

발간등록번호

11-1543000-002734-01

산양삼 가공 소재 및 생물전환 산양삼을 활용한 비만유래 만성대사질환 개선 제품 개발 최종보고서

2019. 06. 05.

주관연구기관 / (주)네추럴웨이
위탁연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 경희대학교
협동연구기관 / 단국대학교
협동연구기관 / 경희대학교

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “산양삼 가공 소재 및 생물전환 산양삼을 활용한 만성대사질환 개선 제품 개발”(개발기간 : 2016.07.07 ~ 2018.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 05. 03.

주관연구기관명 : (주)네추럴웨이 (대표자) 최종현 (인)
협동연구기관명 : 경희대학교 (대표자) 이범석 (인)
협동연구기관명 : 단국대학교 (대표자) 김철현 (인)
협동연구기관명 : 경희대학교 (대표자) 이범석 (인)
위탁연구기관명 : 서울대학교 (대표자) 윤의준 (인)

주관연구책임자 : 이근
협동연구책임자 : 백무열
협동연구책임자 : 이형재
협동연구책임자 : 김우기
위탁연구책임자 : 허철성

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	3
2. 연구수행 내용 및 결과	10
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	163
4. 연구결과의 활용 계획 등	163
붙임. 참고 문헌	

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 국산 산양삼의 활용도 증진을 위한 산양삼의 물리적 및 생물학적 가공기술 개발로 다양한 식품소재 개발 및 산양삼 가공소재를 활용한 고기능성 산양삼 식품 개발

1-2. 연구개발의 필요성

○ 국민소득의 향상에 따른 생활수준의 상승과 고령화로 인한 건강지향 욕구 증대로 소비시장에서 건강증진 기능성 생리활성 소재의 공급이 확대되고 있으며 고급화된 소재의 업체 수요가 꾸준히 증가함

○ 2004년 건강기능식품 제도 도입 이후 처음으로 2010년 건강기능식품 생산액이 1조원을 돌파했으며 꾸준한 성장세를 지속하고 있음. 특히 개별인정형 제품의 경우 더욱더 빠른 성장률을 보이며 성장하고 있음. 따라서 새로운 기능성 소재를 필요로 하는 바이오기능성식품 시장이 지속적으로 성장할 것으로 예측됨

○ 본 연구과제에서는 기존 산양삼 원물 또는 증숙을 통한 홍삼화된 소재 대신, 이전에 시도되지 않았던 팽화 및 초고압 등 물리적 가공 또는 효소를 이용한 생물전환을 통해 산양삼의 기능성을 극대화하고, 이를 활용 만성 대사성 질환 개선 제품의 개발을 통해 산양삼 관련 기존 제품과는 차별화된 제품을 생산할 수 있을 것임

○ 산양삼 가공 제품의 기능성을 극대화 시키기 위하여 필수적인 팽화 및 초고압처리 등의 물리적 가공방법 및 효소를 이용한 생물전환법을 정립하여 산양삼 유효 성분의 전환 관련 기술을 확보 가능할 것임

○ 산양삼 재배 농가 소득수준의 향상과 관련 제조업의 확대를 유도하기 위하여 산양삼의 효능이 극대화된 다양한 형태의 관련 제품을 개발을 통해 기존 제품과는 다른 개념의 고기능성 제품을 개발하는 것이 가능함

○ 이를 통해 산양삼 가공 고부가가치식품의 국내 및 세계 시장을 개척 및 확대하기 위하여 본 연구의 진행이 매우 중요한 역할을 할 것임

○ 천연물 유래 기능성 물질 필요성

- 식생활의 변화에 따른 만성질환의 증가에 있어서, 의약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 만성질환의 예방 및 완화를 통한 건강 증진을 위한 방법으로 기능성 식품에 대한 요구가 커지고 있음
- 이에 따라, 식품의 기능중 전통적 1차 기능인 영양의 공급을 통한 생명유지의 목적과 2차 기능인 관능적(기호적) 목적에 더불어, 3차 기능으로서 생체 방어, 생체리듬의 조절, 비만 방지, 노화 억제, 만성염증의 예방 및 회복 등의 목적으로서의 식품연구가 필요함
- 국제적인 추세를 볼 때, 일본은 기능성 식품을 통한 식품 산업계를 주도하고 있으며, 미국도 새로운 산업으로 designer foods(생체 기능을 조절할 수 있는 식품)의 가능성을 인식하고 있음
- 따라서, 국내 환경에 적합한 유용 천연자원을 활용한 소재의 탐색 및 제형의 개발에 관한 협동연구의 필요성이 대두됨
- 이에 관하여, 한방에서 오랜 기간 사용되어온 생약유래의 천연물들에 대한 관심이 커져

왔으나, 체계적인 제조, 품질관리, 유효기간 및 사용상의 주의사항 등 과학적인 근거의 미비로 인한 오남용에 대한 대처가 시급함

- 따라서, 안전성 및 안정성이 뛰어난 천연물을 이용하여 체중조절 기능을 갖추면서도 부작용의 위험이 거의 없는 기능성물질을 발굴 개발하여 대사성증후군(metabolic syndrom)의 예방 및 완화 기작을 밝히는 연구가 활발히 진행되고 있음
- 천연물을 활용한 항비만 소재 중 식욕억제에 관여하는 물질로서 녹차의 caffeine과 catechin, 캄보지아 껍질에서 분리된 hydroxycitric acid(HCA), Olibra, 치커리, 이눌린 등의 식이섬유 등이 있으며, 지방의 소화 및 흡수를 저해하는 물질로서 키토산, 보리의 글루칸(β -glucan), flavonoids 등이 있음

○ 의약품 유래 비만치료제의 한계

- 비만 치료를 위한 합성 의약품 유래 비만 치료제의 문제점에도 불구하고 비만인구의 증가와 함께 비만치료제의 수요는 급격하게 증가하고 있는 실정임
- 비만의 근본적인 치유 방법은 식습관을 건전하게 개선하며 규칙적인 운동량을 증가시켜서 체중을 감량하는 것이 필요하나 약물치방이나 외과적 수술요법을 병행하여 비만을 예방·치료하고 있음
- 비만치료제는 여러 작용기전에 따라 개발되고 있지만 현재 시판되고 있는 비만 치료제는 sibutramine과 같이 중추신경계에 작용하여 식욕을 억제시키거나 orlistat 제제와 같이 지방의 소화를 억제하여 체외로 배출하는 약물이며 위장장애, 복부팽만, 구갈, 불면증, 두통, 혈압상승 등의 부작용을 야기한다고 보고되고 있고, 일부는 항정신성 의약품으로 분류되어 있음
- Orlistatsms 지방분해 효소 억제제로 섭취한 지방의 약 30%가 흡수되지 않고 배설되거나 부작용으로 잦은 대변감, 지방변 등이 나타나며 지방흡수율의 감소로 지용성비타민의 흡수율이 떨어질 수 있음
- 또한 최근까지 사용되던 sibutramine(Reductil)과 remonabant(Acomplia)가 자살충동, 우울증, 심혈관 문제등으로 퇴출되었고, 시판되고 있는 약물들도 잠재적 위험성을 가지고 있음



- Sibutramine 제제의 판매 중단 조치로 인한 소비자들의 불안감이 증가하고 있으며 해외 다이어트 제품 중 사용 금지 의약품 성분이 검출되어 판매중지된 제품들도 있음
 - 따라서 오랫동안 식품과 약재로 사용되어 안전성이 확보된 식용 및 약용 작물로부터 체중조절에 효과적이면서 부작용이 적은 기능성물질을 찾아내어 작용기전에 따라 건강 식품이나 의약품으로 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있음
- 안전하면서도 저렴한 다이어트 제품에 대한 요구도 증가
- 항비만에서 유일한 생리활성기능 1등급 원료인 가르시니아 캄보지아 껍질 추출물의 경우 모두 수입에 의존하고 있음
 - 평창군의 산양삼특구 지정으로 인하여 안전하고 검증된 산양삼 가공물을 이용하여 비만억제 제품의 개발은 고무적이라 할수 있음
- 예방적 차원의 기능성 소재 개발에 대한 요구도 증가
- 우리나라를 비롯한 동양에서는 의식동원(醫食同原)이라 하여 식품과 약은 서로 같아 인체에서의 기능 역시 같다는 생각이 오랫동안 지배해 왔으므로 식생활의 개선이 병을 예방하고 치료할 수 있다는 것을 의미함
 - 이러한 예방적 의료개념은 비만이나 이로 인한 만성질환의 예방개념에서 의학계의 치료제의 개발 못지않게 부작용을 줄이면서 천연자원의 안전성을 이용한 이들 만성질환을 사전에 예방하거나 억제시킬 수 있는 기능성식품의 개발 및 적용을 위한 연구가 절대적으로 필요하다는 의미이기도 함
 - 발병 후 치료에 접근하는 방식과 달리 사전 예방적 차원에서 비만의 발달을 제어하는 효율적인 기능성 소재 개발이 필요함
 - 현재 효과적인 제어력을 갖는 예방적 차원에서의 기능성 소재 개발은 미흡하며, 특히 조절 신호전달 체계가 상세히 규명되지 않는 경우가 많아 관련 분야 연구가 절실함
- 체지방 감소 기능성 시장에서 신소재의 요구도 증가
- 지금까지 체지방 감소 기능성 건강기능식품 소재는 약 20여종 이며, 그중 시장 트렌드를 주도했던 원료는 잔티젠, CLA, 가르시니아 캄보지아, 마테추출물, 망고 추출물 등 5~6종임
 - 트렌드의 변화에 맞추어 신소재, 특히 국산 원료에서 유래한 신소재의 요구가 증가함에 따라, 본 산양삼 가공소재를 이용한 제품개발은 이에 대한 요구도에 매우 부합함
 - 상기 기술한 바와 같이, 평창군 재배 산양삼은 수급과 공급이 매우 원활하며, 수입에 의존하던 시장에서 새로운 변화를 줄 수 있는 소재로 가치가 높음
 - 본 국내산 원료의 산업화를 통하여, 해외 제품에 대한 경쟁력 제고에 큰 역할을 할 것으로 보이며, 나아가 국내 농가 경제의 건실화를 이끌어, 갈수록 자국 원료 보호 정책이 심해지는 세계정세에서 국내 건강기능식품 산업이 나아가야 하는 방향을 제시할 수 있는 원료라고 생각됨

1-3. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	산양삼 가공 소재 및 생물전환 산양삼을 활용한 비만유래 만성대사질환 개선 제품 개발	주관연구책임자 이근 외 총 16명

기관 별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
중소기업	1	3
대 학	4	14

주관연구기관 (주)네추럴웨이	제1협동 (경희대학교)	제2협동 (단국대학교)	제3협동 (경희대학교)
고기능성 산양삼 가공소재의 원료 표준화 및 제품화	팽화 및 초고압처리의 단행 또는 병행처리 한 유효성분 함량 극대화된 산양삼 소재 개발	생물전환을 통한 유효성분 함량 극대화된 산양삼 소재 개발	산양삼 가공 단계별 표준화 소재 및 제품의 비만유래 만성대사질환 조절 평가 및 메커니즘 구명
이근 외 2명	백무열 외 2명	이형재 외 2명	김우기 외 3명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> • 기능성 소재의 대량 생산을 위한 공정 확립 (scale up 확립 및 공정도 작성) • 시제품 제작: 원료 및 제품의 표준화를 통한 다양한 제형의 시제품 개발 • 개발 산양삼 소재를 적용한 고기능성 제품 생산 • 제품화를 위한 가공, 관능검사 및 저장 안정성 평가 • 제품 제작: 포장, 디자인 등 준비 • 판매전략 수립, 홍보 	<ul style="list-style-type: none"> • 산양삼의 최적 팽화처리 조건 확립 • 산양삼의 최적 초고압처리 조건 확립 • 최적 팽화처리 조건 및 최적 초고압처리 조건의 복합처리를 통한 유효성분 극대화 	<ul style="list-style-type: none"> • 산양삼 및 생물전환 산양삼의 추출, 기능성 분석 • 산양삼 생물전환: 시판효소 적용 생물전환 조건 확립 • 생물전환 산양삼의 일반성분, 기능성 분석(항산화능, 총페놀함량 등) • 생물전환 산양삼의 유효 성분변화 측정: ginsenoside profiling • 산양삼 가공소재 기반 제품 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 처리농도별 세포생존률 측정을 통한 세포독성평가 • 지방세포의 지방축적능 평가 • 대식세포의 대식기능, 활성화마크 및 사이토카인분비량 평가 • 고지방식이 섭취 생쥐의 비만, 혈중지질마크, 당노, 염증성 사이토카인 분비량 평가 • 고농도 식이를 통한 독성평가

위탁연구기관 (서울대학교 산학협력단)
산양삼 원료 연구 및 유산균 발효 가공법 개발
허철성 외 3명
담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> • 평창지역 원료 산양삼 수급 • 평창지역 산양삼 현황 및 정보조사 • 산양삼 발효 유산균의 선발 • 산양삼 발효 프로바이오틱 개발

1-4. 추진일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	• 가공 산양삼의 제품소재로서의 원료 표준화							■	■	■	■	■	■	■	22,500	이근 (주관:(주) 네추럴웨이)
2	• 원료 산양삼 수급							■	■	■	■	■	■	■	6,000	허철성 (위탁: 서울대학교)
3	• 산양삼 현황 및 정보조사							■	■	■	■	■	■	■	4,000	
4	• 수분함량별 산양삼의 최적 팽화처리 조건 확립							■	■	■	■	■	■	■	11,500	백무열 (제1협동:경 희대학교)
5	• 팽화압력별 산양삼의 최적 팽화처리 조건 확립									■	■	■	■	■	11,000	
6	• 산양삼 일반성분 분석: 추출 및 분석							■	■	■	■	■	■	■	4,000	이형재 (제2협동:단 국대학교)
7	• 산양삼의 기능성 기본 분석: 추출 및 분석								■	■	■	■	■	■	5,000	
8	• 산양삼의 유효성분분석: ginsenoside profiling									■	■	■	■	■	6,000	
9	• 산양삼 최적 효소처리조건 탐색							■	■	■	■	■	■	■	7,500	
10	• 세포주 안정화							■	■	■	■	■	■	■	2,000	김우기 (제3협동:경 희대학교)
11	• 지방세포 지방축적능 측정								■	■	■	■	■	■	4,500	
12	• qRT-PCR을 이용한 지질축적 인자 발현량 측정									■	■	■	■	■	6,000	
13	• 대식세포의 대식능 및 활성화마커 측정										■	■	■	■	4,000	
14	• 대식세포의 사이토카인 분비능 측정												■	■	6,000	

2차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	- 중간원료로서 물질 안정성 및 타 소재내에서의 물성, 가공적성 검토 및 제형별 시제품화 경우 저장적성 검토														12,750	이근 (주관:(주) 네추럴웨이)
2	- extract, 기호음료, tablet, capsule 형태로 시제품 제작														25,500	
3	• 산양삼 발효 유산균 선발														10,000	허철성 (위탁: 서울대학교)
4	• 산양삼 소재 내 성장성 평가														7,000	
5	- 산양삼의 유효성분 증진을 위한 최적 처리 압력 조건 확립														19,250	백무열 (제1협동:경 희대학교)
6	- 산양삼의 유효성분 증진을 위한 최적 처리시간 조건 확립														19,000	
7	• 산양삼 최적 생물전환조건 확립														12,000	이형재 (제2협동: 단국대학교)
8	• 생물 전환 산양삼 일반성분 분석														7,250	
9	• 생물 전환 산양삼 유효성분 분석														19,000	
10	• 가공소재의 지방구 제어능 평가														8,000	김우기 (제3협동: 경희대학교)
11	• 가공소재의 대식능 제어 평가														8,000	
12	• 가공소재의 사이토카인 분비 억제 평가														8,000	
13	• 가공소재의 활성마커 제어 평가														8,250	
14	• 가공소재의 세포독성 평가														6,000	

3차년도															연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	고기능성 산양삼 가공소재 기반 제 품 생산	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	33,250	이근 (주관:(주) 네추럴웨이)
2	판매전략 계획 수 립, 제품 홍보, 포 장 및 디자인 개발 및 적용										■	■	■	■	5,000	
3	• 발효 프로바이오틱스 특성 분석	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	허철성 (위탁: 서울대학교)
4	• 발효 프로바이오틱스 선발			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7,000	
5	- 최적조건의 팽화 후 초고압처리 synergistic 효과 분석	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19,250	백무열 (제1협동:경 희대학교)
6	- 최적조건의 초고압처리 후 팽화 synergistic 효과 분석					■	■	■	■	■	■	■	■	■	19,000	
7	• 산양삼 가공소재 기반 제품 분석	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	18,000	이형재 (제2협동: 단국대학교)
8	• 제품의 주요 기능성 성분 분석을 통한 제품의 고기능성 연구					■	■	■	■	■	■	■	■	■	20,250	
9	• 고지방식이 비만마우스 급여	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8,000	김우기 (제3협동: 경희대학교)
10	• 혈중 사이토카인 분석			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8,000	
11	• 혈중 콜레스테롤 분석					■	■	■	■	■	■	■	■	■	8,000	
12	• 혈당 및 혈중 인슐린 분석							■	■	■	■	■	■	■	8,250	
13	• 보고서 및 논문 작성										■	■	■	■	6,000	

2. 연구수행 내용 및 결과

○ 연차별 개발목표 및 내용

가. 1차년도

[제1세부 : (주)네추럴웨이]

개발목표: 제품화를 위한 고기능성 산양삼 가공소재의 산업적 활용

개발내용:

- 산양삼의 제품소재로서의 원료 표준화 연구
 - : Bench scale의 추출 최적조건 및 plot plant scale의 추출공정 탐색
- 용매추출(solvent extraction) 조건 연구
 - 식물추출 방법에는 일반적으로 사용되는 용매추출법(물, 주정)을 사용하여 추출. 실험실 단위에서 조추출물 제조 시 식품첨가물공전에서 정하고 있는 기준 및 규격에 적합한 용매 선정
- 공업적 순도수준의 정제방법 연구
 - 추출용매의 선정, 추출온도 설정, 용매비율 설정, 추출시간 설정, 추출 횟수 선정, 건조방법 설정, 분말 및 액상화 설정

[위탁연구기관: 서울대학교]

개발목표: 산양삼의 재배면적, 품종, 재배수확현황, 농가현황 조사

개발내용:

- 산양삼 현황 조사 (평창농업기술센터 협조)
 - 평창 산양삼 특구 농가별 씨앗 밭아에서 식재까지의 현황, 수확율, 질병현황, 수확 후 판매형태와 현황 등을 평창농업기술센터의 협조 조사
- 산양삼 생산기반구축: 과제 성공 시, 생산농가와 밀접한 관계성립을 통한 신뢰성 높은 생산기지 구축

[제1협동연구기관: 경희대학교]

개발목표: 산양삼 유효성분의 극대화를 위한 최적 팽화조건 확립

개발내용: 수분함량별, 팽화처리 압력별 산양삼의 유효성분의 변화 연구

- 수분함량 (5-15%), 팽화압력 (5-9 Kgf)에 따른 최적 팽화조건 확립
- 팽화처리 산양삼의 일반성분 분석
 - 수분 : AOAC Method로 분석
 - 조단백 : 킬달법으로 분석
 - 조지방 : 속실헬법으로 분석
 - 회분 : 회화로를 이용하여 분석
 - 환원당 : DNS 법으로 분석
- 팽화처리 산양삼의 유효성분 분석
 - 추출수율 : 추출 후 건조물의 무게로 추출수율 분석
 - 조사포닌함량 : 수포화 부탄올을 이용하여 조사포닌 분리 후 무게로 분석

- 항산화능 : DPPH radical scavenging activity 측정
- 총페놀 : Total Phenolic content(TPC)를 비색법으로 분석
- 진세노사이드 프로파일 분석 : HPLC를 이용하여 분석

[제2협동연구기관: 단국대학교]

개발목표: 산양삼 유효성분의 극대화를 위한 최적 생물전환조건 탐색

개발내용:

- 산양삼 일반성분분석
 - 수분함량: AOAC method로 분석
 - 조단백: 킬달법으로 분석
 - 조지방: 속실텟법으로 분석
 - 조회분: 회화로를 이용하여 분석
 - 환원당: DNS 법으로 분석
- 산양삼 유효성분 분석
 - 추출수율: 추출 후 건조물의 무게로 추출수율 분석
 - 조사포닌함량: 수포화 부탄올을 이용하여 조사포닌 분리 후 무게로 분석
 - 항산화능: DPPH radical scavenging activity 측정
 - 총페놀: Total Phenolic content(TPC)를 비색법으로 분석
 - 진세노사이드 프로파일 분석: HPLC를 이용하여 분석
- 산양삼의 효소처리를 통한 최적생물전환 조건 탐색: 기반 연구
 - Novozyme, Megazyme 등 주요효소업체의 beta-glucanase 등 시판효소 처리 조건 탐색
: 처리시간, 산양삼 대비 효소 첨가량, 온도 등 최적 생물전환 조건 탐색
 - 진세노사이드 프로파일 분석: 처리조건 별 유효 진세노사이드 변화 탐색

[제3협동연구기관: 경희대학교]

개발목표: 산양삼 원료의 항비만 및 항염증 효과 in vitro 검증

개발내용:

- 산양삼 원료의 수급 및 추출조건별 샘플 확보
 - 본 과제를 위하여 정보 협력 지원 서약서를 체결한 평창군 농업기술센터를 통하여 2-3년근 산양삼을 수매하여, 수세 후 주정 및 물 추출물을 제조하여 냉동보관함
- 3T3-L1 지방세포에 미치는 영향 검증
 - 3T3-L1 세포의 MTT assay 및 annexin-V 염색을 통하여 추출물의 농도별 처리에 따른 세포독성을 측정하여 세포수준에서의 사용가능량을 탐색함
 - 추출물의 농도별 처리 후, 3T3-L1 세포를 지방세포 분화배지에 배양하여 Oil-Red-O 염색을 통한 지방구의 지방축적 측정
 - 추출물이 처리된 3T3-L1 지방세포의 분화 배양액 내 adipokine을 ELISA법으로

측정하여 지방세포유래 대사질환 지표인자(TNF- α , IL-6 등)의 생성억제를 확인함

- RAW264.7 대식세포를 이용한 항염증 효과 검증

- 추출물의 농도별 처리 후, 형광 Beads의 공배양 중 대식기능을 FACS를 통하여 측정함
- LPS를 이용하여 대식세포를 활성화 할 때, 추출물을 농도별로 처리하여 세포배양 상층액 내의 사이토카인 분비량을 ELISA법으로 측정, 염증성 매개물의 분비량 억제능을 평가함
- 추출물의 농도별 처리 후, 형광항체를 이용한 대식세포 활성화마커 단백질(MHC-II, CD80)을 FACS법으로 측정하여 대식세포의 활성화도를 평가함
- 추출물 처리 및 LPS에 의한 활성화 대식세포를 회수하여 Qiagen kit를 이용하여 RNA를 추출 및 정량 후, qRT-PCR법을 이용하여 염증성 유전자(iNOS, COX-2)의 발현량을 확인함

나. 2차년도

[제1세부 : (주)네추럴웨이]

개발목표: 기능성제품 소재로의 개발 산양삼 소재의 산업적 활용

개발내용:

- 가공 산양삼의 제품소재로서의 원료 표준화 확립
 - 원재료 유사종 확인: 제품개발에 사용하고자 하는 식물의 정확한 종을 파악하여 원재료로 사용
 - 원재료 부위 확인: 원재료의 사용 부위를 명확히 하여 제품 개발에 적용
 - 원산지 확인: 수급이 장기적으로 가능한 지역(평창)을 선정하여 효능이 동일하도록 표준화
 - 채취시기 확립 : 제품개발 초기에 사용된 원료와 일정시간이 흐른 후 새롭게 채취된 기능(지표)성분 함량변이 및 추출물의 활성을 확인
- 고기능성 산양삼 소재의 산업적 활용 및 가공적성 확인
 - 중간원료로서 물질 안정성 및 타 소재들 내에서의 물성, 가공적성 검토
 - 액상, granule, tablet, capsule 형태의 시제품화 시 저장적성 검토
 - 시작품 제작: Extract, 기호음료, tablet, capsule 제형 개발

[위탁연구기관: 서울대학교]

개발목표: 산양삼 발효 유산균의 선발

개발내용:

- 산양삼 발효 유산균 선발
 - 평창지역 유래 나물, 약재, 김치로부터 자연 유산균을 이용 산양삼의 ginsenoside를 compound K로의 전환능을 가진 유산균 선발
 - beta-glucosidase활성을 선발지표로 활성이 높은 균주 DB 구축. 산양삼 소재 내

성장성 평가

[제1협동연구기관: 경희대학교]

개발목표: 산양삼 유효성분의 극대화를 위한 최적 초고압 처리조건 확립

개발내용:

- 압력 (100-550 MPa), 용매비율에 따른 최적 초고압 처리조건 확립
- 주정추출 및 열수추출 등 일반적인 추출방법과 초고압처리 추출방법의 비교 분석
- 초고압처리 산양삼의 유효성분 분석
 - 추출수율 : 추출 후 건조물의 무게로 추출수율 분석
 - 조사포닌함량 : 수포화 부탄올을 이용하여 조사포닌 분리 후 무게로 분석
 - 항산화능 : DPPH radical scavenging activity 측정
 - 총페놀 : Total Phenolic content(TPC)를 비색법으로 분석
 - 진세노사이드 프로파일 분석 : HPLC를 이용하여 분석

[제2협동연구기관: 단국대학교]

개발목표: 산양삼 최적 생물전환조건 확립 및 생물전환 산양삼 성분 연구

개발내용:

산양삼 최적 생물전환조건 확립: 유효성분 극대화 최적 생물전환조건 확립

- Novozyme, Megazyme 등 주요효소업체의 beta-glucanase 등 시판효소 처리 : 처리시간, 산양삼 대비 효소 첨가량, 온도 등 최적 생물전환 조건 비교 분석
- 진세노사이드 프로파일 분석: 처리조건 별 유효 진세노사이드 변화 측정을 통한 최적 생물전환조건 확립
- 생물전환 산양삼 일반성분 분석
 - 수분함량: AOAC method로 분석
 - 조단백: 킬달법으로 분석
 - 조지방: 속실렛법으로 분석
 - 조회분: 회화로를 이용하여 분석
 - 환원당: DNS 법으로 분석
- 생물전환 산양삼 유효성분 분석
 - 추출수율: 추출 후 건조물의 무게로 추출수율 분석
 - 조사포닌함량: 수포화 부탄올을 이용하여 조사포닌 분리 후 무게로 분석
 - 항산화능: DPPH radical scavenging activity 측정
 - 총페놀: Total Phenolic content(TPC)를 비색법으로 분석
 - 진세노사이드 프로파일 분석: HPLC를 이용하여 분석

[제3협동연구기관: 경희대학교]

개발목표: 산양삼 가공 소재의 지방세포 지방축적 및 대식세포 활성화 억제 기작 연구

개발내용:

- 물리적 및 생물학적 산양삼 가공소재의 농도별 세포독성 평가
 - 제1협동 연구기관인 경희대학교에서 산양삼의 팽화 및 초고압을 통한 물리적 가공물의 추출물을 공급받아 이후에 기술된 연구방법을 통하여 1차년도 수행된 원료 추출물과의 효능차이를 비교분석함
 - 제2협동 연구기관인 단국대학교에서 산양삼의 효소적 생물전환을 통한 가공물의 추출물을 공급받아 아래와 같이 비교분석함
 - 주관연구기관의 위탁연구기관인 서울대학교로부터 산양삼의 생물학적 생물전환 가공물의 추출물을 공급받아 아래와 같이 비교분석함
- 3T3-L1 지방세포에 미치는 영향 검증
 - 3T3-L1 세포의 MTT assay 및 annexin-V 염색을 통하여 추출물의 농도별 처리에 따른 세포독성을 측정하여 세포수준에서의 사용가능량을 탐색함
 - 추출물의 농도별 처리 후, 3T3-L1 세포를 지방세포 분화배지에 배양하여 Oil-Red-O 염색을 통한 지방구의 지방축적 측정
 - 추출물이 처리된 3T3-L1 지방세포의 분화 배양액 내 adipokine을 ELISA법으로 측정하여 지방세포유래 대사질환 지표인자(TNF- α , IL-6 등)의 생성억제를 확인함
- RAW264.7 대식세포를 이용한 항염증 효과 검증
 - 추출물의 농도별 처리 후, 형광 Beads의 공배양 중 대식기능을 FACS를 통하여 측정함
 - LPS를 이용하여 대식세포를 활성화 할 때, 추출물을 농도별로 처리하여 세포배양 상층액 내의 사이토카인 분비량을 ELISA법으로 측정, 염증성 매개물의 분비량 억제능을 평가함
 - 추출물의 농도별 처리 후, 형광항체를 이용한 대식세포 활성화마커 단백질(MHC-II, CD80)을 FACS법으로 측정하여 대식세포의 활성화도를 평가함
 - 추출물 처리 및 LPS에 의한 활성화 대식세포를 회수하여 Qiagen kit를 이용하여 RNA를 추출 및 정량 후, qRT-PCR법을 이용하여 염증성 유전자(iNOS, COX-2)의 발현량을 확인함
- 산양삼 가공소재의 대식세포 항염증 효과 동물실험
 - 산양삼 가공소재를 제1,2 협동연구기관에서 제공받음
 - C57BL/6 마우스에 산양삼 가공소재를 사료에 배합하여 자유롭게 2주간 급여
 - 마우스의 골수로부터 monocyte를 회수한 후, 대식세포로의 분화도를 CD11b의 염색법을 통하여 평가함

3. 3차년도

[제1세부 : (주)네추럴웨이]

개발목표: 개발 산양삼 가공소재를 적용한 고기능성 제품 제작

개발내용:

- 고기능성 산양삼 가공소재 기반 제품 생산

- 가공, 품질 및 관능적 특성 평가
- 저장적성 및 안전성(물리, 화학적, 생물학적) 평가
- 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 시험
- 보존기준 유통기간 및 그 설정에 관한 시험
- 유해물질에 대한 규격 및 그 설정에 관한 자료
- 지표성분의 표준품 제조, 표준물질 안정성 시험
- 판매전략 계획 수립, 제품 홍보, 포장 및 디자인 개발 및 적용
 - 판매전략 계획수립: 타겟 소비층, 제품 유형 등 분석 및 판매전략으로의 적용
 - 포장, 디자인 개발: 소비자 이해도를 향상 및 제품 기호도 증진 전략 수립

[위탁연구기관: 서울대학교]

개발목표 : 산양삼 발효 프로바이오틱 개발

개발내용 및 범위 :

- 산양삼 발효 프로바이오틱 개발
 - 발효 프로바이오틱 특성 분석: 2차년도에 개발된 산양삼 발효우수 능력 유산균을 probiotics로서의 내산성, 장내 부착성, 담즙내성, 항생제 저항성, 성장속도 등 평가
 - 발효 프로바이오틱 선발: 산양삼 기능성을 상승시키는 프로바이오틱스 개발

[제1협동연구기관: 경희대학교]

개발목표: 산양삼 유효성분의 극대화를 위한 팽화 및 초고압 복합처리조건 확립

개발내용:

- 팽화 후 초고압처리 시료와 초고압처리 후 팽화 시료 제조 특성 분석
- 병행처리 산양삼의 유효성분 분석
 - 추출수율 : 추출 후 건조물의 무게로 추출수율 분석
 - 조사포닌함량 : 수포화 부탄올을 이용하여 조사포닌 분리 후 무게로 분석
 - 항산화능 : DPPH radical scavenging activity 측정
 - 총페놀 : Total Phenolic content(TPC)를 비색법으로 분석
 - 진세노사이드 프로파일 분석 : HPLC를 이용하여 분석
- 병행처리 산양삼의 시너지 효과 검증

[제2협동연구기관: 단국대학교]

개발목표: 산양삼 가공소재 기반 제품 분석

개발내용:

- 산양삼 가공소재 기반 제품 일반특성 분석
 - 색도분석: 색차계를 이용하여 분석
 - pH 분석: pH meter 이용 분석
 - 제형에 따른 분석: 조단백, 조지방, 조회분, 환원당 성분 등 분석
- 산양삼 가공소재 기반 제품 유효성분 분석: 주요 기능성 성분 분석을 통한 제품의 고기능성 연구

- 향산화능: DPPH radical scavenging activity 측정
- 총페놀: Total Phenolic content(TPC)를 비색법으로 분석
- 제품의 저장 중 안전성 평가
 - 저장 중 안전성 평가: 일반 및 식품위해미생물(세균, 효모, 곰팡이 등)

[제3협동연구기관: 경희대학교]

개발목표: 산양삼 가공 소재 및 제품의 식이급여를 통한 마우스 만성대사질환 개선 효과 구명

개발내용:

- 비만유래 대사질환 마우스 모델의 개발
 - C57BL/6 마우스의 전체 식이열량의 40%를 동물성지방(lard)으로 자유급여(ad libitum)하여 정상식이(NIH AIN-76A 식이)를 섭취한 마우스와의 비교를 통하여 대사질환 모델 확립
 - 마우스의 식이급여기간중 주차별 체중측정을 통한 체중증가량 확인
- 산양삼 가공 소재 및 제품의 식이급여를 통한 개선효과 검증
 - 2년차 연구내용에 기술된 바와 같이 제1,2협동연구기관 및 위탁연구기관으로부터 공급받은 물리적 및 생물학적 산양삼 가공소재를 생쥐의 식이에 배합하여 16주간 장기급여
 - 주관연구기관인 네추럴웨이로부터 개발제품을 공급받아 농도별로 생쥐의 식이에 배합하여 16주간 장기급여
 - 장기급여중 동물행동을 관찰하고 급여 후 간조직을 적출하여 독성평가를 실시하여 장기섭취에 따른 무독성을 검증함
 - 급여중 꼬리정맥으로부터 혈액을 매주 채취하여 혈장을 분리하여 냉동보관 후, 아래와 같은 혈액내 대사성질환 인자를 측정함
 - 상용 발색 kit를 이용하여 혈액내 공복혈당 및 인슐린 분리량 측정하여 대사성질환인 당뇨의 정도를 평가함
 - High-sensitive ELISA kit를 이용하여 혈장내 염증성 사이토카인 분비량 측정을 통하여 만성염증도를 평가
 - 상용 발색 kit를 활용한 혈액내 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤을 측정하여 지질대사의 정상화 여부를 판정함

○ 연구개발성과

가. 1차년도

성과목표	사업화지표										1연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	2	2		1	10	2	1,660				1	3	3	6	2	51		2	
1차년도	목표															17			
	실적												1			17			
달성율(%)														100		100			

1. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	(사)한국식품영양과학회	윤소정, 이상금, 이형재	2016.11.01	제주 icc 컨벤션	국내

2. 인력양성

No 1	분류	기준년도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	활용	2016	5	3	9		12	5	11	3				3

나. 2차년도

성과목표	사업화지표										1연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
최종목표	2	2		1	10	2	1,660				1	3	3	6	2	51		2	
2차 년도	목 표	1										1	1	3	1	17		1	
	실 적	1									2		2	6	1	6		1	
달성율(%)	100										100	100	100	100	50	35		100	

1. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	ISNFF 2017	나귀환	2017.10.24	군산GSCO	국내
2	(사)한국산업식품공학회	윤소정, 이형재	2017.11.02	강릉	국내
3	(사)한국산업식품공학회	최광수, 백무열	2017.04.21	서울대학교	국내
4	한국식품과학회	최광수, 백무열	2017.06.21	제주ICC	국내
5	(사)한국산업식품공학회	나귀환, 김우기	2017.04.21	서울대학교	국내
6	한국식품과학회	나귀환, 김우기	2017.06.21	제주ICC	국내

2. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	RAW264.7 대식세포주에서 근령별 산양삼 추출물의 항염증효과	산업식품공학	이근	21(3)	국내	한국산업식품공학회	비SCI	2017.08.31
2	연근별 산양삼의 일반성분 및 항산화 효과	산업식품공학	이근	21(3)	국내	한국산업식품공학회	비SCI	2017.08.31

Food Eng. Prog.
Vol. 21, No. 3, pp. 201-207 (2017.8)
DOI <https://doi.org/10.13050/foodengprog.2017.21.3.201>
ISSN 1226-4768 (print), ISSN 2288-1247 (online)



RAW264.7 대식세포주에서 근령별 산양삼 추출물의 항염증 효과

이근 · 나귀환^{1,2} · 김우기^{1,2} · 백무열^{1,2} · 이형재³ · 황재관*
연세대학교 생물소재공학협동과정, ¹경희대학교 식품생명공학과
²경희대학교 생명공학원, ³단국대학교 식품공학과

Anti-inflammatory Effect of Cultivated Wild *Panax ginseng* Extracts at Various Ages in RAW264.6 Macrophages

Geun Lee, Guihwan Na^{1,2}, Wooki Kim^{1,2}, Mooyeol Baik^{1,2}, Hyungjae Lee³, and Jae-Kwan Hwang*

Graduate Program in Biomaterials Science & Engineering, Yonsei University
¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University
²Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University
³Department of Food Engineering, Dankook University

Food Eng. Prog.
Vol. 21, No. 3, pp. 208-214 (2017.8)
DOI <https://doi.org/10.13050/foodengprog.2017.21.3.208>
ISSN 1226-4768 (print), ISSN 2288-1247 (online)



연근별 산양삼의 일반성분 및 항산화 효과

이근 · 최광수¹ · 이주열¹ · 윤소정² · 김우기¹ · 이형재² · 백무열¹ · 황재관*
연세대학교 생물소재공학협동과정, ¹경희대학교 식품생명공학과, ²단국대학교 식품공학과

Proximate Analysis and Antioxidant Activity of Cultivated Wild *Panax ginseng*

Geun Lee, Gwang-Su Choi¹, Ju-Yeol Lee¹, So-Jung Yun², Wooki Kim¹,
Hyungjae Lee², Moo-Yeol Baik¹, and Jae-Kwan Hwang*

Graduate Program in Biomaterials Science and Engineering, Yonsei University
¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University
²Department of Food Engineering, Dankook University

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	컴파운드K의 함량이 증가된 팽화 산양삼의 제조방법	국내	경희대학교 산학협력단	2017.11.06.	10-2017-0146844				100%

관인생략

출원번호통지서

출원 일자 2017.11.06
 특 기 사 항 심사청구(우) 공개신청(우)
 출원 번호 10-2017-0146844 (접수번호 1-1-2017-1099435-58)
 출원인 명칭 경희대학교 산학협력단(2-2004-007362-3)
 대리인 성명 김연권(9-2003-000399-0)
 발명자 성명 백두열 김병용 최광수
 발명의 명칭 컴파운드 K의 함량이 증가된 팽화 산양삼의 제조방법

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경장), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받으려는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허마당-PCT마드리드>
 ※ 우선권 인정기간 : 특허 실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원권 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국계상표이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

4. 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	양성	2017	1	5			4	2	3	1			2

5. 기술인증

No	인증명	인증기관	인증일
1	지리적표시 등록증	산림청	2017.06.12
2	GAP 농산물우수관리인증서	유기농업기사인증평가원	2017.09.04



지리적표시 등록증
CERTIFICATION OF KOREA PROTECTED GEOGRAPHICAL INDICATION

1. 등록번호 : 제55호
(REGISTRATION NUMBER)

2. 등록품목 : 산양삼
(TYPE OF PRODUCTS)

3. 등록 명칭
(REGISTRATION NAME)

- 한 글: (IN KOREAN) : 평창산양삼
- 영 문: (IN ENGLISH) : PyeongChang Wild-cultivated Ginseng

4. 대상지역 : 행정구역상 강원도 평창군 일원
(RANGE OF PRODUCTION)

5. 등 록 자 : 평창산양삼특구영농조합법인
(REGISTRANT)

6. 주 소 :
(ADDRESS OF REGISTRANT)

「농수산물 품질관리법」 제32조제8항 및 같은 법 시행규칙 제58조제2항에 따라 위와 같이 지리적표시의 등록을 하였음을 증명합니다.
(This is to certify that the Korea protected geographical indication is registered according to Agricultural & Fishery products quality management law of the Republic of Korea)

2017년 6월 12일
(REGISTRATION DATE: 12/ 06/ 2017)



COMMISSIONER, THE KORE



농산물우수관리인증서

제 1009014 호

1. 생산자 (조직명) : 장석홍 (평창산양삼특구영농조합법인) (농가수 :19명)

2. 생년월일 (사업자등록번호) :

3. 주 소 :

4. 품 목 명 : 장뇌

5. 재 배 면 적 (㎡) : 1,447,130.00

6. 소 재 지 : 강원도 평창군 봉평면 먼운리 상394-0 외 28필지

7. 유효 기 간 : 2017년 09월 04일 ~ 2019년 09월 03일

8. 생산자별 재배내역 : 별도 붙임

「농수산물 품질관리법」 제6조 및 같은 법 시행규칙 제11조제5항에 따라 인증심사를 한 결과 농산물우수관리의 기준에 적합함을 인증합니다.

2017년 09월 04일



(주) 유기농업기사인증평가원

다. 3차년도

성과목표	사업화지표										1연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시		
												SCI	비SCI							
최종목표	2	2		1	10	2	1,660				1	3	3	6	2	51		2		
3차년도	목표	1	2		1	10	2	10				1	2	2	3	1	17		1	
	실적	1			1	10	2	10					2		5	1	7		1	
달성율(%)	100			100	100	100	100					100		100	100	41		100		

1. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2018 춘계 학술대회 및 심포지엄	김장환	2018.04.27	서울여자대학교	국내
2	2018 KoSFoS T International Symposium and Annual Meeting	김장환	2018.06.27	부산 벡스코	국내
3	2018년 추계 학술대회 및 심포지엄	김장환	2018.11.30	CJ Blossom park conference hall	국내
4	The 12th International symposium on Ginseng, 2018	김장환	2018.10.23	서울드래곤시티 호텔	국내
5	2018년 추계 학술대회 및 심포지엄	반인수	2018.11.30	CJ Blossom park conference hall	국내

2. 논문개재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI 여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	Change of ginsenoside profiles in processed ginsengs by drying, steaming, and puffing	Journal of Microbiology and Biotechnology	신지혜, 김우기, 이형재, 백무열	29(2)	국내	Springer	SCI	2019.01.04
2	Puffing of <i>Rehmannia glutinosa</i> enhances anti-oxidant capacity and down-regulates IL-6 production in RAW 264.7 cells	Food Sci Biotechnol	권예지, 백무열, 김우기		국내	Springer	SCI	2019.02.06

J. Microbiol. Biotechnol. (2019), 29(2), 222–229
<https://doi.org/10.4014/jmb.1809.09056>

Food Sci Biotechnol
<https://doi.org/10.1007/s10068-019-00566-z>



Change of Ginsenoside Profiles in Processed Steaming, and Puffing

Ji-Hye Shin¹, Young Joon Park², Wooki Kim¹, Dae-Ok Kim¹, Byung-Yo Moo-Yeol Baik^{3*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Institute of Life Science and Resources, Kyung Hee University, Seoul 02447
²Department of Science in Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University, Seoul 02447
³Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

Received: September 28, 2018
 Revised: December 21, 2018
 Accepted: December 26, 2018

First published online
 January 4, 2019

*Corresponding authors
 M.Y.B.
 Phone: +82-31-201-2625;
 Fax: +82-31-204-8116;
 E-mail: mooyeol@khu.ac.kr
 H.L.
 Phone: +82-41-550-3561;
 Fax: +82-41-559-7968;
 E-mail: lie252@dku.ac.kr

plSSN 1017-7825, eISSN 1738-8872

Copyright © 2019 by
 The Korean Society for Microbiology
 and Biotechnology

Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) was processed by effects of these processes on the ginsenoside profile. A 4-year-old raw Korean ginseng was dried to produce white ginseng, was employed to produce red or black ginseng. Processed ginseng was puffed using a rotational puffing method, resulting in significantly higher extraction yields of ginsenosides (sample) and crude saponin content (59.40–63.87 mg sample) puffed ginseng, respectively. Moreover, puffing of ginsenosides (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, and Rg1) of ginseng (Rg5), comparable to the steaming process effect on the le. However, steaming takes much longer (4 to 36 days) ginsenoside transformation. Consequently, puffing is a technique for enhancing the extraction yield and levels of the major biological activities of ginseng.

Keywords: Ginsenoside profile, *Panax ginseng* Meyer, dry

Introduction

The root of ginseng, *Panax ginseng* Meyer (Araliaceae), has frequently been used as a traditional medicine in Asian countries. Ginseng products are increasingly popular and are readily available in pharmacies and health food stores worldwide. Functional ingredients in ginseng include saponins, phenolic compounds, polyacetylenes, alkaloids, and polysaccharides [1]. Among the saponins in ginseng, ginsenosides are the main effective components responsible for the antidiabetic [2, 3], anti-allergic [4], and anti-tumor [5] activities of ginseng. More than forty ginsenosides have been identified and characterized [6] based on their aglycone moieties [7], which can be categorized into three types: protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT), and oleanolic acid. It has been reported that minor ginsenosides

such as Rg3, Rk1, Rg5, and bioavailability, such as Rb1, Rb2, Rc, R, was reported to potent outcomes including protection [10], immun [12]. The degradation Rg5, caused by high temperature, through the decomposition of ginsenoside Rd [14]. In a period of time, the fresh white ginseng or steamed black ginseng. These major ginsenosides in Rg1 into minor ginseng

Puffing of *Rehmannia glutinosa* enhances anti-oxidant capacity and down-regulates IL-6 production in RAW 264.7 cells

Yeji Kwon¹ · Seungmin Yu¹ · Gwang Su Choi¹ · Jang Hwan Kim¹ · Mooyeol Baik¹ · Seung Tae Su² · Wooki Kim¹✉

Received: 3 December 2018 / Revised: 8 January 2019 / Accepted: 16 January 2019
 © The Korean Society of Food Science and Technology 2019

Abstract The roots of *Rehmannia glutinosa* (RG) have been widely used for medicinal purposes in Asia. The traditional processing of RG involves repetitive steaming and drying, and 9-time-steamed RG (NSRG) is the most commonly consumed form. For a development of a convenient processing method, RG was puffed at various pressures resulting in significantly increased solid extraction yield by up to 14%. The amount of the Maillard reaction product 5-hydroxymethylfurfural and the antioxidant capacities determined by the ABTS and DPPH radical scavenging assays were enhanced at increasing puffing pressure. Treatment of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages with RG extracts revealed that puffing of RG enhanced its suppression of the pro-

inflammatory cytokine IL-6 by up to 37%. The 5-hydroxymethylfurfural contents, ABTS/DPPH radical scavenging capacities, and IL-6 regulatory effects of puffed RG samples were greater than those of the NSRG control, indicating that puffing is a desirable processing technique for development of nutraceuticals using RG.

Keywords Puffing · Cytokine · Antioxidant · Extraction yield · *Rehmannia glutinosa*

Introduction

The roots of *Rehmannia glutinosa* (RG), generally known as *Jihwang* in Korea, are widely used as an herb in traditional oriental medicine. Previous studies have shown that RG has anti-cancer (Xu et al., 2017a, 2017b), blood-glucose regulatory (Zhang et al., 2004), anti-inflammatory (Wang et al., 2015), antioxidant (Zhang et al., 2004), and immunoregulatory (Kim et al., 1998) effects. Among the three forms in which RG is consumed, i.e., raw, dried, and steamed, the most commonly consumed form is 9-time-steamed RG (NSRG), which is prepared by repetition of alcohol soaking, steaming, and drying (Hong et al., 1993). The repetition of these processes is thought to soften the physical matrices of the roots, increasing the extraction of bioactive compounds. With respect to chemical changes, the heating process degrades complex polymers into smaller molecules, increasing the bioavailability and functionality of the effective ingredients. Despite the health benefits of NSRG, this manufacturing process is complex, costly, and time-consuming. In addition, the use of soaking solution and incomplete drying may cause microbial contamination. Therefore, there is demand for alternative processing methods for RG.

✉ Wooki Kim
 kimw@khu.ac.kr
 Yeji Kwon
 dcgr1111@naver.com
 Seungmin Yu
 dbmdals1004@hanmail.net
 Gwang Su Choi
 cgs91@naver.com
 Jang Hwan Kim
 zongy5000@naver.com
 Mooyeol Baik
 mooyeol@khu.ac.kr
 Seung Tae Su
 bibongherb@bibongherb.com

¹ Department of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1732 Deogyong-daero, Gihung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, Republic of Korea
² Bibong Herb, Yangju 11414, Republic of Korea

Published online: 06 February 2019

Springer

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	컴파운드K의 함량 및 항산화 효능이 증가된 팽화 산양삼의 제조방법	국내	경희대학교 산학협력단	2018.03.05	10-2018-0025620				100%

관인생략

출원번호통지서

출원 일자 2018.03.05
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원 번호 10-2018-0025620 (접수번호 1-1-2018-0218371-49)
 출원인 명칭 경희대학교 산학협력단(2-2004-007362-3)
 대리인 성명 김연권(9-2003-000399-0)
 발명자 성명 백두원 김병용 최광수
 발명의 명칭 컴파운드 K의 함량 및 항산화 효능이 증가된 팽화 산양삼의 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상표이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

4. 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	양성	2018		7			5	2	7					

5. 기술실시

No	기술실시 계약명	기술실시권 유형	기술실시 내용	기술실시일
1	특허권 양도 계약서	양도	'컴파운드K의 함량 및 항산화 효능이 증가된 팽화 산양삼의 제조방법'특허권 양도	2019.03.08

* 미달성 목표 진행사항

-특허등록 : 특허출원 2건 심사 진행 중

-논문 : 비 SCI 1건, SCI 1건 논문 게재 준비 중

○ 연구결과

1. 1차년도

<제1세부 : (주)네추럴웨이>

산양삼 제품 제조공정도



-실험실단계의 추출조건 최적화 탐색

1. 추출용매의 결정

-원료의 추출에 사용되는 추출용매의 선택

- 1) 공전3장 개별기준 및 규격 또는 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 적합한 원료 사용
(주정, 물)

-추출에 이용된 주정 성적서

발효주정 기준 및 규격표

제조원 진로발표

판매회사명	대한주정라이프 주식회사 (인)	수요자명	네추럴데이
-------	------------------	------	-------

시 험 결 과

항 목 별	단 위	기 준 치	관 정
성 상		무색 투명하고 부유물 및 이물, 이취가 없을 것	정 상
에 탄 율	V/V %	95 이상	95.0%
중 발 건 류 분	mg/100g	2.5 이하	흔 적
총 산	초산 W/V %	0.002이하	0.0011
알 데 히 드	아세트알데히드 mg/100ml	1.0 이하	기준이하
메 탄 율	mg/ml	0.15 이하	0.0219
퓨 겔 율	V/V %	0.01 이하	불검출
중 금 속	mg/kg	불검출	불검출
과망간산 환원성 물질	5분 이내에 표준액보다 퇴색되지 않을 것		7분 20초
황 산 정 색 물	-	불검출	불검출
염 화 물	-	불검출	불검출

서식번호 87

위와 같이 분석함.

2016 년 7 월 18

대한주정판매 (주)



2. 추출 온도의 영향

(240g 사용)

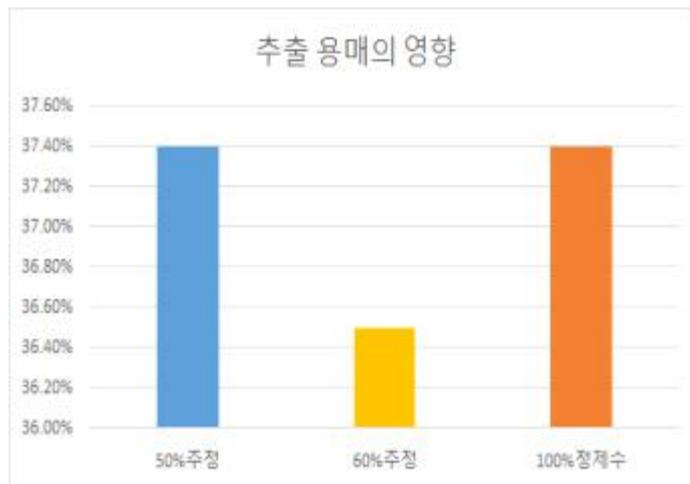
시료 40g , 시료량대비 9배 용매사용 (시료를 건조하여55℃ 수분(13%이하)을 제거한 후)

구분	시료1	시료2	시료3
전처리	파쇄	파쇄	파쇄
추출온도	65	75	85
추출용매	70%주정	70%주정	70%주정
시간(h)	4*6회 / 24시간	4*6회 / 24시간	4*6회 / 24시간
압력(bar)	1.5	1.5	1.5
추출수율	36.8%	37.1%	37.5%



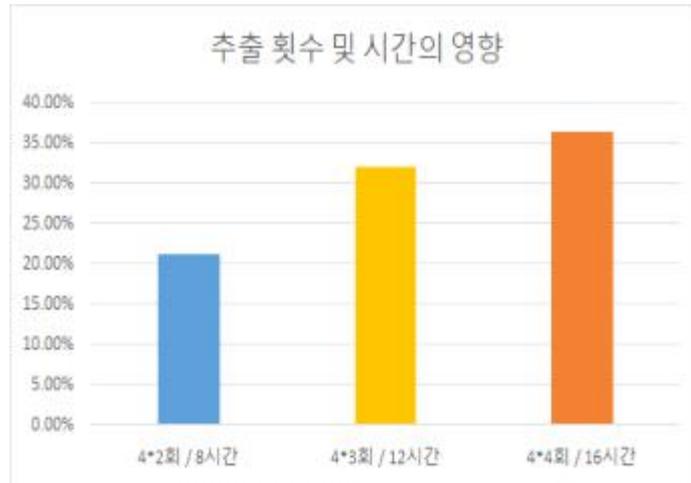
3. 추출 용매의 영향

구분	시료4	시료5	시료6
전처리	파쇄	파쇄	파쇄
추출온도	85	85	85
추출용매	50%주정	60%주정	100%정제수
시간(h)	4*5회 / 20시간	4*5회 / 20시간	4*5회 / 20시간
압력(bar)	1.5	1.5	1.5
추출수율	37.4%	36.5%	37.4%



4. 추출 횟수 및 시간의 영향

구분	시료7	시료8	시료9
전처리	파쇄	파쇄	파쇄
추출온도	85	85	85
추출용매	70%주정	70%주정	70%주정
시간(h)	4*2회 / 8시간	4*3회 / 12시간	4*4회 / 16시간
압력(bar)	1.5	1.5	1.5
추출수율	21.2%	32.0%	36.4%
농축	40brix	40brix	40brix



5. 온도, 용매, 추출시간 따른 추출 수율의 변화

구분	시료1	시료2	시료3	시료4	시료5	시료6	시료7	시료8	시료9
추출수율 (%)	36.8%	37.1%	37.5%	37.4%	36.5%	37.4%	21.2%	32.0%	36.4%
조사포닌 (mg/g)	6.40	7.95	8.08	6.51	7.90	6.47	4.83	4.94	6.61
산성 다당체	9.3%	10.2%	10.9%	9.1%	10.2%	9.3%	8.5%	8.6%	9.2%
진세노사이드 (mg/g)	3.37	4.63	4.71	3.21	4.61	3.30	2.21	2.31	3.28



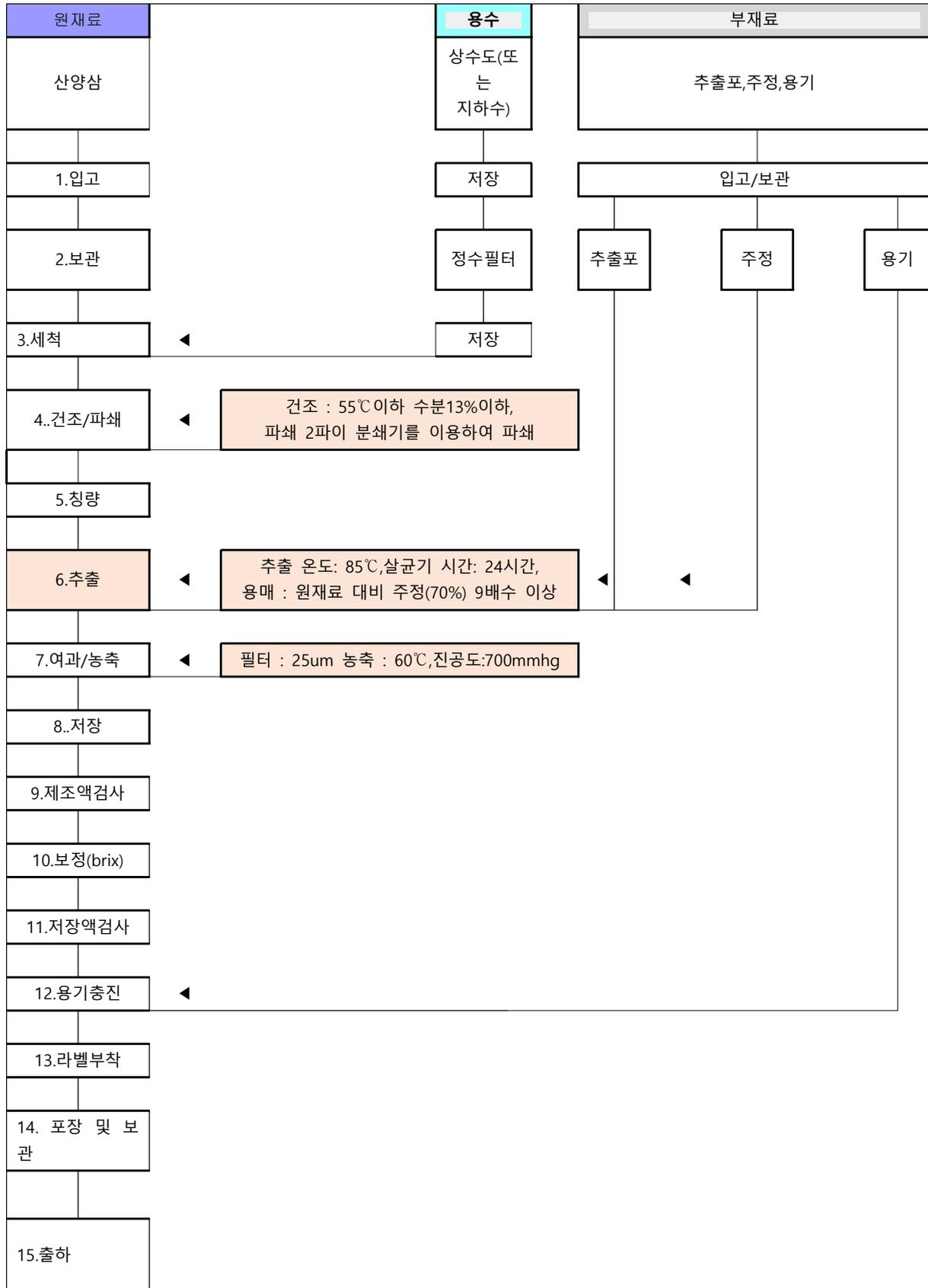
6. 종합

조건	결과
원재료의 분쇄도	용매와 용질의 접촉면적이 넓어짐으로 확산속도가 증가하여 추출 속도 증가에 따라 설정함(2파이 분쇄)
추출온도	온도는 높을수록 추출은 잘되지만 불필요한 성분의 용출이 증가하고 열에 약한 기능성분의 불활성화를 고려하여 설정함 (85℃)
추출시간	시간은 길어질수록 확산평형(diffusion equilibrium)이 이루어지며 불순물의 유출이 늘어나 유효성분의 농도가 낮아지므로 기능성분 함량이 가장우수한 시간 설정 (24시간)
추출농도	원재료의 용매의 비율을 높이면 농도차가 커져서 확산 속도는 빨라지지만 단위처리량이 작아지고 농축해야할 용액이 많아져 생산성이 떨어짐, 하지만 고가의 산양삼에 최대한 유효성분을 추출하기 위하여 용매의 양은 많을 수록 좋다고 판단됨 (시료량 대비 9배)
용매의 설정	수율은 에탄올의 농도가 증가될수록 감소되는 반면 조사포닌은 증가되었고 이러한 경향은 을확인할수 있었다. 그러나 이를 원료대비로 보면 일반적인 경향은 증가되나 그 차이가 크지 않았다. 순수사포닌의 수율은 70%와 90% 크게 향상되지 않았으나 ginsenoside-Rb1, Rb_1, - Rb2, Rb_2 와 -Rd이외의 ginsenoside는 계속 증가되는 경향이 있다. 또한 PD/PT계의 용출된 양의 비는 1.69~1.951.69\sim 1.95 의 범위였으며 50%, 0% 및 70%구간에서 각각 1.69, 1.75, 1.76의 수치를 보여 산양삼추출물의 수율과 작업성을 고려할 때 조사포닌과 엑기스의 용출율이 높으며 또한 순수사포닌의 용출율이 가장 높은 에탄올 70%가 적합한 것으로 사료되었다.

