

숙성지황의 당류와 미생물에 에탄올 첨가가 미치는 영향

장귀영 · 최재훈 · 김형돈 · 서경혜 · 이승은 · 지윤정* · 강민혜 · 김동휘** · †최수지***

국립원예특작과학원 인삼특작부 농업연구사, *국립원예특작과학원 인삼특작부 전문연구원,
국립원예특작과학원 인삼특작부 농업연구관, *국립원예특작과학원 인삼특작부 보건연구관

Influence of Ethanol Addition on Sugars and Microbial Growth of *Rehmannia glutinosa* Rhizome with Aging Treatment

Gwi Yeong Jang, Je Hun Choi, Hyung Don Kim, Kyung Hye Seo, Seung Eun Lee,
Yun Jeong Jee*, Min Hye Kang, Dong Hwi Kim** and †Su Ji Choi***

Researcher, Dept. of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea

*Post-Doctor, Dept. of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea

**Senior Researcher, Dept. of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea

***Senior Researcher, Dept. of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea

Abstract

The aging treatment was applied to *Rehmannia glutinosa* rhizome (RGR) to improve the digestibility by the enzymatic hydrolysis of undigestible sugars. However, RGR spoils easily during the aging treatment. Thus, the purpose of this study was to investigate the influence of ethanol addition as preservatives on sugars and microbial growth of aged RGR. The RGR was treated with the addition of ethanol (0~10%) at 55°C for eight days. Reducing, free sugars, and total bacterial counts of RGR with ethanol concentrations were analyzed during the aging periods. The aged RGR with 0-2% ethanol appeared spoiled in appearance, and total bacterial counts of these samples increased from 1.1×10^5 to 2.2×10^7 CFU and then decreased again. When treated with 4~10% ethanol, the total bacterial counts of aged RGR decreased by more than 99.9% at eight days. In all samples, reducing and digestible sugars increased, and stachyose decreased by the aging treatment. Sucrose content was highest in the 6% ethanol sample (18.2% at six days). These results indicate that the ethanol addition can be applied to the aging treatment of the RGR for improving qualities (sweetness, digestibility, and microbial growth), and can be considered for the stable production of high quality aged RGR.

Key words: *Rehmannia glutinosa* rhizome, digestibility, ethanol, sugars, microbial growth

서 론

지황(*Rehmannia glutinosa*)은 현삼과(Scrophulariaceae) 약용작물로 국내 주요 약용작물 중 하나이다(Jeong 등 2004; MAFRA 2017). 지황은 대부분 주침, 증숙 및 건조를 반복하여 제조하는 숙지황으로 이용하고 있으며, 생지황이나 건지황으로 이용하는 양은 많지 않다(Lee 등 2002; Kim 등 2008; Lee 등 2017).

생지황의 이용에 대한 문제점은 지황에 다량 존재하는 당류에서 기인한다. 생지황의 주요 당은 stachyose와 raffinose로(Oshio 등 1981; Liu 등 1992; Ghisalberti EL 1998), 인간의 체내에 소화효소가 없는 비소화성 당류이다. 비소화성 당류의 섭취는 설사와 팽만감, 복통을 유발할 수 있어(Murphy 등 1972; Hata 등 1991), 생지황의 이용 장애요인으로 작용할 수 있다.

이전 연구에서 생지황의 소화성을 개선하기 위하여 숙성

† Corresponding author: Su Ji Choi, Senior Researcher, Dept. of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.
Tel: +82-43-871-5761, Fax: +82-43-871-5759, E-mail: suji8937@korea.kr

가공을 통하여 자체적으로 존재하는 α -galactosidase를 이용한 소화성 개선 연구가 진행되었다(Jang 등 2018). 그러나 숙성에 의한 품질 증진효과를 평가하기 위한 구체적인 당류 변화와 숙성가공 중 미생물 증식에 대한 연구가 이루어지지 않아 추가적인 연구가 필요하다.

