



증숙 처리에 의한 산삼 부정 배양근의 저분자 진세노사이드 추출

이예지*¹ · 김희규**¹ · 고은지*** · 최재후**** · 조아름* · 김철중* · 이재근* · 임정대*** · 최선강**** · 유창연****†

*주화진바이오테크놀로지, **강원도산림과학연구원, ***강원대학교 생약자원개발학과,
****강원대학교 농생명산업학과, *****강원대학교 생물자원학과

Extraction of Low Molecular Weight Ginsenosides from Adventitious Roots Culture of Wild Mountain Ginseng by Steam Processing

Ye Ji Lee*¹, Hee Kyu Kim**¹, Eun Ji Go***, Jae Hoo Choi****, Ah Reum Jo*, Chul Joong Kim*,
Jae Geun Lee*, Jung Dae Lim***, Seon Kang Choi**** and Chang Yeon Yu****†

*Research Institute of Biotechnology, HwajinBioCosmetic, Chuncheon 24232, Korea.
**Gangwon Forest Science Institute, Chuncheon 24207, Korea.

***Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea.

****Department of Agricultural Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

*****Department of Bio-Resource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

ABSTRACT

Background: Hot steaming is known to be effective in improving the biological activities of plant extracts by breaking down useful compounds to low molecular weight ones.

Methods and Results: This study aimed to develop an optimal extraction and steam processing method for enhancing the low molecular ginsenoside contents of the adventitious roots culture of wild mountain ginseng. The total ginsenoside was optimally extracted when 70% EtOH was used at 50 °C, whereas low molecule ginsenoside such as Rg2, Rh1, Rh4 and Rk1 could be extracted using 70% EtOH at 70 °C. The adventitious roots culture of wild mountain ginseng is known to contain four major ginsenosides, i.e., Rb2, Rb1, Rg1 and Rd, however new ginsenosides Rg6, Rh4, Rg3, Rk1 and Rg5 were new abundantly obtained after steam processing method was applied. The contents of total ginsenosides were the highest when thermal steam processing was conducted at 120 °C for 120 min. Unlike ginsenosides such as Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, and Rh1, which decreased after steam processing, Rg3, Rk1, and Rg5 increased after thermal processing. Steam processing significantly reduced the content of Rb1, increased that of Rg6 by about ten times than that in the adventitious roots culture of wild mountain ginseng.

Conclusions: Our study showed that the optimal extraction and steam processing method increased the content of total ginsenosides and allowed the extraction of minor ginsenosides from major ones.

Key Words: Low Molecule Conversion, Ginsenoside, Mountain Wild Ginseng Adventitious Roots Culture, Steam Processing

서 언

산삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생 초본으로, 재배하지 않고 야생에서 자연적으로 발아하여 성장한 삼을 말한다. 맛은 달고 쓰며

온한 기운을 가지고 있는 약재로 알려져 있으며 (Shin, 2001; Park *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2008), 인삼과 장뇌삼에 비해 약효적인 면에서 우수하다고 알려져 있다 (Nam *et al.*, 2012).

산삼은 제한적 생산과 비용 문제로 산업적 활용의 어려움이

¹Ye Ji Lee and Hee Kyu Kim are contributed equally to this paper

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6410 (E-mail) cyyu@kangwon.ac.kr

Received 2018 February 28 / 1st Revised 2018 March 26 / 2nd Revised 2018 April 16 / 3rd Revised 2018 April 19 / 4nd Revised 2018 April 20 / Accepted 2018 April 23

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

있으나, 이를 극복하기 위해 생물공학적인 기법인 식물조직배양 기술과 대용량 생물반응기 (bioreactor)를 이용한 산삼 부정 배양근의 대량 증식 기술이 발달하고 있다. 이러한 생물공학 기법으로 배양된 산삼 부정 배양근은 유전적 조성이 안정적인 것으로 보고되고 있다 (Shin *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016).

산삼의 약효성분인 사포닌 (saponin)계 진세노사이드 (ginsenoside)는 triterpenoid 계열 화합물로, oleanane 계열과 dammarane 계열 saponin으로 구분되며, ginsenoside의 대부분은 dammarane 계열 saponin으로 carbon 3, 12, 20 번에 hydroxyl group이 있는 protopanaxadiol saponin (PDS) 계열, carbon 6, 12, 20 번에 hydroxyl group이 있는 protopanaxatriol saponin (PTS) 계열로 구분된다 (Tansakul *et al.*, 2006).

이 중 고분자 saponin은 3 개 이상의 당 (β -D-glucopyranosyl, α -L-arabinopyranosyl, α -L-rhamnopyranosyl)이 결합된 saponin을 뜻하며 당 (단당류) 사이 강한 이중결합을 띄고 있다. 하지만 고분자 saponin은 생체 내의 흡수가 현저히 낮아 흡수율 및 약리적 효능을 증대시키기 위해 저분자로의 전환이 필수적이며 (Yi *et al.*, 2012), 산과 미생물을 이용한 가수분해를 통해 고분자 saponin을 저분자 saponin으로 변환시키는 연구가 보고되고 있다 (Kim *et al.*, 2007).

대표적인 저분자 saponin으로는 Rg3, Rk1, Rg5, compound K 등이 있으며, Rg3는 혈압저하 (Jovanovski *et al.*, 2014), 항암효과 (Park *et al.*, 2013), Rk1, Rg5는 치매 예방효과 (Kim *et al.*, 2013), 아토피치료 (Ahn *et al.*, 2016), 골다공증 (Siddiqi *et al.*, 2014), compound K는 간 보호 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Lee *et al.*, 2005).

증숙은 직접적인 열처리를 통한 추출공정에서 나타나는 조직성분의 연소, 활성성분의 파괴, 그에 따른 활성성분의 수율 및 생리활성의 감소와 같은 단점을 극복하기 위해 적용되는 공정으로서, 습기를 통한 간접적인 열처리로 활성성분의 파괴를 막고 유용성분의 용출을 증진시킬 수 있는 공정으로 알려져 있다 (Song *et al.*, 2012). 또한 작물 내 구성 성분의 변화를 유도하여 새로운 화합물을 만들어 내거나 조직을 연화시켜 유용성분 용출을 극대화 하는 공정으로 사용되고 있다.

Kang 등 (2006)은 인삼을 대상으로 한 증숙 공정의 적용이 maltol, salicylic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid 등의 페놀성 화합물의 함량을 증가시킨다고 보고하였으며, Song 등 (2012)은 인삼의 고분자 형태 유용성분이 저분자화 되거나, ester form으로 conjugation되어 있는 phenolic compound가 free compound로 전환되어 효과적인 용출과 항산화 활성이 증가하였다고 보고하였다. 또한 인삼의 증숙으로 인해 고분자 ginsenoside인 Rg1의 감소와 함께 저분자 ginsenoside인 Rg3, Rh2, Rb1이 증가하는 형태로 ginsenoside가 변환된다는 보고가 있다 (Lee *et al.*, 2008).

