

발간등록번호

11-1541000-001068-01

보안과제(), 일반과제() 과제번호 109159-2

흑삼의 두뇌활성화 기능탐색과 상품화

(Study on the brain activating function of
black ginseng and commercialization)

충남대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “흑삼의 두뇌활성화 기능탐색과 상품화”에 관한 연구과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 성 창 근

연 구 원 : 이 미 라

연 구 원 : 왕 쥬

연 구 원 : 유 퇴

연 구 원 : 장 동 량

협동연구기관명 : (주)대덕바이오

협동연구책임자 : 모 은 경

요 약 문

I. 제 목

흑삼의 두뇌활성화 기능탐색과 상품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 최종 목적은 고려인삼을 가공처리하여 ginsenoside Rg₃ 성분이 강화된 흑삼의 제조공정을 표준화하고, 흑삼의 뇌기능 개선에 대한 약리학적 효능과 뇌질환 보호기전을 과학적으로 규명하고, 뇌기능 활성 건강기능식품을 개발·상품화하는 데 있다.

최근 국민생활 수준의 향상과 더불어 의학기술의 발달에 따른 노인인구의 증가로 인구의 고령화 현상이 두드러지게 나타나고 있으며, 치매를 비롯한 많은 퇴행성 질환들이 커다란 의료 및 사회적 문제로 대두되고 있다. 치매 치료제 개발을 위한 연구는 식품 성분이나 천연 생약을 중심으로 많은 연구가 진행되고 있지만, 현재까지 치매를 근본적으로 치료할 수 있는 약물은 개발되어있지 않은 실정이다.

인삼의 소비는 Well-being, LOHAS와 같은 현재 트렌드에 맞춰 인삼의 효능이 계속적으로 확인됨에 따라 시장규모는 점점 더 성장할 것으로 예상된다. 따라서 효능을 기초로 한 안전성 있는 건강 기능성식품 개발에 대한 소비자들의 요구가 증가되고 있다. 최근 인삼가공법이 발전하여 백삼이나 홍삼 중 일부 ginsenoside를 구조 전환하는 가공기술이 개발되어 특정 ginsenoside를 강화시킨 제품개발에 관심이 주목되고 있다.

본 연구는 산과 열처리 방법을 병행하여 ginsenoside Rg₃를 고농도로 함유하는 기능성 소재를 개발하고, ginsenoside Rg₃ 함량을 극대화한 흑삼의 신규 기능성인 뇌기능 개선기전을 과학적으로 규명하고자 한다. 또한 이를 이용한 건강기능성 제품을 개발하여 국민 보건향상과 고려인삼의 세계적 브랜드 이미지 구축 및 고부가가치사업 창출로 국·내외 인삼 산업의 경쟁력을 확고히 하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제인 “흑삼의 두뇌활성화 기능탐색과 상품화” 연구는 ginsenoside Rg₃ 함량을 극대화시킨 인삼 가공품인 흑삼의 표준제조공정을 확립하고, 흑삼의 신규 기능성인 뇌기능 개선 효과를 규명하기 위하여 다음과 같이 연구개발 내용을 구성하였다.

- (1) 세부과제(주관기관) : 흑삼의 뇌기능 개선 효과탐색

- ① 흑삼의 항산화능 및 AChE 억제 효과 탐색
- ② Scopolamine 유도 치매동물모델의 학습 및 기억력 개선효과 탐색
- ③ 노화 흰쥐의 뇌기능개선에 미치는 효과 탐색
- ④ 흑삼의 독성안전성 검정

(2) 협동과제 : 기능성 ginsenoside Rg₃ 성분을 강화한 흑삼의 표준제조법 확립

- ① 흑삼제조기술 개발 및 표준화 공정 확립
- ② HPLC를 이용한 ginsenosides의 분석조건 확립
- ③ 흑삼의 잔류농약 검사
- ④ 두뇌활동개선을 위한 건강기능식품 개발 및 상품화

IV. 연구개발결과

본 연구 과제를 성공적으로 수행하여 다음과 같은 주요 연구기술 및 제품을 개발하였다.

① 흑삼의 표준화 제조공정 확립

기존의 흑삼 제조방법은 구증구포 방식으로 제조시간이 오래 걸리고, 잘못 증숙하게 되면 인삼이 탄화되어 발암물질인 벤조피렌 성분이 생성되는 문제점들이 발생하였다. 본 연구는 인삼 성분의 물리·화학적 전환원리를 과학적으로 적용하여 제조시간을 단축시키고, 유효 지표사포닌인 ginsenoside Rg₃ 함량을 극대화한 흑삼을 다량 제조할 수 있는 방법을 개발하여 특허등록을 완료하였다.

② Ginsenoside Rg₃ 최적분석 조건 확립

HPLC를 이용한 흑삼의 유효 지표사포닌인 ginsenoside Rg₃ 성분 분석법을 확립하여 표준화된 검사방법으로 제조 흑삼의 품질을 향상시킬 수 있다.

③ 흑삼의 항산화 활성 및 Cholinesterse 억제활성 탐색

- 백삼, 홍삼과 비교하였을 때, 흑삼은 DPPH 라디칼 소거능 활성, 페놀함량, SOD-유사활성이 유의적으로 높은 활성을 보였다.
- Acetylcholinesterase (AChE)와 butyrylcholinesterase (BuChE) 억제활성이 백삼, 홍삼보다 높게 나타났다.

④ 흑삼의 단회독성 안전성 평가

흑삼 추출물을 5, 10, 15 g/kg 용량으로 단회 경구독성 실험을 실시한 결과, 어떠한 임상적인 독성증상도 나타나지 않았다.

⑤ 흑삼의 뇌기능 개선 효과 탐색

- 치매유발 물질인 scopolamine투여 흰쥐의 기억개선 효과
Scopolamine 복강투여 후 실시한 행동실험 즉, passive avoidance test, Y-maze test, Morris water maze test 결과, 흑삼 추출물을 포함한 인삼 투여군에서 정상적으로 기억력이 회복되는 효과를 나타냈다.
- Cholinergic biomarker 효소 활성 및 발현량 비교
흑삼추출물은 scopolamine투여로 증가된 뇌조직의 AChE 활성을 감소시킬 뿐 아니라, acetylcholine 합성 효소인 ChAT의 활성을 증가시켰다. Western blot 결과에서도 인삼 추출물 투여시 ChAT의 발현량이 현저히 증가되었다.
- 흑삼은 뇌조직 항산화 효소 활성을 증가시켜 stress에 대한 뇌보호 효과가 뛰어났다.

⑥ 노화 흰쥐의 뇌기능 개선에 미치는 효과

- 뇌기능 관련 인자의 활성 및 단백질 발현량 증가
노화 흰쥐에 흑삼 추출물을 4개월간 섭취하였을 때, cholinergic marker의 효소활성뿐 아니라, synaptic marker인 GAP-43, SNAP-25, NGF의 단백질 발현이 유의적으로 증가하였다.
- D-galactose로 유발한 노화 흰쥐의 기억력 개선
D-galactose의 피하주사로 노화를 유발한 실험에서 흑삼을 비롯한 백삼, 홍삼 추출물은 뇌조직의 항산화 활성을 증가시키고, cholinergic marker 효소의 활성조절과 GAP-43 및 SNAP-25의 발현을 증가시켜 신경전달물질의 이용을 촉진하여 기억력 개선 효과가 있음을 보여주었다.

⑦ 흑삼을 이용한 건강기능 식품 개발

흑삼을 이용한 건강기능성 제품으로 파우치, 절편, 엑기스 제품을 개발하여 상품화하였다.

⑧ 두뇌 활성화 제품을 위한 상표출원

본 연구 결과를 바탕으로 흑삼의 뇌기능 개선효과를 부각시킬 제품 생산을 위해 2개의 상표를 출원하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구에서 개발한 흑삼제조 공정은 제조시간을 단축시키고, 안전한 방법으로 다량의 흑삼을 제조할 수 있는 방법으로, 인삼시장이 홍삼류 제품에 제한을 받고 있어 산업 확장에는 다소 어려움이 있지만, 소규모 인삼농가의 수익성 확보를 위해 지자체나 관련 기관을 통한 기술소개를 통해 인삼시장에서 경쟁력 있는 새로운 블루오션을 창출할 수 있는 사업으로 사료된다.
- 흑삼의 지표 유효 사포닌인 ginsenoside Rg₃ 분석을 위한 표준화된 검사방법을 확립함으로써 제조 흑삼의 품질을 향상시킬 수 있고, 소비자들에게 신뢰를 줄 수 있는 제품을 생산할 수 있다.
- 본 연구에서 규명한 흑삼의 신규 기능성인 뇌기능 개선 및 치매예방효과에 대한 과학적 자료를 바탕으로, 흑삼을 단순한 건강보양식으로 제한하지 않고, 연령층과 특정효능을 타겟으로 삼는 건강기능식품 개발의 주류를 따라 특정 성분인 ginsenoside Rg₃ 성분을 강화한 제품과 특정 효능-뇌기능 개선 효과를 위한 제품 개발을 시도할 계획이다.
- 본 연구가 종료되는 되는 대로, 흑삼의 뇌기능 개선효과에 대한 논문을 해외 저명학술지 (SCI) 에 투고함으로써 가공인삼인 흑삼에 대한 구체적이고 체계적인 연구기반의 틀을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.
- 본 연구결과를 바탕으로하여, 아직까지 규명되지 않은 흑삼의 기능성을 다양한 연구를 통하여 규명함으로써, 새로운 시장진입을 위한 과학적 근거자료를 준비해야 할 것으로 사료된다.

SUMMARY

This study was conducted to develop a new method for enhancing ginsenoside Rg₃, which is abundant in black ginseng (BG) and to evaluate memory enhancing effect of processed BG using amnesic and ageing animals.

BG was prepared according to the traditional manufacturing method: “九蒸九曝”. Ginsenoside Rg₃ was not detected in white ginseng (WG) and its content in S9WG, 6.44 mg/g, was about 53.7, 11.9, 5.0 times higher than that in 2-, 3-, 6-time repeatedly steamed ginsengs, respectively. However, the current method for preparing BG has several disadvantages such as long-term consuming production, limit to mass production, etc, which lead to the high price and poor acceptance. In order to make BG more popular and more accessible, several variables including steaming temperature, time, steaming number, etc. that affect the quality of BG were investigated. As a result, a process was developed for preparing a novel BG (6.56 mg/g). Moreover, the PAHs contamination was not detected by GC-MS in the finished BG products.

BG was also found to be fairly nontoxic when oral acute toxicity was examined in rats. However, a chronic toxicity study is needed to further support the safe use of BG.

Subsequently, it was conducted to compare antioxidant activity and effect of cholinesterases inhibition for WG, red ginseng (RG), and BG extract. RG and BG showed high inhibitory activity to both cholinesterases, such as AChE and BChE. BG exhibited the highest total phenolic content followed by WG, RG. BG showed significantly stronger activity than WG and RG on DPPH radical scavenging. BG also had the greatest XO inhibitory effect, followed by the RG, WG.

It was investigated whether administration of Korean WG, RG, and BG extracts (200 mg/kg, p.o., respectively) could protect against SCOP-induced memory impairment (2 mg/i.p.). WG, RG, and BG significantly reversed SCOP-induced memory impairment in the passive avoidance test and also reduced escape latency in training trials of the Morris water maze test. The increased AChE activity produced by SCOP was significantly inhibited by WG and RG. RG and BG significantly increased ChAT activity. SCOP administration increased oxidative damage in the brain. Treatment of amnesic mice with ginseng extracts decreased MDA levels and restored SOD and CAT activity to control levels. Treatment with WG, RG, and BG showed not only significant decrease of AChE protein expression, but also increase of ChAT protein expression in the cerebral cortex and

the hippocampus of amnesic mice induced by SCOP.

It was undertaken to investigate whether long-term high (3%) and low dose (1%) of WGE, RGE and BGE diets consumption for 8 months in middle-aged mice would alter serum cholesterol levels. Especially, the 3% BG diet group showed significantly increased levels of HDL-cholesterol by 30.9% compared to the control group. ChAT activity was significantly increased to 20% in the 3% BG diet group compared with the control group. Western blot analysis revealed a significant increase of cholinergic marker (ChAT and VAcHT) and synaptic marker (GAP-43 and SANP-25) and NGF protein in the 3% ginseng extract diet group compared with the control group.

This study evaluated to check whether long-term treatment with RG and BG extracts (200 mg/kg, p.o.) would result in the prevention of the memory impairment in aged mice. Ageing induces DNA damage, but RG and BG may protect DNA from damage or allow recovery of DNA in mice lymphocyte. Western blot analysis showed that the AChE, ChAT, and VAcHT protein expression in the hippocampus of the RG and BG-treated mice were significantly increased as compared with the aged control mice. Significant increase in synaptic marker (GAP-43, SNAP-25) and neurotrophic factor (NGF, BDNF) protein levels were showed in the RG and BG treated group by comparison to the control group.

Ginseng extracts markedly reversed the D-galactose induced learning and memory impairment by behavioral test in Morris water maze. In order to seek the genes responsible for learning and memory, 12,060 genes were investigated in the rat hippocampus of all groups using cDNA microarray techniques. Among these genes, 276 genes were at least two-fold different compared D-galactose group to other ginseng groups and 324 genes were related to neuronal activities. The effect of ginseng extracts on improvement of cognitive deficit were related to its ability to inhibit the biochemical changes in the brain of D-galactose treated rats. Ginsengs restored SOD, catalase, GPx, Na⁺-K⁺ ATPase, ChAT activities, but decreased MAO-B, AChE activities and MDA levels in brain of D-galactose treated groups.

These results suggest that the processed BG may be useful for the cognitive improvement via regulation of the cholinergic marker, synaptic proteins and neurotrophic factors and the antioxidant defense system.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
1. Necessity	15
2. Objectives	18
Chapter 2. International·Domestic trends	19
1. The Trends of Overseas research	19
2. Current status of domestic research	19
3. Examples of Improving memory foods	20
Chapter 3. Research contents and Results	21
1. Research Methods	21
2. Results and discussion	32
Chapter 4. Achievement degree of objective and contribution	117
Chapter 5. Application	120
Chapter 6. Collected scientific and technical informations from overseas	122
Chapter 7. References	126

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 1절 연구개발의 필요성	15
1. 기술적 측면	15
2. 경제·산업적 측면	15
3. 사회·문화적 측면	16
가. 실버건강제품의 필요성	16
나. 건강 및 기능성 식품에 대한 관심의 증가	17
제 2절 연구개발의 목적	18
1. 연구의 목적 및 범위	18
가. 연구의 목적	18
나. 연구의 범위	18
제 2 장 국내외 기술개발 현황	19
제 1절 국내외 연구개발 현황	19
1. 국외의 연구개발 현황	19
2. 국내의 연구개발 현황	19
3. 국내·외 「기억능력 향상」 표기 건강기능식품의 예	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
제 1 절 연구수행방법	21
1. 구중구포 흑삼 제조와 HPLC 분석조건 확립	21
가. 구중구포 흑삼의 제조	21
나. 인삼 사포닌 분석	21
2. 새로운 흑삼제조 기술 탐색	21
가. 과일 유기산 침지방법을 이용한 흑삼의 제조	21
나. 추출 조건에 따른 사포닌 함량 비교	21
다. 증숙온도 및 증숙시간에 따른 흑삼의 사포닌 함량 변화	21
라. 염기 용액 침지법을 이용한 흑삼의 제조	22
마. 제조흑삼의 PHAs 안전성 평가	22
3. 흑삼의 항산화 및 Cholinesterase 억제활성 탐색	22

가. 흑삼의 제조	22
나. 흑삼 엑기스 제조	22
다. 흑삼 엑기스의 항산화 활성	22
(1) DPPH 라디칼 소거 활성	22
(2) SOD 유사 활성	23
(3) 폴리페놀 함량	23
라. Cholinesterase 억제 활성	23
4. 화기삼, 전칠삼을 이용한 흑삼 제조	24
가. 흑삼제조	24
나. 화기흑삼, 전칠흑삼, 고려흑삼의 사포닌측정, 항산화 및 Cholinesterase 억제활성	24
5. 단회투여에 의한 AChE의 억제 효과	24
가. 실험동물	24
나. 뇌조직의 AChE 활성 측정	24
6. 흑삼의 독성 안전성 평가	24
가. 실험 동물 및 처치	24
나. Hematological, biochemical analyses	25
다. 뇨 검사	25
라. 간, 신장의 조직검사	25
7. Scopolamine에 의한 치매 동물모델에 대한 흑삼의 기억력 개선 효과	25
가. 인삼추출물 제조	25
나. Scopolamine을 이용한 치매 동물 유발	25
다. 수동회피실험-Passive avoidance test	26
라. 수중미로 실험-Morris water maze	26
마. Y-미로 실험	27
바. 뇌조직의 AChE, ChAT, 및 항산화 효소활성	27
사. 뇌조직의 Cholinergic marker 단백질의 발현	27
8. 인삼 추출물의 장기 섭취가 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과	28
가. 실험 동물	28
나. 혈청 분석	28
다. 뇌조직의 AChE, ChAT, 및 항산화 효소활성	28
라. 뇌조직의 Cholinergic marker, Synaptic plasticity, Nerve growth factor	

단백질의 발현	28
9. 노화 흰쥐의 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과 탐색	28
가. 실험 동물	28
나. 뇌조직의 AChE, ChAT, 및 항산화 효소활성	28
다. 뇌조직의 Cholinergic marker, Synaptic plasticity, Nerve growth factor 단백질의 발현	29
10. D-galactose로 손상된 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과	29
가. 실험 동물	29
나. 수중 미로 실험	29
다. 혈청과 뇌적출	29
라. RNA 추출과 Microarray analysis	29
마. Real time-PCR를 통한 synaptic plasticity 활성	29
바. 뇌조직의 효소 활성 및 지질 과산화물 함량	30
11. 뇌신경세포 생성과 기억력 개선에 미치는 Ginsenoside Rb ₁ 의 효과	30
가. Ginsenoside Rb ₁ 투여	30
나. Morris water maze test	30
다. BrdU protocol	30
라. 면역조직화학법	30
마. BrdU positive cell 정량	30
12. 통계처리	31
제 2 절 연구 수행 결과	32
1. 인삼의 뇌기능 개선 관련자료 수집 및 분석	32
가. 주요 사포닌의 화학적 구조	32
나. 주요 인삼 사포닌의 약리학적 기능과 기전	34
다. Ginseng polysaccharides의 약리학적 기능	37
라. 사포닌 전환 원리	37
마. Ginsenoside biotransformation에 사용되는 미생물과 대사물	39
2. 구중구포 방법에 의한 흑삼 제조 및 HPLC 사포닌 분석조건 확립	41
가. 흑삼제조	41
나. Ginsenoside Rg ₃ 분석을 위한 HPLC 분석 조건 확립	41
(1) TLC 분석을 통한 사포닌 패턴 비교	41

① 인삼 추출물 제조	41
② TLC 분석	42
③ TLC 전개용매	42
(2) Ginsenoside Rg ₃ 의 최적 분석 조건 확립	43
다. 증숙 횟수에 따른 사포닌 함량 변화	47
라. 증숙횟수에 따른 ginsenoside Rg ₃ 함량의 변화	50
3. 새로운 흑삼제조 기술 탐색	50
가. 과일 유기산 침지방법을 이용한 흑삼의 제조	50
(1) 흑삼제조	50
(2) 과일주스 침지에 따른 흑삼의 사포닌 함량 변화	50
(3) 과일주스 침지에 따른 흑삼의 ginsenoside Rg ₃ 함량 비교	53
나. 포도주스 침지를 이용한 흑삼 제조의 최적 조건 탐색	53
(1) 최적온도 조건 탐색	53
(2) 증숙온도 120℃에서의 최적의 증숙시간 탐색	56
(3) 증숙 횟수에 따른 흑삼제조 (120℃, 60 min)	59
다. 염기용액에 침지하여 제조한 흑삼 (121℃, 15 min)	61
(1) NaHCO ₃ 용액을 이용한 흑삼 제조	61
(2) 포도주스와 0.4% Citric acid에 침지 후 흑삼 제조	62
라. 제조 흑삼의 잔류농약 안전성 평가	63
3. 흑삼 추출물의 항산화 및 Cholinesterase 억제 효과 탐색	64
가. 백삼, 홍삼, 흑삼의 사포닌 변화	64
나. 흑삼 추출물의 항산화 활성	66
(1) 총 페놀 함량	66
(2) DPPH 라디칼 소거능과 Xanthine oxidase (XO) 억제활성	66
다. 흑삼 추출물의 Cholinesterase 억제활성	67
4. 화기삼, 전칠삼을 이용한 흑삼제조	68
가. 흑삼제조	68
나. 각 국 인삼 (백삼)의 사포닌 분석	68
다. 각 국 흑삼의 사포닌 분석	70
라. 각 국 인삼 (백삼, 흑삼)의 항산화 활성 비교	72
(1) 총 폴리페놀 함량	72
(2) DPPH 라디칼 소거활성	72

(3) Xanthine oxidase 억제활성	72
마. 각 국 인삼의 Cholinesterase 억제활성비교	74
(1) AChE 억제활성	74
(2) BuChE 억제활성	74
바. 흑삼 추출물의 단회 투여에 의한 뇌조직의 AChE 억제 효과	76
5. 흑삼의 급성 독성 안전성 평가	76
가. 실험동물의 체중 및 장기무게	76
나. 혈액학적 분석	78
다. 혈청학적 분석	79
라. 뇨 검사	80
마. 조직학적 분석	80
6. Scopolamine에 의한 치매 동물모델에 대한 흑삼의 기억력 개선 효과	81
가. 시료 인삼 추출물의 사포닌 함량	81
나. Passive avoidane test -흑삼추출물의 용량별 효과 탐색	82
다. 인삼추출물의 Passive avoidance test 효과	82
라. Morris water maze 실험	84
마. Y-maze 실험	85
바. 뇌조직의 acetylcholinesterase, choline acetylcholinesterase 활성	86
사. 뇌조직의 항산화 활성	87
아. Cholinergic marker 발현에 미치는 흑삼의 효과; Western blot	88
자. Cholinergic marker 발현에 미치는 흑삼의 효과; RT-PCR	89
7. 인삼 추출물의 장기 섭취가 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과 탐색	90
가. 체중 및 장기 무게	90
나. 혈청학적 분석 결과	91
다. 뇌조직의 acetylcholinesterase, choline acetyltransferase 활성	92
라. 뇌조직의 항산화 효소 활성에 미치는 효과	93
마. Cholinergic marker protein 발현에 미치는 효과	94
바. GAP-43, SNAP-25, NGF 발현에 미치는 효과	95
8. 노화 흰쥐의 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과 탐색	96
가. 수동회피실험	96
나. Comet assay를 통한 혈액 lymphocyte의 DNA damage	96
다. Cholinergic protein 발현에 미치는 효과	97

(1) AChE, ChAT 효소 활성화	97
(2) Cholinergic protein-AChE, ChAT, VChT 단백질 발현 효과	98
9. D-galactose로 유발한 노화 흰쥐의 뇌기능에 미치는 흑삼의 효과	100
가. Morris water maze test	100
나. 뇌조직의 항산화 효소 활성화	100
(1) 뇌조직의 지질과산화물 형성	100
(2) 항산화 효소 활성화	100
(3) Na ⁺ -K ⁺ -ATPase activity	100
다. 뇌조직의 cholinergic enzyme 및 MAO-B 활성화	103
라. Real-time PCR를 통한 GAP-43, SNAP-25의 발현 비교	104
마. Microarray 분석결과	105
10. 뇌신경세포 생성과 기억력 개선에 미치는 Ginsegnoside Rb ₁ 의 효과	113
가. Morris water maze test	113
나. 해마조직에서 세포증식에 미치는 Rb ₁ 의 효과	114
11. 흑삼을 이용한 건강기능 식품 개발	115
가. 흑삼제품 개발	115
나. 파우치 제품의 사포닌 분석	115
다. 저장 기간 중 파우치 제품의 세균수 측정	116
라. 제품의 관능평가	116
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	117
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	120
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	122
제 7 장 참고문헌	126

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

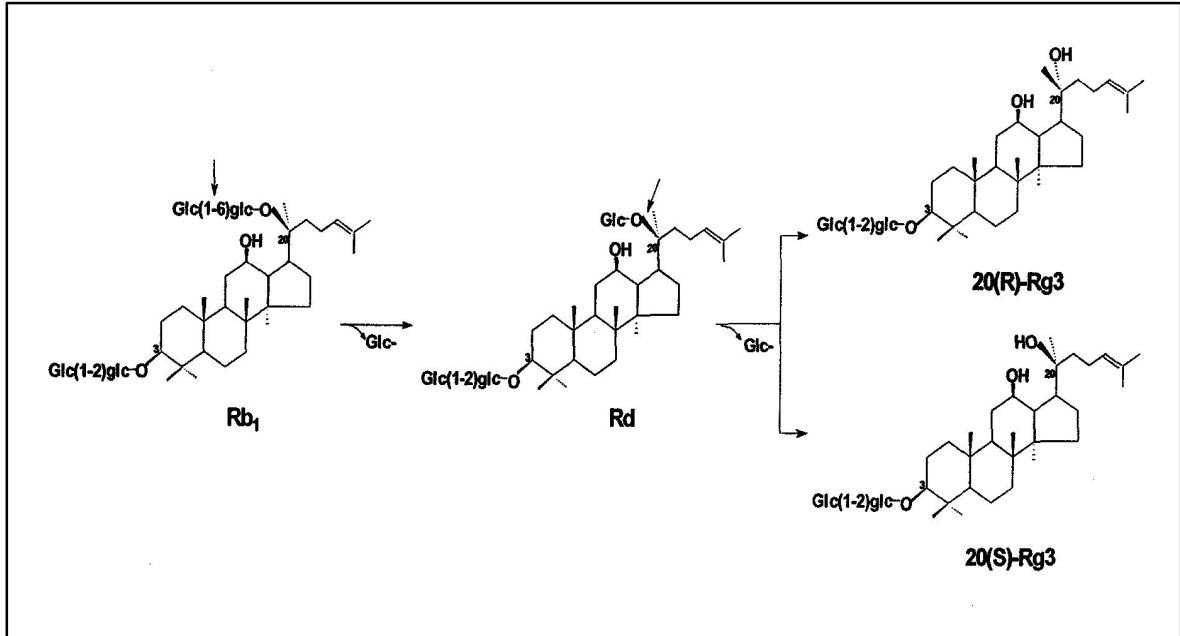
- 최근 국민생활 수준의 향상과 더불어 의학기술의 발달에 의한 노인인구의 증가로 인구의 고령화 현상이 두드러지게 나타나고 있다. 이로 인한 인구의 노령화로 치매와 같은 퇴행성 질환의 발병률이 지속적으로 증가하여 이의 예방 및 치료에 대한 수요가 크게 증가하고 있다.
- 우리나라 인구의 사인 중 뇌졸중, 치매, 정신 및 행동장애와 같은 뇌질환이 암 및 순환기계 질환 다음으로 높은 사망원인을 차지하며, 단일 장기의 질환으로는 가장 높은 사망원인에 해당된다.
- 대표적인 질환으로는 Alzheimer's disease, Multiple sclerosis, Amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, 뇌졸중 (stroke), 허혈장애 (ischemia) 등이다.
- 치매 치료제 개발을 위한 연구는 식품 성분이나 천연 생약을 중심으로 많은 연구가 진행되고 있지만 현재까지 치매를 근본적으로 치료할 수 있는 약물은 개발되어있지 않으며, 발병을 늦추거나 증상완화, 부차적 증상인 정신증상을 완화하는 약물들이 대신하고 있다.

2. 경제·산업적 측면

- 인삼의 소비는 Well-being, LOHAS와 같은 현재의 트렌드에 맞춰 인삼의 효능이 계속적으로 확인됨에 따라 시장규모는 점점 더 성장할 것으로 예상된다. 따라서 효능을 기초로 한 안전성 있는 건강 기능성식품 개발이 시급한 실정이다.
- 2004년 시행된 건강기능식품법의 시행으로 대기업에서 인삼제품시장에 신규 진출해 시장규모가 급격히 증가되고 있다. 인삼업계의 홍삼시장은 2004년 3,112 억원에서 2006년 6,000억원, 2010년도에는 1 조억원대의 거대시장을 형성할 것으로 전망한다.
- 최근 인삼가공법이 발전함에 따라 백삼이나 홍삼 중 일부 ginsenoside를 특정 기능을 가지는 ginsegnoside로 구조를 전환시킬 수 있는 가공법들이 개발되어 특정 ginsenoside 강화제품개발에 관심이 주목되고 있다.
- 효소처리에 의한 인삼의 구조 전환은 고비용 저효율의 방법으로 실효성이 미흡한 실정이며, 열처리 가공에 의한 방법은 고열에 의해 다른 유효 사포닌이 파괴되는 단점이 있다. 이를 극복하기 위하여 산과 열처리 방법을 병행하여 ginsenoside Rg₃를 고농도로 함유

하는 기능성 소재를 개발하고자 한다.

- Ginsenoside-Rg₃는 Rb₁의 C-20에 결합되어있는 두 분자의 glucose가 순차적으로 가수분해 되면서 생성된 minor ginsenoside로서 R형과 S형 두 가지 입체구조를 가진다.



- 아직까지 본 연구에서처럼 인삼의 산·열처리 가공기술로 ginsenoside Rg₃의 함량을 극대화한 흑삼의 신규 기능성인 뇌기능 개선기전을 규명하고 이를 이용한 건강기능성 제품 개발의 사례는 없는 상황이다.
- 흑삼의 뇌기능 개선에 대한 특정약리효능을 과학적으로 분석하고 이를 소재로 한 뇌기능 개선 건강기능식품을 개발한다면 국내 시장뿐 아니라 국제적으로 경쟁력 있는 제품이 될 것으로 사료한다.

3. 사회·문화적 측면

가. 실버건강제품의 필요성

- 우리나라 65세 이상의 노인인구는 1990년 약 210만 명에서 2000년 약 320만 명, 2020년에는 약 630만 명에 이를 것으로 예상되어 전체 인구의 약 12.5%를 점유할 것으로 예측된다. 따라서 우리나라도 21세기에 들어서면서 노인 인구에 치매를 비롯한 많은 퇴행성질환들이 커다란 의료 및 사회적 문제로 대두하게 될 것이다.
- 국민들도 고령화 사회를 인식하게 되어 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 일상 생활을 통한 예방에 관심이 높아지고 있다.
- well-being 식품에 대한 관심이 증가되고 있으나 노인층을 대상으로 한 뚜렷한 제품개발

은 아직 미비한 실정이다. 따라서 고령자 실버세대 및 예비 노인층을 수요층으로 한 맞춤형 식품개발이 필요하다.

나. 건강 및 기능성 식품에 대한 관심의 증가

- 최근 건강기능성 식품도 다양한 연령층, 계층 및 특정효능을 타겟으로 삼는 건강기능식품개발이 주류를 이루고 있으며 인삼제품도 특정성분-특정효능발현(Product based on efficacy) 방향으로 나아가는 추세이다.
- 또한 인삼이 중년층 이상에서만 복용하는 건강식품이 아니고, 젊은 층 및 여성층 등 다양한 계층을 타겟으로 하는 제품개발이 필요하다.
- 고려인삼의 효능을 기반으로 하는 기능성 제품개발연구는 국민의 건강에 도움을 주고 국가와 농민에 있어서 전 세계적 무역장벽을 극복하고 수출할 수 있는 기반을 제공해 준다는 측면에서 지속적인 연구가 필요하다.

따라서 본 연구는 고려인삼을 가공처리하여 ginsenoside Rg₃ 성분이 강화된 **흑삼의 제조공정을 표준화**하고, **흑삼의 뇌기능 개선에 대한 약리학적 효능과 뇌질환 보호기전을 규명**하고자 한다. **인삼의 특정성분-특정효능발현의 뇌기능 활성 건강기능식품을 개발**하여 국민 보건향상과 고려인삼의 세계적 브랜드 이미지 구축 및 고부가가치사업 창출로 국·내외 산업의 경쟁력을 확고히 하고자 한다.

제 2절 연구개발의 목적

1. 연구의 목적 및 범위

가. 연구의 목적

본 연구는 ginsenoside Rg₃를 비롯한 특이 사포닌을 강화한 흑삼의 제조공정을 표준화하여 신규 기능성인 치매 및 노화에 대한 뇌기능 개선 기전을 탐색하고 두뇌활동을 돕는 특정 기능성 강화제품을 개발하여 국민 보건향상과 고부가가치사업 창출로 국가 경쟁력을 확고히 하고자 한다.

나. 연구의 범위

- (1) 세부과제(주관기관) : 흑삼의 뇌기능 개선 효과탐색
 - ① 흑삼의 항산화능 및 AChE 억제 효과 탐색
 - ② Scopolamine 유도 치매동물모델의 학습 및 기억력 개선효과 탐색
 - ③ 노화 흰쥐의 뇌기능 개선에 미치는 효과 탐색
 - ④ 흑삼의 독성안전성 검증
- (2) 협동과제 : 기능성 Ginsenoside Rg₃ 성분을 강화한 흑삼의 표준제조법 확립
 - ① 흑삼제조기술 개발 및 표준화 공정 확립
 - ② HPLC를 이용한 Ginsenosides의 분석조건 확립
 - ③ 흑삼의 잔류농약 검사
 - ④ 두뇌활동개선을 위한 건강기능식품 개발 및 시제품의 저장성 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내외 연구개발 현황

1. 국외의 연구개발 현황

- 다양한 신기능성 물질들을 함유하고 있는 천연식물들은 최근 EU와 미국 등 선진국에서의 약품으로의 응용성 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 1978년 WHO 31차 회의에서 개발도상국을 대상으로 하여 민간요법에서 사용되는 유용식물에 대한 효과적 사용에 관한 권고 결의안을 채택한 이후 국제적인 천연자원 목록 작성과 유용성, 안전성, 표준화에 관한 연구가 지속되고 있다.
- 미국을 비롯한 선진국가의 제약회사에서는 다양한 작용기전의 치매 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있으며, 미국 정부에서도 2002년 회계연도에 6억 달러의 연구비를 치매와 관련된 연구에 투자하고 있다.
- 스위스의 파마톤사는 캡슐내 진세노사이드의 유효성분 함량을 표준화한 파마톤이나 진사나를 생산하여 우리나라 총 인삼수출액 2배 이상의 시장을 차지하고 있다.
- 일본 교와 제약에서는 L-carnitine과 choline 중합체를 개발하여 치매 및 인지기능 개선 등 뇌기능 개선용 건강기능식품 소재로서 판매를 시도하고 있다.
- 최근 중국에서 전통약재인 이끼류 *Huperiza serrate*로부터 acetylcholinesterase를 억제하는 알칼로이드 Huperizine을 분리하여 뇌기능 향상을 위한 기능성 식품 소재로 개발하였다.
- 2000년부터 치매치료제로 사용되고 있는 Eisai Co (UK)의 도네페질과 엑셀론은 안전성 문제가 제기됨에 따라 치매 치료의 효용성 문제가 지적되고 있는 실정이다. 그러므로 안전성이 높은 대체 천연물 제품에 관심이 증대되고 있어 천연물 산업의 새로운 기회로 평가된다.

2. 국내의 연구개발 현황

- 국내에서도 2004년 건강기능식품법의 발효에 따라 많은 천연 신소재가 소개되고 있으나 국내 자체 연구진에 의해 개발된 소재는 거의 없는 상태로 천연물 제품화 기술력이 아직 낮은 상태이다.
- 최근 학계와 정부산하 연구소 등을 중심으로 천연물로부터 과학적인 연구를 통한 기능성 소재 개발이 이루어지고 있고, 업계에서는 유니젠의 인삼추출물 표준화 기술개발로 선진국의 기술수준에 많이 접근하였으나 일본 및 독일 등의 선진국에 비하면 천연물로부터 기능성 소재 및 제품화 기술이 부족한 수준이다.

- 국내의 경우 소수의 연구진이 천연물로부터 관절염, 천식 등의 치료제 개발을 위한 연구를 수년간 수행해 왔으나 아직은 퇴행성 질환에 대한 적응증의 범위에 있어서 극히 일부에 불과하다.
- 국내의 경우 전통 한방약 및 일부 의약품, 차류, 건강보조식품, 천연염료 및 향료 등의 제품이 이미 판매되고 있으나 대부분의 원료를 수입에 의존하고 있는 실정이다.

3. 국내·외 「기억능력 향상」 표기 건강기능식품의 예

제품명		제조원	성분
국내	헬스브레인21	한풍제약	황기, 백복령, 당귀, 인삼(근류 100%), 천궁, 호두외
	브레인슈타인	CJ뉴트라	피브로인추출물 BF-7, 정제어유,달맞이꽃종자유 외
	바이렘G	바이렘	피브로인추출물 BF-7, 알콕시글리세롤, 정제어유 외
국외	ReCall	Ocean Seacrets (U.S.A.)	아스트라칼루스, 리씨열매, 감초, 생강
	Hyperium Peroratum II	HBS(U.S.A)	John's wort, Microcrystalline cellulose etc.
	Soya lecithine	Nature Made (U.S.A)	soya lecithine, phosphatidyl choline, gelatin, glycerin
	Ginkoba	Pharmaton (Germany)	ginkgo biloba extract, hydropropyl methyl cellulose, lactose, synthetic iron etc.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행방법

1. 구증구포 흑삼 제조와 HPLC 분석조건 확립

가. 구증구포 흑삼의 제조

4 년근 수삼을 그늘에서 약간 수분을 건조시킨 후 100℃에서 10시간 증숙한 후, 60℃ 오븐에서 8시간 건조 후 80℃에서 6시간 증숙 후 건조하는 과정을 8회 반복하여 흑삼을 제조하였다.

나. 인삼 사포닌 분석

사포닌 함량 측정은 HPLC (SPD 20A, SIMADZU, Japan)를 이용하였다 (1). 컬럼은 ACE 5 C₁₈ (250×0.4 mm, 5 μm)을 이용하였으며, 검출기는 UV detector (203 nm)를 사용하였다. 이동상은 물 (A)과 acetonitrile (B)의 gradient system을 사용하였다. 용출조건은 B를 기준으로 0-30분 20%, 30-60분 20-45%, 60-78분 45-75%, 78-80분 75-80%, 80-100분 80-100% 이었다. 이동상의 유속은 1 mL/min 이었으며, 시료는 10 μL를 주입하였다. 11종의 ginsenoside standards (Rg₁, Re, Rf, Rg₂, Rb₁, Rc, Rb₂, Rb₃, Rd, 20(S)-Rg₃, 20(R)-Rg₃)는 98% 이상의 순도는 갖는 것으로 Hongjiu Biotech Co. Ltd (Jilin, China)에서 구입하였다.

2. 새로운 흑삼제조 기술 탐색

가. 과일 유기산 침지방법을 이용한 흑삼의 제조

백삼을 유기산이 많이 함유되어 있는 과일주스-사과, 포도, 파인애플 주스에 24시간 침지시킨 후 60℃에서 24시간 건조시킨 후 98℃에서 3시간씩 증숙-건조 과정을 반복하여 흑삼을 제조하였다 (2).

나. 추출 조건에 따른 사포닌 함량 비교

흑삼 사포닌의 추출효율을 알아보기 위하여 에탄올비율과 추출방법인 Soxhlet 추출과 초음파 추출방법을 비교하였다. 추출용매는 증류수, 70% 에탄올, 100% 에탄올을 사용하였고, soxhlet추출은 75-80℃에서 3, 6시간 추출하였다. 초음파추출은 1.5 시간, 3시간 동안 추출하여 추출효율을 비교하였다.

다. 증숙온도 및 증숙시간에 따른 흑삼의 사포닌 함량 변화

과일 주스 중 가장 사포닌 함량 효율을 높인 과일주스에 24시간 침지시킨 후 증숙 온도를 80, 100, 120℃, 증숙시간을 15분, 30분, 45분으로 나누어 흑삼을 제조하여 지표 사포

닌 ginsenoside Rg₃ 함량을 비교하였다.

라. 염기 용액 침지법을 이용한 흑삼의 제조

백삼을 1, 2, 4% NaHCO₃ 용액에 침지한 후 120℃에서 15분간 4회 증숙-건조과정을 반복하여 흑삼을 제조하였다.

마. 제조흑삼의 PHAs 안전성 평가

흑사분말 10 g을 100 mL 증류수와 혼합한 후 20 mL methylene chloride을 넣고 10분간 2회 반복 초음파 추출을 실시하였다. methylene chloride 추출액을 동량의 sodium sulphate와 혼합한 후 N₂ gas로 건조하였다. 건조물은 2 mL n-hexane으로 용해한 후 1 mL을 취해 Silica-Florisisil column에 여과시켰다. 다시 80 mL methylene chloride-n-hexane (1:9 v/v) 혼합 용액으로 elution시킨 후 여과액을 N₂ gas로 건조하였다. 건조물은 다시 0.5 mL의 cyclohexane에 internal standards을 첨가하여 GC/MS를 측정하였다.

3. 흑삼의 향산화 및 Cholinesterase 억제활성 탐색

가. 흑삼의 제조

본 연구결과로 특허등록을 완료한 「고품질 흑삼 및 이의 제조방법」에 따라 흑삼을 제조하였다. 특히 청구항 중 유기산 침지법 이용한 흑삼 제조는 유기산을 많이 함유하는 포도주스를 사용하였다. 즉, 4년근 수삼을 60℃에서 건조한 백삼을 4℃에서 포도주스에 24시간 침지시킨 후 120℃에서 30분간 증숙한 후 60℃ 오븐에서 24시간 건조하였다. 증숙과 건조과정을 3번 반복하여 흑삼을 제조하였다 (3).

나. 흑삼 엑기스 제조

흑삼 분말에 80% 에탄올을 10배량 가하여 60℃에서 1시간 동안 ultrasonication한 후 여과하였고, 추출과정은 3회 반복 실시하였다. 추출 여액은 감압 농축한 후 동결 건조하여 추출 수율 44.50%의 흑삼 엑기스를 얻었다.

다. 흑삼 엑기스의 향산화 활성

(1) DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH radical 소거능은 Blois (4)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료 0.2 mL에 4×10^{-4} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Co., St. Louis, MO, USA), 용액 0.8 mL를 가하여 10초 동안 진탕하고 상온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 다음 식에서와 같이 계산하여 전자공여능(electron donating activity; EDA)의 백분율로 표시하였다.

EDA (%) = (A - B/A) × 100 여기서 A는 무첨가구의 흡광도이고, B는 시료 첨가구의 흡광도이다.

(2) SOD 유사 활성

SOD 유사활성은 Marklund & Marklund (5)의 방법에 따라 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene)의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 일정 농도의 시료 10 μL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer (50 mM tris + 10 mM EDTA) 130 μL과 7.2 mM pyrogallol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 μL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응 후, 1 N HCl 10 μL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능 (\%)} = (A - B/A) \times 100$$

(3) 폴리페놀 함량

폴리페놀에 대한 0.5% FeCl₃ 침전반응을 육안관찰 후 시료의 총페놀 함량(total phenolics content)을 Slinkard & Singleton (6)의 방법에 따라 측정하였다. 10 mg/mL 농도로 시료 용액을 제조한 후, 시료용액 50 μL에 7.5% Na₂CO₃ 1.5 mL을 가하여 충분히 혼합하고 10% Folin-Ciocalteu 시약 (Wako Chemical Co., Osaka, Japan) 1.5 mL을 가하여 상온에서 30분 동안 방치하고 분광광도계(Genesys 5, Milton Roy, NY, USA)로 765 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 tannic acid에 의한 표준곡선을 이용하여 polyphenol 함량을 산출 하였다.

라. Cholinesterase (ChE) 억제 활성

ChE 억제 활성은 Ellman의 방법 (7)을 변형하여 실시하였다. Acetylcholinesterase (AChE)와 butyrylcholinesterase (BuChE)의 기질은 acetylcholine과 butyrylcholine을 사용하였다. 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 8.0) 340 μL, 2 mM 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 40 μL, 시료 40 μL와 50 mM Tris buffer (pH 8.0, 0.1% bovine serum albumin)에 녹인 AChE, BuChE (0.22 U/mL) 460 μL을 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시킨 후, 각각의 효소 기질인 3.75 mM acetylthiocholine iodide (ATCI)와 butyrylthiocholine chloride (BTCC) 10 μL을 넣고 2분간 410 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 후삼 엑기스의 ChE억제활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = [A_0 - A_1/A_0] \times 100$$

A₀ : 대조구의 흡광도

A₁ : 시료의 흡광도

IC₅₀ value (mg/mL) 기질의 가수분해를 50% 감소시키는데 필요한 시료 양

4. 화기삼, 전철삼을 이용한 흑삼 제조

가. 흑삼제조

포도주스에 화기삼과 전철삼을 4℃에서 24시간 침지시킨 후 120℃에서 30분간 증숙한 후 60℃ 건조기에서 18시간 건조하는 과정을 3반복하여 흑삼을 제조하였다.

나. 화기흑삼, 전철흑삼, 고려흑삼의 사포닌추정, 항산화 및 Cholinesterase 억제활성

각각의 흑삼 분말에 70% 에탄올을 6배량 넣고 1시간 동안 초음파 추출한 후 여과하는 과정을 3반복한 후 농축하여 시료로 사용하였다. 또한 흑삼의 사포닌 함량은 HPLC 분석법을 이용하였다. 흑삼의 항산화 활성은 폴리페놀함량, SOD-유사활성, DPPH 라디칼 소거능을 측정하였고, AChE와 BuChE 억제 활성을 측정하였다.

5. 단회투여에 의한 AChE의 억제 효과

가. 실험동물

체중이 25-30 g의 수컷 ICR mice을 (주) 대한 바이오링크에서 구입하여 온도 23±2oC, 습도 55±5℃, 12시간 dark/light cycle 조건의 사육실에서 일주일간 적응시켰다. 물과 사료 섭취는 제한하지 않고 공급하였다. 흑삼추출물 단회투여 농도는 200 mg/kg을 경구투여하였다. 투여 1시간, 6시간, 24시간 경과 후에 각 그룹의 (n=5) 뇌를 적출하여 AChE 활성을 측정하였다. 대조군은 생리식염수를 투여하였다. 실험과 관련된 동물 사육은 미국 국립보건원 (NIH, National Institutes of Health)에서 제시한 기준 (No. 85-23, revised 1985)을 준수하였고, 충남대학교동물실험 윤리위원회의 승인 하에 수행되었다.

