

## 프로바이오틱스 개발을 위한 홍삼 전분을 활용한 유산균 배양

김영수<sup>1</sup> · 이 환<sup>1</sup> · 김도연<sup>1</sup> · 김소영<sup>2</sup> · 이완규<sup>3</sup> · 이상명<sup>4</sup> · 박종대<sup>1</sup> · 손미례<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>(재단법인)금산국제인삼약초연구소, <sup>2</sup>농촌진흥청 기능성식품과, <sup>3</sup>충북대학교 수의학과,  
<sup>4</sup>전북대학교 환경생명자원대학 생명공학부

## Cultivation of Lactic Acid Bacteria for the Development of Probiotic Products using Red Ginseng Starch

Yeong-Su Kim<sup>1</sup>, Hwan Lee<sup>1</sup>, Do-Yeon Kim<sup>1</sup>, So-Young Kim<sup>2</sup>, Wan-Kyu Lee<sup>3</sup>, Sang-Myeong Lee<sup>4</sup>,  
Jong-Dae Park<sup>1</sup> and Mi-Yae Shon<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>International Ginseng & Herb Research Institute, Geumsan 312-804, Korea

<sup>2</sup>Functional Food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, National Academy of Agricultural Sciences,  
Rural Development Administration, Suwon 441-853, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

<sup>4</sup>Division of Biotechnology, College of Environmental & Bioresource Sciences, Chonbuk National University,  
Iksan 570-752, Korea

### Abstract

To reduce the production cost of *Lactobacillus*, discarded red ginseng starch was collected from a factory of red ginseng extract in order to develop the *Lactobacillus* culture medium. According to the analysis of the ginsenoside composition of red ginseng starch, the total ginsenoside content of starch was 2.73 mg/g, and the ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub> and Rg<sub>3</sub> contents were 0.1, 0.29 and 0.52 mg/g, respectively. For the preparation of the liquid media, red ginseng starch was added at rates of 0, 5, 10 and 20%. Further, *Lactobacillus plantarum* 15357 and *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. strains were then inoculated to these prepared broths. With the red ginseng starch medium, the growth rates ( $1.42 \times 10^7$  and  $2.96 \times 10^{10}$  CFU/mL) and the final cell concentrations were higher than the MM medium ( $1.0 \times 10^7$  CFU/mL). The optimal concentration of red ginseng starch and yeast extract as a medium were 20% and 10 g/L, respectively. Under these conditions, the cell mass of *L. plantarum* 15357 and *L. mesenteroides* sub sp. reached  $5.11 \times 10^{10}$  and  $8.17 \times 10^{10}$  CFU/mL. These results show a great possibility for the utilization of red ginseng starch as economic medium sources in the production of cell mass of lactic acid bacteria. This is the first trial of development of economic LAB growth medium using discarded red ginseng starch.

Key words : Lactic acid bacteria, red ginseng starch, red ginseng starch medium, ginsenoside

### 서 론

프로바이오틱스(Probiotics)는 “사람이나 동물에게 건조제 포나 발효산물의 형태로 투여하여 숙주의 장내 균총을 개선하여 좋은 영향을 주는, 단일 혹은 복합 형태의 생균제”를 의미하는 것으로 주로 유산균을 이용한 제품 또는 유산균 자체를 의미한다. 유산균(Lactic acid bacteria, LAB)은 각종 발효 식품의 제조에 전 세계적으로 응용되는 산업적으로 중요한 미생물이며, 장내 부패 억제, 장의 운동을 촉진하여 변비 방지, 면역력 증가, 발암 억제, 비타민 B군의 생산 등 여러 가지 생리적 기능을 가지는 것으로 밝혀지고 있다(Ji GE 1994,

Doron *et al* 2005, Muller *et al* 2009). 또한 아세트산 및 젖산과 같은 유기산 그리고 박테리오신 같은 항균 물질 등 다양한 대사산물을 생산하여 장내 부패균 및 유해한 병원성 세균의 생육을 저해하고 있는 것으로 알려져 있어, 다양한 방면에서 연구가 진행 중이다(Chae *et al* 2010, Diep *et al* 2006, Mathara *et al* 2008, Park *et al* 2013). 이들을 유산균 제제로 사용하기 위해서는 위산에서 기인되는 낮은 pH와 담즙산에서 견디어 장내에 도달할 수 있는 생존능력 및 균주의 안정성이 고려되어야 한다(Ozlem *et al* 2011). 따라서 요구르트, 유산균 음료, 분말, 과립 및 정제 형태의 유산균 제품이 기능성 식품으로 가장 큰 시장을 형성하고 있다. 뿐만 아니라 최근 들어 유산균은 장내 미생물 균총의 개선에 의한 건강 증진 효과 이외에 생리활성 물질 생산균으로 새롭게 부상하고 있으며, 저칼로리당, 설퍼의 다당류, 올리고당 등의 기능성

† Corresponding author : Mi-Yae Shon, Tel : +82-41-750-1661,  
Fax : +82-41-750-1629, E-mail: nuruksmy@ginherb.re.kr

소재 생산과 관련되어 연구가 진행되고 있다(Ryu *et al* 1998). 최근에는 식물성 재료에서 분리한 유산균의 장점이 부각되고 있으며, 식물성 유산균은 식물 원료의 발효 식품에서 분리된 유산균을 지칭한다(Kumagai T 2009). 식물성 유산균은 일반 유산균보다 적은 영양소와 천연 항균 물질이 포함되어 있는 상황에서 생육하기 때문에 영양소를 분해, 섭취하는 능력이 뛰어나며, 각종 생리활성 물질의 생산력도 뛰어난 것으로 알려져 있다(Igarashi T 2007, Huang *et al* 2008).

