

## 발효 미생물에 따른 인삼꽃의 항산화 활성

김경희<sup>1</sup> · 김다미<sup>1</sup> · 변명우<sup>2</sup> · 윤영식<sup>1</sup> · 육홍선<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 식품영양학과  
<sup>2</sup>우송대학교 외식조리영양학부

### Antioxidant Activity of *Panax ginseng* Flower-buds Fermented with Various Microorganisms

Kyoung-Hee Kim<sup>1</sup>, Da-Mi Kim<sup>1</sup>, Myung-Woo Byun<sup>2</sup>, Young-Sik Yun<sup>1</sup>, and Hong-Sun Yook<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Culinary Nutrition, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea

#### Abstract

To improve the use of ginseng flower-buds, antioxidant activities of ginseng flower-buds fermented using a variety of useful microorganisms were analyzed. Non-fermented grape pomace was used as a control, while fermentation was carried out using *Bacillus subtilis* (BS), *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactobacillus casei* (LC), *Candida utilis* (CU), *Saccharomyces cerevisiae* strain CHY1011 (Y1), *Saccharomyces cerevisiae* strain ZP 541 (Y2), and a mixed-strain culture with LP, LC, and CU (M). The total polyphenol content of ginseng flower-buds was highest in the control compared to the other fermented ginseng flower-buds. DPPH radical and ABTS radical scavenging activity were also highest in fermented group by BS. The FRAP value (10 mg/mL) was highest in the control group but did not show a significant difference in the fermented group by BS. The highest reducing power activity was in the fermented group by LC compared to the other group, including the control. Therefore, the fermentation of ginseng flower-buds using various microorganisms, shows that fermentation with the *Bacillus subtilis* strain increases antioxidant activity. More research of its effects on other physiological activities will be needed.

**Key words:** antioxidant, flower-buds of *Panax ginseng* C.A. Meyer, fermentation

#### 서 론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오가피과(Araliaceae)에 속하는 반음지성 식물로서 동양의학에서 오랜 기간 사용되어 온 약재이다. 일반적으로 뿌리를 약용으로 이용하며 자연 건강식품으로 널리 이용되고 있고, 약리 효능의 과학적 입증과 임상을 근거로 인식과 신뢰가 높으며, 의약품 및 기능성 식품으로 그 수요가 증가하고 있다. 인삼의 뿌리에는 사포닌, 지용성 성분, 산성다당류, 페놀 화합물, 합질소 화합물 및 펩타이드, 유리당, 유리산, 비타민, 무기성분 등이 있으며, 그중에서 인삼 사포닌인 ginsenoside는 우수한 약리 효과가 있다(1,2). 이처럼 인삼의 뿌리에 관한 성분 및 효능 연구가 많이 이루어져 있고 유용 성분의 이용을 목적으로 홍삼, 홍삼추출농축액, 파우치 등으로 가공하거나 한약재료로 사용되고 있지만, 잎을 포함한 지상부는 거의 약용으로 이용되지 않고 있다.

지상부에 속하는 인삼의 꽃은 ginsenoside 함량이 뿌리보다 많고 그 종류도 뿌리와 유사하다. 꽃에서는 Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd,

Re, Rg<sub>1</sub> 및 총 ginsenoside가 많으며, 특히 꽃에서의 Re 함량은 채취시기와 관계없이 월등히 많았는데 잎과 줄기와는 달리 채취시기별 함량변이도 거의 없다(3). 뿐만 아니라 채종하지 않는 꽃은 인삼의 뿌리 성장을 촉진하기 위하여 제거되므로 이들의 활용방법에 대한 검토가 필요하다. 한편 발효는 가장 오래된 역사를 가진 생물학의 기술로 산업전반에 걸친 기술개발이 현재에도 이루어지고 있으며, 특히 식품에서의 기술개발이 주류를 이루고 있고 수삼 가공의 경우 건조, 증자, 가열 추출의 물리적 방법 외에 생물학적 가공방법인 발효를 이용한 가공방법이 최근 증가하고 있는 추세이다. 수삼의 경우 수삼을 발효시켜 미생물의 발효과정 중 생성되는 당 분해효소 등을 이용하여 인삼사포닌의 전환을 유도함으로써 영양학적, 기능적 가치를 높이고자 하는 인삼 발효 미생물의 선별에 관한 연구가 진행된 바 있으며(4), Senthil 등(5)의 연구에서는 인도 음식에서 분리해낸  $\beta$ -glucosidase 활성을 보이는 세균이 인삼으로부터 분리해낸 Rb<sub>1</sub>을 미량 ginsenoside인 Rd로 변환시킨다고 보고하였다. 또한 유산균을 이용한 발효인삼 제조에 가장 적합한 유산균주 및 최적공

