

흑삼 제조과정 중 증포 횟수에 따른 색상 및 진세노사이드 함량 변화

남기열 · 이누리 · 문병두* · 송규용** · 신호상*** · 최재율†

충남대학교 농업생명과학대학, *(주) 고려바이오 홍삼, **충남대학교 약학대학, ***공주대학교 환경교육학과

Changes of Ginsenosides and Color from Black Ginsengs Prepared by Steaming-Drying Cycles

Ki Yeul Nam, Nu Ri Lee, Byung Doo Moon*, Gyu Yong Song**,
Ho Sang Shin*** and Jae Eul Choi†

College of Agricultural & Life Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

*Korea Bio Red Ginseng Co., Ltd. 317, Geumsan 312-844, Korea.

**College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

***Department of Environmental Education, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea.

ABSTRACT : This study was conducted to investigate changes in composition of ginsenosides and color of processed ginsengs prepared by different steaming-drying times. Processed ginsengs were prepared from white ginseng with skin by 9-time repeated steaming at 96 °C for 3 hours and followed by hot air-drying at 50 °C for 24 hours. As the times of steaming processes increased, lightness (L value) decreased and redness (a value) increased in color of ginseng powders. Crude saponin contents and ginsenosides compositions in processed ginsengs prepared by different steaming-drying times were investigated using the HPLC method, respectively. Crude saponin contents according to increasing steaming-drying times decreased in some degree. In the case of major ginsenosides, the contents of Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Re, Rg₁, Re were decreased with increase in steaming times, but those of Rh₁, Rg₃, Rk₁ were increased after especially 3 times of steaming processes. Interestingly, in black ginseng were prepared by 9 times steaming processes, the content of ginsenoside Rg₃ was 8.20 mg/g, approximately 18 times higher than that (0.46 mg/g) in red ginseng. In addition, the ratio of the protopanaxadiol group and protopanaxatriol group (PD/PT) were increased from 1.9 to 8.4 due to increasing times of steaming process.

Key Words : Ginseng, Black ginseng, Ginsenosides, Rg₃, Steaming Times, Ginseng Color

서 론

인삼은 가공 방법에 따라 수삼, 백삼, 태극삼 및 홍삼 등으로 분류된다. 백삼은 수삼을 햇볕 또는 열풍으로 건조시킨 것이고, 태극삼은 수삼을 뜨거운 물에 일정시간 넣어 익혀 말린 것이며, 홍삼은 수삼을 증숙기 또는 기타 방법으로 찌서 익혀 건조한 것을 말한다. 특히 홍삼은 증숙 과정을 거치는 동안 열처리가 가해짐으로 조직 중의 전분 입자가 호화되어 백삼보다 소화율이 높으며, 각종 효소들이 불활성화 되어 백삼보다 저장성이 양호하다. 또한, 제조과정 중 일부 성분의 화학적 변화가 일어나 수삼이나 백삼에 존재하지 않는 새로운 생리활성 성분의 생성과 함량 증가가 일어난다 (Kitagawa *et al.*, 1987; Nam, 2005; Choi *et al.*, 2010).

최근에는 홍삼 중 미량으로 존재하는 생리활성 성분의 함량

을 더욱 증가시키고자하는 가공법 개발의 일환으로 흑삼이라는 가공인삼이 개발되고 있다. 흑삼은 한약의 전통적 가공법의 하나인 구증구포 (九蒸九曝)의 방법을 이용하여 수삼을 9 번 찌고 말리는 과정을 반복하여 제조된 것으로서 색깔은 검은색을 띠고 있어서 흑삼 (black ginseng)이라고 부른다 (Han *et al.*, 2005; Jo *et al.*, 2009).

그 동안 흑삼의 성분 분석 (Han *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009)과 실험적 연구를 통한 생리활성 (Lee *et al.*, 2006, 2007, 2010; Kim *et al.*, 2007, 2008, 2009, 2011)에 대한 연구가 수행되어 흑삼의 유용성에 대해 보고되고 있다.

현재 흑삼은 홍삼의 일종으로 홍삼액 파우치나 농축액 등의 원료로 사용되고 있으나, 아직까지 원형삼으로는 품목이 설정되어 있지 않고 있다. 그러나 현재 수삼, 백삼, 태극삼, 홍삼

†Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5729 (E-mail) choije@cnu.ac.kr
Received 2012 January 25 / 1st Revised 2012 February 3 / Accepted 2012 February 6

등 4가지로 규정되어 있는 인삼류에 “그 밖의 인삼”을 추가하여 흑삼 등의 제조·유통이 가능토록 인삼산업법이 개정되어 입법예고를 거쳐 금후 원형삼으로 유통될 전망에 있다.

한편, 흑삼의 제조 가공법이 개발 되고 있으나 (Kim *et al.*, 2008), 증삼 온도와 건조 시간 등이 보고자들에 의해 차이가 있다. 일부 흑삼은 옹기나 시루를 이용하여 (Jo *et al.*, 2009) 찌는 과정을 반복하기 때문에 대량 생산에 어려움이 수반된다. 더욱이 어느 정도의 온도에서 얼마 동안 찌 것인지, 건조는 어떻게, 얼마나 할 것인지 등 표준화 공정이 아직 설정되어 있지 않다. 또한 구중구포로 제조된 흑삼이나 일부 구중구포 과정 중의 이화학적 특성 변화에 대한 연구 결과가 발표되었으나 (Kim *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007), 아직도 가공 공정이나 품질기준 설정을 위한 자료는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 흑삼의 가공공정과 품질기준 설정에 대한 기초 자료를 얻기 위하여 수삼으로부터 제조된 피부직삼을 증삼기를 이용하여 구중구포하여 흑삼을 제조하는 과정에서 외관 색깔과 주요 생리활성 성분인 ginsenosides의 함유 조성 변화를 조사하고 아울러 열처리 과정에서 생성이 우려되는 벤조피렌 (B(a)P) 함량에 대해서도 조사하였다.

재료 및 방법

1. 인삼 재료

충남 금산 인삼 농가포장에서 재래종 6년근을 수확하여 사용하였다. 수삼을 세척한 후 건조기 내에서 1차 건조 (60 ± 5 °C, 12시간) → 2차 건조 (50 ± 5 °C, 6시간) → 3차 건조 (45 ± 5 °C, 10시간) → 일광 건조하여 피부직삼으로 제조하여 증포 횟수별 가공인삼의 원료삼으로 사용하였다.

