



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월02일
(11) 등록번호 10-1711383
(24) 등록일자 2017년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/00 (2016.01) A23L 1/30 (2006.01)
A23L 5/10 (2016.01) A23L 5/20 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/00 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0181602
(22) 출원일자 2015년12월18일
심사청구일자 2015년12월18일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130010042 A*
KR100143282 B1
KR101371636 B1
김염 외 6인, '새로운 자동 구증구포방법에 의한 인삼사포닌의 변환 및 이화학적 특성', 2012, 한국자원식물학회지, 제25권, 제4호, 1-9면.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 금산국제인삼약초연구소
충청남도 금산군 금산읍 인삼광장로 25
(72) 발명자
손미례
충청남도 금산군 금성면 금산로 1570, 908 (금성아파트)
김도연
대전광역시 동구 용운로 80, 317동 702호 (용운동, 용방마을아파트)
김영수
서울특별시 광진구 아차산로57길 9, 303호 (구의동)
(74) 대리인
특허법인 참좋은

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **흑삼의 표준화 소재 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 표준화 소재**

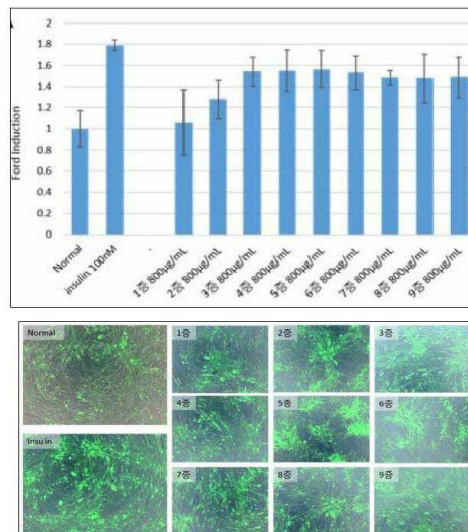
(57) 요약

본 발명은 규격화된 금산흑삼의 표준화 방법 및 상기 방법으로 표준화된 표준화 소재에 관한 것이다.

본 발명에 따른 수삼을 90~96 ℃의 온도에서 3~5시간 건조하는 단계; 상기 건조된 수삼을 45~55℃에서 36~48시간 동안 증숙하는 단계; 상기 증숙된 수삼을 40~60℃에서 2~4시간 동안 건조하는 단계; 상기 건조 단계 및 증숙 단

(뒷면에 계속)

대표도 - 도9



계를 5-9회 반복하여 규격화된 흑삼을 제조하는 단계; 70% 에탄올로 상기 흑삼을 1차 추출하여 1차 추출물을 제조하는 단계; 70% 에탄올로 상기 1차 추출 후 남은 흑삼을 2차 추출하여 2차 추출물을 제조하는 단계; 상기 1차 및 2차 추출물을 여과, 혼합 및 농축하여 농축물을 제조하는 단계; 및 상기 농축물을 동결건조하여 분말 형태로 표준화 소재를 제조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 규격화된 금산흑삼의 표준화 방법에 관한 것이다.

상기 규격화된 흑삼은, 기준치 이하 벤조피렌을 함유하거나 아예 벤조피렌을 함유하지 않으며, 항산화 효과를 보유하고 있으며 또한 인체에 유익한 미량 진세노사이드가 증진되어서 함유되어 있는 특징을 보유하고 있다.

상기 표준화 소재는, 유전독성이 없고 또한 혈당을 조절할 수 있는 효능을 보유하고 있다.

(52) CPC특허분류

A23L 5/13 (2016.08)

A23L 5/21 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

A23V 2250/2124 (2013.01)

A23V 2300/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

수삼을 90~96 ℃의 온도에서 3~5시간 1차 건조하는 단계;
 상기 건조된 수삼을 90~96℃에서 3~5시간 동안 증숙하는 단계;
 상기 증숙된 수삼을 50~60℃에서 36~48시간 동안 2차 건조하는 단계; 및
 상기 증숙 단계 및 2차 건조 단계를 5~9회 반복하는 단계;로 제조되는 흑삼을 규격화된 흑삼으로 정의하고,
 70% 에탄올로 상기 규격화된 흑삼을 1차 추출하여 1차 추출물을 제조하는 단계;
 70% 에탄올로 상기 1차 추출 후 남은 흑삼을 2차 추출하여 2차 추출물을 제조하는 단계;
 상기 1차 및 2차 추출물을 여과, 혼합 및 농축하여 농축물을 제조하는 단계; 및 상기 농축물을 동결건조하여 분말 형태로 흑삼 소재를 가공하는 단계;로 제조되는 흑삼 소재를 흑삼 표준화 소재로 정의하되,
 상기 증숙 단계 및 2차 건조 단계를 7~9회 반복할 경우의 규격화된 흑삼에는 벤조피렌 함량이 아예 포함되어 있지 않고,
 상기 증숙 단계 및 2차 건조 단계를 5~9회 반복할 경우의 규격화된 흑삼은 진세노사이드 Rg5, Rk1 및 Rh4를 10.5~14.3 mg/g 함유하며,
 상기 흑삼 표준화 소재는, 총 폴리페놀 함량이 15~23 mg/g 이고, 유전독성이 없으며, 900 mg/kg(마우스 체중기준, 경구투여 기준) 복용하였을 때 혈당 강하가 16%인 것을 특징으로 하는, 흑삼 표준화 소재의 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 기재된 방법으로 제조된 흑삼 표준화 소재.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 규격화된 금산흑삼의 표준화 방법 및 상기 방법으로 표준화된 표준화 소재(GBG05-FF)에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 수삼을 90~96℃의 온도에서 3~5시간 건조하는 단계; 상기 건조된 수삼을 45~55℃에서 36~48시간 동안 증숙하는 단계; 상기 증숙된 수삼을 40~60℃에서 2~4시간 동안 건조하는 단계; 상기 건조 단계 및 증숙 단계를 5~9회 반복하여 규격화된 흑삼을 제조하는 단계; 70% 에탄올로 상기 흑삼을 1차 추출하여 1차 추출물을 제조하는 단계; 70% 에탄올로 상기 1차 추출 후 남은 흑삼을 2차 추출하여 2차 추출물을 제조하는 단계; 상기 1차 및 2차 추출물을 여과, 혼합 및 농축하여 농축물을 제조하는 단계; 및 상기 농축물을 동결건조하여 분말 형태로 표준화 소재를 제조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 규격화된 금산흑삼의 표준화 방법에 관한 것이다.

