

## 천마의 젖산발효에 따른 이취성분 및 Parishin 유도체의 변화

†송영은 · 이인석 · 송은주 · 최민경 · 한현아 · 신소희 · 최소라 · 이기권 · 김명곤\* · 박신영\*\*  
전라북도농업기술원, \*전북대학교 식품공학과, \*\*국립농업과학원

### Changes of Off-Odor Constituent and Parishin Derivatives of Fermentation of *Gastrodia elata* Rhizome by Lactic Acid Bacteria Strains

†Young Eun Song, In Sok Lee, Eun Ju Song, Min Kyung Choi, Hyun Ah Han, So Hee Shin,  
So Ra Choi, Ki Kwon Lee, Myung Kon Kim\* and Shin Young Park\*\*

Jeollabukdo Agricultural Research & Extension Service, Iksan 54968, Korea

\*Dept. of Food Science and Technology Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

\*\*National Institute of Agricultural Science, Wanju 55365, Korea

#### Abstract

*Gastrodia elata* Blume often has been used for the treatment of headaches, convulsions, hypertension, and neurodegenerative diseases. The main active constituents are gastrodin, 4-hydroxybenzyl alcohol, vanillyl alcohol, 4-hydroxybenzylaldehyde and parishin A, B, C and E. Because *Gastrodia elata* has also unacceptable off-odor (swine barnyard-like) for food, there is a need to reduce it as well as allow for greater utilization as a functional food materials. In this study, a major off-odor producing substance of *Gastrodia elata* was fractionated by steam distillation and silica gel column chromatography. The substance was identified as *p*-cresol(4-methyl phenol) by GC-MS analysis and comparison of the retention time with that of an authentic compound in GC. The content of *p*-cresol in fermented *Gastrodia elata* was decreased. A fermented sample of *Latobacillus sakei* for 2 days was reduced to 54.7%, when compared with a unfermented sample. The five parishin derivatives in *Gastrodia elata* were identified by HPLC-MS analyses, and a comparison of HPLC retention times with those of authentic compounds. When compared with parishin derivatives of an unfermented *Gastrodia elata*, those of *Gastrodia elata* fermented by *L. sakei*, increased to 18.3% for 2 days. Increases of about 14.0~38.4% of the total phenolic compounds and 57.4~77.3% total flavonoids were found in fermented extracts, by 3 lactic acid bacteria strains. They were compared with 97.1±2.9 µg/g and 40.9±2.0 µg/g in the unfermented control, respectively. The extracts of *Gastrodia elata* Blume that were fermented by lactic acid bacteria had higher DPPH free radical scavenging activity and FRAP reducing power than the unfermented control.

Key words: *Gastrodia elata*, lactic acid bacteria, fermentation, *p*-cresol, parishins

#### 서론

천마는 주로 한국, 일본, 중국 등 동남 아시아 부식질이 많은 계곡의 숲속에서 자생하고 있는 다년생 난과식물로서 비록 고등식물이지만, 엽록소가 없어 독립적인 생활을 할 수 없기 때문에 공생균인 뿔나무 버섯균을 이용하여 영양분을 공

급받아 성장한다. 천마의 임상적 효능에 관해서는 본초강목, 동의보감을 비롯한 여러 본초관련 문헌에 기록되어 있는데, 주로 고혈압, 두통, 마비, 향경련, 진통, 진정과 신경성 질환 치료에 이용되어 왔다. 또한, 천마는 뇌 기능 개선 및 중추 신경계에 대한 신경 차단 기능을 지니고 있을 뿐 아니라, 항염증 효과와 면역력도 증가시키는 것으로 알려져 있다(Ahn 등

† Corresponding author: Young Eun Song, Jeollabukdo Agricultural Research & Extension Service, Iksan 54968, Korea. Tel: +82-63-290-6043, Fax: +82-63-290-6059, E-mail: sjm964@korea.kr

2007; Zhou 등 2011).

천마의 주요 약리활성 성분으로서는 gastrodin, 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillyl alcohol, parishin A, B, C, E 등이 잘 알려져 있다(Taguchi 등 1981; Zhou 등 1983; Lin 등 1996; Baek 등 1999; Jang 등 2010). 이들 중에서 특히 gastrodin은 주요 활성성분으로서 신경 쇠약으로 인해 유발되는 두통을 치료하는 약으로 시판되고 있고(Qiu 등 2014), parishin A는 뇌질환에 대한 신경보호 효과가 있는 것 알려져 있다(Tang 등 2015). 천마가 국내 농가에서 인공재배되기 시작한 이후로 천마의 활용성 증대의 필요성이 꾸준히 제기되었으나, 천마는 그동안 식품의약품안전처에 의해 식품원료로 사용이 규제되어 있어서 가공식품으로의 이용이 제한되어 왔었다. 그러나 2000년 9월 이후로 규제가 풀려서 식품원료로 사용이 가능해짐에 따라 가공식품으로의 개발이 필요한 실정이다.

그러나 천마는 특유의 이취를 지니고 있으면서 건조 후에도 이취가 잔존하여 천마 가공 및 식품으로 이용에 제약요인으로 작용하고 있으며, 이취의 주 원인물질은 *p*-cresol(4-methylphenol)일 것으로 추정되나, 보다 구체적인 연구결과는 보고되어 있지 않다. 지금까지 천마의 이취 감소를 위한 연구로는 건조방법에 따른 천마의 향기 패턴 분석(Lee 등 2002), 초음파 처리 및 효소반응에 의한 천마의 불쾌취 감소방법(Kim 등 2004)과 젖산처리에 의한 천마의 불쾌취 감소(Chang & Ahn 2011) 등이 있다.

또한, 발효시킨 천마의 생리활성 연구와 관련해서는 건천마와 발효천마 추출물의 항노화 활성과 신경 성장인자 유도 효과 비교(Choi 등 2013), 젖산균 발효 천마의 수면유도 효과 연구(Lee 등 2013), 발효 천마의 기능성 성분 함량 변화 및 항산화 활성연구(Kim 등 2014), 흑천마 및 발효천마 제조에 따른 기능성 물질 gastrodin과 *p*-hydroxybenzyl alcohol 등 분석 연구(Kim HJ 2014) 등이 있다. 이에 따라 본 연구에서는 천마의 이취와 관련하여 주요 원인성분을 구명하고, 젖산균을 이용하여 천마의 발효시켜 이취를 감소시키고 동시에 parishin 유도체 등 기능성 성분 증대시킬 수 있는 발효방법을 개발함으로써 발효천마를 고부가가치 식품 또는 건강기능식품의 원료로써 사용 가능성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

실험에 사용한 천마는 2015년 10월에 전라북도 무주지역에서 수확한 다음, 동결건조하여 분말화한 제품을 구입 후 냉장실에 보관하면서 실험에 사용하였다. 시약인 tannic acid, rutin, Folin-Ciocalteu 시약, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH),

2,4,6-tripyridyl-s-triazine(TPTZ), *p*-cresol, *o*-cresol, 4-hydroxybenzyl alcohol(4-HBA) 및 gastrodin은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Parishin 유도체들인 parishin A, B, C 및 E는 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.(Chengdu, Sichuan, China)에서 구입하여 사용하였고, silica gel(230-400 mesh)은 Merck사(Darmstadt, Germany) 제품을 구입하여 사용하였다. Acetonitrile, metanol *n*-hexane 및 diethyl ether는 J.T. Baker사(PA, USA) 제품, 기타 시약은 대정화금(시흥, 경기도)제 특급을 사용하였다.