\*Corresponding author. E-mail: yhsuny@cnu.ac.kr  
Phone: 82-42-821-6840, Fax: 82-42-821-8887

정을 확립하여 차후 건강기능성 식품소재로서의 유산균 발효 인삼제품화 가능성을 조사한 연구가 수행된 바 있다(6). Ramesh 등(7)의 연구에서는 발효인삼의 처리가 노화 중 일어나는 산화를 개선하여 free radical과 관련된 산화적 스트레스 및 노화를 최소화한다고 보고하였다. 그밖에도 백삼, 홍삼과 대비하여 발효인삼의 일반성분에 대한 성분 특성을 분석한 보고도 있으며(8), 인삼을 비롯한 다양한 소재들을 활용하여 발효하거나 또는 첨가하여 식품의 기능성 강화, 관능적 품질을 향상시켜 발효식품으로써 개발하려는 연구가 시도되었다(9). 따라서 인삼과 마찬가지로 많은 사포닌을 함유하고 있는 인삼꽃을 발효할 경우 유용한 생리활성물질이 많이 생성될 것으로 사료되어 본 연구에서는 인삼과 마찬가지로 많은 사포닌 함량을 지니고 있으나 아직까지 그 이용 정도가 미비한 인삼꽃을 대상으로 여러 유용 미생물을 이용하여 인삼꽃을 발효시킨 후 여러 미생물별 인삼꽃 발효에 따른 항산화 활성 변화를 조사하여 향후 화장품 등의 산업원료 소재 및 사료 첨가제로서의 이용 가능성을 탐색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용된 인삼꽃은 공주시에 있는 인삼재배 농가에서 5년근 인삼의 꽃을 구입하여 사용하였으며 인삼꽃 발효물의 제조는 20 g의 glucose와 5 g의 peptone을 1 L의 3차 증류수(DW)에 넣은 후 121°C 15분으로 가압고온 멸균하여 실온에서 서서히 식힌 다음 미리 활성화 시킨 7종의 발효 균주를 각각 10 mL씩 넣은 후 잔물에 5회 수세한 100 g의 건조 인삼꽃을 넣고, *Bacillus(B.) subtilis*, *Candida(C.) utilis*, *Saccharomyces(S.) cerevisiae*, 혼합균주(*Lactobacillus(L.) plantarum*, *L. casei*, *C. utilis*의 혼합)는 30°C, *L. plantarum*, *L. casei*는 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 여과지(Whatman No. 4, Whatman, Middlesex, UK)로 여과시킨 여액을 121°C에서 15분 동안 가압 고온 멸균시켰다. 멸균된 배양액을 -75°C deep freezer에 12시간 두었다가 freeze dryer에 넣고 동결건조 하여 실험에 사용하였다. 인삼꽃 무발효 대조군으로는 인삼꽃 100 g당 10배량(w/v)의 DW로 24시간 동안 3회 추출한 후 여과지(Whatman No. 4)로 여과한 다음 동결건조 하여 얻은 인삼꽃 물 추출물(이하 무발효 추출물)을 사용하였다. 각 시료 분획물은 50% ethanol에 용해하여 실험에 사용하였다.

### 사용균주

인삼꽃 발효에 사용된 균주는 *B. subtilis* KCTC 1022 (BS), *L. plantarum* KCTC 3104(LP), *L. casei* KCTC 2180 (LC), *C. utilis* KCCM 50342(CU)로 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea) 및 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms,

Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. *S. cerevisiae* 균주들(*S. cerevisiae* strain CHY1011: Y1, *S. cerevisiae* strain ZP 541: Y2)은 빵 발효에 이용되는 효모를 사용하였으며, 18S rRNA 서열의 유사성에 근거하여 가장 가까운 종을 표시하였다. BS는 nutrient broth에서, LP 및 LC는 Lactobacilli MRS broth에서, CU, Y1, Y2는 YM broth에서 배양하였다. BS, CU, Y1, Y2는 30°C, LP, LC는 37°C에서 24시간 주기로 3회 계대배양 후 600 nm에서 흡광도 값이 0.4~0.6( $1 \times 10^5$  CFU/mL) 범위 안에 들게 하여 발효 균주로 사용하였다.

### 사용균주에 따른 인삼꽃 발효액의 배양 특성

균주의 성장에 따른 배양액의 pH의 변화는 24시간 배양 후 여과지(Whatman No. 4)에 여과한 다음 pH meter를 사용하여 측정하였다. 혼탁도 측정은 24시간 배양 후 여과된 발효액의 흡광도를 UV/Visible spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 600 nm에서 측정하여 미생물의 발효 정도를 확인하였다. 생균수 측정은 24시간 배양한 인삼꽃 발효액을 여과하여 멸균된 생리식염수에 희석해 측정하였다. 발효 희석액을 충분히 혼합한 후, plate count agar (PCA) 및 potato dextrose agar(PDA) 배지에 분주한 후 각각 37°C, 30°C에서 24시간 배양하여 생균수를 측정하였으며, 모든 실험구는 4회 반복으로 실험하였다.