에탄올은 식품의 부패 방지를 목적으로 활용되고 있으며, 밀폐된 공간에서의 미생물 증식 억제에 효과가 우수하여(Smith 등 1987; Vora & Shidhu 1987; Dantigny 등 2005), 부패에 취약한 숙성 공정에 적용함으로써 미생물 증식 억제 효과를 통한 안전한 숙성 가공품 제조를 기대할 수 있다.

따라서 본 연구는 숙성지황의 제조 시 나타날 수 있는 미생물에 의한 품질 저하 방지와 효율적인 숙성가공을 목적으로 에탄올 첨가량을 달리하여 숙성지황을 제조하고 품질을 평가함으로써 최적 숙성조건을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 지황 전처리 및 숙성처리 온도 설정

지황은 충북 음성군 소재의 농가에서 2018년 10월에 수확한 토강 품종을 시료로 사용하였다. 지황은 흐르는 물에 깨끗이 세척 후 상온에서 물기를 제거하고 3 cm의 길이로 절단하여 시료로 사용하였다. 절단된 지황 100 g을 유리 용기에 밀폐시켜 숙성하였다. 숙성온도는 선행연구(Jang 등 2018)를 참고하여 45, 50, 55 및 60°C에서 4시간 숙성 후 최적 온도설정을 위한 시료로 사용하였다.

2. 에탄올 첨가량별 숙성지황 제조

숙성지황의 부패방지 및 품질 증진을 위한 에탄올 첨가량을 결정하기 위하여 95% 에탄올을 지황 무게(200 g)의 0~10%(v/w)로 첨가하고 300 mL의 유리용기에 넣고 밀폐하여 55°C에서 1, 2, 4, 6 및 8일간 숙성시켰다. 숙성지황은 품질 평가를 위하여 총생균수, 환원당 및 유리당 분석에 시료로 사용하였다.

3. 총생균수 측정

에탄올 첨가량에 따른 숙성지황의 부패 가능성을 확인하기 위하여 총생균수를 측정하였다(Jang 등 2015). 에탄올 첨가량별 숙성지황은 클린벤치에서 마쇄 후 시료 대비 2배의 증류수로 상온에서 교반 후 총생균수 측정에 사용하였다. 시료는 적정 균수 범위에서 접종하기 위하여 10배 단위로 희석하였으며, 희석에는 PBS(phosphate buffered saline, SH30256, Hyclone, Logan, UT)를 사용하였다. 총생균수 측정을 위한 미생물 배양은 dry culture plate(3M Petrifilm AC, 3M Microbiology, St. Paul, MN, USA)에 희석액(1 mL) 접종 후 37°C

에서 48시간동안 배양하고, 생성된 콜로니 수를 측정하여 CFU/g으로 나타내었다.

4. 총산도 측정

에탄올 첨가량에 따른 숙성지황의 총산도는 Jeong 등(2011)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 숙성지황 추출물 5 mL를 증류수로 10배 희석하여 0.1% phenolphthalein 용액을 지시약으로 0.01 N NaOH 용액으로 종말점까지 적정하였다. 0.1 N NaOH 용액의 소비량은 acetic acid 함량으로 환산하여 나타내었다.

5. 환원당 함량 측정

에탄올 첨가량에 따른 숙성지황의 환원당 함량은 Park 등(2012)의 방법으로 측정하였다. 생지황 및 숙성지황은 마쇄하여 50% 에탄올로 상온에서 초음파 추출하고 여과하여 사용하였다. 환원당 측정에 사용한 DNS 시약은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS, Sigma-aldrich, St. louis, MO, USA) 0.5 g을 50 mL에 용해하고, 20 mL의 2 N-NaOH(Sigma-Aldrich)를 가한 후, 30 g의 potassium sodium tartrate tetrahydrate(Sigma-Aldrich)를 가하여 용해 후 증류수로 100 mL까지 정용하여 제조하였다. 환원당 함량 측정은 추출물 0.2 mL에 DNS 시약 0.4 mL를 가하여 100°C에서 5분간 가열 후 냉각시키고, 증류수 1.8 mL를 첨가하였다. 흡광도는 microplate reader(Synergy H1, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 525 nm에서 측정하였다. 검량선 작성에는 표준물질로 glucose(Sigma-Aldrich)를 사용하였으며, 환원당 함량은 건물량 기준 mg/g으로 나타내었다.

