

유포자성 유산균을 이용한 인삼차 개발에 관한 연구

김영만* · 한영희 · 백남수

한경대학교 식품공학과 및 식품생물 산업연구소

Studies on the Ginseng Tea using Spore-forming Lactic Acid Bacteria

Young-Man Kim*, Young-Hee Han and Nam-Soo Paek

Department of Food Science & Technology and Food & Biotechnology Research Center,
Hankyong National University

In order to develop ginseng tea powder with spore forming lactic acid bacteria *Lactobacillus sporogenes* was used. In the jar fermentor experiment under optimal culture conditions, the number of spore of *L. sporogenes* reached about 20×10^8 CFU/mL and sporulation rate was 97%. Granulated ginseng tea was made from glucose 7 kg, lactose 2 kg, ginseng extract 1 kg and spores 5 g (5200×10^8 CFU/g). In the treatment of artificial gastric juice (pH 3.0) for 4 h and artificial bile for 8 h, the survival rate of spores in the granulated ginseng tea was 55.4% and 90.0% respectively. The spores survived 77.6% after incubation for 20 min in boiled water. Its storage stability was about 75% for 12 months at room temperature.

Key words: spore forming lactic acid bacteria, *Lactobacillus sporogenes*, granulated ginseng tea

서 론

인삼(人蔘, *Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오갈피 나무과(五加科; Araliaceae) 인삼속(人蔘屬; *Panax*)의 다년생 초본류로서 그 뿌리를 인삼(*Ginseng radix*)이라 하며 약용으로 사용되어왔다. 인삼은 현재 우리나라 뿐만 아니라 중국, 일본 등지에서도 재배되고 있으나 특히 우리나라 인삼은 그 약효가 뛰어나기 때문에 고려인삼이라는 별칭으로 불리어지고 있다. 이러한 인삼의 화학성분은 (1) 배당체(인삼 saponin) (2) 지용성 성분 (3) 다당체 (4) 합질소 화합물 및 펩타이드 (5) 유리당 및 유기산 (6) 비타민 및 무기성분으로서 인삼의 약리효능은 주로 인삼 사포닌에 의한 것으로서 중추신경계에 대한 작용⁽¹⁾, 뇌기능에 대한 작용⁽²⁾, 항암작용⁽³⁾, 면역기능 조절작용⁽⁴⁾, 항당뇨작용⁽⁵⁾, 간기능 강화작용⁽⁶⁾, 심혈관 장애 개선작용⁽⁷⁾, 혈압 조절작용⁽⁸⁾, 갱년기 장애 개선작용⁽⁹⁾, 항스트레스⁽¹⁰⁾와 항피로작용⁽¹¹⁾, 항산화 작용⁽¹²⁾ 등이 보고되었다.

이러한 약효를 이용한 인삼제품으로는 (1) 인삼의 형태제품 (2) 분말제품 (3) 엑기스 제품 (4) 차제품 (5) 스포츠음료 (6) 기타제품으로 이용되고 있다.

한편 유산균은 1908년 Pasteur 연구소의 러시아 미생물 학자인 Metchnikoff(1845-1916)⁽¹³⁾가 Balkan(Bulgaria)지방 주민의 장수설이 요구르트에 들어있는 유산균을 상용 함으로써 유산균의 정상작용에 의한다고 보고한 이래 정상·건강 식품의 재료로서 널리 사용되어 왔다.

이 유산균은 우리의 건강상태, 식생활, 의약품의 투여(특히 항생제, 설파제의 투여)등 여러 가지 요인에 의하여 장내 세균의 종류와 비율에 변화를 일으킬 때 이 장내 세균총의 분포를 조절하고 있는 일군의 세균이다.

이와같은 유산균을 건조상태의 식품이나 의약품에 이용할 때에는

- (1) 제조공정에서 안정성이 있어야 하며
- (2) 인체의 장관내에서 생존이 확실하여 유산균의 활성을 나타내야 하고
- (3) 보존성이 우수하여야 한다.

