

발간등록번호

11-1541000-000548-01

보안과제(O), 일반과제()

과제번호 (108045-02-2-CG000)

**인삼의 발효법을 이용한 사포게닌 증량법 개발
및 이를 이용한 혈행개선 기능성식품 개발**

(Development of functional food for the improvement of
blood circulation with sapogenin increase method using
ginseng zymotechnics)

- 발효법을 이용한 생물전환 인삼조성물 및 그 제조
(Composition and Manufacturing of Biotransformed Ginseng by Fermentation Processing.)
- 성분분리 및 분석
(Isolation and Analysis of Components)
- 생리활성 시험
(Study on Bioactivity)
- 식품 소재화 가공
(Food Processing)

주관연구기관: (주)휴메딕스

농림수산식품부

인삼의 발효방법을 이용한 사포제닌 증량법 개발 및 이를 이용한 혈행개선 기능성식품 개발
농림수산식품부

주 의

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

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인삼의 발효법을 이용한 사포게닌 증량법 개발 및 이를 이용한 혈행개선 기능성식품 개발(세부과제 “발효법을 이용한 생물전환 인삼조성물 및 그 제조”)의 보고서로 제출합니다.

2010년 6월 24일

주관연구기관명 : (주)휴메딕스

총괄연구책임자 : 김재영

세부연구책임자 : 조순현

연 구 원 : 김경남

연 구 원 : 유우상

연 구 원 : 이경훈

연 구 원 : 이신구

연 구 원 : 이기호

협동연구기관명 : 세명대학교

협동연구책임자 : 고성권

협동연구기관명 : 세명대학교

협동연구책임자 : 임강현

협동연구기관명 : 포천중문의대

협동연구책임자 : 이부용

요 약 문

I. 제 목

인삼의 발효법을 이용한 사포게닌증량법 개발 및 이를 이용한 혈행개선 기능성식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

▶ 본 연구에서는 sapogenin을 이용한 인삼 조성물에 대하여 우수 발효균주 선별, 생물전환력이 높은 균주로 개량, 원료표준화연구, 식품소재화연구, 성분분리분석, 표준품개발과 효력시험 등을 실시하여 혈행개선 효과가 뛰어난 기능성식품 개발

▶ 고려인삼종주국으로서 표준화된 인삼 sapogenin 소재를 기능성 식품의 원료화하여 혈액순환개선 효능의 우수성을 지닌 신 기능성식품을 개발하게 되며, 이를 통해 도출된 생약추출기술과 기능성식품등록 노하우를 향후 타 농산물소재에 확대시켜서 국내 농산물산업의 기술력 강화 및 국제경쟁력을 향상.

▶ 인삼의 인삼사포닌(ginsenoside Rb₁, Rg₂, Ro)이 항혈전작용을 나타낸다고 보고되었으며, 콩발효물도 항혈전 효과가 있는 것은 이제는 공지의 사실임. 따라서, 위와 같은 가공방법에 의한 활성형 인삼 사포게닌 소재를 이용하여 기능성이 향상된 혈행개선 기능성식품을 개발하므로서 우리나라 인삼산업의 혁신적인 발전에 기여하고자 함.

2. 연구개발의 필요성

고도의 경제성장, 인구의 고령화 및 노령화 인구의 증가와 산업화의 추세로 우리의 식생활 패턴이 달라지고, 비만, 성인병, 노인성질환 등의 만성, 퇴행성 질환이 늘어나고 있는 추세이며 도시화되는 현대사회는 점점 운동이 부족하고 시간에 쫓기는 바쁜 생활 속에서 비만과 더불어 순환기질환이 점점 증가하는 성인병으로 생활습관병중의 하나라고 할 수 있는데, 심장병, 혈전증, 말초순환장애 등 여러 합병증을 야기하여 사람들의 건강한 삶을 위협하고 있다. 이와 같은 질환에 우리나라의 전통의학인 한방에서 사용한 인삼을 비롯한 여러 생약이 현대에도 임상에 응용되고 있으므로 이를 이용한 신 생리활성소재의 개발을 통한 기능성식품의 개발은 거부할 수 없는 현실이다. 특히, 우리나라의 최고 브랜드인 인삼은 현재 원료삼을 중심으로 생산·수출되었고, 제품은 국내·외를 막론하고 Total 엑스레벨의 제품이 주류를 이루고 있다. 또한, 세계시장에서 3%의 보잘것없는 마켓셰어(market share)를 차지하는 현실에 직면하고 있다. 이러한 인삼산업의 획기적 중흥과 수출증대를 위하여 전문화되고, 첨단화된 성분 레벨의 기능성식품의 개발이 필요하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 추출온도별 ginsenoside 함량변화 연구

미삼추출물의 추출온도에 따른 ginsenoside 함량실험을 진행하여 시료의 표준화 및 ginsenoside의 최적 추출조건을 찾는다.

2. 생물전환 우수 발효균주 선별 및 동정

인삼에 함유되어 있는 saponin들은 glucose, rhamnose, arabinose 등의 당기를 가지고 있으며, saponin에서 당기가 제거된 형태인 aglycon의 함량을 효율적으로 증가시키는 미생물을 찾는다.

3. 균주개량

최종발효균주로 선정된 미생물을 계대배양 함으로서 생물전환 능력이 뛰어난 균주로 개량한다.

4. 최적발효법 연구 및 물질분석

최종 선별된 균주를 통하여 인삼 사포게닌의 함량을 최대로 함유하는 인삼조성물을 얻기 위하여 액상발효 및 고상발효를 통해 최적발효법 연구.

또한, 액상발효 및 고상발효에서 얻어진 물질의 분리 및 동정을 통하여 aglycon을 확인한다.

5. 효능실험

액상발효물, 고상발효물로부터의 혈소판응집억제반응 측정 및 혈관수축에 미치는 영향을 알아본다.

6. 시제품제작

최종 개발된 물질의 상품화를 위해 최적 공정을 검토하여 시제품을 제작한다.

Ⅳ. 연구개발결과

1. 추출온도별 ginsenoside 함량변화 연구

미삼에서 추출온도가 높아질수록 ginsenoside의 Area가 높아지는 것을 알 수 있었다. 그러나 실제 제품을 생산할 때 현장에서 생산 가능한 온도인 80℃로 추출하는 것으로 정하였다.

2. 생물전환 우수 발효균주 선별 및 동정

처음으로 esculin배지에서 glucose를 분해하는 효소인 β -glucosidase생산능력을 plate상에서 측정한 결과 B.natto, S.cerevisiae가 β -glucosidase생산능력이 뛰어났으며, 과거 연구를 통하여 β -glucosidase생산능력은 떨어지지만 glucose 분해능력이 뛰어났었던

M.ruber를 1차적으로 선별하였다.

1차 선별된 균주들을 각각의 배지에서 배양하여 미삼에서 생물전환 능력을 측정한 결과 Bacillus natto 및 Saccharomyces cerevisiae는 protopanaxadiol, protopanaxatriol의 함량이 꾸준한 증가를 보인 반면 M.ruber는 protopanaxadiol, protopanaxatriol로 생물전환 시키지 못하였다.

따라서, 미삼에 함유되어 있는 saponin배당체를 aglycon형태인 protopanaxadiol, protopanaxatriol을 효율적으로 생물전환 시키는 균주인 Bacillus natto 및 Saccharomyces cerevisiae를 최종 발효균주로 선정하였다.

3. 균주개량

미생물을 계대배양을 통하여 균주를 개량하고 개량 전, 후를 분석하는 실험을 진행한 결과 본 연구에서 목적으로 하는 물질인 PPD, PPT중 PPD는 개량 전, 후에도 전혀 나타나지 않았으며 PPT의 경우는 함량이 개량 전에는 0.1595%이고 개량 후에는 0.2223%로서 유의적으로 늘어나는 경향을 나타내었으나, 전환되는 양이 미미하여 계대배양을 통한 균주개량은 적합하지 않은 것으로 판단하였다.

4. 최적발효법 연구 및 물질분석

Saponin배당체를 aglycon전환 최적발효법을 찾기 위하여 액상발효법과 고상발효법 2가지로 나누어 진행한 결과 액상발효에서는 protopanaxadiol, protopanaxatriol로의 전환이 전혀 이루어지지 않았고, 고상발효에서는 1일과 6일차에서 PPD로의 전환이 의미가 있는 농도로 전환이 이루어졌다.

그리고 인삼사포게닌 고농도 함유제품에 대한 성분 분석법을 개발하기 위해서 인삼사포게닌이 비극성 물질인 점을 착안하여 GC 분석법 중 ECD detector에 의해서 검출한 결과는 Protopanaxadiol(PPD)의 시그날이 RT 3.3 min.에서 확인되었으며, Protopanaxatriol(PPT)의 시그날은 RT 3.4 min.에서 확인되어 GC를 이용한 분석법도 유효한 분석법으로 사용할 수 있다고 판단하였다.

또한, 고체발효를 통해 전환된 Protopanaxadiol(PPD)과 Protopanaxatriol (PPT)를 순수 분리하여 본 연구에서 목적으로 하는 물질인지 확인하였다.

NMR을 이용하여 ¹H-NMR 스펙트럼 및 ¹³C-NMR로 동정한 결과 본 연구에서 목적으로 하는 물질인 (20S)-protopanaxadiol, (20S)-protopanaxatriol로 확인되었다.

5. 효능실험

액체발효물과 고체발효물의 유효한 효능을 비교한 결과 액체발효물보다 고체발효물에서의 혈소판응집억제 및 혈관수축에서 효과가 높게 나타났다. 액체발효물의 효과는 외인성 인자의 억제를 통해 나타난다기 보다는 내인성인자 중 혈소판의 기능을 억제하여 유효한 효과를 발휘한다는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 고체발효물의 혈관평활근에 미치는 효과를 관찰한 결과 강하지는 않으나 고체발효물에서 효과를 관찰할 수 있었고, 기전연구를 통해 작용기전을 확인한 결과 혈관내피에 존재하는 eNOS에 영향을 미쳐 혈관이완효과를 발휘한다는 것을 확인할 수 있었다. 위 결과를 종합하여 보자면 고체발효물은 혈소판 응집과 혈관평활근 이완작용을 통해 혈행개선을 시키는 것으로 확인되었으며, 이의 효과는 기능성 제품으로 만드는데 손색이 없는 것으로 판단된다.

6. 시제품제작

최종 개발된 물질의 상품화를 위해 최적 공정을 검토하여 시제품을 제작한다.

1)고상발효물의 하드캡슐 시제품 제작

(1)건조된 고상발효물을 수분함량 5% 미만, 입자크기 80mesh 이하로 분쇄하였다.

(2)캡슐화에 적합하도록 적절히 가수하여 조절하여 입자의 흐름성을 조절한다. 캡슐에 충전될때 브릿지(bridge)현상 등에 의해 캡슐속으로 내용물이 제대로 충전 되지 않는 현상 등을 방지하기 위하여 입자의 흐름성을 조절한다. 필요시 부재료(중량제(텍스트린 등), 감미료(포도당 등))를 적정량 배합할 수 있다.

(3)캡슐레이션후 공기세척에 의해서 캡슐의 표면에 붙어있는 미립자들과 이물을 제거한다.

(4)육안에 의한 캡슐검사로 불량품을 선별한다.

(5)습기가 통하지 않도록 제습제를 사용하고 적절히 포장한다.

2)고상발효물의 과립 시제품 제작

(1)건조된 고상발효물을 수분함량 5% 미만, 입자크기 80mesh 이하로 분쇄하였다.

(2)감미를 위해서 포도당을 일부 첨가하고, 과립화에 적합하도록 증류수를 가수하여 잘 균질화시킨후, 입자의 뭉침성을 조절하여 반죽물을 제조한다

(3)과립기 호퍼에 반죽물을 충전하고 압출력에 의해 15-20mesh 크기로 과립을 제조한다.

(4)55℃ 이하의 열풍으로 수분함량이 8%이하가 되도록 과립을 건조시킨다.

(5)건조된 과립을 sieving에 의하여 선별한다.

(6)습기가 통하지 않도록 제습제를 사용하여 적절히 포장한다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 제품화

- ▶ 객관적, 과학적 연구 결과를 바탕으로 한 신뢰할 수 있는 혈행개선 제품 출시
- ▶ ‘2010 제천국제한방바이오v엑스포’를 활용한 제품 홍보 전략
- ▶ 등록된 특허를 바탕으로 기술우수성 홍보

2. 추가 연구

- ▶ 혈행개선 건강기능식품 허가를 위한 추가 연구
- ▶ 독성시험 및 임상시험 진행
- ▶ 본 과제의 성과를 바탕으로 건강기능식품 개별인정형 허가를 위한 추가 정책자금 지원 신청

3. 관련 연구 활용

- ▶ 발효물을 이용한 혈전, 당뇨 및 동맥경화 등 관련 분야로 연구 영역 확대
- ▶ 은행잎, 산사추출액 등 기존 혈행개선 제품과의 시너지 효과 연구

SUMMARY

I . Title

The Sapogenin Enrichment of Ginseng through Fermentation and the Development of Health Supplements to Enhance Circulation Produced Using This Method

II . Objectives

- ▶ Exploring methods to increase the concentration of sapogenin in ginseng through fermentation
- ▶ Verifying the ability of sapogenin in high concentration to enhance blood circulation, and developing of health supplement products containing sapogenin
- ▶ Improving the competitiveness of the Korean agricultural sector

III . Results

i . Identification and selection of microbial strains with superior bioconversion performance

A total of 9 types of microbes were tested for their ability to convert the saponin in ginseng tails into sapogenin. It was shown that *B.natto* and *S.cerevisiae* perform the best.

ii . Investigation into the optimal fermentation method and substance analysis

In order to find the optimal fermentation method, liquid-state fermentation and solid-state fermentation were conducted and compared, the results of which revealed that the rate of bioconversion was higher in solid fermentation. Having found this, further research was conducted on the development of health supplement products made using solid-state fermentation.

iii . Lab tests

In vitro and *in vivo* tests confirmed that solid-fermentation products perform better than liquid-fermentation products in enhancing circulation.

iv. Manufacture of prototype products

Research was conducted to find the optimal dosage form for the ease of ingestion of the solid-state fermentation products, which had been proven to be superior. The granular and the capsular forms were ultimately chosen and manufactured.

Index

Part 1. Introduction	p1
Chapter 1. Objectives of the study	p1
Chapter 2. Context and motivation of the study	p1
Part 2. Survey of existing studies and technology	p5
Chapter 1. Survey of existing studies and technology (domestic and foreign) in relevant fields	p5
Chapter 2. Trends in technological development and in the market	p5
Part 3. Methods and results of research	p6
Chapter 1. Studying the changes in the concentration of ginsenoside according to extraction temperature	p7
Chapter 2. Identification and selection of microbial strains with superior bioconversion performance	p10
Chapter 3. Enhancement of microbes	p26
Chapter 4. Finding the optimal fermentation method and substance analysis	p32
Chapter 5. Testing for effects of sapogenin	p58
Chapter 6. Manufacture of prototype product	p79
Part 4. Evaluation of the study's achievements and its impact on related fields	p83
Chapter 1. Chronology of research objectives and processes	p83
Part 5. Plans to utilize the findings of the research	p85
Chapter 1. Product commercialization	p85
Chapter 2. Further research	p85
Chapter 3. Application in related fields	p86
Part 6. References	p87

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	p1
제1절 연구개발과제의 목적	p1
제2절 연구개발의 필요성	p1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	p5
제1절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황	p5
제2절 기술개발대상 및 제품 동향	p5
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	p6
제1절 추출온도별 ginsenoside 함량변화연구	p7
1. 목적	p7
2. 실험방법	p7
3. 실험결과	p8
4. 결론	p9
제2절 생물전환 우수 발효균주 선별 및 동정	p10
1. 목적	p10
2. 실험방법 및 결과	p10
가. Esculin배지에서 미생물의 β -glucosidase생산 능력 측정	p10
나. 선정 균주를 통한 미삼 발효	p13
3. 결론	p25
제3절 균주 개량	p26
1. 목적	p26
2. 실험방법	p26
3. 실험결과	p28
4. 결론	p31

제4절 최적발효법 연구 및 물질분석	p32
1. 목적	p32
2. 실험내용	p32
가. 액상발효실험	p32
나. 고상발효실험	p44
가. 인삼사포게닌 GC 분석법	p46
라. 인삼사포게닌 분리 확인 동정	p48
3. 결론	p57
제5절 효능실험	p58
1. 목적	p58
2. 실험내용	p58
가. In vitro 혈소판 응집 억제작용 및 기전평가	p58
나. 혈액 응고 억제 평가	p69
다. 혈행개선관련 biomarker 측정	p72
라. 혈관평활근에 대한 작용평가 및 기전연구	p73
3. 결론	p78
제6절 시제품 제조	p79
1. 고상발효물을 이용한 시제품 제조	p79
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	p83
1. 연도별 연구개발의 목표 및 내용	p83
제 5 장 연구개발결과의 활용 계획	p85
1. 제품화	p85
2. 추가연구	p85
3. 관련연구활용	p86
제 6 장 참고문헌	p87

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발과제의 목적

인삼은 예로부터 한방의학에서 수천년 동안의 경험에 의하여 그 약효가 특출한 것으로 인정받아 왔다. 488~496년에 도홍경은 《신농본초경》을 수정하였는데, 이 저서에 의하면 "인삼은 주로 오장을 보하고 정신을 안정시키며 경계(驚悸)를 멈추게 하고 눈을 밝게 하며 머리를 지체롭게 하고 오랫동안 복용하면 수명(壽命)을 연장한다"고 하였다. 또한, 현대에 이르러서는 세계 각국의 저명한 학자들의 활발한 과학적 연구가 진행되어 인삼이 동맥경화예방, 간장보호, 피로회복, 혈당강하작용 등 무수히 많은 효능이 있다고 하였다.

그러나 우리나라는 고려인삼중주국으로서 원료삼만을 중심으로 생산, 수출되고 있으며 제품은 국내외를 막론하고 엑스레벨의 제품이 주류를 이루고 있다. 또한, 세계시장에서 3%의 보잘것없는 마켓쉐어를 차지하는 현실이다.

이러한 인삼산업의 획기적 증흥과 수출증대를 위하여 전문화되고, 첨단화된 성분 레벨의 기능성 식품의 개발이 필요하였다.

그리하여 본 연구에서는 인삼saponin을 이용한 인삼 조성물에 미생물을 이용하여 생리활성이 높은 생물전환체들을 효율적으로 생산해낼 수 있는 방법을 찾고 표준화된 인삼 sapogenin소재를 기능성 식품의 원료로하여 혈행개선 효능의 우수성을 지닌 신 기능성식품을 개발하고 이를 통해 도출된 생약추출기술과 기능성식품등록 노하우를 향후 타 농산물소재에 확대시켜 국내 농산물산업의 기술력 강화 및 국제경쟁력을 향상시키는 것을 목적으로 한다.

제2절 연구개발 필요성

1. 기술적 필요성

1) 우리 농산물의 부가가치를 높이기 위해서는 전문화되고 기능성을 극대화한 제품을 개발함으로써 세계화가 가능함.

2) 고부가가치 기능성식품의 개발은 우선적으로 안전성이 확보된 가공방법과 생리활성 소재연구를 통한 유효성의 확보가 반드시 필요함.

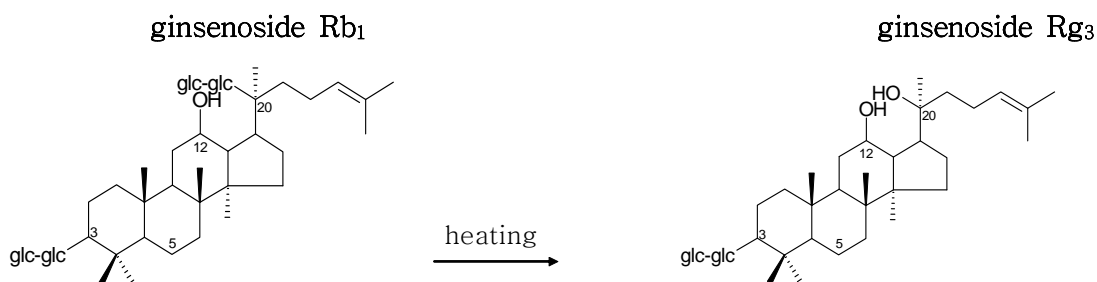
3) 또한, 국산 농산물 중 오랜 세월 세계 최고 품질의 브랜드 이미지를 갖고 있는 인삼제품이 세계시장에서 3% 정도의 마켓쉐어(market share)를 차지하고 있는 불행한 현실은 1차 가공제품인 본삼류(뿌리삼)와 토탈 엑기스 수준의 단순 가공제품으로 세계시장에 도전했기 때문임.

4) 고부가가치 인삼제품을 개발하기 위해서는 강력한 생리활성을 나타내는 특정성분을

고농도로 함유하게 하는 가공기술과 이와 관련한 생리활성소재의 유효성을 입증한 기능성식품을 개발해야함.

5) 인삼 함유 성분에 있어서 수삼 및 백삼에는 인삼사포닌 배당체(ginsenoside Ra, Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁ 등)가 함유되어 있음.

6) 인삼사포닌 배당체는 동맥경화 및 고혈압의 예방, 위 및 간기능 촉진 및 숙취 제거 효과, 항피로 및 항스트레스 작용, 노화방지 작용, 두뇌활동 촉진 작용, 항당뇨작용, 혈행개선 및 혈소판 응집억제작용 등이 보고되어 있음.

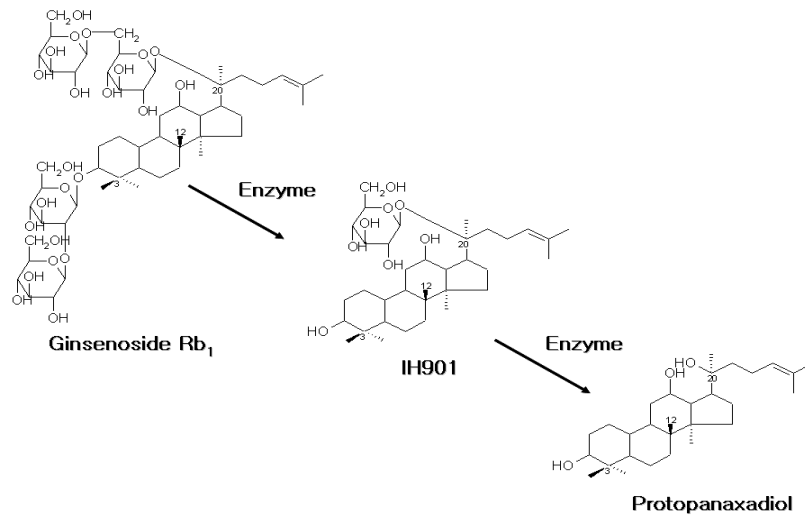


7) 또한, 수삼(생삼)을 찌서 건조한 삼을 홍삼이라고 하며, 홍삼은 찌때, 열에 의해서 ginsenoside의 일부의 당이 가수분해되어서, 홍삼특유성분인 ginsenoside Rg₂, Rg₃, Rh₂, Rh₄가 생성되며, 이는 항암, 혈압강하, 뇌인지력개선 등의 다수의 생리활성이 보고되고 있다. 이와 같은 홍삼특유성분을 고농도로 함유하는 인삼제품 개발은 (주)진생사이언스가 물리적 방법에 의한 「선삼」, (주)광동제약이 효소 가수분해에 의한 「신삼」이 출시되었으며, (주)유유가 본 연구진의 기술(국내특허 출원번호 : 10-2003-41914, 국제특허 PCT출원번호 : PCT/KR/01660) 공여에 의하여 공동 개발하고 있는 발효양조식초 가공에 의한 기능성식품인 「긴삼」의 출시를 눈앞에 두고 있다.

8) 최근, Hasegawa, 김 등을 비롯한 국내외의 학자들에 의해서 한약, 특히, 인삼의 사포닌 배당체 성분(ginsenosides)이 인체내의 장내 미생물이 분비하는 효소에 의해서 효소가수분해되어 ginsenosides에 결합되어 있는 일부의 당이 유리되어 prosapogenin형태의 IH-901(compound K)이 생성되는데, 항암 및 암전이 억제효과가 뛰어나다고 보고하였고, 이를 이용하여 (주)일화에서 「락토진생」이라고 하는 건강식품을 출시하고 있다.

9) 그러나, 본 연구팀은 인삼과 콩에 *Bacillus natto*를 접종 발효하여 인삼 sapogenin (protopanaxadiol, protopanaxatriol)이 고농도로 함유된 인삼 식품소재를 천연물화학적 접근방법을 통하여 개발을 완료하여 국내특허(출원번호 : 10-2006-0113772)를 출원하였음.

10) 이는 콩의 발효 과정 중에 관여하는 *Bacillus natto*가 분비하는 효소에 의해서 ginsenosides의 당이 가수분해되는 것으로 사료되며, 기존에는 콩의 발효 과정 중 생산되는 당 및 단백질 분해 효소에 의한 인삼의 1차 대사산물의 생화학적 변화에만 초점이 맞춰 있었으나, 본 실험에 의해서, 인삼의 2차 대사산물인 천연물 배당체(glycosides)의 당도 가수분해 된다는 것을 확인할 수 있었다.



11) 이와 같은 발명은 현재 개발된 인삼 prosapogenin 소재와는 다른 세계 최초의 인삼 sapogenin 소재로서, 간단히 인삼 sapogenin을 대량으로 생산할 수 있는 실용성이 있는 방법으로 산업계에서 주목을 받고 있음.

12) 특히, 21세기 고영양시대를 맞이하여, 우리나라 사망원인의 23%가 심혈관계 질환이다. 따라서, 순환기 질환에 대한 예방적 차원의 기능성식품 개발은 시급한 과제이며, 체계적인 접근의 연구개발이 필요함.

13) 공지의 사실인 인삼사포닌 배당체(ginsenoside Rb₁, Rg₂, Ro)와 콩발효물의 혈행개선 작용을 증대시키는 인삼 sapogenin 소재의 개발은 시대에 부응하는 과제임.

14) 따라서, 본 소재의 생리활성에 대한 연구와 더불어서 인삼사포닌 배당체와 인삼 sapogenin과의 성분 수준에서의 생리활성 연구가 절실히 필요하며, 이를 통하여 혈전증 개선에 대한 기능성식품 신소재 개발이 가능하리라 사료됨.

15) 유산균과 장내세균, *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto* 등의 음식물이나 약물 중에 함유된 화합물을 생물전환하는데 이때 생성된 생물전환체들은 원화합물에 비해 생리활성이 높은 경우가 다수 있으며, 이 유효균주들을 균주 개량하여 더 높은 생리활성을 내는 유효균주로 개량하여 산업화 함으로서 발효인삼 산업분야에 크게 기여할 것임.

2. 경제·산업적 필요성

- 1) '제4의 물결'로 간주되는 바이오테크 혁명과 연계, 인삼성분을 이용하여 기능성 식품 분야의 제품컨셉을 제공함으로써 향후 이 분야에서의 연구 활성화를 도모하며, 신 기능성 제품의 개발은 인삼산업 및 국가경제 발전에 큰 기여를 할 수 있을 것임.
- 2) 신제품 개발 기술과 과학적인 시장출시 능력을 배양하여 우리나라 인삼산업의 어려움(세계시장 3% 점유율)을 극복하고 혁신적 중흥에 기여함.
- 3) 농가소득 측면에서도 인삼은 여러 가지 국내의 농산물 중 차별화 요인이 크고 단위 재배 면적 당 부가가치가 높아 인삼원산지의 지역경제 활성화 가능성을 개발함.
- 4) 인삼은 한계농지 및 노령화로 노동력과 같은 농촌지역의 한계자원이나 유휴자원을 활용해서 세계적인 특산품으로 생산할 수 있어 농가의 주요 소득원이 될 수도 있음
- 5) 국가의 위상제고에도 도움을 줄 수 있고, 국제 경쟁력 있는 인삼 기능성식품의 개발은 지역, 국가 경제적으로나 산업적인 측면에서 지대한 영향을 미칠 수 있음.

3. 사회·문화적 필요성

- 1) 고도의 경제성장, 인구의 고령화 및 노령화 인구의 증가와 산업화의 추세로 우리의 식생활 패턴이 달라지고, 비만, 성인병, 노인성질환 등의 만성, 퇴행성 질환이 늘어나고 있는 추세이며 이에 대한 국민들의 건강에 대한 관심이 날로 증가하고 있어 이들 질환의 예방과 치료차원에서 생체방어기능을 갖는 고기능성 식품에 대한 관심과 수요가 급증함.
- 2) 도시화되는 현대사회는 점점 운동은 부족하고 시간에 쫓기는 바쁜 생활 속에서 비만과 더불어 순환기질환이 점점 증가하는 성인병으로 생활습관병중의 하나라고 할 수 있는데, 심장병, 혈전증, 말초순환장애 등 여러 합병증을 야기하여 사람들의 건강한 삶을 위협함.
- 3) 이와 같은 질환에 우리나라의 전승의학인 한방에서 사용한 인삼을 비롯한 여러 생약이 현대에도 임상에 응용되고 있으므로 이를 이용한 신 생리활성소재의 개발을 통한 기능성식품의 개발은 거부할 수 없는 현실임.
- 4) 특히, 우리나라의 최고 브랜드인 인삼은 현재 원료삼을 중심으로 생산·수출되었고, 제품은 국내·외를 막론하고 Total 엑스 레벨의 제품이 주류를 이루고 있음. 또한, 세계 시장에서 3%의 보잘것없는 마켓쉐어(market share)를 차지하는 현실에 직면하고 있음. 이러한 인삼산업의 획기적 중흥과 수출증대를 위하여 전문화되고, 첨단화된 성분 레벨의 기능성식품의 개발이 필요함.

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

제1절 국내 · 외 관련분야에 대한 기술개발현황

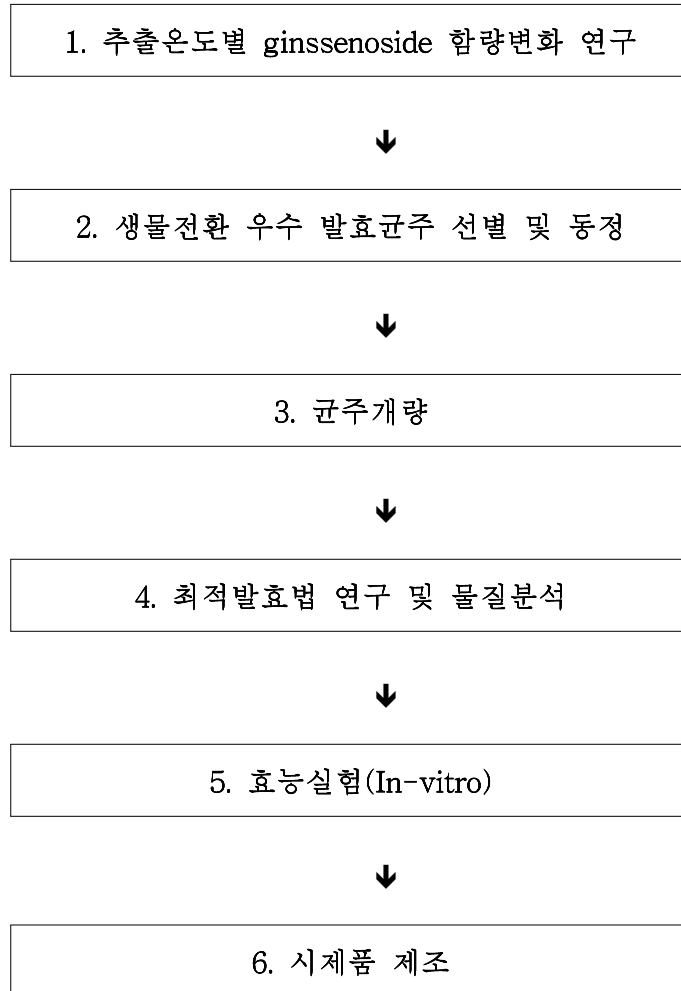
연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
서울대학교 (박만기)	물리적인 방법(열과 압력에 의한 가수분해)에 의한 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg3, Rg5) 고농도 함유 인삼제제 개발	선삼(진생사이언스) 출시
서울대학교 (허훈)	생화학적 방법(발효에 의한 효소 가수분해)에 의한 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg3, Rh2) 고농도 함유 인삼제제 개발	신삼(광동제약) 출시
(주)일화 (성종환)	생화학적 방법(장내 미생물에 의한 효소 가수분해)에 의한 인삼 prosapogenin(IH-901) 고농도 함유 인삼제제 개발	락토진생(일화) 출시
(日本) 一都生命 (하세가와)	생화학적 방법(장내 미생물에 의한 효소 가수분해)에 의한 인삼 prosapogenin(IH-901) 고농도 함유 인삼제제 개발	효삼(원광제약) 출시
(주)유유 (고성권)	천연물화학적 방법(식용식초에 의한 가수분해)에 의한 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg3, Rh2) 고농도 함유 인삼제제 개발	긴삼(유유)출시

제2절 기술개발대상 및 제품 동향

기능성/인삼 조성물	인삼 사포닌 배당체	인삼 prosapogenin 소재	인삼 sapogenin 기능성식품
	홍삼정(한국인삼공사) i pass(한국인삼공사)	-	-
자양강장, 피로회복, 면역증진	-	선삼(진생사이언스) 신삼(광동제약) 어삼(상아제약) 효삼(원광제약) 락토진생(일화) 황삼(일동제약) 헤븐리 진생(유니젠)	-
항당뇨작용	-	긴삼(유유)	-
혈액순환 개선작용	-	-	(본 연구 개발 제품)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

※연구개발 process



제1절. 추출온도별 ginsenoside 함량변화 연구

1. 목적

미삼추출물의 추출온도에 따른 ginsenoside 함량실험을 진행하여 시료의 표준화 및 ginsenoside의 최적 추출조건을 찾는다.

