

신규 섬유질 분해성 젖산균 *Enterococcus* sp. TO-94를 이용한 오미자의 발효 특성

류일환* · 이어진* · 권지웅* · 이강수** · 권태오*†

*원광대학교 생명자원과학대학, **전북대학교 농업생명과학대학

Fermentation Property by Novel Cellulolytic Lactic Acid Bacteria *Enterococcus* sp. TO-94 on Omija (*Schizandra chinensis* Baillon)

Il Hwan Ryu*, Eoh Jin Lee*, Ji Wung Kwon*, Kang Soo Lee** and Tae Oh Kwon*†

*College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.

**College of agriculture & life science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea.

ABSTRACT : The use of cellulolytic lactic acid bacteria in new method to prepare high nutrition complementary foods was investigated. For the screening of cellulolytic lactic acid bacteria, more than 1,150 bacterial colony were isolated from diluted infant feces samples. A typical strain which appeared the most excellent cellulolytic activities was identified novel acidophilic *Enterococcus* sp. TO-94 through the results of morphological, biochemical and chemotaxonomic characteristics and 16S rDNA sequencing. The optimal lactic acid fermentation conditions of Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) by *Enterococcus* sp. TO-94 were as follows: pH and temperature were 3.0 and 37 °C, respectively, and fermentation time was 20hrs. The fructose and glucose were major free sugar and the contents were 5.83 and 4.30 mg/g after fermentation, respectively. The contents of lactic acid and acetic acid were 9.84 mg/g and 2.08 mg/g after fermentation, respectively. The vitamin B₁, B₂, niacin, folic acid and C were major vitamin in the fermented broth, the contents were 1.5~3 times higher than those of initial fermentation time. Also, the contents of polyphenol and anthocyanine were 3.8 and 1.2 times higher than those of initial fermentation time.

Key Words : *Enterococcus* sp. TO-94, Cellulolytic Lactic Acid Bacteria, High Health Food, Omija (*Schizandra chinensis* Baillon)

서 언

오미자는 오미자 나무과에 속하는 낙엽성 덩굴식물로 혈압 강하, 항암, 항노화, 면역조절 및 항균활성 등 다양한 생리 기능이 보고되어 있으며 (Ahn *et al.*, 2000a; Ames *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 2007; Devy and Gautier, 1990; Takashi *et al.*, 2002; Kamei *et al.*, 2003), 오미자 특유의 붉은색을 내는 색소인 anthocyanine은 항산화 활성이 있는 것으로 알려져 있다. 다섯 가지 맛을 내는 오미자는 다양한 기능성과 더불어 천연 유색음료의 비중이 높아지는 세계 음료시장의 추세에 따라 상품성이 높은 원료로 주목 받고 있다 (Lee *et al.*, 2006).

또한 최근 들어 식품의 발효를 통해 생성되는 유기산 및 분해산물들이 건강에 좋다는 연구 결과 등이 발표되면서 발효식품의 인기는 점점 높아지고 있는 실정이다 (Ahn *et al.*,

2000b; Doh *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009b). 그러나 통상적으로 오미자의 특성 안정화를 위하여 60°C 안팎의 저온에서 물 추출을 행하나 수율 및 활성 또한 적어 실효성이 없다 (Lee *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). 또한 과일 자체에 포함된 당의 함량이 4.05%로 미생물 영양원으로 사용되기에 턱없이 부족한 양으로 발효에 적합하지 않으며 (Hyun *et al.*, 2002), 초기 pH가 2.5로 저산성 성질을 나타내므로 발효 미생물의 생육에도 적합하지 못하다. 그러나 젖산균은 저산성 조건에서 생육이 가능하며 유산발효하여 식품의 부패를 방지하고 bacteriocin과 같은 항균물질을 분비하여 식중독균 및 장내 부패세균의 억제효과를 가지는 미생물이다 (Park and Chang, 2003). 모든 젖산균은 생태적, 대사적, 영양 요구적 특성이 유사하다. 첫 번째 유사성은 혐기적 조건에서 최종산물인 젖산을 생성하고, 두 번째 유사성은 영양학적으로 아미노산, 펩타이드, 핵산유도체, 비

†Corresponding author: (Phone) +82-63-850-6681 (E-mail) agrokto@wonkwang.ac.kr

Received 2010 October 16 / 1st Revised 2010 December 7 / 2nd Revised 2010 December 13 / Accepted 2010 December 16

타민, 엽, 지방산 등이 구비된 조건에서만 탄수화물을 젖산으로 바꾸는 특성을 갖고 있다 (Thomsen *et al.*, 2007). 오미자는 당 함량의 부족으로 이 또한 적합하지 않다. 탄수화물의 함량을 증가시키기 위하여 상업적 효소의 사용 시 오미자의 낮은 pH 조건에서 활성을 나타내는 효소의 구입이 원활하지 않을 뿐 아니라 제품 생산 비용의 상승 및 생산 시 추가 공정에 대한 설비 추가의 필요 등을 고려 할 때, 실용성이 없다.

그러나, 최근 전분질 원료를 가수분해할 수 있는 젖산균을 이용하여 저영양의 소재로부터 중량 증가 및 고에너지 보충용 식품의 개발을 위한 다양한 연구가 시도되고 있다. Songre-Ouattara 등 (Songre *et al.*, 2009)은 땅콩 슬러지 전분을 *Lactobacillus plantarum* A6를 사용하여 부분 분해 시 중량의 증가를 나타내었다고 보고하였다. 그 외 Corn (Nakamura, 1981), potato (Chatterjee *et al.*, 1997), Cassava (Giraud *et al.*, 1991a, 1991b) 등 amyloseous raw material을 발효시키는 *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum* 등이 보고되어 있다. 또한 Thi (Thi *et al.*, 2007)와 Nguyen 등 (Nguyen *et al.*, 2007)은 rice/soybean을 *Lactobacillus plantarum*으로 발효하여 영양 보충성 식품을 개발하였다고 보고하는 등 다양한 연구가 진행되고 있으나 cellulolytic 또는 pectiolytic 유산균 및 특성에 대하여 보고된 예는 *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*를 사용하여 kraft pulp mill을 가수분해하여 젖산을 생성 하였다는 Remedios 등 (Remedios *et al.*, 2003)의 보고 외에는 그 예를 찾기 어렵다.