그러므로, 유산균의 안정성(stability)과 내성(resistance)이 중요한 요소로서 이러한 목적으로 개발된 것이 유포자성 유산균(spore forming lactic acid bacteria)의 이용⁽¹⁴⁻¹⁹⁾이다.

본 연구에 사용한 유포자성 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*는 *Lactobacillus*와 *Bacillus*의 중간형 성질을 가진 균종으로 homo fermentation으로 L(+)-lactic acid를 생성하는 고온성균으로 발효와 호흡의 두가지 형태로 energy를 얻을 수 있는 특이한 균종이다.

발효성 당이 풍부한 배지를 이용하여 발효에 의한 물질대사를 하며 당의 발효에 의한 유산 생성능이 90% 이상이며, 당이 적고 yeast extract 와 peptone 같은 단백질 분해물을 이

*Corresponding author : Young-Man Kim, Department of Food Science & Technology and Food & Biotechnology Research Center, Hankyong National University, 67 Seokjeong-dong, Ansung, Kyonggi-do 456-749, Korea
Tel: 82-31-670-5150
Fax: 82-31-677-0990
E-mail: kimagj@hanmail.net

용하여 호기적 조건에서는 호흡에 의한 물질대사를 하며 포자를 90%이상 형성하는 내성이 우수한 유포자성 유산균이다.

본 연구에서는 약리적 효과가 우수한 인삼차를 제조하면서 정장·건강 식품으로 사용하는 유포자성 유산균을 혼합한 인삼차를 개발하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

사용균주: 유포자성 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*는 일동제약(주) 중앙연구소에 보존된 균주를 사용하였다.

인삼추출 농축액: 고형분 60%로서 (주)개풍양행의 인삼추출 농축액을 사용하였다.

유포자성 유산균의 발효율 및 유산 생성물의 측정⁽²⁴⁾

유포자성 유산균의 배양방법에 따라 PGY broth 전배양액을 발효용 배지(glucose 10%, yeast extract 0.5%, peptone 0.25%, CaCO₃ 7%, pH 6.8)에 3% 접종하고 45°C에서 5일간 정치발효(매일 2~3회 정도 교반하여 발효중 생성된 산을 CaCO₃로 중화)하였다. 발효후에 발효액을 원심분리하여 균체와 과잉의 CaCO₃를 제거한 여액 중의 잔당, 총산, 휘발산의 생성량을 측정하여 발효율은 초기당량에 대한 소비당으로, lactic acid 생성율은 소비한 당에 대해 생성한 lactic acid 량으로 구하였다. 또한 당, 총산, 휘발산등의 정량방법은 상법⁽²⁰⁾에 따라 분석하였다.

유포자성 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*의 생균수 및 포자형성율 측정

0.1% CaCO₃와 1% glucose를 첨가한 BCP plate count agar(glucose 0.1%, peptone 0.5%, yeast extract 0.25%, tween80 0.1%, L-cystein 0.01%, BCP(brom cresol purple) 0.003%, agar 1.5%, pH 6.8)를 이용한 평판 배양법으로 45°C에서 2일간 배양하여 CaCO₃를 투명하게 액화시키고 BCP를 황변시킨 집락수를 계측하여 평균 집락수에 희석 배수를 곱하여 1 g의 생균수를 구하였다. 포자수는 최종희석액을 70°C에서 30분간 열처리 한후 동일한 방법에 의하여 생균수를 구하여 포자수(열내성생균수)로 계산하여 생균수에 대한 포자형성율을 구하였다.

유포자성 유산균의 배양방법 및 유포자성 유산균 원말 제조

사면배양한 종균 1백균이를 PGY(peptone-glucose-yeast extract) broth에 접종, pH 6.8과 45°C에서 7시간 진탕배양(배지주입량: 150 mL / 500 mL 진탕후라스크; 진탕속도: 120 strokes / min; 진폭: 7 cm의 진탕배양조건)한 대수증식기 중기를 전배양액으로 사용하였다.

