

장수버섯 배양으로 제조한 발효옷 추출물이 장류 미생물의 증식 및 효소활성에 미치는 영향

최한석^{1*} · 여수환¹ · 정석태¹ · 최지호¹ · 강지은¹ · 김명곤²

¹농촌진흥청 국립농업과학원 발효식품과, ²전북대학교 식품공학과

Effect of the Extracts from Fermented-*Rhus verniciflua* Stem Bark with *Fomitella fraxinea* on the Growth and Enzyme Activity of Soybean Product-fermenting Microorganisms

Han-Seok Choi^{1*}, Soo-Hwan Yeo¹, Seok-Tae Jeong¹, Ji-Ho Choi¹, Ji-Eun Kang¹ and Myung-Kon Kim²

¹Fermented Food Science Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea

(Received 30, October 2012., Revised 8, December 2012., Accepted 19, December 2012)

ABSTRACT: We studied the effect of fermented *Rhus verniciflua* stem bark (FRVSB) extract (used in herbal medicine by Koreans) on the microbial growth and enzyme activity of 12 soybean-fermenting microorganisms, including *Bacillus* spp., lactic acid bacteria, yeast, and other harmful bacteria. The ethanol and methanol extracts of FRVSB inhibited the growth of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, and *Zygosaccharomyces rouxii*, and in the disk diffusion assay, their inhibition zone diameters were 11.06-12.23, 12.32-18.38, 11.47-11.84, and 13.59-14.21 mm, respectively. The water extract did not show any inhibitory effect. In fact, the water extract addition enhanced the growth of *B. subtilis* and *B. licheniformis* by 1.3-4.5 fold and that of *B. cereus* by 1.2-1.4 fold. However, the water extract did not affect the growth of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Escherichia coli*. The addition of water extract increased the amylase and protease activity of *B. subtilis* and *B. licheniformis*.

KEYWORDS : *Fomitella fraxinea*, FRVSB, *Rhus verniciflua*, Soybean product

서 론

세계적으로 옷나무과에 속하는 식물은 600여종이 존재하고 있는 것으로 알려져 있으나 이중 옷나무속으로 분류되는 식물은 200여종 정도이며(Fernald, 1950) 우리나라에는 참옷나무를 포함한 6종의 옷나무가 분포하고 있다(Kim *et al.*, 2002). 옷은 혈액순환 촉진, 위장질환, 심장질환, 부인과 질환(Namba, 1980) 등에 효과가 있으나 urushiol을 함유하고 있어 수포, 가려움, 발진 등을 동반한 접촉성피부염을 유발하기 때문에(Epstein, 1974) 그 사용에 주의를 기울여 왔다. 서양인들은 동양인 보다 urushiol에 민감한 탓에(Draper *et al.*, 2002) 옷에 의해 유발된 접촉성 피부염을 치료하기 위한 분야가 발전된 반면(Vidmar and Iwane, 1999; Patterson *et al.*, 1999; Saary *et al.*, 2005) 동양에서는 옷의 독성을 제거하고 약리적으로 이용하고자 하였다(Kim *et al.*, 2002). 우리나라 및 중국의 전

통의학에서 사용되는 옷은 1차적으로 자연 건조시키거나 끓여 말린 후 2차적으로 잘게 갈아서 충분히 볶아 그 독성을 제거하여 사용하였는데(Eom and Kim, 2008) 이는 urushiol이 비교적 산화되기 쉽고 열안정성이 낮아 중합되거나 휘발되어 제거되는 원리를 이용한 것이다(Choi *et al.*, 2007b). 우리나라에서 언제부터 옷을 섭취하여 왔는지 명확하지는 않지만 고려중기 향약구급방에 최초의 기록이 나타나며, 식품의약품안전청(식약청) 지정 11종의 한약서 중 9종의 도서에서 옷을 처방약으로 사용하였고 근현대에 이르기까지 광범위하게 사용된 것으로 추정하고 있다(Eom and Kim, 2008). 닭과 오리 등에 옷을 첨가하여 먹어오는 풍습은 현재까지도 이어지고 있으며, 옷에 함유된 폴리페놀 및 플라보노이드 성분이 항산화(Kim, 2003; Lee *et al.*, 2002; Son *et al.*, 2005), 항돌연변이(Park *et al.*, 2004), 항염증(Lee *et al.*, 2009, 2010) 및 항균, α -glucosidase 억제효과(Kim *et al.*, 2010)등이 있는 것으로 알려지면서 산업적으로 그 사용량도 확대되어 왔다. 옷나무 생산면적은 2002년 1,216천 m²에서 2007년 3,058천 m²,

*Corresponding author <E-mail : coldstone@korea.kr>

2010년 11,570천 m²으로 증가하였으며, 옷의 식용판매액 비중도 2002년 52.5%에서 2007년 75.8%로 증가하였다(KFS, 2008; RDA, 2011).

식약청에서는 안전상의 이유로 전통적으로 섭취하여온 옷땀 및 옷오리 조리에 한하여 옷 사용을 허용하고(KFDA, 2010) 있으나 옷의 기능적 효과를 보고자 하는 소비자의 욕구로 옷 된장, 옷 고추장 등 다양한 형태의 식품으로 유통되면서 음성시장이 확대되고있는 실정이다. 옷의 allergy 유발성분인 urushiol의 제거방법은 유기용매(Choi *et al.*, 2007b), 전자선 또는 방사선 처리(Kim, 2010), 그리고 장수버섯 배양(Choi *et al.*, 2007a) 등이 제시되었으며, 옷나무의 열수추출물에 대해서는 단회 경구 투여 독성(Choi *et al.*, 2010b), 접촉 알러지성 자극(Choi and Han, 2005a), 유전독성(Choi and Han, 2005b), 4주 반복투여 독성(Choi and Han, 2005c)등이 관찰되지 않았다. 그러나 화학적인 방법과 방사선 처리는 식품사용에 매우 제한적이며, 열수추출만을 통한 urushiol의 완벽한 제거 또한 쉽지 않다(Choi *et al.*, 2012).

