

Chitin과 Chitosan 처리에 의한 인삼모상근으로부터 Ginsenosides 생산

오승용 · 박효진 · 최경화 · 맹성주 · 양계진* · 양덕춘#

한국인삼연초연구원 신사업연구부, *중부대학교 생명자원학부
(2000년 4월 25일 접수)

The Production of Ginsenosides from Ginseng Hairy Root by Treatment of the Chitin and Chitosan

Seung-Yong Oh, Hyo-Jin Park, Kyung-Hwa Choi, Sung-Ju Meang, Kye-Jin Yang* and Deok-Chun Yang#

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon, 305-345, Korea

*College of life science, Joongbu University, Kumsan, 312-800, Korea

(Received April 25, 2000)

Abstract : To elucidate the effect of chitin and chitosan on the production of ginsenosides and growth, ginseng hairy root was cultured on the 1/2 MS medium supplemented with chitin and chitosan of various concentrations and culture period. The highest growth was obtained with 1 mg/L of chitin. However, the growth was inhibited by 20 mg/L or above. The contents and productivity of ginsenosides were the highest when ginseng hairy roots were cultured on 40 mg/L chitin and applied of the third-weeks of culture period. Ginseng hairy root culture with 1 mg/L of chitosan resulted in the best growth, but the highest ginsenosides level was appeared in 30 mg/L chitosan. Ginsenosides content was increased when it was treated at the forth-week after culture as 30 mg/L of chitosan.

Key words : Chitin, chitosan, ginseng, ginsenosides, hairy root.

서 론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 예로부터 보혈강장 및 불로장생의 영약으로 한방에서 널리 애용되어 왔으며, 단백질과 핵산의 생합성 촉진,^{1,2)} 간기능회복,³⁾ 항암 및 항산화 효과등이 탁월하다고 알려져 있으며,⁴⁾ 사포닌을 비롯한 몇 가지 특정 인삼의 고유생리활성 성분에 대해서는 생체내에서의 작용기작도 보고되었다.⁵⁾ 인삼 사포닌 구조에 관한 연구는 Shibata,⁶⁾ Tanaka⁷⁾등에 의해서 활발하게 진행되어 왔으며 고려인삼의 사포닌류는 genin 부분인 dammarane계의 protopanaxadiol(PPD)과 protopanaxtriol(PPT)이 당과 결합하고 있는 배당체로서 ginsenoside라고 불리우며, 생합성 과정은 acetate → mevalonate → squalene → sapogenin → saponin 경로가 존재하여 동물계에서의 sterol 합성과정과 유사할 것으로 예측되고 있다.⁸⁾ 최근에는 이들 인삼고유성분중에서 ginsenosides의 약리작용이 밝혀지면서,^{9,10)} ginsenosides의

대량생산이 요구되고 있는 실정이다. 이를 위하여 Yang¹¹⁾등은 인삼으로부터 *Agrobacterium rhizogenes* 균주를 이용하여 형질전환된 인삼으로부터 모상근을 유도하여 특정 ginsenosides를 대량으로 생산하고자 하는 연구를 수행한 바 있다.

Agrobacterium rhizogenes 균주에 의하여 유도된 모상근은 유전적으로 매우 안정하며, 식물생장조절제가 없는 배지에서 지속적으로 생장이 가능하기 때문에 대량배양이 가능한 것으로 알려지고 있다.^{12,13)} Yang¹¹⁾등에 의해 선발된 모상근을 이용할 경우 성장도 빠르며 세포의 회수도 쉽게 할 수 있을 뿐 아니라 유효성분도 다량 함유하고 있어서 특정 성분 생산을 위한 좋은 세포주로서 각광을 받게 되었다. 특히 인삼의 경우, 사용부위가 뿌리이기 때문에 캘러스보다 뿌리형태로 자란 모상근이 더욱 생리활성물질의 생산을 위해서는 좋은 재료로 이용될 수 있다. 이러한 방법으로 식물의 특정한 고유성분만을 대량생산하기 위하여 여러 가지 elicitor들을 이용하기도 한다. Elicitor는 일반적으로 UV, 열 등의 비생물적 elicitor와 미생물에서 유래된 생물적 elicitor로 구분된다. 생물적 elicitor는 그 유래에 따라 외생적 elicitor와 내생적 elicitor로 구분할 수 있는데 이들 두 종류의 elicitor는 서로