본배양액은 5 L용 jar fermentor(New Brunswick Scientific Co.Inc)에 3 L의 포자형성용 배지(Table 1)를 주입, 살균, 냉각후 전배양액을 3%접종(전배양액 90 mL), 45°C에서 교반속도 200 rpm과 통기량 1 vvm(3 NL of air/3 L of broth/min)의 조건으로 20시간 호기배양하였다. 포자수는 최종희석액을 70°C에서 30분간 열처리 한 후 동일한 방법에 의하여 생균

Table 1. Composition of spore forming medium for *Lactobacillus sporogenes*

Ingredient	Content(%)
*SEH	1.5
Peptone	0.75
K ₂ HPO ₄	0.025
KH ₂ PO ₄	0.025
MgSO ₄	0.001
CaCl ₂	0.001 pH 6.8

*SEH (soybean enzymatic hydrolysate)

soybean powder 1 kg→suspension(dispersed in water 10 L, solid content 10%)→autoclaving(121°C, 20 min)→cooling→add CHCl₃ 250 mL and protease(pancreatin 3 g)→incubation for 18 h, at 37°C→boiling(removed CHCl₃)→cooling→centrifuge (10,000 rpm, 10 min)→supernatant(soybean enzyme hydrolysate, SEH).

수를 구하여 포자수(열내성 생균수)로 계산하여 생균수에 대한 포자형성율을 구하였다.

이때 처음에 생긴 포자는 내성이 없으므로 일정시간 (6~10 시간) 포자숙성시켜 내성이 있는 포자를 얻었다. 이 내성 포자를 원심분리하여 포집하고 아세톤 소량으로 1~2회 세척하고 55°C에서 1~2시간 건조하여 유포자성 유산균 원말을 얻었다.

유포자성 유산균을 이용한 인삼차 제조

부재료인 glucose 7 kg과 lactose 2 kg을 칭량하고 유포자성 유산균 원말 5 g을 고르게 잘 혼합한 후 인삼 추출농축액 1 kg(고형분 60%)을 소량씩 넣어 주면서 잘 혼합하고 약 30 mesh의 체를 통과시켜 과립을 만들었다. 다음에 55°C에서 2 시간 건조하고 정립하여 과립형 인삼차 제품을 만들었다.

인삼차중 생존포자의 내구성에 관한 시험

내열성 시험: 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 끓는물로 음용시 끓는물에 대한 내열성을 시험하기 위하여 끓인물 100 mL에 인삼차 3 g을 첨가하고 식힌 후, 열처리 하지않은 대조군의 생존율과 비교 측정하여 인삼차를 끓인물로 음용시 생존포자의 내열성을 비교 시험하였다.

내산성 시험: 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 음용시 위액에 대한 내산성을 시험하기위하여 인공위액(HCl액, pH 3.0)으로 37°C에서 경시적(1, 2, 3, 4시간)으로 산처리하여, 산 처리하지않은 대조군의 생존율과 비교 측정하여 인삼차중 생존포자의 내산성을 비교 시험하였다.

내담즙성 시험: 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 음용시 소화담즙에 대한 내담즙성을 시험하기 위하여 인공소화담즙액(oxgal 0.1%, pH 6.8)으로 37°C에서 경시적(2, 4, 6, 8 시간)으로 처리하여 처리하지 않은 대조군과 생존율을 비교 측정하여 인삼차 중 생존포자의 내담즙성을 비교 시험하였다.

보존성 시험: 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 실온과 37°C에서 밀폐된 용기(병)에 보관하면서 경시적(3, 6, 9, 12 개월)으로 생존율을 측정하여 인삼차중 생존포자의 보존성을 비교 시험하였다.