2. 증포횟수별 가공인삼의 제조 및 수율조사

6년근의 원료수삼으로 제조한 피부직삼을 사판에 배열한 후 무압식 증삼기 (1.6 × 2.0 × 2.0 m, 아성공업사, 경기 부천시) 내에서 96°C에서 3시간 증삼한 후 50°C에서 24시간 열풍건조를 각각 0~9번씩 반복하여 가공인삼을 제조하였다. 증포 횟수별 가공인삼은 고려바이오 홍삼(주)에서 제조하였다.

증포횟수별 제조수율은 피부직삼 각각 1 kg을 원료삼으로 선정하여 증포횟수별 가공인삼을 제조한 후 원료삼 대비 중량비 (%)로 나타내었다.

3. 가공인삼의 색도 측정

증숙 횟수에 따른 인삼을 각각 15개체씩 선정하여 100 mesh 이하로 분쇄하여, 색도는 Spectrophotometer (300A, Nippon Denshoku)를 이용하여 명도 (L), 적색도 (a) 및 황색도 (b) 등을 측정하였으며, Hue 값을 아래의 공식으로 산출하였다.

Hue value (°) = [Tan-1(b/a 2π)]/360, Red = 0, Yellow = 90, Green (Lime) = 180, Blue = 270

4. 분석용 시료 조제 및 조사포닌 (crude saponin) 분석

피부직삼, 1회, 3회, 5회, 7회, 9회 증숙/건조 가공하여 제조된 각각의 가공인삼을 각각 개체중에 따라 대 (평균 31.5 g), 중 (평균 24.5 g), 소 (평균 17.5 g)로 각각 10개체씩을 분쇄하여 분석용 시료로 사용하였다.

조사포닌 분석을 위해 인삼분말시료를 각각 10 g를 취하여 70% 에탄올로 6시간씩 3회 환류 추출 하였다. 추출한 용액을 실온까지 냉각시킨 후 여과한 뒤 감압 농축기를 이용하여 에탄올과 물을 제거하고 얻어진 농축물에 증류수 200 ml를 가하여 현탁시킨 후 에테르 150 ml을 넣고 separatory funnel에서 층 분리하였다. 에테르 층을 2회 제거한 뒤 수층에 수포화 부탄올을 가하여 separatory funnel에서 분리하였다. 수층에 수포화부탄올로 추출하기를 3회 반복한 후 부탄올을 감압 농축기로 제거하여 부탄올 추출물 즉 조사포닌을 정량하였다.

5. Ginsenosides 분석

제조한 추출물 50 mg을 메탄올 1 ml에 녹인 후 0.50 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC (Shimadzu LC-6AD-Japan) 분석을 위한 시료로 사용하였다. 컬럼은 Bischoff C₁₈-ACE EPS column (4.6 × 250 mm)를 사용하였다. 이동상으로 사용한 A 용매는 CH₃CN : H₂O = 20 : 80, B 용매는 CH₃CN : H₂O = 80 : 20이었다. 용매는 gradient elution system으로 0분 (0%B), 0~10분 (5%B), 10~30분 (15%B), 30~60분 (35%B), 60~70분 (50%B), 70~95분 (100%B), 95~140분 (100%B), 140~142분 (0%B), 142~150분 (0%B)으로 조절하였다. 전개온도는 40°C이었고 유속은 1.2 ml/min이었으며, 검출기는 UV 205 nm (Shimadzu, Japan)를 사용하여 사포닌의 성분을 분석하였다.

6. 벤조피렌 함량 분석

흑삼의 벤조피렌 분석은 식품의약품안전청 (2007) “건강기능식품중 벤조피렌 시험법지침”에 근거하여 다음과 같이 실험하였다. 흑삼분말 시료 5 g을 증류수 20 ml에 1시간 침지시킨 후 헥산을 10 ml 넣어 헥산층을 추출하였다. 추출한 헥산층을 감압농축기 (MG-2100, Buchi, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 MeOH 100 μl에 녹여 GC-MS (6890series, Agilent, USA)에 주입하여 결과를 얻었다. 기기분석조건에서 컬럼은 HP-5MS (60 m × 250 mm × 0.25 μm)을 사용하였고, Split mode 에서 split ratio 는 5 : 1로 하였다. 오븐 조건은 초기 50°C에서 1분간 유지시키고 분당 10°C씩 상승시켜서 310°C까지 올린 후 15분 유지하였다. Injector port의 온도는 300°C로 사용하였으며 이동기체는 헬륨을 이용하여 결과를 얻었다.

흑삼 제조과정 중 증포 횟수에 따른 색상 및 진세노 사이드 함량 변화

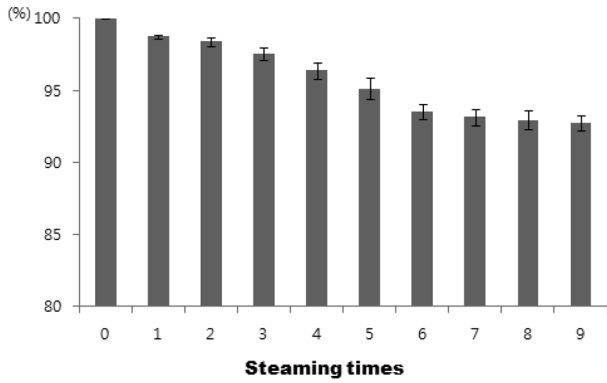


Fig. 1. Yield of ginseng prepared by different steaming-drying times.



Fig. 2. Appearance characteristics of white ginseng by steaming times.

결과 및 고찰

1. 가공인삼의 제조 및 수율

6년근 피부직삼을 무압식 증삼기내에서 96℃로 3시간 증삼한 후 50℃에서 24시간 0~9번 열풍건조하여 증포 횟수별 제조 수율을 조사한 결과는 Fig. 1에서와 같다. 수삼으로부터 제조된 피부직삼 (수분 함량 15% 이하)을 원료삼으로 하여 증포 횟수별 가공인삼의 제조 수율은 증포 횟수가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 9중9포한 가공삼의 경우는 평균 92.7%로 피부직삼 (원료삼) 대비 약 7%의 무게 감소를 보였다. 일반적으로 원료수삼 (수분 70% 이상 기준)으로부터 가공인삼류의 수율은 수분 15% 이내 기준으로, 백삼 (본삼)과 홍삼은 27%로 정하고 있는데 (2009 농림부 통계자료집, 2010), 9중9포의 흑삼 경우는 약 25% 정도로 백삼과 홍삼에 비해 제

조수율이 약간 감소하는 것으로 보인다.

