

## LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포에서 수삼깍두기의 항염증 효과

김세미<sup>1</sup> · 전영주<sup>1</sup> · 심현지<sup>2</sup> · 이영은<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 대학원 식품산업융복합학과, <sup>2</sup>식품영양학과, <sup>3</sup>원광식품산업연구원

### Protective Effect of Fresh Ginseng *Kkakdugi* against LPS-induced Inflammation in RAW264.7 Macrophages

Se-Mi Kim<sup>1</sup>, Young-Joo Jeon<sup>1</sup>, Hyun-Ji Sim<sup>2</sup>, Young-Eun Lee<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Convergence Technology for Food Industry, Wonkwang University

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Wonkwang University

<sup>3</sup>Wonkwang Research Institute for Food Industry, Wonkwang University

### Abstract

This study was conducted to investigate the bioconversion of ginsenosides as well as anti-inflammatory activities of fresh ginseng *Kkakdugi* during fermentation. Fresh ginseng *Kkakdugi* reached proper ripeness, pH 4.30, and acidity 1.69% at 15°C after 10 days. Lactic acid bacteria grew until reaching  $1.10 \times 10^9$  CFU/mL after 20 days of fermentation, and  $\beta$ -glucosidase activity increased from 1.154 to 1.885 units/g. The bioconversion of ginsenosides was confirmed based on increased content of Rg3, an aglycone, from 0.13 to 0.17 mg/g during fermentation through HPLC. Fresh ginseng *Kkakdugi* did not display cytotoxicity up to the concentrations of 80  $\mu$ g/mL, regardless of ripening period. Nitrite production and expression of inflammation-related proteins, iNOS and COX-2, decreased in a dose-dependent manner regardless of ripening period. From these results, fresh ginseng *Kkakdugi* showed the bioconversion of ginsenosides to aglycone during the lactic acid fermentation as well as an anti-inflammatory effect through the reduction of NO production and iNOS and COX-2 expression.

**Keywords:** Fresh ginseng, fermentation, ginsenoside, biotransformation, anti-inflammation

## 1. 서 론

인삼은 오가과(Araliaceae)의 인삼속(*Panax genus*)에 속하는 다년생 음지성 초본식물로 한반도를 중심으로 한 동아시아로부터 시베리아 동부, 북미에 걸쳐 분포하고 있다(Hong 1980). 인삼의 주요한 생리활성 물질은 인삼사포닌(ginsenoside), polyacetylenes, 산성다당체, 인삼단백질, 페놀성물질 등이 알려져 있다(Namba 1980). 인삼사포닌은 구조적으로 triterpenoid dammarane 골격에 glucose, arabinose, xylose, rhamnose 등 당이 결합되어 생성된 배당체로 인삼의 가장 중요한 기능성 성분으로 인정되고 있다.

인삼을 추출하여 사용할 경우 가장 많이 얻어지는 진세노사이드는 Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>으로 비교적 분자량이 큰 진세노사이드가 추출이 된다. Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub> 이외에 인삼 내부에 Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>2</sub>, compound-K이 미량 존재하며 암세포 전이 억제작용, 혈소판 응집 억제 작용 등의 생리활성을 나타낸다(Keum et al.

2000; Kim & Yoon 1999; Bao et al. 2005). 인삼의 유효 성분은 장내 미생물에 의해 분비되며 배당체를 기질로 하는  $\beta$ -glucosidase 의해 glycoside결합이 끊어지고 체내 흡수되어 약리효과를 나타낸다. 홍삼 제조과정 중에도 열처리와 가수분해 반응에 의해 화학성분의 구조적 변환이 일어나 암세포 증식 억제 활성 성분인 ginsenoside-Rh<sub>2</sub>, -Rh<sub>4</sub>, -Rs<sub>3</sub>, -Rs<sub>4</sub>, -Rg<sub>5</sub>과 같은 특유 성분이 생성되기도 하고 암세포 전이 억제 효과를 나타내는 ginsenoside-Rg<sub>3</sub> 등의 일부 생리활성 성분의 함량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 이는 절대적 함량 증가가 아닌 ginsenoside의 구조 변환에 의한 증가로 G-Rb<sub>1</sub> 등의 PD계 ginsenoside로부터 Rg<sub>3</sub>, Re 또는 G-Rh<sub>1</sub>으로 변환되는 것이다(Ha 2010).

그러나 인삼 사포닌의 흡수 정도는 사람마다 달라 개인차가 나타난다. 그 이유는 사람마다 장내 세균총이 다르기 때문에 분해하는 능력도 차이가 있다고 보고 있다(Hasegawa et al. 1997). 따라서 최근에는 이러한 차이를 줄이고자 홍삼

\*Corresponding author: Young-Eun Lee, Department of Food and Nutrition, Wonkwang University, Iksan 570-749, Republic of Korea  
Tel: 82-63-850-6896 Fax: 82-63-850-6022 E-mail: yelee@wku.ac.kr

을 미리 발효시킨 발효 홍삼 형태가 많이 생산되고 있다. Chi et al.(2005)은 김치 유산균인 *Leuconostoc mesenteroides* 와 *Lactobacillus brevis*가 배당체 결합을 끊어주는  $\beta$ -glucosidase 효소를 생산한다고 보고하였고, Quan et al. (2008)은 ginsenoside Rb<sub>1</sub>이 compound-K로 배당체 전환이 되는 것을 보고하였다.

면역에는 선천성 면역과 후천성 면역이 있는데 이 중 선천성 면역반응의 하나인 염증은 우리 몸에서 가장 빈번히 발생되고 있는 방어작용의 하나이다. 주위 세포나 조직이 손상되면, 즉각적으로 이들 면역세포들(주로 phagocytes류)은 신속하게 손상을 극소화하는 일련의 염증반응을 유도하게 된다. 내독소 lipopolysaccharide (LPS)는 염증 유발원으로써 대식세포에서 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, interleukin (IL)-1 $\beta$ 와 같은 염증성 cytokine을 증가시켜 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) 등의 염증 매개 물질을 분비한다. 염증상태에서 유동성 cyclooxygenase (COX)-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 유도되면서 과량의 PGE2나 NO가 생성되면서 질병이 촉진되는 것이다(Lee & Lim 2008). COX는 arachidonic acid를 염증 반응에 관여하는 prostaglandin으로 변환시키는 효소단백질로 염증반응 조절에 중추적인 역할을 하는 COX-2 발현의 억제에는 염증과 통증을 완화시키는 효능을 나타낸다(Lawrence et al. 2002; Higuchi et al. 1990).