홍삼은 수삼을 써서 말린 제품으로 수삼에는 없는 ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>2</sub>, Compound-K(C-K) 등의 희소 진세노사이드 성분들을 포함하고 있으며, 그 효능이 우수하여 식품, 의약품 및 화장품 원료로서 주목 받고 있다(Keum *et al* 2000, Kim *et al* 1999, Kim *et al* 2000, Bao *et al* 2005). 홍삼 전분은 홍삼 농축액을 만드는 공정 중에 불용성 성분으로 분리되는 미·이용 자원으로써 홍삼의 진세노사이드를 포함하고 있는 면역 기능을 가진 우수한 원료로 사용이 가능하다. 또한 유리당과 유기산을 포함하고 있어서 미생물 증식에 유익한 원료로 사용될 수 있는 조건을 갖추고 있다. 인삼 전분을 이용하여 알코올 발효 또는 홍삼박 분말을 사용한 일부 연구 결과는 있으나(Rho *et al* 2005, Han *et al* 2007), 홍삼 전분을 이용한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 홍삼 농축액 제조 과정에서 나온 부산물인 홍삼 전분을 활용하여 기존 배지와 차별화된 경제적인 유산균 대량 생산 배지를 개발하고자 유산균을 배양하고 균체 생산을 위한 실험을 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 균주

균주 *Lactobacillus plantarum* 15357, *Leuconostoc mesenteroides* sub sp.는 농진청 농업유전자원센터로부터 분양받아 사용하였다. 홍삼 전분은 충남 소재 (주)성신비에스티의 100% 홍삼에서 분리된 홍삼 전분을 연구용으로 기탁 받아서 사용하였으며, 유산균 배양에 필요한 일반 배지는 MRS broth (Difco, USA)를 이용하였고, 홍삼 전분 배지는 미네랄과 효모 추출물을 혼합하여 사용하였다.

### 2. 홍삼 전분의 제조

실험에 사용한 홍삼 전분은 홍삼 농축액 제조 과정에서 발생하는 홍삼 추출액에서 가라앉은 불용성 성분을 수거하여 원심분리 후, 페이스트 상태로 제조되며, 제조 후 -20℃에서 냉동 보관하면서 실험에 이용하였다.

### 3. 홍삼 전분의 진세노사이드 분석

분말 시료 0.5 g을 농축용 플라스크에 평량해 넣고 수포화 부탄올 50 mL를 첨가하고 80℃ 환류 냉각 추출기에서 1시간 추출하였으며, 10분간 방냉 후 추출액을 여과하고 잔사에 다시 동량의 용매를 넣어 2번 더 반복 추출하였다. 총 3회 추출된 추출액은 분액 깔대기에 옮기고 150 mL 증류수를 가하여 진탕한 후 부탄올 층과 물 층을 분리하고 물 층을 제거하며, 남은 부탄올 층을 농축 플라스크에 모아 45℃ 수조에서 rotary evaporator를 이용하여 진공 농축하였다. 농축 후 플라스크 내 잔류물을 50% MeOH 20 mL에 녹여 0.45 μm membrane filter로 여과하였다. Gensenoside 함량은 Agilent 2690 HPLC system (USA)를 이용하여 측정하였다. HPLC 분석은 μ-Bondapak C<sub>18</sub> (3.9 mm×150 mm, 5 μm) column을 사용하여 이동상의 유속과 컬럼 온도는 각각 0.6 mL/min, 43℃로 하고, UV 검출기의 검출 파장은 203 nm로 하여 분석하였다(Kim *et al* 2007, Park *et al* 2011).

### 4. 홍삼 전분의 유리당 분석

홍삼 전분 10 g을 10 mL의 증류수에 현탁하고, 80℃의 water bath에 30분간 둔 후에 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4℃)를 하고, 상등액을 0.2 μm membrane filter로 여과하였으며, 여과액을 10배 희석한 후, carbohydrate cartridge column (waters, USA)을 사용하여 flow rate 0.5 mL/min 및 injection volume은 10 μL로 HPLC(LC-10A, Shimadzu, Japan)로 분석하였다.

### 5. 홍삼 전분의 NO 생성능

단핵 세포 세포주인 RAW 264.7 세포로부터 NO 생산의 지표로서 배양 상층액 내에 안정된 NO 산화물인 NO<sup>2-</sup> (nitrite)를 Griess 반응으로 측정하였다. EDTA(ethylenediamine tetra acetic acid)가 들어 있는 50 mM potassium phosphate buffer로 조직을 마쇄한 후에 4℃, 10,000×g에서 15분 동안 원심 분리하여 조직의 상층액을 준비하며, 각각의 상층액 100 μL를 96 well plate에 넣고, 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylendiamine H<sub>2</sub>O:1% sulfanilamide/5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>= 1:1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 NaNO<sub>3</sub>를 이용하여 얻은 표준 곡선과 비교하여 계산하였다.

### 6. 홍삼 전분 배지의 제조

대조구의 배지로는 MRS 배지를 사용하였으며, 균주 증식 및 발효에 사용된 미네랄 배지(mineral medium : MM)는 증류수 1 L에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g, FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01 g, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, CaCO<sub>3</sub> 0.05 g, ethylene diamine tetra acetic acid 0.1 g을 용해하여 pH를 6.5로 보정하여 제조하였다. 미네랄 배지

에 0.5%(w/v) 효모 추출물(yeast extract)을 포함하였을 때는 MMY로 표기하였다. 전배양을 위한 발효 배지는 MMY에 홍삼 전분이 10%(w/v)가 되도록 조정된 후 제조하였다.

### 7. 유산균 배양

홍삼 전분 MMY 배지에서 전배양한 배지 10%을 본배양 배지에 접종하여 배양하였으며, 전배양은 진탕 배양기(Jssi-300CL, JSR, Korea)에서 30℃, 120 rpm 조건으로 24시간 동안 진탕 배양하였고, 본 배양을 위한 종균으로 사용하였다. 본 배양을 위한 홍삼 전분 MMY 배지의 조성은 MMY에 홍삼 전분이 2, 5, 10, 20%(w/v), 그리고 효모추출물은 2, 5, 10%(w/v)로 첨가하여 제조하였으며, 각각의 조건에서 유산균의 증식 상태를 관찰하였다. 본 배양은 working volume 300 mL의 홍삼 전분 배지에 종균 10%를 무균적으로 공급을 하고, 30℃, 120 rpm 조건으로 72시간동안 수행하면서 생균수를 측정하였다(Hwang *et al* 2008).

