

홍삼으로부터 분리한 수용성 갈변물질의 구조 특성

이종원 · 고태룡* · 심기환**

한국인삼연초연구원, *생명공학연구소, **경상대학교

Structural Characteristics of the Water Soluble Browning Reaction Products Isolated from Korean Red Ginseng

Jong-Won Lee, Hack-Ryong Ko* and Ki-Hwan Shim**

Korean Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

*Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, Taejon 306-600, Korea

**Gyeongsang National University, Chinju, 600-701, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate the structural characteristics of water soluble browning reaction products (WS-BRPs) isolated from Korean red ginseng. They all showed the maximum absorbances at near 280 nm. Their IR spectra suggested the presence of hydroxyl, amide carbonyl and aliphatic methine groups. From sugar analysis it was identified that L and S-1 contained two kinds of sugar, glucose and xylose, and S-2, a fructose together with glucose and xylose. Thirteen different amino acids were identified in L. Ten amino acids from S-1 and seven amino acids from S-2 were identified using Auto Amino Acid Analyzer. Glycine, serine and glutamic acid in S-1 and one unknown amino acid and glycine in S-2 were detected as the major amino acids, respectively.

From the ^1H - and ^{13}C -NMR spectra, it was identified that a number of sugar moieties, carbonyl and carbon double bonds (only in S-2) were contained in the three WS-BRP components. Approximate number of sugar moiety of L, S-1 and S-2 was determined to be 8~10, 9~11 and 4~5, respectively. Contents of nitrogen, carbon and hydrogen showed $\text{L} > \text{S-1} > \text{S-2}$.

Key words : *Panax ginseng*, browning reaction, water soluble browning products, melanoidin, brown pigment.

서론

갈색화반응은 식품을 가공 또는 저장하는 과정에서 일어나는 식품의 색깔이 점차 갈색 내지는 암갈색을 갖게 되는 여러가지 복잡한 반응들을 말하며, 이 반응의 진행정도는 가공정도에 따라 색깔을 통해서 이들 식품의 품질에 직접적으로 간접적으로 큰 영향을 준다¹⁾. 갈변물질들은 항산화작용^{2~5)}, 항돌연변이원성⁶⁾ 및 노화억제작용⁸⁾에도 큰 영향을 준다고 보고하고 있다.

한편 홍삼의 갈변반응과 관련된 연구는 많이 이루어졌지만^{9~11)}, 갈변물질 분리, 구조 등에 대해서는 연

구된 바 없다. 전보에서^{12,13)} 이미 홍삼의 갈색화 반응이 초기에는 효소적 갈색화반응, 증삼후에는 비효소적 갈색화반응이 관련된 복합적 반응에 의해 이루어지며 홍삼의 갈변물질은 대부분이 수용성 물질임을 밝혔고, 또한 홍삼분말을 물로 추출한 뒤, 투석, 알콜 침전, gel filtration 등의 방법에 의해 홍삼의 갈변색소는 저분자, 고분자 갈변물질이 존재하고 있음을 밝힌 바 있다.

본 연구에서는 고려홍삼에서 분리한 수용성 갈변물질을 재분리하여, UV-spectrum, IR-spectrum, 당 성분, 아미노산 조성, NMR-spectrum 및 원소 조성 등을 분석하여 결과를 보고한다.

Corresponding author : Jong-Won Lee

재료 및 방법

1. 시료 제조

홍삼 100 g에 10배 가량의 증류수를 가한 후 4℃에서 24시간씩 3회 추출하고, 4℃에서 원심분리(8,000rpm, 20분)하여 얻은 상정액에 n-BuOH를 첨가한 후 진탕하면서 실온에서 3회 추출하여 지용성 물질과 사포닌류를 n-BuOH층으로 이행시켜 제거하였다. 이렇게 제거된 수용성 갈변물질 분획에 55% 에탄올을 가하여 침전물을 제거한 후 (Spectra, M. W. Cut-off 3,500) 투석막으로 4℃에서 1일씩 3회 투석하여 투석내액(L)과 투석외액으로 나누었다^{12, 13)}.

투석외액의 갈변물질을 분리하기 위하여 Bio-Gel P-2로 겔크로마토그래피한 후 2개의 주 피크를 동결 건조한 후 다시 Bio-Gel P-2로 겔크로마토그래피하여 단일 피크의 갈변물질 분획을 얻었다. 먼저 추출되는 갈변물질 분획을 S-1, 그 다음에 유출되는 갈변물질 분획을 S-2로 명명한 후 기기분석 시료로 사용하였다.

