

미삼의 압출공정에 의한 세포벽
수용화 및 재구성 기법 연구

Study on the Solubilization and Fabrication of Cell
wall Components of Ginseng Radix by Extrusion
Process

연구기관
한국식품연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미삼의 압출성형에 의한 세포벽 수용화 및 재구성 기법 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10월 14일

주관연구기관명: 한국식품연구원

총괄연구책임자: 김 철 진

세부연구책임자: 조 용 진

세부연구책임자: 김 종 태

연 구 원: 지 호 균

연 구 원: 구 미 영

연 구 원: 최 혜 선

연 구 원: 최 애 진

연 구 원: 오 현 정

위탁연구기관명: 이화여자대학교

위탁연구책임자: 김 양 하

연 구 원: 원 혜 숙

연 구 원: 최 은 하

연 구 원: 박 주 연

연 구 원: 김 영 진

요 약 문

I. 제 목

미삼의 압출성형에 의한 세포벽 수용화 및 재구성 기법 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

인삼 및 인삼 가공품은 우리 나라 식품 가운데 해외에서 가장 지명도가 높은 상품이나, 그 동안 기술개발 노력 부족과 중국, 미국등의 기술향상으로 세계시장에서 중주국으로서의 위치를 위협받고 있음. 이를 타개하기 위하여서는 우수한 고려인삼을 원료로하여 값이 저렴하고 편이성이 강조된 가공제품을 개발하여 보급할 수 있는 기술 개발이 시급하다 하겠다.

즉, 고려인삼이 약리효능을 십분 발휘하기 위해서는 장시간 다려야만 약효를 볼 수 있다는 관점을 피하기 위해서는 인삼의 약리효능 성분의 추출이 단시간내에 이를 수 있는 전처리 개발과 전처리에 의하여 추출효율이 증가할 뿐 아니라 전처리 인삼을 원료로하여 제조된 인삼 가공소재의 약리효능을 과학적이고 체계적으로 입증하는 일이 필요하다고 생각된다.

고온/고압 압출공정의 세포벽 수용화 및 재성형 기법을 활용하여 인삼(미삼)을 원료로하여 살균 단립화 인삼분말, 산성다당체 다량 함유 인삼 엑스분 및 재구성 인삼 연제품을 개발함과 아울러 압출공정 처리에 의한 인삼의 extract 소재의 항스트레스 생리기능 증진 효과를 동물실험을 통하여 검증하여 개발 신제품의 산업화 촉진시키는 것이 본 연구의 목적이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 인삼분말 단립화(團粒化) 및 살균을 위한 고온/고압 압출공정 최적화 연구
 - 인삼분말의 세포벽 및 전분성분 수용화 극대화를 위한 압출 공정변수 범위

- 살균 및 수용화 최적 공정변수 확립
 - 고온/고압 압출공정의 scale-up
- 열수추출에 의한 압출미삼 엑스 제조공정 개발
- 산성다당체등 생리효능 추출률 극대화를 위한 열수추출 조건 확립 및 modeling
 - 시제 인삼엑스분(65. brix)의 저장후 환원시 침전물 생성 억제기법 개발
 - 압출성형 전처리 인삼의 추출/농축 공정 최적화
- 재구성 및 성형 압출공정에 인삼 연 제품 제조공정 개발
- 배합 당류 및 보습제 첨가가 압출 재구성 조직에 미치는 영향 실험
 - 압출 성형 인삼 연제품의 물성 안정화 기법 확립
- 압출 전처리 인삼 엑스분의 항스트레스 생리기능 증진 효과 확인
- 동물실험을 통한 항스트레스 및 에너지 대사 조절 생리기능 증진 효과를 확인 검증 및 독성검사

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

-미삼분말을 압출 성형 처리하여 단립화하고 향미를 개선시킬 수 있는 최적 압출조건을 확립하였음.

압출미삼은 용적밀도가 0.31로 낮아졌으며(원료미삼분말의 용적밀도; 0.528), 공극률이 크게 확대되었으며, 평균입자는 ϕ 2 mm X 3 mm로 현장에서 이송 중 먼지등 비산문제를 해결할 수 있었다. 그리고 원료미삼의 생균수 1.2×10^3 에서 155°C 이상의 온도에서의 압출미삼은 전혀 생균수가 나타나지 않아 미생물 사멸 효과가 큰 것으로 나타났다.

압출에 의한 미삼의 향기성분 변화는 floral과 sweet 향의 강도는 압출온도가 높을수록 높아졌고, 문제시되는 흄냄새 향은 강도가 낮아짐을 GC/ Olfactometry로 확인하여 압출성형처리에 의하여 향미를 개선시킬 수 있었다.

- 미삼의 압출성형 처리에 의하여 고형분은 추출방법에 따라 상온 단시간 추출의 경우 2배 이상 추출률이 증가하고, 고온 (95℃) 장시간 추출방법의 경우 약 30% 증가시킬 수 있는 압출 처리공정의 최적 조건을 확립

압출성형 처리에 의한 추출률 증대 모델 해석에 있어 미삼의 세포벽 구성 다당체인 hemicellulose 추정 성분의 수용화가 주된 요인임을 밝혔음. 즉, 압출성형에 의한 미삼 성분의 수용화는 세포벽 구성 다당체의 저분자화에 기인하는 것이 아니라, 각 세포벽 구성 다당체의 즉, pectic 류와 cellulose의 binding의 가교역활을 하는 hemicellulose의 수용화가 주된 요인임을 Barbier등의 분획법에 의한 연속적 추출 분획의 다당체함량 및 분자량 분포 분석에 의하여 밝혔음.

- Pilot 규모 (100L) 추출 실험을 통하여 열수 추출중 내열성 α -amylase와 amylo-glucosidase를 반응시켜 추출액의 저장중 침전생성등을 감소시킬 수 있었으며, 주요 생리활성 물질인 인삼의 산성 다당체의 추출률을 약 3 배 증가시킬 수 있었고, saponin의 추출률도 크게 증가시킬 수 있었음. saponin의 추출률 증대 뿐아니라 추출된 saponin의 ginsenoside의 종류도 홍삼류에서 확인 되는 ginsenoside Rh1, Rh2 및 Rg3가 생성되었음을 HPLC로 확인하였음. 추출액의 polymer의 GPC 및 ion exchange chrom에 의하여 분획하고당조성을 분석하여, 추출액 다당체의 산성 다당체 함량이 압출처리에 의하여 크게 증가함을 확인하였음.

- 재구성 연제품의 제품 concept을 확립하고, 제품의 부재료를 선정하였고, 재구성 성형을 위한 냉각 Die의 제작, 시제품을 시험 생산하였음. 재구성 미삼 연제

품 시제품은 압출미삼 20, 변성전분, gelatine 및 pectin 30, 당류 35의 배합물을 60℃ 저온에서 압출 성형하여, 탄력을 특성으로 하는 재구성제품을 개발하였음.

- 압출 미삼 Extract의 급여는 스트레스 부하 시 감소된 체중 증가가 미삼추출 방법에 따라서 미삼 단독 압출 보다는 citric acid 첨가 압출 처리구가 효과가 더 좋은 것으로 나타났으며, 대조구 미삼 추출물을 섭취한 군보다는 압출 처리 미삼 추출물을 섭취한 군에서 지방조직의 무게가 낮았다. 따라서 압출 미삼에서 비만 방지의 효과가 있는 물질의 추출률의 증가를 시사하였다. 본 미삼 추출물의 항 스트레스 생리 효능 평가를 위한 스트레스 부하 검증 system이 개발되었음.

미삼 추출물의 섭취가 스트레스 관련 조직인 부신, 비장 및 흉선의 정상화에 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 스트레스 부과 시 혈중 GOT, GPT가 유의성 있게 증가하였으며 미삼 추출물에 의해 유의성은 보이지 않았으나 약간 감소하는 경향을 보여 긍정적인 항스트레스 작용을 나타내었다고 사료된다. 혈중 콜레스테롤은 스트레스에 의해 약간 감소하였고 인삼 추출물에 의해 다소 증가하는 경향을 보이지만 모든 그룹 간에 유의적 차이는 없었다. 스트레스 부과는 혈중 corticosterone의 수치를 360.20±57.36ng/ml에서 500.30 ±89.94ng/ml로 증가시켰으며 이는 미삼 추출물에 의해 423.43±60.26ng/ml으로 유의적으로 감소하여 압출 미삼추출물이 스트레스를 완화해주는 효과가 있음을 확인하였음. 그리고, 스트레스에 유도된 TH, DBH mRNA 수준이 미삼 투여에 의해 유의적으로 감소하여 미삼 추출물이 항스트레스 작용을 나타내었다고 판단된다.

- 미삼의 압출 Extract 성분의 식욕조절 효능 검증 및 system 확립

미삼 추출물이 white adipose tissue을 감소시키는데 다소 영향을 줄 수 있다고 판단하나 유의적인 결과는 나타나지 않았다. Brown adipose tissue는 모든 군간에 유의적 차이가 나타나지 않았다.

Total-C, LDL-C, TG 함량이 대조군에 비해 미삼 추출 군에서 증가하여 미삼 추출물이 지질 대사에 좋은 영향을 주지 못했다고 판단한다.

Uncoupled protein-1 mRNA 발현을 측정한 결과는 모든 군 간에 유의적 차이가 나타나지 않았다.

2. 활용에 대한 건의

미삼 압출처리공정은 인삼의세포벽 성분의 수용화를 촉진하여 가공제품 중 추출/농축단계를 획기적으로 줄인 수 있을 뿐만 아니라 단립화를 이루어 압출물 자체로 인삼분말차로의 사용이 가능성이 밝혀졌다. 앞으로 개발된 압출처리 기법이 참여업체등에 기술이전되어 산업화를 이루기 위한 다음 단계의 추가 연구가 계속되길 기대한다.

한편, 압출처리 미삼의 항스트레스 생리효능 증진 효과 규명 연구결과는 학계에 발표 및 특허를 출원하고, 항스트레스 생리효능과 편리성이 제고된 미삼 제품의 산업화 촉진에 사용될 것을 기대한다.

SUMMARY

I. Subject

Study on the Solubilization of Cell Wall Components of Ginseng Radix and Fabrication by Extrusion Process

II. Objectives and Significance

In the present study, A particular emphasis was placed on the solubilizing phenomena of rigid ginseng cell walls by extrusion and the changes of extraction properties of functional components and the anti-stress and anti-obesity effects of ginseng extracts from ginseng extrudates against immobilization stress.

Ginseng has a long history of use as an important traditional medicine. Recent studies have reported that ginseng increases resistance to stress, decreases blood pressure, benefits the nervous system, and improves energy and nucleic acid metabolism. Research into the anti-stress effects of ginseng has identified ginseng saponins as the active components involved in the alleviation of mental and physical stress and the normalization of work capacity.

It has been reported that ginseng reversed the stress induced repression of lymphocyte synthesis in laboratory rats. As shown above, there are numerous reports of the anti-stress effects of ginseng, but the mechanism action has yet to be elucidated.

III. Contents and Scope of Research

1. Optimization of Extrusion Conditions for the production of ginseng extrudate having improved water-solubility.
2. Development of process for production of reconstitutable Ginseng

concentrates and Jelly type product fabricated from Ginseng extrudates powder.

4. Comparison of Anti-stress and Anti-obesity effects of the extracts from Ginseng Extrudates in immobilization- stressed rats

IV. Results and Recommendation

1. Twin-screw extruder was employed to disintegrate ginseng radix to facilitate production of ginseng extract by water. Ginseng powder was extruded under condition of screw speed 350 rpm, feed rate 23kg/hr, water addition 1 l/hr with a co-rotating and intermeshing type twin-screw extruder equipped with screw configuration type 1 and L/D ratio 20 and 1mm die openings.

The Ginseng extrudates obtained at above optimum operation condition is a granular form and show no earth flavour and no living microbes so that is able to use for a bag type Ginseng tea.

The hot water extractability of ginseng extrudates increased to 70% from 45% of raw ginseng. Most of acid polysaccharides in the extrudates was extracted at mild condition of water extraction step in sequential extraction procedure which consisted of steps of water, HCl, NaOH, however, most of those in raw ginseng can be extracted upto HCl step. Effect of solubilizing by extrusion was due to disintegrating the hairy region of cell wall compartments, not to degradations of polymer components.

2. Development of ginseng jelly products by refabrication the mixture ginseng extrudates and gums, which have lasted good texture during 1 week storage period.

3. Anti-stress effects of Ginseng in immobilization- stressed rats

Ginseng administration to immobilization stressed rats partially reversed the decrease in body weight gain and food intake, but not significantly.

The ginseng administered group had a significant reversal in the stress-induced decrease in thymus weight. The weights of adrenal glands tended to increase in the stress group and to be normalized by ginseng administration. The plasma corticosterone concentration was significantly higher in the stressed group compared to control group. The ginseng administered group exhibited a significant reversal in the stress-induced plasma corticosterone concentration. The expressions of catecholamine-synthesizing Tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine- β -hydroxylase (DBH) mRNA were significantly increased by Immobilization stress. The ginseng administration significantly inhibited the stress-induced increase of TH and DBH mRNA expression.

4. Anti-obesity effects of Ginseng

Treatment with the ginseng extract increased body weight gain in rats. There were no differences in the adipose tissue levels among groups. Administration of ginseng extract increased total-cholesterol, LDL-cholesterol and TG. There were no differences in Uncoupled protein-1 mRNA among groups

CONTENTS

Summary

Chapter 1. Introduction

Section 1 Research background

Section 2 Objectives of the research

Chapter 2. The State-of-Art Report

Chapter 3. Contents and Results

Section 1. Optimization of Extrusion Process Condition for Ginseng

1. Materials and methods
2. Preliminary test run for determination range of operation conditions
3. Change of extraction characteristics of ginseng extrudates
4. Change of extractability of polycarbohydrates of extrudates extruded at Optimum conditions and Flavor characteristics

Section 2. Model for one-step hot water extraction process

1. Preparation of ginseng extrudates
2. Characterization of Components in water extracts
3. Effect of amylase treatment in hot water extraction
4. Model for One-step Extraction

Section 3. Development of Ginseng Powder Fabrications Products

1. Product Concept and Design of Key part of Extruder
2. Manufacture Processing of the Extruded Ginseng Jelly
3. Changes of Physical Properties of Ginseng Jelly during storage

Section 4. Physiological Functions of Ginseng Extrudates

1. Research background
2. Contents and Results
 - a. Materials and Methods
 - 1) Enhancing Anti-stress effects of Ginseng Extrudates in immobilization- stressed rats
 - 2) Anti-obesity effects of Ginseng Extrudates
 - 3) Bio Marker for Anti-stress effects of Ginseng extrudates
 - b. Results
 - 1) Enhancing Anti-stress effects of Ginseng Extrudates in immobilization- stressed rats
 - 2) Anti-obesity effects of Ginseng Extrudates
 - 3) Bio Marker for Anti-stress effects of Ginseng extrudates

Chapter 4. The objective achievement and contribution to related fields

Section 1. The objective achievement

Section 2. The contribution to related fields

Chapter 5. Practical application of final results

References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

제 2 절 연구개발의 목적과 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황과 문제점

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 미삼 압출공정 최적화

1 실험재료 및 방법

2 압출공정 조건범위 확정을 위한 예비실험

3 압출공정 변수에 따른 추출특성 변화

4 최적 조건 압출미삼의 추출특성 및 향미성분 변화

가. 미삼 extrudate의 제조

나. 추출률 및 추출 다당체 특성 비교

다. 산성다당체 분획 및 면역활성 비교

라. 향미특성 분석

제 2절 열수추출 공정 모델 확립

1 압출미삼 제조

2 압출미삼의 물 추출액 의 분석

3 열수 추출시 전분분해효소 처리 효과

4 One-step 추출공정 확립

제 3절 재구성 미삼 연제품개발

- 1 제품의 Concept 및 주요 부품제작
- 2 재구성 압출성형 인삼 Jelly 제조
- 3 저장중 인삼 Jelly의 물리적 특성

제 4절 압출처리 미삼 Extract 성분의 활리활성 기능연구

- 1 연구개발 개요
- 2 연구개발 수행내용 및 결과
가 연차별 연구방법
 - 1) 항스트레스 생리기능 증진 효과 연구방법
 - 2) 항비만 생리활성 검증 방법
 - 3) 항스트레스 생리활성 검증 방법

나 연구결과

- 1) 미삼의 전처리에 따른 항스트레스 생리기능 증진 효과
- 2) 미삼의 항비만 생리활성 효과 검증
- 3) 미삼의 항스트레스 생리활성 효과 검증

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에 기여도

제 1절 목표달성도

제 2절 관련분야의 기여도

제 5 장 연구개발 결과 활용계획

참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

인삼 가공제품 (차류 및 드링크)의 주 원료로 사용되는 가용성 성분 추출 농축액 (엑스분은 4년 근 이상의 인삼근에 5~6 배 가량의 알코올 수용액(80~50%)을 용매로하여 90℃ 이하의 온도에서 8시간 씩 3~5회 추출하는 등 장시간이 소요되는 비경제적인 방법을 사용하고 있는 데 이는 물을 용매로 사용할 경우 인삼근 내의 전분질이 함께 용출되어, 냉각/농축시 노화되어 침전이 생성되기 때문에 제품의 품질저하의 주요인이 되기 때문이다. 한편 최근 인삼의 새로운 약리 효능 물질로 밝혀진 산성다당체 (α -polygalacturonic acid 가 주성분인 hetero-polysaccharide)는 알콜 불용성이기 때문에 현 추출 공정에서는 추출 잔사 박으로 폐기되고 있는 실정이다.

단순 인삼 분말 제품이 반가공품으로 출시되어 많은 가공제품의 원료로 사용되고 있는 데, 가공공장에서 취급시 분말의 비산 및 미생물의 오염등의 문제를 야기시키고 있는 실정이다.

한편, 인삼의 당 침적 연제품등의 경우 고가의 원형삼을 이용하고 있으며 미삼등의 원료는 추출 및 분말 제품으로 만 가공되고 있다.

미삼 원료의 전처리 공정으로 고온/고압 압출성형공정의 세포벽 수용화 기능을 활용하면, 엑스분 제조시 침전의 원인 물질인 전분질의 수용화를 기할 수 있어, 단일 열수 추출로 산성다당체 및 사포닌을 동시에 효율적으로 추출 할 수 있으며, 압출공정의 재성형 기능을 활용하여 미삼등을 원료로하여 미생물의 오염을 배제한 단립화 인삼 분말제품 뿐 아니라, 다양한 형태의 인삼 연제품을 제조할 수 있을 것으로 기대된다

인삼은 2000년도에 약 1만톤 생산되어 생산금액은 약 3천 7백억원에 달하여 국내 주요 농산물중의 하나임.

그러나, 인삼류 및 가공품의 수출액은 1995년도 1억 4천만 불에서 2000년도 7천 9백만 불로 계속하락 추세임. 2000년도 인삼류 품목별 수출액은 홍삼류가 4

천 9 백만 불, 백삼류가 2천 5 백만 불, 음료, 액즙등 기타가 5백 2십 만불을 차지하여 홍삼류가 주종을 차지하며 홍삼류 중에서도 원형 홍삼이 4천 3백만 불로 수출액의 반 이상을 차지하고 있어, 다양한 가공제품의 개발이 절실한 실정임.

미국등 주요 인삼 생산국의 판매 홍보 전략은 편의성을 강조한 다양한 인삼 제품을 내세워 세계 시장을 공략하고 있어, 약리 작용의 우수성을 내세우는 우리나라 홍보 전략에 비하여 시장 석권의 우의를 차지하고 있음.

인삼 가공업계의 영세성에 비추어 다양한 가공제품의 원료소재가 되는 인삼의 가용성 성분의 추출농축액의 제조 공정비를 절감하는 기술개발이 시급히 요청된다.

고가인 원형 삼을 대신하여 미삼을 원료로 하여 재구성 기법을 이용한 새로운 형태의 재구성 연제품의 개발은 다양한 가공제품을 비교적 값 싼 원료로 고가의 원료를 대체하여 관련 업계의 이익 창출에 일익을 담당할 것으로 꼭 필요한 연구개발이라고 기대된다.

인삼 및 인삼 가공품은 우리나라 식품 가운데 해외에서 가장 지명도가 높은 상품이나, 그 동안 기술개발 노력 부족과 중국, 미국 등의 기술향상으로 세계시장에서 중주국으로서의 위치를 위협받고 있음. 이를 타개하기 위하여서는 우수한 고려인삼을 원료로 하여 값이 저렴하고 편의성이 강조된 가공제품을 개발하여 보급할 수 있는 기술 개발이 시급하다 하겠다.

즉, 고려인삼이 약리효능을 십분 발휘하기 위해서는 장시간 다려야만 약효를 볼 수 있다는 관점을 피하기 위해서는 인삼의 약리효능 성분의 추출이 단시간 내에 이를 수 있는 전처리 개발과 전처리에 의하여 추출효율이 증가할 뿐 아니라 전처리 인삼을 원료로 하여 제조된 인삼 가공소재의 약리효능을 과학적이고 체계적으로 입증하는 일이 필요하다고 생각된다.

제2절 연구개발의 목적과 범위.

고온/고압 압출공정의 세포벽 수용화 및 재성형 기법을 활용하여 인삼(미삼)을 원료로 하여 살균 단립화 인삼분말, 산성 다당체 다량 함유 인삼 엑스분 및 재구성 인삼 연제품을 개발함과 아울러 압출공정 처리에 의한 인삼의 extract 소재의 항스트레스 생리기능 증진 효과를 동물실험을 통하여 검증하여 개발 신제품의 산업화 촉진 방안을 마련함

- 인삼분말 단립화(團粒化) 및 살균을 위한 고온/고압 압출공정 최적화 연구
 - 인삼분말의 세포벽 및 전분성분 수용화 극대화를 위한 압출 공정변수 범위
 - 살균 및 수용화 최적 공정변수 확립

- 열수추출에 의한 압출미삼 엑스 제조공정 개발
 - 산성 다당체 등 생리효능 추출률 극대화를 위한 열수추출 조건 확립 및 modeling
 - 시제인삼 엑스분(65. brix)의 저장 후 환원 시 침전물 생성 억제기법 개발
 - 압출성형 전처리 인삼의 추출/농축 공정 최적화

- 재구성 및 성형 압출공정에 인삼 연 제품 제조공정 개발
 - 배합 당류 및 보습제 첨가가 압출 재구성 조직에 미치는 영향 실험
 - 압출 성형 인삼 연제품의 물성 안정화 기법 확립
 - 압출성형 인삼 연제품의 저장 안정성 연장 기법 확립

- 압출 전처리 인삼 엑스분의 항스트레스 생리기능 증진 효과 확인
 - 압출 전처리 인삼의 약리성분(사포닌 류, 산성 다당체)함량 함량분석
 - 동물실험을 통한 항스트레스 및 에너지 대사 조절 생리기능 증진 효과를 확인 검증

제 2 장 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

우리나라의 고려인삼(*panax ginseng* C.A. Meyer) 생산량은 1994년 14,292 M/T에서 매년 감소 추세를 보여 1998년 약 10,000 M/T에 머물고 있다. 고려인삼의 과학적 연구는 1975년 Breckman의 adaptogen 설이 발표되면서 인삼의 화학적이고 분자 생물학적 연구가 활발히 진행되기 시작하였다. 이후, 사포닌, 폴리아세틸렌 및 산성다당체 등 많은 휴효 성분이 밝혀지고 암, 당뇨, 간 질환, 순환계 질환 및 중추신경계 등 각종 질환에 대한 인삼의 약리효능이 계속 입증되고 있다.

최근 인삼의 약리효능이 과학적으로 입증되고 국민의 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 건강식품으로 중요한 위치를 차지하고 있으며, 이와 관련하여 기호도를 높힌 인삼차, 인삼엑기스, 인삼 캡슐, 인삼드링크 등 다양한 가공제품이 시판·수출되고 있다.