2. 실험방법

가. 추출온도별 미삼추출액 제조

- ① 미삼 20g×3을 정밀하게 칭량하였다.
- ② 분쇄한 미삼을 500ml 환류플라스크에 각각(3개) 넣는다.
- ③ 환류플라스크에 70% ethanol 200ml를 넣은 후 water bath에서 50℃, 70℃, 90℃로 5시간 환류추출을 하였다.
- ④ 추출 후 냉각하여 시료로 사용하였다.

나. 전처리 및 HPLC 분석조건

① Sample preparation: 각 추출물 50ml씩을 농축플라스크에 취하여 70℃에서 감압농축하고, 이에 수포화부탄을 3회 추출 후 추출액을 모두 합쳐 다시 70℃에서 감압농축 하여 Methanol 25ml에 녹여 0.45 μm filter로 처리하였다.

sample	추출조건
1	미삼 50℃추출물
2	미삼 70℃추출물
3	미삼 90℃추출물

② injection volume : 10μl

③ HPLC-data

Apparatus : Waters 510 Binary HPLC pump, Waters 717plus Autosampler,
Waters 996 Photodiode Array Detector.

column : Eclipse XDB-C18 5μm (250*4.6mm)

solvent system : A : Acetonitrile (HPLC용) / B : water (3차 증류수)

Flow rate : 0.8 ml/min

Run time : 180min

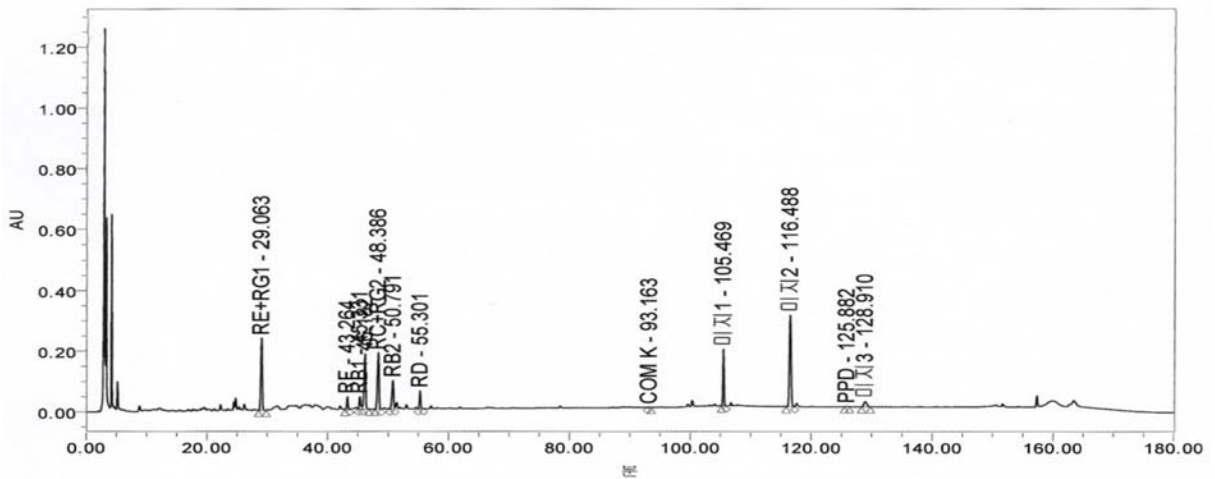
Detection : 203nm

Gradient :

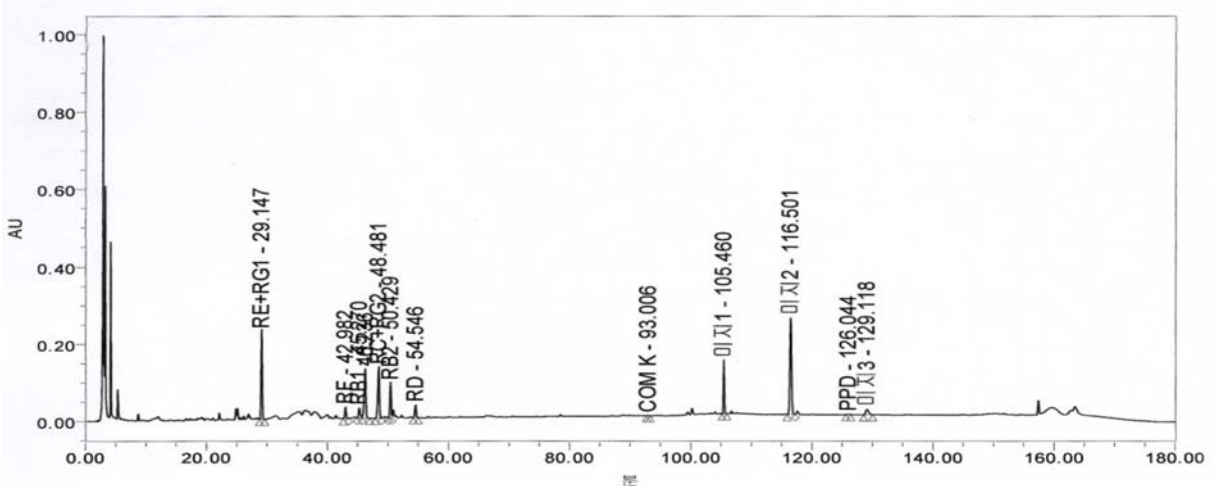
Time	Flow	A% (ACN)	curve
0	0.8	17.0	6
25	0.8	30.0	6
50	0.8	40.0	6
90	0.8	60.0	6
100	0.8	80.0	6
140	0.8	80.0	6
145	0.8	100.0	6
155	0.8	100.0	6
170	0.8	17.0	6
180	0.8	17.0	6

3. 실험결과

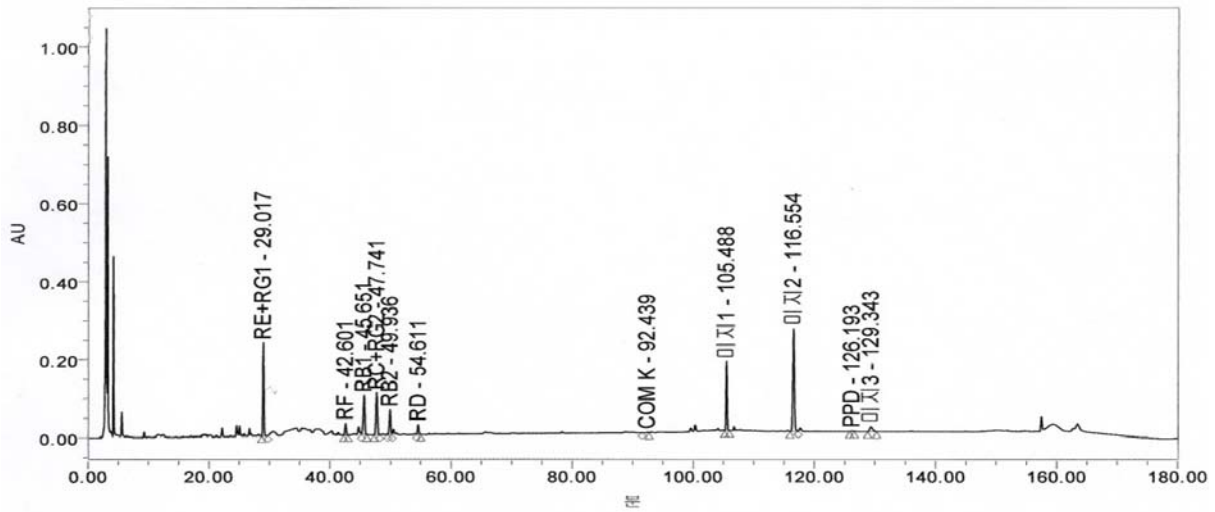
(1) 미삼 50°C 추출물



(2) 미삼 70°C 추출물



(3) 미삼 90℃추출물



(4) Sample군별 ginsenoside Area비교

Ginsenoside	Area		
	50℃ 추출물	70℃ 추출물	90℃ 추출물
Rg1+Re	2558110	2925722	3789618
Rf	417295	466063	575511
Rb1	1733795	2429913	3265905
Rg2+Rc	1878425	2352322	3379076
Rb2	964620	1241986	1829914
Rd	335557	495618	847916
Compound K	12001	12359	23182
PPD	22422	26014	27678

▶ 위의 표에서 보면 50℃에서 90℃로 높아질수록 각 ginsenoside의 Area가 높아지는 것을 알 수 있다.

4. 결론

이번 실험을 통하여 미삼에서 추출온도가 높아질수록 ginsenoside의 Area가 높아지는 것을 알 수 있었다.

제2절. 생물전환 우수 발효균주 선별 및 동정

1. 목적

인삼에 함유되어 있는 saponin들은 glucose, rhamnose, arabinose 등의 당기를 가지고 있으며, 이번 연구에서 중요한 목적은 saponin에서 당기가 제거된 형태인 aglycon의 함량을 효율적으로 증가시키는 미생물을 찾는 것을 목적으로 한다.

2. 실험방법 및 결과

가. Esculin배지에서 미생물의 β -glucosidase생산 능력 측정(1차 균주 선별)

1) 목적

당기를 분해하는 효소인 β -glucosidase 생산능력이 뛰어난 미생물들을 esculin을 함유한 한천배지 실험법을 통해 선별함을 목적으로 한다.

2) 실험방법

β -glucosidase를 생산하는 미생물이 무수히 많기 때문에 논문 등을 통하여 β -glucosidase를 효율적으로 생산하는 균주를 선별하였으나 대부분은 유산균류이며 특허에 등록되어 사용할 수 없는 균주를 제외시킨 아래 균주9종을 선택하여 실험하였다.

(1) 선정균주 9종 및 배양조건

No.	Name	KCCM	ATCC	배양 및 발효조건	
				온도	습도
1	Bacillus natto			35℃	60%
2	Saccharomyces cerevisiae original			28℃	
3	Lactobacillus mali	40992	27053	35℃	
4	Lactobacillus plantarum	11322	8014	35℃	
5	Monascus ruber	60617		28℃	
6	Saccharomyces cerevisiae	11519		35℃	
7	Lactobacillus rhamnosus				
8	Lactobacillus casei	12452			
9	Lactobacillus gasseri				

Table 1. 선정균주 9종의 배양, 발효조건

(2) Esculin 배지조제

- ① 1000ml bottle에 esculin agar 21.75g을 정확하게 칭량한다.
- ② 증류수를 500ml를 넣고 가운하여 녹인다.
- ③ 마개를 느슨하게 막고 미리 셋팅된 autoclave에 넣어서 121℃에 15분간 고압멸균을 실시한다.
- ④ 고압 멸균이 된 배지용액은 적당히 식힌 후 clean bench안에서 plate에 각 30ml씩 정확히 분주한다.
- ⑤ esculin배지가 식어서 굳어지면 밀봉하여 냉장보관한다.

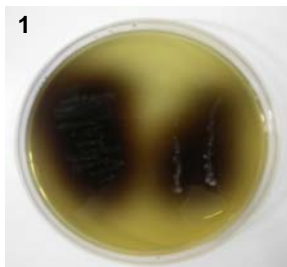
(3) Esculin 배지에의 균주접종 및 배양

- ① esculin배지에 균주 9종을 도말한다.
- ② 위의 Table1에 나와있는 배양 및 발효조건에 따라 배양한다.

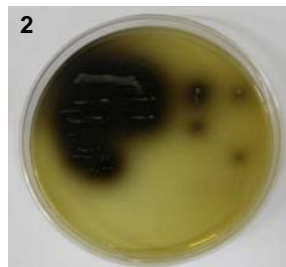
3) 실험결과

B.natto 균주가 다른 균주들에 비해 균체가 빨리 증식하고 β -glucosidase를 생성하여, 24시간만 반응시키고 정지시켰으며 나머지 5종의 균주들은 72시간 반응하여 균체증식과 β -glucosidase의 활성을 비교하였다.

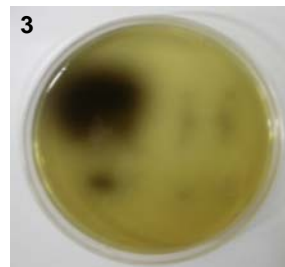
Esculin agar plate에서의 β -glucosidase의 활성분석



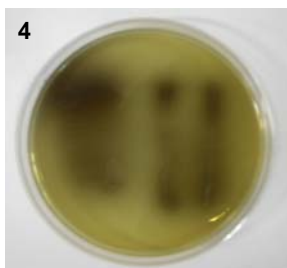
B. natto



S. cerevisiae 11519



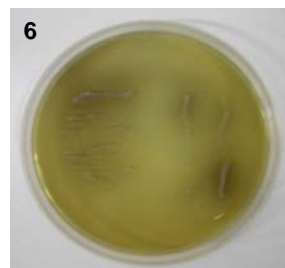
L. mali



L. plantarum



M. ruber



S. cerevisiae original



L. rhamnosus

L. casei

L. gasseri

Fig. 1. Esculin agar plate에서의 β -glucosidase 활성분석

	Strains	배양시간(hr)	균체증식속도	β -glucosidase 활성
1	B.natto	24	++++	++++
2	S.cerevisiae 11519	72	+++	+++++
3	L.mali	72	++	+++
4	L.plantarum	72	++	++
5	M.ruber	72	+++	+
6	S.cerevisiae original	72	+++	+
7	L.rhamnosus	48	++	++++
8	L.casei	72	++	+++
9	L.gasseri	72	+	-

Table 2. 선정균주 9종의 균체증식속도 및 β -glucosidase 활성

▶ esculin agar plate가 균체에 따라 증식속도와 효소생산에 영향을 주지만, 위의 결과로 볼때 B.natto 균주와 S.cerevisiae 11519 균주가 다른 균주들에 비해 균체증식이 잘되고, β -glucosidase의 생산성이 높은 것을 확인하였다.

▶ S.cerevisiae 11519균주가 가장 높은 β -glucosidase 활성을 나타내지만, B.natto는 24시간만 반응시켰기 때문에 실질적인 β -glucosidase 생산성은 B.natto균주가 가장 좋은 것으로 판단하였다. 또한, M.ruber의 경우 예전에 연구하였던 오가피 발효실험에서 glucose를 분해하는 능력이 뛰어났었다.

4) 결론

esculin배지를 통한 균주의 선별은 최종적으로 B.natto, S.cerevisiae 11519, M.ruber 균주를 선정하였다.

나. 선정 균주(3종)를 통한 미삼 발효(2차 균주 선별)

1) 목적

앞에서 선별된 균주 3종을 각각의 액체배지에서 배양하여 미삼에서의 aglycon의 생산능력을 측정하여 최종균주를 선별함.

2) 실험방법

(1) 미삼 동결건조물

미삼은 금산농협협동조합에서 10월 말경에 구입하여 사용하였다.

- ① 미삼 773g을 정밀하게 칭량하여 부직포에 담았다.
- ② 부직포에 담은 미삼과 70%에탄올 7.7L(10배수)를 약탕기에 넣은 후 80℃에서 5시간 추출하였다. (이때, 약탕기는 순환식이 아닌 감압식으로 추출하였다.)
- ③ 추출 후 냉각하여 부직포로 여과하였다.
- ④ 5A(110mm, 7um)여과지로 다시 여과하였다.
- ⑤ 여과된 액을 모아 water bath 70℃에서 감압농축 하였다.
- ⑥ 농축액을 선반동결건조 하였다.

(2) 액체 배지조제

- ① 1000ml bottle 2개에 각각 PDB(potato dextrose broth)12g과 NB(Nutrient broth) 4g을 정밀하게 칭량하여 넣는다.
- ② 각각 증류수를 500ml를 넣고 가온하여 녹인다.
- ③ 마개를 느슨하게 막고 미리 셋팅된 autoclave에 넣어서 121℃에 15분간 고압멸균을 실시한다.
- ④ 고압멸균이 된 배지용액은 밀봉하여 보관한다.

(3) 선정 균주 3종 배양

- ① clean beach안에서 PDB배지 및 NB배지를 준비된 250ml baffle flask에 각각 50ml씩 넣었다.
- ② 선정한 균주3종을 각각의 배지에 맞는 baffle flask에 접종하였다.
- ③ 접종한 후 각 균주에 맞는 온도 조건이 일정하게 유지된 shacking incubator에 넣고 24시간동안 배양하였다.

No.	Name	KCCM	배지	배양 및 발효조건	
				온도	습도
1	Monascus ruber		PDB	28	60%
2	Sacchromyces cerevisiae	11519	PDB	28	60%
3	Bacillus natto		NB	35	60%

Table 3. 선정균주 3종의 배양 및 발효조건

(4) 미삼 fermentation 및 sampling

- ① 250ml baffle flask 5개에 각각 PDB배지(3개) 및 NB배지(2개)를 45ml씩 담았다.
- ② 배지가 담긴 5개의 baffle flask에 미삼 동결건조물 250mg씩을 가하였다.
- ③ 각 flask에 접종할 균주의 이름을 적고 배지에 맞는 균주배양액 5ml을 접종하였다.
- ④ 균주가 접종된 각 flask를 발효조건에 맞는 온도에서 14일간 shaking incubator에서 발효하였다.
- ⑤ 발효7일째, 14일째에 15ml conical tube에 각 sample 20ml를 채취하였다.
- ⑥ 채취한 sample은 냉장상태로 보관하였다.

(5) 전처리 및 HPLC 분석조건

- ① standard preparation: Ginsenoside Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rh1, Rc, Rd, Rg3, PPD (protopanaxadiol), PPT(protopanaxatriol), Compound K, Rh2(chromadex, U.S.A) 1mg을 정밀하게 달아 1ml에 녹여 stock solution을 만들었다.
이를 각각 100 μ m씩 취한 후 잘 혼합하여 standard로 사용하였다.
- ② Sample preparation : 수포화부탄을 3회 추출 후 감압농축 1mg시료를 100% Methanol 1ml에 녹인 후 sep-pak, 0.45 μ m filter로 처리하였다.
- ③ injection volume : 10 μ l
- ④ HPLC-data
Apparatus : Waters 1525 Binary HPLC pump, Waters 717plus Autosampler,
Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector.
column : Eurospher 100-5 C18 (250*3mm)
solvent system : A : Acetonitrile (HPLC용) / B : water (3차 증류수)
Flow rate : 0.8 ml/min
Run time : 180min
Detection : 203nm

Gradient :

Time	Flow	A% (ACN)	corve
0	0.8	17.0	6
25	0.8	30.0	6
50	0.8	40.0	6
90	0.8	60.0	6
100	0.8	80.0	6
140	0.8	80.0	6
145	0.8	100.0	6
155	0.8	100.0	6
170	0.8	17.0	6
180	0.8	17.0	6

3) 실험결과

(1) 미삼 동결건조물의 총 사포닌 함량

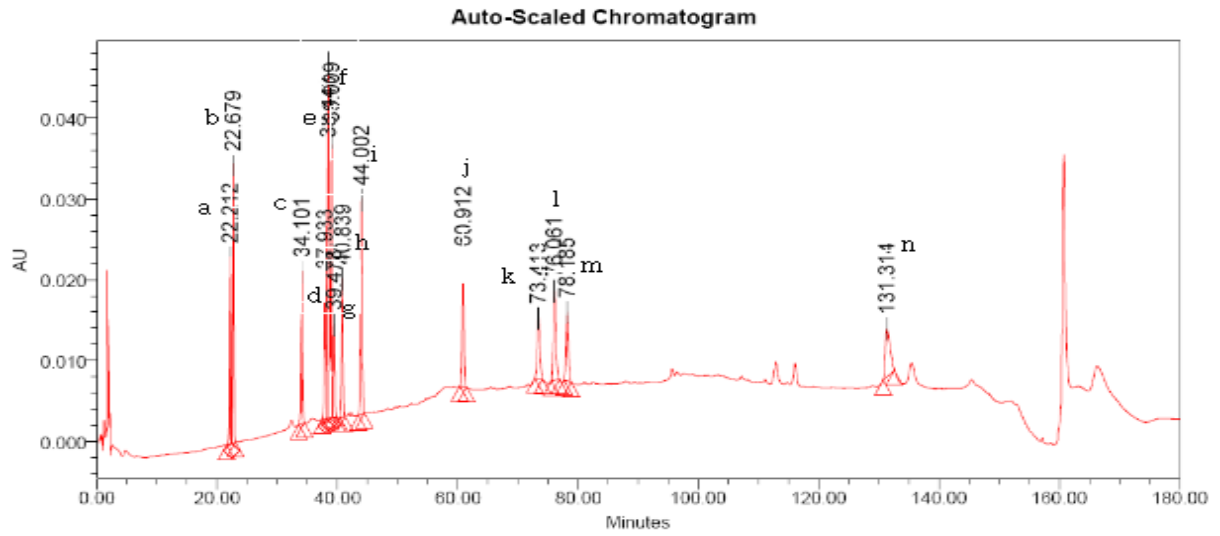
총 사포닌 함량은 식품공전의 조 사포닌 시험법에 따랐으며, 미삼 동결건조물의 총 사포닌 함량은 20.585%이었다.

(2) 1주차 발효물 분석결과

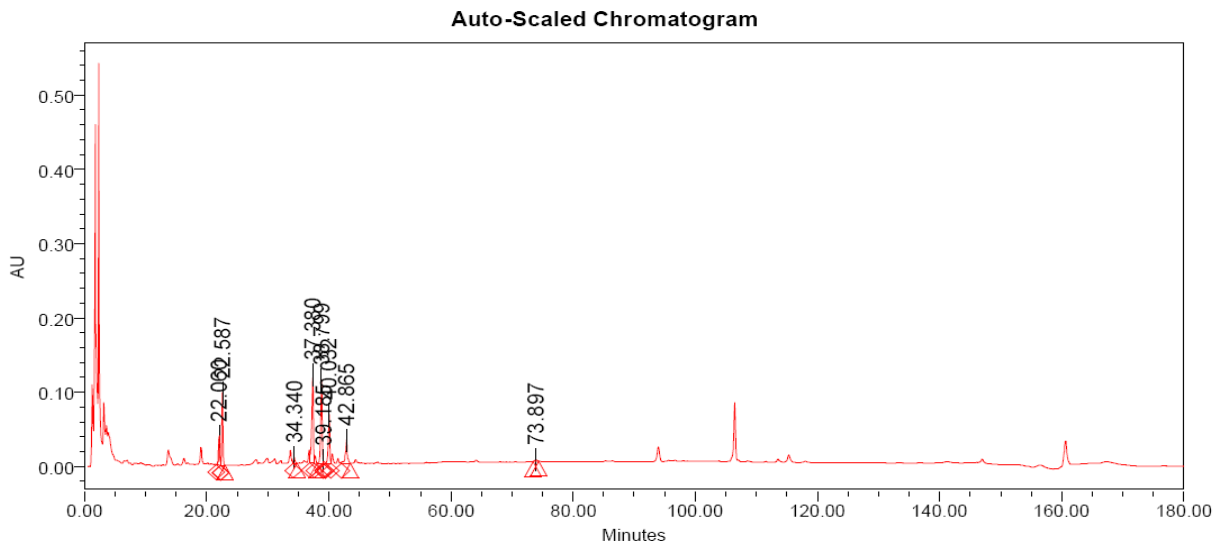
sample	sample name	ppm	조사포닌 함량(%)
1	mix14(standard)	각71.42857	
2	PDB배지 대조군 미삼 7일	10000	20.273
3	NB배지 대조군 미삼 7일	10000	28.061
4	monascus ruber 미삼 7일	10500	18.26
5	B.natto 미삼 7일	10000	30.612
6	Saccharomyces 11519 미삼 7일	7000	3.867

Table 4. 대조군 및 실험군

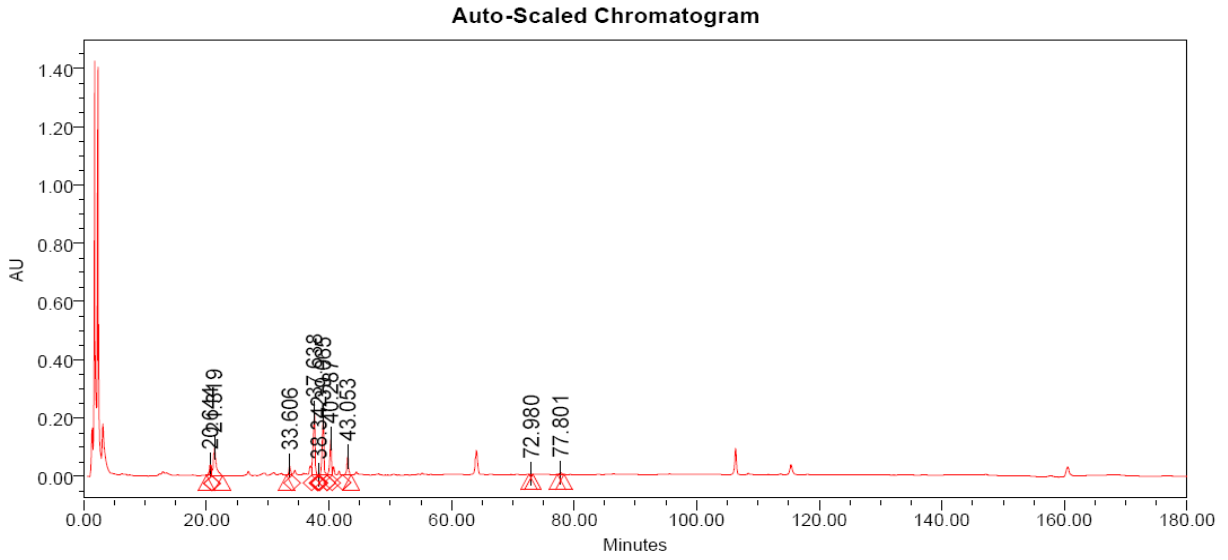
- ① Standard(Ginsenoside Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rh1, Rc, Rd, Rg3, PPD, PPT, Compound K, RH2) HPLC chromatogram



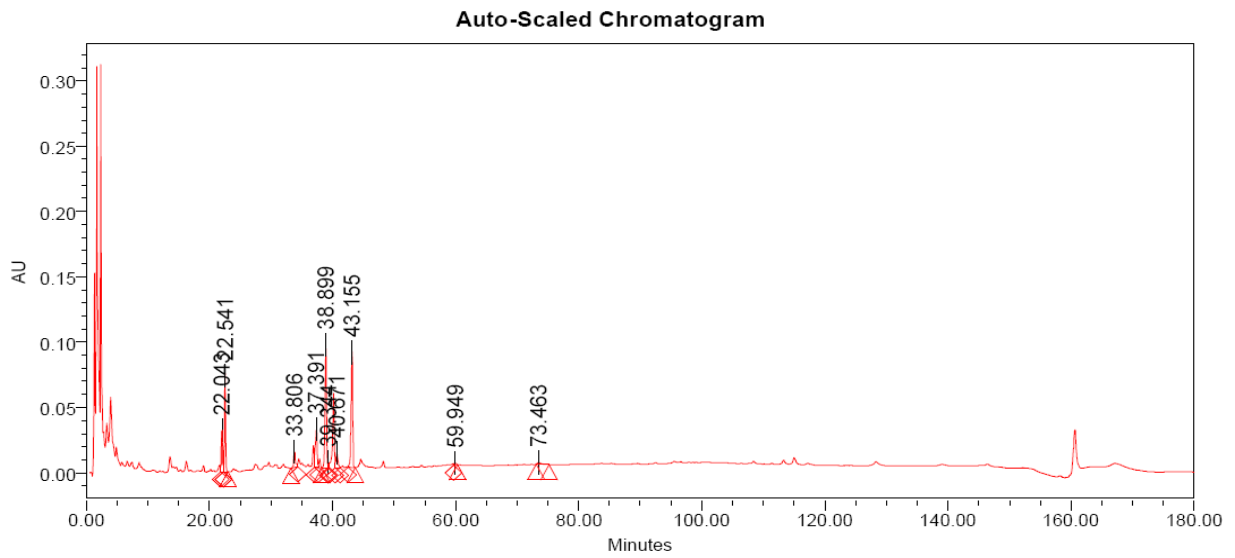
- ② PDB배지 대조군 미삼 7일



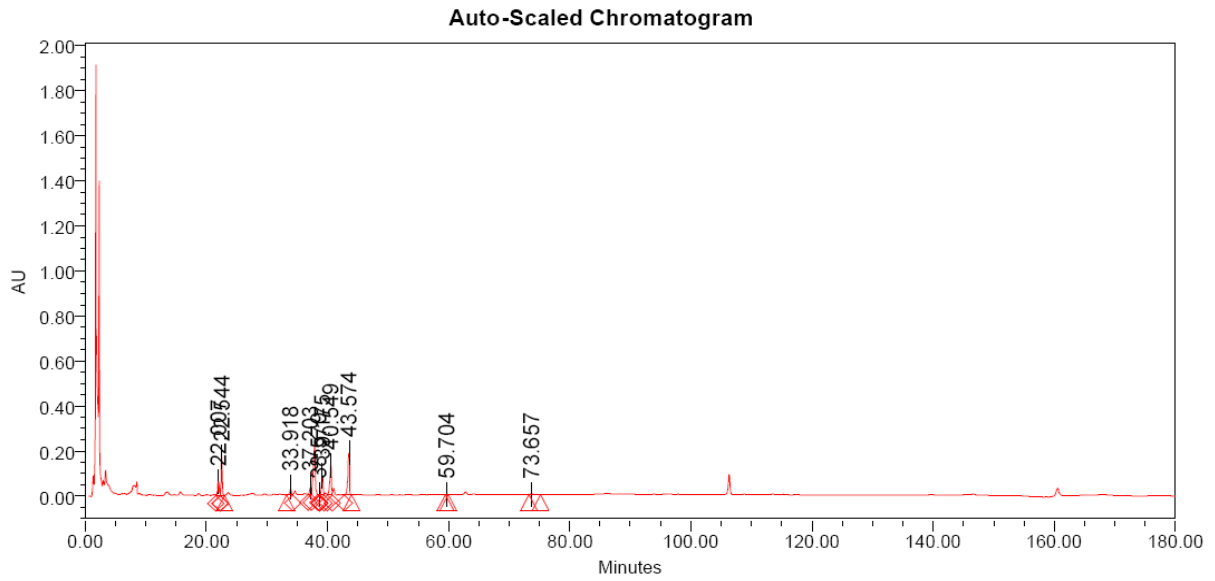
③ NB배지 대조군 미삼7일



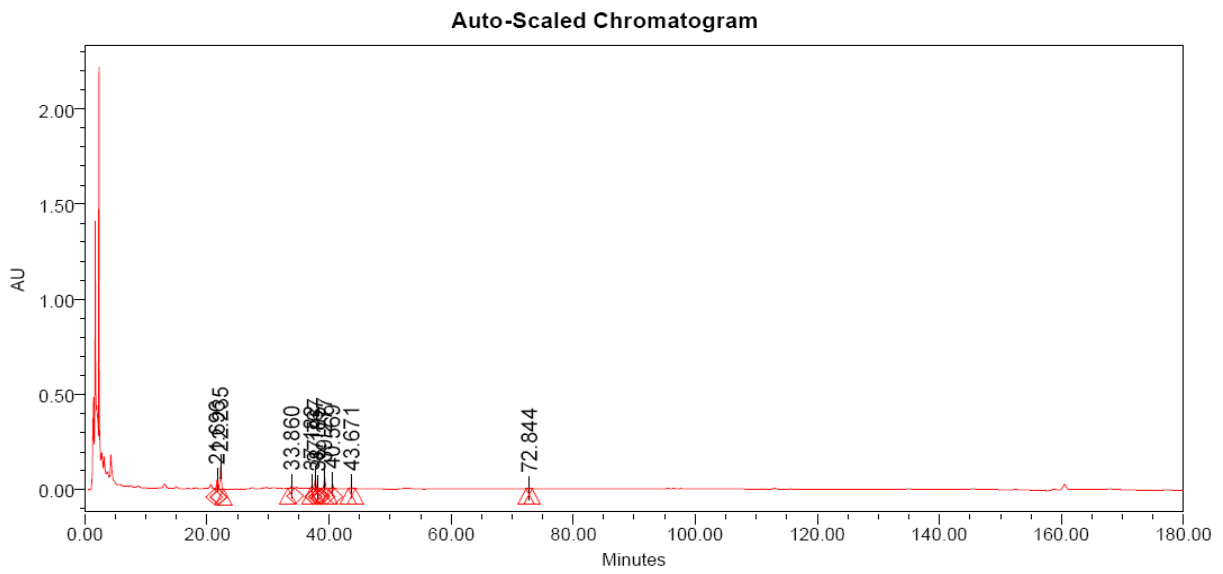
④ Monascus ruber 미삼 7일



⑤ *Bacillus natto* 미삼7일



⑥ *Saccharomyces cerevisiae* 11519 미삼7일



⑦ Sample군별 ginsenoside Area비교

Ginsenoside	Area 1	Area 2	Area 3	AV
Rg1	302690	314442	311552	309561.3
Re	448741	469937	463126	460601.3
Rf	499688	299073	298980	365913.7
Rb1	269026	270992	264628	268215.3
Rg2	743451	768310	763360	758373.7
Rh1	610203	620347	609525	613358.3
Rc	180267	178816	177917	179000.0
Rb2	255622	266289	265944	262618.3
Rd	421627	436163	429777	429189.0
Rg3	295602	307103	302611	301772.0
PPT	176247	220002	221488	205912.3
Compound K	325058	320700	312388	319382.0
Rh2	214236	221014	216778	217342.7
PPD	398053	320534	283322	333969.7