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-5434; (팩스) 042-862-2522
(E-mail) dcyang@gtr.kgtri.re.kr

다른 elicitation의 기작을 갖는다.¹⁴⁾ 이러한 elicitor는 유용한 대사산물의 생합성과 분비를 촉진하기 때문에 식물세포배양에서 유용한 2차대사산물의 생산을 위해 사용되고 있다.¹⁵⁾

Chitin은 무척추동물인 게나 새우등의 갑각류를 비롯하여 투구벌레나 귀뚜라미 등의 곤충류와 오징어 등의 연체동물에 대량으로 포함되어 있을 뿐만 아니라 곰팡이, 효모, 버섯 등의 세포에도 많이 포함되어 있는 뮤코다당류의 일종으로, 그 구조는 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합으로 이루어진 poly-N-acetyl-D-glucosaminan의 형태이다. 이러한 chitin은 지구상에서 셀룰로오즈 다음으로 많은 천연고분자 재료이며 chitosan의 탈아세틸 화물의 총칭이다.

Chitosan은 2-acetamino-2-deoxy-D-glucose(N-acetyl glucosamine)의 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합된 다당 chitosan의 탈아세틸화물 중에서, glucosamine 잔기 비율(탈아세틸화도)이 80% 이상이며 붉은 산에 가용성인 물질을 총칭한다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 1975년, chitosan이 처음으로 산업적 폐수처리를 위한 양이온 천연 응집제로서 사용된 이래¹⁹⁾ chitin과 chitosan이 상처치료등에 놀라운 효과가 있음이 밝혀져 의학 분야와 수의학 분야에서 널리 사용되어 왔고,²⁰⁾ 그 밖의 여러 용도로도 그 응용범위는 점점 넓어지고 있다.^{21,22)}

따라서 본 연구는 인삼에 *Agrobacterium rhizogenes* strain A4를 도입하여 얻어진 모상근을 실험재료로 사용하여 2차대사물질 유도제로 쓰이는 chitin, chitosan과 같은 elicitor를 처리하여 모상근의 성장량과 ginsenosides 함량증대를 위한 실험을 수행하였던 바 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 인삼 모상근 세포주는 *Agrobacterium rhizogenes* strain A4²³⁾를 이용하여 형질전환 시킨 후 유도된 모상근을 사용하였다.¹¹⁾

2. 모상근의 배양

모상근이 7~8 cm 길이로 성장하면 근단으로부터 2~3 cm 길이로 잘라내어 항생제와 식물생장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS배지에 5~6조각을 치상하여 3주 간격으로 진탕배양기(100 rpm, 23°C)에서 암조건으로 계대배양하며 실험재료로 사용하였다.

3. Chitin과 Chitosan의 정제 및 처리

인삼모상근의 성장과 ginsenosides 생산에 미치는 chitin과 chitosan의 영향을 조사하기 위하여 이들을 각각 정제하여 농도별로 배지에 처리하였다. Chitin의 정제는 chitin(Sigma,

C-3387) 50 g을 황산(원액 36%) 1 L에 넣고 12~24시간 동안 교반하여 잘 녹인 다음 95% EtOH 1 L를 넣고 이 용액을 원심분리(6000 rpm, 10분)하여 상등액은 버리고 침전된 chitin만 모았다. 이렇게 모은 chitin에 증류수 2 L를 첨가하여 10분 동안 교반한 후 30분간 방치하였다. 그 후 상등액은 버리고 chitin만 모아서 증류수 2 L를 첨가한 후 pH를 7.0으로 맞추고 다시 현탁액을 10분간 교반한 후 20분간 방치하였다. 다시 상등액은 버리고 chitin만 모아서 최종적으로 chitin 농도를 10 g/250 mL로 증류수로 맞춘 후 고압멸균(121°C, 15분)하여 사용하였다.

Chitosan(Sigma, C-0792)의 정제는 chitosan을 90 mL 0.1 M acetic acid에 녹인 후, 30분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하고 남은 상등액을 5M NaOH로 pH 8.0으로 맞추어 흰색으로 침전된 chitosan 덩어리를 여과지로 걸러낸 다음 증류수로 세척하여 동결건조 시켰다. 건조된 chitosan은 0.1M acetic acid(1 g chitosan/90 mL acetic acid)로 녹여 pH 5.0으로 조정하고 121°C에서 15분 동안 고압멸균하여 사용하였다. 각각의 실험구는 chitin, chitosan 모두 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L 농도로 배지에 첨가하고 일주일 간격으로 모상근을 접종하여 4주 동안 배양한 후, 모상근 성장과 ginsenosides 함량을 측정하였다.