이에 비해, 버섯발효 방법은 화학물질을 사용하지 않기 때문에 환경오염에 대한 염려가 적으며, 발효균주인 장수버섯균은 지금까지 식품원료 사용이 불가능하였으나 독성이 없어 2012년부터 식품원료로 사용이 가능하게 되었다(KFDA, 2012a). 또한, 장수버섯 균사체 배양에 의해 urushiol이 제거된 발효옷은(Choi *et al.*, 2012) 단회투여 독성, 13주 반복투여독성, 유전독성, 피부자극시험 등 13가지 항목의 독성검사에서 안전성에 문제가 없는 것으로 나타나 장류, 발효식초 및 일부 주류에 대하여 사용이 가능하게 될 전망이다(KFDA, 2012b). 그러나 지금까지 발효옷 추출물이 이들 식품군들에 어떠한 영향을 미치는지 연구된바 없어 제품 제조과정에 상당한 어려움이 예상된다. 따라서 본 연구에서는 발효옷 추출물이 장류에 미치는 영향을 살펴보기 위한 선행 연구로서 urushiol이 제거된 발효옷 추출물이 장류미생물에 미치는 영향에 대하

여 조사하였다. 우리나라 전통장류에는 *B. licheniformis*와 *B. subtilis*가 주요미생물로(Nam *et al.*, 2012), *B. licheniformis* KCCM 11051P, 11052P, 11053P, 11054P는 *B. cereus* 저해능력을 가지고 있어 산업적으로 이용되고 있기 때문에(Sunchang-gun, 2012; Sunchang-gun & Chonbuk Nat'l Univ., 2012) 이들 균주와 표준균주인 *B. subtilis* 균주에 대하여 중점적으로 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

본 시험에 사용된 미생물 및 기본배지는 Table 1과 같다. *B. licheniformis*는 KCCM에서 구매하였고 *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *B. cereus*, *E. coli*는 KAAC로부터 획득하여 사용하였다. 모든 균주는 실험전에 기본배지(Difco™, BD Co., MD, USA)를 사용하여 30°C에서 48시간 동안 활성화한 후 사용하였다.

발효옷 추출물 제조

본 시험에 사용된 발효옷은 2011년 4월에 채취한 충북 옥천산 옷나무 껍질을 2×2 cm 크기로 자른 후 수분이 통할 수 있는 자루에 담아 1일 동안 수침하고 건져내서 1일 동안 물빼기 하였다. 수분이 흡수된 옷나무 껍질을 5 L 버섯재배 봉투에 옮겨 담은 다음 필터를 달아 121°C에서 100분 동안 살균하였다. Choi 등(2007a)의 방법에 따라 전배양된 장수버섯균사체를 접종하고 21°C에서 30일간 배양한 후 50°C에서 열풍 건조시켜 발효옷을 제조하였다.

물 추출물은 믹서로 잘게 갈은 발효옷 1 kg에 10배(w/v)의 증류수를 첨가한 후 무게를 측정하고 고압살균기에 넣어 100°C에서 8시간 동안 추출하였다. 증발된 수분량을 보정하기 위하여 물을 첨가하여 동일무게로 맞추고 원심분

Table 1. The list of microorganisms and basal medium used in this study

No.	Scientific Name	Variety	Medium
1	<i>Bacillus subtilis</i> KACC 10854	bacteria	NB
2	<i>Bacillus subtilis</i> KACC 14741	bacteria	NB
3	<i>Bacillus licheniformis</i> KCCM 11051P	bacteria	NB
4	<i>Bacillus licheniformis</i> KCCM 11052P	bacteria	NB
5	<i>Bacillus licheniformis</i> KCCM 11053P	bacteria	NB
6	<i>Bacillus licheniformis</i> KCCM 11054P	bacteria	NB
7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KACC 30008	yeast	YM
8	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> KACC 30001	yeast	YM
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> KACC 15357	bacteria	MRS
10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KACC 12312	bacteria	MRS
11	<i>Bacillus cereus</i> KACC 11240	bacteria	NB
12	<i>Escherichia coli</i> KACC 14818	bacteria	NB

NB: Nutrient broth

리(4°C, 12,000 × g, 30 min)한 다음 여과(Filter paper No. 2, Whatman™, GE Healthcare Co., Buckinghamshire, UK)하여 제조하였다. 에탄올 및 메탄올 추출물은 잘게 갈은 발효물 20 g에 70% 에탄올 및 메탄올을 각 200 mL를 넣고 30°C에서 초음파로 2시간 추출한 후 원심분리(4°C, 12,000 × g, 30 min)하여 상등액을 회수한 다음 동일 양의 용매를 사용하여 재추출하고 원심분리(4°C, 12,000 × g, 30 min) 후 상등액을 합쳤다. 조추출물을 감압농축하고 추출용매를 이용하여 감압농축물을 20 mL로 정용한 다음 여과(Filter paper No. 2, Whatman™, GE Healthcare Co., Buckinghamshire, UK)한 것을 알코올 추출물로 하였다.

항균활성

발효물 추출물을 nylon 재질로 이루어진 membrane 필터(0.2 µm, Millipore Co., Cork, Ireland)를 통과시켜 제균하고 살균된 paper disc(8 mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Japan)에 50 µL씩 점적한 다음 무균실 안에서 건조시켜 모든 용매를 제거시켰다. 활성화된 12종의 균주를 기본배지에 2% agar(Difco™, BD Co., MD, USA)가 첨가된 평판배지에 도말한 뒤 추출물이 점적된 disc를 배지 위에 올려놓고 30°C에서 48 h 동안 배양한 후 clear zone의 직경을 측정하였다.

미생물 증식

물을 1/2만 넣어 2배 농도로 조제된 기본배지에 물과 발효물 물추출물을 사용하여 발효물 물추출물의 최종농도가 부피비로 0%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% 되도록 배지를 제조하였다. 미생물 증식은 Bioscreen C(Thermo Labsystems Co., NJ, USA)를 사용하여 측정하였다. 발효물 물추출물이 첨가된 배지 10 mL에 기본배지에서 활성화된 미생물을 1%(v/v) 접종하고 잘 섞은 후 Bioscreen C용 well plate에 100 µL씩 넣은 다음 37°C에서 72시간 동안 증식시키면서 1시간 단위로 흡광도(420-580 nm, Wideband)를 측정하였다. 이때, 미생물 농도는 발효물 추출물의 각 농도별 증식 0시간 제의 흡광도를 blank로 하고 시간별 획득된 흡광도에서 blank를 뺀 수치로 하였다.