⑧ Sample군별 ginsenoside 함량비교(%)

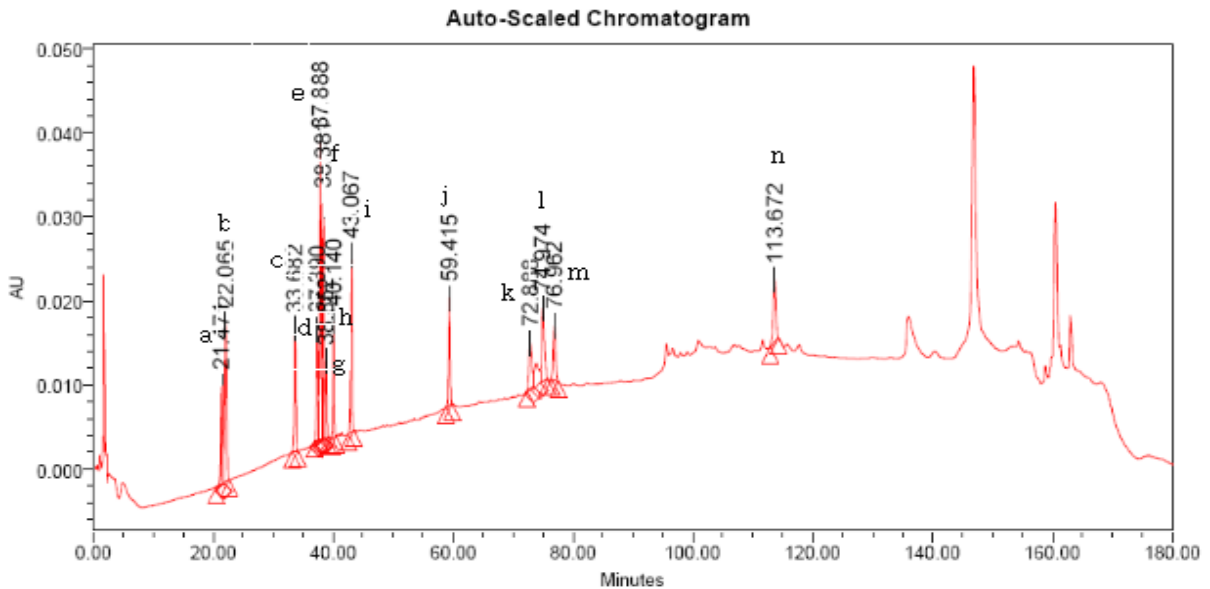
Ginse noside	(%, 평균함량w/표준편차w)				
	PDB 배지	NB배지	M. ruber	B. natto	S. cerevisiae 11519
Rg1	0.237± 0.036	0.659±0.100	0.178±0.007	1.495±1.317	0.093±0.009
Re	0.428± 0.017	1.231±0.067	0.275±0.005	1.779±0.996	0.154±0.001
Rf	0.097± 0.042	0.316±0.004	0.099±0.036	0.146±0.192	0.023±0.009
Rb1	0.847± 0.671	3.489±0.031	0.276±0.010	0.337±0.222	0.028±0.000
Rg2				0.550±0.740	0.033±0.025
Rh1	0.431± 0.003	0.008±0.000	0.327±0.016	0.270±0.351	0.005±0.001
Rc	0.028± 0.003	4.407±0.039	0.247±0.306	2.166±3.402	0.164±0.066
Rb2	0.577± 0.011	1.716±0.013	0.226±0.225	0.636±0.778	0.040±0.031
Rd	0.203± 0.027	0.575±0.006	0.478±0.025	1.267±1.771	0.022±0.000
Rg3			0.027±0.014	0.026±0.027	
PPT	0.050±0.005	0.041±0.030	0.028±0.012	0.136±0.012	0.010±0.000
com K					
Rh2		0.149±0.013			
PPD					

▶ 1주차 발효의 결과에 있어서 모든 균주들이 protopanaxadiol은 산생시키지 못하였다. 또한, protopanaxatriol에 있어서는 *Monascus ruber* 0.028%, *Saccharomyces cerevisiae* 11519는 0.01%로 나타났으나, 대조균인 PDB배지 0.05%에 비하여 줄어든 경향을 보였다. 그러나 *Bacillus natto*의 경우 protopanaxatriol에서 대조균은 0.041%인데 비하여 실험균은 0.136%로 3배정도 증가한 수치를 보였다. 이와 같은 결과로부터 1주차 발효에 있어서는 *Bacillus natto*가 비교적 우수한 발효균으로 확인되었다.

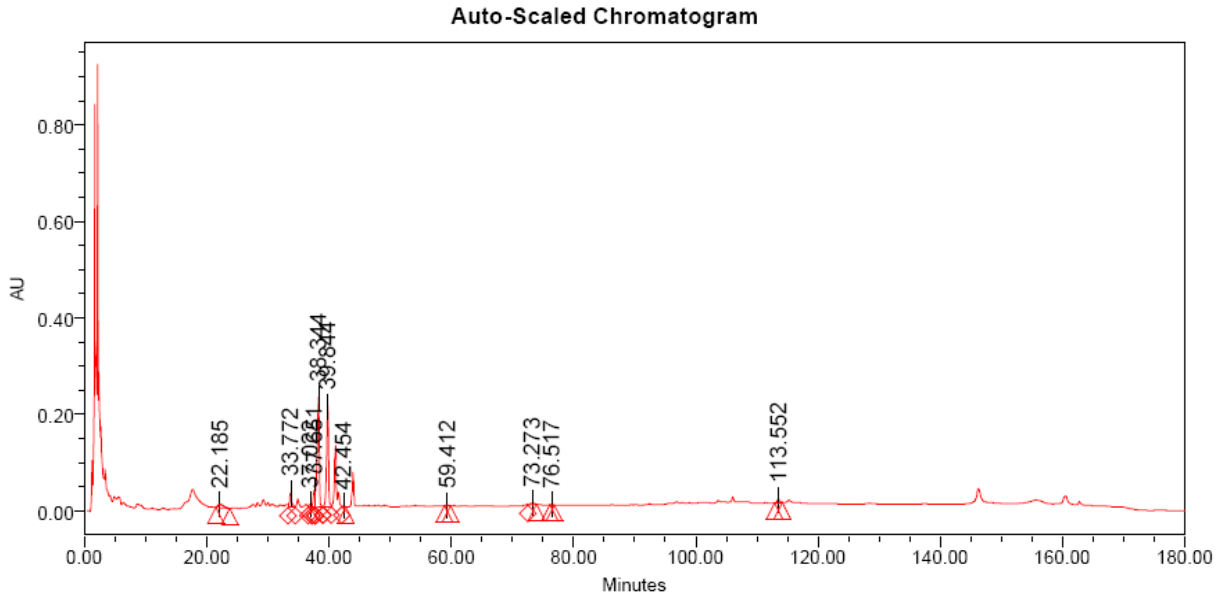
(3) 2주차 발효물 분석결과

Sample	sample name	ppm	조사포닌함량 (%)
1	mix14	각71.42857	
2	PDB배지 대조군 미삼 14일	10000	15.126
3	NB배지 대조군 미삼 14일	10000	20.236
4	Monascus ruber 미삼 14일	10000	20.2878
5	B.natto 미삼 14일	10000	40.153
6	Saccharomyces 61519 미삼 14일	2100	24.706

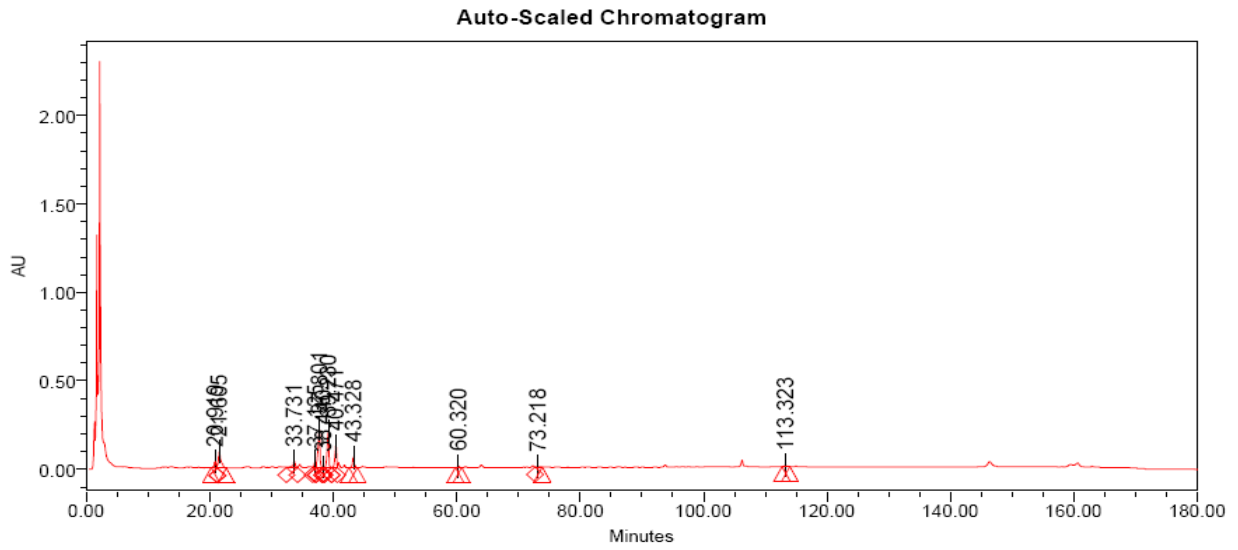
① Standard(Ginsenoside Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rh1, Rc, Rd, Rg3, PPD, PPT, Compound K, RH2) HPLC chromatogram



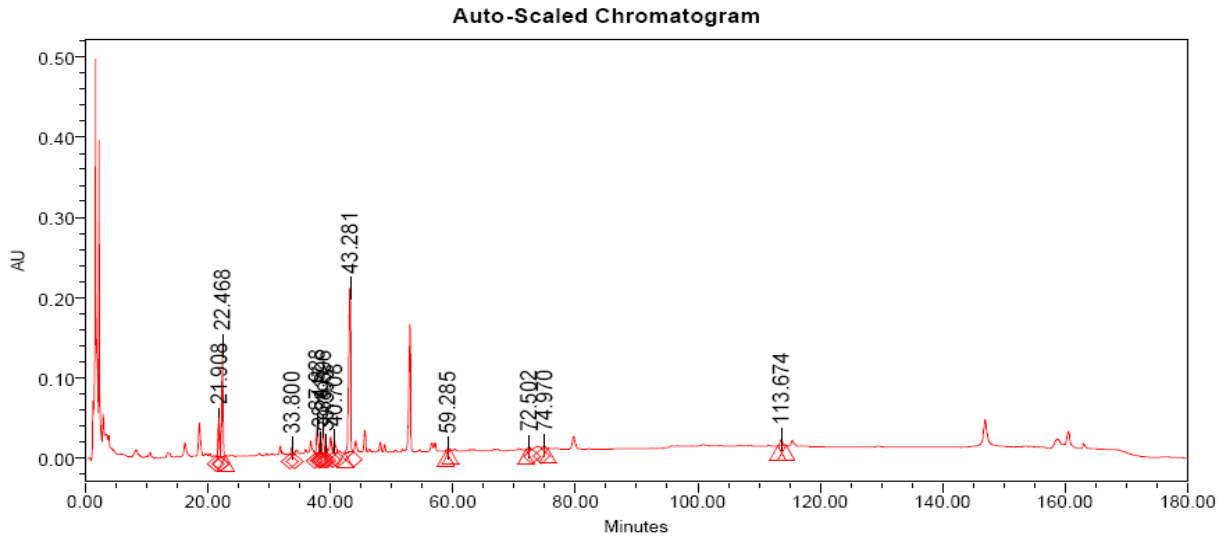
② PDB배지 대조군 미삼 14일



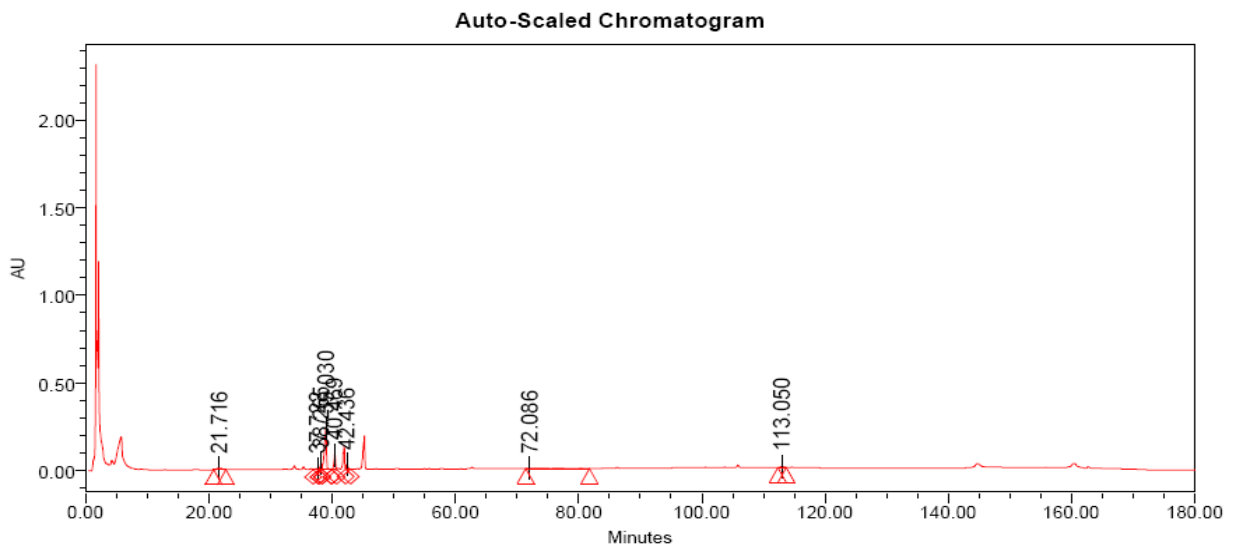
③ NB배지 대조군 미삼 14일



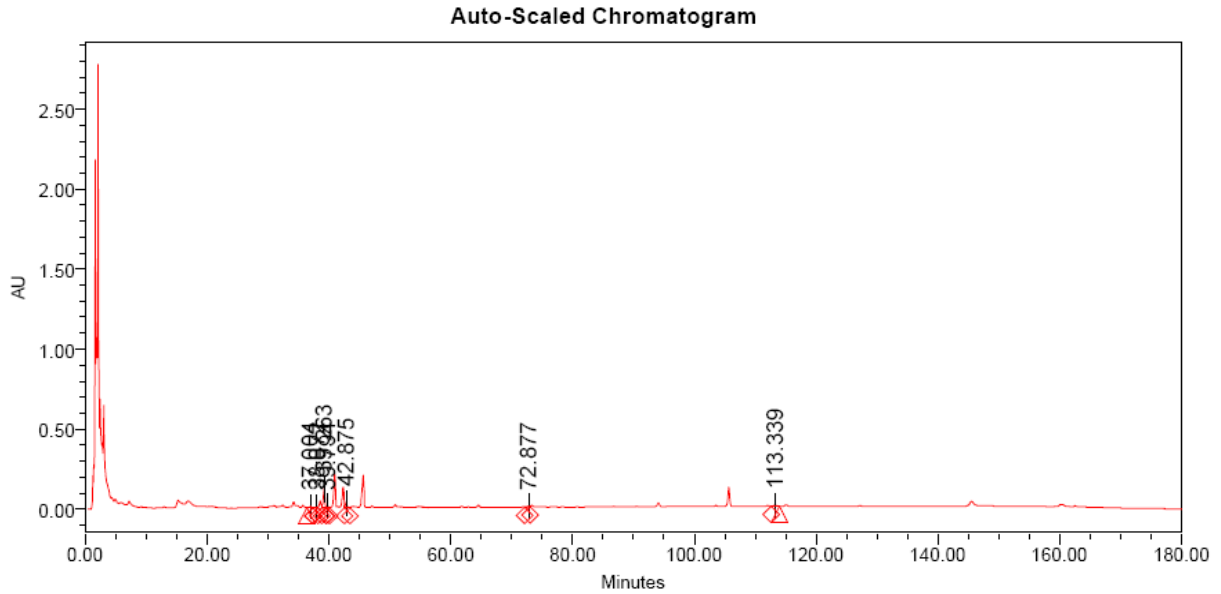
④ monascus ruber 미삼 14일



⑤ B.natto 미삼 14일



⑥ Saccharomyces 11519 미삼 14일



⑦ Sample군 별 ginsenoside Area비교

Ginsenoside	Area 1	Area 2	Area 3	AV
Rg1	618367		233510	425938.5
Re	356593		382951	369772
Rf	226843		237122	231982.5
Rb1	307987	557251	221804	362347.3
Rg2	636721	707808	612881	652470
Rh1	490489		487509	488999
Rc	135686	172277	140027	149330
Rb2	201314		212295	206804.5
Rd	317710	340254	331484	329816
Rg3	240061	241255	241312	240876
PPT	277288	175678	166982	206649.3
Compound K	222218	283887	290464	265523
Rh2	160483	172705	173575	168921
PPD	293363	207881	214564	238602.7

⑧ Sample군별 ginsenoside 함량비교(%)

(% , 평균 함량w/표준편차w)					
Ginse noside	PDB 배지	NB배지	M. ruber	B. natto	S. cerevisiae 11519
Rg1		0.277±0.001	0.229±0.032		
Re	0.141±0.009	1.066±0.028	0.838±0.049	0.292±0.075	
Rf	0.354±0.054	0.525±0.211	0.104±0.012	0.592±0.064	3.502±0.124
Rb1	0.050±0.015	0.245±0.001	0.267±0.003		
Rg2	0.107±0.025	1.101±0.067	0.053±0.001	0.044±0.043	
Rh1	1.235± 0.019	0.562±0.775	0.177±0.002	0.381±0.048	0.955±0.745
Rc		3.160±0.933	0.169±0.005	10.74±1.211	12.31±0.704
Rb2	2.421± 0.017	1.539±0.029	0.263±0.003	1.955±0.071	80.67±113.2
Rd	0.013± 0.002	0.534± 0.01	2.006±0.020	0.483±0.011	1.047±0.654
Rg3	0.019± 0.010	0.110± 0.01	0.035±0.000		
PPT	0.088± 0.025	0.088± 0.02	0.067±0.001	0.437±0.241	0.651±0.005
com K			0.063±0.003		
Rh2	0.012± 0.003				
PPD	0.097± 0.012	0.128±0.003	0.134±0.002	0.263±0.004	0.950±0.179

▶ 1주차 발효 결과에서 모든 균주들이 protopanaxadiol을 산생시키지 못하였으나, 2주차 발효의 결과에 있어서는 모든 균주들이 protopanaxadiol을 산생시켰다. 함량은 *Monascus ruber* 0.134%, *Saccharomyces cerevisiae* 11519 0.950%로서 대조군인 PDB배지 0.097%보다 *Monascus ruber*는 1.4배, *Saccharomyces cerevisiae* 11519는 10배가량 많았으며 *Bacillus natto*는 0.263%로서 대조군인 NB배지 0.128%보다 2배가량 많았다.

▶ 또한, protopanaxatriol에 있어서는 *Monascus ruber* 0.067%, *Saccharomyces cerevisiae* 11519는 0.651%로 나타나 대조군인 PDB배지 0.088%보다 *Saccharomyces cerevisiae* 11519가 7.3배가량 많은 함량을 나타내었으며 *Bacillus natto*는 0.437%로서 대조군인 NB배지 0.088%보다 5배가량 많은 함량을 나타내었다.

▶ 위와 같은 결과를 토대로 보았을 때 1주, 2주차에서 protopanaxadiol, protopanaxatriol의 함량이 꾸준한 증가를 보인 *Bacillus natto* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 11519가 우수한 발효균으로 확인되었다.

3. 결론

이번 실험에서는 인삼에 함유되어 있는 ginsenoside들의 당기를 효율적으로 제거할 수 있는 미생물을 찾고자 하였다.

처음으로 esculin배지에서 glucose를 분해하는 효소인 β -glucosidase생산능력을 plate상에서 측정한 결과 B.natto, S.cerevisiae가 β -glucosidase생산능력이 뛰어났으며, 과거 연구를 통하여 β -glucosidase생산능력은 떨어지지만 glucose 분해능력이 뛰어났었던 M.ruber를 1차적으로 선별하였다.

1차 선별된 균주들을 각각의 배지에서 배양하여 미삼에서 생물전환 능력을 측정한 결과 Bacillus natto 및 Saccharomyces cerevisiae는 protopanaxadiol, protopanaxatriol의 함량이 꾸준한 증가를 보인 반면 M.ruber는 protopanaxadiol, protopanaxatriol로 생물전환 시키지 못하였다.

따라서, 미삼에 함유되어 있는 saponin배당체를 aglycon형태인 protopanaxadiol, protopanaxatriol을 효율적으로 생물전환 시키는 균주인 Bacillus natto 및 Saccharomyces cerevisiae를 최종 발효균주로 선정하였다.

제 3 절. 균주 개량

1. 목적

앞서 최종발효균주로 선정된 *Bacillus natto* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 중 사업계획서에서 선정하였던 *Bacillus natto* 균주를 중심으로 계대배양 함으로서 생물전환 능력이 뛰어난 균주로의 개량을 목적으로 한다.

2. 실험방법

가. 미삼 농축액 제조

- ① 미삼 300g을 정밀하게 칭량하여 분쇄한다.
- ② 분쇄한 미삼 300g을 20L round flask에 넣는다.
- ③ round flask에 70%ethanol 2.0L를 넣고 48시간 냉침한다.
- ④ 냉침 후 100℃에서 5시간 동안 환류추출을 한다.
- ⑤ 추출이 끝난 후 여과(No.51, 110mm)하고, 농축하여 시료로 사용한다.
총 농축액: 110ml, Brix: 43

※수득율

※ 300g의 미삼 70%ethanol 추출물의 농축 중량 = 110ml

$$\frac{110}{300} \times 100 = 36.66 \%$$

나. 액체 배지조제

- ① 1000ml bottle 2개에 각각 NB(Nutrient broth)4g을 정밀하게 칭량하여 넣는다.
- ② 각 bottle에 증류수 500ml씩 넣고 가운하여 녹인다.
- ③ 마개를 느슨하게 막고 미리 셋팅된 autoclave에 넣어서 121℃에 15분간 고압멸균을 실시한다.
- ④ 멸균이 된 배지용액은 밀봉하여 보관한다.

다. B.natto균주의 개량

1주, 2주차까지 사용하였던 균주를 plate에 계대배양을 하였다.

- ① clean beach안에서 NB배지를 준비된 250ml baffle flask에 50ml를 넣었다.
- ② Plate에 계대하였던 B.natto균을 각각의 baffle flask에 접종하였다.
- ③ 접종한 후 균주에 맞는 온도 조건이 일정하게 유지된 shaking incubator에 넣고 24시간 동안 배양하였다.

No.	Name	KCCM	배지	배양 및 발효조건	
				온도	습도
1	Bacillus natto		NB	35	60%

- ④ 미삼농축액 5ml를 baffle flask에 넣은 후 NB배지 40ml 및 균주배양액 5ml를 가하고 배양조건에 맞추어 4일간 배양하였다.
- ⑤ ④번의 공정 중 NB배지 대신 증류수양을 100%까지 점차적으로 늘려가며 균주를 계대배양 하였다.

라. B.natto의 계대배양 전, 후 fermentation

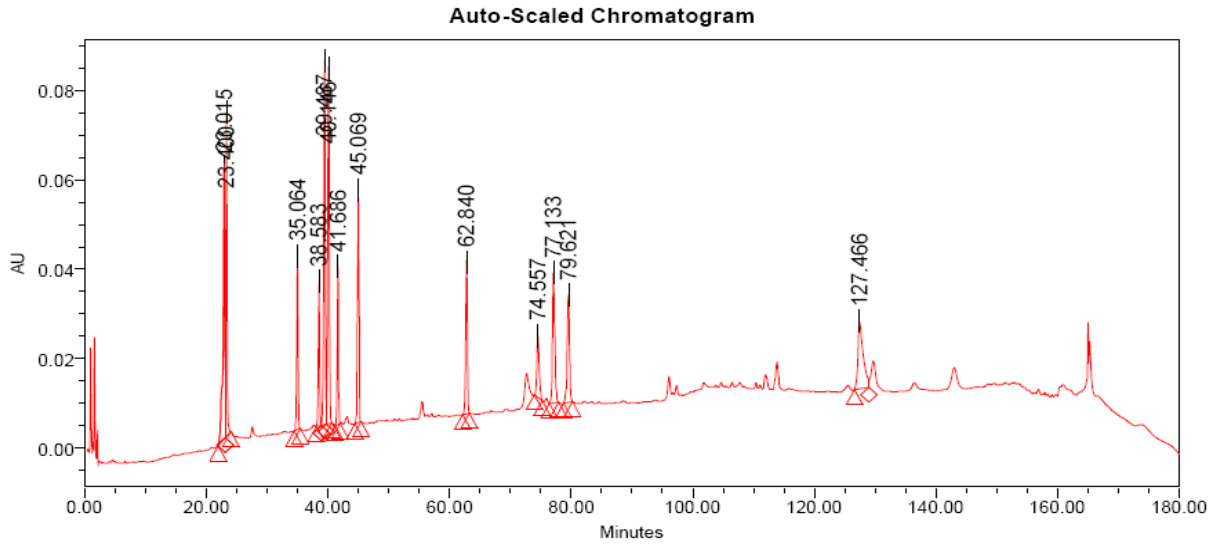
- ① baffle flask 3개에 NB배지 40ml을 넣었다.
- ② 배지가 담긴 3개의 baffle flask에 증류수5ml, 미삼동결건조물 5ml 및 균주배양액 5ml씩을 가하였다.

Sample	sample name
1	NB배지+미삼농축액5ml+증류수 5ml
2	NB배지+미삼농축액5ml+B.natto(계대배양전)5ml
3	NB배지+미삼농축액5ml+B.natto(계대배양후)5ml

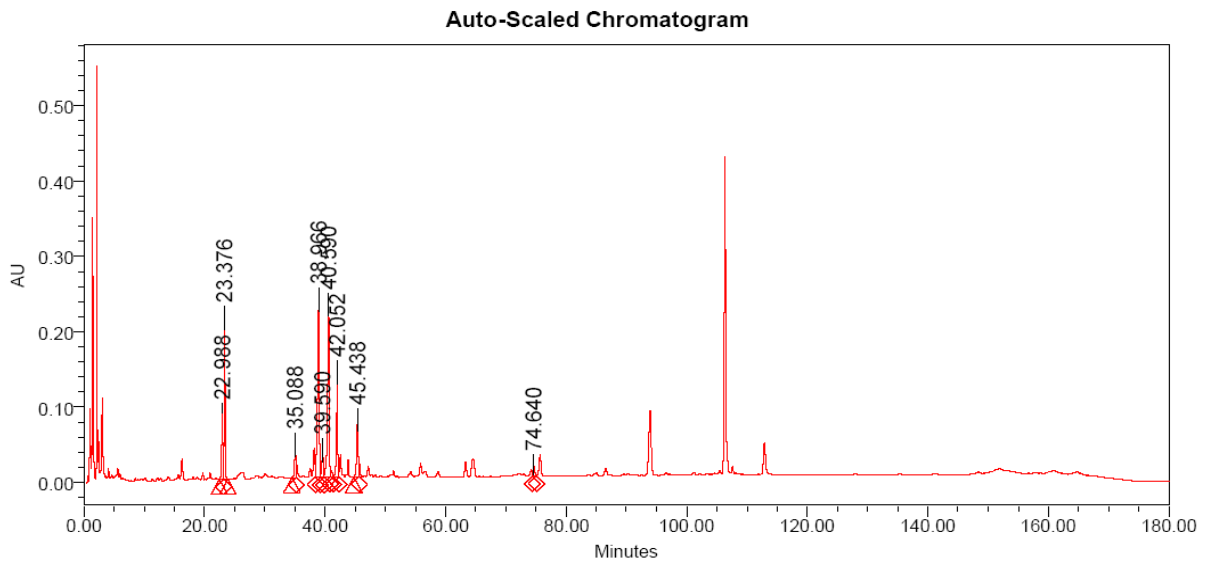
- ③ 각 flask를 균주의 발효조건에 맞추어 7일간 shacking incubator에서 발효하였다.
- ④ 발효가 끝난 후 15ml conical tube에 sample 15ml을 채취하였다.
- ⑤ 채취한 sample은 냉장상태로 보관, 분석하였다.