### 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin과 Denis의 방법(10)에 따라 측정하였다. 시료를 증류수에 녹여 추출한 뒤 시료 0.2 mL에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 증류수를 1:2로 섞은 혼합액 0.2 mL를 첨가하고 암실에서 3분 방치 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 mL를 가하여 1시간 다시 암실에 방치 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준곡선은 gallic acid를 이용한 표준 검량식에 적용하여 1 g에 대한 mg gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다.

### DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거능은 Blois(11)의 방법에 준하여 농도 별로 제조한 시료 1 mL에 0.2 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Chemical Co.)용액 1 mL를 넣은 후 vortex mixer를 사용하여 실온에서 30분간 반응시켜 methanol 용액을 blank로 하여 517 nm에서 UV/Visible spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu)로 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음과 같은 계산식에 의해 환산하여, 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

DPPH radical scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

### ABTS radical 소거활성 측정

총 항산화력 측정은 Pellegrin 등(12)의 ABTS radical 소거능에 따라서 측정하였다. 7 mM ABTS와 140 mM potassium persulfate 용액을 혼합하여 하루 동안 어두운 곳에 방치하여  $ABTS^{\cdot+}$ 를 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이  $0.70 \pm 0.02$ 가 되도록 50% ethanol로 희석하였다. 희석된  $ABTS^{\cdot+}$  용액 1 mL에 50% ethanol에 농도별로 희석된 추출액 50  $\mu$ L를 가하여 흡광도의 변화를 정확히 3분 후에 측정하였으며, 다음의 식에 의해 저해율을 환산하여 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

ABTS radical scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

### FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정

FRAP 측정 방법은 Benzie와 Strain(13)의 방법을 참고하여 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma Chemical Co.) 5 mL와 20 mM ferric sulfate(FeSO<sub>4</sub>) 2.5 mL를 가하여 제조하였다. 제조된 0.9 mL FRAP reagent에 5 및 2.5 mg/mL의 농도로 용해시킨 시료 0.03 mL와 증류수 0.09 mL를 넣은 다음 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 593 nm에서 UV/Visible spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료 대신 에탄올을 넣어 측정하였다.

### 환원력 측정

환원력은 Oyaizu(14)의 방법에 따라 측정하였다. 농도를 각각 달리하여(2.5, 5, 10, 20 mg/mL) 첨가한 화합물 1에 sodium phosphate buffer(0.25 mL, 200 mM, pH 6.6)와 potassium ferricyanide(0.25 mL, Sigma Chemical Co.)를 혼합시켰다. 그리고 혼합물을 50°C에서 20분 동안 배양시킨 후 tri-chloroacetic acid(0.25 mL, 10%, w/v)를 첨가시킨 후 10분 동안 3,000 rpm으로 원심분리를 시켜 상정액(0.5 mL)에 탈이온수(0.5 mL)와 1% ferric chloride(0.1 mL, Sigma Chemical Co.)를 첨가시켰고, UV/Visible spectrophotometer(UV-1800, Shimadzu)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였으며, 그 결과는 IBM SPSS Statistics 19.0 software system(Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 분산분석(ANOVA)을 실시하여 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

Table 1. pH value, turbidity and viable cell count in the broth of ginseng flower-buds fermented by microorganism

Microorganism <sup>1)</sup>	pH	Turbidity <sup>4)</sup>	Viable cell count (log CFU/mL)
BS	4.76 ± 0.01 <sup>2)a3)</sup>	1.77 ± 0.01 <sup>bc</sup>	9.44 ± 0.07 <sup>a</sup>
LP	3.74 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.81 ± 0.02 <sup>bc</sup>	6.34 ± 1.14 <sup>b</sup>
LC	3.52 ± 0.00 <sup>f</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>d</sup>	6.31 ± 1.65 <sup>b</sup>
CU	3.68 ± 0.00 <sup>e</sup>	1.73 ± 0.04 <sup>c</sup>	7.47 ± 0.46 <sup>b</sup>
Y1	3.92 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.05 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.48 ± 0.01 <sup>b</sup>
Y2	4.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	2.04 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.71 ± 0.20 <sup>b</sup>
M	3.52 ± 0.00 <sup>f</sup>	1.84 ± 0.06 <sup>b</sup>	7.71 ± 0.64 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>BS, *B. subtilis*; LP, *L. plantarum*; LC, *L. casei*; CU, *C. utilis*; Y1, *S. cerevisiae* strain CHY1011; Y2, *S. cerevisiae* strain ZP 541; M, microbial consortium fermented with LP, LC and CU.

<sup>2)</sup>Mean ± SD (n=4).

