 보이지만 발효 시점 7일이 지났을 때 상당량이 생성됨을 알 수 있었음. 또한 84분대 피크의 미지 사포닌도 같이 형성됨을 알 수 있었음. 발효 시점 14일이 지나서는 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc등의 PD계열 사포닌이 사라짐을 볼 수 있었고 Rd와 Rd 옆 84분대의 피크는 상당량 크게 나타남을 알 수 있었으며, Rd 보다 84분대의 피크의 사포닌이 좀더 많이 형성되었음을 알 수 있었음.

■ 123균주에 의한 인삼翌의 발효홍삼의 변화-123(*Bacillus coagulans*)

① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼(翌)의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을



HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 419균주의 발효 와 같이 123균주 발효 홍삼에서 비교적 대량으로 84분대의 피크가 나타남을 알 수 있었음.(그림 45)

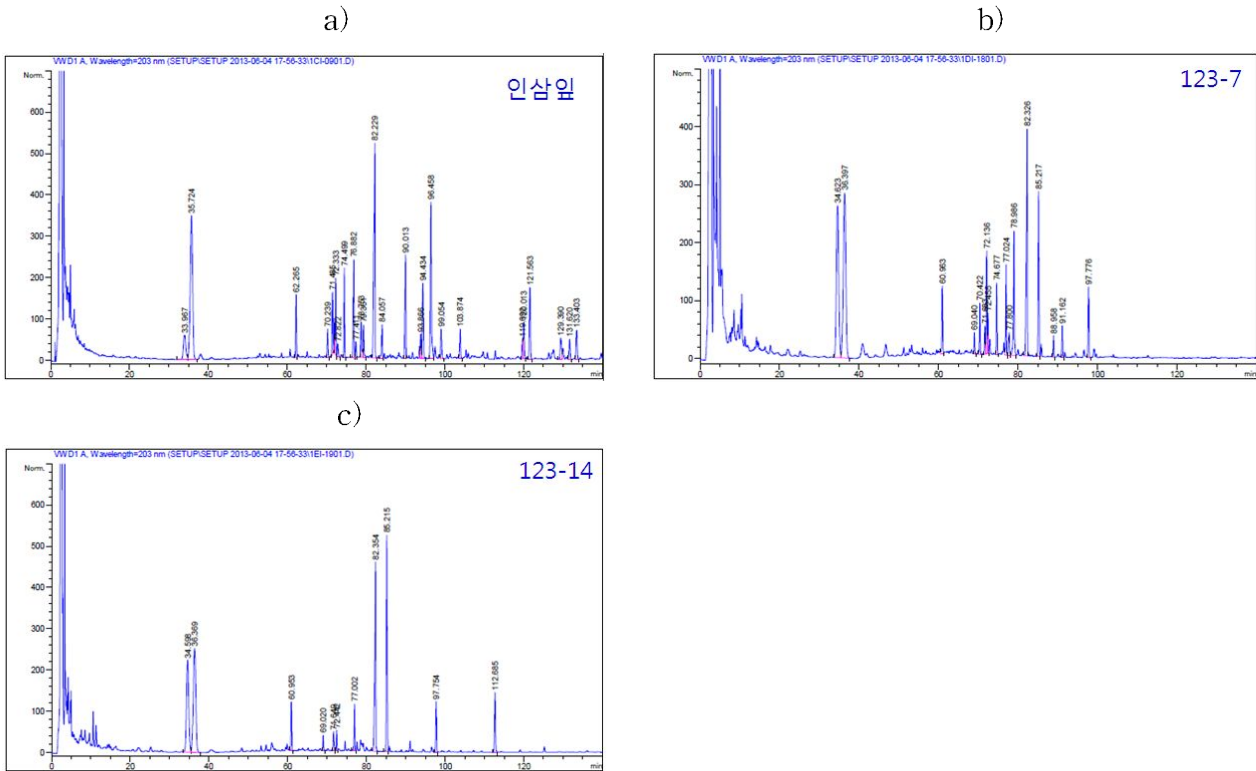


그림 45. 발효홍삼(잎)의 HPLC 분석-123 균주 발효  
a) 0일 발효 홍삼; b) 7일 발효홍삼; c) 14일 발효홍삼

#### 라. 균주별 사포닌 변화 - *Leuconostos*에 의한 발효 홍삼

-38(*Leuconostos cetrium*), 46(*Leuconostos mesenteroides*)

##### ■ 38 유산균에 의한 수삼의 발효홍삼의 변화

###### ① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 38 균주 발효홍삼에서 96분대의 피크인 ginsenoside Rg4가 생성됨을 알 수 있었고 그와 더불어 103분과 105분대의 피크, 즉 R & S형의 ginsenoside Rg3가 각각 생성되면서 121분대에 ginsenoside Rg5가 생성됨을 알 수 있었음.

또한 38 균주의 발효에 의해서 비교적 대량으로 (R) & (S)-ginsenoside Rg3, ginsenoside Rg5를 생산하였음을 알 수 있었음..(그림 46)

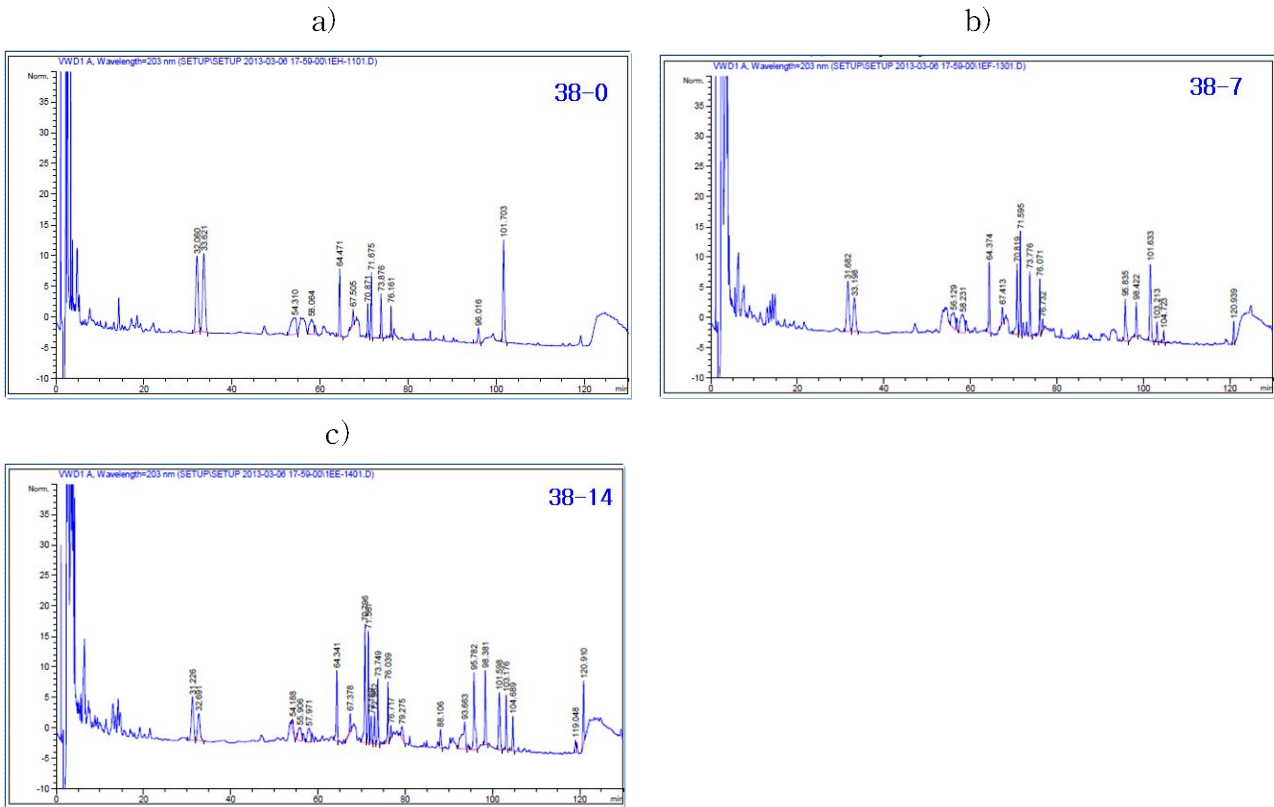


그림 46. 발효홍삼의 HPLC 분석-38 유산균 발효  
a) 0일 발효 홍삼; b) 7일 발효홍삼; c) 14일 발효홍삼

발효된 샘플의 성분 변화를 HPLC결과로 수삼이 38 유산균 발효에 의해 ginsenoside Rg4, (R)-ginsenoside Rg3, (S)-ginsenoside Rg3, ginsenoside Rg5의 물질의 화학적 구조 변화를 찾을 수 있었음.

#### ■ 38 유산균에 의한 인삼잎의 발효홍삼 변화

##### ① HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼(인삼잎)의 성분변화

발효에 따른 인삼잎에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 38 균주에 의한 인삼잎의 발효홍삼에서 retention time 79분대에 peak 가 생성됨을 알 수 있었음.(그림 47)



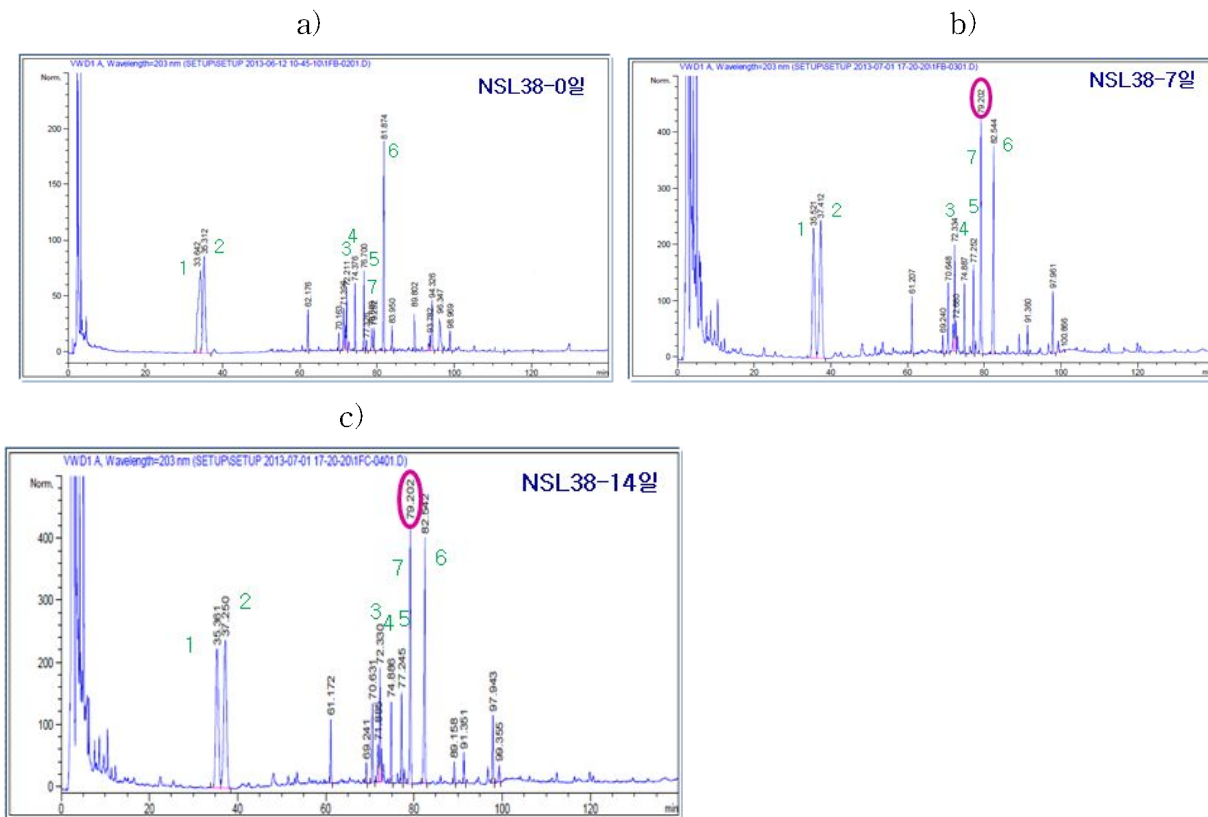


그림 47. 발효홍삼의 HPLC 분석-38 유산균 발효  
a) 0일 발효 홍삼; b)7일 발효홍삼; c)14일 발효홍삼  
1:Rg1, 2:Re, 3:Rb1, 4:Rc, 5:Rb2, 6:Rd, 7:NON

발효된 샘플의 변화된 성분인 retention time 79분의 성분은 현재 분리 중으로 밝혀내지 못하였음.

■ 46 유산균에 의한 수삼의 발효홍삼 변화

① TLC를 이용한 성분변화

46 균주에 의한 발효홍삼의 사포닌 성분 변화를 알아보기 위하여 그림 48에서와 같이 TLC의 패턴으로 수삼을 이용한 46 균주에 의한 발효 홍삼의 성분변화를 표준물질과 비교분석하였음. 실험 결과 그림 48에서와 같이 발효 시간에 따라서 ginsenoside Rg3와 Rg5가 발효 시간에 따라 점차적으로 증가하는 추세로 생성됨을 알 수 있었음.

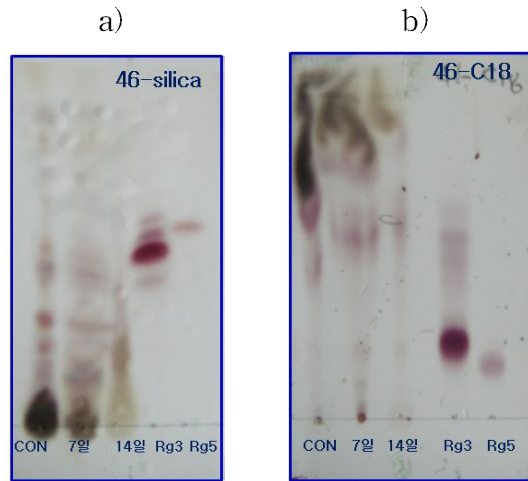


그림 48. 인삼 뿌리의 46균주의 발효에 따른 TLC 형태  
 a) 발효홍삼의 시간별 성분변화<Silica>; b) 발효홍삼의 시간별 성분변화<C<sub>18</sub>>;  
 TLC 조건=>Silicagel <CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10>  
 C<sub>18</sub> <MeOH:H<sub>2</sub>O = 5:1>

② HPLC를 이용한 발효에 따른 발효홍삼의 성분변화

발효에 따른 인삼에 존재하는 인삼사포닌의 성분의 변화를 알아보기 위하여 제2세부과제에서 넘겨받은 발효홍삼 시료를 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 분석 조건은 표 2의 조건으로 분석을 하였으며 분석 결과 46 균주 발효홍삼에서 96분대의 피크인 ginsenoside Rg4가 생성됨을 알 수 있었고 그와 더불어 103분과 105분대의 피크, 즉 R & S형의 ginsenoside Rg3가 각각 생성되면서 121분대에 ginsenoside Rg5가 생성됨을 알 수 있었음.

또한 46 균주의 발효에 의해서 비교적 대량으로 ginsenoside Rg3, ginsenoside Rg5를 생산하였음을 알 수 있었음.(그림 49)

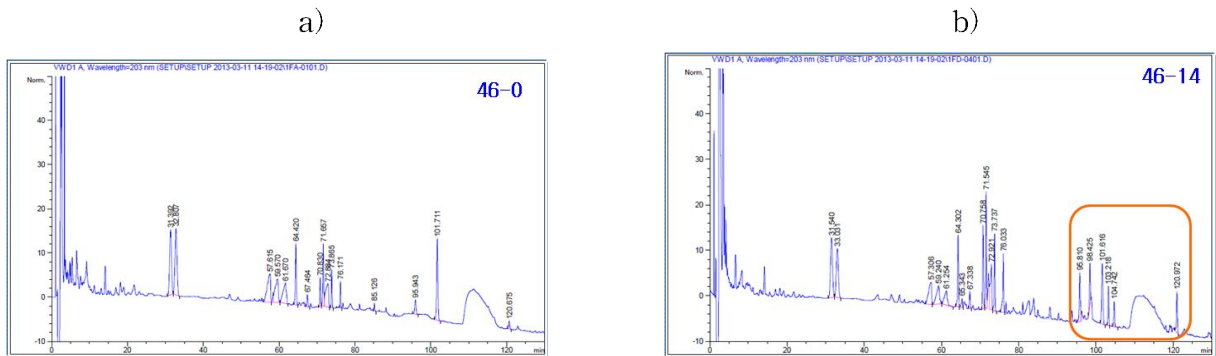


그림 49. 발효홍삼의 HPLC 분석-46 유산균 발효  
 a) 0일 발효 홍삼; b)14일 발효홍삼

발효된 샘플의 성분 변화를 HPLC결과로 수삼이 46 유산균 발효에 의해 ginsenoside Rg4, (R)-ginsenoside Rg3, (S)-ginsenoside Rg3, ginsenoside Rg5 물질의 화학적 구조 변화를 찾았음.

마. 발효홍삼내고함량진세노사이드3종분리법

(1) Rd 대량분리

그림 50번은 419 발효홍삼에서 대량 생산되는 Rd의 대량 분리 모식도임.

모식도와 같은 방법으로 발효인삼 1kg으로부터 Rd 순수물질 10g이상을 정제 분리. 이의 HPLC 패턴은 205nm파장에서 그림56와 같이 98% 이상의 순도를 보임

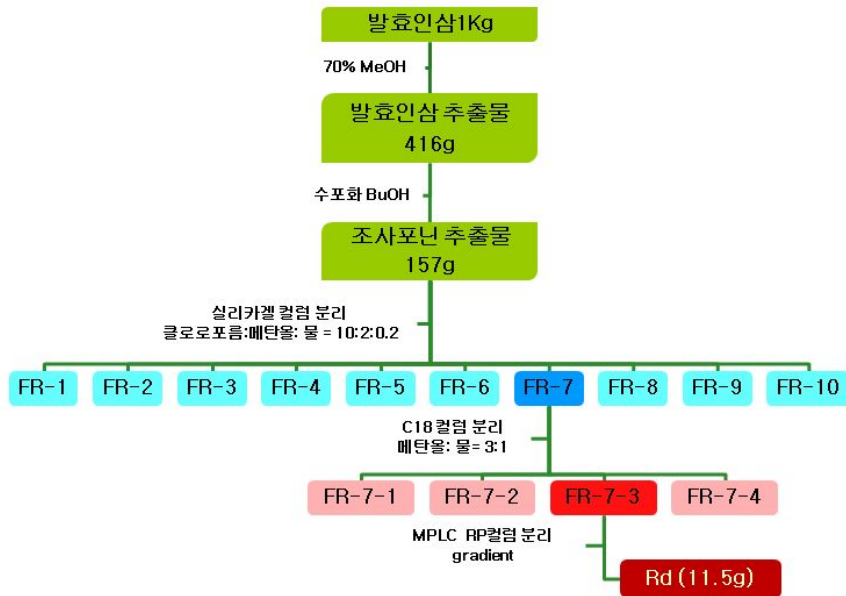


그림 50. 발효홍삼으로부터 Rd의 순수 분리

☞ 추출물의 TLC 분석

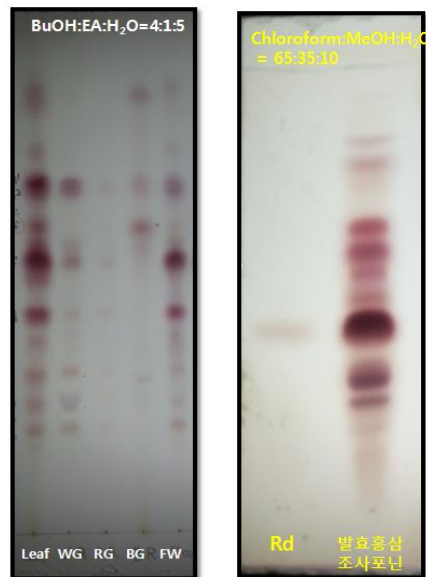


그림 51. 발효 홍삼 추출물 및 조사포닌 TLC Rd분석

☞ 추출물의 two-dimensional normal phase TLC 분석

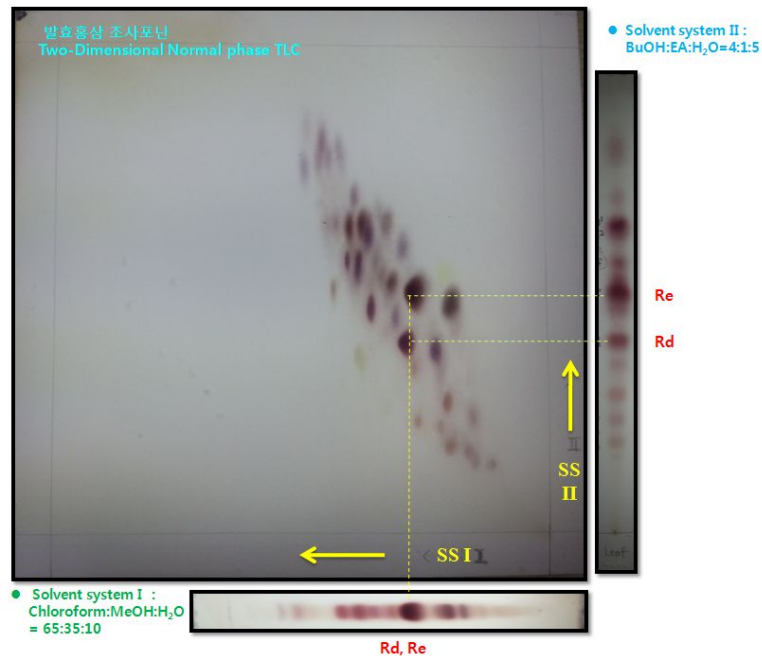


그림 52. 발효홍삼의 two-dimensional normal phase TLC Rd 분석

(2) Rg3 대량 분리

☞ 그림 53번은 (S)-Rg3 및 (R)-Rg3의 대량 분리 모식도임.

모식도와 같은 방법으로 발효인삼 100g 으로부터 (S)-Rg3 125mg, (R)-Rg3 268mg 을 각각 정제 분리하였음.

이의 HPLC 패턴은 205nm 파장에서 그림 57, 58과 같이 95% 이상의 순도를 보임.

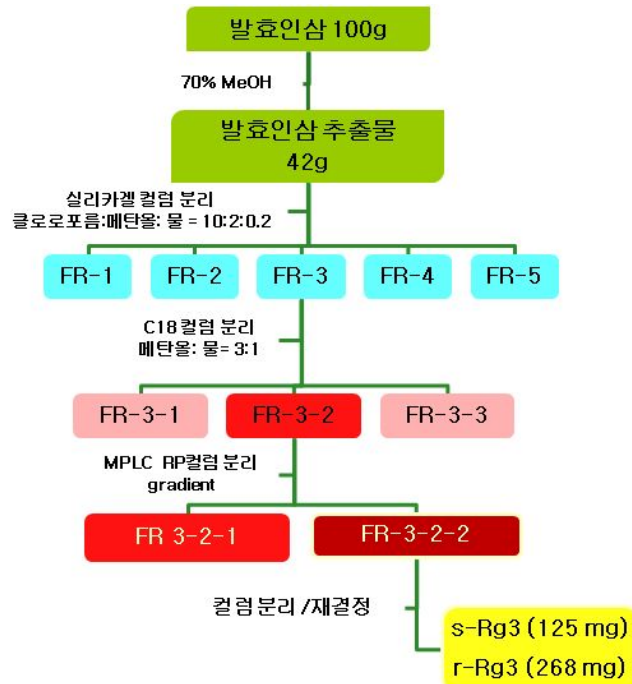


그림 53. 발효인삼으로부터 Rg3 (S)-form, (R)-form의 순수 분리

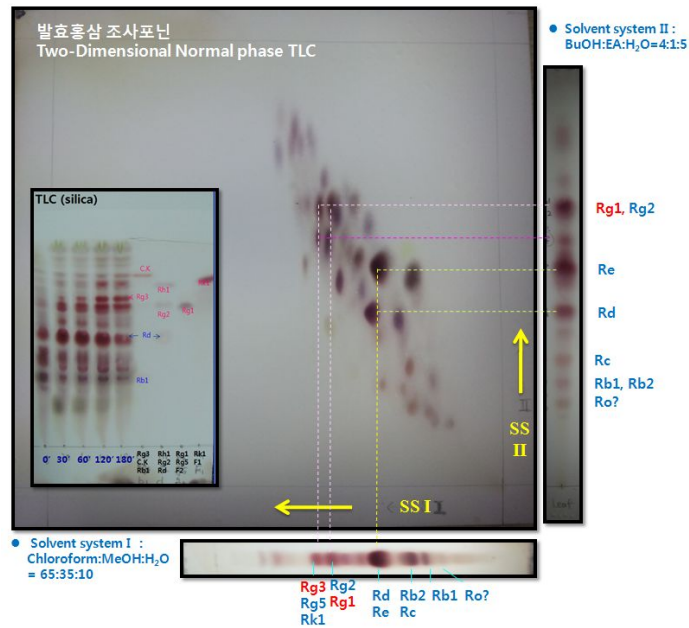


그림 54. 발효홍삼의 two-dimensional normal phase TLC Rg3 & Rg5 분석

### (3) Rg5 대량 분리

#### (가) 발효증숙인삼 조사포닌

그림 55에서와 같이 제조한 발효증숙인삼 1Kg을 5리터 round flask에 넣고 70%에탄올 3리터를 넣고 5시간씩 3회 추출하였음. 추출물을 여과한 후 여액을 감압농축하여 발효증숙인삼 에탄올 추출물 420g을 얻었음. 발효증숙인삼 추출물 400g을 2.5리터의 물에 현탁시킨 후 separatory funnel을 이용하여 두 번 2리터 diethylether로 비극성 물질을 제거하고 다시 물 층을 물 포화된 n-butanol 1.5리터씩 넣어 조사포닌을 4번 추출하여 감압농축기로 부탄올을 제거하여 발효증숙인삼 조사포닌 82.5g을 얻었음.

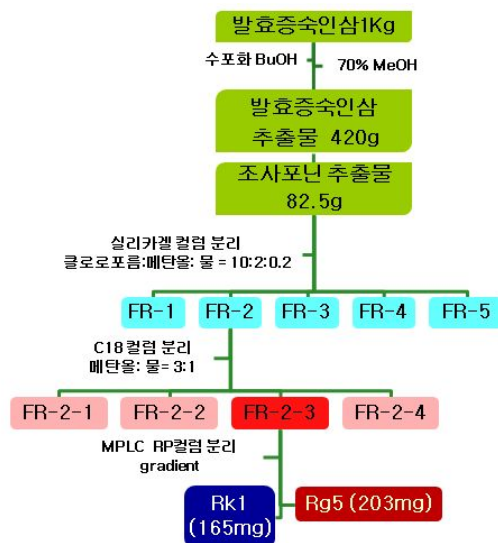


그림. 55. 발효증숙인삼의 사포닌 분리

#### (나) 발효증숙인삼 조사포닌의 분리

그림 55에서와 같이 상기에서 얻은 조사포닌을 실리카겔 및 C-18 역상 컬럼을 이용하여 발효증숙인삼에 존재하는 사포닌을 분리하였음. 즉, 발효인삼 조사포닌 82.5g을 CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=65:35:10의 하층액을 분리용매로 실리카겔을 이용하여 5개의 분획으로 나누었다(Frac 1-5). 다시 5개 분획들을 MPLC(18C column)를 이용하여 MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1로부터 MeOH:H<sub>2</sub>O=5:1까지 극성을 점점 낮춰 가면서 분리를 시도하여 Frac 1으로부터 1-1, 1-2, 1-3, 1-4와 같은 2개의 분획을, Frac 2로부터 2-1, 2-2와 같은 2개의 분획을, Frac 3으로부터 3-1과 3-2의 분획으로 각각 나누었음. 이것을 다시 Prep. HPLC를 이용하여 CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O의 조건하에 분리하여 최종 Rk1=165mg, Rg5=203mg, compound K =106mg을 각각 분리하였음.

#### ■ 발효인삼으로부터 대량분리한 진세노사이드의 분석 및 순도평가(NMR,HPLC)

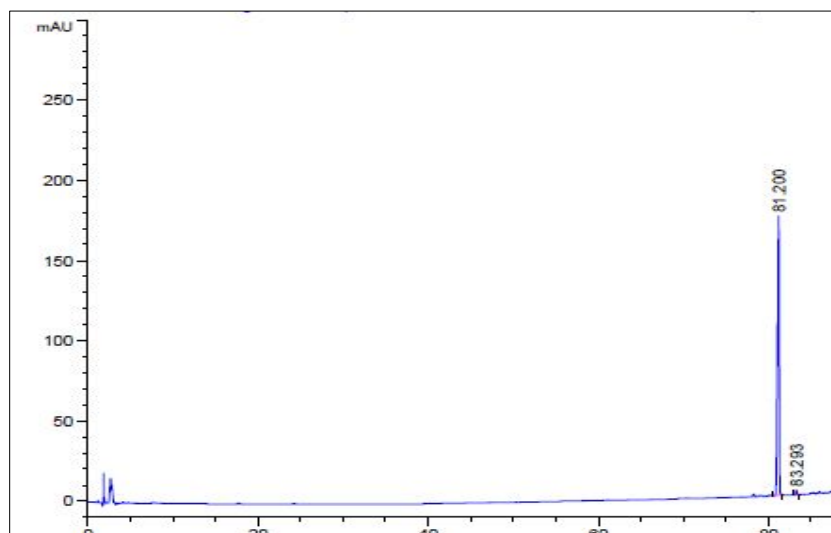
분리한 사포닌의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR(400Mz NMR spectrometer, Jeol, Akishima, Japan), PE-SCIEX LC/MS/MS mass spectrometer(API 2000, Japan), DIP-370 polarimeter(Jasco, Tokyo, Japan), and Nicolet 380 FT-IR spectrometer(Thermo, Madiso, USA) 등을 이용하여 기존의 논문에 보고된 데이터 및 표준품과 비교분석하여 사포닌의 구조를 결정하였음.<sup>1-3)</sup>

#### 가)Rd

Amorphous powder, C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>9</sub>, mp: 202.2-202.5°C, [α]<sub>D</sub>: +26.9 ° (MeOH, c= 0.5%, 20°C); IR Vmax (KBr,cm<sup>-1</sup>): 3390, 2928, 1650,1385, 1022

MS(*m/z*) 643 (M+Na)<sup>+</sup><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.86(3H, s, H-30), 1.02(1H, m, H-1a), 1.05(1H, s, H-19), 1.13 (1H, t, J =10.2Hz, H-15b), 1.29 (1H, m, H-16b), 1.23 (1H, s, H-18), 1.38 (3H, s, H-21), 1.43(1H, d, J=10.2Hz, H-5), 1.54 (1H, m, H-11b), 1.58(3H, s, H-9), 1.60(3H, s),3.23 (1H, dd, J= 11.76, 4.37 Hz, H-3), 3.89 (3H, H-12, 5',5"), 4.83 (1H, d, J= 7.53 Hz, H-1), 4.86 (1H, br. s, H-21), 5.13 (1H, br. s, H-21), 5.23(1H, br.t, J= 6.68 Hz, H-24), 5.33 (1H, d, J= 7.71 Hz, H-1"), 3.23 (1H, dd, J= 11.76, 4.37 Hz, H-3), 3.89 (3H, H-12, 5',5"), 4.83 (1H, d, J= 7.53 Hz, H-1), 4.86 (1H, br. s, H-21), 5.13 (1H, br. s, H-21), 5.23(1H, br.t, J= 6.68 Hz, H-24), 5.33 (1H, d, J= 7.71 Hz, H-1").

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO, ppm) δ 15.85, 16.35, 16.50, 16.98, 17.06, 18.07, 18.18, 25.74, 26.75, 27.08, 28.11, 30.77, 32.60, 32.67, 33.89, 35.36, 39.30, 39.72, 37.03, 40.21, 48.23, 50.86, 56.08, 61.32, 61.50, 63.25, 70.32, 70.46, 71.47, 75.74, 76.56, 76.86, 76.98, 77.31, 81.79, 88.63, 104.11,104.34, 123.84, 125.17, 130.83



Signal 1: VWD1 A, Wavelength=203 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	81.200	BV	0.2119	2391.47412	174.43776	98.4817
2	83.293	BB	0.1830	36.86933	3.11645	1.5183

그림 56. Rd 의 HPLC 분석 및 순도평가

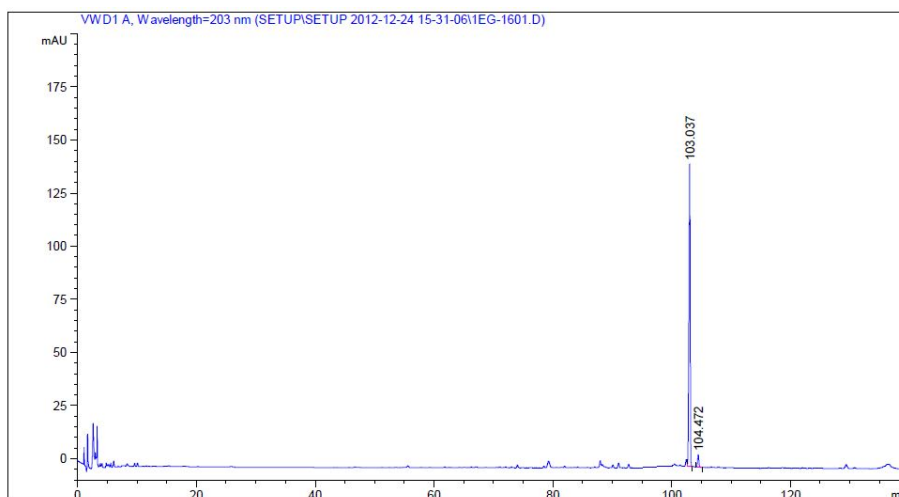
#### 나) Ginsenoside Rg3

##### ① (20S)-Ginsenoside Rg<sub>3</sub>

Amorphous solid. C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub> ; [α]<sub>D</sub> : +8.5° (MeOH, c=1.0%, 20°C), MS(*m/z*) 807.6 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.68 (1H, br. d, *J* =11.2Hz, H-5), 0.80 (3H, s, Me-19), 0.95 (3H, s, Me-30), 0.96 (3H, s, Me-18), 1.09 (3H, s, Me-29), 1.28 (3H, s, Me-28), 1.40 (1H, m, H-9), 1.42 (3H, s, Me-21), 1.62 (3H, s, Me-27), 1.65 (3H, s, Me-26), 2.01(1H, m, H-13), 2.35 (1H, m, H-17), 3.26 (1H, dd, *J* =4.3, 11.5 Hz, H-3), 3.89(1H, m, H-5'), 3.90 (1H, m, H-12), 3.91(1H, m, H-5"), 4.11 (1H, m, H-2"), 4.11 (1H, t, *J* =7.5 Hz, H-4'); 4.19 (1H, m, H-3'), 4.22 (1H, m, H-2'), 4.28 (1H, m, H-3"), 4.30 (1H, m, H-4"), 4.33 (1H, m, H<sub>b</sub>-6'), 4.43 (dd, *J* =3.7, 11.5Hz, H<sub>b</sub>-6"), 4.47 (dd, *J* =2.9, 11.5 Hz, H<sub>a</sub>-6"), 4.53 (1H, dd, *J* =2.6, 11.8Hz, H<sub>a</sub>-6'), 4.90 (1H, d, *J* =7.3 Hz, H-1), 5.31(1H, t, *J* =7.2Hz, H-24), 5.34 (1H, d, *J* =7.5 Hz, H-1")

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 15.9, 16.4, 16.7, 17.1, 17.8, 18.5, 23.1, 25.9, 26.8, 26.9, 28.2, 31.4, 32.1, 35.2, 35.9, 37.0, 39.2, 39.8, 40.0, 48.6, 50.4, 51.8, 54.9, 56.4, 62.8, 62.9, 71.1, 71.7, 73.1, 77.2, 78.0, 78.2, 78.4, 83.4, 89.0, 105.2, 106.1, 126.4, 130.8



Signal 1: VWD1 A, Wavelength=203 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	103.037	VB	0.2328	2134.34546	142.41470	95.9414
2	104.472	BB	0.2304	90.28957	6.07605	4.0586

그림 57. (S)-Rg3 의 HPLC 분석 및 순도평가

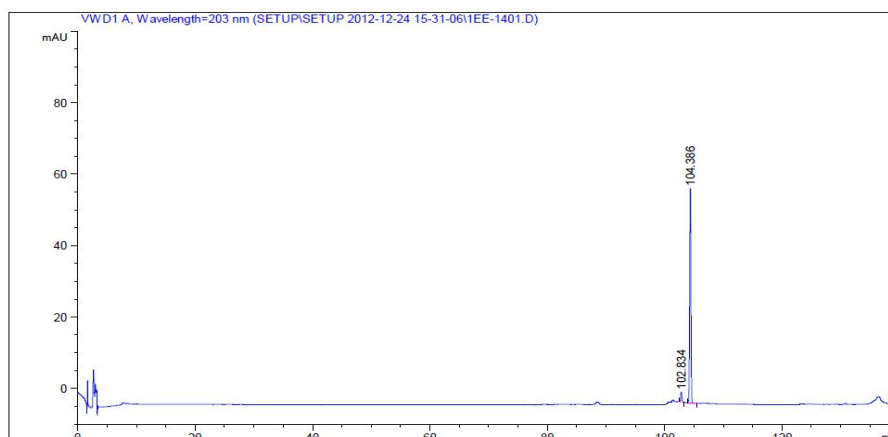
## ② (20R)-Ginsenoside Rg<sub>3</sub>

Amorphous solid. (C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>, 784.5), MS(*m/z*) 807.6 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.69 (1H, br. d, *J* =11.2Hz, H-5), 0.82 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, H-18), 1.11 (3H, s, H-29), 1.30 (3H, s, H-28), 1.40 (3H, s, H-21), 1.41 (1H, m, H-9), 1.66 (3H, s, H-27), 1.70 (3H, s, H-26), 2.01 (1H, m, H-13), 2.40 (1H, dd, *J* =6.9, 10.2Hz, H-17), 3.29 (1H, dd, *J* =4.2, 11.6Hz, H-3), 3.89 (1H, m, H-5), 3.91(1H, m, H-12), 3.93 (1H, m, H-5), 4.12 (1H, t, *J* =7.5, H-2), 4.14 (1H, t, *J* =7.5Hz, H-4), 4.20 (1H, m, H-3), 4.22 (1H, m, H-2), 4.28 (1H, m, H-3), 4.31(1H, m, H-4); 4.33 (1H, m, H<sub>b</sub>-6), 4.45 (1H, dd, *J* =4.2, 11.6Hz, H<sub>b</sub>-6), 4.49 (1H, dd, *J* =3.3, 11.6Hz, H<sub>a</sub>-6), 4.55 (1H, dd, *J* =2.5, 11.6Hz, H<sub>a</sub>-6), 4.92 (1H, d, *J* =7.5Hz, H-1), 5.23 (1H, t, *J* =7.2Hz, H-24), 5.37 (1H, d, *J* =7.7Hz, H-1)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 15.9, 16.4, 16.7, 17.4, 17.8, 18.5, 22.7, 22.8, 25.9, 26.7, 26.8, 28.2, 31.5, 32.2, 35.2, 37.0, 39.2, 39.8, 40.1, 43.3, 49.3, 50.4, 50.7, 51.8, 56.4, 62.7, 62.9, 71.9, 71.7, 73.1, 77.2, 78.0, 78.2, 78.3, 78.4, 83.4, 89.0, 105.2, 106.1, 126.1, 130.9





Signal 1: VWD1 A, Wavelength=203 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	102.834	BB	0.2364	42.51196	2.77966	4.4526
2	104.386	BB	0.2363	912.26172	60.04013	95.5474

그림 58. (R)-Rg3 의 HPLC 분석 및 순도평가

#### 다) Ginsenoside Rg5

Amorphous solid. (C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>, 766.49); m.p; 188-192.C, [α]<sub>D</sub>: +4.70 (c=1.2, MeOH),

IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3460, 3124, 2985, 1646 cm<sup>-1</sup>; MS(m/z) 789 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.81 (3H, s, H-29), 0.95 (3H, s, H-30), 1.01 (3H, s, H-19), 1.09 (3H, s, H-18), 1.27 (3H, s, H-28), 1.58 (3H, s, H-27), 1.62 (3H, s, H-26), 1.81 (3H, s, H-21), 2.77 (2H, dd, J =7.0, 6.9 Hz, H-23), 3.26 (1H, dd, J = 4.0, 11.6 Hz, H-3), 3.90 (1H, br. s, H-12), 4.10 (1H, dd-like, H-2.), 4.21 (1H, dd-like, H-2.), 4.90 (1H, d, J =7.4 Hz, H-1.), 5.21 (1H, t, J =6.9 Hz, H-24), 5.33(1H, t, J =7.6 Hz, H-1), 5.49 (1H, t, J =7.0 Hz, H-22)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 13.07, 15.72, 16.35, 16.49, 16.92, 17.66, 18.33, 25.60, 26.64, 27.35, 28.00, 28.73, 32.10, 35.24, 32.54, 39.60, 36.91, 39.17, 40.14, 50.33, 50.66, 50.80, 50.91, 56.29, 62.58, 62.73, 71.50, 71.53, 72.49, 77.00, 77.82, 77.98, 78.13, 78.21, 83.31, 88.182, 105.00, 105.91, 123.21, 123.54, 131.16, 140.06

#### ■ 발효홍삼내미량진세노사이드4종분리 및 분석결과

##### 가)Ginsenoside Rk1

Amorphous powder, C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>12</sub>, mp: 178-181°C, [α]<sub>D</sub>: +11.0 ° (MeOH, c= 0.2%, 20°C); IR Vmax (KBr,cm<sup>-1</sup>): 3400, 2944, 1655, 1457, 1389, 1078.

MS(m/z) 789 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.62 (1H, d, J= 11.47 Hz, H-5), 0.72 (3H, s, Me-19), 0.91 (3H, s, Me-30), 1.95 (3H, s, Me-18), 1.02 (3H, s, Me-29), 1.31 (3H, s, Me-28), 1.49 (3H, s, Me-27), 1.61(3H, s, Me-26), 2.77 (1H, m, H-17), 3.23 (1H, dd, J= 11.76, 4.37 Hz,

H-3), 3.89 (3H, H-12, 5',5''), 4.83 (1H, d,  $J=7.53$  Hz, H-1), 4.86 (1H, br. s, H-21), 5.13 (1H, br. s, H-21), 5.23(1H, br.t,  $J=6.68$  Hz, H-24), 5.33 (1H, d,  $J=7.71$  Hz, H-1'').

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , ppm)  $\delta$  15.80, 16.45, 16.58, 16.98, 17.74, 18.45, 25.74, 26.75, 27.08, 28.11, 30.77, 32.60, 32.67, 33.89, 35.36, 39.30, 39.72, 37.03, 40.21, 48.23, 50.86, 51.21, 52.49, 56.43, 62.76, 62.87, 71.65, 71.72, 72.47, 77.08, 77.96, 78.06, 78.19, 78.34, 83.45, 88.95, 105.09, 106.01, 108.15, 125.33, 131.21, 155.55

#### 4) Compound K:

amorphous powder,  $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$ , mp 162-164°C;  $[\alpha]_{\text{D}} = +43.1$  ( $c=0.248$ , MeOH),  $\text{MS}(m/z) = 645$  (M+Na)<sup>+</sup>,

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , ppm)  $\delta$  5.22 (1H, t,  $J=7.1$ Hz, H-24), 5.17 (1H, d,  $J=7.8$ Hz, H-31), 3.93 (1H, ddd-like, H-12-OH), 3.4 (1H, dd,  $J=10.5, 5.1$ Hz, H-3-OH), 1.62 (3H, s, H-21), 1.57 (6H, s, H-26, 27), 1.22 (3H, s, H-28), 1.03 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-30), 0.93 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, s, H-19), 0.79 (1H, d,  $J=11.0$ Hz, H-5);

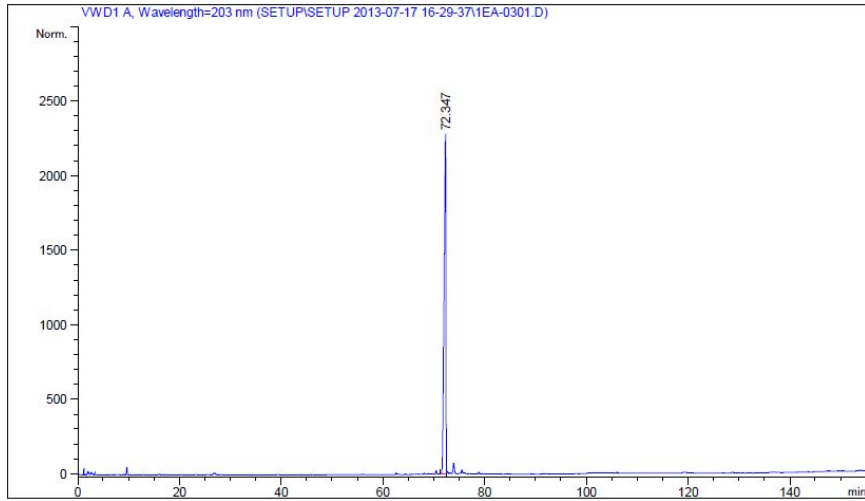
$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , ppm)  $\delta$  16.7, 17.1, 18.1, 18.5, 19.5, 23.0, 23.9, 26.4, 27.3, 28.9, 29.3, 31.4, 31.6, 35.7, 36.7, 37.9, 39.9, 40.1, 40.6, 50.0, 50.8, 51.9, 52.0, 56.8, 63.3, 70.5, 72.0, 75.4, 78.3, 78.6, 79.6, 83.5, 98.4, 125.9, 130.8

#### 4) (20R)-Ginsenoside Rh<sub>1</sub>

amorphous powder,  $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$ , mp : 155-157°C,  $[\alpha]_{\text{D}} : +26.9^\circ$  (MeOH,  $c=0.5\%$ , 20°C), IR  $\text{Vmax}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3390, 2928, 1650, 1385, 1022.  $\text{MS}(m/z)$  643 (M+Na)<sup>+</sup>

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , ppm)  $\delta$  0.86 (3H, s, H-30), 1.02(1H, m, H-1a), 1.05(1H, s, H-19), 1.13(1H, t,  $J=10.2$  Hz, H-15b), 1.29(1H, m, H-16b), 1.23(1H, s, H-18), 1.38 (3H, s, H-21), 1.43(1H, d,  $J=10.2$  Hz, H-5), 1.54(1H, m, H-11b), 1.58(3H, s, H-9), 1.60 (3H, s), 1.63 (3H, s, H-27), 1.64 (1H, m, H-15a), 1.67 (1H, m, H-22b), 1.69 (3H, s, H-27) 1.70(1H, m, H-1b), 1.72 (1H, m, H-22a), 1.81(1H, m, H-2b), 1.92 (1H, m, H-16a), 1.93(1H, br d,  $J=11.5$ , H-2a) 1.94(1H, s, H-7a), 2.01(1H, t,  $J=10.4$  Hz, H-13), 2.06(3H, s, H-28), 2.15 (1H, dd,  $J=5.1, 11.5$  Hz, H-11a), 2.33(1H, m, H-17), 2.42 (1H, dd,  $J=6.6, 12.6$  Hz, H-23b), 2.49 (1H, m, H-23a), 2.53(1H, dd,  $J=2.5, 12.9$  Hz, H-7b), 3.52 (1H, br d,  $J=9.3$  Hz, H-3), 3.91(1H, dd,  $J=5.2, 11.5$  Hz, H-12), 3.95(1H, s, H-5'), 4.08 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2'), 4.20 (1H, t,  $J=9.1$  Hz, H-4'), 4.25((1H, t,  $J=8.5$  Hz, H-3'), 4.35(1H, dd,  $J=4.8, 11.5$  Hz, H-6' b), 4.44 (1H, t,  $J=10.7$  Hz, H-6), 4.52 (1H, br d,  $J=11.5$  Hz, H-6' a), 5.03(1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-1'), 5.30(1H, t,  $J=6.9$  Hz, H-24)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , ppm)  $\delta$  16.5, 17.2, 17.5, 17.8, 17.8, 22.7, 22.8, 25.9, 26.7, 28.0, 31.4, 31.8, 32.3, 39.5, 39.8, 40.4, 41.2, 43.3, 45.3, 49.0, 50.7, 50.3, 51.4, 61.5, 63.2, 71.0, 71.9, 73.1, 75.5, 78.2, 78.7, 79.7, 80.1, 106.1, 126.1, 130.9



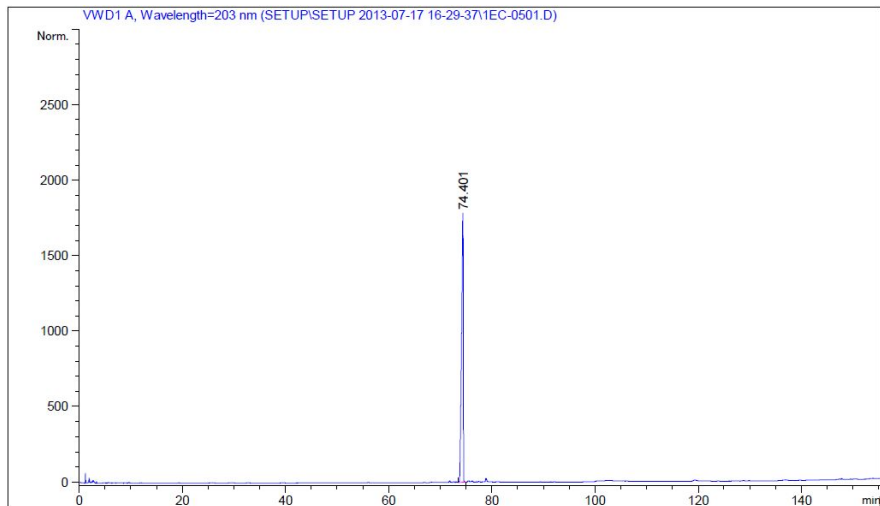
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=203 nm

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	72.347	1	BV	5.90069e4	2280.73755	100.0000

그림 59. Rh1 의 HPLC 분석 및 순도평가

라) (20S)-Ginsenoside Rh<sub>1</sub>

amorphous powder, C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>9</sub>, mp : 155-157°C, [α]<sub>D</sub> : -26.8° (MeOH, c=0.5%, 20°C), IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3390, 2928, 1650, 1385, 1022. MS(m/z) 643 (M+Na)<sup>+</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR 데이터는 R 이성체와 동일함.)



Signal 1: VWD1 A, Wavelength=203 nm

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	74.401	1	BB	4.15720e4	1783.66150	100.0000

그림 60. Rh1 의 HPLC 분석 및 순도평가

### 3. 발효인삼의 벤조피렌 발암성 검사

벤조피렌은 Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)으로 동물성이나 식물성 성분의 불완전 연소에 의해 생기는 환경 오염 물질로서 국제 암 연구소(IARC)에서 발암물질 그룹 1 로 분류되고 있음. 현재 우리나라에서는 올리브유, 옥수수 기름 등 식용 유지에 대해서만 2 ppb 이하로 기준을 정하여 관리하고 있는 상태로서 발효 및 열처리를 통해 얻어지는 발효증숙인삼에 대한 기준은 정해져 있지 않은 실정임. 그러나 최근 흑삼에서 발암물질인 벤조피렌의 함량이 기준치 이상으로 검출되어 사회적인 이슈가 되고 있어 이에 대한 기준과 검체 특성에 따른 벤조피렌의 추출방법 등에 대한 검토가 필요할 것으로 사료되어짐.

따라서 본 연구에서는 발효인삼 및 발효 증숙 인삼에서의 식약청 고시 기준에 의한 추출방법을 이용하여 벤조피렌 함량을 검토하여 벤조피렌이 검출되지 않는 우수한 품질의 발효인삼 및 발효증숙인삼 제조방법을 제시하고자 하였음.

#### 가. 시약 및 기기

시약으로는 벤조피렌(Sigma Chem., U.S.A), N,N-Dimethylformamide(이하 DMF로 약함, Samchen, Korea), 황산나트륨.10수화물, 무수황산나트륨, HPLC용 아세토니트릴과 3차 증류수를 사용하였음. 기기로는 Machanical Stirrer(MS-280, Korea), 감압 농축기(Laborata 410, Heidolph, Germany), 원심분리기(Micro 12, Hanil Sci. Inc., Korea) HPLC(Waters millenium system)를, Column은 AtlantisTMD C<sub>18</sub>(4.6\*250mm, 5 $\mu$ m, Waters, U.S.A.)을 Detector는 Fluorescence Detector를 선택해 사용하였음.

#### 나. 분석기기 조건

사용한 HPLC는 Waters alliance system을 사용 하였고, 여기 파장 294nm, 형광 파장 404nm, 컬럼 온도는 30 $^{\circ}$ C, 이동상으로는 아세토니트릴 : 3차 증류수(80:20), 유속은 1.0 ml/min에서 정량하였음.

#### 다. 직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

벤조피렌 표준품 50mg을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 정확히 50 ml로 하여 표준원액으로 한 다음 이를 희석하여 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5 및 125 ng/ml의 농도별 표준액을 제조하여 분석 조건에 의한 피크 면적을 구하여 검량선을 작성하였음. 작성된 검량선으로부터 직선식의 상관 계수 (기준: R<sup>2</sup>=0.99 이상)를 구하여 직선성을 검토 하였고, 3번 반복 실험하여 평가 하였음. 검량선의 직선성 범위가 좋은 부분을 이용하여 다음과 같은 식을 이용하여 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)를 산출하였음.

$$\text{검출한계} = 3.3 \times \sigma/S \quad (S/N=3)$$

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma/S \quad (S/N=10)$$

이 때  $\sigma$ 는 절편의 평균표준편차이며 s는 기울기의 평균을 의미함.

#### 라. 특이성

시료 추출액과 시료 추출액에 기지 농도의 표준품을 각각 spiking하여 정량적으로 늘어나는지의 여부를 검토하였음. 따로 시료에서 벤조피렌을 추출하기 위하여 사용되어진 방법에 얻어진 헥산층이 벤조피렌의 피크에 영향을 미치는지를 검토하기 위하여 상층과 하층을 모두 처리

하여 HPLC로 주입하여 분석하여 크로마토그램을 얻었음. 즉 헥산 100 ml을 분액여두에 넣고 물:DMF 혼합액(1:9) 50ml를 넣어 균일하게 흔들어 섞어줌.. DMF와 헥산을 분리한 후, 헥산층에 물:DMF 혼합액(1:9) 25ml를 넣고 흔들어 섞어준 다음 분리된 헥산과 DMF층을 분리한다. 이를 2회 실시함. 헥산층을 증류수로 3회 세척하여 헥산 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40 °C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1ml에 용해하고 0.45 $\mu$ m 막 여과하여 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였음(상층). 따로 100 ml의 DMF층에 1회 실시함. 용액 100 ml를 넣고 충분히 섞은 후, 헥산 50 ml를 넣고 추출하고, 다시 헥산 35 ml를 넣고 2회 더 추출함. 헥산 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40 °C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1ml에 용해하고 0.45 $\mu$ m 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였음(하층).

#### 마. 추출 효율

벤조피렌 표준액 0.25  $\mu$ g/ml을 헥산 100 ml에 넣어 충분히 섞어 준다. 헥산층에 물:DMF 혼합액(1:9)을 50 ml 넣어 균일하게 흔들어 섞어준 다음 DMF와 헥산을 분리시켰다. 다시 헥산층에 DMF혼액 25 ml을 넣어 추출하였음. 이 조작을 2회 반복하여 총 DMF가 100 ml이 되게 하였음.

분리된 물:DMF 혼합액(1:9)층에 1% 황산나트륨 100 ml을 넣고 충분히 섞은 후, 헥산 50 ml를 넣고 추출하고 다시 헥산 35 ml를 넣고 2회 더 추출하였음. 헥산 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40 °C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였음. 따로 벤조피렌 표준액 0.25  $\mu$ g/ml을 HPLC에 주입하여 분석하여 얻어진 면적값을 사용하여 다음과 같은 식으로 추출효율을 계산하였음.

$$\text{추출효율 (\%)} = \frac{\text{추출후면적}}{\text{벤조피렌표준액의면적}} \times 100$$

#### 바. 벤조피렌의 함량 분석

증숙조건에 따른 인삼지상부에 존재하는 벤조피렌의 함량변화를 관찰하기 위하여 0, 60, 120, 180, 240 및 300분 동안 증숙한 인삼지상부를 각각 10g을 취하여 다음과 같은 추출방법으로 3번 추출하여 HPLC에 주입하여 분석하였음. 시료 10g을 칭량하여 헥산 100 ml을 넣어 섞어준 다음, 물:DMF 혼합액(1:9) 50 ml를 넣어 균일하게 흔들어 섞어준 다음 DMF와 헥산을 분리시킴. 다시 헥산층에 DMF혼합액 25 ml을 넣어 추출하였음. 이 조작을 2회 반복하여 총 DMF가 100 ml가 되도록 함. 분리된 DMF 혼액층에 1% 황산나트륨 용액 100 ml을 넣고 충분히 섞은 후, 헥산 50 ml를 넣고 추출하고 다시 헥산 35 ml를 넣고 2회 더 추출하였음. 헥산 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40 °C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 0.45  $\mu$ m 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였음. 벤조피렌을 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5 및 125 ng/ml의 농도로 제조하여 HPLC로 분석하였을 때 얻은 피크 면적을 Y축으로 표준액 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하여 나타내었음.(그림 61) 이 때 얻어진 검량선식으로부터 상관계수는 0.999이상으로 양호한 직선성을 나타내었음. 가장 직선성이 좋은 부분을 이용하여 검출한계와 정량한계를 구한 결과 각각 2.7과 8.2 ng/ml이었음.

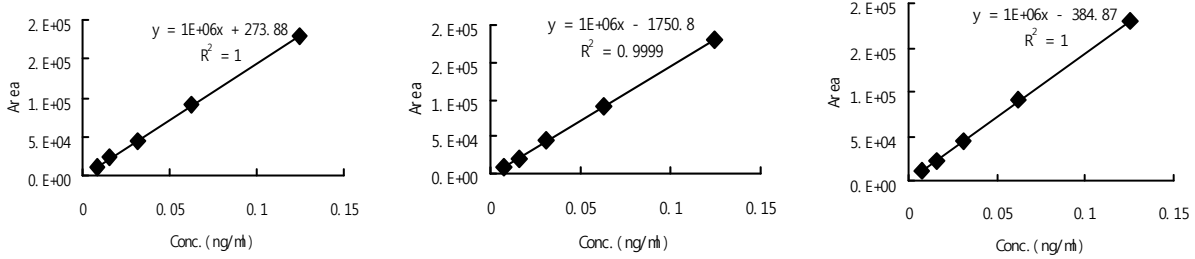


그림 61. 벤조피렌 검량선 작성

특이성은 시료 내 다른 물질의 공존 시 해당 분석물질을 분리하고 정량하는 분석 능력을 나타낸다. 벤조피렌 표준액(5 µg/ml), 시료 추출액, 벤조피렌 표준액으로 spiking한 시료 추출액의 벤조피렌의 머무름 시간은 10.881분으로 시료 추출액의 다른 성분들과 명확하게 분리되었음. 시료 추출액에 기저 농도의 표준품을 spiking하여 얻어진 면적은 시료 추출액의 면적과 표준품의 면적을 더한 값과 같으므로 다른 물질과의 간섭이 없이 분석할 수 있는 방법임을 확인할 수 있었음. 또한 공시험에서 상층과 하층을 각각 위의 분석조건으로 분석한 결과 상층에서 10.942분의 유지시간을 가지는 미지의 피크가 나타났는데 이는 정제과정을 충분히 거치지 않아 잔류하는 DMF로 인한 피크로 사료되어짐. 그러나 하층에서는 벤조피렌의 피크에 영향을 주는 아무런 피크가 나타나지 않으므로 기술된 추출 단계를 거쳐 추출되어지는 방법에 의해 얻어지는 추출액을 가지고 분석할 때 이러한 분석방법은 다른 피크와 분리되어 벤조피렌을 분석할 수 있을 것으로 사료되어짐.

벤조피렌 표준액 0.25ppm의 면적과 추출 과정을 거친 벤조피렌의 면적값을 이용하여 추출 효율을 검토한 결과 약 97%이었음. 일반적으로 재현성 있고 정확한 추출과정은 95% 이상의 추출효율을 기대하므로 이 방법은 신뢰할 수 있는 추출방법이라고 할 수 있었음.

따라서 발효인삼과 발효인삼의 증숙시간에 따른 벤조피렌의 함량을 분석하여 표 4와 5에 나타내었음. 실험결과 발효인삼 및 발효증숙인삼에서 발암성물질인 벤조피렌이 전혀 검출되지 않았음. 따라서 이러한 조건에서 발효한 인삼 및 발효증숙인삼을 이용한 제품개발에는 전혀 문제가 없을 것으로 판단됨.

표 4. 발효균주에 따른 발효인삼의 벤조피렌 함량

발효균주	발효인삼	Benzopyrene Conc. (µg/kg)
A3	SN-1	0
A5	SN-2	0
A6	SN-3	0
B9	SN-4	0
2-2	SN-5	0

표 5. SN-5의 증숙시간에 따른 벤조피렌 함량

Treatment time (hr)	Benzopyrene Conc. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30	0
60	0
90	0

표 6. 발효균주에 따른 발효인삼꽃봉오리의 벤조피렌 함량

발효균주	발효인삼	Benzopyrene Conc. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
S-16	SN-6	0
S-18	SN-7	0
S-A4	SN-8	0
S-A5	SN-9	0

표 7. SN-6의 증숙시간에 따른 벤조피렌 함량

Treatment time (hr)	Benzopyrene Conc. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
30	0
60	0
90	0

#### 4. 잔류농약검사

- 금산국제인삼약초연구소에 발효 홍삼을 비롯한 샘플 3종을 잔류농약 시험에 의뢰함.
- 시험 샘플 - 잔류농약에 많을 것을 판단한 인삼잎, 인삼 꽃봉오리 그리고 잎을 이용한 발효 홍삼 3종을 택하여 시험의뢰 함.
- 검사 항목 - 표8에서 보는 바와 같이 잔류농약 57종 검사 실시

표 8. 잔류농약검사항목

시험항목
<b>잔류농약 (57종)</b> Acetamiprid, Aldrin, Amisulbrom, Azoxytobin, Bifenthrin, BHC, Boscalid, Buprofezin, Carbendazim, Carbofuran, Cadusafos, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Clothianidin, Cyazofamid, Cyfluthrin, Cyhalothrin, Cymoxanil, Cypermethrin, DDT, Diethofencarb, Difenoconazole, Dimethomorph, Dinotefuran, Endrin, Ethaboxam, Fenhexamid, Fluazinam, Fludioxonil, Fluopicolide, Fluquinconazole, Flusilazole, Flutolanil, Hexaconazole, Kresoxim-methyl, Mandipropamid, Metalaxyl, Metconazole, Methoxyfenozide, Pencycuron, Prochloraz, Propamocarb, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Quintozene, Sethoxydim, Simeconazole, Tebupirimfos, Tefluthrin, Thioclopid, Thiamethoxam, Thifluzamide, Tolclofos-methyl, Tolyfluanid, Trifloxystrobin, Triflumizole

■ 잔류농약 검사 결과 (표 9)

인삼 꽃봉오리에서는 5.58 mg/kg의 Thifluzamid의 검출을 제외하고는 인삼잎과 인삼잎을 이용한 발효 홍삼에서는 불검출 되었음.

표9. 잔류농약검사결과

시료명	검출항목	결 과	비 고
GL-1	NA	-	-
GF-1	Thifluzamid	5.58 mg/kg	-
GLNS-1	NA	-	-

GL-1: 인삼잎; GF-1: 인삼꽃봉오리; GLNS-1: 발효인삼잎

- 결과 원인 : 인삼잎이나 꽃봉오리에는 잔류 농약 농도가 많이 존재할거라는 예상과 달리 시험결과 인삼잎에서는 발효 전후 모두에서 검출이 되지 않음. 본 연구실에선 이 금산지역에서 인삼잎과 꽃봉오리를 채집 후 초음파세척기를 통하여 철저히 세척한 후 건조한 뒤 1년 동안 보관하였음. 이 인삼잎과 꽃봉오리를 보관하는 동안 샘플에 남아있던 잔류 농약이 자체 분해되어 검출되지 않은 듯함. 또한 잔류농약이 검출된 꽃봉오리 GF-1 샘플은 시료의 특성으로 보아 잎 표면에 존재하는 잔류농약보다 꽃봉오리 사이사이 박혀 있는 셋기지 않은 것들이 남아 있어 이런 결과가 나온 것으로 판단됨.



