

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0086807 (43) 공개일자 2009년08월14일
(51) Int. Cl. <i>A61K 36/258</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0012281 (22) 출원일자 2008년02월11일 심사청구일자 2008년02월11일	(71) 출원인 주식회사 비티씨 경기도 안산시 단원구 고잔동 707-4 한남법조빌딩 728 (주) 세종고려인삼 인천 남동구 논현동 446-9 25B 10L (72) 발명자 서형주 서울 양천구 목6동 902 목동신시가지아파트 233동 504호 신광순 경기 성남시 분당구 수내2동 파크타운 113동 220 2호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인다울	

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법

(57) 요약

인삼에, 베타-글루카네이즈(β -glucanase), 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase), 셀룰레이즈(cellulase), 아라비네이즈(arabinase) 및 자일라네이즈(xylanase)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 가하여 인삼을 가수분해시킴으로써 진세노사이드의 함량을 증가시키는 방법이 개시된다.

(72) 발명자

오성훈

서울 강남구 대치1동 우성1차아파트 14동 1505호

김태영

경기 안산시 단원구 고잔동 720번지 호수공원대림
아파트107-604호

윤병국

인천 연수구 동춘동 9250 한양1차아파트 111동
2103호

특허청구의 범위

청구항 1

인삼에, 베타-글루카네이즈(β -glucanase), 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase), 셀룰레이즈(cellulase), 아라비네이즈(arabinase) 및 자일라네이즈(xylanase)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 가하여 인삼을 가수분해시킴으로써 진세노사이드의 함량을 증가시키는 것을 포함하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인삼은 홍삼인 것을 특징으로 하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드는 Rg2이며, 상기 효소는 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase) 및 셀룰레이즈(cellulase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소인 것을 특징으로 하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 효소는 펙티네이즈(pectinase)인 것을 특징으로 하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드는 Rg3이며, 상기 효소는 베타-글루카네이즈(β -glucanase), 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase) 및 셀룰레이즈(cellulase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소인 것을 특징으로 하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 효소는 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase) 및 셀룰레이즈(cellulase)의 조합인 것을 특징으로 하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드는 Rb1이며, 상기 효소는 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase) 및 셀룰레이즈(cellulase)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소인 것을 특징으로 하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 가수분해는 추출과 동시에 수행되는 것을 특징으로 하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 가수분해는 추출 전에 수행되는 것을 특징으로 하는 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따라 제조된 가공 인삼 또는 인삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 건강식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 건강식품 조성물은, 감마 사이클로덱스트린을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 건강식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 감마 사이클로텍스트린은 액상인 인삼 추출물이 100일 때 5 내지 20 중량부의 함량으로 함유된 것을 특징으로 하는 건강식품 조성물.

청구항 13

인삼에, 베타-글루카네이즈(β -glucanase), 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase), 셀룰레이즈(cellulase), 아라비네이즈(arabinase) 및 자일라네이즈(xylanase)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 가하여 얻어진 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 건강식품 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 건강식품 조성물은, 감마 사이클로텍스트린을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 건강식품 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 감마 사이클로텍스트린은 액상인 인삼 추출물이 100일 때 5 내지 20 중량부의 함량으로 함유된 것을 특징으로 하는 건강식품 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 진세노사이드의 함량이 증가된 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 효소에 의한 가수분해를 이용하여 진세노사이드의 함량이 증가된 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 인삼은 수삼, 백삼, 홍삼, 산삼, 장뇌, 미삼, 원삼 등을 모두 포함하는 가장 넓은 개념이다. 인삼은 중국 등 한방의학에서 매우 가치가 높은 의약품으로 이용되어온 천연물 소재이다. 수많은 의서에 인삼의 약효가 수록되어 있다. 그러나 실제로 장구한 이용의 역사에도 불구하고 임상연구를 통한 과학적인 규명은 부족한 형편이다. 그럼에도 불구하고 현대 의학이 소개된 지금도 보약으로서 인삼의 인기가 떨어지지 않고, 건강기능식품 중 부동의 1위를 차지하고 있는 것은 오랜 임상 역사가 인정하는 약효를 나타내고 부작용이 적으며 안전도가 높은 생약이란 이유일 것이다.
- <3> 인삼의 주된 기능성 성분은 식물체의 여러 사포닌 중 인삼 사포닌만을 특별하게 구분하여 명명한 "진세노사이드(ginsenoside)"라 불리우는 인삼 사포닌이다.
- <4> 인삼 성분에 대한 과학적인 연구가 시작된 것은 1960년대 이후라고 볼 수 있다. 사포닌의 화학구조를 보면 크게 당부분(glycone)과 비당부분(aglycone)으로 구성된 배당체이다. 이러한 사포닌이 체내에서 흡수될 때는 사람의 장내에 있는 특유 미생물에 의해 분해되어 체내로 흡수 되어진다. 하지만 인삼 사포닌을 분해하는 장내 미생물은 사람의 체질에 따라 그리고 식습관 따라 그 존재의 유무와 보유하고 있는 정도가 다르다. 이로 인해 인삼의 복용 후 사람마다 효능의 차이가 나타날 수 있다. 어떤 사람은 사포닌 중 디올(diol) 형태만을 흡수하고, 어떤 사람은 트리올(triol) 형태만을 흡수하며, 어떤 사람은 인삼 사포닌을 전혀 흡수를 하지 못하게 된다.
- <5> 백삼과 홍삼의 성분의 차이는 함유된 진세노사이드 종류와 함량의 차이이다. 백삼에는 진세노사이드 Ra, Rb1, Rb2, Rc, Rg1, Re 등이 주로 함유되어 있다. 홍삼은 상기 백삼에 있는 성분들이 쪄는 과정에서 물리화학적 전환체가 형성된다. 예컨대, 쪄는 과정에서 진세노사이드 Rg3가 다량 생성된다. 그 외에도 홍삼에는 진세노사이드 Rh2, Rh1 등을 소량 함유하고 있다. 이러한 성분들은 서로 전혀 다른 생리활성을 갖고 있다. 백삼은 분자량이 큰 다당체를 많이 함유하고 있지만, 산성다당체는 홍삼에 비해 낮다. 홍삼에는 분자량이 백삼에 비해 작은 다당체를 다량 함유하고 있다.

