

고초균 발효에 의한 홍삼박 발효물에 썩 분말 첨가에 따른 물리화학적 및 항산화적 특성

정혜원¹ · 김지은^{1,2} · 서지현² · 이삼빈^{1,2*}

¹계명대학교 식품가공학과

²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

Physicochemical and Antioxidant Properties of Red Ginseng Marc Fermented by *Bacillus subtilis* HA with Mugwort Powder Addition

Hye-Won Jung¹, Ji-Eun Kim^{1,2}, Ji-Hyun Seo², and Sam-Pin Lee^{1,2*}

¹Dept. of Food Science and Technology and

²The Center for Traditional Microorganism Resources (TMR), Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

Red ginseng marc (RGM) was fermented by the solid-state fermentation using *Bacillus subtilis* HA to produce biologically active compounds. The red ginseng marc fermented without mugwort possessed higher mucilage content (11.5%) and proteolytic activity (277.5 unit/g). The RGM fermented with 3% mugwort showed lower production of mucilage and protease activity whereas higher tyrosine content (581.3 mg%) and consistency index (8.8 Pa · sⁿ). The mucilage produced from fermented RGM contained γ -PGA with 1,100 kDa of molecular weight, and its yield was 15.9 g/kg. 70% ethanol extract from the RGM fermented with 3% mugwort had the highest DPPH radical scavenging effect (IC₅₀ value of 0.57 mg/mL), and the water extract showed the highest ABTS radical scavenging effect, indicating IC₅₀ value of 1.24 mg/mL. Overall, the RGM fermented by *B. subtilis* HA with mugwort contained various biologically active compounds having antioxidant effects.

Key words: red ginseng marc, mucilage, antioxidant effect, *Bacillus subtilis*

서 론

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 한국과 중국 등에서 2,000년 이상 가장 고귀한 생약제로 사용되어 왔으며, 홍삼은 수삼을 증숙한 후 건조함으로써 갈변화 등을 포함한 품질 변화가 수반된다. 홍삼의 약리 효능은 사포닌, 단백질, 펩타이드나 비전분성 다당체에 관한 연구가 이루어져 항산화, 항염증, 면역기능증진, 신경조절, 간 보호, 혈당저하, 지방흡수 조절작용 등의 생리활성 기능이 보고되고 있다(1). 홍삼의 효능이 과학적으로 밝혀지면서 다양한 기능성식품의 소재로 응용되어 전 세계적으로 홍삼의 유통량은 급격한 증가 추세를 나타내고 있다(2).

홍삼을 물 또는 알코올로 가열 추출하여 홍삼 추출물을 제조한 후 배출되는 부산물인 홍삼 잔사, 즉 홍삼박은 산업적으로 동물 사료와 퇴비로 이용되거나 높은 수분함량으로 미생물에 의해 쉽게 부패되어 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 이러한 홍삼박에는 홍삼의 향 및 고유한 색을 유지하고 다당체를 포함한 여러 가지 유효성분이 함유된 것으로 보고

되었으며 식이섬유가 풍부하다(3). 지금까지 보고된 홍삼박에 관한 연구로는 홍삼박 분말을 첨가한 식빵의 품질 특성(4), 홍삼박 분말을 첨가한 반죽의 특성(5) 등 홍삼박 분말 첨가에 따른 제과·제빵의 품질특성에 관하여 연구되어 왔으며, 그 밖의 볶음 처리한 홍삼박의 향기성분과 관능적 특성(6), 홍삼박으로부터 산성 다당체의 추출조건 조사(7), 효모생육에 미치는 홍삼박의 영향(8)에 관하여 보고되었다. 이처럼 홍삼박의 식품소재로 이용에 관한 연구는 주로 건조 및 가공소재로 이용에 한정되며, 홍삼박의 발효에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

전통발효식품에 관여하는 고초균(*Bacillus subtilis*)은 호기성균이며 다양한 가수분해효소를 생산하면서 콩 발효식품에 크게 기여한다. 고초균 발효에는 대두를 발효한 청국장 이 있으며, 발효과정을 거치면서 고초균에 의해 생산되는 단백질 가수분해 효소 및 탄수화물 가수분해 효소, 혈전분해 효소 및 기능성 펩타이드, 고분자 점질물 등의 생리활성물질을 포함한다(9). 고초균의 발효대사산물인 점질물은 glutamic acid가 중합된 γ -polyglutamic acid(PGA)와 과당의 중

*Corresponding author. E-mail: splee@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5554, Fax: 82-53-580-5554

합체인 fructan 형태의 레반으로 구성되어 있다(10). 이러한 점질물은 발효제품의 품질특성에 중요한 영향을 미치며, 특히 PGA는 미생물 고분자물질의 일종으로 면역증진 효과, 항암효과 등의 생리활성기능을 가지고 있으며 식품, 의약품 뿐만 아니라 보습성이 뛰어나 화장품으로도 각광받고 있는 기능성 소재이다(11).

콩 가공 제품으로부터 생산되는 부산물인 탈지 대두 분말은 단백질이 풍부하며 지방질이 매우 적게 함유된 식품소재로서 다양한 가공식품에서 단백질의 원료로 사용되고 있다. 최근에 단백질이 풍부하며 지방질이 적게 함유된 탈지대두 분말을 이용하여 고초균을 이용한 고체 발효를 통해서 펩타이드, 아미노산, 점질물 및 다양한 효소를 포함한 생리활성 소재를 생산함으로써 기능성식품의 원료로 가능성을 보고하였다(12). 또한 탈지 대두 분말은 고초균에 의해서 단시간에 발효가 진행되는 장점을 가지고 있어, 고체 발효 시 중요한 단백질 원료로서 매우 유용하다.