본 연구는 저산성을 나타내고 발효성 당이 부족하며 높은 섬유질 함량을 갖는 오미자를 고영양 식품으로 개발하기 위하여 섬유질 분해능을 갖는 젖산균을 분리, 동정하고 그 균을 이용한 오미자의 발효특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 오미자는 전북 장수군에서 재배된 오미자 생과를 구입하여 -20°C에서 냉동 보관 하면서 사용하였다.

2. 섬유질 분해 활성을 갖는 유산균의 분리

유산균을 분리하기 위해서 생후 2개월 미만의 영아 분변을 총 17종 수집하였다. 수집된 영아 분변은 여과 후 적정 배율로 희석하였다. 희석액은 *Lactobacilli* MRS (Difco Co., France) 배지에 도달 후 37°C 24시간 배양하였다. 배양 후 형성된 콜로니는 2% CaCO₃가 첨가된 MRS 배지에 tooth picking하여 투명환을 형성하는 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 dextrose와 ammonium citrate를 제외시키고 10 g/L carboxymethyl cellulose를 *Lactobacilli* MRS agar에 희석 접종하고 37°C 24시간 배양하였다. 배양 후 1% congo

red 용액으로 염색하고 1% NaCl 용액으로 세척하여 노란색의 투명환을 형성하는 균주를 최종 선별하고 gram염색 (BD Co., U.S.A)을 하여 현미경하에서 형태학적 특성을 관찰하였다.

3. 유산균의 동정

1) 형태 및 배양학적 특성

분리균주의 크기와 형태는 Gerhardt 등 (Gerhardt *et al.*, 1981)의 방법에 따라 gram 염색하여 광학현미경 (Nicon, FK-IIA, Japan)으로 관찰하였다. Glucose-nutrient agar 배지, skim milk 배지, Luria-Bertani 배지에서 생육한 집락의 형태, 크기, 색깔 등을 관찰하였고, 반유동고체배지 (tryptose 1.0%, sodium chloride 0.5%, agar 0.5%)에 배양하여 운동성을 조사하였다.

2) 생리학적 특성

균주의 생리적 특성으로는 casein 분해능, 전분 분해능, gelatin 액화력, 당 발효성, indole 생성능, nitrate 환원력, catalase와 oxidase 생성능을 조사하였다. 선별된 균주의 생리학적 성질은 microbiology laboratory manual (Cappuccino and Sherman, 1987; Komagata and Suzuki, 1987)에 따랐다.

3) 생물학적 특성

분리균주의 생물학적 특성은 Bochner 등 (Bochner *et al.*, 2001)과 Lee 등 (Lee *et al.*, 2002)의 방법에 준하여 측정하였다. 분리균주를 nutrient limited medium (Resasoner and Geldreich, 1985)에서 24시간 전배양한 후 멸균 saline으로 적정 농도까지 현탁하고, 각종의 carbon source, nitrogen source, phosphate source, sulfur source, autotrophic supplement 및 inhibitory compound가 포함된 BiologTM GP microplate 에 150 μ l 씩 분주하여 microplate를 4~24시간 동안 배양하였다. 이 기간 동안 세포의 호흡활동으로 각종 source들이 산화하게 되고 plate에 포함된 tetrazolium 염료는 보라색을 형성하게 된다. 이 패턴을 biologi data base를 사용하여 표준균주와 유사도를 비교하였다.

4) 화학적 특성

균주의 화학적 특성은 Komagata와 Suzuki (Komagata and Suzuki, 1987)의 Method in Microbiology, Miller (Miller, 1959)의 Microbial Identification System (MIS)에 준하여 분석하였다. 분석방법으로는 세포벽내의 fatty acid type, DNA base composition (G+C mole content), DNA sequence 등을 조사하였다.

균주의 whole cell fatty acid 조성을 확인하기 위하여 gas chromatography (GC, HP 6890)를 사용하였다. 표준지방산으로는 Hewlett-Packard (HP)사에서 제공하는 표준 지방산

(calibration standard kit)을 사용하였으며 균주의 배양은 Sabouraud's agar (Difco, USA) 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 배양된 균체를 시험관에 취한 후 saponification reagent (45 g sodium hydroxide, 150 ml methanol, 150 ml D.W)을 1 ml 를 가한 후 30분간 100°C에서 중탕 후 유수에 냉각하였다.

비누화된 균체를 6 N HCl과 methanol 2.6 : 1 혼합물 2 ml 를 가한 후 80°C에서 10분간 methylation시키고, hexane과 methyl tert-butyl ether 1 : 1 (v/v) 혼합물 1.25 ml 를 가한 후 10분간 상온에서 천천히 진탕한 후 하층액을 제거하여 세포 지방산을 추출하였다. 5.4% NaCl로 세척 후 분석용 시료로 하였다. 분석용 시료는 GC를 사용하여 분석후 MIDI사의 균주 동정 프로그램인 sherlock program을 통하여 분석하였다.

