

# 전통장류 유래 GB-07균주에 의해 생산된 Compound K 함유 발효인삼의 항산화 및 항염증 활성 연구

신동규<sup>1</sup>, 서정훈<sup>1</sup>, 조상민<sup>1</sup>, 최학주<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>제너럴바이오(주), <sup>2</sup>대전대학교 난치성면역질환의동서생명의학연구소

## Study on antioxidant and anti-inflammatory activity of compound K extract produced by *Saccharomyces servazzii*(GB-07) strain derived from traditional soy

Dong-Gue Shin<sup>1</sup>, Jeong-Hun Seo<sup>1</sup>, Shang-Min Cho<sup>1</sup>, Hak-Joo Choi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>General Bio Co., Ltd, <sup>2</sup>Traditional and Biomedical Research Center (TBRC), Daejeon University

**요약** 인삼은 약용으로 수 천년 동안 소중하게 사용되어 왔으며 근대에 들어와 단일 성분의 분리와 각 성분별에 대한 효능의 과학적인 연구가 활발히 이어져 오고 있다. 최근에는 인삼 성분 중에 Rg3, compound K 등이 주목 받고 있으며 기능성을 갖는 다양한 소재들이 연구 개발되어 제품화 되고 있다. 본 연구에서는 전통 장류에서 유래한 효모균 (*Saccharomyces servazzii*, GB-07)을 이용하여 인삼 추출물을 발효하여 compound K를 생산하고 기능성을 확인하여 상업적 이용 가능성을 확인하였다. Compound K 함유 (20 µg/g 함유) 인삼 발효 추출물을 이용하여 항산화 및 항염증 활성을 측정하였다. 발효 인삼 추출물은 자유 라디칼 DPPH (di(phenyl) -(2,4,6-trinitrophenyl)를 농도 의존적으로 소거하였으며, macrophage(RAW 264.7 cell)에서 ROS의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 LPS에 의해 유도된 염증 사이토카인 IL-1β와 IL-6 그리고 TNF-α의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 본 연구 결과는 향후 공정개발과 다양한 효능 시험을 통해 compound K를 함유한 제품의 개발을 통한 산업화의 가능성 시사하고 있다.

**Abstract** Ginseng, which has long been used for its medicinal properties, has recently been investigated by scientific research to identify its components and evaluate its efficacy. Recently, two components of ginseng, Rg3 and compound K, have been attracting attention and various functional materials containing these materials have been developed and investigated. In this study, compound K was produced using yeast (*Saccharomyces servazzii*, GB-07) and To be used for industrialization. The antioxidant and anti-inflammatory activity of compound K (containing 20 g/g) ginseng fermented extract was investigated. In the fermented ginseng extract, the free radical DPPH was scavenged in a concentration-dependent manner and the production of ROS was inhibited in macrophages(RAW 264.7 cell). Moreover, the LPS-induced inflammatory cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α were suppressed. These results suggest the possibility of industrialization via the development of products containing compound K through future process development and various efficacy tests.

**Keywords** : Antioxidant, Compound K, GB-07, *Saccharomyces servazzii*, Traditional soy

### 1. 서론

인삼은 두릅나무과 다년초 식물로 중국의 동북지방에

본 논문은 산업통상자원부와 한국산업기술진흥재단이 지원하는 경제협력권산업 육성사업으로 수행되었음.

\*Corresponding Author : Hak-Joo Choi (Daejeon Univ. TBRC)

Tel: +82-42-280-2830 email: hjchoi@dju.kr

Received May 11, 2017

Accepted September 15, 2017

서 한반도에 걸쳐 자생하고 있다. 인삼은 뿌리를 약용으로 사용하여 고대로부터 불로장생의 명약으로 매우 소중하게 여겨져 왔다. 뿌리가 사람의 모습을 닮았다고 하여

Revised (1st August 14, 2017, 2nd August 24, 2017, 3rd September 5, 2017)

Published September 30, 2017

인삼(人蔘) 이라고 이름이 붙여졌으며 중국고대 의서인 「신농본초경」에 상품은 오장을 튼튼하게 하고, 마음과 정신을 안정시키며, 눈을 밝게 해주고, 장기복용하면 장수한다고 기록하고 있다.

동양의학에 있어 수천 년의 역사를 갖고 있는 인삼은 25종 이상의 사포닌, 다당류, 펩타이드, 아미노산 등의 성분으로 이루어져 있다[1]. 인삼의 대표적인 약효성분 중에 가장 주목받고 있는 것은 의약 및 약학적으로 활발하게 연구되어 온 사포닌 배당체의 일종인 진세노사이드이다. 인삼의 주요 약리 성분인 진세노사이드는 크게 중추신경 진정효과, 진정작용, 항염 및 진통의 효과가 있는 protopanaxadiol(PPD)계 진세노사이드(Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rb<sub>4</sub>)와 피로회복, 운동 근력 증진 및 콜레스테롤 효과를 가진 protopanaxatriol(PPT)계 진세노사이드(Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>)로 나눌 수 있다[2,3].