[0003] 상기 규격화된 흑삼(GBG05)은, 기준치 이하 벤조피렌을 함유하거나 아예 벤조피렌을 함유하지 않으며, 항산화 효과를 보유하고 있으며 또한 인체에 유익한 미량 진세노사이드가 증진되어서 함유되어 있는 특징을 보유하고 있다.

[0004] 상기 표준화 소재(GBG05-FF)는, 유전독성이 없고 또한 혈당을 조절할 수 있는 효능을 보유하고 있다.

배경 기술

[0006] 일반적으로 수삼은 복수 회에 걸친 증숙 및 건조 과정을 통해 붉은 색깔을 가지게 되는 홍삼 단계를 거치게 되며, 홍삼을 재차 복수 회에 걸쳐 증숙 및 건조시키면 검정색을 가지게 되는 흑삼으로 변하게 된다.

[0007] 이러한 홍삼 및 흑삼은 복수 회에 걸친 증숙 및 건조하는 과정을 통해 수삼의 약리작용의 변화로 인해 수삼과 비교하여 홍삼 내 활성성분 함량이 뛰어난 것으로 알려져 있으며, 흑삼의 경우에도 홍삼을 재차 복수 회에 걸쳐 증숙 및 건조 시키는 공정을 통해 홍삼에는 적게 포함된 미량진세노사이드 성분이 더욱 강화되는 것으로 알려져 있다.

[0008] 진세노사이드(Ginsenoside)는 인삼에 있는 사포닌으로 최근 항암, 항산화, 콜레스테롤 저하효과가 밝혀지면서 생리활성물질로 각광받기 시작했다. 인삼 사포닌은 다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다른 특이한 화학구조를 가지고 있으며 약리효능도 특이하여 인삼(Ginseng) 배당체(Glycoside)란 의미로 '진세노사이드'라 불린다.

[0010] 그러나 수삼을 홍삼 및 흑삼으로 변화시키기 위한 과정 중 특히 수회에 걸친 고온에서의 증숙 또는 건조와 같은 열처리 단계에서 인체에 유해한 벤조피렌(benzopyrene)이 발생할 수 있다.

[0012] 따라서 본 출원인은 벤조피렌을 저하하면서 미량 진세노사이드를 다량으로 함유시킬 수 있는 금산 흑삼의 규격화 방법을 연구하여 본 발명을 완성하였다.

[0014] 또한, 본 출원인은 규격화된 금산흑삼을 이용하여 표준화하여 표준화 소재를 제조하기 위하여 표준화 소재의 혈당 조절 효능에 대해 연구하여 본 발명을 완성하였다.

[0016] 이하, 본 발명과 관련된 선행기술에 대하여 간략하게 살펴본다. 등록특허공보 제10-1093899호에는 복수 회에 걸쳐 높은 온도에서 수증기로 찌는 증숙 및 열풍 건조기 내에서 고온으로 건조하는 단계에서 발생하는 인체에 유해한 발암물질의 일종인 벤조피렌을 감소시키는 홍삼 및 흑삼의 제조방법에 대해 기재되어 있다.

[0017] 그러나 상기 선행기술은 홍삼 및 흑삼의 제조방법에 대해서만 기재하고 있을 뿐 증숙 횟수에 따른 진세노사이드의 종류별 함량과 증포별 벤조피렌 변화 값에 대해서는 알 수 없는 문제점이 있다.

[0018] 따라서 진세노사이드의 종류가 다양하게 함유되고 특히 미량 진세노사이드의 함량이 증진된 항산화 효능을 보유한 흑삼의 제조 방법은 알 수 없는 문제점이 있다.

[0020] 또한 등록특허공보 제10-1027707호에는 구증구포홍삼 농축액과 이를 이용한 당대사조절강화 기능성 식품의 제조 방법이 기재되어 있다. 개략적으로 살펴보면, 청구항 1에는 1차 증숙-2차 건조 - 2차 증숙 - 3차 건조 - 추출 과정을 6회 이상 반복하여 추출물을 얻는 것이 기재되어 있다.

[0021] 그러나 상기 선행기술은 2증포한 추출물을 반복적으로 획득하는 것에 대해서만 기재하고 있을 뿐으로서, 3증 이상의 증숙 횟수에 따른 혈당 조절 효능에 대해서는 알 수 없는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0023] (특허문헌 0001) 등록특허공보 제10-1093899호(2011.12.13.)

(특허문헌 0002) 등록특허공보 제10-1027707호(2011.04.12.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0024] 본 발명은 위와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 규격화된 금산흑삼의 표준화 방

법 및 상기 방법으로 표준화된 표준화 소재를 제공하는 것이다.

[0025] 본 발명의 목적은 벤조피렌의 발생이 억제되고, 진세노사이드의 함량이 증가하면서도 다종의 미량 진세노사이드를 함유하는 향산화 효능을 보유한 규격화된 금산흑삼의 표준화 방법 및 상기 방법으로 표준화된 표준화 소재를 제공하는 것이다.

[0026] 본 발명의 목적은 증숙 횟수 및 추출방법에 따른 향산화 효과를 측정함으로써 효율적인 규격화 방법을 도출한 향산화 효능을 보유한 규격화된 금산흑삼의 표준화 방법 및 상기 방법으로 표준화된 표준화 소재를 제공하는 것이다.

[0027] 본 발명의 목적은 규격화된 금산흑삼(GBG05)을 이용하여 유전독성이 없고 혈당 조절 효능을 보유한 표준화 소재(GBG05-FF)를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0029] 본 발명은, 수삼을 90~96 °C의 온도에서 3~5시간 건조하는 단계; 상기 건조된 수삼을 45~55°C에서 36~48시간 동안 증숙하는 단계; 상기 증숙된 수삼을 40~60°C에서 2~4시간 동안 건조하는 단계; 상기 건조 단계 및 증숙 단계를 5~9회 반복하여 규격화된 흑삼을 제조하는 단계; 70% 에탄올로 상기 흑삼을 1차 추출하여 1차 추출물을 제조하는 단계; 70% 에탄올로 상기 1차 추출 후 남은 흑삼을 2차 추출하여 2차 추출물을 제조하는 단계; 상기 1차 및 2차 추출물을 여과, 혼합 및 농축하여 농축물을 제조하는 단계; 및 상기 농축물을 동결건조하여 분말 형태로 표준화 소재를 제조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 규격화된 금산흑삼의 표준화 방법을 제공함으로써, 기술적 과제를 해결하고자 한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 향산화 효능을 보유한 금산흑삼은 벤조피렌의 발생이 억제되고, 미량 진세노사이드의 함량이 증가하면서도 다종의 진세노사이드를 함유하는 효능을 보유하고 있다.

[0032] 본 발명에 따른 향산화 효능을 보유한 금산흑삼은 증숙 횟수 및 추출방법에 따른 향산화 효과를 측정함으로써 효율적인 규격화 방법을 도출한 효능을 보유하고 있다.