## 시험성적서 (잔류농약)


<b>(재)금산국제인삼약초연구소</b>		성적서번호: GHB20130711-071 페이지(1)/(총1)	
충남 금산군 금산읍 신대리 678-7 Tel : 041-750-1634 Fax : 041-750-1619			
<b>1. 의뢰자</b> ○ 기관명 : 충남대학교 산학협력단 ○ 주소 : 대전광역시 유성구 공동 220번지 ○ 의뢰일자 : 2013년 7월 11일			
<b>2. 시험성적서의 용도</b> : 참고용			
<b>3. 시험대상품목 또는 물질, 시료명</b> : 인삼잎 3점 (GL-1, GF-1, GLNS-1)			
<b>4. 시험기간</b> : 2013.7.11. ~ 2013.7.25.			
<b>5. 시험방법</b> : 국립농산물품질관리원 고시 제2012-14호에 준함			
<b>6. 시험환경</b> 온도 : (24±2) °C , 습도 : (55±4) % R.H.			
<b>7. 시험결과</b>			
<b>시험항목</b>			
잔류농약 (57종) Acetamiprid, Aldrin, Amisulbrom, Azoxystrobin, Bifenthrin, BHC, Boscalid, Buprofezin, Carbofuran, Cadusafos, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Clothianidin, Cyazofamid, Cyfluthrin, Cyhalothrin, Cymoxanil, Cypermethrin, DDT, Diethofencarb, Difenoconazole, Dimethomorph, Dinotefuran, Endrin, Ethaboxam, Fenhexamid, Fluazinam, Fludioxonil, Flupicolid, Fluquinconazole, Flusilazole, Flutolanil, Hexaconazole, Kresoxim-methyl, Mandipropamid, Metalaxyl, Metconazole, Methoxyfenozide, Pencycuron, Prochloraz, Propamocarb, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Quintozene, Sethoxydim, Simeconazole, Tebupirimfos, Tefluthrin, Thiacloprid, Thiamethoxam, Thifluzamide, Tolclofos-methyl, Tolyfluanid, Trifloxystrobin, Triflumizole			
시료명	검출항목	결과	비고
GL-1	NA	-	-
GF-1	Thifluzamid	5.58 mg/kg	-
GLNS-1	NA	-	-
이 성적서 위의 내용은 시험의뢰인에 의해 제공된 시료에 한하며, 용도이외의 사용을 금합니다.			
확 인	작성자	승인자	
	연구원	분석지원팀장	
	박영순	유대석	
2013.07.25			
(재)금산국제인삼약초연구소장 (인)			

그림 61. 잔류농약시험성적서

### 5. 발효인삼의 항산화활성 측정

발효인삼의 항산화 활성을 위하여 폴리페놀의 정량, DPPH 라디칼 소거능 측정, 아질산염 소거작용, superoxide anion 소거능 측정, hydrogen peroxide 소거능 측정 등의 방법을 사용함.

#### 가. 발효인삼 및 발효중숙인삼의 활성

산소는 호흡을 통해 체내로 들어와 혈관을 타고 운반되며, 음식물 소화를 비롯한 대사에 관여하는 과정에서 불안정한 상태로 변하는데, 이런 산소를 활성산소라 함. 일반적으로 호흡으로 들어마신 산소의 약 1-2%가 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의해서 활성산소로 변하며, 일부는 몸 속에서 저절로 없어지거나 각종 감염을 막는 면역기능도 하지만, 과잉 생산된 활성산소가 문제임. 이러한 과잉의 활성산소는 정상 세포막과 세포를 손상시키며, 피부를 구성하는 콜라겐을 산화시켜 노화를 촉진하고, DNA를 손상시켜 암을 유발하는가 하면 세포막의 불포화지방산을 산화작용을 통해 이물질로 바꿔 동맥경화, 뇌졸중 등 여러 가지 질병을 야기한다고 알려져 있음.<sup>4-6)</sup>

생체에서 발생하는 활성산소와 관련된 대표적인 산화성물질은 산소에서 유래된 singlet oxygen, superoxide radical, 과산화수소(hydrogen peroxide), hydroxyl radical, peroxy radical, alkoxy radical과 질소에서 유래된 nitric oxide와 peroxyxynitrite 그리고 myeloperoxidase에서 생성되는 hypochlorous acid 등이 있음<sup>7-9)</sup>. 이들 산화성물질 중에서 superoxide radical과 nitric oxide는 반응성이 낮아 생체의 거대분자를 산화시키는 능력은 낮으나 두 물질이 반응하여 생성되는 peroxyxynitrite는 매우 반응성이 강하여 세포에 독성을 유발한다<sup>7)</sup>. 과산화수소는 반응성이 낮아 mM 농도에서 독성을 유발하나 세포막을 투과할 수 있으며 최근 신호전달물질로 작용하는 것으로 제안되고 있음. Hydroxyl radical의 공격에 의해 산화된 carbon-centered radical이 산소와 반응하여 생성되는 peroxy radical은 반응성이 강하며 hydroxyl radical에 비하여 긴 반감기를 가짐. 일반적으로 항산화 활성을 평가하는 방법은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay가 대표적임<sup>10)</sup>. DPPH assay 방법은 가장 광범위하게 사용되며 high-throughput system에 적용될 수 있어 시간과 경비를 절약할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 DPPH assay를 포함하여 여러 가지 방법을 사용하여 발효인삼의 항산화 활성을 측정하고자 하였음.

### (1) 총 폴리페놀의 정량

총 폴리페놀 화합물은 Folin-Denis 방법<sup>11)</sup>으로 측정하였으며, 시료 (10%) 1 ml에 95% 에탄올 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 1N Folin-ciocalteu reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어 주고, 5분간 방치한 후, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 ml를 가한 후, 725 nm에서 1시간 이내에 흡광도를 측정하여 gallic acid를 이용하여 미리 작성된 검량선으로부터 양을 환산하였음. 이 때 검량선은 탄닌산 표준품 10 mg을 에탄올 5 ml에 용해시켜 표준원액을 제조한 다음 적당히 희석하여 작성하였음. 식물체에 함유되어 있는 페놀성 화합물은 콜레스테롤 저하작용, 정작작용 항암 및 항산화작용 등의 다양한 항산화 생리활성을 나타내는 물질임.<sup>12,13)</sup> 폴리페놀은 항산화작용과 관련하여 최근 생체 내에서의 산소 free radical 반응이 생체조직의 노화나 질병과 관련이 있으며 페놀성물질의 hydroxyl group이 주요한 역할을 한다고 알려져 있음.

실험결과 발효균주에 따른 발효인삼의 폴리페놀 함량은 75-81 mg/g 수준으로 거의 동등한 것으로 나타났음. 또한 SN-5의 증숙시간에 따른 총 폴리페놀 함량에는 거의 변화가 없음을 알 수 있었음.(표 10, 11)

표 10. 발효인삼에 존재하는 총 폴리페놀 함량

발효균주	발효인삼	총 폴리페놀(mg/g)
A3	SN-1	77±1.2
A5	SN-2	81±2.8
A6	SN-3	75±2.9
B9	SN-4	79±3.0
22	SN-5	80±2.5

표 11. SN-5의 증숙시간에 따른 총 폴리페놀 함량

증숙시간	총 폴리페놀(mg/g)
30	79±0.9
60	80±1.4
90	80±1.1

실험결과는 표 12, 13에 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC<sub>50</sub> 값은 65.43±1.95 µg/ml으로 가장 강력한 라디칼 억제활성을 나타내었음. 양성 대조군으로 사용한 BHA 보다는 약한활성을 나타냈지만, 발효인삼 SN-6, SN-7, SN-8 및 SN-9의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 102.56±5.93, 95.84±8.34, 90.43±7.43, 78.01±5.99으로 비교적 강한 DPPH 라디칼 억제활성을 나타내었음.

한편, SN-6를 120℃에 30분, 60분, 90분 증숙한 발효인삼의 라디칼 억제활성은(IC<sub>50</sub>) 각각 95.39±3.94, 84.06±4.05, 69.45±5.96µg/ml로써 90분을 증숙 하였을 경우 양성대조군으로 사용한 BHA에 비해서 강력한 라디칼 억제활성을 나타내었음. 이러한 결과는 Kang등<sup>12)</sup>에 따르면 ginsenoside Rg3가 항산화활성을 나타낸다는 실험결과를 밝힌바, 발효인삼을 120℃에서 시간별로 증숙하였을 경우 ginsenoside Rg3, Rk1, Rg5와 같은 새로운 사포닌들이 생성되는데 이러한 사포닌에 의해서 항산화 활성이 증강되는 것이라 판단됨.

표 12. 발효인삼꽃봉오리의 DPPH free radical 소거활성

발효군주	발효인삼	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> (µg/ml)]
S16	SN-6	102.56±5.93
S18	SN-7	95.84±8.34
SA4	SN-8	90.43±7.43
SA5	SN-9	78.01±5.99
BHA		65.43±1.95

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means ± S.D. of 3 experiments.

표 13. SN-6의 증숙시간에 따른 DPPH free radical 소거활성

증숙시간	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> (µg/ml)]
30	95.39±3.94
60	84.06±4.05
90	69.45±5.96
BHA	65.43±1.95

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means ± S.D. of 3 experiments.

## (2) Superoxide anion 소거능

Super anion 소거활성은 Okamura 등<sup>13)</sup>의 방법을 변형하여 측정하였음. 즉 시료 20  $\mu\text{l}$ , 2 mM xanthine과 0.1mM NBT 혼합액 160  $\mu\text{l}$ 를 넣고 0.05 mM EDTA가 포함된 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹인 xanthine oxidase (0.5 unit/ml) 20  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰음. 다음, 여기에 2.5N HCl 80  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 중지시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하였음.

실험결과는 표 14, 15에 나타내었음. 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC<sub>50</sub> 값은 59.56±4.54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 가장 강력한 superoxide anion 억제활성을 나타내었음. 이에 비해서 발효균주 중에서 S-16 균주에 의해서 발효한 SN-6 가장 강력한 superoxide anion 억제활성(IC<sub>50</sub>, 84.06±8.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 나타냈으며, SN-8, SN-9, SN-7 순으로 라디칼 억제활성을 나타내었음.

한편, SN-6를 120°C에 30분, 60분, 90분 증숙한 발효인삼의 superoxide anion(IC<sub>50</sub>) 각각 78.45±6.79, 70.45±7.45, 64.74±6.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로써 90분을 증숙 하였을 경우 양성대조군으로 사용한 BHA와 거의 동등한 수준의 superoxide anion 억제활성을 나타내었음. 이러한 결과는 앞서 설명한 DPPH radical 소거능과 마찬가지로 증숙시간이 증가할수록 점점 강력한 superoxide anion 억제활성을 나타내었음.

표 14. 발효인삼꽃봉오리의 Superoxide anion 소거활성

발효균주	발효인삼	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )]
S16	SN-6	84.06±8.37
S18	SN-7	153.94±10.94
SA4	SN-8	114.03±9.04
SA5	SN-9	125.93±7.49
BHA		59.56±4.54

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means  $\pm$  S.D. of 3 experiments.

표 15. SN-6의 증숙시간에 따른 Superoxide anion 소거활성

증숙시간	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )]
30	78.45±6.79
60	70.45±7.45
90	64.74±6.58
BHA	59.56±4.54

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means  $\pm$  S.D. of 3 experiments.

표 16. 발효홍삼의 superoxide anion 소거활성

발효균주	발효인삼	superoxide anion 소거활성[IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )]
A3	SN-1	95.47 $\pm$ 6.77
A5	SN-2	84.35 $\pm$ 4.09
A6	SN-3	102.56 $\pm$ 9.56
B9	SN-4	69.61 $\pm$ 6.34
22	SN-5	73.26 $\pm$ 3.27
BHA		52.63 $\pm$ 3.25

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means  $\pm$  S.D. of 3 experiments.

표 17. SN-5의 증숙시간에 따른 superoxide anion 소거활성

증숙시간	superoxide anion 소거활성[IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )]
30	68.77 $\pm$ 6.34
60	61.45 $\pm$ 5.34
90	51.09 $\pm$ 7.98
BHA	52.63 $\pm$ 3.25

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means  $\pm$  S.D. of 3 experiments.

실험결과는 표 16, 17에 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC<sub>50</sub> 값은 52.63 $\pm$ 3.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 가장 강력한 superoxide anion 억제활성을 나타내었음. 이에 비해서 발효균주 중에서 B9 균주에 의해서 발효한 SN-4가 가장 강력한 superoxide anion 억제활성(IC<sub>50</sub>, 69.61 $\pm$ 6.34  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 나타냈으며, SN-5, SN-2, SN-1, SN-2 순으로 라디칼 억제활성을 나타내었음.

한편, SN-5를 120 $^{\circ}\text{C}$ 에 30분, 60분, 90분 증숙한 발효인삼의 superoxide anion(IC<sub>50</sub>) 각각 68.77 $\pm$ 6.34, 61.45 $\pm$ 5.34, 51.09 $\pm$ 7.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로써 90분을 증숙하였을 경우 양성대조군으로 사용한 BHA와 거의 동등한 수준의 superoxide anion 억제활성을 나타내었음. 이러한 결과는 앞서 설명한 DPPH radical 소거능 및 아질산염 소거능과 마찬가지로 증숙 시간이 증가할수록 점점 강력한 superoxide anion 억제활성을 나타내었음.

### (3) DPPH 라디칼 소거능

DPPH free radical에 대한 소거활성은 Blois의방법<sup>14)</sup>을 변형하여 측정하였음. 각 시료 20  $\mu\text{l}$ 에 0.1 mM DPPH 180  $\mu\text{l}$ 를 넣고 vortex한 후, 30분 동안 방치한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였음. DPPH 라디칼 소거능은 다음 식으로 나타내었음.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = [\text{대조군의 흡광도} - \text{반응군의 흡광도}/\text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

실험결과는 표 18, 19에 나타내었음. 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC<sub>50</sub> 값은 59.72±1.02μg/ml로 가장 강력한 라디칼 억제활성을 나타내었음. 이에 비해서 B9 균주에 의해서 발효한 SN-4가 BHA와 거의 동등한 수준의 라디칼억제활성(IC<sub>50</sub>, 62.53±4.31μg/ml)를 나타냈으며, SN-5, SN-2, SN-1, SN-3 순으로 라디칼 억제활성을 나타내었음.

한편, SN-5를 120℃에 30분, 60분, 90분 증숙한 발효인삼의 라디칼 억제활성은((IC<sub>50</sub>) 각각 65.56±4.36, 60.96±7.46, 56.54±6.48μg/ml로써 90분을 증숙하였을 경우 양성대조군으로 사용한 BHA에 비해서 강력한 라디칼 억제활성을 나타내었음. 이러한 결과는 Knag등<sup>15)</sup>에 따르면 ginsenoside Rg3가 항산화활성을 나타낸다는 실험결과를 밝힌바, 발효인삼을 120℃에서 시간별로 증숙하였을 경우 ginsenoside Rg3, Rk1, Rg5와 같은 새로운 사포닌들이 생성되는데 이러한 사포닌에 의해서 항산화 활성이 증강되는 것이라 판단됨.

표 18. 발효홍삼의 DPPH free radical 소거활성

발효균주	발효인삼	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> (μg/ml)]
A3	SN-1	86.56±5.87
A5	SN-2	77.26±5.37
A6	SN-3	91.21±6.70
B9	SN-4	62.53±4.31
2-2	SN-5	69.45±4.76
BHA		59.72±1.02

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means ± S.D. of 3 experiments.

표 19. SN-5의 증숙시간에 따른 DPPH free radical 소거활성

증숙시간	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> (μg/ml)]
30	65.56±4.36
60	60.96±7.46
90	56.54±6.48
BHA	59.72±1.02

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means ± S.D. of 3 experiments.

#### (4) 아질산염 소거 작용

아질산염 소거작용은 Kato 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였음. 즉, 1 mM의 NaNO<sub>2</sub> 용액 30 μl에 시료추출물을 60 μl를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl 용액 210 μl를 가하여 전체를 300 μl로 하였다. 그리고 37℃에서 1시간동안 반응시켜 얻은 반응액을 40 μl씩 취하고 여기에 2% 초산 용액 200 μl를 첨가한 다음 Griess 시약 16 μl를 가하여 혼합시켜 실온에서 15분간 방치시킨 후 흡수 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염

의 백분율로 나타내었음. 공시험은 Griess시약 대신 증류수를 가하여 같은 방법으로 행하였음.

$$N(\%) = [1-(A-B)/(C-D)] \times 100$$

N : 아질산 소거능(%)                      A : 시료의 흡광도  
 B : 시료 대조군의 흡광도                C : Control의 흡광도  
 D : Control 대조군의 흡광도

실험결과는 표 20, 21에 나타내었음. 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC<sub>50</sub> 값은 12.70±1.09 µg/ml로 가장 강력한 라디칼 억제활성을 나타내었음. 이에 비해서 발효홍삼(SN-1~SN-5) 모두 아질산염 소거활성을 나타내지 않았음.

한편, SN-5를 120°C에 30분, 60분간 증숙한 발효증숙홍삼은 아질산염 소거활성을 나타내지 않았으나 90분 증숙한 발효홍삼의 억제활성은(IC<sub>50</sub>) BHA에 비해서는 약하지만 86.45±2.5µg/ml로써 증숙시간에 따라서 아질산염 소거활성이 증가됨을 관찰하였음. 이러한 결과는 앞서 설명한 바와 같이 ginsenoside Rg3, Rk1, Rg5와 같은 새로운 사포닌들이 생성되는데 이러한 사포닌에 의해서 항산화 활성이 증강되는 것이라 판단됨.

표 20. 발효홍삼의 아질산염 소거활성

발효균주	발효홍삼	아질산염 소거활성[IC <sub>50</sub> (µg/ml)]
A3	SN-1	>100
A5	SN-2	>100
A6	SN-3	>100
B9	SN-4	>100
22	SN-5	>100
BHA		12.70±1.09

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means ± S.D. of 3 experiments.

표 21. SN-5의 증숙시간에 따른 아질산염 소거활성

증숙시간	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> (µg/ml)]
30	>100
60	>100
90	86.45±2.5
BHA	12.70±1.09

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means ± S.D. of 3 experiments.

실험결과는 표 22, 23에 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC<sub>50</sub> 값은 25.84±2.04  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 가장 강력한 라디칼 억제활성을 나타내었다. 이에 비해서 발효인삼(SN-6 ~ SN-9)은 모두 약한 아질산염 소거활성을 나타내었음..

한편, SN-5를 120°C에 30분, 60분간 증숙한 발효증숙홍삼은 아질산염 소거활성을 나타내지 않았으나 90분 증숙한 발효홍삼의 억제활성은(IC<sub>50</sub>) BHA에 비해서는 약하지만 90.45±5.41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로써 증숙시간에 따라서 아질산염 소거활성이 증가됨을 관찰하였음. 이러한 결과는 앞서 설명한 바와 같이 ginsenoside Rg3, Rk1, Rg5와 같은 새로운 사포닌들이 생성되는데 이러한 사포닌에 의해서 항산화 활성이 증강되는 것이라 판단됨.

표 22. 발효인삼꽃봉오리의 아질산염 소거활성

발효균주	발효홍삼	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )]
S16	SN-6	>100
S18	SN-7	>100
SA4	SN-8	>100
SA5	SN-9	>100
BHA		59.56±4.54

표 23. SN-6의 증숙시간에 따른 아질산염 소거활성

증숙시간	라디칼 소거활성[IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )]
30	>100
60	>100
90	90.45±5.41
BHA	59.56±4.54

#### (5) Hydrogen peroxide 소거능 측정

Hydrogen peroxide 소거활성은 Park 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라 96-well microplate에 phosphate buffered saline (PBS) 100  $\mu\text{l}$ , 분획물 20  $\mu\text{l}$ 를 넣고 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하여 5분방치 한 다음, 1.25 mM ABTS 30  $\mu\text{l}$ 와 PBS에 녹인 peroxidase (1unit/ml) 30  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였음.

실험결과는 표 24, 25에 나타남. 양성대조군으로 사용한 BHA의 IC<sub>50</sub> 값은 19.11±0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 가장 강력한 hydrogen peroxide 억제활성을 나타내었음. 이에 비해서 발효균주 중에서 B9 균주 및 22 균주에 의해서 발효한 SN-4과 SN-5가 가장 강력한 hydrogen peroxide 억제활성(IC<sub>50</sub>, 28.76±6.34, 29.08±4.36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 나타냈으며, SN-1, SN-2, SN-3순으로 hydrogen peroxide 억제활성을 나타남.

한편, SN-5를 120°C에 30분, 60분, 90분 증숙한 발효인삼의 hydrogen peroxide 억제활성은(IC<sub>50</sub>) 각각 24.08±2.97, 20.56±6.13, 15.76±2.23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로써 90분을 증숙하였을 경우 양성대조군으



로 사용한 BHA에 비해서 강력한 hydrogen peroxide 억제활성을 나타냄. 이러한 결과는 앞서 설명한 DPPH radical 소거능, 아질산염 소거능 및 superoxide anion 소거활성과 마찬가지로 증속시간이 증가할수록 점점 강력한 hydrogen peroxide 억제활성을 나타냄.

표 24. 발효인삼의 Hydrogen peroxide 소거활성

발효균주	발효인삼	Hydrogen peroxide 소거활성 [IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )]
A3	SN-1	45.82±9.07
A5	SN-2	51.09±6.97
A6	SN-3	56.54±11.24
B9	SN-4	28.76±6.34
22	SN-5	29.08±4.36
BHA		19.11±0.39

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means ± S.D. of 3 experiments.

표 25. SN-5의 증속시간에 따른 Hydrogen peroxide 소거활성

증속시간	Hydrogen peroxide 소거활성 [IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )]
30	24.08±2.97
60	20.56±6.13
90	15.76±2.23
BHA	19.11±0.39

BHA : Butylated hydroxy-anisole as used a positive control, Data are means ± S.D. of 3 experiments.

## 6. 발효인삼의 아토피 억제활성 측정

### 가. THP-1 및 EoL-1 세포를 이용한 아토피 억제활성

발효인삼의 아토피억제활성을 관찰하기 위하여 아토피 질환을 유발한다고 알려져 있는 진드기 추출물을 **THP-1 및 EoL-1 세포에** 처리하면 아토피를 유발하는 MCP-1, IL-6 및 IL-8과 같은 cytokine이 급격히 증가하는데 발효인삼을 처리했을 때 이러한 cytokine의 변화를 측정함으로써 발효인삼의 아토피 질환 억제활성을 조사하였음.

**Mast cell interaction : IgE-FcεRI Binding activation mechanism**

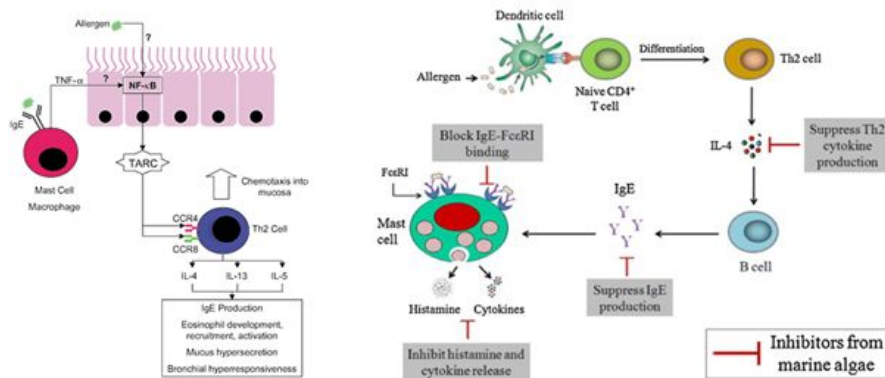


그림 62. 아토피를 유발하는 MCP-1, IL-6, IL-8

아토피피부염의 병인기전은 아직 완전하게 밝혀지지 않았지만 환경 내에서 흔한 물질(알레르겐)에 대한 과민한 면역반응(알레르기반응)으로 인하여 피부에 만성적인염증반응을 유발하여 아토피피부염이 발생한 것으로 알려져 왔음. 특히 그 근거로 집먼지진드기에 노출된 양과 아토피피부염의 발병빈도간의상관성을 보이며 아토피성 피부염의 중증도와도 유의한 상관관계를 보인다고 알려져 있다. 또한 환경 내에서 집먼지 진드기에 대한 노출을 줄임으로써 아토피피부염의 중증도를 감소시킬 수 있다고 알려져 있음. 또한, 스테로이드는 기관지천식 등의 염증성 질환에서 가장 널리 사용되는 효과적인 치료제임.

최근 스테로이드에 대한 기전이 많이 밝혀지고 있으나 아직은 그 기전을 완전히 이해하지 못한 상태이며 기관지천식이나 류마티스 관절염 등의 환자들 중 일부는 스테로이드에 반응하지 않는 스테로이드 저항성을 보임. 이러한 스테로이드 저항성을 보이는 환자들은 많지는 않지만 대개는 중증이고 치료에 의한 합병증에 시달리며, 치료비용이 커 큰 문제이기 때문에 스테로이드 저항성의 기전을 밝히는 것은 조속히 해결하여 야 할 숙제임. 즉, 만성 염증성 반응에서 다양한 세포를 통해 섬유화에 관련된 종양성장인자(tumor growth factor-β, TGF-β), IL-4, IL-13 등의 다양한 사이토카인을 분비함. 이를 통해 섬유모세포(fibroblast)를 활성화시키는 IL-6의 분비를 증가시켜 많은 섬유모세포의 분화·증식을 초래하며, 세포외 기질(extra cellular matrix)의 생산을 과생산하여 세포 및 조직의 변형과 섬유화를 야기시킴.

아토피 피부염은 스테로이드 계통의 약제를 통해 치료가 되나, 만성화되면서 조직의 변형 및 섬유화로 스테로이드 제제에 대한 내성을 보이게 되는 것이 이러한 이유임. 단핵구 화학유인물질 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)은 chemokine receptor (CCR2)에 결합하며 MCP-1 유전자가 제거된 생쥐는 monocytes에 대한 화학주성이 손상을 받고, 특정 균의 감염에 저항성이 약화되는 것이 관찰되었으며, 이러한 현상은 CCR2 유전자가 제거된 동물에서 관찰되는 증상과 유사함. 이 밖에도 MCP-1은 시험관에서 Th0 cells 을 Th2 cytokines 을 분비하는 세포로 전환시킨다는 보고가 있고 MCP-1을 정맥주사 하였을 때 IL-12의 생성은 감소되고 IL-4의 생성이 증가함. 이는 간접적으로 IgE-의존적 알레르기 염증을 악화시킬 수 있음을 의미함.

IL-8은 초기염증반응에 중요하고 기도상피세포에서 분비되는 중요한 염증성 케모카인으로

서 IL-8에 의해 기관지 과민성이 유발되고 알레르기 비염이나 기관지 천식에서 증가되며 IL-8은 스테로이드에 의해 억제됨.

즉, 아토피를 유발하는 집먼지 진드기 추출물을 THP-1 세포나 EoL-1 세포에 처리하면 아토피를 유발하는 cytokine 인 MCP-1, IL-6, IL-8의 양이 증가하게 됨. 따라서 본 실험에서는 THP-1 세포를 이용하여 이러한 병적인 상태에서 발효인삼 및 발효증숙인삼을 처리했을 때 진드기 추출물인 DP에 의해서 증가된 MCP-1, IL-6, IL-8의 양을 감소시키는지를 관찰하고자 하였음.

(1) 수삼을 이용한 발효 홍삼 SN 1~ SN5

■ THP-1 세포배양

사람의 단핵구(monocyte)인 THP-1 (human acute monocytic leukemia cell; 미국세포주은행)를  $2.0 \times 10^5$ /m로 RPMI 1640 배지, antibiotics (penicillinm  $10^4$  U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25  $\mu$ g/ml)과 10% FBS를 넣고, 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일간 배양하였음.

■ MCP-1, IL-6, IL-8 측정

THP-1세포를 0.5% FBS가 든 RPMI에  $2.0 \times 10^6$ /m로 24 well plate에 분주한 후 배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 16시간 배양하였음. 배양 후 시료 (최종 농도 200 $\mu$ g/ml)을 14시간 동안 처리한 후 HDE (1 $\mu$ g/ml)를 각각 24시간 동안 처리한 다음, ELISA를 이용하여 상층액에서 단핵구 화학유인물질 단백질-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), IL-6, IL8의 양을 측정하였음.

■ 발효홍삼 및 발효증숙인삼의 아토피 억제활성

발효홍삼의 아토피 억제활성을 측정하기 위하여 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물을 가하여 MCP-1, IL-6, IL-8의 분비를 촉진시킨 후 발효홍삼추출물을 가하여 얼마나 줄어드는지를 관찰하였음.

(가) MCP-1 분비 억제활성

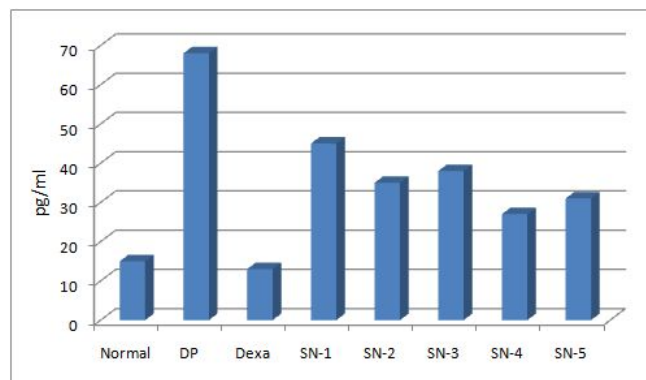


그림 63. 발효인삼의 MCP-1 분비억제

그림 63 에서와 같이 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물(DP)을 처리하면 MCP-1의 분비가 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군으로 사용한 dexamethasone은 거의 정상수준으로 떨어졌으며, 발효인삼 추출물은 증가된 MCP-1를 43-77% 정도 억제함을 알 수 있었으며 SN-4가 가장 강한 77% 억제활성을 나타내었음.

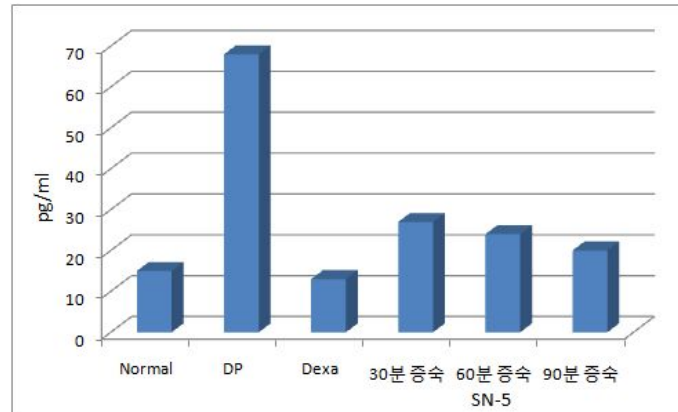


그림 64. SN-5 증숙시간에 따른 MCP-1 분비억제

그림 64에서와 같이 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물(DP)을 처리하면 MCP-1의 분비가 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군으로 사용한 dexamethasone은 거의 정상수준으로 떨어졌음. SN-5 발효인삼을 120℃에서 30분, 60분, 90분 증숙시킬 수록 비례해서 억제활성이 증강됨을 알 수 있었음. 특히 90분 증숙하였을 경우에는 90%의 억제활성을 나타내었음. 이러한 결과는 항산화 활성결과와 마찬가지로 증숙과정 중에 새로 생성되는 물질에 의한 것으로 판단됨.

#### (나) IL-6 분비 억제활성

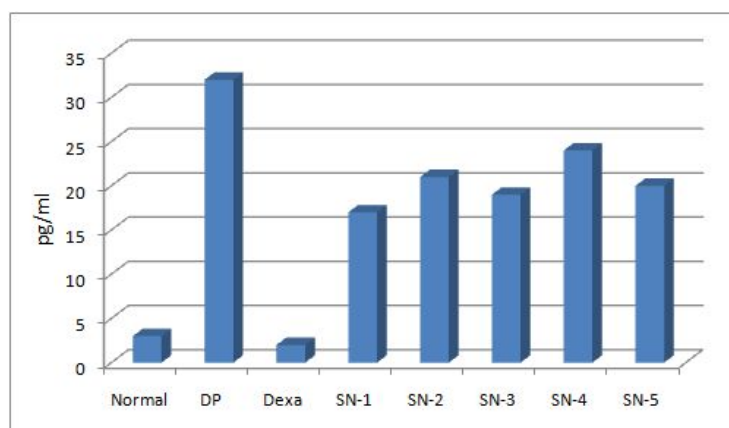


그림 65. 발효인삼의 IL-6 분비억제

그림 65에서와 같이 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물(DP)을 처리하면 IL-6의 분비가 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군으로 사용한 dexamethasone은 거의 정상수준으로 떨어졌으며, 발효인삼 추출물은 증가된 IL-6를 28-52% 정도 억제함을 알 수 있

었으며 SN-1이 가장 강한 52% 억제활성을 나타내었음.

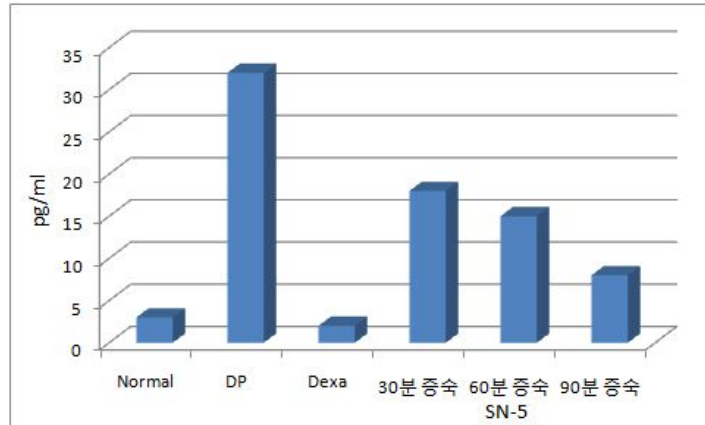


그림 66. SN-5 증숙시간에 따른 IL-6 분비억제

그림 66에서와 같이 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물(DP)을 처리하면 IL-6의 분비가 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군으로 사용한 dexamethasone은 거의 정상수준으로 떨어졌음. SN-5 발효인삼을 120°C에서 30분, 60분, 90분 증숙 시킬수록 비례해서 억제활성이 증강됨을 알 수 있었음. 특히 90분 증숙 하였을 경우에는 83%의 억제활성을 나타내었다. 이러한 결과는 MCP-1 억제활성과 마찬가지로 증숙과정 중에 새로 생성되는 물질에 의한 것으로 판단됨.

(다) IL-8 분비 억제활성

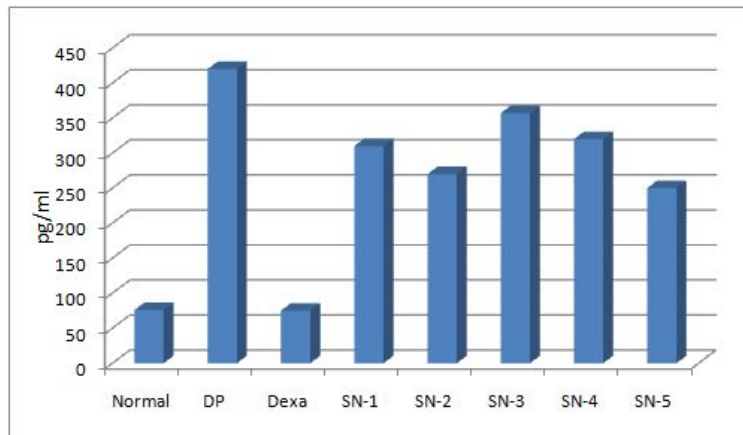


그림 67. 발효인삼의 IL-8 분비억제

그림 67에서와 같이 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물(DP)을 처리하면 IL-8의 분비가 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군으로 사용한 dexamethasone은 거의 정상수준으로 떨어졌으며, 발효인삼 추출물은 증가된 IL-8을 18-49% 정도 억제함을 알 수 있었으며 SN-5가 49%의 가장 강력한 억제활성을 나타내었음.

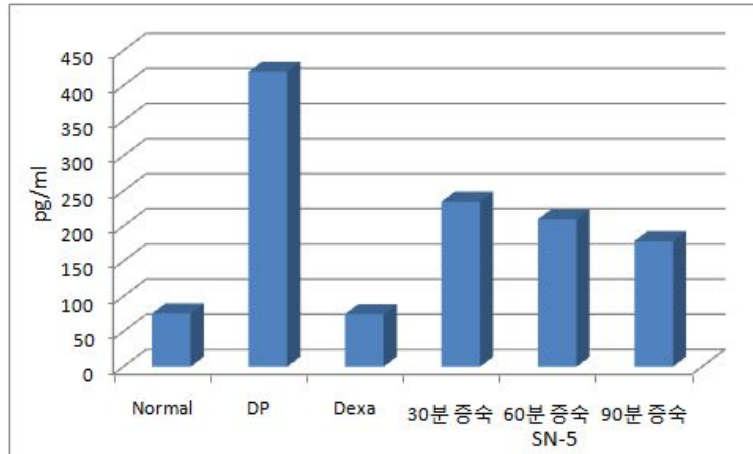


그림 68. SN-5 증숙시간에 따른 IL-8 분비억제

그림 68에서와 같이 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물(DP)을 처리하면 IL-8의 분비가 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군으로 사용한 dexamethasone은 거의 정상수준으로 떨어졌음. SN-5 발효인삼을 120℃에서 30분, 60분, 90분 증숙 시킬수록 비례해서 억제활성이 증강됨을 알 수 있었음. 특히 90분 증숙 하였을 경우에는 70%의 억제활성을 나타내었다. 이러한 결과는 MCP-1, IL-6 억제활성과 마찬가지로 증숙과정 중에 새로 생성되는 물질에 의한 것으로 판단되어짐.

## (2) 아토피억제활성-꽃봉오리 발효홍삼 SN6~SN9

### (가) MCP-1 분비 억제활성

표 26에서와 같이 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물(DP)을 처리하면 MCP-1의 분비가 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군으로 사용한 dexamethasone은 거의 정상수준으로 떨어졌으며, 발효인삼 추출물은 증가된 MCP-1을 억제함을 확인할 수 있었음. 발효홍삼 중에서 발효균주 S-16에 의한 SN-6이 가장 강한 억제활성을 나타내었음.

표 26. 인삼꽃봉오리 발효홍삼의 MCP-1 분비억제

시 료	발효인삼	MCP-1의 양(pg/ml)
Normal	-	14
DP	-	79
Dexamethasone	-	13
<b>S16</b>	<b>SN-6</b>	<b>58</b>
S18	SN-7	69
SA4	SN-8	68
SA5	SN-9	61

한편, 표 27에서와 같이 SN-6 발효인삼을 120℃에서 30분, 60분, 90분 증숙 시킬수록 비례해서 억제활성이 증강됨을 알 수 있었음. 특히 90분 증숙 하였을 경우에는 80%의 억제활성을 나

타내었음. 이러한 결과는 항산화 활성결과와 마찬가지로 증숙과정 중에 새로 생성되는 물질에 의한 것으로 판단됨.

표 27. 증숙시간에 따른 인삼 꽃봉오리 발효홍삼의 MCP-1 분비억제

증숙시간	MCP-1의 양(pg/ml)
Normal	14
DP	79
Dexamethasone	13
30분	50
60분	46
90분	37

(나) IL-8 분비 억제활성

표 28에서와 같이 THP-1 세포에 아토피를 유발한다고 알려진 진드기 추출물(DP)을 처리하면 IL-8의 분비가 증가됨을 알 수 있었음. 양성대조군으로 사용한 dexamethasone은 거의 정상 수준으로 떨어졌으며, 발효인삼 추출물은 증가된 IL-8을 억제함을 확인할 수 있었다. 발효홍삼 중에서 발효균주 S-16에 의한 SN-6이 가장 강한 억제활성을 나타내었음.

한편, 표 29에서와 같이 SN-6 발효홍삼을 120℃에서 30분, 60분, 90분 증숙 시킬수록 비례해서 억제활성이 증강됨을 알 수 있었음. 특히 90분 증숙 하였을 경우에는 87%의 억제활성을 나타내었다. 이러한 결과는 항산화 활성결과와 마찬가지로 증숙 과정 중에 새로 생성되는 물질에 의한 것으로 판단됨.

표 28. 발효인삼꽃봉오리 발효홍삼의 IL-8 분비억제

시 료	발효인삼	IL-8의 양(pg/ml)
Normal	-	65
DP	-	436
Dexamethasone	-	71
<b>S16</b>	<b>SN-6</b>	<b>265</b>
S18	SN-7	321
SA4	SN-8	376
SA5	SN-9	302

표 29. 증숙시간에 따른 발효인삼꽃봉오리 발효홍삼의 IL-8 분비억제

증숙시간	IL-8의 양(pg/ml)
Normal	65
DP	436
Dexamethasone	71
30분	204
60분	157
90분	112

### 6. MC/9비만세포를 이용한 발효인삼 아토피 억제활성 효능

아토피 피부염의 임상적 특징은 크게 소양증(국한성 또는 전신성 가려움), 발진, 만성적 재발 등을 들 수 있으며, 혈청내 IgE 수치 향상, Eosinophilia, 호염기구의 자발적인 히스타민 분비증가, CD23 발현 증가, CD8 Suppressor 감소, Th2에 의한 IL-4, IL-5 분비 증가 등의 현상을 동반함. 아토피 피부염은 연령대에 따라 유아형(생후2~24개월), 소아형(3~4세에서 10세 전후의 소아), 사춘기 및 성인형(만 12세 이후)으로 분류하며, 아토피 피부염은 대부분 IgE와 연관된 면역기전에 의해 발병되는데 특정 알레르겐(Allergen)에 대한 즉시형 면역반응보다는 T 세포 이상에 의한 지연형 면역 반응이 관여하는 것으로 보고되고 있음. 이중 Th cell이 중요한 역할을 하는데, 아토피 피부염 병변에서는 T 세포가 많이 발견되며, 이중 Th2에 의해 분비되는 사이토카인(cytokine)이 아토피 발병에 밀접한 관계가 있음. Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-13을 분비하는데 이 중에서 IL-4, IL-13은 IgE 생성을 촉진하고 IL-5는 호염구(basophil) 반응을 증진시킴.

앞서 설명한 바와 같이 아토피 피부염은 대부분 IgE와 연관된 면역기전에 의해 발병되는데 이러한 IgE와 결합할 수 있는 수용체를 가진 세포로서 비만세포(mast cell)와 호염구(basophil)이 있음. 비만세포는 세포표면에 본질적으로 수용체로서 FcεR I을 발현하는데, 항원들이 이들 수용체들에 결합된 IgE와 교차결합 되면 세포의 활성화가 시작되어 탈과립화가 진행된다. 탈과립화는 보통 항원 결합 후 수초 내에 발생하며, 그 결과로서 다양한 종류의 염증성 매개물질들이 과립으로부터 방출되어 세포 밖으로 분비가 됨. 이러한 매개물질들에는 히스타민(histamine)과 함께 비만세포 키마제(mast-cell chymase), 트립타제(tryptase), 그리고 세린에스테라제(serin esterases)과 같은 효소들이 있음. 이들 효소들은 차례로 조직간질 메탈로프로테아제(matrix metalloprotease)를 활성화시켜 조직 세포간질을 깨뜨려서 조직을 파괴시키는 기능을 하며, 활성화된 비만세포에 의해 많은 양의 종양 괴사인자-α (TNF-α)들이 분비되는데, 일부는 비만세포 과립들 내에 저장된 것들로부터 유래하며, 다른 일부는 활성화된 비만세포들 자체에 의해 새로 생성된 것들로 내피세포들을 활성화하여 부착분자(adherent molecule) 발현을 증가시킴으로써 염증성 백혈구와 림프구의 유입을 조장하는 것으로 알려져 있음. 또한 비만세포가 활성화되면, 케모카인, 류코트리엔 및 혈소판 활성화인자(platelet-activating factor, PAF)와 같은 지방성분의 매개물과 함께 Th2 반응을 지속시키는 IL-4(인터루킨-4, interleukin-4) 및 IL-13과 같은 추가적인 사이토카인들도 합성되고 분비됨.

호염구는 과립구(granulocyte)의 일종으로, 혈관이나 림프관 근처의 결합조직에 많이 존재하며, 특히 피부, 점막조직에 많이 존재함. 세포표면에 비만세포와 같이 Ig E에 대한 수용체를 가



지고 있어, 수용체에 Ig E 항체가 결합되고, 알레르겐이 이들 세포의 Ig E에 결합하게 되면, 이들 세포들이 활성화되어, 과립내의 생리활성물질(히스타민 등)이 방출되어 알레르기 반응이 나타남. 즉, 제1형 과민반응이라고 하며, 비만세포(mast cell)도 동일한 양상을 나타냄.

비만세포를 활성화시키는 매체로는 compound48/80, IgE 항체, protein kinase C(PKC) activator인 phorbol 12-myristate 13-acetate, anti-DNP IgE, 및 calcium ionophore (A23187) 등이 있음. 비만세포에서 유리되는 화학매체의 양은 히스타민이 가장 많다. 따라서 알레르기반응에서 히스타민에 의한 작용이 중요하며 혈관 확장, 부종 등에 의한 증상이 주로 나타남.

비만세포의 탈과립은 비만세포 분비 자극물질로 알려진 양전하로 하전된 일군의 물질들에 의해 촉발됨. 그 중에서 compound 48/80 또는 anti-DNP-IgE는 가장 강력한 분비 자극물질 중의 하나이며, 적절한 양의 compound 48/80와 anti-DNP-IgE는 아나필락시스의 기작을 연구하는데 있어 직접적이고 편리한 물질로 활용되고 있음.

알레르기 반응의 새로운 개념인 알레르기성 염증반응은 이들 화학매체의 작용만으로는 설명하기 어려움.

최근에 발표된 많은 병리소견에서 만성 염증성 반응이 알레르기 반응에서 공통적으로 발견되었고, 특히 6시간 전후에 나타나는 후기 반응의 기전이 염증반응으로 이해되고 있기 때문에 비만세포로부터 유리되는 화학매체 외에 염증성 사이토카인인 종양괴사인자 알파(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ), 인터루킨-1 (IL-1)과 인터루킨-6 (IL-6)이 이러한 알레르기성 염증반응의 유도에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있음.

따라서 발효인삼의 아토피 억제활성을 측정하기 위하여 발효홍삼이 활성화된 생쥐 MC/9 비만세포가 발현하는 IL-13와 MIP-1 $\alpha$ 를 조절 할 수 있는지를 ELISA로 측정하였고, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, TNF- $\alpha$ 는 real-time PCR로 측정하였음.

## ■ 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, 적혈구 용혈액(ACK lysis solution), DMEM (Dubecco's modified Eagle's medium) 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate(SDS), Streptomycin(Gibco, USA)을 사용하였다. IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, TNF- $\alpha$  그리고 IL-13 ELISA kit는 eBioscience사(USA) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였음.

## ■ 실험기기

본 실험에 사용한 기기는 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치(rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> 배양기(Forma scientific Co., USA), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker(Lab-Line, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer(Sanyo, Japan), Quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA), ELISA reader (Molecular Devices, USA)등을 사용하였음.

## ■ MC/9 세포주 배양

MC/9 murine mast cell line (ATCC, USA)을 10% FBS, 10% T-stim, 0.05mM 2-mercaptoethanol and 2mM L-glutamine(Sigma-Aldrich, USA) 및 100 µg/ml streptomycin 이 함유된 DMEM 배지에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였음.

#### ■ 세포독성 측정

세포 독성은 MTT법을 약간 변형하여 실험에 사용하였으며, MC/9비만세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 배양한 후 수삼추출물 (NS)과 수삼발효추출물 (NS-419-14) (최종 농도 400, 200, 100, 50, 25 µg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 µl씩 각 well에 가하고 실험 종료시까지 배양하였으며 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA reader(Molecular devices, USA)에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였음.

#### ■ Real-Time PCR(polymerase chain reaction)

##### RNA 추출

MC/9 세포를 48-well plate에 5×10<sup>5</sup>/ml로 1 ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE (1 µg/ml) 로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였음. 3시간 후 수삼추출물 및 수삼발효추출물 (100 µg/ml)와 양성대조군으로 Cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml)를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA (0.5 µg/ml)으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻었음. 그 세포에 Trizol (Ambion, USA) 시약을 1 ml넣고 eppendorf tube에 넣은 후 클로로포름(Sigma Co.)을 100 µl 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 층이 분리되면 eppendorf tube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 이소프로판올 (Sigma, USA)을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였음. 이때 상층액은 버리고 80% 에탄올(Sigma USA)로 세척한 후, 13000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water (Invitrogen, USA)로 cell의 양에 따라 25 µl 넣어 녹였음.

#### ■ 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75°C에서 5분 동안 변성 (denaturation)시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix와 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl) 및 RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였음. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였음.

#### ■ cDNA PCR

Real time quantitative RT-PCR은 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였으며, 사용된 Probe와 Oligonucleotide의 염기 배열은 다음과 같음 (표 30).

표 30 . Primer sequence for real-time PCR analysis

Target gene	Primer	Sequences
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTTCCTTGTTGCCGTAAG-3'
IL-5	Forward	5'-AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT-3'
	Reverse	5'-TCCAATGCATAGCTGGTGATTT-3'
IL-6	Forward	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'
	Reverse	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCTTT-3'
TNF-a	Forward	5'-GGCTTTCGAATTCCTGGAGCCT-3'
	Reverse	5'-CCCCGGCCTTCCAAATAAATACATTCATA-3'
GAPDH-VIC	Probe	5'-CATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG-3'

mouse GAPDH probe set; Endogenous Control (VIC<sup>®</sup> / MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems (4352339E) 유전자 발현은 Taqman PCR Master mix (ABI)를 사용하였고, internal standard를 G3PDH를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시켰음. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation을 2 min at 50 °C, 10 min 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 60 °C에서 수행하였으며 Target group의 RQ (relative quantitative)는 Quantitative PCR로 다음과 같이 측정하였음.

$$y = x(1+e)^n$$

x : starting quantity

y : yield

n : number of cycles

e : efficiency

#### ■ ELISA 측정

MC/9 세포를 48-well plate에  $5 \times 10^5$ /ml로 1 ml씩 분주하고 24시간 동안 DNP-IgE (1  $\mu$ g/ml)로 자극한 후 PBS로 수세하고 10% FBS-DMEM으로 교체하였으며, 3시간 후 수삼추출물과 발효홍삼 (100  $\mu$ g/ml)와 양성대조군으로 CsA (10  $\mu$ g/ml)를 처리하고 1시간 후에 DNP-BSA (0.5  $\mu$ g/ml)으로 자극한 뒤 16시간 후에 세포를 얻었음. Mouse IL-13 (Bioscience, USA), MIP-1a (eBioscience, USA) ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100  $\mu$ l씩 분주하고 4°C에서 16시간 두었으며 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200  $\mu$ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였음. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100  $\mu$ l씩 넣었으며 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였음. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였음. Stop solution을 각 well에 50  $\mu$ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450nm로 측정하였음.

## (1) 세포 독성(cytotoxicity)

### ■ 419균주에 의한 발효홍삼 추출물

수삼추출물과 수삼발효추출물의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비하여 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 400  $\mu\text{g/ml}$ 까지 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았음(그림 69).

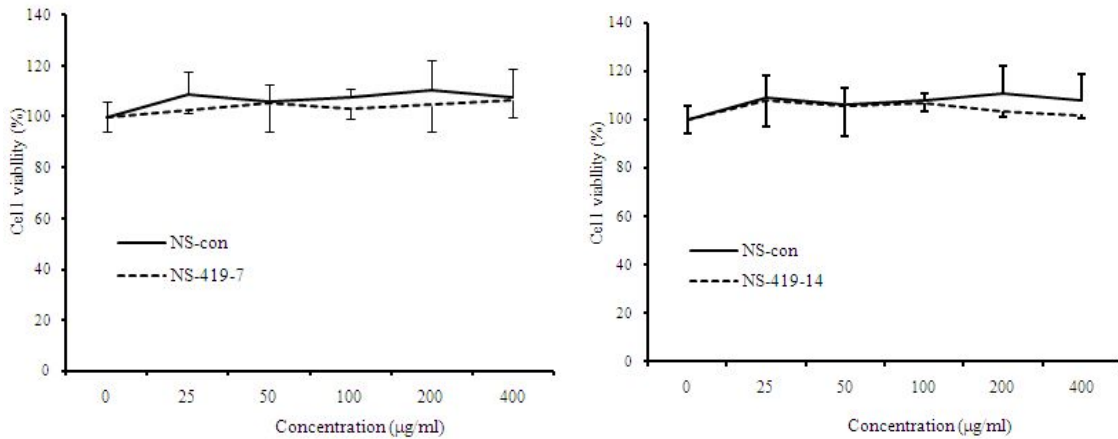
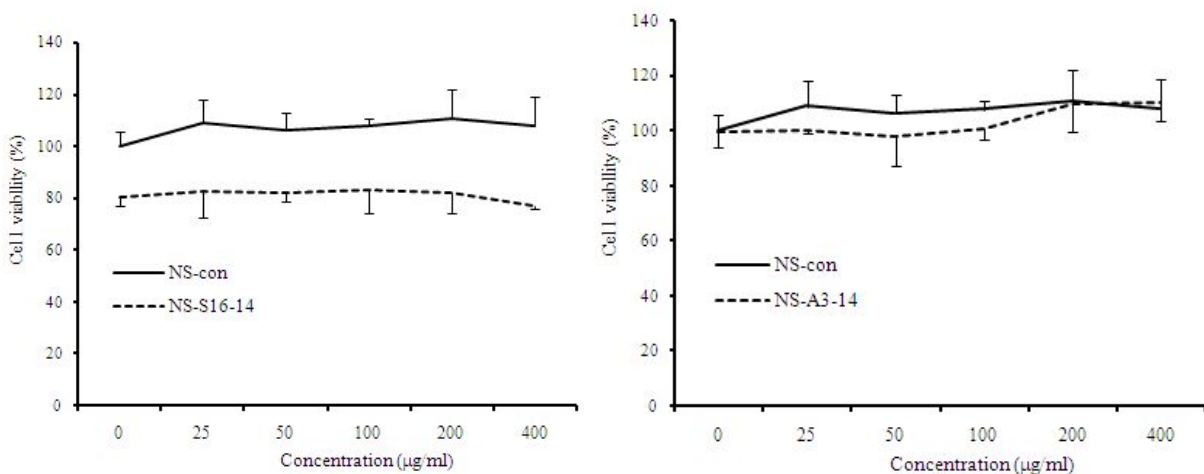


그림 69. 419균주의 발효된 발효홍삼의 세포 독성(murine MC/9 mast cell line)

Murine MC/9 mast cells were pretreated with various concentration NS and NS-419-14 extract. The results are expressed the mean $\pm$  S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*\* $p < 0.001$ ).

### ■ S16, A3, SA5, 46균주에 의한 발효홍삼 추출물

수삼추출물과 수삼발효홍삼추출물의 세포독성을 측정한 결과, S16(*Enterococcus durans*), A3(*Enterococcus faecalis*), SA5(*Enterococcus faecium*), 46(*Leuconostos mesenteroides*) 균주를 14일 수삼으로 발효한 발효홍삼 추출물은 대조군에 비하여 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 400  $\mu\text{g/ml}$ 까지 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았음(그림 70).



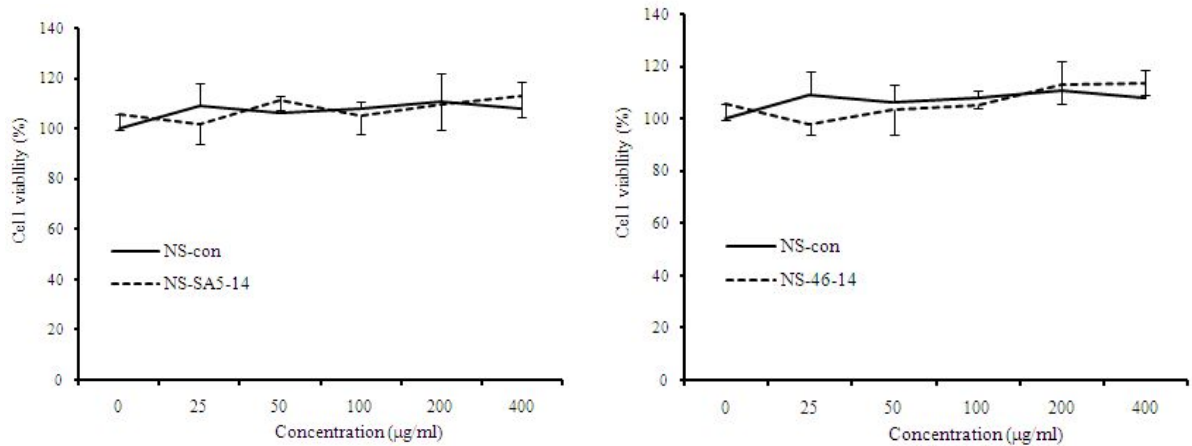


그림 70. 유산균 발효된 수삼발효홍삼의 세포독성

■ 발효홍삼으로부터 분리한 단일 사포닌 Rg3

단일 사포닌의 세포독성을 측정한 결과, (S)-ginsenoside Rg3와 (R)-ginsenoside Rg3는 대조군에 비하여 25µg/ml에서 400 µg/ml까지 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았음. (그림 71).

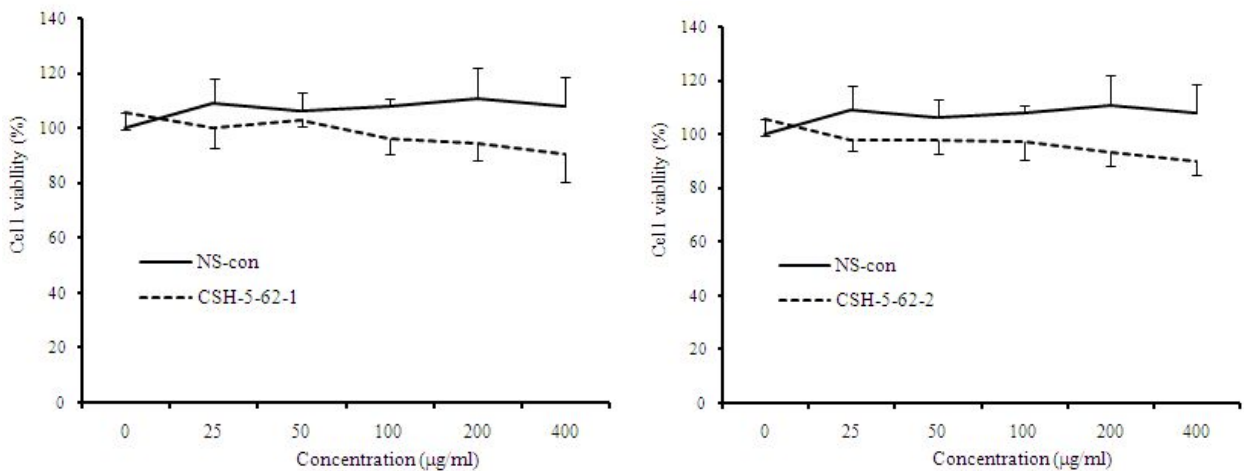


그림 71. 사포닌 단일 물질 (R-, S-Rg3)의 세포독성 결과

(2) ELISA 분석

수삼추출물 (NS)과 발효홍삼이 비만세포에서 IL-13과 MIP-1α 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 수삼추출물 (NS)과 발효홍삼을 처리한 후 DNP-IgE로 자극한 뒤 24시간 후 ELISA로 IL-13과 MIP-1α 생산량을 측정하였음.

(가) IL-13 단백질 생성

그림 72에서 보는 바와 같이 MC/9 비만세포에서 IL-13 생산량은 무처리군 (Only MC/9 cell)은 510.3±25.7 (pg/ml)이었고, DNP-IgE를 처리한 대조군은 935.5±26.8 (pg/ml)로 무처리군

(Only MC/9 cell)에 비해 약 45.4%이상 증가되었음. 양성대조군인 Cyclosporin A (CsA, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )는 IL-13 생산량이 596.7 $\pm$ 25.0 (pg/ml)으로 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 감소되었음. 수삼추출물 (NS)과 발효홍삼 처리한 실험군의 IL-13 생산량은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 각각 874.9 $\pm$ 18.0 (pg/ml)과 734.2 $\pm$ 29.4 (pg/ml)로 대조군에 비하여 각각 약 6.4%와 21.5% 이상 유의성 있게(p<0.05) 감소되었음(그림 72).

이 결과로 비만세포에서 대조군에 비하여 발효홍삼이 수삼추출물 (NS) 보다 더 IL-13 발현량이 감소되어 수삼이 발효를 통하여 아토피 억제활성에 대한 효능강화가 나타났다고 생각되어짐. 한편, 발효홍삼으로부터 분리한 단일 Rg3(CSH-5-62-2)가 가장 강한 억제활성을 나타내었음. 이러한 결과로 보아 발효홍삼의 IL-13 억제활성은 Rg3에 기인한다고 판단됨.

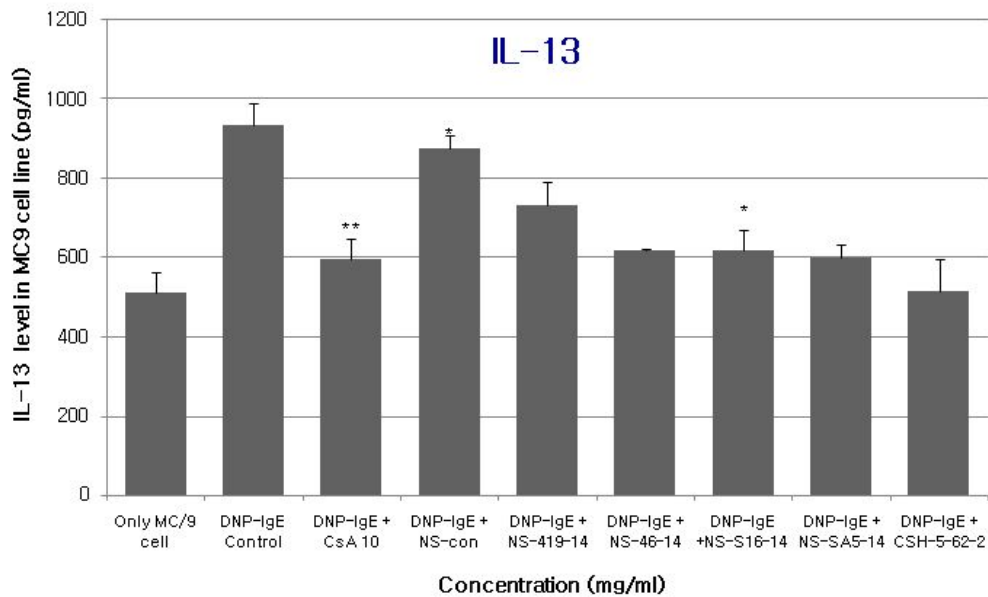


그림 72. MC/9 비만세포에서 IL-13 생산량에 발효 홍삼이 미치는 억제효과

#### (나) MIP-1 $\alpha$ 단백질 생성

그림 73에서 보는 바와 같이 MC/9 비만세포에서 MIP-1 $\alpha$  생산량은 무처치군 (Only MC/9 cell)은 188.9 $\pm$ 7.13 (pg/ml)이었고, DNP-IgE를 처리한 대조군은 291.9 $\pm$ 4.7 (pg/ml)로 무처치군 (Only MC/9 cell)에 비해 약 35.2% 이상 증가되었음. 양성대조군인 Cyclosporin A (CsA, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )는 MIP-1 $\alpha$  생산량이 203.6 $\pm$ 4.8 (pg/ml)으로 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.001) 감소되었음. 수삼추출물 (NS)과 발효홍삼을 처리한 실험군의 MIP-1 $\alpha$  생산량은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 각각 256.8 $\pm$ 6.06 (pg/ml)과 224.6 $\pm$ 7.71 (pg/ml)로 대조군에 비하여 각각 약 12.0% (p<0.01)와 23.0% (p<0.05) 이상 유의성 있게 감소되었음 (그림 73).

이 결과로 비만세포에서 대조군에 비하여 발효홍삼이 수삼추출물 (NS) 보다 더 MIP-1 $\alpha$  발현량이 감소되어 수삼이 발효를 통하여 아토피 억제활성에 대한 효능강화가 나타났다고 생각되어짐. 한편, 발효홍삼으로부터 분리한 단일 Rg3(CSH-5-62-2)가 가장 강한 억제활성을 나타내었음. 이러한 결과로 보아 발효홍삼의 MIP-1 $\alpha$  억제활성은 Rg3에 기인한다고 판단됨.