본 연구에서는 산삼 부정 배양근을 대상으로 하여 추출용매, 시간, 온도, 횟수를 달리하여 적용하고 수율 및 총 ginsenoside 함량을 비교함으로써 최적의 추출 조건을 확립하였으며 다양한 증숙 조건별로 유도되는 저분자 ginsenoside 함량을 검정하여 저분자 ginsenoside 함량을 증진시키는 방법을 개발하고, 기능성과 체내 흡수율이 향상된 저분자 ginsenoside를 고농도로 함유한 원료를 산업적으로 활용하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 산삼 부정 배양근은 2017년 10월 주식회사 화진바이오테크 생명공학연구소에서 배양한 것을 실험 원료로 사용하였다.

배지조성물은 Schenk and Hildebrandt medium (Duchefa Biochemie, Harlem, Netherlands) 3.15 g/l, sucrose (Samyang Co., Seongnam, Korea) 30 g/l, pH 5.75 조건으로 18 l 생물반응기에 배양액을 제조한 후, 고온·고압 (127.0°C, 45 min, 0.15 mPa) 멸균하여 냉각하였다. 이후 pre-culture 된 산삼 부정 배양근 세포 30 g을 접종하여, 온도 25.0 ± 0.5°C, 습도 40.0 ± 5.0%, 광도 1,200 ± 50 Lux에서 8-9 주간 배양한 후, 수확하여 사용하였다.

2. 기기 및 시약

실험에 사용한 HPLC/VWD (high performance liquid chromatography/variable wavelength detector)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)의 ultimate 3000 series, 감압회전 농축기는 EYELA (Tokyo, Japan)의 N-1200, 초음파 추출기와 강제순환 건조기는 Jeiotech (Seoul, Korea)의 VCP-10와 OF-22GW, 미량전자저울은 Mettler Toledo (Columbus, OH, USA)의 ME204, 동결건조기는 Operon (Gimpo, Korea)의 FDTA-45, vortex mixer는 Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)의 BF-MXS, 분쇄기는 Shinil (Seoul, Korea)의 SMX-9400MD, 습윤고압 증숙기 Hankuk S&I (Hwaseong, Korea)의 HK-AC200을 사용하였다.

분석시약은 water, acetonitrile (AcN), ethanol (EtOH)은 J. T. Baker Chemical (Phillipsburg, NJ, USA)의 일급 또는 특급 제품을 구입하여 사용하였다.

진세노사이드 표준품 ginsenoside Rg1, ginsenoside Re, ginsenoside Rb2, ginsenoside Rb3, ginsenoside Rh1, ginsenoside Rd, ginsenoside Rg6, ginsenoside Rh4, ginsenoside Rg3, ginsenoside Rk1, ginsenoside Rg5, ginsenoside Rh2, ginsenoside Rh3는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 제품, ginsenoside Rb1은 HWI (Ruelzheim, Germany)의 제품, ginsenoside Rc, compound

K는 Chem Faces (Hubei, China)의 제품, ginsenoside Rg2는 Ambo Institute (Daejeon, Korea)의 제품을 구입하여 사용하였다.

3. 산삼 부정 배양근 조건별 추출

동결건조한 건조물 1 kg을 분쇄기를 이용하여 100 mesh로 분말화하여 용매, 시간, 온도, 횟수에 따른 추출수율 및 총 ginsenoside 함량을 확인하였다.

추출용매에 따른 조건으로 water, 20%, 40%, 60% 70% 80%, 100% EtOH을 시료 무게 당 10 배 (v/w) 혼합하였고, 추출시간에 따른 조건은 70% EtOH에 시료를 침지한 후, 2, 4, 6, 8, 16, 32 시간으로 나누어 추출을 실시하였다.

추출온도에 따른 조건은 30, 40, 50, 60, 70, 80°C, 추출횟수에 따른 조건은 1, 2, 3, 4 회로 나누어 실시하였다. 각 추출액을 0.45 µm filter (Sartorius Stedim Biotech Co., Gottingen, Germany)로 여과, 농축 및 동결건조하여 사용하였다.

4. 산삼 부정 배양근 증숙

생체 1 kg을 60, 80, 100, 120°C에서 30, 60, 120 분 습윤 고압 증숙기에서 각각 증숙한 후, 2 일간 동결건조 하였다. 건조가 완료되면 분쇄기를 이용하여 100 mesh로 분말화한 후, 70% EtOH 추출, 농축 및 동결건조하여 시료로 사용하였다.

5. 추출수율 측정

추출수율은 초기 투입한 산삼 부정 배양근 대비 동결건조 후 제조된 시료의 무게를 다음 계산식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{수율 (\%)} = B / A \times 100$$

A: 시험에 사용된 산삼 부정 배양근 무게

B: 동결건조 후 시료의 무게

6. 총 ginsenoside 분석

1) 분석시료 제조 및 분석

시료 약 2 g을 정밀히 측정하여 50 ml 부피 플라스크에 취하고, 완전하게 용해시키며 증류수를 표선까지 채운 후, Minisart® 0.2 µm filter (Sartorius Stedim Biotech Co., Gottingen, Germany)로 여과하였다.

총 ginsenoside는 HPLC 분석으로 실시하였다. Column은 Capcell pak C18 column (Shiseido Osaka Soda Co., Ltd., Osaka, Japan, 5 µm, 250 × 4.6 mm), 이동상은 solvent A; water, solvent B; acetonitrile (AcN)를 사용하였다. 시료 주입량 10 µl, 유속 1.0 ml/min, 온도 30°C, UV detector로 203 nm를

이용하였다.

이동상은 처음 5 분까지는 solvent A를 80% 수준으로 유지하였고, 5 분에서 20 분까지 solvent A의 농도를 77%, 20 분에서 25 분까지 solvent A의 농도를 70%, 25 분에서 30 분까지 solvent A의 농도를 60%, 30 분에서 60 분까지 solvent A의 농도를 50%로 유지하였다. 다시 60 분에서 65 분까지 solvent A의 농도를 15%를 낮추는 gradient system을 적용하여 수행하였다.