[0033] 본 발명에 따른 향산화 효능을 보유한 금산흑삼은 진세노사이드 Rg5, Rk1 및 Rh4의 함량이 증가하며, 총 페놀의 함량과 향산화 활성이 증가한 효능을 보유하고 있다.

[0034] 본 발명에 따른 표준화 소재(GBG05-FF)는 유전 독성이 없고 혈당을 강하할 수 있는 효능을 보유하고 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 증숙 횟수에 따른 금산흑삼의 색도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2는 증숙 횟수에 따른 금산흑삼 추출물에서 검출된 벤조피렌 함량을 나타낸 표이다.

도 3은 홍삼과 금산흑삼의 증숙 및 건조 횟수에 따른 진세노사이드 함량의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 5중 흑삼의 진세노사이드 함량을 분석한 그래프이다.

도 5는 증포별 금산흑삼의 총 페놀 함량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 증포별 금산흑삼의 조지방, 조단백질 및 조지방 함량 분석을 나타낸 표이다.

도 7은 물을 용매로 사용하여 표준화 방법으로 제조된 시료의 증포별 유전독성을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 표준화 소재의 증포별 유전독성을 실험한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 표준화 소재의 혈당 흡수율을 실험한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 표준화 소재의 동물 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12는 5중 흑삼을 이용하여 제조된 표준화 소재의 진세노사이드 함량을 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 명세서 및 청구 범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [0039] 따라서 본 명세서에 기재된 실시예, 참조예 및 도면에 기술된 사항은 본 발명의 가장 바람직한 일 예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0041] **실시예 1. 항산화 효능을 보유한 금산흑삼의 규격화 방법**
- [0043] 1) 세척 및 1차 건조단계
- [0044] 재료(수삼 및 진삼 등)를 채취하여 흙 또는 이물질을 제거하는 세척작업을 실행한 뒤 세척된 재료의 몸체와 미삼을 구분하여 건조시킨다.
- [0045] 이때 건조는 감압건조, 동결건조, 양건조, 음건조 및 진공건조 등 다양한 건조 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 원적외선건조 방법을 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 여기에서 상기 건조 온도는 다양하게 설정될 수 있으나 바람직하게 90℃~96℃의 온도로 3시간 내지 5시간 건조가 수행될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 2) 증숙 단계
- [0049] 상기 1)의 과정에서 건조된 재료를 증숙기에 넣고 수증기를 이용하여 증숙한다.
- [0050] 증숙기는 무압식, 가압식 또는 상압식 증숙기 등이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 무압식 증숙기가 사용될 수 있다.
- [0051] 무압식 증숙기를 이용한 증숙은 재료가 압력으로 인해 터지는 것을 막아 품질이 좋은 흑삼을 제조할 수 있으며, 과습으로 재료의 유효성분이 누출되는 것을 막는다.
- [0052] 가압증숙 온도는 다양하게 설정될 수 있으며, 바람직하게는 90℃~96℃에서 3시간에서 5시간동안 가압증숙이 수행될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 3) 2차 건조 단계
- [0055] 상기 2)의 과정에서 증숙한 재료를 건조한다.
- [0056] 이때 건조 방법은 상기 1)에 기재한 방법과 같이 다양한 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 진공건조 방법을 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 건조 온도 및 시간은 설계 조건에 따라 다양하게 설정될 수 있으며, 바람직하게는 50~60℃에서 36~48시간 동안 건조가 수행될 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 이때 건조는, 재료의 잔류 수분 함량이 바람직하게는 흑삼 전체 성분 내의 15% 이하가 되도록 할 수 있다.
- [0060] 한편, 상술된 2차 건조 후 증숙단계가 반복되어 증숙 단계 및 2차 건조 단계가 반복 수행될 수 있는데, 상기 반복이 수행되는 횟수에 따라 1증포 내지 9증포로 지칭한다.
- [0061] 이때, 증숙과 건조를 반복함으로써 점차 색이 검어질 수 있다.
- [0063] 이상의 상술된 과정을 통해 규격화된 금산흑삼(GBG05)을 얻을 수 있는데, 이때 'GBG05'는 본 출원인인 금산국제인삼약조연구소에서 규격화된 금산흑삼에 대해 GBG05라고 정하고 있어 본 명세서에 병기한 것이다.
- [0065] **실시예 2. 규격화된 금산흑삼의 표준화 방법**
- [0067] 실시예 1에 따른 규격화 방법에 의해서 제조된 금산흑삼 소재를 이용하여 다음의 단계를 수행하여 표준화 소재(GBG05-FF)를 제조한다.
- [0069] 4) 1차 추출물 제조단계
- [0070] 규격화된 금산흑삼을 선별 및 검수하여 추출할 준비를 한다.
- [0071] 이후에 50~90% 에탄올을 이용하여 금산흑삼을 1차 추출한다. 투입되는 금산흑삼의 부피 대비 8~12배의 에탄올을 투입하여, 50~80℃에서 18~30시간 동안 추출한다. 바람직하게는, 70% 에탄올을 흑삼 부피 대비 10배 정도를 투

입하여 70℃에서 24시간 추출한다.

[0073] 5) 2차 추출물 제조단계

[0074] 1차 추출물 제조단계와 실질적으로 동일하게 1차 추출 후 남은 흑삼에 대해서 2차 추출하여 2차 추출물을 제조한다. 즉 1차 추출 후 남은 흑삼의 부피 대비 8~12배의 에탄올을 투입하여, 50~80℃에서 18~30시간 동안 추출한다. 바람직하게는, 70% 에탄올을 1차 추출 후 남은 흑삼 부피 대비 10배 정도를 투입하여 70℃에서 24시간 추출한다.

[0076] 6) 여과, 혼합 및 농축 단계

[0077] 1차 추출물 및 2차 추출물을 각각 여과한 후에 혼합하여 농축한다.

[0078] 이때 바람직하게는 상기 여과는 100~200mesh의 여과망을 이용하며, 상기 농축은 60℃의 온도에서 감압농축될 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니며 다양하게 적용될 수 있다.

[0080] 7) 동결건조 단계

[0081] 농축물을 동결건조하여 분말 형태로 표준화 소재를 제조한다.

[0082] 다른 일례로서, 상기 동결건조 단계는 분무건조 또는 진공건조가 사용될 수도 있다.

[0084] 한편, 상기 7) 단계의 동결건조 단계 이후에는 분말 형태의 표준화 소재의 성상, 건조중량 및 지표물질 함량에 대해 시험을 진행할 수 있다.