나. 뇌조직의 AChE 활성 측정

AChE 활성은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하는 Ellman의 방법 (7)을 변형하여 활성을 측정하였다. 적출한 뇌에 10배의 homogenization buffer (12.5 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 400 mM NaCl)로 균질화하여 1,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 효소원으로 사용하였다. 실험방법은 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) 2 mL, 10 mM Ellman's 용액 (10 mM DTNB, 15 mM sodium bicarbonate) 50 µL, 뇌조직액 0.1 mL을 cuvette에 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 75 mM acetylthiocholine iodide 10 µL를 첨가하여 410 nm에서 2분간 흡광도 변화를 측정하여 계산하였다.

6. 흑삼의 독성 안전성 평가

가. 실험 동물 및 처치

수컷 Sprague-Dawley rat (8주령)을 대한 바이오링크에서 구입하여 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5^{\circ}\text{C}$, 12시간 dark/light cycle 조건의 사육실에서 일주일간 적응시켰다. 물과 사료섭취는 제한하지 않고 공급하였다. 흑삼추출물 단회투여 농도는 18시간 금식 후 각각 5, 10, 15 g/kg bw 용량으로 10 mL/kg volume 으로 경구투여 하였다. 대조군은 동량의 생리식염수를 경구투여하였다. 투여 10시간동안 실험동물의 독성작용을 관찰하였다. 2주간동안 흑삼 단회 투여의 독성효과를 관찰하고, 매주 실험동물의 체중을 기록하였다. 실험 마지막날 12시간 이상 금식시킨 후 혈액, 간, 신장, 비장, 심장, 고환, 폐를 적출하여 무게를 측정하고, 간과 신장 조직은 10% formaldehy 용액에 고정하여 HE 염색을 실시하였다. 실험과 관련된 동물 사육은 미국 국립보건원 (NIH, National Institutes of Health)에서 제시한기준 (No. 85-23, revised 1985)을 준수하였고, 충남대학교동물실험 윤리위원회의 승인 하에 수행되었다.

나. Hematoligical, biochemical analyses

일부 혈액은 EDTA가 처리된 채혈관에 담아 혈액분석기 (Sysmex XE 2100, Japan)로 RBC, WBC, 헤마토크리트치, MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin), 혈소판, 백혈구 조성을 측정하였다. EDTA를 처리하지 않고 채혈한 혈액은 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 분리혈청은 GOT, GPT, creatinine, BUN, cholesterol, Glucose, Bilirubin, Protein, Na, K, Cl의 농도를 측정하였다.

다. 뇨 검사

실험종료 2일 전부터 실험동물의 뇨를 수거하여 3000 rpm에서 원심분리하여 이물질 제거한 후 뇨중 적혈구, 질소, glucose, ketone, bilirubin, blood를 분석하였다.

라. 간, 신장의 조직검사

Formaldehyde용액에 고정한 간과 신장 조직은 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 고정시킨 후 5 uM로 절단한 후 slide glass에 고정하여 올려놓은 후 Hematoxyline-Eosin염색을 실시하였다.

7. Scopolamine에 의한 치매 동물모델에 대한 흑삼의 기억력 개선 효과 탐색

가. 인삼추출물 제조

백삼, 홍삼, 흑삼을 분쇄하여 70% 에탄올을 10 배량 (v/w) 가하여 50°C 에서 1시간씩 초음파 추출한 후 상징액을 여과하여 3회 반복 추출하였다. 여과한 상징액을 혼합하고 60°C 이하에서 감압농축한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

나. Scopolamine을 이용한 치매 동물 유발

체중이 25~30 g의 수컷 ICR mice를 (주)샘타코에서 구입하여 온도 23±2℃, 습도 50 ± 5℃, 12시간 dark/light cycle 조건의 사육실에서 일주일간 적응시켰다. 물과 사료섭취는 제한하지 않고 공급하였다. 실험군은 대조군, Scopolamine 투여군, Tacrine 투여군, 인삼 추출물 투여군 으로 나누어 각 군당 8마리씩 5군으로 구성하였다. 인삼추출물과 Tacrine은 인지시험 1시간 전에 각각 200 mg/kg, 10 mg/kg의 농도로 경구투여 하였으며, 기억손상 유발을 위해 인지시험 30분 전에 scopolamine hydrobromide를 2 mg/kg의 농도로 복강투여 하였다. 인삼추출물과 tacrine, scopolamine은 생리식염수에 녹여 사용하였고, 대조군은 동일 용량의 생리식염수를 투여하였다.

다. 수동회피실험-Passive avoidance test

수동회피실험은 길로틴 문을 중심으로 밝은 방과 어두운 방으로 구획이 나누어진 장치를 (Jungdo Bio & Plant Co. Ltd, Seoul, Korea) 이용하여 실시하였다. 각각의 구획은 20 × 20 × 20 cm로, 전기가 통할 수 있는 grid 막대로 구성되었다. 수동회피 실험을 실시하기 60분 전에 인삼추출물과 positive control로 tacrine (TAH, 10 mg/kg)을 용량별로 생리식염수에 녹여 경구투여하였으며, 대조군은 동량의 생리식염수를 투여하였다. 마우스를 조명을 비추는 밝은 쪽 방에 놓고 10초간 탐색시킨 후 길로틴문 (guillotin door)을 열어 어두운 방으로 들어갈 수 있게 하였다 (Gemini Avoidance System, San Diego, USA). 이때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 방으로 들어가지 않는 마우스는 실험에서 제외시켰다. 길로틴문이 열린 후 마우스가 어두운 방으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하여 이를 학습 시험 (acquisition trial)이라고 정의하였다. 마우스가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문을 닫고, 0.5 mA의 전기 자극을 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 하여 마우스가 이를 기억하도록 하였다. 학습 시험 (acquisition trial)이 끝난 지 24시간 후에 장기 기억에 미치는 인삼 추출물의 효과를 확인하였다. 즉, 수동회피 실험 실시 60분전에 각각의 용량별로 인삼 추출물과 THA를 경구투여하였고, 투여 30분 후에 기억력 손상을 유발하기 위하여 scopolamine (SCOP, 2 mg/kg)을 복강투여하였다. 마우스를 밝은 방에서 10초간 탐색하게 한 후 길로틴문을 열고 어두운 방으로 마우스의 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간을 측정하였다(retention trial). 밝은 방에서 머무르는 시간은 300초까지 측정하였다.

라. 수중미로 실험-Morris water maze

수중미로 시험은 원형 pool (직경 120 m, 높이 65cm)안에 물을 30 m 높이로 채우고(23 ±2℃), 수조 4분면의 한 구획에 직경 10 cm의 도피대 (escape platform)를 수면아래 1cm에 위치하도록 하고 검은색 물감 풀어 받침대가 보이지 않게 하였다. 실험 첫날은 platform 없이 수조안에서 실험동물이 60초간 자유롭게 수영하도록 하였고, 4일 동안 매일 입수하는 사분면을 달리하여 하루 2번씩 반복하여 인지적응훈련을 수행하였다. 실험동물이 platform에 도달하면 10초 동안 platform에 머물도록 하였으며, 120초 안에 platform을 찾지

못할 경우에는 10초 동안 platform에 머물도록 하여 platform을 기억하도록 하였다. 수중미로 실험은 20분 간격으로 반복하였으며, 실험 5일째에는 working memory를 측정하기 위하여 platform을 제거하고 platform을 찾아가는 시간(escape latency)을 기록하는 probe test를 실시하였다 (8).

마. Y-미로 실험

Y-미로 시험은 단기기억형태의 순간 공간인지력을 평가하기 위한 방법으로 ICR mice를 이용하여 실험하였다. 미로시험1시간 전에 인삼추출물과 tacrine을 경구투여하고, scopolamine을 2 mg/kg 용량으로 시험 30분 전에 복강투여한 후 미로시험을 실시하였다. Y-미로는 검은 아크릴로 규격(길이 40 cm, 너비 4 cm, 높이 12 cm, 각 arm의 각도 120°)에 맞추어 제작한 Y자 모양의 사방이 막힌 미로에서 세 가지를 각각 A, B, C로 정한 후 한 쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 후 마우스가 들어간 가지를 순서대로 기록하였다. 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 계속하였으며, 한번 들어갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점을 부여하였다 (ABC, CAB, BCA; 실제 변경, actual alternation). 변경행동력(alternation behavior)은 다음의 수학적식에 의해 계산하였다.

$$\text{변경행동력(\%)} = [\text{실제 변경(actual alternation)} / (\text{총 출입 횟수} - 2)] \times 100.$$

변경행동력은 단기기억회복의 측정지표로 사용되며 총 출입횟수는 활동성 변화를 나타낸다.

바. 뇌조직의 AChE, ChAT, 및 항산화 효소활성

Water maze 실험 종료 후 실험동물을 희생시켜 대뇌피질과 해마를 적출하여 10배의 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 400mM NaCl)로 균질화하여 1,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 효소원으로 사용하였다. AChE 활성은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하는 Ellman의 방법을 변형하여 분석하였다. 뇌조직의 지질과산화물 함량은 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 방법으로 분석하였다 (9). Choline acetylcholine transferase (ChAT), catalase, SOD, GSH-Px 활성은 해당 분석 kits (Jiancheng Institute of Biotechnology, Nanjing, China)을 사용하여 분석하였다.

사. 뇌조직의 Cholinergic marker 단백질의 발현

뇌조직의 해마와 피질의 cholinergic marker인 AChE, ChAT 발현을 western blot과 RT-PCR 분석을 통하여 단백질과 mRNA 수준에서 비교 관찰하였다 (10,11).

8. 인삼 추출물의 장기 섭취가 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과 탐색

가. 실험 동물

8주 ICR 마우스를 (주)샘타코에서 구매한 후 4개월간 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물 1%, 3% diet를 섭취하도록 하였다. 혈액과 뇌를 적출하여 대뇌피질과 해마를 분리 적출하여 -80℃에 보관하였다.

나. 혈청 분석

채혈한 혈액은 3500 rpm에서 15 분간 원심분리한 후 cholesterol, HDL-cholesterol, TG, glucose 농도를 측정하였다.

다. 뇌조직의 AChE, ChAT, 및 항산화 효소활성

대뇌피질과 해마를 10배의 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 400 mM NaCl)로 균질화하여 1,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 효소원으로 사용하였다. AChE 활성은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하는 Ellman의 방법을 변형하여 분석하였다. 뇌조직의 지질과산화물 함량은 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 방법으로 분석하였다. Choline acetylcholine transferase (ChAT), SOD, GR 활성은 해당 분석 kits (Jiancheng Institute of Biotechnology, Nanjing, China)을 사용하여 분석하였다.

라. 뇌조직의 Cholinergic marker, Synaptic plasticity, Nerve growth factor 단백질의 발현

뇌조직의 해마와 피질의 Cholinergic marker인 ChAT, VChT, Nerve growth factor인 NGF, synaptic plasticity 단백질인 GAP-43, SNAP-25 단백질 발현을 western blot 통하여 단백질발현을 비교 관찰하였다.

9. 노화 흰쥐의 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과 탐색

가. 실험 동물

16주 ICR 마우스를 (주)샘타코에서 구매한 후 1년간 실험실에서 사육하였다. 1년 4개월의 노령의 마우스에 홍삼과 흑삼 추출물을 200 mg/kg 용량으로 4개월간 경구투여한 후 혈액과 뇌를 적출하여 대뇌피질과 해마를 분리 적출하여 -80℃에 보관하였다.

나. 뇌조직의 AChE, ChAT, 및 항산화 효소활성

대뇌피질과 해마를 10배의 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 400 mM NaCl)로 균질화하여 1,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 효소원으로 사용하였다. AChE 활성은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하는 Ellman의 방법을 변

형하여 분석하였다. 뇌조직의 지질과산화물 함량은 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 방법으로 분석하였다. Choline acetylcholine transferase (ChAT), catalase, SOD, GSH-Px 활성은 해당 분석 kits (Jiancheng Institute of Biotechnology, Nanjing, China)을 사용하여 분석하였다.

다. 뇌조직의 Cholinergic marker, Synaptic plasticity, Nerve growth factor 단백질의 발현

뇌조직의 해마와 피질의 cholinergic marker인 AChE, ChAT과 Nerve growth factor인 NGF, BDNF, synaptic plasticity 단백질인 GAP-43, SNAP-25 단백질 발현을 western blot 통하여 단백질발현을 비교 관찰하였다.

10. D-galactose로 손상된 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과

가. 실험 동물

4개월된 Sprague-Dawley 흰쥐를 (주)샘타코에서 구매한 후 실험전 일주일간 실험실 환경에 적응하도록 하였다. 실험군은 생리식염수를 투여한 대조군, D-galactose (80 mg/kg, s.c.) 투여군, 백삼 추출물 + D-gal 투여군, 홍삼 추출물 + D-gal 투여군, 흑삼추출물 + D-gal 투여군으로 나누었다. 인삼추출물은 5 g/kg 수준으로 식이에 첨가하였다.

나. 수중 미로 실험

실험종료 일주일 전에 수중미로 실험을 실시하였다.

다. 혈청과 뇌적출

수중미로 실험종료 후 12시간 이상 금식시킨 후 쥐를 희생하여 혈액과 뇌를 적출하였다. 혈액은 3500 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하고, 뇌의 피질과 해마를 적출하여 -80℃ 냉동고에 보관하여 사용하였다.

라. RNA 추출과 Microarray analysis

Total RNA는 해마에서 Trizol 시약을 사용하여 제조사의 지시에 따라 RNA 추출하였다. 모든 RNA는 UV 스펙트로 포토미터를 이용하여 흡광도 260/280nm에서 정량하였다. Gene expression은 Illumina® RatRef-12 BeadChip Arrays (Microgen Inc., Korea)로 분석하였다.

마. Real time-PCR를 통한 synaptic plasticity 활성

Primer는 GAP-43 sense primer는 5'-AGG GAG ATG GTC CTG CTA CT-3', antisense primer 5'-TCT TTA CCC TCA TCC TGT CG-3', SNAP-25 sense primer 5'-ATG AAC TGG AGG AGA TGC AG-3', antisense primer 5'-CGA TTC TGG GTG TCA ATC TC-3', GAPDH

sense primer 5'-GTG ATG CTG GTG CTG AGT ATG TC-3', antisense primer 5'-CAG TCT TCT GAG TGG CAG TGA TG-3'을 사용하였다.

바. 뇌조직의 효소 활성 및 지질 과산화물 함량

적출한 대뇌피질과 해마를 10배의 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 400 mM NaCl)로 균질화하여 1,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 효소원으로 사용하였다. AChE, ChAT, SOD, catalase, GSH-Px, MAO-B, Na⁺, K⁺-adenosine triphosphate (ATPase) 활성은 측정 kit를 사용하여 분석하였다. 지질과산화물 (MDA) 함량은 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 방법으로 분석하였다

11. 뇌신경세포 생성과 기억력 개선에 미치는 Ginsenoside Rb₁의 효과

가. Ginsenoside Rb₁ 투여

12주령의 Sprague - Dawley rats (270-300g)에 98% 이상 순도의 ginsenoside Rb₁을 2 mg/kg 용량으로 30일간 경구투여하였다. 본 연구 scheme은 아래 도표와 같다.

나. Morris water maze test

실험종료 5일전에 Morris water maze test를 실시하였다.

다. BrdU protocol

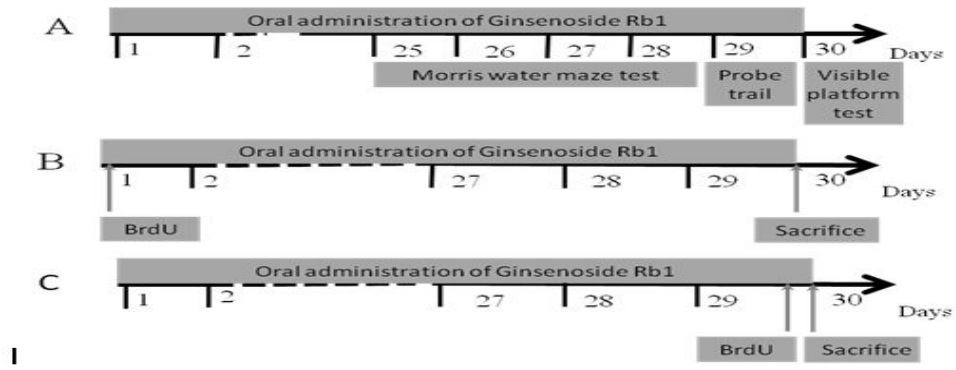
BrdU는 투여 2시간 후에 DNA 합성경로 중 S-phase에서 세포분열 안에 혼합되어 새로운 DNA가 분열하게 되면 잔류하게 되어 시간별로 잔류물질을 확인할 수 있게 된다 (12). 본 연구는 ginsenoside Rb₁이 해마조직의 세포생성에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여 실험 종료일 실험동물을 희생하기 전에 BrdU를 투여한 후 2시간 후에 실험동물을 희생하여 해마조직의 뇌세포 생존을 확인하였다.

라. 면역조직화학법

실험동물을 마취하여 4% paraformaldehyde 용액을 심장을 통해 관류시켜 뇌조직을 고정한 후 적출하였다. 적출한 뇌는 4°C에서 사후고정을 위해 12시간 이상 보관하였다. 뇌조직은 paraffin을 제작하여 9 μm 두께로 조직 슬라이드를 제작하였다. 면역조직 화학법은 Histostain detection system (Invitrogen CA, USA)을 이용하였다.

마. BrdU positive cell 정량

광학현미경을 이용하여 BrdU에 염색된 해마의 신경세포를 관찰하였다.



Overview of the experimental design.

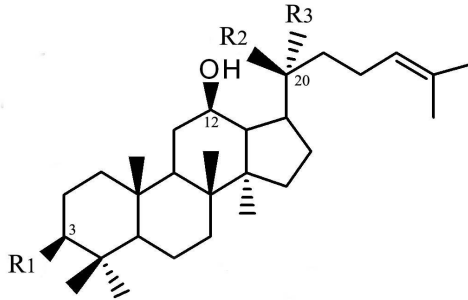
12. 통계처리

모든 실험에서 얻어진 자료는 SPSS 통계 package program (statistical package social science, version 15.0)을 이용하여 분산분석 (ANOVA)을 실시하였고, 처리군 간의 유의성은 Duncan' multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

제 3 절 연구 수행 결과

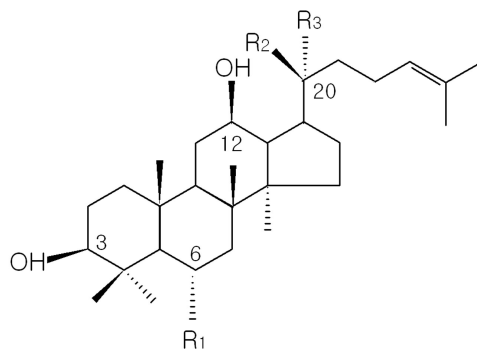
1. 인삼의 뇌기능 개선 관련자료 수집 및 분석

가. 주요 사포닌의 화학적 구조



Ginsenoside	R ₁	R ₂
Ra ₁	-Oglc(2-1)glc	-Oglc(6-1)arap(4-1)x
Ra ₂	-Oglc(2-1)glc	-Oglc(6-1)araf(4-1)xy
Ra ₃	-Oglc(2-1)glc	-Oglc(6-1)glc(3-1)xy
Rb ₁	-Oglc(2-1)glc	-Oglc(6-1)glc
Rb ₂	-Oglc(2-1)glc	-Oglc(6-1)arap
Rb ₃	-Oglc(2-1)glc	-Oglc(2-1)xyl
Rc	-Oglc(2-1)glc	-Oglc(6-1)araf
Rd	-Oglc(2-1)glc	-Oglc
20(S)-Rg ₃	-Oglc(2-1)glc	-OH
20(R)-Rg ₃	-Oglc(2-1)glc	-CH ₃
Rh ₂	-Oglc(2-1)glc	-OH
Rs ₁	-Oglc(2-1)glc-ac	-Oglc(6-1)arap
Rs ₂	-Oglc(2-1)glc-ac	-Oglc(6-1)araf
F ₂	-Oglc	-Oglc

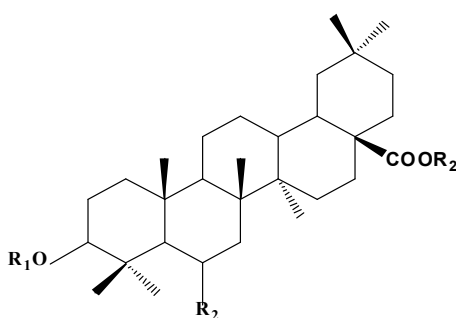
Figure 1-1. Chemical structures of protopanaxadiol (PPD) saponin. Glc, β-D-glucopyranosyl; Xyl, β-D-xylopyranosyl; Rha, α-L-rhamnopyranosyl; Arap, α-L-arabinopyranosyl; Araf: α-L-arabinofuranosyl; Ac, acetyl



Ginsenoside	R ₁	R ₂	R ₃	MW
Rg ₁	-Oglc	-Oglc	-CH ₃	801.03
Re	-Oglc(2-1)rha	-Oglc	-CH ₃	947.17
Rf	-Oglc(2-1)glc	-OH	-CH ₃	801.03
Rg ₂	-Oglc(2-1)rha	-OH	-CH ₃	785.03
Rh ₁	-Oglc	-OH	-CH ₃	638.89
Notoginsenoside R ₁	-Oglc(2-1)xyl	-Oglc	-CH ₃	933
F ₁	-OH	-Oglc	-CH ₃	638.89

Figure 1-2. Structures of protopanaxatriol (PPT) class.

Glc, β -D-glucopyranosyl; Xyl, β -D-xylpyranosyl; Rha, α -L-rhamnopyranosyl.



Ginsenoside	R ₁	R ₂
Rg ₁	-glc UA(2-1)glc	-glc

Figure 1-3. Structures of oleic acid

나. 주요 인삼 사포닌의 약리학적 기능과 기전

Ginsenosides (Panaxadiol)	Effects	Experimental model	Mechanism
Rb₁	CNS effect	PC12 Cells	Promoting neurotransmitter release by increasing the phosphorylation of synapsins through the PKA pathway
		Stressde mice	Lowering neurosteroid levels;
		Cortical neuron	Attenuating beta AP(25-35)-induced tau protein hyperphosphorylation by inhibiting the experssion of GSK-beta;
	Nootropic	Rat brain	Actions on the cholinergic&neurotrophic systems
	Immunomodulataion	Mice	Eliciting a balanced Th1 and Th2 immune response
	Neuroprotective	Hippocampal neurons	Possibly by scavenging free radicals;
	Hepatoprotective	Rat liver	Lower TG levels vis cAMP-production in liver Through its metabolite compound K;
	Estrogenic-like activity	Male rats MCF-7 cells	Increase LH secretion but independent of the direct estrogen receptor association;
	Antipruritic	Scratching behavior mouse	Vascular permeability-inhibitory;
Anti-ulcer	Gastric lesion	Increase in mucus secretion;	
Improving contact dermatitis or psoriasis	Mouse ear dermatitis	Regulation of COX-2 produced by macrophage cells & interferon-gamma and IL-4 induced by Th cells	
Rg₃	Antiapoptotic activity	Human endothelia cells	Via Akt-dependent inhibition of the mitochondrial apoptotic signaling pathway
	Antitumor	HUVEC	Angiosuppressive activity, inhibits the proliferation of HUVES, suppresses the capillary tube formation of HUVEC
	Antiinflammamatory	Microglial cells	Inhibits the activation of AP-1 & protein kinaseA pathway; enhances the macroglial phagocytosis of Abeta;
	Neuroprotective	Rats	Against the cerebral ischemia-induced injury, reduces lipid peroxides, scavenges free redicals & improves energy metabolism
	Against neurofoxicity	Rats	Antagonized the effects induced by ACR
	Hepatoprotective	HepG2 Cells	Inhibits the increase of serum AST and ALT, through its metabolite Rh ₂

Rg₃	Rregulates ion channel	Rat brain	Stereospecificity; from the outside
	Antinociception	Rat sensory neurons	Na(+) channel inhibition; interactions with the S4 voltage-sensor segment of domain II, Carbohydrate portion of Rg ₃ plays an important role; Modulate Ca ²⁺ channel currents;
	Relaxation of smooth muscle	Canine corpus cavernosum	Increases cyclic nucleotide levels through phosphodiesterases inhibition;
	Reles vessels	Rats aortic rings	Through induction of nitric oxide synthase
Rg₁	Vascular endothelial		Activates the glucocorticoid receptor (GR), stimulates the expression of VEGF through a cells effects phosphatidy-linositol3-kinase(PI3K)/Akt and veta-catenin/T-cell fector-dependent pathway; Serve as an agonist ligand for GR and induce rapid NO production from eNOS via the non-transcriptional PI3K/Akt pathway; Increases the secretion of plasminogen activator and angiotensin-converting enzyme;
Re	Antidiabetic	Mice	Antioxidant and antihyperlipidemic efficacies;
	Fertile effect	Human sperm	Promotes human sperm capacitation through NO/cGMP/PKG pathway;
	.Electro-physiological	Guinea pig	Increases human sperm motility by induction of nitric oxide synthase; Inhibition of I(Ca,L) and enhancement of I(Ks); Activates cardiac potassium channels via a nongenomic pathway of sex hormones;
	Embryotoxic	Rat embryos	-
	Attenuates neurotoxicity	PC12 cells	-
	Against MPTP-induced apoptosis	Mouse nigra neurons	Up-regulates the expression of Bcl-2 protein, down-regulates the expression of Bax, & iNOS protein, & inhibits the activation of caspase-3;
angiogenic	HUVECs	-	
Rf	Lipoprotein metabolism	Mice	Regulates apo A-I and C-III mRNA, via interactions with peroxisome proliferator-activated receptor alpha
Rg₂	CNS effects		Acts specifically on heteromeric human nAChRs modulating their desnsitization

Rg₁	CNS effect	Rat nigral neurons	Inhibits the mitochondrial apoptotic pathway and increases the survival change of the primary culture nigral neurons against rotenone toxicity
	Nootropic & antidementia	C57-BL mice	Reduces neuron loss by suppressing oxidative stress;
		Rats	inhibits the intracellular level of cAMP;
	Antiapoptosis & antiaging	Hippocampal Progenitor cells	Inducing proliferation and differentiation of neural progenitor cells.
		SD rats	Influence on neuronal, synaptic plasticity, neurogenesis; Promoting neurogenesis, regulates the proliferation of hippocampal progenitor cells
	immuno-modulation	Mice	Inhibits the activity of AchE but increases that of ChAT;
		Wistant rats	Increases membrane fluidity
		Mouse neurons	Enhances Bcl-2 and Bcl-x1 expression, reducing Bax & iNOS expression, and inhibiting activation of caspase-3
PC12		Suppresses intraellular oxidative stress;	
Rat cortical neurons human cells		Inhibits the activit of JNK and CDK3, removes ROS	
	Aged rats	Enhances the proliferation of lymphocytes and the production of IL-2;	
	Aged rats	Enhances the expression of IL-2 receptor alpha chain and inhibits the release of soluble IL-2 receptor; Increaces of cAMP and cGMP contants, resulting in IL-2 gene expression and splenocyte proliferation; Enhances CD4(+) T-cell activity;	
Rb₂	Anti-cancer	B16-BL6 melanoma cells	Inhibits lung tumor metastasis & tumor associated angiogenesis;
	Promotion wound healing	Epidermal cells	Enhances epidermal cell proliferation, up-regulates the expressions of proliferation-related factors;
	Enhancing the plasminogen activator activity levels	Bovine aortic endothelial cells	Stimulates the secretion of urokinase-type PA
Rb₃	Inhibiting I (gly)	Hippocampal beurons	Possibly as a non-competitive antagonist
Rc	anticancer	MCF-7 human breast carcinoma cells	Induced c-Fos expression;
	CNS effects	Rat brain	Modulates NMDA receptor subunit mRNA levels
Rd	Antiaging	Mice	Attenuates free-radical-induced damage

다. Ginseng polysaccharides의 약리학적 기능

Pharmacological activity	Experimental model	Mechanism
1. Anti-tumor	plumorary macrophage	Induces cytokine production (TNF, INF- γ , IL-8, IL- β , IL-6, etc) (13-15)
	HL-60 cell	Inhibits the proliferation of tumor cell, and leads to Go/G1 phase block (16)
	Melanoma B16 Model	Enhances the activities of T lymphocytes (17)
	P ₈₁₅ cells in mice	Enhances the activities of T NK cells, lymphokine activated killer cells (LAK cells)
	Abdominal cavity	Enhances the activities of T NK cells, lymphokine activated killer cells (18)
2. Immuno-modulation	Splenocyte	strengthens the phagotrophy function of mononuclear macrophage system (19)
	Mice	Promotes the formation of antibody and complement
	Guinea pig	Increase the weight of immune organs
3. Hypoglycemic effect	Mice	Possibly enhances the oxidative phosphorylation of mitochondria and the activities of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase (20)
	Mice	Up-regulates hematopoietic growth factor secreted by stromal cells inhematopoietic microenvironment (21)
4. Hematopoiesis regulation	Human umbilical vein endothelial cell Ecv304	

라. 사포닌 전환 원리

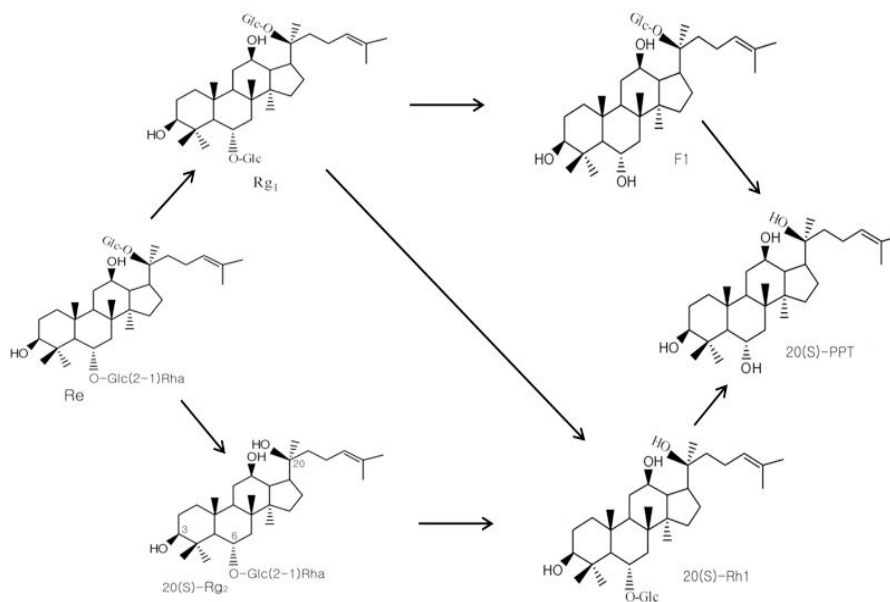


Figure 1-4. Biotransformation pathway of protopanaxatriol type saponins

Glu: β -D-glucopyranosyl, Rha: α -L-rhamnose

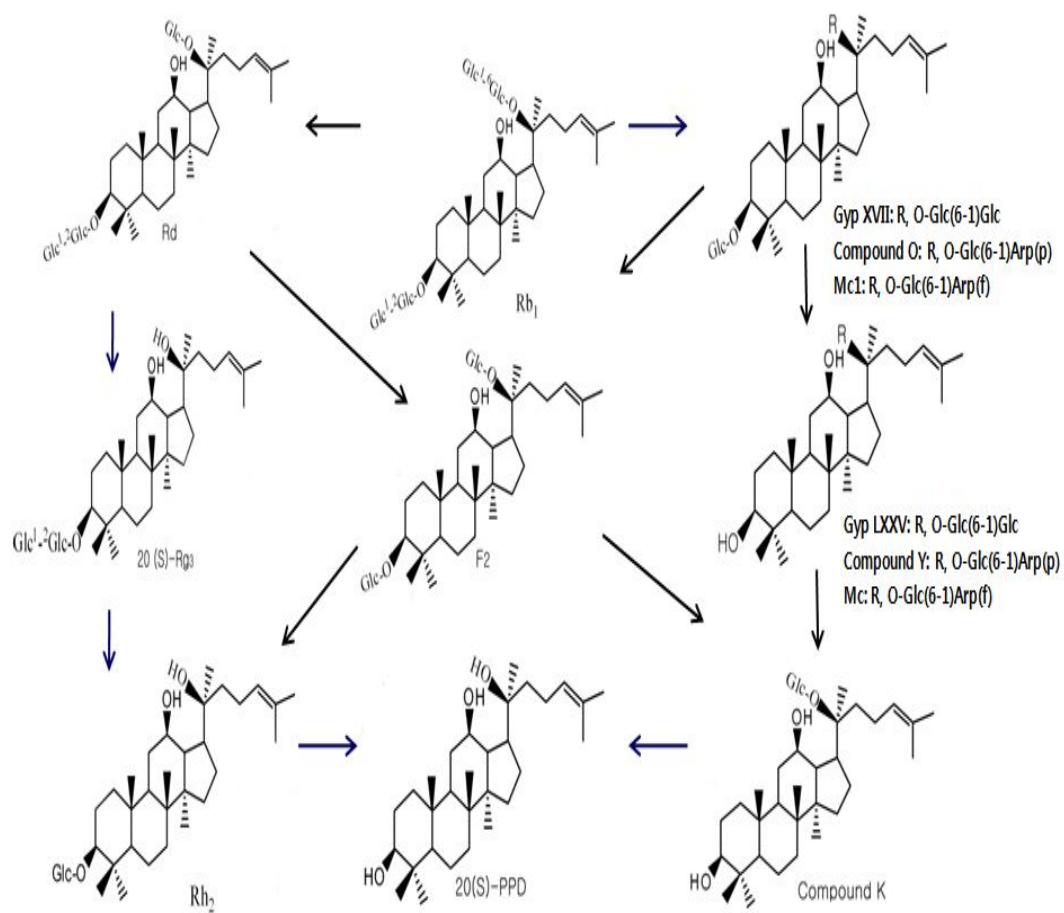
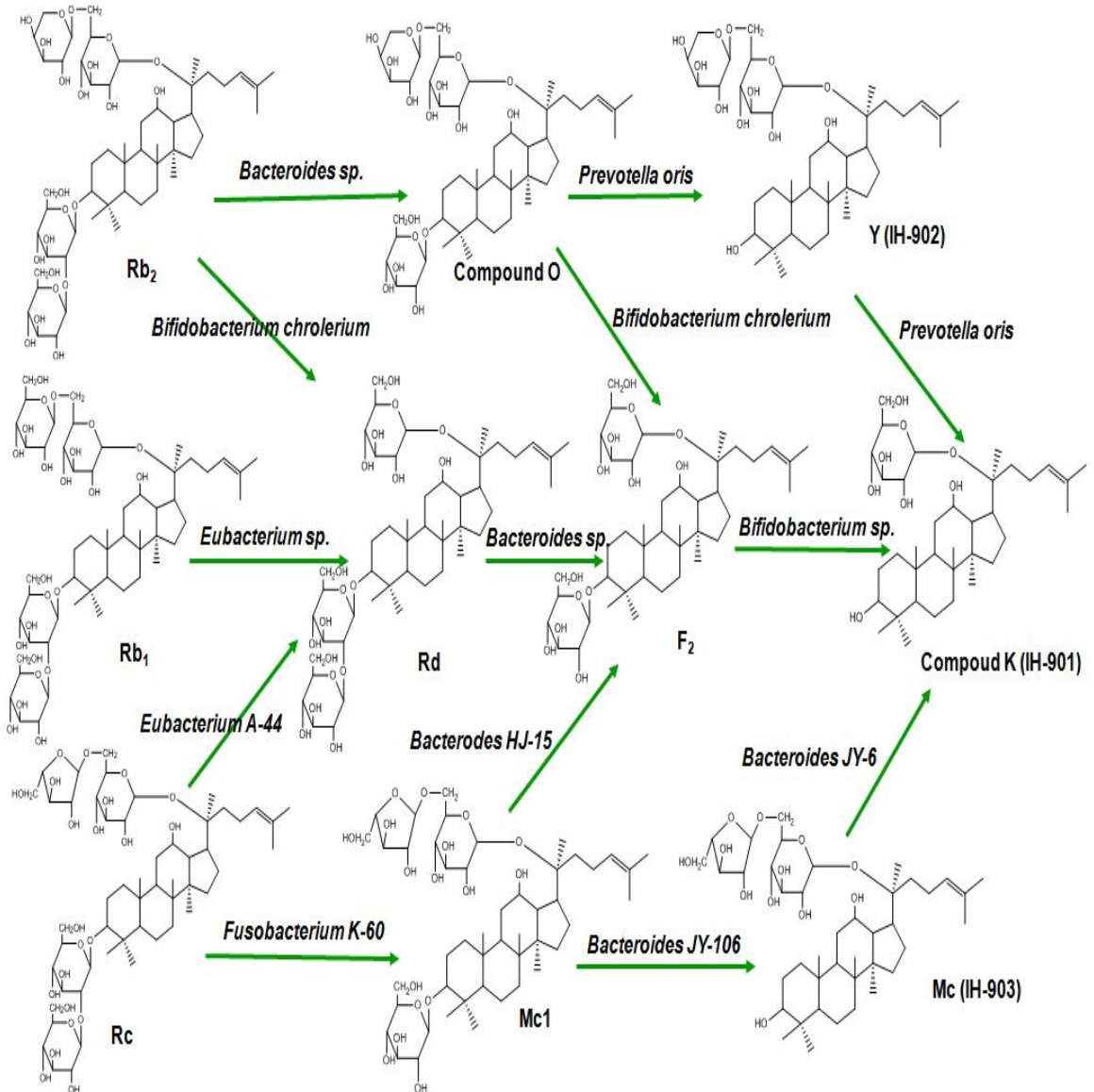
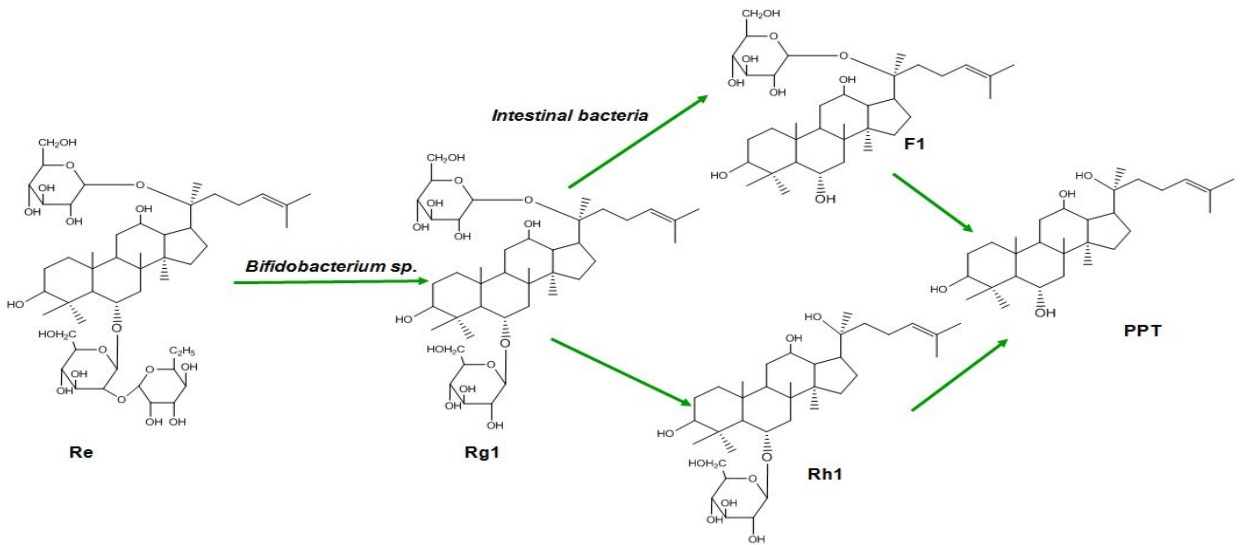


Figure 1-5. Biotransformation pathway of protopanaxadiol type saponins

Glu: β -D-glucose, Ara(p): α -L-arabinose (pyranose), Ara(f): α -L-arabinose (furanose)

따. Ginsenoside biotransformation에 사용되는 미생물과 대사물

Substrates	Products	Microbes
Ra ₁	Rb ₂	<i>Bifidobacterium breve</i> K-110 (22)
Rb ₁	Rd	<i>Burkholderia pyrocinia</i> GP16, <i>Bacillus megaterium</i> GP27
		<i>Sphingomonas echinoides</i> GP50 (23)
	C-K	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 6906, <i>A.usamii</i> var. <i>shirousamii</i> KCTC 6956, <i>Bifidobacterium</i> sp. Int57, <i>Bifidobacterium</i> sp. SJ32, <i>Fusobacterium</i> K-60, <i>Sterptococcu</i> SP, <i>Eubacterium</i> A-44 (24-26)
	F ₂	<i>Bifidobacterium</i> sp. SH5
	Rh ₂	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp., <i>Delbrueckii</i> KCTC1047, <i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
Rb ₂	Rd	<i>Bifidobacterium breve</i> K-110 (27)
	F ₂	<i>Bifidobacterium</i> sp. SH5
	C-K	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 6906, <i>A.usamii</i> var. <i>shirousamii</i> KCTC 6956, <i>Bifidobacterium</i> sp. Int57, <i>Bifidobacterium</i> sp. SJ32, <i>Eubacterium</i> A-44
	Rh ₂	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp., <i>Delbrueckii</i> KCTC1047
Rc	Rd	<i>Bifidobacterium breve</i> K-110
	C-K	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 6906, <i>A.usamii</i> var. <i>shirousamii</i> KCTC 6956, <i>Bifidobacterium</i> sp. Int57, <i>Bifidobacterium</i> sp. SJ32,
	F ₂	<i>Bifidobacterium</i> sp. SH5
	Rh ₂	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp., <i>Delbrueckii</i> KCTC1047
Rg ₃	Rh ₂	<i>Bacteroides</i> sp., <i>Eubacterium</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp. (28)
		<i>Fusarium proliferatum</i> ECU2042 (29)
Re	Rg ₁	<i>Penicillium</i> sp (30)
	F ₁	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i> , <i>Penicillium decumbens</i>
	Rg ₂	<i>A.usamii</i> var. <i>shirousamii</i> KCTC 6956, <i>Aspergillus oryzae</i>
	Rh ₁	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 6906, <i>Bifidobacterium</i> sp. Int57, <i>Bifidobacterium</i> sp. SJ32, <i>Penicillium</i> sp., <i>Penicillium decumbenes</i> (31)
Rg ₁	F ₁	<i>Penicillium decumbens</i>
	Rh ₁	<i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i>
Rg ₂	Rh ₁	<i>Penicillium</i> sp., <i>Absidia</i> sp.39
	Ppt	<i>Penicillium decumbens</i>
Rf	Rh ₁	<i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus oryzae</i>
	Ppt	<i>Penicillium decumbens</i>



2. 구증구포 방법에 의한 흑삼 제조 및 HPLC 사포닌 분석조건 확립

가. 흑삼제조

4 년근 수삼을 그늘에서 약간 수분을 건조시킨 후 100℃에서 10시간 증숙한 후, 60℃ 오븐에서 8시간 건조한다. 다시 80℃에서 6시간 증숙 후 건조하는 과정을 8회 반복하여 흑삼을 제조하였다. 아래 도표는 구증구포 흑삼의 제조과정을 도식화한 것이며, Fig. 2-1 은 증숙 횟수에 따른 흑삼모양을 나타내었다.

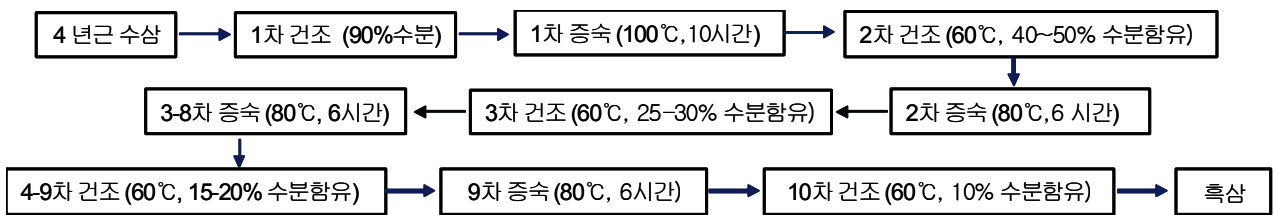
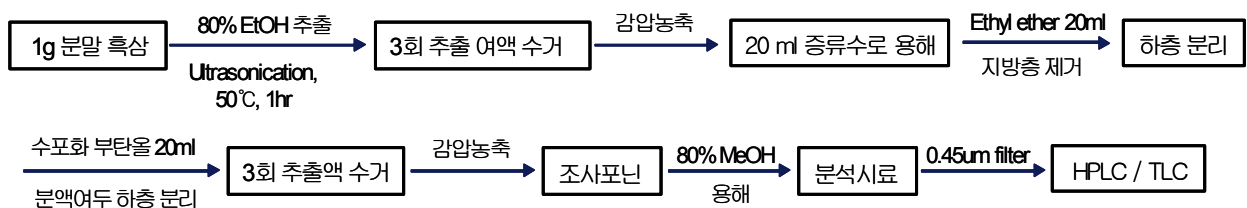


Figure 2-1. The morphological changes of ginseng in black ginseng processing.