인삼의 많은 효능은 수천 년에 걸쳐 많은 의서 등에 수록되어 왔으며, 근래에 들어와서 과학적인 연구가 활발하게 이어져 오고 있다. 주요 효능으로는 말초혈관확장, 항당뇨, 항혈전, 항고지혈 효과 등 순환기계와 신경계, 항암 등의 많은 효과들이 밝혀지고 있다. 인삼은 약재뿐만 아니라 식품, 기능성식품, 기능성화장품 등 다양한 소재로 연구 개발되고 있다[4-6].

사포닌의 체내 흡수와 대사를 보면 홍삼사포닌의 인간 혈중 농도 측정 연구에서 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rb<sub>4</sub> 등의 복수의 사포닌이 위액 중에서 20분 탄소 위치의 당쇠가 절단되면 Rg<sub>3</sub>로 변환되어 흡수되는 것으로 알려져 있으며, 사포닌 중 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rb<sub>4</sub> 등이 Rg<sub>3</sub>의 전구체로서의 가능성이 보고되고 있고, Rb<sub>1</sub>은 Rb<sub>4</sub>를 거쳐 compound K로 변환되는 것이 밝혀졌다[7]. Compound K는 미생물에 의해 생성되는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서는 우리나라 전통장류에서 효모를 분리하였다.

최근 연구에 의하면 compound K가 항염증효과, 항당뇨, 항알레르기, 항암작용 등의 효과가 보고되고 있다[8,9].

본 연구에서는 최근 다양한 제품 응용으로 주목받고 있는 compound K를 상업적으로 이용하고자 전통장류 유래의 효모 균주 GB-07을 이용하여 생산한 compound K 함유 발효인삼의 항산화 및 항염증 활성을 실험하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1 약재

본 연구에서 사용된 인삼은 금산인삼시장의 S사에서 4-5년근 수삼을 구매하여 세절한 후 60℃에서 72시간 건조한 후 분쇄기를 이용하여 분말화하여 사용하였다.

### 2.2 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약은 Lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma사 (Saint Louis, U.S.A.)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin 및 Streptomycin은 Hyclone사 (Logan, Ut, U.S.A.), Cell viability assay kit은 Daecellab sevice사 (Seoul, Korea), API50CHL kit은 BioMerieux사 (Marcy-l'Étoile, France), Genomic DNA extraction kit은 Qiagen사 (Hilden, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 사용된 기기는 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.)와 Flow cytometry system (BD Biosciences immunocytometry systems, U.S.A.) 등을 이용하였다.

### 2.3 미생물의 동정

미생물 분리용 기본배지로는 Nutrient Broth (NB) 평판 배지 또는 액체배지를 사용하며, 된장으로부터 균주를 분리하였다. 시료를 0.85% 생리식염수로 희석한 후에 NB 평판배지에 도말하여, 37℃에서 2일간 배양하였다. 1차적으로 무작위 선발법을 이용하여 미생물을 분리한 후에, 내생포자를 형성하는 미생물을 최종적으로 선발하였다. 분리한 균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자서열과 형태학적, 생화학적 특성 등을 확인하고 분리한 균주의 형태학적인 특징은 그람염색을 하여 현미경으로 관찰하며, 생화학적 특성은 API50CHL kit을 사용하여 조사하였다. Genomic DNA extraction kit을 이용하여 분리한 균주의 genomic DNA를 추출한 후 16S rDNA 증폭을 위한 universal primer (27F/1492R)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

### 2.4 인삼 추출물의 발효

세절한 수삼을 60℃에서 72시간 건조한 후 분쇄한

인삼분말 100 g에 물 1,000 ml을 넣고 100℃에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 1회 추출한 인삼액을 감압증류장치를 이용하여 농축하고 동결건조기를 이용하여 건조 분말하였다. 인삼 추출분말 5 g에 GB-07 균주가 들어있는 배양액 50 ml을 넣고 진탕배양기에서 140rpm으로 30℃에서 24시간 배양하였다.

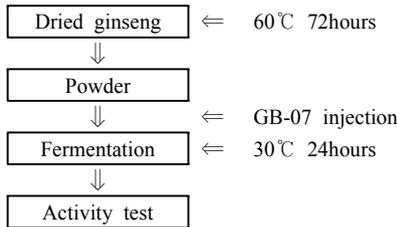


Fig. 1. Experimental flow

### 2.5 Compound K 분석

Compound K 함유 발효인삼을 분석하기 위해 식약처의 인삼 사포닌 분석 방법을 이용하여 Table 1과 같은 조건으로 HPLC 분석을 진행하였다. 분석은 발효 후 1회 측정하여 분석하였다.