16S rDNA 유전자 분석은 Wizard Genomic DNA Prep Kit (Promega)를 사용하여, PCR을 행하였다. 이때 반응조건은 94°C 1분간 denaturation, 60°C 1분 30초간 anneal 시킨 후, 72°C 1분간 extend 하였으며, 이 조작을 총 30 cycle을 반복하였다. 이때 사용한 primer는 27F (5'AGAGTTTGATCM TGGCTCAG)와 1492r (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT) 이었다. Amplified fragment (16S rDNA region)를 pGEM T Easy vector (Promega)에 삽입하고, host cell로 *E. coli* DH5a를 사용하여 일반적인 molecular cloning방법에 의하여 transformation 시킨 후, Wizard Plus SV miniprep DNA purification system을 이용하여 plasmid를 mini-preparation시키고, automated DNA sequencer (ABI 3700, Applied Biosystems Inc.)를 사용하여 sequencing하였다. Alignment는 Clustal X (ver. 1.8) software를 사용하여, sequence를 rRNA 이차구조를 참고하여 alignment 한 후, similarity 값을 구하였다. 또한 advanced blast search를 통하여 genebank의 염기 서열과 비교하였고 (Lee *et al.*, 2002), treeview (ver. 1.66)를 이용한 phylogenetic tree의 dendrogram은 neighbor-joining analysis (Lee *et al.*, 2002) 방법에 의하여 작성하였다. 이때 tree의 scale bar는 0.1 substitution per site를 의미한다.

4. 유산균의 섬유질 분해 활성 측정

분리 균주의 섬유질 분해능은 CMCase의 활성 및 Pectinase 활성을 측정하여 확인하였다. CMCase의 활성도는 DNS 방법 (Miller, 1959)에 의하여 CMC로부터 유리된 환원당을 정량하여 측정하였다. 즉, 이 실험의 표준 측정을 위하여 증류수에 녹인 CMC (1.0%, w/v) 500 μ l, 200 mM Na-citrate 완충용액 (pH 5.5) 250 μ l 와 효소 용액을 혼합하여 최종 1 ml로 한 후 55°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3.0 ml 와 glucose 용액 (0.1 mg/ml) 0.1 ml을 첨가하여 반응을 정지시키고 5분 동안 끓인 다음 식힌 후 550 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 환원당의 양은 glucose 표준용액을 사용하여 작성한

표준곡선으로 부터 구하였다. 효소의 활성도 1.0 unit는 CMC를 기질로 하여 55°C 조건하에서 1분 동안에 1.0 μ mol glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

5. 유산균의 배양 방법

섬유질 분해 유산균 *Enterococcus* sp. TO-94는 40% glycol 용액에서 -80°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 균의 증식은 1% CMC가 첨가된 MRS 배지에 10% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 spectronic 401 spectrophotometer (Milton Roy, paris, France)를 사용하여 600 nm 에서 균의 생육 (A600 vs. cfu/ml)을 측정하였다. 배양 후 14,000 \times g에서 10분간 원심분리 하여 균체를 모았다. 이 균체를 physiological sterile 용액 (0.9%, w/v saline)에 세척 후 동일 조건으로 재 원심분리 하여 오미자 발효의 접종균으로 사용하였다. 발효 동안 유산균의 성장은 단계회석 후 생균수를 측정하였다.

6. 발효조건

Enterococcus sp. TO-94에 의한 오미자의 발효는 다음과 같이 행하였다.

냉동 보관한 오미자에 동량 (v/v)의 정제수를 첨가한 후 homogenizer를 사용하여 씨가 분쇄되지 않게 주의하면서 파쇄하였다.

유산 발효를 위한 starter를 접종하기 위하여 오미자 분쇄액은 과피에 존재하는 오염균을 제거하기 위하여 고온 단시간 살균법에 의하여 75°C에서 10분간 가열 살균을 실시하였다. starter로 사용된 *Enterococcus* sp. TO-94는 생리 식염수에 희석하여 8.0 log cfu/ml를 접종하고 37°C 72시간 배양하면서 제반 분석을 행하였다.

7. pH 및 산도의 측정

발효과정 동안 4시간마다 pH는 pH meter (sp-701, Suntex Inc. Korea)를 사용하여 측정하였으며 산도는 AOAC법 (1990)에 의하여 발효액 20 ml 를 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH용액으로 적정한 후 0.1 N NaOH 소요량을 lactic acid (%) 함량으로 환산하였다.

$$\text{산도 (\%)} = \frac{0.1 \text{ N NaOH 소비량} \times \text{NaOH 역가}}{\text{시료의 부피}} \times \text{acid factor (0.0090)}$$

8. 당도 및 유리당의 측정

발효과정동안 4시간 마다 발효액을 취하여 당도계 (Master-M, Atage, Tokyo, Japan)를 사용하여 당도를 측정하였고, 유리당은 멤브레인 필터 (0.45 μ M)로 여과 후 Shiseido HPLC system (Shiseido, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. 유리당의 분석 조건은 Table 1과 같다.

9. 유기산의 측정

오미자 발효물의 유기산의 측정은 2008년도 건강 기능성 식품공전에 준하여 C18 카트리지에 ACN/DW (1:1) 10 ml 에 오미자 발효액 10 ml 를 가하여 초기 용출액 4~5 ml 를 제거 후 Shiseido HPLC system (Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. 유기산의 분석 조건은 Table 1과 같다.

10. 비타민의 측정

오미자 발효물 중의 비타민 함량은 건강 기능성 식품공전 미량 성분시험법에 준하여 Shiseido HPLC system (Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. 비타민의 분석 조건은 Table 2와 같다.

11. 총 페놀성 화합물의 측정

오미자 발효물을 10배 희석한 5 ml 에 Folin-Ciocalteu 시약 5 ml 를 가하여 혼합하고 3분후 10% Na₂CO₃ 용액 (w/v) 5 ml 를 넣어 진탕하고 실온에서 방치한 후 700 nm 에서 비색

Table 1. Operation condition of Shiseido HPLC system for the analysis of free sugars and organic acid in Omija fermentation.

	Free sugars	Organic acid
Column	Asahipak NH2P-50 4E (4.6 × 250 mm)	Prevail Organic acid, 5 um (4.6 × 250 mm)
Temperature	35°C	40°C
Injection volume	20 µl	10 µl
Mobile phase	78% ACN	25 mM KH ₂ PO ₄ , pH 2.5
Flow rate	1 ml/min	1 ml/min
Detector	RID	PDA detector 210 nm

Table 2. Operation condition of Shiseido HPLC system for the analysis of vitamins in Omija fermentation.