3. 실험결과

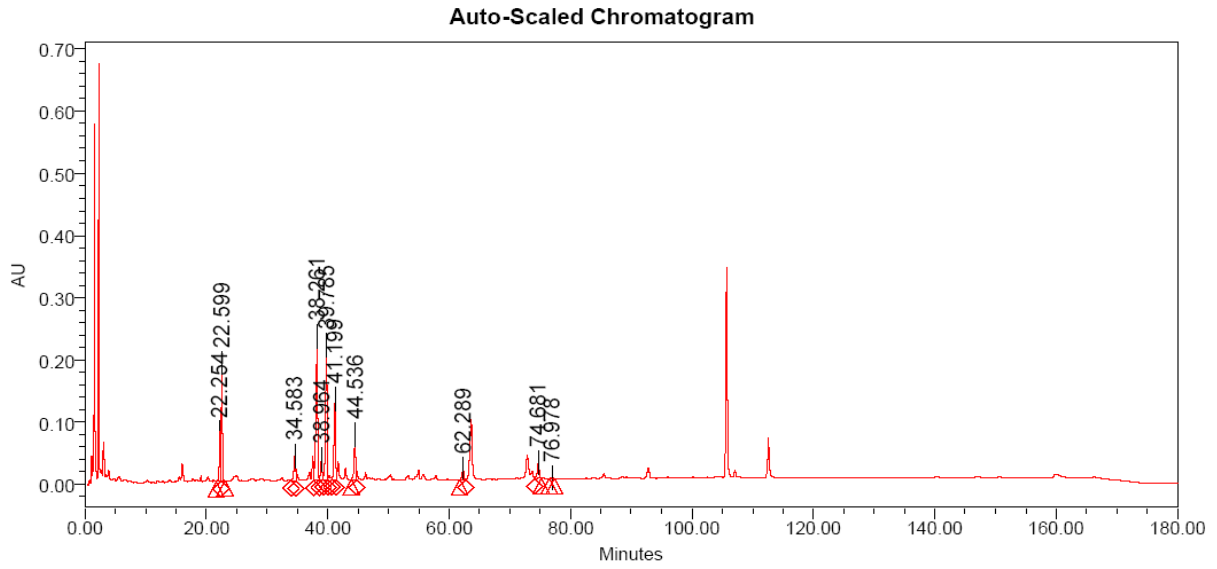
① Standard(Ginsenoside Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rh1, Rc, Rd, Rg3, PPD, PPT, Compound K, RH2) HPLC chromatogram



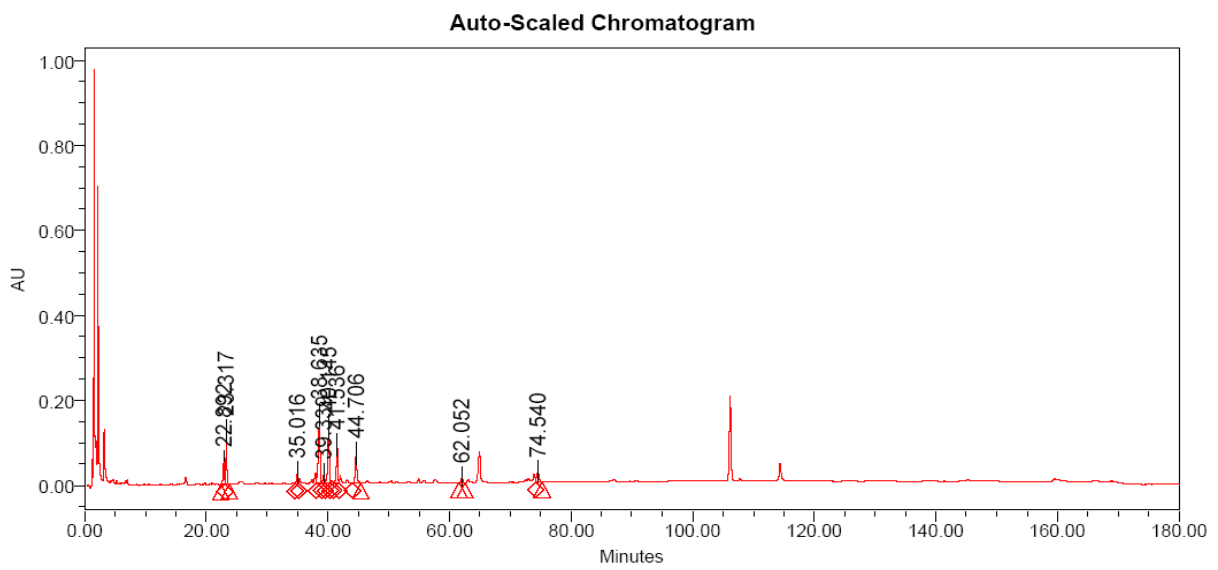
② 대조군



③ 실험군1(계대배양 전)



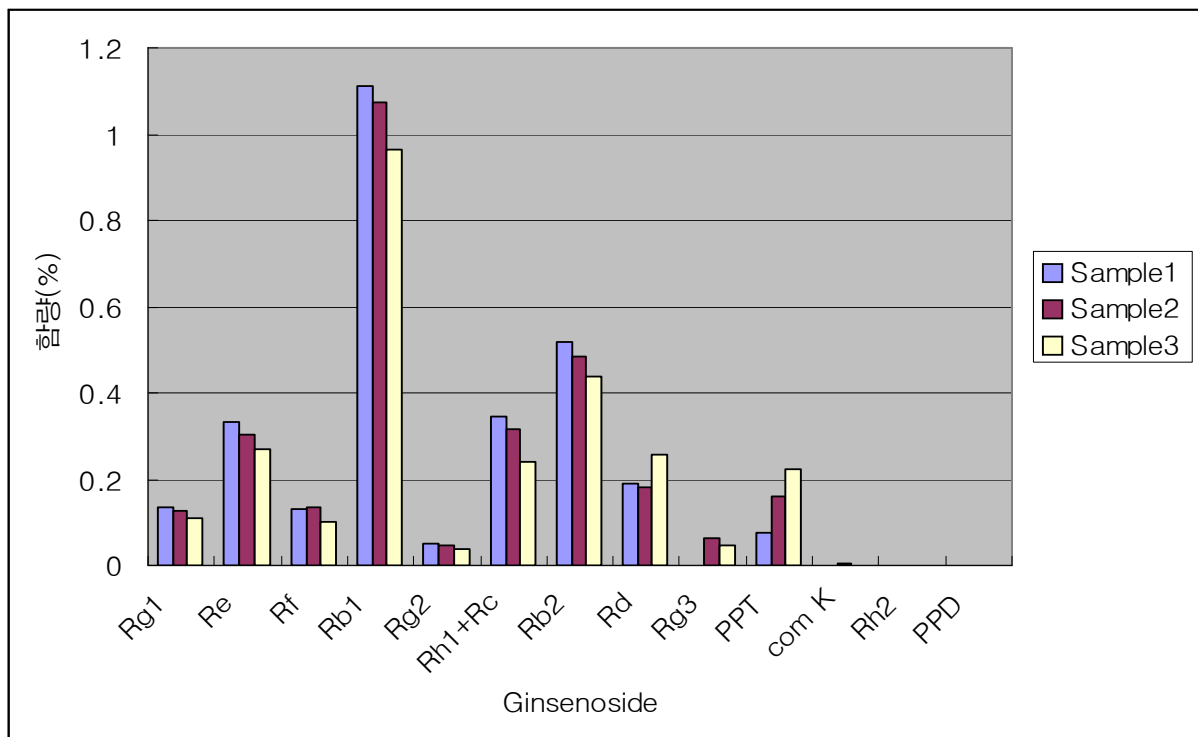
④ 실험군2(계대배양 후)



⑤ Sample군별 ginsenoside 14종 함량(%)

Ginse nosides	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Rg1	0.136785	0.127795	0.110988
Re	0.333620	0.301902	0.271161
Rf	0.130185	0.135434	0.100319
Rb1	1.111727	1.075330	0.964908
Rg2	0.050165	0.048361	0.038708
Rh1+Rc	0.343684	0.315297	0.238850
Rb2	0.518327	0.482356	0.437300
Rd	0.187624	0.182314	0.255386
Rg3		0.064058	0.046936
PPT	0.076624	0.159569	0.222327
com K		0.006283	
Rh2			
PPD			

⑥ Sample군별 ginsenoside 14종 함량그래프



▶ 위의 그래프에서 알 수 있듯이 인삼사포닌 배당체인 ginsenoside(Rg1, Re, Rf, Rb1등) 대부분의 함량이 내려가며 인삼사포닌 비당체인 PPT의 함량이 대조군 < 계대배양전 B.natto < 계대배양후 B.natto 순으로 점차 높아지는 것을 알 수 있다.

4. 결론

B.natto를 계대배양을 통하여 균주를 개량하고 개량 전, 후를 분석하는 실험을 진행하였다.

그 결과, 우리가 목적으로 하는 물질인 PPD, PPT중 PPD는 개량 전, 후에도 전혀 나타나지 않았으며 PPT의 경우는 함량이 개량전에는 0.1595%이고 개량후에는 0.2223%로서 유의적으로 늘어나는 경향을 나타냈다.

그러나 전환율을 조금 더 높일 수 있는 추가적인 연구가 필요하다.

제 4 절. 최적발효법 연구 및 물질분석

1. 목적

- 1) 최종 선별된 균주를 통하여 인삼 사포게닌의 함량을 최대로 함유하는 인삼조성물을 얻기 위하여 액상발효 및 고상발효를 통해 최적의 발효조건 확립
- 2) 액상발효 및 고상발효에서 얻어진 물질의 분리 및 동정을 통하여 aglycon을 확인하고 최적의 발효법을 선별한다.

2. 실험내용

가. 액상발효실험

1) 실험방법

(1) 미삼 동결건조물

미삼은 금산농협협동조합에서 10월 말경에 구입하여 사용하였다.

- ① 미삼 773g을 정밀하게 칭량하여 부직포에 담았다.
- ② 부직포에 담은 미삼과 70%에탄올 7.7L(10배수)를 약탕기에 넣은 후 100℃에서 5시간 추출하였다. (이때, 약탕기는 순환식이 아닌 감압식으로 추출하였다.)
- ③ 추출 후 냉각하여 부직포로 여과하였다.
- ④ 5A(110mm, 7um)여과지로 다시 여과하였다.
- ⑤ 여과된 액을 모아 water bath 70℃에서 감압농축 하였다.
- ⑥ 농축액을 선반동결건조 하였다. (충청북도 전통의약산업센터 의뢰)

(2) 선정 균주 2종 배양

- ① clean beach안에서 PDB배지 및 NB배지를 준비된 250ml baffie flask에 각각 50ml씩 넣었다.
- ② 선정한 균주 2종을 각각의 배지에 맞는 baffie flask에 접종하였다.
- ③ 접종한 후 각 균주에 맞는 온도 조건이 일정하게 유지된 shacking incubator에 넣고 48시간동안 배양하였다.

No.	Name	KCCM	배지	배양 및 발효조건	
				온도	습도
1	Sacchromyces cerevisiae	11519	PDB	28	60%
2	Bacillus natto(개량 후)		NB	35	60%

(3) 미삼동결건조물 액상발효

- ① 미삼동결건조물 35g을 3차 증류수 350ml에 완전히 용해시킨다.
- ② 6개의 baffle flask에 각 50ml씩 채취한다.
- ③ 각 flask에 접종할 균주의 이름을 적고 48시간 배양시킨 seed culture 5ml을 접종하였다.
- ④ 균주가 접종된 각 flask를 발효조건에 맞는 온도에서 7일간 shaking incubator 에서 발효하였다.
- ⑤ 7일간 배양 후 각 sample을 7um여과지로 여과하였다.
- ⑥ 각 Sample의 여과액을 농축플라스크에 각각 옮긴다.
- ⑦ water bath 70℃에서 감압농축 하였다.
- ⑧ 플라스크를 실온으로 한 후 sample로 사용하였다.

Sample No.	Sample name
Sample 1	미삼동결건조물
Sample 2	B.natto 접종 7일 발효
Sample 3	B.natto 접종 7일 발효
Sample 4	S.cerevisiae 접종 7일 발효
Sample 5	B.natto 및 S.cerevisiae 접종 7일 발효
Sample 6	B.natto 접종 7일 발효 후 S.cerevisiae 접종 7일 발효

(4) 시료전처리 및 HPLC분석조건

■시료의 전처리

- ① Ginsenoside 14종 표준품으로 Calibration curve를 그린다.
- ② Sample 약50mg을 팔콘튜브에 취하여 3차 증류수 10ml에 녹인다.
- ③ 3차 증류수 10ml에 수포화부탄올 25ml를 가하여 강하게 진탕혼합한다.
- ④ 진탕혼합 후 4000rpm에서 5분간 2회 원심분리 한다.
- ⑤ 원심분리 후 상등액을 농축플라스크에 정밀히 취한다.
- ⑥ ③~⑤의 공정을 2회 더 실시한다.
- ⑦ 농축플라스크에 모은액을 water bath 60℃에서 감압농축한다.
- ⑧ 완전히 감압농축 후 MeOH 20ml를 가하여 녹인다.
- ⑨ MeOH에 녹인 액을 0.45um syringe filter하여 HPLC에 injection한다.

■ 분석조건

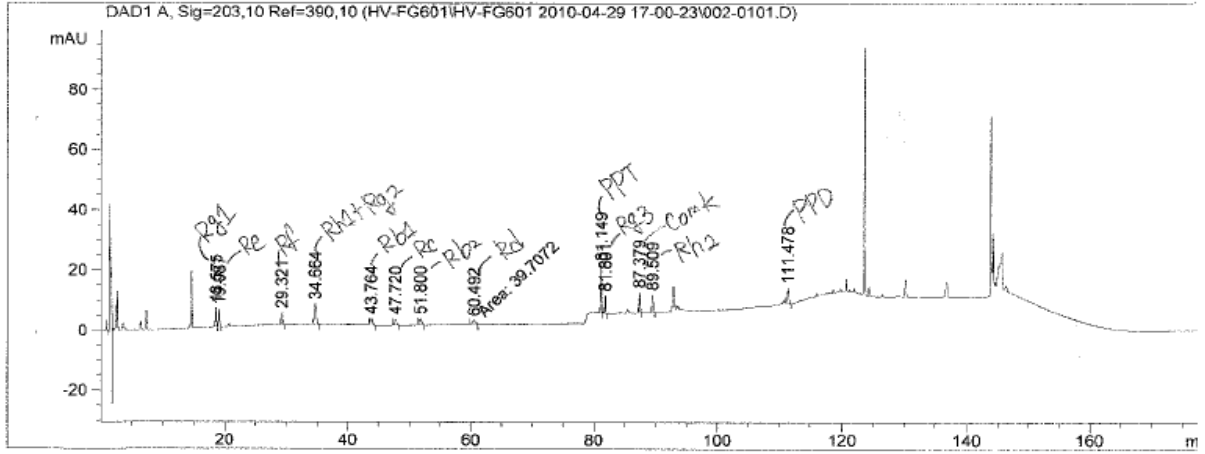
- * HPLC system: Agilent 1200 Series LC System & Modules
- * Column: Fortis C18 (150 x 3.6mm, 3 μ m)
- * Mobile Phase (A): Acetonitrile
- * Mobile Phase (B): Water
- * Detection wavelength(검출파장): 203nm
- * Injection volume(시료주입량): 10 μ l
- * Column temperature(컬럼온도): 30 $^{\circ}$ C

Gradient:

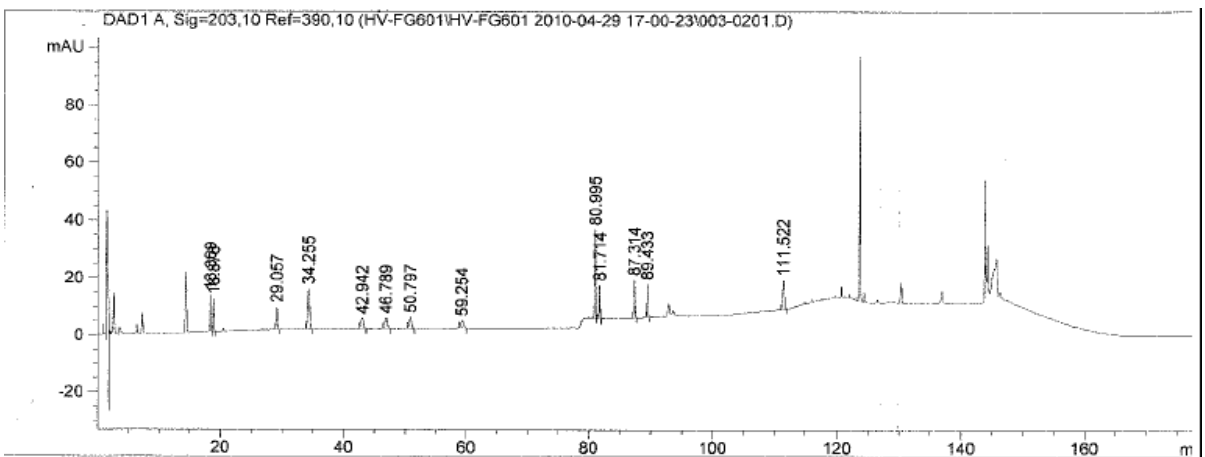
Time	A(%)	B(%)	Flow
0	17	83	0.6
25	30	70	0.6
75	35	65	0.6
76	50	50	0.6
100	60	40	0.6
110	70	30	0.6
120	100	0	0.6
140	100	0	0.6
160	17	83	0.6
180	17	83	0.6

2) 실험결과

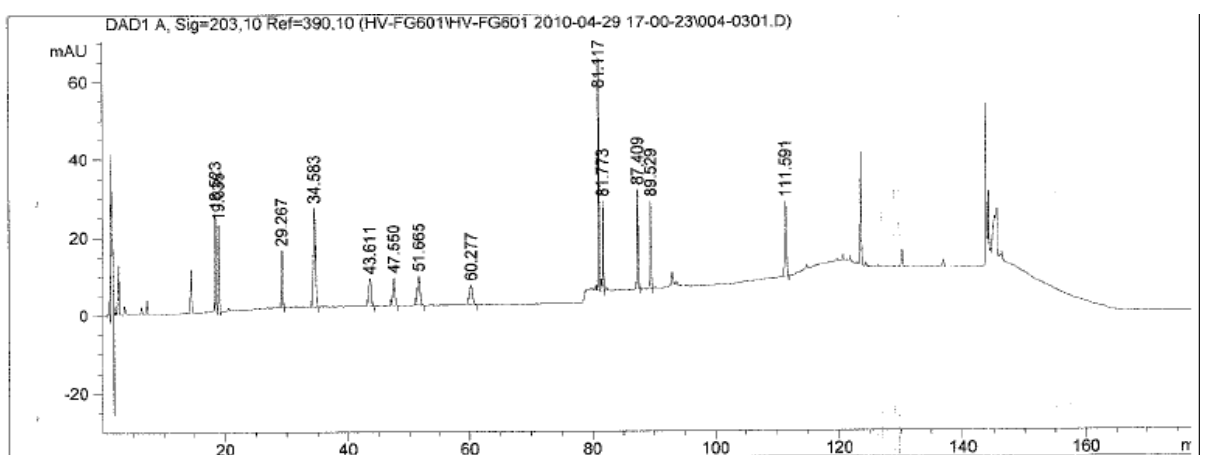
① STD 1



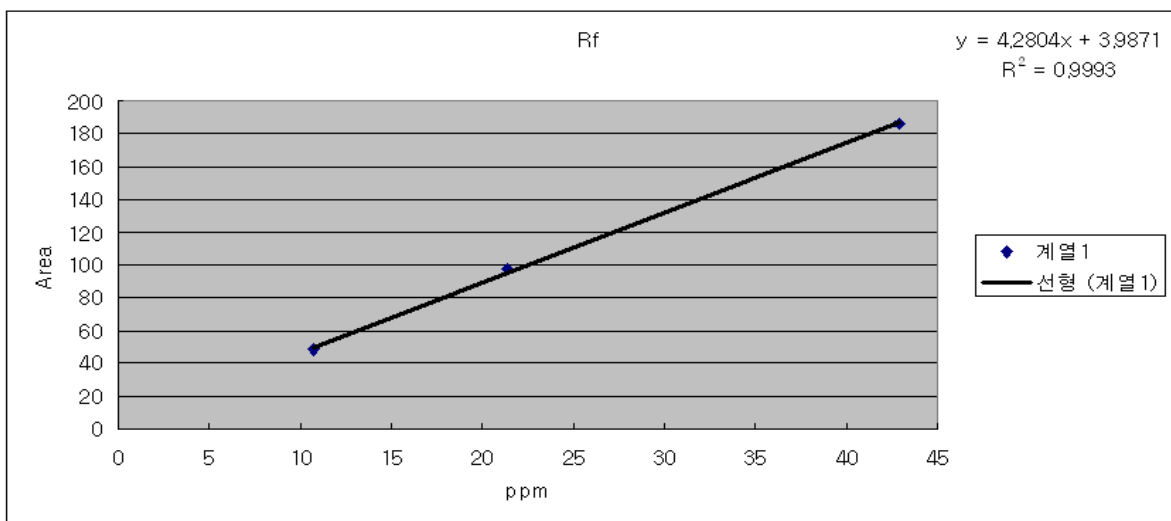
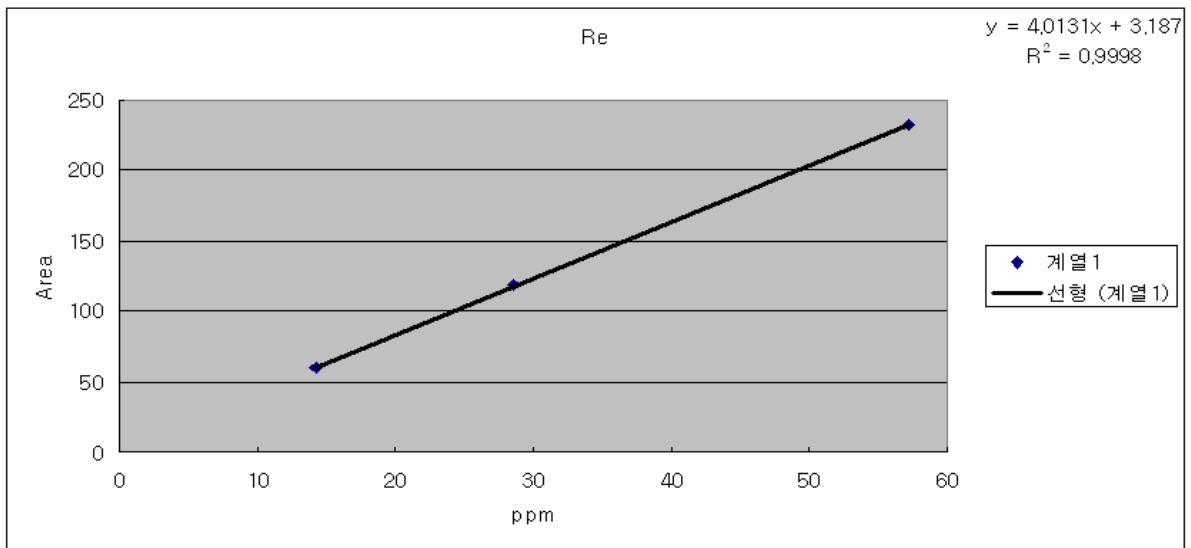
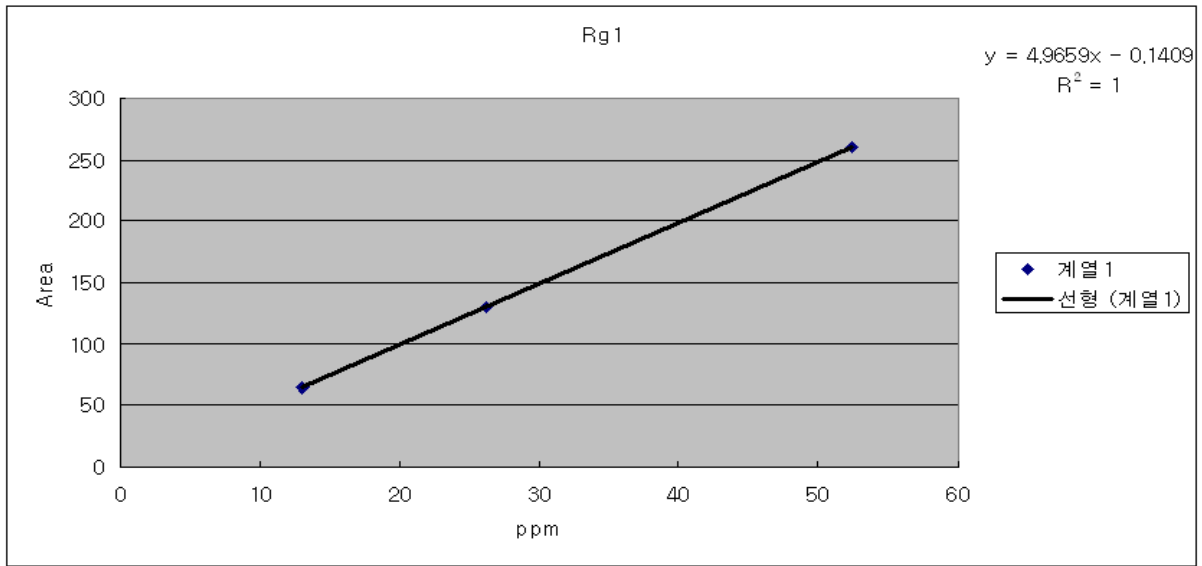
② STD 2

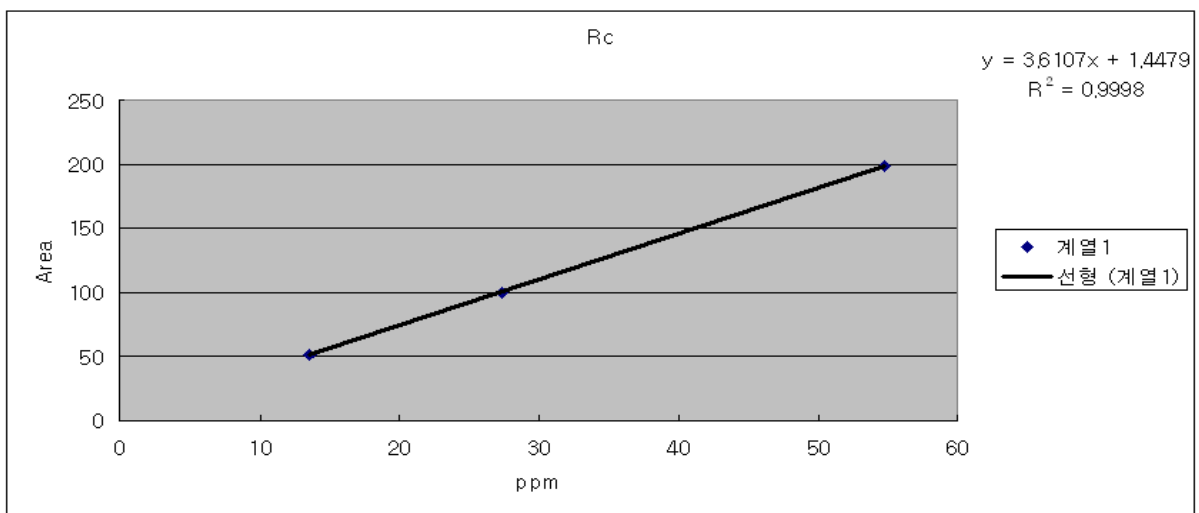
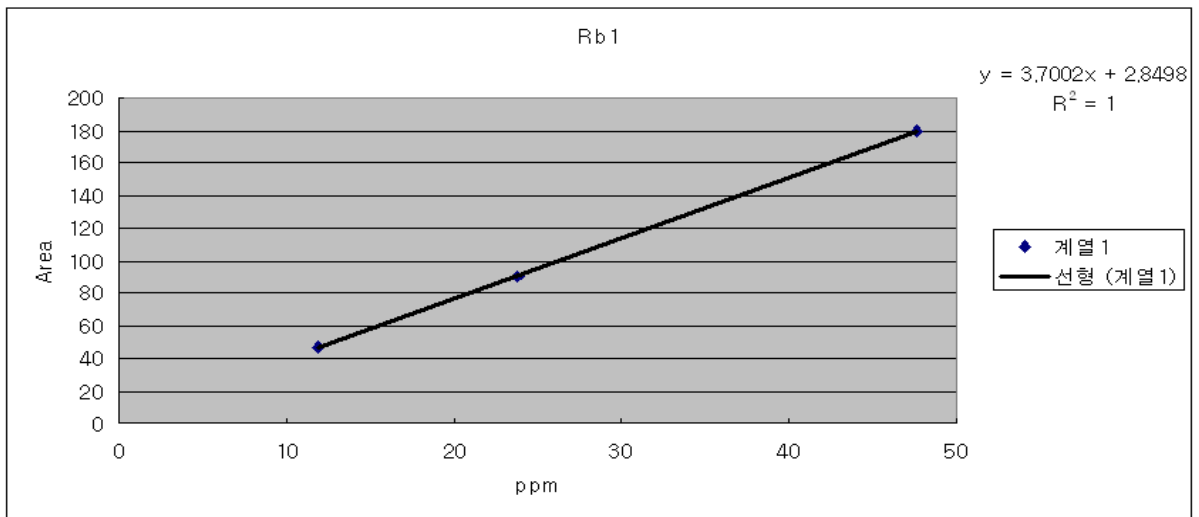
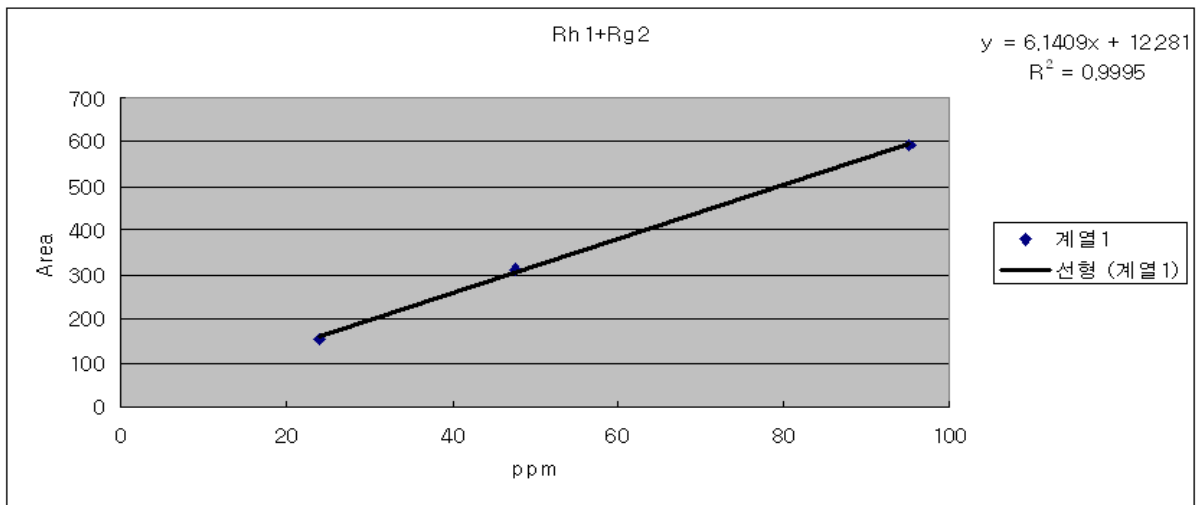