- <6> 인삼의 주성분은 사포닌인 진세노사이드들이며 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)계인 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc 등과 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol)계인 진세노사이드 Re, Rg1, Rf 등이 알려져 있다. 이 성분들의 대표적인 약리작용으로는 항암 활성, 항염증, 항당뇨 작용 등을 들 수 있다. 이 성분들을 가지고 직접 암세포를 이용하여 인 비트로(*in vitro*)에서 항암 활성 등을 측정하면 활성이 없다. 그러나, 이 성분들이 경구 투여되는 경우에는 장내세균의 대사를 받아 컴파운드 케이(compound K)와 같은 화합물로 전환되면 강한 암세포 독성과 암 전이 억제 활성을 나타낸다.
- <7> 진세노사이드가 상기한 장내세균의 대사를 받는 과정을 보면 다음과 같다. 먼저 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)계 화합물인 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc 등은 진세노사이드 F2를 경유하여 컴파운드(compound) K로 대사된다. 이러한 대사 반응은 장내 우세균인 박테로이드(*Bacteroides*)속, 푸소박테리움(*Fusobacterium*)속, 프로베텔라(*Provetella*)속 균주 등에 의해 촉매된다. 또한 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol)계 화합물인 진세노사이드 Re, Rg1, Rf 등은 상기 균주들에 의해 진세노사이드 Rh1 또는 F1로 대사되고 더 나아가 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol)로 대사된다.
- <8> 물리화학적인 방법에 의해서도 인삼의 성분들이 전환될 수 있다. 예를 들면 인삼 중의 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc 등은 열처리에 의해 진세노사이드 Rg3로 전환될 수 있다. 이렇게 전환된 인삼 사포닌을 함유한 인삼을 복용하게 되면 장내에서 장내세균에 의해 진세노사이드 Rh2로 전환될 수 있고 나아가 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)로 전환될 수 있다.
- <9> 상기와 같은 성분의 차이는 인삼 약효의 차이와 밀접한 관계가 있다. 만약, 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc가 많이 함유된 백삼의 경우에는 컴파운드 K가 혈액 중으로 많이 이행될 수 있다. 한편, 진세노사이드 Rg3가 많은 홍삼의 경우에는 진세노사이드 Rh2가 혈액 중으로 많이 이행될 수 있다. 그외에 다른 인삼 사포닌들 역시 혈액 중으로 이행되는 양상이 다를 수 있으므로, 인삼의 약효를 평가함에 있어 상기와 같은 점을 고려해야 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 본 발명의 일실시예의 목적은 인삼의 진세노사이드 조성을 변화시키는 것이다.
- <11> 본 발명의 다른 일실시예의 목적은 인삼의 진세노사이드 중 Rg2 및 Rg3의 함량을 높이는 것이다.
- <12> 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 인삼 내 유효성분들을 효과적으로 추출해 내는 방법을 제공하는 것이다.
- <13> 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 진세노사이드 함량이 높은 인삼 추출물을 제공하는 것이다.
- <14> 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 진세노사이드 중에서도 특히 Rg2 및 Rg3의 함량이 높은 인삼 추출물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <15> 본 발명의 일실시예에 따른 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법은, 인삼에, 베타-글루카네이즈(β -glucanase), 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase), 셀룰레이즈(cellulase), 아라비네이즈(arabinase) 및 자일라네이즈(xylanase)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 가하여 인삼을 가수분해시킴으로써 진세노사이드의 함량을 증가시키는 것을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <16> 본 발명의 일실시예에 따른 건강식품 조성물은, 인삼에, 베타-글루카네이즈(β -glucanase), 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase), 셀룰레이즈(cellulase), 아라비네이즈(arabinase) 및 자일라네이즈(xylanase)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 가하여 얻어진 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