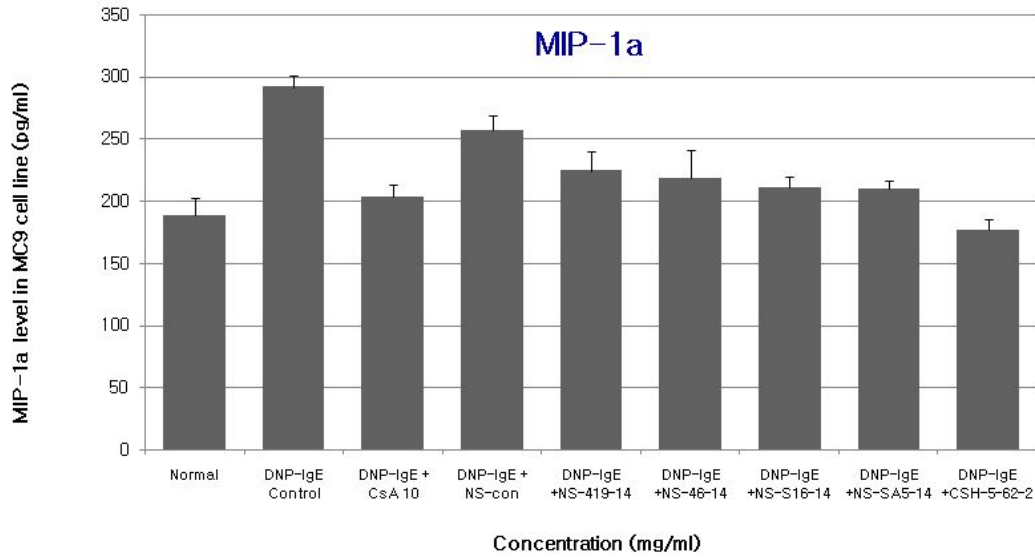


그림 73. MC/9 비만세포에서 MIP-1 $\alpha$  생산량에 발효 홍삼이 미치는 억제효과

$5 \times 10^5$  MC/9 cells were primed with  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of  $0.5 \mu\text{g/ml}$  DNP-BSA. MC/9 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or NS and NS-419-14 ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) for 16 hours. MIP-1 $\alpha$  levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values are expressed as means $\pm$ S.E. from two-independent experiments. (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

#### (다) Real-time PCR 분석

수삼추출물 (NS)과 발효홍삼이 비만세포에서 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, 그리고 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, MC/9 세포에 CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ )와 다양한 농도의 수삼추출물 (NS)과 발효홍삼을 처리한 후 DNP-IgE ( $1 \mu\text{g/ml}$ )으로 자극한 뒤 6시간 후 real-time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였음.

#### ① IL-13와 IL-5 mRNA 유전자 발현

그림 74-(a)에서 보듯이 IL-13 mRNA 유전자 발현은 무처치군 (Only MC/9 cell)은 각각  $0.261 \pm 0.040$ 이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은  $0.994 \pm 0.007$ 으로 무처치군 (Only MC/9 cell)에 비하여 약 73.7% 이상 유전자 발현이 증가되었음. 양성대조군인 CsA처리군은 각각  $0.341 \pm 0.080$  ( $p < 0.001$ )로 대조군에 비하여 약 65.7% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소되었음. 수삼추출물 (NS)과 발효홍삼을 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 각각 약 30.8% ( $p < 0.001$ )와 45.1% ( $p < 0.001$ ) 이상의 통계학적 유의성 있게 감소되었음. 한편, 발효홍삼으로부터 분리한 단일 Rg3(CSH-5-62-2)가 가장 강한 억제활성을 나타내었음.

그림 74-(b)에서 보듯이 IL-5 mRNA 유전자 발현은 무처치군 (Only MC/9 cell)은 각각  $0.116 \pm 0.047$ 이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은  $0.981 \pm 0.020$ 으로 무처치군 (Only MC/9 cell)에 비하여 현저하게 유전자 발현이 증가되었음. 양성대조군인 CsA처리군은 각각  $0.363 \pm 0.235$  ( $p < 0.01$ )로 대조군에 비하여 약 63.0% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소되었음. 수삼추출물 (NS)과 발효홍삼을 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 IL-5 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 각각 약 18.0%와 27.5% 이상의 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었음.

이 결과로 비만세포에서 대조군에 비하여 발효홍삼이 수삼추출물 (NS) 보다 더 IL-13과 IL-5 mRNA 유전자 발현량이 감소되어 수삼이 발효를 통하여 항알레르기에 대한 효능강화가 나타났다고 생각됨. 한편, 발효홍삼으로부터 분리한 단일 사포닌 Rg3(CSH-5-62-2)가 가장 강한 억제활성을 나타내었음.

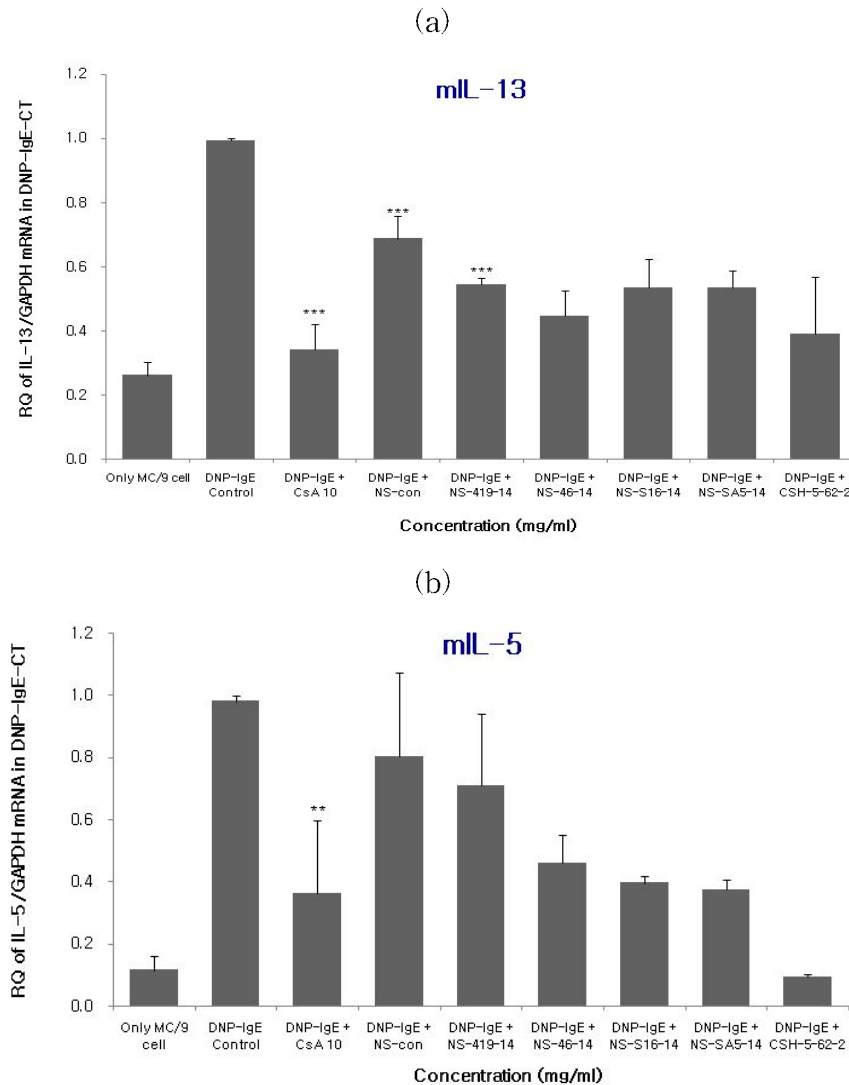


그림 74. MC/9 비만세포에서 IL-13과 IL-5 mRNA 유전자 발현의 발효홍삼이 미치는 억제 효과

$5 \times 10^5$  MC/9 cells were primed with  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of  $0.5 \mu\text{g/ml}$  DNP-BSA. MC/9 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or NS and NS-419-14 ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) for 6 hours. The expression of IL-13 (A) and IL-5 (B) mRNA was analyzed by real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means $\pm$ S.E. from two-independent experiments. (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## ② IL-6과 TNF- $\alpha$ mRNA 유전자 발현

그림 75-(a)에서 보듯이 IL-6 mRNA 유전자 발현은 무처리군 (Only MC/9 cell)은 각각  $0.378 \pm 0.024$ 이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은  $1.059 \pm 0.059$ 으로 무처리군 (Only MC/9 cell)에



비하여 현저하게 유전자 발현이 증가되었음. 양성대조군인 CsA처리군은 각각  $0.538 \pm 0.091$  ( $p < 0.001$ )로 대조군에 비하여 약 49.2% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소되었음. 수삼추출물(NS)과 발효홍삼(NS-419-14)을 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 IL-6 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 각각 약 40.1% ( $p < 0.05$ )와 40.0% ( $p < 0.01$ ) 이상의 통계학적 유의성 있게 감소되었음. 또한 발효홍삼 NS-46-14와 NS-SA5-14가 가장 강한 억제활성을 나타내었으나 유의성은 없었음. 한편, 단일 사포닌 CSH-5-62-2의 경우에도 강한 억제활성을 나타내었음.

그림 75-(b)에서 보듯이 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현은 무처리군 (Only MC/9 cell)은 각각  $0.036 \pm 0.026$ 이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은  $0.969 \pm 0.031$ 으로 무처리군 (Only MC/9 cell)에 비하여 현저하게 유전자 발현이 증가되었음. 양성대조군인 CsA처리군은  $0.365 \pm 0.259$  ( $p < 0.05$ )로 대조군에 비하여 약 62.3% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소되었음. 수삼추출물(NS)과 발효홍삼(NS-419-14)을 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 각각 약 47.0% ( $p < 0.05$ )와 51.7% ( $p < 0.05$ ) 이상의 통계학적 유의성 있게 감소되었음.

이 결과로 비만세포에서 대조군에 비하여 발효홍삼이 수삼추출물(NS) 보다 더 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현량이 감소되어 수삼이 발효를 통하여 아토피억제 활성화에 대한 효능이 증가되었을 것으로 생각되며, 그 중 NS-419-14 보다는 NS-SA5-14에서 좀 더 나은 효능을 보이고 있음. 또한 단일 사포닌 (S)-Rg3가 가장 좋은 효능을 지니고 있는데 이는 발효홍삼에서 (S)-Rg3가 아토피 억제 활성을 지니고 있을 것으로 판단됨.

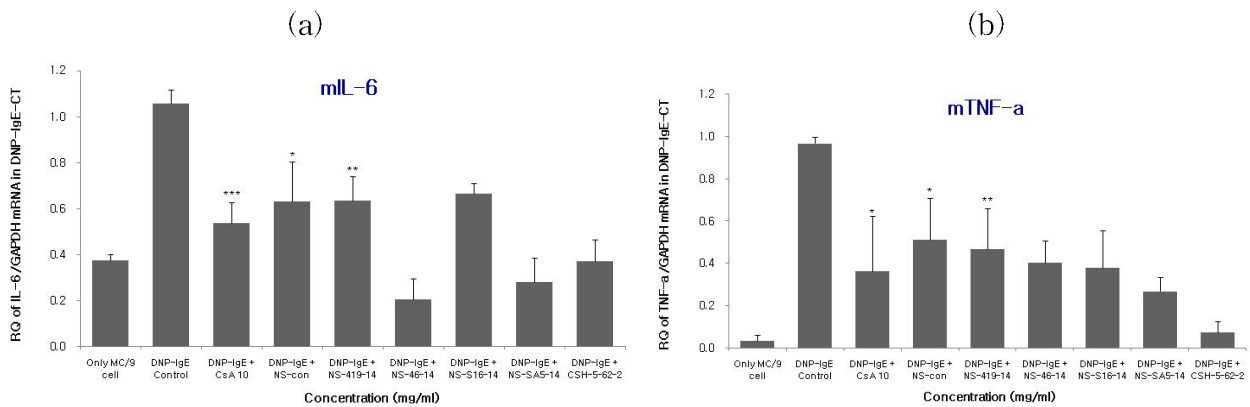


그림 75. MC/9 비만세포에서 IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현의 발효홍삼이 미치는 억제 효과

$5 \times 10^5$  MC/9 cells were primed with  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of  $0.5 \mu\text{g/ml}$  DNP-BSA. MC/9 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or NS and NS-419-14 ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) for 6 hours. The expression of IL-6 (A) and TNF- $\alpha$  (B) mRNA was analyzed by real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. from two-independent experiments. (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

③ IL-4과 GM-CSF mRNA 유전자 발현

그림 76-(a)에서 보듯이 IL-4 mRNA 유전자 발현은 무처치군 (Only MC/9 cell)은  $0.176 \pm 0.013$ 이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은  $0.988 \pm 0.013$ 으로 무처치군 (Only MC/9 cell)에 비하여 현저하게 유전자 발현이 증가되었음. 양성대조군인 CsA처리군은  $0.214 \pm 0.023$  ( $p < 0.001$ )로 대조군에 비하여 약 78.3% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소되었음. 수삼추출물(NS)과 발효홍삼(NS-419-14)을 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 각각 약 33.9% ( $p < 0.001$ )와 49.2% ( $p < 0.001$ ) 이상의 통계학적 유의성 있게 감소되었음.

이 결과로 비만세포에서 대조군에 비하여 발효홍삼이 대조군인 수삼추출물(NS) 보다 더 IL-4 mRNA 유전자 발현량이 감소되어 수삼이 발효를 통하여 아토피억제 활성화에 대한 효능강화가 나타났다고 생각되었음.

그림 76-(b)에서 보듯이 GM-CSF mRNA 유전자 발현은 무처치군 (Only MC/9 cell)은  $0.246 \pm 0.063$ 이었고, DNP-IgE로 자극한 대조군은  $1.003 \pm 0.003$ 으로 무처치군 (Only MC/9 cell)에 비하여 현저하게 유전자 발현이 증가되었음. 양성대조군인 CsA처리군은  $0.431 \pm 0.295$  ( $p < 0.05$ )로 대조군에 비하여 약 57.0% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소되었음. 수삼추출물(NS)을 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 GM-CSF mRNA 유전자 발현은 대조군과 차이가 없었음. 그러나 발효홍삼을 처리 후 DNP-IgE로 자극한 실험군의 GM-CSF mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 각각 약 14.6% 이상의 증가하였지만 통계학적 유의성은 없었음.

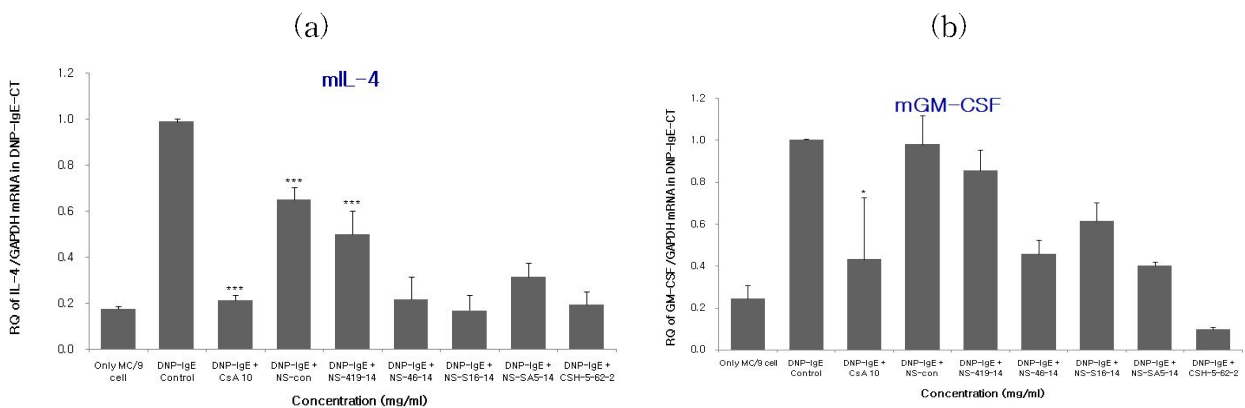


그림 76. MC/9 비만세포에서 IL-4와 GM-CSF mRNA 유전자 발현의 발효홍삼이 미치는 억제 효과

$5 \times 10^5$  MC/9 cells were primed with  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-DNP IgE overnight and stimulated by addition of  $0.5 \mu\text{g/ml}$  DNP-BSA. MC/9 cells were pretreated with CsA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or NS and NS-419-14 ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) for 6 hours. The expression of IL-4 (A) and GM-CSF (B) mRNA was analyzed by real-time PCR. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. from two-independent experiments. (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## 7. 아토피 억제효능 - *in vivo*

*In vitro* 결과 발효 홍삼이 대조군으로 사용한 수삼추출물에 비해 아토피 억제 활성을 지니고 있음 확인하였음. 그 중에서 가장 억제활성을 나타내는 것은 **NS-SA5-14와 NS-46-14 발효홍삼이었음**. 이에 본 연구팀에서는 산업화를 위하여 효능도 좋고 식용으로 가능한 균주 NS-46-14번 균주 발효홍삼을 택하여 동물실험을 실시하고자 하였음. SA5균주는 *Enterococcus*류로 구균계의 유산균으로 거의 식음료에 사용되고 있지만, 미국에서 부분적으로 식음료에 사용이 제한되는 균주이기 때문에, 효능도 좋고 식음료에 제한이 없는 46(*Leuconostos mesenteroides*)균주를 이용한 발효홍삼 NS-46-14를 선택하여 동물실험을 실시하였음. 또한 이 균주에 의해 변화되는 사포닌 중 *in vitro* 실험에서 억제활성을 나타낸 (S)-Rg3도 동물실험을 실시하였음(표 31).

표 31. *In vivo* 샘플 처리군

처리군	처리 방법
NC/Nga-Nr	Normal NC/Nga mice
DNCB-Control	Atopy dermatitis skin lesions-induced in NC/Nga mice by 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)
DNCB-FK506	DNCB plus FK506 (0.1% ointment)
DNCB-3% NS-46-14	DNCB plus 3% NS-46-14 (ointment)
DNCB-0.5% NS-46-14	DNCB plus 0.5% NS-46-14 (ointment)
DNCB-3% S-Rg3	DNCB plus 3% S-Rg3 (ointment)
DNCB-0.5% S-Rg3	DNCB plus 0.5% S-Rg3 (ointment)

### (!) 실험재료

#### (가) 실험시약

동물실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, trichloroacetic acid, isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, 적혈구 용혈액(ACK lysis solution), DMEM (Dubecco's modified Eagle's medium) 배양액, dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), sulforhodamin B(SRB), 2-isopropanol, sodium dodecyl sulfate(SDS), Streptomycin(Gibco, USA)을 사용하였다. HPLC 표준시료는 Myricitrin (Sigma,USA)과 Quercitrin (Sigma, USA) 제품을 사용하였음. 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, USA) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), T-stim은 BD Bioscience(USA)사 제품을, anti-B220-PE, anti-Gr-1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD3 mAb 등은 Pharmingen사(USA) 제품을, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , 그리고 IL-13 ELISA kit는 eBioscience사 (USA) 제품을, IgE ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) kit는 Shibayagi사 (Shibukawa, Japan) 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였음.

(나) 실험기기

동물실험에 사용한 기기는 열탕추출기(DWT-1800T, 대웅, Korea), 감압 증류장치(rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO2 배양기(Forma scientific Co., USA), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker(Lab-Line, USA), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer(Sanyo, Japan), Quantitative Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA), ELISA reader (Molecular Devices, USA), HPLC (High performance liquid chromatography ; Waters Co. USA) 등을 사용하였음.

(2) 실험동물

아토피 피부염 병변을 관찰하기 위하여 수컷이며 7 주령의 20~22g NC/Nga생쥐(SLC, Inc, Japan)를 중앙실험동물에서 공급받음. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 light-dark cycle의 환경을 유지하며 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용하였음.. 그리고 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인(승인번호:DJUARB2013-012)을 받았음.

(3) 발효홍삼 및 (S)-Rg3의 크림제형 제조

발효홍삼 및 (S)-Rg3 크림제형은 수상, 유상, 안정제에 3% 발효홍삼 및 (S)-Rg3, 0.5% 발효홍삼 및 (S)-Rg3, 그리고 0.5% FK506의 제형을 혼합하여 제조하였으며 구성성분은 표 32과 같았음.

표 32. 발효홍삼 및 (S)-Rg3 extract cream formulation

구성성분		3% 추출물 (함량)	0.5% 추출물 (함량)	FK506(양성대조군) (함량)
수상	Glycerine	10.00	10.00	10.00
	Silicon 유도체	0.20	0.20	0.20
	Microcide-C	0.20	0.20	0.20
	EDTA-2Na	0.01	0.01	0.01
	Keltrol F(1%)	5.00	5.00	5.00
	Sepiplus 400	0.30	0.30	0.30
유상	Lanette O	2.00	2.00	2.00
	Olive M 1000	1.00	1.00	1.00
	Tego care 450	2.00	2.00	2.00
	Puresyn 4	2.00	2.00	2.00
	TCG-M	3.00	8.00	8.00
	DC 200/6cs	2.50	2.50	2.50
	Lipex Shea	1.00	1.00	1.00
	Vitamin E	0.50	0.50	0.50
	D-P	0.10	0.10	0.10
BHT	0.02	0.02	0.02	
안정제	TEA	0.10	0.10	0.10
	Di water	2.00	2.00	2.00
첨가제		A	B	C
	3% 발효홍삼추출물	3.00		
	0.5% 발효홍삼추출물		0.5	
	FK506 (양성대조군)			0.5

(4) *In vivo*; Atopic dermatitis-like skin lesions induced in NC/Nga mice by DNCB

: 피부염 유도 및 시료처리

- 7주령의 NC/Nga 생쥐를 1주일 동안 적응시킨 후 NC/Nga 생쥐의 등에 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치 후 1%의 DNCB (dinitrochlorobenzene)가 들어 있는 아세톤 : 올리브오일(3 : 1) 200  $\mu$ l를 제모 부위에 도포하고, 3일 후 2차 도포하였음.
- 1차 도포 후 7일째부터는, 1주일에 3회씩 3주간 0.4% DNCB 용액 150  $\mu$ l를 재차 도포 (10주령 ~13주령)하여 아토피 피부염을 유발시켰으며, 피부발진 육안 평가는 Yamamoto163)의 평가항목을 참고하여 erythema / hemorrhage, dryness / scarring, edema, excoriation / erosion, lichenification 5가지 항목으로 하고 육안 평가하여 아토피 피부발진을 판단하였음.
- 시료 도포는 0.4% DNCB를 2주간 도포한 후 CP-A-B 추출물을 3%와 0.5% 크림형으로 제조하여 각각 3주간(12주령~15주령) 오전 11시에 1회씩 등부분에 골고루 도포하여 실험군으로 설정하였고, 양성 대조 약물로 FK506 (tacrolimus) 0.5%를 주 5회 발진된 등부위에 도포하여 양성대조군으로 설정하였음.
- 시료 도포 종료한 다음 혈액을 채혈하고 등 부위의 피부를 절제하여 10% 포르말린 용액에 담아 보관하였음.

(5) 실험방법 및 실험결과

(가)Atopy dermatitis like NC/Nga mice

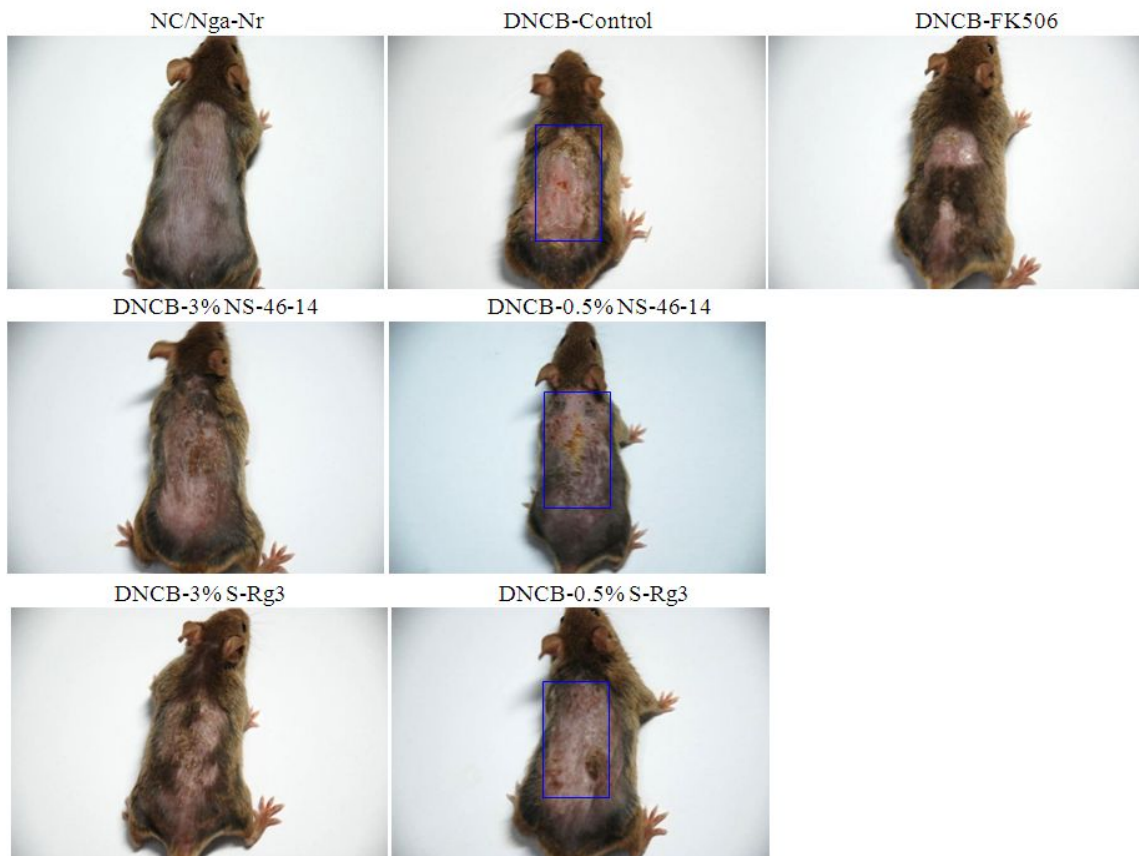


그림 77. NC/Nga mice에서 FK506과 발효홍삼과 단일 사포닌의 치료에 대한 임상소견

그림 77은 NC/Nga normal mice와 여기에 DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 DNCB-induced atopy dermatitis mice(대조군), DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 0.5% FK506을 처리한 군, DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 3% NS-46-14를 처리한 군, DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 0.5% NS-46-14를 처리한 군 그리고 DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 3%와 0.5% (S)-Rg3 처리군의 실험결과를 나타낸 것임.

전체적으로 아토피가 발현된 마우스는 피부건조, 발진, 상처가 귀, 얼굴과 머리 그리고 등에 발현되었음을 알 수 있었음. 이에 비해서 양성대조군인 FK506을 처리하면 아토피가 상당히 호전되어 외관상 털도 자라고 피부의 재생이 일어남을 알 수 있었음. 한편, 3% 발효홍삼 처리군 및 (S)-Rg3를 처리한 군에서 아토피가 상당히 호전되었음을 확인하였음.

(나) Hematological parameters

혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구 세포수의 측정을 하여 아토피 억제 활성을 봄. 최종 실험종료 후 heparin (20 IU) 30 $\mu$ l 처리된 3ml syringe 주사기로 심장 혈액 0.8ml를 채취하였다. 전혈을 서울의과학연구소(서울시 용산구)에 의뢰하여 혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구의 총 세포수를 자동 혈액 분석기로 측정하였음.

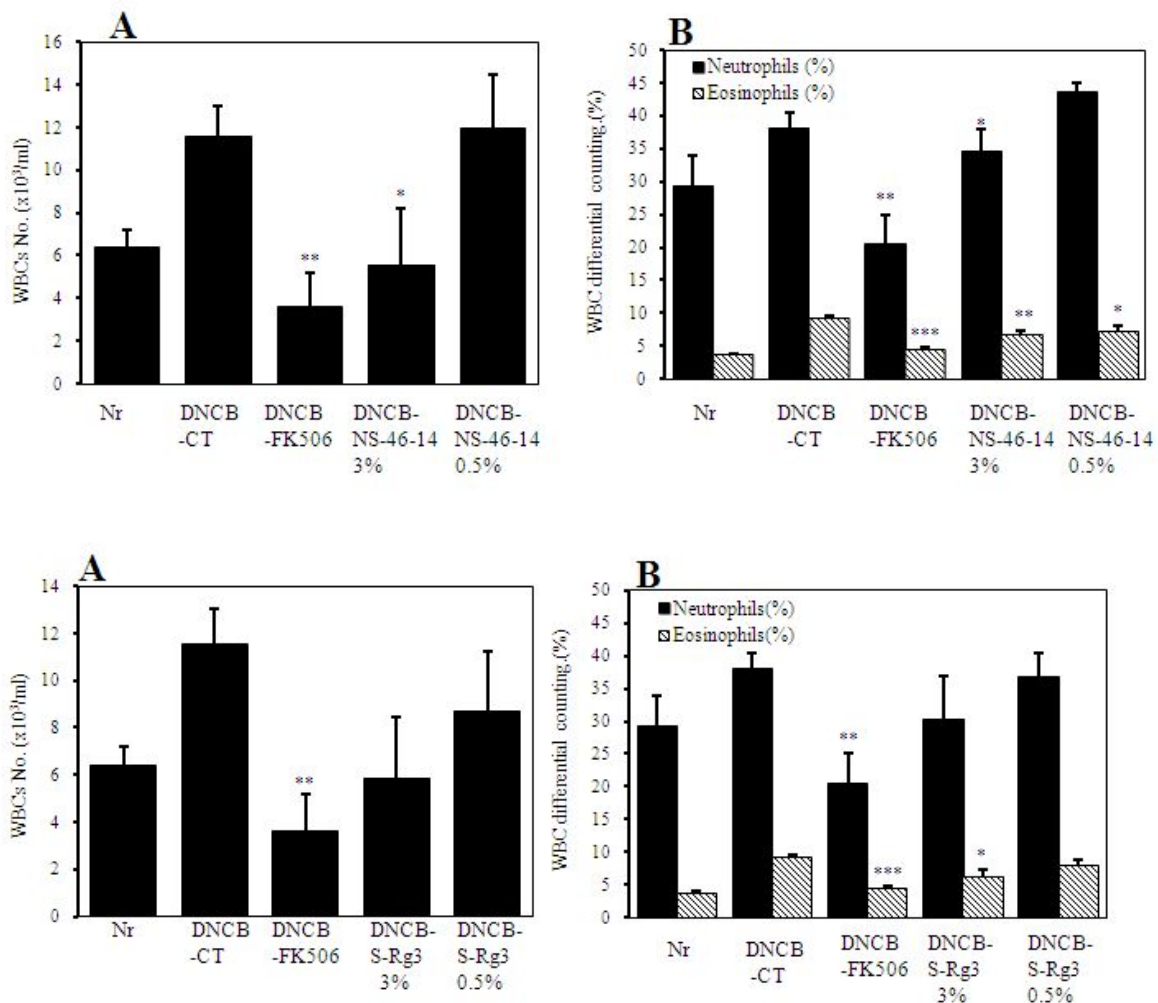


그림78. 혈액 중 백혈구와 호중구, 호산구 세포수의 측정

그림 78은 NC/Nga normal mice와 여기에 DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 DNCB-induced atopy dermatitis mice(대조군), DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 0.5% FK506을 처리한 군, DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 3% NS-46-14를 처리한 군, DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 0.5% NS-46-14를 처리한 군 그리고 DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 3% 와 0.5% (S)-Rg3 처리군에서의 혈약중 백혈구, 호중구, 호산구 세포수를 나타낸 그래프임. 이는 아토피가 발현하면서 증가함에 발효홍삼과 (S)-Rg3 처리군을 양성대조군인 FK506을 처리시 비교분석함. 분석결과 3%의 발효홍삼과 (S)-Rg3 처리군에서 양성대조군과 비슷한 억제 활성을 관찰 할 수 있었음. 0.5%의 경우에는 양성대조군에는 미치지 못하지만 약간의 억제 활성을 관찰 할 수 있었음.

(다) Immunoglobulin E Serum level

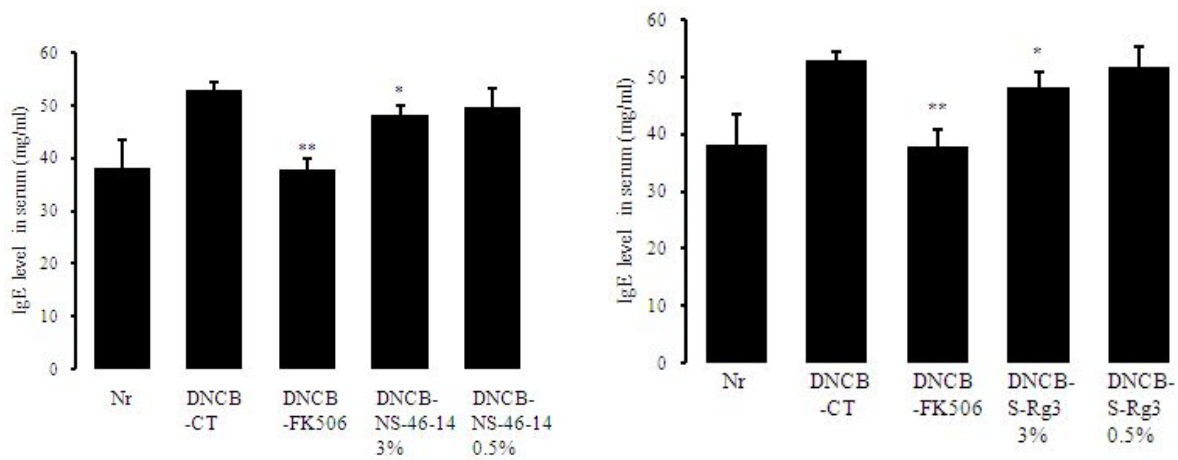


그림 79. Immunoglobulin E Serum level-발효홍삼 및 (S)-Rg3

Immunoglobulin E Serum level은 채혈을 통해 IgE 수준 측정하여 알아보았음.

- 실험은 NC/Nga 생쥐의 후안와 정맥총 (retro-orbital venus plexus)에서 10주, 12주, 14주에 capillary tube를 이용하여 약 100 $\mu$ l의 혈액을 채혈한 후 원심분리기 6,500rpm에서 20분간 원심분리한 후 30 $\mu$ l의 혈청을 분리하였음.
- 혈청은 취하여 -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였고 NC/Nga 생쥐의 혈청 내 IgE 농도 측정은 ELISA로 IgE 수준을 측정하였음.
- 각 well에 NC/Nga 생쥐에서 10주, 12주, 그리고 14주에 채혈한 혈청 5 $\mu$ l (1/10 dilution)와 dilution buffer 45 $\mu$ l를 혼합하여 각 well에 분주하고, 2시간 동안 25 $^{\circ}$ C 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음, biotin- conjugated anti IgE를 넣고 2시간 방치하였음.
- 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 Avidin-HRP conjugated antibody 100 $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였음. 또한 TMB 기질을 100 $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였음.

그림 79는 NC/Nga normal mice와 여기에 DNCB를 처리하여 아토피를 유발한



DNCB-induced atopy dermatitis mice(대조군), DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 0.5% FK506을 처리한 군, DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 3% NS-46-14를 처리한 군, DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 0.5% NS-46-14를 처리한 군 그리고 DNCB를 처리하여 아토피를 유발한 마우스에 3% 와 0.5% (S)-Rg3 처리군에서의 Immunoglobulin E Serum의 분비 정도를 나타내는 그래프임.

Immunoglobulin E(IgE)는 포유동물에서 발견되는 항체의 그룹으로 주요 기능은 면역 방어 기능으로 알레르기 천식, 알레르기성 비염, 음식 알레르기, 만성두드러기 아토피성 피부염의 일부 유형 등 다양한 알레르기 질환에서 중추적인 역할을 함. 즉 IgE는 mast cell에 결합하여 mast cell에서의 사이토카인 또는 히스타민등 알레르기 원인인자를 분비하게 되었음. 따라서 IgE의 분비량이 많아지면 질수록 아토피 유발요인이 증가한다는 해석임.

그림 79를 보면 아토피 유발한 마우스에 발효홍삼처리군과 단일 사포닌 Rg3의 처리군은 이 Immunoglobulin E Serum level을 낮추는 효과를 보이고 있음. 이는 FK506을 처리한 군만큼은 아니지만 그래도 대조군에서 발생하는 IgE의 분비량을 다소 낮춤으로 아토피 억제 활성을 보임을 알수 있었음.

#### (라) Cytokine production

비장세포 분리 및 사이토카인 측정을 통하여 아토피 억제 활성을 알아보았음.

실험방법은 다음과 같음.

- NC/Nga 생쥐 실험 14주 후에 실험을 종료하고 비장을 적출하여 100 mesh로 비장세포를 분리하였음.
- 전날 CD3 mAb 1 $\mu$ g/ml을 96well plate에 coating하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 overnight한 다음 D-PBS로 2회 수세함.
- 분리한 비장세포는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후 DNCB extract가 coating된 각각의 well에 5x10<sup>5</sup> 세포씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48시간 동안 배양한 후, 원심분리기 2,000rpm에서 3분간 원심분리한 후 200 $\mu$ l의 배양상청액을 얻었음.
- 배양상청액내의 IL-4 (BioSource, USA)와 IFN- $\gamma$  (BioSource, USA), 혈청내 IL-5 (BioSource, USA), 그리고 혈청내 IL-13 (R&D system, USA)의 수준 측정은 ELISA로 측정하였음.
- 각 well에 배양상청액 50 $\mu$ l를 분주하고, 2시간 동안 25 $^{\circ}$ C 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 biotin conjugated anti -IgE를 넣고 2시간 방치하였음.
- 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 Avidin-HRP conjugated antibody 100 $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였음.
- TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 100 $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였음.



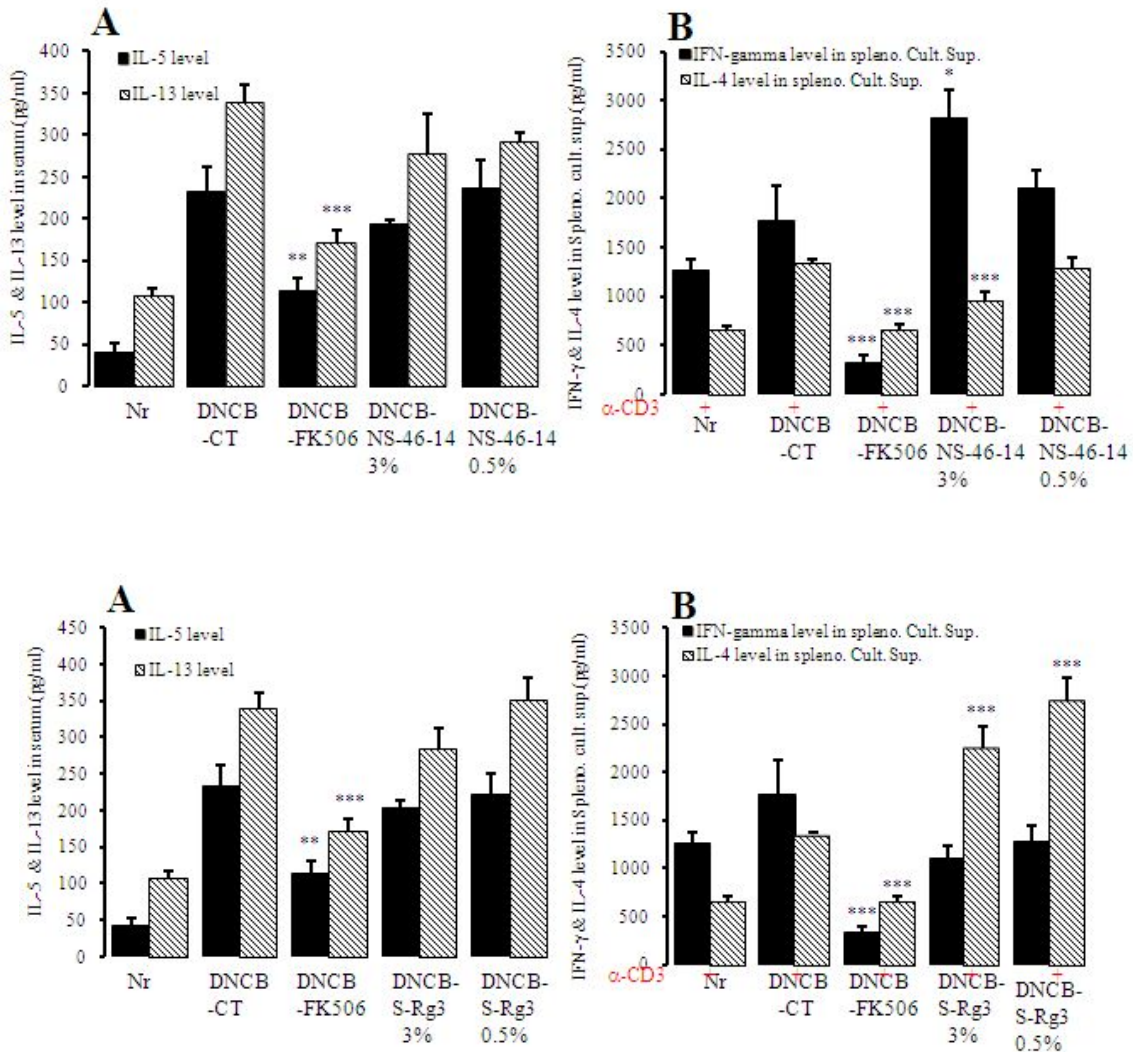


그림 80. Cytokine production level

그림 80은 NC/Nga normal mice, DNCB-induced atopy dermatitis mice (control), DNCB plus 0.5% FK506-ointment mice, DNCB plus 3% NS-46-14-ointment mice, and DNCB plus 0.5% NS-46-14-ointment mice (dorsal skin tissue)를 4주 동안 처리한 마우스의 비장세포에서 발현되는 cytokine의 생성되는 수준을 표시하는 그래프임. 그림 80에서 보는 바와 같이 발효홍삼 추출물과 (S)-Rg3의 처리를 한 마우스의 경우 사이토카인의 분비량이 적음을 알수 있으며 3%의 농도에서는 아토피의 치료제로 사용되고 있는 FK506에 비슷한 효능을 지니고 있음으로 발효홍삼과 단일 사포닌 (S)-Rg3는 아토피의 억제 활성을 나타냄을 알수 있었음.

#### (마) FACS에 의한 유세포 분석

Axillary lymph node(ALN), 그리고 등피부조직에서 형광 유세포 분석의 실험방법은 다음과 같음.

- NC/Nga 생쥐에서 ALN를 각각 적출하여 100mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리(1700 rpm)하고 2회 세척한 후 cell strainer (FALCON, USA)에 통과시켜 세포 이외

의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였음.

- 등 피부조직은 잘게 chopping한 후 collagenase 1mg/ml (in 3% FBS + RPMI 1640)를 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20 min) 배양기에서 배양한 후 상청액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였음.
- 분리한 ALN과 피부조직 침윤세포의 총 세포수를 측정한 다음 모든 조직의 세포 등을  $5 \times 10^5$  Cells/ml 세포로 조정한 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였음.
- 각각에 anti-CD3e-PE, anti-CD11b-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD23-FITC, anti-Neutrophils-FITC, anti-Gr-1-PE, 그리고 anti-B220-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰음.
- 반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3+, CD4+, CD8+, Neutrophils+Gr-1+, 그리고 B220+CD23+ 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총 세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였음.

■ ALN cell content & absolute No.

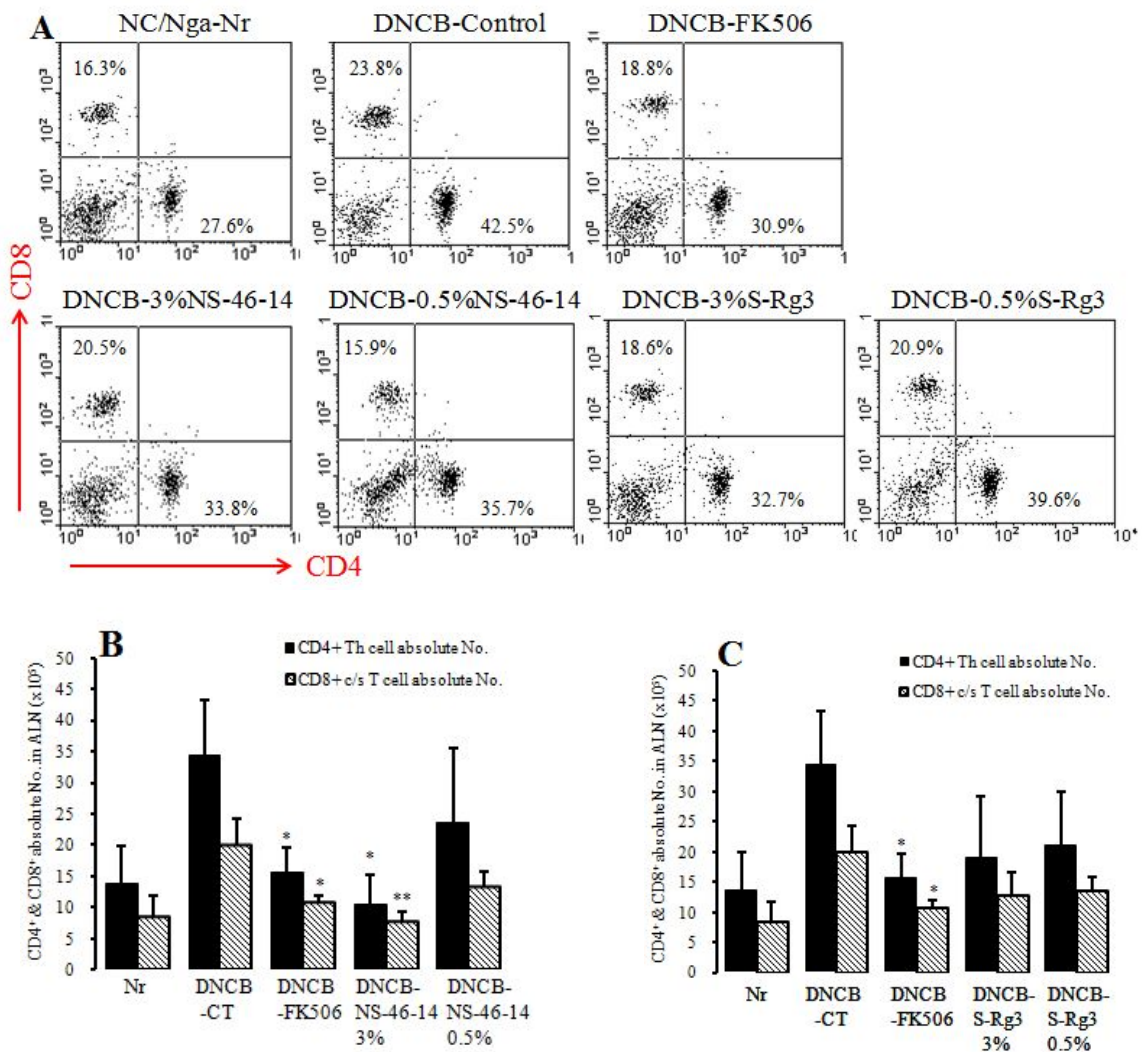


그림 81. FACS에 의한 유세포 분석

그림 81-86는 발효 홍삼과 단일 진세노사이드의 유세포 분석임. 이는 미처리군 및 추출물 처리군들의 비장의 T-lymphocyte subsets population의 변화에 미치는 영향을 알아보았음. 비장은 가장 큰 보조 면역장치로 가장 많은 면역세포를 포함함. 이는 혈액을 따라서 이동하는 병원균들에 대한 적절한 면역방어를 유도하는 기관이며 이 병원균들은 대식세포와 수지상 세포에 의해 발견되고 습득되어 주로 혈관을 통해 비장으로 이동한 후 T 림프구 및 B림프구를 활성화 시킴. 이렇게 활성화된 면역세포들은 CD(cluster of differentiation)이라는 백혈구 표면에 발현하는 인자로서 면역세포의 표현형 구분 및 기능을 나타내는 용어로 표현함. 따라서 유세포 분석은 면역세포의 분석으로 형광으로 표지된 세포나 염색체를 유체의 흐름으로 그래픽화 한 것임. 그림 81-86에서 보는 바와 같이 유세포 분석의 수치는 면역세포에서 발견되는 림프구들의 활성화 정도를 나타냄. 따라서 유세포 분석은 발현 정도를 나타냄으로써 아토피 억제 활성을 지니고 있음을 나타냄.

그래프 결과 발효 홍삼추출물과 단일 사포닌 (S)-Rg3가 아토피 억제 활성을 지니고 있음을 나타냄.

■ ALN cell content & absolute No.

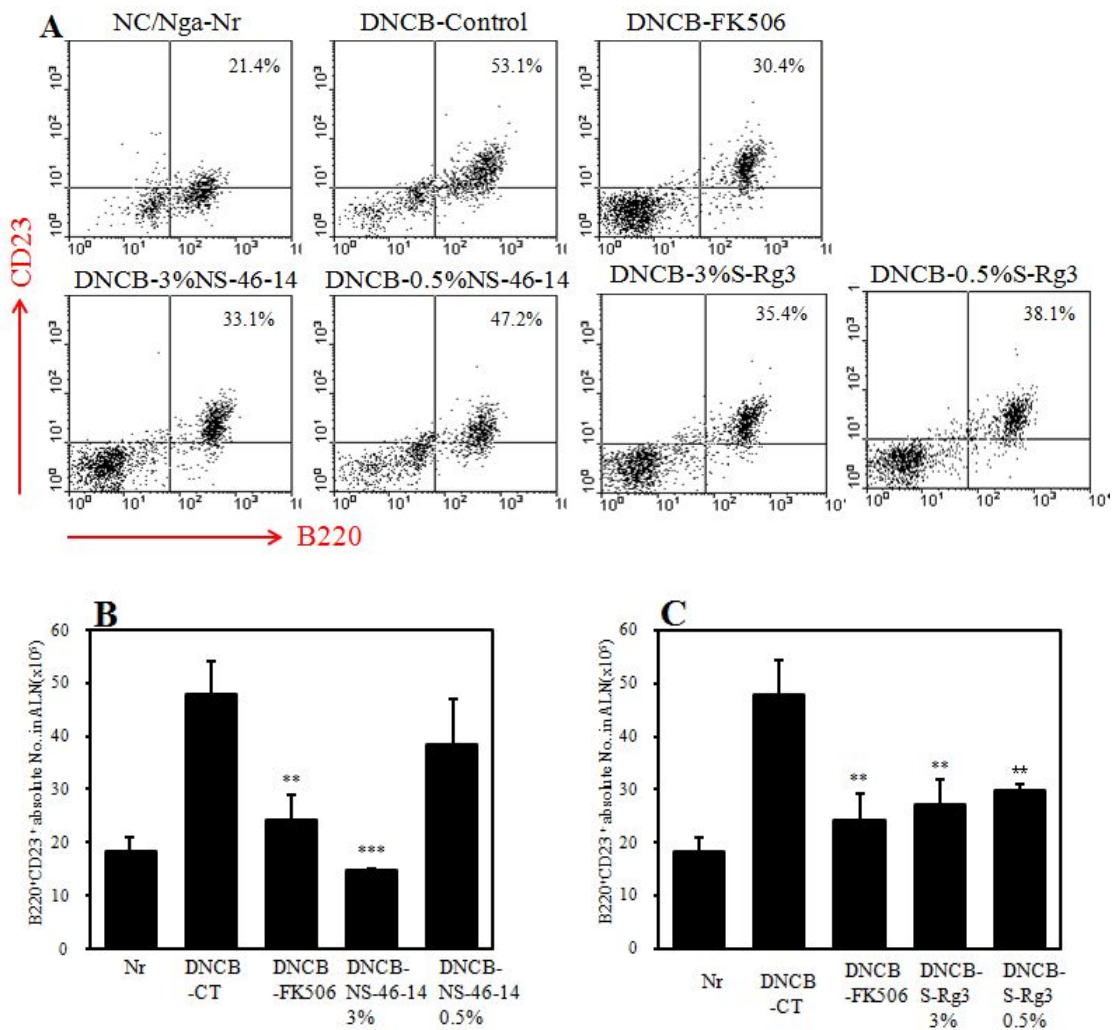


그림 82. FACS에 의한 유세포 분석

■ PBMC content percent

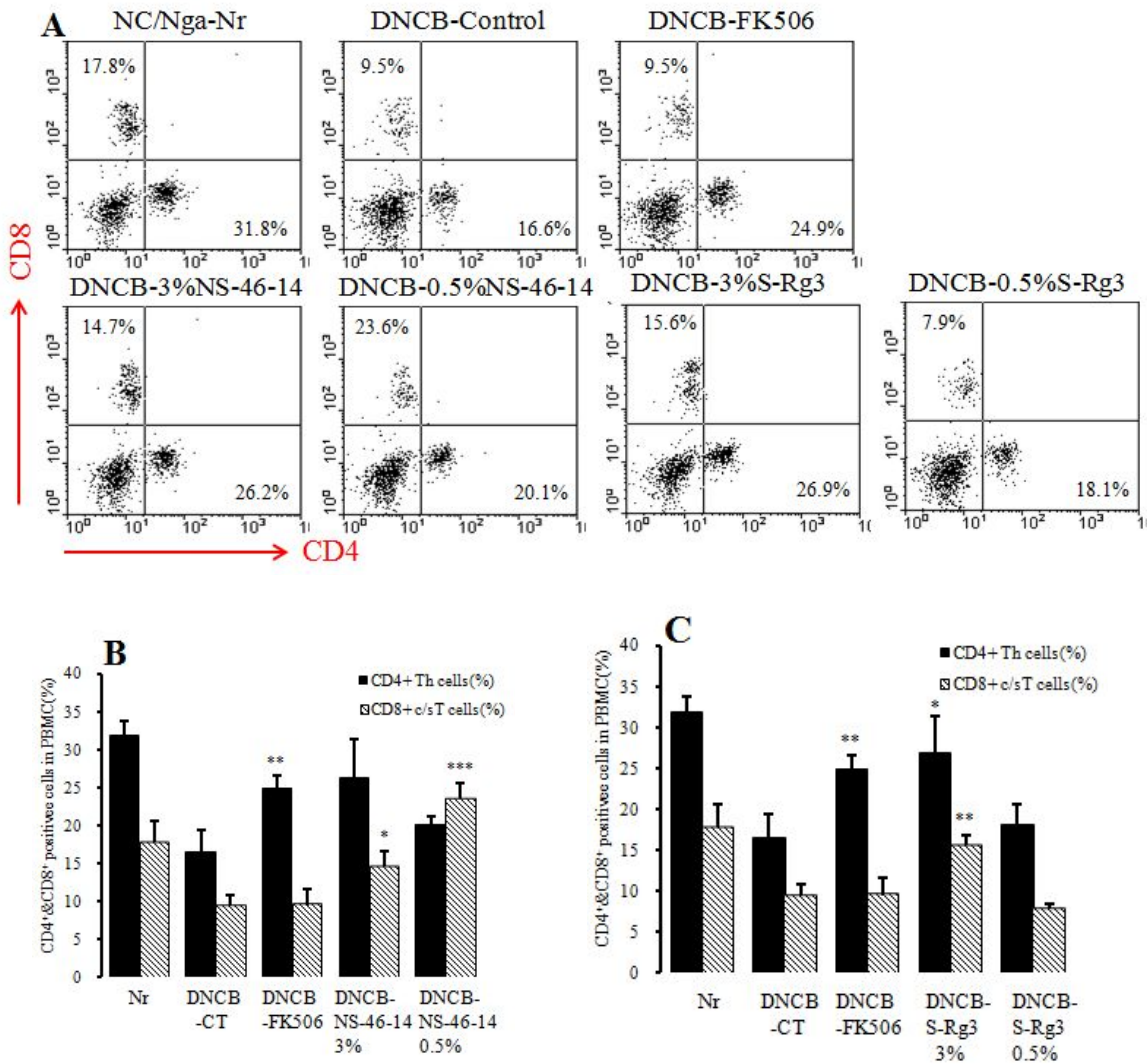


그림 83. FACS에 의한 유세포 분석

Effects of FK506 and NS-46-14 composition on FACS analysis in ALN in atopy-like NC/Nga dermatitis mouse model by DNCB stimulation.

After atopy NC/Nga dermatitis skin lesions-induced by DNCB followed by the ointments of FK506 (0.1%), 발효 홍삼 (3% NS-46-14, 0.5% NS-46-14, dorsal skin to ointment) and ginsenoside(3% S-Rg3, 0.5% S-Rg3 dorsal skin to ointment) for 4 weeks. PBMCs (5x10<sup>5</sup> cells/ml) were isolated, and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Total cell content of CD8/CD4 in NC/Nga mice PBMCs.



■ PBMC content percent

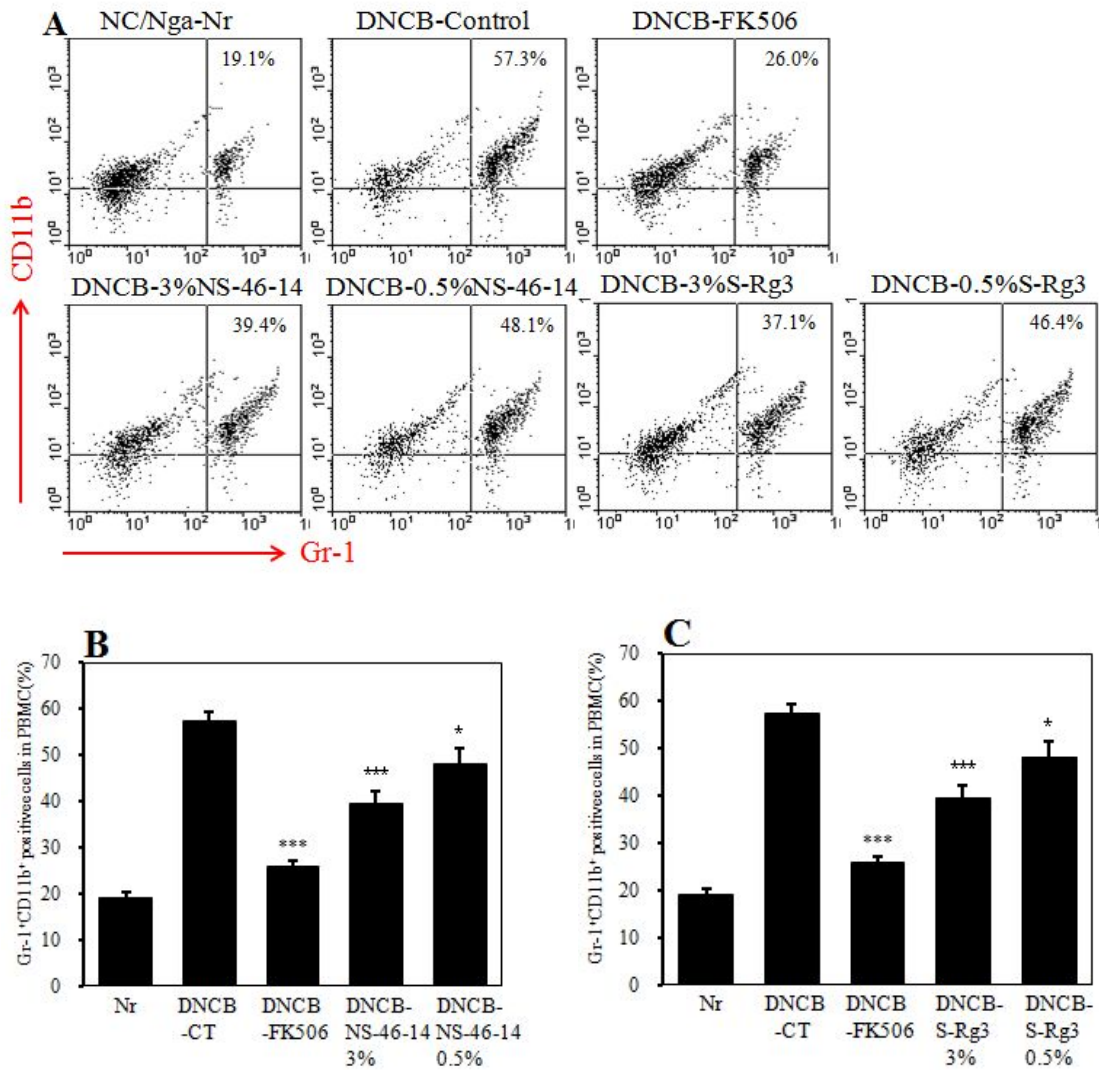


그림 84. FACS에 의한 유세포 분석

Effects of FK506 and NS-46-14 composition on FACS analysis in PBMC in atopy-like NC/Nga dermatitis mouse model by DNCB stimulation.

After atopy NC/Nga dermatitis skin lesions-induced by DNCB followed by the ointments of FK506 (0.1%), 발효 홍삼 (3% NS-46-14, 0.5% NS-46-14, dorsal skin to ointment) and ginsenoside(3% S-Rg3, 0.5% S-Rg3 dorsal skin to ointment) for 4 weeks. PBMCs ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were isolated, and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Total cell content of CD4/CD8 in NC/Nga mice PBMCs.

■ Dorsal skin cell content & absolute No

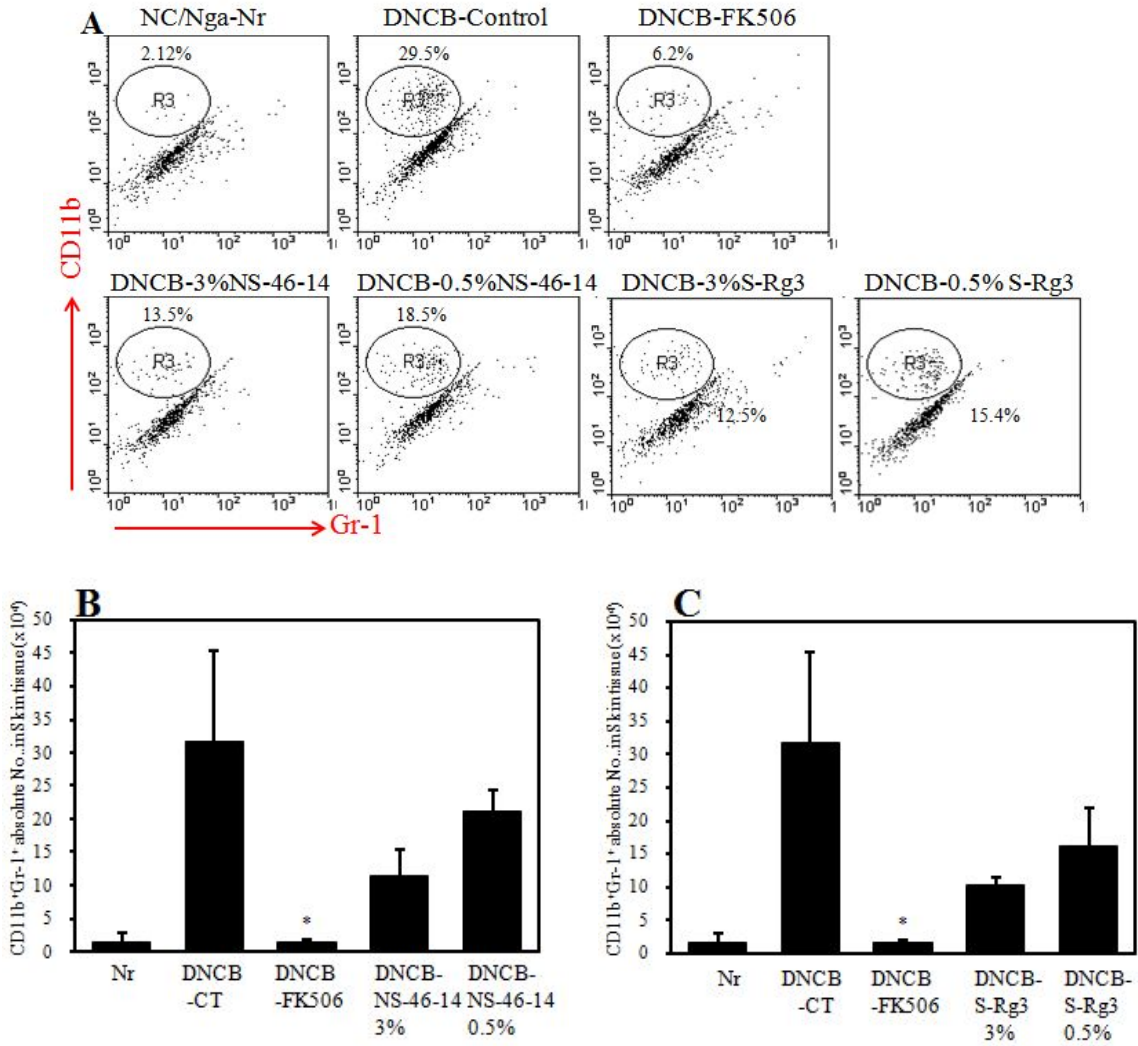


그림 85. FACS에 의한 유세포 분석

■ Dorsal skin cell content & absolute No.