나. Ginsenoside Rg₃ 분석을 위한 HPLC 분석 조건 확립

(1) TLC 분석을 통한 사포닌 패턴 비교

① 인삼 추출물 제조



② TLC 분석

인삼 추출액을 TLC plate에 점적한 후 각 조건의 전개용매에 전개하여 건조시킨 후 10% 황산용액에 담근 후 알콜램프로 plate를 가열하여 인삼 추출물의 사포닌 조성을 분석하였다.

③ TLC 전개용매

4 가지 조건의 TLC 전개용매 조성에 따라 인삼 추출물의 사포닌을 정성하기 위하여 분석한 결과 2번째 전개용매 조성 (BuOH : EtOAc : H₂O = 4 : 1 : 5 (upper layer)에서 사포닌 분리도가 높게 나타났다 (Table 2-1. Fig. 2-2).

Table 2-1. The developing system for TLC analysis

Developing solvent ratio	
[A] CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O = 65:35:10	lower layer
[B] BuOH : EtOAc : H ₂ O = 4:1:5	upper layer
[C] CHCl ₃ : MeOH : BuOH : H ₂ O = 13:10:10:8	lower layer
[D] CHCl ₃ : MeOH : EtOAc : H ₂ O = 16:40:22:10	lower layer

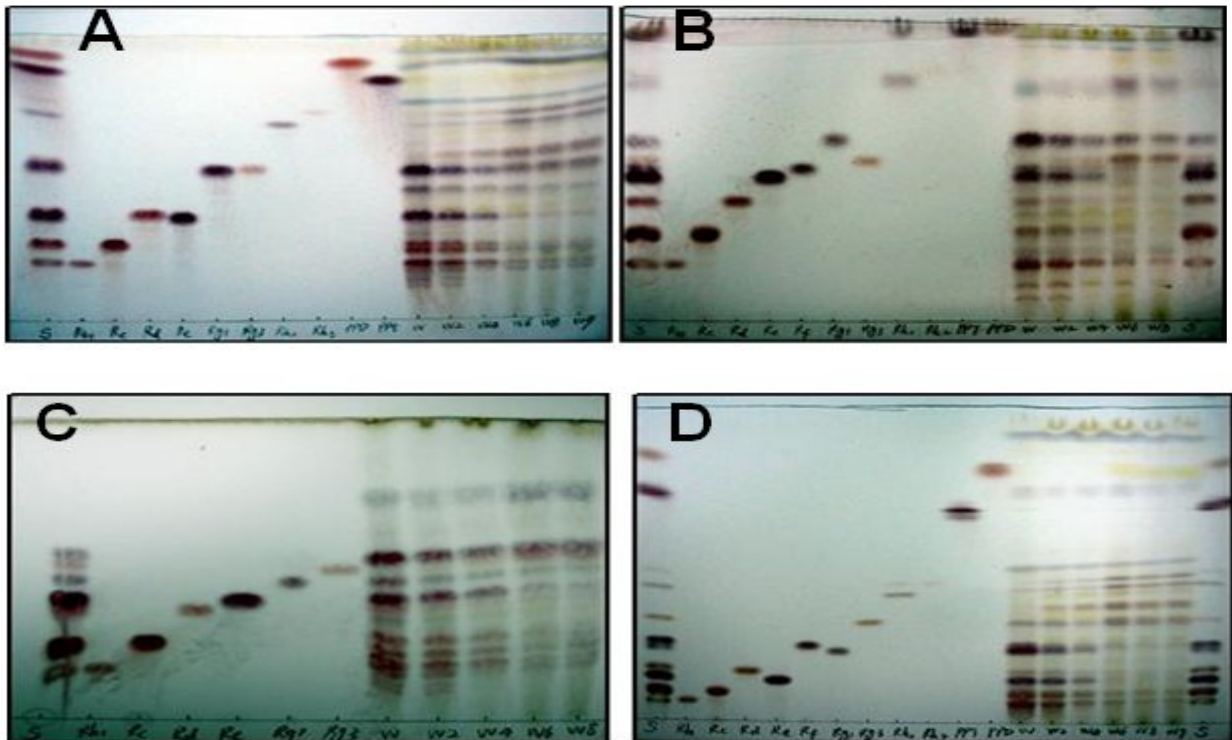


Figure 2-2. TLC results of ginsenoside standards and total ginsenosides extracted from Korean white ginseng, steamed ginseng for 2, 4, 6, 8, 9 times.

(2) Ginsenoside Rg₃의 최적 분석 조건 확립

HPLC system을 이용하여 인삼의 사포닌을 분석하기 위하여, 조사포닌을 추출한 후 Table 2-2의 조건에 따라 이동상인 물과 Acetonitrile 용매를 다른 조성으로 전개하도록 하여 인삼 사포닌을 분리하는 gradient system을 적용하여 분석하였다. 시료주입은 15 uL, 유속은 1 mL/min이었다. 11개의 표준 사포닌을 본 system에 적용한 결과, 각 표준 사포닌의 분리시간은 (Retention time) Rg₁ 18.61분, Re 19.95분, Rf 47.13분, Rb₁ 49.02분, Rg₂ 49.71분, Rc 50.41분, Rb₂ 51.50분, Rb₃ 50.12분, Rd 53.78분, 20(S)-Rg₃ 66.13분, 20(R)-Rg₃ 66.45분으로 나타났다 (Fig. 2-3). 그 외 HPLC 분석조건의 정확도와 재현성을 알아보기 위한 표준 사포닌의 calibration curve, overall intra-, interday variation과 accuray에 대한 결과는 Table 2-3~5에 나타내었다.

Table 2-2. HPLC condition

HPLC	Agilent 110 (Palo Alto, CA, USA)
Column	Discovery C ₁₈ column (5 μm, 250 × 4.6 mm)
Detection wavelength(UV)	203 nm
Flow rate	1 mL/min
Mobile phase	Water (A), Acetonitrile(B)
Injection volume	15 uL
Gradient elution system : B(%)	0-30 min 20%, 30-60 min 20-45%, 60-70 min 45-62%

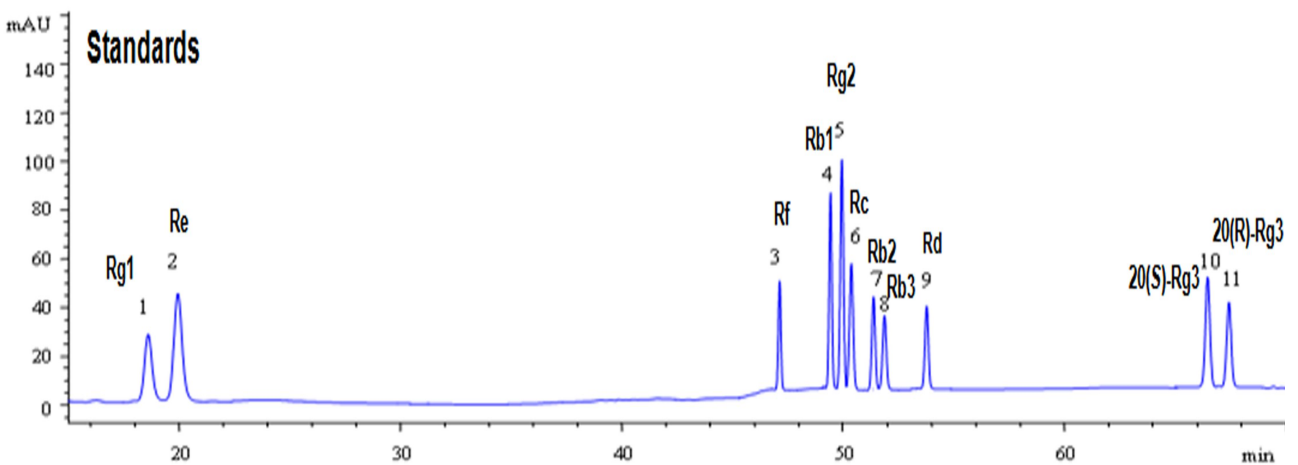


Figure 2-3. Typical HPLC chromatogram of ginsenoside reference standards.

Table 2-3. Calibration curves and LODs for 11 ginsenosides

	RT (min)	Calibration curve ^{a)}	Correlation coefficient(r^2)	Test range (mg/mL)	LOD ^{b)} (μ g/ML)
Rg ₁	18.61	$y=3246.7x+17.952$	0.9995	0.050-1.000	3.6
Re	19.95	$y=3683.2x-10.658$	0.9996	0.050-1.000	2.6
Rf	47.13	$y=3275.1x+21.432$	0.9995	0.050-1.000	2.5
Rb ₁	49.02	$y=3425.5x+8.8987$	0.9997	0.010-0.200	2.6
Rg ₂	49.70	$y=3262.3x+20.69$	0.9999	0.050-1.000	3.2
Rc	50.41	$y=3573.0x+15.459$	0.9997	0.050-1.000	2.9
Rb ₂	51.50	$y=2441.2x+14.129$	0.9998	0.050-1.000	2.7
Rb ₃	50.12	$y=5579.0x+42.583$	0.9998	0.050-1.000	2.4
Rd	53.78	$y=3253.4x+15.892$	0.9998	0.050-1.000	3.9
20(S)-Rg ₃	66.13	$y=2494.4x-11.716$	0.9996	0.050-0.500	2.2
20(R)-Rg ₃	66.45	$y=2598.7x-19.356$	0.9997	0.050-0.500	2.9

^{a)} y =peak area; x =concentration (mg/ml); ^{b)}LOD=Limit of detection (S/N=3)

Table 2-4. Intra- and inter-day variations of HPLC method for determination of 11 ginsenosides

Analytes	Intra-day (n=3)		Inter-day (n=5)	
	Content (mg/g)	R.S.D. ¹⁾ (%)	Content (mg/g)	R.S.D.(%)
Rg ₁	1.68±0.08	2.62	1.57±0.05	2.32
Re	0.66±0.02	1.14	0.62±0.03	1.86
Rf	0.44±0.02	1.45	0.48±0.04	1.58
Rb ₁	2.66±0.07	2.14	2.43±0.05	1.84
Rg ₂	0.57±0.04	0.85	0.53±0.09	1.21
Rc	1.54±0.06	1.86	1.58±0.04	1.45
Rb ₂	0.52±0.04	1.32	0.49±0.05	1.74
Rb ₃	ND ²⁾	ND	ND	ND
Rd	0.48±0.02	0.72	0.47±0.06	1.69
20(S)-Rg ₃	2.84±0.18	2.44	2.80±0.12	1.73
20(R)-Rg ₃	2.20±0.09	1.87	2.12±0.05	1.21

¹⁾R.S.D.(%)=100×S.D./mean: ²⁾ND, not detected

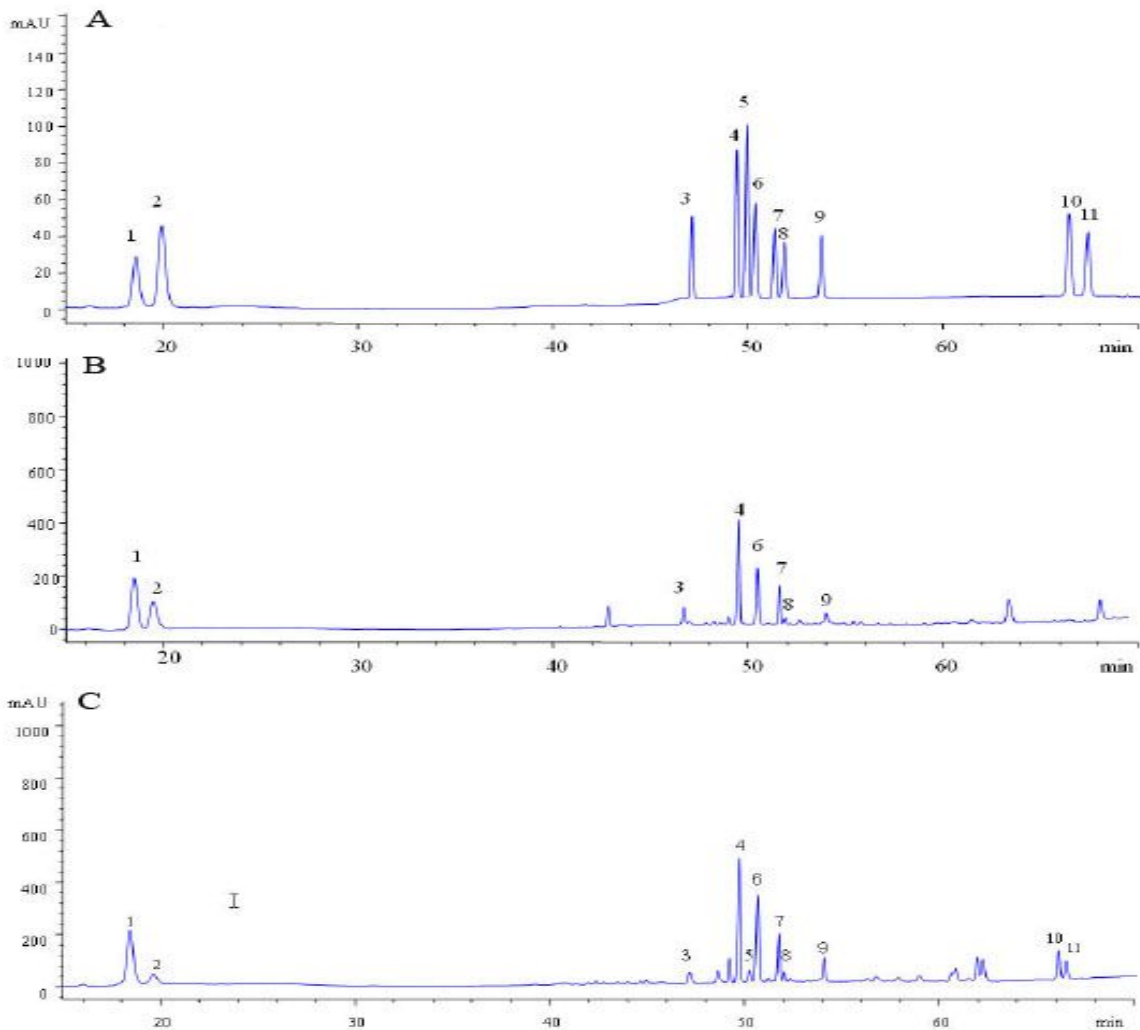
Table 2-5. Accuracy of HPLC method for the determination of 11 ginsenosides

Analytes	Original (mg)	Spiked (mg)	Found (mg)	Recovery ^{a)} (%)	R.S.D. (%)
Rg ₁	1.66	3.00	4.54	96.0	2.18
		1.50	3.20	102.7	1.67
Re	0.69	1.00	1.66	97.0	1.23
		0.50	1.20	102.0	0.75
Rf	0.47	1.40	1.90	102.1	3.16
		0.70	1.19	102.9	1.37
Rb ₁	2.64	5.00	7.52	97.6	2.36
		2.50	5.22	103.2	1.43
Rg ₂	0.53	1.50	1.96	95.3	1.67
		1.75	1.32	105.3	1.16
Rc	1.57	2.00	3.64	103.5	1.75
		1.00	2.59	102.0	2.16
Rb ₂	0.52	1.20	1.74	101.7	2.73
		0.60	1.15	105.0	1.25
Rb ₃	ND	0.40	0.41	102.5	0.96
		0.20	0.20	100	0.83
Rd	0.49	1.40	1.93	102.9	0.88
		0.70	1.17	97.1	0.75
20(S)-Rg ₃	2.84	5.00	7.90	101.2	2.48
		2.50	5.32	99.2	0.79
20(R)-Rg ₃	2.15	3.00	5.17	100.7	0.61
		1.50	3.69	102.7	0.84

^{a)}Recovery(%)=100×(amount found-original amount)/amount spiked; R.S.D.(%)=100×S.D./mean.

다. 증숙 횟수에 따른 사포닌 함량 변화

증숙 과정에 따라 변화되는 사포닌 함량을 HPCL로 분석한 결과와 전체적인 사포닌 함량의 변화를 Fig. 2-4와 2-5에 나타내었다. 증숙하지 않은 백삼의 경우 ginsenoside Rg₃ (S), (R) form이 보이지 않았다. 2번 증숙한 경우 전체적으로 모든 사포닌 함량이 미량으로 증가하였고, 새로운 peak인 9, 10의 ginsenoside Rg₃(S), (R) 사포닌 새롭게 형성되는 것을 볼 수 있었다. 3회, 6회, 9회의 증숙이 반복될수록 1, 2번 peak인 Rg₁, Rg₂는 거의 없어지고, 3-8번의 peak도 함량이 많이 감소하였다. 그러나 9, 10번의 ginsenoside Rg₃(S), (R) peak는 상당히 증가하였다 (Table 2-6). 이러한 결과는 가열 증숙과정시 열에 불안정한 수용성 malonyl ginsenoside의 (m-Rb₁, m-Rb₂, m-Rb₃, m-Rc, m-Rd) malnoyl기가 떨어져 Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd와 같은 PPD계 사포닌이 생성되고, 열에 의해서 C-20에 결합되어 있는 당이 가수분해되거나, C-20 위치의 OH 기가 이성화되어 ginsenoside Rg₃으로 새롭게 전환되는 것으로 사료된다 (32).



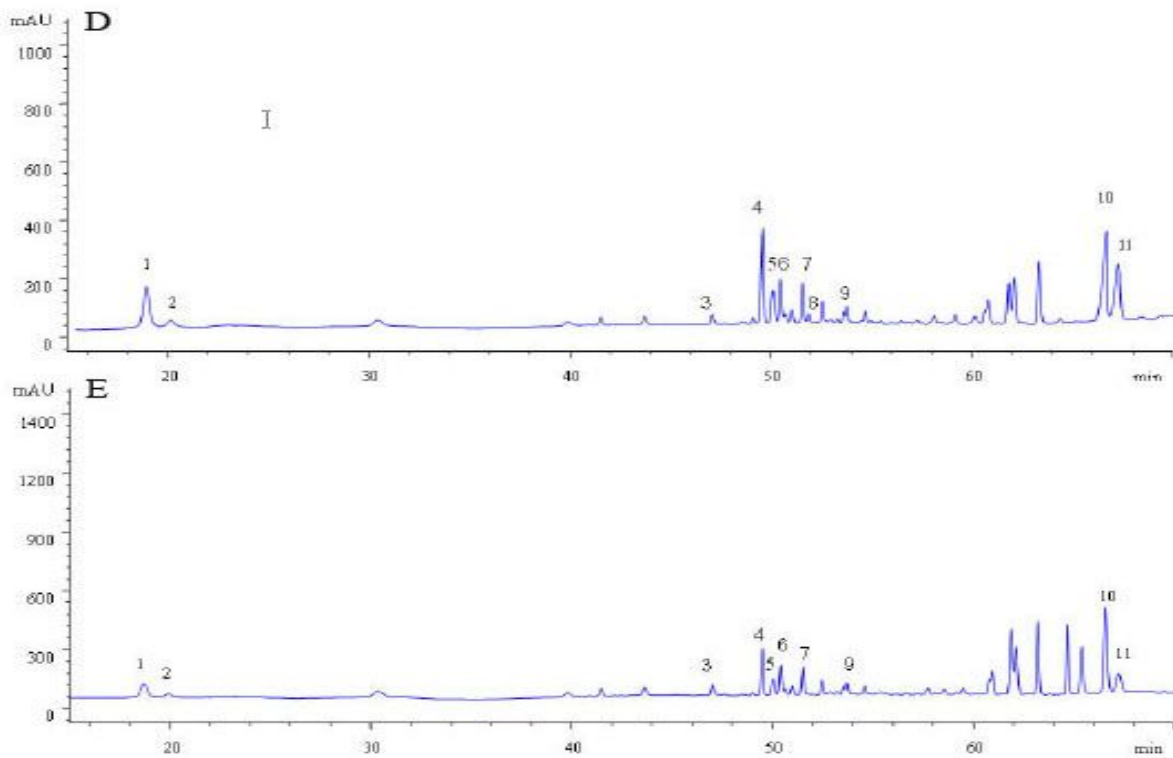


Figure 2-4. HPLC-UV chromatograms of mixed standards (A) and ginsenosides in WG (B) AND steamed ginseng 3 times (C), 6 times (D), 9 times (E). Peaks: 1, Rg₁; 2, Re; 3, Rf; 4, Rb₁; 5, Rg₂; 6, Rc; 7, Rb₂; 8, Rb₃; 9, Rd; 10-11, 20(S)-, 20(R)-Rg₃

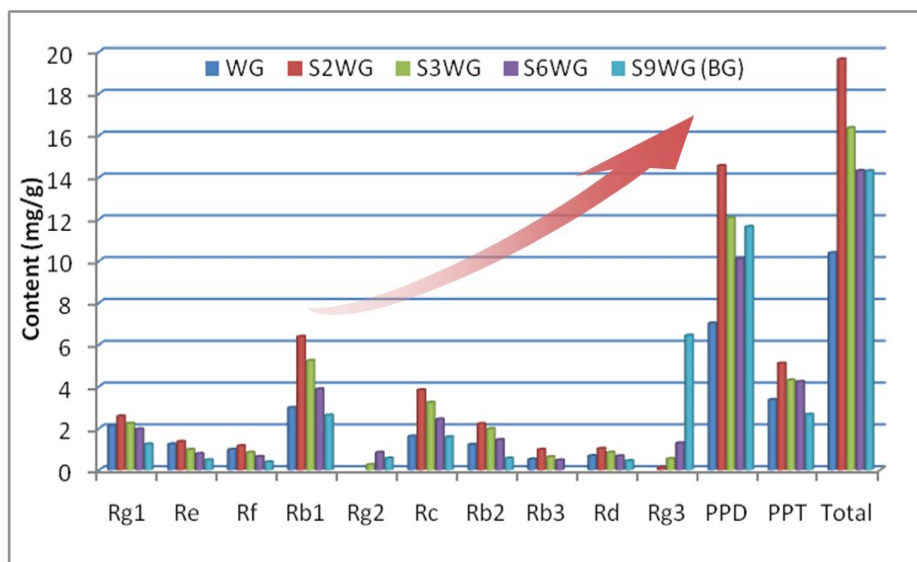


Figure 2-5. Comparison of ginsenosides with steaming times

Table 2-6. The amounts of ginsenosides in WG and 2-, 3-, 6- and 9 times steamed ginseng

Compound (mg/g)	WG ^{a)}	S ₂ WG ^{b)}	S ₃ WG ^{c)}	S ₆ WG ^{d)}	S ₉ WG ^{e)}
Rg ₁	2.12±0.06	2.58±0.07	2.23±0.03	1.96±0.05	1.24±0.04
Re	1.24±0.04	1.36±0.05	0.98±0.03	0.78±0.05	0.48±0.03
Rf	0.98±0.03	1.16±0.02	0.84±0.05	0.64±0.06	0.38±0.03
Rb ₁	2.98±0.07	6.38±0.12	5.23±0.15	3.87±0.08	2.62±0.09
Rg ₂	ND ²⁾	ND	0.25±0.02	0.84±0.02	0.56±0.04
Rc	1.62±0.03	3.83±0.08	3.23±0.07	2.43±0.09	1.58±0.07
Rb ₂	1.22±0.07	2.21±0.04	1.97±0.05	1.45±0.04	0.56±0.02
Rb ₃	0.52±0.05	0.98±0.02	0.63±0.04	0.47±0.03	ND
Rd	0.68±0.07	1.03±0.02	0.84±0.04	0.67±0.05	0.44±0.01±
Rg ₃	ND	0.12±0.02	0.54±0.05	1.29±0.03	6.44±0.08
PPD ³⁾	7.02±0.14	14.55±0.15	12.06±0.12	10.09±0.09	11.64±0.19
PPT ⁴⁾	3.36±0.12	5.10±0.08	4.30±0.09	4.22±0.11	2.66±0.09
Total	10.38±0.17	19.64±0.19	16.36±0.14	14.31±0.21	14.30±0.13

^{a)}WG, white ginseng(*P. ginseng* C.A. Meyer);

^{b),c),d),e)} S₂ WG, S₃ WG, S₆WG, and S₉WG : white ginsengs were steamed 2, 3, 6, and 9times according to the traditional method of making blacking ginseng, respectively;

¹⁾All values were expressed as the means ± S.D. (n=3)

²⁾ND, Not detected;

³⁾PPD: Protopanaxdiol type saponins: Pb₁+Rc+Rb₂+Rd+Rg₃

⁴⁾PPT: protopanaxtriol type saponins: Rg₁+Re+Rf+Rg₂ .

라. 증숙횟수에 따른 ginsenoside Rg₃ 함량의 변화

증숙횟수를 반복할수록 새롭게 형성되는 ginsenoside Rg₃ 함량은 Fig. 2-6에 나타내었다. 2회 증숙시 ginsenoside Rg₃는 0.12 mg/g을 나타내었고, 증숙횟수가 반복될수록 그 함량이 증가되어, 최종 흑삼을 제조하였을 때의 ginsenoside Rg₃ 함량은 6.44 mg/g으로 홍삼보다 50배 이상이 증가하였다.

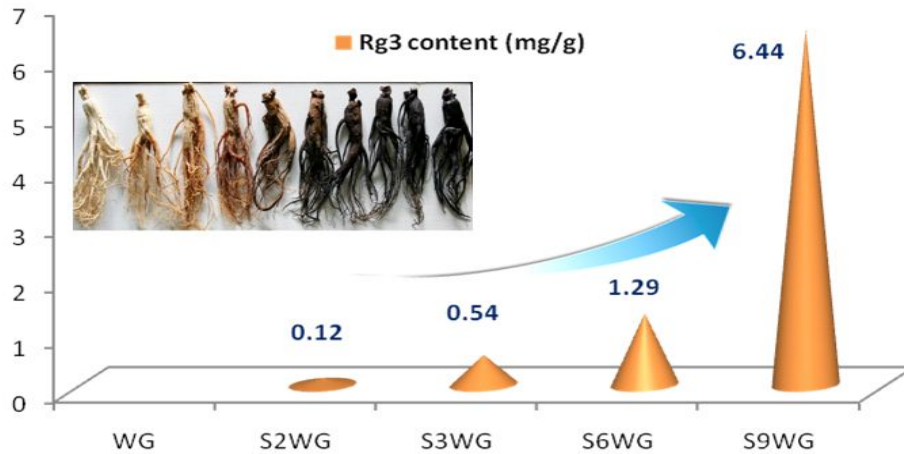


Figure 2-6. Change of ginsenoside Rg₃ contents in a traditional way for preparing BG

3. 새로운 흑삼제조 기술 탐색

가. 과일 유기산 침지방법을 이용한 흑삼의 제조

(1) 흑삼제조

4년근 수삼을 80℃에서 15분간 증숙한 후 60℃에서 24시간 건조한 후 사과주스, 포도주스, 파인애플 주스에 24시간 침지한 후 60℃ 오븐에서 24시간 건조한다. 흑삼의 제조는 전통적인 구증구포 방법으로 증숙하여 제조하였다 (Fig. 2-7)

(2) 과일주스 침지에 따른 흑삼의 사포닌 함량 변화

인삼 사포닌이 산성 조건에서 열을 가하면 C-20에 결합되어 있는 당의 가수분해를 촉진하는 특성을 이용하여 파인애플주스, 사과주스, 포도주스에 침지하여 흑삼을 제조한 후 각각의 사포닌 함량 변화를 HPLC 분석을 통하여 살펴보았다. 각 제조인삼 사포닌의 크로마토그램과 사포닌 함량 변화를 Fig. 2-8, 2-9에 나타내었다. 수삼을 아무런 처리 없이 4번 증숙한 대조군의 경우 총 사포닌 함량은 15.10±0.12 mg/g이었고, 사과주스에 침지하여 제조한 흑삼은 14.43±0.17 mg/g, 파인애플 주스에 침지한 흑삼은 16.16±0.14 mg/g, 포도주스에 침지하여 제조한 흑삼은 16.70±0.21 mg/g으로 포도주스에 침지하여 제조한 흑삼의 총사포닌 함량이 가장 높았다 (Table 2-7).



A. 대조군 B. Apple juice C. Grape juice D. Pineapple juice

Figure 2-7. Black ginseng produced by soaking into several fruit juices

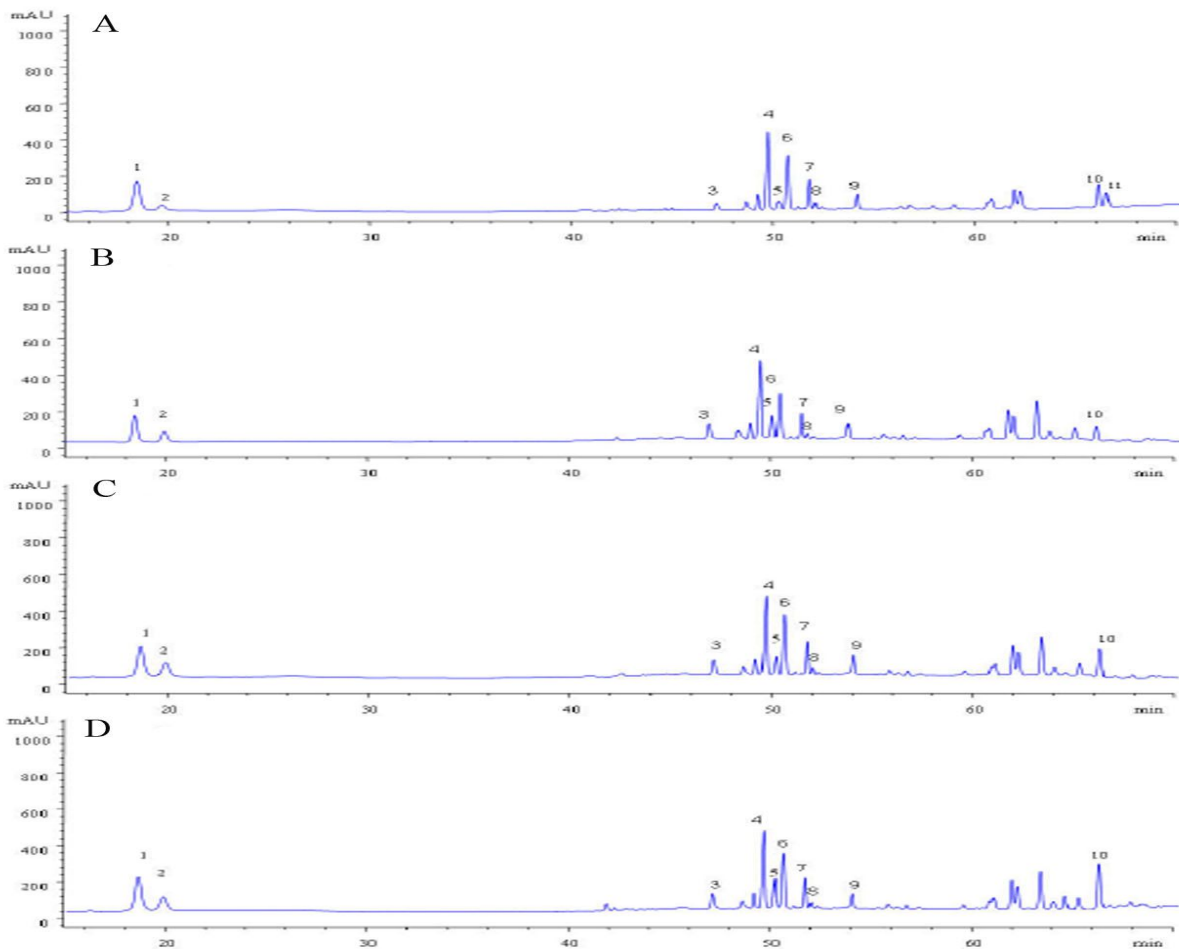


Figure 2-8. HPLC-UV chromatograms of ginsenosides extracted from the ginsengs steamed 4 times after soaking in apple (B), pineapple (C), grape (D) juices, and 4 times repeated steaming white ginseng (A), respectively.

Table 2-7. The amounts of ginsenosides in 4 times steamed ginseng after soaking into different fruit juices

Compound (mg/g)	S ₄ WG	S ₄ WG (apple juice)	S ₄ WG (pineapple juice)	S ₄ WG (grape juice)
Rg ₁	2.13±0.02	1.96±0.02	2.46±0.02	2.33±0.04
Re	0.88±0.03	1.02±0.04	1.28±0.02	1.15±0.04
Rf	0.76±0.05	0.86±0.02	0.93±0.04	0.85±0.06
Rb ₁	4.35±0.12	3.96±0.13	3.94±0.02	3.89±0.05
Rg ₂	0.31±0.03	0.72±0.03	0.62±0.03	1.17±0.01
Rc	3.02±0.06	2.64±0.08	3.21±0.07	3.17±0.04
Rb ₂	1.76±0.04	1.58±0.02	1.65±0.05	1.60±0.03
Rb ₃	0.54±0.01	0.42±0.05	0.57±0.03	0.62±0.01
Rd	0.76±0.02	0.84±0.04	0.83±0.06	0.93±0.04
Rg ₃	0.59±0.04	0.43±0.02	0.67±0.02	0.89±0.02
PPD	11.02±0.12	9.87±0.12	10.87±0.12	11.10±0.09
PPT	4.08±0.07	4.56±0.05	5.29±0.09	5.50±0.12
Total	15.10±0.12	14.43±0.17	16.16±0.14	16.70±0.21

PPD: Protopanaxdiol type saponins: Pb₁+Rc+Rb₂+Rd+Rg₃

PPT: protopanaxtriol type saponins: Rg₁+Re+Rf+Rg

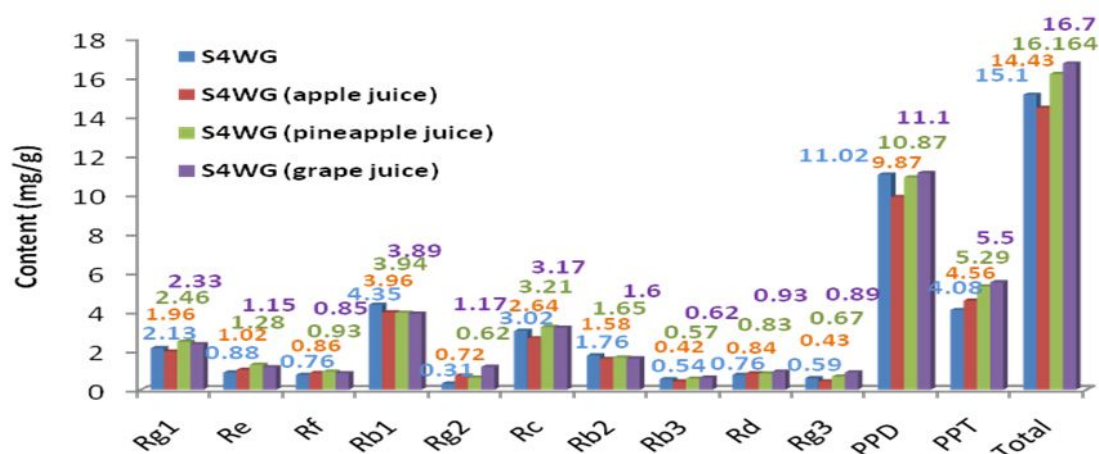


Figure 2-9. Comparison of ginsenosides with different fruit juices

(3) 과일주스 침지에 따른 흑삼의 ginsenoside Rg₃ 함량 비교

각 주스에 침지하여 제조한 흑삼 엑기스의 조사포닌 TLC 분석결과 (Fig. 2-10), 포도주스에 침지하여 제조한 흑삼의 Rg₃ 함량은 0.89±0.02 mg/g으로 무처리 4회 증숙 인삼의 Rg₃ 함량 0.59±0.04 mg/g보다 현저히 증가하였다. 본 실험을 통하여 포도주스 침지방법을 이용한 흑삼제조가 흑삼의 유효사포닌 Rg₃ 함량을 극대화시킬 수 있는 방법으로 사료되었다.

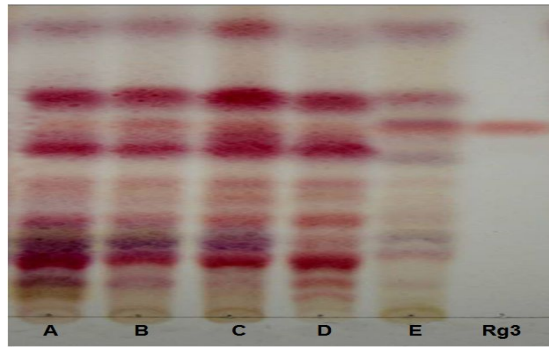


Figure 2-10. TLC of methanol extracts from 4-time steaming WG which firstly was soaked with 3 kinds of fruit juices. A: 4th steamed WG (Apple juice), B: 4th steamed WG (pineapple juice), C: 4th steamed WG (grape juice), D: 4th steamed WG, E: 8th steamed WG.

나. 포도주스 침지를 이용한 흑삼 제조의 최적 조건 탐색

(1) 최적온도 조건 탐색

과일주스 침지방법 중 가장 높은 사포닌 함량을 보여준 포도주스를 이용하여 포도주스 침지 후 3회~6회 증숙시 80℃, 100℃, 120℃로 온도를 달리하여 흑삼을 제조하였다 (Fig. 2-11). 각 조건으로 제조한 흑삼 추출물의 TLC 분석결과, 증숙온도 100℃, 120℃에서 Rg₃ 함량이 높게 나타났다 (Fig. 2-12~14, Table 2-8).

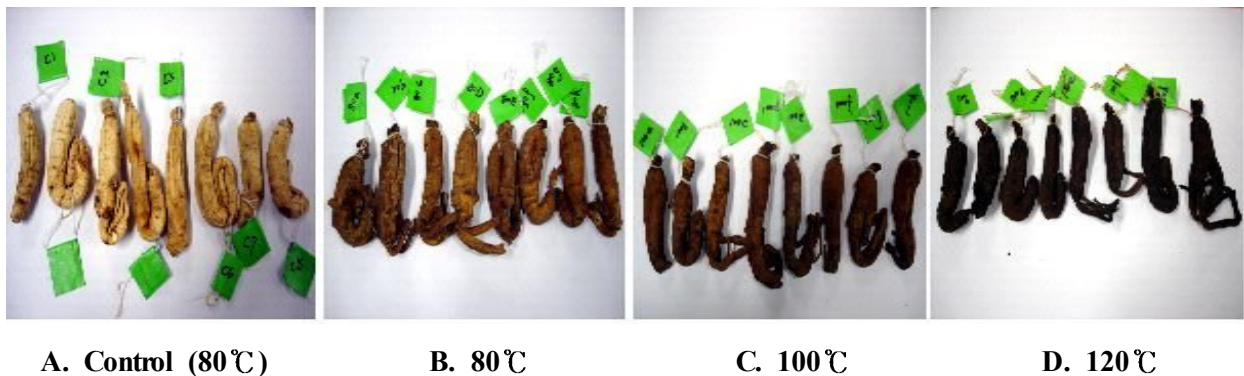


Figure 2-11. Black ginseng soaked into grape juice steamed at different steaming temperature

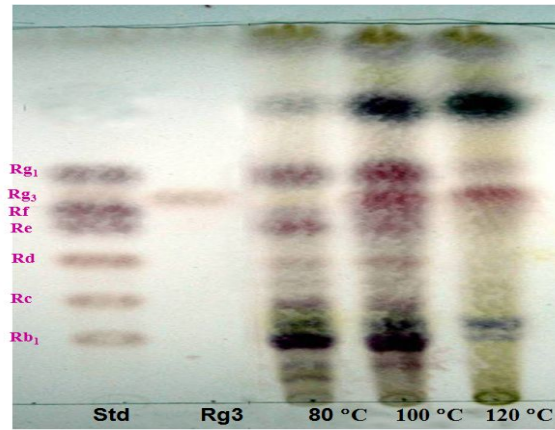


Figure 2-12. TLC analysis of ginsenosides extracted from 3 times steaming ginseng treated firstly with grape juice. (steaming time: 1 h)

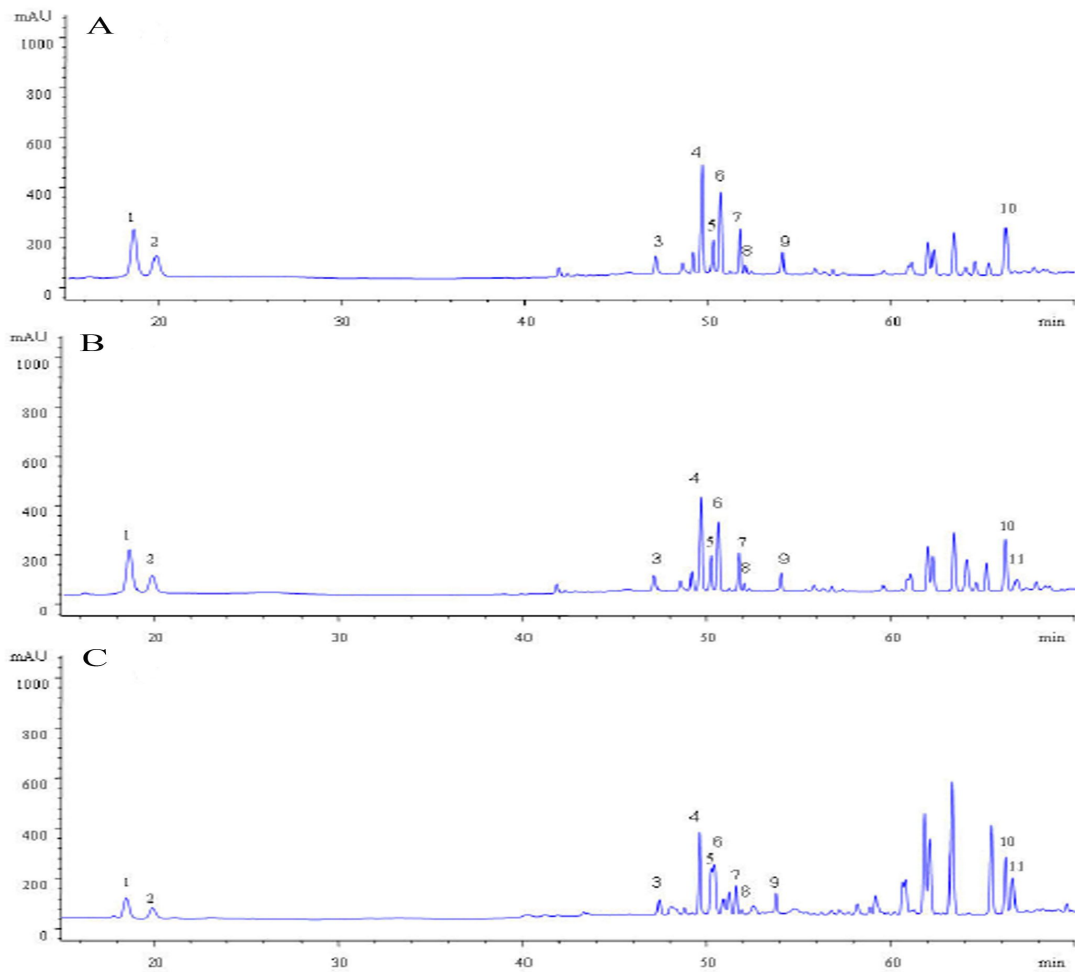


Figure 2-13. HPLC-UV chromatograms of ginsenosides extracted from the ginsengs steamed at different temperature 3 times after soaking in grape juice. A 80°C, B 100°C, C 120°C.

Table 2-8. The amounts of ginsenosides in 3 times steamed ginseng at different temperature after soaking into grape juice

Compound (mg/g)	S ₃ WG (80 °C)	S ₃ WG (100 °C)	S ₃ WG (120 °C)
Rg ₁	1.86±0.03	1.72±0.03	1.26±0.03
Re	0.92±0.01	0.78±0.01	0.65±0.01
Rf	0.74±0.03	0.63±0.03	0.85±0.06
Rb ₁	2.94±0.12	2.68±0.02	2.43±0.02
Rg ₂	0.53±0.03	0.69±0.02	0.82±0.02
Rc	2.48±0.03	2.12±0.09	1.98±0.03
Rb ₂	1.32±0.04	1.16±0.07	0.87±0.06
Rb ₃	0.34±0.01	0.37±0.03	0.26±0.02
Rd	0.48±0.03	0.62±0.06	0.58±0.05
Rg ₃	0.62±0.01	1.28±0.03	2.54±0.01
PPD	8.18±0.10	8.23±0.14	8.66±0.08
PPT	4.05±0.06	3.82±0.08	3.58±0.11
Total	12.23±0.12	12.05±0.13	12.24±0.16

PPD: Protopanaxdiol type saponins: Pb₁+Rc+Rb₂+Rd+Rg₃

PPT: protopanaxtriol type saponins: Rg₁+Re+Rf+Rg₂

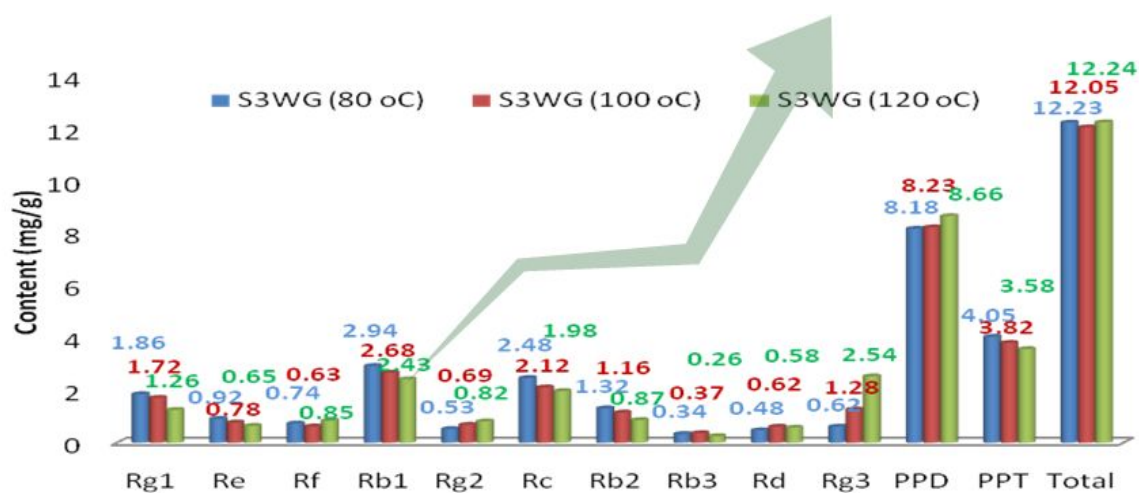


Figure 2-14. Comparison of ginsenosides

(2) 증숙온도 120℃에서 최적의 증숙시간 탐색

포도주스에 침지한 후 120℃에서 15분, 30분, 45분, 1시간, 각각의 제조 시간에 따라 4번 증숙하여 흑삼을 제조하였다 (Fig. 2-15). 증숙 시간과 횟수가 증가할수록 흑삼의 색이 더 검색 변하는 것을 알 수 있었다. 또한 TLC 분석결과 증숙 시간이 증가할수록 Rg₃ 함량도 증가하였다 (Fig. 2-16). 120℃에서 시간별 증숙에 따른 사포닌 함량은 Table 2-9에 나타내었다. 증숙시간이 증가할수록 Rg₁, Rf, Rb₁, Rg₂ 사포닌의 함량이 감소하였고, Re, Rc, Rb₃, Rd는 60분 증숙시 소멸되었다 (Fig. 2-17). 그러나 Rg₃ 함량은 대조군 0.44±0.02 mg/g, 30분 증숙시 2.00±0.08 mg/g, 45분 증숙시 2.14±0.07 mg/g, 60분 증숙시 2.54±0.12 mg/g으로 증숙시간이 증가할수록 Rg₃ 함량도 함께 증가하였다 (Fig. 2-18).