인삼 가공제품 원료로 사용되는 가용성 성분 추출물(인삼 엑스)은 4년근 이상의 인삼 근을 물 또는 알코올을 용매로 사용하여 90℃ 이하의 온도에서 추출하도록 규정되어 있다(1). 국내 인삼 가공업계에서는 인삼 엑스 제조용 원료 인삼으로는 유용성분(사포닌 등)의 함량이 높고 가격이 비교적 저렴한 미삼(尾蔘, fiber root)류를 대부분 사용하고 있으며, 가용성 인삼 성분은 원료의 5~6배의 량의 에탄올(70% 이상)이나 물을 용매로 하여 8 시간 씩 3~5회 추출하는 등 장시간이 소요되는 비경제적인 방법이 이용되고 있으며 이에 대한 개선방안 마련이 요구되고 있다. 또한, 50% 이상의 에탄올을 용매로 사용하면 사포닌 이외의 약리효능이 밝혀진 산성 다당체의 추출은 거의 일어나지 않으며, 이를 추출하기 위해서는 열수 (80℃ 이상)를 사용하여야 효과적인데, 이 때 20% 정도를 차지하는 전분이 호화되어 함께 용출되어 냉각 또는 저장 시 혼탁 또는 침전이 발생되기 때문에 제품의 품질저하를 방지하기 위하여서는 복잡한 여과과정을 거쳐야한다. 즉, 현행 인삼 엑스 제조기술은 에탄올을 용매로 사용할 경우 ginsenosides

의 추출은 용이하나 인삼의 또 다른 약리효능이 있는 산성 다당체의 추출은 불가능하여 인삼 추출 밖으로 잔존되어 폐기되어 지고 있다. 그렇다고 열수추출을 할 경우 산성 다당체 이외에 전분질이 함께 추출되어 농축/냉각 저장시 전분의 노화로 인하여 발생하는 침전물에 의하여 공정상에 많은 문제점을 야기하고 있어(14), 목적에 따라 에탄올 함량을 조절하는 편법을 도입하고 있으며, 추출업체들의 빈약한 시설로 인하여 추출 밖에 잔존하는 에탄올의 회수는 불가능하여 추출비용 증가의 큰 원인이 되고 있다.

Kwon등은 마이크로웨이브 추출장치를 사용하면 인삼의 가용성 성분 및 사포닌을 에탄올 농도 40~50%, 추출온도 140℃ 부근에서 3~4회 반복하여 추출시간을 6분 이내로 단축시킬 수 있다 하였고, 이때 가용성 성분은 에탄올 함량이 낮을수록, 사포닌 성분은 에탄올 함량이 높을수록 증가한다고 하였다(2). 그러나 총 추출률은 40% 내외로 기존의 추출방법에 비하여 비슷한 결과를 나타내었다.

Li(3)등은 70% 에탄올로 인삼분말을 상온에서 추출할 때, 초음파(10- 300 kHz)처리를 하면 총 가용성 성분의 추출률은 15%, 사포닌 추출률은 약 30% 증가시킬 수 있었고, 기존과 같은 추출률에 도달하는 시간은 1/2로 단축되었다고 하였다.

최근 인삼의 유용성분으로써 ginsenosides 외에도 알코올 불용성인 여러 다당체를 함유하고 있는 것으로 밝혀져 있다. 혈당 강하 성분으로 밝혀진 Panaxan A-U 등 21종의 다당체 성분과 단백질 함유 다당체가 밝혀져 있다. 또한 산성 다당체 (α -polygalacturonic acid가 주된 물질이고 그 외 glucose, rhamnose, arabinose등이 소량 결합된 펙틴과 유사한 분자량 34,600 정도의 hetero-polysaccharide)가 ginsenoside Rb2와 함께 악성 종양 환자의 식욕부진 회복기능과 지방분해 촉진 인자로 알려진 toxohormon L의 지방분해를 저해하는 기능이 밝혀짐으로써 인삼내의 다양한 다당체의 추출 및 효능검증에 많은 연구가 계속되고 있다 (4, 5, 6).

또한, 박 등은 인삼속 식물을 기존의 홍삼제조 조건보다 격렬한 110~180℃

에서 0.5~20 시간동안 가열하여 수득한 가공인삼을 추출하여 수득한 비극성 사포닌 분획은 기존 홍삼 추출액보다 많은 사포닌을 획득할 수 있었고, 이로부터 제조되는 가공인삼 추출물로부터 분획한 성분으로 신장 보호제 외에 여러 가지 생리기능을 갖는 추출물을 얻을 수 있었다고 하였다(7).

스트레스는 위협을 가하는 외부 환경을 뜻하며 동시에 그 외부의 위협에 생체가 방어하기 위하여 반응하는 현상을 나타낸다. Selye는 외부의 위협 (스트레스)의 종류와는 상관없이 소화관 점막의 파손, 흉선의 위축, 부신 비대 등의 공통 반응을 나타낸다고 보고한 바 있다. 즉 스트레스를 느낀다는 것은 외부 환경에 대한 일종의 비특이적인 생체방어 기구중의 하나로 볼 수 있다. 그러나 이러한 스트레스의 생성 기전에 대하여는 아직도 정확하게 알려지지 않았으나 스트레스 응답반응의 하나로서 부신피질로의 glucocorticoid (GC)의 분비가 있으며 Selye는 이 GC를 생체의 스트레스 반응의 성립에 중요한 조절인자로 제안하였다. 부신을 적출한 동물에게 스트레스를 주었을 경우 사망률이 현저히 높아지나 미리 GC를 투여하였을 경우 사망률이 억제된다는 보고는 외부로부터 위협을 느꼈을 경우 그 위협을 이겨내기 위하여 최소한 생체 내에 GC가 필요하다는 것을 알 수 있다. 또한 많은 연구에 따르면 스트레스는 면역 기능의 저하와도 관계가 있다고 한다.

최근 천연 식물체로부터 부작용이 적고 생리활성이 강한 활성성분을 찾아내어 새로운 건강식품 내지는 의약품으로 개발하려는 노력이 활발히 진행되고 있다. 고대로부터 약리 효과가 탁월한 것으로 평가되어온 인삼의 경우 주로 인삼 사포닌 성분에 연구 초점이 맞추어져 중추신경에 대한 작용, 항스트레스 작용, 발육과 기초대사에 미치는 영향, 발암 작용, 면역기능 향상, 탄수화물 대사, 지방질 대사, 단백질 대사 및 핵산합성 등에 영향에 대한 많은 연구 보고가 있었다. 그러나 비사포닌계의 인삼성분에 대한 약리작용에 대하여도 관심이 높아지고 있는데 Rb₁ 성분은 사포닌과 함께 항스트레스 효과가 있음이 보고된 바 있다.

특히 인삼으로부터 추출한 산성 다당체는 분자량 수만 이상의 물 추출물로, 헥소오스(47.1%), 우론산(43.1%), 단백질(3.7%)로 구성되어 있다. 백삼의 산성다당체가

항암 작용을 지닌 면역조절물질로써 새로운 생체응답조절제 (biological response modifier)로써 가치가 있는 것으로 발표되었으며 수삼에 함유된 산성다당체는 세포분열 촉진작용 (mitogenic activity)을 갖고 있으며, 홍삼의 산성 다당체에서는 지방분해를 촉진하는 독소의 하나인 toxohormone L의 활성을 억제하는 성분이 분리되었다.

인삼의 섭취가 항스트레스 효과를 나타내고 있고 인삼 산성다당체가 위궤양을 억제한다는 연구 결과들은 인삼내의 항스트레스 인자가 정확하게 규명되지는 않았으나 인삼에 있는 사포닌, Rb₁ 및 산성다당체 성분 등이 인삼의 항스트레스 효과를 발현시키는데 관여하고 있음을 시사해준다. Gaffiney등은 사람을 대상으로 운동 스트레스를 주었을 경우 인삼의 효과를 보았으나 인삼의 항스트레스 효과를 밝혀내는 데에 실패하였다. 그 이유로 스트레스의 강도가 적절하지 못하지 않았나 추론하였다. 본 연구에서는 동물을 실험대상으로 하여 압출 미삼으로부터 추출한 extract 성분들의 항스트레스 효과를 보고자한다

많은 사람들이 스트레스를 과도하게 느낌으로써 식욕 조절에 문제가 발생하는데 이는 스트레스로 인한 에너지대사 관련 호르몬들의 불균형에 의한 것이다. 비만은 에너지 균형적인 측면에서 장기간에 걸쳐서 에너지 소비량보다 많은 에너지를 섭취함으로써 잉여의 에너지가 지방의 형태로 변하여 지방이 과잉 축적된 현상이라고 설명할 수 있다. 과도한 스트레스는 에너지 대사의 불균형을 일으켜 장기간 과잉의 에너지를 섭취하게 함으로써 비만을 일으킬 수 있는 원인이 될 수 있음을 보여준다. 따라서 압출 미삼 extract 성분이 실험동물에게 스트레스 유도시 식욕 조절 효과 및 항암 스트레스 유도시 생체 반응 조절에 미치는 영향을 검증함으로써 기존의 연구들과는 다른 측면에서 인삼의 생리 기능성을 살펴보고자 한다.

한편, 한국식품연구원의 황 등은 사과 박을 압출성형 처리한 결과, 기계적 에너지 소모율(SME, specific mechanical energy consumption)에 비례하여 고품분의 용해도 지수(WSI)가 증가하였고, 이는 수용성 식이섬유의 증가에 기인하며, 총 식이섬유의 양은 변화가 없다고 하였으며(11), 특히 110~170 kWh/ton 범위의 SME에서 압출 처리된 사과 박은 열수 추출만으로도, 산 추출(HCl pH 1.8,

85℃) 펙틴과 같은 점조성을 갖는 펙틴을 얻을 수 있어, 압출성형 처리가 세포벽 성분을 수용화 시켜, pectin의 추출률을 증가 시켰다고 보고 하였다(12). 또한 전분을 주성분으로 하는 옥분을 압출성형 시키면 구성 전분분자의 붕괴로 인하여 전분의 냉수 수용성을 증가시킬 수 있으며, 증가 정도는 SME가 클수록 증가 하였다(13).

앞으로 전망

- 인삼 특히, 미삼을 압출성형 처리하면 세포벽의 수용화를 유발시켜 사포닌 뿐 아니라, 산성다당체의 추출률을 크게 증가시킬 수 있으며, 아울러 인삼에 20% 내외 함유된 전분분자를 저분자화 시켜, 추출물을 농축/냉각/저장 시 침전 발생을 억제할 수 있을 것으로 기대되어, 인삼 엑스 제조공정을 획기적으로 개선시켜 관련 업계의 국제 경쟁력을 제고시킬 수 있음.
- 인삼의 압출 성형 시 고온/고압 조건에서 체류시간을 조절하여, 인삼의 열처리에 의한, 사포닌 배당체의 sapogenin화를 유발시켜, 새로운 약리효능이 있는 aglyco-gisenosides의 생성이 기대되며, 세포벽 수용화 붕괴로 인한 polysaccharide의 용해도를 증가시켜 새로운 생리기능이 부여된 엑스분이 제조될 것으로 기대되며, 이 효능 증진 효과를 과학적으로 검증함으로써 새로운 시장 증대가 기대됨.
- 인삼의 압출성형에 의한 세포벽 수용화 극대화 최적조건에서, 보습제, 증량제등과 함께 재성형을 강조한 조건에서 처리하면 미삼을 새로운 형태의 다양한 연제품으로의 개발이 가능하여 관련업계에서 산업화하여 인삼의 새로운 수요 창출에 힘입어 인삼가공업계의 수익률 증가 및 인삼 가공제품 수출증대에 기여할 것 임.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 미삼 압출공정 최적화

1. 실험재료 및 방법

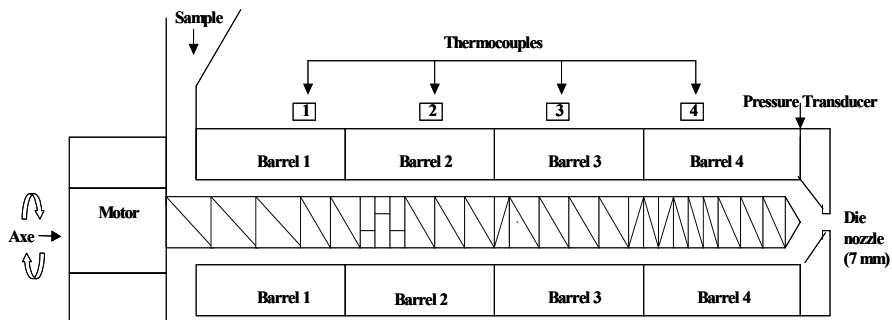
가. 실험재료

시료용 인삼분은, 4 년근 백미삼을 건조하여 60 메쉬 이하로 분쇄한 것을 0°C 냉동고에 보관하면서 실험하였다. 사용된 원료의 일반성분은 표 3에 나타내었다. 조지방함량은 1.60%, 조단백질은 16%, 회분은 7.3%, 조섬유는 6.1% 이었고 전분의 함량은 18.6%였다.

나. 실험방법

압출 처리 미삼 분 제조

미삼분말 압출성형은 쌍축압출성형장치(DNDL-44, Buhler Brothers Co., Uzill, Switzerland)를 사용하여 지름이 1 mm인 원형 사출구 하나를 열어서 압출성형 하였다(Fig 2). 사출구와 스크류 전면사이에 thermocouple 및 tanderucer를 통하여 압출성형 온도와 압력을 측정하였다. 자세한 압출성형의



Configuration of screws ;
66R * 3 44R*2 KD(kneading disk) - R*L*R
44R * 3 RSE(reverse) - L 44R * 4 RSE(reverse) -L
RSE(reverse)-R*3 33R*4 Screw top

Fig. 2. Schematic diagram of twin-screw extruder

조건은 다음과 같다.

Screw configuration and extrusion condition

Extruder	Co-rotating, intermeshing twin-screw extruder Buhler Brothers Co., DNDL-44, Uzwil, Switzerland
L/D20	feed로부터 3,4번 가열
Heater	120 ~ 180 °C
Screw Type	66R*3, KD(RLR), 44R*5, RSE(LR), 44R*4, REE(LRL), 33R*5, ST
Die	1 mm/1 e.a.

압출 미삼의 특성 분석

일반성분은 AOCS 방법을 이용하여 수분, 조지방, 조단백, 조섬유, 회분을 분석하고, 전분함량은 α -amylase와 amyloglucosidase로 분해한 후 생성된 glucose 양을 glucoseoxidase/ peroxidase 및 α -dianisidine 발색법을 이용하여 측정하였다.

분말의 색도는 색차계(CR-200, Minolta Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 압출 성형 처리한 인삼을 blender (CGS-2500, Sunbo, Seoul, Korea)로 2분간 분쇄하여 페트리디쉬에 담은 후, L(명도), a(적색도), b(황색도)를 측정하였다. 추출액의 색도는 인삼분 압출물 1 g과 증류수 100 mL을 잘 분산시킨 후 6,000 rpm, 15분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

추출물은 압출인삼분 10 g, 증류수 및 다양한 농도의 에탄올 100 mL을 80°C에서 1시간 동안 냉각관을 연결하여 환류 추출하였다. 이를 6,000rpm, 20분 동안 원심분리 하였다. 상등액의 고형분 함량을 측정후 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$WSI = \frac{\text{soluble solid}}{\text{total solid}} \times 100$$

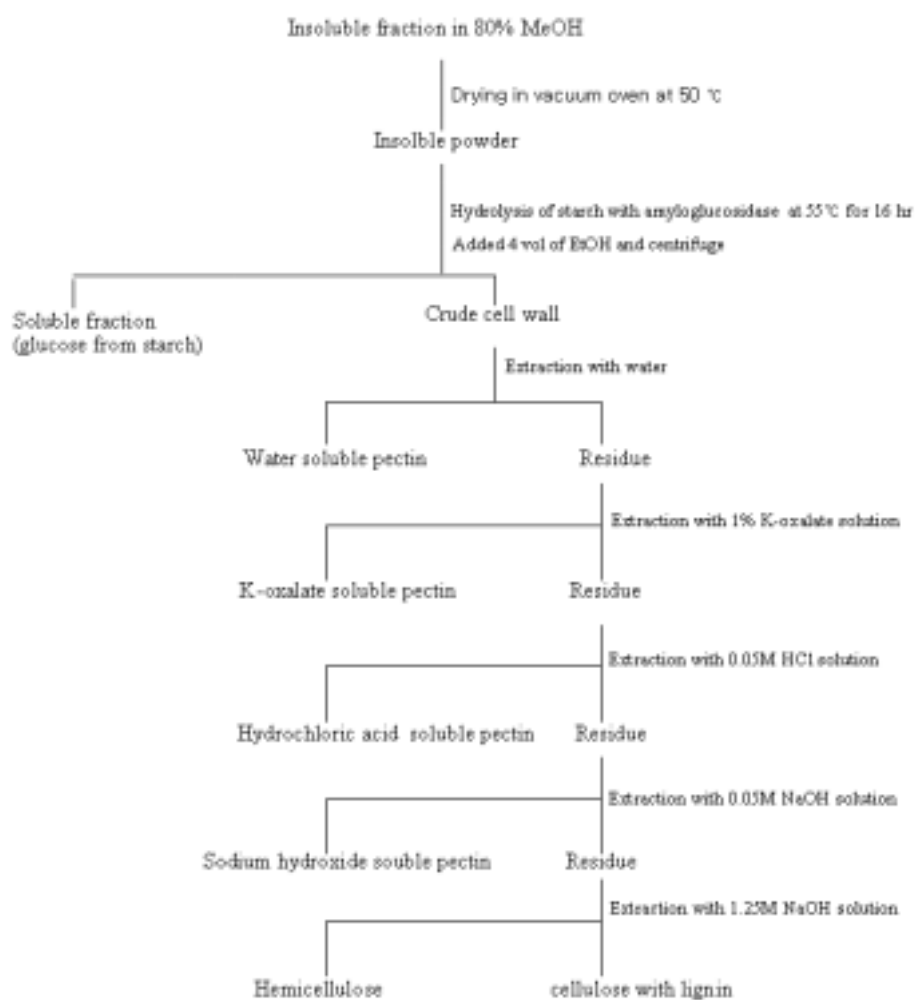


Fig. 2 Procedure for fractionation of cell wall components from extruded Ginseng

인삼 components의 분획 및 성분 분석:

Fig. 1과 Fig 3의 방법에 따라 압출 인삼 시료를 추출 분획하고 분획물의 saponins 및 조세포벽 성분을 측정하였다.

조사포닌: 80% 메탄올 용액으로 환류추출을 3회, 여과하여 각 여액을 합하여 감압 농축한다. 농축물을 증류수 녹이고 분액여두에 넣어 에테르로 2회 반복 추출한다. 물 층을 물포화 부탄올로 4회 반복 추출한다. 물 포화 부탄올 층을 한테 모아 증류수로 2회 씻은 다음 물 포화 부탄올을 감압 농축한다. 잔유물을 105℃에서 약 2시간 건조시키고 무게를 측정한다.

총사포닌은 상기 농축물을 메탄올에 녹이고 일정 부피로 하여 사포닌 추출액으로 한다. 사포닌 추출액 100 μ l를 정확히 취하여 시험관에 넣고 얼음물 속에서 8% 바닐린-에탄올 용액 0.3ml와 72% 황산용액 4ml를 가한다. 시험관을 60℃의 물중탕에서 10분간 가온하여 내용액을 발색시키고 545nm에서 분광도를 측정한다. 표준 정량곡선은 ginsenoside Rg를 사용하여 같은 발색법에 의하여 발색시켜 구하였다.

Ginsenoside의 TLC 및 HPLC 분석:

TLC 분석: 사포닌 추출액 (MeOH)을 시료용액으로 하고, Ginsenoside 표준품 각 5mg을 메탄올 5ml에 녹여 표준용액으로 하였다. . 시료추출액과 표준액 각 10, 20 μ l를 실리카 겔 판에 점적하고 클로로포름-메탄올-물(65:35:10, v/v)의 아래층(lower layer)으로 전개시켰다.

전개후 30% 황산용액을 분무하고 110℃에서 약 10분간 가온하여 발색시켰다.

HPLC 분석

추출액에서 Ethanol 80%에 soluble한 fraction을 물포화 butanol로 추출하여 건조 후 methanol에 용해한 시료를 0.2 μ m filter로 여과 후 사포닌 추출액을 membrane filter(0.45 μ m pore size)로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

< HPLC conditions >

Column	Carbohydrate ES, 5 μ m, 250 x 4.6mm(Alltech, USA)				
Pump	S-3740(SOMA, Japan)				
Detector	ELSD (Alltech, USA)				
Mobile phase	A: Acetonitrile:Water:Isoprophyl alcohol (80:5:15) B: Acetonitrile:Water:Isoprophyl alcohol (67:21:12)				
Gradient	Time	0	28	35	45
	%B	25	85	75	90
Flow rate	0.8mL/min				
Injection	20 μ L				

인삼 세포벽 다당체 분석 : 조세포벽 조제는 Fig. 3과 같이 80% MeOH 불용성 성분에서 amyloglucosidase를 반응시켜 전분을 제거하여 조세포벽 성분을 제조하였다. 조세포벽성분은 Barbier등의 방법에 따라 증류수, K-oxalate 용액, 0.05 M HCl, 0.05M NaOH 및 1.25M NaOH 용액 가용성 등 5 종류로 분획하였다. 각 분획물의 총당(Phenol/Sulphuric Reaction) 및 uronic acid(Carbazole Reaction)를 측정하여 압출에 의한 미삼 세포벽 성분의 분획별 추출률을 측정하였다. 각 분획을 Gel permeation chromatography(Sepharosil CL-6B)를 하여 다당체의 분자량 분포를 분석하여 압출의 효과를 검토하였다.

산성다당체의 면역활성 : SRB(Sulforhodamin) assay를 통하여 세포독성을 확인하여 처리 농도를 결정하고, 산성다당체의 면역활성을 측정하기 위해 Macrophage 활성화에 의한 NO농도를 측정하였다.

즉, RAW 264.7 cell을 배양하고, NO 활성 대조군으로 LPS(lipopolysaccharide, from Escherichia coli 026:B6, sigma)와 IFN- γ (interferon- γ , BD Pharmingen)을 사용하여 세포에서 유리된 nitrite(NO₂⁻)량을 측정하여 대식세포의 활성을 검증하였다.

Polymer의 구성당 분석 (The Uppsala Method): 추출/분획된 polymer의 구성당은 Uppsala method에 의하여 분석하였다. 즉, amylase 가수분해후 80% ethanol에 의하여 전분성분을 여액으로 제거한 후, Neutral Sugar Residues, Uronic Acid Residues, 및 Klason Lignin 등으로 측정하였다. 전분성분은 thermostable α -amylase and amyloglucosidase를 반응시켜 반응액에 4volume의 ethanol을 가하여 제거하고, 생성된 침전을 non-starch polysaccharide (NSP)로 회수하였다.

NSP는 H_2SO_4 가수분해한 후, 생성된 neutral sugars를 alditol acetates로 유도체를 만들어 gas-liquid chromatography로 측정하였다.

Acid hydrolysate내의 Uronic acids는 colorimetry로 측정하였고, Klason lignin은 ash-free acid-insoluble로 중량법으로 측정하였다. 즉, 회수된 polymer는 전분성분 외에 amylase-resistant polysaccharides 및 Klason lignin으로 나타내었다.

< GC conditions >

Hewlett Packard, Model 6890

Column : SP-2330 (ID 0.25mm×30m, film thickness 0.2 μ m)
Injection : Temp.-230 $^{\circ}C$, flow 10.3ml/min, volume 4 μ l, split 1:1
Oven Temp : Temp.-230 $^{\circ}C$ for 25min, column flow 1.0ml/min,
pressure 19.75 psi
Detector : Flame ionization detector, temp.-240 $^{\circ}C$,
make up flow 4.5ml/min

휘발성 향기 성분의 추출 , Gas chromatography/Masselectrometry(GC/MS),
Gaschromatography/ olfactometry(GC/O) 및 휘발성 향기 성분의 동정

시료를 20%v/w로 제조하여 60℃에서 20분간 평형시킨 후 40분 동안 85 μ m Carboxen /PDMS StableFlex이 코팅 Solid phase Microextraction (SPME)을 이용하여 포집 후 GC에 1분 동안 주입하였으며 GC의 분석조건은 Table과 같으며 internal STD로 n-caproic acid (sigma grade) 0.1 μ l를 사용하였다. 휘발성 향기 성분의 동정은 retention indices(RI), mass spectra 와 aroma properties를 비교하여 휘발성 향기성분을 확인하였다.

Instrument	Hewlette Packard 6890 GC
Detector	Hewlette Packard 5973N mass detector (MSD)
Column	DB-Wax(60m x 0.25mm I.d x 0.25 μ m film thickness : J & W Scientific, Folsom, CA, USA)
Temperature	injection port : 200 $^{\circ}$ C Column oven : initial temp. : 100 $^{\circ}$ C temp. rate : 2 $^{\circ}$ C final temp. I : 170 $^{\circ}$ C temp. rate : 4 $^{\circ}$ C final temp. II : 200 $^{\circ}$ C, 10min
Gas flow rate	Carrier gas He : 1ml/min
MSD condition	Capillary direct interface temperature : 250 $^{\circ}$ C Ion source temperature : 230 $^{\circ}$ C Ionization voltage : 70eV Mass range : 33-350 m/z Scan rate : 2.2 scan/sec

2. 압출 공정조건 범위 확정을 위한 예비실험

본 실험에 앞서 2개의 reverse element로 한 전형적인 screw 조합 및 1 mm die opening을 사용하여, screw 회전속도를 300 rpm 그리고 barrel을 135℃로 가열한 조건에서 인삼분말을 시간당 20~26kg 투입하면서 가수량을 변화시켜 압출온도의 변화양상을 살펴보았다.

