



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

산삼배양근의 생리활성 탐색 및
항산화 단백질의 분리 정제

濟州大學校 大學院

食品營養學科

姜 旻 旻

2009 年 8 月

산삼배양근의 생리활성 탐색 및 항산화 단백질의 분리 정제

指導教授 申 東 範

姜 旻 旻

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2009 年 8 月

姜旻旻의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (인)

委 員 _____ (인)

委 員 _____ (인)

濟州大學校 大學院

2009 年 8 月

Screening of Biological Activities and
Purification of Antioxidant protein
from Wild Ginseng Root extracts

Min Gyeong Kang
(Supervised by professor Dong-Bum Shin)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2009 . 8 .

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE&NUTRITION
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract	iii
List of Tables	v
List of Figures	vi
I. 서론	1
II. 이론적 배경	3
III. 실험재료 및 방법	19
1. 실험재료	19
1) 재료	
2) 시료의 조제	
3) 유효성분의 추출	
2. 실험방법	20
1) 산삼배양근 추출액의 혈전용해 활성 측정	
(1) 혈전용해 활성 측정	
2) 산삼배양근 추출액의 항산화 활성 측정	
(1) DPPH radical scavenging activity	
(2) SOD 유사활성 측정	
(3) 총 페놀(Total phenol) 측정	
(4) 아질산염 소거능 측정	
(5) 지질 과산화 측정(Ferric thiocyanate method)	
3) 산삼배양근의 유효성분 추출 및 정제	
(1) 총 단백질 함량 측정(BCA assay)	
(2) 유효 성분 추출	

IV. 결과 및 고찰.....	29
1) 산삼배양근 추출액의 혈전용해 활성 측정	
(1) 시료의 혈전용해 활성 측정	
2) 산삼배양근 추출액의 항산화 활성 측정	
(1) DPPH radical scavenging activity	
(2) SOD 유사활성 측정	
(3) 총 페놀(Total phenol)함량	
(4) 아질산염 소거능	
(5) 지질 과산화 측정(Ferric thiocyanate: FTC method)	
3) 산삼배양근의 유효성분 추출 및 정제	
(1) 시료 중 총 단백질 함량	
(2) 유효 성분 검정	
V. 요약 및 결론.....	54
VI. 참고문헌.....	56
VII. 초록.....	65

Abstract

Screening of Biological Activities and Purification of Antioxidant protein
from Wild Ginseng Root extracts

Min Gyeong Kang

Department of Food Science and Nutrition, Graduate School
Jeju National University, Jeju, Korea

This research examined the effect of cultured mountain ginseng on thrombolysis, antioxidant activity and explored possibility of developing cultured mountain ginseng as health enhancing functional food. ethanol and hot water extraction were conducted and thrombolytic activity of cultured mountain ginseng was measured in a fibrin plate method. To measure antioxidant activity it was conducted to measure DPPH radical scavenging activity, SOD like activity, total amount of phenolic compounds in the sample, sodium nitrite scavenging activity and anti-lipid peroxidation activity.

The thrombolytic effect of cultured mountain ginseng extracts from hot water was showed 41.8%. The ethanol extracts of cultured mountain ginseng had 28.1% of thrombolytic activity same as that of red ginseng, and ethanol extracts of red ginseng showed 18.3%.

Ethanol extracts of cultured mountain ginseng had the highest DPPH radical scavenging activity of 74.37% at a significance level ($p < 0.05$). In case of hot water extraction, the cultured mountain ginseng was showed the activity of 60.96%, almost twice that of red ginseng. SOD like activity of both ethanol and hot water extracts from cultured mountain ginseng marked significantly ($p < 0.05$) higher than both ethanol and hot water extracts of red ginseng. Total amount of phenolic compounds of both ethanol and hot water extracts of cultured mountain ginseng were showed higher than those of red ginseng extracts. On the other hand, anti-lipid peroxidation activity of red ginseng extract were showed higher value than that of cultured mountain ginseng.

It was performed to separate and purify the antioxidant proteins from cultured mountain ginseng using prep-HPLC. Two peaks were observed and suggested that two kinds of antioxidant proteins were existed.

In conclusion, it can be noted that cultured mountain ginseng contains ingredients that activate several physiological activities such as thrombolysis and anti-oxidation. Extracted proteins showed antioxidant activity as well, suggesting that health enhancing functional food can be developed and consumed that contains cultured mountain ginseng to fortify antioxidation and thrombolytic effect.



List of Table

Table 1. Chemical constituents in korean ginseng	4
Table 2. Pharmacology effect of ginsenoside	7
Table 3. Pharmacology effect of non-ginsenoside	10
Table 4. Fibrinolytic activities of Wild ginseng root extract and Red ginseng extract by fibrin plate method.	30
Table 5. DPPH radical scavenging activity of Wild ginseng extract and Red ginseng extract.	33
Table 6. SOD activity(Inhibition rate%) of Wild ginseng extract and Red ginseng extract.	35
Table 7. Total phenol contents of Wild ginseng root extract and Red ginseng.	37
Table 8. Nitrate scavenging activity of extract of Wild ginseng root extract and Red ginseng.	39
Table 9. Lipid peroxidation in linoleic acid substrate containing extract of Wild ginseng roots and Red ginseng during storage at 40°C for 6 days.	42
Table 10. Conditions of prep-HPLC for the purification of antioxidative Wild ginseng root extract.....	49

List of Figures

Fig. 1. Classification of saponin.	6
Fig. 2. Fibrinolytic activities of Wild ginseng root extract and Red ginseng extract.....	30
Fig. 3. Lipid peroxidation inhibition rate in linoleic acid substrate containing extract of Wild ginseng roots and Red ginseng during storage at 40°C for 6 days.....	43
Fig. 4. Absorbance at 280nm of Wild ginseng crude protein extract fractionation by gel filtration.	46
Fig. 5. DPPH radical scavenging activity of Wild ginseng crude protein extract fractionation by gel filtration.	47
Fig. 6. SOD activity(Inhibition rate%) of Wild ginseng crude protein extract fractionation by gel filtration.	48
Fig. 7. prep-HPLC chromatogram of 10-20 fraction and 21-31fraction.	50
Fig 8. Polyacrylamide gel electrophoresis results.....	52

I. 서론

산삼은 야생 상태에서 자연 발아하여 성장한 삼(蔘)을 일컬으며 예로부터 영약으로 취급되어온 고귀한 한약재이다. 이러한 산삼은 희소성과 고가 등으로 인해 대중화되지 못하고 있는 실정이다.

그동안 산삼과 관련된 주요 생리활성 연구로 면역증강, 항종양, 혈당조절 및 항궤양작용(Konno등, 1984), 지방분해 억제효과, 항 당뇨, 인슐린 유사작용(Ando 등, 1980)이 보고되었으며, 이외에도 암세포증식억제, 항종양, 항암작용, 혈소판 응집억제 및 항혈전 작용과 항산화 활성 등 여러 가지 생리활성 기능이 보고되었다.

이러한 선행 연구를 바탕으로, 본 연구에서는 산삼을 조직 배양하여 모근과 동일한 형질을 가지게 한 산삼배양근을 이용, 혈전 용해효과 및 항산화 효과를 알아보고자 하였다.

최근 우리나라에서는 국민소득의 향상과 식생활의 변화로 인하여 혈액순환장애에 따른 심장 질환과 같은 성인병의 발병률이 높아지고 있으며, 사망률도 높은 비중을 차지하고 있다.

혈액 순환계 질환의 많은 원인 중 대표적인 것으로 혈전을 들 수 있는데 혈전은 상처 복구시 지혈과정에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나 혈관 내에 생성된 혈전은 혈관 벽에 점착하거나 미세 혈관을 막아 정상적인 혈류를 방해하게 되어 혈액 순환계 질환을 초래하게 된다.

이러한 혈전으로 인해 발생하는 심혈관계 질환의 치료제로서 사용되는 혈전용해 효소 즉, 유로키나제(Urokinase, UK), 스트렙토키나제(streptokinase, SK) 그리고 조직형 플라스미노겐 활성화인자(tissue type plasminogen activator, tPA) 등이 사용되고 있다. 이러한 효소를 이용한 혈전 용해 치료는 너무 비싸고 환자가 합병증 등의 부작용으로 인해 고통 받을 수 있다는 단점이 있다.

따라서 부작용이 적고 체내 혈전형성 예방효과가 있는 새로운 혈전용해제 개발이 절실히 요구됨에 따라 경제적이고 경구투여가 가능한 저분자 혈전증 치료제 개발을 위한 연구가 다양하게 시도되고 있다.

최근 들어 한국의 청국장, 된장, 버섯 등 일본의 나또(natto)와 토푸요(tofuyo)등 식품류에서 혈전용해효소들이 많이 발견되고 있다. 이와 같이 식품에서 분리되는

혈전 용해 효소들은 혈전용해 치료에 유용하게 사용될 뿐 아니라, 효율적으로 대량 생산할 수 있어 현재 일반적으로 사용되는 값비싼 혈전 용해제를 대체할 수 있을 것으로 사료된다.

이와 더불어 식품중의 다양한 생리활성 중 항산화 식품 소재에 대한 관심과 연구가 증가하고 있다.

항산화제란 산화를 억제하는 물질로 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연할 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하며 인공 합성품을 비롯한 동식물체 내에도 이러한 기능을 가지는 물질이 많이 알려지고 있다. 최근에는 식품의 유지 산패 억제나 품질 변화의 억제 차원을 넘어 인체 내 생리적 활성에 영향을 미치는 측면까지 포함하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

생체 내 산화로 인해 암과 같은 여러 가지 질환이 발생하므로 최근에 다양한 생리활성을 가지는 건강기능 식품 중 항산화에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 인공 항산화 합성물은 뛰어난 항산화 효과를 지니고 있어 많이 이용되었으나, 안정성에 논란이 있고, 소비자의 거부감이 높아짐에 따라 최근 안전하게 섭취할 수 있도록 천연물로부터 항산화 식품을 섭취하려는 욕구가 높아지고 있다. 따라서 천연물에서 항산화 물질을 분리, 산업에 이용하려는 시도가 끊임없이 진행 중에 있다.

따라서 본 연구에서는 산삼배양근의 생리활성능을 알아보기 위하여 혈전 용해 효과, 항산화 활성 등의 생리활성을 측정하였다. 또한 산삼배양근에서 추출한 항산화 단백질을 분리, 정제하기 위하여 DPPH radical scavenging activity와 SOD 유사활성을 측정하는 동시에 gel filtration, prep-HPLC등을 이용하여 단계별 단백질의 정제 과정을 통해서 항산화 활성 단백질을 분리 정제하였다.

이러한 연구를 통해 산삼배양근의 혈전 용해제와 항산화제로서의 개발 가능성을 제시하고자 하였다.

II. 이론적 배경

2.1 산삼

산삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오가피나무과(Araliaceae)에 속하는 다년생 초본식물로서 한방에서 사용되는 한약재 중의 하나로서 기미가 달면서 쓴맛이 있고, 따뜻한 기운을 가지고 있으며 원기를 보호하고 비장을 좋게 하며, 폐를 튼튼하게 해주는 본초학적인 효능을 가지고 있다고 알려져 있다.

산삼을 신초 또는 불로초라고 하는 만큼 성장 조건도 까다로우며 환경조건에 많은 영향을 받는 식물이기 때문에 다양한 생태적 특징을 가진다. 산삼은 자생조건이 까다로운 식물로 나무가 무성한 밀림 지대에서 자생하며, 소나무나 전나무 같은 침엽수가 섞인 활엽수림 지대를 선호하며, 고온다습하지 않으며 적당한 습도가 유지되고 마사토에 낙엽이 부식하고 있는 곳이 산삼이 자생하기에 가장 알맞은 장소이다

산삼은 성장이 느린 식물로 삼의 중량도 6년생 재배인삼은 평균 80g정도 증가하지만, 산삼의 성장속도는 10.8배정도 느리며 중량도 연간 0.001~0.5g정도만 증가한다고 한다. 또한 산삼은 다년간 장수하는 식물로, 재배되는 인삼은 빠른 성장을 보이지만 6년 이후에는 삼의 기능을 잃어버린다. 하지만 산삼은 이전부터 오랜 기간 동안 성장한 것을 발견하였다고 한다. 산삼의 연령 판단은 뇌두를 보고 판단하는데 뇌두는 매년 싹이 나온 흔적을 나타내며, 나이테 같은 표시를 한다. 산삼은 성장 조건에 따라 잠자는 식물로서 이를 휴면삼이라고 하는데 기후와 토양이 변하고 일조량이 달라지면 휴면상태로 변하게 된다. 따라서 산삼은 영하의 추위 속에서도 얼어 죽지 않으며, 성장조건이 조성되면 다시 새로운 뿌리를 내리고 싹이 자라게 된다, 다섯 번째로 산삼은 번식력이 약한 식물로서 주로 뿌리나 줄기로 번식하지 않고 씨앗으로 번식을 한다. 생육조건이 좋아야만 보통 6-7년만에 꽃을 피우고 2-3개의 열매를 맺는 것으로 알려져 있다.

인삼(*Panax ginseng*)속 식물의 성분에 대한 체계적인 연구는 Garriques (1854)가 미국삼(*Panax quinquefolium*)으로부터 일종의 saponin 혼합물인 무정형 물질($C_{24}H_{25}O_{18}$)을 분리하여 panaquilon이라 명명하여 발표한 후부터 시작되었다.

Shibataemd(1962)은 인삼 saponin의 화학구조에 대한 연구를 하여 인삼 saponin

비당부위(aglycon, genin)인 protopanaxadiol과 protopanaxatriol의 화학 구조를 밝혀내었다. 지속적인 연구를 통해 사포닌 성분을 순수 분리하여 ginsenoside라고 명명하였다.

인삼 사포닌은 30여종 이상의 성분이 분리되어 화학구조가 밝혀지고 있으며, 인삼의 사포닌 성분은 dammarane계 사포닌이라 일컫는 triterpenoid계 화합물로서 인삼속 식물에만 특유하게 함유되어 있는 성분이다. 또한, 비 사포닌 계의 생리활성 물질로 polyacetylene, phenolic compounds, acidic polysaccharide, peptides, alkaloids, amino acids 유도체 등이 발견되었으며, 인삼의 기타 성분으로 volatil oil, sugar, starch, pectin 및 minerals 이 함유되어 있다.

Table 1. Chemical constituents in korean ginseng

	Saponins(3-6%)	Protopanaxadiol-type ginsenosides Protopanaxatriol-type ginsenosides Oleanolic acid-type ginsenosides
	Nitrogen compounds(12-16%)	Protein, amino acid Peptide, Nucleic acid Alkaloids
Organic	Lipid soluble components(1-2%)	Fats, Fatty acid Essential Oils Phytosterol Organic acid Phenolic compounds Polyacetylenes Terpenoids
	Vitamins(0.05%)	Water-soluble vitamin
	carbohydrates(60-70%)	Polysaccharide Oligosaccharide Sugar, Fiber, Pectin
	Inorganic Ash(4-6%)	Minerals
	Water content : 9-11%	

남, 1996

2.2 산삼의 생리활성 물질 및 약리효능

2.2.1 사포닌(saponin)

사포닌은 화학물질의 하나로, 자연에서 생성되는 2차 대사산물 중의 하나이며 다양한 식물종에서 발견되는 물질의 하나이다. 사포닌은 화학적으로 배당체(glycoside)라 부르는 화합물의 일종이며, 양친매성으로 친수기와, 소수기 그룹을 가지고 있으며 식물체의 뿌리, 줄기, 잎, 껍질, 씨 등에 분포하며 식물체의 방어기제의 하나로 식물체 내에서 항 바이러스, 항균작용등을 하는 성분으로 알려져 있다.

현재까지 약 750여종의 식물에서 90여종의 사포닌이 확인되었으나, 몇몇 식물에서 추출한 사포닌들은 독성이나 용혈작용과 같은 부작용을 동반하므로 인체에 유익한 사포닌을 함유한 식물의 종류는 많지 않다. 사포닌은 비누를 뜻하는 그리스어인 sapon에서 유래되었는데, 수용액상에서 흔들면 비누처럼 미세한 거품을 내는데서 붙여진 이름이다.

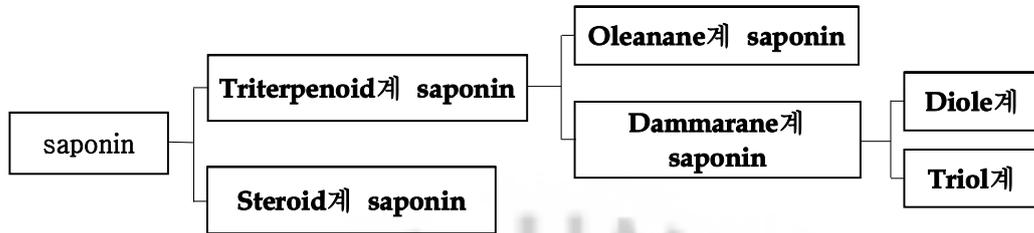
사포닌의 화학구조는 당부분'sugar(glycone)'과 비당부'non-sugar(aglycone)'으로 구성되어 있는데, 특히 사포닌의 비당부분을 sapogenin이라고 부른다. 사포닌은 비 영양물질로 알려졌으나 최근 사포닌의 항암, 항산화, 콜레스테롤 저하 효과가 밝혀지면서 생리활성물질로 각광받기 시작했다. 한방약에서는 강심제나 이뇨제로 사용되어 왔으며 세포에 대해서는 표면 활성제로 작용하여 세포막의 구조를 파괴하거나, 물질의 투과성을 높이기도 한다.