Figure 2-15. The morphological changes of ginsengs steamed at 120℃ in various times (15, 30, 45, and 60 min). Before steaming each time, ginsengs were soaked in grape juice for 24h.

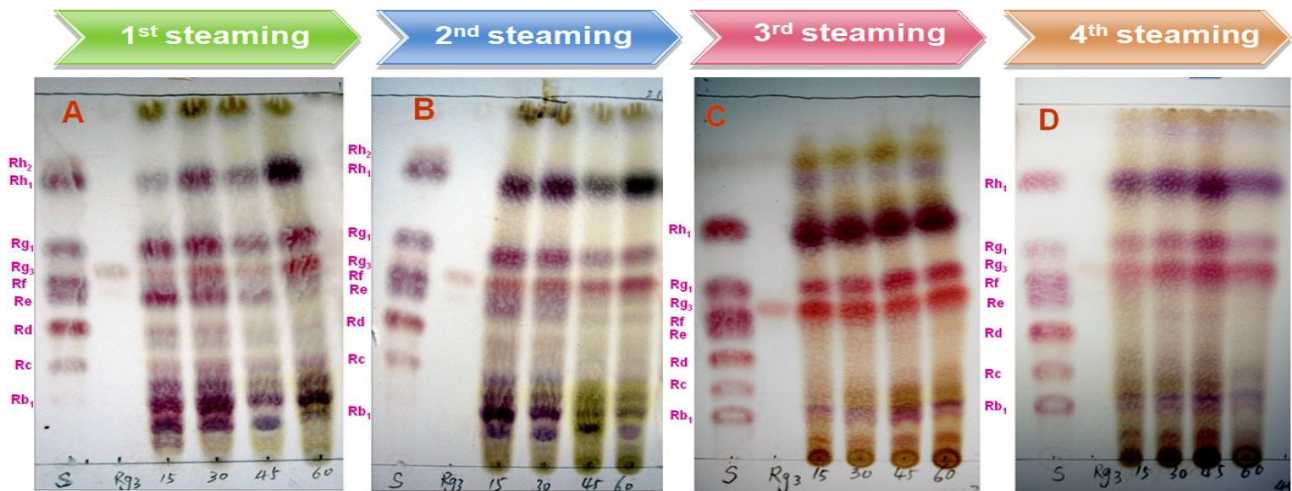


Figure 2-16. Thin layer chromatograms of total ginsenosides extracted from ginsengs steamed at 120°C in various times (15, 30, 45, and 60 min). Before steaming each time, ginsengs were soaked in grape juice for 24 h.

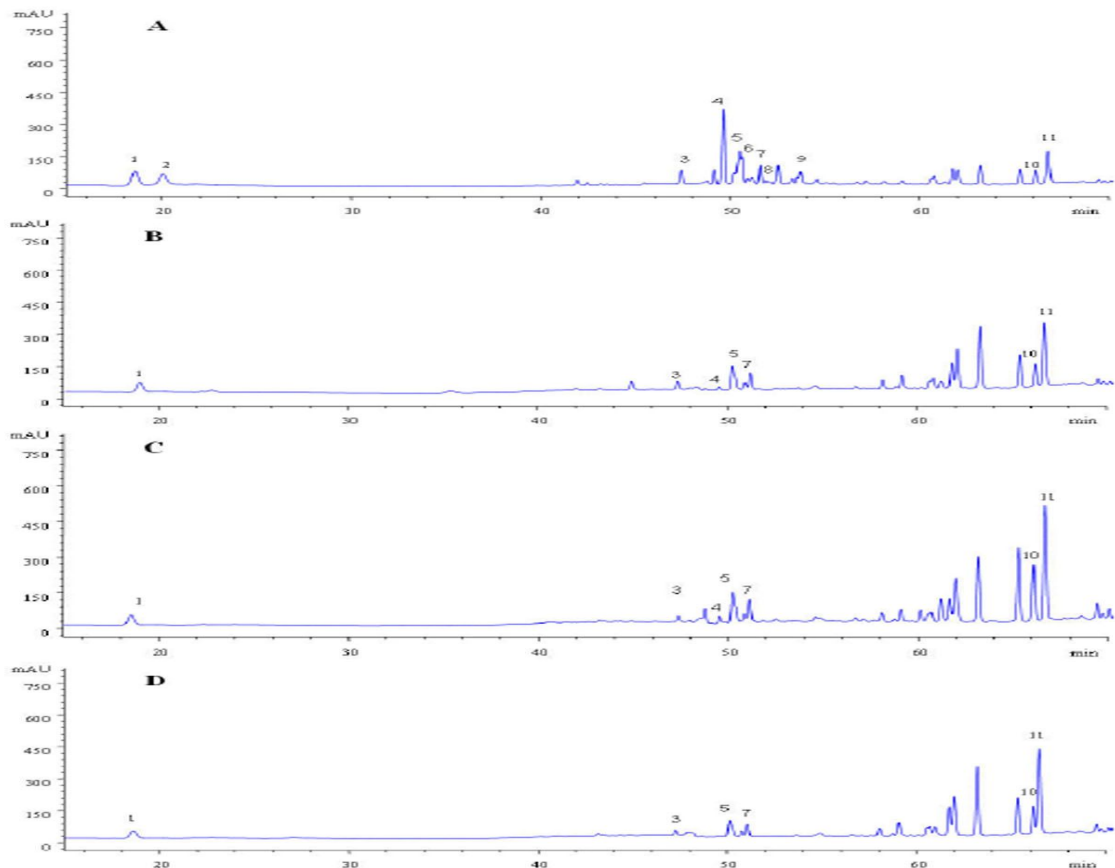


Figure 2-17. HPLC-UV chromatograms of total ginsenosides extracted from ginseng steamed 2 times at 120°C in various times (15, 30, 45, and 60 min). Before steaming each time, ginsengs were soaked in grape juice for 24 h. A, 15 min; B, 30 min; C, 45 min; D, 60 min.

Table 2-9. The amounts of ginsenosides in 2 times steamed ginseng in different steaming time

Compound (mg/g)	S ₂ WG (15min)	S ₂ WG (30min)	S ₂ WG (45min)	S ₂ WG (60min)
Rg ₁	1.32±0.01	1.48±0.01	0.76±0.02	0.67±0.01
Re	0.74±0.02	0.78±0.02	-	-
Rf	0.84±0.03	0.93±0.01	0.45±0.03	0.47±0.02
Rb ₁	2.84±0.09	2.26±0.02	0.59±0.02	0.32±0.03
Rg ₂	0.62±0.04	0.43±0.02	0.52±0.03	0.58±0.02
Rc	1.84±0.02	1.92±0.07	-	-
Rb ₂	0.74±0.05	0.85±0.06	0.53±0.04	0.46±0.03
Rb ₃	0.34±0.01	0.35±0.04	-	-
Rd	0.65±0.04	0.68±0.04	0.38±0.04	-
Rg ₃	0.44±0.02	2.00±0.08	2.14±0.07	2.54±0.12
PPD	6.85±0.09	6.08±0.10	3.64±0.09	3.32±0.07
PPT	3.52±0.08	3.62±0.08	1.73±0.07	1.72±0.09
Total	10.37±0.14	9.70±0.09	5.37±0.12	5.07±0.07

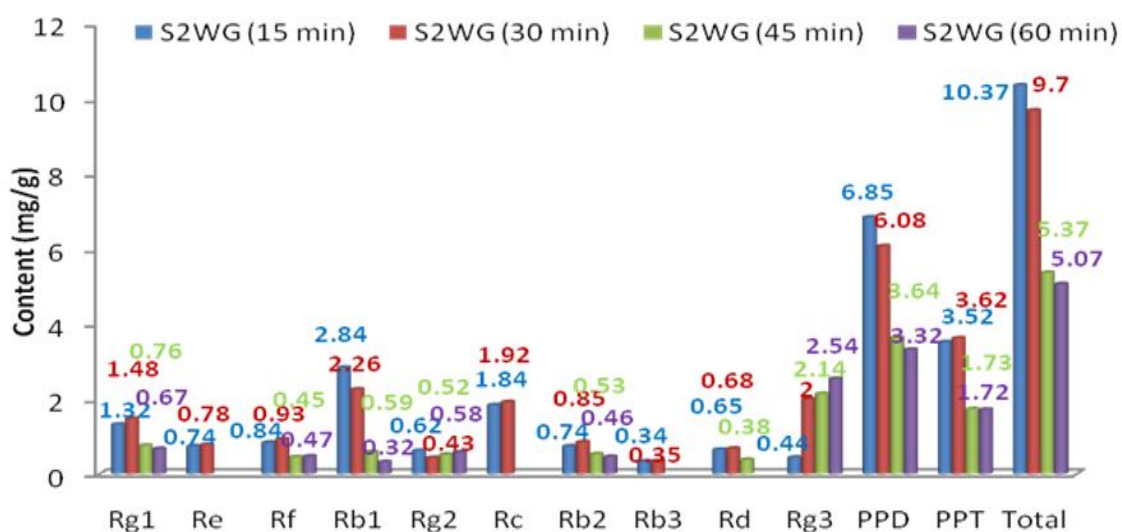


Figure 2-18. Effects of different steaming time on Rg₃ content.

(3) 증숙 횟수에 따른 흑삼제조 (120℃, 60 min)

포도주스를 이용한 흑삼 제조의 최적조건을 찾기 위하여 증숙 온도와 시간을 고정한 후 적정 증숙 횟수를 찾기 위하여 4회의 증숙과정을 반복하여 각 과정에서 제조한 흑삼의 사포닌 함량을 분석하여 Table 2-10와 Fig. 2-19,20에 사포닌 함량 변화를 비교하여 나타내었다. 120℃에서 60분간 3회 증숙하여 제조한 흑삼의 총 사포닌 함량과 Rg₃ 함량이 가장 높게 나타났다.

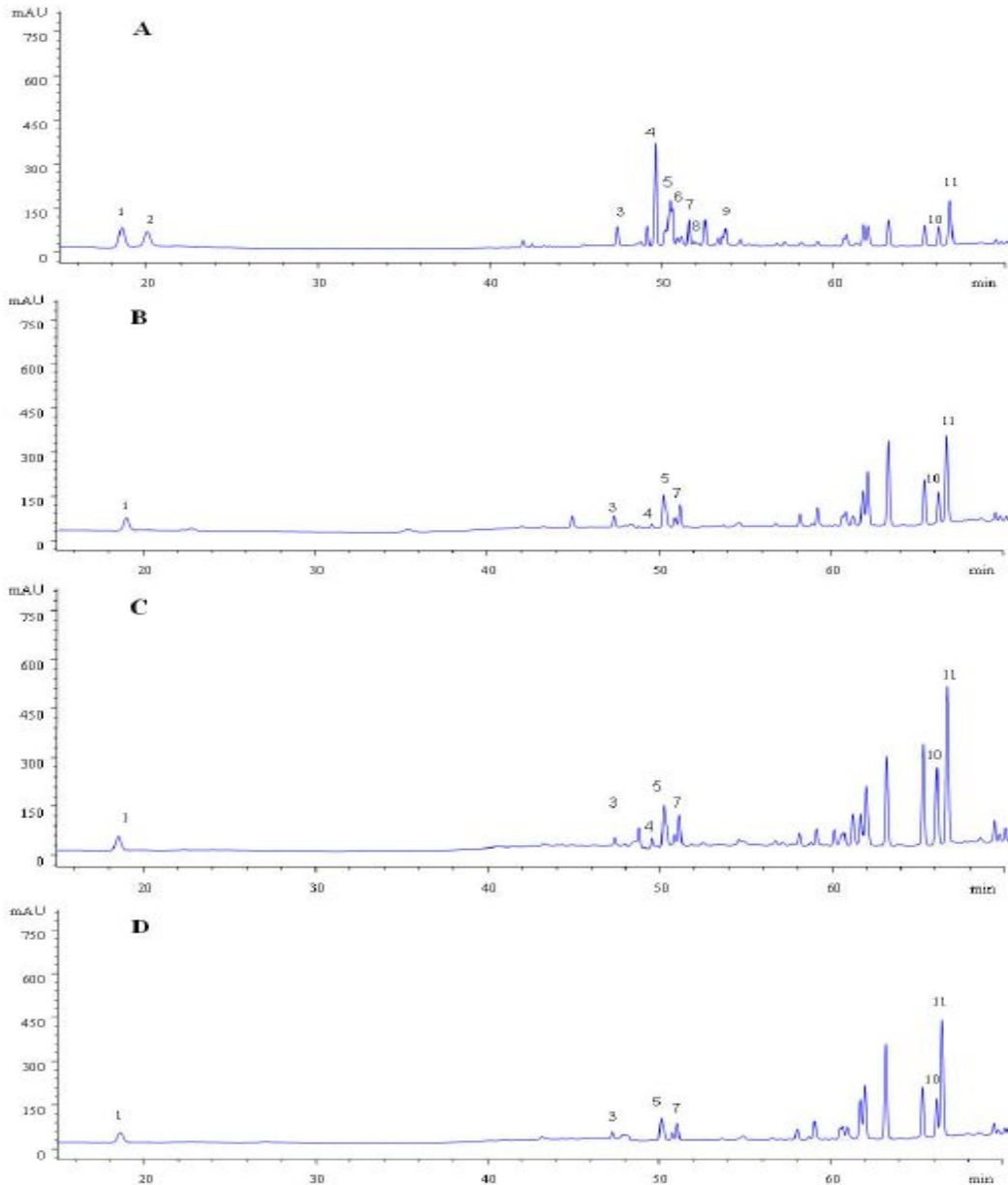


Figure 2-19. HPLC-UV chromatograms of total ginsenosides extracted from ginseng steamed 2 times at 120℃ in various times (15, 30, 45, and 60 min). Before steaming each time, ginsengs were soaked in grape juice for 24 h. A, 1 time; B, 2 times; C, 3 times; D, 4 times.

Table 2-10. The amounts of ginsenosides in ginsengs steamed at 120°C for 60 min (different steaming numbers)

Compound (mg/g)	S ₁ WG (60min)	S ₂ WG (60min)	S ₃ WG (60min)	S ₄ WG (60min)
Rg ₁	0.86±0.03	0.67±0.01	0.58±0.03	0.49±0.02
Re	0.94±0.02	-	-	-
Rf	0.75±0.06	0.47±0.02	0.34±0.03	0.31±0.03
Rb ₁	2.57±0.12	0.32±0.03	0.69±0.02	-
Rg ₂	0.96±0.07	0.58±0.02	0.74±0.03	0.47±0.01
Rc	1.53±0.03	-	-	-
Rb ₂	0.65±0.09	0.46±0.03	0.68±0.04	0.34±0.02
Rb ₃	0.27±0.02	-	-	-
Rd	0.54±0.07	-	-	-
Rg ₃	0.89±0.07	2.54±0.12	6.56±0.17	5.65±0.14
PPD	6.45±0.14	3.32±0.07	7.93±0.09	6.46±0.07
PPT	3.51±0.10	1.72±0.09	1.66±0.05	1.27±0.06
Total	9.96±0.14	5.07±0.07	9.59±0.18	7.73±0.09

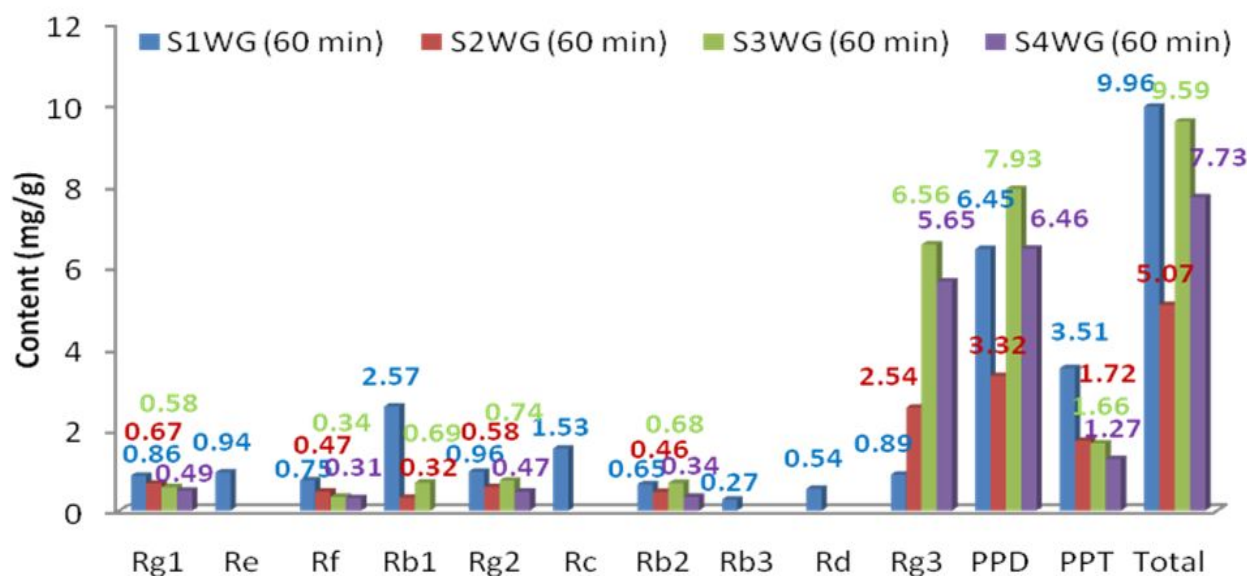


Figure 2-20. Effects of different steaming numbers on Rg₃ content (120°C, 60 min).

다. 염기용액에 침지하여 제조한 흑삼 (121℃, 15min)

(1) NaHCO₃ 용액을 이용한 흑삼 제조

약알칼리 용액에 침지하여 흑삼을 제조하기 위한 시도로 포도주스를 대신하여 여러 농도의 NaHCO₃ 용액에 인삼을 침지하여 121℃에서 15분간 증숙하여 흑삼을 제조하였다 (Fig. 2-21). 알칼리 용액 침지 방법을 사용한 흑삼의 제조는 TLC 분석한 결과, 1% 농도에서 Rg₃가 가장 많이 나타났다 (Fig. 2-22). Table 2-11에서는 1% NaHCO₃ 용액에 침지하여 제조한 흑삼의 사포닌 함량을 나타내었다. 약알칼리 용액에 제조한 흑삼은 포도주스에 침지하여 제조한 흑삼보다 사포닌 함량이 적었고, Rg₃ 함량 역시 낮게 나타났다.



Figure 2-21. The outside and insider morphological changes of ginsengs soaked in various different concentration NaHCO₃ aqueous solution and steamed at 120℃ for 15 min. A, 1 time steaming; B, 2 times steaming; C, 3 times steaming; D, 4 times steaming.

Table 2-11. The amounts of ginsenosides in ginsengs steamed at 120°C for 15 min after soaked in 1% NaHCO₃ for 24h

120°C, 15min	Rg ₁	Re	Rf	Rh ₁	Rb ₁	Rg ₂	Rc	Rb ₂	Rd	Rg ₃ (S)
1st steamed	1.408	0.734	1.242	0.114	2.764	0.101	2.173	1.693	0.835	0.0536
4th steamed	0.095	0.294	1.016	0.028	0.817	0.825	0.257	0.470	0.176	0.399

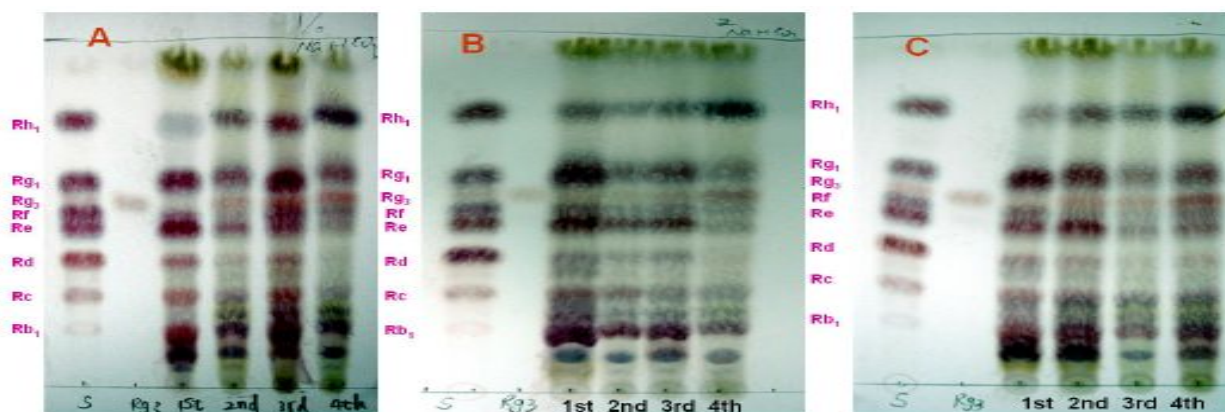


Figure 2-22. TLC chromatograms of total ginsenosides extracted from ginsengs steamed 1, 2, 3, and 4 times at 120°C for 15 min. Before steaming each time, ginsengs were soaked in different concentration of NaHCO₃ for 24h. A, 1%; B, 2%, C, 4%.

(2) 포도주스와 0.4% Citric acid에 침지 후 흑삼 제조

과일주스와 약산 용액을 혼합한 용액에 인삼을 침지하여 흑삼을 제조하였다. 외관상 흑삼의 색과 모양에는 큰 차이를 보이지 않았으나 (Fig. 2-23), Table 2-12에 나타난 사포닌 분석 결과, 전체 사포닌 함량과 Rg₃ 함량이 낮았다.

Table 2-12. The amounts of ginsenosides in ginsengs steamed after soaked in grape juice and 0.4% citric acid mixed solution

mg/mL	Rg ₁	Re	Rf	Rh ₁	Rb ₁	Rg ₂	Rc	Rb ₂	Rd	Rg ₃ (S)	Rg ₃ (R)
2nd steamed	0.388	0.231	0.452	0.067	1.121	0.692	0.891	0.297	0.209	1.367	
3rd steamed	0.397	0.198	0.569	0.094	1.227	0.653	0.768	0.226	0.213	0.698	2.095



2 times steamed (121°C, 15min)

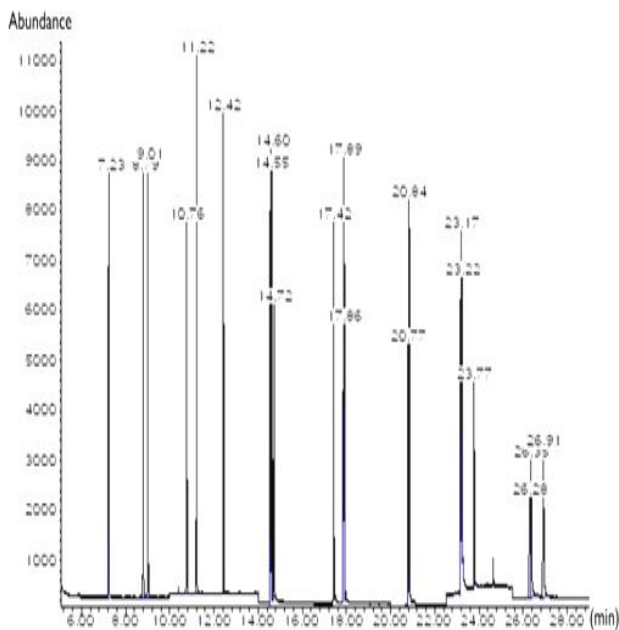


3 times steamed (121°C, 15min)

Figure 2-23. The morphological changes of ginsengs soaked in solution mixed with grape juice and 0.4% citric acid.

라. 제조 흑삼의 잔류농약 안전성 평가

여러 방법에 의해 제조한 각 흑삼의 잔류농약을 분석한 결과 농약성분이 검출되지 않았다. 특히, 흑삼의 증숙시 직화로 인한 잘못된 제조기술로 인해 생성되는 발암성분인 Bezopyrene 역시 검출되지 않았다 (Fig. 2-24).



PAHs	CNU-S-01	CNU-S-02	CNU-S-03	CNU-S-04
Naphthalene	불검출	불검출	불검출	불검출
1-Methylnaphthalene	불검출	불검출	불검출	불검출
2-Methylnaphthalene	불검출	불검출	불검출	불검출
Acenaphthylene	불검출	불검출	불검출	불검출
Acenaphthene	불검출	불검출	불검출	불검출
Fluorene	불검출	불검출	불검출	불검출
Phenanthrene	불검출	불검출	불검출	불검출
Anthracene	불검출	불검출	불검출	불검출
Fluoranthene	불검출	불검출	불검출	불검출
Pyrene	불검출	불검출	불검출	불검출
Benz(a)anthracene	불검출	불검출	불검출	불검출
Chrysene	불검출	불검출	불검출	불검출
Benzo(b)fluoranthene	불검출	불검출	불검출	불검출
Benzo(k)fluoranthene	불검출	불검출	불검출	불검출
Benzo(a)pyrene	불검출	불검출	불검출	불검출
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	불검출	불검출	불검출	불검출
Dibenz(a,h)anthracene	불검출	불검출	불검출	불검출
Benzo(ghi)perylene	불검출	불검출	불검출	불검출

불검출 = <0.1 µg/kg

Cancer Group : A,1=Human carcinogen, B,2A=Probable human carcinogen(B,1=limited human carcinogen, B,2=sufficient evidence in animals and inadequate or no evidence in human), C,2B=Possible human carcinogen, D=Not classifiable as to human carcinogenicity, E=Evidence of noncarcinogenicity for humans.

Figure 2-24. GC-MS chromatograms of PAHs standards.

3. 흑삼 추출물의 항산화 및 Cholinesterase 억제 효과 탐색

가. 백삼, 홍삼, 흑삼의 사포닌 변화

본 연구에서 개발한 유기산 침지 흑삼 (BG II)의 사포닌 함량을 비교하기 위하여 백삼 (WG), 홍삼 (RG), 전통적인 제조법인 구증구포 방법으로 제조한 흑삼 (BG I)의 사포닌 함량을 분석하였다. 각 인삼추출물의 크로마토그램과 사포닌 함량은 각각 Fig. 3-1와 Table 3-1에 나타내었다. 흑삼의 제조 과정 중에 백삼과 홍삼에서 보이지 않거나, 소량이었던 peak가 분석 60 분 이후에는 peak 면적이 커지고, 새로운 peak가 생성되는 것을 볼 수 있었다. 반면, Rg₁, Re, Rb₁, Rb₃, Rc, Rd 등의 사포닌 함량을 증숙과정 중에 그 함량이 유의적으로 감소하였다. 본 연구에서 포도주스에 침지하여 제조한 흑삼의 Rg₃ 함량이 구증구포 방법으로 제조한 흑삼보다 함량이 증가하였다.

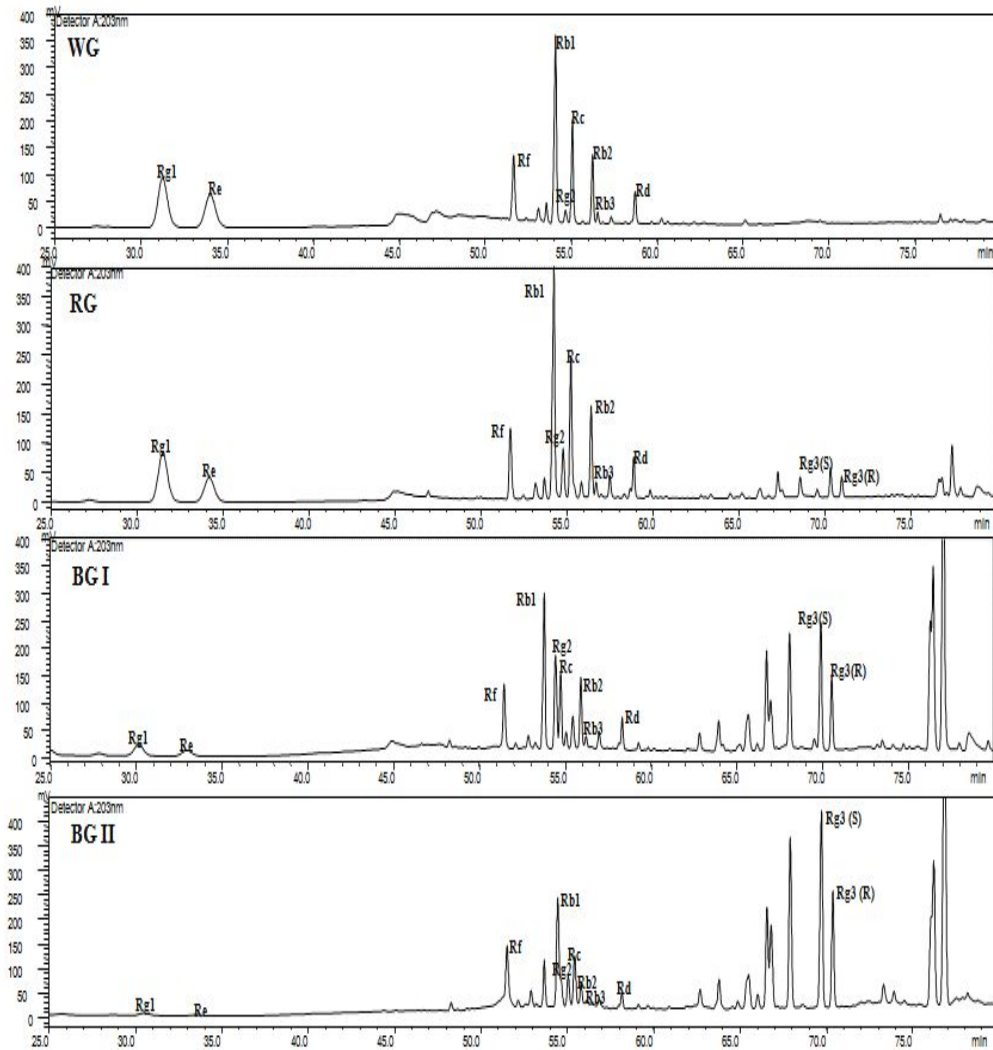


Figure 3-1. HPLC-UV chromatograms of ginsenosides in Korean WG (A), RG (B), BG I (C), and BG II (D). Peaks: 1, Rg₁; 2, Re; 3, Rb₁; 4, Rb₁; 5, Rc; 6, Rb₂; 7, Rd; 8, Rg₃(R); 9, Rg₃(S).

Table 3-1. Comparison of ginsenosides content in Korean WG, RG, and BG (I), (II)

Ginsenoside (mg/g)	WG	RG	BG I ²⁾	BG II ³⁾
Rg ₁	2.54±0.17	2.31±0.04	0.71±0.09	0.41±0.05
Re	2.02±0.26	1.35±0.04	0.36±0.05	0.14±0.04
Rf	0.32±0.02	0.30±0.01	0.30±0.01	0.35±0.01
Rg ₂	0.12±0.02 ^c	0.68±0.01 ^a	0.53±0.06 ^b	0.16±0.02 ^c
Rb ₁	2.03±0.13 ^b	2.60±0.20 ^a	1.43±0.11 ^c	1.37±0.02 ^c
Rc	1.81±0.11 ^b	2.34±0.10 ^a	1.24±0.13 ^c	1.00±0.04 ^d
Rb ₂	1.14±0.07 ^b	1.45±0.06 ^a	1.20±0.11 ^b	0.32±0.05 ^c
Rb ₃	0.39±0.07 ^a	0.47±0.02 ^a	0.37±0.08 ^a	0.01±0.00 ^b
Rd	0.40±0.01 ^c	0.68±0.02 ^a	0.53±0.06 ^b	0.30±0.04 ^c
Rg ₃ (S)	ND	0.47±0.01 ^c	4.43±0.32 ^b	6.73±0.16 ^a
Rg ₃ (R)	ND	0.15±0.02 ^c	1.69±0.13 ^b	4.18±0.25 ^a
PPD ⁴⁾	5.77±0.39 ^d	8.16±0.25 ^c	10.89±0.94 ^b	13.91±0.56 ^a
PPT ⁵⁾	5.00±0.47 ^a	4.64±0.10 ^b	1.90±0.21 ^c	1.06±0.12 ^d
Total	10.47±0.86 ^c	12.80±0.35 ^b	12.79±1.15 ^b	14.97±0.68 ^a

¹⁾ Values were expressed as the mean ± SD (n=3). ND: not detected. Values with different superscripts within the same line are significantly different at $p < 0.05$.

²⁾ 9 times steaming at 98°C for 3 hr

³⁾ 3 times steaming at 120°C for 30 min after soaking into grape juice for 24 h

⁴⁾ PPD (protopanaxadiol type ginsenosides): Rb₁+Rc+Rb₂+Rb₃+Rd+Rg₃

⁵⁾ PPT (protopanaxatriol type ginsenosides): Rg₁+Rg₂+Re+Rf

나. 흑삼 추출물의 항산화 활성

(1) 총 페놀 함량

페놀 화합물은 수소나 전자를 제공하는 반응성이 있어 상당한 자유라디칼 소거활성이 있는 것으로 보고되고 있다 (33). 인삼 추출물의 페놀화합물은 Fig. 3-2에 나타났다. 흑삼 추출물의 총 페놀 함량은 34.12 ± 0.16 mg/g으로 가장 높았고, 다음으로 백삼 20.40 ± 0.9 mg/g, 홍삼 11.40 ± 0.30 mg/g 순으로 나타났다.

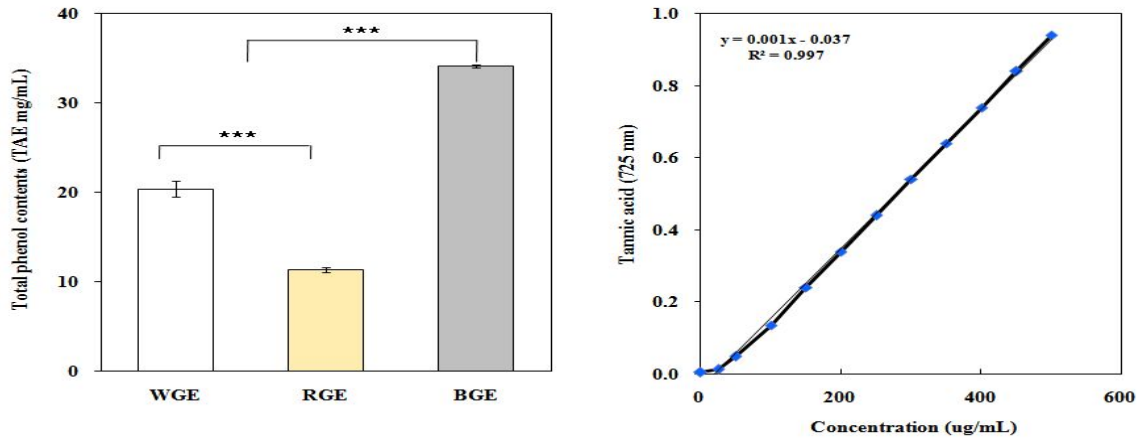


Figure 3-2. Total phenol contents in WGE, RGE, and BGE. Data expressed as tannic acid equivalents (TAE, mg/g) in extracts. Results are expressed as Means \pm SD (n=3). ***p<0.001.

(2) DPPH 라디칼 소거능과 Xanthine oxidase (XO) 억제활성

각 인삼 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. 흑삼 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 현저히 높았으며, 백삼, 홍삼 순으로 나타났다 (Fig. 3-3). 5 mg/mL 농도에서 흑삼은 거의 86% 소거활성을 나타냈고, 백삼과 홍삼은 각각 55.15%, 40.42%를 나타냈다. DPPH 라디칼 소거능의 IC₅₀ 값은 흑삼 2.28 mg/mL, 홍삼 7.48 mg/mL, 백삼 4.12 mg/mL을 나타냈다 (Table 3-2). XO 억제활성은 흑삼 추출물이 가장 높은 활성을 보였고, 홍삼과 백삼 순으로 나타났다. XO의 IC₅₀ 값은 백삼 11.20 mg/mL, 홍삼 5.89 mg/mL, 흑삼 2.41 mg/mL이었다 (Fig. 3-3, Table 3-2).

Table 3-2. IC₅₀ values of ginseng extracts on the antioxidant activity

IC ₅₀ (mg/mL)	WGE	RGE	BGE	ASA
DPPH	4.12 \pm 0.80	7.48 \pm 2.19	2.28 \pm 1.33	0.11 \pm 0.14
XO	11.20 \pm 0.38	5.89 \pm 1.52	2.41 \pm 0.17	0.48 \pm 0.38

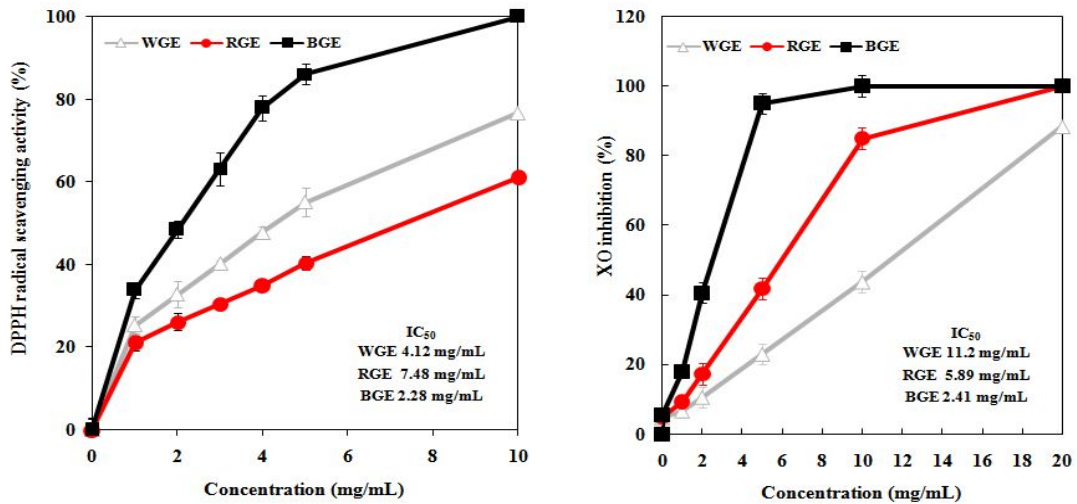


Figure 3-3. Free radical DPPH scavenging activities and . XO inhibitory activities of ginseng extracts at different concentrations. Each value represent means \pm SD (n=3).

다. 흑삼 추출물의 Cholinesterase 억제활성

흑삼추출물의 AChE 억제는 0.5, 2, 4, 6, 8 mg/mL농도에서 5.67%, 64.98%, 84.28% 95.47%의 억제효과를 나타냈다 (Fig. 3-4). IC₅₀값은 백삼 5.89 mg/mL, 홍삼 6.30 mg/mL, 흑삼 1.84 mg/mL이었으며, 양성대조군으로 사용된 tacrine (THA)는 824.7 nM 이었다. 반면, BuChE의 억제활성은 인삼추출물간의 큰 차이를 보이지 않았다. BuChE IC₅₀값은 백삼 2.56 mg/mL, 홍삼 1.84 mg/mL, 흑삼 1.88 mg/mL이었다 (Table 3-3).

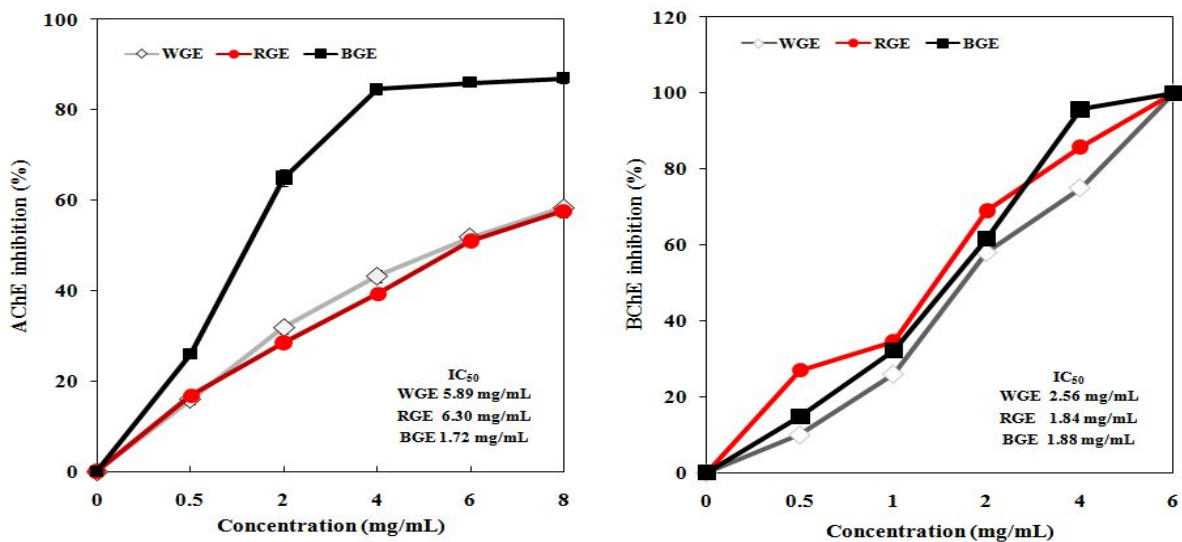


Figure 3-4. Effect on AChE and BuChE inhibitory activities according to different concentration of various ginseng extracts. WGE: white ginseng extract, RGE: red ginseng extract, BGE: black ginseng extract. Results are expressed as Means \pm SD (n=3).

Table 3-3. IC₅₀ values of the ginseng extracts on AChE and BuChE

Ginseng extracts	IC ₅₀ (mg/mL)	
	AChE	BChE
WGE	5.89	2.56
RGE	6.30	1.84
BGE	1.72	1.88
THA(nM)	824.7	394.5

1) Values are expressed as means ± SD (n=3).

2) THA: tacrine, WGE: white ginseng extract, RGE: red ginseng extract, BGE: black ginseng extract.

4. 화기삼, 전칠삼을 이용한 흑삼제조

가. 흑삼제조

본 연구에서 개발한 방법을 이용하여 중국 전칠삼과 미국 화기삼을 이용하여 흑삼을 제조하였다. 건조된 백삼을 포도주스에 4℃에서 24시간 침지한 후 120℃에서 30분간 증숙한 후 60℃ 건조기에서 18시간 건조한 후 3번 반복하여 증숙하였다. 분석을 위하여 80% 에탄올에 1시간 초음파추출을 3번 반복한 후 여과하여 농축하였다. 농축 시료를 이용하여 흑삼추출물의 항산화 활성과 Cholinesterase 억제활성을 측정하였다.

나. 각 국 인삼 (백삼)의 사포닌 분석

*Panax ginseng*인 고려 인삼 (WPG)의 주요 사포닌은 Rg₁, Re, Rf, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd로 총 7개의 사포닌은 함유하고 있었다. 반면, 미국 화기삼 (*Panax quinquefolium*, WPQ)은 Rf가 분석되지 않았다. 중국 전칠삼 (*Panax notoginseng*, WPN)에서는 Rf, Rc, 그리고 Rb₂가 검출되지 않았다. 문헌의 결과에서와 같이 고려인삼은 미국 화기삼과 중국 전칠삼과 확연히 구별되는 사포닌으로 Rf 함량이 0.1% (w/w)이상 함유되는 것으로 보고된다. 화기삼에서는 Rb₂ 함량이 0.25% 이상이었으며, 전칠삼과 고려인삼에서는 그 함량이 매우 낮았다. 전칠삼의 Rg₁ 함량은 34.6 mg/g으로 가장 높았고, 고려인삼은 4.78 mg/g, 화기삼은 3.13 mg/g 순으로 나타났다. 또한 중국 전칠삼의 경우 특징적인 사포닌 Rb₁은 약 1.1%의 매우 높은 농도를 함유한다. 각국 인삼의 분석 크로마토그램과 함량은 Fig. 4-1과 Table 4-1에 나타났다.