현대인들은 흡연, 음주, 스트레스 등으로 인하여 체내에 활성산소가 많이 생성되는데, 활성산소는 암, 노화 등의 성인병으로 연결될 수 있다(13). 신체의 노화나 암, 심장병 등의 질환은 생체 내에서 산화적 스트레스에 의해 생성되는 자유라디칼(free radical)에 기인하는데 자유라디칼은 세포 구성성분과 강하게 반응하여 세포와 조직에 손상을 가하고 지속적인 DNA 손상은 돌연변이를 일으켜 암, 노화 등을 유발하게 된다(14). 이러한 측면에서 항산화식품 섭취가 중요시 되면서 이에 대한 많은 연구들이 진행되고 있으며, 다양한 한방소재에서도 항산화 효과가 보고된 바 있다.

쑥(*Artemisia asiatica* Nakai)은 한국에서 자생하는 대표적인 야생식물로 식용 또는 약용으로 많이 이용되고 있다. 최근 들어서 쑥의 향미 첨가물로서의 가치뿐만 아니라 쑥이 가지고 있는 고유한 생리활성을 이용해 식품에 응용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(15). *Artemisia*속의 식물들은 다양한 flavonoid류를 함유하고 있으며 flavonoid들의 다양한 생리활성 중 항산화 효과는 매우 중요한 활성으로 알려져 있으며 여러 가지 flavonoid들이 효소적 또는 비효소적으로 지질과산화물 효과를 억제한다고 보고되었다(16).

본 연구에서는 홍삼 추출 후 부산물로 생산되는 홍삼박을 열풍 건조하여 초미세 분말화 한 후 쑥 농도별 첨가에 따른 유용 고초균을 이용하여 고체 발효를 하였으며, 기능성 점질물 PGA, 펩타이드, 단백질 가수분해효소 및 항산화 활성을 포함하는 발효물의 생리활성물질 생산을 위한 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

홍삼박(red ginseng marc, RGM)은 주식회사 정문(Gyeong-san, Korea)으로부터 제공받았으며, 부재료로 탈지대두분말(defatted soybean flour, DSF)은 Archer Daniels Midland사

(Decatur, IL, USA)의 제품을 구입하였고, 쑥 분말은 열매누리(Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

MRS broth는 Difco사(Sparks, MD, USA)의 제품을 구입하여 사용하였으며, 점질물 향상을 위해 첨가된 mono sodium glutamate(MSG)는 Wei-chuan Foods사(Taipei city, Taiwan)의 제품을 사용하였다. HPLC에 사용된 water와 acetonitrile은 HPLC 등급용 용매(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였으며, 그 외의 시약들은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

균주 및 스타터 배양액 제조

재래식 청국장에서 분리한 후 한국미생물보존센터에 기탁한 *B. subtilis* HA(KCCM 10775P) 균주를 사용하였다. 스타터 배양액은 탈지대두분말 5% 용액(w/v)을 균질화한 후 121°C에서 15분간 멸균한 액체 배지 50 mL에 MRS agar plate에서 42°C로 24시간 동안 배양한 균주를 1회 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Daejeon, Korea)에서 42°C로 24시간 동안 배양하여 스타터로 사용하였다 (6.5×10^8 CFU/mL).

홍삼박의 성분분석

홍삼박은 60°C에서 24시간 열풍건조한 후 초미세 분쇄기(Air Classifier Mill, Hankook crusher Co., Seoul, Korea)를 이용하여 분말화하여 사용하였다. 초미세 분말화한 홍삼박의 수분, 조단백질, 조지방 함량은 AOAC법(17)에 따라 정량하였다. 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 단백질 자동분석기(Buchi 339, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)를 사용하여 질소함량을 측정하였으며, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조섬유는 Johansson과 Hallmer(18)를 이용하여 정량하였다. 홍삼박에 포함된 saponin 중 Rg1과 Rb1의 분석은 HPLC를 이용하여 분석하였으며 홍삼박 분말 10 g에 70% 메탄올을 200 mL 첨가하여 80°C에서 1시간 동안 환류 냉각 추출한 후 여과, 농축하고 동결 건조하여 분석에 이용하였다. HPLC 분석 조건은 용매로는 A용매(10% acetonitrile, 90% water)와 B용매(90% acetonitrile, 10% water)를 사용하여 A와 B용매를 20:80으로 혼합하여 5분까지 유지하다가 점차 A용매의 농도를 증가시켜 60분까지 95%에 이르도록 하여 분석하였다. 사용된 column은 Capcell pak MG C₁₈(Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였고 column의 온도는 30°C로 고정하였으며 UV 203 nm에서 분당 1 mL 씩 용매를 흘려주면서 분석하였다.

쑥 분말의 성분분석

쑥 분말의 수분, 조단백, 조지방 함량은 홍삼박 분말의 분석과 동일한 방법으로 하였다. 수분 흡습력 측정 실험은 쑥 분말 1 g에 증류수 25 mL를 가한 뒤 30°C 항온 수조에서 30분간 교반한 후 1,000×g에서 20분간 원심분리하고 남은 침전물의 무게를 측정하여 수분 흡착 지수(WAI, Water absorption index)를 구하였다.