2. 가공인삼의 외관 및 색도

증포 횟수별 가공삼의 외관은 Fig. 2에서와 같이 1차 증숙된 인삼은 전형적인 홍삼의 형태를 띠었으며, 2차 증숙을 거쳐 8차의 증숙 과정을 거치면 점점 색깔이 적갈색에서 흑색으로 변하는 것을 알 수 있었다. 9차 증숙 과정을 거치면 완전히 외형이 흑색인 흑삼을 제조 할 수 있었다.

식품의 색은 관능적 품질에 중요한 영향을 미치는 요인 중 하나라, 피부 백삼을 초기시료로 하여 9번의 증숙과 건조공정을 반복하면서 색도를 측정해 본 결과는 Fig. 3과 같다. 밝기를 나타내는 L값은 가공전 80.46이었고, 가공처리 3회 증숙처리 시까지는 각각 51.52, 45.46, 36.92로 급격한 감소를 보이다가 4회 증숙처리 부터 최종 9회 증숙처리 까지는 34.56,

Table 1. Change of ginseng Hue value according to steaming times.

	Steaming times*									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hue value(°)**	75.4±0.4	63.1±1.1	59.4±2.3	53.7±1.7	52.2±1.2	54.8±1.1	54.2±1.2	50.8±1.5	51.4±1.7	50.1±1.3

*0~9: steam and dry-processing times, **Hue value (°) = [Tan⁻¹(b/a 2π)]/360, Red = 0, Yellow = 90, Green (Lime) = 180, Blue = 270

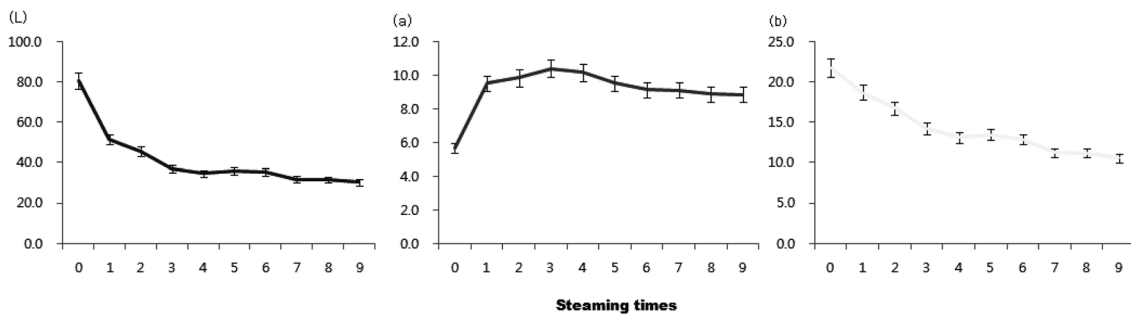


Fig. 3. Change of ginseng color according to steaming times (L (lightness), a (redness) and b (yellowness)).

35.78, 35.19, 31.77, 31.57, 30.39로 증숙처리 횟수의 증가에 따라 서서히 감소하였다. 적색도를 나타내는 a값은 증숙 전 5.66이었으나, 1회 처리부터 3회 처리까지 각각 9.50, 9.82, 10.38로 증가하다가, 이후 4회 처리 후 부터는 10.14, 9.50, 9.13, 9.11, 8.86, 8.83으로 처리 횟수가 증가함에 따라 조금씩 감소하는 경향이였다. 황색도를 나타내는 b값은 증숙 전 21.74이었으며, 1회처리시 21.74에서 9회처리시 10.57로 증숙처리 횟수 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이는 Hong 등 (2007) 에서 흑삼의 분말 시료 색도를 측정 한 것과 비교한 결과 L값은 비슷한 경향을 보였으나 a,b값에서는 다른 경향을 보였다.

Table 1과 같이 증숙처리에 따른 Hue값은 가공 전에는 75.4°이었으나, 증숙처리 1회 시에는 63.1°로 급격한 감소를 보였으며, 2회 증숙처리 부터 4회 증숙처리 시까지는 증숙처리 횟수에 따라 59.4, 53.7, 52.2°로 감소하였으나, 5회처리 이후부터 9회 처리까지는 각각 54.25, 54.15, 50.76, 51.41, 50.09°로 약간 감소하는 경향이였다.

3. 조사포닌 (crude saponin) 함량 비교

가공삼의 증숙 처리 횟수에 따른 조사포닌 함량변화는 Table 2과 같다. 가공 전의 피부직삼은 평균 6.0%이었고, 증숙 횟수 증가에 따라 1회 처리 시 5.8%에서 9회 증숙 처리 시에는 5.7%로 조사포닌 함량의 큰 변화를 볼 수 없었다. 또한 인삼의 크기별 조사포닌 함량의 차이는 보이지 않았다. 인삼 산업법의 인삼성분함량기준 (n-부탄올추출물 : 조사포닌)은 본삼류 2.0%, 대미, 중미류, 분쇄인삼 3%, 세미류 5% 이상으로 정하고 있다. 따라서 제조된 가공인삼 (흑삼)의 조사포닌 함량은 국내 인삼 산업법의 성분 기준에 적합하게 나타났다.

4. 가공삼의 Ginsenosides 함량 비교

수삼의 개체 크기 간 및 증숙공정에 따른 주요 ginsenoside 함량의 변화는 Table 3와 같다. 증숙처리 전 피부직삼의 total ginsenoside 함량이 평균 22.87 g/mg 인 피부직삼을 1, 3회의 증숙과 건조 공정을 거침에 따라 각각 21.75, 19.54 mg/g으로