7. 제조공정 표준화 공정

공정		WeightorVol.	Brix	회수액(ml)	고형분(g)	조사포닌	다당체
1차	원재료	40g	-	400ml	-	-	-
	용매(70%주정)	360ml					
	추출 85 °C	4	-	-	-	-	-
		8	-	-	-	-	-
		12	-	-	-	-	-
		16	-	-	-	-	-
		20	-	-	-	-	-
		24	4.6	352ml	16g	8.08 (mg/g)	10.9%
잔사 무게	25g(62.5%)						
농축 (여과25um,60°C)	12hr	27	40.48ml	16g			
	24hr	40					
건조 (sd,fd,vd)	-						
건조 (FD)	-						
최종(수율)				37.5%			

8. 산양삼 추출물 제조공정도



9. 산양삼추출물 생산공정 설명



원물 세척

✓ 농수산물 원물 세척



원물 파쇄

✓ 대용량 파쇄기



추출포 침지

✓ 원물을 담은 주유포 용매침지



추출

✓ 100°C 24시간 원물대비 상수10배



농축

✓ 4.5T 감압농축기



분무 건조

✓ 100kg 분무건조기 (Fluid bed granulator)



포장

✓ 내포장 파손에 대비한 포장방법



품질관리

✓ 엄격한 품질관리
✓ 기준규격 검사

- 1) 입고 : 질량표준에 맞게 산양삼을 검측, 검측 합격 후 입고 한다.
- 2) 보관 : 원료 보관 기준(실온, 상온, 냉장, 냉동)에 적합하도록 구분하여 보관한다.
- 3) 세척: 흙, 또는 남아있는 이물을 제거하기 위해 산양삼을 세척한다.
- 4) 건조/파쇄: 55°C 이하에서 열풍으로 수분함량 13% 이하가 될 때까지 건조 후 2파이 파쇄기로 파쇄
- 5) 칭량: 제조서 기준에 입각하여 정량을 계량하여 준비한다.
- 6) 추출: 산양삼원료를 85°C 조건에서 9배량의 주정(70%)을 이용하여 4시간 추출, 6번 추출, 추출액 모음.
- 7) 여과/농축: 추출액을 여과막(10~50 μ m)에 여과, 농축: 추출액을 -0.08MPa ~ -0.093MPa, 60°C 조건에서 진공농축(상대 밀도 1.30~1.35)
- 8) 저장: 농축액을 저장탱크로 이송한다.
- 9) 제조액 검사: 산양삼 농축액의 지표성분 및 미생물안전성을 확인한다.
- 10) 보정: 원하는 brix 만큼 정제수를 이용 하여 보정한다.
- 11) 저장액 검사: 보정된 농축액의 기준규격을 확인한다 (거래처 요청에 의한 brix, 지표성분함량)
- 12) 용기 충전: 생산된 농축액을 보관용기에 맞게 충전한다.
- 13) 라벨 부착 : 식품위생법에 의거하여 한글표시사항 라벨을 부착한다.
- 14) 포장 및 보관: 합격제품은 외포장 및 포장 상태 검사, 완성품은 서늘하고 건조한 창고에 보관.
- 15) 출하: 출하 요청 및 물품 출납증 확인후 출고한다.

10. 산양산 추출분말 작업일보(예)

추출 작업 일보			작업자	금영호				
			일자	2015.06.15(월)				
업체명(원료)	네추럴웨이 (산양삼)	순환 추출기 구분	4.5t 순환추출 system					
원료 입고 일자		원료량(kg)	200kg					
작업기간								
작업공정	투입원료량(kg) /용매량(L)	전처리 여부	비고					
	200kg/4,100L	-	-					
<p>* 작업 공정 FLOW</p> <p>원료(200KG) / 상수 (4,100L) 추출 -> 부직포, 1um filter 1ea ->2차 이송 ->농축</p>								
추출공정								
횟수	용매명 - 용매량(L)				온도	압력	시간	비고
	용매1	용매2	용매3	계				
1#	상수			상수	100℃	-	11:50~ 21:50	
	4,100L			4100L			~	
					추출량	Brix	고형분 량	수율
					3,550 L	1Brix	35.5kg	17.7%
2#	용매1	용매2	용매3	계				
					추출량	Brix	고형분 량	수율
3#	용매1	용매2	용매3	계				
					추출량	Brix	고형분 량	수율
특이사항								

농축 작업 일보			작업자		금영호			
			일자		2015.06.16(화)			
업체명(원료)	네추럴웨이 (산양삼)	순환 농축기 구분	4.5t 순환농축 system					
원료 입고 일자	2015.06.12(금)	원료량(L)	3550L	여과	부직포.1um 필터			
작업기간	2015.06.16(화)~2015.06.16(화)							
농축공정								
시각 (시:분)	온도(℃)			진공도 (mmHg)	Brix	농축 액량 (L)	공급량 (L)/h	비고
	원액	농축액	냉각수					
10:15	농축시작			700	1Brix	-	700	
11:00	67.8	68.7	28	700	-	-	800	
12:00	67.8	68.7	28	700	-	-	800	
14:00	67.8	68.7	28	700	-	-	400	
14:50	67.8	68.7	28	700	-	-	800	
15:50	최종 농축물 11brix 250L							
농축결과								
농축결과	농축			농축액				
	Brix	액량(L)		Brix	액량(L)	포장단위		
야관문-1	1Brix	3350L		11Brix	250L			
<p style="text-align: center;">특이사항</p> <p style="text-align: center;">야관문-2와같이 말토덱스트린 혼합후 분무건조기로 이송시킨다.</p>								

분무건조 작업 일보			작업자		금영호				
			일자						
업체명(원료)	네추럴웨이	분무건조기 구분		춘천 바이오 분무건조기(대)					
원료 입고 일자	2015.06.12(금)	원액량(L)		약 530L	Brix	12Brix			
텍스트린 첨가량(kg)	10kg	고형분량 합계(kg)		약63.k g	원액량 합계(L)	530L			
총 생산 예상량(kg)	530L X 12 Brix = 63.6kg								
rpm(%)	14,609(70%)	Double damper		(70/3) sec					
작업기간									
시각 (시: 분)	온도(℃)					Chamber 차압 (송풍/쇄풍)	공급량(%)	feed 압 (bar)	비 고
	송풍	배풍	air broo m	이송	액온				
11:20	188.3	93.0	90.0	30.2	67.2	-69.5 (100/94.4)	25.2	0.7	
12:00	1차수거, 11.9kg								
12:30	2차수거 11kg								
13:00	3차수거 11.7kg								
13:30	4차수거 11.55kg								
14:00	5차수거 8.8kg								
14:40	6차수거 5.75kg (건조 종료)								
	최종 : 60.7kg (3시간 20분)								
건조결과									
건조물 (air 회수)	-	총생산 량 (kg)	60.7k g	생산수율(%)	95.44	가동시간 (h)	3시간20분		
특이사항									

11. 산양삼추출물 품목제조보고 현황 (10월14일 완료)

제조방법 설명서

1. 제품명 : 산양삼추출물
2. 식품의 유형 : 기타가공품
3. 원재료명 및 배합비율 : 계 100%

NO	원재료명	배합비율(%)	원재료기타설명
1	산양삼추출액	100	
합계(%)			100

4. 제조방법

- 1)입고 : 질량표준에 맞게 산양삼을 검측, 검측 합격 후 입고 한다.
- 2)보관 : 원료 보관 기준(실온,상온,냉장,냉동)에 적합하도록 구분하여 보관한다.
- 3)세척: 흙,또는 남아있는 이물을 제거하기위해 산양삼을 세척한다.
- 4)건조/파쇄: 55℃ 이하에서 열풍으로 수분함량 13% 이하가 될 때까지 건조 후 2파이 파쇄기로 파쇄
- 5)청량: 제조서 기준에 입각하여 정량을 계량하여 준비한다.
- 6)추출: 산양삼원료를 85℃조건에서 9배량의 주정(70%)을 이용하여 4시간 추출, 6번 추출,추출액 모음.
- 7)여과/농축: 추출액을 여과막(10~50µm)에 여과,농축: 추출액을 80℃~60℃ 조건에서 진공농축한다.
- 8)저장: 농축액을 저장탱크로 이송한다.
- 9)제조액 검사: 산양삼 농축액의 지표성분 및 미생물안전성을 확인한다.
- 10)보정: 원하는 brix 만큼 정제수를 이용 하여 보정한다.
- 11)저장액 검사: 보정된 농축액의 기준규격을 확인한다 (거래처 요청에의한 brix, 지표성분함량)
- 12)용기 충전:생산된 농축액을 보관용기에 맞게 충전한다.
- 13)라벨부착 : 식품위생법에 의거하여 한글표시사항 라벨을 부착한다.
- 14)포장 및 보관: 합격제품은 외포장 및 포장 상태 검사, 완성품은 서늘하고 건조한 창고에보관.
- 15)출하: 출하 요청 및 물품 출납증 확인후 출고한다.

5.성 상 :

암갈색의 액상

6. 용도·용법 :건강기능식품 제조 및 일반식품가공 업체의 원료로 사용.

7.포장의 재질 및 단위

- 포장재질 : 내면도장관 , 폴리에틸렌(PE)
- 포장방법 : 밀봉포장 , 포장단위 : 1~100KG

8. 보존(보관) 및 유통기한

제조일로부터 12개월

9.기준및규격

- (1) 성상 : 암갈색의 액상
- (2) 이물 : 규격에 적합하여야 한다.

12. 완제품 상세 공정도



Bottom spray

- ✓ 유동층 코팅기
- ✓ (Fluid bed cooler)



Top spray

- ✓ 유동층 과립기
- ✓ (Fluid bed granulator)



Lap 유동층

- ✓ 다양한 테스트
- ✓ 최상의 제품 생산



품질관리

- ✓ 엄격한 품질관리
- ✓ 입도, 수분 등 기준규격 검사



타정

- ✓ 레일 및 턴테이블 방식



코팅

- ✓ 하이크타 방식



선별 및 검수

- ✓ 자동정제 선별기를 통한 검수



포장 Type

- ✓ PTP, 자동병충진기
- ✓ 최적의 포장방법 확인

- (1) 원료 : 모든 원료를 원료규격에 맞는지 시험 후 적합 판정을 받은 원료를 사용한다.
- (2) 칭량 : 각각의 원료를 배합비에 맞게 전자저울을 이용하여 정확히 칭량한다.
- (3) 과립 및 건조 : 과립기를 이용하여 과립물 제조 후 건조기를 이용하여 건조한다.
- (4) 혼합 : 활택제를 넣은 후 혼합한다.
- (5) 타정 : 타정기를 이용하여 일정량을 타정한다.
- (6) 코팅 : 코팅기를 이용하여 일정량을 코팅한다.
- (7) 선별 : 불량한 정제를 선별한다.
- (8) 포장방법 : 신고 된 포장재질에 적합한 포장방법 및 포장단위로 포장한다.
- (9) 검사 : 건강기능식품 규격에 따라 검사를 실시한다.
- (10) 출고 : 포장상태의 이상 유무를 확인하여 규격에 적합한 제품에 한하여 출하한다.

<위탁연구기관 : 서울대학교>

○ 평창 산양삼 재배 현황

(2015년말 기준, 단위 = m²)

구 분	특구 구역 내		특구 구역 외		전체	
	필지수	재배면적	필지수	재배면적	필지수	재배면적
합 계	48	4,282,456	113	5,717,111	161	9,999,567
평 창 읍	3	107,543	22	839,668	25	947,211
미 탄 면	2	54,885	8	423,968	10	478,853
방 립 면	3	1,454,168	6	270,586	9	1,724,754
대 화 면	3	27,831	29	1,484,202	32	1,512,033
봉 평 면	16	1,670,265	17	1,547,514	33	3,217,779
용 평 면	11	368,149	5	164,765	16	532,914
진 부 면	7	288,218	5	318,434	12	606,652
대관령면	3	311,397	21	667,974	24	979,371

○ 산양삼 품종 특성 및 환경요인

(1) 평창산양삼의 품질 특성

▪ 평창산양삼은 뇌두가 조밀하고 삼의 몸통주름이 선명한 특성을 가지고 있으며, 황금색의 잔뿌리가 곧고 단단하며 다수의 옥주가 붙어 있는 등 조직이 치밀하여 산양삼 본연의 향이 진한 품질특성 보유. 특히 산양삼의 대표적인 성분인 진세노사이드함량이 풍부한 품질특성을 가지고 있음.



그림 1. 평창 산양삼

▪ 외부형태 분석결과 평창산양삼은 몸통길이는 3.76cm, 뿌리길이는 19.50cm로 타 지역 산양삼에 비하여 전체길이가 다소 긴 것으로 나타났음.

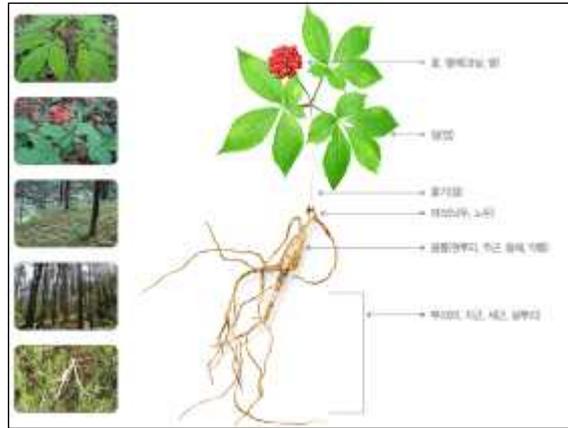


그림 2. 산양삼 구조와 명칭

- 평창지역에서는 산양삼 생산 시 인위적인 재배관리를 하지 않고(자연 방임 생산) 자연 상태 그대로 생육시키고 있는데, 특히 대부분의 생산지가 평창지역 관내 해발 고도 700m이상의 청정 산지에 입지하고 있는 특성으로 평창산양삼은 야생성이 강하고 영양이 풍부하며 산양삼 본연의 향이 깊은 품질특성을 가지고 있음.
- 산양삼은 오랜 역사를 가지고 있는 평창지역의 대표적인 특산품으로 조선시대 산삼주산지로 보호하기 위하여 일반인을 출입을 금하기 위하여 세워진 ‘산삼봉표(山蔘封)’를 비롯하여, 오래전 심마니들이 산삼을 재배했었던 ‘산양삼 재배터’가 평창지역에 남아 있는 등 ‘산양삼’은 평창지역민의 삶과 함께 계승되어 왔음.
- 평창지역에서는 산양삼 생산 시 종자에서부터, 토양, 산양삼 품질 등에 대하여 한국임업진흥원, 평창군의 엄격한 관리 및 지원하여 생산되고 있으며, 산양삼 품질이력제를 도입, 다양한 인증제(강원도 푸른강원인증, 강원도지사 품질보증인증, 평창군수 품질인증) 획득 등 보다 안전하고 품질이 우수한 평창산양삼 생산을 위하여 노력하고 있음.
- 평창산양삼의 품질특성 계승 및 보전을 위하여 평창지역에서는 산양삼 종자 및 종묘를 생산할 수 있는 채종포, 종묘단지를 조성·운영·관리하고 있음.

(2) 품질특성과 지리적 요인과의 관계

- 지리적 특성
 - 평창지역은 전체 토양의 60%이상이 해발고도 700m이상의 고산지대(임지)로 구성되어 있는 지리적 특성으로 산양삼 생육에 매우 알맞은데, 전체토양의 96.4%가 산양삼 생육에 알맞은 사양토~사질양토로 구성되어 있어 토양 내 양·수분의 원활한 흡수가 용이하고, 산양삼 뿌리 생육 증진 등이 가능하여 보다 영양이 풍부한 평창산양삼의 생산이 가능함.
 - 북쪽과 서쪽에는 오대산(1,563m)에서 분기한 차령산맥이 뻗어 있어 계방산(1,577m)·홍정산(1,277m)·태기산(1,261m)·청태산(1,200m)·백덕산(1,350m) 등이 솟아 있고, 동쪽에는 황병산(1,407m)·고루포기산(1,238m)·발왕산(1,458m)·박지산(1,394m)·백석산(1,365m)·청옥산(1,256m)·가리왕산(1,516m) 등이 높고 험한 산들이 연봉을 이루고 있음.

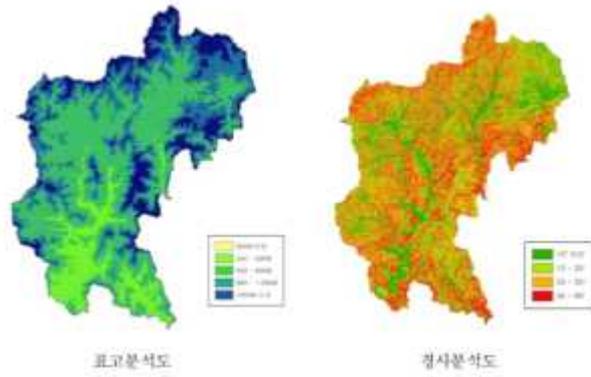


그림3. 전체토양의 60 % 이상이 해발 700 m 이상의 고산지대(산양삼 생육 적지)



그림4. 산악지형이 발달된 평창(내륙 고산지대)

- 산양삼의 대량생산적지는 고온과 건조를 피할 수 있는 해발고도 600m 이상의 고지대로 임목이 울창한 산복부가 적합한 것으로 판단되며, 토질은 배수가 양호한 사질양토의 토양으로 유기물이 토양 내 축적되어 부식층이 발달한 곳을 산양삼 생육지로 선정하는 것이 바람직함.
- 평창지역은 전체토양의 97.9%가 토양 배수성이 양호(농촌진흥청 토양정보시스템)한 곳으로 국내 타 산양삼 생산지에 비하여 월등히 많은 비율을 차지하는데, 토질의 배수가 양호함에 따라 산양삼의 뿌리생육을 보다 원활히 하여 영양이 풍부한 산양삼 생산이 가능함.
- 기상
 - 평창지역의 연평균 기온은 8.1℃로 국내 타 산양삼 생산지에 비하여 서늘한 기온특성으로 산양삼 생육에 매우 알맞은데, 특히 여름철(7~9월) 평균 최고기온은 24.2℃로 국내 타 산양삼 생산지에 비하여 다소 서늘하여 고온피해(휴면기 발생으로 인한 생육 저하 등) 없이 품질이 우수한 산양삼 생산이 가능함.

표1. 국내 산양삼 생산지별 월평균 최고기온 특성(04~13년)

(단위 = °C)

구분	연평균 기온	연평균 최고기온	여름철 (7~9월) 연평균 최고기온
산양삼 생육적지 (한국임업진흥원)	0~10	-	20~25
평 창	8.1	13.9	24.2
함 양	12.3	19.3	29.2
안 동	12.2	18.3	28.5
서 천	12.5	17.4	29.3

자료/ 기상청·각지자체

- 산양삼은 다소 서늘한 기온환경에서 생육이 알맞은 것으로 알려져 있는데, 연평균 기온이 0°C~10°C 여름철 기온이 20~25°C로 서늘한 곳이 적합하며, 최고기온이 35°C 이상일 경우 고온피해가 발생, 산양삼의 생육불균형 및 품질저하의 요인으로 작용함.
- 지중온도가 18°C넘어가면 산양삼의 지상부는 고온 휴면상태에 들어가 엽의 낙엽이 발생하여 생육에 제한을 받는 것으로 알려져 있으며, 이는 이식묘가 과종묘에 비하여 더욱 심한 것으로 나타나는 등 산양삼 생육에 있어서 고온 환경은 산양삼의 품질저하(산양삼 휴면상태로 인한 생육 저하)의 요인으로 작용하고 있음.
- 산양삼의 생육적지는 고온과 건조피해를 피할 수 있는 지역으로 여름철에도 서늘한 기온을 유지 할 수 있는 곳이 알맞음.
- 평창지역은 해발고도가 높은 고산지대로 연평균 기온이 서늘하고 특히, 여름철 기온이 동위도 지역과 비교하여 서늘한 특성으로 산양삼 생육에 알맞는데,
- 숲이 발달한 평창지역의 지리적 특성으로 평균상대습도는 72.9%(연평균 강수량 1,426.0 mm)로 국내 타 산양삼 생산지에 비하여 높아 산양삼 생육적지 환경을 제공, 광합성 효율 증대, 산양삼의 활발한 동화작용으로 인한 진세노사이드 합성 및 축적이 가능하여 보다 영양이 풍부한 평창산양삼의 생산이 가능함.
- 일반적으로 산양삼이 건조, 고온 및 고온건조의 스트레스를 받을 경우 광합성효율 및 광합성에 관련된 기작의 효율이 매우 떨어지는 것으로 나타났으며, 특히 고온과 건조피해를 동시에 받을 경우 생존은 가능하지만 생육은 불량한 원인으로 작용함.

표2. 국내 산양삼 생산지별 평균상대습도 특성(04~13년)

구분	연평균 상대습도 (%)	연평균 강수량 (mm)	연평균기온 (℃)
평 창	72.9	1,426.0	8.1
함 양	68.5	1,413.9	12.3
안 동	67.6	1,055.5	12.2
서 천	72.8	1,363.7	12.5

자료/ 기상청·각지자체

- 평창지역의 연평균 적설량은 116.4cm로 국내 타 산양삼 생산지에 비하여 눈이 많이 오는 지리적 특성을 가지고 있는데, 월동생육을 하는 산양삼의 생육 특성상 겨울철 눈은 산양삼 생육지 지중온도를 보호하고, 수분의 공급을 용이하게 하는 등 산양삼의 원활한 월동생육을 가능, 영양이 풍부하고 품질이 우수한 산양삼의 생산이 가능함.
- 눈이 많이 쌓이는 지역의 지온은 상대적으로 높기 때문에 겨울나기 작물의 동해방지에 유리하며 쌓인 눈은 땅에 수분을 공급해줌.

표3. 국내 산양삼 생산지별 평균 적설량 특성(04~13년)

구분	평균 적설량(mm)
평 창	116.4
함 양	21.9
안 동	18.5
서 천	21.3

자료/ 기상청·각지자체

(3) 품질특성과 인적 요인과의 관계

- 엄격한 품질 관리 및 자연생태(자연방임 재배) 생육
 - 평창지역에서는 산양삼 본연의 품질을 가진 평창산양삼을 생산하기 위하여 인위적인 생산·재배관리는 최대한 자제하고 자연상태 그대로 생육시켜 산양삼을 생산하고 있음.
 - 평창지역 관내에는 예로부터 산삼이 평창지역에 생산되어 온 것을 증명할 수 있는 ‘산삼봉표’, ‘산양삼 재배터’ 등이 남아 있는 등, 평창지역은 예로부터 산양삼 생육의 최적지의 지리적 특성(고산지대, 서늘한 기온 특성, 토양배수성 우수, 다습·다설지역)을 가지고 있어 파종 이후 인위적인 재배관리를 하지 않고 평창지역의 청정 원시림의 자연상태에서 산양삼을 생육·생산하고 있음.
 - 평창지역에서는 보다 품질이 우수한 산양삼의 생산 및 품질관리를 위하여 산양삼 생산 시 생산지 토양, 종자검사 및 수확 시 산양삼 품질검사 등의 엄격한 생산적합성조사(한국 임업진흥원)를 실시하고 있으며, 산양삼 전문검수단의 공동검수를 통하여 엄격하게 품질

관리하여 산양삼을 생산하고 있음.

- 평창산양삼특구영농조합법인에서는 강원도 품질인증마크인‘푸른강원인증(강원11-20호)’,’강원도지사인증(제15-58-04호)’,’평창군수품질인증(제2015-05-25호)’을 획득하는 등 평창산양삼의 품질향상 및 엄격한 품질관리를 위하여 노력하고 있음.



그림5. 평창산양삼 품질인증제 도입

▪ 안정적인 생산기반 조성

- 평창지역에서는 평창산양삼의 품질특성을 보존·계승하고 보다 안정적인 산양삼생산을 위하여 채종포(종묘 포함) 단지를 조성하여 관리하고 있는데, 채종포 면적은 34.7ha로 채종량은 약 610kg, 종묘포 면적은 48.3ha, 생산 종묘량은 2,856만종임.



그림6. 평창산양삼 채종포 지정 및 관리

▪ 평창산양삼의 중장기적인 발전을 위한 평창군청의 다양한 지원사업

- 평창군은 평창산양삼 산업의 발전 및 품질향상을 위하여 평창산양삼특구 지정을 추진하여 2014년 9월 25일에 중소기업청으로부터 지정받은것을 비롯하여 다양한 지원사업을 펼치고 있는 등 평창산양삼에 대한 중장기적 발전 계획을 가지고 있음.
- 평창군은 「산양삼 기반조성사업」, 「산양삼 가공육성 사업」, 「산양삼 HAPPY 700 마케팅사업-2018 평창동계올림픽 마케팅」으로 구분하여 2015년~2019년 기간 동안 약 215억원 규모의 연차별 지원사업 계획을 가지고 있음.

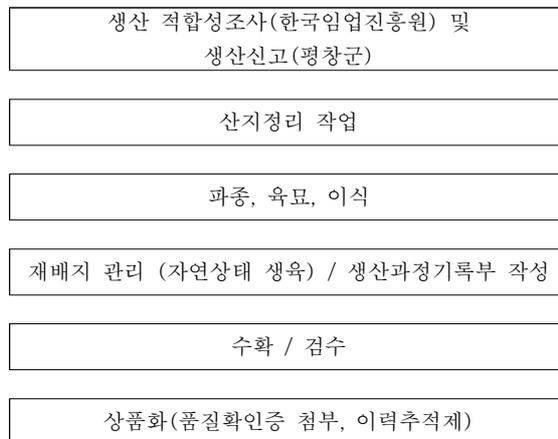
- 활발한 생산자 교육
- 평창지역에서는 평창산양삼의 품질향상 및 생산량 증대, 생산농가 역량 강화 등을 위하여 매년 5회 이상 산양삼 생산자 및 신규재배자를 대상으로 교육사업을 진행하고 있음.



그림7. 평창 산양삼 신규 재배자 교육

○ 평창산양삼 생산과정상의 특징

(1) 개요



- 평창지역에서는 산양삼 생산 시 한국임업진흥원의 생산적합성조사(토양, 종자 등) 및 평창군 생산신고 등을 통하여 엄격하게 생산관리하고 있으며, 주로 가을파종(8월, 11월 내외)하여 인위적인 재배관리는 최대한 자제한 상태로 약 5년 이상 생육 시킨 후 채취수확하여 생산되고 있음.
- 대부분의 산양삼 생산지는 해발 700m 이상의 산야지에 조성되어 있으며, 파종 이후 5년 이상 생육 후 채취수확하여 엄격한 검수과정을 거쳐 상품화되고 있음.
- 평창지역에서는 산양삼 생산지 선정, 조성, 종자, 종묘, 식재, 생산관리, 품질검사, 유통 등 산양삼 전과정에서 있어서 「임축법」에서 정한 기준을 준수하고 있음.

(2) 생산적합성 조사 및 생산신고

- 평창지역에서는 산양삼 재배 시 생산지 환경(토양), 종자 및 종묘에 대하여 한국임업진흥원으로부터 산양삼 생산성적합조사 받는 것을 원칙으로 하고 있는데, 생산성적합조사

에서 '적합' 평가를 득한 후 평창군의 산양삼 생산신고필증을 교부받아 산양삼을 생산하고 있음.

- 평창지역에서는 종자, 생산환경 등 한국임업진흥원, 평창군의 엄격한 생산관리 하에서 산양삼을 생산하고 있음.
- 산양삼을 생산하기 위해서는 임업 및 산촌진흥 촉진에 관한 법률 제18조의2(특별관리 임산물의 생산) 및 시행규칙 제25조의2(특별관리 임산물 생산의 신고)에 의거, 평창군에게 생산신고 후 신고필증을 교부받아 생산하는 것을 원칙으로 하고 있음.

표4. 생산적합성 조사

구분	산양삼 생산적합성 조사
토양	- 시료량은 200g씩 5~10개소에서 시료를 채취한 후 혼합하여 1kg 이상을 수거 - 검사대상지 면적 3ha 기준으로 지형적 특성을 고려하여 최소 5개소, 최대 10개소의 채취지점 선정 - 지표층의 유기물을 걷어내고 토양 채취 후 비닐팩에 넣어 운반
종자	- 시료량은 100kg 기준으로 50g 채취 - 채취지점은 단위별로 3등분하여 고르게 채취
종묘	- 시료량은 (검사대상지면적 3ha) 채취지점별 10g 이상, 총 50g 이상 채취 - 채굴용 도구로 뿌리가 손상되지 않도록 단위별 3등분하여 고르게 채취 - 시료채취 지점을 표시한 후 gps장비이용 위치정보 기록 - 채취한 시료는 토양제거용 솔을 이용하여 흙을 털어내고 무게를 측정.기록 - 조사원이 현장에서 직접 채취하며, 생산자가 반드시 입회

자료/ 한국임업진흥원

(3) 생산지 선정 및 정리작업

- 생산지 선정 및 조성은 지형, 해가림정도, 토양산도, 배수조건 등을 종합적으로 생산자가 검토한 후
에 파종을 하는데, 일반적으로 해발고도 700m 이상의 고산지로 활엽수가 우거진 북동향의 경사면에 조성하는 것을 원칙으로 함.
- 평창지역에서는 산양삼 생산 시 일반적으로 약 1년~2년 전부터 산지정리작업하고 있는데, 파종 전년 가을이나, 당년 봄에 하층의 잡관목은 제거 작업하고 있음.
- 정리작업은 임목의 가지치기를 통하여 울폐율이 약 80~90%가 되도록 작업하고 있으며, 상층부 임상의 투과율은 약 20%정도로 조절, 불량목과 관목류 등을 제거하여 관리하고 있음.
 - 하층 잡초 관리 시 동일 방향에서 지속적으로 불어오는 주풍으로부터 보호받을 정도의 하층식생은 남겨두고 작업하는 것을 원칙으로 하고 있음.
- 일반적으로 하층 관목, 초본 및 낙엽을 모두 제거하면 우기 시 물방울이 땅이 떨어지면서 산양삼의 잎 뒷면에 흙탕물이 튀어 기공이 막혀 생육저하 및 토양의 온·습도 유지가 불안정해지는 요인으로 작용할 수 있으므로, 평창지역에서는 과도하게 정리작업 하지 않고 생산자가 생산지 입지, 토양, 임목 등의 생산요건을 감안하여 작업하는 것을 원칙으로 하고 있음.

(4) 파종 및 이식

▪ 평창지역에서는 직파 및 육묘 후 이식을 통하여 산양삼을 생산하고 있는데, 파종시기는 8월, 11월 이듬해 4월 내외이며 파종방법으로는 산파종(홀어뿌림), 점파종, 줄파종 등이 있는데, 생산자가 생산여건에 따라 파종방법을 정하며, 파종량은 파종량은 99㎡당 약 1.0kg(1,500립 내외)을 원칙으로 하고 있음.

- 등고선 방향(경사면 방향에 직각방향)으로 줄을 띄우고 낙엽을 제거 후 팽이나 호미를 이용하여 골을 파고 종자를 약 20cm 정도의 일정한 간격으로 2~3립 점파하거나 대상으로 줄파 후 0.8~2cm정도로 복토하고 주변에 모아둔 낙엽으로 덮어주고 있음.



그림8. 파종 모습

▪ 육묘 시 11월 전후에 파종하여 2~3년 생육시킨 후 생육이 튼실한 묘를 선발하여 11월 내외에 본생산지에 이식작업하고 있음.

- 종자는 크기가 크고 통통한 우량종자를 사용하는데, 잔류농약검사 등의 산양삼 생산 적합성조사(한국임업진흥원 종자검사)를 통한 검정결과가 첨부된 종자를 사용하는 것을 원칙으로 하고 있음.



그림9. 1년생 종묘(좌), 2년생 종묘(우)

(5) 생산지 관리(자연방입재배)

- 평창지역에서는 산양삼 생산 시 자연상태에서 생산되는 산양삼 본연의 야생성을 극대화 시키기 위하여 파종 이후 제초 및 병해충 관리 등의 인위적인 재배관리는 최소화하는 것(자연 방입재배)을 원칙으로 하고 있음.
- 평창산양삼 식재지는 평창군 관내 해발 700m이상의 산야지에 조성되어 있는 등 평창지역에서는 산양삼 생산 시 인위적인 재배관리를 최소화하고 자연상태로 산양삼을 생육시켜 생산하고 있음.



그림10. 평창군의 청정산지(해발 700 m 이상)에서 생육하는 평창산양삼

(6) 채취수확

- 평창지역에서는 파종 이후 약 5년 이상의 생육기간을 거쳐 산양삼을 채취수확하고 있는데, 수확시기는 주로 8월 중순에 산양삼의 잔뿌리가 상하지 않도록 조심하여 채심(채굴)하는 것을 원칙으로 하고 있음.
- 산양삼 주위를 넓게 잡아 삽이나 호미를 이용하여 작업 후 최종 나무갈 등을 이용하여 흙을 정리, 잔뿌리가 떨어지지 않도록 파내며 수확하는데, 수확 직후 나무 이끼를 덮어 수분이 증발 되지 않도록 관리하고 있음.



그림11. 평창 산양삼 수확 채취

○ 산양삼 검수 및 상품화

(1) 검수 및 상품화

- 평창산양삼의 검품은 평창산양삼 전문감정위원의 엄격한 공동검수를 과정을 거쳐 이를 통과한 산양삼만이 상품화되어 출하되고 있는데, 한국임업진흥원의 산양삼 품질(잔류 농약검사, 비료 사용여부 등) 검사증명서‘합격’통지받은 산양삼만이 검수과정을 거쳐 상품화되고 있음.
- 평창산양삼특구영농조합법인에서는 평창산양삼의 엄격한 품질관리 및 향상, 소비자 보호 등을 위하여‘평창산양삼 이력추적제’를 도입하고 있는데, 산양삼 출하 시 품질검사합격증(전문기관:한국임업진흥원)은 기본 진품이력추적이 가능한 RFID 태그와 생산자 상세정보를 확인 할 수 있는 QR코드를 부착하고 있음.



그림12. 한국임업진흥원 품질검사 합격증 및 QR코드

- 잎이 떨어진 후 채취한 근삼(뿌리)은 수태(이끼)를 이용할 경우 약5℃ 내외의 환경으로 저장하는 것을 원칙으로 하고 있으며, 동절기 판매를 위하여 장기간 보관할 경우 단열이 되는 상자에 이끼를 상·하로 덮은 후 1℃~2℃내외의 환경에서 저온 저장하는 것을 원칙으로 하고 있음.
- 거래단위는 주(뿌리)단위로, 길이 20cm×너비 10cm×높이 3cm이상의 포장상자를 사용하고 있음.



그림13. 평창산양삼 상품화

<1협동연구기관 : 경희대학교>

재료 및 방법

1. 실험재료 및 전처리

본 연구에서는 평창지역에서 재배된 산양삼 3년 근, 4년근, 5년 근, 7년 근을 가지고 사용하였다. 산양삼 시료의 전처리는 시료를 흐르는 물을 이용하여 3회 수세하고 증류수에 5분간 수침 후 증류수를 이용하여 최종 수세하고, paper towel이 깔린 테이블에서 표면을 건조하고 냉동실(-20℃)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

추출에 사용된 주정은 주정판매월드주식회사(전주, 대한민국)의 것을 사용하였고, 조사포닌 분석에 사용한 Ether 와 n-buthanol은 대정화금주식회사(시흥, 대한민국)의 것을 사용하였다. HPLC분석에는 HPLC grade등급의 용매를 사용하였다.

2. 팽화산양삼의 제조

산양삼의 동체를 1cm의 일정한 두께로 세절한 뒤 40℃ 열풍건조기를 이용하여 산양삼의 건조곡선(그림1)을 제작한 뒤에 수분함량을 건조시간 4시간 30분, 5시간, 5시간 30분으로 설정하였다. 각각 건조시간에 따른 수분함량은 약 14%, 10%, 8%로 나타났다. 고온에 의한 산양삼의 탄화를 최소화 하여 최적의 팽화 상태를 유지하기 위한 목적으로 건조한 산양삼 절편과 쌀을 1:50 (w/w)의 비율로 혼합하였으며, 이것을 회전식 팽화기에 넣고 가열하였다. 게이지 압력이 5 kgf/cm²에 도달했을 때 3 kgf/cm²으로 중간 압을 한번 빼준 뒤, 다시 가열하여 압력이 7 kgf/cm², 8 kgf/cm², 9 kgf/cm², 10 kgf/cm²에 이르렀을 때, 팽화기의 문을 개방하여 팽화를 유도하였다. 대조군으로는 건조과정을 거치지 않은 산양삼을 사용하였다.

3. 산-초고압 산양삼의 제조

냉동상태의 원삼을 사용하였으며 팽화 산양삼의 경우 원삼과의 수분함량 차이만큼 증류수를 첨가하여 사용하였다. 0.5M oxalic acid를 산 처리에 사용하였다. Dried solid

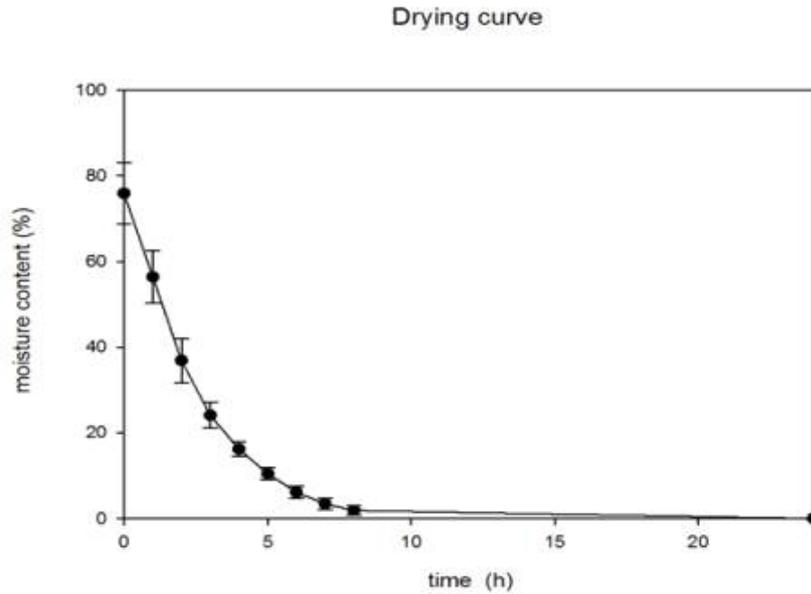


그림 1. 산양삼 건조 곡선

중량의 10배에 해당하는 산 용액을 가하여 믹서기를 이용하여 분쇄한 후 plastic pouch (Nylon)에 넣어 주었다. Pouch 내부의 공기를 최대한 제거한 상태로 heat sealer로 밀봉하였다. 상압-산 처리의 경우 상온에서 15분간 방치하였으며, 초고압-산 처리의 경우 550 MPa에서 15분간 초고압 처리를 진행하였다. 반응이 완료된 후에 2M NaOH를 이용하여 pH 4.75로 중화시켰다. 대조군으로는 산 용액과 중화를 위해 첨가한 NaOH 대신하여 동량의 증류수를 첨가한 시료를 사용하였다.

4. 산양삼 일반성분 분석

산양삼의 일반성분은 AOAC법을 따라 분석하였다. 즉 수분함량은 105°C dry oven에서 24시간 건조하여 측정하였으며, 조지방은 soxhlet추출법으로, 질소함량은 digester (MBCM12, Raypa, barcelona, Spain), distiller (DNP1500, Raypa, barcelona, Spain), 및 titrator (Hirschmann Laborgerate, Akku-drive, Eberstadt, Germany)를 이용하여 semi-micro Kjeldahl법으로 계산하였다. 조회분은 550°C 회화법을 이용하여 분석하였다.

5. 추출

각각의 산양삼 시료를 생물기준 3년 근 500g(고형분 약 109.8g) 5년 근 200g(고형분 약 51.0g) 7년 근 200g(고형분 약 56.8g)에 70% 주정에탄올 12.5L 5L 5L를 가한 뒤, 70°C에서 24시간동안 환류냉각추출기(JUNG SUNG HASCOM glass extractor, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. Kimble-filtering flask에 funnel을 장착하고 여과지

(whatman No.2)를 사용하여 추출물을 여과한 뒤 여과액을 미리 항량된 수기에 넣어 50℃의 수온에서 Rotary vacuum evaporator를 사용하여 감압농축 (EYELA Rotary vacuum evaporator N-11, Japan)하고, 농축물을 제조하였다.

팽화산양삼의 추출은 앞서 사용한 방법이 아닌 상온에서 수출하는 방법을 사용하였다. 시료의 양이 크게 차이 나기 때문에 추출방법을 달리 하였다. 팽화 산양삼 시료 고형분 5 g에 70% 주정에탄을 25배를 가한 뒤, 상온에서 마그네틱 바를 이용하여 회전시키면서 30분 동안 추출하였다. Kimble-filtering flask에 funnel을 장착하고 여과지 (Whatman No.2)를 사용하여 추출물을 여과한 뒤 여과액을 추출물로 사용하였다. 여과액을 미리 항량된 수기에 넣어 50℃의 수온에서 Rotary vacuum evaporator를 사용하여 감압농축 (EYELA Rotary vacuum evaporator N-11, Japan)하고, 농축물을 제조하였다.

2, 3년차의 초고압 처리가 사용된 시료의 경우 시료의 높은 수분함량으로 인해 추출용매의 희석현상이 나타났다. 때문에 시료의 수분함량을 고려하여 95% 주정 에탄올과 70% 주정 에탄올을 이용하여 dried solid 중량에 80배에 해당하는 70% 주정 에탄올을 사용한 것과 같은 효과를 내었다. 추출은 상온에서 마그네틱 바를 이용하여 회전시키면서 30분 동안 추출하였다. Kimble-filtering flask에 funnel을 장착하고 여과지 (Whatman No.2)를 사용하여 추출물을 여과한 뒤 여과액을 추출액으로 사용하였다. 추출액을 열풍건조기(HB-502M, HanBeak Scientific Co., Bucheon-si, Republic of Korea)에 넣고 105 ℃에서 건조하였다. 모든 시료는 추출액의 일부를 105℃에서 24시간 건조 항량시킨 뒤 무게를 측정하여 다음과 같은 식(1)을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Extraction yield (\%)} = \dots\dots\dots (1)$$

Where,

W1 = Initial weight of aluminum dish (g)

W2 = Weight of aluminum dish and solid (g)

A = Weight of sample (g)

E = Total volume of extract (mL)

E' = Used volume of extract (mL)

6. 조사포닌 분석

시료의 조사포닌 함량을 식품공전에 따라 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 농축액에서 시료2g에 해당하는 양과 증류수 25ml을 분액깔때기에 넣고 diethyl ether 25ml을 더한 다음 시료가 골고루 섞이도록 잘 흔들어준 후 물 층과 에테르 층으로 분리 될 때까지 방치 시켰다. 분리된 에테르 층은 버리고 남아있는 물 층에 다시 수포화 부탄올 25ml을 더하여 다시 잘 흔들어준 후 분리 될 때까지 방치시켰다. 분리된 수포화 부탄올 층은 따로 모아놓아 물 층에 다시 수포화 부탄올을 분는 과정을 3번 반복하였다. 분리된 수포화부탄올에 물 50ml를 넣고 잘 흔들어 준 후 다시 분리 될 때까지 방치시

킨 후 Rotary vacuum evaporator를 사용하여 미리 항량된 수기에 넣고 감압 농축하였다. 감압농축 후 dry oven에서 2시간 건조 항량시킨 후 무게를 측정하여 다음과 같은 식(2)를 이용하여 조사포닌 함량을 측정하였다.

$$\text{Crude saponin (mg/g ginseng)} = \dots\dots\dots (2)$$

Where,

W1 = Weight of the dried sample and flask (mg)

W2 = Weight of the flask (mg)

W3 = Weight of total dried ginseng (g)

A = Weight of total concentrations (g)

B = Weight of used concentrations (g)

7. Ginsenosides profile 분석

Ginsenoside profile은 6에서 얻어진 조사포닌 시료에 HPLC grade methanol 5 mL을 넣어 용해한 후 Millipore filter (pore size 0.45 μm)로 여과한 후 HPLC (agilent 1260, USA)를 이용하여 분석하였다. Binary gradient elution solvent로는 증류수 (A)와 acetonitrile (B)를 mobile phase: 0 - 7 min, 81% A, 19% B; 7 - 11 min, 71% A, 29% B; 11-14 min, 71% A, 29% B; 14 - 25 min, 60% A, 40% B; 25-28 min, 44% A, 56% B; 28-30 min, 30% A, 70% B; 30-31.5 min, 10% A, 90% B; 31.5-34 min, 10% A, 90% B; 34-34.5 min, 81% A, 19% B; 34.5-40 min, 81% A, 19% B로 사용하였다. Mobile phase의 flow rate는 0.6 mL/min을 이용하였고, sample injection 양은 5 μL , 분석 온도는 45 $^{\circ}\text{C}$ 에서 진행하였다.

8. 항산화능

8.1 Total flavonoid 함량

Total Flavonoids contents (TFC)는 Zhishen, Mengcheng, & Jianming, 1999()의 방법을 수정하여 측정 하였다. 추출액 0.5 mL, 증류수 3.2 mL 및 5 % NaNO₂ 0.15 mL를 혼합 하였다. 5 분 후, 10 % AlCl₃ 0.15 mL를 첨가 하였다. 1 분 후, NaOH 1ml를 첨가하였다. Blank는 3차 증류수를 사용 하였으며 Blank로 영점을 잡은 후 510 nm에서 흡광도를 측정 하였다. Catechin을 표준 물질로 사용하였으며, 총 페놀 함량은 mg catechin equivalent (CE) / g dried ginseng으로 표기하였다.

8.2 Total phenolic 함량

Total phenolic content (TPC)은 수정 된 Folin-Ciocalteu 방법으로 측정 하였다 Singleton & Rossi, 1965(). 추출액 200 μL , 증류수 2.6 mL 및 Folin-Ciocalteu 용액 200 μL 를 6 분 동안 반응시켰다. 반응 후, Na₂CO₃ 2 mL를 첨가하고, 90분간 상온에서 반응시켰다. Blank는 3차 증류수를 사용 하였으며 Blank로 영점을 잡은 후 750 nm에서 흡광도를 측정 하였다. gallic acid를 표준 물질로 사용하였으며, 총 페놀 함량은

mg gallic acid equivalent (GAE) / g dried ginseng으로 표기하였다.

8.3 DPPH radical 소거능

추출물의 DPPH 유리 radical 소거능은 DPPH와 80 % 메탄올을 사용하여 0.1 mM DPPH 용액을 제조하는 방법Blois, 1958Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995(;) 을 수정하여 측정 하였다. 80% methanol을 이용하여 DPPH solution의 흡광도를 517nm 에서 0.650 ± 0.020 로 맞추었다. DPPH 용액과 추출물을 혼합하고 암실에서 30 분간 반응시켰다. 517nm에서의 흡광도를 측정 한 후 다음과 같은 식(3)을 이용하여 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 비타민 C를 표준물질로 사용하였으며, 추출물의 radical 소거 활성을 mg vitamin C equivalent (VCE) / g dried ginseng로 표기하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{\text{reference}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{reference}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

Where,

$A_{\text{reference}}$ = the absorbance of the blank sample

A_{sample} = the absorbance of the tested sample at 30 min

reference = the mixture of 0.1 mL of 80% MeOH and 2.9 mL of DPPH radical solution

9. 통계분석

모든 실험을 3 번 반복 측정하였다. 실험 데이터는 분산 분석 (ANOVA)에 의해 분석되었고 평균값 \pm 표준 편차로 표현되었다. Duncan's multiple range tests는 실험 평균값 사이의 유의 한 차이를 평가하기 위해 수행되었습니다 ($p < 0.05$). 모든 통계 계산 및 분석은 SAS 소프트웨어 (버전 8.2, SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA)를 사용하여 수행되었습니다.

결과

1. 산양삼의 전처리와 형태



그림 2 연 근별 산양삼의 형태

초기의 산양삼은 그림2와 같은 모습을 나타내었다. 3년 근은 동체가 작고 잔뿌리의 수가 대체로 적은 것을 보였고, 5년 근과 7년 근 산양삼에 비하여 눈에 띄게 작았다. 5년 근과 7년 근의 차이는 동체의 둘레길이가 차이가 났으며 잔뿌리의 수 역시 7년 근에서 많이 나타났다.

2. 산양삼의 연 근별 일반성분

표 1 산양삼의 일반성분

	수분함량	조지방	조단백	조회분
3년 근	78.04±2.26 ^a	0.83±0.14 ^b	8.77±0.14 ^b	5.04±1.43 ^a
5년 근	74.47±1.43 ^{ab}	0.85±0.12 ^b	9.58±3.12 ^b	5.14±1.42 ^a
7년 근	71.58±0.98 ^b	1.36±0.28 ^a	11.66±1.51 ^a	5.92±0.99 ^a

*Significant differences between values are indicated by different letters (P < 0.05).

산양삼의 일반성분 분석결과를 표1에 나타내었다. 조지방, 조단백질 함량은 7년 근에서 가장 높게 나타났다. 5년 근, 3년 근 순으로 나타났지만 3년 근과 5년 근에서는 유의차가 나타나지 않았다. 조회분과 수분함량의 결과는 반대로 3년 근, 5년 근, 7년 근 순으로 함량이 높은 것으로 나타났다. 하지만 조회분에서는 유의차가 나타나지 않았다.

3. 산양삼의 연 근별 추출 수율 및 조사포닌

표 2 산양삼 추출수율 및 조사포닌 함량

	추출수율 (%)	조사포닌 함량 (mg/g dried ginseng)
3년 근 산양삼	38.29±0.17 ^c	78.57±3.25 ^a
5년 근 산양삼	52.56±0.63 ^a	75.72±0.17 ^a
7년 근 산양삼	47.67±0.68 ^b	65.50±3.92 ^b

*Significant differences between values are indicated by different letters (P < 0.05).

산양삼을 환류추출 했을 때의 추출수율은 표2와 같다. 추출수율은 5년 근에서 가장 높았고, 7년 근, 3년 근 순이었다. 하지만 조사포닌 함량결과를 보면 3년 근과 5년 근의 유의차는 없었고 7년 근의 조사포닌 함량이 상대적으로 낮게 나타났다. 추출수율과 조사포닌 함량의 관계는 상관관계를 가지지 않는 것으로 보인다.

4. 산양삼의 연 근별 진세노사이드 함량

표 3 환류냉각추출한 산양삼 ginsenoside 함량(mg/g dry ginseng)

	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg	C-K	Rh2	total
3년 근	1.92± 0.020 ^c	8.90± 0.163 ^a	1.26 0.10 6 ^b	0.69± 0.037 ^a	9.05± 0.035 ^b	8.31± 0.117 ^b	1.12± 0.035 ^b	1.08± 0.022 ^c	N.D.	0.13± 0.136 ^a	0.36± 0.058 ^a	32.81 ±0.49 9 ^b
5년 근	2.08± 0.078 ^b	6.02± 0.082 ^b	1.17± 0.040 ^b	0.54± 0.059 ^b	8.49± 0.040 ^c	7.45± 0.126 ^c	0.804 ±0.04 0 ^c	1.18± 0.041 ^b	N.D.	0.05± 0.006 ^a	0.29± 0.088 ^b	28.09 ±0.42 1 ^c
7년 근	3.22± 0.087 ^a	7.85± 0.196 ^c	1.72± 0.098 ^a	0.70± 0.037 ^a	12.67 ±0.03 8 ^a	10.26 ±0.22 5 ^a	1.27± 0.038 ^a	1.44± 0.047 ^a	N.D.	0.05± 0.034 ^a	N.D.	39.19 ±0.90 1 ^a

*Significant differences between values are indicated by different letters (P < 0.05).

*N.D. = Not Detected

그림3는 환류 추출한 3년 근, 5년 근, 7년 근 산양삼의 HPLC chromatogram으로 정성적인 분석 후에 미리 standard curve를 이용하여 각각의 피크의 면적을 계산하여 표3의 ginsenoside 함량을 나타내었다. Total ginsenoside는 7년, 3년, 5년 순으로 나타났다. 특히적으로 Rh2의 경우는 7년 근에서 검출되지 않았다. Rh2의 경우 일반인삼에서는 존재하지 않고 산삼에만 미량 들어있다고 알려져 있는데 7년 근의 경우 chromatogram에서는 peak가 미세하게 나타났지만 정량적으로 분석될만한 양이 아니기 때문에 검출이 되지 않은 것 이라 판단된다.

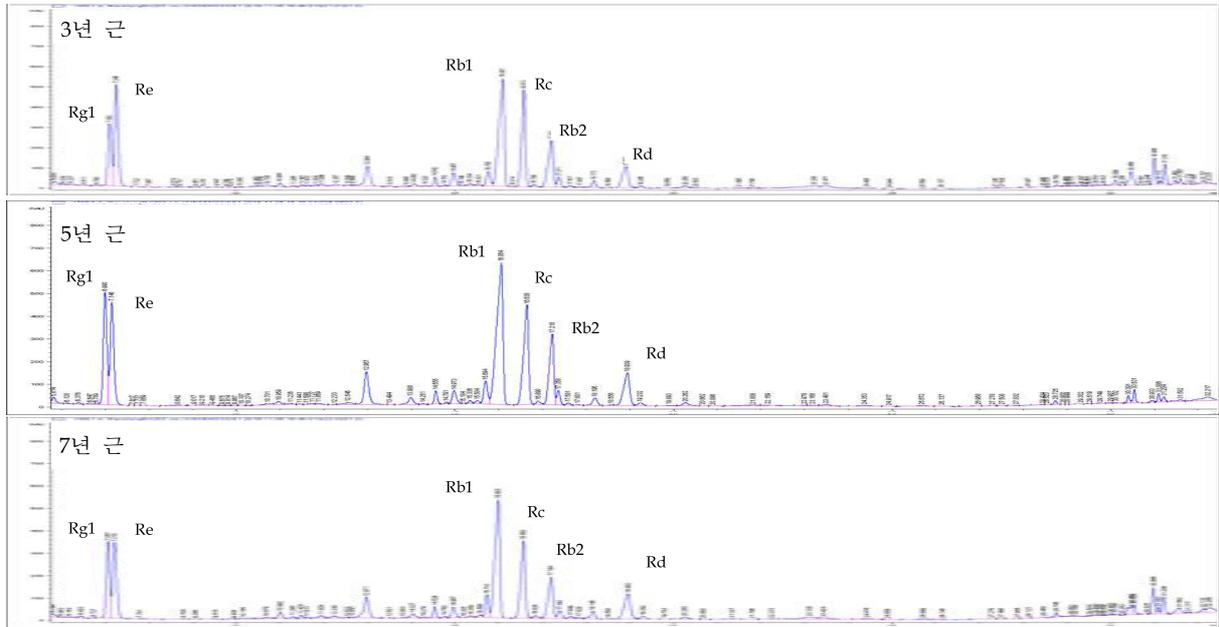


그림 3 산양삼 HPLC chromatogram

조사포닌 함량에서는 3년 근, 5년 근, 7년 근 순서로 큰 값을 나타내었지만 HPLC 분석을 통해 Rg1, Re, Rf, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rd, compound k, Rh2 등의 함량을 보았을 때 7년 근, 3년 근, 5년 근 순으로 나타났다.

5. 추출방법에 따른 추출수율 및 조사포닌

표 4 3년 근 삼양삼의 추출방법별 비교

	추출수율 (%)	조사포닌 함량 (mg/g dried ginseng)
환류 추출 3년 근 산양삼	38.29±0.17 ^a	78.57±3.25 ^a
상온 추출 3년 근 산양삼	24.16±0.24 ^b	67.60±8.43 ^b

*Significant differences between values are indicated by different letters (P < 0.05).

추출방법에 따른 차이를 보기위해 3년 근의 추출을 비교하였다. 시료의 양이 크게 차이가 나기 때문에 환류추출과 상온추출 등 추출방법을 달리하여 추출하였다. 3년 근 산양삼의 추출방법에 따른 추출수율과 조사포닌 함량을 표4에 나타내었다. 환류추출한 3년 근 산양삼의 추출수율이 38.29로 나타났고 상온추출한 산양삼의 추출수율을 이보다 유의적으로 낮은 24.16으로 나타났다. 환류추출의 경우 상온추출에 비하여 장시간 동안 진행되기 때문인 것으로 판단된다. 또한 추출과정에서 환류추출은 비교적 높은

온도에서 이루어지는 반면 상온추출은 낮은 온도에서 이루어지기 때문에 환류추출의 경우 열에 의해 많은 성분들이 용매로 이행이 되기 때문에 더 높은 추출수율을 나타냈을 것으로 판단된다. 조사포닌 함량 역시 환류추출한 3년 근 산양삼에서 78.57로 상온 추출한 3년 근 산양삼 67.60보다 유의적으로 높은 함량을 나타냈다.

6. 추출방법에 따른 ginsenoside 함량

표 5 추출방법에 따른 ginsenoside 함량(mg/g dry ginseng)

	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3	C-K	Rh2	total
환류추출			1.2									
3년 근	1.92±	8.90±	6 ±	0.69±	9.05±	8.31±	1.12±	1.08±		0.13±	0.36±	32.81
산양삼	0.02 ^a	0.16 ^a	0.1	0.04 ^a	0.04 ^a	0.12 ^a	0.04 ^a	0.02 ^a	N.D.	0.14 ^b	0.06	±0.50 ^a
			6 ^a									
상온추출	1.67	8.12	1.11	0.47	4.91	5.01	0.64	0.36		0.27		22.56
3년 근	±0.0	±0.3	±0.0	±0.0	±0.2	±0.2	±0.0	±0.0	N.D.	±0.0	N.D.	±0.2
산양삼	7 ^b	5 ^b	5 ^b	4 ^b	4 ^b	6 ^b	4 ^b	3 ^b		5 ^a		9 ^b

*Significant differences between values are indicated by different letters (P < 0.05).

*N.D. = Not Detected

3년 근 산양삼의 추출방법에 따른 ginsenoside 함량을 표5에 나타냈다. 진세노사이드 함량도 추출수율과 조사포닌 함량과 마찬가지로 compound K를 제외한 모든 ginsenoside 함량이 환류추출한 3년 근 산양삼에서 높게 나타났다. 진세노사이드 Rh2는 상온추출한 3년 근 산양삼의 경우 정성적으로는 검출이 되었지만 standard curve에 의해 정량분석이 가능한 양이 아니었기 때문에 정량분석으로 검출이 되지 않았다고 나타내었다.

7. 팽화처리에 의한 산양삼의 추출수율 및 조사포닌 함량

표 6 팽화산양삼 추출수율 및 조사포닌 함량

	추출수율 (%)	조사포닌 (mg/g dried ginseng)
팽화하지 않은 산양삼	24.16 ± 0.24 ^a	67.6 ± 8.43 ^{abc}
14%-7 kgf/cm ²	22.13 ± 0.41 ^{abcd}	59.8 ± 1.73 ^{bc}

14%-8 kgf/cm ²	20.23 ± 0.48 ^{bcd}	39.8 ± 0.99 ^c
14%-9 kgf/cm ²	23.60 ± 5.12 ^{ab}	63.8 ± 3.66 ^{abc}
14%-10 kgf/cm ²	19.20 ± 1.53 ^{de}	64.6 ± 3.24 ^{abc}
10%-7 kgf/cm ²	21.68 ± 1.13 ^{abcd}	64.4 ± 6.47 ^{abc}
10%-8 kgf/cm ²	21.04 ± 0.73 ^{abcd}	53.0 ± 5.54 ^{bc}
10%-9 kgf/cm ²	19.75 ± 0.24 ^{cde}	64.5 ± 2.21 ^{abc}
10%-10 kgf/cm ²	19.76 ± 0.28 ^{cde}	55.2 ± 2.36 ^{bc}
8%-7 kgf/cm ²	23.09 ± 0.63 ^{abc}	90.8 ± 3.32 ^a
8%-8 kgf/cm ²	20.48 ± 0.73 ^{bcd}	59.8 ± 7.16 ^{bc}
8%-9 kgf/cm ²	19.60 ± 0.97 ^{cde}	73.4 ± 5.93 ^{ab}
8%-10 kgf/cm ²	17.12 ± 2.78 ^e	58.9 ± 7.05 ^{bc}

*Significant differences between values are indicated by different letters (P < 0.05).