본 연구에서는 가격이 비교적 저렴한 4년근 수삼을 이용하여 염도 1.4%가 되도록 깎두기를 제조한 후 15°C에서 숙성시키면서 숙성기간에 따른 진세노사이드의 비배당체로의 전환여부와 각 숙성 시기별 항염증 효과 여부를 확인하고자 하였다.

## II. 연구 내용 및 방법

### 1. 수삼깎두기의 제조

#### 1) 수삼

실험에 사용된 수삼은 4년근 금산산으로 2014년도 금산농협을 통해 구입하여 사용하였다.

#### 2) 수삼깎두기 제조

부재료인 고춧가루(영양산), 새우젓(한성젓갈, 염도 25%), 마늘, 생강, 쪽파, 소금(천일염 NaCl 89.4%), 설탕, 참쌀풀을 사용하였다. 구입한 수삼을 놉두 부분을 제거하고 잔뿌리까지 깨끗이 세척한 후 체에 바쳐 건조시킨 후 종이타월로 여분의 물기를 닦아내어 최대한 물기를 제거하였다. 세척한 수삼을 1 cm 간격을 잘라 10% 소금물에 6시간 절여 사용하였고, 배합비는 Kim et al. (1998)의 방법을 참고하여 수삼 100%를 기준으로 <Table 1>의 비율에 따라 최종 염도가 1.4% 되도록 맞추었고, 뿌리와 몸통을 일정한 비율로 나눠 700g씩 밀봉하여 15°C 배양기에 저장하면서 실험하였다.

<Table 1> Ingredient ratio of fresh ginseng *Kkakdugi*

Ingredient	Ratio of materials (% ginseng wt basis)
Ginseng	100
Fermented shrimp sauce	5.00
Green onion	3.50
Red pepper	3.50
Galic	3.50
Salt	1.86
Sugar	2.00
Ginger	0.64
Glutinous rice paste (30%)	10.00

### 2. 이화학적 특성 및 관능평가

#### 1) pH 및 총산도 측정

시료를 채취하여 믹서(Braun 후드믹서-MP220, Germany)로 마쇄 후 거즈로 여과하여 고형물을 걸러낸 여과액을 사용하여 pH meter (Mettler Toledo-MP 220, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 산도는 여과액 10 mL를 취하여 0.1 N NaOH로 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 lactic acid 함량으로 나타내었다.

#### 2) 총 균수 및 유산균 수 측정

총 균수와 젖산균 수는 Collins & Lyne (1985)을 참고하여 수삼깎두기 국물 1 mL을 멸균생리식염수에 단계적으로 희석한 후 1 mL씩 pouring culture 방법으로 PCA (plate count agar) (Difco Lab, USA) 및 BCP (Bromocresol purple) 첨가 한천배지(Difco Lab, USA)에 접종하여 37°C에서 48시간 배양 후 황색 집락을 유산균 집락으로 계수하였다.

#### 3) 색도

색도는 색차계(CR-300, Minolta, Japan)를 이용하여 35×10 mm petri dish에 채우고 측정부위에 랩을 씌워 발효액에 기포가 생기지 않도록 한 후 Hunter L, a, b 값을 측정하였다.

#### 4) 관능평가

숙성기간에 따른 수삼깎두기 시료를 정량적묘사분석(quantitative descriptive analysis, QDA) 방법을 통해 20~60대 연령의 26명 패널에게 김치 평가방법에 대해 훈련시킨 후, 색, 향, 쓴맛, 신맛, 아삭한 정도는 강도(1점, 매우 약함, 5점 매우 강함)를 평가하게 하였고, 전반적인 기호도(1점 매우 싫어함, 5점 매우 좋아함)를 5점 척도법을 이용하여 관능평가하게 하였다(Kim & Kim 1994; Ku et al. 2006).

### 3. $\beta$ -Glucosidase 활성 측정

Kim & Yoon(1999)의 방법을 참고하여 수삼깎두기 국물 2 mL에 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 20 mL를 첨가하여 밀봉한 후 실온에서 4시간 진탕추출 한다. 4°C 1,000

&lt;Table 2&gt; The condition of mobile phase in HPLC-MS/MS

Time (min)	Mobile phase*	
	Solvent A	Solvent B
Initial	80	20
0.1	80	20
2	68	32
7	67	33
20	48	52
23	47	53
26	20	80
26.9	0	100
27	80	20
30	80	20

\*Eluent A: 100% water; Eluent B: 100% acetonitrile

rpm에서 1시간 동안 원심분리 후 상층을 취하여 4배의 냉각 ethanol을 충분히 혼합시킨 후 0°C에서 10,000 rpm으로 40분간 원심분리 후 침전물을 효소액으로 실험에 사용하였다.  $\beta$ -glucosidase 활성측정은 Peralta 방법(1997)을 이용하여 효소액을 30°C에서 5분간 미리 활성화시키고, 0.2 M sodium phosphate- $\beta$ -glucopyranoside 용액과 혼합 후 30°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 첨가하여 반응을 증진시켜 유리되는 p-nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 1단위는 반응시간 분당 생성되는 p-nitrophenol 1  $\mu\text{mole}$ 을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

#### 4. HPLC-MS/MS에 의한 진세노사이드 분석

메탄올 5 mL에 녹인 추출물 시험용액을 HPLC-MS/MS에 주입하여 분석하였다. HPLC분석 column 은 Discovery® C18 (250×4.6 mm, ID 5  $\mu\text{m}$ , Supelco), 시료주입량은 20  $\mu\text{L}$ , 이동상은 water (solvent A)과 acetonitrile (solvent B)의 gradient 조건을 이용하였고 유속은 1.0 mL/min, UV detector로 203 nm에서 측정하였다. Gradient 조건은 <Table 2>에 제시하였다.