Table 2. Fermentation products from glucose in buffered condition by *L. sporogenes*

Initial glucose (%)	Residual glucose (%)	Degree of fermentation (%)	Volatile acid 1) (%)	Non-Volatile acid 2) (%)	Yield of lactic acid (%)
10.0	0.4	99.6	0.4	96.0	96.4

1) as acetic acid 2) as lactic acid.

결과 및 고찰

유포자성 유산균의 배양시험

젖산발효 시험: 유포자성 유산균인 *Lactobacillus sporogenes* 는 *Lactobacillus*와 *Bacillus*의 중간형 성질을 가진 균종으로 energy를 얻는 물질대사를 배양조건에 따라 발효와 호흡의 두가지 형태를 취하는 특이한 균종으로서 알려져있다.

즉, 발효성 당이 풍부한 배지에서 혐기적으로는 발효에 의한 물질대사를 하여 발효성 당에 대한 발효능과 소모한 당에 대한 젖산 생성능이 각각 95% 이상으로 homo lactic acid 발효를 하였다(Table 2).

유포자성 유산균의 배양결과: 유포자성 유산균 원말 제조 방법에 따라 PGY broth 전배양액을 포자형성용 배지 3 L에 3%(전배양액 90 mL) 접종하고 jar fermentor를 사용하여 동일한 호기조건으로 20시간 배양한 결과 생균수 20×10^8 CFU/mL와 포자형성율이 97%이었다. 이 때의 pH는 5.0에서 8.0으로 변하면서 대수증식기 및 포자형성시 생육곡선은 Fig. 1과 같다.

유포자성 유산균을 이용한 인삼차 제조

유포자성 유산균 원말제조: 예시한 방법에 따라 호기배양한 jar fermentor 배양액 3 L(포자수 20×10^8 CFU/mL, 포자형성율 97%)를 균원말 제조방법에 의거 원심분리후, 세척, 건조된 포자균체 10 g 정도를 얻었다(균원말 포자생균수 5200×10^8 CFU/g).

유포자성 유산균을 이용한 인삼차 제조: 예시된 방법에 따라 제조된 과립형의 유포자성 유산균을 이용한 인삼차(생균

수 2.7×10^8 CFU/g) 시제품 10 kg을 제조 후 생존율은 95% 이상이었다(Fig. 2).

인삼차중 유산균 생존포자의 내구성에 관한 시험

내열성시험: 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 음용시 끓인물과 끓이지 않은 물로 생존율을 비교 측정하여 생존 포자의 내열성을 비교 시험하였다(Fig. 3).

그 결과 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 끓인물에 타서 음용시 생존율이 77.6% 이상으로 내열성이 높아 인삼차는 물론 다른 차류에도 이용 가능성이 높은 것으로 사료된다.

내산성 시험: 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 음용시 위액에 대한 내산성을 시험하기 위해서 인공위액(pH 3.0)으로 37°C에서 경시적(1, 2, 3, 4 시간)으로 산처리하여 산처리하지않은 대조군과 생존율을 비교측정하여 인삼차중 유산균 생존포자의 내산성을 비교시험 하였다(Fig. 4).

그 결과 인공위액(pH 3.0)에서 4시간 처리에도 생존율이 55.4% 이상으로 내산성이 높아 음용시 위에서도 사멸되지 않고 장에 도달할 수 있을 것으로 예측된다.

내담즙성 시험: 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 음용시 소화 담즙액에 대한 내담즙성을 시험하기 위하여 인공소화 담즙액(0.1% oxgal, pH 6.8)으로 37°C에서 경시적(2, 4, 6, 8시간)으로 처리하여 처리하지 않은 대조군과 생존율을 비교 측정하여 인삼차중 유산균 생존 포자의 내담즙성을 비교 시험하였다(Fig. 5).

그 결과 인공 소화 담즙액으로 37°C에서 8시간 처리하여도 생존율이 90% 이상으로 내담즙성이 높아 음용시 장내에서 생존하여 유의한 장내세균총을 형성할것으로 사료된다.