2. UV-Spectrum

고려홍삼으로부터 분리한 수용성 갈변물질 분획 L, S-1 및 S-2를 증류수에 용해시킨 다음 흡광도를 UV/visible spectrophotometer(Hewlett Packard, 8452A, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. IR-Spectrum

KBr 20%와 수용성 갈변물질 분획 L, S-1 및 S-2를 혼합하여 유발에 마쇄하여 KBr pellet으로 제조한 다음 FT-IR(Lase Precision Analytical IFX-65S)로 흡수 spectrum을 측정하였다.

4. 당류분석

수용성 갈변물질 분획 L, S-1 및 S-2를 일정량 취하여 5% HCl/MeOH : H₂O(1:1)를 혼합하여 70℃에서 2시간 정도 환류냉각시킨 후 녹색이 될 때까지 Ag₂CO₃를 첨가하여 여과한 후 농축하여 HPLC¹⁴⁾로 분리, 확인하였다. 수용성 갈변물질의 당류 분석 기기는 HPLC(Alytical HPLC/ALC-244)로 column은 Lichrosorb NH₂(Merck Co., 10μm, 4mm I.D X 250mm), mobile phase는 acetonitrile : distilled water(88:12%), flow rate는 1.0ml/min, detector는 RI-401로 하여 사용

하였다.

5. 아미노산 분석

수용성 갈변물질 분획 L, S-1 및 S-2를 일정량 취하여 앰플에 넣은 후 6N HCl 2ml를 가하여 질소로 공기를 제거하여 진공상태에서 밀봉한 후 110℃에서 22시간 가수분해한 후 감압농축하여 pH 2.2의 Wasit르산 완충용액 3ml를 가하여 용해, 여과(milipore filter 0.20 m)하고, 여액 1ml를 취하여 Sep pak C18로 처리하여 아미노산 자동분석기(Parmacia LKB 4150)¹⁵⁾로 분석하였다.

6. NMR-Spectrum

수용성 갈변물질 분획 L, S-1 및 S-2를 water-d₂ (D₂O) 1ml에 용해시킨 다음 여과하면서 NMR용 튜브에 넣고 Buker AR×400(400MHz)의 자기장에서 ¹H, ¹³C nuclear magnetic resonance(NMR)를 사용하여 분석하였다. 화학적 이동은 내부 표준 물질로 tetramethylsilane(TMS)을 사용하여 ppm 단위로 나타내었다.

7. 갈변물질의 원소조성

수용성 갈변물질 분획 L, S-1 및 S-2의 C, H, O는 자동원소 분석기(Carlo Erba EA-1106R, U.S.A.)로 분석하였다. 분석조건은 carrier gas로서 헬륨은 180ml/min, 산소는 7.0ml/min, 대기압은 764.5mmHg, combustion 온도는 80℃, reduction 온도는 500℃, detector 온도는 55℃, bridge current는 각각 C:65mA, H:65mA 및 N:110mA였다.

결과 및 고찰

1. 갈변물질 분리

고려홍삼(양삼 30지)을 전처리한 후 투석하여 투석내액(L)과 투석외액으로 분리하였다. 투석외액의 갈변물질 분획은 Bio-Gel P-2 column chromatography에 분리, 재분리 한(S-1, S-2) 물질은 Fig. 1과 같다.

2. UV spectrum

미갈색 분말의 수용성 갈변물질인 L, S-1 및 S-2를 순수한 물에 녹여 UV scanning한 결과 280nm 부근에서 최대 흡수를 나타내었다. 이런 결과는 아미노산과 당의 반응으로 형성된 갈변물질인 melanoid-

