

Lactobacillus sp.균주를 이용한 산삼 배양근 발효물의 기능성 평가

신은지 · 조장원 · 김영언 · 한대석 · 홍희도 · 이영경*
한국식품연구원

Evaluation of Functional Properties of the Tissue Cultured Wild Ginseng Fermented by *Lactobacillus* sp.

Eun Ji Shin, Chang-Won Cho, Young-Eon Kim, Daeseok Han, Hee-Do Hong, Young Kyoung Rhee*
Korea Food Research Institute

Abstract

A tissue cultured wild ginseng (TCWG) suspension was inoculated with lactic acid bacteria and fermented to improve the functionality of TCWG. The utilization of TCWG was increased directly using the freeze-dried powder. The optimal ratio of TCWG powder and water for fermentation was 1:19 (5%), which was selected by measuring the fluidity and viable cell count according to concentration. The effects on ADH activation and immune cell activation by each ferments with 10 kinds of *Lactobacillus* sp. strains were examined. The ferments with the *Lactobacillus casei* KFRI 692 strain showed 5.4 times higher ADH activity and 1.3 times higher ALDH activity than the non-fermented TCWG powder (control). The level of NO production and cytotoxicity was also measured by Raw 264.7 cells. The ferment with the *Lac. casei* KFRI 692 strain showed the highest level of NO production and lower cytotoxicity than the others. Therefore, the *Lac. casei* KFRI 692 strain was selected as a strain for fermentation of a TCWG suspension to maximize its functionality. To identify the optimal fermentation time of the selected *Lac. casei* KFRI 692 strain on the 5% TCWG suspension, the viable cell count of lactic acid bacterial and the changes in pH were observed for 72 hours. 24-hrs was found to be the optimal fermentation time. In this way, fermented TCWG with lactic acid bacteria showed higher ADH activation efficacy and immune cell activation than non-fermented TCWG.

Key Words: Tissue cultured wild ginseng, fermentation, alcohol dehydrogenase, immune-enhancing

1. 서 론

산삼은 산에서 자연적으로 나는 인삼(人蔘)으로, 적응증이나 효용은 인삼과 비슷하나 약효가 월등하고, 여러 가지 질병의 치료와 병후 회복에 큰 효험을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 재배가능 면적의 감소와 무분별한 채취로 점차 고갈되었고 그 희귀성 때문에 국내에서 산삼에 대한 과학적인 연구나 관련 제품 개발이 거의 없었다. 이러한 한계를 보완하기 위해 산삼으로부터 조직을 분리하여 인공 배양한 산삼 배양근 소재가 개발되었다. 산삼 배양근이란 특수한 조건하에서 천연 산삼 뿌리로부터 조직을 분리하여 세포괴(callus)를 유도한 다음, 세포괴에서 뿌리가 자라나도록 부정근을 유도하고, 이 뿌리 중에서 건실한 것을 선별하여 다양한 생물반응기를 통해 대량 생산된 소재를 말한다(Han 등 2003, Yoo 등 2003). 이와 같이 조직 배양을 통해 생산된

산삼 배양근은 산삼과 매우 유사한 성분을 함유하고 대체로 인삼보다 사포닌 함량이 높은 것으로 보고되고 있다(강 & 김 2008). 현재까지 알려진 산삼 배양근의 효능으로는 뇌졸중 및 치매 치료에 효능을 보였던 연구 결과 외에도 당뇨병, 항암치료, 면역 활성화 증강 및 콜레스테롤 저하 등에서도 다양한 약리작용이 있는 것으로 밝혀지고 있다(Mizuno 등 1994; Lee 등 2003).

희귀소재인 산삼과는 달리 대량생산이 가능하여 가공을 하여도 가격 경쟁력이 있는 산삼 배양근은 인삼을 대체할 소재로 여겨져 다양한 개발이 시도되고 있다. 인삼의 경우, 수삼과 같은 생물 형태 외에도 건삼, 추출물 농축액과 같은 단순 가공 소재에서부터 전통적인 가공 인삼의 형태인 홍삼, 미생물 대사를 접목시킨 발효 홍삼 소재까지 다양한 소재 개발에 성공하고 있다(Park 등 2006). 특히 발효 홍삼의 경우, Kobashi 등(1998)에 의해 인삼의 유효 성분인 ginsenosides

*Corresponding author: Young Kyoung Rhee, Division of Convergence Technology, 561 Baekhyeun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-746 Korea Tel: 82-31-780-9319 Fax: 82-31-709-9876 E-mail: ykrhee@kfri.re.kr

가 장내 미생물에 의해 대사된 후, compound K라는 대사체의 형태로 체내 흡수가 이뤄진다는 점을 보고하면서 이를 응용하여 유효성분의 체내 대사율을 높인 기능성 소재로서 개발되기 시작하였다. 발효 홍삼이 개발된 이후, 섭취가 용이한 유산균 외에도 *Aspergillus* sp.나 버섯 균사체를 활용한 다양한 인삼 발효물에 대한 연구가 진행되었으며 그 효능으로 항염, 항알러지, 암세포 증식 억제, 항산화, 항노화, 고지혈증 및 혈당 개선 등이 밝혀졌다(Trinh 등 2007; Hyun 등 2009; Park 등 2010; Kim 등 2010; Kim 등 2011; Jeon 2011). 미생물을 이용한 발효의 개념이 인삼 소재 개발에 도입되면서 다양한 기능성 발현에서도 그 영향을 확인할 수 있게 된 것이라 하겠다.

