



Rhizopus delemar로 발효된 지황의 이화학적 성분 분석

송빛나 · 이다빈 · 박보람 · 황 해 · 김소영 · 박신영[†]
농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과

Physicochemical Components of *Rehmannia glutinosa* Fermented with *Rhizopus delemar*

Bitna Song, Dabin Lee, Boram Park, Hae Hwang, So Young Kim and Shin Young Park[†]

Fermented and Processed Food Science Division, NIAS, RDA, Wanju 55365, Korea.

ABSTRACT

Background: This study was carried out to determine the physicochemical components of *Rehmannia glutinosa* (RG) fermented with *Rhizopus delemar*.

Methods and Results: Physicochemical components such as changes in moisture content, pH value, total acidity, amount of reducing sugars as well as quantity of free sugars, free amino acids, and catalpol were investigated. Result showed that, the moisture content ranged from 64.26 to 65.51%. The pH and total acidity of the fermented RG decreased significantly during fermentation. The reducing sugar content ranged from 0.10 to 1.34%. The most abundant main free sugars were identified as raffinose, xylose, glucose, fructose, and sucrose. The sucrose content in 80% ethanol and in water extracts increased during RG fermentation. In total, 26 free amino acids were detected, including seven essential amino acids. In addition, the quantity of free amino acids decreased significantly during fermentation. Finally, the catalpol content of the fermented RG was highest on the 2nd day of fermentation at 2,028.67 mg/ 100 g.

Conclusions: These results indicated that fermentation of *Rhizopus delemar* could be used to enhance biological activity, and that fermented RG could be used as a functional material and as an edible resource in food and functional materials industries.

Key Words: *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel., *Rhizopus delemar*, Fermentation, catalpol, Extract

서 언

지황 (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel.)은 현삼과에 속하는 약용작물로, 우리나라를 비롯하여 동아시아에 분포하는 다년생 식물이다 (Jeong *et al.*, 2004). 지황의 뿌리는 한약재로 이용되어지며, 용도에 따라 생것을 생지황, 건조시킨 것을 건지황, 찌서 말린 것을 숙지황이라고 분류한다 (Kim *et al.*, 2008).

생지황 및 건지황의 주요 성분으로는 catalpol과 더불어 rehmanin, carotene, β -sitosterol 및 stigmasterol, vitamin A, raffinose, fatty acid, arginine, stachyose, carbohydrate, norcarotenoid, γ -butyl amino acid 등의 다양한 성분이 알려

져 있다 (Ahn *et al.*, 1998).

지황의 약리작용에 한 연구에서 catalpol이 치매 치료에 효과가 있다고 보고되었다 (Jiang *et al.*, 2008). 또 지황 추출물의 경구 투여에 의한 토끼의 혈당강하효과 (Kubo *et al.*, 1994), 면역에 효과가 있다는 등의 보고가 있다 (Tian *et al.*, 2006). 지황의 효능 효과에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으나, 지황은 쓴맛이 강하여 다양한 식품 소재로 활용되지 못하고 있는 실정이다.

최근 들어 유산균, 효모, 곰팡이 등의 미생물을 이용한 발효 기술의 연구로 다당체, 올리고당, 아미노산 펩타이드 등의 발효산물을 얻고, 상호간의 시너지 작용으로 생리활성 효능이 상승되는 것에 대한 연구가 많이 진행되고 있다 (Yang *et al.*,

[†]Corresponding author: (Phone) +82-63-238-3641 (E-mail) soyoenj@korea.kr

Received 2018 September 27 / 1st Revised 2018 October 22 / 2nd Revised 2018 December 10 / 3rd Revised 2018 December 13 / Accepted 2018 December 20

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2007). 주로 탄수화물과 단백질을 분해하는 미생물 중의 하나인 곰팡이는 분비하는 효소에 의하여 생성되는 아미노산류, 유기산류, 당류 등의 맛 성분은 제품의 품질에 결정적인 영향을 준다. 뿐만 아니라 bioconversion에 의하여 다양한 생리활성작용을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2005).

국내에서 *Rhizopus* 속이나 *Aspergillus* 속 등의 곰팡이를 이용하여 전분질 원료를 당으로 전환시킬 수 있는 당화 효소의 생성을 목적으로 곡자, 국 등을 제조해 막걸리 주조에 이용하고 있다 (Kim *et al.*, 2012). 전통누룩에서 *Rhizopus* 속 곰팡이는 당화 아밀라아제 생성을 주도하는 것으로 알려져 있으며 (So and Lee, 2009), 누룩의 당화력을 향상시키기 위하여 *Rhizopus* 속을 인위적으로 접종하는 연구도 종종 보고되고 있다 (So, 1993).