*N.D. = Not Detected

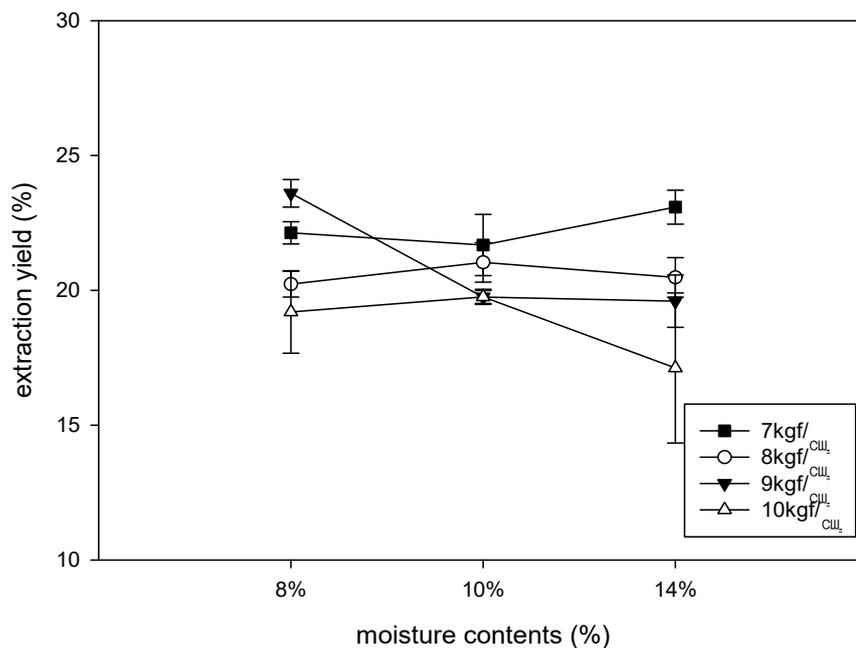


그림 4 수분함량에 따른 팽화산양삼의 추출수율

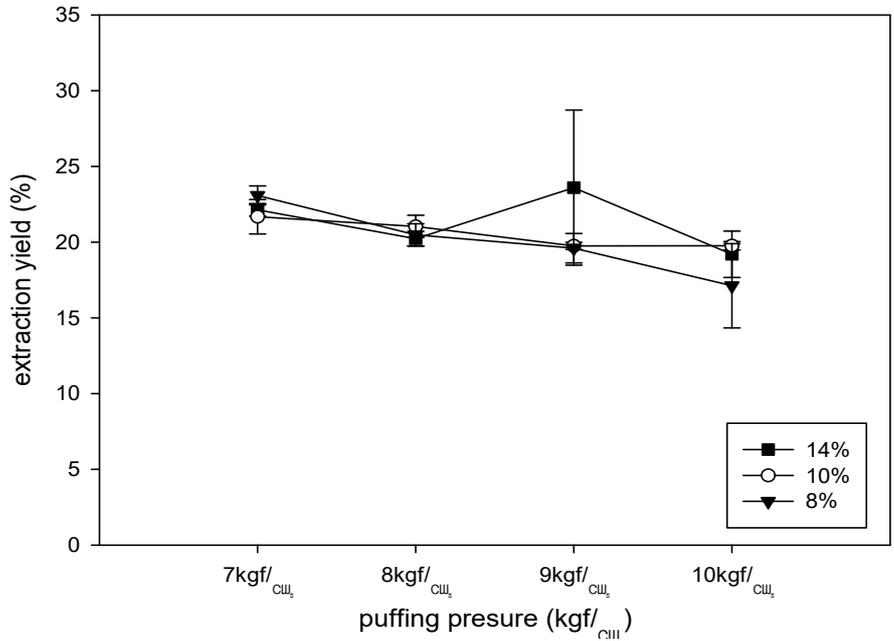


그림 5 팽화압력에 따른 팽화산양삼의 추출수율

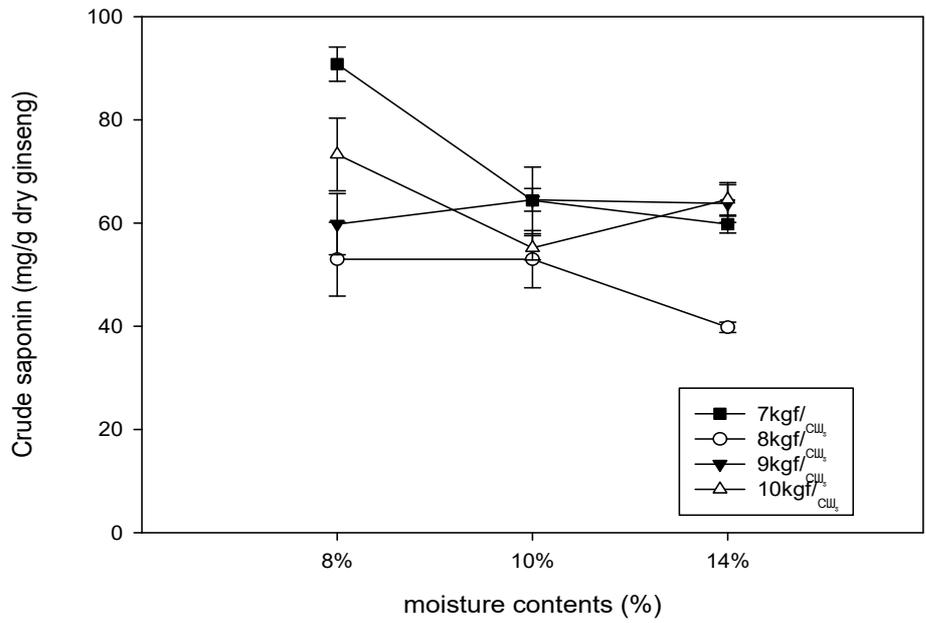


그림 6 수분함량에 따른 팽화산양삼의 조사포닌의 함량

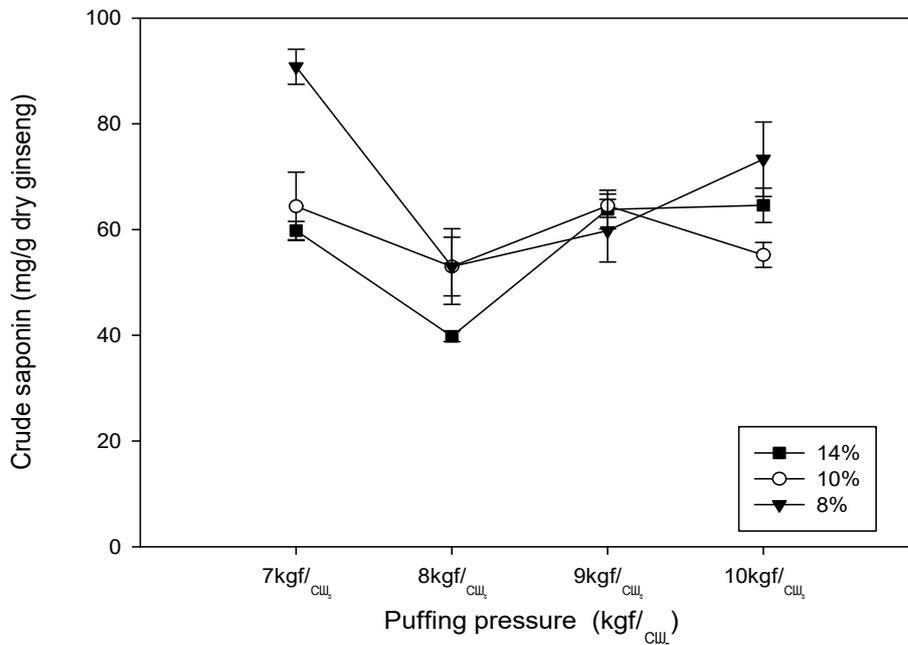


그림 7 팽화압력에 따른 팽화산양삼의 조사포닌의 함량

팽화처리한 산양삼의 추출수율과 조사포닌 함량을 표6에 나타내었다. 팽화처리한 3년 근 산양삼의 경우 처리하지 않은 산양삼보다 추출수율이 낮아진 것을 볼 수 있다. 그림4에서 팽화 압력이 일정한 조건에서 수분 함량 증가에 따라 대체로 일정하였지만 10 kgf/cm² 조건에서는 감소하는 것을 보였다. 그림5을 보면 수분함량이 일정한 조건에서 팽화 압력이 증가함에 따라 추출 수율이 유의적으로 감소하였다. 팽화 산양삼의 추출 수율은 초기 수분 함량 보다는 팽화 압력에 의한 영향이 더 크게 작용함을 알 수 있다.

그림6은 같은 압력조건에서 수분함량에 따른 조사포닌 함량을 나타낸 그래프이다. 그림7을 보면 모든 수분함량에서 8kgf/cm²에서 최솟값을 보이고 9kgf/cm²에서 다시 증가하는 모습을 보였다. 앞서 환류추출한 산양삼의 추출수율과 조사포닌 함량이 일치하지 않았듯이 팽화처리한 산양삼 시료에서도 추출수율 값과 조사포닌 함량이 일치하지 않는 것으로 나타났다.

대조군으로 사용된 팽화처리하지 않은 3년 근의 조사포닌 함량은 67.6mg/g dried ginseng으로 나타났는데 이는 전체 데이터에서 3번째로 높은 값으로 나타났다. 이는 팽화 과정 중에 고온에 의한 ginsenoside의 분해에 관련이 있다고 생각된다. 열에 의해 손실되는 ginsenoside의 양이 분해되어 생성되는 ginsenoside의 양보다 많기 때문에 전체적인 총량에서는 감소하는 것은 이미 기존의 논문들에서 보고된 바 있다.

8. 팽화 산양삼의 ginsenoside 함량

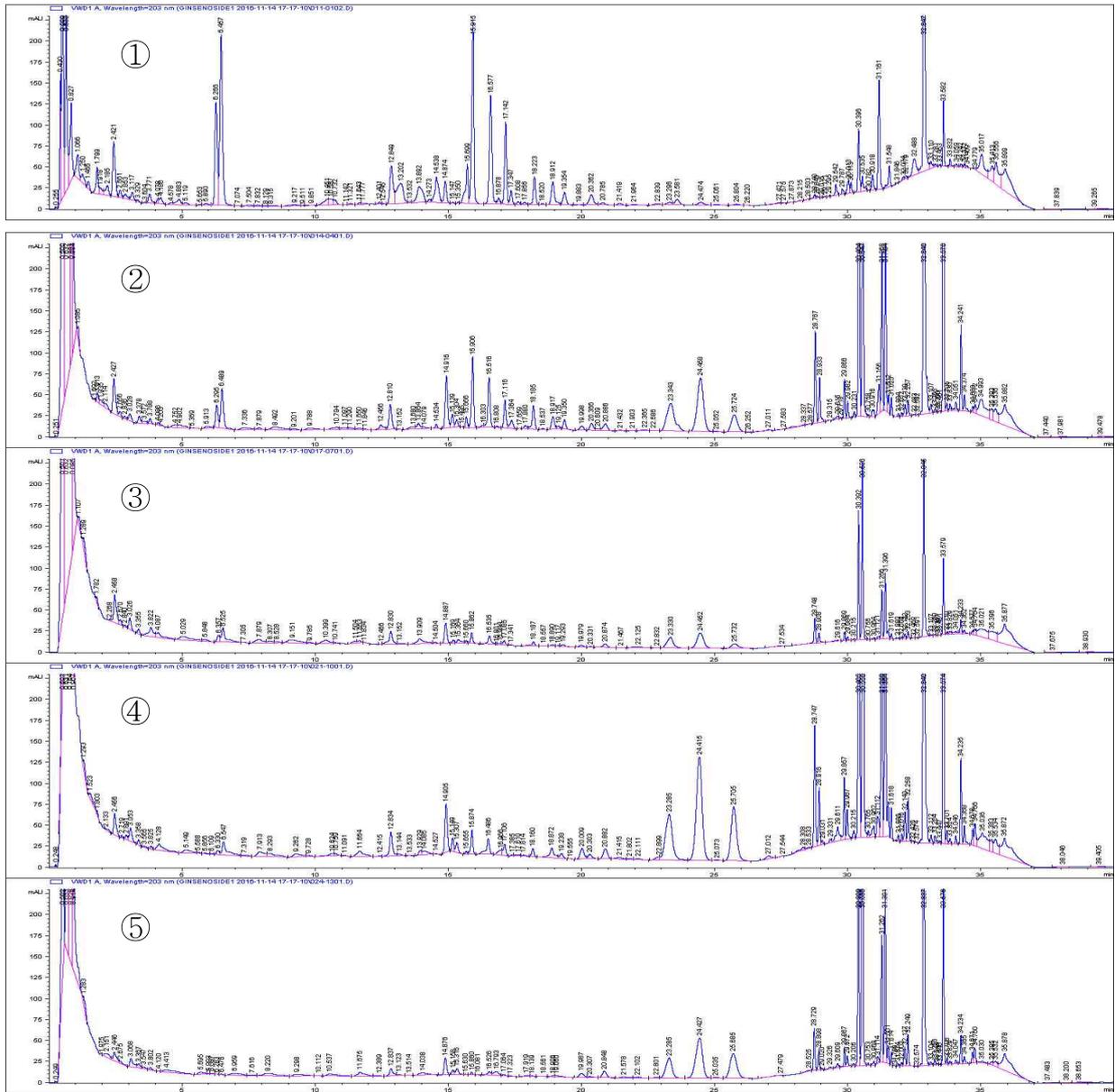


그림 8 수분함량 14% 팽화산양삼의 HPLC chromatogram

①대조군, ②14%-7kgf/cm², ③14%-8kgf/cm², ④14%-9kgf/cm², ⑤14%-10kgf/cm²

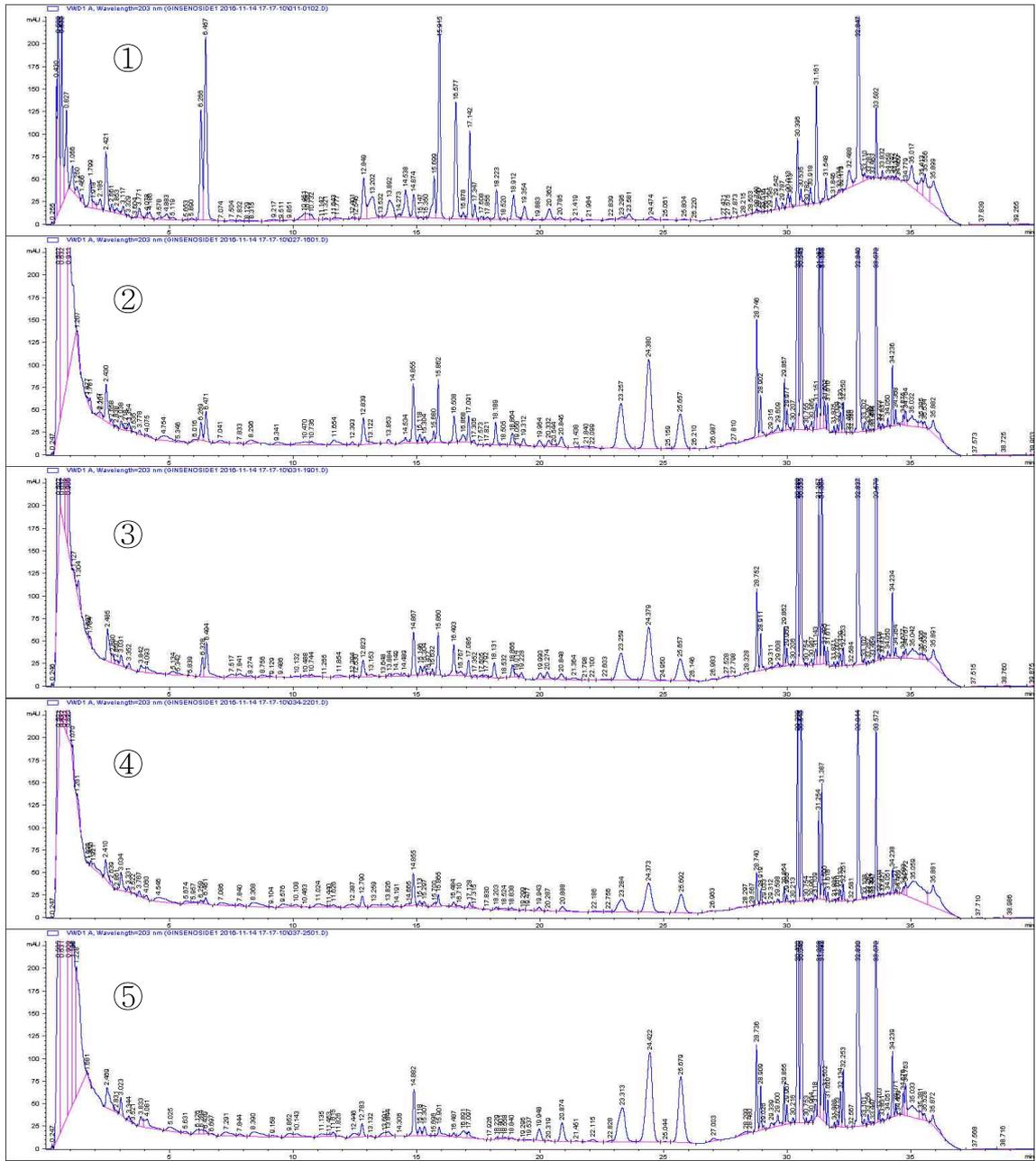


그림 9 수분함량 10% 팽화산양삼의 HPLC chromatogram
 ①대조군, ②10%-7kgf/cm², ③10%-8kgf/cm², ④10%-9kgf/cm², ⑤10%-10kgf/cm²

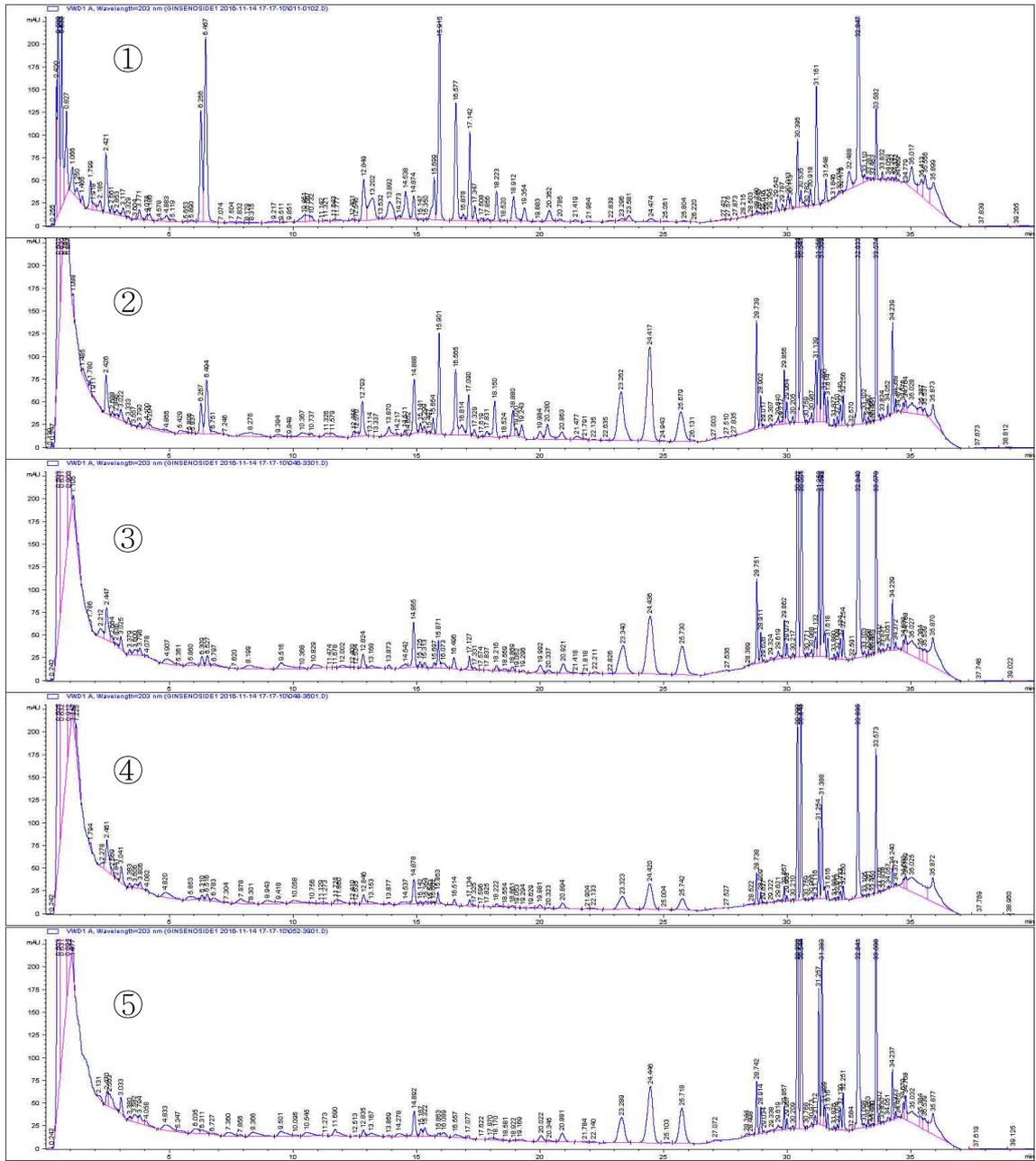


그림 10 수분함량 8% 팽화산양삼의 HPLC chromatogram
 ①대조군, ②8%-7kgf/cm², ③8%-8kgf/cm², ④8%-9kgf/cm², ⑤8%-10kgf/cm²

Significant differences between values are indicated by different letters (P < 0.05).
 *control= Untreated wild ginseng , **N.D. = Not Detected

그림8, 그림9, 그림10을 각각 보았을 때 팽화하지 않은 산양삼에서는 23분~26분 사이에 peak가 생성되지 않았지만 팽화처리한 시료에서는 peak가 생긴 것을 볼 수 있

다. 이 부근에서의 피크는 minor ginsenoside인 Rg3, compound K 그리고 Rh2로 팽화 처리 시에 이들의 peak가 커지는 것을 볼 수 있었다.

팽화 산양삼의 ginsenoside 함량을 나타낸 표7을 보았을 때 팽화 전에 비하여 major ginsenoside인 Rg1, Re, Rf, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rd의 함량이 크게 감소하고 minor ginsenoside인 Rg3, compound K, Rh2의 함량이 크게 증가한 것을 볼 수 있었다. Total ginsenoside의 범위는 1.86에서 9.29로 팽화처리하지 않은 대조군에 비하여 16.7%에서 83.0% 감소하였다. 열처리에 의하여 major ginsenoside가 분해되어 minor ginsenoside인 Rg3와 compound K로 변화 되었고 현재의 분석조건에서 분석을 하지 못하는 성분들로 구조가 파괴되었기 때문이라고 판단된다. 한편 팽화를 하였을 때 산삼에서만 검출되는 minor ginsenoside인 Rh2의 함량도 크게 증가하는 것으로 나타났다. 홍삼 등에 특이적으로 검출되는 Rg3와 산삼에서 특이적으로 발견되는 Rh2는 항암 효과와 면역력증가에 효과를 나타내는 것으로 많이 보고되었다. 결과적으로 산양삼을 팽화하였을 때 추출수율, 조사포닌 함량 및 진세노사이드 함량이 줄어들었지만 산삼 및 홍삼에서 발견되는 minor ginsenoside인 Rh2와 Rg3가 특이적으로 증가된다는 것을 확인할 수 있었다.

<2협동연구기관 : 단국대학교>

산양삼 유효성분 극대화를 위한 최적 생물전환조건 탐색

1.1. 1년차 연구내용 전체 요약

- 3년근, 5년근, 7년근 산양삼을 각각 70% ethanol (EtOH)로 70℃에서 24시간 환류 추출 후 농축하여 기능성 분석을 수행하였음. 이를 위해 산양삼의 total phenolic contents(TP), total flavonoid contents(TF)를 측정하였고, 산양삼의 항산화능을 알아보기 위해 DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능을 측정하였음. 그 결과, TP의 경우 52.78±1.37-62.60±0.91 mg gallic acid equivalent/100 g으로 나타났으며, TF의 경우 13.26±1.24-18.77±1.02 mg catechin equivalent/100 g로 나타났다. 산양삼의 항산화능은 DPPH radical 소거능의 경우 12.99±0.41-17.21±0.27 mg vitamin C equivalent/100 g, ABTS radical 소거능의 경우 33.46±0.88-41.90±1.64 mg vitamin C equivalent/100 g으로 측정되었음. 모든 실험 결과에서 3년근 측정값이 유의적으로 가장 높게 나타났으며, 5년근과 7년근은 비슷하거나 약간에 차이가 있는 것으로 나타났음(p<0.05). 이상의 결과를 통해 총페놀, 총플라보노이드 함량 및 항산화능은 3년근 산양삼이 가장 우수한 것으로 나타남.
- 산양삼의 최적 생물전환 조건을 탐색하기 위하여 구입한 시판 효소 10개 중 사포닌을 분해하는 효소로 알려져 있거나 사포닌을 분해하는 미생물과 관련된 효소 3개를 선정하여 항산화 효과가 가장 좋은 3년근 산양삼 추출물과 반응시켰으며, 그에 따른 산양삼 성분 변화정도를 HPLC를 이용하여 확인하였음. 그 결과, 산양삼 추출물의 성분의 변화를 확인할 수 있었으며, 이를 토대로 2년차에 생물소재 전환을 위한 효소 반응 최적화를 진행 할 예정임.

2. 산양삼 추출물 제조

2.1. 방법 및 내용

- 강원도 평창군에서 재배한 3년근, 5년근 7년근 무농약 산양삼을 구입하였음.
- 3년근 500 g, 5년근 200 g, 7년근 200 g을 1·2·3차 과정을 통해 수세하여 증류수에 세척한 후 자연 건조하였으며, 건조한 산양삼은 건조중량을 알아보기 위해 수분함량을 잰 후에 시료와 70% 에탄올을 1:25(w/v) 비율로 70°C에서 24시간 환류 추출(JUNG SUNG HASCOM glass extractor ,Seoul ,Korea)하여 추출물을 얻었으며, 이 추출물을 (Rotary vacuum evaporator N-11, EYELA, Japan) 이용해 농축하였으며 -20°C에서 냉동보관 하였다가 시료로 사용하였음.
- 추출물의 TP, TF, antioxidant capacity 등 기초 기능성 분석을 수행함.

2.2. 연구 결과

- 총 농축된 양은 3년근 840 mL, 5년근 191 mL, 7년근 165 mL이었고, 이에 따른 수분 함량은 3년근이 78.04%, 5년근이 74.47%, 7년근이 71.58%로 나타남.(그림 1)
- 수분함량을 토대로 산양삼의 원물대비건조중량은 3년근의 경우 500 g에서 109.77 g으로 나타났고, 5년근의 경우 200 g에서 51.07 g, 7년근 200g에서 56.85 g으로 나타났음.
- 산양삼의 재배기간에 따라 색상 및 부유 상태가 모두 달랐음. 7년근의 경우 보관 후 5년근 보다 조금 더 진한 녹색을 띠며.

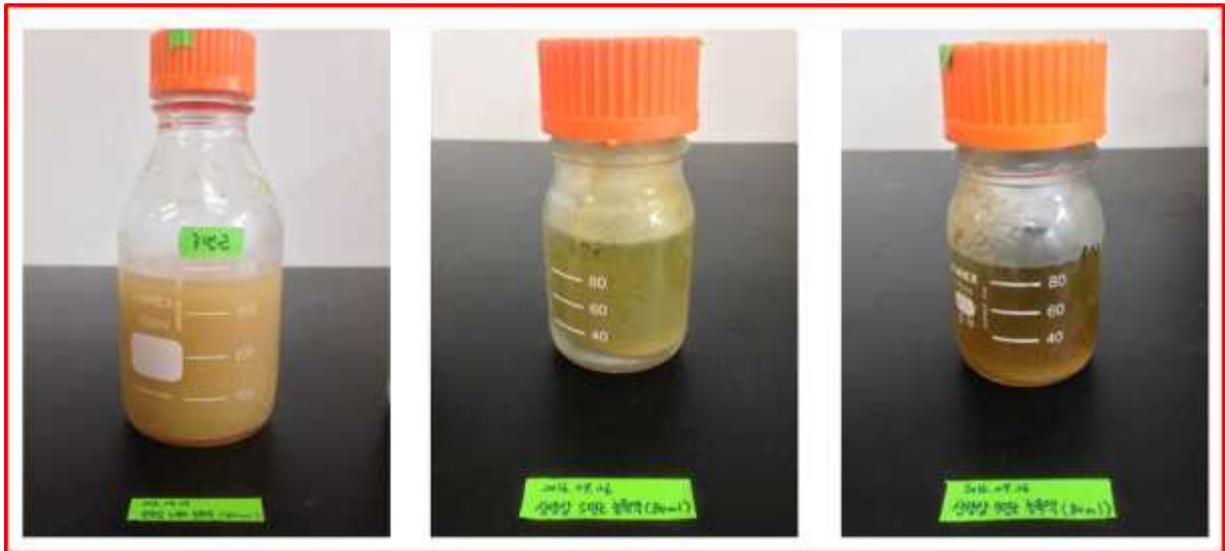


그림 1 환류 추출한 3·5·7년근 산양삼 농축액

- 시료 농축액의 경우 농축량이 달라 분석에 어려움이 있어 생물 산양삼 기준 100 mL 당 20 g이 농축되도록 70% 에탄올로 재농축 하였음. (그림2)

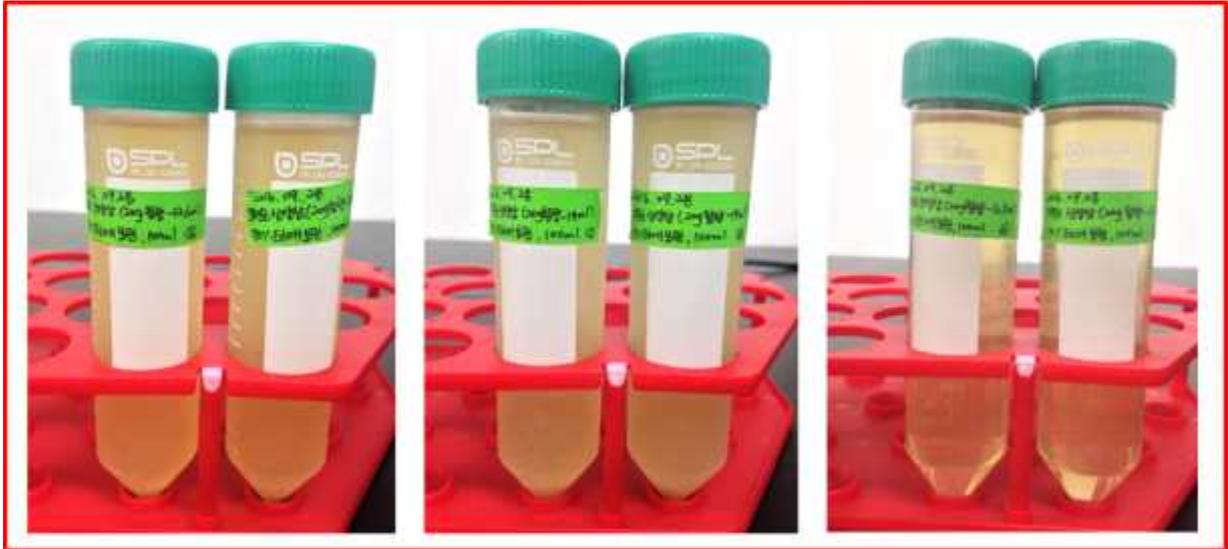


그림 2 3·5·7년근 산양삼 농축액 (생물 산양삼 기준 20 g 함량)

- 수분함량을 통하여 기능성 평가에 사용하기 위한 산양삼 농축액의 원물대비 건조 중량을 환산하였을 때 3년근 4.392 g, 5년근 5.106 g, 7년근 5.684 g으로 나타났음(표 1).

표 1 산양삼 농축액 원물 대비 건조 중량

	Fresh ginseng (농축 후 산양삼 양)	Dry weight
3 년근	20 g	4.392 g
5 년근	20 g	5.106 g
7 년근	20 g	5.684 g

3. 산양삼 추출물의 총폴리페놀, 총플라보노이드 및 항산화능

3.1. 방법 및 내용

산양삼 농축액 냉동보관(-20oC) 시 발생하는 침전물 제거 후 원심분리 후 시료로 사용하였음.

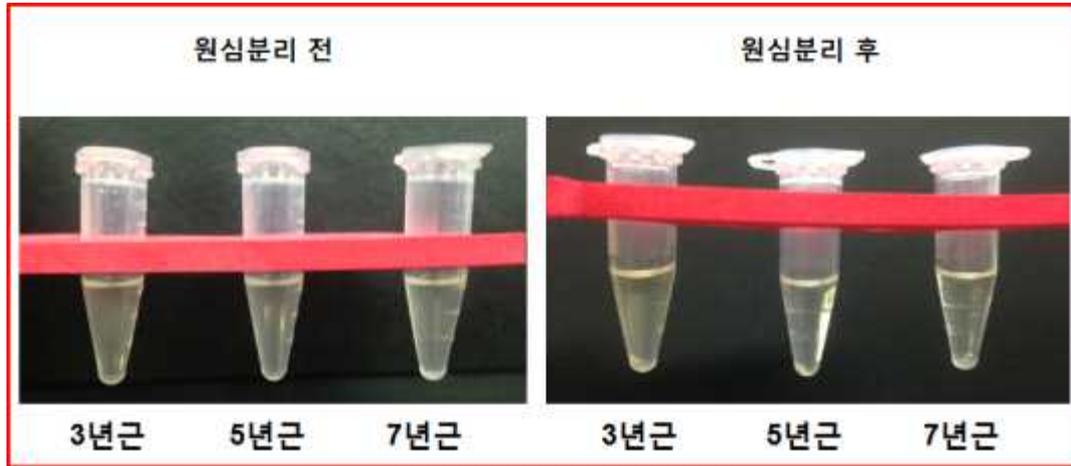


그림 3 산양삼 농축액의 원심분리 후 시료 상태

- 총페놀 함량 측정 (Total Phenolics: TP): 총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법 (Singleton, 1999)을 변형하여 측정하였음. 시료 10 μL 와 증류수 100 μL 를 혼합한 후 Folin-Ciocalteu's 용액(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 μL 를 넣고 균질화 하여 6분간 반응시켰음. 그 후 7% Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich Co) 80 μL 를 넣고 균질화 한 후 실온에서 90분간 반응 시킨 뒤 750 nm에서 96 well microplate reader(iMark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 3번 반복 측정하였음. 표준물질은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co)를 사용하여 표준곡선을 구하고, mg gallic acid equivalent(GAE)/100 g으로 표기하였음.
- 총플라보노이드 측정 (Total Flavonoids: TF): 총플라보노이드 함량은 건강기능식품공전방법(Korea Food and Drug Administration, 2013)을 변형하여 실험하였음. 희석한 시료 17 μL 와 증류수 96 μL 를 혼합한 후 2.5% NaNO_2 (Sigma-Aldrich Co) 10 μL 를 넣어 균질화 하였음. 이후 5% AlCl_3 (Sigma-Aldrich Co) 10 μL 를 넣고 1 M Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich Co) 67 μL 넣어 균질화 한 후, 510 nm에서 96 well microplate reader(iMarK)를 이용하여 흡광도를 3회 반복 측정하였음. 표준물질은 catechin(Sigma-Aldrich Co)을 사용하였으며, mg catechin equivalent (CE)/100 g로 표기하였음.
- 항산화능 (DPPH free radical scavenging activity, ABTS radical scavenging): DPPH radical 소거능은 free radical scavenging activity를 측정하는 방법(Brand-Williams et al., 1995)을 변형하여 진행하였음. 80% 메탄올을 사용하여 0.1 mM DPPH 용액을 제조하였으며, DPPH 용액과 시료를 섞어 30분간 실온반응하고, 510 nm에서 96 well microplate reader(iMark)를 이용하여 흡광도를 3회 반복 측정하였음. 항산화 활성의 표준물질은 vitamin C(Ascorbic acid, Sigma-Aldrich Co)를 사용하였으며, mg vitamin C equivalent(VCE)/100 g으로 표기하였음. ABTS radical 소거능의 경우 1.0

mM AAPH(2,2 ϕ -azobis-(2-amidinopropane)HCl)와 2.5 mM ABTS2-(2,2 ϕ -azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)를 PBS와 혼합하여 70 $^{\circ}$ C에서 반응 시킨 후 syringe filter (PTFE 0.2 μ m, Tokyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 후 ABTS-시약과 시료를 10분 동안 반응시킴. 반응온도는 37 $^{\circ}$ C이었으며, 흡광도는 96 well microplate reader(iMark)를 이용하여 750 nm에서 3회 반복 측정하였음. 실험방법은 Re 등의 방법(Re et al., 1999)을 변형하여 실험하였음.

- 통계분석은 재배기간(3·5·7년근)에 따른 산양삼 시료 간 기능성 차이를 알아보기 위해 각 기능성 항목 별로 분산분석(ANOVA) 중 일원배치분산분석(one way-ANOVA)을 수행하였으며, 유의성을 검정하기 위하여 Tukey 검정(Tukey HSD test)을 수행하였음. SPSS Version 23.0 package program (SPSS INC., Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계분석을 실시하였고, 유의 수준은 $p < 0.05$ 이었음.

2.2. 연구 결과

- 총폴리페놀의 경우 3년근은 62.60 ± 0.91 mg gallic acid equivalents(GAE)/100 g, 5년근은 58.28 ± 0.75 mg GAE/100 g, 7년근은 52.78 ± 1.37 mg GAE/100 g으로 측정되었으며, 건조 산양삼 기준으로 환산하였을 때, 3년근은 285.19 ± 4.16 mg GAE/100 g, 5년근은 228.27 ± 2.93 mg GAE/100 g, 7년근은 185.73 ± 4.80 mg GAE/100 g로 나타났음(표 2-3).
- 총플라보노이드의 경우 3년근은 18.77 ± 1.02 mg catechin equivalents(CE)/100 g, 5년근은 16.85 ± 1.02 mg CE/100 g, 7년근은 13.26 ± 1.24 mg CE/100 g으로 측정되었으며, 건조 산양삼 기준으로 환산하였을 때, 3년근은 85.51 ± 4.64 mg CE/100 g, 5년근은 65.99 ± 3.99 mg CE/100 g, 7년근은 46.64 ± 4.35 mg CE/100 g으로 나타났음.
- 항산화능의 경우 DPPH 소거능법으로 3년근이 17.21 ± 0.27 mg vitamin C equivalents(VCE)/100 g, 5년근이 12.99 ± 0.41 mg VCE/100 g, 7년근이 13.26 ± 1.24 mg VCE/100 g로 측정 되었고, 건조 산양삼으로 환산하였을 때, 3년근은 78.42 ± 1.23 mg VCE/100 g, 5년근은 50.90 ± 1.62 mg VCE/100 g, 7년근은 52.87 ± 3.34 mg VCE/100 g이었음. ABTS 소거능의 경우, 3년근이 41.90 ± 1.64 mg VCE/100 g, 5년근이 33.46 ± 0.88 mg VCE/100 g, 7년근이 34.46 ± 2.60 mg VCE/100 g으로 측정되었으며, 건조 산양삼 기준으로 환산하였을 때 3년근은 190.89 ± 7.49 mg VCE/100 g, 5년근은 131.04 ± 3.45 mg VCE/100 g, 7년근은 121.24 ± 9.16 mg VCE/100 g으로 나타났음.
- 3년근 산양삼의 경우 원물과 건조물로 볼 때 총페놀, 항산화능에서 5년근, 7년근 보다 유의적으로 함량의 높았고, 총플라보노이드 함량은 원물의 경우 3년근과 5년근이 유의적으로 차이가 없었으나, 건조 산양삼 기준으로 환산 시 3년근이 5년근 보다 유의적으로 함량이 높았음 ($p < 0.05$).

따라서, 기능적 측면과 경제성을 종합적으로 고려할 때 3년근 산양삼이 가장 우수한 것으로 판단됨.

표 2 산양삼의 원물기준 기능성 분석 결과

Functionality1) Sample	Wild ginseng		
	3 year	5 year	7 year
Total phenolics (mg GAE/100 g)	62.60±0.912a	58.28±0.75b	52.78±1.37c
Total flavonoids (mg CE/100 g)	18.77±1.02a	16.85±1.02a	13.26±1.24b
DPPH radical scavenging (mg VCE/100 g)	17.21±0.27a	12.99±0.41c	15.03±0.95b
ABTS radical scavenging (mg VCE/100 g)	41.90±1.64a	33.46±0.88b	34.46±2.60b

1) Total phenolics, total flavonoids are expressed as gallic acid equivalents (GAE), catechin equivalents (CE), ABTS radical scavenging activity and DPPH radical scavenging activities are expressed as vitamin C equivalents (VCE), respectively; 2) Data are expressed as a mean±standard deviation (SD) (n=3). Different superscripts in the same row indicate significant difference based on Tukey's multiple range test at p<0.05.

표 3 산양삼의 건조된 기준 기능성 분석 결과

Functionality1) Sample	Wild ginseng		
	3 year	5 year	7 year
Total phenolics (mg GAE/100 g)	285.19±4.16 2)a	228.27±2.93 b	185.73±4.80 c
Total flavonoids (mg CE/100 g)	85.51±4.64a	65.99±3.99b	46.64±4.35c
DPPH radical scavenging (mg VCE/100 g)	78.42±1.23a	50.90±1.62b	52.87±3.34b
ABTS radical scavenging (mg VCE/100 g)	190.89±7.49 a	131.04±3.45 b	121.24±9.16 b

1) Total phenolics, total flavonoids are expressed as gallic acid equivalents (GAE), catechin equivalents (CE), ABTS radical scavenging activity and DPPH radical scavenging activities are expressed as vitamin C equivalents (VCE), respectively; 2) Data are expressed as a mean±standard deviation (SD) (n=3). Different superscripts in the same row indicate significant difference based on Tukey's multiple range test at p<0.05.

4. 시판 미생물 유래 효소를 이용한 산양삼 추출물의 생물전환

4.1. 방법 및 내용

- 효소는 Novozyme(Novo Nordisk Co., Denmark) 효소를 서울소재 (주)대중상사에서 구매하여 냉장보관(4℃)하였음. 효소 선정은 사포닌의 배당체를 분해하는 것으로 알려진 미생물이나 미생물 유래 효소 3가지를 선택하였고, 그 중 효소 종류와 선행 연구를 통해 효소 3가지를 선택하여 실험에 사용하였음. 선택된 효소는 전분 분해 효소인 Fungamyl 800L, 펙틴 분해 효소인 Pectinex Ultra pulp, beta-glucan분해 효소인 Viscozyme L이었음.
- 산양삼의 효소 반응을 통한 HPLC 성분분석은 기능성 분석에서 함량 및 활성이 높게 나타나고 산양삼의 HPLC 유효성분 함량값이 높고 다양하게 나타난 3년근 산양삼을 먼저 선택하여 효소 반응 실험에 사용하였음.
- 효소 반응 조건은 문헌조사 및 효소 안정성과 분해 효율성, 효소의 종류 등을 고려하여 진행하였음. 시료의 양은 전체 양의 40%, 효소의 양은 5%로 하였으며, HPLC급 water를 이용하여 희석하였음. 총 부피는 1 mL로 반응 온도는 50℃, 반응 시간은 1 hr, 2hr으로 하여 진행하였음.
- 효소 반응물을 원심분리 후 상등액을 채취하여 syringe filter(PTFE 0.2 μm, Tokyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 분석용 시료로 사용하였음. Ginsenoside 함량은 Agilent YL 9100 HPLC system (USA)을 이용하여 측정하였음. HPLC 분석은 ZORBAX eclipse XDB-C18 column (5 μm, 4.6×150 mm)을 사용하였고, 이동상 용매는 water(A)와 acetonitrile(B)를 사용하였으며, gradient system으로 진행하였음 (0-5 min: 0% ACN; 5-55 min: 0-100% ACN; 55-60 min: 100% ACN). 유속과 column 온도는 각각 1.0 mL/min, 30도로 하고, 시료 주입량은 원액시료의 경우 80 uL, control(시료+water)과 효소반응 한 반응물은 50 uL, UV 검출기의 검출 파장은 203 nm에서 분석하였음.

4.2. 연구 결과

- 효소 반응 전 재배기간별 산양삼의 유효성분을 비교하기 위해 산양삼 농축액(원액)을 HPLC 분석하였음.
- 기능성 분석 결과, 기능성 성분 함량이 높다고 판단된 3년근 산양삼 농축액(원액)을 선택하여 3종류의 효소를 이용하여 상기 조건에서 반응 처리함. 3년근 산양삼 농축액(원액)의 HPLC 분석한 결과임(그림 4).

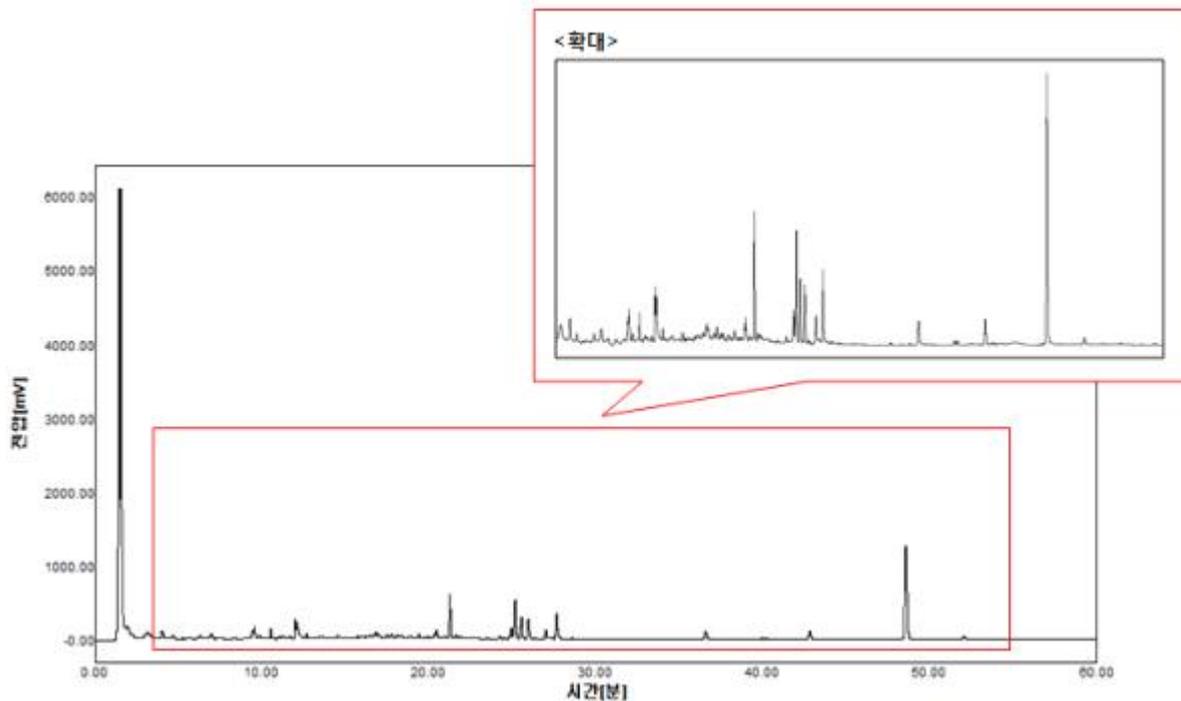


그림 4 3년근 산양삼 농축액(원액) HPLC 분석결과

- 이후, 3년근 산양삼을 이용하여 효소반응 최적화를 위한 실험을 진행하였음.

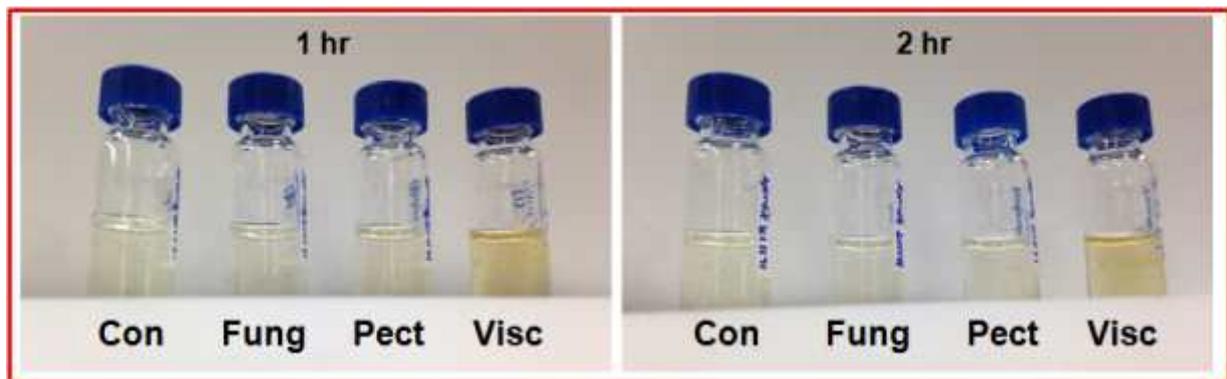


그림 5 산양삼농축액(원액)의 효소 반응 양상

- 효소 반응 실험 결과, 열처리를 한 경우(control) 많은 유효성분이 줄어들거나 없어지는 것을 알 수 있었음. 효소 분해한 경우 1hr 반응, 2hr 반응에서 대부분 control보다 수치가 낮거나 비슷한 값을 보였음
- 그러나, Pectinex Ultra pulp를 제외한 효소 반응에서 control보다 해당 peak 면적이 증가하거나 새로 생성된 peak가 관찰되었음. Fungamyl 800L 효소로 분해한 경우 retention time(RT) 22-25 min에서 새로운 peak가 생성되는 것을 볼 수 있었고, Viscozyme L 효소로 분해한 경우 RT 16-24 min에서 새로 생기거나 증가하는 peak

를 볼 수 있었음.

- 열처리와 효소 처리를 통해 생성되는 ginsenoside 등 기능성 성분의 분해에 의해 생성되는 것으로 추정됨.

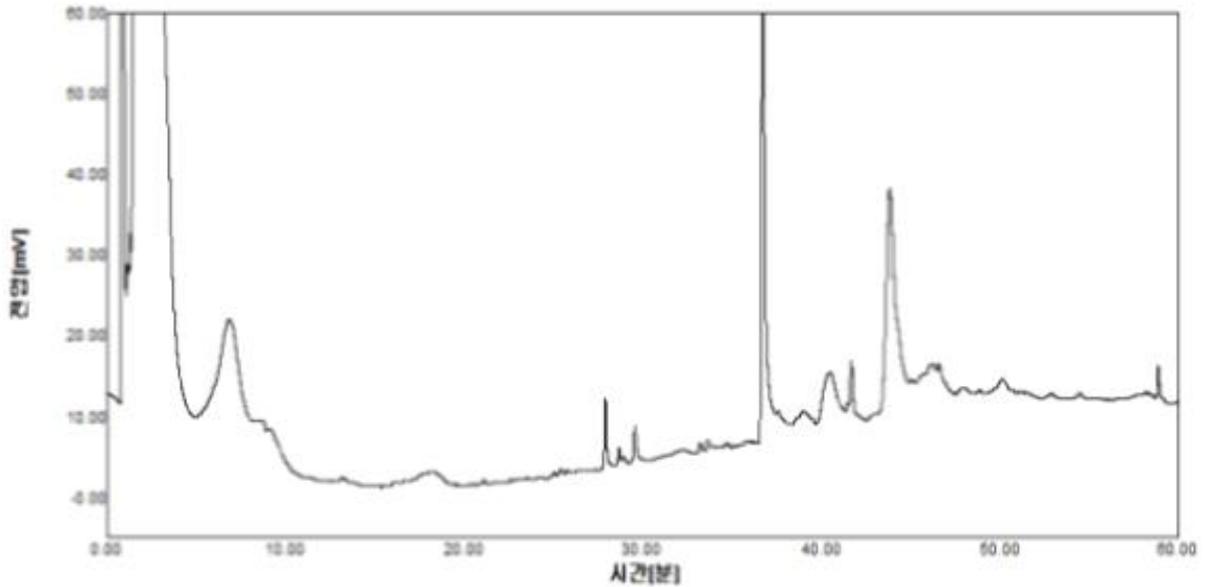


그림 6 3년근 산양삼 1시간 효소 반응 control (sample+water)

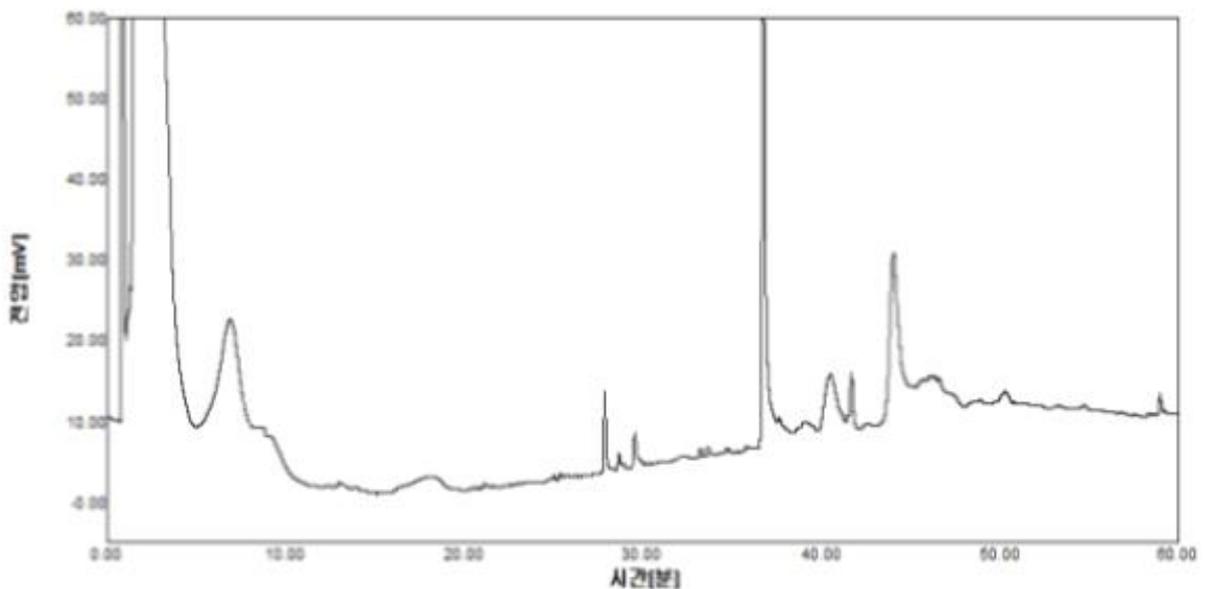


그림 7 3년근 산양삼 2시간 효소 반응 control (sample+water)

- 3년근 산양삼의 경우 열처리만 하였을 때 모든 peak 면적이 감소되는 것을 볼 수 있었음.

- 농축액을 열처리 한 경우 1시간 열처리와 2시간 열처리 한 시료를 비교 시 peak가 감소 측면에서 큰 차이가 없었음. 열처리로 인해 여러 성분들의 변화가 있었던 것으로 추정됨.

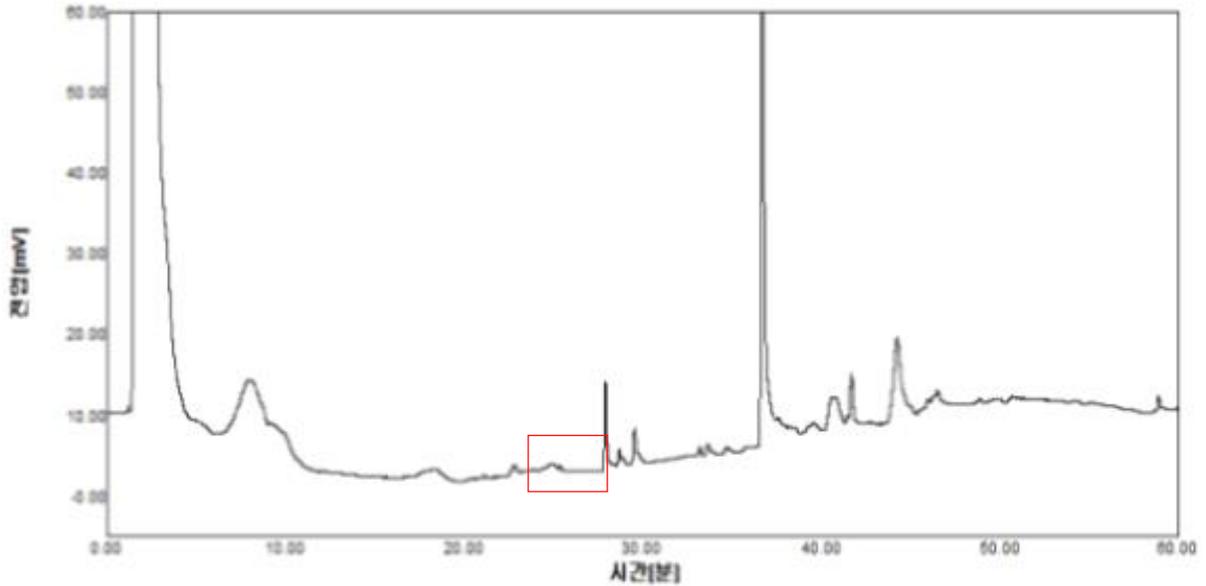


그림 8 3년근 산양삼 Fungamyl 800L 1시간 효소반응 (sample+water+enzyme)

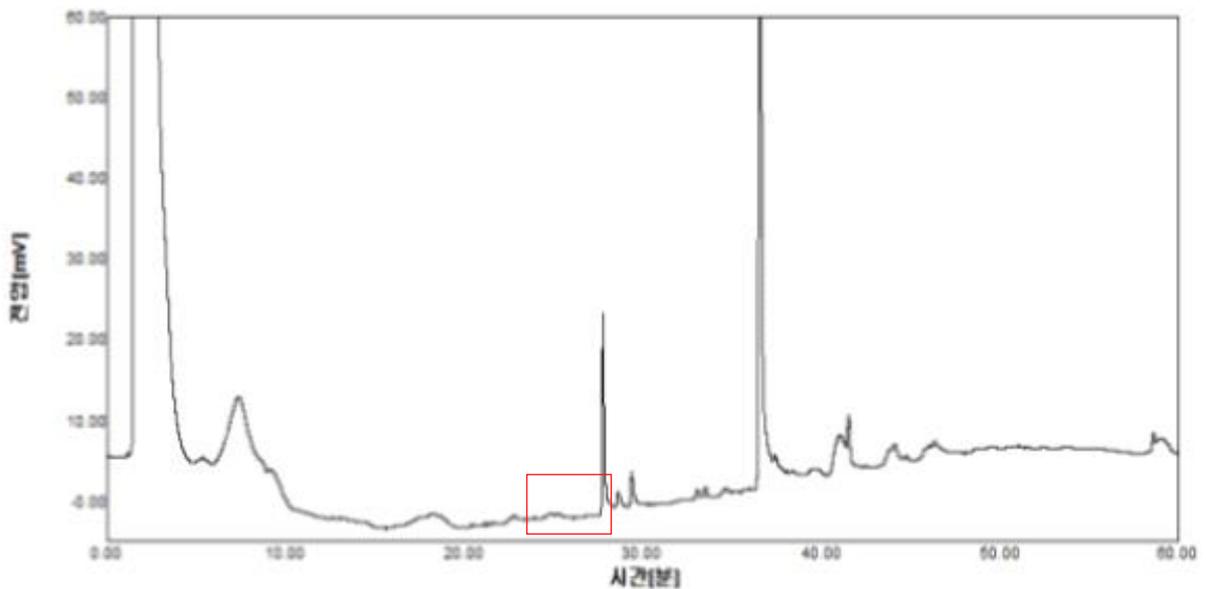


그림 9 3년근 산양삼 Fungamyl 800L 2시간 효소반응 (sample+water+enzyme)

- 전분을 분해하는 효소로 알려진 Fungamyl 800L 효소의 경우 22-28 min에서 작은 peak 여러개가 검출된 것을 볼 수 있었음.

- 효소의 작용에 의하여 산양삼 유효성분의 분해를 통해 생성된 것으로 판단됨.