효 과

- <17> 본 발명의 일실시예에 따른 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법을 이용하면, 진세노사이드의 함량이 현저히 증가된 인삼 또는 인삼 추출물을 얻을 수 있다.
- <18> 본 발명의 또 다른 일실시예에 따른 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물의 제조방법을 이용하면, 진세노사이드 중 특히 Rg2, Rg3 및 Rb1의 함량이 높은 가공 인삼 또는 가공 인삼 추출물을 얻을 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <19> 본 발명의 일실시예에서는 인삼을 가수분해하기 위한 효소로서 셀룰레이즈(Cellulase)를 사용할 수 있다. 셀룰레이즈의 예로서, 트리코더마(*Trichoderma*)속에서 유래된 셀룰레이즈를 들 수 있다. 트리코더마(*Trichoderma*)속 유래 셀룰레이즈로는 Econase CE (AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Germany)를 들 수 있다. Econase CE의 최적 pH는 4.0 내지 5.5이며, 최적 온도는 55℃이다.
- <20> 셀룰레이즈 활성을 갖는 또 다른 효소를 예를 들면, Rapidase (DSM, Delft, Netherlands) 및 Viscozyme (Novozymes, Dittingen, Switzerland)을 들 수 있다. Rapidase는 아스프. 니거(*Asp. Niger*) 또는 티. 롱기브라키아툼(*T. longibrachiatum*)으로부터 유래된 효소로서, 셀룰레이즈 활성 이외에도 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase) 활성을 갖고 있다. Rapidase의 최적 pH는 4.0 내지 5.0이고, 최적 온도는 10 내지 55℃이다. Viscozyme은 아스프. (*Asp.*) 속으로부터 유래된 효소로서, 셀룰레이즈 활성 이외에도 아라비네이즈(arabinase), 베타-글루카네이즈(β -glucanase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase), 자일라네이즈(xylanase) 활성을 갖고 있다.
- <21> 본 발명의 다른 일실시예에서는 인삼을 가수분해하기 위한 효소로서 펙티네이즈를 사용할 수 있다. 펙티네이즈의 예로서, Cytolase PCL 5 (Gist-Brocades, Seclin, France)를 들 수 있다. Cytolase PCL 5는 아스퍼질러스 나이지(*Asp. Niger*)로부터 유래된 펙티네이즈로서, 최적 pH는 2.5 내지 5.0이고 최적 온도는 10 내지 55℃이다. 상기 언급한 Rapidase 역시 펙티네이즈의 활성을 갖고 있으므로 본 실시예에서 인삼을 가수분해하기 위한 펙티네이즈로서 사용될 수 있다.
- <22> 본 발명의 또 다른 일실시예에서는 인삼을 가수분해하기 위한 효소로서 헤미셀룰레이즈를 사용할 수 있다. 헤미셀룰레이즈로서 앞서 언급한 Rapidase 또는 Viscozyme을 사용할 수 있다.
- <23> 본 발명의 또 다른 일실시예에서는 인삼을 가수분해하기 위한 효소로서 베타-글루카네이즈(β -glucanase)를 사용할 수 있다. 베타-글루카네이즈의 예로 Ultraflo L (Novozymes, Dittingen, Switzerland)을 들 수 있다. Ultraflo L은 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*)로부터 유래된 효소로서 최적 pH가 6이고 최적 온도는 40℃이다. 앞서 언급한 Viscozyme 역시 베타-글루카네이즈 활성을 갖고 있으므로, 상기 Ultraflo L 대신 Viscozyme을 사용할 수도 있다.
- <24> 그 외 본 발명의 또 다른 일실시예에서 사용될 수 있는 효소는 아라비네이즈(arabinase), 자일라네이즈(xylanase) 등을 들 수 있다.
- <25> 진세노사이드 Rg2는, 백삼에는 존재하지 않고 홍삼에만 소량 존재하는 진세노사이드이다. Rg2는 혈소판 응집 억제, 아세틸콜린 유도 카테콜아민 분비 억제 및 세포내 칼슘 유입 억제, 항 트롬빈, 기억 감퇴 개선, 평활근 세포 증식 억제 작용 등을 한다. 인삼에 펙티네이즈를 처리하여 가수분해시키면 Rg2의 함량을 현저히 증가시킬 수 있다. 또한, 인삼에 셀룰레이즈 또는 헤미셀룰레이즈를 처리하는 경우에도 Rg2의 함량을 상당히 높은 수준으로 증가시킬 수 있다.
- <26> 진세노사이드 Rg3 역시 백삼에는 존재하지 않고 홍삼에만 소량 존재한다. Rg3은 암세포 전이 억제 작용, 혈소판 응집 억제 및 항혈전 작용, 간 상해 억제 작용, 혈관 이완 작용, 항암제의 내성 억제 작용, 뇌신경 보호 등을 한다. 인삼에 펙티네이즈를 처리하여 가수분해하는 경우에 Rg3의 함량을 현저히 증가시킬 수 있다. 그 외, 베타-글루카네이즈, 셀룰레이즈 또는 헤미셀룰레이즈를 처리하는 경우에도 Rg3의 함량을 상당히 높은 수준으로 증가시킬 수 있다.
- <27> 진세노사이드 Rb 1은 백삼이나 홍삼 모두에 다량 함유되어 있다. Rb1은 중추억제 및 정신 안정 작용, 공격성 행동억제, 진통 작용, 항경련 작용, 고콜레스테롤 저하 작용, 항불안 작용, 콜레스테롤 생합성 촉진작용, 골수세포의 DNA, RNA, 단백질 및 지질 합성 촉진 작용, 단백질 합성 촉진 작용, 신경세포 생존 촉진 작용, 아세틸콜린 방출 촉진 작용, 기억력 개선 작용, 혈소판 응집 억제 작용, 지질 과산화 억제작용, 혈관 확장작용, 콜레스테롤 대사촉진작용, 항염작용, 간 상해 보호작용 등을 한다. 진세노사이드 Rb1은 펙티네이즈, 셀룰레이즈, 헤미셀룰레이즈를 처리하여 가수분해시키는 경우에 그 함량을 상당한 수준으로 증가시킬 수 있다.
- <28> 그 외에 Rg1, Rf, Re, Rd, Rc, Rb2 등의 진세노사이드들도 인삼에 베타-글루카네이즈, 펙티네이즈, 헤미셀룰레이즈, 셀룰레이즈 및/또는 아라비네이즈 및 자일라네이즈로부터 선택된 하나 이상의 효소를 처리하여 가수분해시킴으로써 그 함량을 현저히 증가시킬 수 있다.
- <29> 본 발명의 일실시예에 따른 제조방법에서는, 효소 처리에 의한 가수분해 과정이 추출 및/또는 농축 과정과 동

