

압출성형에 의한 ginsenoside의 변환

류재형¹ · 이춘영¹ · 안문섭² · 김장원¹ · 강위수³ · 이해익^{1*}

¹강원대학교 생명공학부, ²강원도 농업기술원, ³강원대학교 농업공학부

The Conversion of Ginsenosides by Extrusion Molding

Jae-Hyung Ryu¹, Chun Ying Li¹, Moon-Sub Ahn², Jang-Won Kim¹, Wie-Soo Kang³ and Hae-Ik Rhee^{1*}

¹Department of Molecular Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

²Gangwon Provincial Agricultural Research & Extension Services, Chuncheon 200-939, Republic of Korea

³Department of Agricultural Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

Received January 23, 2008; Accepted April 21, 2008

Ginseng treated with several treatment conditions of various acids to search hydrolysates on the basis of increased biological activity and modified structure. In the result of acid treatment, the conversion rate of ginsenoside Rg3, Rk1 and Rg5 was highest when ginseng treated with citric acid. After added citric acid to ginseng extract, boiled at 100°C for 1 hour and add enzyme, which is examined change by time. It compared with group which did not treated acid. Two groups became difference according to enzyme but the generation rate of ginsenoside Rg3, Rk1 and Rg5 did not show difference greatly. Also, the generation rate of ginsenoside Rg3, Rk1 and Rg5 by time passes did not show difference. The generation rate of ginsenoside Rg3, Rk1 and Rg5 increased when increased acid concentration, temperature and time. We did exclusion molding to shorten treatment time. In the result of ginseng treated with citric acid of various concentrations at various temperatures as time passes by extrusion molding, the generation rate of ginsenoside Rg3, Rk1 and Rg5 was highest when ginseng treated with 3% citric acid at 160°C for 20 minutes. In addition, total saponin amount of ginseng treated with 3% citric acid at 160°C for 20 minutes was about 11% higher than ginseng heated at 120°C for 3 hours. These results indicated that our exclusion molding process more effective, compared to traditional red ginseng manufacturing process.

Key words: Citric acid, Extrusion molding, Ginsenoside

서 론

인삼(*Panax ginseng*)은 오가피과(Araliaceae)에 속하는 음지성 식물로서 동양의학에서 오랜 기간 사용되어 온 약재이다. 인삼의 유효 성분으로는 사포닌, 페놀성 화합물, 폴리사세칠렌 류, 알카로이드 류, 다당체 등이 알려져 있다. 사포닌은 인삼 특유의 성분으로 인삼의 효능을 발현하는데 있어서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 인삼 사포닌은 dammarane 골격에 3, 6 또는 20번 위치에 당이 2~4개 붙어있는 배당체 구조로 보통 ginsenoside라고 불리며 수삼, 백삼, 홍삼 등에서 약 35종이 분리 보고되었다.

Ginsenoside류는 항암, 면역증강, 혈압강하, 혈당강하, 항염증 및 항산화 효과 등 매우 다양한 효능을 가지는 것으로 알려져 있다.²⁻⁶⁾ Ginsenoside는 장내 미생물에 의해 당 사슬이 부분적

으로 가수분해됨으로써 체내의 흡수율이 높아지는 것으로 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 인간의 장내 미생물에 의한 ginsenoside Rb1의 가수분해 능력은 개체간에 큰 차이를 나타낸다. 즉 장내 미생물에 의해 당 사슬이 분해되는 정도에 따라 ginsenoside의 흡수율이 달라지며 인삼의 효능도 다르게 발현 될 수 있음을 나타내 준다.¹⁰⁻¹¹⁾ 이러한 결과를 바탕으로 인삼의 ginsenoside의 흡수 효율을 증가시키고자 ginsenoside를 화학적, 효소적으로 변환하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 이에 따른 새로운 형태의 인삼제품도 많이 생산되고 있다.

한편 홍삼은 제조과정 중 화학적 성분 변환이 일어나 수삼이나 백삼에 존재하지 않은 새로운 생리활성 성분의 생성과 함량 증가가 일어난다. 사포닌의 경우 백삼에 존재하는 malonyl-ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd는 malonyl 그룹이 떨어져서 ginsenoside-Rb1, Rb2, Rc, Rd가 생성되며 ginsenoside의 C-20 위치에서 glycosyl 잔기가 이탈되거나 C-20 위치에서 수산기가 이성화되어 수삼에는 없는 미량 성분인 ginsenoside Rg3, Rg5, Rk1로 전환된다.^{12,13)} 그러나 홍삼은 제조공정이 길고 복잡하기 때문에 가격이 비싸 대중적이지 못한 단점이 있다. 이러한 홍

*Corresponding author

Phone: +82-33-250-6481; Fax: +82-33-241-6480

E-mail: rheehae@kangwon.ac.kr

삼 특이성분을 극대화 시키고자 수삼을 120°C에서 3시간 이상 장시간 처리한 가공 방법이 제시된 바 있다.¹⁴⁾

따라서 본 연구에서는 ginsenoside를 효율적으로 전환시키기 위하여 인삼에 순간적인 고열과 고압을 가하여 가공 시간을 단축하고 특정 성분의 함량이 증가되는 가공방법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