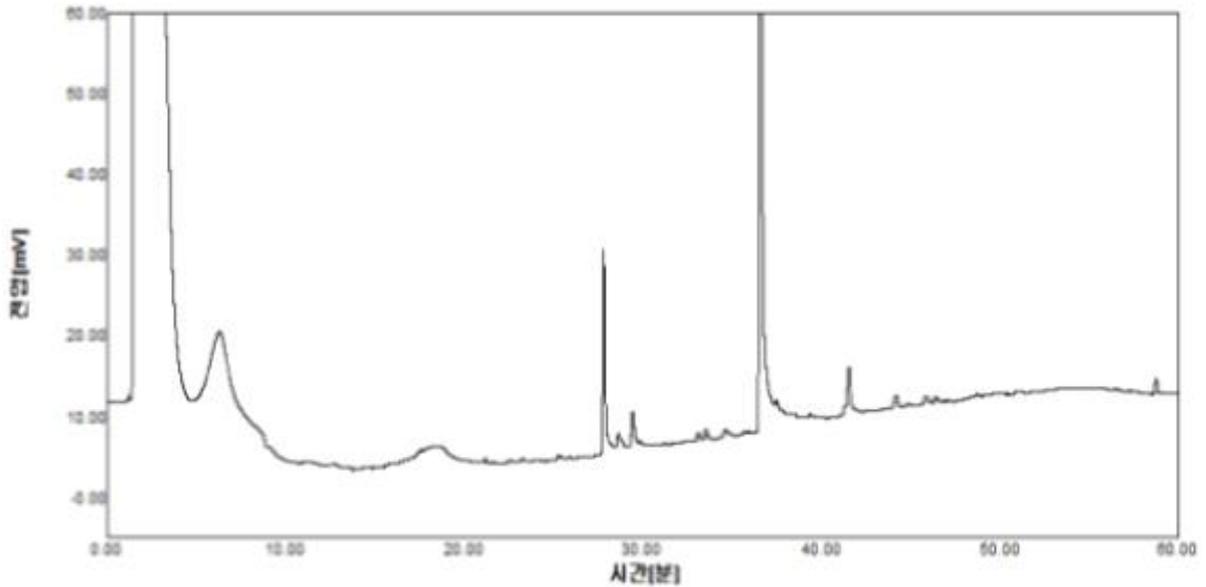


그림 10 3년근 산양삼 Pectinex Ultra plup 1시간 효소반응 (sample+water+enzyme)

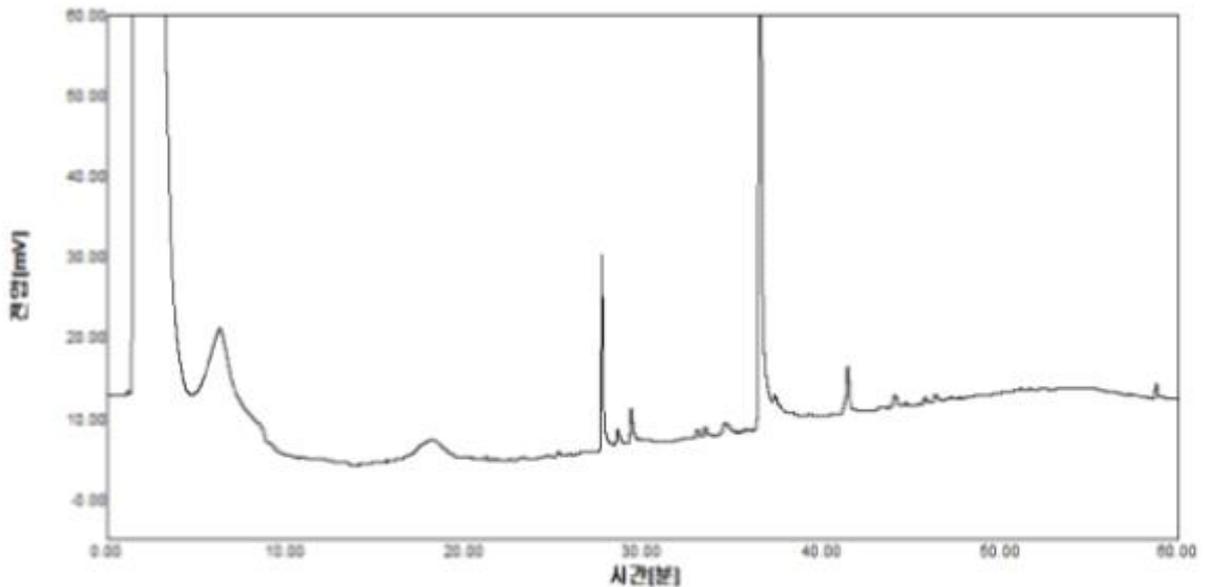


그림 11 3년근 산양삼 Pectinex Ultra plup 2시간 효소반응 (sample+water+enzyme)

- Pectinex Ultra plup 효소의 경우 펙틴을 분해하는 효소이며, 효소반응을 진행하였을 때 수치가 오르거나 새로 생성된 peak는 보이지 않았음.
- 따라서, 산양삼 유효성분 생전환에는 이 효소가 효율적이지 않을 것으로 생각됨.

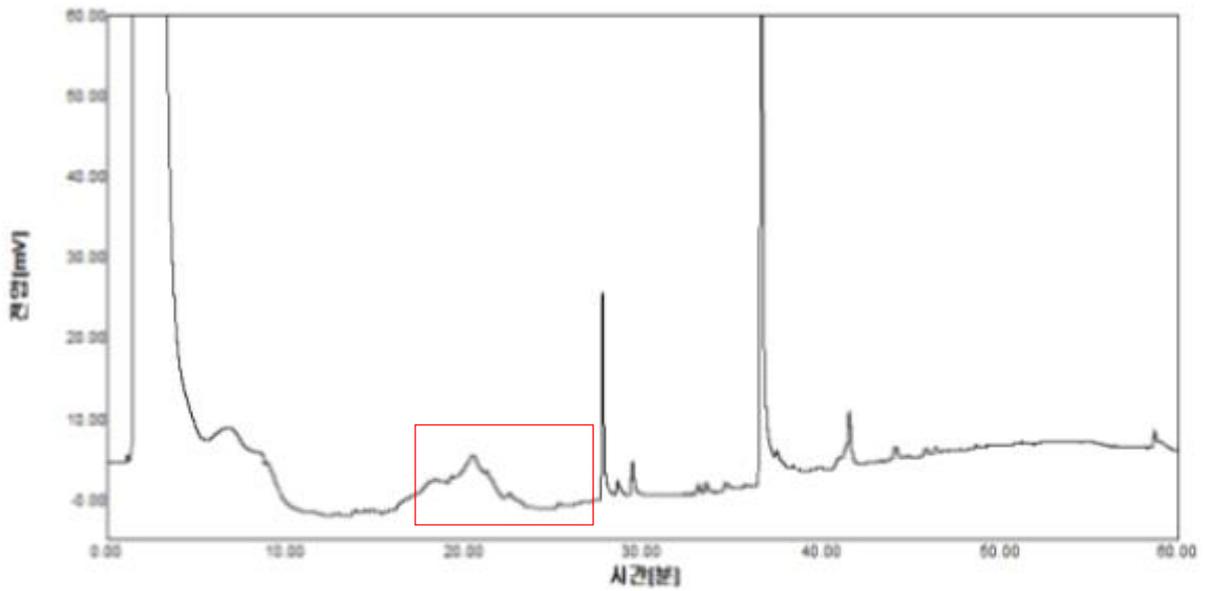


그림 12 3년근 산양삼 Viscozyme L 1시간 효소반응 (sample+water+enzyme)

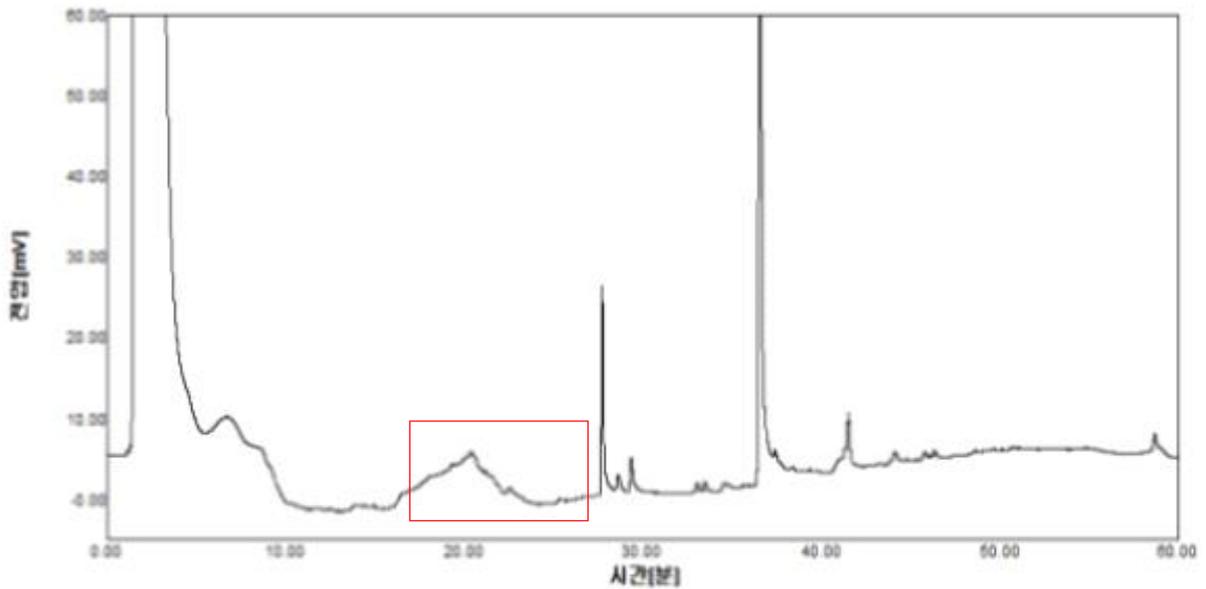


그림 13 3년근 산양삼 Viscozyme L 2시간 효소반응 (sample+water+enzyme)

- beta-glucan을 분해하는 효소로 알려진 Viscozyme L 효소의 경우 16-24 min에서 peak가 커진 것을 볼 때 betaglucan을 분해하여 생성된 분해물인 것으로 생각됨.
- 효소의 작용에 의하여 산양삼 유효성분의 분해를 통해 생성된 것으로 판단됨.

[산양삼 농축액의 효소처리 결과 및 고찰]

- 3년근 산양삼의 경우 열처리만 하였을 때 모든 성분이 일부 감소되는 것을 볼 수 있었음.
- 농축액을 열처리 한 경우 1시간 열처리와 2시간 열처리 한 시료를 비교 시 peak가 감소 측면에서 큰 차이가 없었음.
- 열처리한 시료에 비해 증가하거나 새로 생긴 peak가 있었는데 이는 효소분해 시 생성되는 물질로 생각되며, 각 성분의 생전환 최적조건 확립 등 추가연구를 수행할 예정이다.
- 산양삼의 유효성분 증가를 위한 효소 반응 및 조건 최적화를 통한 산양삼의 유효성분의 동정을 진행할 예정이다.
- 2년차 이후 산양삼에 포함된 ginsenoside 등 주요 기능성 성분에 대한 동정을 수행하여 산양삼에 포함된 기능성 성분의 변화 및 증진을 탐색하고자 함.
- 산양삼 분석을 위한 최적조건을 적용하여 효소처리를 통한 산양삼 유효성분의 profile 변화를 분석하고자 함. 이를 통해 차년도에 산양삼 bioconversion 조건의 최적화를 수립하고자 함.

<3협동연구기관 : 경희대학교>

2-1. 이론적, 실험적 연구수행 내용

(1) 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화

본 연구에 이용된 생쥐 유래의 3T3-L1 지방전구세포주는 다양한 연구에 널리 사용되는 세포모델로서, (사)한국세포주은행으로부터 구입하여 사용하였다. 1% Antibiotics/antimycotic solution (10,000 U/mL penicillin G, 10,000 µg/mL streptomycin, 25 µg/mL amphotericin B)과 10% bovine calf serum (BCS)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)을 이용하여 2일 간격으로 배지를 교환하며 배양용기의 바닥에 포화시킨 후, 20 mM dexamethasone, 0.1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 10 µg/mL insulin 및 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 분화배지를 이용하여 지방세포로의 분화를 유도하였다. 2일간의 분화유도 후, 이후 2일 간격으로 10% FBS 및 10 µg/mL insulin 이 포함된 숙성배지를 이용하여 지방세포의 숙성을 유도하였다.

(2) MTT assay를 이용한 세포독성 측정법

계대배양한 세포를 5×10^4 cells/mL 농도로 배양용기에 분주 후, 근령별 및 농도별 산양삼 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 이 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 용액 (Cell Signaling) 10 µL를 첨가한 후, 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 2-4시간 배양하였다. 배양 후, 배양액을 제거하고 MTT formazan crystal을 DMSO를 이용하여 용출한 후, 마이크로플레이트 리더(Bio-Rad)를 이용하여 590 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 무처리군의 흡광도와 비교하여 산양삼 추출물 처리에 따른 세포독성을 나타내었다.

(3) 지방세포의 지방구 염색 및 지방구 축적도 정량

근령별 및 농도별 산양삼 추출물을 처리하여 지방세포로 분화를 유도한 3T3-L1 세포주를 PBS로 세척한 후, 10% formalin을 고정하였다. 이 후, 60% isopropanol을 이용하여 formalin을 세척하고, 60% saturated Oil-Red-O (Sigma Aldrich)와 함께 상온에서 10분간 반응하여 지방구를 염색하였다. 증류수를 이용하여 여분의 Oil-Red-O를 제거하고, 100% isopropanol로 세포내에 염색된 Oil-Red-O를 회수하여 마이크로플레이트리더(Bio-Rad)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 비처리군과 비교하여 상대적 지방구 축적도를 정량하였다.

(4) ELISA법을 이용한 사이토카인 정량

세포배양액을 원심분리(300x g, 5분)하여 상층액을 회수한 후, 염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 에 특이적인 상용 ELISA kit (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. 간략하게 기술하면, 96 well plate를 capture antibody로 4°C에서 12시간 코팅한 후, assay diluent를 이용하여 비특이적 항원-항체반응을 막았다. 이후, 100배 희석한 세포배양액 100 μ L를 분주한 후, 상온에서 1시간 방치하였다. Washing buffer를 이용하여 수차례 세척한 후, capture antibody 100 μ L를 분주하여 상온에서 1시간 방치한 후, biotin-conjugated detection antibody 와 streptoavidin-conjugated horse radish peroxidase를 첨가하여 상온에서 1시간 반응하였다. 기질을 첨가하여 30분간 발색반응을 유도한 후, 1 M H₃PO₄ stop solution을 첨가하여 반응을 종료하고 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정한 후, kit에 제공된 사이토카인 표준품을 이용하여 정량하였다.

(5) RAW264.7 세포주의 계대배양 및 LPS를 이용한 활성화

본 연구에 이용된 생쥐 유래의 RAW264.7 대식세포주는 (사)한국세포주은행으로부터 구입하여 사용하였다. 1% Antibiotics/antimycotic solution과 10% fetal bovine serum (FBS)가 첨가된 DMEM을 이용하여 24 well plate에 1x10⁵ cells를 분주한 후, 근령별 및 농도별 산양삼 추출액을 처리하여 24시간 배양 후, 500 ng/mL 농도의 lipopolysaccharides (LPS, Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 24시간 동안 활성화 하였다.

(6) 형광 Bead 및 FACS를 이용한 대식능 측정법

대식세포주를 형광 Bead (Fluoresbrite(R) plain yellow green latexa beads, 1.0 μ m, 1x10⁹ particles/mL)과 함께 30분간 배양한 후, 4°C의 PBS를 이용하여 세척하여 회수된 세포를 flow cytometry (Accuri C6, BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. 대식세포는 세포의 크기(FSC) 및 세포의 과립도(SSC)를 이용하여 분석하였으며, 대식세포내 형광bead는 FITC 형광물질의 형광세기 (mean fluorescence intensity, MFI)를 측정하여 정량하였다.

(7) 형광항체 및 FACS를 이용한 활성화마커 발현 정량

1x10⁵ cells/mL 농도의 세포를 96 well plate에 분주한 후, 근령별 및 농도별 산양삼 추출물과 24시간 배양한 후, 500 ng/mL 농도의 LPS를 이용하여 24시간 활성화하였다. PBS를 이용하여 세포를 세척한 후, anti-mouse CD16/CD32 (R&D systems)와 4°C에서 10분간 반응하여 비특이적 항원-항체반응을 막은 후, anti-CD80-FITC, anti-CD86-PE, anti-MHC II-APC 등 활성화마커 특이적 형

광향체를 이용하여 4°C에서 10분간 반응하였다. PBS로 수차례 세척 후, FACS를 이용하여 대식세포를 확인 후 (FSC vs SSC), FITC, PE 및 APC의 형광도를 각각 측정하여 CD80, CD86 및 MHC II의 발현량을 MFI값을 통하여 측정하였다.

(8) qRT-PCR을 이용한 세포내 mRNA 정량

RAW264.7 세포주를 근령별 및 농도별 산양삼 추출물과 배양하여 LPS로 활성화한 후, 원심분리를 통하여 세포를 회수하였다. 총RNA를 Qiagen RNeasy(R) mini kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 추출한 후, Nanodrop 200 spectrophotometer (Thermo Scientific)을 이용하여 RNA를 정량 및 순도검증하였다. QuantiFast(R) SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) 및 CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)를 이용하여 quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR)을 실시하였다 (50°C 10분+95°C 5분 후, 95°C 10초+60°C 30초 39사이클). 본 연구에 사용된 프라이머는 다음과 같다: GAPDH F 5'-ATCATCCCTGCATCCACT-3', R 5'-ATCCACGACGGACACATT-3'; COX-2 F 5'-TGCACTATGGTTACAAAAGCTGG-3', R 5'-TCAGGAAGCTCCTTATTTCCCTT-3'; iNOS F 5'-CGAAACGCTTCACTTCCAA-3', R 5'-TGAGCCTATATTGCTGTGGCT-3'. COX-2 및 iNOS의 Ct 값으로부터 GAPDH의 Ct값을 빼어 ΔCt 값을 구하여 상대적 전사량으로 표현하였다.

(9) 고지방식이 비만마우스 급여

4주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 사용하여 1주일간 AIN-76A 사료로 적응식이 기간을 가진 후, Normal diet(AIN-76A)군, High-fat diet(HFD)군 및 HFD+PWPG(Puffed Wild Panax Ginseng)군으로 나누어 자유급여로 식이를 진행한다. 일반식이사료의 경우 지방의 함량은 열량기준으로 11.5 kcal%이며 HFD의 경우 지방의 함량이 45 kcal%를 가진다. 팽화산양삼은 HFD사료에 들어있는 셀룰로오스 함량(약5%)을 대체하여 첨가함으로써 동일열량(iso-caloric) 실험을 진행하였다. 사육기간 동안 외형 및 상태를 관찰하고, 체중을 기록하였으며, 그 외 혈당측정을 매주 실시하고, 채혈을 하여 마우스 혈액의 비만 및 염증 반응 지표물질들을 분석하였다.

(10) 마우스 혈중 사이토카인 분석

마우스 혈액으로부터 얻어진 혈청으로 혈중 사이토카인 분석을 진행하였다. eBioscience사의 High sensitivity ELISA(IL-6, TNF- α)를 사용한다. 기존 ELISA kit와 다르게 추가적인 Streptavidin-HRP 증폭과정이 포함되어 있어서 *in vivo* 실험에서 얻은 혈액 중에 존재하는 미량의 사이토카인을 정량할 수 있도록 해준다. 100pg/mL - 1.56pg/mL의 스탠다드 농도 범위를 가지며, 샘플(혈청)을 희석용액과 같이 넣어준 후, Biotin-conjugate, Streptavidin-HRP, amplification solution들을 차례로 넣고 반응한 후 substrate를 넣어주어 발색시킨 후 stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(11) 마우스 혈중 콜레스테롤 분석

마우스 혈액으로부터 얻어진 혈청으로 혈중 콜레스테롤 분석을 하였으며, abcam사의 HDL and LDL/VLDL Cholesterol assay kit를 사용하였다. 분석의 원리는 혈청에 존재하는 콜레스테롤이 중

성지질에 결합한 cholesterol ester의 형태로 존재하거나 free cholesterol 형태로 존재할 때, 총 콜레스테롤은 혈청에 존재하는 모든 콜레스테롤을 정량하는 것이고 HDL, LDL/VLDL은 물리·화학적 차이로 먼저 구분해내고 따로 정량하는 것이다. 이때 총 콜레스테롤 정량을 위해 cholesterol esterase를 넣어주어 ester결합을 하고 있는 콜레스테롤까지 정량하는 차이가 있다.

총 콜레스테롤 정량에는 혈청을 바로 사용하여 프로토콜대로 용액을 배합하여 넣어주어 570nm 흡광도로 측정한다. HDL과 LDL분리에는 침전용액이 사용되어, 혈청에 침전용액을 넣어준 뒤 원심분리를 2000x g에서 10분간 진행하면 상등액으로부터 HDL 분획을 얻을 수 있으며 침전된 LDL을 회수할 수 있다. 이 때 한 번 더 같은 조건으로 원심분리를 진행하여 최대한 HDL을 제거하고 PBS에 침전물을 재현탁시켜서 LDL 정량에 사용하였다.

(12) 마우스 혈당 측정

혈당 측정은 사육기간 동안 꼬리정맥에서 채혈하여 진행하였다. 마우스가 움직이지 못하도록 구속장치를 사용하고, 혈압을 높여 원활한 채혈이 가능하도록 적외선 램프를 사용하여 마우스의 체온을 상승시킨다. 혈당측정기기로는 ACCU-CHEK Performa®를 사용하고 동사의 채혈침과 검사지를 사용하였다.

자유급여로 식이를 관리하기 때문에 마우스들의 식이 섭취에서 오는 차이가 클 수 있으므로, 공복혈당을 측정하였다. 혈당 측정 5시간 전 사료와 물을 제한하여 공복상태로 만든 후 혈당을 측정하였다.

(13) 마우스 혈중 인슐린 분석

마우스 혈액에서 분리한 혈청을 사용하여 혈중 인슐린 농도를 정량하였다. Crystal Chem사의 Ultra high sensitive mouse insulin ELSIA kit를 사용하였으며, 해당 kit는 1 - 64 ng/mL의 범위까지 정량할 수 있다. 정량법의 원리는 일반적인 ELISA kit에 사용되는 Sandwich ELISA 기술이며, Ultra high sensitive의 경우 well-plate에 capture antibody가 이미 코팅되어있다. 혈청을 희석하여 첨가하고, anti-insulin enzyme conjugate와 enzyme substrate, stop solution을 넣고 흡광도를 측정하여 $Abs_{450nm} - Abs_{630nm}$ 으로 계산하였다.

(14) 마우스 중성지질 분석

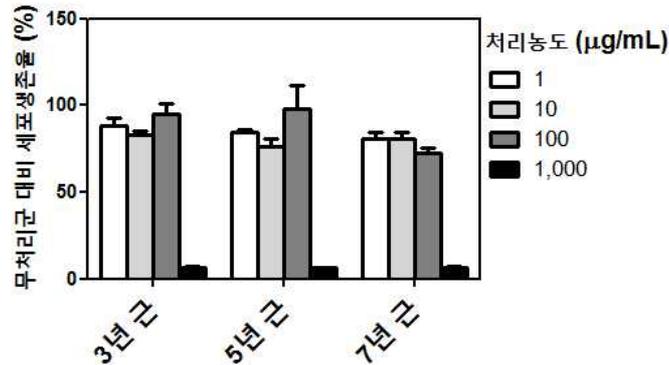
마우스 혈청을 사용하여 혈중 중성지방을 정량하였다. Abcam사의 Triglyceride quantification assay kit를 사용하였으며, 이 분석의 원리는 중성지방이 Lipase에 의해 지방산과 글리세롤로 분해되면 kit에 들어있는 probe와 enzyme mix에 의해 글리세롤이 산화반응을 일으키며 과산화수소를 생성하고, Peroxidase에 의한 발색반응의 결과 흡광도를 측정하는 것이다.

중성지방 표준품 농도 범위는 4 - 10 μ M이며, 표준품 용액들을 준비하고 Lipase를 첨가한 후 반응시약용액을 넣어준 뒤 1시간 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과

1. 산양삼 추출물 처리에 따른 지방세포의 독성시험

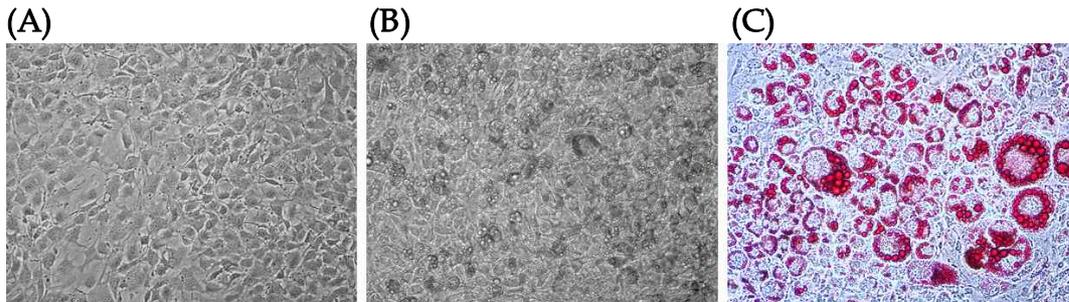
3T3-L1 세포주를 1-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 산양삼 추출물 시료와 24시간 공배양 후, MTT assay법으로 분석한 결과, 산양삼 원재료의 근령에 관계없이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도까지 세포독성이 없으며, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 세포독성을 보임을 확인하였음(그림 1). 따라서, 이후의 연구에서는 세포독성에 대하여 안전한 농도인 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로 유지하였음.



<그림 1. 근령별 및 농도별 산양삼 추출물 처리에 따른 3T3-L1 지방세포주의 세포생존율>

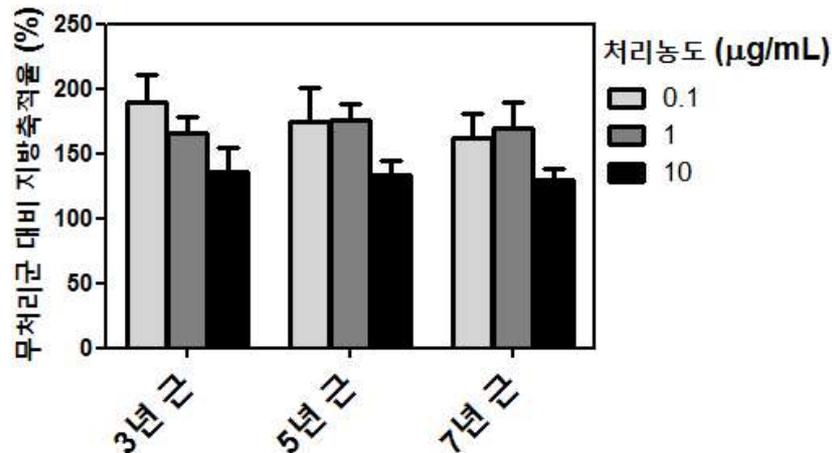
2. 산양삼 추출물 처리에 따른 지방축적능의 억제효과

3T3-L1 지방전구세포(그림 2A)를 dexamethasone, IBMX 및 insulin을 이용하여 지방세포(그림 2B)로 분화시킬 때 지방구의 축적을 광학현미경으로 관찰 가능하였으며, 이를 다시 Oil-Red-O 시약을 이용하여 세포내 지방을 염색하여(그림 2C) 흡광도를 이용하여 정량이 가능함을 보였음.



<그림 2. 3T3-L1 세포주의 지방세포 (A)분화전, (B)분화후 현미경 사진 및 (C) Oil-Red-O 시약을 이용한 세포내 지방구 염색 사진>

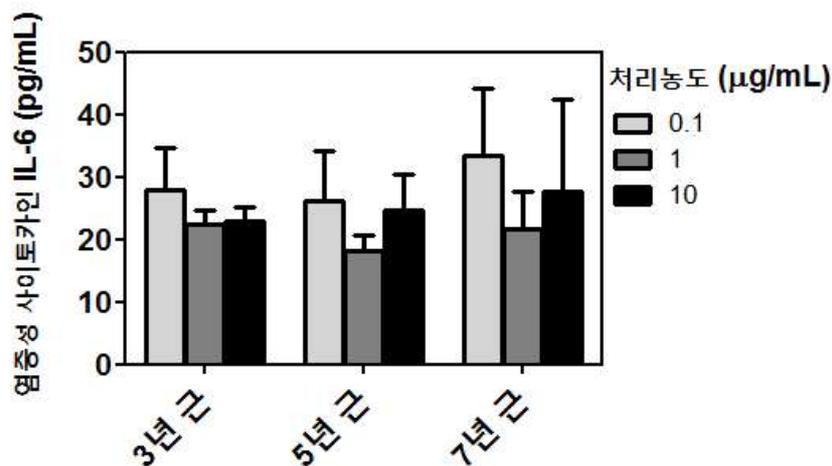
이와 같은 지방전구세포로부터 지방세포로의 분화중 1-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 산양삼 추출물 시료와 24시간 공배양하여 지방구를 염색한 Oil-Red-O 시약의 흡광도를 측정하여 지방축적도를 측정한 결과, 산양삼의 근령에 따른 유의차는 없었으며, 처리농도 의존적인 지방축적을 감소효과를 보였음(그림 3).



<그림 3. 근령별 및 농도별 산양삼 추출물 처리에 따른 3T3-L1 지방세포주의 지방축적율>

3. 산양삼 추출물 처리에 따른 지방세포의 염증성 사이토카인 분비능

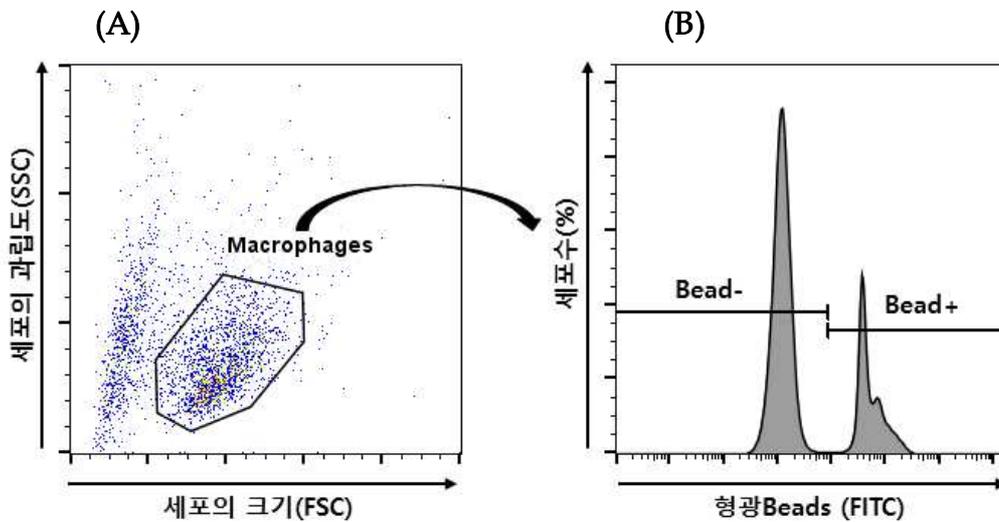
3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포로의 분화에 따른 염증성 사이토카인 IL-6 분비량은 30 pg/mL 내외의 농도로서, 급성 염증반응에 영향을 미치지 않으나 장기간에 걸친 분비를 통하여 저도만성 염증(low-grade chronic inflammation)의 위험이 있음. 본 연구의 근령별 및 농도별 산양삼 추출물 과의 공배양 결과, 지방세포 유래의 염증성 사이토카인 IL-6 분비량은 변화가 없었음(그림4).



<그림 4. 근령별 및 농도별 산양삼 추출물 처리에 따른 3T3-L1 지방세포주의 염증성 사이토카인 IL-6 분비량>

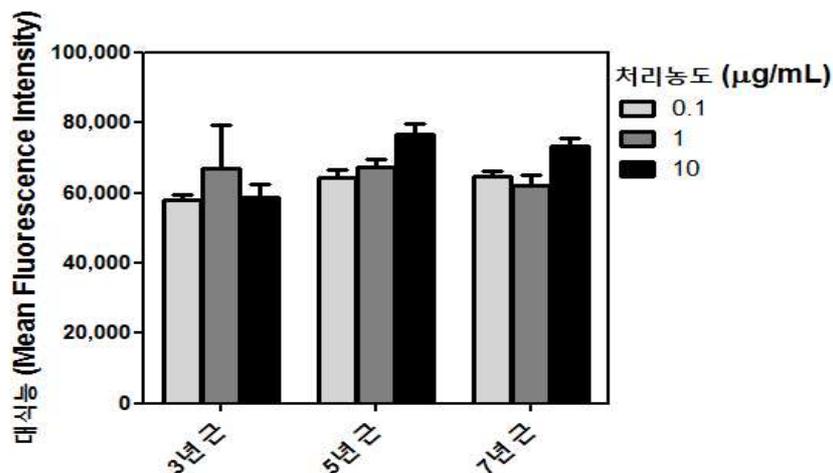
4. 산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포의 대식능

본 연구에 사용한 RAW264.7 대식세포주를 FACS를 통하여 분석한 결과, 그림5A와 같이 세포의 크기(FSC) 및 세포의 과립도(SSC)를 활용하여 대식세포를 gating 할 수 있었음. 또한, 형광 bead 와 공배양한 대식세포를 FACS로 분석하여 gating한 결과, phagocytic cells (그림5B, Bead+)와 대 식작용을 하지 않은 세포(그림5B, Bead-)로 나눌수 있으며, 나아가 Bead+ 세포의 형광도(mean fluorescence intensity, MFI)를 측정함으로써 대식기능을 측정할 수 있음을 보였음.



<그림 5. 형광Bead와의 공배양 및 FACS 분석을 통한 대식세포주의 대식능 측정법>

이에 따라, 근령별 및 농도별 산양삼 추출물의 처리에 따른 대식능(MFI)를 측정된 결과, 3년근 추출물 처리군과 비교하여 5년근 및 7년근 추출물 처리군에서 대식능이 농도에 따라 증가하는 경향을 보였음(그림 6). 이는 5년근 및 7년근에 포함된 유효성분이 대식세포의 대식능을 자극하여 선천성 면역기능을 강화할 수 있음을 보여줌.

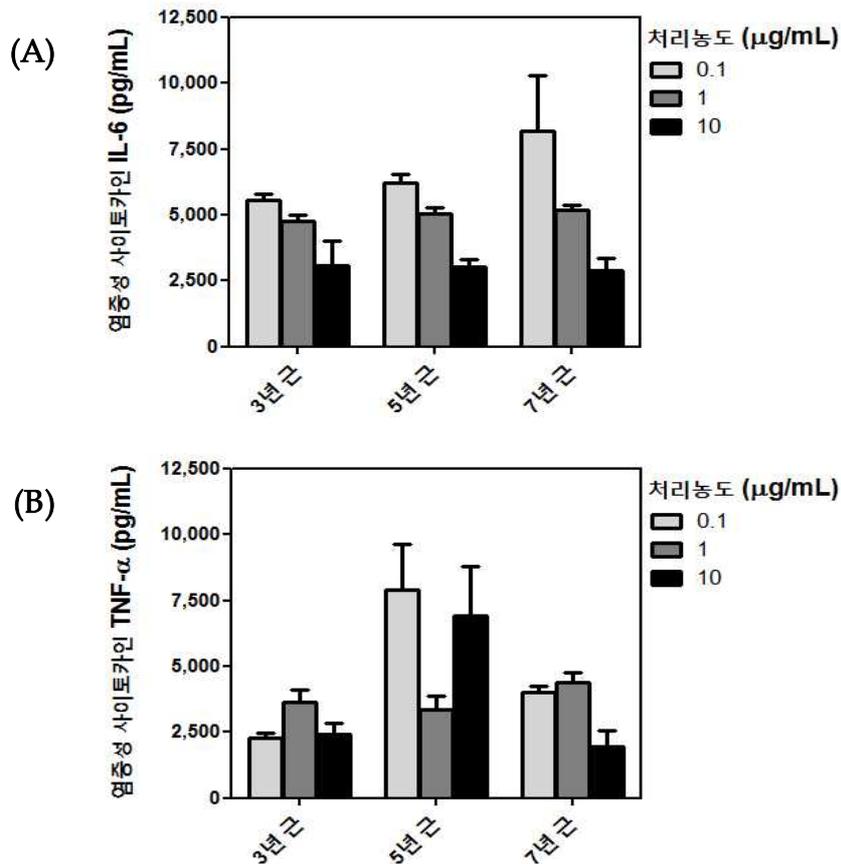


<그림 6. 근령별 및 농도별 산양삼 추출물 처리에 따른 RAW264.7 대식세포주의 대식능>

5. 산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포의 염증성 사이토카인 분비능

근령별 및 농도별 산양삼 추출물의 처리에 따른 RAW264.7 세포주의 염증성 사이토카인 IL-6 분비능은 근령에 상관없이(P>0.05) 처리농도에 따라 감소함을 보였음(P<0.05) (그림7A). 그러나, 또 다른 염증성 사이토카인 TNF- α 분비량에 있어서는 5년근 추출물의 처리시 3년근 및 7년근에 비하여 그 분비량이 증가되는 경향을 보였으며, (그림 7B). 또한, 3년근 추출물 처리군의 경우, 0.1 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에 비하여 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 유의적으로 증가한 TNF- α 의 분비량을 관찰하였으나, 5년근 처리군에서는 그 반대의 결과를 보였으며, 7년근 처리군에서는 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서

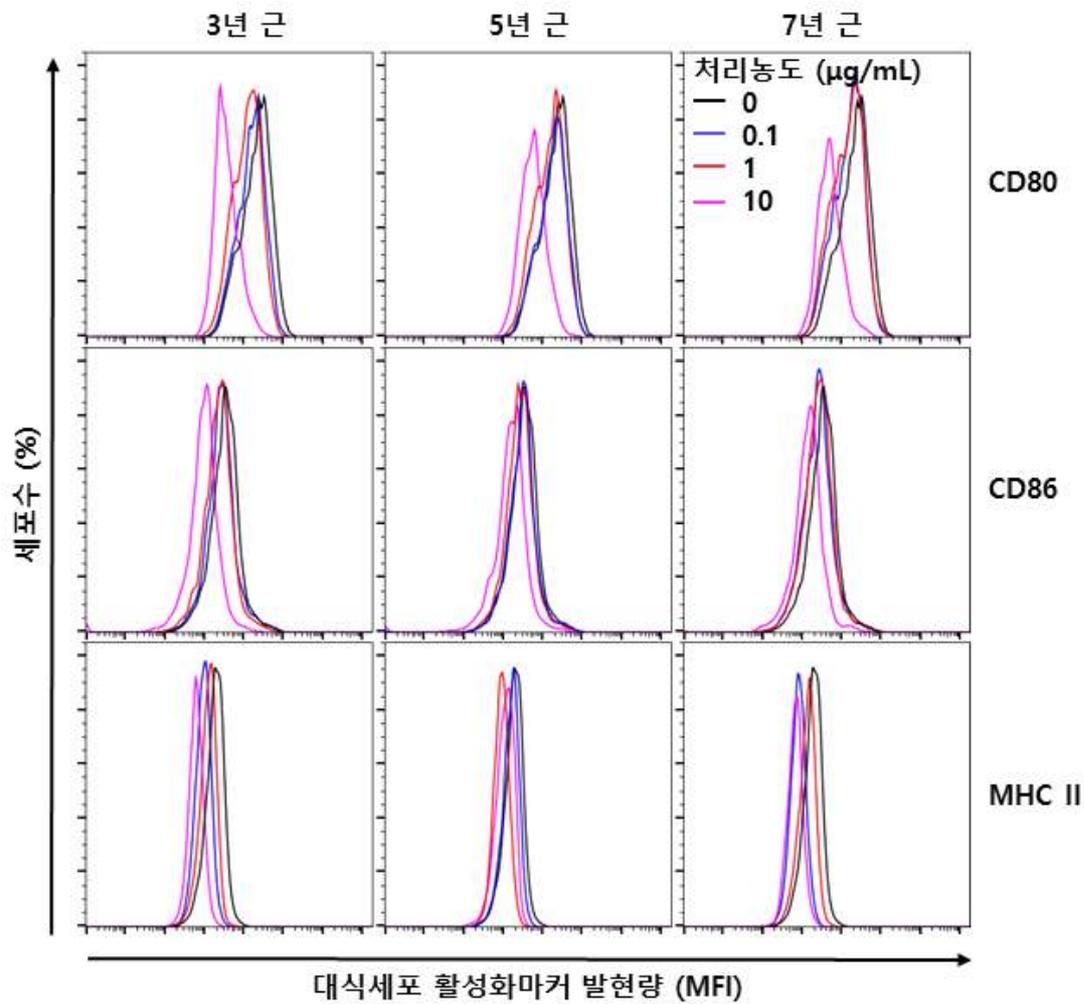
가장 낮은 분비량을 보임으로써 처리농도에 따른 일관된 경향은 보이지 않았음. 이에 대하여, 자세한 통계연구를 통하여 그 영양생리학적 의의를 파악할 예정임.



<그림 7. 근령별 및 농도별 산양삼 추출물 처리에 따른 RAW264.7 대식세포주의 염증성 사이토카인 (A) IL-6 및 (B) TNF-α 분비능>

6. 산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포의 활성화마커 발현량

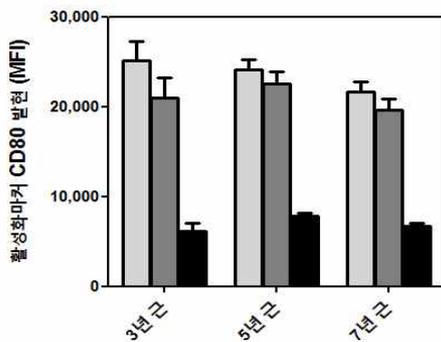
근령별 및 농도별 산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포의 활성화마커 발현량을 FACS를 이용하여 분석하여, 각 처리군별 대표 histogram을 그림 8에 나타내었다. CD80와 CD86는 T-cell costimulatory molecule이라고도 불리우는 단백질로서, 후천성면역의 기능조절에 중요한 역할을 함. 산양삼의 처리농도에 따른 CD80와 CD86의 발현량은 0(흑색), 0.1(청색), 1(적색), 10(자색) μg/mL 으로 농도가 증가할수록 감소함을 보였다. MHC II 단백질은 대식세포의 대식과정 이후 면역성 항원물질을 후천성면역세포에 제공하는 역할을 하는 단백질로서, 그 발현량 역시 산양삼 추출물 처리에 따라 감소하는 경향을 보였다.



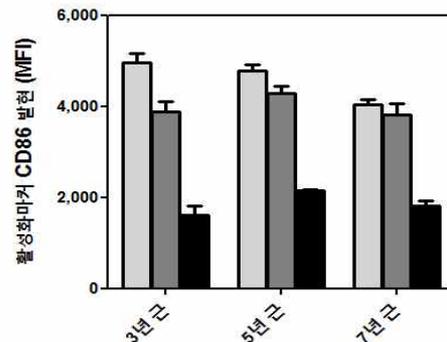
<그림 8. 근령별 및 농도별 산양삼 추출물 처리에 따른 RAW264.7 대식세포주의 활성화마커 발현량의 대표 histogram>

이와 같이 대식세포 표면의 활성화마커 발현을 반복측정하여 그 형광의 세기(MFI)로 발현량을 상대적으로 비교한 결과, 산양삼의 근령과 관계없이 처리농도에 따라 CD80 및 CD86의 발현량이 농도의존적으로 감소함을 보였음(그림 9A,B). 특히, 10 µg/mL 이상의 농도로 처리할 경우 CD80/CD86 costimulator molecules의 발현이 50% 이하로 줄어들음을 보였음. 또한, two-way ANOVA 분석 결과, MHC II의 발현량은 근령 및 처리농도에 따른 일관된 경향을 보이지 않았음 ($P>0.05$) (그림 9C).

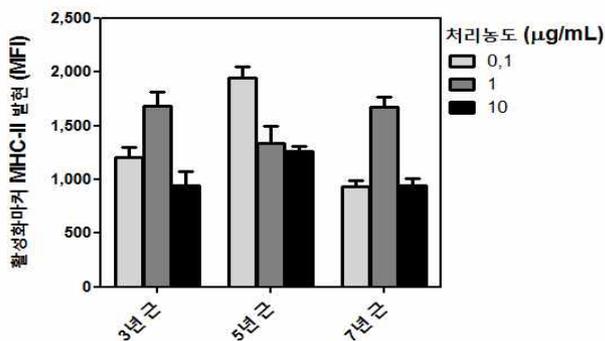
(A)



(B)



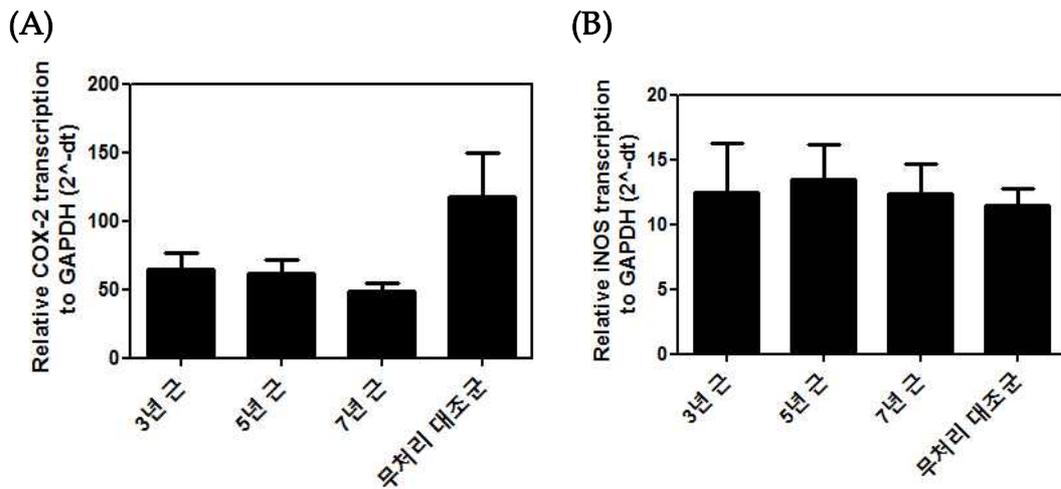
(C)



<그림 9. 근령별 및 농도별 산양삼 추출물 처리에 따른 RAW264.7 대식세포주의 활성화마커 발현량의 변화>

7. 산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포의 염증성 유전자 전사량

RAW264.7 대식세포주를 산양삼 추출물을 1 µg/mL 농도로 처리하여 LPS로 활성화한 결과, 대식세포의 염증성 유전자 COX-2와 iNOS의 전사량은 근령에 따른 차이가 없음을 보였음(그림 10). 염증성 유전자 COX-2와 iNOS는 세포성장성 전사인자인 NF-κB의 전사조절아래에 발현되며, COX-2는 오메가-6 지방산인 아라키돈산을 기질로 하여 prostaglandins를 생성하며, iNOS는 아르기닌을 기질로 하여 nitric oxide(NO)를 생성함으로써 각각 염증성 매개물질(inflammatory mediators)을 생성하여 염증의 악화에 기여함. 본 연구를 통하여, 사이토카인 분비량의 감소에 유의한 농도인 1 µg/mL 산양삼 추출물은 COX-2 및 iNOS의 발현에 영향이 없음을 확인하였음.



<그림 10. 근령별 산양삼 추출물 처리에 따른 RAW264.7 대식세포주의 염증성 유전자 (A) COX-2 및 (B) iNOS의 전사량>

2. 2차년도

<제1세부 : (주)네추럴웨이>

시제품 제작 및 산양삼 분말 및 tablet 제품 제조공정도 및 가공적성 실험

1. 원료

: 건조 산양삼, 초미세 인삼, 벌꿀 분말, 결정과당, 재이단, P1670, 말토덱스트린, 식물성 크리머, 변성전분, 아라비아검, 미립당, 잔탄검, 혼합버터유분말, 인삼향

2. 유동층 과립 및 배합

: 분말 제품과 tablet 제품의 타소재 내에서의 물성, 가공적성의 우수성을 확보 하기 위해서 과립 원료와 후배합 원료를 구별한다.

본 공정의 과립 공정 조건과 tablet 공정 setting을 위한 제형별 시제품 가공적성 실험을 연구하였다,

1) 유동층 과립 원료

: 초미세 인삼, 벌꿀 분말, 결정과당, 재이단, P1670, 말토덱스트린, 식물성크리머, 변성전분, 아라비아검, 미립당, 잔탄검

① 분말의 유동성 과립 가공적성 테스트

: 유동층 과립기에 투입된 원료의 적성에 따라 분말 제형 및 tablet 제형이 우수한 제품으로 제조되므로 통상적인 범위 내에서 가공적성 테스트를 실시 하였다.

<그림 1. 유동층 과립기>



<표1. 유동층 과립기 일반적인 조건 범위>

항 목	범 위
inlet temp.(°C)	20 ~ 90
material temp.(°C)	20 ~ 60
fan flow(mm ³ /h)	25 ~ 80
atomizing(bar)	0.5 ~ 5
speed of pump(rpm)	3 ~ 35

② 분말의 유동성 과립 가공적성 결과

: 유동층 과립 가공적성 실험을 통하여 아래와 같은 결과를 도출 하였다.

<표2. 유동층 과립기 최적 조건>

항 목	범 위
inlet temp.(°C)	60 ~ 80
material temp.(°C)	30 ~ 38
fan flow(mm ³ /h)	40 ~ 65
atomizing(bar)	2.4
speed of pump(rpm)	5~22

<그림 2. 유동층 과립기 배합 제조 된 원료 >



3. 후배합 분말 원료 및 제조

1) 후배합 원료

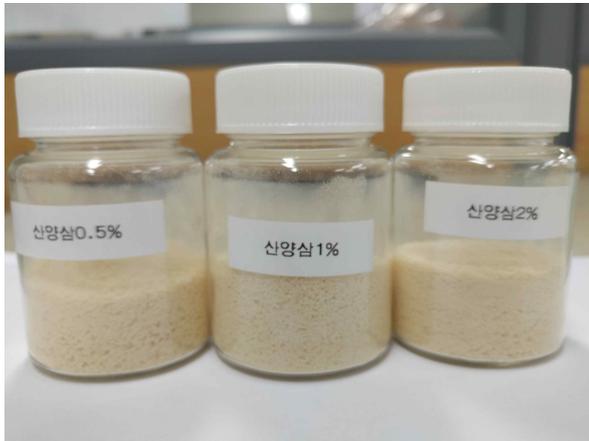
: 산양삼, 인삼향, 스테아린마그네슘

4. 배합비 및 산양삼 함량별 제품

<표3. 분말제품 배합비>

* 배합비의 빈공란은 당사의 중요한 함량비이므로 기록을 하지 않았으나, 요청이 있을 경우에는 따로 서면으로 제시할 수 있다.

<그림 3. 산양삼 분말 제품>



5. tablet 제조 조건 setting 및 제조

: tablet 제조 조건을 아래와 같다.

- ① bulk density(g/ml)
- ② 수분(% , 103℃, 5분)
- ③ 수율(%)
- ④ 중량(mg)
- ⑤ 두께(mm)
- ⑥ 경도(N)

1) tablet 제조 조건 범위

: tablet 제조 조건 설정을 잘해야 tablet 깨짐 및 분말 생성 억제가 되어야 좋은 tablet 제품을 제조, 생산 할 수 있으므로 표4.의 범위 조건으로 반복 테스트를 통해서 표5와 같은 조건을 설정 하였다.

<표4. tablet 조건 범위>

항 목	범 위
bulk density(g/ml)	0.1 ~ 0.9
수분(%, 103℃, 5분)	3 ~ 10
수율(%)	65 ~ 98
중량(mg)	300 ~ 900
두께(mm)	400 ~ 600
경도(N)	50 ~ 130

<표5. tablet 조건 setting>

항 목	범 위
bulk density(g/ml)	0.4
수분(%, 103℃, 5분)	4
수율(%)	70
중량(mg)	500 ~ 530
두께(mm)	530 ~ 560
경도(N)	80 ~ 100

<그림 4. 산양삼 tablet 제품>



<그림 5. 산양삼 tablet 이중캡 제품>



6. 저장 적성 테스트

: tablet를 제조한 제품으로 저장성 테스트를 실시하였고, 측정 항목은 수분과 성상으로 2항목을 10주간 일주일 단위로 측정 실험 하였다.

< 실험 장비 >

- Incubator 1, 2, 3(한양 사이언스)
- 할로젠 수분 측정기(Mettler toledo)

<실험 방법>

- 1군당 3정의 tablet의 무게를 측정하여 평균값으로 계산을 하여, 습도(70%~80%)로 setting하여 저장성 테스트를 실시하였고, 성상은 표준군과 대조군을 비교하여 평가 하였다.

<표6. tablet 무게 측정 결과> (단위 : g)

	25℃	35℃	45℃
1	0.5466	0.5778	0.5923
2	0.5784	0.5883	0.5684
3	0.5843	0.5942	0.5776
4	0.5475	0.5682	0.5623
5	0.5627	0.5489	0.5863
6	0.5635	0.5789	0.5812
7	0.5958	0.5874	0.5645
8	0.5623	0.5771	0.5883
9	0.5937	0.5813	0.5689
10	0.5529	0.5684	0.5741

<실험 결과 판정>

- * 식품공전 정상시험법 5점 척도 중 3점 이상 적합기준에 따라 5점 척도 3점 이상을 적합인 것으로 설정 하였다.
- * 수분함량 적합 범위는 $\pm 95 \sim 105\%$ 한다. (실험전 평균 무게를 100%
- * 수분함량은 실험전 평균무게 대비 실험 후 평균무게를 %로 환산하였다.
(실험 후 평균 무게/ 실험 전 평균 무게)*100)

<표7. tablet 성상 및 수분함량 측정 결과>

25℃			35℃			45℃		
주차	성상	수분(%)	주차	성상	수분(%)	주차	성상	수분(%)
1	5	99.98	1	5	99.84	1	5	99.81
2	5	99.95	2	5	99.38	2	5	99.39
3	5	99.29	3	5	99.57	3	5	98.51
4	5	98.58	4	5	99.67	4	5	98.67
5	5	98.75	5	5	98.01	5	5	97.79
6	5	98.76	6	5	98.71	6	5	98.54
7	5	98.58	7	5	98.05	7	5	97.69
8	5	98.02	8	5	97.63	8	5	97.35
9	5	98.30	9	5	97.95	9	5	96.78
10	5	97.13	10	4	96.78	10	4	96.61

7. 결 론

산양삼 분말 및 tablet 제품 제조의 유동층 과립화와 tablet 가공적성 연구를 통해서 최적의 가공적성 분말 및 tablet, tablet 이중캡 제품을 연구 실험을 통해서 제조 하였다. 유동층 과립화와 tablet 가공적성 연구는 <표2>의 유동성 과립화 가공적성 결과를 토대로 하여 우수한 <표3>의 산양삼 분말 배합비 결과를 도출 하였다.(그림3 참조) 산양삼 분말 배합비로 제조하여 tablet 제조를 위한 <표5>의 가공적성 테스트 결과를 이용하여 tablet를 제조 하였다.(그림4 참조) 당사 이중캡 제형을 이용하여 1% 함유 산양삼 tablet 제품도 제작 하였다.(그림5 참조)

<위탁연구기관 : 서울대학교>

■ 산양삼 발효유산균 선발

○ 발효식품으로부터 유산균 분리 및 동정을 통한 균주 확보

- 발효식품 제조를 위한 발효능력을 가지는 유산균주를 선별하기 위하여 평창지역의 김치를 포함한 다양한 발효식품 (배추김치, 양배추김치, 깍두기, 열무김치, 달래김치, 마카김치, 민들레김치, 오가피김치, 백김치, 물김치, 부추김치, 고들빼기, 도라지김치, 총각김치, 오이김치, 오징어젓갈, 창난젓, 풀뚜기젓, 낙지젓 등)로부터 유산균 분리를 하였다 (그림 1). 수집한 발효식품 시료를 0.85 % NaCl에 희석하여 de Man Rogosa, and Sharpe (MRS; Difco, USA) agar plate에 streaking을 실시하였고 37 ℃에서 24시간 동안 배양한 후, 콜로니의 형태가 서로 다른 균주를 선별하여 총 62종의 균주를 분리하였다 (그림 2).



그림 1. 평창 지역 유래 발효 식품

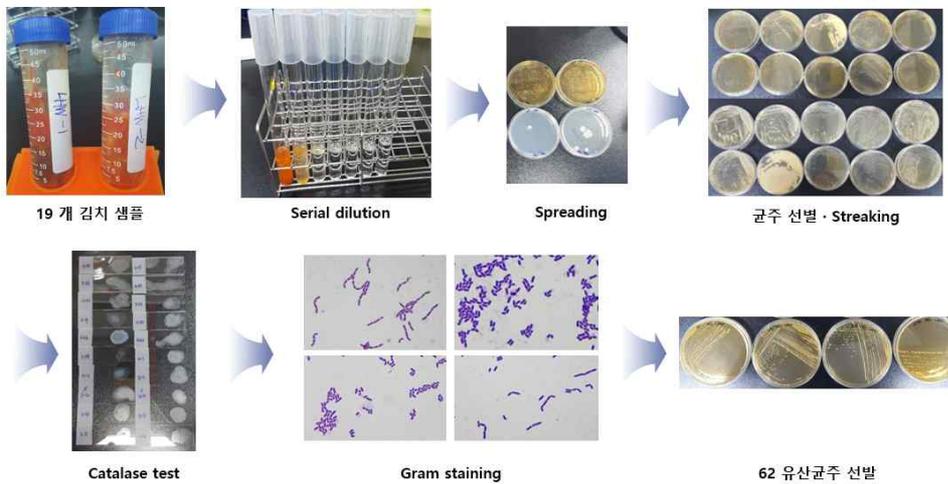


그림 2. 발효식품 유래 유산균 분리 프로세스

○ Esculin agar test

- 분리한 62종의 균주를 MRS broth (Difco, USA)에서 2회 계대배양한 후, 배양액을 esculin agar (Sigma, USA) plate에 접종하여 배지 색 변화 (black complex)를 관찰 하였다. Esculin agar 조성은 표 1과 같으며, β -glucosidase가 esculin의 β -glucose를 절단 하는 과정에서 생성된 esculetin은 배지 내에 있던 ferric ammonium citrate와 반응하여 agar plate에 black complex를 형성하게 된다 (그림 3). 따라서 black complex가 형성된 균주들을 β -glucosidase 활성을 가지는 균주라고 판단하였다. 분리한 62종의 균주 중, 53 종의 균주가 esculin agar plate에서 black complex를 형성하였다 (그림 4).

표 2. Esculin agar 조성

Ingredients	Amount (g/L)
Pancreatic digest of casein (Casamino acids)	13
NaCl	5
Yeast extract	5
Heart muscle, solids from infusion	2
Esculin	1
Ferric ammonium citrate	0.5
Agar	15

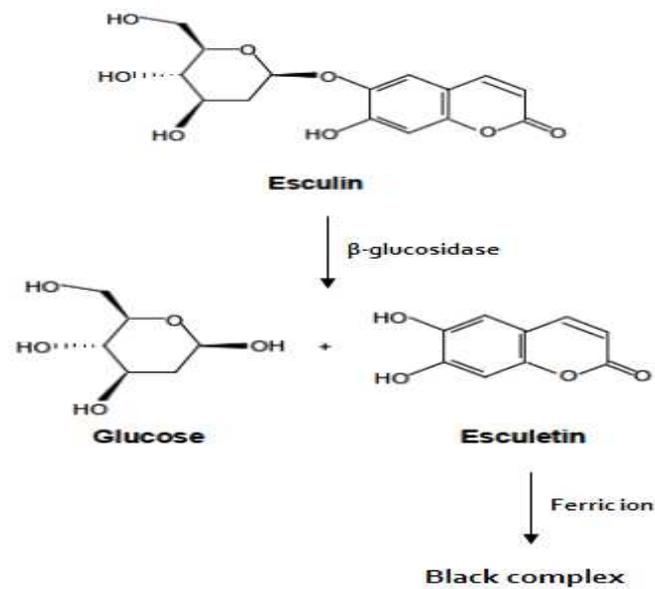


그림 3. β -glucosidase에 의한 esculin 배지에서 black complex 생성

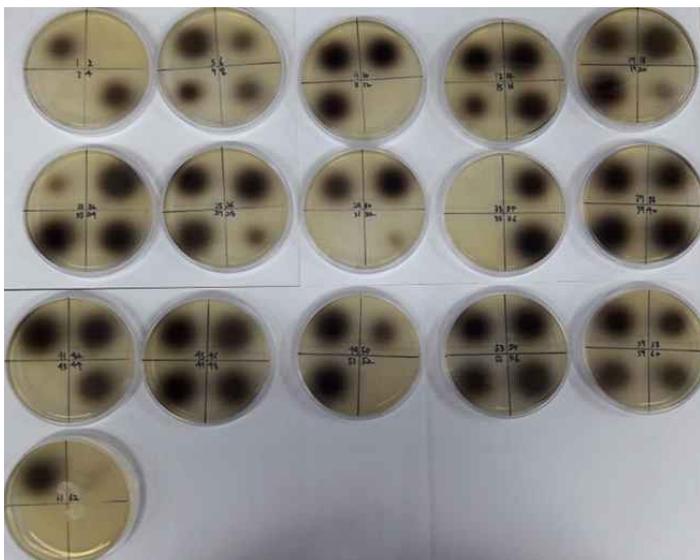


그림 4. 분리균주의 Esculin agar test

○ β -glucosidase 활성 측정

- 분리한 62종의 균주 중, esculin agar plate에서 β -glucosidase 활성을 가지는 53종의 균주를 선별하였다. 선별된 균주의 β -glucosidase 활성 측정을 위한 colorimetric assay를 수행하기 위해 균주를 MRS broth에서 2회 계대배양하였다 (그림 5). 선별된 균주의 배양액을 원심분리 (13,000 rpm, 5 min)하여 얻은 상등액 (세포 외 효소, Extracellular)과 균체를 파쇄하여 얻은 파쇄액 (세포 내 효소, Intracellular)을 효소액으로 사용하였다. 5 mM로 제조한 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (Sigma, USA) 400 μ l의 기질용액에 효소액을 구성하는 상등액과 파쇄액을 각각 50 μ l, 10 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 반응액에 차가운 500 mM Na₂CO₃ 용액 500 μ l를 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 β -glucosidase 활성을 확인하였다. 최종적으로 53종의 균주 중 β -glucosidase 활성이 우수한 KO-4, MOJ-2 균주를 선별하였다 (표 2).