최근에 천연물 소재는 주목받는 분야이며, 식물유래 생리활성물질은 대사증후군 및 성인병을 예방하는 기능성소재로서 각광받고 있다. 기존 천연물질을 이용한 추출 방법은 주로 단순 추출하거나 액상발효방법을 활용하여 왔지만 효과가 낮은 한계가 있으므로, 최근 다양한 기질에서도 자랄 수 있는 곰팡이류 등의 미생물을 활용해 고체 발효함으로써 발효 대상 기질을 그대로 이용해 생 변환 효율을 높이는 기술을 사용하고 있다 (Bae *et al.*, 2004). 이는 미생물이 식물 섬유소 및 각종 천연물을 분해 및 변환하는 능력이 우수하므로 대부분 식물유래 천연물질을 발효 대상으로 사용할 수 있는 장점 때문이다 (Cho *et al.*, 2006)

따라서, 본 연구에서 *Rhizopus delemar*로 지황을 발효하여 기능성뿐만 아니라 이용성을 증진시킨 식품 개발과 더불어 다양한 용도로 쓰일 수 있는 소재를 개발하기 위한 기초자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 균주는 국립농업과학원 발효가공식품과에서 분리한 *Rhizopus delemar* 58-8 (KACC 46422)를 사용하였으며 생지황 (*Rehmannia glutinosa* Licoxshitz ex Steudel)은 경북 군위산 2년근으로 경동시장에서 구입하여 농촌진흥청 원예특작과학원 약용작물과에서 확인 후 사용하였다.

2. 균주 배지 및 배양조건

균의 보존용 배지로는 potato dextrose agar (PDA, Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) 배지를 사용하여, 30°C에서 24 시간 평판 배양하였다.

형성된 단일 colony를 potato dextrose broth (PDB, Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) 배지에 30°C에서 24 시간 3 회 계대 배양한 후, 접종원으로 사용하였다.

3. 균주 배양 및 발효 지황 제조

생지황 500 g을 세척하여 3-5 cm로 썰어 멸균 팩에 담아 autoclave (Vision Scientific Co., Ltd., Westland, MI, USA)에서 121°C, 15 분 멸균시킨 후, 2% *R. delemar*를 접종하여 30°C 온도의 incubator (VS-1203PFHLN, Vision Scientific Co., Ltd., Westland, MI, USA)에서 8 일 동안 배양하며 발효시켰다.

균을 배양한 지황은 -80°C 초저온냉동기 (deep freezer, Ilsin BioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에서 24 시간 동결시킨 후 동결건조기 (freeze dryer, Ilsin BioBase Co., Dongducheon, Korea)에서 72 시간 동안 동결 건조시킨 것을 분쇄하여 시료로 사용하였다.

4. 발효 지황의 수분 함량, pH 및 산도 측정

발효 지황의 수분 함량은 적외선 수분 측정기 (MS-70, AND Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. pH는 시료 2 g을 칭량하여 8 ml의 증류수를 가하여 균질화한 후 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리 하여 상등액을 취한 후 pH meter (HM-30P, DKK-TOA, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

총 산도는 pH 측정의 시료와 동일한 시료를 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리한 후 시료액 0.1 ml에 0.9 ml의 증류수를 가하여 1 ml로 정용한 후, 0.1 N NaOH로 pH 8.3에 도달할 때까지 적정하였다. 적정에 소비된 NaOH 소비량을 이용하여 acetic acid 함량 (%)으로 환산하여 총산 함량을 표시하였다. 실험은 3 회 반복하여 그 평균값으로 나타내었다.

5. 환원당 측정

환원당은 dinitrosalicylic acid (DNS)법 (Kim *et al.*, 2012)에 따라 시료 2 g을 칭량하여 8 ml의 증류수를 가하여 균질화한 후 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리 하여 상등액을 취한 후 DNS reagent 1 ml을 가하여 15 분간 끓인 다음, 냉각한 후 증류수 3 ml을 첨가하여 microplate reader (Biotek Synergy Mx, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 546 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 당의 정량은 glucose를 표준물질로 사용하였으며, 표준곡선으로부터 환산하여 함량을 산출 하였다.

6. 발효 지황 추출물 제조

동결 건조한 발효 지황을 사용하여 물 추출물 및 80% 에탄올 추출물을 제조하였다. 물 추출물의 제조는 다음과 같다. 각 발효물 5 g에 끓인 증류수 100 ml을 혼합 후 ultrasonication (Power Sonic 420, 50/60 HZ, 700 W, Hwashin Co., Seoul, Korea)로 1 시간 씩 2 회 반복 추출한 후 Whatman No. 2 여과지를 이용하여 여과시킨 후, 여과액을 200 ml로 정용하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여

50°C 이하에서 감압·농축한 뒤, 이를 같은 추출용매로 용해하여 본 실험의 분석용 시료로 사용하였다.

80% 에탄올 추출물의 제조는 다음과 같다. 각 동결건조된 발효물 5 g에 80% 에탄올 수용액 100 ml 씩 가하여 ultrasonicator (Power Sonic 420, 50/60 HZ, 700W, Hwashin Technology Co., Seoul, Korea)로 1 시간씩 2 회 sonication 하여 추출한 후 Whatman No. 2 여과지를 이용하여 여과시킨 후, 여과액을 200 ml 로 정용하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여 50°C 이하에서 감압·농축하였고, 이를 같은 추출용매로 용해하여 본 실험의 분석용 시료로 사용하였다.

7. 유리당 분석

유리당 분석은 HPLC (Waters 2695, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다.