Column	Capcell pak C18 UG 120 (3.0 × 250 mm)
Temperature	40°C
Injection volume	10 µl
Mobile phase	A: DW 957 ml + MeOH 25 ml + PicB7 20 ml B: DW 500 ml + MeOH 500 ml + PicB7 20 ml A: 10 ml NaH ₂ PO ₄ in DW(1 L)(pH 5.5) B: MeOH A : B = 78 : 22 20 ml NaH ₂ PO ₄ (pH 2.1) : ACN = 98 : 2 A: 5 mM KH ₂ PO ₄ + 0.1% Phosphoric acid B: 5 mM KH ₂ PO ₄ /MeOH = 80/20 A : B = 500 : 10 MeOH
Flow rate	1 ml/min
Detector	PDA detector 210 nm, 248 nm UV detector 200 nm, 270 nm

정량 하였다. Tannic acid를 표준물질로 작성한 검량곡선으로부터 총 페놀성 화합물의 함량을 측정하였다.

12. Antocyanine의 측정

오미자 발효물 10 ml 를 0.1% HCl-80% MeOH 용액 (v/v) 40 ml 에 혼합하고 24시간 진탕 추출하였다. 추출된 색소는 3,000 × g에서 10분간 원심분리 하여 얻어진 상등액을 0.1% HCl-80% MeOH 용액 (v/v)으로 100 ml 로 정용한 후 528 nm 에서 비색정량 하였다. Cyanidine을 표준물질로 작성한 검량 곡선으로부터 anthocyanine 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *Enterococcus* sp. TO-94의 분리 및 동정

오미자 젖산발효를 위하여 섬유질 분해능을 갖는 유산균의 분리는 희석한 생후 2개월 미만의 영아의 분변액을 Lactobacilli MRS 배지에 배양하여 colony를 형성하는 균주를 선발하고, 선발된 균주에서 2% CaCO₃가 첨가된 MRS 배지에서 투명환을 형성하고, carboxymethyl cellulose (CMC)가 포함된 MRS 배지에서 congo red 염색시 노란색의 투명환을 형성하는 균주를 최종 선발하였다. 선발된 균주 TO-94는 산성 평판배지 (pH 3.0)에서의 colony 형태는 원형이었고, 색깔은 밝은 유백색이었으며 표면은 볼록하고 매끄러운 상태였다. 또한 산성 액체배지에서 생육은 좋았고 혐기성이었으며, 균체의 침전현상을 나타내었다 (data not shown). TO-94의 physiological 특성을 Table 3에 나타내었다. 생육 pH 범위는 2.0~9.0이었고, 생육온도 범위는 15~45°C이었다. 또한 염농도 10%까지 생육이 가능하였으며, catalase 음성, oxidase 음성 및 starch, casein을 가수분해하였으며, cellulose 가수 분해능

Enterococcus sp. TO-94를 이용한 오미자의 발효 특성

은 양성이었다. 또한 indole 생산능을 갖고 있었고, arginine과 peptone으로부터 NH₃를 생산하였으며, 중성의 영양배지에서도 생육이 확인되었다. 당 발효성 실험에서 L-rhamnose를 이용하

지 못하였으나 glucose, sucrose, raffinose는 잘 이용하였다. glucose를 비롯한 일부 당으로부터 산을 생산하였으나, 모든 당에서 gas는 생산되지 않았다.

Table 3. Physiological properties of the strain TO-94.

Temperature range for growth	15~45 °C
pH range for growth	2.0~9.0
NaCl tolerance for growth	≤ 10%
Catalase	-
Oxidase	-
Lecithinase	+
Lipase	-
Phenylalanine deamination	-
Hydrolysis of	
Starch	+
Casein	+
Cellulose	+
Esculin	+
Indole production	+
Levan formation from sucrose	+
NH ₃ production from arginine	+
NH ₃ production from peptone	+
Gelatin liquefaction	+
Methyl-red test	-
Voges-Proskauer reaction	+
Nitrate reduction	+
Action on milk	
Coagulation	+
Peptonization	+
Oxidation-Fermentation test	Fermentation
Growth on nutrient plate	+

- : negative, + : positive

Biolog™ GP Microplate를 사용한 biological assimilation test에서 *Lactococcus lactis*와 약 43.3% 및 *Streptococcus thermophilus*의 약 20.7% 유사도를 나타내어 새로운 미생물일 가능성이 있는 것으로 판단하였다.

세포 지방산 성분을 검토한 결과, Table 4에서와 같이 주성분은 16:0과 19:0 cyclopropane w8c로 각각의 함량은 22.29%와 24.37%를 나타내었다. 특이적으로 19:0 cyclopropane w8c와 17:0 cyclopropane의 함량이 높게 나타났다. 이는 *Leuconostoc*속 유산균은 평균 11.29%와 0.38%를 가지고 있으며 (Lee *et al.*, 1996), 또한 *Enterococcus* 속의 유산균은 17:0 cyclopropane 없이 19:0 cyclopropane w8c만 미량 (2.5%) 가지고 있고 (Grazia *et al.*, 2004), *Streptococcus* 속 및 *Lactobacillus* 속 유산균의 경우 39.8% 및 10.7%를 함유하고 있다는 보고 (Thi *et al.*, 2007)와 비교 시 일치하는 점을 찾을 수 없었다. Reference와 비교 한 결과도 *Leuconostoc pseudomesenteroides*와는 약 33.6%의 유사도를 나타내었으며, *Lactobacillus fermentum*과는 약 22.9%, *Tetragenococcus halophila*와는 약 21.5%의 유사도를 보였다. *Enterococcus faecium* IFO13712와 비교한 결과 (Youko *et al.*, 2003)를 Table 4에 나타내었다. Table 4에서 보는 바와 같이 비교가 불가능 할 만큼 많은 차이를 보이고 있어 지금까지 보고되지 않은 새로운 미생물일 가능성이 높다.

