ISSN(Print) : 1738-7248, ISSN(Online) : 2287-7428
Korean J. Food Preserv.
27(1), 66-73 (2020)
https://doi.org/10.11002/kjfp.2020.27.1.66

사단법인 한국식품저장유통학회
The Korean Society of Food Preservation

Optimization of formation of the ginsenoside Rg_3 in black ginseng steamed with acetic acid solution

Gee-Dong Lee*
Division of Integrated Biotechnology, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

초산용액으로 증자한 흑삼의 ginsenoside Rg_3 발현 최적화

이기동*
중부대학교 바이오융합학부

Abstract

This study aimed to obtain high quality black ginseng with a high content of the ginsenoside Rg_3 and melanoidins and low benzopyrene content via nine steaming-drying cycles. The steaming-drying of ginseng was carried out at low pH, and the heat treatment conditions were set to gradually decrease. The steaming-drying conditions were evaluated using response surface methodology. The coefficients of determination (R^2) of the models were 0.8926 - 0.9744 ($p<0.05$) for the dependent parameters. The response surface for the intensity of the brown color of the black ginseng showed a maximum point at which the brown color intensity was 3.39 (OD at 420 nm) at a mean steaming time of 155.25 min and a mean drying temperature of 57.56℃. The response surface for the ginsenoside Rg_3 content of black ginseng showed a saddle point with a maximum ginsenoside Rg_3 content of 6.26 mg/g at a mean steaming time of 177.72 min and a mean drying temperature of 65.46℃. However, the response surface for the benzopyrene content of black ginseng showed a maximum point, with the lowest benzopyrene content of 0.22 μg/kg occurring at a mean steaming time of 60.97 min and a mean drying temperature of 56.42℃. The optimal conditions were determined to be a mean steaming time of 175 min and at a mean drying temperature of 68℃; black ginseng manufactured using these conditions yielded a brown color intensity of 2.72 and a Rg_3 content of 6.20 mg/g, with a low benzopyrene content of 0.29 μg/kg.

Key words : black ginseng, steaming-drying cycles, ginsenoside Rg_3, benzopyrene, optimization

서 론

전통적으로 인삼을 오랜 기간 저장하기 위해 수삼을 찌고 말려 건강식품으로 또는 약용으로 이용하여 왔다(Nam, 1996). 이러한 찌고 말리는 증포과정이 인삼 사포닌의 변화를 가져오게 되고 그 기능성 성분도 변화하게 되었는데, 이러한 변화가 홍삼을 많이 이용하게 된 원인으로 여겨진다. 흑삼은 구증구포, 즉 9번까지 찌고 말리는 과정을 반복함으로써 홍삼과는 다른 차별화된 기능성을 만들어 내게 되어(Hu 등, 2008; Kim, 2008), 소비자들이 새로운 흑삼에 많은 관심을 가지게 되었으나, 과다한 열처리로 benzopyrene의 발생이 문제가 되고 있다(Kim, 2008; Jo 등, 2009).

흑삼에 대한 기능성 연구가 많이 이루어져 왔으며, 흑삼이 당뇨로 인한 간장의 지방축적과 신장의 손상을 완화하는데 긍정적인 효과를 보이며(Kim 등, 2012) 혈당강하 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Kim과 Kang, 2009). 또한, 흑삼이 신생혈관 억제활성을 나타내어 항암활성 가능성

*Corresponding author. E-mail : geedlee@jbm.ac.kr, Phone : 82-41-750-6291, Fax : 82-41-750-6160
Received 13 August 2019; Revised 01 October 2019; Accepted 07 October 2019.
Copyright ⓒ The Korean Society of Food Preservation.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 보이고 있다(Song 등, 2011). 기존의 구증구포 흑삼 제조공정으로 제조하지 않고 건조과정을 원적외선으로 균일하게 건조하여 제조한 흑삼에서 항암효과가 우수하다는 보고도 있다(Kim 등, 2008). 그리고 폐고혈압 유발 흰쥐에서 흑삼의 항고혈압 효과가 확인된 바 있다(Song 등, 2009).

인삼의 사포닌 중 PPD계의 ginsenoside Rb_1과 Rc의 경우, 가수분해반응을 통해 C-20에 있는 glycosyl moiety의 제거로 ginsenoside 20(S)-Rg_3와 20(S)-Rg_3로 된다. 그 다음은 ginsenoside Rg_3는 탈수반응에 의해 ginsenoside Rk_1과 Rg_5로 변환된다. 또한, C-3 위치의 말단에 붙어 있는 포도당 분자 하나가 떨어지면 G-Rh_2로 된다(Nam 등, 2015). 일반적으로 전분의 산에 의한 가수분해 반응은 산의 수소이온의 촉매반응으로 일어나며, 전분의 가수분해 속도는 수소이온의 농도와 반응 온도에 비례한다(Lee, 1997). 흑삼 제조관정 중 증포 횟수에 따른 색상 및 ginsenoside 함량의 변화를 관찰하여 증포 횟수에 비례하여 ginsenoside Rg_3가 증가하며, 색상 또한 증포 횟수와 비례하여 증가하는 것으로 알려져 있다(Nam 등, 2012). 증포 횟수가 다른 홍삼과 흑삼의 사포닌 함량을 비교한 결과, ginsenoside 20(S)-Rg_3는 홍삼보다 흑삼이 3배 이상 많으며 ginsenoside 20(R)-Rg_3 또한 홍삼보다 흑삼이 3배 정도 많아 ginsenoside Rg_3가 증포횟수가 증가할수록 증가하는 것을 알 수 있다(Jo 등, 2011). 원적외선을 통한 건조방법을 도입하여 기존 건조방법보다 더 균일하게 열처리할 수 있어 더 우수한 흑삼을 개발한 바 있다(Kim 등, 2008).

