

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2022.8.2.409

JCCT 2022-3-54

사전 열처리 공정 처리한 야채류 복합추출물의 항산화활성 평가

Antioxidant Activity Evaluation of Vegetable Complex Extract of Pre-Heat Treatment Process

김현경*, 황혜영**, 김흥태***, 김혜진****, 서수진*****

Hyun-Kyoung Kim*, Hye-young Hwang**, Heung-Tae Kim***,
Hye-Jin Kim****, Soo-Jin Seo*****

요약 식재료로서 안전성이 확립되고 항산화성이 입증되어 있으며, 유의한 생리활성을 나타내는 성분을 동시에 섭취할 수 있는 과일 및 야채의 복합 추출물을 항산화 활성이 더욱 증가하도록 가공한 항산화성 복합 추출물의 항산화 활성을 평가하였다. 실험 결과에 의하면 항산화성 복합 추출물은, 사전 열처리 과정을 추가하는 것에 의해 DPPH 라디칼 소거능으로 측정되는 항산화능이 41% 증가하여 항산화성이 현저하므로, 항산화능을 이용한 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 식품 조성물에 유용하게 사용될 수 있다는 결과를 얻었다.

주요어 : 증숙, 유산균 발효, 프로테아제, 항산화활성, DPPH 라디칼 소거능

Abstract As a food ingredient, the extract has been proven of its antioxidant properties and safe to be consumed. It's increased antioxidant activity was evaluated by comparing its activity to the complex extract of fruits and vegetables, which is known to exhibit both antioxidant and physiological activities. In this experiment, after pre-heat treatment process, the increased antioxidant extract showed 41% of DPPH radical scavenging activity. The remarkable antioxidant activity of the produced extract will become useful in creating cosmetic or health products.

Key words : Steaming, Lactobacillus Fermentation, Protease, Anti-oxidant Activity, DPPH Radical Scavenging Activity

1. 서론

급속한 경제성장에 따른 국민 생활수준의 향상과 식생활의 서구화로 인해 압, 동맥경화, 비만, 당뇨 등과 같은 성인병의 발병율이 급격하게 증가하고 있다. 또한

생활수준의 질적 향상, 소비구조의 고급화, 다양화, 평균수명의 증가에 따라 건강한 삶에 대한 관심이 꾸준히 증가하고 있다. 이에 따라 활성산소의 생성을 억제하거나, 생성된 활성산소를 제거하는 효능이 있는 항산화 물질에 대한 연구가 많은 관심을 받고 있다. 항산화 물질은

*정회원, 서원대학교 식품공학과 조교수 (제1저자, 교신저자)
**정회원, 서원대학교 휴머니티교양대학 부교수 (참여저자)
***정회원, 서원대학교 생물교육과 조교수 (참여저자)
****정회원, 서원대학교 음악교육과 조교수 (참여저자)
*****정회원, 서원대학교 체육교육과 조교수 (참여저자)
접수일: 2022년 2월 28일, 수정완료일: 2022년 3월 1일
게재확정일: 2022년 3월 8일

Received: February 28, 2022 / Revised: March 1, 2022

Accepted: March 8, 2022

*Corresponding Author: Kimhk4@seowon.ac.kr

Dept. of Food Science and Engineering, Seowon Univ, Korea

합성 항산화제와 천연 항산화제로 구분된다[1,2].

합성 항산화제로는 BHA(butylated hydroxy anisol)과 BHT (butylated hydroxy toluene)가 가장 널리 사용되고 있다. BHA나 BHT는 우수한 항산화 효과로 인하여 가공식품의 산화방지제로 널리 사용되었으나, 발암성 및 알레르기 유발 가능성이 제기되면서 사용 대상과 사용량을 법적으로 엄격하게 규제하고 있다. 이에 보다 안전하게 사용할 수 있는 항산화 물질로서, 천연 항산화제를 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다 [3]. 식물 속에는 파이토케미컬(phytochemical)로 불리는 생리활성을 나타내는 다양한 물질들이 함유되어 있으며, 이 중에는 항산화성을 나타내는 물질 또한 포함되어 있다. 파이토케미컬은 예를 들어 빨간색, 보라색, 초록색, 노란색, 흰색 등 주로 과일과 야채의 색을 나타내는 성분과 관련되어 있으며, 따라서 다양한 색의 과일과 야채를 섭취하는 것이 중요하다. 특히 과일과 야채는 오랜기간 동안 식품으로서 섭취되어 안전성이 확립되어 있으므로 안심하고 사용할 수 있으며, 다양한 과일과 야채의 복합 추출물은 항산화성 뿐만 아니라 각 재료가 가지고 있는 해독작용, 면역기능, 항균작용, 호르몬 작용과 같은 다른 유익한 생리활성을 나타내는 성분을 동시에 섭취할 수 있는 장점이 있다. 또한, 기본적으로 과일이나 야채에 함유되어 있는 항산화 물질에 의한 항산화성보다 더 높은 항산화성을 나타낼 수 있도록 가공할 수 있다면, 더 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다[4,5].