식품으로 이용 가능한 소재의 발효 공정에는 다양한 미생물이 사용가능하다. 그 중 특히 유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 오래전부터 발효 유제품(발효유, 치즈 등)을 중심으로 각종 장류, 김치, 발효 소시지, 의약품 및 가축의 사료 첨가제에 이르기까지 그 특성에 따라 인류생활에 광범위하게 활용되고 있기도 하다. 유산균 자체가 갖는 기능성도 많이 연구되어 장내 환경 개선, 유해균의 억제 작용, 미네랄 흡수 촉진 효과 등의 효능이 알려져 있다(Kim 등 1999).

따라서 본 연구에서는 인삼을 대체할 소재로 주목받는 산삼 배양균의 부가가치를 향상시키는 한편, 기능성을 높이기 위한 연구의 일환으로 산삼 배양균 분말 현탁액에 유산균을 배양하여 발효소재를 만들고자 하였다. 이를 위하여 일차적으로 소재 기능성 증진에 적합한 균주를 선발하기 위하여 균주별 산삼 배양균 발효에 의한 알콜 분해 효소 활성화 및 면역 세포 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. 여기에서 선별된 발효 균주인 *Lac. casei* KFRI 692를 산삼 배양균 분말 현탁액 배지에서 접종하여 생육 특성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 기기

본 실험에 사용한 산삼 배양균은 영천지역에서 제공되었다. 발효 기질로 사용하기 위하여 산삼 배양균은 -70°C 에서 동결한 후 동결건조(Bondiro, ILSHIN, Korea)하였다. 건조시료를 가정용 분쇄기(HMF-3000S, 한일, Korea)로 1차 분쇄하였고, 미분쇄기(CyclotecTM 1093, Foss Tecator, Sweden)에서 분말의 입경이 100 mesh 이하가 되도록 2차 분쇄하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용된 유산균은 한국식품연구원(KFRI, Korea)에서 보관하고 있는 8종의 *Lactobacillus* sp. 균주와 생명자원센터(KCTC, Korea)로부터 분양받은 2종의 균주를 MRS broth(Difco, USA)에 접종하여 37°C 에서 15시간 동안 배양하여 발효 균주로 사용하였다<Table 1>.

<Table 1> Starter strain of lactic acid bacteria to ferment the suspended 5% TCWG¹⁾ powder

No.	Strain
KFRI 128	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
KFRI 164	<i>Lactobacillus fermentum</i>
KFRI 345	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
KFRI 442	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
KFRI 491	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
KFRI 658	<i>Lactobacillus gasseri</i>
KFRI 692	<i>Lactobacillus casei</i>
KFRI 693	<i>Lactobacillus casei</i>
KCTC 3594	<i>Lactobacillus reuteri</i>
KCTC 5033	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG

¹⁾TCWG: Tissue cultured wild ginseng.

2. 산삼 배양균 현탁액 발효물의 제조

산삼 배양균 분말:증류수의 비율을 1:19 (5.0%)로 하여 500 mL씩 만들어 121°C 15분간 멸균하였다. 멸균 후 방냉한 시료에 MRS에서 15시간 배양한 균액을 1% 접종하였다. 이것을 37°C shaking incubator에서 120 rpm으로 진탕해주며 24시간 발효시킨 후 pH 및 생균수를 측정하였고, 이것을 효능 평가용 시료로 활용하였다.

3. 기능성 평가 시료의 제조

동결 건조된 발효물과 증류수를 1:4의 비율로 100°C 에서 환류 냉각법으로 1시간 추출한 것을 whatman no 2. 여과지로 여과하여 추출액을 얻은 후 동결건조 하였다.

4. 산삼 배양균 발효물의 알콜 분해 효소 활성화 효과 측정

알콜 분해 효소 ADH(alcohol dehydrogenase)의 활성화 효과 측정 방법은 다음과 같다. 시험관에 증류수 1.4 mL, 1 M tris-HCl(pH 8.8) 750 μL , 2.5 mM NAD(Nicotinamide Adenine Dinucleotide)/0.05 M trizma-HCl 300 μL , 95% ethanol 300 μL , 7.5 unit AD /mL 100 μL 분주 후, 발효하지 않은 산삼 배양균 추출물 대조구와 산삼 배양균 발효 추출물 시료(1,000, 500, 250, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 100 μL 분주하였다. 37°C 를 유지하며 ELISA Reader(Tecan, Switzerland)기기를 사용하여 340 nm에서 0, 10분 간격으로 흡광도를 측정하여 상대적인 ADH 활성(%)을 구하였다.