총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 측정하기 위하여 썩 분말 3 g에 물과 에탄올을 각각 50 mL씩 넣고 25°C에서 6시간 동안 교반 추출하였다. 감압 농축기를 이용하여 농축하여 용매를 제거한 후 동결 건조하여 총 폴리페놀 함량은 AOAC법(17)에 의하여 측정하였고, 총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법(19)을 일부 변형하여 측정하였다.

홍삼박 고체발효

250 mL 비커에 홍삼박 10 g과 탈지대두분말 3 g을 혼합한 후 증류수를 첨가하였다. 혼합된 시료는 autoclave(MLS-3020, Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균시킨 후, 실온(25~30°C)에서 충분히 식히고, MSG 2%를 첨가한 후 *B. subtilis* HA starter를 고정분 무게의 1%씩 접종하여 42°C에서 24시간 동안 발효하였다. 또한 썩을 농도별(0~3%)로 첨가하여 발효 후 동결 건조하여 분석하였다.

Tyrosine 함량 측정

발효물의 펩타이드 생성 정도를 측정하기 위하여 Folin phenol 시약을 이용하여 발효물 중에 존재하는 tyrosine 함량을 측정하였다(20). 홍삼박 발효물 2 g을 증류수 18 mL로 희석하여 균질화 한 시료를 test-tube에 취하여 15분간 원심분리(1,500×g) 한다. 상등액 0.7 mL과 0.44 M TCA(trichloroacetic acid) 0.7 mL을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 15분간 원심분리 하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 mL과 phenol reagent 0.5 mL을 차례로 넣고 혼합한 후 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 spectrophotometer(Uvikon, Kontron Co., Ltd., Milano, Italy)로 660 nm에서 측정하였다.

Protease 활성 측정

Protease 활성은 Anson의 방법(21)을 변형하여 측정하였으며, 홍삼박 발효물 2 g에 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0) 18 mL을 첨가한 뒤 실온에서 진탕 후 1,500×g에서 15분간 원심분리 하여 상등액으로부터 조효소액을 조제한 다음 효소활성을 측정하였다.

점조도 측정

홍삼박 발효물 5 g에 증류수 10 mL을 첨가하여 균질화한 후에 여과 체(sieve, 0.99 mm)를 이용하여 여과하였다. 점조도는 원통형점도계(RheoStress 1, HAAKE, Karlsruhe, Germany)에 cone plate device(Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter)를 장착하여 측정하였다. 시료 1 mL을 plate에 올려 10초 동안의 평균값이 측정되어 얻은 값을 shear rate(1/s)와 shear stress(Pa)로 나타내어 점조도를 측정하였다. 측정온도는 20°C에서 전단속도($\dot{\gamma}$)는 1~100 s⁻¹의 범위로 유동특성을 알아보았고, 점조도 지수는 power law model로 측정하였다(22).

점질물 함량

홍삼박 발효물 5 g에 증류수를 45 mL 첨가하여 점질물을 용출한 후 원심분리 하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 2배의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 형성된 점질물은 95% ethyl alcohol를 이용하여 세척한 후 회수한 점질물을 건조하여 실험에 사용하였다. 상기에서 회수된 건조 점질물을 50°C에서 항량이 될 때까지 감압건조기를 이용하여 건조 후, 건조중량으로 측정하였다(23).

Glutamate 잔존량 및 전환율 측정

홍삼박 발효물에 존재하는 glutamate 잔존량 및 전환율은 TLC 분석으로 측정하였다(24). 상기의 isopropanol 함유 용액을 50°C에서 10 mL까지 농축하여 원심분리 한 후 0.45 µm syringe filter로 여과한 후 thin layer chromatography (TLC) pattern을 이용하여 잔존량을 분석하였다. 분석조건은 표준물질(1, 5, 10 mg/mL L-glutamic acid)과 여과액을 각각 2 µL씩 cellulose plate에 점적하여 전개용매(1-butanol : acetate : water=5:4:3, ethanol : water=63:37)로 전개하고 건조한 후 발색시약(0.2% ninhydrin in acetone)을 spraying 한 후 105°C에서 1분 동안 건조한 후 확인하였다.

γ-Polyglutamic acid(PGA) 분자량 및 함량 측정

건조한 점질물을 0.1 M Na₂SO₄/0.05 M NaN₃ 용액(glacial acetic acid로 pH를 4로 조정)에 1% 되게 녹인 다음, 원심분리 후 상등액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 GPC(gel permeation chromatography)로 분석하였다. 분석조건은 검출기로 RI를 이용하였으며, GPC column은 Shodex SB 805 HQ(Kawasaki, Japan)를 이용하여 이동상을 0.1 M Na₂SO₄/0.05 M NaN₃로 유속은 1.0 mL/min의 속도로 흘러주었다(25). 표준곡선은 각기 다른 분자량을 가진 dextran (American Polymer Corporation, Mentor, OH, USA)을 이용하여 작성하였다. PGA의 함량은 정제한 PGA를 표준물질로 사용하였으며 GPC 분석을 실시하고 생성된 peak 면적을 이용하여 계산하였다.

DPPH radical 소거활성 측정

홍삼박 발효물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소거활성은 Blois의 방법(26)을 변형하여 측정하였다. 시료를 농도별로 희석한 희석액 0.8 mL과 에탄올에 녹인 0.15 mM DPPH용액 0.2 mL를 가하여 실온에서 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 IC₅₀값으로 나타내었다. 이때 상대 활성의 비교를 위하여 대조군으로 butylated hydroxy anisole(BHA), vitamin C를 사용하였다.