재료. 실험에서 사용한 인삼은 2007년 강원인삼농협에서 구입하였고 ginsenoside standard는 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)을 그 외 시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

Ginsenoside 분석 시료의 조제. 플라스크에 인삼 시료 약 5g을 정확히 칭량하여 methanol 100 ml를 가하여 물 증탕에서 1시간 동안 환류 추출한 다음 여과하였다. 여과 후 잔사에 methanol 100 ml를 가하여 1~2회 반복하여 추출 여과하였다. 추출한 여액을 모아 감압 농축시킨 후 농축물을 증류수 50 ml에 녹여 분액 깔대기에 옮기고 diethylether 100 ml로 추출하여 불순물을 제거 하였다. 이 후 남아있는 물 층에 물 포화 butanol 용액 50 ml를 첨가하여 3회 추출한 다음 여액을 모아 감압 농축시킨 후 methanol 5 ml로 녹이고 0.45 µm의 막 필터로 여과하여 LC-MS를 위한 시료용액으로 사용하였다. Ginsenoside standard는 시료 1 mg을 methanol 1 ml에 녹인 후 0.45 µm막 필터로 여과하여 사용하였다.

HPLC 분석 조건. 분석에는 Agilent 1100 Series LC/MSD Trap system(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)를 사용하였고 column은 Zorbax Eclipse XDB-C8(4.6×150 mm i.d., 5 µm)을 사용하였다. 이동상은 (A) water와 (B) acetonitrile을 사용하였고, 용매 기울기는 0-4분, 9-9%B; 4-5분, 9-12%B; 5-10분, 12-15%B; 10-15분, 15-25%B; 15-35분, 25-35%B; 35-40분, 35-40%B; 40-70분, 40-70%B; 70-80분, 70-80%B; 마지막으로 9%B를 5분간 흘려주어 처음 단계로 하였다. 유속은 0.5 ml/min으로, oven 온도는 40°C로 하였고 자외선 검출기로 203 nm에서 검출하였다. ESI-MS condition은 drying gas N₂, 7 l/min, 온도 325°C, nebulizer 압력은 25 psi, source voltage는 3.5 kV로 하였다.

결과 및 고찰

산 농도와 처리 온도에 따른 ginsenoside의 변환. 산 농도와 처리온도에 따른 ginsenoside의 변환 패턴을 알아보기로 식품으로 사용이 가능한 citric acid를 분쇄 된 수삼에 건조 량 기준으로 1, 5, 10%가 되도록 각각 첨가 한 후 100°C에서 1~3시간 가열하여 ginsenoside의 변화를 TLC와 HPLC-ESI-MS ion chromatography로 확인하였다. Fig. 1에서 나타나듯이 수삼에 10% citric acid를 첨가하여 3시간 처리한 시료에서 가장 많이 ginsenoside Rg3, Rg3(iso), Rk1 및 Rg5로 전환됨을 확인하였다(Fig. 1). 한편 이를 HPLC-ESI-MS ion chromatography의 결과와 문헌(15)의 분자량 대조를 통해 각각의 peak를 동정한 결과 수삼에는 ginsenoside Re, Rg1, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rd가