4. 모상근 성장률과 Ginsenosides 함량측정

모상근의 성장률은 1/2 MS 액체배지 40 mL을 함유한 100 mL 삼각플라스크에 모상근 1 g을 접종하여 암상태에서 4주간 배양한 후 수확하여 측정하였다. 수확한 모상근은 증류수로 세척하고 여과지로 1차 건조시킨 후, 탈수기를 이용하여 완전히 잔여수분을 제거한 후에 생체중량을 측정하였으며, 건조중량은 시료를 동결건조시켜 측정하였다. Ginsenosides 함량은 Ando²⁴⁾등의 방법으로 추출한 후 측정하였다. 즉 동결건조시킨 분말시료 0.5 g을 취하여 80°C 수욕조에서 80% 메탄올 30 mL로 3회 추출 후 농축하여 건조시킨 후 메탄올 엑기스를 얻은 다음 에테르로 추출하여 탈지시키고 수포화 1-부탄올로 3회 추출하여 1-부탄올층을 모두 합하여 증류수로 1회 세척한 후 수층은 버리고 1-부탄올층만 건조시킨다. 그 후 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph., Waters)용 메탄올 500 μ 에 녹이고 millipore syringe filter(0.45 μ m)로 여과한 다음 10 μ 를 HPLC에 주입하여 ginsenosides를 분리·정량하였다. 검출은 Waters R401 refractive index(RI) 검출기로 검출·정량하여 분석하였다. 크로마토그램의 각 peak는 표준화 사포닌의 크로마토그래피에 의해 동정하고, 각 ginsenosides의 함량은 표준형태와 비교하여 peak 고도로 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 모상근의 성장과 Ginsenosides 생산증대에 미치는 Chitin의 영향

Chitin과 chitosan을 비롯한 β -glucan, glycoprotein 같은 물질은 여러 종류의 다양한 식물세포들에서 강한 elicitor로써 작용하여 유용한 2차대사산물을 생산하는데 많이 이용되어 왔으며¹⁴⁾ 그 중 chitin과 chitosan은 여러 종류의 식물들에 대해 효과적인 elicitor로써 작용됨이 보고되었고 식물배양세포에서 2차대사산물을 생산하기 위한 elicitor로 사용되고 있다.²⁵⁾

특히 chitin은 새우, 게, 버섯, 곤충의 껍질 등에 많이 함유되어 있고 글루코사민 결합으로 되어있는 천연고분자 물질로서 다른 스트레스 화합물 생성유도인자와 함께 elicitor로 사용되어 목적하는 유용물질 생산을 증대시키는 중요한 작용을 하는 물질이다.²⁶⁾ Chitin 처리 후 나타나는 인삼모상근의 성장과 ginsenosides 함량변화를 조사하기 위하여 chitin을 농도별로 처리한 결과 모상근의 생장은 1 mg/L 처리구에서 12.69 g/flask로 대조구의 10.83 g/

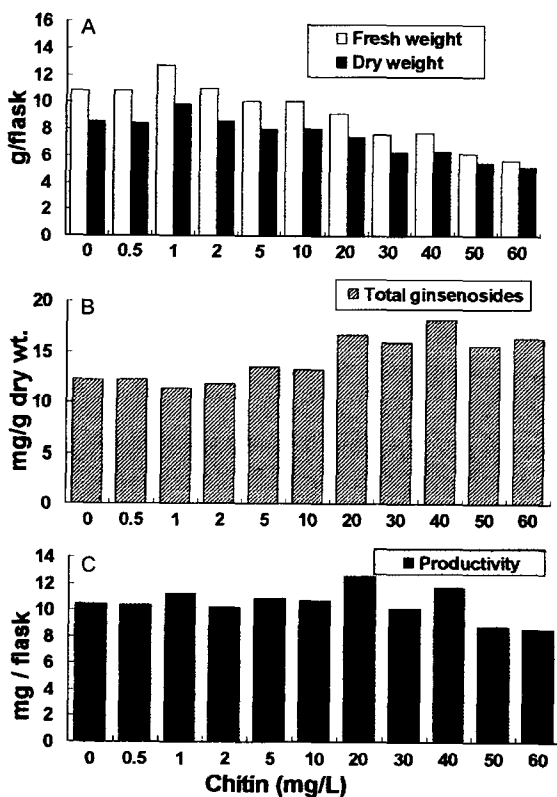


Fig. 1. The effects of chitin on the growth (A), contents of ginsenosides (B) and ginsenosides productivity (C) from ginseng hairy root cultured in the 100 mL flask containing various concentrations of chitin.