2) Ginsenoside 정량 분석

시험물질의 정량값은 측정값의 피크면적을 검량선 ($y = ax + b$) 식에 대입한 후 정량값 계산식에 의해 산출하였다. 검량선은 x축에 농도를 y축에 피크면적을 적용하여 최소자승법으로 계산하였다.

$$\text{정량값 계산식 (mg/g)} = C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$$

C: 시험용액 중 개별 ginsenoside 농도 (µg/ml)

a: 시험용액의 전량 (ml) S: 시료 채취량 (g)

b: 희석배수 1/1,000: 단위 환산 계수

7. 통계처리

모든 실험은 3 회 반복으로 진행하여 평균과 표준편차를 나타내었다. 실험에 관련된 통계처리는 SPSS program (Statistical Package for Social Science, Version 24; IBM, Chicago, IL, USA)를 이용하여 Duncan's Multiple Range Test (DMRT) 검증하였고, 통계적 유의성을 5% 수준에서 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 추출조건별 수율 및 총 ginsenoside 함량

1) 추출용매 조건별 비교

산삼 부정 배양근에 water 및 EtOH 농도별 용매를 적용하고 추출 수율을 조사한 결과 각 용매 당 추출 수율은 $1.44 \pm 0.05 - 2.79 \pm 0.13\%$ 의 범위를 나타냄을 확인하였으며, 70% EtOH로 추출하였을 때 $2.79 \pm 0.13\%$ 로 가장 높은 수율을 나타냈다 (Table 1).

총 ginsenoside 함량은 water 추출물에서 23.01 ± 1.09 mg/g 검출되었으며, EtOH 농도가 증가할수록 $23.19 \pm 0.69, 24.37 \pm 0.71, 25.59 \pm 0.89, 33.18 \pm 1.72, 38.36 \pm 1.72, 50.53 \pm 2.81$ mg/g으로 함량이 증가하였다. 모든 추출용매별 조건에서 Rh4, Rg3, Rk1, compound K는 검출되지 않았지만, 60% EtOH 추출부터 EtOH 농도가 증가할수록 Rb1, Rb2, Rd가 증가하여 총 ginsenoside 함량이 증가하였다 (Table 1).

증숙 처리에 의한 산삼 배양근 진세노사이드의 저분자 변환

Table 1. Yields and ginsenoside contents in the adventitious roots culture of wild mountain ginseng by different extraction solvents.

| Contents | | Treatment | Water | 20% EtOH | 40% EtOH | 60% EtOH | 70% EtOH | 80% EtOH | 100% EtOH |
|-------------------------|------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Concentration (mg/g) | Rg1 | | 3.77±0.31 ^c | 3.66±0.45 ^c | 4.28±0.05 ^b | 3.12±0.07 ^d | 3.34±0.24 ^{cd} | 4.22±0.08 ^b | 6.53±0.69 ^a |
| | Re | | 3.20±0.22 ^{bc} | 2.96±0.10 ^c | 3.55±0.34 ^b | 2.31±0.21 ^d | 2.40±0.28 ^{cd} | 3.40±0.26 ^{bc} | 5.25±0.28 ^a |
| | Rb1 | | 5.88±0.57 ^e | 5.70±0.12 ^e | 6.28±0.18 ^d | 7.13±0.10 ^c | 7.31±0.14 ^c | 10.07±0.39 ^b | 13.06±1.09 ^a |
| | Rc | | 0.76±0.15 ^d | 0.99±0.11 ^c | 1.02±0.15 ^c | 0.98±0.08 ^c | 1.34±0.22 ^b | 1.33±0.17 ^b | 1.51±0.18 ^a |
| | Rb2 | | 6.19±0.64 ^d | 6.95±0.27 ^{cd} | 7.27±0.00 ^c | 6.24±0.28 ^d | 9.03±0.38 ^b | 8.89±0.26 ^b | 9.50±0.28 ^a |
| | Rb3 | | - ¹⁾ | 0.05±0.00 ^e | 0.05±0.00 ^e | 0.10±0.01 ^d | 0.56±0.07 ^b | 1.20±0.12 ^a | 0.44±0.17 ^c |
| | Rg2 | | 0.09±0.02 ^b | 0.36±0.13 ^a | 0.19±0.24 ^b | - | - | - | - |
| | Rh1 | | - | - | - | - | - | - | - |
| | Rd | | 1.93±0.74 ^d | 1.34±0.12 ^{de} | 0.94±0.23 ^e | 4.89±0.25 ^c | 5.48±0.39 ^c | 6.78±1.13 ^b | 10.42±0.60 ^a |
| | Rg6 | | - | - | - | - | 0.99±0.19 ^b | 0.71±0.22 ^b | 1.40±0.15 ^a |
| | Rh4 | | - | - | - | - | - | - | - |
| | Rg3 | | - | - | - | - | - | - | - |
| | Rk1 | | - | - | - | - | - | - | - |
| | Rg5 | | - | - | - | - | 0.01±0.01 ^a | - | - |
| | Compound K | | - | - | - | - | - | - | - |
| | Rh2 | | 0.39±0.16 ^e | 0.51±0.18 ^d | 0.78±0.33 ^c | 0.50±0.08 ^d | 0.36±0.14 ^e | 0.97±0.02 ^b | 1.38±0.09 ^a |
| | Rh3 | | 0.76±0.16 ^b | 0.63±0.30 ^{bc} | - | 0.30±0.16 ^d | 0.53±0.09 ^c | 0.76±0.14 ^b | 1.00±0.04 ^a |
| | Total | | 23.01±1.09 ^d | 23.19±0.69 ^d | 24.37±0.71 ^d | 25.59±0.89 ^d | 33.18±0.58 ^c | 38.36±1.72 ^b | 50.53±2.81 ^a |
| | Yield (%) | | 2.1±0.02 ^c | 2.00±0.00 ^c | 2.36±0.04 ^b | 2.47±0.02 ^b | 2.79±0.13 ^a | 2.07±0.04 ^c | 1.44±0.05 ^d |

¹⁾-; not detected. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (n = 3). Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test (p < 0.05).