따라서 식재료로서의 안전성이 확립되고 항산화성이 입증되어 있으며, 유익한 생리활성을 나타내는 성분을 동시에 섭취할 수 있는 과일 및 야채의 복합 추출물을 항산화 활성이 더욱 증가하도록 가공한 항산화성 복합 추출물의 제조 전 사전 열처리를 실시하고, 추출물을 제조하여 항산화성을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약류

TLC Silica gel 60 F254 aluminium sheets(M 1.05554.0001, 20x20cm)을 10x10cm로 절단하여 사용하였다. Folin & ciocaltue's phenol reagent(Sigma F-9252), aluminium chloride 6-hydrate(YAKURI PURE CHEMICAL CO., Japan: Test No. 01709), gallic

acid (SAMCHUN, G0448) 및 quercetin(Sigma Q-0125)을 폴리페놀 및 플라보노이드의 발색시약과 정량용 표준품으로 각각 사용하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma, D9132)은 DPPH라디칼 소거능 측정용으로, linoleic acid(Aldrich S2240-250ml) 및 2-thiobarbituric acid(Sigma-Aldrich T5500-25g)은 TBA 항산화능 측정용 시약으로 각각 사용하였다. 기타 시약류와 용매류는 extra pure grade 시약을 사용하였다.

2. 시험 기기

Microplate reader(Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific: Type 1510), Incubator(SANYO, CO₂ incubator), Autoclave(Han Back Scientific Co., Model HB-506), Freeze dryer(Ilsin Lab Co. LTD.) Evaporator (EYELA, Type N-N), Centrifuge(Ha@nil, Mega 17R), Shaking incubator (Vision Scientific, VS 8480SF)

3. 복합 추출물 재료의 선정

항산화능에 관한 선행 문헌조사, 향미 평가 및 연중 재료의 입수 용이성을 고려하여 사과, 무, 브로콜리, 양배추, 당근, 블루베리 및 대추를 재료로 선정하였다. 연중 신선한 재료를 얻을 수 있는 사과, 무, 브로콜리, 양배추, 당근은 신선한 재료를 약 5 cm 두께로 잘라 사용하였고, 블루베리는 냉동 유통품을 구입하여 사용하였으며, 대추는 건조품을 작은 조각으로 잘라 사용하였다.

4. 복합추출물의 제조

선정한 추출물의 재료는 600g을 각각 기준으로 하고, 다만 블루베리는 냉동품을 200g을 사용하였다. 사과, 무, 브로콜리, 양배추, 당근은 신선한 재료를 약 5 cm 두께로 절단하고, 건조 대추는 작은 조각으로 자른 후 총 3,800g을 추출용 재료들을 추출 여과용 부직포에 넣은 상태로 알루미늄 20L 용기에 넣었다. 용기의 뚜껑은 제거한 상태로 autoclave(Han Back Scientific Co., Model HB-506)에 넣은 다음, 재료가 탄화되지 않도록 autoclave에 물을 넣고 평압에서 100℃로 2시간 열처리 하였다. 이때 재료에 직접적으로 물이 닿지 않도록 하였다. 열처리된 재료에 1.2배(v/w), 4560 mL의 정제수를 90℃에서 3시간 추출하고, 이어서 100℃에서 1시간 추출하여 총 4시간 추출하였다. 추출액을 실온으로 식힌

다음 여과 및 세척하고, 사용한 재료와 동량이 되도록 농축하여 총 추출액의 부피를 3,800 mL로 조정하여 실험에 사용하였다.

5. 유산균 배양 및 유산균 수 측정

유산균 배양은 유산균 배양과정에서 유산균 배양 starter 로 사용되는 4종의 유산균제품을 녹용 물추출물 (5 Brix)에 2% (w/v)를 각각 첨가하여 37°C에서 2일간 배양하였다. 한편, 동물성 단백질의 가수분해에 주로 사용되는 protease 효소제품류 4종을 검토 후 Maxazyme NNP DS(Maxazyme)을 선정하여 녹용 물추출물에 2%(w/v)를 가하여 50°C에서 24시간 효소반응을 한 다음 autoclave에 넣고 90°C에서 1시간 가열 살균 후 유산균 starter제품 4종을 각각 2% (w/v)를 첨가하여 유산균을 배양하였다. 유산균 수 측정은 녹용 물추출물에 유산균 starter제품 4종을 각각 2% 농도 (W/V)로 첨가하여 37°C에서 2일간 배양한 다음 증식된 유산균 수를 측정하였다. 유산균 수의 측정은 한국 식약처 기능성식품공전 시험법의 유산균 수 측정방법에 준하여 BCP 샬레 배지에 첨가하여 37°C에서 2일간 배양하여 그 수를 측정하였다[6].

6. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정은 김 등의 방법을 다소 변형하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 녹용 물추출물, 유산균 발효균 및 protease 반응 후 유산균 발효균을 5 mL씩 취하고 여기에 동량의 ethanol을 각각 첨가한 다음 시험관 진탕기로 균질화하였다. 그 다음 상등액 1 mL을 취하여 12,000rpm으로 원심분리하여 상등액을 검액으로 사용하였다. 한편 본 실험에서 양성 대조군으로 사용한 gallic acid, quercetin 및 BHT는 각각 50% ethanol에 용해시켜 0.1mM농도로 조제하여 사용하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정용 시약은 사용 직전에 DPPH를 ethanol에 용해시켜 5 x 0.1 mM 농도로 조제하여 사용하였다. 시료용액 및 대조군 용액을 각각 200 uL을 EP튜브에 취하고 여기에 DPPH 용액을 200 mL씩 가한 다음 뚜껑을 닫고 5초간 상하로 맹렬히 진탕하였다. 그 다음 12,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 각각 microplate reader plate에 200uL씩 취하여 총 10분 경과 후 517nm에서 3반복으로 검액의 흡광도를 동시에 측정하고 평균값을 제시하였다. 측정된 값은

다음과 같은 공식을 이용하여 EDA(electron donating ability, %) 값으로 산출하였다[3].

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Abs of blank} - \text{Abs of sample}}{\text{Abs of blank}} \times 100$$

7. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 홍 등의 방법을 참조하여 다음과 같은 실험조건으로 정량하였다. 시료별로 조제된 검액 및 gallic acid 농도별 표준액을 각각 400 uL을 취한 다음 50 % Folin & ciocaltue's phenol reagent을 100 uL을 가하였다. 실온에서 5분간 방치 후 2% sodium carbonate을 200 uL을 가한 다음에 진탕하고 12,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 시료별로 상등액을 각각 200 uL씩 취하여 96 well cell culture plate에 가한 다음에 실온에서 10분 경과한 다음 microplate reader를 이용하여 750nm에서 흡광도를 측정하여 총 폴리페놀 함량을 gallic acid 표준검량선을 이용하여 정량한 다음 gallic acid equivalent로 환산하였다.

8. TBA값 측정 항산화능 비교

8.1. 기질용액과 반응액의 조제

linoleic acid 기질에 대한 말론알데히드(malon dialdehyde: TBA)의 생성 억제효과를 TBA값을 측정하여 산패 억제효과를 조사하였다. 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid 을 0.03M이 되도록 첨가하여 기질용액으로 사용하였다. 50ml의 팔콘 튜브에 기질용액 5ml와 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) 4.5 mL을 가하고 여기에 검액 0.5 mL을 가한 다음에 shaking air bath (37°C)에서 130rpm으로 1주일 동안 연속적으로 shaking한 다음 TBA 값을 측정하였다.

8.2 TBA 값의 측정

TBA 값은 Mitsuda 등 및 Sidwell 등 방법을 참조하여 다음과 같이 본 실험에 적합한 방법으로 변경하여 측정하였다. 반응액을 각각 37°C에서 1주일 동안 연속적으로 shaking을 한 다음에 시료별로 각각 2.0 mL씩을 취하고 여기에 35% trichloroacetic acid 1.0 mL, 0.75% TBA 시액 2.0 mL을 가한 다음에 시험관 진탕기로 진탕시켜 30초 동안 진탕하여 균질화 시킨 후 water bath (95°C)에서 40분 간 발색시켰다. 발색반응이 끝난 후 수돗물 수조에서 냉각시키고 acetic acid 1.0mL,

chloroform 2.0mL을 가진 다음에 시험관 진탕기로 다시 진탕시킨 후 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 그 다음 상등액을 각각 Cell Culture plate (HYUNDAI 96 WELL, H31096)에 200uL씩 3반복으로 취하고 microplate reader의 532nm에서 흡광도를 동시에 측정하고 평균값을 제시하였다. TBA value를 측정하고 다음과 같은 공식을 이용하여 Antioxidant activity (%) 값으로 산출하였다[7,8].