[0085] 이는 본 발명의 흐름을 쉽게 이해하기 위해 시험 단계로 지칭할 수 있으며, 이 시험 단계를 거쳐 상기 성상, 건조중량 및 지표물질 함량을 충족하면 표준화 소재(GBG05-FF)로 채택할 수 있다.

[0086] 여기서 표준화 소재를 'GBG05-FF'로 지칭하는 것은, 본 출원인인 금산국제인삼약초연구소에서 표준화소재에 대해 GBG05-FF로 정하고 있어 본 명세서에서 병기한 것이다.

[0088] **실험예 1. 증포별 흑삼의 색도 분석**

[0090] 1) 실험과정

[0091] 실시예 1를 기반으로 제조된 흑삼을 실험 재료로 사용하되, 증숙 횟수에 따라 각각의 흑삼을 제조하였다.

[0093] 흑삼의 증포별 색 변화 측정방법은 시료를 미세하게 분쇄한 후, 분광측색계 KONICA MINOLTA (Model No. CM2500D)를 이용하여 측정과장범위(360mm~740mm)에서 SCI(정반사포함) 값으로 3회 측정하였고 CIE 규격에 맞추어 측정하였으며, L*값, a*값 및 b*값을 각각 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

[0094] 여기에서 상기 L*은 명도, a*는 적색, b*는 황색의 강도를 표시한다.

[0096] 2) 실험 결과

[0097] 도 1은 증포를 거듭함에 따른 흑삼의 색도 변화를 분석한 그래프이다.

[0099] 실험 결과, 증숙 전 흑삼의 명도는 68.94이며, 적색은 6.85이고, 황색은 16.08을 나타냈다. 아울러, 증포된 횟수에 따라 나타난 흑삼의 색도를 보면 아래와 같다.

[0100] 1증포 : 명도 69.09 / 적색 6.39 / 황색 21.71

[0101] 2증포 : 명도 58.52 / 적색 9.63 / 황색 19.66

[0102] 3증포 : 명도 55.30 / 적색 8.56 / 황색 17.37

[0103] 4증포 : 명도 53.88 / 적색 8.81 / 황색 16.75

[0104] 5증포 : 명도 51.85 / 적색 7.13 / 황색 14.57

[0105] 6증포 : 명도 51.04 / 적색 7.38 / 황색 14.30

[0106] 7증포 : 명도 39.98 / 적색 4.46 / 황색 3.21

[0107] 8증포 : 명도 39.63 / 적색 2.96 / 황색 2.32

[0108] 9증포 : 명도 40.60 / 적색 3.19 / 황색 2.65

- [0110] 즉, 첨부된 도면의 도 1을 참조하여 위의 기재를 보면, 대체적으로 명도는 증포를 거듭할수록 수치가 낮아짐을 알 수 있으며 이는 증포의 횟수에 따라 흑삼의 명도가 낮아서 검은색에 가까워짐을 알 수 있다.
- [0111] 다만, 1증포에 비해 2증포에서는 명도가 약간 높아졌으나, 적색 및 황색의 수치를 보면, 적색이 6.85에서 6.39로 낮아진 반면, 황색이 16.08에서 21.71로 높아진 것으로 보았을 때 색감이 어두워졌음을 의미한다.
- [0113] 3증포의 경우, 2증포보다 적색 수치가 높아지고 황색 수치가 낮아졌으나, 색도의 차이가 크게 낮아진 것으로 보아 색감이 어두워진 것을 의미한다.
- [0115] 4증포 내지 9증포에서도 보면, 점점 색도와 적색 및 황색의 수치가 낮아지는 경향을 보이므로 본 실험에서는 증포 횟수가 반복될수록 흑삼의 색감이 어두워지는 것을 알 수 있었다.
- [0117] **실험예 2. 증포별 흑삼의 벤조피렌 함량 분석**
- [0119] 1) 실험 과정
- [0120] 흑삼 중의 벤조피렌 함량 분석은 식품의약품안전청(2007) 건강기능식품(소위 흑삼) 중 벤조피렌 시험법 지침(식약청공문 건강기능성 식품규격팀-5454, 2007. 12. 31)에 근거하여 분석하였다.
- [0122] 흑삼 시료 5g을 증류수 20mℓ에 1시간 침지시킨 후 hex산을 10mℓ 주입하여 hex산층을 추출하였다.
- [0123] 추출한 흑삼의 hex산층을 감압농축기 (MG-2100, Buchi, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 MeOH 100에 녹여 GC-MS (6890series, Agilent, USA)에 주입하여 벤조피렌의 함량을 분석하였다.
- [0125] 2) 실험 결과
- [0126] 도 2는 증숙 횟수에 따른 흑삼 추출물에서 검출된 벤조피렌 함량을 나타낸 표이다.
- [0128] 실험 결과, 외부분석에 의하면 벤조피렌(ppb) 검출 값이 없는 것으로 나타났으나, 위 실험 과정에 따라 자체적으로 분석한 결과에 따르면, 1증포인 경우, 벤조피렌(ppb) 검출 값이 0.049 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 나타났고, 2증포인 경우 0.052 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3증포인 경우 0.071 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 나타났으며, 4증포인 경우 0.074 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5증포인 경우 0.061 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 6증포인 경우 0.030 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 벤조피렌 값이 검출되었다. 그러나 7증포 내지 9증포의 경우 벤조피렌 값이 검출되지 않았다.
- [0129] 또한 검출된 벤조피렌의 함량 역시 식품공전에서 제시한 기준치인 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하인 것을 확인하였다.
- [0131] 즉, 증숙 단계 및 건조 단계를 7회 이상 거친 흑삼은 벤조피렌이 함유되지 않은 것을 알 수 있었으며, 본 발명에 따른 흑삼 규격화 방법으로 규격화된 금산흑삼은 증포횟수에 관계없이 벤조피렌이 기준치 이하 생성되는 것을 알 수 있다.
- [0132] 특히 1 내지 4증포까지는 벤조피렌의 함량이 상승하다가 5증포부터는 벤조피렌의 함량이 급격하게 하강되기 시작한 것을 알 수 있다.
- [0134] **실험예 3. 증포별 홍삼 및 흑삼의 진세노사이드 함량 분석**
- [0136] 1) 실험 과정
- [0137] 진세노사이드를 추출하기 위하여 흑삼 100g을 칭량한 후 시료의 20배(v/w)에 해당하는 80% 에탄올(ethanol) 2L를 첨가하여 2시간 동안 환류 냉각하여 추출한 후 원심분리하여 상정액과 침전물을 분리하였다. 상정액은 감압농축기(Rota evaporator, Buchi Labor technik AG, Switzerland)를 사용하여 60℃에서 감압농축시켜 에탄올을 제거한 후 증류수를 첨가하여 추출액을 200mℓ가 되도록 하였다.
- [0138] 추출액은 10,000rpm, 4℃에서 20분동안 원심분리하여 상정액을 회수하였다.
- [0139] 흑삼의 80% ethanol 추출액으로부터 진세노사이드를 정제하기 위해서 Diaion HP-20 수지 흡착법(Mitsubishi Kasei, Japan)을 이용하여 분리하였다. 즉, 흑삼의 80% ethanol 추출액 200 mℓ를 0.45mm 필터로 여과한 후, Diaion HP-20 column (2.5*50cm, wet volume 100 mℓ)에 흡착시켰다. 이후 3L의 증류수와 25% ethanol로 용출하였고 최종적으로 3L의 95% ethanol로 용출하였다. 95% ethanol 용출액은 감압 농축기를 사용하여 60℃에서 감압 농축시켜 ethanol을 제거한 후 동결 건조하여 진세노사이드 시료로 사용하였다.
- [0140] 진세노사이드 분석은 HPLC-ELSD를 이용하여 실시하였다. 시료는 0.2%의 농도가 되도록 methanol을 첨가한 후, 0.2mℓ를 채취해 0.1% Internal standard(IS, Digoxin, Sigma) 0.1mℓ와 혼합하여 0.45mm 필터로 여과하여 사용

