

발효에 의한 수경재배 인삼 잎의 항산화 및 간 보호 효과

이아름[#], 박재호^{*}

중원대학교 생약자원개발학과

Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Hydroponic-cultured Ginseng Folium by fermentation

Ah Reum Lee[#], Jae Ho Park^{*}

Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

ABSTRACT

Objectives : Positive effects of Ginseng has great research attentions such as anticancer, anti-diabetic, anti-aging, liver, immune function, CNS, etc. In this study, we investigated Hydroponic-cultured Ginseng Folium fermented by *Bacillus subtilis* to establish fermentation conditions for enhancing functionality.

Methods : Ginseng Folium were cultivated hydroponic-cultured and were extracted with methanol. We inoculate *Bacillus subtilis* for fermentation by adding to 0%, 3% and 5% sugar respectively and checked antioxidant activities, total phenolic content and total saponin content in 2 days intervals during 11 days. The antioxidant activities were studied by the 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) radical, 2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) diammonium salt(ABTS) radical scavenging assay and Reducing power assay. We analyzed the Total phenol content, crude saponin content and ginsenoside content. Moreover, Hepatoprotective effects by Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) and Glutamic pyruvic transaminase(GPT) in Sprague-Dawley rat.

Results : The results of DPPH and ABTS were 66.89% and 96.72%, respectively. The reducing power was resulted in optical density of 0.7312 with 3% sugar after 9 days of fermentation, and the concentration at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Total phenol content was 36.92mg/g with 3% sugar after 9 days of fermentation, in which crude saponin content wasn't changed, and ginsenoside content such as Rg3, Re and Rb was increased. Activities of GOT and GPT concentration were decreased in rat.

Conclusions : This study suggests that hydroponic-cultured Ginseng Folium fermented by *Bacillus subtilis* in 9 days showed significant efficacy of hepato-protection as well as antioxidant compared to the others. In addition, it shows not only improved value but also utilized hydroponic-cultured Ginseng Folium by fermentation.

Key words : Ginseng, Fermentation, Antioxidant, Ginsenoside, Hepatoprotective effect

서론

人蔘의 주요 약효성분으로는 배당체 성분인 30여종 이상의 ginsenosides를 비롯하여 정유, 유기산, 염기성물질, vitamin, 당류, 미량원소 및 효소까지 다양한 물질들이 함유되어있고¹⁾. 人蔘 사포닌의 효능은 현재까지 중추신경계에 대한 작용²⁾, 뇌 기능에 대한 작용³⁾, 항암작용⁴⁾, 면역기능 조절작용⁵⁾, 항당뇨 작용⁶⁾, 간 기능 강화작용⁷⁾, 심혈관 장애 개선작용⁸⁾, 혈압조절 작용⁹⁾, 갱년기 장애 개선 작용¹⁰⁾, 항 스트레스^{11,12)}, 항 피로

작용¹³⁾, 항 노화¹⁴⁾ 및 항산화작용^{15,16)} 등이 알려져 있다.

최근 동서양을 막론하고 건강에 관한 관심과 더불어 건강 식품의 관심 또한 증대되고 그 중 人蔘을 활용한 건강식품이 가장 각광받고 있다. 이에 따라 人蔘 단일제제 및 생약 복합 제제가 개발되고 있고 최근 들어 人蔘의 뿌리뿐만 아니라 잎, 줄기 등과 같은 人蔘 부산물들을 이용하고자 하는 관심이 증대되고 있어 부산물의 성분뿐만 아니라 활용방안에 관한 다양한 연구가 기대되고 있다. 人蔘 잎 성분에 관한 유효성과 약

*Corresponding author : Jae Ho Park, Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea
· Tel : +82-43-830-8614 · E-mail : parkjh@jwu.ac.kr

#First author : Ah Reum Lee, Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea
· Tel : +82-43-830-8614 · E-mail : dkfma511@naver.com

· Received : 16 June 2015 · Revised : 21 July 2015 · Accepted : 21 July 2015

리효능에 대한 연구가 시도되며 人蔘 잎의 활용에 많은 관심을 가지게 되었다. 人蔘 잎은 saponin 함량 비교에서 人蔘 근보다 약4-5배, 줄기보다 9배 이상 높으며 ginsenoside도 人蔘 근과 유사하다는 것을 확인하며 人蔘 잎의 가치가 새롭게 재조명되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾.

더불어 人蔘의 활용방안 뿐만 아니라 재배방법 또한 다양하게 연구되고 있는 추세이다. 특히 수경 재배 人蔘은 재배 및 관리가 까다로운 人蔘의 재배에 있어 새로운 시도로서 人蔘생육에 필요한 무기양분의 공급을 조절할 수 있으며 온도, 광도 및 물 관리 등 생육환경 조절이 용이하고, 빗물과 토양 등에 의한 병해 발생의 경감 등의 장점이 있다²¹⁾. 수경재배는 토경재배에서보다 단위면적당 수량증가 및 생육기간 단축, 작물의 생육에 적합한 양분관리에 따른 건강한 생산물 수확, 토양병해 및 연작장해가 없으며 제초제를 포함한 농약오염이 없는 청정 농산물 생산, 토질에 관계없이 재배가 가능하며 토경재배 대비 약 10%의 물만으로도 재배가 가능하다는 점, 비료 유실이 거의 없다는 장점들이 있다²²⁾.