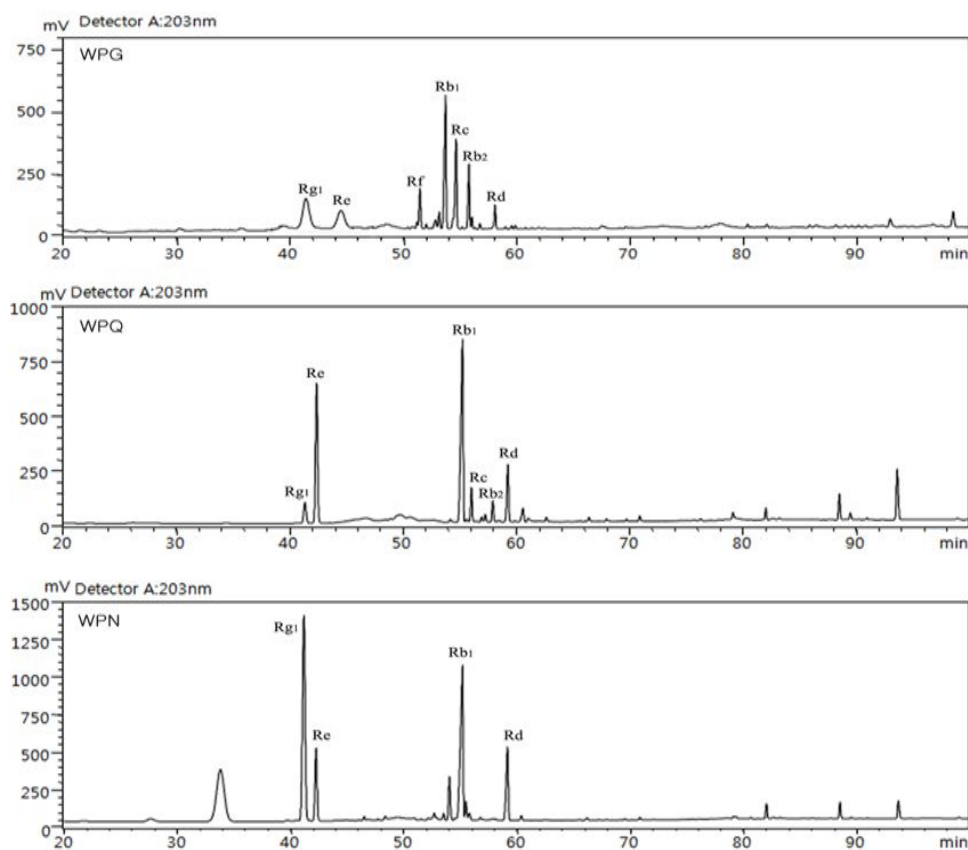


Figure 4-1. HPLC-UV chromatograms of ginsenosides in three commercial WG products for *panax ginseng* (WPG), *panax quinquefolium* (WPQ), and *panax notoginseng* (WPN).

Table 4-1. Comparison of ginsenoside contents of WPG, WPQ, and WPN

	WPG	WPQ	WPN
Rg ₁	4.78±0.13	3.13±0.26	34.61±0.54
Re	2.02±0.30	16.08±0.47	11.54±0.40
Rf	0.97±0.05	-	-
Rb ₁	6.80±1.23	22.24±1.57	28.93±1.04
Rc	6.70±0.14	3.35±0.29	-
Rb ₂	3.05±0.30	0.39±0.04	-
Rd	1.57±0.11	4.75±0.16	9.62±0.27
Total	25.89±2.26	48.39±2.80	84.70±2.25

Values were expressed as means ± SD (n=3). WPG; white *panaxginseng*, WPQ: white *panax quinquefolium*, WPN: white *panax notoginseng*.

다. 각 국 흑삼의 사포닌 분석

제조 흑삼의 9개의 주요 총 사포닌 함량은 고려흑삼 (BPG) 21.54 mg/g, 화기흑삼 (BPQ) 21.84 mg/g, 전칠흑삼 (BPN) 38.33 mg/g으로 전칠흑삼의 총 사포닌 함량이 가장 높았다. Ginsenoside Rg3 함량은 전칠 흑삼 (BPN)이 19.17 mg/g으로 가장 높았으며, 다음으로 화기흑삼 (BPQ) 14.25 mg/g, 고려흑삼 (BPG) 11.84 mg/g 순이었다 (Fig. 4-2, Table 4-2).

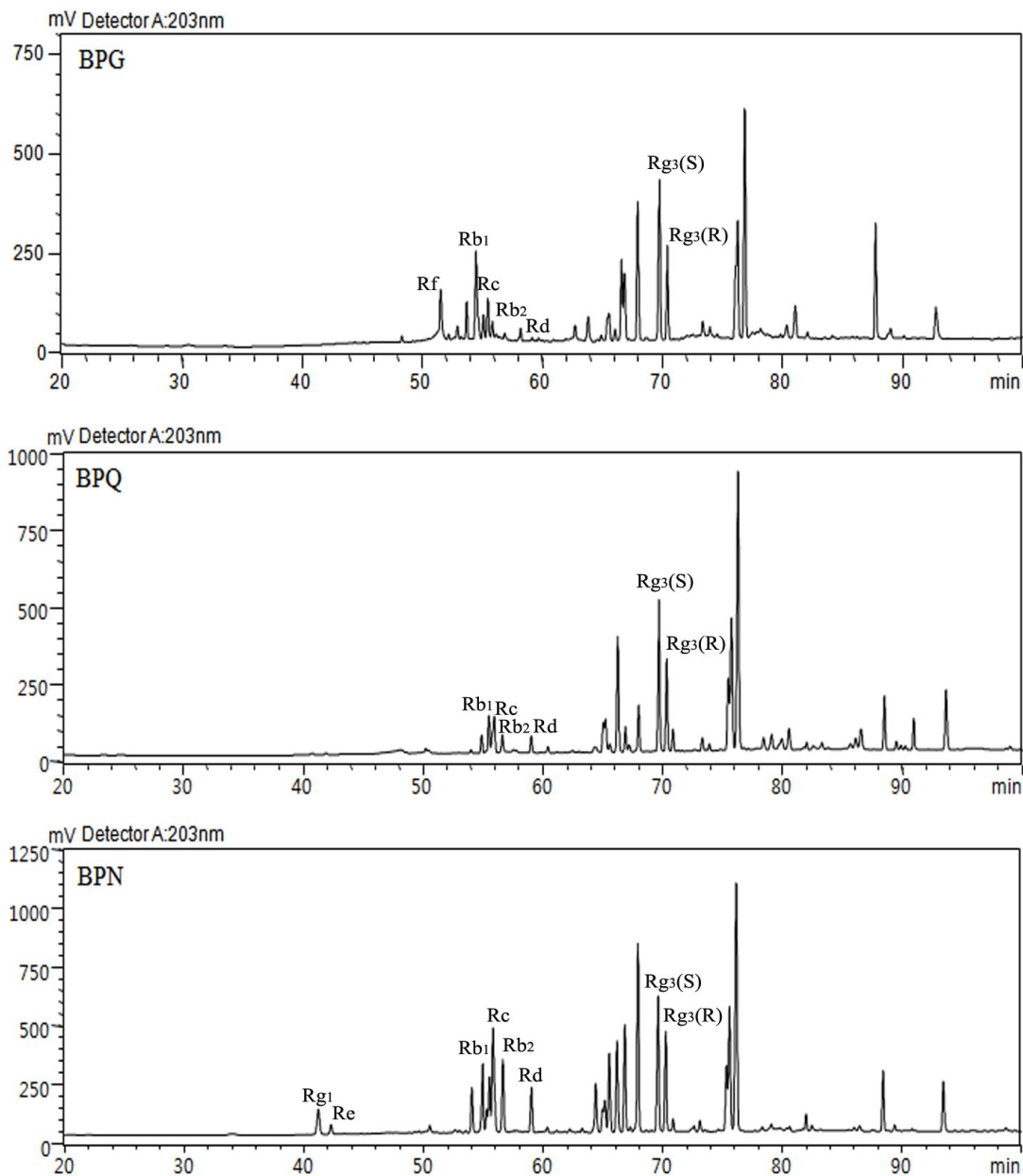


Figure 4-2. HPLC-UV chromatograms of ginsenosides in three BG products for *panax ginseng* (BPG), *panax quinquefolium* (BPQ), and *panax notoginseng* (BPN).

Table 4-2. Comparison of ginsenoside contents of BPG, BPQ, and BPN

Composition	BPG	BPQ	BPN
Rg ₁	-	-	2.61±0.05
Re	-	-	1.02±0.01
Rf	0.82±0.02	-	-
Rb ₁	4.88±0.14	2.07±0.30	3.48±0.17
Rc	1.72±0.62	3.65±0.20	4.51±1.02
Rb ₂	1.76±0.34	1.02±0.13	3.53±0.37
Rd	0.52±0.04	0.86±0.01	3.02±0.19
Rg ₃ (S)	6.73±0.48	7.22±0.62	10.64±0.02
Rg ₃ (R)	5.11±0.62	7.03±0.5	8.53±0.03
Total	21.54±2.26	21.84±1.76	38.32±3.51

Values were expressed as means ± SD (n=3). BPG; black *panaxginseng*, BPQ: black *panax quinquefolium*, BPN: black *panax notoginseng*.

라. 각 국 인삼 (백삼, 흑삼)의 항산화 활성 비교

(1) 총 폴리페놀 함량

백삼의 경우 총 페놀함량은 고려인삼이 20.4 mg/g으로 가장 높았고, 화기삼 (17.12 mg/g), 전칠삼 (14.45 mg/g)순으로 나타났다. 흑삼으로 제조하였을 때는 전체적으로 페놀 함량이 3배이상 증가하는 것을 볼 수 있었다. 고려흑삼 34.3, 화기흑삼 44.15, 전칠흑삼 34.05 mg/g 이었으며, 화기흑삼이 페놀함량이 가장 높았다 (Fig. 4-3).

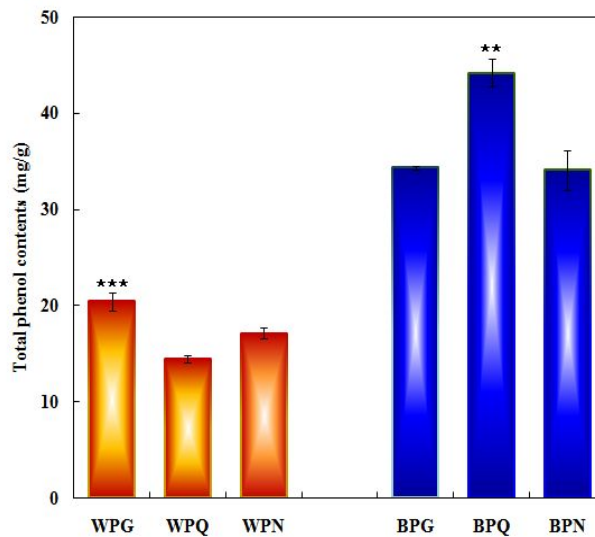


Figure 4-3. The changes in total phenolic contents of the WG and BG products. PG: *panax ginseng*, PQ; *panax quinquefolium*, PN: *panax notoginseng*. Results are expressed as Means \pm SD (n=3). ** p < 0.01, *** p<0.001.

(2) DPPH 라디칼 소거활성

자유라디칼 소거능은 고려백삼과 고려흑삼이 5 mg/mL 농도에서 각각 55.4%, 86.8%로 가장 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 4-4). 같은 농도에서 화기백삼 (흑삼)은 33.02% (65.2%), 전칠삼 (흑삼) 29.3% (53.31%)의 활성을 나타냈다. 고려흑삼의 라디칼 소거능은 화기삼, 전칠삼보다 각각 1.5배, 1.9배 높았다. 각각 인삼 추출물의 DPPH 라디칼 IC₅₀ 값은 Table 4-3에 나타내었다.

(3) Xanthine oxidase (XO) 억제활성

XO 활성은 백삼보다 흑삼 제조시 2배 이상 활성이 증가하였다. 고려 흑삼이 가장 활성이 높았으며, 전칠흑삼, 화기흑삼 순으로 나타났다. Table 4-3에 나타난 바와 같이 흑삼의 XO IC₅₀값은 각각 2.3, 3.56, 1.53 mg/mL 이었다 (Fig. 4-5).

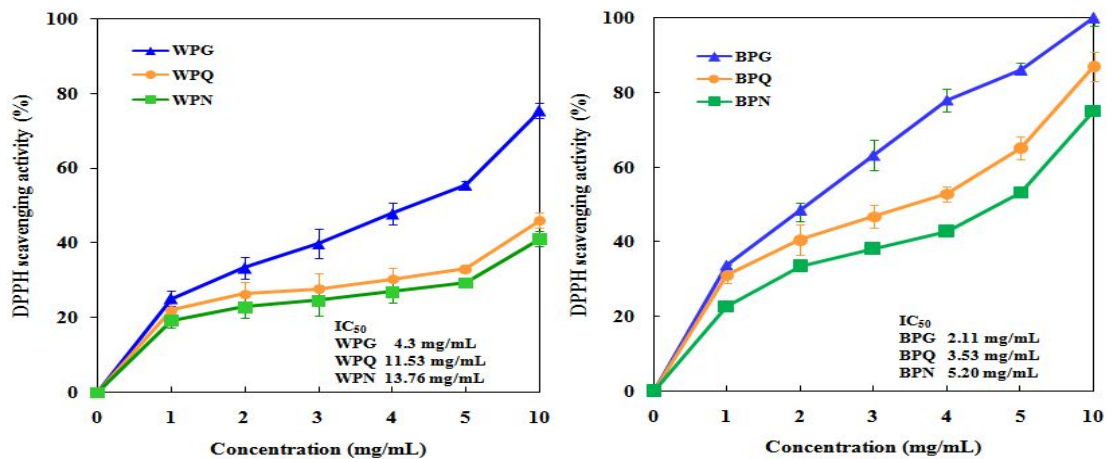


Figure 4-4. Free radical DPPH scavenging activities for the three species WG and BG products at different concentrations. Each value represent means \pm SD (n=3).

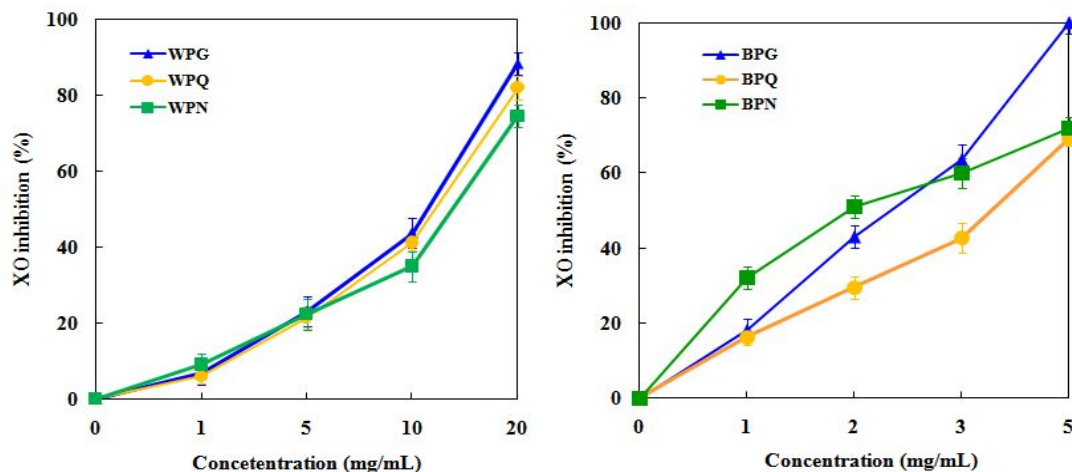


Figure 4-5. XO inhibitory activities of the WG and BG products. PG: *panax ginseng*, PQ; *panax quinquefolium*, PN: *panax notoginseng*. Results are expressed as Means \pm SD (n=3).

Table 4-3. IC₅₀ values of WG and BG products on the antioxidant activity

Ginseng/Reference		IC ₅₀ (mg/mL)	
		DPPH	XO
WG	PG	4.30	11.20
	PQ	11.53	12.09
	PN	13.76	13.88
BG	PG	2.11	2.30
	PQ	3.53	3.56
	PN	5.20	1.53
ASA		0.11	0.48

따. 각 국 인삼의 Cholinesterase 억제활성비교

(1) AChE 억제활성

백삼의 AChE 억제활성은 10 mg/mL 농도에서 고려인삼 73.46%, 화기삼 37.84%, 전칠삼 33.76%로 고려인삼이 현저한 억제활성을 보였다 (Fig. 4-6). 흑삼 제조시 백삼보다 전체적으로 AChE 억제활성이 증가하는 것을 관찰하였다. 흑삼의 AChE IC₅₀ 값은 고려흑삼 2.64 mg/mL, 화기흑삼 8.56 mg/mL, 전칠흑삼 7.50 mg/mL 였다. AChE 억제활성은 고려인삼이 가장 우수한 효과를 보였다 (Table 4-4).

(2) BuChE 억제활성

인삼 추출물의 BuChE 억제활성은 AChE의 억제활성보다 더 높게 나타났다. BuChE 억제활성은 백삼과 흑삼간의 차이가 크게 나타나지 않았다 (Fig. 4-7). 흑삼의 BuChE IC₅₀ 값은 고려흑삼, 화기흑삼, 전칠흑삼이 각각 1.88, 1.07, 0.71 mg/mL였다 (Table 4-4).

Table 4-4. IC₅₀ values of WG and BG products on AChE and BuChE

Ginseng extracts		IC ₅₀ (mg/mL)	
		AChE	BChE
WG	WPG	5.37	1.84
	WPQ	15.01	4.63
	WPN	13.68	1.19
BG	BPG	2.64	1.88
	BPQ	8.56	1.07
	BPN	7.50	0.71

¹⁾Values are expressed as means ± SD (n=3).

²⁾WG: white ginseng, BG: black ginseng, PG: *panax ginseng*, PQ; *panax quinquefolium*, PN: *panax notoginseng*.

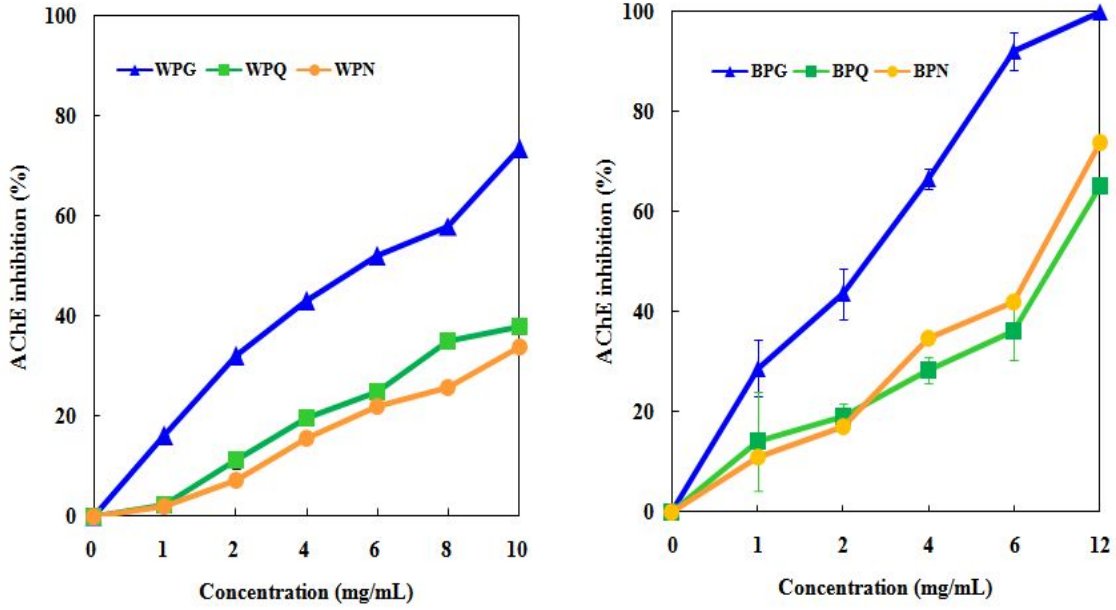


Figure 4-6. Effect on AChE inhibitory activities according to different concentration of WG and BG products. PG: *panax ginseng*, PQ; *panax quinquefolium*, PN: *panax notoginseng*. Results are expressed as means \pm SD (n=3).

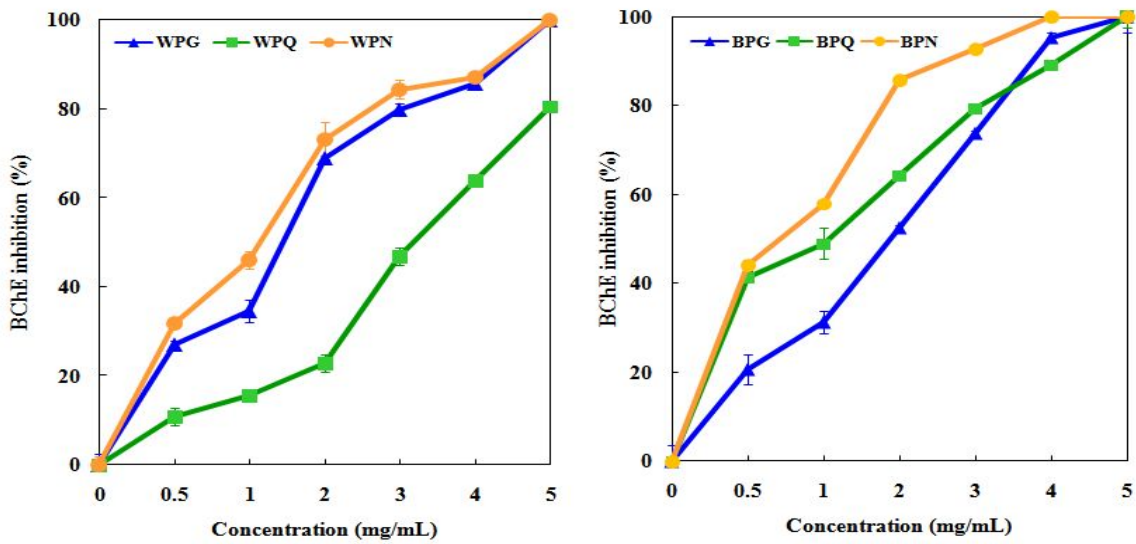


Figure 4-7. Effect on BChE inhibitory activities according to different concentration of WG and BG products. PG: *panax ginseng*, PQ; *panax quinquefolium*, PN: *panax notoginseng*. Results are expressed as means \pm SD (n=3).

바. 흑삼 추출물의 단회 투여에 의한 뇌조직의 AChE 억제 효과

8주령, 수컷 ICR 마우스를 이용하여 각각의 인삼 추출물을 200 mg/kg 농도로 경구투여한 후 24시간 후에 뇌를 적출하여 뇌조직의 AChE의 활성을 측정하였다. 생리식염수를 처리한 대조군의 AChE 활성을 100로 하여 인삼 추출물의 AChE 억제활성을 나타낸 결과는 Fig. 4-8과 같다. 각 인삼의 AChE 억제율은 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 흑삼이 가장 큰 억제 효과를 보였다. 또한 흑삼 추출물의 투여시간에 따른 AChE 억제효과를 보면 투여 1시간 후는 95%, 투여 6시간 후에는 93%, 투여 24시간 후에는 83%의 감소효과를 나타내었다 (Fig. 4-8).

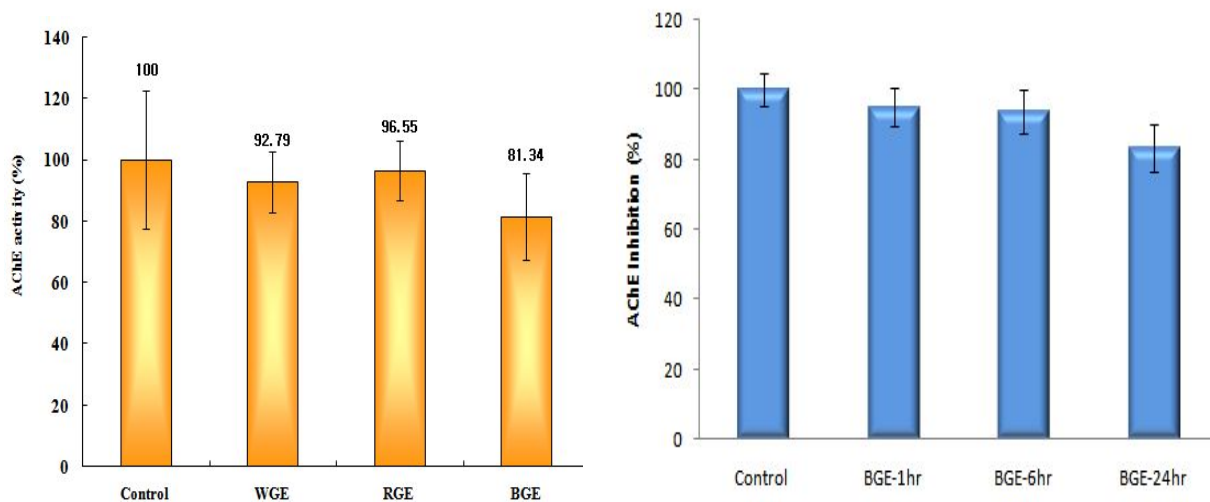


Figure 4-8. Inhibitory effect of a single administration of ginseng extract on AChE activity in mouse whole brain.

5. 흑삼의 급성 독성 안전성 평가

가. 실험동물의 체중 및 장기무게

7주령 SD rat을 실험동물로 하여 흑삼 추출물의 단회 경구투여가 미치는 급성 독성을 확인하기 위하여 5, 10, 15 g/kg B.W.의 각 용량에 5 마리의 rat으로 구성하여 실험하였다. 경구투여 후 2주간의 관찰기간 동안 각 군의 실험동물은 죽지 않았으며, 외관적 행동습관, 동공상태 모두 정상으로 판명되었다. 희생 후 적출한 장기무게에도 영향을 주지 않았다 (Table 5-1, 2). 본 연구결과에 따르면, 흑삼의 치사량 (LD_{50})은 15 g/kg이상으로 예상할 수 있다.

Table 5-1. Body weights and food intakes of rats in acute toxicity of BGE

Parameters	Control	BGE (g/kg)		
		5	10	15
Initial weight (g)	215.2 ± 10.7	220.0 ± 13.2	218.6 ± 7.6	214.5 ± 11.7
Final weight (g)	292.0 ± 12.1	287.4 ± 10.6	303.5 ± 6.7	293.0 ± 5.3
Food intake (g/day)	25.3 ± 1.3	23.4 ± 1.8	24.8 ± 2.2	25.5 ± 2.4
FER (%)	21.7 ± 6.4	20.2 ± 7.1	24.5 ± 3.6	22.0 ± 4.8

¹Values are expressed as means ± S.D. (n=5).

²FER : food efficiency ratio (body weight gain/food intake x 100)

Table 5-2. Internal organs weight of rats in acute toxicity of BGE

Parameters	Control	BGE (g/kg)		
		5	10	15
Liver	3.13 ± 0.15	2.91 ± 0.16	2.94 ± 0.29	2.92 ± 0.11
Kidney	0.82 ± 0.03	0.78 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.79 ± 0.04
Lung	0.83 ± 0.12	1.11 ± 0.2	1.00 ± 0.14	0.94 ± 0.15
Heart	0.43 ± 0.12	0.41 ± 0.07	0.39 ± 0.05	0.38 ± 0.07
Spleen	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.01
Brain	0.79 ± 0.13	0.86 ± 0.19	0.82 ± 0.10	0.76 ± 0.14
Testes	1.19 ± 0.12	1.08 ± 0.23	1.20 ± 0.18	1.05 ± 0.20

Values are expressed as means ± S.D. (n=5).

나. 혈액학적 분석

흑삼 추출물 단회투여 2주 후 24시간 절식시킨 후 희생하여 EDTA가 처리된 CBC tube 에 혈액을 채취하여 적혈구, 백혈구, 혈소판, Hb 등 혈액조성인자를 분석하는 시료로 사용하였다. 모든 항목에 대한 각 농도의 흑삼 추출물 처리구는 대조구와 유의적 차이를 보이지 않았다 (Table 5-3).

Table 5-3. Effect of BGE on haematological values

Parameters	Unit	Control	BGE (g/kg)		
			5	10	15
RBC	10 ⁶ /μL	7.7 ± 0.28	8.1 ± 0.40	8.7 ± 0.13	9.06 ± 0.35
WBC	10 ³ /μL	10.5 ± 4.55	7.3 ± 1.88	7.2 ± 1.03	8.11 ± 0.69
HCT	%	53.4 ± 0.78	53.0 ± 3.68	59.1 ± 0.57	60.6 ± 3.32
Hb	g/dL	15.6 ± 0.64	16.1 ± 0.64	17.5 ± 0.21	18.1 ± 0.71
MCV	fL	69.4 ± 1.56	65.8 ± 1.27	68.1 ± 0.42	66.9 ± 1.06
MCH	pg	20.3 ± 0.07	20.0 ± 0.21	20.2 ± 0.07	20.0 ± 0.05
Platelet	10 ³ /μL	1226 ± 68	1034 ± 107	995 ± 25	945 ± 116
Monocyte	%	2.3 ± 0.71	3.9 ± 1.27	3.8 ± 0.14	4.85 ± 0.92
Eosinophil	%	0.3 ± 0.01	0.85 ± 0.21	0.45 ± 0.07	0.45 ± 0.04
Lymphocyte	%	93.7 ± 2.12	85.4 ± 2.26	87.5 ± 1.56	87.3 ± 1.13

¹⁾Values are expressed as means ± S.D.(n=5).

²⁾RBC: red blood cell; WBC: white blood cell; HCT; hematocrits; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume.

다. 혈청학적 분석

흑삼 추출물 단회투여 2주 후 24시간 절식시킨 후 희생하여 혈청을 분리하여 혈청학적 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분석항목은 BUN, Glucose, Cholesterol, Bilirubin, ALP, AST, ALT, LDH, Na, K, Cl, 중성구와 림프구를 분석하였다. 모든 분석 항목에서 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았다 (Table 5-4).

Table 5-4. Blood chemistry values of rats in acute toxicity of BGE

Parameters	Unit	Control	BGE (g/kg)		
			5	10	15
ALP	U/L	310 ± 30.4	290 ± 24.5	283 ± 25.4	291 ± 21.3
AST	U/L	92.7 ± 4.2	96.5 ± 3.7	89.4 ± 9.5	94.2 ± 12.7
ALT	U/L	43.2 ± 2.5	41.5 ± 4.9	44.5 ± 4.9	49.0 ± 7.0
LDH	U/L	477.5 ± 57.6	470.5 ± 46.1	477.5 ± 58.7	489.0 ± 50.4
Creatinine	mg/dL	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.65 ± 0.1	0.60 ± 0.1
BUN	mg/dL	14.5 ± 2.3	15.3 ± 1.5	11.0 ± 2.0*	11.7 ± 1.4*
Cholesterol	mg/dL	68.5 ± 6.4	57.0 ± 9.0	69.0 ± 7.0	55.7 ± 8.6
Glucose	mg/dL	198.4 ± 12.5	162.0 ± 15.7	230.5 ± 10.6	213.5 ± 25.4
Bilirubin	mg/dL	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
Protein	g/dL	5.32 ± 0.1	5.35 ± 0.2	5.32 ± 0.2	5.30 ± 0.2
Na	mmol/L	142.5 ± 8.6	139.5 ± 12.2	144.5 ± 10.4	146.7 ± 14.2
K	mmol/L	5.5 ± 0.3	5.6 ± 0.3	6.8 ± 0.6*	7.1 ± 0.5*
Cl	mmol/L	103.4 ± 10.7	102.5 ± 8.2	104.7 ± 7.3	107.0 ± 10.6

¹⁾ Values are expressed as means ± S.D. (n=5). * $p < 0.05$ compared with control group

²⁾ ALP: alkaline phosphatase; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; BUN : blood urea nitrogen; LDH: lactate dehydrogenase.

라. 뇨 검사

경구투여 후 2 주간의 관찰이 끝나는 2 일전에 각 실험동물의 대사케이지에서 24 시간 urine을 수거하여 5000rpm에서 10 분간 원심분리한 후 분석을 위한 시료로 사용하였다. 모든 분석항목에 대한 결과는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 5-5).

Table 5-5. Urinary analysis of rats in acute toxicity of BGE

Parameters	대조군	Black ginseng extract		
		5 g/kg	10 g/kg	15 g/kg
Nitrite (RU)	positive	positive	positive	positive
Protein (RU)	Trace	1 positive	Trace	Trace
Glucose (RU)	negative	negative	negative	negative
Ketone (RU)	1 positive	1 positive	1 positive	1 positive
Bilirubin (RU)	negative	negative	negative	negative
Blood (RU)	negative	negative	negative	negative

마. 조직학적 분석

흑삼 추출물 투여군 (5, 10, 15 g/kg) 용량 투여군 (15 g/kg B.W.)의 간, 신장 조직을 HE staining 하여 현미경으로 사진을 분석한 결과 대조군과 다른 조직이상 증상을 발견할 수 없었다 (Fig. 5-1).

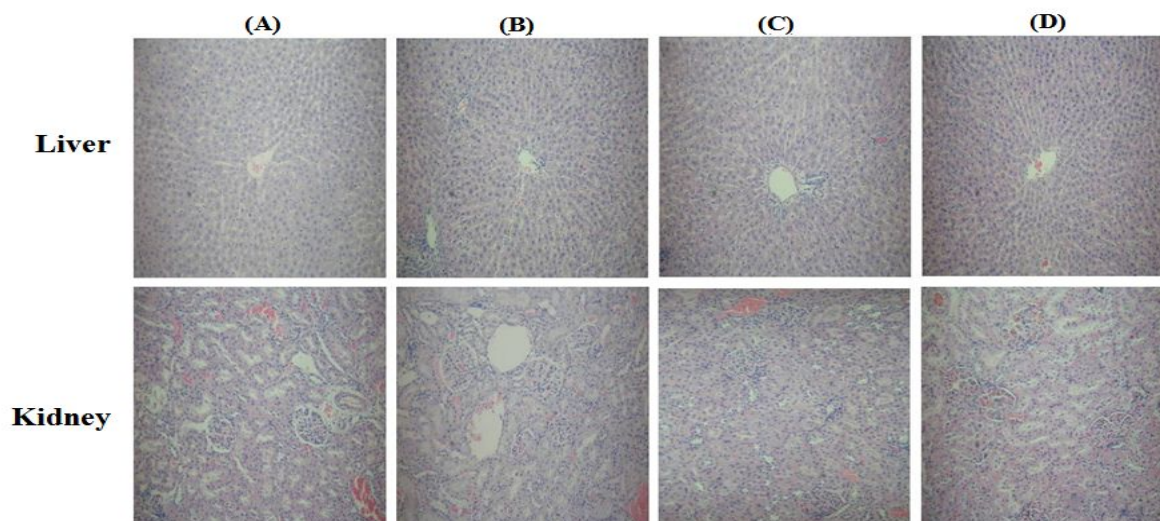


Figure 5-1. Histopathological images of liver and kidney of rats treated orally with BGE by hematoxyline-eosin (H&E) staining ($\times 100$). (A) Control group, (B) treated BGE at dose 5 g/kg, (C) treated BGE at dose 10 g/kg, (D) treated BGE at dose 15 g/kg.

6. Scopolamine에 의한 치매 동물모델에 대한 흑삼의 기억력 개선 효과 탐색

가. 시료 인삼 추출물의 사포닌 함량

본 연구에 사용된 70% 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물의 주요 9종 사포닌 함량을 HPLC을 이용하여 분석하였다. Fig. 6-1은 각 추출물 사포닌의 크로마토그램을 나타내었다. 9종 사포닌의 총 함량은 백삼 추출물 (WGE) 49.59 mg/g, 홍삼 추출물 (RGE) 38.52 mg/g, 흑삼 추출물 (BGE) 20.65 mg/g으로 백삼 추출물이 가장 높은 함량을 보였다. Ginsenoside Rg₃는 백삼추출물에서는 검출되지 않았으며, 홍삼은 1.4 mg/g, 흑삼추출물은 12.8 mg으로 9종 사포닌 총량의 62%를 차지하였다 (Table 6-1).

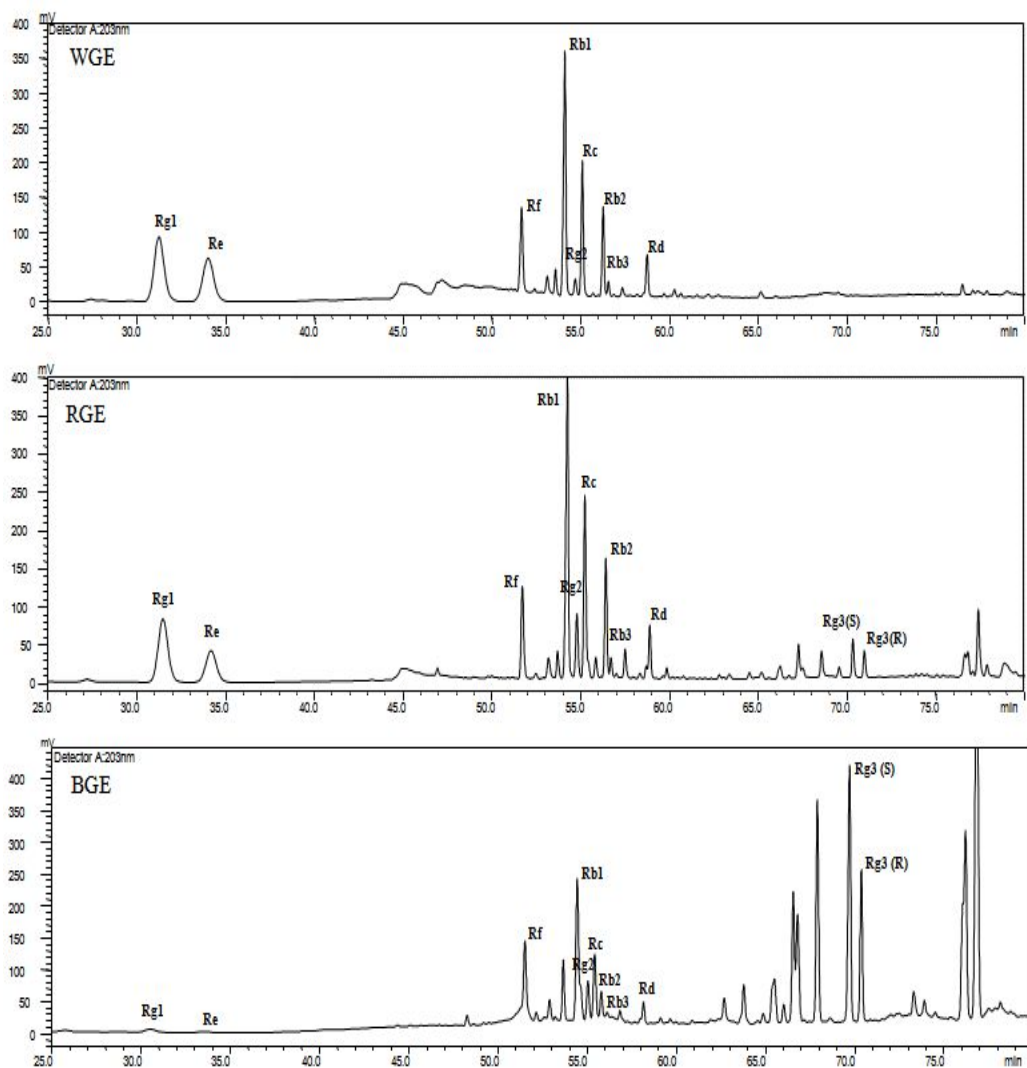


Figure 6-1. HPLC-UV chromatograms of ginsenosides in Korean ginseng extracts. White ginseng extract (WGE), red ginseng extract (RGE), black ginseng extract (BGE).

Table 6-1. Ginsenoside contents in Korean ginseng extracts

Ginsenoside (mg/g extract) ¹⁾	WGE	RGE	BGE
Rg ₁	9.27±0.13	6.94±0.09	ND
Re	8.29±0.08	5.07±0.06	ND
Rf	2.17±0.07	1.54±0.12	0.81±0.02
Rb ₁	12.88±0.11	9.44±0.15	2.21±0.07
Rc	9.90±0.04	7.89±0.10	3.26±0.11
Rb ₂	5.22±0.06	4.36±0.07	1.16±0.06
Rd	1.86±0.05	1.86±0.04	0.40±0.01
Rg ₃ (S)	ND	0.66±0.02	4.30±0.01
Rg ₃ (R)	ND	0.74±0.04	3.50±0.02
Total	49.59±0.54	38.52±0.66	20.65±0.30

1) Values were expressed as the mean±SD (n=3). ND : not detected.

2) WGE: white ginseng extract, RGE : red ginseng extract, BGE : black ginseng extract

나. Passive avoidane test -흑삼추출물의 용량별 효과 탐색

흑삼 추출물의 단회 투여가 콜린성 신경전달을 차단하는 scopolamine (SCOP)에 의한 기억손상에 대한 효과를 평가하기 위하여 용량별로 수동회피 실험을 시행하였다 (Fig. 6-2). SCOP으로 기억손상을 유발한 군의 step-through latency는 생리식염수를 처리한 대조군보다 현저히 감소하였으며 ($p<0.01$, 34), 흑삼 추출물은 50 mg/kg에서 500 mg/kg의 용량 범위에서 SCOP에 의한 기억손상을 회복하는 효과를 보여주었다. 특히 100 mg/kg, 200 mg/kg의 용량에서 각각 대조군의 77.8%, 87.9% 회복효과를 나타내었다. 따라서, 흑삼 추출물 200 mg/kg 농도를 기준으로 백삼, 홍삼 추출물의 농도를 결정하여 비교실험을 실시하였다.

다. 인삼추출물의 Passive avoidance test 효과

백삼, 홍삼, 흑삼 추출물을 각각 200 mg/kg을 투여한 후 실시한 수동회피실험의 결과는 Fig. 6-3에 나타났다. SCOP으로 기억손상을 유발한 군의 step-through latency는 17.48±7.5 sec로 생리 식염수를 처리한 대조군의 252.00±106.03 sec보다 유의적으로 현저하게 감소하였다 ($p<0.001$, Fig. 6-2). 양성 대조군인 tacrine (THA) 투여군은 SCOP에 의해 감소된 step-through latency를 현저히 증가시켜 치매 치료효과를 보여주었다 ($p<0.05$). 또한 인삼추출물 투여군도 SCOP군보다 step-through latency가 유의적으로 증가하였으며, THA보다 증가량이 높게 나타났다 ($p<0.01$).

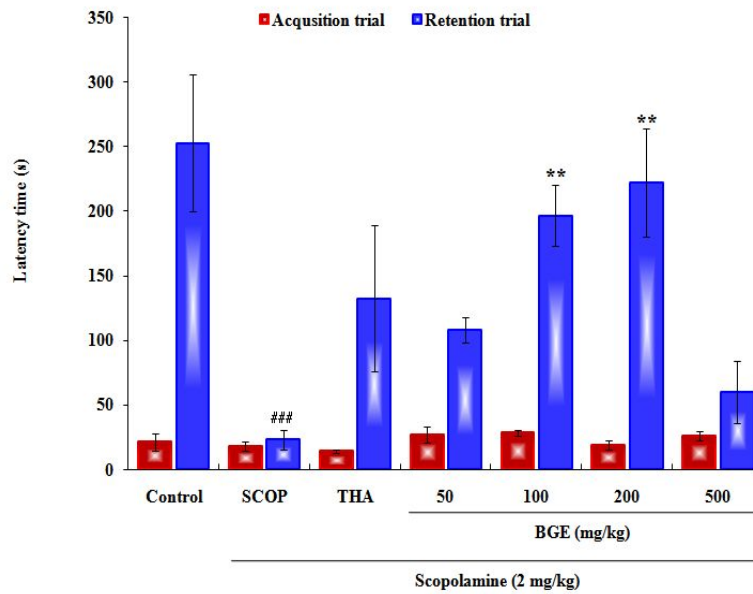


Figure 6-2. Effect of a single administration of BGE on SCOP-induced memory deficits in the passive avoidance task. ** $p < 0.01$ versus SCOP group, ### $p < 0.01$ versus control group.

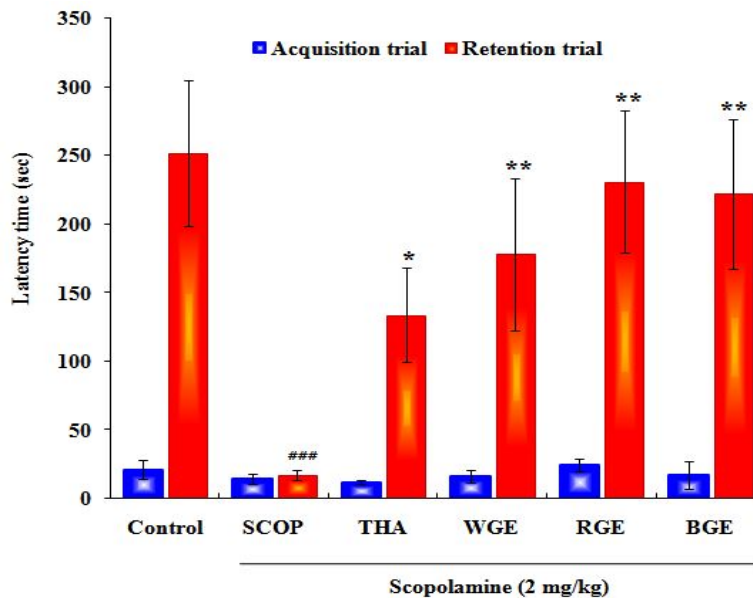


Figure 6-3. Effect of a single administration of Korean ginseng extracts on SCOP-induced memory deficits in the passive-avoidance task. Control (equal volume of 0.9% saline), THA (tacrine, 10 mg/kg, p.o.), WGE, RGE, or BGE (white, red, and black ginseng extract, respectively, 200 mg/kg, p.o.) were administered to mice 60 min before the acquisition trial.

라. Morris water maze (수중미로) 실험

SCOP으로 유도한 치매 환쥐의 공간 학습능력에 대한 인삼 추출물의 효과를 평가하기 위하여 수중 미로실험을 실시하였다. SCOP을 처리한 군의 escape latency는 훈련기간 동안 대조군에 비해 현저히 증가하여 장기기억에 손상을 입은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6-4A). THA와 인삼 추출물 투여군은 훈련 3일째부터 대조군과 비슷한 수준으로 회복되었으며, 4일째에는 모든 실험군의 escape latency가 SCOP군보다 유의적으로 현저히 감소하였다. 실험 5일째 platform을 제거한 후 실시한 probe test에서도 인삼 추출물 투여군의 escape latency가 대조군 수준으로 감소되어, 인삼 추출물의 투여로 4일간 반복학습을 통해 공간 인지력이 강화된 것을 확인할 수 있었다. 반면, SCOP군의 escape latency는 대조군과 유의적인 차이를 보이며 증가하였다 ($p < 0.001$).