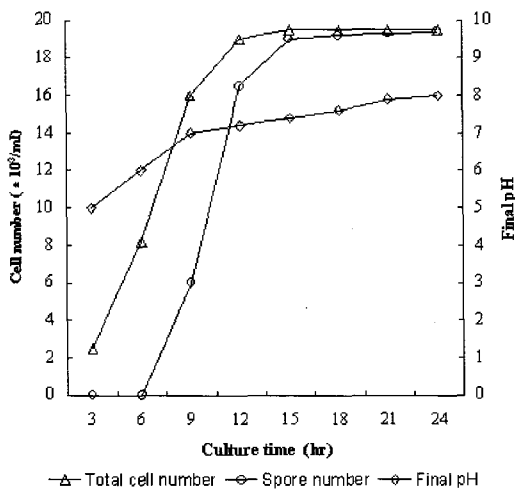


Fig. 1. Time course of the aerobic culture in jar fermentor. Total cell number (Δ), Spore number (\circ), pH (\diamond).

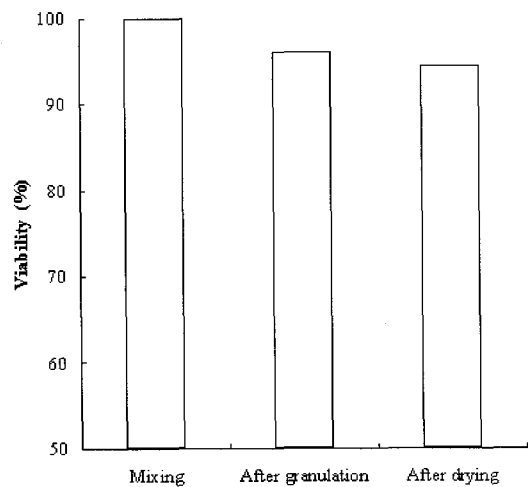


Fig. 2. Viability of spore during ginseng tea manufacturing process.

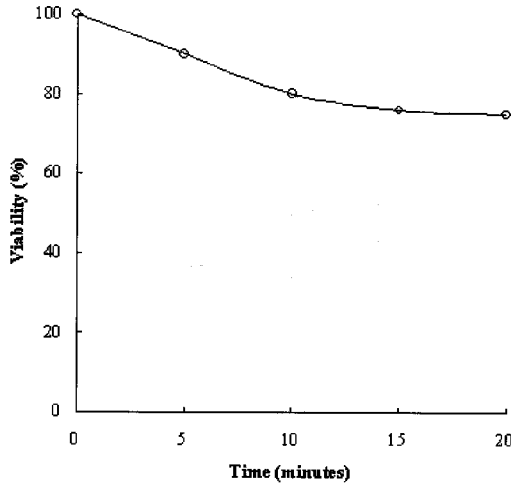


Fig. 3. Viability of spore by boiled water treatment.

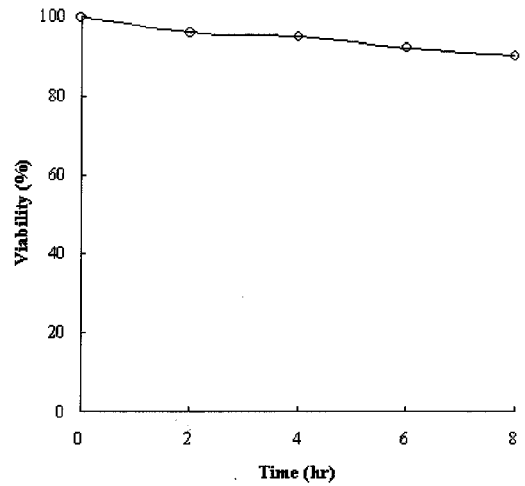


Fig. 5. Viability of spore by bile acid (oxgal 0.1%, pH 6.8) treatment.