현재 人蔘가공의 동향은 생리적으로 유용한 성분을 조절하여 특정성분을 강화하는 기술들이 시도되고 있다. 가압이나 팽화와 같은 물리적 처리를 하거나 산이나 효소를 처리하여 가수분해한 뒤 성분을 전환하는 방법, 유산균이나 식용 곰팡이를 활용한 발효처리, 조직배양을 통한 성분조절 방법 등이 있다^{23,24)}.

이들 기술 중 찌서 말리거나 여과하는 방법과 함께 발효처리 방법은 현행 건강기능성식품 공전에 고시된 방법 중의 하나로 미생물이 분비하는 효소 등의 생 촉매의 기능을 활용하여 기능성 물질을 생물전환반응(bioconversion 또는 biotransformation) 하는 방법으로 특정성분을 강화하여 새로운 신소재나 신제품을 개발할 수 있는 인간과 환경을 고려한 청정기술로서 최근에 활발히 연구되고 있다²⁵⁾. 발효기술을 이용한 人蔘은 살아 있는 유용한 미생물을 프로바이오틱스로 공급할 수 있는 장점과 배당체 구조인 ginsenoside의 당을 분해하여 ginsenoside의 구조를 전환하며 일반 수삼에서 섭취할 수 있는 사포닌보다 고효율의 사포닌을 섭취할 수 있는 장점이 있다²⁶⁾.

본 연구에서는 최근 다양한 식품소재로 이용되고 있는 수경재배 人蔘 잎의 기능성 증진을 위해 발효조건을 확립하고, 생리활성 물질을 분석하여 수경재배 발효人蔘 잎의 생물학적 유용성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 시료는 (주)수인삼농업회사법인에서 생산한 수경재배 人蔘을 구매하여 사용하였다. 생체 시료를 세척한 다음 지상부와 지하부를 분리하여 동결건조한 뒤 분석을 위한 시료로 사용하였다. 각 처리별 수경재배 人蔘잎 1g을 100% MeOH 15 mL에 침지한 뒤, 초음파를 가하여 추출하여 유효성분 분석 및 활성측정을 위한 시료로 사용하였다.

2. 발효 미생물 선별 및 발효 조건 확립

1) 사용 균주 및 균주 선별

본 연구의 선행연구에 있어 수경재배 人蔘잎을 발효하기 위해 4종(*Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Monascus purpureus*)의 균주로부터 1차 발효된 발효산물의 항산화 활성과 총페놀함량 분석하여 가장 활성이 높았던 *Bacillus subtilis* 균주를 선별하였다. 본 연구에서는 선별된 *Bacillus subtilis*의 최적 발효조건을 확립하기 위해 발효일자 및 당 첨가에 따른 생물학적 유용성을 평가하였다.

2) 발효 조건

건조된 수경재배 人蔘 잎 분말과 물을 1:2 비율로 잘 배합한 후 당 함량(0%, 3%, 5%)을 달리하여 30℃에서 일차별로 배양하여 기능성 및 성분 분석을 통하여 최적의 발효조건을 확립하였다.

3. 방법

1) DPPH 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 전자 공여능은 Bondet²⁷⁾ 방법을 참고하여 측정하였다. DPPH solution은 300 μM 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)를 515 nm에서 흡광도 값이 1.0이 되도록 Ethanol을 이용하여 희석 준비하였다. 각 농도별 추출물 40 μl에 DPPH solution 760 μl를 첨가한 후 20분간 37℃에서 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성률은 DMSO 처리 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

2) ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg²⁸⁾ 등의 방법을 참고하여 측정하였다. ABTS solution은 7 mM 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid(2,2'-azino-bis)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 24시간동안 ABTS+·을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.7이 되게 희석하였다. 각 농도별 추출물 40 μl에 ABTS solution을 760 μl씩 각각 첨가한 후 20분간 37℃에서 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료처리에 의한 소거활성률은 DMSO 처리 대조구와 비교하여 계산하였고, 추출물의 소거활성은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

3) 환원력

환원력은 Oyaizu²⁹⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. 각 농도별 추출액 100 μl에 0.2 M Potassium Phosphate buffer (pH 6.6) 250 μl과 1% Potassium Hexacyanoferrate(III) 250 μl을 혼합한 후, 50℃에서 20분간 반응시킨 후 찬물로 냉각한 후, trichloroacetic acid(TCA) 250 μl를 첨가하였다. 위 반응액을 2000 g에서 5분간 원심 분리하여 상등액 400 μl에 증류수 200 μl와 0.1% ferric chloride 16 μl를 첨가하여

혼합한 후, UV/Visible spectrophotometer(Human Cop, Xma-3000PC)을 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값이 높을수록 환원력이 강한 것으로 평가된다.

4) 총 페놀 함량 분석

총 페놀 화합물 함량은 Folin-denis³⁰⁾ 방법으로 비색 정량하였다. 각 추출물은 메탄올에 10 mg/ml 농도로 녹인 시료 1 ml와 Folin시약 1 ml를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 뒤, 10% Na₂CO₃용액 1 ml를 혼합한 후 실온에서 1시간 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 화합물의 함량은 gallic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하고 gallic acid에 대한 당량으로 환산하였다.