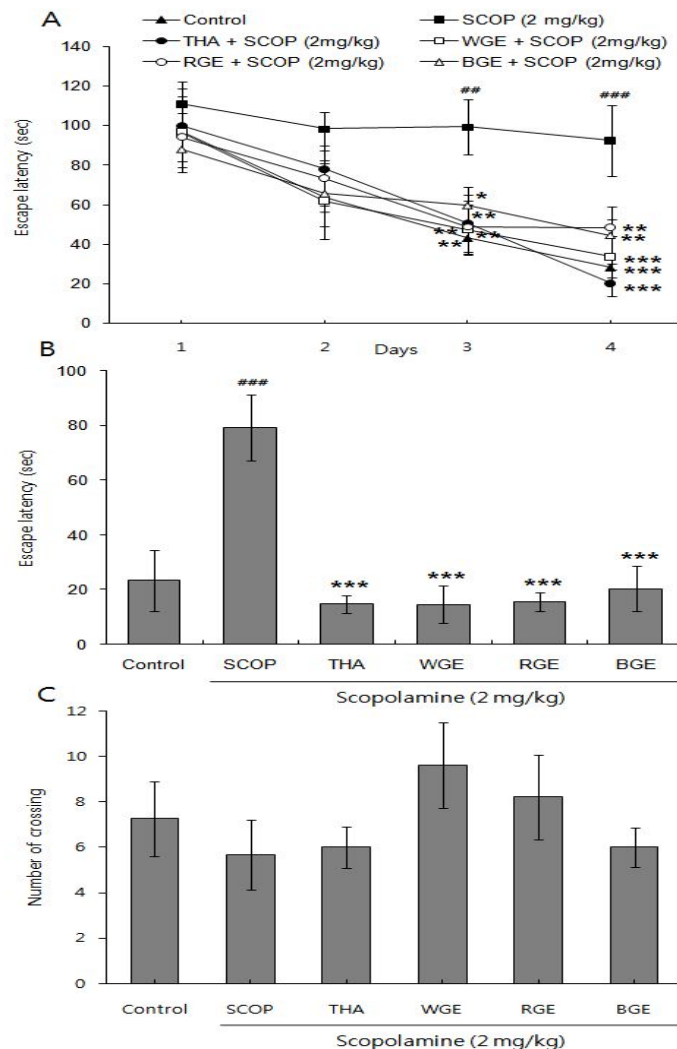


Figure 6-4. Effect of Korean ginseng extracts on escape latency in the training-trial sessions (A) and the probe trial session (B), number of crossing platform area (C) for the SCOP-induced memory deficits mice.

마. Y-maze 실험

단기 기억의 지표인 working memory를 반영하는 Y-maze test에 의한 행동 변경력 (spontaneous alternation)과 총 출입횟수는 Fig. 6-5와 같다. SCOP 투여군의 행동 변경력은 대조군보다 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 인삼 처리군은 SCOP에 의해 감소된 spontaneous alternation을 대조군과 비슷한 수준으로 회복하였으며, 흑삼 추출물 처리군은 양성 대조군인 THA 처리군보다 높은 효과를 나타내었다. 총 출입회수는 모든 군에서 차이가 없었다. 이는 인삼추출물이 실험동물의 일반적 운동성에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다 (35, 36).

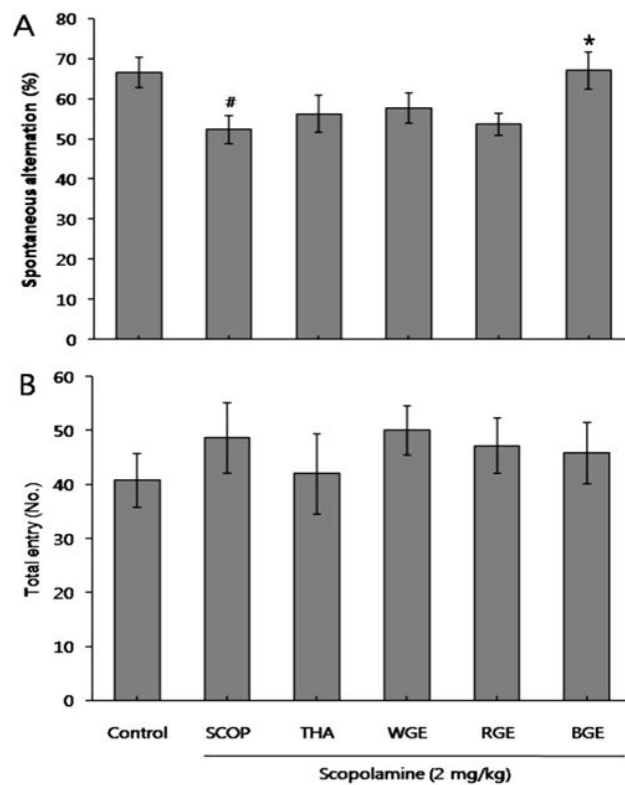


Figure 6-5. Effect of a single administration of WGE, RGE and BGE on SCOP-induced memory deficits as determined using the Y-maze. Spontaneous alternation (A) and the number of arm entries (B) during a session in the 8-min period were measured.

바. 뇌조직의 acetylcholinesterase (AChE), choline acetylcholinesterase (ChAT) 활성

SCOP은 cholinergic receptor의 저해제로 기억손상을 유발하여 알츠하이머나 다른 퇴행성 신경질환으로 인한 기억손상의 약리학적 실험모델로 사용되고 있다 (37). 본 연구에서 SCOP처리군의 AChE 활성은 9.04 ± 1.03 U/mg protein으로 가장 높은 활성을 보였으며 ($p < 0.05$), AChE inhibitor인 THA 처리군은 7.72 ± 0.38 U/mg protein으로 SCOP 처리군보다 AChE 활성을 20% 감소시켰다 (Table 6-2). 반면, 백삼과 홍삼 처리군은 각각 45%, 40%로 AChE 활성을 크게 억제하였다 ($p < 0.001$). 흑삼처리군은 대조군과 비슷한 수준의 결과를 보여주었다. 중추 신경계에서 신경전달 물질인 acetylcholine의 생합성에 관여하는 효소인 ChAT 활성은 SCOP에 의해 크게 영향을 받지 않았다 (38). 그러나 홍삼추출물과 흑삼추출물은 각각 1.96 ± 0.13 U/mg protein, 2.02 ± 0.18 U/mg protein으로 대조군의 활성보다 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 위의 결과를 통하여 백삼은 ACh 가수분해 효소 AChE 활성을 억제함으로 ACh가 후시냅스에서 ACh 수용체에 결합하도록 돕는 반면, 흑삼은 AChE 억제보다 전 시냅스에서 ACh 합성을 촉진하여 시냅스 간격에서 분해되는 ACh 함량을 증가시켜 신경전달을 활성화시키는 것으로 사료된다. 또한 홍삼은 AChE 활성 억제와 ChAT 활성 촉진을 통하여 시냅스 간격에서 이용할 수 있는 ACh의 양을 증가시켜 SCOP에 의한 기억손상을 빠르게 회복하는 것으로 사료된다 (39).

Table 6-2. Effect of Korean ginseng extracts on AChE and ChAT activity in mice brain following SCOP treatment

Groups	AChE	ChAT
	U/mg protein	
Control	8.78 ± 1.04^{ab}	1.75 ± 0.13^b
SCOP	9.04 ± 1.03^a	1.70 ± 0.03^b
THA	7.72 ± 0.38^b	1.76 ± 0.08^b
WGE	5.18 ± 0.85^c	1.77 ± 0.13^a
RGE	5.69 ± 0.85^c	1.96 ± 0.13^a
BGE	8.63 ± 0.48^{ab}	2.02 ± 0.18^a

¹⁾Control: vehicle-treated group; SCOP: scopolamine (2 mg/kg, i.p.) treated group; THA: pretreated with tacrine (10 mg/kg, p.o.) + scopolamine; WGE, RGE, and BGE: pretreated with each ginseng extract (200 mg/kg, p.o.) + scopolamine.

²⁾Values are expressed as means \pm SD (n=10).

³⁾Values with different superscripts within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

사. 뇌조직의 항산화 활성

흑삼을 비롯한 백삼, 홍삼 추출물의 항치매 효과에 대한 작용기전을 살펴보고자 뇌조직의 항산화 효소활성과 지질과산화물 형성을 측정하여 Table 6-3에 나타내었다. SCOP의 MDA 함량은 11.96 ± 2.31 nmole/mg protein으로 대조군보다 160% 증가하였다 ($p < 0.001$). THA와 인삼 추출물은 대조군과 비슷한 수준으로 뇌조직의 지질과산화를 억제하였다. SCOP군의 총 항산화 활성 (TAOC)은 대조군보다 유의적으로 감소하였으며 ($p < 0.05$), 백삼과 홍삼 추출물은 유의적인 차이를 보이지 않았으나, SCOP 처리군보다 증가하였다. 체내 superoxide free radical을 제거하는 SOD 활성은 SCOP 군에서 유의적으로 증가하였다 (40). Hydrogen peroxide를 소거하는 catalase는 SCOP군에서 유의적으로 감소하였으나 (41), 인삼추출물 투여시 catalase 활성이 증가되었고, 특히 흑삼추출물 투여시 가장 높은 활성을 나타냈다.

Table 6-3. Effect of ginseng extracts on antioxidant enzyme activities following SCOP treatment

Groups	SOD	CAT	TAOC	MDA
	(Unit/mg protein)			nmole/mg protein
Control	$65.49 \pm 4.15^{b2)}$	2.09 ± 0.99^a	9.86 ± 2.00^{ab}	7.44 ± 1.27^b
SCOP	88.23 ± 10.95^a	1.34 ± 0.29^b	6.93 ± 0.95^c	11.96 ± 2.31^a
THA	64.35 ± 9.30^b	1.32 ± 0.21^b	9.04 ± 0.89^{ab}	7.96 ± 0.41^b
WGE	64.86 ± 9.27^b	1.63 ± 0.23^{ab}	8.20 ± 1.13^{bc}	8.35 ± 0.91^b
RGE	71.38 ± 16.19^b	1.80 ± 0.35^{ab}	8.43 ± 0.99^{bc}	7.71 ± 2.20^b
BGE	69.39 ± 11.66^b	2.10 ± 0.32^a	10.55 ± 1.33^a	8.04 ± 0.90^b

¹⁾ Control: vehicle-treated group; SCOP: scopolamine (2 mg/kg, i.p.) treated group; THA: pretreated with tacrine (10 mg/kg, p.o.) + scopolamine; WGE, RGE, and BGE: pretreated with each ginseng extract (200 mg/kg, p.o.) + scopolamine.

²⁾ Values are expressed as means \pm SD (n=3).

³⁾ Values with different superscripts within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

아. Cholinergic marker 발현에 미치는 흑삼의 효과 -Western blot assay

Cholinergic marker인 ChAT과 AChE 의 발현을 대뇌피질과 해마에서 western bolt으로 확인하였다 (Fig. 6-6). 해마와 대뇌피질의 ChAT 단백질 발현은 인삼추출물 군에서 현저히 증가하였다. 대뇌피질의 ChAT 발현은 positive control인 THA 처리군보다 인삼추출물 처리군에서 현저히 증가하였다. 반면, 해마의 ChAT 발현은 그룹간의 차이를 보이지 않았다. SCOP군의 대뇌 피질 ChAT 단백질 수준은 대조군보다 76.1% 감소하였다.

SCOP투여는 뇌조직의 AChE 활성을 증가시키는데 (42, 43), 본 연구에서도 해마와 대뇌피질의 AChE 단백질 발현이 대조군보다 각각 117.9%, 143.2%로 현저히 증가한 것을 관찰하였다. SCOP처리로 인하여 증가된 해마 AChE 단백질은 대조군과 비교하였을 때, 인삼 추출물 처리시 백삼 51.8%, 홍삼 82.3%, 흑삼 79.5% 수준으로 감소시켰다. 또한 대뇌피질의 AChE 수준 역시 인삼추출물에 의해서 각각 대조군의 66.8%, 61.3%, 52.1% 수준으로 억제되었다. 인삼 추출물의 AChE 단백질 발현억제효과는 AChE inhibitor인 THA의 억제효과보다 현저히 높은 활성을 나타내었다.

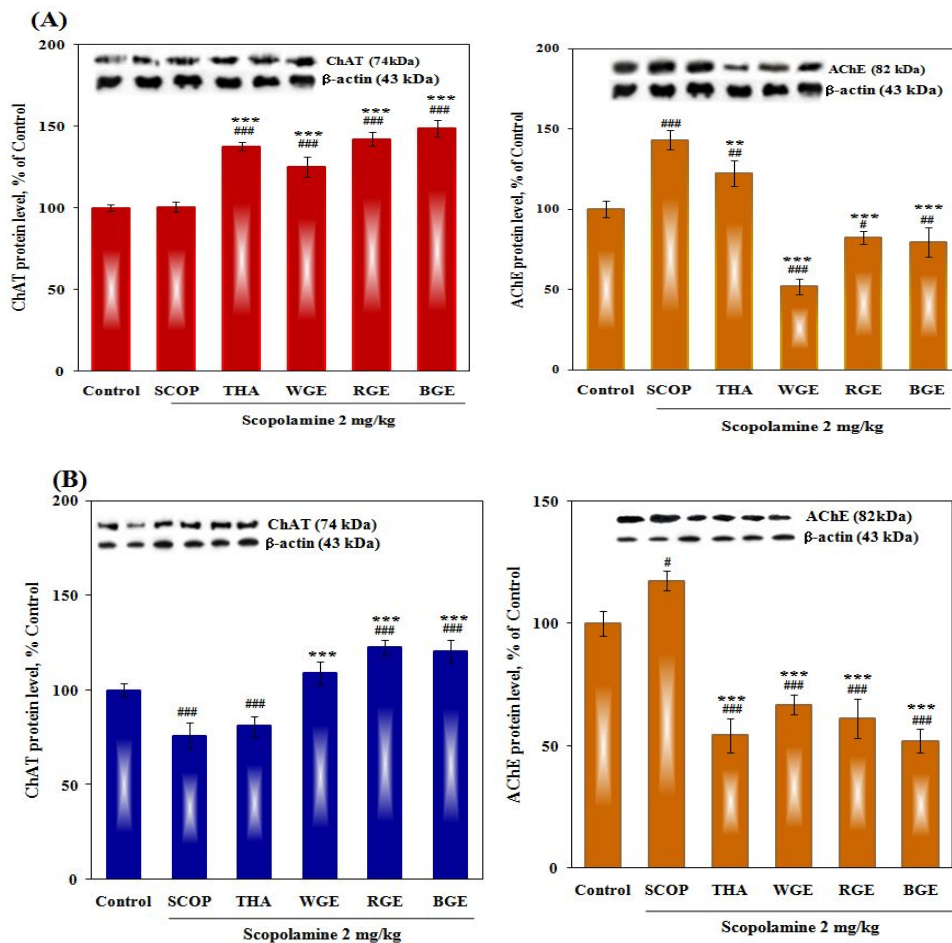


Figure 6-6. Western blot analysis of the cholinergic marker proteins in the hippocampus (A) and cerebral cortex (B) of amnesic mice induced by SCOP. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 compared with control group.

자. Cholinergic marker 발현에 미치는 흑삼의 효과 ; RT-PCR

대뇌피질과 해마조직에서 cholinergic marker인 ChAT과 AChE의 mRNA 발현을 살펴 보았다 (Fig. 6-7). ChAT mRNA 발현은 해마 (72.7%)와 대뇌피질 (78.2%)에서 현저히 감소하였다. 그러나, THA와 흑삼은 감소된 ChAT의 mRNA 발현에는 영향을 주지 못하였다. 반면, 백삼과 홍삼추출물 처리시 해마의 ChAT mRNA 발현은 각각 91.2%, 88.35%로 증가시켰다. 대뇌피질의 ChAT mRNA 수준은 SCOP에 의해 감소된 mRNA 발현에 어떤 처리도 영향을 주지 않았다. 해마의 AChE mRNA 발현은 SCOP투여로 인하여 40.6%로 감소하였으나, 대뇌피질에서는 영향을 받지 않았다. 증가된 AChE mRNA 발현은 AChE inhibitor인 THA나 인삼 추출물 투여로 대뇌피질과 해마에서 현저히 억제되었다. 본 연구결과를 통하여 볼 때, 인삼 추출물은 AChE 단백질 및 mRNA 발현을 억제할 뿐아니라, ChAT 단백질과 mRNA의 발현을 활성화시키므로써 SCOP에 의해 유도된 치매를 치료하는 것으로 사료되었다.

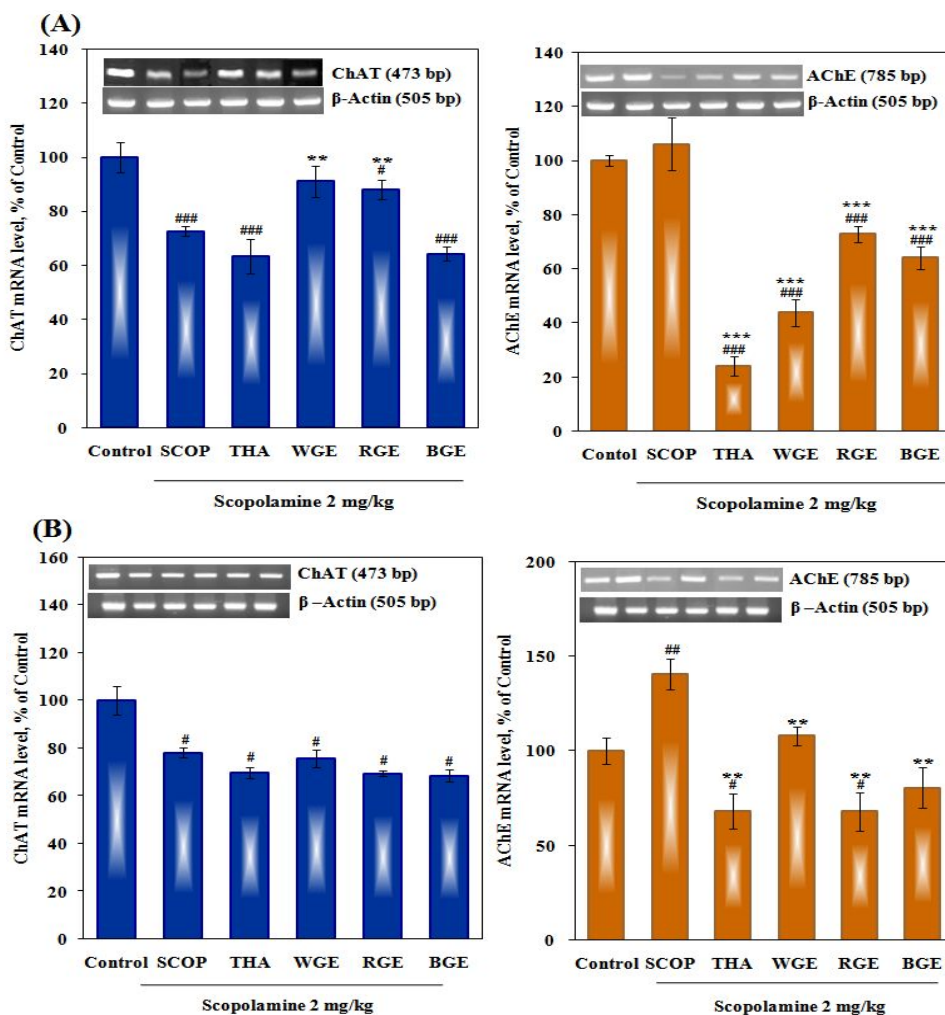


Figure 6-7. RT-PCR of the cholinergic marker genes in the hippocampus (A) and cerebral cortex (B) of amnesic mice induced by SCOP. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with SCOP group.

7. 인삼 추출물의 장기 섭취가 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과 탐색

가. 체중 및 장기 무게

백삼, 홍삼, 흑삼 추출물을 1%, 3%의 수준으로 실험동물에 8개월간 식이에 섭취하여 제공하였다. 각 그룹의 체중변화는 그룹간 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 3% 흑삼 추출물 군의 체중이 가장 증가한 것을 확인하였다. 장기무게의 경우, 고환무게는 처리군간의 유의적 차이를 보이지 않았다. 1% 백삼 추출물 군의 신장과 간 무게가 대조군보다 유의적으로 낮았다. 3% 홍삼추출물 군의 심장과 뇌무게가 유의적으로 증가하였다. High dose 그룹에서의 체중증가현상을 관찰할 수 있는데, 이것은 lean body mass의 증가로 사료 되어 진다 (44-46).

Table 7-1. Body weight (g) and organs weight (mg/g b.w.) after 8 months ginseng extracts treatment in aged mice

	B.W.	Liver	Kidney	Testes	Heart	Brain
Control	55.0±5.0 ^{ab}	32.2±2.1 ^{ab}	12.2±1.2 ^{ab}	4.3±0.7 ^{ab}	3.8±0.4 ^b	8.8±0.7 ^b
HWG	58.2±1.7 ^a	31.3±3.4 ^{abc}	10.6±0.6 ^c	3.6±0.5 ^b	3.6±0.4 ^b	8.6±0.6 ^b
HRG	50.5±5.2 ^b	33.0±1.2 ^a	13.3±0.1 ^a	4.5±0.3 ^a	4.5±0.7 ^a	10.4±1.6 ^a
HBG	56.0±3.8 ^{ab}	29.6±0.7 ^{bc}	11.02±0.4 ^{bc}	4.3±0.4 ^{ab}	0.8±0.2 ^b	8.9±0.9 ^b
LWG	54.0±5.6 ^{ab}	29.0±2.2 ^c	10.34±0.7 ^c	4.4±0.7 ^{ab}	4.0±0.6 ^{ab}	9.4±0.8 ^{ab}
LRG	55.4±4.5 ^{ab}	30.7±2.2 ^{abc}	10.22±1.0 ^c	4.3±0.4 ^{ab}	3.8±0.2 ^b	9.10±1.0 ^{ab}
LBG	52.9±4.5 ^{ab}	31.9±1.7 ^{abc}	11.38±1.65 ^{bc}	4.5±0.6 ^{ab}	3.9±0.3 ^{ab}	9.3±1.0 ^{ab}

¹⁾Values are expressed as means ± SD (n=5).

²⁾HWG, HRG, HBG : 3% WGE, RGE, BGE diet

³⁾LWG, LRG, LBG : 1% WGE, RGE, BGE diet

⁴⁾Values with different superscripts within the same row are significantly different at p< 0.05.

나. 혈청학적 분석 결과

혈청을 분리하여 인삼 추출물의 장기 섭취가 혈청학적 분석에 어떤 영향을 주는지 평가하고자 Cholesterol, TG, HDL-cholesterol, Glucose의 농도를 측정하였다 (Table 7-2). 1% 흑삼추출물은 혈청 cholesterol 수치를 현저하게 감소시켰다. 3% 흑삼 추출물은 혈청 HDL-cholesterol 수치를 대조군보다 30.9%를 증가시키는 효과를 나타내었다. 1% 흑삼추출물군을 제외한 나머지 인삼 처리군에서도 대조군보다 HDL-cholesterol 수치가 증가하였다. 혈청 중성지방 농도는 인삼추출물 처리시 현저하게 감소하였다. 3% 홍삼, 3% 흑삼, 1% 홍삼 식이군에서 각각 15.6%, 41.2%, 20.8% 수준으로 혈청 지방 농도를 감소시켰다 (47-49).

Table 7-2. Cholesterol, HDL-cholesterol, TG, and glucose after 8 months ginseng extracts treatment in aged mice

Group	TC	HDL-C	TG	Glucose
	mg/dL			
Control	129.3±39.3 ^a	48.5±3.8 ^b	108.5±22.0 ^a	157.25±22.6 ^{ab}
HWG	116.9±10.9 ^{ab}	56.2±3.7 ^{ab}	89.0±16.3 ^{bc}	182.5±8.4 ^a
HRG	106.8±6.9 ^{ab}	54.6±4.9 ^{ab}	75.4±11.8 ^c	132.6±20.6 ^{bc}
HBG	127.9±22.4 ^{ab}	63.5±11.2 ^a	82.4±14.6 ^c	92.43±9.9 ^d
LWG	122.7±8.0 ^{ab}	56.2±6.2 ^{ab}	97.2±12.0 ^{bc}	168.78±18.6 ^a
LRG	101.8±14.6 ^{ab}	52.2±6.1 ^{ab}	85.9±7.3 ^{bc}	124.5±13.7 ^c
LBG	95.0±21.4 ^b	48.3±6.0 ^b	107.5±17.2 ^{ab}	165.3±18.18 ^a

¹⁾ Values are expressed as means ± SD (n=5).

²⁾ HWG, HRG, HBG : 3% WGE, RGE, BGE diet

³⁾ LWG, LRG, LBG : 1% WGE, RGE, BGE diet

⁴⁾ Values with different superscripts within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

다. 뇌조직의 acetylcholinesterase, choline acetyltransferase 활성

8개월간 1%, 3%의 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물을 식이에 첨가하여 실험한 결과, 뇌조직의 AChE 활성은 모든 그룹에서 대조군보다 현저히 감소하였다 (Table 7-3). ChAT의 활성은 3% 흑삼 추출물 처리군에서 대조군보다 20% 활성이 증가하였다. 본 실험결과를 통하여 볼 때, 흑삼추출물의 장기섭취는 AChE 활성억제와 ChAT 촉진 효과가 있어 cholinergic system을 조절하는 기전을 통하여 노화 흰쥐의 뇌기능 개선에 효과적인 것으로 사료된다 (50, 51).

Table 7-3. Effect on the AChE and ChAT activities in the brain after 8 months ginseng extracts treatment in aged mice

Group	AChE	ChAT
	U/mg protein	
Control	4.77±0.98 ^a	6.43±0.19 ^b
HWG	3.44±0.79 ^b	6.60±0.74 ^b
HRG	2.92±1.12 ^b	6.32±0.56 ^b
HBG	2.36±0.77 ^b	7.69±0.39 ^a
LWG	3.04±1.23 ^b	6.05±0.34 ^b
LRG	2.81±0.69 ^b	6.11±0.83 ^b
LBG	2.22±0.55 ^b	6.84±0.56 ^b

¹Values are expressed as means ± SD (n=5).

²HWG, HRG, HBG : 3% WGE, RGE, BGE diet

³LWG, LRG, LBG : 1% WGE, RGE, BGE diet

⁴Values with different superscripts within the same row are significantly different at p< 0.05.

라. 뇌조직의 항산화 효소 활성화에 미치는 효과

인삼추출물의 장기섭취가 뇌조직 항산화활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 지질과산화물 형성과 SOD, Glutathione reductase (GR)활성을 분석하였다 (Table 7-4). 뇌조직의 지질과산화물은 대조군이 3.33 ± 0.23 nmole/mg protein으로 가장 높은 수치를 보였다. 인삼추출물 처리군은 전반적으로 지질과산화물 수치가 감소하였으나, 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. SOD와 GR 활성화도 인삼추출물 처리시 증가하는 경향을 보였으며, 특히 SOD는 3% 흑삼 섭취군에서, GR 활성화는 3% 백삼, 홍삼, 1% 홍삼 군에서 현저히 증가하였다.

Table 7-4. Changes in MDA levels, SOD and GR activities in the brain after 8 months treatment with ginseng extracts treatment in aged mice

Group	MDA	SOD	GR
	nmole/mg protein	Unit/mg protein	
Control	3.33 ± 0.23	45.43 ± 11.16^b	11.50 ± 2.57^c
HWG	3.21 ± 0.45	56.06 ± 4.95^a	19.60 ± 4.19^a
HRG	3.06 ± 0.46	47.71 ± 5.45^b	18.57 ± 4.45^a
HBG	3.11 ± 0.32	55.04 ± 5.59^b	15.25 ± 2.34^c
LWG	2.93 ± 0.26	44.80 ± 2.99^b	13.25 ± 2.04^c
LRG	2.98 ± 0.24	49.32 ± 5.24^b	17.19 ± 3.21^b
LBG	2.70 ± 0.35	50.37 ± 10.96^b	13.67 ± 1.54^c

¹⁾ Values are expressed as means \pm SD (n=5).

²⁾HWG, HRG, HBG : 3% WGE, RGE, BGE diet

³⁾LWG, LRG, LBG : 1% WGE, RGE, BGE diet

⁴⁾Values with different superscripts within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

마. Cholinergic marker protein 발현에 미치는 효과

Fig. 7-1은 3% 인삼 추출물을 8개월간 장기 섭취시킨 마우스 뇌조직의 cholinergic marker 발현을 관찰하기 위하여 대뇌피질과 해마에서 acetylcholine 합성 효소와 시냅소소포로 acetylcholine을 운반하는 이동 단백질인 vesicular acetylcholine transferase (VACHT) 발현을 western blot을 통하여 확인하였다. 대뇌피질의 VACHT 단백질은 대조구와 비교하여 발현량을 비교하였을 때, 백삼 177%, 홍삼 170%, 흑삼 252% 증가하였다. 해마 VACHT 역시 각각 123%, 114%, 174%로 증가되었다. VACHT 발현과 마찬가지로 대뇌피질의 ChAT 단백질은 백삼, 홍삼, 흑삼추출물 투여로 각각 117%, 140%, 217% 증가하였다. 특히, 흑삼추출물은 VACHT와 ChAT 단백질 발현을 대뇌피질과 해마에서 모두 대조군보다 약 2배가량 활성을 증가시켰다.

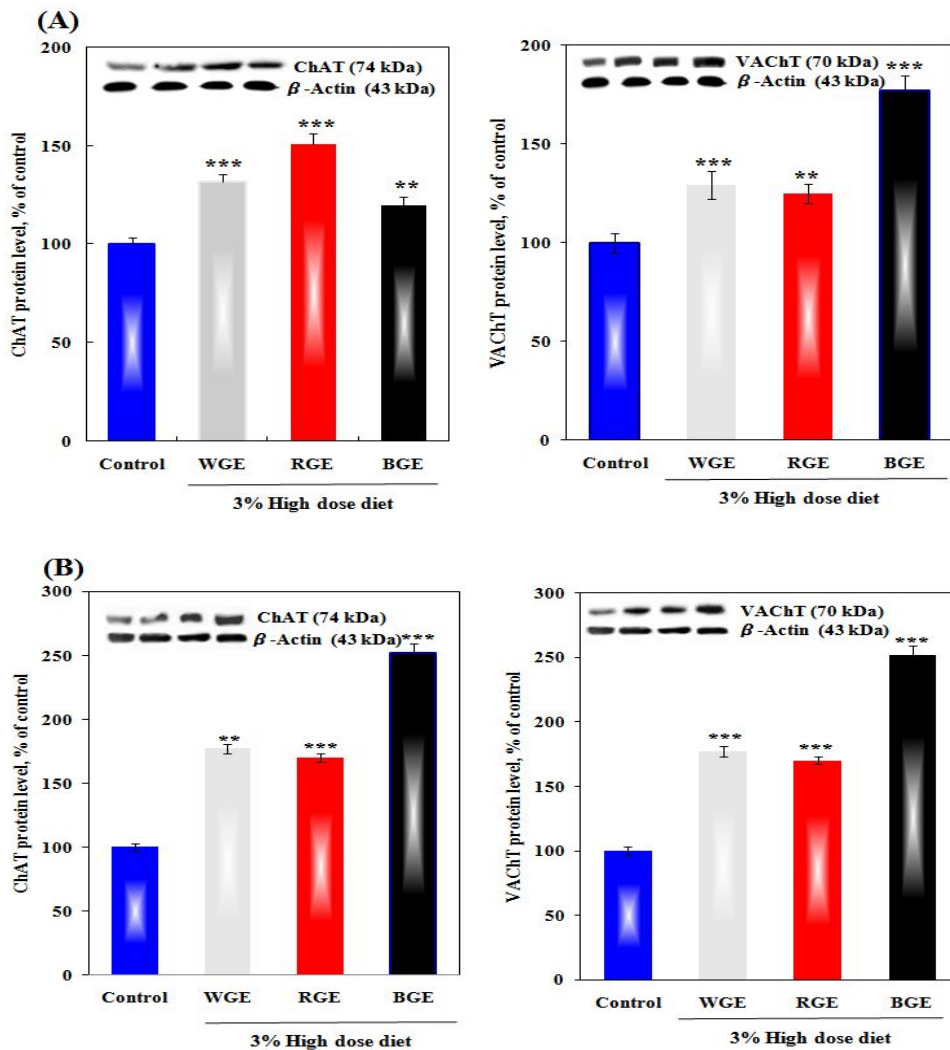


Figure 7-1. Western blot analysis of the cholinergic marker proteins in the hippocampus (A) and cerebral cortex (B) of aged mice fed 3% ginseng extract diets for 8 months.

바. GAP-43, SNAP-25, NGF 발현에 미치는 효과

Synaptic marker인 GAP-43과 SNAP-25 그리고 Neurophins 중의 중요 단백질인 NGF의 발현을 대뇌피질에서 관찰하였다 (Table 7-2). GAP-43은 3% 홍삼과 흑삼 추출물 처리시 대조군보다 유의적으로 증가하였다. SNAP-25 단백질은 인삼 처리군에서 모두 유의적으로 증가하였다. 백삼과 흑삼에서 각각 137%, 139%로 증가되었다.

Neurotrophin NGF는 cholinergic cell의 생존과 유지, 시냅스 가소성에 중요한 역할을 하는 단백질로 ChAT의 활성을 조절하여 신경전달물질인 acetylcholine의 합성과 분비를 조절한다. NGF는 백삼 122%, 홍삼 110%, 흑삼 133% 발현을 증가시켰다. 위의 결과로 볼 때, 인삼 추출물 특히, 가장 높은 활성을 나타낸 흑삼은 노화로 인한 neurotrophin의 분해와 cholinergic system 및 memory 장애를 회복하는 기능이 있는 것으로 사료된다 (52-54).

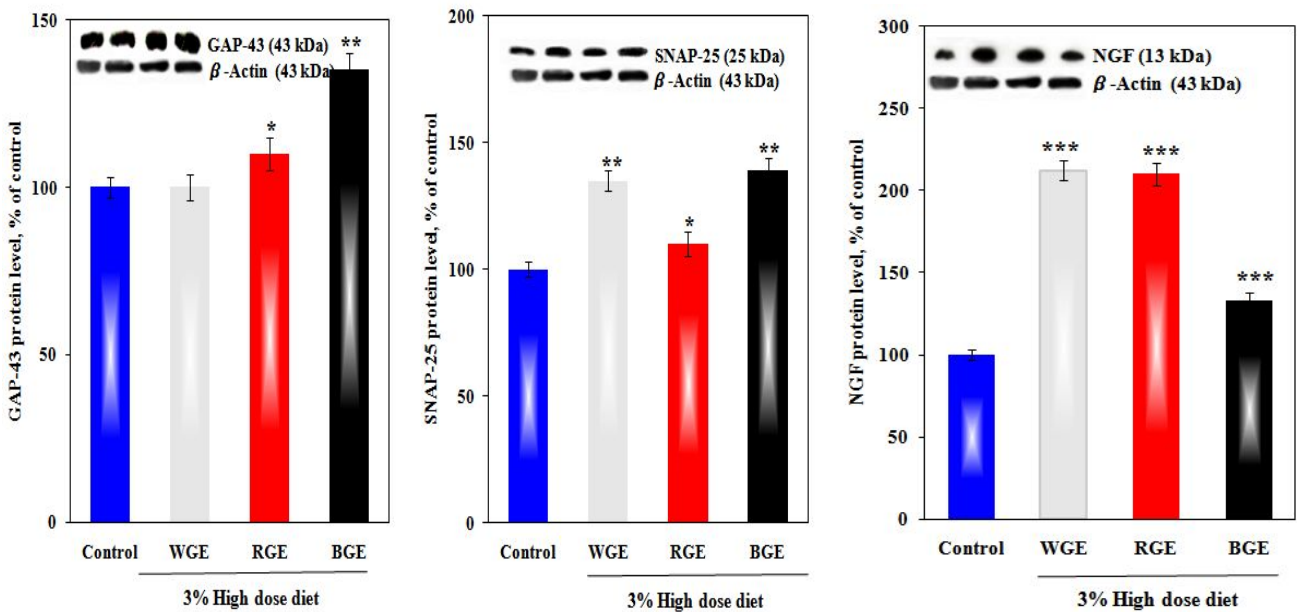


Figure 7-2. Western blot analysis of GAP-43, SNAP-25, and NGF protein in the cerebral cortex of aged mice fed ginseng extracts for 8 months.

8. 노화 흰쥐의 뇌기능 개선에 미치는 흑삼의 효과 탐색

가. 수동회피실험

18개월된 ICR 마우스를 이용하여 홍삼과 흑삼 추출물을 200 mg/kg 용량으로 16주간 경구투여하여 노화 흰쥐의 뇌기능 개선효과를 수동회피실험을 통해 확인하였다 (Fig. 8-1). 노화 흰쥐의 대조군의 latency time은 38.89 ± 15.25 sec 였고, 홍삼과 흑삼 추출물 투여군은 각각 74.25 ± 19.02 sec, 65.93 ± 8.66 sec로 증가하였으나, 통계적 유의성은 보이지 않았다.

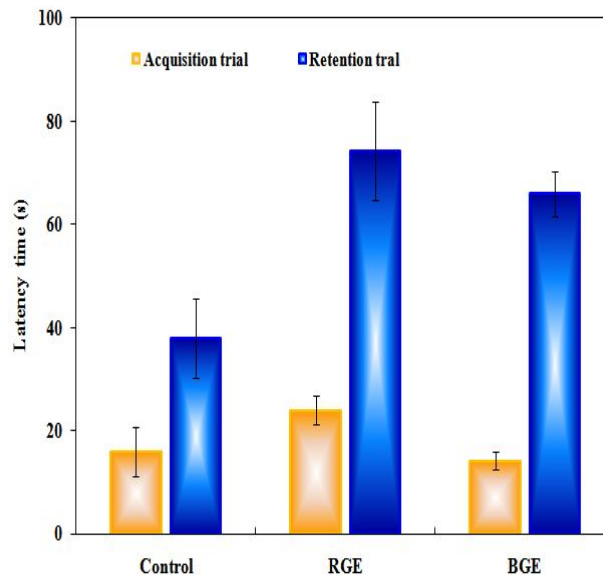


Figure 8-1. Effect of long-term treatment of RGE and BGE on aged memory deficits in the passive avoidance task. Retention trials were carried out for 5 min 24 h after the acquisition trials.

나. Comet assay를 통한 혈액 lymphocyte의 DNA damage

혈액 Lymphocyte의 DNA손상은 100개의 cell을 측정하여 tail ratio, tail moment, tail length을 계산하였다 (Fig. 8-2, Table 8-1). 대조군의 평균 Olive tail moment는 5.48 ± 1.27 인 반면, 16주간 인삼추출물을 투여하였을 때, 홍삼군은 2.71 ± 0.30 , 흑삼군은 2.76 ± 0.85 으로 현저히 감소시켜 노화로 인한 DNA 손상으로부터 세포를 보호하고 회복하는 효과가 있음을 확인하였다 (55-57).

Table 8-1. Effect of RGE and BGE on comet parameters of the lymphocytes of peripheral blood in aged mice

	Tail ratio (% DNA)	Olive tail moment	Tail Length (μm)
Control	10.85 \pm 1.07 ^a	5.48 \pm 1.27 ^a	16.56 \pm 2.52 ^a
RGE	7.02 \pm 0.73 ^b	2.71 \pm 0.30 ^b	11.35 \pm 1.54 ^b
BGE	6.01 \pm 0.91 ^b	2.76 \pm 0.85 ^b	9.70 \pm 1.20 ^b

1) Values are expressed as the group mean \pm S.D. (n=5).

2) Values with different superscripts within the same row are significantly different at $p < 0.05$.

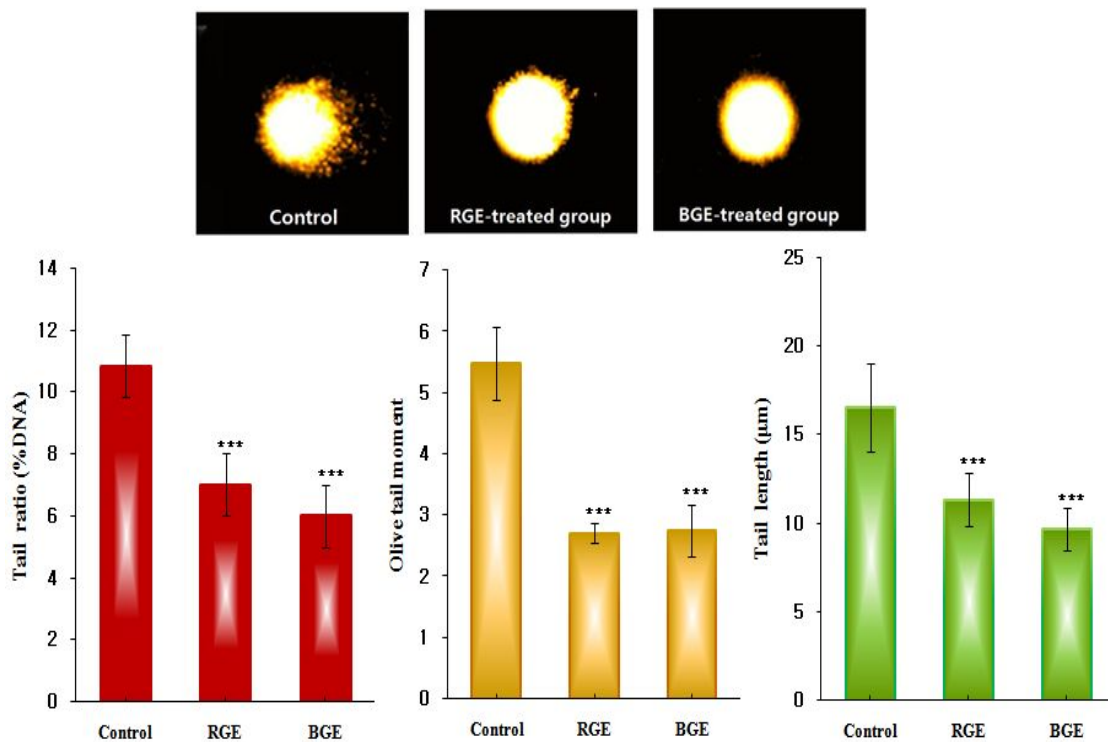


Figure 8-2. Representative image of fluorescent microscopic and comet parameters.

다. Cholinergic protein 발현에 미치는 효과

(1) AChE, ChAT 효소 활성

노화 흰쥐의 뇌조직 cholinergic system에 미치는 인삼 추출물의 효과를 관찰하기 위하여 대뇌 피질의 cholinergic marker인 AChE와 ChAT의 효소활성을 측정하였다 (Fig. 8-3).

알츠하이머 질환은 cholinergic system의 손상으로 나타나는 대표적인 인지장애로, AChE와 ChAT 활성이 감소하는 특징이 있다 (58, 59). 대조군의 AChE 활성은 1.76 ± 0.46 U/mg protein, 홍삼군 2.02 ± 0.58 U/mg protein, 흑삼군 1.82 ± 0.45 U/mg protein으로 감소된 노화 흰쥐의 AChE 활성을 회복시키는 효과를 나타내었다. ChAT 활성은 흑삼군에서 약간 증가하였으나, 통계적 유의성은 보이지 않았다.

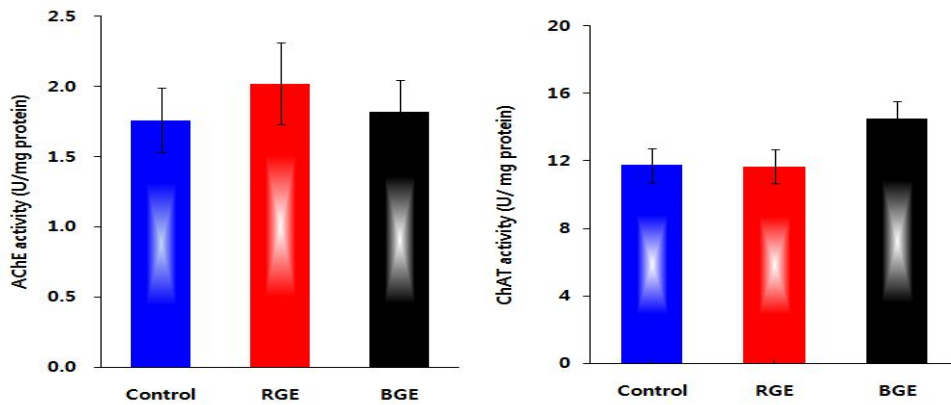


Figure 8-3. Effect of ginseng extracts on AChE and ChAT activities in the cerebral cortex of aged mice brain. Values are expressed as means \pm S.D.

(2) Cholinergic protein-AChE, ChAT, VACHT 단백질 발현에 미치는 효과

Western blot 방법을 이용하여 노화 흰쥐의 대뇌 피질에 있는 cholinergic protein의 발현을 관찰하였다. 신경전달물질인 acetylcholine의 합성 (ChAT), 운반 (VACHT), 분해 (AChE)에 관여하는 단백질의 발현을 Fig. 8-4에 나타냈다. AChE 단백질 발현은 대조군에 비해 홍삼군이 142.2%, 흑삼군이 154.3% 증가시켰다. ChAT와 VACHT 단백질 역시, 홍삼과 흑삼 추출물 투여로 현저히 발현량이 증가되었다. ChAT 단백질은 홍삼군 162.1%, 흑삼군 157.4% 증가하였고, VACHT 단백질은 홍삼군 138.9%, 120.4% 증가시켰다.

