

## 반응표면분석을 이용한 홍삼주 발효조건 최적화

김성호 · 강복희<sup>1</sup> · 노상균<sup>2</sup> · 김종국<sup>3</sup> · 이상한<sup>4</sup> · 이진만<sup>1,5\*</sup>

경북과학대학 바이오식품과, <sup>1</sup>호서대학교 식품기능안전연구센터, <sup>2</sup>동양대학교 생명화학공학과, <sup>3</sup>경북대학교 미생물학과, <sup>4</sup>경북대학교 식품공학과, <sup>5</sup>호서대학교 식품생물공학과 및 기초과학연구소

Received March 31, 2008 / Accepted April 24, 2008

**Optimization of Fermentation Condition for Red Ginseng Wine Using Response Surface Methodology.** Seong Ho Kim, Bok Hee Kang<sup>1</sup>, Sang Gyun Noh<sup>2</sup>, Jong Guk Kim<sup>3</sup>, Sang Han Lee<sup>4</sup> and Jin Man Lee<sup>1,5\*</sup>. Department of Bio and Food Science, Kyongbuk College of Science, Chilgok 718-851, Korea, <sup>1</sup>Center for Food Function and Safety, Hoseo University, Asan 336-795, Korea, <sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Dong Yang University, Youngjou 750-711, Korea, <sup>3</sup>Departments of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, <sup>4</sup>Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, <sup>5</sup>Department of Food and Biotechnology & Basic Science Institute, Hoseo University, Asan 336-795, Korea - Response surface methodology was used to monitor the optimization of fermentation conditions for red ginseng wine. A central composite design was applied to investigate the effects of independent variables, fermentation temperature ( $X_1$ ), fermentation time ( $X_2$ ) and initial pH ( $X_3$ ) on dependent variables, physicochemical characteristics and effective ingredients. Alcohol and total sugar content were significantly affected both by fermentation temperature and time. Crude saponin content was greatly affected by fermentation time, and pH was significantly affected by initial pH. Fermentation time and initial pH had a greater effect on ginsenoside content than fermentation temperature. Ginsenoside content increased along with fermentation time and initial pH. We elicited a regression formula for each variable, and superimposed the total optimum points of fermentation conditions for physicochemical characteristics and the effective constituents. The predicted values at the optimum fermentation conditions were at 21~27°C for 15~20 day in initial pH 4.6~5.2.

**Key words :** Response surface methodology, red ginseng, fermentation, ginsenoside, wine

## 서 론

고려 인삼은 식물학적으로 오가피 나무과(Araliaceae)의 인삼속(*Panax*)에 속하는 식물로서 뿌리를 약용으로 이용한다 [21]. 예로부터 생약재 중에서 가장 진귀한 약재로 사용되어 왔으며, 최근 인삼의 다양한 한방적 효능이 현대 과학적 연구를 통하여 점차 밝혀지고 있다[11]. 인삼의 가공형태는 원형이 그대로 유지되는 1차 가공형태로서 홍삼, 백삼, 태극삼 등이 있고 2차로 가공하여 제조하는 분말, 타블렛, 캡슐 등의 분말 제품류와 드링크, 차, 팩 등의 제품이 판매되고 있다[4].

홍삼은 수삼의 세척, 증자(90~100°C), 1차 건조(수분함량 35~40%), 저장숙성, 2차 건조(수분함량 16% 내외), 정형 등의 과정을 거쳐 제조되며, 담황갈색 또는 담적갈색을 띤다 [10]. 홍삼의 제조공정과정에서 수삼을 증자 열처리하면 성분의 화학적 변화가 일어나 수삼이나 백삼에 존재하지 않는 새로운 생리활성물질의 생성과 함께 기존의 생리활성물질 함량이 증가한다[26]. 홍삼제조 과정 동안 변화되는 주요 성분은 사포닌계와 비사포닌계로서 사포닌계 성분을 보면

홍삼에 30종 백삼에는 22종이 분리되어 보고되어 있으며, 홍삼과 백삼에 공통함유 18종, 홍삼에 특이적으로 존재하는 사포닌 12종, 백삼에만 존재하는 4종의 사포닌이 규명되어 있다[9].

인삼의 사포닌은 항암 작용, 항산화 작용, 동맥경화 및 고혈압 예방, 간기능개선, 항피로, 항스트레스 작용, 노화방지, 두뇌활동 촉진, 항염활성, 알레르기성 질환치료 및 단백질합성 능력의 촉진 등의 생리활성이 있으며[23], 고려 홍삼은 항산화[15], 혈압강하[6], 알코올성 고지혈증 개선[12], 혈당강하 작용[13,14] 등의 우수한 생리활성을 지니고 있다.

최근 건강에 대한 인식이 증대됨에 따라 기능성식품소재에 대한 연구가 활발하게 진행되면서 약용식물을 이용한 발효주 및 침출주에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 대한 생리활성 및 기능성 등이 일부 보고되고 있다. 인삼을 이용한 발효 및 주류 관련연구로는 발효 인삼주[1,25], 홍삼 엑기스를 함유한 분말주[16], 인삼 민속주의 제조 및 생리 기능성 [8], 인삼성분이 알코올 발효에 미치는 영향[24] 등이 있으나 홍삼을 이용한 발효주 및 관련 성분에 대한 체계적인 연구가 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 홍삼농축액을 이용한 고품질의 홍삼주 개발을 목적으로 중심합성계획법에 의한 반응표면분석법으로 홍삼주의 최적발효조건을 설정하고

\*Corresponding author

Tel : +82-41-540-5645, Fax : +82-41-544-4151

E-mail : jmlee@hoseo.edu

자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 홍삼농축액(60 °brix)은 경북 풍기영농협동조합에서 생산된 것을 구입하여 4°C 냉장보관하면서 사용하였다.

### 발효조건 최적화를 위한 실험 계획

홍삼주 발효조건을 최적화를 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM) [20]을 이용하여 발효조건에 따른 이화학적 특성을 모니터링하였다. 발효조건을 최적화를 위한 실험 계획은 중심합성계획법[28]에 의하여 실시하였으며, 발효에 영향을 미칠 것으로 고려되는 인자, 발효 온도( $X_1$ ), 발효기간( $X_2$ ) 및 초기 pH ( $X_3$ )를 독립변수로 설정하여 각각을 5단계 부호화하였으며, 중심합성계획에 의하여 Table 1과 같이 16구로 설정하여 발효를 실시하였다. 각각의 발효조건에서 얻어진 홍삼주의 이화학적 특성과 관련된 종속변수( $Y_n$ )로는 이화학적 특성으로서 알코올 함량, 조사포닌 함량, 총당 및 pH를 조사하였으며, 유효성분의 함량은  $Re+Rg$ ,  $Rb_1$ ,  $Rc$ ,  $Rb_2$ ,  $Rd$  및 Total ginsenoside를 설정하여 측정된 값을 회귀분석에 사용하였다. 발효조건이 홍삼주의 이화학적 특성 및 홍삼의 유효성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program [17]을 이용하여 4차원 반응표면분석으로 해석하였다.

### 종 배양 및 발효

예비 실험에서 알코올 발효능이 우수한 것으로 나타난 *Saccharomyces cerevisiae* JF-Y3 효모를 30°C에서 3일간 전배양하여 발효를 위한 주모로 사용하였으며, 발효시 5%를 접종하였다. 발효액에 대해 설탕(삼양사) 25%, Yeast extract (Difco, Co.) 0.5% 및 홍삼액(20 °brix) 30%를 첨가하여 각각의 실험조건에 따라 발효를 실시하였으며, 홍삼농축액(60 °brix)은 20 °brix로 희석하여 발효에 사용하였다.

### 알코올 함량 측정

발효액 100 ml를 취하여 알코올자동증류장치(J. P. SELECTA, S.A., Spain)에서 알코올 증류 후 주정계를 이용하여 알코올 함량을 측정하였다.

Table 1. Level in fermentation condition of red ginseng wine

Fermentation conditions	-2	-1	0	1	2
X1 Fermentation temp. (°C)	15	20	25	30	35
X2 Fermentation time (day)	5	10	15	20	25
X3 Initial pH	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0

### 조사포닌 함량 측정 및 진세노사이드 분석

식품공전상의 수포화 부탄올에 의한 추출법[7]으로 조사포닌 함량을 측정하였고, 진세노사이드 분석은 HPLC (Shimadzu LC-10AT, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 분석 조건은 Table 2와 같다.