#### 5. 항염증 효과

##### 1) 추출물 제조

열풍건조기에 60°C로 건조한 수삼각두기를 마쇄하여 분말로 제조한 후 검체 5 g에 n-부탄올 50 mL를 첨가하여 환류 냉각시켜 부탄올 층은 농축플라스크에 옮겨 감압농축 후 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

##### 2) RAW264.7 세포배양

한국세포주은행에서 동결상태로 구입한 RAW264.7 마우스 대식세포주를 FBS (10%), penicillin (100 U/mL)와 streptomycin sulfate (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다.

##### 3) 세포 생존률 측정

수삼각두기의 RAW264.7 대식세포에 대한 세포독성을 측정하고 실험 시 처리 농도를 결정하기 위해 MTT assay를 사용하였다. 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고 새로운 배지를 넣어준 후 DMSO에 녹인 수삼각두기 1일 (GK1), 10일 (GK10) 및 20일째 (GK20) 시료를 다양한 농도 (10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 각각 RPMI 1640 배지에 희석하여 첨가하였다. DMSO의 처리 농도는 배지 대비 0.1% 이하가 되도록 하였다. 이를 다시 24시간 배양한 후에 배지를 제거하고 MTT시약 (5 mg/mL)을 넣고, 4시간 동안 방치한 후 상층액을 제거하였다. 형성된 formazan의 각 well에 DMSO 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가한 후 orbital shaker를 이용하여 녹이고, 30분 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였으며, 대조군 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

##### 4) Nitrite assay

Nitrite assay는 NO생성 양을 측정하는 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 배양된 세포를  $4 \times 10^5$  cells/well 수준으로 24 well plate에 1 mL씩 배양한 다음 24시간 동안 배양하고, 24시간 후 medium을 제거한 후 RPMI 1640으로 희석된 각 농도별 시료 처리 후 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 24시간 후 세포에서 medium으로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess 시약 [0.1% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid]을 사용하여 반응하였다. 반응 후 ELISA microplate reader (Bio Rad Laboratories Inc., USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다. 생성된 NO 양은  $\text{Na}_2\text{NO}_2$ 를 표준물질로 비교하였다. NO 생성억제 효과는 수삼각두기 추출물을 농도별로 처리 후 LPS를 처리하여 측정된 실험군의 흡광도 값에서 LPS를 처리하지 않은 대조군과의 흡광도 값의 차이를 구하여 계산하였다.

##### 5) Western blot analysis

RAW264.7 대식세포를  $4 \times 10^5$  cells/well 밀도로 24시간 배양한 후 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. RAW264.7 대식세포에 RIPA® buffer를 첨가한 다음, 4°C, 14,000×g에서 25분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA) 단백질 실험 키트를 이용하였고 각각의 시료를 12% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane (NC membrane)으로 전사하였다. 전사된 NC membrane을 5% blocking buffer (0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 blocking한 후 iNOS, COX-2 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 2차 antibody를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응한 다음, ECL 용액을 1:1로 잘

섞어서 NC membrane 위에 가하여 발광시키고 암실에서 X 선 필름에 감광한 후 현상하였다. 같은 방법으로 actin antibody를 이용하여 actin을 측정한다.

6. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복하여 이루어졌으며, SPSS (Statistical Package for the Social Science, ver. 12.0 for Windows) program을 사용하여 이화학적 분석은 ANOVA 분석을 통해 통계처리 하였고, 또한 *in vitro* 실험결과는 Student's t-test 방법을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 수삼깍두기의 이화학적 특성 및 관능평가

1) pH 및 산도

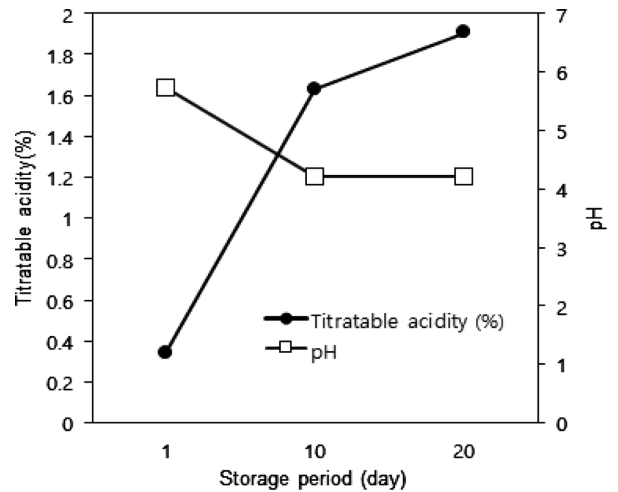
수삼깍두기의 pH 및 산도 변화는 <Figure 1>과 같이 숙성이 진행되며 감소하였다. 1일째(5.73±0.00, 0.73%), 10일째(4.30±0.00, 1.69%), 20일째(4.2±0.00, 1.90%)로 변화하였고 pH는 10일째 급격하게 감소되었고 산도는 숙성됨에 따라 증가함을 보였다. 일반적으로 김치의 숙성 기준으로 pH 4.2~4.5와 적정 산도 0.6~0.8%이라고 제시되어 있는데, 15°C 숙성시킨 수삼깍두기는 10일째 숙성적기에 도달하였다고 할 수 있다. Ku 등(2006)의 인삼이 첨가된 배추김치의 발효 중 품질특성 연구결과를 보면 절임배추와 인삼 비율(30:70)로 하였을 때, pH와 산도는 1일째(5.68±0.01, 0.24%)에서 10일째(4.16±0.01, 0.70%), 25일째(4.16±0.01, 1.00%)로 pH가 급격하게 감소한 후 변화가 적게 나타남을 확인하였고 이는 본 실험과 유사한 경향을 나타냈다.