### 8. 생균수 측정

각각 제조된 배지로부터 유산균 균수의 측정은 채취된 시료를 멸균 생리식염수(0.9% NaCl)를 사용하여, 10진 희석법에 따라 희석한 후, BCP첨가 평판 측정용 한천 배지(peptone, yeast extract, dextrose, tween80, cysteine, bromocresol purple, agar)를 배지로 사용하여 30℃에서 배양한 후, 생성된 집락을 3회 반복하여 측정하였다.

### 9. 유산균 생육 중의 pH 변화 분석

유산균은 일반적으로 생육 중에 여러 가지 산을 생성시킴으로 배양 중에 산 생성량 변화가 발생하며, 산 생성량 변화를 pH 변화로 조사하였다. 대조균은 MRS 배지로 배양하였고, 홍삼 전분 MMY 배지는 홍삼 전분 및 질소원의 농도별로 배양하면서 pH를 측정하였다.

### 10. 동결 건조 보호제의 효과

홍삼 전분 MMY 배지를 사용하여 유산균을 배양한 후, 원심 분리(Supra-25K, Hanil, Korea)를 10분간하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 동결 건조 보호제(skim milk), 홍삼 전분 그리고 skim milk, 홍삼 전분 혼합물을 첨가하여 균질화한 후 -40℃로 동결시킨 다음 동결 건조기(LP 50, II Shin BioBase, Korea)에서 건조하였다. 건조된 균체는 분쇄하여 분말화시킨 다음 멸균 생리식염수에 단계 희석하여 BCP 배지에 도말한 후 30℃에서 72시간 배양한 다음, 생균수를 측정하여 동결 건조 후의 생존수를 측정하였다.

### 11. 동결 건조 분말의 인공 위액에서 생존 효과

동결 건조 보호제에 따른 유산균의 내산성을 시험하기 위해 인공 위액(Kobayashi *et al* 1974)의 방법에 따라 HCl을 사용하여 pH를 3.0으로 조정된 홍삼 전분 MMY 배지(pepsin 1.0% 첨가)에 30℃로 맞추어 30분 동안 방치한 후, 멸균 생리식염수에 단계 희석하여 BCP 배지에 도말한 후, 30℃에서 72시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 동결 건조 후의 생존수를 측정하였다.

### 12. 통계 처리

본 실험에서 얻어진 통계 분석 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science)를 이용해서 통계 분석하였다. 실험군당 평균±표준 오차로 표시하였고, 그룹 간 평균차에 대한 통계적 유의성을 검정하기 위해 일원 배치 분산 분석(one-way analysis of variance)을 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 Tukey's test를 이용한 사후 검정(Post-Hoc test)을 실시하였다

## 결과 및 고찰

### 1. 홍삼 전분의 진세노사이드 함량

홍삼 전분은 홍삼 농축액 제조 과정에서 부산물로 홍삼 추출액 중 침강되는 불용성 성분을 수거하여 원심분리 후 만들어 실험에 사용하였다. 홍삼 전분은 불용성 성분으로 아직까지는 그 이용 가치 또는 활용 방법에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았다. 홍삼 전분은 전분, 조단백, 지방산 등 일반 성분뿐 아니라, 홍삼에 존재하는 진세노사이드를 포함하고 있어 기능성 소재로 개발 가능성이 있는 물질이다.

HPLC system를 이용하여 진세노사이드 함량을 측정한 결과, Table 1과 같이 홍삼에서 발견되는 R<sub>g3</sub>와 compound-K를 0.52 mg/g과 0.1 mg/g을 포함하고 있는 전형적인 홍삼의 특징을 가지고 있었으며, 다양한 진세노사이드를 포함하고 있어(Fig. 1) 홍삼의 기능을 이용할 수 있는 기능성 배지로 사용될 수 있을 것으로 확인되었다. 율피, 소청룡탕 등 한약재의 유산균 발효를 통한 효능 연구에 따르면 유산균에 의해 발효된 한약재의 경우 항산화 활성, 항염증 활성이 더 높은 것으로 알려져 있다(Choi *et al* 2013, Kang & Kim 2011, Han & Lee 2011). 홍삼의 특징을 유지하고 있는 홍삼 전분은 유산균 배양 배지로의 역할뿐 아니라, 효능 면에서도 우수한 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

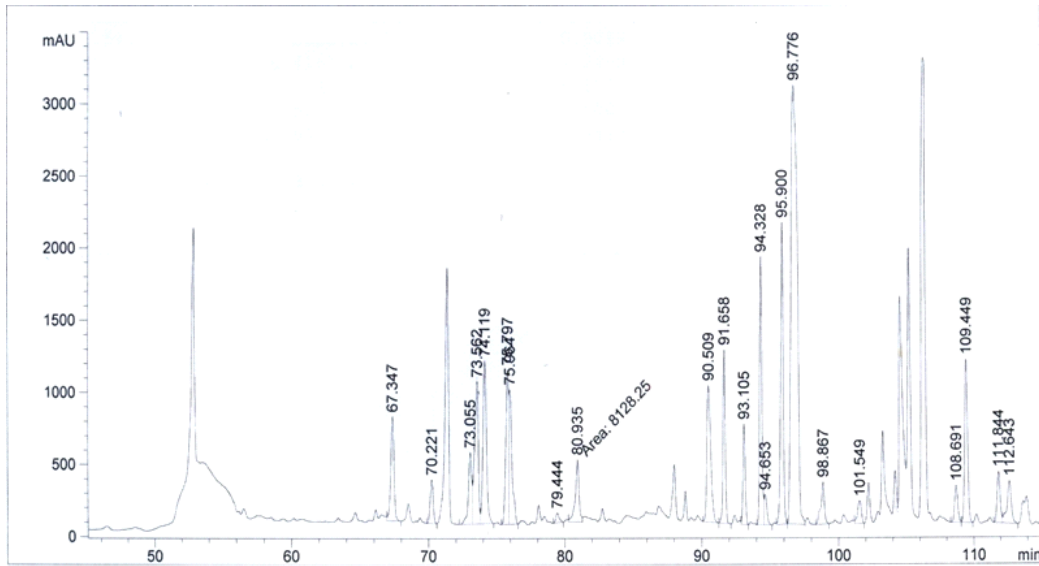
### 2. 홍삼 전분의 NO 생성능

대식 세포를 sample과 24시간 반응시킨 후, 2,500 rpm에서 5분간 원심분리를 하였으며, 상등액 50 µL를 취해 NO량(uM)을 측정하였다. 그 결과(Fig. 2), 샘플 농도가 증가할수록 NO 생성량이 유의적으로 증가하는 것으로 확인되었으며, 농축