하였다. HPLC-ELSD는 ELSD detector(Polymer Laboratories, PL-ELS 2100, USA)가 장착된 Dionex HPLC(Ultimate 3000, USA)를 사용하였다. Column은 Gemini 5mm C18 column (250*4.6mm, Phenomenex, USA)를 사용하였고, 이동상은 LC급 water를 A용매로, LC급 acetonitrile을 B용매로 사용하였다. Column 온도는 35℃로 유지하였고, flow rate는 1L/min으로 시료는 10ml씩 주입하였다. Gradient 조건은 0~20분 동안 B용매를 30%에서 40%로, 20~45분 동안 40%에서 90%로 증가시켰다.

- [0142] 2) 실험 결과
- [0143] 도 3은 홍삼과 흑삼의 증숙 및 건조 횟수에 따른 진세노사이드 함량의 변화를 그래프로 나타낸 것이다. 도 4는 5증 흑삼의 진세노사이드 함량을 분석한 그래프이다.
- [0145] 홍삼은 증숙/건조를 거듭할수록 진세노사이드(Rg1, Rb1, Rg3)가 감소했고, 흑삼은 증숙/건조를 거듭할수록 진세노사이드(Rg5, Rk1, Rh4)가 증가했다.
- [0147] 이때 홍삼은 참조 수치로 표시된 것으로서, 본 발명과 연계된 흑삼을 보면, 대체적으로는 증포가 반복됨으로 인해 Rg5, Rk1 및 Rh4의 총합 함량이 증가됨을 알 수 있었다.
- [0148] 즉, 증숙 전의 흑삼에는 Rg5, Rk1 및 Rh4이 함유되어 있지 않았으나, 증포를 거듭하면서 Rg5, Rk1 및 Rh4의 함량이 점차적으로 증가되었고, 구체적으로는,
- [0149] 1증포에서 Rg5, Rk1 및 Rh4의 총합 함량이 1 내지 1.5mg/g, 2증포에서 2.2 내지 2.7mg/g, 3증포에서 5.2 내지 5.6mg/g, 4증포에서 5.7 내지 6mg/g, 5증포에서 10.5 내지 11mg/g, 6증포에서 12.5 내지 13mg/g, 7증포에서 13 내지 13.6mg/g, 8증포에서 12.8 내지 13mg/g, 9증포에서 14 내지 14.3mg/g이 나타남을 알 수 있었다.
- [0151] 위의 결과에 따르면, Rg5, Rk1 및 Rh4의 총합 함량은 증포를 거듭할수록 점차적으로 증가하는 추세를 보이며, 특히 5증포에서부터 급진적으로 증가하였음을 알 수 있다.
- [0152] 이에 따라, 증포가 반복되는 흑삼일수록 Rg5, Rk1 및 Rh4의 함량이 높아지며, 이러한 Rg5, Rk1 및 Rh4는 홍삼에 함유하는 Rg1, Rb1 및 Rg3에 비해 항산화, 인지개선능력, 피로개선, 갱년기극복, 혈액개선에 더 큰 효능을 보이므로, 도 1에서와 같이 증포에 따라 홍삼의 Rg1, Rb1 및 Rg3 함량이 감소하여도, 반대로 Rg5, Rk1 및 Rh4의 함량이 증가되기 때문에 더 큰 효과를 갖을 것으로 예상된다.
- [0154] **실험예 4. 흑삼의 폴리페놀함량 측정**
- [0156] 1) 실험 과정
- [0157] 흑삼분말 0.5g에 60% EtOH를 가하여 80℃에서 1시간 추출한 후 추출물을 여과하고 5배 희석하여 분석용 시료로 사용하였다.
- [0158] 시료 1ml와 Folin시약 1ml을 혼합하여 실온에서 3분간 정치시킨 다음 10% Na2CO3 용액 1ml을 가하여 혼합한 후, 실온에서 1시간 정치한 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0160] 2) 실험 결과
- [0161] 도 5는 증포별 흑삼의 총 페놀 함량을 나타낸 그래프이다.
- [0163] A사 홍삼은 폴리페놀함량이 6 mg/g으로 나타났고, 태극삼은 2.5 mg/g로 나타났으며, 증포별 흑삼의 폴리페놀함량은 증숙/건조 과정을 거칠수록 더 높게 측정되었다.
- [0164] 즉 총 페놀 함량은, 본 발명에 따라 규격화된 금산흑삼의 경우 증포 횟수를 거듭할 수록 증가하는 추세를 보이고 있는데, 특히 증포가 되기 전(0포)이어도 타 제품(A사 및 태극삼)에 비해 총 페놀 함량이 더 높음을 알 수 있었고, 더불어 증포 횟수가 반복될수록 상기 타제품과 총 페놀 함량의 차이가 심해짐을 알 수 있었다.
- [0165] 이러한 결과에 따라, 본 발명에 따라 규격화된 금산흑삼은 총 페놀 함량의 향상으로 인해 항산화능의 효능을 더 보유할 수 있을 것으로 기대된다.
- [0167] 특히, 5증포부터는 총 페놀함량이 급격히 증가한 것을 알 수 있는데, 이는 5증포부터 항산화 효능이 현저함을 의미하는 것이다.
- [0168] 즉, 5증포부터는 15 내지 23mg/g의 총 페놀함량을 나타냄으로써, 그 이전(4증포)까지 최대 13mg/g의 총 페놀함량을 보이던 수치에 비해 급격히 증가한 것이다.

