

- 연구노트 -
호소처리와 열처리에 의한 인삼 추출물의 항산화 활성

김영찬¹ · 조장원¹ · 이영경¹ · 유경미² · 노정해^{1*}

¹한국식품연구원

²건국대학교 생명공학과

Antioxidant Activity of Ginseng Extracts Prepared by
Enzyme and Heat Treatment

Young-Chan Kim¹, Chang-Won Cho¹, Young-Kyung Rhee¹,
Kyung Mi Yoo², and Jeonghae Rho^{1*}

¹Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

²Division of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

In this study, extraction yield of ginseng and contents of phenolic compounds were increased through enzyme and heat treatment, and antioxidant activities of each treatment group were investigated. In the case of enzyme treatment groups, the extraction yields showed remarkable difference: pectinase (76.0%) > cellulase (44.7%) > α-amylase (43.1%) > protease (34.3%). Heat treatment groups did not show much difference in extraction yields (51.1~53.1%) except for 90°C-treated group (48.7%). Pectinase-treated group (2.21%) and 90°C heat treatment group (2.34%) showed the highest total phenol contents. DPPH radical scavenging activities of the solvent-treated, enzyme-treated and heat-treated extracts were 12.3~33.2%, 29.7~40.3% and 57.8~75.2%, respectively, at 100 mg/mL concentration. The pectinase-treated extract exhibited the greatest ABTS radical scavenging activity (60%), followed by 150°C, 120°C, and 90°C-treated groups.

Key words: Korean ginseng, antioxidant activity, enzyme treatment, heat treatment

서 론

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 전 세계적으로 가장 널리 연구되고 있는 생약중의 하나이며, 사포닌, 페놀성 성분, 폴리사세칠렌 성분, 알카로이드 성분, 다당체 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(1). 인삼 내 유효성분이 사포닌 성분임이 제시된 이후 사포닌을 중심으로 항당뇨 작용(2), 심혈관계 장애 개선작용(3) 등에 관한 약리작용이 밝혀졌다. 그러나, 사포닌 이외 인삼 속에 함유된 polyacetylene 성분들이 암세포 증식을 억제하는 것이 밝혀지면서 사포닌 이외 유효성분의 생리활성에 대한 연구가 이루어졌다(4). 또한, 인삼에서 분리한 순수 사포닌에 대해서는 항산화 효과가 나타나지 않거나 미약한 것으로 보고되어 있어(5), 인삼의 항산화 작용들은 사포닌 이외 페놀성 성분에 의한 것으로 인식되고 있다.

인삼으로부터 ferulic acid, cinnamic acid, caffeic acid 등 10여종의 페놀산이 확인되었으며, maltol은 홍삼 특이성분으로 수삼으로부터 홍삼 제조시 생성되는 것으로 강한 활성

산소 소거활성을 가지는 것으로 알려져 있다(6). Choi 등(7)은 백삼으로부터 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산을 분리하여 이들의 항산화 활성을 보고하였고, 이외에도 활성산소 소거활성(8), 방사선 조사시 항산화 관련 효소활성에 미치는 영향(9), 인체 내 지질대사에 미치는 영향(10) 등이 보고되었다.

추출수율 향상과 특정 유용성분의 함량 증대를 위하여 홍삼(11), 황기(12), 은행잎(13) 등을 호소 처리하여 이들의 성분과 생리활성 변화에 대한 연구가 진행되었다. 최근에 도입된 고온 처리법 역시 홍삼의 가공 온도를 100~120°C 이상으로 상승시켜 Rk₁, Rg₃, Rg₅ 등의 사포닌 전환에 의한 항암성과 항산화성을 증대시킨 제품이 출시되고 있다. 그러나 이러한 연구는 특정 사포닌 성분에 한정되어 있고, 사포닌을 제외한 인삼의 비사포닌계 화합물에 대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구는 pectinase, protease, cellulase, α-amylase를 이용한 호소처리와 90~175°C로 열처리하여 추출한 인삼의 비사포닌계 저분자 화합물의 항산화 활성을 기존 용매 추출과 비교 시험하였다.

*Corresponding author. E-mail: drno@kfri.re.kr
Phone: 82-31-780-9060, Fax: 82-31-780-9312

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 인삼은 금산에서 2003년 9월에 수확하여 건조한 4년근 백삼을 200 mesh 이하로 분쇄하여 사용하였다. 일정량의 시료에 중량 대비 10배의 물, 25% 에탄올(v/v), 75% 에탄올(v/v), 에탄올을 이용하여 3시간씩 2회 반복 환류 추출하였다. 항산화 시험용 저분자 분획은 에틸아세테이트를 가하여 페놀성 화합물을 추출하였다.