효소활성

발효물 추출물이 첨가된 배지에서 증식된 미생물 배양액을 원심분리(4°C, 12,000 × g, 30 min)하고 여과(0.2 µm, Millipore Co., Cork, Ireland)한 다음 각각의 plate를 이용하여 효소활성을 측정하였다. 즉, 증류수 50 mL에 1.2%의 agar에 amylase는 0.5% soluble starch, protease는 1.2% skim milk(Wako Co., Osaka, Japan), cellulase는 0.4% CMC(carboxy methyl cellulose), lipase는 5 mL TBN(glyceryl tributyrat)과 2.5 g gum arabic(from acacai tree)을 첨가했다. 혼합물을 수욕상에서 녹인 후

glass plate(18 × 16 cm × 3 mm)에 채우고 굳힌 다음 직경이 6 mm 되도록 구멍을 뚫어 plate를 제작하였다. 배양액을 plate에 10 µL씩 점적하고 25°C에서 24 h 동안 반응시킨 다음 clear zone의 직경을 측정하였다. 달리 표시되지 않은 시약은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

항균활성

발효물이 장류발효미생물에 대한 항균활성을 가지고 있을 경우 발효기간 연장 및 이상발효 등의 염려가 있기 때문에 추출물의 장류 미생물에 대한 항균활성을 조사하여 결과를 Table 2에 나타내었다. 발효물은 추출용매에 따라 일부 장류 미생물에 대해 항균활성을 가지고 있는 것으로 조사 되었다. 젖산균과 대장균 및 *S. cerevisiae*는 물추출물을 포함하여 에탄올과 메탄올 추출물 모두에서 항균활성이 관찰되지 않은 반면 *Bacillus* 속과 내염성 효모인 *Z. rouxii*의 경우 물추출물에서는 항균활성이 없었으나 알코올 추출물에서는 알코올의 종류와 상관없이 비교적 높은 항균활성을 보였다. *B. subtilis*는 에탄올과 메탄올 추출물에서 11.1-11.2 mm의 clear zone을 형성하였고 *B. licheniformis*는 12.3-18.4 mm, *Z. rouxii*는 13.6-14.2 mm, *B. cereus*는 11.5-11.8 mm로 *B. licheniformis*와 *Z. rouxii*가 발효물 알코올 추출물에 더욱 민감하게 반응 하였다. 윗에 함유된 urushiol 및 polyphenol 성분은 다양한 미생물에 항균활성을 나타내는데, urushiol은 *Apergillus awamori*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium oxalicum*의 곰팡이류에 대해 500-4 µg/mL의 최소저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 가지며, *B. subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*의 세균류에 대해서도 1000-250 µg/mL의 MIC값을 가져 곰팡이와 세균류에 대해 비교적 높은 항균활성을 가지고 있다(Kim *et al.*, 1997). Polyphenol 성분 중 3',4',7'-trihydroxyflavone 또한 *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Candia albicans*, *Pichia jadinii*에 대한 MIC값이 250-32 µg/mL로 비교적 높은 항균활성을 가지고 있다. 이외에 fustin, fisetin 및 gallic acid는 세균류나 효모에 대한 MIC 값이 1000 µg/mL로 항균활성은 높지 않으나 *E. coli*에 대해서 특이적으로 높은 항균활성을 가지고 있는 특징이 있다(Kim *et al.*, 2010).

이러한 사실에도 불구하고 발효물 열수 추출물이 장류 발효 미생물에 대하여 항균활성이 나타나지 않은 이유는 추출물에 항균활성을 가지는 성분들이 비교적 낮은 용량으로 존재하고 있기 때문인 것으로 판단된다. 즉, 발효물 열수 추출물에는 항균활성이 높은 것으로 알려진 urushiol이 함유되어 있지 않으며, gallic acid는 열수 추출 건조물 100 g당 1090 mg, fustin과 fisetin은 각각 28 mg, 136 mg

씩 존재하고 있다(Choi *et al.*, 2012). 발효옷의 추출수율은 5.7%로 발효옷 100 g당 5.7 g의 추출 건조물을 얻을 수 있다는 것을 의미하여 본 시험에서 처리한 열수추출물 50 μ L에 함유된 농도로 환산하면 gallic acid, fustin, fisetin이 각각 285 μ g, 7.3 μ g, 35.6 μ g 존재하는 것으로 추정된다. 이들 농도가 *B. subtilis* 등 된장발효에 주되게 관여하는 미생물에 대한 증식저해농도 이하였기 때문에 물추출물에서는 항균활성이 나타나지 않은 것으로 판단된다. 그러나 추출물이 농축된다면 물 추출물에서도 충분히 항균활성을 나타낼 수 있기 때문에 식품사용에 있어 추출물 사용량 결정도 필요하다. 한편, 발효옷 알코올 추출물에서 일부 미생물에 항균활성이 나타난 이유는 알코올 추출물에는 발효에 의해서 제거되지 않은 urushiol이 함유되어 있으며(Choi *et al.*, 2010a), 미생물의 산화적인 스트레스를 증가시킬 수 있는 phenolic acid의 함량이 물추출물에 비하여 비교적 높다(Choi *et al.*, 2010a). 이 외에 3',4',7'-trihydroxyflavone 등의 항균물질이 용출되었을 것으로 추정하고 있으나 발효옷에서 3',4',7'-trihydroxyflavone의 존재는 아직 밝혀지지 않았다.

이외에 주목할 만한 사실은 발효옷 물추출물은 12종의 모든 균주에 항균활성이 없었기 때문에 장류제조에 충분한 가능성이 있으며 알코올 추출물 또한 *Bacillus* 속에 특이적으로 항균 작용을 나타내므로 urushiol이 용출되지 않는 30% 미만의 알코올 추출물(RDA, 2010) 장류발효가 완료된 후 첨가한다면 유통기간 중에 *B. cereus*의 증식을 억제시킬 수 있으며 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*에 의한 과잉발효를 제어하여 장류의 품질유기기간을 증대시킬 수

있는 가능성도 있으나 후속 연구가 필요하다.