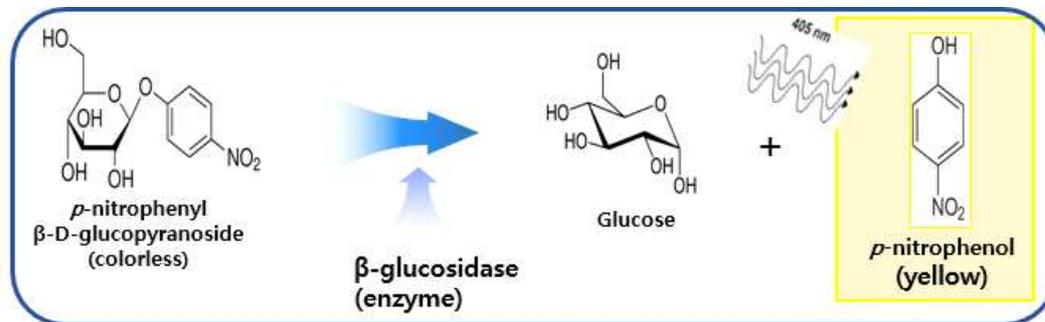


그림 5. β -glucosidase 활성 측정 방법

표 2. β -glucosidase 활성 평가

Isolate	O.D at 405 nm	
	세포 내 효소	세포 외 효소
KO-4	0.014	0.031
MOJ-2	0.003	0.023

○ 선별된 유산균주의 동정

- 선별된 유산균주의 정확한 동정을 위해 16S rRNA 염기서열 분석을 진행하였다. 16S rRNA 염기서열은 universal primer set (27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R 5'-TAGGAGCTCCAGATGCCGTG-3')을 사용하여 증폭되었으며, PCR 조건은 아래 그림 6과 같다. 증폭된 16S rRNA 염기서열 시퀀싱은 분석회사인 (주) 마크로젠에서 이루어졌으며, KO-4는 *Weissella cibaria*, MOJ-2는 *Leuconostoc mesenteroides*로 NCBI BLAST search 결과 동정되었다 (그림 7, 8).

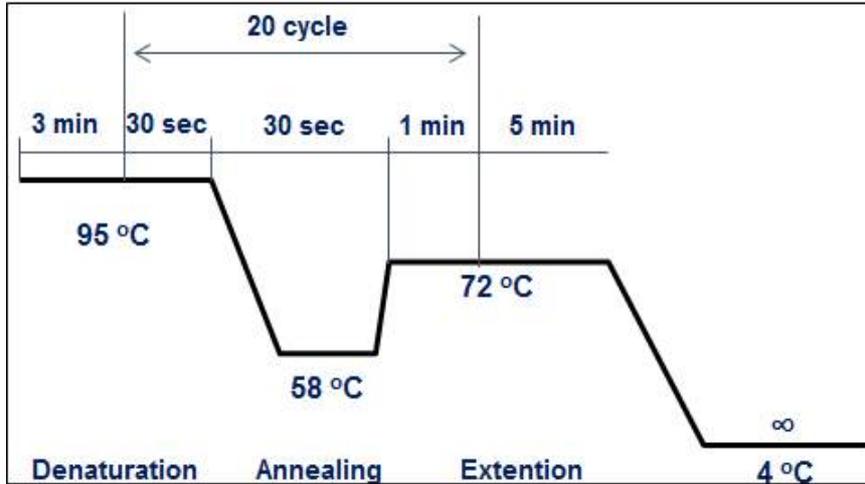


그림 6. PCR 조건

KO-4

```
TGGCCGGGCGGCGTGCTATACATGCAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGC TCAGATA TGACGATGGACATT
GCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGA
TAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTG
AGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTC
GTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAAT
ACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGC GTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGT
CTGAAGTGAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAAATGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGAACCTCCATGT
GTAGCGGTGAAAATGCGTAGATTATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTC TGGACTGTAAC TGACGTGAGGCCTCGAAAG
TGGTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACAACCGTAAACGATGAGTGGCTAGGTGTTTGAGGGTTCCGCCCTTAA
GTGCCGAGCTAAAGCATAGCACTCCCGCTGGGGGAGTACGACCGCAGGTGAAC TCAAAGGATGACGGACCCGCAAAGCGGTGG
AAGCATGTGTAATCCGAAGCCACCCGAAGACCTACAGTCTGAAATCC TGGACACTCGAGATGGACGTTCC TTCGGTACAGGTACGG
TGTCATGGATGCCTCACCTCTGTTGGAA TGTGGTTAGTTC CCGACGGGCCACCTTATACAATGGGCAACATA TGTGGACCTATGG
ATCGCGTTACAACGGGAATGTGATATCATCAGGCC TTCAGACTGGTACTACACCGT
```

→ *Weissella cibaria* KO-4

그림 7. *Weissella cibaria* KO-4의 16s rRNA 염기서열

MOJ-2

```
GGGGAAGTGC GGCGTGC TATACATG CAGTCGAA CGCACAGC GAAAGGTG CTTCACAC CTTTCAAG TGAGTGCG AACGGGTG AGT  
AACACGTGG ACAACCTG CCTCAAGGC TGGGGATA AACATTG GAAACAGATG CTAATACC GAATAAAA CTTAGTGT CGCATGACA  
AAAAGTTAAA AAGGCGCTTC GGCGTCA CCTAGAGAT GGAATCC GCGGTGC ATTAGTTAG TTGGTG GGGTAAAGG CCTACCAAGACA  
ATGATGCATAG CCGAGTTG AGAGAC TGATCGGCC ACAATTGG GACTGAGACAC GGCCCAAAC TCC TACGGGAG GCTGCAGTAGGG  
AATCTTCCACA ATGGGCGAA AGCCTG ATGGAGCA ACGCCGCG TGTTGATGA AGGCTTTCGGG TCGTAAAG CACTGTTGTATGGG  
AAGAACAGC TAGAATAG AAAATGATTTT TAGTTTGACGG TACCATACC CAGAAAAG GGACGGCTAAA TACGTGCC AGCAGCCGCGGT  
AATACGTATGT CCGGAGCGT TATCCG GATTTATTGG GCGTAAAGC GAGCGCAGACGG TTTATTAAG TCTGATGTG AAAGCCC GGA  
GCTCAACTCC GGAATGGCATTG GAAACTGGTTAA CTTGAGTGCAGTAGAGG TAAAGTGAAC TCCATG TGTAGCGGTG GAAATGCGT  
AAATTTATGGA AGAACACCAGTGGC GAAGGCGGCTTACTGGACTGCAAC TGACGTTGAGGCTCGAAA GTGGGTAGCAAACAG  
GATTAATAAC CCGGTAATCCACACCGTAAACGATGAAA CTAGGTGTTAGGAGGTTTC CGCCTC TTAGTGC CGAACCTAAGGCAT  
TAATTTTTCCC CTGGGAATACAACGGCAGG GTTGA AACCTCAAGGGAATGAGGGG GACCCCCAAA GCGGTGGAACAGAGGGT  
TTAATTCGAAGC ACCGAAAAA AACTTAACAGGTTTGACTCCTTAAACGTTTAAAA AAAAAAAAAA TTTTCTTTTCAGAAAAAATAG  
GAAGGGGGGCAGAAGGGCCCTCCCTCCCGGTGCGGGAAAGTTGGGAATAACTCCCGAACCGAG
```

→ *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2

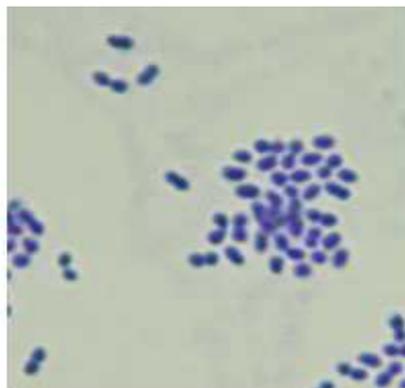
그림 8. *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2의 16s rRNA 염기서열

○ 선발된 유산균주의 그람염색

- 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 동정된 유산균주 *Weissella cibaria* KO-4, *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2의 형태 및 그람 양성/음성을 그람염색 method를 이용하여 확인하였다. 그람염색 결과, *Weissella cibaria* KO-4, *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2는 그람 양성균으로서 타원형의 구균 혹은, 매우 짧은 간균 형태를 보였다 (그림 9).



Weissella cibaria KO-4



Leuconostoc mesenteroides MOJ-2

그림 9. *Weissella cibaria* KO-4, *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2의 그람염색

○ 선발된 유산균주의 산양삼 내 성장성 평가

- 제공 받은 4년근 산양삼 농축액을 5 brix로 희석하여 L-cysteine HCl을 0.05 % 첨가한 뒤, pH 6.5로 조정하였다. 선발된 유산균주를 희석된 산양삼 농축액에 106 CFU/ml 수준으로 접종한 후, 37 °C, 70 rpm 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 접종된 유산균주의 성장 정도를 확인하기 위해서 0, 12, 24, 36, 48 시간별로 pH, 생균수 변화를 측정하였다. 24시간 배양하였을 때, *Weissella cibaria* KO-4의 생균수는 약 107 CFU/ml 수준이었으며, pH는

48 시간 배양하였을 때 4.68로 가장 낮았다 (표 3, 4, 그림 10, 11). 또한, *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2는 12 시간 배양하였을 때, 생균수가 약 107 CFU/ml로 확인되었으며, pH는 48 시간 배양하였을 때 4.49로 가장 낮았다. 위의 선발된 유산균주의 산양삼 내 발효 결과를 정리하면, *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2가 *Weissella cibaria* KO-4보다 신속하게 대수기(log phase)로 진입함을 알 수 있었다.

표 3. 산양삼 농축액에서의 *Weissella cibaria* KO-4와 *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2의 생균수 (CFU/ml)

Strain	생균수 (CFU/ml)				
	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr
KO-4	2.6E+06	4.3E+05	1.5E+07	4.4E+06	4.0E+05
MOJ-2	6.5E+06	8.8E+07	1.5E+07	3.5E+04	1.4E+04

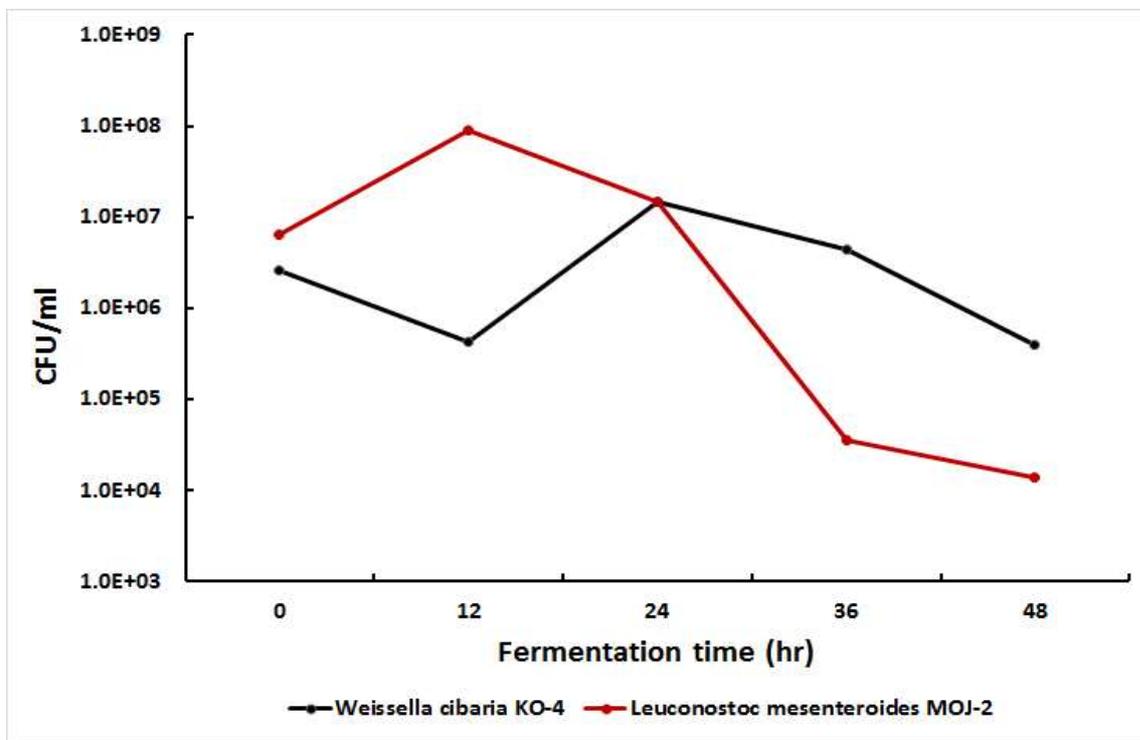


그림 10. 산양삼 농축액에서의 *Weissella cibaria* KO-4와 *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2의 생균수 변화

표 4. 산양삼 농축액에서의 *Weissella cibaria* KO-4와 *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2의 pH

Strain	pH				
	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr
KO-4	6.60	6.41	5.70	4.72	4.68
MOJ-2	6.60	4.62	4.53	4.51	4.49

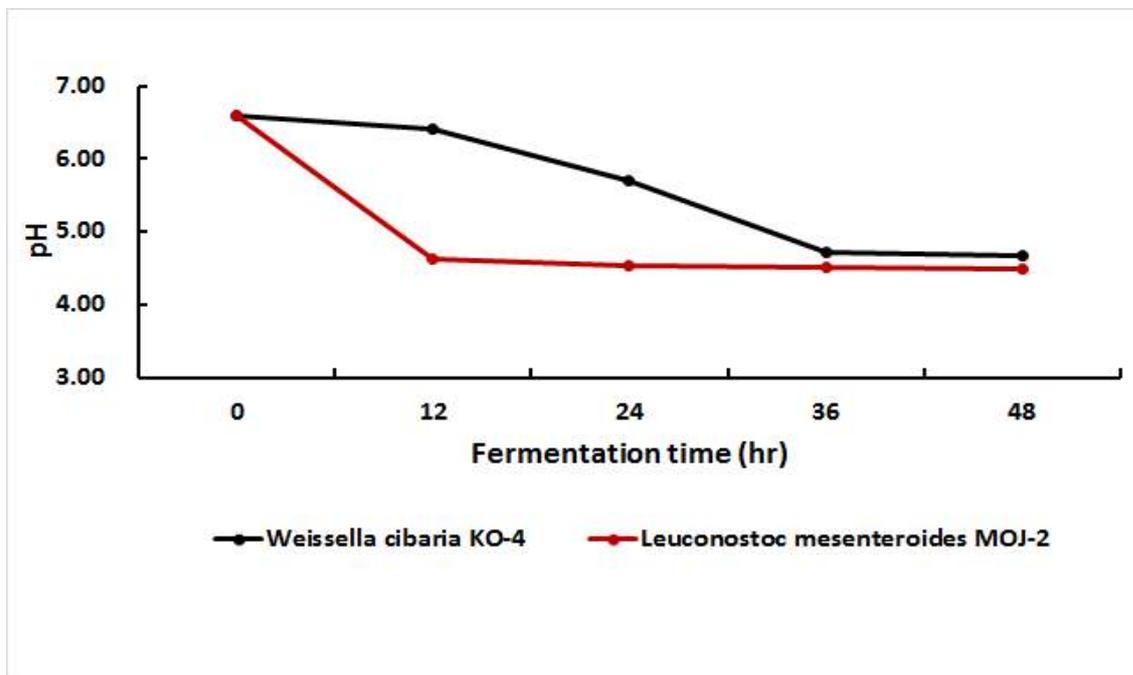


그림 11. 산양삼 농축액에서의 *Weissella cibaria* KO-4와 *Leuconostoc mesenteroides* MOJ-2의 pH 변화

<1협동연구기관 : 경희대학교>

1. 산양삼의 전처리와 형태

4년 근 산양삼의 경우 전체적으로는 그림11-(A)의 형태를 나타냈다. 동체의 길이나 잔뿌리의 수가 3년 근 산양삼에 비하여 확연한 차이를 보였으며, 5년 근 산양삼에 비하여 작은 크기를 나타냈다. 하지만 그림11-(B)와 같이 일부 시료는 동체가 짧고 굵은 형태를 가지며 잔뿌리가 많은 형태도 확인되었다.

2. 산양삼의 일반성분

표 66 4년근 산양삼 일반성분

수분함량	조지방	조단백	조회분
------	-----	-----	-----

4년 근	84.84±0.37%	0.94±0.51	10.51±1.08	3.51±0.49
------	-------------	-----------	------------	-----------

4년근 산양삼의 일반성분을 분석한 결과를 표8에 나타내었다. 4년근 산양삼의 일반성분 중 조단백 함량이 상대적으로 높은 것으로 나타났다.

3. 추출방법에 따른 추출수율 및 조사포닌 함량

표 67 추출방법에 따른 추출수율 및 조사포닌 함량

	추출수율 (%)	조사포닌 함량 (mg/g dried ginseng)
환류 추출 4년 근 산양삼	52.67±4.04 ^a	186.17±35.22 ^a
상온 추출 4년 근 산양삼	39.73±1.55 ^b	149.83±13.46 ^a

*Values with the same letter in the same column are significantly different ($p<0.05$).

추출방법에 따른 차이를 보기위해 4년근 산양삼의 추출수율과 조사포닌 함량을 표9에 나타내었다. 환류 추출한 4년 근 산양삼의 추출수율이 52.67%로 나타났고 상온추출한 산양삼의 추출수율은 이보다 유의적으로 낮은 39.73%로 나타났다. 이러한 차이는 환류추출의 경우 상온추출에 비하여 장시간 동안 진행되기 때문인 것으로 판단된다. 또한 추출과정에서 환류추출은 비교적 높은 온도에서 이루어지는 반면 상온추출은 낮은 온도에서 이루어지기 때문에 환류추출의 경우 열에 의해 많은 성분들이 용매로 이행이 되기 때문에 더 높은 추출수율을 나타냈을 것으로 생각된다. 조사포닌 함량 역시 환류 추출한 4년근 산양삼에서 186.17로 상온 추출한 4년근 산양삼 149.83보다 높은 함량을 나타냈지만, 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다.

4. 추출방법에 따른 ginsenoside 함량 및 크로마토그램

표 68 추출방법에 따른 ginsenoside 함량 및 크로마토그램

	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	F1	Rd	F2	Rg3	C-K	Rh2	total
상온추출 4년근 산양삼	1.98± 0.18 ^a	7.25± 1.19 ^a	2.22± 0.50 ^a	0.92± 0.24 ^a	5.09± 0.36 ^a	2.31± 0.11 ^a	5.70± 0.35 ^a	0.65± 0.07 ^a	0.79± 0.05 ^a	0.23± 0.00 ^a	0.29± 0.07 ^a	0.82± 0.34 ^a	0.17± 0.00 ^a	28.41 ±2.6 7 ^a
환류추출 4년근 산양삼	2.85± 0.24 ^b	7.93± 0.63 ^a	1.61± 0.14 ^a	0.67± 0.06 ^a	13.62 ±1.69 b	5.43± 0.58 ^b	14.42 ±1.49 b	0.95± 0.12 ^b	2.39± 0.21 ^b	0.23± 0.00 ^b	0.36± 0.03 ^b	0.90± 0.20 ^b	0.17± 0.01 ^a	51.56 ±5.27 a

*Values with the same letter in the same column are significantly different ($p<0.05$).

추출방법에 따른 ginsenoside 함량을 표10에 나타내었다. 진세노사이드 함량 역시 추

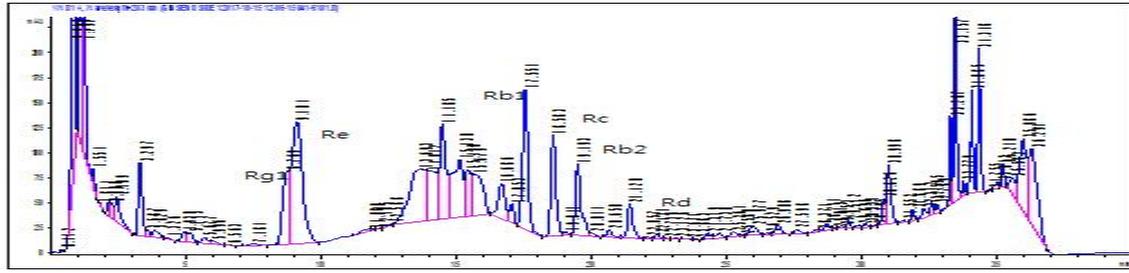


그림 95 상온추출 4년근 산양삼 chromatogram

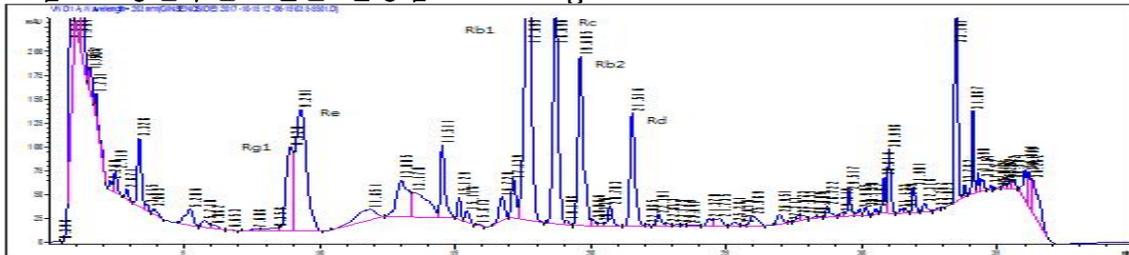


그림 96 환류추출 4년근 산양삼 chromatogram

출수율 및 조사포닌의 함량과 동일한 경향을 나타내었다. Total ginsenoside를 비롯한 대부분의 ginsenoside의 함량이 환류추출한 산양삼에서 높게 나타났다. minor ginsenoside인 Rg3, C-K, Rh2는 두 시료에서 모두 소량 검출되었다.

그림 12, 13의 크로마토그램을 비교해 보면 ginsenoside 함량의 차이를 더 명확히 알 수 있다. 크로마토그램의 전체적인 형태는 동일하게 나타났다. 하지만 각 peak의 높이는 환류추출이 상온추출에 비해 높게 나타났다.

5. 초고압-산 처리 산양삼의 ginsenoside profile

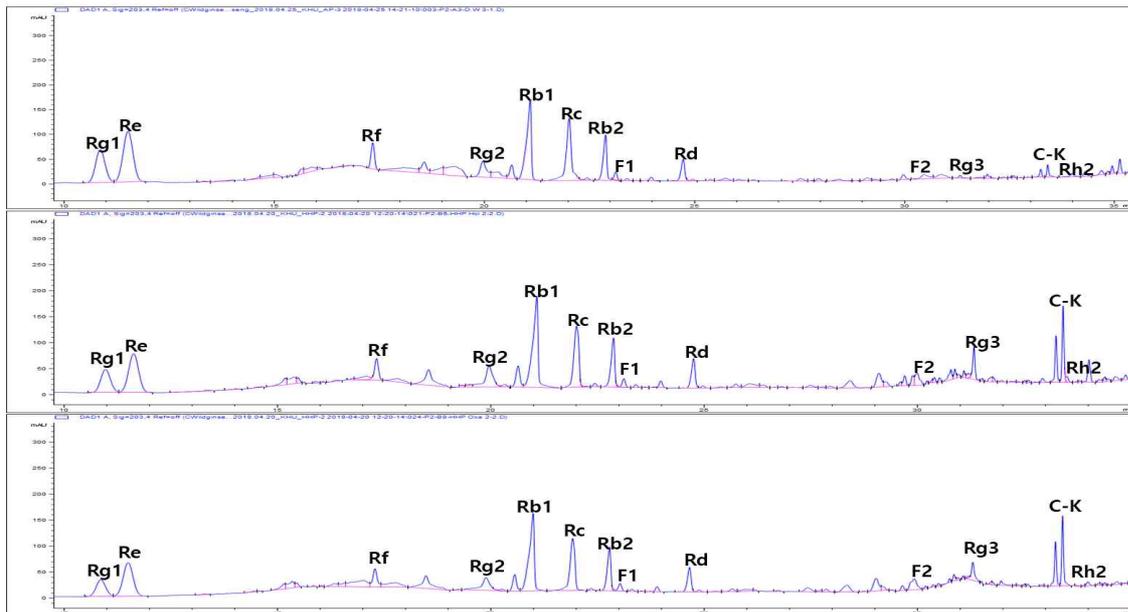


그림 97 초고압-산 처리 산양삼 chromatogram (A) 비처리 산양삼 (B) 초고압-HCl 산양삼 (C) 초고압-oxalic acid 처리 산양삼

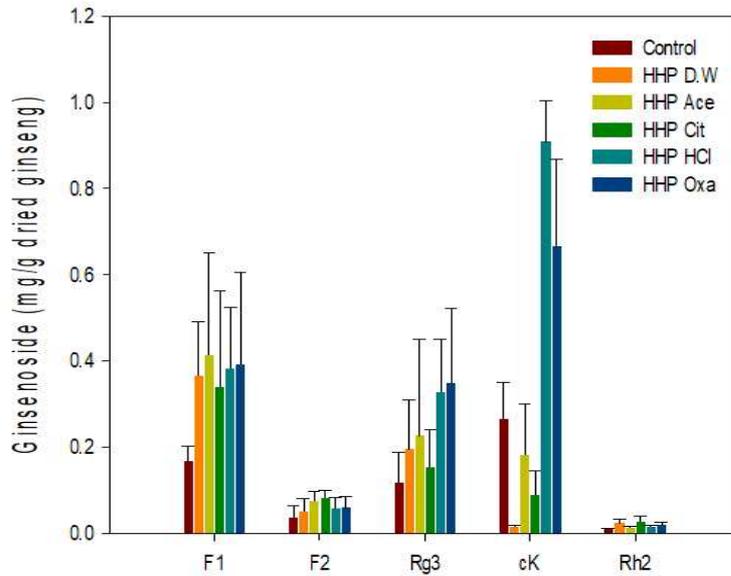


그림 98 초고압-산 처리 산양삼 minor ginsenosid함량

Chromatogram을 보면 대조군으로 사용된 4년근 산양삼의 경우 앞선 실험에서와 같이 Rg1, Rb1, Rb2등의 major ginsenoside peak가 크게 나타난 반면 minor ginsenoside peak는 거의 확인되지 않았다. 이러한 경향은 초고압 처리 산양삼의 chromatogram에서도 동일하게 나타났다. 이를 통해 초고압 단행 처리의 경우 ginsenoside 전환에 큰 영향을 주지 않는다고 판단할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 ginsenoside 전환에 큰 영향을 주는 것으로 알려진 산 처리를 초고압 처리와 병행하여 추가적인 실험을 진행하였다. 사용된 산은 acetic acid, citric acid, HCl, oxalic acid를 사용하였다. 550 MPa에서 15분간 acetic acid, citric acid 처리한 산양삼의 경우 비처리 산양삼과 큰 차이를 나타내지 않았다. 반면 550 MPa에서 15분간 HCl과 oxalic acid로 처리된 산양삼의 경우 chromatogram에 확연한 변화를 나타내었다. 그림14를 보면 대조군 chromatogram과 달리 Rg3, compound-K peak가 확연히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 6가지 시료의 minor ginsenoside의 정량분석 결과를 그림15에 나타내었다. chromatogram 결과와 동일하게 비처리 산양삼에 비해 초고압-산 처리된 시료들의 minor ginsenoside 함량이 유의적으로 증가된 것을 확인할 수 있었다. 특히 HCl과 oxalic acid로 처리된 산양삼의 Rg3, compound-K 함량이 급격히 증가함을 확인할 수 있었다. 이를 통해 초고압-산 처리를 통해서 산양삼의 major ginsenoside를 minor ginsenoside로 전환할 수 있음을 확인했다. 또한 이러한 전환 과정은 산의 종류에 영향을 받는 것을 확인할 수 있었고 이후 실험에서 사용된 조건의 기준이 되었다.

<2협동연구기관 : 단국대학교>

1. 산양삼 최적 생물전환 조건 확립

1.1 예비실험: 최적생물전환을 위한 산양삼 효소반응시간 설정

- 최적 효소 생물전환을 위한 효소 반응시간을 설정하기 위하여 1차년도에 효소 반응 조건은 문헌조사 및 효소 안정성과 분해 효율성, 효소의 종류 등을 고려하여 진행하였음.
- 시료의 양은 전체 양의 40%, 효소의 양은 5%로 하였으며, 총 부피는 1 mL로 반응 온도 50°C, 반응 시간 1 hr, 2 hr로 chromatogram을 비교하였음.
- 그 결과, 1 hr 반응한 산양삼에서 2 hr 반응한 것과 비슷하거나 더 높은 유효성분이 관찰되어 반응시간을 1 시간으로 설정함.

1.2 시판 효소를 이용한 생물전환 산양삼의 최적 반응조건 탐색 & ginsenoside 분석

- 산양삼 추출 농축액 제조: 1협동기관인 경희대학교에서 3년근 또는 4년근 산양삼을 70% ethanol (EtOH)로 70°C에서 24시간 환류 추출 후 농축하고, 증류수로 현탁한 추출 농축액을 제조하여 공급받음. 4년근 산양삼 농축액의 경우 농도가 5 mL/[1 g 건조 산양삼]이 되도록 현탁함.
- 산양삼의 효소에 의한 생물전환: 1차년도에 선택한 산양삼의 효소생물전환에 적용한 효소는 Novozyme 사(Bagsvaerd, Denmark)에서 8종을 구매하여 사용하였음. 선택한 효소 8종은 Ban 480 L, Fungamyl 800 L, AMG 300 L, Pectinex Ultra Pulp, Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Ultra AFP, Viscozyme L, Celluclast 1.5 L임. 시료 50%, 효소 양은 5%, 반응 온도 50°C, 반응 시간 1 hr, 총 부피는 1 mL로 반응 후, 90°C 10분 열 처리로 불활성화 함. 효소생물전환 조건은 그림 14에 나타냄.

	3 or 4 years extract	
	enzyme X	enzyme O
Reaction Temperature	50°C (shaking)	
Reaction time	1 hour	
	Unit : µl	
Amount of the enzyme (5%)	X	50
Amount of the water (DDW)	500	450
Amount of the ginseng	500	500
Total volume	1000	1000

그림 14. 산양삼의 효소 생물전환 탐색 조건

- 산양삼 ginsenoside 추출: 효소 반응액을 C18 Sep-Pak cartridge(Waters, USA) 추출 방법을 이용하여 실험을 진행하였음. 사용된 C18 Sep-Pak cartridge 분획법의 경우 실험의 효율성을 위해 문헌(Kim al et. 2008)에서 사용된 방법을 변형하였음. 즉, C18 cartridge sep-pak을 꺼내어 MeOH을 3 mL를 넣고 천천히 흘려보낸 다음, 3차 증류수 3 mL로 다시 흘려보내주어 Sep-Pak을 활성화 시켜줌. 이 후 산양삼 희석액과 산양삼을 효소생물전환 한 시료 1 mL를 각각 C18 cartridge Sep-Pak에 천천히

Loading 시켜준 다음, 시료에 있는 당 등을 제거하기 위하여 3차 증류수 10 mL로 세척함. 세척 후에 따로 농축을 진행하지 않고 HPLC grade MeOH 2 mL로 용량을 맞춰 vial에 담아 HPLC용 sample로 사용함. 실험 시 추출시간을 단축시킬 수 있는 C18 Sep-Pak cartridge 추출방법을 사용하였음. 기존에 ginsenoside 추출에 이용되는 BuOH 추출법과 C18 cartridge 분획법은 그림 15에 비교함.

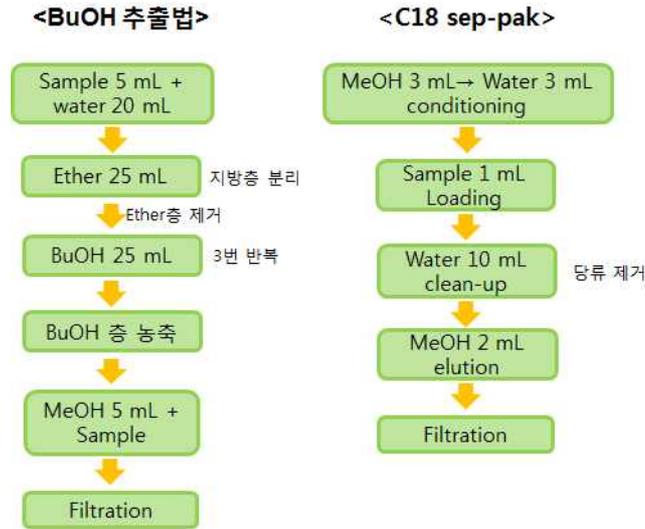


그림 15. BuOH추출법과 C18 cartridge 분획법 비교

- HPLC(Agilent 1260, USA) system을 이용한 ginsenoside 성분 분석: ZORBAX eclipse XDB-C18 column (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)을 사용하였고, 검출기는 UV detector, 파장은 203 nm에서 측정하였으며 이동상으로는 증류수(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였고 gradient는 0-6, 6-11, 11-15, 15-25, 25-26.5, 26.5-29, 29-31, 31-32.5, 32.5-34.5, 34.5-35.5, 35.5-40분마다 82:18, 79:21, 74:26, 68.5:31.5, 66.1:33.9, 60:40, 44:56, 30:70, 15:85, 15:85, 82:18, 82:18 비율로 조절하였고, 이동상의 유속은 1.0 mL/min이었으며, 표 4과 같음. 또한 초기 반응한 sample의 양을 고려하여 BuOH 추출은 5 μ L, C18 cartridge 분획은 20 μ L를 injection하였고 분석온도는 45 $^{\circ}$ C로 하였음

min	Water (A)	ACN (B)
0	82.0	18.0
0-6	79.0	21.0
6-11	79-74	21-26
11-15	74-68.5	26-31.5
15-25	68.5-66.1	31.5-33.9
25-26.5	66.1-60	33.9-40
26.5-29	60-44	40-56
29-31	44-30	56-70
31-32.5	30-15	70-85
32.5-34.5	15	85
34.5-35.5	15-82	85-18
35.5-40	82	18

표 4. HPLC 분석 용매 조건

- 효소를 3년근 산양삼과 반응하여 진세노사이드의 변화를 HPLC chromatogram으로 확인하였음(그림 16-18)

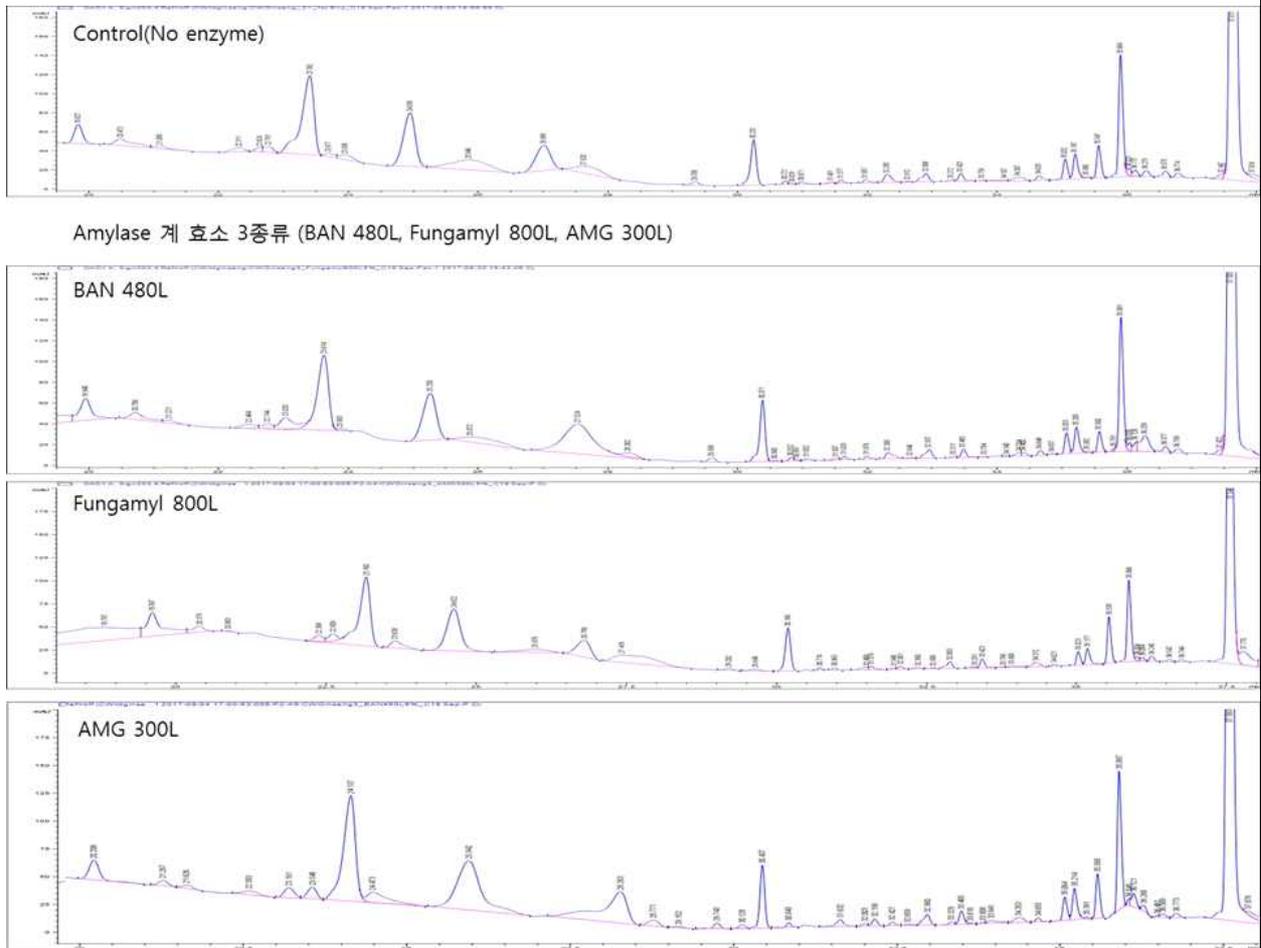


그림 16. Amylase 계통 효소를 이용한 산양삼의 생물전환 ginsenoside profile 비교

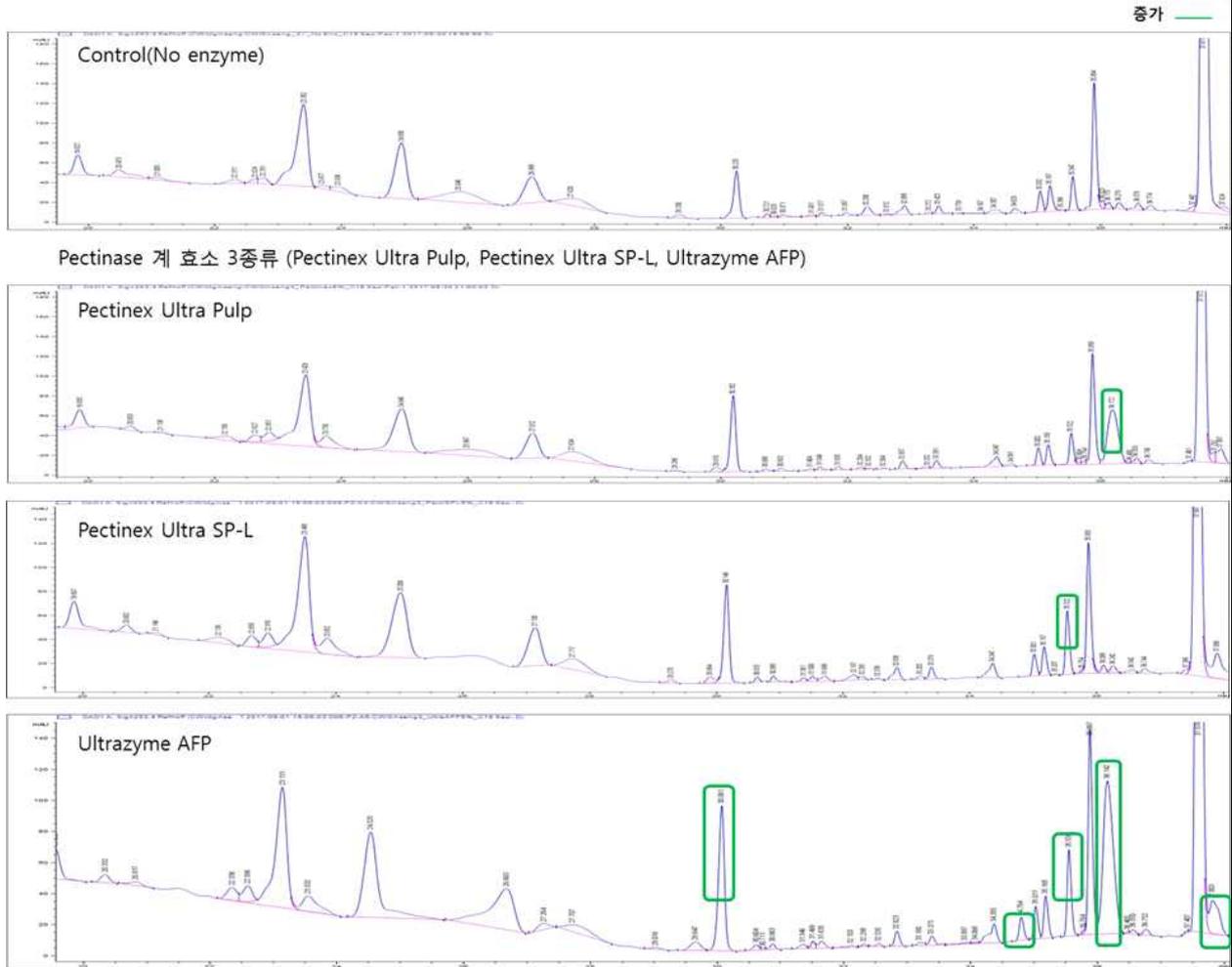


그림 17. Pectinase 계 효소를 이용한 산양삼의 생물전환 ginsenoside profile 비교

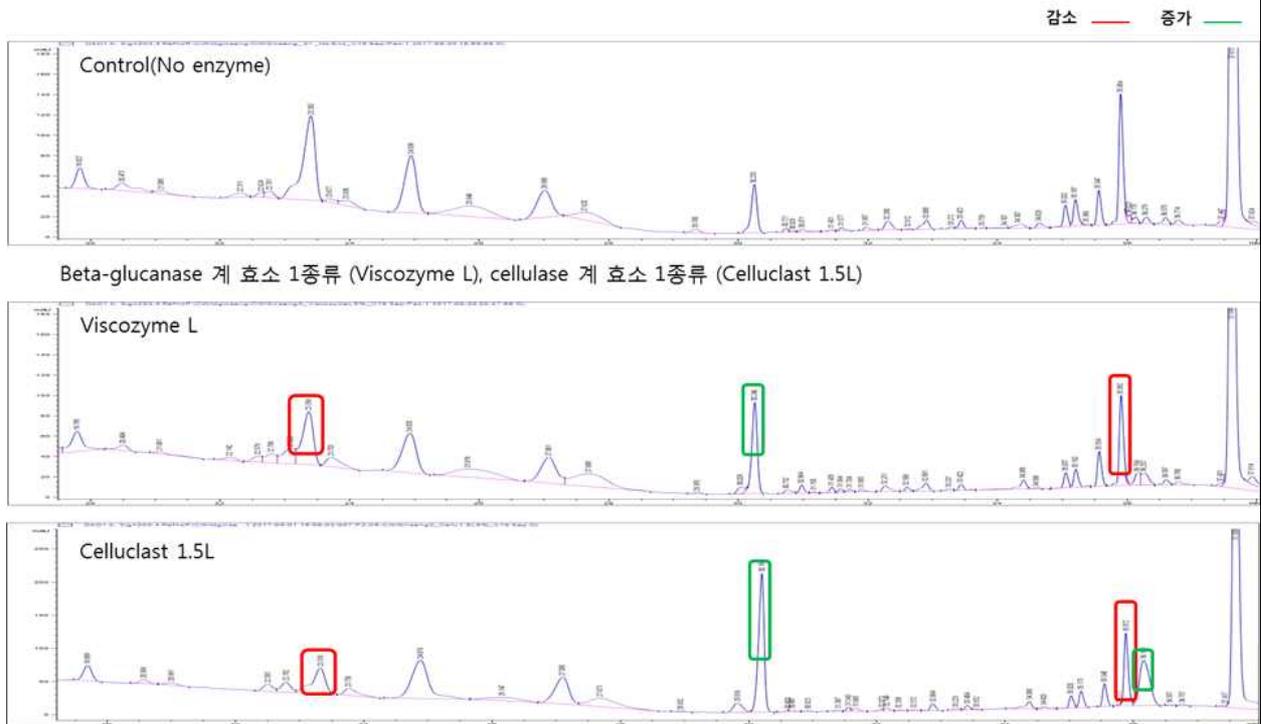


그림 18. β -glucanase 계통과 Cellulase 계통 효소를 이용한 산양삼의 생물전환 ginsenoside profile 비교

- 그 결과, amylase 계통에서는 진세노사이드의 변화가 없었고, pectinase 계통인 Pectinex Utra Pulp는 36.172 min, Pectinex Utra SP-L은 35.522 min, Ultrazyme AFP는 30.061 min, 34.784 min, 35.535 min, 36.142 min, 37.800 min에서 peak가 증가하는 것을 볼 수 있었음.
- 또한, β -glucanase 계통 Viscozyme L의 경우 30.240 min에서 증가하는 peak를 보였음. cellulase 계통 Celluclast 1.5 L 효소는 30.190 min, 36.153 min에서 증가하는 peak를 보였음
- 위 실험 결과를 통해 산양삼 ginsenoside HPLC profile의 변화를 뚜렷하게 나타낸 Pectinex Utra Pulp, Pectinex Utra SP-L, Ultrazyme AFP, Viscozyme L, Celluclast 1.5 L 5종의 효소를 생물전환 최적조건을 위한 효소로 선정하여 이후 실험을 진행하였음.

1.3. 5종 효소를 이용한 생물전환 산양삼의 최적 반응조건 탐색 & ginsenoside 분석

- 상기 선택된 5종의 효소를 표 5에 나타내었고, 이를 이용해 반응조건(온도, 시간, 효소 농도)에 따른 생물전환을 진행하였음.

Product name	Enzyme class	Application
Ban 480 L	a-amylase	중온용 액화효소
Fungamyl 800 L	Fungal a-amylase	maltose 분해, 사포닌 분해
AMG 300 L	Glucoamylase	당화효소
Pectinex Ultra Pulp	Pectinase	사포닌 분해
Pectinex Ultra SP-L	Pectinase	수율증가, 식물구성 최적 추출
Ultrazyme AFP	Pectinase	자연 pH 범위에서 침출 최적
Celluclast 1.5 L	Cellulase	높은수율, Brix 증가, 사포닌 분해
Viscozyme L	B-glucanase	야채,과일 가공, 식물의 구성요소 추출, 사포닌 분해

표 5. Novozyme 8가지 효소 중 산양삼 생물전환에 선택된 5가지 효소

- 생물전환 진행 시 1차년도에 유효성분이 높았던 3년근 산양삼 시료와 2차년도에 구매한 4년근 산양삼의 추출하여 실험을 진행하였으며, 2차년도에 구매한 4년근 산양삼 추출물을 효소 생물전환 시료로 사용하였음.
- 3년근과 4년근 산양삼 간의 유효성분의 차이를 비교하기 위하여, 각 연근의 산양삼 추출 농축액의 C18 Sep-Pak cartridge 방법으로 분획하여 그림 6과 같이 HPLC chromatogram을 비교하였음. 그 결과, 35.530, 35.862 RT에서 감소 또는 증가가 있었으나 유효성분인 ginsenoside는 아님. 따라서 연근에 따른 차이는 없거나 4년근이 더 높을 것으로 판단되어 이후 실험에는 4년근 산양삼으로 생물전환을 진행하였음.

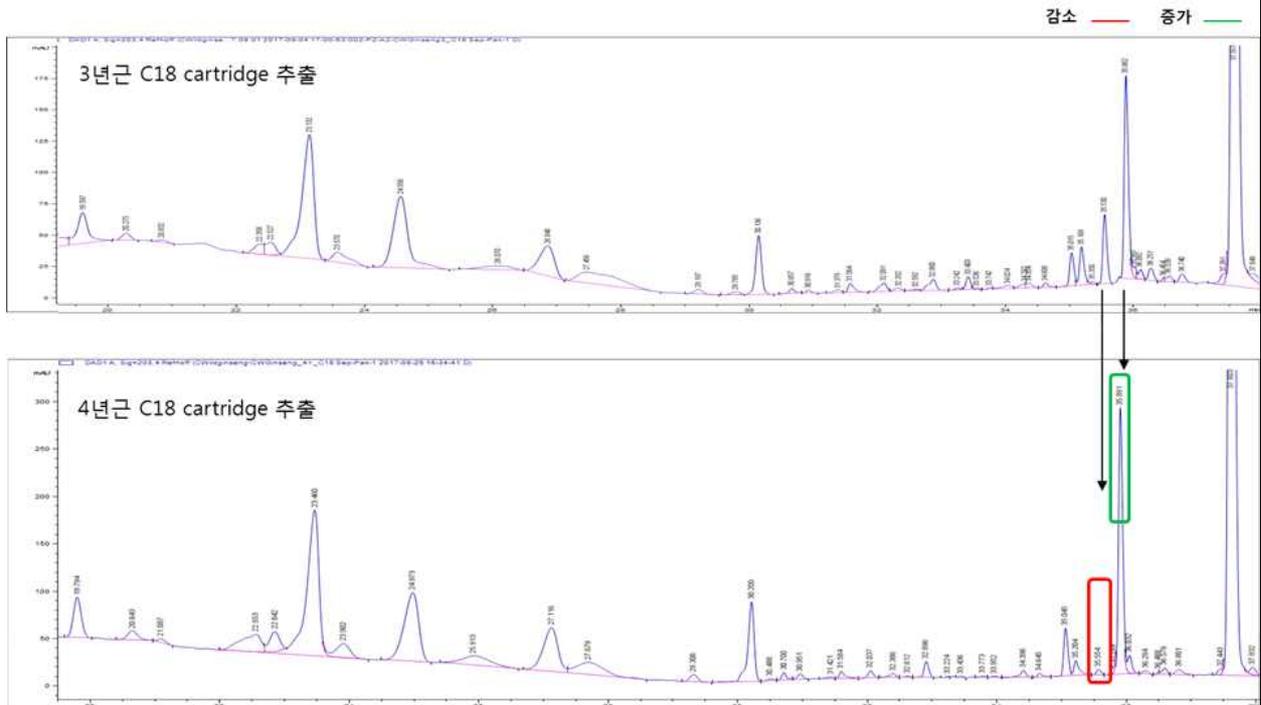


그림 19. 3년근 산양삼과 4년근 산양삼의 ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교

- 선택한 5가지의 효소를 반응 조건(온도(40°C, 50°C, 60°C), 효소 첨가량(2.5%, 5%, 10%), 1 hr 반응하여 생물전환 후, 산양삼의 ginsenoside를 C18 cartridge를 이용하여 분획하였고, HPLC 분석을 통해 ginsenoside profile을 chromatogram을 통해 확인하였음.
- 산양삼 ginsenoside 추출: 효소 반응액을 C18 Sep-Pak cartridge(Waters, USA) 추출법을 이용하여 실험을 진행하였음. 사용된 C18 Sep-Pak cartridge 분획법의 경우 실험의 효율성을 위해 문헌(Kim et. al 2008)에서 사용된 방법을 변형하였음. 즉, C18 cartridge sep-pak을 꺼내어 MeOH을 3 mL를 넣고 천천히 흘려보낸 다음, 3차 증류수 3 mL로 다시 흘려보내주어 Sep-Pak을 활성화 시켜줌. 이 후 산양삼 희석액과 산양삼을 효소생물전환 한 시료 1 mL를 각각 C18 cartridge Sep-Pak에 천천히 Loading 시켜준 다음, 시료에 있는 당 등을 제거하기 위하여 3차 증류수 10 mL로 세척함. 세척 후에 따로 농축을 진행하지 않고 HPLC grade MeOH 2 mL로 용량을 맞춰 vial에 담아 HPLC용 sample로 사용함.

1.4. Ginsenoside profile의 HPLC 분석

- 5종 효소를 이용한 생물전환 후, ginsenoside profile 분석을 통한 최적 반응조건을 탐색하기 위해 HPLC system을 사용함. Ginsenoside 함량은 생물전환 된 산양삼을 HPLC grade MeOH에 용해한 후 Millipore filter (pore size 0.45 μ m)로 여과한 후 HPLC를 이용하여 분석함.
- HPLC system과 조건은 HPLC(Agilent 1260, USA), 컬럼은 Phenomenex사 Kinetex C18(50×4.6 mm, ID 2.6 μ m) column, 검출기는 UV detector, 파장은 203 nm에서 측정하였음.
- 이동상으로는 증류수(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였고 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5, 34.5-40분마다 81:19, 81:19, 81-71:19-29, 71:29, 71-60:29-40, 60-44:40-56, 44-30:56-70, 30-10:70-90, 10:90, 10-81:90-19, 81:19 비율로 하였으며, 표 3와 같음. 이동상의 유속은 0.6 mL/min이었으며 초기 반응한 sample의 양을 고려하여 C18 cartridge 추출은 20 μ L를 injection하였고 분석온도는 45°C로 하였음.

표 6. HPLC 분석 용매 조건

min	Water (A)	ACN (B)
0	81.0	19.0
0-7	81.0	19.0
7-11	81-71	19-29
11-14	71	29
14-25	71-60	29-40
25-28	60-44	40-56
28-30	44-30	56-70
30-31.5	30-10	70-90
31.5-34	10	90
34-34.5	10-81	90-19
34.5-40	81	19

● 1.5. 반응온도의 차이에 따른 진세노사이드 함량의 변화

- 생물전환 반응조건 최적화를 위한 효소 반응 온도 40°C, 50°C, 60°C에서 효소 첨가량을 2.5%, 5%, 10%로 달리하여 최적화 실험을 진행하였음. 이 중 아래 그림 7-11에 각 효소 처리구에서 ginsenoside profile의 변화가 나타난 chromatogram만을 표시하였음. 또한 ginsenoside 함량(area)의 변화가 큰 부분을 *로 표시하였음. 그림 7-11의 ginsenoside peak 면적이 증가 또는 감소한 경우 녹색으로 표시함.
- Pectinex Ultra Pulp 효소의 경우 10% 효소농도에서 50°C, 1 hr 반응하였을 때, 일부 ginsenoside peak 면적의 증가 및 다른 ginsenoside peak 면적의 유지정도가 상대적으로 높은 것을 확인하였음. Pectinex ultra SP-L 효소의 경우 10% 효소농도에서 60°C, 1 hr 반응하였을 때, Ultrazyme AFP은 5% 효소농도에서 50°C, 1 hr 반응 시, Viscozyme L 10% 효소농도에서 50°C, 1 hr 반응 하였을 때, Celluclast 1.5 L 5% 효소농도에서 60°C, 1 hr 반응 시 일부 ginsenoside peak 면적의 증가 및 다른 ginsenoside peak 면적의 유지정도가 상대적으로 높은 것을 확인함.

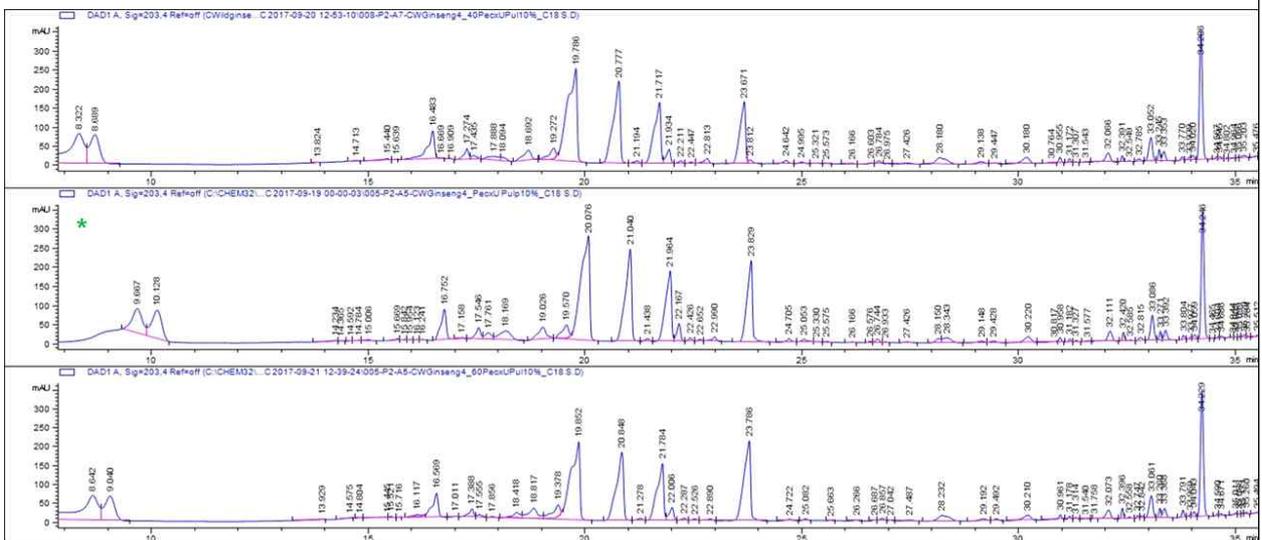


그림 20. Pectinex Ultra Pulp(반응온도 40/50/60°C, 효소농도 10%) ginsenoside profile

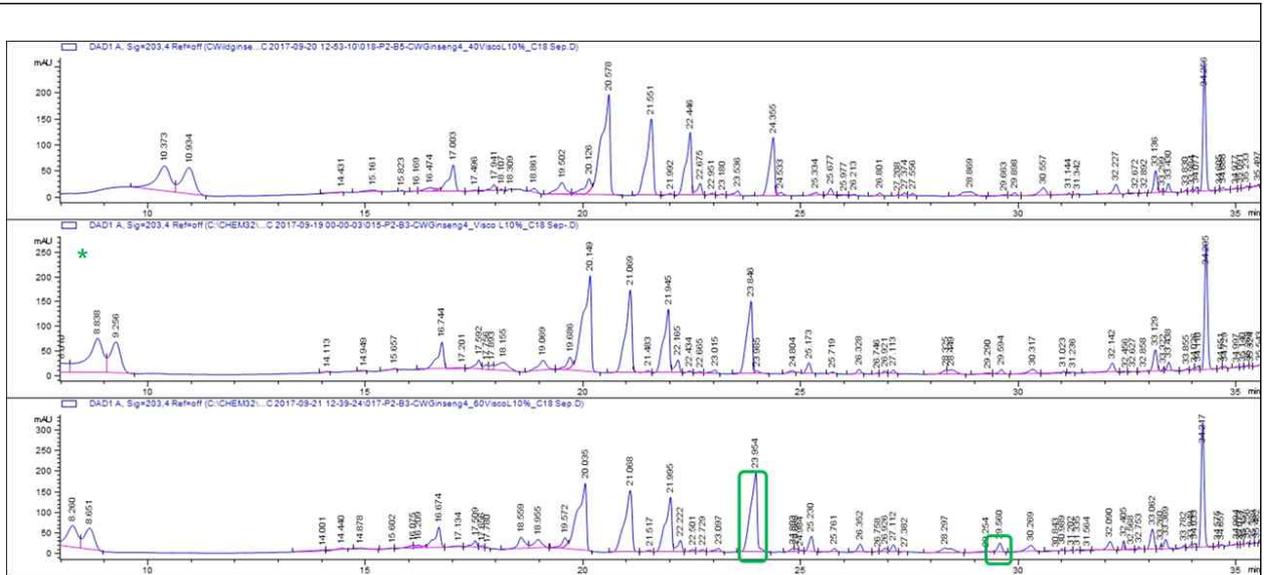


그림 23. Viscozyme L 생물전환 산양삼 온도별(반응온도 40/50/60°C, 효소농도 10%) ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교

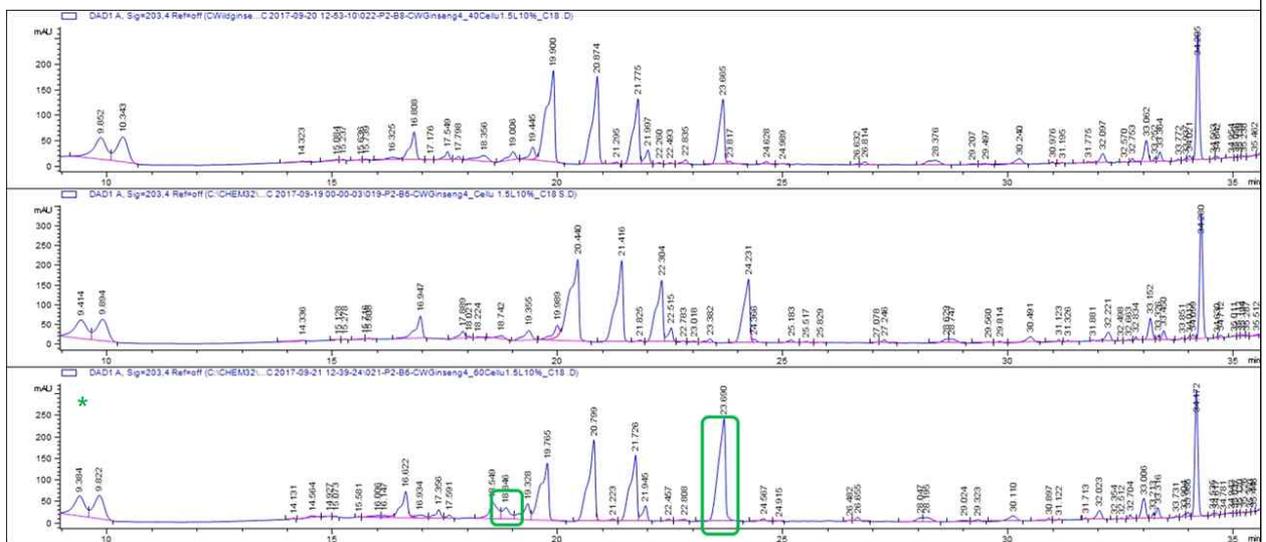


그림 24. Celluclast 1.5L 생물전환 산양삼 반응온도별(반응온도 40/50/60°C, 효소농도 10%) ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교

- 반응온도 최적조건 실험에서 50°C와 60°C 처리군 간의 ginsenoside profile의 변화에 차이가 거의 없었음. 추후 산업적 적용을 위한 비용 고려 시 낮은 온도가 유리하므로, 최적 반응온도를 50°C로 선정함.