### 2. 기기

Gas chromatography(GC)는 6890 GC(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였고, Gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)는 Shimadzu(Kyoto, Japan) QP2010 plus GC-MS를 사용하여 실시하였다. High performance liquid chromatography(HPLC)는 Waters 600E system controller(Waters, Milford, MA, USA) 626 pump, 717 plus autosampler 및 996 photodiode array detector(PDA)를 사용하였고, HPLC-MS는 binary pumps, 1024-elements diode array detector(DAD) 및 ion trap mass spectrometer로 구성된 Agilent 1100 series HPLC-MS system(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 negative electrospray ionization(negative ESI) mode로 분석하였다.

### 3. 발효균주

천마 발효에 사용된 젖산균은 전북농업기술원이 김치에서 분리 동정한 *Pediococcus inopinatus* BK-3, *Lactobacillus sakei* C-11과 막걸리에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* VL-1 균주를 MRS 액체배지(Difco Laboratories Inc. Detroit, USA)에서 2회 계대배양한 후 발효균주로 사용하였다.

### 4. 젖산균 발효

천마분말을 100 g을 적정 용기에 담아 원료 대비 0.5배의 물을 가하고, 충분히 혼합한 다음 체로 거른 후 10분간 증자하였다. 증자한 시료에 엿기름 추출액을 동량 첨가하여 항온 수조에서(65°C, 3시간) 당화시킨 후 121°C에서 15분간 고압 살균하였다. 이어서 시료를 방냉한 후 *L. sakei* 등 3종의 젖산균 발효액을 시료 무게의 1%로 접종하고, 30°C 항온기에서 2일간 발효시킨 다음, 동결 건조한 후 분말로 제조하여 분석 시료로 사용하였다.

### 5. 이취 성분 분리

#### 1) 이취성분의 분리

동결 건조한 천마시료 시료 100 g과 증류수 2 L를 등근바닥 플라스크에 넣고, Schultz 등(1977)의 방법에 따라 SDE (Likens & Nickerson type simultaneous steam distillation and extraction) 장치를 사용하여 추출하였다. 이때 용매로서는 *n*-pentane: diethyl ether(1:1) 혼합액 50 mL를 사용하여 2시간 추출하였으며, 얻어진 휘발성 성분 분획은 무수 황산나트륨을 첨가하여 24시간 탈수시킨 다음 여과하고, Vigreux column(15 cm)를 사용하여 40°C에서 약 2 mL로 농축하여 천마 특유의 이취를 함유하는 휘발성 성분 분획을 얻었다. 농축된 휘발성 성분 분획은 silica gel column chromatography에 의해 분획하였다. 즉, silica gel(230-400 mesh) 70 g을 충전한 칼럼(3.0×20 cm)에 휘발성 성분 분획을 loading한 후, *n*-hexane과 diethyl ether 혼합액을 사용하여 단계적으로 diethyl ether의 비율을 증가시키면서 용출하면서 30 mL씩 분취하였다. 각 분획은 30°C 이하에서 약 5 mL로 농축하여 관능평가용 시료로 사용하였다.

## 2) 관능평가

각 분획의 관능평가는 향미 프로파일법(favor profile method) (Krasner 1988; Chang & Ahn)에 준하여 실시하였다. 즉, 관능평가 요원은 20세 이상의 대학생 남녀 각각 3명씩으로 구성하고, 동결건조한 천마분말을 관능평가요원에게 제시하여 천마 특유의 이취(pig feces, swine barn-like)를 인식하도록 하였다. 이어서 silica gel column chromatography에 의해 얻어진 각 분획의 농축액 소량을 paper smelling strips에 적신 다음 용매를 휘발시키고, 관능평가 요원에게 제시하여 향 특성을 기술하도록 하였다.

## 3) GC 및 GC-MS 분석

SDE 방법으로 수증기 증류하여 얻어진 휘발성 성분 분획 및 silica gel column chromatography에 의해 얻어진 각 분획을 Yong(2015)의 방법을 변형하여 GC로 분석하였다. 칼럼은 Supelcowax 10 fused silica capillary column(30 m×0.25 mm, 0.25 μm, Supelco Inc. Bellefonte, USA)을 사용하였고, 칼럼 온도는 50°C에서 230°C까지 분당 2°C의 속도로 승온 후 230°C에서 20분간 유지하였다. 주입구와 검출기는 250°C로 설정하였고, 운반 기체는 질소가스(N<sub>2</sub>)를 사용하여 분할비(split ratio=20:1) 모드로 분석하였다.

GC-MS 분석을 위한 칼럼은 Supelcowax 10 fused silica capillary column(30 m×0.25 mm, 0.25 μm, Supelco Inc. Bellefonte, USA)을 사용하였고, 칼럼온도는 위에서 GC분석과 동일한 조건으로 하였으며, 주입구와 interface 온도는 250°C로 하였다. 운반 기체는 헬륨가스(He)를 사용하여 유량(flow rate)은 분당 1.0 mL로 하여 분할비(split ratio=20:1) 모드로 분석하였

다. 성분의 동정은 GC-MS 분석에 의해 mass spectrum을 얻은 후, Wiley/NIST(National Institute of Standards and Technology, US Department Commerce, USA) mass spectrum library 검색 및 GC에서 시판 표준품과 머무름 시간의 비교에 의해 확인하였다.

## 6. 발효 천마 중의 *p*-cresol 분석

### 1) 검량선 작성

표준품 *p*-cresol 50 mg을 취하여 ethyl acetate 25 mL에 용해시키고, 내부표준 물질인 *o*-cresol 105.6 mg을 취해 ethyl acetate 100 mL에 용해시킨 다음, 내부표준물질 대비 *p*-cresol(40-800 μg/mL)의 비율을 증가시켜 검량선을 작성하였다.