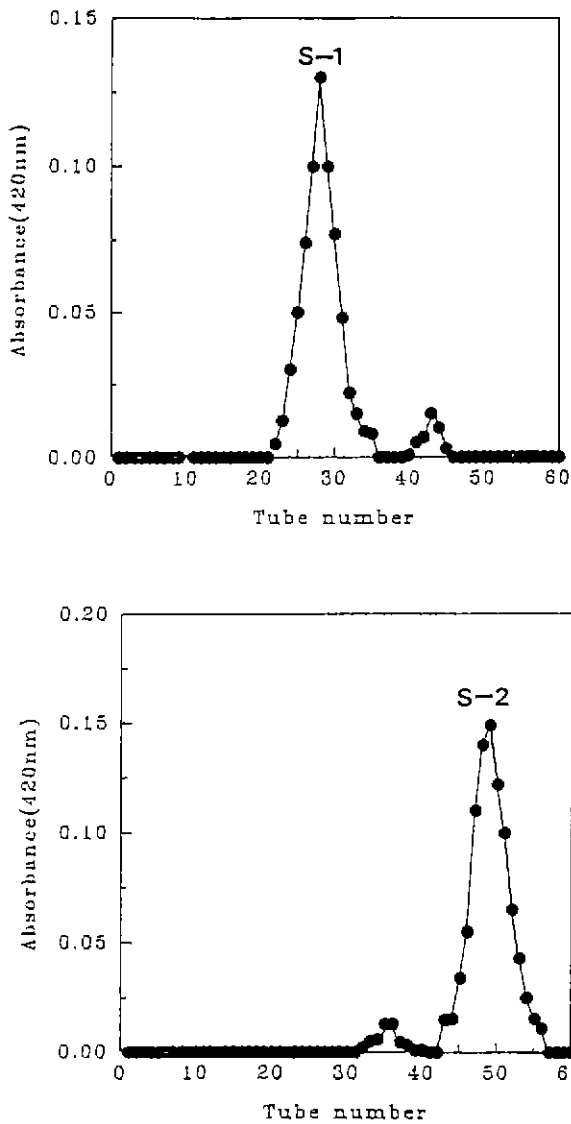


Fig. 1. Bio-Gel P-2 recolumn chromatography of the dialysis-out fraction. The column(12×75cm) was eluted with distilled. 3ml per tube was collected at a flow rate of 12ml/hr.

ins에서 나타나는 spectrum과 유사하였다.

3. IR spectrum

IR spectrum은 Fig. 3과 같이 3370cm⁻¹ 부근에서 L, S-1 및 S-2 세 시료 모두 -OH, amide 및 NH의 broad한 흡수대를 2,950cm⁻¹ 부근에서 지방족 CH의 흡수대를 보였고, L과 S-1의 경우 1,630cm⁻¹ 부근에서 amide 또는 C=O 구조의 흡수대로 여겨지는 peak가 나타났으나 S-2에서는 동일 흡수대의 peak가 없는 반면, 1,570cm⁻¹ 부근에서 C=C에 기인한 것으로 보이는 강한 흡수를 보여 차

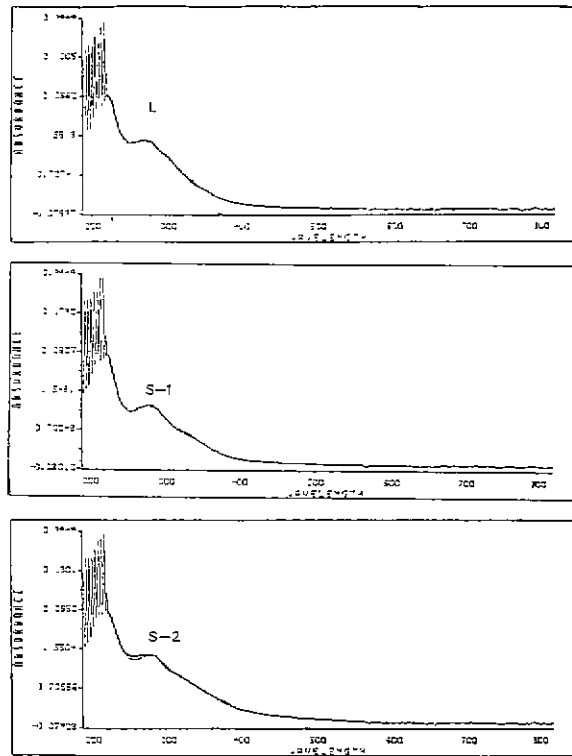


Fig. 2. FT-IR spectrum of red ginseng WS-BRPs.