효소처리

일정량의 인삼 분말 100 g에 증류수를 1 L를 가하여 현탁시킨 후 가수분해 효소 (protease: EC 3.4.24.32, from *Bacillus polymyxa*, 1.0 Unit/mg, α-amylase: from *Bacillus subtilis*, 52.9 Unit/mg, cellulase: from *Aspergillus niger*, 0.45 Unit/mg, pectinase: from *Aspergillus niger*, 1.8 Unit/mg) 를 건물량 기준으로 0.5% 첨가하여 12시간 동안 가수 분해시켰다. 가수분해가 끝난 시료는 여과(Whatman No. 4) 후 감압 농축하여 에틸아세테이트를 가하여 페놀성 화합물을 추출하였다.

열처리

Microwave를 이용하여 고온 추출 시험을 위하여 시료 10 g에 6 N HNO₃를 10 mL를 가하며 90, 120, 150, 175°C에서 30분간 분해한 후 증류수 100 mL에 현탁시킨 후 에틸아세테이트 150 mL를 가하여 2회 반복 추출하였다.

총 페놀화합물 함량

인삼 추출물의 총페놀 함량은 Folin-Denis 방법(14)으로 비색정량하였다. 건조시료를 메탄올에 10 mg/mL 농도로 녹인 시료 1 mL와 Folin 시약 1 mL를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 뒤 10% Na₂CO₃용액 1 mL를 가하여 혼합하여 실온에서 1시간 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 환산하였다.

DPPH radical 소거활성

DPPH 라디칼에 대한 소거활성은 Blois의 방법(15)으로 측정하였다. 에탄올 적정량에 에틸아세테이트로 분획한 시료 0.2 mL와 4×10⁻⁴ M DPPH 용액 0.8 mL을 가하여 10초간 혼합하고 10분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다.

ABTS 소거활성

ABTS 소거활성은 Van den Berg 등의 방법을 변형하여 측정하였다(16). 1 mM의 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)은 100 mM PBS buffer에 녹인 2.5 mM의 ABTS(2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)와 혼합한 후 68°C의 항온조에서 12분 동안 반응시켰다. ABTS 용액의 농도는 734 nm에서 0.650±0.2가

되도록 조정하였다. 시료 20 µL와 980 µL ABTS 용액을 37°C water bath에서 10분간 반응시키면서 734 nm에서 감소하는 흡광도 정도를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 평균과 표준편차로 산출하였으며, 각 실험기간의 검증은 SAS를 이용한 ANOVA와 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다(17).

결과 및 고찰

추출수율 및 총페놀 함량

인삼을 용매추출, 효소처리, 열처리하여 각각의 추출수율과 총페놀 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 용매별 추출수율은 물>25% 에탄올>75% 에탄올>에탄올 순으로, 에탄올 함량이 높을수록 추출수율은 낮았으며, 물 추출물의 경우 61.2%로 에탄올 추출물(28.7%)보다 2배 이상의 추출수율을 보였다. Kim 등(18)은 백삼분말을 물과 유기용매로 추출하였을 때 물 추출물이 37.1%, 에탄올 추출물이 8.3%의 추출 수율을 가지는 것으로 보고하였는데 본 실험에서는 다소 높은 추출수율을 보였다. 이는 추출온도와 추출 횟수의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 효소처리의 경우 pectinase(76.0%)>cellulase(44.7%)>α-amylase(43.1%)>protease(34.3%)의 순으로 처리 효소에 따라 큰 차이를 보였다. 열처리구의 경우 90°C 처리구의 추출 수율이 48.7%로 가장 낮았으며, 그 외의 온도 구간에서는 51.1~53.1%로 비슷한 추출수율을 보였다. 각각의 추출수율은 pectinase(76.0%), 물(61.2%), 150°C(54.1%) 순이었으며, 에탄올 추출시 28.7%의 가장 낮은 추출수율을 보였다.