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{\text{Abs of blank} - \text{Abs of sample}}{\text{Abs of blank}} \times 100$$

III. 실험결과

3.1. 과일 및 야채류 혼합추출물의 수분함량 조사

과일야채류 재료의 수분함량 조사는 잘게 컷팅한 시료를 105℃ 거의 항량이 되도록 건조하여 측정하였다. 신선 재료의 수분함량은 82.02% ~ 95.72%로 시료간의 함량 차이가 현저하였다. 대추는 연중 신선한 재료를 구입할 수가 없어서 건조품을 시료로 사용하였다. 사용한 상태의 각 재료를 105℃에서 항량이 될 때까지 건조한 후, 건조 전과 건조 후의 무게를 측정하여 그로부터 수분함량을 계산하였다(Table 1).

표 1. 수분함량 측정

Table 1. Determination of moisture content of samples used in this study

Complex Samples	Moisure contents(%)
Apple	84.26
Radish	95.72
Cabbage	93.13
Broccoli	89.21
Carrot	90.12
Blueberry	82.02
Jujube	10.50

표 2. 과일 및 야채류 물추출물의 pH 및 건조추출물 함량

Table 2. pH and dry extract content of water extracts of fresh vegetables

Sample preparation and extraction conditions	Water extract of fresh vegetables		Water extract after steaming fresh vegetables	
	pH	Driedextract (mg/100ml)	pH	Driedextract (mg/100ml)
Apple	4.39	3.73	4.36	4.34
Radish	5.87	0.52	5.50	0.84
Cabbage	5.73	0.99	5.47	1.78
Broccoli	6.23	0.96	5.69	1.07
Carrot	5.95	1.68	5.52	2.09
Blueberry	3.90	7.60	3.82	7.43
Jujube	4.87	3.14	4.34	3.38

2. 과일 및 야채류의 추출물의 pH 및 건조 extract 함량 조사

신선한 과일 야채류의 추출물의 시료에 따라서 pH는 3.90~6.23으로 시료에 따라서 차이가 현저하였다. 한편 신선한 동일 재료를 100℃에서 증숙 후 동일한 조건으로 추출한 추출액의 pH는 3.82~5.69로 시료에 따라서 전반적으로 낮아지는 경향이 있었다. 이것은 야채의 가열 증숙과정에서 갈색화반응 촉진에 따른 갈색화반응의 촉진으로 유기산의 전환 생성이 증가되어 pH가 낮아지는 경향과 상관성이 있을 것으로 고찰되었다. 한편 신선한 과일야채 혼합물을 증숙 후 동일 조건으로 추출하였을 때 전반적으로 extract의 함량은 증가 경향을 보였다. 이것은 증숙 과정에서 Amino-carbonyl 갈색화반응 촉진에 따른 물 가용성 성분의 증가에 기인되는 것으로 간주되었다(Table 2).

3. 과일 및 야채류의 개별 추출물의 가열처리 처리 조건에 따른 DPPH radical scavenging activity

사과 추출물의 DPPH radical scavenging activity는 87.33으로 매우 강력하였으며 증숙 후 추출과정에서 일부 활성분의 감소에 기인하여 그 활성은 감소되는 것으로 고찰되었다. 그 외에는 시료에 따라서 활성이 다소 증가되거나 감소되는 경향을 보였다. 활성이 증가된 시료는 증숙 과정 중에 새로운 활성성분이 생성되는 경우와 관련이 되고, 그 활성이 감소되는 경우는 증숙 과정에서 이와 관련된 활성 성분의 감소와 관련된 것으로 사료된다(Table 3).

4. 과일 및 야채류 혼합 추출물의 유산균 발효 및 활성조사

과일 및 야채류의 유산균 발효는 신선한 재료 추출구에 비하여 증숙구의 유산균 발효물에서 유산균의 수가 상당히 증가되었다. 이와 같은 추출물에 홍삼 엑스를 각각 1%를 첨가하여 유산균 발효결과, 유산균 증식이 다소 저조한 신선재료 추출구는 홍삼엑스의 첨가 효과가 양호하였으나 유산균 증식이 양호한 증숙 후 추출구에서 홍삼엑스의 첨가 효과가 적었다(Table 4).