### 2) 시료 추출

분말상태의 대조구(무발효)와 동결건조한 발효시료 각각 2.0 g씩을 취한 다음 50 mL 용량의 코니칼 튜브에 담고, 1N-HCl 용액 10 mL와 내부 표준물질로 사용한 *o*-cresol 용액 0.5 mL(*o*-cresol 528 ug 함유) 및 추출 용매인 ethyl acetate 29.5 mL를 가한 후, 실온에서 120 rpm으로 12시간 진탕하여 추출하였다. 추출된 시료는 원심분리(4,500 rpm, 20분)한 다음, ethyl acetate층 20 mL를 50 mL 코니칼 튜브에 취한 다음 무수 황산나트륨 6 g을 가하고, 3시간 동안 진탕한 후 여과하였다.

### 3) GC 분석

여과액은 30°C 이하에서 감압 농축한 다음 acetone 1.0 mL에 용해시킨 후 GC 방법으로 분석하였다. 칼럼은 Supelcowax 10을 사용하고, 칼럼 온도는 130°C에서 3분간 유지한 다음 230°C까지 분당 3°C의 속도로 승온 후 230°C에서 15분간 유지하였다. 주입구와 검출기는 250°C로 설정하였고, 운반기체는 N<sub>2</sub>(1.0 mL/min)를 사용하여 분할비(split ratio=20:1) 모드로 분석하였다.

## 7. 발효 천마의 Parishin 유도체 분석

### 1) 시료 추출 및 HPLC 분석

시료에서 parishin 유도체의 추출은 Zhang 등(2015)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 즉, 분말 시료 2.0 g에 80% 메탄올 20 mL를 가한 다음 70°C에서 30분 가열 추출한 후, 원심분리(4,500 rpm, 20분)하여 상층액을 취하고, 잔사는 동일한 방법으로 한번 더 추출하였다. 상층액을 합하여 감압 농축하고, 70% 메탄올 5 mL에 용해시킨 후 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 칼럼은 Eclipse XDB C<sub>18</sub>(4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였고, 검출기는 PDA(220 nm)

를 사용하였다. 용매는 0.1% 인산 수용액(A 용매)과 100% 메탄올(B 용매)을 사용하였으며, Gradient 조건은 85%(A) 및 15%(B) (0~2분), 45%(A) 및 55% (B) (2~35분), 85%(A) 및 15%(B) (35~50분)의 비율로 하였고, 유속은 0.8 mL/min, 주입량은 10  $\mu$ L로 하였다. 각 성분은 표준품을 사용하여 절대 검량선법으로 검량곡선을 작성하여 정량하였다.

## 2) HPLC-MS 분석

천마에 함유된 parishin 유도체의 구조 동정을 위하여 대조구 분말시료를 HPLC 분석시료와 동일한 방법으로 추출한 다음 Chen 등(2016)의 방법을 변형하여 HPLC-MS로 분석하였다. 칼럼은 Kinetex XB-C<sub>18</sub> 100 Å(50×2.1 mm, 2.6  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였다. 용매는 0.1% formic acid를 함유하는 deionized water(A)와 0.1% formic acid를 함유하는 acetonitrile(B)를 사용하여 gradient mode로 분석하였고, flow rate는 분당 0.5 mL로 하였다. Gradient 조건은 HPLC 분석과 동일한 조건으로 하였으며, mass 조건으로서 ion spray voltage 3300 eV, ion source temperature는 400°C, scanning range는 100~1,500 amu로 하였다. HPLC 분석에서 total ion current(TIC) mode와 DAD(220 nm)로 검출된 각 성분들의 mass spectrum들은 문헌에 보고된 성분들의 mass spectral data의 비교 및 HPLC에서 표준품과 머무름 시간의 비교에 의해 동정하였다.

## 8. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

### 1) 시료조제

동결 건조 시료 2 g을 칭량한 후 100% methanol 20 mL로 20분간 초음파 3회 추출, 여과하여 상층액을 감압농축 후 5 mL에 용해하여 사용하였다.

### 2) 총 폴리페놀 함량

시료 중의 총 폴리페놀 함량은 Folin & Denis(1912) 방법으로 측정하였다. 시료 0.2 mL에 증류수 0.8 mL를 넣고, 2 N Folin-Ciocalteu reagent 0.1 mL를 가하여 혼합, 3분간 정치 후 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.2 mL에 증류수 0.7 mL를 첨가하였다. 혼합액을 1시간 동안 반응시킨 후 분광광도계(Specord, Analytikjena, Germany)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준물질(tannic acid)를 이용하여 작성한 검량곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

### 3) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Davis WB(1947) 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 0.1 mL에 diethylene glycol 0.15 mL를 가

하여 혼합하고, 이어서 1N NaOH 용액 20  $\mu$ L를 가한 다음 혼합 후 37°C에서 1시간 동안 반응하고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Rutin을 이용하여 작성한 검량곡선으로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

## 9. 발효천마의 항산화 활성

### 1) DPPH free radical 소거능

DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois MS(1958) 방법을 변형하여 측정하였다. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정에서 같이 조제한 시료 20  $\mu$ L에 0.1 M Tri buffer(pH 7.4) 100  $\mu$ L 및 500  $\mu$ M로 제조한 DPPH 용액 20  $\mu$ L를 96-well plate에 넣고, 실온에서 20분간 반응시키며, 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구는 시료 대신 증류수를 넣어 측정하였다. DPPH free radical 소거능은 아래와 같은 식으로 계산하여 백분율(%)로 표시하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%)=

$$\left[ 1 - \left( \frac{\text{실험구 흡광도}}{\text{음성대조구 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

### 2) FRAP(ferric reducing antioxidant power)

반응액으로서 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM 염산에 녹인 10 mM 2,4,6-트리피리딜-s-트리아진(TPTZ) 및 20 mM FeCl<sub>3</sub>을 준비한 다음 acetate buffer, TPTZ/40 mM HCl 용액 및 FeCl<sub>3</sub> 용액을 10:1:1(v/v/v)로 혼합하여 37°C에서 15분간 예비반응시켰다. 시료 0.15 mL와 예비 반응된 FRAP 시약 2.85 mL를 섞어 15분간 반응시키고, microplate reader(Power wave XS2, Biotek Instrument Inc. VT, USA)를 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 10. 통계처리

실험에서 얻어진 결과 값은 SAS(Statistical Analysis System, USA) 프로그램을 이용하여 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 천마의 이취 원인성분 구명

천마는 항경련, 진통, 뇌 기능 개선, 항염증, 면역력 증진 활성 이외에도 고혈압, 당뇨 등 성인병에 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 식품이나 건강기능성 소재로 사용하기에 부적합할 정도의 특유의 이취(pig feces, swine barn-like)를 지니고 있으며, 그의 주요 원인성분에 대해서는 구체적으로 알려

져 있지 않다. 따라서 일차적으로 천마의 이취 원인성분을 구명하기 위하여 수증기 증류법에 의해 천마로부터 휘발성 성분을 분리하여 silica gel column chromatography에 의해 성분을 분획한 다음, 관능평가에 의해 이취 함유 여부를 평가한 결과는 Table 1과 같다. 분획 중 특히 *n*-hexane:diethyl ether(80:20) 혼합액으로 용출한 분획에서 천마 특유의 강한 이취가 발현되었다.