Benzopyrene은 폐암, 간암 등을 일으키는 발암물질로서 polycyclic aromatic hydrocarbons이다(Kulkarmi와 Anderson, 1984). 이러한 benzopyrene은 굽거나 볶음식품에 많이 있을 수 있으며, 찌고 말리는 약재나 튀기거나 훈제하는 식품에서도 생성되는 것으로 알려져 있다(Jo 등, 2009; Cho 등, 2011). 식품의 기준 및 규격 일부 개정고시(고시 제 2012-128호, 2012.12.27.)에서 흑삼(분말 포함)이 2.0 μg/kg 이하이고, 흑삼농축액이 4.0 μg/kg 이하로 설정하고 있다. 홍삼 및 흑삼의 찌고 말리는 과정에서도 benzopyrene이 생성될 수 있다(Jo 등, 2009). 그러나 Hu 등(2008)은 시중에서 유통되는 홍삼음료 7종을 대상으로 benzopyrene 함량을 분석해 보았으나 모두 benzopyrene이 검출되지 않고 있어 안전한 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 전통적인 흑삼 제조방법인 구증구포를 통해서 흑삼을 제조하지만, benzopyrene이 거의 발생하지 않고 흑삼의 대표적인 유효 성분인 ginsenoside Rg_3와 갈변물질의 함량이 높은 고품질의 흑삼을 개발하고자 반응표면분석을 통해 최적 조건을 설정하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 인삼은 경북 영주시 풍기에서 수확된 6년근 수삼(중간 크기)을 거피가 상하지 않게 깨끗이 세척하여 상온에서 24시간 음건한 후 1 kg씩 지프팩에 넣어 1℃ 냉장고에 보관하면서 증삼용으로 사용하였다. 본 실험에 사용한 시약은 hexane, methanol 및 acetonitrile(JT Baker, Philipsburg, NJ, USA)와 ginsenoside Rg_3(Wako, Osaka, Japan), benzo(α)pyrene standard(Supelco, Bellefonte, PA, USA), acetic acid 및 ethanol(Samchun Chemical, Seoul, Korea) 등이다.

증자 및 건조 방법

흑삼의 증자는 홍삼제조기(HD-WH210, Habdongjeong-milgigong, Anyang, Korea)에 증류수 4,975 mL와 초산 25 mL를 첨가하여 증자용수로 사용하면서 증자하였다. 구증구포 흑삼을 제조하기 위한 증자 및 건조방법은 증자기 내부온도 100℃에서 실험계획에 따라 일정 시간을 증자하고 증자가 끝난 인삼을 건조기(OF-22GW, Jerotech, Daejeon, Korea)에서 실험계획에 따라 일정 온도에서 20시간을 건조하는 과정을 9회 반복하여 구증구포 흑삼을 제조하였다.

실험계획

본 실험에서는 인삼의 증자 및 건조 과정을 9회 반복하여 가공하는 구증구포 흑삼을 제조하면서 갈색도, ginsenoside Rg_3 및 benzopyrene 함량을 모니터링해 보고자 실험계획에 의한 반응표면분석을 실시하였다. 실험계획은 중심합성 실험계획법(Myers, 1971)에 의하여 실험을 설계하였으며, 반응표면 회귀분석은 갈색도, ginsenoside Rg_3 및 benzopyrene 함량을 SAS program(ver. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 사용하여 분석하였다. 중심합성 실험계획법으로 설계된 구증구포의 요인변수는 증자 평균시간(X_1)과 건조 평균온도(X_2)로 각 요인변수는 -2, -1, 0, 1, 2로 다섯 단계로 부호화하여 실험값을 Table 1에 나타내었다. 또한, 이들 요인 변수에 영향을 받는 반응변수들은 갈색도(Y_1), ginsenoside Rg_3(Y_2) 및 benzopyrene(Y_3)로 하고, 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다.

실험조건은 증자 평균시간과 건조 평균온도를 증자 및 건조의 9단계 조건의 평균으로 표시하였으며, 증자시간은 증자 평균시간으로부터 5분 간격으로 위로 4단계와 아래로 4단계로 총 9단계(구증구포)로 시간을 변경하면서 증자하였고, 건조온도는 건조 평균온도로부터 2℃ 간격으로 위로 4단계와 아래로 4단계로 총 9단계로 온도를 낮추면서

Table 1. Central composite design of response surface analysis for steaming-drying conditions of black ginseng

Exp. No.	Steaming-drying conditions			
	Steaming mean time (min)[1)]	Total ranges of nine step steaming at 5 min intervals	Drying mean temp. (℃)[2)]	Total ranges of nine step steaming at 2℃ intervals
1	150 (1)	170 - 130	70 (1)	78 - 62
2	150 (1)	170 - 130	50 (- 1)	58 - 42
3	90 (- 1)	110 - 70	70 (1)	78 - 62
4	90 (- 1)	110 - 70	50 (- 1)	58 - 42
5	120 (0)	140 - 100	60 (0)	68 - 52
6	120 (0)	140 - 100	60 (0)	68 - 52
7	60 (- 2)	80 - 40	60 (0)	68 - 52
8	180 (2)	200 - 160	60 (0)	68 - 52
9	120 (0)	140 - 100	40 (- 2)	48 - 32
10	120 (0)	140 - 100	80 (2)	88 - 72

[1)]Steaming mean time is the average time of the increased time by changing the time to nine steps every five minute.
[2)]Dry mean temperature is the average temperature of the increased temperature by changing the temperature to nine steps at 2℃ intervals.