Clustal X (ver. 1.8) software를 사용하여 16S rDNA 유전자 alignment를 행한 결과 1674 bp의 염기서열을 결정하고 또한 이를 근거로 reference와 비교하여 similarity (%)를 구한 결과, 이 균주는 *Enterococcus*속에 속하는 세균으로 판명되었

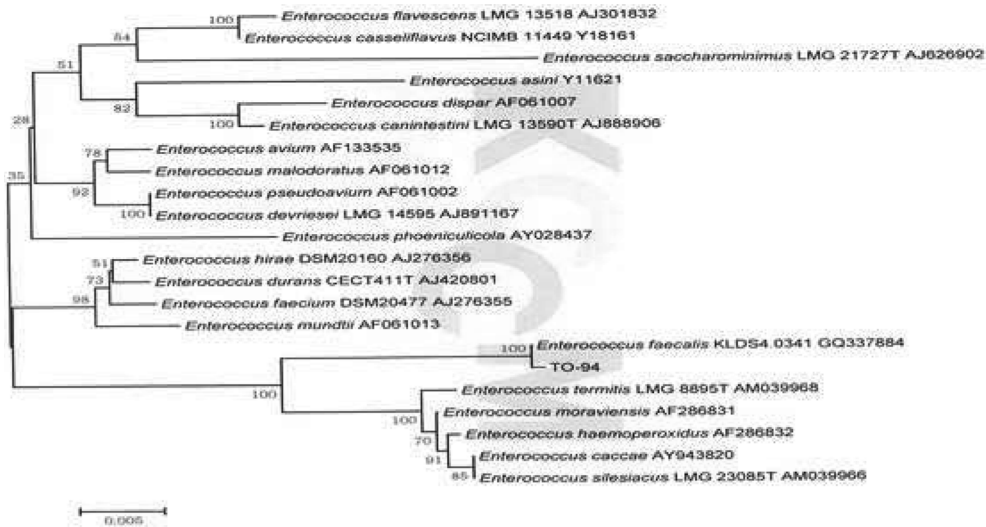
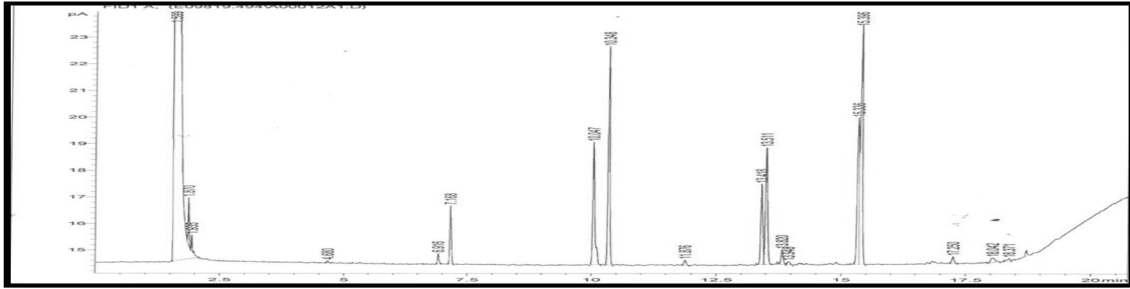


Fig. 1. The phylogenetic tree of *Enterococcus* sp. TO-94.

Table 4. Fatty acid composition of total membrane lipid extracted *Enterococcus faecium* IFO13712 and strain TO-94.



Fatty acid	% of fatty acid in membrane	
	<i>Enterococcus faecium</i> IFO13712	TO-94
C12:0 iso	0.07	0.20
C14:0 iso	ND	ND
C14:0 nomal	0.34	4.87
C15:0 iso	ND	ND
C15:0 anteiso	ND	ND
C15:0 nomal	ND	ND
C16:0 w7c alcohol	ND	ND
C16:0 iso	ND	ND
C16:0 nomal	8.22	22.29
C16:1 nomal	ND	ND
C16:1 w11c	ND	ND
C16:1 w9c	0.25	ND
C17:0 iso	0.11	ND
C17:0 Cyclo	ND	0.61
C17:0 anteiso	ND	ND
C17:1 w10c iso	ND	ND
C17:1 anteiso	ND	ND
C18:0 nomal	0.05	1.70
C18:1 nomal	1	ND
C18:1 w9c	81.72	ND
C18:1 w7c	ND	11.96
C18:11 methyl w7c	ND	0.43
C18:2 nomal	ND	ND
C19:0 Cyclo w9c	9.24	ND
C19:0 Cyclo w8c	ND	24.37

ND: Not Detection.

으며, 실험균주는 *Enterococcus faecium*의 표준균주와 95.7% 유사도를 나타내어 가장 가까운 균이라 할 수 있으나, 세포 지방산 및 생물학적 유사도 시험 결과 같은 종의 균이라고 볼 수는 없었다. 그러므로 새로운 종이라 판단하여 *Enterococcus* sp. TO-94라 명명하였다. 또한 neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)에 의하여 계통수 (phylogenetic tree)를 작성하고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이때 tree의 scale bar는 0.1 substitution per site를 의미한다.