ABTS radical 소거활성 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay 방법(27)에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 희석된 용액 990 µL에 sample 10 µL를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 이때 상대 활성의 비교를 위하여 대조군으로 vitamin C, trolox를 사용하였다.

통계처리

실험 결과는 SPSS statistical package program(V.17.0)을 이용하여 평균과 표준오차(mean±SD)를 구하였으며, 각 집단 간 평균치 차이를 검증하기 위하여 one way-ANOVA 및 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 결과에 대한 검증은 p<0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

홍삼박 및 썩 분말의 물리화학적 특징

열풍 건조된 홍삼박을 초미세로 분쇄한 분말의 입자 크기는 20 µm로 나타났다. 일반성분 분석결과 수분이 11.1%, 조단백 18.0%, 조지방 4.0%, 탄수화물은 73.1%, 조섬유 20.1%를 차지하였으며 대부분 탄수화물로 구성되어 있고, 특히 식이섬유 함량이 높게 나타났다. 또한 홍삼박 중에 함유된 saponin 중 Rb1과 Rg1은 검출되지 않아 홍삼 추출 시 모두 추출된 것으로 나타났다.

썩 분말의 일반성분을 측정된 결과 pH는 5.6으로 나타났고 수분이 8.45%, 단백질 9.8%, 조지방 3.6%, 탄수화물 65.8%로 탄수화물 함량이 가장 높았다. 수분 흡착 지수(WSI)는 5.9 g/g, 총 폴리페놀 함량은 물 추출물이 60.1 mg%, 에탄올 추출물이 49.2 mg%로 물 추출물의 함량이 조금 높았다. 총 플라보노이드 함량 역시 물 추출물이 38.0 mg%, 에탄올 추출물이 36.0 mg%로 물 추출물의 함량이 높게 나타났다.

홍삼박 발효물의 특성변화

고초균을 이용하여 고체 발효시킨 홍삼박 발효물의 pH,

수분함량 및 생균수 변화는 Table 1과 같다. 썩을 첨가하지 않은 홍삼박 발효물은 pH 6.2를 나타냈으며, 썩 첨가에 따라 발효물의 pH는 약간 감소하는 경향을 보였다. 홍삼박 발효물의 수분함량은 썩 분말을 첨가할수록 감소하는 경향을 나타냈으며, 홍삼박 발효물의 생균수 측정 결과 썩을 첨가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. 썩이 첨가되지 않은 홍삼박 발효물은 9.2×10^8 의 생균수가 나타났고 썩이 3% 첨가된 홍삼박 발효물은 4.0×10^7 으로 낮은 생균수를 보였다. Ahn(28)은 썩이 *B. subtilis*에 대한 항균 작용을 나타낸다고 보고한 바 있으며 이에 따라 썩의 농도가 높을수록 고초균 생육이 점차 억제되어 생균수의 감소가 나타난 것이라 생각된다. 이 결과로 썩은 전통발효식품 제조 시 고초균에 의한 생육을 억제시키는 천연물 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Protease 활성과 tyrosine 함량 변화

B. subtilis HA를 이용한 홍삼박 발효 시 protease 활성 측정 결과 썩을 첨가하지 않은 구에서 277.5 unit/g으로 가장 높은 활성을 나타냈으며 썩의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타냈다. 썩은 고초균의 생육을 억제하는 작용이 있어 생균수를 감소시키는 결과를 나타냈으며(Table 1), 이와 관련하여 protease 활성 역시 썩의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 보인 것이라 생각된다. Kim과 Lee(29)는 대두 가공품인 soybean grit 원료에 고초균을 이용한 고체 발효 시 protease 활성이 151.24 unit/g으로 나타낸다고 보고한 바 있으며, 동일한 고초균으로 고체 발효된 홍삼박 발효물의 protease 활성이 soybean grit 발효물보다 약 1.5배 높은 활성을 나타냈다. 따라서 고체 발효 시 발효 원료에 따른 단백질 가수분해효소 활성이 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 홍삼박 발효물의 단백질 가수분해활성에 기인한 펩타이드 함량을 간접적으로 측정하는 방법으로 tyrosine 함량을 측정된 결과 홍삼박에 썩을 첨가할수록 tyrosine 함량이 증가하였다. 썩이 첨가되지 않은 홍삼박 발효물의 tyrosine 함량은 485.0 mg%로 나타났으며 썩 3% 첨가 시 581.3 mg%로 가장 높은 함량을 나타냈다(Table 1). 썩 첨가 경우에 홍삼박 발효물의 단백질 가수분해효소의 활성이 감소하였지만 발효 원료에 존재하는 단백질의 함량이 증가되어 최종 단백질 가수 분해물을 나타내는 tyrosine 함량이 높게 측정된 것으로 추측된다. 썩의 일반적인 단백질 함량은 약 9~14% 정도

Table 1. Comparison of biochemical properties of red ginseng marc fermented by *B. subtilis* HA with different contents of mugwort