### 총당 함량 측정

발효액의 총당함량은 phenol-sulfuric acid 법으로 측정하였다. 적절히 희석한 시료 1 ml를 취하여 5% phenol 1 ml를 가한 다음  $H_2SO_4$  5 ml를 가하여 상온에서 20분간 반응시켜 냉각 후 UV-1601PC spectrophotometer (Shimadzu Co. Japan)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### pH 측정

발효액의 pH는 pH meter (Metrohm Co., Swiss)를 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 발효조건에 따른 홍삼주의 이화학적 특성 변화

발효조건에 따른 홍삼주의 알코올 함량, 조사포닌 함량, 총당 및 pH를 조사한 결과는 Table 3과 같다. 홍삼주의 알코올 함량은 9.8~15.8%로 나타났으며, 조사포닌 함량은 0.85~1.05%의 범위로 나타났다. Ann 등[1]의 연구에서 인삼박 농도를 5~20%로 다르게 첨가하여 인삼주 발효를 실시한 결과 알코올 함량이 6.4~12% 이었으며, 본 연구결과에서는 알코올 함량이 좀 더 높게 나타났다. Min 등[19]의 몇 가지 약용주의 발효특성에 관한 연구에서는 발효종료일의 약용주 알코올 함량이 12.3~13.6%이었다고 보고하였다. 또한, 홍삼주의 발효시 발효조건에 따른 조사포닌 함량의 변화에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났는데, Ann 등[1]에 의하면, 인삼주 발효 진행 중에 사포닌 함량의 변화는 없었다고 보고하여 본 결과와 일치하는 경향을 보였다.

홍삼주의 총당 함량은 1.40~2.50%이었으며, 발효 후의

Table 2. Operating conditions of HPLC for the analysis of ginsenoside

Specification	Conditions
Instrument	Shimadzu LC-10AT
Column	XTerra RP $C_{18}$ (3.0 mm×250 mm, pore size 5 $\mu$ m, Waters Co., U.S.A)
Column temp.	35°C
Mobile phase	Acetonitrile:water=30:70
Flow rate	1.0 ml/min
Detector	UV 203 nm

Table 3. Experimental data on alcohol content, crude saponin content, total sugar content and final pH of red ginseng under different conditions based by response surface analysis on central composite design

Exp. No. <sup>1)</sup>	Fermentation conditions			Alcohol content (%)	Crude saponin (%)	Total sugar (%)	pH	Re+Rg <sub>1</sub> (mg%)	Rb <sub>1</sub> (mg%)	Rc (mg%)	Rb <sub>2</sub> (mg%)	Rd (mg%)	Total ginsenoside (mg%)
	Temp. (°C)	Time (day)	Initial pH										
1	30	20	5.5	11.1	0.93	1.97	4.48	219.97	26.41	28.47	55.25	15.79	345.89
2	30	20	4.5	9.8	0.95	2.50	4.24	174.21	24.82	25.19	53.92	15.21	293.35
3	30	10	5.5	14.9	0.91	1.47	4.49	157.46	22.00	19.41	37.69	10.11	246.67
4	30	10	4.5	15.8	0.89	1.49	4.17	138.35	19.00	20.88	50.71	11.97	240.91
5	20	20	5.5	14.5	1.02	1.40	4.63	239.46	28.36	30.94	57.15	17.10	373.01
6	20	20	4.5	14.0	0.99	1.85	4.26	182.24	23.03	22.82	51.46	12.01	291.56
7	20	10	4.5	14.9	0.90	1.95	4.17	170.26	18.01	19.86	47.76	10.35	264.24
8	20	10	4.5	14.8	0.90	1.95	4.17	170.26	18.01	17.86	47.76	10.35	264.24
9	25	15	5.0	14.6	0.98	1.61	4.46	246.22	28.88	30.94	68.87	16.99	391.90
10	25	15	5.0	14.5	0.98	1.61	4.46	246.22	28.88	30.94	68.87	16.99	391.90
11	35	15	5.0	9.8	0.95	2.11	4.49	214.57	27.22	31.26	56.55	15.97	345.57
12	15	15	5.0	15.6	0.94	1.52	4.47	153.96	19.87	19.67	47.54	11.05	252.09
13	25	25	5.0	12.2	1.05	1.81	4.42	183.27	23.15	24.02	51.30	10.89	292.63
14	25	5	5.0	14.8	0.85	1.55	4.29	132.94	16.54	16.01	38.30	11.53	215.32
15	25	15	6.0	14.0	0.96	1.80	4.73	168.95	21.37	18.94	49.09	13.00	271.35
16	25	15	4.0	13.8	0.93	1.87	3.93	139.38	20.56	17.99	60.65	10.01	248.59

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

pH는 3.93~4.73으로 나타났다(Table 3). Ann 등[1]의 발효 인삼주에 관한 연구에서는 인삼박 농도를 달리한 인삼주 발효에서 발효후의 총당은 105~215 mg/ml로 나타났으며, 효모로 발효시킨지 3일 뒤 총당 함량은 효모의 sucrase에 의해 대부분 환원당인 글루코오스와 프룩토오스로 바뀌었다고 보고하였다. Min 등[19]에 의하면 약용주 발효 후의 총당 함량이 2.7~4.4%의 범위로 나타나 본 결과와 비교하였을 때 2% 정도 높은 함량을 보였다.

Han 등[5]에 의하면 최종 백삼발효액의 경우 pH가 3.12, 홍삼발효액은 pH 4.03으로 보고하였으며, Ann 등[1]은 수삼과 인삼박으로 발효 시 모두 발효 3일째에 3.5~4.0 사이로 급격히 떨어진 다음 3.5 정도에서 변화가 없다고 하였다. 또한, 몇 가지 약용주의 발효특성에 관한 연구[19]에서 발효 종료일에 약용주의 pH가 3.44~3.62의 범위로 나타나 본 실험 결과와 비교하였을 때, 홍삼주의 pH가 약간 높은 경향을 나타내었다.

발효조건에 따른 홍삼주의 이화학적 특성에 대한 반응표면 회귀식은 Table 4에 나타내었으며 알코올함량, 조사포닌 함량, 총당 및 pH에 대한 회귀식은 R<sup>2</sup>는 0.9309, 0.8880, 0.8816 및 0.9778이었다. 알코올함량 및 pH는 1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었으며, 조사포닌 및 총당의 함량은 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다.

**발효조건에 따른 홍삼주의 유효성분 함량 변화**

홍삼주 발효조건 최적화를 모니터링 하기 위해 중심합성 계획법을 이용하여 발효온도, 발효기간 및 초기 pH의 발효

조건에 따라 홍삼주를 제조하였다. 발효온도 15~35°C, 발효기간 5~25일 및 초기 pH 4.0~6.0으로 조절하여 발효한 홍삼주의 Re+Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub>, Rd 및 Total ginsenoside 분석 결과를 회귀분석에 이용하였으며, 발효조건이 홍삼주의 유효성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program을 이용하여 4차원 반응표면분석을 실시하였다.

발효조건에 따른 홍삼주의 유효성분 함량 분석 결과 Re+Rg<sub>1</sub>의 함량이 132.94~246.22 mg%, Rb<sub>1</sub>은 16.54~28.88 mg%, Rc는 16.01~30.94 mg%, Rb<sub>2</sub>의 함량이 37.69~68.87 mg%, Rd는 10.01~17.10 mg% 및 Total ginsenoside가 215.32~391.90 mg%로 나타났으며, 홍삼주의 개별 ginsenoside 및 total ginsenoside의 함량 변화는 발효조건에 따라 함량의 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 3).

홍삼주 발효조건 최적화를 위해 발효온도, 발효기간 및 초기 pH를 달리한 홍삼주의 유효성분 분석 결과를 SAS program을 이용하여 회귀분석한 결과는 Table 3과 같다. 회귀분석의 결과 발효조건에 따른 홍삼주 유효성분에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 Re+Rg<sub>1</sub> 0.8591, Rb<sub>1</sub> 0.8973, Rc 0.9036, Rb<sub>2</sub> 0.8504, Rd 0.8162 및 Total ginsenoside 0.8692로 나타났다. Rb<sub>1</sub>, Rc 및 Total ginsenoside는 5%이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었으며, Re+Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub> 및 Rd는 10% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었다.