건조하였다. Table 1의 실험번호 1번의 경우를 예로 들어, 증자기에 증류수 4,975 mL와 초산 25 mL를 증자용수로 첨가하고, 1단계로 100℃에서 170분 동안 증자 후 78℃에서 20시간 건조, 2단계로 100℃에서 165분 동안 증자 후 76℃에서 20시간 건조, 3단계로 100℃에서 160분 동안 증자 후 74℃에서 20시간 건조, 4단계로 100℃에서 155분 동안 증자 후 72℃에서 20시간 건조, 5단계로 100℃에서 150분 동안 증자 후 70℃에서 20시간 건조, 6단계로 100℃에서 145분 동안 증자 후 68℃에서 20시간 건조, 7단계로 100℃에서 140분 동안 증자 후 66℃에서 20시간 건조, 8단계로 100℃에서 135분 동안 증자 후 64℃에서 20시간 건조, 그리고 마지막으로 9단계로 100℃에서 130분 동안 증자 후 62℃에서 20시간 건조함으로써 점차 증자시간과 건조온도를 낮추어 가면서 구증구포를 실행하여 흑삼을 제조하였다. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10번 시료도 Table 1의 조건에 따라 같은 방법으로 긴 시간 증자와 높은 온도 건조에서 점차 짧은 시간 증자와 낮은 온도로 조건을 완화하면서 흑삼을 제조하였다.

갈색도 측정

갈색도를 측정하기 위해 흑삼을 분쇄하여 40 mesh 분말 2 g을 물 200 mL에 넣고 30℃에서 5시간 동안 교반하면서 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 2로 2회 반복 여과하여 그 여액을 분광광도계(UV1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ginsenoside Rg_3 측정

먼저 흑삼으로부터 ginsenoside를 80% 이상의 순도로 추출 정제하였다. 흑삼 100 g을 칭량한 후 시료의 20배(v/w)에 해당하는 80% ethanol 2 L를 첨가하여 2시간 동안 환류 냉각하여 추출한 후 원심분리하여 상징액과 침전물을 분리하였다. 상징액은 감압농축기(Buchi Labor technik AG, Flawil, Switzerland)를 사용하여 60℃에서 감압농축시켜 ethanol을 제거한 후 증류수를 첨가하여 추출액을 200 mL가 되도록 하였다. 추출액은 원심분리기(Micro 12, Hanil Sci. Inc., Incheon, Korea) 10,000 rpm, 4℃에서 20분 동안 원심분리하여 상징액을 회수하였다.

흑삼의 80% ethanol 추출액으로부터 ginsenoside의 정제는 Kim과 Kang(2012)이 사용한 Diaion HP-20 수지 흡착법을 이용하여 분리하였다. 즉, 흑삼의 80% ethanol 추출액 200 mL를 0.45 mm 필터로 여과한 후, Diaion HP-20 column(2.5×50 cm, particle size 250 - 850 μm, wet volume 100 mL)에 흡착시켰다. 이 후 3 L의 증류수와 25% ethanol로 용출하였으며, 최종적으로 3 L의 95% ethanol로 용출하였다. 95% ethanol 용출액은 감압농축기를 사용하여 60℃에서 감압 농축시켜 ethanol을 제거한 후 동결 건조하여 ginsenoside시료로 사용하였다.

Ginsenoside Rg_3 분석은 HPLC-ELSD를 이용하여 실시하였다. 시료는 0.2%의 농도가 되도록 methanol을 첨가한 후, 0.2 mL를 채취해 0.1% internal standard(IS, Digoxin, Sigma, USA) 0.1 mL와 혼합하여 0.45 mm 필터로 여과하여 사용하였다. HPLC-ELSD는 ELSD detector(Polymer Labo-

ratories, PL-ELS 2100, Austin, TX, USA)가 장착된 Dionex HPLC(Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하였다. 칼럼은 Gemini 5 mm C18 column(250×4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였고, 이동상은 LC급 water를 A용매로, LC급 acetonitrile을 B용매로 사용하였다. 칼럼 온도는 35℃로 유지하였고, flow rate는 1 mL/min으로 시료는 10 μL씩 주입하였다. Gradient 조건은 0–20분 동안 B용매를 30%에서 40%로, 20–45분 동안 40%에서 90%로 증가시켰다.

Benzopyrene 측정

흑삼 중의 benzo(α)pyrene 함량 분석은 식품의약품안전청(2007) 건강기능식품 중 benzo(α)pyrene 시험법 지침에 근거하여 분석하였다. 분석시료 5 g을 증류수 20 mL에 1시간 침지시킨 후 hexane을 10 mL 첨가하여 hexane층을 추출하였다. 추출한 hexane층을 감압농축기를 이용하여 농축한 후 methanol 100 μL에 녹여 GC-MS(6890 series, Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 측정하였다. 칼럼은 HP-5MS(60 m×250 mm×0.25 μm, Agilent)를 사용하였고, split mode에서 split ratio는 5 : 1로 하였다. 오븐의 조건은 초기 50℃에서 1분간 유지하였고, 분당 10℃씩 상승시켜서 310℃까지 올린 후 15분 유지하였다. Injector port의 온도는 300℃로 사용하였으며, 기동기체는 helium가스를 사용하였다.