5) 조사포닌 함량 분석

조사포닌 함량은 식품공전에 수록된 홍삼성분분석법에 따라 정량하였다. 수경재배 발효인삼 잎 1 g을 수포화부탄올 30 ml에 현탁하였다. Water bath를 이용하여 85℃에서 1시간동안 추출하는 조작을 3회 반복하여 추출액을 모두 합한 후 원심분리기를 이용하여 3200 rpm 에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 분액 깔대기에 취하여 증류수 30 ml를 첨가하여 혼합 후 6시간동안 방치하였다. 물층을 제거하고 수포화부탄올층을 80℃에서 감압농축하고 에테르 30 ml를 넣고 46℃에서 30분간 가열한 후 건조오븐을 이용하여 105℃에서 20분간 건조한 후 방냉하여 무게를 측정하여 조사포닌의 양을 계산하였다.

6) 진세노사이드 함량 분석

각 처리별 추출물 1 ml를 취하여 증류수 1 ml를 가한 뒤 Sep-Pak으로 전처리하였다. 먼저 Sep-Pak Plus C₁₈ cartridge 에 3 ml의 MeOH로 서서히 용출시켜 conditioning 하고 다시 3 ml의 증류수로 2차 conditioning시켰다. 그리고 시료액을 cartridge에 loading 하고 10 ml의 증류수로 서서히 당류 등을 제거하였다. 이 cartridge에 2 ml의 MeOH로 ginsenoside 를 용출시켰다. 정확히 부피를 2 ml로 조절한 후 시료액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 표준품은 ginsenoside Rg1, Re, Rf, Rb1, RC, Rb2, Rd, F2로 사용하였고, HPLC 분석은 다음과 같은 조건에 의하여 분석하였다.

Instrument	Agilent 1260 system, USA		
Column	4.6 x 250mm 5μm Eclipse plus C ₁₈		
Detector	Diode Array Detector		
Wavelength	203 nm		
Temperature	40℃		
	A : Water, B : Acetonitrile (ACN)		
	Time(min)	Water(%)	ACN(%)
	0	95	5
	4,00	95	5
	9,00	89	11
	19,00	87	13
	26,00	79	21
	28,00	72	28
	32,00	72	28
	341,00	68	32
	40,00	55	45
	42,00	45	55
	50,00	45	55
	55,00	95	5
	62,00	95	5
Flow	0.8 mL/min		
Injection volumn	10 μl		

7) GOT,GPT 활성 측정

(1) 실험동물 및 처치

동물은 생후 5주 된 체중 150g 내외의 음성 Sprague-Dawley rat를 대한바이오링크(충북, 음성)로부터 구입하여 동물사육 chamber에서 일정한 조건(온도 : 22 ± 2℃, 습도 : 50 ± 5%, 명암 : 12시간 light/darkcycle)으로 일주일간 적응시킨 후 사용하였으며, 실험군은 3마리씩 정상군(무처리), 대조군(알코올만 처리), 시료 투여군(시료 + 알코올 처리)으로 나누었다. 실험에 앞서 사료 섭취로 인해 나타날 수 있는 위장관을 통한 알코올의 흡수 방해 현상을 배제하기 위해 18시간 동안 절식시켰으며 이때 물은 제한 없이 공급하였다. 각 처리별 시료는 500 mg/kg씩 알코올 투여 30후 경구 투여 하였다. 알코올은 40%의 주정을 5 ml/kg씩 경구투여하였다. 채혈은 시료 투여 1시간 후에는 꼬리 정맥 채혈 하였으며 4시간 후에는 diethyl ether 마취하여 복부 정중선을 따라 개복하고 복부 대동맥으로부터 채혈하였다.

(2) 혈청 중 간 기능 지표 효소 활성 측정

Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamicpyruvic transaminase(GPT)의 활성도는 각 기질과 효소반응을 이용한 비색법에 의해 제조된 assay kit(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)로 측정하였다.

4. 통계학적 분석

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 각 실험의 평균과 표준편차를 계산하였고, P<0.05 수준에서 Duncan 다중검정법 (duncan's multiple range test)를 이용하여 각 실험의 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 항산화 활성

B.subtilis 균주로 발효된 수경재배 인삼 잎의 항산화 활성 분석을 위해 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 그리고 환원력을 당 첨가에 따라 비교 분석하여 나타냈다.

B.subtilis 균주로 발효된 수경재배 인삼 잎의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과(Table 1), 각 시료의 발효일수가 길어질수록 DPPH 소거 활성이 높았으며, 특히 발효 9일 째 와 11일 째 발효된 수경재배 인삼 잎의 DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 우수하였다. 시료의 농도 200 μg/ml에서 9일 66.85%, 11일 66.89%의 소거 활성을 나타내었다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity (%) of Hydroponic-cultured Ginseng Folium fermented by *Bacillus subtilis*.

Treatment	Fermentation period (days)					
	0	3	5	7	9	11
0% sugar	30,98±0.1a	32,45±0.2b	34,68±0.2c	40,25±0.3c	49,39±0.4c	49,2±0.4c*
3% sugar	30,98±0.2a	33,25±0.3a	38,16±0.5a	46,59±0.7a	66,85±0.9a	66,89±0.9a
5% sugar	30,98±0.1a	33,09±0.2ab	36,24±0.3b	42,86±0.3b	58,07±0.4b	59,88±0.4b

* Each value is expressed as mean ± SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05). all SD values were rounded off the numbers to two decimal places.