용매추출시 총페놀 함량은 에탄올(0.9%)>75% 에탄올(0.8%)>25% 에탄올(0.59%)>물(0.34%) 순으로 추출수율과는 정반대의 결과를 보였다. 효소처리구의 경우 pectinase 처리구의 총페놀 함량이 2.21%로 가장 높았으며, cellulase

Table 1. Yields and total phenol contents of white ginseng extracts treated with enzyme and heat

	Crude extract (%)	Total phenol (dry basis, %)	
Solvent	Water	61.2±2.3 ¹⁾	0.34±0.08
	25% ethanol	41.0±1.9	0.59±0.07
	75% ethanol	36.1±1.8	0.80±0.07
	Ethanol	28.7±2.0	0.90±1.02
Enzyme	Protease	34.3±1.7	0.69±0.04
	α-amylase	43.1±0.9	0.95±0.06
	Cellulase	44.7±0.9	0.45±0.11
	Pectinase	76.0±1.3	2.21±0.09
Temperature (°C)	90	48.7±2.1	2.34±0.12
	120	53.1±2.3	1.40±0.04
	150	54.1±3.3	1.12±0.06
	175	51.1±3.0	1.22±0.07

¹⁾Values are mean±SE.

처리구가 0.45%로 가장 낮은 함량을 보였다. 열처리구의 경우 90°C 처리구에서 2.34%로 가장 높은 총페놀 함량을 보였으며, 120°C 처리구가 1.40%, 150°C 처리구가 1.12%, 175°C 처리구가 1.22%로 온도 의존적으로 함량 증가를 보이지 않았다. 각 처리구 중에서 가장 높은 총페놀 함량을 보인 처리구는 pectinase 처리구였으며, 물추출물의 경우 가장 낮은 총페놀 함량을 보였다. Lee 등(19)은 홍삼을 60% 에탄올로 추출시 1.3%의 페놀화합물이 함유되었다고 보고하였는데, 본 실험의 경우 용매 추출시에는 홍삼보다 페놀화합물의 함량이 낮았으나, pectinase 처리나 90°C 열처리의 경우 페놀화합물의 함량이 각각 2.21%와 2.34%로 더 높게 나타났다.

Kim 등(11)은 홍삼 엑기스에 β -amylase와 transglucosidase를 처리하여 홍삼 엑기스중의 당류의 변화와 ginsenoside 함량 변화를 보고한 바 있으며, Shin 등(20)은 인삼 잎으로부터 pectinase 처리를 통하여 rhamnogalacturonan II를 분리 동정하였다. Kim 등(12)도 황기의 유효성분인 claycosin과 formononetin의 추출함량을 높이기 위하여 펙틴, 탄수화물, 셀룰로오스 분해 효소의 처리 효과를 시험하였으며, 이외에도 은행잎(13), 합초(21)를 효소 처리한 결과 유효성분의 추출수율 향상과 생리활성이 증가됨을 확인하였다.

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성

각 처리구별 인삼 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 시험한 결과는 Table 2와 같다. 용매추출물의 경우 10 mg/mL 농도에서는 3.0~9.4%의 낮은 라디칼 소거활성을 보였으며, 효소처리구의 경우 16.3~27.7%, 열처리의 경우 35.3~46.3%의 라디칼 소거활성을 보였다. 시료를 100 mg/mL로 처리한 경우는 용매추출물에서 12.3~33.2%, 효소처리구에서 29.7~40.3%, 열처리구는 57.8~75.2%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다. Trolox의 경우 10 mg/mL과 100 mg/mL에서 각각 80.7%와 95.1%의 라디칼 소거활성을 보였다.

Table 2. DPPH radical scavenging activities of white ginseng extracts treated with enzyme and heat

	DPPH radical scavenging activity (%)	
	10 mg/mL	100 mg/mL
Solvent	Water	3.0±2.1 ¹⁾
	25% ethanol	7.4±1.9
	75% ethanol	7.5±4.6
	Ethanol	9.4±2.8
Enzyme	Protease	17.7±1.7
	α -amylase	16.3±1.2
	Cellulase	17.8±0.9
	Pectinase	27.7±0.2
Temperature (°C)	90	46.3±1.3
	120	37.6±2.9
	150	35.7±1.4
	175	35.3±0.3
Trolox	80.7±3.6	95.1±2.1

¹⁾Values are mean±SE.

각 처리구별 인삼 추출물의 AAPH에 의해 생성된 ABTS 라디칼 소거능을 시험한 결과는 Fig. 1과 같다. 용매추출의 경우 에탄올 추출물이 50%, 75% 에탄올 추출물이 40%의 ABTS 라디칼 소거능을 보여 유의적인 활성 차이를 보였으며, 효소처리군에서는 pectinase 처리군이 60%의 라디칼 소거활성을 보여 가장 높은 활성을 보였으며, 이는 Trolox보다 다소 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 열처리구의 경우 175°C 처리구에서 60% 이상의 라디칼 소거능을 보였으며, 150°C, 120°C, 90°C 순으로 소거활성이 낮았다. 이는 DPPH 라디칼 소거능 시험에서 90°C 처리구에서 가장 높은 라디칼 소거활성을 보인 결과와는 다른 경향을 나타내었다.