flask 및 다른 처리구에 비해 가장 양호하였으며 2 mg/L의 농도에서부터는 생장률이 점차 낮아지기 시작해 20 mg/L 이상의 농도부터는 대조구에 비해 평균 40~50% 정도 낮은 생장률을 보였다(Fig. 1A). Ginsenosides 함량의 경우 생장률이 저농도에서 높았던 것과는 달리 고농도의 chitin 처리시에 ginsenosides의 생성이 촉진되었다. Ginsenosides 함량은 chitin 20 mg/L를 처리하였을 때부터 높아지기 시작하여 40 mg/L에서 18.20 mg/g dry wt.로 처리구중 가장 높아 생장률이 가장 양호했던 1 mg/L 처리구의 11.35 mg/g dry wt.보다 40% 정도 높은 ginsenosides 함량을 보여 생장률과는 상호 대조적인 현상을 보였다(Fig. 1B). Ginsenosides 생산성은 20 mg/L 처리구와 ginsenosides 함량이 가장 높았던 40 mg/L 처리구에서 가장 양호하여 ginsenosides 함량이 높은 처리구에서 생산성도 높은 것으로 조사되었다(Fig. 1C). 이상의 결과를 바탕으로 적정농도의 chitin을 모상근 배양시기별로 처리하여 모상근의 성장과 ginsenosides의 함량을 조사해보고자 ginsenosides의 함량을 가장 높게 증가시켰던 40 mg/L의 농도를 모상근을 배양하며 1주 간격으로 처리하였다. 그 결과 모상근의 생장은 배양기간에 따라 거의 일정하게 유지되었고(Fig. 2A), ginsenosides 함량은 배양 3주째 처리구에서 17.73 mg/g dry wt.로 대조구의 12.02 mg/g dry wt.보다 30% 높은 함량을 보였으며(Fig. 2B), 플라스크당 ginsenosides 생산성은 배양 1주째와 3주째 처리구에서 각각 14.53 mg/flask와 14.15 mg/flask로 나타나 처리구중에 가장 높은 생산성을 나타내었다(Fig. 2B).

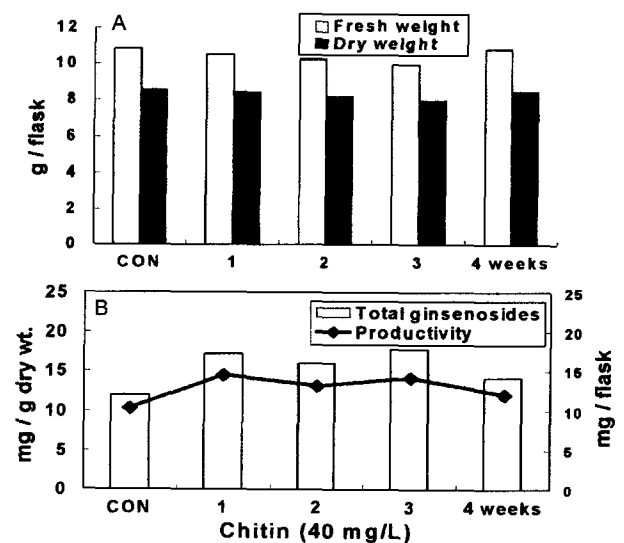


Fig. 2. The effects of chitin (40 mg/L) on the growth (A), and ginsenosides contents and productivity (B) from ginseng hairy root according to culture period.