ABTS 라디칼 소거활성은(Table 2) 발효 0일에서 90,31%로 높은 활성을 보였으며, 발효일수가 경과함에 따라 활성이 증가하였다. 발효 9일 째 3% 당 첨가 발효 조건에서 비교적 높은 활성을 보였으며, 200 µg/ml의 농도에서 96,72%으로 가장 높은 소거 활성을 보였다.

Table 2. ABTS radical scavenging activity (%) of Hydroponic-cultured Ginseng Folium fermented by *Bacillus subtilis*.

Treatment	Fermentation period (days)					
	0	3	5	7	9	11
0% sugar	90,31±0,2a	91,55±0,3a	92,24±0,3ab	92,61±0,3b	93,28±0,3b	93,17±0,3b*
3% sugar	90,31±0,4a	91,64±0,5a	93,55±0,5a	95,22±0,5a	96,72±0,5a	94,69±0,5a
5% sugar	90,31±0,5a	90,66±0,6a	91,85±0,6b	92,82±0,6b	93,35±0,7b	93,45±0,7ab

* Each value is expressed as mean ± SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0,05). all SD values were rounded off the numbers to two decimal places.

B.subtilis 균주로 발효된 수경재배 人蔘 잎의 환원력의 평균은 700 nm에서 나타내는 O.D의 값을 비교하였다. 흡광도가 증가하는 것에 따라 환원력이 증가하는 것으로, 발효일수의 경과에 따라 흡광도가 증가하였으며 200 µg/ml의 농도에서 발효 9일 째 3% 당 첨가 조건에서 0,7312의 값으로 가장 높은 활성을 보였다(Table 3).

Table 3. Reducing Power O.D in 700nm of Hydroponic-cultured Ginseng Folium fermented by *Bacillus subtilis*.

Treatment	Fermentation period (days)					
	0	3	5	7	9	11
0% sugar	0,3038±0,001a	0,3142±0,001b	0,3698±0,002c	0,4233±0,003b	0,5012±0,003b	0,5789±0,004b*
3% sugar	0,3038±0,001a	0,3429±0,001a	0,4782±0,002b	0,5972±0,004a	0,7312±0,005a	0,7304±0,005a
5% sugar	0,3038±0,001a	0,3449±0,001a	0,4892±0,002a	0,5892±0,004a	0,7219±0,005a	0,7221±0,005a

* Each value is expressed as mean ± SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0,05). all SD values were rounded off the numbers to four decimal places.

2. 총 페놀 화합물 함량 분석

B.subtilis 균주로 발효된 수경재배 人蔘 잎의 페놀성 화합물의 총 함량을 비교 분석한 결과(Table 4), 발효일수에 따라 페놀성 화합물의 총량이 증가하였으며 3% 당 첨가 실험군이 비교적 높은 함량을 보였다. 발효 9일 째 3% 당 첨가 조건에서 36,92mg/g으로 가장 높은 함량을 보였다. 총 페놀 함량은 농도별로 희석한 Tannic acid의 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다.

Table 4. Total phenolic compounds content of Hydroponic-cultured Ginseng Folium fermented by *Bacillus subtilis*.

Treatment	Fermentation period (days)					
	0	3	5	7	9	11
0% sugar	32,33±0,1a	32,42±0,2a	32,87±0,2c	33,1±0,2b	33,12±0,2b	33,24±0,2b*
3% sugar	32,33±0,1a	32,57±0,1a	33,92±0,1a	34,87±0,1a	35,88±0,1a	35,61±0,1a
5% sugar	32,33±0,2a	32,68±0,1a	34,02±0,1b	34,88±0,1a	35,67±0,1a	35,68±0,1a

* Each value is expressed as mean ± SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0,05). all SD values were rounded off the numbers to two decimal places.

3. 조사포닌 함량 분석

*B.subtilis*로 발효된 수경재배 人蔘 잎의 조사포닌 함량을 분석한 결과(Table 5), 발효 시간의 경과에 따라 조사포닌 함량의 변화는 나타나지 않았다.

Table 5. Total saponin content of Hydroponic-cultured Ginseng Folium fermented by *Bacillus subtilis*.

Treatment	Fermentation period (days)					
	0	3	5	7	9	11
0% sugar	197,52±0,2a	197,35±0,2a	197,48±0,2a	197,44±0,2a	197,12±0,2b	197,82±0,2a*
3% sugar	197,52±0,4a	197,43±0,4a	197,24±0,4a	198,12±0,4a	198,21±0,4a	197,97±0,4a
5% sugar	197,52±0,4a	197,32±0,4a	197,36±0,4a	197,46±0,4a	197,29±0,4ab	197,59±0,4a

* Each value is expressed as mean ± SD(n=3). Values followed by the same letter are not significantly different (p < 0,05). all SD values were rounded off the numbers to two decimal places.