알콜 분해 효소 ALDH(aldehyde dehydrogenase)의 활성화 효과 측정방법은 다음과 같다. 시험관에 증류수 2.1 mL, 1 M trizma-HCl(pH 8.0) 300 μL , 2.5 mM NAD(Nicotinamide Adenine Dinucleotide) 100 μL , 1 M acetaldehyde 100 μL , 3 M KCL/1 M trizma-HCl 100 μL , 0.33 M 2-mercaptoethanol 100 μL , 1 unit ALDH/mL 100 μL 분주 후, 발효하지 않은 산삼 배양균 추출물 대조구와 산삼 배양균 발효 추출물 시료(1,000, 500, 250, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 100 μL 분주하였다.

37°C, 340 nm에서 0분, 10분 간격으로 흡광도를 측정하여 상대적인 ALDH 활성(%)을 구하였다.

5. 산삼 배양근 발효물의 면역세포 활성화 효과 측정

면역 기능 활성화를 관찰하기 위해 본 연구에 사용된 Raw 264.7 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic을 포함한 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)을 배양액으로 사용하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

Nitrite oxide(NO) 측정은 Griess assay법(Kiemer & Vollmar, 1997)에 따라 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well tissue culture plate(TPP)의 각 well에 1×10⁵ cells/well의 농도로 분주한 후 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 세포의 배양 상등액을 제거하고 LPS(lipopolysaccharid), 산삼 배양근 추출물과 산삼 배양근 발효 추출물 시료가 100 ppm 포함된 배지를 분주하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양한 후 반응한 상층액 100 µL과 griess reagent(Sigma, Korea) 100 µL를 혼합하여 10분간 shaking 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NaNO₂ (0~200 µL/mL) standard curved의 흡광도에 준하여 NO의 생성능을 측정하였다.

Raw 264.7 세포에 대한 시료의 독성을 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay로 측정하였다. MTT 시약은 thiazolyl blue tetrazolium bromide를 최종 농도 5 mg/mL가 되도록 PBS에 녹인 후 빛을 차단하고 4°C에 보관하였다. NO assay를 위해 세포 배양 상등액이 제거된 96 well TPP에 10배 희석한 MTT 시약 200 µL을 첨가하여 알루미늄 호일로 감싼 후 4시간 동안 37°C의 5% CO₂ incubator에서 반응 시킨다. 반응 후 배지를 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide) 200 µL을 분주하여 10분간 shaking 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 산삼 배양근 현탁액 배지에서의 *Lac. casei* KFRI 692 성장 특성

멸균된 5% 산삼 배양근 현탁액 배지에 생균수 5×10⁹ CFU/mL의 *Lac. casei* KFRI 692 균 배양액을 1% 농도로 접종하여 발효 0, 4, 24, 48, 72시간의 pH와 생균수를 측정하였다. 생균수는 십진 희석법을 사용하여 5% horse blood가 함유된 BL agar 배지에 시료액을 도말하여 48시간 37°C incubator에 배양 후 자라난 colony의 수를 계수하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 발효 균주에 따른 산삼 배양근의 발효 특성

Lactobacillus sp.의 균주는 산삼 배양근 분말 현탁액 발효 과정에서 생균 분포를 고르게 유도하기 위해 진탕 배양을 하였다. 또한 진탕 배양의 효과를 높이기 위해서는 발효 기질에

<Table 2> pH and viable cell counts on suspended 5% TCWG¹⁾ powder ferments by each lactic acid bacteria

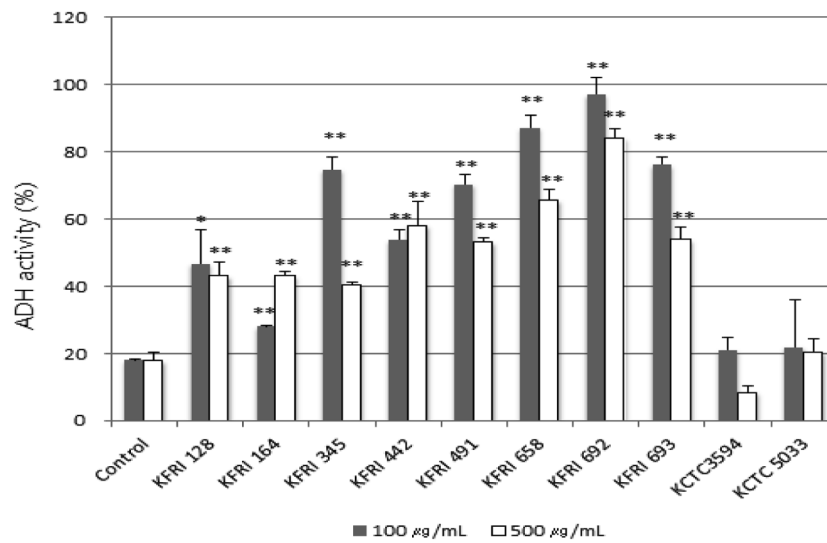
Strain No.	pH	Viable cell count (CFU/mL)
Blank	5.20	-
KFRI 128	3.96	1.810
KFRI 164	3.92	1.410
KFRI 345	3.94	1.910
KFRI 442	3.94	1.610
KFRI 491	3.70	6.2108
KFRI 658	3.79	1.710
KFRI 692	3.94	1.810
KFRI 693	3.92	9.9108
KCTC 3594	4.41	4.1107
KCTC 5033	3.90	5.7107

¹⁾TCWG: Tissue cultured wild ginseng.