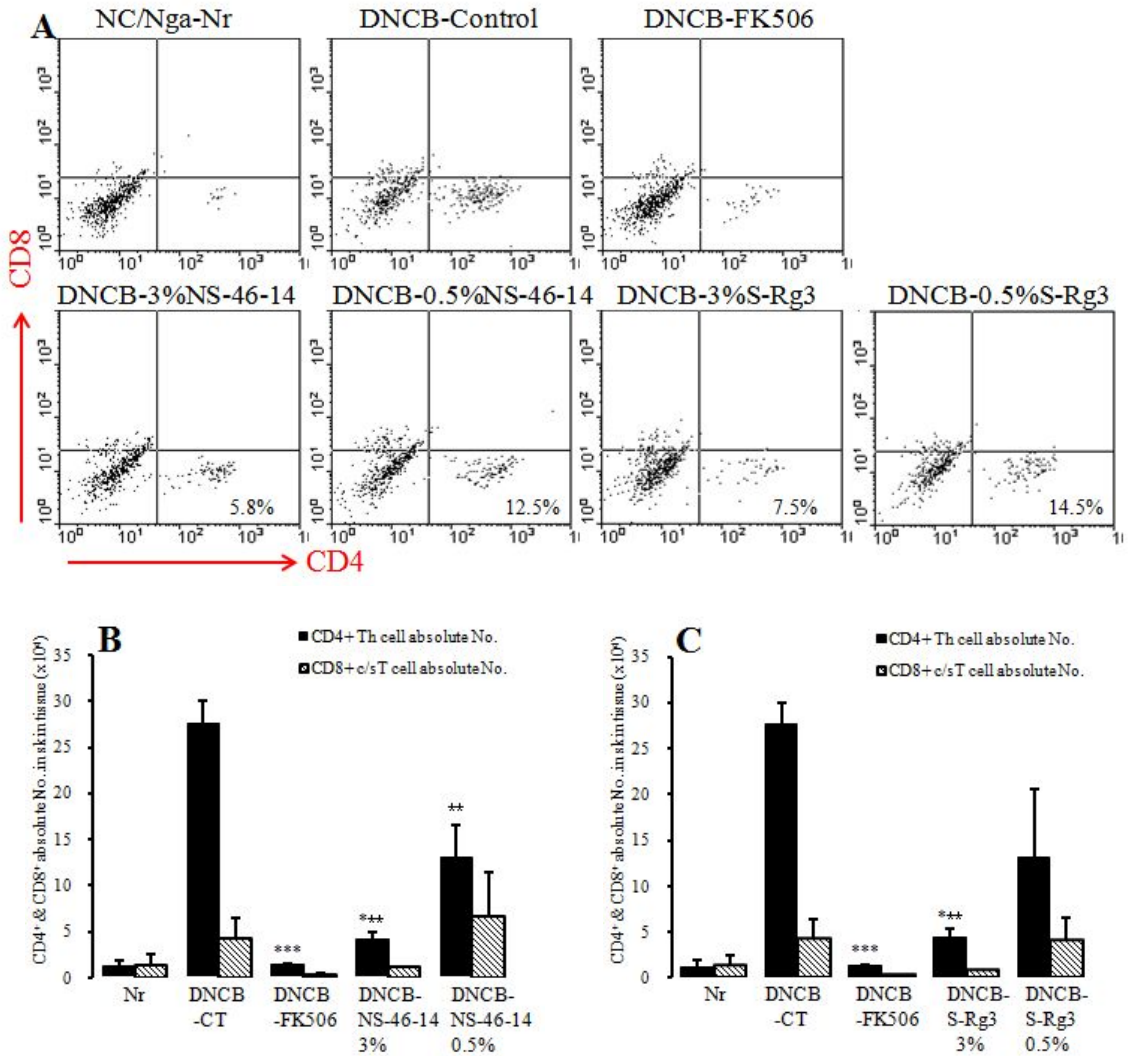


그림 86. FACS에 의한 유세포 분석

(바) Real-time PCR : Dorsal skin tissue

NC/Nga 생쥐의 등 피부조직에서 RNA 분리 방법임.

- Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 등 피부조직을 적출하여 각각에 RNAzolB 500  $\mu$ l를 넣고 용해될 때까지 homogenizer로 분쇄함.
- 조직분쇄 혼합 부유액에 클로로포름(CHCl<sub>3</sub>) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였음.
- 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리한 후 약 200  $\mu$ l의 상청액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu$ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였으며, 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였음.

- 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 $\mu$ l의 증류수에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였음.

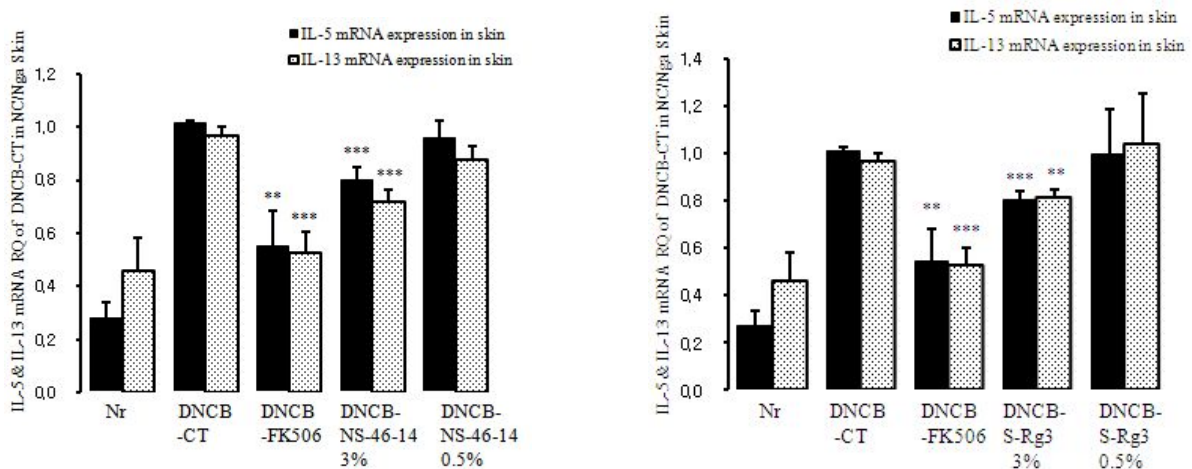


그림 87. Dorsal skin tissue에서의 사이토카인의 분비량

역전사-중합효소 연쇄반응은 다음과 같음.

- 준비된 total RNA 2 $\mu$ g을 DNase I (10U/ $\mu$ l) 2U/tube를 37 $^{\circ}$ C heating block에서 30분간 반응한 후 75 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 변성시킴.
- 이에 2.5 $\mu$ l 10mM dNTPs mix, 1 $\mu$ l random sequence hexanucleotides (25pmole/25 $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1 $\mu$ l RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l 100mM DTT, 4.5 $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 $\mu$ l의 M-MLV RT (200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 함.
- 이 20 $\mu$ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 $^{\circ}$ C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, USA)를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용함.

Real time quantitative RT-PCR 방법은 다음과 같음.

- 7500 Real-Time PCR system을 이용하여 수행하였으며 Mouse Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같음(표 33).



표 33.. Primer Sequence

Gene	Primer	Sequence
G3PDH	Forward	5' TGAAGCAGGCATCTGAGGG 3'
	Reverse	5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG 3'
IL-5	Forward	5' AGCCTAACCCCTGTTGGAGGT 3'
	Reverse	5' GTGATCGGCTTTTCTTGAGC 3'
IL-13	Forward	5' ATGCCCAACAAAGCAGAGAC 3'
	Reverse	5' TGAGAGAACCAGGGAGCTGT 3'

- Cytokine 유전자 발현은 SYBR® Green PCR Master mix를 사용하였고, internal standard는 GAPDH로 Taqman probe를 사용하였으며, primer의 최종농도가 200 nM이 되게 반응시킴.
- IL-5와 IL-13 mRNA 발현은 등피부조직에서 관찰하였고 cDNA를 합성하여 분석하였음.
- Real time quantitative PCR의 조건
  - Pre-denaturation은 2min at 50°C, 10min 94°C, 그리고 40 cycles을 0.15min at 95°C, 1 min at 60°C에서 수행함.
  - Hydrocortisone 도포군과 야생화 추출물 투여군의 대조군은 internal standard로 GAPDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR은  $y=x(1+e)^n$  (x:starting quantity, y : yield, n : number of cycles, e : efficiency)로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정함.

그림 87은 역전사-중합효소 연쇄반응을 통해 아토피 억제 활성을 보는 그래프임. 본 실험은 Dorsal skin tissue에서 발효 홍삼추출물과 단일 진세노사이드의 도포후 혈청에서의 사이토카인의 유전자 발현을 측정하였음. 실험 결과 발효 홍삼추출물과 단일 사포닌의 처리는 미처리에 비해 20%정도의 사이토카인의 분비가 감소됨을 알수 있음. 이는 피부조직에서의 면역효과가 20%정도 효과적임을 알수 있음.

(사) Effects of Drug on AD-Like Skin Lesions

■ Dorsal skin tissue (H & E staining)

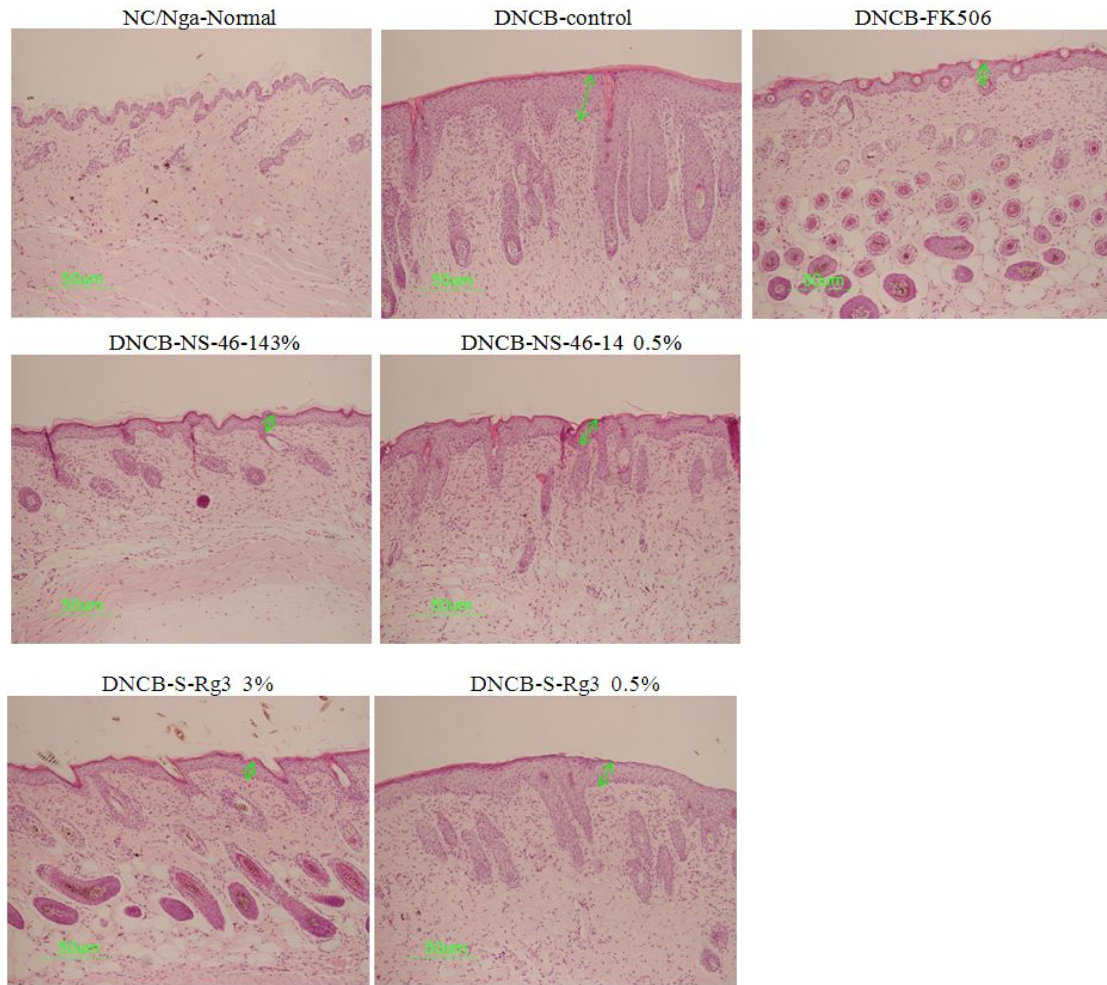


그림 88. Dorsal skin tissue (H & E staining)

■ 조직의 분석을 통해 아토피의 효과를 알아보게 됨.

■ 실험 방법은 다음과 같음.

- 등 쪽 목 부분의 피부를 떼어내어 10% paraform-aldehyde에서 24시간 동안 포르말린에 고정하였으며 그 조직을 파라핀으로 포맷하였고, 5µm 두께로 block을 만듦.
- 조직부분은 염증을 일으키는 epidermis, dermis, keratinocytes, neutrophils/ eosinophil 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline /eosin (H&E) 염색과 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경 (x200, Nikon, Japan)으로 관찰하였음.

그림 88과 그림 89는 Dorsal skin tissue세포에서 조직을 나타내는 그림임. 그림에서와 같이 아토피에 노출되었을 경우 조직의 파괴로 정상세포에 비해 조직이 불균형적이고 두꺼워지는 경향을 나타내지만 발효홍삼과 단일 사포닌 Rg3의 처리군의 경우는 조직의 정상 세포에 가깝게 표피부분이 얇고 조직이 치밀함을 알 수 있었음.

따라서 발효 홍삼과 발효홍삼 안에 다량 존재하는 유효 성분인 (S)-ginsenoside Rg3는 아토피 억제 활성화와 치료 효능을 지니고 있다고 볼 수 있었음.

■ Dorsal skin tissue (Toluidin blue staining, mast cell)

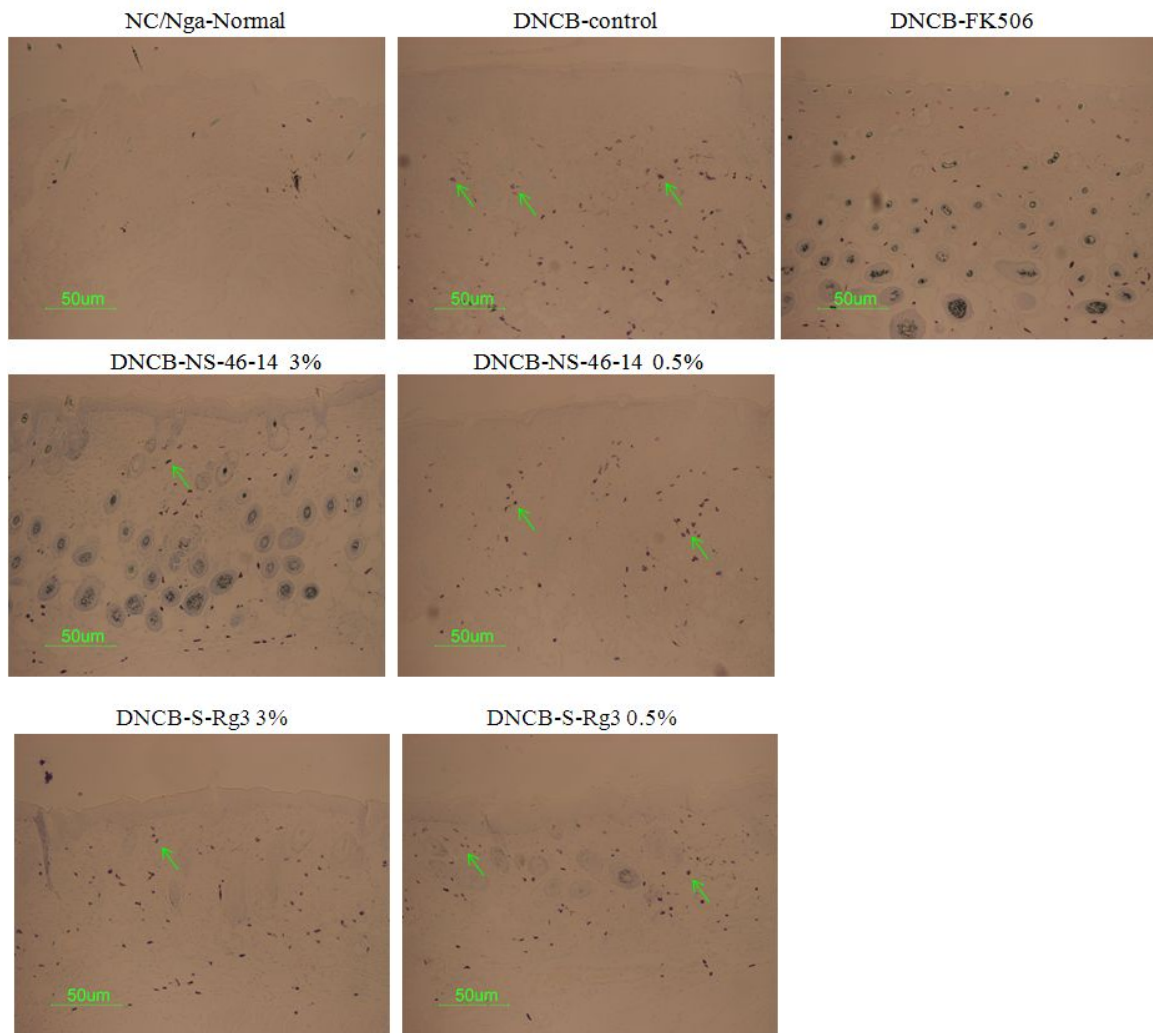


그림 89. Dorsal skin tissue (Toluidin blue staining, mast cell)

## 8. 제1세부과제 결론

제2세부과제에서 여러 가지(15종) 발효균주에 의해서 발효된 인삼의 성분을 분석 및 활성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었음;

- S16과 SA4 균주가 비교적 대량으로 compound K를 생산하였음을 알 수 있음
- A3 유산균은 발효 과정을 거쳐 단일 사포닌 Rb1을 Rg3와 Rg5로 전환시킴을 확인하였으며, 수삼(뿌리)의 발효 과정을 통해 발효홍삼에 (S)-Rg3, (R)-Rg3, Rg5가 생성됨을 확인하였음.
- 인삼잎의 경우에도 발효가 일어났음을 확인하였음.
- 수삼(뿌리)에 의한 419 발효에서는 여러 가지 사포닌 중 선택적으로 Rb1을 Rd로 전환시킴을 확인하였음.
- A3, 46, SA5 균주는 발효를 통하여 홍삼에 미량으로 존재하는 (S)-Rg3, (R)-Rg3, Rg5로 전환시키는 균주임을 확인하였음.
- 발효홍삼으로부터 Rd 및 (S,R)-Rg3 및 Rg5를 대량으로 분리하였음.
- 22균주에 의한 발효홍삼 SN-5은 및 이를 120℃에 30분, 60분, 90분 증숙 발효홍삼의 경우 증숙시간에 비례하여 항산화활성을 나타내었음(hydrogen peroxide 억제활성, DPPH radical 소거능, 아질산염 소거능 및 superoxide anion 소거활성).
- 발효홍삼의 아토피 억제활성을 측정된 결과 14일 발효한 발효 홍삼 SA5-14, 46-14, S16-14, 419-14순으로 강한 억제 활성을 나타냄을 확인하였음.
- 이 중 발효홍삼을 이용한 상품화를 하기 위하여 항산화활성, 아토피 억제활성이 강할 뿐만 아니라 식용으로도 가능한 46-14 발효 홍삼과 발효 홍삼에서 주요 유효 성분인 (S)-Rg3의 동물실험을 실시한 결과 세포 독성도 없고, 사이토카인의 억제 활성 뿐만 아니라 조직의 경우 아토피에 의해서 두꺼워진 피부와는 달리 정상균과 거의 동등함을 최종 확인하였음.
- 이러한 결과로부터 전통식품으로부터 신규균주 15종을 분리 확인하였으며 이 중 5종을 기탁완료하였음. 또한 특허출원 5건, 기술이전 1건, 신규균주, 논문투고(2편 게재, 2편 투고중)과 같은 실적을 얻었을 뿐만 아니라 상품화를 위한 시제품을 개발하였음.

## 제 2 절. 제2세부과제 수행 내용 및 결과

### : 전통발효식품 및 유산균을 이용한 인삼발효에 따른 생화학적 변화

#### 1. 전통발효식품 및 유산균을 이용한 인삼발효에 따른 생화학적 변화

가. 한국의 전통 김치와 콩고의 마유 등 다양한 분리원에서 분리한 유산균주의 선발과 동정 및  $\beta$ -glucosidase 활성균주의 선발

■ 유산균 분리 : 적당한 희석 배수로 희석하여 MRS agar plate 에 심은 후 37°C에서 3일간 배양함. Plate에 자란 colony를 취하고 esculin agar 배지에 배양한 다음 plate 상에  $\beta$ -glucosidase 활성이 있는 검은 복합체를 형성한 균주를 순수하게 분리하고 16S rRNA gene sequence를 통하여 동정함.

■  $\beta$ -glucosidase 활성을 나타내는 유산균들을 MRS broth 배지에서 현탁 배양 후 배양액과 사포닌 혼합액을 진탕배양기에서 37°C로 48시간 반응 후 사포닌 전환활성을 가진 균주를 선발함.

나.  $\beta$ -glucosidase 활성 균주의 최적 배양 조건 확립

■ 배지의 종류에 따른 유산균주의 성장 효과

- LB broth, MRS broth, tryptic soy broth 등 3종류의 배지를 사용하고, 24시간 배양 과정에서 4시간 간격으로 O.D600 값을 측정하여 균의 배지별 성장속도를 측정함.

■ 온도에 따른 유산균주의 성장 효과

- 23, 30, 37°C에서 24시간 배양 후 O.D600 값을 측정하여 균의 온도별 성장 속도를 측정함.

■ 배지의 pH에 따른 유산균주의 성장 효과

- 6.0, 7.0, 8.0에서 24시간 배양 후 O.D600 값을 측정하여 균의 pH별 성장속도를 측정함.

■ 조효소의 생산과 조제

- 균주의 최적 배양 조건으로 배양 후 에탄올을 처리하여 단백질을 침전시켜 10,000×g로 30분 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물을 취하여 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시켜 조효소액으로 사용함.

다. 조효소를 이용한 사포닌의 전환

■ 사포닌의 전환

- 조효소 조제물을 제1세부과제에서 분리한 사포닌과 30°C에서 72시간 반응시킨 후 TLC 및 HPLC로 사포닌의 전환여부를 확인함.

■ 유산균주 생장이 사포닌 전환효소 생산에 미치는 영향

- 균주의 생장을 O.D<sub>600</sub> 측정 값(1.00, 1.25, 1.50) 별로 조효소를 분리하여 사포닌의 전환에 미치는 영향을 조사함.

■ 사포닌 전환효소의 최적 온도 및 pH 결정

- 유산균주가 생산한 조효소를 사포닌과 반응시키고 온도(23, 30, 37, 44, 51℃)별로 사포닌 전환에 미치는 영향을 조사함.
- 유산균주가 생산한 조효소를 사포닌과 반응시키고 pH(5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0)별로 조절하여 최적온도 조건에서 사포닌 전환에 미치는 영향을 조사함.

## 2. 실험방법

### 가. 사포닌 분해 유산균의 분리

사포닌 분해 유산균의 분리원은 한국의 전통 김치와 콩고의 마유를 이용하였음. 수집한 김치시료 및 마유를 멸균수에 희석하고, 희석액 1ml를 BCP agar plate에 분주하여 30℃와 37℃에서 3일간 배양하였음. 배양후 BCP agar plate상에서 colony 주위에 노란색의 환을 형성하는 균주를 선발하여 BCP agar에 5회 계대 배양하여 순수 분리하였음.

사포닌 분해능력을 가진 균주를 분리하기 위하여 분리된 균주를 Esculin-agar 배지에 접종하여 배지내의 색깔 변화를 관찰하였음. 사포닌 분해능력을 가진 균주는  $\beta$ -glucosidase를 생성하고 esculin에  $\beta$ -glucose가 반응하여 생성된 esculetin은 배지내에서 ferric ammonium citrate와 반응하고, colony 주위에 검정색 환을 형성하게 되었음. 따라서 colony 주위에 검정색 환이 형성된 균주들을  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 균주라고 판단하고, 사포닌 분해능력이 있을 것으로 판단되어 사포닌 분리 균주로서 선발하였음.

선발된 균주의  $\beta$ -glucosidase 활성 측정은 MRS broth에 30℃와 37℃에서 배양하여 24, 48, 72 시간에 배양액을 채취하고, Enzyme assay kit을 사용하여  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정하였음.

표 34. Composition of BCP agar

Ingredients	Amount (g/L)
Extract Yeast Dried	2.5
Peptone	5.0
Glucose	1.0
L-Cysteine	0.1
Tween 80	1.0
Bromcresol purple	0.04
Agar powder	15.0

표 35. Composition of Esculin Agar

Ingredients	Amount (g/L)
Pancreatic digest of casein	13.0
NaCl	5.0
Yeast extract	5.0
Esculin	1.0
Ferric ammonium citrate	0.5
Agar	15.0

## 나. 사포닌 분해 미생물의 선발과 미생물의 동정

$\beta$ -glucosidase 활성을 나타낸 유산균들의 사포닌 분해 능력을 시험하기 위하여 선발된 균주를 MRS broth 배지(pH 7.0, 8.0)에 계대 배양한 후 배양액 1ml를 채취하여 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 1 mg/ml 농도의 standard saponin 용액 1ml를 혼합하였음. 혼합액은 30°C의 진탕 배양기에서 7일 동안 반응시켰음. 혼합액에 500ul 수포화 부탄올을 혼합하고, 부탄올층을 추출하여 동결건조한 후 다시 수포화 부탄올에 녹여서 TLC 분석 시료로 사용하였음. 사포닌 분해 정성정량 측정에는 분리한 수포화 부탄올층을 메탄올에 용해시켜 HPLC를 사용하여 사포닌 전환활성을 가진 균주를 선발하였음.

### (1) TLC 분석

사포닌 전환 미생물의 선발은 반응산물은 TLC plate에 (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Aluminium sheets) 0.8cm 간격으로 점적하고, 반응기내에 정치하고 하층반응액으로 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (65:35:10, v/v)를 사용하여 5.5cm 전개하였다. 반응시킨 TLC plate에 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 분무하여 110°C에서 가열하여 발색시켰음.

### (2) Genomic DNA 결과 및 분리한 유산균의 효소 활성

사포닌 분해 유산균으로 선발된 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성이 가장 뛰어난 균주 5개를 선발하여 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 이용하여 동정을 실시하였음. 두 균주의 DNA를 추출하여 universal primer (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 사용하여 Yoon 등(1997)의 조건에 따라 PCR을 행하여 16S rDNA (16S rRNA coding gene)를 증폭하였음. 증폭된 16S rDNA는 PCR product purification kit (Qiagen 사)를 사용하여 정제한 후 sequencing 반응에 이용하였음. 염기서열 결정은 Genetic analyzer 377 (Perkin-Elmer 사)을 사용하였으며 염기서열의 분석은 주로 CLUSTAL W 프로그램 (Thompson et al., 1994) 및 PHYLIP 프로그램 (Felsenstein, 1993)을 사용하였음.

## 다. 사포닌 분해 미생물의 특성

### (1) 탈지유에서의 발효특성

선발된 유산균의 발효 특성은 10% 탈지유에 1% (v/v) 접종시켜 30°C와 37°C에서 24, 48, 72 시간 배양하여 pH 및 커드의 응고를 측정하였음.

### (2) 당분해 특성 및 효소특이성

최종 분리된 5개 유산균의 효소생산 특이성과 탄수화물의 분해특성을 시험하기 위하여 API ZYM 및 API 20 strips kit을 사용하여 확인하였음. 균주를 MRS broth에 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리를 하여 균주를 회수하고, kit 기본 배지에 현탁하고 접종하여 배양하였음. 배양 12, 24, 48시간에 따른 배지색의 변화로 당자화성의 유, 무를 판단하였음.

### (3) 최적 생장의 배지 시험

선발된 유산균의 최적 배지를 시험하기 위하여 Difco사의 MRS broth, nutrient broth (NB)

및 tryptic soy broth (TSB) 3종류의 배지를 사용하였음. 선발균주를 MRS broth에 접종하여 30℃의 진탕 배양기에서 190rpm으로 24시간 배양하였음. 균주배양액을 MRS, NB 및 TSB에 각각 1%(v/v) 접종하고 같은 배양조건으로 24시간 배양하였고, 4시간 간격으로 O.D<sub>600</sub>값을 측정하여 균의 성장속도를 비교 시험하였음.

#### 라. 선발균주의 온도에 따른 성장 특성

선발균주를 MRS broth에서 24시간 배양한 후 MRS broth에 1%씩 접종하여 20, 30, 40℃의 진탕배양기에서 190rpm으로 24시간 배양하였음. 배양액은 4시간 간격으로 O.D<sub>600</sub>값을 측정하여 적절한 균주 배양온도를 시험하였음.

#### 마. 선발균주의 pH 조건에 따른 성장 특성

선발균주를 MRS broth에서 24시간 배양한 후 pH를 6.0, 7.0, 8.0으로 조정하여 MRS broth에 1%씩 접종하여 30℃의 진탕배양기에서 190rpm으로 24시간 배양하였음. 배양액은 4시간 간격으로 O.D<sub>600</sub>값을 측정하여 적절한 pH 조건을 시험하였음.

#### 바. 사포닌 분해 미생물의 효소 분리와 효소 특성

##### (1) 사포닌 분해 미생물의 효소 분리

사포닌 분해 유산균으로 선발된 균주는 MRS 배지를 사용하여 30℃의 진탕배양기에서 190rpm으로 24시간 배양하였음. 배양액을 4℃에서 7,500 rpm으로 15분간 원심분리하여 균체를 제거하고 상층액을 추출하였고, 4배의 에탄올을 첨가하여 충분히 혼합시킨 후 0℃에서 40분 정지하여 단백질을 침전시켰음. 위 용액은 4℃에서 10,500 rpm으로 40분간 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물을 채취하여 20mM의 sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시켜 조효소액으로 사용하였음.

##### (2) 미생물의 종류에 따른 사포닌 분해 조효소의 특성

###### - Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환 효소의 최적 온도

사포닌 분해 선발 균주(22)의 조효소액을 각각 0.2mg/ml ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 수용액과 4:1 (v/v) 비율로 혼합한 후 pH를 7.0로 조절하고 반응온도를 각각 20, 30, 35, 40, 50, 60℃로 하여 7일간 반응하였음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 TLC 분석을 통하여 사포닌 분해를 측정하여 조효소의 최적 반응온도 조건을 시험하였음.

###### - Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환 효소의 최적 pH

사포닌 분해 선발 균주(22)의 조효소액을 각각 0.2mg/ml ginsenoside Rb<sub>1</sub> 수용액과 4:1 (v/v) 비율로 혼합한 후 반응용액을 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 조절하고 30℃에서 7일간 반응시켰음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 Thin Layer Chromatography(TLC) 분석을 통하여 사포닌의 분해를 시험하여 조효소의 최적 온도조건을 시험하였음.

###### - 조효소에 의한 Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환의 HPLC 양상

사포닌 분해 선발 균주(22)의 조효소액을 0.2mg/ml ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 수용액과 4:1 (v/v) 비



을로 혼합한 후 반응용액을 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 조절하고 30℃에서 7일간 반응시켰음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 Thin Layer Chromatography(TLC) 분석을 통하여 사포닌의 분해를 시험하여 조효소의 최적 온도조건을 시험하였음.

- 효소의 분자량 측정

사포닌 분해 선발균주 5종 에서 분비되는 효소의 분자량은 SDS-PAGE 시험을 통하여 조사하였음. EtOH precipitation 방법으로 조효소액을 (0.1mg/ml) 만들어서 12% acrylamide electrophoresis gel을 가지고 전기영동을 하였음. 전기영동 버퍼로 0.025M Tris-base, 0.192M glycine, pH 8.3 을 사용하였음. Current voltage는 50V로 하였음.

사. 사포닌 전환 유산균에 의한 saponin 전환

- Ginsenoside protopanaxadiol Rd 전환

사포닌 분해 선발 균주를 0.4 mg/mL의 ginsenoside protopanaxadiol Rd에 접종하여 7일간 반응시켰음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하여 제1세부과제에서 TLC 분석을 통하여 사포닌 전환을 측정하였음.

- Ginsenoside protopanaxatriol Rg<sub>1</sub> 전환

사포닌 분해 선발 균주를 0.4 mg/mL의 ginsenoside protopanaxatriol Rg<sub>1</sub>에 접종하여 7일간 반응시켰음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하여 제1세부과제에서 TLC 분석을 통하여 사포닌 전환을 측정하였음.

- 인삼꽃봉오리

사포닌 분해 선발 균주를 0.4 mg/mL의 인삼꽃봉오리에 접종하여 7일간 반응시켰음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하여 제1세부과제에서 TLC 분석을 통하여 사포닌 전환을 측정하였음.

아. 대규모 발효공정에 의한 인삼(뿌리)의 발효

기술이전 한 참여기업 비단피 공장에서 상품화하기 위하여 인삼 100 kg을 준비하여 발효공정에 투입하였음. 사용균주는 1차년도에 분리한 *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 이고, 35℃에서 7일간 배양하였음.

즉, 인삼뿌리를 잘게 잘라서 믹서기로 갈아서 준비한 20g을 100mL 증류수와 혼합하고 1, 3, 5% GF(growth factor, 성장촉진 인자)를 조정하여 첨가하였음. 75도에서 10분 열처리를 하고 실온에 식힌 후에 *Lactobacillus plantarum* CRNB-22를 1%로 접종한 후 35℃에서 7일간 진탕배양기에서 200rpm으로 배양하였다. 배양기간 동안 24시간 간격으로 미생물수를 counting 하였음.

3. 실험결과

가. 사포닌 분해 유산균의 분리 I

그림 89와 같이 한국의 전통 김치 및 콩고의 마유로부터 33종의 유산균을 분리하였음. 유산균의 선별은 30℃와 37℃에서 BCP agar plate에 배양하여 colony 주위에 노란색의 환을 형성

하는 균주를 선발하였으며, 선발된 균주는 BCP agar에 5회 계대 배양하여 순수 분리하였음. 분리된 유산균수는 김치로부터 28개와 몽고 마유로부터 33개의 유산균을 순수분리하였음.

분리된 유산균 중 사포닌 분해가 가능한 균주를 선별하기 위하여 그림 90과 같이 Esculin-agar 배지에 접종하여 배지내의 색깔 변화를 관찰하였음. 사포닌 분해능력을 가진 균주는  $\beta$ -glucosidase를 생성하는 것으로 알려져 있으며, 그것은 배지에 있는 esculin과  $\beta$ -glucose가 반응하여 생성된 esculin이 배지내에서 ferric ammonium citrate와 반응하고,  $\beta$ -glucosidase를 생성하는 균주의 주위에 검정색 환을 형성하게 됨. 따라서 colony 주위에 검정색 환이 형성된 균주들을  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 균주라고 판단하고, 사포닌 분해능력이 있을 것으로 판단되어 사포닌 분리 균주로서 선발하였음. 선발된 유산균수는 표 34과 35에 나타난 것과 같이 김치로부터 6개와 몽고 마유로부터 10개의 유산균을 순수 분리하였음.

선발된 균주의  $\beta$ -glucosidase 활성 측정은 MRS broth에 30°C와 37°C에서 배양하고, 배양 후 24, 48, 72시간에 배양액을 채취하고, Enzyme assay kit을 사용하여  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정한 결과 표 36와 같이 5개(A3, A5, A6, B9, 22)의 분리된 유산균에서 높은  $\beta$ -glucosidase 활성이 나타났음. 선발된 유산균의  $\beta$ -glucosidase activity는 모두 24시간 배양에 활성이 가장 높았으며 37°C보다 30°C에서 배양한 것이  $\beta$ -glucosidase의 활성이 가장 높게 나타났음.

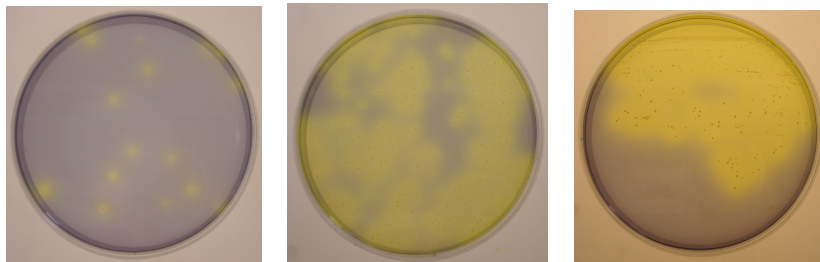


그림 90. BCP agar를 사용하여 김치와 마유로부터 유산균의 분리.

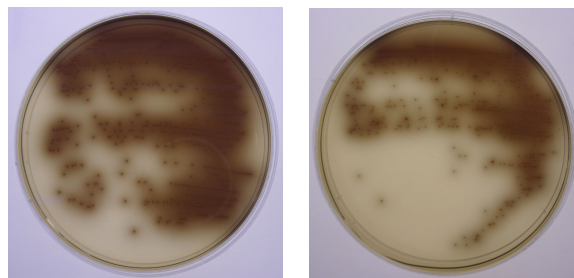


그림 91. 분리된 유산균을 Esculin agar에 배양하여  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정.

표 36. 김치에서 분리한 유산균의 pH 및 응고 측정

	온도	유산균	응고			pH			Esculin test
			24hrs	48hrs	72hrs	24hrs	48hrs	72hrs	
1	37°C	1-1	-	+	+	5.11	4.41	4.19	+
2		1-2	-	+	+	6.25	4.50	4.33	+
3		1-3	-	+	+	6.13	4.70	4.33	-
4		1-4	+	+	+	4.44	4.39	4.27	+
5		2-1	-	+	+	6.15	4.49	4.17	-
6		2-2	-	+	+	5.28	4.82	4.55	=
7		2-3	-	-	+	5.78	5.44	4.83	-
8		2-4	-	+	+	6.25	5.02	4.55	-
9		2-5	-	+	+	6.17	4.66	4.33	-
10		3-1	-	-	-	6.09	5.64	5.62	-
11		3-2	-	-	-	6.00	5.92	5.67	-
12		3-3	-	-	-	6.15	5.94	5.68	-
13		3-4	-	-	-	6.14	5.75	5.66	-
14		4-1	+	+	+	4.86	4.20	4.19	+
15		4-2	+	+	+	4.93	5.12	4.94	+
16		4-3	-	-	-	5.91	5.58	5.48	-
17		4-4	-	-	+	6.21	5.12	4.75	-
18		4-5	-	-	-	6.15	-	-	-
19		5-1	-	+	+	5.79	4.63	4.47	-
20		5-2	-	+	+	5.91	4.66	4.47	-
21		5-3	-	+	+	6.25	4.93	4.72	-
22		5-4	-	+	+	6.14	4.72	4.52	-
23		5-5	-	-	+	6.09	5.25	4.98	-
24		5-6	-	+	+	6.14	4.68	4.49	-
25		5-7	-	+	+	6.48	4.61	4.42	+
26		5-8	-	+	+	6.37	4.88	4.78	-
27		5-9	-	+	+	6.21	4.94	4.71	-
28		5-10	-	+	+	6.23	4.63	4.42	-

표 37. 마유에서 분리한 유산균의 pH 및 응고 측정

	온도	유산균	응고			pH			Esculin test
			24hrs	48hrs	72hrs	24hrs	48hrs	72hrs	
1	37°C	A1	+	+	+	4.89	4.48	4.10	-
2		A2	+	+	+	4.43	4.26	4.07	-
3		A3	+	+	+	5.58	5.29	5.10	+
4		A4	+	+	+	4.63	4.22	4.04	-
5		A5	-	+	+	5.00	4.56	4.32	+
6		A6	+	+	+	4.86	4.56	4.33	+
7		A7	+	+	+	4.80	4.38	4.23	-
8		A8	+	+	+	4.68	4.32	4.19	-
9		A9	+	+	+	4.70	4.37	4.28	-
10		A10	+	+	+	4.84	4.67	4.59	-
11		B3	+	+	+	4.34	4.16	4.12	-
12		B4	+	+	+	4.24	3.50	3.33	-
13		B5	+	+	+	4.78	4.50	4.34	-
14		B8	-	+	+	5.13	4.45	4.41	-
15		B9	+	+	+	4.52	4.48	4.47	+
16		B10	+	+	+	4.53	4.33	4.33	-
17		C1	-	+	+	5.02	4.56	4.84	+
18		C2	+	+	+	4.74	4.47	4.30	-
19		C3	+	+	+	4.52	4.54	4.51	+
20		C4	-	+	+	5.03	4.74	4.85	+
21		C6	+	+	+	4.62	4.21	4.05	-
22		C7	-	+	+	5.09	4.90	4.87	+
23		C8	+	-	-	4.75	6.33	6.19	-
24		C9	-	+	+	5.13	4.93	4.88	+
25		C11	-	+	+	5.98	4.20	4.56	+
26	30°C	D2	-	+	+	5.05	4.24	4.24	-
27		D3	-	+	+	4.96	3.89	3.89	-
28		D4	-	+	+	5.13	4.53	4.53	-
29		D5	-	+	+	5.21	4.68	4.68	-
30		D6	-	+	+	5.15	4.60	4.60	-
31		D7	-	+	+	5.18	4.36	4.36	-
32		D9	-	+	+	5.19	4.58	4.58	-
33		D10	-	+	+	5.25	4.70	4.70	-

표 38. Enzyme Assay Kit를 사용한 유산균의  $\beta$ -glucosidase activity 측정

Isolated Lactic Acid Bacteria (LAB)	Temperatures (enzyme activity Units/liter)					
	37°C			30°C		
	24hrs	48hrs	72hrs	24hrs	48hrs	72hrs
A3	17.24	16.66	5.25	34.32	14.87	7.83
A5	17.81	13.21	4.67	30.89	21.73	5.72
A6	11.49	10.34	7.59	21.73	14.87	4.57
B9	5.17	8.60	8.04	18.30	14.30	5.14
22	7.47	2.29	6.32	18.30	14.87	0.00

나. 사포닌 분해 유산균의 분리 II

그림 92에 나타난 바와 같이 몽고의 마유로부터 유산균을 분리하였음. 유산균의 선별은 30°C와 37°C에서 BCP agar plate에 배양하여 colony 주위에 노란색의 환을 형성하는 균주를 선발하였으며, 선발된 균주는 BCP agar에 5회 계대 배양하여 순수 분리하였음. 분리된 유산균수는 몽고 마유로부터 39개의 유산균을 순수 분리하였음.

분리된 유산균 중 사포닌 분해가 가능한 균주를 선별하기 위하여 그림 93과 같이 Esculin-agar 배지에 접종하여 배지내의 색깔 변화를 관찰하였음. 사포닌 분해 능력을 가진 균주는  $\beta$ -glucosidase를 생성하는 것으로 알려져 있으며, 그것은 배지에 있는 esculin과  $\beta$ -glucose가 반응하여 생성된 esculin이 배지내에서 ferric ammonium citrate와 반응하고,  $\beta$ -glucosidase를 생성하는 균주의 주위에 검정색 환을 형성하게 됨. 따라서 colony 주위에 검정색 환이 형성된 균주들을  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 균주라고 판단하고, 사포닌 분해능력이 있을 것으로 판단되어 사포닌 분리 균주로서 선발하였음. 선발된 유산균은 SA4, SA5, A16, S18로 4종류를 선발하였음.

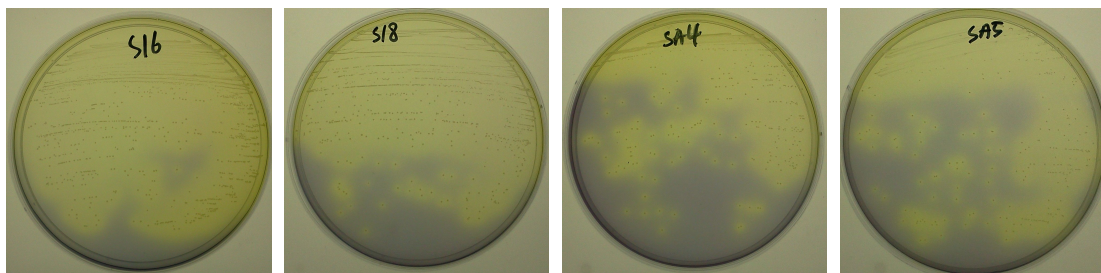


그림 92. Isolation of lactic acid bacteria from Kimchi and Mare's milk at BCP agar.

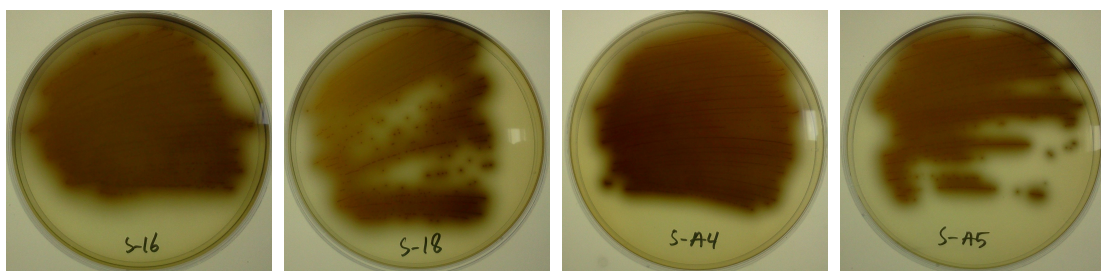


그림 93. Isolation of lactic acid bacteria having  $\beta$ -glucosidase activity at Esculin agar.



■ 사포닌 분해 미생물의 선발과 미생물의 동정

① 사포닌 전환 미생물의 선발

$\beta$ -glucosidase 활성이 있는 4개의 유산균들이 실제로 사포닌 분해 능력이 있는지 확인하기 위하여 선발된 균주를 single saponin Rb2 용액이 함유된 MRS broth 배지에 접종하고 30°C의 진탕배양기에서 7일 동안 반응시켰음. 사포닌의 분해 정도를 시험하기 위하여 배양액을 TLC 분석한 결과 그림94 와 같이 사포닌 표준품과 비교하여 S16, S18, SA4 및 SA5의 4개의 분리 균주로 배양 후 single saponin과 비교하여 새로운 분해물이 형성된 것으로 보아 single saponin Rb2가 전환되어 새로운 물질이 화살표에 표시된 바와 같이 생성된 것을 확인 할 수 있었음.(그림 94)

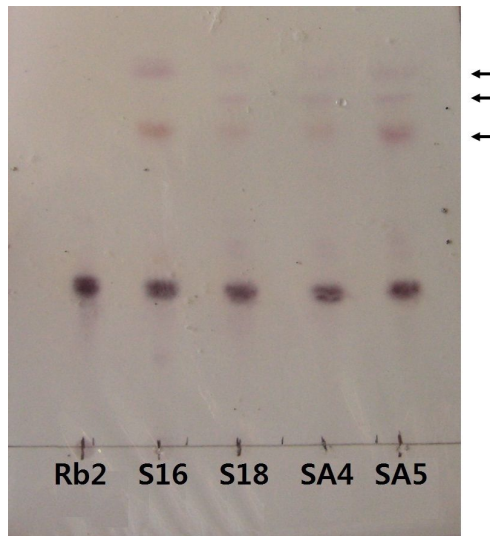


그림 94. TLC analysis pattern of Rb2 conversion by S16, S18, SA4 and SA5.

그림 95와 같이 표준사포닌과 비교하여 A3, A5, A6, B9 및 22의 5개의 분리 균주에서 배양 후 standard saponin과 비교하여 새로운 분해물이 형성된 것으로 보아 특정 사포닌이 분해된 것을 확인 할 수 있었음.

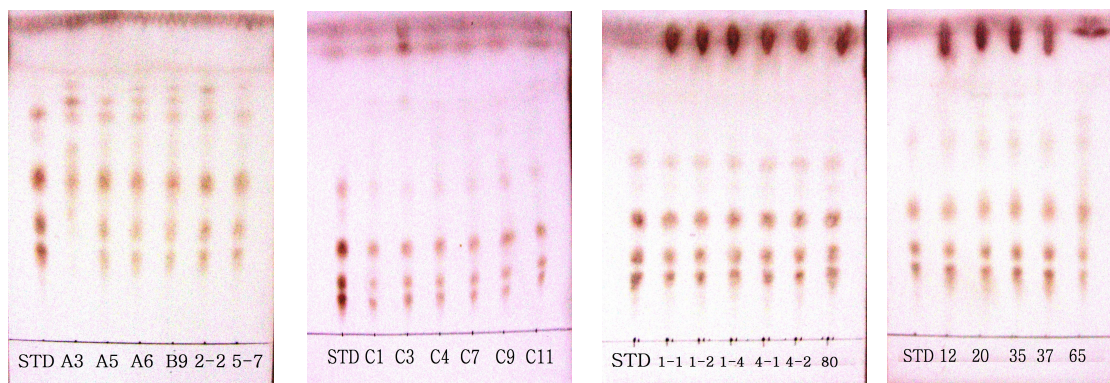


그림 95. 분리 선발된 유산균 중 Standard saponin이 함유된 MRS broth 배지(pH 7.0)로 30°C에서 7일간 배양 후 배양액의 TLC

## ② Genomic DNA 분석 및 분리한 유산균의 효소 활성

사포닌 분해 유산균으로 선발된 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성이 가장 뛰어난 균주 5개를 선발하여 균주의 유전자염기서열분석을 통하여 동정하였음(그림 96-100). 김치에서 분리한 유산균은 *Lactobacillus plantarum*로 동정되었으며 이 균은 신규균주로서 *Lactobacillus plantarum* CRNB-22(KCTC11931BP)로 명명하였으며, 마유에서 분리했던 유산균 A3은 신규균주로서 1,389개의 염기서열 중 1,387개의 염기서열이 동일하여 99%의 염기서열 상동성이 있는 *Enterococcus faecalis*로 동정되었으며, *Enterococcus faecalis* CRNB-A3(KCTC11930BP)로 명명하였음. A5는 *Enterococcus faecium*, A6은 *Enterococcus faecium*, B9는 *Enterococcus faecium* 으로 동정되었으며, A5는 *Enterococcus faecium* CRNB-A5, A6은 *Enterococcus faecium* CRNB-A6, B9는 *Enterococcus faecium* CRNB-B9으로 명명하였음.

이와같이 총 5종의 신규균주를 분리 동정하였으며, 이 중에서 2종은 KCTC에 기탁함과 동시에 특허 2건을 출원하였음.

## ③ 분리된 미생물의 Genomic DNA 분석

```
1 AAAAGGTAC CTCACCGACT TCGGGTGTTA CAAACTCTCG TGGTGTGACG GCGGGTGTGT ACAAGCCCCG
71 GGAACGTATT CACCGCGGCG TGCTGATCCG CGATTACTAG CGATTCCGGC TTCATGCAGG CGAGTTGCAG
141 CCTGCAATCC GAACTGAGAG AAGCTTTAAG AGATTTGCAT GACCTCGCGG TCTAGCGACT CGTTGTACTT
211 CCCATTGTAG CACGTGTGTA GCCCAGGTCA TAAGGGGCAT GATGATTTGA CGTCATCCCC ACCTTCTCC
281 GGTGGTGAC CGGCAGTCTC GCTAGAGTGC CCAACTAAAT GATGGCAACT AACAATAAGG GTTGCAGTCCG
351 TTGCGGGACT TAACCCAACA TCTCACGACA CGAGCTGACG ACAACCATGC ACCACCTGTC ACTTTGTCCC
421 CGAAGGGAAA GCTCTATCTC TAGAGTGGTC AAAGGATGTC AAGACCTGGT AAGGTTCTTC GCGTTGCTTC
491 GAATTAACC ACATGCTCCA CCGCTGTGC GGGCCCCCGT CAATTCCTTT GAGTTTCAAC CTGCGGTTCG
561 TACTCCCCAG GCGGAGTGCT TAATGCGTTT GCTGCAGCAC TGAAGGGCGG AAACCCTCCA ACACCTAGCA
631 CTCATCGTTT ACGGCGTGGA CTACCAGGGT ATCTAATCCT GTTTGCTCCC CACGCTTTCG AGCCTCAGCG
701 TCAGTTACAG ACCAGAGAGC CGCCTTCGCC ACTGGTGTTT CTCCATATAT CTACGCATTT CACCCTACA
771 CATGGAATTC CACTCTCCTC TTCTGCACTC AAGTCTCCCA GTTTCCAATG ACCCTCCCCG GTTGCAGCCG
841 GGGCTTTTAC ATCAGACTTA AGAAACCGCC TGGCTCGCT TTACGCCAA TAAATCCGGA CAACGCTTGC
911 CACCTACGTA TTACCGCGC TGCTGGCAGC TAGTTAGCCG TGGCTTTCTG GTTAGATACC GTCAGGGGAC
981 GTTCAGTTAC TAACGTCCTT GTTCTTCTCT AACAACAGAG TTTTACGATC CGAAAACCTT CTCACTCAC
1051 GCGGCGTTGC TCGGTCAGAC TTTCGTCCAT TGCCGAAGAT TCCCTACTGC TGCTCCCCGT AGGAGTCTGG
1121 GCCGTGTCTC AGTCCCAGTG TGGCCGATCA CCCTCTCAGG TCGGCTATGC ATCGTGGCCT TGGTGCAGCC
1191 TTACCTCACC AACTAGCTAA TGCACCGCGG GTCCATCCAT CAGCGACACC CGAAAGCGCC TTCACTTTT
1261 ATGCCATGCG ACATAAACTG TTATGCGGTA TTAGCACCTG TTTCCAAGTG TTATCCCCCT CTGATGGGTA
1331 GGTACCACAC GTGTTACTCA CCCGTCGCC ACTCCTCTTT CCAATTGAGT GCAAGCACT
```

그림 96. 16S rDNA sequence (1,389bp) of A3 isolated from horse milk.

1 TGGTTCCTAA AAGGTTACCC CACCGACTTT GGGTGTTACA AACTCTCATG GTGTGACGGG CGGTGTGTAC  
71 AAGGCCCGGG AACGTATTCA CCGCGGCATG CTGATCCGCG ATTACTAGCG ATTCCGACTT CATGTAGGCG  
141 AGTTGCAGCC TACAATCCGA ACTGAGAATG GCTTTAAGAG ATTAGCTTAC TCTCGCGAGT TCGCAACTCG  
211 TTGTACCATC CATTGTAGCA CGTGTGTAGC CCAGGTCATA AGGGGCATGA TGATTGACG TCATCCCCAC  
281 CTTCTCCGG TTTGTACCG GCAGTCTCAC CAGAGTGCCC AACTTAATGC TGGCAACTGA TAATAAGGGT  
351 TGCCTCGTT GCGGGACTTA ACCCAACATC TCACGACACG AGCTGACGAC AACCATGCAC CACCTGTATC  
421 CATGTCCCGG AAGGGAACGT CTAATCTCTT AGATTTGCAT AGTATGTCAA GACCTGGTAA GGTTCCTCGC  
491 GTAGCTTCGA ATTAACCAC ATGCTCCACC GCTTGTGCGG GCCCCCGTCA ATTCTTTGA GTTTCAGCCT  
561 TCGGCGCGTA CTCCCAGGC GGAATGCTTA ATGCGTTAGC TGCAGACTG AAGGGCGGAA ACCCTCCAAC  
631 ACTTAGCATT CATCGTTTAC GGTATGACT ACCAGGTAT CTAATCCTGT TTGCTACCCA TACTTTCGAG  
701 CCTCAGCGC AGTTACAGAC CAGACAGCCG CCTTCGCCAC TGGTGTCTT CCATATATCT ACGCATTTC  
771 CCGCTACACA TGGAGTTCCA CTGCTCTCTT CTGCACTCAA GTTCCCAGT TTCCGATGCA CTTCTTCGGT  
841 TGAGCCGAAG GCTTTCACAT CAGACTTAAA AAACCGCCTG CGCTCGCTT ACGCCAATA AATCCGGACA  
911 ACGCTTGCCA CCTACGTATT ACCGCGGCTG CTGGCAGTA GTTAGCCGTG GCTTCTGGT TAAATACCGT  
981 CAATACCTGA ACAGTTACTC TCAGATATGT TCTTCTTAA CAACAGAGT TTACGAGCCG AAACCCTTCT  
1051 TCACTCACGC GCGGTTGCTC CATCAGACTT TCGTCCATTG TGGAAGATTC CCTACTGCTG CCTCCCGTAG  
1121 GAGTTTGGG CGTGTCTCAG TCCCAATGTG GCCGATTACC CTCTCAGGTC GGCTACGTAT CATTGCCATG  
1191 GTGAGCCGTT ACCCCACCAT CTAGCTAATA CGCCGCGGA CCATCCAAA GTGATAGCCG AAGCCATCTT  
1261 TCAAACCTCG ACCATGCGGT CCAAGTTGTT ATGCGGTATT AGCATCTGTT TCCAGGTGTT ATCCCCGCT  
1331 TCTGGGCAGG TTTCCACGT GTTACTCACC AGTTCGCCAC TCACTCAAAT GTAAATCATG ATGCAAGCAC  
1401 CAATCAATAC CAGAGTTCGT TCGACTGC

그림 97. 16S rDNA sequence (1,428bp) of 22 isolated from Kimch.

1 GCGGATTGGG CCCTCTAGAT GCATGCTCGA GCGGCCGCCA GTGTGCGGGA GAGCTGCAGA ATTCGCCCTT  
71 TACGGCTACC TTGTTACGAC TTCACCCCAA TCATCTATCC CACCTTAGGC GGCTGGCTCC AAAAAGGTTG  
141 CCTCACCGAC TTCGGGTGTT ACAAACCTCTC GTGGTGTGAC GGGCGGTGTG TACAAGGCC GGAACGTAT  
211 TCACCGCGGC GTGCTGATCC GCGATTACTA GCGATTCCGG CTTCATGCAG GCGAGTTGCA GCCTGCAATC  
281 CGAACTGAGA GAAGCTTTAA GAGATTAGCT TAGCCTCGCG ACTTCGCGAC TCGTTGTA CTCCATTGTA  
351 GCACGTGTGT AGCCAGGTC ATAAGGGGCA TGATGATTTG ACGTCATCCC CACCTTCCTC CGGTTTGTCA  
421 CCGGCAGTCT TGCTAGAGTG CCCAACTGAA TGATGGCAAC TAACAATAAG GGTTCGCTC GTTGCGGGAC  
491 TTAACCCAAC ATCTCACGAC ACGAGCTGAC GACAACCATG CACCACCTGT CACTTTGCC CCGAAGGGGA  
561 AGCTCTATCT CTAGAGTGAT CAAAGGATGT CAAGACCTGG TAAGGTTCTT CGCGTTGCTT CGAATTA AAC  
631 CACATGCTCC ACCGCTTGTG CGGGCCCCCG TCAATTCCTT TGAGTTTCAA CCTTCGCGTC GACTCCCCA  
701 GCGGAGTGC TTAATGCGTT AGCTGCAGCA CTGAAGGGCG GAAACCCTCC AACACTTAGC ACTCATCGTT  
771 TACGGCGTGG ACTACCAGGG TATCTAATCC TGTTTGTCTC CCACGCTTTC GAGCCTCAGC GTCAGTTACA  
841 GACCAGAGAG CCGCCTTCGC CACTGGTGTT CCTCCATATA TCTACGCATT TCACCCTAC ACATGGAATT  
911 CCACTCTCCT CTTCTGCACT CAAGTCTCCC AGTTTCCAAT GACCCTCCCC GGTTCGAGCC GGGGCTTCA  
981 CATCAGACTT AAGAAACCGC CTGCGCTCGC TTTACGCCA ATAAATCCGG ACAACGCTTG CCACCTACGT  
1051 ATTACCGCG CTGCTGGCAC GTAGTTAGCC GTGGCTTCTT GGTTAGATAC CGTCAAGGGA TGAACAGTTA  
1121 CTCTCATCCT TGTTCTTCTC TAACAACAGA GTTTTACGAT CCGAAAACCT TCTTCACTCA CGCGGCGTTG  
1191 CTCGGTCAGA CTTTCGTCCA TTGCCGAAGA TTCCTACTG CTGCCTCCCG TAGGAGTTTG GGCCGTGTCT  
1261 CAGTCCCAAT GTGGCCGATC ACCCTCTCAG GTCGGCTATG CATCGTGGCC TTGGTGAGCC GTTACCTCAC  
1331 CAACTAGCTA ATGCACCGCG GGTCCATCCA TCAGCGACAC CCGAAAGCGC CTTTCAAATC AAAACCATGC  
1401 GGTTCGATT GTTATACGGT ATTAGCACCT GTTTCCAAGT GTTATCCCCT TCTGATGGG AGGTTACCCA  
1471 CGTGTACTC ACCCGTTCGC CACTCTTCTT TTTCCGGTGG AGCAAGCTCC GGTGAAAAA GAAGCGTACG  
1541 ACTTGCATGT ATTAGGCACG CCGCCAGCGT TCGTCCTGAG CCATGATCAA ACTCTAAGGG CGAATTCCAG  
1611 CACACATGCG GCACACTCGC GGCCGCTCGA GCATGCATCT AGAGGGCCCA AT

**그림 98. 16S rDNA sequence (1,662bp) of A5 isolated from Kimch.**



1 CCTCTAGATG CATGCTCGAG CGGCCGCCAG TGTGCGGGAG ATCTGCGGAA TTCGCCCTTT ACGGCTACCT  
 71 TGTTACGACT TCACCCCAAT CATCTATCCC ACCTTAGGCG GCTGGCTCCA AAAGGTTACC TCACCGACTT  
 141 CGGGTGTTAC AACTCTCGT GGTGTGACGG GCGGTGTGTA CAAGGCCCGG GAACGTATTC ACCGCGGCGT  
 211 GCTGATCCGC GATTACTAGC GATTCCGGCT TCATGCAGGC GAGTTGCAGC CTGCAATCCG AACTGAGAGA  
 281 AGCTTTAAGA GATTAGCTTA GCCTCGCGAC TTCGCAACTC GTTGTACTTC CCATTGTAGC ACGTGTGTAG  
 351 CCCAGGTCAT AAGGGGCATG ATGATTTGAC GTCATCCCCA CCTTCCTCCG GTTTGTACC GGCAGTCTTG  
 421 CTAGAGTGCC CAACTGAATG ATGGCAACTA ACAATAAGGG TTGCGCTCGT TGCGGGACTT AACCCAACAT  
 491 CTCACGACAC GAGCTGACGA CAACCATGCA CCACCTGTCA CTTTGCCCCC GAAGGGGAAG CTCTATCTCT  
 561 AGAGTGGTCA AAGGATGTCA AGACCTGGTA AGGTTCTTCG CGTTGCTTCG AATTAACCA CATGCTCCAC  
 631 CGCTTGTCGC GGCCCCGTC AATTCCTTTG AGTTTCAACC TTGCGGTCGT ACTCCCCAGG CGGAGTGCCT  
 701 AATGCGTTAG CTGCAGCACT GAAGGGCGGA AACCTCCAA CACTTAGCAC TCATCGTTTA CGGCGTGGAC  
 771 TACCAGGGTA TCTAATCCTG TTTGCTCCCC ACGCTTTCGA GCCTCAGCGT CAGTTACAGA CCAGAGAGCC  
 841 GCCTTCGCCA CTGGTGTTCC TCCATATATC TACGCATTTC ACCGCTACAC ATGGAATTCC ACTCTCCTCT  
 911 TCTGCACTCA AGTCTCCAG TTTCCAATGA CCCTCCCCGG TTGAGCCGGG GGCTTTCACA TCAGACTTAA  
 981 GAAACCGCCT GCGCTCGCTT TACGCCAAT AAATCCGGAC AACGCTTGCC ACCTACGTAT TACCGCGGCT  
 1051 GCTGGCACGT AGTTAGCCGT GGCTTTCTGG TTAGATACCG TCAAGGGATG AACAGTFACT CTCATCCTTG  
 1121 TTCTTCTCTA ACAACAGAGT TTTACGATCC GAAAACCTTC TTCACTCACG CGGCGTTGCT CGGTCAGACT  
 1191 TTCGTCCATT GCCGAAGATT CCCTACTGCT GCCTCCCCGTA GGAGTTTGGG CCGTGTCTCA GTCCCAATGT  
 1261 GGCCGATCAC CCTCTCAGGT CGGCTATGCA TCGTGGCCTT GGTGAGCCGT TACCTACCA ACTAGCTAAT  
 1331 GCACCGCGGG TCCATCCATC AGCGACACCC GAAAGCGCCT TTCAAATCAA AACCATGCGG TTTTGATTGT  
 1401 TATACGGTAT TAGCACCTGT TTCCAAGTGT TATCCCCTTC TGATGGGCAG GTTACCCACG TGTTACTCAC  
 1471 CCGTTCGCCA CTCCTCTCTT TCCGGTGGAG CAAGCTCCGG TGGAAAAAGA AGCGTTCGAC TTGCATGTAT  
 1541 TAGGCACGCC GCCAGCGTTC GTCCTGAGCC AGGATCAAAC TCTAAGGGCG AATTCAGCA CACATCCGGC  
 1611 ACACACGCGG CCGCTCGAGC ATGCATCTAG AGGGCCCAAT

그림 99. 16S rDNA sequence (1,650bp) of A6 isolated from Kimch.