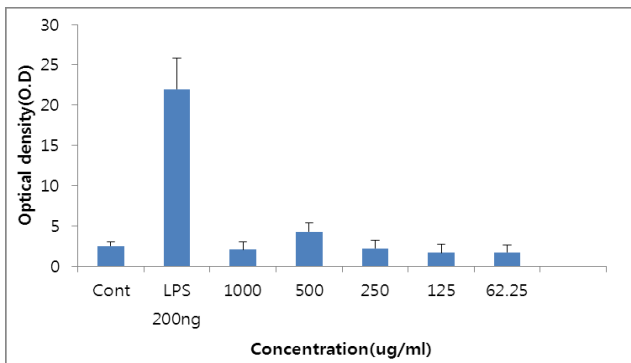
**Table 1. Contents of ginsenoside of red ginseng starch**

Red ginseng starch	Contents of ginsenoside (mg/g) <sup>1)</sup>												Total
	RF	Rb1	Rg2	Rc	Rb2	Rb3	F1	Rd	F2	Rg3	Rk	C-K	
	0.24±0.04	0.10±0.01	0.15±0.03	0.19±0.04	0.29±0.07	0.33±0.05	0.01±0.00	0.16±0.02	0.09±0.01	0.52±0.10	0.52±0.10	0.10±0.01	2.73±0.20

<sup>1)</sup> Ginsenoside contents in red ginseng starch. Values were expressed as the mean±S.D. (n=3).



**Fig. 1. Chromatogram of ginsenoside of red ginseng starch.**



**Fig. 2. Production contents of nitric oxide of red ginseng starch on RAW 264.7 macrophage for 24 hrs.**

Data represent the means of three separate experiments and error bars represent standard deviation.

물의 농도 50~400 ug/mL에서 5.63~16.14 uM까지 증가하였다.

**3. 홍삼 전분의 유리당 함량**

홍삼 전분의 유리당 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같이 총 유리당 함량은 3.6 mg/g으로 sucrose 2.3 mg/g, glucose 0.6

mg/g, mannose 0.1 mg/g, 그리고 fructose 0.3 mg/g으로 측정되었다. 홍삼 전분의 유리당은 유산균의 생장에 필요한 탄소원으로 사용될 수 있으며, Table 3, 4의 결과와 같이 대조군 ( $1.0 \times 10^7$  CFU/mL)과 비교하여 균체 생산량 ( $1.9 \times 10^9 \sim 1.4 \times 10^{10}$  CFU/mL)을 증가시켰다. 따라서 기존에 미생물 배양에 필요한 유리당의 증식 효과와 같은 결과를 보여주었으나, 산도는 강하게 나타나지 않아서 기존 유리당보다는 산미가 온화하여 식품개발 배지로 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다 (Cho *et al* 2011). 기존 연구에 의하면 인삼 분말 배지, 홍삼 추출물 등을 사용하여 유산균 및 *Bacillus* 균주를 배양하고, 발효를 통해 진세노사이드를 전환 시킨 연구는 있었으나 (Kim *et al* 2007, Park *et al* 2011, Kim *et al* 2010), 홍삼 전분을 이용하여 기능성 유산균을 생산하고자 하는 연구는 아직 이루어지지 않았다.

**4. 유산균 생육 중의 pH 및 총 균수 변화**

홍삼 전분 배지에서 유산균을 배양 시 유산균 발효에 의한 pH 및 총 균수 변화를 확인하기 위하여, *L. plantarum* 15357과 *L. mesenteroides* sub sp.을 MM 배지(Mineral medium;  $K_2HPO_4$  3 g/L,  $FeSO_4 \cdot H_2O$  0.01 g/L,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$

**Table 2. Contents of carbohydrates of red ginseng starch**

Red ginseng starch	Contents of free carbohydrates (mg/g) <sup>1)</sup>				
	Sucrose	Glucose	Mannose	Fructose	Total
	2.30±0.08	0.60±0.12	0.10±0.02	0.30±0.04	3.60±0.15

<sup>1)</sup> Free carbohydrates contents in red ginseng starch. Values were expressed as the mean±S.D. (n=3).

0.01 g/L, CaCO<sub>3</sub> 0.05 g/L, ethylene diamine tetra acetic acid 0.1 g/L, 홍삼 전분 배지 그리고 질소원(Yeast extract)을 첨가한 홍삼 전분 배지에서 배양하면서 pH 및 생균수를 측정하여 Table 3, 4에 나타내었다. Table 3에서 MM 배지에서 배양한 유산균의 총 균수는 1.0×10<sup>7</sup> CFU/mL, pH는 7.47이었으며, 홍삼 전분 10%로 배양한 유산균의 총 균수 및 pH는 *L. plantarum* 15357, *L. mesenteroides* sub sp.는 1.4×10<sup>10</sup> CFU/mL, *L. mesenteroides* sub sp.는 2.9×10<sup>10</sup> CFU/mL 그리고 pH는 각각 4.62와 4.17이었다. Table 4에서 홍삼 전분 배지 10%에 질소원 5%를 첨가하여 유산균을 배양하였을 때, 유산균의 총 균수 및 pH는 *L. plantarum* 15357는 2.8×10<sup>10</sup> CFU/mL, *L. mesenteroides* sub sp.는 5.3×10<sup>10</sup> CFU/mL 그리고 pH는 각각 4.51와 3.69로 측정되었다. 홍삼 전분 농도 0~2%에서는 총 균수는 *L. plantarum* 15357는 2.0×10<sup>7</sup>~4.6×10<sup>8</sup> CFU/mL 그리고 *L. mesenteroides* sub sp.는 1.0×10<sup>7</sup>~3.6×10<sup>9</sup> CFU/mL로 측정되었으며, 홍삼 전분의 농도가 증가할수록 총 균수는