점차 감소하며 유의차를 보였으나. 5, 7, 9회의 증숙/건조시에는 19.58, 19.66, 19.13 mg/g으로 total ginsenoside 함량은 유의차를 보이지 않았다. PPD계 ginsenoside인 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd는 가공 전 각각의 평균함량은 7.08, 4.05, 2.55, 1.38 mg/g을 나타내었으나, 구증구포 후 2.23, 1.06, 1.02, 0.51 g/mg으로 증숙처리를 거치면서 유의차를 보이며 급격하게 감소하는 경향이였다. 증숙처리 전 PPT계 ginsenoside로 알려진 Re, Rg₁의 평균함량은 2.76, 3.41 mg/g을 나타내었으나, 구증구포 후에는 거의 검출되지 않는 것을 볼 수 있다. 반면 20(S)-Rh₁, 20(S)-Rg₃, 20(R)-Rg₃, Rk₁은 증숙 처리 이전 피부직삼에서는 함량이 극히 미량이거나 존재 하지 않았으나, 증포횟수 증가에 따라 증가하여 구증구포 후에는 각각 1.51, 4.36, 3.84, 4.07 mg/g으로 유의차를 보이며 높은 함량을 나타내었다. 이는 흑삼제조 시 증숙공정을 거치는 동안 protopanaxadiol (PPD)계 ginsenoside인 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd와 protopanaxtriol (PPT)계 ginsenoside인 Rg₁과 Re이 열에 의해 특정부위의 당이 떨어져 나가면서 구조적 변환에 의해 prosapogenin인 Rg₃, Rk₁, Rh₁의 함량증가가 현저하게 나타나는 것을 볼 수 있다.

한편 인삼과 홍삼의 기능성 지표성분인 ginsenoside Rg₁과 Rb₁의 함량은 증숙처리 전 피부직삼의 경우 각각 3.41 mg/g, 7.08 mg/g이었으며, 구증구포 후 함량은 각각 0 mg/g, 2.23 mg/g (불검출)을 나타내었다. 현재 건강기능식품으로서 인삼/홍삼의 원료제조기준은 Rg₁과 Rb₁의 함량을 합하여 0.8~34 mg/g으로 규정하고 있어 구증구포한 흑삼의 경우도 이 기준에 적합한 것으로 보였다. 그러나 의약품으로 인삼·홍삼의 대한약전의 지표성분 규격기준은 ginsenoside Rg₁ 0.1% 이상, Rb₁ 0.2% 이상으로 되어 있어 5회 이상의 증숙/건조의 경우 이 규격기준에 Rg₁과 Rb₁의 함량이 미치지 못한 것으로 나타났다.

Table 3에서처럼 인삼을 크기별로 대, 중, 소로 나누어 진세노사이드 함량을 비교한 결과 크기별 뚜렷한 경향을 보이지 않았다. 이러한 결과는 주근의 직경이 작아지면 총 진세노사이드 및 개별 진세노사이드 (Rb₁, Rb₂, Rc, Rg₁, Re 등)의 함량이 증가한다는 보고 (Li et al., 2009)와는 일치하지 않았다.

인삼의 ginsenosides는 그 화학구조에 따라 크게 PPD계 사

Table 2. Change of Crude saponin contents according to steaming times in 6-year-old ginseng.

Size*	Crude saponin (%)					
	0**	1	3	5	7	9
L	6.03	6.01	5.43	6.09	5.30	5.54
M	5.89	5.62	5.16	5.82	5.63	5.83
S	6.08	5.81	5.26	5.95	5.51	5.75
Mean±S.D***	6.00±0.05a	5.82±0.1ab	5.28±0.07c	5.95±0.07a	5.48±0.09bc	5.71±0.08abc****

* L, M, S : Content of ginsenosides in different root size, root weight average 29.4 g (L), 19.5 g (M), 7.6 g (S).

** 0~9 : Steam and dry-processing times.

*** All values are mean ±S.D of three replication.

**** a~c : Different superscripts are significantly different within each row by Duncan's multiple range test at p < 0.05.

Table 3. Change of ginsenosides according to steaming times in 6-year-old ginseng.

Times*	Size**	Ginsenoside(mg/g)											
		Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf	Rg ₁	Rh _{1-s}	Rg _{3-s}	Rg _{3-r}	Rk ₁	Total
0	S	6.98	4.01	2.54	1.32	2.78	1.32	3.43	0.23	0.00	0.00	0.00	22.61
	M	7.04	4.02	2.65	1.27	2.65	1.54	3.27	0.19	0.00	0.00	0.00	22.63
	L	7.21	4.12	2.45	1.54	2.84	1.48	3.53	0.21	0.00	0.00	0.00	23.38
Mean±S.D***		7.08±0a****	4.05±0.03a	2.55±0.05a	1.38±0.7a	2.76±0.5a	1.45±0.6a	3.41±0.7a	0.21±0.01d	0.00f	0.00f	0.00e	22.87±0.07a
1	S	6.87	3.87	2.21	1.31	2.13	1.31	3.02	0.24	0.21	0.17	0.20	21.54
	M	7.01	3.99	2.30	1.19	2.04	1.48	3.12	0.23	0.26	0.21	0.16	21.99
	L	7.18	4.01	2.09	1.04	1.97	1.43	2.98	0.34	0.27	0.24	0.18	21.73
Mean±S.D		7.02±0.08a	3.96±0.04a	2.2±0.06b	1.18±0.07ab	2.05±0.04b	1.41±0.05a	3.04±0.04b	0.27±0.03cd	0.25±0.02e	0.21±0.02e	0.18±0.01e	21.75±0.12b
3	S	6.03	3.02	1.99	1.13	1.03	1.23	1.32	0.41	1.23	1.08	1.24	19.71
	M	6.11	3.12	1.91	1.03	0.86	1.16	1.05	0.39	1.32	1.20	1.30	19.45
	L	5.97	3.14	2.12	0.94	0.78	1.04	1.12	0.43	1.38	1.22	1.31	19.45
Mean±S.D		6.04±0.04b	3.09±0.03b	2.01±0.6bc	1.03±0.5bc	0.89±0.7c	1.14±0.5b	1.16±0.7c	0.41±0.01c	1.31±0.04d	1.17±0.04d	1.28±0.02d	19.54±0.8c
5	S	4.03	2.01	1.85	0.85	0.32	0.87	0.41	0.94	2.98	2.54	2.87	19.67
	M	3.97	1.98	1.78	0.84	0.41	0.96	0.54	0.88	2.77	2.56	2.70	19.39
	L	3.98	2.01	1.71	0.86	0.40	0.94	0.52	0.96	2.89	2.65	2.76	19.68
Mean±S.D		3.99±0.02c	2.00±0.01c	1.78±0.04c	0.85±0.01cd	0.38±0.03d	0.93±0.03bc	0.49±0.04d	0.93±0.02b	2.89±0.05c	2.58±0.03c	2.78±0.05c	19.58±0.08c
7	S	3.01	1.65	1.18	0.76	0.10	0.76	0.19	1.23	4.05	3.28	3.43	19.64
	M	2.98	1.45	1.21	0.77	0.08	0.69	0.18	1.45	4.00	3.27	3.33	19.41
	L	2.96	1.66	1.32	0.76	0.09	0.71	0.19	1.40	4.08	3.21	3.54	19.92
Mean±S.D		2.98±0.02d	1.59±0.06d	1.24±0.04d	0.76±0.01de	0.09±0.01e	0.72±0.02cd	0.19±0.01e	1.36±0.06a	4.04±0.02b	3.25±0.02b	3.43±0.06b	19.66±0.13c
9	S	2.34	1.01	0.99	0.54	0.00	0.54	0.00	1.43	4.23	3.76	3.99	18.83
	M	2.32	1.13	1.02	0.51	0.00	0.51	0.00	1.54	4.31	3.87	4.01	19.22
	L	2.04	1.03	1.04	0.49	0.00	0.55	0.00	1.55	4.54	3.88	4.21	19.33
Mean±S.D		2.23±0.09e	1.06±0.03e	1.02±0.02d	0.51±0.02e	0.00e	0.53±0.01d	0.00e	1.51±0.04a	4.36±0.08a	3.84±0.04a	4.07±0.06a	19.13±0.13c