<sup>3)</sup>Different letters within a same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

<sup>4)</sup>Turbidity measurement based on OD<sub>600</sub> in the broth of ginseng flower-buds fermented by microorganism.

## 결과 및 고찰

### 사용균주에 따른 인삼꽃 발효액의 배양성 결과

인삼꽃의 발효 정도를 확인하기 위해 발효 미생물별로 24 시간 발효시킨 인삼꽃 발효액의 pH 변화를 측정하였다. Table 1에서와 같이 pH 값은 발효하지 않은 배지에서  $6.27 \pm 0.02$ 인 반면(data not shown), 발효한 배지에서는  $3.52 \sim 4.76$ 이 되어 발효에 의해 pH가 낮아져 모든 실험군에서 모두 발효가 일어났음을 확인할 수 있었다. 이 중 BS 균주를 이용한 발효군에서  $4.76 \pm 0.01$ 로 가장 높은 pH 값을 보였으며, Y2, Y1, LP, CU, LC 및 M의 순서로 나타났다. 보통 BS를 이용한 발효의 경우 pH 변화가 적으며 이는 본 연구에서도 BS가 가장 영향을 덜 주는 것으로 확인되었다. 미생물이 일정한 배수로 증가하는 활동은 흡광도 측정(OD<sub>600</sub>)으로 부유된 미생물의 양을 측정함으로써 판단할 수 있어(15) 발효 후 미생물 성장에 의한 혼탁도 분석 결과(Table 1), 발효전의 혼탁도는  $0.01 \sim 0.03$ (data not shown)의 범위를 나타내었으며 인삼꽃 발효액의 혼탁도는 LC( $0.25 \pm 0.04$ )를 제외하고 1.70 이상을 나타내었다. LC의 경우 pH 측정 실험에서 발효에 의해 pH 값이 감소된 것을 확인하였으며 48시간 배양 시 OD<sub>600</sub> 값은 0.17로 24시간 발효했을 때보다 낮은 OD<sub>600</sub> 값을 보였다. 인삼꽃 발효액이 미생물 성장에 미치는 영향을 검토하기 위해 24시간 발효 후 생균수를 측정된 결과(Table 1), 발효 전 생균수가  $5.71 \sim 6.71$ (data not shown)의 범위를 나타내는데 비해 발효 후에는  $6.31 \sim 9.44$  log CFU/mL의 생균수를 나타내었다. BS 처리군에서  $9.44 \pm 0.07$  log CFU/mL로 가장 높게 나타났으며, 다른 군들에서는 유의적 차이를 보이지 않았다( $p < 0.05$ ). Park 등(6)의 연구에서는 24시간 배양한 1% 백삼분말 배지를 MRS 배지에서 생균수 측정 시 LP 및 LC의 생균력이 각각 8.10 log CFU/mL 및 4.70 log CFU/mL로 나타났다고 보고하였는데, 이는 본 연구의 생균수 측정 실험에서 LC를 이용하여 발효했을 때 생균수가 다른 발효군

Table 2. The total polyphenol content of fermented ginseng flower-buds by various microorganism

Microorganism <sup>1)</sup>	Total polyphenol content (GAE mg/g, dry basis)
Control	44.22 ± 0.69 <sup>2)a3)</sup>
BS	40.21 ± 0.22 <sup>b</sup>
LP	27.72 ± 0.04 <sup>g</sup>
LC	32.15 ± 0.63 <sup>e</sup>
CU	30.49 ± 0.27 <sup>f</sup>
Y1	34.54 ± 0.20 <sup>d</sup>
Y2	36.08 ± 0.08 <sup>c</sup>
M	27.41 ± 2.11 <sup>g</sup>

<sup>1)</sup>Control, water extract of ginseng flower-buds; BS, *B. subtilis*; LP, *L. plantarum*; LC, *L. casei*; CU, *C. utilis*; Y1, *S. cerevisiae* strain CHY1011; Y2, *S. cerevisiae* strain ZP 541; M, mixed strain culture with LP, LC and CU.

<sup>2)</sup>Mean ± SD (n=3).

<sup>3)</sup>Different letters differ significantly (p<0.05).

들에 비해 적게 측정된 것과 비슷한 결과이다. 따라서 24시간 배양하여 인삼꽃 발효액을 제조했을 때 pH, 흡광도 측정, 생균수 측정 결과 충분한 미생물 성장에 의해 인삼꽃 발효가 잘 진행되었음을 확인하였다.