이상의 결과는 chitin을 형질전환된 대두 세포에 처리했을 때 cytosolic Ca⁺ 농도의 빠른 증가를 가져옴으로써 해서 식물 세포의 외부 자극에 대한 방어기작과 연관이 있음이 밝혀진 보고²⁷⁾와 견주어 볼 때 elicitor인 chitin을 처리했을 때 모상근은 방어기작의 일환으로 2차대사산물인 ginsenosides를 생산한다고 볼 수 있다. 이때 ginsenosides의 함량을 증가시키기 위해서는 chitin의 적정농도와 모상근의 배양시간이 중요함을 알 수 있었다. 본 실험결과 모상근에서 ginsenosides의 대량생산을 위해서는 chitin 40 mg/L를 배양 3주째에 처리하는 것이 가장 효과적이었다.

2. 모상근의 성장과 ginsenosides 함량증대에 미치는 chitosan의 영향

인삼모상근의 성장과 ginsenosides 생성을 높이기 위하여 chitosan을 농도별로 처리하여 모상근을 배양한 결과, 모상근 생장은 1 mg/L 처리구에서 13.40 g/flask로 가장 높았으며 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 mg/L 농도에서는 대조구에 비하여 약간 높은 성장률을 나타냈다. 그러나 30 mg/L 이상의 농도에서는 농도가 증가함에 따라 대조구에

비해 평균 40~50% 성장률이 낮았는데 이는 chitin과 마찬가지로 일정농도 이상에서는 모상근의 생장이 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 3A). Ginsenosides 함량은 30 mg/L 처리구에서 13.47 mg/g dry wt.로 가장 높게 나타나 성장률이 가장 높았던 1 mg/L의 11.43 mg/g dry wt. 보다 15%정도 높은 ginsenosides 함량을 보여 chitin과 마찬가지로 성장률과의 상관관계는 나타나지 않았다(Fig. 3B). 플라스크당 ginsenosides 생산성면에서는 20 mg/L 처리구와 30 mg/L 처리구에서 각각 11.70 mg/flask, 11.39 mg/flask로 처리구중에서 가장 높게 나타나 chitin과 마찬가지로 ginsenosides 함량이 높은 처리구에서 생산성도 높은 것으로 나타났다(Fig. 3C).

이러한 결과를 바탕으로 chitin과 마찬가지로 방법으로 ginsenosides의 함량을 가장 높게 증가시켰던 chitosan 30 mg/L를 모상근을 배양하며 1주 간격으로 처리하여 모상근의 성장과 ginsenosides의 함량을 조사해보았다. 그 결과 모상근의 생장은 배양 2주까지 감소하다가 그 후 증가하는 경향을 보였고(Fig. 4A), ginsenosides의 함량은 배양 4주째 처리구에서 13.02 mg/g dry wt.로 대조구의 12.02 mg/g dry wt. 보다 약 5% 정도 높아서 chitin과는 달리 ginsenosides 함량증가에 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 4B). 플라스크당 ginsenosides 생산성은 성장률과 마찬가지로 배양 2주까지 감소하다가 그 후 증가하는 경향을 나타내다가 배양 4주 처리구에서는 10.70 mg/flask로 대조구와 비슷한 수준으로 회복되었다(Fig. 4C). 이는 chitin과는 달리 모상근의 성장과 ginsenosides 함량과 플라스크당 생산성면에는 상관관계를 나타내

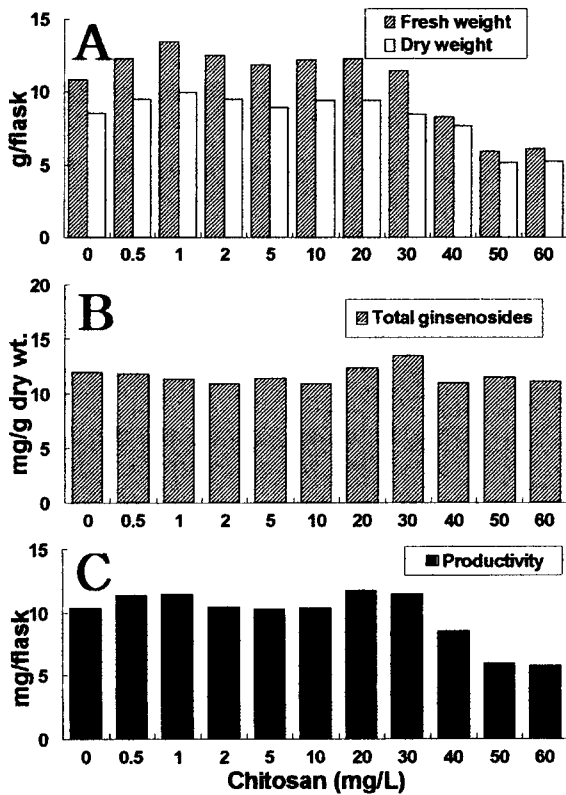


Fig. 3. The effects of chitosan on the growth (A), contents of ginsenosides (B) and ginsenosides productivity (C) from ginseng hairy root cultured in the 100 mL flask containing various concentrations of chitosan.