*0~9 : Steam and dry-processing times.

**L, M, S : Content of ginsenosides in different root size, root weight average 29.4 g (L), 19.5 g (M), 7.6 g (S).

***All values are mean ±S.D of three replication.

****a~f : Different superscripts are significantly different within each column by Duncan's multiple range test at p < 0.05.

포닌인 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₃ 등과 protopanaxtriol (PPT) 계 사포닌인, ginsenosid-Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rh₁ 등으로 구분된다. 중추신경계에 약리작용을 보면 PPD계 사포닌은 진정작용을 나타내고 PPT계 사포닌은 완만한 흥분작용을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Nam, 1996). 더욱이 최근에는 ginsenoside의 절대함량 뿐만 아니라 각 ginsenoside의 성분 조성비 (PD/PT 비율)가 당뇨병의 유효성과 관련된 약리 효과 발현에 중요한 역할을 시사하는 연구결과가 발표되고 있어 주목을 받고 있다 (Sievenpiper JL *et al.*, 2003, 2006). 가공에 따른 흑삼의 PPD계 ginsenosides 함량과 PPT계 함량 및 PPD/PPT 비는 Fig. 4와 같다. 가공 전 PPD, PPT계 ginsenosides의 함량은 각각 15.05, 7.82 mg/g이었으나, 구증구포 후 17.09, 2.04

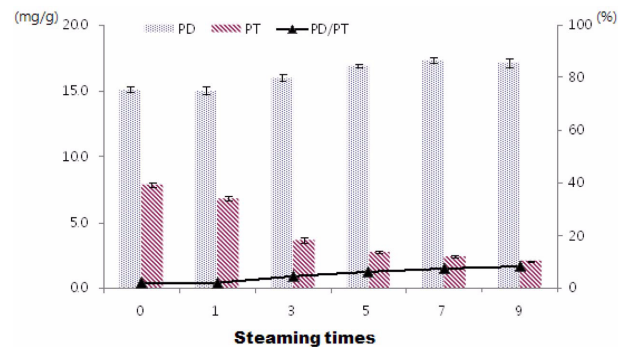


Fig. 4. Change of PD and PT, PD/PT ratio according to steaming times in 6-year-old ginseng. *PD: Rb₁ + Rb₂ + Rc + Rd + Rg₃, PT: Re + Rf + Rg₁ + Rg₂ + Rh₁.

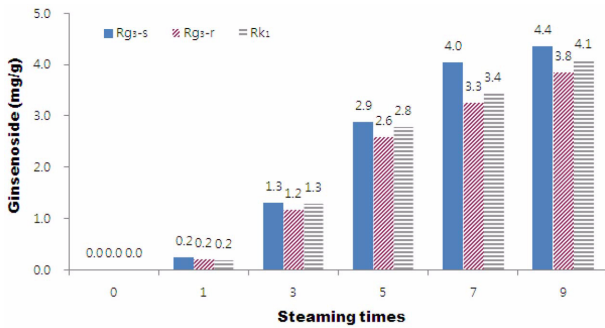


Fig. 5. Change of ginsenoside Rg₃-s, Rg₃-r, Rk₁ according to steaming times in 6-year-old ginseng.

mg/g으로 PPD계 ginsenoside는 증가 추세를 보였으며, PPT계 ginsenoside는 현저한 감소를 보였다. PD/PT 비율이 증숙 건조 처리 전에는 1.9였으나, 증숙/건조 횟수 증가에 따라 각각 2.2, 4.4, 6.2, 7.3, 8.4로 현저한 증가를 보였다. 이는 증숙 횟수의 증가에 따라 PPT계 ginsenoside Re와 Rg₁의 감소가 현저하고 상대적으로 PPD계 ginsenoside인 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd의 감소에도 불구하고, Rg₃, Rk₁의 현저한 증가로 인해서 나타난 결과로 여겨진다.

이상과 같이 가공방법에 따라 ginsenoside의 종류별 함량이 다양하게 변화하였는데, 최근 실험적 연구를 통해 흑삼에 대한 항암활성 (Kim *et al.*, 2008), 항당뇨 효과 (Kim *et al.*, 2009), 항건망증 효과 (Lee *et al.*, 2010) 등이 보고되고 있는데 주요 생리활성 성분으로서 ginsenoside Rg₃, Rk₁의 증가가 주목되었다. Rg₃는 입체이성체 (stereoisomer)가 존재하는데 열처리과정을 거치는 동안 C-20에서 glycosyl 잔기의 제거 및 수산기 (hydroxyl group)의 epimerization에 의해 그 에피머 (epimers)로 20(S)-Rg₃와 20(R)-Rg₃로 구분되며 (Nah *et al.*, 1997), 증포 횟수별 함량을 보면 Fig. 5에서와 같다. 증포 횟수 증가에 따라 Rg₃는 현저하게 증가하였는데 20(S)-Rg₃와 20(R)-Rg₃ 함량은 비슷한 수치로 증가하였으며, 특히 9회 증포한 흑삼의 ginsenoside Rg₃ (S+R) 함량은 1회 증숙한 홍삼 0.46 mg/g의 18배 높은 함량 (8.28 mg/g)을 보였다. 이러한 결과는 Lee 등 (2006)과 Sun 등 (2009)이 보고한 증숙 횟수가 증가할수록 Rg₃ 함량이 증가된다는 연구결과와 일치하였다. Rg₃의 약리활성으로 혈관신생억제를 통한 항종양효과 및 항암제 효과 상승 (Liu *et al.*, 2009), 암세포의 정상세포대로 침윤과 혈관신생의 억제를 통한 암세포 전이억제 (Mochizuki M *et al.*, 1995, Xu *et al.*, 2008), 항암제 내성 억제 (Park *et al.*, 1995), 혈관 확장 작용 (Kim, 2008), 혈액순환촉진 (Matsuda *et al.*, 2000), 혈소관 응집억제 (Kim, 2008; Samukawa *et al.*, 1992), 인슐린 분비 촉진작용 (Park *et al.*, 2008), 항비만효과 (Hwang *et al.*, 2009), 신경보호효과 (Kim *et al.* 1998; Tian *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007), 항불안