시에 수행될 수 있다.

- <30> 본 발명의 또 다른 일실시예에 따른 제조방법에서는, 효소 처리에 의한 가수분해 과정이 추출 과정 전에 별개로 수행될 수 있다.
- <31> 본 발명의 일실시예에 따른 건강식품 조성물은 상기에서 언급한 방법 중 어느 하나에 의해 제조된 인삼 또는 그 추출물을 유효성분으로서 포함할 수 있다.
- <32> 본 발명의 다른 일실시예에 따른 건강식품 조성물은 감마 사이클로덱스트린을 더 포함하는 것을 특징으로 한다. 인삼은 우수한 효능에도 불구하고 특유의 쓴 맛이 큰 문제점으로 인식되고 있다. 인삼에서 쓴 맛을 유발하는 성분들을 감마 사이클로덱스트린의 공동 내에 포집시키면 인삼의 쓴 맛을 현저히 감소시킬 수 있다. 감마 사이클로덱스트린의 양은 액상의 인삼 추출물, 구체적으로 인삼 농축액을 100 중량부로 하였을 때, 감마 사이클로덱스트린의 함량은 5 내지 20중량부인 것이 바람직하다. 감마 사이클로덱스트린의 양이 5중량부 미만이면 쓴 맛 차폐 효과가 미미하고, 20중량부를 초과하면 제형 안정성이 나빠질 수 있다. 더 바람직한 감마 사이클로덱스트린 함량 범위는 7 내지 10중량부이다.
- <33> 이하에서는 일실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하나, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- <34> 실시예
- <35> <실시예1 내지 실시예 5: 홍삼 가수분해물의 제조>
- <36> 금산에서 구입한 홍삼 분말 6 g에 인산염 완충용액(50 mM, pH 5.0) 30 mL을 가하여 현탁한 후, 하기 표 1에 기재된 각 효소 200 μ L을 가하여 45 $^{\circ}$ C, 12 시간 가수분해를 행하였다. 가수분해물에 80% 에탄올 300 mL을 가하여 3시간 동안 환류하여 진세노사이드를 추출하였으며, 이 환류액을 30 mL까지 농축하였다. 실시예의 결과와 비교하기 위하여 효소 처리를 하지 않은 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 농축액을 제조하였다(비교예 1)

표 1

<37> 실시예	효소	주요 활성	공급원	최적 조건	
				pH	온도($^{\circ}$ C)
실시예 1	Ultraflo L (Novozymes, Dittingen, Switzerland)	베타-글루카네이즈	휴미콜라 인솔렌즈(<i>H. umicola insolens</i>)	6	40
실시예 2	Rapidase (DSM, Delft, Netherlands)	펙티네이즈, 헤미셀룰레이즈, 셀룰레이즈	아스프 니거(<i>Asp. Niger</i>) & 티.롱기브라키아툼(<i>T. longibrachiatum</i>)	4.0-5.0	10-55
실시예 3	Viscozyme (Novozymes, Dittingen, Switzerland)	아라비네이즈, 셀룰레이즈, 글루카네이즈, 헤미셀룰레이즈, 자일라네이즈	아스프. (<i>Asp.</i>) 속	3.3-5.5	40-50
실시예 4	Cytolase PCL 5 (Gist-Brocades, Seclin, France)	펙티네이즈	아스프. 니거(<i>Asp. Niger</i>)	2.5-5.0	10-55
실시예 5	Econase CE (AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Germany)	셀룰레이즈	트리코더마(<i>Trichoderma</i>) 속	4.0-5.5	55