Mugwort (%)	pH	Moisture content (%)	Viable cell counts (CFU/g)	Tyrosine content (mg%)	Protease activity (unit/g)
0	6.2±0.1 ^b	4.8±0.2 ^b	9.2×10^8	485.0±1.2 ^a	277.5±0.2 ^b
1	5.9±0.1 ^{ab}	3.7±0.1 ^a	6.3×10^8	514.9±0.5 ^{ab}	241.9±28.0 ^b
2	5.8±0.1 ^a	3.5±0.1 ^a	1.9×10^8	543.1±5.4 ^b	170.3±29.8 ^a
3	5.8±0.1 ^a	3.5±0.1 ^a	4.0×10^7	581.3±2.1 ^c	125.9±0.2 ^a

Each value is mean±SD (n≥3). Means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 2. γ -PGA content and molecular weight of RGM fermented by *B. subtilis* HA with different contents of mugwort

Mugwort (%)	Consistency index (Pa·s ⁿ)	Mucilage content (%)	γ -PGA content (g/kg)	Molecular weight of γ -PGA (kDa)
0	1.5±0.1 ^a	11.5±0.1 ^d	15.9±0.3 ^d	1,100
1	2.4±0.1 ^b	8.4±0.1 ^c	11.2±0.2 ^c	1,105
2	7.2±0.1 ^c	9.0±0.1 ^b	8.2±0.1 ^b	1,090
3	8.8±0.9 ^c	7.2±0.1 ^a	5.6±0.1 ^a	1,070

Each value is mean±SD (n≥3). Means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

로 보고되고 있으며(30), 썩의 첨가 농도가 높을수록 고초균이 분비하는 단백질 분해효소에 의해서 썩에 있는 단백질의 가수분해가 일어나 tyrosine 함량이 증가하는 것으로 사료된다.

점질물 함량과 점조도 변화

B. subtilis HA를 이용한 홍삼박 발효물의 점조도 변화와 생산되는 점질물 함량 변화는 Table 2와 같다. 홍삼박 발효물로부터 추출된 수용성 성분의 알코올 침전에 의해서 얻어진 점질물 함량은 썩을 첨가하지 않은 구에서 11.5%로 가장 높은 함량을 나타냈으며 썩을 첨가할수록 감소하면서 썩 3% 첨가 시 점질물 함량은 7.2%로 나타났다. 이는 썩 첨가에 따른 고초균의 생육 억제에 따른 결과로 생각된다. Oh(24)는 두부 제조 시 생산되는 부산물인 비지를 이용하여 *B. subtilis* KU-A와 *B. subtilis* GT-D 균주로 발효한 비지 발효물의 점질물 함량을 측정된 결과 각각 4.9%, 2.9%로 나타났다고 보고한 바 있다. 이와 비교 시 홍삼박의 점질물 함량은 두부 부산물인 비지 발효물보다 점질물 생성이 우수하며 점질물의 생산에는 원료 종류 및 발효 균주가 큰 영향을 미칠 것이라고 추측되어진다. 점조도는 홍삼박 발효물을 증류수로 5배 희석하여 여과한 추출액을 이용하여 측정하였다. 홍삼박 발효물의 점조도 측정 결과 썩을 첨가할수록 증가하였으며, 썩을 첨가하지 않은 홍삼박 발효물의 점조도 값은 1.5 Pa·sⁿ으로 나타났고 썩 3% 첨가 시 점조도 값은 8.8 Pa·sⁿ으로 썩을 첨가하지 않은 발효물보다 약 6배 높은 점조도 값을 나타냈다. 썩 첨가에 따른 홍삼박 발효물의 점조도 증가는 수분 함량의 차이 및 썩 분말과 점질물 등을 함유한 발효물 사이의 상호 결합에 의한 결과라 사료된다. 따라서 홍삼박 발효 시에 첨가되는 썩은 고초균에 의한 점질물 생산을 저해하는 반면에, 발효물의 점조도는 증가시키는 경향을 보이면서 홍삼박 발효물의 물성 조절이 가능하며, 다양한 식품소재로 활용이 기대된다.

γ -Polyglutamic acid(PGA) 분자량 및 함량

홍삼박 발효물의 썩 농도별 발효 시 γ -PGA의 생산량 및 γ -PGA의 분자량변화를 GPC를 이용하여 측정하였으며, dextran을 이용한 표준곡선과 대비하여 측정된 결과는 Table 2와 같다. 발효물의 점질물 함량은 썩을 첨가하지 않은 구에서 11.5%로 가장 높게 나타났고, 발효물 중의 γ -PGA 함량 역시 썩을 첨가하지 않은 구에서 15.9 g/kg으로 가장

높게 나타났다. 고초균에 의한 고체 발효물에서 생산되는 점질물은 γ -PGA와 fructan 형태의 레반으로 구성되어 있는 것으로 보고되고 있지만, 홍삼박 발효물의 점질물 분석 결과 레반은 측정되지 않았다. Xu 등(31)에 의하면 γ -PGA 생산은 배지의 수분함량, 탄소원, 질소원, 발효시간에 따라 달라지며, 최적조건에서 고체 발효 시 7~18 g/kg 정도의 γ -PGA를 생산하는 것으로 보고되었다. 이 결과는 홍삼박 발효물과 비슷한 함량을 나타내었다. 썩을 첨가하지 않은 구에서 γ -PGA의 분자량은 1,100 kDa으로 나타났으며, 썩 첨가 시 유사한 경향을 나타내어 썩 첨가에 따른 γ -PGA의 분자량은 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. Masao와 Kiyotaka(32)는 고초균 균주를 달리하였을 때 γ -PGA의 분자량을 측정된 결과 100~2,000 kDa의 범위로 큰 차이가 나는 것으로 보고하였다.