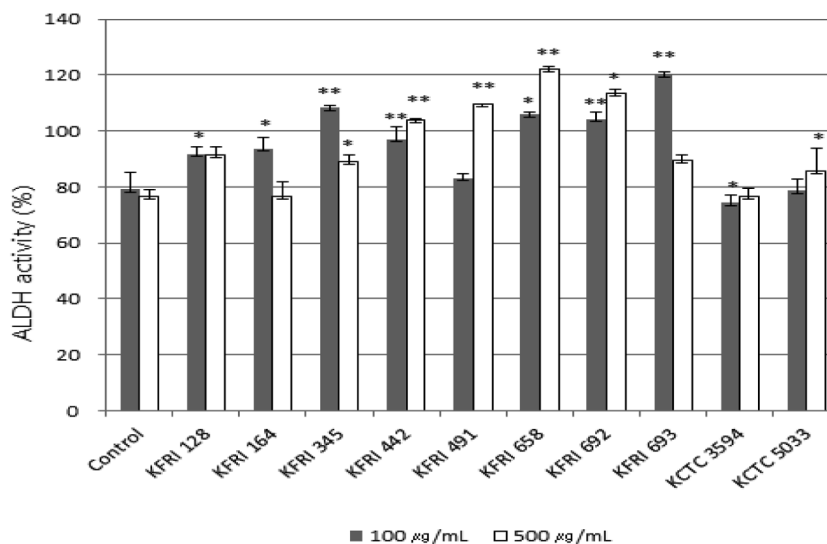
유동성이 확보되어야 하는 한편, 발효 공정의 경제성을 높이기 위해서는 고형분 함량이 높을수록 유리하므로 먼저 사전 실험을 통해 분말 현탁액 배지의 적정 농도를 5% w/v로 정하였다.

총 10종의 *Lactobacillus* sp. 균주를 5.0% 산삼 배양근 분말 현탁액 배지 100 mL에 접종, 24시간 배양하여 얻은 발효물의 pH와 생균수는 <Table 2>와 같다. 10종의 균주에 대한 발효물의 pH는 초기 pH 5.20에서 3.70~4.41까지 내려간 것을 확인하였고, 이를 통해 정상적인 유산균 증식이 이뤄졌음을 알 수 있었다. 각각의 균주 생육 특성상 *Lac. acidophilus* KFRI 491을 접종한 발효물의 pH가 3.70으로 가장 낮았고, *Lac. reuteri* KCTC 3594를 접종한 발효물의 pH가 4.41로 가장 높게 나타났다. 또한, 생균수를 관찰한 결과 균주별 발효물에서 10⁷~10⁹의 생균수를 확인하였다. 접종된 균수가 조절되지 않은 상태에서 15시간 MRS에서 배양한 유산균액의 비율을 분말 현탁액 대비 1% v/w로 하여 접종하였으므로 절대적인 균수 증가 정도는 확인할 수 없었다. 그러나, 상업적으로 널리 이용되므로 잘 자랄 것으로 예측했던 *Lac. reuteri* KCTC 3594(루테리 유산균)와 *Lac. rhamnosus* GG KCTC 5033(GG 유산균)과 같은 프로바이오틱스들이 발효물 중에서 그 생균수가 각각 4.1×10⁷와 5.7×10⁹로 다른 8종의 유산균에 비해 낮게 나타난 것은 특이할 만 하였다.

추출물이 아닌 분말 현탁액이나 분말 발효처럼 고형 소재를 활용한 세균류 이용 발효는 사포닌과 같은 특정 성분 발효에 앞서 전분, 섬유질 등 미생물이 영양원으로 쉽게 이용할 수 있는 고형 표면 위주의 성분 분해가 먼저 이뤄진다. 때문에 별도 영양원의 첨가가 없어도 이들 고형분을 이루는 당질을 이용할 수 있는 유산균은 생균수 증식에 유리하다고 할 수 있다. Park 등(2006)의 연구에 따르면 27종의 유산균을 1 또는 5% 인삼 분말 현탁액에 접종했을 때, 8종의 유산균이 인삼 배지 중에서 유의적으로 증식하였으며 최대 1.39×10⁹까지 생균수가 1,400배 증가하였다고 보고하였다. 본 연



<Figure 1> The effect of suspended TCWG powder ferments by each lactic acid bacteria on alcohol dehydrogenase (ADH) activity *in vitro*
 *Each values were compared with control at p<0.05
 **Each values were compared with control at p<0.01



<Figure 2> The effect of suspended TCWG powder ferments by each lactic acid bacteria on acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activity *in vitro*
 *Each values were compared with control at p<0.05
 **Each values were compared with control at p<0.01