**홍삼주 발효조건 최적화**

발효조건에 따른 홍삼주의 이화학적 특성을 4차원 반응표

면으로 나타낸 결과는 Fig. 1~10과 같다. 홍삼주의 알코올 함량이 가장 높게 나타난 발효조건은 발효온도 28.13°C, 발효일수 6일 및 초기 pH는 4.64이었으며 이 때의 최대값은 16.24%로 예측되었다(Table 6). 발효조건에 대한 알코올 함량의 변화는 Table 5와 같이 발효온도와 발효기간에 영향을

많이 받고 있는 것으로 나타났으며, 초기 pH에 대한 영향은 거의 받지 않는 것으로 나타났다. Cho 등[3]에 의하면 초기 pH를 3.0~6.67의 범위로 하여 단감와인을 제조하였을 때, pH를 3.5까지 변화시켜도 알코올 생산량은 13.2%로 알코올 생산에 커다란 영향을 주지 않는다고 보고하여, 알코올 함량

Table 4. Polynomial equations calculated by RSM program of alcohol content, crude saponin content, total sugar content and pH and ginsenosides in fermentation conditions of red ginseng wine

Response	Second order Polynomials	R <sup>2</sup>	Significance
Alcohol content	$Y_{AC} = -8.516667 + 1.260417X_1 + 0.453750X_2 + 3.133333X_3 - 0.018500X_1^2 - 0.047833X_1X_2 - 0.010500X_2^2 + 0.033333X_1X_3 + 0.173333X_2X_3 - 0.650000X_3^2$	0.9309	0.0073
Crude saponin	$Y_{CS} = -0.751827 + 0.031365X_1 + 0.033327X_2 + 0.404615X_3 - 0.000350X_1^2 - 0.000546X_1X_2 - 0.000300X_2^2 - 0.001462X_1X_3 - 0.000462X_2X_3 - 0.035000X_3^2$	0.8880	0.0278
Total sugar	$Y_{TS} = 10.047468 - 0.257910X_1 - 0.072385X_2 - 1.829744X_3 + 0.002050X_1^2 + 0.010997X_1X_2 + 0.000700X_2^2 + 0.001641X_1X_3 - 0.041359X_2X_3 + 0.225000X_3^2$	0.8816	0.0321
pH	$Y_{pH} = -2.796058 + 0.047837X_1 + 0.074183X_2 + 2.068462X_3 + 0.000200X_1^2 - 0.000135X_1X_2 - 0.001050X_2^2 - 0.011846X_1X_3 - 0.006846X_2X_3 - 0.130000X_3^2$	0.9778	0.0003
Re+Rg <sub>1</sub>	$Y_{REG} = -2276.003077 + 25.10699X_1 + 4.079202X_2 + 834.824615X_3 - 0.8815X_1^2 + 834.824615X_1X_2 - 0.88115X_2^2 + 1.227538X_1X_3 + 5.038538X_2X_3 - 92.055X_3^2$	0.8591	0.0509
Rb <sub>1</sub>	$Y_{Rb1} = -265.133205 + 3.928849X_1 + 3.192163X_2 + 84.055641X_3 - 0.053350X_1^2 - 0.014406X_1X_2 - 0.090350X_2^2 - 0.165897X_1X_3 + 0.067103X_2X_3 - 7.915000X_3^2$	0.8973	0.0220
Rc	$Y_{Rc} = -369.516090 + 5.113676X_1 + 1.333298X_2 + 125.428718X_3 - 0.054750X_1^2 - 0.022737X_1X_2 - 0.109250X_2^2 - 0.338205X_1X_3 + 0.620795X_2X_3 - 12.475000X_3^2$	0.9036	0.0185
Rb <sub>2</sub>	$Y_{Rb2} = -471.371122 + 12.750516X_1 + 2.632413X_2 + 143.588974X_3 - 0.168250X_1^2 + 0.017660X_1X_2 - 0.240700X_2^2 - 0.881564X_1X_3 + 0.989436X_2X_3 - 14.000000X_3^2$	0.8504	0.0595
Rd	$Y_{Rd} = -214.483141 + 4.187670X_1 + 0.541433X_2 + 67.215128X_3 - 0.034800X_1^2 + 0.020199X_1X_2 - 0.057800X_2^2 - 0.526179X_1X_3 + 0.168821X_2X_3 - 5.485000X_3^2$	0.8162	0.0998
Total ginsenoside	$Y_{TGC} = -3596.506635 + 51.087702X_1 + 11.778510X_2 + 1255.113077X_3 - 0.930700X_1^2 + 0.032719X_1X_2 - 1.379250X_2^2 - 0.684308X_1X_3 + 6.884692X_2X_3 - 131.930000X_3^2$	0.8692	0.0419

Table 5. Regression analysis for regression model of alcohol content, crude saponin content, total sugar content and pH and ginsenosides in fermentation conditions of red ginseng wine

Fermentation conditions	F-Ratio									
	Alcohol content (%)	Crude saponin (%)	Total sugar (%)	pH	Re+Rg (mg%)	Rb <sub>1</sub> (mg%)	Rc (mg%)	Rb <sub>2</sub> (mg%)	Rd (mg%)	Total ginsenoside (mg%)
X <sub>1</sub> Fermentation temp. (°C)	13.19 <sup>***</sup>	1.35	7.66 <sup>**</sup>	1.07	1.98	2.86	3.00	2.95	2.39	2.33
X <sub>2</sub> Fermentation time (hr)	11.02 <sup>***</sup>	9.61 <sup>***</sup>	7.01 <sup>**</sup>	2.76	6.29 <sup>**</sup>	9.01 <sup>**</sup>	8.24 <sup>**</sup>	7.22 <sup>**</sup>	3.30 <sup>*</sup>	7.46 <sup>**</sup>
X <sub>3</sub> Initial pH	0.67	0.58	2.43	55.56 <sup>***</sup>	5.54 <sup>**</sup>	4.26 <sup>*</sup>	6.38 <sup>**</sup>	2.86	3.84 <sup>*</sup>	5.18 <sup>**</sup>

\*Significant at 10% level ; \*\*Significant at 5% level ; \*\*\*Significant at 1% level

의 경우 초기 pH의 영향은 거의 받지 않는 것으로 나타난 본 결과와 일치하였다.

조사포닌 함량이 가장 높게 나타난 홍삼주 발효조건은 발효온도 20.18°C, 발효기간 23.7일, 발효초기 pH 5.10이었고, 발효조건별 홍삼액의 조사포닌 함량은 Fig. 2와 같이 발효온도가 높아질수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 발효기간에 가장 많은 영향을 받고 있는 것으로 나타났다.

총당 함량은 발효온도 31.77°C, 발효기간 21.58일 및 발효초기 pH 4.67일 때 최대값 2.66%를 나타내었고(Table 6), 발효온도와 발효기간에 크게 영향을 받는 것으로 나타났으며,

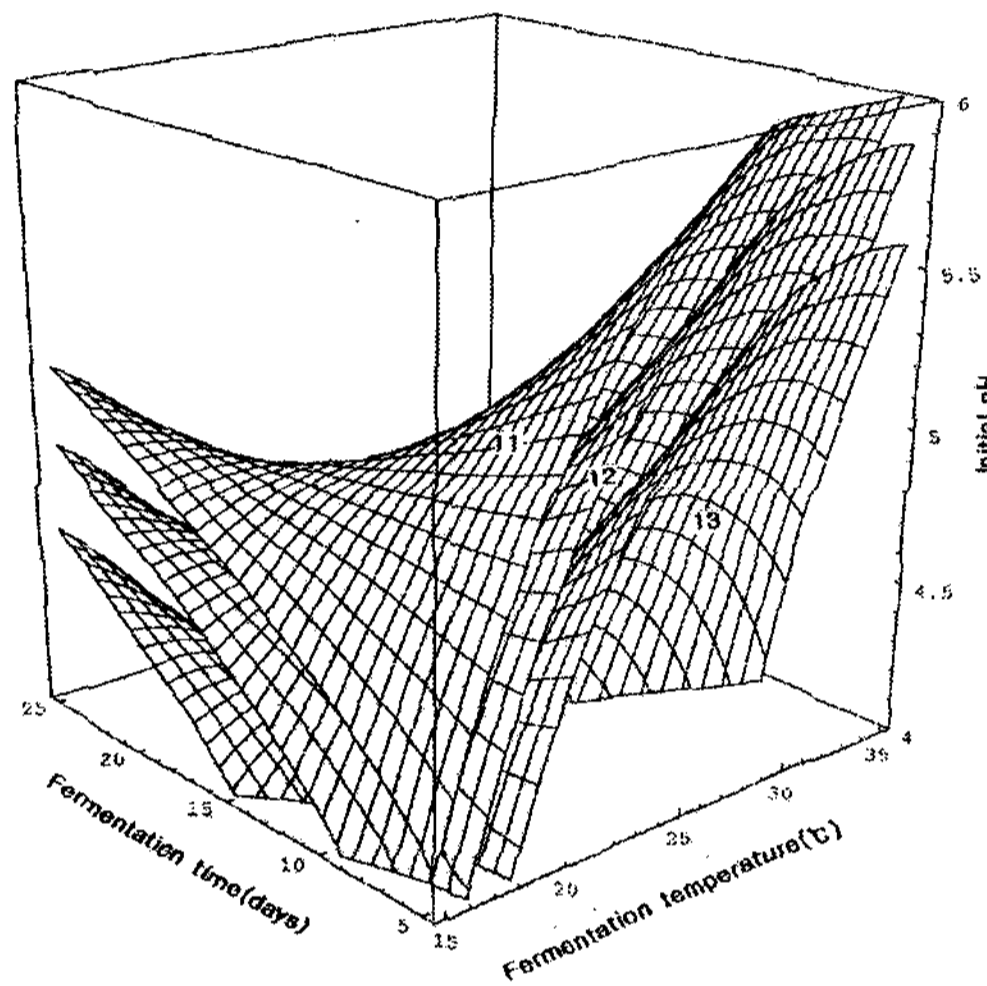


Fig. 1. Response surface for alcohol content of red ginseng wine at constant values (alcohol content: 11, 12, 13%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