4. Ginsenoside 함량 분석

*B.subtilis*로 발효된 수경재배 人蔘 잎의 일자별, 당 첨가 조건에 따른 ginsenoside 함량을 분석하기 위해 아래의 8가지의 standard를 이용하여 함량을 분석하였다. Fig. 1은 발효전 수경재배 人蔘잎 추출물의 ginsenoside 분석 HPLC chromatogram으로, 이 8가지의 ginsenoside 중 Rd의 함량(3,149 mg/g)이 가장 높게 나타났다.

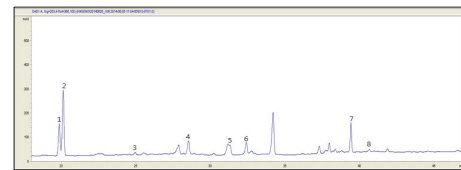


Fig. 1. HPLC chromatogram of Ginsenoside, which the pre-fermentation of Hydroponic-cultured Ginseng Folium. (1:Rg 1, 2:Re, 3:Rf, 4:Rb1, 5:Rb2, 6:Rd, 7:F2, 8:Rg3)

상기 *B.subtilis*로 발효된 수경재배 人蔘 잎의 항산화 활성이 대체로 9일 째에 높은 경향치를 보여, 발효 9일째 수경재배 人蔘 잎으로부터 추출한 시료를 통해 당 첨가 조건별 ginsenoside 함량을 분석 비교 하였다(Table 6), *B.subtilis* 균주로 발효한 수경재배 人蔘 잎 추출물의 ginsenoside 함량은 분석된 8종 모두 발효 전에 비해 발효 후 증가하는 것으로 나타났다. 당 첨가 조건별로는 무첨가에 비해 당 첨가군의 ginsenoside 함량이 높았으며, 당 첨가 5%에 비해 3% 당첨가 실험군이 다소 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

Table 6. Ginsenoside content of Hydroponic-cultured Ginseng Folium fermented by *Bacillus subtilis* in 9 days.

No	Ginsenoside	Pre-fermentation	Added to sugar		
			0%	3%	5%
1	Rg1	0,148	0,205	0,258	0,213
2	Re	0,327	0,458	0,732	0,476
3	Rf	0,575	0,875	0,817	0,650
4	Rb1	0,016	0,018	0,043	0,021
5	Rb2	2,223	2,341	3,726	2,682
6	Rd	3,149	1,110	4,922	1,370
7	F2	2,845	4,351	3,661	4,812
8	Rg3	0,016	0,014	0,053	0,016
Total		9,298	9,372	14,213	10,241

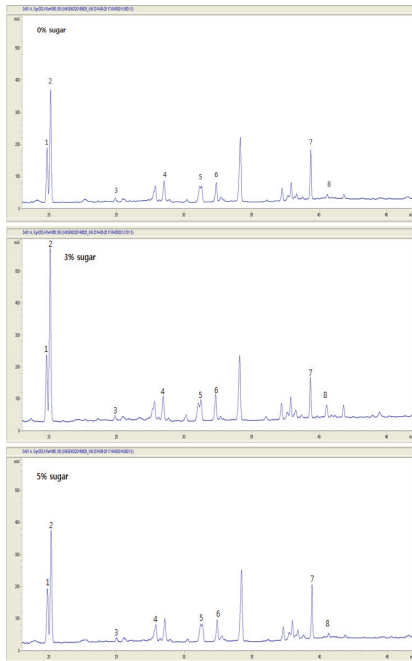


Fig. 2. HPLC chromatogram of ginsenoside, which Hydroponic-cultured Ginseng Foliom fermented by *Bacillus subtilis* with addition of sugar in 9 days.

고찰

본 연구에서 최근 다양하게 이용되고 있는 수경재배 人蔘 잎의 산업적 이용가치를 높이기 위해, *B. subtilis* 균주를 이용하여 다양한 발효조건으로 발효된 수경재배 人蔘 잎으로부터 총 페놀성 화합물, 조사포닌과 진세노사이드 함량, 항산화 활성 비교를 통해 최적의 발효조건을 확립하고, 발효 수경재배 人蔘잎의 간 보호 효과 검증을 통해 발효에 의한 수경재배 人蔘잎의 생물학적 유용성 증진을 검증하였다.

B. subtilis 균주로 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물의 항산화 활성은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능으로 비교 분석하였다. DPPH 라디칼 소거능은 발효 3일째부터 3% 당 첨가 실험군에서 활성이 높았으며 9일과 11일에서 가장 높은 활성을 보였다. 시료의 농도 200 µg/ml에서 9일 66.85%, 11일 66.89%의 소거 활성을 보였고, 발효전과 비교하여 약 2.16배 활성 증가를 나타냈다. ABTS 라디칼 소거능은 발효 5일째부터 차이를 보였으며 9일에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 200 µg/ml의 농도에서 96.72%의 소거 활성을 보였으며, 발효전과 비교하여 약 1.07배의 활성 증가를 보였다. 또한 환원력도 매우 높은 활성을 나타내었는데, 발효전 0.3083에 비해 발효 9일째 3% 당 첨가 실험군에서 0.7312로 높은 값을 보였으며 처리 내에서 가장 높은 활성을 보였다. 환원력은 일반적으로 전자나 수소, 산소 등의 전자의 이동이나 공여가 가능한 물질들이 산화를 통해 활성산소를 발생하는 것에 대한 억제능력을 뜻한다.