- <38> <실험예1: 폴리페놀, 총당, 산성당 및 건물량의 측정>
- <39> 상기 비교예 1, 실시예 1 내지 5에 따라 제조된 농축액에 대하여 폴리페놀, 총당, 산성당 및 건물량을 측정하였다.
- <40> 폴리페놀 함량은 폴린-데니스(Folin-Denis) 법(Dewanto, V., Wu, X., & Liu, R. H. (2002b). Processed sweet

corn has higher antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 4959-4964.)에 따라 측정하였다.

<41> 총당과 산성당의 함량은 페놀-황산(phenol-sulfuric acid)법과 Blumenkrantz과 Asboe-Hansen법 (Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. (1973) Anal. Biochem., 54, 484)에 의해 측정하였다. 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

<42>

구분	효소	총 당(Total sugar) (mg/ml)	산성당(Uronic acid) (μ g/ml)	폴리페놀 (μ g/ml)	건물양(solid) (%)
비교예 1	control	284.8 \pm 30.4 ^d	160.00 \pm 66.55 ^d	479.28 \pm 10.80 ^c	8.47 \pm 0.01 ^e
실시예 1	Ultraflo L	264.5 \pm 31.9 ^d	377.67 \pm 108.15 ^d	423.84 \pm 24.24 ^d	7.85 \pm 0.20 ^f
실시예 2	Rapidase	462.9 \pm 37.4 ^{ab}	2124.71 \pm 129.41 ^b	798.22 \pm 12.56 ^a	12.77 \pm 0.19 ^a
실시예 3	Viscozyme	516.5 \pm 6.0 ^a	2626.67 \pm 170.62 ^a	694.71 \pm 2.78 ^b	11.63 \pm 0.12 ^c
실시예 4	Cytolase PCL 5	393.1 \pm 65.7 ^c	1167.84 \pm 288.26 ^c	728.39 \pm 63.86 ^b	12.15 \pm 0.11 ^b
실시예 5	Econase CE	417.9 \pm 26.6 ^{bc}	854.12 \pm 216.30 ^c	114.73 \pm 14.62 ^e	9.78 \pm 0.16 ^d

<43> 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 효소 처리에 의해 형성된 가수분해물의 총 당과 산성 당이 효소를 처리하지 아니한 비교예 1에 비하여 현저히 증가하였음을 확인하였다. 식물체에 존재하며 여러가지 활성을 보이는 폴리페놀의 함량은 실시예 5를 제외하고는 모두 높게 나타났다. 건물양 역시 가수분해물이 높은 것으로 나타났다.

<44> <실험예 2: 진세노사이드 함량 측정>

<45> 상기 비교예 1 및 실시예 1 내지 5에 따라 제조된 각 농축액 1g을 평량하여 70% 에탄올 50 mL을 가하여 80℃ 진탕 배양기에서 2회 추출하고 Whatman #1 paper를 이용하여 여과하였다. 여액은 진공농축기를 이용, 감압 건조하고 50 mL의 증류수를 가하여 용해하였다. 이 용액 1 mL에 디에틸에테르 2 mL을 가하여 혼합한 후, 1500 rpm에서 10분간 원심분리하여 디에틸에테르를 제거하고 여기에 다시 물포화 부탄올을 1.5 mL 가하여 혼합한 다음 부탄올층을 회수하였다. 3회 재 반복하여 회수한 부탄올층에 증류수 1.5 mL을 가하여 혼합하고 원심분리하여 물층을 제거하였으며 본 조작을 2회 재반복하여 수용성 불순물을 세척하였다. 이렇게 얻어진 부탄올층은 40℃에서 N₂ 가스를 분사하며 건조하였으며 여기에 메탄올 0.5 mL을 가한 후, 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. HPLC 분석은 Prevail Carbohydrate ES 5 μ column(Alltech, USA)이 장착된 HPLC를 이용, ELSD로 분석하였으며 하기 표 3 및 표 4(그라디언트 테이블)에 표시한 바와 같은 조건에서 수행하였다. 한편 진세노사이드 분석 시에는 엠보연구소(대덕, 한국)에서 구입한 14종의 표준물질(compound K, Rh2, Rh1, Rg5, Rk1, Rg2, Rg3, Rg1, Rf, Re, Rd, Rb2, Rc, Rb2)을 이용하여 표준곡선을 작성하고 각 피크 면적비로부터 함량을 계산하였다.