2. *Enterococcus* sp. TO-94의 생육 곡선

일반적으로 유산균은 당을 발효하여 유산을 생성하는 미생물로 식품의 부패 및 식중독 유발균의 생육을 억제하는 등 다양한 기능성을 부여하는 미생물이다. 본 연구에서는 오미자의 생과를 발효하기 위하여 cellulolytic 활성을 나타내는 유산균 *Enterococcus* sp. TO-94를 MRS 배지 및 오미자 과쇄액에 각각 접종하여 37°C에서 배양하면서 4시간 간격으로 균의 생육을 비교하였다. 그 결과 Fig. 2에 보인 바와 같이 MRS 배지에서는 접종 4시간부터 대수 증식기가 시작되어 12시간 후

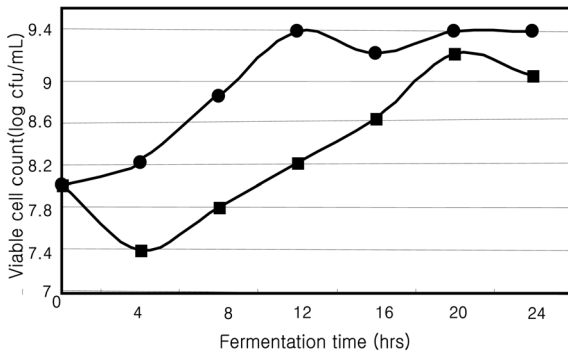


Fig. 2. Growth of strain *Enterococcus* sp. TO-94 in Omija grinding solution and MRS broth. ■: Omija grinding solution, ●: MRS broth

에 정지기에 도달하였다. 반면 오미자 과쇄액에 접종시 접종 8시간 까지 유도기가 지속되었으며, 대수 증식기 또한 20시간 까지 지속되었다. 이는 발효에 이용되는 당의 함량이 4.05%로 (Choi *et al.*, 2008) 과실 자체에 발효성 당이 거의 없고 영양 원으로 이용될 수 있는 성분이 적기 때문인 것으로 판단되며, 발효가 진행됨으로 인해 비 발효성 고분자 성분이 분해되면서 유산균의 생육이 증가되는 것으로 판단된다. 이는 오미자의 효소추출물이 젖산균의 선택적 생육 증진을 가져 온다는 Ryu 등 (Ryu *et al.*, 2007)의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다.

3. 발효과정중 당도 및 유리당 함량의 변화

Enterococcus sp. TO-94에 의한 오미자의 발효 과정 중 유리당 함량 및 총당의 함량변화를 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fructose 및 glucose의 함량은 발효 20시간 후 5.83 및 4.30 mg/g으로 발효과정 동안 증가하였으나, 이당류인 sucrose 및 maltose는 발효 8시간 후 6.0 및 3.0 mg/g으로 증가되었으나 발효 20시간 후 각각 0.35와 0.90 mg/g으로 감소되었다. 이는 초기에는 *Enterococcus* sp. TO-94에 의한 비발효성 당의 분해에 기인하여 이당류의 증가가 나타났으며, 이후 균 생육의 영양원으로 사용된 것으로 판단된다. 이 결과는 rice/soybean을 *Lactobacillus plantarum* A6에 의해 발효 시 sucrose를 발효한 반면 glucose의 함량이 증가하였다는 Thi 등 (Thi *et al.*, 2007)의 보고와 일치하는 결과를 보였다. 이는 *Enterococcus* sp. TO-94가 젖산 생성의 탄소원으로 cellulose를 사용함을 알 수 있는 결과이다. 또한, Giraud 등 (Giraud *et al.*, 1991a, 1991b)은 sucrose가 충분히 감소된 뒤에 전분의 발효가 일어나며 그 이후 fructose와 glucose의 생성이 증진된다고 보고하였다.

또한, total sugar의 함량이 1.8 Brix에서 10.2 Brix로 약 5 배 증가하였다. 이는 탄소원의 부족으로 발효식품의 개발이 어려운 오미자의 발효식품의 개발에도 큰 역할을 할 것으로 판단된다.

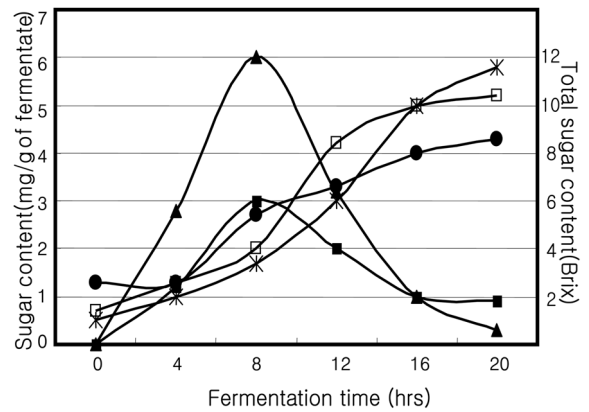


Fig. 3. Sugar change during fermentation of Omija by strain *Enterococcus* sp. TO-94. ■: Maltose, ▲: Sucrose, ●: Glucose, ※: Fructose, ◇: Total sugar content.

Table 5. Organic acids change during fermentation of Omija by *Enterococcus* sp. TO-94.

Organic acids	content (mg/g of fermentate)	
	0 hr	20 hrs after
Oxalic acid	0.18±0.07	0.03±0.01*
L-tartaric acid	ND	1.83±0.08
Formic acid	2.20±0.06	ND**
L-malic acid	18.91±0.30	14.17±0.36
L-lactic acid	ND	9.84±0.12
Acetic acid	0.38±0.06	2.08±0.18
Citric acid	37.41±0.46	36.35±0.60
Succinic acid	ND	ND

*Each value represents the mean±SD (n = 3). **ND: Not Detection.

4. 발효과정 중 유기산 함량의 변화

Enterococcus sp. TO-94에 의한 오미자의 발효 과정 중 유기산의 함량변화를 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다. 발효 과정 중 다양한 유기산의 변화가 측정되었다. 젖산의 주산물인 lactic acid의 함량이 0에서 9.84±0.12 mg/g으로 상승되었으며 특히적으로 acetic acid와 L-tartaric acid의 함량 또한 0.38±0.06에서 2.08±0.18 mg/g과 0에서 1.83±0.08 mg/g으로 상승되었다. 반면, oxalic acid, formic acid와 malic acid의 함량이 감소하는 결과를 보였다. 또한 citric acid 함량은 변화를 나타내지 않았다. 이는 *Enterococcus* sp. TO-94균의 발효 특성으로 판단된다. *Lactobacillus manihotivorans* OND 30, *L. fermentum* Ogi E1, *Leconostoc* St3-28을 starch 배지에서 배양시 24시간 후 lactic acid 및 acetic acid의 함량이 30~50% 증가하였다는 Mette 등 (Mette *et al.*, 2007)의 보고 및 *Lactobacillus plantarum* A6에 의해 발효시 acetic acid의 함량이 1.5~2.5배 상승하였다는 Thi 등 (Thi *et al.*, 2007)의 보고와 유사한 결과를 보였다. 이 결과들은 다당류를 탄소원으로 사용하는 젖산균의 공통된 발효특성으로 판단된다.