증가하였다. 그러나 배양 시간이 증가할수록 pH는 감소하였으나, 배양액의 산성화에 따른 유산균의 증식에는 영향을 미치지 않았다. MM 배지에서는 유산균 성장 총 균수가 1.0×10<sup>7</sup> CFU/mL까지 성장하였으나, pH는 감소하지 않았다. 이것은 MM 배지에 포함되어 있는 미네랄 성분에 의하여 산도가 변하지 않았으며, 유리당 같은 성장에 필요한 영양분 부족으로 성장에는 한계가 있는 것으로 확인되었다. 또한 홍삼 전분의 함유량이 증가할수록 미생물의 총 균수는 증가하였으며, pH도 감소하였다. 따라서 홍삼 전분에 포함되어 있는 유리당 성분들이 유산균 성장에 영향을 미친 것으로 확인되었다.

인삼 분말 배지를 사용하여 발효 미생물을 배양한 연구에 의하면 2.5%(w/v) 인삼 분말이 첨가된 배지에서는 인삼 분말에 함유된 진세노사이드나 다른 성분의 저해로 유산균이 생장을 보이지 않고 1% 인삼 분말이 첨가된 배지에서 1.0×10<sup>7</sup> CFU/mL 이상의 생장을 보였다(Rho *et al* 2011). 산업 부산물을 이용한 유산균 배양에 대한 연구는 옥수수 칩 공정

**Table 3. pH change and bacterial number of culture media of red ginseng starch medium according to the culture time at 72 hr of *Lactobacillus plantarum* 15357 and *Leuconostoc mesenteroides* sub sp.**

	Ginseng starch(%)	pH <sup>1)</sup>	Bacterial number(CFU/L) <sup>1)</sup>
<i>L. plantarum</i> 15357	MRS	4.19±0.82 <sup>b</sup>	4.57×10 <sup>10</sup> ±0.32
	0	7.47±0.33 <sup>a</sup>	1.0×10 <sup>7</sup> ±0.51
	2	6.74±0.17 <sup>a</sup>	1.96×10 <sup>9</sup> ±0.42
	5	5.25±0.62 <sup>ab</sup>	7.05×10 <sup>10</sup> ±0.41
	10	4.62±0.43 <sup>b</sup>	1.42×10 <sup>10</sup> ±0.62
	20	4.43±0.25 <sup>b</sup>	8.53×10 <sup>10</sup> ±0.72
<i>L. mesenteroides</i> sub sp.	MRS	4.18±0.67 <sup>b</sup>	4.96×10 <sup>10</sup> ±0.21
	0	7.61±0.34 <sup>a</sup>	1.0×10 <sup>7</sup> ±0.64
	2	6.30±0.40 <sup>ab</sup>	1.57×10 <sup>7</sup> ±0.35
	5	4.39±0.65 <sup>b</sup>	6.87×10 <sup>8</sup> ±0.34
	10	4.17±0.72 <sup>b</sup>	2.96×10 <sup>10</sup> ±0.71
	20	4.11±0.66 <sup>b</sup>	9.97×10 <sup>10</sup> ±0.63

<sup>1)</sup> Values were expressed as the mean±S.D. (n=3).

Means followed by the same letter are not significantly different by Tukey's test(*P*<0.05).

Data are reported as the mean±standard error.

**Table 4. pH change and bacterial number of culture media of red ginseng starch with yeast extract according to the culture time at 72 hr of *Lactobacillus plantarum* 15357 and *Leucostoc mesenteroides* sub sp.**

	Ginseng starch(%)	Yeast extract(%)	pH <sup>1)</sup>	Bacterial number(CFU/L) <sup>1)</sup>
<i>L. mesenteroides</i> sub sp.	MRS	-	4.21±0.31	3.24×10 <sup>9</sup> ±0.51
	0	2	7.81±0.25 <sup>a</sup>	2.0×10 <sup>7</sup> ±0.62
		5	7.96±0.18 <sup>a</sup>	4.0×10 <sup>7</sup> ±0.74
		10	6.85±0.56 <sup>ab</sup>	3.41×10 <sup>7</sup> ±0.35
	2	2	6.45±0.50 <sup>ab</sup>	1.59×10 <sup>7</sup> ±0.33
		5	4.52±0.33 <sup>bc</sup>	4.62×10 <sup>8</sup> ±0.21
		10	4.57±0.64 <sup>bc</sup>	3.28×10 <sup>8</sup> ±0.32
	5	2	4.63±0.21 <sup>bc</sup>	3.63×10 <sup>8</sup> ±0.51
		5	4.83±0.31 <sup>bc</sup>	5.78×10 <sup>9</sup> ±0.41
		10	4.19±0.36 <sup>bc</sup>	9.87×10 <sup>8</sup> ±0.32
	10	2	5.17±0.33 <sup>b</sup>	1.34×10 <sup>10</sup> ±0.50
		5	4.51±0.41 <sup>bc</sup>	2.80×10 <sup>10</sup> ±0.72
		10	4.97±0.46 <sup>b</sup>	5.97×10 <sup>10</sup> ±0.11
	20	2	3.89±0.37 <sup>c</sup>	8.87×10 <sup>9</sup> ±0.20
		5	3.94±0.33 <sup>c</sup>	4.63×10 <sup>10</sup> ±0.71
10		4.55±0.43 <sup>bc</sup>	8.17×10 <sup>10</sup> ±0.53	
<i>L. plantarum</i> 15357	MRS	-	5.31±0.55 <sup>ab</sup>	5.11×10 <sup>10</sup> ±0.61
	0	2	7.78±0.54 <sup>a</sup>	3.11×10 <sup>7</sup> ±0.42
		5	7.90±0.61 <sup>a</sup>	1.0×10 <sup>7</sup> ±0.31
		10	6.90±0.34 <sup>a</sup>	2.7×10 <sup>7</sup> ±0.70
	2	2	4.35±0.33 <sup>b</sup>	1.83×10 <sup>7</sup> ±0.71
		5	4.28±0.26 <sup>b</sup>	3.79×10 <sup>9</sup> ±0.73
		10	4.36±0.33 <sup>b</sup>	3.62×10 <sup>9</sup> ±0.12
	5	2	3.75±0.15 <sup>c</sup>	6.32×10 <sup>10</sup> ±0.21
		5	3.66±0.17 <sup>c</sup>	9.23×10 <sup>10</sup> ±0.61
		10	3.64±0.28 <sup>c</sup>	8.66×10 <sup>10</sup> ±0.35
	10	2	3.67±0.25 <sup>c</sup>	1.45×10 <sup>10</sup> ±0.81
		5	3.69±0.08 <sup>c</sup>	5.32×10 <sup>10</sup> ±0.52
		10	3.72±0.19 <sup>c</sup>	5.63×10 <sup>10</sup> ±0.73
	20	2	4.10±0.21 <sup>b</sup>	7.14×10 <sup>10</sup> ±0.92
		5	3.86±0.32 <sup>c</sup>	8.23×10 <sup>10</sup> ±0.86
10		3.82±0.40 <sup>c</sup>	8.05×10 <sup>10</sup> ±0.77	