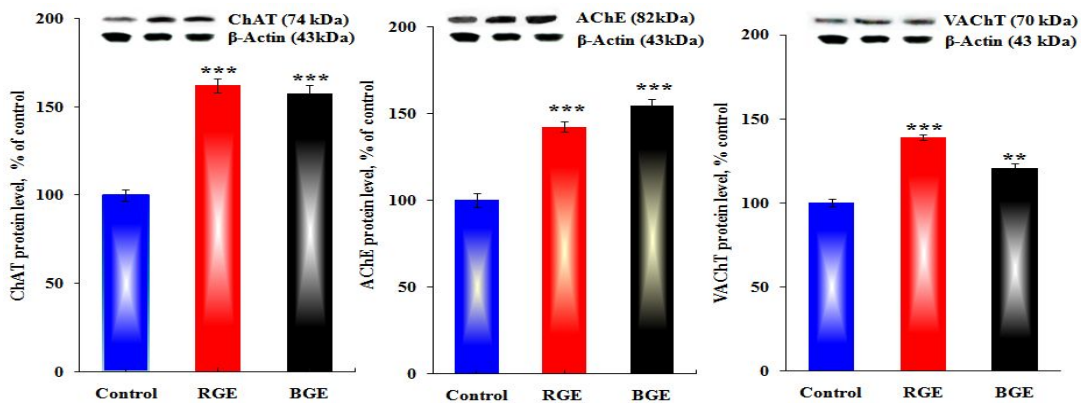


Figure 8-4. Western blot analysis of AChE, ChAT and VACHT protein in the hippocampus of aged mice.

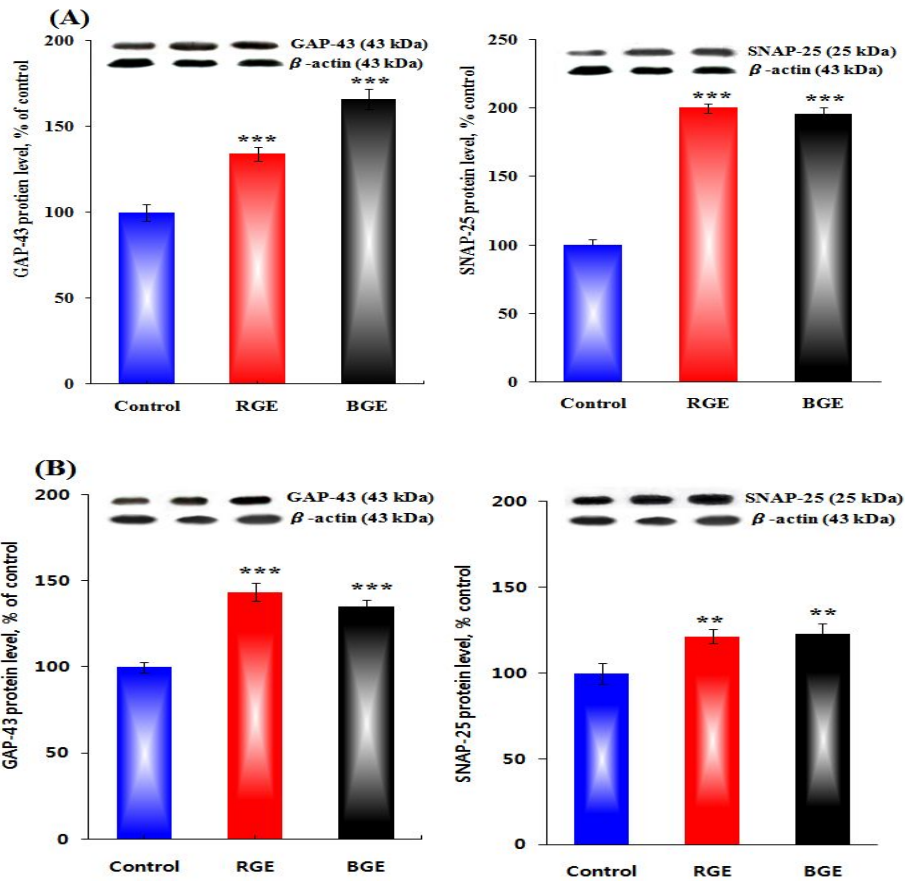


Figure 8-5. Western blot analysis of GAP-43 and SNAP-25 protein in the hippocampus (A) and cerebral cortex (B) of aged mice

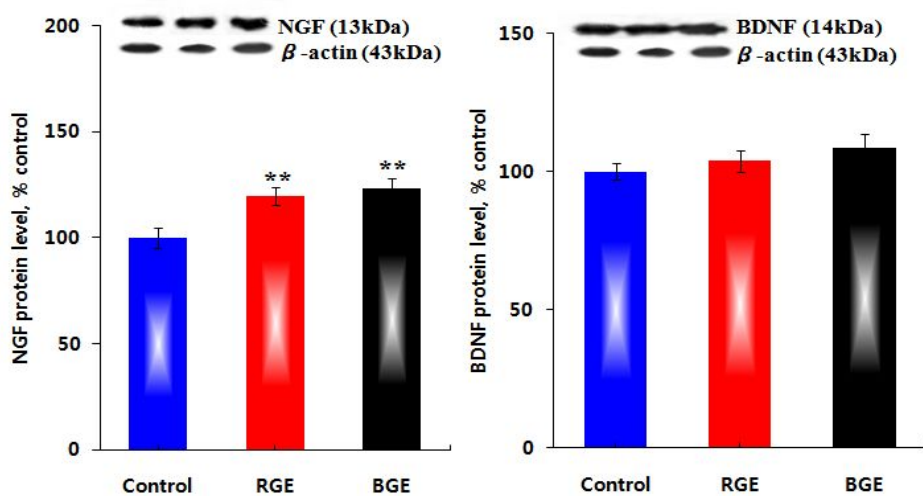


Figure 8-6. Western blot analysis of GAP-43 and SNAP-25 protein in the hippocampus of aged mice.

9. D-galactose로 유발한 노화 흰쥐의 뇌기능에 미치는 흑삼의 효과

가. Morris water maze test

뇌 노화를 유발하는 D-galactose 80 mg/kg을 8주간 피하주사하여 노화를 유발하면서, 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물을 300 mg/kg 용량으로 식이에 첨가하였다. 8주 실험 종료 5일전에 수중미로실험을 실시하였다 (Fig. 9-1-A). D-galactose만을 투여한 실험군의 escape latency time은 4일간의 훈련에도 불구하고 감소폭이 매우 작았으나, 인삼추출물 투여군은 모두 대조군과 비슷한 수준으로 회복되었다. 실험 5일째 물속의 platform을 제거한 후 실험동물이 platform의 위치를 찾아가는 횟수를 기록한 결과는 대조군이 7회, D-gal군이 3.2회, 백삼추출물군 5.8회, 홍삼군 7.2회, 흑삼군 6.8회로 인삼섭취군이 platform의 위치를 기억하고 찾아가려는 횟수가 대조군과 비슷한 수준으로 향상되었다 (Fig. 9-1-B). 또한, platform이 위치한 4분면 위에 머무는 시간 역시 인삼투여군에서 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 9-1-C).

나. 뇌조직의 항산화 효소 활성

(1) 뇌조직의 지질과산화물 형성

지질과산화물 측정은 생체내 조직의 산화적 스트레스 수준을 측정하기 위한 biomarker로 이용된다. 본 연구에서 뇌 노화물질인 D-galactose에 노출된 군의 뇌조직 지질과산화물 형성은 유의적으로 증가되었다 (Fig. 9-2). 인삼추출물을 함께 처리하였을 때, 뇌조직의 산화적 스트레스를 많이 감소시켜주었다. 특히, 홍삼과 흑삼 추출물 투여군은 대조군의 수준으로 뇌조직을 산화적 스트레스로부터 보호해주었다.

(2) 항산화 효소 활성

Reactive oxygen species (ROS)의 농도는 여러 항산화 물질과 효소에 의해서 제거되는 속도와 생체내에서 형성되는 속도에 따른 균형에 의해 결정된다. 생체내 항산화 효소 중 SOD (superoxide dismutase)는 O_2^- 를 peroxide로 전환하는 경로에 처음 작용하는 효소이며, peroxide는 catalase와 glutathione peroxide (GPx)에 의해 물로 전환된다. D-galactose 투여로 뇌조직의 항산화 효소의 활성은 감소되었으나, 인삼추출물 투여로 대뇌피질과 해마 조직의 항산화 효소 활성이 증가하는 결과를 나타냈다 (Fig. 9-3,4).

(3) Na^+-K^+ -ATPase activity

Na^+-K^+ -ATPase 효소는 신경계에 Na과 K 이온을 전달하는 역할을 수행하는 효소로 탈분극 후 신경 세포막의 안정과 유지를 위해 40-50%의 ATP를 사용한다. D-galactose 투여군은 Na^+-K^+ -ATPase 활성이 현저히 감소되어 뇌세포의 에너지 대사를 방해하는 것으로

나타났다 (Fig. 9-4)(60, 61). 인삼 추출물 투여군은 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 효소 활성을 증가시켜 뇌신경세포의 신경전달을 원활하게 회복하는 기전이 있음을 확인하였다 (62, 63).

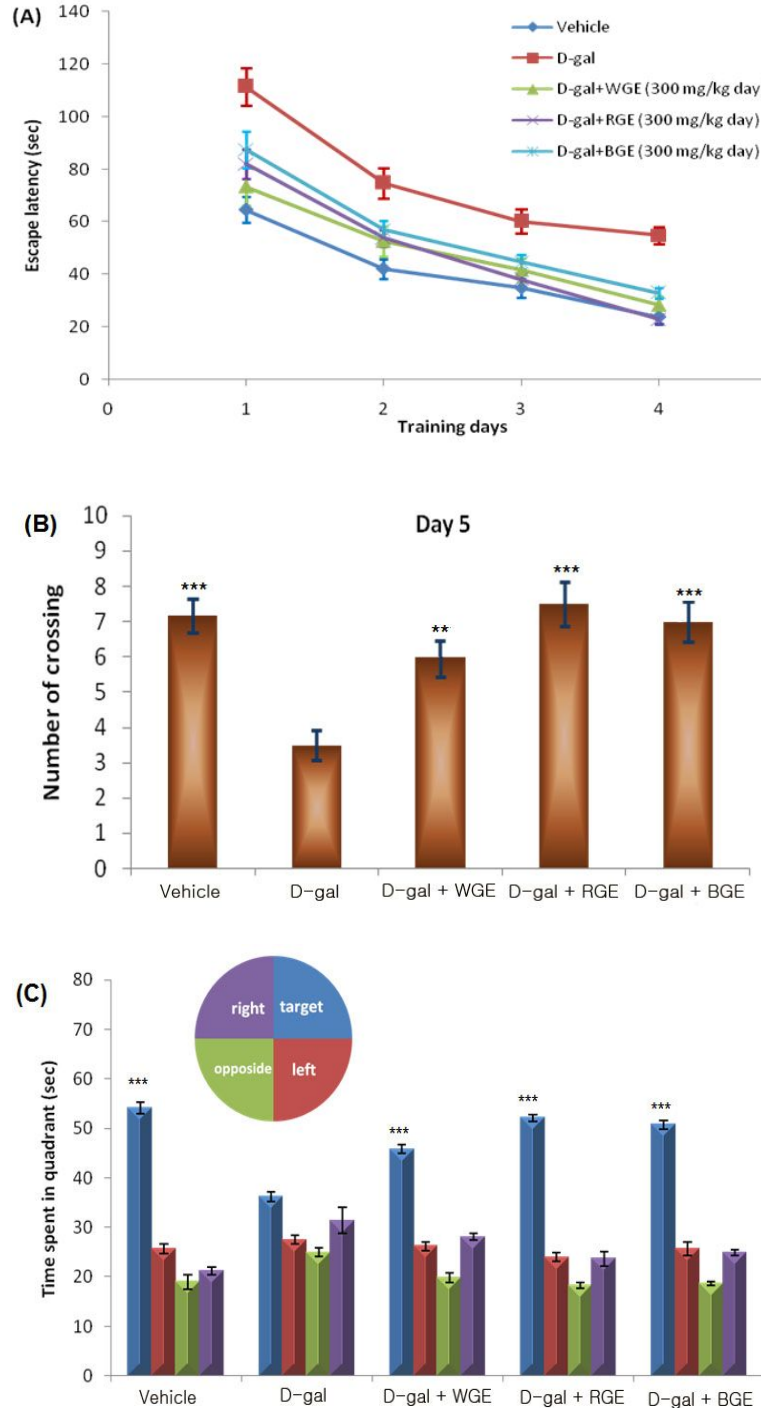


Figure 9-1. The Morris water maze test of all groups of rats.(A) Latencies to find a fidden platform in the water maze during 4 consecutive days training; (B) the number of crossing over the exact location of the former platform; (C) comparison of the time spent in the target quadrant with other quadrants on day 5.

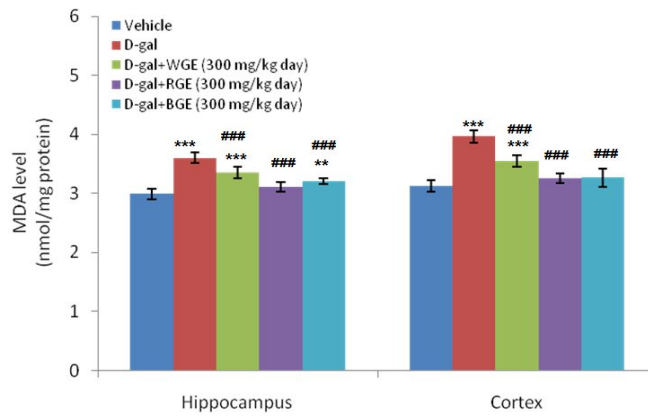


Figure 9-2. Effects of different ginseng extracts on the contents of MDA in the cortex and hippocampus of D-galactose treated rats.

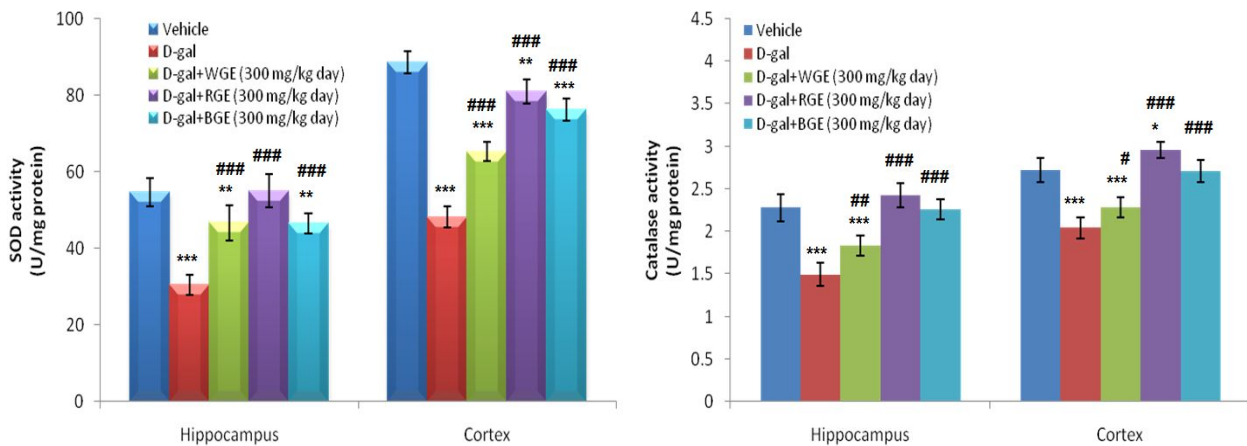


Figure 9-3. Effects of different ginseng extracts on the SOD and Catalase activity in the cortex and hippocampus of D-galactose treated rats.

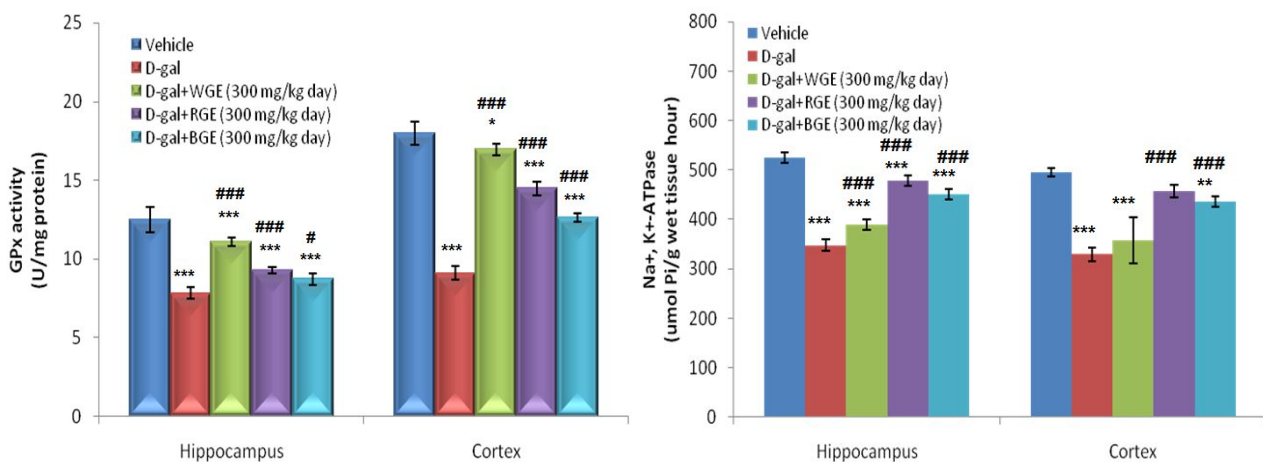


Figure 9-4. Effects of different ginseng extracts on the GPx and Na⁺-K⁺-ATPase activity in the cortex and hippocampus of D-galactose treated rats.

다. 뇌조직의 cholinergic enzyme 및 MAO-B 활성

장기간의 D-galactose 투여는 뇌조직 (septohippocampus)의 cholinergic system을 손상하고, 산화적 스트레스를 유도하여 노화를 촉진하게 된다 (64, 65). D-galactose에 의한 cholinergic system의 손상은 D-gal군에서 대뇌피질과 해마조직에서 acetylcholine 분해 효소인 AChE이 유의적으로 증가하였고, 반면, acetylcholine 합성효소인 ChAT 활성이 유의적으로 감소한 것을 통해 확인할 수 있었다. 인삼 추출물을 투여한 군에서는 백삼, 홍삼, 흑삼 처리군 모두 D-gal군의 효소활성을 대조군의 수준으로 회복하는 효과를 보여주었다 (Fig. 9-5). Amine계 신경전달물질을 분해하는 효소인 MAO-B (monoamine oxidase-B)의 효소활성도 D-gal군에서 유의적으로 증가하였다 (Fig. 9-6). D-galactose 투여로 증가한 뇌조직의 MAO-B 활성은 인삼추출물 투여로 정상수준으로 회복하는 결과를 나타내었다.

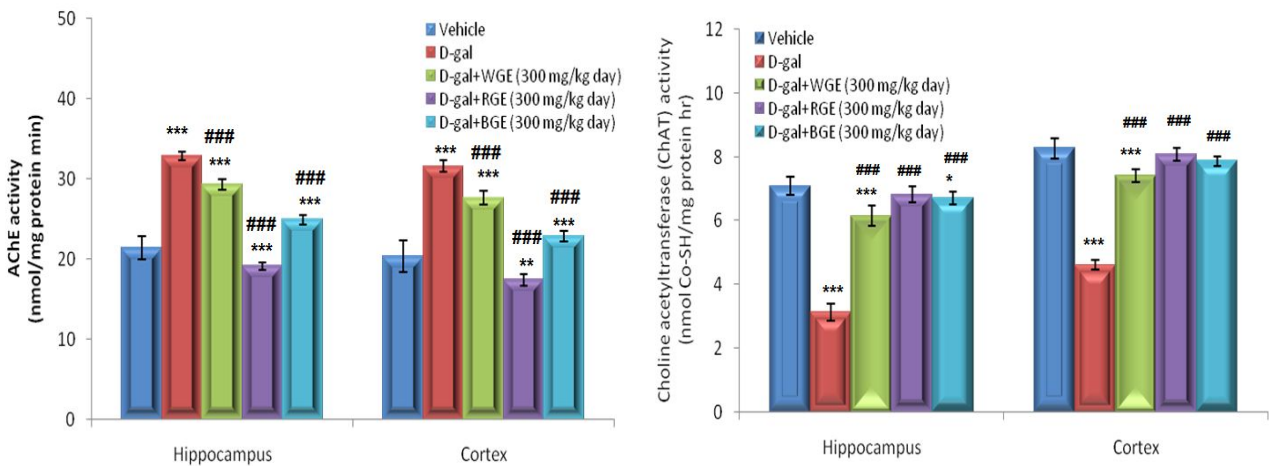


Figure 9-5. Effects of different ginseng extracts on the AChE and ChAT activity in the cortex and hippocampus of D-galactose treated rats.

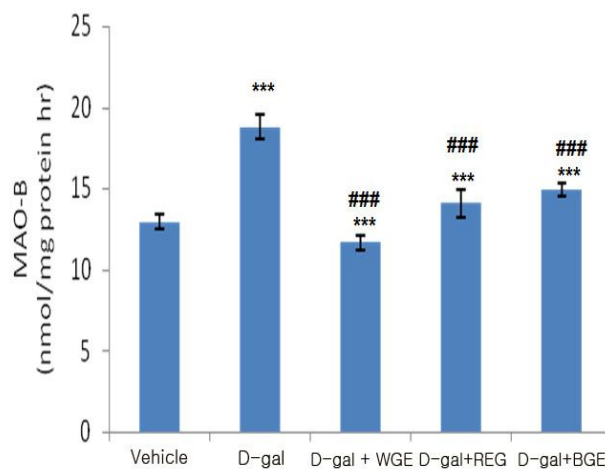


Figure 9-6. Effects of different ginseng extracts on the MAO-B activity in the D-galactose treated rat brain.

라. Real-time PCR를 통한 GAP-43, SNAP-25의 발현 비교

Total RNA분석의 정확성을 확인하기 위해 1.2% formaldehyde gel (Fig. 9-7-A)과 Agilent 2100 bio-analyzer를 통해 정량하였다(Fig. 9-7-B). PCR를 통해 해마 조직의 synaptic plasticity에 관여하는 주요 인자인 GAP-43과 SNAP-25의 mRNA 발현결과는 D-gal군이 유의적으로 발현량이 감소하였고, 인삼추출물을 투여하였을 때, 유의적으로 발현량이 증가되었다 (Fig. 9-7-C).

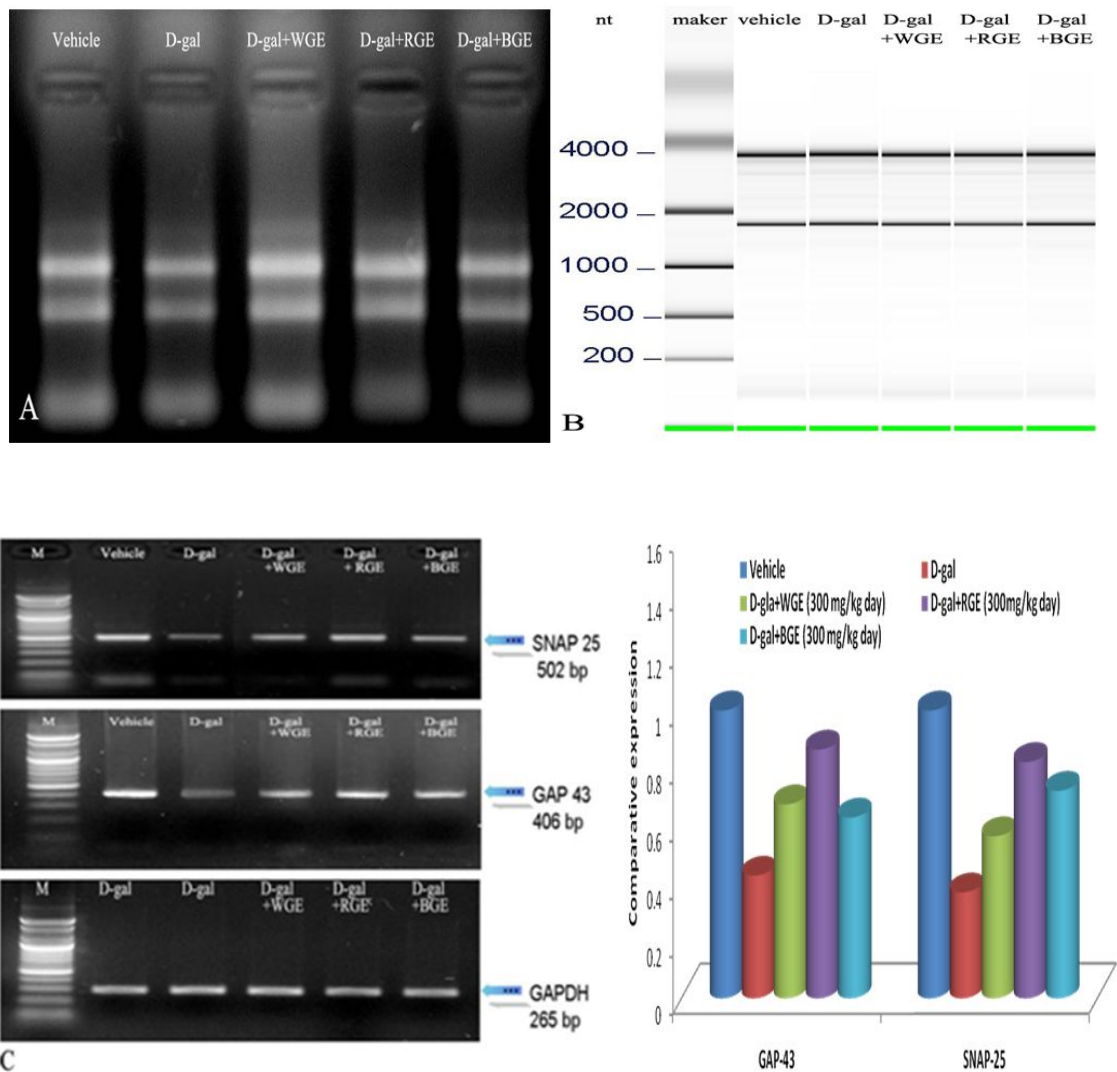


Figure 9-7. Comparison between total RNA, RT-PCR and real-time PCR of GAP-43 and SNAP-25 from hippocampus of D-gal treated rats. (A) Total RNA samples on a 1.2% agarose gel, (B) The gel-like Agilent 2100 bioanalyzer image, (C) RT-PCR results for SNAP-25 and GAP-43, (D) Real-time PCR of SNAP-25 and GAP-43 comparative expressions in hippocampus of different rat groups.

마. Microarray 분석결과

Array 분석결과는 multi-step 과정을 통하여 image spot으로 해독하였다. D-galactose투여 군과 대조군을 비롯한 인삼 투여군에서 선택한 12,060개의 유용한 gene을 분석한 결과, 대부분의 genes은 signal transduction, protein metabolism and modification, transport에 관여하는 유전자였다 (Fig. 9-8). Neuronal activity에 관여하는 324 genes은 Illumina® BeadChip으로 분석하였다. 모든 genes은 nucleic acid binding, transcription factor, receptor, transferase의 기능을 갖는 것들이었다 (Fig. 9-9). Hierarchical gene clustering dendrogram은 12,060 genes 중 276 genes이 D-gal 군과 다른 4개의 group과 비교하였을 때, 최소 2배 이상의 차이를 나타내었다 (Fig. 9-10). Table 9-1는 D-gal군과 최소 2배 이상의 차이를 보이는 57 genes을 나타내었다. Table 9-2, 9-3, 9-4는 각각 propagation, synaptic transmission, neuronal activity를 나타내는 gene을 정리하였다.

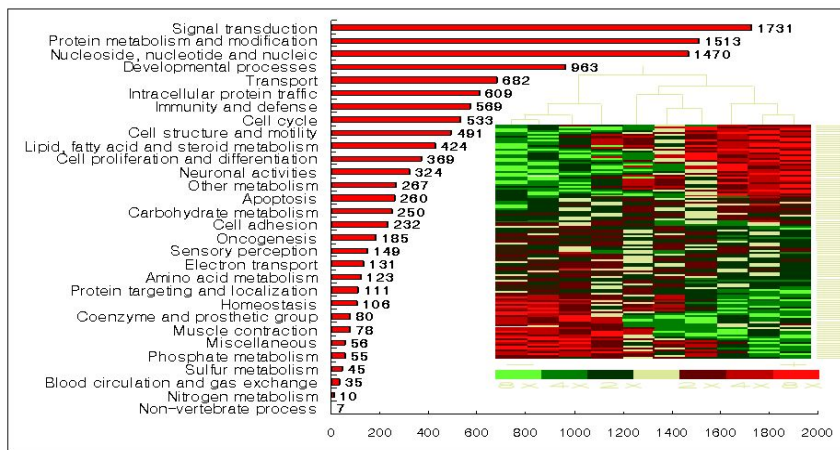


Figure 9-8. The expression genes in various biological processes.

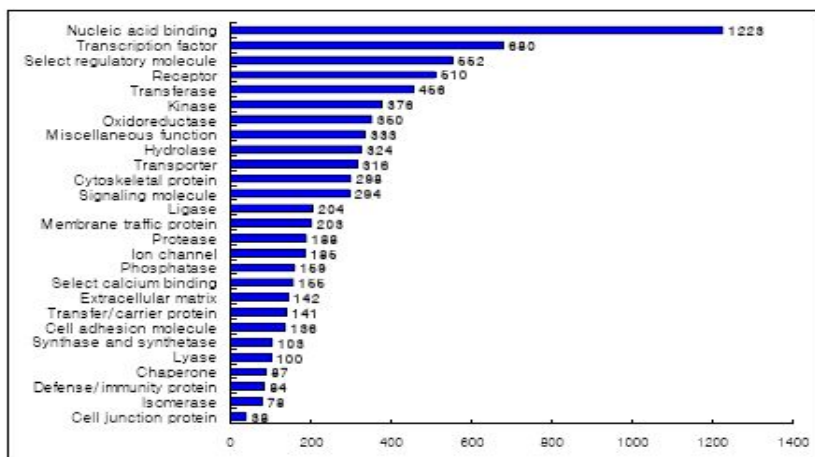


Figure 9-9. The expression genes related to diverse molecular functions

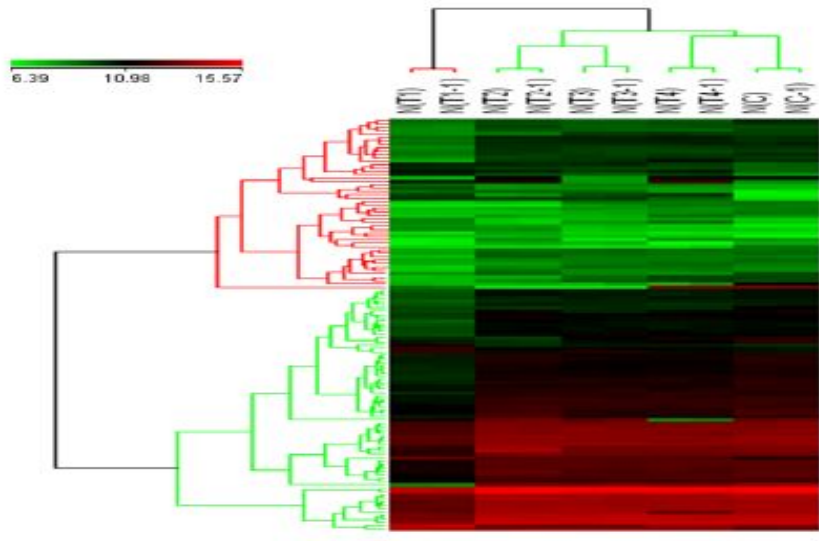


Figure 9-10. Altered gene expression between (T1) D-gal-treated and other groups (T2, WGE; T3, RGE; T4, BGE; C, vehicle control group). 276 genes out of 12,060 genes were at least two-fold different.

Table 9-1. Some genes with known functions that were up- and down regulated in the rat hippocampus after the Morris water maze test (at least 2-fold)

Function	Identified genes	T1/C	T2/T1	T3/T1	T4/T1
DNA replication(1)	NM_001008768.1/DNA primase, p49 subunit	-1.99	1.16	2.93	2.67
Energy/metabolism(17)	NM_080481.1/ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e (Atp 5i)	-2.40	2.31	2.43	2.31
	NM_017311.1/ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, ubunit c, isoform 1	-2.09	1.88	1.69	1.76
	NM_019292.3/catbionic anhydrase 3 (Ca3)	-10.81	10.52	1.49	9.45
	NM_130403.1/protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	-2.13	2.41	2.25	1.69
	NM_016891/protein phosphatase 2, regulatory subunit A alpha isoform	-2.45	1.78	2.58	1.69
	NM_138748/protein phosphatase 2, regulatory subunit B	-1.75	1.56	3.39	1.84
	NM_181381.2/ATP-binding cassette, sub-family G, member2	-1.20	1.95	2.59	2.90
	NM_080767.1/proteosome subunit, beta type 8	-1.47	2.65	1.63	1.96
	NM_010731/ATPase, Na ⁺ , K ⁺ , transporting alpha polypeptide	-2.17	1.32	2.47	1.78
	NM_031756.1/ gamma-glutanmyl carboxylase	-8.61	1.13	3.19	2.90
	NM_212506.1/MHC class II region expressed gene KE2	-2.32	2.86	1.95	2.78
	NM_022215.2/ glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1(soluble)	-1.53	2.72	5.09	4.16
	NM_017253.1/branched chain aminotransferase 1, cytosolic	1.80	-1.50	-2.81	-1.96
	NM_022944.1/inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (Inppll)	-2.01	2.25	1.92	1.81
	NM_053540.1/cytochrome c oxidase, subunit XVII assembly protein homlog (yeast)	-2.37	2.31	2.13	2.26
	NM_181687.1/neuronatin, transcript variant2	-2.80	1.25	1.80	2.18
	NM_001008352.1/phosphomevalonate kinase	-2.29	1.72	1.46	1.67
Heat shock/ stress(2)	NM_031970.1/heat shock 27kDa protein 1	-2.40	1.26	2.47	2.68
	XM_343065.2/nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha(Nfkbia)	-1.35	2.02	2.22	1.53
Matrix/structural proteins (2)	NM_080697.2/dynein light chain-2	-2.62	2.36	2.37	2.67
	NM_173102.1/tubulin. beta 5	-1.97	1.75	1.96	2.02
Protein synthesis /translational control (10)	NM_017152.1/ribosomal protein S17	-1.89	2.18	1.85	1.80
	NM_022699.2/ribosomal protein L30	-42.31	28.30	28.56	27.34
	NM_053597.2/ribosomal protein S27	-1.90	2.10	2.04	2.02
	NM_012875.1/ribosomal protein L39	-1.93	2.17	2.16	1.92
	NM_022504.1/ribosomal protein L36	-2.79	2.88	2.31	2.31
NM_021264.2/ribosomal protein L35a	-1.88	2.02	1.77	1.84	

	NM_031111.1/ribosomal protein S21	-2.14	2.13	2.25	2.13
	NM_031327.2/cysteine rich protein 61	-2.13	1.67	1.39	3.19
	NM_017216/solute carrier family 3, member 1	1.39	-3.70	-1.84	-1.53
Signal transduction (10)	NM_173339.1/CEA-related cell adhesion molecule 10	-1.37	1.53	3.00	2.15
	NM_012614.1/neuropeptide Y	-1.51	2.32	1.75	1.37
	NM_053485.2/S100 calcium binding protein A 6	-1.70	2.20	2.10	1.68
	NM_031645.1/receptor (calcitonin) modifying protein 1(Ramp1) activity	-2.05	1.39	1.56	1.66
	NM_012862.1/matrix Gla protein (Mgp)	-1.89	2.21	2.03	1.94
	NM_031511.1/insulin-like growth factor 2	-1.60	2.00	1.16	2.16
	NM_031648.1/FXYD domain-containing ion transport regulator 1	-1.60	2.14	1.94	1.91
	NM_012612.1/natriuretic peptide precursor type A	-2.08	1.31	1.59	1.68
	NM_019161.1/cadherin 22	-2.46	1.22	1.42	1.38
	NM_019904.1/lactin, galactose binding, soluble 1	-1.63	2.37	1.66	1.72
Transcription/chromatin (11)	NM_019137.1/early growth response 4	-1.54	1.86	1.97	2.18
	NM_023988.1/zinc finger protein 354C	1.85	-2.13	-1.75	-1.69
	NM_017364.1/ zinc finger protein 260	1.50	-2.23	-1.91	-1.76
	NM_019310.1/inter leukin 8 receptor, alpha	1.08	3.49	2.95	3.55
	NM_053425.1/copper chaperone for superoxide dismutase	-2.03	2.37	1.97	1.82
	NM_012733.3/retinol binding protein 1, cellular	-1.33	2.26	1.94	1.33
	NM_198776.1/beta-glo (MGC72973)	-2.46	3.51	2.00	2.01
	NM_033234.1/hemoglobin beta chain complex	-2.62	4.12	2.03	2.17
	NM_053371.1/fractured callus expressed transcript 1	-1.91	1.87	2.15	1.82
	NM_013096.1/hemoglobin alpha, adult chain 1	-2.81	4.86	2.50	2.55
	NM_012824.1/apolipoprotein C-I	-3.14	2.92	1.53	2.11
Miscellaneous function (2)	NM_022668.1/myelin oligodendrocyte glycoprotein	-1.51	1.77	2.35	1.94
	NM_012676.1/troponin T2 cardiac	-2.76	1.12	2.75	2.44
Developmental process	NM_053713.1/Kruppel-like factor 4 (gut)	1.69	1.71	1.64	2.19
	NM_001009645.1/Kinesin family member 22	-1.84	2.05	1.75	1.53

Table 9-2. Some genes related to action potential propagation in hippocampus

Identified genes	T1/C	T2/T1	T3/T1	T4/T1
NM_053981.1/potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	-1.16	1.61	1.15	1.35
NM_012971.1/potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily J, member 4	1.31	-1.15	-1.44	-1.70
NM_173095.2/potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily J, member 1	1.27	-1.78	-1.20	-1.11
NM_019266.1/sodium channel, voltage-gated, type 8, alpha polypeptide	1.22	-1.42	-1.89	-1.55
NM_030875.1/sodium channel, voltage-gated, type 1, alpha polypeptide	1.42	-1.70	-1.19	-1.33

Table 9-3. Some genes related to the synaptic transmission in hippocampus

Identified genes	function	T1/C	T2/T1	T3/T1	T4/T1
NM_177982.1/huntingtin-associated protein 1 (Hap1), transcript variant 2	Membrane traffic protein; Intracellular protein traffic; Synaptic transmission	-1.66	1.26	1.40	1.79
NM_030844.1/islet cell autoantigen 1	Synaptic transmission; Neurotransmitter release	-1.02	1.70	1.47	1.02
NM_052829.1/regulating synaptic membrane exocytosis 1	Select regulatory molecule; Regulated exocytosis; Neurotransmitter release	-1.52	1.61	1.56	1.08
NM_031594.1/purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4.	Signal transduction; Nerve-nerve & Neuromuscular synaptic transmission	-1.28	1.28	1.32	1.21
NM_024394.1/5-hydroxytryptamine(serotonin) receptor 3a	Receptor, Signal transduction; Nerve-nerve synaptic transmission	-1.83	1.42	1.56	1.96
NM_175758.3/sodium-dependent neutral amino acid transporter ASCT2	transporter; Ion transport; Neuronal activities; Synaptic transmission	-1.27	1.66	1.37	1.50
NM_053585.1/MAP-kinase activating death domain	Signal transduction; Synaptic transmission; Apoptosis; Neurogenesis	-1.49	1.68	1.72	1.48
NM_017194.1/cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide	Signal transduction; Transport; Neuromuscular synaptic transmission	-1.37	1.31	1.54	1.72
NM_052806.1/cholinergic receptor, nicotinic beta polypeptide 4	transport; Nerve-nerve synaptic transmission; Sensory perception	-1.85	1.57	1.41	1.75
NM_012528.1/cholinergic receptor, nicotinic beta polypeptide 1	Acetylcholine receptor; Transporter, Signal transduction; Neuromuscular synaptic transmission	-1.73	1.78	1.69	1.76
NM_019145.1/cholinergic receptor, nicotinic gamma polypeptide	Acetylcholine receptor; Neuromuscular synaptic transmission; Muscle contraction	-1.03	1.65	1.52	1.88
NM_024354.1/cholinergic receptor, nicotinic alpha polypeptide 4	Acetylcholine receptor; Signal transduction; Nerve-nerve synaptic transmission	-1.14	1.00	1.04	1.64
NM_017078.1/cholinergic receptor, nicotinic alpha polypeptide 5	Signal transduction; Nerve-nerve synaptic transmission	-2.17	2.61	1.23	1.44
NM_012527.1 /cholinergic receptor, muscarinic 3.	G-protein coupled receptor; Signal transduction; Neurotransmitter release	-1.81	1.94	2.00	1.85
NM_017263.1/glutamate receptor, ionotropic, 4	Glutamate receptor; Transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.47	-1.39	1.54	-1.30
NM_017261.1/glutamate receptor, ionotropic 2	Glutamate receptor; Transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.70	-1.41	-1.28	-1.60
NM_032990.1/glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	Glutamate receptor; Transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.60	-1.43	-1.59	-1.60
NM_012575.2/glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C	Signal Transduction; Transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.74	-1.84	-1.39	-1.04
NM_012574.1/glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B	Signal Transduction; Transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.35	-1.44	-1.59	-1.39
NM_080587.1/gamma-aminobutyric acid (GABA-A)receptor, subunit alpha 4	Signal Transduction Transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.62	-1.55	-1.95	-1.76
NM_183327.1/gamma-aminobutyric acid A receptor, gamma 2	GABA receptor; transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.51	-1.85	-1.81	-1.62

Table 9-4. Some genes with known functions that were related to other neuronal activities in the rat hippocampus after the Morris water maze test

Identified genes	Function	T1/C	T2/T1	T3/T1	T4/T1
NM_021595.1/ninjurin 2	Cell adhesion molecule; Cell adhesion; Neuronal activities; Neurogenesis	-1.48	1.80	1.89	1.62
NM_012828.1/Calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	Voltage-gated calcium channel; Neurotransmitter release; Nerve-nerve & Neuromuscular synaptic transmission	-1.45	1.61	1.21	1.78
NM_053399.1/neurturin	Neurotrophic factor; Signal transduction; Neuronal activities	-1.33	1.39	1.39	1.63
NM_013175.1/secretory granule neuroendocrine protein 1 (SGNE 1)	Signaling molecule; Neuropeptide; Neuronal activities	-1.05	1.03	1.69	1.79
NM_013179.1/hypocretin	Signaling molecule; Neuropeptide; Signal transduction; Neuronal activities	-1.23	1.74	1.45	2.24
NM_139326.2/pro-opiomelanocortin	Neuropeptide; Signal transduction; Neuronal activities	-1.37	1.72	1.37	1.59
NM_013007.1/prepronociceptin	Neuropeptide; Signal transduction; Neuronal activities	-1.33	1.65	1.22	1.32
NM_023968.1/neuropeptide Y receptor Y2	Signal transduction; Neuronal activities	-1.17	1.88	1.05	1.06
NM_012869.1/neuropeptide Y receptor Y5	Signal transduction; Neuronal activities	1.62	-1.42	-1.06	-1.37
NM_019162.1/tachykinin 2	Signal transduction; Neuropeptide; Neuronal activities ;	-1.25	2.99	1.44	1.56
NM_012768.1/dopamine receptor 5	Receptor; G-protein coupled receptor; Signal transduction;	-1.01	1.40	1.95	1.34
NM_012585.1/5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	G-protein receptor; Signal transduction;	-1.12	1.49	1.72	1.46
NM_017053.1/tachykinin receptor 3	G-protein receptor; Signal transduction;	1.18	-1.65	-1.10	-1.10
NM_017012.1/glutamate receptor, metabotropic 5 (GRM 5)	Signal transduction; G-protein mediated signaling; Neuronal activities	1.53	-1.66	-1.85	-1.67
NM_017011.1/glutamate receptor, metabotropic 1(GRE 1)	Signal transduction; G-protein mediated signaling; Neuronal activities	1.94	-1.65	-1.62	-1.91
NM_012912.1/activating transcription factor 3 (ATF3)	Transcription factor; CREB; transcription factor; Neuronal activities	-1.09	1.06	1.86	1.69
NM_017334.1, cAMP responsive element modulator, transcript variant 2	CREB Transcription factor; Signal transduction; Neuronal activities	-1.27	1.30	1.82	1.37
NM_019166.1/synaptogyrin 1	Membrane traffic regulatory protein; Neuronal activities	-1.21	1.56	1.22	1.03
NM_022533.1/transmembrane superfamily member 11	Transport; Ion transport; Neuronal activities	-1.11	1.28	1.60	1.30
NM_053851.1/calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	Neurotransmitter release; Nerve-nerve & Neuromuscular synaptic transmission	-1.71	1.44	1.34	1.40
NM_017110.1/cocaine amphetamine regulated transcript	Signal transduction; synaptic transmission	-1.20	1.51	1.04	1.15
NM_031503.1/achaete-scute complex homolog-like 2 (Drosophila)	Transcription factor; Neuronal activities; Neurogenesis; Oncogenesis	-1.53	1.45	1.04	1.19
NM_031019.1/corticotropin releasing hormone	Peptide hormone; Signal transduction; Stress response; Neuronal activities-	1.68	-1.24	-1.36	-1.46

NM_017295.1/gamma-aminobutyric acid A receptor, alpha 5	GABA receptor, Signal transduction, Nerve-nerve synaptic transmission	1.49	-1.66	-1.16	-1.42
NM_017065.1/gamma-aminobutyric acid receptor, subunit beta 3	Signal transduction; Transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.88	-1.86	-1.95	-1.94
NM_183326.1/gamma-aminobutyric acid A receptor, alpha 1	GABA receptor, Nerve-nerve synaptic transmission	1.43	1.68	-1.65	-1.36
NM_031656.1/syntaxin 8	SNARE protein; General vesicle transport; Neurotransmitter release	-1.31	1.79	1.45	1.29
NM_053788.2/syntaxin 1A(brain)	SNARE protein; Small molecule transport; Synaptic transmission	-1.18	1.04	1.43	1.71
NM_030991/synaptosomal-associated protein 25	SNARE protein; Small molecule transport; Synaptic transmission	-2.74	1.74	2.46	1.89
NM_013038.3/syntaxin binding protein 1	Membrane traffic regulatory protein; Transport; Neurotransmitter release	-1.36	1.72	1.51	1.29
NM_178346.1/syntaxin binding protein 5(tomomyon)(Stxbp5), transcript variants	Membrane traffic regulatory protein; Neurotransmitter release	-1.50	1.30	1.49	1.47
NM_019159.1/syntaxin II(Syn2), transcript variant 2	Membrane traffic regulatory protein; Synaptic transmission	-1.15	1.73	1.55	1.85
NM_031693.1/synaptotagmin 4	Membrane traffic regulatory protein; Neurotransmitter release	-1.30	1.58	1.44	1.24
NM_023974.1/synaptoporin	Membrane traffic regulatory protein; Neurotransmitter release	-1.48	1.56	1.68	1.43
NM_017195/growth associated protein 43	Membrane traffic regulatory protein; Neurotransmitter release	-2.54	1.86	2.02	2.43
NM_017346.1/calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	voltage-gated calcium channel; Neurotransmitter release; Nerve-nerve&Neuromuscular synaptic transmission	-1.68	1.68	1.31	1.57
NM_053997.3/potassium gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	voltage-gated potassium channel; Signal transduction; Synaptic transmission	-1.29	1.77	1.46	1.55
NM_053296.1/glycine receptor, beta subunit(Glrb)	Receptor; Signal transduction; transport; Nerve-nerve synaptic transmission	1.47	-2.04	-1.44	-1.34
NM_012788.1/discs, large homolog 1(Drosophila)	Transmembrane receptor regulatory/adaptor protein; signal transduction	1.25	-1.88	-1.44	-1.13
NM_001007235.1/inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	Receptor; Calcium mediated signaling; Stress response; Neurotransmitter release	1.64	-1.28	-1.16	-1.26
NM_021748.1/N-ethylmaleimide sensitive fusion protein	Hydrolase; Exocytosis; Transport; Neurotransmitter release	2.32	-2.86	-2.96	-1.85
NM_012513.2/brain derived neurotrophic factor(BDNF)	Neurotrophic factor; Nerve-nerve synaptic transmission; Neurogenesis	-1.68	1.31	1.41	1.80
NM_013032.2/solute carrier family 1, member 1	Transporter; Transport; Signal transduction; Synaptic transmission	-1.02	1.62	1.35	1.43
NM_019225.1/solute carrier family 1, member 3	Transporter; Signal transduction; Synaptic transmission	1.49	-1.32	-1.94	-1.36
XM_341071.2/RIM2(predicted)	Miscellaneous function; Signal transduction; Synaptic transmission	1.49	-1.08	-1.57	-1.61
NM_134411.1/RAB3A protein(rabin3)-like 1	Guanyl-nucleotide exchange factor; Signal transduction; Synaptic transmission	1.75	-1.29	-1.33	-1.47

10. 뇌신경세포 생성과 기억력 개선에 미치는 Ginsenoside Rb₁의 효과

가. Morris water maze test

4일간의 수중미로 훈련을 통하여 Rb₁ 투여군은 조금씩 platform을 찾아가는 시간이 감소되어 실험 3, 4일에는 대조군보다 유의적으로 escape latency 시간이 감소되었다. 5일째 platform을 제거한 후 실험동물이 도피대가 설치되었던 위치에 머문 시간 역시 대조군보다 오래 지속하였다. 도피대의 정확한 위치를 기억하고 지나친 횟수역시 Rb₁을 투여한 군에서 현저히 증가하여, Rb₁이 수중미로 실험에서 공간인지력을 향상시키는 것을 볼 수 있었다.