6. 유리당 함량 측정

에탄올 첨가량에 따른 숙성지황의 유리당 함량 분석에는 HPLC-ELSD(Waters alliance 2795, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 유리당 분석 조건으로 컬럼은 Luna Omega sugar column(amide polyol, Phenomenex, 150 mm×4.6 mm, 3 μ m, Torrance, CA, USA), 이동상은 75% acetonitrile/water를 사용하였으며, 유속은 1.0 mL, 시료 주입량은 10 μ L, ELSD의 spray chamber와 drift tube의 온도는 각각 40, 70°C 이었다. 표준물질로 galactose, sucrose, raffinose 및 stachyose(Sigma-Aldrich)를 사용하였다.

7. 통계분석

모든 실험은 3회 반복하였으며, 통계분석은 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Ver. 23.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 각 시료군의 평균과 표준편차를 산출하고, 처리 간 차이 유무를 one-way ANOVA(Analysis of

variation)로 분석한 후 Duncan's multiple range test(DMRT)를 이용하여 검정하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 숙성 온도에 따른 지황의 환원당 함량

이전 연구(Jang 등 2018)에서 10℃ 간격으로 비교한 숙성 조건을 5℃ 간격으로 세분화하여 최적 숙성온도를 설정하기 위한 실험 결과는 Fig. 1과 같다. 숙성온도를 달리하여 4시간 동안 숙성시킨 지황의 환원당 함량은 무처리, 45, 50, 55 및 60℃에서 각각 5.70, 6.96, 7.37, 7.90 및 6.42%로 나타나 최적 처리온도를 55℃로 결정하였다. 숙성에 따른 환원당 증가는 비환원당인 stachyose와 raffinose가 α-galactosidase에 의해 환원당인 galactose와 비환원당인 sucrose로 분해되기 때문이며, 45℃에서 55℃로 온도 상승에 따라 환원당이 증가한 후 60℃에서 다시 증가량이 감소한 것은 α-galactosidase의 최적 온도가 55℃에 가깝기 때문인 것으로 추정된다.

이전 지황의 가수분해 효소에 대한 연구에서 온도 조건에 따른 효소활성에 대한 연구에서 10℃ 간격의 실험조건에서 최적조건은 50℃인 것으로 보고된 것과 유사하다(Zhao 등 2008; Jang 등 2018). 지황에 함유된 당류 중 가장 높은 비율을 차지하는 stachyose는 2개의 galactose와 1개의 sucrose가 결합된 올리고당이며, raffinose는 sucrose와 1개의 galactose가 결합된 형태이다. Stachyose와 raffinose는 체내에서 소화되지 않는 난소화성 당류로 많은 양을 섭취하면 가스생성에 의한 복부팽만과 설사를 야기할 수 있어 지황 이용의 장애요인으로 작용할 수 있다(Murphy 등 1972; Hata 등 1991; Oh 등 2012). Stachyose와 raffinose는 비환원성 당류로 α-galactosidase에 의해 가수분해되어 1개의 sucrose와 환원당인 galactose가 생성되는 것으로 보고되어 있으며(Zhao 등 2006), stachyose와 raffinose의 감소는 지황의 소화성 개선

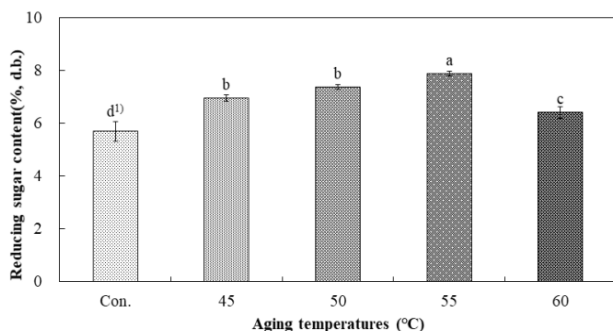


Fig. 1. Reducing sugar content of *Rehmannia glutinosa* rhizome with aging temperatures. ¹⁾ Different letters on the bars means a significant difference by DMRT ($p < 0.05$).