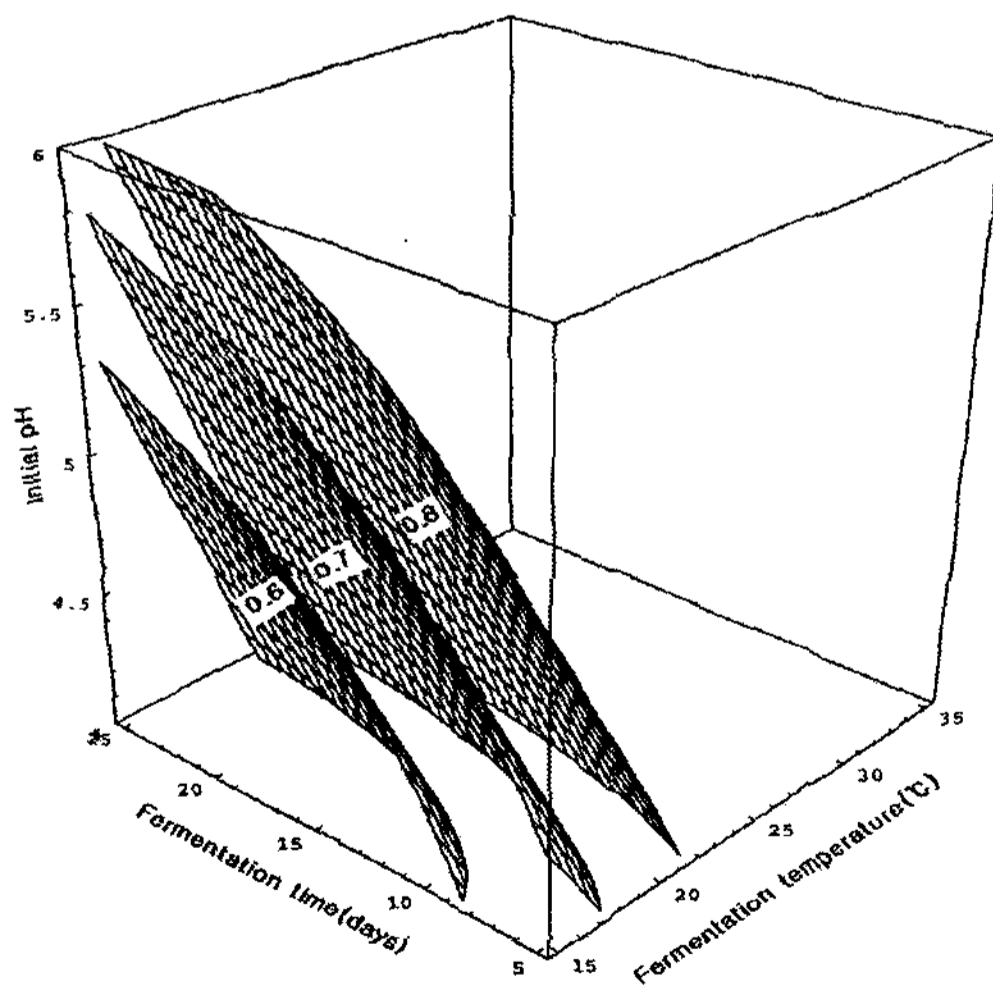


Fig. 2. Response surface for crude saponin of red ginseng wine at constant values (crude saponin: 0.6, 0.7, 0.8%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

발효 후 pH에 대해서는 거의 영향을 받지 않았다(Table 5).

발효 후 pH는 발효온도 19.31°C, 발효일수 15.05일 및 발효 후 pH 5.82일 때 가장 높은 pH를 나타내었으며, 초기 pH가 높을수록 발효 후의 pH도 높아지는 경향을 나타내었고(Fig. 4), 초기 pH가 발효 후 pH에 가장 많은 영향을 미치고 있는 것으로 나타났다(Table 5).

발효조건에 따른 홍삼주의 유효성분을 4차원 반응표면으로 나타낸 결과는 Fig. 5~10과 같다. 홍삼주에 대하여 유효성분인 Re+Rg<sub>1</sub>의 함량을 조사한 결과 발효온도 25.74°C, 발효기간 17.36일 및 초기 pH 5.16일 때 최대값 250.41 mg%를

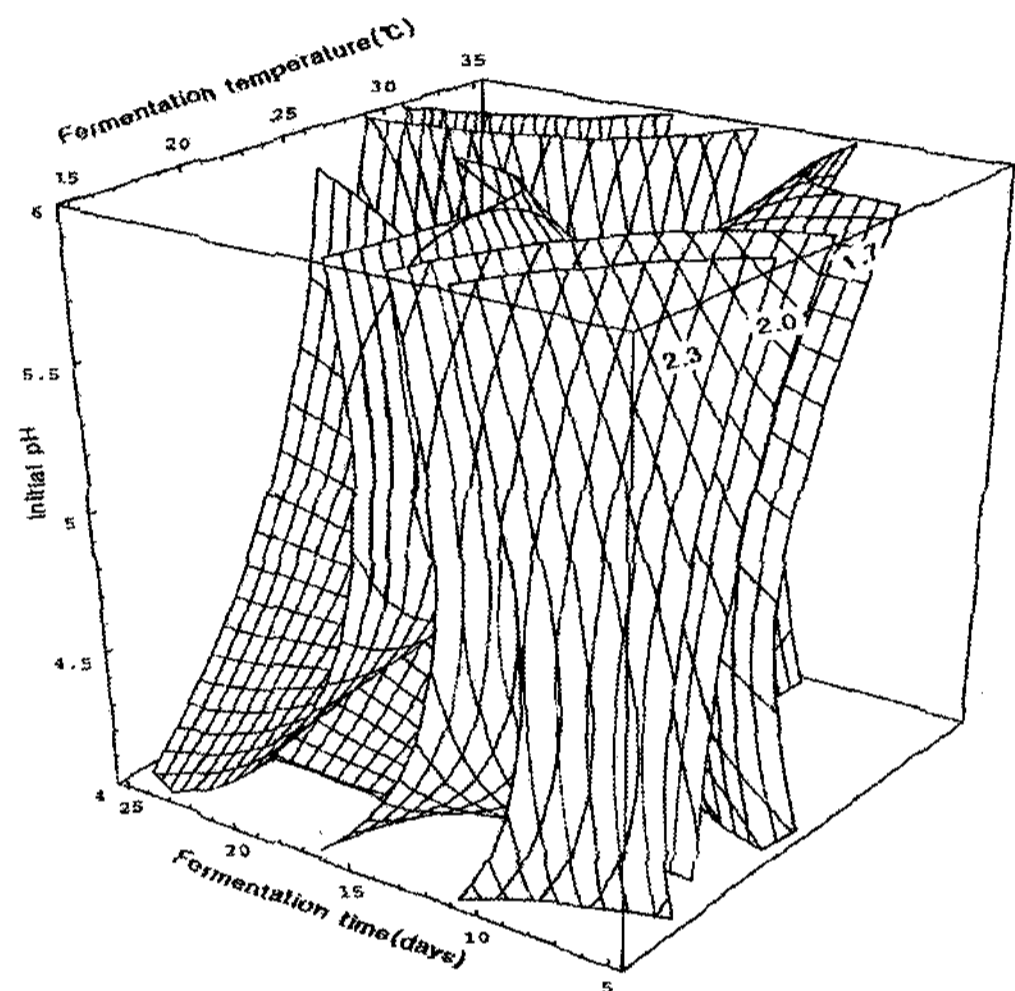


Fig. 3. Response surface for total sugar of red ginseng wine at constant values (total sugar: 1.7, 2.0, 2.3%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