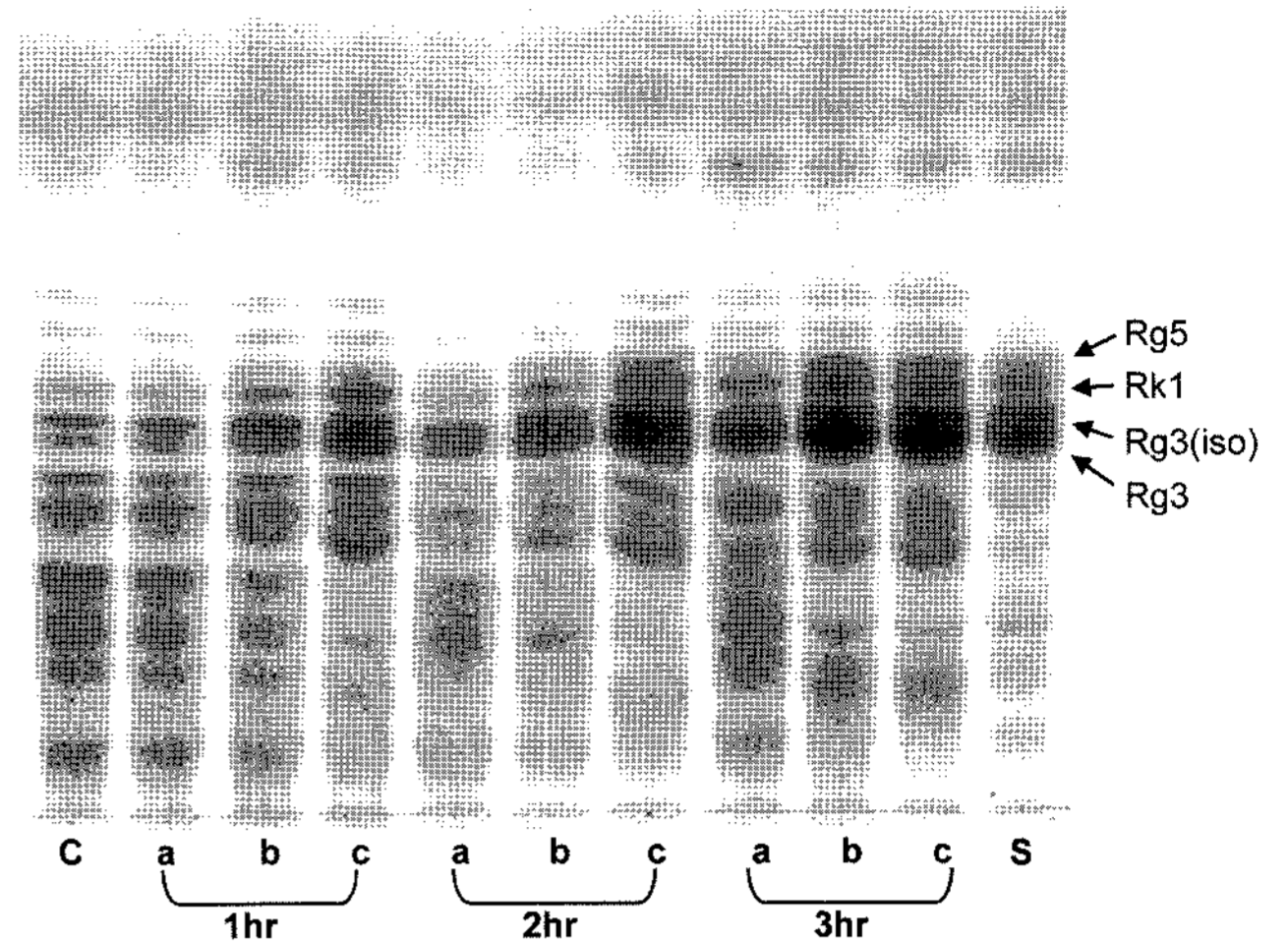


Fig. 1. Thin layer chromatogram of methanol extracts from ginseng treated with citric acid of various concentrations at 100°C. C, control; S, heated at 120°C for 3 h. Citric acid concentration of 1% (a), 5% (b) and 10% (c).

대부분을 차지하였다. 기존의 여러 연구에서 수삼에는 ginsenoside Rg3, Rg3(iso), Rk1, Rg5가 존재하지 않거나 극미량 존재하는 것으로 보고되고 있으나 본 실험에서는 미량으로 존재함을 확인하였다. 반면 산 처리한 인삼은 ginsenoside Re, Rg1, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rd는 거의 존재하지 않고 ginsenoside Rg3, Rg3(iso), Rk1, Rg5가 ginsenoside함량의 대부분을 차지함을 확인하였다(Fig. 2). 이는 이전 실험에서 확인하였던 protopanaxadiol계열의 ginsenoside Rb1, Rc, Rd가 산 처리 시 ginsenoside Rg3로 변환되는 것과 같은 양상으로 볼 수 있다(data not shown). 각각의 ginsenoside의 양은 HPLC의 peak area로부터 계산하였으며 3 반복하여 평균치로 나타내었다(Table 1). HPLC-ESI-MS/MS ion spectra로 ginsenoside Rg3, Rg3(iso)의 분자량([M-H]) peak m/z 784를 확인할 수 있었으며, glucose 한 분자가 탈리 된 fragment ion이 m/z 621에서 base peak로 나타났다. Ginsenoside Rk1과 Rg5의 분자량([M-H])은 m/z 766, glucose 한 분자가 탈리 된 fragment ion은 m/z 603임을 확인하였다(Table 2).

처리 시간과 산 농도에 따른 변화를 살펴보기 위해 3, 4% citric acid를 첨가하여 120°C로 10~30분간 가열한 결과 4% citric acid를 첨가하여 30분간 처리한 시료에서 ginsenoside Rg3, Rg3(iso), Rk1 및 Rg5가 가장 높게 생성되었다(Fig. 3). 따라서 처리온도가 높아지면 낮은 산 농도 및 짧은 처리시간에서도 효율적으로 ginsenoside를 전환시킬 수 있음을 알 수 있었다.

압출성형에서의 처리 시간, 온도에 따른 ginsenoside의 변환.