이를 나타내었다. 또한, 세 시료 모두 1,410cm⁻¹ 부근에서 지방족 탄소 사슬 구조의 흡수대를 보였다. 그러나 L과 S-1은 1,000~1,080cm⁻¹ 부근에서 C-O 신축 진동으로 추정되는 강한 흡수대를 보인 반면 S-2는 약한 흡수를 나타내었다. S-2는 방향족 화합물인 페닐 또는 질소고리 화합물에 특징적인 지문 영역을 보여 주며 이들 화합물에서 발견되는 840cm⁻¹ 근처에서 강한 흡수 피크를 나타내었으나 L과 S-1은 매우 약한 흡수대를 보여 차이를 나타내었다. L과 S-1은 거의 유사한 스펙트럼을 보여주었으나 S-2에서는 다소 차이를 나타내었다. 따라서, L과 S-1은 상당히 유사한 구조이며, S-2 보다는 많은 양의 OH 및 amide carbonyl group을 가지는 것으로 추정되었다. S-2의 경우 L, S-1 보다는 관능기가 적으나 이중탄소 결합(C=C)을 다수 가지는 것으로 나타났다.

4. 당류 확인

당을 HPCC 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. L과 S-1에서는 glucose와 xylose가 검출되었고, S-2에서는 glucose와 xylose 이외에 fructose와 이동도가 거의 일치하는 피크가 확인되었다.

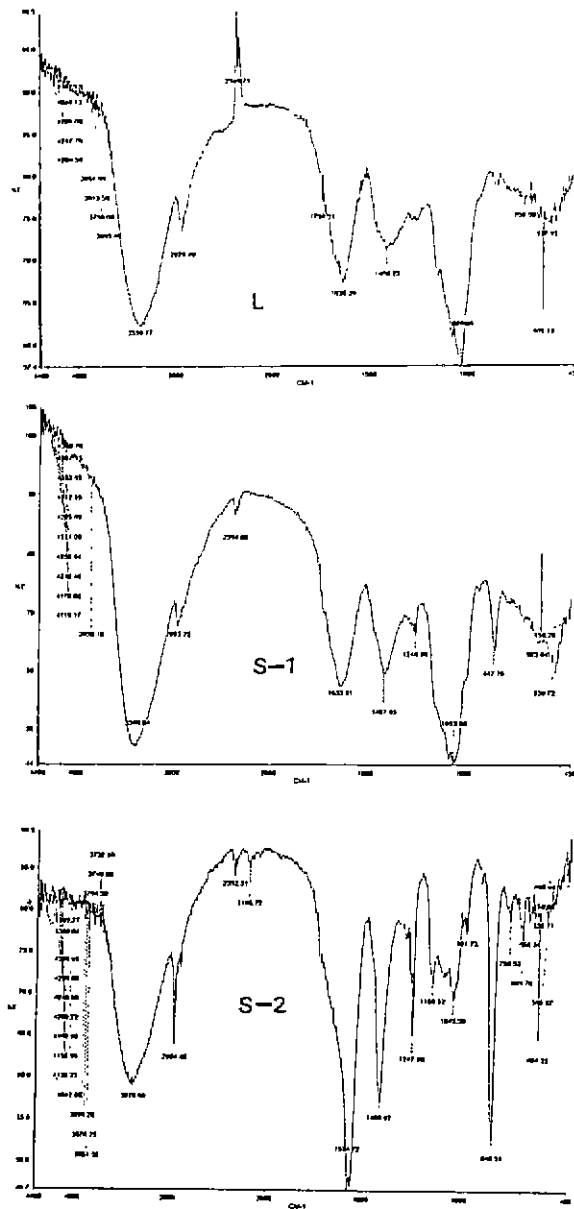


Fig. 3. FT-IR spectrum of red ginseng WS-BRPs.

5. 아미노산 조성

아미노산 조성 분석 결과는 Table 1과 같다. 즉, L의 아미노산 함량이 S-1과 S-2에 비해 훨씬 높게 나타났다. 종류도 다양하였다. L의 경우 arginine의 함량이 다른 것에 비해 월등히 높았으며 aspartic acid, glutamic acid, lysine, glycine 및 phenylalanine 등의 순으로 약 12종의 아미노산이 존재하는 것으로 나타났다. S-1은 glycine을 가장 많이 포함하고 있었으며, 그 외에 serine, aspartic acid, glutamic acid, alanine, lysine 및 arginine 등과 함께