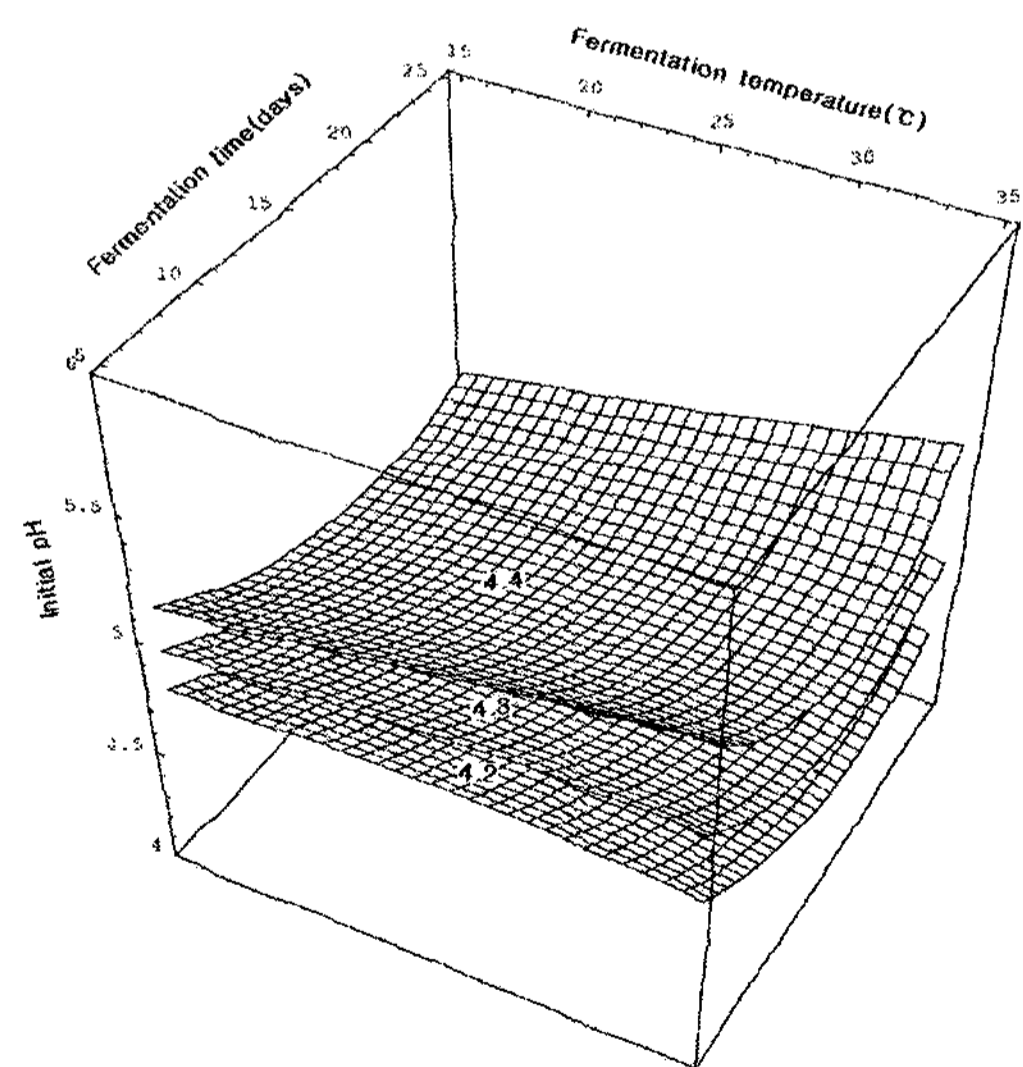


Fig. 4. Response surface for pH of red ginseng wine at constant values (pH: 4.2, 4.3, 4.4) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

Table 6. Predicted level of fermentation conditions for the maximum responses of variables by the ridge analysis

Responses	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Maximum	Morphology
Alcohol content (%)	28.13	6.20	4.64	16.24	Saddle point
Crude saponin (%)	20.18	23.70	5.10	1.05	Maximum
Total sugar (%)	31.77	21.58	4.67	2.66	Saddle point
pH	19.31	15.05	5.82	4.74	Saddle point
Re+Rg <sub>1</sub> (mg%)	25.74	17.36	5.16	250.41	Maximum
Rb <sub>1</sub> (mg%)	26.48	17.39	5.10	29.41	Maximum
Rc (mg%)	27.51	17.92	5.11	31.82	Maximum
Rb <sub>2</sub> (mg%)	25.90	16.46	4.89	67.02	Maximum
Rd (mg%)	26.76	17.09	5.12	17.30	Maximum
Total ginsenoside (mg%)	25.87	17.46	5.15	394.83	Maximum

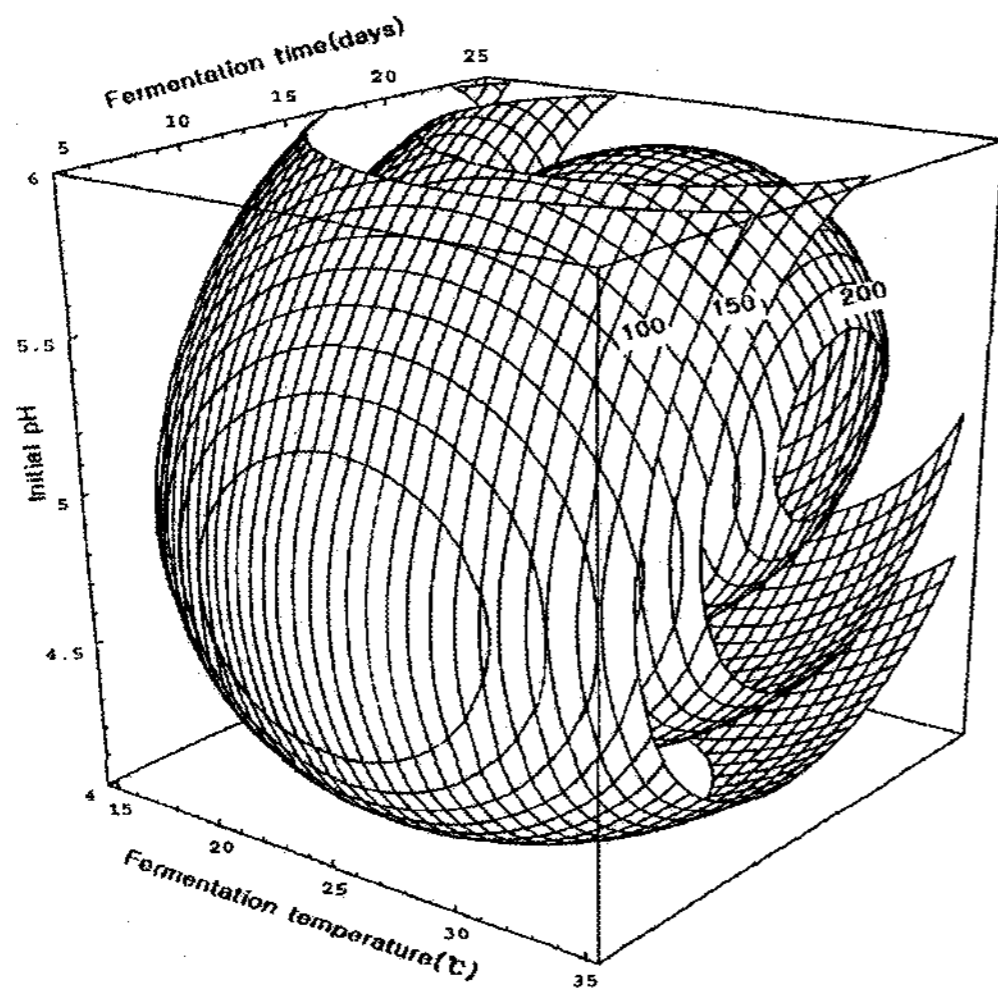


Fig. 5. Response surface for Re+Rg<sub>1</sub> of red ginseng wine at constant values (Re+Rg<sub>1</sub>: 100, 150, 200 mg%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