인삼을 고온으로 처리 시 ginsenoside의 변환율이 높아지는 것을 확인하였으므로 신속하고 효율적인 공정을 위해 인삼의 압출성형 가공을 하였다. 실험에 사용한 piston type extruder는 원료를 일정한 통로(barrel)을 통과시키면서 원료에 열에너지, 압력, 전단력을 가함으로써 원료의 물리, 화학적 변화를 일으킬 수 있는 복합시스템이다. 따라서 본 기기를 사용하여 순간적인 고압과 고열을 가함으로써 ginsenoside를 변환하고자 하였다. 압

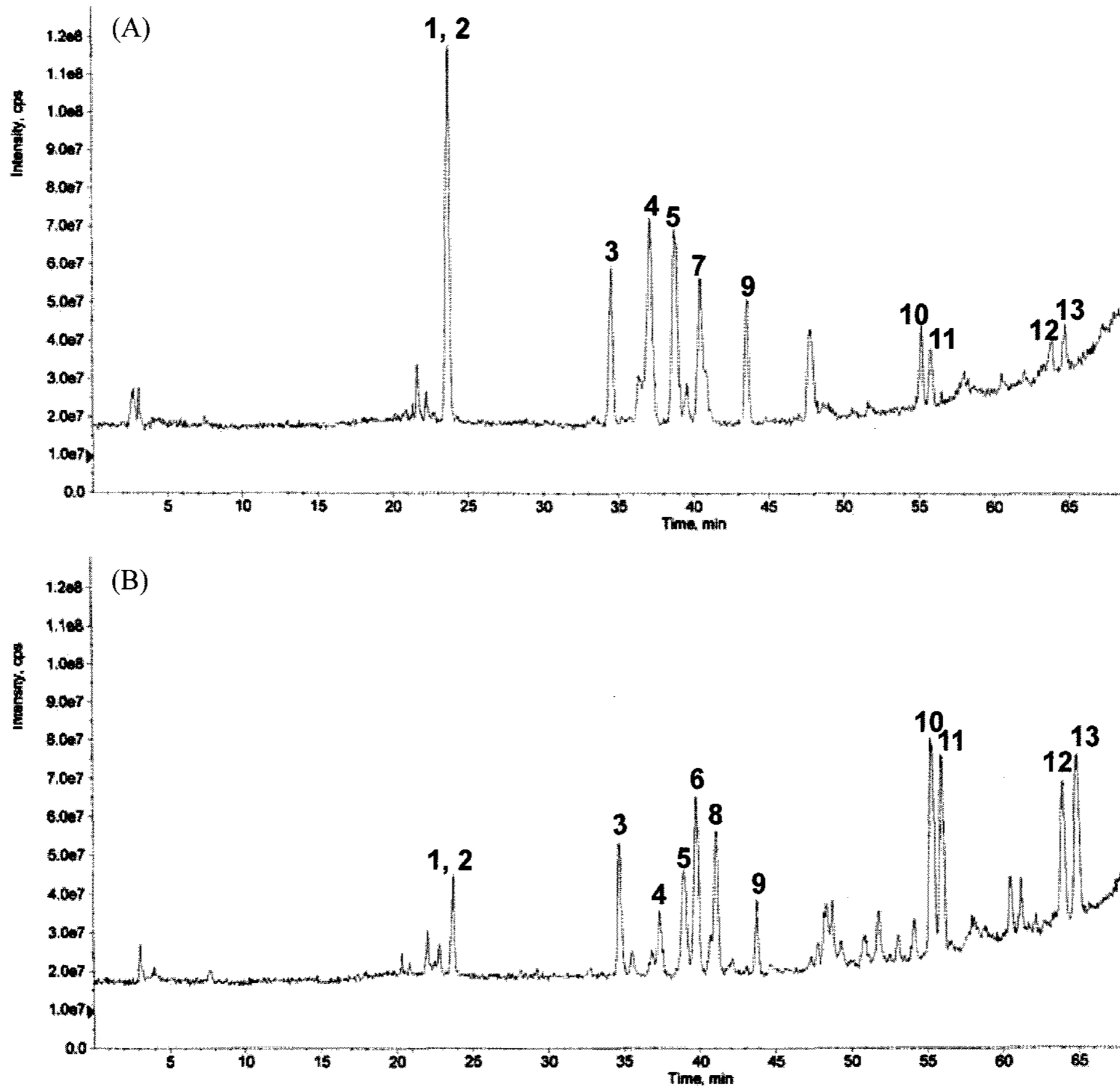


Fig. 2. HPLC-ESI-MS ion chromatograms of ginsenosides in ginseng (A) and 10% citric acid treated ginseng (B).

출성형 공정은 건조한 인삼에 5% citric acid를 첨가 후 수분이 30%가 되도록 조정하여 piston type extruder에 주입 후 120°C에서 180°C까지 온도를 높여 주면서 체류 시간을 각각 10, 20분으로 하여 압출성형을 하였다. 압출성형으로 발포상태가 된

실(絲)형태의 성형물을 얻었다. 압출된 시료는 methanol로 70°C에서 1시간 환류 추출하여 TLC로 확인한 결과 ginsenoside

Table 1. Ginsenoside composition of the ginseng treated with 10% citric acid

Ginsenosides	Ratio (%)	
	Fresh ginseng	Fresh ginseng+ 10% citrate (100°C, 3 h)
Re+Rg1	32.67±0.98	0.62±0.02
Rf	6.42±0.24	3.21±0.11
Rb1	16.68±0.65	0.23±0.04
Rc	16.18±0.75	0.48±0.09
Rb2	5.88±0.16	N.D.*
Rg2	N.D.*	6.76±0.87
Rh1	N.D.*	3.5±0.64
Rd	4.51±0.48	0.23±0.01
(20S)Rg3	1.53±0.95	15.25±0.16
(20R)Rg3	0.89±0.11	10.65±0.23
Rk1	0.51±0.14	14.20±0.58
Rg5	2.60±0.23	24.09±0.97

*N.D.: not detected
All values are mean±S.D. (n=3).