[0170] **실험예 5. 증포별 흑삼의 일반성분 측정**

[0172] 1) 실험 과정

[0173] 증포별 흑삼의 일반성분 측정 과정은 통상적인 일반성분 측정 방법으로 실행되었다.

[0175] 2) 실험 결과

[0176] 도 6은 증포별 흑삼의 조회분, 조단백질 및 조지방 함량 분석을 나타낸 표이다.

[0178] 즉, 첨부된 도면의 도 6을 통해 본 발명에 따른 금산흑삼의 조회분, 조단백질 및 조지방에 대한 규격화 수치를 알 수 있는데, 이를 참조하면,

[0179] 0증포 : 조회분 3.92 ± 0.05 / 조단백질 14.84 ± 0.30 / 조지방 1.23 ± 0.14

[0180] 1증포 : 조회분 3.72 ± 0.01 / 조단백질 15.24 ± 0.97 / 조지방 1.41 ± 0.04

[0181] 2증포 : 조회분 3.64 ± 0.01 / 조단백질 14.83 ± 0.56 / 조지방 1.42 ± 0.05

[0182] 3증포 : 조회분 4.07 ± 0.03 / 조단백질 14.68 ± 0.40 / 조지방 1.34 ± 0.04

[0183] 4증포 : 조회분 4.39 ± 0.12 / 조단백질 13.02 ± 0.21 / 조지방 1.31 ± 0.04

[0184] 5증포 : 조회분 4.01 ± 0.10 / 조단백질 12.47 ± 0.01 / 조지방 1.29 ± 0.05

[0185] 6증포 : 조회분 3.85 ± 0.10 / 조단백질 11.23 ± 0.28 / 조지방 1.30 ± 0.02

[0186] 7증포 : 조회분 3.84 ± 0.01 / 조단백질 10.11 ± 0.35 / 조지방 1.15 ± 0.06

[0187] 8증포 : 조회분 3.92 ± 0.07 / 조단백질 10.57 ± 0.41 / 조지방 1.13 ± 0.05

[0188] 9증포 : 조회분 3.86 ± 0.07 / 조단백질 10.36 ± 0.68 / 조지방 1.07 ± 0.01 의 각 증포 횟수에 따라 규격화된 조회분, 조단백질 및 조지방에 대한 규격화 수치를 알 수 있었다.

[0189] 즉, 5증포부터 9증포까지의 조회분, 조단백질 및 조지방은 1증포부터 4증포까지의 양과 대동소이하며, 조회분, 조단백질 및 조지방의 함량에는 문제점이 없음을 알 수 있었다.

[0191] **실험예 6. 유전독성 실험**

[0193] 1) 실험과정

[0194] 유전독성 실험은 식이 소재가 유전물질인 DNA에 변화를 줄 수 있는지를 검증하는 실험으로서, DNA가 변화되면 자손에 전해져 장애가 나타날 수 있기 때문에 그 가능성을 검증하여 안전성을 제고할 수 있는 실험이다.

[0195] 본 실험에서는 쥐티프스균(*Salmonella typhimurium*)을 이용하여 유전독성을 평가하였다.

[0197] 2) 실험결과

[0198] 도 7은 실시예 2에서 에탄올 대신에 열수를 이용하여 제작한 소재를 대상으로 실험한 결과이고, 도 8은 실시예 2에 따라서 제작된 표준화 소재(GBG05-FF)를 대상으로 실험한 결과이다.

[0199] 실험결과를 살펴보면, 열수 추출을 이용한 소재와 표준화 소재(GBG05-FF) 모두 유전독성에 대해서는 문제가 없음이 입증되었다.

[0201] **실험예 7. 혈당 흡수율 실험**

[0203] 1) 실험과정

[0204] 골격근 근육세포주에서 흑삼의 증수에 따른 글루코스 업테이크를 측정하였다. 즉, 글루코스 업테이크가 세포 내로 유입되는 양을 측정하는 것이다.

[0205] 인슐린 100nM을 대조군으로 하여 표준화 소재(GBG05-FF)로 시료를 제작한 후에 실험하였다(표준화 소재 농도 800 ug/ml).

[0207] 2) 실험결과

[0208] 도 9는 표준화 소재(GBG05-FF)의 혈당 흡수율을 실험한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 9를 살펴보면, 3증 이

상을 수행한 시료군이 2중 시료군보다 급격히 혈당 흡수율이 증가하였음을 알 수 있다. 또한 3중~9중 사이의 혈당 흡수율은 대체적으로 일정하였음을 알 수 있다.

[0210] 삭제

[0211] 삭제

[0212] 삭제

[0213] 삭제

[0214] 삭제

[0215] 삭제

[0216] 삭제

[0217] 삭제

[0218] 삭제

[0219] 삭제

[0220] 삭제

[0221] 삭제

[0222] 삭제

[0223] **실험예 9. 혈당 저하율 실험(동물실험)**

[0225] 1) 실험과정

[0226] 제2형 당뇨병 모델을 이용하여 표준화 소재(GBG05-FF)의 혈당 저하율을 분석하였다. 실험방법은 통상적으로 사용되는 마우스 모델을 이용하여, 5중 표준화 소재를 고농도(900 mg/kg(체중)) 및 저농도(300 mg/kg(체중))를 경구 투여한 후에 1주 동안 혈당과 체중을 살펴보았다.

[0228] 2) 실험결과

[0229] 도 11은 표준화 소재의 동물 실험 결과를 나타내는 그래프이다. 도 11을 살펴보면, 고농도 처리군에서는 1주 후에 -29.46의 혈당 저하가 관찰되었고, 저농도 처리군에서는 1주 후에 -5.86의 혈당 저하가 관찰되었다. 즉 고농도 처리군에서는 약 16% 정도의 혈당 강하 효과가 관찰되었다.