발효 지황 추출물을 희석하여 0.45 μm PVDF membrane filter (Waters Co., Miliford, MA, USA)를 여과한 것을 시험용액으로 하였고, column은 YMC-PACK Polyamine II (5 μm, 4.6 × 250 mm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)을 사용하였으며, mobile phase는 acetonitrile : water 혼합액 (75 : 25, v/v), flow rate는 1.0 ml/min, detector는 ELSD Signal (Waters 2414, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 사용하여 분석하였다

8. 유리 아미노산 분석

유리아미노산 분석은 유리아미노산은 발효 지황 추출물에 5% TCA 용액을 5 배 넣은 후 원심분리 (12,000 rpm, 15 분)한 다음 상등액을 취하여 n-hexane 혼합하여 비극성 물질을 처리한 후 0.25 μm syringe filter에 통과시킨 후 아미노산 분석기 (Hitachi L-8900, Hitachi High Technologies America Inc., Schaumburg, IL, USA)로 분석하였다.

이때 column은 hitachi 4.6 × 60 mm (seperation), hitachi 4.6 × 40 mm (ammonia filtering)을 사용하였으며, column 온도는 50°C, mobile phase는 buffer set (PH-SET KANTO, Hitachi High Technologies America Inc., Schaumburg, IL, USA), flow rate (ml/min)는 buffer 0.4, ninhydrin 0.35, injection volume은 20 μl 였다.

9. catalpol 함량분석

발효 지황의 80% 에탄올 및 물 추출물 시료의 성분분석은 UPLC (Waters 2626, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 추출물은 0.2 μm PVDF membrane filter 를 여과한 것을 시험용액으로 하였고, 분석조건은 다음과 같다.

Column은 ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm, 2.1 × 50.0 mm, Waters Co., Miliford, MA, USA), mobile phase 조성은 solvent A는 0.5%의 acetic acid를 포함한 water를 혼

합하여 사용하였으며 solvent B acetonitrile를 사용하였고, flow rate 및 column 온도는 각각 0.5 ml/min, 30°C, 검출 파장은 280 nm로 detector는 Photodiode array detector ELSD Signal (Waters 204, Waters Co., Miliford, MA, USA)를 사용하여 검출하였다.

표준물질 catalpol은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고 UPLC에서 나타난 peak area의 3회 반복 평균값을 취한 후 표준품의 양과 peak area사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하여 계산하였다.

10. 통계처리

본 실험의 결과는 3 회 반복 실험을 실시한 뒤 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 25.0 program (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago IL, USA)을 이용하여 ANOVA를 실시한 후 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)방법을 사용하여 각 처리구간의 유의적 차이를 검증하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 발효기간 중 지황의 이화학적 특성 변화

*Rhizopus delemar*를 접종하여 8 일간 발효한 지황의 수분함량, pH 및 환원당의 측정 결과는 Table 1과 같다. 발효 지황의 수분함량은 전반적으로 64.32 - 65.51%로 거의 유사하였다. 이는 발효 기간이 증가함에 따라 발효 지황의 수분 함량이 거의 변화가 없는 것으로 나타났다.

pH는 대조구가 pH 5.20인데 비하여 발효 4 일차에 pH 4.86로 가장 낮은 값을 나타냈다. 이는 *R. delemar* 균주의 생장은 알칼리보다는 pH 4 - 5 범위의 산성에서 배양이 잘된다는 보고와 일치하였다 (Kim *et al.*, 1999). 산도는 배양기간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보는데 배양 0 일차 0.53%로 총 산도가 가장 높았으며 이후 배양 2, 4, 6, 8 일차 각각 0.52%, 0.22%, 0.17%, 0.26%로 대조구에 비해 감소하였다.

이 결과는 발효가 진행되면서 산성을 나타내는 유기산의 일부분이 소모되면서, 세포내 탈 탄산효소에 의해 다른 물질로 전환되어 발효물의 산도를 감소시키거나 유지하는 경향을 나타낸다는 연구결과와 유사하였다 (Lee *et al.*, 2016).

발효 지황의 환원당 함량을 측정한 결과 발효 기간이 증가함에 따라 함량 차이를 보였다. 발효 6 일차 환원당 함량은 1.34 mg/100 g으로 가장 높은 환원당 함량을 나타냈으며 대조구 환원당 함량 0.10 mg/100 g에 비해 약 13 배 높은 환원당 함량을 나타내었다. Park 등 (2010)이 보고한 바에 따르면 α-amylase를 생성하는 미생물들이 발효식품 제조에서 전분질 원료를 당화시키는 것이라고 하였는데, 본 연구에서도 *R. delemar*를 지황에 배양하여 발효기간이 증가함에 따라 효소활

발효 지황의 이화학적 성분 분석

Table 1. Changes in moisture, pH, total acidity and reducing sugar content of fermented *R. glutinosa*.