인삼의 주요 성분의 하나로 알려진 사포닌은 특히 함량이 높으면서도 인삼 특이 성분으로 다른 식물에 들어있는 사포닌과는 달리 생리활성물질의 하나로 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

인삼 사포닌은 다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다른 특이한 화학구조를 가지고 있으며 약리효능도 특이하여 인삼(Ginseng) 배당체(glycoside)란 의미로 '진세노사이드(Ginsenoside)'라 불린다.

saponin은 일종의 배당체로서 그 aglycone(sapogenin)의 종류에 따라 Steroid계 saponin과 Triterpene계 saponin 두 가지로 분류된다.

Fig 1. Classification of saponin



Triterpene계 saponin의 sapogenin으로서 Oleanane 골격을 가진 것이 가장 많고, 기타 dammarane골격, lanostane골격등의 Triterpene도 유효성분으로 발견되고 있다.

인삼 saponin은 Triterpenoid의 dammarane계 saponin으로서 인삼 속 식물에만 존재하는 특유의 saponin이다. 따라서 인삼 saponin의 특수한 화학구조를 가지고 있고, 비당부분에 따라 4환성의 dammarane계 saponin과 5환성의 Oleanane계 saponin의 두종류로 구별된다.

dammarane계 saponin은 다시 비당부분에 붙어있는 수산기(-OH)의 수에 따라 2개인 경우는 protopanaxadiol(PPD)계 saponin, 3개인 경우는 protopanaxatriol(PPT)계 saponin으로 나누어 진다.

(1) 인삼 saponin(Ginsenoside)의 약리효과

인삼saponin으로 불리는 ginsenoside는 인삼의 가장 중요한 약효성분으로서 인삼에는 모두30여종 이상의 ginsenoside가 함유되어 있음이 확인되고 있다. 주요 ginsenoside의 약리작용을 살펴보면 다음과 같다.

Table 2. Pharmacology effect of ginsenoside

ginsenoside	주요약리작용
G-Ro	항 염증작용, 혈소판 응집억제, 항트롬빈작용 및 선용활성화 작용, 평활근 세포증식 억제작용
G-Rb1	중추억제 및 정신안정 작용, 중추성 섭식억제작용, 공격성 행동억제, 진통작용, 항경련작용, 부신피질 자극 호르몬 및 코티코스테론 분비 촉진작용, 항 불안작용, 콜레스테롤 생합성 촉진작용, 고콜레스테롤과 중성지방 및 유리지방산의 저하작용, 골수세포의DNA, RNA, 단백질 및 지질합성 촉진, 혈소판 응집 억제작용, 지질과산화 억제작용, 혈관 확장작용, 콜레스테롤 대사 촉진작용, 항 염증작용, 간상해 보호작용, 사염화탄소 유도 간의 단백질 인산화 억제 및 세포내 칼슘축적 억제작용, 탐식기능 활성화작용, 신장사구체 비대억제(mesenchyme세포 증식 억제)
G-Rb2	당 및 지방대사 촉진, 항 당뇨작용, ACTH, cAMP, epineprine유도 지방분해 억제작용, 질소대사 평형유지작용, 고콜레스테롤 저하 및 항동맥경화작용, DNA, RNA, 부신피질자극 호르몬, 코티코스테론 분비촉진작용, 암독소호르몬의 길항작용, 평활근세포 증식 억제작용, 종양 혈관 신생 억제작용, 항산화 활성물질 생성 촉진작용, 간조직의 ATP공급 활성화 작용, TAX2 합성효소 억제, 콜레스테롤 대사 촉진작용, 간 세포 증진 및 DNA합성 촉진, 면역조절작용, 진통작용
G-Rc	진통작용, 코티코스테론 분비 촉진작용, PGI2생성 촉진작용, 간 혈청 콜레스테롤 RNA합성 촉진작용, 골수세포 DNA, RNA 단백질 지질합성 촉진작용, 프로스타글란딘 생합성 촉진, mesenchyme세포 증식 억제
G-Rd	부신피질자극 호르몬, 코티코스테론 분비촉진작용, mesenchyme세포 증식 억제
G-Re	부신피질 자극 호르몬, 코티코스테론 분비촉진, 골수세포의 DNA, RNA단백질 지질합성 촉진작용, 진통작용, 평활근 세포증식 억제, 혈관확장작용, 콜레스테롤 대사 촉진작용, 사염화탄소 유도 간상해 보호작용
G-Rf	통증억제 작용, 지질과산화 억제작용, 알코올 유도 뇌발육 장애 방어작용

G-Rg1	면역기능 증강작용, 혈소판 응집억제, 항 트롬빈 선용 활성화 작용, 기억 및 학습기능 증진작용, 코티코스테로이드 수용체 활성화 작용, 당백질 합성 촉진작용, 항피로작용, 항스트레스 작용, 중추흥분작용, 혈관확장작용, 고온환경및 내인성 발열물질 등 유해자극 방어작용, 스트레스성 행동장애 개선작용, 항신염작용 및 신혈류량 증대작용, 신경세포 생존률 촉진 작용, 콜레스테롤 대사 촉진작용, 항염증작용, 간세포 증식 및 DNA합성 촉진, 부신피질자극 호르몬 분비 촉진작용
G-Rg2	혈소판 응집억제, 항 트롬빈, 선용활성화 작용, 기억감퇴 개선, 평활근 세포 증식 억제작용, 아세틸콜린 유도 카테콜아민 분비억제 및 세포내 칼슘 유입 억제작용
G-Rg3	암세포 전이 억제작용, 혈소판 응집억제 및 항혈전 작용, 혈관이완작용, 항암제의 내성 억제작용
G-Rh1	실험적 간상해 억제작용, 종양세포(F9 cells)분화촉진, 혈소판 응집 억제및 선용활성화 작용
G-Rh2	암세포 증식 억제작용, 재분화유도 촉진작용, 암세포 침윤 억제작용, 항암제의 항암활성 증대작용

인삼의 saponin 성분은 1854년 미국 인삼에서 saponin 성분의 존재가 보고된 이래로 많은 학자들에 의해서 saponin의 분리 및 화학구조 동정과 더불어 생화학적, 약리학적 연구가 계속되어 왔다. Kotake(1930)는 Panaxin, prosaponin 및 α -panaxin을 인삼으로부터 분리하였다고 보고하였다.

Hohammer(1961)은 50% 에탄올로 인삼을 추출한 것을 7%황산으로 가수분해해서 얻은 saponin 중에서 olenolic acid를 분리할 수 있다고 보고하였다. Shibata(1962)등은 인삼 saponin의 구조동정을 위해서 화학적 방법과 분광학적 방법을 이용하여 dammarane 계열의 triterpenoid saponin을 분리하였다.

지금까지 연구된 ginsenoside의 종류는 올레아난계 saponin인 ginsenoside-Ro 1종, 프로토파낙사디올계 사포닌인 진세노사이드 -Ra1, -Ra3, -Rb1, -Rb2, -Rb3, -Rc, -Rd 및 -Rg3 9종이며, 프로토파낙사트리올계 사포닌은 진세노사이드 -Re, -Rf, 20-gluco-Rf, -Rg1, -Rg2 및 -Rg1 6종으로 총 16종이 밝혀졌다.

2.2.2 비 사포닌(non-saponin)

인삼의 non-saponin 성분들 중 정유성분은 Tanaka등(1915)이 인삼의 뿌리에서 ether 가용성 물질을 추출하여 panacene과 terpene이 함유되어 있다고 하였고, Yamaguchi등(1918)은 인삼에서 steric acid와 palmitic acid의 지방산을 추출하였다고 보고하였다. Lee등(1976)은 인삼 정유에서 용매 분획하여 인삼의 향기성분인 알코올과 ester를 밝혀내었고, Kim과 Park(1984)은 에테르 가용성 성분중에서 진통, 소염작용을 나타내는 성분인 azulene, maphthalene, patcholuen, farnescene 및 maalien 등 약 30여종의 sesquiterpene계 화합물이 존재한다고 보고하였다.

Hwang등(1978)은 인삼에 polyacetylene 성분이 항암작용이 있다고 보고하였으며, Ahn과 Kim(1988)의 연구에서도 인삼에 panaxydol 성분이 항암작용을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Ahn과 Kim(1988)의 연구에서도 항암작용을 하는 acetyl panaxydol, chloropanaxydol, 10-acetylpanaxydol, panaxyne 및 panaxyne epoxide를 밝혀내었다.

Han등(1978)연구에서는 인삼에서 노화 억제 활성작용을 하는 maltol을 밝혀내었다고 보고하였으며, 항산화 작용을 하는 salicylic acid, vanilic acid도 밝혀내었다. Choi등(1983)은 인삼에서 항산화 작용을 하는 cinnamic acid, m-coumaric acid, syringic acid, ferulic acid, esculetin 및 caffeic acid 성분을 추가적으로 밝혀내었다.

Meer등(1961)은 인삼에서 생리활성물질인 alkaloids 성분을 밝혀내었고, Han등(1986)은 alkaloids물질인 β -carboline 3종의 화합물을 밝혀내었다. Han등(1987)은 수삼 메탄올 엑스로 수용성 alkaloids인 spinacine을 분리하였다. Konno등(1984)의 연구에서는 면역증강, 항종양, 혈당조절 및 항 궤양작용을 하는 다당류를 인삼에서 21종류를 밝혀내었다고 보고하였다.

Ando등(1980)의 연구에서는 지방분해 억제효과, 항 당뇨, 인슐린 유사작용을 하는 펩타이드를 인삼에서 밝혀내었다고 보고하였으며, Yang등(1990)은 지방분해 억제 효과를 나타내는 oligopeptide을 밝혀내었고 Okuda(1980)의 연구에서는 인삼의 아데노신이 지방분해 억제작용을 하며 포도당으로부터 지방합성을 촉진하는 조절제로서 인슐린과 유사한 작용을 한다고 보고하였다.

Table 3. Pharmacology effect of non-ginsenoside

Polysaccharides	<ul style="list-style-type: none"> - 혈당저하작용(항당뇨작용):Panaxans - 면역기능증진 : 망내계 기능증진, 항체생산증대, 항보체활성, 항암제면역독성억제작용 등 - 암세포 분비 독소(Toxohormone-L) 길항작용: 체지방분해억제, 암환자체중감소 억제 (Acidic polysaccharide) - 위점막 조직 병변 억제: 항 위궤양작용
Amino: Maltulosyl arginine (Arginine-Fructose-Glucose)	<ul style="list-style-type: none"> - 위 점막에서 suvrase와 maltase활성 억제: 장관에서 당과 지방흡수 억제, 지연으로 비만증 예방 -혈장 중성지질(Plasma triglyceride)함량 저하 - 혈관확장효과 기대 : 인삼내 혈관 확장유도 물질인 NO합성의 기질물질인 Arginine 다량 함유
Proteins	<ul style="list-style-type: none"> - 방사선(X,γ-선)조사로 인한 조혈기능장애 회복 촉진 - 방사선 조사 동물의 생존율 증가 및 염색체 DNA손상 보호작용 - 간의 단백질 인산화 조절작용(간기능 개선) - 말초혈액 임파구 세포 유사분열 촉진작용 (면역세포:T와 B세포 분화 촉진)
Polypeptide, Acidieptide, Oligopeptide, Adenosine, Pyroglutamicacid,	<ul style="list-style-type: none"> - Insuline 유사작용물질 : 당과 지방대사 조절작용 - 혈당 강화 지방분해 억제작용 : 항 당뇨효과 발현
polyacetylene	<ul style="list-style-type: none"> - 암세포증식억제, 항종양, 항암제 작용 증대 - 지질과산화억제와 피부암 발생억제작용 - panaxynol : 혈소판 응집억제 - Lipophilic fr: TXA2·cGMP함량 감소: 혈소판 응집제 - 혈중 cholesterol 저하작용(Panaxydiol)
Alkaloides	<ul style="list-style-type: none"> - 항암작용, 방사선장해 방어 효과
Lignans	<ul style="list-style-type: none"> - 간 보호 작용

2.3 산삼배양근

산삼(山蔘)은 산중에서 자생하는 인삼으로 예로부터 선약(仙藥) 또는 영약(靈藥)으로 취급되어 온 매우 희귀한 약용식물이다. 이러한 산삼은 그 희귀성과 효능면에서 인삼보다 탁월하다고 인식되어져 재배인삼과는 비교도 안되는 고가에 매매되고 있다.(Mizuno 등, 1994) 재배인삼의 시조인 산삼은 영약으로 여러 가지 질병의 치료와 병후 회복에 놀라운 효험을 가지고 있는 것으로 구전되어 왔으며, 오늘날에도 산삼은 불로장생의 효험이 매우 큰 것으로 믿고 있어 많은 사람들이 산삼을 동경하고 있다(남기열, 1996). 그러나 산삼은 한 뿌리에 수백 만원에서 수천 만원에 거래되기도 할 뿐만 아니라 그 희귀성 때문에 일반 대중이 산삼을 접하기란 극히 어려운 실정이다. 천연 산삼은 예로부터 그 효능이 알려지면서 과다한 채굴고 점차적으로 고갈되기 시작하여 현재는 거의 남아있지 않은 상태이다. 그리하여 인위적으로 산삼의 일종인 장뇌삼을 재배하기 시작하였다. 그러나 토양의 오염과 오염된 대기 환경으로 인하여 예전과 같은 양질의 산삼을 재배하는데 어려움이 있고, 수량 확보에 많은 시간이 걸린다.

식물조직배양을 통하여 유용물질을 생산하려는 연구는 1980년대 후반에 시작되어 최근에는 주목 세포의 대량배양을 통한 대량 생산이 이루어지고 있다. 이처럼 고가의 약제생산이나 희귀한 약초를 기내배양을 통하여 대량으로 생산하려는 시도가 최근에 많이 연구되고 있다. 우리나라의 대표적인 자생 약용식물인 산삼도 그 희귀성 때문에 최근 조직 배양기술을 이용하여 산삼 뿌리로부터 식물성 호르몬을 처리하여 모근과 동일한 유전자 형질을 가지는 뿌리(산삼배양근)를 유도하고, 이들로부터 특수 사포닌을 고 생산하는 산삼배양근을 선발한 후에 기내 배양을 통한 대량 생산방법이 개발되었다.(양덕춘, 2003; Han et al., 2003; Yoo et al., 2003). 생물 반응기를 통한 산삼배양근은 짧은 기간에 수확이 가능하며, 일정 시설만 갖추면 년 중 대량으로 생산할 수 있어 안정적으로 원료공급이 가능하고 또한 오염되지 않은 환경에서 자라기 때문에 오염을 최소화 할 수 있는 장점이 있다.

산삼에 대한 효능연구는 산삼의 성분연구(Yamaguchi et al., 1988)를 시작으로 in vitro 및 in vivo 실험을 통한 면역 활성화 증강 효과가 입증된 바 있다.(Mizuno et al., 1994). 기내 배양을 통하여 대량 생산된 산삼배양근을 재료

로 하여 기존에 구전되어 왔던 다양한 산삼의 효험을 연구하는 의약계에 연구시료를 제공함으로써 산삼의 숨겨진 약리 효능을 토대로 신의약품 개발 및 기능성 식품의 개발로 이어져 국민의 보건 향상에 크게 기여할 것으로 기대되며, 최근에 이런 기대에 부응하여 산삼 배양근 추출물을 이용한 고지혈증의 약리효능에 대한 연구가 보고되었으며(Lee et al., 2003), 미백효과도 있는 것으로 보고되었으며(신미희, 2001) 산삼배양근으로부터 추출한 추출물의 혈압강하 및 혈관이완 효과(김소미외 2008)에 대해서도 보고되어 산삼배양근의 생리활성효과와 약리효능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

2.4 홍삼의 생리활성 물질 및 약리효능

홍삼의 제조 과정은 수삼의 세척, 수증기에 의한 증숙 그리고 건조의 순서로 진행된다. 홍삼 제조 과정동안 생리활성물질의 변화가 일어나 수삼과 백삼에는 존재하지 않는 특이 성분들이 생성된다. 홍삼은 제조과정 중에서 특수한 ‘증숙(蒸熟)’ 공정을 거치는 동안 인삼 조직중의 전분 입자가 호화(gelatinization)되어, 조직이 견고하고, 각종 효소들이 불활성화 되므로 장기 보존 중에도 뚜렷한 성분 변화가 거의 일어나지 않는다고 보고되었다. 또한 홍삼은 찌 후 건조과정에서 갈색화 반응이 일어나고, 홍삼의 장기 저장 시에도 비효소적 갈색화 반응이 완만하게 진행되어 갈색화 반응 생성물이 증가되는데, 이때 생기는 갈색화 반응 생성물은 항산화 활성을 나타내며, 아울러 인삼에 함유된 지방산의 산패를 억제함으로써 품질 안정성을 양호하게 한다. 홍삼의 약리 작용으로는 사포닌 성분이 발기부전에 유효한 효과, 중추신경계 신경 억제 및 흥분작용, 혈관 확장 작용, 암세포 전이 억제 효과의 우수성, 항 피로 및 항 스트레스 효과 등이 보고되었다. 최근에는 AIDS 바이러스 증식 억제 효과가 있다는 보고도 있다.