으로 지황 활용에 도움을 줄 수 있다.

2. 에탄올 첨가량 및 숙성 기간에 따른 숙성지황의 총생균수 및 총산도

숙성 중 에탄올 첨가량에 따른 부패 방지효과를 비교하기 위하여 총생균수와 총산도를 측정하였다. 에탄올 농도에 따라 숙성지황의 총생균수는 큰 차이를 나타내었다(Fig. 2). 원료 지황의 총생균수는 1.1×10^5 CFU/g 수준이었고, 무처리와 에탄올 첨가량 2% 시료에서 숙성 1일차에 각각 2.2×10^7 CFU/g와 2.6×10^6 CFU/g으로 크게 증가 후 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 4% 이상의 에탄올 첨가 시료에서는 1일차에 1.3×10^3 CFU/g 이하였으며, 숙성 8일차에는 33 CFU/g 이하로 숙성하지 않은 원료 지황(1.1×10^5 CFU/g) 대비 99.9% 이상 감소하였다. 총생균수 측정과 함께 미생물에 의한 영향을 확인하기 위하여 총산도를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 원료 지황의 총산도는 2.28 mg/g이었으며, 무처리 시료는 숙성 2일차에 4.32 mg/g으로 크게 증가 후 숙성기간이 지날수록 소량 감소하였다. 그에 반하여 에탄올 4% 이상 첨가한 모든 시료는 숙성 8일차까지 서서히 증가하여 8일차

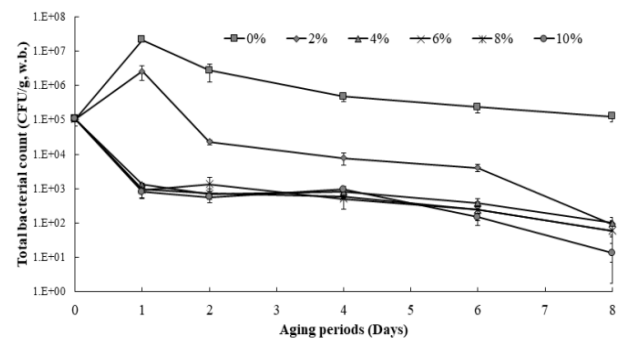


Fig. 2. Total bacterial count of *Rehmannia glutinosa* rhizome with different ethanol concentrations during aging periods.

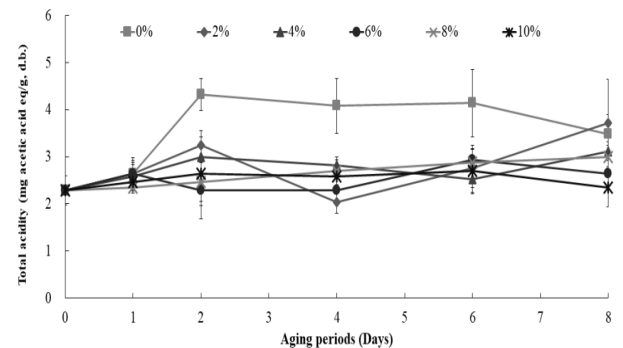


Fig. 3. Total acidity of *Rehmannia glutinosa* rhizome with different ethanol concentrations during aging periods.

에 3.12 mg/g 이하를 나타내어 무처리 대비 변화가 크지 않은 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 에탄올 첨가가 숙성 중 미생물 증식을 억제함으로써 부패에 의한 품질 저하 방지에 효과적일 것으로 판단된다.