Table 6. Vitamins change during fermentation of Omija by *Enterococcus* sp. TO-94.

Vitamins	Content (mg/100 g of fermentate)	
	0 hr	20 hrs after
B ₁	0.19±0.04	0.52±0.03*
B ₂	0.02±0.01	0.08±0.02
B ₅	3.50±0.32	ND**
B ₆	ND	ND
B ₇	ND	ND
Niacin	0.83±0.05	1.44±0.02
Folic acid	502.05±12.64	901.26±14.96
B ₁₂	ND	ND
C	12.65±1.42	38.0±1.29
K ₁	ND	ND
β-carotene	ND	ND

*Each value represents the mean±SD (n = 3). **ND: Not Detection.

5. 발효과정 중 비타민 함량의 변화

Enterococcus sp. TO-94에 의한 오미자의 발효 과정 중 비타민의 함량변화를 측정된 결과를 Table 6에 나타내었다. 비타민 B₁, B₂, niacin, folic acid 및 C가 주를 이루고 있으며 발효 전에 비하여 모든 비타민이 약 1.5~3배 가량 증가하였다. 발효 전 함량은 분쇄 착즙한 것으로 용출의 효율성에 관련이 있는 것으로 판단된다. *Enterococcus* sp. TO-94에 의한 오미자의 발효 과정 중 세포벽을 구성하는 섬유질의 분해에 의해 용출 효율이 증가함으로써 함량이 증가된 것으로 판단된다.

오미자는 열수 및 물과 알코올 추출이 주를 이루고 있어 (Kim *et al.*, 2009a; Choi *et al.*, 2008; Kwon and Park, 2008; Osawa, 1994) 비타민 함량에 대한 예를 찾아보기 어렵다. 이는 가온 및 용매에 의한 비타민의 소실 및 용해도 저하에 기인한 것으로 판단된다. 따라서 섬유소 보호능을 갖는 유산균에 의한 발효방법은 영양적으로 더욱 향상된 오미자 식품의 개발에 유용한 것으로 판단된다.

6. 발효과정 중 polyphenol 및 anthocyanine 함량의 변화

Enterococcus sp. TO-94에 의한 오미자의 발효 과정 중 polyphenol 및 anthocyanine의 함량변화를 측정된 결과를 Table 7에 나타내었다.

Polyphenol의 경우 발효초기 0.211 ± 0.005%에서 20시간 후 0.823 ± 0.017%로 약 3.8배 증가하였으며, anthocyanine의 경우 또한 45.23 ± 1.19 µg/ml 에서 51.40 ± 1.32 µg/ml 로 약 1.2 배 상승하였다. 그러나 polyphenol과 anthocyanine의 함량 증가는 큰 차이를 나타내었다. Polyphenol의 경우 추출용매로 ethanol의 함량이 증가하거나 추출온도의 상승시 높게 나타나는 것이 일반적인 특징이다 (Osawa, 1994). 항산화능을 포함한 다양한 생리 활성을 나타내는 phenolic compound는 높은

Table 7. Polyphenol and anthocyanine change during fermentation of Omija by *Enterococcus* sp. TO-94.

	Content	
	0 hr after	20 hrs after
Polyphenol (%)	0.211±0.005	0.823±0.017*
Anthocyanine (µg/ml)	45.23±1.19	51.40±1.32

*Each value represents the mean±SD (n = 3)

온도에서 또는 ethanol의 사용시 더 많이 추출된다 (Kim *et al.*, 2004). 본 연구의 결과 또한 발효과정동안 polyphenol의 함량이 증가하였으나 50% ethanol 추출시 0.98%의 함량을 나타내었다는 Kim 등 (Kim *et al.*, 2009a)의 결과보다는 낮은 함량을 나타내었다. 그러나 물 추출시 0.58% 보다는 높은 함량을 나타내어 polyphenol의 함량증가에도 비교적 효과적임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 장수오미자클러스터사업단 (JOC) 연구 개발사업에 의해 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

LITERATURE CITED

- Ahn DJ, Kwak YS, Kim MJ, Lee JC, Shin CS and Jeong KT. (2000a). Screening of herbal plant extracts showing antimicrobial activity against some food spoilage and pathogenic microorganisms. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 8:109-116.
- Ahn SW, Kim MH, Chung WT, Hwang B, Seong NS and Lee HY. (2000b). Enhancement of alcohol fermentation yield by adding the extract of dried *Rehmannia glutinosa* Liboschitz. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 8:351-361.
- Ames BN, shigenaga MK and Hagen TM. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90:7915-7922.
- AOAC (1990). *Official methods analysis* (15th edn). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA.
- Bochner BR, Gadzinski P and Panomitros E. (2001). Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic test and assay of gene function. *Genome Research*. 11:1246-1255.
- Cappuccino JG and Sherman N. (1987). *Microbiology a laboratory manual*. 2nd Ed. p. 52-80. Benjamin and Cummings, California. USA.
- Chatterjee M, Charkrabarty SL, Chattoadhyay BD and Mandal RK. (1997). Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. *Biotechnology Letters*. 19:873-874.
- Cho IS, Han YH, Lee GY and Park KY. (2007). Search for medicinal plants on improvable effect intestinal microflora. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:26-29.