Table 1. Operating Conditions of HPLC for Compound K.

HPLC conditions			
Column	ACE 5 C18 (250X4.6)mm 5 μm		
PDA	203 nm		
Flow rate	1 ml/min		
Column Temp.	40℃		
Eluent	min	A% (DW)	B% (ACN)
	0	82	18
	45	78	22
	85	65	35
	110	45	55
	125	40	60
	145	0	100
	181	0	100

### 2.6 세포 생존율 측정

RAW 264.7 cells (한국세포주은행)에 대한 세포 생존율 측정을 위해 96 well plates에 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 이후 compound K 함유 발효인삼을 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 배양액을 교체하여 다시 24시간 동안 배양하고 10 μl의 WST solution을 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분 반응 시켰다. 반응 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm의 흡광도로 변화를

측정한 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

### 2.7 DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능 측정을 위해 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μl에 1, 10, 100 (μg/ml) 농도의 compound K 함유 발효인삼을 각각 100 μl씩 혼합하고, CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 ELISA reader를 이용하여 517 nm의 흡광도로 변화를 측정하였으며, 이때 대조군은 시료액 대신 증류수, DPPH 용액 대신 에탄올을 넣어 보정 값을 얻었다. 양성 대조군으로 ascorbic acid를 농도별로 조제하여 사용하였으며, 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율 (\%)} = (\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도} \times 100$$

### 2.8 활성산소 생성억제 측정

RAW 264.7 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성량 측정을 위해 12 well plate에 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 이후 compound K 함유 발효인삼 1, 10, 100 (μg/ml) 농도에 LPS를 1 μg/ml 농도로 혼합한 배양액을 교체하여 다시 24시간 동안 배양하고 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모든 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 세포 염색을 위해 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)은 10 μM이 되도록 첨가하여 15분 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 염색하고 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

### 2.9 Cytokine 생성량 측정

RAW 264.7 세포 내 염증성 cytokine 생성량 측정을 위해 12 well plate에 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 이후 compound K 함유 발효인삼 1, 10, 100 (μg/ml) 농도에 LPS를 1 μg/ml 농도로 혼합한 배양액을 교체하여 다시 24시간 동안 배양하고 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상청액과 standard, control을 96 well plate에

25  $\mu$ l씩 분주하고 assay buffer 및 DMEM, antibody-immobilized beads를 각 25  $\mu$ l씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 25  $\mu$ l의 detection antibody을 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시키고 추가로 25  $\mu$ l의 streptavidin-phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150  $\mu$ l 넣고 5분 간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 측정하여 절대 값으로 표시하였다.

### 2.10 통계처리

본 연구의 실험 결과는 평균값  $\pm$  표준 편차 (mean  $\pm$  S.D.)로 표시하였다. 각 처리군의 비교는 student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ).

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 미생물 분리

전통 장류에서 분리한 균주는 *Saccharomyces servazzii*로 동정되었으며, GB-07로 명명하고, 국립미생물유전자은행에 특허미생물로 등록하였다.

### 3.2 Compound K 분석 결과

분리된 효모 균주로 24시간 배양하였을 때 20  $\mu$ g/g의 compound K가 생성되어 본 연구에 사용하였다(Fig. 1).

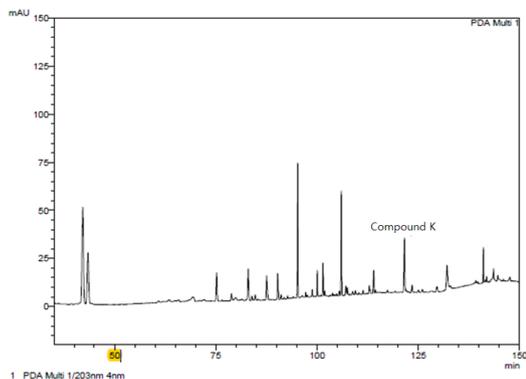


Fig. 2. Compound K production.

### 3.3 세포 생존율

Compound K 함유 발효인삼의 독성의 유무를 확인하고자 RAW 264.7 세포에서 생존율을 확인한 결과, 대조군에 비해 25, 50, 100  $\mu$ g/ml 농도는 각각  $103.2 \pm 0.4$ ,  $102.7 \pm 1.3$ ,  $97.8 \pm 1.2\%$ 로 모든 농도에서 95% 이상의 생존율이 나타나 안전한 것으로 확인되었다(Fig. 2).