따라서 이취의 원인성분을 구명하기 위하여 수증기 증류에 의해 분리된 휘발성 성분 분획(volatile oil)과 이를 silica gel chromatography로 분리하였을 때 강한 이취를 발현하는 분획(fraction number 18-20)을 GC로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 이취를 함유하는 분획에서는 3개의 큰 peak 이외에도 다수의 작은 peak들이 검출되었으며, GC-MS 분석에 의해 각 성분들을 동정한 다음, 동정된 성분들의 표준품을 대상으로 관능평가를 실시한 결과, *p*-cresol의 냄새가 천마에서 발현되는 이취와 매우 유사하였다. 또한, 동일한 조건에서 시료와 표준품 *p*-cresol을 GC로 분석하였을 때 Fig. 1에서와 같이 머무름 시간이 일치하였고, GC-MS로 분석하였을 때 Fig. 2에서와 같이 mass spectrum도 일치하였다. 따라서 천마에서 발현되는 특유의 이취(swine barn-like)는 주로 *p*-cresol (4-methylphenol)에 기인하는 것으로 판단되며, *p*-cresol은 공기 중에서 odor threshold가 1 ppb일 정도로 매우 낮은 농도에서도 특징적이면서 강한 냄새를 생성하는 것으로 알려져 있다(Leonardos 등 1969). Chang & Ahn(2011) 연구에서도 생천마에서 1,1'-oxybis-ethane, acetaldehyde, formic acid ethyl ester, butanal 등 11종의 휘발성 향기성분 분석하여 *p*-cresol (4-methylphenol)을 확인하였다. 덜 익은 바닐라콩에 *p*-cresol이 배당체 형태로 존재하는데, 수확 후 발효과정에서 β-glucosidase작용으로 가수분해되어 *p*-cresol이 생성된다는 보고가 있다(Kanisawa 등 1994).

2. 발효에 의한 이취성분 변화

3종의 젖산균을 이용하여 천마를 2일간 발효시킨 다음,

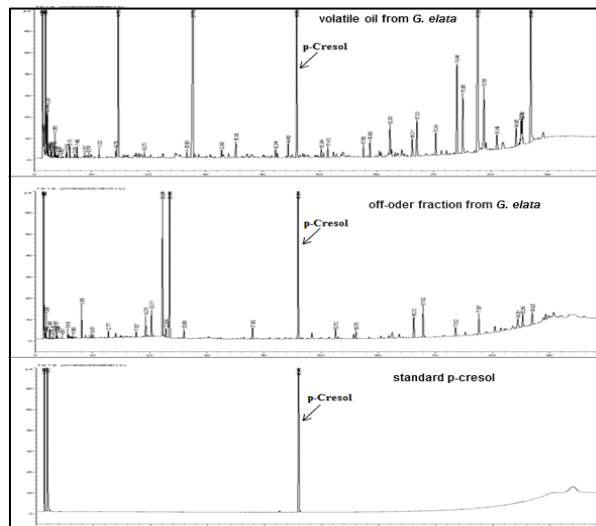


Fig. 1. Gas chromatogram of off-odor containing fraction (n-hexane:diethylether=80:20) of *G. elata* by silica gel column chromatography.

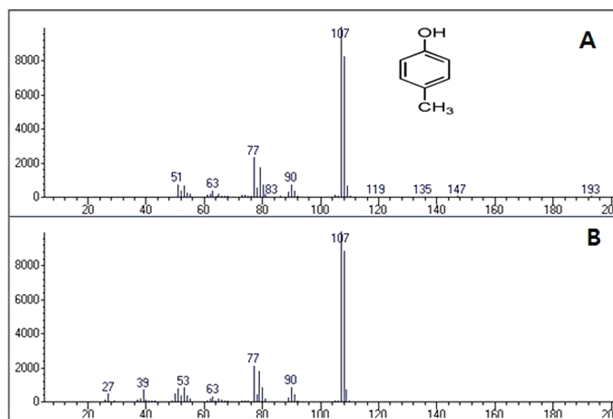


Fig. 2. Mass spectrum of off-odor containing fraction (n-hexane: diethylether=80:20) and standard *p*-cresol of *G. elata*. A: *p*-cresol-like component from *G. elata*, B: standard *p*-cresol component.

Table 1. Sensory evaluation of each fraction of *G. elata* by silica gel column chromatography

Solvent ratio(%)	Fraction number	Odor profile
<i>n</i> -Hexane:ethylether (95:5)	1~7	Weak odor, not contained characteristic odor
<i>n</i> -Hexane:ethylether (90:10)	8~14	Slightly odor, waxy, green
<i>n</i> -Hexane:ethylether (80:20)	15~17	Off-odor, phenolic, medical
<i>n</i> -Hexane:ethylether (60:40)	18~20	Strong off-odor, strong swine barn-like
<i>n</i> -Hexane:ethylether (60:40)	22~26	Weak odor
<i>n</i> -Hexane:ethylether (50:50)	27~32	Acidic, lactone-like
Etyl acetate (100)	33~40	Odorless

발효 천마 중의 *p*-cresol 함량을 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 발효하지 않은 대조구에 비해 발효한 천마 시료에서는 *p*-cresol 함량이 낮았으며, 특히 *L. sakei* C-11 균주로 발효한 시료에서 *p*-cresol 함량이 가장 낮았다. *p*-Cresol은 방향족 아미노산(티로신, 페닐알라닌, 트립토판)이 아미노기 전달반응(transamination)에 의해 *p*-hydroxyphenyl acetic acid로 전환되고, 탈탄산 반응에 의해 생성된다고 알려져 있다(Scheline 1968). 젖산균에 의한 *p*-cresol 함량 감소 결과는 아미노산 대사에 의해 생성된 *p*-cresol 등의 화합물이 젖산균과 결합하여 *p*-cresol 농도를 감소시키며, 젖산균 종류 등에 따라 그 감소 정도가 달라질 수 있다는 Nowak & Libudzisz(2007) 연구결과와 일치하였다. 또한, 천마를 젖산균으로 발효시키면 *p*-cresol의 함량이 감소됨에 따라 비례하여 이취도 어느 정도 감소하였으나, 이취가 완전히 소실되지는 않았다.