Table 2. HPLC-ESI-MS and HPLC-ESI-MS/MS ions of saponins in Panax ginseng

No.	Identification (Ginsenoside)	Sample		Reference ⁽¹⁵⁾	
		A ¹⁾	B ²⁾	MS[M-H] ⁻	MS[M-H] ⁻
		RT (min)	RT (min)		
1	Rg1	23.70	23.78	800	800
2	Re	23.70	23.78	946	946
3	Rf	34.55	34.73	800	800
4	Rb1	37.15	37.38	1108	1108
5	Rc	38.77	38.94	1078	1078
6	Rg2	N.D. ³⁾	39.82	784	784
7	Rb2	40.44	N.D. ³⁾	1078	1078
8	Rh1	N.D. ³⁾	41.10	638	638
9	Rd	43.61	43.82	946	946
10	(20S)Rg3	55.19	55.31	784	784
11	(20R)Rg3	55.77	56.15	784	784
12	Rk1	64.51	64.00	766	766
13	Rg5	64.76	64.94	766	766

¹⁾A: fresh ginseng.
²⁾B: fresh ginseng treated with 10% citrate at 100°C for 3 h.
³⁾N.D.: not detected.

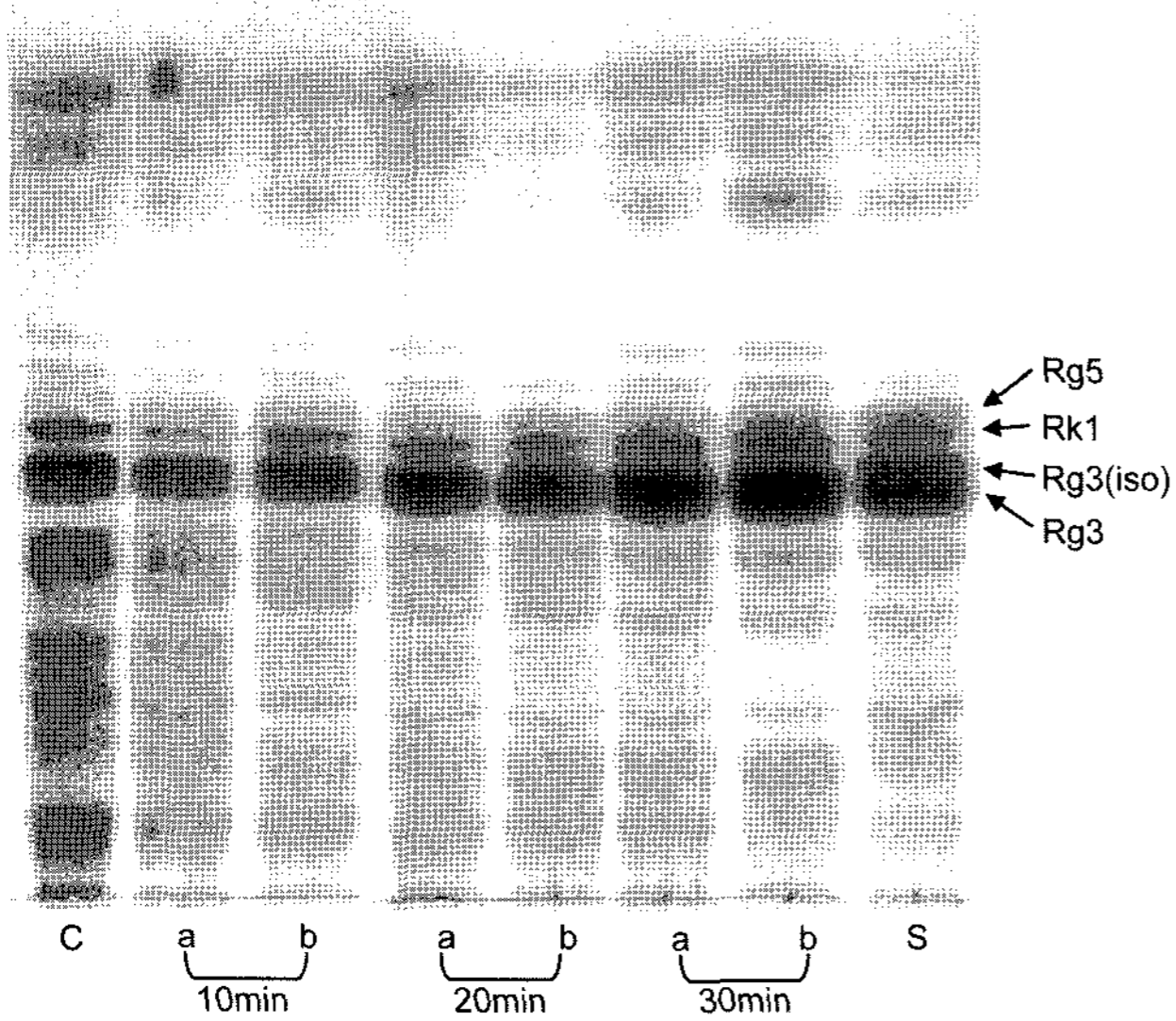


Fig. 3. Thin layer chromatogram of methanol extract from ginseng treated with various concentrations of citric acid at 120°C. C, control; S, heated at 120°C for 3 h. Citric acid concentration of 3% (a) and 4% (b).