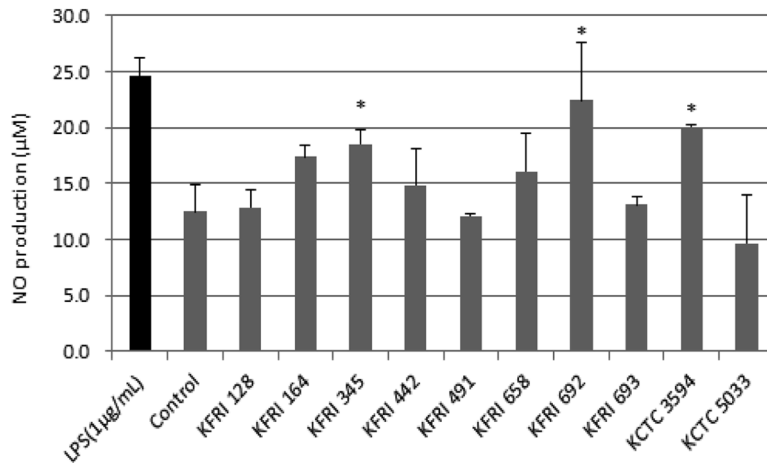
구에서도 유산균 접종 후, 산삼 배양근 분말 현탁액 배지를 24시간 발효시켰을 때, *Lac. bulgaricus* KFRI 345 발효물의 생균수가 1.9×10^9 로 확인되어 인삼 배지 발효 연구에서와 유사한 정도의 최대 생균수를 확인할 수 있었다.

2. 산삼 배양근 발효물의 알콜 분해 효소 활성화 효과

술의 주성분인 ethanol은 소화기관내에서 흡수되어 간에서 alcohol dehydrogenase(ADH) 등의 효소계의 작용을 받아 1차적으로 acetaldehyde로 전환되고, 다시 acetaldehyde는 aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 작용을 받아 무해한 acetic acid로 분해되어 호흡, 소변, 땀 등의 형태로 체외로

배출된다(Kim 등 2004). 이러한 대사과정에서 ethanol이나 그 대사물질이 축적된다면, 소화불량, 구토, 두통 등의 다양한 증상, 이른바 숙취를 발생시킨다. 그러므로, 알콜 대사와 관련된 효소 활성을 유도하는 소재를 개발할 수 있다면 alcohol 섭취로 인해 나타나는 부작용을 줄일 수 있을 것이다. 본 연구에서는 유산균 발효를 이용하여 산삼 배양근에 ADH 및 ALDH 같은 알콜 대사 효소의 작용을 활성화하는 기능성을 증진시킬 수 있는가에 대한 연구를 실시하였다.

앞의 실험을 통해 만들어진 산삼 배양근 분말 현탁액 발효물로부터 추출물(이하 발효 추출물)을 만들어 기능성 평가에 사용하였다. *In vitro*상의 기능성 평가 실험 대조구는 균



<Figure 3> The nitric oxide producing effect of suspended TCWG powder ferments by each lactic acid bacteria on Raw 264.7 cells
*Each values were compared with control at p<0.05

주를 접종하지 않은 산삼 배양근 추출물, 공시험은 시료대신 증류수를 첨가하여 실험하였다.

먼저 ADH 활성은 발효 전 시료인 대조구로 효소 활성을 유도하였을 때, 증류수를 첨가한 blank 보다 100 µg/mL 농도에선 18.1%, 500 µg/mL 농도에선 17.9%로 나타났다. 그러나, 발효물 중 *Lac. casei* KFR1 692 균주로 발효한 발효 추출물의 경우, 100 µg/mL 농도에서 blank의 97.2%, 500 µg/mL 농도에서 84.3%의 효소활성을 보여 발효 전 시료와 비교하여 각각 5.4배와 4.7배로 ADH 효소 활성이 크게 증가한 것을 확인 할 수 있었다<Figure 1>.

또한, 알콜의 유해한 중간대사산물인 acetaldehyde를 대사시키는 ALDH 활성은 발효 전 시료의 경우, 증류수를 첨가한 blank에서의 효소활성 대비 100 µg/mL 농도에선 79.1%, 500 µg/mL 농도에선 76.4%의 활성을 보였다. 발효 추출물 농도 100 µg/mL에서 *Lac. casei* KFR1 693 균주 발효 추출물의 활성이 가장 높아 blank 대비 120.4%, 발효 전 시료에 비해서는 1.5배 활성이 증가하였다. 발효 추출물 농도 500 µg/mL에서는 *Lac. gasseri* KFR1 658와 *Lac. casei* KFR1 692 균주로 발효한 발효 추출물의 활성이 가장 높아 blank 대비 각각 122.0%와 113.4%의 효소활성 유도 효과가 있었으며 이는 대조구에 비해 약 1.6배와 1.5배 활성이 증가한 수치이다<Figure 2>.

최근 생약제 추출물 및 홍삼에 대한 알콜 분해 효소 활성에 대한 연구가 많이 진행 되고 있다. 이런 선행 연구에서 시료는 높은 수치의 알콜 분해 효소 활성을 보여주었고, 홍삼의 경우 동물 실험에서도 그 효과가 입증되고 있다(Kim 등 2004, Lee 등 2009) 본 실험에선 산삼 배양근을 발효하는 것으로 발효 전에 비해 ADH나 ALDH 효소 활성을 크게 증가시켰으며, ALDH 효소 활성의 경우, 무처리구에 비해서도 약 20 % 정도의 효소활성 유도 효과가 있었다. 특히, *Lac. casei* KFR1 692로 발효한 발효 추출물은 ADH와

ALDH 효소활성 유도에 모두 긍정적인 효과가 있는 것으로 사료되었다.