1 TCTAGATGCA TGCTCGAGCG GCCGCTAGTG TGCGGGAGTG CTGCGGAATT CGCCCTTTAC GGTACCTTG  
 71 TTACGACTTC ACCCAATCA TCTATCCCAC CTTAGGCGGC TGGCTCCAAA AAGGTTACCT CACCGACTTC  
 141 GGGTGTACA AACTCTCGTG GTGTGACGGG CGGTGTGTAC AAGGCCCGG AACGTATTCA CCGCGGCGTG  
 211 CTGATCCGCG ATTACTAGCG ATTCCGGCTT CATGTAGGCG AGTTGCAGCC TACAATCCGA ACTGAGAGAA  
 281 GCTTTAAGAG ATTAGCTTAG CCTCGGACT TCGCGACTCG TTGTA CTCCATTGTAGCA CGTGTGTAGC  
 351 CCAGGTCATA AGGGGCATGA TGATTTGACG TCATCCCAC CTTCTCCGG TTTGTCACCG GCAGTCTTGC  
 421 TAGAGTGCCC AACTAAATGA TGGCAACTAA CAATAAGGTT TGCCTCGTT GCGGGACTTA ACCCAACATC  
 491 TCACGACACG AGCTGACGAC AACCATGCAC CACCTGTAC TTTGCCCGG AAGGGGAAGC TCTATCTCTA  
 561 GAGTGGTCAA AGGATGTCAA GACCTGGTAA GGTCTTCGC GTTGCTTCGA ATTAACCAC ATGCTCCACC  
 631 GCTTGTGCGG GCCCCGTC ATTCTTTGA GTTCAACCT TGCCTCGTA CTCCCAGGC GGAGTGCTTA  
 701 ATGCGTTAGC TGCAGCACTG AAGGGCGGAA ACCCTCCAAC ACTTAGCACT CATCGTTTAC GGCCTGGACT  
 771 ACCAGGGTAT CTAATCCTGT TTGCTCCCCA CGCTTTCGAG CCTCAGCGTC AGTTACAGAC CAGAGAGCCG  
 841 CCTTCGCCAC TGGTGTTCCT CCATATATCT ACGCATTTCA CCGCTACACA TGAATTCCA CTCTCCTCTT  
 911 CTGCACTCAA GTCTCCAGT TTCCAATGAC CCTCCCCGGT TGAGCCGGGG GCTTTCGCAT CAGACTTAAG  
 981 AAACCGCCTG CGCTCGCTTT ACGCCAATA AATCCGGACA ACGCTTGCCA CCTACGTATT ACCGCGGCTG  
 1051 CTGGCAGTA GTTAGCCGTG GCTTTCTGGT TAGATACCGT CAAGGGATGA ACAGTTACTC TCATCCTTGT  
 1121 TCTTCTCTAA CAACAGAGTT TTACGATCCG AAAACCTTCT TCACTCACGC GGCCTTGCTC GGTCAGACTT  
 1191 TCGTCCATTG CCGAAGATTC CCTACTGCTG CCTCCCGTAG GAGTTTGGGC CGTGTCTCAG TCCCAATGTG  
 1261 GCCGATCACC CTCTCAGGTC GGCTATGCAT CGTGGCCTTG GTGAGCCGTT ACCTACCAA CTAGCTAATG  
 1331 CACCGCGGGT CCATCCATCA GCGACACCCG AAAGCGCCTT TCAAATCAA ACCATGCGGT TTCGATTGTT  
 1401 ATACGGTATT AGCACCTGTT TCCAAGTGT ATCCCCTTCT GATGGGCAGG TTACCCACGT GTTACTCACC  
 1471 CGTTCGCCAC TCTTCTTTTT CCGGTGGAGC AAGCTCCGGT GGAAAAGAA GCGTACGACT TGCATGTATT  
 1541 AGGCACGCCG CCAGCGTTCG TCCTGAGCCA TGATCAAACCT CTAAGGGCGA ATTCCAGCAC ACATCCGGCA  
 1611 CACTCGCGGC CGCTCGAGCA TGCATCTAGA GGGCCCA

그림 100. 16S rDNA sequence (1,647bp) of B9 isolated from Kimch.

#### ④ 유산균 동정 및 효소 활성

사포닌 전환 활성이 있는 유산균으로 선발된 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성이 가장 뛰어난 4 종류의 유산균을 선발하여 유전자염기서열분석을 통하여 동정하였음. 그림. 101, 102, 103, 104에 나타난 바와 같이 S16은 1,451개의 염기서열 중 1,445개의 염기서열이 동일하여 99%의 염기서열 상동성이 있는 *Enterococcus durans* 으로 동정되었으며, S18은 *Enterococcus faecalis*, SA4는 *Enterococcus faecium*, SA5는 *Enterococcus faecium* 으로 각각 동정되었음. 동정된 S16은 *Enterococcus durans* CRNB-S16으로 명명하여 KCTC에 등록하였고 등록번호는 KCTC12191BP 이며, SA4는 *Enterococcus faecium* CRNB-SA4로 명명하여 KCTC에 등록하였고 등록번호는 KCTC12192BP 임.

```

1      CACCTTAGGC GGCTGGCTCC AAAAGGTTAC CTCACCGACT TCGGGTGTTA CAAACTCTCG TGGTGTGACG
71     GGCGGTGTGT ACAAGGCCCG GGAACGTATT CACCGCGGCG TGCTGATCCG CGATTACTAG CGATTCCGGC
141    TTCATGTAGG CGAGTTGCAG CCTACAATCC GAACTGAGAG AAGCTTTAAG AGATTAGCTT AGCCTCGCGA
211    CTTGCGGACT CGTTGTACTT CCCATTGTAG CACGTGTGTA GCCCAGGTCA TAAGGGGCAT GATGATTTGA
281    CGTCATCCCC ACCTTCCTCC GGTTCGCTAC CGGCAGTCTT GCTAGAGTGC CCAACTAAAT GATGGCAACT
351    AACAATAAGG GTTGCCTCGT TTGCGGGACT TAACCCAACA TCTCACGACA CGAGCTGACG ACAACCATGC
421    ACCACCTGTC ACTTTGCCCC CGAAGGGGAA GCTCTATCTC TAGAGTGGTC AAAGGATGTC AAGACCTGGT
491    AAGGTTCTTC GCGTTGCTTC GAATTAACC ACATGCTCCA CCGCTTGTGC GGGCCCCCGT CAATTCCTTT
561    GAGTTTCAAC CTTGCGGTGC TACTCCCCAG GCGGAGTGCT TAATGCGTTA GCTGCAGCAC TGAAGGGCGG
31     AAACCTCCA  AACTTAGCA  CTCATCGTT  ACGGCGTGA  CTACCAGGT  ATCTAATCT  GTTTGCTCC
701    CCACGCTTTC GAGCCTCAGC GTCAGTTACA GACCAGAGAG CCGCCTTCGC CACTGGTGT  CCTCCATATA
771    TCTACGCATT TCACCGCTAC ACATGGAATT CACTCTCCT  CTTCTGACT CAAGTCTCCC AGTTTCCAAT
841    GACCCTCCCC GGTGAGCCG GGGGCTTTC  CATCAGACTT AAGAAACCG  CTGCGCTCG  TTTACGCCA
911    ATAAATCCGG ACAACGCTTG CCACCTACGT ATTACGCGG  CTGCTGGCAC GTAGTTAGCC GTGGCTTTCT
981    GGGTTAGATA CCGTCAAGG  ATGAACAGT  ACTCTCATCC TTGTTCTTCT CTAACAACAG AGTTTTTACG
1051   ATCCGAAAAC CTTCTTCACT CACGCGGCGT TGCTCGGTCA GACTTTCGTC CATTGCCGAA GATTCCCTAC
1121   TGCTGCCTCC CGTAGGAGT  TGGGCCGTG  CTCAGTCCCA ATGTGGCCGA TCACCCTCTC AGGTCGGCTA
1191   TGCATCGTGG CTTGGTGAG  CCGTTACCT  ACCAACTAGC TAATGCACCG CGGGTCCATC CATCAGCGAC
1261   ACCCGAAAGC GCCTTTCAA  TCAAAACCAT GCGGTTTCGA TTGTTATACG GTATTAGCAC CTGTTTCCAA
1331   GTGTTATCCC CTTCTGATGG GCAGGTTACC CACGTGTTAC TCACCGTTC  GCCACTCTC  TTTTCCGGT
1401   GGAGCAAGCT CCGGTGAAA  AAGAAGCGTA CGACTGCATC ATAGCACCCG C

```

그림 101. 16S rDNA sequence (1,451bp) of isolated lactic acid bacteria S-16.

```

1      AGAGTTTGA  CCTGGCTCAG  GACGAACGCT  GGCGGCGTGC  CTAATACATG  CAAGTCGTAC  GCTTCTTTTT
71     CCACCGGAGC TTGCTCCACC  GGAAAAAGAA  GAGTGGCGAA  CGGGTGAGTA  ACACGTGGGT  AACCTGCCCA
141    TCAGAAGGGG ATAACACTTG  GAAACAGGTG  CTAATACCGT  ATAACAATCG  AAACCGCATG  GTTTTGATTT
211    GAAAGCGCT  TTCGGGTGTC  GCTGATGGAT  GGACCCGCGG  TGCATTAGCT  AGTTGGTGAG  GTAACGGCTC
281    ACCAAGGCCA CGATGCATAG  CCGACCTGAG  AGGGTGATCG  GCCACATTGG  GACTGAGACA  CGGCCAAAC
351    TCCTACGGGA GGCAGCAGTA  GGAATCTTC  GGCAATGGAC  GAAAGTCTGA  CCGAGCAACG  CCGCGTGAGT
421    GAAGAAGGTT TTCGATCGT  AAAACTCTGT  TGTTAGAGAA  GAACAAGGAT  GAGAGTAACT  GTTCATCCCT
491    TGACGGTATC TAACCAGAAA  GCCACGGCTA  ACTACGTGCC  AGCAGCCGCG  GTAATACGTA  GGTGGCAAGC
561    GTTGTCCGGA TTTATTGGGC  GTAAAGCGAG  CGCAGGCGGT  TTCTTAAGTC  TGATGTGAAA  GCCCCCGGCT
631    CAACCGGGA  GGGTCATTGG  AAAGTGGGAG  ACTTGAGTGC  AGAAGAGGAG  AGTGGAAATC  CATGTGTAGC
701    GGTGAAATGC GTAGATATAT  GGAGGAACAC  CAGTGGCGAA  GGCGGCTCTC  TGGTCTGTAA  CTGACGCTGA
771    GGCTCGAAAG CGTGGGGGAG  CAAACAGGAT  TAGATACCCT  GGTAGTCCAC  GCCGTAACG  ATGAGTGCTA
841    AGTGTGGGAG GGTTCGCC  CTTCAGTGT  GCAGCTAACG  CATTAAAGCAC  TCCGCCTGGG  GAGTACGACC
911    GCAAGTTGA  AACTCAAAGG  AATTGACGGG  GGCCCGCACA  AGCGGTGGAG  CATGTGGTTT  AATTCGAAGC
981    AACCGGAAGA ACCTTACCAG  GTCTTGACAT  CCTTTGACCA  CTCTAGAGAT  AGAGCTTCCC  CTTCCGGGGC
1051   AAAGTGACAG GTGGTGCATG  GTTGTGCTCA  GCTCGTGTGC  TGAGATGTTG  GGTAAAGTCC  CGCAACGAGC
1121   GCAACCCTTA TTGTTAGTTG  CCATCATTCA  GTTGGGCACT  CTAGCAAGAC  TGCCGGTGAC  AAACCGGAGG
1191   AAGGTGGGGA TGACGTCAA  TCATCATGCC  CCTTATGACC  TGGGCTACAC  ACGTGCTACA  ATGGGAAGTA
1261   CAACGAGTTG CGAAGTCGCG  AGGCTAAGCT  AATCTCTTAA  AGCTTCTCTC  AGTTCCGATT  GCAGGCTGCA
1331   ACTCGCTGC  ATGAAGCCGG  AATCGCTAGT  AATCGCGGAT  CAGCACGCCG  CCGTGAATAC  GTTCCCGGGC
1401   CTTGTACACA CCGCCGTCA  CACCACGAGA  GTTTGTAACA  CCCGAAGTCG  GTGAGGTAAC  CTTTT

```

그림 102. 16S rDNA sequence (1,465bp) of isolated lactic acid bacteria S-18.

1 GATCACTTAG GCGGCTGGCT CCAAAGGTTA CCTCACCGAC TTCGGGTGTT ACAAACCTCTC GTGGTGTGAC  
71 GGGCGGTGTG TACAAGGCC GGAACGTAT TCACCGCGGC GTGCTGATCC GCGATTACTA GCGATTCCGG  
141 CTTTCATGCAG GCGAGTTGCA GCCTGCAATC CGAACTGAGA GAAGCTTTAA GAGATTAGCT TAGCCTCGCG  
211 ACTTCGCAAC TCGTTGACT TCCATTGTA GCACGTGTGT AGCCCAGGTC ATAAGGGGCA TGATGATTTG  
281 ACGTCATCCC CACCTTCCTC CGGTTTGCA CCGGCAGTCT TGCTAGAGTG CCCAACTGAA TGATGGCAAC  
351 TAACAATAAG GGTGCGCTC GTTGCGGGAC TTAACCCAAC ATCTCACGAC ACGAGCTGAC GACAACCATG  
421 CACCACCTGT CACTTTGCC CCGAAGGGGA AGCTCTATCT CTAGAGTGGT CAAAGGATGT CAAGACCTGG  
491 TAAGGTCTT CGCGTTGCTT CGAATTAAC CACATGCTCC ACCGCTTGTG CGGGCCCCG TCAATTCCTT  
561 TGAGTTCAA CTTGCGGTC GACTCCCA GCGGAGTGC TTAATGCGTT AGCTGCAGCA CTGAAGGGCG  
631 GAAACCCTCC AACACTTAGC ACTCATCGTT TACGGCGTGG ACTACCAGG TATCTAATCC TGTTTGCTCC  
701 CCACGTTTC GAGCCTCAGC GTCAGTTACA GACCAGAGAG CCGCCTTCG CACTGGTGT CCTCCATATA  
771 TCTACGCATT TCACCGCTAC ACATGGAATT CACTCTCCT CTTCTGCACT CAAGTCTCCC AGTTTCCAAT  
841 GACCCTCCCC GGTGAGCCG GGGGCTTCA CATCAGACTT AAGAAACCG CTGCGCTCGC TTTACGCCA  
911 ATAAATCCCG GACAACGCTT GCCACCTAG TATTACCGCG GCTGTGGCA CGTAGTTAGC CGTGGCTTTC  
981 TGGGTTAGAT ACCGTCAAGG AATGAACAGT TACTCTCATC CTTGTTCTTC TTCTAACAAA CAGAGTTTTA  
1051 CGATCCGAAA ACCTTCTCA CTCACGCGGC GTTGTCTGGT CAGACTTTCG TCCATTGCCG AAGATTCCCT  
1121 ACTGCTGCCT CCCGTAGGAG TTTGGGCCGT GTCTCAGTCC CAATGTGGCC GATCACCTC TCAGGTCGGC  
1191 TATGCATCGT GGCCTTGGTG AGCCGTTACC TCACCAACTA GCTAATGCAC CGCGGGTCCA TCCATCAGCG  
1261 ACACCCGAAA GCGCCTTCA AATCAAAACC ATGGGGTTTT GATTGTTATA CGGTATTAGC ACCTGTTTCC  
1331 AAGTGTATC CCCTTCTGAT GGGCAGGTTA CCCACGTGT ACTCACCCGT TCGCCACTCT TCTTTTTCCG  
1401 GTGGA

그림 103. 16S rDNA sequence (1,405bp) of isolated lactic acid bacteria S-A4.

1 CTTAGGCGGC TGGCTCAAAA GGTTACCTCA CCGACTTCGG GTGTTACAAA CTCTCGTGGT GTGACGG  
71 GTGTGTACAA GGCCCGGAA CGTATTCACC GCGCGTGCT GATCCCGAT TACTAGCGAT TCCGGCTTCA  
141 TGCAGGCGAG TTGCAGCCTG CAATCCGAAC TGAGAGAAGC TTAAAGAGAT TAGCTTAGCC TCGCGACTTC  
211 GCAACTCGTT GACTTCCCA TTGTAGCAGC TGTGTAGCCC AGGTCATAAG GGGCATGATG ATTTGACGTC  
281 ATCCCCACCT TCCTCCGTT TGTCACCGGC AGTCTTGCTA GAGTGCCAA CTGAATGATG GCAACTAACA  
351 ATAAGGGTTG CGCTCGTTG GGGACTTAAC CCAACATCTC ACGACACGAG CTGACGACAA CCATGCACCA  
421 CCTGTCACTT TGCCCCGAA GGGGAAGCTC TATCTCTAGA GTGGTCAAAG GATGTCAAGA CCTGGTAAGG  
491 TTCTTCGCGT TGCTTCGAAT TAAACCACAT GCTCCACCGC TTGTGCGGGC CCCCCTCAAT TCCTTTGAGT  
561 TTCAACCTTG CGGTCGTA CTCCAGGCGG AGTGCTTAAT GCGTTAGCTG CAGCACTGAA GGGCGGAAAC  
631 CCTCCAACAC TTAGCACTCA TCGTTTACGG CGTGGACTAC CAGGGTATCT AATCCTGTTT GCTCCCCACG  
701 CTTTCGAGCC TCAGCGTCAG TTACAGACCA GAGAGCCGCC TTCGCCACTG GTGTTCTCTC ATATATCTAC  
771 GCATTTACC GCTACACATG GAATTCCACT CTCCTTTCT GCACTCAAGT CTCCCAGTTT CCAATGACCC  
841 TCCCCGGTTG AGCCGGGGC TTTACATCA GACTTAAGAA ACCGCCTGCG CTCGCTTAC GCCCAATAAA  
911 TCCGGACAAC GCTTGCCACC TACGTATTAC CGCGCTGCT GGCACGTAGT TAGCCGTGGC TTTCTGGGTT  
981 AGATACCGTC AAGGGATGAA CAGTTACTCT CATCCTTGT CTTCTTCTAA CAACAGAAGT TTTACGATCC  
1051 GAAAACCTTC TTCACTCAG CCGCGTTGCT CGGTACAGT TTCGTCCATT GCCGAAGATT CCCTACTGCT  
1121 GCCTCCGTA GGAGTTTGGG CCGTGTCTCA GTCCAATGT GGCCGATCAC CCTCTCAGGT CGGCTATGCA  
1191 TCGTGGCCTT GGTGAGCCGT TACCTACCA ACTAGCTAAT GCACCGGGG TCCATCCATC AGCGACCC  
1261 GAAAGCGCCT TTCAAATCAA AACCATGCGG TTTGATTGT TATACGGTAT TAGCACCTGT TTCCAAGTGT  
1331 TATCCCTTC TGATGGGAG GTTACCCAG TGTACTCAC CCGTTCGCCA CTCTTCTTT TCCGGTGGAG

그림 104. 16S rDNA sequence (1,400bp) of isolated lactic acid bacteria S-A5

(1) 사포닌 분해 미생물의 특성

(가) 탈지유에서의 발효특성

김치로부터 28개와 콩고 마유로부터 33개의 순수분리된 유산균의 발효 특성은 표 36, 37와 같음. Esculin agar에 배양하여  $\beta$ -glucosidase 활성을 나타내는 김치로부터 분리된 6개의 유산균과 콩고 마유로부터 분리된 10개의 선발 유산균주 모두 10% 탈지유에서 잘 배양되고 산생성 능력이 있어 모두 응고되었고, pH도 5.0 이하로 나타났음.

(나) 당분해 특성 및 효소특이성

최종 분리 선발된 5개 유산균의 효소생산 특이성과 탄수화물의 분해특성을 시험하기 위하여 API ZYM 및 API 20 strips kit을 사용한 결과는 표 39, 40과 같음.

표 39. Carbohydrate fermentation patterns of Lactic acid bacteria isolated from Kimchi and Mare's milk (dehydrated substrates for the demonstration of enzymatic activity or the fermentation of sugars)

No	Substrates	Reactions/enzymes	Isolated lactic acid bacteria				
			A3	A5	A6	B9	22
1	Sodium pyruvate	Acetoin production	+	+	+	+	+
2	Hippuric acid	Hydrolysis	-	-	-	-	-
3	Esculin ferric citrate	$\beta$ -glucosidase	-	±	±	±	+
4	Pyroglutamic acid - $\beta$ naphthylamide	Pyrrolidonyl arylamidase	+	+	+	+	-
5	6-bromo-2-naphthyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside	$\alpha$ -galactosidase	-	-	-	-	±
6	Naphtol ASBI-glucuronic acid	$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-	-
7	2-naphthyl- $\beta$ -D- galactopyranoside	$\beta$ -galactosidase	-	+	-	+	+
8	2-naphthyl phosphate	Alcaline-phosphatase	-	-	-	-	-
9	L-leucine- $\beta$ -naphthylamide	Leucine arylamidase	+	+	+	+	+
10	L-arginine	Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
11	D-ribose	Acidification	+	+	+	+	+
12	L-arabinose	Acidification	-	+	+	+	+
13	D-mannitol	Acidification	+	+	+	+	+
14	D-sorbitol	Acidification	-	-	-	-	+
15	D-lactose	Acidification	+	+	+	+	+
16	D-trehalose	Acidification	+	+	+	+	+
17	Inulin	Acidification	-	-	-	-	-
18	D-raffinose	Acidification	-	+	+	±	+
19	Starch	Acidification	+	+	+	+	+
20	Glycogen	Acidification	-	-	-	-	-

표 40. Enzymatic activity of Lactic acid bacteria isolated from Kimchi and Mare's milk

No	Enzymes	Substrates	Isolated lactic acid bacteria				
			A3	A5	A6	B9	2-2
1	Control		0*	0	0	0	0
2	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	0	0	0	0	0
3	Esterase (c4)	2-naphthyl butyrate	3	2	2	2	0
4	Esterase lipase (C8)	2-naphthyl caprylate	2	1	1	1	0
5	Lipase (c14)	2-naphthyl myristate	0	0	0	0	0
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	3	3	3	4	5
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	1	1	1	2	4
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	2	0	2	1	1
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	0	0	0	0	0
10	$\alpha$ -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	1	0	1	0	0
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	2	2	2	2	1
12	Naphtol-AS-BO-phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-phosphate	1	1	2	2	2
13	$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-galactopyranoside	0	0	0	0	1
14	$\beta$ -galactosidase	2-naphthyl- $\beta$ D-galactopyranoside	0	5	0	1	5
15	$\beta$ -glucuronidase	Naphtol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronide	1	0	0	0	0
16	$\alpha$ -glucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside	0	0	0	0	2
17	$\beta$ -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- $\beta$ D-glucopyranoside	0	0	0	0	5
18	N-acetyl-b-glucosamidase	1-naphthyl-N-acetyl- $\beta$ D-glucosaminide	0	0	0	0	4
19	$\alpha$ -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-mannopyranoside	0	0	0	0	0
20	$\alpha$ -fucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ L-fucopyranoside	0	0	0	0	0

\* Quantity of hydrolysed substrate

0 : 0 nanomoles, 1 : 5 nanomoles, 2 : 10 nanomoles, 3 : 20 nanomoles, 4 : 30 nanomoles, 5 :  $\geq 40$  nanomoles

(2) 사포닌 전환 미생물의 특성

(가) 당 분해 특성 및 효소특이성

최종 분리 선발된 4개 유산균의 효소생산 특이성과 탄수화물의 분해특성을 시험하기 위하여 API ZYM 및 API 20 strips kit을 사용한 결과는 표 41과 42과 같음.

41. Carbohydrate fermentation patterns of Lactic acid bacteria isolated from Mare's milk (dehydrated substrates for the demonstration of enzymatic activity or the fermentation of sugars)

No	Substrates	Reactions/enzymes	Isolated lactic acid bacteria			
			S-16	S-18	S-A4	S-A5
1	Sodium pyruvate	Acetoin production	+	+	+	+
2	Hippuric acid	Hydrolysis	-	-	-	-
3	Esculin ferric citrate	$\beta$ -glucosidase	+	+	+	+
4	Pyroglutamic acid - $\beta$ naphthylamide	Pyrrolidonyl arylamidase	+	+	+	+
5	6-bromo-2-naphthyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside	$\alpha$ -galactosidase	-	-	-	-
6	Naphtol ASBI-glucuronic acid	$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-
7	2-naphthyl- $\beta$ -D- galactopyranoside	$\beta$ -galactosidase	-	+	-	+
8	2-naphthyl phosphate	Alcaline-phosphatase	-	-	-	-
9	L-leucine- $\beta$ -naphthylamide	Leucine arylamidase	+	+	+	+
10	L-arginine	Arginine dihydrolase	+	+	+	+
11	D-ribose	Acidification	+	+	+	+
12	L-arabinose	Acidification	+	+	+	-
13	D-mannitol	Acidification	+	+	+	+
14	D-sorbitol	Acidification	-	-	-	-
15	D-lactose	Acidification	+	+	+	+
16	D-trehalose	Acidification	+	+	+	+
17	Inulin	Acidification	-	-	-	-
18	D-raffinose	Acidification	+	+	+	-
19	Starch	Acidification	+	+	+	+
20	Glycogen	Acidification	-	-	-	-

표 42. Enzymatic activity of Lactic acid bacteria isolated from Mare's milk

No	Enzymes	Substrates	Isolated lactic acid bacteria			
			S-16	S-18	S-A4	S-A5
1	Control		0*	0	0	0
2	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	0	0	0	0
3	Esterase (c4)	2-naphthyl butyrate	3	2	2	2
4	Esterase lipase (C8)	2-naphthyl caprylate	2	1	1	1
5	Lipase (c14)	2-naphthyl myristate	0	0	0	0
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	3	3	3	4
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	1	1	1	2
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	2	0	2	1
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	0	0	0	0
10	$\alpha$ -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	1	0	1	0
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	2	2	2	2
12	Naphtol-AS-BO-phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-phosphate	1	1	2	2
13	$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-galactopyranoside	0	0	0	0
14	$\beta$ -galactosidase	2-naphthyl- $\beta$ D-galactopyranoside	0	5	0	1
15	$\beta$ -glucuronidase	Naphtol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronide	1	0	0	0
16	$\alpha$ -glucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside	0	0	0	0
17	$\beta$ -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- $\beta$ D-glucopyranoside	0	0	0	0
18	N-acetyl- $\beta$ -glucosamidase	1-naphthyl-N-acetyl- $\beta$ D-glucosaminide	0	0	0	0
19	$\alpha$ -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-mannopyranoside	0	0	0	0
20	$\alpha$ -fucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ L-fucopyranoside	0	0	0	0

\* Quantity of hydrolysed substrate

0 : 0 nanomoles, 1 : 5 nanomoles, 2 : 10 nanomoles, 3 : 20 nanomoles, 4 : 30 nanomoles, 5 :  $\geq 40$  nanomoles

(나) 최적 생장의 배지 시험

선발된 유산균의 최적의 배지를 시험하기 위하여 Difco사의 MRS broth, nutrient broth (NB) 및 tryptic soy broth (TSB) 3종류의 배지를 사용하였음. 선발된 5개의 유산균주를 MRS broth에 접종하여 30°C의 진탕 배양기에 배양한 결과는 그림 105와 같음. 그림 105 결과와 같이 3가지 배지 중 MRS broth에서 가장 잘 배양되었으며 LB broth에서 가장 낮은 성장을 보였음.



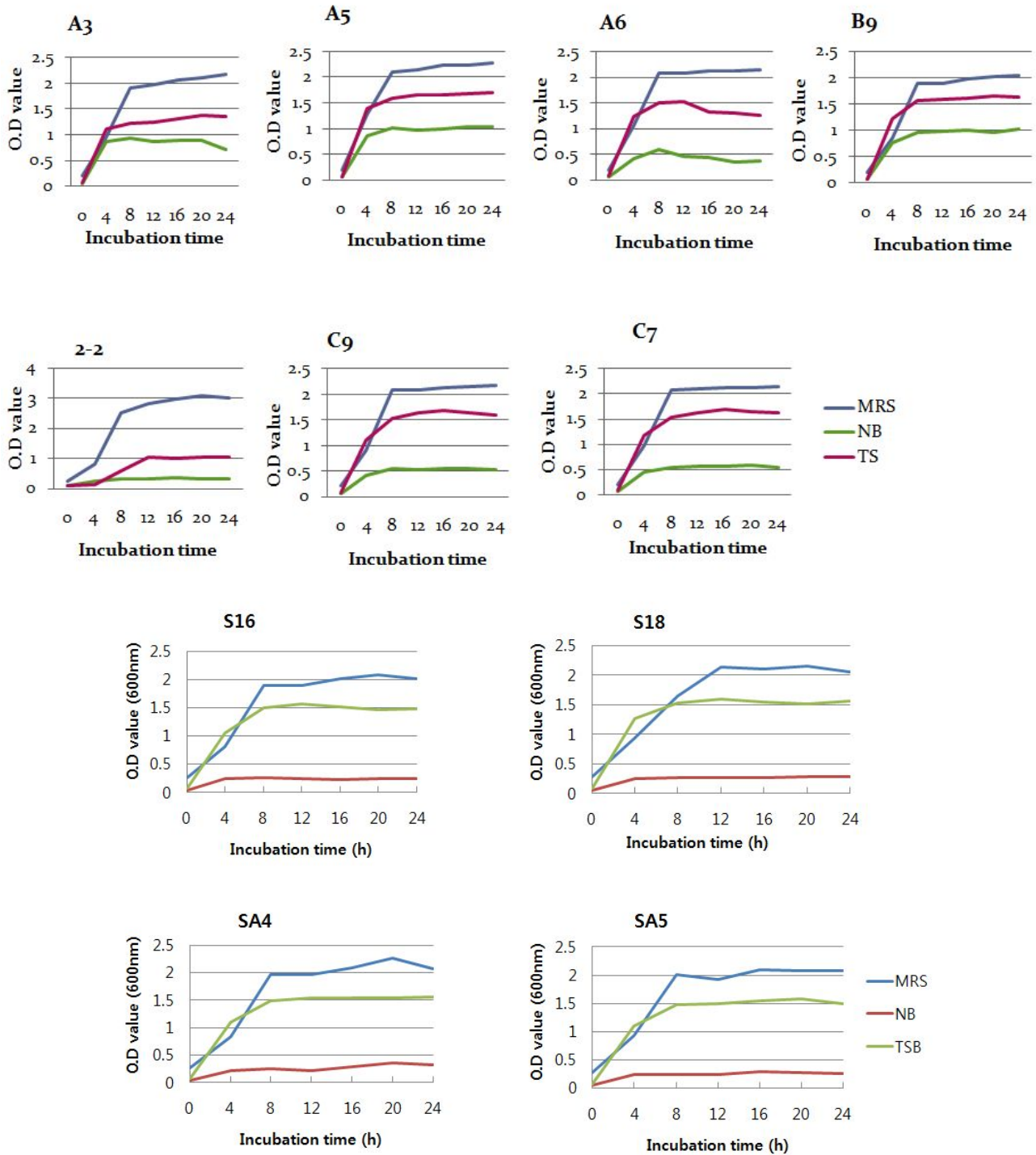


그림 105. 배지의 종류에 따른 유산균주의 성장 효과

(다) 선발균주의 온도에 따른 성장 특성

9개의 선발된 유산균주의 온도에 따른 성장특성을 알아보기 위하여 MRS broth에서 20, 30, 40℃로 배양온도를 설정하고 진탕배양기에서 190rpm으로 24시간 배양한 결과 그림 106과 같음. 그림 106의 결과에 의하면, 40℃에서 배양시 8시간에 최대 배양되어 계속 유지되었으며, 20℃에서 배양시 배양 24시간에 최대의 균수를 나타내었으며, 이에 따라 선발된 균주의 배양온도는 40℃에서 가장 빨리 성장하는 것으로 나타남.

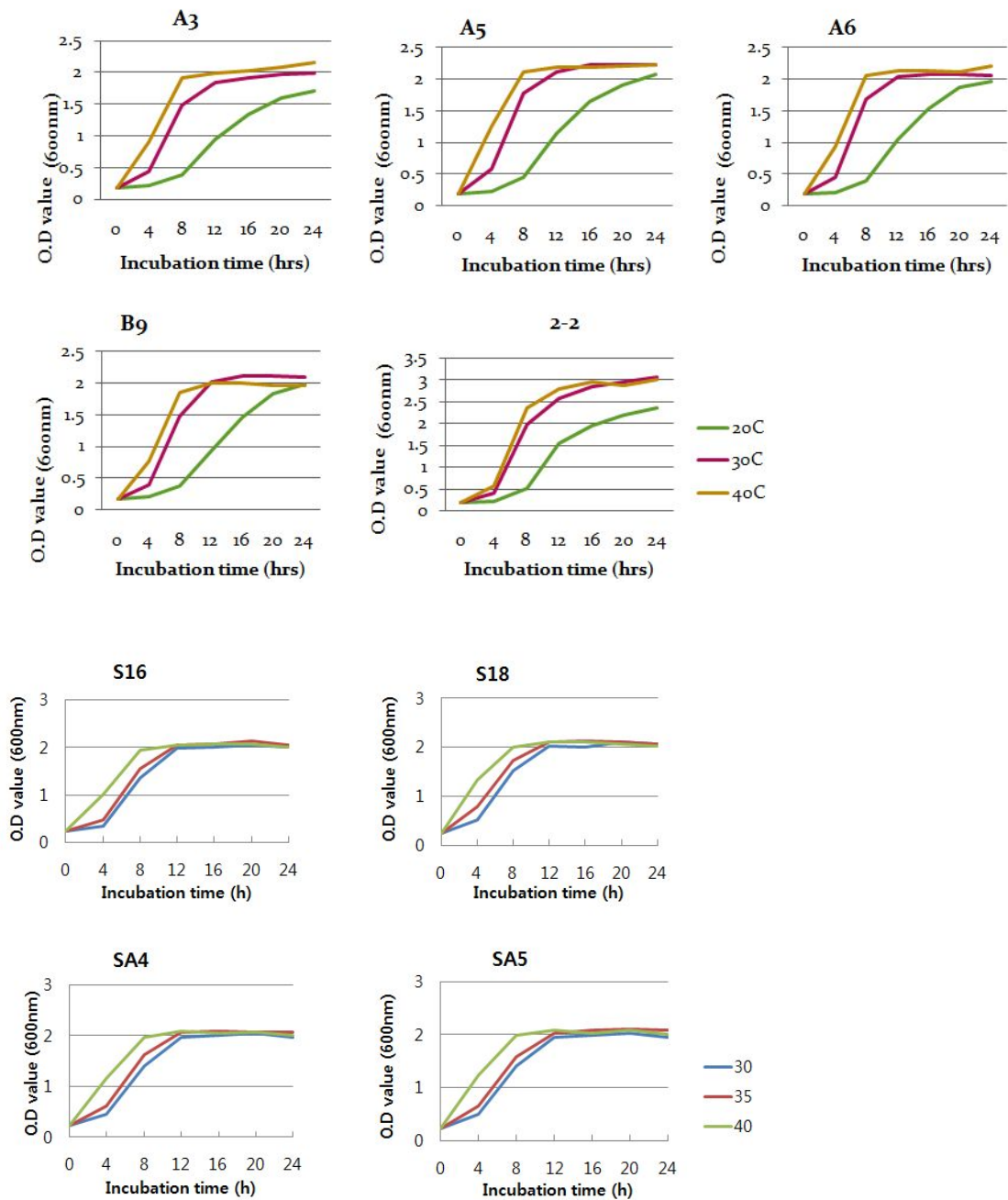


그림 106. 온도에 따른 유산균주의 성장 효과

(라) 선발균주의 pH 조건에 따른 성장 특성

선발된 9개의 균주를 30°C의 진탕배양기에서 190rpm으로 24시간 배양하면서 pH에 따른 선발균주의 성장 특성을 시험한 결과 그림 107과 같음. 그림 107의 결과에 의하면 22 균주만 제외하고 모두 pH7과 8에서 잘 성장하였으며, pH6에서는 약간의 생장이 억제되었음.

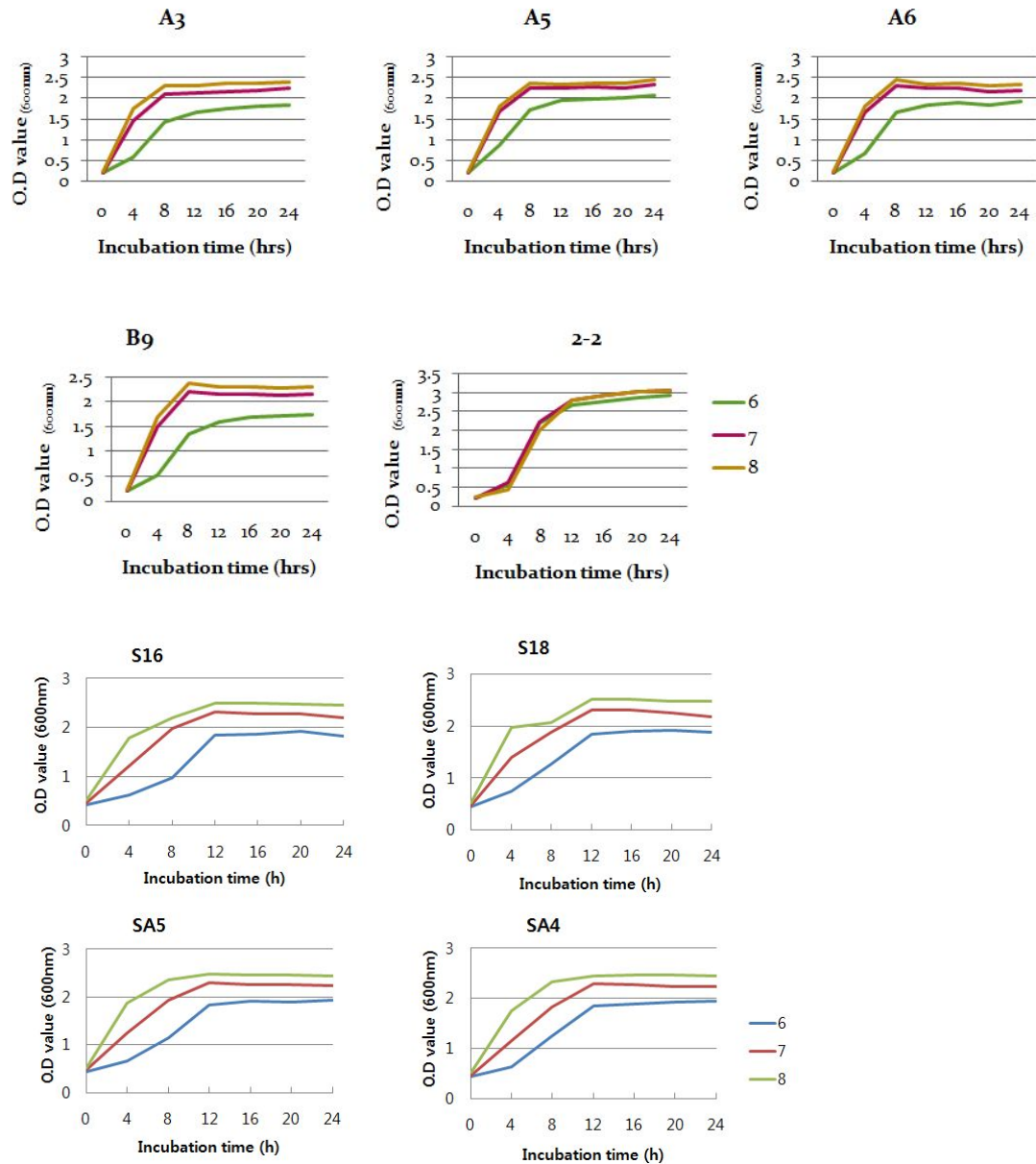


그림 107. pH에 따른 유산균주의 성장 효과

#### (마) 선발균주의 배양시간에 따른 유산균수와 pH 변화

선발된 5개의 균주를 MRS broth에서 24시간 동안 배양하여 유산균수와 pH의 변화를 측정하였음. 표 43, 그림 108에서 나타난 바와 같이 유산균수는 배양초기에 급속히 성장하여 22 균주를 제외한 모든 균주에서 배양 8시간째에 최대 균수에 이르러 정체기가 24시간동안 배양 중에 계속 유지되었으며, 22균주는 성장속도는 느리지만 지속적으로 성장하여 배양 20시간에 최대 균수를 나타내었음.

선발균주의 배양 중 균수가 가장 많이 증식된 균주는 A3, A5, B9, A6, 22 순으로 나타남. 선발균주의 산생성에 따른 배지의 pH 변화는 그림 109에서와 같이 22 균주를 제외하고는 모두 배양 8시간째에 pH 5.0 이하로 내려갔으며, 균의 성장 속도가 느린 22 균주가 배양 8시간째에는 pH 4.5 이하로 내려가 특이하게 산생성 능력이 높은 것으로 나타남. 이와 같은 결과는 22 균주는 산생성 능력이 탁월하게 높으나 다른 한편으로는 생성된 산에 의한 생장이 급속이 낮

아저 균의 성장에 억제를 받는 것으로 생각됨.

표 43. Count of liable lactic acid bacteria in MRS broth

Lactic acid bacteria	Incubation time (hrs)						
	0	4	8	12	16	20	24
A3	$1.49 \times 10^7$	$7.19 \times 10^8$	$1.92 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$1.83 \times 10^9$	$1.97 \times 10^9$	$1.87 \times 10^9$
A5	$1.08 \times 10^7$	$9.2 \times 10^8$	$1.45 \times 10^9$	$1.26 \times 10^9$	$1.37 \times 10^9$	$1.38 \times 10^9$	$1.22 \times 10^9$
A6	$3.59 \times 10^6$	$3.68 \times 10^8$	$7.3 \times 10^8$	$6.0 \times 10^8$	$6.75 \times 10^8$	$5.9 \times 10^8$	$5.8 \times 10^8$
B9	$5.0 \times 10^6$	$3.83 \times 10^8$	$8.0 \times 10^8$	$8.3 \times 10^8$	$7.45 \times 10^8$	$1.04 \times 10^9$	$8.55 \times 10^8$
2-2	$3.94 \times 10^6$	$7.9 \times 10^7$	$1.58 \times 10^8$	$3.17 \times 10^8$	$4.75 \times 10^8$	$5.55 \times 10^8$	$3.6 \times 10^8$

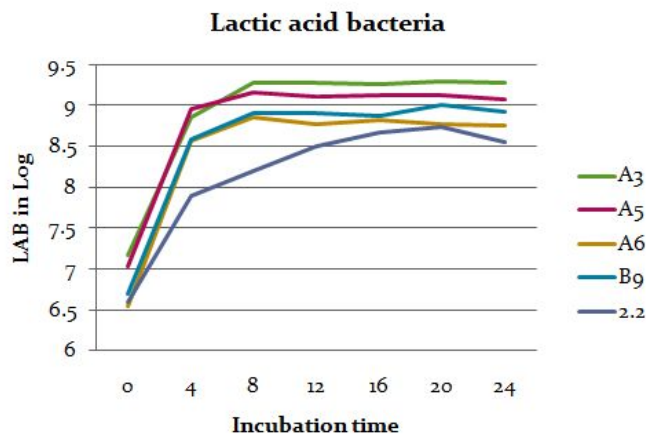


그림 108. Growth of lactic acid bacteria

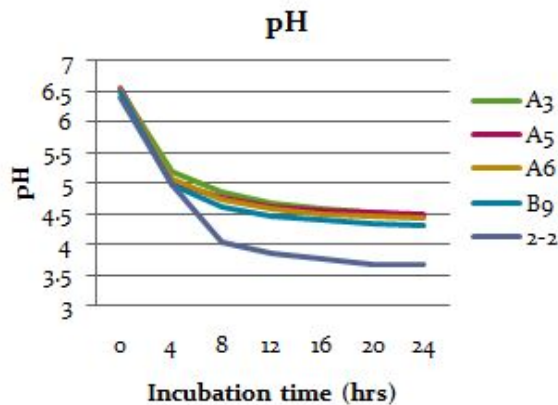


그림 109. A3, A5, A6, B9, 22 균주 배양액의 pH 변화

### (3) 미생물에 따른 사포닌 분해 조효소의 특성

#### (가) 사포닌 분해 미생물의 효소 분리

사포닌 분해 유산균으로 선발된 유산균(22)은 MRS 배지에 배양하고 원심분리하여 상등액을 모아 농축하고 50% 에탄올을 처리하여 조효소 성분을 회수하여 20mM의 sodium phosphate

buffer (pH 7.0)에 용해시켜 조효소액으로 사용하였음.

#### (나) TLC 분석에 의한 조효소의 사포닌 분해 특성

##### - Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환 효소의 최적 온도

사포닌 분해 유산균으로 선발된 유산균(22)의 조효소를 수집하여 사포닌 분해를 위한 최적 온도 조건을 시험한 결과 그림 110과 같음.

그림 110의 결과에 의하면 ginsenoside Rb<sub>1</sub>에서는 30°C와 35°C에서 새로운 사포닌이 생성됨을 알 수 있었음. 한편, 40°C 이상에서는 전혀 변화가 없는 것으로 보아 고온에서는 효소가 불활성화되는 것으로 판단됨.

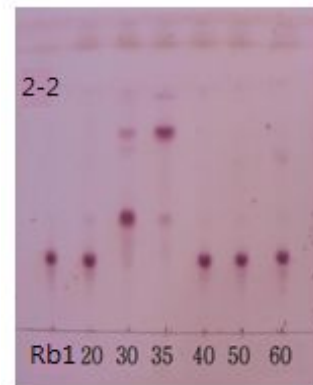


그림 110. Ginsenoside Rb<sub>1</sub>을 2-2 균주의 조효소액으로 온도에 따라 7일간 반응시킨 TLC 양상.

##### - Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환 효소의 최적 pH

사포닌 분해 유산균으로 선발된 유산균(22)의 조효소를 수집하여 사포닌 분해를 위한 최적 pH 조건을 실험한 결과를 그림 111에 나타내었음. 그림 111의 결과에 의하면 최적의 pH는 7.0으로 나타남.

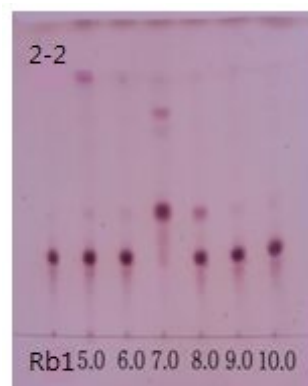


그림 111. Ginsenoside Rb<sub>1</sub>을 22 균주의 조효소액으로 pH에 따라 7일간 반응시킨 TLC 양상

##### - 효소의 전기영동 양상

사포닌 분해 선발균주에서 분비되는 효소의 분자량은 SDS-PAGE 시험을 통하여 조사하였음. 그림 112의 결과에 의하면 분비된 효소의 분자량은 약 8만 정도로 생각됨.

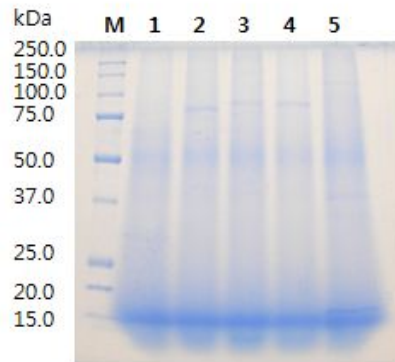


그림 112. 선발균주 조효소액의 SDS-PAGE 결과

- M: Standard molecular marker
- Lane 1: A3 균주의 조효소액
- Lane 2: A5 균주의 조효소액
- Lane 3: A6 균주의 조효소액
- Lane 4: B9 균주의 조효소액
- Lane 5: 2-2 균주의 조효소액

#### (4) 사업화를 위한 유산균을 이용한 대량 발효

##### (가) *Lactobacillus plantarum* CRNB-22를 이용한 인삼뿌리 발효

기술이전 한 신규균주인 *Lactobacillus plantarum* CRNB-22로 접종하여 7일간 배양한 배양 물을 24시간 간격으로 미생물 수를 counting 한 결과는 표 44과 그림 113에 나타낸 바와 같 음. Viable cell counting 결과 GF 3%로 첨가해서 반응시킨 구에서 유산균수가 반응 2일째부 터 6일까지  $10^8$ 으로 유지되다가 7일째는  $2.44 \times 10^7$  으로 가장 높게 나타났음.

표 44. Viable cell count of *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 in GF 0%, GF 1%, GF 3% and GF 5%

Samples		Incubation time (day)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
L. plantarum	GF-0%	$4.62 \times 10^6$	$1.7 \times 10^7$	$3.4 \times 10^8$	$2.84 \times 10^8$	$4.54 \times 10^8$	$4.09 \times 10^7$	$1.51 \times 10^7$	$2.25 \times 10^5$
	GF-1%	$5.92 \times 10^6$	$2.2 \times 10^7$	$3.5 \times 10^8$	$2.62 \times 10^8$	$4.98 \times 10^8$	$1.53 \times 10^8$	$1.07 \times 10^7$	$2.88 \times 10^6$
	GF-3%	$5.59 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$	$2.85 \times 10^8$	$2.25 \times 10^8$	$1.62 \times 10^8$	$2.51 \times 10^8$	$1.56 \times 10^8$	$2.44 \times 10^7$
	GF-5%	$5.53 \times 10^6$	$2 \times 10^7$	$3.25 \times 10^8$	$3.96 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$6.17 \times 10^7$	$3.27 \times 10^7$	$8.55 \times 10^6$



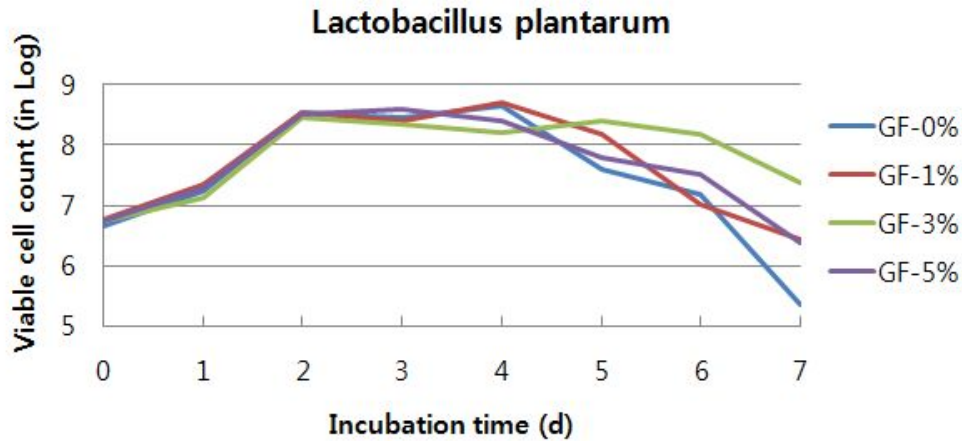


그림 113.. Viable cell count of *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 in GF 0%, GF , % and GF 5% in Log phase.

(나) 유산균 성장인자를 첨가한 saponin 전환 반응 조사

■ 인삼뿌리 용액 반응액의 사포닌 전환 양상

*Lactobacillus plantarum* CRNB-22로 7일간 배양한 인삼뿌리 반응생산물을 TLC로 수행한 결과는 그림 114에 나타난 바와 같음. *Lactobacillus plantarum* CRNB-22로 배양한 결과는 control에 비해 사포닌 성분들의 변화가 있는 것으로 확인되었음.

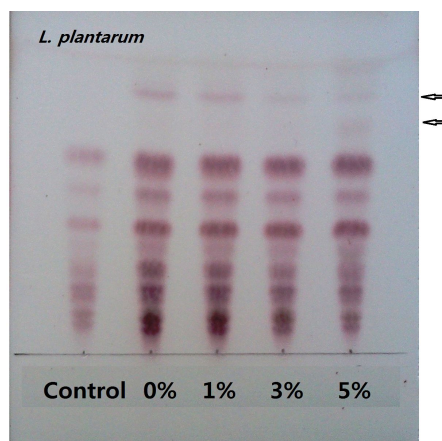


그림 114. TLC analysis of fermented products with *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 for 7 days in Ginseng root solution added with GF 0%, GF 1%, GF 3% and GF 5%.

*Lactobacillus plantarum* CRNB-22를 이용하여 3% GF를 첨가하여 꽃봉오리, 잎, 뿌리를 반응시킨 TLC 결과는 그림 115에 나타난 바와 같음. 반응시키지 않은 꽃봉오리, 인삼잎, 인삼뿌리와 반응시킨 꽃봉오리, 인삼잎, 인삼뿌리의 사포닌 전환이 일어난 정도를 보면 꽃봉오리, 인삼잎, 인삼뿌리 모두 사포닌 전환이 크게 일어난 것이 뚜렷이 확인되었고, 새로운 전환물질이 많이 생성된 것으로 나타났음.

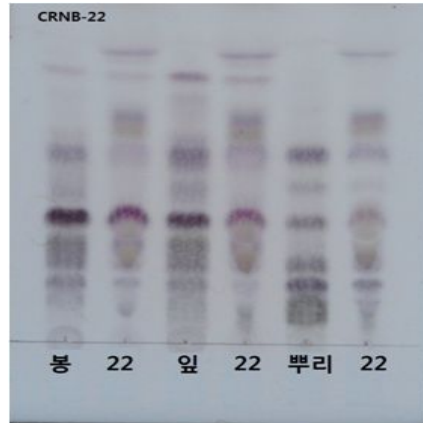


그림 115. TLC analysis of fermented products with *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 for 7 days in flower, leaf and root added with GF 3%.

#### (5) 대규모 발효공정에 의한 인삼(뿌리)의 발효

확립된 발효방법을 이용하여 시제품을 생산하기 위하여 인삼 100 kg을 세절하여 물 400 kg과 혼합하고 GF 3%를 첨가하여 75°C에서 10분간 열처리를 하였음. 사용균주는 1차년도에 분리한 *Lactobacillus plantarum* CRNB-22를 2% 접종하고, 35°C에서 교반하면서 7일간 배양하였음. 배양이 끝난 인삼발효액을 열처리하고 약 60 brix 농도로 농축하여 농축제품을 생산하거나 또는 12 brix 농도로 조정하여 파우치 형태로 생산하였음.

#### 4. Ginsenoside Rb1의 Rd로의 선택적 전환 균주 분리 동정 ; MBT213와 103L

##### (1) 사포닌 분해 유산균의 분리

사포닌 분해 미생물의 분리원은 한국의 전통 EM을 이용하였음. 수집한 샘플 1ml를 10ml MRS broth에 접종시키고 30°C와 37°C에서 3일간 배양하였음. 배양 후 배양액을 멸균수에 희석하고, 희석액 1ml를 BCP agar plate에 분주하여 30°C에서 3일간 배양하였음. BCP agar plate상에서 colony 주위에 노란색의 환을 형성하는 균주를 선발하여 BCP agar에 5회 계대 배양하여 순수 분리하였음..

사포닌 분해능력을 가진 균주를 분리하기 위하여 분리된 균주를 Esculin-agar 배지에 접종하여 배지내의 색깔 변화를 관찰하였음. 사포닌 분해능력을 가진 균주는  $\beta$ -glucosidase를 생성하고 esculin에  $\beta$ -glucose가 반응하여 생성된 esculetin은 배지내에서 ferric ammonium citrate와 반응하고, colony 주위에 검정색 환을 형성하게 됨. 따라서 colony 주위에 검정색 환이 형성된 균주들을  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 균주라고 판단하고, 사포닌 분해능력이 있을 것으로 판단되어 사포닌 분리 균주로서 선발하였음.



**표 45. Composition of MRS broth**

Ingredients	Amount (g/L)
Enzymatic digest of Animal tissue	10
Beef extract	10
Yeast extract	5
Dextrose	20
Sodium acetate	5
Polysorbate 80	1
Potassium phosphate	2
Ammonium citrate	2
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05

**표 46. Composition of BCP agar**

Ingredients	Amount (g/L)
Extract Yeast Dried	2.5
Peptone	5.0
Glucose	1.0
L-Cysteine	0.1
Tween 80	1.0
Bromcresol purple	0.04
Agar powder	15.0

**표 47. Composition of Esculin Agar**

Ingredients	Amount (g/L)
Pancreatic digest of casein	13.0
NaCl	5.0
Yeast extract	5.0
Esculin	1.0
Ferric ammonium citrate	0.5
Agar	15.0

(2) Genomic DNA 분석

선발된 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성이 가장 뛰어난 균주 8개를 선발하여 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 이용하여 동정을 실시하였음. 두 균주의 DNA를 추출하여 universal primer (5'-GAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 사용하여 Yoon 등(1997)의 조건에 따라 PCR을 행하여 16S rDNA (16S rRNA coding gene)를 증폭하였음. 증폭된 16S rDNA는 PCR product

purification kit (Qiagen 사)를 사용하여 정제한 후 sequencing 반응에 이용하였음. 염기서열 결정은 Genetic analyzer 377 (Perkin-Elmer 사)을 사용하였으며 염기서열의 분석은 주로 Bioedit 프로그램 및 MEGA5.2 프로그램을 사용하였음.

### (3) 사포닌 분해 미생물의 선발과 미생물의 동정

$\beta$ -glucosidase 활성을 나타낸 균주의 사포닌 분해능력을 시험하기 위하여 선발된 균주를 TS broth 배지(pH7.0)에 계대 배양한 후 배양액의 pH를 7.0으로 맞춰서 0.2 mg/ml 농도의 protopanaxadiol ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>와 protopanaxatriol ginsenoside Re 수용액 1ml를 혼합하여 혼합액을 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 35°C의 배양기에서 7일 동안 반응시킴. 혼합액에 수포화 부탄올을 1:1 비율로 혼합하고, 부탄올층을 추출하여 동결건조한 후 다시 수포화 부탄올에 녹여서 TLC 분석 시료로 사용하였음.

표 48. Trypticase Soy broth

Ingredients	Amount (g/L)
Pancreatic digest of casein	17.0
Papaic digest of Soybean Meal	3.0
Sodium chloride	5.0
Dipotassium phosphate	2.5
Dextrose	2.5

#### ■ TLC 분석

반응산물은 TLC plate에 (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Aluminium sheets) 0.8cm 간격으로 점적하고, 반응기내에 정착하고 하층반응액으로 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (65:35:10, v/v)를 사용하여 5.5cm 전개하였음. 반응시킨 TLC plate에 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 분무하여 110°C에서 가열하여 발색시킴.

### (4) 사포닌 분해 미생물의 특성

#### ■ Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환 효소의 최적 온도

사포닌 분해 선발 균주의 배양액을 0.2mg/ml ginsenoside Rb<sub>1</sub> 수용액과 1:1 (v/v) 비율로 혼합한 후 pH를 7.0로 조절하고 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 반응온도를 각각 30, 35, 40°C로 하여 7일간 반응하였음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 Thin Layer Chromatography (TLC) 분석을 통하여 사포닌 분해를 측정하여 효소의 최적 반응온도 조건을 시험하였음.

#### ■ Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환 효소의 최적 pH

사포닌 분해 선발 균주의 배양액을 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조절한 후 0.2mg/ml ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 수용액과 1:1 (v/v) 비율로 혼합하여 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 35°C에서 7일간 반응시켰음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 Thin Layer Chromatography(TLC) 분석을

통하여 사포닌의 분해를 시험하여 조효소의 최적 온도조건을 시험하였음.

#### ■ 최적 온도와 pH에서 ginsenoside Rb1을 전환의 TLC 분석와 HPLC 양상

사포닌 분해 선발 균주의 반응용액을 최적 온도와 pH에서 0.2mg/ml ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 수용액과 1:1 (v/v) 비율로 혼합하여 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 각각 3, 7, 10, 14 일간 반응시켰음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 Thin Layer Chromatography(TLC) 분석을 통하여 사포닌의 분해를 시험하였음.

#### ■ HPLC 분석

인삼 발효액을 동결건조 시킨 후에 50% methanol에 녹이고 7500rpm에 20분 원심분리 하여 추출물을 수집해서 다시 동결건조 한 후에 methanol 후 0.50  $\mu$ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였음. 사용한 HPLC 장치는 Agilent Technologies 1260 infinity 이었으며, 컬럼은 ACE 5-C<sub>18</sub> cloumn (250×4.6mm)를 사용하였음. 이동상으로 사용한 A 용매는 H<sub>2</sub>O, B 용매는 CH<sub>3</sub>CN을 사용하였음. 용매는 gradient elution system으로 0~35분(20% B), 35~85분(40%B), 85~105분(50%B), 105~135분(65% B), 135~145분(85% B), 145~155분(100% B), 155~160분(100% B), 160~163분(20% B), 163~165분(20% B)으로 조절하였음. 전개온도는 40℃ 이었고 유속은 1.0ml/min이었으며, 검출기는 UV 205nm (Agilent Technologies 1260 infinity)를 사용하여 사포닌의 성분을 분석하였음.

#### (5) 선택한 균주 MBT213와 103L 인삼뿌리에 배양

인삼뿌리를 잘게 잘라서 믹서기로 5분 갈아서 20% 수액을 만들고 75℃에서 10분 열처리를 하고 실온에 식힌 후에 *Paenibacillus* sp MBT213와 *Lactobacillus buchneri*을 3%로 접종한 후 *Paenibacillus* sp MBT213을 이산화탄소배양기에서 30℃에서 14일간, *Lactobacillus buchneri*을 진탕배양기에서 35℃에서 14일간 200rpm으로 배양하였고 배양 중에 3일, 7일, 배양 끝나고 14일째에 미생물수를 세었음.

#### 6) 인삼(뿌리)의 산업화

인삼 100 kg을 세절하여 물 400 kg과 혼합하고 85℃에서 10분간 열처리를 하였음. 사용균주는 3차년도에 분리한 *Paenibacillus*. sp MBT213을 2% 접종하고, 35℃에서 14일간 배양하였음. 배양이 끝난 인삼발효액을 열처리하고 약 60 brix 농도로 농축하여 농축제품을 생산하거나 또는 12 brix 농도로 조정하여 파우치 형태로 생산함.

## 5. 제2 세부과제의 결과

### ■ 사포닌 분해 유산균의 분리

그림 116와 117에서와 같이 한국의 전통 EM으로부터 미생물을 (*Sporolactobacillus*) 분리하였다. 유산균의 선별은 30℃와 37℃에서 BCP agar plate에 배양하여 colony 주위에 노란색의 환을 형성하는 균주를 선발하였으며, 선발된 균주는 BCP agar에 5회 계대 배양하여 순수 분리하였다. 분리된 미생물은 37개를 순수 분리하였음.

분리된 미생물 중 사포닌 분해가 가능한 균주를 선별하기 위하여 그림 116와 같이 Esculin-agar 배지에 접종하여 배지내의 색깔 변화를 관찰하였다. 사포닌 분해능력을 가진 균주는  $\beta$ -glucosidase를 생성하는 것으로 알려져 있으며, 그것은 배지에 있는 esculin과  $\beta$ -glucose가 반응하여 생성된 esculin이 배지내에서 ferric ammonium citrate와 반응하고,  $\beta$ -glucosidase를 생성하는 균주의 주위에 검정색 환을 형성하게 됨. 따라서 colony 주위에 검정색 환이 형성된 균주들을  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 균주라고 판단하고, 사포닌 분해 능력이 있을 것으로 선발하였음. 선발된 미생물은 표 49에 나타난 것과 같이 EM으로부터 17개의 미생물을 순수 분리하였음.

선발된 균주 중에서 colony 모양을 보면서 8개를 선택하고 genomic DNA 분석을 하였음.

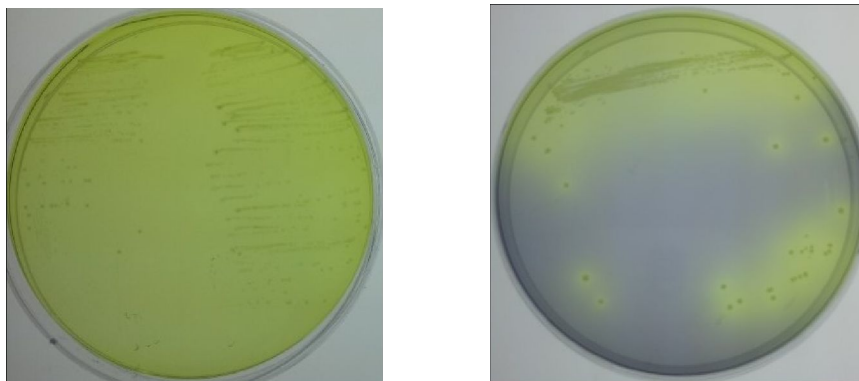


그림 116. BCP agar를 사용하여 EM으로부터 미생물의 분리

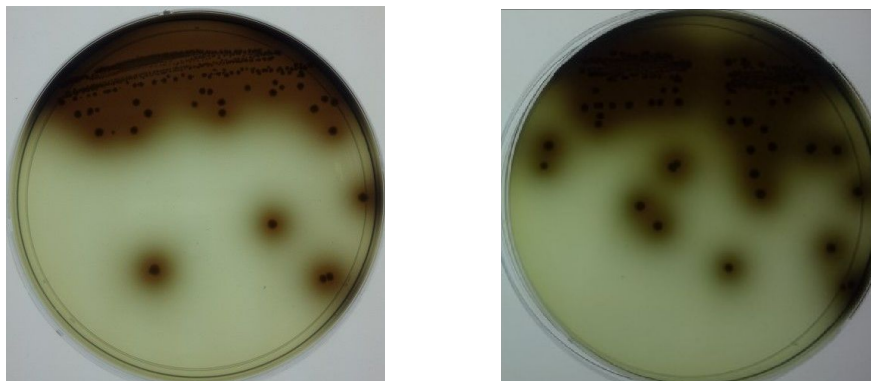


그림 117. 분리된 미생물을 Esculin agar에 배양하여  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정

표 49. Isolation of strain with  $\beta$ -glucosidase activity from EM samples

Sample No	Total colonies	Esculin positive	Selected for DNA analysis
4	41S, 42S, 43S, 44L, 45L, 46L, 47L	-	-
5	51S	-	-
6	61L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 70L	61L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 70L	63L, 65L
7	71L, 72bS, 72S, 72'S, 73sS, 73bS	71L, 72bS, 72S, 72'S, 73sS, 73bS	71L, 72S, 73S
8	84S, 85L	-	-
9	95L, 96L, 97L	95L (1)	95L
10	101L, 102L, 103L, 104L	-	103L
12	122, 123, 124L, 125L	122, 123	123
14	141, 142	-	-
	37 colonies	17 colonies	8 colonies

■ Genomic DNA 분석

사포닌 분해 미생물로 선발된 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성이 가장 뛰어난 균주 2개를 선발하여 균주의 유전자염기서열분석을 통하여 동정하였음. 분리했던 미생물 MBT213는 1,450개의 염기서열 중 1374개의 염기서열이 동일하여 95%의 염기서열 상동성이 있는 *Paenibacillus* sp. 로 동정되었으며, 미생물 103L은 99%의 염기서열 상동성이 있는 *Lactobacillus buchineri* 로 동정되었음.