2.4.1 사포닌 성분

홍삼 제조 과정 중 많은 ginsenoside 성분이 가수분해되어 C-20위치에서의 이성체화 및 분해가 일어나 홍삼 특유 사포닌이 생성된다. 미량으로 홍삼에만 존재하는 사포닌 성분으로는 암세포 전이 억제효과에서 우수한 효능을 보이는

ginsenoside-Rg3과 항산화 활성을 나타내는 성분인 ginsenoside-Rh2를 포함하는 protopanaxdiol계 사포닌 11종이 보고되었다. 실험적으로 간 상해 억제작용이 있는 ginsenoside-Rh1을 포함하는 protopanaxtriol계 사포닌 4종이 보고되고 있다.

2.4.2 비 사포닌 성분

1) polyacetylene 성분

인삼의 polyacetylene계 성분은 현재 10여종 이상이 발견되고 이들 성분은 대부분 암세포에 대한 세포독성을 나타냄으로써 암세포의 증식을 억제하는 작용이 있다. 이중 대표적인 인삼의 polyacetylene성분은 panaxynol, panaxutriol등이 있으며 이 중 panaxutriol은 홍삼 특유 성분으로 밝혀지고 있다.

이 성분은 암세포에 대해서 선택적 독성을 발현하고, 암세포를 이식한 마우스에서 종양 증식억제 효과를 나타내며, panaxutriol 성분이 암세포의 막 유동성을 저하시킴으로서 항암성분의 암세포 내로 유입을 촉진시키거나, 세포내 축적을 증강시키는 효과 등에 의해 항암제와 함께 섭취 시 항암활성의 증강효과가 나타난다고 보고되어 있다.

2) 산성 다당체 성분

체지방 분해작용과 암환자의 식욕감퇴 및 체중감소를 일으키는 독소호르몬 (toxohormone-L)에 대해 길항적 작용을 나타내는 인삼의 산성다당체 성분 (pectin-like α -1, 4 polygalacturonan 골격을 가지고 있음)이 홍삼에서 추출 수율이 높다고 알려져 있다.

3) 말톨(maltol)

홍삼의 대표적 항산화 물질인 maltol은 홍삼의 증숙과정에서 maltose가 아미노산과 반응하여 생성되는 phenolic compound이다. maltol은 열처리에 의해 그 중간체로서 isomaltol glucoside가 생성되고 다시 당의 이탈과 이성화 반응에 의해 생성되는 홍삼 특유 성분이다. Arg-Fru-Glc는 maltase를 저해하고 혈관을 확장하는 생리활성을 나타내며, 말톨 성분은 생체 노화와 관련된 지질의 과산화를 억제하는 효능이 보고되고 있다.

4) 기타

홍삼에서 분리된 adenosine은 인슐린 유사작용을 하여 지방세포의 포도당으로부터 지방생성을 촉진하고 에피네프린에 의해 유도되는 지방분해를 억제하는 대사 조절 작용을 한다고 보고하였다.

2.5 혈전

혈액(blood)은 혈관 속에서 흐르는 액상의 조직을 말하며, 뼈 속에 있는 골수에서 만들어진 뒤 혈관을 통하여 온 몸을 끊임없이 순환하며 우리의 생명을 지키고 유지하는 중요한 역할을 한다.

혈액은 혈장(blood plasma)과 혈구(blood corpuscle)로 구성되는데, 혈장은 수분으로 이루어져 있고 혈액응고인자, 전해질 등을 포함하며 혈구는 적혈구, 백혈구 및 혈소판으로 이루어진다. 혈장에 녹아있는 성분 중 많은 부분이 이온 상태의 무기 염류로서 혈액 전해질이라고 부르며, 이들은 삼투균형, pH 완충작용, 막 투과성의 조절 등의 역할을 한다. 또한 혈장은 수많은 기능을 가지고 있는 혈장 단백질을 함유하고 있다. 혈장 단백질은 알부민(albumin), 피브리노겐(fibrinogen), 면역글로불린(immunoglobulins)등으로 구성되어 있으며, 이들은 각각 삼투균형, 혈액응고, 방어기능을 수행한다.

혈액의 세포성 요소에는 크게 적혈구(red blood cell)와 백혈구(white blood cell)가 있는데, 적혈구는 산소의 운반과 세포에서 생긴 이산화탄소와 노폐물을

이동시키는 역할을 담당하고, 백혈구는 식세포 작용과 면역 반응 등에 관여한다. 세 번째 세포성 요소로 혈소판(platelet)을 들 수 있는데, 이는 지름 2-3um 정도로 작은 세포 조각들로서 핵이 없으며 골수에 있는 거대세포(giant cell)의 세포질 일부가 떨어져서 생성된다. 이렇게 형성된 혈소판은 혈액으로 들어가 혈액의 응고에 중요한 역할을 담당하게 된다.

체내의 세포는 혈액으로부터 공급되는 산소와 영양물질들을 이용해 생명유지에 필요한 대사 작용을 한다. 하지만 혈액순환에 장애가 생기면 여러 가지 질병을 초래하게 된다. 체내에서 혈액은 응고계(blood clotting system)와 용해계(fibrinolytic system)의 적절한 균형으로 유지되고 있기 때문에, 정상상태에서 생성된 혈전은 즉시 용해되어 인체에 영향을 주지 않는다. 여러 가지 원인에 의해 이러한 균형이 깨지게 되면 생성되는 혈전이 용해되는 혈전보다 많아지게 되고, 용해되지 않은 혈전은 혈관을 막고 혈액의 순환을 방해하여 조직(tissue)으로의 영양분과 산소공급을 차단함으로써, 협심증, 뇌경색, 뇌출혈, 심근경색과 같은 심혈관계 질환의 원인이 되기도 한다. 이러한 질환은 경우에 따라서는 심각한 후유증을 갖게 되고 궁극적으로 사망에 이르게 되는 데, 이는 전 세계 사망원인의 약 29%를 차지하고 있다. 혈전증은 노화에 따라 진행되고 혈관벽에서 발생하는 죽상경화의 일종이지만, 혈소판 응집력의 항진에 의한 혈전의 형성이 직접적인 원인이 되기도 한다.

혈액 순환계 질환의 많은 원인 중 대표적인 것으로 혈전을 들 수 있는데 혈전은 상처 복구시 지혈과정에서 중요한 역할을 담당하고 있으나 혈관 내에 생성된 혈전은 혈관 벽에 점착하거나 미세 혈관을 막아 정상적인 혈류를 방해하게 되어 혈액 순환계 질환을 초래하게 된다.

최근 우리나라에서는 국민소득의 향상과 식생활의 변화로 인하여 혈액순환장애에 따른 심장 질환과 같은 성인병의 발병률이 높아지고 있으며, 사망률도 높은 비중을 차지하고 있다.

심혈관계 질환의 발생 원인에는 유전적 요인이 있기는 하지만, 생활습관도 중요한 원인이 된다. 발병률을 높이는 후천적 요인으로는 흡연, 운동부족, 동물성 기름의 과다섭취, 혈액내 고콜레스테롤증(hypercholesterolemia)등이다. 건강한 동맥은 매끄러운 내벽을 가지고 있어 혈액의 흐름을 방해하지 않지만, 콜레스테롤이 침적되면서 내벽에 플라크(plaque)가 형성되고, 이 플라크에 콜레스테롤이

침적되어 표면이 거칠어진다. 일단 플라크가 생기면 섬유성 결합조직에 걸려 더 많은 콜레스테롤이 결합하게 된다. 이러한 플라크의 형성은 혈관을 좁히는 결과를 가져오며, 그 결과로 만성 심혈관계 질환인 아테롬성 동맥경화(atherosclerosis)를 유발하게 되는 것이다. 고혈압(hypertension)은 동맥경화(atherosclerosis)를 악화시키고 심장마비(heart attack)나 뇌졸중(stroke)의 위험을 증가시킨다. 동맥경화가 생기면 혈관이 좁아지고 탄력이 줄어들어 혈압이 높아지는 경향이 있다. 동맥경화가 진행될수록 혈관은 점점 좁아지고 심장마비나 뇌졸중이 일어날 확률은 점점 높아진다. 치명적인 마지막 단계에서는 심장마비나 뇌졸중이 일어나는 데 심장마비는 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥중 하나 이상이 막힘으로써 심장근육에 산소 공급이 막히고 그 결과로 심장근세포들이 죽는 것이다. 심장마비나 뇌졸중은 흔히 혈전, 즉 혈액 응결체에 의해 발생하게 되는데, 이 혈전 형성의 주된 원인은 혈관 내벽에 쌓인 LDL에 의해 촉발된 염증반응이다. 이러한 염증 반응은 플라크를 파괴할 수 있고, 이때 혈전을 형성할 수 있는 조각들이 떨어져 나오게 된다. 혈전은 관상동맥이나 뇌동맥에서 생길 수도 있고 순환계의 다른 지역에서 발생하여 심장이나 뇌에 도달할 수도 있다. 이와 같은 운송된 혈전을 색전(embolus)이라고 부르기도 하며, 자신이 통과할 수 없는 좁은 혈관에 이르기까지 순환계를 돌아다니게 된다. 따라서 이 색전은 이미 혈관 벽이 좁아진 곳에 걸리게 될 확률이 높고, 이렇게 혈관이 막히게 되면 그 뒤로 연결된 심장이나 뇌 조직 세포들은 산소부족으로 죽게 되는 것이다.

이처럼 심혈관계 질환은 개인의 삶의 질에 있어 지대한 영향력을 미치고 있어 이들의 예방과 치료에 많은 연구가 계속적으로 진행되고 있다.

항 혈전제는 혈전 생성 단계별 표적에 따라 항응고제와 항 혈소판제로 분류되고, 항응고제는 트롬빈(thrombin)생성이나 피브린(fibrin)형성을 억제하는 작용이 있으며, 항 혈소판제는 혈소판(platelet)의 응집을 억제함으로써 항혈전 효과를 나타낸다.

항응고제의 한 종류인 혈전용해 효소들은 피브린 덩어리를 용해시키는 제제로서, 일반적으로 이러한 목적으로 사용되는 3가지 효소는 유로키나제(Urokinase, UK), 스트렙토키나제(streptokinase, SK) 그리고 조직형 플라스미노겐 활성화자(tissue type plasminogen activator, tPA)가 있다. 그러나 유로키나제의 정맥내 주사와 같은 혈전 용해효소 치료는 너무 비싸고 환자가 합병증 등의 부작용

으로 인해 고통 받을 수 있다는 단점이 있다.

혈전치료에 이용되는 혈전용해 효소는 혈전 성분인 피브린을 용해시키는 물질로서 작용기전에 따라 두 가지로 나눌 수 있다. (1) 혈전용해효소가 피브린을 직접 용해하는 직접 용해작용과 (2) 플라스미노겐 활성화인자에 의해 플라스민을 활성화 시켜서 혈전을 용해하는 간접 용해작용이 있다.

현재 임상에서 쓰이고 있는 혈전용해제는 혈전을 직접 용해시키지 않고 체내에 있는 플라스민의 전구체인 플라스미노겐을 활성화 시켜 플라스미노겐을 플라스민으로 전환시켜 혈전을 용해시킨다. 이러한 혈전용해제는 혈전에 대한 선택성이 낮고 반감기가 짧으며, 알레르기, 발열, 국소출혈등과 같은 부작용을 가지고 있다. 또한 가격이 비싸며, 유로키나아제를 제외하고는 경구투여가 불가능하고, 체내의 혈전형성 예방효과를 기대 할 수 없다. 따라서 부작용이 적고 혈전에 대한 선택성이 높으며 체내 혈전형성 예방효과가 있는 새로운 혈전용해제 개발이 절실히 요구되어 짐에 따라 경제적이고 경구투여가 가능한 저분자 혈전증 치료제 개발을 위한 연구가 다양하게 시도되고 있다.

최근 들어 한국의 청국장, 된장, 버섯 등 일본의 나또(natto)와 토푸요(tofuyo) 등 식품류에서 혈전용해효소들이 많이 발견되고 있다. 이와 같이 식품에서 분리되는 혈전 용해 효소들은 혈전용해 치료에 유용하게 사용될 뿐 아니라, 효율적으로 대량 생산할 수 있어 현재 일반적으로 사용되는 값비싼 혈전 용해제를 대체할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이러한 효소들의 분리는 심혈관계 관련 질환을 효과적으로 예방할 수 있는 기능성 식품 생산에도 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

2.6 항산화

최근 경제 성장에 따른 식생활의 변화로 각종 만성퇴행성 질환의 발병과 사망률이 증가되는 추세이다. 또한 흡연, 과음 및 스트레스와 같은 간접적 인자들의 억제 또는 예방 및 치료를 위한 건강기능성 식품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그중 생체 내에서의 정상적인 대사 과정 및 극심한 운동, 노화, 중금속 오염 등의 요인에 의해 생성될 수 있는 자유기 및 활성산소종 등은 DNA, 단백질, 그리고 지질에 산화적 손상을 일으키는데, 이것은 암, 노화 및 심혈관계 질

환 등과 밀접한 관계가 있다.

모든 생물체들은 생체 내에 에너지 생산을 위한 산소 이용과정에서 활성산소가 생성된다. 이들 활성산소는 생체 내 superoxide dismutase(SOD), catalase, xanthin oxidase(XO), glutathione peroxidase(GSH-Px)등의 저분자로서 항산화제 혹은 free radical scavenger 역할을 하는 것으로 Vitamin E, β -carotene, Vitamin C 및 glutathione등과 같은 물질에 의한 기작에 의해 대부분이 소멸되지만 과량의 활성 산소나 지속적인 활성산소 생성으로 항산화 방어계의 균형이 깨지게 되면 각종 질환을 일으키는 원인이 된다. 유해산소로 알려져 있는 활성산소는 가장 안전한 형태인 $^3\text{O}_2$ 가 환원되면서 superoxide radical($\cdot\text{O}_2$), 과산화수소(H_2O_2), hydroxy radical($\cdot\text{OH}$), 지질 peroxide(ROOH)이나 여기에서 생기는 free radical($\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$)등의 과산화 지질로서 이러한 활성산소의 과산화지질이 정상적으로 소거되지 않았을 때 free radical로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에서 생기게 된다. 이러한 산화적 스트레스는 생체막의 필수 구성성분인 불포화 지방산의 탄소 사슬을 공격하여 microsome, mitochondria, ribosome의 막을 손상시키고, 이로 인해 과산화물이 생성된다.

신체는 이러한 산화적 스트레스로부터 세포막과 세포내 물질을 보호하기 위한 항산화 기전이 존재하는데 그 중 하나는 항산화 효소에 의한 효소적 방법이고 나머지는 생체 내 여러 가지 항산화 물질과 식이를 통하여 공급되는 항산화 비타민이나 polyphenol류와 같은 항산화제에 의한 비효소적 방법이다. 그러나 신체가 항산화 방어체계를 구축하여 스스로를 보호하지만 항산화 체계가 약화되거나 산화적 스트레스가 가해질 때 증가되는 활성산소종에 대항하기는 역부족 상태에 놓이게 된다. 따라서 항산화 성분의 섭취나 항산화 효소 활성 증가 등으로 체내 항산화 효능을 증진시키는 것은 누적되는 산화적 손상에 대항하기 위해서 매우 중요한 것으로 보고되고 있으며, 더불어 항산화 물질을 함유한 천연 자원에 대한 관심도 증가되고 있다.

Ⅲ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 재료

산삼배양근은 Joy Bio 영농조합법인에서 제공하여 실험에 사용하였으며, 홍삼은 (주)한국인삼공사에서 구입하여 실험에 사용하였다.

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, BHA(butalated hydroxy toluene), α -tocopherol, ascorbic acid, sulfanilic acid, naphthylamine, fibrinogen, thrombin, plasmin 등 실험에 사용된 시약은 연구용 특급시약을 사용하였다.

2) 시료의 조제

산삼배양근의 혈전용해 효과와 항산화 효과를 알아보기 위해서 시료 10g에 70% ethanol 용액을 가하여 24시간 동안 추출한 후 ethanol 추출 시료로 사용하였고, 시료 10g에 증류수를 가한 후 120℃에서 4시간동안 열수 추출한 것을 열수 추출 시료로 사용하였다.

3) 유효성분의 추출

건조 산삼배양근 100g을 취하여 blender로 곱게 분쇄한 후, 10mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) 용액 2L를 첨가하여 4℃에서 24hr동안 교반 추출하였다. 이렇게 추출된 추출액을 cheese cloth 1차 거름망과 2차 거름망을 통해서 두 차례 filtration한 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 산삼배양근 추출액의 혈전용해 활성 측정

(1) 혈전용해 활성측정

산삼배양근 추출물의 혈전용해 활성측정은 Fibrin plate법에 준하여 실행하였으며, 항균활성을 측정하는데 사용되는 paper disk diffusion method를 응용하여 측정하였다.

시약은 plasmin, Fibrinogen, thrombin(sigma)를 사용하였고, 직경 90mm의 petri dish를 사용하여 fibrin plate를 제조하였다. 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 0.5% fibrinogen용액 10ml를 조제한 후 50unit/ml가 되도록 조제한 thrombin 용액 200ul을 섞고, bubble이 생기지 않도록 조심하여 petri dish에 조심스럽게 부어준다. bubble이 생겼을 경우에는 petri dish의 가장자리로 보내고 평평하게 하여 plate를 제조한다. 10-20분 경과 후 thrombin에 의해서 fibrinogen이 fibrin으로 되면서 gel상의 fibrin plate가 만들어지는데, 여기에 각각의 시료를 paper disk(Advantec filter paper, d=0.6cm)에 20ul씩 흡수시켜 37°C의 incubator에서 5시간 반응시킨 후, 반응 후에 생긴 fibrin의 (lyzed zone) 용해효과(용해된 면적)를 측정한다.