결과 및 고찰

갈색도의 변화

흑삼의 갈색도는 흑삼의 중요한 품질 요소로 진한 흑갈색을 띠고 있어야 한다. 초반 증포과정에서 갈변을 유도하고 후반 증포에서는 더 이상 갈변색소인 melanoidin이 고분자화 되어 불용화 되지 않도록 하고자 증포단계가 증가할수록 증자시간과 건조온도를 낮추어 가면서 아홉 번을 증포하였다. 흑삼의 증포에 따른 갈색도의 변화를 관찰해 본 결과, 100℃에서의 증자 평균시간과 건조 평균시간의 변화에 따른 갈색도의 변화는 1.7170–3.3810(OD, 420 nm)의 차이를 나타내었다(Table 2). 이를 회귀분석한 결과, 갈색도에 대한 모델식의 R^2은 0.9744로 1% 이내 유의수준에서 유의성이 있었다 (data not shown).

$$Y_1 = -22.246033+0.134560X_1+0.527896X_2 - 0.000192X_1^2 - 0.002828X_2^2 - 0.001304X_1X_2$$

수삼의 증포에 따른 흑삼의 갈색도는 100℃에서의 증자 평균시간이 증가하거나, 증자 후 건조 평균온도가 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 이것은 증자 또는 건조과정 중에 열처리의 효과로 갈변이 이루어지고 있기 때문으로 여겨진다. 그러나 증자 평균시간이 길고 건조 평균온도가 높은 조건에서 구증구포된 흑삼은 오히려 갈색도가 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 결과는 열처리가 지나치게 많이 되면 오히려 수용화 가능한 melanoidin이 고분자화 되거나 불용성화 되어 용해도가 감소하기 때문으로 여겨진다. 이러한 현상은 Park 등(2000)이 둥굴레의 볶음에서 볶음온도가 높을수록 갈색도가 높아지나, 장시간 가열시 많은 갈변물질이 불용성

Table 2. Experimental data on brown color intensity, ginsenoside Rg_3 and benzopyrene of black ginseng under different conditions based on central composite design for response surface analysis

Exp. No.	Brown color intensity (OD at 420 nm)	Ginsenoside Rg_3 (mg/g)	Benzopyrene (μg/kg)
1	2.8763[1)]	5.60	0.453
2	2.9773	4.57	0.427
3	3.1803	2.25	0.434
4	1.7170	2.07	0.349
5	3.3810	2.52	0.537
6	3.3333	2.49	0.506
7	1.9206	1.01	0.253
8	3.3070	5.56	0.255
9	1.5490	1.68	0.475
10	2.7960	2.72	0.524

[1)]Data were expressed as mean of triplicate determinations.

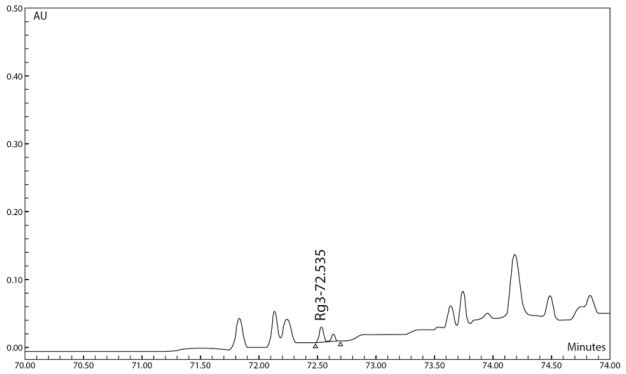

Fig. 1. HPLC chromatogram of ginsenoside Rg_3 for sample 1 on central composite design for response surface analysis.
Sample 1 was experimental number 1 of Table 2.

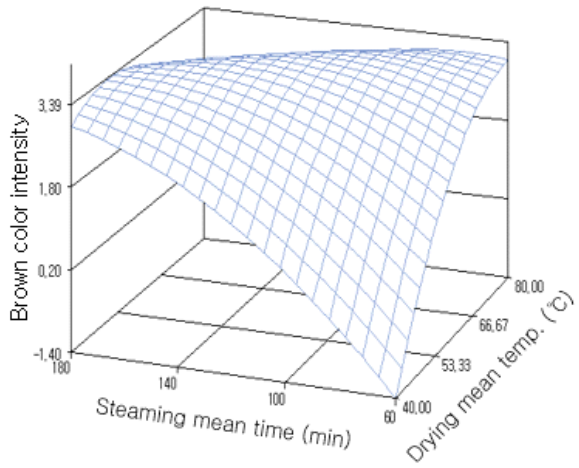

Fig. 2. Response surface for brown color intensity (OD at 420 nm) in black ginseng depending on steaming mean time (min) and drying mean temperature (℃).