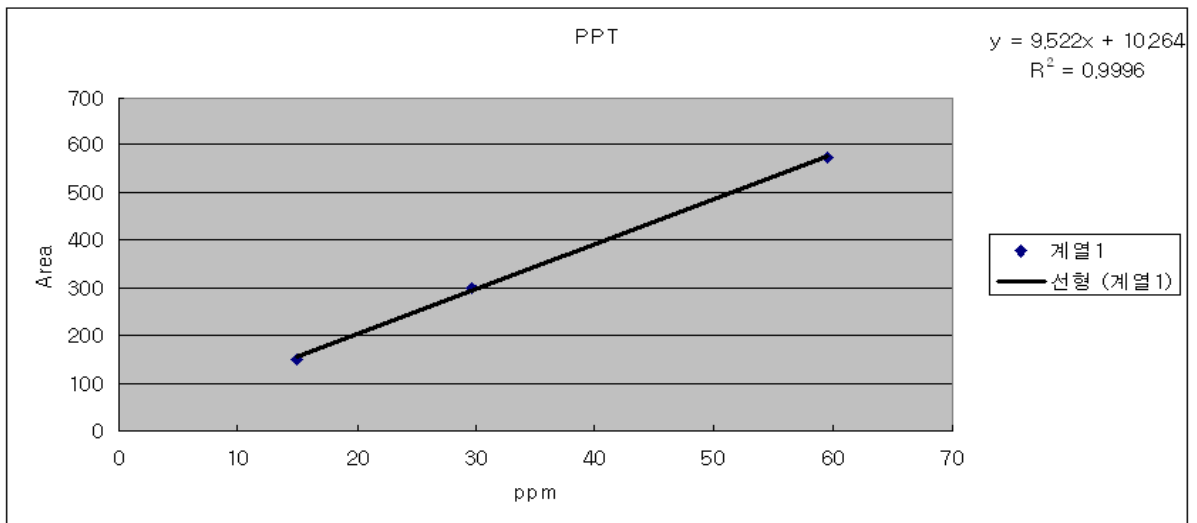
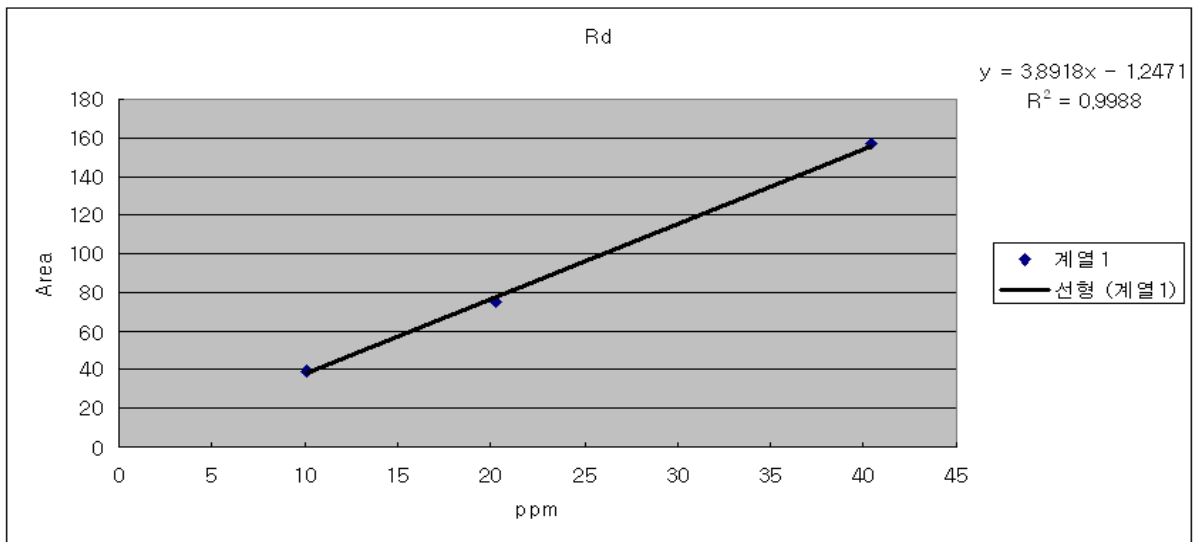
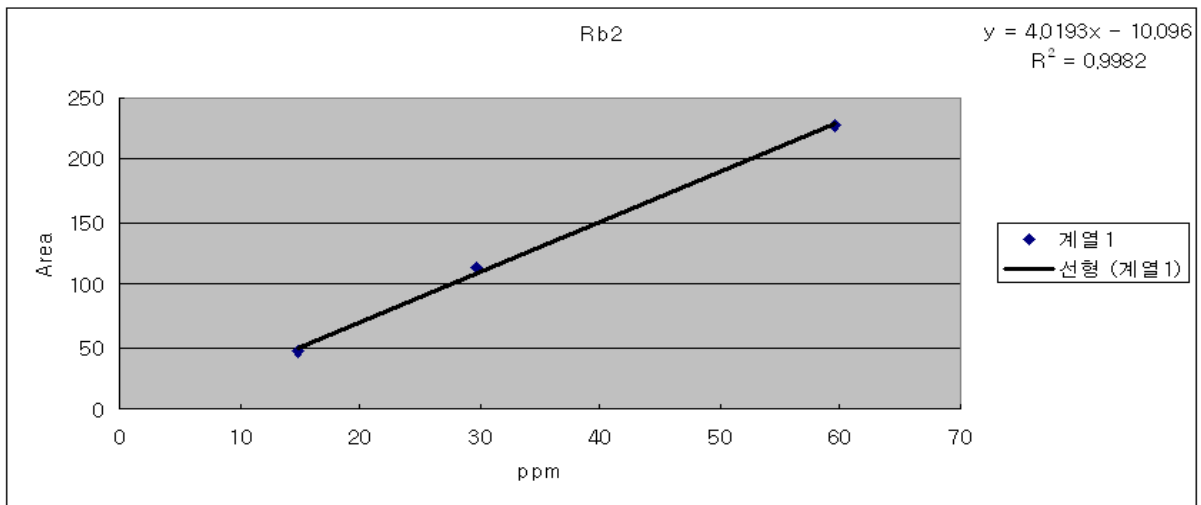
③ STD 3

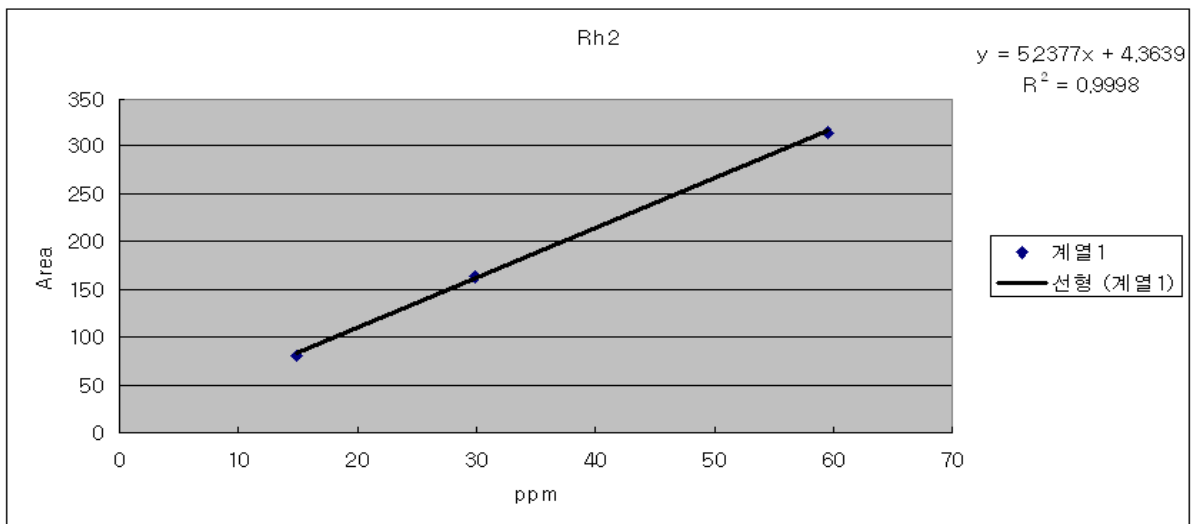
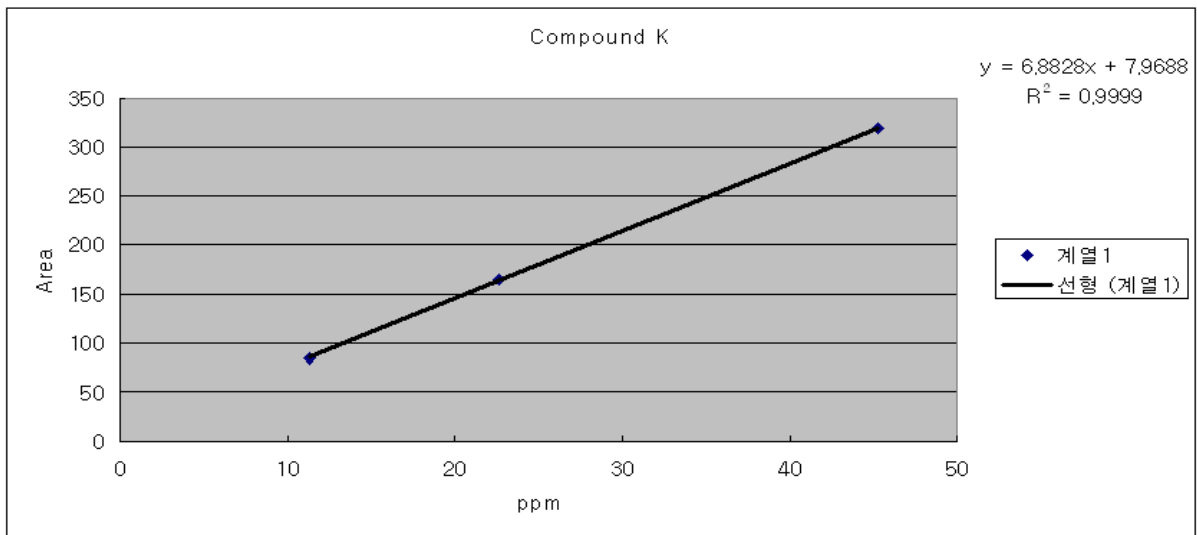
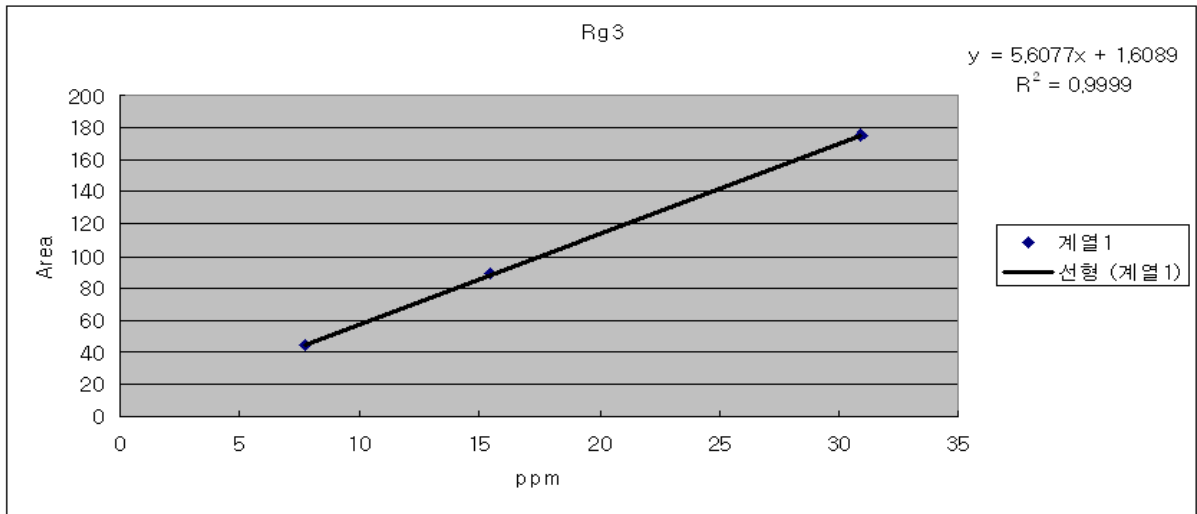


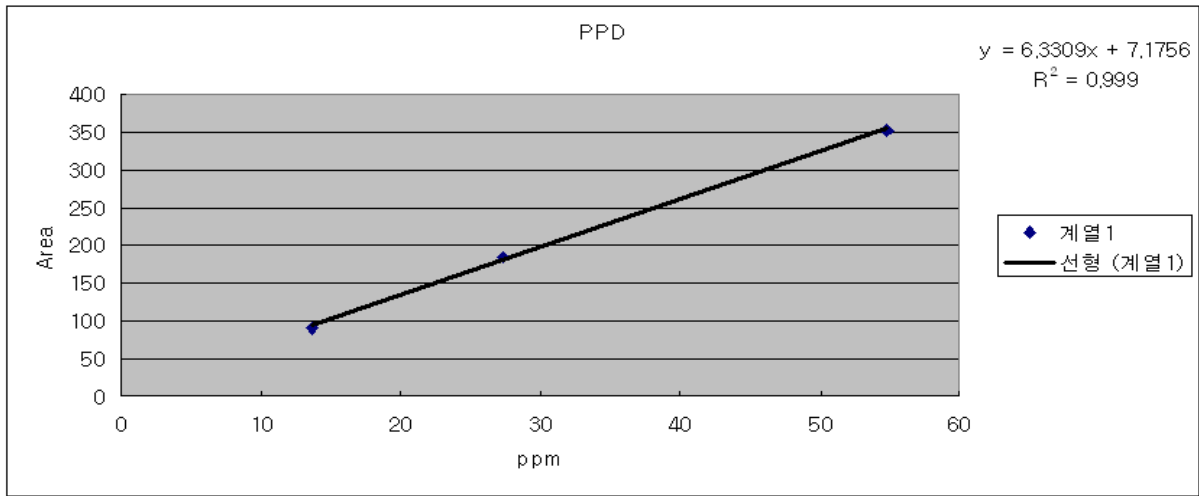
④ calibration curve



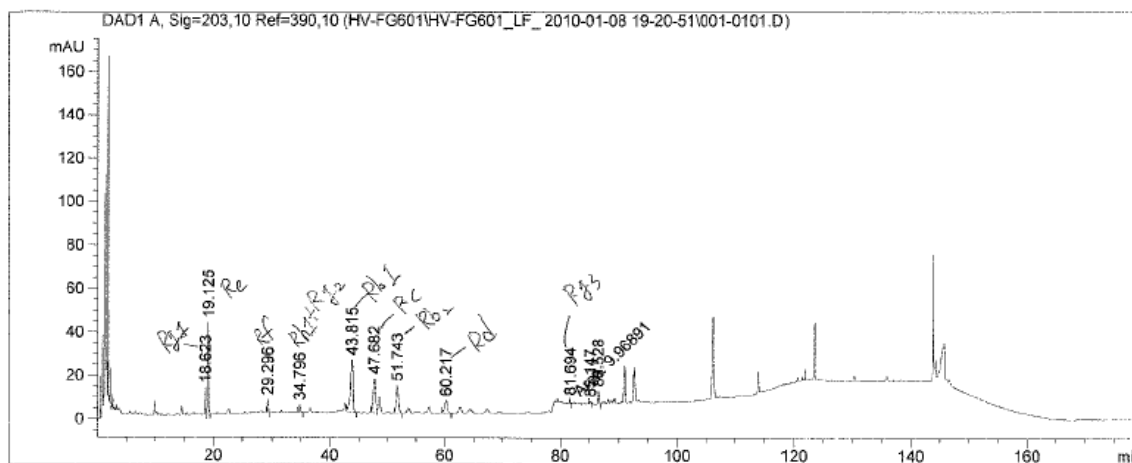




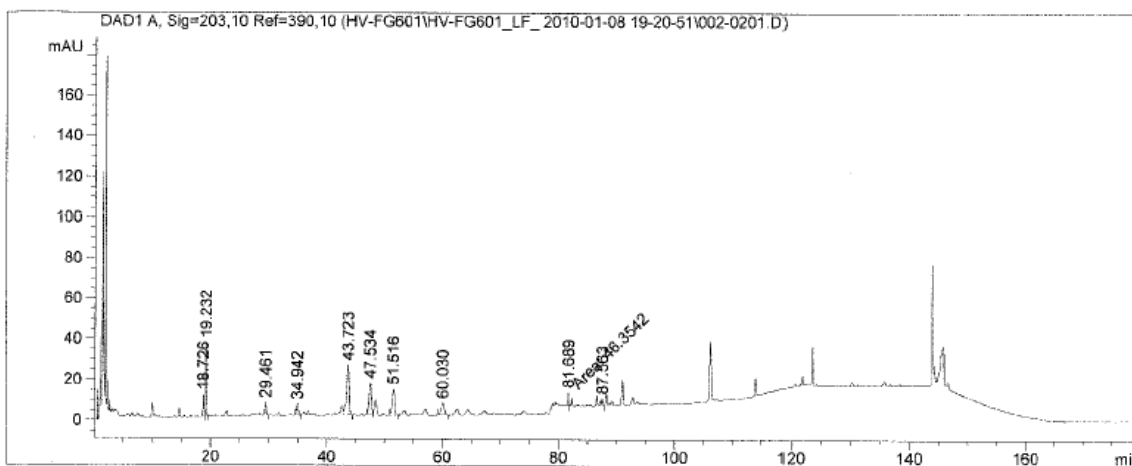




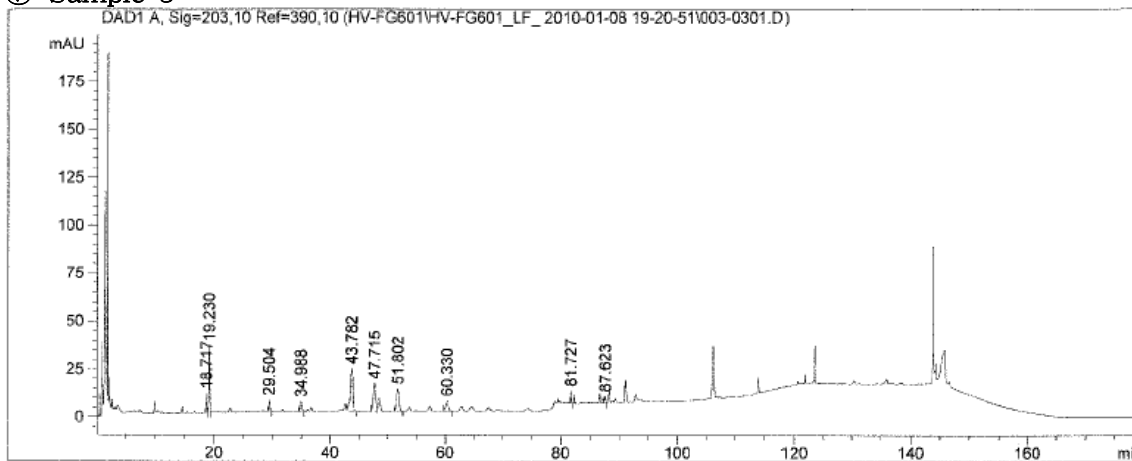
⑤ Sample 1



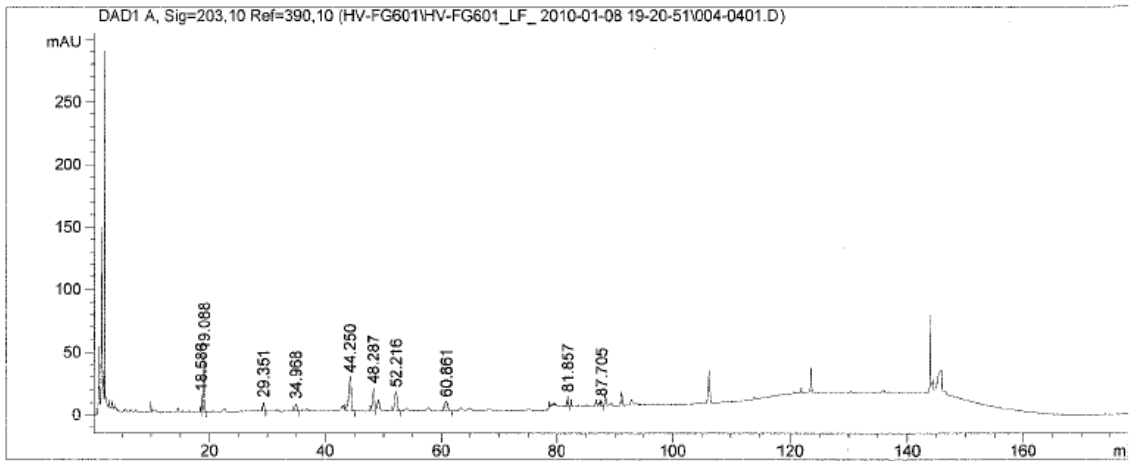
⑥ Sample 2



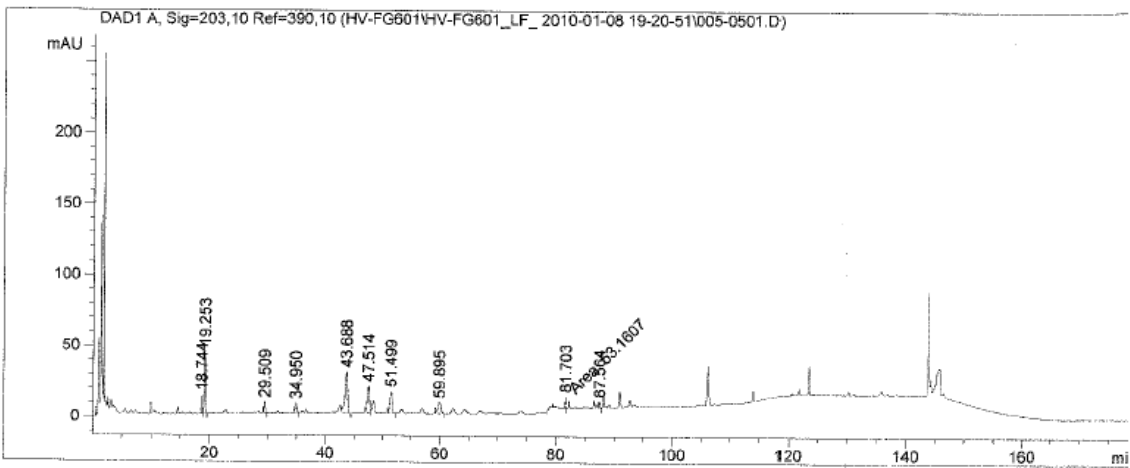
⑦ Sample 3



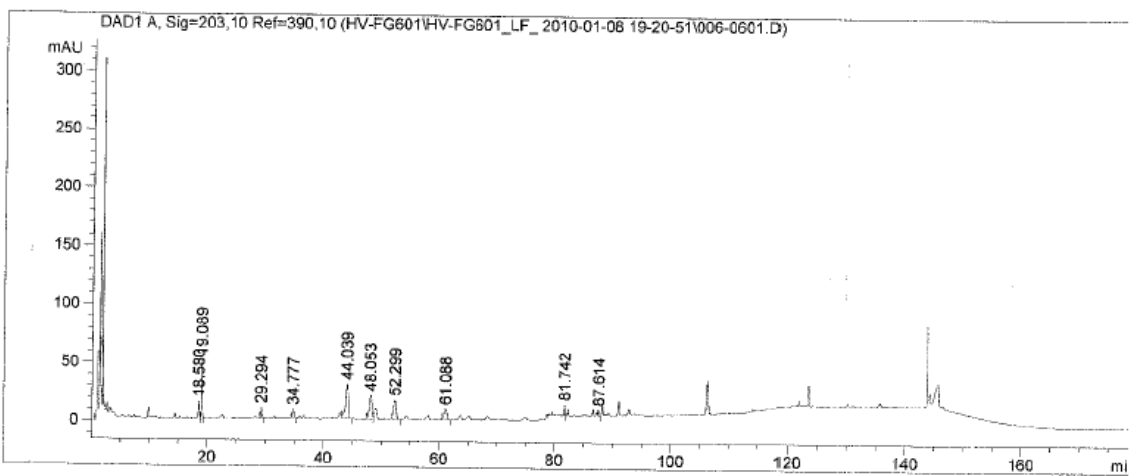
⑧ Sample 4



⑨ Sample 5



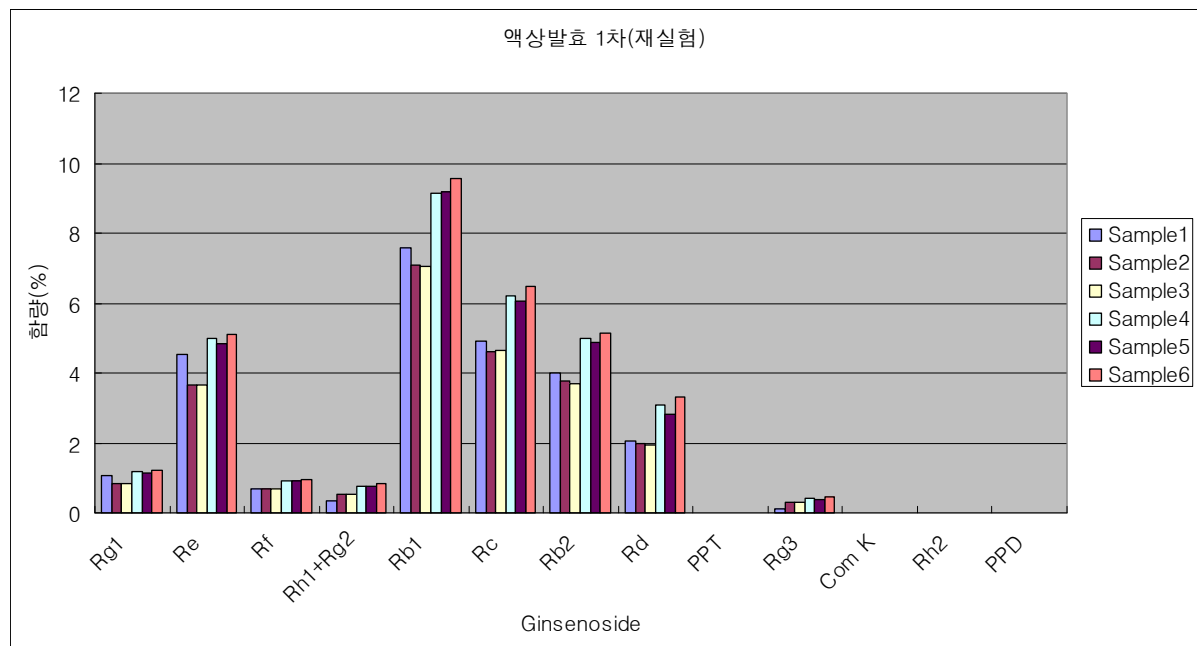
⑩ Sample 6



⑪ Sample군별 ginsenoside 14종 함량

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
	2470	2625	2525	2390	2395	2575
	ppm					
Ginsenoside	함량(%)	함량(%)	함량(%)	함량(%)	함량(%)	함량(%)
Rg1	1.0479	0.8511	0.8533	1.1776	1.1333	1.2026
Re	4.5195	3.6425	3.6547	5.0023	4.8512	5.1232
Rf	0.6811	0.6752	0.6777	0.9259	0.9097	0.9677
Rh1+Rg2	0.3400	0.5499	0.5462	0.7785	0.7588	0.8352
Rb1	7.5909	7.0689	7.0385	9.1616	9.1945	9.5631
Rc	4.9273	4.6247	4.6602	6.1958	6.0433	6.4896
Rb2	4.0149	3.7587	3.6948	4.9719	4.8764	5.1590
Rd	2.0599	1.9965	1.9389	3.0675	2.8132	3.3053
PPT	-	-	-	-	-	-
Rg3	0.1111	0.3039	0.3220	0.4234	0.3838	0.4580
Com K	-	-	-	-	-	-
Rh2	-	-	-	-	-	-
PPD	-	-	-	-	-	-

⑫ Sample군별 ginsenoside 14종 함량그래프



▶ 액상발효 실험 결과 *S.cerevisiae*를 접종한 군에서 모든 ginsenoside들의 함량이 높게 나타났으나, PPD 및 PPT로의 전환은 이루어지지 않았다.

▶ 또한, *B.natto*(개량균)를 접종하여 발효를 진행하였을 때 PPD 및 PPT로의 전환이 이루어지지 않았다.

나. 고상발효실험

1) 실험방법

(1) 자연 발효 인삼청국장제

- ① 8시간 삶은 콩 200g에 백삼분말 30g을 잘 혼합한다.
- ② 종 배양액 접종 후 42 °C에서 24 ~ 144 시간 발효하였다.
- ③ 발효가 완료된 인삼소재를 동결건조하여 HPLC분석한다.

(2) 시료의 전처리

- ① Sample 약50g씩 취하여 증류수에 현탁한다.
- ② 수포화 부탄올로 3 회 처리한다.
- ③ 얻어진 수포화 n-부탄올 층을 감압 농축하여 조(crude) 사포닌으로 한다.
- ④ 얻어진 조 사포닌을 HPLC법에 의하여 정량 분석하였다.

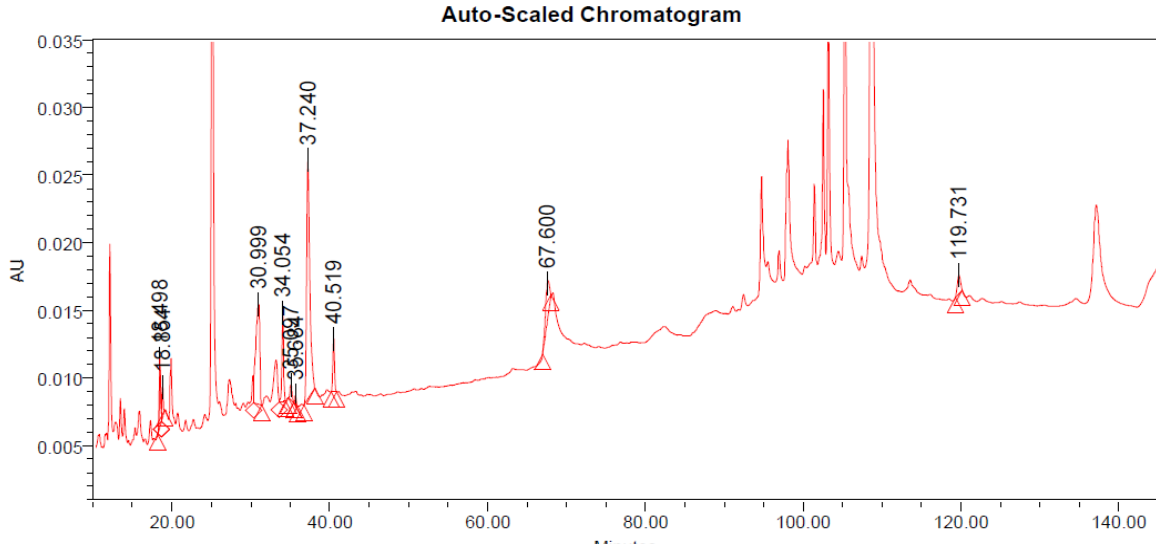
(3) HPLC분석조건

위에서 얻은 엑스를 HPLC 분석을 실시하고, 상법에 따라 표품과 직접 비교하여 인삼 사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표품은 Chromadex (U.S.A.)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다.

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은 Gemini 5 μ C18 110A(Phenomenex, 4.6 \times 250mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %에서 40 %, 60 % 그리고 80 %로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 1.0 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

2) 실험결과

① 인삼 고상 배양물의 HPLC 시그널



② The ginsenoside content of the fermented soybeans with white ginseng

(%, w/w)

Ginsenosides	1일재	2일재	3일재	4일재	5일재	6일재
Rg1	0.1764±0.0227	0.0021±0.0018	0.0067±0.0003	±	0.0019±0.0001	0.0028±0.0025
Re	0.4365±0.0522	0.0042±0.0003	0.0178 ±0.0025	0.0211±0.0205	0.0141 ±0.0015	0.0192±0.0090
Rf	0.1809±0.0218	±	0.1074 ±0.0094	0	0.0136 ±0.0012	±
Rb1	0.7792 ±0.0942	0.0004 ±0.0007	0.0570±0.0046	0	0.0020 ±0.0002	±
Rg2	0.0228 ±0.0030	±	0.0034±0.0035	0	±	0.0413±0.0030
Rh1	0.0050±0.0003	±	0.0057±0.0027	0	0.0227±0.0018	±
Rc	0.2712 ±0.0314	0.0029±0.0050	0.0703±0.1068	0	±	±
Rb2	0.1658 ±0.0169	0.0071±0.0062	0.1597±0.1177	0.0094±0.0014	0.0632±0.0062	0.0197±0.0028
Rd	0.0752±0.0095	±	0.0220±0.0191	0	0.0033±0.0004	±
Rg3	0.0281±0.0047	0.0105 ±0.0182	±	0	±	±
PPT	0.0072±0.0010	0.0069±0.0060	0.0192±0.0017	0	0.0094±0.0007	0.0151±0.0014
k	0	±	±	0.0107 ±0.0014	0.0157±0.0014	0.0091 ±0.0014
Rh2	0	±	±	±	±	±
PPD	0.0258±0.0054	0.0070±0.0012	0.0163±0.0010	0.0205±0.0034	0.0211±0.0038	0.0315±0.0038

▶인삼청국장제제에서는 1일 발효제제에서 인삼사포닌 비당체인 protopanaxadiol(PPD)가 0.0258%의 함유량을 나타내었으나, 2, 3, 4, 5 발효에서는 0.007%, 0.0163%, 0.0205%, 0.0211%를 나타내어 1일 발효보다 저농도 함유량을 보여주었으나, 6일 발효에서는 0.0315%의 함유량을 나타내어 높은 함유량을 나타내었다. 이와 같은 결과는 자연발효 시 1일과 6일 발효 제제가 높은 농도의 protopanaxadiol(PPD)이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

다. 인삼사포게닌 GC 분석법

1) 목적

인삼사포게닌 고농도 함유제품에 대한 성분 분석법을 개발하기 위해서 인삼사포게닌이 비극성 물질인 점을 착안하여 GC 분석법에 의해서도 성분분석이 가능할 것으로 사료되어 아래와 같은 방법으로 시행하고자 한다.

2) 실험방법

(1) 시료전처리

- ① 검체 및 표준품(Rg1, Rb1) 일정량(검체는 5mg 해당량, 표준품은 각각 5mg)을 평저플라스크에 넣고 에탄올성 황산(H₂O:EtOH=3:1)용액을 가하여 전체농도가 5% 황산용액이 되도록 하고 6시간 수욕상에서 환류(약 90℃)시킨 후 45% NaOH용액을 가하여 중화시킨다.
- ② Cholesterol 표준용액 500 μ l 가하고 (cholesterol 0.5mg 해당량) 에탄올을 날려 보낸 후 4% NaOH용액 40ml 가한다.
- ③ 이 액을 300ml 분액 여두에 옮긴 후 평저 플라스크를 소량의 물로 2~3회 세척하여 합친다.
- ④ CH₂Cl₂ 100ml로 3회 추출하고 추출액을 모아 농축하여 100ml가 되게 하여 분액여두로 옮긴다.
- ⑤ 4% NaOH용액 100ml 와 증류수 100ml로 차례로 세척한다.
- ⑥ CH₂Cl₂층을 삼각플라스크에 옮긴 후 무수망초로 탈수시킨다.
- ⑦ CH₂Cl₂를 날려 보낸 후 잔사를 TMS화 용기에 옮기고 질소기류 하에 용매를 날려 보낸다.
- ⑧ MSTFA 200 μ l와 EtoAc200 μ l를 가하여 80℃에서 40분간 반응시킨 용액을 GC 분석용 시료로 한다.