2) 수삼깍두기의 총균수 및 유산균수

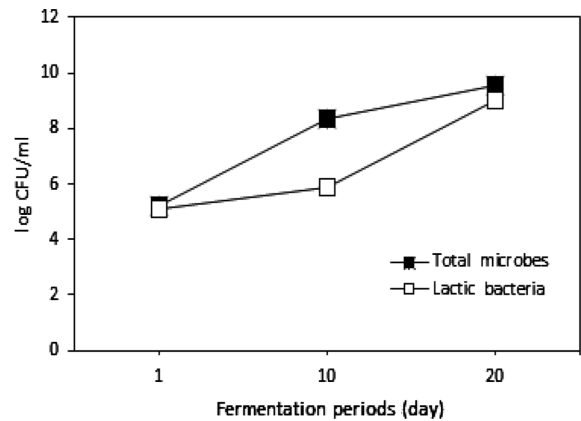
숙성초기에는 총균수와 유산균수는 1.17×10<sup>6</sup>, 1.28×10<sup>7</sup>이며, 10일째는 2.39×10<sup>8</sup>, 7.63×10<sup>6</sup>, 20일째는 3.40×10<sup>9</sup>, 1.10×10<sup>9</sup> CFU/mL로 숙성이 진행될수록 총 균수가 급증하고 젖산균수도 증가하였다<Figure 2>. 김치는 발효를 하면서 미생물들에 의해 생성된 부산물인 유기산에 의해 신맛을 나타낸다고 하였다(Park & Lee 2005). 따라서 수삼깍두기도 숙성이 진행될수록 젖산균 수 증가함에 따라 산도가 증가함을 확인할 수 있었다.

3) 색도 변화

수삼깍두기를 믹서기로 분쇄 후 색도계를 이용하여 Hunter's color value인 L (lightness), a (redness), b (yellowness) 값을 측정하였다. <Table 3>에 제시한 바와 같이 명도(L), 적색도(a), 황색도(b)값은 각각 1일(L: 54.90, a: 21.70, b: 19.34), 10일째(L: 38.62, a: 19.70, b: 18.70), 20일째(L: 37.85 a: 21.70, b: 18.16)로 적색도와 황색도는 숙성기간 중 유의적인 차이가 없었으나 숙성됨에 따라 명도는 약간 어두워지며 색의 강



<Figure 1> Change in pH and titratable acidity of fresh ginseng Kkakdugi during fermentation period



<Figure 2> Change in total microbes and lactic acid bacteria of fresh ginseng Kkakdugi during fermentation period

<Table 3> Hunter's color values L, a, b of fresh ginseng Kkakdugi during fermentation period

	L	a	b
1 day	54.90±0.02 <sup>a</sup>	21.70±0.03	19.34±0.02
10 day	38.62±0.01 <sup>b</sup>	19.70±0.16	18.70±0.01
20 day	37.85±0.04 <sup>b</sup>	19.39±0.02	21.70±0.00

<sup>a-b</sup>Means with different letters in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

도는 진해지는 것으로 나타났다(p<0.05). 이러한 결과는 김치 여과액으로 색상 변화를 본 Hong et al.(1995)의 연구에서 L, a값이 전반적으로 감소한다는 연구결과와 비슷하였고, 15°C에서 14일 동안 발효시켰을 때 김치의 색도변화를 비교한 Ku et al.(1988)의 연구결과를 보면 L값(31.8)으로 14일 동안 본 연구와 비슷한 수준으로 나타났지만 발효되는 동안 L값은 증가되는 양상을 보이며 본 연구와는 다른 결과를 보였다.

<Table 4> Sensory characteristics of fresh ginseng *Kkakdugi*

	Color	Flavor	Bitterness	Sourness	Crispiness	Overall acceptability
1 day	2.56±0.84 <sup>bc</sup>	3.00±0.95	3.35±1.15	2.48±0.95 <sup>bc</sup>	1.43±0.51	2.26±1.21 <sup>b</sup>
10 days	2.74±0.69 <sup>b</sup>	2.87±1.01	3.04±0.88	2.69±1.11 <sup>b</sup>	1.22±0.42	3.56±0.95 <sup>a</sup>
20 days	3.22±0.85 <sup>a</sup>	2.69±1.18	2.82±1.30	3.17±1.07 <sup>a</sup>	1.30±0.47	3.26±1.39 <sup>ab</sup>

<sup>a-c</sup>Means with different letters in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

<Table 5> β-Glucosidase activities and ginsenoside content of fresh ginseng *Kkakdugi*

	β-glucosidase activities (unit/g)	Rb <sub>1</sub> +Rg <sub>1</sub> (mg/g)	Rg <sub>3</sub> (mg/g)
1 day	1.154±0.05 <sup>b</sup>	0.85±0.02 <sup>b</sup>	0.13±0.01 <sup>b</sup>
10 days	1.308±0.02 <sup>b</sup>	0.78±0.01 <sup>b</sup>	0.10±0.01 <sup>b</sup>
20 days	1.885±0.01 <sup>a</sup>	1.05±0.01 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup>Means with different letters in same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

4) 관능 특성

수삼각두기의 색은 숙성기간에 따른 유의적인 차이는 없었으나, 숙성됨에 따라 고춧가루가 어우러져 색깔이 진해지는 것으로 나타났다. 수삼각두기의 전반적인 기호도는 숙성기간이 10일이 지나면 신맛이 생기기 시작하면 인삼 특유의 향과 쓴맛이 감소하면서 보통 이상을 나타내었으며, 10일째가 숙성적기로 가장 좋아 3.56점을 나타내었다. 숙성되었을 때 생 것일 때 보다 기호도가 좋아지는 것으로 나타났다 <Table 4>. 그러나 수삼은 무와 달리 육질이 단단하여 아삭한 정도에서 점수가 좋지 않으므로 텍스처를 향상시키는 방안만 연구된다면 숙성됨에 따라 인삼의 향과 쓴맛은 줄어들어 수삼각두기는 숙성적기를 넘겨 장기간 숙성하며 섭취하였을 때 오히려 전반적인 기호도를 좋게 하여 고부가가치화할 수 있을 것으로 생각되었다.