식품에서 에탄올은 매우 우수한 항균효과를 갖는 것으로 알려져 있으며(Vora & Sidhu 1987), 수분이 많은 크림펫 포장에 에탄올 증기를 생성하는 가스팩을 적용하였을 때 *Clostridium botulinum*의 증식과 독소 생성이 효과적으로 억제되었다. *C. botulinum*의 증식과 독소 생성 억제는 에탄올 농도 2% 이상에서부터 효과가 나타났으며, 3% 이상에서는 증식이 완전히 억제되었다(Daifas 등 2000). 에탄올을 직접 첨가하는 것보다 증기상태에서 더욱 효과적인 것으로 보고되었다(Smith 등 1987). Dantigny 등(2005)의 식품 부패 곰팡이의 증식속도에 대하여 에탄올 농도가 미치는 효과에 대한 연구에서도 12종의 곰팡이가 2~7%의 에탄올 농도에서 증식이 완전히 억제되었으며, 12종 중 1종의 곰팡이를 제외하고 에탄올 농도에 의존적으로 증식이 억제되었다.

3. 에탄올 첨가량 및 숙성 기간에 따른 숙성지황의 유리당 조성

숙성에 따른 지황의 당류 변화와 에탄올 첨가가 숙성 중 가수분해 효소의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 유리당 조성을 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. 지황의 주요 당인 stachyose는 α -galactosidase에 의해 가수분해될 경우, galactose, sucrose와 raffinose가 생성된다(Zhao 등 2006). 원료 지황의 유리당 함량은 sucrose, raffinose 및 stachyose가 각각 6.52, 7.23 및 49.85%로 대부분 stachyose이었으며, galactose는 검출되지 않았다. 그러나 숙성과정에서 stachyose가 분해되면서 galactose와 sucrose가 증가하였고, 중간 산물인 raffinose는 대부분의 시료에서 8일차에 4.96~10.37% 수준으로 원료와 큰 함량 차이를 나타내지 않았다. Stachyose의 최종 산물인 galactose와 sucrose 함량은 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 에탄올 첨가량이 가장 높은 10% 처리구는 생성량이 낮았다. 무처리와 2% 에탄올 첨가 시료는 일부 불규칙한 경향을 나타내었으며, 이는 미생물 증식에 의한 영향으로 추정된다. Sucrose 생성량이 가장 높은 에탄올 첨가 조건은 6%이었다. 난소화성 당인 stachyose와 raffinose 함량은 에탄올 처리농도가 10%이었을 때 가장 높아 에탄올 첨가 수준이 과도할 경우 효소에 의한 가수분해를 억제하는 것으로 추정된다. Stachyose에 대한 분해효과가 가장 좋은 조건은 6% 에탄올 첨가와 무처리이었다. 난소화성 당류 분해효과와 sucrose 생성량 측면에서 적절한 숙성기간은 6일 차에 수렴하는 것으로 나타나 6일 이상이 적절하였다.