(2)분석조건

칼럼 : DB-1

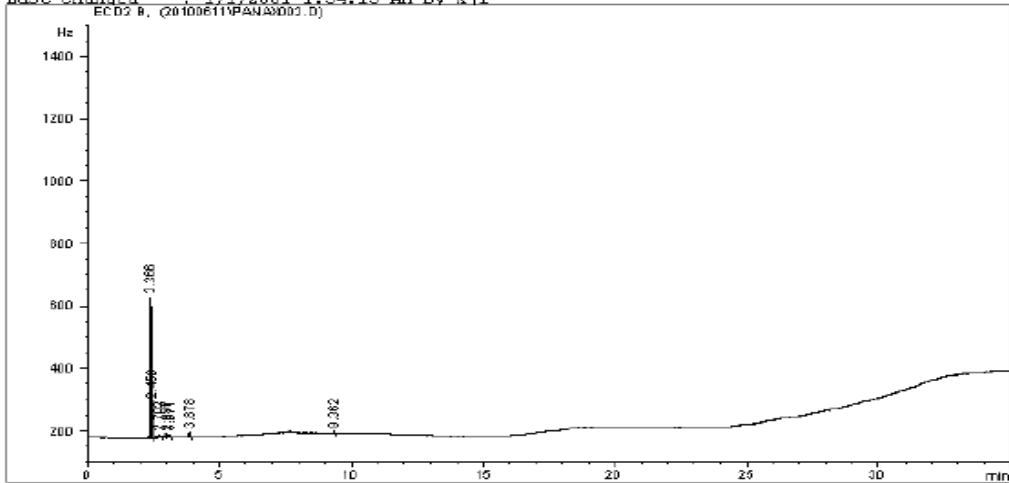
주입구 온도 : 290℃ 검출기 온도 : 300℃

오븐 : 250℃에서 5분간 머무른 후 300℃까지 10℃/min 으로 상승, 300℃에서 20분간 유지

3) 실험결과

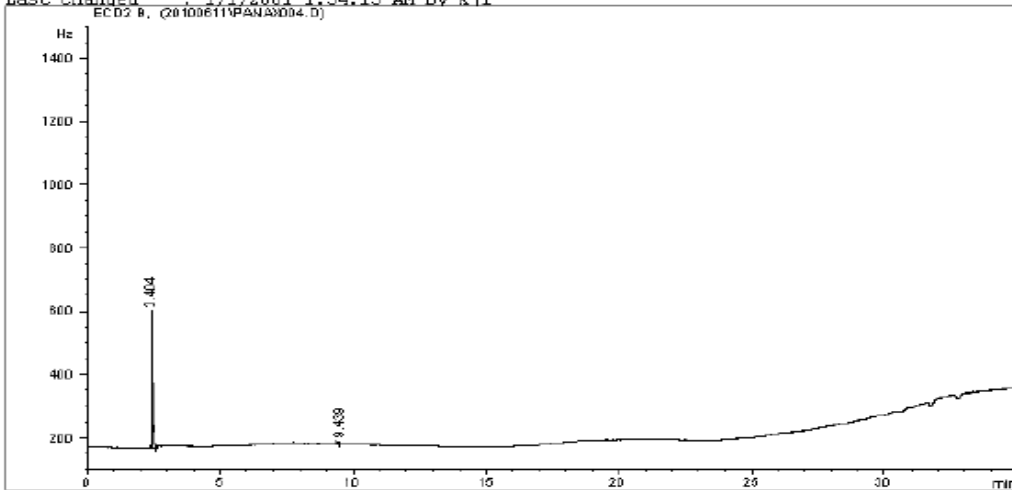
① Protopanaxadiol(PPD)의 GC 시그널

Injection Date : 1/1/2001 2:38:58 AM Ser. Line : 2
Sample Name : PPD Location : Vial 2
Acq. Operator : Kji Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 1 µl
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\PANAX.S
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PESTICID.M
Last Changed : 1/1/2001 1:54:13 AM by Kji
ECD2 B, (20100611\PANAX003.D)



② Protopanaxatriol(PPT)의 GC 시그널

Injection Date : 1/1/2001 4:05:10 AM Ser. Line : 4
Sample Name : PPT Location : Vial 4
Acq. Operator : Kji Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : 1 µl
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\PANAX.S
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PESTICID.M
Last Changed : 1/1/2001 1:54:13 AM by Kji
ECD2 B, (20100611\PANAX004.D)



▶ECD detector에 의해서 검출한 결과는 Protopanaxadiol(PPD)의 시그널이 RT 3.3 min.에서 확인되었으며, Protopanaxatriol(PPT)의 시그널은 RT 3.4 min.에서 확인되어 GC를 이용한 분석법도 유효한 분석법으로 사용할 수 있다고 판단된다.

라. 인삼사포게닌 분리 확인 동정

1) 목적

본 연구의 주 기능성 물질로 판단되는 Protopanaxadiol(PPD)과 Protopanaxatriol (PPT)를 순수 분리하여 분광학적 방법에 의하여 화학구조를 동정하고자 한다.

2) 실험방법

(1) 실험재료

백삼 (*Panax ginseng*)의 *Bacillus natto* 접종 대두 고체 발효물

(2) 실험방법

① 인삼사포게닌 분리

샘플을 동결건조 후 95% ethyl alcohol로 2시간 2회 환류 추출한 후 감압농축한 다음 농축물을 증류수 (100ml)에 용해하고 ethyl ether (100ml)로 2회 추출하여 ethyl ether 분획을 감압농축하였다. 얻은 농축물을 silica gel column chromatography [n-hexane/ethyl acetate (1 : 1, v/v)] 하여 (20S)-protopanaxadiol (200mg)을 얻었다.

② TLC (Thin Layer Chromatography)를 이용한 인삼사포게닌 확인

Fig. 1에서 보는바와 같이 silica gel TLC plate (Kieselgel 60 F254, Merck)를 이용하여 전개용매 Hexane : Ethyl acetate = 1 : 3 (v/v)로 전개하여 검토하였다.

③ Protopanaxadiol(PPD)의 화학구조 동정

(20S)-protopanaxadiol의 ¹H-NMR 스펙트럼(Fig. 2)에 있어서 3.34ppm에서 관측된 H-12 시그널로부터 H-11, H-9 및 H-13, H-17, H-16, H-15 스그널을 각각 동정하였다. 또한, H-24 (δ 0.72)에서 관측되었는데, 이 시그널로부터 H-6과 H-7 methylene signal이 동정되었다. Table 1과 2의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR의 결과는 이 등1)의 참고문헌의 (20S)-protopanaxadiol 데이터와 일치함로 (20S)-protopanaxadiol로 확인 동정하였다.

④ Protopanaxatriol(PPT)의 화학구조 동정

(20S)-protopanaxatriol의 ¹H-NMR 스펙트럼(Fig. 4)에 있어서 3.95ppm에서 관측된 H-12 시그널로부터 H-11, H-9 및 H-13, H-17, H-16, H-15 시그널을 각각 동정하였다. 또한, H-24 5.34ppm에서 관측되었는데, 이 시그널로부터 H-6과 H-7 methylene signal이

동정되었다. Table 3과 4의 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 의 결과는 이 등1)의 참고문헌의 (20S)-protopanaxadiol 데이터와 일치함으로 (20S)-protopanaxatriol로 확인 동정하였다.

3) 실험결과

① TLC (Thin Layer Chromatography)를 이용한 인삼사포게닌 확인

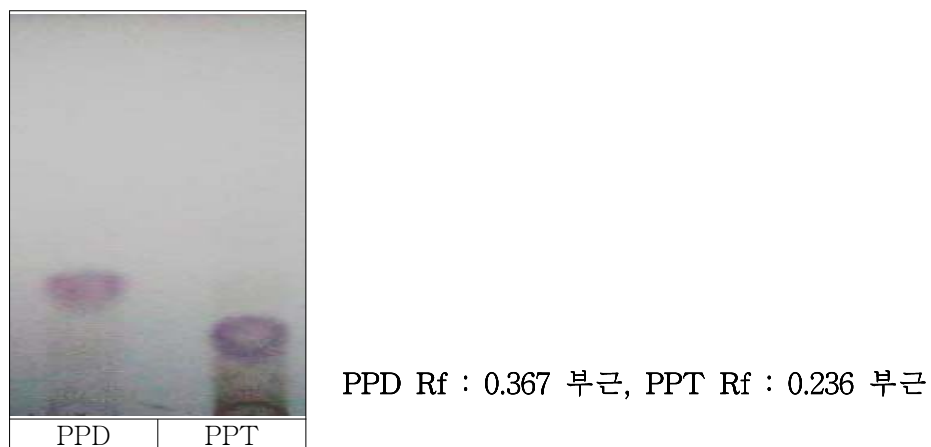
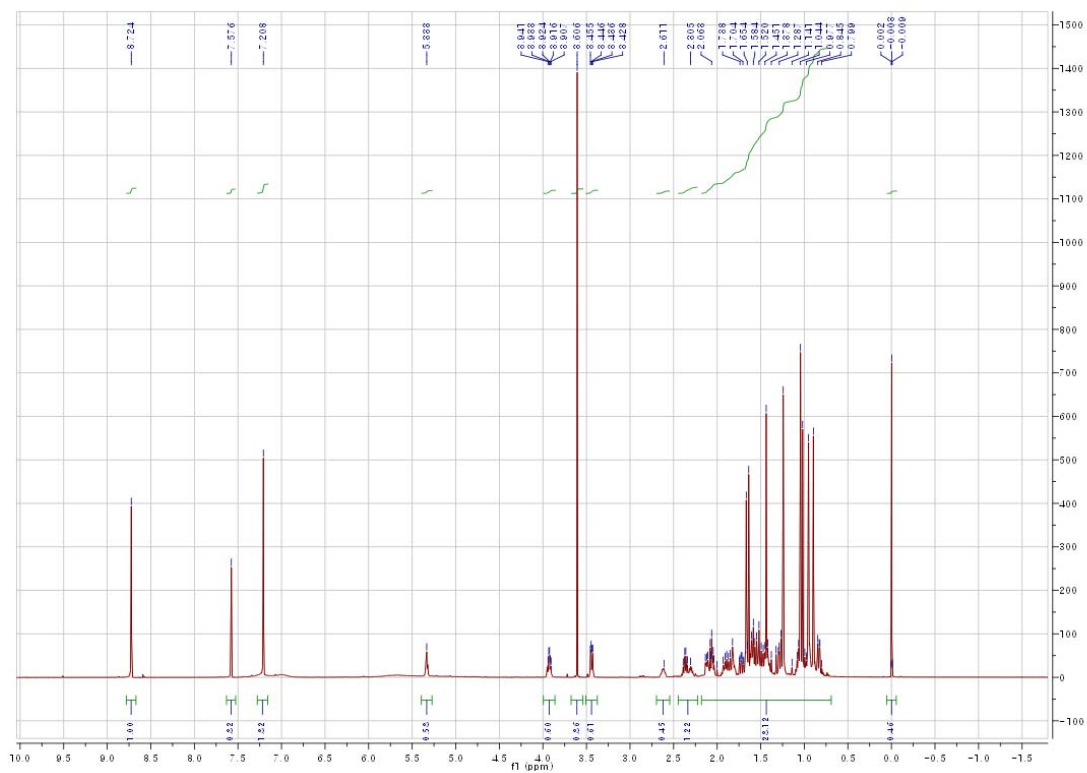


Fig. 1 TLC (Thin Layer Chromatography)

② Protopanaxadiol(PPD)의 화학구조 동정

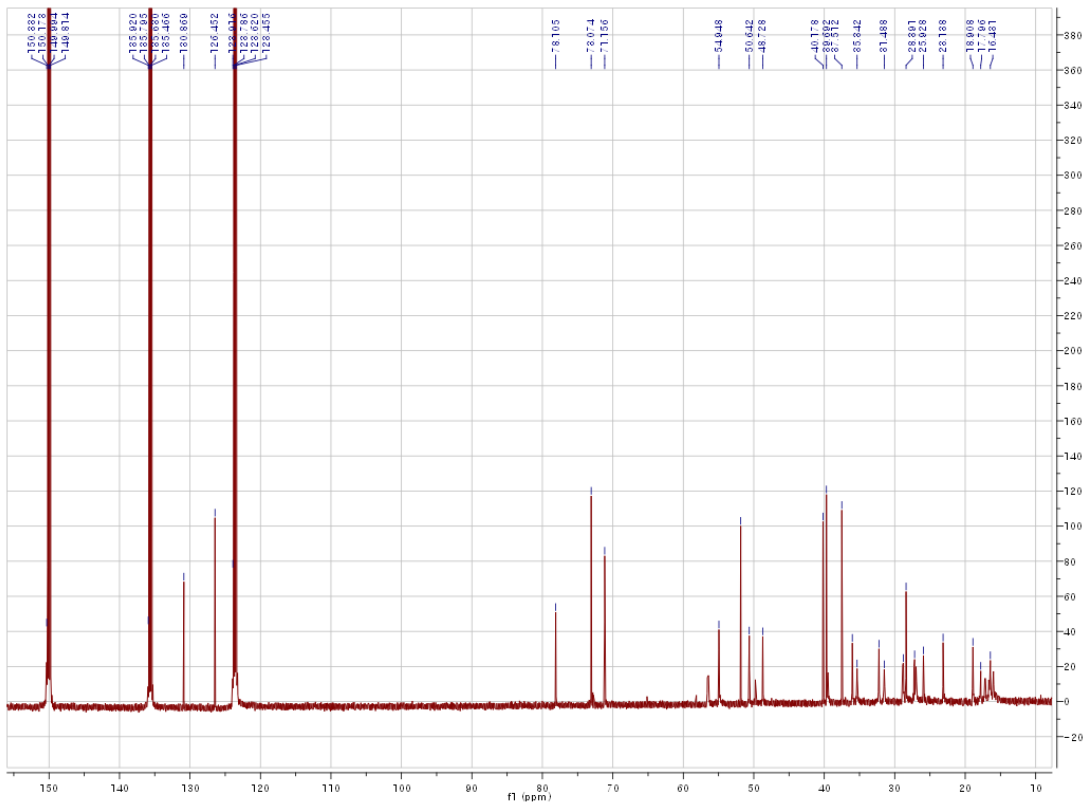
No of H	(20S)-protopanaxadiol	
H-3	3.34 (1H, dd, J=5.3, 10.8)	3.428
H-7	1.15 (1H, ddd-like)	1.242
H-12	3.83 (1H, ddd, J=5.2, 10.4, 10.4)	3.907
H-16	1.32 (1H, m)	1.437
H-18	0.90 (3H, s)	0.895
H-24	5.22 (1H, dd, J=7.0, 7.0)	5.333

Table 1. $^1\text{H-NMR}$ of (20S) protopanaxadiol



No of H	(20S)-protopanaxadiol	
	past	present
1	39.5	39.5
2	28.2	28.2
3	77.9	77.9
4	39.5	39.5
5	56.3	56.3
6	18.7	18.7
7	35.2	35.2
8	40.0	40.2
9	50.4	50.4
10	37.3	37.3
11	32.0	32.0
12	70.9	70.9
13	48.5	48.7
14	51.6	51.6
15	31.8	31.8
16	26.8	26.8
17	54.7	55.0
18	16.2	16.2
19	15.8	15.8
20	72.9	72.9
21	26.9	27.0
22	35.8	35.8
23	22.9	22.9
24	126.2	126.2
25	130.6	130.6
26	25.8	25.8
27	17.6	17.6
28	28.6	28.6
29	16.4	16.4
30	17.0	17.1

Table 2. C-NMR of (20S) protopanaxadiol (d5-Py.)



③ Protopanaxatriol(PPT)의 화학구조 동정

No of H	(20S)-protopanaxadiol
H-3	3.55 (1H, m)
H-6	4.43 (1H, m)
H-12	3.95 (1H, S)
H-24	5.34 (1H, m)

Table 3. ¹H-NMR of (20S) protopanaxatriol

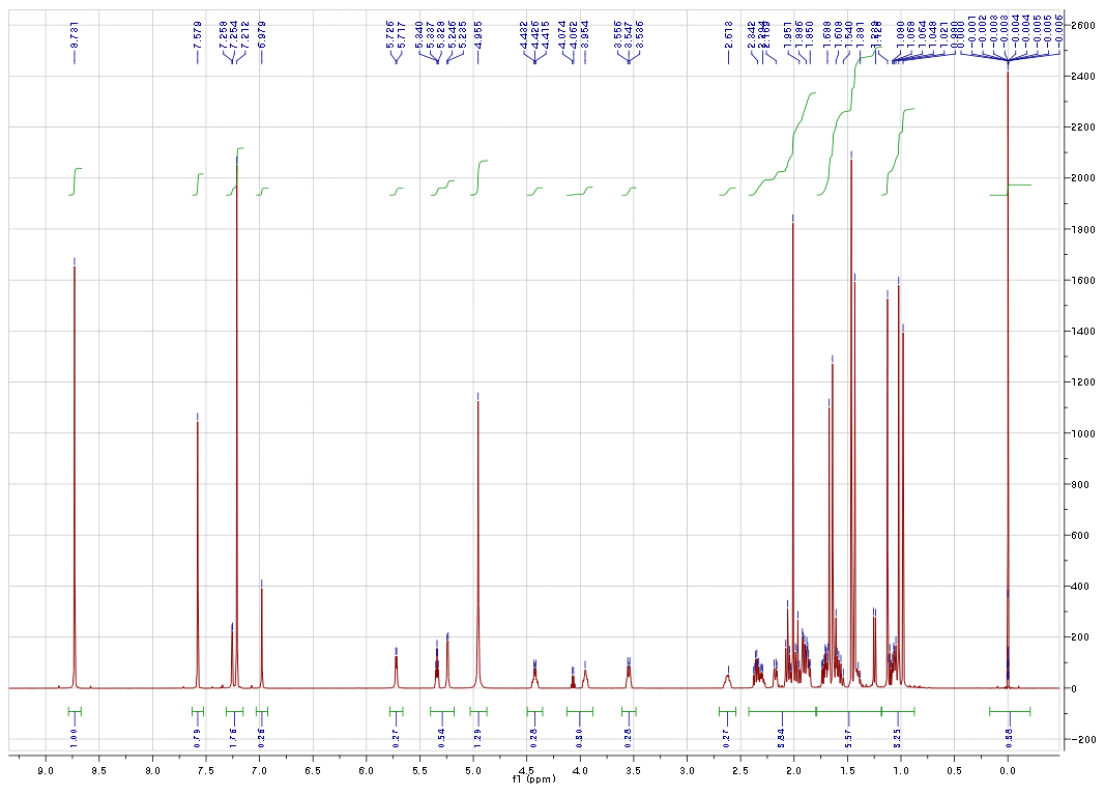


Fig. 4. Protopanaxatriol(PPT)의 ¹H-NMR 시그널

No of H	(20S)-protopanaxadiol	
	past	present
1	38.78	39.36
2	27.56	27.09
3	77.84	78.43
4	39.79	40.88
5	61.20	61.80
6	67.14	67.73
7	46.95	47.56
8	40.60	41.20
9	49.54	50.13
10	38.78	39.36
11	31.42	32.00
12	70.47	71.05
13	47.67	48.28
14	51.08	50.13
15	30.79	31.88
16	26.28	26.00
17	54.22	54.82
18	17.00	17.59
19	16.88	17.47
20	72.41	72.97
21	26.48	26.00
22	35.27	35.87
23	22.43	23.02
24	125.74	126.82
25	130.26	130.80
26	25.27	26.00
27	17.14	17.70
28	31.48	31.88
29	15.95	16.52
30	16.50	17.09

Table 4. C-NMR of (20S) protopanaxatriol (d5-Py.)

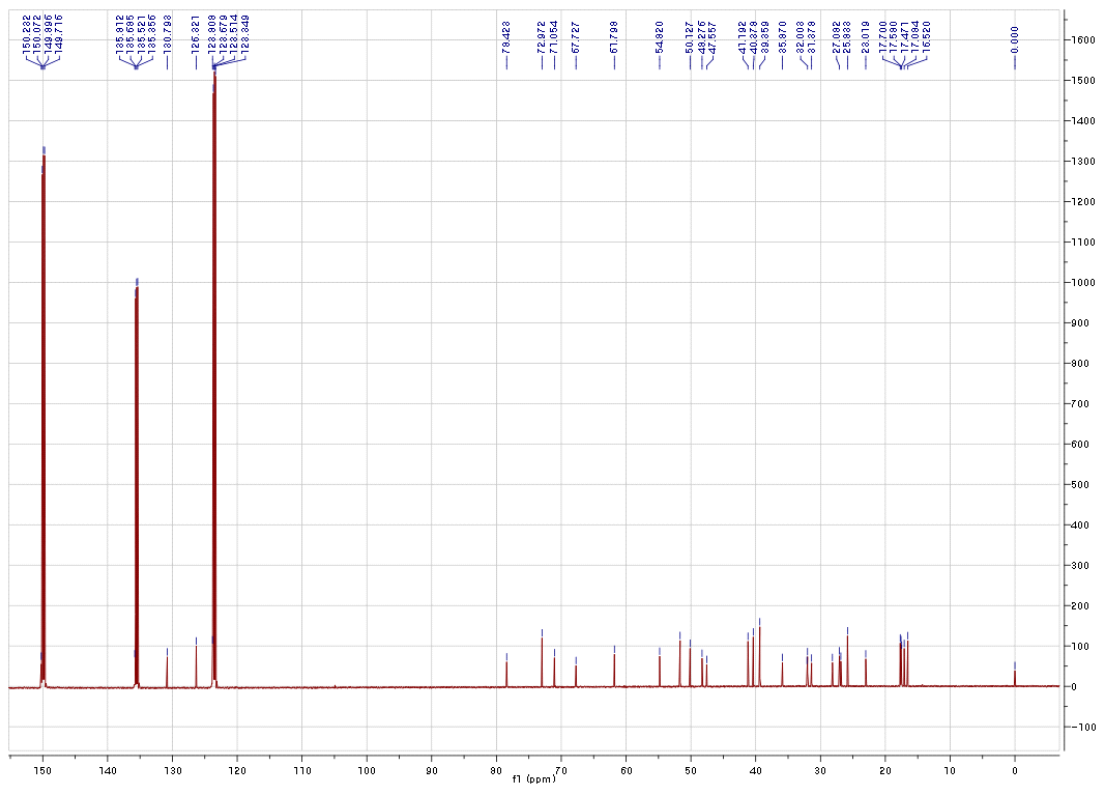
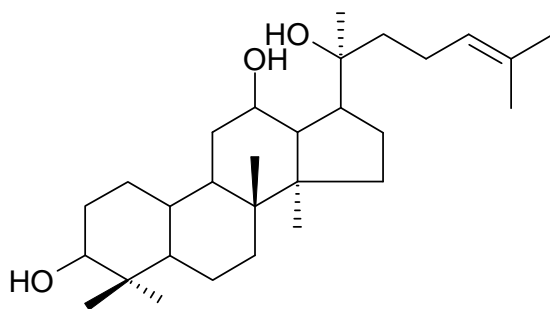
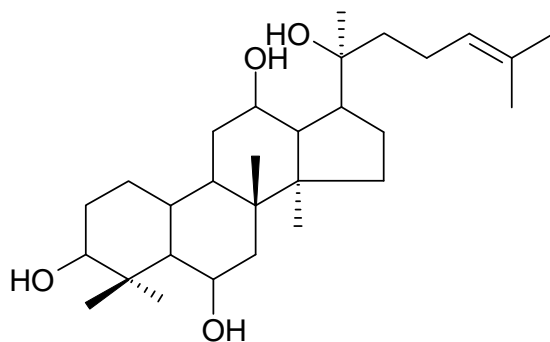


Fig. 5. Protopanaxatriol(PPT)의 ¹³C-NMR 시그널

④ Protopanaxadiol(PPD), Protopanaxatriol(PPT)의 화학구조



Protopanaxadiol



Protopanaxatriol

▶(20S)-protopanaxadiol의 1H-NMR 스펙트럼(Fig. 2)에 있어서 3.34ppm에서 관측된 H-12 시그널로부터 H-11, H-9 및 H-13, H-17, H-16, H-15 시그널을 각각 동정하였다. 또한, H-24 (δ 0.72)에서 관측되었는데, 이 시그널로부터 H-6과 H-7 methylene signal이 동정되었다. Table 1과 2의 1H-NMR, 13C-NMR의 결과는 이 등1)의 참고문헌의 (20S)-protopanaxadiol 데이터와 일치함으로 (20S)-protopanaxadiol로 확인 동정하였다.

▶(20S)-protopanaxatriol의 1H-NMR 스펙트럼(Fig. 4)에 있어서 3.95ppm에서 관측된 H-12 시그널로부터 H-11, H-9 및 H-13, H-17, H-16, H-15 시그널을 각각 동정하였다. 또한, H-24 5.34ppm에서 관측되었는데, 이 시그널로부터 H-6과 H-7 methylene signal이 동정되었다. Table 3과 4의 1H-NMR, 13C-NMR의 결과는 이 등1)의 참고문헌의 (20S)-protopanaxadiol 데이터와 일치함으로 (20S)-protopanaxatriol로 확인 동정하였다.

3. 결론

- 1) Saponin배당체를 aglycon전환 최적발효법을 찾기 위하여 액상발효법과 고상발효법 2가지로 나누어 진행을 하였다.
그 결과, 액상발효에서는 protopanaxadiol, protopanaxatriol로의 전환이 전혀 이루어지지 않았고, 고상발효에서는 1일과 6일차에서 PPD로의 전환이 의미가 있는 농도로 전환이 이루어졌다.
- 2) 인삼사포게닌 고농도 함유제품에 대한 성분 분석법을 개발하기 위해서 인삼사포게닌이 비극성 물질인 점을 착안하여 GC 분석법 중 ECD detector에 의해서 검출한 결과는 Protopanaxadiol(PPD)의 시그날이 RT 3.3 min.에서 확인되었으며, Protopanaxatriol(PPT)의 시그날은 RT 3.4 min.에서 확인되어 GC를 이용한 분석법도 유효한 분석법으로 사용할 수 있다고 판단하였다.
- 3) 고체발효를 통해 전환된 Protopanaxadiol(PPD)과 Protopanaxatriol (PPT)를 순수 분리하여 본 연구에서 목적으로 하는 물질인지 확인하였다.
NMR을 이용하여 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 로 동정한 결과 본 연구에서 목적으로 하는 물질인 (20S)-protopanaxadiol, (20S)-protopanaxatriol로 확인되었다.
- 4) 위의 결과를 종합하면, 액상발효법보다 고상발효법에서 aglycon으로의 전환이 좋았다.

제 5 절. 효능실험

1. 목적

액상발효물, 고상발효물로부터의 혈소판응집억제반응 측정 및 혈관수축에 미치는 영향을 알아본다.

2. 실험내용

가. In vitro 혈소판 응집 억제작용 및 기전 평가

1) 실험목적

가토 or Rat의 세척혈소판 (washed platelet)을 이용한 혈소판 응집억제 작용 평가

2) 실험방법: Chronolog aggregometer를 이용한 탁도법 (Turbidimetry)

본연구실에 잘 확립된 protocol에 의해 rabbit ear vein 으로부터 채혈하여 washed platelet을 제조함: 30 ml 혈액을 채혈하여 ACD 항응고제와 6:1의 비율로 혼합, 1400 rpm에서 10분간 원심분리하여 PRP 획득, 10분 배양, 3000rpm 에서 10분간 원심분리, 1차 buffer로 현탁, 배양, 3000 rpm에서 10분간 원심분리, 2차 buffer로 현탁, 배양, 3000 rpm으로 원심분리, 3차 buffer로 현탁후 4×10^8 /ml 로 조정.

- collagen 등을 선별하여 응집유발제로 사용함
- 혈소판 응집 반응 후 억제작용 측정

3) 실험결과

(1) 혈소판 응집 반응을 최대로 일으키는 collagen의 농도 결정

고혈압, 고지혈증, 흡연 등의 혈관 손상인자들에 의해서 혈관이 손상되었을 때 혈관 내 피세포로부터 들출/분비되는 collagen에 의해서 혈관에서 순환하던 혈소판이 최초로 응집된다. 이것은 지혈의 한 과정이지만, collagen과 혈소판의 상호작용에 의한 혈소판 응집반응은 혈전증, 심근경색 또는 동맥경화발생의 원인이 된다(2). 따라서 collagen에 의한 혈소판 응집반응을 저해하는 약물은 혈전증 등의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다(2). 이러한 의미에서 collagen에 의해 일어나는 혈소판 응집에 미치는 기대 물질들의 효과를 보기에 앞서 collagen이 혈소판 응집을 최대로 일으키는 그 농도를 먼저 측정했다. collagen은 전술한 바와 같이, 손상된 혈관내피 세포로부터 분비되지만, 손상의 크기에 따라 분비되는 collagen의 양/농도가 다르다. 손상이 크면 클수록 많은 양(농도)의 collagen이 분비되어진다. 따라서 collagen의 농도를 변화시키면서 혈소판의 응집을 최대로 일으키는 농도를 결정하는 것이 중요하므로 그것을 측정했다.

Collagen ($\mu\text{g/ml}$)	Platelet aggregation (%)
0.5	8.0 ± 4
1	39 ± 4
2	42 ± 2
5	60 ± 3
10	73 ± 2
15	72 ± 2
18	72 ± 1
20	72 ± 2

Table 1. Maximum concentration of collagen on rat platelet aggregation

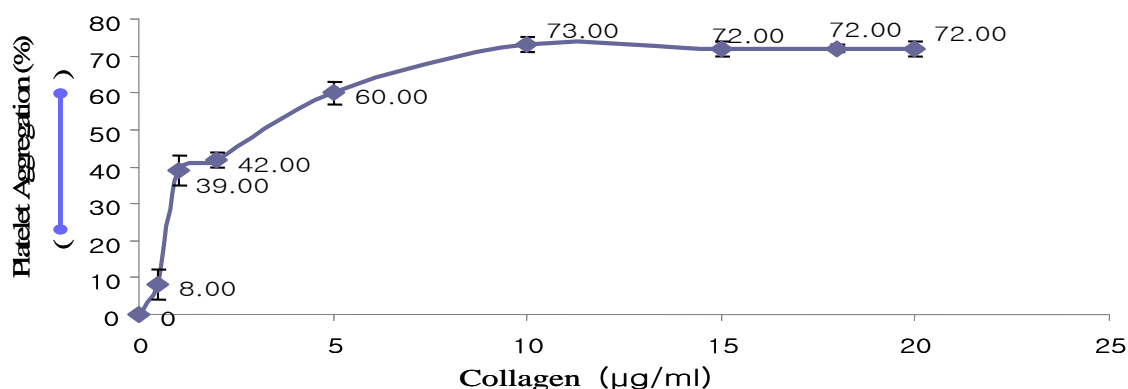


Fig. 1. Threshold concentration of collagen on rat platelet aggregation

▶Rat로부터 얻은 세척혈소판 (108개 platelets/ml)에 collagen 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 18, 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가하여 일어나는 light transmission을 측정하여 platelet aggregation (%)로 표시했을 경우 collagen의 농도가 증가함에 따라 응집율 (%)가 증가했다. 이 결과를 가지고 threshold 곡선을 그려본 결과 10 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$ 에 의해서는 거의 변화가 없이 평행선을 유지하고 있음을 볼 수 있다. 이것은 collagen을 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로 즉, 15, 18, 20 $\mu\text{g/ml}$ 으로 rat 혈소판을 자극시켜도 응집반응은 거의 동일함을 알 수 있기 때문에 collagen의 threshold 농도는, 즉 최대로 응집시키는 collagen의 농도는 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 판단할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 기대 물질들의 혈소판 억제효과를 보기 위해 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 collagen을 이용하였다.

(2) 혈소판 응집 반응을 최대로 일으키는 thrombin의 농도결정

Thrombin에 의한 혈소판 응집반응은 collagen과는 다르게 혈액의 응고가 일어날 때 생성되며, 이것에 대한 응집 메카니즘은 collagen과 동일하지만, 혈소판에 있는 수용체가 서로 다르다. 따라서, thrombin에 의한 혈소판 응집반응을 검사하는 목적은 혈전의 형성에 있어서 혈관에서 응집반응과 동일한 영역에서 일어나는 혈액응고와 연관시키는 것이며, 이것에 의한 혈소판 응집반응도 강력한 혈전형성에 관여한다. 그러므로 thrombin에 의한 혈소판 응집반응에 미치는 기대 물질들의 효과를 조사하기 위해 우선 혈소판 응집반응에서 thrombin에 의해 최대로 일어나는 농도를 결정했다.