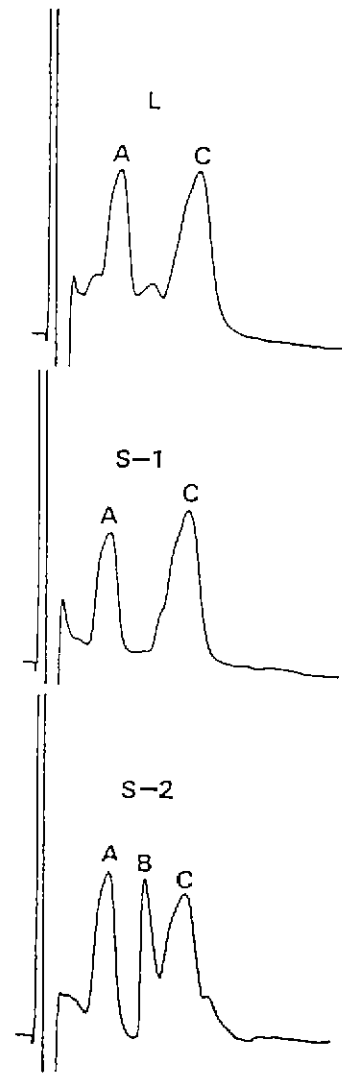


Fig. 4. HPLC for sugar analysis of red ginseng WS-BRPs. A; xylsoe, B; fructose, C; glucose.

미량의 몇몇 아미노산이 존재하였고, S-2는 phenylalanine과 histidine 사이에 존재하며 정확한 아미노산 종류의 판단이 어려운 미분석(변형) 아미노산이 가장 많은 양으로 함유하고 있었으며, 그 다음으로 glycine, serine, glutamic acid 및 aspartic acid가 존재하는 것으로 확인되었다. S-2에서 발견된 미분석 아미노산은 L에서는 나타나지 않으나 S-1에서는 동일위치에 어느 정도 양으로 확인되었다. 수용성 갈변물질인 L, S-1 및 S-2는 아미노산 종류 및 함량에서 상당한 차이를 보이며 특히 L에서 가장 높게 존재했던 arginine이 S-1에서는 미량으로, S-2에서는 거의 없는 것으로 나타나 큰 차이를 보였다. Phenylalanine과 lysine의 경우에도 arginine과 유사한

Table 1. Contents of amino acid analysis of red ginseng WS-BRPs
(Unit : mg%)

Amino acids	Contents		
	L	S-1	S-2
Aspartic acid	5.613	2.362	1.623
Threonine	1.808	—	—
Serine	2.218	3.025	2.385
Glutamic acid	4.093	2.950	2.276
Glycine	4.166	7.134	3.237
Alanine	1.701	2.340	—
Valine	1.751	—	—
Isoleucine	1.685	1.578	—
Leucine	1.266	—	—
Phenylalanine	5.150	1.245	—
Unknown	—	2.873	6.546
Histidine	1.254	—	—
Lysine	5.470	2.237	1.432
Arginine	36.104	2.305	1.258
Total	72.279	28.049	18.757

경향을 나타내었다. 일반적으로 갈변화 반응 중 pH가 산성으로 떨어질 경우 이때 염기성 아미노산의 큰 감소가 일어난다고 알려져 있으며, 본 실험에서 홍삼 갈변화 반응액의 pH가 4.57로 약산성이므로, 이들 세 가지 갈변물질의 염기성 아미노산 변화로 보아 S-2, S-1 및 L의 순으로 갈변화 반응이 더 진행된 산물로 추정되었다.

6. NMR spectrum

1) ^1H -NMR spectrum

수용성 갈변물질의 ^1H -NMR spectrum은 Fig. 5와 같다. 즉, 세 시료 모두 3.1~4.2ppm에서 sugar의 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ proton으로 추정되는 다량의 signal이 확인되었다. 또한, 1.4~2.4ppm에서 여러 개의 methyl(S-2의 경우 : 1.48ppm), methylene, methine 등의 signal이 나타났으며, 4.5~5.4ppm에서 doublet sugar anomeric proton으로 추정되는 다수의 signal들이 물 피크와 함께 존재하였다. 세 시료는 상당량의 아미노산을 포함하고 있으므로 이들의 methylene 및 methine proton들은 3.1~4.2ppm 그리고, 1.4~2.4ppm의 signal들과 중복되어 존재할 것으로 보였다. 한편, 전체적으로 L과 S-1의 spectrum은 유사하므로 두 시료의 주요 구성분자가 서로 매우 비슷하다는 것을 알 수 있었고, S-2의 경우 두께와는 다소 차이가 있고 특히 6.5ppm downstream의 signal들이 존재하였다. 이들 signal은 phenyl