식물에 흔하게 분포하는 페놀류 화합물은 킬레이팅을 통해 금속이온들을 비활성화 시키고 추가적으로 superoxide-driven fenton reaction과 같은 활성산소종의 기원으로 중요하게 인식되고 있는 반응들을 억제한다^{31,32}. *B. subtilis* 균주로 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물의 총 페놀성 화합물의 함량은 발효기간에 따라 증가하였고, Tannic acid 표준곡선을 통해 정량한 결과, 발효 9일째 3% 당 첨가 조건에서 36.92mg/g으로 0일째에 비해 약 2.41배 증가하였다.

人蔘의 주요한 생리활성물질 중에서 人蔘사포닌 진세노사이드라고 명명되며 Shibata 등³³의 연구에 의해서 그 화학구조가 명확히 확인되었고, 항당뇨 활성³⁴을 비롯하여 항암작용, 항산화작용, 동맥경화 및 고혈압의 예방, 간 기능 촉진 및 숙취제거효과, 항 피로 및 항 스트레스 작용, 노화방지 작용, 두뇌활동 촉진작용, 항염활성, 알레르기성 질환치료, 단백질합성능력의 촉진 등이 보고되었다³⁵.

B. subtilis 균주로 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물의 조사포닌 함량은 발효일자가 증가하는 것과 상관없이 변화하지 않았다. 또한 당 첨가 실험군 전체에서 당 첨가 변화와 관계없이 유의적인 변화와 관찰되지 않았다.

위의 연구를 통해 9일의 발효기간이 최적의 발효기간으로 설정하여 *B. subtilis*로 발효된 수경재배 人蔘 잎의 당 첨가 조건에 따른 ginsenoside 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석을 실시한 발효 전 수경재배 人蔘 잎 추출물의 ginsenoside는 Rg 1, Re, Rf, Rb1, Rb2, Rd, F2, Rg3로 이 8가지의 ginsenoside 중 Rd의 함량(3,149 mg/g)이 가장 높게 나타났다. *B. subtilis* 발효 9일 후 ginsenoside 함량은 Re, Rf의 함량이 높게 나타났다. Re는 간 손상 보호 작용, Rf는 진통작용의 효과로 알려져 있다. 특히 3% 당 첨가 군에

5. GOT, GPT 활성 측정

3% 당을 첨가하고 9일간 *B. subtilis* 균주로 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물의 간보호 효과를 검증하기 위하여 혈중 생화학지표 Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT)를 분석하였다.

실험동물을 이용하여 발효 전, 후 수경재배 人蔘 잎 추출물의 알코올 섭취에 따른 간기능 변화를 GOT나 GPT 수준으로 확인한 결과(Table 7, 8), 알코올 대신 물을 처리한 무처리군에 비해 알코올만을 처리한 대조군의 GOT와 GPT 수준은 현저히 높게 나타났다. 추출물 처리군은 알코올 처리 1시간과 4시간 후, 대조군에 비해 GOT와 GPT 수준이 현저히 낮게 나타났다. 또한 발효 전 추출물에 비해 발효 후 추출물의 GOT와 GPT 수준이 다소 낮게 나타났다.

Table 7. Comparison of GOT activity of before and after fermentation Hydroponic-cultured Ginseng Foliom by *Bacillus subtilis*

Unit	Karmen		IU	
	1 hour	4 hours	1 hour	4 hours
Untreated	48,2		23,6	
Control	83,7	62,4	40,1	30,5
Treatment by extract	77,4	59,6	38,4	29,3
Treatment by fermented extract	72,7	58,4	35,1	27,8

Table 8. Comparison of GPT activity of before and after fermentation Hydroponic-cultured Ginseng Foliom by *Bacillus subtilis*

Unit	Karmen		IU	
	1 hour	4 hours	1 hour	4 hours
Untreated	37,13		17,5	
Control	76,2	63,2	35,9	29,7
Treatment by extract	59,6	51,1	29,3	24,0
Treatment by fermented extract	58,4	49,3	27,3	23,2

서 Rg3, Re 및 Rb의 함량이 발효전에 비해 약 3.31, 2.24 및 2.68배 함량이 증가된 것으로 나타났다. Rg3는 암세포 전이 억제, Rb는 항당뇨 및 항산화 물질로 알려져 있다.

이를 통해 발효를 통해 Rg 1, Re, Rf, Rb1, Rb2, Rd, F2, Rg3 모두 함량의 증가를 보였으며 크기는 약 3.31배의 함량 증대를 나타냈다.

알코올은 주로 간에서 대사되는 물질로 알코올 섭취가 잦은 사람은 간세포의 파괴가 증가하고, 이로 인해 혈중 GOT나 GPT의 농도가 증가한다³⁶⁾. 간세포 손상은 수송기능 및 막 투과성에 변화를 초래하여 결국 세포로부터 효소들을 혈액으로 방출시킨다³⁷⁾. 따라서 GOT 및 GPT의 순환계로의 많은 방출은 알코올에 의한 독성화 과정 동안에 간 조직막에 심각한 손상이 있었음을 의미한다.