1.6. 효소첨가량에 따른 진세노사이드 함량 변화

: 효소량을 반응액 최종부피의 2.5%를 첨가하였을 때보다 5%를 첨가하였을 때, HPLC 분석을 통해 진세노사이드 함량이 증가하는 것을 확인하였음.

- 아래 그림 12-16에서 각 그림에 포함된 3개의 chromatogram은 위에서부터 아래로 50°C 반응 시 각각 2.5, 5, 10% 효소를 첨가하여 생물전환을 한 후, 각 반응액의 ginsenoside profile을 HPLC로 분석한 결과를 나타냄.

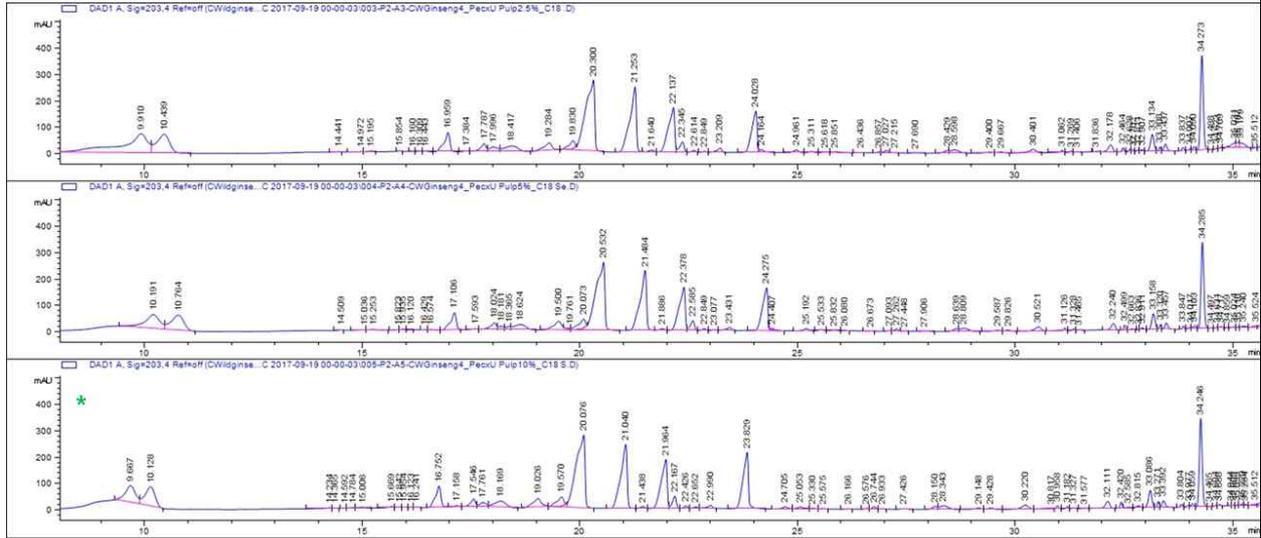


그림 25. Pectinex Ultra pulp 생물전환 산양삼 농도별 2.5/5/10% ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교(반응시간 50°C)

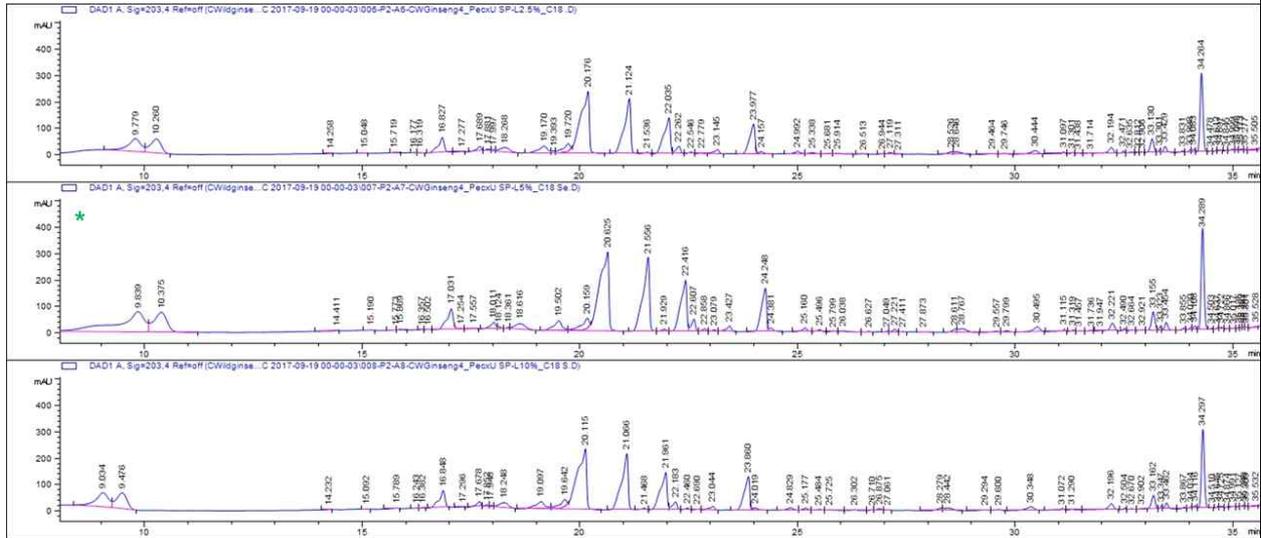


그림 26. Pectinex Ultra SP-L 생물전환 산양삼 농도별 2.5/5/10% ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교 (반응시간 50°C)

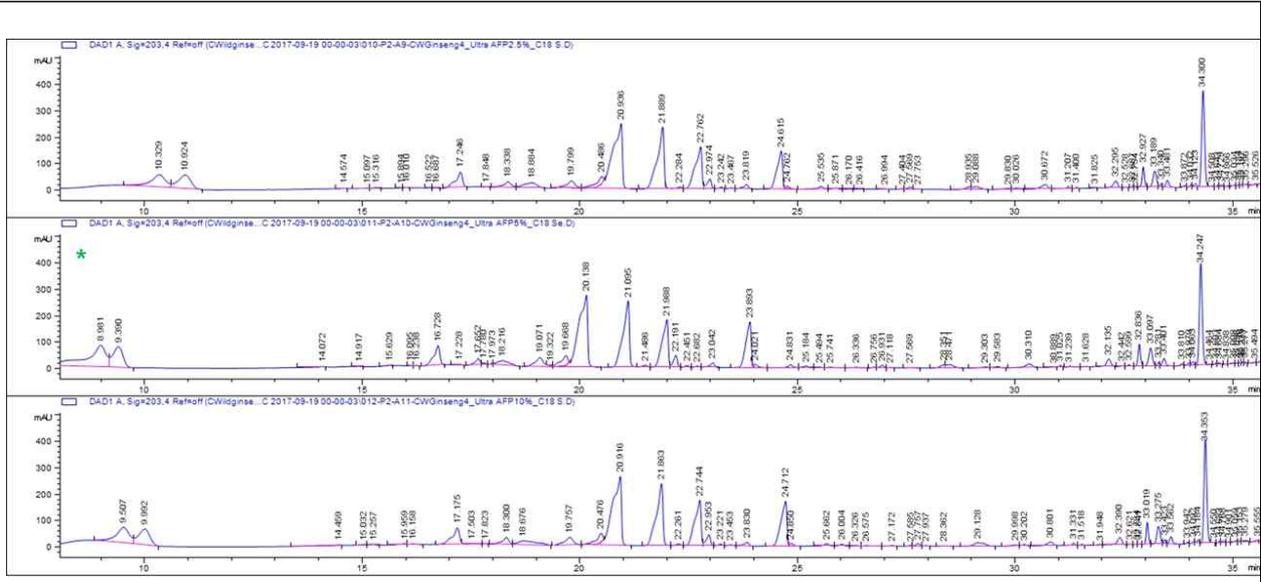


그림 27. Ultrazyme AFP 생물전환 산양삼 농도별 2.5/5/10% ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교 (반응시간 50°C)

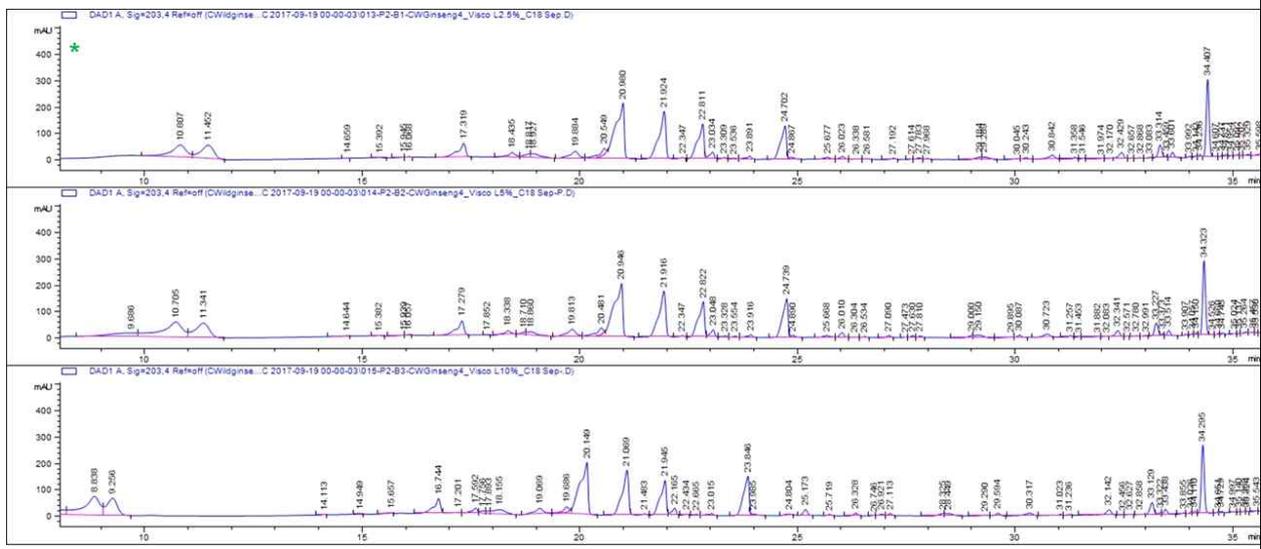


그림 28. Viscozyme L 생물전환 산양삼 농도별 2.5/5/10% ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교 (반응시간 50°C)

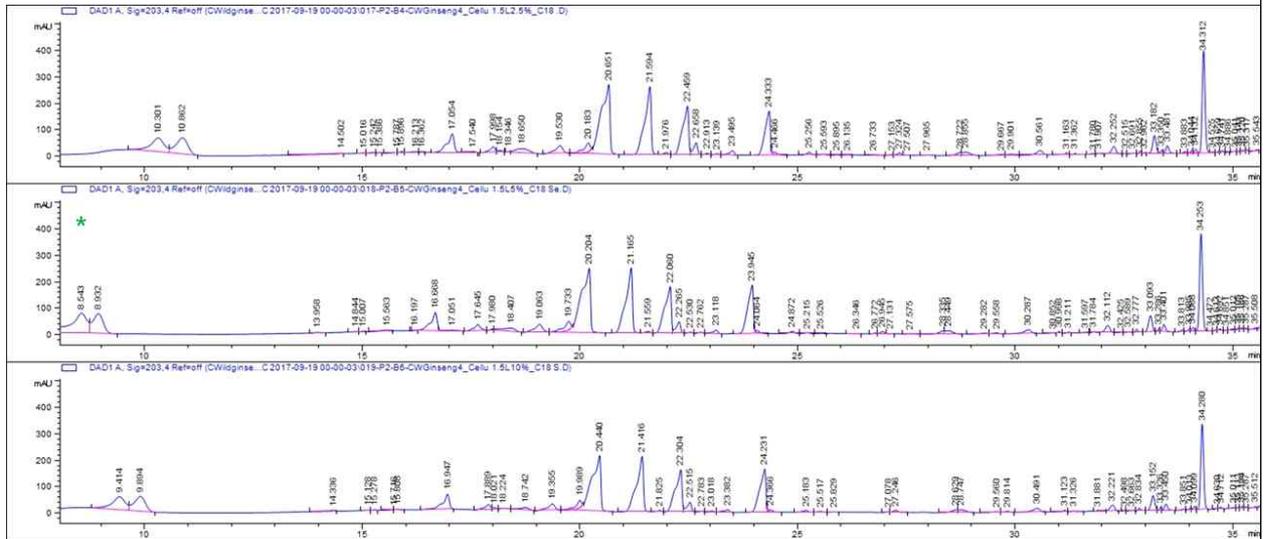


그림 29. Celluclast 1.5L 생물전환 산양삼 농도별 2.5/5/10% ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교 (반응시간 50°C)

- 5% 효소농도와 10% 효소농도 간의 ginsenoside profile과 함량 변화는 효소별로 다른 양상을 보임. 따라서, 이후 유효성분 분석 실험에서 ginsenoside profile 분석을 통해 효소 첨가량에 대한 최적조건을 확립하기 위해, 효소 첨가량을 달리하여 실험함 (온도 및 반응시간은 고정함).
- 이상의 결과를 통해, 최적 반응조건 최종 실험은 반응온도 50°C, 효소농도 5-10%, 반응시간 1 hr으로 판단되어, 반응온도(50°C)와 반응시간(1 hr)을 고정하고 산양삼 생물 전환의 효소 첨가량 조건(2.5%, 5%, 10%)을 달리하여 최종 최적반응조건을 탐색함.

2. 생물전환 산양삼의 유효성분 분석: Ginsenoside

2.1. Ginsenoside standard 정량 분석

- 산양삼의 유효성분을 분석하기 위하여 Ambo 연구소에서 Ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Compound K (CK), F1 등 총 10종을 구매하여, HPLC 분석을 통해 정량곡선을 작성하고, 4년근 산양삼과 4년근 생물전환 산양삼 시료의 진세노사이드를 정량하였음.
- Ginsenoside standard HPLC 분석
 - Ginsenoside standard를 HPLC system을 통해 정량곡선을 작성함.
 - 농도별로 MeOH에 녹여 만든 Ginsenoside standard를 Millipore filter (pore size 0.45 μm)로 여과한 후 HPLC를 이용하여 분석함.
 - HPLC system과 조건은 HPLC(Agilent 1260, USA), 컬럼은 Phenomenex사 Kinetex C18(50 \times 4.6 mm, ID 2.6 μm) column, 검출기는 UV detector, 파장은 203 nm에서 측정하였음.

- 이동상으로는 증류수(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였고 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5, 34.5-40분마다 81:19, 81:19, 81-71:19-29, 71:29, 71-60:29-40, 60-44:40-56, 44-30:56-70, 30-10:70-90, 10:90, 10-81:90-19, 81:19 비율로 하였으며, 표 3와 같음. 이동상의 유속은 0.6 mL/min이었으며 초기 반응한 sample의 양을 고려하여 C18 cartridge 추출은 20 μ L를 injection하였고 분석온도는 45°C로 하였음.
- 분석 결과 10종 ginsenoside standard의 RT(min)는 각각 Rg1 7.890 min, Re 8.328 min, Rf 16.409 min, Rg2 18.907 min, Rb1 19.596 min, Rc 20.613 min, Rb2 21.821 min, F1 21.954 min, Rd 23.786 min, Compound K (CK) 33.144 min이었음

각 RT에 따른 Ginsenoside standard peak chromatogram은 그림 30과 같음

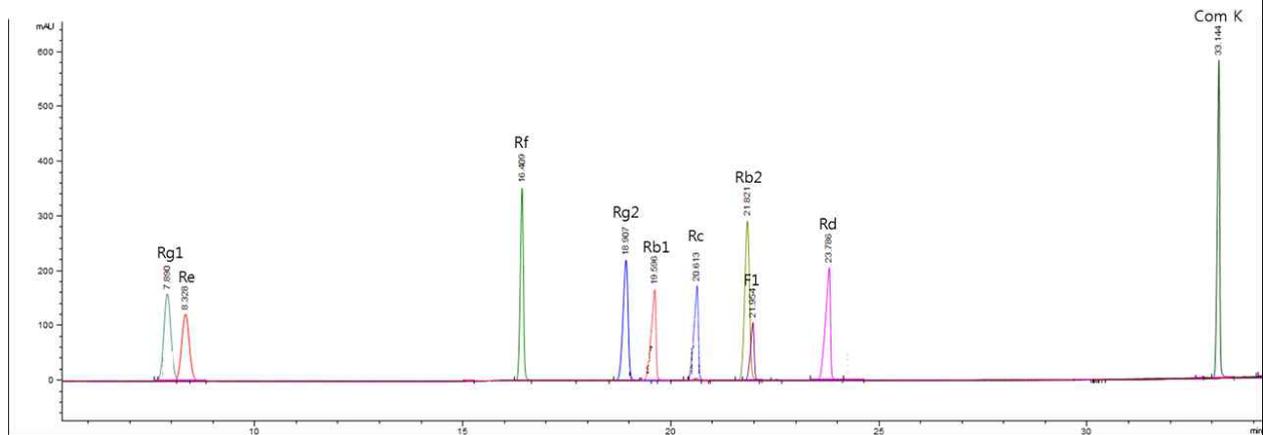


그림 30. Ginsenoside standard HPLC chromatogram

2.2. 최적 반응조건을 이용한 효소 첨가량 조건 탐색 및 효소 생물전환 4년근 산양삼의 BuOH 추출을 통한 유효성분 함량 비교

● 실험 방법

- 4년근 산양삼 효소 생물전환 방법은 50 mL Conical tube에 3차 증류수 4-5 mL를 넣고 산양삼 추출액 5 mL를 넣어 각각 2.5%(0.25 mL), 5%(0.5 mL), 10%(1 mL) 농도로 효소를 첨가하여 50°C, 1 hr 반응을 진행하였으며, 10 min에 1회씩 반응물을 섞어주었음. 4년근 산양삼의 효소생물전환 조건은 표 4와 같음.
- 효소반응 이후에는 90°C에서 10 min간 효소를 불활성화 시켰으며, 반응물을 실온에서 냉각 후 BuOH 추출을 진행하였음.

표 7. 4년근 산양삼 효소생물전환 조건

	4 years extract			
	enzyme X	enzyme O		
Reaction Temperature	50°C (shaking)			
Reaction time	1 hour			
	Unit : mL	2.5%	5%	10%
Amount of the enzyme (2.5%/5%/10%)	X	0.25	0.50	1.00
Amount of the water(DW)	5.00	4.75	4.50	4.00
Amount of the ginseng extract	5.00	5.00	5.00	5.00
Total volume	10.00	10.00	10.00	10.00

- BuOH 추출: 시료 10 mL를 250 mL separation funnel에 넣고 3차 증류수 15 mL를 넣어 시료가 추출이 잘 일어나도록 부피를 증가시켰음. 이후 ethyl ether를 25 mL를 넣어 1:1로 흔들어서 섞어준 다음 산양삼의 지방성분이 에테르층으로 이행되도록 20분간 정치시켰음. 에테르층으로 이행된 지방성분을 제거 후, funnel의 남아있는 에테르를 완벽히 제거하기 위하여 95% EtOH로 세척 후 증류수로 재세척함. 이후 물층을 다시 funnel에서 BuOH과 1:1로 섞은 후, 30분간 이행되도록 정치시켰음. 남은 물층 시료와 BuOH을 넣어 같은 방법으로 반응을 2회 더 진행한 뒤, BuOH층을 모두 모아 45°C에서 Rotary evaporator(BUCHI, Germany)로 농축하였음.
- HPLC sample 준비: 농축한 시료는 HPLC grade MeOH을 이용하여 5 mL로 용량을 맞춘 후(건조 산양삼 1g/5mL) 0.45 µm filter로 여과하여 sample로 사용함.
- HPLC 장비와 조건은 HPLC(Agilent 1260, USA), 컬럼은 Phenomenex사의 Kinetex C18(50×4.6 mm, ID 2.6 µm)column, 검출기는 UV detector, 파장은 203 nm에서 측정하였으며 이동상으로는 증류수(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였고 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5, 34.5-40분마다 81:19, 81:19, 81-71:19-29, 71:29, 71-60:29-40, 60-44:40-56, 44-30:56-70, 30-10:70-90, 10:90, 10-81:90-19, 81:19 비율로 조절하였고, 이동상의 유속은 0.6 mL/min이었으며 초기 반응한 sample의 양을 고려하여 BuOH추출은 5 µL를 injection하였고 분석온도는 45°C로 하였음.
- 4년근 산양삼과 최적반응조건인 50°C, 1 hr으로 반응시킨 효소처리 생물전환 산양삼의 ginsenoside profile HPLC chromatogram을 비교한 그림은 그림 18-21과 같음. 각각의 그림에 포함된 개별 chromatogram은 위에서부터 아래로 4년근 산양삼(Control) 2.5%, 5%, 10% 효소농도 순이며, 그림 18의 경우 위에서부터 아래로 4년근 산양삼, Pectinex Ultra Pulp 2.5%, 5%, 10%, Pectinex Ultra SP-L 2.5%, 5%, 10% 순이었음
- 4년근 산양삼과 최적반응조건인 50°C, 1 hr으로 반응시킨 효소처리 생물전환 산양삼

의 ginsenoside profile HPLC chromatogram을 비교하였을 때, Pectinex Ultra Pulp와 Pectinex Ultra SP-L 효소로 반응한 생물전환 산양삼에서는 ginsenoside peak 면적의 변화가 없거나, 오히려 4년근 산양삼보다 유효성분인 ginsenoside가 줄어들었음(그림 31).

- 그러나 Ultrazyme AFP의 경우 4년근 산양삼보다 Rd에서 증가하는 경향을 보였음(그림 32). Viscozyme L의 경우 Rg1, Rg2, Rd, Compound K에서 증가하는 경향을 보였고(그림 33), Celluclast 1.5 L에서는 Re, Rg2, Rd, Compound K가 증가하는 경향을 보였음(그림 34).

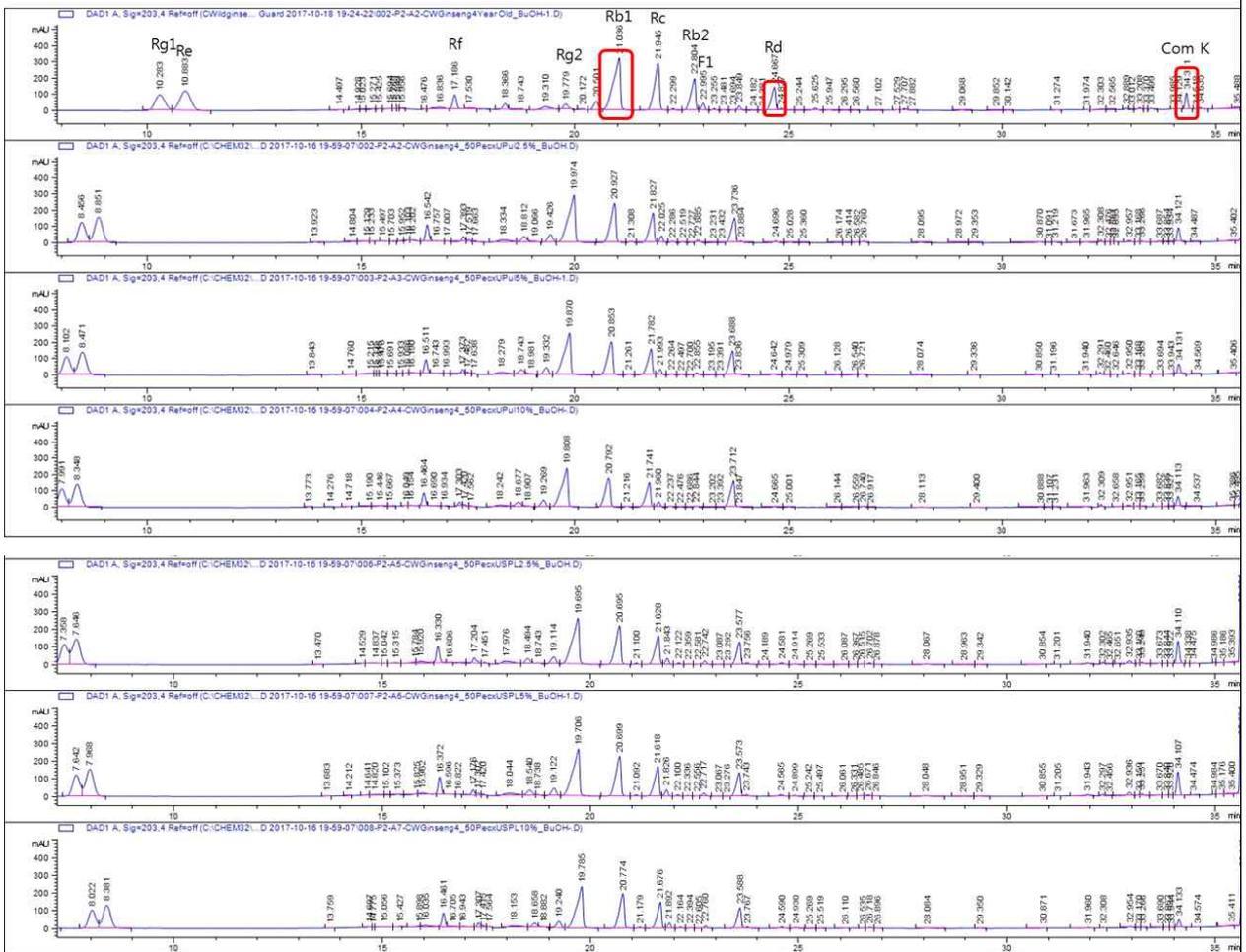


그림 31. 4년근 산양삼과 Pectinex Ultra Pulp와 Pectinex Ultra SP-L 생물전환 산양삼 ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교



그림 32. 4년근 산양삼과 Ultrazyme AFP 생물전환 산양삼 ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교

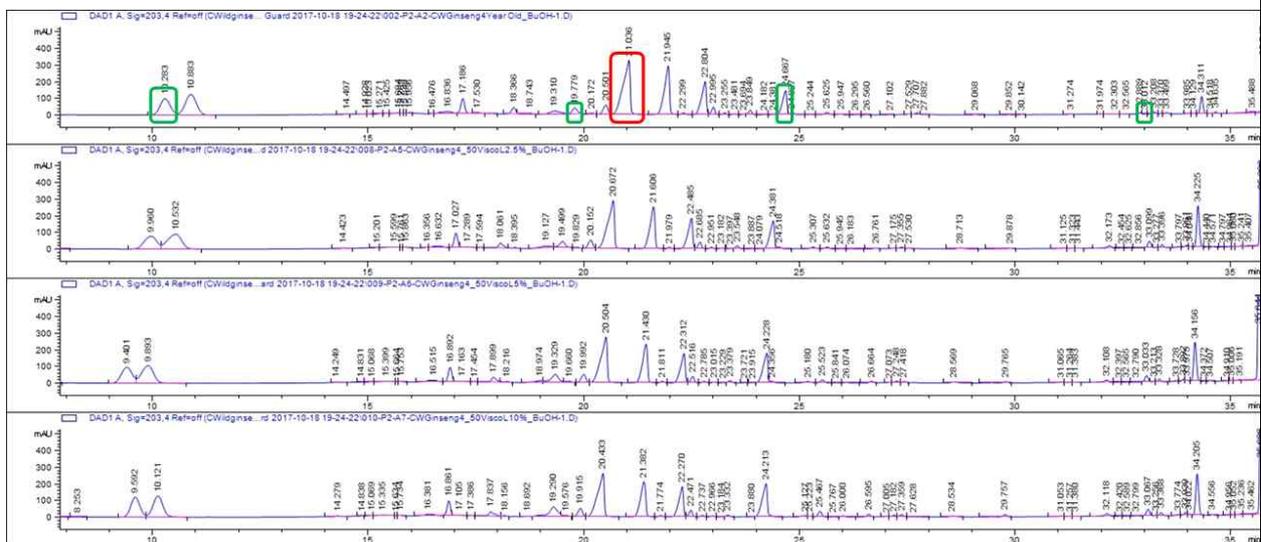


그림 33. 4년근 산양삼과 viscozyme L 생물전환 산양삼 ginsenoside profile HPLC chromatogram 비교

- 4년근 산양삼의 Rg1 함량은 4.191 mg/g dried cultivated wild ginseng(DCWG)이었으며 4년근 산양삼보다 Rg1의 함량이 높았던 생물전환 산양삼은 viscozyme 5%(4.270 mg/g DCWG)와 10%(4.624 mg/g DCWG), celluclast 1.5 L 5%(4.212 mg/g DCWG) 처리구 였음.
- 4년근 산양삼의 Re와 Rb2 함량은 각각 7.068 mg/g DCWG, 5.669 mg/g DCWG이었으며, 4년근 산양삼보다 Re와 Rg2 함량이 높은 생물전환 산양삼은 celluclast 1.5 L 효소 5%(각각 7.202 mg/g DCWG, 5.974 mg/g DCWG) 처리구가 유일하였음.
- Rg2의 경우 Pectinex ultra pulp 2.5%와 Ultrazyme AFP, Viscozyme L, Celluclast 1.5 L 효소 모든 농도에서 4년근 산양삼 보다 높은 Rg2 함량을 나타내었고 그 중 Celluclast 1.5 L 효소 처리군 가장 높은 함량을 보였음
- F1의 경우 4년근 산양삼의 함량은 0.489 mg/g DCWG이었으며, 4년근 산양삼보다 F1 함량이 증가한 생물전환 산양삼은 Celluclast 1.5 L 5%(0.563 mg/g DCWG)와 10%(0.531 mg/g DCWG) 농도 처리구였으며, 그 중 효소농도 5% 처리구에서 F1 함량이 가장 높게 나타남.
- Rd의 경우 4년근 산양삼의 함량은 2.923 mg/g DCWG이었고, Pectinex Ultra SP-L의 모든 농도처리군를 제외한 생물전환 산양삼의 Rd 함량이 4년근 산양삼 보다 높게 나타났음. Pectinex ultra pulp 처리군의 경우 3.074-3.548 mg/g DCWG, Ultrazyme AFP 효소 처리군은 3.056-3.468 mg/g DCWG, Viscozyme L 처리군은 3.557-4.818 mg/g DCWG, Celluclast 1.5 L 효소 처리군은 4.051-6.868 mg/g DCWG이었음. 이 중 가장 높은 Rd 함량은 Celluclast 1.5 L 10%(6.868 mg/g DCWG) 처리구 였음.
- Compound K의 4년근 산양삼 함량은 0.150 mg/g DCWG이었으며, 4년근 산양삼 열처리 시 함량 값이 증가하여 0.229 mg/g DCWG로 나타났음. 이는 열처리만 했을 경우 다른 9종의 ginsenoside의 경우와는 달리 함량이 증가하였음을 알 수 있었고, 산양삼을 열처리만으로도 compound K를 증가시킬 수 있을 것으로 판단됨. 4년근 산양삼의 효소생물전환을 진행한 결과 Pectinex ultra SP-L 2.5%(0.255 mg/g DCWG), 5%(0.258 mg/g DCWG)와 Ultrazyme AFP 2.5%(0.239 mg/g DCWG), Viscozyme L 2.5%(0.475 mg/g DCWG), 5%(0.439 mg/g DCWG), 10%(0.479 mg/g DCWG)와 Celluclast 1.5 L 2.5%(0.398 mg/g DCWG), 5%(0.520 mg/g DCWG), 10%(0.408 mg/g DCWG) 처리구에서 Compound K 함량 값이 증가하였음. 그 중 가장 많이 증가한 효소와 농도는 Celluclast 1.5 L 5% 농도였음.
- 4년근 산양삼을 효소 생물전환 하였을 때, 함량이 낮았던 ginsenoside는 Rf, Rb1, Rc

이었음

- Ginsenoside 함량이 가장 많이 증가된 생물전환 산양삼은 viscozyme L(효소 10%에서 Rg1 함량 4.624 mg/g DCWG)과 Celluclast 1.5 L(효소 5%에서 Re 함량 7.202 mg/g DCWG, Rg2 함량 2.831 mg/g DCWG, Rb2 함량 5.974 mg/g DCWG, F1 함량 0.563 mg/g DCWG, CK 함량 0.520 mg/g DCWG, 효소 10%에서 Rd 함량 6.868 mg/g DCWG)로 나타남.
- 4년근 산양삼을 반응온도 50°C, 반응시간 1 hr, 효소농도 2.5%, 5%, 10%로 하여 선택한 효소 5종(Pectinex Ultra pulp, Pectinex Ultra SP-L, Ultrazyme AFP, Viscozyme L, Celluclast 1.5L)에 의한 산양삼 생물전환을 진행한 결과, viscozyme L에서는 4년근 산양삼보다 Rg1, Rg2, Rd, CK가 증가하였고, Celluclast 1.5 L에서는 Rg1, Re, Rg2, Rb2, F1, Rd, CK에서 증가하는 것을 볼 수 있었음. 이를 통해 β -glucanase 계통 효소와 cellulase 계통 효소가 산양삼의 유효성분을 증가시키는 것으로 생각됨. 또한 가장 많은 진세노사이드 증가를 보인 효소 및 농도는 Celluclast 1.5 L 5%이었음.
- 따라서, 효소를 이용한 산양삼의 생물전환 시 Viscozyme L을 이용 시, 반응온도 50°C, 반응시간 1 hr, 효소농도 10%로, Celluclast 1.5L을 이용하여 생물전환 시 반응온도 50°C, 반응시간 1 hr, 효소농도 5%로 하여 반응시키고자 함. 이를 통해 ginsenoside 중 생리활성이 높다고 알려진 compound K 등 minor ginsenoside 등 유효성분의 함량을 극대화 할 예정임.

2.3. 생물전환 산양삼의 유효성분 분석

: 4년근 산양삼과 효소생물전환된 4년근 산양삼의 총폴리페놀, 총플라보노이드, 항산화능(DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging) 비교

- 실험 방법
 - 시료의 전처리는 BuOH 추출 후 Rotary evaporator로 농축 후 5 mL MeOH에 녹여 시료로 사용하였음.
 - 총페놀 함량 측정 (Total Phenolics: TP): 총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법 (Singleton, 1999)을 변형하여 측정하였음. 시료 10 μ L와 증류수 100 μ L를 혼합한 후 Folin-Ciocalteu's 용액 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 μ L를 넣고 균질화 하여 6분간 반응시켰음. 그 후 7% Na₂CO₃(Sigma-Aldrich Co) 80 μ L를 넣고 균질화 한 후 실온에서 90분간 반응 시킨 뒤 750 nm에서 96 well microplate reader(iMark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용 하여 흡광도를 3 번 반복 측정하였음. 표준물질은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co)를 사용하여 표준곡

선을 구하고, mg gallic acid equivalent(GAE)/g으로 표기하였음.

- 총플라보노이드 측정 (Total Flavonoids: TF): 총플라보노이드 함량은 건강기능식품공전방법(Korea Food and Drug Administration, 2013)을 변형하여 실험하였음. 희석한 시료 17 μ L와 증류수 96 μ L를 혼합한 후 2.5% NaNO₂(Sigma-Aldrich Co) 10 μ L를 넣어 균질화 하였음. 이후 5% AlCl₃(Sigma-Aldrich Co) 10 μ L를 넣고 1 M Na₂CO₃(Sigma-Aldrich Co) 67 μ L 넣어 균질화 한 후, 510 nm에서 96 well microplate reader(iMark)를 이용하여 흡광도를 3회 반복 측정하였음. 표준물질은 catechin(Sigma-Aldrich Co)을 사용하였으며, mg catechin equivalent(CE)/g로 표기하였음.
 - 항산화능 (ABTS radical scavenging, DPPH free radical scavenging activity):
 - ABTS radical 소거능의 경우 1.0 mM AAPH(2,2 ϕ -azobis-(2-amidinopropane)HCl)와 2.5 mM ABTS2-(2,2 ϕ -azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)를 PBS와 혼합하여 70°C에서 반응 시킨 후 syringe filter (PTFE 0.45 μ m, Tokyo Roshi Kaisha Ltd.,Tokyo, Japan)로 여과한 후 ABTS-시약과 시료를 10분 동안 반응시킴. 반응온도는 37°C이었으며, 흡광도는 96 well microplate reader(iMark)를 이용하여 750 nm에서 3회 반복 측정하였음. 실험방법은 Re 등의 방법(Re et al., 1999)을 변형하여 실험하였고, mg vitamin C equivalent(VCE)/g으로 표기하였음.
 - DPPH radical 소거능은 free radical scavenging activity를 측정하는 방법 (Brand-Williams et al., 1995)을 변형하여 진행하였음. 80% 메탄올을 사용하여 0.1 mM DPPH 용액을 제조하였으며, DPPH 용액과 시료를 섞어 30분간 실온반응하고, 510 nm에서 96 well microplate reader(iMark)를 이용하여 흡광도를 3회 반복 측정하였음. 항산화 활성의 표준물질은 vitamin C(Ascorbic acid, Sigma-Aldrich Co)를 사용하였으며, mg vitamin C equivalent(VCE)/g으로 표기하였음.
 - 통계분석: 통계분석은 시료와 추출용매간의 측정된 흡광도 값의 차이를 알아보기 위해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, Tukey's multiple range test를 통하여 유의성을 검정하였음. SPSS Version 21.0 package program (SPSS INC., Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계분석을 실시하였고, 유의수준은 p<0.05 이었음.
- 효소 생물전환 4년근 산양삼의 총폴리페놀, 총플라보노이드, 항산화능 측정
- 4년근 산양삼 추출 농축액을 기질로 반응온도(50°C)와 반응시간(1 hr)을 고정하고 산양삼 생물전환의 효소 첨가량 조건(2.5%, 5%, 10%)을 달리하여 반응한 효소 생물전환 4년근 산양삼 ginsenoside 추출물의 기능성 분석 결과는 표 9와 같음.

표 9. 4년근 산양삼과 생물전환 산양삼의 총폴리페놀과 총플라보노이드, 항산화능 결과

	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CE/g)	ABTS (mg VCE/g)	DPPH (mg VCE/g)
4y cultivated wild ginseng control	45.29±1.90 ^{def}	6.85±0.49 ^c	37.42±4.34 ^{de}	17.35±1.83 ^d
4y cultivated wild ginseng heating	45.76±0.38 ^{odef}	6.85±0.49 ^c	30.97±5.01 ^e	17.83±0.45 ^d
pectinex ultra pulp 2.5%	50.79±0.49 ^a	5.52±0.32 ^e	45.60±0.28 ^{ab}	19.71±0.47 ^{bcd}
pectinex ultra pulp 5%	48.60±0.76 ^{abcd}	4.29±0.32 ^e	39.68±1.15 ^{bcd}	18.47±0.29 ^d
pectinex ultra pulp 10%	50.84±0.80 ^a	5.42±0.54 ^e	41.68±1.34 ^{abcd}	19.35±0.23 ^{bcd}
pectinex ultra SP-L 2.5%	44.50±0.80 ^{def}	6.39±0.09 ^c	37.82±0.80 ^{cde}	18.56±1.00 ^{cd}
pectinex ultra SP-L 5%	48.15±0.86 ^{abcde}	6.70±0.24 ^c	45.51±2.54 ^{ab}	18.92±0.77 ^{cd}
pectinex ultra SP-L 10%	43.41±1.39 ^f	5.01±0.18 ^d	43.02±2.82 ^{abcd}	18.80±0.45 ^{cd}
ultrazyme AFP 2.5%	49.66±1.05 ^{abc}	7.52±0.54 ^e	44.22±2.72 ^{abcd}	17.92±1.71 ^d
ultrazyme AFP 5%	42.32±0.49 ^f	6.54±0.41 ^e	47.37±2.27 ^a	17.56±0.77 ^d
ultrazyme AFP 10%	42.92±0.41 ^f	5.72±0.24 ^e	42.04±2.20 ^{abcd}	18.89±1.49 ^{cd}
vicozyme L 2.5%	42.74±1.22 ^f	11.57±0.31 ^a	41.57±1.51 ^{abcd}	17.98±0.19 ^d
vicozyme L 5%	43.68±1.64 ^f	10.95±0.81 ^a	43.35±2.77 ^{abcd}	18.53±0.79 ^d
vicozyme L 10%	50.45±3.14 ^{ab}	8.59±1.31 ^b	45.66±2.17 ^{ab}	19.80±0.58 ^{bcd}
celluclast 2.5%	43.93±1.29 ^{ef}	10.49±0.62 ^e	45.00±1.84 ^{abc}	21.77±0.42 ^{ab}
celluclast 5%	50.25±1.94 ^{ab}	11.31±0.81 ^e	47.80±2.04 ^a	22.98±0.14 ^a
celluclast 10%	46.18±2.31 ^{bodef}	8.75±0.58 ^e	38.51±1.20 ^{bcd}	21.20±0.38 ^{abc}

- 4년근 산양삼과 생물전환 산양삼의 총폴리페놀을 측정된 결과, 4년근 산양삼의 총폴리페놀 양은 45.29±1.90 mg GAE/g이었으며, 생물전환 산양삼 중 Pectinex ultra pulp 2.5%(50.79±0.49 mg GAE/g), 10%(50.84±0.80 mg GAE/g)와 Viscozyme L 10%(50.45±3.14 mg GAE/g), Celluclast 1.5 L 5%(50.25±1.94 mg GAE/g)에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였음. 그 중 가장 높은 총폴리페놀함량은 Pectinex ultra pulp 2.5%(50.79±0.49 mg GAE/g), 10%(50.84±0.80 mg GAE/g)이었음.
- 4년근 산양삼과 생물전환 산양삼의 총플라보노이드를 측정된 결과 4년근 산양삼의 총플라보노이드는 6.85±0.49 mg CE/g이었으며, 생물전환 산양삼 중 4년근 산양삼보다 함량이 높았던 시료는 Viscozyme L 2.5%(11.57±0.31 mg CE/g), 5%(10.95±0.81 mg CE/g), 10%(8.59±1.31 mg CE/g)이었음. 그 중 가장 높은 총플라보노이드 함량은 Viscozyme L 2.5%와 5%이었음
- 4년근 산양삼과 생물전환 산양삼의 항산화능(ABTS radical scavenging와 DPPH radical scavenging)을 측정된 결과

 - ABTS radical scavenging의 경우 4년근 산양삼의 항산화능은 37.42±4.34 mg VCE/g이었고, Pectinex ultra pulp 2.5%(45.60±0.28 mg VCE/g), Pectinex ultra SP-L 5%(45.51±2.54 mg VCE/g), Ultrazyme AFP 5%(47.37±2.27 mg VCE/g), Vicozyme L 10%(45.66±2.17 mg VCE/g), Celluclast 2.5%(45.00±1.84 mg VCE/g), 5%(47.80±2.04 mg VCE/g) 처리구에서 유의적으로 증가하였고, 그 중 가장 높은 ABTS radical 소거능을 가진 생물전환 산양삼은 Ultrazyme AFP 5%(47.37±2.27

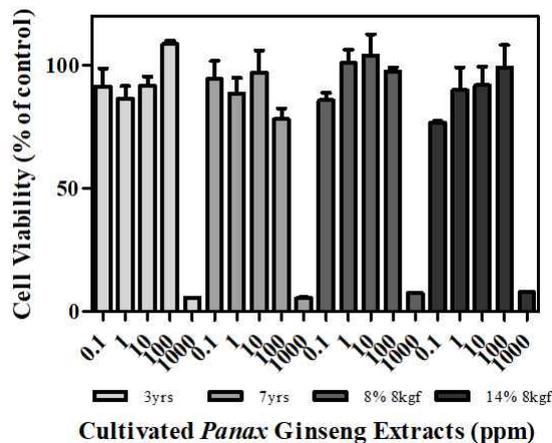
mg VCE/g)와 Celluclast 5%(47.80±2.04 mg VCE/g)처리구 었음.

- DPPH radical scavenging에서 4년근 산양삼의 항산화능은 17.35±1.83 mg VCE/g 이었으며, 생물전환 산양삼 중 Celluclast 2.5%(21.77±0.42 mg VCE/g), 5%(22.98±0.14 mg VCE/g), 10%(21.20±0.38 mg VCE/g) 처리구에서만 유의적으로 증가하였음. 이 중 가장 높은 DPPH radical 소거능을 가진 생물전환 산양삼은 Celluclast 5%(22.98±0.14 mg VCE/g) 처리구 었음.

- 생물전환 산양삼의 기능성을 측정된 결과 Pectinex ultra pulp의 총폴리페놀 함량이 가장 높았고, Vicozyme L의 총플라보노이드 함량이 가장 높았으며, ABTS radical 소거능의 경우 Ultrazyme AFP와 Celluclast 1.5 L에서 DPPH radical 소거능의 경우 Celluclast 1.5 L에서 가장 높게 나타났음.
- 이 실험의 결과와 ginsenoside 함량을 비교하여 볼 때, Celluclast 1.5 L의 높은 항산화능은 Celluclast 1.5 L의 높은 ginsenoside 함량으로 인한 것으로 생각됨.

<3협동연구기관 : 경희대학교>

1. 팽화산양삼 추출물 처리에 따른 세포독성 평가

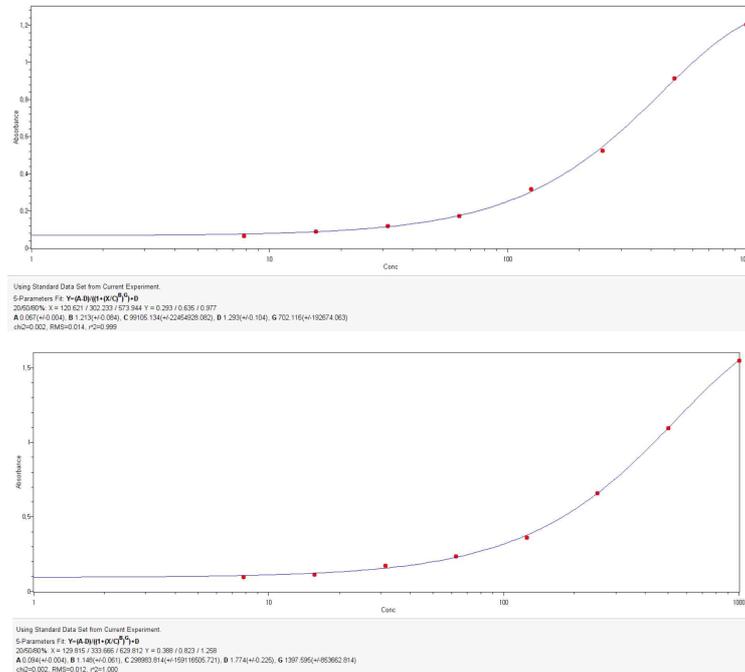


<그림 1. 산양삼의 팽화조건에 따른 추출물의 세포독성>

상대적으로 가격이 저렴한 3년삼 및 그 팽화조건별 (수분 8% 팽화압력 8kgf 또는 수분 14% 팽화압력 8kgf) 추출물을 고가의 7년삼 추출물과 비교하기 위하여, 처리농도별 세포 생존률을 측정하였음.

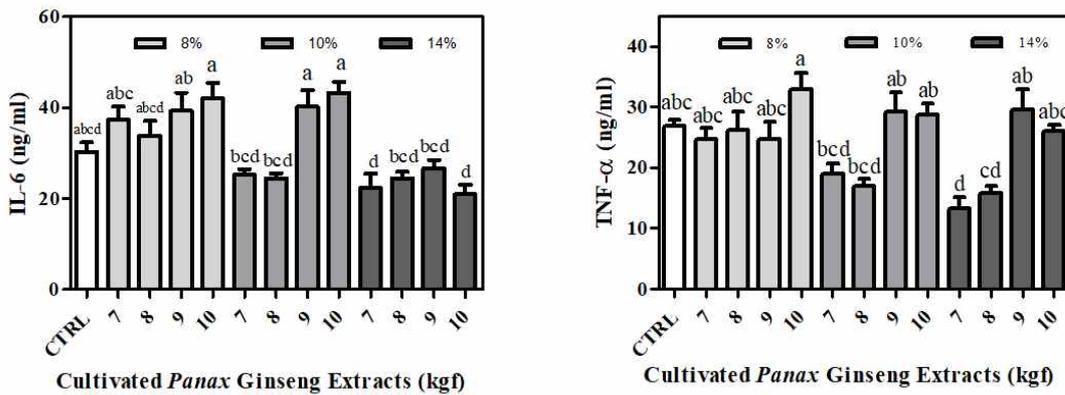
그 결과, 모든 처리군에서 0.1-100 ppm의 농도에서는 세포독성이 관찰되지 않았으나 (세포 생존률 80% 이상), 1,000 ppm의 농도에서 강한 세포독성을 보임으로써 이후의 연구에서는 100ppm 이하의 농도에서 실시하는 것이 적정한 것으로 나타났음.

2. 팽화산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포의 염증성 사이토카인 분비량



<그림 2. IL-6(상) 및 TNF-α(하) 표준품을 이용한 사이토카인 ELISA 검정곡선>

세포배양액 내의 사이토카인 정량을 위하여 IL-6와 TNF-α의 표준품을 이용하여 ELISA 검정곡선을 작성하였으며, 각각 R2>0.99 이상의 상관관계를 보임으로써 정확한 정량에 사용할 수 있음을 확인하였음.



<그림 3. 팽화조건별 산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포의 염증성 사이토카인 분비량>

산양삼과 그 물리적 성질이 유사한 인삼연구의 선행결과를 참고하여, 최적의 팽화조건설정을 설정하기 위하여 팽화시 수분 8, 10, 14% 및 팽화압력 7, 8, 9, 10 kgf의 조건을 조합하여 팽화산양삼을 준비하고 70% 에탄올 추출물을 획득함.

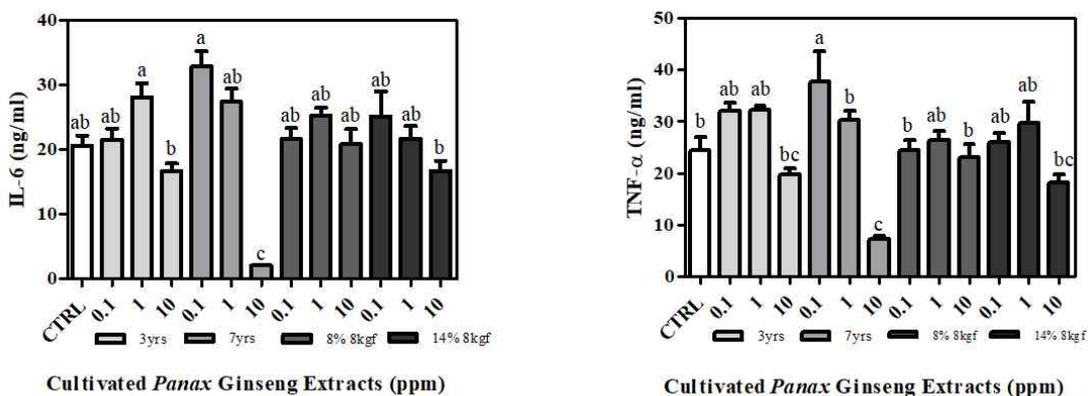
각 추출물을 10 ppm의 동일농도로 대식세포주에 처리하여 24시간 배양 후, 500 ng/mL 농도의 LPS로 세포자극시 배양액중에 분비되는 IL-6 및 TNF-α를 상기 검정곡선을 이

용하여 정량함.

그 결과, 팽화전 산양삼 추출물 대조군(CTRL)과 비교하여 수분농도 8% 팽화조건의 시료군에서는 IL-6 분비량의 유의차를 보이지 않았으나, 10% 수분시 팽화압력 7, 8 kgf 또는 14% 수분조건 전팽화압력 시료군에서 그 생성량이 저하되는 경향을 보였음 (그림 3좌).

또한, TNF- α 분비량의 경우, 역시 8% 수분으로 팽화처리된 시료군에서는 무팽화 대조군과의 유의차가 없었으나, 10 또는 14% 수분으로 팽화시 7, 8 kgf 조건의 팽화 시료군에서 사이토카인의 생성량이 저감하였음을 확인함 (그림 3우).

이상의 결과를 종합할 때, 적절한 팽화조건에 따라 3년근 산양삼을 팽화할 경우 그 유효성분의 추출수율 증가를 통하여 기능적 특성이 향상될 수 있음을 보였음.



<그림 4. 팽화산양삼 추출물 농도별 처리에 따른 사이토카인 분비량>

산양삼의 팽화에 따른 그 추출물의 항염증 기능 가능성을 확인 한 후, 그 농도별 처리에 따른 항염증능을 확인하기 위하여 팽화전 3, 7년근 추출물 또는 팽화후 3년근 추출물을 세포독성이 없는 0.1-10ppm의 농도범위로 처리하여 LPS로 자극된 대식세포의 사이토카인 분비량을 측정하였음.

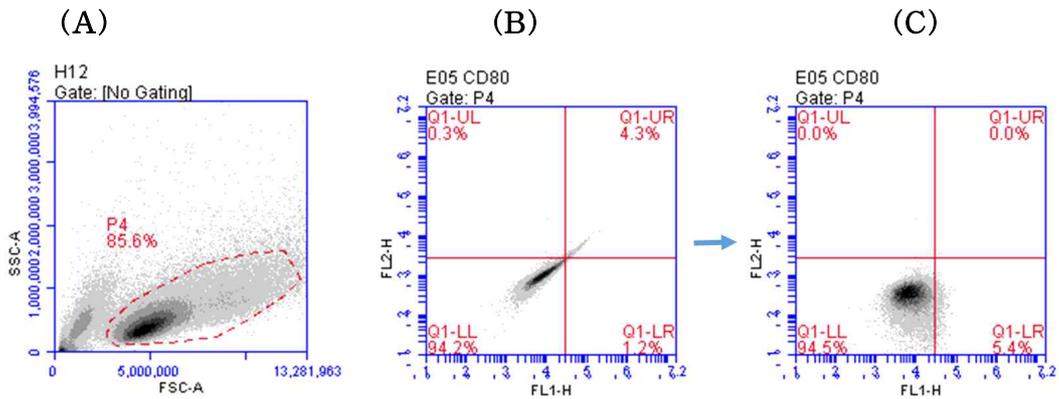
그 결과, 추출물 미처리구(LPS만 처리, CTRL)와 비교하여 3년근 미팽화 추출물은 농도의존적으로 IL-6의 분비량이 감소하는 경향을 보였으나, 통계적 유의차는 없었음 (그림4 좌).

그러나 고가의 7년근 추출물을 처리시 농도의존적 감소를 보였을 뿐 아니라, 10 ppm의 농도에서는 대조군 대비 80% 이상의 억제력을 보임으로써 강한 항염증능을 가지고 있음을 확인하였음.

나아가, ginsenoside 함량이 높은 팽화조건인 수분 8%-팽화압력 8 kgf 또는 수분 14%-팽화압력 8 kgf 의 팽화산양삼 추출물 처리시 전농도 구간에서 미팽화 3년근과 유사한 패턴을 보이며 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였음.

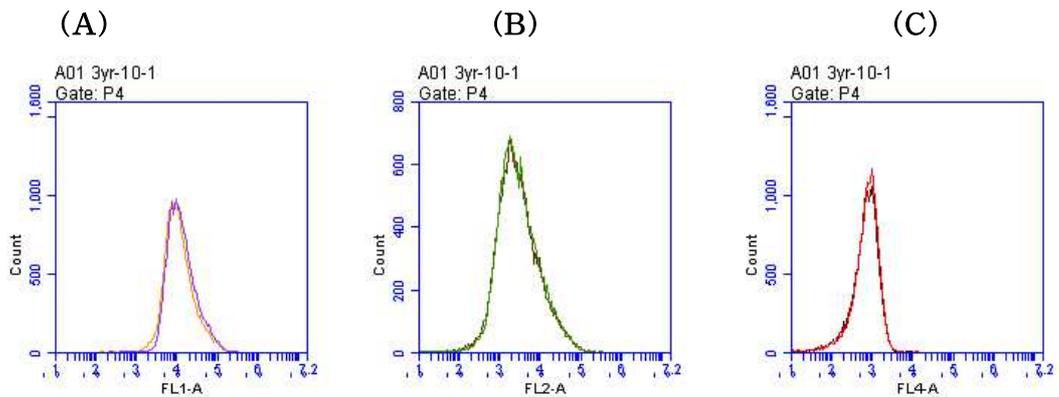
TNF- α 분비량의 경우도 미팽화 산양삼 7년근 추출물이 3년근 추출물에 비하여 고농도 (10 ppm)에서 탁월한 항염증능을 보였으나, 팽화조건별 및 처리농도별 3년근 팽화산양삼 추출물 처리군은 뚜렷한 유의차를 보이지 않았음 (그림4우).

3. 팽화산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포 활성화마커 발현량



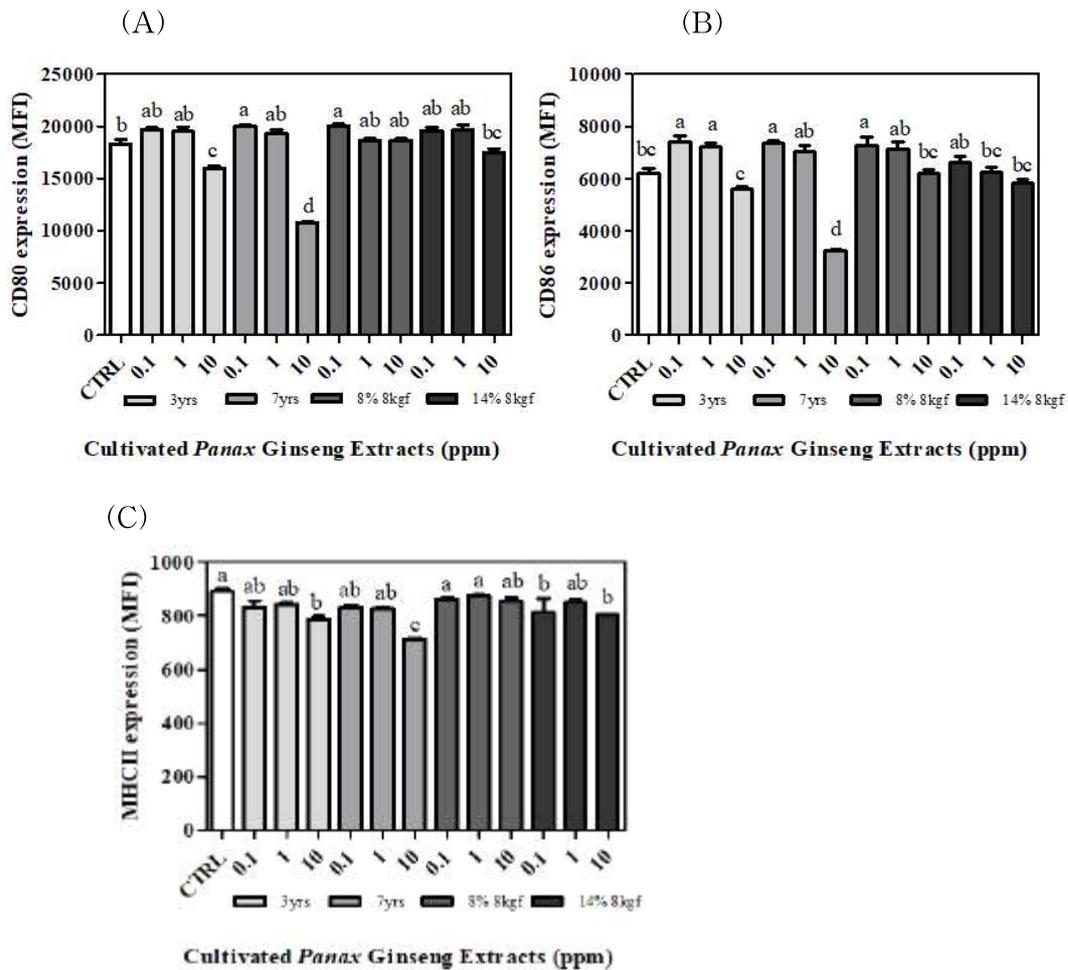
<그림 5. 대식세포 활성화마커 발현량 측정을 위한 flow cytometry>

대식세포는 그 크기와 과립성의 특징으로 인하여 FSC vs SSC plot을 통하여 gating 하였으며(그림 5A), CD80와 CD86는 각각 FITC 또는 PE의 형광물질을 사용하므로 FL-1 과 FL-2에서cross-bleeding을 보였음 (그림 5B). 따라서, 그 정확한 발현량을 측정하기 위하여 compensation을 시행하여 보정하였음 (그림 5C).