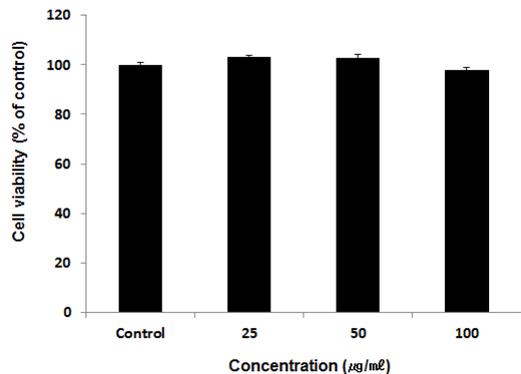


Fig. 3. Cytotoxicity of compound K inclusion on RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 25, 50 and 100  $\mu$ g/ml of compound K inclusion for 24hr. Cell viability was measured using a ELISA reader. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments.

### 3.4 DPPH radical 소거능

-OH를 많이 포함하고 있는 phenolic compound와 같이 수소나 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하면 전자나 수소기와 같은 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 되어 안정한 분자로 전환하며, 환원이 많이 될수록 보라색의 DPPH 용액이 노란색으로 변하는 흡수 파장의 차이를 흡광도로 측정하는 DPPH radical 소거 측정법은 식물 추출물 또는 식품의 항산화능력을 측정하는 대표적인 방법이다[10,11]. 본 연구에서 compound K 함유 발효인삼의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml 농도는  $21.8 \pm 2.5$ ,  $42.9 \pm 2.3$ ,  $53.9 \pm 0.1\%$ 로 나타나 농도 의존적으로 radical 소거능이 확인되었다. 또한, 양성대조군인 ascorbic acid와 radical 소거능을 비교하였을 때, 1~4  $\mu$ g/ml 농도보다는 우수하며, 5  $\mu$ g/ml 농도와는 비슷하거나 낮은 활성을 보였다(Fig. 3).

이와 같은 결과는 기존 연구 결과를 통해 항염증, 항

당뇨, 항알러지, 항종양 등에 효과가 있다고 알려진 compound K의 기능뿐만 아니라[12,13], ascorbic acid를 사용하는 괴혈병, 암 예방, 심혈관 질환, 감기 등에도 본 연구결과인 compound K 함유 발효인삼이 활용될 수 있으며, 이에 대한 기초적 자료를 마련하였다.

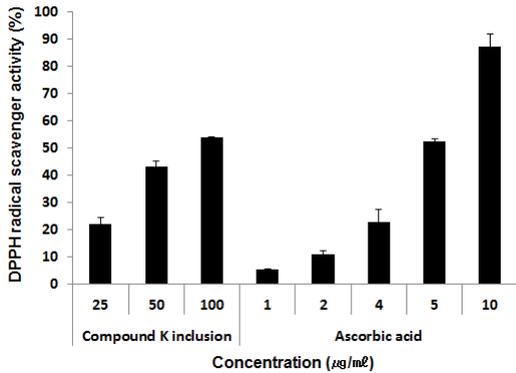


Fig. 4. Scavenging activity of compound K inclusion and ascorbic acid on DPPH free radical. compound K inclusion and ascorbic acid were reacted with DPPH for 30 minutes at 37°C, and the absorbance at 517nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean ± SD of three independent experiments.

### 3.5 활성산소 생성억제 효과

활성산소 (ROS)는 오염 물질, 방사선, 약물 등의 외인성 요인과 여러 메커니즘을 통해 세포 내에서 생산되는 내인성 요인으로 인해 인체에 있어 필수불가결한 관계이다[14,15]. 이와 같은 활성산소는 외부에서 이물질이나 바이러스 등이 침입할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하는 역할을 하지만 과도한 생성으로 인해 체내에 쌓이게 되면 세포 사멸, DNA 손상, 신체 조절 효소의 불활성화 등 인체의 정상기능을 파괴함으로써 암 세포의 증식, 노화 등이 발생하는 원인이 된다[16]. 또한, TNF-α, IL-1, IL-6 등의 염증성 사이토카인을 유도하여 만성 염증 질환의 중요한 매개체로 알려져 있어[17], 효과적인 활성산소의 제어는 위와 같은 질환 예방에 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서 compound K 함유 발효인삼의 활성산소 생성량을 측정된 결과, 25, 50, 100 µg/ml 농도는 대조군에 비해 각각 21.3, 37.6, 70.5%의 유의적인 (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ) 억제 효과가 확인되었다(Fig. 4).