표 3. 본 연구에 사용된 청과물 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성
 Table 3. DPPH radical scavenging activity of water extract of fruits and vegetables used in this study

Samples	Activity(%) of fresh sample extract	Activity (%) of Steamed sample extract
Apple	87.33 ± 0.69	69.68±0.15
Radish	11.71 ± 0.77	16.27±0.53
Cabbage	17.62 ± 0.40	18.52±0.44
Broccoli	43.10 ± 1.90	42.91±0.87
Carrot	38.67± 0.30	32.32±0.67
Blueberry	93.44 ± 0.66	91.01±0.76
Jujube	52.83 ± 0.69	58.80±0.40
Gallic acid	87.64 ± 0.34	-

5. 과일 및 야채류의 혼합물의 가열처리 처리조건에 따른 DPPH radical scavenging activity

과일 및 야채류의 혼합물의 신선한 상태의 추출물 DPPH radical scavenging activity 활성 29.21%에 비하여 증숙 추출물은 41.28%로 현저한 증가를 보였다. 또한 이들 추출물에 홍삼엑스를 1% 첨가한 경우에도 활성이 다소 증가되는 경향을 보였다. 대조구 표준품은 total polyphenols 정량용 표준품으로 사용한 Gallic acid와 total flavonoids 정량용 표준품을 사용한 Quercetin을 사용하였다. 한편 대표적인 합성 항산화제인 BHT는 DPPH radical scavenging activity 활성은 없었다. 그러나

증숙 추출물 및 홍삼엑스 1% 첨가구의 유산균 발효구는 대체로 DPPH radical scavenging activity의 감소경향을 보였다. 이것은 유산균 발효과정에서 유효성분의 감소와 관련이 있거나, 또는 유산균 발효 후 발효액의 점액질 물질이 증가되어 여과과정에서 여지 위에 여과 잔유물이 증가됨에 따라 관련된 활성성분이 감소가 된 것인지 추출 검토가 필요한 사항이다(Table 5).

6. 과일 및 야채 혼합 재료별 추출액 및 발효액의 전처리 조건에 따른 total polyphenols 정량

과일 및 야채 혼합 재료별 추출액 및 발효액의 전처리 조건에 따른 total polyphenols 정량 시험 결과 Table 6에서와 같다. 과일야채 혼합추출물은 159.70~184.16 ug/mL 수준이었으나 홍삼엑스를 1%씩 각 첨가한 구에서는 213.784~231.19 ug/mL로 증가되는 경향을 보였다. 한편 유산균 발효구에서는 total polyphenols의 함량이 전반적으로 감소되는 되었다. 이들 야채 추출물의 유산균 발효액에서 total polyphenols의 함량이 감소되는 원인에 대해서는 발효과정에서 유산균 증식에 따라서 영양원으로 이용되어 감소될 수 있는 가능성과 유산균 발효액의 점도가 증가되어 여과 전처리 과정에서 감소가 될 수 있는 가능성을 고려해 볼 수 있다(Table 6).

7. 과일 및 야채류 추출물 및 생약재 추출물의 유산균 발효에 의한 인삼 사포닌의 구조전환 특성 조사

7.1. 홍삼 사포닌의 추출 및 분획물 분리정제

과일 및 야채 추출물 및 생약재 추출물과 유산균 발효물에서 홍삼 사포닌의 ginsenosides는 Figure 1와 같은 방법으로 추출 및 분획하였다. 홍삼 사포닌의 ginsenosides가 함유된 1-butanol layer의 분획을 분리한 다음에 동량을

표 4. 과일 및 야채류 혼합 물추출물을 이용한 유산균 발효 후 유산균수 측정

Table 4. Measurement of the number of lactic acid bacteria after fermentation of lactic acid bacteria using water extract of a mixture of fruit and vegetable extract

Sample	Number of viable cells	Remarks
A. <i>Lactobacillus</i> fermentation (Lab/F*) with the fresh sample extract	2.90x10 ⁷ (cfu/ml)	Fermentation at 37°C for 48 hours by adding a starter of 8 kinds of lab mixture*
B. Lab/F* with the steamed sample extract	3.57x10 ⁷ (cfu/ml)	Fermentation at 37°C for 48 hours by adding a starter of 8 kinds of lab mixture*
C. Lab/F* with 1% red ginseng extract added to the fresh sample extract	3.79x10 ⁷ (cfu/ml)	Fermentation at 37°C for 48 hours by adding a starter of 8 kinds of lab mixture*
D. Lab/F* with 1% red ginseng extract added to the steamed sample extract	3.68x10 ⁷ (cfu/ml)	Fermentation at 37°C for 48 hours by adding a starter of 8 kinds of lab mixture*

표 5. 연구에 사용된 과일 및 채소 추출물과 유산균 발효 추출물의 혼합물의 DPPH 라디칼 소거 활성
Table 5. DPPH radical scavenging activity of a mixture of fruit and vegetable extract and lactic acid bacteria fermented extract used in this study

Samples	DPPH radical scavenging activity
Extract after steaming 7 fresh sample mixture	41.38 ± 0.91
Extract of a mixture of 7 fresh samples	29.21 ± 0.60
Gallic acid	87.64 ± 0.34
Quercetin	70.59 ± 1.04