물질로 바뀌어 침전되어 수용성 갈별물질이 상대적으로 감소한다고 한 연구결과와 유사하였다. 일반적으로 pH가 낮으면 갈변반응은 억제되며, 수분이 많은 증자와 같은 조건에서는 대부분의 갈변이 caramelization에 의해 일어나고 수분이 적고 pH가 높은 건조에서는 Maillard 반응에 의해 일어난다(Lee, 1997).

구증구포 변수인 증자 평균시간과 건조 평균온도가 갈색도에 미치는 영향을 알아보고자 회귀분석을 통해 F값을 구해 본 결과(Table 3), 증자 평균시간과 건조 평균온도 각각 26.37, 37.01로 모두 유의성이 인정되어 두 변수 모두 흑삼의 갈색도에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 100℃에서 증자 평균시간보다는 건조 평균온도가 더 영향을 미치는 것으로 나타났다. 구증구포 흑삼의 갈색도에 대한 능선분석 결과, 반응표면 형태는 최대점을 나타내었

Table 3. Analysis of variables for regression model of dependent variables on steaming-drying conditions for the nine times steaming-drying cycles of black ginseng

Regression models	F-value	
	Steaming mean time	Drying mean temperature
Brown color intensity	26.37***	37.01***
Ginsenoside Rg_3	9.90**	0.75
Benzopyrene	18.24***	1.20

*Significant at 10% level, **Significant at 5% level, ***Significant at 1% level.

으며, 최소의 갈색도는 증자 평균시간 82.55분 및 건조 평균온도 44.37℃에서 흡광도 0.63으로 나타났으며, 최대의 갈색도는 증자 평균시간 155.25분 및 건조 평균온도 57.56℃에서 흡광도 3.39로 나타났다. 증자 및 건조과정 중 열처리에 따라 형성된 갈색물질은 주로 Maillard 반응에 의해 형성된 갈변물질로 저분자 구조는 수용성이나 과도한 열처리로 고분자가 되거나, 비극성화 되면 용해도가 떨어져 물에서 불용화된 상태로 남아 있게 된다. 수용성 갈변물질인 melanoidin은 항산화성, 항돌연변이원성 등 기능성이 우수하여 네 번의 찌고 말린 구기자는 건조구기자에 비해 항산화 효과가 10배 이상 증가하는 것으로 알려져 있다(Lee, 2017).

Ginsenoside Rg_3의 변화

홍삼의 대표적인 사포닌 성분인 ginsenoside Rg_3는 증포 횟수를 증가시키면 증가하는 것으로 알려져 있다(Nam 등, 2012). 전통적인 흑삼 가공방식인 구증구포를 할 경우 ginsenoside Rg_3가 상대적으로 증가할 수 있으나 지나친 열처리로 인하여 갈변물질인 melanoidin이 고분자화 되어 불용화 되는 부작용도 있다(Park 등, 2000). 그러므로 ginsenoside Rg_3도 많이 생성되는 흑삼 제조조건 설정이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 흑삼 제조방법을 개선하기 위하여 증자용수에 초산을 첨가하여 낮은 pH에서 증자함으로써 증자 중 ginsenoside 20번 탄소의 당의 탈당을 유도하고 지나친 갈변을 방지하고자 하였다. 또한 건조과정에서도 인삼에 침투한 초산용액이 건조 중 pH를 낮추어 ginsenoside 20번 탄소의 당의 탈당을 유도하고 지나친 갈변을 억제하고자 하였다.

흑삼의 증포에 따른 ginsenoside Rg_3의 변화를 관찰해 본 결과, 중심합성계획의 1번 시료 ginsenoside Rg_3의 HPLC chromatogram은 그림 1과 같으며, 100℃에서의 증자 평균시간과 건조 평균온도의 변화에 따른 ginsenoside Rg_3의 변화는 1.68 - 5.60 mg/g의 차이를 나타내었다(Table 2).

이를 회귀분석한 결과 ginsenoside Rg_3에 대한 모델식의 R^2은 0.8926으로 5% 이내 유의수준에서 유의성이 인정되었다(data not shown).

$$Y_2 = -1.787262 - 0.033948X_1 + 0.119524X_2 + 0.000137X_1^2 - 0.001476X_2^2 + 0.000708X_1X_2$$

흑삼의 ginsenoside Rg_3 함량은 짧은 증자 평균시간에서는 건조 평균온도가 증가해도 거의 변화가 없었으나, 긴 증자 평균시간에서는 일반적으로 증자 평균시간과 건조 평균온도가 증가할수록 증가하였다(Fig. 3). 이것은 증자 또는 건조과정 중에 산 및 열처리의 효과로 ginsenoside 20번 탄소의 당의 탈당이 일어나 ginsenoside Rg_3 함량이 증가하는 것으로 여겨진다. Nam 등(2012)은 흑삼 제조과정 중 증포 횟수에 따른 ginsenosides의 변화를 관찰하여 증포횟수가 증가함에 따라 ginsenoside Rg_3 함량은 꾸준히 증가한다고 하였다.