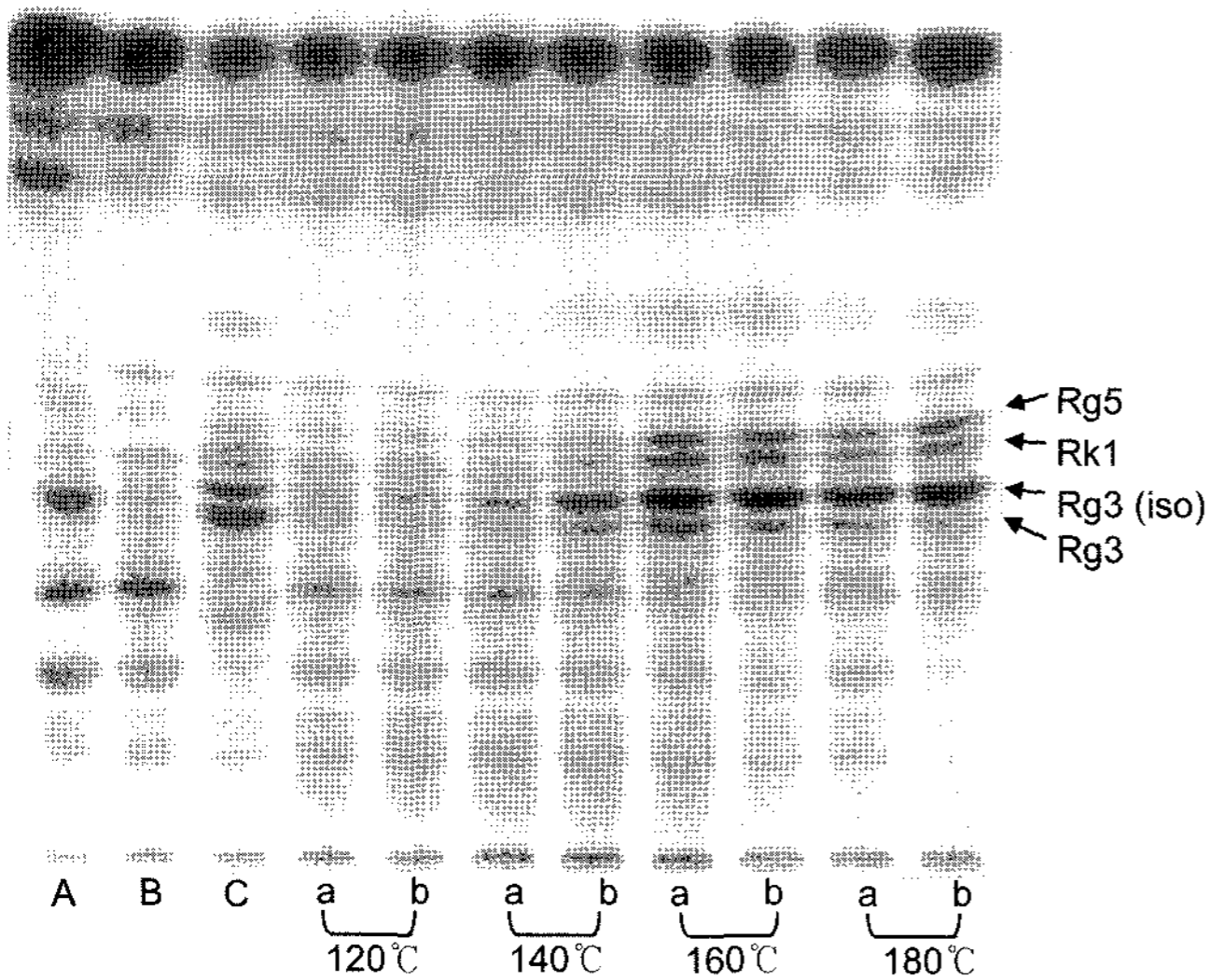


Fig. 4. Thin layer chromatogram of methanol extract from extruded ginseng treated with citric acid of various concentrations at various temperatures. Fresh ginseng (A), dried ginseng (B) and heated ginseng at 120°C for 3 h (C). Heating time: 10 min (a) and 20 min (b).