표 3

<46>

기기들	SP930D Solvent delivery pump SDV50A Vacuum degasser and valve module CTS 30 Column oven (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
검출기	ELSD (GmbH, Germany)
컬럼	Prevail Carbohydrate ES 5 μ , 250 \times 4.6 mm (Alltech, USA)
오븐 온도	35℃
용매	A (Acetonitrile : Water : IPA = 80 : 5 : 15) B (Acetonitrile : Water : IPA = 67 : 21 : 12)
주입 부피	20 μ l

표 4

Time (min)	Flow (ml/min)	%A	%B
초기(Initial)	0.8	90	10
28	0.8	15	85
35	0.8	20	80
45	0.8	25	75
50	0.8	10	90
51	0.8	0	100
57	0.8	75	25
58	0.8	90	10
65	0.8	90	10

그 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

진세노사이드	concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	비교예 1 (control)	실시예 1 (Ultraflo L)	실시예 2 (Rapidase)	실시예 3 (Viscozyme)	실시예 4 (Cytolase)	실시예 5 (Econitase)
Rh2						
Rh1						
Rg2	292.92	123.15	1027.34	374.33	1444.25	516.83
Rg3	49.34	222.31	182.21	132.55	271.09	238.85
Rg1	2369.73	103.55	5087.37	2863.61	5528.22	3372.65
Rf	492.43	142.07	1257.42	858.56	1125.46	1373.97
Re	4514.99	116.61	9779.11	7355.22	7612.66	11388.15
Rd	3472.62	158.24	6040.91	4762.92	20347.8	3787.97
Rc+Rb2	2729.64	192.35	20572.44	3726.69	26762.88	12206.30
Rb1	4889.36	129.62	10209.58	8150.15	10074.82	10669.09

상기 표 5에 나타난 바와 같이, 항암 효과가 높은 Rg2의 함량은 실시예 2(rapidase)와 실시예 4(cytolase) 가수분해물에서 각각 1027.34 $\mu\text{g/mL}$ 와 1444.25 $\mu\text{g/mL}$ 로 비교예 1(cotrol)의 292.92 $\mu\text{g/mL}$ 보다 높은 함량을 보였다. 또한 Rg3의 함량은 비교예 1(control)이 49.34 $\mu\text{g/mL}$ 인 반면, 모든 가수분해물이 132.55-271.09 $\mu\text{g/mL}$ 으로 높은 함량을 보였다. Rb1의 함량은 비교예 1(control)은 4889.36 $\mu\text{g/mL}$ 인 반면, 실시예 1(Ultraflo L)을 제외한 가수분해물은 8150.15-10669.09 $\mu\text{g/mL}$ 의 높은 함량을 보였다. 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc가 많이 함유한 백삼의 경우에는 컴파운드 K가 혈액 중으로 많이 이행될 수 있다.

<실시예 6 내지 실시예 9: 다양한 효소 조합에 의한 홍삼 가수분해물의 제조1>

상기 실시예 1 내지 5에서 사용된 가수분해 효소 중 진세노사이드 생산이 우수하였던 Rapidase, Cytolase 및 Viscozyme을 다양하게 조합하여 사용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1 내지 5와 동일하게 하여 농축액을 얻었다.

<실험예 3: 총당, 산성당, 건물량의 측정 2>

상기 실시예 6 내지 9에 따라 얻어진 각 농축액에 대하여 총당, 산성당, 건물량을 상기 실험예 1과 동일한 조건 하에서 측정하였다. 그 결과는 하기 표에 나타내었다.

표 6

<55>

시료	효소	효소 첨가량(μl)	총당(mg/ml)	산성당($\mu\text{g/ml}$)	폴리페놀($\mu\text{g/ml}$)	건물양 (%)
비교예 2	control	0	138.83 \pm 8.34 ^c	152.16 \pm 41.32 ^b	341.35 \pm 7.04 ^c	9.05 \pm 0.18 ^c
실시예 6	Rap+Visco+Cytol	100+100+100	223.36 \pm 68.71 ^b	2646.28 \pm 238.02 ^a	561.33 \pm 32.60 ^{ab}	14.83 \pm 0.24 ^a
실시예 7	Rap+Visco	150+150	210.98 \pm 15.06 ^b	2575.69 \pm 255.69 ^a	591.30 \pm 18.35 ^a	15.07 \pm 0.49 ^a
실시예 8	Rap+Cytol	150+150	199.31 \pm 28.37 ^b	2507.06 \pm 123.95 ^a	518.32 \pm 30.49 ^b	14.33 \pm 0.42 ^b
실시예 9	Visco+Cytol	150+150	228.60 \pm 4.76 ^a	2540.39 \pm 207.25 ^a	583.89 \pm 27.50 ^a	14.67 \pm 0.46 ^{ab}

<56>

상기 표 6에 나타난 바와 같이 총당의 함량은 Viscozyme과 Cytolase를 혼합 사용시(실시예 9) 가장 높은 228.60 mg/ml의 함량을 보였으며, 산성당의 함량은 비교예 2에 비하여 효소를 혼합 사용하여 얻은 가수분해물의 함량이 2507.06-2646.28 $\mu\text{g/ml}$ 로 높은 함량을 보였다. 폴리페놀의 함량은 Rapidase+Viscozyme (실시예 7)와 Viscozyme+Cytolase (실시예 9)를 혼합 사용하여 얻은 가수분해물이 각각 591.30과 583.89 $\mu\text{g/ml}$ 의 함량을 보였다.