### 3. 발효에 의한 parishin 유도체의 변화

천마를 젖산균으로 발효시켰을 때 이취성분 이외에도 천마에 함유되어 있는 중요한 생리활성 물질들인 parishin 유도체들도 변화할 것으로 예상되나, 국내에서 생산된 천마 중의 parishin 유도체들에 대한 연구가 많이 수행되지 않아, 우선 HPLC-MS에 의해 parishin 유도체들의 구조 동정을 시도하였다. 발효하지 않은 천마(대조구)를 70% methanol 수용액으로 추출한 시료를 HPLC-MS(negative ESI mode)로 분석하여 얻어진 chromatogram은 Fig. 4와 같다.

TIC chromatogram에서 약 10개의 peak들이 검출되었고, UV(222 nm) 검출기에서는 약 5개의 peak들이 검출되었으나, 그 중 mass spectrum을 기초로 동정 가능한 것은 6개 성분(peak 1~6)이었고, 나머지 성분들은 molecular ion들이 명확하지 않아 동정하기 곤란하였다. Fig. 4(A)에서 검출된 peak 2-6의 성분들은 Table 2에서와 같이 quasimolecular ion들이 관측되었고, 문헌에 보고된 각 성분의 mass spectral data와 비교하여 이들은 parishin 화합물들이므로 확인되었다. 또한, 검출기로서 DAD를 사용한 HPLC 분석에서 이 성분들의  $\lambda_{max}$ 는

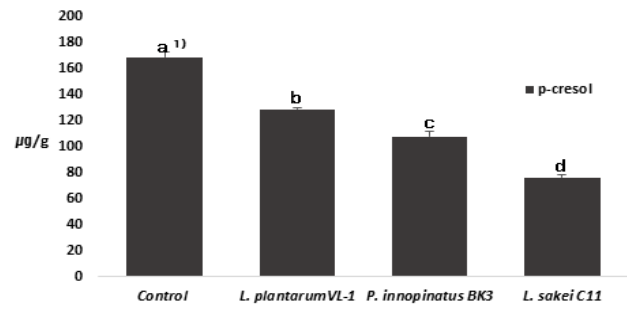


Fig. 3. *p*-Cresol of the fermented *G. elata* by lactic acid bacteria strains. \* fermented period: 2 days. <sup>1)</sup> Means with different letters(a-d) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

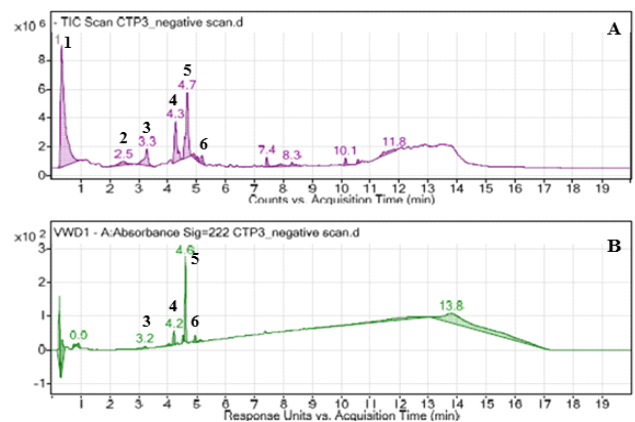


Fig. 4. Analysis of *G. elata* extract by HPLC-MS (negative ESI mode). A, TIC; B, PDA (222 nm).

220 nm 부근이면서 UV absorption spectrum들이 비슷하여 서로 유사한 구조를 가진 화합물이라는 것을 알 수 있다. 특히 peak 2, 4, 5는 HPLC 분석에서 표준품인 parishin E, B 및 A와 머무름 시간이 일치하였으며, peak 3의 parishin G와 peak 6의 parishin R 또는 S는 문헌에 보고된 mass spectral data와 비교하여 잠정적으로 확인하였다. 본 실험에서 동정된

Table 2. Characterization of constituents identified from *Gastrodia elata* by negative ESI-HPLC-MS

Peak No.	[M-H] <sup>-</sup>	MW	Detection		Identification	Reference
			TIC	UV		
1	191.0	192.1	○	-	Citric acid	Li <i>et al.</i> (2015)
2	459.2	460.4	○	-	Parishin E	Li <i>et al.</i> (2015)
3	459.2	460.4	○	○	Parishin G	Li <i>et al.</i> (2015)
4	727.2	728.7	○	○	Parishin B	Li <i>et al.</i> (2015)
5	995.3	996.9	○	○	Parishin A	Li <i>et al.</i> (2015)
6	1101.3	1102.4	○	○	Parishin R or S	Li <i>et al.</i> (2015)



parishin 유도체들의 구조는 Fig. 5와 같으며, 이러한 성분들은 중국산 천마에서 이미 발견된 주요 생리활성 물질들로 알려져 있다. 또한, DAD(220 nm) 검출기에서는 검출되지 않고 TIC에서만 검출된 peak 1은 quasimolecular ion이 191.0 [M-H]<sup>-</sup>으로 관측되어 이 성분은 citric acid로 판명되었다. 천마의 중요한 약리활성 성분으로 알려져 있는 parishin 화합물들은 citric acid에 gastrodin[4-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl alcohol] 1~3개가 ester 결합한 화합물이기 때문에, 천마에는 citric acid도 함유되어 있다는 것을 시사해주는 결과이기도 하다.