미생물 증식에 미치는 영향

Table 2에서 발효옷 물추출물은 장류발효 미생물에 대한 항균활성이 없었기 때문에 장류제조에 이용할 수 있을 것으로 판단하고 발효옷 열수 추출물에 의한 된장발효미생물의 증식과 효소활성에 미치는 영향을 살펴보았다(Figs. 1, 2). 그 결과 Fig. 1과 같이 발효옷 추출물은 특이적으로 *Bacillus*속의 균체성장을 큰 폭으로 증가시키는 것으로 나타났다. *B. licheniformis*의 대수증식기에서의 최대 균체농도는 대조구가 0.232(11054p)-0.296(11053p) 범위였던 반면, 추출물 첨가군의 균체농도는 0.293-0.859(3%), 0.540-1.129(5%), 0.771-1.240(10%), 0.947-1.241(15%) 범위로 strain number에 따라 균체농도의 차이는 있었으나 추출물의 농도에 의존적으로 1.3-4.5배까지 증가하였다. 특히, *B. licheniformis* 11051P와 11052P 균주는 3%의 비교적 낮은 농도의 추출물 첨가에 의해서도 균체농도가 각각 2.4배, 3.3배 증가하였고, 5% 첨가에 의해서는 각각 4.1배, 4.3배 증가하여 1.8배/2.3배(3%/5%), 1.3배/2.3배 증가한 11053P 및 11054P 보다 발효옷 추출물에 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 그러나 *B. licheniformis* 4균주 모두 15%이상의 농도에서는 추출물 첨가량을 50%까지 증가시켜도 더 이상 균체 농도의 증가는 없었다(data not shown). *B. subtilis* 역시 추출물 첨가에 의해서 추출물의 농도 의존적으로 균체가 증가하는 것으로 나타났다. *B. subtilis* 10854의 발효옷 추출물 첨가군의 최대균체 농도는 각각 0.395(3%), 0.492(5%), 0.746

Table 2. Antimicrobial activity of extracts from FRVSB against fermented soybean product-related microorganisms

	Strain	Strain No.	Clear zone size (mm)		
			EtOH (70%)	MeOH (70%)	Water
Fermentable bacteria	<i>B. subtilis</i>	10854	11.06±0.34	11.19±1.25	nd
		14741	12.08±0.52	12.23±0.74	nd
		11051P	16.22±0.63	17.03±0.63	nd
	<i>B. licheniformis</i>	11052P	15.37±0.69	14.74±3.85	nd
		11053P	18.38±3.47	15.84±0.75	nd
		11054P	13.14±2.01	12.32±0.90	nd
Yeast	<i>S. cerevisiae</i>	30008	nd	nd	nd
	<i>Z. rouxii</i>	30001	13.59±1.90	14.21±1.34	nd
Lactic acid bacteria	<i>L. plantarum</i>	15357	nd	nd	nd
	<i>L. mesenteroides</i>	12312	nd	nd	nd
Harmful bacteria	<i>B. cereus</i>	11240	11.47±1.05	11.84±1.25	nd
	<i>E. coli</i>	14818	nd	nd	nd

FRVSB means fermented-*Rhus verniciflua* stem bark.

nd means not detected.

Values represent means of three replications±standard deviations.

Bacillus licheniformis was purchased from KCCM and other microorganisms were obtained from KACC.

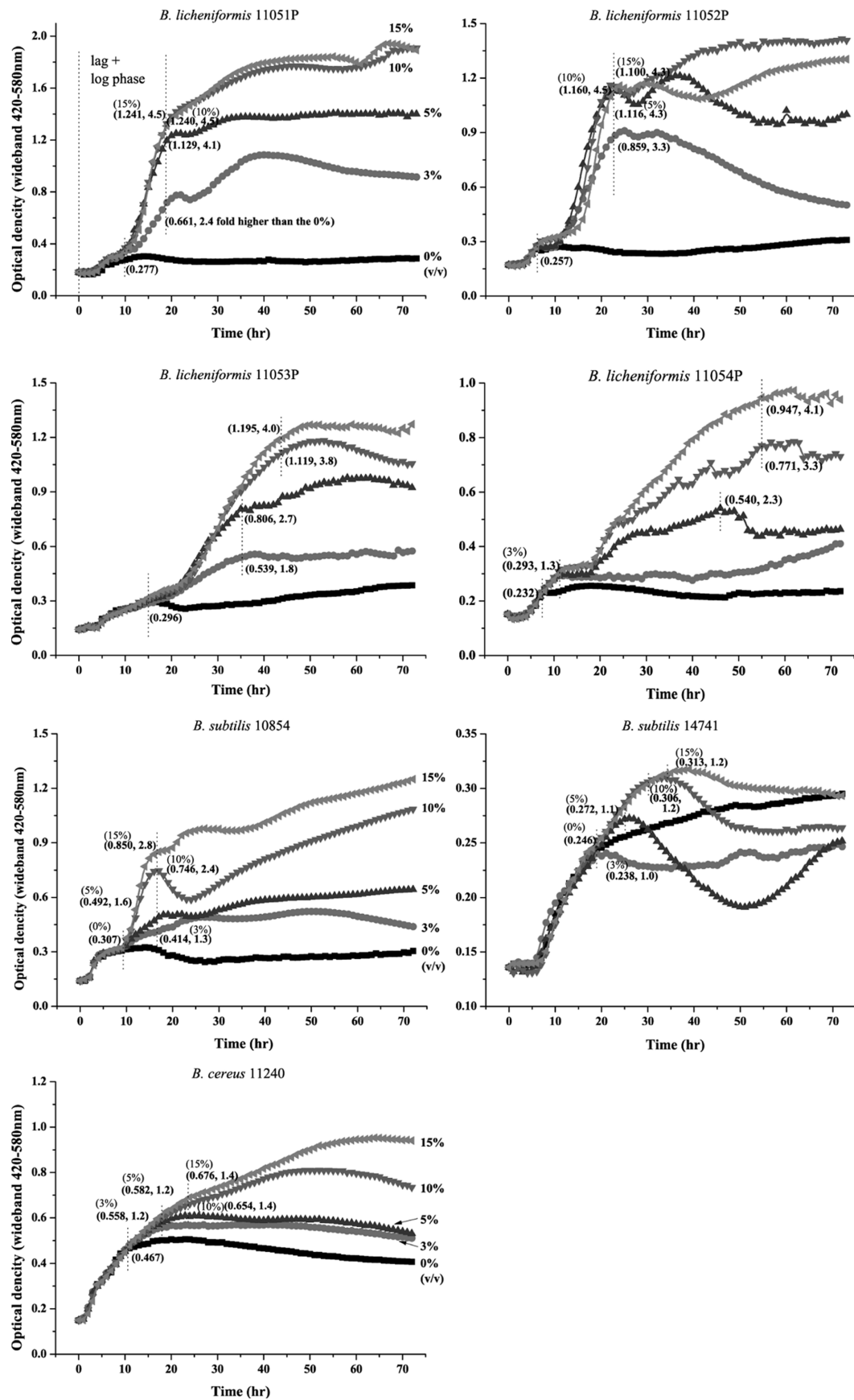


Fig. 1. Effect of FRVSB water extract on microbial growth of *B. licheniformis*, *B. subtilis* and *B. cereus*. FRVSB means fermented-*Rhus verniciflua* stem bark.