Table 2. Yields and ginsenoside contents in in the adventitious roots culture of wild mountain ginseng by different extraction times.

| Contents | | Treatment | 2 hour | 4 hour | 6 hour | 8 hour | 16 hour | 32 hour |
|-------------------------|------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Concentration (mg/g) | Rg1 | | 5.00±0.06 ^b | 4.38±0.64 ^c | 5.92±0.25 ^a | 4.56±0.23 ^c | 5.55±0.53 ^{ab} | 4.63±0.13 ^c |
| | Re | | 2.77±0.62 ^a | 2.40±0.24 ^{ab} | 2.55±0.05 ^{ab} | 1.94±0.35 ^c | 2.38±0.20 ^{ab} | 2.10±0.41 ^{bc} |
| | Rb1 | | 7.23±0.41 ^b | 6.18±0.30 ^c | 7.47±0.58 ^b | 7.55±0.63 ^b | 8.82±0.61 ^a | 8.66±0.75 ^{ab} |
| | Rc | | 1.80±0.58 ^{ab} | 1.91±0.67 ^a | 1.41±0.07 ^c | 2.01±0.45 ^a | 1.91±0.39 ^a | 1.66±0.25 ^b |
| | Rb2 | | 10.49±0.37 ^b | 15.09±0.89 ^a | 7.56±0.30 ^c | 15.35±0.23 ^a | 14.69±1.04 ^a | 15.22±1.25 ^a |
| | Rb3 | | 0.53±0.06 ^b | 0.32±0.05 ^c | 0.48±0.08 ^b | 0.72±0.06 ^a | 0.52±0.06 ^b | 0.42±0.07 ^{bc} |
| | Rg2 | | - ¹⁾ | 0.17±0.08 ^a | - | - | - | - |
| | Rh1 | | - | - | - | - | - | - |
| | Rd | | 4.86±0.91 ^{ab} | 4.23±0.77 ^b | 5.04±0.12 ^a | 4.01±0.98 ^c | 4.80±0.78 ^{ab} | 4.51±0.20 ^b |
| | Rg6 | | 1.15±0.07 ^d | 0.81±0.03 ^e | 0.99±0.02 ^{de} | 2.61±0.75 ^a | 1.52±0.08 ^b | 1.26±0.01 ^c |
| | Rh4 | | 0.32±0.07 ^a | 0.17±0.05 ^b | - | - | - | - |
| | Rg3 | | - | - | - | - | - | - |
| | Rk1 | | - | - | - | - | - | - |
| | Rg5 | | - | - | 0.04±0.02 ^a | - | 0.04±0.00 ^a | 0.02±0.00 ^b |
| | Compound K | | - | - | - | - | - | - |
| | Rh2 | | - | 0.28±0.10 ^c | 0.41±0.05 ^d | 1.36±0.77 ^a | 0.81±0.08 ^c | 0.96±0.04 ^b |
| | Rh3 | | - | 0.50±0.03 ^{bc} | 0.52±0.08 ^{bc} | 0.47±0.08 ^{bc} | 0.86±0.02 ^a | 0.41±0.09 ^c |
| | Total | | 34.14±1.13 ^b | 36.42±5.41 ^b | 32.38±1.31 ^b | 40.56±1.67 ^a | 40.49±1.57 ^a | 39.83±1.05 ^a |
| | Yield (%) | | 2.27±0.07 ^d | 2.55±0.01 ^c | 2.67±0.03 ^{bc} | 2.76±0.03 ^b | 2.80±0.13 ^b | 3.01±0.03 ^a |

¹⁾-; not detected. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (n = 3). Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test (p < 0.05).

Table 3. Yields and ginsenoside contents in the adventitious roots culture of wild mountain ginseng by different extraction temperatures.

| Contents | | Treatment | 30°C | 40°C | 50°C | 60°C | 70°C | 80°C |
|-------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Concentration (mg/g) | Rg1 | | 2.65±0.07 ^{ab} | 2.16±0.11 ^{bc} | 2.23±0.09 ^{bc} | 1.81±0.44 ^c | 3.10±0.19 ^a | 2.51±0.11 ^b |
| | Re | | 3.15±0.14 ^a | 2.14±0.05 ^{cd} | 2.38±0.22 ^{bc} | 2.00±0.12 ^d | 2.50±0.14 ^b | 3.18±0.00 ^a |
| | Rb1 | | 6.19±0.17 ^d | 7.28±0.05 ^c | 9.14±0.08 ^b | 5.45±0.24 ^e | 6.47±0.25 ^d | 11.09±0.61 ^a |
| | Rc | | 1.42±0.27 ^{bc} | 2.24±0.29 ^b | 2.11±0.06 ^b | 1.34±0.13 ^{bc} | 1.13±0.10 ^c | 3.56±0.85 ^a |
| | Rb2 | | 11.33±0.47 ^c | 16.87±1.25 ^b | 16.39±0.56 ^b | 18.84±1.03 ^a | 15.64±0.35 ^b | 2.23±0.22 ^d |
| | Rb3 | | 0.19±0.27 ^{bc} | 0.20±0.21 ^{bc} | 0.35±0.13 ^{bc} | 0.56±0.20 ^b | – | 2.29±0.12 ^a |
| | Rg2 | | 0.08±0.11 ^b | – | – | – | 0.36±0.05 ^a | – |
| | Rh1 | | – ¹⁾ | – | – | – | 0.23±0.02 ^b | 0.55±0.14 ^a |
| | Rd | | 3.32±0.13 ^d | 4.23±0.02 ^c | 5.88±0.23 ^b | 4.28±0.21 ^c | 3.55±0.24 ^d | 8.41±0.14 ^a |
| | Rg6 | | 0.08±0.08 ^c | 1.23±0.09 ^{ab} | 1.39±0.12 ^a | 1.21±0.07 ^b | – | – |
| | Rh4 | | 0.17±0.13 ^c | – | – | – | 1.33±0.07 ^b | 2.45±0.37 ^a |
| | Rg3 | | 0.34±0.21 ^b | – | – | – | – | 0.87±0.04 ^a |
| | Rk1 | | – | – | – | – | 0.03±0.04 ^a | – |
| | Rg5 | | – | – | – | – | 0.01±0.02 ^a | 0.01±0.01 ^a |
| | Compound K | | – | – | – | – | – | – |
| | Rh2 | | 2.41±0.12 ^a | 0.76±0.25 ^{cd} | 0.72±0.37 ^{cd} | 0.50±0.19 ^d | 1.47±0.42 ^b | 1.18±0.27 ^{bc} |
| | Rh3 | | 0.86±0.13 ^{ab} | 0.53±0.08 ^b | 0.96±0.32 ^a | 0.57±0.06 ^b | 0.52±0.22 ^b | 0.41±0.30 ^c |
| Total | | 32.24±0.38 ^b | 37.66±0.86 ^{ab} | 41.35±0.48 ^a | 36.61±2.20 ^{ab} | 36.37±1.51 ^{ab} | 38.78±0.75 ^{ab} | |
| Yield (%) | | 1.96±0.01 ^c | 2.28±0.04 ^{bc} | 2.54±0.04 ^b | 2.36±0.15 ^{bc} | 2.91±0.06 ^a | 2.85±0.08 ^a | |

¹⁾–; not detected. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (n = 3). Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test (p < 0.05).