천마 대조구의 추출물, 4-HBA, gastrodin과 4종의 parishin 유도체 표준품의 혼합물을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 6과 같다. 본 실험에서 사용한 HPLC 분석 조건에서 6종의 성분들이 잘 분리되었으며, 각 표준품의 머무름 시간과 시료에서 일치하는 peak들의 머무름 시간도 잘 일치하였다. 또한, 각 시료에 함유된 parishin 유도체들을 포함한 6종의 성분의 함량을 정량하기 위하여 표준품을 사용하여 절대 검량선법으로 검량곡선을 작성한 다음, *L. plantarum* VL-1, *P. inopinatus* BK-3 및 *L. sakei* C-11로 발효시킨 시료 중의 parishin 유도체 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 발효하지 않은 대조구에 비해 젖산균 발효한 시료에서 parishin A 함량은 감소하고, parishin B, C, gastrodin, 4-HBA는 증가하였는데, 이는 citric acid와 3개의 gastrodin이 에스테르 결합되어 있는 parishin A가 발효 중 열에 의한 에스테르 결합의 분해, 효소들에 의한 hydrolyzation, oxidation 과정을 거쳐 여러 중간 가수 분해물과 gastrodin 유도체 등으로 분해됨으로써 parishin A는 대조구에 비해 감소하고, 기타 유도체들은 증가했으리라 생각된

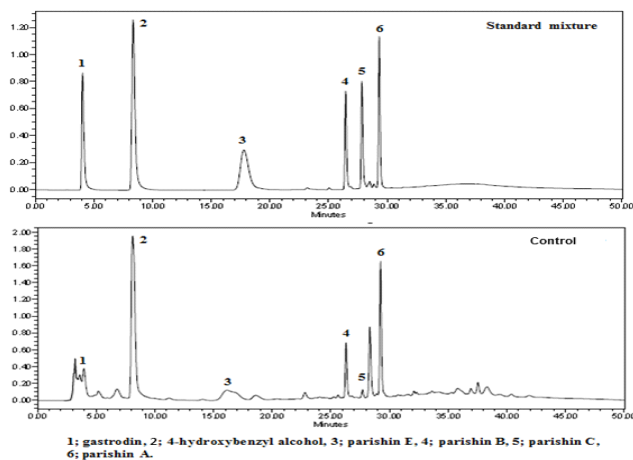


Fig. 6. HPLC chromatogram parishin derivatives on standard and control of *G. elata*. 1; gastrodin, 2; 4-HBA, 3; parishin E, 4; parishin C, 5; parishin B, 6; parishin A.

다(Kim MN 2016). 이러한 결과는 UHPL/Q-TOF MS를 사용하여 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 parishin의 대사물 프로파일을 조사한 결과, parishin이 쥐의 위장에 투여된 후 쥐의 plasma와 urine에서 parishin이 가수분해, 산화, 황화 및 glucuronidation을 거쳐 gastrodin 유도체 등으로 검출되었다는 Tang(2015)의 연구결과도 보고되어 있다. 특히 *L. sakei* C-11 젖산균 발효의 경우, 발효하지 않은 대조구와 다른 젖산균에 비해 parishin A의 함량은 감소하고 이루어져 parishin B, C, E, gastrodin 성분들의 함량이 증가하였다.

4. 발효에 의한 페놀성 화합물 및 항산화 활성 변화

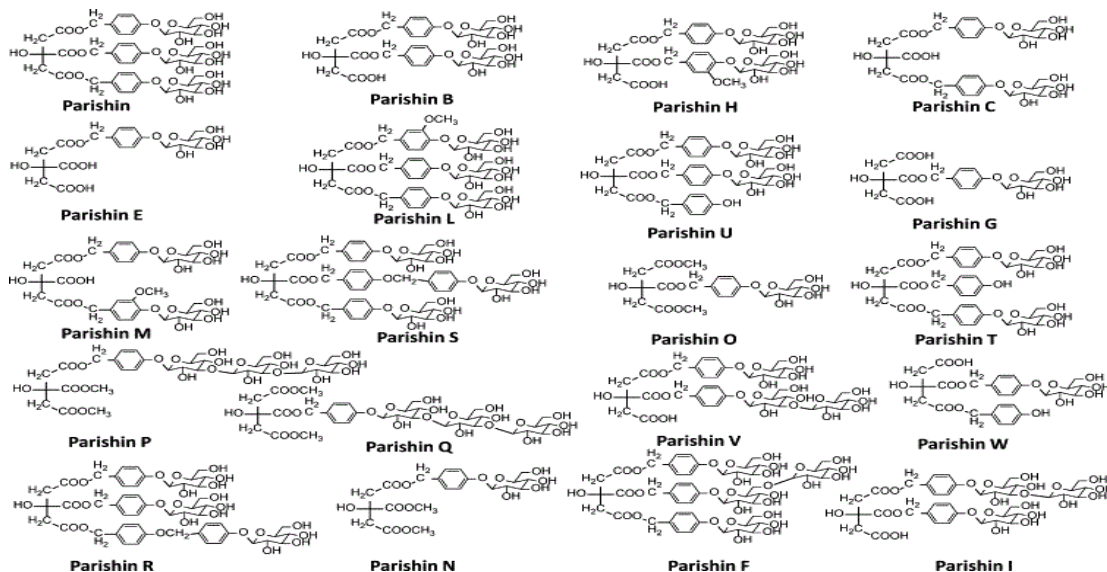


Fig. 5. Chemical structures of parishins identified in *G. elata* (Li et al., 2015).

**Table 3. Content of parishin derivatives of the fermented *G. elata* by lactic acid bacteria strains** (unit:  $\mu\text{g/g}$ )

Sample	Gastrodin	4-HBA	Parishin E	Parishin B	Parishin C	Parishin A
Control	1,280.2 $\pm$ 33.9 <sup>d</sup>	4,069.1 $\pm$ 107.7 <sup>b</sup>	1,223.2 $\pm$ 32.4 <sup>c</sup>	2,192.5 $\pm$ 58.0 <sup>c</sup>	459.7 $\pm$ 12.2 <sup>d</sup>	3,522.2 $\pm$ 93.2 <sup>a</sup>
<i>L. plantarum</i> VL-1	2,890.5 $\pm$ 104.2 <sup>a</sup>	3,330.5 $\pm$ 120.1 <sup>c</sup>	1,675.0 $\pm$ 60.4 <sup>a</sup>	2,406.1 $\pm$ 86.8 <sup>b</sup>	1,141.0 $\pm$ 41.1 <sup>b</sup>	2,080.3 $\pm$ 75.0 <sup>b</sup>
<i>P. inopinatus</i> BK-3	1,578.8 $\pm$ 98.6 <sup>c</sup>	3,549.7 $\pm$ 221.7 <sup>c</sup>	1,521.5 $\pm$ 95.0 <sup>b</sup>	1,663.0 $\pm$ 103.9 <sup>d</sup>	773.0 $\pm$ 48.3 <sup>c</sup>	1,903.8 $\pm$ 118.9 <sup>c</sup>
<i>L. sakei</i> C-11	2,462.1 $\pm$ 65.1 <sup>b</sup>	4,814.3 $\pm$ 127.4 <sup>a</sup>	1,296.5 $\pm$ 34.3 <sup>c</sup>	3,210.1 $\pm$ 84.9 <sup>a</sup>	1,411.3 $\pm$ 37.3 <sup>a</sup>	1,885.0 $\pm$ 49.9 <sup>c</sup>

\* Fermented period: 2 days, 4-HBA: 4-Hydroxybenzylalcohol.