#### 인삼꽃 발효물의 총 폴리페놀 함량

폴리페놀계 물질들은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(-OH)기를 가진 방향족 화합물들을 총칭하며, 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원 반응에서 기질로 작용한다. 플라보노이드와 탄닌이 주된 식물계 폴리페놀 물질이며, 충치 예방, 고혈압 억제, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(16). 6종의 단일균주 및 혼합균주를 이용하여 발효시킨 인삼꽃 발효물의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과(Table 2), 무발효 추출물이 44.22 GAE mg/g으로 발효시킨 인삼꽃에 비해 유의적(p<0.05)으로 높은 값을 나타내었으며, 발효균주 중에서는 BS로 발효시킨 것이 40.21 GAE mg/g으로 가장 높게 나타났으며, 그 뒤로 Y2(36.08), Y1(34.54), LC(32.15), CU(30.49), LP(27.72) 및 혼합균주(27.41) 순으로 함량을 나타내었다. Doh 등(17)은 연구에서 발효인삼의 폴리페놀류 함량 측정 결과, 무발효 추출물은 61.92 mg/10 g으로 나타났고 *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* 및 *Streptococcus thermophilus*로 발효한 발효 추출물은 9.18~17.05 mg/10 g으로 나타나 발효 시에 무발효 추출물의 폴리페놀 함량보다는 낮았다고 보고하고 있어 본 연구와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 인삼과 마찬가지로 인삼의 부산물인 인삼꽃의 경우에도 발효에 의해 폴리페놀 함량이 감소하는 것으로 여겨진다.

#### 인삼꽃 발효물의 radical 소거능

항산화 활성 측정 방법 중 DPPH 라디칼 소거법은 실제 항산화 활성과 연관성이 높은 방법으로서, 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질의 산화를 억제시키는 척도로 사용

Table 3. DPPH and ABTS radical scavenging activity of fermented ginseng flower-buds by various microorganism

Microorganism <sup>1)</sup>	DPPH radical scavenging activity	ABTS radical scavenging activity
	IC <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>2)</sup>	
Ascorbic acid	0.03 ± 0.00 <sup>3)g4)</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>e</sup>
Control	1.16 ± 0.03 <sup>e</sup>	4.28 ± 0.13 <sup>a</sup>
BS	0.73 ± 0.02 <sup>f</sup>	1.13 ± 0.05 <sup>d</sup>
LP	2.13 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.08 <sup>b</sup>
LC	1.71 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.28 ± 0.13 <sup>bc</sup>
CU	1.49 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.74 ± 0.08 <sup>cd</sup>
Y1	1.79 ± 0.19 <sup>c</sup>	2.06 ± 0.71 <sup>bc</sup>
Y2	1.48 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.89 ± 0.55 <sup>bc</sup>
M	1.92 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.12 ± 0.65 <sup>bc</sup>

<sup>1)</sup>Control, water extract of ginseng flower-buds; BS, *B. subtilis*; LP, *L. plantarum*; LC, *L. casei*; CU, *C. utilis*; Y1, *S. cerevisiae* strain CHY1011; Y2, *S. cerevisiae* strain ZP 541; M, mixed strain culture with LP, LC and CU.

<sup>2)</sup>Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determinations, obtained by interpolation of concentration inhibition curve.

<sup>3)</sup>Mean ± SD (n=5).

<sup>4)</sup>Different letters within a same column differ significantly (p<0.05).

되고 있을 뿐 아니라, 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다(18). DPPH 법은 특히 수소공여성을 측정하는 대표적인 방법으로 수소공여 항산화물질의 특징은 hydroxyl기를 하나 이상 함유하고 있는 환구조(ring)와 메틸기나 비극성 탄화수소 사슬 구조와 같은 비극성기를 가지고 있으며, 식품에 함유되어 있는 폴리페놀계 물질이 이와 같은 분자 구조적 특징을 가지고 있는 대표적인 항산화 물질이다(19).

인삼꽃 발효액의 DPPH radical 소거활성은 Table 3에 나타내었다. 무발효 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 1.16 mg/mL의 활성을 나타냈으며, 전체적으로는 BS 발효물에서 0.73 mg/mL로 가장 높은 활성을 나타내었다. 그 뒤로 Y2(1.48 mg/mL), CU(1.49 mg/mL), LC(1.71 mg/mL), Y1(1.79 mg/mL), M(1.92 mg/mL), LP(2.13 mg/mL) 순으로 DPPH radical 소거활성이 높은 경향을 보였다. 총 페놀성 화합물 함량이 높았던 BS 및 Y2에서 DPPH radical 소거활성 역시 높게 나타났으며 특히 BS 발효물의 경우 페놀 함량이 가장 높게 나타난 무발효 추출물보다 DPPH radical 소거능이 높았는데 이는 미생물에 발효에 일어난 의한 ginsenoside 전환에 의해 항산화 활성을 나타내는 ginsenoside 함량이 증가하였기 때문인 것으로 사료되며, ginsenoside Rh2, Rb1, RC 등이 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(20).