1	TCTACCCACC	TTCGGCGGCT	GGCTCCTTGC	GGTACCTCA	CCGACTTCGG	GTGTTGTA	AACTCTCGTGGT
71	GTGACGGGCG	GTGTGTACAA	GACCCGGGAA	CGTATTACCC	GCGGCATGCT	GATCCGCGAT	TACTAGCAAT
141	TCCGACTTCA	TGCAGGCGAG	TTGCAGCCTG	CAATCCGAAC	TGAGACTGGC	TTTTTAGGAT	TCGCTCCATC
211	TCGGGACTTC	GCTTCCCGTT	GTACCAGCCA	TTGTAGTACG	TGTGTAGCCC	AGGTCATAAG	GGGCATGATG
281	ATTTGACGTC	ATCCCCGCCT	TCCTCCGGTT	TGTCACCGGC	AGTCATTCTA	GAGTGCCAC	CITTAGTGTG
351	TGGCAACTAA	AAICAAGGGT	TGCGCTCGIT	GCGGGACTTA	ACCCAACATC	TCACGACACG	AGCTGACGAC
421	AAACCATGCAC	CACCTGTCTC	CTCTGTCCCG	AAGGAAAAGA	TACA TCTCTG	TACCGGTACG	AGGGATGTCA
491	AGACCTGGTA	AGGTTCTTCG	CGTTGCTTCG	AATTAACCA	CATACTCCAC	TGCTTGTGCG	GGTCCCGTTC
561	AAITCCITTG	AGTITCAGTC	TTGCGACCGT	ACTCCCAGG	CGGAATGCTT	AATGTGTTAA	CITCGGCACC
631	AAGGGIATCG	AAACCCCTAA	CACCTAGCAT	TCATCGITTA	GCGCGTGGAC	TACCAGGGTA	TCTAATCCTG
701	TTTGTCTCCC	ACGCTTTCGC	GCCTCAGCGT	CAGTTACAGC	CCAGAGAGTC	GCCTTCGCCA	CTGGTGTTC
771	TCCACATCTC	TACGCATTTT	ACCGCTACAC	GTGGAATTCC	ACTCTCCCTT	TCTGCACCTA	AGCTACCCAG
841	TTTCCAATGC	GACCTAAGGT	TGAGCCTCAG	GATTAACAT	CAGACTTAAA	TAGCCGCTG	GCGCGCTTT
911	ACGCCAATA	ATTCCGGACA	ACGCTTGCCC	CTTACGTATT	ACCGCGGCTG	CTGGCAGCTA	GTTAGCCGGG
981	GCTTITCTTC	TCAGGTACCG	TCACTCCGGT	AGCAGTACT	CTACCGAACG	TCTTCCCTG	GCAACAGAGC
1051	TTTACGATCC	GAAAACCTTC	ATCACTACAG	CGGCGTTGCT	CCGTCAGACT	TTCTGCCATT	GCGGAAGATT
1121	CCCTACTGCT	GCCCTCCGTA	GGAGTCTGGG	CCGTGCTCA	GTCCAGTGT	GCCGTTTAC	CCTCTCAGT
1191	CGGCTACGCA	TCGTCCGCTT	GGTGAGCCGT	TACCCACCA	ACTAGCTAAT	GCGCCGACAG	TCCATCTGCA
1261	AGTACAGAT	TGCTCCGCTT	TTCAITACTT	CCCAATGCGA	GAAAATAAAT	TATCCGGTAT	TAGCTAACGT
1331	TTCCGCTAGT	TATCCAGTCT	TTACAGGCGA	GTTACTTACG	TGTTACTCAC	CCGTCGCGCG	CTAACCCCTC
1401	TGGAGAGCAA	GCTCTCCATC	AAGTCCGCTC	GACTGCATGT	ATAGCNCGCC		

그림 118. 16S rDNA sequence (1,450bp) of isolated *Paenibacillus*. sp MBT213

```

1      CTGTCACTTA GACGGCTGGT CCCCGAAGGT TACCTACCG GCTTTGGGTG TTACAAACTC TCATGGTGTG
71     ACGGGCGGTG TGTACAAGGC CCGGGAACGT ATTACCCGTG GCATGCTGAT CCACGATTAC TAGCGATTCC
141    AACITCATGT AGGCGAGTTG CAGCCTACAA TCCGAAC TGA GAAACGGCTTT AAGAGATTAG CTTGACCTCG
211    CGGTTTCGCG ACTCGTTGTA CCGTCCATTG TAGCACGTGT GTAGCCCAGG TCATAAGGGG CATGATGATT
281    TGACGTCAAT CCCACCTTCC TCCGGTTTGT CACCGGCAGT CTGCTAGAG TGCCCAACTG AATGCTGGCA
351    ACTAACAATA AGGGTTGCGC TCGTTGCGGG ACTTAACCCA ACATCTCAGC ACACGAGCTG ACGACAACCA
421    TGCACCACCT GTCAATTCTGT CCCCAGAGG AACGCCTAAT CTCTTAGGTT GGCAGAGAT GTCAAGACCT
491    GGTAAGGTTT TCGCGTAGC ATCGAATTAA ACCACATGCT CCACCCTTG TGCGGCCCC CCGCAATTCC
561    TTTGAGTTTC AACCTTGGCG TCGTACTCCC CAGGCGGAGT GCTTAAATGCG TTAGCTGCAG CACTGAAGGG
631    CGGAACCCTT CCAACACTTA GCACTCATCG TTTACGGCAT GGACTACCAG GGTATCTAAT CCTGTTCCGT
701    ACCCATGCTT TCGAGCCTCA GCGTCAGTTA CAGACCAGAC AGCCGCTTC GCCACTGGTG TTCTTCCATA
771    TATCTACGCA TTTACCCGCT ACACA TGGAG TTCCACTGTC CTCTTCTGCA CTCAGTCTC CCGGTTTCCG
841    ATGCACTTCT CCGGTAAAGC CGAAAGGCTT TCACATCAGA CCTAAAAAAC CGCCTGCGCT CGCTTTACGC
911    CCAATAAATC CGGACAACGC TTGCCACCTA CGTATTACCG CCGCTGCTGG CACGTAGTTA GCCGTGGCTT
981    TCTGGTTGGA TACCGTCAAG ATGTCACAG TTAATCTGAC ACCTGTTCTT CTCCAACAAC AAGTITTTAC
1051   GAGCCGAAAC CCTTATCAC TCACGCGGCG TTGCTCCAAC AGACTTTCGT CCATTTGTTGA AGATTCCCTA
1121   CTGCTGCCTC CCGTAGGAGT TTGGGCGGTG TCTAGTCCC AATGTGGCCG ATTAACCTCT CAGGTCGGCT
1191   ACGTATCATC GCCTTGGTAA GCCGTACCT TACCAACAAG CTAATACGCC GCGGTCCAT CCTAAGTGA
1261   CAGCCGAAGC CGTCTTTTAA ACCAAACCA GGTGGTTTGT GTTGTIATAC GGTATTAGCA CCTGTTTCCA
1331   AGTGTATCC  CCTACTTCAA GGGCAGGTTA CCGACGTGTT ACTACCAAT TCGCCACTCG TCTCAATGTT
1401   AAATCTTTCA AGTGCAAGCA CCTAAATCA TTAACGGAGA CCGGTTGAC TGCAATGATA GCNCCCNM
1471   NCCC

```

그림 119. 16S rDNA sequence (1,474bp) of isolated *Lactobacillus buchineri* 103L

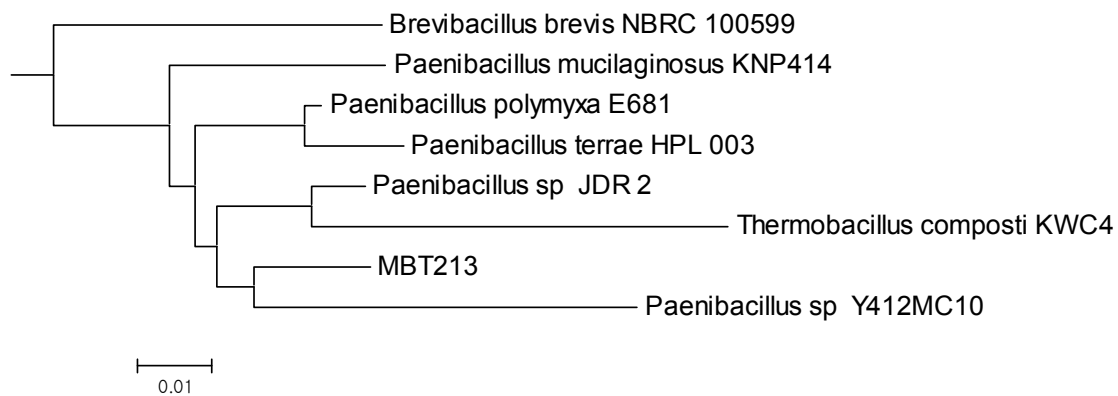


그림 120 . Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of strain MBT213, showing the phylogenetic relationships among strain MBT213 and related bacteria. Scale length is 0.01.



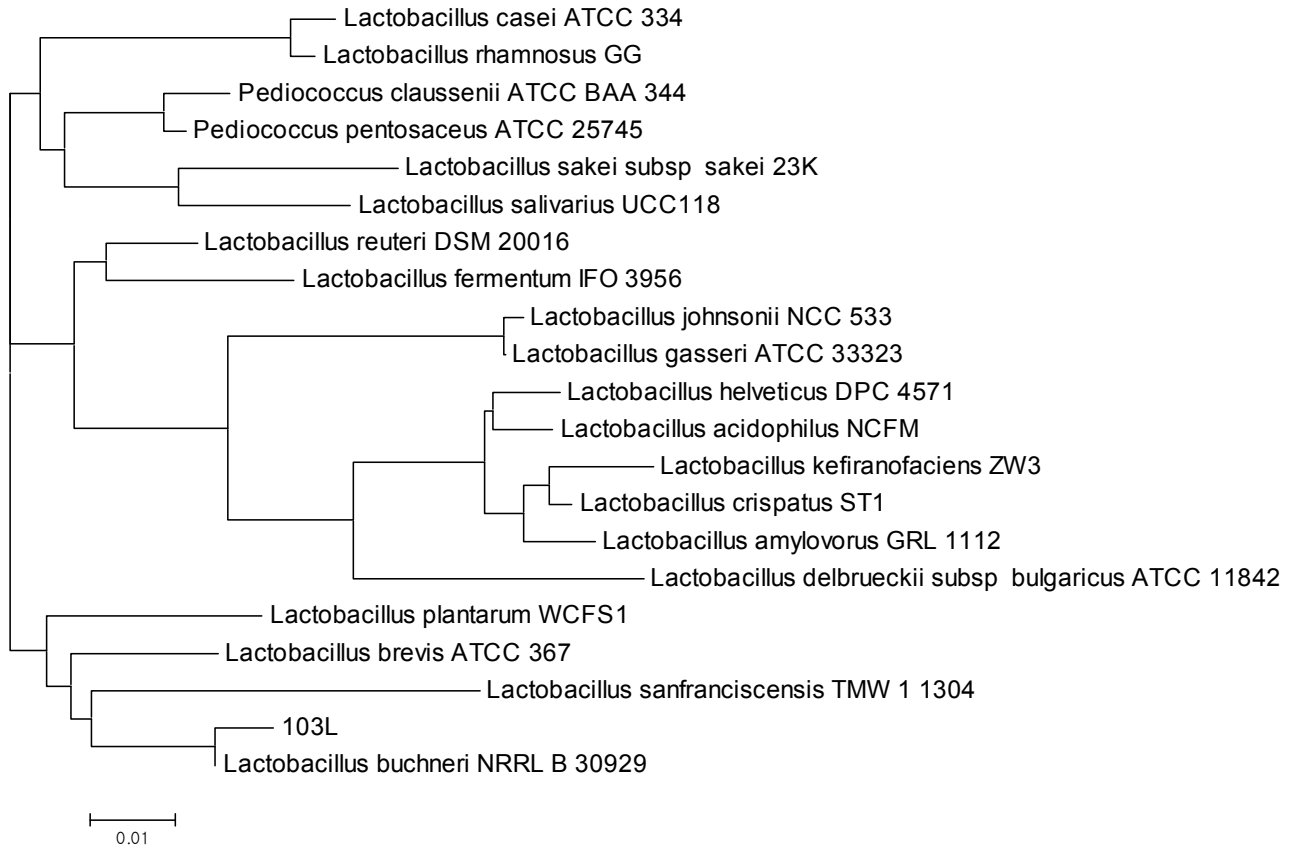


그림 121. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of strain 103L, showing the phylogenetic relationships among strain 103L and related bacteria. Scale length is 0.0

### ■ 사포닌 분해 미생물의 선발과 미생물의 동정

#### -사포닌 분해 미생물의 선발

Genomic DNA 분석한 미생물 중에서  $\beta$ -glucosidase 활성이 높은 2개의 미생물 실제로 사포닌 분해능력이 있는지 확인하기 위하여 선발된 균주를 TS broth 배지에 접종하고 30°C에서 3일 동안 배양하고, 3일 배양 후에 7500rpm에서 15분 원심분리를 하며 배양액을 가지고 사포닌의 분해 정도를 시험하기 위하여 배양액 pH을 7.0으로 맞춰서 0.2mg/ml의 protopanaxadiol ginsenoside Rb1, Rb2와 protopanaxatriol ginsenoside Re 수용액과 각각 1:1 (v/v) 비율로 혼합하여 혼합액을 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 35°C의 배양기에서 7일 동안 반응시킴.

TLC 분석한 결과 그림 122와 그림 123과 같이 나타남.

표준사포닌과 비교하여 MBT213과 103L 2개의 분리 미생물에서 배양 후 standard saponin과 비교하여 새로운 분해물이 형성된 것으로 보여 특정 사포닌이 분해된 것을 확인 할 수 있었음.

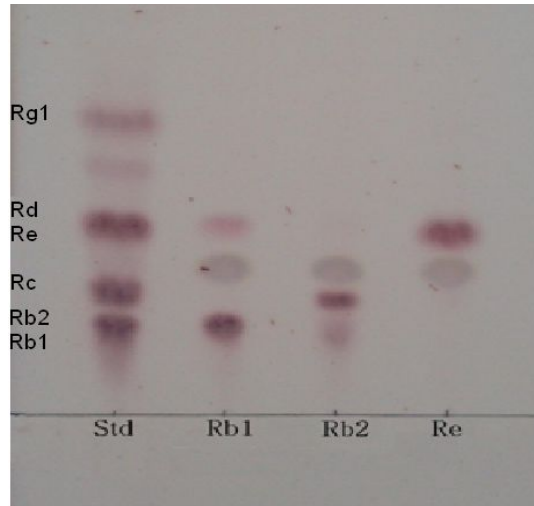


그림 122. TLC analysis of ginsenoside Rb1, Rb2, and Re conversion by cultured broth of strain MBT213 for 7 days.

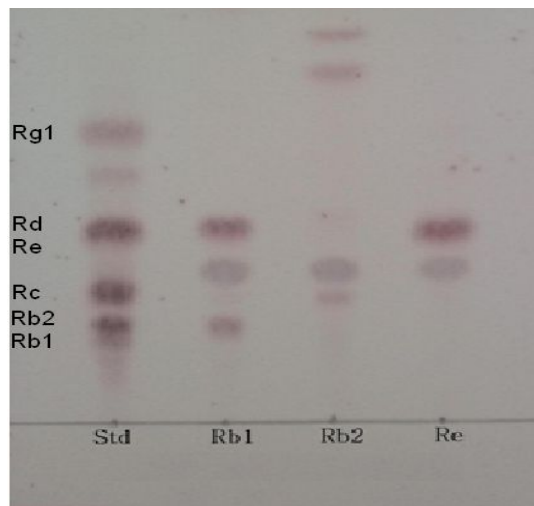


그림 123. TLC analysis of ginsenoside Rb1, Rb2, and Re conversion by cultured broth of strain 103L for 7 days.

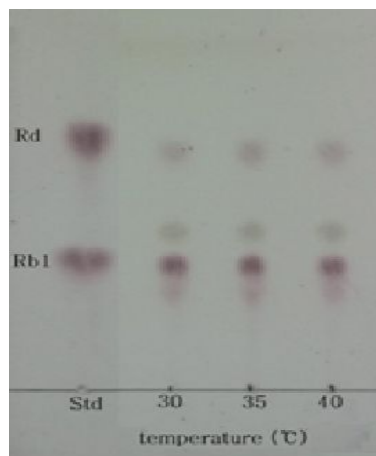


그림 124.. TLC analysis of conversion of ginsenoside Rb1 by strain MBT213 for determination to optimum temperature



## ■ 사포닌 분해 미생물의 특성

### - Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환 효소의 최적 온도

사포닌 분해 선발 미생물의 배양액을 0.2mg/ml ginsenoside Rb<sub>1</sub> 수용액과 1:1 (v/v) 비율로 혼합한 후 pH를 7.0로 조절하고 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 반응온도를 각각 30, 35, 40 $^{\circ}$ C로 하여 7일간 반응하였음. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 TLC 분석을 통하여 사포닌 분해를 측정하여 효소의 최적 반응온도 조건을 시험하였음. TLC결과에서 보며 미생물 MBT213과 103L이 가진  $\beta$ -glucosidase 효소가 ginsenoside Rb<sub>1</sub>을 분해한 최적 온도는 35 $^{\circ}$ C으로 나타났음.

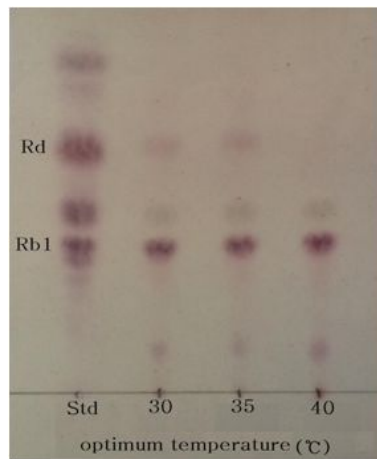


그림 125. TLC analysis of conversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by strain 103L for determination to optimum temperature

### - Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환 효소의 최적 pH

사포닌 분해 선발 균주의 배양액을 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조절한 후 0.2mg/ml ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 수용액과 1:1 (v/v) 비율로 혼합하여 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 35 $^{\circ}$ C에서 7일간 반응시킴. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 TLC 분석을 통하여 사포닌의 분해를 시험하여 조효소의 최적 온도조건을 시험하였음. TLC결과에서 보며 미생물 MBT213이 가진  $\beta$ -glucosidase 효소가 ginsenoside Rb<sub>1</sub>을 분해한 최적 pH는 7.0이였고, 미생물 103L이가 가진  $\beta$ -glucosidase 효소가 ginsenoside Rb<sub>1</sub>을 분해한 최적 pH는 5.0으로 나타남.

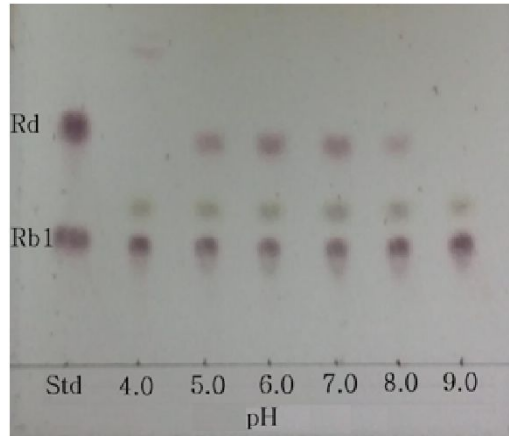


그림 126. TLC analysis of conversion of ginsenoside Rb1 by strain MBT213 for determination to optimum pH.

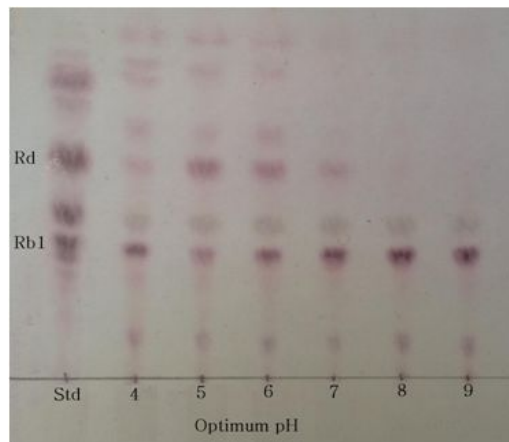


그림 127. TLC analysis of conversion of ginsenoside Rb1 by strain 103L for determination to optimum pH.

**-최적 온도와 pH에서 ginsenoside Rb1을 전환의 TLC 분석과 HPLC 양상**

사포닌 분해 선발 미생물 MBT213의 반응용액을 최적 온도와 pH에서 0.2mg/ml ginsenoside Rb1의 수용액과 1:1 (v/v) 비율로 혼합하여 각각 3, 7, 10, 14 일간 반응시킴. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 TLC와 HPLC 분석을 통하여 사포닌의 분해를 시험하였음. TLC 분석에서는 반응 시간이 갈수록 ginsenoside Rb1의 band가 없어지고 ginsenoside Rd의 band가 더 진하게 나타내며 HPLC 분석에서도 반응 시간이 갈수록 ginsenoside Rb1의 peak가 줄어들고 ginsenoside Rd의 peak가 높아짐. 반응 14일째는 ginsenoside Rb1의 peak는 없어지고 ginsenoside Rd의 peak만 본 것으로 미생물 MBT213의 가진  $\beta$ -glucosidase 효소는 ginsenoside Rb1을 ginsenoside Rd로 완전히 전환하는 것으로 확인하였음.

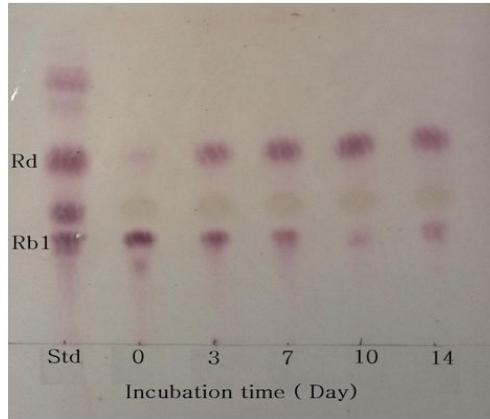


그림 128. TLC analysis of ginsenoside Rb1 conversation by culture broth of strain MBT213 at optimum temperature and optimum pH for 14 days

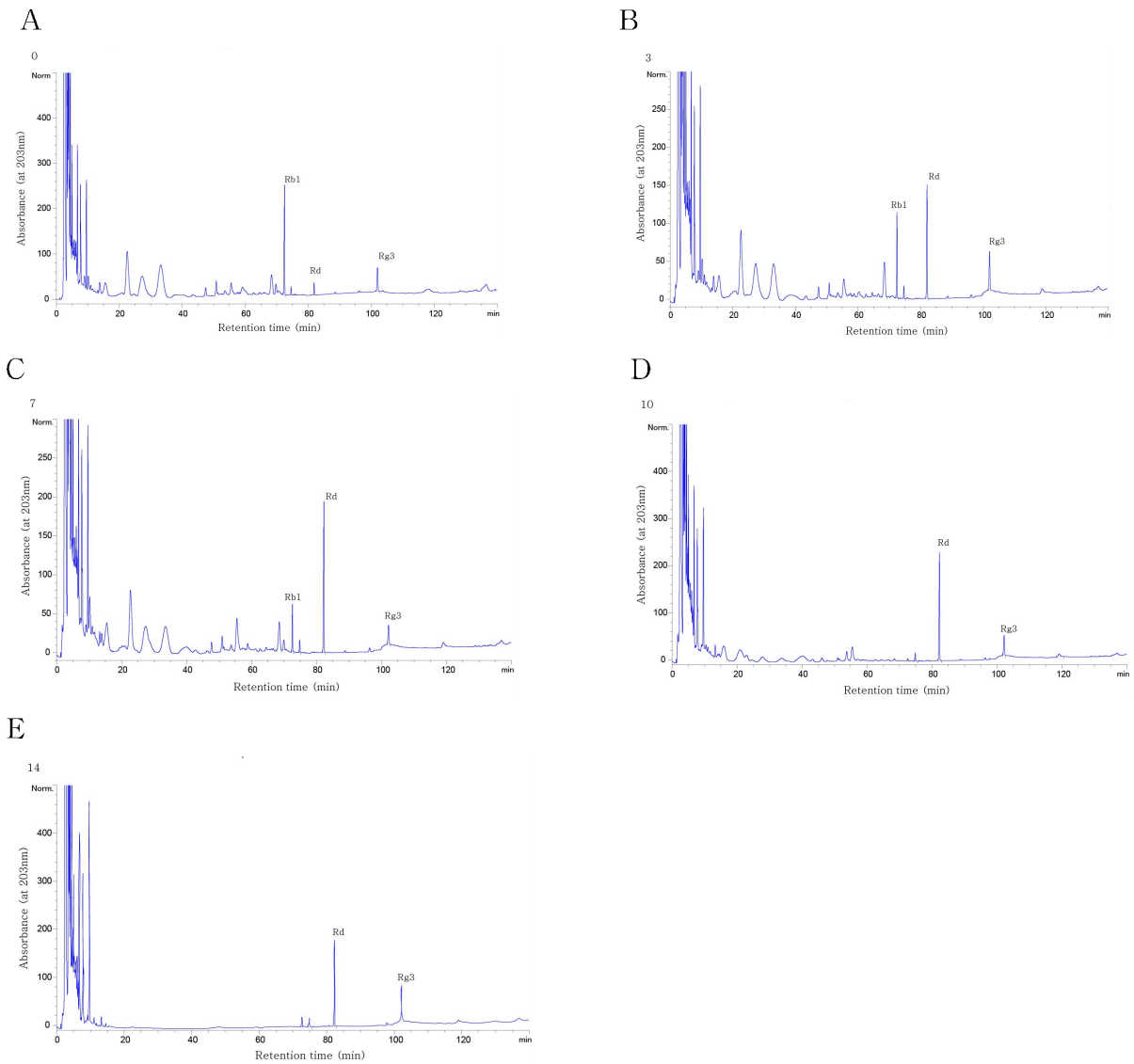


그림 129. HPLC analysis of ginsenoside Rb1 conversation by culture broth of strain MBT213 at optimum temperature and optimum pH for 14 day ; A-0day, B-3days, C-7days, D-10days, E-14days.

- 선택한 균주 MBT213와 103L 인삼뿌리 발효

인삼뿌리를 잘게 잘라서 믹서기로 5분 갈아서 20% 수액을 만들고 75℃에서 10분 열처리를 하고 실온에 식힌 후에 *Paenibacillus* sp. MBT213와 *Lactobacillus buchneri*을 3%로 접종한 후 *Paenibacillus* sp. MBT213을 이산화탄소배양기에서 35℃에서 14일간, *Lactobacillus buchneri*을 진탕배양기에서 35℃에서 14일간 200rpm으로 배양하였고 배양 중에 3일, 7일, 배양 끝나고 14일째에 미생물수를 counting 한 후 *Paenibacillus* sp MBT213로 접종하여 14일간 배양한 배양물을 미생물 수를 counting 한 결과는 표 50과 그림 130에 나타낸 바와 같다. Viable cell counting 결과에는 균수는 14일째는  $1.43 \times 10^8$  으로 가장 높게 나타났음.

*Lactobacillus buchneri* 103L로 접종하여 7일간 배양한 배양 물을 미생물 수를 counting 한 결과는 표 50와 그림 131에 나타낸 바와 같음. Viable cell counting 결과에는 7일째는  $1.86 \times 10^8$ 으로 가장 높게 나타나고, 14일째는  $3.2 \times 10^7$ 으로 나타내고 많이 줄어지지 않는 것임.

표 50. Viable cell count of *Paenibacillus* sp MBT213 in 20% ginseng root

미생물	Incubation time (days)			
	0	3	7	14
<i>Paenibacillus</i> sp MBT213	$4 \times 10^3$	$9.8 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$	$1.43 \times 10^8$
<i>Lactobacillus buchneri</i> -103L	$1.12 \times 10^7$	$7.7 \times 10^7$	$1.86 \times 10^8$	$3.2 \times 10^7$

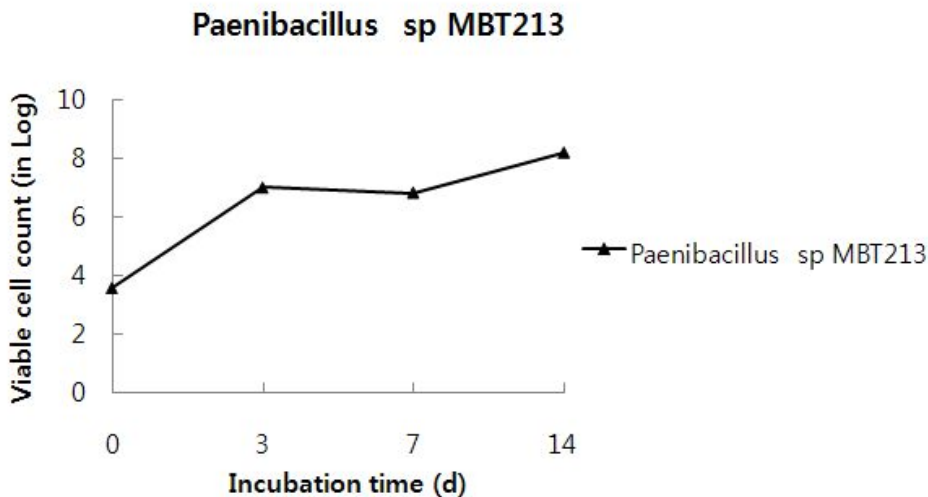


그림 130. Viable cell count of *Paenibacillus* sp MBT213 in 20% ginseng root.

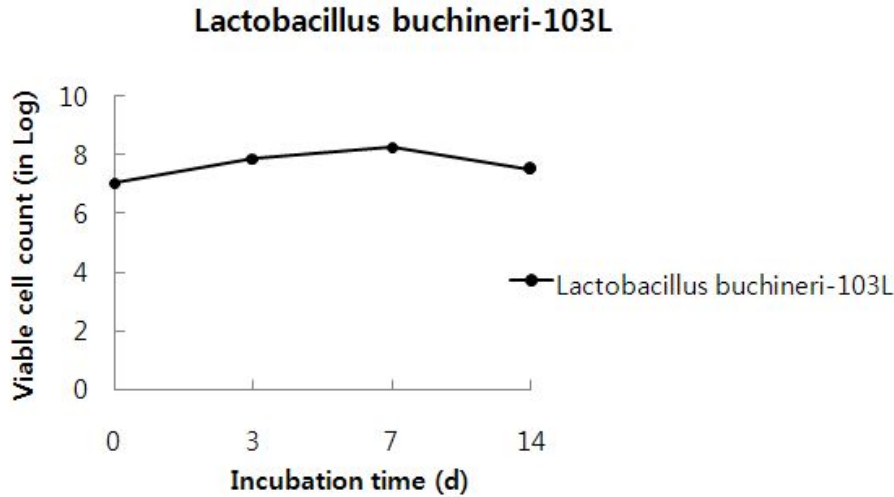


그림 131. Viable cell count of *Lactobacillus buchineri* 103L in 20% ginseng root.

- HPLC 분석

*Paenibacillus* sp. MBT213으로 14일간 배양한 인삼뿌리 반응생산물을 HPLC로 수행한 결과는 그림 132에 나타난 바와 같음. Ginsenoside들의 변화를 확인할 때 ginsenoside Rb1을 기준으로 하였으며 ginsenoside Rb1에서 ginsenoside Rd로 전환하여 생성되는 peak로 확인하였음. *Paenibacillus* sp. MBT213의 인삼발효에 대해서는 발효시간이 길어질수록 ginsenoside Rb1의 peak 높이는 줄어들고 ginsenoside Rd의 peak는 높게 나타났고, 발효 14일째는 새로운 여러 종류의 peak를 나타냄.

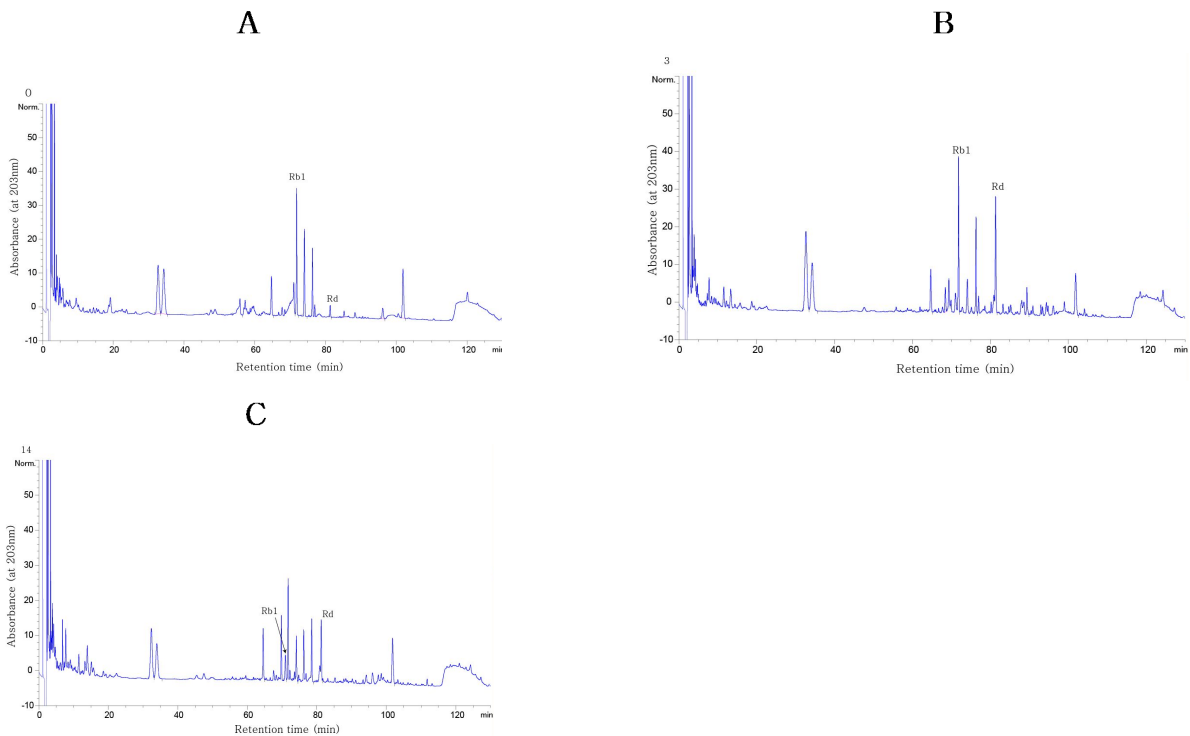


그림 132. HPLC HPLC analysis. Ginsenosides conversion in ginseng root by strain *Paenibacillus* sp MBT213 for 3 and 14days; A-0day, B-3days, C-14days

*Lactobacillus buchineri* 103L으로 14일간 배양한 발효 홍삼 반응생산물을 HPLC로 수행한 결과는 그림 133에 나타난 바와 같음. Ginsenoside들의 변화를 확인할 때 ginsenoside Rb1을 기준으로 하였으며 ginsenoside Rb1에서 ginsenoside Rd이나 ginsenoside Rg3를 생성하는 peak로 확인하였음. *Lactobacillus buchineri* 103L의 인삼발효에 대해서는 발효 시간이 길어질수록 ginsenoside Rb1의 peak 높이는 크게 변화하지 않았지만 생산한 ginsenoside Rd의 peak는 시간에 따라 높이가 상승되었고, 발효 14일째는 새로운 여러 가지 peak를 나타내었는데 그 중에 ginsenoside Rg3도 생성되었음.

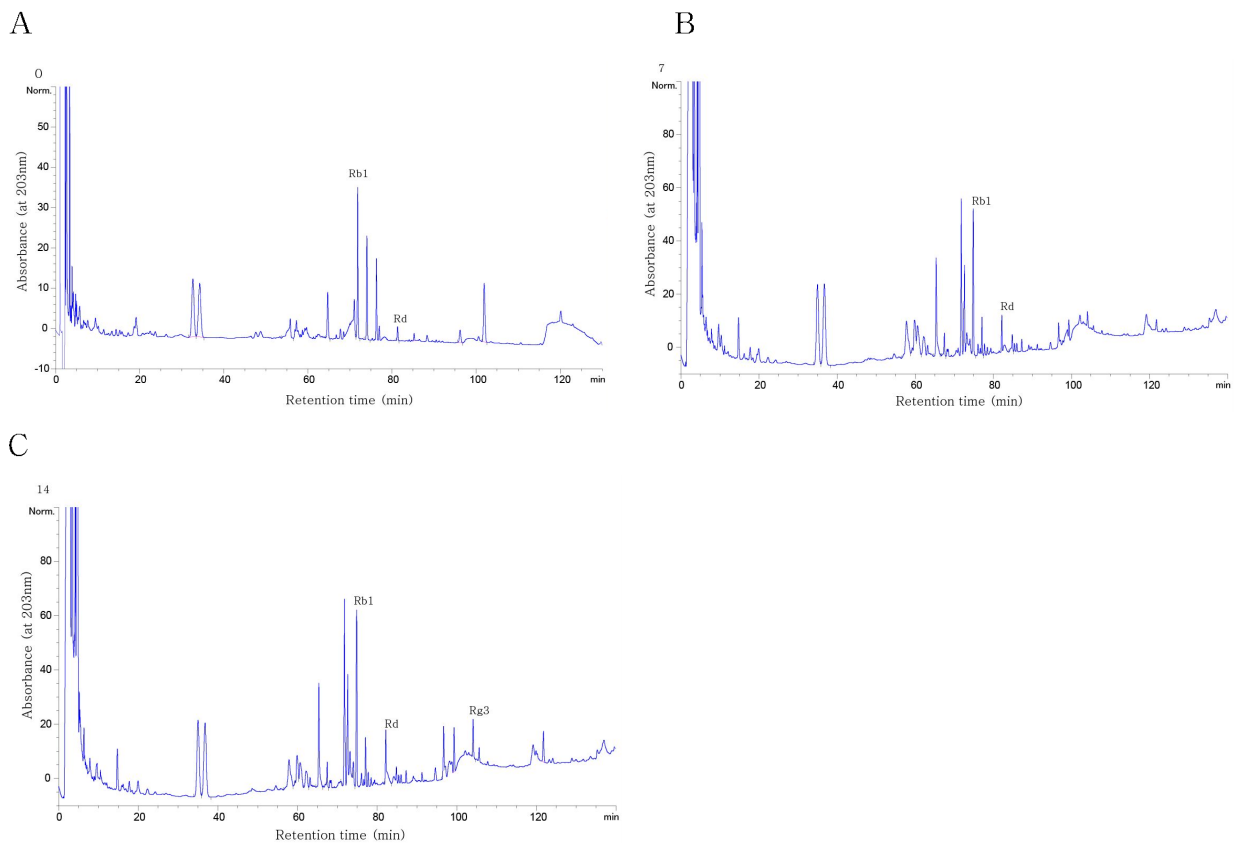


그림 133. HPLC analysis. Ginsenosides conversion in ginseng root by strain *Lactobacillus buchineri* 103L for 3 and 14days; A-0day, B-7days, C-14days

#### - 발효홍삼(뿌리)의 산업화

인삼 100 kg을 세절하여 물 400 kg과 혼합하고 85℃에서 10분간 열처리를 하였음. 사용균주는 3차년도에 분리한 *Paenibacillus*. sp MBT213를 2% 접종하고, 35℃에서 교반하면서 14일간 배양하였음. 배양이 끝난 인삼발효액을 열처리하고 약 60 brix 농도로 농축하여 농축제품을 생산하거나 또는 12 brix 농도로 조정하여 파우치 형태로 생산하였음(그림 135).





그림 134. 제품 생산 발효 장치



그림 135. 시제품 생산

## 6. 제2세부과제 결론

제2세부과제에서 발효홍삼을 만들기 위하여 여러 가지 전통식품을 통하여 분리 동정하여 15종의 균주와 그의 발효를 통한 발효 홍삼을 만들면서 다음과 같은 결론을 얻었음;

- 김치 및 마유로부터 인삼을 발효 시킬수 있는 신규 균주 15종을 분리하여 확인하였음. 이 중에서 A3와 22를 비롯하여 5종의 균주를 KCTC에 기탁하였으며 특허를 출원하였음.
- 최적의 발효 조건(발효온도, pH 등)을 확립하였음.
- Ginsenoside 성분을 전환하는 신균주의 분리는 2균주로 *Paenibacillus*. sp. MBT213와 *Lactobacillus buchineri*-103L으로 동정되었으며, 분리된 2균주 모두 Single saponin Rb1을 Rd로 전환하는 능력이 우수한 것으로 확인되었음.
- *Paenibacillus*. sp. MBT213를 접종한 인삼뿌리 발효에서 첨가시 생균수가 증가되어 발효 마지막 날인 14일째는 가장 높게 나타남으로 14일이 가장 적당함. 그러나 *Lactobacillus buchineri*-103L를 접종한 인삼뿌리 발효에서는 발효 7일째 가장 높게 나타났고 14일째는 생균수가 감소하여 7일이 적당함을 알았음.
- *Paenibacillus* sp. MBT213 및 *Lactobacillus buchineri*-103L를 뿌리에 접종하여 반응시킨 결과 2 균주 모두 발효시간이 경과됨에 따라 Rb1은 줄어들고 Rd 성분이 증가된 것으로 나타났음. 이 두 균주는 선택적으로 Rb1에서 Rd로 전환시키는 균주임. 그리고 발효 14일째는 Rg3를 포함한 새로운 ginsenoside들이 생성되는 것을 관찰하였음.
- Ginsenoside를 전환하는 신균주의 분리는 4균주로 *Enterococcus durans* 으로 동정되었으며, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium* 으로 각각 동정되었다. 분리된 신균주 모두 단일 사포닌 Rb1, Rb2, Rd, Re, Rg1과 꽃봉우리, 뿌리의 전환 능력이 우수한 것으로 확인되었음.
- 인삼(뿌리)의 발효는 성공적으로 수행되었으며, 발효홍삼(뿌리)의 산업화를 확립하여 현재 발효홍삼 농축액을 파우치 형태로 생산함.



### 3절. 제1협동과제 : 발효 인삼을 이용한 제형 개발 및 안정성

#### 1. 발효 홍삼을 이용한 제형 개발 및 안정성

##### 가. 정제

##### (1) 타정의 preformulation

일반적으로 타정을 하기 위해서는 여러 가지 인자들을 고려해야 함. 따라서 약물의 종류에 따른 부형제 등의 영향을 검토하고 펀치 모양이나 크기 및 부형제의 물리화학적인 특징 등을 검토하여 이후에 진행되는 새로운 물질 등의 특성에 따라 타정 및 코팅을 실시하는데 기본 자료로 삼고자 하였음.

##### (가) 설계 공정의 검토

정제를 제조시 과립에 대한 물리적 특성인 입자의 크기와 입도 분포에 따라 타정시 과립의 유동성이 달라질 뿐 아니라 겉보기 밀도와 진밀도를 따로 관리하지 않으면 함량 균일성이나 정제의 중량에 큰 변동을 가져옴. 따라서 일반적으로 제조 시 유동성과 정전기적인 문제로 인해 직접법으로 타정할 때 많은 장애를 가지고 있는 것으로 알려진 아세트아미노펜을 이용하여 매트릭스 정제 제조시 사용되는 고분자의 함량 변화 및 제조방법에 따라 물리적 특성의 영향을 알아 보기위해 유동성(Hausner ratio), 겉보기 밀도(Bulk density), 진밀도(Tapped density), 압축성(Carr's index)을 측정하고 재현성을 확인하였음. 이 때 유동성(Hausner ratio)과 압축성(Carr's index)의 측정은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였음. 이 때 Hausner ratio 값이 1.25이상인 경우 유동성이 떨어지며 Carr's index 값이 23이상 일 때 유동성이 떨어지는 것으로 알려져 있음.

$$\text{Hausner ratio}(H) = \frac{p T}{p B}$$

$p T$  : the tapped density of the power or granulation

$p B$  : the freely settled bulk density of the power or granulation

$$\text{Carr's index} = 100 \times \left(1 - \frac{1}{H}\right)$$

표 51. Formulation of acetaminophen matrix tablet

Drug	Formulation(mg)								
	A	B	C	D	A-1	B-1	B-2	C-1	C-2
AAP	200	200	200	200	200	200	200	200	200
LH	16.25	34.25	26.75	19.25	16.25	34.25	34.25	50.75	26.75
Avicel PH 102	16.25	34.25	26.75	19.25	16.25	34.25	34.25	26.75	50.75
PVP K-30	6	-	-	-	6	-	-	-	-
HPMC 2910	60	30	45	60	60	30	30	45	45
Mg.St	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Aerosil®	-	-	-	-	9	9	15	-	-
Total					300				

(나) 정제의 제조 및 평가

■ 인삼류(흑삼 분말)

여러 가지 부형제를 선택하여 생약분말을 되도록 많이 함유할 수 있으면서 압축성이나 섞임성이 좋은 부형제를 선택하고자 하였음.

제조된 정제는 중량편차, 마손도, 경도 및 붕해시험 등을 실시하였음.

이 때 중량편차는 제제된 정제 10개의 무게를 측정해 그 평균을 내고 중량편차를 계산하였음. 또한 마손도는 정제 각 10개의 무게를 측정하고, 마손도 측정기를 이용하여 250초에 100회를 시행 한 후, 가루를 털어내어 정제의 무게를 다시 측정하였음. 그 때의 감량은 정제전량의 0.8%이하일 경우 적합으로 판정하였음.

표 52. Formulation of tablet containing Black ginseng

Compostion	Content(%)
Active material	67.05
direct lactose	18
Avicell 102	8
Mg.st	1.41
MF	3.45
DW	1.25
Explotab	0.84
<b>Total</b>	<b>100</b>

■ 발효 생약

인삼류와 동일하게 현재 진행되고 있는 것들이 발효를 통한 새로운 물질의 도출에 따른 생약류 등을 이용할 것이므로 실제로 발효되어 제품화를 검토하고 있는 여러 가지 생약 혼합 발효물에 대한 물성 검토를 바탕으로 하여 타정에 맞는 조건들을 검토하였음.

(다) 코팅

인삼류에서 실험실적으로 잡힌 코팅기제 구성성분을 바탕으로 최근의 환경 문제 등을 해결할 수 있도록 하기 위해서 상품화 되어진 피름 코팅기제를 이용하여 수계 코팅의 조건을 잡아 검토하였음.

천연물 특성상 수분에 약하고 마찰에 약할 뿐만 아니라 냄새 때문에 나정 상태의 외관이나 상품성을 높이기 위해서는 코팅하여 나정의 문제점을 보완할 필요성이 있어 방습 코팅 기제들을 사용하여 코팅시의 여러 가지 조건들을 검토하여 실시하였음.

먼저 일차적으로 인삼류에서 유계 코팅과 수계코팅을 모두 실시하여 추후의 코팅에 대한 조건들을 확립한 이후 발효 생약에 확립된 조건을 적용하여 수계 코팅의 여부를 검토하였음.

이 때 천연물들은 일반적으로 유통과정 중에 수분이 증발되어 결합력이 약해져 경도가 감소되거나 냄새 등의 문제점이 발생할 수 있으므로 이를 개선하기 위해 코팅을 실시하였음. 코팅은 1차와 2차에 걸쳐 실시하였으며 이때 코팅 기제의 조성은 다음과 같았음.

표 53. The composition of coating agent in Black ginseng and fermentated herbal medicine.

Compostion	Content(g)	
	Formulation 1	Formulation2
First coating		
HPMC(6cp)	25	30
HPMC (50cp)	35	
PEG 6000	26	13
피마자유	4	2
Second Coating		
코팅기제	48	60
피마자유	2	

먼저 인삼류와 같은 흑삼은 점도가 다른 HPMC를 해당량 만큼 취하여 에탄올에 녹인 후, PEG 6000과 피마자유를 메틸렌클로라이드에 용해한 용액을 앞의 용액과 혼합하여 1차 코팅을 실시한 이후 황토색 코팅기제를 가하여 2차 코팅을 실시하였음. 이 때 두 번의 코팅은 모두 다음과 같은 코팅 조건으로 실시하였음. formulation 2의 조성에 따라 1차 코팅은 type 1에 따라 실시하였으나 수계코팅의 여부를 검토하기 위하여 formulation 2에서는 코팅기제를 물에 분산

하여 type 2에 따라 실시하였음.

따로 발효생약에서도 발효로 인한 나쁜 냄새라든가 보관 기간 중에 수분의 손실로 인한 정도의 감소 등을 고려하고 formulation 2의 조성에 따라 수계 코팅의 여부를 type 3의 조건으로 코팅여부를 검토하였음.

표 54. Coating condition in Black ginseng and fermentated herbal medicine

Parameter	Condition		
	Type 1	Type 2	Type 3
Temperature(℃)	40	75	40
Exhaust Blower(rpm)	1150	1150	1350
Coating pan(rpm)	4	5	8
Solution pump	17~22	12	3
Atomizing air	0.25	0.23	0.2

이때 정제 제조과정과 코팅을 하나의 단계로 정리하면 그림 138과 같음.

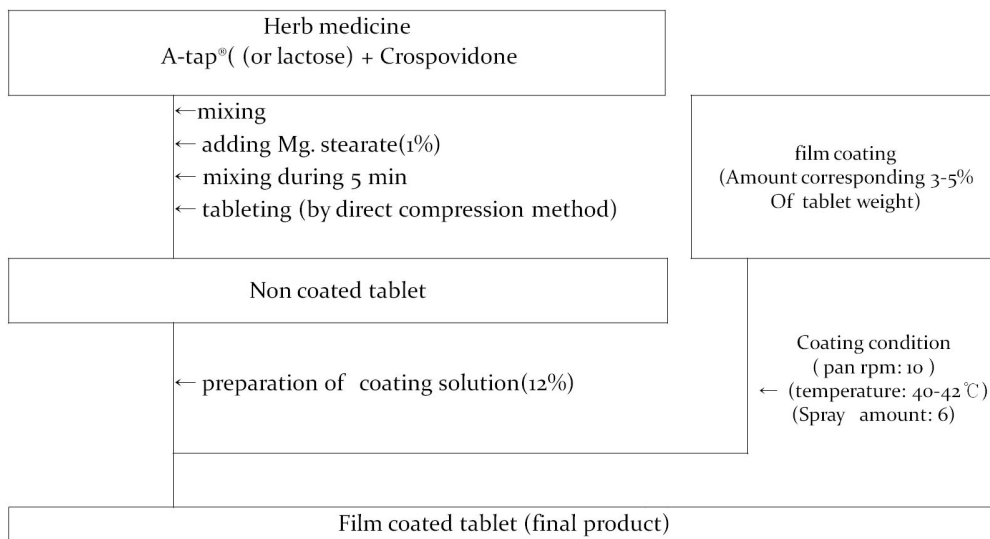


그림 138. Procedure in tablet preparation and coating

(라) 함량개선 검토

일반적으로 나오는 인삼분말은 90%이상의 함량을 포함하는 것으로 알려져 있어 이를 보완하기 위해서 압축성과 유동성을 개선할 수 있는 다른 부형제를 검토하였음. 즉 다공성을 가지는 부형제를 이용하면 생약등을 흡착해서 유동성을 개선할 수 있을 것으로 기대하여 해조칼슘이나 Aerosil을 같이 첨가하여 생약의 함량을 증가시킬 수 있는지의 여부를 검토하였음.

## 나. 가용화

일반적으로 발효를 진행할 때 원하는 성분은 많아질 수 있지만 주성분의 용해도는 떨어질 수 있어 제형 개발에서 문제점으로 부각될 수 있음.

본 연구에서도 인삼류에 존재하는 사포닌들이 발효를 통해 당이 떨어지는 aglycon의 형태로 바뀌기 때문에 약물의 용해도가 떨어질 가능성이 있으므로 이에 대한 preformulation이 필요할 것으로 판단되어짐.

따라서 최근 여러 가지 기술들이 도입이 되고 있지만 가용화의 문제뿐만 아니라 안정성의 문제점도 해결할 수 있는 NLC 기술이 많이 적용되어지고 있음.

### (1) 나노구조형 지질 전달체(NLC, Nanostructured lipid carrier)

계면활성제를 이용하여 약물을 안정화시키는 미립자 전달체인 에멀전은 1970년대에 개발이 시작된 이래 난용성 약물의 가용화 및 경구 투여시 생체율을 향상시켜 경피, 정맥 그리고 경구 투여 등 다양하게 사용되어지고 있음. 그러나 물리적인 불안정성 때문에 소화기관내에서 낮은 pH와 높은 이온강도 등의 요인으로 인해서 치료에 적용하는 제한을 받고 있다[4]. 에멀전의 안정성을 극복하기 위하여 지질을 이용한 1st generation 나노입자가 1990년대 중반에 소개되었다. 즉 고히지질나노입자는 물리적 안정성을 보호하여 분해를 방지할 뿐만 아니라 약물 방출을 조절할 수 있는 장점을 가지고 있다. 고히지질 나노입자(SLN, solid lipid nanoparticle)를 사용한 경우 입자의 서방성을 나타낼 뿐만 아니라 정맥이나 안점막을 통한 흡수 그리고 십이지장으로의 전달시 약물 용액 자체보다 높은 혈중농도를 나타낸다고 알려져 있다. 그러나 고히지질 나노입자와 관련된 문제점 즉 난용성 약물에 대한 고히지질에서의 용해도가 극히 낮기 때문에 drug loading capacity의 제한, 보관기간동안 lipid polymorphism에 의해  $\beta$ -modification을 일으켜서 perfect crystalline 구조를 형성함으로써 야기되는 drug leakage와 gelation의 위험(그림 139), 수용성 SLN dispersion의 높은 물 함량(70-95%) 등의 문제점을 가지고 있다. 이러한 고히지질 나노입자의 단점인 낮은 약물 봉입효율을 향상시키고 용출 특성을 개선하기 위해 공간 상으로는 서로 배합할 수 없는 오일을 고히지질과 함께 사용하는 혼합물에 의해 제조되어질 수 있으면서 drug loading capacity의 개선, drug release의 modulation 및 보관기간동안 안정하게 약물 봉입이 유지되는 특별한 나노구조체인 2nd generation인 나노구조형 지질 전달체(NLC, nanostructured lipid carrier)가 1990년대 말에 소개되었음.

고형지질에 오일이 혼합되면 지질 미립자의 매트릭스는 원래 고히 지질에 비해 용점이 낮아 지지만 체내에서는 고히 상태로 남아 있으면 방출을 조절해줄 수 있는 콜로이드 전달 시스템 중의 하나임.

제조방법과 지질 혼합물의 조성에 따라 다른 종류의 NLC 즉 imperfect(NCL I), multiple component(NCL II) and amorphous(NCL III)가 얻어질 수 있음(그림 140). 특히 multiple O/F/W particle인 NCL II type은 higher drug loading, firm incorporation 등의 장점을 가지고 있어 고히지질 나노입자에서는 1%를 loading시킬수 있지만 6%까지 높일 수 있음.

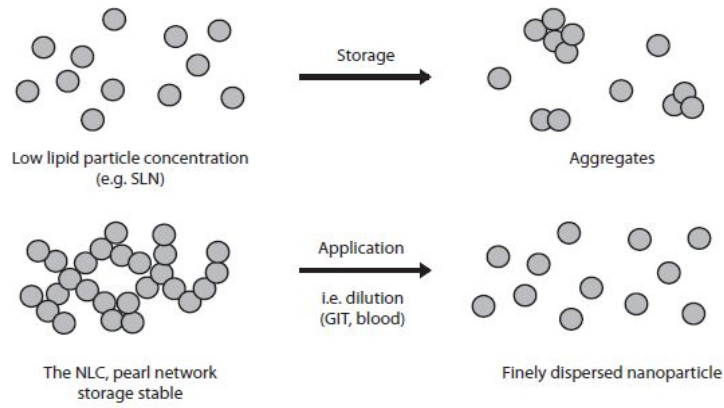


그림 139. Aggregation process in low concentrated dispersion(upper) and pearl-like networking NLC dispersions with stabilizing effect

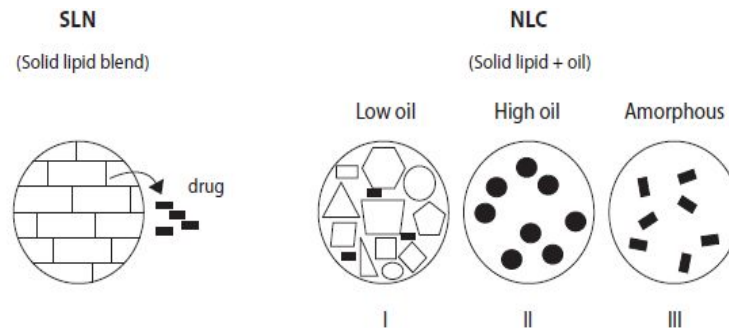


그림 140. Different types of NLC : I -highly imperfect matrix ; II - multiple O/F/W type;III -non-crystalline amorphous NLC(versus SLN with high cryatllinity)

예를 들면 너무 많은 양이 녹으면 차가운 물에서 냉각과정 또는 희석동안 약물이 expulsion이 발생할 수 있으므로 소량의 오일을 함유하는 고형지질 매트릭스로부터 얻어질 수 있는 multiple component가 유용할 수 있음.

나노 구조형 지질 전달체를 제조하는 기술은 Gasco 등의 microemulsion technique, Muller 등의 high pressure homogenization(HPH), solvent evaporation 또는 deposition등인 micellaneous technique등을 이용할 수 있음.

microemulsion technique은 가온한 상태에서 지질, 약물, 계면활성제로 마이크로에멀전을 제조한 다음 cold water에 마이크로에멀전을 넣으면 마이크로에멀전이 파괴되어 고형화된 나노입자가 생성되는 원리를 이용하는데 이 방법은 particle suspension을 0.1-1%로 dilution해야 되고 유기용매를 사용해야 하고 대량 생산시 off-the-shelf 장비가 없다는 것임.

체내에서 NLC로부터 약물의 방출은 diffusion에 이어 자발적인 지질 입자의 degradation에 의해 일어나며 온도와 수분 증발이 많아지면 release rate를 상승시킬 수 있음(그림 141).

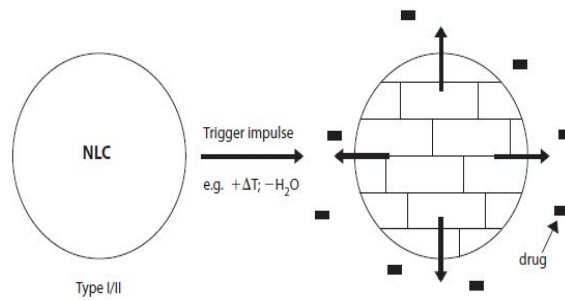


그림 141. Triggered drug release from NLC by initiating the conversion form a highly disordered lipid structure to more ordered stable modifications

### (2) 산업에서 나노 구조형 지질 전달체의 적용 및 연구현황

나노구조형 지질 전달체는 80-1000nm의 크기를 가지는 고형지질 미립자로서 모든 제약 산업 및 화장품 산업에 유용하게 사용되어질 수 있음. 즉 oral과 topical delivery에 유용하게 사용되어질 뿐만 아니라 용출 거동을 조절할 수 있어 erythropoietin과 같은 물질의 지속성 주사제에도 적용되어질 수 있음.

개발 초기단계에는 레티놀의 경우 고형지질 미립자의 경우 1%의 drug loading을 나타내었지만 나노구조형 지질 미립자의 경우 6%까지 증가시킬 수 있어 높은 봉입효율을 가지면서 안정성이 개선되어져 피부에 적용되어 사용되어지고 있음.

또한 ascorbyl palmitate, clotrimzole, ketoconazole, sunscreens 및 다른 antifungal agent등과 같은 다양한 약물의 용출 거동을 조절하여 적용되어지고 있음.

coenzyme Q10을 고형 고형 지질로서 cetyl palmitate를 사용하여 HPH method를 이용하여 나노 구조형 지질 전달체를 제조하여 피부에 적용하여 biphasic release pattern 즉 초기의 빠른 방출과 오일의 함량에 따라 방출을 지속적으로 적용할 수 있는 결과를 얻은 바 있음.

최근 H. Yuan등에 의해 간초회 통과효과를 받는 지용성 약물인 progesterone을 melt-emulsification에 의해 NLC에 적용하여 오일인 올레인산의 함량에 따라 방출이 조절되어 경구투여 제형으로서의 가능성을 평가하여 기존의 solvent diffusion method에 비해 봉입률을 향상시킬 수 있으며 유기용매를 사용하지 않고 24시간동안 방출을 조절할 수 있는 가능성 있는 결과를 얻은 바 있음. 즉 나노 구조형 지질 전달체는 현재 화학적으로 불안정한 물질의 안정화, controlled release, 투과 촉진, 경구투여 이후 생체이용률의 증가 등에 이용되고 있음.

나노 구조형 지질 전달체는 주로 경구 또는 피부적용제제로서 많이 개발되어 불안정한 물질의 안정화 즉 retinol 제제 등에 적용되어 피부 전달체로서 제품에 적용되어지고 있으며 최근에는 난용성이면서 장기 투여에 의 systemic toxicity가 나타나는 celecoxib와 같은 COX-2 inhibitor를 NLCdp 적용하여 gel제제로 처방하여 피부에 적용하고자 microemulsion template technique을 적용하여 빠른 작용발현과 지속적인 약물 작용의 결과를 얻은 바 있음.

### (3) Selection of components

모델 약물로서 난용성 약물인 이트라코나졸을 선정하여 평가하였음. 즉 과량의 약물을 오일, 계면활성제 및 가용화제 1 ml에 넣고 3시간동안 교반한 다음 원심분리하여 상층액을 취하여 HPLC를 이용하여 분석하였음.

약물의 봉입량을 결정하기 위해서는 용융된 지질에서 약물의 용해도가 중요한 역할을 하기 때문에 고흥 지질의 용해도는 변형된 방법을 사용하여 결정하였음(Joshi and Patravale, 2006), 즉 탈녹시펜 일정량을 test tube에 취해서 고흥지질을 0.5g단위로 취해서 80°C로 유지시키면서 용융된 상태에서 이트라코나졸 일정량을 녹일 수 있는 고흥지질의 양을 결정하였음.

## 다. 결과 및 고찰

### (1) 정제의 preformulation

처방에서 Aerosil®는 유동성 개선의 목적으로 사용되었으며 결과에서 보듯이 모든 처방들은 모두 만족하지 않은 결과를 나타내어 물리화학적인 특성을 다시 조절하여 새로운 처방을 제조하여 수치에 맞는 처방을 개발하여 정제를 제조할 수 있었음. 그러나 개발된 처방들도 정제의 중량이 증가하였을 때 펀치 모양 등에 따라 상당한 영향을 받아 펀치의 모양을 원형에서 장방형으로 바꾸어 만족할만한 결과를 얻을 수 있었음.

결과적으로 타정할 때 첨가되는 부형제들의 물리화학적인 특성도 아주 중요한 역할을 하지만 최종 중량에 맞는 펀치 사이즈나 모양의 선택도 중요한 인자라고 할 수 있으므로 실제 매트릭스가 복잡한 천연물을 이용하여 제형개발을 검토할 때 미리 검토되어야 할 사항으로 보여짐.

표 55. Physical characteristics in various formulation of acetaminophen matrix

Formulation	Bulk density (g/mL)	Tapped density (g/mL)	Carr's index	Hausner ratio
A	0.29	0.53	1.82	45.00
B	0.32	0.53	1.65	39.00
C	0.37	0.53	1.53	34.00
D	0.38	0.53	1.41	29.00
A-1	0.30	0.46	1.55	35.00
B-1	0.25	0.42	1.67	40.12
B-2	0.29	0.47	1.63	38.65
C-1	0.32	0.50	1.56	35.89
C-2	0.31	0.53	1.73	42.14

### (2) 정제 제조 및 평가

#### (가) 인삼류(흑삼)

표 56과 같은 처방에 따라 다양한 부형제를 함유하는 정제를 한 정당 290~320 mg의 무게로 5~6 Mpa의 정도로 제조하였음.