2. β-Glucosidase 활성

β-Glucosidase는 당을 가수분해 하는 효소이다. 숙성기간에 따른 β-glucosidase 활성을 분석 결과는 <Table 5>에 나타나 있으며, 숙성이 진행됨에 따라 1일째(1.154±0.05 units/g), 10일째(1.308±0.02 units/g), 20일째(1.885±0.01 units/g)으로 효소활성이 증가함을 확인하였다. Kim et al.(2010)의 연구에서 미생물, 효소를 이용한 생물학적 전환은 미생물이 가지고 있는 β-glucosidase를 이용하여 비배당체 부분에 결합된 당을 가수분해하여 사포닌의 전환을 유도할 수 있음을 보여주고 있다. 김치로부터 분리한 β-glucosidase 활성 유산균인 *Lactobacillus brevis*에서 ginsenoside 전환을 확인하였으며, *L. brevis*는 김치 발효 후기에 나타나는 유산균으로 발효가 진행될수록 효소활성이 증가될 수 있음을 알 수 있었다(Yi et al. 2012).

3. HPLC-MS/MS에 의한 진세노사이드 분석

배당체 형태의 ginsenoside인 Rb1과 Rg1의 함량도 숙성기간이 증가함에 따라 조금씩 증가하는 경향이였으며, 20일째에는 Rb1과 Rg1의 합이 1.05±0.01 mg/g에 도달하였다. 비배당체인 ginsenoside Rg3의 함량도 1일째(0.13±0.01 mg/g), 10일째(0.10±0.01 mg/g), 20일째(0.17±0.01 mg/g)으로 숙성이 진행될수록 증가되는 것을 확인할 수 있었다<Table 5>. 이는 β-glucosidase 활성이 증가함에 따라 배당체의 비배당체로의 전환이 많이 이루어진 결과로 생각된다.

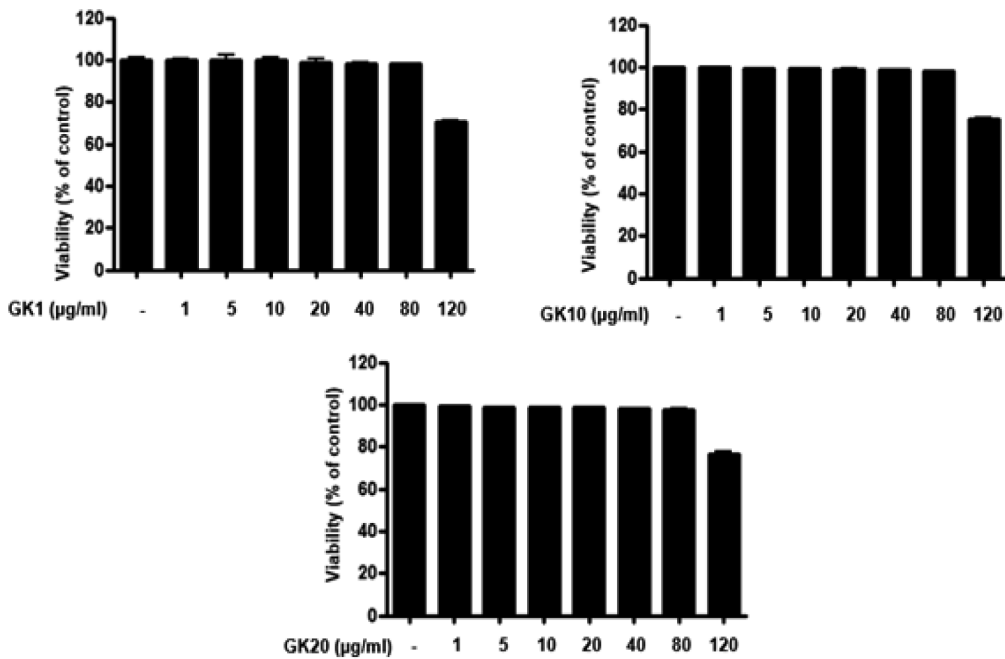
4. 수삼각두기의 항염증 효과

1) 수삼각두기가 세포 생존률에 미치는 영향

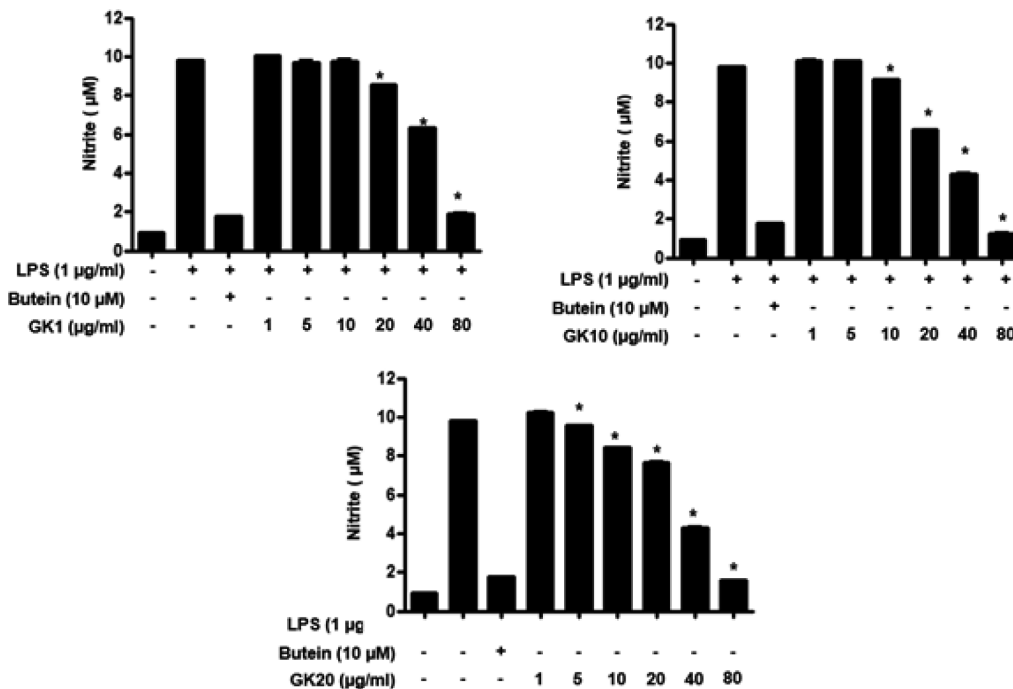
염증유발 인자에 관한 치료 효능평가는 lipopolysaccharide (LPS)나 peptidoglycan (PGN) 등과 같은 세균유래 염증유발원을 대식세포주 혹은 분리된 일차 대식세포세포에 처리하여 분비되는 염증물질의 정량평가를 통해 수행되고 있다(Kim & Choi 2007). 수삼각두기가 RAW264.7 세포에서의 세포생존률에 미치는 영향을 알아보기 위해 최저 농도 1 μg/mL부터 120 μg/mL까지 처리하였다. 실험결과 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 80 μg/mL까지 최고농도로 하여 진행하였다<Figure 3>. Shin et al.(2012) 연구결과에서는 홍삼이 LPS에 의해 자극된 대식세포에서 100 μg/mL까지 생존률 저하를 나타내지 않았고, 100 μg/mL 이상에서 급격한 세포 생존률 저하를 보이며 수삼각두기와 다른 농도를 보였다.