<57>

<실험예4: 진세노사이드 함량 측정 2>

<58>

상기 실시예 6 내지 9에 따라 얻어진 각 농축액에 대하여 진세노사이드 함량 변화를 상기 실험예 2와 동일한 조건 하에서 측정하였다. 그 결과는 하기 표에 나타내었다.

표 7

<59>

분획 (fraction)	농도 (ppm)(/mL)				
	비교예 2(control)	실시예 6(Rap+Visco+Cytol)	실시예7(Rap+Visco)	실시예 8(Rap+Cytol)	실시예 9(Visco+Cytol)
Rh2	0.0	89.3	0.0	0.0	0.0
Rh1	99.1	95.6	0.0	0.0	0.0
Rg2	292.9	372.7	334.0	200.7	348.9
Rg3	49.34	106.7	106.4	1014.6	104.5
Rg1	2369.73	2078.5	1654.5	0.0	1799.4
Rf	492.43	855.5	833.0	440.3	896.3
Re	4514.99	4506.9	4102.1	2522.8	5792.9
Rd	3472.62	5645.3	4087.6	3677.1	7747.8
Rc	5708.8	5029.8	4649.4	2881.5	6404.8
Rb2	3100.2	2736.1	2532.1	1584.0	3473.4
Rb1	4889.4	10566.5	9343.8	6583.7	12636.1

<60>

상기 표 7에 나타난 바와 같이, Rapidase+Viscozyme+Cytolase 혼합 사용시(실시예 6) Rg2함량이 가장 높았으며, Rg3의 함량은 Rapidase+Cytolase 혼합 사용시(실시예 8) 가장 높은 함량을 보였다. 또한 Rb1의 함량은 Viscozyme+Cytolase 혼합 사용시(실시예 9) 가장 높았다.

<61>

<실시예 10 내지 실시예 16>

<62>

Rapidase, Viscozyme, Cytolase, Econase를 다양하게 조합시켜 가수분해시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1 내지 5와 같이 하여 농축액을 제조하였다.

<63> <실험예 5: 총당, 산성당, 건물양의 측정 3>

<64> 상기 실시예 10 내지 16에 따라 제조된 농축액에 대하여 상기 실험예 1에서와 같이 총당, 산성당, 건물양을 측정하였다. 그 결과는 하기 표와 같다.

표 8

<65>

시료	효소	효소 첨가량(μl)	총당 (mg/ml)	산성당 ($\mu\text{g/ml}$)	폴리페놀 ($\mu\text{g/ml}$)
비교예 3	control	0	103.12 \pm 14.18 ^c	239.39 \pm 37.88 ^d	346.3 \pm 7.8 ^c
실시예 10	Rap+Visco+Cytol	100+100+100	191.45 \pm 10.41 ^{ab}	988.89 \pm 31.54 ^{ab}	752.1 \pm 45.0 ^a
실시예 11	Rap+Cytol	150+150	178.12 \pm 15.41 ^b	776.77 \pm 88.78 ^{bc}	694.6 \pm 11.3 ^b
실시예 12	Rap+Visco+Cytol+Eco	100+100+100+100	193.83 \pm 14.31 ^{ab}	706.06 \pm 124.02 ^c	758.1 \pm 28.6 ^a
실시예 13	Visco+Cytol+Eco	100+100+100	170.98 \pm 35.75 ^b	1195.96 \pm 97.41 ^a	787.3 \pm 40.4 ^a
실시예 14	Rap+Cytol+Eco	100+100+100	213.60 \pm 12.32 ^a	842.42 \pm 136.36 ^{bc}	731.3 \pm 28.4 ^{ab}
실시예 15	Eco+Cytol	100+100+100	185.74 \pm 19.59 ^{ab}	988.89 \pm 201.77 ^{ab}	750.3 \pm 23.3 ^a
실시예 16	Eco+Rap	150+150	159.79 \pm 14.50 ^b	312.12 \pm 138.87 ^d	735.8 \pm 29.1 ^{ab}

<66> 상기 표 8에 나타나 있는 것과 같이, 총당 함량은 Rapidase+Cytolase+Econase 혼합 사용시(실시예 14) 213.60 mg/ml 가장 높았으며, 산성당의 함량은 Viscozyme+Cytolase+Econase 혼합 사용시(실시예 13) 1195.96 $\mu\text{g/ml}$ 으로 가장 높았다. 폴리페놀의 함량은 Rapidase+Viscozyme+Cytolase+Econase (실시예 12)와 Viscozyme+Cytolase+Econase 혼합 사용시(실시예 13) 758.1과 787.3 $\mu\text{g/ml}$ 으로 가장 높았다.