증자 평균시간과 건조 평균온도가 ginsenoside Rg_3 함량에 미치는 영향을 알아보고자 회귀분석을 통해 F값을 구해본 결과(Table 3), 증자 평균시간이 9.90으로 5% 유의수준에서 유의성이 인정되어 흑삼의 ginsenoside Rg_3 함량에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났으나, 건조 평균시간은 0.75로 유의성이 인정되지 않아 상대적으로 영향이 적은 것을 알 수 있었다. 구증구포 흑삼의 ginsenoside Rg_3 함량에 대한 능선분석 결과, 반응표면 형태는 안장점의 형태로 나타났으며, ginsenoside Rg_3 함량은 증자 평균시간 63.37분 및 건조 평균온도 66.61℃에서 1.02 mg/g으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 그러나 흑삼 제조를 위해 실험범위 이내

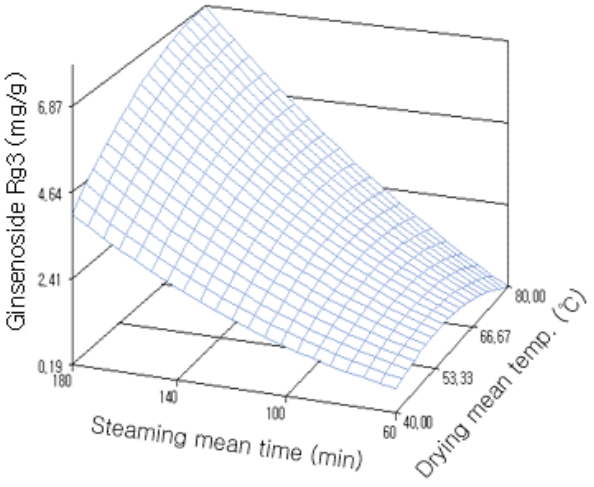

Fig. 3. Response surface for ginsenoside Rg_3 (mg/g) in black ginseng depending on steaming mean time (min) and drying mean temperature (℃).

인 증자 평균시간 177.72분 및 건조 평균온도 65.46℃에서 9번 찌고 말렸을 때에는 ginsenoside Rg_3 함량이 6.26 mg/g으로 최대치를 나타내었다. 본 연구에서는 산처리, 증포횟수 증가시 열처리 완화, 최적 실험조건의 설정 등으로 높은 ginsenoside Rg_3 함량을 얻을 수 있었다.

Benzopyrene의 변화

흑삼은 증포 횟수가 많아 지나친 열처리를 받을 수 있다. 전통적인 방법인 구증구포는 찌고 말리는 과정이 9번이나 반복됨으로써 benzopyrene의 발생 가능성이 높아진다(Jo 등, 2009). 따라서 본 연구에서는 benzopyrene의 발생을 최소화 하고자 초산용액에서 증자를 하여 pH를 낮추고 증포과정이 반복됨에 따라 지나친 열처리를 막고자 증자 및 건조 조건을 증포횟수가 증감함에 따라 점차 낮게 설정하여 마지막 증포조건이 가장 완화된 조건으로 증포하도록 설정하였다. 그리고 반응표면분석을 통해 증포 중 증자 평균시간과 건조 평균온도를 최적화 하였다. 흑삼의 증포에 따른 benzopyrene의 변화를 관찰해 본 결과, 증자 평균시간에 따른 benzopyrene의 변화는 0.253 - 0.537 μg/kg의 차이를 나타내었다(Table 2). 이를 회귀분석한 결과 benzopyrene에 대한 모델식의 R^2은 0.9464로 5% 이내 유의수준에서 유의성이 인정되었다(data not shown).

$$Y_3 = -1.133774 + 0.020428X_1 + 0.011381X_2 - 0.000071657X_1^2 - 0.000031161X_2^2 - 0.000049167X_1X_2$$

흑삼의 benzopyrene 함량은 주로 증자 평균시간의 영향을 받아 120분의 증자 평균시간까지는 시간이 증가할수록 증가하였으나, 120분 이상의 증자 평균시간에서는 시간이 증가할수록 benzopyrene이 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 건조 평균온도의 변화에 따른 benzopyrene 함량의 변화는 거의 없었다(Fig. 4). 이러한 결과는 benzopyrene이 건조과정에서 발생하는 것보다 증자과정에서 주로 발생한다는 것을 보여주고 있다.

증자 평균시간과 건조 평균온도가 benzopyrene 함량에 미치는 영향을 알아보고자 회귀분석을 통해 F값을 구해본 결과(Table 3), 증자 평균시간이 18.24로 1% 유의수준에서 유의성이 인정되어 흑삼의 benzopyrene 함량에 주로 영향을 미치는 것으로 나타났으나, 건조 평균시간은 1.20으로 유의성이 인정되지 않아 상대적으로 영향이 적은 것을 확인할 수 있었다. 흑삼의 benzopyrene 함량에 대한 능선분석 결과, 반응표면 형태는 최대점의 형태로 나타났으며, benzopyrene 함량은 증자 평균시간 60.97분 및 건조 평균온도 56.42℃에서 0.22 μg/kg으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 그러나 증자 평균시간 115.25분 및 건조 평균

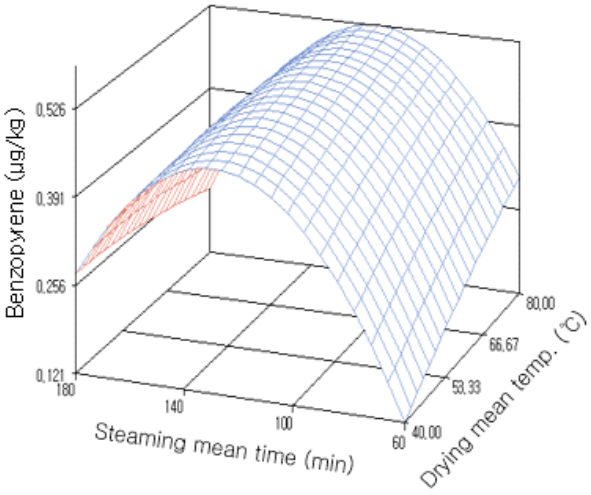

Fig. 4. Response surface for benzopyrene (μg/kg) in black ginseng depending on steaming mean time (min) and drying mean temperature (℃).