[0231] 삭제

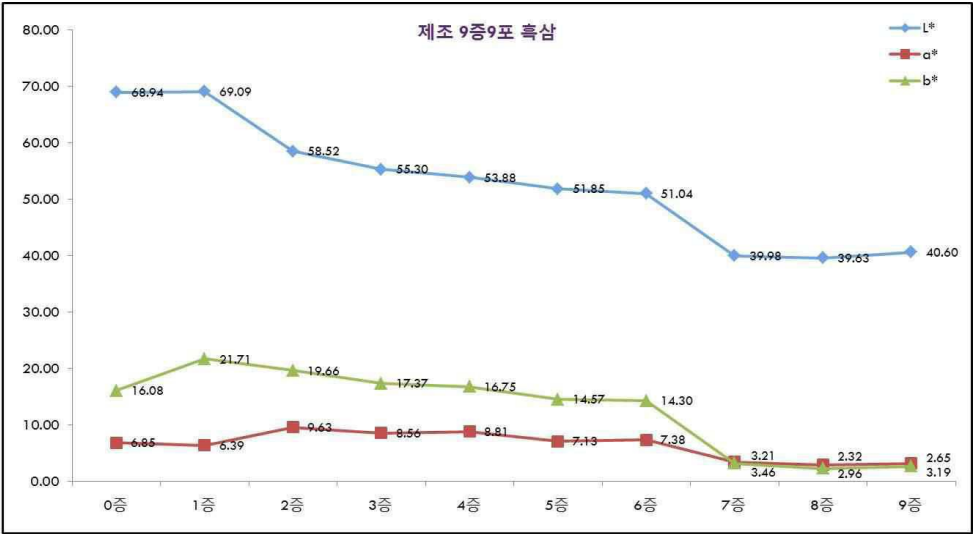
[0232] 삭제

[0233] 실험예 10. 진세노사이드 함량 분석 실험

[0235] 도 12는 5중 흑삼을 이용하여 제조된 표준화 소재의 진세노사이드 함량을 분석한 그래프이다. 도 4의 5중 금산 흑삼의 진세노사이드 함량과 비교하여 보면, 표준화 소재에 미량 진세노사이드가 증진되어 함유되었음을 확인할 수 있다.

도면

도면1



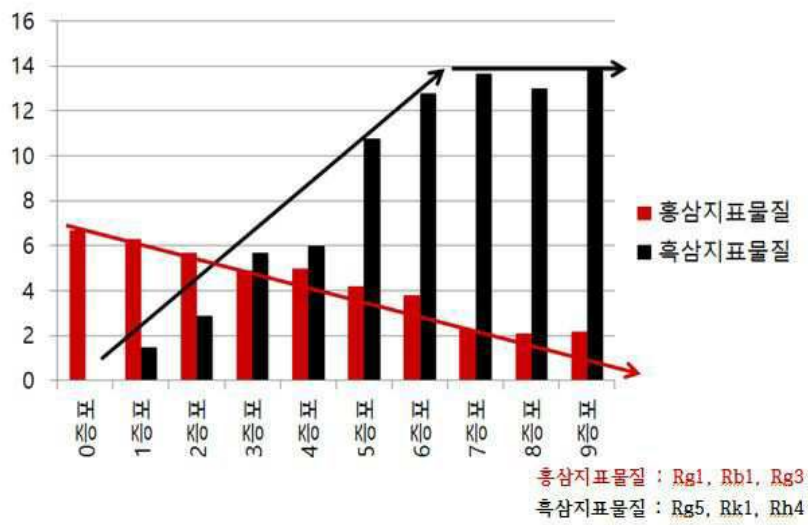
L* : Degree of Lightness, a* : Degree of redness, b* : Degree of yellowness

도면2

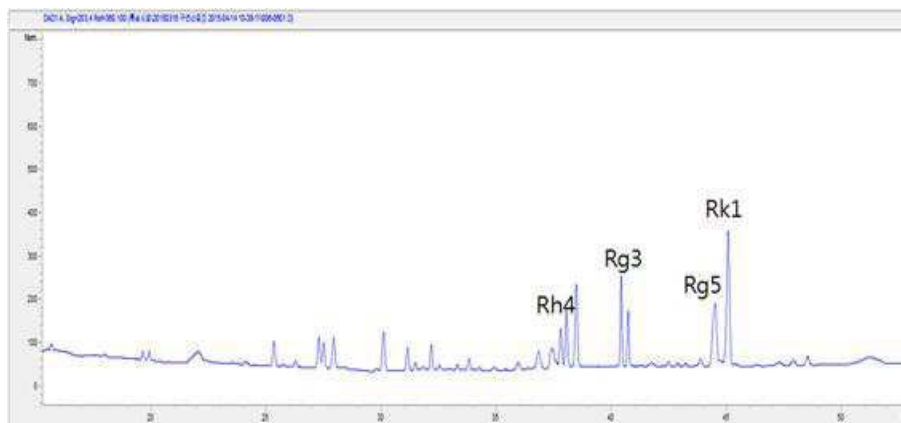
벤조피렌 (ppb)	1중	2중	3중	4중	5중	6중	7중	8중	9중
자체분석	0.049	0.052	0.071	0.074	0.061	0.030	NO	NO	NO
외부분석	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

식약처 허용기준 분말 2. 농축액 4ppb

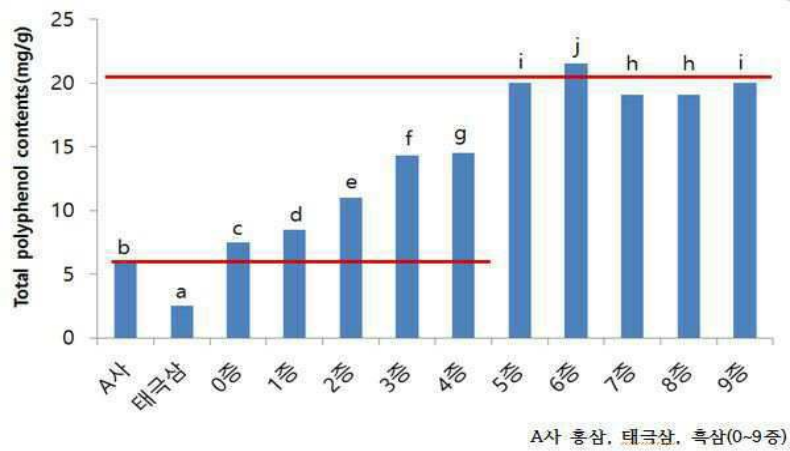
도면3



도면4



도면5



도면6

	Crude Ash(%)	Crude protein(%)	Crude fat(%)
0중	3.92±0.05	14.84±0.30	1.28±0.14
1중	3.72±0.01	15.24±0.97	1.41±0.04
2중	3.64±0.01	14.83±0.56	1.42±0.05
3중	4.07±0.03	14.68±0.40	1.34±0.04
4중	4.39±0.12	13.02±0.21	1.31±0.04
5중	4.01±0.10	12.47±0.01	1.29±0.05
6중	3.85±0.10	11.23±0.28	1.30±0.02
7중	3.84±0.01	10.11±0.35	1.15±0.06
8중	3.92±0.06	10.57±0.41	1.13±0.05
9중	3.86±0.07	10.36±0.66	1.07±0.01