최적의 발효조건인 *B.subtilis* 균주로 발효된 3% 당 첨가 및 9일 발효기간으로 설정된 수경재배 人蔘 잎 추출물의 간 손상 보호 효과를 위해 Sprague-Dawley rat을 이용하였다. 발효 전, 후 수경재배 人蔘 잎 추출물의 알코올 섭취에 따른 간 기능 변화를 GOT나 GPT 수준으로 확인한 결과, 물만 처리한 무처리군에 비해 알코올만 처리한 대조구의 GOT와 GPT 수준의 변화가 관찰됐다.

GOT 활성에서 무처리군의 Karmen과 IU는 각각 48.2, 23.6으로 낮은 값을 보였다. 대조구에서는 알코올 투여 후 1시간의 각 값은 83.7, 40.1 그리고 4시간의 각 값은 62.4, 30.5로 알코올 투여 직후 GOT 활성이 급격히 상승하였다. 이 상승은 알코올의 독성에 의한 간 조직막의 손상을 나타낸다. 발효 전 추출물 처리군은 1시간 경과 후 77.4, 38.4로 나타났으며, 특히 발효 추출물 처리군은 알코올 처리 대조구와 발효 전 추출물에 비해 알코올 투여 후 1시간에서는 72.7, 35.1으로 현저히 낮은 값을 나타냈다.

GPT 활성에서 무처리군 대조구의 Karmen과 IU는 각각 37.13, 17.5로 낮은 값을 보였다. 대조구에서는 알코올 투여 후 1시간의 각 값은 76.2, 63.2 그리고 4시간의 각 값은 35.9, 29.7로 알코올 투여 직후 GPT 활성이 급격히 상승하였다. 발효 전 추출물 처리군은 단위에서 1시간 경과 후 59.6, 29.3로 나타났으며, 특히 발효 추출물 처리군은 알코올 처리 대조구와 발효 전 추출물에 비해 알코올 투여 후 1시간에서는 58.4, 27.3으로 IU 단위에서 약 7%의 낮은 값을 나타냈다. 따라서 수경재배 人蔘 잎 추출물은 알코올 처리에 의한 간 보호 작용이 효과적으로 나타났으며, 특히 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물은 발효 전 수경재배 人蔘 잎에 비해 간 보호 효과 활성이 높은 것으로 나타났다.

결론

본 연구는 수경재배 人蔘 잎의 생물학적 이용가치 증진을 위해 *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 발효 수경재배 人蔘 잎으로부터 항산화활성, 총 페놀성 화합물, 조사포닌 함량, 진세노사이드함량 분석을 통해 최적 발효조건을 확립하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. *Bacillus subtilis* 균주를 통한 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물의 DPPH, ABTS 그리고 환원력은 대체로 9

일의 발효기간과 3% 당 첨가 실험군에서 높은 활성을 보였다.

2. *Bacillus subtilis* 균주를 통한 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물의 총 페놀성 화합물의 함량은 9일의 발효기간과 3% 당 첨가 실험군에서 높은 함량으로 분석되었다.
3. *Bacillus subtilis* 균주를 통한 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물의 조사포닌 함량은 당 첨가와 관계없이 변화를 보이지 않았지만, HPLC를 통한 8종의 ginsenoside의 분석에서는 당 첨가에 따라 ginsenoside의 함량이 증대되었고, 3% 당 첨가 실험군에서 가장 높은 증대 효과를 보였다.
4. 위의 연구를 통해 선정된 최적의 발효조건인 9일의 발효기간과 3% 당 첨가를 통한 *acillus subtilis* 균주를 통한 발효된 수경재배 人蔘 잎 추출물을 이용한 간 손상에 대한 보호효과를 동물실험을 통해 간 손상지표인 GOP, GTP를 관찰한 결과 상당한 효과를 보였다.

결론적으로 人蔘 잎의 최적의 발효균주와 발효조건은 3% 당 첨가 및 *Bacillus subtilis* 균주를 통한 9일간 발효된 수경재배 人蔘 잎으로 나타났으며, 그 추출물의 ginsenoside 함량의 증대와 간 보호 통해 상대적으로 이용이 적은 부산물의 가치 증대와 발효 전에 비해 비교적 상당한 활성을 나타내는 발효를 통해 산업적 이용이 기대된다.

감사의 글

본 논문은 2013년도 중소기업청의 재원으로 2013년도 건강진단연계형 창업성장기술개발사업(S2134448)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

1. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DR, Boo YM. Herbological Study on herbal medicine. Seoul : Youngrim, 2008 : 761-6.
2. Benishin GC. Actions of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve endings. Neurochem Int, 1992 ; 21 : 1-5.
3. Hiroshi S, Nobuyoshi N, Akihiko I, Shinichi K, Toshiyuki H, Toshimi S, Chizu F. Effect of ginseng and its saponins on experimental amnesia in mice and on cell cultures of neurons. 5th Int'l Ginseng Symp of Korean Ginseng Society. 1988 : 92-8.
4. Kikuchi Y, Sasa H, Kita T, Hirata J, Tode T. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by ginsenoside-Rb2 and adjuvant effects of cisplatin *in vivo*. anticancer Drug. 1991 ; 2 :