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]는 비교적 안정한 free radical로서 DPPH 방법과 함께 항산화활성을 스크리닝하는데 많이 이용되고 있다. 또한 lipophilic 또는 hydrophilic 항산화 물질의 측정에 적용 가능한 방법으로 이 방법에 의한 항산화 활성은 ABTS radical을 억제하거나 소거하는 것에 의해 이루어진다(12). ABTS를

peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응시켜 활성 양이온인 ABTS<sup>+</sup>이 형성 되면 추출물의 항산화력에 의해 ABTS<sup>+</sup>이 소거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 수치로 나타내어 추출물의 항산화 활성을 평가할 수 있다(12).

인삼꽃 무발효 추출물 및 발효물의 ABTS radical 소거활성을 평가한 결과, Table 3에 나타낸 바와 같이 인삼꽃 무발효 추출물에서 4.28 mg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보여 발효액과 비교했을 때 가장 낮은 활성을 나타내었다. 인삼꽃 발효물은 BS (1.13 mg/mL), CU(1.74 mg/mL), Y2(1.89 mg/mL), Y1(2.06 mg/mL), M(2.125 mg/mL), LC(2.28 mg/mL), LP(2.63 mg/mL)의 순으로 항산화 활성이 높았으며, DPPH radical 소거능 측정 결과와 마찬가지로 BS 발효물의 활성이 가장 높았으나 다른 미생물 발효물의 ABTS radical 소거활성은 DPPH radical 소거활성과는 차이를 나타내었다. 일반적으로 반응속도가 빠른 ABTS 라디칼과는 달리 DPPH 라디칼의 반응속도는 화합물에 따라서 매우 다르다고 알려져 있는데, 비타민 C의 경우 EC50 농도에서 동적평형상태(steady state)로 도달하는 시간이 75분인데 반해 rutin의 경우 103분이 걸린다고 알려져 있다(21). 앞서 언급한 바와 같이 ABTS radical은 DPPH radical과 달리 극성과 비극성 물질 모두와 반응하여 소거되며(22), ABTS 라디칼과 잘 반응하는 항산화 물질이 DPPH와는 전혀 반응하지 않을 수도 있다고 알려져 있다(23). 따라서 각각의 미생물에 대한 발효 생성물의 차이가 ABTS 및 DPPH radical 소거활성에 대한 차이를 나타내었다고 사료된다.

인삼꽃 발효물의 FRAP(ferric reducing antioxidant power) value

FRAP value의 측정은 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) 복합체가 파란색의 ferrous tripyridyltriazine(Fe<sup>2+</sup>-TPTZ)으로 환원될 때 발생하는 청색과장을 593 nm에서 측정하여 환원력을 계산하는 방법으로 라디칼 소거방식의 항산화 측정법과는 다른 메커니즘의 항산화 측정법으로 흡광도의 변화는 반응 혼합물속에 존재하는 전자를 공여하는 항산화제의 전체 환원능력 또는 결합 능력과 직접 관련이 있으며 라디칼 소거방식의 항산화 측정법과는 다른 메커니즘의 항산화 측정법이다(13,24,25). 실험 결과 무발효 추출물의 FRAP value는 3.03 mM로 가장 높은 활성을 나타내었으나 BS 발효물과는 유의적 차이를 보이지 않았다(p<0.05). 발효물 중에서는 BS에서 3.02 mM로 가장 높았고 그 뒤로 Y1, Y2, LC, CU, M, LP 순서로 각각 2.54 mM, 2.46 mM, 2.34 mM, 2.23 mM, 2.05 mM, 1.74 mM의 활성을 나타내었다(Table 4). 상황버섯 균사체를 이용한 발효 홍삼의 경우 비발효 홍삼(47.2 mM)에 비해 발효 홍삼에서 높은 FRAP 활성(95.8 mM)을 나타내었다고 보고(26)하고 있으며, Chaiyasut 등(27)은 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 발효한 태국대두의 경우 발효에 의해 FRAP value가 증가하였다고 보고하였으나, 본 연구에서는 BS 발효물을 제

Table 4. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) value of fermented ginseng flower-buds by various microorganism

Microorganism <sup>1)</sup>	FRAP value (mM)
Control	3.03±0.13 <sup>2)a3)</sup>
BS	3.02±0.30 <sup>a</sup>
LP	1.74±0.10 <sup>d</sup>
LC	2.34±0.04 <sup>bc</sup>
CU	2.23±0.08 <sup>bc</sup>
Y1	2.54±0.06 <sup>b</sup>
Y2	2.46±0.24 <sup>b</sup>
M	2.05±0.12 <sup>cd</sup>

<sup>1)</sup>Control, water extract of ginseng flower-buds; BS, *B. subtilis*; LP, *L. plantarum*; LC, *L. casei*; CU, *C. utilis*; Y1, *S. cerevisiae* strain CHY1011; Y2, *S. cerevisiae* strain ZP 541; M, mixed strain culture with LP, LC and CU.