<그림 6. CD80 (A), CD86 (B) 및 MHC II (C)의 발현량을 측정한 histogram 예시>

대식세포의 활성화에 따른 표면 단백질인 CD80 (그림 6A), CD86 (그림 6B), MHC II (그림 6C) 발현량을 histogram으로 작성하여 그 형광의 세기를 CFlow 프로그램을 이용하여 mean fluorescence intensity (MFI)로 표기하였음.



<그림 7. 산양삼 팽화조건별 추출물의 처리에 따른 CD80 (A), CD86 (B) 및 MHC II (C)의 발현량>

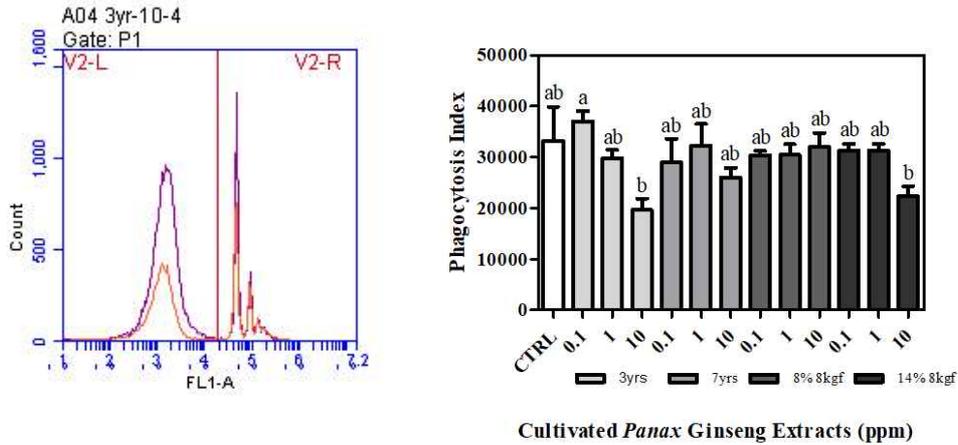
팽화조건별 산양삼 추출물의 처리 후 대식세포 표면의 CD80의 발현량을 측정된 결과, 모든 처리군에서 발현량이 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였으나, 3년삼 팽화전후의 추출물 처리군은 유사한 경향을 보임 (그림 7A).

CD80의 발현량도 7년근 산양삼 추출물 처리시 가장 강한 감소를 보였으며, 3년근 미팽화 추출물 처리시에 농도의존적 감소경향을 보였음. 그러나, 수분농도 14%-팽화압력 8kgf 조건의 팽화산양삼 추출물 처리군에서 낮은 농도 (1 ppm)에서도 미팽화 추출물 처리군과 비교하여 유의적인 감소를 보임으로써, 산양삼의 팽화에 따른 대식세포 활성조절의 가능성을 보였음 (그림 7B).

또한, T세포에 항원을 제시하여 후천성 면역기능과의 기작적 연결고리 기능을 하는 MHC II의 발현량의 경우 7년근 고농도에서 약간의 유의적인 감소를 보였으나, 다른 처

리군에서는 유의차가 없는 것으로 보아 (그림 7C), 팽화전후 산양삼 추출물은 선천성 면역기능을 통한 염증은 제어하지만 후천성 면역기능에는 저하효과가 없는 것으로 예상된다.

4. 팽화산양삼 추출물 처리에 따른 대식세포 탐식능



<그림 8. 형광 Bead를 이용한 대식능 측정법 예시(좌) 및 그 형광도 측정을 통한 대식능의 계량적 측정 결과 (우)>

대식세포는 그 이름에서도 알 수 있듯이 외부물질 또는 체내 불필요 물질을 탐식 (phagocytosis)하여 제거하는 1차적 기능을 가지고 있음.

형광 beads를 대식세포와 공배양 처리시, 대식세포중 일부는 bead를 외부물질로 인식하여 대식작용을 진행하며 (그림 8좌, FL1high), 그 형광의 세기(MFI)를 측정하여 대식능을 계량적으로 측정하였음.

그 결과, 추출물 미처리군(CTRL)과 비교하여 비팽화 3년근 산양삼 추출물은 농도의존적 감소효과를 보였으며, 7년근 추출물은 유의차를 보이지 않았음 (그림 8우).

수분 8%-팽화압력 8kgf 또는 수분 14%-팽화압력 8kgf 조건에서 팽화한 3년근 산양삼의 추출물의 경우에도 처리농도별 유의차는 보이지 않았으며, 7년근 비팽화 추출물 시료와 유사한 경향을 보였음.

대식작용은 미생물 또는 바이러스에 의하여 감염된 비정상세포의 자가제거와 관계된 작용으로서 산양삼의 팽화 추출물이 대식기능에 영향을 미치지 않음을 보임으로써, 염증성 반응은 제어하되 기본적 방어체계인 대식기작은 저하되지 않았음으로 확인하였음.

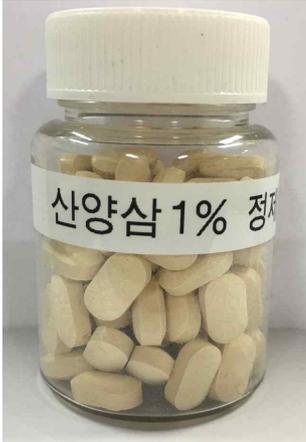
3. 3차년도

<제1세부 : (주)네추럴웨이>

○ 고기능성 산양삼 가공소재 기반 제품 생산

1. 시제품 제작

- 과립, 정제 시제품 제작

형태	사진
과립	
정제	

○ 판매전략 계획 수립, 제품 홍보, 포장 및 디자인 개발 및 적용

1. 제품개발 및 제작

		제조 지시 및 기록서		NW-2100-642 [Rev.00]
제 품 명	제 조 번 호	제 조 단 위	제 조 년 월 일	유통 기 한 [제조일로부터24개월]
로얄 산양삼차 우리두	864201	743.25 Kg (92.906kg*8batch)	2018.12.19	2020.12.18
<p>상기 제품은 ㈜네추럴웨이 GMP 규정에 의하여 엄격한 제조관리와 품질관리로 생산된 제품임을 확인함.</p>				
생산시작확인	생산부서 담당자	서지민	확인 일자	18.12.19
생산완료확인	생산부서 책임자	김민준	확인 일자	2018.12.19
출하확인	품질부서 책임자	임부익	확인 일자	2018.12.20
기록서 보존 기 한 : 2021 년 월 일				

㈜네추럴웨이

[Rev.00]

로얄산양삼차 제품 제조지시 및 기록서



로얄산양삼차 제품 사진

2. 판매전략 계획 수립 및 제품 홍보

*사업화 전략을 위한 MKT 일정 process

- ① 시장 분석 및 기회도출
- ② 혁신 아이디어 및 컨셉 도출
- ③ 브랜드 개발
- ④ STP 전략
- ⑤ 상품화
- ⑥ 런칭

*Sales & public Relations 전략

① 인터넷 쇼핑몰 구축

- 네추럴웨이 홈페이지 카테고리 및 구성 요소 변경
- 컨셉에 맞는 쇼핑몰 디자인 및 Tone&Manner 변경
- 별도의 온라인 홈페이지 구축 및 현재 홈페이지에 카테고리 개설
- 온라인 상의 이벤트를 위한 마이크로 사이트 제작

② TV 홈쇼핑 광고

- 벤더사와의 전략적 제휴를 통한 홈쇼핑 채널을 탐색
- 제품을 효과적으로 알리기 위한 최적의 컨셉을 설정
- 제품을 효과적으로 전달할 수 있는 출연진 섭외
- 홈쇼핑 채널을 통한 런칭 및 광고

③ 소셜미디어 및 검색엔진 최적화

- 파워블로거 및 온라인 상의 영향력 있는 유저 섭외
- 제품에 대한 특성이나 소개글들을 블로그에 포스팅하여 포털사이트에 노출
- 제품과 연관되는 연관검색어를 별도로 설정하여 이슈화
- 제품에 대한 블로그 및 페이스북 운영하여 소통의 극대화

④ 오프라인 프로모션

- 내부인력과 외주업체가 아이디어 협의하여 프로모션 방향 설정
- 도출된 아이디어를 통한 구체적인 세트 제작 및 프로모션 진행

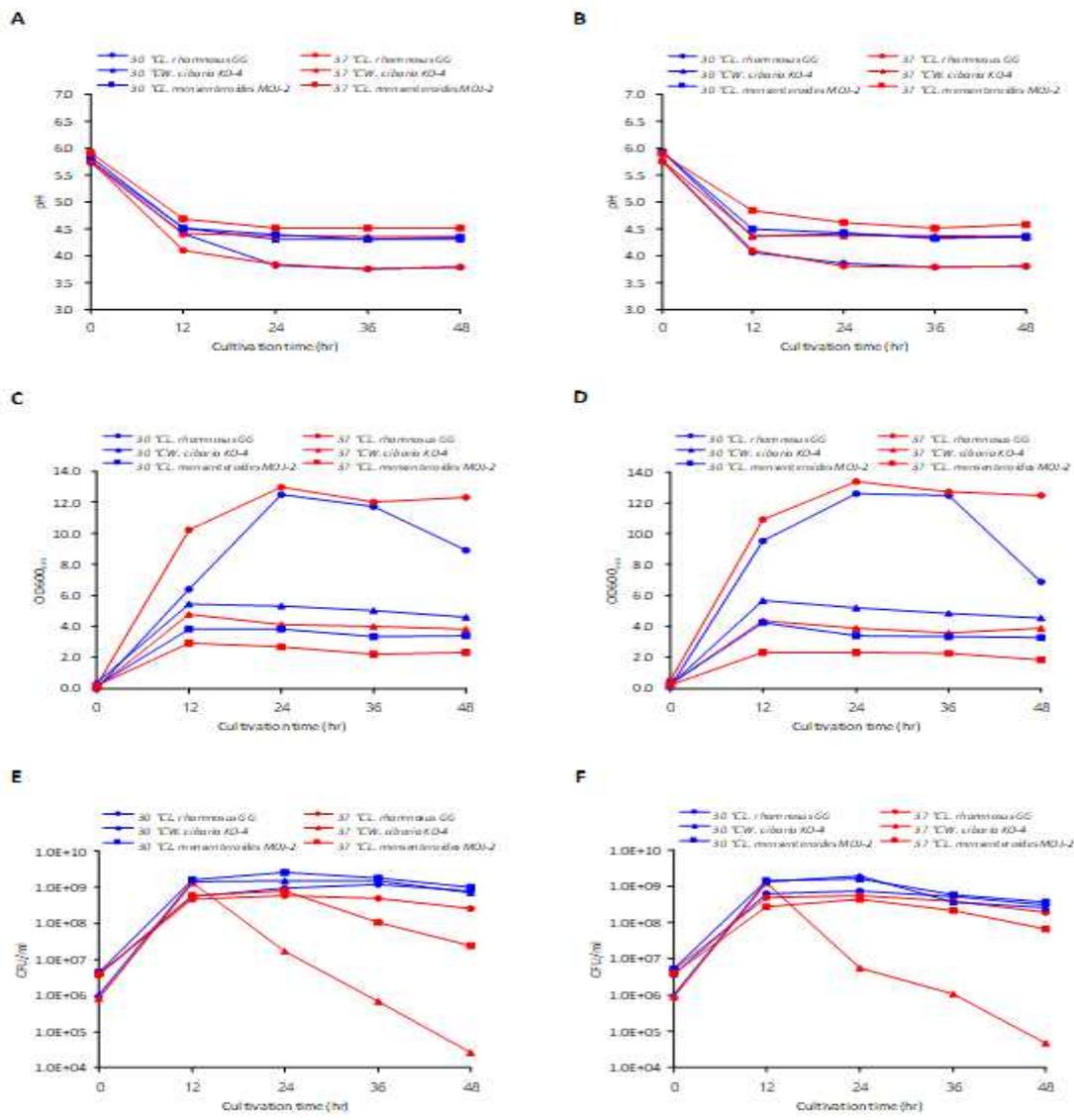
<위탁연구기관 : 서울대학교>

○ 산양삼 소재 발효 유산균주의 최적배양조건 선정

-80 °C에 보관 중인 컨트롤균주(*Lactobacillus rhamnosus* GG)와 선발균주 *W. cibaria* KO-4, *L. mensenteroides* MOJ-2를 총 2 회 계대배양 하여 사용하였음. 150 ml MRS broth에 0.05 % L-cysteine을 첨가한 배지(MRSC 배지)를 이용하여 균주들의 최적배양조건을 확인하기 위하여 30 - 37 °C, 0 - 70 RPM의 조건으로 48시간 동안 배양하였음. 배양 0, 12, 24, 36, 48시간의 pH, OD600nm 값, 생균수 측정을 통하여 균주들의 성장 정도를 확인하였음. 실험결과, LGG, *W. cibaria* KO-4, *L. mensenteroides* MOJ-2의 교반 속도에 의한 균주들의 배양 차이는 확인되지 않은 반면, 온도에 의한 배양 차이는 확인되었음 (그림 18). 48시간 배양 후, LGG는 30 °C와 0 rpm, 30 °C와 70 rpm, 37 °C와 0 rpm, 37 °C와 70 rpm의 배양액에서 pH가 3.8, 3.8, 3.8, 3.8까지 감소한 것에 반해, *W. cibaria* KO-4, *L. mensenteroides* MOJ-2는 동일한 조건에서 각각 4.3, 4.3, 4.4, 4.4로, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6으로 LGG에 비해 pH 감소 폭이 적었음. 이와 유사하게, 교반속도 차이는 배양되는 동안 측정된 균주들의 OD_{600nm} 값, 생균수에서도 유의한 변화를 보이지 않았음. LGG는 교반속도 보다는 온도 변화에 따른 LGG의 배양 차이를 확인할 수 있었음. 특히, LGG의 optical density 측정 결과를 살펴보면 30 °C에서는 36 h에서 48h 으로 구간에서 감소하였으나 37 °C에서는 증가하는 모습을 보였음. *W. cibaria* KO-4는 70 rpm에서, *L. mensenteroides* MOJ-2는 0 rpm에서 각각 0, 70 RPM에서 배양하였을 때보다 증가된 생균수를 확인할 수 있었음. 교반속도 결과와 달리 균주들은 배양온도 30, 37 °C의 차이에 따라 서로 다른 배양 정도를 보였음. 48시간 배양 pH 결과를 살펴보면, LGG의 경우 37 °C에서 pH 3.8, *W. cibaria* KO-4, *L. mensenteroides* MOJ-2의 경우 30 °C에서 pH 4.4로 각각 30, 37 °C에서 배양하였을 때보다 낮은 pH 기록하였음. 이는 배양되는 동안 측정된 균주들의 OD_{600nm} 값에서도 유사하였음. 생균수 변화에서도 전반적으로 배양온도 30, 37 °C 차이에 의한 유의미한 변화는 확인되지 않았으나, *L. mensenteroides* MOJ-2는 30 °C 에서 시간대 별로 5.4E+06, 1.4E+09, 1.6E+09, 6.0E+08, 3.7E+08로, LGG는 37 °C 에서 4.9E+06, 4.9E+08, 5.4E+08, 4.0E+08, 1.9E+08로 비교적 높은 생균수를 확인할 수 있었음. 본 실험을 통해, LGG의 경우 37 °C에서, *W. cibaria* KO-4와 *L. mensenteroides* MOJ-2의 경우, 30 °C에서 배양 정도가 좋은 것으로 확인되었음. 차후 실험들 위해서 LGG의 경우 37 °C, 70 RPM을, *W. cibaria* KO-4와 *L. mensenteroides* MOJ-2의 경우 30 °C, 70 RPM을 최적배양조건으로 선정하였음.

그림 18. MRSC 배지를 이용하여 다양한 교반속도, 온도에서 LGG와 선발된 유산균주들 (*W. cibaria* KO-4, *L. mensenteroides* MOJ-2) 배양 시 pH, OD_{600nm} 값, 생균수 변화. 48 시간 동안 교반속도 0 (A, C, E) - 70 (B, D, F) rpm, 온도 30 (푸른색) - 37 (붉은색) °C에서 배양한 LGG(●, ●), *W. cibaria* KO-4(▲, ▲), *L. mensenteroides* MOJ-2(■, ■).

○ 선정된 최적배양조건에서 배양된 유산균주들의 산양삼 추출액 내 성장성 평가



- 5 brix로 희석한 4 년근 산양삼 추출액에 0.05 % L-cysteine을 첨가한 후, pH 6.5로 조정하였음. 총 2 회 계대배양된 LGG, *W. cibaria* KO-4, *L. mesenteroides* MOJ-2 전 배양액을 10⁶ CFU/ml 수준으로 집중한 후, LGG 집중 배양액을 37 °C에서, *W. cibaria* KO-4와 *L. mesenteroides* MOJ-2 집중 배양액을 30 °C에서 70 rpm으로 교반함으로써 배양하였음. 유산균주들의 발효 정도를 확인하기 위해 배양액의 pH, 생균수 변화를 배양시작 후 0, 12, 24, 36, 48 시간별로 측정하였음. 실험결과, LGG의 경우 37 °C에서 48 시간 동안 발효하였을 경우 생균수, pH 값이 2.2 x 10⁷CFU/ml, 3.7로 선발된 두 균주와는 다르게 12 시간 이후 일정하게 1.0 x 10⁷ CFU/ml를 유지하였음 (그림 19). 선발균주인 *W. cibaria* KO-4의 경우, 30 °C에서 12 시간 발효하는 동안 생균수가 각각 5.0 x 10⁸, 2.9 x 10⁸ CFU/ml로 증가하였으나, 이후 감소하여 48 시간 발효하였을 때 생균수는 7.8 x 10⁷, 9.5x10⁷CFU/ml로 확인되었음. 또한, *W. cibaria* KO-4을 48 시간 동안 발효 시 pH 값이 4.3으로 감소하였으며, LGG, *L. mesenteroides* MOJ-2 보다 소폭 높은 pH를 나타냈음. 마지막으로 *L. mesenteroides* MOJ-2의 경우, 12 시간 발

효하였을 때 생균수가 7.8×10^8 CFU/ml로 가장 높게 측정되었으나, 이후 급격히 감소하였음.

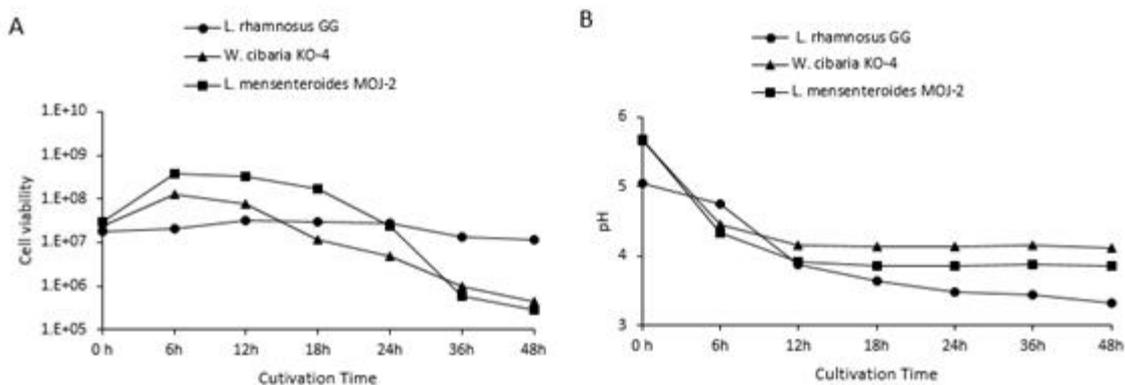


그림 19. 5 brix 산양삼 추출액에서 LGG와 선발된 유산균주들 (*W. cibaria* KO-4, *L. mesenteroides* MOJ-2)의 (A) 생균수, (B) pH 변화. LGG(●), *W. cibaria* KO-4(▲), *L. mesenteroides* MOJ-2(■).

○ 선발된 유산균주의 진세노사이드 생물전환능 평가

- 앞서 5 brix로 희석한 4 년근 산양삼 추출액에 LGG, *W. cibaria* KO-4, *L. mesenteroides* MOJ-2를 각각 접종하여 24, 48 시간 배양한 발효액들의 진세노사이드 생물전환 여부를 확인하고자 발효액 내 진세노사이드 함량을 분석하였음. 진세노사이드의 HPLC 분석을 진행하기에 앞서, 발효 산양삼 추출액 내 진세노사이드를 추출 및 농축하였음. 멸균수 그리고 ethyl ether를 pyriform separatory funnel 내에서 혼합하여 2 시간 동안 층분리를 유도하였음. Ethyl ether층은 제거하고 분리된 멸균수층을 pyriform separatory funnel에서 물 포화 부탄올과 혼합하여 30 분 동안 층분리를 유도한 후, 멸균수층은 제거하고 남은 부탄올층은 수집함. 위의 과정을 3 회 반복한 후, 45 °C, 145 rpm, cooling temperature 4 °C 조건으로 rotary evaporator를 이용하여 농축시켰음. 농축한 진세노사이드 추출액들은 초음파 분쇄한 후, HPLC용 메탄올에 의해 5 mL로 적량하여 -20 °C 보관하였음. 이후 진세노사이드 추출·농축액들을 상온에서 녹인 후, 0.45 µm filter로 여과하여 진세노사이드 standard와 함께 HPLC 분석하였음.
- 진세노사이드의 HPLC 분석 조건은 다음과 같음: injection volume: 10 µm, input: 45 °C, post-run: 5 min, 용매 A: distilled water, 용매 B: acetonitrile, 파장 ±203 nm, flow: 0.6 mm/1min.
- LGG, *W. cibaria* KO-4, *L. mesenteroides* MOJ-2를 이용하여 발효한 5 brix 산양삼 추출물의 진세노사이드 함량 변화를 살펴보면 표 7과 같음. 유산균주에 의한 산양삼 추출물 발효가 진행됨에 따라 확인된 진세노사이드 함량 변화는 크지 않았음. Rg1, Re, Rb1의 경우 유산균주 발효를 진행함에 따라 발효 전에 비해 감소한 반면 Rf의 경

우 발효가 진행됨에 증가하였음. 이는 유산균주가 성장하기 위해서 필요한 당 성분 및 함량이 5 brix으로 희석된 산양삼 추출물에는 부족하였기에 진세노사이드의 생물전환을 위한 유산균주의 생장이 충분이 이루어지지 못하였을 것으로 사료됨. 이에 산양삼 추출물에 당 성분을 첨가함으로써 유산균주의 성장을 높여준다면 유산균주에 의한 산양삼 추출물 내 진세노사이드 생물전환 효과가 증가할 것으로 예상됨.

표 7. 5 brix 산양삼 추출액에서 배양 시 LGG, *W. cibaria* KO-4와 *L. mesenteroides* MOJ-2의 진세노사이드 함량 변화

발효여부 접종균주	발효 전			발효 후			
	접종 전	LGG		KO-4		MOJ-2	
진세노사이드농도 (mg/g driedginseng)/ 발효시간	0h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Rg1	5.11	4.24	3.86	4.61	4.25	3.74	4.50
Re	5.06	4.46	4.04	4.78	4.44	3.96	4.62
Rf	1.56	1.70	1.67	1.80	1.99	1.70	1.67
Rg2	0.99	0.95	1.13	0.96	0.81	0.95	0.91
Rb1	14.11	12.27	11.95	13.18	12.41	12.95	12.98
Rc	9.30	8.11	7.88	8.69	8.18	8.48	8.55
Rb2	5.90	5.21	5.17	5.60	5.19	5.38	5.44
Rd	2.98	2.60	2.51	2.77	2.61	2.74	2.73
F2	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04
Rg3	0.00	0.01	0.10	0.03	0.00	0.00	0.01
Compound K	0.03	0.06	0.14	0.03	0.04	0.03	0.05
Rh2	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02

<1협동연구기관 : 경희대학교>

1. 추출 수율 및 조사포닌

추출 수율 및 조사포닌은 그림16에 나타냈다. 산 처리 시료의 경우 시료내 염의 잔존 현상 때문에 정확한 측정이 불가능하여 산 처리하지 않은 시료의 결과만을 나타내었다. 팽화 및 초고압 처리를 진행 하였을 때 추출 수율은 감소하는 결과를 나타내었다. 초고압처리 시료는 18.99 %의 감소율을 나타냈다. 팽화처리 시료는 11.19 %의 감소율을 나타냈다. 팽화처리를 통한 추출 수율의 감소는 시료의 탄화에 영향을 받았다고 생각된다. 산양삼은 일반적인 인삼에 얇고 긴 동체를 가지며 많은 잔뿌리를 가지는 특징이 있다. 이러한 형태학적 특징 때문에 팽화 과정에서 잔뿌리들이 탄화되어 전체시료 중 탄화시료의 함량이 늘어나 추출수율이 감소했다고 생각된다. 팽화-초고압 처리 시료의 경우 28.88 %의 감소율을 나타내었다. 이러한 결과는 팽화 및 초고압 처리를 단독적으로 시행하였을 때의 변화율의 합과 유의적 차이가 없으며 이를 통해 유의미

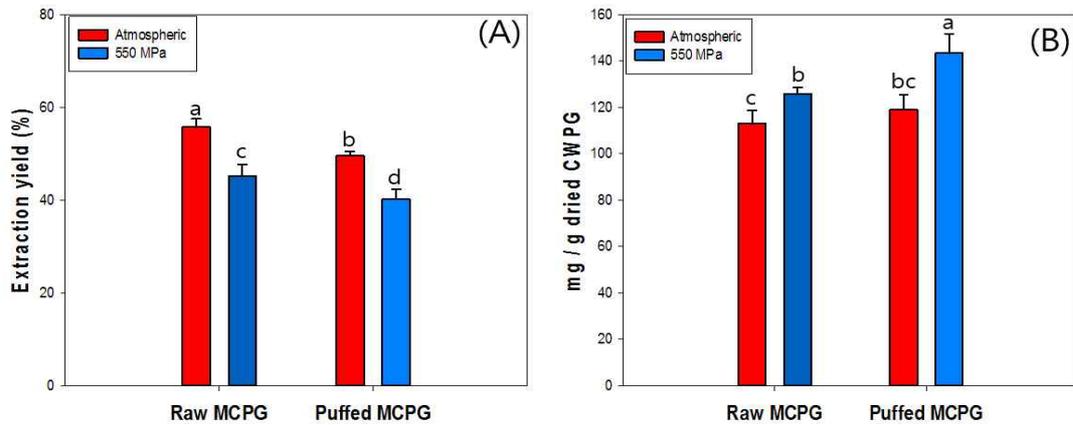


그림 16 초고압, 팽화 산양삼의 추출수율 (A) 및 조사포닌 (B)

Significant differences between values are indicated by different letters ($P < 0.05$).

한 상승작용이 없음을 알 수 있다.

조사포닌의 경우 단독처리 및 병행처리 모두 증가하는 결과를 나타내었다. 팽화처리 시료는 5.29 %의 증가율을 나타냈다. 이는 팽화 처리로 인해 인삼의 세포벽 파괴 및 다공성 구조의 형성으로 내부에 있던 성분들의 용출이 용이해졌기 때문으로 보여진다. 초고압 처리시료는 11.31 %의 증가율을 나타냈다. 이는 초고압 처리시 세포구조의 파괴를 통한 물질 전달속도의 증가에 의한 결과라 보여진다. 팽화-초고압 처리 시료의 경우 26.78 %의 증가율을 나타내었다. 이는 팽화 및 초고압 처리를 단독적으로 시행 하였을때의 변화율의 합에 비해 유의적으로 높은 값이며 이를 통해 조사포닌 함량에 팽화-초고압 처리가 유의미한 상승작용을 확인할 수 있었다.

2. Ginsenoside profile

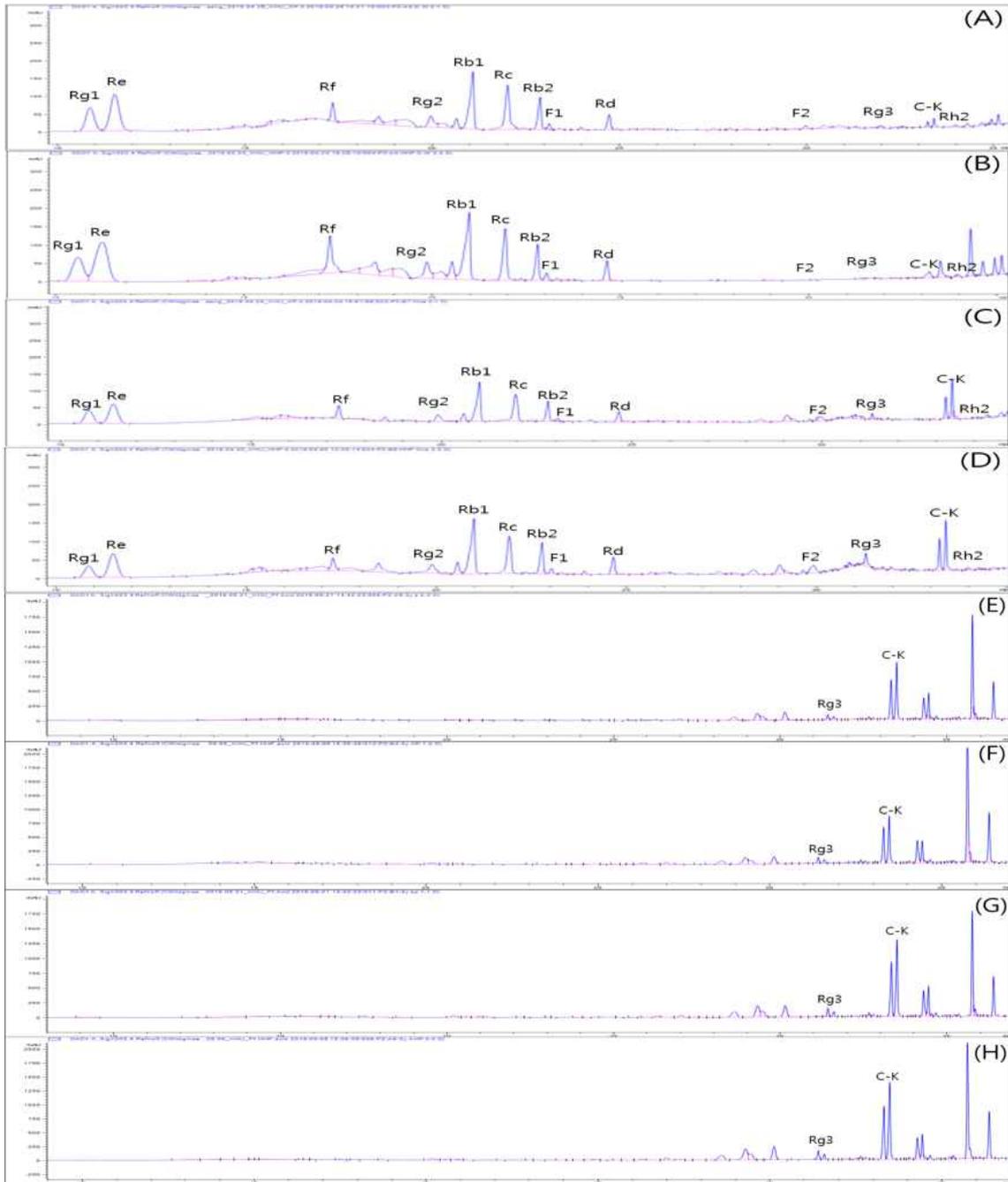


그림 17 산, 초고압, 팽화 산양삼의 HPLC chromatograms (A): Raw MCPG (B) : HHP MCPG (C) : Oxalic MCPG (D) : HHP-oxalic MCPG (E) : Puffed MCPG (F) : Puffed-HHP MCPG (G) : Puffed-oxalic MCPG (H) : Puffed-HHP-oxalic MCPG.

표 11 Ginsenoside profile of MCG with acid, HHP and puffing treatments.

	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	F1	Rd	F2	Rg3
Control	2.31±0.29 ^b	5.31±0.89 ^b	2.43±0.19 ^a	0.97±0.07 ^b	5.29±0.35 ^{ab}	3±0.79 ^a	3.28±0.13 ^a	0.17±0.01 ^d	0.78±0.01 ^{ab}	0.04±0.01 ^d	0.13±0.01 ^d
HHP	3.75±0.06 ^a	6.21±0.26 ^a	2.13±0.40 ^{ab}	1.11±0.25 ^{ab}	5.52±0.45 ^a	3.45±0.28 ^a	3.25±0.10 ^a	0.30±0.03 ^c	0.70±0.08 ^c	0.06±0.02 ^{bcd}	0.20±0.01 ^d
Oxalic	1.49±0.12 ^d	3.23±0.35 ^c	1.63±0.12 ^c	0.66±0.03 ^c	4.77±0.70 ^{bc}	2.25±0.31 ^b	2.31±0.50 ^b	0.52±0.04 ^a	0.57±0.02 ^b	0.27±0.00 ^a	0.33±0.01 ^d
HHP-Oxalic	1.87±0.10 ^c	3.52±0.28 ^c	1.93±0.17 ^{bc}	1.22±0.12 ^a	4.52±0.34 ^c	3.21±0.35 ^a	1.90±0.10 ^c	0.38±0.02 ^b	0.85±0.12 ^a	0.06±0.01 ^{bcd}	0.36±0.01 ^d
puffed	0.00±0.00 ^e	0.05±0.00 ^d	0.29±0.01 ^d	0.58±0.03 ^c	0.10±0.02 ^d	0.05±0.00 ^c	0.09±0.00 ^d	0.01±0.01 ^e	0.04±0.01 ^f	0.05±0.00 ^{cd}	0.70±0.01 ^d
puffed-HHP	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d	0.3±0.02 ^d	0.63±0.05 ^c	0.05±0.00 ^d	0.05±0.00 ^c	0.11±0.02 ^d	0.00±0.00 ^e	0.12±0.02 ^{ef}	0.04±0.00 ^d	0.81±0.01 ^d
puffed-oxalic	0.00±0.00 ^e	0.09±0.00 ^d	0.37±0.02 ^d	0.93±0.03 ^b	0.17±0.01 ^d	0.11±0.00 ^c	0.14±0.01 ^d	0.00±0.00 ^e	0.13±0.02 ^{ef}	0.07±0.00 ^b	1.31±0.01 ^d
puffed-HHP-oxalic	0.00±0.00 ^e	0.06±0.01 ^d	0.36±0.00 ^d	0.95±0.01 ^b	0.10±0.02 ^d	0.09±0.01 ^c	0.11±0.00 ^d	0.02±0.00 ^e	0.25±0.01 ^d	0.06±0.00 ^{bc}	1.36±0.01 ^d

Values within a column followed by different letters are significantly different by Duncan's multiple test ($P < 0.05$)

3가지 가공 처리에 대한 ginsenoside chromatogram을 그림17에 나타냈다. Control에서는 Rg1, Rb1, Rb2 등의 major ginsenoside peak가 높게 나타났으며 Rg3, compound k (C-K)와 같은 minor ginsenoside가 미량 나타났다. HHP 처리 산양삼의 경우 전체적인 profile은 control과 유사하게 나타났다. 산처리 산양삼의 경우 major ginsenoside peak가 줄어들었으며, Rg3와 C-K peak가 증가하였다. 초고압-산 병행처리 산양삼 또한 산처리 산양삼과 비슷한 ginsenoside profile을 나타냈다. 이를 통해 상온 상압에서의 ginsenoside 전환은 산성 조건에 영향을 받는다는 것을 확인할 수 있었다. 팽화 처리 산양삼의 경우 major ginsenoside peak 대부분이 나타나지 않았으며 Rg3, C-K peak가 확연히 증가하였다. 팽화 산양삼에 초고압 및 산 처리를 병행한 경우 역시 팽화 산양삼의 profile과 유사한 형태를 나타냈다.

Ginsenoside 함량을 표1에 나타냈다. 초고압 처리 산양삼은 비 처리 산양삼에 비해 전체적으로 높은 ginsenoside 함량을 나타냈다. 이러한 결과는 초고압 처리를 통한 세포벽의 파괴 및 물질 전달 속도의 증가에 의한 결과로 보여진다. 산 처리 산양삼의 경우 ginsenoside Rg1, Re, Rf, Rg2, Rb1, Rc, Rb2의 함량이 감소한 반면 Rg3, C-K의 함량이 증가하였다. 산-초고압 처리 산양삼 역시 비슷한 경향성을 나타내었으며 두 처리방식간의 유의미한 상승작용은 나타나지 않았다. 팽화 처리 산양삼은 대부분의 major ginsenosides가 발견되지 않은 반면 Rg3, C-K의 함량이 크게 증가하였다. 팽화

-초고압 처리 산양삼 역시 팽화 처리 산양삼과 비슷한 경향을 나타냈다. 팽화-산 처리 산양삼은 팽화 처리 산양삼에 비해 많은 Rg3, C-K 함량을 나타냈다. 이러한 Rg3와 C-K의 함량증가는 ginsenoside 전환 과정에서 생기는 중간산물의 영향으로 생각된다. Major ginsenosides는 여러 단계를 거쳐 Rg3및 C-K의 형태를 가지게 된다(Quan, Jin, Wang, Min, Kim, & Yang, 2012). 때문에 처리 후 다양한 중간산물들을 가질 수 있는데 팽화 처리 후 생긴 다양한 중간산물들이 산 처리에 의해 Rg3와 C-K로 전환되어 높은 함량을 나타낸 것으로 보여진다. 팽화-산-초고압 처리 산양삼의 경우 팽화-산 처리 산양삼과 유의미한 차이를 보이지 않았다. 팽화 처리의 경우 압력조건이 높아짐에 따라 ginsenoside 전환율이 증가하는 것으로 알려져 있다. 하지만 일정 압력이상에서 탄화와 같은 부작용이 발생하기 때문에 조건 설정이 제한적이다. 팽화-산 병행처리를 통해 탄화가 일어나지 않는 조건에서 더욱 높은 전환율을 유도 함으로써 효율적인 산양삼 가공방식으로 적용 가능할 것으로 생각된다.

2. 항산화능

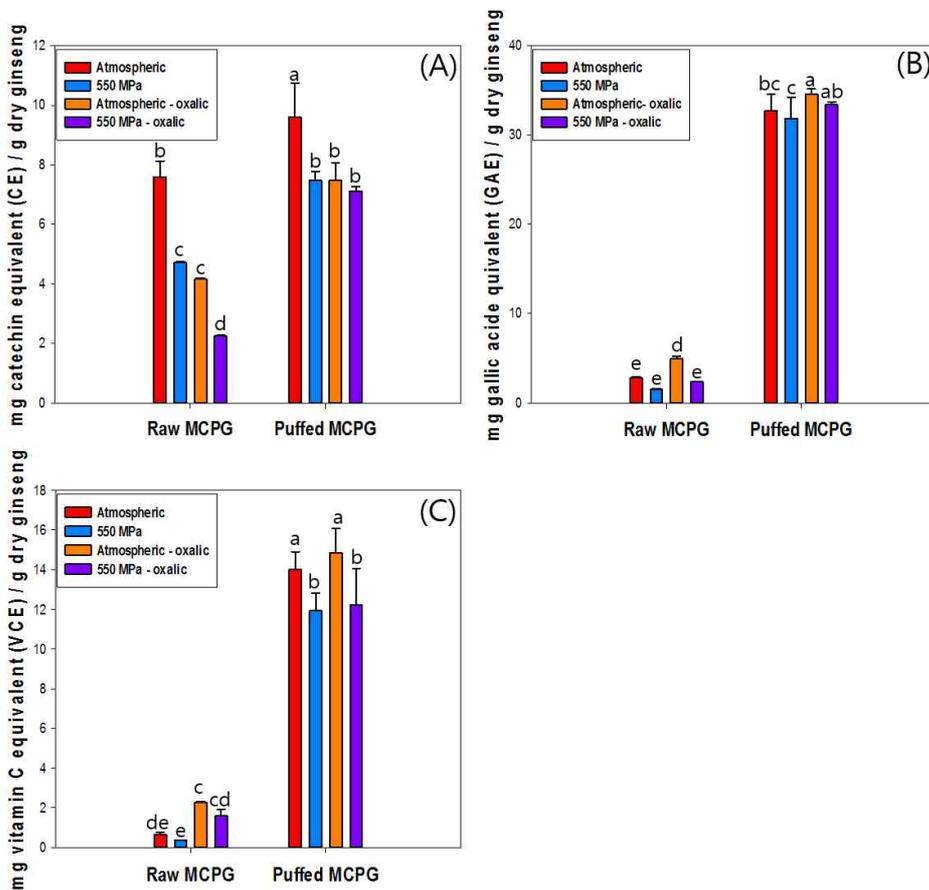


그림 18 TFC (A), TPC (B) and DPPH radical scavenging activity (C) of MCG with acid, HHP and puffing treatments.

Significant differences between values are indicated by different letters ($P < 0.05$).

Total flavonoid content (TFC), total phenolic content 및 DPPH radical 소거능은 그림 18에 나타났다. TFC는 초고압 처리에 의해 -37.7 %, 산 처리에 의해 -52.3 %, 산-초고압 병행 처리에 의해 -70.4 %만큼 변화하였다. 반면 팽화 처리에 의해 +29.6 %의 변화율을 나타냈으며, 팽화-초고압, 팽화-산, 팽화-산-초고압 처리는 각각 -1.00 %, -1.81 %, -6.4 %의 변화율을 나타냈다. 3가지 가공처리가 단독으로 진행 되었을 때의 변화율의 합과 병행처리 되었을 때의 변화율이 유사한 것으로 보아 3가지 가공처리는 TFC에 독립적으로 작용한다고 생각된다. TFC와 DPPH radical 소거능은 비슷한 경향성을 나타냈다. 산, 팽화 처리에 의해 증가하였으며, 초고압 처리에 의해 감소하였다. 또한 3가지 가공처리 중 팽화 처리가 매우 높은 영향을 주었다. TFC는 초고압, 산, 초고압-산 처리에 의해 각각 -44.8%, +77.3%, -15.6%의 변화율을 나타냈다. 팽화 처리에 의해 +1071.8 %의 변화율을 나타냈으며, 팽화-초고압, 팽화-산, 팽화-산-초고압 처리는 각각 +1039.9 %, +1140.2 %, +1097.4 %의 변화율을 나타냈다. DPPH radical 소거능은 초고압, 산, 초고압-산 처리에 의해 각각 -42.05%, +260.7%, +149.6%의 변화율을 나타냈다. 팽화 처리에 의해 +2132.9 %의 변화율을 나타냈으며, 팽화-초고압, 팽화-산, 팽화-산-초고압 처리는 각각 +1795.9 %, +2258.56 %, +1826.91 %의 변화율을 나타냈다. TFC와 DPPH radical 소거능에 대한 3가지 가공 처리의 유의미한 상승작용은 확인되지 않았다. 초고압 처리는 3가지 결과 모두 감소하는 결과를 나타내었는데 이러한 결과는 초고압 처리에 의한 추출수율 감소가 원인으로 보여진다. 또한 팽화 처리에 의해 전체적인 항산화능이 급격히 증가하였는데 이러한 결과는 팽화 처리에 의한 다공성 구조 형성과 가열 처리를 통한 항산화능에 영향을 주는 수용성 물질들의 용출을 증가 및 Maillard reaction 산물에 영향을 받았다고 생각된다.

2. 결론

산, 초고압, 팽화의 단독 및 병행처리를 통한 산양삼의 ginsenoside profile 및 항산화능의 변화와 상승작용에 관한 연구를 진행하였다. 초고압과 팽화 처리 모두 추출수율을 감소시켰으며 두 처리간의 상승작용은 확인되지 않았다.

반면 초고압과 팽화 처리를 통해 조사포닌 함량은 증가하였으며 병행처리를 통해 유의적으로 높은 조사포닌 함량 증가율을 나타냄으로써 두 처리방식 간의 상승작용을 확인할 수 있었다.

Ginsenoside profile는 초고압 처리에 의해서는 유의적 변화를 나타내지 않았으며 산과 팽화 처리에 의해 major ginsenoside가 minor ginsenoside로 전환되는 것을 확인하였다. 또한 산과 팽화 처리를 병행 하였을 때 확연히 높은 Rg3, C-K함량을 나타냈다. 이러한 결과는 팽화 처리 과정에서 생성된 중간산물들이 산 처리에 의해 Rg3, C-K의 형태를 가짐으로써 나타났다고 생각된다. 팽화 처리는 시료의 탄화와 같은 문제점이 존재하는데 팽화-산 병행처리를 통해 이러한 문제점을 해결하고 더 높은 ginsenoside 전환율을 유도할 수 있을 것이라 생각된다.

TFC는 산 과 초고압 처리에 의해 감소하는 반면 팽화 처리에 의해 증가하였다. TPC와 DPPH radical 소거능은 초고압 처리에 의해 감소한 반면 산과 팽화 처리에 의

해 증가하였다. TFC, TPC, DPPH radical 소거능 모두 팽화 처리에 의해 가장 큰 영향을 받았으며 세가지 가공 처리간의 유의미한 상승작용은 확인되지 않았다.

연구된 다양한 산양삼의 처리 방식은 단일 처리 및 병행 처리를 통해 기존의 가공방식과는 다른 결과를 발생시켰다. 많은 에너지와 오랜 처리시간을 요구하는 기존의 가공방식과는 다르게 팽화 처리는 짧은 시간동안 처리 함에도 불구하고 기존의 가공방식과 비슷한 수준의 ginsenoside 전환율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 산-팽화 병행처리는 이러한 특징을 더욱 강화 하는 결과를 나타냈다. 이러한 결과를 토대로 기존의 가공방식을 대체할 수 있는 새로운 가공방식을 제공할 수 있을것으로 사료되며, 이를통해 산양삼을 이용한 고부가가치 식품의 국내 및 세계 시장을 개척 및 확대하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

<2협동연구기관 : 단국대학교>

1. 산양삼 추출물의 생물전환 (효소병합, 고농도)

1.1. 실험방법

산양삼 가공소재 특성 및 유효성분 분석 (효소 병합처리)

- 효소선택: 높은 생물전환율을 보인 Ultrazyme AFP, Viscozyme L, Celluclast 1.5 L 효소를 각각 2가지씩 선택하여 실험에 사용하였음.
- 효소 생물전환: 50 mL Conical tube에 3차 증류수 2-5 mL를 넣고 산양삼 추출액 5 mL를 넣어 각각의 농도로 효소를 첨가하여 50°C, 1 hr 반응을 진행하였으며, 10 min에 1회씩 반응물을 섞어주었음. 효소반응 이후에는 90°C에서 10 min간 효소를 불활성화 시켰으며, 반응물을 실온에서 냉각 후 BuOH 추출을 진행하였음.
- 실험 1 산양삼 추출물의 효소 병합처리가 생물전환에 효과가 있는지 알아보기 위해 기존에 생물전환율이 높았던 효소농도 5%를 최종농도로 하여 각각 2개의 효소를 2.5%씩 첨가하여 반응시킴.

표 10 효소 복합처리 생물전환 조건(1:1비율)

(Enzyme treatment condition)		
sample	wild ginseng extract	
reaction time(hr)	1	
Reaction Temperature(°C)	50	
Reaction pH	Sterile water (No pH adjustment)	
Total volume (mL)	10.0	
	Enzyme 1	Enzyme 2
Amount of the enzyme(%)	5.0	
(mL)	2.5	2.5
	0.25	0.25
Amount of the substrate (%)	50	
(mL)	5.0	
Amount of the water	4.5	
Total	10 mL	

- 실험 2 그 중 전환력이 좋았던 효소 2가지를 1:1, 3:1, 1:3 로 비율을 달리하여 생물 전환 최적화를 진행하였음.

표 11 효소 복합처리 생물전환 조건(1:1, 1:3, 3:1 비율)

(Enzyme treatment condition)			
sample	wild ginseng extract		
reaction time(hr)	1		
Reaction Temperature(°C)	50		
Reaction pH	Sterile water (No pH adjustment)		
Total volume (mL)	10.0		
	1:1	3:1	1:3
Amount of the enzyme(%)	5.0		
(mL)	2.5/2.5	3.75/1.25	1.25/3.75
	0.25/0.25	0.375/0.125	0.125/0.375
Amount of the substrate (%)	50		
(mL)	5.0		
Amount of the water	4.5		
Total	10 mL		

- 실험 3 효소를 고농도로 첨가하여 사용하였을 때 산양삼 추출물의 생물전환력을 확인하기 위해 최적효소 2가지를 추가로 10%(각각 5%), 20%(각각 10%), 30%(각각 15%) 농도로 첨가하여 반응을 시켰으며, 불활성화 후 BuOH 추출을 진행함

표 12 효소 복합처리 생물전환 조건(1:1, 1:3, 3:1 비율)

(Enzyme treatment condition)			
sample	wild ginseng extract		
reaction time(hr)	1		
Reaction Temperature(°C)	50		
Reaction pH	Sterile water (No pH adjustment)		
Total volume (mL)			
10.0			
Amount of the enzyme(%)			
	10.0	20.0	30.0
	5.0/5.0	10.0/10.0	15.0/15.0
(mL)			
	0.5/0.5	1.0/1.0	1.5/1.5
Amount of the substrate (%)			
	50		
(mL)			
	5.0		
Amount of the water			
	4.0	3.0	2.0
Total			
	10 mL		

- BuOH 추출: 시료 10 mL를 250 mL separation funnel에 넣고 3차 증류수 15 mL를 넣어 시료가 추출이 잘 일어나도록 부피를 증가시켰음. 이후 ethyl ether를 25 mL를 넣어 1:1로 흔들어서 섞어준 다음 산양삼의 지방성분이 에테르층으로 이행되도록 20분간 정치시켰음. 에테르층으로 이행된 지방성분을 제거 후, funnel의 남아있는 에테르를 완벽히 제거하기 위하여 95% EtOH로 세척 후 증류수로 재 세척함. 이 후 물층을 다시 funnel에서 BuOH과 1:1로 섞은 후, 30분간 이행되도록 정치시켰음. 남은 물층 시료와 BuOH을 넣어 같은 방법으로 반응을 2회 더 진행한 뒤, BuOH 층을 모두 모아 45°C에서 Rotary evaporator(BUCHI, Germany)로 농축하였음.
- HPLC sample 준비: 농축한 시료는 HPLC grade MeOH을 이용하여 5 mL로 용량을 맞춘 후(건조 산양삼 1g/5mL) 0.45 µm filter로 여과하여 sample로 사용함.
- HPLC 장비와 조건은 HPLC(Agilent 1260, USA), 컬럼은 Phenomenex사의 Kinetex C18(50×4.6 mm, ID 2.6 µm)column, 검출기는 UV detector, 파장은 203 nm에서 측정하였으며 이동상으로는 증류수(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였고 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5, 34.5-40분마다 81:19, 81:19, 81-71:19-29, 71:29, 71-60:29-40, 60-44:40-56, 44-30:56-70, 30-10:70-90, 10:90, 10-81:90-19, 81:19 비율로 조절하였고, 이동상의 유속은 0.6 mL/min이었으며 초기 반응한 sample의 양을 고려하여 BuOH추출은 5 µL를 injection하였고 분석온도는 45°C로 하였음.

표 13. HPLC 분석 용매 조건

min	Water (A)	ACN (B)
0	81.0	19.0
0-7	81.0	19.0
7-11	81-71	19-29
11-14	71	29
14-25	71-60	29-40
25-28	60-44	40-56
28-30	44-30	56-70
30-31.5	30-10	70-90
31.5-34	10	90
34-34.5	10-81	90-19
34.5-40	81	19

1.2. 실험결과

- 4년근 산양삼 추출물과 시판 Novozyme 효소를 이용하여 효소 병합처리를 진행한 결과는 다음과 같음.

표.14 4년근 산양삼 5% 효소 복합처리 생물전환 결과 (1:1)

	mg/g dried cultivated wild ginseng													
	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	F1	Rd	F2	Rg3	CK	Rh2	Total
4y cultivated wild ginseng control	4.11	6.94	1.45	0.82	12.82	8.59	5.50	0.46	2.74	ns	ns	ns	ns	43.430
4y cultivated wild ginseng heating	3.97	6.74	1.38	0.88	12.66	8.23	6.10	0.46	2.71	ns	0.13	ns	ns	43.260
visco+ultra (1:1, total 5%)	4.15	6.45	2.03	0.95	11.40	7.96	5.61	0.50	3.86	0.46	ns	ns	ns	43.370
cellu+ultra (1:1, total 5%)	3.85	6.39	2.03	0.92	10.86	8.98	5.52	0.51	3.83	0.44	ns	ns	ns	43.330
cellu+visco (1:1, total 5%)	4.43	7.02	1.46	0.93	11.25	7.98	5.58	0.64	4.12	0.42	ns	ns	ns	43.830

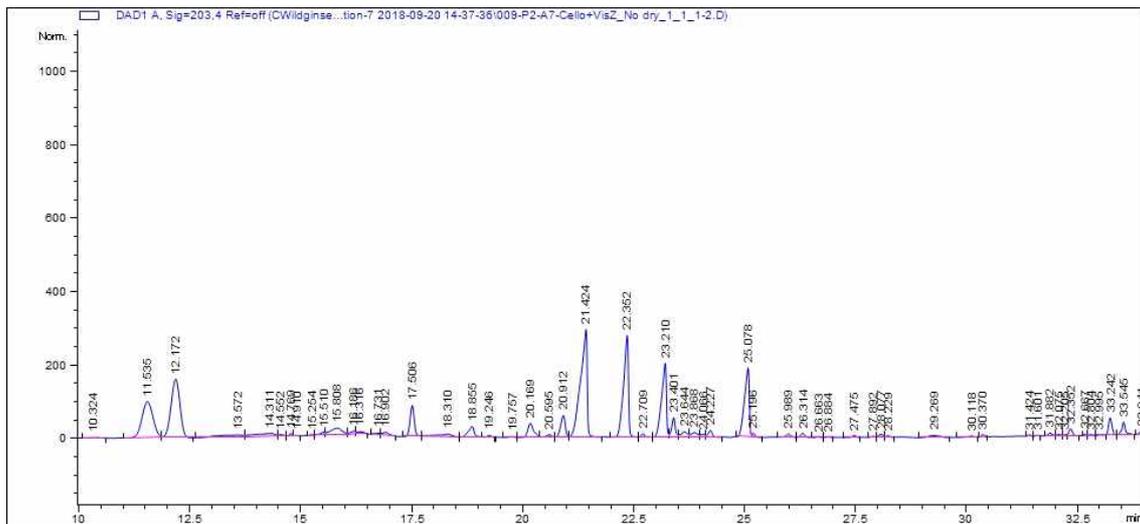


그림. 35 생물전환 4년근 산양삼의 5% celluclast 1.5L+viscozyme L 복합처리 chromatogram

- 산양삼 5% 효소 복합처리 생물전환 결과, 산양삼 추출물(control)과 산양삼 추출물을 50°C, 1 hr 반응한 후 90°C에서 10 min 불활성화 시킨 열처리 control과 함께 효소 처리한 산양삼 추출물을 비교한 결과, control군과 차이가 있었던 celluclast 1.5L+viscozyme L (1:1) 효소처리군의 전환력이 가장 좋았음(그림 35).
- 산양삼 추출물의 Ginsenoside 함량을 분석한 결과, F2, Rg3, Com K, Rh2는 검출되지 않았으며, 열처리 산양삼 추출물 control의 경우 F2, Com K, Rh2가 검출되지 않았음. 효소처리의 경우 Rg3, Com K, Rh2 모두 검출되지 않았음.
- 전환력이 가장 높았던 celluclast 1.5L+viscozyme L (1:1) 효소처리군을 선택하여 효소 간의 비율과 농도를 달리하여 실험을 진행하였음.

표. 15 4년근 산양삼 5% 효소 병합처리 생물전환 결과 (비율 상이)

	mg/g dried cultivated wild ginseng													
	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	F1	Rd	F2	Rg3	CK	Rh2	Total
4y cultivated wild ginseng control	4.11	6.94	1.45	0.82	12.82	8.59	5.50	0.46	2.74	ns	ns	ns	ns	43.430
4y cultivated wild ginseng heating	3.97	6.74	1.38	0.88	12.66	8.23	6.10	0.46	2.71	ns	0.13	ns	ns	43.260
cellu+visco (3:1, total 5%)	4.21	6.91	1.51	0.90	11.06	7.99	5.44	0.47	3.96	ns	0.27	ns	ns	42.720
cellu+visco (1:1, total 5%)	4.43	7.02	1.46	0.93	11.25	7.98	5.58	0.64	4.12	ns	0.42	ns	ns	43.830
cellu+visco (1:3, total 5%)	4.14	6.27	1.31	0.85	10.44	7.04	4.86	0.57	3.65	0.10	0.34	ns	ns	39.570

- celluclast 1.5L+viscozyme L (1:1) 효소처리군의 비율을 다르게 하여 실험한 결과 1:1 비율로 반응하였을 때 가장 큰 전환율을 보여 최적 비율로 결정하였음.
- 또한 minor ginsenoside 인 Rg3와 같은 성분의 경우 viscozyme L 효소 함량이 높거나 1:1비율로 반응하였을때 함량이 높게 나타남(그림 35).

표. 16 4년근 산양삼 고농도(10%, 20%, 30%)효소 병합처리 생물전환 결과 (1:1)

	mg/g dried cultivated wild ginseng													
	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	F1	Rd	F2	Rg3	CK	Rh2	Total
4y cultivated wild ginseng control	4.11	6.94	1.45	0.82	12.82	8.59	5.50	0.46	2.74	ns	ns	ns	ns	43.430
4y cultivated wild ginseng heating	3.97	6.74	1.38	0.88	12.66	8.23	6.10	0.46	2.71	ns	0.13	ns	ns	43.260
cellu+visco (1:1, total 10%)	4.00	5.28	1.25	0.82	7.02	4.84	3.62	0.55	4.04	0.08	0.35	ns	ns	31.850
cellu+visco (1:1, total 20%)	4.09	5.28	1.26	0.83	6.64	4.43	3.61	0.56	4.42	0.16	0.41	ns	ns	31.690
cellu+visco (1:1, total 30%)	4.05	5.16	1.24	0.83	9.54	6.22	5.18	0.48	5.03	0.26	0.38	ns	ns	38.370

- 효소 농도가 증가할수록 Rg3 함량이 소폭증가하였고, 30% 효소 농도에서 Rb1의 함량이 크게 증가하는 것을 확인 할 수 있었음.

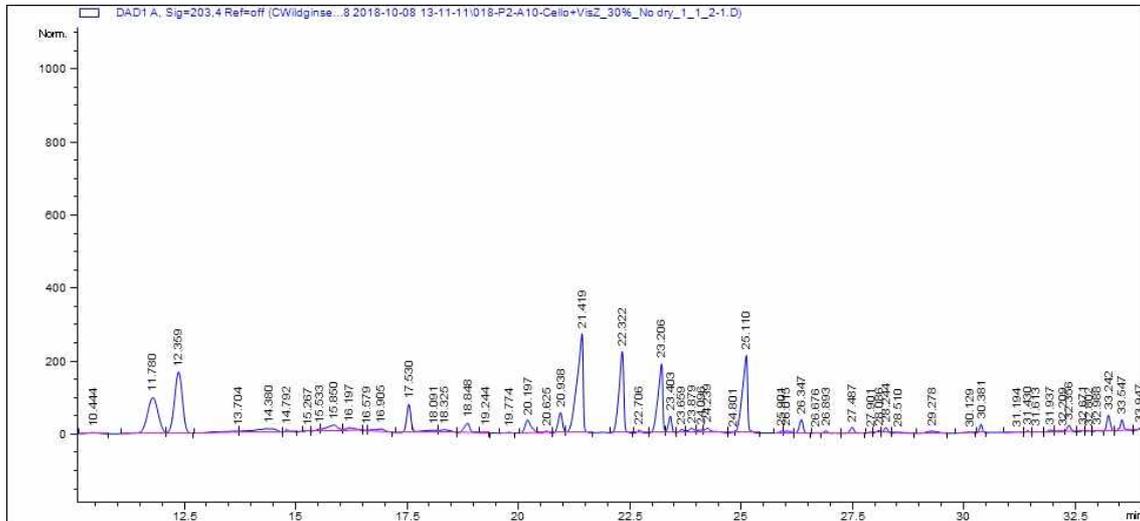


그림. 36 생물전환 4년근 산양삼의 30% celluloclast 1.5L+viscozyme L 복합처리 chromatogram

- 산양삼 생물전환 효소의 최고 농도를 알아보기 위해 Ginsenoside를 정량한 결과 효소 함량이 증가할수록 전환력도 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 최고 농도는 30%농도에서 가장 높게 나타났음. 10%농도와 20%농도 차이보다 20%농도와 30%농도 간 전환력에 차이가 더 크게 때문에 20% 농도 이상, 30% 농도 이하에서 가장 좋은 전환력을 보일 것으로 생각됨.