Kim 등(12)은 황기를 수증의 가수분해 효소를 처리하였을 때 플라보노이드 화합물의 추출 수율이 무처리군에 비하여 증가한다고 보고한 바 있으며, Kim 등(22)도 감태 추출물

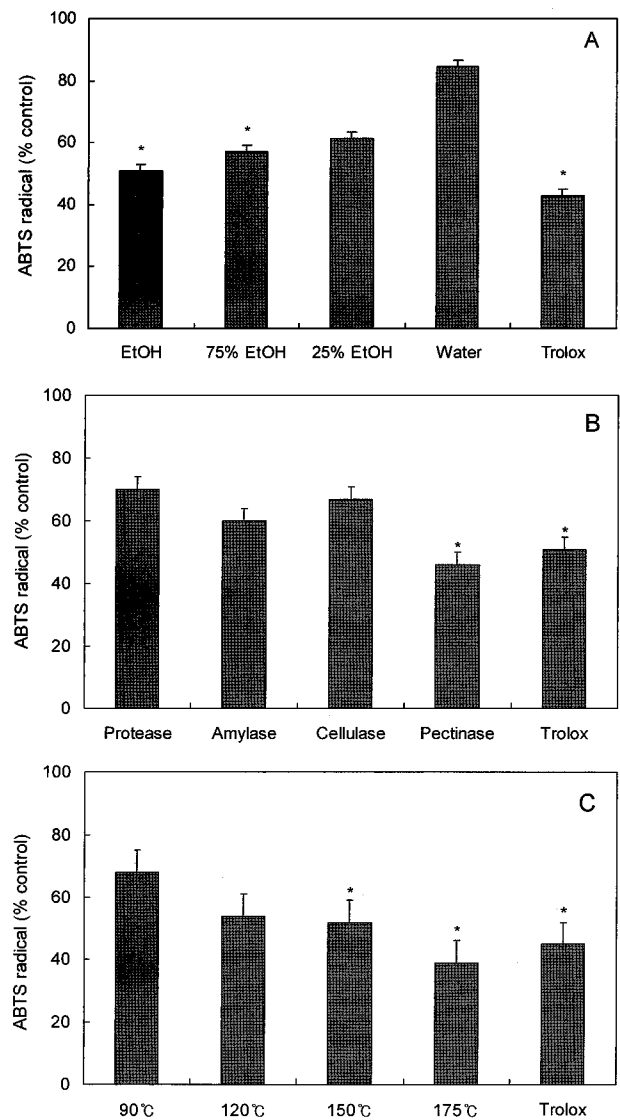


Fig. 1. ABTS radical scavenging activities of white ginseng extracts treated with enzyme and heat.

A: solvent extraction, B: enzyme treatment, C: heat treatment.

을 효소 처리하여 분획한 결과 항산화 효과와 V79-4 세포주에 대한 보호효과가 증가됨을 보고하였다. 또한 Kim 등(21)도 효소 처리한 함초 물추출물을 급여한 흰쥐에서 지질대사 개선효과를 보고하였는데, 이는 효소처리에 의하여 페놀성 화합물의 함량 증가와 연관이 있는 것으로 보고하였다.

따라서 인삼을 효소 또는 열처리를 통하여 추출할 경우 일반 용매추출보다 페놀성 화합물의 함량이 높았으며, 이는 강한 라디칼 소거능과 연관이 있는 것으로 생각되며, 효소 또는 열처리에 의한 개별 페놀성 화합물의 조성과 함량 변화에 대한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 효소처리와 열처리를 통하여 인삼의 추출수와 과 비사포닌계 페놀성 화합물의 함량을 증가시키고, 각 처리군의 항산화 활성을 시험하였다. 효소처리의 경우 pectinase(76.0%)>cellulase(44.7%)> α -amylase(43.1%)>protease(34.3%)의 순으로 처리효소에 따라 큰 차이를 보였으며, 열처리구의 경우 90°C 처리구의 추출수율이 48.7%로 가장 낮았으며, 그 외의 온도 구간에서는 51.1~53.1%로 비슷한 추출수율을 보였다. 총페놀 함량은 pectinase 처리구가 2.21%로 가장 높았으며, 열처리의 경우 90°C 처리구에서 2.34%로 가장 높게 나타났다. 시료를 100 mg/mL로 처리한 경우는 용매추출물에서 12.3~33.2%, 효소처리구에서 29.7~40.3%, 열처리구는 57.8~75.2%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다. ABTS 라디칼 소거능은 pectinase 처리구가 60%의 라디칼 소거활성을 보여 가장 높은 활성을 보였으며, 열처리구의 경우 175°C 처리구에서 60% 이상의 라디칼 소거능을 보였으며, 150°C, 120°C, 90°C 순으로 소거활성이 낮았다.