난소화성 당류에 대한 분해효과와 감미성을 갖는 sucrose

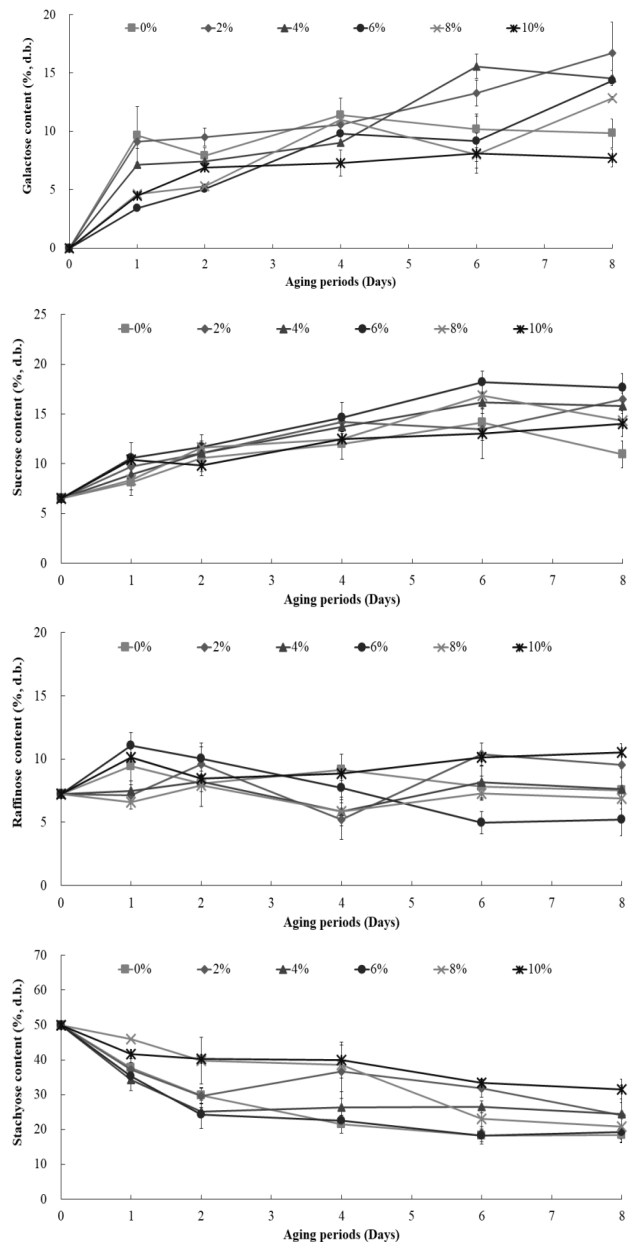


Fig. 4. Free sugar composition of *Rehmannia glutinosa* rhizome with different ethanol concentrations during aging periods.

생성량 측면에서 보았을 때 6% 에탄올 처리가 가장 적절하였으며, 이러한 결과는 미생물 증식에 의한 부패 위험 측면에서도 안전한 조건으로서 활용 가능할 것으로 판단된다.

요약 및 결론

본 연구 결과, 최적 숙성처리 온도는 55°C이었으며, 에탄올 첨가에 의한 숙성 중 부패 방지효과를 확인하였다. 에탄

을 첨가량은 4% 이상에서 미생물 증식을 효과적으로 억제하였으며, 총생균수를 기준으로 숙성시키지 않은 원료 대비 99.9% 이상 감소하였다. 미생물 증식 억제효과, 난소화성 당류에 대한 분해효과와 관능적으로 긍정적인 영향을 줄 수 있는 sucrose 생성량 측면에서 보았을 때 에탄올 첨가량은 6%가 최적조건이었으며, 숙성기간은 6일 이상이 적절하였다. 본 연구에서 제시하는 안전한 숙성가공방법은 낮은 소화성으로 인한 생지황 이용의 문제점을 해결할 수 있으며, 생지황의 산업적 활용 측면에서 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 원예특작시험연구사업의 지원에 의해 수행된 연구과제(과제번호: PJ01431702)의 일부 결과입니다.