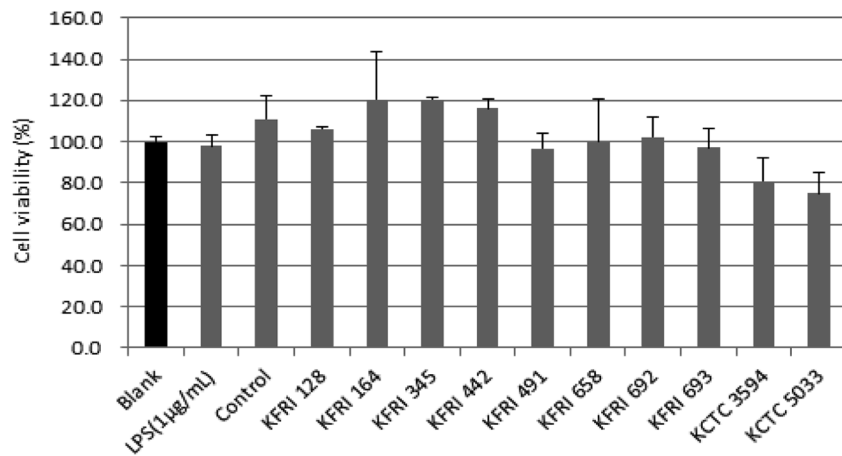
3. 산삼 배양근 유산균 발효물의 NO 생성 유도 효과

Raw 264.7 세포에 의해 배지로 분비되는 NO의 양은 griess reaction을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 Raw 264.7 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양하여 산삼 배양근 발효물 추출액을 100 ppm 처리한 후 37°C에서 다시 24시간 동안 배양하여 배지내 NO₂-생성량을 측정하였다.

생체 면역 체계의 cytokines이나 LPS(lipopolysaccharide) 등에 노출되면 macrophage의 NOS 유전자가 발현되고, NOS 유전자 발현으로 생성된 nitric oxide(NO)는 세균 감염 등 면역체계를 위협하는 요인을 제거한다(Ha 2009). <Figure 3>의 결과에서 알 수 있듯이 같은 *Lactobacillus* sp.임에도 산삼 배양근을 발효한 균주의 종류에 따라 NO의 생산량을 유도하는 것에는 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 대조구인 발효 전 산삼 배양근을 처리했을 때 Raw 264.7 cells에서 생성된 NO의 농도는 100 ppm에서 12.5 µM/mL이었으며, 대조구에 비해 유의적으로 NO의 생성량이 높았던 발효물은 *Lac. casei* KFR1 692, *Lac. reuteri* KCTC 3594, *Lac. fermentum* KFR1 164에 의한 발효물로 각각에 의한 NO 농도는 평균 22.4, 20.1, 17.4 µM/mL으로 나타났다.

동일한 실험에 대하여 산삼 배양근 추출물과 유산균 발효 추출물의 Raw 264.7 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 MTT assay를 측정하였다.

시료 대신 증류수를 첨가한 blank를 대조구로 하여 생존율을 100%로 환산하였을 때 대조구 및 발효 추출물을 100 ppm 처리한 경우의 세포 생존율은 대조구 110.9%, 발효 추출물 처리구는 120.6~74.8%로 나타났다. 그러나, 대조구에 대한 발효 추출물 처리구의 세포 생존율에는 유의적인 차이가 없었다<Figure 4>.



<Figure 4> The cytotoxicity of suspended TCWG powder ferments by each lactic acid bacteria on Raw 264.7 cells

<Table 3> Change of pH and viable cell counts on suspended 5% TCWG¹⁾ powder ferments by *Lac. casei* KFRI 692 strain after 0, 4, 12, 24, 48, and 72 hrs of incubation at 37°C

<i>Lactobacillus casei</i> KFRI 692		
Fermentation time (hrs)	pH	Viable cell count (CFU/mL)
0	5.09	5.5107
4	5.05	2.8108
24	3.72	5.1108
48	3.72	1.1108
72	3.71	4.9107

¹⁾TCWG: Tissue cultured wild ginseng.

4. 발효물에서 *Lac. casei* KFRI 692의 생육 특성

앞선 실험에서 *Lac. casei* KFRI 692는 발효 전 산삼 배양근에 비해 알콜 분해 효소인 ADH 및 ALDH 활성을 증가시켰고, Raw 264.7 cells로부터 면역 세포 활성화 지표인 NO의 생성을 유도하는 발효물을 만들 수 있는 균주임을 확인하였다. 효능 평가로부터 기능성을 최대화하는 발효 균주로 선정된 *Lac. casei* KFRI 692 균주를 5% 산삼 배양근 분말 현탁액 배지에 접종하여 시간대별 pH 및 생균수 변화를 측정하였다.