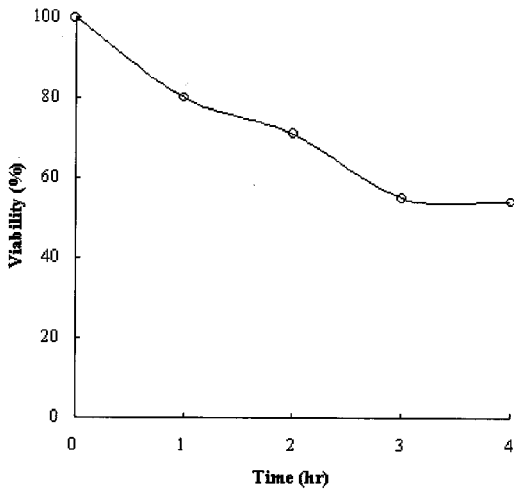


Fig. 4. Viability of spore in artificial gastric juice (pH 3.0).

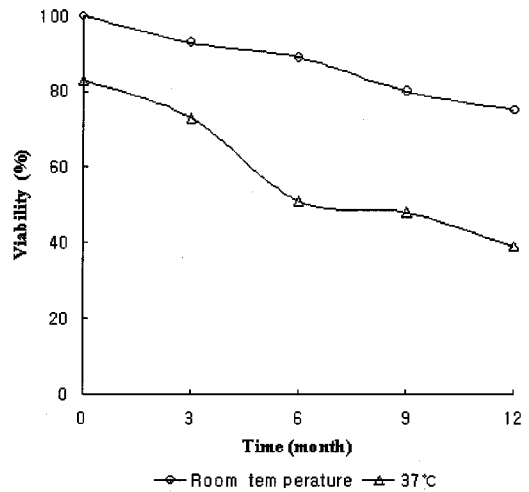


Fig. 6. Viability of spore at room temperature and 37°C for 12 months. room temperature (- ○ -), 37°C (- △ -).

보존성 시험: 유포자성 유산균을 이용한 인삼차를 실온과 37°C에서 밀폐된 용기(병)에 넣어 보관하면서 경시적(3, 6, 9, 12개월)으로 생존율을 측정하여 인삼차중 유산균 생존 포자의 보존성을 비교 시험하였다(Fig. 6).

그 결과 실온 보관 1년(12개월)후에도 생존율이 75% 정도로 보존성이 우수하여 장기간 유통기간에서도 이용성이 높은 것으로 사료된다.

요 약

유포자성 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*를 함유한 인삼차를 개발하기 위하여 jar fermentor에서의 최적배양결과 spore는 20×10^8 CFU/mL이었고, 포자형성율은 97%이었다. 이 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 포집된 균체는 증류수로 1회 세척한 후 다시 acetone 소량으로 재차 세척하고, 55°C에서 2시간 건조하여 생균수 5200×10^8 CFU/g의 균체원말 10 g 정도를 얻었다.

다음에 유포자성 유산균을 이용한 인삼차 과립시제품을 만

들었다(생균수 2.3×10^8 CFU/g).

이같이 조제한 유포자성 유산균을 이용한 인삼차 과립제품을 뜨거운 물에 타서 음용시 끓인물에 대한 내열성을 시험한 결과 식힌후에 생존율이 77.6%였다.

다음에 음용후, 인공 위액에 대한 내산성과 소화 담즙액에 대한 내담즙성을 조사한 결과 각각 pH 3의 인공위액에서 4시간 처리한 경우 생존율이 55.4%이고 인공 소화담즙액(oxgal 0.1%)에서 8시간 처리 후에도 생존율이 90% 이상으로 위액과 소화담즙액에 대한 내성이 높은 것으로 나타났다.

장기 보존성 시험에서는 인삼차 과립제품을 병에 보관하여 실온에서 1년간 보존 후 생존율을 측정한 결과, 생존율이 75% 정도로 경시변화에 대한 안정성이 높은 것으로 나타났다.