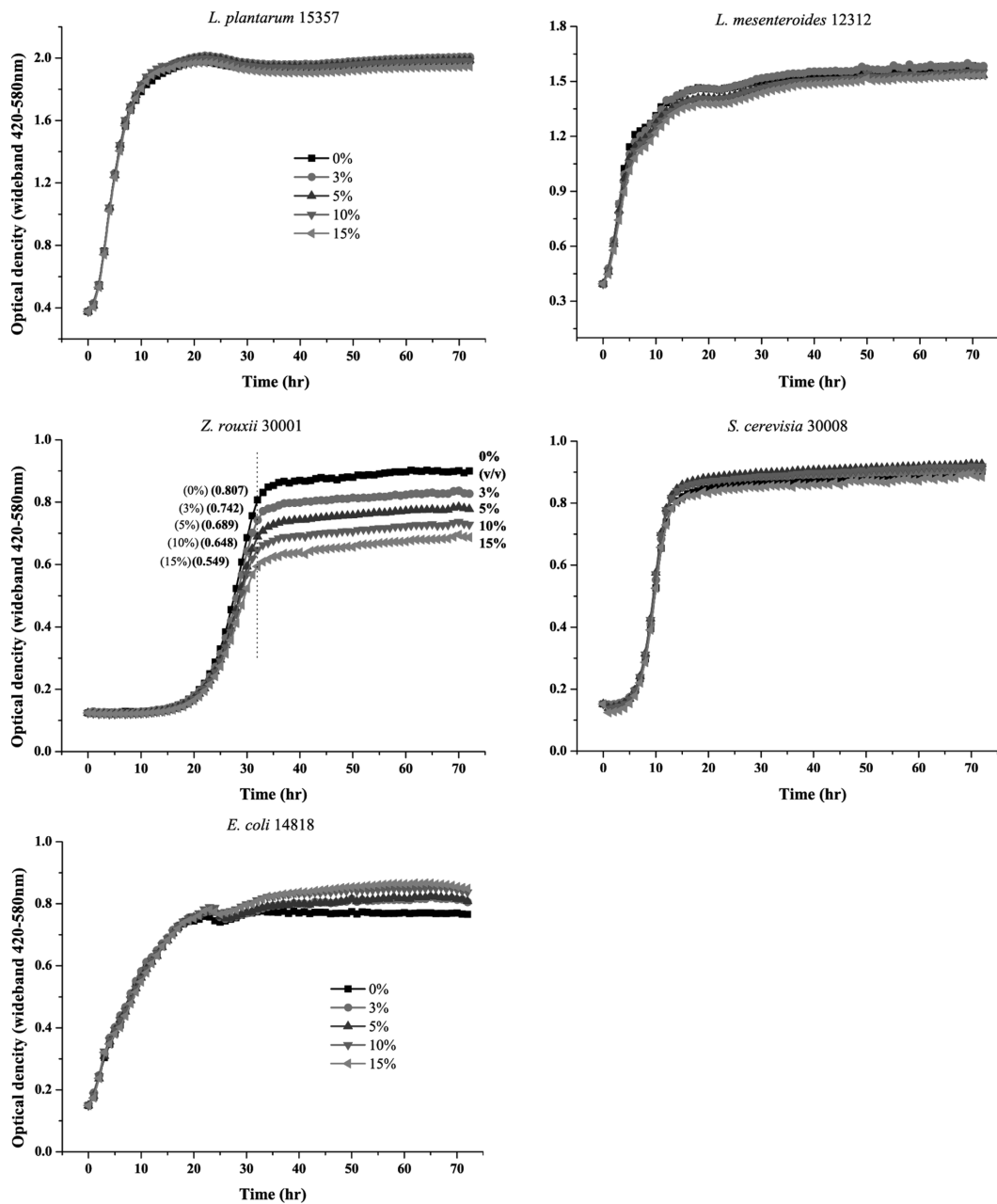


Fig. 2. Effect of FRVSB water extract on microbial growth of lactic acid bacteria, yeast and *E. coli*. FRVSB means fermented-*Rhus verniciflua* stem bark.

(10%), 0.850(15%)으로 대조군(0%)의 0.307에 비하여 1.3-2.8배 증가하였다. *B. subtilis* 14741의 발효옷에 의한 균체증가 효과는 *B. subtilis* 10854에 비하여 비교적 낮게 나타났는데 추출물 첨가군의 균체농도는 각각 0.238, 0.272, 0.306, 0.313으로 대조군의 0.246에 비하여 최대 1.2배 증가하는데 그쳤다.

또한 발효옷 물추출물은 장류제조에 있어 문제가 되고 있는 *B. cereus*의 균체증식에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. *B. cereus* 11240의 균체량은 추출물 농도에 의존적으로 대조군에 비하여 각각 1.2, 1.2, 1.4, 1.4배 증가하였다. 그러나 그 증가폭은 *B. licheniformis*나 *B. subtilis*

10854에 비하여 비교적 낮은 것으로 장류제조에 있어 *B. licheniformis*나 *B. subtilis*가 우점 할 때까지 초기 *B. cereus*가 오염되지 않도록 주의를 기울인다면 문제는 없을 것으로 생각된다.

Bacillus 속을 포함한 장류발효 미생물의 영양조건에 대한 연구가 없어 발효옷 추출물 첨가에 의한 균체증가 효과의 이유는 명확하지 않으나 발효옷 열수추출 건조물에는 조지방 1.69%, 조단백질 10.21%, 조회분 15.80%가 함유되어 있기 때문에(Choi *et al.*, 2012) 이들 성분이 *Bacillus* 속의 균체증식에 영향을 주었을 것으로 추정된다. 그러나 발효옷 건조물의 추출수율 5.7%를 고려하면 액상

상태의 발효물 추출물에는 조지방, 조단백질 및 조지방의 함량이 각각 96.3 ppm, 582.0 ppm, 900.6 ppm씩 함유되어 있고 미생물 증식을 위해 배지에 처리된 양이 3-15% 범위이기 때문에 실질적으로 배지에 첨가된 양은 이보다도 매우 낮아진다. 따라서 이들 성분 중 균체성장에 영향을 줄 수 있는 인자는 탄소원 및 질소원보다는 무기물 등의 미량요소의 영향으로 판단된다.