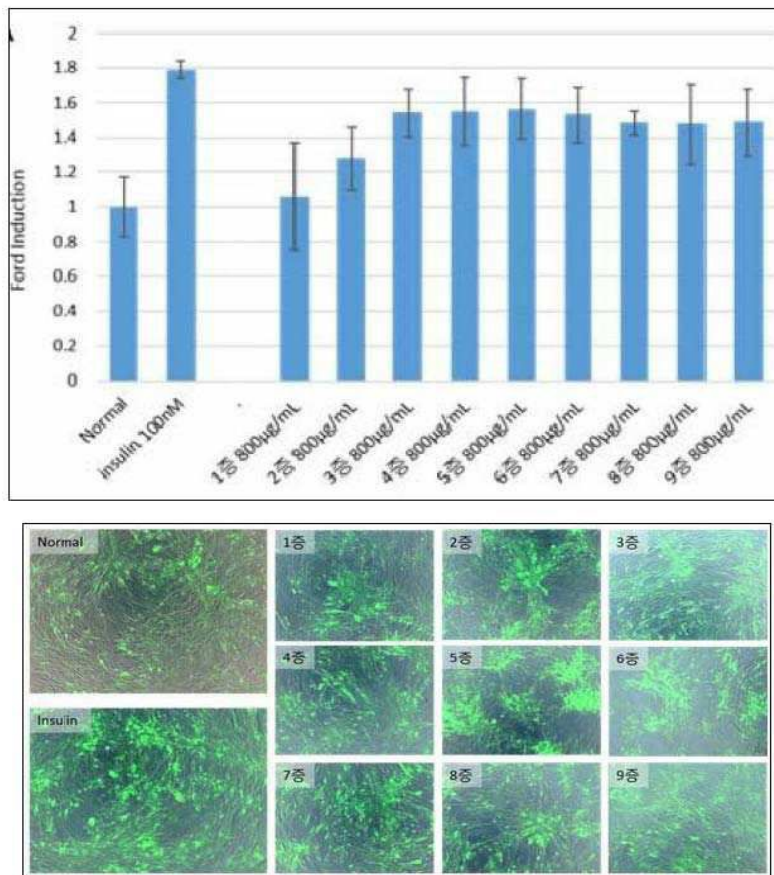
도면7

Strain	Sample	Colonies/plate (Water extract)		Strain	Sample	Colonies/plate (Water extract)	
		With S9 Mix	W/O S9 Mix			With S9 Mix	W/O S9 Mix
<i>S. Typhimurium</i> TA98	Positive control	514±24	417±26	<i>S. Typhimurium</i> m TA1537	Positive control	241±24	374±36
	Negative control	39±2	37±3		Negative control	34±2	28±4
	1 μ	35±4	29±6		1 μ	31±2	33±2
	2 μ	29±3	31±9		2 μ	34±5	27±4
	3 μ	34±5	43±4		3 μ	16±2	26±2
	4 μ	27±3	29±3		4 μ	24±2	32±4
	5 μ	35±6	34±4		5 μ	23±6	25±3
	6 μ	21±3	28±5		6 μ	19±7	21±2
	7 μ	38±6	37±6		7 μ	32±3	26±3
	8 μ	41±2	38±5		8 μ	31±2	27±4
<i>S. Typhimurium</i> TA100	9 μ	29±7	39±2	<i>S. Typhimurium</i> m TA1535	9 μ	28±2	25±5
	Positive control	621±31	411±26		Positive control	311±14	385±31
	Negative control	89±9	84±6		Negative control	27±3	31±5
	1 μ	73±4	82±8		1 μ	31±2	31±4
	2 μ	82±7	75±5		2 μ	21±4	28±5
	3 μ	65±6	57±10		3 μ	14±2	19±3
	4 μ	88±6	92±4		4 μ	17±5	25±3
	5 μ	73±6	91±3		5 μ	23±2	27±2
	6 μ	88±5	85±4		6 μ	24±5	35±2
	7 μ	86±4	86±7		7 μ	11±2	34±1
				16	8 μ	23±4	27±3
					9 μ	27±2	25±4

도면8

Strain	Sample	Colonies/plate (EtOH extract)		Strain	Sample	Colonies/plate (EtOH extract)	
		With S9 Mix	W/O S9 Mix			With S9 Mix	W/O S9 Mix
<i>S. Typhimurium</i> TA98	Positive control	514±24	417±26	<i>S. Typhimurium</i> m TA1537	Positive control	241±24	374±36
	Negative control	39±2	37±3		Negative control	34±2	28±4
	1 μ	32±4	21±4		1 μ	31±4	25±4
	2 μ	38±2	36±4		2 μ	38±2	26±2
	3 μ	36±4	39±2		3 μ	36±3	31±2
	4 μ	23±5	32±6		4 μ	25±6	21±3
	5 μ	46±4	38±5		5 μ	31±4	19±2
	6 μ	38±3	29±4		6 μ	30±2	30±4
	7 μ	32±2	36±2		7 μ	35±2	28±5
	8 μ	37±6	38±1		8 μ	29±3	26±3
<i>S. Typhimurium</i> TA100	9 μ	41±4	35±6	<i>S. Typhimurium</i> m TA1535	9 μ	31±1	28±5
	Positive control	621±31	411±26		Positive control	311±14	385±31
	Negative control	89±9	84±6		Negative control	27±3	31±5
	1 μ	69±4	93±3		1 μ	31±2	26±1
	2 μ	85±1	85±2		2 μ	28±3	25±2
	3 μ	79±5	79±9		3 μ	35±4	35±2
	4 μ	85±3	86±5		4 μ	28±2	27±5
	5 μ	96±7	84±2		5 μ	27±6	35±3
	6 μ	85±3	75±6		6 μ	21±4	37±2
	7 μ	84±5	85±4		7 μ	29±2	29±2
					8 μ	31±2	28±2
					9 μ	27±4	31±3

도면9



도면10

삭제

도면11

제 2형 당뇨 모델에 대한 0-1주차 혈당 확인 결과				
혈당	정상군	당뇨군	고농도 처리군	저농도 처리군
실험 시작 전 (0H)	62	187.36	182.19	179.86
실험 시작 후 (24H)	63.17	192.73	164.18	146.91
실험 시작 후 (1 주)	93.57	183.82	152.73	174
변화량	31.57	-3.54	-29.46	-5.86

제 2형당뇨 모델에 대한 0-1주차 동물실험 결과 (체중)				
	정상군	당뇨군	고농도 처리군	저농도 처리군
체중 (0주)	25.93	37.96	40.18	38.06
체중 (1주)	27.15	43.49	43.54	41.41
체중 변화량	1.22	5.53	3.36	3.35

복용량 : 900, 300mg/kg 체중, 경구투여

도면12