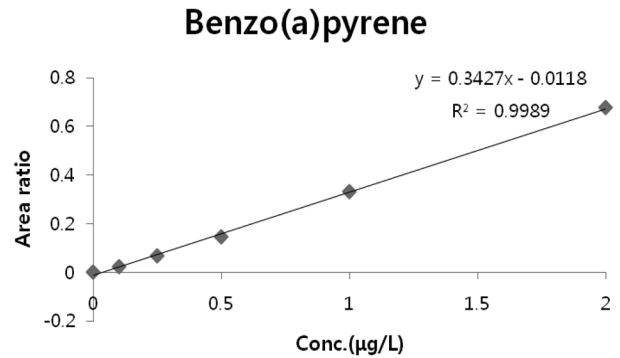


Fig. 6. Calibration curve of benzo(a)pyren.

효과 (Kim *et al.*, 2009) 등이 보고되고 있다. 또한 증포횟수 증가에 따라 함량증가가 현저한 Rk₁의 간암 세포에 대한 항종양 효과 (Kim *et al.*, 2008), 혈소관 응집억제 효과 (Lee *et al.*, 2009), 혈관 손상에 의한 내피세포의 세포사멸을 억제하는 효과 (Lee *et al.*, 2010) 등이 보고되었다.

5. 벤조피렌 분석

벤조피렌은 다환 방향족 탄화수소 화합물 (polycyclic aromatic hydrocarbons, 이하 PAHs)로써 국제암연구기관이 1급 발암물질로 규정하고 있는 물질이다. 이것은 산소가 부족한 상태에서 식품이나 유기물이 탄화될 때 생기는 tar상 물질의 구성 성분으로서 PAHs 화합물 중에서도 벤조피렌은 피부암, 폐암, 간암을 일으키는 강력한 발암물질로 보고되어 있다 (Jay *et al.*, 1984; Kulkarni and Anderson, 1984).

벤조피렌은 일반적으로 규제 농도가 매우 낮으므로 극미량 분석이 가능해야 한다. 분석법으로 HPLC-UV법이나 HPLC-FLD법을 주로 사용하였으나 이 방법은 방해물질을 구분할 수 없는 단점이 있다. 본 연구에서는 감도와 선택성에서 뛰어난 GC-MS (SIM)방법을 사용하여 흑삼의 안전성을 조사하였다. 표준물질을 사용하여 검정곡선을 작성한 결과 Fig. 6과 같이 0.1-2.0 µg/L의 농도범위에서 0.999의 좋은 직선성을 보였다.

GC-MS (SIM)방법으로 표준물질과 시료를 분석한 결과 크로마토그램 상에서 방해물질 없이 매우 낮은 농도까지 측정이 가능하였다. 표준물질 0.25 µg/L은 Fig. 7 (A)에 나타내었고, 검출이 되지 않은 추출물 시료의 크로마토그램은 Fig. 7 (B)에 나타내었으며, 0.04 µg/kg로 검출된 시료의 크로마토그램은 Fig. 7 (C)와 같다. 시료 중에서 검출된 농도는 한국의 식의약청이 요구하는 검출한계 0.1 µg/kg보다 낮은 농도로 방해 피크없이 깨끗한 피크를 보이고 있다.

이 연구에 사용한 시험방법의 검출한계 (limit of detection, LOD)는 벤조피렌이 검출되지 않는 흑삼 5개의 시료에 0.01 µg/kg이 되도록 첨가한 다음 평균과 표준편차를 구하여 표준