Thrombin (U/ml)	Platelet aggregation (%)
0.3	20 ± 3.0
0.4	38 ± 0.0
0.5	79 ± 0.7
1	76 ± 1.2

Table 2. Maximum concentration of thrombin on platelet aggregation

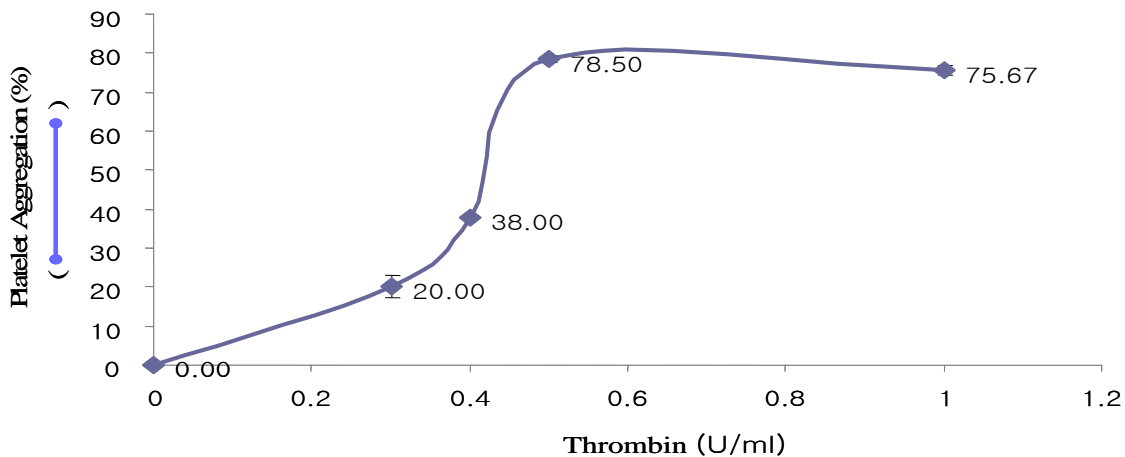


Fig. 2. Threshold concentration of thrombin on platelet aggregation

▶Rat로부터 얻은 세척혈소판 (108개 platelets/ml)에 thrombin 농도별로 첨가하여 혈소판 응집반응을 측정하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 0.3~0.5 U/ml의 thrombin에 의해 계속적으로 응집이 증가하다가 1 U/ml의 thrombin에 의해서는 0.5 U/ml보다 약간 감소하는 경향으로 응집이 일어났다. 이것으로 혈소판을 최대로 응집시키는 thrombin의 농도는 0.5 U/ml임을 알 수 있다. 이것을 곡선으로 나타내면 0.5 U/ml과 1 U/ml의 농도곡선이 거의 일치함을 보이는 것으로부터도 알 수 있다.

(3) 혈소판 응집 반응을 최대로 일으키는 ADP의 농도결정

ADP는 collagen 및 thrombin에 의해 혈소판이 응집될 때 혈소판 dense body에서 혈중으로 방출되어 collagen이나 thrombin의 수용체와 다른 ADP수용체 (P2Y12)에 작용하여 혈소판 응집을 일으킨다. 이것의 억제제는 항 혈소판제로서 사용되므로, ADP의 응집반응에 미치는 효과를 보기위해 우선 최대로 혈소판 응집을 일으키는 ADP의 농도를 결정했다.

ADP (μM)	Platelet aggregation (%)
2.5	24 \pm 1.4
5	34 \pm 1.4
10	54 \pm 1.5
15	56 \pm 1.4

Table 3. Maximum concentration of ADP on platelet aggregation

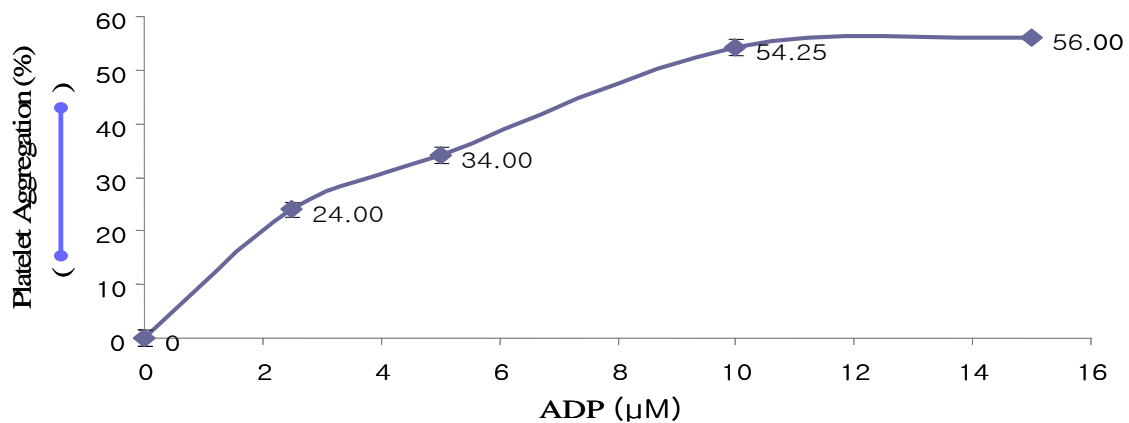


Fig. 3. Threshold concentration of ADP on platelet aggregation

▶Table 3에서 볼 수 있듯이 ADP는 그 농도에 의존하여 혈소판의 응집을 촉진시켰지만, 10~15 μM 의 ADP에 의해서 거의 평행선을 이루면서 더 이상 응집이 일어나지 않았다. 그래서, 혈소판 응집을 최대로 일으키는 ADP의 농도는 10 μM 로 결정하였다.

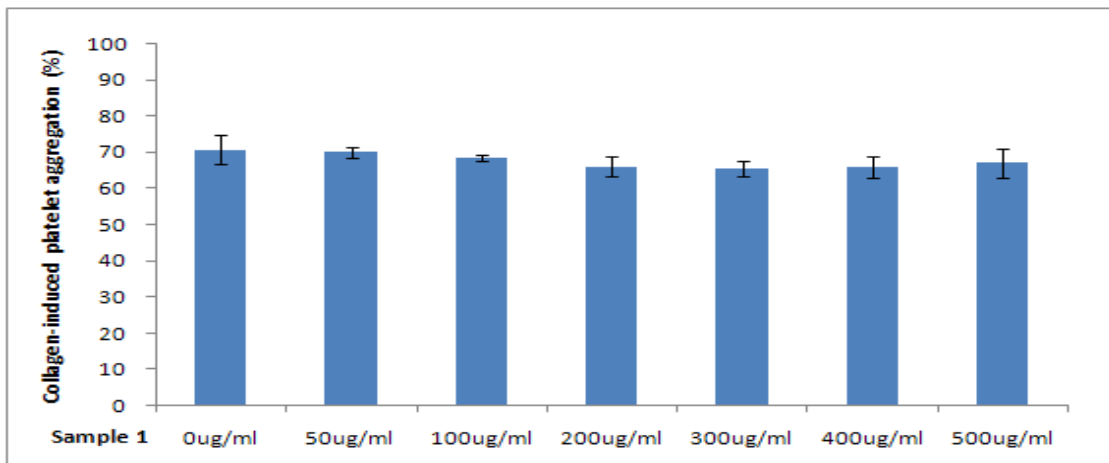
▶Rat로부터 얻은 세척혈소판 (108개 platelets/ml)에 ADP 농도별로 첨가하여 혈소판 응집반응을 측정하였다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 2.5~10 μM 의 ADP에 의해 계속적으로 응집이 증가하다가 15 μM 의 ADP에 의해서는 10 μM 보다 약간 감소하는 경향으로 응집이 일어났다. 이것으로 혈소판을 최대로 응집시키는 ADP의 농도는 10 μM 임을 알 수 있다. 이것을 곡선으로 나타내면 10 μM 과 15 μM 의 농도곡선이 거의 일치함을 보이는 것으로 부터도 알 수 있다.

(4) 액체발효 Sample 1, 2의 혈소판 응집반응에 미치는 효과

① Sample 1, 2가 collagen-유인 Rat 혈소판의 응집에 미치는 효과 (Table 4)

	Platelet aggregation (%)	Inhibition (%)
Collagen (10 µg/ml)	70.7 ± 4.0	-
Sample 1 (µg/ml)		
50	70.0 ± 1.4	1.0
100	68.5 ± 0.7	3.1
200	66.0 ± 2.8	6.6
300	65.3 ± 2.1	7.6
400	66.0 ± 3.0	6.6
500	66.7 ± 2.8	5.7
Collagen (10 µg/ml)	76.3 ± 2.5	-
Sample 2 (µg/ml)		
50	75.5 ± 5.0	1.0
100	71.3 ± 2.1	6.6
200	66.5 ± 2.1*	12.8
300	50.0 ± 1.4*	34.5
400	51.5 ± 2.1*	32.5
500	43.0 ± 2.8*	43.6
1000	32.0 ± 5.6*	58.1
2500	18.0 ± 0.0*	76.4

Data are expressed as mean ± S.D (n=1~3). *: p <0.05 compared with control (Sample 1 : 백삼추출물, Sample 2 : B.natto 액체발효 백삼추출물)



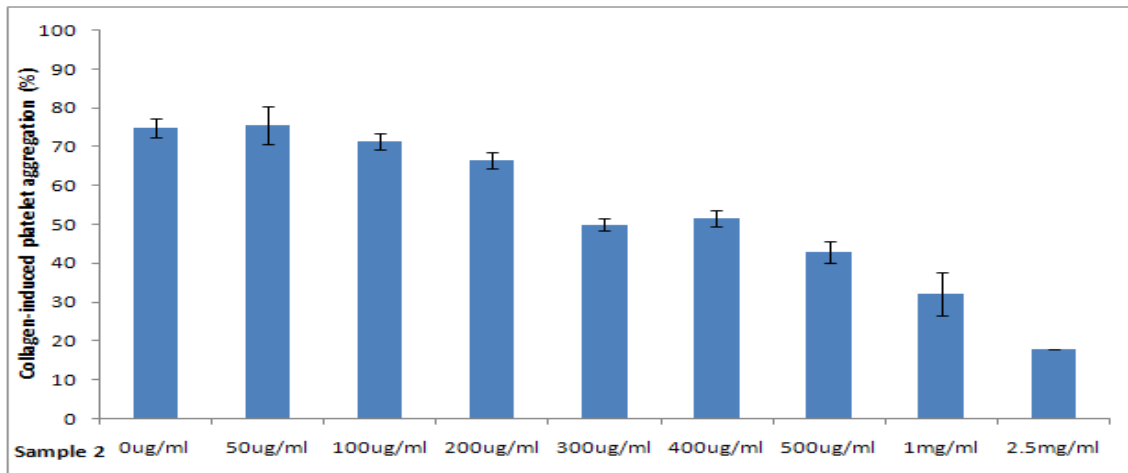


Fig. 4. Sample 1, 2가 collagen-유인 rat 혈소판의 응집에 미치는 효과

▶ Sample 2은 농도 의존적으로 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)에 의해 유인된 혈소판 응집반응을 억제시켰고 Sample 1에서는 억제효과가 거의 나타나지 않았다. sample 2가 collagen의 최대응집을 반으로 억제시키는 농도(IC50)는 약 874.3 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.

② Sample 1, 2가 thrombin-유인 Rat 혈소판의 응집에 미치는 효과 (Table 5)

	Platelet aggregation (%)	Inhibition (%)
Thrombin (0.5Unit/ml)	76.7 \pm 2.1	-
Sample 1 ($\mu\text{g/ml}$)		
50	71.0 \pm 1.4	7.4
100	74.5 \pm 0.7	2.9
200	70.0 \pm 1.4	8.7
300	69.0 \pm 1.4	10.0
400	72.3 \pm 4.5	5.7
500	71.5 \pm 0.7	6.8
Thrombin (0.5Unit/ml)	76.3 \pm 2.3	-
Sample 2 ($\mu\text{g/ml}$)		
50	77.5 \pm 3.5	2.0
100	78.5 \pm 4.9	3.0
200	77.0 \pm 2.8	-
300	78.0 \pm 2.8	-
400	78.5 \pm 2.1	-
500	74.8 \pm 1.3	-
1000	74.0 \pm 1.4	-

Data are expressed as mean \pm S.D (n=1~3). *: p <0.05 compared with control (Sample 1 : 백삼추출물, Sample 2 : B.natto 액체발효 백삼추출물)

▶ Thrombin (0.5 Unit/ml)에 의해 유인된 혈소판 응집반응에서는 Sample 1에서 약간의 억제효과가 나타났다.

③ Sample 1, 2가 ADP-유인 Rat 혈소판의 응집에 미치는 효과 (Table 6)

	Platelet aggregation (%)	Inhibition (%)
ADP (10 μ M)	70.3 \pm 5.3	-
Sample 1 (μ g/ml)		
50	66.0 \pm 1.4	6.1
100	65.0 \pm 2.8	7.5
200	71.0 \pm 4.2	-
300	64.0 \pm 0.0	9.0
400	65.5 \pm 0.7	6.8
500	67.5 \pm 2.1	4.0
1000	67.3 \pm 3.5	4.3
ADP (10 μ M)	56.3 \pm 5.3	-
Sample 2 (μ g/ml)		
50	54.0 \pm 0.0	4.1
100	59.0 \pm 0.0	-
200	58.0 \pm 0.0	-
300	55.0 \pm 0.0	2.3
400	51.0 \pm 0.0	9.4
500	50.0 \pm 0.0	11.2

Data are expressed as mean \pm S.D (n=1~3). *: p <0.05 compared with control (Sample 1 : 백삼추출물, Sample 2 : B.natto 액체발효 백삼추출물)

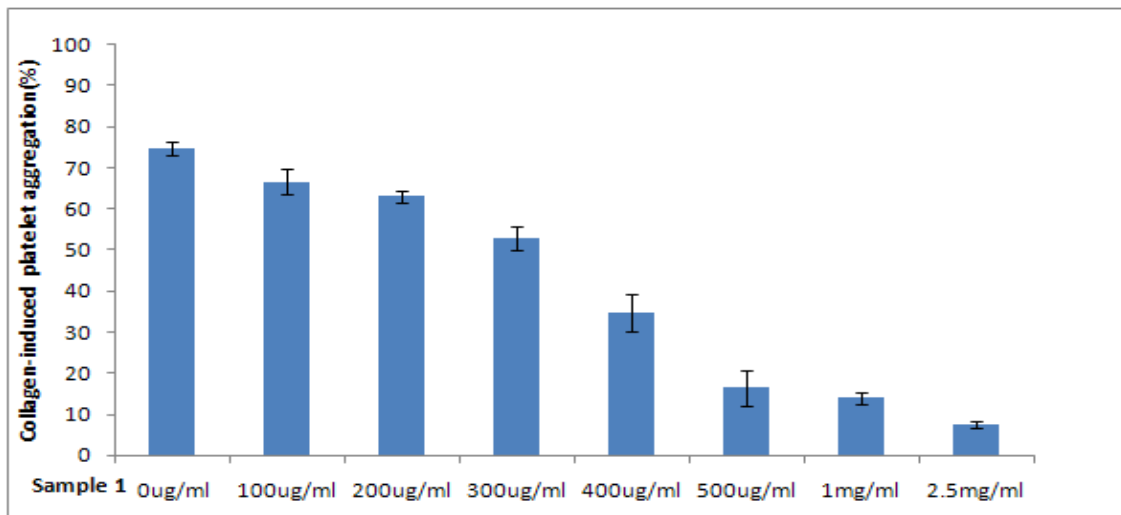
▶ADP (10 μ M)에 의해 유인된 혈소판 응집반응에서는 Sample 1, 2에서 모두 약간의 억제효과가 나타났다.

(5) 고체발효 Sample 1, 2의 혈소판 응집반응에 미치는 효과

① 고체발효 Sample 1, 2가 collagen-유인 rat혈소판의 응집반응에 미치는 효과(Table 7)

	Platelet aggregation (%)	Inhibition (%)
Collagen (10 µg/ml)	74.7 ± 1.5	-
Collagen + Sample 1 (µg/ml)		
100	66.7 ± 3.2*	10.7
200	63.0 ± 1.4*	15.7
300	53.0 ± 2.8*	29.0
400	34.7 ± 4.6*	53.6
500	16.5 ± 4.4*	77.9
1000	14.0 ± 1.4*	81.3
2500	7.5 ± 0.7*	90.0
Collagen (10 µg/ml)	75.5 ± 0.7	-
Collagen + Sample 2 (µg/ml)		
100	73.0 ± 2.7	3.3
200	75.0 ± 2.8	0.7
300	69.5 ± 0.7	7.9
400	57.0 ± 2.8*	24.5
500	35.0 ± 2.8*	54.6
1000	22.3 ± 2.3*	70.5
2500	8.0 ± 1.4*	89.4

Data are expressed as mean ± S.D (n=3). *: p <0.05 compared with collagen alone
(고체발효 Sample 1 : 백삼추출물, 고체발효 Sample 2 : B.natto 발효 백삼추출물)



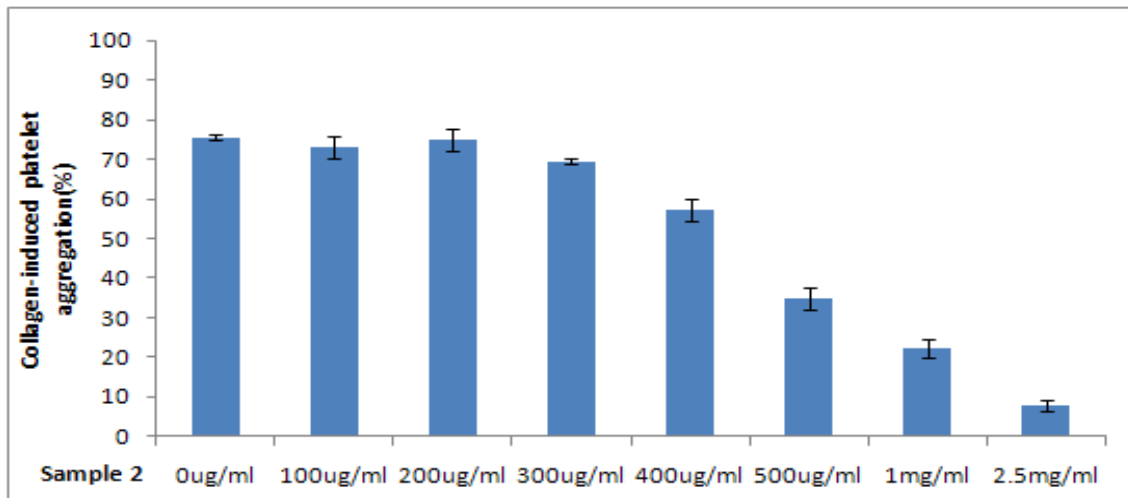


Fig. 5. 고체발효 Sample 1, 2가 collagen-유인 rat 혈소판의 응집반응에 미치는 효과

▶ Sample 1, 2는 농도 의존적으로 collagen (10 µg/ml)에 의해 유인된 혈소판 응집반응을 억제시켰다. collagen의 최대응집을 반으로 억제시키는 농도(IC50)는 Sample 1, 2가 각각 385.4 µg/ml, 487.5 µg/ml 로 나타났다.

② 고체발효 Sample 1, 2가 thrombin-유인 rat 혈소판의 응집반응에 미치는 효과 (Table 8)

	Platelet aggregation (%)	Inhibition (%)
Thrombin (0.5 Unit/ml)	81.8 ± 3.6	-
Thrombin + Sample 1 (µg/ml)		
100	75.5 ± 0.7	7.7
200	73.0 ± 1.4*	10.7
300	71.0 ± 0.0*	13.1
400	67.5 ± 2.1*	17.4
500	61.5 ± 2.1*	24.8
1000	43.0 ± 2.8*	47.4
2500	6.0 ± 1.4*	92.7
Thrombin (0.5 Unit/ml)	75.3 ± 1.9	-
Thrombin + Sample 2 (µg/ml)		
100	74.7 ± 3.8	0.8
200	74.7 ± 0.6	0.8
300	75.0 ± 1.0	0.4
400	73.3 ± 3.1	2.7
500	55.0 ± 1.4*	27.0
1000	26.0 ± 1.4*	65.5
2500	9.0 ± 1.4*	88.0

Data are expressed as mean ± S.D (n=3). *: p < 0.00. compared w.ch.collagen alone (고체발효 Sample 1 : 백삼추출물, 고체발효 Sample 2 : B.natto 발효 백삼추출물)

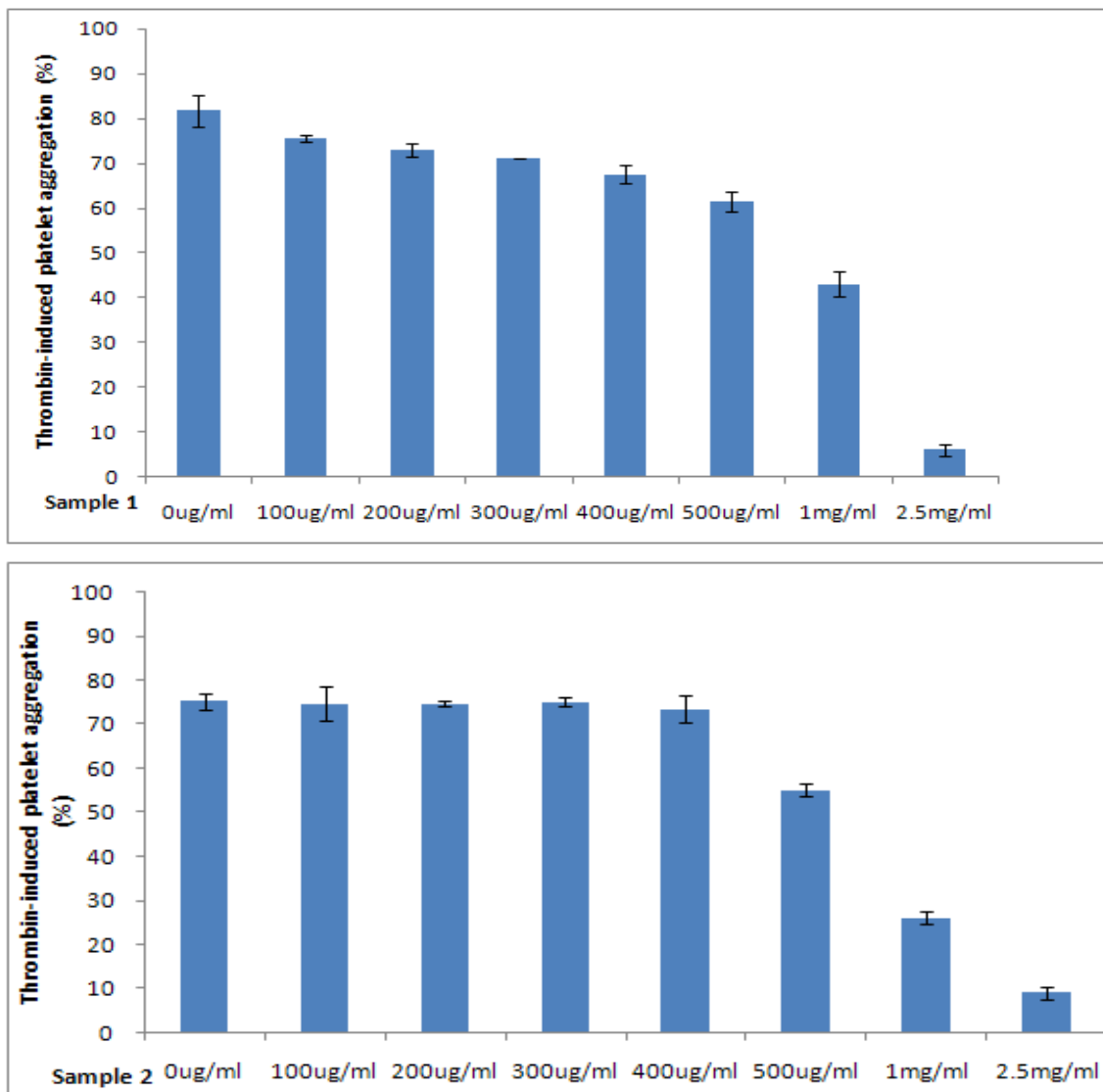


Fig. 6. 고체발효 Sample 1, 2가 thrombin-유인 rat 혈소판의 응집반응에 미치는 효과

▶ Sample 1, 2는 농도 의존적으로 thrombin (0.5 Unit/ml)에 의해 유인된 혈소판 응집반응을 억제시켰다. thrombin의 최대응집을 반으로 억제시키는 농도(IC50)는 Sample 1, 2가 각각 1067.4 $\mu\text{g/ml}$, 499.6 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.

③ 고체발효 Sample 1, 2가 ADP-유인 rat 혈소판의 응집반응에 미치는 효과 (Table 9)

	Platelet aggregation (%)	Inhibition (%)
ADP (10 μ M)	55.3 \pm 6.8	-
ADP + Sample 1 (μ g/ml)		
62.5	64.5 \pm 4.9	-
12.5	61.0 \pm 9.9	-
250	59.5 \pm 0.7	-
500	62.0 \pm 0.7	-
ADP (10 μ M)	59.0 \pm 1.7	-
ADP + Sample 2 (μ g/ml)		
100	57.5 \pm 0.7	2.5
200	60.0 \pm 2.8	-
300	58.0 \pm 1.4	1.7
400	65.5 \pm 2.1	-
500	45.5 \pm 0.7*	22.9
1000	35.3 \pm 2.5*	39.8

Data are expressed as mean \pm S.D (n=3). *: p <0.05 compared with collagen alone
 (고체발효 Sample 1 : 백삼추출물, 고체발효 Sample 2 : B.natto 발효 백삼추출물)

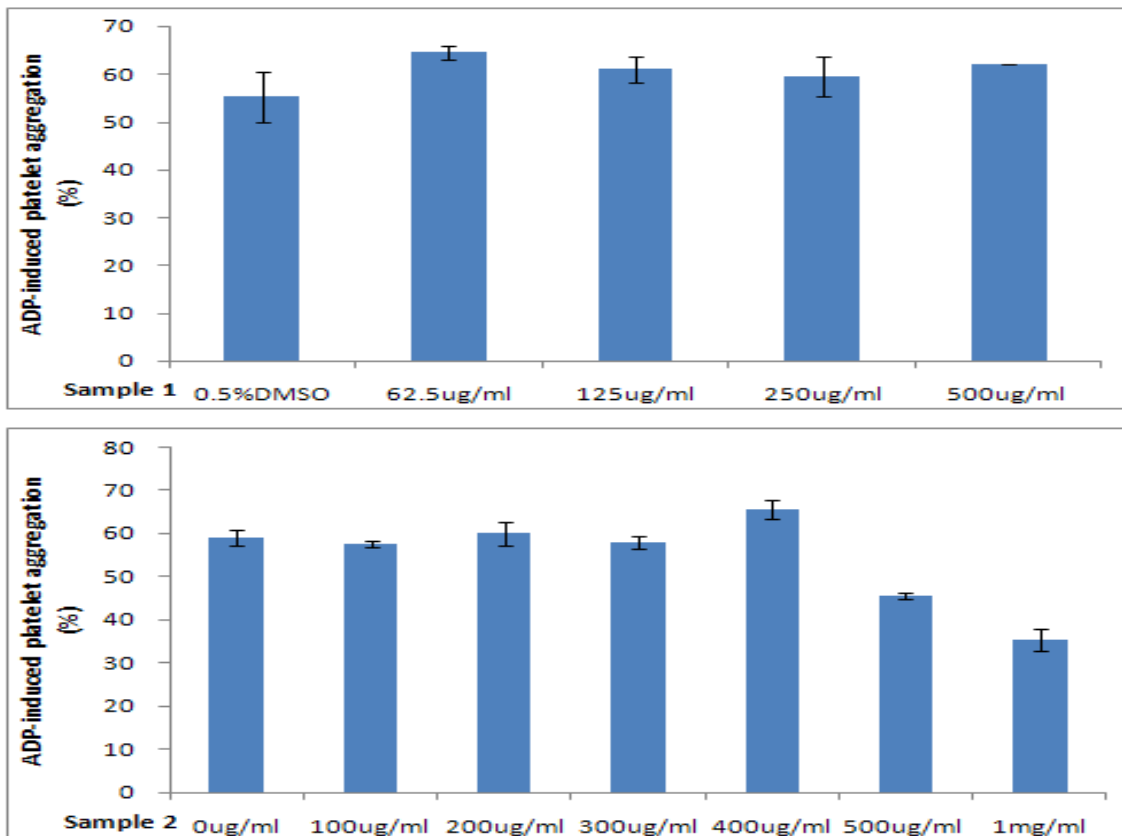


Fig. 7. 고체발효 Sample 1, 2가 ADP-유인 rat 혈소판의 응집반응에 미치는 효과
 ▶ ADP (10 μ M)에 의해 유인된 혈소판 응집반응에서는 높은 농도의 Sample 2에서만 응집 억제효과가 나타났다.

나. 혈액 응고 억제 평가

1) 실험목적

activated partial thromboplastin time (aPTT) 및 prothrombin time (PT) 측정의 내인성 및 외인성 혈액응고계에 대한 작용 평가

2) 실험방법

(1) APTT 측정: APTT는 factor VII, XIII을 제외한 혈장응고 효소의 결핍에 대한 screening test로서 사용됨.

-cephalin이 들어있는 APTT 시약을 9 ml의 증류수를 가해 녹인 후 15-25°C 되는 곳에 보관하고, 혈소판을 완전히 제거한 PPP에 시료를 넣고 10분간 incubation시킨 후 혈액 응고자동측정기(ACL analyzer)에 넣고 응고시간을 관찰함.

-먼저 로터에 sample이 50 μ l를 취해지고 cephalin 용액이 100 μ l 가해진 후 CaCl₂ 50 μ l 첨가로 반응이 시작되어 혈장이 응고되는 시간이 탁도법에 의해 측정됨.

(2) PT 측정: PT는 fibrinogen, prothrombin, factor V, VII, X을 포함하는 외인계응고기 전 측정

-정제수 8 ml로 PT-Fibrinogen 시약을 녹인 후 15-25°C 되는 곳에 보관하며, 혈소판을 완전히 제거한 PPP에 시료를 넣고 10분간 incubation 시킨 후 혈액응고자동측정기 (ACL analyzer)에 넣고 응고시간을 관찰함.

-로터에 혈장 sample이 50 μ l 취해진 후, 미리 37°C에서 incubation 시킨 calcium thromboplastin 100 μ l가 가해지면 반응이 시작되고 탁도법에 의해 응고시간이 측정됨.

3) 실험결과

(1) 액상발효 Sample 1,2가 Rat 혈액 응고에 미치는 효과

① Sample 1,2가 Rat 혈액의 PT에 미치는 효과 (Table 10)

	PT time (초)	Extension (%)
Control	14.9 ± 0.0	-
Sample 1 (µg/ml)		
50	15.0 ± 0.3	0.7
100	14.6 ± 0.7	-
200	15.0 ± 0.9	0.7
300	14.5 ± 1.1	-
400	14.7 ± 0.5	-
500	14.8 ± 0.4	-
Control	16.0 ± 0.4	-
Sample 2 (µg/ml)		
50	16.5 ± 0.5	3.0
100	16.2 ± 0.6	1.8
200	16.3 ± 0.7	1.8
300	16.0 ± 0.3	-
400	15.7 ± 1.1	-
500	15.7 ± 0.4	-
1000	16.0 ± 0.8	-

Data are expressed as mean ± S.D (n=3). *: p <0.05 compared with control
(Sample 1 : 백삼추출물, Sample 2 : 액체발효 백삼추출물)

② Sample 1,2가 Rat 혈액의 APTT에 미치는 효과 (Table 11)

	PT time (초)	Extension (%)
Control	18.9 ± 0.0	-
Sample 1 (µg/ml)		
50	19.3 ± 0.6	2.1
100	18.8 ± 0.7	-
200	19.6 ± 0.1	3.6
300	19.1 ± 0.6	1.0
400	18.9 ± 0.4	-
500	18.9 ± 0.2	-
Control	20.3 ± 0.4	-
Sample 2 (µg/ml)		
50	21.3 ± 0.3	4.7
100	20.7 ± 0.2	1.9
200	21.7 ± 0.4	6.5
300	20.7 ± 0.4	1.9
400	20.4 ± 0.9	0.5
500	19.5 ± 0.4	-
1000	20.9 ± 0.5	2.9

Data are expressed as mean ± S.D (n=3). *: p <0.05 compared with control
(Sample 1 : 백삼추출물, Sample 2 : 액체발효 백삼추출물)

▶ 액상발효 Sample 1, 2는 PT, APTT의 응고반응의 연장에 거의 영향을 미치지 않았다.