2. 생물전환 팽화산양삼의 유효성분 분석

2.1 실험방법

- 4년근 팽화산양삼을 제공받아 70% EtOH로 250 mL 씩 3번 추출하여 실온에서 30분간 stirring 후 여과하여 Total volume 105 mL(5 mL/1g)로 맞춰 사용함.
- 효소선택: 높은 생물전환율을 보인 Pectinex Ultra Pulp, Pectinex Ultra SP-L, Ultrazyme AFP, Viscozyme L, Celluclast 1.5 L 효소를 실험에 사용하였음.
- 효소 생물전환: 50 mL Conical tube에 3차 증류수 4.5-5 mL를 넣고 산양삼 추출액 5 mL를 넣어 각각 5%(0.5 mL) 농도로 효소를 첨가하여 50°C, 1 hr 반응을 진행하였으며, 10 min에 1회씩 반응물을 섞어주었음. 효소반응 이후에는 90°C에서 10 min간 효소를 불활성화 시켰으며, 반응물을 실온에서 냉각 후 BuOH 추출을 진행하였음.

표 17 팽화산양삼 생물전환 조건

(Enzyme treatment condition)	
sample	wild ginseng extract
reaction time(hr)	1
Reaction Temperature(°C)	50
Reaction pH	Sterile water (No pH adjustment)
Total volume (mL)	10
비율(enzyme:substrate)	(1:10)
Amount of the enzyme(%)	5
(μ L)	0.5
Amount of the substrate (%)	50
	5
Amount of the water	4.5
Total	10 mL

- BuOH 추출: 시료 10 mL를 250 mL separation funnel에 넣고 3차 증류수 15 mL를 넣어 시료가 추출이 잘 일어나도록 부피를 증가시켰음. 이후 ethyl ether를 25 mL를 넣어 1:1로 흔들어서 섞어준 다음 산양삼의 지방성분이 에테르층으로 이행되도록 20분간 정치시켰음. 에테르층으로 이행된 지방성분을 제거 후, funnel의 남아있는 에테르를 완벽히 제거하기 위하여 95% EtOH로 세척 후 증류수로 재세척함. 이 후 물층을 다시 funnel에서 BuOH과 1:1로 섞은 후, 30분간 이행되도록 정치시켰음. 남은 물층 시료와 BuOH을 넣어 같은 방법으로 반응을 2회 더 진행한 뒤, BuOH 층을 모두 모아 45°C에서 Rotary evaporator(BUCHI, Germany)로 농축하였음.
- HPLC sample 준비: 농축한 시료는 HPLC grade MeOH을 이용하여 5 mL로 용량을 맞춘 후(건조 산양삼 1g/5mL) 0.45 μ m filter로 여과하여 sample로 사용함.
- HPLC 장비와 조건은 HPLC(Agilent 1260, USA), 컬럼은 Phenomenex사의 Kinetex C18(50 \times 4.6 mm, ID 2.6 μ m)column, 검출기는 UV detector, 파장은 203 nm에서 측정하였으며 이동상으로는 증류수(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였고 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5, 34.5-40분마다 81:19, 81:19, 81-71:19-29, 71:29, 71-60:29-40, 60-44:40-56, 44-30:56-70, 30-10:70-90, 10:90, 10-81:90-19, 81:19 비율로 조절하였고, 이동상의 유속은 0.6 mL/min이었으며 초기 반응한 sample의 양을 고려하여 BuOH추출은 5 μ L를 injection하였고 분석온도는 45°C로 하였음.

표 18. HPLC 분석 용매 조건

min	Water (A)	ACN (B)
0	81.0	19.0
0-7	81.0	19.0
7-11	81-71	19-29
11-14	71	29
14-25	71-60	29-40
25-28	60-44	40-56
28-30	44-30	56-70
30-31.5	30-10	70-90
31.5-34	10	90
34-34.5	10-81	90-19
34.5-40	81	19

2.2. 실험결과

- 4년근 팽화산양삼 추출물을 사용하여 Ginsenoside 정량을 진행할 결과는 다음과 같음.

표19. 4년근 팽화 산양삼 5% 효소 단일 처리 생물전환 결과

	mg/g puffed cultivated wild ginseng													
	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	F1	Rd	F2	Rg3	CK	Rh2	Total
4y puffed cultivated wild ginseng control	ns	ns	0.21	0.39	0.01	0.01	ns	ns	0.03	ns	0.45	2.9	ns	4.000
4y puffed cultivated wild ginseng heating	ns	ns	0.24	0.49	0.05	0.01	ns	ns	0.57	ns	ns	3.71	ns	5.070
Puff_Pectinex Ultra Pulp_5%_No heat	ns	ns	0.24	0.51	0.05	0.02	0.01	ns	0.06	ns	0.58	3.7	ns	5.170
Puff_Pectinex Ultra Pulp_5%	ns	ns	0.26	0.51	0.05	0.03	0.02	ns	0.15	ns	0.61	3.75	ns	5.380
Puff_Pectinex Ultra SP-L_5%_No heat	ns	ns	0.26	0.52	0.07	0.01	ns	ns	0.06	ns	0.59	3.68	ns	5.190
Puff_Pectinex Ultra SP-L_5%	ns	ns	0.25	0.51	0.06	0.01	0.01	ns	0.06	ns	0.6	3.78	ns	5.280
Puff_Celluclast 1.5L_5%_No heat	ns	ns	0.29	0.57	0.07	0.03	0.02	ns	0.08	ns	0.74	4.83	ns	6.630
Puff_Celluclast 1.5L_5%	ns	ns	0.24	0.44	0.01	0.03	0.04	ns	0.11	ns	0.51	3.1	ns	4.480
Puff_Viscozyme L_5%_No heat	ns	ns	0.25	0.55	0.08	0.02	0.01	ns	0.05	ns	0.66	4.28	ns	5.900
Puff_Viscozyme L_5%	ns	ns	0.19	0.58	0.02	ns	ns	ns	0.08	ns	0.62	4.11	ns	5.600
Puff_Ultrazym AFP_5%_No heat	ns	ns	0.25	0.52	0.02	0.02	0.02	ns	0.09	ns	0.59	3.75	ns	5.260
Puff_Ultrazym AFP_5%	ns	ns	0.26	0.56	0.09	0.02	0.01	ns	0.07	ns	0.69	4.5	ns	6.200

- 팽화산양삼 추출물(control), 열처리 팽화산양삼 추출물, 효소처리 control과 효소처리 반응을 진행한 sample의 Ginsenoside를 정량하였고, 그 결과, 효소처리 control과 비교하여 Ginsenoside 함량이 증가한 효소는 pectinex Ultra Pulp, Pectinex Ultra SP-L, Ultrazyme AFP 3가지 효소였으며, 3가지 효소 모두 효소처리 하지 않은 control군 보다 높은 Ginsenoside 함량을 보였음. 이 중 가장 높은 전환력을 보인 효소는 Ultrazyme AFP이었음(표 19).



그림. 37 4년근 산양삼, 4년근 팽화 산양삼, 팽화산양삼 열처리, Ultrazym AFP 효소처리 팽화산양삼의 chromatogram

- 팽화산양삼의 경우 산양삼의 함유된 진세노사이드가 열에 의해 분해되어 major 진세노사이드 함량이 낮아지며, 동시에 total 진세노사이드 함량도 낮아짐. 그러나 major Ginsenoside의 분해로 minor Ginsenoside 중 Rg3와 com K 함량이 증가하였음.

3. 산양삼 가공소재 기반 제품 특성 및 유효성분 분석

3.1. 실험방법

- 산양삼 가공소재 기반 제품은 1세부에서 시제품으로 만들어 5% 산양삼(건조 기준)이 첨가된 분말을 제공받았으며, 10 g의 시제품을 70% EtOH로 100 mL 씩 믹서기를 이용하여 1분 30초 동안 추출하였고, 2번 더 반복하였음. 그 후 여과하여 Total volume 25 mL(10g(0.5g 건조 산양삼))로 맞춰 정용하였으며, 냉동(-60°C)에서 보관하였다가 사용함.
- BuOH 추출: 시료 25 mL를 250 mL separation funnel에 넣고 ethyl ether 25 mL를 넣어 1:1로 흔들어서 섞어준 다음, 산양삼의 지방성분이 에테르층으로 이행되도록 24

시간 동안 정치시켰음(제품 가공 시 안정제로 사용된 성분으로 인해 분리가 빠르게 진행되지 않음). 에테르층으로 이행된 지방성분을 제거 후, funnel의 남아있는 에테르를 완벽히 제거하기 위하여 95% EtOH로 세척 후 증류수로 재세척함. 이 후 물층을 다시 funnel에서 BuOH과 1:1로 섞은 후, 30분간 이행되도록 정치시킨 후 원심분리(4000 rpm, 15 min)하여 BuOH층을 모았음. 남은 물층 시료와 BuOH을 넣어 같은 방법으로 반응을 2회 더 진행한 뒤, BuOH 층을 모두 모아 45°C에서 Rotary evaporator(BUCHI, Germany)로 농축하였음.

- HPLC sample 준비: 농축한 시료는 HPLC grade MeOH을 이용하여 2.5 mL로 용량을 맞춘 후(건조 산양삼 1g/5mL) 0.45 µm filter로 여과하여 sample로 사용함.
- HPLC 장비와 조건은 HPLC(Agilent 1260, USA), 컬럼은 Phenomenex사의 Kinetex C18(50×4.6 mm, ID 2.6 µm)column, 검출기는 UV detector, 파장은 203 nm에서 측정하였으며 이동상으로는 증류수(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였고 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5, 34.5-40분마다 81:19, 81:19, 81-71:19-29, 71:29, 71-60:29-40, 60-44:40-56, 44-30:56-70, 30-10:70-90, 10:90, 10-81:90-19, 81:19 비율로 조절하였고, 이동상의 유속은 0.6 mL/min이었으며 초기 반응한 sample의 양을 고려하여 BuOH 추출은 5 µL를 injection하였고 분석온도는 45°C로 하였음.

표 20. HPLC 분석 용매 조건

min	Water (A)	ACN (B)
0	81.0	19.0
0-7	81.0	19.0
7-11	81-71	19-29
11-14	71	29
14-25	71-60	29-40
25-28	60-44	40-56
28-30	44-30	56-70
30-31.5	30-10	70-90
31.5-34	10	90
34-34.5	10-81	90-19
34.5-40	81	19

3.2. 실험결과

- 산양삼 5% 첨가된 산양삼 시제품을 제공 받아 Ginsenoside 함량을 분석하였음.

표 21. 4년근 산양삼 제품 (산양삼 5%) Ginsenoside 분석 결과

	mg/g dried cultivated wild ginseng													Total
	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	F1	Rd	F2	Rg3	CK	Rh2	
4y cultivated wild ginseng control	4.11	6.94	1.45	0.82	12.82	8.59	5.50	0.46	2.74	ns	ns	ns	ns	43.430
4y cultivated wild ginseng heating	3.97	6.74	1.38	0.88	12.66	8.23	6.10	0.46	2.71	ns	0.13	ns	ns	43.260
CWGinseng product	9.21	9.45	2.57	0.94	12.30	8.80	4.57	0.44	1.49	ns	ns	ns	ns	49.770

- 그 결과, 대조군과 비교하여 함량이 증가한 것을 확인할 수 있었음.
- 그러나 minor Ginsenoside의 함량은 거의 증가하지 않았음.

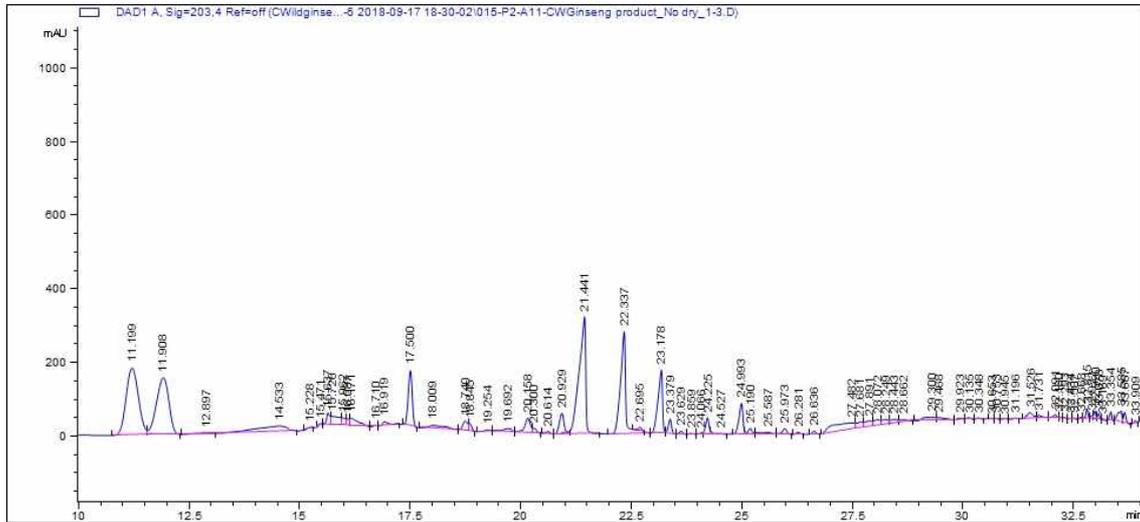


그림. 38 4년근 산양삼 제품의 chromatogram

4. 제품의 저장 중 안전성 평가

:저장 중 안전성 평가: 일반 및 식품위해미생물(세균, 효모, 곰팡이 등)

4.1. 실험방법

- 보관 온도의 경우 냉장 보관을 염두하여 5℃로 설정하였고, 25℃의 경우 실온 보관, 37℃의 경우 미생물 번식 최적 온도를 고려하여 각각 설정하였음.
- 보관용기는 멸균된 conical tube에 시료 25 g을 넣어 보관하면서 필요한 만큼 털어 사용하였음.
- 생균수의 경우 세균, 효모, 곰팡이에 대한 저장 안전성을 실험하기 위해 Difco사에서 Plate Count Agar(PCA), YM agar, Potato Dextrose Agar(PDA)를 사용하였으며, 식품공전법을 참고하여 pouring법으로 실험한 후 PCA는 37℃, YM, PDA는 30℃ incubator에서 24시간에 한번씩 count하였고, 72시간 동안 관찰한 후 균수에 따라 Log CFU/mL로 표기함.

4.2. 실험 결과

- 산양삼 제품의 경우 분말제형으로 제공 받았으며, 5%의 산양삼이 첨가되어있는 상태였음.

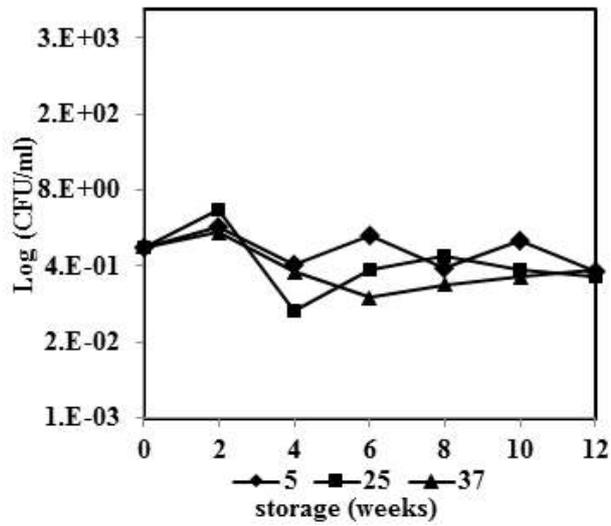


그림. 39 산양삼 제품의 저장일수 별 일반세균(PCA)

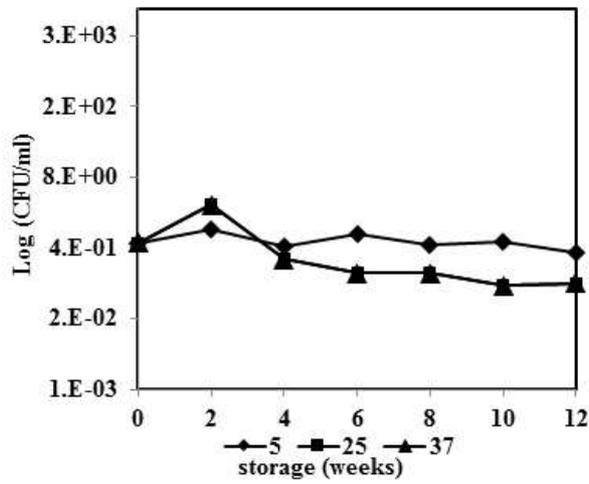


그림. 40 산양삼 제품의 저장일수 별 효모 및 곰팡이(PDA)

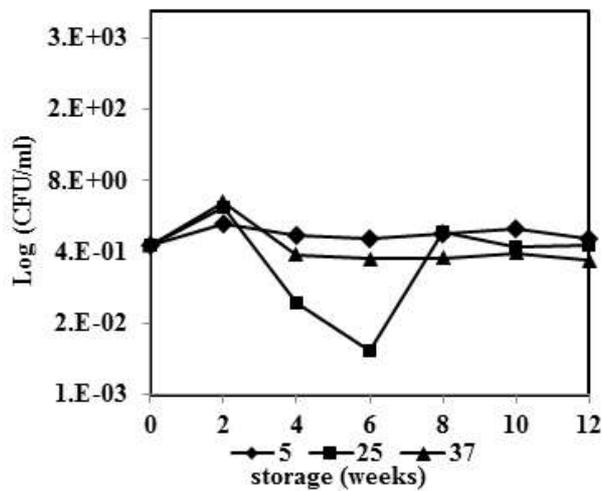


그림.41 산양삼 제품의 저장일수 별 효모 및 곰팡이(YM)

- 일반세균(PCA)의 경우 5°C, 25°C, 37°C 저장온도에서 모두 점점 세균수가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 미생물의 감소량이 많았던 순은 25°C>37°C>5°C 순이었음. 이는 보관 중 수분의 미세한 손실에 의해 일어났을 것으로 생각 됨.
- 효모 곰팡이의 경우 저장 기간별 균수는 거의 차이가 없거나 미미하게 감소하였으며, YM 그래프에서 시료를 25°C 저장한 경우에서 6주 보관 했을 때, 낮아지는 균수를 확인할 수 있었지만, 이후 다시 증가하였기 때문에 균수가 감소한 것으로는 생각되지 않음.
- 본 실험을 통해 산양삼 원료 및 제품을 보관할 때 균수의 변화를 고려하여 실온에서 보관 할 수 있을 것으로 보이며, 미생물 초기 균수를 볼 때, 제품 가공 후 살균처리를 통한 초기균수의 제어가 중요할 것으로 생각됨.

5. 산양삼 제품 및 생물전환 산양삼의 면역억제 반응 확인

5.1. 실험방법

- 시료는 4년근 추출물과 생물전환 시 효과를 보였던 11종의 sample, 산양삼 제품 1종으로 총 13종에 대한 면역억제 반응을 확인하였음.
- 시료는 액체 상태로 보냈으며, 면역 실험 전 가공하여 실험에 사용하였음.

표. 22 산양삼제품 및 생물전환 산양삼의 면역실험 sample list

Sample No. (label)	원료	Specification
18	4WG	Ultrazyme AFP 5% 단일 생물전환-BuOH 추출 50도 1시간반응 90도 10분 불활성
19	4WG	Viscozyme L 5% 단일 생물전환-BuOH 추출 50도 1시간반응 90도 10분 불활성
20	4WG	Celluclast 1.5L 5% 단일 생물전환-BuOH 추출 50도 1시간반응 90도 10분 불활성
21	4WG	Ultrazyme AFP+Viscozyme L 1:1 combi total 5% 생물전환-50도 1시간반응 90도 10분 불활성
22	4WG	Ultrazyme AFP+Celluclast 1.5L 1:1 combi total 5% 생물전환-50도 1시간반응 90도 10분 불활성
23	4WG	Viscozyme L+Celluclast 1.5L 1:1 combi total 5% 생물전환-50도 1시간반응 90도 10분 불활성
24	4WG	Viscozyme L+Celluclast 1.5L 1:3 combi total 5% 생물전환-50도 1시간반응 90도 10분 불활성
25	4WG	Viscozyme L+Celluclast 1.5L 3:1 combi total 5% 생물전환-50도 1시간반응 90도 10분 불활성
	제품 산양삼제품	10 mL 농축 5 mL 보냄 (5%산양삼제품 10g 추출)
29	4WG	Viscozyme L+Celluclast 1.5L 1:1 combi total 10% 생물전환-50도 1시간반응 90도 10분 불활성
30	4WG	Viscozyme L+Celluclast 1.5L 1:1 combi total 20% 생물전환-50도 1시간반응 90도 10분 불활성
31	4WG	Viscozyme L+Celluclast 1.5L 1:1 combi total 30% 생물전환-50도 1시간반응 90도 10분 불활성
4YR(CTRL)	4WG	4년근 산양삼 70% 주정추출물 (water에 현탁되어 있음); 농도: 5 mL/1 g 건조산양삼

- 추출물은 고형분 10 uL/mL로 희석하여 대식세포(RAW 264.7)와 함께 24시간 배양하였으며, 이후, LPS(1 ng/mL)를 넣어 12시간 염증반응을 유도하였음. 이후 세포배양액 내에서 염증성 사이토카인으로 알려진 IL-6의 분비량을 ELISA로 측정함. LPS only는 추출물이 들어가지 않은 음성대조군으로써 순수한 염증반응을 말함.

5.1. 실험결과

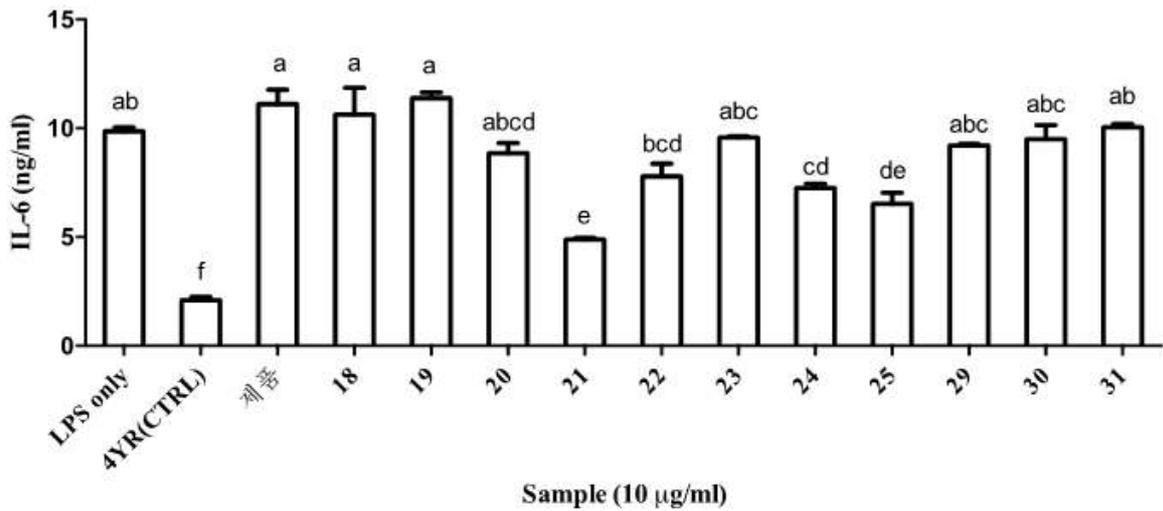


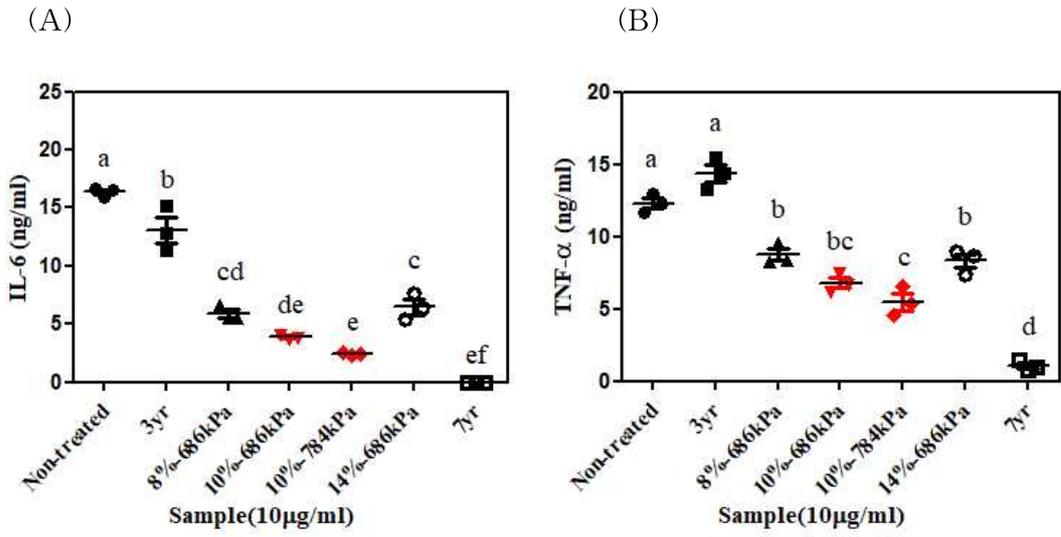
그림. 42 산양삼 제품 및 생물전환 산양삼의 면역실험 결과

- 실험결과 산양삼 제품에서는 IL-6의 분비량이 높아 음성대조군과 차이가 없었으며, 따라서, 항염증효과는 없는 것으로 보임
- 단일효소로 생물전환을 한 경우보다 복합효소 처리를 한 경우 좀 더 낮은 사이토카인 분비량을 확인 할 수 있었지만 음성대조군과의 차이는 없었음.
- 생물전환 산양삼의 경우 Ultrazyme AFP+Viscozyme L을 1:1로 병합처리한 시료와 Viscozyme L+Celluclast 1.5 L을 각각 1:3, 3:1로 넣어 반응한 시료에서 항염증 효과가 있는 것으로 나타났음.
- 4년근 산양삼의 경우에서도 음성대조군에 비해 높은 항염증 효과를 보였음.

<3협동연구기관 : 경희대학교>

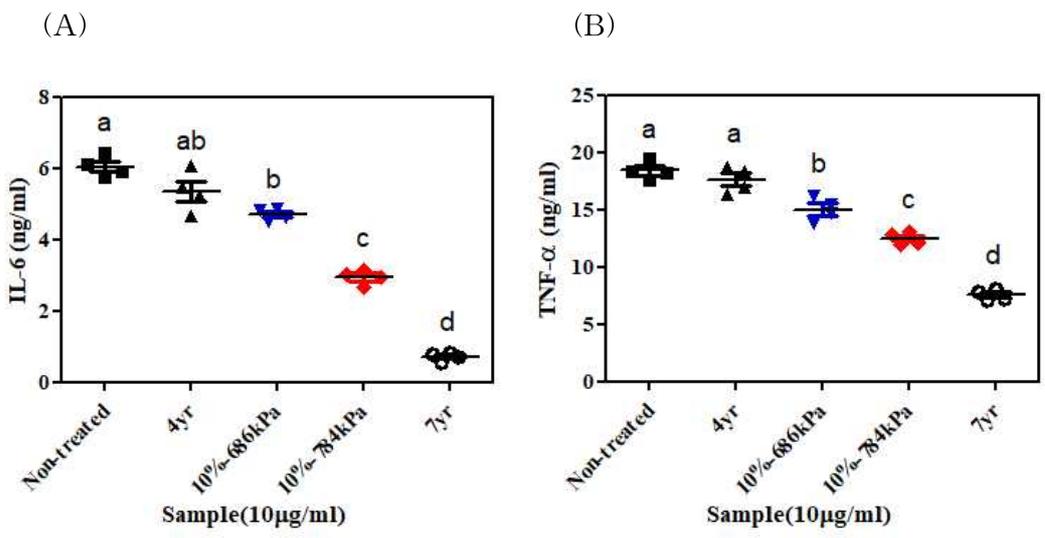
1. 마우스 사료용 4년근 산양삼 팽화 조건 결정

앞선 1,2차년도 연구 결과 팽화처리 산양삼 추출물의 기능성을 확인 할 수 있었으며, 3차년도 *in vivo* 마우스 실험에 3년근 산양삼 대신 4년근을 사용하게 되어서 같은 효능을 나타내는지 확인하고 마우스 사료에 첨가할 산양삼의 팽화 조건을 결정하는 연구를 진행 하였음.



< 그림1. RAW264.7 대식세포주에 3년근 산양삼 추출물 처리에 따른 염증성 사이토카인 (A) IL-6, (B) TNF-α 정량 결과. >

그림1에서 수분 10%, 팽화압력 7, 8kgf(= 686, 784kPa)에서 가장 효과적인 기능성이 나타남을 확인함. 이를 토대로 4년근 산양삼도 같은 팽화 조건에서 팽화 처리를 한 후 동일한 조건으로 연구를 진행함.

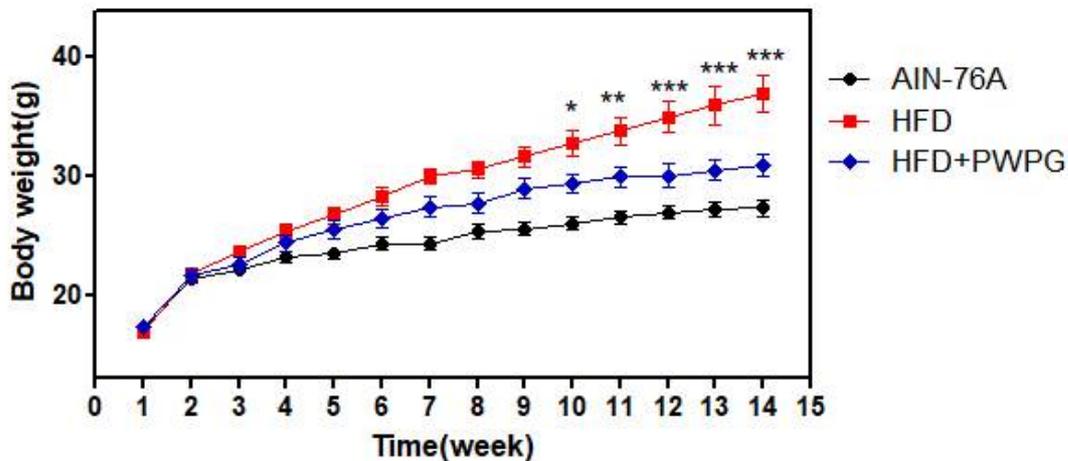


< 그림2. RAW264.7 대식세포주에 4년근 산양삼 추출물 처리에 따른 염증성 사이토카인 (A)IL-6, (B)TNF-α 정량 결과. >

연구결과, 그림2와 같이 4년근 산양삼 추출물의 연구결과가 3년근의 결과와 거의 동일한 효과를 나타낸다고 볼 수 있음. 또한 두 가지 조건 중에서도 수분 10%, 팽화 압력 8kgf에서 더 효과적이라고 판단하여 해당 조건으로 4년삼을 가공하여 마우스 사료에 첨가하기로 결정함.

2. 고지방식이 급여를 통한 비만마우스 유도

고지방식으로 비만이 유도되는 감수성이 뛰어난 마우스 계통인 C57BL/6 마우스를 연구에서 사용함. 4주령의 마우스를 받아서 1주일간 AIN-76A diet로 적응기간을 가진 후, 일반식이군(normal diet, AIN-76A)을 음성대조군으로, 고지방식이군(high-fat diet, HFD)을 양성대조군으로, 실험군은 팽화산양삼(puffed wild cultivated panax ginseng, PWPG)을 포함한 고지방식이군(HFD+PWPG)으로 각각 식이 섭취를 진행하여 14주간 사육하였음. 팽화산양삼은 위의 연구에서 결정한 수분 10%, 팽화압력 8kgf의 조건에서 팽화하였으며, 사료에 첨가한 양은 사료 중량의 5%로 존재하는 식이섬유(cellulose)를 대체하여 칼로리 적 동등성을 맞추었음. 연구기간 동안 사료와 음용수는 마우스에 자율식으로 제공되었음.

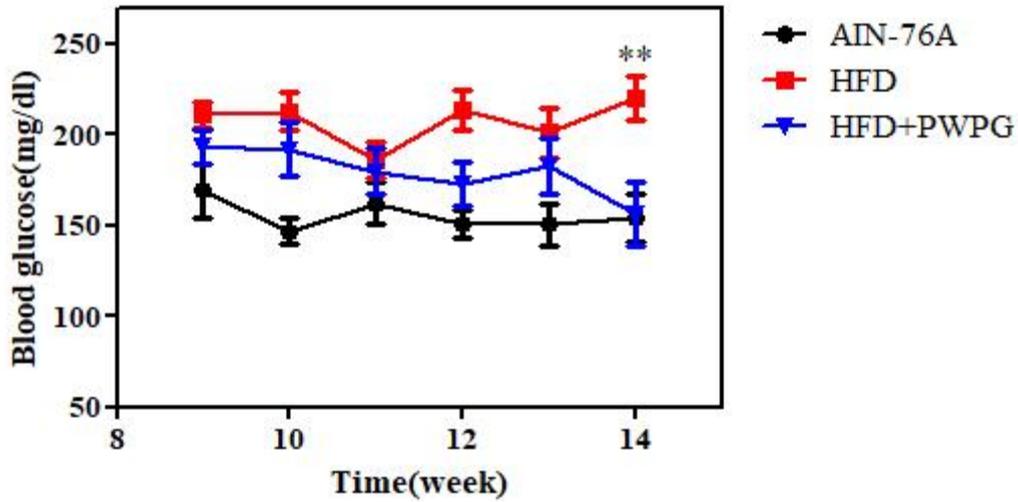


< 그림3. 식이군별 마우스 체중 변화 그래프 >

체중은 1주일 간격으로 측정하였으며, 일반식이군과 고지방식이군은 5주차부터 통계적으로 유의적인 체중 차이가 나타났으며 팽화산양삼을 같이 섭취한 고지방식이군은 두 대조군 사이의 체중 값을 나타냈음. 또한 10주차부터 고지방식이군과 유의차가 나타나기 시작하였음. 고지방식이 급여를 통한 비만마우스 유도는 성공적으로 진행되었으며 팽화산양삼이 체중 증가를 억제하는 효과를 나타냄을 확인함.

3. 마우스 혈당 측정

동물실험 진행 중반 시점부터 마우스의 혈당 측정을 꼬리정맥 채혈을 통해서 진행하였음. 자율식이를 통해 사료와 물을 섭취하였기 때문에 공복혈당을 측정하기 위해서 혈당을 측정하기 5시간 전에 사료와 물을 제한하였음. 마우스 제어 기구를 사용하여 마우스의 행동을 제한하고 연구원이 꼬리를 다룰 수 있도록 하였고, 원활한 채혈을 위하여 적외선 램프를 이용하여 마우스의 체온을 상승시킴.



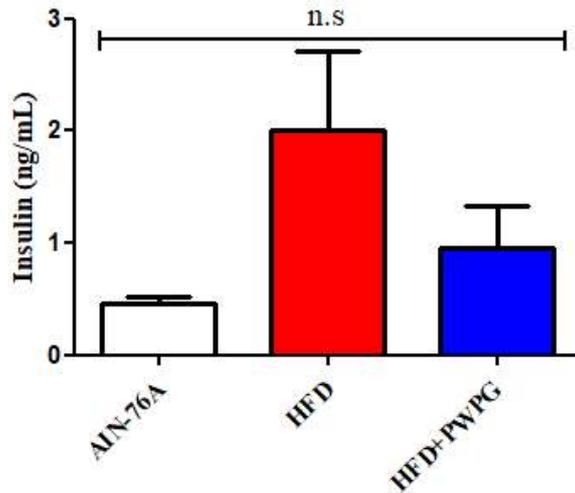
<그림4. 마우스 혈당 측정 그래프 >

9주차부터 마지막 14주차까지의 혈당을 측정한 결과, HFD이 가장 높았으며 일반식이군과 HFD군 사이에 펩타이드산양삼 섭취군의 혈당이 위치하였음. 마지막 14주차에는 HFD와 HFD+PWPG 사이에 유의차를 보임으로써, 펩타이드산양삼이 비만한 상태에서 나타날 수 있는 혈당상승을 억제할 수 있음을 확인함.

4. 혈중 인슐린 정량

혈당과 관련하여 혈중 인슐린 정량을 실시함. 제2형 당뇨병은 비만과 관련이 있다고 알려져 있으며, 인슐린 감수성 저하로 인해 혈중 인슐린 농도가 증가하므로, 혈당 측정과 더불어 혈중 인슐린 농도는 비만 관련 지표로 사용되기도 함.

마우스의 혈액수집은 14주차 마지막에 마우스를 안락사 진행 후 심장에서 채혈하였음. 이 혈액을 사용하여 혈중 비만 관련 물질들을 분석함.



< 그림5. 마우스 혈중 인슐린 농도 정량 >

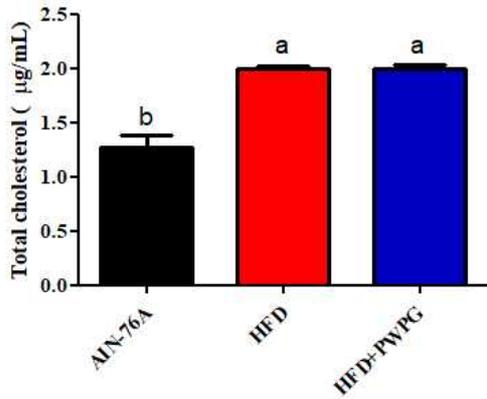
수집한 마우스 혈액은 항응고제(EDTA, 헤파린 등)를 가하지 않고 저온보관(~4℃)하여 혈구들이 자연적으로 응집하고 침전하게 만든 후, 원심분리기를 사용하여 상등액인 혈청을 분리하였음. 혈청을 사용하여 Crystal Chem사의 high sensitive mouse insulin ELISA kit를 사용하여 흡광도를 통한 인슐린 농도 정량을 실시하였음. 그 결과, 그림5와 같이 실험군 사이에 통계적 유의차는 나타나지 않았으나, HFD군이 일반식이군보다 많은 인슐린 농도를 나타냈으며 팽화산양삼 섭취군은 HFD군에 비해 인슐린 농도가 감소함을 보여줌. 이는 팽화산양삼의 섭취가 비만에 의한 인슐린 저항성을 완화시킬 수 있음을 보임.

5. 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 분석

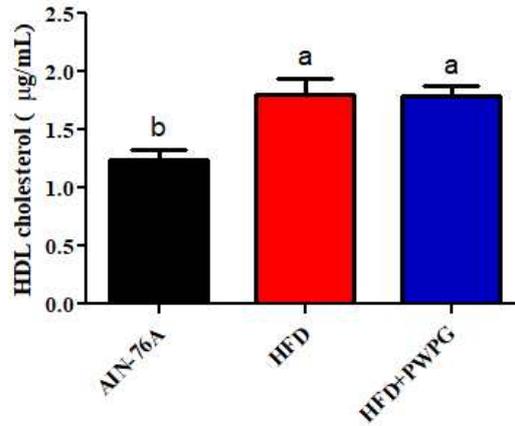
혈중 콜레스테롤과 중성지방 수치에 따른 심혈관계 질환 위험과 관련하여, 고지방식이에 의한 비만에서는 두 수치의 혈중 농도가 높아진다고 알려져있음.

분리해낸 마우스 혈청을 사용하여 Abcam사의 cholesterol assay kit와 triglyceride assay kit를 이용하여 혈중 콜레스테롤 농도와 중성지방 농도를 분석함.

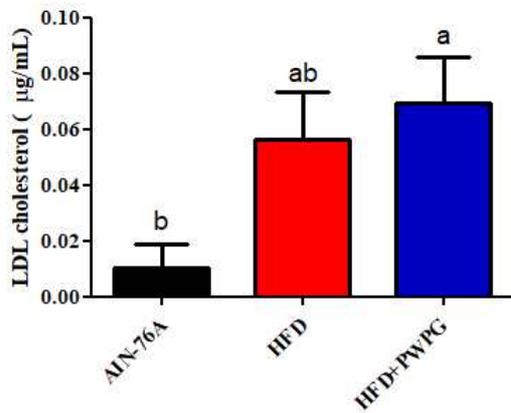
(A)



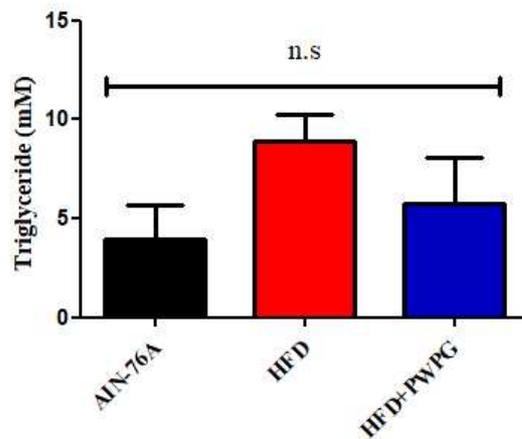
(B)



(C)



(D)



< 그림6. 혈중 (A) 총 콜레스테롤, (B) HDL 콜레스테롤, (C) LDL 콜레스테롤 및 (D) 중성지방 정량 그래프 >

혈중 총콜레스테롤(A), HDL 콜레스테롤(B) 및 LDL 콜레스테롤(C) 모두 정상식이에 비하여 HFD 급여시 유의적 증가를 보였으며, 팽화산양삼 섭취가 유의적 영향을 미치지 않음을 보임. 중성지방(C)의 경우 실험군간 유의차는 없었으나, HFD에 비해 HFD+PWPG가 감소하는 추세를 보임.

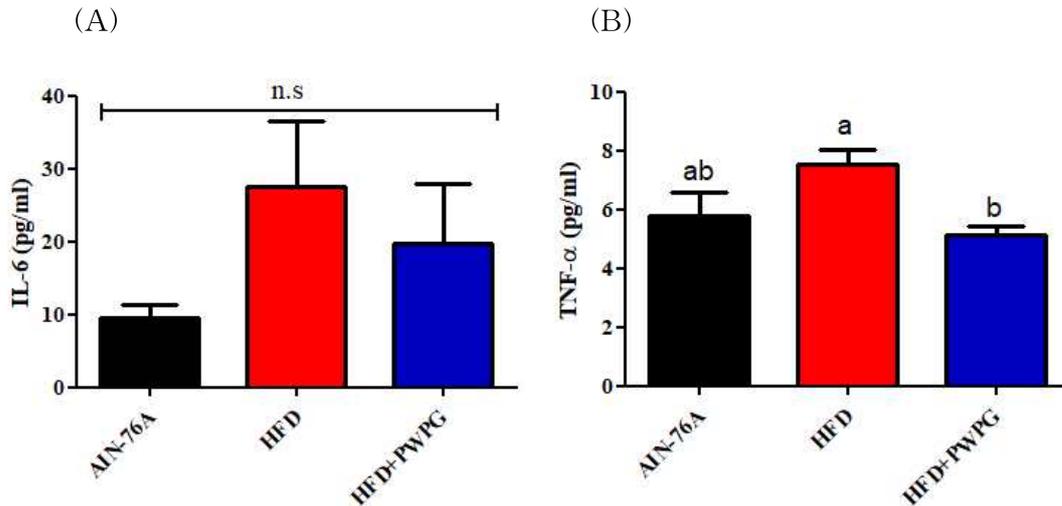
콜레스테롤의 경우 일반식이에 비해 고지방식이에 의한 혈중 농도 상승이 일어남. 체내 콜레스테롤 조절 대사에는 팽화산양삼의 영향이 덜 하다고 여겨짐. 그러나 중성지방의 농도를 낮춤으로써 총콜레스테롤, LDL콜레스테롤, 중성지방 수치가 높아서 나타나게 되는 이상지질혈증 예방에는 도움이 될 것으로 보임.

따라서 비만환자의 혈중 중성지방 수치 개선 역할 가능성이 있음.

6. 혈중 염증성 사이토카인 정량

비만에 의한 체내의 지방축적은 지방조직을 이루는 지방세포에 주로 일어나며, 지방세포는 여러 가지 호르몬을 비롯한 단백질 구조의 신호전달 물질(adipokine)을 생성함. 이는 면역 및 염증 반응에 관여하는 세포들에게도 영향을 줌. 현재까지 많은 연구들을 통해 비만과 만성염증의 상관관계가 알려져 있음.

따라서 역으로 혈중 염증성 사이토카인의 수치를 통해 비만을 판단할 수도 있으며, 비만에 의한 만성염증질환 판단도 가능함.



< 그림7. 혈중 염증성 사이토카인 (A)IL-6, (B)TNF-α 정량 결과 >

혈중 염증성 사이토카인 정량은 eBioscience 사의 high sensitivity ELISA kit를 사용하여 프로토콜대로 진행하였음. 정량 결과, 일반식이군에 비해 HFD군에서 혈중 염증성 사이토카인 IL-6의 농도가 높은 경향을 보였으나 통계적 유의차는 없었음 (그림7A). HFD에 PWPG첨가한 경우, 혈중 IL-6이 줄어드는 경향을 보였으나 유의적 차이는 없었음. 염증성 사이토카인 TNF-α의 경우 정상식이와 HFD간의 유의적 차이는 없었으나, HFD에 PWPG를 첨가한 경우 TNF-α의 분비가 유의적으로 감소함을 보임. 두 사이토카인 정량 결과를 종합하여 생각했을 때, 고지방식이로 유도된 비만에 의해 염증성 사이토카인의 혈중 농도 증가가 일어나고 팽화산양삼의 항염증 기능이 작용하여 완화하는 역할을 한다고 여겨짐.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 국산 산양삼의 활용도 증진을 위한 산양삼의 물리적 및 생물학적 가공기술 개발로 다양한 식품소재 개발 및 산양삼 가공소재를 활용한 고기능성 산양삼 식품 개발

3-2. 목표 달성여부

○ 계획서에 명시된 연구 및 제품화 개발활동을 계획대로 무사히 진행하여 산양삼 가공소재의 원료 표준화 및 제품화 기술, 팽화 및 초고압처리의 단행 또는 병행처리한 유효성분 함량 극대화된 산양삼 소재 개발 기술, 효소 및 미생물 생물전환을 통한 유효성분 함량 극대화된 산양삼 소재 개발 기술 및 산양삼 표준화 소재 및 제품의 비만유래 만성대사질환 조절 평가 기술 개발을 완료하였으며, 이를 기반으로한 제품화 두건을 진행하였음.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 일부 성과지표들의 완료가 늦어져 평가 후 자료를 입력하게 되었음. 특히 특허 등록과 SCI 논문 1편 및 비SCI 논문 1편의 목표 달성을 2020년에 마무리 지을 계획임.

4. 연구결과의 활용 계획 등

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.1억원	
			향후 3년간 매출	150억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.01 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 12 % 국외 : 1 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	0.5		
	소요예산(백만원)	0.05		
	예상 매출규모	현재까지	3년후	5년후

	(억원)		0.1	150	300
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.01	12	20
	국외	0	1	1.5	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		과립 형태 이외 제품 개발 예정		
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)				
	수출				

○ 사업화전략

: 제품홍보, 판로확보, 판매전략 등의 사업화 추진전략
가. 주관((주)네추럴웨이)

구분	구체적인 내용																																												
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : 과립 ○ 수요처 : 홈쇼핑, 주요 백화점 및 대형마트, 온라인 쇼핑몰 ○ 예상 단가 : 120,000원 ○ 개발 투입인력 및 기간 : 개발 투입인력 5명, 기간 6개월 																																												
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자체 공장을 통한 제품생산 및 품질관리 ○ 분말의 수용성, 유동성, 균질도 등을 최적화시키는 과립제조와 미세분말 및 펠렛(Seed)의 분말표면코팅 기술력 확보 ○ 중량, 체적 등 기준규격을 세밀하게 생산 ○ 롤러코팅식 자동 제한기를 이용하여 경질소환, 대환 등이 생산 가능 ○ 이중캡충진기, 스틱포장기, PTP포장기, 사면포장기, 삼면포장기, 이열포장기, 로타리파우치포장기 확보 																																												
상용화 계획 및 일정	<p>○ 마케팅 전략 수립 : 2019년 1/4분기</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">목적</th> <th>Phase I</th> <th>Phase II</th> <th>Phase III</th> <th>Phase IV</th> </tr> <tr> <th>Diagnosis</th> <th>Research</th> <th>Hit Idea & Concept Creation</th> <th>Concept Evolution</th> <th>STP Strategy</th> <th>Launching Strategy</th> <th>Coaching & Advisory</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Market</td> <td colspan="2">"Market Chance Extraction" 사업 시장 기회 도출</td> <td colspan="2">"Hit Concept Development" 혁신적인 아이디어 및 concept 도출</td> <td colspan="2">"STP 4P Mix & Launching" 차별적 Positioning과 성공적 4P Mix 도출시키고 효과적인 런칭전략</td> <td>내부 실행력 강화 등합대 달성</td> </tr> <tr> <td>개발</td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • Triangle Work Shop™ • Pest Analysis • SMC.C Model™ • Chance Recheck™ </td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • Seri-Colg™ • E2 balance™ • Value Transfer™ • USP Logic Trip™ • Concept Evaluation Process™ </td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • 2 Way Segmentation • Target Finette™ • Positioning Cascading™ • UPP 13way™ • MSP™, S-Big Picture • IMC™, TTL Communication </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> • Coaching & Advisory • Education </td> </tr> <tr> <td>조사</td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • U&A조사 (On-line) • 전문가 Depth Interview (Delphi) </td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • 1차 Test : 장성조사 FGD • 2차 Test : Concept & Product Test (HUT) </td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • Survey Data Analysis </td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>실행</td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • Internal Interview - Project Needs 성취 • Data Research - 2차 자료 조사 시장사업 구조 분석 • 사업 전략 리뷰 - 내부 전략의 후안점 - 기존 전략에 대한 평가 • Quick & Core FGD • Triangle Work Shop </td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • Hit Idea 개발 - SerI Profiling - Key Hit Point 도출 및 적용 - COIG 아이디어 개발 - Idea Screening • Hit Concept 개발 - Mega Hit concept 개발 - Main Benefit Creation 개발 - USP 도출 - Ingredient Branding 개발 • Concept 검증 및 비교회 - 조사설계 및 조사 진행 - 조사분석 </td> <td colspan="2"> <ul style="list-style-type: none"> • STP 전략 수립 - 신규 브랜드 concept 고객반응조사 결과를 통해 최적의 STP 도출 차별화가 가능한 positioning 수립 - 전용 시장 수요예측 • 4P MIX Guideline - 성공적인 시장 진입을 위한 최적의 4P Mix 조합 도출 - 제품 이미지 전략, 가격 전략, 유통 전략, 커뮤니케이션 전략 수립 - 소비자조사 결과를 바탕으로 가격 설정 • 런칭 전략 및 실행 프로그램 설계 • BTL Communication 전략 설계 </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> • 전략실행 관련 자문 - DNP Partner Networking </td> </tr> </tbody> </table> <p><사업화 4P 전략></p>	목적	Phase I	Phase II	Phase III	Phase IV	Diagnosis	Research	Hit Idea & Concept Creation	Concept Evolution	STP Strategy	Launching Strategy	Coaching & Advisory	Market	"Market Chance Extraction" 사업 시장 기회 도출		"Hit Concept Development" 혁신적인 아이디어 및 concept 도출		"STP 4P Mix & Launching" 차별적 Positioning과 성공적 4P Mix 도출시키고 효과적인 런칭전략		내부 실행력 강화 등합대 달성	개발	<ul style="list-style-type: none"> • Triangle Work Shop™ • Pest Analysis • SMC.C Model™ • Chance Recheck™ 		<ul style="list-style-type: none"> • Seri-Colg™ • E2 balance™ • Value Transfer™ • USP Logic Trip™ • Concept Evaluation Process™ 		<ul style="list-style-type: none"> • 2 Way Segmentation • Target Finette™ • Positioning Cascading™ • UPP 13way™ • MSP™, S-Big Picture • IMC™, TTL Communication 		<ul style="list-style-type: none"> • Coaching & Advisory • Education 	조사	<ul style="list-style-type: none"> • U&A조사 (On-line) • 전문가 Depth Interview (Delphi) 		<ul style="list-style-type: none"> • 1차 Test : 장성조사 FGD • 2차 Test : Concept & Product Test (HUT) 		<ul style="list-style-type: none"> • Survey Data Analysis 		-	실행	<ul style="list-style-type: none"> • Internal Interview - Project Needs 성취 • Data Research - 2차 자료 조사 시장사업 구조 분석 • 사업 전략 리뷰 - 내부 전략의 후안점 - 기존 전략에 대한 평가 • Quick & Core FGD • Triangle Work Shop 		<ul style="list-style-type: none"> • Hit Idea 개발 - SerI Profiling - Key Hit Point 도출 및 적용 - COIG 아이디어 개발 - Idea Screening • Hit Concept 개발 - Mega Hit concept 개발 - Main Benefit Creation 개발 - USP 도출 - Ingredient Branding 개발 • Concept 검증 및 비교회 - 조사설계 및 조사 진행 - 조사분석 		<ul style="list-style-type: none"> • STP 전략 수립 - 신규 브랜드 concept 고객반응조사 결과를 통해 최적의 STP 도출 차별화가 가능한 positioning 수립 - 전용 시장 수요예측 • 4P MIX Guideline - 성공적인 시장 진입을 위한 최적의 4P Mix 조합 도출 - 제품 이미지 전략, 가격 전략, 유통 전략, 커뮤니케이션 전략 수립 - 소비자조사 결과를 바탕으로 가격 설정 • 런칭 전략 및 실행 프로그램 설계 • BTL Communication 전략 설계 		<ul style="list-style-type: none"> • 전략실행 관련 자문 - DNP Partner Networking
목적	Phase I		Phase II	Phase III	Phase IV																																								
	Diagnosis	Research	Hit Idea & Concept Creation	Concept Evolution	STP Strategy	Launching Strategy	Coaching & Advisory																																						
Market	"Market Chance Extraction" 사업 시장 기회 도출		"Hit Concept Development" 혁신적인 아이디어 및 concept 도출		"STP 4P Mix & Launching" 차별적 Positioning과 성공적 4P Mix 도출시키고 효과적인 런칭전략		내부 실행력 강화 등합대 달성																																						
개발	<ul style="list-style-type: none"> • Triangle Work Shop™ • Pest Analysis • SMC.C Model™ • Chance Recheck™ 		<ul style="list-style-type: none"> • Seri-Colg™ • E2 balance™ • Value Transfer™ • USP Logic Trip™ • Concept Evaluation Process™ 		<ul style="list-style-type: none"> • 2 Way Segmentation • Target Finette™ • Positioning Cascading™ • UPP 13way™ • MSP™, S-Big Picture • IMC™, TTL Communication 		<ul style="list-style-type: none"> • Coaching & Advisory • Education 																																						
조사	<ul style="list-style-type: none"> • U&A조사 (On-line) • 전문가 Depth Interview (Delphi) 		<ul style="list-style-type: none"> • 1차 Test : 장성조사 FGD • 2차 Test : Concept & Product Test (HUT) 		<ul style="list-style-type: none"> • Survey Data Analysis 		-																																						
실행	<ul style="list-style-type: none"> • Internal Interview - Project Needs 성취 • Data Research - 2차 자료 조사 시장사업 구조 분석 • 사업 전략 리뷰 - 내부 전략의 후안점 - 기존 전략에 대한 평가 • Quick & Core FGD • Triangle Work Shop 		<ul style="list-style-type: none"> • Hit Idea 개발 - SerI Profiling - Key Hit Point 도출 및 적용 - COIG 아이디어 개발 - Idea Screening • Hit Concept 개발 - Mega Hit concept 개발 - Main Benefit Creation 개발 - USP 도출 - Ingredient Branding 개발 • Concept 검증 및 비교회 - 조사설계 및 조사 진행 - 조사분석 		<ul style="list-style-type: none"> • STP 전략 수립 - 신규 브랜드 concept 고객반응조사 결과를 통해 최적의 STP 도출 차별화가 가능한 positioning 수립 - 전용 시장 수요예측 • 4P MIX Guideline - 성공적인 시장 진입을 위한 최적의 4P Mix 조합 도출 - 제품 이미지 전략, 가격 전략, 유통 전략, 커뮤니케이션 전략 수립 - 소비자조사 결과를 바탕으로 가격 설정 • 런칭 전략 및 실행 프로그램 설계 • BTL Communication 전략 설계 		<ul style="list-style-type: none"> • 전략실행 관련 자문 - DNP Partner Networking 																																						

- product : 과립을 이용한 산양삼차 등의 제품으로 포지셔닝하여 경쟁력 세울 계획
- price : 시장경쟁력을 위해서 타 산삼, 인삼 제품과 비교하여 적절하고, 소비자 입장에서 합당한 선으로 가격 결정할 계획
- place : 최근 트렌드에 맞게 온·오프라인 전반에 걸친 유통전략 필요. 특히 홈쇼핑과 동시에 제품 론칭을 기획하여 매출에 대한 기대효과 바라볼 계획
- promotion : 현재 계획은 없으나, 인지도 향상을 위해서 명절에만 프로모션 계획 중

<사업화 전략을 위한 MKT 일정 Process>

① 시장 분석 및 기회도출

- 내부 전략가설 공유 및 Key Man Interview
- 국내외 관련시장 트렌드 분석, 2차 자료 분석
- U&A 조사 (On Line Survey)
- 국내시장 주요 경쟁자 분석/자사분석
- 해외시장 주요 브랜드 벤치마킹
- 네추럴웨이 시장 기회 도출

② 혁신 아이디어 및 컨셉 도출

2-1) Product Hit Idea

- Key Hit Point 도출
- 상품화 아이디어 개발
- 아이디어 스크리닝

2-2) Hit Concept

- Hit Concept 개발
- Main Benefit 도출
- USP 도출

2-3) 검증 및 정교화

- 가설 컨셉 검증 (FGD : Focus Group Discussion)
- 컨셉 수정 및 정교화 : Winning Concept 설정

③ 브랜드 개발

- 브랜드 Identity 설계
- Brand Textbook
- 신규 브랜드 네임 & 디자인 개발

④ STP 전략

- Sales Communication Target 규정
- Positioning 목표 설정

⑤ 상품화

5-1) 내용물 개발

- 제형 및 응용방법 결정 확정

5-2) 용기개발

- 용기& 그래픽 디자인 개발
- 용기 업체 선정 / 생산 Feedback
- 초도 생산 및 입고
- Concept& Product Test(HUT 조사 : Home Using Test)

⑥ 런칭

- 가격 전략
- 유통 전략
- 런칭/ IMC 전략 수립
- MD / In-store Promotion / 판촉물 기획 및 준비
- 런칭 프로그램 실행

⑦ 출시 후 관리

- 런칭 후 Brand Tracking
- 국제 박람회 참석
- 2차 상품화 준비 및 해외진출 준비

<Sales & Public Relations 전략>

① 인터넷 쇼핑몰 구축

- 네추럴웨이 홈페이지 카테고리 및 구성 요소 변경
- 컨셉에 맞는 쇼핑몰 디자인 및 Tone&Manner 변경
- 별도의 온라인 홈페이지 구축 및 현재 홈페이지에 카테고리 개설
- 온라인 상의 이벤트를 위한 마이크로 사이트 제작

② TV 홈쇼핑 광고

- 벤더사와의 전략적 제휴를 통한 홈쇼핑 채널을 탐색
- 제품을 효과적으로 알리기 위한 최적의 컨셉을 설정
- 제품을 효과적으로 전달할 수 있는 출연진 섭외
- 홈쇼핑 채널을 통한 런칭 및 광고

③ 소셜미디어 및 검색엔진 최적화

- 파워블로거 및 온라인 상의 영향력 있는 유저 섭외
- 제품에 대한 특성이나 소개글들을 블로그에 포스팅하여 포털사이트에 노출
- 제품과 연관되는 연관검색어를 별도로 설정하여 이슈화

	<ul style="list-style-type: none"> - 제품에 대한 블로그 및 페이스북 운영하여 소통의 극대화 <p>④ 오프라인 프로모션</p> <ul style="list-style-type: none"> - 내부인력과 외주업체가 아이디어 협의하여 프로모션 방향 설정 - 도출된 아이디어를 통한 구체적인 세트 제작 및 프로모션 진행
--	---

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.