표 6. 비가열처리 및 가열처리 시료의 추출물 및 유산균 발효 추출물의 총 폴리페놀 측정
Table 6. Total polyphenol determination of extracts and lactic acid bacteria fermented extracts of fresh and steamed samples

Samples	DPPH radical scavenging activity
Extract of a mixture of 7 fresh samples	184.16±0.67
Extract after steaming 7 fresh sample mixture	159.70±0.47

정제수를 첨하여 진탕한 다음에 방치하여 1-butanol layer의 분획을 정제수로 세척하였다. 그 다음에 1-butanol layer의 분획물과 정제수가 함유된 혼합물을 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 1-butanol layer와 water layer를 분리한 다음 상층으로 분획된 1-butanol layer를 취하여 홍삼 사포닌의 ginsenosides의 분리 동정에 TLC 검액으로 사용하였다(Figure 1).

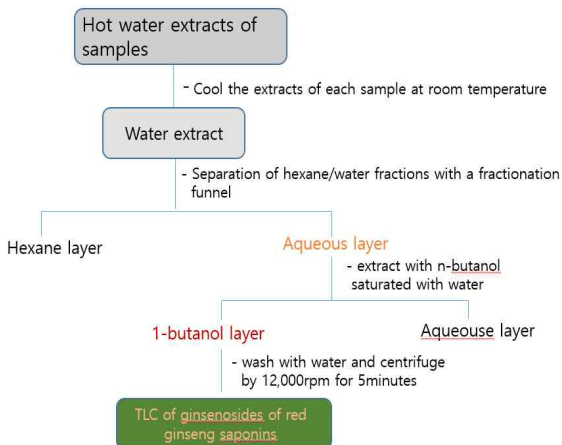


그림 1. 과일 및 야채류 추출물로부터 TLC 패턴 분석용 진세노사이드 분획별 추출물 제조
Figure 1. TLC pattern identification after ginsenosides extraction and fractionation of samples

7.2. 과일 및 야채류 추출물 및 유산균 발효물의 홍삼 사포닌 ginsenosides의 TLC 분리 동정

과일 및 야채 추출물에 홍삼엑스 1%(W/V) 첨가구 및 유산균 발효구의 홍삼 사포닌의 ginsenosides의 TLC 분리 동정은 Silica gel 60 TLC aluminum sheet에 전개용매 chloroform/1-butanol/methanol/water(20:40:15:20, lower phase)으로 전개하여 10%-sulfuric acid/ethanol을 분무한 다음 가운데 Figure 2와 같이 분리 패턴을 얻었다. 이와 같이 야채 추출물에 홍삼엑스가 1%(W/V) 첨가된 유산균 발효물에서 홍삼에 함량이 매우 낮은 특이 활성성분인 ginsenoside Rg₅, Rg₃, Rg₂ 등외에 전환된 ginsenosides의 생성이 확인되었다(Figure 2).

7.3. 생약재 추출물 및 유산균 발효물의 홍삼 사포닌 ginsenosides의 TLC 분리 동정

생약재추출물에 홍삼엑스 1%(W/V) 첨가구 및 유산균 발효구의 홍삼 사포닌의 ginsenosides의 TLC 분리 동정은 Silica gel 60 TLC aluminum sheet에 전개용매 chloroform /methanol /water(65:35:10, lower phase)으로 전개하여 10%-sulfuric acid/ethanol을 분무한 다음 가운데 Figure 3와 같이 분리 패턴을 얻었다. 이와 같이 생약 추출물에 홍삼엑스가 1%(W/V) 첨가된 유산균 발효물에서 홍삼에 함량이 매우 낮은 특이 활성 성분인 ginsenoside-Rg₅, Rg₃, Rg₂ 등외에 전환된 ginsenosides의 생성이 확인되었다. 진세노사이드 성분 분석 결과 홍삼 엑스는 높은 메탄올 추출물의 함량에도 불구하고, 조사포닌 함량이 다소 낮았는데 이는 가미를 위한 당류와 같은 친수성 물질의 함량이 높기 때문이라고 사료된다. 제조예의 조사포닌은 다른 원료들에 비해 사포닌 중 Rg₃의 함량(w%)이 5배 이상임을 확인할 수 있었다. 이 부분은 사실 Rb₁, Rb₂, R_C, R_D 등이 거의 분해되어 Rg₃로 전환되어 5배 이상 증가되는 것으로 사료된다[9,10].