이때 투입 반죽물의 수분함량을 15.0 ~30.0 % 범위 내에서 변화시키기 위하여 가수량을 시간당 1.5 L에서 6.0 L로 변화시켰다. 가수량을 증가시킬수록 압출온도가 낮아졌다. 즉, 반죽의 수분함량이 15% 이하에서는 압출온도가 180℃이상이므로 상승하여 압출물이 타는 현상이 일어났으며, 반죽의 수분함량 30%에서는 점도가 낮아 열 발생이 낮아 압출온도가 110℃이하로 떨어졌다.

압출온도가 140, 155, 170℃에 도달하였을 때 공정조건을 고정시켜 10분간 운전하여 압출물을 시료로 취하여 추출온도 및 용매에 따른 수용성 성분의 용해도를 측정한 결과 표2에 나타낸 것과 같다. 증류수를 용매로 사용한 경우 미삼의 상온에서의 용해도가 36%였고, 추출온도 80℃인 경우 용해도가 56%로 높아졌다. 압출 인삼의 경우 용해도가 70%에 달하였으며, 압출온도가 높을수록 용해도가 높게 나타났으나 추출온도에 따라 큰 변화를 보이지 않았다.

80% 에탄올을 용매로 사용한 경우에는 압출 인삼의 용해도는 원료미삼의 용해도 23.6%와 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 80% 에탄올에 용해되는 성분은 분자량이 작은 것이므로, 압출처리에 의하여 수용성 성분이 증가하는 것은 인삼 성분의 저분자화가 올리고당 수준까지는 일어나지 않음을 시사한다. 이는 표3에 나타낸 것과 같이 압출에 의하여 유리당 함량이 늘어나지 않고 오히려 감소한 결과와도 일치한다. 유리당 함량이 감소한 이유는 유리당이 갈변화 반응에 의하여 색소물질로 변화한 것으로 생각된다. 실제로 압출 인삼분은 백삼분말보다 진한 갈색을 나타내고 있었다.

압출 인삼분의 색도 변화는 표3에 나타내었다. 처리온도가 높을수록 명도는 대조구와 홍삼에 비해 모두 낮은 값을 나타내었으며, 적색도의 경우 대조구와 홍삼에 비해 모두 높은 값을 나타내었고 황색도는 대조구보다 높은 값을 나타내

있으며 홍삼분 보다 낮은 값을 나타내었다. 이는 압출처리 시 발생하는 고온과 낮은 수분활성도, 당성분 등에 의한 갈색반응물질이 생성된 것으로 생각된다. 압출인삼분 추출액의 색도 변화의 경우 또한 갈색반응물질에 의해 색이 진해진 것을 알 수 있었다.

인삼의 주요 생리활성 물질로 알려져 있는 사포닌과 산성다당체의 추출률 변화를 측정한 결과는 표 4 에 나타낸 것과 같이, 중량법에 의한 조사포닌의 경우는 압출인삼의 경우가 거의 2배 가까이 높았으나, 비색법에 의한 총사포닌의 경우는 최대 약 50% 까지 증가하는데 그쳤다. 그러나 extrusion 열처리에 의하여 사포닌의 함량이 또는 추출률이 증가함을 확인할 수 있었다. 그리고 산성다당체의 경우는 미삼의 1700 mg%의 함량에서 압출처리하면 3배 이상의 열수 추출률 증가가 확인되었다.

표 1. 조건별 압출 인삼의 추출용매 및 온도에 따른 가용성 성분의 변화

용매 및 온도	압출조건	용해도 (%)
증류수 (상온)	Raw	35.9
	140 ℃	68.2
	155 ℃	70.4
	170 ℃	78.0
증류수 (80℃)	Raw	56.0
	140 ℃	69.8
	155 ℃	72.4
	170 ℃	71.2
80% 에탄올(80℃)	Raw	23.6
	140 ℃	22.8
	155 ℃	24.8
	170 ℃	25.3

표 2 압출조건에 따른 압출물의 유리당 함량(mg%) 변화

처리조건	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	Total
Raw	239	57	1,580	145	2,031
140 °C	157	30	1,342	67	1,596
155 °C	65	23	1,125	45	1,258
170 °C	67	9	996	17	1,089

표 3 . 압출 인삼 분말 및 추출액 색도변화

Sample	Raw	140°C	155°C	170°C	홍삼분
형 태	powder	powder	powder	powder	powder
L	86.92	71.84	69.52	67.40	73.45
a	0.16	6.34	7.07	7.65	5.04
b	17.64	28.02	28.11	27.68	29.63
추출액 (450 nm)	0.3390	0.6433	0.837	0.9402	.

표 4 압출조건별 압출인삼 열수 추출물 사포닌 및 산성다당체 함량변화

처리조건	조사포닌 (%)	총사포닌 (mg%)	산성다당체 (mg%)
Raw	4.56	232	1,684
140°C	5.56	217	5,362
155°C	6.79	317	6,369
170°C	8.17	285	6,642

* 산성다당체 함량은 pectin 표준물질(uronic acid 80%)로 환산하여 계산함

이상의 예비 압출 실험결과 인삼은 extrusion cooking에 의하여 열수 추출률은 약 30% 증가하며, 이는 저분자 물질의 생성에 기인하는 것이 아니라 압출공정의 강한 전단에 의하여 세포벽의 수용화에 의한 고분자 성분의 부분 절단에 의한 수용성의 증가에 기인하는 것을 80%에탄올 추출률이 변화하지 않는 것과 유리당의 함량이 감소한 것을 미루어 확인할 수 있었으며, 인삼의 주요 생리활성물질로 알려진 사포닌은 압출처리 중 발생하는 열에 의하여 새롭게 생성되던가 전단에 의하여 열수 추출률 최소 50% 이상증가 하였고, 산성다당체의 경우는 압출온도가 높을수록 최대 약 300%이상 추출률이 증가함을 확인하였다.

3. 압출 공정변수에 따른 추출특성 변화

본 실험의 압출공정 범위는 수분함량 15~20% 범위, 원료투입량 20~25 kg/hr, screw speed 280~320 rpm 범위에서 열수 추출률을 극대화하고, 인삼차로씨의 관능이 우수한 압출물을 제조할 수 있는 최적조건을 설정하고, scale-up에 필요한 공학적 자료를 적출하기 위한 실험을 실시하였다.

예비 실험결과 얻어진 조건의 범위 내에서 압출성형 조건을 달리하여 처리하는 중 일어나는 시스템 변수(압출온도/압력 및 specific mechanical energy input)의 변화를 표 5에 나타내었다. 가수량이 증가할수록 전단에 의한 마찰열 발생이 감소하여 압출온도가 바렐 가열온도보다 낮아지는 경향이 있었으며, SME도 현저히 낮아지는 경향을 보여주었다.

표 5의 여러 조건에서 압출성형된 미삼분 압출물의 열수(80℃)에 의한 고형분 추출률 변화는 표 6에 나타내었다. 압출온도가 증가할수록 용해도지수(WSI)가 높아지는 경향을 나타내었으며, 인삼의 압출공정에 의해 세포벽이 파괴되어 세포벽 성분의 용해도가 증가하였고, 추출잔사의 수분흡착지수(WAI)가 감소하여 추출률이 증가되었다고 생각된다.

표 5. 미삼 압출성형에 공정 변수변화에 따른 시스템 변수

Item sample	Process parameter				System parameter		
	Feed rate (kg/hr)	Water feed rate (ℓ/hr)	Screw speed (rpm)	Barrel heating temp. (°C)	Ext. Temp. (°C)	Pressure (bar)	SME ¹⁾ (kJ/kg)
1	23	2.0	315	140	160	18	116.5
2	23	1.9	315	160	165	16	108.4
3	23	1.8	315	170	170	13	104.4
4	23	1.7	315	175	174	12	104.4
5	7	2.0	328	86	125	13	434.5
6	5	2.7	315	102	126	3-7	388.0
7	23	2.2	315	169	161	11	403.6
8	26	2.2	315	131	173	15	404.0
9	26	2.2	315	120	170	13	456.1

표 6 . 압출조건에 따른 WSI, 추출률 및 WAI 변화

sample item	Raw	1	2	3	4	5	6	7	8	9
WSI (%)	52.3	66.1	66.8	67.3	68.0	61.0	62.8	68.4	67.0	68.6
E ¹⁾ (%)	38.1	59.2	60.1	61.9	63.0	53.4	56.8	61.6	60.1	61.5
WAI	5.68	3.08	3.05	2.46	2.27	3.19	2.56	3.14	3.06	3.32
Uronic acid (mg%)	247.6	598.7	623.9	491.9	458.5	333.1	303.9	364.5	345.9	358.6

¹⁾ Extractability: 상등액으로 회수된 추출액의 고형분으로 계산된 추출률
 WSI: 원심분리 후 침전물 고형분에 흡착된 수분의 양 (g water/g solid)

압출조건을 feed rate 23 kg/hr로 고정하고 가수량을 시간당 2.0 ~1.7 L 및 가열온도를 140~175°C로 변화시키면서 압출성형한 시료 (running no 1,2,3,4) 시

료의 열수추출물의 사포닌 함량을 비교분석한 결과는 표 7과 같다. 즉, 가수량을 줄이고 바렐 가열온도를 증가시킬수록 결과적으로 압출온도가 160℃에서 174℃로 높아질수록 고형분의 추출률 및 인삼사포닌의 추출률이 높아지는 경향을 나타내었으면, 이러한 실험범위 내에서는 미삼압출물에 burnt flavor가 생성되지 않았다.

표 7. 압출인삼의 조사포닌과 사포닌의 열수추출률 변화

	조사포닌 (%)	총사포닌(비색법) (mg%)	총Ginsenoside (mg%)
Raw	5.62	232	2.00
1	8.71	249	2.98
2	8.56	308	3.13
3	8.64	307	3.13
4	9.25	329	3.02
홍삼	4.52	144	1.90

*총 Ginsenoside는 HPLC로 분석

추출된 인삼 사포닌을 TLC로 분석한 결과 FIG. 3과 같았다. 대조구로 사용한 미삼 및 홍삼 추출사포닌과 비교하여 보면 STD로 사용한 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf 및 Rg1 이외에 홍삼에서 나타나는 Ginsenoside Rh류의 spot이 진하게 나타나는 것으로 확인되었다.

잠정적으로 인삼의 주요 생리활성물질로 알려진 사포닌은 압출처리 중 발생하는 열에 의하여 새롭게 생성되던가. 전단에 의하여 열수 추출률 최소 50% 이상 증가 함을 확인할 수 있었다. 특히, 홍삼에서 발견되는 ginsenoside Rh 류와 부분적으로 aglycone화된 ginsenoside Rf 및 20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S) protopanaxadiol (compound K) 등이 생성되었음을 TLC에 의하여 정성적으로 확인하였다.

미삼 압출성형조건 결정: 이상의 압출성형 실험 및 추출 실험에 의하여 미삼의 세포벽 성분의 다당체 및 사포닌의 추출률을 극대화 시키기 위한 압출성형 최적조건은 사용한 Buhler DNDL 44 twin-screw extruder의 경우 L/D 20, screw type : 66R*3, KD(RLR), 44R*5, RSE(LR), 44R*4, REE(LRL), 33R*5, ST, die opening: 1 mm orifice type 의 기계적 조건에서 원료투입 시간당 23 kg, 가수량 2 l이며, screw 회전속도: 315 rpm, barrel 가열온도: 175℃ 이었으며, 이 때 system parameter는 압출온도: 170 ℃, 압력 10 bar, SME: 110 KJ/kg이었다.

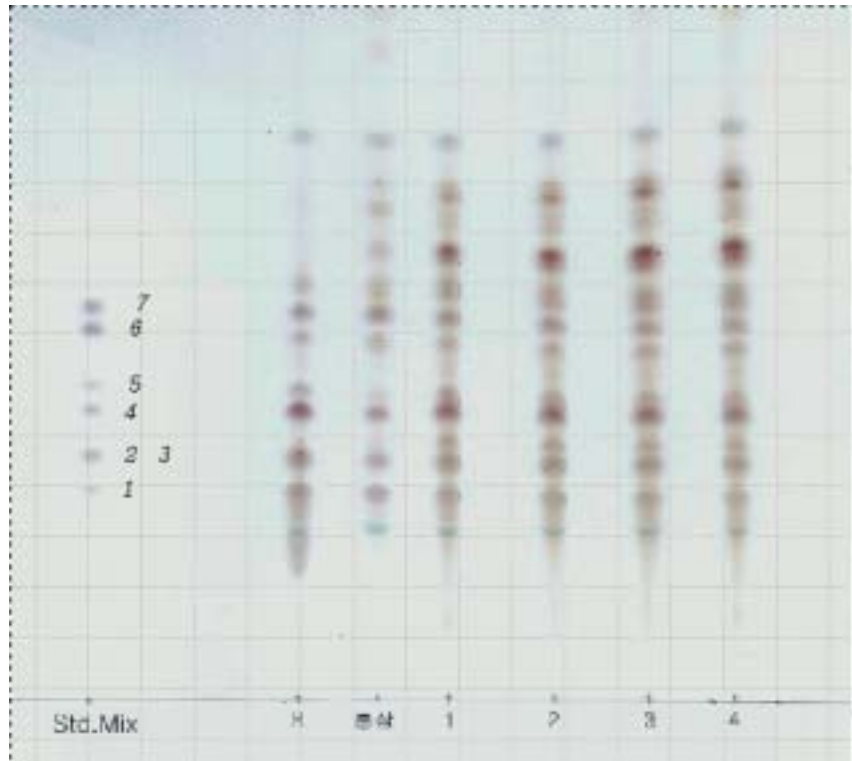


Fig. 4. 압출 미삼 열수추출물의 사포닌(Ginsenoside) TLC 결과
 Mobile Phase : Chloroform - Methanol - water (65:35:10)
 (1) ginsenoside Rb₁ (2) ginsenoside Rb₂ (3) ginsenoside Rc
 (4) ginsenoside Rd (5) ginsenoside Re (6) ginsenoside Rf
 (7) ginsenoside Rg₁

4. 최적조건 압출미삼의 추출 특성 및 향미성분 변화

가. 미삼 extrudates의 제조

Bhuler DNDL-44 쌍축 extruder를 사용하여, L/D ratio 20, screw type : 66R*3, KD (RLR), 44R*5, RSE(LR), 44R*4, REE(LRL), 33R*5, ST, die opening 1mm orifice type의 기계적 조건에서 상기 적출된 최적 운전조건에서 미삼분말 단독 또는 1% citric acid와 혼합한 미삼분말을 압출성형하였다. 이 때 2종의 미삼원료 공히 system parameter인 압출온도는 155℃, SME는 340 KJ/KG을 나타내었다. 압출물의 수분함량은 미삼 단독(EX)인 경우 5.7%, 1% citric acid와 혼합한 경우 2.3 %로 약간의 차이가 있었다.

나. 추출률 및 추출 다당체의 특성비교

최적 압출조건에서 압출성한 압출 미삼을 20배의 증류수로 상온에서 2시간, 또는 끓는 물로 16시간 추출한 경우 추출률을 비교한 결과 표 8 에 나타낸 것과 같다.

표 8. 압출 미삼의 추출방법에 따른 고형분, 우론산 및 사포닌 추출률

추출방법 및 성분		고형분 (%)	우론산 (mg%)	조사포닌 (%)	총사포닌 (mg%)
상온 2hr	RAW	33.7	57.3	5.89	134.4
	EXT	70.3	514.7	8.10	231.8
	EXTC	69.8	523.9	9.92	180.7
환류 15hr	RAW	57.9	493.1	2.33	240.7
	EXT	73.3	587.0	2.66	237.9
	EXTC	75.7	600.0	2.72	240.7

압출처리에 의하여 상온 단시간 추출 경우에는 추출률 증가가 각 성분별로 고품분(100%), 우론산(900%) 및 사포닌 (100%) 에 달하였으나, 고온 장시간 추출의 경우에는 압출에 의한 고품분 추출률 증가가 30%에 그치는 등 효과가 크게 나타나지 않았다. 구연산의 첨가한 경우는 추출률에 미치는 효과가 미삼 단독 처리한 경우와 크게 차이가 나지 않았다.

압출성형 처리가 미삼의 세포벽 성분 중 어떠한 성분을 수용화시켜 물 추출률을 증가시키려는가를 살펴보기 위하여 압출미삼 분말로부터 Fig. 1과 같은 과정에서 제조된 조세포벽을 증류수, 1% K-oxalate, 0.05 M HCl, 0.05M NaOH, 1.25M NaOH 용액으로 추출한 각 분획물의 총당 및 우론산의 함량을 측정된 값을 그림 5 및 6에 나타내었다.

즉, 압출처리한 미삼의 조세포벽 성분은 증류수로부터 1.25M NaOH 용액으로 연속적으로 추출할 때, 각 분획에 용해된 총당의 합은 대조구인 미삼분말의 경우 제조된 조세포벽 5 g으로 부터 총당 1.86 g 이 추출되었고, 압출 미삼의 경우 미삼 단독 처리구는 2.2 g 구연산 첨가구는 2.17 g로 압출처리에 의하여 세포벽성분의 총 추출률은 약 18% 증가하는 데 그쳤으나, 순수 수용성 다당체 (증류수 획분) 만을 비교할 때, 대조구인 미삼의 경우 1.12 g 으로 총 추출성분의 60%만이 추출되는 데 그쳤으나, 압출처리한 경우는 총 용해성 다당체의 약 80%이상이 순수 수용성 다당체로 나타났다.

대조구인 경우 0.05M NaOH 용해성 다당체 (일반적으로 hemicellulose)가 총 용해 다당체의 약 22%에 달하는데 비하여 압출처리한 경우는 0.05M NaOH 용해성 다당체의 비율이 2%정도에 머무는 것으로 나타났다. Fig 6의 우론산의 추출 경향도 비슷한 경향을 나타내었다.

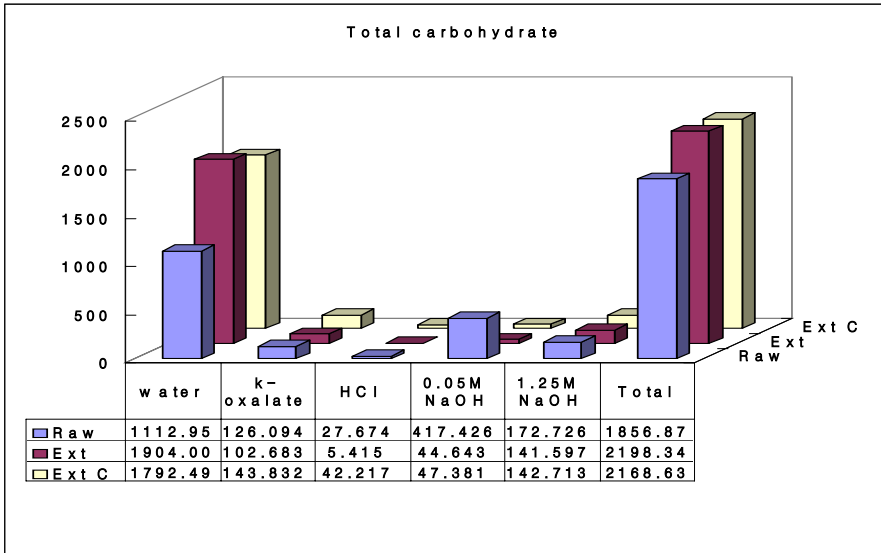


그림 5 압출 미삼 조세포벽의 sequential extraction 분획의 neutral sugar 함량

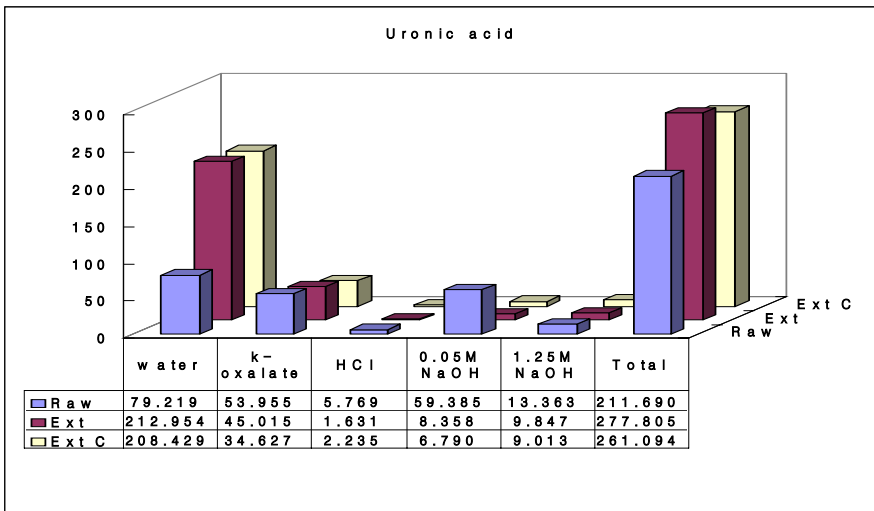


그림. 6 압출 미삼 조세포벽의 sequential extraction 분획 추출물의 우론산 함량 변화

이상의 결과로부터 미삼의 압출처리는 미삼의 세포벽 구성성분 중 식물세포벽의 견고성을 유지시키기 위하여 cellulose 성분과 pectic 성분의 가교역활을 하는 hemicellulose 성분의 가교를 물리적인 전단에 의하여 절단 또는 용융시켜 수용성을 증가시키는 것으로 추정할 수 있었다.

압출처리에 의하여 미삼 세포벽 성분의 수용성 증가가 압출전단에 의하여 각 다당체 분의 분자 수준에서의 붕괴에 의한 것인지를 확인하기 위하여 조세포벽 각 분획 다당체의 분자량 분포를 sheparose CL-6B를 사용하여 GPC 분석을 행한 결과 순수 수용성 획분(pectic류 로 추정) 의 다당체 크로마토그램을 Fig.7에 나타내었다. 결과를 보면 압출처리 미삼의 수용성 획분은 압출처리하지 않은 대조구 미삼분말의 수용성 획분 다당체보다 고분자 다당체의 조성이 큰 것으로 나타났다. 즉, 미삼세포벽 다당체는 압출성형처리에 의한 고압/고온 하에서 전단에 의하여 저분자화 되기보다는 각 세포벽 구성 다당체의 가교역활을 하는 hemicellulose를 가용화시키는 것으로 잠정 결론을 내릴 수 있다.

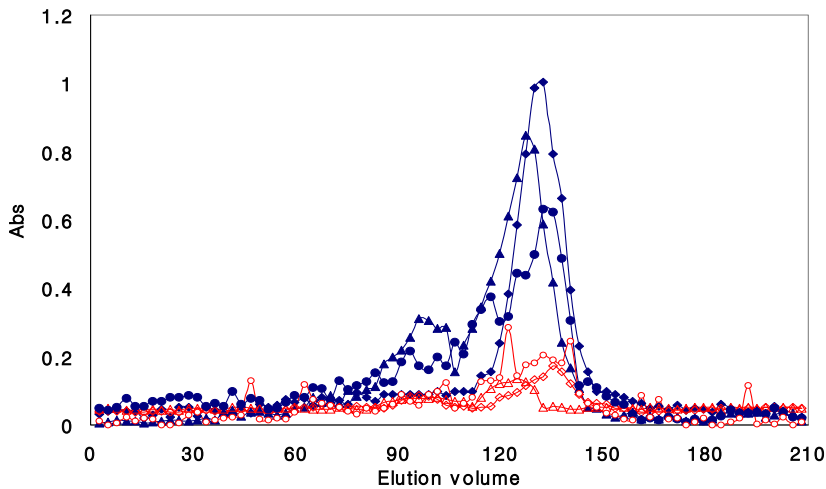


Fig. 7 Gel permeation chromatogram of water soluble polymer extracted from crude cell wall of extruded ginseng

-◆-: Raw total CHT, -▲-: Ext total CHT, -●-: ExtC total CHT.
 -◇-: Raw uronic acid, -△-: Ext uronic acid, -○-: ExtC uronic acid

다. 산성 다당체 분획 및 면역활성 비교

연속 추출에 의한 고분자 탄수화물의 특성

그림 3의 연속 추출기법에서 얻은 각각의 추출물을 0.05M NaOH와 HCl로 중화시키고, 50% 에탄올용액으로 침전시키고 난 후 dialysis tubing을 이용하여 염을 제거하여 얻어진 고분자 탄수화물(NSP)의 수율 및 우론산 함량을 분석하여 표 9에 나타내었다. 연속 추출법에 의해 생성된 추출물을 50% 에탄올 용액으로 침전시켜 polymer를 생성 시켰다. 생성된 polymer의 함량은 raw, 155t, 155c 각각 93.702g, 92.81g, 102.478g였고, 산성다당체의 총 함량은 각각 40.414g, 38.428g, 46.026 g 으로 총 함량에는 큰 차이가 없었지만, 열수 추출물중 raw에 비해 압출성형 미삼이 각각 214%와 155%의 증가량을 보였고, 산성다당체의 함량은 145% 및 125%의 증가량을 보였다. 또한, 미삼 열수 추출물중 다당체 함량은 raw, 155t, 155c 각각 100, 80, 96.4%로써 polysaccharide가 주된 구성 성분임을 확인하였다. 이는 압출공정 중 전단응력 및 마찰열등이 세포벽 구성 매트릭스를 붕괴하고, 미삼의 세포벽 구성 성분의 분자량을 polymer에서 oligomer 정도의 수준으로 낮춤에서 오는 수용성 성분 증대의 결과로 판단된다. 인삼 추출물을 이용한 제품 개발 시 화학적인 추출을 하지 않고 압출성형공법을 이용하여 열수 추출물에 세포벽에서 유리된 산성다당체 함량을 증가시켜 기능성 식품제조를 기대할 수 있을 것으로 판단되며, 인삼 추출박을 최소화 하여 효율성을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 즉, 155t, 155c 미삼 중 약산성에서 추출된 polymer의 TCH와 UA의 함은 Raw미삼 중 약산성에서 추출된 polymer의 TCH와 UA의 함보다 277.2, 277.4% 적게 추출된 것으로 확인 할 수 있었다.