용해효과는 반응 후에 생긴 lyzed zone의 서로 수직인 두 개의 지름을 측정하며, lyzed zone이 타원형인 경우에는 가장 긴지름(d_1)과 가장 짧은 지름(d_2)을 측정하여 아래의 공식으로 계산하였다.

대조구로서는 plasmin을 1.0unit/ml이 되도록 제조한 시료와 같은 양을 점적하여 대조구로 사용하였다.

$$\text{lyzed zone area}(\text{cm}^2) = \pi \times \frac{d_1}{2} \times \frac{d_2}{2}$$

2) 산삼배양근 추출액의 항산화 활성 측정

(1) DPPH radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity는 Blois법(Blois, 1958)에 준하여 측정하였다. 즉, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 99.5% 에탄올에 녹여 0.2mM 농도가 되게 조제한 후, 홍삼 및 산삼배양근에서 추출한 각각의 시료 2ml에 DPPH용액을 1ml 첨가한 후 반응이 잘 일어날 수 있도록 각각의 시료를 10초간 mixing 하였다.

37°C의 incubator에서 30분간 반응 시킨 후 Spectrophotometer를 이용, 517nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 전자공여능 측정은 시료 첨가구에 대한 흡광도의 감소비율로 나타내며, 대조군으로는 시료대신 시료와 동량의 ethanol용액을 사용하여 흡광도를 측정하였다. positive control로 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxy toluene)과 천연 항산화제인 α -tocopherol과 ascorbic acid를 사용하였다. 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = \left(1 - \frac{ABS_{sample}}{ABS_{control}}\right) \times 100$$

$A_{control}$: 대조구(분획 미첨가)의 흡광도

A_{sample} : 실험구(분획첨가)의 흡광도

(2) SOD 유사 활성

SOD 유사활성 물질의 측정은 SOD Assay kit-WST(Dojindo, Japan)를 사용하였다. SOD Assay kit는 산화효소인 xanthine oxidase(XO)의 작용에 의해 WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-tetrazolium, monosodium salt)가 환원되어 WST-1 formazan으로 바뀌며 노란색으로 발색되는 반응을 이용한 것이다.

SOD 유사 활성물질은 xanthine oxidase에 의해서 유발되는 산화반응을 저해시키므로 SOD activity가 높으면 WST-1이 WST-1 formazan으로 바뀌지 않으므로 Inhibition rate가 높게 나타나게 된다.

96-well micro plate를 이용하여 다음과 같이 시료 및 시약을 분주하였다.

	sample	blank ₁	blank ₂	blank ₃
Sample solution	20µl	-	20µl	-
ddH ₂ O	-	20µl	-	20µl
WST working solution	20µl	200µl	200µl	200µl
Enzyme Working solution	20µl	20µl	-	-
Dilution Buffer	-	-	20µl	20µl

plate의 well에 시료(Sample solution) 또는 ddH₂O 20μl 씩을 분주한 후 각각의 Well에 WST working solution을 200μl씩 넣어준다.

sample과 blank 1에는 Enzyme Working solution을 20μl씩 가하고 blank2, blank3에는 Enzyme Working solution 대신에 Dilution Buffer를 20μl씩 가한 후 반응이 잘 일어날 수 있도록 잘 섞어주고 37°C의 incubator에서 20분 동안 배양한다.

반응이 완료된 plate는 최종적으로 ELISA reader(Immunomini NJ2300, System Instrument, Japan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 이 반응은 450nm에서 흡광도를 나타내며, SOD 유사활성(Inhibition rate%)는 다음의 공식에 의거 산출하였다.

$$\text{SOD activity(Inhibition rate\%)} = \left\{ \frac{[(A_{\text{blank}_1} - A_{\text{blank}_3}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}_2})]}{(A_{\text{blank}_1} - A_{\text{blank}_3})} \right\} \times 100$$

(3) 총 페놀함량 측정(The Folin-Ciocalteu colorimetric method)

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu의 방법에 의해 측정되었다. 반응액은 시료 20 μ l, DW 1.58ml 그리고 Folin-Ciocalteu reagent 100 μ l을 혼합하여 만들었다. 위 반응 액에 300 μ l의 20% sodium carbonate를 첨가하고 잘 혼합하였다. 그런 다음 실온에서 2시간 동안 배양한 후, 765nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 증류수를 가하여 측정하였고, 표준물질로 gallic acid를 사용하였다. 총 페놀함량은 gallic acid equivalents(GAE, μ g)/ 시료100mg로 나타내었다.

(4) 아질산염 소거능(nitrate scavenging ability, NSA)

아질산염 소거능(nitrate scavenging ability)은 Kato등(Kato, H., et al., 1987)의 방법으로 측정하였다. 즉, 1mM NaNO₂ 용액 2ml에 시료 1ml를 가하고, 0.1N HCl(pH1.2), 0.2M 구연산 완충액 (pH 3.0, 6.0)으로, 각각 pH 1.2, 3.0, 6.0으로 보정한 후, 반응용액의 부피를 10ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시키고, 각 반응액 1ml를 취하여 2% 초산용액 2ml와 30%초산용액으로 용해한 Griess reagent (1% sulfanilic acid: 1% naphthylamine=1:1) 0.4ml를 가한 다음 혼합하여, 실온에서 15분간 방치한 후, 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군은 Griess reagent대신에 증류수를 가하여 위와 동일한 방법으로 측정하여 잔존하는 아질산의 양을 구하였으며, positivecontrol로 천연 항산화제인 ascorbic acid와 합성 항산화제인 BHA를 사용하였다. 아질산염 소거 능은 분획을 첨가하기 전과 후의 아질산염 백분율(%)로 표시하였으며, 실험은 3회 반복 실시하였다.

$$N(\%) = 1 - \frac{(A-C)}{B} \times 100$$

N : Nitrate scavenging ability

A : Absorbance of 1 mM NaNO₂ added sample after standing for 1 hour

B : Absorbance of 1 mM NaNO₂ added griess reagent

C : Absorbance of control

(5) 지질과산화 측정(ferric thiocyanate method)

지질과산화는 Kikuzaki와 Nakatani의 방법에 준하여 측정 하였다.

Ferric thiocyanate법에 의한 측정은 유지의 자동산화에 의해 형성된 과산화물이 ferrous thiocyanate를 ferric thiocyanate로 산화시키는 정도를 비색법을 통해 측정하는 방법이다.

홍삼, 산삼 배양근 에탄올, 열수 추출물에 의한 Linoleic acid 에멀전 기질에서의 과산화물 생성 억제 효과를 측정하였다.

즉 시료 3.9ml와 에탄올 4ml을 혼합하고, 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid 4.1ml와 0.05M phosphate buffer(pH 7.0, 8ml)를 첨가하여, 암 조건을 유지시킨 40°C incubator에서 24시간 배양 후, 이 반응액 0.1ml을 취하여 75% 에탄올 9.7ml와 30% ammonium thiocyanate 0.1ml를 혼합하고, 3.5% HCl에 녹인 0.02M ferrous chloride 0.1ml을 가한 다음, 실온에서 3분간 반응시켜 FeCl₂와 thiocyanate의 발색정도에 따른 흡광도를 500nm에서 측정하였다.

대조군은 시료대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 대조군의 흡광도가 최고치를 나타낼 때 까지 24시간 단위로 흡광도를 측정하였다.

positive control로 천연 항산화제인 α -tocopherol, ascorbic acid와 합성 항산화제인 BHA를 사용하여 시료의 항산화 활성을 비교하였으며, 실험은 3회 반복 실시하였다.

3) 산삼배양근의 유효성분 추출 및 정제

(1) 유효 성분 추출

산삼배양근의 단백질 추출을 위해 산삼배양근 100g을 분쇄한 후 산삼배양근 부피의 20배의 10mM PBS(Phosphate buffer saline) Buffer를 가하여 4℃에서 하루 동안 교반 추출을 실시하였다.

① 황산암모늄 분획

산삼배양근중의 단백질 조분획을 위해 황산암모늄 분획을 실시한다. 추출한 시료 용액에 포화 상태가 될 때까지 황산암모늄을 용해하여 시료중의 단백질의 이온강도를 증가시켜 침전이 일어나도록 하였다.

② 투석(Dialysis)

황산암모늄 분획에서 침전된 단백질을 수집, 원심분리(13000rpm, 20min, 4℃)를 통해 단백질과 상층액을 분리시킨 후, 침전된 단백질을 걸어내어 Dialysis tubing cellulose membrane (Ave. flat width 33mm, Sigma-Aldrich)을 이용하여 투석을 실시한다.

③ Gel filtration column chromatography

투석 실시 후 침전된 물질을 원심분리(8,000rpm, 10min, 4℃)를 통해 분리한 후 상층액(supernatant)를 분리해 조단백질 분획으로 사용한다.

gel filtration column 으로 Amesham Bioscience사의 Sephacryl S-300 High resolution을 사용하여 open column에 충전시켜 10mM PBS buffer를 이용 overnight flow 시켜 gel을 평형화 시킨다.

gel이 안정화 되면 산삼배양근으로 부터 추출한 단백질 용액을 분주한 후 PBS buffer를 전개용매로 사용, filtration을 실시한다.

④ 분획의 수집 및 흡광도 측정

유속은 1.8ml/min로 하고, 6ml씩 분획을 수집하여, 280nm에서 수집한 분획의 흡광도를 측정한다.

⑤ 분획의 항산화 활성 측정

Gel filtration을 통해서 분리해낸 분획 중 높은 흡광도를 나타내는 영역의 DPPH free radical 소거능, SOD 유사활성을 측정하였다.

(2) 산삼배양근 생리활성 물질의 분리 및 정제

산삼배양근 추출 생리활성 물질의 분리, 정제를 위해 Recycling preparative HPLC(prepare-HPLC; JAI Korea Co., Ltd. LC-9104)를 이용 하였다.

Column으로 GS-310(20 \times 500mm)을 이용하였으며, 용매로 Phosphate buffer를 이용하여 각각의 peak를 수집하였다.

(3) Polyacrylamide gel electrophoresis

Recycling preparative HPLC(prepare-HPLC)를 통해서 수집한 peak의 분자량을 측정 하기위해 단백질 전기영동을 실시하였다.

단백질의 전기영동은 Laemmli의 방법에 따라 15% 농도의 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 사용하였고, 전기영동 용매는 SDS-Tris-glycine 완충액(0.025M Tris, 0.195M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)을 사용하여 10mA로 전기영동을 실시하여 유효성분의 분자량을 측정하였다.

전기영동 후 염색(Coomassie brilliant blue R-250)용액으로 2시간이상 침지하여 염색, 7% acetic acid와 10%methanol 혼합액으로 탈색하였다.

4. 통계처리

연구의 실험분석 결과는 SPSS (statistical package for social science. Ver 12.0, Spss Inc.)를 이용하였으며, 각 실험결과 평균값들의 차이 검증은 일원 배치 분산분석 One-way ANOVA(analysis of variance)을 실시하였고, 각 측정 평균값의 유의성($p < 0.05$)은 Duncan's multiple range test를 사용하여 검정하였다.



IV. 결과 및 고찰

1. 산삼배양근 추출액의 혈전용해 활성 측정

혈전은 혈관 내 상처 복구 시 지혈과정에서 트롬빈에 의해 섬유소원으로부터 생긴 섬유소와 혈소판의 응집체로 형성된다. 정상적인 경우 내피세포로부터 생긴 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator)의 작용에 의해 plasminogen으로부터 생긴 plasmin에 의해 형성된 혈전이 용해되어 혈관 내에 응고체와 용해체계가 평형을 이룬다. 그러나 지혈과정에서 혈액 응고가 과다하게 진행되어 생긴 혈전은 plasmin에 의해 완전한 용해가 일어나지 않아, 이 작은 혈전들이 혈관을 따라 흐르며 혈관계 질환을 유발하게 된다. 이러한 혈전을 용해시키기 위해서 혈전 용해제를 사용하는데 기존에 사용되고 있는 혈전용해제는 가격이 비싸며 혈전에 대한 선택성이 낮아 여러 가지 부작용을 초래한다.

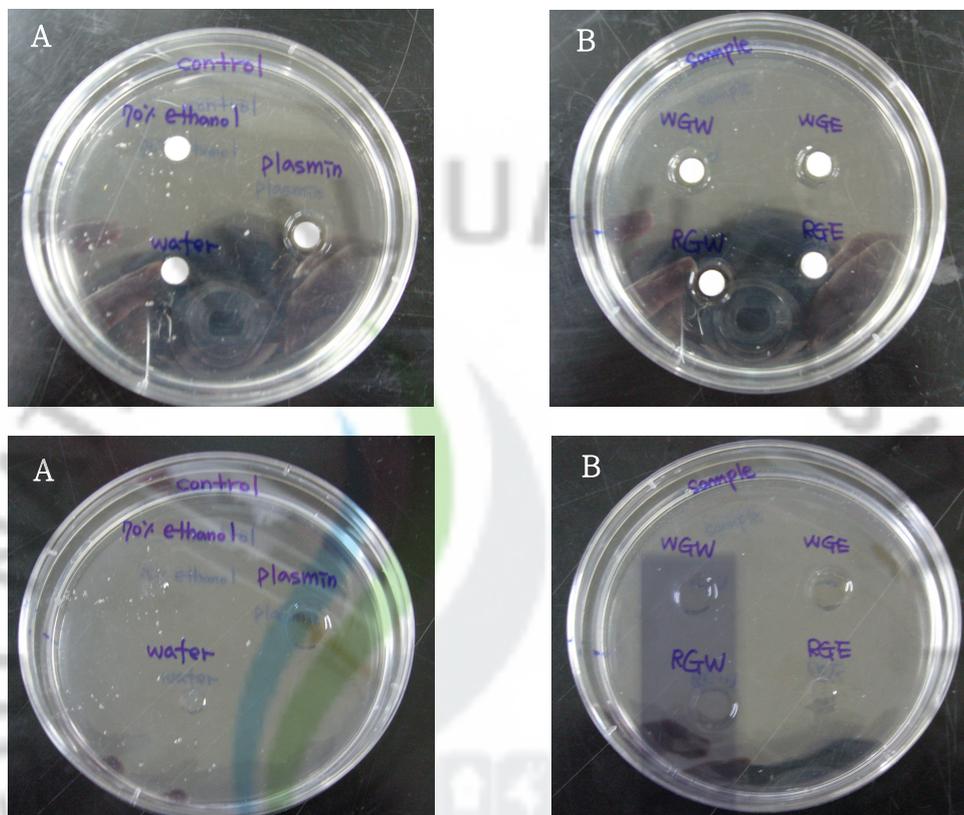
이러한 이유로 최근 새로운 혈전용해제의 필요성이 대두되었다. 근래에 혈전과 섬유소원을 직접 용해하는 효소를 뱀독(Chung and Kim, 1992)과 지렁이(Park et al., 1998)로부터 분리 정제하였다는 보고와 함께 발효식품인 청국장(Kim et al., 1995), 된장(Kim, 1998), 젓갈(Park et al., 1998)로부터 혈전용해 물질을 찾으려는 연구가 많이 진행되었다.

따라서 본 연구에서는 산삼배양근과 홍삼에서 생리활성을 나타내는 성분을 추출하여 혈전 용해 활성을 알아보려고 하였다.

산삼배양근과 홍삼 추출액의 혈전용해 효과는 fibrin plate 법에 의해 측정하였다. fibrin plate 법의 원리는 Thrombin이 fibrinogen과 반응함으로 인해 형성된 gel 상의 혈전물질인 fibrin을 물로 가수분해하는 정도를 측정함으로써 혈전 용해의 효과를 알아보는 실험이다.

시료별 추출용매에 따른 혈전용해 활성을 알아보기 위해 대조군으로 1.0unit plasmin을 이용, 혈전 용해 활성을 측정한 결과는 다음과 같다(Fig 2).

Fig 2. Fibrinolytic activities of Wild ginseng root extract and Red ginseng extract.



A : Plasmin(1.0unit/ml), water(Distilled water) and 70%ethanol were used as controls.
 B : WGE: Wild ginseng ethanol extract; RGE: Red ginseng ethanol extract;
 WGW; Wild ginseng water extract; RGW: Red ginseng water extract.

Table 4. Fibrinolytic activities of Wild ginseng root extract and Red ginseng extract by fibrin plate method.

control		Sample		
Sample	cm ²	Sample ¹⁾	cm ²	(%)
Plasmin 1.0unit/ml	1.53 cm ²	WGW	0.64 cm ²	41.8%
water	0 cm ²	WGE	0.43 cm ²	28.1%
70% ethanol	0 cm ²	RGW	0.43 cm ²	28.1%
		RGE	0.28 cm ²	18.3%

¹⁾WGE: Wild ginseng ethanol extract; RGE: Red ginseng ethanol extract;
 WGW; Wild ginseng water extract; RGW: Red ginseng water extract.