IV. 결론

과일 및 야채류 7종 혼합 추출물의 유산균 발효 시험결과 신선한 재료를 바로 추출한 추출물의 48시간 배양 후 유산균은 2.90x10⁷(cfu/mL)으로 다소 낮았으나, 과일 및 야채류 7종을 혼합한 다음 증숙 후 추출물의

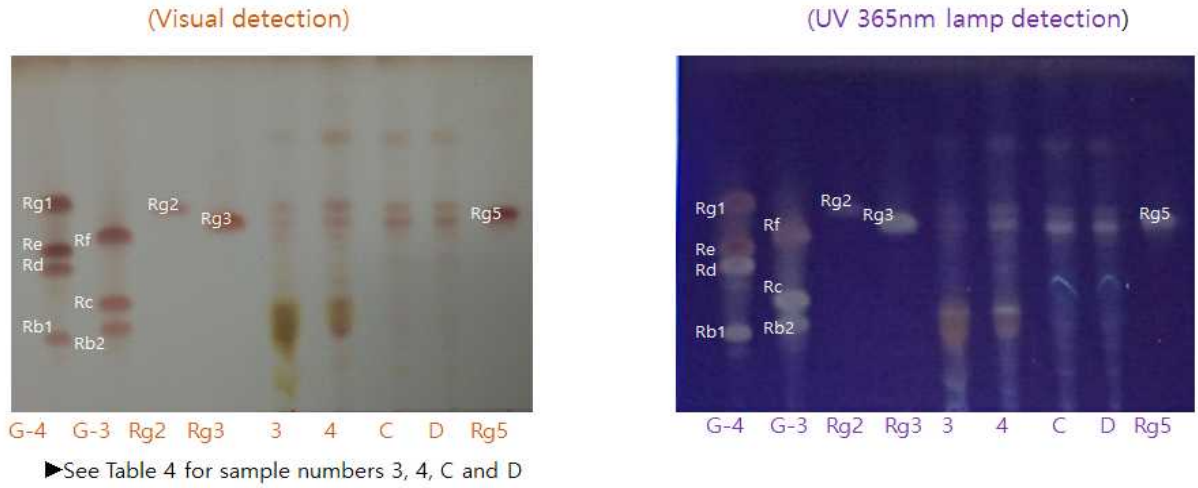


그림 2. 과일 및 야채류 추출물로부터 부탄올층의 TLC 전개 결과
 Figure 2. TLC of 1-butanol layer from which saponins are mainly extracted for detection of ginsenosides in ginseng contained in extracts of samples

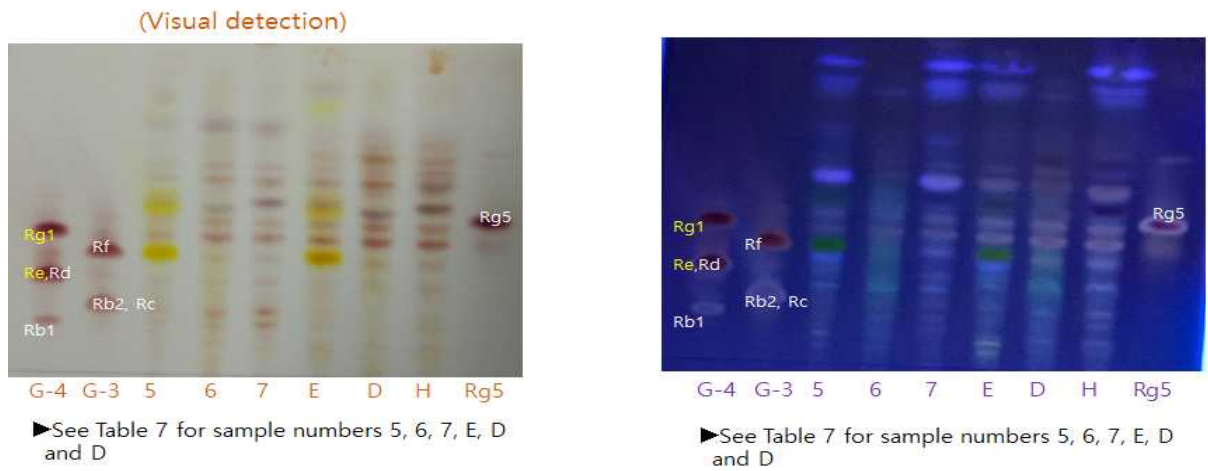


그림 3. 과일 및 야채류 추출물 및 유산균 발효물로부터 홍삼사포닌 TLC 전개 결과
 Figure 3. TLC of 1-butanol layer from which saponins are mainly extracted for detection of ginsenosides of ginseng contained in extracts of samples