이와 같은 결과는 compound K 함유 발효인삼이 효과적인 항산화제로써 활용될 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

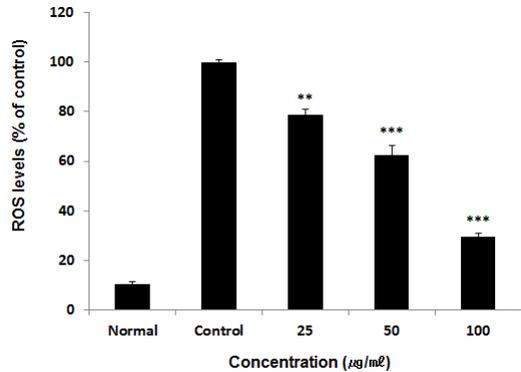


Fig. 5. Effect of compound K inclusion on ROS levels in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 25, 50 and 100 (µg/ml) of compound K and LPS 1 µg/ml for 24hr. The ROS levels were analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. (significance of results, \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  compared to control)

### 3.6 IL-1β 생성억제 효과

단핵구, 대식세포, 혈관내피세포 및 상피세포에서 분비되는 IL-1β는 급성 혹은 만성 염증단계의 초기에 관여하여 caspase-1에 의해 활성화되어 국소적 염증반응을 일으켜 발열, 염증, 급성기 단백 유도를 통해 심혈관, 중추신경계, 간 등의 질환을 일으키는 사이토카인으로 알려져 있다[18]. 본 연구에서 compound K 함유 발효인삼의 IL-1β 생성량을 측정된 결과, 50, 100 µg/ml 농도는 대조군에 비해 각각 29.4, 73.8%의 유의적인 (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ) 억제 효과가 확인되었다(Fig. 5).

이와 같은 결과는 compound K의 기존 연구 결과와 본 연구 결과인 compound K 함유 발효인삼 모두 항염증 효능이 확인되었으며, 이는 추후 연구를 통해 compound K 자체 효능과의 비교 검증이 진행되어야 할 것으로 보이나 IL-1β의 유의적인 억제는 급성, 만성 염증기에 모두 활용될 수 있음을 나타내고 있다.

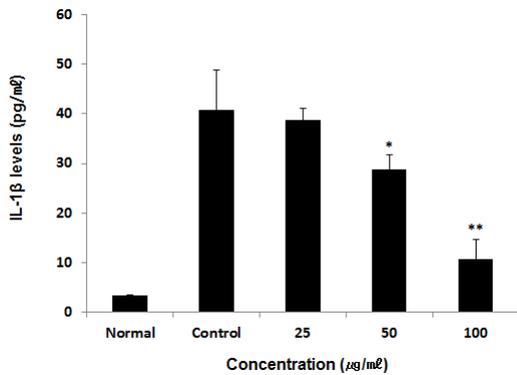


Fig. 6. Effect of compound K inclusion on IL-1β levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 25, 50 and 100 (μg/ml) of compound K inclusion and LPS 1 μg/ml for 24hr. Cytokine was measured using a luminex. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments. (significance of results, \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  compared to control)

### 3.7 IL-6 생성억제 효과

대식세포와 혈관내피세포에서 분비되는 IL-6는 면역 반응, 조혈 및 염증을 조절하며, 림프구를 활성화시켜 항체 생산을 증가시키는 친염증성 역할과 동시에 과생산시에는 B세포성 면역질환, 자가면역질환의 원인이 되는 항염증성 작용을 동시에 하게 항염증 작용을 모두 관여하는 사이토카인이다[19-21]. 특히, 임상에서 류마티스 관절염 환자의 혈액에서 특징적으로 증가하며, 항IL-6 억제제를 개발은 당뇨, 알츠하이머, 골수종 등의 질환에도 치료제로 활용될 수 있어 다양한 분야에서 IL-6 생성 억제에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[22,23]. 본 연구에서 compound K 함유 발효인삼의 IL-6 생성량을 측정 한 결과, 25, 50, 100 μg/ml 농도는 대조군에 비해 각각 25.2, 58.2, 85.4%의 유의적인 (\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ) 억제 효과가 확인되었다(Fig. 6).

이와 같은 결과는 compound K 함유 발효인삼이 임상에서 다양한 질환의 원인으로 알려진 IL-6 생성량을 억제시킴에 따라 치료용 소재로 활용될 가능성을 나타내고 있다.