Rg3 isomer와 Rk1과 Rg5의 양이 증가하는 양상을 나타냈으며 시간과 온도가 증가 할수록 ginsenoside Rg3, Rk1, Rg5로의 변환율이 높아짐을 확인하였고 그 중 160°C로 처리하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다. 반면 180°C로 처리한 시료는 온도가 너무 높아 시료가 타면서 ginsenoside가 분해되어 소실된 것으로 판단되었다(Fig. 4).

압출성형에서의 처리 시간, 산 농도에 따른 ginsenoside의 변환. 위의 결과로부터 인삼을 160°C에서 처리하는 것이 가장 효과적인 것으로 판단하고 시간과 산의 농도를 최적화하고자 하였다. 건조한 인삼에 0-5%의 citric acid를 첨가 후 수분이

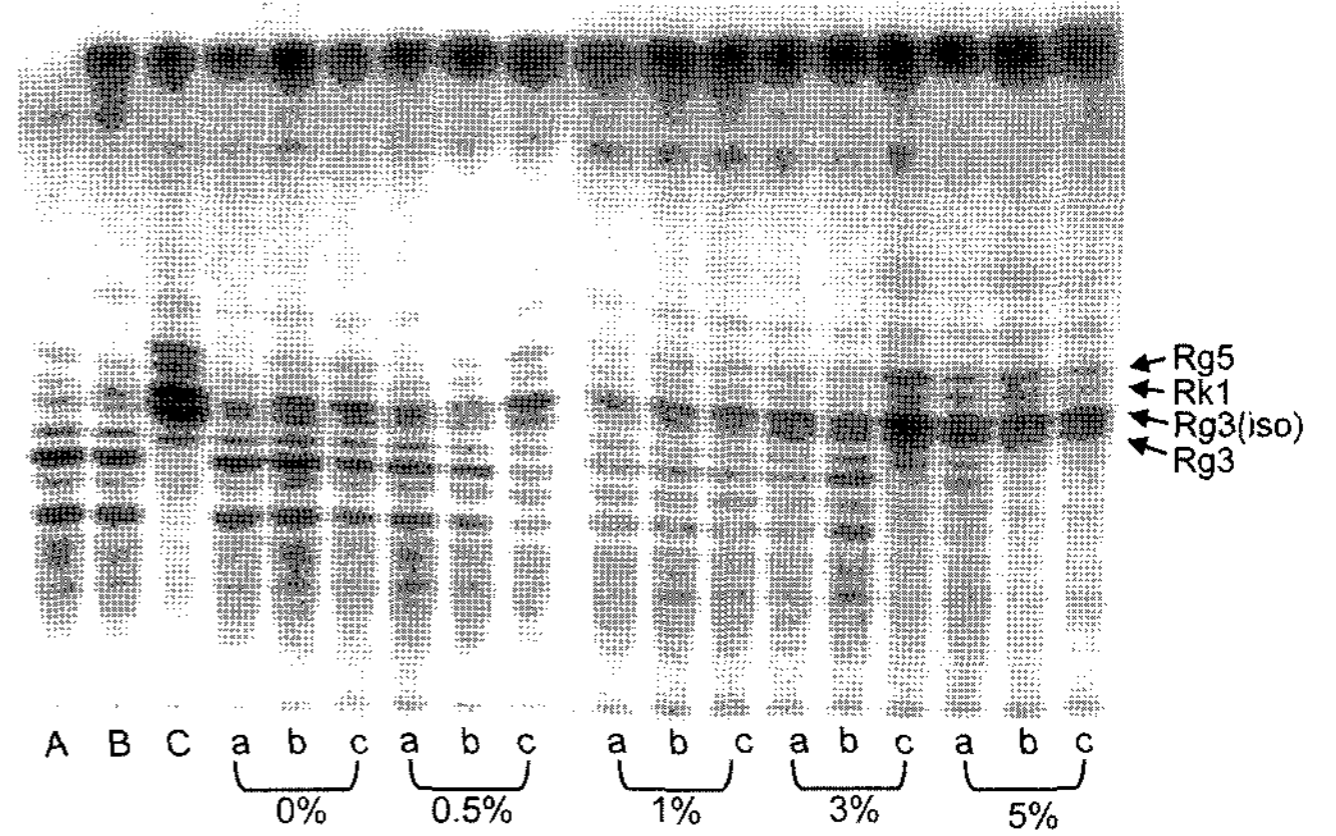


Fig. 5. Thin layer chromatogram of methanol extract from extruded ginseng treated with citric acid of various concentrations at 160°C. Fresh ginseng (A), dried ginseng (B) and heated ginseng at 120°C for 3 h (C). Heating time: 5 min (a), 10 min (b) and 20 min (c).

Table 3. The total saponin in extruded ginseng treated with 3% citric acid

Samples	Total saponin (% , w/w)
Fresh ginseng	1.48±0.26
Fresh ginseng (120°C, 3h)	2.04±0.13
Fresh ginseng + 3% citrate (160°C, 5 min)	1.96±0.19
Fresh ginseng + 3% citrate (160°C, 10 min)	1.99±0.09
Fresh ginseng + 3% citrate (160°C, 20 min)	2.26±0.11

All values are mean±S.D. (n=3).