- 63-7.
5. Singh VK, Agarwal SS, Gupta BM. Immunomodulatory activity of Panax ginseng extract. *Planta Med.* 1984 ; 50(6) : 462-5.
 6. Huo YS, Chen YZ, Yu ZY, Zhang PY. The effect of Panax ginseng extract(GS) on insulin and corticosteroid receptors. *J Tradit Chin Med.* 1998 ; 8(4) : 293-5.
 7. Oura H, Hiai S. Physical chemistry of ginseng. *Metabolism Disease.* 1973 ; 10 : 564-9.
 8. Kim HY, Chen X, Gills CN. Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium against free radical induced injury. *Biochem Biophys.* 1992 ; 189 : 670-6.
 9. Kang SY, Kim ND. The antihypertensive effect of red ginseng saponin and endothelium- derived vascular relaxation. *Korean J Ginseng Sci.* 1992 ; 18 : 175-82.
 10. Ogita S, Samugawa K. Clinical effectiveness of Korea ginseng on patients with climateric disturbance. *Ginseng Rev.* 1994 ; 18 : 95-8.
 11. Saito H, Bao TT. Effect of red ginseng on mice exposed to various stress. 4th Int'l Ginseng Sym of Korean Ginseng Society. 1984.
 12. Kim ND, Han BH, Lee EB, Kong JY, Kim MH, Jin CB. Studies of ginseng on the antistress effects. *Korean J Pharmacog.* 1979 ; 10 : 61-7.
 13. Brekham II. Ancient ginseng and pharmacology. *Symp of Institute of Gerontology.* 1976.
 14. Choi JH, Oh SK. Studies on the anti-aging acting of Korea ginseng. *Korean J Food Nutr.* 1983 ; 12 : 323-35.
 15. Mei B, Wang YE, Wu JX, Chen WZ. Protective effects of ginsenosides on oxygen free radical induced damages of cultured vascular endothelial cells in vitro. *Yao Hsueh Hsuuh Pao.* 1994 ; 29 : 801-8.
 16. Jung NP, Jin SH. Studies on the physiological and biochemical effects of Korea ginseng. *Korea J Ginseng Sci.* 1996 ; 20 : 431-71.
 17. Chang HK. Effect of precessing methods on the saponin contents of panax ginseng leaf-tea. *Korean J Food Nutr.* 2003 ; 16 : 46-53.
 18. Lee JW, Do JH. Antioxidative activity of ethanol extraction fraction from the Korean red tail ginseng. *Korean J Food Sci Technol.* 2001 ; 33 : 497-500.
 19. Zhang S, Takeda T, Zhu T, Chen T, Yao X, Tanaka Y, Okihara. A new minor saponin from the leaves of panax ginseng. *Planta Med.* 1990 ; 56 : 298-301.
 20. Zhang S, Yao X, Chen Y, Cui C, Tezuka T, Kikuchi T. Ginsenoside La, a novel saponin from the leaves of panax ginseng. *Chem Pharm Bull.* 1989 ; 37 : 1966-8.
 21. Lee GA, Chang YK, Park SY, Kim GA, Kim SH, Park KC, Kim YB, Cha SW, Song BH. Comparative Analysis on Concentration and Uptake Amount of Mineral Nutrients in Different Growth Stages and Temperatures of Panax ginseng C. A. Meyer Grown with Hydroponic Culture. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2012 ; 20(4) : 251-8.
 22. Burrage SW. Nutrient film technique in protected cultivation. *Acta Hort.* 1992 ; 323 : 25-38.
 23. Yang DC, Le QC. Bio-Conversion Technology of Ginseng Saponin for Production of Functional Foods. *J Ginseng Res.* 2008 ; 2 : 13-21.
 24. Jeon BS, Kwak YS, Baek SS. Research Prospect of Korean Ginseng Processing. *J Ginseng Res.* 2008 ; 2 : 7-12.
 25. Lee YC. Status of Ginseng Products. *J Ginseng Res.* 2007 ; 9 : 291-307.
 26. Doh ES, Chang JP, Lee KH, Seong NS. Ginsenoside Change and Antioxidation Activity of Fermented Ginseng. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2010 ; 18(4) : 255-65.
 27. Bondet V, Brand Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm Wiss u-Technol.* 1997 ; 30 : 609-15.
 28. Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 1999 ; 66 : 511-7.
 29. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr.* 1986 ; 44 : 307-15.
 30. AOAC. Official Methods of Analysis. 14th ed. Washington DC. : Association of Official Analytical Chemists. 1995 : 8-35.
 31. Aroraa, Nair G, Strasburg GM. Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of plavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med.* 1998 ; 24 : 1355-63.
 32. Rice-evans CA, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997 ; 2(4) : 152-9.
 33. Sanata S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O, Shibata S. Studies on the saponins of ginseng. Structure of ginseng-R0, Rb1, Rb2, Rc and Rd. *Chem Pharm Bull.* 1974 ; 22 : 421-8.
 34. Yokozawa T, Kobayashi T, Oura H, Kawashima Y. Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb2 in streptozotocin-diabetic rats. *Chem Pharm Bull.* 1985 ; 33 : 869-72.

35. Park JD. Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng. *Korean J Ginseng Sci.* 1996 20 : 389-415.
36. Lieber CS. Alcohol and liver. *Gastroenterology.* 1994 ; 106 : 1085-109.
37. Zimmerman HJ, Seeff LB. Enzymes in hepatic disease. In *Dagnostic Enzymology.* Goodley EL, ed. Philadelphia : Lea and Febiger Publisher, 1970 : 1-38.