Glutamate의 잔존량과 전환율 변화

홍삼박의 고체발효를 위해서 이용된 고초균은 glutamate의 전생성 균주로서 기질로서 glutamate를 이용하여 glutamic acid의 중합체인 γ -PGA을 포함하는 점질물을 생산한다. 발효물중의 glutamate의 이용능을 측정하는 수단으로 발효물에 잔존하는 glutamate 잔존량을 TLC로 분석하였으며, 결과는 Fig. 1과 같다. 홍삼박 발효물의 glutamate 전환율은 약 80%로 나타났으나 썩의 첨가에 따른 glutamate 전환율의 변화는 없었다(Fig 1a). 썩을 첨가하지 않고 glutamate를 2% 첨가하여 발효한 홍삼박 발효물의 발효시간에 따른 glutamate 전환율을 측정하였다(Fig. 1b). 발효시간이 길어질수록 잔존하는 glutamate 함량이 약간 감소되는 것을 TLC 분석으로 확인할 수 있었다. 홍삼박의 고체 발효 중 첨가된 glutamate의 전환은 24시간 이내로 대부분 이루어지며, 발효시간을 늘릴수록 glutamate 전환율은 다소 증가될 수 있지만, 홍삼박 발효물의 냄새 등을 고려할 때 발효시간은 24시간이 적당한 것으로 사료된다. PGA 생산을 위한 glutamate 첨가 시 액체발효에서는 균주에 따라 전환율의 차이를 보이며, *B. lichniiformis*(ATCC 9945a) 균주는 85%의 전환율을 나타내어 홍삼박 발효물과 비슷한 전환율을 나타냈다(33). 또한 *B. subtilis* F-2-01 균주를 이용한 액체발효 시 전환율은 68%로 전환율에 차이를 보였다(34).

DPPH radical 소거활성

수소 공여능을 측정하는 대표적인 방법인 DPPH는 hy-

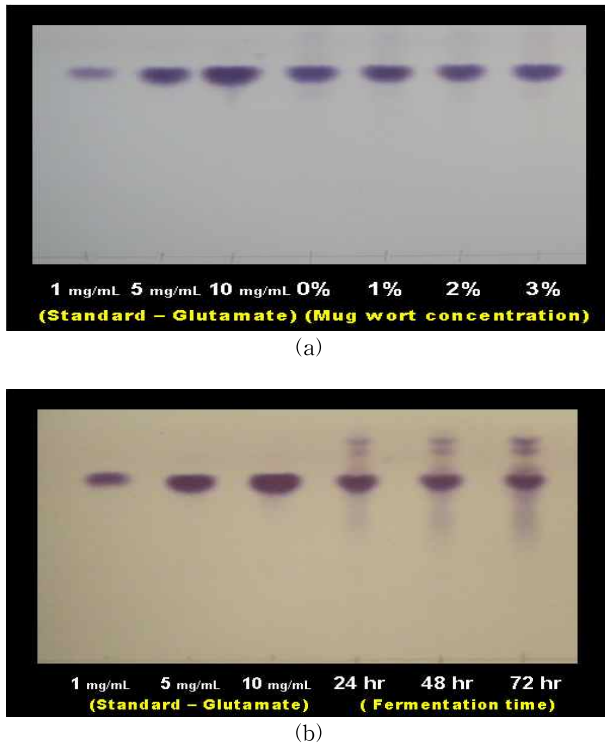


Fig. 1. TLC patterns of residual glutamate in RGM fermented with different contents of mugwort (a) and fermentation time (b).

drazy]의 질소 원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소 원자를 받아들임으로써 자체의 정색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화능의 정도를 측정할 수 있다. DPPH radical 소거법은 일종의 전자 공여능을 측정하는 방법으로 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 가능하게 된다(35).

DPPH radical 소거 활성법을 이용한 홍삼박 발효물의 물 추출구 및 70% 주정 추출구의 항산화력을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 물 추출구에서는 썩을 첨가할수록 우수한 소거활성을 나타냈으며 썩 3% 첨가 시 IC_{50} 값이 0.62 mg/mL로 나타났다. 70% 주정 추출구 역시 썩을 첨가할수록

Table 3. DPPH radical scavenging effect of RGM fermented by *B. subtilis* HA with different contents of mugwort

Mugwort (%)	IC_{50}^1 (mg/mL)	
	Water extract	70% EtOH extract
0	0.79 ± 0.12^b	0.71 ± 0.12^a
1	0.71 ± 0.14^b	0.66 ± 0.04^{ab}
2	0.62 ± 0.08^a	0.61 ± 0.03^{ab}
3	0.62 ± 0.01^a	0.57 ± 0.04^c
BHA ²⁾	$9.7 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$	
Vit-C	$6.4 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH radical at 30 min after starting the reaction. Each value is mean \pm SD ($n \geq 3$). Means with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

²⁾Butylated hydroxy anisole.

우수한 소거활성을 나타냈으며 썩 3% 첨가 시 IC_{50} 값이 0.57 mg/mL로 물 추출구보다 높은 소거활성을 나타냈다.

Park 등(36)은 썩의 물 추출물과 에탄올 추출물의 전자공여능 측정 결과 물추출물은 100, 300, 500, 1000 ppm의 농도에서 각각 41%, 50%, 53%, 57%의 활성을 나타냈고 에탄올 추출물의 100, 300, 500, 1000 ppm의 농도에서 각각 39%, 51%, 58%, 64%의 활성을 나타내었다고 보고하여 500 ppm 이상의 농도에서 물 추출물보다 에탄올 추출물이 5~7% 높은 전자공여능을 나타낸다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

ABTS radical 소거활성

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 $ABTS^+$ 이 생성되면 시료의 항산화력에 의해 $ABTS^+$ 이 소거되어 radical 특유의 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 $ABTS^+$ 의 소거 활성능을 측정할 수 있다(37).