일반적으로 인삼과 같이 뿌리를 이용하는 생약 등에는 섬유소 등이 많이 들어있어 정제 등을 개발시 압축성이 낮고 유동성이 나빠 50% 이상이 함유되도록 제조하기 힘든 단점이 있음. 이러한 단점들을 보완하기 위해서 유동성이나 정전적인 성질을 조절할 수 있는 부형제를 선택하여 제조하였음.

먼저 흑삼 분말은 미세 파우더를 다량 함유하기 때문에 압축력이 매우 작아서 타정이 어렵다고 판단하여 생약, 직타유당, Avicell 102 및 마그네슘 스테아레이트를 적당한 비율로 혼합하여



타정하기 좋은 상태로 혼합한 다음, 타정의 여부를 검토하였으나 정제가 제조되어도 경도가 약하거나 부서졌음. 이는 섬유소 등의 물질을 많이 함유하는 흑삼 자체의 결합력이 약하기 때문에 마손도나 경도(1.5~2 Mpa)가 현저히 감소하는 것으로 판단되어져 본 연구진은 압축성이나 유동성의 문제가 발생할 때 자주 사용되는 MF(함수이산화규소) 3.45%와 소량의 정제수를 혼합하여 결합력을 높여서 타정을 실시한 결과 마손도와 경도도 시험에 적합할 뿐만 아니라 15분 이내에 분해하는 정제를 제조할 수 있었음. 그러나 이 67%이상의 생약분말을 사용해서 정제를 제조하는 것은 불가능하였음. 흑삼 정제는 처음 제조시 50%정도의 함량에서 검토하였으나 함수이산화규소를 첨가한 이후 67%까지 함량조절이 가능하였음.

표 56. - Formulation of tablet containing herbal medicine

Composition	Formulation(mg)							
	A-1	A-2	A-3	A-4	B-1	B-2	B-3	B-4
Herbal medicine	120	150	180	204	120	150	180	204
A-tap®	175.5	145.5	115.5	91.5				
Lactose					175.5	145.5	115.5	91.5
Crospovidone				1.5				
Mg. stearate				3				
Total				300				

#### (나) 발효생약

섬유소가 많이 들어있고 매트릭스가 복잡한 흑삼을 직접압축법에 의해 정제 제조시 유동성과 압축성으로 인한 경도가 떨어지는 문제점을 확인하여 이를 보완하고자 했던 경험을 바탕으로 본 연구진에서 현재 개발하고 있는 발효인삼과 물성과 비슷할 것으로 보이는 발효생약의 분말을 이용하여 정제 제조의 가능성을 검토하였음. 이 때 좀 더 구체적으로 판단하기 위해서 부형제의 함량에 따른 물리화학적인 특징을 검토하여 최적 처방을 개발하고자 하였음(표 56). 일반적으로 경도를 개선하고자 하면 분해의 문제점이 발생되므로 본 실험에서는 crospovidone을 이용하여 해결하고자 하였음.

결과에서 볼 수 있듯이 A-tap(일인산수소칼슘)과 직타용 락토즈는 정도의 차이는 발생하지만 일정량 이상 즉 50%이상이 함유되는 유동성에 영향을 미쳐 거의 유동성이 없는 것으로 나타났다.(표 57, 58) 따라서 적정한 함량으로 집어넣은 것이 바람직할 것으로 보이며 다른 부형제와의 compatibility 등을 고려할 때 lactose보다는 일인산 수소 칼슘을 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단되어짐.

표 57. The hardness disintegration time and flowability of tablet containing herbal medicine according A-tap® addition content

Formulation	Hardness (kgf/cm <sup>2</sup> )	Disintegration time (sec)	Fluidity (g/sec)
A-1	6.9	230~260	2.5
A-2	5.5	230~260	2.3
A-3	3.2	230~260	1.5
A-4	2.1	230~260	0

표 58. The hardness disintegration time and flowability of tablet containing herbal medicine according lactose addition content

Formulation	Hardness (kgf/cm <sup>2</sup> )	Disintegration time (sec)	Fluidity (g/sec)
B-1	7.5	420~480	0
B-2	6.7	420~480	21
B-3	4.1	420~480	17
B-4	3.2	230~260	0

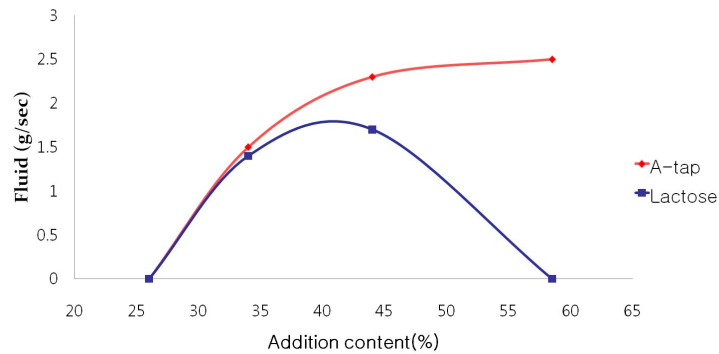


그림 142. The change of flowability measurement according to A-tap® and lactose addition content

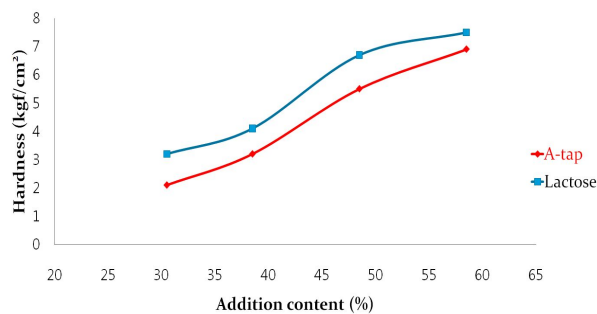


그림 143. The Change of hardness according to A-tap® and lactose addition content

(다) 코팅

환경 오염 등의 문제로 인해 최근에는 유계코팅보다는 수계 코팅에 중점을 두어 코팅 조건을 잡고자 하였으며 인삼류에서는 수계 코팅을 할 때 75°C의 고온에서 실시하였으나 이러한 조건

은 실제 코팅시 열에 불안정한 성분은 일반적으로 분해될 수 있으므로 온도를 좀 더 낮추어야 할 필요성이 있다. 따라서 발효생약에는 이를 type 2의 조건을 좀 더 보완하여 온도를 40℃로 낮추어 실시하였음.

최종적으로 수계 코팅으로 제조된 발효생약의 코팅정제와 나정을 40℃, RH 75%의 보관조건에서 3일동안 보관하면서 나정과 코팅정의 경도를 측정한 결과 코팅정에서 훨씬 느린 속도로 경도의 감소 현상이 발생하는 것으로 보아 최종 개발된 제품에서는 코팅을 실시하는 것이 바람직할 것으로 판단되어짐.(그림 144).

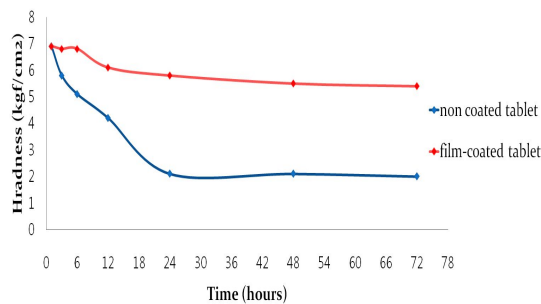


그림 144. The hardness of film coated tablet and non-coated tablet in 40℃, RH 75%



Non coated tablet



Final product

그림 145. Picture of final products. in herbal medicine

#### (라) 함량개선 검토

본 연구진은 A-tap® 또는 MF 등을 이용하여 섬유소 등이 많고 매트릭스가 복잡하여 50% 이상의 함량을 유지하면서 제조하기 힘든 인삼이나 발효생약에서 68% 이상으로 함량을 증가시킬 수 있는 방법을 검색하였으니 이러한 함량은 고함량의 생약을 요구하는 소비자들의 욕구를 충족시켜 줄 수 없으므로 90%이상으로 함량을 증가시킬 수 있는 방법을 검토하였다. 표면에 많은 구멍을 가지고 있어 흡착능력이 뛰어난 aerosil 즉 SiO<sub>2</sub> 2%를 사용하여 흑삼의 함량을 98%까지 증가시켜 경도 5이상을 가지면서 15분 이내에 분해되는 최종 처방의 정제를 제조할 수 있었으며 이를 양을 늘려 타정하였을 때에도 98%이상의 회수율을 보이면서 재현성 있게 찍히는 것을 알 수 있었음.

따라서 이후 이러한 인삼이나 발효생약처럼 섬유소 등이 많이 들어 있어 매트릭스가 복잡한 천연물을 이용한 제품 개발에 적용할 수 있을 것으로 사료되어짐.

### (3) 가용화

본 연구에서는 이트라코나졸 NLC를 제조하여 입자크기와 분포, drug loading, drug encapsulation efficacy 및 방출 패턴 등을 SLN과 비교하고자 하였으며 가장 좋은 NLC 제조 방법도 설정하고자 하였음. 또한 일반적으로 높은 농도의 지질 입자들은 수용성 현탁액으로부터 solid product로 쉽게 바꿀 수 있어 정제, 펠렛, 캡슐 및 분말 형태로 개발할 수 있다는 장점이 있으므로 최종적으로 발효인삼의 주요 성분을 가지고 이에 대한 가능성도 같이 검토하고자 하였음.

본 연구에서는 먼저 NLC 제조를 위해 오일과 고형지질에서의 용해도를 검토하여 표 59에 나타내었다. 따라서 오일로는 용해도가 비교적 높은 tetraglycol과 labrasol을 선택하여 고형지질과의 compatibility를 검토하였음.

고형지질로는 Compritol 888ATO, Precirol ATO5(glycerol Distearate) 및 Glycerol monostearate을 가지고 이트라코나졸이 용해되는 정도를 살펴보았음. 그 결과 이트라코나졸 10mg을 compritol 888 ATO는 0.2gdptj 투명하게 용해하는 것을 확인하였음. 그러나 나머지 두 가지 고형지질은 0.6 g이 필요한 것으로 보아 최종적으로 compritol 888 ATO를 선정하여 이하 실험을 진행하는 것으로 하였음.

표 59. The solubility in various vehicle

Vehicle	Mean±S.D.
Tetraglycol	8.04±0.41
Labrasol	1.52±0.02
Transcutol P	4.20±0.07
TEC	2.27±0.06
Cremophor RH 40	0.32±0.01
Solutol HS 15	1.32±0.05

## 2. 발효 홍삼을 함유한 면역력 강화 정제의 제조 및 평가 I

### 가. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약으로는 Fermented red ginseng, Colostrum powder, Isomaltooligosaccharde, Xylitol, Mixed yoghurt powder, HPMC 2208, 식용유청칼슘, 밀크향분말, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 스테아린산마그네슘, 프락토올리고당, 락토페린농축분말, 락토바실러스애시도필러스, 수크랄로오즈, 레스페리딘 등을 사용하였다.

기타 시약 및 기구는 특급 및 일급시약을 사용하였다.

### 나. 실험방법 및 결과

#### (1) 설계 공정 검토 및 정제의 제조

##### (가) 최적 홍삼 비율의 검토

발효 홍삼은 일반 홍삼에 비해 이삼 특유의 쓴맛 등이 더 강하게 느껴지므로 실제 소비자에

게 공급되어질 때 이러한 쓴맛을 제거하기 위해서 많은 노력이 필요함. 이를 위해서는 먼저 발효 홍삼의 적정 비율을 넣어서 정제를 제조하여 맛등을 평가하는 것이 가장 좋을 것으로 사료되어 기존에 면역력 강화를 위해 나와 있는 초유 분말이나 유산균 등을 같이 발효 홍삼 5, 10, 12.5%와 같이 혼합하여 정제를 제조하여 평가하여 최적 발효홍삼의 함량을 결정하였음.

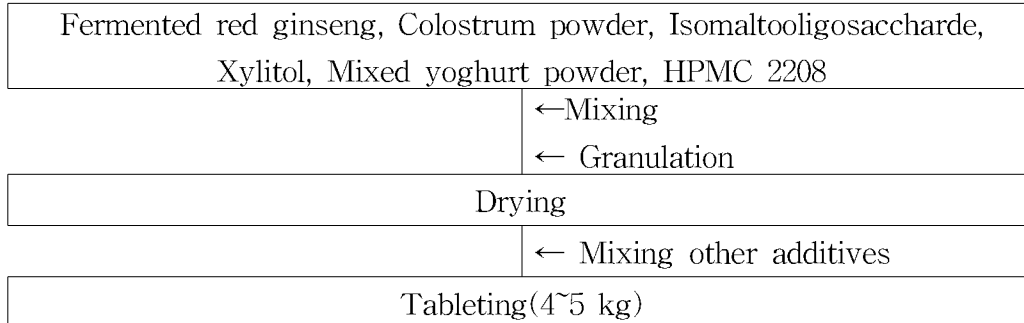


그림 146. Proceduer of tablets containing fermentated red ginseng

표 60. Formulation of tablets containing fermentated red ginseng(5, 10%) for immune system

Component	Formulation(%)		
	A	B	C
Fermented red ginseng Ext.	5.00	10.00	12.50
Colostrum powder	40.00	35.00	32.50
Isomaltooligosaccharide	28.18	28.18	28.18
Xylitol	11.00	11.00	11.00
Mixed Yoghurt powder	9.00	9.00	9.00
Whey calcium	2.00	2.00	2.00
Milk flavor	1.90	1.90	1.90
HPMC 2208	1.20	1.20	1.20
Mg.St	1.00	1.00	1.00
Fructooligosaccharide	0.40	0.40	0.40
Lactoferrin Cocentrates	0.20	0.20	0.20
Lactobacilus acidphilus	0.10	0.10	0.10
Sucralose	0.02	0.02	0.02
Total		100	

이 때 정제 제조 방법은 표 60의 처방에 따라 제조하였음. 즉 먼저 초유분말, 발효홍삼, 이소말트, 자일리톨, 요구르트 혼합분말 및 HPMC 2208을 처방에 따라 칭량하여 과립으로 제조하여 건조함. 이후 과립과 다른 원료와 잘 혼합하여 타정함. 타정하기 전에 유동성 등의 설계공정에 영향을 미치는 인자를 미리 시험하여 체크한 다음 적당한 유동성과 공극률을 가질 수 있도록 혼합물들의 함량을 조절하여 타정공정을 실시하였음. 발효홍삼 함유량에 따라 미리 정제 제조공정에 영향을 미치는 인자로 확인된 유동성, 겉보기 밀도, 진밀도 및 압축성을 측정하여

그 결과를 표 59에 나타내었다. 이 때 유동성(Hausner ratio)과 압축성(Carr's index)의 측정은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다. 이 때 Hausner ratio 값이 1.25이상인 경우 유동성이 떨어지며 Carr's index 값이 23이상 일 때 유동성이 떨어지는 것으로 알려져 있다.

$$\text{Hausner ratio}(H) = \frac{p T}{p B}$$

$p T$  : the tapped density of the power or granulation

$p B$  : the freely settled bulk density of the power or granulation

$$\text{Carr's index} = 100 \times \left(1 - \frac{1}{H}\right)$$

**표 61. Bulk density, Tapped density, Hausner ratio and Carr's index according to content fermented red ginseng**

Contents(%)	Bulk density (g/ml)	Tapped density (g/ml)	Hausner ratio	Carr's index
5	0.407	0.493	1.211	17.424
10	0.619	0.693	1.120	10.714
12.5	0.568	0.645	1.136	11.972

발효 홍삼 함량에 따라 모두 유동성은 타정하는데 영향을 미치지 않을 것으로 판단할 수 있었으며 홍삼 함유량이 늘어날수록 과립화에 용이한 것으로 나타났으며 맛의 측면에서는 10% 정도가 적당할 것으로 판단되어 10%를 함유하도록 제조하여 여러 가지 실험을 실시할 수 있도록 하였음.

**(나) 맛의 은폐**

최적의 발효홍삼 함량을 결정한 정제에 대해서 쓴맛을 은폐하기 위하여 수크랄로오스 대신 레스페리딘 DC, 스테비오사이드, 밀크향 분말 및 감초 농축액을 각각 단독 혹은 혼합하여 섞어 비교하여 맛을 평가하였으며 처방이 바뀔 때마다 유동성을 같이 평가하여 타정에 영향을 미치는지를 평가하였음. 이 때 맛에 대한 평가는 관능평가를 이용하여 5점 척도법을 이용하여 실시하였으며 이 때 처방은 표 62과 같았음.

**표 62. Formulation of tablets containing fermentated red ginseng for masking effect with various sweetening agents**

Ingredients	Formulation(%)				
	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
Fermented red ginseng Extract	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Colostrum powder	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
Isomaltooligosaccharie	28.18	28.18	28.18	28.18	28.18
Xylitol	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
Mixed Yoghurt powder	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
Whey calcium	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Milk flavor	1.90	1.90	-	-	-
Cocoa powder	-	-	1.90	1.90	1.80
HPMC 2208	1.21	1.21	1.21	1.20	1.20
Mg.St	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Fructooligosaccharide	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lactoferrin Cocentrates	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Lactobacilus acidphilus	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Neohesperidine DC	0.01	0.005	0.01	-	-
Sucralose	-	0.005	-	-	-
Steavioside	-	-	-	0.02	0.02
Glycyrrhiza uralensis Fischer Extract	-	-	-	-	0.1
Haun's ratio	1.23	1.24	1.22	1.23	1.20
Score	2	1	3	3	4
Total	100				

다른 첨가제에 의해서는 유동성은 크게 변화하지 않았으나 공정에 미칠 영향을 고려하여 모두 유동성을 체크하였음. suralose와 다른 감미제와의 여러 가지 혼합정도를 이용하여 평가한 결과 네오스페리딘 DC에 의해서는 홍삼 특유의 쓴맛이 많이 없어지긴 하였으나 계속 단맛이 입안에 남는 단점이 있어 양을 0.005%로 조절하였으나 이는 개선효과는 떨어지는 것으로 나타났다. 여러 가지 처방 중에 감초 추출물과 스테비오사이드를 같이 0.1과 0.02% 첨가한 B-5 처방에서 가장 좋은 점수로 나타났으나 여전히 쓴맛은 있었으며 여자들에 비해서 남자들에 있어서 맛에 대한 선호도가 좋은 것으로 나타나서 인삼류에 대한 선호도 조사에 참고할 수 있을 것으로 사료된다.

**(다) 향의 선택**

전체적인 당도를 조절하여 어느 정도의 쓴맛을 조절하여 적당한 맛을 찾은 이후 맛을 개선하기 위하여 향을 같이 섞어 맛의 변화 여부를 관찰하였다. 이 때 사용한 향으로는 표 63에서

보는 바와 같이 홍삼, 딸기 및 포도향 분말과 대추향과 복분자향코튼을 같이 2%씩 넣어 검토 하였으며 이 때에도 유동성의 변화 여부를 같이 검토하였다.

**표 63. Formulation of tablets containing fermentated red ginseng for masking effect with various flavor and essence**

Drug	Formulation(%)				
	B-5-1	B-5-2	B-5-3	B-5-4	B-5-5
Fermented red ginseng Extract	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Colostrum powder	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
Isomaltooligosaccharie	28.18	28.18	28.18	28.18	28.18
Xylitol	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Mixed Yoghurt powder	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Whey calcium	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Milk flavor	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Cocoa podwer	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
Mg.St	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Fructooligosaccharide	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lactoferrin Cocentrates	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Lactobacilus acidphilus	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Steavioside	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Glycyrrhiza uralensis Fischer Extract	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Red ginseng flavor	2.00	-	-	-	-
Strawberry flavor	-	2.00	-	-	-
Date essence	-	-	2.00	-	-
Grape powder	-	-	-	2.00	-
Rubus coreanus esence	-	-	-	-	2.00
Haun's ratio	1.22	1.20	1.23	1.22	1.19
Score	3.5	3	4	2	1
Total	100				

홍삼을 함유한 제제이므로 홍삼향이 제일 어울리고 거부감을 나타내지는 않는다는 전체적인 평가이었고 다른 딸기나 포도는 나쁜 맛은 괜찮지만 맛이 서로 어울리지 않고 따로 맴도는 듯한 느낌으로 나타났음. 그러나 이 중 대추향은 많이 쓴맛이 은폐되고 오히려 생각보다 맛이 좋다는 평가를 받아 홍삼향과 대추향을 이용하여 최종적인 처방으로 해서 홍삼의 함량을 5와 10%로 하여 맛에 대한 전반적인 선호도 등을 연령대별로 실시할 계획을 세웠음.

**(2) 최종 처방의 결정**

위의 설계공정에 따라 선택된 향과 당도 조절제를 이용하여 표 64과 같은 처방의 최종 처방을 얻어 이를 이용하여 홍삼의 함량을 5와 10%로 하여 실험실적으로 소비자의 반응정도를 평



가하였으며 이때에도 유동성의 변화여부를 체크하였음.

표 64. Final formulation of tablets containing fermented red ginseng(5 and 10%)

Drug	Formulation(%)			
	B-5-1 (10%)	B-5-3 (10%)	B-5-1 (5%)	B-5-3 (5%)
Fermented red ginseng Extract	10.00	10.00	5.00	5.00
Colostrum powder	35.00	35.00	40.00	40.00
Isomaltooligosaccharie	28.18	28.18	28.18	28.18
Xylitol	10.50	10.50	10.50	10.50
Mixed Yoghurt powder	8.00	8.00	8.00	8.00
HPMC 2208	1.20	1.20	1.20	1.20
Whey calcium	2.00	2.00	2.00	2.00
Cocoa powder	1.80	1.80	1.80	1.80
Mg.St	1.00	1.00	1.00	1.00
Fructooligosaccharide	0.40	0.40	0.40	0.40
Lactoferrin Cocentrates	0.20	0.20	0.20	0.20
Lactobacilus acidphilus	0.10	0.10	0.10	0.10
Steavioside	0.015	0.015	0.015	0.015
Glycyrrhiza uralensis Fischer Ext.	0.10	0.10	0.10	0.10
Neohesperidine DC	0.005	0.005	0.005	0.005
Red ginseng flavor	1.50	-	1.50	-
Date essence	-	1.50	-	1.50
Haun's ratio	1.22	1.23	1.22	1.18
Score	3	3	4	4.5
Total	100			

최종적으로 간이적인 시험 결과 홍삼향보다는 대추향에서 쓴맛의 은폐효과나 다른 원료들과의 적합성 등에 더 좋은 것으로 평가되어 대추향을 이용하여 5와 10%로 제조하여 연령대별로 다음 과정에 따라 설문조사를 실시하였음.

### (3) 설문 조사

위의 처방에 따라 5와 10%를 함유하는 정제를 제조하여 설문 조사는 다음과 같은 기본적인 형태로 진행할 예정이며 적용 연령이나 대상 등에 따라 약간씩 수정하여 진행하기로 하였음.

별지

### 제 품 선 호 도 설 문 조 사

1. 성별?

- ① 남자 ② 여자

2. 나이?

- ① 10대 ② 20대 ③ 30대 ④ 40대 ⑤ 50대 ⑥ 60대 ⑦ 70대

3. 건강기능식품의 선호도는 어느 정도입니까?

- ① 필요하다. ② 있어도 그만 없어도 그만이다. ③ 필요없다.

4. 현재 복용하는 건강기능식품이 있습니까?

- ① 있다. ② 없다.

4-1. 있다면 어떤 종류입니까?(적어주시면 됩니다.)

-

4-2. 있다면 건강기능식품을 왜 먹습니까?

-

5. 이 제품의 맛, 색, 냄새 등을 종합적으로 평가한다면 어떠합니까?

(구체적으로 적어주시고 10점 만점 중 몇 점으로도 적어주세요.)

ex. 씹을 때 이 사이에 끼어서 불편감을 줍니다. 쓴 맛이 너무 강해 먹기가 힘들 정도입니다.

2점

6. 이 제품을 구입하여 먹을 마음이 있습니까?

- ① 있다. ② 없다.

6-1. 구입하여 먹을 마음이 있다면 그 이유는 무엇입니까?

-

6-2. 구입하여 먹을 마음이 없다면 그 이유는 무엇입니까?

-

7. 개선되어야 할 부분이 있습니까? 있다면 어느 부분입니까?(구체적으로 적어주세요.)

### 3. 발효홍삼을 함유한 음료의 제조 및 평가 I

#### 가. 시약 및 기기

사용한 시약으로는 Fermented red ginseng, High fructose corn syrup, Xylitol(Kookgeon Pharm. Ltd.), Vit C(Daejuna), Mango syrup(Dami and F) 향으로는 Cranberry, red ginseng, Rubus coreanus, Strawberry flavor, Date Grape essence를 아이향료에서 공급받았고, 썬올리고 P2(삼양제넥스), Sucralose, 타우린, Cocoa powder(아이향료), 여러 가지 생약 추출물을 사용하였다.

#### 나. 실험 방법 및 결과

##### (1) 각종 추출물 및 첨가제에 의한 맛의 은폐효과 검색

발효홍삼은 일반 홍삼 추출물에 비해 맛에 대한 예민성이 더 나타나는 특징이 있어 이를 잡기 위해서는 여러 가지 첨가제를 사용할 필요가 있음. 기본적으로 고과당 따라서 단맛을 조절하기 위해 발효 홍삼을 1%로 고정하여 네스페리딘 DC 0.05% 그리고 여러 가지 추출물 및 향(옥수수, 보리, 보이차, 그린티, 누룽지, 현미, 쌀기, 오미자, 솔잎, 망고, 대추 및 구기자)을 0.3%씩 집어넣고 맛의 변화여부를 검토하였음.

평가 결과 종류에 따라 오히려 더 쓴맛이 나거나 하는 경우가 있어 이 중 가장 맛이 좋다고 평가되어진 망고향을 선택하여 다른 원료 즉 타우린, 비타민 C등과의 적합성을 평가하였을 뿐만 아니라 단맛에 의한 은폐 효과를 높이기 위하여 네스페리딘 단독으로 사용하던 것에 액상 과당, 자일리톨 그리고 수크랄로스 등에 대한 함량 검토도 같이 이루어졌음. 또한 대추나 구기자 등도 한약을 먹는 느낌은 나지만 전체적으로 홍삼에 대한 거부감이 많이 없어지면서 특유의 쓴맛도 제거되어지는 느낌을 받았다. 그러나 옥수수, 그린티, 보이차 등은 오히려 특유의 맛과 어우러져 홍삼의 맛에 더 안 좋은 느낌을 주는 것으로 평가되어졌음. 또한 네스페리딘 DC 은 일반적으로 설탕보다 당도가 400배 정도 높은 것으로 알려져 있지만 이것의 단점은 많이 들어갈 경우 단맛의 느낌이 계속 입속에 남아 있어 이것의 양을 조절할 필요가 있으므로 고과당, 자일리톨 등을 이용하기로 하였음. 망고향보다는 망고시럽을 사용한 경우 맛이 은은하게 느껴지므로 망고시럽을 이용하고 다른 향을 검토한 결과 크린베리 향을 첨가한 경우 쓴맛이 어느 정도 제거되었으므로 이를 이용하기로 하였음.

타우린과 비타민 C도 너무 많이 함유되는 경우 발효홍삼의 쓴맛에 영향을 줄 수 있어 맛에 영향을 미치지 않도록 하여 결정하기 위하여 비타민 C 0.2%로 고정하고 타우린을 0.3과 0.5% 두 가지 함량으로 하여 다른 향과의 맛의 영향을 검토하였음. 그 결과 향에 의해서 어느 정도 쓴맛이나 홍삼 특유의 맛을 조절할 수 있는 가능성을 찾아 다음 표 63과 같이 비타민 C와 타우린의 함량을 모두 0.1%로 고정하여 향에 대한 평가를 실시하였음.

표 65. Formulation of Drinks containing fermented red ginseng for masking effect and flavor

Ingredients	Formulation(%)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Fermented red ginseng Ext.	1	1	1	1	1	1	1	1
High fructose corn syrup	3	3	3	3	3	3	3	3
Sucralose	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Xylitol	3	3	3	3	3	3	3	3
Vit C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Taurin	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cocoa powder	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mango syrup	2	2	2	2	2	2	2	2
Oligosaccharide								0.1
Cranberry flavor	0.1	0.3						
Rubus coreanus flavor			0.3					
Strawberry flavor				0.3				
Date Flavor					0.3			
Grape essence						0.3		
Red ginseng flavor							0.3	0.3
water	90.69	90.67	90.67	90.67	90.67	90.67	90.67	90.57
Total					100			

(2) 올리고당에 의한 영향

이미 스크리닝 단계에서 여러 가지 당의 종류에 따라 발효 홍삼의 맛을 조절할수 있다는 것을 알았으므로 이를 더 조절하여 뒷맛이 깔끔하게 가기 위해서 향을 홍삼향으로 하여 올리고당을 0.1과 0.2%로 조정하여 쓴맛에 대한 영향을 검토한 결과 이들은 올리고당의 첨가로 인하여 단맛이 증가함을 알 수 있었음. 그러나 너무 단맛이 강하여 자일리톨의 함량을 3에서 2%로 조절 한 경우에는 쓴맛이 여전히 남아 있었으나 맛의 조절에는 자일리톨을 늘리는 것보다 2%로 고정하여 올리고당의 함량을 좀 더 높이고 향을 조절하는 것이 더 좋은 것으로 평가되었음.

(3) 향의 선택

일반적으로 음료에는 분말보다는 에센스 향으로 선택하는 것이 좋으므로 처음에는 에센스 향으로 검토를 하였으나 홍삼 특유의 맛이 먼저 올라오는 그런 느낌으로 인해 좀더 부드럽게 향을 조절할 수 있는 방법이 필요하므로 이에 대해서 본 연구진은 같은 향이라도 에센스와 분말 향을 이용하여 조절하고자 하였음.

**표 66. Formulation of Drinks containing fermented red ginseng for masking effect by various flavor**

Ingredients	Formulation(%)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Fermented red ginseng	1	1	1	1	1	1	1	1
Ext.								
High fructose corn syrup	3	3	3	3	3	3	3	3
Sucralose	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Xylitol	2	2	2	2	2	2	2	2
Vit C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Taurin	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cocoa powder	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mango syrup	2	2	2	2	2	2	2	2
Oligosaccharide	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Red ginseng flavor	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Date flavor		0.1						
Strawberry flavor			0.1					
Mango flavor				0.1				
Rubus coreanus flavor					0.1			
Cranberry flavor						0.1		
Grape essence							0.1	
Milk flavor								0.05
Water	91.095	90.995	90.995	90.995	90.995	90.995	90.995	91.045
Total					100			

홍삼향을 사용하는 경우 인삼 특유의 홍삼향이 먼저 올라와서 거부감을 줄 수 있어 올리고당을 0.5에서 1%로 올리고 0.03%로 조절하여 복분자향과의 혼합여부를 평가하였을 때 홍삼 단독을 줄여서 사용하는 것이 가장 바람직한 것으로 평가되었음.

**(4) 추출물의 첨가**

음료의 맛을 좀 더 진하게 느껴지게 하기 위해서 스크리닝 단계에서 좋다고 평가되었던 진피, 대추, 감초, 오가피 엑기스를 0.1%씩 첨가하여 가장 좋은 추출물을 찾고자 하였음.

**표 67. Formulation of Drinks containing fermented red ginseng for masking effect by various extracts**

Ingredients	Formulation(%)					
	I	II	III	IV	V	VI
Fermented red ginseng	1	1	1	1	1	1
High fructose corn syrup	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sucralose	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Xylitol	2	2	2	2	2	2
Vit C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Taurin	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cocoa powder	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mango syrup	2	2	2	2	2	2
Oligosaccharide	1	1	1	1	1	1
Citrus feel Ext.	0.1					
Acantophanax Ext.		0.1				
Glycyrrhiza uralensis Fischer Ext.			0.1			
Date Ext.				0.1		
Acantophanax Ext. + Glycyrrhiza uralensis Fischer Ext					0.1	
Citrus feel Ext. + Acantophanax Ext.						0.1
Red ginseng flavor	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
water	92.065	92.065	92.065	92.065	92.065	92.065
Total				100		

**다. 최적 처방의 결정**

향을 분말과 후레바 상태로 첨가하였을 때 느낌이 서로 달라지므로 가장 좋았던 처방 II에 홍삼 후레바, 홍삼 분말향, 딸기 분말향 무향 상태로 평가하였을 때 후레바 상태보다는 분말향이 더 무난하게 어우러져 특히 딸기향을 이용하였을 때 가장 어울리는 향이 되는 것으로 평가되어졌음. 그러나 이러한 향은 연령이나 적용 대상자들에 따라 약간씩 조정이 되어야 할 것으로 사료되어지며 이후 발효홍삼엑기스를 0.5와 1% 두가지 농도로 제조하여 여러 가지 설문 항목에 따라 처방을 결정하여 최종적인 음료개발을 진행하고자 함.

**4. 나노구조형 지질 전달체(NLC, Nanostructured lipid carrier)를 이용한 제형의 제조 및 평가**

일반적으로 발효를 진행할 때 원하는 성분은 많아질 수 있지만 주성분의 용해도는 떨어질 수

있어 제형 개발에서 문제점으로 부각될 수 있음.

본 연구에서도 인삼류에 존재하는 사포닌들이 발효를 통해 당이 떨어지는 aglycon의 형태로 바뀌기 때문에 약물의 용해도가 떨어질 가능성이 있으므로 이에 대한 preformulation이 필요할 것으로 판단되어짐.

따라서 최근 여러 가지 기술들이 도입이 되고 있지만 가용화의 문제뿐만 아니라 안정성의 문제점도 해결할 수 있는 NLC 기술이 많이 적용되어지고 있음.

### 가. 실험방법 및 고찰

#### (1) 이트라코나졸 함유 나노구조형 지질 전달체(NLC, Nanostructured lipid carrier)의 제조

모델 약물로 선정된 이트라코나졸을 가지고 1차년도에 선택되어진 오일과 계면 활성제를 표 68과 같은 처방에 따라 오일 10%, emulsifier 0.2%, 수상 87.8%(2.8% poloxamer 188 함유) 그리고 약물 2%를 함유하도록 그림 147에 따라 제조하였음. 즉 오일과 친유성 계면활성제를 85℃에서 용해하고 여기에 이트라코나졸을 가한 후, 2.8% poloxamer 188용액을 가하여 혼합하여 10분동안 85℃로 유지해줌. 이를 Ultraturex로 12000rpm에서 10분동안 혼합하여 에멀전을 제조한 다음, 온도를 유지하며 10분동안 probe type의 소니케이터로 소니케이션하고 다시 Ultraturex로 1200rpm으로 교반하면서 실온까지 냉각하여 NLC를 제조하였음.

표 68. Composition of the developed SLN, NLC and NE formulation %

Formulation	Lipophilic emusifier(0.2%)	GMO:α-tocopherol (10%)	수상(2.8% poloxamer188 함유)
1	Lipoid S 75	10:0	
2		8:2	
3		5:5	
4		2:8	
5		0:10	
6	Lauroglycol FCC	10:0	87.8
7		8:2	
8		5:5	
9		2:8	
10		0:10	

Dissolving oil and lipophilic emulsifier(85℃)	
	← Adding drug ← Mixed 2.8% poloxamer 188 solution ← Heating to 85℃ for 10 min
Stirring for 10 min at 12000 rpm(Ultraturex)	
Sonication with probe type sonicator for 10min	
Cooling to room temperature and stirring with Ultraturex	
Preparation NLC	

그림 147. Procedure method of NLC

나. 평가

(1) 입자크기의 측정

이트라코나졸을 함유하는 NLC 제제를 물로 각각 10배 희석하여 입도분포를 동적 광산란법을 이용하여 측정하였다. 이 때 광원으로 He-Ne laser, 측정파장은 632.8nm, 산란각도 90°로 설정하고 25±1℃, intensity 8000~14000 cps에서 각 용액으로 100배 희석하여 측정하였다(NPA 250, Microtact Inc., U.S.A.).

표 69. Mean particle size, polydispersity index(PI) of NE, SLN and NLC formulations(n=3, Mean±SD)

Formulation	Particle size(nm)	PI
1	5707.2±200	1.85±0.11
2	3132.6±190.5	1.85±0.07
3	1870.9±48.9	1.18±0.03
4	199.6±0.5	0.23±0.01
5	321.6±1.2	0.39±0
6	4099.4±120.6	1.64±0.06
7	2229.6±115.1	1.16±0.02
8	798.5±68.1	0.6±0.8
9	235.9±1.4	0.2±0.01
10	315.8±1.6	0.26±0

액체 오일의 양이 늘어날 수록 입자크기는 점점 작아지는 것으로 나타났는데 이는 고형지질이 액체지질과 충분히 유화가 되면서 solid lipid nanoparticle을 형성하던 것이 점점 오일의 함량이 증가되면서 NLC를 형성하는 것으로 사료되어짐.



**다. *In vitro* 용출 시험(투과 실험)**

이트라코나졸을 함유하는 NLC 제제 0.5g을 셀룰로오스멤브레인에 도포하여 Franz형 확산 셀을 사용하여 37±1℃로 유지시키면서 600rpm으로 교반하면서 실시하였음.

제제를 투여한 셀룰로오스멤브레인의 면적은 2.54cm<sup>2</sup>이고, receptor phase는 pH7.4 인산염 등장 완충액 12ml로 채웠음.

도포 후, 2, 4, 8, 12, 24, 36 및 48 시간마다 0.2ml씩 채취하여 HPLC에 직접 주입하여 위의 조건으로 분석하였음. 채취된 양은 즉시 동량의 pH 7.4 등장 인산염 완충액으로 보충하였음. 투과 마지막 채취시간인 48시간 이후에 멤브레인 위에 남아 있는 NLC 제제를 취하여 메탄올과 염화메틸렌(1:1) 혼합액에 용해하여 적당히 희석하여 남아 있는 이트라코나졸의 약물양을 평가하였음.

**표 70. Cumulative amount of itraconazole released from NLC prepared by Lipoid S and Lauroglycol FCC as lipophilic emusifier**

#	Conc.(ug/ml)								
	Time(hr)								
	2	4	6	8	10	12	24	36	48
1	-								
2	0	0	0	±	±	±	±	±	±
				9.02	1.62	1.36	1.32	3.93	19.63
3	14.19	24.88	32.08	33.75	41.36	43.39	44.76	45.38	51.23
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
4	24.58	16.39	14.82	14.48	15.31	14.35	14.88	14.43	12.38
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
5	59.41	95.10	116.35	125.75	156.76	184.07	206.39	220	259.59
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
6	17.9	15.71	12.6	17.63	22.48	9.68	16.97	11.62	32.55
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
7	89.48	150.3	177.82	227.66	256.8	266.51	269.81	335.15	367.48
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
8	29.14	65.87	85.16	62.26	64.12	59.55	62.13	60.32	88.53
	-								
9	4.18	4.2	8.55	8.64	12.81	12.9	12.93	13.17	14.91
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
10	7.23	7.27	7.41	7.48	0.7	0.72	0.75	0.89	0.55
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
11	10.09	35.59	48.27	54.75	60.21	65.38	69.43	74.44	90.87
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
12	9.00	18.11	26.73	25.78	22.6	23.18	22.36	22.72	10.75
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
13	36.67	52.42	61.23	63.45	86.27	99.98	105.73	107.33	114.15
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
14	19.92	14.81	11.5	12.9	29.25	31.46	35.92	35.47	35.32
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
15	4.04	4.05	4.07	8.18	13.47	14.05±	14.43	19.65	24.06
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
16	7.00	7.02	7.06	7.09	1.3	1.1	1.35	4.11	8.09
	±	±	±	±	±	±	±	±	±

피부투과 실험 결과 처방에 따라 투과된 약물량을 표 70 와 그림 148과 149에 나타내었다. 즉 친유성 유화제의 종류에 관계없이 고형지질 즉 GMO만 함유하는 경우에는 약물이 전혀 투과되지 않았으며 오일인  $\alpha$ -tocopherol의 양이 증가함에 따라 전체적으로 투과되는 약물량이 많아지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 친유성 유화제의 종류에 따라 약간 양상이 달라 Lipoid S의 경우에는 100% 오일인 경우 가장 많이 투과되었으나 Lauroglycol의 경우 고형지질과 오일이 1:4인 경우 가장 높다가 오히려 오일의 양이 100%일 경우에는 현저히 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 이는 1차년도에 용해도 실험에서도 관찰한 바와 같이 약물 자체의 용해도에 따른 결과인 것으로 판단되어진다.

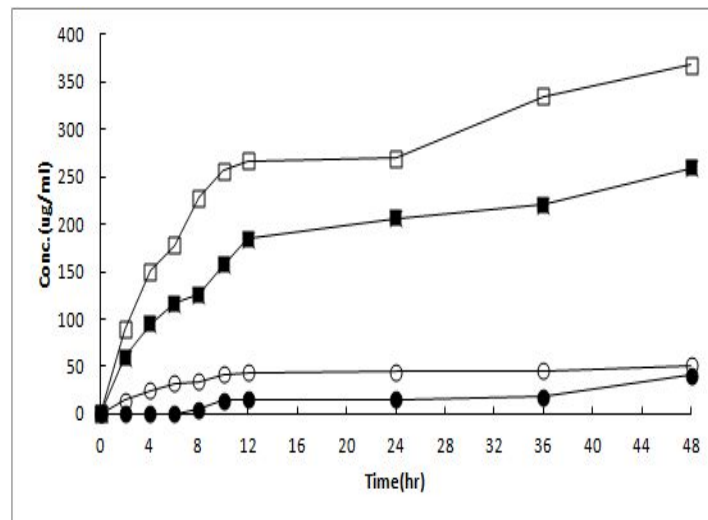


그림 148. Cumulative ammount of itraconazole released from NLC prepared by Lipoid S

Key : -●- formulation 2 -○- formulation 3 -■- formulaion 4 -□- formulation 5

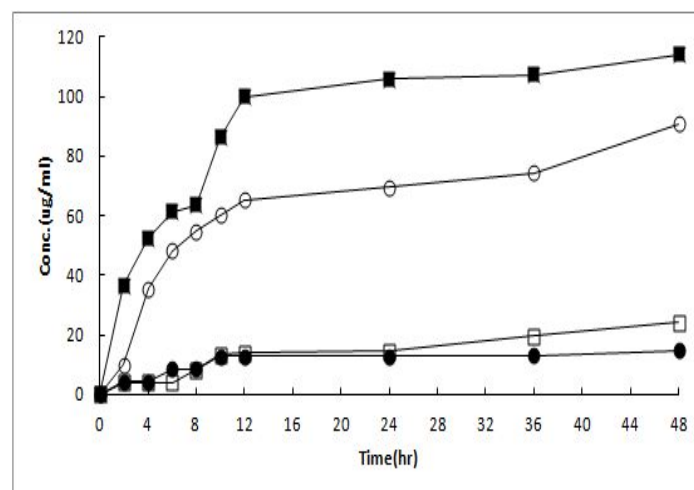


그림 149. Cumulative ammount of itraconazole released from NLC prepared by Lauroglycol FCC

Key : -●- formulation 7 -○- formulation 8 -■- formulaion 9 -□- formulation 10

## 라. 발효홍삼을 함유한 NLC의 제조 및 평가

그림 147과 같이 이트라코나졸을 함유하는 NLC의 제조한 방법에 따라 Formulation 5 즉 오일과 고형지질 1:1혼합물에 이트라코나졸 대신 발효홍삼을 함유한 NLC를 제조하여 입자크기를 측정하고 10일동안 방치한 후 층의 분리 여부를 관찰하였음.

관찰한 결과  $55.5 \pm 3.02$  nm이고 PI는  $1.23 \pm 0.01$ 로서 이트라코나졸을 함유한 같은 처방의 NLC에 비해서 입자크기가 큰 것을 알 수 있었음. 이는 발효홍삼 추출물 안에는 여러 가지 수용성성분이 들어있어서 홍삼 성분 주 성분들이 수상쪽으로 들어가면서 입자사이즈가 커지는 것으로 사료되어지지만 자세한 것은 추후에 실험을 통해서 알아보는 것이 타당할 것으로 보임. 또한 10일 정도 실온에 방치하면서 입자 사이즈의 변화나 침강 유무를 관찰했으나 그런 현상은 관찰되지 않아 이후에 홍삼에도 적용할 수 있는 것으로 사료되어짐.

## 마. 결론

1. 면역활성에 좋은 초유성분 등과 함께 발효홍삼 성분이 함유된 정제를 적합한 향과 함량을 선택하여 제조할 수 있었음.
2. 발효홍삼을 함유하는 음료 제조시 적합한 향과 생약 추출물을 선택하여 적당한 음료를 제조할 수 있었음.
3. 발효홍삼 성분이 함유된 NLC를 제조하여 향후 피부적용제제를 개발할 수 있는 기초 자료를 얻을 수 있었음.

## 5. 발효 홍삼을 함유한 면역력 강화 정제의 제조 및 평가 II

### 가. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약으로는 Fermented red ginseng, Colostrum powder, Isomaltooligosaccharide, Xylitol, Mixed yoghurt powder, HPMC 2208, 식용유청칼슘, 밀크향분말, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 스테아린산마그네슘, 프락토올리고당, 락토페린농축분말, 락토바실러스애시도필러스, 수크랄로오즈, 레스페리딘, 이소말트 (과립형, 분말형), 오렌지향 코톤, xylisorb 700, 아스코르빈산 (과립, 분말), 밀크칼슘, 초유분말 등을 사용하였음.

또한 sieve(850 $\mu$ m, 710 $\mu$ m), 건조기, 유발 및 유봉, 타정기 등을 사용하였으며, 기타 시약 및 기구는 특급 및 일급시약을 사용하였음.

### 나. 실험방법 및 결과

#### (1) 홍삼 함량과 향 선호도 조사

표 71의 처방에 따라 5와 10%를 함유하는 정제 4종을 제조하여 설문조사를 진행하여 적당한 홍삼의 함량을 결정하기로 하였음.

설문조사에 참여한 인원은 71명(남자 26명, 여자 45명)이며 10대부터 50대까지 순서대로 8, 18, 10, 21 및 14명이 참여하여 실시하였음. 건강식품에 대한 선호도와 현재 건강식품을 섭취하고 있는 경우는 연령대가 높아질수록 증가하는 경향을 나타내었음.

표 71. Final formulation of tablets containing fermented red ginseng(5 and 10%)

Ingredients	Formulation(%)			
	A-1	B-1	A-2	B-2
Fermented red ginseng Extract	10.00	10.00	5.00	5.00
Colostrum powder	35.00	35.00	40.00	40.00
Isomaltooligosaccharide	28.18	28.18	28.18	28.18
Xylitol	10.50	10.50	10.50	10.50
Mixed Yoghurt powder	8.00	8.00	8.00	8.00
HPMC 2208	1.20	1.20	1.20	1.20
Whey calcium	2.00	2.00	2.00	2.00
Cocoa powder	1.80	1.80	1.80	1.80
Mg.St	1.00	1.00	1.00	1.00
Fructooligosaccharide	0.40	0.40	0.40	0.40
Lactoferrin Concentrates	0.20	0.20	0.20	0.20
Lactobacillus acidophilus	0.10	0.10	0.10	0.10
Steavioside	0.015	0.015	0.015	0.015
Glycyrrhiza uralensis Fischer Ext.	0.10	0.10	0.10	0.10
Neohesperidine DC	0.005	0.005	0.005	0.005
Red ginseng flavor	1.50	-	1.50	-
Date essence	-	1.50	-	1.50
Haun's ratio	1.22	1.23	1.22	1.18
Score	3	3	4	4.5
Total	100			

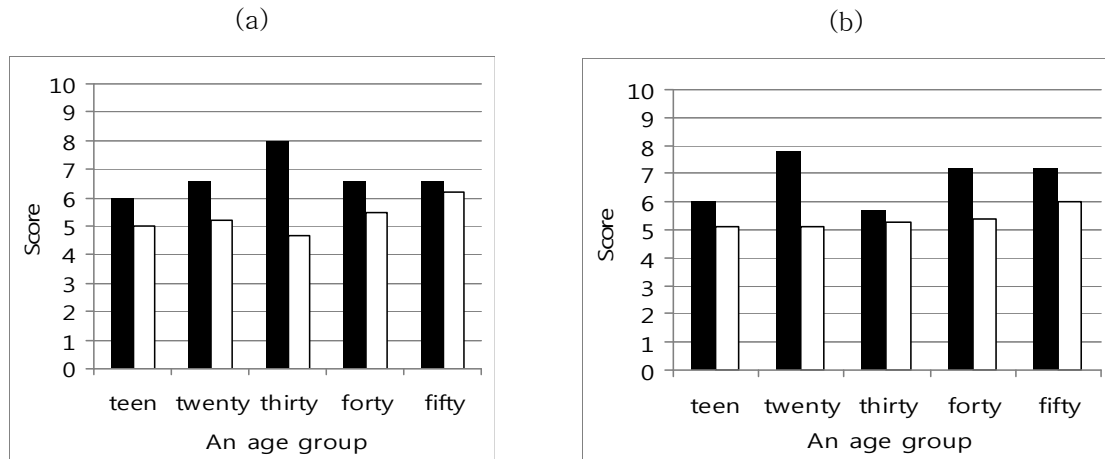


그림 150. An age group preference of Red ginseng flavor(a) and Date essence(b) of tablet containing Fermented red ginseng(5 and 10%)

■ 5% Fermented red ginseng □ 10% Fermented red ginseng

그림 150에서 볼 수 있듯이 전반적으로 홍삼 10% 함유한 정제보다 홍삼 5% 함유한 정제의 평점이 높으며 홍삼향과 대추향의 종합적인 평점은 비슷하였음. 30대는 홍삼향을 그리고 40대와 50대는 대추향을 선호하였음.

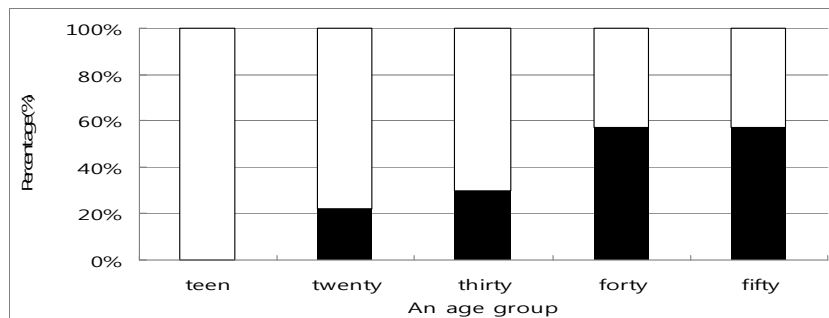


그림 151. Preference of purchase a tablet containing Fermented red ginseng

■ Purchase □ not purchase

그림 151의 결과에서 알 수 있듯이 구매를 희망하는 경우는 건강식품 선호도와 복용 상태와 동일하게 연령대가 높아질수록 높아지는 것을 알 수 있었음. 또한 제조된 정제의 일반적인 평중에는 씹을 때 이에 낀다, 텅텅하다는 평이 많았으며 홍삼향이 강하고 대추향은 약하다는 평도 있었음. 또한 몇몇의 인원이 장방형인 정제가 약 같다, 삼켜먹어도 될 것 같다는 평도 있었음.

위의 설문 조사 결과에 따라 본 팀은 추후 실험의 방향을 홍삼 10%보다는 5% 처방을 선택하여 진행하기로 하였고, 건강식품 선호도와 건강식품 섭취 중에 있는 연령을 보면 10, 20대가 상당히 낮으므로 적용 연령에서 제외하기로 하였음. 또한 홍삼향을 줄여서 30대에 그리고 대추향은 늘려서 40, 50대에 적용하여 다시 의견을 수렴하기로 하였음. 정제의 모양을 장방형에서 원형으로 바꾸어 다시 설문조사에서 나타난 문제점을 해결하여 적용하도록 계획을 수정하였음.

별지

## 제 품 선 호 도 설 문 조 사

1. 성별?

- ① 남자 ② 여자

2. 나이?

- ① 10대 ② 20대 ③ 30대 ④ 40대 ⑤ 50대 ⑥ 60대 ⑦ 70대

3. 건강기능식품의 선호도는 어느 정도입니까?

- ① 필요하다. ② 있어도 그만 없어도 그만이다. ③ 필요없다.

4. 현재 복용하는 건강기능식품이 있습니까?

- ① 있다. ② 없다.

4-1. 있다면 어떤 종류입니까?(적어주시면 됩니다.)

-

4-2. 있다면 건강기능식품을 왜 먹습니까?

-

5. 이 제품의 맛, 색, 냄새 등을 종합적으로 평가한다면 어떠합니까?

(구체적으로 적어주시고 10점 만점 중 몇 점으로도 적어주세요.)

ex. 씹을 때 이 사이에 끼어서 불편감을 줍니다. 쓴 맛이 너무 강해 먹기가 힘들 정도입니다.

2점

6. 이 제품을 구입하여 먹을 마음이 있습니까?

- ① 있다. ② 없다.

6-1. 구입하여 먹을 마음이 있다면 그 이유는 무엇입니까?

-

6-2. 구입하여 먹을 마음이 없다면 그 이유는 무엇입니까?

-

7. 개선되어야 할 부분이 있습니까? 있다면 어느 부분입니까?(구체적으로 적어주세요.)

-

## 6. 고체 분산체 제조를 이용한 공정 개선

2차년도에 선정되어진 최종 처방을 이용하여 설문 조사 결과 인삼 특유의 맛과 거부감을 없앨 뿐만 아니라 끈적이는 홍삼 엑기스의 특징으로 인해 공정을 개선해야 할 필요성이 있었음. 따라서 본 팀은 이를 개선하기 위해 정제를 제조하기 전에 먼저 SiO<sub>2</sub>을 이용하여 발효홍삼과 고체 분산체 형태로 제조하기로 하였고 씹히는 촉감이 좋지 않아 이를 개선하기 위해 비타민 c와 많이 들어가는 부형제인 이소말트를 과립형의 형태로 바꾸어 제조하기로 하였음. 이러한 과정에서 적당한 과립의 크기와 건조시간 그리고 고체 분산체의 첨가 순서 등과 같은 공정 벨리데이션을 실시하여 최적의 공정을 찾고자 하였음. 이러한 결과에 따라 최종적으로 선택된 공정 방법은 그림 152과 같았음.

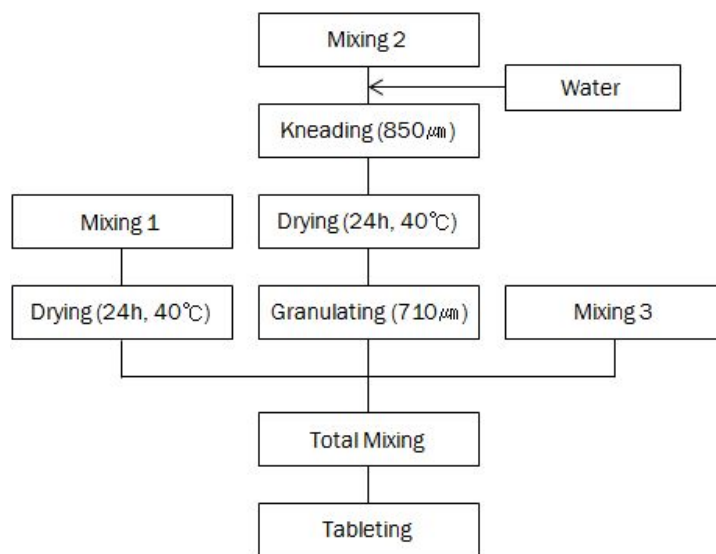


그림 152. Process of tablets containing fermentated red ginseng

- Mixing 1 : Fermented red ginseng + SiO<sub>2</sub> + Cocoa powder
- Mixing 2 : Colostrum powder + Xylitol +HPC-L + Avicel pH 102
- Mixing 3 : Isomaltooligosaccharide + ascorbic acid + Mixed Yoghurt powder + Whey calcium + milk flavor powder + strawberry flavor powder + Mg.St + fructooligosaccharide + Lactoferrin Cocentrates + Lactobacilus acidphilus, Date essence + sucralose

### 가. 발효홍삼과 SiO<sub>2</sub>의 최적 비율 선정

#### (1) 고체분산체란

통상적으로 경구 복용되는 액상 제제는 쓴맛을 포함하여 화학적, 금속성인 맛과 같은 불쾌한 맛은 복용성에 나쁜 영향을 주어 약효에 발현에 영향을 주게 되었음. 따라서 주약물의 주로 쓴 맛을 포함한 불쾌한 맛을 나타내는 활성성분을 이용한 경구용 조성물에 대한 맛 개선연구는 끊임없이 진행되어 왔음. 향신료나 당 또는 감미제와 같은 화합물 또는 화합물의 혼합물을 사용하여 다양한 경구용 조성물의 불쾌한 맛을 유발하는 물질을 차폐하는 방법들이 시도되었음. 젤라틴(일본 특허 04-346, 937호)/제라틴화 전분(일본 특허 04-235, 136호) ; 산성 아미노산(미국특허 4,517,379호 및 일본 특허 05-015, 389호 및 05-004, 921호) ; 키토산(일본 특허 04-009,

335호) ; 사이크로텍스트린(미국특허 5,024,997호) ; 리포솜(미국 특허 5,009,819호) ; 레시틴 혹은 레시틴성 물질(일본특허 62-265, 234호) ; 계면활성제(미국 특허 5,439,671호); 염(미국 특허 5,262,179호) 등이 경구용 조성물의 불쾌한 맛을 차폐하도록 사용되어 왔음.

본 팀이 적용하고자 하는 고체분산체는 고체상태의 고분자나 불활성 담체에 하나 이상의 활성성분이 균등하게 분산되어 있는 혼합물을 의미하는데, 약물의 용해도를 개선함으로써 경구흡수율을 증가시키는 목적이나 불쾌한 맛을 masking하는 목적으로 가장 많이 사용되는 것으로 알려져 있음. 고체분산체를 제조하는 방법에는 공침 (coprecipitation), 공동증발 (coevaporation), 동결건조 (freeze drying), 분무건조 (spray drying) 및 공동연마 (cogrinding) 등의 방법들이 있음.

## (2) 발효홍삼과 SiO<sub>2</sub>의 최적비율 선정

설문 조사 결과에 따라 발효홍삼의 함량은 5% 함유한 경우에 선호도가 좋았으므로 5%로 줄이고 에탄올 또는 물에 녹여서 다른 혼합물과 혼합하였으나 HPMC와 같은 결합제와 만나 더욱 끈적임이 남으므로 이를 개선하기 위해서는 새로운 제제기술을 도입해야 할 필요성이 있음. 일반적으로 고체 분산체는 제제기술에서 난용성 물질을 가용화하거나 맛이나 외관을 개선하기 위하여 전통적으로 사용되어지고 기술 중의 하나로 알려져 있음. 특히 최근에는 무게에 비해 상대적으로 많은 부피를 차지하는 SiO<sub>2</sub>를 이용하는 방법 등이 많이 사용되어지고 있음.따라서 본 팀에서도 여러 가지 물질을 검색하던 중 SiO<sub>2</sub>와의 혼합가능성을 검토하기로 하여 고체분산체로 제조하여 맛의 은폐나 끈적임 등의 물성을 체크하였음.

가장 적당한 효과를 나타내는 발효홍삼과 SiO<sub>2</sub>의 비율을 검토하기 위하여 표 72와 같은 처방에 따라 각각 1 : 0.6, 1 : 0.8, 1 : 1의 비율로 제조하여 비교하였음. 또한 혼합과정이나 맛에서 코코아 분말은 나중에 다른 첨가제들과 혼합하는 것보다는 제조된 고체 분산체에 넣어 직접 타정하는 것이 적당하여 첨가순서를 약간 변경하였음.

### 나. 결합제의 변경

고체 분산체를 제조한 후, 표 72의 처방에 따라 그림 153의 방법에 따라 정제를 제조하였음.. 즉 먼저 초유분말, 발효홍삼, 이소말트, 자일리톨, 요구르트 혼합분말 및 HPC-L을 처방에 따라 칭량하여 과립으로 제조하여 건조함. 이후 과립과 다른 원료와 잘 혼합하여 타정함. 설문에서 지적되었던 이에 끼는 문제와 씹히는 맛을 개선하기 위하여 결합제의 양을 조절하거나 변경하여 과립 제조시에 미치는 영향을 검토하였음. 결합제가 지나치게 많이 들어가는 경우 과립을 제조할 때 너무 끈적거리 과립이 제조되지 않고 기존에 사용하던 HPMC 2208보다는 HPC-L이 제조하기에 더 적당한 것으로 평가되었음. 또한 기존의 1.2%에서 결합력을 주어 씹히는 식감을 높이기 위해 표69 와 같이 5, 7.5 및 10%로 양을 조절하고 대신 초유의 양을 줄여 검토하였음. 검토한 결과 7.5나 10%는 상대적으로 과립을 제조하기가 어려워 5%로 최종적으로 결정하였으며 유동성의 개선을 위해 Avicel pH 102를 2%의 중량으로 같이 첨가하였음.



㉟ 72. The formulation of solid dispersion prepared by various ratio in fermented red ginseng : silicon dioxide(1:0.6, 1:0.8 and 1:1)

Ingredients	Formulation(%)		
	I	II	III
Fermented red ginseng Extract	5.00	5.00	5.00
Silicon dioxide	3.00	4.00	5.00
Colostrum powder	27.15	26.15	25.15
Mixed Yoghurt powder	8.00	8.00	8.00
Xylitol	15.00	15.00	15.00
Isomaltooligosaccharie	22.00	22.00	22.00
HPC-L	5.00	5.00	5.00
Avicel pH 102	2.00	2.00	2.00
Vitamin C	2.50	2.50	2.50
Whey calcium	2.00	2.00	2.00
Milk flavor	0.3	0.3	0.3
Cocoa podwer	1.80	1.80	1.80
Strawberry flavor	2.00	2.00	2.00
Mg.St	2.00	2.00	2.00
Fructooligosaccharide	0.40	0.40	0.40
Lactoferrin Cocentrates	0.20	0.20	0.20
Lactobacilus acidphilus	0.10	0.10	0.10
Sucralose	0.05	0.05	0.05
Date essence	1.50	1.50	1.50
Total		100	

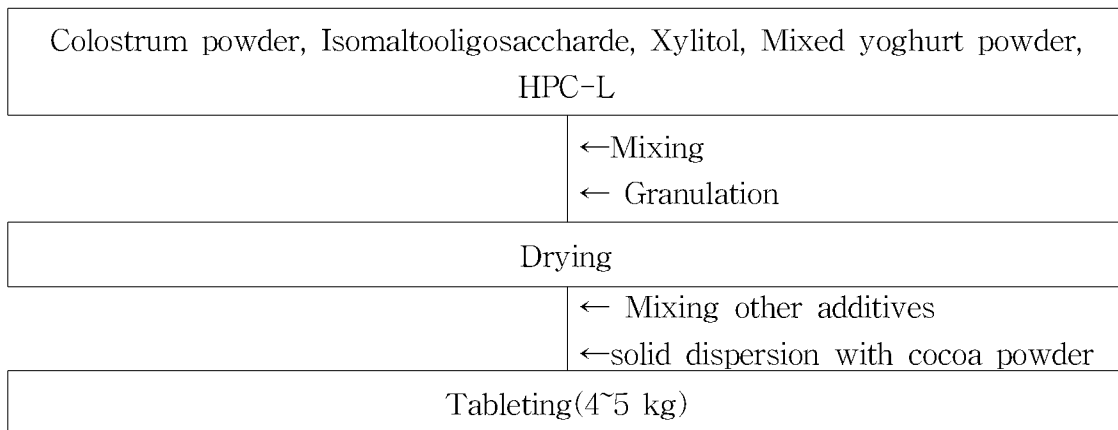


그림 153. Process of tablets containing fermented red ginseng

표 73. The formulation according to change HPC-L content(5, 7.5 and 10%)

Ingredients	Formulation(%)		
	II	II-1	II-2
Fermented red ginseng Extract	5.00	5.00	5.00
Silicon dioxide	4.00	4.00	4.00
Colostrum powder	26.15	23.65	21.15
Mixed Yoghurt powder	8.00	8.00	8.00
Xylitol	15.00	15.00	15.00
Isomaltooligosaccharie	22.00	22.00	22.00
<b>HPC-L</b>	<b>5.00</b>	<b>7.50</b>	<b>10.00</b>
Avicel pH 102	2.00	2.00	2.00
Vitamin C	2.50	2.50	2.50
Whey calcium	2.00	2.00	2.00
Milk flavor	0.3	0.3	0.3
Cocoa podwer	1.80	1.80	1.80
Strawberry flavor	2.00	2.00	2.00
Mg.St	2.00	2.00	2.00
Fructooligosaccharide	0.40	0.40	0.40
Lactoferrin Cocentrates	0.20	0.20	0.20
Lactobacilus acidphilus	0.10	0.10	0.10
Sucralose	0.05	0.05	0.05
Date essence	1.50	1.50	1.50
Total		100	

#### 다. 과립제조 공정의 벨리데이션

##### (1) 결합용매 종류 및 양

2차년도까지는 고체분산체를 제조하기 보다는 발효홍삼의 엑기스가 어느 정도 끈적거림과 수분을 함유하고 있으므로 이를 이용하여 과립을 제조하는 방법을 사용하였으나 이로 인해 결합력이 떨어져 유동성이나 식감이 떨어지는 것으로 판단되어 이를 개선하기 위해 용매를 이용하여 과립을 제조하는 방법을 검토하기로 하였음. 에탄올과 물을 가지고 검토한 결과 에탄올은 물에 비해 제조하기에 적당하고 쉽게 과립을 제조할 수 있었을 뿐만 아니라 건조시간이 짧은 장점을 가지고 있었으나 제조된 이후 전체적인 정제의 맛이 써지는 현상이 나타났음.. 쓴맛을 나타내는 원인을 알아보기 위하여 과립화 과정에서 들어가는 모든 원료를 에탄올에 녹여 검색한 결과 초유 분말 등이 대부분의 원료들이 쓴 맛으로 바뀌는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 팀은 물을 이용하여 결합액을 제조하기로 하였으니 물은 많이 사용할 경우 너무 끈적끈적하여 오히려 과립이 제조되지 않아 과립 제조시 들어가는 전체 양의 5%로 정하였음.