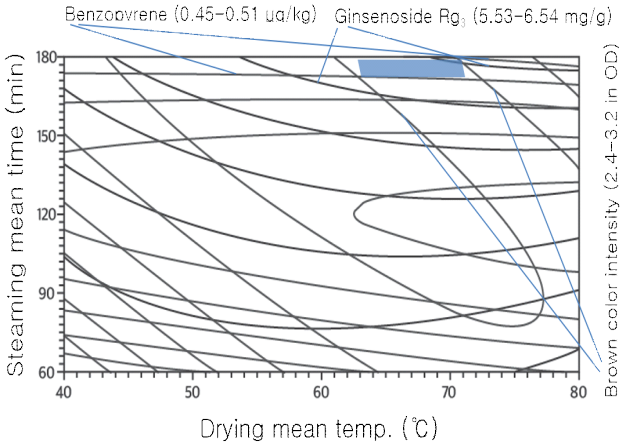

Fig. 5. Superimposed contour map of optimized condition for brown color intensity, ginsenoside Rg_3 and benzopyrene of the black ginseng as a function of steaming mean time and drying mean temperature.

온도 79.94℃에서는 benzopyrene 함량이 0.53 μg/kg으로 최대치를 나타내었다. Jo 등(2009)은 benzopyrene이 적게 생산되는 증자 및 건조 온도를 설정하여 흑삼은 증숙온도가 80 - 120℃, 건조온도가 50℃ 이하가 적당한 것으로 보고하였다. 그러나 benzopyrene이 적게 생성되는 것이 중요하지만 증자와 건조과정의 목적인 갈변의 유도와 ginsenoside Rg_3의 생성은 언급하지 않고 있다. Cho 등(2011)은 시중에서 판매되고 있는 훈제식육식품의 benzopyrene 함량을 분석한 결과 평균농도가 0.42 μg/kg으로 안전하다고 하였다. 본 연구의 최적화된 흑삼은 훈제 식육식품보다도 더 낮은 함량을 가지고 있어 안전한 것으로 여겨진다.

흑삼의 증숙공정 최적화

Ginsenoside Rg_3가 높은 흑삼을 제조하기 위해 초산용액에서 증자 및 건조공정을 최적화하고자 하였다. 흑삼의 갈색도, ginsenoside Rg_3 함량 및 benzopyrene 함량에 대한 반응표면을 겹쳐 그려서 갈색도와 ginsenoside Rg_3 함량이 높고 benzopyrene 함량이 낮은 최적 조건을 설정해 보았다. 갈색도, ginsenoside Rg_3 함량 및 benzopyrene 함량 모두 만족하는 최적조건은 Fig. 5의 어두운 부분으로서 증자 평균시간 170 - 180분 및 건조 평균온도 65 - 72℃에서 흑삼 구증구포를 행하는 것이 가장 우수한 흑삼을 제조할 수 있는 것으로 나타났다. 임의의 최적 조건(증자 평균시간 175 min 및 건조 평균온도 68℃)에서 제조한 흑삼의 품질을 예측해 보면, 갈색도는 흡광도(420 nm)가 2.72로 최대가 되고, ginsenoside Rg_3 함량은 6.20 mg/g으로 높은 함량의 흑삼을 제조할 수 있으며, benzopyrene 함량이 0.29 μg/kg으로 식품 기준 및 규격의 기준치(2.0 μg/kg 이하)와 비교해 아주 낮은 수치임을 확인할 수 있었다. Jo 등(2009)은 구증구포를 통한 흑삼 가공시 50℃의 낮은 온도로 건조함으로써 benzopyrene 함량이 0.12 ppb의 흑삼을 가공할 수 있다고 하였으나, 너무 낮은 온도에서 건조시 건조시간이 길어서 가공비용이 많이 소요되는 문제가 있을 수 있다.

따라서 진한 흑갈색을 띠며 ginsenoside Rg_3 함량이 홍삼에 비해 월등히 높은 흑삼을 가공하기 위해서 구증구포를 행하고 있으나, 지나친 가열로 인해 benzopyrene이 많이 생성되어 유해한 성분이 발현되는 문제가 대두되어 왔다. 그러나 본 연구에는 ginsenoside Rg_3 함량이 더 높으면서도 benzopyrene 함량을 최소화 하고자 인삼 증자시 증자액에 초산을 첨가하여 pH을 낮춤으로써 사포닌에 당의 이탈로 ginsenoside Rg_3 함량을 증가시키고 산성조건하에서 benzopyrene이 거의 생성되지 않도록 온도와 시간을 낮추면서 증포하는 증자 및 건조 조건을 설정하여 새로운 흑삼 제조방법을 개발하였다.