Lee 등 (2016)은 EtOH 농도가 높아질수록 추출수율은 감소하지만 ginsenoside Rg1 함량이 23.0 mg/g으로 증가하였다고 보고하였고, Corbit 등 (2005)은 북미삼 (*P. quinquefolius* L.)의 추출에서 100% methanol을 사용하여 추출하는 경우 열수 추출 대비 ginsenoside Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, Rd 함량이 증가하였다고 하였으며, Kim과 Kim (2005)은 장뇌삼 추출액의 총 사포닌 함량은 water 추출액에서 3.12%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% EtOH 추출액에서 각각 3.60%, 3.68%, 5.08%, 5.72%, 6.24%로 EtOH 농도에 따라 총 사포닌 함량이 비례한다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사하였다.

2) 추출시간 조건별 비교

산삼 부정 배양근을 대상으로 최적용매인 70% EtOH을 적용하고 추출시간을 각각 2, 4, 6, 8, 16, 32 시간동안 추출하여 수율을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

추출시간 2 시간에서 2.27±0.07%로 가장 낮은 수율이 확인되었고, 추출시간이 증가할수록 수율이 증가하여 32 시간 추출에서 3.01±0.03%를 나타내어 산삼 부정 배양근을 70% EtOH을 적용하여 추출하는 경우 추출시간이 증가할수록 용출되는 양이 증가되고 이에 따라 추출 수율이 증가된다는 것을 확인하였다.

총 ginsenoside 함량은 6 시간 추출에서 32.38±1.31 mg/g으로 가장 낮은 함량을 보였고 8 시간 추출에서 40.56±

1.67 mg/g의 가장 높은 함량을 나타내어 ginsenoside의 함량은 8 시간이 가장 높은 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통하여 수율은 추출시간이 증가할수록 원재료로부터 용출되는 추출물의 양이 증가하지만 유용성분의 경우는 최적의 추출 시간이 존재한다는 것을 확인하였다.

3) 추출온도 조건별 비교

산삼 부정 배양근을 대상으로 최적용매인 70% EtOH을 적용하고 추출시간을 2 시간으로 고정하고 추출온도를 30 - 80°C로 달리하여 추출한 후 온도별 수율을 검정한 결과는 Table 3와 같다. 추출온도가 높아질수록 추출물의 수율도 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 추출온도를 70°C로 하여 추출한 경우 수율은 2.91±0.06%로 최대 수율을 나타냈다.

총 ginsenoside 함량은 50°C에서 추출하는 경우 41.35±0.48 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, Rb1, Rb2의 함량이 9.14±0.08, 16.39±0.56 mg/g을 나타내 총 ginsenoside 비율 중 61%를 차지하였다. 반면 70°C에서 추출하는 경우 총 ginsenoside 함량은 36.37±1.51 mg/g을 나타내어 50°C에서 추출하는 경우 보다 함량은 감소하였으나, Rh1, Rh4, Rk1 등이 미량 검출되었으며, 수율도 증가하였다.

Yang 등 (2006)은 홍삼을 추출하기 위해 24, 48, 72 시간의 추출시간과 섭씨 82, 93°C의 추출온도로 나누어 실시하였다. 시간에 따른 총 ginsenoside 함량은 24 시간 (0.13%)일 때

Table 4. Yields and ginsenoside contents in the adventitious roots culture of wild mountain ginseng by the number of extraction cycles.

| Contents | | Treatment | 1 cycle | 2 cycle | 3 cycle | 4 cycle |
|-------------------------|-----------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Concentration (mg/g) | Rg1 | | 2.40±0.04 ^a | 2.33±0.13 ^b | 1.85±0.05 ^c | 1.00±0.09 ^d |
| | Re | | 2.72±0.49 ^a | 2.51±0.46 ^a | 1.99±0.08 ^b | 2.21±0.08 ^{ab} |
| | Rb1 | | 5.24±0.72 ^b | 5.64±0.34 ^b | 4.15±0.41 ^c | 7.31±0.50 ^a |
| | Rc | | 0.91±0.08 ^a | 0.53±0.08 ^b | 0.50±0.04 ^b | 0.36±0.03 ^c |
| | Rb2 | | 9.66±0.97 ^c | 12.45±0.81 ^b | 17.78±0.21 ^a | 3.66±0.41 ^d |
| | Rb3 | | - ¹⁾ | 0.19±0.00 ^b | 0.16±0.01 ^b | 2.02±0.02 ^a |
| | Rg2 | | 0.22±0.03 ^b | - | - | 0.58±0.05 ^a |
| | Rh1 | | - | - | - | 0.07±0.00 ^a |
| | Rd | | 2.79±0.58 ^c | 3.50±0.27 ^b | 3.33±0.36 ^b | 7.16±0.28 ^a |
| | Rg6 | | 0.16±0.01 ^c | 0.54±0.06 ^a | 0.40±0.03 ^b | 0.52±0.10 ^a |
| | Rh4 | | 0.31±0.06 ^a | 0.23±0.01 ^b | - | - |
| | Rg3 | | 0.55±0.06 ^a | 0.56±0.06 ^a | - | - |
| | Rk1 | | - | - | - | 0.73±0.09 ^a |
| | Rg5 | | - | - | - | 1.22±0.08 ^a |
| Compound K | Rh2 | | 2.15±0.09 ^a | 2.03±0.06 ^a | 1.54±0.07 ^b | 1.11±0.07 ^c |
| | Rh3 | | 0.91±0.12 ^a | 0.91±0.04 ^a | 0.89±0.04 ^a | - |
| | Total | | 28.03±1.26 ^b | 31.40±0.56 ^a | 32.57±1.05 ^a | 27.95±0.54 ^b |
| | Yield (%) | | 2.34±0.09 ^a | 0.91±0.01 ^b | 0.37±0.02 ^c | 0.11±0.01 ^d |

¹⁾-; not detected. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (n = 3). Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test (p < 0.05).

높은 함량이 나타났지만, 추출시간이 지속될수록 감소하는 경향을 나타내었다. 온도에 따른 총 ginsenoside 함량은 93°C (1.42%)로 고온일 때 증가하였고, 온도가 증가함에 따라 PDS와 PTS의 비율이 0.40%에서 0.14%로 감소되었다. 이는 PDS가 PTS에 비해 열처리에 의해 보다 쉽게 가수분해가 되기 때문인 것으로 보고하였다.

Lee 등 (2011)는 인삼 화서 (inflorescence)를 75-95°C 고온으로 열수추출한 후, 11종의 ginsenoside를 분석한 결과에서 저분자 ginsenoside인 prosapogenin (ginsenoside Rh1, Rg3, Rg2, Rg5, Rh2, Rh4)의 총량은 75°C의 36시간 추출액이 11.69 mg/g, 85°C의 36시간 추출액이 18.38 mg/g, 95°C의 12시간 추출액이 18.58 mg/g로 증가하는 것을 보고하였다.