## (2) 혼합시간 및 과립의 건조시간

또한 물에 녹인 결합액은 혼합시간에 따라 폴리머의 swelling정도가 달라질 수 있으므로 적당한 혼합시간을 얻기 위하여 5, 10 및 15분 동안 혼합하여 과립을 제조하여 평가하였음. 과립을 제조하기 가장 적당한 점도를 얻기 위해서는 혼합시간을 5분으로 하였을 때 가장 적합하였음 그 이상 혼합 시 서로 뭉쳐져서 과립을 제조하기 어려웠음. 압출은 20호 체 (850 $\mu$ m)에서 하였으며 건조는 40 $^{\circ}$ C에서 24시간 하였음. 24시간 이전에는 과립의 건조가 부족하여 과립이 수분을 머금고 있으므로 충분한 건조가 필요하다고 사료되었음. 과립의 정립은 25호 체 (710 $\mu$ m)에서 하였음. 또한 상대적으로 많이 첨가되고 있는 이소말트 올리고당도 처음에는 분말형을 사용하여 다른 원료들과 과립화 공정에서 같이 사용하였으나 이것은 제조과정과 유동성에 영향을 주므로 이를 개선하기 위해 과립형으로 바꾸어 사용하고 과립화 과정에서 넣지 않고 마지막 정립과정에서 첨가하도록 하였음..

전체적으로 공정을 벨리데이션하여 최적의 공정 조건을 정하였을 때 입자의 유동성이 1.20~1.25 정도로 개선되었음.

## 라. 감미제의 변경 및 비타민 C를 이용한 은폐효과

감초농축액이 점성이 있는 농축액이다 보니 혼합단계에서 다른 입자들과 덩어리지고 혼합이 불균일해졌고, 맛의 균일성과 외관상 보기에 좋지 않았기 때문에 감미제로 사용하던 감초농축액을 최종처방에서 제외하였다. 또한 처방에서 맛에 큰 영향을 주지 않았던 스테비아 허브티도 최종처방에서 제외하였음.

감미제로서 달 맛에 큰 영향을 주던 Neohesperidine DC를 수크랄로오즈로 대체 하였다. 수크랄로오즈의 단맛의 적정량을 찾기 위해 0.02, 0.03 및 0.05%로 넣어 다른 것과의 조화를 평가한 결과 0.05%가 가장 적당하였음.

고체 분산체를 제조한 이후 발효홍삼과 비타민 C를 혼합하여 신맛을 추가하여 맛을 더욱 개선하고자 하였으며 이를 위해 비타민 C를 1, 2 및 3%를 첨가하여 간이적으로 비교 테스트를 한 결과 2%가 가장 적합하였으나 조금 더 새콤한 맛을 부여하기 위하여 2.5%로 결정하였음.

표 74. The formulation according to change of vitamin C content (1, 2 and 3%)

Ingredients	Formulation(%)		
	IV	V	VI
Fermented red ginseng Extract	5.00	5.00	5.00
Silicon dioxide	4.00	4.00	4.00
Colostrum powder	27.65	26.65	25.65
Mixed Yoghurt powder	8.00	8.00	8.00
Xylitol	15.00	15.00	15.00
Isomaltooligosaccharie	22.00	22.00	22.00
HPC-L	5.00	5.00	5.00
Avicel pH 102	2.00	2.00	2.00
<b>Vitamin C</b>	<b>1.00</b>	<b>2.00</b>	<b>3.00</b>
Whey calcium	2.00	2.00	2.00
Milk flavor	0.3	0.3	0.3
Cocoa podwer	1.80	1.80	1.80
Strawberry flavor	2.00	2.00	2.00
Mg.St	2.00	2.00	2.00
Fructooligosaccharide	0.40	0.40	0.40
Lactoferrin Cocentrates	0.20	0.20	0.20
Lactobacilus acidphilus	0.10	0.10	0.10
Sucralose	0.05	0.05	0.05
Date essence	1.50	1.50	1.50
Total		100	



그림 154. 타정기에 충전하는 과정 최종 정제

#### 마. 안정성 시험

여러 가지 제조 공정과 밸리데이션을 통해 가장 최적 처방으로 선정되어진 처방 II를 이용하여 함유되어진 발효홍삼이 끈적거림이나 색깔의 변색유무 등을 관찰하여 안정성 실험을 실시하였음.

결정되어진 최종 처방을 온도  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도(RH)  $75\pm 5\%$  조건 하에 3개월 동안 보관하였으며 매월마다 붕해 시간, 경도, 중량 및 색상(색상)의 변화 여부를 측정하여 안정성을 평가하였다. 정제를 유리 바이알에 10정씩 넣은 것을 3개로 제조하여 이를 정해진 기간에 꺼내어 평가항목을 측정하였음.

측정한 결과 처방은 3개월 동안 색깔의 변화나 끈적거림 등의 현상 없이 30분 이내에 모두 붕해되어 안정함을 확인하였음.

표 75. The result of stability test at storage conditon of  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ , RH  $75\pm 5\%$ .

Test item	Time(month)			
	0	1	2	3
Disintegration time(min)	< 30 min	< 30 min	< 30 min	< 30 min
Hardness(kgf)	$4.87\pm 0.10$	$4.78\pm 0.02$	$4.79\pm 0.21$	$4.76\pm 0.12$
Weight(g)	$0.796\pm 0.12$	$0.790\pm 0.13$	$0.786\pm 0.11$	$0.791\pm 0.15$
Color change	상아색	No change	No change	No change

## 7. 발효홍삼을 함유한 음료의 제조 및 평가

### 가. 시약 및 기기

사용한 시약으로는 Fermented red ginseng, High fructose corn syrup, Xylitol(Kookgeon Pharm. Ltd.), Vit C(Daejeong), Mango syrup(Dami and F) 향으로는 Cranberry, red ginseng, Rubus coreanus, Strawberry flavor, Date Grape essence를 아이향료에서 공급받았고, 썬올리고 P2(삼양제넥스), Sucralose, 타우린, Cocoa powder(아이향료) 그리고 Yuzu concentrate, Lemon concentrates 등을 사용하였다. 방부제로는 ethyl paraben을 사용하였음.

### 나. 실험방법 및 결과

#### (1) 1차 설문 조사

2차년도에 발효홍삼을 0.5와 1%를 실험실적으로 비교하였을 때 홍삼의 맛이 많이 느껴지는 것이 건강음료로서 더 믿음이 간다고 평가되어 표 76.의 처방에 따라 그림 156의 방법에 따라 제조하여 1차 설문 조사를 5점 척도법으로 실시하였음. 성인 남녀 25명(10대 2명, 20대 6명, 30대 4명, 40대 7명, 50대 6명)을 대상으로 진행하였으며, 쓴맛, 단맛, 향, 색 그리고 전체적인 음료의 맛에 대해 관능평가를 진행하였고, 제품으로 출시되었을 때 구매의사에 대해서도 조사했다. 개선사항으로 나온 의견들을 토대로 음료의 처방을 변경하기로 하였음.

표 76. The formulation for first survey.

Ingredients	Formulation(%)
Fermented red ginseng	1
High fructose corn syrup	2.5
Sucralose	0.005
Xylitol	2
Vit C	0.1
Taurin	0.1
Mango syrup	2
Oligosaccharide	1
Strawberry powder	0.1
water	q.s
Total	100

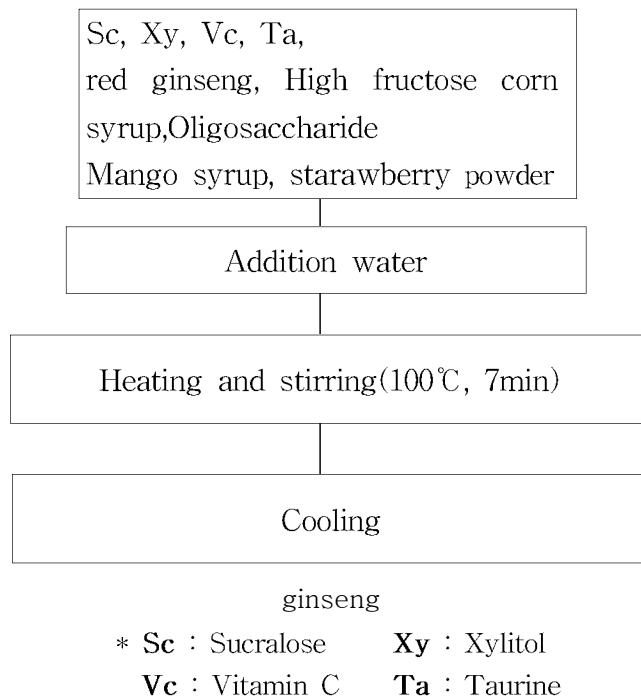


그림 155. Process of drinkin product containing fermentated red

(가) 색과 향에 대한 선호도

전체적인 색과 향에 대한 설문 조사 결과 색과 향 모두 20대에서 가장 만족도가 낮아 젊은 층은 홍삼과 같은 맛을 좋아하지 않는 것으로 나타났으나 색의 경우 10대에서 가장 만족도 높아 3점 그리고 향은 50대에서 2.8점 정도의 점수를 나타내었음. 이는 건강에 대한 관심이 40, 50대에서 급격히 높아지는 것과 무관하지 않은 것으로 보이며 구매여부 조사에서도 같은 결과가 나타났음.

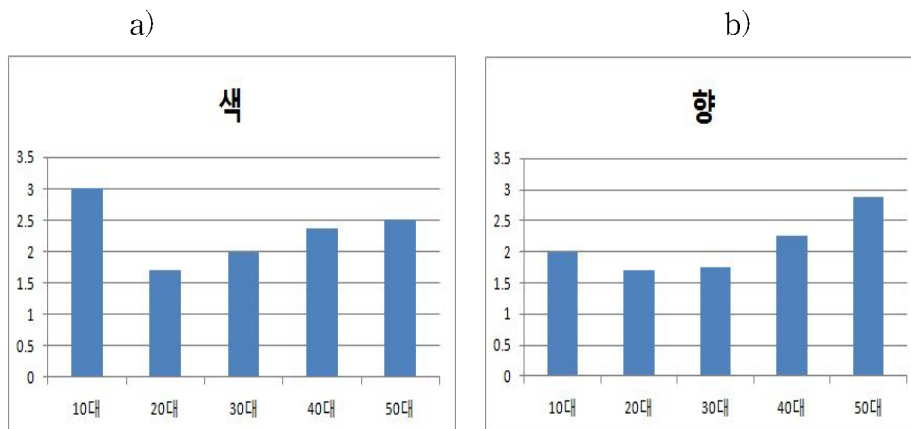


그림 156. The result of survey for color(a) and flavor(b)

(나) 맛에 대한 선호도

그림 157에서 보는 바와 같이 맛에 대한 전체적인 경향은 향과 색과 마찬가지로 10대 또는 40, 50대에서 만족도가 높았으나 점수는 2.5점 미만으로 나타나서 맛은 반드시 개선해야 되는 항목으로 평가되었음.

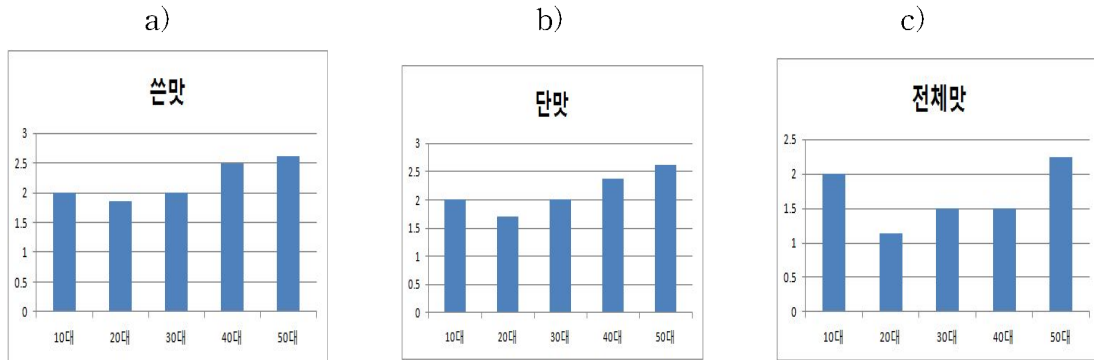


그림 157. The result of survey for taste  
(a - bitterness, b - sweetness, c -total taste)

(다) 구매여부와 이유

구매하지 않으려는 이유를 살펴보면 20대 이하에서는 홍삼제품자체를 선호하지 않는 경향이 있었고, 30대 이상에서는 색과 향을 그 이유로 들었음. 구매하고자 하는 40대 이상에서는 대부분 홍삼이 들어있기 때문에 건강식품대용으로서 좋을 것 같다는 의견이 있었는데 이는 결국 일반적으로 건강에 대한 관심이 급증하는 연령대에서 선호하는 것으로 조사된 결과와 일치하는 것이라 할 수 있었음.

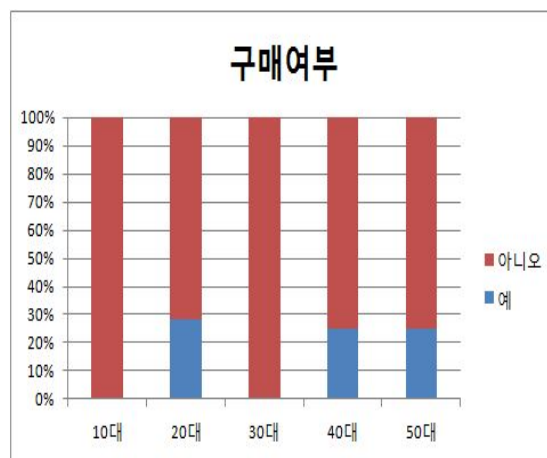


그림 158. The result of survey for purchasing situation and reason



표 77. The negative reason for purchasing situation

Age	%				
	Flavor	Bitterness	Sweetness	Negative red ginseng product	Color
10	-	-	-	100	-
20	-	17	-	83	-
30	-	25	25	-	50
40	28	29	14	-	29
50	33	16	17	17	17

위의 조사를 바탕으로 전체적으로 개선되어야 할 사항을 연령대별로 정리하여 그림 159에 나타내었다. 전체적으로 쓴 맛이 약해졌으면 좋겠다는 의견이 많았고 그 다음으로는 다른 향을 첨가하였으면 좋겠다는 의견이 있었음. 따라서 쓴 맛을 차폐하면서 다른 맛을 낼 수 있는 방법을 찾아보기로 하고, 현재의 처방을 토대로 개선사항을 반영하여 새로운 처방의 음료를 제조하여 2차 설문조사를 진행하기로 하였음.

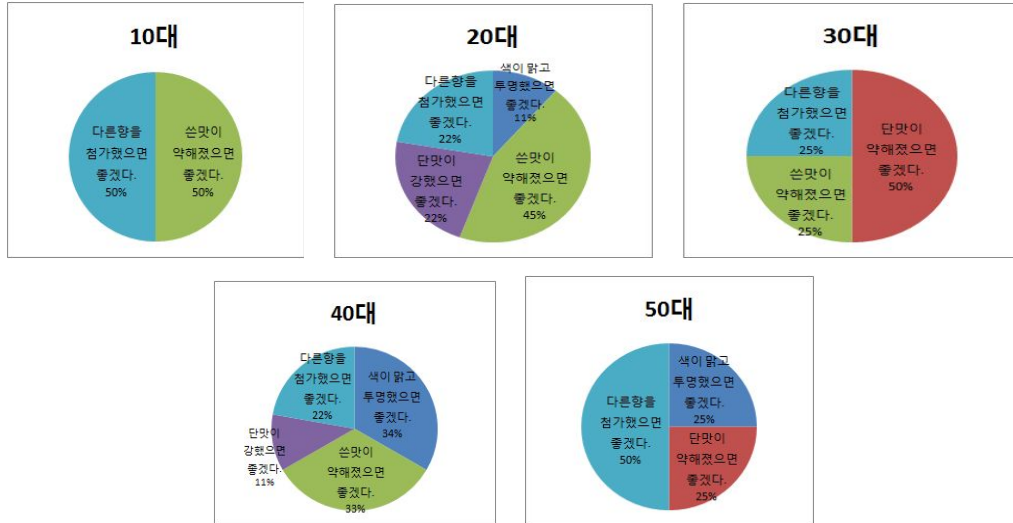


그림 159. The plan for improvement according to survey according to age group

별지

# 제품 선호도 설문조사

안녕하십니까? 이 설문조사는 저희가 개발한 홍삼음료 제품에 대해 전체적인 맛을 평가받기 위해 실시하는 것입니다. 이 제품은 홍삼농축액이 들어간 푸딩으로 전 연령대가 거부감 없이 쉽게 먹기 위하여 개발되었습니다. 제품을 맛보시고 제품에 대한 의견과 평을 솔직하게 적어주세요.

1. 귀하의 성별은 무엇입니까?

- ① 남자            ② 여자

2. 귀하의 나이는 무엇입니까?

- ① 10대            ② 20대            ③ 30대            ④ 40대            ⑤ 50대 이상

2. 음료 시제품에 대한 평가표입니다. 해당 부분에 1~5점으로 적어 주십시오.

3. 푸딩 시제품에 대한 평가표입니다. 해당 칸에 1~5점으로 적어 주십시오.

(매우 만족하지 못함-①.....보통-③.....매우 만족함-⑤)

푸딩 A

항목 \ 점수	①	②	③	④	⑤
쓴맛					
단맛					
향					
색깔					
식감					
전체맛					

4. 본 제품을 구매할 의사가 있으십니까?

- ① 예            ② 아니요

4-1. 구매할 의사가 있다면 이유는 무엇입니까? (복수선택 2가지 가능)

- ① 홍삼성분이 들어가서
- ② 맛이 있어서
- ③ 너무 달지 않아서
- ④ 너무 쓰지 않아서
- ⑤ 건강식품대용으로

4-2. 구매할 의사가 없다면 이유는 무엇입니까? (복수선택 2가지 가능)

- ① 향이 좋지 않아서
- ② 쓴맛이 강해서
- ③ 단맛이 강해서
- ④ 홍삼제품을 좋아하지 않아서
- ⑤ 색깔이 좋지 않아서

5. 시제품에 대해 귀하의 개선사항을 선택하여주세요. (복수선택 2가지 가능)

- ① 색깔이 맑고 투명해졌으면 좋겠다.
- ② 단맛이 약해졌으면 좋겠다.
- ③ 쓴맛이 강했으면 좋겠다.
- ④ 단맛이 강해졌으면 좋겠다
- ⑤ 다른 향을 첨가했으면 좋겠다.
- ⑥ 기타.

6. 시제품에 대해 다른 의견이 있다면 자세하게 적어주세요.

## (2) 방부제 첨가

음료가 실제 소비자에게 공급되어 질 때 제품의 변질을 막기 위해서는 천연적으로 방부효과가 있는 물질이나 합성 방부제를 첨가해야 하므로 이를 해결하기 위하여 본 팀은 시중에 판매되는 음료에 첨가되는 방부제의 종류를 조사하였음. 판매되는 음료 중에는 안식향산, 소르빈산, 에틸파라벤, 메틸파라벤 등이 가장 많이 사용되어 식품공전의 기준에 맞추어 첨가되어 유통되고 있었음. 따라서 본 팀도 식품공전의 기준에 따라 하루 섭취량을 고려하여 표 78의 함량대로 음료에 첨가하여 보았으나 방부제의 종류에 따라 음료의 맛에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었음. 즉 안식향산과 소르빈산의 경우 쓰고 톡 쏘는 맛이 강하여 사용할 수 없었으나 상대적으로 에틸 파라벤은 음료의 맛에 가장 영향을 주지 않는다는 의견이 많아 방부제는 에틸 파라벤으로 결정하였음. 함량은 0.005와 0.01%를 첨가하여 비교 평가한 결과 0.005%가 맛에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났음.

## (3) 카제인의 첨가 및 음료의 제조과정 검토

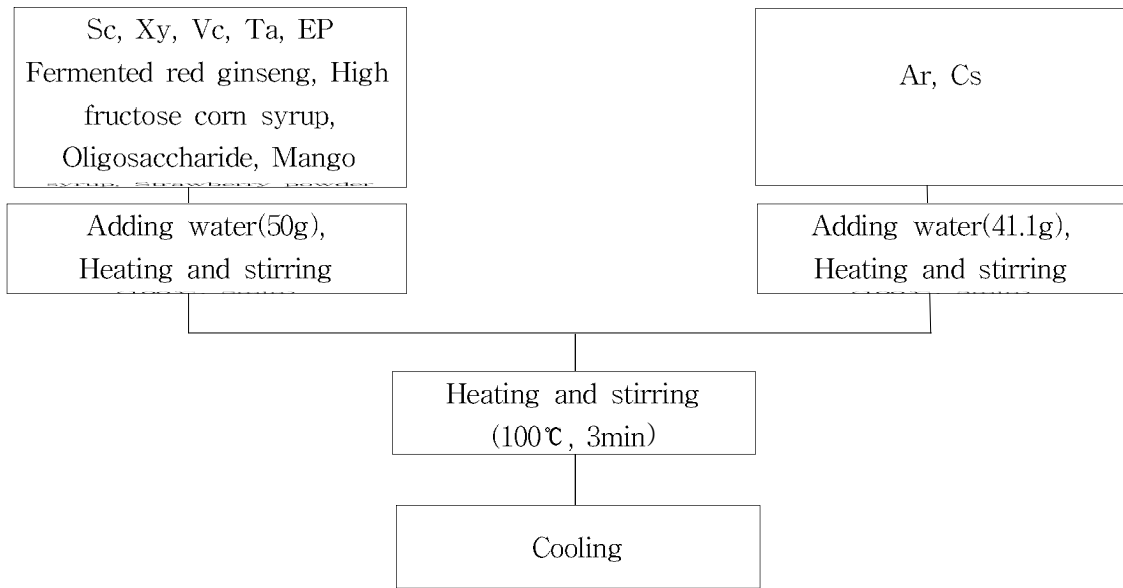
최근 음료 시장에서는 모 회사에서 마케팅 전략으로 사용하고 있는 천연 카제인 열풍이 많이 일고 있는 것으로 알려져 있음. 따라서 본 팀에서도 여러 가지 맛을 첨가하여 인삼 특유의 맛을 없애기 위한 노력을 하다 이러한 아이디어 착안을 하게 되어 인삼의 쓴맛을 조금 더 부드럽게 하기 위하여 천연 카제인을 첨가하기로 하였으나 이는 산성보다는 알칼리성에서 잘 녹는 것으로 확인되었음. 카제인을 용해시키기 위해서는 인위적으로 전체 음료의 pH를 알칼리성으로 조절하거나 알칼리성을 띄는 물질을 첨가하여 용해시키는 것이 바람직할 것으로 평가되었음. 여러 가지 물질을 조사하던 중 건강 음료를 개발하는 것이 최종 목표이므로 이러한 목적에 맞는 물질을 첨가하는 것이 바람직하여 염기성 아미노산인 아르기닌과 라이신을 검토하던 중 아르기닌을 첨가한 경우 더 잘 용해되어 아르기닌을 이용하여 용해하기로 하였음. 그러나 제조과정에서 그림 156과 같은 제조과정을 통해 제조하면 용해되었던 천연 카제인이 다시 침전으로 떨어지는 현상이 발생되어 이를 방지하기 위해서 따로 아르기닌에 카제인을 용해시킨 다음 첨가해야 할 필요성이 대두되어 그림 160의 제조과정으로 변경하여 제조하였음.(표 79)

☿ 78. The formulation of drinking product containing various preservatives

Ingredients	Formulation(%)						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Fermented red ginseng Ext.	1	1	1	1	1	1	1
High fructose corn syrup	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sucralose	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Xylitol	2	2	2	2	2	2	2
Ascorbic Acid	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mango syrup	2	2	2	2	2	2	2
Oligosaccharide	1	1	1	1	1	1	1
Taurine	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Strawberry powder	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Benzoic acid	<b>0.06</b>	-	-	-	-	-	-
Sorbic acid	-	<b>0.05</b>	-	-	-	-	-
Ethyl paraben	-	-	<b>0.01</b>	-	-	<b>0.005</b>	<b>0.01</b>
Methyl paraben	-	-	-	<b>0.01</b>	<b>0.06</b>	-	-
water				q.s			
Total				100			

**㉟ 79. The formulation of drinking product containing Acid Casein and L-Arginine**

ingredients	Formulation(%)	
	VIII	VIII-1
Fermented red ginseng Ext.	1	1
High fructose corn syrup	2.5	2.5
Sucralose	0.005	0.005
Xylitol	2	2
Ascorbic Acid	0.1	0.1
Ethyl Paraben	0.005	0.005
Mango syrup	2	2
Oligosaccharide	0.1	0.1
Taurine	1	1
Strawberry powder	0.1	0.1
L-Arginine	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>
Acid Casein	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>
water		q.s
Total		100



\* Sc : Sucralose, Xy : Xylitol, Vc : Ascorbic Acid C, Ta : Taurine,  
EP : Ethyl Paraben, Ar : L-Arginine, Cs : Acid Casein

그림 160. Process of drinking product containing acid casein and L-arginine

#### 4. 홍삼 맛의 차폐 및 당도조절

1차 설문 조사의 개선 사항으로 지적되었던 음료의 맛을 좀 더 깊고 진하게 만들기 위하여 대추 추출물, 구기자 추출물, 영지추출물을 각각 0.1%씩 첨가하고, 쓴맛이 많이 남아있고 단맛이 적게 느껴진다는 것을 해결하기 위하여 망고추출물의 함량을 2.5에서 5%로 높이거나 망고 추출물 대신 액상과당의 함량을 2.5, 5 및 7%로 조절하여 표 80의 처방대로 제조하여 각각의 맛을 간이 평가식으로 조사하였음. 그 결과 처방 XII가 음료의 맛이 깊으면서 액상과당의 단 맛 때문에 홍삼의 쓴맛이 가장 잘 차폐되는 것으로 평가되었음.

표 80. The formulation of drinking product containing various high fructose corn syrup(2.5, 5 and 7.5%) and various herbal extracts

Ingredients	Formulation(%)			
	IX	X	XI	XII
Fermented red ginseng Ext.	1	1	1	1
High fructose corn syrup	2.5	2.5	<b>5</b>	<b>7</b>
Sucralose	0.005	0.005	0.005	0.005
Xylitol	2	2	2	2
Ascorbic Acid	0.1	0.1	0.1	0.1
Ethyl Paraben	0.005	0.005	0.005	0.005
Mango syrup	<b>5</b>			
Oligosaccharide	0.1	0.1	0.1	0.1
Taurine	1	1	1	1
Strawberry powder	-	-	-	-
L-Arginine	0.2	0.2	0.2	0.2
Acid Casein	0.2	0.2	0.2	0.2
Date Ex.		<b>0.1</b>	0.1	0.1
Lycium chinense Miller Ex.		<b>0.1</b>	0.1	0.1
Ganoderma lucidum Ex.		<b>0.1</b>	0.1	0.1
water			q.s	
Total			100	

### (3) 음료 안정성 시험

최종적으로 결정되어진 처방 XII를 제조하여 온도 및 습도에 의한 음료의 변화여부를 측정하여 안정성을 평가하였다. 이 때 미리 제조된 최종 처방 음료를 밀폐된 용기에 일정량씩 넣어 각각 3개씩 냉장(0-10℃), 실온(25-30℃) 및 40±2℃에서 상대습도 75±5%의 조건 하에 보관하면서 정해진 기간에 샘플링하여 평가하였으며 모든 측정항목은 각 3번씩 분석한 결과의 평균값으로 표시하였다.

pH 측정은 pH meter(Istek 720)를 이용하여 실온에서 측정하였으며 당도는 당도계(Atago N-1E Brix, 0~32%)를 이용하여 시료 1.5 ml를 취하여 측정하였다. 또한 점도는 검체 5ml를 취하여 점도계(Brookfield, DV-III+)에서 120 rpm으로 30초간 회전시킨 후 측정하였다.



안정성 시험에서 pH는 4.4, 당도는 9.9 그리고 점도는 2~4 cp 정도의 값을 나타내었다. 그러나 안정성 시험 중 음료를 밀폐된 용기에 보관하였음에도 불구하고 10일 이내 음료에 불순물이 생기며, 침전이 많이 떨어지는 것을 보아 이는 음료가 변질되었다고 판단하여, 안정성 시험을 중단하고 방부제의 함량을 더 늘리기로 결정하였을 뿐 아니라 설문조사를 실시하여 처방의 타당성을 같이 검토하였다.

#### (4) 2차 설문조사

안정성 실험에 사용하였던 최종적인 처방 XII를 이용하여 음료의 맛의 개선과 주요 소비 연령층을 결정하기 위하여 50명의 남녀를 대상(10대-2명, 20대-8명, 30대-16명, 40대-12명 및 50대 12명)으로 하여 실시하였다. 10~50대 연령대별로 음료의 쓴맛, 단맛, 향, 색깔, 전체적인 기호도와 구매 의향을 7점 척도법으로 조사하였다.

##### (가) 향 및 색깔에 대한 선호도

1차 설문조사 결과와는 약간 다르게 향에 대한 만족도는 30대에서 가장 좋아 5점 정도의 점수를 나타내었으며 색깔에 대한 만족도는 모든 연령대에서 거의 비슷하게 조사되는 것을 확인할 수 있었음.

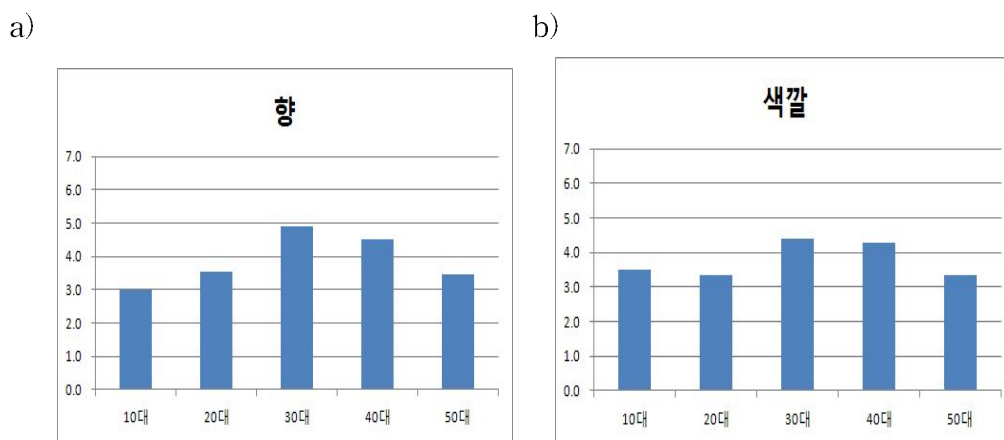


그림 161. The result of survey for color(a) and flavor(b)

##### (나) 맛에 대한 선호도

쓴맛에 대한 평가는 여전히 1차 설문 조사와 마찬가지로 연령대가 낮은 10대와 30대에서 많이 느끼는 것으로 평가되었고 단맛과 전체적인 맛에 대한 평가는 모든 연령대가 높지는 않았으나 비슷한 결과를 나타내었음.

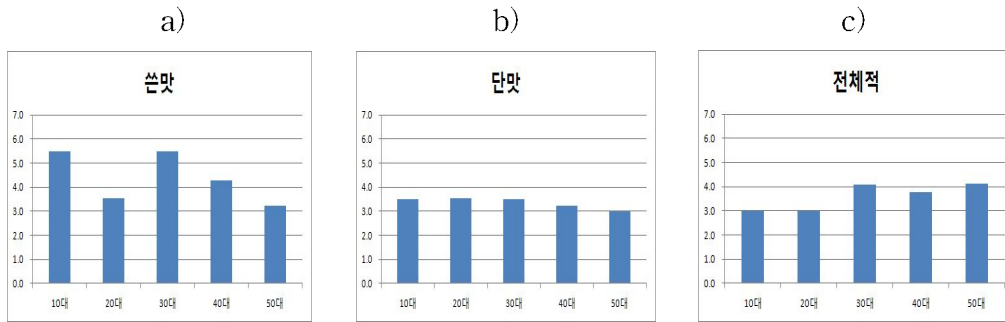


그림 162. The result of survey for taste(a-bitterness, b- sweetness, c-total taste)

(다) 구매여부와 이유

구매의사는 전체의 56%가 구매한다는 의견이었고, 44%가 구매하지 않겠다는 의견이었다. 10대와 50대의 경우에는 현저한 차이를 나타내어 10대는 모두 구입하지 않겠다는 의사를 50대는 모두 구입하겠다는 의사를 나타내었음.(그림 163). 구매하려는 이유를 연령대별로 나타낸 결과, 건강을 위해서라는 의견이 60%이상으로 가장 많은 의견을 내는 것으로 보아 홍삼이 함유된 제품은 음료에서도 웰빙 시대와 맞물려 건강을 생각하는 소비자들의 의견이 주로 반영되는 현상을 볼 수 있었음.(그림 164).

또한 구매하지 않는다는 이유를 연령대별로 정리하였을 때 건강에 자신있다고 생각하는 연령대인 10, 20 및 30대의 경우에는 홍삼제품을 좋아하지 않는다는 의견이 가장 많아서 홍삼 제품을 개발하기 위해서는 건강을 많이 생각하는 40, 50대가 좋아하는 맛이나 향에 맞추는 가장 타당한 것으로 조사되었음.(그림 165).

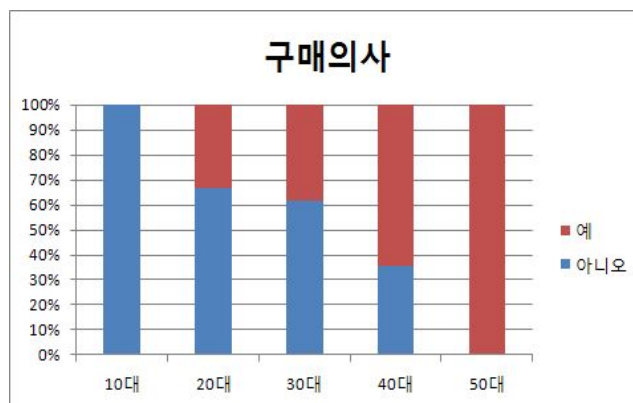


그림 163. The result of survey for purchasing situation and reason

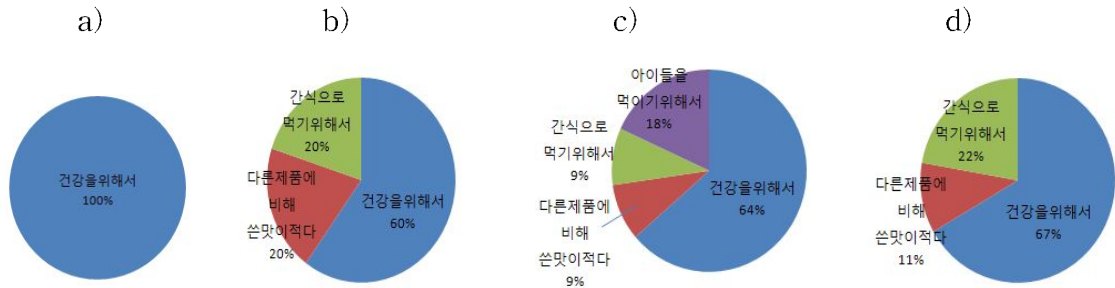


그림 164. The positive reason for purchasing situation according to age group  
(a - 20 age group, b - 30 age group, c - 40 age group, d - 50 age group)

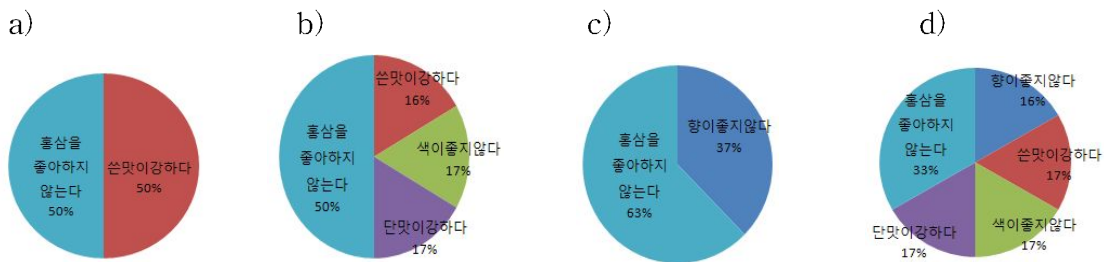


그림 165. The negative reason for purchasing situation according to age group  
(a - 10 age group, b - 20 age group, c - 30 age group, d - 40 age group)

(라) 개선사항

전체적인 설문조사 결과 맑고 투명했으면 좋겠다는 결과에 따라 약간 불투명한 현상을 일으키는 물질을 조사한 결과 카제인이 제조과정에서는 용해되었다가 시간이 지남에 따라 약간 침전으로 떨어진다는 사실을 확인할 수 있었으며 이후 처방에서는 제외하기로 하였음. 또한 전반적으로 모든 연령대에서 향은 약해졌으면 하고 맛은 조금 더 단맛을 내는 것을 선호하는 것으로 나타나서 이를 개선하기 위해서는 농축액이나 향보다는 과일 추출물을 이용하여 단맛을 높이면서 상큼한 맛을 낼 수 있도록 방향을 바꾸었음.

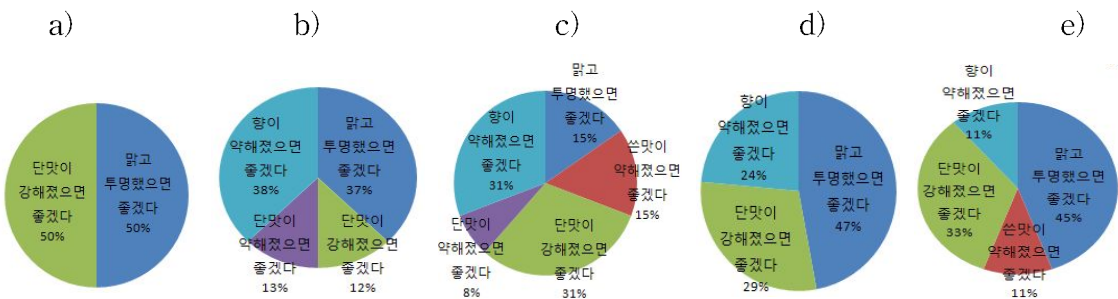


그림 166. The plan for improvement according to survey according to age group  
(a - 10 age group, b - 20 age group, c - 30 age group, d - 40 age group, e - 50 age group)

별지

# 제품 선호도 설문조사

안녕하십니까? 이 설문조사는 저희가 개발한 홍삼음료 제품에 대해 전체적인 맛을 평가받기 위해 실시하는 것입니다. 이 제품은 홍삼농축액이 들어간 푸딩으로 전 연령대가 거부감 없이 쉽게 먹기 위하여 개발되었습니다. 제품을 맛보시고 제품에 대한 의견과 평을 솔직하게 적어주세요.

1. 귀하의 나이는 무엇입니까?

- ① 10대            ② 20대            ③ 30대            ④ 40대            ⑤ 50대 이상

2. 음료 시제품에 대한 평가표 입니다. 해당 부분에 1~7점으로 체크하여 주십시오.

	0		7
쓴맛	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----		
	약하다		강하다
	0		7
단맛	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----		
	약하다		강하다
	0		7
향	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----		
	나쁘다		좋다
	0		7
색깔	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----		
	나쁘다		좋다
	0		7
전체적 기호도	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----		
	나쁘다		좋다

3. 본 제품을 구매할 의사가 있으십니까?

- ① 예            ② 아니요

3-1. 구매할 의사가 있다면 이유는 무엇입니까?

- ① 홍삼성분이 들어가 건강을 위해서
- ② 다른 홍삼식품에 비해 쓴맛이 덜해서
- ③ 간식으로 먹기 위해서
- ④ 아이들을 먹이기 위해

3-2. 구매할 의사가 없다면 이유는 무엇입니까?

- ① 향이 좋지 않아서
- ② 쓴맛이 강해서
- ③ 색이 좋지 않아서
- ④ 단맛이 강해서
- ⑤ 홍삼을 좋아하지 않아서

4. 시제품에 대해 귀하의 개선사항을 선택하여주세요.

- ① 맑고 투명해졌으면 좋겠다.
- ② 쓴맛이 약해졌으면 좋겠다.
- ③ 단맛이 강했으면 좋겠다.
- ④ 단맛이 약해졌으면 좋겠다
- ⑤ 향이 좀 더 약했으면 좋겠다.
- ⑥ 기타.

5. 시제품에 대해 다른 의견이 있다면 자세하게 적어주세요.

## 8. 문제점 해결

안정성 평가의 결과 보관기간 동안 문제가 발생되었을 뿐 만 아니라 부드러운 맛을 첨가하여 홍삼의 쓴맛을 은폐하기 위하여 첨가하였던 카제인의 재침전으로 인해 음료를 불투명한 상태로 존재하게 하여 소비자들에게 불쾌감을 줄 수 있다는 설문 조사 결과에 따라 이를 개선하기 위한 방안을 검색하였음. 홍삼향 이외에 다른 향과 맛이 느껴진다는 의견이 있어 이를 sucralose의 함량을 0.005에서 0.002%로 감소하여 특유의 향을 제거할 수 있었으며 이로 인해 단맛이 떨어지는 것을 보완하기 위해 자일리톨과 액상과당의 함량을 조절하여 해결하기로 하였음. 또한 설문조사에서 대두되었던 강한 향의 원인은 높은 농도의 액상과당으로 인해서도 발생되므로 이를 해결하기 위해서 적당한 액상과당의 농도를 결정하고 이를 대체하기 위하여 과일 추출물을 이용하여 새로운 처방을 완성하여 전체적인 문제점을 해결하기로 하였음(표 79). 과일 추출물을 이용한 결과 음료가 상큼하게 느껴졌음. 매실의 경우는 신 맛이 강하여 처방에서 제외하였고, 유자와 레몬을 각각 처방한 것 보다 두 개를 혼합하여 제조한 것이 음료의 맛이 좋다는 평가가 많아 두 개를 각 1차적으로 0.5%씩 처방하였을 때 거부감이 많이 사라지는 것을 확인할 수 있었음. 특히 향에 민감한 20대에서도 상큼함이 느껴져 피로하거나 할 때 먹고 싶다는 의견이 많이 나와서 이를 좀 더 개선하기 위해서 레몬추출물과 유자 추출물의 함량을 1%로 높여 음료의 전체적인 향을 좀 더 진하게 해주어 홍삼의 향을 차폐하는 동시에 새콤한 맛과 단맛을 높여주어 홍삼의 거부감을 줄여주고자 하였음. 단맛이 많을수록 홍삼 특유의 맛은 감소되므로 최종적인 처방을 결정하기 위하여 자일리톨을 이용하여 맛을 좀 더 강화하기로 하였음.

즉 자일리톨의 함량을 4와 6%로 비교평가 하였을 때 Sucralose을 완전히 제거 하였던 것 보다는 Sucralose가 0.002% 첨가된 처방이 거부스러운 향이 느껴지지 않으면서 단맛이 더 잘 느껴지면서 좋다는 의견이 많아 Sucralose 0.002%에 Xylitol 4%를 최종 처방으로 결정하였음(표 80).

표 79. The formulation on plan of improvement for drinking product containing fermented red ginseng

Ingredients	Formulation(%)					
	A	B	C	D	E	F
Fermented red ginseng Ext.	1	1	1	1	1	1
High fructose corn syrup	2.5	5	5	5	6	6
Sucralose	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Xylitol	2	2	2	2	2	2
Ascorbic Acid	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Ethyl Paraben	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Oligosaccharide	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Taurine	1	1	1	1	1	1
L-Arginine	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Plum Ex		1				
Yuzu Ex			1			0.5
Lemon Ex				1	2	0.5
water				q.s		
Total				100		

표 80. Final formulation of drinking product containing fermented red ginseng

Ingredients	Formulation(%)
Fermented red ginseng Ext.	1
High fructose corn syrup	6
Sucralose	0.002
Xylitol	4
Ascorbic Acid	0.1
Ethyl Paraben	0.01
Oligosaccharide	1
Taurine	0.1
L-Arginine	0.2
Yuzu Ex	1
Lemon Ex	1
water	q.s
Total	100

최종 처방을 이용하여 20일 동안 안정성을 측정한 결과 모든 온도에서 큰 변화없이 안정함을 유지하는 것을 확인할 수 있었으며 설문조사 결과에서 우리는 인삼의 맛에 의한 거부감 같은 것을 없애기 위해서는 음료를 실온에 보관해서 먹는 것보다는 냉장 보관하여 차게 해서 복용하는 것이 훨씬 만족도가 좋아지는 것을 확인할 수 있으므로 발효홍삼을 이용한 제품개발에 참고가 될 것으로 사료됨.

## 9. 결론

- 면역활성에 좋은 초유성분 등과 함께 발효홍삼 성분이 함유된 정제를 적합한 향과 함량을 선택하여 제조할 수 있었음.
- 발효홍삼을 함유하는 음료 제조시 적합한 향과 생약 추출물을 선택하여 적당한 음료를 제조할 수 있었음.
- 발효홍삼 성분이 함유된 NLC를 제조하여 향후 피부적용제제를 개발할 수 있는 기초 자료를 얻을 수 있었음.
- 면역활성에 좋은 초유성분 등과 함께 발효홍삼 성분이 함유된 정제를 적합한 향과 함량을 선택하여 제조할 수 있었을 뿐만 아니라 홍삼 특유의 맛을 발효홍삼과 SiO<sub>2</sub>의 고체분산체를 제조하여 masking할 수 있는 유용한 제제기술 중의 하나임. 최종적으로 개발된 formulation은 발효홍삼 5%, SiO<sub>2</sub> 4%, 초유분말 26.15, 혼합요구르트 분말 8%, 자일리톨 15%, 이소말토올리고당 22%, HPC-L 5%, Avicel pH 102 2%, Vitamin C 2.5%, 밀크 유청 2%, 밀크향 0.3%, 코코아 분말 1.8%, Magnesium starate 2%, 폴락토올리고당 0.4%, 락토펜 농축물 0.2%, 락토마실러스 에시도필러스 0.1%, 수크랄로오스 0.05% 그리고 대추향 1.5%을 함유하는 처방이었음.
- 제조과정에 대한 밸리데이션을 실시한 결과 HPC-L의 함량은 5%가 적당하였으며 이때 결합액 제조시 전체 중량의 5%의 물을 사용하여 5분동안 혼합한 다음 제조되어진 과립을 40°C에서 24시간 건조하는 조건의 최적의 조건으로서 유동성은 1.20~1.25이었음.
- 발효홍삼을 함유하는 음료 제조시 과일 추출물을 이용하여 소비자가 원하는 적당한 향과 당도를 가지면서 안정한 음료를 제조할 수 있었음. 이 때 개발된 최종 처방은 발효홍삼 1%, 액상과당 6%, 수크랄로오스 0.002%, 자일리톨 4%, 비타민 C 0.1%, 에틸 파라벤 0.01%, 올리고당 1%, 타우린 0.1%, L-아르기닌 0.2%, 유차추출물 1%, 레몬 추출 1%이었음.
- 전체적으로 발효홍삼을 함유하는 제품을 개발할 때에 가장 관점을 두어야 할 부분은 인삼 특유의 쓴맛과 향으로 설문조사 평가되었고 특히 이런 맛은 고분자나 SiO<sub>2</sub>와 같은 담체를 이용한 고체 분산체와 같은 제제기술이 유용할 것으로 사료됨.



## 제 3 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절. 연차별 목표 달성도

- 본 연구는 인삼 발효를 통하여 발효홍삼의 성분 전환으로 생성된 사포닌의 성분 분석 및 유효 성분의 분리 그리고 발효홍삼에 대한 항산화활성, 아토피 억제 활성과 같은 다양한 생리 활성 검증하고 이를 이용하여 제품화하는 것을 목표로 함. 이는 전통발효식품에서의 우량균주의 분리와 이들 균주를 이용한 발효를 통해 발효인삼의 제조, 이를 이용한 제품 개발과 소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 맞춤형 제형개발을 수행하는 과제로 다음과 같이 연차별로 목표를 달성하였음.

1. 1차년도 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	발효인삼의 성분분석 및 활성검증	전통발효식품 및 다양한 분리원으로부터 분리한 우량 발효균주로 처리한 발효인삼(뿌리)의 성분 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 전통발효식품으로 처리한 발효인삼(뿌리)을 대량 추출한 후 성분을 분석; 발효 전/후의 성분변화를 분석</li> <li>■ 발효에 따른 진세노사이드 조성의 변화 측정(뿌리)</li> <li>■ 성분변화에 따른 발효 종말점 선정</li> </ul>
		전통발효식품 및 다양한 분리원으로부터 분리한 우량 발효균주로 처리한 발효인삼(뿌리)으로부터 활성물질의 분리/정제 및 구조결정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 각종 크로마토그래피를 이용한 활성물질의 분리정제</li> <li>■ <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR 등을 이용한 화합물의 구조동정</li> <li>■ COSY, HMQC, HMBC 등을 이용한 화합물의 구조동정</li> <li>■ LRMS HR MS등을 이용한 화합물의 분자량 동정</li> </ul>
		전통발효식품 및 다양한 분리원에서 분리한 우량발효균주로 처리한 발효인삼(뿌리)의 활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 전통발효식품으로 처리한 발효인삼의 아토피억제 및 항산화활성 측정</li> </ul>
		최적의 추출방법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 지표물질의 분석 및 최적의 추출방법을 확립함</li> </ul>
	전통 발효식품 및 유산균을 이용한 인삼발효에 따른 생화학적 변화	인삼(뿌리)을 소재로 한 우량균주를 이용한 최적의 발효조건 및 공정 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼(뿌리)을 원료로 하여 선정된 발효우량균주를 이용한 최적의 발효조건을 확립함</li> <li>■ 인삼(뿌리)을 원료로 하여 전통발효식품(김치) 및 다양한 분리원에서 유용균주 선발 및 최적의 발효조건을 확립함</li> <li>■ 발효공정 표준화(뿌리)</li> </ul>
	발효 인삼을 이용한 제형개발 및 안정성	발효인삼(뿌리) 제형개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 맞춤형 제형개발을 수행하였음</li> </ul>
		발효인삼(뿌리) 응용제품개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 정제, 캡슐제, 환제 등 고부가가치의약품형태의 발효홍삼제품으로 개발</li> </ul>

## 2. 2차년도 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2011)	발효인삼의 성분분석 및 활성검증	전통발효식품 및 다양한 분리원으로부터 분리한 우량 발효균주로 처리한 발효인삼(잎)의 성분 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼을 발효한 발효인삼을 대량 추출한 후 성분을 분석; 발효 전 후의 성분변화를 분석</li> <li>■ 발효에 따른 진세노사이드 조성의 변화 측정(잎)</li> </ul>
		발효인삼으로부터 활성물질의 분리/정제 및 구조결정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 각종 크로마토그래피를 이용한 활성물질의 분리정제</li> <li>■ <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR 등을 이용한 화합물의 구조동정</li> <li>■ COSY, HMQC, HMBC 등을 이용한 화합물의 구조동정</li> <li>■ LRMS HR MS 등을 이용한 화합물의 분자량 동정</li> </ul>
		전통발효식품 및 다양한 분리원으로부터 분리한 우량 발효균주로 처리한 발효인삼(잎)의 활성측정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 발효인삼의 아토피억제 및 항산화활성 측정</li> </ul>
		최적의 추출방법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 지표물질의 분석 및 최적의 추출방법을 확립함</li> </ul>
	전통 발효식품 및 유산균을 이용한 인삼발효에 따른 생화학적 변화	인삼(잎)을 소재로 한 우량 균주를 이용한 최적의 발효 조건 및 공정 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 발효공정 표준화(잎)</li> </ul>
		소규모로 전통식품으로부터 1차년도에 확립된 발효공정에 의한 인삼(뿌리, 잎) 발효	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 1차년도에 확립된 유용균주를 인삼(뿌리, 잎)에 소규모로 적용시켜 성분 분석 및 물질정제를 위해서 발효</li> </ul>
	발효 인삼을 이용한 제형개발 및 안정성	발효인삼(잎) 제형개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 맞춤형 제형개발</li> </ul>
		발효인삼(잎) 응용제품개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 정제, 캡슐제, 환제 등 고부가가치의약품형태의 발효인삼제품으로 개발</li> </ul>
		대량 생산공정 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 원료 및 응용 시제품 및 대량 생산 공정 개발</li> </ul>

### 3. 3차년도 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2012)	발효인삼의 성분분석 및 활성검증	전통식품으로부터 분리한 유용균으로 발효한 발효인삼으로부터 활성성분의 대량분리	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 대량분리정제를 위한 시료 확보</li> <li>■ 대량분리정제를 위한 최적분리방법 설정</li> <li>■ 대량분리방법의 최적화 및 제품개발을 위한 산업화 연구</li> <li>■ 파이롯트 규모의 분리정제</li> </ul>
		활성물질의 산업화	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 공장스케일의 분리정제</li> <li>■ 지표물질의 분석 및 최적의 추출방법을 확립함</li> </ul>
	전통 발효식품 및 유산균을 이용한 인삼발효에 따른 생화학적 변화	대규모로 전통식품으로부터 1차년도에 확립된 발효공정에 의한 인삼(뿌리, 잎) 발효	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 산업화 및 농가보급을 위하여 1, 2차년도에 확립된 유용균주를 인삼(뿌리, 잎)에 적용시켜 제1세부과제 및 참여기업에게 넘겨주었음.</li> </ul>
	발효 인삼을 이용한 제형개발 및 안정성	발효인삼(잎) 제형개발 발효인삼(잎) 응용제품개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 맞춤형 제형개발을 수행하였음</li> </ul>
		개발균주의 보존 및 배양기술 이전	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 개발균주의 보존 및 배양기술을 참여기업으로 이전하였음</li> </ul>
		판매 및 마케팅	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 식품, 화장품, 샴푸, 웰빙생활용품 등으로 개발한 후 마케팅</li> </ul>

### 제 2절 관련 분야에의 기여도

- 대부분 가공 인삼은 기존에 존재하는 진세노사이드의 함량이나 종류에 한계성을 지니고 있음. 그러나 이 발효 홍삼은 기존의 미량으로 존재하는 진세노사이드의 함량을 높여 좀 더 약리효능에 기대치를 높여주며 아토피 억제 활성화에 있어서도 향후에 커다란 기여를 할 것으로 판단됨.
- 수삼 뿐만 아니라 인삼잎과 꽃봉오리로 부터 얻어진 발효 홍삼은 그동안 대부분이 버려지고 있던 인삼 지상부를 소재로 우량균주의 처리를 통하여 새로운 가공 인삼 분야에 커다란 영향력을 제시 할 수 있을 것이라 판단됨.
- 본 과제를 통하여 특정 진세노사이드의 대량 생산을 통해 유효 성분의 연구효율을 높일수 있다고 기대함

## 제 4 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절. 실용화 · 산업화 계획

- 수삼 및 인삼잎과 인삼 꽃봉오리를 이용한 발효 홍삼의 개발은 기존에 없는 사포닌의 생성과 약리 효능을 증가 시키는 역할을 할 수 있음
- 발효 홍삼에는 흑삼에만 존재하는 ginsenoside Rg5와 홍삼에 존재하는 (S)-, (R)-ginsenoside Rg3가 다량 존재함으로써 유효 약리성분을 이용한 산업화의 개발에 유용함.
- 아토피억제 효과를 나타내는 발효 홍삼은 그에 존재하는 단일물질 (S)-ginsenoside Rg3의 역할이 아토피 억제 활성이 있음. 그 역할을 주요 활성으로 발효 홍삼의 항아토피 제품의 개발 가능성이 있음.
- 기술이전 한 참여기업 비단피 공장에서 상품화하기 위하여 인삼 100 kg을 준비하여 발효공정에 투입하였음. 사용균주는 1차년도에 분리한 *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 이고, 현재 산업화에 이용하여 발효홍삼의 농축을 이용하여 파우치 형태의 상품의 생산이 진행되고 있음.
- 특히 출원된 신규한 패니바실러스 속 엠비티 213는 선택적으로 Rb1을 Rd로 전환시키는 균주로서 분리된 신규 균주에 의한 발효홍삼을 현재 참여기업에 기술이전 협의 중이며 향후 제품화 할 것임.

### 2절. 교육지도, 홍보, 특허, 지적재산권 확보 계획

#### 1. 발효 인삼의 미생물 동정에 관련된 학회 포스터

가. Microorganism Screening from Mare's Milk with  $\beta$ -glucosidase activity and Hydrolysis of Saponin of Korean Ginseng -2012년 한국축산식품학회

나. Biotransformation of ginsengs in *Panax ginseng* (Korean Ginseng) by beta-glucosidase extracted from *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 in Korean Kimchi -2012년 International Food Technology

다. Fermentation characteristics of *Panax ginseng* by *Lactobacillus paraplantarum* 17 -2013년 한국축산식품학회

라. Fermentation characteristics of *Panax ginseng* by *Leuconostoc cetrium* 38 - 2013년 한국축산식품학회

마. Fermentation characteristics of *Panax ginseng* by *Enterococcus faecalis* CRNB-A3 -2013년 한국축산식품학회

## 2.. 발효 인삼의 미생물 동정과 발효에 의한 사포닌 전환에 관련된 특허

### ◆ 특허출원 5건;

- 1) 인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 출원번호 : 10-2010-0029649,
- 2) 인삼 발효능을 갖는 신규 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 출원번호 10-2011-0043206, (충남대학교산학협력단)
- 3) 락토바실러스 플랜타럼 시알엔비-22를 이용하여 발효한 발효인삼을 함유하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물, 10-2012-0045101,
- 4) 엔테로코커스 패칼리스 시알엔비-에이3를 이용하여 발효한 발효인삼을 함유하는 아토피 예방 또는 치료용 조성물, 10-2012-0045101,
- 5) 신규한 패니바실러스 속 엠비티213 균주, 이를 이용한 발효인삼 및 이를 이용한 발효인삼 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물, 출원번호 : 10-2013-0090695

## 3. 발효 인삼의 미생물 동정 및 발효에 의한 사포닌 전환 관련 논문

### ◆ 논문투고 2건;

- 1) 흑삼의 신생혈관 억제활성에 대한 연구; 대한분초학회지,26(3), 83-90 (2011)
- 2) 흑삼의 아토피 억제활성에 대한 연구; 대한피부미용학회지, 10(1), 91-97(2012),

### ◆ 논문투고 중 2건;

- 1) Identification of  $\beta$ -glucosidase activity of *Lactobacillus plantarum* CRNB-22 in Kimchi and its potential in conversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> from *Panax ginseng*; Journal of Agricultural and Food Chemistry
- 2) 발효균주에 의한 선택적 Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 전환된 발효 홍삼과 그의 아토피 억제 효과 ; 대한피부미용학회지에 투고 하였음

## 4. 기술이전 1건 : 비단피

- ◆ 인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 [KCTC 11931BP] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환방법(출원번호 : 10-2011-0043207), 비단피농업법인으로 일금 30,000,000원에 기술이전 하였음(2012.4.30).

## 5. 시제품 개발 1건

- ◆ 충남대학교 발효홍삼 클래스-제조원 : 비단피농업법인(주)

# 기술이전계약서

기술의 명칭 : “인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼  
CRNB-22 [KCTC11931 BP] 균주 및  
이를 이용한 사포닌 전환 방법”  
(출원번호 : 10-2011-0043207)

2012. 4. 30

갑 : **충남대학교 산학협력단**  
을 : **비단외농업법인**

# 기술이전계약서

충남대학교산학협력단(이하 "갑"이라 한다)은 비단외농업법인(이하 "을"이라 한다)에게 "갑"이 개발하여 보유하고 있는 기술을 제공하고 산업화를 촉진하기 위하여 "을"에게 통상실시권을 허여한다. 이에 (갑)과 (을)은 다음과 같이 합의하고 계약을 체결한다.

○ 이전 기술명 : “ 인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 [KCTC11931 BP] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법 “  
(출원번호 : 10-2011-0043207)

○ 기술이전료 (VAT별도 : 이하 동일)

①고정 기술료(Fixed payment) : 금삼천만원정(₩30,000,000원)

- [ 1차 기술료 ] : 금삼백만원(₩3,000,000원)

- [ 2차 기술료 ] : 금이천칠백만원(₩27,000,000원)

②경상 기술료(Running royalty)

: 상기 실시 허락 대상 기술이 적용된 "본 기술이 적용된 원료 및 함량이 표시된 제품"의 국내 및 해외 현지법인의 전년도(1월1일 ~ 12월31일 기준) 총매출액의 (1)%

○ 기술사용기간 : 2012년4월27일 ~ 2017년4월26일(5년간)

○ 기술사용범위 : 대한민국 특허법 제2조 제3호의 행위

○ 기술사용지역 : 대한민국 전역 및 (을)의 해외현지법인이 설립된 국가로서 (갑)과 (을)이 합의하는 국가

○ 계약 당사자

갑 : 충남대학교산학협력단

( 단 장 감 용 )

을 : 비단외농업법인

( 대표 이사 정 해 일 )





## 제 5 장. 참고문헌

1. Il Ho Park, Sang Beom Han, Jong Moon Kim, Longzhu Piao, Sung Won Kwon, Na Young Kim, Tak Lim Kang, Man Ki Park, and Jeong Hill Park, Four New Acetylated Ginsenosides from Processed Ginseng (Sun Ginseng), *Arch Pharm Res* Vol 25, No 6, 837-841, 2002
2. Il Ho Park, Na Young Kim, Sang Beom Han, Jong Moon Kim, Sung Won Kwon, Hyun Jung Kim, Man Ki Park, and Jeong Hill Park, Three New Dammarane Glycosides from Heat Processed Ginseng, *Arch Pharm Res* Vol 25, No 4, 428-432, 2002
3. Shin Il Kim, Jeong Hill Park, Jae-Ha Ryu, Jong Dae Park, You Hui Lee, Jae-Hyun Park, Tae-Hee Kim, Jong Moon Kim, and Nam-In Ba. Ginsenoside Rg, A Genuine Dammarane Glycosides from Korean Red Ginseng, *Arch Pharm Res* Vol 19, No 5, 551-553, 1996
4. Lee YY, Lee S, Jin JL, Yun-Choi HS. Platelet anti-aggregatory effects of coumarins from the roots of *Angelica genuflexa* and *A. gigas*. *Arch Pharm Res*. 2003;26:723-726.
5. Wen JJ, Gupta S, Guan Z, Dhiman M, Condon D, Lui C, et al. Phenyl-a-tert-butyl-nitron and benzonidazole treatment controlled the mitochondrial oxidative stress and evolution of cardiomyopathy in chronic chagasic rats. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(22):2499-2508.
6. Arif IA, Khan Haseeb A. Environmental toxins and Parkinson's disease : putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. *Toxicology and Industrial Health*. 2010;26(2):121-128.
7. Pellegrini M, Baldari CT. Apoptosis and oxidative stress -related diseases: the p66 Shc connection. *Current Molecular Medicine*. 2009;9(3):392-398.
8. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit. Care Med*. 2005;33:498-501.
9. Malle E, Marsche G, Arnhold J, Davies MJ. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;1761:392-415.
10. Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, Kawakami Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem Mol. Biol. Int*. 1997;42:361-370.
11. Folin AD, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *Biol. Chem*. 1995;22:305-308.
12. Oi N, Jeong CH, Nadas J, Cho YY, Pugliese A, Bode AM et al. Dong Z. Resveratrol, a red wine polyphenol, suppresses pancreatic cancer by inhibiting leukotriene a4 hydrolase. *Cancer Res*. 2010;70(23):9755-64.
13. Shen JL, Man KM, Huang PH, Chen WC, Chen DC, Cheng YW, et al. Honokiol and magnolol as multifunctional antioxidative molecules for dermatologic disorders. *Molecules*. 2010;15(9):6452-65.

14. Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S, et al.
15. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 2002;54:419-423.
16. Kang KS, Kim HY, Baek SH, Yoo HH, Park JH, Yokozawa T., Study on the hydroxyl radical scavenging activity changes of ginseng and ginsenoside-Rb2 by heat processing. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(4):724-8.
17. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines. *Agric. Biol. Chem.* 1987;51:1333-1338.
18. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry.* 1993;33:557-561.
19. Park SW, Chung SK, Park JC. Active oxygen scavenging activity of luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. *Korean Soc Food Sci Nutr.* 2000;29:106-110

## 주 의

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