Fermentation period (day)	Components			
	Moisture content (%)	pH	Total acid (%)	Reducing sugar (mg/100 g)
0	65.51±1.05 ^a	5.20±0.02 ^b	0.53±0.01 ^a	0.10±0.04 ^a
2	64.32±0.67 ^a	5.25±0.03 ^b	0.52±0.01 ^a	0.07±0.04 ^a
4	64.26±0.78 ^a	4.86±0.26 ^a	0.22±0.01 ^a	1.20±0.15 ^c
6	65.18±0.99 ^a	5.03±0.26 ^a	0.17±0.01 ^a	1.34±0.06 ^c
8	65.50±5.44 ^a	5.04±0.13 ^a	0.26±0.06 ^a	0.84±0.16 ^b

Values are means ± SD (n = 3). *Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT).

성이 증가하여 당화되었음을 확인 할 수 있었다.

2. 발효 지황의 유리당 함량 분석

발효 지황의 추출용매에 따른 유리당 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 대조구의 80% 에탄올 추출물은 raffinose 356.17 mg/100 g, xylose 329.17 mg/100 g, fructose 1,177.53 mg/100 g, glucose 2,550.33 mg/100 g, sucrose 3,005.26 mg/100 g이 검출되었다.

발효 4 일차 지황의 80% 에탄올 추출물의 경우 xylose의 함량이 661.52 mg/100 g으로 약 2 배, sucrose의 함량이 3,384.15 mg/100 g 으로 약 1.13 배 증가하였다. 반면 glucose는 1,726.11 mg/100 g 으로 대조구에 비하여 감소하였다. raffinose, fructose는 발효 2 일차 이후에는 검출되지 않았다.

열수추출물에서 대조구의 유리당 함량은 raffinose 284.11 mg/100 g, xylose 365.47 mg/100 g, fructose 635.50 mg/100 g, glucose 2,114.78 mg/100 g, sucrose 1,903.53 mg/100 g이 검출되었다.

발효 2 일차 지황의 열수추출물에서는 raffinose의 함량이

516.03 mg/100 g, xylose의 함량이 665.68 mg/100 g 으로 각각 약 1.82 배, sucrose의 함량이 3,097.94 mg/100 g 으로 약 1.63 배 증가하였다.

반면 glucose의 함량은 발효 2 일차에 1,653.37 mg/100 g으로 감소하였다가 발효 8 일차에 2,180.45 mg/100 g으로 대조구에 비해 증가하였다. fructose는 발효 2 일차 이후에는 검출되지 않았다.

이는 발효 미생물이 amylase 분해효소에 의해서 glucose 등과 같은 환원당으로 분해되어져 발효의 기질로 이용되어 진다는 보고가 있으며 본 연구의 결과와 유사하였다 (Lee *et al.*, 2015).

3. 발효 지황의 유리 아미노산 분석

발효 지황이 가지는 유리아미노산의 조성은 Table 3과 같다. 총 아미노산은 총 아미노산은 필수아미노산 7 종을 포함하여 26 종이 검출되었으며 배양기간이 경과함에 따라 유리 아미노산이 유의적인 변화를 나타내었다.

80% 에탄올 추출물의 배양 2 일차의 경우 arginine이 106.88 mg/100 g 으로 구성성분 가장 높았으며, 그 다음으로 g-amino-N-butyric acid가 168.56 mg/100 g, glutamic acid 50.90 mg/100 g, aspartic acid 31.59 mg/100 g 순으로 나타났다. 그 외에도 cystine, methionine, tyrosine, phenylalanine, histidine 등이 검출되었다. 그 중 taurine과 phenylethylamine은 배양 0 일차에는 검출되지 않았으나, 배양 2 일차부터 검출되었다. 반면에 citrulline, tyrosine, isoleucine, phenylalanine, β -amino isobutyric acid, ornithine은 발효 2 일차에는 검출되었으나, 4 일차 이후부터는 검출되지 않았다. 또한 threonine, serine, histamine, arginine은 발효 6 일차 이후부터 검출되지 않았고, methionine은 발효 8 일차에 검출되지 않았다.

Lew 등 (1988)이 보고한 바에 따르면 미생물의 protease 활성으로 단백질이 가수 분해됨으로써 아미노산 생성 증가에 기인 한다고 보고하였는데, 본 실험에서도 발효 기간에 따라

Table 2. The free sugars content of fermented *Rehmannia Glutinosa*.

Fermentation period (day)	Content (mg/100 g)									
	80% EtOH ext.					Water ext.				
	Raffinose	Xylose	Fructose	Glucose	Sucrose	Raffinose	Xylose	Fructose	Glucose	Sucrose
0	356.17±17.2 ^a	329.03±0.1 ^a	1,177.53±22.4 ^b	2,550.33±48.7 ^c	3,005.26±1.1 ^{ab}	284.11±7.5 ^a	365.47±10.5 ^a	635.50±23.7 ^b	2,114.78±57.3 ^c	1,903.53±32.2 ^a
2	348.17±29.2 ^a	429.30±24.0 ^b	152.15±41.3 ^a	1,089.17±36.4 ^a	2,540.98±303.6 ^a	516.03±13.5 ^d	665.68±65.8 ^c	429.88±38.2 ^a	1,653.37±165.1 ^b	3,097.94±279.5 ^{bc}
4	ND	661.52±17.5 ^d	ND	1,726.11±78.2 ^b	3,384.15±357.1 ^b	380.57±41.6 ^b	647.61±43.9 ^c	ND ¹⁾	1,200.65±58.6 ^a	2,834.11±103.6 ^b
6	ND	482.90±40.7 ^c	ND	1,614.95±36.5 ^c	4,505.93±432.7 ^c	348.39±28.7 ^b	547.94±37.8 ^b	ND	1,621.33±32.0 ^b	3,252.35±351.3 ^c
8	ND	436.09±17.0 ^b	ND	1,904.78±46.6 ^d	3,287.24±155.2 ^b	460.62±28.6 ^c	624.42±43.4 ^{bc}	ND	2,180.45±102.2 ^c	5,833.59±154.3 ^d