본 연구결과에서는 PDS 계열의 ginsenoside Rb1, Rc, Rb2, Rb3, Rg3가 PTS 계열의 ginsenoside Rg1, Re, Rg2보다 성분변화가 많은 것을 확인하였고, 추출온도 50°C 일 때 총 ginsenoside 함량 최대치를 나타내었으며, 그 이상 온도에서는 감소하는 경향을 보여 기존연구 결과와 유사한 것을 확인하였다.

4) 추출횟수 조건별 비교

산삼 부정 배양근을 대상으로 최적용매인 70% EtOH을 적용하고 추출시간을 2시간으로 고정하고 추출온도를 50°C로 고정된 후 추출 횟수별 추출수율을 확인한 결과는 Table 4와

같다. 추출횟수가 1차에서 4차 추출로 반복될 수록 수율은 2.34±0.09%, 0.91±0.01%, 0.37±0.02%, 0.11±0.01%순으로 감소하는 것을 확인하였다. 총 ginsenoside 함량은 27.95-32.57 mg/g으로 유사하였지만, 1차 추출과 달리 2차에서 4차 추출까지 추출되는 정도는 ginsenoside의 종류에 따라 다른 양상을 나타내었다. 추출횟수가 증가할수록 Rg1, Re는 감소하였고 Rb2는 3회 추출까지 증가한 후 감소하였으며 Rd, Rg6는 매회 증가하였고, 4차 추출에서는 이전까지 추출되지 않은 Rk1, Rg5가 0.73, 1.22 mg/g 검출되었다.

Ha 등 (2015)은 70% EtOH을 용매로 5회 추출한 후 얻어지는 ginsenoside 종류 및 함량을 검정한 결과에서 ginsenoside 중 Re, Rg1, Rd 함량이 추출 횟수가 늘어날수록 29.84 mg/g에서 2.15 mg/g까지 점차 감소하였다고 보고하였으나 본 연구에서는 Re, Rg1은 동일하게 감소하는 경향을 나타내었고 Rd는 증가하여 상이한 결과를 나타내었다.

2. 증숙 조건별 수율 및 총 ginsenoside 함량

산삼 부정 배양근 생체를 온도 (80-120°C)와, 시간 (30-120 분)으로 증숙한 후, 추출수율을 확인한 결과, 3.47±0.26%에서 4.59±0.34%의 범위를 나타내었고, 80°C 이상 온도조건에서는 4% 이상의 수율을 나타냈다. 반면, 증숙 처리를 하지 않은 대조군의 추출수율은 2.30±0.15%를 나타내어, 증숙 처리군에서 수율이 약 1.5배에서 2배 수준으로 증가됨을

Table 5. Yields and ginsenoside contents in the adventitious roots culture of wild mountain ginseng by different steam processing condition (temperature and time).

(Unit: %)

| | Control | Treatment (steam processing) | | | | | |
|--------|-------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 60°C | | | 80°C | | |
| | | 30 min | 60 min | 120 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| Rg1 | 16.46±0.12 ^a | 14.97±0.60 ^b | 14.52±0.65 ^b | 13.38±0.51 ^c | 14.22±0.30 ^b | 11.87±0.28 ^d | 11.30±0.53 ^d |
| Re | 9.06±0.35 ^a | 7.62±0.26 ^c | 7.82±0.15 ^{ab} | 6.34±0.54 ^{cd} | 6.00±0.52 ^e | 6.32±0.74 ^{cd} | 5.82±0.15 ^e |
| Rb1 | 23.46±1.15 ^b | 18.48±0.28 ^c | 21.02±0.21 ^{bc} | 18.73±0.58 ^c | 16.27±0.14 ^d | 21.30±0.18 ^{bc} | 17.99±0.43 ^{cd} |
| Rc | 3.03±0.05 ^a | 2.85±0.03 ^{bc} | 1.32±0.08 ^f | 0.97±0.90 ^g | 1.09±0.03 ^g | 1.03±0.01 ^g | 2.11±0.03 ^d |
| Rb2 | 29.18±2.13 ^c | 42.21±2.55 ^a | 29.32±1.65 ^c | 37.99±6.13 ^b | 43.41±2.12 ^a | 42.79±3.11 ^a | 45.32±4.23 ^a |
| Rb3 | — ¹⁾ | — | 8.04±0.11 ^a | 3.58±0.05 ^c | — | — | 0.94±0.03 ^e |
| Rg2 | — | — | — | — | — | 1.03±0.08 ^d | — |
| Rh1 | — | — | — | — | — | — | — |
| Rd | 4.29±1.12 ^g | 4.41±0.07 ^g | 8.33±0.05 ^d | 6.36±0.03 ^f | 6.29±0.02 ^e | 6.14±0.06 ^f | 7.74±0.03 ^e |
| Rg6 | 0.53±0.01 ^g | 1.55±0.03 ^e | 1.89±0.07 ^{cd} | 1.28±0.07 ^f | 1.87±0.06 ^{cd} | 1.40±0.06 ^{ef} | 1.33±0.05 ^h |
| Rh4 | 1.03±0.03 ^d | — | — | — | — | — | — |
| Rg3 | 1.83±0.09 ^d | — | — | — | — | — | — |
| Rk1 | — | — | — | — | — | — | — |
| Rg5 | — | — | — | — | — | — | — |
| Com. K | — | — | — | — | — | — | — |
| Rh2 | 7.16±0.31 ^d | 7.91±0.13 ^b | 7.74±0.12 ^{bc} | 8.31±0.11 ^a | 7.42±0.15 ^c | 5.26±0.12 ^e | 4.08±0.07 ^d |
| Rh3 | 3.03±0.11 ^b | — | — | 3.07±0.06 ^b | 3.43±0.03 ^a | 2.86±0.07 ^b | 2.53±0.08 ^c |
| Total | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| Yield | 2.36±0.10 ^e | 3.62±0.09 ^c | 3.46±0.06 ^d | 3.62±0.05 ^c | 4.27±0.03 ^{ab} | 4.20±0.05 ^{ab} | 4.42±0.16 ^a |