<sup>2)</sup>Mean±SD (n=5).

<sup>3)</sup>Different letters differ significantly (p<0.05).

Table 5. Reducing power of fermented ginseng flower-buds by various microorganism

	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL
Control <sup>1)</sup>	0.16±0.56 <sup>2)e3)</sup>	0.48±0.04 <sup>d</sup>	0.72±0.09 <sup>a</sup>	1.64±0.95 <sup>abc</sup>
BS	0.17±0.42 <sup>e</sup>	0.50±0.02 <sup>cd</sup>	0.68±0.06 <sup>a</sup>	0.90±0.24 <sup>c</sup>
LP	0.34±0.45 <sup>bc</sup>	0.58±0.11 <sup>bcd</sup>	0.71±0.01 <sup>a</sup>	1.67±0.85 <sup>abc</sup>
LC	0.38±0.50 <sup>a</sup>	0.83±0.23 <sup>a</sup>	0.80±0.08 <sup>a</sup>	2.56±0.28 <sup>a</sup>
CU	0.31±0.46 <sup>c</sup>	0.77±0.07 <sup>ab</sup>	0.80±0.09 <sup>a</sup>	2.41±0.92 <sup>ab</sup>
Y1	0.26±0.41 <sup>d</sup>	0.84±0.05 <sup>a</sup>	0.73±0.21 <sup>a</sup>	1.44±0.45 <sup>abc</sup>
Y2	0.37±0.39 <sup>ab</sup>	0.71±0.06 <sup>abc</sup>	0.61±0.06 <sup>b</sup>	1.33±0.50 <sup>bc</sup>
M	0.26±0.39 <sup>d</sup>	0.70±0.16 <sup>abc</sup>	0.49±0.09 <sup>b</sup>	0.99±0.24 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Control, water extract of ginseng flower-buds; BS, *B. subtilis*; LP, *L. plantarum*; LC, *L. casei*; CU, *C. utilis*; Y1, *S. cerevisiae* strain CHY1011; Y2, *S. cerevisiae* strain ZP 541; M, mixed strain culture with LP, LC and CU.

<sup>2)</sup>Mean±SD (n=5).

<sup>3)</sup>Different letters within a same column differ significantly (p<0.05).

외하고 발효에 의해 FRAP value가 낮아지는 것으로 확인되었다.

#### 인삼꽃 발효물의 환원력

활성 산소종 및 유리기에 전자를 공여하는 능력이 환원력이며 환원력이 강할수록 녹색에 가깝게 발색되므로 항산화 활성이 큰 물질일수록 높은 흡광도 값을 나타낸다(28). 따라서 항산화 활성은 환원력과 함께 수반되며 일반적인 특징은 reductone의 존재와 관계되어 reductone이 peroxide의 어떤 전구체로서 반응하기 때문에 peroxide 형성을 억제한다고 보고되고 있다(29). 인삼꽃 무발효 추출물 및 발효물의 농도를 2.5, 5, 10, 20 mg/mL로 각각 달리하여 첨가한 후 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정한 결과는 Table 5와 같다. 5 mg/mL 농도에서 측정한 결과, 무발효 추출물에 비해 발효물들에서 더 높은 환원력을 나타내었으며, 10 mg/mL 농도군에서는 Y2 및 혼합균주 발효물을 제외한 모든 시료군에서 유의차를 보이지 않았다. 또한 이전의 항산화 실험에서 BS 발효물에서 높은 항산화 활성을 보인 것과는 다르게 환원력의 경우 LC 및 CU 발효물에서 높은 활성을

보였으며 이러한 결과는 발효에 관여하는 균주의 특성에 따라 생성되는 발효대사 산물인 항산화 물질의 차이에 의한 것으로 여겨진다.

## 요 약

인삼과 마찬가지로 많은 사포닌을 함유하고 있는 인삼꽃의 이용 가치를 증진시키기 위한 연구의 일환으로 *Bacillus subtilis*(BS), *Lactobacillus plantarum*(LP), *Lactobacillus casei*(LC), *Candida utilis*(CU), *Saccharomyces cerevisiae* strain CHY1011(Y1), *Saccharomyces cerevisiae* strain ZP 541(Y2), 혼합발효(M) 등의 여러 유용 미생물을 이용하여 인삼꽃을 발효시킨 후 미생물별 인삼꽃 발효물에 대한 항산화 활성 변화를 탐색하였다. 총 페놀함량 측정 결과 무발효 추출물은 인삼꽃 발효물에 비해 유의적( $p < 0.05$ )으로 높은 값을 보였으며, 발효 균주 중에서는 BS로 발효한 발효물이 가장 높은 값을 나타내었다. DPPH radical 소거활성 및 ABTS radical 소거활성 측정 결과 BS 발효물이 유의적으로 가장 높은 활성을 나타내었으나, FRAP value(10 mg/mL)는 무발효 추출물의 활성이 가장 높게 나왔으며 BS 발효물과는 유의차를 보이지 않았다. 환원력 측정 결과, 대체적으로 무발효 추출물에 비해 미생물 발효물에서 높은 활성을 나타내었으며 LC 발효물이 높은 활성을 나타내었다. 따라서 여러 유용미생물을 이용한 인삼꽃 발효의 경우 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효할 경우 다른 균주들을 이용하는 것보다 항산화 활성 증진에 우수한 효과를 나타낼 것으로 사료되며 다른 생리활성 증진 효과에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 할 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2011-0012449)이며 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