¹⁾ND; Not detected. Values are means ± SD (n = 3). *Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT).

Table 3. Amino acid content of fermented *Rehmannia Glutinosa*.

(unit: mg/100 g)

Water extract	Fermentation period (days)				
	0	2	4	6	8
Threonine ¹⁾	0.19±0.03 ^a	2.51±0.38 ^c	0.08±0.01 ^a	0.17±0.10 ^a	1.66±0.13 ^b
Valine ¹⁾	2.65±0.04 ^c	1.51±0.59 ^b	0.25±0.00 ^a	0.33±0.19 ^a	2.54±0.02 ^a
Methionine ¹⁾	0.17±0.06 ^a	0.42±0.17 ^a	0.03±0.00 ^a	0.06±0.04 ^a	0.77±0.12 ^b
Isolucine ¹⁾	2.12±0.16 ^c	1.22±0.38 ^b	0.16±0.01 ^a	0.17±0.10 ^a	1.80±0.17 ^d
Tyrprophan ¹⁾	2.26±0.16 ^c	1.18±0.39 ^b	0.21±0.08 ^a	0.21±0.13 ^a	1.63±0.58 ^{bc}
Phenylalanine ¹⁾	3.07±0.27 ^c	1.96±0.56 ^b	0.31±0.09 ^a	0.33±0.20 ^a	2.06±0.60 ^b
Histidine ¹⁾	2.26±0.61 ^b	0.92±0.53 ^a	0.68±0.11 ^a	0.62±0.37 ^a	1.06±0.18 ^a
Phosphoserine	ND	ND	ND	ND	ND ²⁾
Taurine	ND	ND	ND	ND	ND
Phenylethylamine	ND	ND	ND	ND	ND
Aspartic acid	1.26±0.73 ^a	1.53±0.71 ^a	3.76±0.69 ^b	2.67±1.58 ^{ab}	2.57±0.46 ^{ab}
Serine	ND	1.23±0.29 ^c	0.19±0.01 ^a	0.27±0.16 ^a	2.08±0.13 ^b
Glutamic acid	11.23±1.67 ^b	1.35±0.58 ^a	4.72±1.48 ^a	0.49±0.38 ^a	4.23±1.32 ^a
Sarcosine	ND	ND	ND	ND	ND
α-Aminoadipicacid	ND	ND	ND	ND	ND
Glycine	1.42±0.25 ^a	0.79±0.23 ^a	0.14±0.04 ^b	0.22±0.14 ^b	1.92±0.55 ^b
Alanine	6.32±0.69 ^c	9.24±0.94 ^d	0.75±0.12 ^a	1.22±0.72 ^a	4.18±0.65 ^b
Citrulline	0.73±0.14 ^a	ND	ND	ND	ND
α-Aminobutyricacid	0.30±0.03 ^a	ND	ND	ND	ND
Cystine	1.15±0.06 ^a	0.80±1.02 ^a	0.35±0.16 ^a	0.44±0.29 ^a	0.47±0.22 ^a
β-Alanine	ND	ND	ND	ND	ND
β-aminoisobutyricacid	ND	ND	ND	ND	ND
g-amino-N-butyric acid	12.76±1.40 ^c	6.13±1.11 ^b	0.91±0.05 ^a	1.35±0.78 ^a	2.15±0.11 ^a
Ethanolamine	0.26±0.03 ^c	0.15±0.01 ^b	0.06±0.01 ^a	0.13±0.08 ^{ab}	0.48±0.06 ^d
Ornithine	ND	5.98±0.48 ^b	5.71±0.90 ^b	0.55±0.32 ^a	0.71±0.02 ^a
Arginine	21.06±2.1 ^c	46.00±5.06 ^b	13.13±4.93 ^a	11.54±7.33 ^a	4.16±1.55 ^a

*R. delemar*의 protease 활성의 증가로 지황의 단백질이 가수 분해됨으로써 아미노산이 증가함을 확인 할 수 있었다. 또한 미생물 증식이 왕성해짐으로써 아미노산의 생성보다 소비 증가로 인해 아미노산 함량이 다시 감소한 것으로 판단되었다 (Park and Suh, 1995).

열수 추출물의 유리아미노산의 함량은 배양 2 일차의 경우 arginine이 46.00 mg/100 g 으로 구성성분 가장 높았으며, 그 다음으로 alanine이 9.24 mg/100 g으로 나타났다. 열수 추출물에서는 80% 에탄올 추출물에 비해 소량의 아미노산이 검출되었거나 또는 검출 되지 않았다.