발효 시간대에 따른 pH 변화로는 균주 접종 시점에선 pH 5.09였으나 24시간 발효 후에는 크게 감소하여 pH 3.72까지 감소하였으며 이 후의 pH는 관찰 시간인 72시간동안 유지되었다.

생균수를 관찰한 결과, 균주 접종 시점 생균수는 5.5×10⁷ CFU/mL였으나, 4시간 후 이보다 5.1배 증가한 2.8×10⁸ CFU/mL, 24시간 후에는 9.3배인 5.1×10⁷ CFU/mL까지 증가하였다. 그러나, 이 후의 관찰 시간대에서는 이보다 낮은 생균수가 관찰되어 발효 시작 48, 72시간에는 각각 1.1×10⁸, 1.1×10⁷ CFU/mL로 나타났다<Table 3>.

Park 등(2006)은 7종의 선별된 *Lactobacillus* sp.를 1%와 5% 인삼 또는 홍삼 분말 배지에 접종하여 접종 24시간과 48

시간 후 발효물의 pH와 생균수를 비교 실험하였다. 이 연구 결과에 따르면 첨가하는 균주 strain에 따라 pH가 저하되는 정도는 차이가 있었으나, 5% 백삼 분말 배지에선 유산균 접종 24시간 후 pH가 3.66~4.08, 48시간에는 3.45~4.51까지 낮아졌다고 보고하였다. 또한 24시간과 48시간 발효물의 생균수는 대부분의 유산균이 48시간 인삼 발효물의 생균수가 24시간 발효물에 비해 저하되었으므로 생균수를 최대화하기 위한 유산균 발효시간은 24시간이 더욱 적합한 조건이라고 밝힌 바 있다. 본 연구 역시 *Lac. casei* KFRI 692 균주를 이용한 5% 산삼 배양근 분말 현탁액을 발효했을 때, 생균수가 접종 후 발효 24시간에서 최대 수치를 보였으며, 48시간에는 24시간대에 확인된 생균수의 21.6% 수준만이 확인되어 생균수 최대화를 위한 발효시간은 24시간이 적합한 것으로 사료되었다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 산삼 배양근의 기능성-알콜 분해 효소 활성 및 면역 세포 활성화- 증진을 위한 최적 발효 균주를 검색하여 *Lac. casei* KFRI 692를 선발하였다. 이 균주를 이용하여 발효된 산삼 배양근 발효물은 발효 전 시료에 비해 ADH 효소 활성활성을 5.4배, ALDH 효소 활성을 1.5배 증가시켰다. 또한 macrophage에서 생산하는 NO 농도는 발효 전 시료에 비해 *Lac. casei* KFRI 692로 발효시킨 산삼 배양근 시료 처리구에서 1.8배 높았다.

Lac. casei KFRI 692를 5% 산삼 배양근 분말 현탁액 배지에 접종하여 생육 특성을 관찰하였다. 접종 후 배양 0, 4, 24, 48, 72시간의 pH는 배양 24시간에 3.72까지 낮아졌고, 그 이후 관찰 시간 동안에는 비슷한 수준을 유지하였다. 또한 생균수는 배양 24시간대에서 최대 5.1×10⁸ CFU/mL까지 증가하였으며, 배양 48, 72시간에는 생균수가 점차 감소하였다.

기능성 식품 소재의 개발은 고부가가치 산업으로 인정받

고 있으며, 이에 대한 연구 개발 투자가 전세계의 다양한 연구기관에서 이뤄지고 있다는 것은 모두가 주지하고 있는 사실이다. 그러나, 천연물 소재로는 이미 그 한계에 이르러 더 이상의 새로운 소재를 찾기는 어렵다는 것이 현실이다. 여기에 미생물을 이용한 소재 발효는 기존 소재에 부족한 기능성을 보완하거나 새로운 기능성을 부여할 수 있으며, 소화흡수에 유리한 형태로 성분을 재구성할 수 있어 기능성 소재 개발을 위한 유효한 응용 기술이라 할 수 있다. 발효에 의한 소재 기능성 부가는 첫째, 발효 균주로 사용된 미생물이 가지고 있던 고유의 기능성 성분에서 유래되었을 수 있다. 또, 둘째는 발효 균주가 기질을 영양원으로 사용하면서 생산한 exopolysacchride 등의 균주 유래 분비물 조성이나 생산량이 변화하면서 나타났을 수 있다. 마지막으로 발효 미생물의 작용으로 기질 고유의 성분이 대사되면서 생산된 대사산물에 의해 기능성이 발현되었을 수도 있는 등 미생물과 소재 조합에 의해 개발 가능한 기능성은 다양하다고 할 것이다. 특히 인삼의 경우, 인삼 발효의 목적이 Akao 등(1998)의 연구를 근거로 ginsenoside 대사에 초점을 맞춰 진행해왔다 그러나, 본 연구의 결과, 발효 전후의 산삼 배양근 시료에 의한 기능성 평가 결과엔 차이가 있었으나, 총사포닌 함량이나 ginsenosides profile에는 변화가 없는 것을 확인하였다(data not shown). 이는 ginsenosides 대사와는 무관하면서도 산삼 배양근의 기능성을 향상시킨 소재 개발이 가능하다는 것을 의미하는 만큼, 관심을 두고 지속적으로 연구할 수 있는 분야로 생각된다. 기능성 발효소재의 개발은 천연 자원은 부족하나 인삼을 비롯한 약선 소재들이 풍부하며, 발효식품이 발달하여 이용할 수 있는 미생물 보유 자원이 많은 우리나라에 적합한 소재 개발 방식이 될 것이다.