추출물이 *Bacillus* 속 이외에 젖산균, 효모, 대장균의 균체성장에 미치는 영향을 살펴본 결과(Fig. 2) *L. plantarum* 15357, *L. mesenteroides* 12312, *S. cerevisiae* 30008, *E. coli* 14818은 *Bacillus*속과 달리 대수증식기까지 추출물에서의 균체농도 변화가 관찰되지 않아 균체성장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 내염성 효모인 *Z. rouxii* 30001의 대수증식기에서의 최대 균체농도는 각각 0.807(0%), 0.742(3%), 0.689(5%), 0.648(10%), 0.549(15%)로 추출물 첨가에 의해서 8-32%까지 농도에 의존적으로 균체량이 감소하였다. 이는 Table 2에서 발효물 물 추출물에서 항균활성이 관찰되지 않았다는 결과와 다소 상이한 결과로 해석될 수 있으나 Table 2의 결과는 clear zone을 조사한 것으로서 균체가 전혀 성장하지 못하는 것으로 의미하고 Fig. 3의 결과는 발효물 추출물에 의해서 균체량은 낮아지나 균체성장을 완전히 억제하지 않는다는 것을 의미한다.

발효물 추출물이 유익미생물의 균체량은 증가시키고 *B. cereus* 등 유해균의 증식은 억제하는 것이 가장 이상적인 모델일 것이다. 그러나 유익 미생물인 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*의 균체증가는 가져왔으나 유해미생물인 *B. cereus*의 균체량의 증가와 더불어 *E. coli*의 증식억제 효

과도 없는 것으로 나타나 제품제조에 있어 유해 미생물 관리가 필요 할 것으로 생각된다.

효소활성에 미치는 영향

발효물 추출물이 첨가된 배지에서 72시간 동안 증식된 *B. licheniformis*와 *B. subtilis*의 효소활성을 측정된 결과(Fig. 3) 발효물 추출물의 농도 의존적으로 amylase와 protease의 활성이 크게 증가하는 것으로 나타났다. 추출물이 첨가되지 않은 *B. licheniformis* 배양물은 4 균주 모두(11051P, 11052P, 11053P, 11054P) starch plate상에서 clear zone을 형성하지 않은 반면 발효물 추출물 첨가에 의해서 전분분해 활성이 나타나기 시작했다. 추출물 3% 처리군의 clear zone은 11051P, 11052P, 11053P, 11054P가 각각 6.0, 7.0, 7.3, 7.8 mm이었으며 5% 첨가군은 각각 10.7, 14.9, 7.7, 8.6 mm로 추출물 농도가 3%에서 5%로 증가함에 따라 효소활성은 각각 1.8배, 2.1배, 1.1배, 1.1배로 증가하였다. 10% 첨가군의 전분분해 활성은 각각 12.5, 16.5, 8.6, 9.2 mm로 효소활성의 증가 경향은 다소 둔화되기 시작하였으며, 10% 이상에서 50%까지는 추출물의 농도가 증가하여도 효소활성은 소폭 증가(11051P, 11052P)하거나 유의적 변화가 없는(11053P, 11054P) 것으로 나타났다. 추출물을 첨가하지 않은 *B. subtilis* 배양액의 전분분해활성은 10854와 14741이 각각 9.1, 6.9 mm로 *B. licheniformis*와 달리 효소활성은 비교적 낮으나 추출물을 첨가하지 않은 기본배지에서도 전분분해 효소를 생산하였다. *B. subtilis* 또한 발효물 추출물의 농도 의존적으로 amylase의 활성이 증가하였는데 3% 첨가군의 효소활성은 10854와 14741 균주가 각각 10.9, 8.6 mm, 5% 첨가

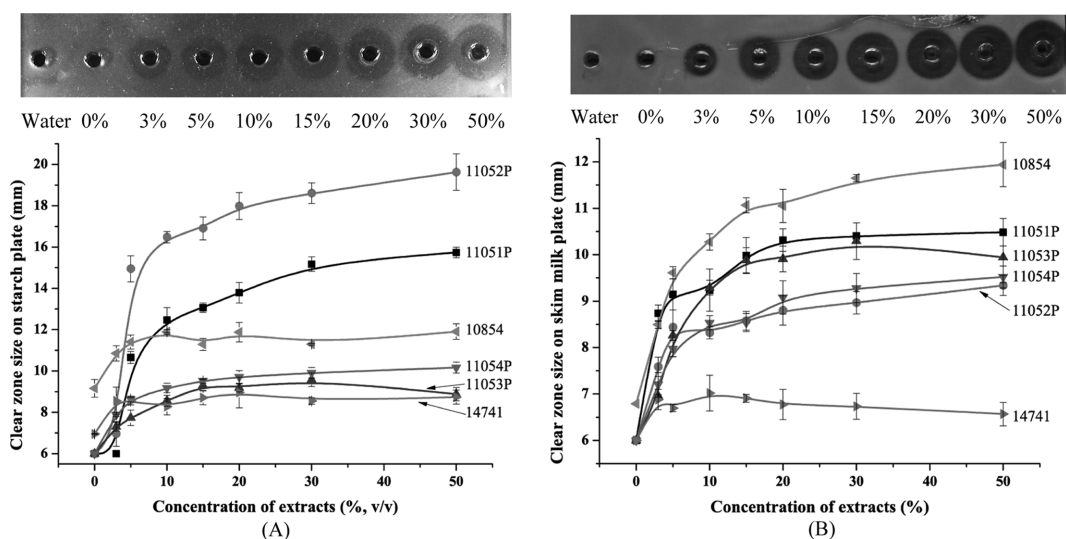


Fig. 3. Amylase (A) and protease (B) activity of *B. subtilis* and *B. licheniformis* cultured on FRVSB extract containing medium. FRVSB means fermented-*Rhus verniciflua* stem bark. The photo is typical picture of clear zone on starch plate for *B. licheniformis* 11052P (A) and skim milk plate for *B. subtilis* 10854 (B). *B. subtilis* : 14741, 10854; *B. licheniformis* : 11051P, 11052P, 11053P, 11054P. The clear zone not detected on TBN (glyceryl tributyrat) and CMC (carboxy methyl cellulose) plate for all strain.

균은 11.4, 8.6 mm, 10% 첨가균은 11.4, 8.5 mm이었으며 10% 이상 에서는 더 이상 효소활성이 증가하지 않았다. 추출물 첨가에 따른 효소활성의 증가폭은 *B. licheniformis* 보다 높지 않았다.