2) 수삼각두기의 NO 생성억제 효과

NO는 무기 저분자 라디칼로써 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등의 역할이 알려져 있으며, NOS에 의해 L-arginine으로부터 합성된다(Kim & Choi 2007). 이와 같은 이로운 작용 이외에도 과량의 NO는 정상세포를 죽이고 염증을 유도하여 급성 또는 만성 염증질환의 원인이 되는 물질로 작용하기도 한다(Barry 1992). LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에서의 1일, 10일, 20일 모두 NO 생성을 억제되는 것을 확인할 수 있었다<Figure 4>. Oh et al.(2004) 연구결과를 보면 20(S)-protopanaxatriol (PPT)라는 물질이 1-20 μM까지 세포생존률에 영향을 미치지 않는 농도로 처리한 후 농도의존적으로 NO 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. PPT는 장내 미생물에 의해 형성되는 인삼사포닌류로부터 이미 항암효과



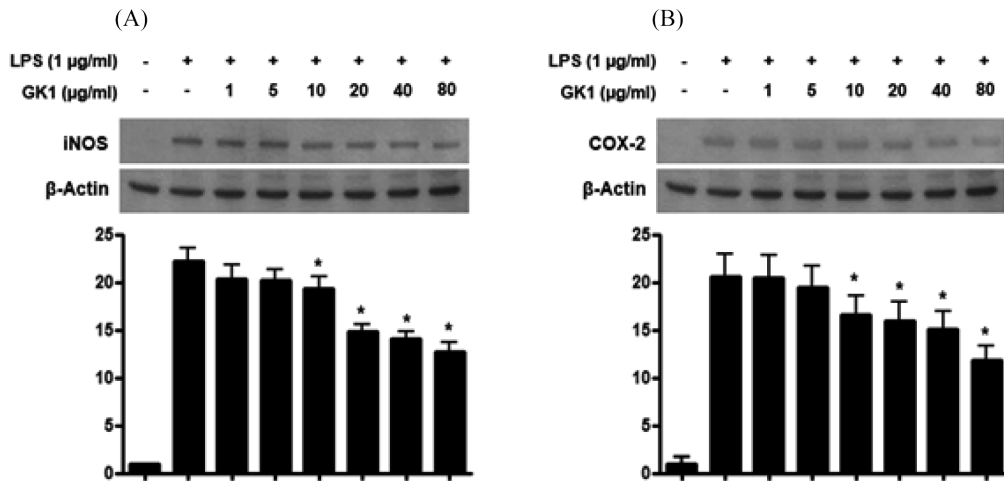
<Figure 3> Effects of fresh ginseng *Kkakdugi* fermented for 1 day (GK1), 10 days (GK10) and 20 days (GK20) on cell viability. RAW264.7 macrophages were incubated for 24 h with various concentrations of fresh ginseng *Kkakdugi* (1-120 µg/mL). Cell viability was determined as described under Materials and Method. Data represent the mean±SD of three independent experiments.



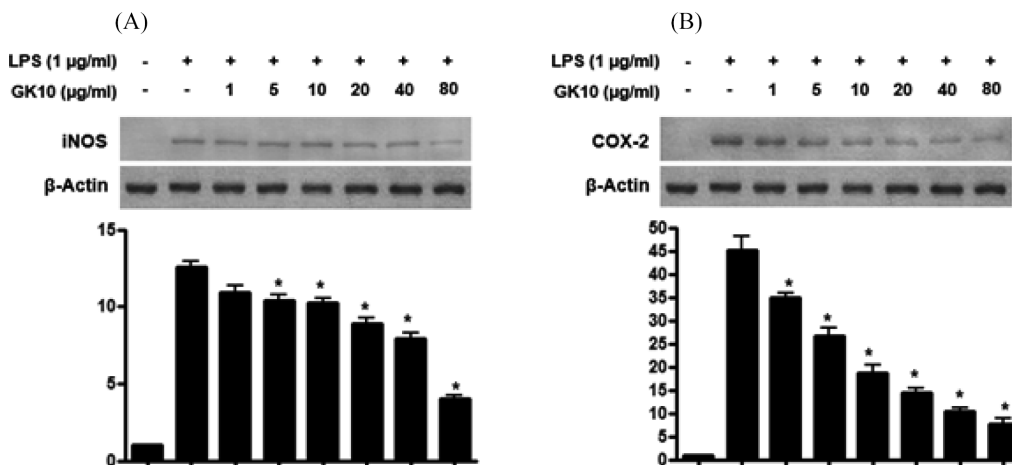
<Figure 4> Effects of fresh ginseng *Kkakdugi* fermented for 1 day (GK1), 10 days (GK10) and 20 days (GK20) on the production of NO in RAW264.7 macrophages stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 12 h with indicated concentrations of fresh ginseng *Kkakdugi*, and stimulated 18 h with LPS (1 µg/mL). The concentration of nitrite were determined as described under Materials and Method. Data represent the mean±SD of three independent experiments. \*p<0.05 compared to the group treated with LPS.