- Lee NR, Han JS, Kim JS, Choi JE. 2011. Effects of extraction temperature and time on ginsenoside content and quality in ginseng (*Panax ginseng*) flower water extract. *Korean J Medicinal Crop Sci* 19: 271-275.
- Nam KY. 2005. The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J Ginseng Res* 29: 1-18.
- Choi JE, Li X, Han YH, Lee KT. 2009. Changes of saponin contents of leaves, stems and flower-buds of *Panax ginseng* C.A. Meyer by harvesting days. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 251-256.
- Kim HG, Kim KY, Cha CJ. 2007. Screening for ginseng-fermenting microorganisms capable of biotransforming ginsenosides. *Korean J Microbiol* 43: 142-146.
- Senthil K, Veena V, Mahalakshmi M, Pulla R, Yang DC, Parvatham R. 2009. Microbial conversion of major ginsenoside Rb1 to minor ginsenoside Rd by Indian fermented food bacteria. *Afr J Biotechnol* 8: 6961-6966.
- Park SJ, 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: 88-94.
- Ramesh T, Kim SW, Sung JH, Hwang SY, Sohn SH, Yoo SK, Kim SK. 2012. Effect of fermented *Panax ginseng* extract (GINST) on oxidative stress and antioxidant activities in major organs of aged rats. *Exp Gerontol* 47: 77-84.
- Kong BM, Park MJ, Min JW, Kim HB, Kim SH, Kim SY, Yang DC. 2008. Physico-chemical characteristics of white, fermented and red ginseng extracts. *J Ginseng Res* 32: 238-243.
- Kim NY, Han MJ. 2005. Development of ginseng yoghurt fermented by *Bifidobacterium* spp. *Korean J Food Cookery Sci* 21: 575-584.
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azino-bis(3-ethyl-enebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 299: 379-389.
- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 230: 70-76.
- Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap J Nutr* 44: 307-315.
- Alpen EL, Mandel HG. 1960. A rapid assay method for tritium in bacterial cells. *Biochim Biophys Acta* 43: 317-321.
- 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. *Korean J Food Sci Technol* 38: 128-134.
- Doh ES, Chang JP, Lee KH, Seong NS. 2010. Ginsenoside change and antioxidation activity of fermented ginseng. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18: 255-265.
- Ahn SI, Heung BJ, Son JY. 2007. Antioxidative activity and nitrite-scavenging abilities of some phenolic compounds. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 19-24.
- Park JW, Lee YJ, Yoon S. 2007. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. *Korean J Food Culture* 22: 353-358.
- Kim KS, Lee KH, Choi KJ, Kwak YK, Sim KS, Lee KH, Chung HY. 1996. Screening of antioxidative components from red ginseng saponin. *Korean J Ginseng Sci* 20: 173-178.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53: 1841-1856.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Kim SJ, Kim SM, Kang SW, Um BH. 2010. The rapid detection of antioxidants from safflower seeds (*Carthamus tinctorius* L.) using hyphenated-HPLC techniques. *Korean J Food Sci Technol* 42: 414-419.

24. Griffin SP, Bhagooli R. 2004. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *J Exp Mar Biol Ecol* 302: 201-211.
25. Ku KM, Kim HS, Kim BS, Kang YH. 2009. Antioxidant activities and antioxidant constituents of pepper leaves from various cultivars and correlation between antioxidant activities and antioxidant constituents. *J Appl Biol Chem* 52: 70-76.
26. Ryu JS. 2012. Chemical composition and biological functions of red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) fermented by *Phelinus linteus* mycelia. *PhD Dissertation*. Dankook University, Chunan, Korea. p 66.
27. Chaiyasut C, Kumar T, Tipduangta P, Rungseewijitprapa W. 2010. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *As J Biotechnol* 9: 4120-4126.
28. Kim JH, Kim JK, Kang WW, Ha YS, Choi SW, Moon KD. 2003. Chemical composition and DPPH radical scavenger activity in different sections of safflower. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 733-738.
29. Duh PD. 1998. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *J Am Oil Chem Soc* 75: 455-461.

(2013년 1월 10일 접수; 2013년 3월 20일 채택)