Fibrin plate를 제조하여 추출한 시료용액을 paper disk에 점적, 37°C incubator에서 5시간 배양하였다. 배양 후 fibrin plate중의 paper disk를 제거하여 시료에 의해 가수분해된 면적을 대조군으로 사용한 1.0unit plasmin의 용해 면적과 비교하여 혈전용해 정도를 측정된 결과 시료의 혈전용해 효과는 대조군으로 사용한 plasmin에 비해 다소 낮은 경향을 보였다. 추출한 시료 중 산삼배양근 열수 추출물에서 41.8%로 혈전 용해 활성이 가장 높게 나타났으며, 산삼배양근 에탄올 추출물과 홍삼 열수 추출물에서 각각 28.1%로 두 번째로 높은 활성을 나타내었으며, 홍삼 에탄올 추출물에서 18.3%로 가장 낮은 혈전 용해 활성을 나타내었다.

전체적인 실험 결과에서 대조군으로 사용한 plasmin에 비해 혈전 용해 효과가 낮게 나타났지만 실험 재료로 사용한 시료에 혈전 용해 효과를 나타내는 물질이 존재 한다는 것을 입증하는 실험결과였다.

본 연구에서 실시한 실험 결과, 시료의 추출 조건에 따라서 혈전용해 효과가 다르게 나타났기 때문에 시료중의 유효성분을 추출하기 위한 추출용매의 선택, 추출 시간, 온도 등과 같은 추출 조건을 달리하여 혈전 용해 활성을 나타내는 물질의 추출, 분리에 관한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

2. 산삼배양근 추출액의 항산화 활성 측정

1) DPPH radical scavenging activity

인체 내에서 생성되는 free radical은 epinephrin의 산화, 미토콘드리아, 식세포, xanthine oxidase나 glutathion reductase 등의 flavoenzyme에 의한 정상적인 대사 과정과 같은 여러 가지 생물학적 반응에 의해 생성된다. 전자 공여 작용은 이러한 free radical에 전자를 제공하여 인체가 산화적 상해에 의해 손상되는 것을 방지해 주는 것으로 설명되고 있다. 이러한 전자공여능 작용은 식물체에서는 주로 phenol 류나 flavone류의 성분에 기인하는 것으로 알려져 있다.

DPPH에 의한 항산화 활성 측정은 비교적 안정한 radical을 가지는 DPPH에 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 radical에 전자를 공여함으로써 radical을 소거하는 활성을 측정하는 것으로, 이 반응으로 DPPH 고유의 색인 보라색이 탈색되어 노란색의 diphenylpicryl hydrazine으로 환원되는 반응을 이용한 항산화 측정 방법이다. 비록 화학적으로 유도되는 radical 이지만, 간편하고 신뢰성이 높은 항산화 활성 측정방법으로 널리 이용되고 있다.

산삼배양근 추출물과 홍삼 추출물을 대표적인 항산화 물질인 α -tocopherol과 ascorbic acid, BHA의 3종을 positive control로 하여 DPPH free radical 소거능을 측정한 값은 다음과 같다(Table 5).

Blois법에 의한 시료중의 DPPH free radical 소거능을 측정한 결과, positive control group중 α -tocopherol과 BHA가 각각 90.42%와 88.58%로 산삼배양근과 홍삼에서 추출한 시료 보다 유의적으로 높은 DPPH free radical 소거능을 나타냈다. α -tocopherol과 BHA 다음으로는 74.37%로 산삼배양근 열수추출물에서 DPPH free radical 소거능이 높게 나타났으며, 다음으로 각각 72.73%와 68.22%로 수용성 항산화제인 ascorbic acid와 홍삼 에탄올 추출물이 유사한 DPPH free radical 소거능을 나타냈다. 그 뒤를 이어 산삼배양근 열수 추출액이 60.96%, 홍삼 열수 추출액이 33.02%의 DPPH free radical 소거능을 나타냈다.

Table 5. DPPH radical scavenging activity of Wild ginseng extract and Red ginseng extract.

DPPH radical scavenging activity(%) ^{2),3)}	
Samples ¹⁾	(%)
α-Tocopherol	90.43 ± 0.84 ^{d)}
ascorbic acid	72.73 ± 1.46 ^{bc)}
BHA	88.58 ± 0.83 ^{d)}
WGE	74.37 ± 2.09 ^{c)}
RGE	68.22 ± 1.17 ^{bc)}
WGW	60.96 ± 2.55 ^{b)}
RGW	33.02 ± 9.48 ^{a)}

¹⁾WGE: Wild ginseng ethanol extract; RGE: Red ginseng ethanol extract; WGW; Wild ginseng water extract; RGW: Red ginseng water extract.

²⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Significantly different from the control value(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

산삼배양근과 홍삼의 추출용매에 따른 DPPH free radical 소거능을 살펴보면 두 가지의 시료 모두 열수 추출한 것에 비해 에탄올 추출한 경우의 DPPH free radical 소거능이 높게 나타났다. 산삼배양근의 경우 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 약 13.4% 높은 DPPH free radical 소거능을 나타내었고, 홍삼의 경우에는 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 35.2% 높은 DPPH free radical 소거능, 즉 열수 추출물에 비해 두 배 가량 높은 DPPH free radical 소거능을 보였다.

추출시료에 따른 DPPH free radical 소거능을 비교해 보면 산삼배양근 추출물에서 홍삼 추출물에 비해 에탄올로 추출한 경우 약 6.2%가량 높은 DPPH free radical 소거능을 나타냈으며, 열수 추출한 경우 산삼배양근 추출물에서 27.9% 높은 DPPH free radical 소거능을 나타내었다.

종합해 보면, 홍삼 추출물에 비해 산삼배양근 추출물에서 DPPH free radical 소거능이 높게 나타났으며, 각각의 시료를 열수 추출한 경우에 비해 70% 에탄올로 추출한 경우가 DPPH free radical 소거능이 높게 나타났다.

2) SOD 유사활성 측정

산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡을 하는 대부분의 생물에서 필수적으로 생성되는 부산물로 ROS에서 유래된 산소 radical은 자유라디칼(free radical)중에서 가장 많은 부분을 차지하며, 비공유 전자쌍(unpaired electron)를 갖고 있기 때문에 불안정하고 반응력이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하게 되고, 끊임없이 체내 고분자들을 공격하여 결국에는 세포와 조직에 비가역적인 손상을 초래하거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하여 생체나 식품에서 문제시 되고 있다. 이러한 ROS를 제거하기 위한 생체 방어 시스템은 superoxide dismutase 등의 효소계에 의한 효소적 방어체계와 ROS나 자유라디칼의 연쇄반응을 중단 또는 종결시키는 비효소적 방어체계로 크게 구별되며, 비효소적 방어체계는 주로 식품을 통해 섭취 가능한 항산화 영양물질과 비영양 항산화 물질에 의하여 이루어진다. 이러한 비영양 항산화 물질로는 polyphenol, phenolic acid, bioflavonoid등이 있다고 알려져 있다.(Kang, M. J., et al., 2002)

항산화 효소중의 하나인 Superoxide dismutase(SOD)는 세포에 해로운 Superoxide를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. Superoxide dismutase(SOD)는 세포의 해로운 환원산소종(superoxide)을 과산화수소로 전환시키는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$)을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 H₂O₂는 peroxidase나 catalase에 의하여 물과 산소분자로 전환되기 때문에 결국 산소 상해로부터 생체를 보호하는 기능을 하게 된다.(Pryor, W. A., 1986)

Superoxide dismutase는 30KDa이상의 분자량은 가진 단백질로 체내에서 흡수되지 않고 체외로 배출되며 열과 pH에 불안정하다. 따라서 Superoxide dismutase와 유사한 활성을 가지면서 단점을 보완할 수 있는 Superoxide dismutase 유사활성물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다.(Jeon, S. W., 2007)

SOD 유사활성물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하여 superoxide의 반응성을 억제한다. 이러한 SOD유사물질을 섭취할 경우 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 산화적 장해를 방어하고 노화억제 효과를 기대할 수 있다.

산삼배양근과 홍삼의 70% 에탄올 추출물과 열수 추출물을 이용하여 SOD 유사활성을 측정한 결과는 다음과 같다(Table 6).

Table 6. SOD activity(Inhibition rate%) of Wild ginseng extract and Red ginseng extract.

SOD activity ^{2),3)}	
Samples ¹⁾	Inhibition rate(%)
WGE	94.67 ± 3.84 ^{b)}
RGE	87.91 ± 0.53 ^{b)}
WGW	96.68 ± 0.93 ^{b)}
RGW	82.79 ± 2.14 ^{a)}

¹⁾WGE: Wild ginseng ethanol extract; RGE: Red ginseng ethanol extract;

WGW; Wild ginseng water extract; RGW: Red ginseng water extract.

²⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Significantly different from the control value(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

산삼배양근 추출물, 홍삼 추출물의 SOD 유사활성을 측정한 결과 산삼배양근 에탄올 추출물이 94.67%, 열수 추출물이 96.68%로 홍삼 에탄올 추출물 87.91%, 홍삼 열수 추출물 82.79%에 비해 SOD 유사활성이 유의적(p<0.05)으로 높게 나타났다.

산삼배양근과 홍삼의 70% 에탄올 추출물의 경우 SOD 유사활성이 산삼배양근에서 홍삼에 비해 약 3.4%가량 높게 나타났으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 열수 추출의 경우는 산삼배양근이 홍삼에 비해 유의적으로 약 13.89% SOD 유사활성이 높게 나타났다.

3) Total phenol

페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 이는 2차 대사산물의 하나로서 일반적으로, 페놀 화합물은 한 개 또는 두 개 이상의 수산기로 치환된 방향족 환을 가지고 있는 물질로, phenolic acid 및 coumarin류, flavonoid류 그리고 tannin류로 나누며 구조에 따라 이화학적 성질 및 생리적 기능이 달리 나타난다.

페놀 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가지며 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합되어 있다.(Cho., 2008)

이들 페놀화합물들은 식물체 및 인체의 항산화효과(Laughton, M. J. et al., 1981) 및 항균작용(Friend and Smith, 1977)등의 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 또한 항 혈전작용 고지혈증 억제작용(Matsumoto, N., Okushio, K. and Hara, Y., 1998) 및 지방간 억제작용 등 여러 가지 생리활성 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 페놀 화합물의 항산화성 정도는 식물의 종류 및 이들에 함유되어 있는 항산화 유효성분의 종류와 추출방법에 따라 현저한 차이가 난다고 한다. 따라서 항산화 활성과 페놀화합물 함량과의 관련성을 검토하기 위하여 추출물 내의 총 페놀 화합물 함량을 측정하였다.(Cho., 2006)

gallic acid를 일정 농도로 조제한 후 순차적으로 희석시켜 standard curve를 작성 하였다.작성한 standard curve를 통해 gallic acid의 농도와 765nm에서의 흡광도 간의 회귀방정식을 산출하였다.

회귀방정식은 $y=0.009x+0.0518$ (y는 765nm에서의 흡광도이며 x는 gallic acid 농도)로 나타났으며, gallic acid의 농도가 증가함에 따라 유의적($r^2=0.986$)으로 765nm에서의 흡광도도 증가하였다.(Yoo, 2007)

앞서 산출된 회귀방정식에 측정된 시료의 흡광도를 적용하여 시료중의 페놀 함량을 측정된 결과는 다음(Table 7)과 같다.

산삼배양근과 홍삼의 에탄올 추출물에서는 총 페놀함량이 44.09%, 홍삼추출물의 경우는 32.89%로 산삼배양근 에탄올 추출물에서의 총 페놀함량이 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났으며, 열수추출물의 경우에도 산삼배양근 추출물에서의 페놀 함량이 46.31%, 홍삼 추출물에서는 42.65%로 유의적이지는 않지만 산삼배양근 열수추출물에서 3.66% 정도 페놀함량이 높게 나타났다.

Table 7. Total phenol contents of Wild ginseng root extract and Red ginseng.

Total phenol contents(%) ^{2),3)}	
Samples ¹⁾	Concentration
WGE	44.09 ± 3.09 ^{b)}
RGE	32.86 ± 1.33 ^{a)}
WGW	46.31 ± 2.96 ^{b)}
RGW	42.65 ± 1.33 ^{b)}

¹⁾WGE: Wild ginseng ethanol extract; RGE: Red ginseng ethanol extract; WGW; Wild ginseng water extract; RGW: Red ginseng water extract.

²⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Significantly different from the control value(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

전체적으로 살펴보면 산삼배양근 추출물이 홍삼 추출물에 비해서 페놀 함량이 높은 것으로 나타났으며, 추출방법에 따른 차이로는 에탄올 추출물에 비해서 열수추출물의 경우가 페놀함량이 높은 것으로 나타났다.

앞서 설명한 바와 같이 산삼배양근에서 추출한 시료의 페놀함량이 홍삼추출물에 비해서 높게 나타나고 있으며, 에탄올 추출물에 비해 열수추출물에서 페놀함량이 높게 나타나는 경향을 보였다.

페놀 물질은 벤젠고리에 하이드록시기(-OH)기가 결합된 물질을 총칭하는 것으로, 항산화 활성을 나타내는 폴리페놀류는 기본 페놀 구조에 하이드록시기(-OH)기를 2개 이상 가지는 물질을 말한다.

이러한 페놀성 물질은 다른 탄소화합물에 비해 녹는점과 끓는점이 높으며 페놀 분자가 가지고 있는 하이드록시기(-OH)가 물과 결합하여 수소결합을 형성할 수 있기 때문에 다른 탄소 화합물에 비해 물에 대한 용해도가 높다고 알려져 있다. 이러한 이유로 인해 에탄올과 같은 유기 용매에 비해 열수 추출한 경우가 페놀 화합물의 용출량이 높게 나타나는 것으로 사료된다.

또한 페놀 화합물은 앞서 설명한 바와 같이 녹는점 및 끓는점이 높기 때문에 실온에서 70%에탄올에 의해서 용출 된 경우에 비해서 120℃에서 6시간 열수 추출한 경우의 페놀 함량이 높게 나타나는 것으로 사료된다.

4) 아질산염 소거작용

육제품이나 수산가공품 등에 발색제로 첨가되는 질산염이나 아질산염은 육제품의 발색 및 육색의 안정화에 기여할 뿐만 아니라 *Clostridium botulinum*에 대한 정균작용 및 육류의 보수성과 결착성을 개선하는 데에 중요한 역할을 한다 (Christiansen L. H., et al., 1974).

질산염은 소화기관내에서 또는 식품의 저장 중에 질산환원 효소나 질산염 환원세균에 의하여 아질산염으로 환원되며, 아질산염은 2급 및 3급 amine류와 반응하여 nitrosoamine을 생성한다(Macrae R. et al., 1993). 이 과정은 pH가 낮은 조건에서 쉽게 일어나는 것으로 알려져 있다.(gray, J.I., et al., 1975)

니트로화(nitration)에 영향을 주는 아질산염(nitrite)은 아질산(nitrous acid, HNO_2)을 형성하기 위해서 산성화되고, HNO_2 는 H_2NO_2^+ 으로 proton화 되어 선택적으로 amide와 반응하여 nitrosamide를 형성한다. 이러한 산성화(acidification)과정 때문에, 이러한 니트로화 반응은 앞서 기술한 대로 pH가 낮은 조건에서 쉽게 일어나므로 주로 생체 내 산성을 띄는 소화기관인 위(acidic stomach)에서 일어나게 된다(Leaf, C.D., et al., 1987).

Nitrosoamine은 체내에서 diazoalkane($\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{N}_2$)으로 변화하여 핵산이나 단백질 또는 세포내의 성분을 알칼리화 함으로써 암을 유발하며(Bartsh H., et al., 1988), 아질산염은 그 자신이 독성을 갖고 있기 때문에 일정 농도 이상 계속 섭취하면 혈중 헤모글로빈을 산화시켜 메트헤모글로빈증(methemoglobinemia)을 일으킨다(Kim. et al., 1987).

pH조건을 각각 1.2, 3.0, 6.0으로 달리하여 positive control 그룹으로 α -tocopherol, ascorbic acid와 BHA를 이용, 각각의 항산화제와 시료 추출물 간의 아질산염 소거능을 비교한 결과는 다음과 같다.

각각의 pH 조건에서 pH가 1.2로 낮을 때 아질산염 소거능이 가장 높게 나타났다. 추출 시료의 아질산염 소거능은 산삼배양근이 홍삼에 비해서 높은 소거능을 나타냈으며, 추출용매에 따른 차이에서는 열수 추출한 경우가 70% 에탄올로 추출한 경우에 비해서 아질산염 소거능이 높게 나타나는 경향을 보였다.

pH 1.2조건에서 대조군인 α -tocopherol, ascorbic acid에 비해 산삼배양근과 홍삼 추출물이 유의적($p < 0.05$)으로 높은 아질산염 소거활성을 나타내었으며, 대

조균에서 가장 높은 아질산염 소거능을 보이는 BHA의 경우 산삼배양근과 홍삼 70% 에탄올 추출물과 유사한 아질산염 소거활성을 나타내었다. 열수 추출한 경우 산삼배양근과 홍삼 추출물에서 대조군에 비해 각각 65.05%, 63.26%로 유의적으로 높은 아질산염 소거능을 나타내었다.

Table 8. Nitrate scavenging activity of extract of Wild ginseng root extract and Red ginseng.