ABTS radical 소거 활성법을 이용한 홍삼박 발효물의 물 추출구 및 70% 주정 추출구의 항산화력을 측정된 결과는 Table 4와 같다. ABTS radical 소거활성은 DPPH radical 소거활성과 같이 썩을 첨가할수록 우수한 소거활성을 나타냈으며 썩 3% 첨가 시 물 추출구에서는 IC_{50} 값이 1.24 mg/mL로 나타났고, 주정 추출구에서는 1.34 mg/mL로 나타났다. DPPH radical 소거활성은 물 추출물보다 70% 주정 추출물에서 더 우수한 활성을 나타낸 반면 ABTS radical 소거활성은 물 추출물에서 더 우수한 활성을 나타냈다.

Hong 등(38)에 의하면 썩 에탄올 분획물에서 약 IC_{50} 값이 52.71 ~ 321.95 $\mu\text{g/mg}$ 의 우수한 소거활성을 보였으며, 썩은 다양한 플라보노이드를 함유하고 있으며 6-methoxy flavonoid의 공통적인 구조를 가지고 있고 플라보노이드는 항산화 효과가 크다고 보고되었다. 따라서 썩 농도에 의존하여 ABTS radical 소거활성을 나타냈으며 썩이 ABTS radical 소거활성에 영향을 주는 것으로 생각된다. 한편, Kim 등(39)은 폐 추출물의 항산화 활성이 pH가 증가할수록 불안정하여 감소되는 것으로 보고하였는데 썩 분말을 첨가할수록 발효물의 pH는 감소하여 항산화성이 증가되는 결과와 비슷한

Table 4. ABTS radical scavenging activity of RGM fermented by *B. subtilis* HA with different contents of mugwort

Mugwort (%)	IC_{50}^1 (mg/mL)	
	Water extract	70% EtOH extract
0	1.57 ± 0.86^b	1.62 ± 0.98^b
1	1.46 ± 0.65^{ab}	1.44 ± 1.12^a
2	1.40 ± 0.19^{ab}	1.41 ± 0.67^a
3	1.24 ± 0.44^a	1.34 ± 0.22^a
Trolox	$56.25 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$	
Vit-C	$64.29 \pm 3.71 \mu\text{g/mL}$	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS radical. Each value is mean \pm SD ($n \geq 3$). Means with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

경향을 나타내었다.

요 약

홍삼 추출액 제조 후 생산되는 부산물인 홍삼박의 식품 소재화를 위해서 열풍 건조시킨 후 초미세 분말화 하였으며, 썩 분말 첨가에 따른 고초균 발효 특성을 조사하였다. 홍삼박 분말에 탈지대두분말 3%와 monosodium glutamate(MSG) 2%, 썩을 농도별(0~3%)로 첨가하여 발효하여 분석하였다. 홍삼박 발효물의 tyrosine 함량은 썩 3% 첨가 시 581.3 mg%로 가장 높은 함량을 나타낸 반면 protease 활성은 썩을 첨가할수록 감소하는 경향을 나타냈으며 썩을 첨가하지 않은 구에서 277.5 unit/g으로 가장 높은 활성을 나타냈다. 점조도 측정 결과 썩 3% 첨가 시 8.8 Pa·s⁰으로 가장 높게 나타났고, 점질물 함량은 썩을 첨가하지 않은 구에서 11.5%로 가장 높은 함량을 나타냈다. 고분자 점질물인 PGA 함량을 GPC를 이용하여 측정한 결과 썩을 첨가하지 않은 구에서 15.9 g/kg이었으며 분자량은 1,100 kDa으로 나타났다. 첨가된 MSG 전환율을 약 80% 정도로 나타냈으며, 썩 첨가에 따른 전환율에 효과는 볼 수 없었다. DPPH radical 소거활성은 썩 3% 첨가된 발효물에서 물과 70% 주정 추출물 각각 IC₅₀값이 0.62 mg/mL, 0.57 mg/mL로 나타났다. ABTS radical 소거활성은 썩 3% 첨가 시 물 과 70% 주정 추출물에서 각각 IC₅₀값은 1.24 mg/mL, 1.34 mg/mL로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