- Choi EO, Lee BS, Park YS, Seo EO and Chung BW.** (2008). Extraction condition from *Schizandra chinensis* Baill on for beverage development of high scizandrin concentration. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 23:271-275.
- Devy C and Gautier R.** (1990). New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and efficiency of superoxide dismutase. Biochemical Pharmacology. 39:399-405.
- Doh ES, Chang JP, Lee KH and Seong NS.** (2010). Ginsenoside change and antioxidation activity of fermented ginseng. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:255-265.
- Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR and Phillips GB.** (1981). Chemical composition "Manual of methods for general bacteriology". p. 328-364. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Giraud E, Lelong B and Raimbault M.** (1991a). Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 36:96-99.
- Giraud E, Brauman A, Keleke S, Lelong B and Raimbault M.** (1991b). Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 36:379-383.
- Grazia FM, Ricci G, Mora D and Manachini PL.** (2004). Molecular analysis of artisanal italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54:1717-1721.
- Hong SW, Kim JY, Lee BK and Chung KS.** (2006). The bacterial biological response modifier enriched Chungkookjang fermentation. Korean Journal of Food Science and Technology. 38:548-553.
- Hyun HK, Kim HJ and Jeong HC.** (2002). A study on determining chemical compositions of *Schizandra chinensis*. Korean Journal Plant Research. 15:1-7.
- Kamei R, Kadokura M, Kitagawa Y, Hazeki O and Okigawa S.** (2003). 2'-Benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Life Sciences. 73:2091-2099.
- Kim CH, Kwon MC, Kim HS, Bae GJ, Ahn JH, Choi GP, Choi YB, Ko JR and Lee HY.** (2007). Enhancement of immune activities of *Kadsura Japonica* Dunal. through conventional fermentation process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:162-169.
- Kim HK, Na GM, Ye SH and Han HS.** (2004). Extraction characteristics and antioxidative activity of *Schizandra chinensis* extracts. Korean Journal of Food Culture. 19:484-490.
- Kim SI, Sim KH, Ju SY and Han YS.** (2009a). A Study of antioxidative and hypoglycemic activities of Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. The Korean Journal of Food and Nutrition. 22:41-47.
- Kim SS, Ha JH, Jeong MH, Ahn JH, Yoon WB, Park SJ, Seong DH and Lee HY.** (2009b). Comparison of biological activities of fermented *Codonopsis lanceolata* and fresh *Codonopsis lanceolata*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:255-265.
- Komagata K and Suzuki KI.** (1987). In method in microbiology. Academic Press. 19:161-207.
- Kwon HJ and Park CS.** (2008). Biological activities of extracts from Omija (*Schizandra chinensis* Baillon). Korean Journal of Food Preservation. 15:587-592.
- Lee JS, Chun CO, Kim HJ, Joo YJ, Lee HJ, Park CS, Ahn JS, Park YH and Mheen TI.** (1996). Analysis of cellular fatty acid methyl ester (FAMES) for the identification of *Leuconostoc* strains isolation from Kimchi. Journal Microbiology. 34:225-228.
- Lee JS, Lee KC, Chang YH, Hong SG, Oh HW, Pyun YR and Bae KS.** (2002). *Paenibacillus daejeonensis* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium from soil. International Journal of Systematic Bacteriology. 52:2110-2123.
- Lee WY, Choi SY, Lee BS and Park JS.** (2006). Optimization of extraction conditions from Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) by response surface methodology. Korean Journal of Food Preservation. 13:252-258.
- Mette HT, Jean PG and Pauli K.** (2007). Batch fermentations on synthetic mixed sugar and starch medium with amyolytic lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 74:540-546.
- Miller GL.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. Analytical Chemistry. 31:426-428.
- Nakamura LK.** (1981). *Lactobacillus amylovorus* a new starch-hydro- lyzing species from cattle waste-corn fermentations. International Journal of Systematic Bacteriology. 31:56-63.
- Nguyen TT, Loiseau G, Icard-Verniere C, Rochette I, Treche S and Guyot JP.** (2007). Effect of fermentation by amyolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: A new method for preparing high energy density complementary foods for young children. Food Chemistry. 100:623-631.
- Osawa T.** (1994). Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. In, V.V. Garcia & E.M. Mendoza(Eds). Postharvest biochemistry of plant food material in the tropics. Japan Scientific Societies Press. Tokyo, Japan. 241-251.
- Park YS and Chang HG.** (2003). Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology. 461:367-375.
- Remedios Y, Belen MA, Luis AJ and Carlos PJ.** (2003). Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. Biotechnology Letters. 25:1161-1164.
- Resasoner DJ and Geldreich EE.** (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied and Environmental Microbiology. 49:1-7.
- Ryu IH, Kwon TO, Lee KS and Yun YG.** (2007). Enzymological evaluation of bowel inflammation inhibitory activity and intestinal microbial flora improvement by enzymatic hydrolysate of *Schizandrae Fructus*. Korean Journal of Pharmacognosy. 38:364-371.
- Saitou N and Nei M.** (1987). The neighbor-joining method; a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4:406-425.
- Songre-Ouattara LT, Mouquet-River C, Icard-Verniere C, Rochette I, Diawara B and Guyot JP.** (2009). Potential of amyolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. International Journal of

Food Microbiology. 130:258-264.

- Takashi N, Kawada T, Goto T, Yamamoto T, Taimatsu A, Mataui N, Kimura K, Saito M, Hosokawa M, Miyashita K and Fushiki T.** (2002). Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARgamma and PPARalpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. FEBS Letters. 514:315-322.
- Thi TTN, Jean PG, Icard-Vernière C, Isabelle R and Gérard L.** (2007). Effect of high pressure homogenization on the capacity of *Lactobacillus plantarum* A6 to ferment rice/soybean slurries to prepare high energy density complementary food.

Food Chemistry. 102:1288-1295.

- Thomsen MH, Guyot JP and Kiel P.** (2007). Batch fermentations on synthetic mixed sugar and starch medium with amyolytic lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 74:540-546
- Youko S, Mizuho M, Satoshi H, Yoichi K, Shinichi K and Jun S.** (2003). Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS, a class IIa bacteriocin. Microbiology. 149:2901-2908.