Sample ¹⁾	pH ^{2),3)}		
	1.2	3.0	6.0
α-Tocopherol	37.43 ± 2.42 ^{a)}	24.22 ± 2.82 ^{a)}	3.46 ± 1.44
ascorbic acid	50.51 ± 1.43 ^{b)}	35.71 ± 2.30 ^{b)}	3.21 ± 0.06
BHA	59.15 ± 0.90 ^{ab)}	52.61 ± 1.32 ^{c)}	5.12 ± 0.75
WGE	59.25 ± 1.45 ^{ab)}	34.07 ± 1.79 ^{b)}	3.62 ± 3.13
RGE	56.05 ± 2.34 ^{ab)}	29.25 ± 2.79 ^{ab)}	1.25 ± 1.71
WGW	65.05 ± 1.34 ^{c)}	35.73 ± 2.31 ^{b)}	4.85 ± 10.04
RGW	63.26 ± 4.78 ^{c)}	29.95 ± 1.32 ^{ab)}	2.48 ± 4.23

¹⁾WGE: Wild ginseng ethanol extract; RGE: Red ginseng ethanol extract;

WGW: Wild ginseng water extract; RGW: Red ginseng water extract.

²⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Significantly different from the control value(p<0.05) by Duncan's multiple range test

추출 용매에 따른 아질산염 소거능의 차이를 살펴보면, 에탄올 추출물에 비해 열수 추출물에서 아질산염 소거능이 산삼의 경우 5.8%, 홍삼의 경우 7.21% 높게 나타나 열수 추출을 한 경우가 에탄올로 추출한 경우에 비해 아질산염 소거능이 유의적으로 높게 나타났다.

pH의 증가에 따라 각 분획의 소거능이 현저하게 감소하는 경향을 보였는데, 이는 nitrosamine의 생성은 pH 의존적이며 아질산염 소거능 역시 강산성에서 높으며, pH가 높아질수록 아질산염 소거능이 감소하는 경향을 보인다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 실험에 제시된 pH 범위는 인체 내에서의 pH 변화를 고려한 것으로 식품을 섭취한 후 소화되는 동안의 pH 변화 정도를 나타낸 것이다. 연구 결과에 의하면 아질산염 소거능은 인체의 위내 pH 조건과 비슷한 pH 1.2에서 가장 우수한 것으로 측정되며 산삼배양근과 홍삼의 추출물은 생체 내에서

도 효과적인 아질산염 소거작용을 통해 nitrosamine의 생성을 억제 할 것으로 생각되어지며 이상의 결과를 통해 지속적인 산삼배양근 및 홍삼 추출물의 섭취는 체내 nitrosamine의 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 생각되어진다.



5) 지질과산화 억제능

FTC 법은 유지의 산화 초기단계에서의 산화의 정도를 나타내는 항산화 지표 값이다.

체내는 정상적인 대사과정 중에서도 free radical이 생성되고 지질과산화가 일어나지만, 이러한 free radical을 제거하는 방어계가 있어 생체를 조직의 과산화로부터 보호한다.(Tappel 1965; Cao and Culter 1993)

과산화 지질은 free radical에 의해 유도된 지질과산화 반응에 의한 생성물질로 생체내 세포막 손상의 지표로 이용되고 있다. (Plaa and Witschin 1976)

세포막에 존재하는 지질은 라디칼에 의하여 지방산으로부터 수소 원자가 이탈함으로써 산화되기 시작하여 반응성이 높은 유리 라디칼이 형성된다. 지질의 산화에 의하여 생성된 hydroperoxide가 촉매력이 강한 전이금속들에 의하여 분해됨으로 인해서 생성되는 alkoxy radicals(RO), peroxy radicals(ROO), hydroxy radical(OH) 및 malondialdehyde 및 4-hydroxynonenal 등은 간접적으로 단백질과 DNA의 손상을 일으킬 뿐만 아니라 노화와 암 발생의 중요한 인자가 되기도 한다(Jeon., 2007). 지질과산화는 화학물질, 약물, Oxygen free radical등에 의한 세포손상의 기전에 의해 이루어진다고 보고되어 있는데, 생성된 과산화지질은 세포막 등에 과산화적 손상을 입혀 세포 기능의 저하, 세포의 괴사, 노화 및 성인병 등과 같은 여러 가지 질병을 발생시킨다.(Phylactos et al 1994; Francesco, Silvana and Anna 1985).

산삼배양근과 홍삼 추출물의 지질과산화와 관련한 항산화 효과를 검토하기 위하여, Linoleic acid에 추출물을 첨가하여 40°C에서 6일 동안 생성된 지질 과산화물의 흡광도(500nm)를 측정하였다.

positivecontrol 그룹으로 α -tocopherol, ascorbic acid와 BHA를 시료대신 첨가 하였으며, control로는 시료대신 증류수를 이용, 각각의 항산화제와 시료 추출물 간의 지질 과산화능을 비교한 결과는 다음과 같다.

Table 9. Lipid peroxidation in linoleic acid substrate containing extract of Wild ginseng roots and Red ginseng during storage at 40°C for 6 days.

Sample	Incubation time(day) ^{2),3)}					
	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	day 6
Control	0.058 ±0.09	0.85 ±0.30	1.25 ±0.56	1.49 ±0.42	2.23 ±0.63	2.98 ±0.03
α-tocopherol	0.046 ±0.03	0.68 ±0.13	0.71 ±0.14	0.71 ±0.01	0.74 ±0.14	0.86 ±0.15
ascorbic acid	0.045 ±0.12	1.18 ±0.22	1.12 ±0.30	1.57 ±0.34	2.24 ±0.10	2.29 ±0.01
BHA	0.036 ±0.06	0.49 ±0.14	0.53 ±0.03	0.45 ±0.04	0.51 ±0.09	0.63 ±0.05
WGW	0.045 ±0.10	0.50 ±0.15	0.71 ±0.06	0.75 ±0.06	1.05 ±0.15	2.21 ±0.09
WGE	0.041 ±0.08	0.52 ±0.06	0.68 ±0.07	0.79 ±0.05	0.79 ±0.08	1.12 ±0.08
RGW	0.039 ±0.05	0.33 ±0.05	0.40 ±0.03	0.37 ±0.07	0.37 ±0.18	0.61 ±0.06
RGE	0.040 ±0.08	0.38 ±0.04	0.44 ±0.03	0.52 ±0.02	0.42 ±0.05	0.57 ±0.06

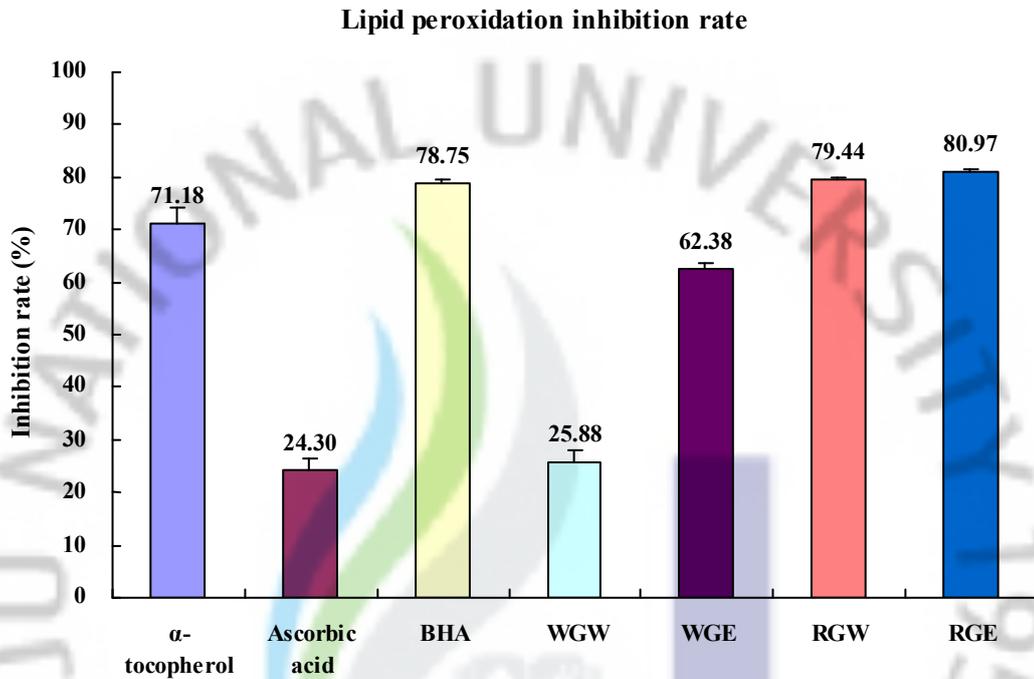
¹⁾WGE: Wild ginseng ethanol extract; RGE: Red ginseng ethanol extract; WGW; Wild ginseng water extract; RGW: Red ginseng water extract.

²⁾All values are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

Linoleic acid를 기질로 하여 6일간 지질 과산화를 유도하여 배양 시간에 따른 시료의 과산화물 생성 정도를 측정된 결과 아무것도 첨가하지 않은 control 군에서 가장 많은 과산화물이 생성되었고, 시료를 첨가한 그룹 중에서 ascorbic acid > WGW > WGE > α-tocopherol > BHA > RGW > RGE 의 순서로 과산화물이 많이 생성된 것을 알 수 있었다.

이를 바탕으로 하여 positive control group, 산삼배양근 추출물과 홍삼 추출물을 가한 시료의 과산화물 생성 억제정도를 control과 비교하여 백분율로 나타낸 결과는 다음과 같다(Fig 3).

Fig 3. Lipid peroxidation inhibition rate in linoleic acid substrate containing extract of Wild ginseng roots and Red ginseng during storage at 40°C for 6 days.



앞선 항산화 실험의 결과들과는 다르게 홍삼 에탄올 추출물에서 80.97%, 열수 추출물에서 79.44%로 산삼배양근 에탄올 추출물 62.38%, 열수 추출물 25.88%로 홍삼 추출물을 첨가한 경우가 지질 과산화 생성 억제능이 높게 나타났다.

이는 홍삼의 제조 과정 중 찌고 말리는 과정 중에서 생리활성 물질의 변화가 일어나 특이한 성분들이 생성되게 되는데 이때 생기는 갈색화 반응 생성물은 항산화 활성을 나타내며, 지방산의 산패를 억제한다는 연구 결과와 일치하였다.

이러한 연구 결과들을 바탕으로 하여 산삼배양근의 홍삼화 등과 같이 식품원료로서 산삼배양근을 활용할 수 있도록 하는 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

3. 산삼배양근의 유효성분 추출 및 정제

1) 유효성분의 추출

(1) 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 분획

분쇄한 산삼배양근을 PBS buffer로 추출한 추출액에 황산암모늄을 포화시켜 24 시간 정치한 후 원심분리(13,000rpm, 20min, 4°C)하여 침전물을 회수 하였다. 황산암모늄 분획은 단백질을 조분획 하기위한 염석 방법의 하나로, 시료에 염을 첨가하여 시료의 이온강도를 증가시켜 단백질을 침전시키는 방법으로, 황산암모늄 대신 산이나 유기용매를 이용, 단백질을 침전시켜 농축시키는 방법도 사용되나 산이나 유기용매를 이용할 경우에 단백질의 변성이 일어나기 때문에 단백질의 구조를 변성시키지 않고 시료중에 함유된 다량의 단백질 조분획을 위해 황산암모늄을 사용하였다.

(2) 투석 (Dialysis)

황산암모늄 분획에서 침전된 단백질을 수집, 원심분리(13000rpm, 20min, 4°C)를 통해 단백질과 상층액을 분리시킨 후, 침전된 단백질을 걸어내어 Dialysis tubing cellulose membrane (Ave. flat width 33mm, Sigma-Aldrich)을 이용하여 투석을 실시하였다.

염석을 통해 침전시켜 모은 단백질에는 불순물로서 단백질 이외에도 저분자물질이나 무기염을 함유하고 있기 때문에 염석된 단백질의 무기염이나, 저분자 불순물을 제거하는 수단으로 투석(dialysis)을 실시하였다.

무기염류와 저분자 물질은 투과하나 단백질이나 고분자 물질은 투과하지 않는 작은 구멍을 가진 막(셀로판 튜브 등)에 단백질 용액을 넣어 증류수나 완충액 속에 장시간 넣어 두면 저분자 물질은 막에서 투과하여 제거되는 원리를 이용하였다.

- dialysis의 주목적 → Ammonium-sulfate 제거
- dialysis의 원리 → 세포막의 확산, 삼투 작용

(3) Gel filtration coulumn chromatography

gel filtraton column 으로 Amesham Bioscience사의 Sephacryl S-300 High resolution을 사용하여 column에 충전시켜 10mM PBS buffer를 이용 overnight flow 시켜 gel을 평형화 시키고 gel이 안정화 되면 산삼배양근으로 부터 추출한 단백질 용액을 분주 한 후 PBS buffer를 전개용매로 사용, Filtration을 실시한다 산삼배양근 시료 용액당 50개씩의 분획을 얻어내었다.

2) 산삼배양근 추출분획의 항산화 활성 측정

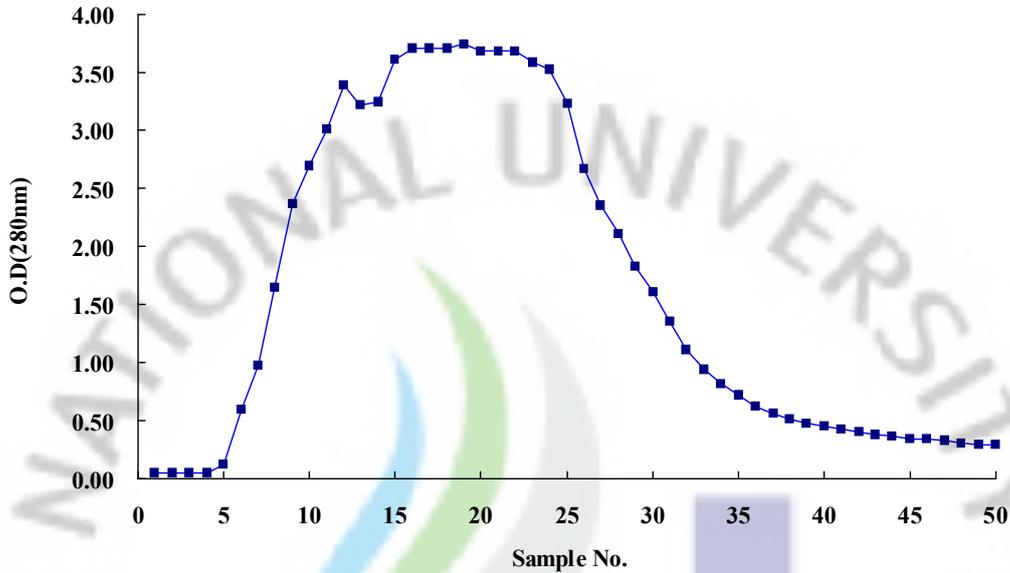
(1) 분획의 흡광도 측정

산삼배양근 유효성분 추출액을 3회에 걸쳐 분획을 수집, 각각의 분획의 흡광도를 측정한 결과는 다음과 같다.(Fig 4)

gel filtration column chromatography를 통해 시료 각각 50개의 분획을 수집한 후 280nm에서의 시료의 흡광도를 측정하였다.

분리한 분획의 흡광도는 10번과 25번 사이의 분획에서 최대 흡광도를 나타내었다.

Fig 4. Absorbance at 280nm of Wild ginseng crude protein extract fractionation by gel filtration



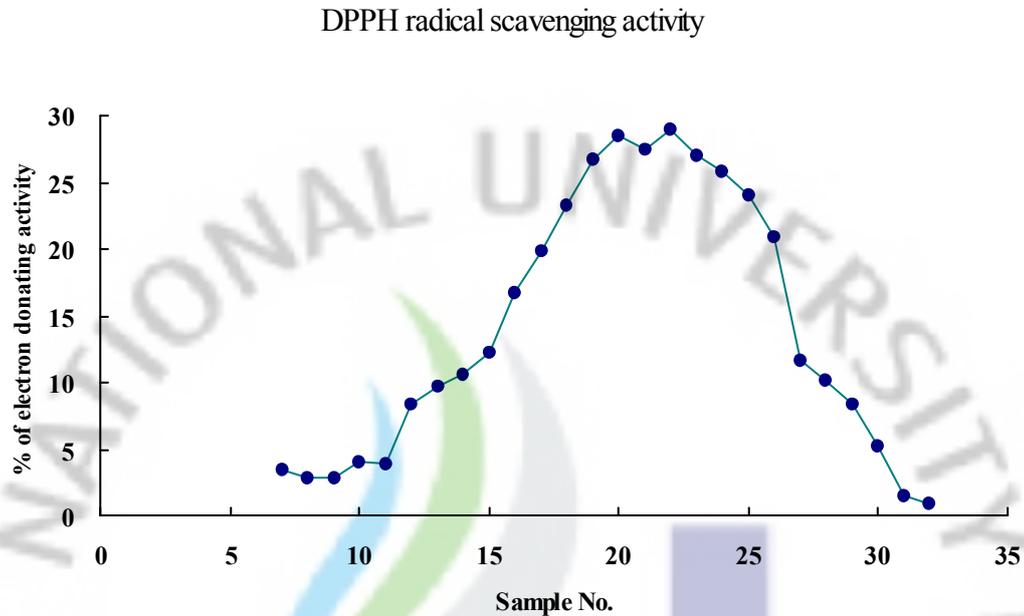
(2) 분획별 항산화 활성의 측정

각각의 분획의 항산화 활성 정도를 알아보기 위하여 각각의 분획을 앞선 항산화 실험방법에 준하여 DPPH radical scavenging activity 와 SOD 유사활성을 측정하였다.