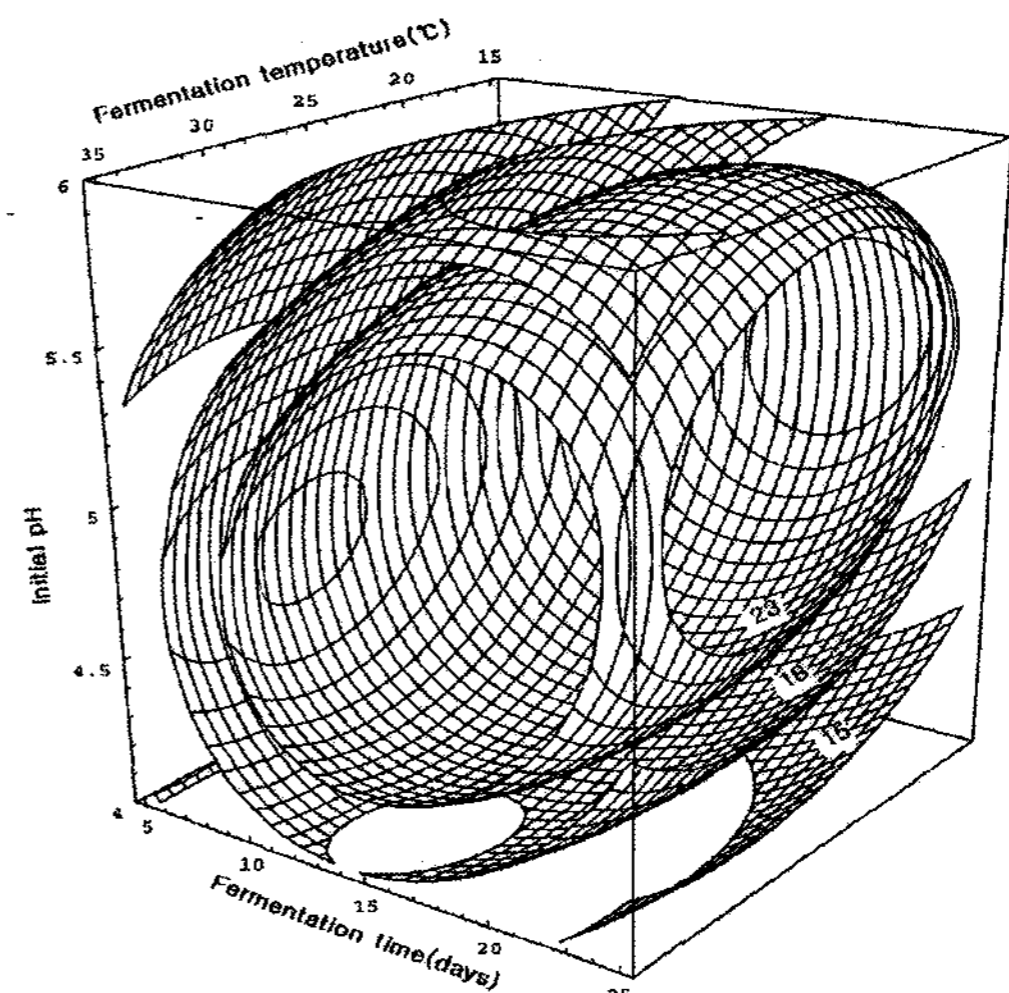


Fig. 7. Response surface for Rc of red ginseng wine at constant values (Rc: 15, 18, 23 mg%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

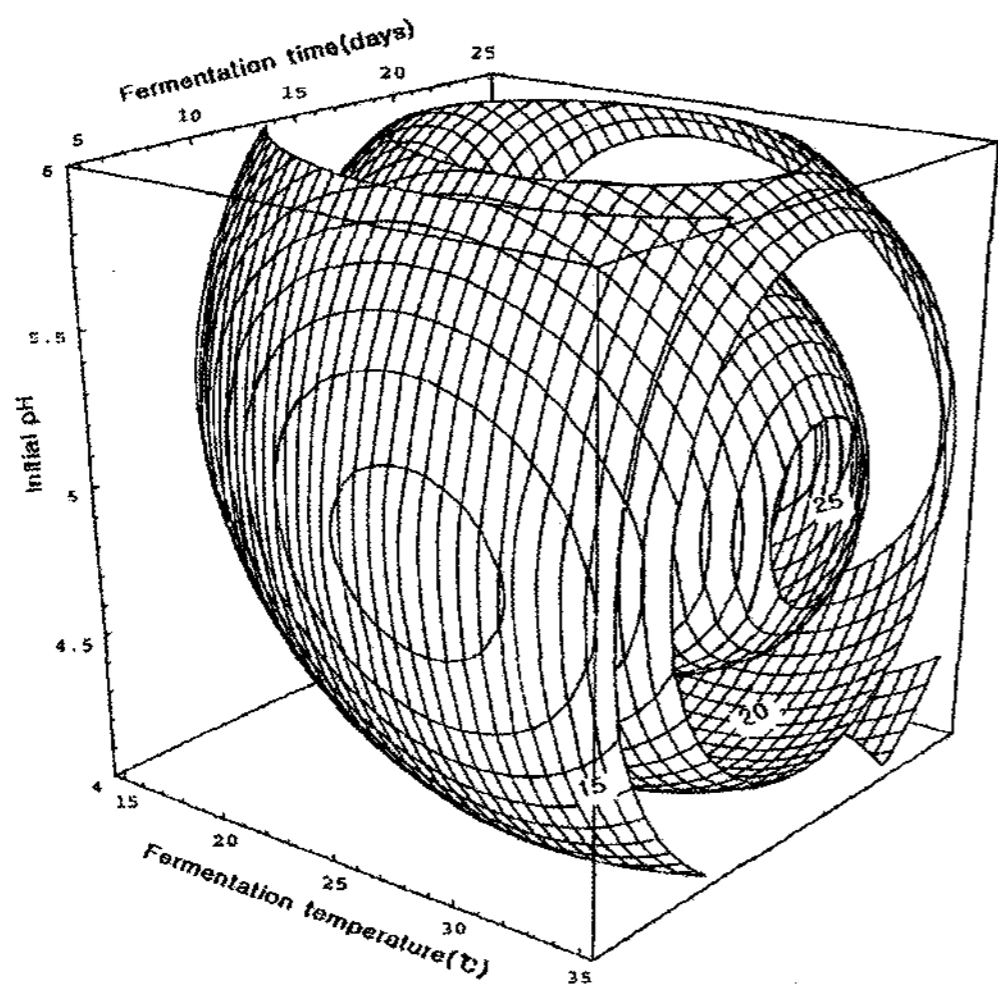


Fig. 6. Response surface for Rb<sub>1</sub> of red ginseng wine at constant values (Rb<sub>1</sub>: 15, 20, 25 mg%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

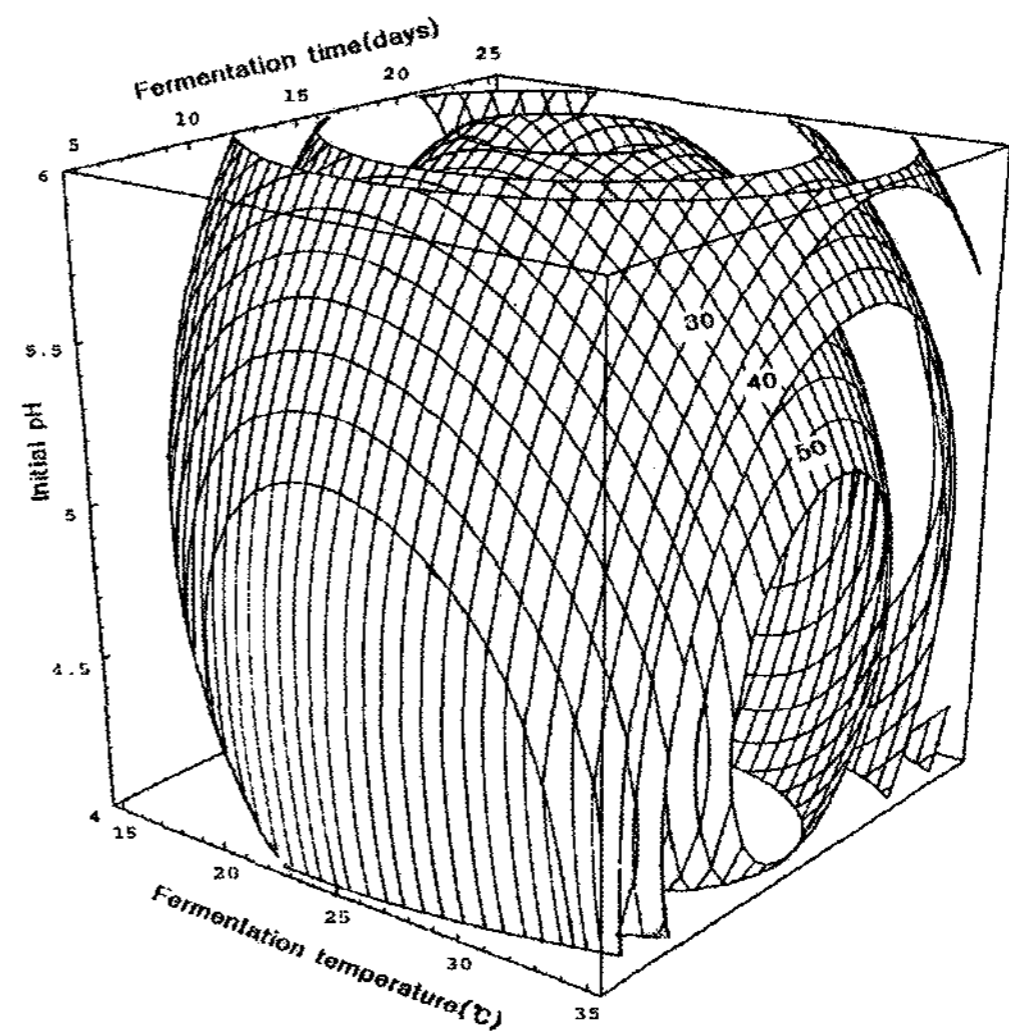


Fig. 8. Response surface for Rb<sub>2</sub> of red ginseng wine at constant values (Rb<sub>2</sub>: 30, 40, 50 mg%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