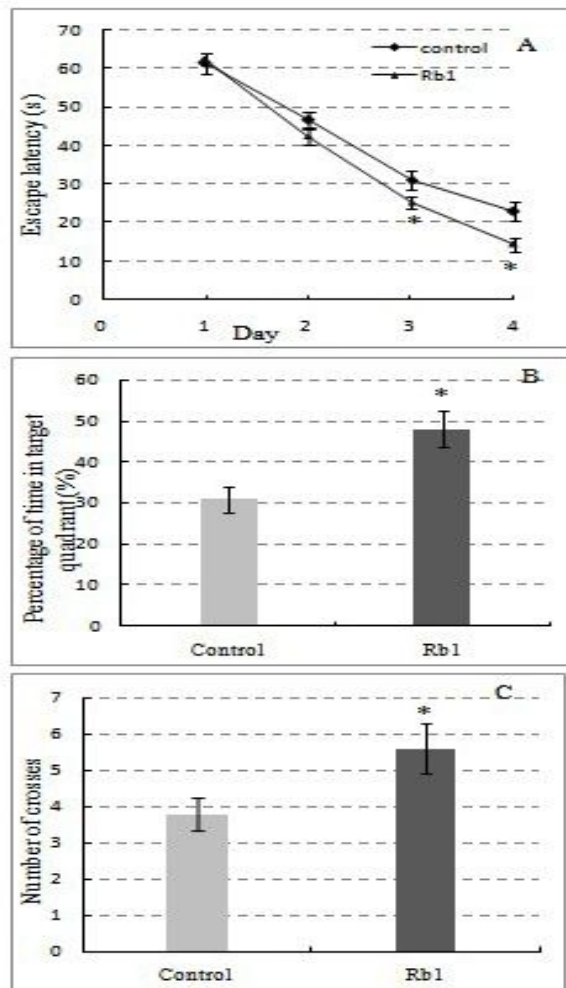


Figure 10-1. The effects of Rb₁ on cognitive performance in Morris water maze test. Rb₁ decreased the escape latency (A), and increased the percentages of time in target quadrant (B) and the number of crosses (C).

나. 해마조직에서 세포증식에 미치는 Rb₁의 효과

30일간 Rb₁을 투여한 후 BrdU-positive cell를 면역조직화학법을 이용하여 해마의 세부 영역인 DG (dentate gyrus), CA1와 CA3 영역에서 관찰하여 Fig. 10-2에 나타내었다. CA3 영역에서의 세포밀도가 DG 영역보다 더 크게 나타났다. 또한, Rb₁이 해마의 세포생존에 미치는 효과를 알아보기 위하여 BrdU를 투여하여 생존한 세포를 관찰하였다 (66). Rb₁은 DG와 CA3에서 세포생존을 현저히 증가시켰으나 (67), CA1영역에서는 차이를 보이지 않았다. Fig. 10-3(B)에서는 Rb₁이 세포 증식에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

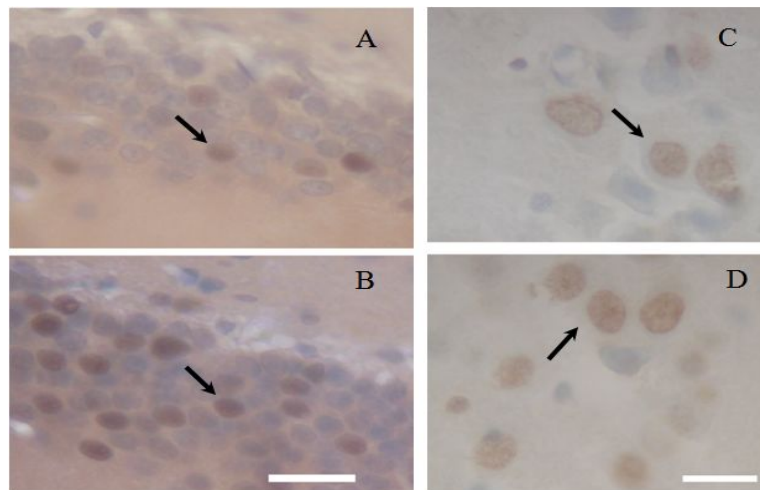


Figure 10-2. BrdU-immunohistochemistry. Photomicrograph of BrdU-positive cells (arrowhead) in the DG (A, control; B, Rb₁) and CA3 (C, control; D, Rb₁). Scale bar = 20µm.

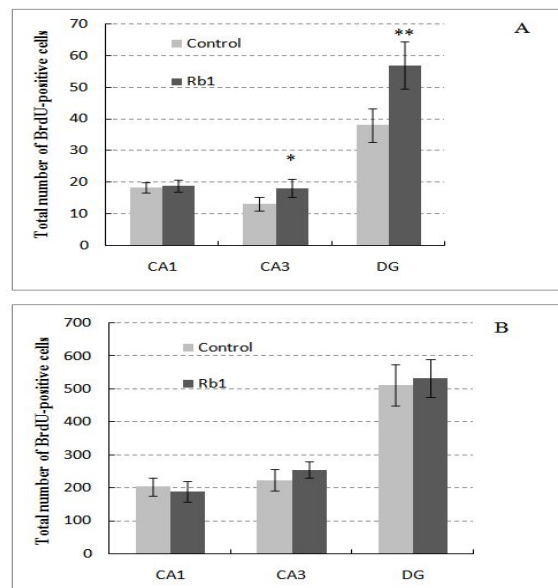


Figure 10-3. Effects of Rb₁ on neurogenesis in the different hippocampal subregions. A, when BrdU was given to rats 30 days before they were killed.

11. 흑삼을 이용한 건강기능 식품 개발

본 연구 결과를 통해 개발된 흑삼제조방법 (특허등록:10-0991351)으로 제조한 흑삼으로 (주) 대덕바이오에서 건강기능식품을 개발하여 상품화 하였다.

가. 흑삼제품 개발

본 연구기술로 개발한 흑삼을 이용한 흑삼엑기스 파우치와 절편, 그리고 농축액을 상품화하였다.



Figure 11-1. Black ginseng products produced by Daeduk bio

나. 파우치 제품의 사포닌 분석

판매되는 파우치의 사포닌 함량을 측정하기 위하여 ethyl-ether로 지용성 성분을 제거한 후 수포화 부탄올로 조사포닌 층을 수거한 후 농축, 여과하여 HPLC로 분석하였다 (Fig. 11-1). 크로마토그램은 파우치 한 팩속에 함유된 사포닌 패턴을 나타내고 있다. 또한, 흑삼의 주요 사포닌 Rg₃의 피크가 증가된 것을 확인할 수 있었다. Rg₃ 함량은 12.52 mg/ea이었다. Rf는 2.19 mg/ea, Rb₁은 0.75 mg/ea, 40분 대에 나타나는 Rg₁ 및 Re의 피크는 보이지 않으므로, 흑삼 가열시 Rg₃로 전환되었음을 알 수 있다.

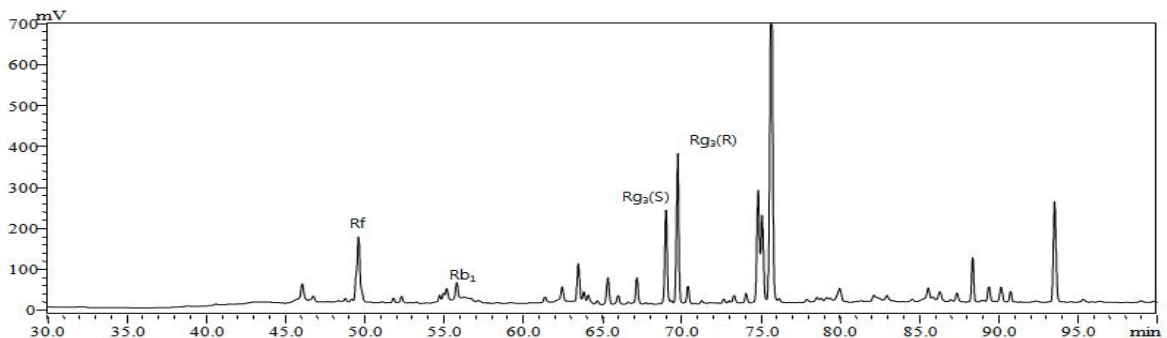


Figure 11-2. Chromatograms of ginsenosides in the liquid product used black ginseng

다. 저장 기간 중 파우치 제품의 세균수 측정

생산 후 1주, 2주, 1달, 3달 동안 제품속의 대장균, 세균, 곰팡이의 오염을 측정 한 결과, 실험기간 동안 어떤 미생물도 발견되지 않았다.

라. 제품의 관능평가

교내 30여명의 학생 및 교직원을 대상으로 흑삼 파우치 제품의 관능평가를 실시하였다. 제품을 간단하게 설명하고, 제품의 색, 냄새, 맛, 입안에서의 느낌 (끈적임), 전체적인 기호도로 나누어 7점 척도로 표시하도록 하였다. 예상외로 흑삼 파우치에 대한 쓴 맛 정도는 적게 나타났다. 오히려 단맛이 강해 쓴맛이 많이 가려진 것으로 사료되었다. 당이 함유되어 있어 입안에서의 걸쭉한 느낌을 선호하는 경향을 보였다. 전체적으로 인삼의 기호성을 고려하여 전체적인 기호도 평가에서 높은 점수를 받았다.

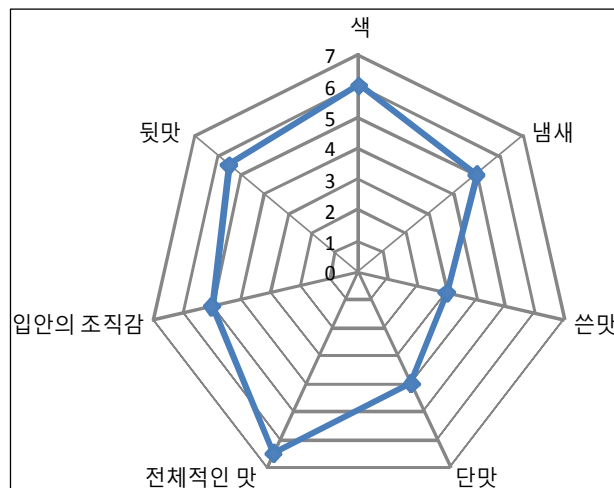


Figure 11-3. Sensory evaluation of black ginseng pouch product

바. 파우치 제품의 이화학적 특성

Parameters	용량 (mL)	pH	당도	색도		
				L	a	b
	49.5±0.04	4.26±0.07	1.86±0.06	17.10±0.23	0.20±0.08	1.20±0.06

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 흑삼제조 기술 개발 및 표준화 공정 확립

□ 흑삼의 표준화 제조 공정 확립

기존의 흑삼 제조방법은 숙지황 제조에 사용되어 온 구증구포 방식을 도입하여 제조시간이 매우 길고, 잘못 증숙하게 되면 직화열이 직접 인삼에 닿아 탄화되어 발암물질인 벤조피렌이 생성되는 문제점들이 발견되었다. 본 연구는 인삼성분의 물리·화학적 전환원리를 과학적으로 적용하여 제조시간을 단축시키고, 안전한 방법으로 다량의 흑삼을 제조할 수 있는 방법을 개발하여 특허 등록을 완료하였다. 본 연구에서 개발된 기술은 기존의 인삼시장에서 ‘흑삼’ 시장개척의 경쟁력 있는 새로운 블루오션을 창출할 수 있을 것으로 사료된다.

□ Ginsenoside Rg₃의 최적분석 조건 확립

HPLC 분석 방법을 이용하여 흑삼의 유효 지표 사포닌인 ginsenoside Rg₃ 성분 분석법을 확립하여, 제조 흑삼의 표준화 공정을 확립하였다.

2. 흑삼의 AChE 억제효과 탐색 및 급성 독성평가

□ 흑삼의 항산화 활성 및 AChE (BuChE) 억제효과 탐색

흑삼의 효과를 평가하기 위하여 백삼과 홍삼 추출물 준비하여 비교분석하였다. 흑삼추출물에는 총 페놀함량이 유의적으로 높았으며, DPPH 자유라디칼 소거활성과 Xanthine oxidase 억제활성도 백삼과 홍삼보다 높게 나타났다. 신경전달물질인 acetylcholine을 시냅스 간격에서 분해하는 효소인 acetylcholinesterase (AChE)와 butyrylcholinesterase (BuChE)의 억제 활성 역시 흑삼이 매우 높은 활성을 보였다. 이 실험방법은 천연물 소재로부터 치매 치료제 개발을 위해 *in vitro*에서 screening 작업을 할 때 많이 이용하는 방법으로, 본 연구 결과에서 보여준 결과를 볼 때, 흑삼 추출물은 치매치료제 개발을 위한 후보물질로 우수한 활성을 지니는 것으로 사료되었다.

□ 흑삼의 단회 독성을 통한 안전성 확보

본 연구에서 개발한 방법으로 제조한 흑삼 추출물의 단회 독성실험을 5g/kg~15g/kg 범위에서 실시한 결과 어떠한 임상적인 독성증상도 나타나지 않았다. 이 결과를 통하여 볼 때, 흑삼도 홍삼과 같이 전혀 독성이 없는 안전한 식품임을 확인하였다.

3. 흑삼의 뇌기능 개선효과 탐색

□ Scopolamine에 의한 기억손상 동물모델의 기억력 개선효과 탐색

■ 행동실험 test를 통한 기억력 개선 효과

백삼, 홍삼, 흑삼 추출물 (200 mg/kg)을 경구투여한 후, 기억력손상을 유발하는 scopolamine (2 mg/kg)을 복강투여 한 후, passive avoidance test, Y-maze test, Morris water maze test를 실시한 결과, 모든 실험에서 흑삼을 포함한 모든 인삼 투여군에서 정상 대조군과 비슷한 회복효과를 나타냈다.

■ Cholinergic biomarker 효소 활성 및 단백질 발현 비교

행동 실험 후 뇌를 적출하여 cholinergic marker인 AChE, ChAT의 효소활성과 단백질 및 mRNA 발현을 비교분석하였다. Scopolamine은 시냅스 간격에서 acetylcholine의 receptor를 차단하므로 결합하지 못한 acetylcholine은 AChE에 의해 분해된다. 따라서, scopolamine 투여군은 뇌조직의 AChE 활성을 증가시키지만, 인삼 추출물 투여군은 증가된 AChE 활성을 감소시킬 뿐 아니라, acetylcholine을 합성하는 ChAT 활성을 현저히 증가시켰다. 특히, 흑삼 추출물의 ChAT 활성 증가효과가 가장 우수하였다.

■ 항산화 효소 활성

뇌조직의 항산화 효소인 SOD, catalase 활성과 뇌조직 지질과산화물 함량을 측정한 결과, scopolamine 투여군에서는 지질과산화물 함량이 현저히 증가했을 뿐아니라, 항산화 시스템이 손상되었다. 그러나, 인삼추출물을 처리하였을 때, 대조군의 수준으로 회복하는 항산화 보호효과를 보여주었다.

4. 노화 흰쥐의 뇌기능 개선에 미치는 효과

□ 뇌기능 관련 인자의 효소활성 및 단백질 발현량 비교

노화 흰쥐의 경우, 치매환자와 같이 AChE와 ChAT의 활성이 현저히 감소하는 특징이 있다. 18개월된 노화 흰쥐에 홍삼과 흑삼 추출물을 4개월간 섭취시켰을 때, 유의적 차이는 없었으나, AChE 활성이 증가하였고, ChAT의 경우, 흑삼 추출물 투여군에서 유의적으로 증가하였다. 본 연구결과는, scopolamine으로 치매를 유발한 동물실험의 결과에서와 같이 흑삼 추출물이 뇌조직의 acetylcholine 합성인자를 활성화시키므로써 신경전달물질의 생성을 증가시켜 결국, 뇌기능 개선에 효과를 주는 것으로 사료된다. 반면, 뇌조직의 cholinergic marker발현은 홍삼과 흑삼 추출물 군에서 AChE, ChAT, vesicular acetylcholine transferase (VChAT, acetylcholine 운반 단백질)의 발현을 모두 증가시켰다.

□ **D-galactose로 유발한 뇌노화 흰쥐의 기억력 개선에 미치는 효과**

8주간 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물 식이에 첨가하여 섭취하도록 하면서, 뇌노화 물질인 D-galactose를 피하주사하여 노화를 유발한 실험에서, 인삼추출물을 섭취한 군에서는 수중 미로실험을 통하여, 공간인지력이 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, D-galactose 투여군에서는 AChE 활성과 ChAT 활성이 현저히 감소하였으나, 인삼추출물을 섭취한 군에서는 모두 유의적인 증가를 보여, cholinergic system이 회복되어 뇌기능이 개선됨을 알 수 있었다. D-galactose 투여군의 뇌조직 항산화 시스템은 손상되었으나, 인삼추출물 섭취군에서는 항산화 효소의 활성이 대조군의 수준으로 회복되어, 외부적인 산화적 스트레스에 대응하는 효과가 매우 우수한 것으로 사료되었다.

□ **Microarray 기법을 이용한 뇌조직 유전자 발현에 미치는 흑삼의 효과**

cDNA microarray 기술을 이용하여, 인삼 추출물 (백삼, 홍삼, 흑삼)이 D-galactose로 노화를 유발한 흰쥐의 뇌기능 개선에 미치는 효과를 밝히고자 관련 유전자를 검색하였다. 총 12,060개의 유전자를 조사하였으며, 그 중 276개의 유전자가 D-galactose 처리군과 2배 이상의 차이를 보이는 유전자로 나타났다. 그리고 324개 유전자가 신경세포 활성과 관련이 있었다.

5. 두뇌활동개선을 위한 건강기능 식품 개발

□ **흑삼을 이용한 건강기능성 제품의 상품화**

흑삼을 이용한 건강기능성 제품으로 파우치와 절편, 그리고 흑삼엑기스 제품을 상품화하였다.

□ **두뇌활성화를 위한 제품의 상표출원**

본 연구결과를 바탕으로 흑삼의 뇌기능 개선효과를 부각시킨 제품 생산을 위한 상표를 출원하였다.



출원번호(일자) 4020100064689(2010.12.16)



4020100064693(2010.12.16)

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 본 연구에서 개발한 흑삼제조 공정은 제조시간을 단축시키고, 안전한 방법으로 다량의 흑삼을 제조할 수 있는 방법으로, 인삼시장이 홍삼류 제품에 제한을 받고 있어 산업 확장에는 다소 어려움이 있지만, 소규모 인삼농가의 수익성 확보를 위해 지자체나 관련 기관을 통한 기술소개를 통해 인삼시장에서 경쟁력 있는 새로운 블루오션을 창출할 수 있는 사업으로 사료된다.
- 흑삼의 지표 유효 사포닌인 ginsenoside Rg₃ 분석을 위한 표준화된 검사방법을 확립함으로써 제조 흑삼의 품질을 향상시킬 수 있고, 소비자들에게 신뢰를 줄 수 있는 제품을 생산할 수 있다.
- 본 연구가 종료되는 되는 대로, 흑삼의 뇌기능 개선효과에 대한 논문을 해외 저명학술지(SCI)에 투고함으로써 가공인삼인 흑삼에 대한 구체적이고 체계적인 연구기반의 틀을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.
- 본 연구결과를 바탕으로하여, 아직까지 규명되지 않은 흑삼의 기능성을 다양한 연구를 통하여 규명함으로써, 새로운 시장진입을 위한 과학적 근거자료를 준비해야 할 것으로 사료된다.
- 제품화 및 사업화 전략
 - 제품화 전략

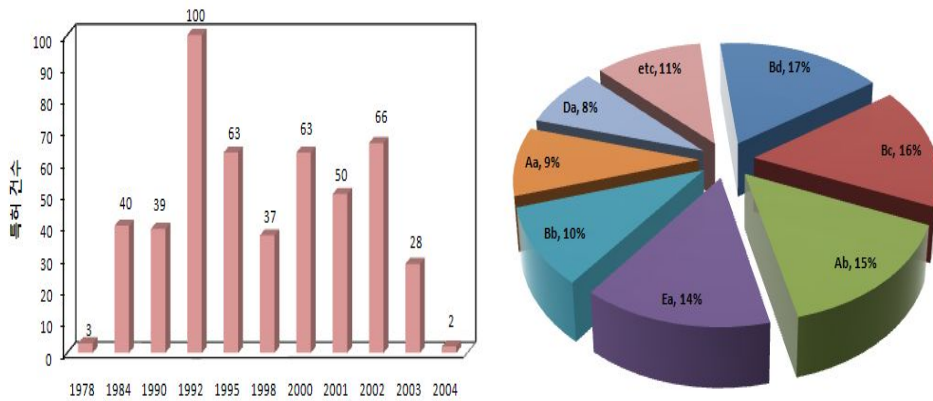
본 연구에서 규명한 흑삼의 신규 기능성인 뇌기능 개선 및 치매예방효과에 대한 과학적 자료를 바탕으로, 흑삼을 단순한 건강보양식으로 제한하지 않고, 연령층과 특정효능을 타겟으로 삼는 건강기능식품 개발의 주류를 따라 특정 성분인 ginsenoside Rg₃ 성분을 강화한 제품과 특정 효능-뇌기능 개선 효과를 위한 제품 개발을 시도할 계획이다.
 - 마케팅 전략
 - 1차로 (주)대덕바이오가 가지고 있는 기존 영업망(인터넷 쇼핑, 일반대리점 판매 등)을 활용한다.
 - 제품 인지도를 끌어올리기 위하여, 전시회 및 박람회 참가를 통한 홍보전략을 이용한다.
 - 보다 안정적인 유통영업망을 확보하기 위하여 다음과 같은 곳에 판로를 확보하고자 한다.

No.	구분	내용	비고
1	쇼셜네트워크	티켓몬스터, 구루폰, 쿠팡, 위메프 등 (신제품소개 목적-저렴한 비용으로 불특정다 수에게 소개 가능)	
2	총판점 구축	전국 6대 광역시를 거점으로하는 총판점 구축	
3	방문판매조직 구축	전문상담사양성을 통한 방문판매전문 조직 구 축	
4	홈쇼핑	GS홈쇼핑, 현대홈쇼핑 등 진출	저비용 · 고효 율 홍보효과 기대

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

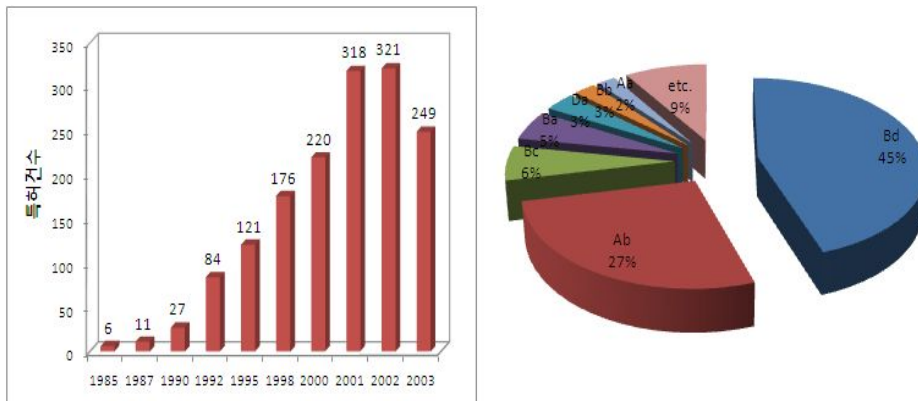
■ 세계 인삼관련 특허 현황

○일본의 특허 동향: Bd 분야의 ADIS 치료제, 항알러지, 위장질환 분야 36건, 조혈 및 혈관 질환개선 분야 32건, 위암 예방 및 치료제 분야 24건으로 인삼의 의약분야에 응용이 증가되고 있음



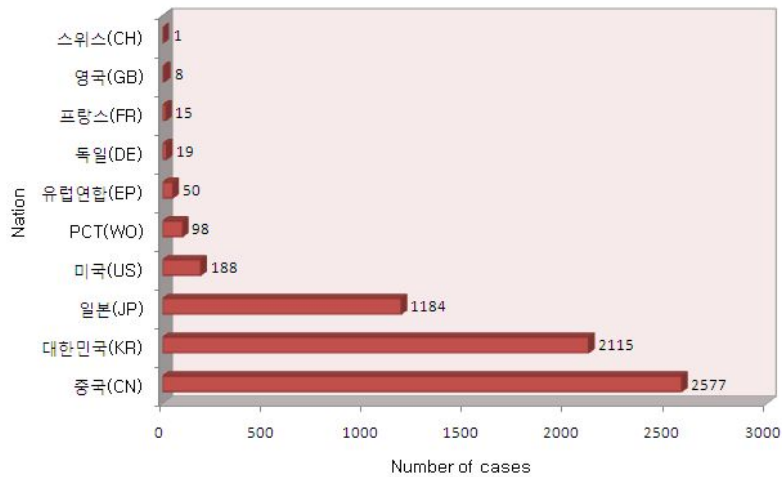
[일본의 특허 출원 및 기술요인 점유율 분석 - 자료 : 일본 통계청]

○중국의 특허 동향: 중국 특허에서는 Bd분야 45%(1155건)와 Ab분야가 27%(691건)로써 약 70%의 점유율을 나타내고 있으며, 이 분야에 대한 연구개발이 많이 이루어지고 있음



[중국의 특허 출원 및 기술요인 점유율 분석 - 자료 : 중국 통계청]

○총괄 특허 동향 분석 : 특허를 출원한 국가는 총 10개국 (WO, EP 포함)이다. 출원은 중국이 가장 많고 그 다음 한국, 일본 미국 순으로 나타났다. 각국 점유율을 보면 상위 3개국인 중국, 한국, 일본이 전체 특허의 94%를 차지함



[총괄 특히 동향 분석 - 자료 : 통계청]

■ 세계 인삼제품 생산 현황

- 프랑스는 해외에서 수입한 인삼 원료 외에도 지난 '91년부터 피카르디(프랑스 북부)지방에서 재배하는 인삼(연간 5톤 정도)을 사용해 크림, 샴푸, 젤리형 등 영양제를 제조하고 있다. 나머지는 제약회사에서 강장제 등 갱년기 현상 방지 보약을 캡슐이나 분말 형태로 제조, 판매하고 있는 것으로 알려졌다
- 프랑스 225개의 의약품 제조업체들 가운데 Arkopharma (22.3%), Phycience (8.6%), Oenobiol (7.7%) 등 3개 사가 인삼을 원료로 한의약품(주로 영양제 및 강장제) 시장의 약 40%를 차지하고 있고 Plantes et Medecines (4.4%), Les Laboratoires Richelet (4.1%) 및 Boiron (3.9%) 등 3개 사가 인삼시장의 12.4%를 차지하고 있어 상기한 6개 사의 동 시장 점유율은 52%인 셈이다.
- 독일, 스위스에서는 인삼을 비타민, 미네랄, 다른 생약제들과 복합 제조하여 새로운 제품을 만들어 상품화하였다.
- 스위스의 파마톤 회사는 인삼 추출물 G115을 만들었는데 G115는 일정량의 ginsenoside 15종을 모아 40mg를 표준화하여 만든 것으로 매년 20~30억 달러의 매출을 기록하고 있으며, 인삼 전체 시장의 15%를 차지하고 있다.
- 유럽의 PhytoLab사는 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rg₁같은 ginsenoside을 표준물질로 판매하고 있다.
- LGC-Promehem사는 Rb₁, Rb₂, Rc, Rh₂, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, notoginsenoside-R₁, Pseudoginsenoside-F₁₁을 판매하고 있다.
- 미국의 Chromadex사는 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rg₁를 표준물질로 생산하여 판매하고

있다.

- 중국의 Hong-Ju Ginseng Co. Ltd.에서는 순도 95%이사의 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rh, F₁₁의 표준물질을 판매하고 있다.

■ 세계 인삼산업의 현황

- 인삼을 상업적으로 재배 생산하는 나라는 한국을 비롯한 중국, 일본, 미국, 캐나다, 유럽 일부지역이다.
- 수삼의 생산량은 중국, 한국, 그리고 북미 순으로 많이 생산한다.
- 전체 생산량은 약 4만톤 정도이며 1980년대 말까지 전 세계 인삼 생산량의 46%를 유지하던 우리나라는 1990년대 30% 내외로 감소하였고, 중국은 1990년대 세계 인삼 생산량의 50%로 증가하였다.
- 미국과 캐나다의 화기삼은 세계 인삼의 10%내외를 차지한다.

■ 세계 인삼산업의 여건 변화

- 자연치료와 대체요법에 대한 관심이 늘어나면서 인삼은 다른 한약재나 허브와 함께 기능성 식품으로 취급되고 있는데, 미국, 일본, 유럽 등 선진국에서 건강 기능성 식품 시장은 대체로 연평균 10%를 상회하는 높은 성장을 거듭하고 있다. 특히, 중국계 소비자들의 경우 오랜 세월동안 인삼복용의 효과를 체험하였을 뿐만 아니라, 인삼은 노인들의 면역기능 강화에서 중년의 체력 보강과 피로 회복, 청소년들의 지능과 학업성적을 향상하는데 도움이 되는 등 적용범위가 넓다고 믿고 있어서, 특히 인삼을 원료로 한 건강기능식품의 소비를 선호하고 있는 것으로 알려졌다. 기능성 식품에 대한 소비의 일환으로 세계 인삼 소비는 건강기능성 식품 소비와 비슷한 성장을 할 것으로 추정되며, 이를 놓고 미국, 캐나다, 중국 등 경쟁국들의 약진이 두드러질 것으로 전망된다.
- 세계 인삼 시장의 새로운 추세는 무엇보다 먼저 화기삼의 시장 확장과 산양삼의 등장을 들 수 있다. 즉, 미국과 캐나다는 서양삼과 동양삼을 차별화하고, 노인이나 여성, 어린이들에게 위험한 동양삼보다 안전한 서양삼을 소비하라고 홍보하여 화상 네트워크를 통해 동양삼 시장을 침투하고 있다.
- 국제 인삼거래의 중심지인 홍콩에서 2004년 나라별 인삼 수입자료를 보면 소위 서양삼이라 할 수 있는 캐나다와 미국으로부터 수입이 88,683 천달러로 78.3% (물량 기준 92.8%)를 차지하는데 비해 우리나라로부터 수입은 11,809 천달러로 10.4% (물량기준 2.2%)에 불과하다. 특히 야생삼은 전체수입량의 99.4%인 27,432 kg을 미국으로부터 수입하고 있는데, 이는 같

은 해 미국이 홍콩에 수출한 재배삼 9,132 천달러보다 배가 넘는 21,204 천달러가 된다.

- 세계 인삼 시장의 또 다른 변화추세는 기존의 동양인에서 유럽이나 남미, 아프리카 등으로 확대되면서 인삼뿌리로 거래되는 원형삼 유통체제에서 탈피하여 과학적 효능을 전제로 한 가공식품시장이 확대되고 있다. 최근 인삼의 효능에 대한 과학적인 접근이 활발하게 이루어지고 이를 바탕으로 새로운 제품을 개발하거나 마케팅활동이 이루어지고 있다.
- 특히 중국의 경우 약전의 인삼에 대한 시험내용에 인삼의 주성분인 ginsenoside 중 Rg₁과 Re는 각기 총량의 0.3% 이상, Rb₁은 0.2%이상으로 규정하고 있어 효능에 기초한 관리를 시도하고 있다는 점도 인삼산업의 향후 발전방향을 시사한다고 할 수 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Shi W, Wang YT, Li J, Zhang HQ, Ding L. Investigation of ginsenosides in different parts and ages of *Panaxginseng*. Food Chem 2007; 102:664–668.
2. Sun BS. Bioconversion to rare ginsenoside and memory and learning functions of white, red, and black ginsengs. Dissertation. Chungnam national university, 2009.
3. Lee MR, Yun BS, Sun BS, Liu L, Zhang DR, Wang CY, Wang Z, Ly SY, Mo EK, Sung CK. Change of Ginsenoside Rg₃ and Acetylcholinesterase Inhibition of Black Ginseng Manufactured by Grape Juice Soaking. J Ginseng Res 2009; 33:349–354.
4. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958; 181:1199–1202.
5. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1974; 47:469–474.
6. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. Am J Enol Vitic 1997; 28:49–55.
7. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961; 7:88-95.
8. Morris RG. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Meth 1984; 11:47–60.
9. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid. Anal Biochem 1978; 86:271–278.
10. Jamal M, Ameno K, Ameno S, Morishita J, Wang W, Kumihashi M, Ikuo U, Miki T, Ijiri I. Changes in cholinergic function in the frontal cortex and hippocampus of rat exposed to ethanol and acetaldehyde. Neurosci 2007; 144:232–237.
11. Chattopadhyay S, Sahoo DK, Subudhi U, Chainy GBN. Differential expression profiles of antioxidant enzymes and glutathione redox status in hyperthyroid rats. Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol 2007; 146:383–391.
12. Packard Jr DS, Menzies RA, Skalko RG. Incorporation of thymidine and its analogue, bromodeoxyuridine, into embryos and maternal tissues of the mouse. Differentiation 1973; 1:397–404.
13. Assinewe V, Amason J, Aubry A, Mullin J, Lemaire I. Extractable polysaccharides of *Panax quinquefolius* L. (North American ginseng) root stimulate TNF alpha production by alveolar macrophages. Phytomed 2002; 9:398–404.
14. Smolina T, Orlova T, Shcheglovitova O, Besednova NN. Interferon-inducing action of polysaccharide-containing biopolymers from ginseng root and cell culture. Antibiot Chemoter

- 1998; 43:21–23.
15. Sonoda Y, Kasahara T, Mukaida N, Shimizu N, Tomoda M, Takeda T. Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of *Panax ginseng*. *Immunopharmacol* 1998; 38:287–294.
 16. Dai Q, Wang YP, Zhou KZ, Jiang R, Wu H, Zheng M. The effect of ginseng polysaccharide on proliferation of human promyelocytic leukemia cell line (HL-60). *J Chongqing Med Univ* 2001; 26:126–131.
 17. Käagi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265:528–530.
 18. Xie ZJ, Liu WQ, Fang CL, Zhang ZB, Liu Y, He YC. Experimental studies on anti-tumor activity and effect of ginseng polysaccharide on proliferative function of LAK cells. *Chin J Clin Oncol Rehabil* 2002; 9:1–2.
 19. Lim TS, Na K, Choi EM, Chung JY, Hwang JK. Immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Panax ginseng*. *J Med Food* 2004; 7:1–6.
 20. Yang M, Wang BX, Jin YL, Wang Y, Cui ZY. Effects of polysaccharides on reducing blood glucose and liver glycogen. *Acta Pharmacol. Sin.* 1990; 11:520–524.
 21. Xu XH, Zhao TQ. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2002; 23:587–590.
 22. Shin HY, Lee JH, Lee JY, Han YO. Purification and characterization of ginsenoside Ra-hydrolyzing β -D-Xylosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium. *Biol Pharm Bull* 2003; 26:1170–1173.
 23. Kim MY, Lee JW, Lee KY, Yang DC. Microbial conversion of major ginsenoside Rb₁ to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd. *J Microbiol* 2005; 43:456–462.
 24. Chi H, Ji GE. Transformation of ginsenosides Rb₁ and Re from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biotechnol Lett* 2005; 27:765–771.
 25. Bae EA, Park SY, Kim DH. Constitutive beta-glucosidase hydrolyzing ginsenoside Rb₁ and Rb₂ from human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull* 2000; 23:1481–1485.
 26. Akao T, Kida Kanaoka M, Hattori M, Kobashi K. Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb₁ from *Panax ginseng*. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50:1155–1160.
 27. Shin HY, Park SY, Sung JH, Kim DH. Purification and characterization of α -L-arabinopyranosidase and α -L-arabinofuranosidase from *bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium metabolizing ginsenoside Rb₂ and Rc. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003a, 69(12): 7116–7123.

28. Bae EA, Han MJ, Choo MK, Park SY, Kim DH. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-Ginsenoside Rg₃ by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. *Biol Pharm Bull* 2002; 25:58–63.
29. Su JH, Xu JH, Lu WY, Lin GQ. Enzymatic transform to Rh₂ using newly isolated *Fusarium proliferatum* ECU2042. *J Mol Ca. B: Enzym* 2006; 38:113–118.
30. Yu HS, Gong JM, Zhang CZ, Jin FX. Purification and characterization of ginsenoside- α -L-rhamnosidase. *Chem Pharm Bull* 2002; 50:1740–1749.
31. Ko SR, Choi JK, Suzuki K, Suzuki Y. Enzymatic preparation of ginsenosides Rg₂, Rh₁, and F₁. *Chem. Pharm. Bull.* 2003, 51(4): 404–408.
32. Ando T, Tanaka O, Shibata S. Chemical studies on the oriental plant drugs XXV. Comparative studies on the saponin and sapogenins of ginseng and related crude drugs. *Syoyakukaku Zasshi* 1971; 25:28–34.
33. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidants properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci* 1997; 2 :152–159.
34. Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation, and retrieval of rat's passive avoidance response: A tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res* 1996; 730:32–39.
35. Beninger RJ, Jhamandas K, Boegman RJ, EL-Defrawy SR. Effect of scopolamine and unilateral lesions of the forebrain on T-maze spatial discrimination and alternation in rats. *Pharmacol Biochem Be* 1986; 24:1353–1360.
36. Dennis WJ. Spontaneous alternation in rats as an indicator of the persistence of stimulus traces. *J Comp Psychol* 1939; 28:305–312.
37. Troster AI, Beatty WW, Staton RD, Rorabaugh AG. Effect of scopolamine on anterograde and remote memory in humans. *Psychobiology* 1989; 17:12–18.
38. Jackson JJ, Soliman MRI. Effects of tacrine (THA) on spatial reference memory and cholinergic enzymes in specific rat brain regions. *Life Sci* 1995; 58:47–54.
39. Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res* 2005; 2:307–318.
40. Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveria CR. Brain oxidative stress in a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:2051–2057.
41. Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafci JA, Freedman ML. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1998; 150:40–44.
42. Yamada N, Hattori A, Hayashi T, Nishikawa T, Fukuda H, Fujino T. Improvement of scopolamine-induced memory impairment by Z-ajoene in the water maze in mice. *Pharmacol*

- Biochem Behav 2004; 78:787–791.
43. Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13541–13546.
 44. Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. *J Pharmacol Sci* 2005; 97:124–131.
 45. Xie JT, Aung HH, Wu JA, Attel AS, Yuan CS. Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in ob/ob mice. *Am J Chin Med* 2002; 30:187–194.
 46. Yun SN, Moon SJ, Ko SK, Im BO, Chung SH. Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. *Arch Pharm Res* 2004; 27:790–796.
 47. Wang L, Higashiura K, Ura N, Miura T, Shimamoto K. Chinese medicine, Jiang-Tang-Ke-Li, improves insulin resistance by modulating muscle fiber composition and muscle tumor necrosis factor-alpha in fructose-fed rats. *Hypertens Res* 2003; 26: 527–532.
 48. Jung CH, Seog HM, Choi IW, Choi HD, Cho HY. Effects of wild ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 98:245–250.
 49. Joo CN, Kang IC, Lee HB. Effect of ginsenosides on the biosynthesis of low density lipoprotein receptor in cultured chine hamster ovary cell. *Korean J Ginseng Sci* 1988; 12:104–113.
 50. Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, Mathis CA, Moore RY, DeKosky ST. Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer’s disease: an in vivo positron tomographic study. *Arch Neurol* 2003; 60:1745–1748.
 51. Wallin A, Sjogren M, Blennow K, Davidsson P. Decreased cerebrospinal fluid acetylcholinesterase in patients with subcortical ischemic vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003; 16:200–207.
 52. Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer’s disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 2002; 68:209–245.
 53. Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 278–294.
 54. Salehi A, Delcroix JD, MobleyWC. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2003; 26:73–80.
 55. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 1996; 4:465–469.
 56. Yokozawa T, Satoh A, Cho EJ. Ginsenoside-Rd attenuates oxidative damage related to aging in senescence-accelerated mice. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56:107–113.

57. Tao H, Yao M, Zou S, Zhao D, Qiu H. Effect of angiogenesis inhibitor Rg₃ on the growth and metastasis of gastric cancer in SCID mice. 2002; 40:606-608.
58. Giacobini E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18:S1-S5.
59. Ogawa N, Asanuma M, Kondo Y, Nishibayashi S, Mori A. Reduced choline acetyltransferase activity and muscarinic M1 receptor levels in aged Fisher 344 rat brains did not parallel their respective mRNA levels. *Brain Res* 1994; 658:87-92.
60. Hoyer S, Lannert H, Latteier E, Meisel T. Relationship between cerebral energy metabolism in parietotemporal cortex and hippocampus and mental activity during aging in rats. *J Neural Transm* 2004; 111:575-589.
61. Sadowski M, Pankiewicz J, Scholtzova H, Ji Y, Quartermain D, Jensen CH, Duff K, Nixon RA, Gruen RJ, Wisniewski T. Amyloid-beta deposition is associated with decreased hippocampal glucose metabolism and spatial memory impairment in APP/PS1 mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63:418-428.
62. Saito H. Effects of ginsenoside Rb₁ and ginsenoside Rg₁ on learning and memory. In Shibata, S, Ohtsuka Y, Saito H (Eds.), *Recent Advances in Ginseng Study*. Hirokawa Publishing, Tokyo, p.99 (1990).
63. Wyse ATS, Brusque AM, Silva CG. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport* 1998 ;9:1719-1721.
64. Cui JF, Bjöorkhem I, Eneroth P. Gas chromatographic-mass sepectrometric determination of 20(S)-protopanaxadiol and 20(S)-protopanaxatriol for study on human urinary excretion of ginsenosides after ingestion of ginseng preparations. *J. Chromatogr B: Biomed. Sci Appl* 1997; 689:349-355.
65. Lu J, Zheng YL, Wu DM. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 1078-1090.
66. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999; 2:266-270.
67. Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao CM, van Praag H, Gage FH, Schinder AF. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol* 2006; 4:2349-2360.

주 의

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