Table 9. TCH, Uronic acid, and solid contents in ginseng extracts.

	Extracation Sovent	solid	TCH	UA
Raw	hot water	26.081	10.805	16.266
	0.05M HCl	43.064	33.137	9.755
	0.05M NaOH	21.822	5.202	13.813
	1.25M NaOH	2.735	1.995	0.580
155t	hot water	55.801	20.981	23.685
	0.05M HCl	24.42	5.255	10.217
	0.05M NaOH	11.039	1.293	4.281
	1.25M NaOH	1.55	1.491	0.245
155c	hot water	40.438	18.653	20.349
	0.05M HCl	27.928	5.323	10.138
	0.05M NaOH	28.944	7.227	15.218
	1.25M NaOH	5.168	4.231	0.321

- Ion-exchange를 이용한 산성다당체 분획

연속추출법에 의해 추출된 각각의 NSP를 DEAE shepharose CL-6B가 충전된 column으로 산성다당체를 분획하였다. 즉, phosphate buffer(pH8, 0.1M)로 NSP를 녹인 후 loading 시켜 NaCl의 농도를 0~1M(gradient), 2M(stepwise)로 높여 가며 분획하였다. 중성 다당체는 phosphate buffer를 elution 하여 분획 하였고, 산성다당체는 NaCl의 농도 변화로 분획하였다. 각각의 연속 추출법에 의해 추출된 NSP의 산성다당체의 분획 패턴을 그림 8, 9 및 10에 나타내었다.

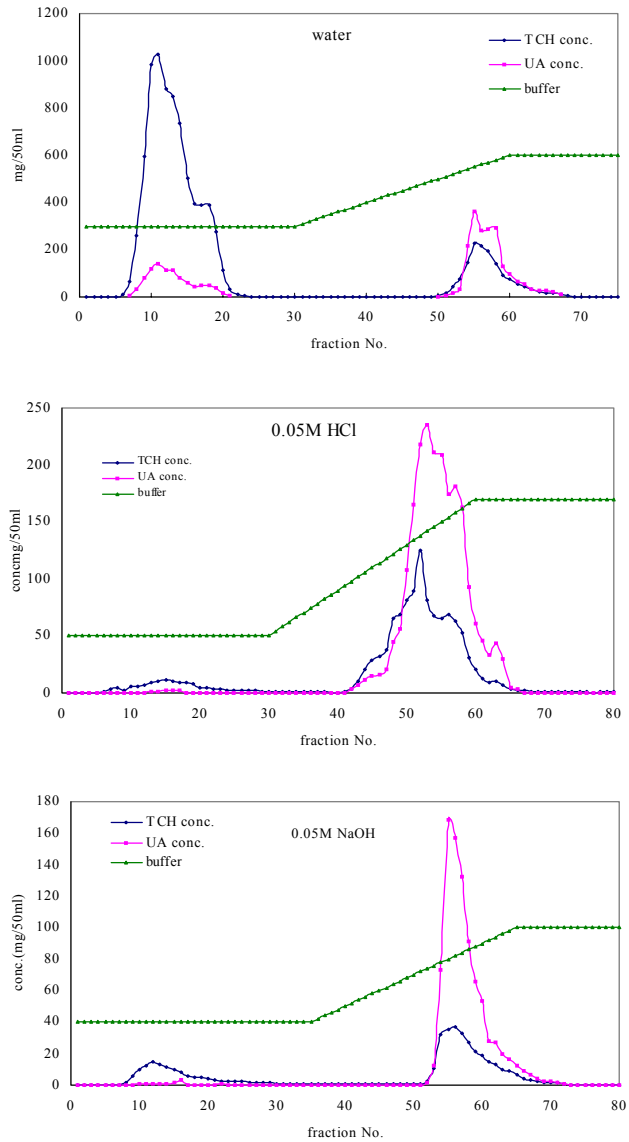


Fig. 8. Elution profile of hot water, 0.05M HCl, and 0.05M NaOH soluble polysaccharide from Raw ginseng on DEAE sepharose CL-6B

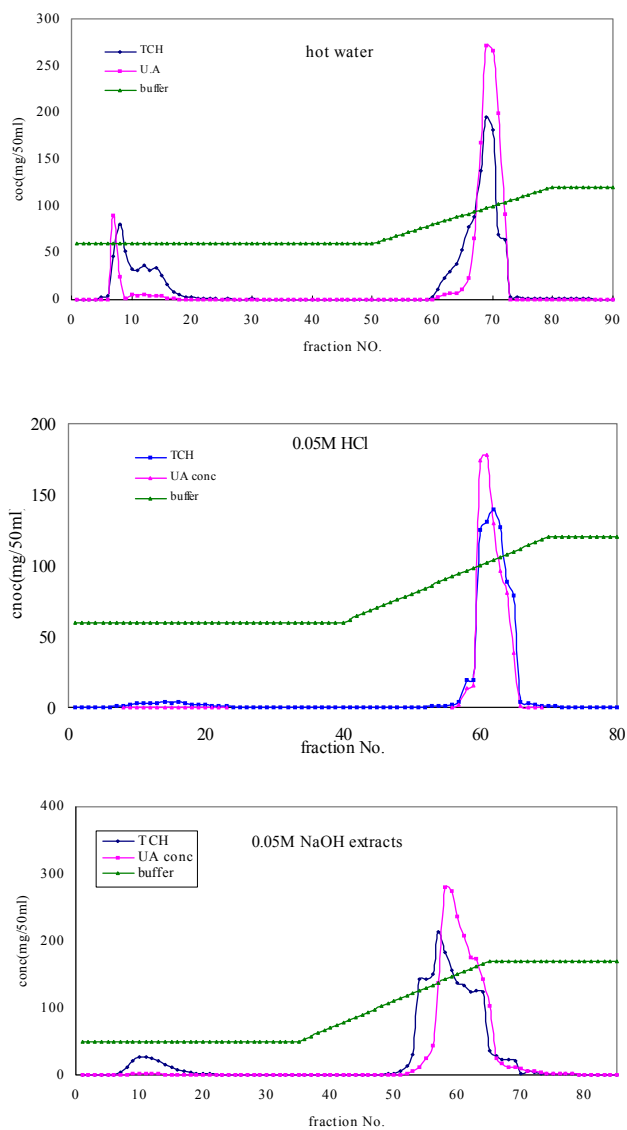


Fig. 9. Elution profile of hot water, 0.05M HCl, and 0.05M NaOH soluble polysaccharide from 155t ginseng on DEAE sepharose CL-6B

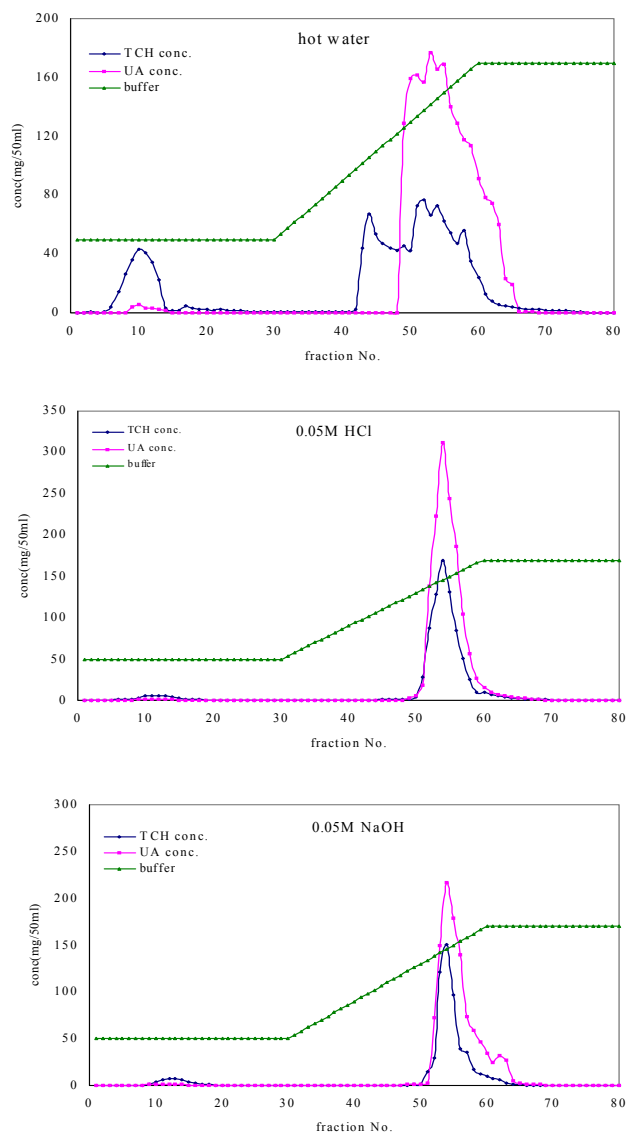


Fig. 10. Elution profile of hot water, 0.05M HCl, and 0.05M NaOH soluble polysaccharide from 155c ginseng on DEAE sepharose CL-6B

이온크로마토그래피에서 얻은 산성 다당체 획분의 수율 및 우론산 함량을 측정하여 표 10에 나타내었다. 열수 추출물의 산성다당체 함량을 비교할 때 압출 미삼의 함량이 raw에 비해 약 4.52 와 3.72배 정도 높은 추출 율을 보였다. 또한 0.05M HCl에서 추출된 산성다당체의 함량은 압출 미삼이 적은 추출 율을 보였다. 이로써 화학 용매를 이용한 추출보다 압출성형공법이 세포벽 성분(산성다당체)의 수용화에 많은 영향을 끼침을 확인할 수 있었다.

Table 10. Yield and composition of acidic polysaccharide pool on Ion-exchange column from extracts solid obtain by sequential extraction procedure

sample	extraction solvent	yield g/100g	ratio	
			TCH	acidic poly.
Raw	water	4.28	42.32	57.68
	0.05M HCl	11.83	31.20	63.32
	0.05M NaOH	5.45	8.56	26.03
155t	water	18.97	47.24	52.76
	0.05M HCl	4.36	35.61	35.02
	0.05M NaOH	6.12	88.28	92.14
155c	water	15.92	33.94	66.06
	0.05M HCl	9.56	25.59	45.97
	0.05M NaOH	6.17	17.99	35.78

- 산성다당체의 구성성분 분석

이온교환 크로마토그래피에 의해서 분획된 미삼의 산성다당체를 모아 염 성분을 없애기 위해 dialysis tubing(MW 12000, sigma, USA)을 이용해 24시간씩 3회 반복 투석한 다음, 동결건조 하여 uppsala method에 의해 산성다당체의 구성당 및 우론산 함량을 표 11에 나타내었다.

이온교환 크로마토그래피에 의해 분획된 산성다당체의 구성성분은 galactose와 arabinose가 주된 성분임을 확인 하였다. 즉, 각각의 미삼에서 열수 추출물의 산성다당체에는 arabinose와 galactose가 주된 구성 성분 이었고, 약 산성이나 약 알칼리에서 추출된 산성 다당체는 galactose가 주된 구성 성분임을 확인 하였다.

Table 11. Sugar composition of acidic polysaccharide in raw, 155t, and 155c ginseng

	raw			155t			155c		
	water	0.05M HCl	0.05M NaOH	water	0.05M HCl	0.05M NaOH	water	0.05M HCl	0.05M NaOH
rha	1.20	4.44	4.32	1.81	5.39	6.60	1.33	6.71	4.00
rib	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ara	19.74	1.98	2.00	22.38	4.28	5.39	13.72	1.77	4.12
xyl	0.34	1.37	1.782	0	2.85	0	0.63	3.82	0.95
man	0.15	0.15	0	0	0	0	0	0	2.38
gal	17.02	38.51	16.08	24.40	34.35	35.55	28.39	35.30	35.01
glc	0.44	0.36	15.96	0.89	1.54	0	0.45	0.82	1.17
sum	39.15	46.82	40.15	49.48	48.41	47.53	44.52	48.41	47.63
UA	61.85	53.18	59.85	50.52	51.59	52.47	55.48	51.59	52.37

각 얻어진 산성 다당체의 면역활성을 측정하기 위하여 먼저 각 획분의 세포독성 여부를 Sulforhodamine B(SRB) assay법을 사용하여 확인하였다.

즉, Machrophge를 96 well plate에 well당 10^6 cells/ml가 되도록 seeding하고 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 시료(500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 μ g/ml)를 100 μ l 첨가하여 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 24시간 배양하였다. 이 때 blank에는 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지만 넣었고, 대조군에는 세포와 시료 대신 배지를 첨가하였다. 배양 24시간 후에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 50 μ l 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 방치하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 증류수로 5번 씻은 후 실온에서 건조시킨 후 0.4% SRB 100 μ l를 첨가하여 30분 동안 염색시켰다. 다음 1% acetic acid로 5번 씻은 후 다시 실온에서 건조시킨 후 0.01M tris base를 100 μ l 첨가한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표 12에서 보는 바와 같이 세포 독성 실험 결과 모든 시료 군에서 세포독성은 나타나지 않았다.

Table 8. Survival effect of acidic polysaccharide from ginseng in sulforhodamin B assey that determined after 1day incubation at 37 $^{\circ}$ C

Conc.(ug/ml)	raw			155t		
	water	0.05M HCl	0.05M NaOH	water	0.05M HCl	0.05M NaOH
500	79	90	76	92	98	94
100	78	82	82	100	98	100
50	82	81	83	97	84	94
10	80	79	81	97	82	93
5	78	80	83	92	82	98
1	79	79	87	97	79	100
0.5	80	81	85	95	85	100
0.1	79	79	81	91	94	95

2) Machrophage에 의한 NO활성 측정

Machrophage는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD)로

부터 Raw264.7 cells을 구입해서, 5% CO₂, 37°C상태에서 10% FBS(fetal bovine sereum), 50 units/ml penicillin 및 50µg/ml streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco-BRL)에 배양하였다. 배양된 machrophage는 96well plate에 well당 10⁶ cells/ml이 되도록 seeding하여 4시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 1µg/ml LPS, IFN-γ1ng/ml와 시료(500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1µg/ml)를 처치한 후, 5% CO₂, 37°C incubator에서 24시간 배양하였다. 이 때 blank에는 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지만 넣었고, NO 생성의 대조군으로는 1µg/ml 용량의 LPS lipopplysaccharides, from Escherichia coli 026:B6, Sigma)와 IFN-γ(Interferon-γ, BD Pharmingen) 1ng/ml을 첨가하였으며, 각 시료는 NO활성 실험 전에 SRB (Sulforhodamin) assay를 통하여 세포독성을 확인하여 처리 농도를 결정하였다. NO생성량은 세포로부터 유리된 nitrite(NO₂⁻)량으로 측정하였는데, 세포배양 상등액 100µl에 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)를 100µl 혼합하여 20분 동안 반응시킨 후에 490nm에서 흡광도 측정하였다.

산성 다당체의 농도 500ug/ml에서 NO의 활성이 높게 나타났고, 열수 추출물에 함유되어 있는 산성 다당체가 가장 높은 NO 활성을 나타내었다. 시료 간에 따라 NO생산량을 그림 4에 나타내었다. 또한 약산성이나 약 알칼리에서 추출된 산성 다당체보다 열수에서 추출된 산성 다당체가 NO활성이 높게 나타났다.

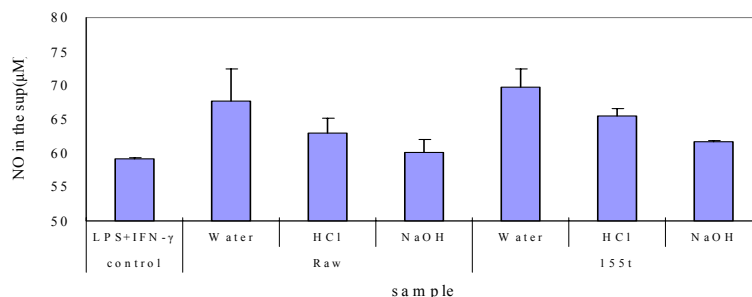


Fig. 4. production of nitrite from machrophages stimulated with LSP+IFN-γ in the presence acidic polysaccharide(500ug/ml) in vivo for 1day

라. 향미특성 분석

압출조건에 따른 압출미삼의 향미특성을 관찰하기 위하여 건조 미삼분말 (RAW)과 125, 160℃에서 압출성형한 시료를 20%v/w로 제조하여 60℃에서 20분간 평형시킨 후 40분 동안 85 μ m Carboxen /PDMS StableFlex이 코팅 Solid phase Microextraction (SPME)을 이용하여 포집 후 GC를 이용하여 분석한 결과를 그림 및 표에 나타내었다.

2-propenal을 포함한 7개의 aldehyde, limonene를 포함한 23개의 hydrocarbon과 eugenol을 포함한 6개의 alcohol등이 검출되었다.

이중 floral과 sweety 향을 나타내는 limonene은 시료의 가열 처리 온도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타냈으며 (+)-aromadendrene의 경우 %area에서는 큰 차이를 나타내지는 않았으나 GC/O에서는 가열 온도가 높은 160℃의 시료에서만 감지되어 온도가 높아짐에 따라 향의 강도가 높아짐을 알 수 있었다.

한편, 인삼의 향에서 문제가 되는 흙냄새를 나타내는 물질은 α -gurjunene로서 가열 온도가 높아짐으로서 %area는 감소하였으나 GC/O에서는 큰 차이가 없이 비슷한 강도로 감지되었다. 인삼냄새와 뿌리 냄새를 나타내는 cedrene-V6는 15개의 C와 24개의 H로 이루어진 물질로서 cedar 나무에서 추출한 essential oil이다. 가열 처리한 원료보다 raw에서 높게 검출되었고 GC/O에서는 가열 처리 온도가 높아짐에 따라 fresh한 인삼의 냄새 보다는 따뜻한 인삼 즉 가열한 인삼의 향으로 감지되었으며 chromatogram 전체적으로 볼 때 %area는 적으나 감지되는 강도는 가장 크고 강하게 나타났다.

2-propenal을 포함한 7개의 aldehyde, limonene를 포함한 23개의 hydrocarbon과 eugenol을 포함한 6개의 alcohol등이 검출되었다. (그림 4 및 table 참조)

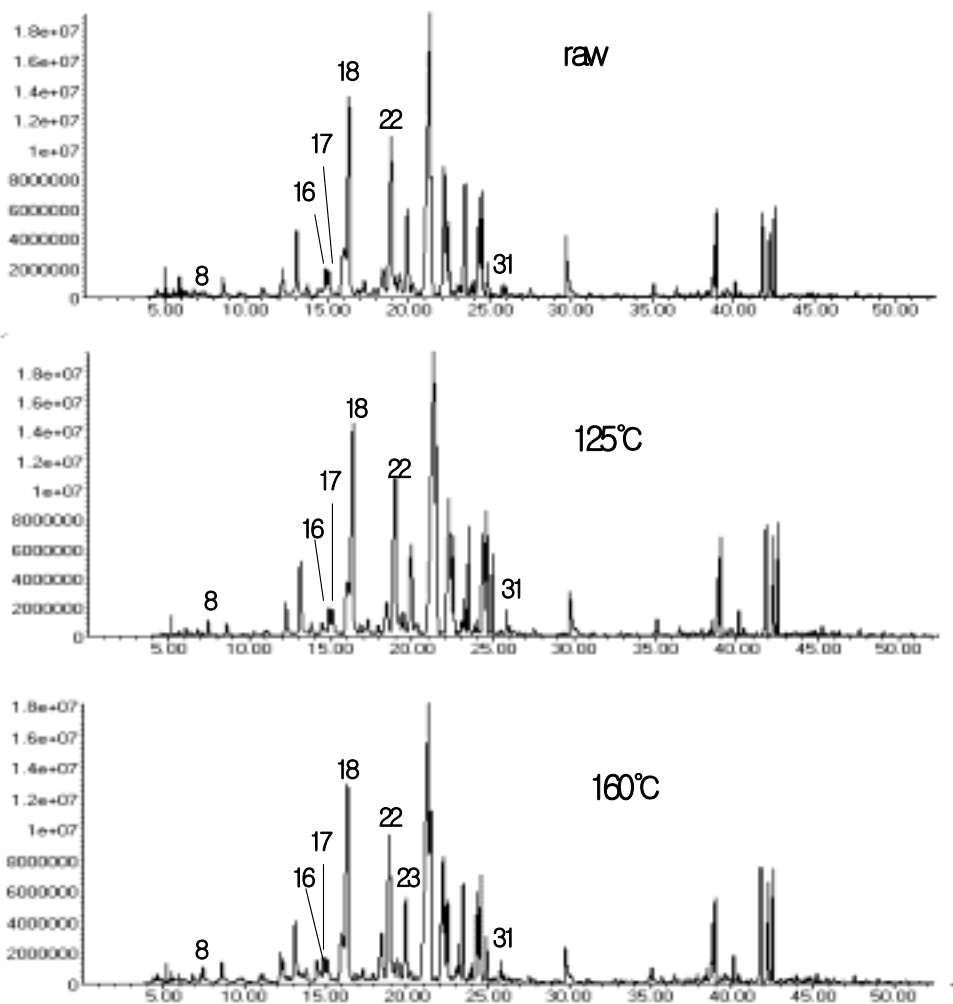


Fig. 8 향기성분 Gaschromatograms

표. 9 압출미삼의 향기성분 분석

No*	RI	compound	%area			aroma description
			raw	125℃	160℃	
1	828	2-propenal	0.141	0.037	0.144	-
2	894	α -pinene	0.197	0.084	0.076	-
3	901	toluene	-	-	0.012	-
4	961	n-hexanal	0.182	0.124	0.128	-
5	1102	β -pinene	0.415	0.279	0.122	-
6	1118	β -myrcene	0.112	0.084	0.022	-
7	1176	n-heptanal	0.178	0.141	0.111	-
8	1204	limonene	0.111	0.093	0.066	floral, sweety
9	1302	2-amylfuran	0.186	0.360	0.459	-
10	1342	n-octanal	0.597	0.510	0.717	-
11	1387	2-heptenal	0.047	0.014	0.053	-
12	1429	2-nonanone	0.202	0.099	0.207	-
13	1433	n-nonanal	0.137	0.071	0.214	-
14	1464	2-cyclopentyl-4-isopropylphenol	1.097	1.005	0.084	-
15	1497	frufural	-	0.077	0.440	-
16	1534	α-gurjunene	1.152	0.916	0.951	earthy
17	1539	cedrene-V6	0.265	1.033	1.035	wood, root
18	1569	β-panasinsene	8.326	7.853	7.528	spice
19	1581	cadinene	0.343	0.392	0.355	-
20	1605	aristolene	0.427	0.344	0.406	-
21	1615	β -elemene	1.579	1.181	2.503	-
22	1631	calarene	9.072	7.772	7.230	rubber
23	1635	(+)-aromadendrene	1.056	0.859	1.018	burnt, honey**
24	1645	1H-cycloprop[e]azulene	2.461	3.891	3.651	-
25	1672	(-)- α -panasinsen	6.786	16.944	16.607	-

표. 9 압출미삼의 향기성분 분석 (계속)

26	1676	trans- β -farnesene	-	-	5.352	-
27	1690	α -humulene	-	5.844	4.897	-
28	1710	(+)-leden	0.262	0.704	0.865	-
29	1716	β -neoclovene	3.332	2.692	2.618	-
30	1746	bicyclogermacrene	0.865	1.898	1.087	-
31	1765	δ -cadinene	0.292	0.533	0.477	-
32	1769	naphthalene	0.271	0.243	0.207	unpleasant
33	1807	dehydroaromadendrene	-	0.060	0.121	-
34	1847	IS***	-	-	-	-
35	2071	caprylic acid	0.190	0.127	0.221	-
36	2085	(-)-globulol	0.283	0.436	0.504	-
37	2093	viridiflorol	0.087	0.122	0.143	-
38	2132	spathulenol	1.648	2.028	2.223	-
39	2155	3,3,7,11-tetramethyltricyclo[5.4.0.0[4.11]] undecan-1-ol	1.850	2.142	2.321	-
40	2170	eugenol	0.021	0.046	0.060	-

* figure의 no 와 동일

** 160℃ 의 원료에서만 향이 detection됨

*** internal STD

제 2 절 열수 추출 공정 모델 확립

1. 압출 미삼의 제조

Bhuler DNDL-44 쌍축 extruder를 사용하여, L/D ratio 20, screw type : 66R*3, KD (RLR), 44R*5, RSE(LR), 44R*4, REE(LRL), 33R*5, ST, die opening 1 mm orifice type의 기계적 조건에서 상기 적출된 최적 운전조건에서 미삼분말 단독 또는 1% citric acid와 혼합한 미삼분말을 압출성형하였다. 이 때 2종의 미삼원료 공히 system parameter인 압출온도는 170℃, SME는 340 KJ/KG을 나타내었다. 압출물의 수분함량은 미삼 단독(EX)인 경우 5.7%, 1% citric acid와 혼합한 경우 2.3 %로 약간의 차이가 있었다.