흑삼 제조과정 중 증포 횟수에 따른 색상 및 진세노 사이드 함량 변화

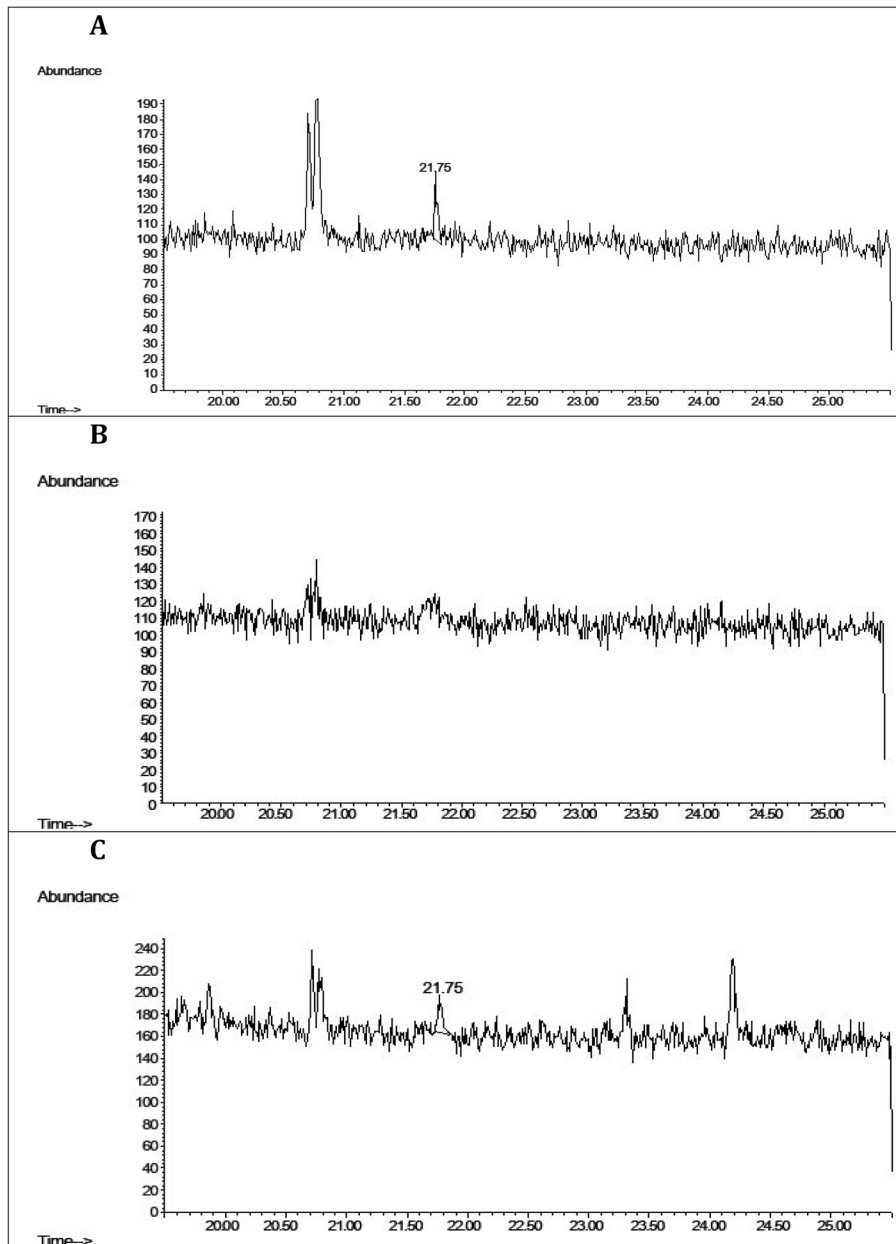


Fig. 7. Chromatograms of 0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ standard solution (A), sample 1 extract and sample 2 extract.

편차에 3.14를 곱한 값으로 계산하였고 정량한계 (limit of quantitation, LOQ)는 위의 표준편차에 10을 곱한 값으로 계산하였다. 그 결과 검출한계는 0.003 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 정량한계는 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다.

본 연구에서 사용된 흑삼의 안전성을 확인하기 위하여 벤조피렌 분석 결과 구증구포 과정 중 증포 횟수가 많은 8중8포에서 0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 9중9포에서 0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 나타내었다. 우리나라에서는 벤조피렌의 허용 함량은 생약재로서 숙지황의 벤조피렌

함량 기준은 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하로 규정하고 있다 (식품공전, 2010). 또한 식품공전 (2010)에는 올리브유, 식용유, 참기름, 들기름, 대두유, 옥수수유등의 식물 유지류에서 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하로 규정하고 있고, 영·유아용 곡류 조제식 등의 경우에도 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하로 설정하고 있다. 따라서 본 실험방법에 의해 제조된 흑삼은 벤조피렌 함량이 이들 생약재 및 식품기준보다 매우 낮아 안전한 식품 소재로 사료된다.

이상의 결과로 보아 무압식 증삼기를 통해 제조된 가공삼은

증포횟수 증가에 따라 담흑갈색 또는 흑다갈색을 띠게 되고 ginsenosides의 성분조성 변화가 일어나고, 특히 다양한 약리활성을 발현하는 Rg₃와 Rk₁ 등의 함량이 증가하여 기존의 홍삼과는 차별성 있는 식품소재로 사용될 수 있고, 아울러 본 실험결과들은 금후 흑삼의 지표 성분 및 품질기준 설정을 위한 기초 자료로 활용될 수 있으리라 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2011년 농촌진흥청 특화작목연구개발과제 2011-0330의 지원으로 수행된 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Choi JE, Nam KY, Li XG, Kim BY, Cho HS and Hwang KB.** (2010). Changes of chemical compositions and ginsenoside contents of different root parts of ginsengs with processing method. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:118-125.
- Han ST, Whang WK, Kim IH, Yang BW, Cho SH and Ko SK.** (2005). Analysis of ginsenosides of black ginseng. *Yakhak Hoeji*. 49:490-494.
- Hong HD, Kim YC, Rho JH, Kim KT and Lee YC.** (2007). Changes on physiological properties of *Panax ginseng* C. A. Meyer during repeated steaming process. *Journal of Ginseng Research*. 31:221-229.
- Hwang JT, Lee MS, Kim HJ, Sung MJ, Kim HY, Kim MS and Kwon DY.** (2009). Antiobesity effect of ginsenoside Rg₃ involves the AMPK and PPAR- γ signal pathways. *Phytotherapy Research*. 23:262-266.
- Jay HL, William JB, Franco B, Robert F, Charles RG, Michael K, Dietrich S and Giuseppe V.** (1984). Patterns of lung cancer risk according to type of cigarette smoked. *International Journal of Cancer*. 33:569-576.
- Jo EJ, Kang SJ and Kim AJ.** (2009). Effects of steam- and dry-processing temperatures on the benzo(a)pyrene content of black and red ginseng. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 22:199-204
- Kim EK, Lee JH, Cho SH, Shen GN, Jin LG, Myung CS, Oh HJ, Kim DH, Yun JD, Roh SS, Park YJ, Seo YB and Song GY.** (2008). Preparation of black *Panax ginseng* by new methods and its antitumor activity. *Journal of Korean Herbology*. 23:85-92.
- Kim HJ, Lee JY, You BR, Kim HR, Choi JE, Nam KY, Moon BD and Kim MR.** (2011). Antioxidant activities of ethanol extracts from black ginseng prepared by steaming-drying cycles. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 40:156-162.
- Kim JH, Cho SY, Lee JH, Jeong SM, Yoon IS, Lee BH, Lee JH, Pyo MK, Lee SM, Chung JM, Kim S, Rhim H, Oh JW and Nah SY.** (2007). Neuroprotective effects of ginsenoside Rg₃ against homocysteine-induced excitotoxicity in rat hippocampus. *Brain Research*. 1136:190-199.
- Kim ND.** (2008). Ginsenosides-mediated vascular relaxation and its molecular mechanisms. *Journal of Ginseng Research*. 32:89-98.
- Kim SN and Kang SJ.** (2009). Effect of black ginseng (9 times-steaming ginsengs) on hypoglycemic action and changes in the composition of ginsenosides on the steaming process. *Journal of Korea Food Science Technology*. 41:77-81.
- Kim TW, Choi HJ, Kim NJ and Kim DH.** (2009). Anxiolytic-like effects of ginsenosides Rg₃ and Rh₂ from red ginseng in the elevated plus-maze model. *Planta Medica*. 75:836-839.
- Kim YC, Hong HD, Rho JH, Cho CW, Rhee YK and Yim JH.** (2007). Changes of phenolic acid contents and radical scavenging activities of ginseng according to steaming times. *Journal of Ginseng Research*. 31:230-236.
- Kim YC, Kim SR, Markelonis GJ and Oh TH.** (1998). Ginsenosides Rb₁ and Rg₃ protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research*. 53:426-432.
- Kim YJ, Kwon HC, Ko H, Park JH, Kim HY, Yoo JH and Yang HO.** (2008). Anti-tumor activity of the ginsenoside Rk₁ in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 31:826-830.
- Kitagawa I, Taniyama T, Shibuya H, Noda T and Yoshikawa M.** (1987). Chemical studies on crude drug processing. V. on the constituents of ginseng radix rubra (2): Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku Zasshi*. 107:495-505.
- KFDA.** (2010). Korean Food Standard Codex. Korea Food and Drug Administration. 10:48-51.
- Kulkarmi MC and Anderson MW.** (1984). Persistence of benzo(a)pyrene metabolite: DNA adducts in lung and liver of mice. *Cancer Research*. 44:97-101.
- Lee JG, Lee YY, Kim SY, Pyo JS, Yun-Choi HS and Park JH.** (2009). Anti-tumor activity of the ginsenoside Rk₁ in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis. *Pharmazie*. 64:602-604.
- Lee JH, Shen GN, Kim EK, Shin HJ, Myung CS, Oh HJ, Kim DH, Roh SS, Cho W, Seo YB, Park YJ, Kang CW and Song GY.** (2006). Preparation of black ginseng and its antitumor activity. *Journal of Korean Oriental Physiology and Pathology*. 20:951-956.
- Lee MR, Yun BS, Liu L, Zhang DL, Wang Z, Wang CL, Gu LJ, Wang CY, Mo EK and Sung CK.** (2010). Effect of black ginseng on memory improvement in the amnesic mice induced by scopolamine. *Journal of Ginseng Research*. 34:51-58.
- Lee SJ, Maharjan S, Kim KJ, Kim NJ, Choi HJ, Kwon YG and Suh YG.** (2010). Cholesterol-derived novel anti-apoptotic agents on the structural basis of ginsenoside Rk₁. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20:7102-7105.
- Lee SR, Yon JM, Kim MR, Baek IJ, Park CG, Lee BJ, Yun YW and Nam SY.** (2007). Effect of black ginseng against ethanol-induced embryotoxicity in mice. *Food Industry and Nutrition*. 12:5-6.
- Lee X, Kang SJ, Han JS, Kim JS and Choi JE.** (2010). Comparison of growth increment and ginsenoside content in different parts of ginseng cultivated by direct seedling and transplanting. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*.