Table 5. Continued

(Unit: %)

| | Treatment (steam processing) | | | | | |
|-------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 100°C | | | 120°C | | |
| | 30 min | 60 min | 120 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| Rg1 | 8.24±0.41 ^f | 7.30±0.14 ^g | 8.14±0.14 ^f | 10.51±0.13 ^e | 11.55±0.52 ^d | 9.90±0.25 ^e |
| Re | 8.43±0.41 ^{ab} | 7.10±0.17 ^{cd} | 7.96±0.35 ^{ab} | 8.25±0.19 ^{ab} | 6.76±0.29 ^{cd} | 5.61±0.34 ^e |
| Rb1 | 15.11±0.27 ^e | 18.96±0.29 ^c | 19.04±0.28 ^c | 28.29±0.38 ^a | 22.89±0.38 ^b | 10.65±0.34 ^f |
| Rc | 1.69±0.04 ^e | 2.49±0.03 ^c | 2.82±0.01 ^{bc} | 3.86±0.04 ^a | 3.07±0.06 ^b | 2.57±0.05 ^c |
| Rb2 | 42.04±2.11 ^a | 45.53±2.18 ^a | 37.84±3.54 ^b | 24.32±2.01 ^d | 18.07±1.19 ^e | 22.99±1.98 ^d |
| Rb3 | 6.31±0.12 ^b | — | 3.88±0.04 ^c | — | — | 1.91±0.03 ^d |
| Rg2 | — | 1.77±0.09 ^c | 1.92±0.03 ^b | 2.56±0.10 ^a | 1.97±0.08 ^b | 2.06±0.09 ^b |
| Rh1 | — | 0.26±0.06 ^c | — | — | 0.84±0.05 ^b | 1.03±0.03 ^a |
| Rd | 7.82±0.09 ^e | 8.49±0.08 ^d | 9.11±0.03 ^c | 11.39±0.19 ^b | 12.09±0.09 ^a | 11.56±0.38 ^b |
| Rg6 | 1.71±0.05 ^d | 2.10±0.03 ^{cd} | 2.56±0.03 ^b | 1.96±0.05 ^{cd} | 2.26±0.11 ^c | 5.02±0.18 ^a |
| Rh4 | — | — | — | 2.15±0.05 ^c | 8.73±0.13 ^a | 2.70±0.12 ^b |
| Rg3 | — | — | — | 2.03±0.10 ^c | 4.37±0.12 ^b | 6.64±0.12 ^a |
| Rk1 | — | — | — | — | 0.83±0.09 ^b | 4.82±0.08 ^a |
| Rg5 | — | — | — | 0.66±0.09 ^c | 2.00±0.08 ^b | 6.06±0.29 ^a |
| Com. K | — | — | — | — | — | — |
| Rh2 | 5.31±0.05 ^e | 3.37±0.02 ^f | 3.46±0.07 ^f | 1.73±0.09 ⁱ | 1.97±0.08 ^h | 2.98±0.05 ^g |
| Rh3 | 3.34±0.05 ^a | 2.63±0.06 ^c | 3.25±0.06 ^{ab} | 2.29±0.05 ^d | 2.59±0.03 ^c | 3.50±0.07 ^a |
| Total ratio | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| Yield | 4.42±0.11 ^a | 4.23±0.06 ^{ab} | 4.36±0.02 ^a | 4.25±0.05 ^{ab} | 4.18±0.08 ^{ab} | 4.44±0.10 ^a |

¹⁾—; not detected. *Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (n = 3). Means within a row followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test (p < 0.05).

확인되어 홍삼의 제조 시 적용되는 증숙 처리과정에서 증숙 온도, 시간이 증가할수록 수율이 증가하였다는 보고 (Hong *et al.*, 2007)와 유사하였다.

Kim 등 (2006)은 인삼의 증숙은 찌고 말리는 일련의 과정을 반복하여 유효성분의 증진과 독성의 완화에 사용되며, 증숙시간이 연장될수록 호화 후 조직의 변화로 세포조직 사이의 도관, 수지관 등의 동공 및 세포막의 구분이 없어진다고 보고하였다. 본 시험결과에서도 증숙이 산삼 부정 배양근 세포막과 세포질의 소기관에 존재하는 물질의 용출을 촉진시켜 증숙하지 않은 대조군과 비교하여 높은 수율을 나타낸 것으로 사료된다.

증숙 조건별 총 ginsenoside 함량을 분석한 결과, 산삼 부정 배양근 대조군에서는 ginsenoside Rg1, Re, Rb1의 비율이 48.98%인 반면, 60 - 100°C 증숙 처리군에서는 Rg1, Re, Rb1는 감소하고, Rb2 비율이 증가하였다.

120°C 증숙 처리군에서는 Rb2 비율이 더욱 감소하고, ginsenoside 중 Rg2, Rd, Rg6, Rh4, Rg3, Rh2, Rh3 비율이 증가하였으며, 증숙시간이 길어질수록 검출되는 Rg2, Rd, Rg6, Rh4, Rg3, Rh2, Rh3 등의 ginsenoside 비율이 증가하여 120 분을 처리하였을 때, 최대치를 나타내었다.

Kim 등 (2017) 증숙삼류 생약을 대상으로 total ginsenoside의 함량 분포를 조사한 결과, ginsenoside Rg3, Rg5, Rk1의 함량에 있어서 홍삼 0.062%, 흑삼 10.012%로 증숙 공정 (시간, 온도, 건조조건)이 추가될수록 높은 함량을 나타내었고, Choi 등 (2010)은 백삼, 태극삼과 1 차, 3 차 증숙을 비교하였을 때, 10 중 ginsenoside 함량이 각각 0.99%, 1.28%, 1.02%, 1.45%로 용출되었으며, 백삼 ginsenoside 함량이 낮은 것은 malonyl ginsenoside가 ginsenoside와 공존함으로써, 수삼을 증숙함에 따라 가열처리에 의해 malonyl기가 탈환되어 각각의 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd로 전환되어 홍삼에서의 ginsenoside 함량이 증가하였다는 연구결과를 보고하였다.

본 연구에서는 산삼 부정 배양근의 추출 및 증숙으로 변화하는 수율과 total ginsenoside 함량 변화의 조건별 실험으로, 70% EtOH을 이용하여 8 시간 동안 50°C 에서 3 회 반복 추출하는 방법이 total ginsenoside 함량을 최대로 수득할 수 있는 추출법으로 확립하였으며, 증숙조건으로 120°C, 120 분 조건에서 산삼 부정 배양근 생체를 증숙할 때 total ginsenoside 함량이 최대로 증가하고, 고온의 증숙으로 인한 당 분해로 Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2는 감소하고, Rg6, Rh4, Rg3, Rk1, Rg5 등 저분자 ginsenoside 비율이 증가하여, Rg3, Rk1, Rg5가 17.25%까지 생성되는 것을 확인하였다.