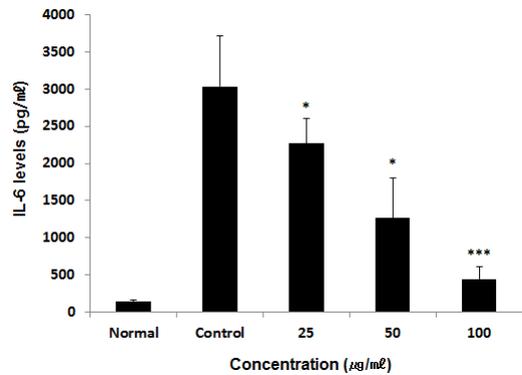


Fig. 7. Effect of compound K inclusion on IL-6 levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 25, 50 and 100 (μg/ml) of compound K inclusion and LPS 1 μg/ml for 24hr. Cytokine was measured using a luminex. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. (significance of results, \* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  compared to control)

### 3.8 TNF-α 생성억제 효과

대식세포에서 분비되는 TNF-α는 중요한 염증성 사이토카인으로서, 주로 면역세포 조절 기능을 담당한다[24]. 그러나 과생성이 되면, IL-1β와 IL-6을 통해 염증반응을 일으키고 악화시키는 인자로 작용하게 되며, 화학주성으로 염증관련 세포들의 활성화를 유도하게 되어 세포 사멸, 암, 우울증, 건선 및 염증성 장 질환 등을 발생시키게 되는 원인으로 알려져 있다[25-28]. 본 연구에서 compound K 함유 발효인삼의 TNF-α 생성량을 측정 한 결과, 100 μg/ml 농도는 대조군에 비해 32.6%의 유의적인 (\* :  $p < 0.05$ ) 억제 효과가 확인되었다(Fig. 7).

이와 같은 결과는 활성산소가 염증성 사이토카인 생성에 연관되어 있다는 연구결과에 부합되는 결과로써 활성산소의 억제가 TNF-α의 생성을 억제시키고 이를 통해 염증을 악화시키는 IL-1β, IL-6 생성량 역시 감소된 것으로 풀이된다. 이를 통해 compound K 함유 발효인삼은 활성산소뿐만 아니라 염증성 질환에 활용될 수 있는 소재임을 보여주고 있다.

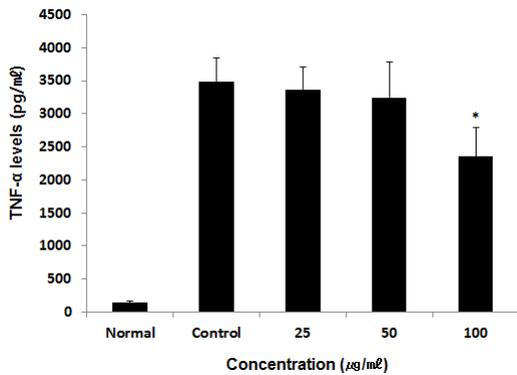


Fig. 8. Effect of compound K inclusion on TNF- $\alpha$  levels in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 25, 50 and 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of compound K inclusion and LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24hr. Cytokine was measured using a luminex. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments. (significance of results, \* :  $p < 0.05$  compared to control)

#### 4. 결론

본 연구는 compound k 생산능을 갖는 효모균주인 GB-07의 분리과 이를 이용하여 24시간 배양하여 20  $\mu\text{g}/\text{g}$ 의 Compound K가 생성되었고 이에 대한 항산화 및 항염증 활성을 확인하고자 다양한 연구를 진행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) Compound K 함유 발효인삼은 RAW 264.7 세포의 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 95% 이상의 생존율이 나타나 안전한 것으로 확인되었다.
- 2) DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과, 농도 의존적으로 radical 소거 활성이 나타났으며, 이는 양성 대조군인 ascorbic acid 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  정도의 효능이 나타났다.
- 3) 활성산소 생성억제 효과를 측정한 결과, compound K의 모든 농도는 대조군에 비해 유의적인 억제 효능이 나타났다.
- 4) 항염증 활성 확인을 위해 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  생성을 확인한 결과, IL-1 $\beta$ 는 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , IL-6는 모든 농도에서, TNF- $\alpha$ 는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군에 비해 유의적인 억제 효능이 나타났다.

위와 같은 결론을 바탕으로 compound K 함유 발효

인삼은 항산화 및 항염증 활성에 있어 우수한 효능이 검증되었으며, 이를 바탕으로 다양한 분야에 대한 기능성 소재로써 활용될 수 있다고 판단된다. 향후 compound K의 함유량을 높이는 지속적인 공정개발과 효능검증을 통한 사업화의 단초가 될 것으로 사료된다.