- Kang KS, Lee YS. 1997. Involvement of the enhancement of natural killer cell activity on the anti-cancer effect of red ginseng during rat hepatocarcinogenesis. *Korean J Toxicol* 13: 23-37.
- Park NY, Seong JH, Choi MS, Moon KD, Kwon JH, Jeong YJ. 2008. Comparison of functional properties of *Cheong-gukjang* by using red ginseng. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 261-268.
- Park YR, Han IH, Kim MY, Choi SH, Shin DW, Chun SS. 2008. Quality characteristics of sponge cake prepared with red ginseng marc powder. *Korean J Food Cookery Sci* 24: 236-242.
- Han IJ, Kim RY, Kim YM, Ahn CB, Kim DW, Park KT, Chun SS. 2007. Quality characteristics of white bread with red ginseng marc powder. *J East Asian Soc Dietary Life* 7: 242-249.
- Han IJ, Kim MY, Chun SS. 2007. Characteristics of dough with red ginseng marc powder. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 371-378.
- Park MH, Sohn HJ, Jeon BS, Kim NM, Park CK, Kim AK, Kim KC. 1999. Studies on flavor components and organoleptic properties in roasted red ginseng marc. *J Ginseng Res* 23: 211-216.
- Lee JW, Do JH. 2002. Extraction condition of acidic polysaccharide from Korean red ginseng marc. *J Ginseng Res* 26: 202-205.
- Kim SD, Do JH, Lee KS, Sing HS. 1986. Effect of ginseng residue extract on yeast growth. *Korean J Ginseng Sci* 10: 1-10.
- Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. 2004. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* jb-1 from *Chungkook-jang* and fermentational characteristics of Jb-1. *Kor J Microbial Biotechnol* 32: 291-296.
- Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. 2001. Antimicrobial activities of viscous substance form *Chongkukjang* fermented with different *Bacillus* spp. *J Fdhyg Safety* 16: 188-193.
- Shih IL, Van YT, Chang YN. 2002. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enzyme Microb Technol* 31: 213-220.
- Jung HW, Lee SP. 2009. Production of carrot pomace fortified with mucilage, fibrinolytic enzyme and probiotics by solid state fermentation using the mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *J Food Sci Nutr* 14: 335-342.
- You HJ. 2004. Characteristics of a fibrinolytic protease and antioxidants in fermented grains by *Bacillus licheniformis* B1. *MS Thesis*. Hoseo University, Asan, Korea.
- Oh HJ, Kim CS. 2007. Antioxidant and nitrite scavenging ability of fermented soybean foods (*Chungkukjang*, *Doenjang*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1503-1510.
- Park WJ, Park HY, Yoo JH, Rhee MS. 2001. Effect of *Artemisia asiatica nakai* extract on the flavor of Chungkuk-jang. *Food Eng Prog* 5: 115-124.
- Lee SJ, Cung HY, Lee IK, Yoo ID. 1999. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 31: 815-822.
- AOAC. 2000. *Official methods of analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Johansson CG, Hallmer H. 1983. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J Agric Food Chem* 31: 476-482.
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
- Oh SM, Kim CS, Lee SP. 2006. Characterization of the functional properties of soy milk cake fermented by *Bacillus* sp. *Food Sci Biotechnol* 15: 704-709.
- Anson. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22: 79-85.
- Son MJ, Son SJ, Lee SP. 2008. Physicochemical properties of carrot juice containing *Phellinus linteus* extract and beet extract fermented by *Leuconostoc mesenteroides* SM. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 798-804.
- Choi SH, Park JS, Whang KS, Yoon MH, Choi WY. 2004. Production of microbial biopolymer, poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* BS 62. *Agric Chem Biotechnol* 47: 60-64.
- Oh SM. 2006. Optimization of production of bioactive compounds of fermented soybean curd residue by *Bacillus* sp. *MS Thesis*. Keimyung University, Daegu, Korea.
- Ryu MJ, Jang EK, Lee SP. 2007. Physicochemical properties

- of a biopolymer flocculant produced from *Bacillus subtilis* PUL-A. *Kor J Microbial Biotechnol* 35: 203-209.
26. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
 27. Kim JE, Joo SI, Seo JH, Lee SP. 2009. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzyme. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 989-995.
 28. Ahn BY. 1992. Antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Korea J Food Hygiene* 7: 157-160.
 29. Kim JE, Lee SP. 2009. Production of bioactive components and anti-oxidative activity of soybean grit fermented with *Bacillus subtilis* HA according to fermentation time. *Korea J Food Sci Technol* 41: 179-185.
 30. Han HS. 1995. A study on the changes of the chemical composition during the ripening process of fermented soybeans with mugwort powder. *MS Thesis*. Konkuk University, Seoul, Korea.
 31. Xu J, Chen S, Yu Z. 2005. Optimization of process parameters for poly γ -glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. *Process Biochem* 40: 3075-3081.
 32. Masao K, Kiyotaka F. 1997. Poly(γ -glutamic acid) hydrogel prepared from microbial poly(γ -glutamic acid) and alkanediamine with water-soluble carbodiimide. *J Appl Polym Sci* 65: 1889-1896.
 33. Birrer GA, Cromwick AM, Gross RA. 1994. γ -Poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. *Int J Biol Macromol* 16: 265-275.
 34. Kubota H, Matsunobu T, Uotani K, Takebe H, Satoh A, Tanaka T, Taniguchi M. 1993. Production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1212-1213.
 35. Nieva MM, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
 36. Park CS, Kwon CJ, Choi MA, Park GS, Choi KH. 2002. Antioxidative and nitrite scavenging activities of mugwort and pine needle extracts. *Kor J Food Preserv* 9: 248-252.
 37. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. 2006. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder.
 38. Hong JH, Jeon JL, Lee JH, Lee IS. 2007. Antioxidative properties of *Artemisia princeps* Pamp. *J Food Soc Food Sci Nutr* 36: 657-662.
 39. Kim MJ, Choi JS, Song EJ, Lee SY, Kim KBRI, Lee SJ, Kim SJ, Yoon SY, Jeon YJ, Ahn DH. 2009. Effects of heat and pH treatments on antioxidant properties of *Ishige okamurai* extract. *Korean J Food Sci Technol* 41: 50-56.

(2010년 6월 1일 접수; 2010년 7월 5일 채택)