■ 참고문헌

- 강태진, 김재훈, 2008 산삼 배양근 기술 현황과 이용. Biowave, Vol.10 (14):1-14
- Akao T, Kida H, Kanaoka M, Hattori M, Kobashi K, 1998. Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng*. J. Pharm. Pharmacol., 50(10):1155-1160
- Cha BC, Yoon HC, Lee DH, Park JS, Kwon KR. 2010. Component analysis of cultivated ginseng and mountain ginseng to the change of ginsenoside components in the process of heating and fermentation. J. pharmacopuncture., 13(2):33-49
- Doh ES, Chang JP, Lee KH, Seong NS. 2010. Ginsenoside Change and Antioxidation Activity of Fermented Ginseng. Korean J. Medicinal Crop Sci., 18(4):255-265
- Ha JH, Jeong HS, Oh SH, Jeong SS, Jeong MH, Jeong HS, Jung JH, Yu KW, Lee HY. 2009. Comparison of Immuno Activities of Fresh Ginseng Cultured *Phelinus Linteus* and *Hericum erinaceum* Mycelium Associated with Ultrasonification Extraction. Korean J. Medicinal Crop Sci., 17(4):311-320
- Han EJ, Kim YS, Yu KW, Jeong CS, Paek KY. 2003. Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.V. Meyer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system. J. Plant Biotechnology., 5(1):1-6
- Hyun MS, Hur JM, Shin YS, Song BJ, Min YJ, Woo WH. 2009. Comparison Study of White Ginseng, Red Ginseng, and fermented Red Ginseng on the Protective Effect of LPS-induced Inflammation in RAW 264.7 Cells. J. Appl. Biol. Chem., 52(1):21-27
- Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheon JW, Lee HS. 2011. Antioxidant and Antiaging Effect of Ginseng Berry Extract Fermented by Lactic Acid Bacteria. J. Soc. Cosmetic Scientists Korea., 37(1):75-81
- Kim DH, Cho YH, Cho JS, Ham TS, Lee JW, Rhee C. 2004. Development of Liquid phase product from red ginseng and medicinal herbs for alcoholic beverage. J. Ginseng Res., 28(1):45-52
- Kim HO, Park MJ, Han JS. 2011. Effects of Fermented Red Ginseng Supplementation on Blood Glucose and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 40(5):696-703
- Kim HY, Joung EM, Hwang IG, Jeong JH, Yu KW, Lee J, Jeong HS. 2010. Effect of Fermented Ginseng Extract by Mushroom Mycelia on Antiproliferation of Cancer Cells. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 39(1):36-41
- Kim JH, Oh MK, Rhee YH, Choi KC, Lee YK, Shin SY. 1999. Selection and physico-chemical characteristics of lactic acid bacteria which had cholesterol lowering activities. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 42(2):83-90
- Lee EJ, Jhao HL, Li DW, Jung CS, Kim JH, Kim YS. 2003. Effect of the MeOH Extract of Adventitious Root Culture of *Panax ginseng* on Hyperlipidemic Rat Induced by High Fat-rich Diet. Kor. J. Pharmacogn., 34(2):156-60
- Lee KS, Kim GH, Seong BJ, Kim HH, Kim MY, Kim MR. 2009. Effects of Aqueous Medicinal Herb Extracts and Aqueous Fermented Extracts on Alcohol-Metabolizing Enzyme Activities. Korean J. Food Preserv., 16(2):259-265
- Mizuno M, Yamada J, Terai H, Kozukue N, Lee YS, Tsuchida H. 1994. Differences in immunomodulating effects between wild and cultured *Panax ginseng*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 200(3):1672-1678
- Park HJ, Jung DH, Joo H, Kang NS, Jang SA, Lee JG, Sohn EH. 2010. The comparative study of anti-allergic and anti-inflammatory effects by fermented red ginseng and red ginseng. Korean J. Plant Res., 23(5):415-422
- Park S, Kim DH, Paek NS, Kim SS. 2006. Preparation and Quality Characteristics of the Fermentation product of

- Ginseng by Lactic Acid Bacteria (FGL). *J. Ginseng Res.*, 30(2):88-94
- Trinh HT, Han SJ, Kim SW, Lee YC, Kim DH. 2007. Bifidus fermentation increases hypolipidemic and hypoglycemic effects of red ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(7):1127-1133
- Yoo BS, Chang MS, Byun SY. 2003. Characterization of cell cultures and ginsenoside production by cultured ginseng and wild mountain ginseng. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 18(2):133-139
-
- 2012년 11월 19일 신규논문접수, 12월 6일 수정논문접수, 12월 23일 채택