① DPPH free radical scavenging activity

gel filtration column chromatography를 통해서 수집한 분획 중 높은 흡광도를 나타내는 영역 즉, 8번부터 32번까지의 분획을 DPPH radical scavenging activity를 통해 DPPH free radical 소거능을 측정한 결과는 다음과 같다(Fig 5).

Fig 5. DPPH radical scavenging activity of Wild ginseng crude protein extract fractionation by gel filtration



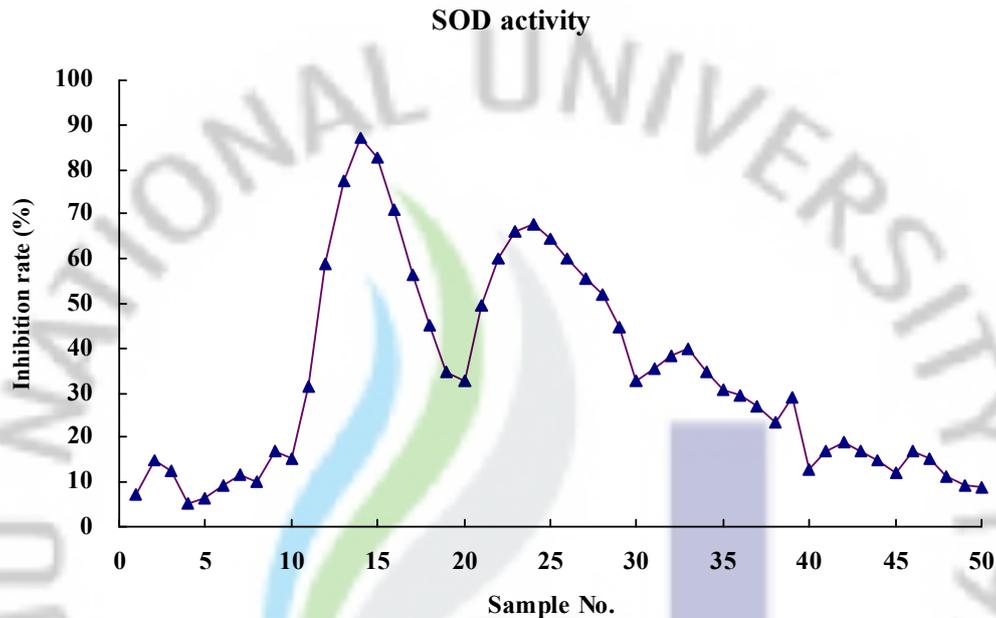
8번부터 32번까지의 분획에서 DPPH free radical 소거능을 측정한 결과 최대 라디칼 소거 활성이 나타나는 분획은 20-25번 사이의 분획으로 평균 26.99%의 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

앞서 실험한 산삼배양근 열수 추출물과, 에탄올 추출물에 비해서 DPPH free radical 소거활성이 실험결과에 미치지 못하는 값을 나타내었으나, 이는 시료의 추출방법과 gel filtration으로 분획 처리가 되었기 때문에 앞선 실험결과에 미치지 못하는 활성이 나타나는 것으로 생각된다.

분획별 DPPH free radical 소거능을 살펴 본 결과, 큰 하나의 분획으로 분리되어지는 것을 알 수 있다.

② SOD 유사활성 측정

Fig 6. SOD activity(Inhibition rate%) of Wild ginseng crude protein extract fractionation by gel filtration



앞선 실험방법에 준하여 각각 분획의 SOD 유사활성을 측정한 결과는 위의 그래프(Fig. 6)와 같다. 각 분획별 SOD 유사활성을 측정한 결과는 10번부터 32번까지 높은 흡광도를 나타내는 영역에서 크게 두 개의 peak로 SOD 유사활성이 높게 나타나, 분획별 DPPH free radical 소거능과는 다른 양상을 보였는데, 이는 분획별로 다른 종류의 항산화 활성을 나타내는 것을 의미한다.

산삼배양근 추출액의 DPPH free radical 소거능과, SOD 유사활성을 측정한 결과 DPPH free radical 소거능의 경우 높은 수준은 아니지만, 18-25번 사이의 분획에서 수집한 분획중 최대 DPPH radical 소거능을 나타내었으나 SOD 유사활성의 경우는 두 개의 피크가 나타난 것을 볼 수 있다. 10-20번사이의 분획에서 평균 48.85%의 SOD 유사활성을 나타내었으며 21-31번 사이에서는 53.25%의 SOD 유사활성을 나타내어 DPPH free radical 소거능의 그래프와는 달리 두 개의 항산화 활성 분획을 가지는 것을 확인하였다.

이렇게 높은 흡광도와 항산화 활성을 가지는 분획 중 10-20까지의 분획을 모아 ㉠ 영역, 21-31까지의 분획을 모아 ㉡ 영역으로 pool 한 후 농축, prep-HPLC를 통해 각각의 활성을 나타내는 단백질을 분리, 분석 하였다.

4) 산삼배양근 생리활성 물질의 분리 및 정제

산삼배양근 추출 생리활성 물질의 분리, 정제를 위해 Gel filtration column에서 얻어진 활성 분획을 Recycling preparative HPLC(prepare-HPLC; JAI Korea Co., Ltd. LC-9104)를 이용하여 분리 정제하였다.

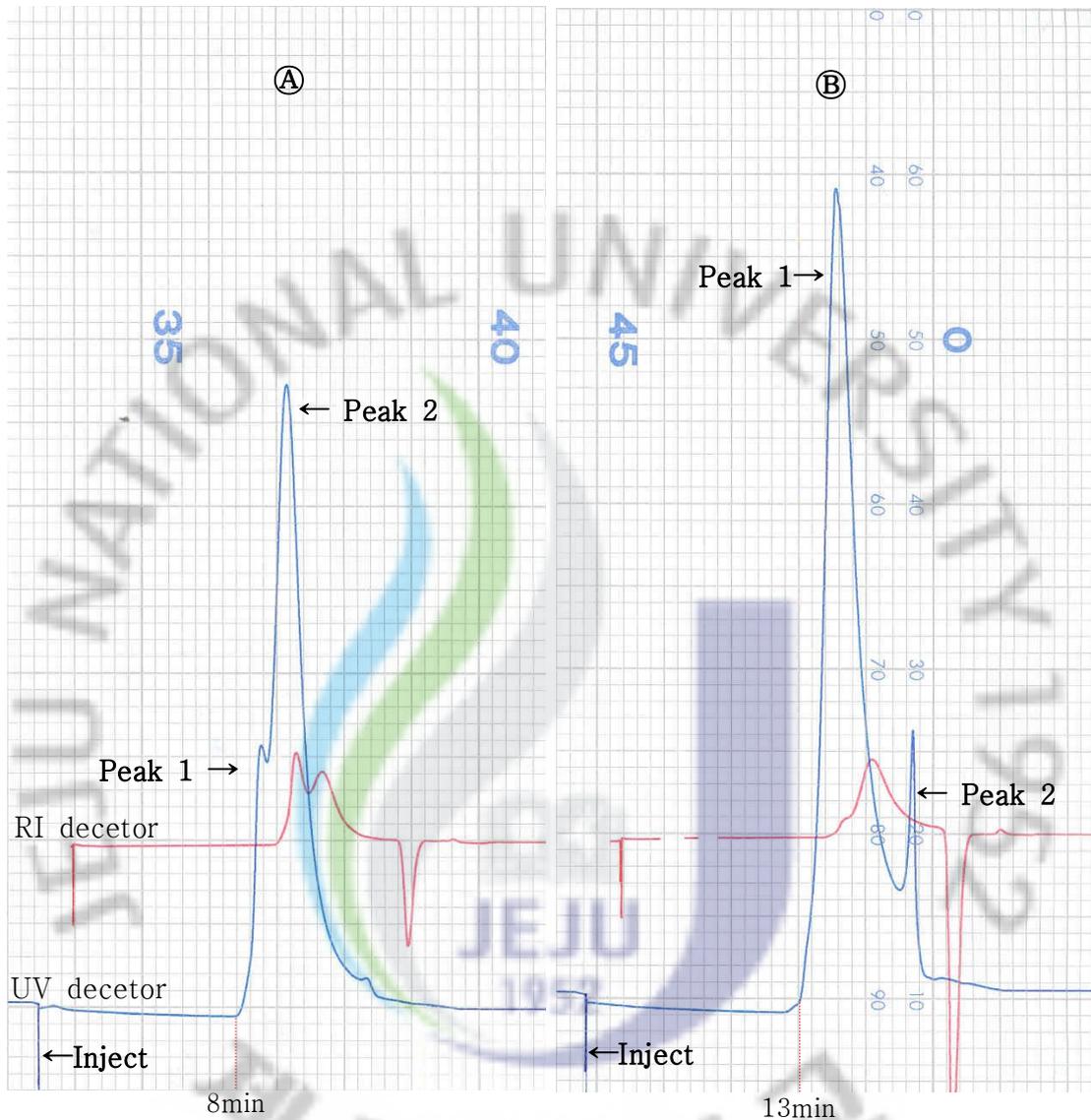
이때 분석조건은 다음과 같다(Table 10).

Column으로 GS-310(20 \times 500mm)을 이용하였으며, 용매로 Phosphate buffer를 이용하여 각각의 peak를 수집하였다.

Table 10. Conditions of prep-HPLC for the purification of antioxidative Wild ginseng root extract.

Instrument	Recycling preparative HPLC(prepare-HPLC; JAI Korea Co., Ltd. LC-9104)
Detector	JAI UV Detector 3702, JAI RI Detector RI-7
Column	GS-310 multicolumn
Column size	20 \times 500mm
Eluent	Phosphate buffer(pH 7.4, 10mM)
Injection volume	1ml, 5ml
Flow rate	5ml/min
Wavelength	280nm

Fig 7. prep-HPLC chromatogram of 10-20 fraction and 21-31fraction.



Ⓐ : fraction 10-20, Ⓑ : fraction 31-31

Sephacryl S-300 High resolution을 충전시킨 gel filtration을 통해 얻어진 분획 분인 10-20, 21-31의 분획을 모아 농축한 후 prep-HPLC를 통해서 유효성분을 확인하였다. HPLC prefilter로 syringe filtration하여 불순물을 제거 하고 GS-310 multicoulmn을 이용하여 280nm에서 prep-HPLC를 행하였다. (Fig. 7) 에서와 같이 10-20분획, 21-31분획에서 각각 활성을 나타내는 두개의 peak를 얻었다.

10-20번의 분획에서 시료를 주입한 시점에서부터 8분경과 후 첫 번째 활성 물질이 검출되었고, 12분후 두 번째 peak가 나타났으며, 21-31번 분획에서는 10-20번 분획보다 약간 늦은 13분에서 첫 번째 peak가 나타났으며 18분경 두 번째 peak가 나타났다.

이는 10-20번의 분획과, 21-31번 분획에서 항산화 활성을 나타내는 두 가지의 물질이 존재한다는 것을 의미한다.

얻어진 두개의 분획을 recycling을 통해서 분리시킨 후 각각의 peak를 수집하였다.



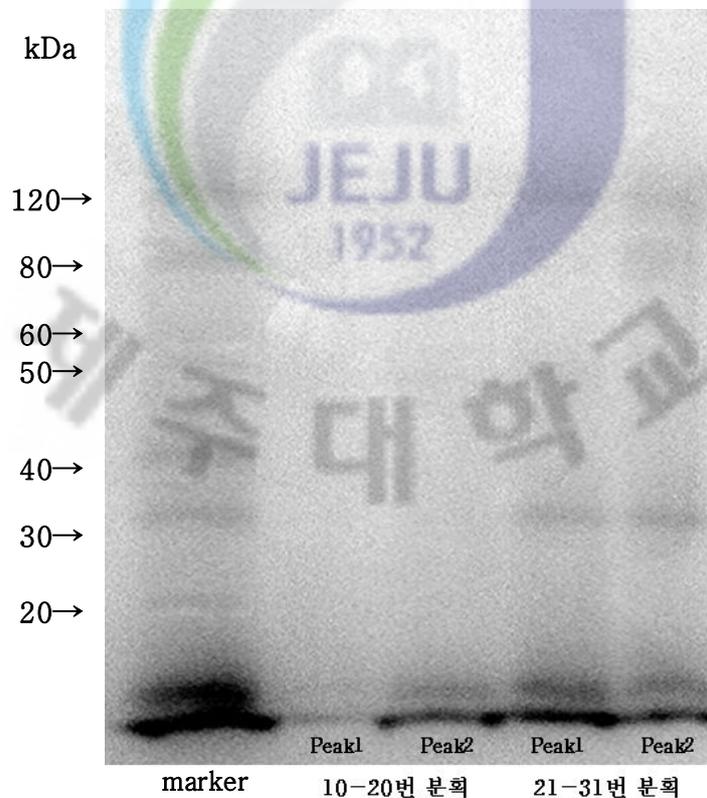
(3) Polyacrylamide gel electrophoresis

prep-HPLC를 통해 확인된 유효 성분의 분자량을 측정 하기위해 수집한 peak를 농축하여 단백질 전기영동을 실시하였다.

단백질의 전기영동은 Laemmli의 방법에 따라 15% 농도의 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 사용하였고, 전기영동 용매는 SDS-Tris-glycine 완충액(0.025M Tris, 0.195M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)을 사용하여 10mA로 2시간동안 전기영동을 실시하여 유효 성분의 분자량을 측정하였다.

전기영동 후 염색(Coomassie brilliant blue R-250)용액으로 2시간이상 침지하여 염색, 7% acetic acid와 10%methanol 혼합액으로 탈색한 결과는 다음과 같다.

Fig 8. Polyacrylamide gel electrophoresis results



수집한 각각의 peak 1ml를 취하여 농축한 후 20 μ l씩 well에 분주하여 loading 한 결과 21-30번 분획에서 120kDa, 30kDa의 유효 단백질이 검출 되었으며, 10-20번 분획에서는 peak 2에서 희미하게나마 50kDa에서 단백질이 검출 된 것을 볼 수 있었다.



V. 요약 및 결론

본 연구는 산삼배양근이 혈전용해효과와 항산화 활성에 미치는 영향에 대해 알아보고, 항산화 활성을 나타내는 단백질의 분리 정제를 과정을 통해 건강 기능성 식품으로서의 산삼배양근의 개발 가능성 모색을 위해 수행되었다. 산삼배양근을 에탄올 추출 및 열수 추출을 하여 fibrin plate법에 의해 혈전용해 활성을 측정하였으며, 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH radical 소거능, SOD 유사활성 측정, 시료중의 총 페놀 함량 측정, 아질산염 소거능과 지질 과산화 억제능을 측정하였다.

항산화 활성을 나타내는 단백질을 추출 정제하기 위해 Gel filtration을 통해 분획을 수집 하였고 각각의 분획의 흡광도, 항산화 활성 등을 측정하여 최대 활성을 나타내는 분획을 모아 prep-HPLC를 통해 유효성분을 분석한 결과를 요약 하면 다음과 같다.

1. 산삼배양근을 에탄올과 물을 이용하여 추출한 것을 시료로 하여 혈전용해 효과를 측정한 결과, 산삼배양근 열수추출물에서 41.8%로 가장 높은 혈전용해 효과를 나타냈고, 산삼배양근 에탄올 추출물과 비교 대상으로 사용한 홍삼 열수추출물에서 각각 28.1%, 홍삼 에탄올 추출물에서 18.3%의 혈전용해 활성을 나타내었다.

2. 산삼배양근 추출물, 홍삼추출물의 DPPH radical 소거능을 비교, 측정한 결과 산삼배양근과 홍삼 추출물을 비교한 경우 산삼배양근 에탄올 추출물에서 74.37%로 DPPH radical 소거능이 유의적($p < 0.05$)으로 가장 높게 나타났으며, 열수 추출의 경우에도 60.96%로 홍삼 추출물에 비해 약 두배 가량 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었다.

3. 산삼배양근 추출물, 홍삼추출물의 SOD 유사활성을 측정한 결과 산삼배양근 에탄올 추출물 94.67%, 열수 추출물 96.68%로 홍삼 에탄올 추출물 87.91%, 홍삼 열수 추출물 82.79%비해 SOD 유사활성이 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타났 다.

4. 산삼배양근 추출물과 홍삼 추출물 중의 총 페놀 함량을 측정한 결과, 산삼배양근 에탄올 추출물 44.09%, 열수 추출물 46.31%로 홍삼추출물 32.86%와 42.65%에 비해 산삼배양근 추출물에서 페놀 함량이 높게 나타났다. 총 페놀 함량의 경우 에탄올 추출물에 비해 열수 추출물에서 페놀 함량이 높게 나타났는데, 이는 페놀류가 가지는 하이드록시기가 물과 결합하여 수소결합을 형성하므로 다른 탄소 분자에 비해 물에 대한 용해도가 높게 나타나는 것으로 사료된다.

5. Linoleic acid를 기질로 하여 산삼배양근 추출물과 홍삼 추출물을 가하여 6일간 지질 과산화를 유도한 후 생성된 과산화물을 FTC법에 의해 측정한 결과 앞서 실험한 결과들과는 다르게 홍삼 에탄올 추출물에서 80.97%, 열수 추출물에서 79.44%로 산삼배양근 에탄올 추출물 62.38%, 열수 추출물 25.88%로 홍삼 추출물을 첨가한 경우가 지질 과산화 생성 억제능이 높게 나타났다.