- 18:70-73.
- Liu TG, Huang Y, Cui DD, Huang XB, Mao SH, Ji LL, Song HB and Yi C.** (2009). Inhibitory effect of ginsenoside Rg₃ combined with gemcitabine on angiogenesis and growth of lung cancer in mice. *Biomed Central Cancer*. 9:1471-2407.
- Matsuda H, Kubo T and Kubo M.** (2000). Chemical changes of ginsenoside -Rb₁ in stomach and improving effects of its product, 20(S)-ginsenoside-Rg₃ on a peripheral circulation disorder. *The Ginseng Review*. 28:12-15.
- Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sata K, Saiki I, Tono-Oka S, Samukawa K and Azuma I.** (1995). Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb₂, 20 (R)-, and 20 (S)-ginsenoside-Rg₃, of red ginseng. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 18:1197-1202.
- Nah SY, Unteutsch A, Bunzow JR, Cook SP, Beacham DW and Grandy DK.** (1997). Mu and delta opioids but not kappa opioid inhibit voltage-activated Ba²⁺ currents in neuronal F-11 cell. *Brain Research*. 766:66-71.
- Nam KY.** (1996). *Choishin korea insam(Component and Efficacy)*. Chonil Press. Daejeon, Korea. p.13-57.
- Nam KY.** (2005). The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs processed ginsengs. *Journal of Ginseng Research*. 29:1-18.
- Park JD and Kim DS.** (1996). Effects of ginseng saponin on modulation of multidrug resistance. *Archives of Pharmacal Research*. 19:213-218.
- Park MW, Ha JH and Chung SH.** (2008). 20(S)-ginsenoside Rg₃ enhances glucose-stimulated insulin secretion and activates AMPK. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 31:748-751.
- Samukawa K, Matsuda H and Kubo M.** (1992). Inhibition of thrombocyte aggregation of red ginseng. -effects of ginsenosides on pulmonary thromboembolism. *The Ginseng Review*. 14:57-61.
- Sievenpiper JL, Arnason JT, Leiter LA and Vuksan V.** (2003). Variable effects of American ginseng: a batch of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) with a depressed ginsenoside profile does not affect postprandial glycemia. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57:243-248.
- Sievenpiper JL, Sung MK, Buono MD, Lee KS, Nam KY, Arnason JT, Leiter LA and Vuksan V.** (2006). Korean red ginseng rootlets decrease acute postprandial glycemia: results from sequential preparation- and dose-finding studies. *Journal of the American College of Nutrition*. 25:100-107.
- Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, Yang CY, Wang Z and Sung CK.** (2009). Determination of 11 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by high performance liquid chromatography. *Food Science and Biotechnology*. 18:561-564.
- Tachikawa E, Kudo K, Nunokawa M, Kashimoto T, Takahashi E and Kitagawa S.** (2001). Characterization of ginseng saponin ginsenoside-Rg₃ inhibition of catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochemical Pharmacology*. 62:943-951.
- Tian J, Fu F, Geng M, Jiang Y, Yang J, Jiang W, Wang C and Liu K.** (2005). Neuroprotective effect of 20(S)-ginsenoside Rg₃ on cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Letter*. 374:92-97.
- Xu TM, Cui MH, Xin Y, Gu LP, Jiang X, Su MM, Wang DD and Wang WJ.** (2008). Inhibitory effect of ginsenoside Rg₃ on ovarian cancer metastasis. *Chinese Medical Journal*. 121:1394-1397.