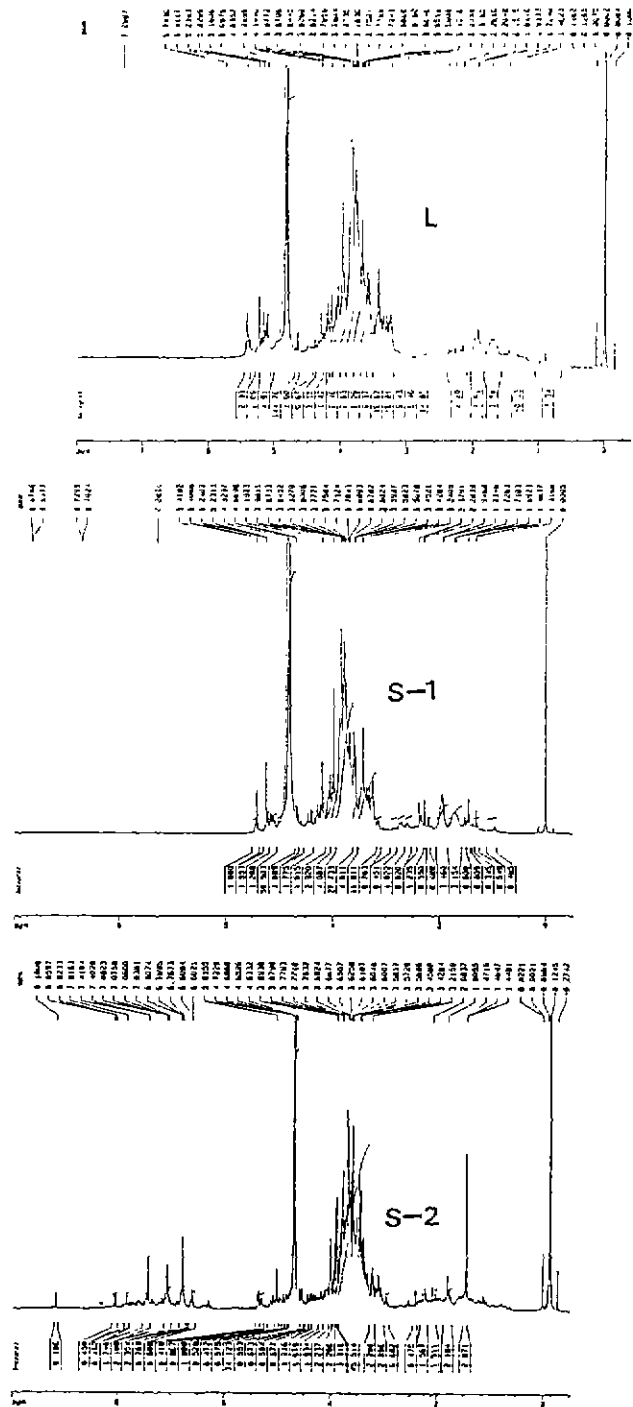


Fig. 5. ^1H -NMR spectrum of red ginseng WS-BRPs in D_2O .

ring 구조의 signal일 가능성이 높아 S-2는 L, S-1와는 달리 구성분자내에 갈변물질의 대표적인 구조 중 melanoidin의 pyrazine 구조나 그 외 aromatic ring 구조를 함유하는 것으로 추정되었다.