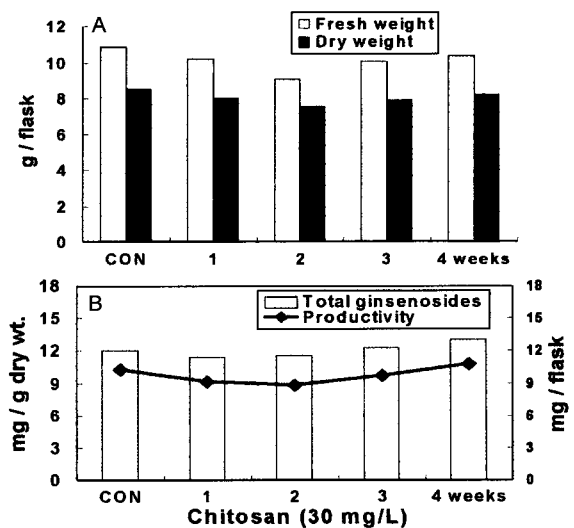


Fig. 4. The effects of chitosan (30 mg/L) on the growth (A), and ginsenosides contents and productivity (B) of ginseng hairy root according to culture period.

어 모상근의 생장이 회복될 수록 ginsenosides 함량도 증가하는 경향을 보여 ginsenosides의 함량을 증가시키기 위해서는 chitosan의 적정농도와 모상근의 배양시간이 중요함을 알 수 있었다. Chitin과 chitosan의 처리에 있어서 적정배양농도가 다른 점을 볼 때 chitosan의 효과를 조사하기 위해서는 배양시간을 더 연장해서 배양 후반기에 좀더 세분화된 시기 별로 농도의 증가와 함께 처리를 하는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Chitosan은 우리 신체의 조직과 유사한 구조를 이루고 있는 천연고분자 화합물로서 일반적으로 위장약이나 상처의 지혈 및 치료제로 사용되어왔던 새우껍질이나 오징어의 뼈의 주성분을 이루고 있다.²⁶⁾ 이처럼 chitosan은 현대에 들어 그 효능이 전해지면서 식품, 의약, 화장품 등 여러 산업에서 중요한 자리를 차지하고 있는 자원이다.²⁸⁾ 또한 Chitosan은 여러 가지 생리학적 활성을 나타내어 *Catharanthus roseus*와 *Wasabia japonica*의 배양세포에 처리했을 때 그들의 막투과성과 원형질형성등에 기여함이 밝혀졌으며,¹⁴⁾ *Mentha piperita*를 배양하여 menthol을 생산하는데 200 mg/L의 chitosan을 처리하여 효과적으로 elicitation 효과를 거두었다는 보고²⁹⁾ 등이 있다.

본 실험을 종합해볼 때 인삼모상근을 배양하여 ginsenosides의 생산을 증대시키기 위해서는 생산성과 ginsenosides 생산량의 관계를 고려할 때 chitin은 40 mg/L의 농도로 3주째 처리가, chitosan은 30 mg/L의 농도가 가장 효과적이었으나 chitin과는 달리 배양후 처리시기는 ginsenosides 생산에 큰 영향을 미치지 않았다. 본 실험결과 인삼의 특정유효성분을 대량생산하기 위한 elicitor의 적절한 처리농도와 처리시기가 규명되어 추후 다른 약용식물의 특정성분 함량증가를 위한 실험에 기초자료로 이용될 수 있으리라 사료된다.

요 약

인삼모상근의 성장과 ginsenosides 함량 증가에 미치는 chitin 및 chitosan의 효과를 규명하기 위해, 식물생장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에 chitin과 chitosan의 농도와 처리시기를 달리하여 인삼모상근을 배양하였다. 인삼모상근 생장은 chitin 1 mg/L의 농도에서 가장 양호하였으나 20mg/L 이상 농도에서는 생장이 감소되었다. Ginsenosides 함량과 생산성은 40 mg/L 첨가시와 배양 3주째 처리구에서 가장 높았다. Chitosan 역시 1 mg/L의 농도에서 인삼모상근의 생장이 가장 높았으나 ginsenosides 함량은 30 mg/L 처리구에서 가장 높게 나타났고 배양 후 처리시기는 ginsenosides의 함량증가에 큰 영향을

미치지 않았다.