#### References

- [1] K. Murata, Y. Tsukioka, K. Nakao, K. Moriyama, K. Samukawa, K. Namba, H. Matsuda, "Improving effects of Red Ginseng and its saponin constituents on blood fluidity", *Journal of Traditional Medicines*, vol. 29, no. 4, pp. 169-178, 2012. DOI: <http://doi.org/10.11339/jtm.29.169>
- [2] Y. Han, B. Sun, X. Hu, H. Zhang, B. Jiang, M. I. Spranger, Y. Zhao, "Transformation of bioactive compounds by *Fusarium sacchari* fungus isolated from the soil-cultivated ginseng", *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 55, no. 23, pp. 9373-9379, 2007. DOI: <http://doi.org/10.1021/jf070354a>
- [3] S. S. Hur, "Ginsenoside Composition and Change of Taste Quality in Red Ginseng Extract by Acid treatment and Complexation with Cyclodextrin", *J. of Korean Oil Chemists Soc.*, Vol.33, No.4, pp. 751-761, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2016.33.4.751>
- [4] H. U. Lee, E. A. Bae, M. J. Han, N. J. Kim, D. H. Kim, "Hepatoprotective effect of ginsenoside Rb1 and compound K on tert butyl hydroperoxide induced liver injury", *Liver International*, vol. 25, no. 5, pp. 1069-1073, 2005. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01068.x>
- [5] H. Matsuda, M. Yamazaki, Y. Asanuma, M. Kubo, "Promotion of hair growth by Ginseng Radix on cultured mouse vibrissal hair follicles", *Phytotherapy Research*, vol. 17, no. 7, pp. 797-800, 2003. DOI: <http://doi.org/10.1002/ptr.1241>
- [6] H. Matsuda, N. Hirata, S. Naruto, S. NISHIDA, K. IRIMAJIRI, K. Samukawa, K. Michinori, "Anti-proliferative effect of Ginseng Radix on human premyelocytic leukemia cells (HL-60)", *Journal of Traditional Medicines*, vol. 22, no. 1, pp. 4-8, 2005. DOI: <http://doi.org/10.11339/jtm.22.4>
- [7] A. Teruaki, K. Matao, K. Kobashi. "Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb1 by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration: measurement of compound K by enzyme immunoassay", *Biological and pharmaceutical bulletin*, vol. 21, no. 3, pp. 245-249, 1998. DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.21.245>
- [8] Y. Li, T. Zhou, C. Ma, W. Song, J. Zhang, Z. Yu, "Ginsenoside metabolite compound K enhances the efficacy of cisplatin in lung cancer cells", *Journal of thoracic disease*, vol. 7, no. 3, p. 400, 2015. DOI: <http://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.03>
- [9] A. Kawase, F. Takeshita, A. Yamada, K. Murata, H. Matsuda, K. Samukawa, M. Iwaki, "Ginseng extracts