단백질 분해활성에 있어서도 *B. subtilis* 10854를 제외한 모든 균주에서 기본배지에서는 효소를 생산하지 않은 반면 추출물 첨가에 의해서 효소활성이 나타나기 시작하였다. 추출물 농도에 따른 효소활성의 증가폭은 5% 첨가구까지는 급격하게 증가하다가 이후 완만해지는 경향이 있었다. *B. subtilis* 10854 균주가 실험에 사용된 6균주 중 단백질 분해활성이 가장 높게 증가하였는데 무첨가균의 활성은 6.9 mm이었으나 3%, 5%, 10%, 15% 첨가균의 효소활성은 각각 8.5, 9.6, 10.3, 11.1 mm로 발효옷에 의하여 효소활성이 1.2, 1.4, 1.5, 1.6배 증가하였다. *B. licheniformis*의 균주별 단백질 분해활성은 11051P > 11053P > 11054P > 11052P 순이었으며, *B. subtilis* 14741 균주가 6균주 중에서 가장 낮은 활성을 보였다.

전분 및 단백질 분해활성 이외에 지방 및 cellulose 분해활성은 *B. licheniformis*와 *B. subtilis*의 모든 균주에서 무첨가균을 포함한 모든 추출물 첨가균에서 나타나지 않았다.

*B. licheniformis*와 *B. subtilis*의 전분 및 단백질 분해활성은 균체량이 높았던 균주에서 비교적 높게 나타나 미생물의 well growth가 1차적인 효소활성의 증가를 이끈 것으로 판단된다. 미생물이 생산하는 amylase 및 protease는 탄소원, 질소원을 포함한 물리화화학적 요소와 계면활성제, phosphate, 금속이온, 배양온도, pH, 교반 등에 의해서 영향을 받는다(Gupta *et al.*, 2003). 이러한 요소들 중 *B. subtilis*는 ammonium sulfate(Dercova *et al.*, 1992) 및 아미노산중 arginine(Lee and Parulekar, 1993)에 의하여 amylase 생산에 영향을 받으며 *B. licheniformis*는 ammonium phosphate(Mabrouk *et al.*, 1999) 및 CaCl₂ (Yoon and Shin, 2010)에 의해서 protease 생산에 많은 영향을 받는다. 발효옷 추출 건조물에는 3034 ppm의 아미노산을 함유하고 있고 이중 ammonia는 593 ppm, arginine은 109 ppm 함유하고 있다(Choi *et al.*, 2012). 따라서 균체의 well growth이외에 이들 화합물들이 효소활성에 영향을 미쳤을 것으로 추정되나 어떠한 물질의 자극에 의해서 비활성형이었던 효소가 활성형으로 변했는지는 더욱 많은 연구가 필요하다.

옷은 allergy 유발물질인 urushiol이 함유되어 있어 식품사용에 어려움을 겪어 왔으나 다양한 방법에 의해서 urushiol의 제거가 가능하고 추출물도 장류 미생물의 성장과 효소활성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났기 때문에 옷의 식품사용이 이루어진다면 발효옷의 수요가 증가할 것으로 판단된다. 또한, 미생물 성장 및 효소활성의 증가는 장류 발효기간을 단축시킬 수 있을 것으로 기대되나 후속연구가 필요하다.

적 요

옷의 장류이용 가능성을 검토하기 위하여 urushiol이 제거된 발효옷 추출물이 장류발효미생물의 증식 및 효소활성에 미치는 영향에 대하여 확인하였다. 발효옷 알코올 추출물은 *Bacillus* 속과 *Z. rouxii*에 대하여 항균활성을 가지고 있었으나 열수 추출물은 *Bacillus* 속과 *Z. rouxii*를 포함한 젖산균, 효모, 대장균에 항균활성이 없었다. 발효옷 열수 추출물은 *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *S. cerevisiae*의 균체성장에는 영향을 미치지 않았으나 *Bacillus*속에 특이적으로 작용하여 *B. licheniformis*, *B. subtilis*의 균체를 1.3-4.5배 증가시켰다. 그러나 *Z. rouxii*는 균체량을 감소시켰으며 유해 미생물인 *B. cereus*와 *E. coli*에 대한 증식억제 효과도 나타나지 않았다. 발효옷 열수 추출물은 *B. licheniformis*와 *B. subtilis*가 생산하는 amylase와 protease의 활성을 큰 폭으로 증가시켰으며, amylase는 *B. licheniformis* 11052P 균주에서 protease는 *B. subtilis* 10854에서 그 증가 폭이 가장 컸다. 지방 및 cellulose 분해활성은 *B. licheniformis*와 *B. subtilis*의 모든 균주에서 나타나지 않았다.

감사의 글

본 연구는 농진청 공동연구사업(과제번호: PJ007663) 및 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ008600)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Choi, C. S. and Han, D. U. 2005a. The observation of the skin contact allergic sensitization test of Rhus-II with Guinea pig maximization test. *J. Fd. Hyg. Safety*. 20:13-17. (in Korean).
- Choi, C. S. and Han, D. U. 2005b. Genotoxicological safety estimate for the Rhus-II. *J. Fd. Hyg. Safety*. 20:18-21. (in Korean).
- Choi, C. S. and Han, D. U. 2005c. Four-week repeated dose safety test of Rhus-II orally administrated to rats. *J. Fd. Hyg. Safety* 20:7-12. (in Korean).
- Choi, H. S., Kim, B. H., Yeo, S. H., Jeong, S. T., Choi, J. H., Park, H. S. and Kim, M. K. 2010a. Physicochemical properties and physiological activities of *Rhus verniciflua* Stem Bark Cultured with *Fomitella fraxinea*. *Korean J. Mycol.* 38:172-178. (in Korean).
- Choi, H. S., Kim, M. K., Park, H. S., Yun, S. E., Mun, S. P., Kim, J. S., Sapkota, K., Kim, S., Kim, T. Y. and Kim, S. J. 2007a. Biological detoxification of lacquer tree (*Rhus verniciflua* Stokes) stem bark by mushroom species. *Food Sci. Biotechnol.* 16:935-942.
- Choi, H. S., Yeo, S. H., Jeong, S. T., Choi, J. H., Park, H. S. and Kim, M. K. 2012. Preparation and characterization of urushiol free fermented *Rhus verniciflua* stem bark (FRVSB) extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44:173-178. (in Korean).