2. 압출 미삼의 물 추출액의 분석

- 고형분 용해도 및 추출물

30배의 물을 가한 후 각 추출온도에서 2시간 추출한 결과 고형분의 용해도 및 추출률은 표 1과 같았다.

Table 1. Changes of Solid Solubility and Extrcatibility of Extruded Ginseng by extraction temperature

Extraction Temp/ Treatments		Solid Solubility (%)	Extractability(%)
Room Temp.	RAW	40.55	30.41
	EXT	60.69	60.68
	EXTC	64.50	59.40
Boiling Temp.	RAW	63.08	52.60
	EXT	63.38	52.83
	EXTC	65.41	59.30

즉, 고형분의 추출률은 상온추출의 경우 extrusion 처리한 시료가 약 2배 정도 높았으나, 열수추출의 경우는 큰 차이가 없었다.

- 각 추출액의 유리당 및 사포닌 분석 결과

각 추출액에 4 vol의 ethanol을 가하여, 고분자물질을 제거한 후, 80% ethanol에 녹는 성분을 몰포화 butanol로 유리당과 사포닌 성분으로 분획하여 각 성분을 정량한 결과를 표 2에 나타내었다. 구연산을 가하여 압출처리한 경우(EXTC)를 제외하면 유리당의 추출률은 열수추출의 경우가 높았다. 특히, EXTC의 경우 sucrose는 열수 추출 중 분해된 것으로 보여진다.

그러나, 총 사포닌의 추출률은 압출처리에 의하여 크게 증가하였다. 특히 상온 추출의 경우 약 3배의 추출률을 보였으나, 열수추출의 경우 그 증가량은 약 1.7배에 그쳤으며, 특히 EXTC의 약 40%로 낮아졌는데, 이는 산의 작용으로 ginsenoside가 분해되었을 가능성을 나타내었다.

Table 2. Extractability of Free Sugar and Saponins

(unit: mg/100 G Ginseng)

	RAW		EXT		EXTC	
	RT	BT	RT	BT	RT	BT
Total Free Sugar	9,600	11,690	8,390	9,040	10,000	5,520
Fructose	2,460	3,870	1,790	4,130	3,060	3,410
Glucose	2,640	3,670	540	2,940	1,170	1,640
Sucrose	3,510	2,160	5,560	1,500	5,380	0
Maltose	990	2,000	500	470	390	470
Lactose	0	0	0	0	0	0
Total Saponin	1,197	2,710	3,377	4,592	3,653	1,136

각 추출액의 사포닌의 ginsenoside 조성은 표 3 와 같았다.

인삼의 주요 생리활성물질로 알려진 사포닌은 압출처리 중 발생하는 열과 전단에 의하여 열수 추출률 최소 50% 이상증가 하였고, 특히, 홍삼에서 발견되는 ginsenoside Rh 류와 부분적으로 aglyconization된 ginsenoside Rf 및 20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S) protopanaxadiol (compoud K) 등이 생성되었음을 1차 년도 TLC에 의한 정성 확인하였고, 2 차 년도에는 HPLC에 의하여 정량 확인하였다. 또한 Rg3가 extrusion처리에 의하여 생성되었음을 확인할 수 있었다. 구연산을 첨가하여 압출처리한 EXTC의 경우 상온에서 물 또는 MeOH로 추출하였을 때 높은 ginsenoside 추출률을 나타내었으나, 열수 추출 중 산의 영향으로 ginsenoside가 많이 파괴되는 것으로 나타났다.

Table 3. The Content of Ginsenosides in Saponin Fration of Various Ginseng Extracts

(unit: mg/100g ginseng)

	MeOH Extracts			RT Extracts			BT Extracts		
	RAW	EXT	EXTC	RAW	EXT	EXTC	RAW	EXT	EXTC
Comp K	89.9	1.54	65.0	4.3	25.5	25.9	20.8	134.2	90.6
Rh2	0.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3
Rh1	7.8	23.2	1.47	0.0	1.8	1.7	0.0	0.0	0.0
Rg2	17.9	0.00	523.9	0.0	19.3	182.1	80.3	136.1	2.6
Rg3	0.0	102.7	1445	0.0	47.2	152.1	1443.7	1868.3	117.9
Rg1	12.4	25.7	10.2	0.0	46.4	58.9	176.2	0.0	9.1
Rf	0.0	727.0	0.0	18.5	128.7	690.6	2207.7	2408.5	0.0
Re	0.0	13.7	6.2	176.4	19.4	38.8	16.4	14.3	0.0
Rd	0.0	51.3	3.5	0.0	0.0	4.4	91.3	3.1	17.4
Rc+ Rb2	11.9	6.7	3.0	330.2	381.6	8.1	0.0	0.0	0.0
Rb1	140.0	3.3	3.3	10.9	869.3	0.0	247.7	4.9	0.0
Total	279.9	955.1	1237.1	540.3	1,539.2	1,162.6	4,284.1	4,569.4	242.9

- 추출액의 고분자물질 분자량 및 당조성 분석

각 추출액의 고형분의 분자량 분포를 GPC로 분석한 결과를 그림 1에 나타내었다. 상온추출의 경우는 Extrusion 처리한 시료에서 상대적으로 고분자물질 (600000~100000 dalton) 이 많이 추출되었으나 (그림 1~4), 열수추출의 경우는 raw 시료에서 고분자 물질이 많이 추출되는 경향을 나타내었다.

각 추출액에 4 vol의 Ethanol을 가하여 polymer를 회수한 후, 전분성분을 제거하기 위하여 Termamyl 및 Amyloglucosidase를 처리한 후, 반응액에 4 vol의 ethanol을 가하여 회수한 비전분 고분자물질(NSP)의 수율과 당조성을 표4에 나타내었다..

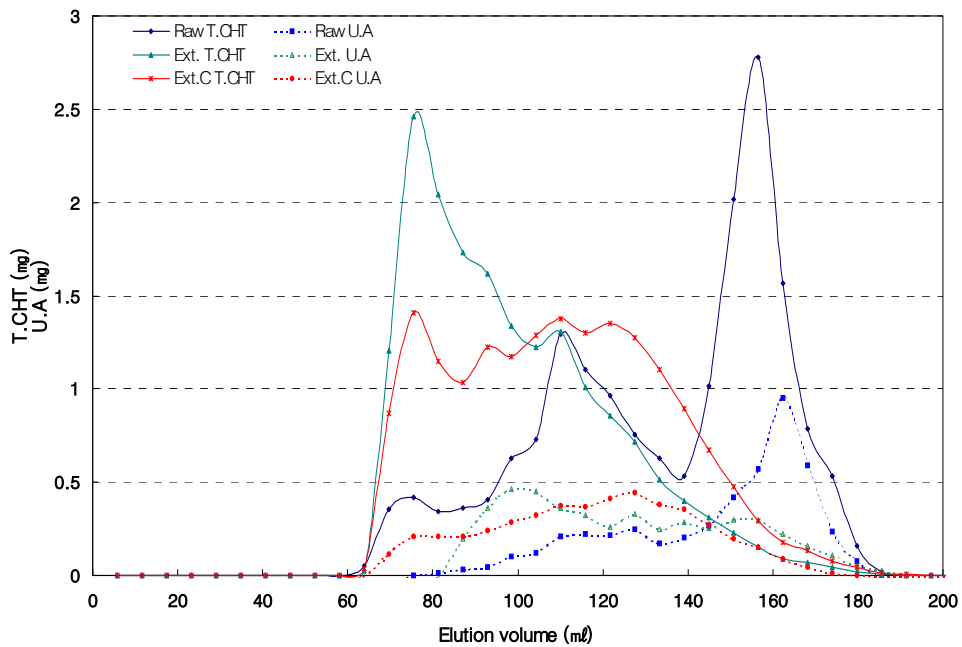


Fig. GPC Chromatogram of Ginseng Extracted Polymer at R.T on Sephrose CL2B Column

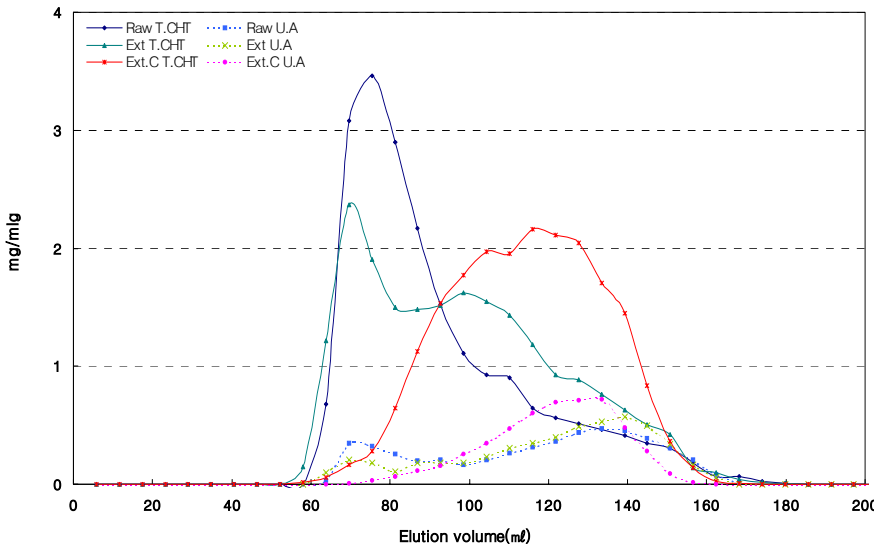


Fig. GPC Chromatogram of Ginseng Extracted Polymer at B.T. on Sephrose CL2B Column

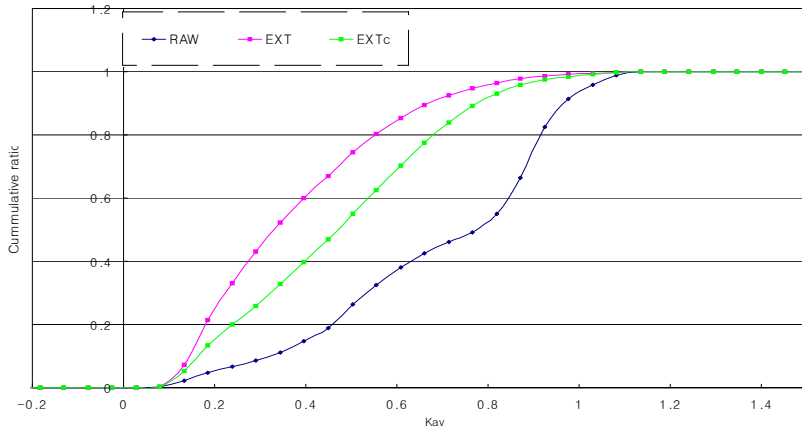


FIG MW distribution of Polymer Extracted at R.T.

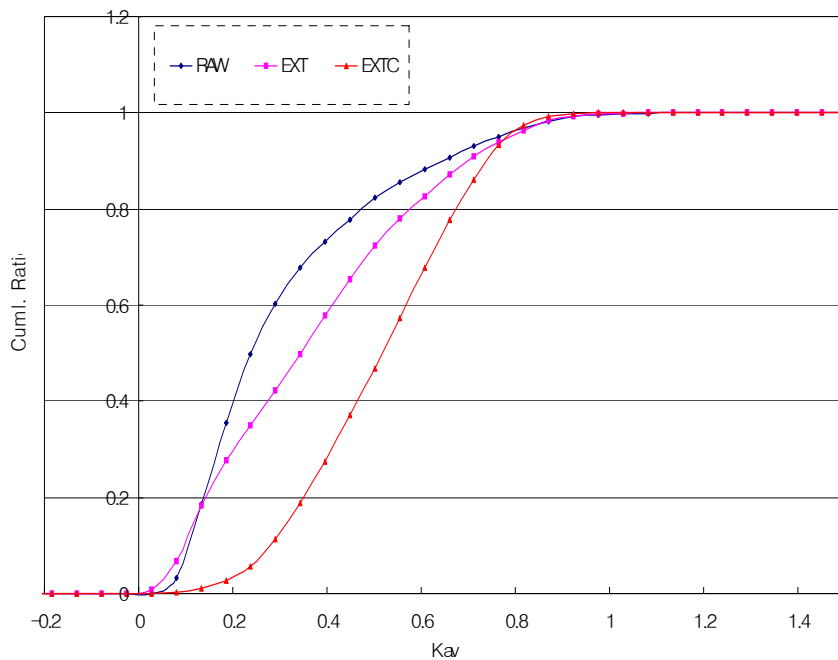


FIG. MWDistribution of Ginseng Polymers Extracted at BT.

Table 4. Yield and Compositions of Ginseng extracts polymers

	Raw		EXT		EXTC	
	R.T	B.T	R.T	B.T	R.T	B.T
Yield (%)	2.00	20.34	23.82	26.53	22.03	21.8
Composition						
starch	17.29	56.16	54.42	53.42	54.29	52.12
NSP	15.28	11.68	9.82	11.59	12.01	11.92
Uronic acid	4.77	5.71	4.54	7.43	6.28	8.88
Sugar Comp. of NSP						
Rhamnose	4.30	4.58	2.69	5.4	3.39	7.51
Ribose	-	3.76	7.67	5.53	4.26	5.64
Arabinose	31.98	26.55	18.85	25.18	13.16	7.11
Xylose	0.66	0.68	0.75	0.55	0.53	0.65
Manose	2.73	1.19	1.24	1.11	1.13	1.28
Galactose	50.3	45.09	32.06	48.88	38.15	56.47
Glucose	10.13	18.15	36.74	13.35	39.39	21.34

3. 열수 추출 시 전분 분해효소 처리효과

추출 엑기스의 농축/환원 시 침전생성을 제거하고도, 산성 다당체등 고분자물질의 효과적인 One-step 열수 추출공정을 확립하기 위하여 10배수(V/W)의 가수량으로 대량 추출실험을 실시하였다.

압출미삼의 열수 추출 시 전분 분해 효소인 Termamyl 및 amyloglucosidase를 처리하여 각 반응액을 여과하여 얻은 추출액의 각 고형분 추출률 및 탄수화물 추출률은 표 5 에 나타낸 것과 같았다.

압출처리한 경우는 추출 가수량을 10배로 감소시켰어도 추출률은 30배의 가수량을 사용한 경우와 같은 결과를 나타내었으나, 80% Ethanol에 의하여 침전되는 고분자 탄수화물(NSP)이 줄어드는 결과를 나타내었다. 이는 최초 추출 시 amylases를 작용시켜 starch를 저분자로 분해시켜 제거한 결과이다.

Table 5. Solid and Carbohydrate Yield of Boiling Water Extraction of Extruded Ginseng with Amylases treatment
(from 1.0 kg Ginseng)

	Total solid (g)	in Total Solid		80% EtOH PPT	
		CHT(g)	Uronic acid(g)	CHT(g)	Uronic acid(g)
RAW	440.1	369.1	34.8	20.3	18.8
EXT	602.0	446.7	90.4	29.7	42.3
EXTC	681.1	306.4	84.5	41.4	54.0

분획한 NSP의 Uppsala method에 의한 당조성 분석을 표 6 에 나타낸 것과 같다.

Extrusion 처리한 미삼의 추출물로부터 얻은 polymer의 uronic acid 함량이 raw의 그것보다 약 2배 높았으며, 당조성의 galactose 함량도 같은 경향을 나타내었다. 이는 압출처리에 의하여 산성다당체의 추출률이 약 2~3배 증가하는 것을 시사한다고 볼 수 있다.

분획한 추출 NSP(1.05 g) in phosphate buffer (pH 8.0; 0.2M))를 column에 loading하여 같은 phosphate buffer로 elution 시킨 다음 stepwise로 NaCl의 농도를 0.1~0.6 M로 증가시켜 용출시켰을 때, 그림 에서 보듯이 NaCl의 농도가 높아짐에 따라 uronic acid의 함량이 증가하는 polymer가 용출됨을 알 수 있었다.

Table 6. Yield and Composition of Polymers prepared from Extracts with amylases at boiling temperature

	RAW	EXT	EXTC
Yield (% of ginseng)	6.8	8.8	11.2
Composition (%)			
starch	20.9	20.7	28.3
NSP	33.7	34.7	32.2
uronic acid	17.0	30.1	31.0
Sugar Comp. of NSP(%)			
rhamnose	24.8	4.8	5.8
ribose	0	0	0
arabinose	30.1	22.9	15.9
xylose	0	2.3	0
manose	4.6	1.6	1.7
galactose	33.0	59.0	60.8
glucose	7.4	9.4	16.7

4. One-step 추출공정 확립

기존의 인삼 엑스분을 제조공정은 추출용매를 ethanol/water (50:50)로 추출하였으나, 본 연구에서는 압출처리에 의하여 세포벽을 수용화시켜 물만을 용매로 하여 추출하는 공정개발을 시도하였다. 압출에 의하여 추출물을 크게 향상시킬 수 있었으나, 구성 성분인 전분 등이 함께 추출되어 추출액의 농축/저장 시 전분의 노화에 의하여 침전을 생성하여 환원 회석 시 부유물 침전생성 등 품질저하의 문제를 제거하여야만 하였다. 이를 해결하기 위하여 추출 시 전분액화 및 당화효소를 반응시켜 침전 등이 야기하는 문제를 최소화시킬 수 있었으며, 최근 그 생리활성 효과가 밝혀지고 있는 산성다당체의 추출물을 크게 향상시키는 압출처리 및 추출방법을 확립할 수 있었다.

제 3 절 재구성 미삼 연제품 개발

1. 제품 Concept 및 주요 부품 시작

개발할 인삼의 연제품은 gummy 및 gelatin과 유사한 조직감을 갖고, 인삼고유의 향을 유지하며 저장수명이 3개월 이상 되어야 할 것으로 결론 내렸다. 재구성 인삼 연제품 concept에 적합한 조직감과 인삼 고유한 향을 부여하기 위하여 몇 가지 hydrocolloid gel, 즉, gelatin, agar, pectin, alginic acid gum arabic, guar gum과 white suger, corn syrup 등의 sweetner의 선정 실험을 거쳐 표 1과 같은 기본 recipes를 확립하였다.

Table 1. Basic recipes for the manufacture of Ginseng Jelly

Ingredients	Quantities for 100 kg Batch			
	Formula A	Formula B	Formula C	Formula D
Ginseng Powder	20	20	20	20
Modified Starch (perfectamy gel NF)	5	4	5.5	6.5
Gelatin (180 Bloom)	7.5	6.5	4.5	6.5
Pectin	2.0	3.5	4.0	-
Sugar	30	30	30	31
Corn Syrup (DE45)	18	18	18	18
Sorbitol	2	1	1	2
Citric acid	1	1	1	1
Water	14.5	16	16	15

성형을 이루는 주요 부품인 Bleaker plate 및 냉각 die를 설계 제작하였다. Fig. 9 에 각 부품의 단면 사진을 나타내었다. Bleaker plate는 extruder screw 선단과 냉각 die 안쪽 side 사이에 위치하게 되며, 냉각 die는 extruder의 생성 압력/온도에 따라, 냉각 zone의 개수를 조절하도록 설계되었으며, 외부 Jacket을 통하여 냉각수를 순환하여 냉각 정도를 조절할 수 있도록 제작하였다.



Fig. 1. Front View of Cooling Die and Bleaker Plate

2. 재구성 압출성형 인삼 jelly 제조

배합순서는 Gelatin은 1.5 배의 물과 혼합하여 50℃로 유지하여 pre-soaking 시킨 다음, sugar, corn syrup, sorbitol, citric acid의 혼합물과 미삼 분말과 pectin 혼합물을 차례로 가하여 Horbat Mixer에서 혼합한 후, Extruder의 feed Hoper로 이송하여 압출기 내로 투입한다.

Extruder는 L/D 20을 사용하여 2, 3 barrel section을 110℃로 가열하고, 4번 barrel은 냉각하여 압출물의 온도를 100 ℃이하로 유지한다. Breaker plate에서 deaeration을 유발시켜 최종 성형제품에 기포가 혼입되는 것을 방지한다. 최종적으로 냉각 Die을 통하여 성형될 때의 온도를 80℃이하를 유지시켜 압력저하에 의한 팽화를 방지한다. 성형제품은 냉각 conveyor 상에서 냉각 고형화를 이루도록 하여 제품생산을 마친다. 이러한 제품제조공정에 의하여 현재 시제품을 생산하였다. 기호성과 저장성을 검토한 후, 재구성 인삼 연제품을 시험생산하기 위하여 1차년도 배합 및 시험생산을 바탕으로 최종 배합비(표 1)로 선정된 배합비로 부원료를 혼합한 후, 쌍축압축성형장치(DNDL-44,Buhler Brothers Co., Uzill, Switzerland)를 이용 최적조건 (표 2)에서 압출성형하여 인삼 jelly를 제조하였다.

Table 2. 재구성 인삼 Jelly 배합비

Ingredients	Composition(%)	weight(kg)
ginseng extrudates	20	2
modified starch (ultratex 3)	20	2
gelatin	5	0.5
pectin	2	0.2
sugar	20	2
corn syrup	15	1.5
sorbitol	2	0.2
citric acid	1	0.1

Table 3 Screw의 조합과 압출성형 조건

L ¹⁾ /D ²⁾ ratio	20
Screw configuration	66 ³⁾ R ⁴⁾ ×3 ⁵⁾ , 44R×2, KD ⁶⁾ (R/L ⁷⁾ /R), 44R×3, RSE ⁸⁾ (L), 44R×4, RSE(L/R/L/R/R/R), 33R×4, ST ⁹⁾
Die(Φ)	orifice (Φ7mm)
Water	2.0kl/h
Screw speed	330 rpm
Feed rate	10kg/h
Extrusion temp.	55 °C
barrel setting temp.	60 °C
barrel 1 temp.	26 °C
barrel 2 temp.	71 °C
barrel 3 temp.	55 °C
barrel 4 temp.	26 °C

¹⁾L: length, ²⁾D: diameter, ³⁾Screw pitch, ⁴⁾R: right handed, ⁵⁾: The number of screw, ⁶⁾KD: kneading disk element, ⁷⁾L: left handed, ⁸⁾ RSE: revers screw element, ⁹⁾ST: screw top

제조된 재구성 인삼연제품의 외형은 그림 1과 같이, 연한 갈색을 나타냈으며, 강한 탄성을 나타내는 연제품 특성을 잘 나타내었다. 외경은 7 mm로 균일하였고 냉각에 의하여 부착성은 감소하였으나, 탄력성은 거의 변하지 않았다.



Fig. 2 재구성 압출인삼의 외형

3. 저장중 인삼 jelly의 물리적 특성

재구성 인삼 연제품을 4℃에 저장하면서 texture 변화를 Sun Rheometer (Compac-100, Sun Scientific Co., LTD)를 이용하여 $\Phi 7$ mm×10mm 규격으로 절단한 시료를 plunger type의 probe(직경 20mm), press speed 50 mm/min, compression 5 mm의 조건에서 2회 반복 mastification하여 15개 시료를 측정 한 평균값을 그림 2에 나타내었다.

즉, hardness는 저장초기 3390에서 일주일 후 3900으로 증가하여 증가가 미미하였고, gumminess가 크게 늘어 탄력성이 감소하는 경향을 보였다.