아미노산의 조성 and 함량은 발효 미생물 사용 여부 및 원료 및 발효기간 등의 조건에 따라 기인하며 (Youn *et al.*, 2016) 미생물을 활용한 발효로 다양한 특성을 가진 아미노산이 증가시킬 수 있다고 보고되고 있다 (Baek *et al.*, 2016). 본 연구의 결과를 볼 때 발효 미생물의 사용과 발효기간을 조정함으로써 아미노산 조성을 증가시킬 뿐만 아니라 독특한 향미를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 발효 지황의 Catalpol 함량 분석

발효 지황의 추출용매에 따른 성분 함량을 측정하였다. 본

발효 지황의 이화학적 성분 분석

Table 3. Continued.

80% EtOH Extract	Fermentation period (days)				
	0	2	4	6	8
Threonine ¹⁾	1.70±1.38 ^a	0.29±0.05 ^a	0.12±0.11 ^a	ND	ND
Valine ¹⁾	6.68±0.90 ^b	4.45±2.54 ^a	2.12±1.37 ^a	0.87±0.12 ^a	4.19±3.78 ^b
Methionine ¹⁾	0.34±1.45 ^a	1.43±1.23 ^a	0.46±0.15 ^a	0.31±0.22 ^a	ND
Isolucine ¹⁾	3.09±0.79 ^a	0.65±0.18 ^b	ND	ND	ND
Tyrptophan ¹⁾	0.73±4.02 ^a	5.51±1.91 ^a	ND	ND	ND
Phenylalanine ¹⁾	1.05±2.71 ^a	4.22±1.31 ^a	ND	ND	ND
Histidine ¹⁾	0.93±7.31 ^a	11.01±2.27 ^a	3.17±0.69 ^a	ND	ND
Phosphoserine	12.34±1.17 ^a	14.02±1.19 ^a	9.35±1.90 ^a	9.84±0.97 ^a	12.25±1.25 ^a
Taurine	ND	8.80±0.69 ^a	5.12±1.57 ^a	5.12±0.89 ^a	6.15±1.01 ^a
Phenylethylamine	ND	12.44±0.33 ^a	8.53±1.90 ^a	7.46±0.48 ^a	7.53±0.36 ^a
Aspartic acid	1.60±1.29 ^a	31.59±5.65 ^a	0.47±0.03 ^a	1.04±0.14 ^a	0.36±0.29 ^a
Serine	0.32±0.04 ^a	0.72±0.04 ^a	0.51±0.36 ^a	ND	ND
Glutamic acid	19.50±0.34 ^{ab}	50.90±8.65 ^b	18.21±2.82 ^a	6.21±2.44 ^a	3.75±1.81 ^a
Sarcosine	ND	ND	ND	3.05±2.85 ^b	4.23±1.76 ^b
α-Amino adipic acid	0.76±0.10 ^a	1.10±0.27 ^a	0.81±0.11 ^a	1.23±0.64 ^a	1.20±0.35 ^a
Glycine	4.72±3.66 ^a	1.74±0.57 ^a	1.01±0.37 ^a	1.34±0.38 ^a	1.27±0.53 ^a
Alanine	25.52±3.36 ^c	13.80±2.64 ^{bc}	14.21±2.29 ^{bc}	7.64±7.54 ^{ab}	7.25±4.68 ^a
Citrulline	0.87±0.20 ^b	0.57±0.05 ^b	ND	ND	ND
α-Aminobutyric acid	0.58±0.21 ^b	0.21±0.02 ^{ab}	0.22±0.13 ^a	0.21±0.10 ^a	0.25±0.03 ^{ab}
Cystine	ND	6.40±2.49 ^{ab}	1.28±0.97 ^{ab}	2.25±1.02 ^a	5.21±4.03 ^b
β-Alanine	1.97±0.80 ^a	2.87±0.55 ^a	1.15±0.33 ^a	1.15±0.47 ^a	1.48±0.43 ^a
β-aminoisobutyric acid	1.60±2.15 ^a	3.96±1.93 ^a	ND	ND	ND
g-amino-N-butyric acid	76.45±2.57 ^b	68.56±4.01 ^b	39.32±2.21 ^a	5.56±2.03 ^a	6.57±0.74 ^a
Ethanolamine	1.58±0.71 ^a	2.96±0.16 ^a	2.15±0.46 ^a	1.63±0.83 ^a	2.15±1.16 ^a
Ornithine	0.26±0.46 ^{ab}	2.26±1.09 ^a	ND	ND	ND
Arginine	0.60±0.08 ^a	106.88±29.68 ^b	0.55±0.14 ^a	ND	ND

¹⁾Essential Amino acid. ²⁾ND; Not detected. *Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT).

실험에서는 지황에 존재하는 지표물질인 catalpol을 UPLC로 분석을 통해 확인하였고 함량을 Table 4에 나타내었으며, UPLC 크로마토그램은 Fig. 1에 나타내었다.