<sup>1)</sup> Values were expressed as the mean±S.D. (n=3).

Means followed by the same letter are not significantly different by Tukey's test( $P<0.05$ ).

Data are reported as the mean±standard error.

서 배출되는 고형분을 약 50%로 농축해서 만들어지는 옥수수 침지액(corn steep liquor)을 이용하여 *Lactobacillus* sp. RKY2를 대량 배양한 결과가 보고되어 있다(Wee *et al* 2006).

### 5. 동결 건조 보호제로서의 효과

본 연구에서는 유산균의 동결 건조 시 이미 알려진 동결 건조 보호제(skim milk)와 본 연구에서 사용하는 홍삼 전분 그리고 동결 건조 보호제와 홍삼 전분을 첨가하였을 때, 동결 건조 후 생균수의 변화에 미치는 영향을 관찰하였다. Table 5에서는 각각의 조건에서 유산균의 생존율을 시험한 결과, skim milk를 2%와 10%를 첨가하였을 때, *L. plantarum* 15357는  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 그리고 *L. mesenteroides* sub sp은  $3.0 \times 10^7$  CFU/mL의 생존 효과를 보였고, 홍삼 전분 2%와 10%는 *L. plantarum* 15357는  $9.7 \times 10^4$  CFU/mL와  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL 그리고 *L. mesenteroides* sub sp은  $2.0 \times 10^{5-6}$  CFU/mL 또한 홍삼 전분 10%+skim milk 2%는 *L. plantarum* 15357는  $5.2 \times 10^9$  CFU/mL 그리고 *L. mesenteroides* sub sp은  $5.3 \times 10^9$  CFU/mL로 측정되었다. 홍삼 전분에 Skim milk를 혼합하여 동결 건조 보호 효과를 측정하였을 때, Skim milk 및 홍삼 전분 단독으로 처리한 효과보다는 생존균수가 높게 측정되었다. 홍삼 전분 단독 투여 시 농도가 증가할수록 보호 효과는 10배 정도가 증가하였으나, 기존 보호제인 skim milk와 비교하였을 때는 그 효과가 100배 정도 낮게 측정되었다. 따라서 홍삼 전분의 효과와 기존 보호제와의 효과를 이용하면 100~1,000배 정도 향상 효과가 증가되었음을 확인하였다. 홍삼 전분이 포함하고 있는 유리당 및 성분들과 기존 보호제의 단백질 성분들과의 상승 보호 효과에 의해서 단독 처리군보다는 생존 총 균수가 100~1,000배 정도 높은 결과를 보여 유산균 생균제 제형 제작에 저렴한 보호제로 사용 가능할 것이다. 기존 연구에 의하면 10% skim milk와 5% sucrose에 구기자 등 생약 추출물 2.5%를 첨가하여 동결 건조 한 경우, 대조군에 비해 유산균 생존율이 다소 증가한다는 결과가 있으나, 본 연구와 같이 산업 부산물을 이용한 연구는 이루어지지 않았다(Choi *et al* 2004).

### 6. 동결 건조 분말의 인공 위액에서의 생존 효과

동결 건조 보호제로 건조된 홍삼 전분 분말로 실험한 결과를 Table 6에 나타내었다. 인공 소화전의 *L. plantarum* 15357는  $8.7 \times 10^9$  CFU/mL 그리고 *L. mesenteroides* sub sp은  $9.0 \times 10^{10}$  CFU/mL이었으나, 소화 후, skim milk 10%에서는 *L. plantarum* 15357는  $5.4 \times 10^7$  CFU/mL 그리고 *L. mesenteroides* sub sp은  $3.3 \times 10^7$  CFU/mL, RGS 10%에서는 *L. plantarum* 15357 CFU/mL는  $2.9 \times 10^7$  CFU/mL 그리고 *L. mesenteroides* sub sp은  $3.5 \times 10^7$  CFU/mL 또한 SM 2%와 RGS 10%