- facilitate cytochrome P450 xenobiotic metabolism in primary cultures of rat hepatocytes”, *Journal of Health Science*, vol. 55, no. 5, pp. 809-813. 2009.  
DOI: <http://doi.org/10.1248/jhs.55.809>
- [10] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT-Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, pp. 25-30, 1994.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- [11] S. Y. Lee, J. C. Yang, B. A. Kim, "A Study on the Antioxidative Effects of *Zostera marina* and its Application in Cosmetics", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 18, no. 3, pp. 534-544, 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.3.534>
- [12] E. K. Park, Y. W. Shin, H. U. Lee, S. S. Kim, Y. C. Lee, B. Y. Lee, D. H. Kim, "Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264. 7 cells induced by lipopolysaccharide", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 28, no. 4, pp. 652-656. 2005.  
DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.28.652>
- [13] S. Jiang, D. Ren, J. Li, G. Yuan, H. Li, G. Xu, X. Han, P. Du, L. An, "Effects of compound K on hyperglycemia and insulin resistance in rats with type 2 diabetes mellitus", *Fitoterapia*, vol. 95, pp. 58-64. 2014.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.02.017>
- [14] Muller F, "The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging", *Journal of the American Aging Association*. vol. 23, no. 4, pp. 227 - 53, Oct. 2000.  
DOI:<https://doi.org/10.1007/s11357-000-0022-9>
- [15] D. Han, E. Williams, E. Cadenas, "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space", *The Biochemical Journal*, vol. 353, no. 2, pp. 411 - 416. 2001.  
DOI: <https://doi.org/10.1042/0264-6021.3530411>
- [16] H. S. Jung, K. H. Noh, H. Y. Cho, J. Y. Park, C. Y. Choi, T. W. Kwon, Y. S. Song, "Effect of buchu (*Allium tuberosum*) on lipid peroxidation and antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats", *Korean J Life Sci*, vol. 13, no. 3, pp. 333-342. 2003.
- [17] H. G. Park, M. R. Cha, J. H. Hwang, J. Y. Kim, M. S. Park, S. U. Choi, H. R. Park, Y. I. Hwang, "Antimicrobial activity of the extract from *Pyrola japonica* against *Bacillus subtilis*", *Journal of Life Science*, vol. 16, no. 6, pp. 989-993. 2006.  
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2006.16.6.989>
- [18] I. H. Ryu, H. B. Cho, S. B. Kim, Y. J. Seo, C. M. Choi, "The inhibitory effect of *Picrasmae lignum* on inflammatory responses", *The Journal of Oriental Obstetrics and Gynecology*, vol. 24, no. 1, pp. 1-14. 2011.
- [19] C. Gabay, "Interleukin-6 and chronic inflammation", *Arthritis research & therapy*, vol. 8, no. 2, S3, 2006.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/ar1917>
- [20] W. Xin, L. Wen-bo, L. Yan, Z. Jian, C. Ting-mei, "Effect of osteoprotegerin in combination with interleukin-6 on inhibition of osteoclast differentiation", *Chinese Journal of Traumatology*, vol. 16, no. 5, pp. 277-280. 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1008-1275.2013.05.004>
- [21] R. Medzhitov, "Origin and physiological roles of inflammation." *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 428-435, 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- [22] B. E. Barton, "Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes", *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 9, no. 4, pp. 737 - 752, 2005.  
DOI: <https://doi.org/10.1517/14728222.9.4.737>
- [23] J. S. Smolen, R. N. Maini, "Interleukin-6: a new therapeutic target", *Arthritis Research & Therapy*, vol. 8, no. 2, S5, 2006.  
DOI:<https://doi.org/10.1186/ar1969>
- [24] D. H. Kim, E. Y. Hwang, J. H. Son, "Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorius* seed extracts in Raw 264.7 cells", *Journal of Life Science*, vol. 23, no. 1, pp. 55-62. 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.1.55>
- [25] R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo, "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology", *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 487 - 501. 2001.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- [26] Y. Dowlati, N. Herrmann, W. Swardfager, H. Liu, L. Sham, E. K. Reim, K. L. Lanctôt, "A meta-analysis of cytokines in major depression", *Biol Psychiatry*, vol. 67, no. 5, pp. 446 - 457, 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033>
- [27] F. C. Victor, A. B. Gottlieb, "TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis", *J Drugs Dermatol*, vol. 1, no. 3, pp. 264 - 275, 2002.
- [28] J. Brynkskov, P. Foegh, G. Pedersen, C. Ellervik, T. Kirkegaard, A. Bingham, T. Saermark, "Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease", *Gut*, vol. 51, no. 1, pp. 37 - 43, 2002.  
DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.51.1.37>

신 동 규(Dong-Gue Shin)

[정회원]



- 1998년 2월 : 홍익대학교 화학공학과 (공학석사)
- 2002년 3월 ~ 2004년 8월 : 나노신소재 개발팀
- 2008년 3월 ~ 2010년 8월 : (주) 위디어 부설연구소 총괄팀장
- 2010년 9월 ~ 현재 : 제너럴바이오(주) 부설연구소 연구소장

<관심분야>

식품미생물학 및 생물공학, 건강기능성소재개발

---

**서 정 훈**(Jeong-Hun Seo)

[정회원]



- 2001년 2월 : 한국폴리텍대학 메카트로닉스공학
- 1997년 9월 ~ 2006년 3월 : LG 전자 엔지니어
- 2006년 3월 ~ 2007년 3월 : Kosmo Tech Malaysia 신소재 사업팀 총괄
- 2007년 11월 ~ 현재 : 제너럴바이오(주) 대표이사

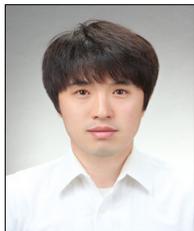
<관심분야>

식품미생물학 및 생물공학, 건강기능성소재개발

---

**조 상 민**(Sang-Min Cho)

[정회원]



- 2008년 2월 : 전북대학교 생물환경학과
- 2002년 2월 ~ 2015년 4월 : (주) 운화 식물줄기세포연구소 연구원
- 2015년 11월 ~ 현재 : 제너럴바이오(주) 부설연구소 주임연구원

<관심분야>

식품미생물학 및 생물공학, 건강기능성소재개발

---

**최 학 주**(Kil-Dong Hong)

[정회원]



- 2003년 3월 : 가고시미국립대학교 생체공학 (공학석사)
- 2016년 9월 : 큐슈대학교 창약과학 (약학박사)
- 2003년 9월 ~ 2008년 8월 : 대전대학교 한의과대학 조교
- 2008년 9월 ~ 2011년 2월 : 대전대학교 TBRC 선임연구원
- 2011년 3월 ~ 현재 : 대전대학교 연구전담교수

<관심분야>

기능성 바이오 소재, 기능성 화장품 소재