가 보고된 약물이다(Kim & Choi 2007). 본 연구에서는 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 80 µg/mL까지 수삼깍두기로 농도를 처리한 결과 1일, 10일, 20일 모두 Oh et al.(2004)

의 연구 결과와 같이 농도는 달랐지만 농도의존적으로 감소시켰으며 특히 10일째 더 낮은 농도 의존적으로 감소시킨 것을 확인할 수 있었다<Figure 4>. 수삼 깍두기는 LPS에 의해



<Figure 5> Effect of fresh ginseng *Kkakdugi* fermented for 1 day (GK1) on the expression of protein iNOS (A) and COX-2 (B) in RAW264.7 macrophages stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 12 h with indicated concentrations of Ginseng *Kkakdugi*, and 18 h with LPS (1 µg/mL). Western blot analysis (A, B) were performed as described in Materials and Method. Data shows the representative blots of three independent experiments. \*p<0.05 compared to the group treated with LPS.



<Figure 6> Effects of fresh ginseng *Kkakdugi* at 10 days of fermentation (GK-10) on the expression of protein iNOS (A) and COX-2 (B) in RAW264.7 macrophages stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 12 h with indicated concentrations of fresh ginseng *Kkakdugi*, and 18 h with LPS (1 µg/mL). Western blot analysis (A, B) were performed as described in Materials and Method. Data shows the representative blots of three independent experiments. \*p<0.05 compared to the group treated with LPS.

활성화된 대식세포에서 NO의 생성억제에 큰 역할을 하는 것으로 판단된다.

3) 수삼깎두기가 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

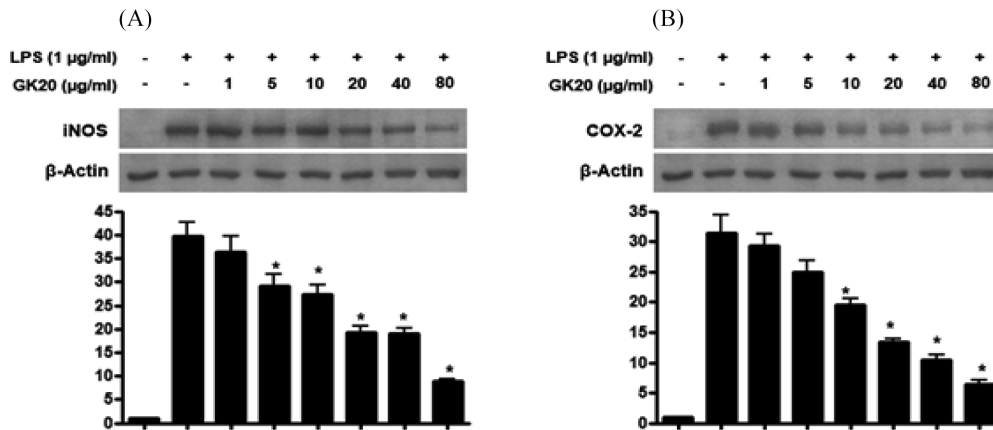
COX-2는 급성염증반응을 조절하는 주요인자로서, 다양한 조직에서 발현되고 염증반응을 확장시키는 역할을 하므로 항염증효능 약물개발에서 가장 많이 주목받는 효소단백질이다 (O'Banion 1993; Choi et al. 2009). 수삼깎두기가 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 영향을 주는지를 알아보기 위해 RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 iNOS와 COX-2 발현을 유도하여 각 시료를 1, 5, 10, 20, 40, 80 µg/mL 농도별로 처리하여 살펴본 결과, 1일, 10일, 20일째 시료 모두 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 억제시켰으며 특

히 10일째 수삼깎두기 시료가 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다<Figure 5, 6, 7>.

Oh et al.(2004) 연구에서도 20(S)-protopanaxatriol (PPT)를 세포생존률에 영향을 미치지 않는 농도인 1~20 µM까지 처리했을 때 농도 의존적으로 iNOS 생성과 COX-2 발현억제 되는 것을 확인할 수 있었다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 수삼깎두기의 발효 과정에서 진세노사이드의 비배당체로의 전환정도를 확인하고 수삼깎두기의 항염증효과를 조사하여 수삼의 고부가가치화 가능성 여부를 알아보고자 하였다. 4년근 수삼을 이용하여 염도가 1.4%가 되도록 깎



<Figure 7> Effects of fresh ginseng *Kkakdugi* at 20 days of fermentation (GK-20) on the expression of protein iNOS (A) and COX-2 (B) in RAW264.7 macrophages stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 12 h with indicated concentrations of fresh ginseng *Kkakdugi*, and 18 h with LPS (1 µg/mL). Western blot analysis (A, B) were performed as described in Materials and Method. Data shows the representative blots of three independent experiments. \*p<0.05 compared to the group treated with LPS.