산삼 부정 배양근은 무균조건하에 기내에서 배양배지 및 환경인자를 조절하여 배양·생산하는 기술로, 유효성분이 존재하지 않으며, 산삼과 동일하게 다양한 ginsenoside를 함유하고 있다. 또한 생산 육종연한이 짧아 그 활용성이 대두되는 원재

료로 산삼 부정 배양근의 prosapogenin 함량 향상을 위한 지속적인 연구가 수행되어 저분자 ginsenoside가 고농도로 함유된 기능성제품 개발에 기대가 모아질 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 경제협력개발기구(사업번호: R0004026)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn S, Siddiqi MH, Aceituno VC, Simu SY, Zhang J, Perez ZEJ, Kim YJ and Yang DC. (2016). Ginsenoside Rg5: Rk1 attenuates TNF- α /IFN- γ -induced production of thymus-and activation-regulated chemokine(TARC/CCL₁₇) and LPS-induced NO production via downregulation of NF- κ B/p38 MAPK/STAT₁ signaling in human keratinocytes and macrophages. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. 52:287-295.
- Choi JE, Nam KY, Li X, Kim BY, Cho HS and Hwang KB. (2010). Changes of chemical compositions and ginsenoside contents of different root parts of ginsengs with processing method. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:118-125.
- Corbit RM, Ferreira JFS, Ebbs SD and Murphy LL. (2005). Simplified extraction of ginsenosides from American ginseng(*Panax quinquefolius* L.) for high-performance liquid chromatography-ultraviolet analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:9867-9873.
- Ha YJ, Kim MR and Yoo SK. (2015). Process optimization of ginseng berry extract using mixed solvent and its ginsenoside analysis. *Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society*. 16:7794-7800.
- Hong HD, Kim YC, Rho JH, Kim KT and Lee YC. (2007). Changes on physicochemical properties of *Panax ginseng* C. A. Meyer during repeated steaming process. *Journal of Ginseng Research*. 31:222-229.
- Hong MH, Lim HK, Park JE, Jun NJ, Lee YJ, Cho MJ and Kim SM. (2008). The antihypertensive and vasodilating effects of adventitious root extracts of wild ginseng. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 51:102-107.
- Jovanovski E, Bateman EA, Bhardwaj J, Fairgrieve C, Mucalo I, Jenkins AL and Vuksan V. (2014). Effect of Rg3-enriched Korean red ginseng(*Panax ginseng*) on arterial stiffness and blood pressure in healthy individuals: A randomized controlled trial. *Journal of the American Society of Hypertension*. 8:537-541.
- Kang KS, Kim HY, Pyo JS and Yokozawa T. (2006). Increase in the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29:750-754.
- Kim CJ, Seong ES, Yoo JH, Lee JG, Kim NJ, Choi SK, Lim JD and Yu CY. (2016). Biological activity of *Panax ginseng* C. A. Meyer culture roots fermented with microorganisms. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:191-197.
- Kim CS, Jang DS and Che SY. (2006). Histological characteristics of Korean red ginseng in steaming processes. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 14:36-40.

- Kim HG, Kim KY and Cha CJ.** (2007). Screening for ginseng-fermenting microorganisms capable of biotransforming ginsenosides. *Korean Journal of Microbiology.* 43:142-146.
- Kim JH and Kim JK.** (2005). Effect of extracting conditions on chemical compositions of Korean mountain ginseng extract. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition.* 34:862-868.
- Kim JK, Kim SH, Lee DS, Lee DJ, Kim SH, Chung SK and Yang HO.** (2013). Effects of fermented ginseng on memory impairment and β -amyloid reduction in Alzheimer's disease experimental models. *Journal of Ginseng Research.* 37:100-107.
- Kim MY, Lee JB, Yang BW, Park JD and Ko SK.** (2017). The comparison of ginseng saponin composition and contents in steaming ginseng radix. *Yakhak Hoeji.* 61:274-280.
- Lee HU, Bae EA, Han MJ, Kim NJ and Kim DH.** (2005). Hepatoprotective effect of ginsenoside Rb1 and compound K on *tert*-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *Liver International.* 25:1069-1073.
- Lee JH, Kwon KR and Cha BC.** (2008). Component analysis of cultivated ginseng, red ginseng, cultivated wild ginseng, and red wild ginseng using HPLC method. *Journal of Pharmacopuncture.* 11:87-95.
- Lee JW, Mo EJ, Choi JE, Jo YH, Jang H, Jeong JY, Jin Q, Chung HN, Hwang BY and Lee MK.** (2016). Effect of Korean red ginseng extraction conditions on antioxidant activity, extraction yield, and ginsenoside Rg1 and phenolic content: Optimization using response surface methodology. *Journal of Ginseng Research.* 40:229-236.
- Lee NR, Han JS, Kim JS and Choi JE.** (2011). Effects of extraction temperature and time on ginsenoside content and quality in ginseng(*Panax ginseng*) flower water extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 19:271-275.
- Nam SH, Rhee YK, Hong HD, Lee YC, Kim YC, Shin KS and Cho CW.** (2012). Immuno-modulatory activity of the crude polysaccharide from wild ginseng adventitious root. *Korean Journal of Food and Nutrition.* 25:755-761.
- Park CK, Jeon BS and Yang JW.** (2003). The chemical components of Korean ginseng. *Food Industry and Nutrition.* 8:10-23.
- Park EH, Kim YJ, Yamabe N, Park Sh, Kim HK, Jang HJ, Kim JH, Cheon GJ, Ham JY and Kang KS.** (2013). Stereospecific anticancer effects of ginsenoside Rg3 epimers isolated from heat-processed american ginseng on human gastric cancer cell. *Journal of Ginseng Research.* 38:22-27.
- Shin CS, Lee DH, Kim SH, Shin MH, Jeong CH and Shim KH.** (2010). Ginsenoside contents and antioxidative activities from red ginseng treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Agriculture and Life Science.* 44:133-140.
- Shin MH.** (2001). Study of mountain ginseng adventitious culture and application. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea.* 27:45-56.
- Siddiqi MH, Siddiqi MZ, Ahn SG, Kang SR, Kim YJ, Veerappen K, Yang DU and Yang DC.** (2014). Stimulative effect of ginsenosides Rg5: Rk1 on murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytotherapy Research.* 28:1447-1455.
- Song CH, Seo YC, Choi WY, Lee CG, Kim DU, Chung JY, Chung HC, Park DS, Ma CJ and Lee HY.** (2012). Enhancement of antioxidative activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 20:238-244.
- Yang BW, Han ST and Ko SK.** (2006). Quantitative analysis of ginsenosides in red ginseng extracted under various temperature and time. *Korean Journal of Pharmacognosy.* 37:217-220.
- Yi EJ, Lee JM, Yi TH, Cho SC, Park YJ and Kook MC.** (2012). Biotransformation of ginsenoside by *Lactobacillus brevis* THK-D57 isolated from kimchi. *Korean Journal of Food and Nutrition.* 25:629-636.