그러므로 유포자성 유산균 원료를 인삼차는 물론 다양한 차류에 이용하여 기능성 차류로 개발, 제품화 할 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

1. Benishin, C.G. Action of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve endings. *Neurochem. Int.* 21: 1-5 (1992)
2. Saito, H. and Nishiyama, N. Effect of ginseng and its saponins on experimental amnesia in mice and on cell cultures of neurons. pp. 92-98. In: *Proc. 5th Int'l. Ginseng Symp.* Seoul, Korea (1988)
3. Kikuchi, Y., Sasa, H., Kita, T., Hirata, J. and Tode, T. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation *in vitro* by ginsenoside-Rh2 and adjuvant effects of cisplatin *in vivo*. *Anticancer Drugs (England)* 2: 63-67 (1991)
4. Singh, V.K., Agarwal, S.S. and Gupta, B.M. Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract. pp. 225-232. In: *Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp.* Seoul, Korea (1984)
5. Huo, Y. and Chen, Y. The effect of *Panax ginseng* extract (GS) on insulin and corticosteroid receptors. *J. Traditional Chinese Medicine* 8: 293-295 (1998)
6. Oura, H. and Hiai, S. Physiological chemistry of ginseng. *Metabolism Disease* 10: 564-569 (1973)
7. Kim, H.Y., Chen, X. and Gillis, C.N. Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium against free radical induced injury. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189: 670-676 (1992)
8. Kang, S.Y. and Kim, N.D. The antihypertensive effect of red ginseng saponin and the endothelium-derived vascular relaxation. *Korean J. Ginseng Sci.* 18: 175-182 (1992)
9. Ogita, S. and Samugawa, K. Clinical effectiveness of Korea ginseng on patients with climacteric disturbances. *The Ginseng Review* 18: 95-97 (1994)
10. Saito, H. and Bao, T.T. Effect of red ginseng on mice exposed to various stress. pp. 97-105. In: *Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp.* Seoul, Korea (1984)
11. Brekhman, I.I. Ancient ginseng and pharmacology. p. 6. In: *Proc. Symp. Gerontology*, Lugano, Switzerland (1976)
12. Mei, B., Wang, Y.E., Wu, J.X. and Chen, W.Z. Protective effect of ginsenosides on oxygen free radical induced damages of cultured vascular endothelial cells *in vitro*. *Yao Hsueh Hsuuh Pao* 29: 801-808 (1994)
13. Metchnikoff, E. Etudes sur la flore intestinale. *Ann.Inst. Pasteur (Paris)* 22: 929-955 (1908)
14. Horwity-Wlassowa, L.M. and Nowtelnow, N.W. Uber eine sporogene Milchsäurebakterienart, *Lactobacillus sporogenes* n.sp. *Zentralblatt Bacteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene* Abt. 11, 87: 331-333 (1932)
15. Nakayama, O. and Sakaguchi, K. Studies on the spore bearing lactic acid forming bacilli. part 1. *J. Agr. Chem. Soc. Japan.* 23: 513-517 (1950)
16. 中山大樹. 有孢子乳酸菌, 食品開發, (日本) 2,10,25-27 (1967)
17. Kim, Y.M., Lee, J.C., Choi, Y.J. and Yang, H.C. Studies on the production of β -galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*. Properties and application of β -galactosidase, *J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 13: 355 - 359 (1985)
18. 城況兄夫. 有孢子乳酸菌「LACRIS」의 乳酸菌保健食의 應用, 食品工業 (日本) 10, 83-86 (1967)
19. Missawa, Y.M. Matsubara and Inuzuka, T. Studies on the application of the spore-bearing lactic acid bacteria to foods, part 1. Isolation and properties of the isolated strain, *J. Japan Soc. Food Sci. Technol.* 19: 14-20 (1972)
20. Kim, Y.M., Lee, G.K. and Min, K.C. The Lactic acid fermentation by *Lactobacillus sporogenes*, *Korean J. Food & Nutr.* 1: 95-101 (1988)

(2002년 3월 18일 접수; 2002년 7월 30일 채택)