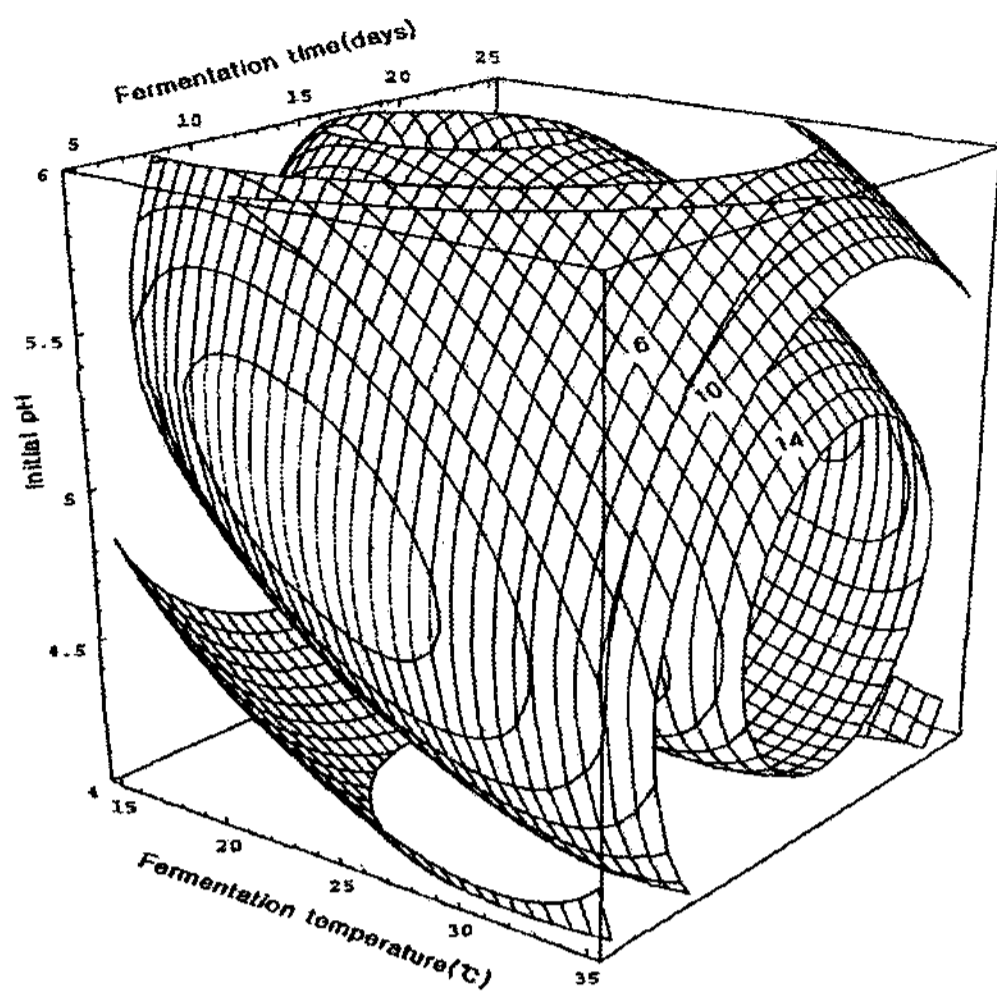


Fig. 9. Response surface for Rd of red ginseng wine at constant values (Rd: 6, 10, 14 mg%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

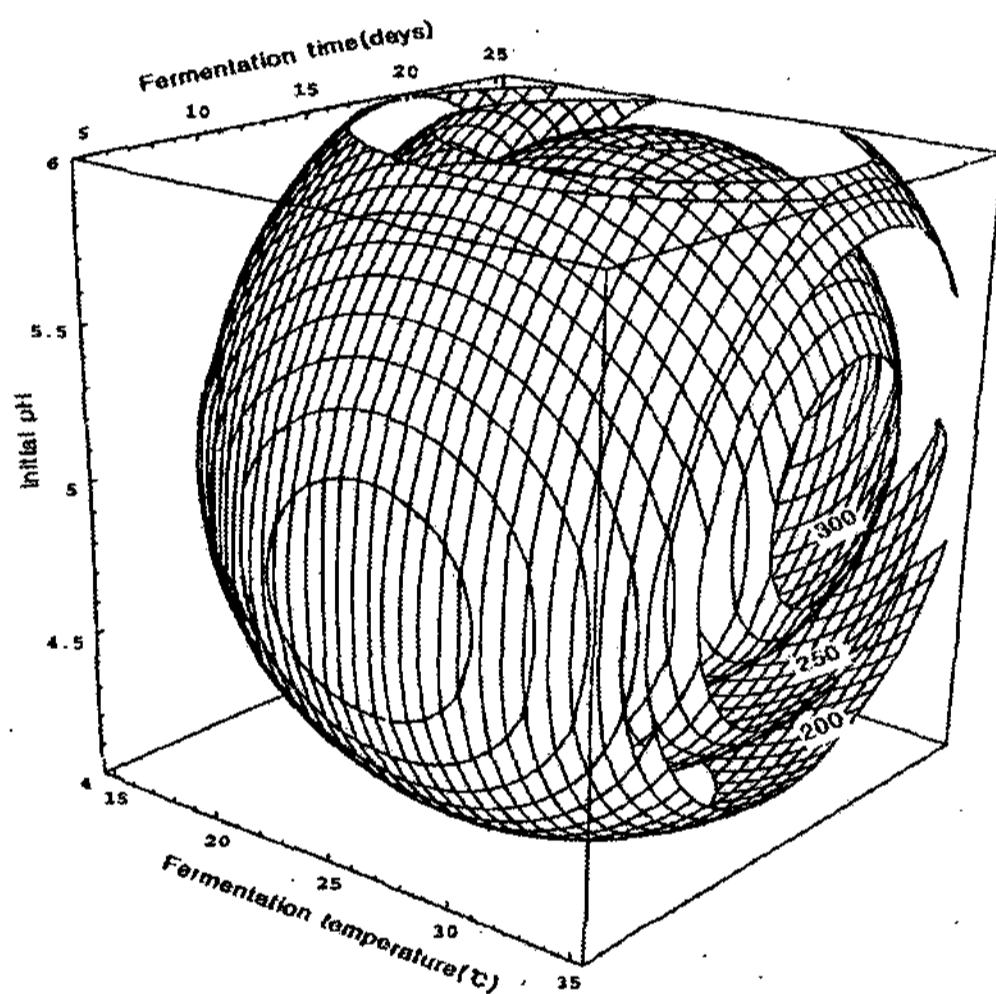


Fig. 10. Response surface for total ginsenoside of red ginseng wine at constant values (total ginsenoside: 200, 250, 300 mg%) as conditions of fermentation temperature, time and initial pH.

나타내었다. Re+Rg<sub>1</sub> 함량은 발효기간 및 초기 pH에 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 발효기간이 15일 이상, 초기 pH 4.5~5.5의 범위에서 가장 높은 함량을 나타내었다(Fig. 5). Ginsenoside Re는 진통작용, 간 상해 보호 작용, 콜레스테롤 대사 촉진 작용[21], Rg<sub>1</sub>은 피로회복 촉진 작용[27], 혈류개선 효과[18]가 있는 것으로 보고된 바 있다.

혈류개선 효과[18], 진정 효과[2]가 있는 Rb<sub>1</sub>의 함량이 가장 높을 것으로 나타난 발효조건은 발효온도 26.48°C, 발효기간 17.39일 및 초기 pH 5.10이었으며, 이 때 최대값은 29.41 mg%를 나타내었다. Rb<sub>1</sub> 함량에 대한 발효조건에 대한 영향은 발효기간이 가장 많은 영향을 미치고 있었으며 다음으로

초기 pH에 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. Rb<sub>1</sub> 함량은 발효기간이 15~25일, 초기 pH가 4.5~5.5의 범위일 때 높은 함량을 나타내었다.

발효조건에 따라 제조한 홍삼주에 대하여 진통작용[21]이 있는 Rc 함량을 조사한 결과 최대점은 발효온도 27.51°C, 발효기간 17.92일, 초기 pH 5.11에서 나타났으며, 이 때의 최대값은 31.82 mg%이었다. 홍삼주의 Rc 함량에 대한 발효조건은 발효기간 및 초기 pH에 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며 발효온도에 대한 영향은 거의 받지 않는 것으로 나타났다.

발효조건에 따른 홍삼주의 Rb<sub>2</sub> 함량은 발효온도 25.90°C, 발효기간 16.46일, 초기 pH 4.89에서 가장 높은 값을 나타내었으며, 이 때 최대값은 67.02 mg%로 나타났다. 노화촉진 마우스에서 항산화작용[19] 및 항당뇨 활성[30]이 있는 Rb<sub>2</sub> 함량은 주로 발효기간에 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 발효기간 약 10~20일 사이일 때 함량이 높게 나타났다.