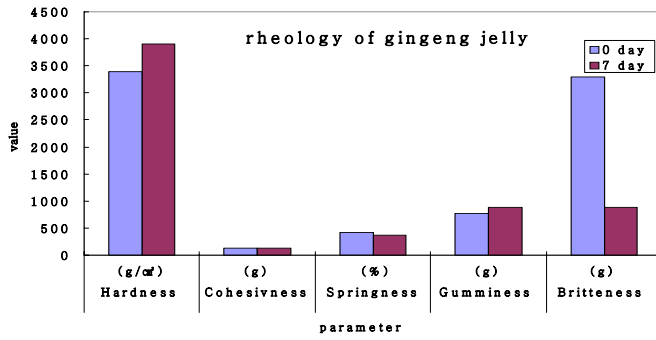


Fig. 3 재구성 인삼 Jelly의 저장 중 물성 변화

제 4절 압출처리미삼 Extract 성분의 생리활성 기능 연구

1. 연구 개발 개요

고대로부터 약리 효과가 탁월한 것으로 평가되어온 인삼의 경우 주로 인삼 사포닌 성분에 연구 초점이 맞추어져 중추신경에 대한 작용, 항스트레스 작용, 발육과 기초대사에 미치는 영향, 발암 작용, 면역기능 향상, 탄수화물 대사, 지방질 대사, 단백질 대사 및 핵산합성 등에 영향에 대한 많은 연구 보고가 있었다. 그러나 비사포닌계의 인삼성분에 대한 약리작용에 대하여도 관심이 높아지고 있는데 Rb₁ 성분은 사포닌과 함께 항스트레스 효과가 있음이 보고된 바 있다.

특히 인삼으로부터 추출한 산성 다당체는 분자량 수만 이상의 물 추출물로, 핵소오스(47.1%), 우론산(43.1%), 단백질(3.7%)로 구성되어있다. 백삼의 산성다당체가 항암 작용을 지닌 면역조절물질로써 새로운 생체응답조절제 (biological response modifier)로써 가치가 있는 것으로 발표되었으며 수삼에 함유된 산성다당체는 세포분열 촉진작용 (mitogenic activity)을 갖고 있으며, 홍삼의 산성 다당체에서는 지방분해를 촉진하는 독소의 하나인 toxohormone L의 활성을 억제하는 성분이 분리되었다.

인삼의 섭취가 항스트레스 효과를 나타내고 있고 인삼 산성다당체가 위궤양을 억제한다는 연구 결과들은 인삼내의 항스트레스 인자가 정확하게 규명되지는 않았으나 인삼에 있는 사포닌, Rb₁ 및 산성다당체 성분 등이 인삼의 항스트레스 효과를 발현시키는데 관여하고 있음을 시사해준다.

인삼은 옛날부터 영약으로 알려져 왔으며 최근에는 스트레스에 대한 저항성, 혈압하강, 이의 호흡, 중추신경, 지질대사, 당대사, 단백질대사, 핵산대사 등에 대한 작용이 보고되고 있다. 인삼의 항 스트레스작용 효과에 관한 연구로서 인삼 사포닌이 정신적 육체적 또는 각종 생리적 스트레스를 해소 방어하는 작용과, 스트레스하의 작업 수행 능력의 정상화에 효과가 있음을 밝혔고, 스트레스로 인한 생쥐 임파구 합성능 감소가 어느 정도 억제 되었다고 보고되었다. Breckman과 Dardymov은 스트레스를 준 상태에서 인삼은 비특이적으로 저항력을 향진시켜 유해상황에 대해 방어능력을 증가시키므로 정상을 유지하려는 어답토겐 작용(

adaptogenic action)을 지닌다고 하였다. 이처럼 인삼의 항스트레스 효능에 관한 연구 보고가 있지만 아직 이에 대한 완전한 정설이 알려져 있지 않다. 이에 본 실험에서는 미삼을 압출성형 처리하여 추출한 미삼 추출물을 흰쥐에 투여하여 미삼의 항스트레스 생리활성 효능을 검증하고자 한다.

연차별 연구개발 내용은 다음과 같다.

1차년도(2002. 10.15~2003. 10.14) : 압출 전처리 미삼 extract 성분의 항스트레스 생리기능 증진 효과 연구: 압출공정에 의하여 생산된 미삼 extract 성분의 항스트레스 생리 기능을 동물 실험을 통하여 검증하고 압출 처리 미삼 extract 성분의 약리성분 (사포닌류, 산성 다당체) 함량 정량 분석한다.

2차년도(2003. 10.15~2004. 10.14) : 미삼의 압출 Extract 성분의 식욕조절 효능 검증 및 system 확립: 압출공정에 의하여 생산된 미삼 extract 성분의 에너지 대사 및 식욕조절 효능을 검증하고 미삼 추출방법에 따른 식욕조절 효능 비교한다.

3차년도(2004. 10.15~2005. 10.14) : 압출 전처리 미삼 Extract 성분의 스트레스 생리활성 검증 압출공정에 의하여 생산된 미삼 extract 성분의 항스트레스 생리 기능을 동물 실험을 통하여 검증하고 미삼 추출방법에 따른 항스트레스 생리활성을 비교한다.

2. 연구 개발수행 내용 및 결과

가. 연차별 연구방법

1) 항스트레스 생리기능 증진 효과 검증 방법

가) 실험재료

본 실험에 사용한 미삼 추출물은 미삼으로부터 다양한 방법의 공정(열수추출 공정, 압출처리 열수추출공정, 압출+Citric acid 열수추출공정)을 거쳐 추출한 후 동결 건조한 미삼 추출 분말로서 한국식품개발원에서 제조한 시료를 사용하였다.

나). 실험동물 사육

Sprague-Dawley rats (Charls River, USA)을 동물사육실(실내온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 12 hour light-dark cycle)에서 물과 AIN-76 diet (Purina, USA)를 제한없이 먹이면서 일주일간 환경에 적응시켰다. 적응 기간 후 체중에 따른 난괴법으로 7마리씩 5군으로 나누어 대조군(Normal: N), 스트레스군(Stress: S), 미삼 열수 추출군 (Raw: R), 미삼 압출 열수추출군: (Extrusion: Ex), 및 미삼 압력+Citric acid 열수 추출군 (Extrusion+citric acid: Exc)으로 각각 나누어 자유 급식법으로 2주간 사육하였다. 미삼 추출군의 경우 100 mg/Kg BW/day 의 미삼을 물에 녹여서 식이와 함께 공급하였다. 실험 design 은 Table 1과 같다. 일주일마다 체중을 측정하여 체중변화량을 계산하였다. 실험기간 중에 스트레스 부하를 위하여 하루 2시간의 부동화 스트레스 (Immobilization Stress)를 반복적으로 2주간 부하하였다.

다) 시료의 수집 및 처리

사육이 끝난 실험동물은 14시간 이상 절식시킨 다음, dry ice로 질식시키고 10mg EDTA 함유 주사기로 심장에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 $3,000\text{rpm}$ 에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 분석 시까지 -20°C 에 보관하였다.

대뇌, 지방조직, 간, 비장, 갑상선 및 부신 조직을 분리하여 냉장 생리식염수로 세척하여 무게를 측정하였다.

Table 1. Experimental design

Group ¹⁾	N	S	R	Ex	Exc
Diet	AIN-76	AIN-76	AIN-76	AIN-76	AIN-76
Water	자유	자유	열수미삼추출물 100mg/kg 준 후 자유	압력열수미삼추출물 100mg/kg 준 후 자유	압력화학미삼추출물 100mg/kg 준 후 자유
Stress	No	아침 10-12시	아침 10-12시	아침 10-12시	아침 10-12시

¹⁾ N: Normal, S: Stress, R: Raw, Ex: Extrusion, Exc: Extrusion+citric

라) 생화학적 분석

Dopamine, norepiniphrin, epinephrine 등은 혈청을 0.45 μ l filter로 여과 후 HPLC를 이용 (Chemical Detector 사용)하여 정량하였다. 혈청의 총콜레스테롤, GOT, GPT는 효소색법을 이용한 kit (영동제약, 한국)를 사용하여 분석하였다.

2) 항비만 생리활성 검증 연구방법

가) 실험재료

본 실험에 사용한 미삼 추출물은 미삼으로부터 다양한 방법의 공정(열수추출 공정, 압출+Citric acid 열수 추출공정)을 거쳐 추출 건조한 미삼 추출분말로서 한국식품개발원에서 제조한 시료를 사용하였다.

나) 실험동물 사육

B6.V-Lepob/J male ob/ob mice (The Jackson Lab, USA)을 동물사육실(실내 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 55 \pm 5%, 12 hour light-dark cycle)에서 물과 고형배합사료 (PMI international, LLC.)를 제한 없이 먹이면서 일주일간 환경에 적응시켰다. 적응 기간 후 체중에 따른 난피법으로 6마리씩 5군으로 나누어 대조군

(Control: C), 3% 미삼 열수 추출군 (Raw 3%), 5% 미삼 열수 추출군 (Raw 5%), 3% 미삼 압출+Citric acid 열수추출군 (Extrusion+citric acid: EXC 3%), 5% 미삼 압출+Citric acid 열수추출군 (Extrusion+citric acid : EXC 5%)으로 각각 나누어 시험식이를 제공하여 7주간 사육하였다. 모든 식이 성분은 (주)중앙 실험동물을 통하여 미국의 Dyets사 제품을 이용하였으며 식이의 구성은 45% 고지방식이로 하였다. 식이의 구성과 시험시료의 함량은 Table 2과 같다.

다) 시료의 수집 및 처리

시험기간이 종료된 실험동물들을 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 heparin(25000IU/5ml) 용액으로 코팅한 10ml주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 2,800rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후 분석 시까지 -70℃에 보관하였다. 혈액을 채취한 후 ice bath위에서 즉시 간, epididymal, subcutaneous, abdominal, retroperitoneal, brown adipose 지방조직을 떼어 ice cold saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 액체질소로 급속동결 시킨 후 분석까지-70℃ deep freezer에 보관하였다.

라) 생화학적 분석

혈청의 총콜레스테롤, 중성지질 및 HDL-콜레스테롤 정량은 호소비색법을 이용한 kit를 사용하여 분석하였고 LDL 콜레스테롤 함량은 Friedewald WT formula를 이용하여 분석하였다. 혈중 leptin의 농도는 ¹²⁵I-labeled leptin RIA(Linco Research, USA)를 이용하여 Gamma Scintillation Counter로 측정하였다.

마) 지방세포의 분리 및 지방세포의 크기와 수 측정

지방세포의 분리는 Rodbell(29)과 Reynisdottir S(30)의 collagenase 처리법을 이용하였다. 실험동물의 부위별 지방조직 0.1g에 1ml의 collagenase solution(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 3% BSA,25 mM HEPES, 1mg/ml collagenase)을 주입하고 37℃에서 250rpm으로 1시간 동안 shaking

incubation시켰다. Incubation 후에 nylon mesh에 걸러 원심분리하고 상층의 지방을 취하여 현미경으로 지방세포의 size를 측정하였다. 비율이 높을 경우 DMEM을 1:1로 희석하여 지방세포의 수와 크기를 측정하였다.

Table 2. Composition of experimental diets

(unit:g/kg diet)

Groups ¹⁾ Ingredients	High fat diet				
	C	Raw3%	Raw 5%	EXC3%	EXC5%
Corn starch	95	95	95	95	95
Casein	250	250	250	250	250
Dextrinized Cornstarch	117	117	117	117	117
Sucrose	197.492	167.492	147.492	167.492	147.492
Lard	203	203	203	203	203
Soybean oil	29	29	29	29	29
Fiber	58	58	58	58	58
Mineral mix ²⁾	35	35	35	35	35
Vitamin mix ³⁾	10	10	10	10	10
L-Cystine	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Experimental mixture	0	30	50	30	50
Tert-butyl hydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Total	1000	1000	1000	1000	1000
TotalCalorie (kcal)	4640	4597	4569	4595	4565
Carbohydrates (% as calorie)	35.4	34.3	34.5	34.8	34.1
Protein (% as calorie)	19.5	20.2	22.2	21.3	22.1
Fat (% as calorie)	45	45.5	45.9	45.7	46.1

1) High fat diet : Diet containing 45% fat as calorie

C : Control diet without experimental mixture

RL : 30g/kg diet) of experimental mixture(Raw ginseng) added

RH : 50g/kg diet) of experimental mixture(Raw ginseng) added

EL : 30g/kg diet) of experimental mixture(EXC ginseng) added

EH: 50g/kg diet) of experimental mixture(EXC ginseng) added

2) Mineral mixture : *AIN -93M-MX(mg/kg diet)* : Calcium 5000, Phosphorus 3000, Magnesium 511, Sodium 1033, Potassium 3600, Chloride 1613, Sulfur (inorganic) 300, Iron 45, Zinc 35, Manganese 10, Copper 6, Iodine 0.2, Molybdenum 0.15, Selenium 0.17, Silicon 5, Chromium 1, Fluoride 1, Nickel 0.5, Boron 0.5, Lithium 0.1, Vanadium 0.1

3) Vitamin Mixture : *AIN -93M-VX(mg/kg diet)* : Nicotinic acid 30, Ca pantothenate 15, Pyridoxine 6, Thiamin 5, Riboflavin 6, Folic acid 2, Biotin 0.2, Vitamin B-12 25 μ g, VitaminK 860 μ g, Vitamin E 75IU, Vitamin A 4000IU, Vitamin D 1000IU, Choline 1000

바)Uncoupled protein-1 mRNA 측정

(1) RNA 추출

TRIzol(Gibco)을 이용하여 조직을 lysis시킨 후 18-21Gauge syringe로 시료를 균질화한다. 이를 4°C에서 12000rpm으로 10분간 원심분리를 통하여 상층액을 수거한 후 이 상층액과 phenol: chloroform: isoamylalcohol이 25 : 24 : 1로 섞여 있는 용액의 상층액 200 μ l를 혼합한 다음 5-15분 정도 상온에 두었다가 맑은 상층액만을 수거하여 4°C에서 12000rpm으로 15분간 원심분리하였다. RNA 층만 떠서 새로운 microtube에 옮기고 동량의 100% isopropanol을 혼합한 후 약 15분 정도 상온에 두었다가 4°C에서 12000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 RNA pellet에 1.5 μ l의 75% ethanol로 vortexing하여 세척한 후 4°C, 12000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 5-10분간 상온에서 완전히 건조시킨 다음 100 μ l의 DEPC-water에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer를 사용하여 정량하였다.

(2) Real-time PCR

추출한 total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 reverse transcription의 반응 조건은 다음과 같다. 5X buffer, 1mM dNTPs, 30pmole oligo dT19, 200U M-MLV (moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)이 포함된 총 volume 20 μ l에 4 μ g total RNA를 혼합하여 37°C에서 1시간, 70°C에서 15분간 반응시켰다. 각각의 cDNA 1 μ l를 2X SYBR Green PCR master mix(Qiagen), 0.25 μ M primer와 반응시켰다. 증폭은 Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research)으로 하였으며, real-time PCR의 반응조건은 95°C 5분, 95°C 15초(denaturation), 60°C 20초(annealing), 72°C 20초(extension)으로 하였다. real-time PCR에 사용한 primer의 sequence는 다음과 같다. Forward: Ucp1, 5'-CAC CTT CCC GCT GGA CAC TA-3'; β -actin, 5'-GGA CCT GAC AGA CTA CCT CA-3', reverse: Ucp1, 5'-CCC TAG GAC ACC TTT ATA CCT AAT GG-3'; β -actin, 5'-GTT GCC AAT AGT GAT GAC CT-3'.

3) 항스트레스 생리활성 검증 방법

가) 실험재료

본 실험에 사용한 미삼 추출물은 미삼으로부터 다양한 방법의 공정(열수추출공정, 압출+Citric acid 열수 추출공정)을 거쳐 추출한 미삼 분말로서 한국식품개발원에서 제조한 시료를 사용하였다.

나) 실험동물 사육

생후 6주령의 male Sprague-Dawley종을 동물사육실(실내온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 12 hour light-dark cycle)에서 물과 고형 배합사료(PMI international, LLC.)을 제한없이 주면서 일주일간 환경에 적응시켰다. 적응 기간 후 체중에 따른 난괴법으로 나누어 대조군(C), 스트레스군(I), 미삼 투여군(I+GS)으로 나누어 2주간 사육하였다. 스트레스군은 하루 2시간씩 2주간 부동화 스트레스를 부과하고 미삼 투여군은 같은 조건으로 스트레스를 주면서 200mg/kg BW/day의 압출 처리한 미삼을 물에 녹여 식이와 함께 공급하였다.

다) 시료의 수집 및 처리

시험기간이 종료된 실험동물들을 12시간 절식시킨 후 단두대로 단두하여 혈액을 채취한다. 채취된 혈액은 2,800rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 분석시까지 -70°C 에 보관한다. 혈액 채취 후 간, 부고환 지방, 부신, 흉선, 비장, 뇌 조직을 떼어 내어 무게를 측정한다. 부신은 액체질소로 급속동결시킨 후 분석시까지 -70°C 에 보관한다.

라) 혈액 분석

혈청의 콜레스테롤 농도는 효소법을 이용한 분석 kit(waco, Japan)를 이용하여 spectrophotometer로 600nm에서 비색 정량하였고, 혈청의 GOT, GPT는 Retiman

-Frankel법을 이용한 분석 kit(영동제약)로 505nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 corticosterone은 RIA kits(Coat-A-Count[®] TKRC1, Diagnostic Products Corporation, U.S.A)를 사용하여 radioimmunoassay(RIA)법에 따라 Gamma counter로 측정하였다.

마) RNA 추출

부신조직으로부터 Total RNA추출은 TRIZOL reagent(MRC사, USA)을 이용하였다. TRIZOL reagent 1ml이 들어있는 tube에 -70℃에서 가져온 부신조직 0.07g 전체를 넣어 얼음 속에서 homogenizer로 균질화시킨다. RT에서 5분간 incubation한 후 chloroform 0.2X(0.2ml)을 가하여 분쇄한 후 20초간 vortexing한다. 다음에 RT에서 10분간 incubation하여 10,000g, 4℃로 15분간 원심분리한다. 분리된 RNA층을 RNase-free tube에 옮긴 후 DEPC-DW 0.5X(0.5ml)을 첨가한 후 혼합한다. 여기에 100% Ethanol 1X(1ml)을 첨가하여 RT에서 10분간 incubation하여 10,000g, 4℃로 15분간 원심분리하여 상등액을 버리고 75% ethanol 1X(1ml)을 넣고 조심스럽게 흔들어 준 후 10,000g, 4℃로 5분간 원심분리한다. 원심분리 후 상등액을 버리고 얼음 위에서 건조시킨다. 여기에 DEPC-DW 50 μ l을 넣고 잘 녹인 다음 microcentrifuge tube로 옮겨 -20℃에 보관하였다가 spectrophotometer을 사용하여 RNA을 정량한다.

바) Catecholamines synthesizing enzymes mRNA의 RT-PCR에 의한 검출

Catecholamines synthesizing enzymes mRNA 발현은 반 정량적 RT-PCR을 사용하였으며, housekeeping gene으로 β -actin을 사용하였다. reverse transcription은 5X RT buffer (250mM Tris-HCl; pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM DTT) 1mM dNTPs, 30pmole oligo dT₁₉, 200U M-MLV (moloney-murine Leukemia virus) reverse transcriptase가 포함된 총 volume 20 μ l에 4 μ g total RNA를 혼합하여 반응시켰으며, cDNA 37℃에서 1시간, 70℃에서 15분간 합성하였다.

사) Real-time PCR

각각의 cDNA 2 μ l를 2X master mix(Qiagen), 0.25 μ M primer와 반응시켰다. 증폭은 Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research)으로 하였으며, real-time PCR의 반응조건은 95 $^{\circ}$ C 10분, 95 $^{\circ}$ C 15초(denaturation), 55 $^{\circ}$ C 20초(annealing), 72 $^{\circ}$ C 20초(extension)으로 하였다. real-time PCR에 사용한 primer의 sequence는 다음과 같다.(Table 3)

Table 3 Primer sequences used for catecholamines synthesizing enzymes quantification by real-time RT-PCR, together with optimal annealing temperatures, size (in bp) and number of cycles.

Primer	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
TH	TAAGTGGTGAATTTTGGCTT	GCTGTGGTATTTGAGGAGAG
DBH	CCAGGATCCCATACTACTAGA	CTGGATACCCATCAGGACTA
PNMT	CAAAGAAGATACCCTTGACG	GCTATCTGTGGTTCCAGTGT
β -actin	AATGTAGTTTCATGGATGCC	CCTAGACTTCGAGCAAGAGA

아) 통계처리

모든 시험 결과는 Window용 SPSS package를 이용하여 통계처리 하였다. 모든 실험결과는 시험군당 평균과 표준오차를 계산하였고 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 각 시험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

나. 연구 결과

1) 미삼 전처리에 따른 의 항스트레스 생리 기능증진 효과

(가) 체중 증가량 변화 (Table 4)

스트레스를 부하한 군에서 체중이 대조군에 비하여 19% 낮게 증가하였고 미삼 추출균을 보충하여 섭취하였을 경우 추출방법에 상관없이 모든 군에 스트레스만 부하한 군보다 높은 체중증가량을 나타내었다. 따라서 스트레스 부하시 감소된 체중이 미삼 추출물을 섭취함으로써 정상으로 되돌아 갈 수 있음을 알 수 있다. 스트레스 부하시 감소된 체중 증가가 미삼추출 방법에 따라서 압출 추출시 보다는 citric acid 로 전처리 한 후에 압출 추출시 효과가 더 좋은 것으로 나타났다. 열수로 추출한 미삼과 citric acid 로 전처리 한 후에 압출 추출한 미삼의 효과가 비슷하여 좀 더 다양한 추출 조건에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of Ginseng on the body weigh gain of rats with or without immobilization stress.

Group ¹⁾	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight gain (g/3weeks)
Normal	179.11±3.38	320.88±8.99	141.76±8.83
Stress	178.82±6.46	293.181±8.88	114.94±21.41
Stress+ R	180.19±4.76	319.161±1.17	139.40±12.95
Stress+ Ex	178.98±3.46	309.371±2.68	131.54±15.25
Stress+ Exc	179.63±6.31	317.221±1.51	137.59±11.54

¹⁾ R: Raw, Ex: Extrusion, Exc: Extrusion+ citric

(나) 뇌, 간, 지방조직의 무게 (Table 5, Table 6)

뇌 조직, 간 조직 무게는 대조군, 스트레스를 부하한 군 및 인삼 추출물을 섭취한 군 사이에 차이가 나타나지 않았다. 압력 미삼 추출물과 압출+구연산 미삼 추출물을 섭취한 군의 지방조직의 무게가 대조군, 스트레스만 부하한 군 및 열수

미삼 추출군보다 낮은 것으로 나타났다. 스트레스를 부하한 군에서 대조군에 비하여 체중 당 지방조직의 무게가 높은 것으로 나타났다. 그러나 미삼 추출물을 섭취하였을 경우 체중 무게 당 지방조직의 무게가 감소하여 미삼 추출물의 섭취가 지방조직 감소에도 효과가 있음을 알 수 있다. 또한 스트레스를 부하한 군에서 대조군에 비하여 체중 증가 무게 당 지방조직의 무게가 높은 것으로 나타났다. 그러나 미삼 추출물을 섭취하였을 경우 체중 증가 무게 당 지방조직의 무게가 감소하여 미삼 추출물의 섭취가 비만 억제에도 긍정적인 효과가 있음을 시사하였다. 열수 추출한 한 미삼을 섭취한 군보다는 압력공정을 거친 미삼을 섭취한 군에서 지방조직의 무게가 낮았다. 따라서 압력공정을 거친 미삼에서 비만 방지의 효과가 있는 물질의 추출률의 증가를 시사하였다.

Table 5. Organ weight of the experimental animals (g)

Group¹⁾	Brain	Liver	Adipose Tissue
Normal	1.62±0.18	11.6±0.95	2.76±0.688
Stress	1.55±0.15	11.39±1.031	2.72±0.87
Stress+ R	1.74±0.08	9.97±0.80	2.74±0.22
Stress+ Ex	1.77±0.18	10.12±1.03	2.37±0.82
Stress+ Exc	1.90±0.09	10.98±1.12	2.21±0.76

¹⁾ R: Raw, Ex: Extrusion, Exc: Extrusion+ citric

Table 6. Adipose tissue weight of the experimental animals (mg/body weight)

Group ¹⁾	Adipose Tissue/ Body weight	Adipose Tissue/ Body weight gain
Normal	8.53±2.04	19.5
Stress	9.54±3.46	23.6
Stress+ R	8.61±0.78	19.6
Stress+ Ex	7.63±2.52	17.9
Stress+ Exc	6.95±2.08	16.0

¹⁾ R: Raw, Ex: Extrusion, Exc: Extrusion+ citric
(다) 부신, 비장, 흉선의 무게 (Table 7)

스트레스 부하 시 대조군에 비하여 스트레스 관련 조직인 부신의 무게는 증가하였고 비장 및 흉선의 무게는 감소하였다. 이와 같은 결과는 스트레스 부하시 나타나는 조직 무게의 변화에 대한 선행 연구들과 유사한 결과를 보여준다. 따라서 본 미삼 추출물의 항스트레스 생리 효능 평가를 위한 스트레스 부하 검증 system이 적절하게 개발되었음을 알 수 있다. 스트레스 부하 시 미삼 추출물을 섭취하였을 경우 부신의 무게는 감소하였으며 비장 및 흉선의 무게는 증가하였다. 따라서 미삼 추출물의 섭취가 스트레스 관련 조직인 부신, 비장 및 흉선의 정상화에 긍정적인 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 비장조직은 면역작용과 매우 밀접한 관계를 갖고 있다. 비장조직의 무게 변화를 볼 때 스트레스를 받을 때 비장의 무게가 감소하였고 미삼 추출물 섭취에 의하여 비장의 무게가 증가되었다. 본 연구 결과는 스트레스에 의하여 감소된 면역기능을 미삼 추출물 섭취에 의하여 향상시킬 수 있음을 시사한다. 스트레스에 의한 부신과 흉선의 변화에서 압출 추출 경우 보다는 citric acid와 함께 압출 추출한 경우가 효과가 더 좋은 것으로 나타났다.