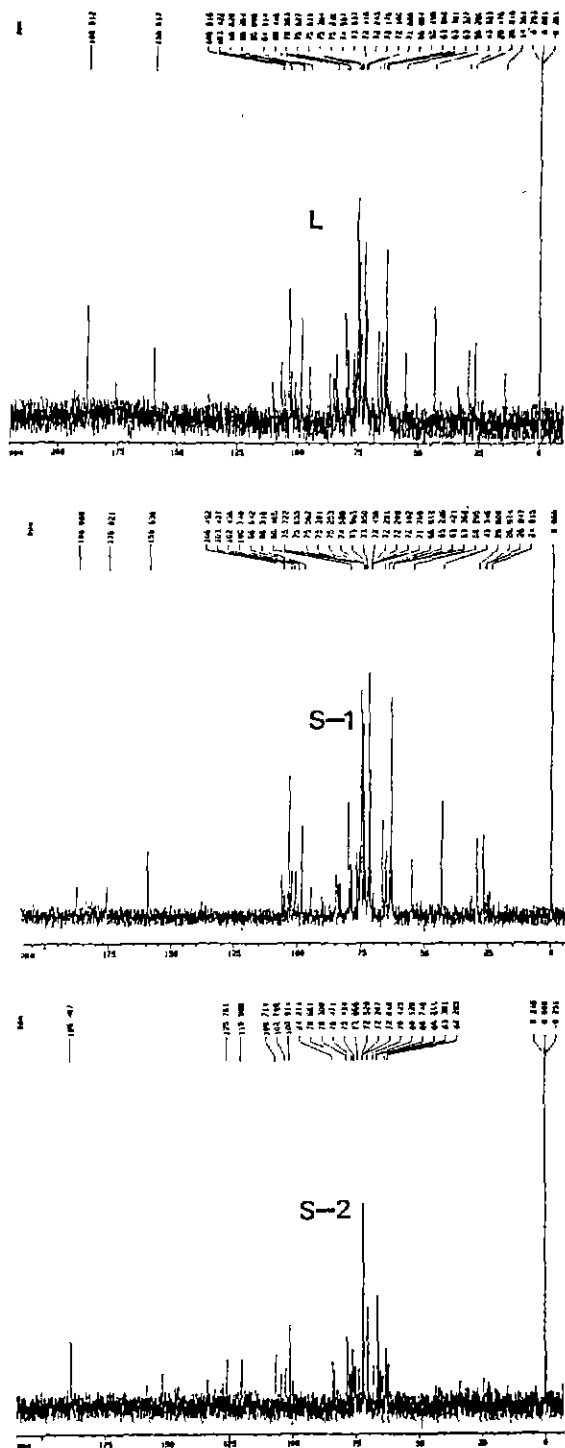


Fig. 6. ^{13}C -NMR spectrum of red ginseng WS-BRPs in D_2O .

2) ^{13}C -NMR spectrum

^{13}C -NMR spectrum의 결과는 Fig. 6과 같다. ^1H -NMR spectrum에서와 같이 ^{13}C -NMR spectrum상에서도 L과 S-1은 매우 유사하였고, S-2는 이

들과는 다소 차이가 있었다. L, S-1 및 S-2 모두 60~85ppm에서 다수의 sugar($\text{C}_2\text{~C}_6$) signal 및 아미노산으로 부터 유래된 methine carbon signal을 나타내었으며, 전체적으로 L과 S-1의 carbon signal이 S-2보다 많은 것으로 나타나 분자량에서도 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. Sugar의 anomeric carbon으로 추정되는 signal이 98~110ppm에서 나타남으로서 L은 8~10개, S-1은 9~11개, 그리고 S-2는 4~5개의 sugar를 함유하는 것으로 판단되었다.

L과 S-1은 세개의 $\text{C}=\text{O}$ 또는 $\text{C}-\text{N}$ carbon signal로 여겨지는 signal이 165~188ppm이 존재하였으나 S-2는 한 개의 $\text{C}=\text{O}$ 의 carbon signal을 가지는 것으로 판단되었다. 그러나, S-2는 L과 S-1과는 달리 125ppm 전후에서 여러 개의 방향족 탄소의 signal을 나타내어 구성분자내에 방향족 고리가 있음을 알 수 있었다. 따라서 분자량은 L, S-1 및 S-2의 순으로 크고, S-2의 경우 이중결합 또는 aromatic ring 구조의 존재로 S-2가 다른 두 개에 비해 갈변화 반응이 많이 진행된 물질로 추정된다.

7. 갈변물질의 원소 조성

수용성 갈변물질의 원소 조성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. Nitrogen은 L이 2.32%로 가장 많았고, S-2가 가장 적었다. 탄소의 경우 L은 47.61%, S-2는 27.28%이고, 수소에서 L은 7.15%, S-2 5.74%로 나타났다.