두기를 제조한 후 15°C에서 숙성시키며, 숙성기간별 품질특성과 진세노사이드의 비배당체로의 전환 양상을 확인하였다. 또한 수삼깍두기의 항염증효과는 RAW 264.7 세포를 이용하여 lipopolysaccharide (LPS)로 유도한 염증에 대해 nitric oxide(NO) 생성, 염증성 cytokine과 염증성물질 변화로 확인하였다. 수삼깍두기는 10일째에 pH와 산도가 각각 4.30, 1.63%로 숙성정기를 나타내었으며, 그 이후에는 산도의 급격한 변화가 없었다. 적색도와 황색도는 숙성기간에 따라 유의적인 차이는 없었으며, 명도는 유의적으로 점점 어두워지는 것으로 나타났다(p<0.05). 숙성됨에 따라 인삼 특유의 향과 쓴맛이 감소하였으며 고춧가루가 어우러져 색은 진해졌으며 숙성 10일째 전체적인기호도가 가장 좋아 3.56점을 나타내었으며, 숙성되었을 때 생것일 때 보다 기호도가 좋아지는 것으로 나타났다. 유산균 수는 숙성기간 중 지속적으로 증가하여 10<sup>9</sup> CFU/mL까지 도달하였다. β-Glucosidase는 숙성이 진행됨에 따라 1.154에서 1.885 unit/g으로 효소활성이 증가되었다. 발효가 진행될수록 배당체가 미미하지만 비배당체인 ginsenoside Rg3로 전환되어 그 함량이 1일째 0.13에서 20일째 0.17 mg/g으로 증가함을 HPLC를 통해 확인하였다. 수삼깍두기의 세포독성 실험 결과, 숙성기간과 상관없이 80 µg/mL까지 세포생존을 확인하였으며, 숙성기간에 따라 농도 의존적으로 NO생성을 억제하였다. 염증매개효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase (COX)-2의 발현도 또한 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다. 이상의 결과를 통해 수삼깍두기는 15°C에서 10일째가 숙성적기였으며, 기호도는 숙성 적기 이후로도 계속 지속되는 것으로 나타났다. 발효에 의해 유산균 수는 10배 이상 증가하였으며 β-glucosidase 활성의 증가로 진세노사이드의 비배당체 Rg3로의 전환을 확인하였다. 또한 NO 생성, iNOS와 COX-2 발현을 농도 의존적으로 억제함으로써 수삼깍두기가 항염증 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

### 감사의 글

이 논문은 2014학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

### References

Hong Mun Hwa. 1980. Korean ginseng (Vol. I). Samhwa Publishing Co., Ltd., Seoul, Korea, pp 48

Barry HW. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59(1):21-40

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. Pharmacol. Res.*, 28(3):335-342

Choi SH, Aid S, Bosetti F. 2009. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation implications for translational research. *Trends Pharmacol. Sci.*, 30(4):174-81

Collins CH, Lyne PM. 1985. *Microbiological methods*. 5th ed, Butterworth & Co. Ltd., Boston, USA, pp 73, 130-133

Chi H, Kim DH, Ji GE. 2005. Transformation of ginsenosides Rb2 and Rc from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(11):2102-2105

Ha JH. 2010. Enhancement of biological activities of low quality fresh ginseng by various extraction processes. Master's degree thesis, Kangwon University, Korea, pp 28-33

Hasegawa H, Song JH and Benno Y. 1997. Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins. *Planta Med.*, 63(5):436-440

Higuchi, M, Hisgahi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act



- synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophage. *J. Immunol.*, 144(4):1425-1431
- Hong SI, Park JS, Park NH. 1995. Quality changes of commercial Kimchi products by different packaging methods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(1):112-118
- Ku KH, Lee KA, Park WS. 2006. Quality characteristics of *Baechukimchi* added ginseng during fermentation periods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35(10):1444-1448
- Ku KH, Kang KO, Kim WJ. 1988. Some Quality changes during fermentation of Kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 20(4):476-482
- Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. 2000. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Letters*, 150(1):41-48
- Kim IB, Lim BL, Seong GS, Lee YE. 2010. Bioconversion of soybean isoflavone by *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum*. *Korea J. Food Cookery Sci.*, 26(2):214-219
- Kim JS, Yoon S. 1999. Isoflavone contents and  $\beta$ -glucosidase activities of soybeans, *meju*, and *doenjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31(6):1405-1409
- Kim JY, Choi JY. 2007. Anti-inflammatory effects of ginseng-derived active compounds. *Korean Ginseng Res. Ind.*, 1(2):17-23
- Kim KO, Kim WH. 1994. Changes in properties of Kimchi prepared with different kinds and levels of salted and fermented seafoods during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(3):324-330
- Kim SD, Hawer WD, Jang MS. 1998. Effect of fermentation temperature on free Sugar, organic acid volatile compounds of *Kkakdugi*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27(1):16-23
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(10):787-759
- Namba T. 1980. The encyclopedia of Wakan-Yaku with color pictures. Hoikusha, Osaka, Japan, pp 16-22
- Oh GS, Pae HO, Choi BM, Seo EA, Kim DH, Shin DH, Shin MK, Kim JD, Kim JB, Chang HT. 2004. 20(S)-Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions through inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Cancer Letters.*, 205(1):23-29
- O'Banion MK. 1993. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 13(1):45-82
- Peralta RM, Kadowaki MK, Terenzi HF, Jorge JA. 1996. A highly thermostable  $\beta$ -glucosidase activity from the thermophilic fungus *humicola-grisea* var. *thermopedia*: Purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiol. Letter*, 146(2): 291-295
- Park SH, Lee TH. 2005. The Correlation of physico-chemical characteristics of Kimchi with sourness and overall acceptability. *Korea J. Food Cookery Sci.*, 21(1): 103-109
- Quan LH, Liang ZQ, Kim HB, Kim SH, Kim SY, Noh YD, Yang DC. 2008. Conversion of ginsenoside Rd to compound K by crude enzymes extracted from *Lactobacillus brevis* LH8. *J. Ginseng Res.*, 32(3):226-231
- Shin JS, Kim JM, An WG. 2012. Anti-inflammatory effect of red ginseng through regulation of MAPK in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.*, 26(3):293-300
- Yi EJ, Lee JM, Yi TH, Cho SC, Park YJ, Kook MC. 2012. Biotransformation of ginsenoside by *Lactobacillus brevis* THK-D57 isolated from Kimchi. *Korean J. Food & Nutr.*, 25(3):629-636

---

Received February 11, 2015; revised February 25, 2015; accepted February 26, 2015