Table 7. Effect of Ginseng on the organ weights of rats with or without immobilization stress

Group ¹⁾	Adrenal	Spleen	Thymus
	(mg/100g of body weight)		
Normal	21.86±5.65	266.04±10.36	165.12±24.14
Stress	31.65±10.3	199.12±8.59	125.40±27.45
Stress+ R	23.63±5.14	234.65±9.86	156.01±17.03
Stress+ Ex	26.42±5.71	227.29±18.83	136.21±22.85
Stress+ Exc	23.11±0.18	200.93±28.27	158.79±44.14

¹⁾ R: Raw, Ex: Extrusion, Exc: Extrusion+ citric

(라) 혈중 catechomanie 함량 (Table 8)

스트레스 부하 시 대조군에 비하여 혈액 norepinephrine 및 dopamine의 농도가 증가하였다. 스트레스 부하군의 혈액 epinephrine 농도는 대조군과 유사하였다. 따라서 본 미삼 추출물의 항스트레스 생리 효능 평가를 위한 스트레스 부하 검증 system이 적절하게 개발되었음을 알 수 있다. 스트레스 부하 시 혈액 dopamine 농도가 증가하였으나 미삼 추출물을 섭취함에 따라 혈액 dopamine 농도가 감소하였다. 따라서 미삼 추출물의 섭취가 스트레스 관련 호르몬인 혈중 dopamine의 농도 안정화에 긍정적인 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 미삼 추출물의 제조공정에 의한 효과에서 열수추출물에 의한 효과보다는 압력공정을 가하였을 때의 미삼추출물이 혈중 dopamine의 농도 안정화에 보다 높은 효과를 나타내었다.

Table 8. Effect of Ginseng on serum catecholamines

Group ¹⁾	Norepinephrine	Epinephrine	Dopamine
Normal	180	193	207.29±52.50
Stress	256	210	326.43±104.48
Stress+ R	124	199	312.31±30.27
Stress+ Ex	480	149	252.92±100.65
Stress+ Exc	103.5	132	256.19±90.57

¹⁾ R: Raw, Ex: Extrusion, Exc: Extrusion+ citric

(마) 혈액 GOT, GPT, Cholesterol 함량 (Table 9)

미삼 추출물의 섭취가 혈액 GOT, GPT의 농도 변화를 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서 개발한 미삼 추출물이 독성실험에서 안정하다는 것을 알 수 있다. 미삼 추출물의 섭취가 혈액 콜레스테롤 농도에 영향을 미치지 않았다.

Table 9. Effect of Ginseng on serum biochemical parameters

Group ¹⁾	GOT (unit/ml)	GPT (unit/ml)	Cholesterol (mg/ml)
Normal	51.04±5.35	37.56±4.83	58.73±2.93
Stress	63.80±6.98	36.26±14.64	61.53±6.55
Stress+ R	54.64±8.50	30.12±5.35	61.51±7.61
Stress+ Ex	73.10±3.63	29.64±3.59	61.87±6.10
Stress+ Exc	71.80±11.10	34.88±5.92	67.35±14.84

¹⁾ R: Raw, Ex: Extrusion, Exc: Extrusion+ citric

2) 미삼의 항비만 생리활성 효과 검증

(가) 식이조성에 따른 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율

식이 조성에 따른 체중증가량은 대조군에 비해 Raw5%군을 제외한 인삼 투여군의 체중증가량이 유의적으로 높았다. 미삼 추출 방법에 따른 체중 증가량 변화는 미삼 열수 추출군(Raw)보다 citric acid와 함께 압출한 미삼압출 추출군(EXC)의 체중 증가량이 유의적이지 않았지만 높은 체중증가량을 나타내었다. 미삼 농도에 따른 체중증가량은 유의적이지 않았지만 미삼 3%에 비해 5%군의 체중 증가량이 낮았다. 식이 섭취량은 미삼 열수 추출군(Raw)이 대조군에 비해 증가했으나 유의적이지는 않았고 미삼 압출 추출군(EXC)은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 미삼 투여군 간에는 유의적 차이는 나타나지 않았다. 식이효율은 모든 군 간에 유의적 차이가 없었다.(Table 10). 이러한 결과로 미루어 볼 때, 미삼 추출물이 식욕을 촉진시켜 체중을 증가시키는 효과가 있다고 판단되고 열수 추출한 미삼보다 압출 추출한 미삼이 체중증가에 더 많은 영향을 준다고 할 수 있다.

Table 10. Body weight gain, food intake, and food efficiency of rats fed experimental diets

Group	Initial body weight	Weight gain	food intake	food efficiency ⁴⁾
	(g)	(g/7weeks)	(g/7weeks)	
C	44.37 ±3.00 ^{1)NS2)}	12.45 ±1.80 ^{b3)}	190.13 ±35.91 ^b	0.067 ±0.017 ^{NS}
Raw3%	44.14 ±3.13	15.05 ±1.39 ^{ac}	235.21 ±46.21 ^{ab}	0.067 ±0.021
Raw5%	43.98 ±4.01	14.19 ±2.05 ^{ab}	223.47 ±35.03 ^{ab}	0.065 ±0.012
EXC3%	44.22 ±4.08	17.28 ±3.29 ^c	278.058 ±72.16 ^a	0.066 ±0.021
EXC5%	43.60 ±4.70	15.04 ±1.86 ^{ac}	259.29 ±45.80 ^a	0.060 ±0.012

¹⁾Values are expressed as mean±SE, N=6.

²⁾NS: not significant

³⁾Values in a column with different superscripts are significantly different, p<0.05

⁴⁾Weight gain (g)/ Food intake (g).

(나) 식이조성에 따른 부위별 지방조직

미삼 추출물이 지방조직에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 지방조직의 무게를 측정하였고 Table 11에 나타내었다. 간무게는 대조군에 비해 EXC 3%군에서 유의적 감소가 나타났고 그 외 모든 군간에 유의적 차이가 없었다. 미삼 추출물이 복부 비만에 미치는 영향을 알아보기 위해 복부 지방조직의 대표적인 adipose tissue인 부고환 주위 지방조직(epididymal adipose tissue)과 후복강 지방조직(retroperitoneal adipose tissue)의 무게를 측정하였다. Table 2를 살펴보면 부고환 지방조직과 후복강 지방조직에서 대조군에 비해 미삼 투여군의 지방조직의 무게가 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다. 위의 결과에서 나타나듯이 미삼 추출물이 부고환 지방량과 후복강 지방량을 감소시키는데 다소 영향을 줄 수 있다고 판단하나 유의적인 결과는 나타나지 않았다. 피하지방

조직인 subcutaneous의 무게는 대조군에 비해 Raw3%군에서 유의적 감소가 나타났고 전반적으로 미삼 추출군의 지방량이 감소하는 경향을 보였다. 이상의 결과로 유의성 있는 감소는 아니지만 미삼추출물이 피하지방 감소에 효과가 있다고 판단할 수 있다. 내장지방 조직인 abdominal의 무게도 대조군에 비해 EXC3%, 5%군에서 다소 감소하는 경향을 보였다. Brown adipose tissue는 모든 군간에 유의적 차이가 나타나지 않았다. Brown adipose tissue는 백색지방조직(WAT)과 체내 에너지 균형을 이루는데 있어서 서로 다른 중요한 역할을 한다. 백색지방조직은 중성 지방의 형태로 에너지를 저장하는 반면, Brown adipose tissue은 열을 발생(thermogenesis)시킴으로서 에너지를 소비하는 기능을 담당한다. Brown adipose tissue내의 미토콘드리아의 내막에는 조직 특이적으로 발현되는 단백질인 uncoupling protein(UCP)-1이 존재하고 BAT thermogenesis는 이 단백질의 활성화에 의존한다. 따라서 Brown adipose tissue가 지방조직에 미치는 영향을 알아보기 위해 UCP-1 발현에 대한 연구가 필요하다.

Table 11. Organ weight of the experiment animals(g)

Group	Liver	Epididymal	Subcutaneous	Abdominal	retroperitoneal	Brown fat
(mg/body weight gain)						
C	291.00 ±33.22 ^{a3)}	266.94 ±15.14 ^{1)NS2)}	332.51 ±27.34 ^a	94.47 ±19.351) ^{NS}	195.56 ±27.10 ^{NS}	46.35 ±6.73 ^{NS}
Raw3%	270.21 ±35.59 ^{ab}	225.56 ±56.79	262.76 _b ±76.53 ^b	97.56 ±30.80	168.69 ±46.73	38.37 ±5.52
Raw5%	251.21 ±54.85 ^{ab}	227.42 ±28.20	290.40 ±25.39 ^{ab}	96.83 ±30.14	176.37 ±22.95	47.45 ±17.57
EXC3%	225.20 ±55.21 ^b	223.15 ±44.79	292.83 ±73.90 ^{ab}	82.17 ±20.39	170.21 ±34.04	35.73 ±9.67
EXC5%	236.36 ±56.20 ^{ab}	241.08± 19.74	308.81 ±54.16 ^{ab}	87.77 ±14.29	169.32 ±37.08	40.06 ±11.36

¹⁾Values are expressed as mean±SE, N=5.

²⁾NS: not significant

³⁾Values in a column with different superscripts are significantly different, p<0.05

(다) 미삼 추출물이 혈장 지질과 Leptin 함량에 미치는 영향

미삼 추출물 처리가 혈중 콜레스테롤, 중성지질 및 Leptin 함량 변화에 미치는 영향은 Table 12에 나타내었다. 총 콜레스테롤의 경우 대조군과 Raw3%, 5% 군 간에는 유의적 차이가 나타나지 않았으나 EXC 3%, 5%군에서는 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 미삼 추출물 처리량의 증가에 따라 유의적 변화는 나타나지 않았다. HDL-cholesterol은 모든 군 간에 유의적 차이가 없었다. LDL-cholesterol은 대조군에 비해 Raw군은 유의적 차이가 나타나지 않았지만 EXC5% 군은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. Raw에 비해 EXC군의 LDL-cholesterol 함량이 유의적으로 높았다. TG의 경우 대조군과 Raw3%, 5% 군은 거의 차이를 보이지 않은 반면 EXC군은 대조군과 Raw에 비해 유의적으로 증가하였다. 혈중 Leptin 함량은 모든 군간에 유의적 차이를 보이지 않았다. 이상의 혈액분석 결과들을 종합해 보면 Total-C, HDL-C, LDL-C, TG의 경우 Raw군은 대조군과 유의적 차이가 없었지만 EXC군은 대조군에 비해 Total-C, LDL-C, TG함량이 오히려 증가하여 미삼 추출물이 지질 대사에 좋은 영향을 주지 못했다고 판단한다.

Table 12. Effect of Ginseng on serum biochemical parameters

Group	Total-C	HDL-C	LDL-C	TG	Leptin
		(mg/dl)			(ng/dl)
C	253.88 ±27.32 ^b	134.93 ±26.86 ^{NS}	104.05 ±22.71 ^{bc}	74.51 ±15.62 ^b	2.21 ±0.18 ^{NS}
Raw3%	254.77 ±25.95 ^b	139.38 ±25.67	97.71 ±19.37 ^b	88.40 ±22.37 ^b	2.35 ±0.26
Raw5%	235.22 ±18.74 ^b	145.46 ±13.75	100.07 ±19.38 ^b	83.58 ±16.01 ^b	2.40 ±0.38
EXC3%	303.43 ±28.26 ^a	136.10 ±14.59	139.62 ±34.43 ^a	138.58 ±14.17 ^a	2.08 ±0.52
EXC5%	291.62 ±25.51 ^a	133.00 ±17.11	131.23 ±28.81 ^{ac}	136.94 ±15.19 ^a	2.29 ±0.13

(라) 미삼 추출물이 지방세포 크기에 미치는 영향

미삼 추출물에 따른 Epididymal, subcutaneous, Abdominal 지방세포 크기는 대조군과 미삼 투여군 간에 유의적 차이가 나타나지 않았다. retroperitoneal 지방세포의 경우 대조군에 비해 EXC 5%의 지방세포 크기가 유의적으로 증가하였다(Table 13). 지방세포 면적을 관찰한 결과 대조군과 미삼 추출군 간에 유의적 차이가 없는 것으로 나타나 미삼 추출물이 지방세포 크기를 감소시키는데 긍정적인 영향을 주었다고 볼 수 없다.

Table 13. Cell volume in fat cell($\times 10^3 \mu\text{m}^3$)

Group	Epididymal	Subcutaneous	Abdominal	retroperitoneal
C	679.64 \pm 274.02 ^N _s	540.81 \pm 295.57 ^N _s	685.63 \pm 513.87 ^N _s	576.30 \pm 365.61 ^b
Raw3%	724.23 \pm 372.57	674.82 \pm 487.49	799.98 \pm 446.74	549.85 \pm 92.41 ^b
Raw5%	692.43 \pm 344.47	869.25 \pm 265.91	921.33 \pm 296.47	646.20 \pm 236.54 ^b
EXC3%	950.59 \pm 295.26	713.45 \pm 540.61	906.22 \pm 350.38	577.29 \pm 188.71 ^b
EXC5%	742.43 \pm 280.93	659.95 \pm 187.28	862.79 \pm 413.29	1024.58 \pm 290.95 ^a

(마) 미삼 추출물이 지방세포수에 미치는 영향

미삼 추출물에 따른 Epididymal 지방세포수는 대조군에 비해 미삼 추출군에서 감소하는 경향을 나타냈고 추출법에 따른 차이는 나타나지 않았다.

Subcutaneous의 경우도 대조군에 비해 미삼 추출군에서 감소하는 경향을 나타냈고 Raw3%, EXC5%에서 두드러지게 감소하는 경향을 보였다. Abdominal

지방세포수는 대조군에 비해 Raw3%, EXC5%군은 감소하였지만 Raw5%, EXC 3%군에서는 증가하는 경향을 나타내었다. retroperitoneal 경우 대조군에 비해 Raw 5%군에서만 감소하는 경향을 나타내었고 다른 미삼 추출 군에서는 증가하는 경향을 보였다.(Table 14)

Table 14. Cell number in individual adipose tissues(number/g)

Group	Epididymal	Subcutaneous	Abdominal	retroperitoneal
C	1887813	2709054	1066567	337260
Raw3%	438404	248070	197675	1172521
Raw5%	401174	1111833	1109034	126078
EXC3%	486468	1166969	1250693	1248657
EXC5%	348351	309053	261916	371476

(사) 미삼 추출물이 Uncoupled protein-1 mRNA 발현에 미치는 영향

Uncoupled protein-1 mRNA 발현을 측정한 결과는 figure 1에 나타내었다.

모든 군 간에 유의적 차이가 나타나지 않았다.

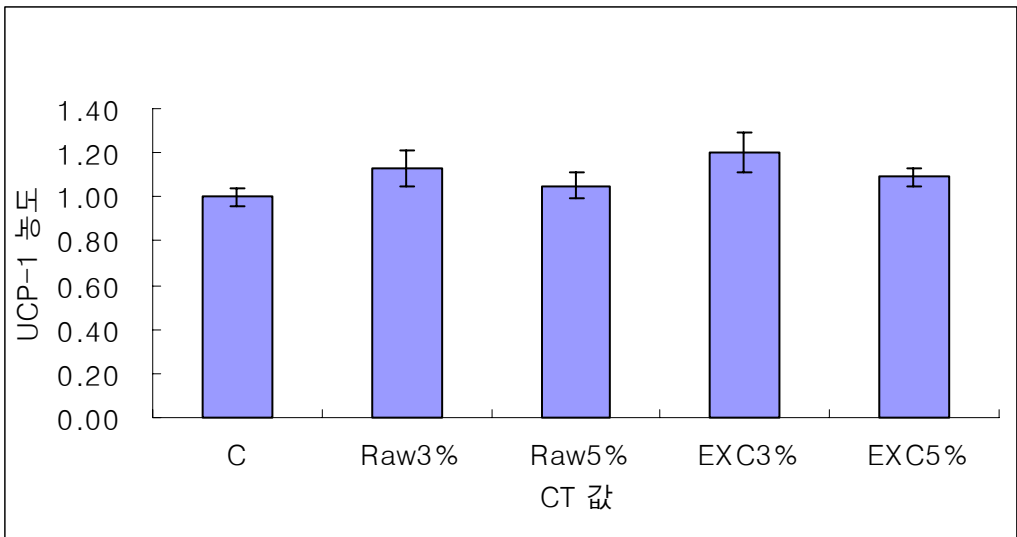


Fig.1. Effects of ginseng Extract on UCP-1 mRNA of ob/ob mice fed high fat diet

3) 미삼의 항스트레스 생리활성 효과 검증

(가) 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율

실험동물의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율은 Table 15와 같다. 체중증가량, 식이 섭취량은 대조군에 비해 스트레스 군에서 유의적으로 감소하였다 ($P<0.05$). 스트레스 군에 비해 미삼 투여군의 체중 증가량과 식이 섭취량이 약간 증가하는 경향을 보이지만 유의적 차이는 없었다. 식이 효율은 모든 군간에 유의적 차이가 없었다. 본 실험결과에서 스트레스로 인해 감소된 체중이 미삼 추출물로 다소 증가하는 경향을 보여 미삼이 스트레스로 인한 체중감소를 어느 정도 억제하는 효과를 갖고 있다고 사료된다.

Table 15. Body weight gain, food intake, and food efficiency of immobilization stressed rats fed experiments with and without ginseng

Group	Initial body weight (g)	Body weight gain (g/2weeks)	Food intake (g/2 weeks)	Food efficiency
C	236.03±3.12 ^{NS}	80.59±6.60 ^a	395.26±13.04 ^a	0.20±0.01 ^a
S	236.98±3.30	30.42±6.10 ^b	313.44±11.15 ^b	0.10±0.02 ^b
Ga	234.10±2.39	41.84±4.88 ^b	344.01±14.57 ^b	0.12±0.01 ^b
Gc	236.23±2.44	35.14±2.79 ^b	310.63±4.89 ^b	0.11±0.01 ^b
Gd	234.69±2.26	39.98±5.85 ^b	334.31±13.29 ^b	0.12±0.02 ^b
Gf	236.11±2.09	42.45±5.45 ^b	352.35±18.48 ^b	0.12±0.01 ^b

C: Control

S: stress

Ga: Hot water Extract (From Raw Ginseng)

Gc: Hot water Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

Gd: 80% EtoH Extract (From Raw Ginseng)

Gf: 80% EtoH Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

(나) 스트레스 관련 장기 무게 비교

각 실험군의 장기 무게는 Table 16에 나타내었다. 흉선의 무게는 스트레스 부과에 의해 유의적 감소를 보였으며($P<0.05$), 이러한 감소는 미삼 투여군에서 억제되는 경향을 보였으며 특히 미삼 투여 Gf군에서 유의적으로 증가하였다. ($P<0.05$). 스트레스 부과 시 부신은 증가하였고 미삼 투여군에서 감소하는 경향을 보였으며 특히 미삼 투여 Gf군에서 유의적 감소하였다. 비장의 무게는 모든 군 간에 유의적 차이는 없었다. 스트레스는 생체에 교감신경계 및 뇌하수체-부신계의 기능 향진에 의해 모든 반응이 매개되어 정동반응을 일으키는 것과 동시에 운동기능 및 자율기능에도 영향을 미친다고 알려져 있다. 외부로부터의 자극은 대뇌의 변연계(limbic system)에 영향을 주며 이는 뇌하수체로부터 ACTH의 분비를 자극하고, 이것은 부신피질을 자극하여 아스코르브산(ascorbic acid)의 소비와 코르티코스테론(corticosterone)의 생합성을 촉진하여 부신의 비대를 촉진하거나 비장, 흉선과 같은 면역 장기의 위축 및 효소의 활성이 증가하게 되는 등의 여러 가지 생체 반응을 나타내게 된다.

본 연구에서 미삼 추출물의 투여는 부동화 스트레스에 의한 흉선의 위축을 억제하였고 스트레스에 의해 증가된 부신의 무게가 미삼 추출물에 의해 유의적으로 감소하여 긍정적인 항스트레스 작용을 나타내었다고 판단된다.

Table 16. Effect of ginseng on the tissue weights of rats with or without immobilization stress

Group	Spleen	Thymus	Adrenal
	(mg/100g of body weight)		
C	204.84±5.49 ^{NS}	168.24±15.42 ^a	13.21±0.91 ^b
S	193.39±8.74	126.16±4.97 ^b	19.08±1.41 ^a
Ga	198.35±7.47	151.11±5.93 ^{ab}	18.09±0.98 ^a
Gc	191.63±10.49	142.89±5.16 ^{ab}	15.94±2.33 ^{ab}
Gd	183.44±7.89	151.44±6.19 ^{ab}	16.04±1.28 ^{ab}
Gf	181.92±15.29	157.54±5.75 ^a	14.60±0.87 ^b

C: Control

S: stress

Ga: Hot water Extract (From Raw Ginseng)

Gc: Hot water Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

Gd: 80% EtoH Extract (From Raw Ginseng).

Gf: 80% EtoH Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

(다) 간조직, 지방조직, 뇌조직 비교

스트레스 부하 시 간 조직은 유의적으로 감소하였으며 미삼 투여로 인한 변화는 나타나지 않았다. 지방조직(epididymal, retroperitoneal)은 모든 군 간에 차이점이 없었다. 스트레스 부하 시 뇌조직은 유의적으로 증가하였고 미삼 투여로 인한 변화는 나타나지 않았다(Table 17).

Table 17. Effect of ginseng on the tissue weights of rats with or without immobilization stress

Group	Liver	Epididymal	Retroperitoneal	Brain
	(g/100g of body weight)			
C	3.49±0.10 ^a	0.91±0.07 ^{NS}	0.63±0.07 ^{NS}	0.63±0.02 ^b
S	3.11±0.09 ^b	0.77±0.05	0.46±0.07	0.70±0.02 ^a
Ga	3.15±0.07 ^b	0.93±0.13	0.58±0.19	0.68±0.01 ^a
Gc	3.07±0.06 ^b	0.96±0.08	0.59±0.08	0.68±0.01 ^a
Gd	3.13±0.09 ^b	0.87±0.06	0.51±0.09	0.69±0.02 ^a
Gf	3.18±0.05 ^b	0.88±0.07	0.51±0.06	0.70±0.01 ^a

C: Control

S: stress

Ga: Hot water Extract (From Raw Ginseng)

Gc: Hot water Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

Gd: 80% EtoH Extract (From Raw Ginseng)

Gf: 80% EtoH Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

(라) 혈액 분석

GOT는 모든 군 간에 유의적이 차이가 나타나지 않았고 GPT는 Ga군과 Gd군에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 그 값들은 SD rat 생화학적 임상 기준치인 GOT의 경우 39~262U/L, GPT의 경우 20~60U/L 범위에 해당하였다. GOT, GPT는 간의 위해가 발생했을 때 혈중으로 다량 방출되게 되는데 이 경우 정상범위 안에 있었으므로 시험식이의 섭취는 시험동물에게 유해하지 않음을 알 수 있었다. 스트레스 부하 시 콜레스테롤 농도변화는 유의적으로 나타나지 않았고 미삼 투여군 Gd군에서 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 스트레스 부하 시 혈중 코르티코스테론의 수치는 유의적으로 증가하였으면 이러한 증가는 미삼 투여군 Gf군에서 유의적으로 억제되는 경향을 보였다(Table 18).