**Table 5. Effect of freeze-drying cryoprotectant agents for viable cell number**

Cryoprotectant agent(%)	Viable cell number(CFU/mL) <sup>1)</sup>	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> 15357	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sub sp.
Control (MRS)	$6.4 \times 10^7 \pm 0.14$	$8.3 \times 10^7 \pm 0.41$
S.M <sup>2)</sup> 2	$2.0 \times 10^7 \pm 0.32$	$3.34 \times 10^7 \pm 0.72$
S.M 5	$8.12 \times 10^7 \pm 0.11$	$1.07 \times 10^7 \pm 0.53$
S.M 10	$2.13 \times 10^7 \pm 0.09$	$3.21 \times 10^7 \pm 0.34$
S.M 20	$1.05 \times 10^7 \pm 0.21$	$3.8 \times 10^7 \pm 0.54$
RGS <sup>3)</sup> 2	$9.7 \times 10^4 \pm 0.41$	$2.0 \times 10^5 \pm 0.35$
RGS 5	$1.6 \times 10^5 \pm 0.08$	$2.07 \times 10^5 \pm 0.72$
RGS 10	$2.12 \times 10^6 \pm 0.04$	$2.61 \times 10^6 \pm 0.85$
RGS 20	$1.32 \times 10^6 \pm 0.12$	$3.5 \times 10^6 \pm 0.90$
SM 2+RGS 2	$3.4 \times 10^8 \pm 0.34$	$2.5 \times 10^8 \pm 0.71$
SM 2+RGS 5	$2.7 \times 10^9 \pm 0.22$	$8.2 \times 10^8 \pm 0.72$
SM 2+RGS 10	$5.2 \times 10^9 \pm 0.11$	$5.3 \times 10^9 \pm 0.52$
SM 2+RGS 20	$1.8 \times 10^{10} \pm 0.02$	$5.9 \times 10^9 \pm 0.53$

<sup>1)</sup> Values were expressed as the mean±S.D. (n=3).

<sup>2)</sup> RGS : Red ginseng starch.

<sup>3)</sup> SM : Skim milk.

에서는 *L. plantarum* 15357는  $7.4 \times 10^9$  CFU/mL 그리고 *L. mesenteroides* sub sp은  $3.1 \times 10^9$  CFU/mL로 측정되었다. SM 2%와 RGS 10%를 혼합한 보호제의 유산균이 다른 조건보다는 인공 위액에서의 생존 효과가 높게 측정되었다. 유산균 제품은 위산에서 견딜 수 있는 제형의 안정성이 중요한 요소로 작용 하는데(Ozlem *et al* 2011), 본 결과에 따르면 홍삼 전분은 이러한 조건을 충족시킬 수 있는 보호제로 유산균 제품의 다양화를 위해 사용가능한 새로운 소재라 할 수 있겠다.

## 결 론

본 연구에 사용된 홍삼 전분은 홍삼 농축액 제조 과정에서 발생하는 불용성 부산물로 현재까지는 폐기물로 인식되어 그 활용이 제한적이었다. 하지만 홍삼 유래의 안전한 물질로 홍삼의 유효 성분인 진세노사이드를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라, 각종 유리당 등 탄수화물이 다량 포함되어 있는 저렴한 소재로 유산균 배양에 적합한 소재로의 가능성을 알아보았다. 기존에 인삼 또는 홍삼을 이용한 발효 연구는 미생물 발효를 통하여 인삼 또는 홍삼의 유효성분인 진세노

**Table 6. Effect of freeze-drying cryoprotectant agents by artificial gastric juice for viable cell number**

Cryoprotectant agent(%)	Viable cell number(CFU/mL) <sup>1)</sup>	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> 15357	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sub sp.
Control(MRS)	8.7×10 <sup>9</sup> ±0.11	9.0×10 <sup>10</sup> ±0.64
S.M 2	1.2×10 <sup>7</sup> ±0.11	5.0×10 <sup>7</sup> ±0.61
S.M 5	3.1×10 <sup>7</sup> ±0.51	3.2×10 <sup>7</sup> ±0.36
S.M 10	5.4×10 <sup>7</sup> ±0.05	3.3×10 <sup>7</sup> ±0.35
S.M 20	6.3×10 <sup>7</sup> ±0.06	3.1×10 <sup>7</sup> ±0.72
RGS 2	5.2×10 <sup>7</sup> ±0.12	2.8×10 <sup>6</sup> ±0.73
RGS 5	6.1×10 <sup>7</sup> ±0.32	5.2×10 <sup>7</sup> ±0.65
RGS 10	2.9×10 <sup>7</sup> ±0.51	3.5×10 <sup>7</sup> ±0.72
RGS 20	5.1×10 <sup>7</sup> ±0.63	4.5×10 <sup>7</sup> ±0.35
SM 2+RGS 2	9.1×10 <sup>8</sup> ±0.71	3.7×10 <sup>9</sup> ±0.21
SM 2+RGS 5	3.7×10 <sup>9</sup> ±0.05	2.2×10 <sup>9</sup> ±0.53
SM 2+RGS 10	7.4×10 <sup>9</sup> ±0.51	3.1×10 <sup>9</sup> ±0.52
SM 2+RGS 20	7.8×10 <sup>9</sup> ±0.04	2.6×10 <sup>9</sup> ±0.41

<sup>1)</sup> Values were expressed as the mean±S.D. (n=3).

사이드의 생물전환에 국한된 연구가 주를 이루고 있었다. 하지만 본 연구에서는 홍삼의 진세노사이드가 함유된 부산물인 홍삼 전분을 이용하여 유산균의 대량 배양에 대한 연구를 진행하였다. 그 결과, 홍삼 전분 배지에서 5.3×10<sup>10</sup> CFU/mL의 유산균을 생산하였다. 이러한 총 균수는 기존 유산균 배지(MRS)와 비교해도 손색일 없을 정도의 뛰어난 균체 생장을 보여 주는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 유산균은 1차적으로 분말화하는 동결 건조 공정에서 cell의 피해를 감소시켜 줘야 하는데, 홍삼 전분과 기존의 동결 건조 보호제를 동시 처리한 실험에서 대조군과 유사한 총 균수를 유지하였으며, 강산의 위액인 pH 3.0에서 홍삼 전분과 skim milk 균에서 1.0×10<sup>9</sup> CFU/mL의 생존 효과를 보였다. 그러므로 홍삼 전분은 유산균 배양 배지로서도 적합하고, 동결 건조 시 cell의 피해를 최소화시키며, 강산의 조건에서도 균의 피해를 최소화하는 것으로 관찰되었다. 본 연구 결과는 홍삼 농축액 제조 과정에서 발생하는 불용성 부산물인 홍삼 전분을 활용하여 유산균의 산업적 생산에 유용하게 사용할 수 있는 기초 결과를 제공하여 향후 유산균 기능성 제품 개발에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년 농촌진흥청 “신 기능성 농식품 및 부가가치 향상 기술 개발” 사업(과제번호 : PJ009126)의 지원에 의해 이루어진 연구이며, 이에 감사드립니다.