References

- Daifas DP, Smith JP, Tarte I, Blanchfield B, Austin JW. 2000. Effect of ethanol vapor on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in a high moisture bakery product. *J Food Saf* 20:111-125
- Dantigny P, Guilmar A, Radoi F, Bensoussan M, Zwietering M. 2005. Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. *Int J Food Microbiol* 98: 261-269
- Ghisalberti EL. 1998. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phyto-medicine* 5:147-163
- Hata Y, Yamamoto M, Nakajima K. 1991. Effects of soybean oligosaccharides on human digestive organs: Estimation of fifty percent effective dose and maximum non-effective dose based on diarrhea. *J Clin Biochem Nutr* 10:135-144
- Jang GY, Kim DH, Park CH, Shin YS, Kang TS, Jeong HS, Choi J. 2018. Changes in reducing sugar and catalpol contents of *Rehmannia* root slurry with aging treatments. *Korean J Food Nutr* 31:559-564
- Jang GY, Lee SH, Li M, Kim ST, Lee JH, Kang TS, Lee JY, Lee J, Jeong HS. 2015. Quality characteristics at different storage temperatures and periods for shelf life evaluation of *Takju*. *Korean J Food Nutr* 28:104-110
- Jeong JH, Yu KW, Kim SJ, Choi YE, Paek KY. 2004. Plant regeneration from adventitious roots of *Rehmannia glutinosa* Liboschitz and bioreactor culture. *Korean J Plant Biotechnol* 31:55-60
- Jeong SJ, Lee CH, Kim HY, Hwang IG, Shin CS, Park ES, Lee J, Jeong HS. 2011. Characteristics of *Goroshoe* (*Acer mono* Max.) sap with different collection times after ultra filtration. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:753-758
- Kim DH, Park CH, Park HW, Park CG, Sung JS, Yu HS, Kim GS, Seong NS, Kim JC, Kim MS, Bae SG, Chung BJ. 2008. A new high-quality, disease resistance and high yielding *Rehmannia glutinosa* cultivar, "kokang". *Korean J Breed Sci* 40:84-87
- Lee SE, Seong NS, Park CG, Seong JS. 2002. Screening for antioxidative activity of oriental medicinal plant materials. *Korean J Med Crop Sci* 10:171-176
- Lee SH, Yoon JS, Kim JK, Park CG, Kim SC, Jung CS, Chang JK, Kim YB. 2017. Aucubin, catalpol and GABA contents in different plant parts of *Rehmannia glutinosa* cultivars. *Korean J Med Crop Sci* 25:16-21
- Liu GC, Du HQ, Liang L. 1992. Determination of catalpol in *Rehmannia glutinosa* by HPLC. *Tradit Herb Drug* 23:71-73
- MAFRA. 2017. 2016 an Actual Output of Crop for a Special Purpose. pp.88-91. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs
- Murphy EL, Horsley H, Burr HK. 1972. Fractionation of dry bean extracts which increase carbon dioxide egestion in human flatus. *J Agric Food Chem* 20:813-817
- Oh HL, Kim NY, Lee KJ, Yang KH, Doh ES, Song MR, Park JY, Kim MR. 2012. Proximate, mineral and sugar composition of *Rehmannia glutinosa* by cultivars. *J East Asian Soc Diet Life* 22:365-370
- Oshio H, Naruse Y, Inouye H. 1981. Quantitative analysis of iridoid glycosides of *Rehmanniae Radix*. *Shoyakugaku Zasshi* 35:291-294
- Park HJ, Lee SH, Kim HY, Jang GY, Hwang IG, Woo KS, Kwon OS, Lee JS, Jeong HS. 2012. Changes in chemical components and antioxidant activity of dried jujube with different aging temperatures and durations. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:591-597
- Smith JP, Ooraikul B, Koersen WJ, Van De Voort FR, Jackson ED, Lawrence RA. 1987. Shelf life extension of a bakery product using ethanol vapor. *Food Microbiol* 4:329-337

Vora HM, Sidhu JS. 1987. Effect of varying concentrations of ethyl alcohol and carbon dioxide on the shelf life of bread. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 11:56-59

Zhao Y, Wen XS, Cui J, Wu WH. 2006. Extraction and salting-out purification of alpha-galactosidase and beta-galactosidase from fresh roots of *Rehmannia glutinosa*. *J Chinese Med Mater* 29:137-139

Zhao Y, Wen XS, Cui J, Wu WH. 2008. Separation, purification and property study of β -glucosidase and α -galactosidase from fresh roots of *Rehmannia glutinosa*. *Food Drug* 11:12-15

Received 20 April, 2020

Revised 06 May, 2020

Accepted 21 May, 2020