<67> <실험예 6: 진세노사이드 함량 측정 3>

<68> 상기 실시예 10 내지 16에 따라 제조된 농축액에 대하여 상기 실험예 2에서와 같은 조건 하에서 진세노사이드의 함량을 측정하였다. 그 결과는 하기 표와 같다.

표 9

<69>

진세노사이드	농도($\mu\text{g/mL}$)							
	비교예 3	실시예 10	실시예 11	실시예 12	실시예 13	실시예 14	실시예 15	실시예 16
컴파운드 K	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rh2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rh1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rg5+RK1	0.00	0.00	190.38	197.77	207.76	265.55	259.94	285.48
Rg2	228.98	178.12	316.62	289.37	249.09	272.84	303.42	293.83
Rg3	0.00	83.17	0.00	0.00	81.32	111.94	0.00	80.90
Rg1	1087.48	939.05	1449.70	1235.31	1202.06	1362.42	1416.78	1295.23
Rf	559.98	276.55	704.78	611.30	565.82	673.77	694.29	710.31
Re	3924.71	2734.65	3698.03	3429.60	3466.66	3900.17	3911.28	4109.67
Rd	2753.69	2915.00	5123.51	3705.41	3720.15	4705.33	5254.44	4363.35
Rb2+Rc	3285.67	2485.61	2978.58	2748.83	2771.10	3430.73	3662.56	4076.86
Rb1	6284.28	6113.00	6661.03	6487.81	6238.48	8355.04	8873.24	9193.84

<70> 상기 표 9에 나타난 바와 같이, Rg2의 함량은 Rapidase+Cytolase (실시예 11), Econase+Cytolase (실시예 15)와 Econase+Rapidase (실시예 16)의 혼합 사용시 각각 316.62, 303.42, 293.83 $\mu\text{g/mL}$ 로 높은 함량을 보였으며, Rg3의 경우 Rapidase+Cytolase+Econase (실시예 14)가 가장 높은 111.94 $\mu\text{g/mL}$ 의 함량을 보였다. Rb1은 Rapidase+Cytolase+Econase (실시예 14), Econase+Cytolase(실시예 15), Econase+Rapidase (실시예 16) 혼합

사용시 각각 8355.04, 8873.24, 9193.84 $\mu\text{g/mL}$ 의 함량을 보였다.

<71> <실시에 17 내지 21: 감마 사이클로텍스트린이 첨가된 조성물>

<72> 상기 실시예 1 내지 5에 따라 제조된 각 홍삼 농축액에 농축액 100 중량부에 대하여 7중량부에 해당하는 감마 사이클로텍스트린인 Cavamax® W8 food(WACKER, Germany)을 더 첨가하였다.

<73> 이하 본 발명의 조성물을 제형예를 들어 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아니라 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<74> <제형예 1: 연질 캡셀제>

<75> 상기 실시예 1 내지 5에 따라 제조된 홍삼농축액 50mg, L-카르니틴 80~140mg, 대두유 180mg, 팜유 2mg, 식물성 경화유 8mg, 황납 4mg 및 레시틴 6mg을 혼합하고, 통상의 방법에 따라 1캡슐당 400mg씩 충전하여 연질캡셀을 제조하였다.

<76> <제형예 2: 정제>

<77> 상기 실시예 17 내지 21에 따라 제조된 홍삼농축액 50mg, 갈락토올리고당 200mg, 유당 60mg 및 맥아당 140mg을 혼합하고 유동층 건조기를 이용하여 과립한 후 당 에스테르(sugar ester)를 6mg을 첨가하여 타정기로 타정하여 정제를 제조하였다.

<78> <제형예 3: 과립제>

<79> 상기 실시예 1 내지 5에 따라 제조된 홍삼농축액 50mg, 무수결정 포도당 250mg 및 전분 550mg을 혼합하고, 유동층 과립기를 사용하여 과립으로 성형한 후 포에 충전하였다.

<80> <제형예 4: 드링크제>

<81> 상기 실시예 17 내지 21에 따라 제조된 홍삼농축액 50mg, 포도당 10g, 구연산 0.6g, 및 액상 올리고당 25g을 혼합한 후 정제수 300ml를 가하여 각 병에 200ml씩 충전한다. 병에 충전한 후 130℃ 에서 4~5 초간 살균하여 음료를 제조하였다.

<82> <제형예 5: 카라멜 제형>

<83> 상기 실시예 17 내지 21에 따라 제조된 홍삼농축액 50mg, 옥수수 시럽(corn syrup) 1.8g, 탈지우유 0.5g, 대두 레시틴 0.5g, 버터 0.6g, 식물성 경화유 0.4g, 설탕 1.4g, 마가린 0.58g, 및 식염 20mg을 혼합하여 카라멜 성형을 하였다.