- Choi, M. J., Lee, S. J., Jang, S. H., Reza, M. A., Hong, J. H., Jung, H. K. and Park, S. C. 2010b. Biological activities and single oral dose toxicity in rat of fermented *Rhus verniciflua* extract. *Korean J. Vet. Res.* 50:187-195. (in Korean).
- Choi, W. C., Park, S. J. and Kwon, S. P. 2007b. Process for the preparation of *Rhus verniciflua* extract having excellent anti-cancer activity and anti-cancer pharmaceutical composition containing same. Int. Patent WO/2007/049846.
- Dercova, K., Augustin, J. and Krajcova, D. 1992. Cell growth and α -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* 37:17-23.
- Draper, W. M., Wijekoon, D., Makinney, M., Behniwal, P., Perera, S. K. and Flessel, C. P. 2002. Atmospheric pressure ionization LC-MS-MS determination of urushiol congeners. *J. Agr. Food Chem.* 50:1852-1858.
- Eom, S. K. and Kim, K. S. 2008. On estimation of indication, property and processing of *Rhus verniciflua* Stokes. *J. Oriental Med. Classics.* 21:29-37. (in Korean).
- Epstein, W. L. 1974. Poison oak and poison ivy dermatitis as an occupational problem. *Cuits* 13:544-548.
- Fernald, M. L. 1950. Gray's Manual of Botany 8th ed., American Book Company, New York, USA. pp. 976-979.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. and Chauhan, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38:1599-1616.
- KFDA. 2010. Analytical Methods Of Korean Food Code. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea. (in Korean).
- KFDA. 2012a. Food ingredients search. Available from: http://fse.foodnara.go.kr/origin/search_data_list.jsp?srch_name=&edible=&animal=&codex=&query=%C0%E5%BC%F6%B9%F6%BC%B8. Accessed Nov. 12, 2012.
- KFDA. 2012b. Notice No. 2012-204. Administrative notice of partial revision of the proposed criteria and standards for foods.
- KFS. 2008. 2007 the investigation of forestry management of Korea. Korea Forest Service, Daejeon, Korea. (in Korean).
- Kim, B. H. 2010. The effect of irradiation and peroxyacetic acid treatment on the reduction of urushiol of *Rhus verniciflua* Stokes and the physiological activities. MS thesis, Chonbuk National University, Gwangju, Korea. (in Korean).
- Kim, J. B. 2003. Identification of antioxidative component from stem bark of *Rhus verniciflua*. *Korean J. Food Nutr.* 16:60-65.
- Kim, J. S., Kwon, Y. S., Chun, W. J., Kim, T. Y., Sun, J., Yu, C. Y. and Kim, M. J. 2010. *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, anti-microbial and α -glucosidase inhibitory effect. *Food Chem.* 120:539-543.
- Kim, M. J., Kim, C. J. and Kwak, S. S. 1997. Antifungal activity of urushiol components in the sap of Korean lacquer tree (*Rhus verniciflua* Stokes). *Korean J. Plant Res.* 10:231-234. (in Korean).
- Kim, T. H., Lee, K. M., Kwon, K. R. and Choi, S. M. 2002. A literature study on lacquer poison. *J. Korean pharmacopuncture institute* 5:159-169. (in Korean).
- Lee, D. S., Jeong, G. S., Li, B., Park, H. and Kim, Y. C. 2010. Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 10:850-858.
- Lee, J. and Parulekar, S. J. 1993. Enhanced production of α -amylase in fedbatch cultures of *Bacillus subtilis* TN 106[pAT5]. *Biotechnol. Bioeng.* 42:1142-1150.
- Lee, J. C., Kim, J., Lim, K. T. and Jang, Y. S. 2002. Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1570:181-191.
- Lee, J. D., Huh, J. E., Jeon, G. S., Yang, H. R., Woo, H. S., Choi, D. Y. and Park, D. S. 2009. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and *in vivo* models. *Int. Immunopharmacol.* 9:268-276.
- Mabrouk, S. S., Hashem, A. M., El-Shayeb, N. M. A., Ismail, A. M. S. and Abdel-Fattah, A. F. 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Biores. Technol.* 69:155-159.
- Nam, Y. D., Lee, S. Y. and Lim, S. I. 2012. Microbial community analysis of Korean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* 155:36-42.
- Namba, T. 1980. Coloured illustrations of Wakan-Yaku. Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, Japan. p. 215.
- Park, K. Y., Jung, G. O., Lee, K. T., Choi, J. W., Choi, M. Y., Kim, G. T., Jung, J. J. and Park, H. J. 2004. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J. Ethnopharmacol.* 90:73-79.
- Patterson, S. E., Williams, J. V. and Marks, J. G. 1999. Prevention of sodium lauryl sulfate irritant contact dermatitis by Pro-Q aerosol foam skin protectant. *J. Am. Acad. Dermatol.* 40:783-785.
- RDA. 2010. Process for production of urushiol free lacquer tree bark extract and its utilization. Korean Patent 10-2010-0113258. (in Korean).
- RDA. 2011. Screening of functional substance and study of utilization technology from lacquer tree. Rural Development Administration, Suwon, Korea. (in Korean).
- Saary, J., Qureshi, R., Palda, V., DeKoven, J., Pratt, M., Skotnicki-Grant, S. and Holness, L. 2005. A systematic review of contact dermatitis treatment and prevention. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53:845-855.
- Son, Y. O., Lee, K. Y., Lee, J. C., Jang, H. S., Kim, J. G., Jeon, Y. M. and Jang, Y. S. 2005. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. *Toxicol. Lett.* 135:115-125.
- Sunchang-gun. 2012. Non-toxic new microbes having inhibitory activity growing for *Bacillus cereus* and sauce including them. Korean Patent 10-1132371-0000. (in Korean).
- Sunchang-gun, Chonbuk National Univ. R&BD foundation. 2012. Method for producing Chungkookjang Kochujang with reduced unpleasant odor. Korean Patent 10-1163386-0000. (in Korean).
- Vidmar, D. A. and Iwane, M. K. 1999. Assessment of the ability of the topical skin protectant (TSP) to protect against contact dermatitis to urushiol (Rhus) antigen. *Am. J. Contact Dermat.* 10:190-197.
- Yoon, K. H. and Shin, H. Y. 2010. Medium optimization for the protease production by *Bacillus licheniformis* isolated from Cheongkookjang, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 38:385-390. (in Korean).