문 헌

- Attele AS, Wu JA, Yuan CS. 1999. Ginseng pharmacology, multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 58: 1685-1693.
- Elma ZT, Ilian EZ, Christina IH. 1991. Effect of ginsenoside Rg₁ on insulin binding in mice liver and brain membrane. *Phytother Res* 5: 46-48.
- Kang SY, Kim SH, Schini VB, Kim ND. 1995. Dietary ginsenosides endothelium dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit. *Gen Pharmacol* 26: 483-487.
- Hwang WI, Oh SK. 1996. Effects of petroleum extract of ginseng root on some enzyme activity in human colon cancer cell. *Korean J Ginseng Sci* 10: 27-35.
- Liu ZQ, Luo XY, Sun YX, Chen YP, Wang ZC. 2002. Can

- ginsenosides protect human erythrocytes against free radical-induced hemolysis? *Biochim Biophys Acta* 1572: 58-66.
- Shin JG, Park JW, Pyo JK, Kim MS, Chung MH. 1990. Protective effects of a ginseng component, maltol (2-methyl-3-hydroxy-4-pyrone) against tissue damages induced by oxygen radicals. *Korean J Ginseng Sci* 14: 187-190.
- Choi CS, Kim KI, Hong HD, Choi SY, Lee YC, Kim KT, Rho J, Kim SS, Kim YC. 2006. Phenolic acid composition and antioxidative activity of white ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) *J Ginseng Res* 30: 22-30.
- Kim YK, Guo Q, Packer L. 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicol* 172: 149-156.
- Kim DJ, Chang CC. 1994. The effects of red ginseng extracts on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of the kidney in γ -postirradiated mice. *Korean J Ginseng Sci* 18: 25-31.
- Kim SH, Park KS. 2003. Effects of panax ginseng extract on lipid metabolism in humans. *Pharmacol Res* 48: 511-513.
- Kim NM, Lee JS, Lee BH. 1999. Effects of β -amylase and trans glucosidase on the qualities of red ginseng extract. *J Ginseng Res* 23: 93-98.
- Kim MJ, Lim KR, Jung TK, Yoon KS. 2007. Anti-aging effects of *Astragalus membranaceus* root extract. *J Soc Cosmet Korea* 33: 33-40.
- Kim BY, Lee CG, Whang WK, Huh JD. 1989. Studies on the extraction of active components in *Ginkgo biloba* leaves by enzyme treatments. *Korean J Pharmacogn* 20: 43-47.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. Cd 8-35.
- Blosis MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Berg R, Haenen GR, Berg H, Bast A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 66: 511-517.
- Choi HJ, Lee CW. 1998. *Statistical Analysis Using SAS Program*. Parkyung Pub. Co., Seoul, Korea. p 103-121.
- Kim SC, Choi KJ, Ko SR, Joo HK. 1987. Content comparison of proximate compositions, various solvent extracts and saponins in root, leaf and stem of *Panax ginseng*. *Korean J Ginseng Sci* 11: 118-122.
- Lee HO, Lee JW, Lee SK, Do JH, Sung HS. 1997. Antioxidant effect of Korean red ginseng extract on aqueous linoleic acid and LDL. *Agric Chem Biotechnol* 40: 283-288.
- Shin KS, Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H. 1997. Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydr Res* 300: 239-249.
- Kim KR, Jang MJ, Choi SW, Woo MH, Choi JH. 2006. Effects of water extract from enzymic-treated hamcho (*Salicornia herbacea*) on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 55-60.
- Kim KN, Heo SJ, Song CB, Lee JH, Heo MS, Yeo IK, Kang KA, Hyun JW, Jeon YJ. 2006. Protective effect of *Ecklonia cava* enzymatic extracts on hydrogen peroxide-induced cell damage. *Process Biochem* 41: 2393-2401.