요 약

본 연구에서는 benzopyrene이 거의 발생하지 않고 흑삼의 대표적인 기능성 성분인 ginsenoside Rg_3와 갈변물질 함량이 높은 고품질의 구증구포 흑삼을 개발하고자 낮은 pH에서 증자 및 건조를 하고, 증포횟수가 증가함에 따라 증포 온도와 시간이 점차 낮아지도록 설정한 후 증포조건을 모니터링하였다. 구증구포 흑삼의 갈색도에 대한 반응표면 형태는 최대점을 나타내었으며, 최대의 갈색도는 증자 평균시간 155.25분 및 건조 평균온도 57.56℃에서 3.39(OD, 420 nm)으로 나타났다. 구증구포 흑삼의 ginsenoside Rg_3 함량

에 대한 반응표면 형태는 안장점의 형태로 나타났으며, 증자 평균시간 177.72분 및 건조 평균온도 65.46℃에서 ginsenoside Rg_3 함량이 6.26 mg/g으로 최대치를 나타내었다. 그러나 흑삼의 benzopyrene 함량에 대한 반응표면 형태는 최대점의 형태로 나타났으며, benzopyrene 함량은 증자 평균시간 60.97분 및 건조 평균온도 56.42℃에서 0.22 μg/kg으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 갈색도, ginsenoside Rg_3 및 benzopyrene 반응표면을 서로 겹쳐 그려서 임의의 최적 조건인 증자 평균시간 175분 및 건조 평균온도 68℃에서 제조한 구증구포 흑삼은 갈색도의 흡광도 2.72 및 ginsenoside Rg_3 함량 6.20 mg/g으로 높은 결과를 얻었으며, benzopyrene 함량이 0.29 μg/kg으로 생성이 미미하였다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 풍기특산물영농조합법인의 산학협력 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Gee-Dong Lee https://orcid.org/0000-0002-6840-1770

References

Cho HK, Kim MH, Park SK Shin HS. Analysis of benzo (α)pyrene content and risk assessment. Korean J Food Sci Ani Resour, 31, 960-965 (2011)

Hu S, Jin S, Choi D. Analysis of benzo(α)pyrene in red ginseng beverage. J Fd Hyg Safety, 23, 26-30 (2008)

Jo EJ, Kang SJ, Kim AJ. Effects of steam- and dry-processing temperature on the benzo(α)pyrene content of black and red ginseng. Korean J Food Nutr, 22, 199-204 (2009)

Jo HK, Sung MC, Ko SK. The comparison of ginseng prosapogenin composition and contents in red and black ginseng. Kor J Pharmacogn, 42, 361-365 (2011)

Kim AJ, Yoo HS, Kang SJ. Ameliorative effect of black ginseng on diabetic complications in C57BLKS/J-*db/db* mice. Korean J Food Nutr, 25, 99-104 (2012)

Kim EK, Lee JH, Cho SH, Shen GN, Jin LG, Myung CS, Oh HJ, Kim DH, Yun JD, Roh SS, Park YJ, Seo YB, Song GY. Preparation of black *Panax ginseng* by new methods and its antitumor activity. Kor J Herbology, 23, 85-92 (2008)

Kim MJ, Kang SM. The effect of red ginseng diet on blood and facial skin improvement of married women. J Kor Soc Cosm, 18, 159-168 (2012)

Kim SN, Kang SJ. Effects of black ginseng (9 times-steaming ginseng) on hypoglycemic action and changes in the composition of ginsenosides on the steaming process. Korean J Food Sci Technol, 41, 77-81 (2009)

Kim SN. Study on ginsenoside patterns on the steam processing of Korean ginseng and hypoglycemic action on streptozotocin induced diabetic rats of 9 time-steamings ginsengs. Ph D Thesis, Choongbu University, Korea (2008)

Kulkarmi MC, Anderson MW. Persistence of benzo(α)pyrene metabolite: DNA adducts in lung and liver of mice. Cancer Res, 44, 97-101 (1984)

Lee GD. Monitoring of antioxidant activities and optimization of extraction conditions for steamed and dried *Gugija* (*Lycium chinensis* Mill). J Korean Soc Food Sci Nutr, 46, 1494-1501 (2017)

Lee GH. Food Chemistry. Hyungseol Press, Seoul, Korea, p 177, 473 (1997)

Myers RH. Response Surface Methodology. Allyn and Bacon Inc., Boston, USA, p 127-134 (1971)

Nam GC. The Most Resent Korea Ginseng. Cheonil Press, Seoul, Korea, p 1-6 (1996)

Nam KY, Kim YS, Shon MY, Park JD. Recent advances in studies on chemical constituents and biological activities of Korean black ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Kor J Pharmacogn, 46, 173-188 (2015)

Nam KY, Lee NR, Moon BD, Song GY, Shin HS, Choi JE. Changes of ginsenosides and color from black ginseng prepared by steaming-drying cycles. Korean J Medicinal Crop Sci, 20, 27-35 (2012)

Park NY, Jeong YJ, Lee GD, Kwon JH. Monitoring of Maillard reaction characteristics under various roasting conditions of *Polygonatum odoratum* root. J Korean Soc Food Sci Nutr, 29, 647-654 (2000)

Song GY, Chung KJ, Shin YJ, Lee GW, Lee SY, Seo YB. Study on antiangiogenic effect of black ginseng radix. Kor J Herbology, 26, 83-90 (2011)

Song NK, Choi HJ, Kim DH, Roh SS, Seo YB. Effects of black ginseng on hypertension-induced Rats. Kor J Herbology, 24, 69-75 (2009)