<sup>1)</sup> Mean $\pm$ S.D.

<sup>2)</sup> Means with different letters<sup>(a-d)</sup> within the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

3종의 젖산균으로 발효시킨 천마 시료의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다. *L. plantarum* VL-1에 의해 발효된 천마시료의 총 페놀 함량은 132.7  $\mu\text{g/g}$ , *P. inopinatus* BK-3 시료는 110.7  $\mu\text{g/g}$ , *L. sakei* C-11 발효시료는 134.6  $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 이는 발효하지 않은 대조구의 총 페놀함량 97.1  $\mu\text{g/g}$  보다 높아 발효에 의해 총 폴리페놀 함량이 증가되었다는 것을 나타내고 있다. 또한 총 플라보노이드 함량은 *L. plantarum* VL-1 균주로 발효한 천마 시료는 68.6  $\mu\text{g/g}$ , *P. inopinatus* BK-3 시료는 64.4  $\mu\text{g/g}$ , *L. sakei* C-11 시료는 70.1  $\mu\text{g/g}$ 으로 대조구 시료 40.9  $\mu\text{g/g}$ 보다 높아 총 폴리페놀 함량도 역시 발효에 의해 증가되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 어섯초 유산균을 이용한 발효 추출물에서 총 페놀함량을 측정된 결과, 발효를 하지 않은 대조군에서 보다 발효한 시료에서 높게 측정되었고, 총 플라보노이드 함량 역시 발효한 추출물에서 발효하지 않은 것에 비해 그 함량이 증가하였다는 Kim 등(2016)의 결과와 같았다.

항산화 활성 지표 중의 하나로서 DPPH free radical 소거능을 조사한 결과는 Table 5와 같다. *L. plantarum* VL-1에 의해 2일 발효한 천마 시료는 73.3%, *P. inopinatus* BK-3은 71.2%, *L. sakei* C-11는 70.0%의 소거활성을 나타내었으며, 발효시킨 천마 시료에서 공통적으로 발효하지 않은 대조구에 비해 DPPH free radical 소거 활성이 증가되는 것을 확인하였다. 또한 FRAP는 시료의 환원능력을 측정하여 항산화력 판단하는 지표로서 *L. plantarum* VL-1으로 발효한 시료의 환원력(FRAP)은 344.3  $\mu\text{g/mL}$ , *P. inopinatus* BK-3 시료는 329.7  $\mu\text{g/mL}$ , *L. sakei* C-11 시료는 529.2  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 발효 천마 시료

모두 대조구(254.9  $\mu\text{g/mL}$ )에 비해 높은 환원력을 나타내었다. 발효천마의 항산화성 연구는 효모로 천마 발효하였을 때 발효 추출물의 농도가 증가할수록 비 발효 천마 추출물보다 DPPH, ABTS의 활성이 높았다고 Park 등(2012)이 보고하였다. 또한, Kim 등(2014)은 *Phellinus linteus*로 다중 발효하였을 때, 발효 천마 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였다고 보고하여 천마 발효에 의한 항산화 활성이 증가함을 알 수 있었다. 특히 *L. sakei* C-11로 발효시킨 천마의 환원력은 본 실험에서 사용한 2종의 다른 젖산균에 비해 환원력이 현저히 높았고, DPPH free radical 소거 활성도 우수한 편이었으며, 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량도 높았다(Table 5). 이러한 결과는 Bandli 등(2017)이 총 폴리페놀과 FRAP이 비례하여 양의 상관관계를 나타낸다는 보고한 결과와 일치함을 알 수 있다.

## 요약 및 결론

발효 천마의 이취저감 및 기능성 성분 증대를 통한 고부가가치 식품 소재로의 활용 가능성을 검토하고자 천마의 성분 분리를 통하여 이취성분을 알아내고, 젖산균 발효에 의한 이취 경감과 기능성 성분 변화를 조사하였다. 천마의 용매분획 중 *n*-hexane:diethyl ether(80:20) 혼합액으로 용출한 분획에서 천마 특유의 강한 이취를 찾아내어 GC와 GC/MS로 분석한 결과, *p*-cresol 성분임을 알아내었다. *L. sakei* C 11 등 3종으로 2일 젖산 발효한 천마의 *p*-cresol 함량은 발효하지 않은 대조구와 대비하여 감소하였으며, 특히 *L. sakei* C 11 발효 시

**Table 4. Total polyphenol and total flavonoid contents of the fermented *G. elata* by lactic acid bacteria strains** (unit:  $\mu\text{g/g}$ )

Sample	Control	<i>L. plantarum</i> VL-1	<i>P. inopinatus</i> BK-3	<i>L. sakei</i> C-11
Total polyphenol	97.1 $\pm$ 2.9 <sup>1)c</sup>	132.7 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	110.7 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	134.6 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>
Total flavonoid	40.9 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	68.6 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>	64.4 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	70.1 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>

\* Fermented period: 2 days.

<sup>1)</sup> Mean $\pm$ S.D.

<sup>2)</sup> Means with different letters<sup>(a-c)</sup> within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.



**Table 5. Antioxidant activity of the fermented *G. elata* by lactic acid bacteria strains**

Sample	Control	<i>L. plantarum</i> VL-1	<i>P. inopinatus</i> BK-3	<i>L. sakei</i> C-11
DPPH radical scavenging activity (%)	51.4±0.9 <sup>c</sup>	73.3±0.5 <sup>a</sup>	71.2±0.6 <sup>ab</sup>	70.1±2.1 <sup>b</sup>
FRAP (µg/mL)	254.9±5.3 <sup>d</sup>	344.3±4.5 <sup>b</sup>	329.7±3.7 <sup>c</sup>	529.2±0.9 <sup>a</sup>

\* Fermented period: 2 days.

<sup>1)</sup> Mean±S.D.

<sup>2)</sup> Means with different letters<sup>(a-d)</sup> within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

54.7% 감소하였다. 젖산균 발효에 의한 parishin 유도체 함량은 발효하지 않은 대조군 대비 parishin A는 함량은 감소하고, parishin B, C, gastrodin 함량은 증가하였다. 또한 젖산 발효 균주에 따라 총 페놀 함량은 14.0~38.4% 및 총 플라보노이드 함량은 57.4~77.3% 증가하였으며, DPPH 소거 활성 및 FRAP 환원력 측정에 의한 항산화 효과도 증가함을 확인하였다.