따라서 고려홍삼에서 분리한 수용성 갈변물질의 부분적 구조를 고찰하면 UV-spectrum에서는 280nm 부근에서 최대 흡수를 보였고, IR-spectrum에서 $\text{C}=\text{C}$, $-\text{OH}$, amide 및 NH 기가 나타났고, 당류에서는 xylose, fructose, glucose가 확인되었다. 또한 아미노산에서는 L의 경우 12종, S-1은 10종 및 S-2는 7종의 아미노산이 확인되었고, NMR spectrum에서는 methylene, methine, doublet sugar anomeric proton으로 추정되는 다수의 signal 등이 확인되었다. 앞으로 수용성 갈변물질이 가지고 있는 여러가지 활성에 대해서도 조사, 연구 해보고자 한다.

요 약

홍삼에서 수용성 갈변물질을 분리하여 부분적 구조 분석을 조사한 결과는 다음과 같다. L, S-1 및 S-2의 UV spectrum은 280nm에서 최대 흡수를 나타내었으며, IR spectrum에서는 hydroxyl, amide 및 지

방족 CH 등이 확인되었다. 당분석의 경우 L과 S-1에서 glucose와 xylose가 확인되었으며, S-2에서 fructose가 추가적으로 확인되었다. 아미노산 분석에서 갈변물질 L에서 13종의 아미노산, S-1에서는 10종의 아미노산 그리고 S-2에서는 7종의 아미노산이 확인되었다. ^1H 및 ^{13}C -NMR spectrum에서는 sugar moiety, carbonyl 및 탄소이중결합(S-2)이 확인되었고, L, S-1 및 S-2는 각각 8~10, 9~11 그리고 4~5개의 당을 함유하고 있는 것으로 추정되었다. 원소조성을 nitrogen, carbon 및 hydrogen 분석 결과 L>S-1>S-2순으로 나타났다.

참고문헌

1. Powrite, W.D., Wu, C.H., Rosin, M.P. and Stich, H.F. : *J. Food Sci.*, **46**, 1433 (1981).
2. Yamaguchi, N. and Fujimaki, M. : Studis on antioxidant activity of amino-carbonyl reaction product(1). *Nippon Shokumin Kogyo Gakkashi*, **21**, 13(1974).
3. Johnson, R.P., Alford, E.D. and Kinzer, G.W. : Formation of sucrose pyrolysis products. *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 22(1969).
4. Bailey, M.E. and Um, K.W. : Maillard reaction products and lipid oxidation in "Lipid oxidation on food" Angelo, A. J. St.(ed), Acs symposium series 500. *Am. Chem., Soc.*, Washington, DC., p. 122(1992).
5. 문갑순, 최홍식 : 양조간장의 항산화 작용 및 항산화성 물질에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **19**, 537(1987).
6. 김선봉, 김인수, 염동민, 박영호 : 당 분해생성물의 돌연변이원성 억제작용. *한국식품과학회지*, **20**, 119(1988).
7. Park, K.Y., Kweon, M.H., Baik, H.S. and Cheish, H.S. : Effect of L-ascorbic acid on the mutagenicity of aflatoxin B₁ in the *Salmonella* assay system. *Environ. Mutagens Carcinogens*, **8**, 13(1988).
8. Kawahima, S. : *Nagoya J. Med. Sci.*, **32**, 303(1970).
9. 김동연 : 홍삼의 갈변에 관한 연구. *한국농화학회지*, **16**, 60(1973).
10. 김상달, 도재호, 오훈일 : 고려인삼이 갈변물질의 항산화 효과. *한국농화학회지*, **24**, 161(1981).
11. 최강주, 김동훈 : 수삼추출물 및 glucose 또는 arginine 첨가 추출물의 특성과, 항산화작용에 대하여. *고려인삼학회지*, **5**, 8(1981).
12. 이종원, 이성계, 도재호, 심기환 : 고려홍삼의 수용성 갈변물질. *고려인삼학회지*, **19**, 244(1995).
13. 이종원, 이성계, 도재호, 성현순, 심기환 : 가열온도에 따른 수삼의 갈변반응 특성. *고려인삼학회지*, **19**, 249(1995).
14. 장진규 : 고속액체 chromatogrph에 의한 인삼 70% ethanol추출물의 유리당 정량. *고려대학교 석사학위논문*(1981).
15. 이종원 : 고려홍삼중 수용성 갈변물질의 이화학적 특성 및 생물활성. *경상대학교 박사학위논문*(1997).

(1998년 9월 2일 접수)