(2)고체발효 Sample 1, 2가 Rat 혈액 응고에 미치는 효과

① 고체발효 Sample 1, 2가 Rat 혈액의 PT에 미치는 효과 (Table 12)

	PT time (초)	Extension (%)
Control	13.4 ± 0.3	-
Sample 1 (µg/ml)		
100	13.7 ± 0.2	2.2
200	13.1 ± 0.0	-
300	13.2 ± 0.4	-
400	13.2 ± 0.3	-
500	13.3 ± 0.2	-
1000	13.3 ± 0.1	-
2500	13.4 ± 0.1	-
Control	14.6 ± 1.1	-
Sample 2 (µg/ml)		
100	15.6 ± 0.3	6.4
200	14.1 ± 0.1	-
300	13.9 ± 0.2	-
400	13.9 ± 0.0	-
500	14.1 ± 0.1	-
1000	14.7 ± 0.8	0.7
2500	14.2 ± 0.2	-

Data are expressed as mean ± S.D (n=3). *: p <0.05 compared with control
(고체발효 Sample 1 : 백삼추출물, 고체발효 Sample 2 : B.natto 발효 백삼추출물)

② 고체발효 Sample 1, 2가 Rat 혈액의 APPT에 미치는 효과 (Table 13)

	PT time (초)	Extension (%)
Control	17.3 ± 0.0	-
Sample 1 (µg/ml)		
100	17.9 ± 0.2	3.6
200	17.3 ± 0.6	-
300	17.3 ± 0.3	-
400	17.5 ± 0.1	1.1
500	17.5 ± 0.1	1.1
1000	17.7 ± 0.1	2.3
2500	16.4 ± 0.1	-
Control	17.2 ± 0.8	-
Sample 2 (µg/ml)		
100	17.6 ± 0.3	2.3
200	17.5 ± 0.2	1.7
300	16.6 ± 0.6	-
400	16.8 ± 0.7	-
500	16.5 ± 0.6	-
1000	16.8 ± 0.8	-
2500	17.3 ± 0.1	0.6

Data are expressed as mean ± S.D (n=3). *: p <0.05 compared with control
(고체발효 Sample 1 : 백삼추출물, 고체발효 Sample 2 : B.natto 발효 백삼추출물)

▶B.natto 및 백삼콩은 PT, APPT의 응고반응의 연장에 거의 영향을 미치지 않았다.

다. 혈행개선 관련 biomarker 측정

1) 실험목적

Serotonin release 측정 실험

2) 실험방법

rat or rabbit 혈소판액 (Platelet-rich plasma 또는 washed plate 현탁액)에 일정시간 시료 처리 후, 혈소판 응집억제실험에 사용된 collagen 또는 thrombin 일정농도를 가하고 3분 반응시킴 (100% release를 위해서는 0.3%triton X-100을 사용, thrombin 등 응집제 생략), 700 ul를 취해, 50 mM EDTA 70 uL와 첨가, vortex, ice 냉각에 의한 반응중지, 12,000g에서 2분간 원심분리, 상등액 700 ul를 6M TCA 140 ul 첨가, 12,000g에서 2분 원심분리, 상등액 600ul를 0.5% o-phathalaldehyde 용액을 첨가해 fluorophore 형성, boiling, 냉각, 클로로포름 첨가 후 상층액을 취해 형광측정, 100% release를 기준으로 시료의 억제작용 평가

3) 실험결과

(1) 고체발효 Sample 2의 혈소판 serotonin release에 미치는 영향

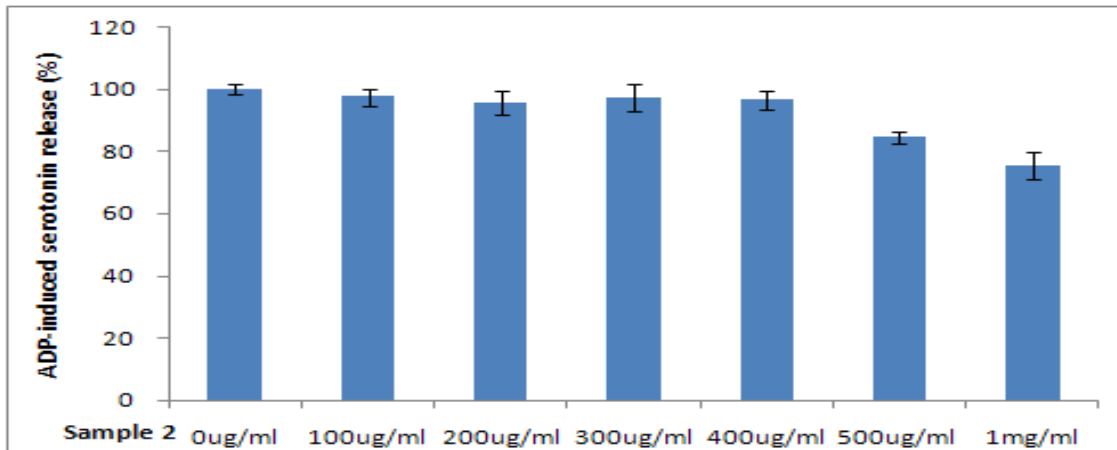


Fig. 8. 고체발효 Sample 2의 ADP-유인 rat 혈소판의 serotonin release에 미치는 효과

▶ Serotonin release에 대한 효과를 알아보기 위해 위에서 유효한 효과를 확인한 고체발효 Sample 2를 혈소판에 전처리하여 serotonin의 양을 정량한 결과 500ug/ml와 1mg/ml 농도에서 농도의존적으로 감소하는 결과를 얻을 수 있었다.

라. 혈관평활근에 대한 작용평가 및 기전연구

1) 실험목적

가토 적출 경동맥 평활근이완 실험 및 기전연구

2) 실험방법

- (1) 평활근이완 실험 : 가토의 경동맥을 적출하여 2-3 mm 두께의 ring 형태로 절단 후 Schuler organ bath에 현수, 1 g tension하에서 연속적으로 안정화시킴, phenylephrine에 의한 농도의존성 수축반응 곡선을 결정하여 시료의 억제작용을 평가함.
- (2) 기전연구: 혈관이완인자에 대한 blocker를 사용하여 작용기전에 대해 탐색함.

3) 실험결과

(1) NE로 수축된 혈관에 미치는 Sample 1의 영향

Effects of Sample 1 extract on the contraction of arterial smooth muscle induced by NE (Table 14)

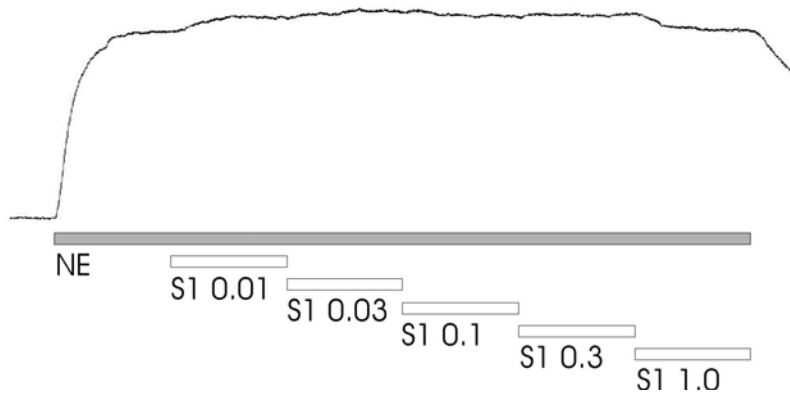
Treatment	Contraction(g)	Relaxation(%)
NE	1.51 ± 0.17 ^a	0
NE + S1 0.01 mg/ml	1.67 ± 0.21	-10.6 ± 4.4
NE + S1 0.03 mg/ml	1.68 ± 0.19	-11.4 ± 5.3
NE + S1 0.1 mg/ml	1.70 ± 0.21	-12.7 ± 6.8
NE + S1 0.3 mg/ml	1.67 ± 0.19	-10.8 ± 6.9
NE + S1 1.0 mg/ml	1.56 ± 0.22	- 3.5 ± 8.1

a : mean±S.D.(n=8).

Relaxation : Percentage of decreased contraction compared with NE precontraction.

NE : norepinephrine 5 μM.

S1 : 백삼추출물, 고체발효



▶NE로 수축시킨 혈관절편에 Sample 1 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 mg/ml을 투여하였을 때 모두 혈관의 수축을 증가시켰다.

(2) NE로 수축된 혈관에 미치는 Sample 2의 영향

Effects of Sample 2 extract on the contraction of arterial smooth muscle induced by NE (Table 15)

Treatment	Contraction(g)	Relaxation(%)
NE	1.57 ± 0.32 ^a	0
NE + S2 0.01 mg/ml	1.68 ± 0.32	- 7.0 ± 3.2
NE + S2 0.03 mg/ml	1.73 ± 0.33	-10.1 ± 5.4 **
NE + S2 0.1 mg/ml	1.71 ± 0.41	- 8.7 ± 8.7 *
NE + S2 0.3 mg/ml	1.66 ± 0.49	- 4.3 ± 12.7
NE + S2 1.0 mg/ml	1.49 ± 0.58	7.9 ± 18.9 *

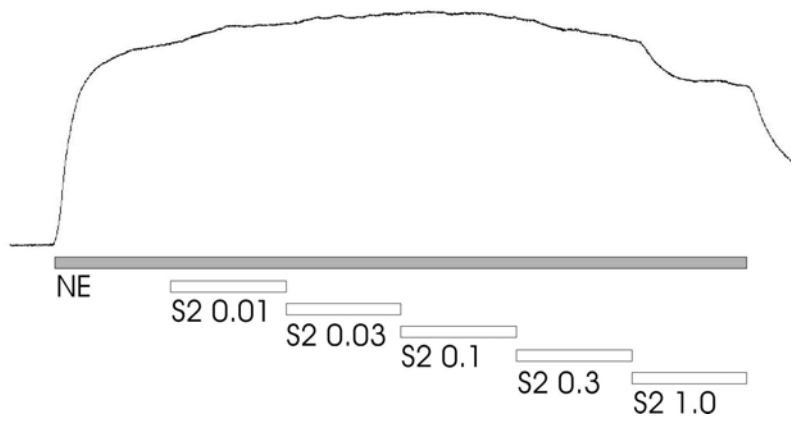
a : mean±S.D.(n=8).

Relaxation : Percentage of decreased contraction compared with NE precontraction.

NE : norepinephrine 5 μM.

S2 : B.natto 발효 백삼추출물

* : significantly different from the value with NE(* : p<0.05, ** : p<0.01).



▶NE로 수축시킨 혈관절편에 Sample 2 0.03, 0.1 mg/ml을 투여하였을 때는 유의성 있게 수축이 증가되었으나, 1.0 mg/ml에서 유의성 있는 혈관이완효과를 나타내었다.

(3) 혈관내피세포 유무에 따른 이완효과

Effects of Sample 2 extract on the contraction of arterial smooth muscle with intact endothelium or damaged endothelium induced by NE (Table 16)

Treatment	Intact endothelium		Damaged endothelium	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
NE	1.60±0.41 ^a	0	1.87±0.59	0
NE+S2	0.44±0.43	10.1±10.6 *	1.98±0.65	-5.4±4.5 ##

a : mean±S.D.(n=7).

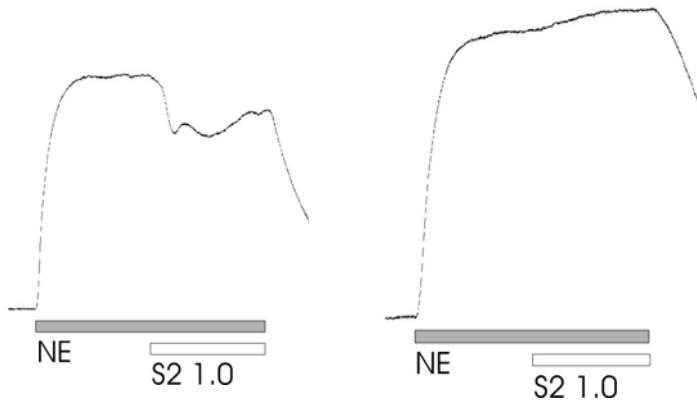
Relaxation : Percentage of decreased contraction compared with NE precontraction.

NE : norepinephrine 5 μM.

S2 : natto 발효 백삼추출물 1.0 mg/ml.

* : significantly different from the value with NE(* : p<0.05).

: significantly different from the value with NE+S2 in intact endothelium (## : p<0.01).



▶혈관내피세포가 존재하는 경우에 Sample 2는 NE로 수축시킨 혈관에 대하여 혈관이완 효과를 나타내었으나, 혈관내피세포가 제거된 경우에는 NE로 수축시킨 혈관에 대한 Sample 2의 혈관이완효과가 유의성 있게 억제되었다.

(4) L-NNA의 전처치에 따른 수축변화

Effects of pretreatment of L-NNA on the endothelium-dependent relaxation induced by Sample 2 extract (Table 17)

Treatment	Non treatment of L-NNA		Treatment of L-NNA	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
NE	1.60±0.42 ^a	0	1.90±0.64	0
NE+S2	0.44±0.43	9.5±10.6 *	2.02±0.68	-6.7±4.1 ** #

a : mean±S.D.(n=7).

Relaxation : Percentage of decreased contraction compared with NE precontraction.

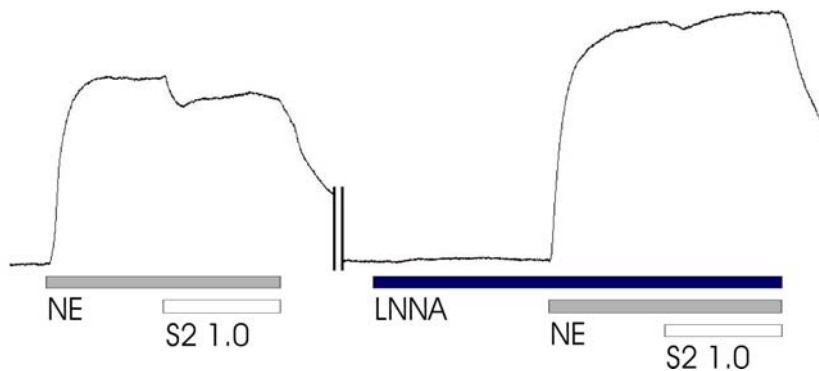
L-NNA : N ω -nitro-L-arginine 100 μ M.

NE : norepinephrine 5 μ M.

S2 : natto 발효 백삼추출물 1.0 mg/ml.

* : significantly different from the value with NE(* : p<0.05, ** : p<0.01).

: significantly different from the value with NE+S2 in non treatment of L-NNA(## : p<0.01).



▶L-NNA를 전처치하지 않은 경우에 Sample 2는 NE로 수축시킨 혈관에 대하여 유의성 있는 혈관이완효과를 나타내었으나, L-NNA를 전처치한 경우에는 NE로 수축시킨 혈관에 대한 Sample 2의 혈관이완효과가 유의성 있게 억제되었다.

3. 결론

- 1) 액체발효물과 고체발효물의 유효한 효능을 비교한 결과 액체발효물보다 고체발효물에서의 혈소판응집억제 및 혈관수축에서 효과가 높게 나타났다.
- 2) 액체발효물의 효과는 외인성인자의 억제를 통해 나타난다기 보다는 내인성인자 중 혈소판의 기능을 억제하여 유효한 효과를 발휘한다는 것을 확인할 수 있었다.
- 3) 고체발효물의 혈관평활근에 미치는 효과를 관찰한 결과 강하지는 않으나 고체발효물에서 효과를 관찰할 수 있었고, 기전연구를 통해 작용기전을 확인한 결과 혈관내피에 존재하는 eNOS에 영향을 미쳐 혈관이완효과를 발휘한다는 것을 확인할 수 있었다.
- 4) 위 결과를 종합하여 보자면 고체발효물은 혈소판 응집과 혈관평활근 이완작용을 통해 혈행개선을 시키는 것으로 확인되었으며, 이의 효과는 기능성 제품으로 만드는데 손색이 없는 것으로 판단된다.

제 6 절. 시제품 제조

1. 고상발효물을 이용한 시제품 제조

1) 시제품화를 위한 고상발효물의 전처리 공정

발효가 끝난 고상 발효물 전체를 동결건조시켜 수분함량을 5% 이하로 조절하였다. 동결건조시 발효취 등의 이취가 상당량 제거되는 것으로 나타났다.

건조된 고상발효물을 하드캡슐화와 과립화에 적합한 입자크기로 핀밀을 사용하여 분쇄하였다. 하드캡슐화 및 과립화에 사용한 고상발효 건조물의 입자크기는 80mesh를 통과한 것을 사용하였다.

2) 고상발효물의 하드캡슐 시제품 제작

(1)건조된 고상발효물을 수분함량 5% 미만, 입자크기 80mesh 이하로 분쇄하였다.

(2)캡슐화에 적합하도록 적절히 가수하여 조절하여 입자의 흐름성을 조절한다. 캡슐에 충전될때 브릿지(bridge)현상 등에 의해 캡슐속으로 내용물이 제대로 충전되지 않는 현상 등을 방지하기 위하여 입자의 흐름성을 조절한다. 필요시 부재료[증량제(텍스트린 등), 감미료(포도당 등)]를 적정량 배합할 수 있다.

(3)캡슐레이션후 공기세척에 의해서 캡슐의 표면에 붙어있는 미립자들과 이물을 제거한다.

(4)육안에 의한 캡슐검사로 불량품을 선별한다.

(5)습기가 통하지 않도록 제습제를 사용하고 적절히 포장한다.



Fig. 1. 고상발효물의 하드캡슐화 제조 공정

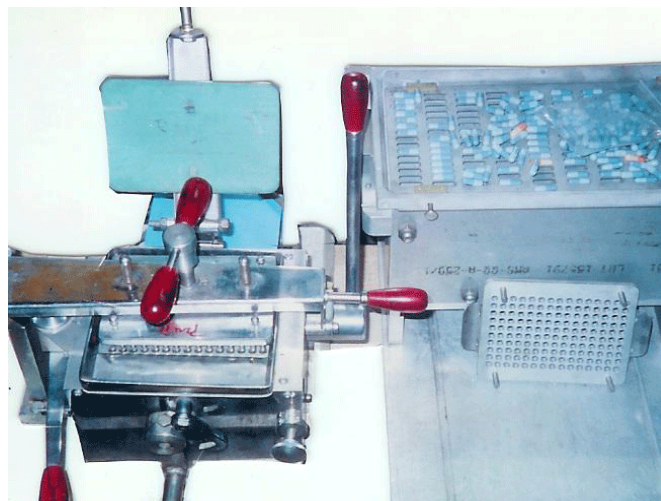


Fig. 2. 반자동식 캡슐제품 제조장치

3) 고상발효물의 과립 시제품 제작

- (1) 건조된 고상발효물을 수분함량 5% 미만, 입자크기 80mesh 이하로 분쇄하였다.
- (2) 감미를 위해서 포도당을 일부 첨가하고, 과립화에 적합하도록 증류수를 가수하여 잘 균질화시킨후, 입자의 뭉침성을 조절하여 반죽물을 제조한다(Table1 참조).

성 분	배합비
고상발효물 분말	64%
포도당(함수결정)	16%
증류수(가수량)	20%
합 계	100%

Table1. 과립화를 위한 반죽물의 성분조성

- (3)과립기 호퍼에 반죽물을 충전하고 압출력에 의해 15-20mesh크기로 과립을 제조한다.
- (4)55℃ 이하의 열풍으로 수분함량이 8%이하가 되도록 과립을 건조시킨다.
- (5)건조된 과립을 sieving에 의하여 선별한다.
- (6)습기가 통하지 않도록 제습제를 사용하여 적절히 포장한다.

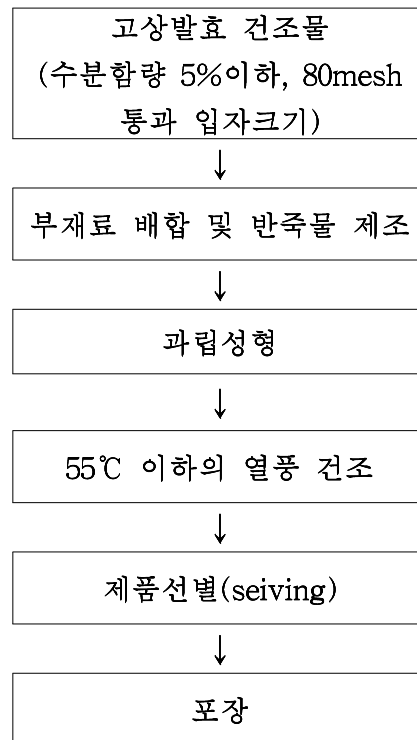


Fig. 3. 고상발효물의 과립화 제조 공정



Fig. 4. 과일 성형기

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연도별 연구개발의 목표 및 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2008. 06.25 ~ 2009. 06.24)	발효법을 이용한 생물전환 인삼조성물 및 그 제조 (제1세부)	생물전환 우수 발효균주 선별 및 동정	100%	◦선정균주 9종을 Esculin 배지에 접종 및 배양 ◦선정균주 3종을 0주차, 1주차, 2주차 미삼 발효 후 성분을 분석
		생물전환능력이 우수한 균주 개발	80%	◦B.natto 균주를 통한 계대 배양 후 0주차, 1주차, 2주차 미삼 발 효 후 성분분석(균주개발)
		선별 균주를 통한 최적 발효 조건의 확립	100%	◦발효기간, 온도 등에 의한 최적 발효조건 확립
	성분 분리 및 분석 (제1협동)	성분 분석	100%	◦인삼 sapogenin 고농도 함유 인 삼 식품소재의 성분 HPLC 분석
		인삼사포닌 분리 및 동정	100%	◦인삼사포게닌(protopanaxadiol, protopanaxatriol)을 분리 확인 동정
	생리활성 시험 (제2협동)	혈행개선 생리활성시험 1 :In-vitro 혈소판 응집 억제작 용 및 기전 평가	100%	◦인삼사포게닌에 대한 혈소판 응 집억제작용 평가
		혈행개선 생리활성시험 2 : 혈관평활근에 대한 작용평가	100%	◦인삼사포게닌의 혈관평활근에 대한 작용 평가
	식품 소재화 가공 (제3협동)	유효성분의 용매별 추출조건 확립	100%	◦증류수, 에탄올 등 용매에 따른 추출율 조사
		액상추출물의 적정 농축 및 분말소재화 공정 확립	100%	◦적정고형분 함량을 위한 진공농 축조건 검토 ◦분무건조 조건 검토

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2009. 06.25 ~ 2010. 06.24)	발효법을 이 용한 생물전 환 인삼조성 물 및 제조 (제1세부)	원료추출 및 제조법 연구	100%	◦최적의 sapogenin을 이용한 인삼 식품소재 제조공정 검토
		발효방법 연구	100%	◦종균의 배양방법에 따른 sapogenin 함량비교 연구
		제품의 원료규격 설정 연구	80%	◦원료의 sapogenin 표준화 연 구 및 기준규격 설정 연구
		우수균주를 통한 Scale-up 제조공정 연구	100%	◦시작품생산 및 Scale-up에 대 비한 제조공정 최적화 연구
	식품소재 분 석법 연구 (제1협동)	기기분석 시험법 연구	100%	◦주성분 분리정량이 가능한 기 기분석 시험법을 개발하여 회 수율 98% 이상을 목표로 함
	생리활성 시 험(제2협동)	시제품의 혈행개선 생리활성 시험-혈소판 응집 억제 작용	100%	◦사포게닌 고농도 함유 시제품 에 대한 혈소판 응집 억제 작 용 평가
		시제품의 혈행개선 생리활성 시험-혈관평활근에 대한 작용	100%	◦사포게닌 고농도 함유 시제품 의 혈관평활근에 대한 작용평 가
		시제품의 혈행개선 생리활성 시험-종합적 혈행개선 효능	100%	◦사포게닌 고농도 함유 시제품 에 대한 종합적 혈행개선 효능 평가 및 기전연구 (혈행개선 biomarker serotonin 분비측정 등)
	발효물을 이 용한 고형 시제품 제조 (제3협동)	적정 건조공정검토 적정 부형제 선정 관능검사	100%	◦냉동건조 ◦열풍건조 ◦Panel discussion 방식에 의한 적정 부형제 및 감미제 선정

제 5 장 연구개발결과의 활용 계획

1. 제품화

▶ 객관적, 과학적 연구 결과를 바탕으로 한 신뢰할 수 있는 혈행개선 제품 출시

혈행개선과 관련된 식품은 너무나도 많지만 대부분이 과대, 허위 광고나 노인을 대상으로 한 방문 판매등의 불건전한 방식으로 판매를 진행해 왔다.

이에 대한 문제점이 사회적으로 불거지면서 결과적으로 식품에 대한 소비자의 불신만 키우는 결과를 초래하고 말았다.

이러한 식품의 현실을 극복하기 위해서는 과학적 연구를 통한 객관적 사실을 근거로 한 정직한 효능으로 소비자들에게 접근해야만 하며, 이러한 원칙에 충실하고자 본 과제를 통한 많은 연구를 진행하였으며, 그 결과물을 바탕으로 객관적이고 과학적인 혈행개선 식품을 제품화 할 것이다.

▶ ‘2010 제천국제한방바이오v엑스포’를 활용한 제품 홍보 전략

제품을 판매하는 방법 중 지역을 기반으로 시작하는 것이 안정적이면서 효과적인 방법 중 하나이다.

이번 2010 제천국제한방바이오 엑스포는 국제적인 대규모 행사이기 때문에 수십만명 이상의 관람객을 유치할 것으로 기대하고 있다. 이러한 큰 행사를 홍보의 수단으로 적극적으로 활용하여 최적의 홍보효과를 올릴수 있는 전략을 구사할 것이다.

▶ 등록된 특허를 바탕으로 기술우수성 홍보

본 연구의 배타적인 권한을 부여하고 있는 특허가 2008년도에 등록이 되었다. 이는 출원된 특허와는 차원이 다른 것이며, 향후 20년간 배타적인 권리를 부여받은 것이기에 특허를 적극적으로 활용하여 당 연구의 기술적 우수성을 적극적으로 홍보할 계획이다.

2. 추가 연구

▶ 혈행개선 건강기능식품 허가를 위한 추가 연구

본 연구는 애초에 식품의 범주에서 진행하는 것을 목표로 진행해 왔다. 이는 그간의 경험상 개별인정형 건강기능식품으로 허가를 받는데 최소한 4년 이상의 시간이 소요됨을 알고 있다. 참고로 당사는 갯잎추출물을 이용한 비만개선용 건강기능식품 개별인정형 허가를 받은 경험이 있으며, 당시 허가를 받기까지 5년여의 시간이 걸렸다.

따라서 당 과제를 통해서 식품 영역의 연구를 진행하고자 했으며, 추가적인 연구를 통해 건강기능식품 개발을 진행할 것이다.

▶ 독성시험 및 임상시험 진행

개별인정형 강기능식품으로 허가를 받기 위해서는 현재 연구 결과물 외에 추가적으로 독성시험과 임상시험을 진행하여야 한다. 당사의 그간의 경험을 토대로 단회 및 반복투여

독성시험을 진행하여 안전성을 확보할 것이며, 임상시험을 통하여 유효성을 입증하고자 한다.

▶ 본 과제외 성과를 바탕으로 건강기능식품 개별인정형 허가를 위한 추가 정책자금 지원 신청

건강기능식품 개별인정형을 받기 위해서는 독성시험과 임상시험을 진행하여야 하는데, 독자적인 방식보다는 추가 정책자금 지원을 신청하여 시험의 범위를 좀 더 다양하고 넓게 진행하여 안전성과 유효성이 충분히 입증된 제품을 개발하고자 한다.

3. 관련 연구 활용

▶ 발효물을 이용한 혈전, 당뇨 및 동맥경화 등 관련 분야로 연구 영역 확대

혈행개선은 그 자체로도 중요한 효능이지만 혈전, 당뇨, 동맥경화 등 혈행 개선과 연관된 다양한 질환이 있다. 따라서 혈행개선을 통한 이러한 질환의 개선 및 치료를 충분히 기대할 수 있으리라 판단되며, 향후 연구의 분야를 순환계질환으로 넓혀갈 계획이다.

▶ 은행잎, 산사추출액 등 기존 혈행개선 제품과의 시너지 효과 연구

독자적인 제품 개발도 중요한 의미가 있지만 기존 혈행개선 제품과의 혼용 또는 mix를 통한 기존 제품보다 우수한 효능을 나타내는 제품의 연구도 산업화에 충분히 적용가능한 방법이기 때문에 상호 시너지효과에 대한 연구도 진행하고자 한다.

제 6 장 참고문헌

참고문헌

- 1) 이천배. 홍삼사포닌의 분리, 제조 및 항암작용; 충남대학교 대학원 생화학과 박사학위 논문. 1995년
- 2) Puddu P., Muscari A., Puddu GM., Cravero E., Giannoni C., Zoli M. The complexity of platelet metabolism and its contribution to atherothrombosis. *Acta Cardiol*; 2009; 64(2); 157-165.
- 3) Hasegawa H., Sung JH., Matsumiya S., Uchiyama M. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Med*; 1996 Oct; 62(5):453-7.
- 4) Zhou, Wei., Li, Jiyang., Li, Xinwei., Yan, Qin., Zhou, Pei. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative determination of ginsenosides Rb1, Rd, F2, and compound K during the process of biotransformation of ginsenoside Rb1. *Journal of separation science*; 2008; v.31 no.6/7; pp.921-925
- 5) Lou, Da-Wei., Saito, Y., Jinno, K. Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography for Simultaneous Determination of Important Bioactive Ginsenosides in Pharmaceutical Preparations. *Chromatographia*; 2005, 62 (7), pp 349
- 6) 공병만., 박민주., 민진우., 김호빈., 김세화., 김세영., 양덕춘. Physico-Chemical Characteristics of White, Fermented and Red Ginseng Extracts. *Journal of ginseng research*; 2008; v.32 no.3; pp.238-243
- 7) Kim, W. Y., Kim, J. M., Han, S. B., Lee, S. K., Kim, N. D., Park, M. K., Kim, C. K., Park, J. Steaming of Ginseng at High Temperature Enhances Biological Activity. *Journal of natural products*; 2000; 63(12); pp 1702
- 8) 이영경., 이영철., 홍희도., 노정해., 김영찬. Principle of Fermentation Ginseng and Trends of Its Products. *The Korean Ginseng research and industry*; 2007; v.1 no.1; pp.8-12
- 9) 김희규., 김기연., 차창준. Screening for Ginseng-Fermenting Microorganisms Capable of Biotransforming Ginsenosides. *The Korean journal of microbiology*; 2007; v.43 no.2; pp.142-146
- 10) 박수진., 김동현., 백남수., 김성수. Preparation and Quality Characteristics of the Fermentation product of Ginseng by Lactic Acid Bacteria (FGL). *Journal of ginseng research*; 2006; v.30 no.2; pp.88-94
- 11) Bae, Eun-Ah., Park, Sun-Young., Kim, Dong-Hyum. Constitutive β -Glucosidases Hydrolyzing Ginsenoside Rb1 and Rb2 from Human Intestinal Bacteria. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 2000; 23 (12); pp. 1481

- 12) Ko, Sung-Kwon., Cho, Ok-Sun., Bae, Hye-Min., Yang, Byung-Wook., Im, Byung-Ok., Hahm, Young-Tae., Kim, Kyung-Nam., Cho, Soon-Hyun., Kim, Jae-Young., Chung, Sung-Hyun., Lee, Boo-Yong. Changes in Ginsenoside Composition of White Ginseng by Fermentation. Food science and biotechnology; 2009; v.18 no.1; pp.253-256
- 13) 성종환., 장곡천수부., 송궁지지., 내산아수., 하주영., 이문순., 허재두. Metabolism of Ginseng Saponins by Human Intestinal Bacteria. 생약학회지; 1995; v.26 no.4; pp.360-367
- 14) 주현규., 이교철. The Effect of Ginseng Extract on Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Korean journal of ginseng science; 1979; v.3 no.2; pp.95-104
- 15) Bae EA, Han MJ, Kim EJ, Kim DH. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. Archives of Pharmacal Research; 2004; vol:27 iss:1 pg:61-67