### 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(세부과제번호: PJ010-84502)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

### References

- Ahn EK, Jeon HJ, Lim EJ, Jung HJ, Park EH. 2007. Anti-inflammatory and anti-angiogenic activities of *Gastrodia elata* Blume. *J Ethnopharmacol* 110:476-482
- Baek NI, Choi SY, Park JK. 1999. Isolation and identification of succinic semialdehyde dehydrogenase inhibitory compound from the rhizome of *Gastrodia elata* Blume. *Arch Pharm Res* 22:219-224
- Bandli JK, Heidari R, Mohammadkhani N. 2017. Phenolic content and ferric reducing antioxidant power of *Artemisia fragrans* Willd and *Artemisia vulgaris* L. Herbs. *Pharm Chem J* 51:52-55
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Chang YN, Ahn BY. 2011. Decrease in intrinsic objectionable odors and change of gastrodin contents in lactic acid treated *Gastrodia elata* Blume. *J Korea Academia-Industrial Cooperation Society* 12:5056-5062
- Chen S, Liu JQ, Xiao H, Zhang J, Liu A. 2016. Simultaneous qualitative assessment and quantitative analysis of metabolites (phenolics, nucleosides and amino acids) from the roots of fresh *Gastrodia elata* using UPLC-ESI-triple quadrupole ion MS and ESI-linear ion trap high-resolution MS. *PLoS One* 11:e0150647
- Choi JH, Kim JH, Jung JY, Suh SG. 2013. Comparison of nerve growth factor induction and anti-aging activity using dried *Gastrodia* and fermented *Gastrodia* extracts. *Kor J Hort Sci Technol* 31:380-387
- Davis WB. 1947. Determination of flavanones in citrus fruits. *Anal Chem* 19:476-478
- Folin O, Dennis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12:239-243
- Jang YW, Lee JY, Kim CJ. 2010. Anti-asthmatic activity of phenolic compounds from the roots of *Gastrodia elata* Bl. *Int Immunopharmacol* 10:147-154
- Kanisawa T, Tokoro K, Kawahara S. 1994. Flavor development in the beans of *Vanilla planifolia*. *Olfaction and Taste* 268-270
- Kim HJ, Kwak IS, Lee BS, Lee HC, Lee EM, Lim JY, Yun YS, Chun BW. 2004. Methods of pretreatment for decrease of discomfortable odor of *Gastrodia elata* Blume. *J Engineering Research* 35:135-140
- Kim HY. 2014. Change of functional substances, gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol in the manufacturing of black *Gastrodia elata* Blume and fermented *Gastrodia elata* Blume. Master's Thesis, Chonbuk National Univ. Korea
- Kim MH, Kim JG, Choi JH. 2014. Antioxidant activity and changes in major functional components of fermented *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Food & Nutr* 27:684-691
- Kim MN. 2016. Strategies of gastrodin production from parishin A using heat or enzyme treatment. Master's Thesis, Chonbuk National Univ. Korea
- Kim YM, Jeong HJ, Chung HS, Seong JH, Kim HS, Kim DS, Lee YG. 2016. Anti-oxidative activity of the extracts from *Houttuynia cordata* Thunb. fermented by lactic acid bacteria. *J Life Sci* 26:468-474
- Krasner SW. 1988. Flavor-profile analysis: An objective sensory technique for the identification and treatment of off-flavors in drinking water. *Water Sci Technol* 20:31-36

- Lee BY, Yang YM, Han CK. 2002. Analysis of the aroma pattern of *Gastrodia rhizoma* by the drying condition. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:13-17
- Lee KH, Rhee KH, Kim BS, Choi YH, Kim CH. 2013. Sleep inducing effect of *Gastrodia elata* fermented with lactic acid bacteria. *Kor J Pharmacogn* 44:281-285
- Leonardos G, Kendall D, Barnard N. 1969. Odor threshold determinations of 53 odorant chemicals. *J Air Pollut Control Assoc* 19:91-95
- Li Z, Wang Y, Ouyang H, Lu Y, Qiu Y, Feng Y, Yang S. 2015. A novel dereplication strategy for the identification of two new trace compounds in the extract of *Gastrodia elata* using UHPLC/Q-TOF-MS/MS. *J Chromatogr B* 988:45-52
- Lin JH, Liu YC, Hau JP, Wen KC. 1996. Parishins B and C from rhizomes of *Gastrodia elata*. *Phytochem* 42:549-551
- Nowak A, Libudzisz Z. 2007. Ability of intestinal lactic bacteria to bind or/and metabolise phenol and *p*-cresol. *Ann Microbiol* 57:329-335
- Park MR, Yoo C, Chang YN, Ahn BY. 2012. Change of total polyphenol content of fermented *Gastrodia elata* Blume and radical scavenging. *Korean J Plant Res* 25:379-386
- Qiu F, Liu TT, Qu ZW, Qiu CY, Yang ZF, Hu WP. 2014. Gastrodin inhibits the activity of acid-sensing ion channels in rat primary sensory neurons. *Eur J Pharmacol* 731:50-57
- Schultz TH, Flath RA, Mon TR, Egging SB, Teranishi R. 1977. Isolation of volatile components from a model system. *J Agricul Food Chem* 25:446-449
- Scheline RR. 1968. Metabolism of phenolic acids by the rat intestinal microflora. *Acta Pharmacol Toxicol* 26:189-205
- Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, Kim IH. 1981. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume. *Cheml Pharm Bull* 29:55-62
- Tang C, Wang L, Li J, Liu X, Cheng M, Xiao H. 2015. Analysis of the metabolic profile of parishin by ultra performance liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 29: 1913-1920
- Yong GR. 2015. Studies on physicochemical properties and biologically active constituents from *Cudrania tricuspidata* fruits. Master's Thesis, Chonbuk National Univ. Korea
- Zhang X, Ning Z, Ji D, Chen Y, Mao C, Lu T. 2015. Approach based on high-performance liquid chromatography fingerprint coupled with multivariate statistical analysis for the quality evaluation of *Gastrodia rhizoma*. *J Sep Sci* 38:3825-3831
- Zhou J, Pu XY, Yang YB, Yang TR. 1983. The chemistry of *Gastrodia elata* BL. IV. the phenolic compounds of some Chinese species of *Gastrodia*. *Acta Botanica Yunnanica* 5:443-444
- Zhou Y, Cao DB, Han YY, Sun JH, Yang SR. 2011. Protective effects of *Gastrodia elata* on myocardial cells of mice with viral myocarditis. *J Clin Pediatr* 29:766-768

---

Received 07 June, 2017  
 Revised 07 August, 2017  
 Accepted 18 August, 2017