배양 후 유산균은 3.57×10^7 (cfu/mL) 으로 뚜렷한 증가 경향을 보였다. 한편 신선한 재료의 추출물에 홍삼엑스를 1%(W/V) 첨가한 추출물의 48시간 배양 후 유산균은 3.79×10^7 (cfu/mL) 으로 신선한 재료의 추출물에 비하여 현저하게 증가를 보였다. 생약재 혼합 10종 추출물, 5종 추출물 및 4종 추출물을 각각 10배량(W/V)을 다시 10배(V/V) 희석하여 유산균 배양결과 매우 묽은 추출액에서도 $1.16 \times 10^7 \sim 1.41 \times 10^7$ (cfu/mL)로 유산균의 발효 증식 효과가 뚜렷하였다. 그러나 오미자, 구기자, 복분자 등 5종의 생약재 추출물에서는 유산균의 증식이 1.16×10^7 (cfu/mL) 수준으로 다소 낮았으나, 홍삼엑스를 1% 첨가한 경우에는 유산균의 증식이 1.95×10^7 (cfu/ml)

수준으로 양호하였다. 과일 및 야채류 혼합물 및 상용 생약재 혼합물 추출물의 유산균 발효과정에서 홍삼 엑스를 1%(W/V)을 첨가한 경우 사용된 기질 추출물에 따라서 유산균 증식효과가 있었다. 또한 홍삼에 미량으로 함유된 특이 사포닌 ginsenoside-Rg₃, -Rg₂, -Rg₅, Rk1 등을 유산균 발효과정에서 전환 증대가 가능함을 확인하였다. 과일 및 야채류와 한방에서 복용 안전성이 입증된 주요 생약류에 대하여 유산균 발효과정에 천연 프리바이오틱스로서 활용가치가 높은 것으로 확인되었다. 또한 이와 같은 유산균 발효과정에 홍삼에 함량이 매우 낮은 활성 사포닌 ginsenosides의 증대 방안으로 활용이 가능함을 확인하였다.

References

- [1] D.B. Kim, E.Y. Ahn, and E.J. Kim, "improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice", *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(1), pp. 315-323, 2018. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.1.315>.
- [2] H.K. Kim, "The functional effects of anti-microbial activity and anti-inflammatory seaweed polysaccharide extracts", *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(2), pp. 155-163, 2018. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.2.155>.
- [3] J.W. Lee, and J.H. Do, "Current studies on browning reaction products and acidic polysaccharide in korean red ginseng," *Journal of Ginseng Research*, Vol. 30(1), pp. 41-48, 2006. <http://dx.doi.org/10.5142/JGR.2006.30.1.041>.
- [4] J.D. Park, "Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng(Panax ginseng C.A. Meyer)," *Journal of Ginseng Research*, Vol. 20(4), PP. 389-415. 1996. <http://dx.doi.org/10.5142/JGR.1996.20.4.389>.
- [5] S.M. Lee, B.S. Bae, H.W. Park, N.G. Ahn, B.G. Cho, Y.L. Cho and Y.S. Kwak, "Characterization of korean red ginseng(Panax ginseng Meyer): History, preparation method and chemical composition," *Journal of Ginseng Research*, Vol. 39(4), pp. 384-391. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/J.Jgr.2015.04.009>.
- [6] J.W. Lee, S. Ho and J.H. Do, "Function of the water soluble browning reaction products isolated from Korean red ginseng," *Journal of Ginseng Research*, Vol. 24(1), PP. 35-40. 2000. <http://dx.doi.org/10.5142/JGR.2000.24.1.035>.
- [7] S.Y. Yoon, J.Y. Park, J.B. Lee, et al, "Ginsenoside Rg3 regulates S-nitrosylation of the NLRP3 inflammasome via suppression of iNOS", *Biochemical and Biophysical Research Coounication*, Vol. 463(4), pp. 1184-1189, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/J.bbrc.2015.06.080>.
- [8] H.S. Sung, S.K. Yoon, W.J. Kim, C.B. Yang, "Relationship between chemical components and theirields of red ginseng extract by various extracting conditions," *Journal of Ginseng Research*, Vol. 9(2), PP. 170-175. 1998. <http://dx.doi.org/10.5142/JGR.1998.09.2.170>.
- [9] Y.J. Ha, S.K. Kim, S.E. Yoon, and S.K. Yoo, "Separation and purification of antioxidany activity acidic polysaccharide from red ginseng marc," *Journal of oil and appled science*, Vol. 34(4). PP. 915-923. 2017. <http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2017.34.4.915>.
- [10] Y.H. Moon and I.C. Jung, "physicochemical characteristics of korean black cattle-fed mugwort," *Journal of life Science*, Vol. 22(5), pp.587-594, 2012. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.5.587>.

※ 본 연구논문은 연구재단의 인문사회기초연구(R&D)2021S1A5A2A03068781의 지원으로 수행하였으며 이에 감사 드립니다.