30%가 되도록 조정하여 piston type extruder에 주입 후 160°C에서 체류 시간을 각각 5, 10, 20분으로 하여 압출성형을 하였다. 그 결과 3% citric acid를 첨가하여 20분간 처리한 시료가 ginsenoside Rg3, Rk1, Rg5로의 변환율이 가장 높음을 확인하였고 5% citric acid를 첨가한 시료는 산의 농도가 높아짐에 따라 ginsenoside Rg3가 분해가 되어 그 양이 줄어든 것으로 판단되었다(Fig. 5). 위와 같은 결과를 종합하여 볼 때 인삼에 3% citric acid를 첨가한 후 160°C에서 20분간 압출성형 시 가장 효과적일 것으로 판단되었다. 이는 단 시간 내에 연속적인 공정이 가능함을 의미하여 장기간 동안 많은 노동력을 필요로 하는 전통적인 홍삼제조 공정이나 긴 제조 공정 시간과 고압 설비가 필요하여 연속적인 공정이 불가능한 기존의 가공 방법보다 매우 효율적일 것으로 판단되었다.

총 saponin 함량. 최종적으로 수삼에 3% citric acid를 첨가하여 160°C에서 압출성형한 시료의 총 saponin 함량을 측정하고 결과 시간이 지남에 따라 총 saponin이 증가하는 양상을 나타냈으며 20분간 압출 성형한 시료는 2.26%로 확인하였다. 이는 생 인삼의 total saponin이 1.48%로 120°C에서 3시간 처리한 것은 2.04%로 확인된 것과 비교하여 볼 때 생 인삼보다 52%, 120°C에서 3시간 처리한 것 보다 약 11% 높음을 확인하였다 (Table 3). 이는 가열시간이 증가하면서 ginsenoside 당 사슬 부분의 분해가 증가되어 가용성 ginsenoside가 증가되었기 때문이라 판단된다.

참고문헌

1. Jeon, H. K., Kim, S. C. and Jung, N. P. (1991) Effects of ginseng saponin fraction and cyclophosphamide on the tumoricidal activity of mouse macrophage and the antitumor effect. *Korean J. Ginseng Sci.* **105**, 15-99.
2. Kim, M. J. and Jung, N. P. (1987) The effect of ginseng saponin on the mouse immune system. *Korean J. Ginseng Sci.* **11**, 130-135.
3. Kang, S. Y. and Kim, N. D. (1992) The antihypertensive effect of red ginseng saponin and the endothelium-derived vascular relaxation. *Korean J. Ginseng Sci.* **16**, 130-135.
4. Joo, C. N and Kim, J. H. (1992) Study on the hypoglycemic action of ginseng saponin on streptozotocin induced diabetic rats(I). *Korean J. Ginseng Sci.* **16**, 190-197.
5. Oliveira, A. C. C., Perez, A. C., Merino, G., Prietp, J. G. and Alvarez, A. I. (2001) Protective effects of Panax ginseng on muscle injury and inflammation after eccentric exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* **130**, 369-377.
6. Kim, J. S. and Kim, K. W. (1996) Screening of antioxidative components from red ginseng saponin. *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 173-178.
7. Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S. and Uchiyama, M. (1996) Main Ginseng Saponin Metabolites Formed by Intestinal Bacteria. *Planta Medica.* **62**, 453-457.
8. Karikura, M., Miyase, T., Tanizawa, H., Taniyama, T. and Takino, Y. (1991) Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. . The decomposition products of ginsenoside Rh2 in the stomach of rats. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 400-404.
9. Tawab, M. A., Bahr, U., Karas, M., Wurglice, M. and Schubert-Zsilavec, M. (2003) Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1065-1071.
10. Hasegawa, H., Sung, J. H. and Benno, Y. (1997) Role of human intestinal Prevotella oris in hydrolyzing ginseng saponins. *Planta Medica* **63**, 436-440.
11. Hasegawa H. and Uchiyama M. (1998) Antimetastatic efficacy of orally administered ginsenoside Rb1 in dependence on intestinal bacterial hydrolyzing potential and significance of treatment with an active bacterial metabolite. *Planta Medica* **64**, 696-700.
12. Akao, T., Kanaoka, M. and Kobashi, K. (1998) Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb1 by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration measurement of compound K by enzyme immunoassay. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 245-249.
13. Han, B. H., Park, M. H., Han, Y. N., Woo, L. K. Sankawa, U. and Tanaka, O. (1982) Degradation of ginseng saponins under mild acidic conditions. *Planta Med.* **44**, 146-149.
14. Jeong, H. P. (2004) Sun Ginseng-A new processed ginseng with fortified activity. *Food Industry and Nutrition.* **9**, 23-27.
15. C.M. Lai, S.P. Li, H. Yu, J. B. Wan, K. W. Kan, Y. T. Wang (2006) A rapid HPLC-SI-MS/MS for qualitative and quantitative analysis of saponins in "XUESETONG" injection. *J. Pharm and Bio analysis* **40**, 669-678.