## 문헌

- Bao HY, Zhang J, Yeo SJ, Myung CS, Kim HM, Kim JM, Park JH, Cho JS, Kang JS (2005) Memory enhancing and neuroprotective effects of selected ginsenosides. *Arch Pharm Res* 28: 335-342.
- Chae DJ, Lee KS, Jang KH (2010) Fermentation characteristics of flour sourdough using mixed lactic acid bacteria and *Bifidobacterium longum* as starters. *J East Asian Soc Dietary Life* 20: 743-750.
- Cho EK, Cho HY, Pyun YR (2011) Development of pretreatment and mixed culture processes for plant originated lactic acid to produce a functional lactic acid beverage. *Korean J Food & Nutr* 24: 117-123.
- Choi JB, Shin YW, Paek NS, Kim YM (2004) Influence of herbal extract on lactic acid bacteria growth and cryoprotectants. *Korean J Food & Nutr* 17: 286-293.
- Choi MO, Kim BJ, Jo SK, Jung HK, Lee JT, Kim HY, Kweon DJ (2013) Anti-allergic activities of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus bifermens*. *Korean J Food Preserv* 20: 583-591.
- Diep DB, Godager L, Brede D, Nes IF (2006) Datamining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology* 152: 1649-1659.
- Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL (2005) *Lactobacillus* GG: Bacteriology and clinical applications. *Gastroenterol Clin N Am* 34: 483-498.
- Han IJ, Kim MY, Jun SS (2007) Characteristics of dough with red ginseng marc powder. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 371-378.
- Han JH, Lee SY (2011) Comparing medical efficacy of Socheongyong-tang with lactic acid bacteria fermented Socheongyong-tang. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25:246-256.
- Huang CJ, Wang ML, Kuo CY (2008) Studies on the cholesterol removal ability of plant origin lactic acid bacteria. *J Taiwan Livestock Res* 41: 267-274.
- Hwang SK, Hong JK, Jung KH, Jang BC, Shin JH, Hwang KS, Yoo SK (2008) Process optimization of dextran pro-



- duction by *Leuconostoc* sp. strain isolated from fermented Kimchi. *J Life Sci* 18: 1377-1383.
- Igarashi T (2007) Development of beverage and food using plant origin lactic acid bacterium. *Bioindustry* 24: 32-39.
- JI GE (1994) Composition and distribution of intestinal microbial flora in Korean. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 22: 453-458.
- Kang DH, Kim HS (2011) Functionality analysis of Korean medicine fermented by *Lactobacillus* strains. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39:259-265.
- Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ (2000) Antioxidants and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Letters* 150: 41-48.
- Kim BG, Choi SY, Kim MR, Suh HJ, Park HJ (2010) Changes of ginsenosides in Korean red ginseng(*Panax ginseng*) fermented by *Lactobacillus plantarum* M1. *Process Biochem* 45: 1319-1324.
- Kim HG, Kim KY, Cha CJ (2007) Screening for ginseng-fermenting microorganisms capable of biotransforming ginsenosides. *Kor J Microbiol* 43: 142-146.
- Kim SE, Lee YH, Park JH, Lee SK (1999) Ginsenoside-R<sub>S3</sub>, a new diol-type ginseng saponin, selectively elevates protein levels of p53 and p21 WAF1 leading to induction of apoptosis in SK-HEP-1 cells. *Anticancer Research* 19: 487-491.
- Kim WY, Kim JM, Han SB, Lee SK, Kim ND, Park MK, Kim CK, Park JH (2000) Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J Nat Prod* 63: 1702-1704.
- Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima T (1974) Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn J Microbiol* 29: 691-697.
- Kumagai T. 2009. Application of plant origin lactic acid bacteria to food. *Food Style* 21 13: 46-47.
- Mathara JM, Schillinger U, Guigas C, Franz CMAP, Kutima PM, Mbugua S, Shin HK, Holzapfel WH (2008) Functional characteristics of *Lactobacillus* sp. from traditional maasai fermented milk products in Kenya. *Int J Food Microbiol* 126: 57-64.
- Muller DM, Carrasco MS, Tonarelli GG, Simonetta AC (2009) Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Ip 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J Appl Microbiol* 106: 2031-2040.
- Ozlem O, Fadime K, Ingolf FN (2011) A probiotic as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Des* 8: 99-100.
- Park JW, Lee JC, Ann S, Seo DW, Choi WS, Yoo YH, Park SK, Choi JY, Um SH, Ahn SH, Han JW (2011) A fermented ginseng extract, BST204, inhibits proliferation and motility of human colon cancer cells. *Biomol Ther* 19: 211-217.
- Park SH, Yang S, Lee JH, Kang M (2013) Selection of phytate-degrading lactic acid bacteria from *Kimchi* and reaction properties in brown rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 627-632.
- Rho SK, Song JS, Park KH (2001) Alcohol fermentability of Insam starch and characteristics of Insam wine. *Food Eng Prog* 5: 43-51.
- Ryu BH, Cho SH, Ha SW, Park KM, Kang KH (1998) Changes of the intestinal microflora and fecal properties by intake of yoghurt added capsulated or uncapsulated bifidobacteria. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 26: 221-225.
- Wee YJ, Kim HO, Yun JS, Ryu HW (2006) Pilot-scale lactic acid production via batch culturing of *Lactobacillus* sp. RKY2 using corn steep liquor as a nitrogen source. *Food Technol Biotechnol* 44:293-298.

---

접 수: 2013년 11월 29일  
 최종수정: 2013년 12월 03일  
 채 택: 2013년 12월 20일