분석결과 대조구의 80% 에탄올 추출물은 260.77 mg/100 g, 물 추출물은 273.15 mg/100 g으로 나타났으며, 발효 지황을 분석한 결과 4 일차에 80% 에탄올 추출물은 1,307.82 mg/100 g으로 대조구에 비해 약 5 배 증가한 함량으로 높은 함량을 나타내었다. 또한 물 추출물은 발효 지황 2 일차에 2,028.67 mg/100 g으로 대조구 보다 약 7.4 배 이상 높은 함량

을 나타내었다.

본 실험에서 대조구와 비교 했을 때 발효 지황의 catalpol 함량이 높게 나타났다. 본 실험의 대조구 뿐만 아니라 Lee 등 (2017)이 보고한 지황의 catalpol의 함량과 대조하였을 때, 발효 지황의 catalpol의 함량이 높게 나타났다. 이러한 발효공정을 통한 약용소재 유효성분의 생물전환으로 약재의 효능 증가 및 새로운 효능 도출이 가능할 수 있으며, 체내 이용 및 흡수를 증진 시켜 여러모로 식품산업에서 폭넓은 활용이 가능할 것으로 판단된다 (Cho *et al.*, 2006).

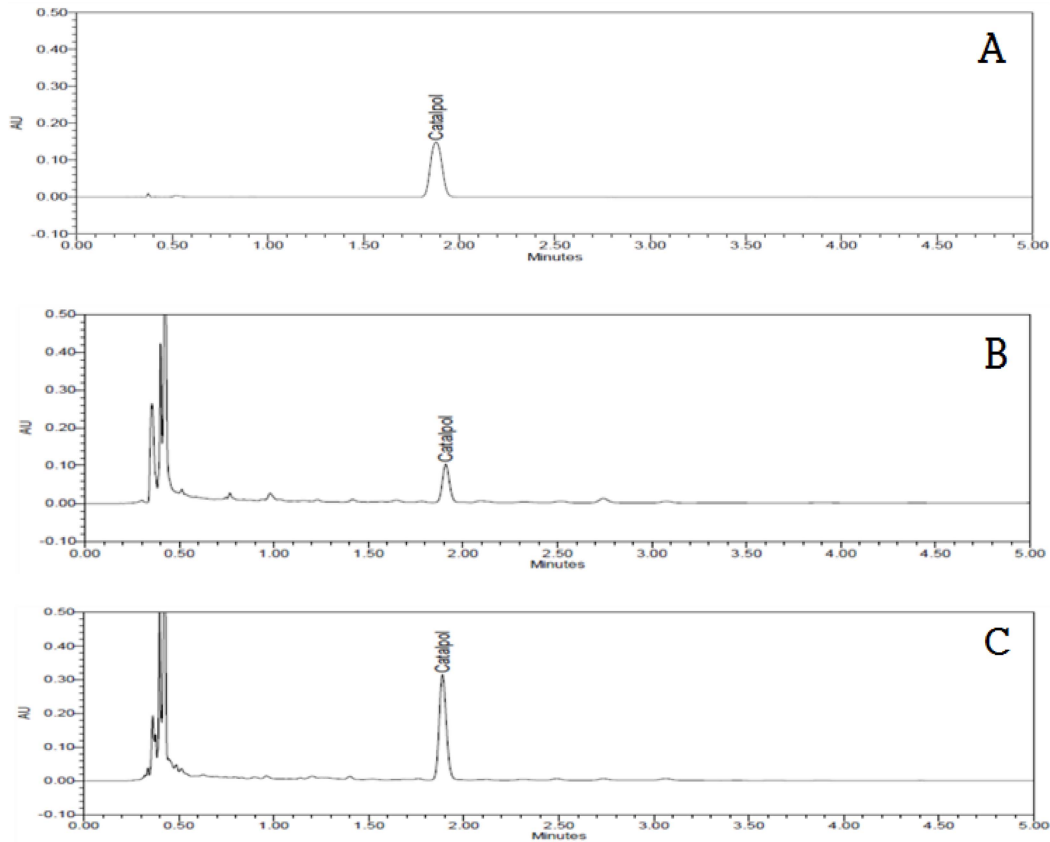


Fig. 1. UPLC chromatograms of catalpol from *Rehmanna Glutinosa* and fermented *Rehmanna Glutinosa*. A; catalpol standard (10 mg/ml), B; *Rehmanna Glutinosa* catalpol, C; fermented *Rehmanna Glutinosa* catalpol.

Table 4. The content of catalpol in fermented *Rehmanna Glutinosa*.
(unit: mg/100 g)

Fermentation period (day)	Catalpol (mg/100 g, dry weight)	
	Water extract	80% EtOH extract
0	273.15±10.69 ^a	260.77±39.10 ^a
2	2,028.67±62.06 ^c	1,095.21±250.87 ^c
4	1,401.82±246.00 ^b	1,307.82±192.55 ^c
6	1,522.66±177.31 ^b	1,033.63±91.20 ^c
8	1,903.82±96.00 ^c	694.71±2.69 ^b

Values are means ± SD (n = 3). *Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Tests (DMRT).