홍삼주의 Rd 함량은 발효온도 26.76, 발효기간 17.09일, 초기 pH 5.12일 때 17.30 mg%로 가장 높게 나타났다(Table 6). 발효조건에 대한 홍삼주의 Rd 함량은 발효기간 및 초기 pH에 영향을 받고 있었으며, 발효온도에 대해서는 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다(Table 5). Rd 함량에 대한 홍삼주 발효조건은 발효기간이 길고, 초기 pH는 4.3 이상일 때 높게 나타났다. 발효에 따른 홍삼주의 Total ginsenoside 함량을 조사한 결과 반응표면에서 최대점은 발효온도 25.87, 발효일수 17.46일 및 초기 pH 5.15이었으며, 이때의 최대값은 394.83 mg%이었다(Table 6). 홍삼주에 함유된 Total ginsenoside는 주로 발효기간 및 초기 pH에 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 5). Yang 등[29]에 따르면 인삼의 Panaxadiol saponin의 pH 안정성을 조사한 결과 pH 5.0~13.0의 범위에서는 비교적 안정하였으나 pH 4.0이하에서는 함량이 서서히 감소되기 시작하여 pH 3.0~1.0에서는 급속히 감소되는 경향을 보고하여, 본 실험결과에서 발효시 Ginsenoside Re+Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rd 및 total ginsenoside 함량이 초기 pH에 영향을 받고 있는 것으로 나타난 점과, pH가 4.5 이상의 범위에서 유효성분의 함량이 비교적 높게 나타난 점이 유사한 경향을 보였다.

따라서, 홍삼주의 유효성분 함량 변화는 주로 발효온도보다는 발효기간 및 초기 pH에 의해 영향을 받는 것으로 조사되었으며, 발효기간이 길고, 초기 pH가 높을수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 홍삼주의 최적발효조건을 알아보기 위하여 각 반응표면을 superimposing한 결과 발효온도 21~27°C, 발효기간은 15~20일, 초기 pH의 경우 4.6~5.2로 각각 예측되었다.

### 요 약

인삼의 다양한 식품소재개발을 위하여 반응표면분석법을

이용한 홍삼주의 최적발효조건을 모니터링하였다. 중심합성 계획법에 의하여 독립변수로서 발효온도, 발효기간 및 초기 pH를 설정하여 종속변수 홍삼주의 이화학적 특성과 유효성분에 대한 영향을 조사하였다. 홍삼주의 알코올 함량과 총당 함량은 발효온도와 발효기간에 영향을 많이 받고 있는 것으로 나타났으며, 조사포닌 함량은 발효기간에 많은 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 발효 후의 pH는 초기 pH에 많은 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 홍삼주의 유효성분인 Ginsenoside 함량을 조사한 결과 주로 발효온도보다는 발효기간 및 초기 pH에 의해 영향을 받고 있는 것으로 조사되었으며, 발효기간이 길고 초기 pH가 높을수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 홍삼주의 이화학적 특성과 유효성분 함량에 대하여 superimposed counter map으로 최적 조건을 예측한 결과 발효온도 21~27°C, 발효기간은 15~20일, 초기 pH의 경우 4.6~5.2로 각각 예측되었다.

### 감사의 글

본 논문은 중기청 산학연 공동기술개발사업(풍기특산물영농조합법인) 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

### References

- Ann, Y. G. and S. K. Lee. 1996. Studies on the ginseng wine. *Kor. J. Food & Nutr.* **9**, 151-159.
- Benishin, C. G., R. Lee, L. C. H. Wang and H. J. Liu. 1991. Effects of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on central cholinergic metabolism. *Pharmacol.* **42**, 223-229.
- Cho, K. M., J. B. Lee, G. G. Kahng and W. T. Seo. 2006. A study on the making of sweet persimmon (*Diospyros kaki*, T) Wine. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 785-792.
- Ha, D. C. and G. H. Ryu. 2005. Chemical components of red, white and extruded root ginseng. *J. Kor. Soc. Food Sci Nutr.* **34**, 247-254.
- Han, J. Y., D. H. Goo, M. S. Han and G. H. Ryu. 2007. Comparison of fermentability and characteristics of fermented broth for white ginseng, red ginseng and extruded white ginseng. *Food Engineering Progress.* **11**, 119-126.
- Jeon, B. H., H. S. Kim and S. J. Chang. 1999. Effect of saponin and non-saponin of Panax ginseng on the blood pressure in the renovascular hypertensive rats. *J. Ginseng Res.* **23**, 81-87.
- KFDA. 2001. Korean Food and Drug Administration. pp. 396-398, Code of Korea food regulation, Seoul, Korea.
- Kim, H. J., J. C. Lee, G. S. Lee, B. S. Jeon, N. M. Kim and J. S. Lee. 2002. Manufacture and physiological functionalities of traditional ginseng liquor. *J. Ginseng Res.* **26**, 74-78.
- Kitagawa, I., M. Yoshikawa, M. Yohihara, T. Hayashi and T. Taniyama. 1983. Chemical studies on crude drug processing. I. On the constituents of ginseng radix rubra (1). *Yakugaku Zasshi.* **103**, 612-622.
- Korea Ginseng & Tobacco Research Institute. 1994a. Korean ginseng: Chapter 5. Processing of ginseng pp. 43-62. Daejeon.
- Kwak, Y. S., J. J. Wee, S. K. Hwang, J. S. Kyung, K. Y. Nam and S. K. Kim. 2000. Effect of crude saponin from Korean red ginseng on clinical chemical parameters of ovariectomized rat. *J. Ginseng Res.* **24**, 46-50.
- Lee, C. K., J. W. Choi, H. K. Kim and Y. N. Han. 1999. Biological activities of acidic polysaccharide of Korean red ginseng. II. Effects on hyperlipidemia induced by alcohol. *J. Ginseng Res.* **23**, 8-12.
- Lee, H. A., H. S. Sim, K. J. Choi and H. B. Lee. 1998. Hypoglycemic action of red ginseng components (II): Investigation of the effect of fat soluble fraction from red ginseng on enzymes related to glucose metabolism in cultured rat hepatocytes. *Kor. J. Ginseng Sci.* **22**, 51-59.
- Lee, H. A., S. O. Kwon and H. B. Lee. 1997. Hypoglycemic action of components from red ginseng: (I) Investigation of the effect of ginsenosides from red ginseng on enzymes related to glucose metabolism in cultured rat hepatocytes. *Kor. J. Ginseng Sci.* **21**, 174-186.
- Lee, H. J., D. Y. Kim and C. C. Chang. 1999. Antioxidant effects of Korean red ginseng components on the antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in the liver of mouse treated with paraquat. *J. Ginseng Res.* **23**, 182-189.
- Lee, S. W., H. G. Choi, J. H. Park and C. K. Kim. 2000. Preparation and evaluation of dry alcohol containing red ginseng extract. *J. Ginseng Res.* **24**, 23-28.
- Martha, L. A. and P. B. James. 1992. The mathematica handbook, compatible with mathematica version 2.0. pp. 15-511. An imprint of academic press. Inc. Harcourt brace & Co., Massachusetts.
- Matsuda, H., K. Samukawa and M. Kubo. 1998. 13th Ginseng Symposium 8.
- Min, Y. K. and J. G. Cho. 1994. Fermentation characteristics of some medicinal herb rice wine. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **37**, 175-181.
- Myers, R. H. 1971. Response surface methodology. pp. 127-139, Allyn and Bacon Inc. Boston.
- Nam, K. Y. 1996. The newest korean ginseng (constituents and efficacy). pp. 13-18, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Korea.
- Oh, M. H., H. Y. Chung, H. S. Yong, K. W. Kim, H. W. Chung, H. Oura and T. Yokozawa 1992. Effects of Ginsenoside Rb<sub>2</sub> on the Antioxidants in SAM - R/1 Mice. *Kor. J. Biochem.* **25**, 492-497.
- Park, J. D. 1996. Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng. *Kor. J. Ginseng Sci.* **20**, 389-415.
- Park, S. H., T. J. Yu and S. K. Lee. 1982. Studies on the effect of Korean Ginseng components on alcoholic fermentation by yeast: 3. Effect on the changes of saponin pat-



- tern, pH and production of organic acid. *Kor. J. Ginseng Sci.* **6**, 17-24.
25. Roh, S. K., J. S. Song and K. H. Park. 2001. Alcohol fermentability of Insam starch and characteristics of Insam wine. *Food Engineering Progress.* **5**, 43-51.
26. Ryu, G. H. 2007. Recent trend in red ginseng manufacturing process and characteristics of extruded red ginseng. *Food Engineering Progress.* **11**, 1-10.
27. Saito, H., Y. Yoshida and K. Takagi. 1974. Effects of Panax ginseng root on exhaustive exercise in mice. *Japanese J. Pharmacology* **24**, 119-127.
28. Wamasimbara, P. K. J. P. D. and F. Shahi. 1996. Optimization of hexameta-phosphate-assited extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *Kor. J. Food Sci.* **61**, 604-607.
29. Yang, J. W., J. H. Do, H. S. Sung and S. K. Hong. 1982. Studies on the manufacturing of ginseng soft drink II. Effect of pH and heat treatment on the stability of panaxidiol saponins. *Kor. J. Ginseng Sci.* **6**, 25-29.
30. Yokozawa, T., T. Kobayashi, H. Oura and Y. Kawashima. 1985. Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb<sub>2</sub> in streptozotocin-diabetic rats. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 869-872.