Table 18. Effect of ginseng on blood biochemical parameters of rats with or without immobilization stress

Group	GOT (unit/ml)	GPT (unit/ml)	Cholesterol (mg/dl)	Corticosterone (ng/ml)
C	179.00±9.84 ^{NS}	38.17±3.67 ^b	54.95±2.62 ^{ab}	39.25±4.63 ^c
S	187.40±19.35	37.80±6.55 ^b	57.11±3.75 ^{ab}	423.55±48.21 ^a
Ga	184.20±28.51	62.20±11.90 ^a	62.23±4.97 ^a	371.98±63.02 ^a
Gc	191.33±6.67	54.50±3.92 ^{ab}	55.01±3.58 ^{ab}	433.45±58.77 ^a
Gd	168.60±4.83	57.40±6.35 ^a	50.72±2.59 ^b	385.21±39.96 ^a
Gf	159.17±6.63	47.83±1.51 ^{ab}	51.61±2.91 ^{ab}	216.17±61.85 ^b

C: Control

S: stress

Ga: Hot water Extract (From Raw Ginseng)

Gc: Hot water Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

Gd: 80% EtoH Extract (From Raw Ginseng)

Gf: 80% EtoH Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

(마) Catecholamines synthesizing enzymes mRNA 비교

Catecholamines synthesizing enzymes (Tyrosine hydroxylase, dopamine-β hydroxylase, phenylethanolamine N-methyltransferase)의 gene expression은 fig 2-4에 나타내었다. 스트레스 부하시 TH(tyrosine hydroxylase) mRNA와 DBH(dopamine-β hydroxylase) 수준은 각각 3.3배, 3.1배 증가하였고 미삼 투여에 의해 35.6%, 48.2% 수준으로 유의적으로 억제되는 경향을 나타내었다. 스트레스 부하시 PNMT(phenylethanolamine N-methyltransferase) mRNA 수준은 증가하는 경향을 나타내었고 미삼 투여로 인해 감소하는 경향을 보였지만 유의적이지 않았다. Catecholamines은 스트레스에 의해 증가되며 스트레스에 유도된 catecholamines은 catecholamines synthesizing enzymes (TH, DBH, PNMT)의 gene expression을 증가를 반영한다. 본 연구에서 스트레스에 유도된 TH, DBH mRNA 수준이 미삼 투여에 의해 유의적으로 감소하여 미삼 추출물이 항스트레스 작용을 나타내었다고 판단된다.

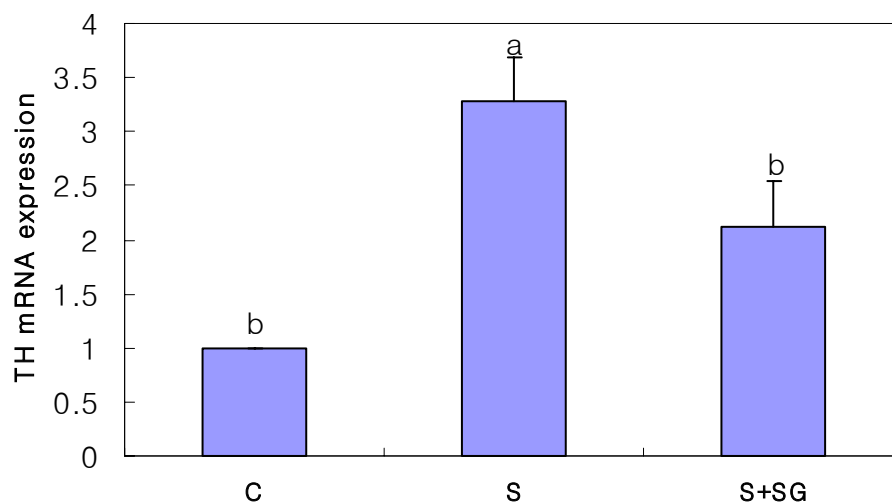


Fig. 2. TH mRNA expression in adrenal of rats fed experimental diets.

Data were processed with a specially designed software program based on Ct values of each sample and normalized to β -actin mRNA ($n=3$). Values in bars with different superscripts are significantly different, ($p<0.05$) and expressed as mean \pm SE, $n=3$. C; control, S; stress, S+GS; immobilization-stressed plus 80% EtoH ginseng Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

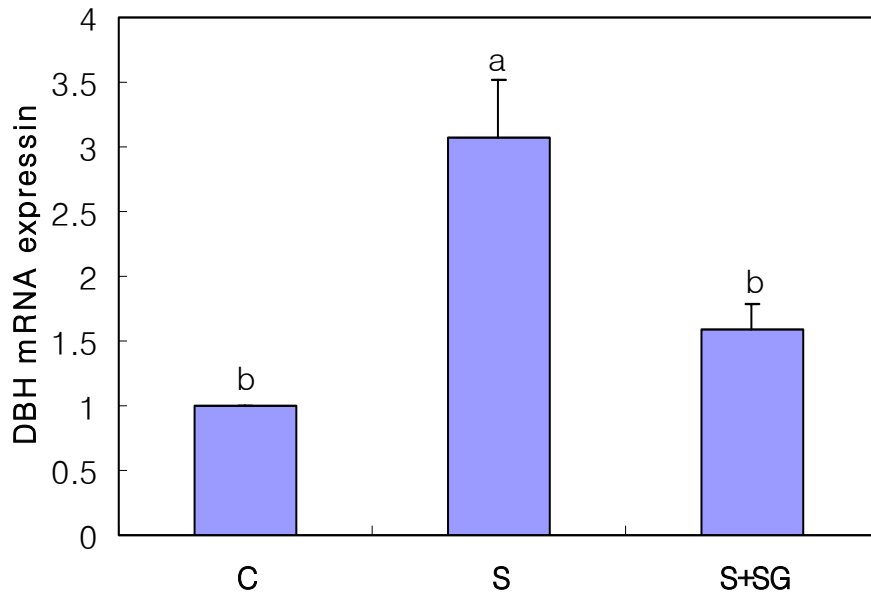


Fig. 3. DBH mRNA expression in adrenal of rats fed experimental diets.

Data were processed with a specially designed software program based on Ct values of each sample and normalized to β -actin mRNA ($n=3$). Values in bars with different superscripts are significantly different, ($p < 0.05$) and expressed as mean \pm SE, $n=3$. C; control, S; stress, S+GS; immobilization-stressed plus 80% EtoH ginseng Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

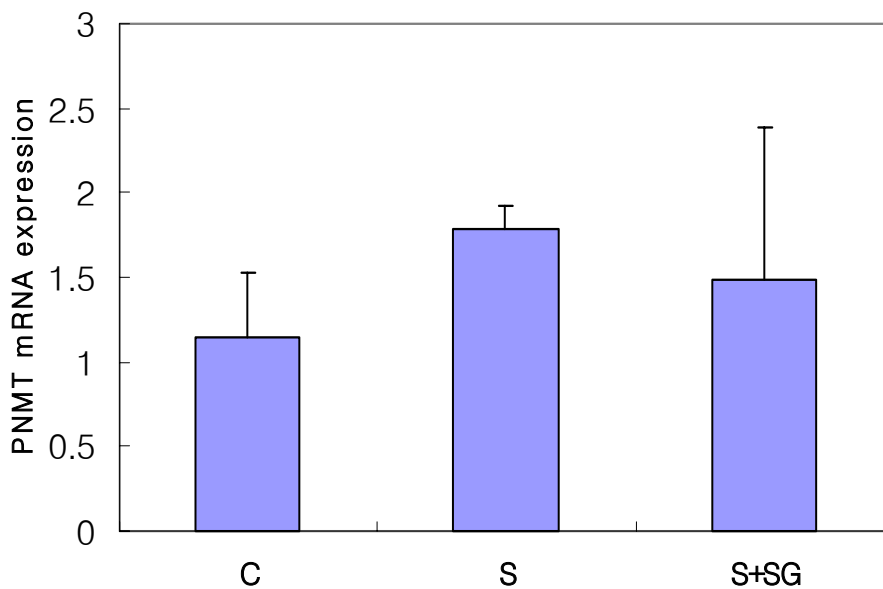


Fig. 4. PNMT mRNA expression in adrenal of rats fed experimental diets.

Data were processed with a specially designed software program based on Ct values of each sample and normalized to β -actin mRNA ($n=3$). Values in bars with different superscripts are significantly different, ($p<0.05$) and expressed as mean \pm SE, $n=3$. C; control, S; stress, S+GS; immobilization-stressed plus 80% EtoH ginseng Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

(바) PPAR- α mRNA 비교

각 실험군의 PPAR- α mRNA expression는 figure 5에 나타내었다. PPAR- α mRNA level은 스트레스 부과에 의해 유의적으로 감소하였으며 이러한 감소는 미삼 투여에 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

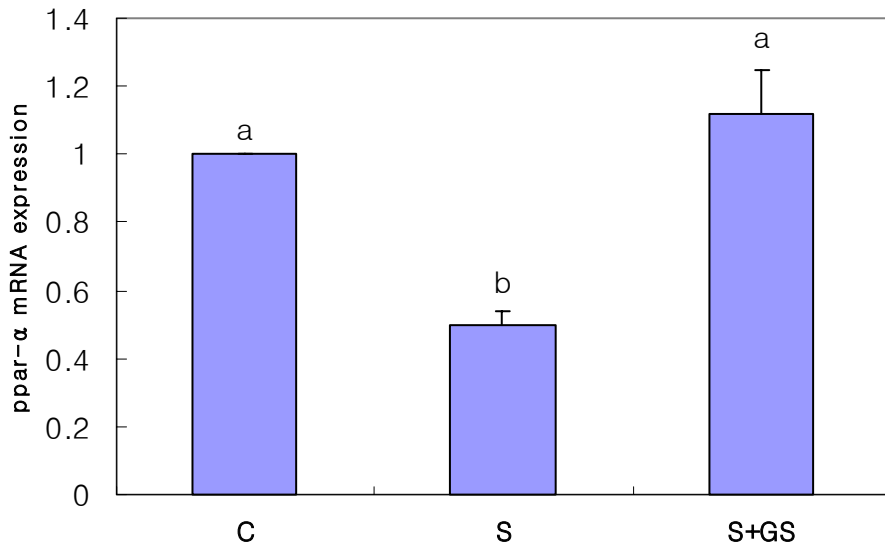


Fig. 5. PPAR- α mRNA expression in adrenal of rats fed experimental diets. Data were processed with a specially designed software program based on Ct values of each sample and normalized to β -actin mRNA ($n=3$). Values in bars with different superscripts are significantly different, ($p < 0.05$) and expressed as mean \pm SE, $n=3$. C; control, S; stress, S+GS; immobilization-stressed plus 80% EtoH ginseng Extract (From Extruded Ginseng with Citric acid)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

-미삼의 압출성형 처리에 의하여 고형분은 추출방법에 따라 상온 단시간 추출의 경우 2배 이상 추출률이 증가하고, 고온 (95℃) 장시간 추출방법의 경우 약 30% 증가시킬 수 있는 압출 처리공정의 최적 조건을 확립하여 당초 목표 이상을 달성하였음.

- 압출성형 처리에 의한 추출률 증대 모델 해석에 있어 미삼의 세포벽 구성 다당체인 hemicellulose 추정 성분의 수용화가 주된 요인임을 밝혔음. 즉, 압출성형에 의한 미삼 성분의 수용화는 세포벽 구성 다당체의 저분자화에 기인하는 것이 아니라, 각 세포벽 구성 다당체의 즉, pectic 류와 cellulose의 binding의 가교역활을 하는 hemicellulose의 수용화가 주된 요인임을 Barbier등의 분획법에 의한 연속적 추출 분획의 다당체함량 및 분자량 분포 분석에 의하여 밝혔음.

-미삼분말을 압출성형 처리하여 단립화하고 향미를 개선시킬 수 있는 최적 압출조건을 확립하였음.

압출미삼은 용적밀도가 0.31로 낮아졌으며(원료미삼분말의 용적밀도; 0.528), 공극률이 크게 확대되었으며, 평균입자는 Φ 2 mm X 3 mm로 현장에서 이송 중 먼지등 비산문제를 해결할 수 있었다. 그리고 원료미삼의 생균수 1.2×10^3 에서 160℃ 이상의 온도에서의 압출미삼은 전혀 생균수가 나타나지 않아 미생물 사멸 효과가 큰 것으로 나타났다.

압출에 의한 미삼의 향기성분 변화는 floral과 sweet 향의 강도는 압출온도가 높을수록 높아졌고, 문제시되는 흠냄새 향은 강도가 낮아짐을 GC / Olfactometry로 확인하여 압출성형처리에 의하여 향미를 개선시킬 수 있었다.

- Pilot 규모 (100L) 추출 실험을 통하여 열수 추출 중 내열성 α -amylase와 amylo-glucosidase를 반응시켜 추출액의 저장 중 침전생성 등을 감소시킬 수 있었으며, 주요 생리활성 물질인 인삼의 산성 다당체의 추출률을 약 3 배 증가시킬 수 있었고, saponin의 추출률도 크게 증가시킬 수 있었음. saponin의 추출률 증대 뿐아니라 추출된 saponin의 ginsenoside의 종류도 홍삼류에서 확인 되는 ginsenoside Rh1, Rh2 및 Rg3가 생성되었음을 HPLC로 확인하였음. 추출액의 polymer의 GPC 및 ion exchangechrom에 의하여 분획하고당조성을 분석하여, 추출액 polymer의 산성 다당체 함량이 압출처리에 의하여 크게 증가함을 확인하였음.

- 재구성 연제품의 제품 concept을 확립하고, 제품의 부재료를 선정하였고, 재구성 성형을 위한 냉각 Die의 제작, 시제품을 시험 생산하였음. 재구성 미삼 연제품 시제품은 압출미삼 20, 변성전분, gelatine 및 pectin 30, 당류 35의 배합물을 60℃ 저온에서 압출 성형하여, 탄력을 특성으로 하는 재구성제품을 개발하였음.

-

- 압출 미삼 Extract의 급여는 스트레스 부하 시 감소된 체중 증가가 미삼추출 방법에 따라서 미삼 단독 압출 보다는 citric acid 첨가 압출 처리구가 효과가 더 좋은 것으로 나타났으며, 대조구 미삼 추출물을 섭취한 군보다는 압출 처리 미삼 추출물을 섭취한 군에서 지방조직의 무게가 낮았다. 따라서 압출 미삼에서 비만 방지의 효과가 있는 물질의 추출률의 증가를 시사하였다. 본 미삼 추출물의 향 스트레스 생리 효능 평가를 위한 스트레스 부하 검증 system이 개발되었음.

미삼 추출물의 섭취가 스트레스 관련 조직인 부신, 비장 및 흉선의 정상화에 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 스트레스 부과 시 혈중 GOT, GPT가 유의성 있게 증가하였으며 미삼 추출물에 의해 유의성은 보이지 않았으나 약간 감소하는 경향을 보여 긍정적인 항스트레스 작용을 나타내었다고 사료된다. 혈중 콜레스테롤은 스트레스에 의해 약간 감소하였고 인삼 추출물에 의해 다소 증가하는 경향을 보이지만 모든 그룹 간에 유의적 차이는 없었다. 스트레스 부과는 혈중 corticosterone의 수치를 360.20 ± 57.36 ng/ml에서 500.30 ± 89.94 ng/ml로 증가시켰으며 이는 미삼 추출물에 의해 423.43 ± 60.26 ng/ml로 유의적으로 감소하여 압출 미삼추출물이 스트레스를 완화해주는 효과가 있음을 확인하였음.

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 압출공정 처리에 의한 미삼의 extract 소재의 항스트레스 생리기능 효과를 동물실험을 통하여 검증하여 개발 신제품의 산업화 촉진 방안을 마련한다.

2. 고가인 원형삼을 대신하여 미삼을 원료로 하여 다양한 식품 제품을 개발함으로써 농가 소득 및 관련 업계의 이익 창출 꾀한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

미삼 압출처리공정은 인삼의세포벽 성분의 수용화를 촉진하여 가공제품 중 추출/농축단계를 획기적으로 줄인 수 있을 뿐만 아니라 단립화를 이루어 압출물 자체로 인삼분말차로의 사용이 가능함이 밝혀졌다. 앞으로 개발된 압출처리 기법이 참여업체 등에 기술 이전되어 산업화를 이루기 위한 다음 단계의 추가 연구가 계속되길 기대한다.

한편, 압출처리 미삼의 항스트레스 생리효능 증진 효과 규명 연구결과는 학계에 발표 및 특허를 출원하고, 항스트레스 생리효능과 편리성이 제고된 미삼 제품의 산업화 촉진에 사용될 것을 기대한다.

참고문헌

1. Mazza. G. Functional Food. 1998. Technomic publishing Co., Inc.
2. A. Robin POOLE. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem. J.* 236: 1-14. 1986
3. Sun XB, Matsumoto T, Yamada H. Anti-ulcer activity and mode of action of the polysaccharide fraction from the leaves of *Panax ginseng*. *Planta Med.* 58(5):432-5, 1992
4. Takahashi M, Tokuyama S, Kaneto H. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* Anti-stress effect of ginseng on the inhibition of the development of morphine tolerance in stressed mice. *Jpn J Pharmacol.* 59(3):399-404, 1992
5. Luo YM, Cheng XJ, Yuan WX. Effects of ginseng root saponins and ginsenoside Rb₁ on immunity in cold water swim stress mice and rats. 14(5):401-4, 1993
6. Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H, Ninomiya Y. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 26;97(20):11044-9, 2000
7. Sonoda Y, Kasahara T, Mukaida N, Shimizu N, Tomoda M, Takeda T. Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of *Panax ginseng*. *Immunopharmacology* 38(3):287-94, 1998
8. Gaffney BT, Hugel HM, Rich PA. The effects of *Eleutherococcus senticosus* and *Panax ginseng* on steroidal hormone indices of stress and lymphocyte subset numbers in endurance athletes. *Life Sci.* 14;70(4):431-42, 2001
9. Kitts D, Hu C. Efficacy and safety of ginseng. *Public Health Nutr* 3(4A):473-85, 2000

10. Banerjee U, Izquierdo JA. Antistress and antifatigue properties of Panax ginseng: comparison with piracetam. *Acta Physiol Lat Am* 32(4):277-85. 1982
11. 도재호, 이형옥, 이성계, 장진규, 성현순, 인삼 산성다당체의 비색정량 방법과 그 추출조건 및 안정성 *고려인삼학회지* 2: 139-144, 1993
12. 황우익, 홍전척도, 고려인삼중 다당체 성분이 암독소 호르몬-L의 지방분해 작용과 안지오텐신 변환효소의 활성화에 미치는 영향, *고려인삼학회지*, 3:248-25,5 1996
13. 이성동, 이광승 고려인삼의 수용성 엑기스 성분이 암독소 호르몬-L의 체지방 분해작용에 미치는 영향 *고려인삼학회지*, 1:7-12, 1992
14. 황윤경, 이성동, 홍삼 산성 다당체 성분의 암독소 호르몬-L에 의한 지방분해 저해 활성화, *고려인삼학회지*, 1:7-12, 1992
15. Glavin GB. 1985. Stress and brain noradrenaline. *Neuro Biobeh Rev* 9: 233-241.
16. David NK, Anthony JM, Robert EF. 1990. Effects of stress on the immune system. *Immunol Today* 11: 170-176.
17. Staratakis CA, Chrousos GP. 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad. Sci.* 771: 1-18.
18. Selye H. 1950. The physiology and pathology of exposure stress. *Montreal Acta* 950: 4-13.
19. Kwon MH, Sung HJ . 1997. Regulation of immune function by complement system active polysaccharide. *Food Indus Nutr* 30: 30-44.
20. Brekhman II, Dardymov IV. 1969. Pharmacological investigation of glycosides from ginseng and eleutherococcus. *Lloydia* 32: 46-59.

21. Sen P, Maiti PC, Puri S, Ray A. 1992. Mechanism of anti-stress activity of *Acimum sanctum* Linn, eugenol and *Tinospora malabarica* in experimental animals. *Ind J Exper Biol* 30: 592-596.
- 22.. Koh JH, Kim KM, et al. 2003. Antifatigue and Antistress Effect of the Hot-water Fraction from Mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull* 26: 691-694.
23. Rai D, Bhatia G, Palit G, Pal R, Singh S, Hermant K, et al. 2003. Adaptogenic effect *Bacopa monniera*(Brahmi). *Pharm Biochem Behav* 75: 823-830.
24. Kawamura T, KoiaumiF, Ishimori A. 1989. Effect of ursodeoxycholic acid on water immersion restraint stress ulcer of rats. *Nippon Shokakibyogakkai Zasshi* 24: 2373-2378.
25. Xie JT, Wu JA, Mehendale S, Aung HH, Yuan CS. 2004. Anti-hyperglycemic effect of the polysaccharides fraction from American ginseng berry extract in ob/ob mice. *Phytomedicine* 11: 182-187.
26. Kaneko H, Nakanishik. 2004. Proof of the mysterious efficacy of ginseng. *J Pharmacol Sci* 95: 158-162.
27. Jeon BH, Kim CS, Kim HS, Park JB, Nam KY, Chang SJ. 2000. Effect of korean red ginseng on blood pressure and nitric oxide production. *Acta Pharmacol Sin* 12: 1095-1100.
28. Himi T, Saito H, Nishiyama N. 1989. Effect of ginseng saponins on the survival of cerebral cortex neurons in cell cultures. *Chem Pharm Bull* 37: 481-485.
29. Kitts DD, Hu C. 2000. Efficacy and safety of ginseng. *Public Health Nutr* 3: 473-485.

30. Luo YM, Cheng XJ, Yuan WX. 1993. Effects of ginseng root saponins and ginsenoside Rb1 on immunity in cold water swim stress mice and rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 14: 401-405.
31. Rai D, Bhatia G, Sen T, Palit G. 2003. Anti-stress effects of Ginkgo biloba and Panax ginseng. *J Pharmacol Sci* 93: 459-464.
32. Kim CC. 1979. Influence of Panax Ginseng on the Responce of Stressful Stimuli in the Experimental Animal exposed to Various Stress. *Kor J Ginseng Sci* 3: 168-177.
33. Brekhman II, Dardycov IV. 1969. Pharmacological investigation of glycosides from ginseng and eleutherococcus. *Lloydia* 32: 46-59.
34. Kim C, Kim CC, Kim MS, Hu CY, Rhee JS. 1970. Influence of ginseng on the stress mechanism. *Lloydia* 33: 43-51.
36. Hong SA, Lim JK, Park CW, Cha IJ. 1979. Pharmacological action of Ginseng. *J Ginseng Sci* 3: 66-93
37. Kaneko H, Nakanishi K. 2004. Proof of the Mysterious Efficacy of Ginseng. *J Pharmacol Sci* 95: 158-162.
38. Yan Hu, Arturo C, Erdal G. 2000. Anti-stress Effects of Dehydroepiandrosterone. *Biochem Pharmacol* 59: 753-762.
39. Tache Y, Du Ruisseau P, Ducharme JR, Collu R. 1978. Pattern of adenohipophyseal hormone changes in male rats following chronic stress. *Neuroendocrinology* 26: 208-219.
40. Valles A, Marti O, Garcia A. 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: 1138-1144.

41. Lawson N, Jennings RJ, Pollard AD, Sturton RG, Ralph SJ, Marsden CA, Fears R, Brindlley DN. 1981. Effects of chronic modification of dietary fat and carbohydrates in rats. *Biochem J* 200: 265-273.
42. Jeong CM, Kyung CH. 1995 The Effect of Dietary n-3 and n-6 Polyunsaturated fats on Changes in Glucose, Non Esterified Fatty Acid and Fatty Acid Compositions in Serum of Rat Exposed to Stress. *Kor J Nutr* 28: 375-386.
43. Kim JY. 1969. Studies on the effect of Ginseng on body weight in rats. Catholic Medical College, Collection of learned papers 17: 109-116.
44. Cho TS, Lee SM, Yeom JH, Yu E, Lim SW, Jang BS, Kim YH. 1995. Anti-stress effects of ursodeoxycholic acid on the restraint stress in rats. *Yakhak Hoeji* 39: 548-553.
45. Ricart-Jane D, Rodriguez-Sureda V, Benavides A. 2002. Immobilization Stress Alters Intermediate Metabolism and Circulating Lipoproteins in the Rat. *Metabolism* 51: 925-931.
46. Marti O, Gavaldà A, Gomez F. 1994. Direct Evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. *Neuroendocrinology* 60: 1-7.
47. Bae SJ, Kim NH, Koh JB. 1997. Effects of Godulbaegi Diets on Enzyme Activities of CCl4 Induced Hepatotoxicity in Rats. *KorJ Nutr* 30: 19-24
48. Kim YK. 1973. Changes in the Lipid Composition and Some Enzyme Activities in the Rat Liver as Affected by Diets. *Kor J Nutr* 6: 15-30
49. Yung Kuk Kim. 1973. Changes in the Lipid Composition and Some Enzyme Activities in the Rat Liver as Affected by Diets. *Korean J Nutrition* Vol 6, No 1: 15-30

50. Ren G and F. Chen. 1999. Degradation of ginsenosides in American Ginseng (*Panax quinquefolium*) extracts during microwave and conventional heating. J. Agric. Food Chem. 47, 1501-1505
51. Sun, JB, Severson, RF and Schlotzhauer, W.S. 1995. Identifying critical volatiles in the "Jewel" of baked Jewel sweetpotatoes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120(3), 468-474
52. KWON, JH, Belanger, JMR, Yaylanyan, VA. 2003. Application of the microwave-assisted process to the fast extraction of ginseng saponins. 2003. Food Research International. 36 491-498