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술연구사업(과제번호: PJ01270102)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn DK, Kim CM, Shin MK and Lee KS. (1998). Traditional Chinese medicine dictionary. Chungdambooks. Seoul, Korea. p.168-176.
- Bae EA, Han MJ, Kim EJ and Kim DH. (2004). Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. Archives of Pharmacol Res. 27:61-67.
- Baek SY, Kim JS, Mun JY, Lee CH, Park YK and Yeo SH. (2016). Quality characteristics of detoxified *Rhus verniciflua* vinegar fermented using different acetic acid bacteria. Korean Journal of Food Preservation. 23:347-354.
- Cho SI, Kim HW and Lee GJ. (2006). Biological activities of extracts of fermented *Camellia japonica* leaf and flower. Korean Journal of Herbology. 21:55-62.
- Jeong JH, Yu KW, Kim SJ, Choi YE and Paek KY. (2004). Plant regeneration from adventitious roots of *Rehmanna glutinosa* liboschitz and bioreactor culture. Korean Journal of Plant Biotechnology. 31:55-60.
- Jiang B, Du J, Liu JH, Bao YM and An LJ. (2008). Catalpol attenuates the neurotoxicity induced by β -amyloid₁₋₄₂ in cortical neuron-glia cultures. Brain Research. 1188:139-147.
- Kim DH, Park CH, Park HW, Park CG, Sung JS, Yu HS, Kim

- GS, Seong NS, Kim JC, Kim MS, Bae SG and Chung BJ.** (2008). A new high-quality, disease resistance and high-yielding *Rehmannia glutinosa* cultivar, "Kokang". Korean Journal of Breeding Science. 40:84-87.
- Kim DS, Roh JH, Cho CW and Ma JY.** (2012). Analysis of nodakenetin from Samultangs fermented by lactose bacteria strains. Korea Journal of Herbology. 27:35-39.
- Kim JS, Kim JY and Chang YE.** (2012). The quality characteristic and antioxidant properties of saccharified strawberry gruels. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 41:752-758.
- Kim SH, Lee JS, Park KS, Lee JS, Lee HW and Park S.** (1999). Liquid culture of basidiomycetes on natural media. Korean Journal of Mycology. 27:373-377.
- Kubo M, Asano T, Shiimoto H and Matsuda H.** (1994). Studies on *Rehmannia Radix*. I. effect of 50% ethanolic extract from steamed and dried *Rehmannia Radix* on hemorhology in arthritic and thrombostatic rats. Biological Pharmaceutical Bullentin. 17:1282-1286.
- Lee H, Kim YS, Kim DY, Kim SY, Lee WK, Lee SM, Park JD and Shon MY.** (2015). A study on manufacturing of red ginseng Makgeolli using the red ginseng starch and changes of physicochemical components of red ginseng Makgeolli during storage periods. Korean Journal of Food Preservation. 22:369-376.
- Lee HS, Kwon SY, Lee SO and Lee SP.** (2016). Production of fermented *Omija*(*Schizandra chinensis*) beverage fortified with high content of gamma-amino butyric acid using *Lactobacillus plantarum*. Korean Journal of Food Preservation. 23:326-334.
- Lee SH, Yoon JS, Kim JK, Park CG, Chang JK and Kim YB.** (2017). Analysis of iridoid glycoside and GABA content in the roots of the *Rehmannia glutinosa* cultivars. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:146-151.
- Lee TS and Choi JY.** (2005). Volatile flavor components in mash of *Takju* prepared by using *Aspergillus kawachii* *Nuruks*. Korean Journal of Food Science and Technology. 37:944-950.
- Lew ID, Park CK and Yu JY.** (1988). Interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Kluyveromyces fragilis* on the metabolism of amino acids in soymilk. Journal of Microbiology and Biotechnology. 16:287-292.
- Park HS, Kim BH, Choi HS, Kim JM and Kim MK.** (2010). Enzyme activity of *Basidiomycetes* products in each cereals. Journal of Mushroom Science production. 8:102-108.
- Park YS and Suh CS.** (1995). Change in soluble protein, free amino acid and starch of Jeungpyun dough during fermentation. Korean Journal Food Cookery Science. 11:82-286.
- So MH and Lee YS.** (2009). Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of saccharifying amylase during the preparation of rice koji. Korean of Journal of Food and Nutrition. 22:644-649.
- So MH.** (1993). Conditions for the production of amylase and protease in making wheat flour nuruk by *Rhizopus japonicus* T2. Korean of Journal of Food and Nutrition. 6:96-102.
- Tian YY, An LJ, Jiang L, Duan YL, Chen J and Jiang B.** (2006). Catalpol protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in mesencephalic neuron-glia cultures. Life Sciences. 80:193-199.
- Yang SA, Im NK and Lee IS.** (2007). Effects of methanolic extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on *in vitro* antithrombotic and antioxidative activities. Korean of Journal of Food Science and Technology. 39:83-37.
- Youn Y, Jeon SH, Yoo JH, Jeong DY and Kim YS.** (2016). Quality characteristics of tangerine peel Soksungjang prepared from different *koji* strains. Korean Journal of Food Preservation. 23:117-126.