이는 홍삼 제조 중 인삼을 찌고 말리는 과정에서 생성되는 홍삼의 특유한 성분이 지질의 과산화를 억제하는 것으로 사료된다.

6. 산삼배양근 중 항산화 활성을 나타내는 단백질의 분리, 정제를 위해 산삼배양근 중의 단백질을 추출, gel filtration을 통한 분획 수집, 분획의 흡광도 및 항산화 활성 측정을 통해 높은 항산화 활성을 나타내는 10-20번사이의 분획과 21-31번까지의 분획을 모아 pool 한 후, 280nm에서 prep-HPLC를 통해 유효 성분을 측정한 결과 10-20번, 21-31번에서 각각 두 가지 peak가 나타났으며, 항산화 활성을 나타내는 물질 두 가지가 존재한다는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 산삼배양근은 혈전용해 활성, 항산화 활성 등 다양한 생리활성을 가지는 물질을 함유한다는 것을 알 수 있었고, 산삼배양근의 단백질 추출 결과 항산화 활성을 보이는 단백질을 함유하고 있어 식품으로서의 다양한 활용과 함께 항산화 관련 건강 기능성 식품, 혈전용해 활성을 가지는 고혈압 예방 건강기능성 식품으로서의 개발 및 활용 가능성이 높을 것이라 생각된다.

V. 참고문헌

- 1) Ahn DC, Choi YS, Park DH, Park SY, Han ZZ, Song IS, Kim EJ, Lee MS, Kwon MS (2001) Chronic toxicity of dry yeast-G (biogermanium) orally administered to beagle dogs for 10 consecutive months. Korean J. Lab. Anim. Sci. 17:99-108.
- 2) Block F, Schwarz M (1998) Global ischemic neuronal damage relates to behavioural deficit : A pharmacological approach. Neuroscience. 82: 791-803
- 3) Curtin ME (1983) Harvesting profitable products from plant tissue culture. Bio/Technology 1:649-657.
- 4) Han EJ, Kim YS, Yu KW, Jeong CS, Paek KY (2003) Adventitious root cultures of Panax ginseng C. V. Meyer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system. J. Plant Biotechnology 5:1-6.
- 5) Henrik A, Wolfgang K, Magnus K, Rolf H, Mats OK (2003) The dosing solution influence on the pharmacokinetics of degarelix, a new GnRH antagonist, after s.c. administration to beagle dogs. Eur. J. Pharm. Sci. 20:335-340.
- 6) Kwon IC, Yoo YJ, Lee JH, Hyun JO (1998) Enhancement of taxol production by in situ recovery of product. Process Biochem. 33:701-708.
- 7) Lee EJ, Zhao HL, Li DW, Jeong CS, Kim JH, Kim YS (2003) Effect of the MeOH extract of adventitious root culture of Panax ginseng on hyperlipidemic rat induced by high fat-rich diet. Kor. J. Pharmacogn. 34:179-184.

- 8) Nakamura T, Miyamoto O, Yamagami S, Toyoshima T, Negi T, Itano T, Nagao S (1999) The Chronic Cell Death with DNA Fragmentation After Post-Ischaemic Hypothermia in the Gerbil Hippocampus. *Acta Neurochir (Wien)* 141: 407-413.
- 9) Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat, Res.* 113:173-215.
- 10) Mizuno M, Yamada J, Terai H, Kozukue N, Lee YS, Tsuchida H (1994) Differences in immunomodulating effects between wild and cultured Panax ginseng. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* 200:1672-1678.
- 11) Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- 12) JEMS-MMS (1998) Atlas of chromosome aberration by chemicals, Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group, Tokyo, Japan.
- 13) Oh SJ, Kim DJ, Shim I, Choi SH, Chun SH, Chun YS, Chun BG (1999) Effects of imidazole - receptor ligands on ischemia-induced changes of evoked population spikes in the hippocampal CA1 of gerbils.
한국 뇌신경 과학회 학술대회, 가톨릭의과대학 의과학연구원.
- 14) SAS Institute (1989a) SAS/STAT User's guide. Version 6, 4th Vol.1
Cary, NC., USA.
- 15) SAS Institute (1989b) SAS/STAT User's guide. Version 6, 4th Vol.1,
Cary, NC., USA.

- 16) Shin SW, Kim YS (1996) Production of Taxane Derivatives by Cell Culture of Korean Taxus Species (I). Korean J. Pharmacogn. 27:262-266.
- 17) Yamaguchi, H, Matsuura, H Kasai, R, Tanaka, O, Satake, M, Kodh a, H, Izumi, H, Nuno M, Katsuki, S and Isoda, S (1998) Analysis of saponins of wild ginseng, Chem Pharm Bull(Tokyo). 36(10) : 4177-4181.
- 18) Yoo BS, Chang MS, Byun SY (2003) Characterization of cell cultures and ginsenoside production by culutured ginseng and wild mountain ginseng. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 18:133-139.
- 19) 남기열 (1196) 최신고려인삼 (성분 및 효능편). 천일인쇄사. 서울 p. 1-3.
- 20) 식품의약품안전청 : 고시 제1999-61호(1999년 12월 22일 제정) 의약품등의 독성시험기준.
- 21) 식품의약품안전청 : 고시 제2000-63호(2000년 12월 11일 제정) 임상시험관리기준.
- 22) 식품신문 : 인공배양삼 원료 산업화 태동. 2003년 2월 10일
- 23) 신미희 (2001) 산삼의 배양 및 그 응용에 관한 연구. 대한 화장품 학회지, 27(2) : 45-56.
- 24) 양덕춘 (2003) 안전성 검사를 통한 산삼배양근의 실용화. 한국자원식물학회 2003년도 춘계학술발표대회. p. 1-32.
- 25) Nelson, D.L., M.M. Cox : Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed., Worth Publishers, New Yo가, p. 877-878, 2000.

- 26) Campbell, N.A., J.B. Reece : Biology. 7th ed., Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 1301 Sansome St., San Francisco, CA, p. 879–883, 2005.
- 27) Ruggeri, Z.M., T.S. Zimmerman : von Willebrand Factor and von Willebrand Disease. *Blood*. 70(4) : 895–904, 1987.
- 28) Arbige, M., W.H. Pitcher : Industrial enzymology : a look towards the future. *Trends Biotechnol.* 7 : 330–335, 1989.
- 29) World Health Organization. The World Health Report 2001, 2001.
- 30) Voet, D., J.G. Voet : Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, p.1087, 2004.
- 31) Eye of Science : Encyclopaedia Britannica. Reissue ed., Photo Researchers, Inc., NY, p. 1659, 2004.
- 32) Silverthorn, D.U., W.C. Ober, C.W. Garrison, and A.C. Silverthorn : Human physiology : an integrated approach. USA, Prentice–Hall Inc., p. 465–471, 1998.
- 33) Mine, Y., A.H.K. Wong, B. Jiang : Fibrinolytic enzyme in Asian traditional fermented foods. *Food Research International*, 38 : 243–250, 2005
- 34) Fenton, J.W., F.A. Oforu, D.G. Moon, and J.M. Maraganore : Thrombin structure and function: why thrombin is the primary target for antithrombotics. *Blood Coagul. Fibrin.* 2 : 69–75, 1991.
- 35) Binnine, C.G., B.W. Erickson, J. Hermans : Inhibition of thrombin by

- synthetic hirudin peptides. *FEBS Lett.* 270 : 85–89, 1990.
- 36) Carpiello, M., P.G. Vilado, A. Lippi, M.A. Criscuoli, and U. Mura : Kinetics of human thrombin inhibition by two novel peptide inhibitors (Hirunorm IV and Hirunorm V). *Biochem. Pharmacol.* 52 : 1141–1146, 1996
- 37) Biological Research Information Center (BRIC) : 항 혈전제의 세계시장 및 전망, p. 5–6, 2002.
- 38) Bode, C., M. Runge, and R.W. Smalling : The future of thrombolysis in the treatment of acute myocardial infarction. *European Heart Journal*, 17 : 55–60, 1996
- 39) Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi, H. Hiratani : Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase, *Acta Haematologica*, 84 : 139–143, 1990.
- 40) Fujita, M., K. Hong, Y. Ito, R. Fujii, K. Kariya, and S. Nishimuro : Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biological & pharmaceutical bulletin.* 18 : 1387–1391, 1995.
- 41) Jeong, Y.K., W.S. Yang, J.O. Kang, I.S. Kong and J.O. Kim : Fibrinolysis of fermented Kimchi. *J. Life Sci.* 5 : 203–207, 1995.
- 42) Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara and H. Muraki : A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a typical and popular soybean food of the Japanese diet. *Experientia.* 43 : 1110–1111, 1987.

- 43) Sumi, H., N. Nakajima and C. Yatagai : A unique string fibrinolytic enzyme(katsuwokinase) in skipjack shiokara, a Japanese traditional fermented food. *Comp. Thromb. Haemost.* 112(3) : 543–547, 1995.
- 44) Blois, M.S. Antioxidant determination by the use a stable free radical. *Nature* 26: 1199–1200, 1958
- 45) Krastanov et al. 2007. Antioxidant activity of a ginger extract(*Zingiber officinale*). *Food chemistry* 102: 764–770
- 46) Slinkard, K., Singleton, V.L. Total phenol Analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enology and Viticulture* 28: 49–55, 1977.
- 47) Kato, H., Lee, I.E., Chyuen, N.V., Kim, S.B., Hayase, F. Inhibitory of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* 51(1): 1333–1338, 1987.
- 48) Kikuzaki, H., Nakatani, N. Antioxidant effect of some ginger constituents. *J. Food. Sci.* 58: 1407–1410
- 49) Ismail, M., Manickam, E., Danial, A.M., Rahmat, A., Yahaya, A. Chemical composition and antioxidant activity of *strobilanthes crispus* leaf extract. *J. Nutr. Biochem.* 11(11–12): 536–542, 2000
- 50) Kang, M. J., Shin, S. R. and Kim, K. S.: Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from Dandelion(*Taraxacum officinale*), *Kor. J. of Food Preservation*, 9, 253–259(2002)
- 51) Pryor, W. A., Oxy-radicals and related species—their formation lifetime

- and reactions, *Ann. Rev. Physiol.*, 48,657–667(1986)
- 52) Jeon, S. W., Study on the Biological Activity of Extracts of *Nelumbo nucifera Stamens* and *Kaempferol.*, Wonkwang University. 2007
- 53) Cho, H. S., Effect of *Orostachys japonicus* water extracts on antioxidant activity and endogenous formation of N-nitrosodimethylamine in human. Gyeongsang National University. 2008.02
- 54) Laughton, M. J., Evans, P. J., Moroney, M. A., Houlst, J. R. S. and Halliwell, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion reducing ability. *Biochem, Pharm.*, 42, 1673–1681(1981)
- 55) Friend and Smith, 1977; Friend, W. G. and Smith, J. J. B. 1977. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Annual review of entomology*. 22. 309–331
- 56) Matsumoto, N., Okushio, K. and Hara, Y. Effect of black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 44(2). 337–342 (1998)
- 57) Cho, S. H., antioxidant Profiles of Extracts from *Sargssum sagamianum*, Pukyong National University. 2006.02
- 58) Yoo, J. S., Effects of *Catthami Flos* on the activity of antioxidant. *Kyungwon University*. 2007.02
- 59) Christiansen L. H., Tompkin R. B., Shaparis A. B., Kueper T. V.,

- Johnston R. W., Kautter D. A. and Kolari O. J : Effect of sodium nitrate on toxin production by *Chlostridium botulinum* in bacon. *Appl. Microiol.* 27, 733–737(1974)
- 60) Macrae R., Robinson R. K and Sadler M. J. : Encyclopedia of food science food technology and nutrition. academic press, *New York, NY, USA*, 3240–3249(1993)
- 61) gray, J.I., Dugan, jr L.R. Inhibition of N–nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40: 981–984, 1975.
- 62) Leaf, C.D., Vecchio, A.L., Roe, D.A., Hotchkiss, J.H. Influence of ascorbic acid does on N–nitrosoproline formation in humans. *Carcinogenesis.* p 791–795, 1987.
- 63) Mirvish, S.S. Formation of N–nitro compounds: Chemistry, kinetics and in vivo occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 325–351, 1975.
- 64) Bartsh H., Ohshima H. and Pignatell B : Inhibition of endogenous nitrosation: Mechanism and implications in human cancer preservation, *Mut. Res*, 202,307–324(1988)
- 65) Kim DS, Ahn BW, Yeum DM, Lee DH, Kim SB, Park YH: Degradation of carcinogenic nitrosamin formation factor by natural food components. 1. Nitrate–scavenging effects of vegetable extracts, *Bull. Korean Fish, Soc.*, 20, 463–468(1987)
- 66) Park, y. j., Optimization of Extraction and Kinetics of Antioxidative Activity for Polyphenols from Cacao(*Theobroma cacao* L.)Department of Biological Engineering Graduate School, Kangwon National University

- 67) Jeon, S. W., Study on the Biological Activity of Extracts of Nelumbo nucifera Stamens and Kaempferol., Wonkwang University. (2007)
- 68) Jang. H, D., Effect of Fermented Wild ginseng culture by – products on performance in Pig and Laying Hens., Dankook University., 2008.
- 69) Sohn. B, H., Purification and Proteomic Analysis of Fibrinolytic Enzyme Isolated from a Soybean–fermenting Bacterium., Soonchunhyang University., 2008.



VII. 초 록

본 연구는 산삼배양근이 혈전용해효과와 항산화 활성에 미치는 영향에 대해 알아보고, 항산화 활성을 나타내는 단백질의 분리 정제를 과정을 통해 건강 기능성 식품으로서의 산삼배양근의 개발 가능성 모색을 위해 수행되었다. 산삼배양근을 에탄올 추출 및 열수 추출하여 fibrin plate법에 의해 혈전용해 활성을 측정하였으며, 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH radical 소거능, SOD 유사 활성 측정, 시료중의 총 페놀 함량 측정, 아질산염 소거능과 지질 과산화 억제능을 측정하였다.

항산화 활성을 나타내는 단백질을 추출 정제하기 위해 Gel filtration을 통해 분획을 수집 하였고 각각의 분획의 흡광도, 항산화 활성 등을 측정하여 최대 활성을 나타내는 분획을 모아 prep-HPLC를 통해 유효성분을 분석하였다.

산삼배양근을 에탄올과 물을 이용하여 추출한 것을 시료로 하여 혈전용해 효과를 측정한 결과, 산삼배양근 열수추출물에서 41.8%로 가장 높은 혈전용해 효과를 나타냈고, 산삼배양근 에탄올 추출물과 비교 대상으로 사용한 홍삼 열수추출물에서 각각 28.1%, 홍삼 에탄올 추출물에서 18.3%의 혈전용해 활성을 나타내었다.

산삼배양근 추출물, 홍삼추출물의 DPPH radical 소거능을 비교, 측정한 결과 산삼배양근과 홍삼 추출물을 비교한 경우 산삼배양근 에탄올 추출물에서 74.37%로 DPPH radical 소거능이 유의적($p < 0.05$)으로 가장 높게 나타났으며, 열수 추출의 경우에도 60.96%로 홍삼 추출물에 비해 약 두배 가량 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었다. SOD 유사활성을 측정한 결과 산삼배양근 에탄올 추출물 94.67%, 열수 추출물 96.68%로 홍삼 에탄올 추출물 87.91%, 홍삼 열수 추출물 82.79%비해 SOD 유사활성이 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타났으며, 시료중의 총 페놀 함량을 측정한 결과, 산삼배양근 에탄올 추출물 44.09%, 열수 추출물 46.31%로 홍삼추출물 32.86%와 42.65%에 비해 산삼배양근 추출물에서 페놀 함량이 높게 나타났다.

Linoleic acid를 기질로 하여 6일간 지질 과산화를 유도, 산삼배양근 추출물과 홍삼 추출물을 가한 시료의 과산화물 억제능을 측정한 결과 앞서 실험한 결과들

과는 다르게 홍삼 에탄올 추출물에서 80.97%, 열수 추출물에서 79.44%로 산삼 배양근 에탄올 추출물 62.38%, 열수 추출물 25.88%로 홍삼 추출물을 첨가한 경우가 지질 과산화 생성 억제능이 높게 나타났다.

산삼배양근 중 항산화 활성을 나타내는 단백질의 분리, 정제를 위해 산삼배양근 중의 단백질을 추출, gel filtration을 통한 분획 수집, 분획의 흡광도 및 항산화 활성 측정을 통해 높은 항산화 활성을 나타내는 10-20번사이의 분획과 21-31번까지의 분획을 모아 pool 한 후, 280nm에서 prep-HPLC를 통해 유효성분을 측정한 결과 10-20번, 21-31번에서 각각 두 가지 peak가 나타났으며, 항산화 활성을 나타내는 물질 두 가지가 존재한다는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 산삼배양근은 혈전용해 활성, 항산화 활성 등 다양한 생리활성을 가지는 물질을 함유한다는 것을 알 수 있었고, 산삼배양근의 단백질 추출 결과 항산화 활성을 보이는 단백질을 함유하고 있어 식품으로서의 다양한 활용과 함께 항산화 관련 건강 기능성 식품, 혈전용해 활성을 가지는 건강기능성 식품으로서의 개발 및 활용 가능성이 높을 것이라 생각된다. 앞으로 산삼배양근을 이용한 혈전 치료제, 항산화제 등의 개발을 위해 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.