인용문헌

1. Lee, K. S. : *Proc. 2nd Int. Ginseng Symp.* p. 93 (1978).
2. Iijima, M., Higashi, T., Sanada S. and Shoji, T. : *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 2400 (1976).
3. Han, B. H., Park, M. W., Woo, W. S. and Han, Y. N. : *Proc. 2nd Int. Ginseng Symp.* p. 13 (1978).
4. Han, B. H., Park, M. W. and Han, Y. N. : *Arch. Pharm. Res.* **4**, 53 (1981).
5. Kim, N. D. and Kang, S. Y. : *Proc. 5th Life Science Sympo. Biomed. Res. with Korean Red Ginseng* p. 9 (1994).
6. Shibata, S. : *Proc. 1st Int. Ginseng Symp.* p. 69 (1974).
7. Tanaka, O. : *Proc. 2nd Int. Ginseng Symp.* p. 145 (1978).
8. Hong, S. J., Lee, Y. W. and Joo, C. N. : *Korean J. Ginseng Sci.* **11**, 136 (1987).
9. Hong, H. Y., Yoo, G. S. and Choi, J. : *Korean J. Ginseng Res.* **22**, 133 (1998).
10. Shin, Y. H., Jeong, O. K., Nah, J. J., Yoon, S. R., Nam, K. Y., Kim, S. K., Kim, S. C. and Nah, S. Y. : *Korean J. Ginseng Sci.* **22**, 43 (1998).
11. Yang, D. C., Kim Y. H., Yang, D. C., Min, B. H., Shin, S. L. and Choi, K. T. : *Korean Society of Plant Tissue Culture* **25**, 6 (1998).
12. Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A. and Tempe, J. : *Nature(Lond)* **295**, 432 (1982).
13. Inze, D., Lijsebettens, M.V., Simoens, C., Genebello, C., Montagu, M. V. and Shell, J. : *J. Mol. Gen. Genet.* **194**, 265 (1984).
14. Akimoto, C., Aoyagi, H. and Tanaka, H. : *Appl. Microbial. Biotechnol.* **52**, 429 (1999).
15. Sim, S. J., Chang, H. N., Liu J. R. and Jung K. H. : *J. Ferment Bioeng* **78**, 229 (1995).
16. Chandrasekaran, R. : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **52**, 311 (1997).
17. Hitoshi, S. and Yoshihiro, S. : *Carbohydrate Polymers* **39**, 127 (1999).
18. Hirano, S. : *Polymer Int.* **48**, 732 (1999).
19. Hirano, S. : *Ullmann's Encyc. Ind. Chem. A.* **6**, 231 (1986).
20. Nakade, T., Yokoda, H., Taniyama, H., Hori, Y., Agata, T., Ikeda, T., Furusaki, H., Yamada, Y., Uchida, Y., Yussa, A., Yamaguchi, M. and Otomo, K. : *Carbohydrate Polymers* **41**, 327 (2000).
21. Hirano, S. : *Ed by Goosen MFA, Technomic, Muscat.* p. 31 (1997).
22. Shigemasa, Y. and Minami, S. : *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* **13**, 83 (1995).
23. Jouanin, L., Vilaine, F., Tourneur, C., Pautot, V., Muller, J. F.

- and Caboche, M. : *Plant Sci.* **53**, 53 (1987).
24. Akiyama, K., Kawazu, K. and Kobayashi, A. : *Carbohydrate Research* **279**, 151 (1995).
25. 김세권 : *식품공업* **106**, 63 (1990).
26. Mithofer, A., Ebel, J., Bharwat, A. A., Boller, T. and Neuhaus-Url, G. : *Planta* **207**, 566 (1999).
27. Minami, S., Okamoto, Y., Matsuhashi, A. and Eguchi, H. : *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* **48**, 419 (1995).
28. Chang, J. H., Shin, J. H., Chung, I. S. and Lee, H. J. : *Biotechnol. Lett.* **20**, 1097 (1998).